

# Využití metod MTT a průtokové cytometrie při stanovení toxicity polymerů

Lenka Onderková

---

Bakalářská práce  
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2012/2013

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Lenka ONDERKOVÁ  
Osobní číslo: T10626  
Studijní program: B2808 Chemie a technologie materiálů  
Studijní obor: Polymerní materiály a technologie  
Forma studia: prezenční

Téma práce: Využití metod MTT a průtokové cytometrie při stanovení toxicity polymerů

Zásady pro vypracování:

Studentka vypracuje literární přehled o využití polymerních látek v biomedicínských aplikacích. Zvláštní zřetel pak bude kladen na polyanilin. V průběhu zpracování teoretické části by měla studentka získat základní informace o různých metodách vyhodnocení *in vitro* testů. V praktické části studentka připraví a zpracuje sérii testů toxicity různých forem polyanilinu dle ISO norem. Vyhodnocení bude provedeno za využití dvou metod: MTT a průtokové cytometrie.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

**Molecular Cell Biology (6th edition) ISBN-10: 0716776014**

**Cell Biology (Third Edition) ISBN: 978-0-12-164730-8**

**Farmakologie a toxikologie ISBN: 80-247-0836-1**

**Culture of Animal Cells ISBN: 978-0-471-45329-1**

**Bioactive Surfaces ISBN: 978-3-642-20154-7**

**Biological and Biomedical Coatings Handbook ISBN: 978-1-4398-4996-5**

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Petr Humpolíček, Ph.D.**

Centrum polymerních materiálů

Datum zadání bakalářské práce:

**11. února 2013**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**31. května 2013**

Ve Zlíně dne 11. února 2013

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*



  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 27.5.2013

.....  


---

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Cílem práce je stanovit, cytotoxicitu 2 forem polyanilinu. Konkrétně byly zkoumány: polyanilinová báze a polyanilinová sůl. Tyto dvě formy se liší jak strukturou, tak vlastnostmi. Polyanilinová sůl označována jako zelená emeraldinová sůl, je vodivou formou polyanilinu. Polyanilinová báze se označuje jako modrá emeraldinová báze a je nevodivou formou. Přejchod mezi oběma formami polyanilinu probíhá změnou pH při hodnotě 5 – 6. Tento přechod se provádí například přidávkem hydroxidu amonného k polyanilinové soli. Polyanilin je zkoumán hlavně kvůli jeho schopnosti vést elektrický proud, čehož se využívá v konstrukci senzorů, antikoročních nátěrů či v oblasti výroby palivových článků. V poslední době se však také zvyšuje zájem o využití polyanilinu v oblasti medicíny. Předpokladem takovýchto aplikací je biokompatibilita polyanilinu. I když je polyanilin zkoumán již řadu let, informace o jeho cytotoxicitě, jako jednoho z parametrů biokompatibility, jsou nedostačující. Cytotoxicita bude studována pomocí stanovení viability extraktů polyanilinu. Vyhodnocení viability bude provedeno jednak pomocí metody MTT a jednak pomocí průtokové cytometrie.

Klíčová slova: polyanilin, apoptóza, nekróza, MTT, průtoková cytometrie

## **ABSTRACT**

The aim of the study is to determine the cytotoxicity of different forms of polyaniline. Concretely, the following forms were examined: polyaniline base and polyaniline salt. These two forms are different in both structures and properties. Polyaniline salt is marked as green emeraldine salt, which is a conductive form of polyaniline. The Polyaniline base is marked as blue emeraldine base, which is not conductive. The transit goes through the change of PH by the value 5-6. This transit is made for example by addition of ammonium hydroxide to polyaniline salt. Polyaniline is examined mainly due its ability to conduct the electrical power, which can be used for the construction of sensors, anticorrosive coat or in the production of fuel segments. The applications in biomedicine are also considered recently. For those applications the biocompatibility of material is crucial. Even though the polyanilin has been examined for many years, the information about his cytotoxicity are insufficient.

Keywords: polyaniline, apoptosis, necrosis, MTT, flow cytometry

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému vedoucímu bakalářské práce panu Ing. Petru Humpolíčkovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a informace ke zvolenému tématu a za věnovaný čas. Dále bych ráda poděkovala Ing. Zdence Kucekové za pomoc a vedení při práci v laboratoři a při vyhodnocování výsledků. V neposlední řadě děkuji za morální podporu a vytvoření vhodného studijního prostředí po celou délku studia mému příteli, rodině a kamarádům.

Motto

*„Alea iacta est“*

(Julius Caesar 100 př. n. l. – 44 př. n. l.)

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 POLYMERY V BIOMEDICÍNSKÝCH APLIKACÍCH</b> .....	<b>12</b>
1.1 HISTORIE POLYMERŮ V BIOMEDICÍNSKÝCH APLIKACÍCH.....	13
1.2 BIODEGRADACE .....	15
1.3 BOKOMPATIBILITA .....	16
1.4 TYPY POLYMERŮ .....	18
1.4.1 Syntetické polymery.....	18
1.4.1.1 Syntetické biodegradabilní polymery .....	18
1.4.1.2 Elastomerní materiály .....	20
1.4.1.3 Hydrogely .....	21
1.4.2 Přírodní polymery .....	22
<b>2 VODIVÉ POLYMERY</b> .....	<b>23</b>
2.1 POLYANILIN .....	24
2.1.1 Struktura polyanilinu.....	24
2.1.2 Vlastnosti.....	25
2.1.3 Syntéza práškového PANI .....	25
2.1.4 Příprava polyanilinových filmů.....	26
<b>3 TESTOVÁNÍ POLYMERNÍCH MATERIÁLŮ PRO MEDICÍNSKÉ APLIKACE</b> .....	<b>27</b>
<b>4 TESTY VIABILITY A BUNĚČNÉ SMRTI</b> .....	<b>28</b>
4.1 VIABILITA .....	28
4.1.1 MTT .....	28
4.2 APOPTÓZA A NEKRÓZA.....	30
4.2.1 Apoptóza .....	30
4.2.2 Nekróza .....	31
4.2.3 Průtoková cytometrie .....	32
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>34</b>
<b>5 MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>35</b>
5.1 SYNTÉZA POLYANILINOVÉ SOLI A BÁZE.....	35
5.2 POUŽITÉ BUNĚČNÉ LINIE .....	35
5.3 PODMÍNKY KULTIVACE .....	35
5.4 EXPERIMENTÁLNÍ USPOŘÁDÁNÍ.....	36
5.4.1 Extrakty polyanilinu.....	36
5.4.2 Prekultivace buněk .....	36
5.4.3 Přidání extraktů .....	37
5.4.4 MTT .....	37
5.4.5 Průtoková cytometrie .....	37
<b>6 VÝSLEDKY</b> .....	<b>39</b>
6.1 PH POLYANILINOVÝCH EXTRAKTŮ SOLI .....	39
6.2 CYTOTOXICITA STANOVENÁ POMOCÍ MTT TESTU.....	39
6.2.1 Cytotoxicita polyanilinové báze.....	39



6.2.2	Cytotoxicita polyanilinové soli .....	42
6.2.3	Cytotoxicita polyanilinové soli s upraveným pH.....	44
6.2.4	Srovnání cytotoxicity různých forem polyanilinu.....	46
6.3	CYTOTOXICITA STANOVENÁ POMOCÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE .....	47
<b>7</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>50</b>
	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>52</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>53</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	<b>60</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>61</b>
	<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	<b>62</b>

## ÚVOD

Hlavním objektem této práce je polyanilin, který je jedním z předních zástupců skupiny vodivých polymerů, což jsou polymery, které disponují řadou různých vlastností. Tyto vlastnosti se týkají hlavně jejich elektrochemického chování, tzn., že se jejich vlastnosti mění v závislosti na jejich elektrochemickém potenciálu (Freund a Deore, 2007). Za výzkum vodivých polymerů byla udělena Nobelova cena za chemii v roce 2000 vědcům Heegerovi, MacDermidovi a Shirakawovi (The Nobel Prize in Chemistry, 2000). Polyanilin má 2 hlavní formy a to polyanilinovou sůl, vodivá forma polyanilinu. Vodivost polyanilinové soli dosahuje až polovodičové úrovně. Druhou formou polyanilinu je polyanilinová báze, která není vodivá. Přejít mezi těmito dvěma formami se děje změnou pH, samotný přechod nastává při hodnotě pH 5-6 (Stejskal, 2002). Polyanilin je zkoumán již řadu let, hlavně pro jeho možné aplikace v oblasti biomedicíny. I přes jeho dlouholeté zkoumání není stále objasněna jeho cytotoxicita jakožto klíčový parametr biokompatibility tohoto polymeru. Cytotoxicita je zkoumána pomocí testů viability buněk a buněčné smrti. Buněčná smrt může být uskutečněna 2 mechanismy a to apoptózou, což je programovaná smrt, při které nedochází k imunologické odpovědi – zánětu. Druhým mechanismem je nekróza, která je hlavně způsobena hlavně akutním poraněním a vyvolává zánět. Ten je způsoben vyjitím buňky do cytosolu a následným poškozením okolních buněk, tím se zánět rozšiřuje (Nečas et al., 2000).

V této práci se cytotoxicita polyanilinu bude zkoumat pomocí 2 metod: 1) pomocí MTT testu; 2) pomocí průtokové cytometrie. Budou se zkoumat extrakty polyanilinové báze a polyanilinové soli, které budou přidány do předem nakultivovaných buněk z buněčné linie lidských keratinocytů (HaCaT). Přidávány budou postupně se snižující koncentrace extraktů a bude vyhodnoceno, jaká koncentrace extraktů již není cytotoxická. Vyhodnocení pomocí MTT testu slouží ke stanovení viability buněk v přítomnosti extraktů. Průtoková cytometrie slouží k rozlišení, zda buňky odumřeli mechanismem apoptózy nebo nekrózy. Veškeré testování i příprava vzorků bude provedena podle normy ČSN EN ISO 10 993 a to konkrétně podle části 5 – „Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro*“ a podle části 12 – „Příprava vzorků a referenční materiály“.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 POLYMERY V BIOMEDICÍNSKÝCH APLIKACÍCH

Pro biomedicínské aplikace, především léčbu postižených či poraněných tkání, respektive jejich částečnou nebo úplnou náhradu, byly používány snad všechny druhy materiálů. Obecně se materiály v těchto aplikacích označují jako biomateriály. Existuje řada definic biomateriálů. V obecné rovině jsou tak označovány látky, které jsou v kontaktu s tkání (Robinson et al., 2001). Dle detailnější definice autorů Dee et. al. (2003) jsou to materiály, které tvoří části lékařských implantátů, extrakorporálních zařízení (takové zařízení, které je umístěno mimo živý organismus, ale působí na něj, například přístroje na léčbu zánětu Achillovy šlachy apod.) a jednorázové pomůcky, které byly využívány v lékařství, chirurgii, zubním lékařství a veterinárním lékařství stejně jako v každém aspektu péče o pacienta. Asi nejvýstižnější definice byla publikována v rámci konference Clinical Applications of biomaterials (NIH Consensus Statement, 1982): biomateriály byly definovány jako látky (jiné než léčiva) nebo kombinace látek, syntetických nebo přírodního původu, které mohou být použity po libovolnou dobu, jako celek nebo jako část systému, který posuzuje, zvyšuje, nebo nahradí kteroukoli tkáň, orgán, nebo funkci těla. Biomateriály mohou být rozděleny do čtyř hlavních skupin materiálů: polymery, kovové, keramické (včetně uhlíku, sklokeramiky a skla) a přírodní materiály. Někdy jsou dvě odlišné skupiny materiálů spojovány dohromady v kompozitní materiál. Kompozity je tak možné považovat za pátou skupinou biomateriálů (Ratner, et al., 2004). Polymery se v biomedicínských aplikacích začaly objevovat až od poloviny 20. století. Jejich využití se neustále rozšiřuje zejména díky inertnosti, nebo dokonce vhodné interakci s vnitřním prostředím. Další výhodou je variabilita jejich vlastností (Sedlářiková et al., 2006).

Biokompatibilita a biodegradabilita jsou dvě kritické vlastnosti, na které je kladen důraz u materiálu používaného v biomedicínských aplikacích (Australian biotechnology, 2006). Podrobněji bude biokompatibilita i biodegradabilita probrána níže.

Obecně je možno konstatovat, že biomateriály by měli být biokompatibilní s biologickým systémem ve kterém se mají nacházet. Což znamená, že by materiál měl být netoxický, nekarcinogenní, neindukující imunologickou reakci, nemutagenní, a neměl by způsobit žádné podráždění nebo alergickou reakci, ať už místní nebo systémovou (Shi, 2004). Soubor pravidel pro testování těchto a dalších vybraných vlastností zdravotnických prostředků je uveden v souboru norem ČSN ISO 10 993 „Biologické hodnocení zdravotnických prostředků“.

Kromě biokompatibility a biodegradability je další podstatnou charakteristikou polymerů pro biomedicínské aplikace požadavek na stejné nebo podobné mechanické vlastnosti jako má původní biologický systém (Australian biotechnology, 2006). Například odolnost polymerů v tahu může být charakterizována podle jejich deformačního chování. Amorfni, kaučukové polymery jsou měkké a reversibilně roztažitelné. Kaučukové polymery vykazují nižší modul pružnosti, nebo ztuhlost a rozšiřitelnost až několik set procent. Sklovité a semikrystalické polymery mají vyšší modul pružnosti, ale nižší roztažitelnost. Konečné mechanické vlastnosti polymerů při velkých deformacích jsou důležité při výběru konkrétního typu polymeru pro biomedicínské aplikace (Ratner et al., 2004).

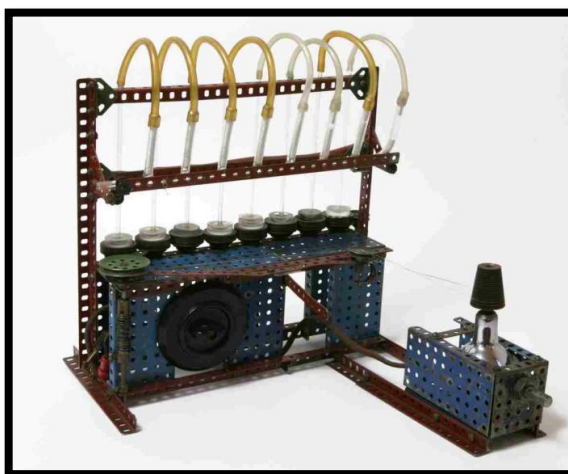
Většinou homogenní polymerní materiál nemůže mít potřebné vlastnosti, zejména požadovanou biokompatibilitu a biostabilitu. Pomocí chemické kombinace odlišných polymerů dosáhneme vyhovujících vlastností. Například byl vyvinut kopolymer polyuretanu a silikonového elastomeru, který vykazuje excelentní mechanické vlastnosti a odolnost proti únavě ve srovnání s uretanovým komponentem a lepší biokompatibilitu než silikonový komponent (Australian biotechnology, 2006).

## 1.1 Historie polymerů v biomedicínských aplikacích

Již v roce 1912 byla udělena Nobelova cena za fyziologii a medicínu Alexisi Carrelovi za jeho práci v oblasti cévní struktury a transplantace krevních cév a orgánů. Věděl, že před tím než dokážeme vhodně transplantovat orgán, je třeba znát anatomii cév a nalézt vhodnou metodu spojování cév nového orgánu a cév hostitele (Alexis Carrel - Nobel Lecture, 1912). Teprve během druhé světové války však dochází k rychlému rozvoji polymerů, které začínají být vidět i v medicínských aplikacích. Polymetylmetakrylát (PMMA) byl jedním z prvních polymerů použitých jako biomateriál. Byl použit k nahrazení lidské rohovky při poranění. Další posun přišel kolem roku 1950, kdy bylo implantováno první umělé srdce (Robinson et al., 2001).

V 60. letech se začínají objevovat hydrogely syntetizované v českých zemích profesory Wichterlem a Límem (Gibas a Janik, 2010). Profesor Wichterle byl průkopníkem v oblasti designu, syntézy a aplikace nových polymerů pro zdravotnické účely. Otto Wichterle se narodil roku 1913 v Prostějově, studoval na fakultě Chemicko-technologického inženýrství na ČVUT v Praze (dnešní Vysoká škola chemicko-technologická v Praze), získal doktorát u profesora Emila Votočka, Wichterleho výkon akademické kariéry byl přerušen v roce 1939 (uzavření vysokých škol nacisty), proto odchází do Zlína, kde mu byla nabíd-

nuta pozice ve Výzkumném ústavu technologie kaučuku společnosti Baťa. Wichterle našel správné polymerační podmínky pro přípravu Nylonu-6 z  $\epsilon$ -kaprolaktamu. V roce 1952 patentoval nové materiály založené na síťování hydrofilních polymerů 2-hydroxy-ethylmetakrylát (HEMA). Následující rok byl takový materiál syntetizován v jeho laboratořích. Licenci na výrobu hydrofilních gelů od něj koupila Americká firma Bausch & Lomb. V roce 1955 byl nominován na plnoprávného člena Československé akademie věd. V roce 1959 založil Ústav makromolekulární chemie. Během posledních 10 let profesor Wichterle a jeho spolupracovníci vyvinuli lepší botnající materiály a nové technologie na kontaktní čočky stejně jako nitrooční hydrogelové čočky, které mohou být implantovány do oka po odstranění zakalené čočky. Tyto první hydrogelové čočky Wichterle zhotovoval na stroji vyrobeném ze stavebnice Merkur (nazýval se čočkostroj), který je vyobrazen na obrázku 1. V roce 1998 umírá ve spánku ve věku téměř 85 let (Sebenda, Hudlický 1999).



Obrázek 1 – čočkostroj Otty Wichterle

(Czechcentres, 2010)

Výrazným posunem v oblasti využití polymerů v medicíně je možné demonstrovat na roce 2012, kdy byla udělena Nobelova cena za medicínu a fyziologii vědcům Gurdonovi a Yamanakamu za výzkum v oblasti dediferenciace buněk a jejich následného umístění do lidského těla pomocí scaffoldu, který prorostou (The Nobel Prize in Physiology or Medicine, 2012).

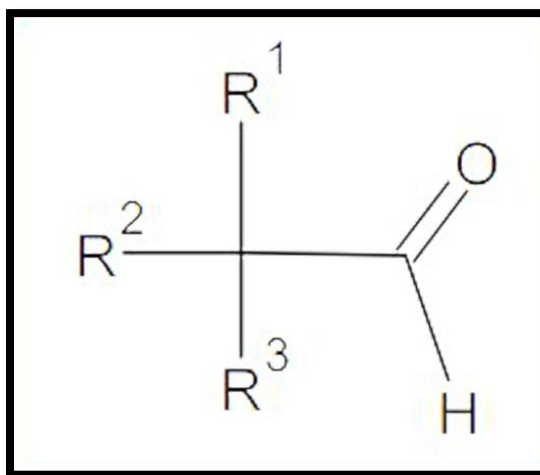
## 1.2 Biodegradace

Biodegradace je schopnost materiálů se rozkládat působením biologických faktorů, především enzymů, v biologickém systému. Při biodegradaci dochází ke zjednodušení a rozpadu původních struktur (Bastioli, 2005). Degradace materiálu může mít dva významné důsledky pro zdravotnické prostředky. První důsledek – ztráta strukturální integrity zdravotnického prostředku, případně až jeho konečné rozpuštění nebo odstranění. Tento důsledek může být nežádoucí v případě, že materiál má být inertní a stabilní v dlouhé časové periodě, ale může být i žádoucí u těch materiálů kde je biodegradace záměrná (Williams, 2003). Tohoto jevu se využívá například v oblasti regenerace kůže, k uchycení kožního štěpu, kde se uplatňují hlavně mukopolysacharidy, kolagen, stabilizovaná kyselina hyaluronová, polylaktid-polyglykolová kyselina (PLA-PGA), kyselina polykaprolaktonová a další polymerní materiály. Méně vhodné jsou syntetické polymery, jelikož jejich biokompatibilita není dokonalá a tím pádem omezuje jejich široké použití v oblasti regenerace kůže i přesto, že mají vhodné mechanické vlastnosti (Hollinger, 2012). Druhý důsledek – uvolnění produktů z procesu degradace může ovlivnit tkáň a to buď lokálně, nebo systémově. Dále může ovlivňovat nepříznivě, nebo příznivě. V případě příznivě uvolňovaných produktů, mají tyto látky žádoucí a zamýšlené funkce (Williams, 2003).

Jedním z nejdůležitějších předpokladů pro úspěšné použití biodegradabilního polymeru pro jakékoliv medicínské aplikace je pochopit způsob jak se bude přípravek rozkládat, nebo jakým způsobem bude narušen a jak se nakonec vstřebá z místa implantace (Ratner et al., 2004). Ačkoliv biodegradace je obvykle definována jako degradace způsobená biologickou aktivitou (zejména enzymovou aktivitou), někdy je iniciována abiotická degradace, které podléhají syntetické polymery, jako je fotodegradace nebo jednoduchá hydrolýza. Hydrolýze podléhá velké množství polymerů, jako jsou například polyestery, polyamidy či polyanhydridy. Dalším typem degradace je enzymatická degradace, která probíhá od povrchu dovnitř, protože makromolekulární enzymy nemůžou proniknout do vnitřku materiálu. Na rozdíl od tohoto typu degradace může chemická hydrolýza pevného materiálu probíhat v celém průřezu, výjimku tvoří velmi hydrofobní polymery (Bastioli, 2005).

Hydrolýza je odštěpení funkčních skupin reakcí s vodou. Může být katalyzována kyselinami, bázemi nebo enzymy. Je to reakce, která probíhá v jednom kro-

ku (Ratner et al., 2004). Hydrolyzovatelné polymerní materiály jsou například materiály, které obsahují karbonylovou skupinu vázanou na heteroatom (viz obrázek 2). Ostatní polymery obsahující skupiny jako jsou například ethery, acetaly, nitrily nebo sulfoamidy podléhají hydrolyze jen za určitých podmínek (Ratner et al., 2004). Mezi faktory ovlivňující polymerní degradaci patří: typy chemických vazeb, pH, teplota, kopolymerní složení či schopnost botnat (Bastioli, 2005).



Obrázek 2 – karbonylová funkční skupina vázaná na heteroatom (ChemSketch - Freeware)

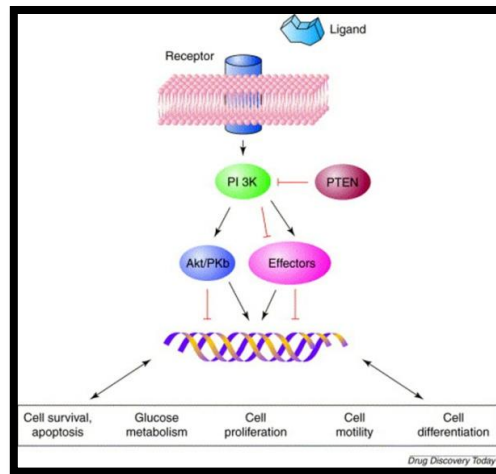
### 1.3 Biokompatibilita

Biokompatibilita je vlastnost, která popisuje interakce, probíhající mezi biomateriály a tkání těla. Je nesmírně komplexní záležitostí zahrnující velký počet mechanismů (Williams, 2003). Dále je biokompatibilita zásadní vlastností materiálů pro jejich použití do biologického systému, tato vlastnost materiálům stanovuje jiné možnosti využití než jenom v oblasti technologie a obchodu (Ratner et al., 2004). Přesná a jednoznačná definice pro ni neexistuje, ale obecnou definicí pojmu biokompatibilita se rozumí přijetí materiálu do okolí tkáně jako celek, materiál musí být s tkání kompatibilní z hlediska mechanického, chemického, povrchových receptorů a farmakologických vlastností (Park a Bronzino, 2003).

Mechanismy, umožňující ovlivňování jedné buňky druhou, jsou podstatné pro přijetí materiálu do biologického systému. Tyto mechanismy existovaly u jednobuněčných organismů dlouho před vznikem mnohobuněčných organismů. Důkazy této teorie můžeme vidět na studii současných jednobuněčných eukaryot, jako jsou kvasinky. Tyto buňky vedou samostatný život, mohou komunikovat a navzájem ovlivňovat své chování. Buňky vyšších



živočichů mohou komunikovat pomocí stovek druhů signálních molekul. Mezi ně patří proteiny, malé molekuly peptidů, aminokyseliny, nukleotidy, steroidy, deriváty mastných kyselin a rozpuštěné plyny jako jsou oxid dusný nebo oxid uhelnatý (Alberts et al., 2002). Byl proveden rozsáhlý výzkum, který potvrdil, že velkou úlohu v problematice buněčné komunikace hraje extracelulární matrix - ECM (Von der Mark et al., 2010). Důkazem je, že signální molekuly se musí dostat od buňky k buňce a to těmito rozlišnými způsoby: 1) jsou vylučovány ze signální buňky do extracelulárního prostoru pomocí exocytózy; 2) jsou uvolněny difúzí přes plasmatickou membránu; 3) jsou vystaveny extracelulárnímu prostoru při zachování pevné vazby k signální buňce. Bez ohledu na charakter signálu, cílové buňky reagují prostřednictvím specifické bílkoviny zvané receptor, který se specificky váže na signální molekulu a poté se v cílové buňce zahájí odpověď na přicházející signál (Alberts, 2002). Na obrázku 3 můžeme vidět jednoduchou interacelulární signální cestu aktivovanou extracelulární signální molekulou. Stejně tyto mechanismy probíhají i v místě implantace. Materiál by proto měl být z hlediska mezibuněčné komunikace co nejvíce podobný biologickému systému, aby jej mohl bez problémů přijmout.



Obrázek 3 – jednoduchá intracelulární signální dráha

(Giese et al., 2002)

## 1.4 Typy polymerů

Polymerní biomateriály jsou syntetické či přirozeně se vyskytující polymery. Dále se dají polymery rozdělit podle toho, do jakých struktur jsou zpracované – velmi lehce se dají zpracovávat do mnoha struktur a tvarů (Shi, 2004). Proto mají širokou škálu uplatnění v aplikacích pro implantaci. Mohou být tvořeny do vláken, textilu, filmů, tyčí a viskózních kapalin (Ratner et al., 2004).

### 1.4.1 Syntetické polymery

Ačkoliv stovky polymerů lze snadno syntetizovat, jako biomateriál může být použito jen 10 až 20 z nich (Park a Bronzino, 2003). Syntetické polymerní biomateriály můžeme rozdělit na hydrofobní (vodu neabsorbující) jako jsou přírodní kaučuky (NR), polyetylen (PE), polypropylen (PP) a další, přes více polární polymery jako jsou polyvinylchlorid (PVC), PLA-PGA a nylony až po botnající polymery jako jsou polyhydroxyethylmetakrylát (PHEMA) a polymery rozpustné ve vodě jako jsou polyetylen glykol (PEG) (Ratner et al., 2004).

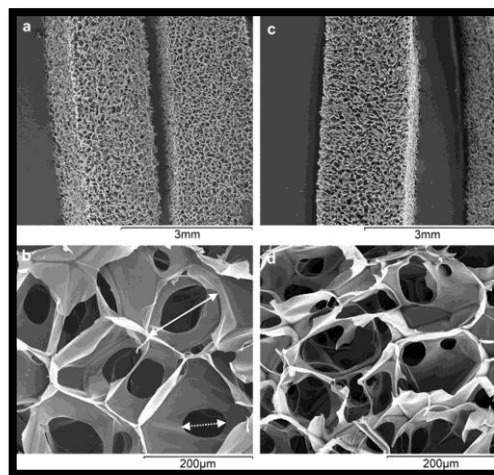
Polymerní materiály se využívají pro tyto aplikace: 1) PVC na výrobu krevních vaků a vaků na roztoky, na chirurgické obaly, zařízení na dialýzu, na láhve katétrů, na svorky a kanyly; 2) PE na farmaceutické láhve, netkané textilie, katétry, různé vaky a ortopedické implantáty; 3) PP na jednorázové injekční stříkačky, šicí materiál, netkané textilie a umělé cévní štěpy; 4) PMMA na krevní pumpy a rezervoáry, oční čočky a kostní cement, 5) nylon na obalové filmy, katétry a na šicí materiál, 6) PLA-PGA ve farmacii pro uvolňování účinné látky z léčiv, šicí materiál a krytí ran, 7) PHEMA na oční čočky a systémy pro uvolňování léčiv (Park a Bronzino, 2003; Ramakrishna, 2010).

Vzhledem k obsáhlosti využití a druhů polymerů se v dalších částech budeme zabývat jen některými typy.

#### 1.4.1.1 Syntetické biodegradabilní polymery

Syntetické biodegradabilní materiály mohou být využity v širokém spektru medicínských aplikací díky jejich dobré biokompatibilitě, kontrolovatelné biodegradaci a poměrně dobré zpracovatelnosti. Mezi tyto materiály patří například polylaktid (PLA), polyglykolid (PGA), PLA-PGA a další. (Park a Bronzino, 2003). Nejčastěji používaný materiál je PLA díky svým funkčním vlastnostem, které napomáhají růstu buněk na tomto materiálu (Ramakrishna, 2010). Protože nejdůležitějším využitím jsou umělé konstrukce pro

růst buněk (dále jen scaffold). Scaffold slouží jako šablona pro regeneraci tkání a hraje klíčovou roli v adhezi, proliferaci a diferenciaci buněk a nové tkáňové formace ve všech třech směrech. V ideálním případě by měl být scaffold navržen tak aby měl následující vlastnosti: měl by být biokompatibilní, biodegradabilní s kontrolovanou rychlostí degradace, 3D strukturu, vysoce porézní strukturu k růstu buněk, propojenou síť pórů s cílem usnadnit výměnu živin a odpadních látek, mechanickou pevnost, aby podporoval regeneraci a dobrou topografii a chemii povrchu, aby podporoval buněčnou interakci a vývoj tkáně (Liu, 2012). Jako příklad je na obrázku 4 uveden scaffold z chitosanu. (a) a (b) je chitosan se 4% acetylací, rozdíl je pouze ve zvětšení, (c) a (d) je chitosan s 15% acetylací, opět rozdíl pouze ve zvětšení. Chitosan byl zkoumán jako možný scaffoldy pro osídlení lidskými endoteliálními buňkami (Amaral et al., 2009).



Obrázek 4 – scaffoldy z chitosanu  
s určitým stupněm acetylace (Amaral et al., 2009)

Většina z běžně používaných biodegradabilních polymerů používaných pro scaffoldy jsou mechanicky pevné, ale pro jisté aplikace jako je tkáňové inženýrství svalů a šlach, které vyžadují značnou pružnost, tyto polymery nejsou optimální. Proto byly vyvinuty nové biodegradabilní polyestery, které mají vynikající elasticitu a pevnost. Scaffoldy z těchto materiálů mohou být užitečné hlavně v oblasti tkáňového inženýrství elastických tkání, jako jsou svaly, kosti a cévy (Lee a Henthorn, 2012). Moderní regenerativní medicína stále více scaffoldy používá, protože představují širokou škálu morfologických a geometrických *in vivo* možností, které mohou být přizpůsobeny pro každou specifickou aplikaci regenerační medicíny (Kim et al., 2011).

Biodegradabilní polymery mohou být tvořeny i z přírodních polymerů jako jsou chitin, alginát, hyaluronová kyselina. Oproti nim mají synteticky připravené biodegradabilní polymery výhodu, že mohou být vytvářeny za kontrolovaných podmínek a tím pádem vykazují obecně předvídatelné mechanické i fyzikální vlastnosti jako je pevnost v tahu, modul pružnosti a rychlost degradace. Další výhodou je kontrola nečistot, které by se mohly dostat do materiálu (Rezwan et al., 2006).

#### **1.4.1.2 Elastomerní materiály**

Jsou to makromolekulární materiály charakterizované schopností značně se deformovat působením poměrně malého vnějšího napětí a po uvolnění napětí nabývat původního nedeformovaného tvaru. Volba tohoto materiálu pro biomedicínské aplikace je podmíněna především konkrétními požadavky na materiál (Bednář et al., 1991).

Přístroje, které jsou vyrobeny z těchto materiálů, se nacházejí hlavně v umělých srdcích, v oblasti protetických srdečních chlopní, uvnitř aorty jako balónové pumpy, prsní protézy, oftalmologické přístroje, v oblasti čelistní rekonstrukce, jako umělá kůže a systémy podávání léků. Hlavními polymery, které jsou pro tyto aplikace používány, jsou silikonová pryž a polyuretan (Teoh et al., 1999). V souhrnu, elastomerní materiály jsou důležitá třída materiálů a další inovace povedou k mnoha objevům v tkáňovém inženýrství (Burdick a Mauck, 2011)

Jako například polyuretan, který je často popisován jako látka, která má překlenout díru mezi pryží a plasty. Má velmi malou hustotu v porovnání s jinými polymery. Nejčastěji je používán pro ventrikulární pomocná zařízení. Tyto zařízení se liší od umělých srdcí. Jsou používány jako krátkodobá pomoc srdečního oběhu. Jsou připojeny buď na jednu, nebo na obě srdeční komory. Zařízení se skládá z potrubí, které je připojené k srdeční chlopni vedoucí k čerpadlu (Robinson et al., 2001). Polyuretan má nevýhodu, že podléhá progresivní degradaci při implantaci (Teoh et al., 1999).

### 1.4.1.3 Hydrogely

Je to stále nová a rychle se rozvíjející skupina polymerních materiálů. Její uplatnění je velmi široké od farmacie přes medicínu až k zemědělství. Podle nejnovějších medicínských i farmaceutických encyklopedií stále neexistuje přesná definice pojmu hydrogel. Nejčastěji je hydrogel považován za materiál, který je vytvořen z polymerní sítě, jenž byla nabotnána vodou (Gibas a Janik, 2010). Procentuální obsah vody je až 98%. Může mít porézní strukturu s póry o velikosti mezi 10 až 100  $\mu\text{m}$  (Hejcl et al., 2008).

Hydrogely jsou materiály, které jsou důležité pro tkáňové inženýrství kvůli jejich funkční podobnosti s přírodním ECM (Burdick a Mauck, 2011). Což je prostor mezi buňkami, který je vyplněn složitými sítěmi makromolekul (Alberts, 2002). ECM obsahuje 3 hlavní typy makromolekul: 1) strukturální bílkoviny – kolagen a elastin; 2) specializované bílkoviny – fibrin, fibronektin a laminin, mají v ECM specifické funkce; 3) proteoglykany sestávající z glykosaminoglykanů připojené na bílkovinné jádro (Murray, 2002). Hlavním důvodem proč je ECM považován ze přírodní hydrogel je fakt, že proteoglykany jsou tvořené polypeptidovým řetězcem, na který jsou napojeny glukozaminoglykany (polysacharidy obsahující glukozamin). Tyto polysacharidové řetězce jsou hydrofilní, a proto poutají velké množství vody. Tvoří gel (Nečas, 2000).

Historie používání hydrogelů v medicíně je dlouhá (Hejcl et al. 2008). Po více než 50 let jsou hydrogely používány v mnoha biomedicínských aplikacích, v oftalmologii jako kontaktní čočky nebo například v chirurgii jako vstřebatelné struktury. Poprvé byly hydrogely syntetizovány v roce 1955 Profesory Límem a Wichterlem v Praze. V 80. letech 20. století byly hydrogely upraveny i pro jiné aplikace (Gibas a Janik, 2010).

Materiál, ze kterého byl první hydrogel připraven, byl metakrylátový ester etylen-glykolu. Mechanismus, pomocí něhož byl tento materiál zhotoven, byla radikálová polymerace. Vzniklý poly(2-hydroxyethylmetakrylát), zkráceně HEMA botná ve vodě až do 40%, a přesto si zachovává uspokojivé mechanické vlastnosti (Raab, 1999). Hlavní výhodou tohoto revolučního materiálu byla jeho stabilita při různých pH, teplotách a tonických podmínkách. Materiál zvaný HEMA je jeden z nejdůležitějších a nejmás široce aplikovaný biomateriál. Jeho vlastnosti závisí mimo jiné, na metodě syntézy, polymerním obsahu, na stupni zesíťování, teplotě a finálním prostředí kde bude aplikován. Po ukončení syntézy se produkt získá ve formě filmu nebo membrány. Následně je film ponořen do vody na 24 hodin, dokud není zcela nasycený vodou, důvodem je odstranění toxických a nezreago-

vaných skupin, které by mohly poškodit biologickou tkáň. Tento materiál může být použit hlavně na výrobu čoček, dále na výrobu umělé kůže, obvazů – speciálně pro hojení popálenin, protože zaručuje dobré podmínky pro hojení atd. (Gibas a Janik, 2010).

Hydrogely mohou být využity i jako degradabilní materiál pro scaffold. Nicméně jsou zde stále omezení, například degradační rychlost nemusí být zcela známa (Hejcl et al., 2008). Degradace vede ke změně průměrné velikosti pórů a ke změně botnací úrovně stejně jako ke změně viskoelasticity materiálů. Na jedné straně zvětšení velikosti pórů usnadňuje šíření makromolekul a migraci buněk, ale na straně druhé mechanické vlastnosti se během degradace výrazně snižují (Burdick a Mauck, 2011).

Další materiály, které se používají na výrobu hydrogelů jsou například PEG a jeho deriváty, poly(vinyl) alkohol, polyamid, polyakrylát a polyuretan (Gibas a Janik, 2010).

#### 1.4.2 Přírodní polymery

Mezi přírodní polymery patří takové látky, které jsou konstrukčním materiálem těl živočichů (Ducháček, 2011). Přírodní polymery mají složitější uplatnění, protože se musí počítat s jejich složitou komplexní strukturou, imunogenicitou, možností přenosu určitého patogenu a obtížnost jejich čištění (Liu, 2012).

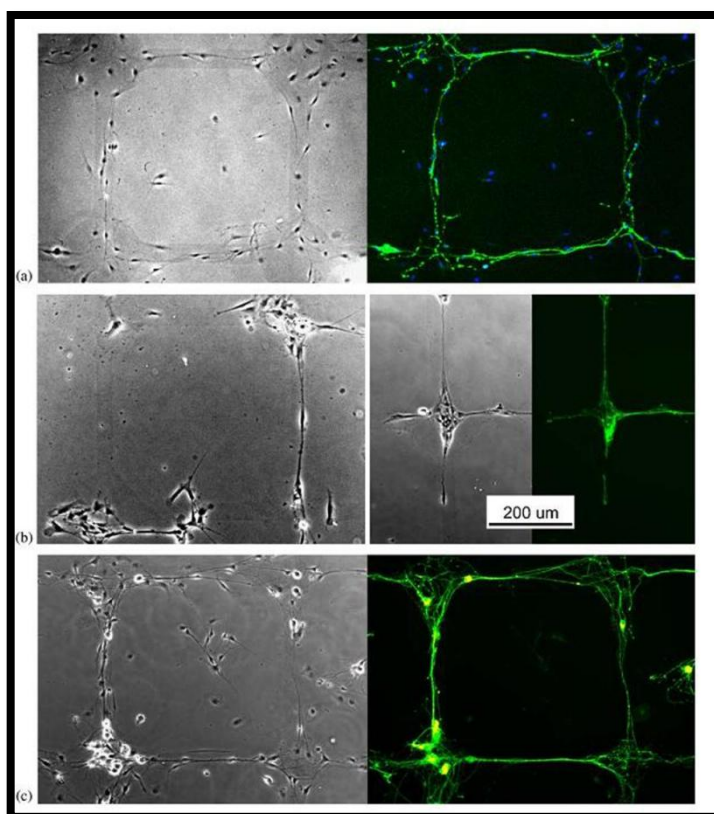
Do této skupiny patří například keratin, který se nachází ve vlasech, nehtech, paroží nebo v peří (Ducháček, 2011). Jeho hlavní výhodou při použití v biomedicínských aplikacích je jeho biokompatibilita, biologická rozložitelnost a možnost urychlit růst fibroblastů. Na druhou stranu má nízké mechanické vlastnosti což snižuje jeho zpracovatelnost a tím pádem i omezuje jeho praktické aplikace (Xing et al., 2011).

Dalším příkladem přírodního polymeru je kolagen, vyskytující se ve vazivových a pojivových tkáních chrupavkách a kostech (Alberts, 2002). Vzhledem k tomu, že kolagen hraje hlavní roli v zachování integrity ECM je důležitý pro aplikace tkáňového inženýrství, které se zaměřují na obnovu struktury a remodelace potenciálních tkáňových defektů (Burdick a Mauck, 2011).

## 2 VODIVÉ POLYMERY

Vodivé polymery disponují řadou různých vlastností, které se týkají jejich elektrochemického chování, tzn., že jejich vlastnosti lze měnit v závislosti na jejich elektrochemickém potenciálu (Freund a Deore, 2007). Za jejich výzkum byla v roce 2000 udělena Nobelova cena za chemii vědcům Heegerovi, MacDermidovi a Shirakawovi za objev a vývoj vodivých polymerů (The Nobel Prize in Chemistry, 2000). Vodivost těchto polymerů se pohybuje v rozmezí  $0,01 - 30 \text{ Scm}^{-1}$  což je srovnatelné s vodivostí anorganických polovodivých materiálů (Stejskal, Kratochvíl a Jenkins, 1996).

Mnoho studií se zabývá využitelností vodivých polymerů, například využití polypyrolu. Polypyrol slouží jako elektricky stimulující podklad pro růst neuronů, jak je zobrazeno na obrázku 5. Zde je vyobrazen polypyrol modifikovaný lamininem nebo lysinem: (a) polypyrol s lysinem; (b) polypyrol s lamininem; (c) polypyrol s lamininem i lysinem. Na pravé straně jsou zobrazeny fluorescenční snímky, z nichž je patrné propojování buněk v závislosti na elektrických stimulech (Song et al., 2006).



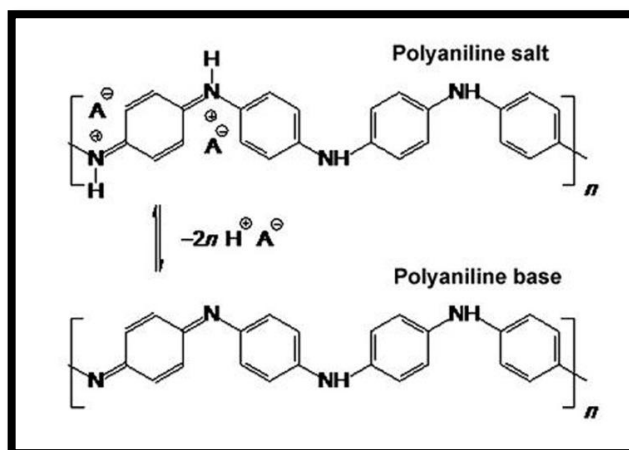
Obrázek 5 – elektricky stimulovatelný podklad z polypyrolu pro orientovaný růst neuronů (Song et al., 2006)

## 2.1 Polyanilin

Polyanilin (PANI) je jedním z mnoha vodivých (elektro aktivních) polymerů. Byl velmi rozsáhle studován hlavně pro jeho vlastnosti, jako jsou ekologická stabilita, vysoký stupeň zpracovatelnosti a zajímavé redoxní vlastnosti, které jsou spojené s jeho strukturou a heteroatomem (Ridge 1998). Pro polyanilin se hledalo specifické využití především pro jeho schopnost reagovat změnou elektrické vodivosti na vnější stimuly. Nakonec bylo nalezeno využití v oblasti senzorů (Airoudj et al., 2009), antikoročních nátěrů (Kalendová et al., 2008) či v oblasti výroby palivových článků (Wang, et al., 2009).

### 2.1.1 Struktura polyanilinu

PANI může existovat v několika formách, které se od sebe navzájem liší stupněm oxidace nebo protonace (Stejskal, Kratochvíl a Jenkins, 1996). Nejběžnějšími formami jsou zeleně zbarvená vodivá polyanilinová (emeraldinová) sůl, která má vodivost na polovodičové úrovni v řádech  $100 \text{ Scm}^{-1}$ , což je o mnoho řádů vyšší než u běžných polymerů ( $< 10^{-9} \text{ Scm}^{-1}$ ). Protonovaná emeraldinová sůl se převede na nevodivou modrou polyanilinovou bázi přidáním hydroxidu amonného (Stejskal, 2002). Strukturální vzorce obou forem PANI můžeme vidět na obrázku 6. K přechodu mezi oběma formami dochází při pH v rozmezí 5 – 6, při tomto přechodu klesá vodivost PANI z jednotek  $\text{Scm}^{-1}$  až na hodnoty  $10^{-9} \text{ Scm}^{-1}$ . Obě uvedené formy PANI se liší v mnoha vlastnostech a to nejen ve vodivosti, ale taky v jejich chování při kontaktu s živými organismy, tkáněmi či jednotlivými buňkami (Humpolíček et al., 2012).



Obrázek 6 – strukturální vzorce polyanilinové soli a polyanilinové báze

(Humpolíček et al., 2012)



### 2.1.2 Vlastnosti

Elektrická vodivost PANI byla přijata jako základní kritérium pro posuzování výrobků z tohoto materiálu (Stejskal, 2002). PANI přitahuje pozornost, vzhledem k jeho potenciálu pro aplikace, jako jsou nízké náklady a ekologická stabilita, se využívá k tvorbě světlo emitujících diod, pro výrobu pohonů – palivové články, plynové separační membrány, antikoroziční barvy a antistatické zařízení (El Khalki et al., 2003). Protože jak již bylo zmíněno má schopnost reagovat změnou elektrické vodivosti na vnější stimuly. V biomedicínských aplikacích se výzkum a vývoj zaměřuje především na jeho uplatnění v regeneraci srdeční či nervové tkáně (McKeon et al., 2010).

### 2.1.3 Syntéza práškového PANI

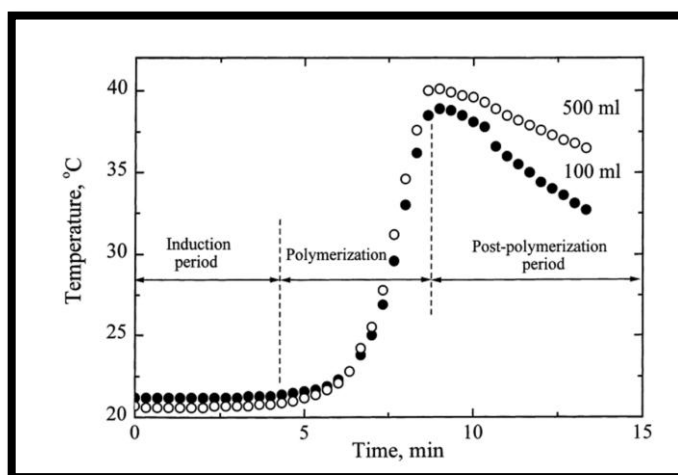
Přesná syntéza práškového PANI je dána podle IUPAC, kterou provedl kolektiv kolem Jaroslava Stejskala v roce 2002. Tato metoda byla uskutečněna tak, že do mnoha laboratoří po celém světě byly zaslány písemné pokyny jak PANI syntetizovat. Někteří pracovníci PANI připravovali poprvé v životě a jiní měli bohaté zkušenosti jak PANI syntetizovat. Následně byla metoda vyhodnocena pomocí měření elektrické vodivosti, což bylo hlavní kritérium pro posuzování. Polymerace byla navržena, aby byla co nejjednodušší. Syntéza byla založena na smíchání vodného roztoku anilin hydrochloridu a hydroxylsulfátu amonného při pokojové teplotě. Následuje oddělení sraženiny PANI hydrochloridu filtrací a sušením. Cílem této studie bylo připravit PANI o definované vodivosti, nemusí být nutně nejvyšší.

Efektivní polymerizace anilinu je dosaženo pouze v kyselém prostředí, kde existuje anilin jako anilinový kation. Pro syntézu PANI byly použity různé anorganické i organické kyseliny v různých koncentracích. Výsledné PANI protonované různými kyselinami se liší v rozpustnosti, vodivosti a stabilitě (Stejskal, 2002).

Pro IUPAC studii byla vybrána kyselina chlorovodíková v ekvimolárním poměru k anilinu. Jako monomer byl použit anilin hydrochlorid. Peroxydisulfát je nejběžnější okysličovadlo a její amonné soli byla dána přednost, protože je lépe rozpustný ve vodě. Koncentrace anilin hydrochloridu byla zvolena 0,2 M. K minimalizaci přítomnosti zbytkového anilinu a získání lepšího výnosu PANI byl ve studii stanoven stechiometrický poměr mezi peroxydisulfátem a anilinem na hodnotu 1,25.

Samotná polymerace trvá při pokojové teplotě 10 minut. Při teplotě 0 – 2°C trvá polymerace 1 hodinu. Oxidace anilinu je exotermickou reakcí, proto teplota reakční směsi může být použita k monitorování postupu reakce. Teplotní profil oxidace anilinu je vyobrazen na obrázku 7, který ukazuje typický průběh reakce zaznamenaný v Ústavu makromolekulární chemie v Praze.

Polymerace anilinu při koncentraci nad 1 M může mít za následek přehřátí systému, následuje výbuch. Proto je důležité se těmito reakčními podmínkami vyhnout (Stejskal, 2002).



Obrázek 7 – teplotní profil polymerizace polyanilinu

(Stejskal, 2002)

#### 2.1.4 Příprava polyanilinových filmů

Při přípravě PANI filmů se využívá schopnosti vodné reakční směsi využité při oxidaci anilinu vytvářet filmy na površích substrátu o submikrometrové tloušťce, které jsou do reakční směsi ponořeny. Anilin hydrochlorid se rozpustí ve vodě a smíchá se stejným objemem vodného roztoku peroxodisíranu amonného. Vzniklá směs se následně nalije do kultivačních misek z polystyrenu. Reakce probíhá při laboratorní teplotě po dobu 10 minut. Následně na miskách naroste zelený film vodivé polyanilinové soli. Následně se misky vypláchnou roztokem kyseliny chlorovodíkové, aby se odstranily sraženiny polyanilinu z povrchu filmu, poté se metanolem opláchnou a vysuší na vzduchu. Film je připraven k testování. Vzniklý film má globulární morfologii a tloušťku kolem 100 nm. Tyto PANI filmy se využívají k testování proliferace buněk.

### 3 TESTOVÁNÍ POLYMERNÍCH MATERIÁLŮ PRO MEDICÍNSKÉ APLIKACE

Legislativní požadavky na materiály, které vstupují do kontaktu s lidským organismem, jsou rámcově zpracovány v české legislativě a podrobně rozpracovány v českých a mezinárodních normách. Nejvýznamnějším je série Českých státních norem: ČSN EN ISO 10993 „*Biologické hodnocení zdravotnických prostředků*“. Tento soubor norem definuje požadavky, parametry a postupy používané při biologickém hodnocení zdravotnických prostředků. Série je rozsáhlý spis, který je složen z dvaceti samostatných dokumentů, proto je obtížné podat úplné informace. Pro tuto práci byly důležité pouze některé části, proto zde není uvedena celá norma, ale pouze její 2 části.

Jako první důležitou částí je pátá část série, jež nese název „*Zkoušky na cytotoxicitu in vitro*“ (ČSN EN ISO 10993-5, 2010). Popisuje tři typy uspořádání zkoušek *in vitro* (ve skle) a to 1) zkoušku extraktu připraveného z testovaného materiálu, 2) zkoušku přímým kontaktem a 3) zkoušku nepřímým kontaktem. Výběr konkrétního postupu závisí na typu vzorku, místě aplikace a charakteru použití. Zkoušky se provádí *in vitro* a používají se buněčné linie kultivované za specifických podmínek

Druhou důležitou částí normy je dvanáctá část série, kde jsou uvedeny požadavky, pokyny a postupy, podle nichž se má provádět příprava vzorků a výběr referenčních materiálů pro zkoušení zdravotnických prostředků v biologických systémech. Norma tak definuje základní pravidla vzorkování, ze kterých vycházejí ostatní normy tohoto dokumentu. Název této části je „*Příprava vzorků a referenční materiály*“ (ČSN EN ISO 10993-12, 2009).

## 4 TESTY VIABILITY A BUNĚČNÉ SMRTI

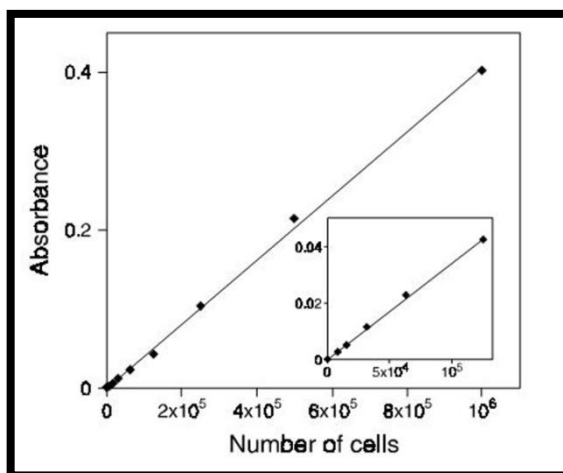
Testy viability a dalších buněčných parametrů jako je například apoptóza či nekróza se běžně používají pro hodnocení biokompatibility materiálů. Prvotní studii provedl pan Kawahara v roce 1955, který vyhodnocoval cytotoxicitu v dentálních materiálech na buněčné kultuře. V následujícím desetiletí došlo k výraznému rozvoji metod, z nichž je možno jmenovat např. metodu převrstvujícího agaru, molekulární filtrace nebo MTT (Wang et al., 2010).

### 4.1 Viabilita

Neboli životaschopnost buněk *in vitro*, je rozhodující faktor v mnoha oblastech biomedicínského výzkumu a konečným faktorem ve vývoji léčiv díky schopnosti předvídat toxikologické účinky léčivých kandidátů *in vivo* na základě jejich profilu toxicity *in vitro* (Ramirez et al., 2010).

#### 4.1.1 MTT

Kalorimetrická metoda, osvědčená pro stanovení počtu životaschopných buněk v proliferaci a pro stanovení cytotoxických studií. Tato metoda je založena na štěpení žluté tetrazolium soli (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid), zkráceně označováno jako MTT, aby se vytvořil modro-fialový formazan, který je ve formě krystalů, což je produkt mitochondriálních enzymů (Sylvester, 2011). Tento produkt je následně uložen v cytoplazmě buněk a poté je přeměněn na rozpustnou formu, přičemž generuje modrou barvu (Wang et al., 2011). Množství vyrobeného formazanu je přímo úměrné počtu živých buněk během provedení MTT testu, jak lze vidět na obrázku 8 (Sylvester, 2011). Jinak řečeno, absorbance rozpuštěného formazanu v oblasti viditelného světla, při vlnové délce 570 nm koreluje s počtem živých buněk až do koncentrace  $10^6$  buněk na jamku (protokol MTT Vybrant, 2002).



Obrázek 8 – graf MTT – lineární závislost viability buněk  
a absorbance (protokol MTT Vybrant, 2002)

Pokud vzorek obsahoval cytotoxické sloučeniny, které jsou schopny poškodit nebo dokonce až zničit buňky, pak ve výsledku bude snížený počet modro-fialového formazanu ve srovnání s kontrolními vzorky (takové vzorky které obsahovaly čisté buňky bez cytotoxických sloučenin). V praxi však může být část formazanu ztracena při odstraňování supernatantu ze vzorků a to může mít vliv na výsledek testu (Wang, et al., 2010). Vzhledem k tomu, že tento test je rychlý, pohodlný a úsporný stala se tato technika velmi populární pro kvalifikaci životaschopných buněk v kultuře (Sylvester, 2011). MTT test se používá v mnoha výzkumech, například k výzkumu regeneraci degenerované meziobratlové ploténky kdy, elastické rosolovité jádro (pulposus nucleus) se vědci snaží osadit buňkami, fyziologickými funkcemi, které byly izolovány z jiných meziobratlových plotének (Ning et al., 2013). Dále byl test MTT použit pro zkoumání cytotoxicity nanočástic stříbra proti lidské rakovině prsu (Jeyaraj et al., 2013).

## 4.2 Apoptóza a nekróza

Z pohledu účinku materiálu na buňku je důležitý také mechanismus zániku buňky. Zánik buňky neboli buněčná smrt má dva základní mechanismy 1) programovaná smrt, které přísluší odborný název apoptóza a 2) náhodnou, či neprogramovanou, které přísluší přesný pojem nekróza (Nečas et al., 2000).

### 4.2.1 Apoptóza

Tento typ buněčné smrti je zánik buněk programovanou smrtí, která je charakteristická dobře definovaným sledem morfologických změn. Slovo apoptóza pochází z řeckého slova, které znamená vypadnout nebo pád (Lodish et al., 2013). Tento mechanismus umožňuje bezpečnou likvidaci buněk, v okamžiku kdy splnily svoji biologickou funkci (Linhart, 2012). Slouží nejen k udržení homeostázy organismu, ale také jako kontrolní mechanismus velikostí a tvarů tkání v různých vývojových stádiích, nebo ke zmenšování počtu specifických efektorových imunitních buněk po vymýcení patogenů (Chaabane et al., 2013). Buňka se při tomto typu smrti zmenší a postupně se všechny buněčné proteiny i ostatní složky buňky rozloží. V konečné fázi je pak buňka rychle fagocytována leukocyty (Linhart, 2012). Což znamená, že nenastanou škodlivé důsledky, jako při nekróze. Další výhodou je, že organické složky buněk mohou opětovně fungovat v jiných buňkách, které je přijmou. Apoptóza je životně důležitý proces během normálního vývoje a života organismů. Příkladem může být fakt, že při rozvoji obratlovců, například v nervovém systému až polovina nebo i více nervových buněk umírá brzy po jejich vzniku (Alberts, 2002).

U lidí může chybná regulace apoptózy vyvolat zánětlivé, maligní, autoimunitní a neurodegenerativní onemocnění (Afford a Randhawa, 2000). Správná regulace apoptózy totiž nevyvolává zánětlivé onemocnění, protože nevznikají antigenní látky. Pochopení mechanismů apoptózy se vyvinulo až v posledních desetiletích a dodnes zůstávají některé detaily procesu nepochopeny, protože celkový pohled na obraz makromolekulárních systémů zúčastňujících se apoptózy je poměrně složitý (White a Sullivan, 1998).

Intracelulární mechanismy apoptózy jsou závislé na rodině cysteinových proteáz, které v aktivním místě obsahují cystein. Tyto proteázy se nazývají Kaspázy. Kaspázy jsou syntetizovány v buňce jako neaktivní prekurzory (neboli prokaspázy), které jsou obvykle aktivovány štěpením asparágové kyseliny jinými kaspázami. Iniciační kaspázy jsou kaspá-

zy 2, 8, 9, 10, 11 a 12. Po aktivaci se kaspázy štěpí a tím aktivují další efektorové prokaspázy (především kaspázy 3, 6 a 7) což vede k zesilování proteolytické kaskády. Další aktivované kaspázy pak štěpí klíčové bílkoviny v buňce. Některé kaspázy štěpí například jaderné laminy, což je síťovitá vrstva proteinů přiléhající na vnitřní stěnu vnitřní jaderné membrány. To způsobuje nevratné zhroucení jaderné laminy. Další kaspázy štěpí protein, který zabraňuje aktivaci DNA degradujícímu proteinu (DNAzou). Rozštěpení tohoto proteinu aktivuje DNAzu a ta rozštěpí molekulu DNA v buněčném jádře (Alberts, 2002). Jako nejpodivnější vlastností mechanismu apoptózy začne „blebbing“. „Blebs“ jsou preapoptická tělíska, která obsahují malé téměř kulovité cytoplazmatické fragmenty zapouzdřené v buněčných membránách. Apoptická tělíska mohou obsahovat funkční organely uzavřené v neporušené plazmatické membráně. Fosfatidyserin a fosfolipidy jsou vystaveny na vnější straně apoptických tělísek, slouží jako signální molekuly pro makrofágy, aby byly následně fagocytovány (Chaabane et al., 2013).

#### 4.2.2 Nekróza

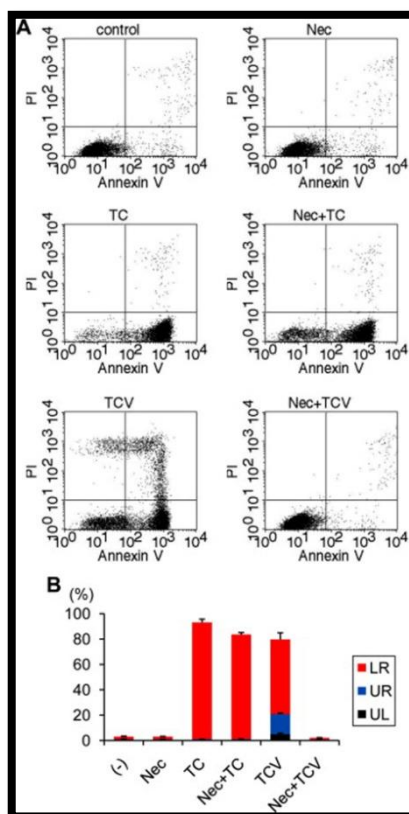
Druhý typ buněčné smrti je charakteristický neobtnáním buňky kdy následně dojde k popraskání buněčné membrány a obsah buňky je vylit do okolí (Linhart, 2012). V mnohobuněčném organismu vyvolá toto vylití buňky do mezibuněčného prostoru imunitní odpověď. Tato odpověď je způsobena vylitím složek cytosolu do okolí. Imunitní systém se snaží tyto složky, proteiny a poškozené membránové struktury z odumřelé buňky eliminovat svými chemickými zbraněmi a volnými radikály kyslíku což vyvolává zánětlivou reakci a ta vede k poškození okolních buněk, čímž se zánětlivý proces rozšiřuje (Linhart, 2012, Chaabane et al., 2013).

Tento mechanismus byl dlouho považován za náhodnou a nekontrolovatelnou formu buněčné smrti. V případě náhodné nekrózy jde hlavně o podněty chemické nebo je důsledkem poranění. Hromadící se důkazy ukazují, že nekrotická buněčná smrt může být i ovládatelná a programovatelná. To je zvláště časté, když pro to má buňka důvod, například při nízké koncentraci ATP není schopna zemřít apoptózou. Nekróza není zpravidla spojena s aktivací kaspázy, spíše může být výsledkem její inhibice. Tento typ programované buněčné smrti je výsledkem několika signálních kaskád (Chaabane et al., 2013).

### 4.2.3 Průtoková cytometrie

Neboli anglicky flow cytometry (FCM) využívá přístroje, který skenuje jednotlivé buňky. Buňky tečou podél budící části stroje v kapalném prostředí. Technologie je unikátní ve své schopnosti poskytovat rychlé, kvantitativní a multiparametrální analýzy jednotlivých živých nebo mrtvých buněk. Proto může být tato metoda použita k testování progresu buněčného cyklu, stejně jako při testování apoptických buněk a buněčných smrtí.

Testy na apoptózu jsou relativně přesné a reprodukovatelné, mohou být použity jako nové metody pro hodnocení biokompatibility materiálů doplňujících test MTT (Wang et al., 2010). Rozlišení mezi apoptickými a nekrotickými buňkami se provádí pomocí duálního barvení a to Annexinem V a propidium jodidem (PI). Na obrázku 9 vidíme různé grafy. Každý graf je rozdělen na 4 části, pomocí nichž rozlišujeme apoptické a nekrotické buňky. Apoptické jsou ty, které jsou na Annexin V pozitivní a na PI negativní, tzn. buňky v pravé dolní části grafu. Nekrotické buňky jsou i na PI pozitivní, tzn. pravá horní polovina grafu (Sawai et al., 2011).



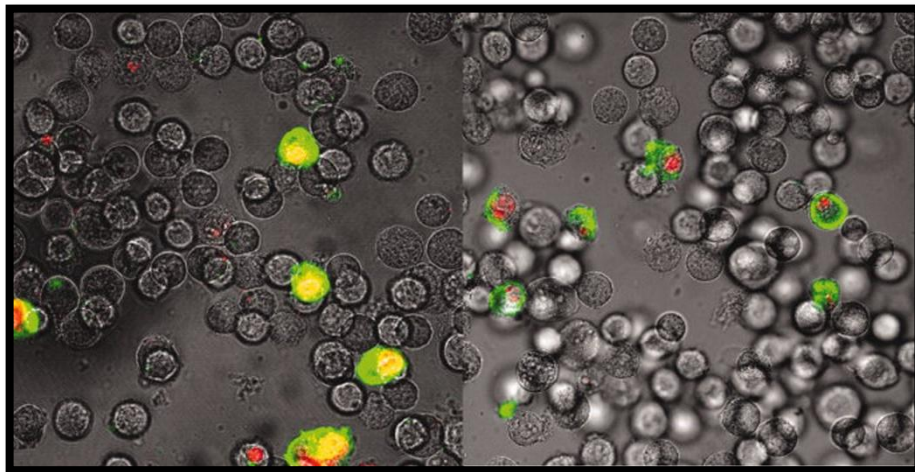
Obrázek 9 – ukázkové vyhodnocení průtokové cytometrie

(Sawai et al., 2011)



Annexin V-FITC detekční soustava na apoptózu se používá k posouzení vazby na Annexin V (Wang et al., 2010). Annexin V je 36-kDa vazebný protein, který má vysokou afinitu k fosfatidylserinu membránového fosfolipidu. Annexin V může být použit k detekci expozice extracelulárního fosfatidylserinu, k této expozici dochází při apoptóze. Proto byl Annexin V určen k detekci apoptických buněk *in vivo* a *in vitro* (Murakami, 2003). Pomocí Annexinu V jsou detekovány fosfatidylserinové zbytky, které byly transportovány do vnějších vrstev, projevují se jako zelené zbarvení.

PI se používá k identifikaci nekrotické buňky, protože Annexin V nerozlišuje mezi buňkou v apoptickém nebo v nekrotickém stavu. I u nekrotické buňky Annexin V detekuje fosfatidylserinové zbytky, ale na rozdíl od apoptické buňky jsou ještě vystaveny účinku PI, což je následně vidět na obrázku 10 jako červená skvrnitost po celém jádře. Nekrotické buňky se nám tedy jeví jako 2x pozitivně zbarvené a to jak Annexinem V - zeleně tak i PI – červeně (Wang et al., 2010)



Obrázek 10 – snímek z invertovaného fluorescenčního mikroskopu buněk v apoptickém i nekrotickém stádiu, zvětšení 200x (Wang et al., 2010)

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 MATERIÁL A METODIKA

### 5.1 Syntéza polyanilinové soli a báze

Polyanilin, jak sůl (PANI-S), tak i báze (PANI-B) byly syntetizovány na pracovišti Akademie věd, Ústavu makromolekulární chemie panem RNDr. Jaroslavem Stejskalem, dle IUPAC (Stejskal, Gilbert 2002). Na Univerzitu Tomáše Bati byly přepraveny, aby mohly být využity k dalšímu výzkumu.

### 5.2 Použité buněčné linie

V pokusu byly použity buňky lidských keratinocytů, označovány HaCaT (CLS - Cell Lines Service). Tyto buňky byly odebrané z lidského organismu, konkrétně z 62letého muže z jeho kůže, náročností biosafety level 1 (což znamená, že s buňkami se může pracovat bez jakéhokoliv omezení, neobsahují žádný patogen, který by mohl vyvolat onemocnění, a představují minimální potenciální riziko pro laboratorní pracovníky a životní prostředí). Tento typ buněčné kultury byl použit například při zkoumání vypnutí genu P12CDK2AP1, což je nádorový supresor, který negativně reguluje činnost cyklin-dependentní kinázy (CDK 2) a potlačuje replikaci DNA (Sun, 2012). Dále byly tyto buňky využity ve výzkumu přípravku Dithranol, který je jeden z nejúspěšnějších lokálních přípravků pro léčbu psoriázy (lupénky). Uplatňuje svůj terapeutický účinek indukci apoptózy keratinocytů (George et al., 2013).

### 5.3 Podmínky kultivace

Buňky byly kultivovány v inkubátoru Heracell 150i (ThermoScientific, USA). Pro tyto buňky je důležité, aby inkubátor udržoval následující parametry: koncentrace oxidu uhličitého (CO<sub>2</sub>) 5%, teplota 37,0 °C a stabilní vlhkost. K buňkám je přidáváno kultivační médium, Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM (PAA) s vyšším obsahem glukózy, které obsahuje anorganické soli s největším podílem chloridu sodného (6400 mg/l), aminokyseliny kde je nejvíce zastoupen L-lysin (146 mg/l), vitamíny a jiné komponenty. Do média se následně přidává 10% fetálního hovězího séra a 1% antibiotik, konkrétně penicilin a streptomycin.

## 5.4 Experimentální uspořádání

### 5.4.1 Extrakty polyanilinu

Extrakty byly připraveny dle ČSN ISO 10 993-5 „Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro*“ a současně podle ČSN ISO 10 993-12 „Příprava vzorků a referenčních materiálů“, smícháním práškové formy PANI\_S s kultivačním médiem pro použité buňky v koncentraci 0,2 g/ml kultivačního média. Obdobně byl připraven extrakt PANI\_B. Smíchané roztoky se nechaly 24 h míchat na třepačce, při teplotě 37°C. Následovala centrifugace a odsátý supernatant (extrakt) se přidával k buňkám. U extraktů byly stanoveny hodnoty pH. V případě polyanilinové báze byly hodnoty pH neutrální, přesněji bylo naměřeno pH = 6,934. Zatímco v případě polyanilinové soli byly silně kyselé, naměřená hodnota byla pH = 1,337. Z tohoto důvodu jsme provedli zdvojený test extraktů polyanilinové soli a to za původního pH a po pufraci pomocí  $\text{NaHCO}_3^-$ , přičemž jsme pufovali na hodnotu pH = 7.

### 5.4.2 Prekultivace buněk

Před započítáním vlastního testu bylo nutné provést prekultivaci buněk po dobu 24 hodin. Prekultivace se prováděla následujícím způsobem 1) dokonalé odsátí kultivačního média, 2) krátké opláchnutí PBS (0,2 ml/cm<sup>2</sup>), které dokonale odstraní všechny stopy média (obsahuje  $\text{Ca}^{2+}$  ionty, které inhibují trypsin) a následné odsátí, 3) přidání trypsinu (0,1 ml/cm<sup>2</sup>), který se nechal působit v inkubátoru Heracell. Působení Trypsinu bylo do oddělení buněk, nejdéle však 20 minut. Oddělování buněk bylo průběžně kontrolováno Invertovaným mikroskopem s fázovým posunem (Olympus CKX 41, Japan). Po zhodnocení, že buňky byly dokonale oddělené od povrchu kultivační nádoby, bylo do této nádoby přidáno stejné množství vhodného média, jako bylo množství přidaného Trypsinu. Následně byly buňky odpipetovány do nádoby vhodné k centrifugaci. Centrifugace se prováděla na centrifuze Ependorf 5702 R (Ependorf, Německo), parametry byly navoleny: doba 3 minuty, teplota 37°C a rychlost  $1,1 \cdot 10^3$  rpm. Po uplynutí potřebné doby byly buňky koncentrovány na spodní části, a proto se jednoduše odsálo médium a buňky se naředily na potřebnou koncentraci  $1 \cdot 10^5$  buněk/ml.

Připravené buňky byly rozpipetovány do 96-jamkové destičky (do každé jamky se pipetovalo 100μl). Celkem byly připraveny 3 destičky. 1. destička byla připravena pro PANI\_S, do levé části byl přidán neupravený extrakt a do pravé části byl přidán upravený

extrakt (upravila se hodnota pH na neutrální). 2. destička byla připravena pro PANI\_S, která byla obdobně rozdělena na pravou a levou část. 3. destička obsahovala kontrolu, což znamená samotné buňky bez žádného přídatku extraktu, pouze s čistým médiem. Připravené pláty se nechaly 24 hodin kultivovat v inkubátoru.

#### 5.4.3 Přidání extraktů

Následující den (po prekultivaci) byly extrakty přidány k předem připraveným destičkám s buňkami. Přidání extraktů bylo provedeno 1) odsátím média z 96 jamkového destičky, 2) přidání zvolených koncentrací extraktů k buňkám: 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 1%. 100% koncentrace znamená přidání 100 $\mu$ l k buňkám bez přídatku čistého média, snížení koncentrace extraktu znamená postupné zvětšování přídatku čistého média, například 50% koncentrace se skládá z 50 $\mu$ l extraktu a 50 $\mu$ l čistého média. Buňky s přidávanými extrakty se opět nechaly 24 hodin kultivovat v inkubátoru.

#### 5.4.4 MTT

Po 24 hodinové kultivaci se buňkám v destičkách vyměnilo médium a bylo přidáno MTT v koncentraci 0,5mg/ml média. V další fázi se MTT nechalo 4 hodiny působit v inkubátoru. Po uplynuté době se odpipetovalo 40 $\mu$ l, zbytek média se odsál a odpipetované množství se vrátilo zpět do jamky. Tento krok se prováděl proto, aby se nám zmenšilo množství tekutiny v jamce a abychom do jamky mohli přidat 80 $\mu$ l DMSO (dimetylsulfoxid), který se nechal 15 minut působit. Jako poslední fáze byla měření absorbance na Mikrotitiračním měřiči absorbance Sunrise (Tecan, Švýcarsko) při vlnové délce 570 nm.

#### 5.4.5 Průtoková cytometrie

Pro stanovení apoptózy a nekrózy byli keratinocyty 24 hodin předkultivované v 96-jamkových destičkách s výchozí koncentrací  $1 \times 10^5$  buněk /ml média. Následně byli k buňkám přidány extrakty polyanilinové báze a soli. Extrakty na buňky působily dalších 24 hodin. Jako kontrolní měření byly použity buňky kultivované v čistém médiu bez extraktů. Apoptické buňky byly vyhodnocované pomocí průtokové cytometrie, která umožňuje analýzu fyzikálně-chemických vlastností buněk během průchodu laserem. Měření probíhalo na přístroji BD FACSCanto II (BD Biosciences) s HTS (High Throughput Sampler), který umožňuje analýzu přímo z 96-jamkových destiček. Na analýzu a zpracování výsledků byl použit software BD FACSDiva. K rozlišení živých, apoptických a nekrotických buněk bylo použito fluorescenční barvivo propidium jodid (roztok o koncentraci

ci 50  $\mu\text{g/ml}$  v PBS), který interaguje s DNA, v kombinaci s proteinem annexin V konjugovaným s FITC (fluorescein isothiokyanát) interagující s fosfatidylserinem. Rychlost průtoku vzorku byla nastavená na 30  $\mu\text{l/sec}$ , objem analyzovaného vzorku byl 100  $\mu\text{l}$ , konečná koncentrace propidium jodidu 10  $\mu\text{g/ml}$  a Annexin V-FITC 5  $\mu\text{g/ml}$ . V důsledku časové náročnosti a problémech při kultivaci buněčných linií se nestihla dokonale zoptimalizovat metoda na stanovení apoptózy a nekrózy eukaryotických buněk. Z toho důvodu v práci nejsou uvedené konečné výsledky testu apoptózy a nekrózy. Na dosavadní výsledky bude navazovat další práce, která tuto metodiku optimalizuje.

## 6 VÝSLEDKY

### 6.1 pH polyanilinových extraktů soli

Jak bylo uvedeno v metodice, po extrakci polyanilinových prášků v kultivačním médiu, byla stanovena hodnota pH. Vzhledem k tomu že pH polyanilinové soli bylo silně kyselé, bylo nutné provést test na vzorcích s upraveným pH, tak aby mohl být vyloučen vliv pH na cytotoxicitu a tím stanoven pouze vliv látek obsažených v extraktu. pH 100% extraktu polyanilinové soli bylo 1,377; pH 50% extraktu pak 2,427. Proto jsme se rozhodli provést zdvojený test a to použitím původního pH a upraveného pH. Pufrace byla provedena pomocí  $\text{NaHCO}_3^-$  a pufrovalo se přibližně do hodnoty neutrálního pH, tedy do hodnoty  $7 \pm 0,2$ . S ohledem na schopnost buněk přizpůsobit se určitému rozmezí pH nebyla pufrace dělána na přesnou hodnotu. V případě polyanilinové báze byly hodnoty pH extraktu neutrální, proto žádná úprava pH nebyla nutná.

### 6.2 Cytotoxicita stanovená pomocí MTT testu

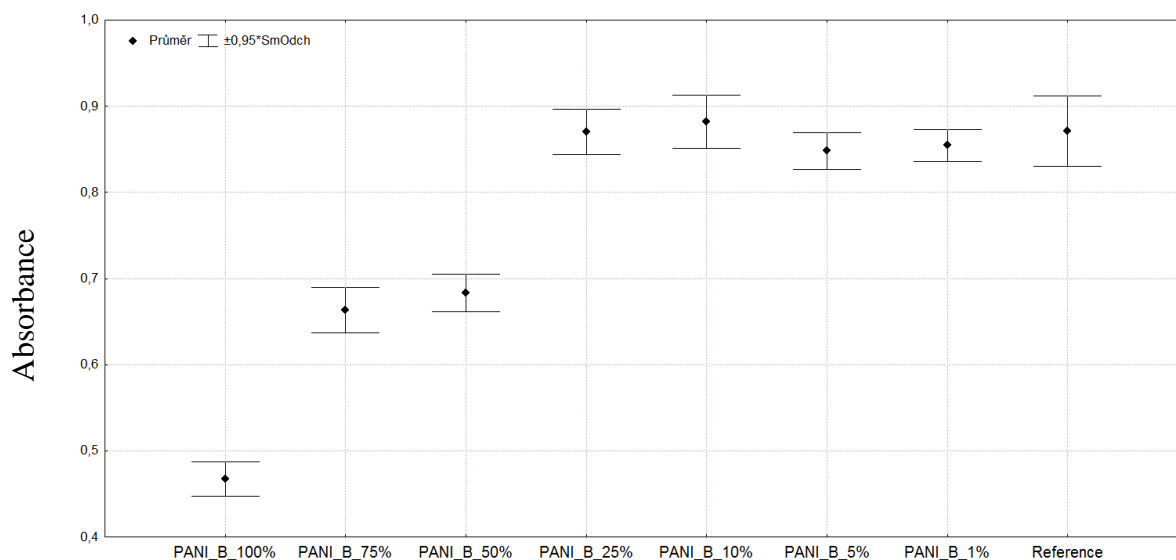
Cytotoxicita je jeden z klíčových parametrů biokompatibility. Vyhodnocuje se pomocí normy ČSN ISO 10 993, konkrétně podle části 5, kde norma popisuje postup zkoušek ke stanovení cytotoxicity *in vitro*. V této práci jsme stanovovali cytotoxicitu pomocí MTT testu celkem 3 odlišných polyanilinových extraktů. Konkrétně extrakty polyanilinové báze, polyanilinové soli s původním pH a polyanilinové soli s upraveným pH.

#### 6.2.1 Cytotoxicita polyanilinové báze

Na obrázku 11 je zobrazen graf, který obsahuje vyhodnocení testu MTT pro polyanilinovou bázi. Výsledky jsou uvedeny v hodnotách absorbance jednotlivých koncentrací extraktu báze oproti referenci. Hodnota absorbance nám udává, kolik buněk bylo životaschopných, protože absorbance formazanu v oblasti viditelného světla koreluje s množstvím živých buněk (protokol MTT Vybrant, 2002). Reference obsahuje pouze čisté buňky, bez přídavku extraktu a udává nám kontrolní výsledek, přirozený růst buněk. V grafu jsou uvedeny průměrné výsledky ze 4 opakování a jejich směrodatné odchylky na hladině významnosti 95%.

Z grafu je zcela patrné, že 100% extrakt polyanilinové báze výrazně snižoval viabilitu buněk. Stejně tak tomu bylo i u koncentrací extraktů 75% a 50% ačkoliv již ne tak výrazně. Od hodnoty 25% až do 1% sledujeme razantní zvýšení viability buněk, což nám

indikuje, že extrakt polyanilinové báze již není tak cytotoxická jako ve vyšších koncentracích. Tyto výsledky jsou pak detailněji rozebrány pomocí hodnot uvedených v tabulce 1. Z grafu je tedy patrná jednoznačná tendence snižující se viability buněk v závislosti na zvyšující se koncentraci extraktů polyanilinové báze.



Obrázek 11 – graf vyhodnocení testu MTT pro PANI-B

Tabulka 1 – Viabilita buněk v přítomnosti extraktu PANI-B

Vzorek	Průměr ± SD	p	%
PANI_B 100%	0,4673 ± 0,0206	0,0000	53,6
PANI_B 75%	0,6636 ± 0,0278	0,0000	76,2
PANI_B 50%	0,6831 ± 0,0228	0,0000	78,4
PANI_B 25%	0,8704 ± 0,0276	0,9780	99,9
PANI_B 10%	0,8822 ± 0,0326	0,6745	101,3
PANI_B 5%	0,8481 ± 0,0224	0,3137	97,4
PANI_B 1%	0,8545 ± 0,0194	0,4629	98,1
Reference	0,8711 ± 0,0427		100

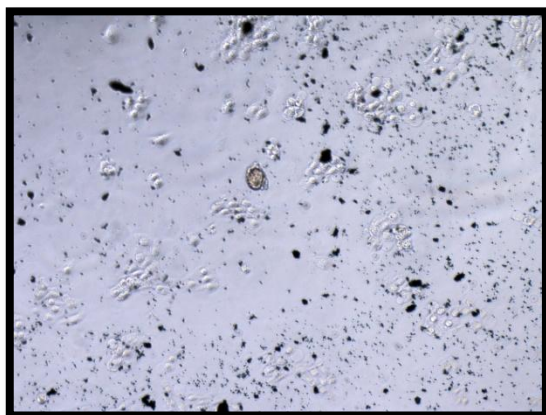
Poznámka: p vyjadřuje hladinu významnosti při porovnání s referencí – hodnoty pod  $p < 0,05$  jsou statisticky rozdílné oproti referenci. % vyjadřují procentuální pokles buněčné viability ve srovnání s referencí přičemž: hodnota rovna 100 znamená 100% přežitelnost buněk;  $>80$  vyjadřuje necytotoxický efekt; 60–80 slabá cytotoxicita; 40–60 střední cytotoxicita,  $<40$  silná cytotoxicita.



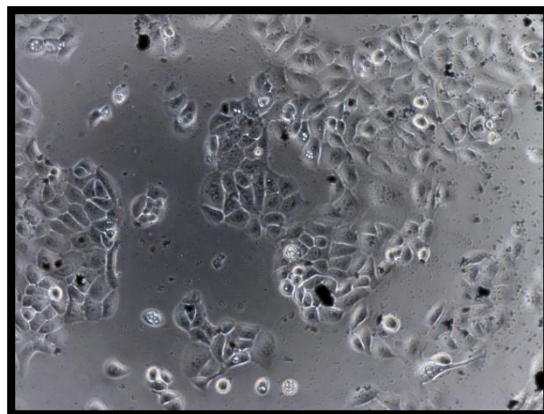
V tabulce č. 1 jsou uvedeny výsledky testu cytotoxicity polyanilinové báze. Výsledky jsou interpretovány jednak pomocí T-testu, který pojednává o průkazných rozdílech ve viabilitě buněk v přítomnosti polyanilinové báze a jednak pomocí vyhodnocení v souladu s ISO normou. Pokud je parametr  $p$  nižší než 0,05 je statisticky průkazné, že daná koncentrace extraktu snižuje viabilitu buněk ve srovnání s referencí.

Konkrétně můžeme konstatovat, že 100% extrakt polyanilinové báze statisticky průkazně snižuje viabilitu buněk. Z procentuálního parametru se dozvídáme, že 100% extrakt je středně cytotoxický. V tabulce je dále vidět, že i další koncentrace extraktu (75% a 50%) statisticky průkazně snižují viabilitu buněk. Podle procentuálního parametru jsou koncentrace 75 a 50% slabě cytotoxické. Nižší koncentrace extraktu (25, 10, 5 a 1%) PANI-B pak viabilitu buněk statisticky nesnižují. Tomu odpovídá i procentuální vyjádření, které odpovídá necytotoxickému efektu.

A



B

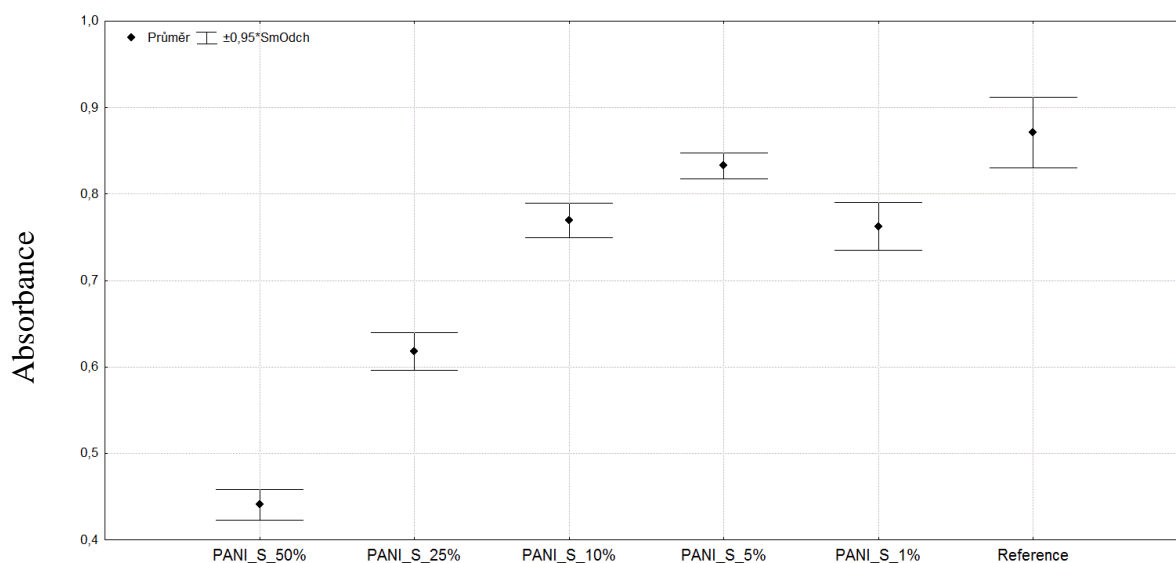


Obrázek 12 – Fotografie buněk kultivovaných v A) 100% koncentraci PANI-B; B) 25% koncentraci PANI-B (zvětšení 100x)

Na obrázku 12A lze prokázat, že polyanilinová báze ve 100% koncentraci je opravdu cytotoxická. Je zde jednoznačně vidět rozdíl v koncentraci buněk oproti obrázku 12B, kde je vyobrazena 25% koncentrace, která jak jsme si již dokázali (viz tabulka 1) není cytotoxická. Z obrázků je dále patrná přítomnost zbytků polyanilinu, i přes důkladnou centrifugaci. Buňky na obrázku 12A mají také pozměněnou morfologii což odpovídá výraznému vlivu extraktu na jejich fyziologii.

## 6.2.2 Cytotoxicita polyanilinové soli

Na obrázku 13 je zobrazen graf, který popisuje výsledky testu MTT pro extrakt polyanilinové soli s původním  $\text{pH} = 1,337$ . V grafu jsou uvedeny hodnoty absorbance jednotlivých koncentrací extraktů včetně reference. Výsledky jsou uvedeny v průměrných hodnotách ze 4 opakování a jejich směrodatné odchylky s hladinou významnosti 95%. Vzhledem k nedostatku vzorku pro přípravu extraktů jsme se rozhodli pracovat pouze s 50% a nižší koncentrací extraktů. S ohledem na fakt, že i koncentrace 50% vykazuje vysokou cytotoxicitu, se dá předpokládat, že i 100% extrakt by byl cytotoxický. Z grafu je zřejmý postupný růst viability buněk se snižující se koncentrací extraktu. Ve srovnání s polyanilinovou bází je ještě 25% koncentrace cytotoxická, zatímco u báze byla již netoxická (viz tabulka 1). Právě tento fakt může být způsoben nízkým  $\text{pH}$  a proto jsme v další části práce  $\text{pH}$  upravovali, abychom si potvrdili, zda je polyanilinová sůl více cytotoxická nebo zda za tento fakt může jen výše zmíněné  $\text{pH}$ . Dále je možno pozorovat, že 5% koncentrace již není toxická. Naopak u 1% koncentrace se zdá být snížena viabilita buněk než u 5% koncentrace což může být způsobeno chybou měření.



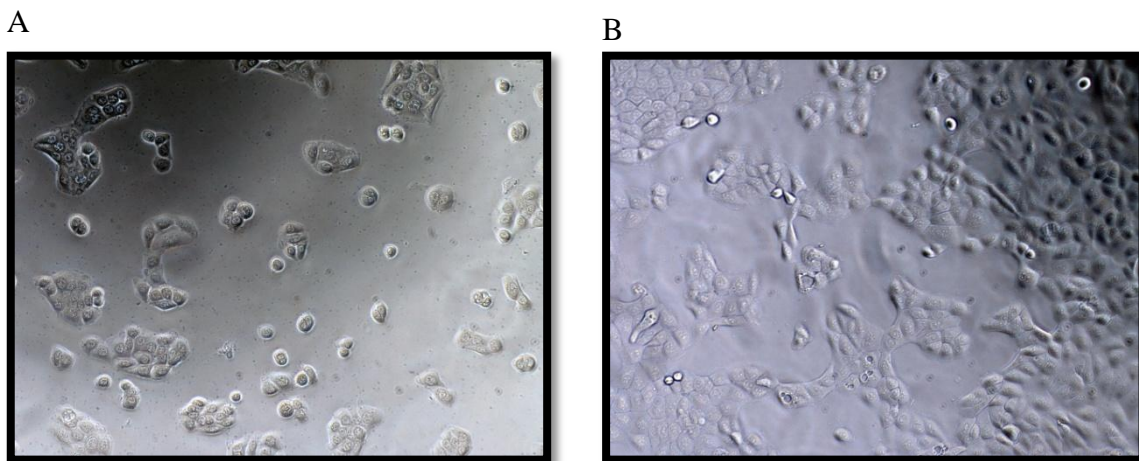
Obrázek 13 – graf vyhodnocení testu MTT pro PANI-S s původním  $\text{pH}$

Tabulka 2 – Viabilita buněk v přítomnosti extraktu PANI-S s původním pH

Vzorek	Průměr ± SD	p	%
PANI_S 50%	0,4407 ±0,0185	0,0000	50,6
PANI_S 25%	0,6180 ±0,0227	0,0000	71,0
PANI_S 10%	0,7695 ±0,0213	0,0008	88,3
PANI_S 5%	0,8327 ±0,0160	0,1476	95,6
PANI_S 1%	0,7624 ±0,0289	0,0001	87,5
Reference	0,8711 ± 0,0427		100

Poznámka: p vyjadřuje hladinu významnosti při porovnání s referencí – hodnoty pod  $p < 0,05$  jsou statisticky rozdílné oproti referenci. % vyjadřují procentuální pokles buněčné viability ve srovnání s referencí přičemž: hodnota rovna 100 znamená 100% přežitelnost buněk;  $>80$  vyjadřuje necytotoxický efekt; 60–80 slabá cytotoxicita; 40–60 střední cytotoxicita,  $<40$  silná cytotoxicita.

V tabulce č. 2 jsou zobrazeny výsledky T-testu, který pojednává o viabilitě buněk v přítomnosti extraktu polyanilinové soli s neupraveným pH. Obdobně jako u tabulky č. 1 jsou uvedeny průměrné hodnoty ze 4 opakování a jejich směrodatné odchylky. Dále je uveden procentuální pokles viability ve srovnání s referencí. Můžeme si zde potvrdit závěry z obrázku 7, že 50% koncentrace extraktu polyanilinové soli vykazuje střední cytotoxicitu. 25% koncentrace extraktu již není tak cytotoxická. Podle tabulky odečteme, že je pouze slabě cytotoxická. Jak jsme se podle grafu domnívali, že 1% koncentrace bude vykazovat cytotoxicitu tak podle procentuálního parametru uvedeného v tabulce lze tvrdit, že cytotoxická není. Podle parametru p, ale statisticky průkazně snižuje schopnost viability buněk.

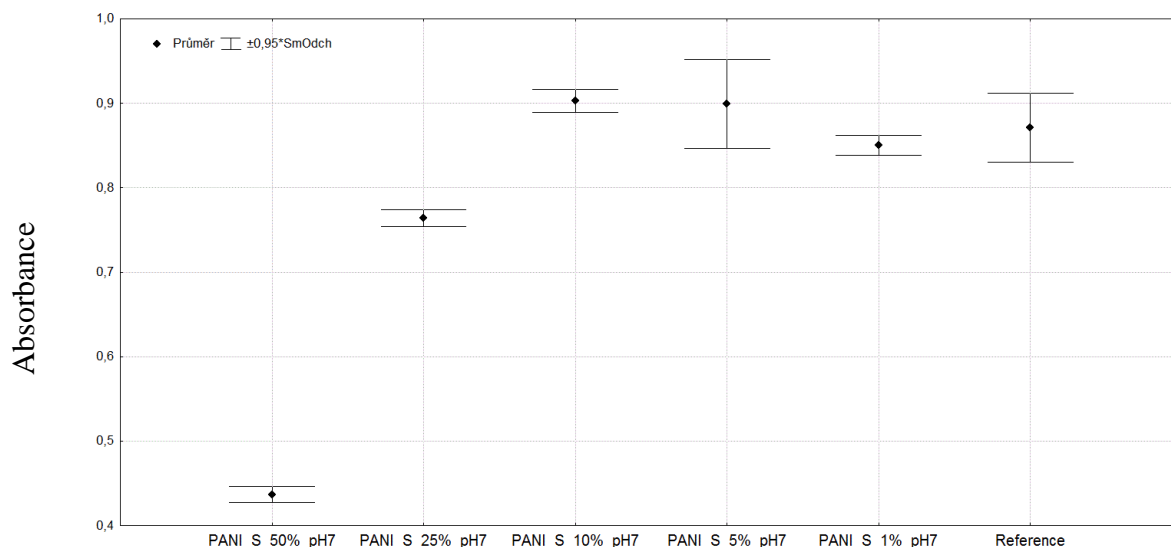


Obrázek 14 – Fotografie buněk kultivovaných v A) 50% koncentraci PANI-S s původním pH; B) 5% koncentraci PANI-S s původním pH (zvětšení 100x)

Na obrázku 14A a 14B jsou snímky polyanilinové soli s neupraveným pH v koncentraci 50% a 5%. Je zde opět pozorovatelný rozdíl v buněčné koncentraci i morfologii buněk. Na snímku 14A jsou vidět jen malé shluky buněk, ale na snímku 14B již vidíme velké shluky buněk. Buňky vykazovaly dobrou proliferaci, polyanilin na ně neměl nežádoucí účinky. Tyto závěry potvrzují výsledky MTT testu mírou absorbance na grafu i vyhodnocení v tabulce.

### 6.2.3 Cytotoxicita polyanilinové soli s upraveným pH

Na obrázku 15 je vyobrazen graf, který zobrazuje výsledky MTT testu. Vyhodnoceno bylo působení extraktu polyanilinové soli s upraveným neutrálním pH na viabilitu buněk. Opět jsou zde zachyceny hodnoty absorbance jednotlivých koncentrací ve srovnání s referencí. Výsledky jsou uvedeny v průměrných hodnotách ze 4 opakování s jejich směrodatnými odchylkami s hladinou významnosti 95%. Jako v předchozím případě, u polyanilinové soli s neupraveným pH, byly koncentrace zvoleny od 50%. Z grafu lze opět vyčíst, že nejvyšší koncentrace je stále cytotoxická i po úpravě pH. Přece jen měla úprava pH jistý vliv na 25% koncentraci, i když ne úplný. Proto lze říct, že velmi kyselé pH se podílí na cytotoxicitě polyanilinové soli. Nižší koncentrace se již zdají být necytotoxické, s určitostí nám to potvrzuje výsledek T-testu zobrazen v následující tabulce č. 3.



Obrázek 15 – graf vyhodnocení testu MTT pro PANI-S s upraveným pH

Tabulka 3 – Viabilita buněk v přítomnosti extraktu PANI-S s upraveným pH = 7

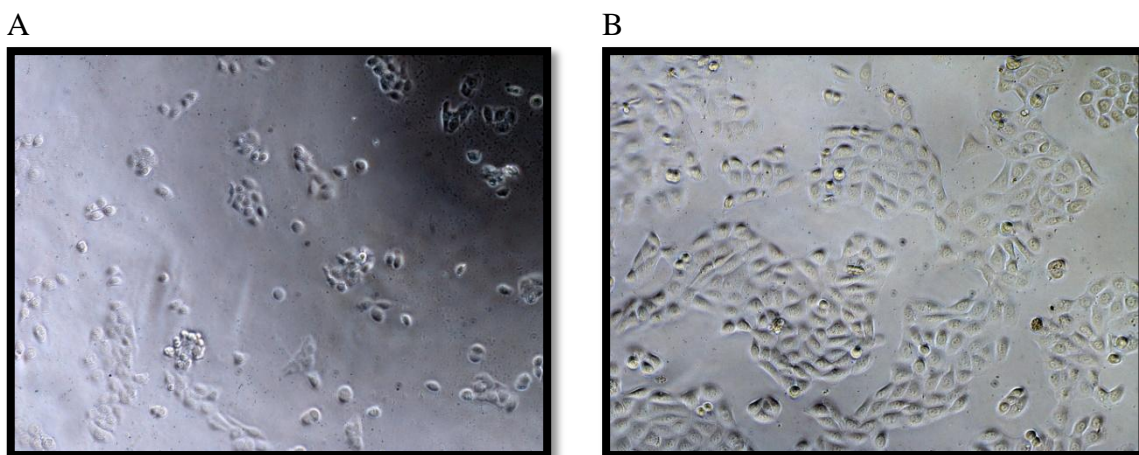
Vzorek	Průměr ± SD	p	%
PANI_S 50%	0,4368 ± 0,0098	0,0000	50,1
PANI_S 25%	0,7640 ± 0,0104	0,0028	87,7
PANI_S 10%	0,9031 ± 0,0143	0,1609	103,7
PANI_S 5%	0,8997 ± 0,0554	0,3895	103,3
PANI_S 1%	0,8506 ± 0,0124	0,4285	97,6
Reference	0,8711 ± 0,042		100

Poznámka: p vyjadřuje hladinu významnosti při porovnání s referencí – hodnoty pod  $p < 0,05$  jsou statisticky rozdílné oproti referenci. % vyjadřují procentuální pokles buněčné viability ve srovnání s referencí přičemž: hodnota rovna 100 znamená 100% přežitelnost buněk;  $>80$  vyjadřuje necytotoxický efekt; 60–80 slabá cytotoxicita; 40–60 střední cytotoxicita,  $<40$  silná cytotoxicita.

V tabulce č. 3 jsou uvedeny výsledky T-testu, který pojednává o viabilitě buněk v přítomnosti polyanilinové soli s upraveným pH na neutrální hodnotu. Obdobně jako v případě tabulky č. 1 a tabulky č. 2 jsou uvedeny průměrné hodnoty se směrodatnými odchylkami, parametr p a procentuální vyjádření podle normy ČSN ISO 10 993.

Podle tabulky můžeme konstatovat, že 50% koncentrace je středně cytotoxická. 25% koncentrace již nevykazuje cytotoxický účinek, ale stále statisticky průkazně snižuje viabilitu buněk. U nižších koncentrací již není možné statisticky prokázat, že by snižovaly

viabilitu buněk. V další části práce jsme se zabývali porovnáním vyšších koncentrací extraktů polyanilinové soli s upraveným a neupraveným pH.



Obrázek 16 – fotografie buněk kultivovaných v A) 50% koncentraci PANI-S s upraveným pH; B) 10% koncentraci PANI-S s upraveným pH

Na obrázku 16A je zobrazen snímek 50% koncentrace polyanilinové soli s upraveným pH a opět lze pozorovat sníženou viabilitu buněk a změnu morfologie buněk oproti obrázku 16B na kterém je snímek 10% koncentrace polyanilinové soli s upraveným pH. Je možné pozorovat i rozdílné schopnosti proliferace v různých koncentracích což odpovídá viabilitě buněk.

#### 6.2.4 Srovnání cytotoxicity různých forem polyanilinu

Podle výše uvedených výsledků můžeme konstatovat, že extrakt polyanilinové báze je méně cytotoxická než extrakt polyanilinové soli. Fakt může být způsoben odlišným pH obou typů polyanilinu, ale i přítomností vodivosti u polyanilinové soli.

Dále jsme srovnávali pH upravených a neupravených extraktů polyanilinové soli, přičemž pH neupravených vzorků bylo stanoveno u původního extraktu, který byl následně ředěn pro získání příslušných testovaných koncentrací. S ohledem na malé objemy extraktů nebylo možné u nižších koncentrací stanovit pH, dá se však předpokládat, že u nižších koncentrací byl vliv pH minimalizován. Výsledky porovnání jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4 – porovnání PANI-S neupravené pH s PANI-S upravené pH

Vzorek	Původí pH Průměr ± SD	Upravené pH Průměr ± SD	p
PANI_S 50%	0,4407 ± 0,0185	0,4368 ± 0,0098	0,7195
PANI_S 25%	0,6180 ± 0,0227	0,7640 ± 0,0104	0,0012
PANI_S 10%	0,7695 ± 0,0213	0,9031 ± 0,0143	0,0002

Poznámka: p vyjadřuje hladinu významnosti při porovnání vzorků s původním a upraveným pH

V tabulce vidíme průměry jednotlivých koncentrací extraktů a jejich směrodatné odchylky a parametr p. Podle tohoto parametru můžeme posuzovat, že statisticky průkazný rozdíl není zřejmý u 50% koncentrace extraktů, ale u nižších koncentrací podle tabulky zřejmý je. Interpretace tohoto výsledku je obtížná. K úplnému pochopení bude nutné provést další testy zaměřené na molekulární biologické parametry buněk.

### 6.3 Cytotoxicita stanovená pomocí průtokové cytometrie

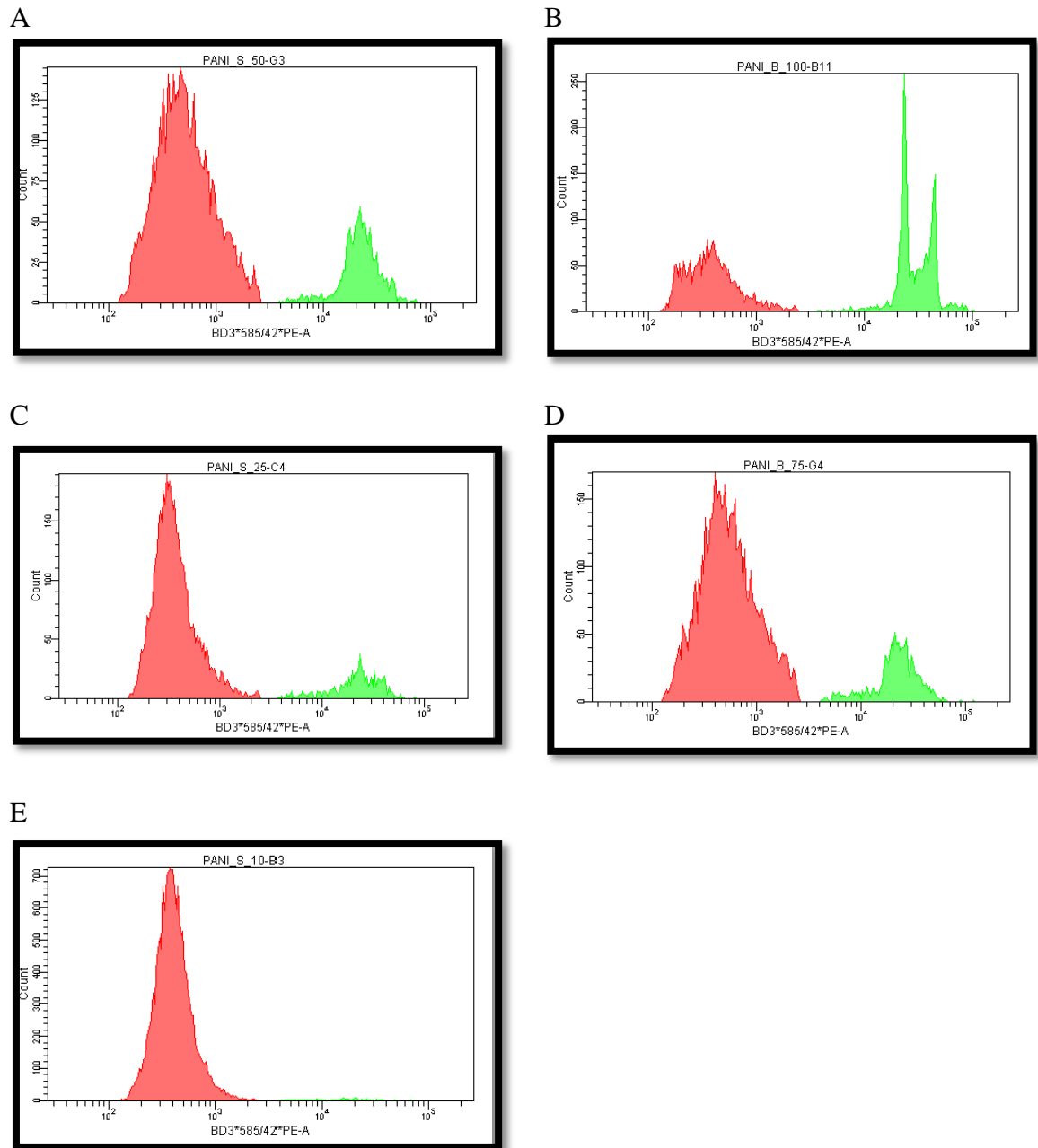
Stanovení buněčné viability pomocí průtokové cytometrie je progresivní metoda umožňující rozlišení řady buněčných parametrů. Jedním z cílů této práce bylo pokusit se ustanovit metodiku pro určení buněčné viability u vzorků polyanilinu. S ohledem na časové možnosti, náročnost práce s průtokovým cytometrem a problémy s kultivací buněk v laboratoři nebylo možné plně ukončit tuto část práce. Níže uvádíme pouze ilustrativní výsledky dosavadní práce, přičemž předpokládáme pokračování v rámci diplomové práce. Výsledky naznačují, že využití průtokové cytometrie pro stanovení viability po působení polyanilinových extraktů může přinést celou řadu zajímavých poznatků.

Rozlišení apoptózy a nekrózy se provádí dvojitém barvením a to fluorescenčním Annexinem V a PI. Populace buněk, která je na Annexin V pozitivní a PI negativní jsou považovány za apoptické. Naopak buňky, které jsou i na PI pozitivní, jsou považovány za nekrotické (Sawai et al., 2011).

V předložené práci byla průtoková cytometrie použita na stanovení viability buněk a rozlišení živých, apoptických a nekrotických buněk po kultivaci buněk s extrakty polyanilinové soli a báze. Vzhledem k nepředvídatelným problémům jsou v práci uvedeny jen neúplné výsledky z průtokové cytometrie. Na obrázku 17 jsou vyobrazené výsledky průtokové cytometrie, grafy 17B a 17D zobrazují buňky kultivované v přítomnosti 75% a 100%

koncentrace extraktu polyanilinové báze a grafy 17A, 17C a 17E buňky na které působily 50%, 25% a 10% extrakty polyanilinové soli. Z grafů „B 100 a 75“ je patrné, že po působení 100% koncentrace extraktu polyanilinové báze je o mnoho vyšší zastoupení mrtvých buněk (tzn. buňky na propidium pozitivní) jako po působení 75% koncentrace extraktu, při kterém počet mrtvých buněk výrazně klesnul a počet živých buněk (tzn. buňky na propidium negativní) naopak výrazně narostl. Obdobnou situaci je možné pozorovat na grafech „S 10, 25 a 50“, kde počet mrtvých buněk výrazně stoupá se zvyšující se koncentrací extraktu polyanilinové soli. Zatím co při použití 10% koncentrace extraktu polyanilinové soli není skoro žádná populace mrtvých buněk (graf S10), což odpovídá stanovení pomocí MTT testu, kde tato použitá koncentrace extraktu nevykazovala cytotoxický efekt (dosahovala 88,3% viability), při vyšších koncentracích se populace pozitivních buněk zvyšuje. Extrakt polyanilinové soli o koncentraci 25% dosahoval při použití MTT testu slabou a 50% extrakt střední cytotoxicitu čemu odpovídá narůstající podíl mrtvých buněk stejných koncentrací extraktů po vyhodnocení pomocí průtokové cytometrie (graf S 25 a 50).





Obrázek 17 – částečné výsledky kultivovaných buněk pomocí průtokové cytometrie v A) 50% extraktu PANI\_S; B) 100% extraktu PANI\_B; C) 25% extraktu PANI\_S; D) 75% extraktu PANI\_B; E) 10% extraktu PANI\_S

## 7 DISKUZE

Objektem této práce byl polyanilin, což je vodivý polymer, který je zkoumán již mnoho let, a stále se o něm nemáme dostatečné informace. Vodivé polymery představují slibnou skupinu materiálů, ať už v technickém využití například v oblasti senzorů (Airoudj et al., 2009), antikorozních nátěrů (Kalendová et al., 2008) nebo v oblasti výroby palivových článků (Wang et al., 2009). Polyanilin je zkoumán také z hlediska použití v biomedicínských aplikacích jako například součást nanovláken, která mohou být použita pro tkáňové inženýrství (Jeong et al., 2008). Dále je polyanilin zkoumán jako součást nanočástic například jako nanodiamant-polyanilin kompozit, by mohl být využit jako nosič léčiv (Villalba et al., 2012). V neposlední řadě je zkoumán v oblasti regenerace srdeční či nervové tkáně (McKeon et al., 2010). Jak je patrné, bylo již provedeno mnoho studií, nicméně cytotoxicitou, či obecně biokompatibilitou polyanilinu se dosud zabývalo jen několik z nich.

V této práci jsme cytotoxicitu polyanilinu zkoumali pomocí metod definovaných v ČSN EN ISO 10 993 konkrétně podle části 5, vzorky byly připravovány podle části 12. Samotné testování bylo provedeno 2 metodami a to pomocí MTT testu a průtokové cytometrie. MTT test je kalorimetrická metoda založená na absorbanci formazanu v oblasti viditelného záření, konkrétně při vlnové délce 570 nm (protokol MTT Vybrant, 2002). Absorbance je přímo úměrná počtu živých buněk ve vzorku. Průtoková cytometrie využívá přístroje, který skenuje buňku po buňce v kapalném prostředí. K analýze využívá detektor se sadou laserů. Průtoková cytometrie je multiparalelní metoda, kterou lze například rozlišovat apoptické a nekrotické buňky ve vzorku (Wang et al., 2010). V našem případě byly použity dva fluorochromy Annexin V-FITC a PI. Buňky, které se v grafu zobrazují v pravé dolní části, jsou pozitivní na Annexin a označují se za apoptické. Buňky, které jsou v pravé horní části, jsou pozitivní na Annexin i na PI a jsou označovány za nekrotické (Sawai et al., 2011).

Výsledky naší práce jsme porovnávali s jedinými výsledky testu cytotoxicity na polyanilinu, které provedli v práci publikované v *Synthetic metals* v roce 2012 „*Biocompatibility of polyaniline*“ P. Humpolíček, V. Kašpárková, P. Sába a J. Stejskal. Tyto výsledky byly provedeny na 2 buněčných liniích, z nichž jedna použitá buněčná linie byla stejná jako v našem případě. Z výsledků publikovaných v této práci vyplývá, že extrakt polyanili-

nové soli je cytotoxický až do 10% koncentrace včetně. A extrakt polyanilinové báze je cytotoxický pouze do 50% koncentrace včetně.

Výsledky testu cytotoxicity extraktu polyanilinové báze v naší práci vykazují podobné výsledky, hlavním společným rysem je fakt, že již 25% koncentrace extraktu polyanilinové báze není cytotoxická. Obdobně jako ve výše zmíněném článku se i náš výsledek testu cytotoxicity extraktu polyanilinové soli jevil do 10% koncentrace včetně cytotoxický. Problém nastal v 1% koncentraci, která by měla být podle článku necytotoxická. Jak jsme už konstatovali, došlo nejspíše k chybě měření. Vzhledem k tomu, že se autoři článku nezabývali studováním cytotoxicity extraktu polyanilinové soli s upraveným pH, nemáme možnost tento test porovnat.

Výsledky z průtokové cytometrie nejsou úplně vzhledem k časovému nedostatku, náročnosti práce s cytometrem a nepředvídaných problémů s kultivací buněk v laboratoři. I tak jsme prezentovali aspoň částečné výsledky a to na stanovení viability buněk. Výsledky apopózy a nekrózy v práci nejsou prezentovány v plném rozsahu. Optimalizace metody bude nadále probíhat v rámci diplomové práce. Vzhledem k tomu, že předběžné výsledky průtokové cytometrie ukazují zajímavá zjištění, může další rozvoj této metody přinést celou řadu zajímavých poznatků.

## ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zjistit cytotoxicitu extraktů 2 forem polyanilinu a to konkrétně polyanilinové soli a polyanilinové báze abychom prokázali nebo vyvrátili jejich cytotoxické účinky, která jsou podle normy ČSN ISO 10 993 – 5 velmi důležitým kritériem pro použití polyanilinu jako biomateriálu. I když je polyanilin zkoumán již řadu let jako velmi slibný vodivý polymer tak stále o jeho cytotoxických účincích moc informací nebylo publikováno. Vyhodnocení cytotoxicity se provádělo pomocí MTT testu a průtokové cytometrie.

Z výsledků testu MTT jsme dostali hodnoty velice blízké již dříve publikovaným hodnotám. Výsledky pro extrakt polyanilinové báze ukazují, že báze přestává být cytotoxická při koncentraci 25%. Oproti tomu výsledky extraktu polyanilinové soli s neupraveným pH ukazují, že je ještě při 10% koncentraci stále cytotoxická. Vzhledem k tomu, že zatím nebyly publikované výsledky MTT testu pro extrakt polyanilinové soli s upraveným pH, nemohli jsme tuto část práce s nikým prodiskutovat. Podle našich výsledků se pH extraktu polyanilinové soli podílí na cytotoxicitě, ale nemá na ni velký vliv. Celkově výsledky vykazovaly rostoucí tendenci viability buněk se snižující se koncentrací extraktů polyanilinu. Při porovnání výsledků extraktů polyanilinové báze a polyanilinové soli jsme dospěli k závěru, že extrakt polyanilinové báze je méně toxický než extrakt polyanilinové soli. Rozdílné pH hraje v extraktu polyanilinové soli jistou roli. Tento faktor však není hlavní.

Testy na průtokovém cytometru byly sice provedeny, ale obstojné výsledky jsme nedostali. Hlavním důvodem byl časový nedostatek, dále náročnost práce se samotným přístrojem a problémy s kultivací buněk v laboratoři. Proto jsme do práce uvedli jen ilustrační výsledky a další měření na průtokovém cytometru bude probíhat v rámci diplomové práce.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- AFFORD, S; S. RANDHAWA. Apoptosis. *Molecular Pathology* : MP, 2000, Vol.53(2), Pp.55-63. 2000, vol. 53, no. 2 s. 55-63. ISSN:1366-8714.
- AIROUDJ, A., D. DEBARNOT, A. BECHE a F. PONCIN-EPAILLARD. Development of an optical ammonia sensor based on polyaniline/epoxy resin (SU-8) composite. *Talanta*. 2009, roč. 77, č. 5.
- ALBERTS, B. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science, c2002, xxxiv, 1463, [84] s. ISBN 0-8153-3218-1.
- AMARAL, I. F.; R. E. UNGER; S. FUCHS; A. M. MENDONÇA; S. R. SOUSA; M. A. BARBOSA; A. P. PÊGO a C. J. KIRKPATRICK. Fibronectin-mediated endothelialisation of chitosan porous matrices. *Biomaterials*. 2009, vol. 30, issue 29, s. 179-186. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.06.056. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644601021262>
- *Australian Biotechnology: Polymers in biomedical applications*. Australian, 2006, roč. 2, č. 16. Dostupné z: [http://www.ausbiotech.org/UserFiles/File/AusBio-Magazine\\_August2006.pdf](http://www.ausbiotech.org/UserFiles/File/AusBio-Magazine_August2006.pdf)
- BASTIOLI, C. *Handbook of biodegradable polymers* [online]. Shawbury: Rapra Technology, 2005.
- BEDNÁŘ, B.; V. FLEMR a B. KRATOCHVÍL. *Nové materiály: stručná informace o vlastnostech a použití*. Praha: VŠCHT, 1991, 208 s. ISBN 8070800984.
- BURDICK, J. A a R. L. MAUCK. *Biomaterials for tissue engineering applications: a review of the past and future trends*. Wien: Springer, c2011, x, 564 s. ISBN 978-3-7091-0384-5.
- CARREL, A. - Nobel Lecture: Suture of Blood-Vessels and Transplantation of Organs". Nobelprize.org. 29 Oct 2012 [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1912/carrel-lecture.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1912/carrel-lecture.html)
- Clinical Applications of Biomaterials. NIH Consensus Statement Online 1982 Nov 1-3 [cited year month day]; 4(5):1-19.
- ČSN EN ISO 10 993. *Biologické hodnocení zdravotnických prostředků: 5 - zkoušky na cytotoxicitu in vitro*. Praha, 2010.

- ČSN EN ISO 10 993. *Biologické hodnocení zdravotnických prostředků: 12 - Příprava vzorků a referenční materiály*. Praha, 2009.
- DEE, K. C., D. A. PULEO a R. BIZIOS. An Introduction To Tissue-Biomaterial Interactions. DOI: 10.1002/0471270598.ch1.
- DUCHÁČEK, V. *Polymery: výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. Vyd. 3., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2011, 276 s. ISBN 978-807-0807-880.
- EL KHALKI, A.; A. GRUGER and P. COLOMBAN. 2003. Bulk–surface nanostructure and defects in polyaniline films and fibres. *Synthetic Metals* [online], roč. 139, č. 2, s. 215–220. [vid. 27. March 2013]. Dostupné z: doi:10.1016/S0379-6779(03)00129-2
- FREUND, M. S. a B. DEORE. Self-doped conducting polymers. *West Sussex: Wiley*, c2007, xii, 326 s. ISBN 978-0-470-02969-5.
- GEORGE, S. E.; R. J. ANDERSON; M. HASWELL a P. W. GROUNDWATER. Silencing P12CDK2AP1 with a lentivirus promotes HaCaT cell proliferation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2013, vol. 65, issue 4, s. -. DOI: 10.1111/jphp.12019. Dostupné z: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2012.1205>
- GIBAS, I. a H. JANIK. Review: synthetic polymer hydrogels for biomedical applications. 2010, roč. 4, č. 4.
- GIESE, K.; J. KAUFMANN; G. J. PRONK a A. KLIPPEL. Unravelling novel intracellular pathways in cell-based assays. *Drug Discovery Today*. 2002, vol. 7, issue 3. DOI: 10.1016/S1359-6446(01)02126-2. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644601021262>
- HEJCL, A.; P. LESNÝ; M. PRÁDNÝ; J. MICHÁLEK; P. JENDELOVÁ; J. STULÍK and E. SYKOVÁ. 2008. Biocompatible hydrogels in spinal cord injury repair. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* [online], roč. 57 Suppl 3, s. S121–32. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18481908>
- HOLLINGER, J. O., *An introduction to biomaterials*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, c2012, xix, 624 s. ISBN 978-1-4398-1256-3.
- HUMPOLICEK, P.; V. KASPARKOVA; P. SAHA aj. STEJSKAL. Biocompatibility of polyaniline. *Synthetic Metals*. 2012, vol. 162, 7-8, s. 722-727. DOI: 10.1016/j.synthmet.2012.02.024. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379677912000781>

- CHAABANE, W.; S. D. USER; M. EL-GAZZAH; R. JAKSIK; E. SAJJADI; J. RZESZOWSKA-WOLNY a M. J. ŁOS. Autophagy, Apoptosis, Mitoptosis and Necrosis: Interdependence Between Those Pathways and Effects on Cancer. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2013, vol. 61, issue 1, s. 43-58. DOI: 10.1007/s00005-012-0205-y. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00005-012-0205-y>
- JEONG, S. I.; I. D. JUN; M. J. CHOI; Y. C. NHO; Y. M. LEE; H. SHIN; G. KAPILDEV; M. MANICKAVASAGAM; N. THAJUDDIN; K. PREMKUMAR a A. GANAPATHI. Development of Electroactive and Elastic Nanofibers that contain Polyaniline and Poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) for the Control of Cell Adhesion: An experimental report. *Macromolecular Bioscience*. 2008-07-07, vol. 8, issue 7, s. 627-637. DOI: 10.1002/mabi.200800005. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mabi.200800005>
- JEYARAJ, M.; G. SATHISHKUMAR; G. SIVANANDHAN; D. MUBARAKALI; M. RAJESH; R. ARUN; G. KAPILDEV; M. MANICKAVASAGAM; N. THAJUDDIN; K. PREMKUMAR a GANAPATHI. Biogenic silver nanoparticles for cancer treatment. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013, vol. 106, issue 6, s. 86-92. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2013.01.027. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jor.22306>
- KALEDOVÁ, A.; D. VESELÝ; I. SAPURINA aj. STEJSKAL. Anticorrosion efficiency of organic coatings depending on the pigment volume concentration of polyaniline phosphate. *Progress in Organic Coatings*. 2008, roč. 63, č. 2.
- KIM, M. S.; J. H. KIM a MIN. Polymeric scaffold for regenerative medicine. 2011. ISSN 1558-3716. DOI: 10.1080/15583724.2010.537800.
- LEE, S. a D. HENTHORN. Materials in biology and medicine. *Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis Group*, 2012, xiv, 246 s. ISBN 978-1-4398-8169-9.
- LINHART, I. *Toxikologie: interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2012, 375 s. ISBN 978-80-7080-806-1.
- LIU, X.; J. M. HOLZWARTEH a P. X. MA. *Macromolecular Bioscience*. 2012, roč. 12, č. 7, s. 911-919. ISSN 16165187. DOI: 10.1002/mabi.201100466. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mabi.201100466>

- LODISH, H. F. *Molecular cell biology*. 7th ed. New York: W. H. Freeman & Company, 2013, xxxiii, 1154, [58] s. ISBN 978-1-4292-3413-9.
- MCKEON, K. D., A. LEWIS a J. W. FREEMAN. Electrospun poly(D,L-lactide) and polyaniline scaffold characterization. *Journal of Applied Polymer Science*. 2010-02-05, roč. 115, č. 3, s. 1566-1572. ISSN 00218995. DOI: 10.1002/app.31296. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.31296>
- MURAKAMI, Y.; H. TAKAMATSU; J. TAKI; M. TATSUMI; A. NODA; R. ICHISE; J. F. TAIT a S. NISHIMURA. 18 F-labelled annexin V: a PET tracer for apoptosis imaging. DOI: 10.1007/s00259-003-1378-8. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00259-003-1378-8>
- MURRAY, R. K. *Harperova biochemie*. Vyd. v ČR 4., V H & H 3. Praha: H & H, 2002, ix, 872 s. ISBN 80-7319-013-3.
- NEČAS, O. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3., přeprac. vyd. Jinočany: H & H, 2000, 554 s. ISBN 8086022463.
- NING, B.; H. LIU; W. GONG, J. JIANG; Y. HU a S.-Y. YANG. Biological characteristics of adult degenerative nucleus pulposus cells in a three-dimensional microcarrier stirring culture system. *Journal of Orthopaedic Research*. 2013, vol. 31, issue 6, s. 858-863. DOI: 10.1002/jor.22306.
- PARK, J. B. a J. D. BRONZINO. *Biomaterials: principles and applications*. Boca Raton: CRC Press, c2003, 250 s. ISBN 0-8493-1491-7.
- RAAB, M. *Materiály a člověk: (netradiční úvod do současné materiálové vědy)*. 1. vyd. Praha: Encyklopedický dům, 1999, 228 s. ISBN 8086044130.
- RAMAKRISHNA, S. *Biomaterials: a nano approach*. Boca Raton: CRC Press, c2010, xxii, 350 s. ISBN 978-1-4200-4781-3.
- RAMIREZ, C. N.; C. ANTCZAK a H. DJABALLAH. Cell viability assessment: toward content-rich platforms. *Expert Opinion on Drug Discovery* [online]. 2010, vol. 5, issue 3, s. 223-233 [cit. 2013-05-24]. DOI: 10.1517/17460441003596685. Dostupné z: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1517/17460441003596685>
- RATNER, B. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press, c2004, xii, 851 s. ISBN 0-12-582463-7



- REZWAN, K., Q.Z. CHEN a J.J. BLAKER. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. 2006. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.039.
- RIDGE, K. 1998. Pergamon POLYANILINE: A POLYMER WITH MANY INTRINSIC., roč. 23, č. 97.
- ROBINSON, J.; P. M. SAINT LOUIS a A. PADMARAJU. Polymer in medicine. 2001, s. 24.
- SAWAI, H.; N. DOMAE; G. SIVANANDHAN; D. MUBARAKALI; M. RAJESH; R. ARUN; G. KAPILDEV; M. MANICKAVASAGAM; N. THAJUDDIN; K. PREMKUMAR a A. GANAPATHI. Discrimination between primary necrosis and apoptosis by necrostatin-1 in Annexin V-positive/propidium iodide-negative cells: An experimental report. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011, vol. 411, issue 3, s. 569-573. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.06.186. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X11011995>
- SEBENDA, J. a M. HUDLICKY. 1999. Otto Wichterle (1913-1998): The father of soft contact lenses. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* [online], roč. 37, č. 9, s. 1221–1223. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1099-0518(19990501)37:9<1221::AID-POLA1>3.0.CO;2-C
- SEDLAŘÍKOVÁ, M.; J. VONDRÁK; K. BARTUŠEK; J. MICHÁLEK a V. ŠUBR. Materiály pro biomedicínské aplikace. *Vysoké učení technické v Brně: Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií*. 2006, s. 37.
- SHI, D., *Biomaterials and tissue engineering*. 1st ed. Berlin: Springer, 2004, xi, 246 s. ISBN 3-540-22203-0.
- SONG, H.-K.; B. TOSTE; K. AHMANN; D. HOFFMAN-KIM a G.T.R. PALMORE. Micropatterns of positive guidance cues anchored to polypyrrole doped with polyglutamic acid: A new platform for characterizing neurite extension in complex environments. *Biomaterials*. 2006, vol. 27, issue 3, s. 473-484. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.06.030. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961205006204>
- STEJSKAL, J. and R G GILBERT. 2002. POLYANILINE. Preparation of a conducting polymer ( IUPAC Technical Report ), roč. 74, č. 5, s. 857–867.

- STEJSKAL, J.; P. KRATOCHVÍL a A. D. JENKINS. The formation of polyaniline and the nature of its structures. *Polymer*. 1996, roč. 37, č. 2.
- SUN, M., *Molecular Medicine Reports*. 2012-11-27. DOI: 10.3892/mmr.2012.1205
- SYLVESTER, P. W. Optimization of the Tetrazolium Dye (MTT) Colorimetric Assay for Cellular Growth and Viability. 2011. ISSN 978-1-61779-012-6. DOI: 10.1007/978-1-61779-012-6\_9.
- TEOH, S. H.; Z. G. TANG and S. RAMAKRISHNA. 1999. Development of thin elastomeric composite membranes for biomedical applications. *Journal of materials science. Materials in medicine* [online], roč. 10, č. 6, s. 343–52. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15348135>
- The Nobel Prize in Chemistry 2000. Nobelprize.org [online]. 2000 [cit. 2013-03-27]. Dostupné z: [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2000/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2000/)
- The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012". Nobelprize.org. 29 Oct 2012 [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2012/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2012/)
- VILLALBA, P.; M. K. RAM; H. GOMEZ; V. BHETHANABOTLA; M. N. HELMS; A. KUMAR; A. KUMAR; M. MANICKAVASAGAM; N. THAJUDDIN; K. PREMKUMAR a A. GANAPATHI. Cellular and in vitro toxicity of nanodiamond-polyaniline composites in mammalian and bacterial cell: An experimental report. *Materials Science and Engineering: C*. 2012, vol. 32, issue 3, s. 627-637. DOI: 10.1016/j.msec.2011.12.017. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493111003742>
- VON DER MARK, K.; J. PARK; S. BAUER and P. SCHMUKI. 2010. Nanoscale engineering of biomimetic surfaces: cues from the extracellular matrix. *Cell and tissue research* [online], roč. 339, č. 1, s. 131-53. [cit. 2013-03-27]. Dostupné z doi: 10.1007/s00441-009-0896-5
- Vybrant® MTT Cell Proliferation Assay Kit (V-13154). Molecular Probes, 2002. Dostupné z URL: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp13154.pdf>
- WANG, X.; Y. XIA a L. LIU. Comparison of MTT assay, flow cytometry, and RT-PCR in the evaluation of cytotoxicity of five prosthodontic materials. 2010. DOI: 10.1002/jbm.b.31723.

- WANG, Y.; H. D. TRAN a R. B. KANER. Template-Free Growth of Aligned Bundles of Conducting Polymer Nanowires. *The Journal of Physical Chemistry C*. 2009-06-18, roč. 113, č. 24, s. 10346-10349. ISSN 1932-7447. DOI: 10.1021/jp903583e. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp903583e>
- WHITE, B. C. a J. M. SULLIVAN. Apoptosis. *Academic Emergency Medicine : Official Journal of the Society for Academic Emergency Medicine*, 1998, Vol.5(10), Pp.1019-29. 1998, vol. 5, no. 10 s. 1019-1029. ISSN:1069-6563.
- WICHTERLE O. *Czech Centres* [online]. Praha, 2010 [cit. 2013-05-22]. Dostupné z: <http://www.czechcentres.cz/projekty/otto-wichterle22/otto-wichterle-osobnosta/>
- WILLIAMS, D. F. *Biomaterials and tissue engineering in reconstructive surgery*. 2003.
- XING, Z.; J. YUAN; W. CHAE a S. KIM. 2011. Keratin Nanofibers as a Biomaterial., roč. 2, s. 120–124.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

PMMA	polymethylmetakrylát	polymethylmetacrylate
HEMA	2-hydroxy-ethylmetakrylát	2-hydroxy-ethylmetacrylate
PLA-PGA	polylaktid polyglykolová kyselina	polylactid-polyglycolic acid
ECM	extracelulární matrix	extracellular matrix
NR	přírodní kaučuk	natural rubber
PE	polyetylen	polyethylene
PP	polypropylen	polypropylene
PVC	polyvinylchlorid	polyvinylchloride
PHEMA	polyhydroxyethylmetakrylát	polyhydroxy-ethylmetacrylate
PEG	polyetylen glykol	polyethyleneglycol
PLA	polylaktid	polylactid acid
PGA	polyglykolid	polyglycolic acid
HEMA	poly(2-hydroxyethylmetakrylát)	poly(2-hydroxyethylmetacrylate)
PANI	polyanilin	polyaniline
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- difenyltetrazolium bromid	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazolium bromide
FCM	průtoková cytometrie	flow cytometry
PI	propidium jodid	propidium iodide
PANI_S	polyanilinová sůl	polyaniline salt
PANI_B	polyanilinová báze	polyaniline base
rpm	otáčky za minutu	revolutions per minute

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 – čočkostroj Otty Wichterle .....	14
Obrázek 2 – karbonylová funkční skupina .....	16
Obrázek 3 – jednoduchá intracelulární signální dráha.....	17
Obrázek 4 – scaffoldy z chitosanu .....	19
Obrázek 5 – elektricky stimulovatelný podklad z polypyrolu .....	23
Obrázek 6 – strukturní vzorce polyanilinové soli a polyanilinové báze.....	24
Obrázek 7 – teplotní profil polymerizace polyanilinu .....	26
Obrázek 8 – graf MTT – lineární závislost viability buněk.....	29
Obrázek 9 – ukázkové vyhodnocení průtokové cytometrie.....	32
Obrázek 10 – snímek z invertovaného fluorescenčního mikroskopu .....	33
Obrázek 11 – graf vyhodnocení testu MTT pro PANI-B .....	40
Obrázek 12 – Fotografie buněk kultivovaných v A) 100% koncentraci PANI-B; B) 25% koncentraci PANI-B (zvětšení 100x).....	41
Obrázek 13 – graf vyhodnocení testu MTT pro PANI-S s původním pH.....	42
Obrázek 14 – Fotografie buněk kultivovaných v A) 50% koncentraci PANI-S s původním pH; B) 5% koncentraci PANI-S s původním pH (zvětšení 100x).....	44
Obrázek 15 – graf vyhodnocení testu MTT pro PANI-S s upraveným pH .....	45
Obrázek 16 – fotografie buněk kultivovaných v A) 50% koncentraci PANI-S s upraveným pH; B) 10% koncentraci PANI-S s upraveným pH.....	46
Obrázek 17 – částečné výsledky kultivovaných buněk pomocí průtokové cytometrie v A) 50% extraktu PANI_S; B) 100% extraktu PANI_B; C) 25% extraktu PANI_S; D) 75% extraktu PANI_B; E) 10% extraktu PANI_S.....	49

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 – Viabilita buněk v přítomnosti extraktu PANI-B.....	40
Tabulka 2 – Viabilita buněk v přítomnosti extraktu PANI-S s původním pH .....	43
Tabulka 3 – Viabilita buněk v přítomnosti extraktu PANI-S s upraveným pH = 7 .....	45
Tabulka 4 – porovnání PANI-S neupravené pH s PANI-S upravené pH.....	47