

# ***In vitro* stanovení toxicity koloidního polyanilinu**

Karel Netík

---

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: **Karel NETÍK**  
Osobní číslo: **T10624**  
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Polymerní materiály a technologie**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **In vitro stanovení toxicity koloidního polyanilinu**

Zásady pro vypracování:

Seznámit se s problematikou přípravy různých forem polyanilinu s ohledem na koloidní formu. V průběhu zpracování práce by si student měl osvojit základní pravidla práce v laboratoři buněčných kultur a seznámit se s základními metodami vyhodnocení vlivu polymerních látek na eukaryotické buňky. V praktické části student provede sérii testů určujících toxicitu různých koncentrací koloidního polyanilinu na buněčné linie

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, považují 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 31. 05. 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 vzdělávacímu 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). Odpírá-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**

Tato bakalářská práce přibližuje skupinu vodivých polymerů z hlediska jejich vlastního principu vodivosti i možného využití. Dále se zabývá jedním z hlavních představitelů této skupiny polymerů, polyanilinem, konkrétně jeho historií, přípravou a formami. Navazuje teorie cytotoxicity, metod jejího posuzování a kultivace buněčných kultur. V praktické části je zkoumán toxický vliv koloidního polyanilinu na lidské keratinocyty a myší fibroblasty NIH/3T3.

**Klíčová slova:** Polyanilin, vodivé polymery, cytotoxicita, biokompatibilita, MTT, buněčné kultury.

## **ABSTRACT**

This bachelor thesis is focused on the conducting polymers in terms of their conductivity, biocompatibility and potential applications. The main attention is paid to the polyaniline, as one of the major representatives of conducting polymers. Specifically its history, preparation and forms. Follows the theory of cytotoxicity, cell viability methods and cell culture cultivation. In the practical part the toxic effect of colloidal polyaniline on human keratinocytes and mouse fibroblasts is studied.

**Keywords:** Polyaniline, conducting polymers, cytotoxicity, biocompatibility, MTT, cell culture.

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucímu bakalářské práce, panu Ing. Petru Humpolíčkovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a trpělivost při vzniku této práce. Dále Ing. Zdence Kucekové za ochotu při předávání zkušeností z práce v laboratoři buněčných kultur.

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</b> .....	<b>12</b>
1.1 CHARAKTERISTIKA ELEKTRICKÉ VODIVOSTI .....	13
1.2 VODIVÉ POLYMERY .....	13
1.2.1 Dopování .....	14
1.2.2 Využití vodivých polymerů.....	14
<b>2 POLYANILIN</b> .....	<b>16</b>
2.1 HISTORIE POLYANILINU.....	16
2.2 FORMY POLYANILINU .....	16
2.3 PŘÍPRAVA POLYANILINU.....	18
2.4 KOLOIDNÍ POLYANILIN .....	19
2.4.1 Příprava koloidního polyanilinu.....	21
2.4.2 Vlastnosti a potenciální využití koloidního polyanilinu .....	21
<b>3 DISPERZNÍ SYSTÉM</b> .....	<b>24</b>
3.1 KOLOIDNÍ DISPERZE .....	24
<b>4 BIOKOMPATIBILITA</b> .....	<b>25</b>
4.1 BIOKOMPATIBILITA .....	25
4.1.1 Dosud známé informace o biokompatibilitě PANI.....	25
4.1.2 Polyvinylpyrrolidon a jeho biokompatibilita .....	26
4.2 CYTOTOXICITA.....	26
4.3 METODY STUDIA ŽIVOTASCHOPNOSTI BUNĚK .....	27
4.3.1 Analýza viability buněk použitím trypanové modři.....	27
4.3.2 MTT test založený na metabolické aktivitě .....	28
4.3.3 Průtoková cytometrie .....	30
<b>5 ZÁKLADY KULTIVACE BUNĚČNÝCH KULTUR</b> .....	<b>31</b>
5.1 BUŇKY PROKARYOTICKÉ A EUKARYOTICKÉ.....	31
5.2 VÝZNAM BUNĚČNÝCH KULTUR .....	31
5.3 PRINCIP KULTIVACE BUNĚČNÝCH KULTUR .....	32
5.3.1 Růstová křivka buněčné kultury.....	32
5.3.2 Vybavení laboratoře pro kultivaci buněk <i>in vitro</i> .....	33
5.3.3 Kultivační média .....	34
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>35</b>
<b>6 MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>36</b>
6.1 SYNTÉZA KOLOIDNÍHO POLYANILINU .....	36
6.2 INFORMACE O POUŽITÝCH BUNĚČNÝCH LINÍCH .....	36
6.3 EXPERIMENT .....	36
6.3.1 Trypsinizace a prekultivace.....	36
6.3.2 Přidání potenciálně toxické látky .....	37
6.3.3 MTT test.....	38
6.3.4 Fluorescenční mikroskopie .....	38



<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>40</b>
7.1	PH ROZTOKŮ KOLOIDNÍHO POLYANILINU .....	40
7.2	CYTOTOXICITA STANOVENÁ U LINIE HACAT .....	40
7.3	CYTOTOXICITA STANOVENÁ U LINIE NIH/3T3 .....	43
7.4	MIKROFOTOGRAFIE BUNĚK KULTIVOVANÝCH ZA PŘÍTOMNOSTI KOLOIDNÍHO POLYANILINU .....	46
7.5	SROVNÁNÍ CYTOTOXICITY U JEDNOTLIVÝCH BUNĚČNÝCH LINÍÍ .....	48
<b>8</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>49</b>
	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>51</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>53</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	<b>62</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>63</b>
	<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	<b>65</b>
	<b>SEZNAM GRAFŮ</b> .....	<b>66</b>

## ÚVOD

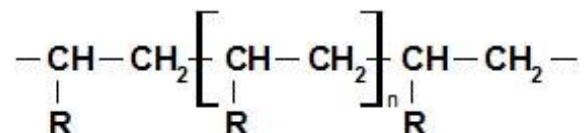
Všeobecně známým faktem o skupině chemických látek nazývaných polymery je od dob jejich prvních syntéz a pozdějšího širšího začlenění do každodenního života člověka v podobě výrobků všeho druhu jejich schopnost izolovat elektrický proud. V 80. letech 20. století však Shirakawa et al. (1977) objevili malou skupinu polymerů, které jsou za určitých podmínek schopny vést elektrický proud. Za tento objev a další rozvoj skupiny vodivých polymerů byl Hideki Shirakawa spolu s Alenem J. Heegerem a Alanem G. MacDiarmidem v roce 2000 oceněn Nobelovou cenou za chemii (Prokeš, Stejskal, Omastová, 2001). Od objevu vodivosti u některých syntetických polymerů velmi rychle vzrostl zájem vědců o tento druh polymerů, a to především díky obrovskému potenciálu, který v sobě tyto relativně levné materiály skrývají z hlediska využití. Mezi vodivé polymery se řadí i polyanilin, látka, která má právě s ohledem na možnosti využití výhodné vlastnosti jako je dobrá stabilita a relativně nenákladná a snadná syntéza. Předmětem této bakalářské práce je jeho koloidní disperze, tedy koloidní polyanilin, který je slibným polymerním materiálem co se týká možného využití v elektronice, ale i v biotechnologiích.

Koloidní polyanilin dosud nebyl studován z hlediska možné cytotoxicity, proto je cílem této bakalářské práce stanovit cytotoxické působení různých koncentrací koloidního polyanilinu na buněčné linie lidských keratinocytů a myších fibroblastů pomocí MTT testu. Výsledky budou prezentovány několika různými způsoby. Jednak vyhodnocením průkaznosti rozdílů mezi průměrnými hodnotami absorbance jednotlivých vzorků a reference, jednak dle ISO normy 10 993-5 pomocí procentuálního vyjádření buněčné viability ve srovnání s referencí a také pořízením mikrofotografií prostřednictvím invertovaného mikroskopu s fázovým kontrastem a fluorescenčního mikroskopu.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

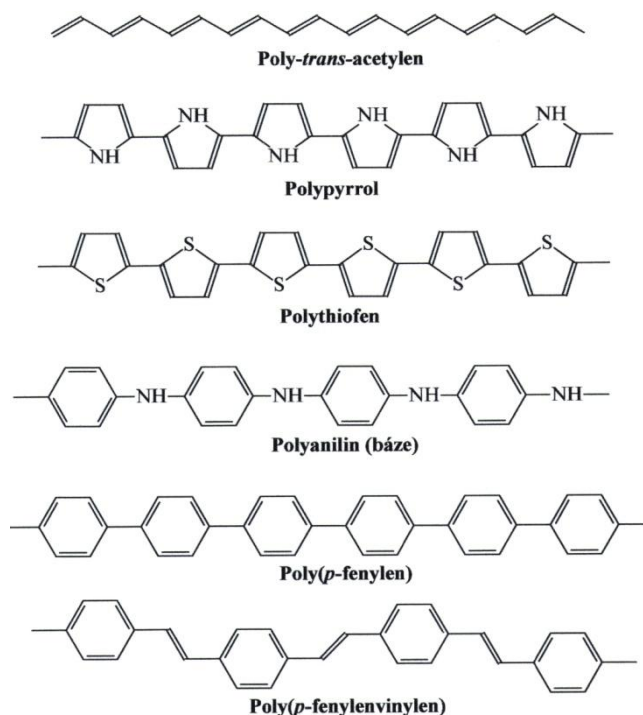
## 1 POLYMERY

Polymer je látka tvořená molekulami (makromolekulami), pro které je charakteristické mnohonásobné opakování jednoho nebo více druhů atomů nebo skupin atomů (konstitučních jednotek) navzájem spojených v tak velkém počtu, že existuje řada vlastností, které se znatelně nezmění přidáním nebo odstraněním jedné nebo několika konstitučních jednotek (Prokopová, 2007).



Obrázek 1 – obecný vzorec polymeru

Polymery, především pak syntetické, jsou všeobecně známy jako izolanty elektrického proudu. Mají dobré mechanické vlastnosti, snadno se zpracovávají a mohou se uplatňovat i jako izolanty tepelné či vrstvy tlumící zvuk (Prokeš, Nešpůrek, Stejskal, 2001). Existuje však skupina polymerů, vykazujících, na rozdíl od ostatních polymerů, vlastní elektrickou vodivost. Nejvýznamnější z nich jsou polyacetylen, polypyrrol, polythiofen, polyanilin, polyfenylen či polyfenylenvinylen (Prokeš, Stejskal, Omastová, 2001). Elektrická vodivost těchto polymerů se pohybuje v rozmezí  $0,01 - 30 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$  a je srovnatelná s vodivostí anorganických polovodivých materiálů (Humpolíček et al., 2012a).



Obrázek 2 – nejdůležitější vodivé polymery (Prokeš, Stejskal, Omastová, 2001)

## 1.1 Charakteristika elektrické vodivosti

Konduktivita (též měrná elektrická vodivost) je fyzikální veličina, která popisuje schopnost látky vést elektrický proud. Látka, která je dobrým vodičem, má vysokou hodnotu konduktivity, špatně vodící látky mají nízkou hodnotu konduktivity (Drápala a Kursá, 2012).

Druh materiálu	Měrná el. vodivost [S.cm <sup>-1</sup> ]
vodiče	10 <sup>3</sup> až 10 <sup>6</sup>
polovodiče	10 <sup>-8</sup> až 10 <sup>3</sup>
izolanty	10 <sup>-20</sup> až 10 <sup>-8</sup>

Tabulka 1 – srovnání konduktivity vodičů, polovodičů a izolantů (Drápala a Kursá, 2012)

## 1.2 Vodivé polymery

Historie polymerů reprezentována ve 20. letech 20. století Staudingerovým konceptem makromolekuly, syntézou pomocí katalyzátorů objevenou v 50. letech 20. století Zieglerem a Nattou a experimentálním a teoretickým výzkumem makromolekul Paula Floryho ve stejném období, se zabývala nasycenými, nevodivými polymery, které se jevily nezajímavé z pohledu materiálů pro elektronické aplikace. Toto ovšem platí pro nasycené polymery, ve kterých jsou všechny čtyři valenční elektrony uhlíku použity v kovalentní vazbě. U konjugovaných polymerů se však elektronová konfigurace zásadně liší. U konjugovaných polymerů vedou chemické vazby k jednomu nepárovému elektronu ( $\pi$ -elektronu) na jeden atom uhlíku. Navíc  $\pi$ -vazba, ve které jsou orbitály uhlíku v konfiguraci  $sp^2p_z$ , a ve které se překrývají orbitály následujícího uhlíkového atomu podél hlavního řetězce, vede k elektronové delokalizaci kolem hlavního řetězce. Tato elektronická delokalizace poskytuje pomyslnou dálnici pro přenos náboje po řetězci polymeru (Heeger, 2001).

Elektrická vodivost vodivých polymerů, které jsou obecně složeny z uhlíku, vodíku a jednoho heteroatomu jako je dusík a síra tedy pochází z  $\pi$ -konjugace. Samotné vodivosti je dosaženo jednoduchou oxidací nebo redukcí vedoucí k zavedení center náboje, které zprostředkovávají transport náboje po řetězci. Oxidace a redukce je prováděna anionty a kationty poněkud nesprávně pojmenovanými jako dopující látky (termín vypůjčen z fyziky polovodičů), celý proces je pak nazýván dopováním (Chandrasekhar, 1999).

Moderní historie vodivých polymerů začíná v roce kdy Shirakawa et al. (1977) objevili, že halogenace *trans*-polyacetyleny zvýšila jeho konduktivitu o několik řádů. Polyacetylenové filmy vystavené účinkům par jodu vedly k produktu o měrné vodivosti

$38 \text{ S.cm}^{-1}$ , která je srovnatelná s parametry elektrické vodivosti anorganických polovodičů. Později Naarman (1987) popsal orientované filmy o měrné vodivosti dosahující řádově až  $10^5 \text{ S.cm}^{-1}$ . I přesto, že vodivost polyacetyleny je vysoká, jeho omezená stabilita vedla k posunu pozornosti ve prospěch mnohem stabilnějších polymerů, polyanilinu a polypyrrolu (Prokeš, Stejskal, Omastová, 2001).

### 1.2.1 Dopování

Základním principem dopování je oxidace nebo redukce řetězce polymeru. Oxidace odebere elektrony působením akceptorů elektronů (např.  $\text{I}_2$ ) a vzniká pozitivně nabitý polymer. Tento děj je popisován jako p-dopování. Podobně pak redukce produkuje působením donorů elektronů (např. Li) záporně nabitý řetězec polymeru, tento děj potom označujeme jako n-dopování (Freund a Deore, 2007). Je však podstatný rozdíl mezi dopováním anorganických a organických polovodičů. U anorganických polovodičů výrazně ovlivňují elektrické vlastnosti již stopové koncentrace dopující látky, zatímco u polymerů je potřeba vyšších koncentrací dopujících látek, řádově jednotky až desítky procent (Prokeš, Stejskal, Omastová, 2001). Dopování tedy může být indukováno chemickým činidlem, existuje však i možnost elektrochemického dopování, kdy se polymer připojí k elektrodě. Elektrochemické dopování probíhá v podstatě stejným způsobem jako chemické dopování s tím rozdílem, že hnací sílu pro oxidaci nebo redukci poskytuje externí zdroj napětí (Freund a Deore, 2007).

### 1.2.2 Využití vodivých polymerů

Vodivé polymery jsou atraktivní materiály pro použití ve stávajících i nově vznikajících technologiích díky své nízké hmotnosti, nízkým nákladům a všestrannosti ve srovnání s ostatními standardními vodiči a polovodiči (Freund a Deore, 2007). Navíc, na rozdíl od běžných polovodičů, mohou vodivé polymery měnit svou strukturu, a tedy i své vlastnosti v reakci na okolní prostředí, což lze využít v řadě aplikací, jako jsou například biosenzory (Prokeš, Stejskal, Omastová, 2001). Využitím vodivých polymerů se vědci zabývají již více než třicet pět let, o čemž svědčí například práce Kaneto et al. (1983) pojednávající o možnosti využití filmů polythiofenu a polypyrrolu pro zobrazovací zařízení v důsledku změny jejich barev v závislosti na jejich p- nebo n-dopování. Publikace Baldissera a Ferreira (2012) se zabývá antikorozi ochranou kovů pomocí nátěrů na bázi epoxidové pryskyřice obsahující vodivý polymer jako antikorozi činidlo. Dále Studie Nambiar a Yeow (2010) pojednávající o využití vodivých polymerů jako biosenzorů, jenž jsou

podle Dhand et al. (2010) analytická zařízení, spojující prvky biologického snímání jako enzymy, protilátky, nukleové kyseliny, buňky, atd. s elektronickým snímačem, který je vybaven elektronickým zesilovačem. Zajišťují rychlou interaktivní informaci o daném vzorku a mají uplatnění v různých oblastech jako klinická diagnostika, monitorování biologických procesů, monitorování životního prostředí a zpracování potravin a zemědělských produktů. Práce Kim et al. (2000) například pojednává o konduktometrickém měření aktivity protilátek specifických pro albumin pomocí imunosenzorů z koloidního zlata a na něm začleněného polyanilinu. Využitím vodivých polymerů se dále zabývá práce Manjunatha et al. (2011) studující uplatnění polypyrrolu jako materiálu pro anody dobíjecích lithiových baterií, či studie autorů Cortés a Moreno (2003), ve kterém je diskutována problematika tvorby umělých svalů za využití vodivých polymerů. S ohledem na nízkou cenu vodivých polymerů pak AlSalhi et al. (2011) shrnuje možnosti využití vodivých polymerů v elektronice, zmiňuje možné aplikace v zobrazovacích zařízeních (displeje, televize), světelných diodách, tranzistorech, fotovoltaických článcích, senzorech a laserech. Z biomedicínského hlediska může být podle Rubinsona a Marka (2003) ovlivněno uvolňování ATP vytvořením vnější membrány na bázi polypyrrolu vzhledem k jeho citlivosti na ionty hořčíku a vápníku. Podle Schmidt et al. (1997) pak oxidovaný polypyrrol může sloužit jako podklad pro zvýšení interakce poškozených nervových buněk. Velký potenciál má také využití vodivých polymerů v oblasti tkáňového inženýrství (Freund a Deore, 2007).

## 2 POLYANILIN

### 2.1 Historie polyanilinu

Polyanilin je pravděpodobně nejstarším syntetickým polymerem, který kdy člověk vůbec připravil. Anilin byl jako produkt pyrolytické destilace indiga získán v roce 1826 německým chemikem Unverdorbenem. Při studiu jeho chemických vlastností popsal roku 1840 Fritze zelené oxidační produkty, které bychom v dnešní terminologii nazvali polyanilinem. V roce 1862 britský profesor chemie Letheby při toxikologické identifikaci anilinu provedl elektrochemickou oxidaci, která vedla po alkalizaci k modrému zbarvení typickému pro polyanilinovou bázi. Britští chemici Green a Woodhead navrhli v roce 1910 pro oxidační produkty anilinu strukturu oktameru. Polymerní povaha oxidačních produktů anilinu byla prokázána až o mnoho desítek let později. Polyanilinové řetězce jsou složeny ze stovek až tisíců anilinových konstitučních jednotek a jde tedy o plnohodnotné polymery. Syntetické postupy vedoucí k polyanilinu byly popsány v Československu Honzlem a Tlustákovou (1968). Konduktivita polyanilinu a příbuzné „anilinové černi“ pohybující se v řádu jednotek  $S \cdot cm^{-1}$  je srovnatelná s měrnou vodivostí běžných polovodičů a byla známa již v šedesátých letech (Prokeš, Stejskal, Omastová, 2001).

Vzhledem k jeho dobré stabilitě, ovlivnitelné elektrické vodivosti, poměrně nenáročné a levné syntéze a zajímavým redoxním vlastnostem spojenými s heteroatomem dusíku v řetězci se stal polyanilin jedním s nejrozsáhleji studovaných vodivých polymerů poslední doby (Kang et al., 1998).

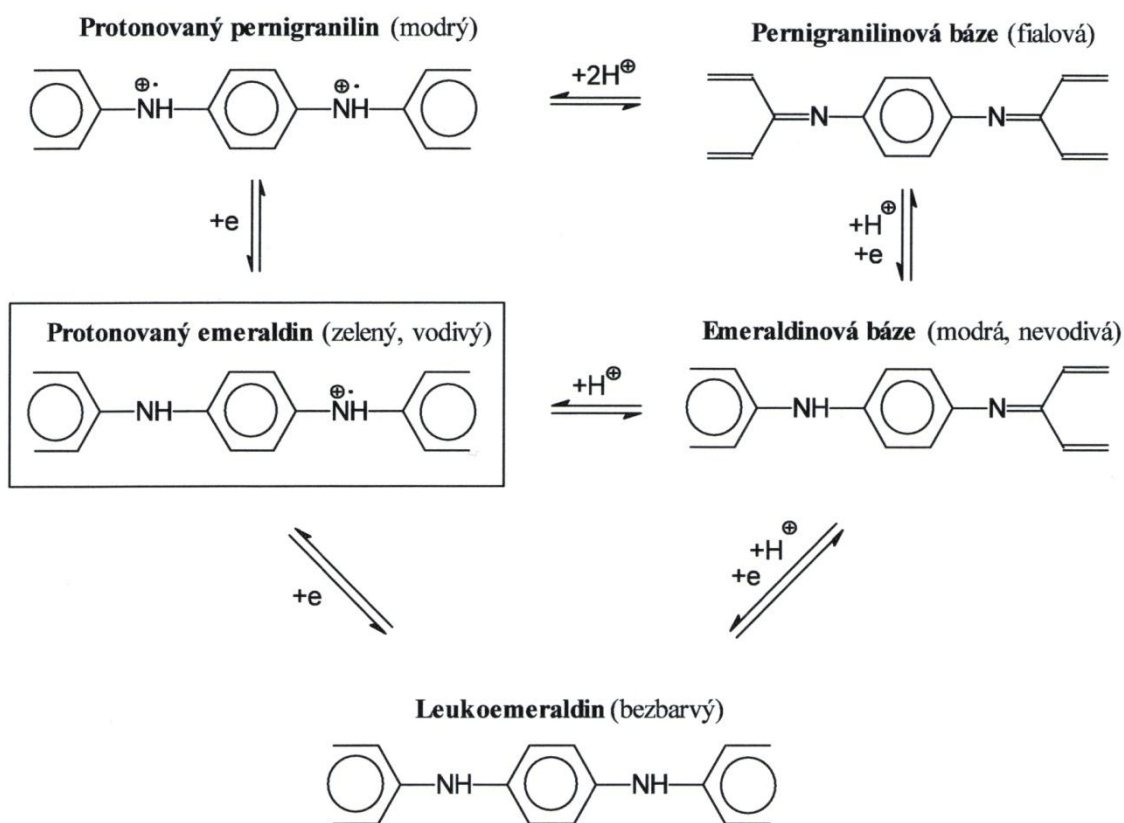
### 2.2 Formy polyanilinu

Mechanismus elektrické vodivosti polyanilinu je oproti ostatním vodivým polymerům unikátní, ačkoli je dopován protonací, podobně jako je tomu například u *p*-dopování polypyrrolu. Protonace vede k formování solí na bázi dusíku spíše než karboniového iontu, jako je tomu u ostatních *p*-dopovaných polymerů. Konfigurace polyanilinu má totiž A-B povahu, zatímco většina ostatních vodivých polymerů je typu A-A. B komponenta představuje heteroatom elementárního dusíku, který je zapojen do konjugace polyanilinu více, než heteroatomy v polypyrrolu a podobných polymerech. Vodivost polyanilinu tedy závisí jak na oxidační formě, tak na stupni protonace (Wallace et al., 2003).

Polyanilin existuje v řadě forem, navzájem se lišících svým stupněm oxidace či protonace. Odebíráním nebo dodáváním elektronů chemickou či elektrochemickou oxidací

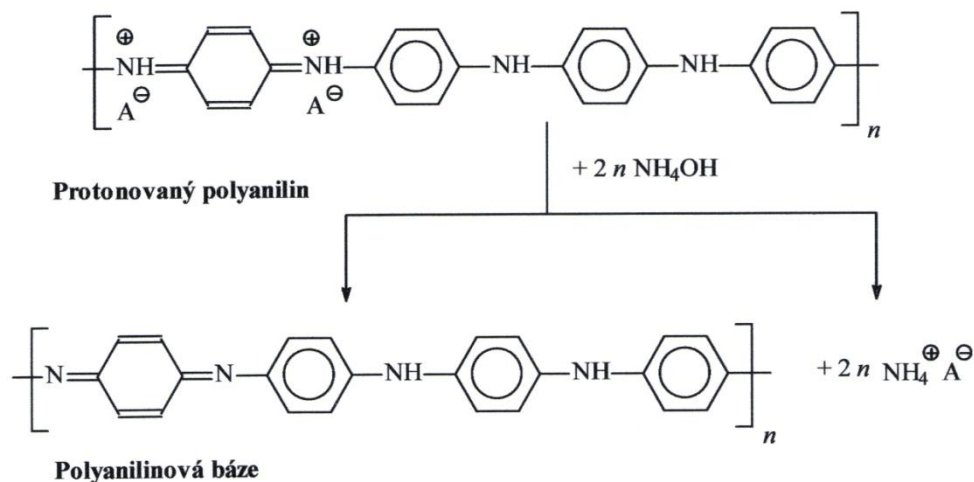


a redukcí lze získat formy s různou chemickou strukturou, stabilitou, zbarvením a elektrickými vlastnostmi. Názvy jednotlivých oxidačních forem, nazvaných leukoemeraldin, emeraldin a pernigranilin, jsou v současnosti používány i pro odpovídající polymery. Název emeraldin (z angl. „emerald“ = smaragd) byl inspirován zeleným zbarvením nejběžnější formy polyanilinu. (Prokeš, Stejskal, Omastová, 2001).



Obrázek 3 – oxidační formy polyanilinu (Prokeš, Stejskal, Omastová, 2001)

Nejběžnějšími formami jsou právě zelená, vodivá polyanilinová (emeraldinová) sůl a nevodivá, modrá báze. K přechodu mezi těmito dvěma formami dochází při pH 5 - 6. Pokud tedy polyanilin po přípravě vystavíme působení alkálií, např. 1 M hydroxidu amonného, změní se vodivost z jednotek  $S.cm^{-1}$  na  $10^{-9} S.cm^{-1}$ , tj. o devět řádů. Tento proces je vratný a bývá využíván při konstrukci aciditních senzorů (Stejskal a Gilbert, 2002).

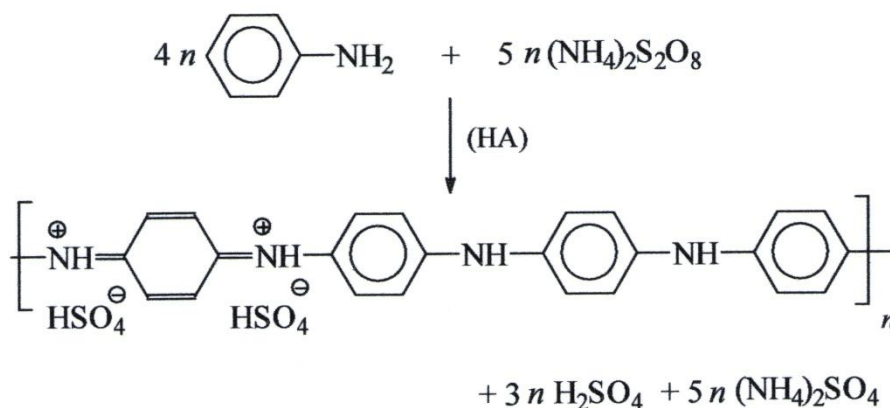


Obrázek 4 – přechod vodivé formy polyanilinu na nevodivou bázi v alkalickém prostředí hydroxidu amonného (Stejskal a Gilbert, 2002)

### 2.3 Příprava polyanilinu

Polyanilin je připravován oxidací anilinu, zpravidla peroxydisíranem amonným. Reakce probíhá v kyselém vodném prostředí, na vzduchu v otevřené nádobě, při laboratorní teplotě, bez nutnosti zahřívání nebo míchání, s prakticky stoprocentním výtěžkem. Exotermní reakce je ukončena během několika minut a produkt se odděluje filtrací. Při skladování má časově neomezenou stálost (Stejskal a Gilbert, 2002).

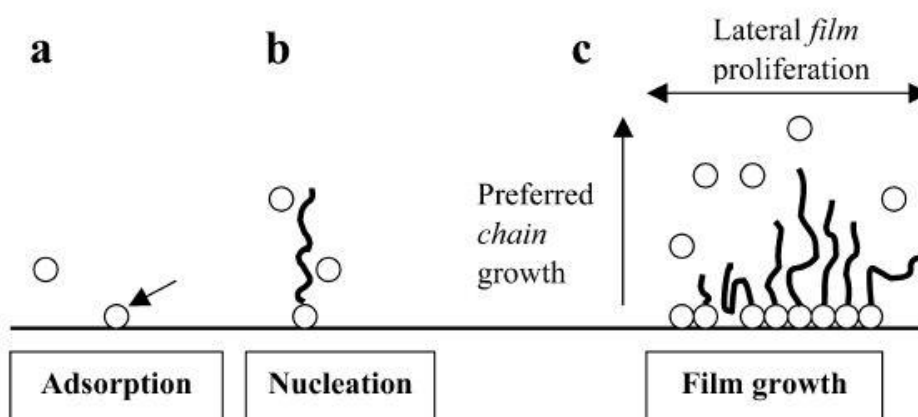
Standardně se polyanilin připravuje oxidací 0,2 M anilin hydrochloridu pomocí 0,25 M peroxydisíranu amonného ve vodném prostředí. Při praktickém provedení je odděleně rozpuštěno 2,59 g (20 mmol) anilinu hydrochloridu v 50 ml vody a 5,71 g (25 mmol) peroxydisíranu amonného rovněž v 50 ml vody. Oba roztoky jsou poté smíseny. Reakční směs po chvíli zmodrá díky vzniku anilinových oligomerů. Zabarvení se prohlubuje; tvoří se pernigranilinová forma polyanilinu, která po skončení polymerace přechází na konečný tmavozelený emeraldin. Polymerace proběhne při laboratorní teplotě asi za 10 minut a teplota reakční směsi vzroste z 20°C na 38°C. (Použití vyšších koncentrací reakčních složek – nad 1 M, má za následek zvýšení teploty, což může vést až k výbuchu). Sraženina polyanilinu je promývána zředěnou (0,2 M) kyselinou chlorovodíkovou a poté důkladně acetonem nebo etanolem. Produkt se suší na vzduchu. Takto připravený polyanilin (emeraldin) v množství kolem 2 g má vodivost 4 S.cm<sup>-1</sup> (Stejskal a Gilbert, 2002).



Obrázek 5 – oxidace anilinu peroxydisíranem amonným v kyselém vodném prostředí poskytující polyanilin (Stejskal a Gilbert, 2002)

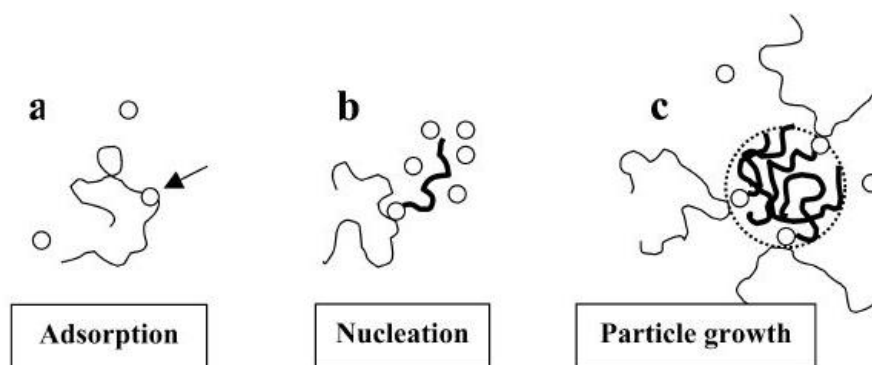
## 2.4 Koloidní polyanilin

Oxidace anilinu v kyselém, vodném prostředí produkuje nejprve anilinové oligomery. Ty jsou více hydrofobní než původní anilinové kationty. Mají tendenci oddělovat se od vodného prostředí, například tím, že se adsorbují na dostupných površích látek stálých v kyselém prostředí. Adsorbované oligomery mají vyšší reaktivitu, což vede k zahájení růstu polyanilinových řetězců. První polyanilinový řetězec ukotvený na povrchu produkuje jádro budoucího filmu. Polymerace anilinu se automaticky zrychluje, to znamená, že nové oligomery vznikají a adsorbují blízko jádra a stimulují růst nových polyanilinových řetězců. Ty vytvářejí film a takto se množí na povrchu. Ze sterickejch důvodů jsou přednostně orientovány kolmo na podklad (Stejskal a Sapurina, 2005).



Obrázek 6 – a) adsorpce oligomeru na povrch, b) růst řetězce PANI, tvorba jádra, c) růst dalších řetězců PANI v důsledku mechanismu automatického zrychlování polymerace (Stejskal a Sapurina, 2005)

Podobný princip je použitelný na formování koloidních částic. Ty jsou vytvářeny polymerací anilinu v prostředí obsahujícím stabilizátor, na něhož přechází role povrchu. Anilinový oligomer se na řetězci sorbuje na stabilizátoru a produkuje jádro polyanilinu. Automaticky se zrychlujícím mechanismem pokračuje v blízkém okolí polymerace - polyanilinové částice rostou a zároveň se formují nové oligomery. Rostoucí částici pak může být zachycen jiný stabilizátor, což vede k vytvoření částicové skořápky, která částice chrání před shlukováním (Stejskal a Sapurina, 2005).



Obrázek 7 – a) sorpce oligomeru na stabilizátor, b) stimulace růstu řetězce, produkce jádra, c) formování koloidní částice (Stejskal a Sapurina, 2005)

Jako stabilizátory se používají vhodné, v reakčním médiu (často ve vodě) rozpustné syntetické polymery jako polyvinylalkohol a polyvinylpyrolidon nebo také bio-logické makromolekuly jako deriváty celulózy nebo například polysacharid chitosan (Cruz-Silva et al., 2007). Dle Güizado-Rodríguez et al. (2010) lze jako stabilizátor použít i polyvinylmethylether nebo speciálně přizpůsobené kopolymery. Stejskal et al. (1996) mezi možné stabilizátory doplňují polyoxymethylen a poly(2-vinylpyridin).

Pokud tedy při oxidaci anilinu do reakční směsi ponoříme libovolný předmět stálý v kyselém prostředí, pokryje se na povrchu vodivým polyanilinovým filmem o tloušťce kolem 100 nm. Tímto způsobem lze modifikovat prakticky libovolný povrch, např. sklo nebo textilní tkaninu. Přidáme-li do polymerační směsi stabilizátor, který je ve vodném prostředí rozpustný (např. 2 váh % polyvinylpyrolidonu), získáme namísto sraženiny koloidní polyanilinovou disperzi připomínající roztok (Stejskal a Sapurina, 2005).

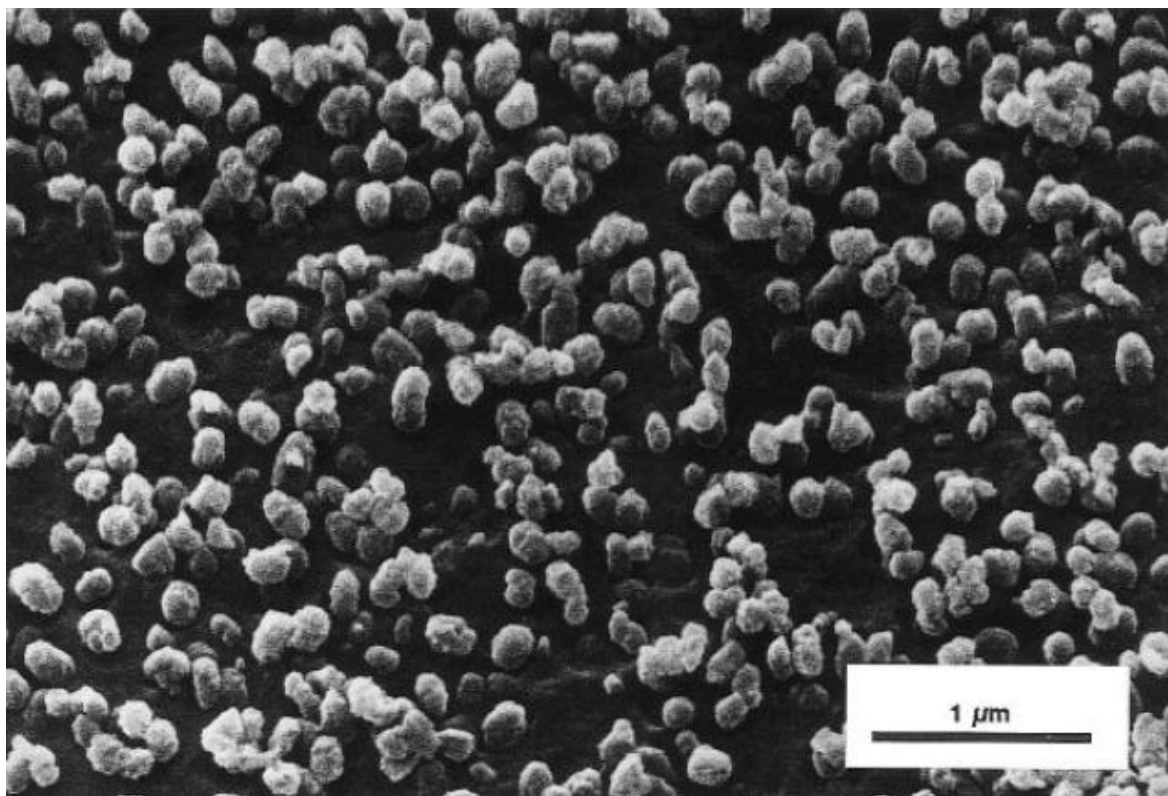
### 2.4.1 Příprava koloidního polyanilinu

Příprava anilinové disperze se provádí oxidací anilin hydrochloridu ( $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ ) peroxydisíranem amonným ( $0,25 \text{ mol.l}^{-1}$ ) v přítomnosti stabilizátoru, 2 váh. % poly(N-vinylpyrrolidonu) (PVP;  $M_r = 360\,000$ ). Anilin hydrochlorid (259 mg) je rozpuštěn místo ve vodě, v 5 ml vodného roztoku PVP ( $40 \text{ g.l}^{-1}$ ). Polymerace anilinu začíná za pokojové teploty blízké  $20^\circ\text{C}$  přidáním 5 ml vodného roztoku obsahujícím 571 mg peroxydisíranu amonného. Směs je krátce míchána a poté zanechána v klidu pro polymeraci. Ta je dokončena v několika minutách. Koloidní disperze se poté ředí na požadovanou koncentraci pomocí  $1 \text{ mol.l}^{-1}$  HCl (Stejskal a Sapurina, 2005).

### 2.4.2 Vlastnosti a potenciální využití koloidního polyanilinu

Jak již bylo zmíněno, polyanilin je z hlediska využití jedním z nejslibnějších vodivých polymerů pro svou dobrou chemickou stabilitu, snadnou a poměrně levnou syntézu a v neposlední řadě pro relativně vysokou a navíc ovlivnitelnou elektrickou vodivost (Cruz-Silva et al., 2006). Jeho použití je však omezeno vzhledem k jeho netavitélnému charakteru a nízké rozpustnosti ve většině organických rozpouštědel. Pro překonání těchto omezení jsou používány disperzní polymerace anilinu, jenž zajišťují vznik ve vodě dispergovatelných koloidních částic (Cruz-Silva et al., 2007).

Střední průměr suchých částic pozorovaných mikroskopem činí  $\approx 150 \text{ nm}$ . Průměr nabotnalých částic nacházejících se v disperzním prostředí určený dynamickým rozptylem světla se pohybuje v rozmezí od 300 do 600 nm (Sulimenko et al., 2001). Tvar částic může být kulovitý, granulární, cylindrický nebo má rozvětvené dendritické struktury (Bhadra et al., 2009). Z těchto disperzí lze připravit kompozitní materiály obsahující až 70 váh. % elektricky vodivého polyanilinu dispergovaného v izolační matici, z hlediska využití tedy kompozity polyanilinu hrají důležitou roli (Stejskal, Kratochvíl, Helmstedt, 1996).



Obrázek 8 – SEM snímek kompozitu obs. 26 váh. % polyanilinových částic dispergovaných v matrici polyvinylalkoholu (Stejskal, Kratochvíl, Helmstedt, 1996)

Z hlediska využití má polyanilin, respektive koloidní polyanilin mnoho potenciálních aplikací závislých na jeho specifických vlastnostech a to napříč různými obory (Bhadra et al., 2009).

Skutečností, že je polyanilin přirozeně vodivý může být podle studie Hosoda, Hino, Kuramoto (2007) využito pro průmyslovou výrobu vodivých nátěrů. Dle práce Hino, Taniguchi, Kuramoto (2005) pak pro syntézu vodivých lepidel na bázi epoxidové pryskyřice a polyanilinu. Publikace Barros, Martins, Azevedo (2005) popisuje princip vodivých inkoustů, kdy je vodivá polymerová suspenze či roztok vložena do cartridge inkoustové tiskárny a následně tiskárnou přenesena na podklad, působením UV záření jsou poté vytisknuté znaky vyvolány. Článek Bowman a Mattes (2005) přibližuje možnost syntézy polyanilinu o ultra vysoké molekulové hmotnosti pro výrobu antistatického textilu.

Dále je možno využít zvyšování viskozity polyanilinové disperze se zvyšujícím se elektrickým polem. Tato vlastnost je výhodná pro aplikace v elektoreologických materiálech. Ty je možné využít v různých elektromechanických zařízeních jako jsou tlumiče nárazů pro jejich reverzibilní přechod z tekutého do pevného stavu pod různým elektric-

kým polem (Bhadra et al., 2009). V práci Choi et al. (1997) je uvedena jako potenciální elektoreologická tekutina suspenze polyanilinu v silikonovém oleji.

Schopnosti polyanilinu měnit elektrickou vodivost a zbarvení při vystavení kyselým, zásaditým a některým neutrálním parám či kapalinám je možné využít v oblasti senzorů, biosenzorů, detektorů a indikátorů. Přičemž senzor je zařízení, které měří fyzikální veličiny a převádí je na signál, který může být detekován pozorovatelem nebo detekčním zařízením (Bhadra et al., 2009). Za mnohé studie je možné citovat práci Irimia-Vladu a Fergus (2006), ve které je popsán senzor oxidu uhličitého založený na kompozitním tenkém filmu emeraldinové báze polyanilinu a polyvinylalkoholu. Dále studii Bai et al. (2007) prezentující jednoduchý senzor amoniaku založený na kompozitním filmu polypyrrolu a sulfonovaného polyanilinu. Ve studii Talaie et al. (2000) bylo využito vztahu mezi změnou vodivosti a barvy kompozitu polyanilinu a polypyrrolu pro detekci pH na platinové elektrodě. Článek Andreu et al. (2005) popisuje stanovení množství vitamínu C pomocí absorpční změny polyanilinu při světelném záření o vlnové délce 700 nm. Koloidního polyanilinu je využito v práci Dhand et al. (2007) pro výrobu vodivého filmu elektroforeticky umístěného na destičku ze skla oxidu india a cínu, který je schopen kovalentně imobilizovat cholesterol oxidázu a tím pádem být využitý jako biosenzor cholesterolu.

Je zjevné, že zde nelze obsáhnout všechna potenciální využití polyanilinu. Je tedy možné konstatovat, že může najít uplatnění v elektronice, elektromechanice, elektoreologii, v oblasti antistatických materiálů, senzorů a biosenzorů, světlo emitujících a zobrazovacích zařízeních, atp.

### 3 DISPERZNÍ SYSTÉM

Disperzní systém (dále disperze) je soustava obsahující podíl rozptýlený ve formě částic v disperzním prostředí. Až na výjimky představují disperzní podíl a disperzní prostředí dvě chemicky odlišné složky nebo směsi složek. Např. mlha je disperze vodních kapének ve vzduchu; v mléce je disperzním podílem tuk a disperzním prostředím vodný roztok různých přírodních látek. V roztocích představuje disperzní prostředí rozpouštědlo a disperzní podíl rozpuštěná látka. Jemnost, s jakou je disperzní podíl rozptýlen, je charakterizována rozměrem disperzních částic. Převrácená hodnota rozměru se nazývá stupeň disperzity. Podle stupně disperzity klasifikujeme disperzní soustavy na:

- hrubé disperze (suspenze, emulze, pěny, prach, dým)
- koloidní disperze (lyofobní soly, micelární koloidní roztoky, roztoky makromolekulárních sloučenin)
- analytické disperze (pravé roztoky nízkomolekulárních látek) (Pouchlý, 2008).

#### 3.1 Koloidní disperze

Jako koloidy označujeme disperze tvořené částicemi o rozměrech v rozmezí od 1 nm ( $10^{-9}$  m) do 1  $\mu\text{m}$  ( $10^{-6}$  m), které jsou rozptýlené v kapalném, popř. plynném, někdy i pevném disperzním prostředí. Částice koloidních disperzí jsou viditelné elektronovým mikroskopem a ultramikroskopem, nejsou však viditelné mikroskopem světelným. Procházejí filtračním papírem, v porovnání s analytickými disperzemi vykonávají méně intenzivní tepelný pohyb a vyvolávají nižší osmotický tlak. Pomalu difundují a sedimentují.

Vzhledem k velké rozmanitosti se koloidní disperze dělí do tří skupin:

- lyofobní koloidy – heterogenní systémy, v nichž disperzní podíl a disperzní prostředí představují dvě různé fáze, které jsou odděleny fázovým rozhraním.
- lyofilní koloidy – homogenní systémy, v nichž disperzní podíl tvoří s disperzním prostředím jednu fázi. Jsou to pravé roztoky makromolekul, které vznikají samovolným rozpouštěním. Samovolný vznik je podmíněn afinitou makromolekul k disperznímu prostředí. Do této skupiny koloidů řadíme i koloidní polyanilin.
- asociativní koloidy – vznikají samovolnou reverzibilní asociací nízkomolekulárních látek s amfifilní strukturou v pravém roztoku (Bartovská a Šišková, 2005).



## 4 BIOKOMPATIBILITA

### 4.1 Biokompatibilita

Biomateriály jsou definovány jako materiály, které mohou být součástí biologického systému za účelem diagnostiky, léčby, náhrady tkáně, orgánu nebo funkce těla. Klinická aplikace biomateriálu by neměla způsobit nežádoucí reakce v organismu a neměla by ohrozit život pacienta. Jakýkoli materiál, který má být použit jako součást biomateriálového zařízení musí tedy být biokompatibilní. Dle definice jsou biokompatibilní materiály netoxické, hypoalergenní, nejsou karcinogenní ani mutagenní a nesmějí ovlivňovat plodnost (Williams, 1986). Obecně je možno definovat biokompatibilní materiál jako takový, který nevyvolává v organismu žádnou negativní reakci. Tato charakteristika ve skutečnosti zahrnuje celou řadu interakcí, charakteristik a testů, které jsou definovány v mezinárodních normách. Teprve souhrnné výsledky těchto testů určují, zda může být daný materiál v konkrétním zdravotnickém prostředí použit (Humpolíček a Kašpárková, 2012a).

#### 4.1.1 Dosud známé informace o biokompatibilitě PANI

V současné době existuje pouze omezené množství studií zabývajících se biokompatibilitou nativního polyanilinu. Publikované práce zabývající se biokompatibilitou polyanilinu se dělí do dvou hlavních skupin. První skupina je zaměřena na *in vivo* testování implantability a post-implantačních změn tkání obklopující implantát. Druhá, převažující skupina testovacích metod se zabývá posuzováním *in vitro* proliferace a diferenciací buněk na povrchu polyanilinu. Tyto studie se týkají hlavně polyanilinových filmů nanesených na různých nosičích dále polyanilinových komplexů, polyanilinových kompozitů nebo směsí připravených pomocí elektrostatického zvlákňování. Publikace pokrývají jak oxidační stavy polyanilinu, tak také různé typy testů (*in vivo*, *in vitro*, odlišné buněčné linie, atd.). Studie zabývající se takovými kombinovanými materiály a modifikovanými polyanilinovými povrchy však podávají omezené informace o chování polyanilinu jako takového. V důsledku toho docházelo k rozporuplným výsledkům, a proto lze jen s těžší vyvodit jednoznačné závěry ohledně cytotoxicity polyanilinu. Dokazují to nesrovnalosti ve výsledcích *in vivo* testů. Například zatímco ve studii Kamalesh et al. (2000) nezpůsobila podkožní implantace polyanilinových filmů v oxidační formě emeraldinu samcům krys Sprague-Dawley po dobu 19 až 90 týdnů žádné zánětlivé reakce, studie Wang et al. (1999) při im-

plantaci emeraldinových filmů identickému druhu laboratorních krys po dobu 19 až 50 týdnů naopak známky zánětlivé reakce prokázala. (Humpolíček et al., 2012b).

Nejnovější studie zabývající se některými aspekty biokompatibility byla publikována v roce 2012 (Humpolíček et al., 2012b). V této studii byl otestován vliv polyanilinu ve formě vodivé soli a nevodivé báze v kontextu dráždění a senzibilizace kůže a cytotoxicity. Z této studie vyplynulo, že obě formy polyanilinu nemají vliv na kůži, nicméně vykazují průkaznou hladinu cytotoxicity. Polyanilinová sůl vykazovala větší cytotoxický efekt.

#### 4.1.2 Polyvinylpyrrolidon a jeho biokompatibilita

Nezanedbatelnou složkou koloidního polyanilinu je stabilizátor, na jehož povrchu probíhá tvorba koloidních částic, nejčastěji polyvinylpyrrolidon.

Tento polymer, řadí se mezi polyvinylacetáty, byl poprvé syntetizován před více než sedmdesáti lety Walterem Reppem. Jedná se o světlý prášek, rozpustný ve vodě a jiných polárních rozpouštědlech. Již za 2. světové války byl používán jako náhrada krevního séra. Přestože se polyvinylpyrrolidon pro toto využití dnes už nepoužívá vzhledem k problematickému vstřebávání vysokomolekulárních látek v těle, jeho uplatnění v biomedicínských a biotechnologických aplikacích je stále předmětem výzkumu (Bühler, 2005).

Výborná rozpustnost je dána polární laktamovou skupinou, která zvyšuje hydrofilní vlastnosti. Lipofilitu polyvinylpyrrolidonu poté zajišťují nepolární metylenové skupiny. Tyto vlastnosti spolu s nízkou toxicitou pro organizmy, vysokou biokompatibilitou (byla prokázána tkáňová kompatibilita s kůží, očima a mukózní sliznicí) a chemickou stabilitou vedou k jeho širokému využití ve farmaceutickém průmyslu pro různé obvazové materiály a pro prakticky všechny typy lékových podání (potahované tablety, kapky, sirupy, injekční roztoky, spreje, atd.). Využití nachází také v kosmetice, potravinářství a textilním průmyslu (Liu et al., 2013).

## 4.2 Cytotoxicita

Jedním z prvních testů, jímž je materiál z hlediska biokompatibility podrobován, je test potenciální cytotoxicity. Cytotoxicita musí být testována u látek, které mají přijít do styku s buňkami, buď proto, že zkoumané sloučeniny se používají jako léčiva či kosmetické přípravky a musí být prokázáno, že jsou netoxické, nebo proto, že jsou navrženy jako látky protinádorové a jejich cytotoxicita může být rozhodující pro jejich činnost (Freshney, 2005).

Konkrétní metody zkoušek pro hodnocení cytotoxicity zdravotních prostředků *in vitro* jsou definovány v páté části souboru norem ČSN EN ISO 10 993-5. Norma s názvem „Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro*“ popisuje tři typy uspořádání zkoušek cytotoxicity a to:

- 1) zkoušku extraktu připraveného z testovaného materiálu,
- 2) zkoušku přímým kontaktem,
- 3) zkoušku nepřímým kontaktem.

Výběr konkrétního postupu závisí na typu vzorku, předpokládaném místě aplikace a charakteru použití. Pro hodnocení cytotoxicity existuje celá řada systémů, které zahrnují morfologické posouzení poškození buněk, měření růstu buněk či měření specifických aspektů buněčného metabolismu. Zkoušky se provádí *in vitro* a využívají buněčných linií kultivovaných za specifických podmínek. Buněčné linie jsou komerčně dostupné a zahrnují velkou škálu buněčných typů. Umožňují tak vysokou specifičnost testování s ohledem na předpokládané využití zdravotnického prostředku (Humpolíček a Kašpárková, 2012).

### 4.3 Metody studia životaschopnosti buněk

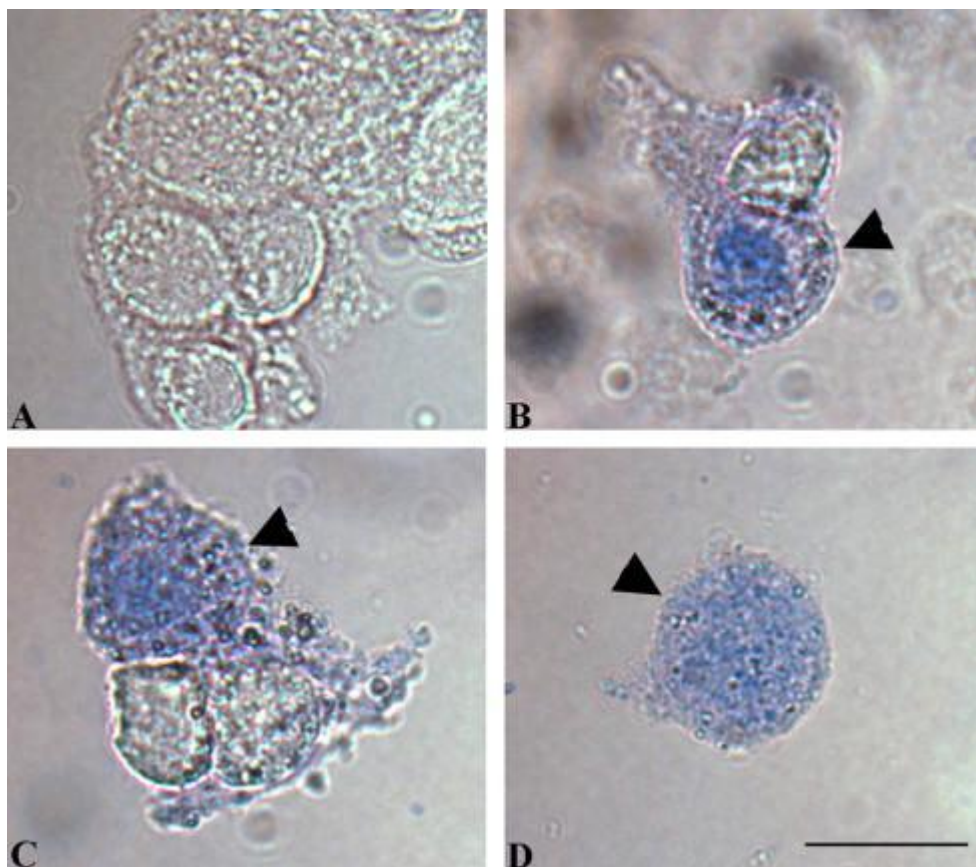
V současné době existuje celá řada metod použitelných pro stanovení životaschopnosti buněk (viability). Metody jsou založeny na různých principech a postupech. Dále bude uveden pouze výběr základních metod.

#### 4.3.1 Analýza viability buněk použitím trypanové modři

Jedna z nejčastěji používaných metod pro určení viability buněk ve vzorku je barvení pomocí trypanové modři (Trypan Blue; sodná sůl toluidin-diazo-diaminonaftholdisulfonové kyseliny) (Mishell a Shiigi, 1980). Základem metody je odlišení živých buněk s neporušenou buněčnou membránou a buněk mrtvých, které mají narušenu strukturální integritu buněčné membrány. Makromolekuly trypanové modři přes intaktní buněčnou membránu s funkčními transportními systémy neprocházejí, naopak při značném poškození buněčné membrány u mrtvých buněk membránou prostoupí a barvivo modře obarví cytoplazmu mrtvé buňky (Kružík et al., 2006).

Tato metoda má však i své nevýhody. Vzhledem k tomu, že trypanová modř vykazuje silné cytotoxické účinky, je třeba vyhodnotit výsledky během doporučené doby 3-5 minut od přidání barviva, poté již modř začne pronikat membránami dosud živých buněk.

Za tuto dobu je ve světelném mikroskopu možno vyhodnotit jen statisticky malé množství buněk (Altman et al., 1993).



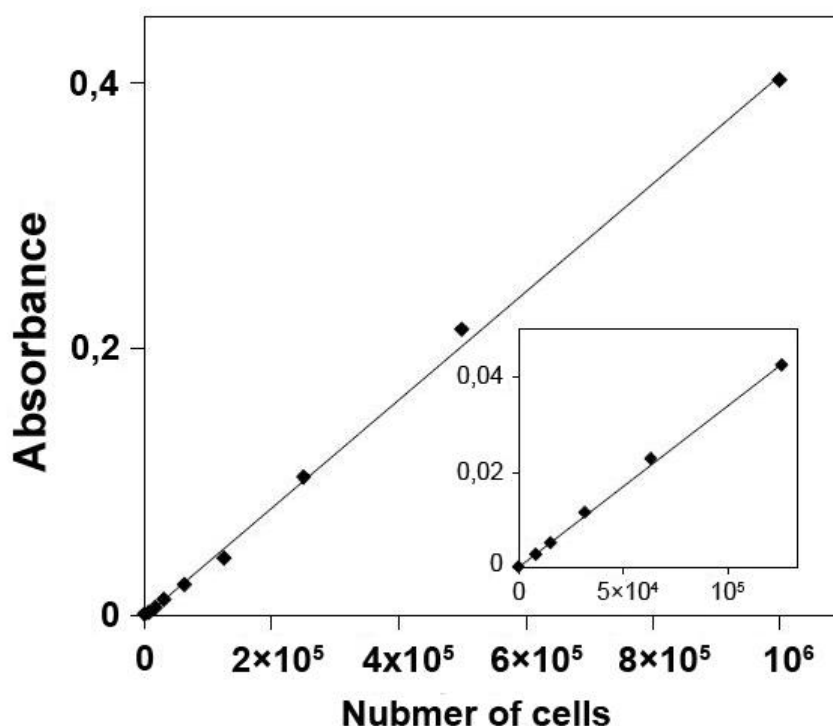
Obrázek 9 – příklad výsledku testu viability nervových buněk švábů po působení dvou druhů neonicotinoidů (druh insekticidů) - imidaclopridu (IMI) a clothianidinu (CLO) na snímcích ze světelného mikroskopu. A) působení 50  $\mu\text{M}$  CLO po dobu 8 hodin, B) působení 50  $\mu\text{M}$  IMI po dobu 8 hodin, C) působení 100  $\mu\text{M}$  CLO po dobu 24 hodin, D) působení 100  $\mu\text{M}$  IMI po dobu 24 hodin. Měřítka 10  $\mu\text{m}$  (Benzidane et al., 2011)

#### 4.3.2 MTT test založený na metabolické aktivitě

MTT test je používán ke stanovení životaschopnosti buněk a cytotoxicity potenciálně toxických látek a léčiv (Scudiero et al., 1988). Poprvé byl proveden a popsán Mossmanem (1983) a stále patří mezi nejuniverzálnější a nejoblíbenější cytotoxické metody.

Při tomto testu jsou buňky v exponenciální fázi růstu vystaveny cytotoxické látce. Doba působení je obvykle stanovena jako doba potřebná pro maximální poškození buněk přičemž je také ovlivněna stabilitou cytotoxické látky. Po odebrání cytotoxické látky je buňkám dovoleno proliferovat po dvě až tři doby zdvojnásobení populace (population-

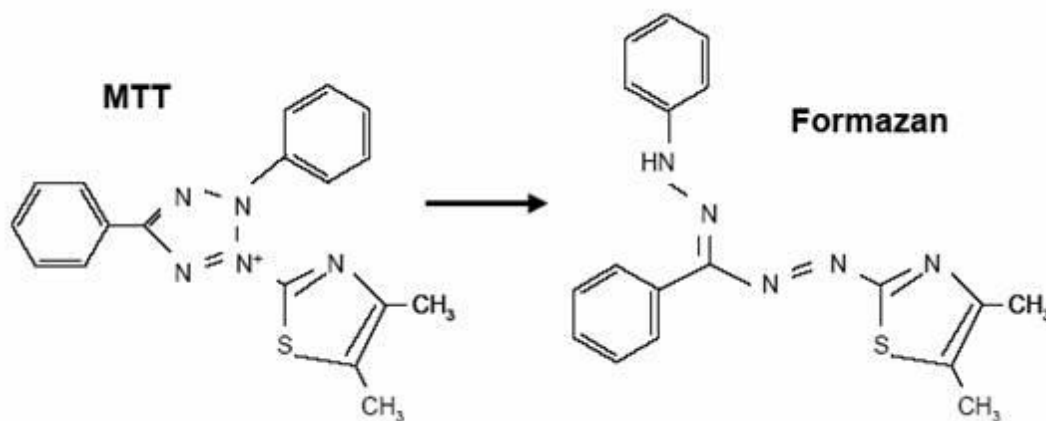
doubling times), aby se rozlišilo mezi životaschopnými buňkami, které jsou schopny proliferace a životaschopnými buňkami, které se již množit nemohou. Počet přeživších buněk je poté určován nepřímo pomocí redukce MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-tetrazolium bromidu, žlutého, ve vodě rozpustného tetrazoliového barviva, živými (metabolicky aktivními), nikoli však mrtvými buňkami na purpurový produkt formazán, který není rozpustný ve vodném prostředí. K redukci dochází na mitochondriální membráně respirační přeživších buněk. Množství vyprodukovaného MTT formazánu může být stanoveno spektrofotometricky za použití vhodného rozpouštědla při vlnové délce 540 nebo 570 nm, přičemž vyšší hodnoty absorbance (více redukovaného formazánu) ukazují na vyšší počet přeživších buněk (Freshney, 2005).



Obrázek 10 – lineární závislost absorbance na počtu živých buněk při vlnové délce 570 nm (Molecular Probes, 2002)

O popularitě této metody vypovídá řada vědeckých článků publikovaných v poslední době. Například práce Gomez et al. (1997) se zabývá hodnocením viability buněk srdeční svaloviny (kardiomyocytů) vystavených působení adenosinu a draslíku. Studie Ahmad et al. (2006) zkoumá vliv cholesterolu na životnost buněk plicního epitelu a endoteliálních buněk koronárních tepen. V práci Jaszczyszyn et al. (2008) je pomocí MTT testován toxický vliv protinádorového léku doxorubicinu na buněčné kultury lidských lymfocytů.

V článku Huveneers-Oorsprong et al. (1997) je touto metodou stanovován toxický vliv veterinárních léčiv na prasečí hepatocyty. Studie Nasr-Esfahani et al. (2002) diskutuje použití MTT testu pro stanovení viability spermií pro klinické a diagnostické účely.



Obrázek 11 – redukce ve vodě rozpustného MTT na nerozpustný formazán (Pulz, 2007)

#### 4.3.3 Průtoková cytometrie

Cytometrie slouží k analýze částic a buněk, které protékají přístrojem v proudu nosné kapaliny. Využívá princip rozptylu světla, excitace a emise fluorochromních molekul k získání dat z mikroskopických částic a buněk. Buňky jsou většinou značeny specifickými fluorochromy a hydrodynamicky soustředěny do tenkého proudu v kapiláře, kterou protékají vysokou rychlostí, přičemž jsou ozařovány monochromatickým koherentním zářením produkovaným laserem. Intenzita fluorescence jednotlivých buněk pak odpovídá množství struktur, které na sebe vážou fluorescenční barvivo (například propidium jodid vážající se na DNA po proniknutí narušenou membránou mrtvé buňky). Hlavními výhodami průtokové cytometrie jsou: jednoduchá příprava vzorků, vysoká rychlost analýz velkých souborů jednotlivých buněk nebo částic, nedestruktivnost, snadná detekce subpopulací a také relativně nízké finanční náklady na analýzu jednoho vzorku. Průtoková cytometrie je v klinické praxi využívána jako významná diagnostická metoda především v hematologii, onkologii a imunologii. Široké využití má také v základním biologickém výzkumu (Slaninová et al., 2008).

## 5 ZÁKLADY KULTIVACE BUNĚČNÝCH KULTUR

### 5.1 Buňky prokaryotické a eukaryotické

Od šedesátých let 20. století jsou rozlišovány dva typy poněkud strukturálně odlišných buněk, buňky prokaryotické a eukaryotické. Tato terminologie vyšla primárně z odlišné struktury jádra. U buněk prokaryotických je jádro tvořeno jedním chromozomem uloženým volně v cytoplazmě. Struktura jádra eukaryotických buněk je vždy složitější. Jádro zde vytváří samostatný kompartment, oddělený od cytoplazmy jaderným obalem. Buňky prokaryotické jsou zpravidla menší (jejich průměr je několik mikrometrů, byť rozdíly v jejich velikostech jsou velké), než buňky eukaryontní (průměr je několik desítek mikrometrů). Prokaryotické buňky jsou velmi chudé na membránové systémy a většina funkcí, které plní membránové organely eukaryotických buněk, je vázána na plazmatickou membránu. Rovněž ribozomy prokaryotických buněk jsou poněkud menší, než u buněk eukaryotických. U prokaryotických buněk nebyly, na rozdíl od buněk eukaryotických, nalezeny komponenty cytoskeletu. Rozdílný je i mechanismus buněčného dělení (Nečas, 2000).

### 5.2 Význam buněčných kultur

V dnešní době patří buněčné kultury mezi nejvíce využívané biologické modely aplikované ve výzkumu. V porovnání s jinými objekty užívanými v experimentech, například laboratorními zvířaty nebo izolovanými orgány či tkáněmi, mají nesporné výhody. V první řadě, pokus je prováděn na jediném, jednoznačně charakterizovaném buněčném typu, který lze většinou kultivovat v krátkém čase a jeho výsledky nejsou ovlivněny interakcí s jinými orgány, tkáněmi či buněčnými populacemi. Z tohoto faktu vyplývá bezproblémová reprodukovatelnost výsledků vědeckých prací. Další výhodou je fakt, že na kultivovaných buňkách lze provádět experimenty, při nichž dojde k jejich zničení. Na druhou stranu je třeba brát na vědomí i řadu omezení. Kultivace buněk neprobíhá ve fyziologickém prostředí tkání, v důsledku čehož mohou buňky během kultivace dediferencovat či měnit svůj fenotyp. Pro práci s buněčnými kulturami je nezbytná speciálně vybavená laboratoř, vyškolený personál, zvláštní spotřební materiál a chemikálie zbavené běžných kontaminantů (Davis, 2002).

### 5.3 Princip kultivace buněčných kultur

Základ buněčné kultury tvoří izolace určitého typu zvířecích, lidských a méně často i hmyzích či rostlinných buněk. Mezi izolační techniky patří mechanická disociace tkáně, natrávení pomocí enzymů, sběr odloupaných buněk z tělesných tekutin apod. První kulturu izolovaných buněk označujeme jako primární kulturu neboli primokulturu. Nejčastěji bývají kultivovány buňky adherované na vhodném povrchu, méně obvykle v suspenzi či zakotvené v matrix. Přičemž kultivační podmínky se snaží simulovat fyziologické podmínky *in vivo*: buňky jsou pěstovány při tělesné teplotě ve speciálních nádobách, rostou v kultivačním médiu, udržují se zpravidla v atmosféře se zvýšeným parciálním tlakem oxidu uhličitého. Jsou-li buňky pěstovány jako adherentní kultura, jsou podstatné vlastnosti povrchu kultivační nádoby. Největší podíl buněčných typů vyžaduje hydrofobní povrch, proto se nejčastěji používají nádoby ze speciálně upraveného polystyrenu. Po dostatečném namnožení se adherentní buňky uvolní od kultivačního povrchu, nejčastěji pomocí proteáz – např. trypsinu, případně odstraněním dvojmocných iontů, mechanicky nebo snížením teploty. Buněčná suspenze je poté nasazena do nové kultivační nádoby, tento postup se obvykle označuje jako pasáž a vzniká jí sekundární kultura čili subkultura. U většiny buněčných linií roste počet buněk přibližně exponenciálně až do chvíle, kdy se buňky začnou těsně dotýkat. V důsledku kontaktní inhibice poté dochází ke zpomalení až zastavení růstu. Velká část adherentních kultur nakonec vytváří na povrchu kultivační nádoby splývající vrstvu o síle jedné buňky (monolayer). Kultivované buňky zpravidla mívají omezenou životnost, kdy po několika pasážích podléhají stárnutí (senescenci) a jejich další dělení se postupně zastavuje. Je ale také možné pracovat s tzv. kontinuálními liniemi tvořenými spontánně, chemicky či virově transformovanými buňkami (Vejška, 2008).

#### 5.3.1 Růstová křivka buněčné kultury

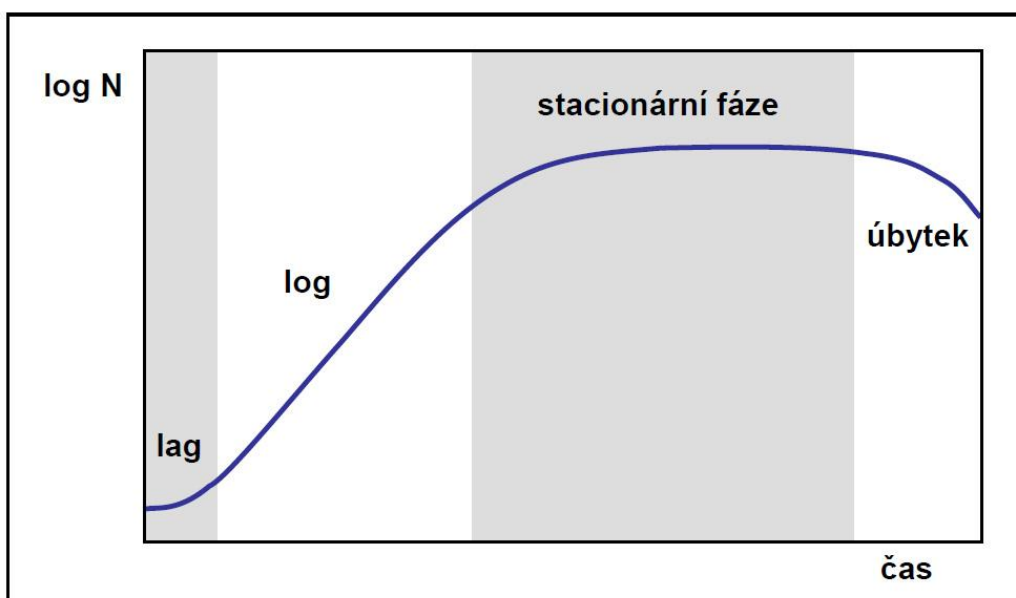
Jak bylo již naznačeno, růst buněčné kultury prochází několika fázemi:

- Lag-fáze – počáteční fáze růstu, ve které počet buněk nejprve mírně klesá a poté poměrně prudce vzrůstá.
- Log-fáze – také logaritmická či exponenciální fáze růstu, kdy počet buněk exponenciálně roste. Lze v ní zachytit nejvíce buněk v mitóze, čehož se využívá pro chromozomová vyšetření.



- Stacionární fáze – během této fáze rychlost růstu buněčné populace postupně klesá, projevují se inhibiční mechanismy jako kontaktní inhibice a produkce růstových inhibitorů. Dále dochází k postupnému vyčerpávání živin z média.
- Fáze úbytku buněk – jedná se o fázi, během níž dochází k postupnému odumírání buněk, v důsledku nedostatku živin, sníženého pH (následkem zvýšené koncentrace oxidu uhličitého a dalších kyselinotvorných látek v médiu) a hromadění toxických produktů buněčného metabolismu (Freshney, 1992).

Tyto fáze jsou znázorněny v růstové křivce buněčné kultury, která vyjadřuje změny početnosti buněk v závislosti na čase:



Obrázek 12 – růstová křivka buněčné kultury (Kultivace buněk *in vitro*, 2009)

### 5.3.2 Vybavení laboratoře pro kultivaci buněk *in vitro*

Jedním z hlavních požadavků laboratoře pro kultivaci buněk *in vitro* je udržení sterility a zabránění kontaminacím. Je vhodné pracovat ve vyhrazené čisté laboratoři podléhající speciálnímu režimu. Mezi základní vybavení laboratoře patří laminární box s řízeným přívodem i odvodem vzduchu, inkubátor s regulací teploty, relativní vlhkosti a parciálního tlaku oxidu uhličitého, pro kontrolu vzorků je nutný mikroskop vybavený fázovým kontrastem. Používá se sterilní jednorázový plast, kultivační nádoby s upraveným povrchem, mikropipety a chemikálie určené pro práci s buněčnými kulturami (Freshney, 2005).

### 5.3.3 Kultivační média

Média používaná pro kultivaci buněčných kultur jsou směsí několika desítek látek. Zpravidla obsahují hlavně anorganické ionty, aminokyseliny, pufrující složku jako stabilizátor pH ( $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ), vitaminy, růstové faktory, stopové prvky, mastné kyseliny lipidy, specifické proteiny a peptidy podporující buněčné dělení. Pro usnadnění práce s buněčnou kulturou se mnohdy přidává acidobazický indikátor. Jako zdroj růstových faktorů, stopových prvků a dalších látek nutných pro růst kultury se používá krevní sérum, nejčastěji fetální bovinní. Při použití média se sérem je nevýhoda nepřesně definované koncentrace veškerých látek, takže se mohou lišit růstové charakteristiky podle šarže použitého séra. Kultivace buněk v definovaném médiu bez séra bývá obtížnější, médium je nutné doplnit celou řadou růstových faktorů a dalších látek. V odůvodněných případech se do kultivačních médií přidávají i antibiotika, jejich použití by nemělo být paušalizováno, neboť zvyšuje riziko skryté kontaminace buněčných kultur (Sigma-Aldrich Co., 2010).

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 6 MATERIÁL A METODIKA

### 6.1 Syntéza koloidního polyanilinu

Testovaná látka, tedy koloidní polyanilin, byla připravena dle postupu IUPAC (Stejskal a Sapurina, 2005), a to RNDr. Jaroslavem Stejskalem na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd v Praze.

### 6.2 Informace o použitých buněčných liniích

V rámci studie byly použity buňky buněčné linie HaCaT. Jedná se o buněčnou linii lidských keratinocytů, které byly získány od firmy Cell Lines Service (Catalog No. 300493, Germany). Jako kultivační médium bylo použito Dulbecco's Modified Eagle Medium, s vyšším obsahem glukózy. K médiu se dle návodu pro kultivaci buněk přidává 10% fetálního séra skotu a antibiotika – konkrétně Penicillin/Streptomycin, 100 U/ml (100 $\mu$ g/ml), (PAA Laboratories GmbH, Austria). Druhou linií použitou v rámci našich testů byla linie myších fibroblastů NIH/3T3 (ATCC CRL-1658). Oproti buňkám HaCaT se kultivační médium liší v použitém séru. V případě NIH/3T3 buněk je použito telecí sérum. Buňky byly kultivovány jako adherentní kultura v polystyrenových kultivačních nádobách (TPP) přičemž ideální podmínky – teplota 37°C, konstantní relativní vlhkost a 5% atmosféra oxidu uhličitého byly zajištěny pomocí inkubátoru Heracell 150i (ThermoScientific, USA).

### 6.3 Experiment

Po dostatečném namnožení adherovaných buněk můžeme kroky vedoucí k vyhodnocení toxického vlivu koloidního polyanilinu na lidské keratinocyty a myší fibroblasty rozdělit do několika fází:

#### 6.3.1 Trypsinizace a prekultivace

Prekultivace buněk je nezbytným krokem před samotným testem, a to z důvodu fyziologických parametrů buněk. Kultivační nádoba s adherovanými buňkami byla nejprve zkontrolována pomocí invertovaného světelného mikroskopu s fázovým kontrastem Olympus CKX 41 (Olympus, Japonsko) a poté přesunuta do laminárního boxu s řízenou cirkulací vzduchu HERAsafe KSP (ThermoScientific, USA). Zde bylo z kultivační nádoby s buňkami pomocí odsávacího zařízení co nejdokonaleji odsáto kultivační médium. Zbytky

média a séra byly poté ještě odstraněny opláchnutím 15 ml fosfátového pufru (PBS, konc. 0,2 ml/cm<sup>2</sup>) a jeho následným odsátím. Dále bylo provedeno přerušení vazeb jak mezi adherovanými buňkami a kultivačním povrchem, tak i mezi jednotlivými buňkami pomocí 7,5 ml serinové proteázy, trypsinu (konc. 0,1 ml/cm<sup>2</sup>). Ten se nechal působit za průběžného kontrolování mikroskopem Olympus CKX 41 v inkubátoru Heracell 150i do oddělení buněk, nejdéle však po dobu 20 minut. Po oddělení buněk bylo v boxu HERAsafe KSP přidáno do kultivační nádoby 7,5 ml kultivačního média a roztok s buňkami byl pomocí pipety převeden do centrifugační zkumavky. Centrifugace probíhala v chlazené centrifuze Eppendorf 5702 R (Eppendorf, Německo) při teplotě 37°C, po dobu tří minut a 1100 rpm. Po centrifugaci byly buňky viditelně koncentrovány na dně zkumavky, což umožnilo odsátí supernatantu. Tímto postupem byl získán přibližný počet –  $2 \cdot 10^7$  buněk což odpovídá povrchu kultivační nádoby a densitě buněk. Bylo tedy možné naředit buňky pomocí kultivačního média na požadovanou koncentraci  $1 \cdot 10^5$  buněk/ml kultivačního média. Buňky v této koncentraci byly nasazeny do 96 jamkových polystyrenových testovacích plátů v objemu 100 µl, přičemž bylo tímto způsobem zaplněno 40 jamek, buňky byly poté ponechány v inkubátoru Heracell 150i po dobu 24 hodin potřebnou pro prekultivaci.

### 6.3.2 Přidání potenciálně toxické látky

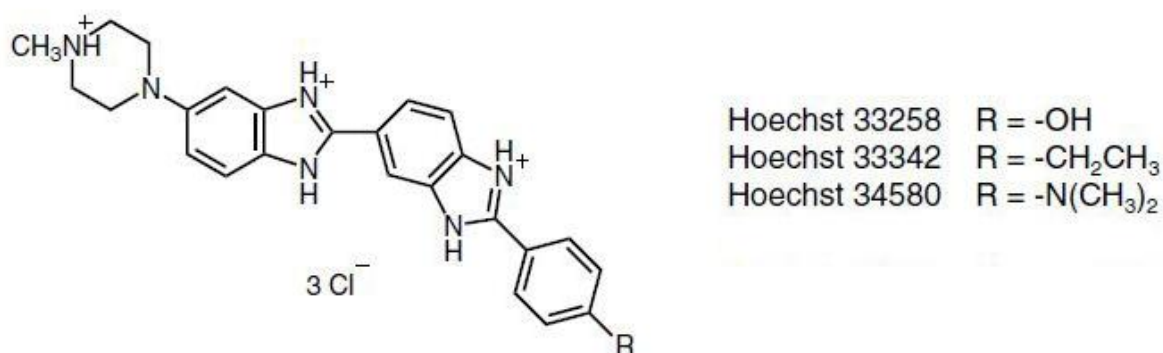
Vlastní test cytotoxicity byl proveden v souladu s ISO normou 10 993-5 „Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro*“ s drobnými úpravami. Po uplynutí doby potřebné pro prekultivaci bylo ze zaplněných jamek destičky odsáto všechno médium. K buňkám v jamkách byly následně přidány různě koncentrované roztoky koloidního polyanilinu v množství 100 µl, vždy určitá koncentrace pro čtyři jamky v řadě. V průběhu experimentální práce byly testovány různé koncentrace koloidního polyanilinu. Dále jsou prezentovány pouze výsledky koncentrací, u kterých dochází k posunu v rámci cytotoxicity. Vyšší a nižší koncentrace, které byly také testovány již uváděny nejsou, protože neposkytují žádnou další informaci. Po předchozích zkušenostech jsme tedy zvolili následující koncentrace koloidu: 3%, 2%, 1%, 0,75%, 0,6%, 0,4%, 0,3%, 0,2% a 0,1%. Do jedné čtveřice jamek s buňkami pak bylo přidáno 100 µl čistého média. Tyto vzorky sloužily jako referenční – jedná se tedy o růst buněk na tkáňovém polystyrenu. Různé koncentrace koloidu byly ředěny pomocí čistého kultivačního média. Jako příklad ředění může být použita 3% koncentrace, která byla získána smícháním 30 µl 100% koloidního polyanilinu s 970 µl média. Po přidání všech roztoků do jamek byly buňky opět ponechány 24 hodin potřebných pro kultivaci v inkubátoru Heracell 150i.

### 6.3.3 MTT test

Po uplynutí 24 hodin kultivace byly z jamek odsáty roztoky různých koncentrací koloidu v kultivačním médiu, v případě kontroly bylo odsáto médium. Do jamek s buňkami bylo přidáno čisté médium a poté MTT o koncentraci 0,5 mg/ml média. Buňky s přidaným MTT byly ponechány čtyři hodiny v inkubátoru Heracell 150i. Po uplynutí této doby bylo pomocí mikropipety odpipetováno 40  $\mu$ l roztoku z každé ze zaplněných jamek, přičemž se toto množství ponechalo v pipetě. Zbylé množství roztoků bylo odsáto a ponechaných 40  $\mu$ l bylo opět vráceno zpět do jamek. Následovalo přidání 80  $\mu$ l DMSO, který byl ponechán působit po dobu 15 minut. Po tomto kroku se již přikročilo k samotnému měření absorbance přístrojem Sunrise (Tecan, Švýcarsko), při vlnové délce 570 nm, které prozradilo množství redukovaného formazánu a tedy i množství přeživších buněk.

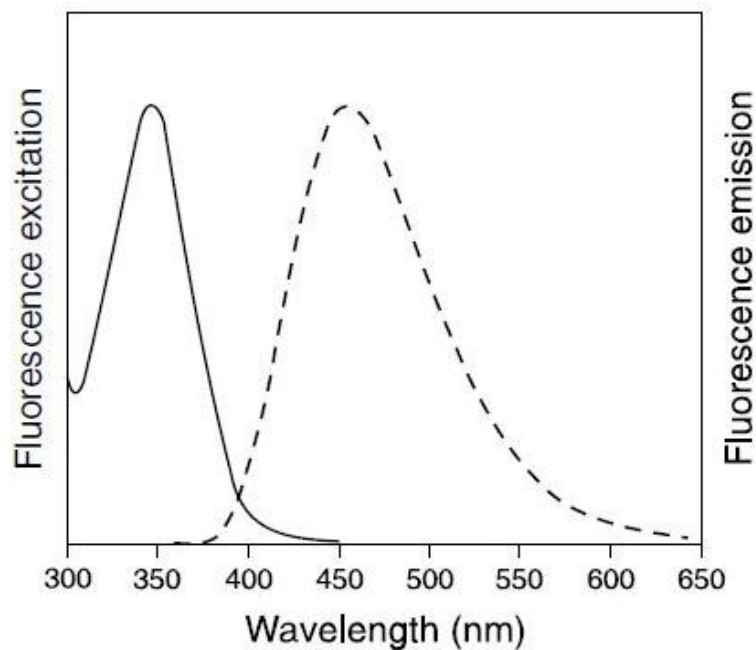
### 6.3.4 Fluorescenční mikroskopie

Po uplynutí stejné doby kultivace jako před MTT testem bylo u buněčné linie fibroblastů NIH/3T3 s různými koncentracemi koloidního polyanilinu pro vyhodnocení viability a morfologických změn buněk využito i pozorování a následné pořízení mikrofotografií na invertovaném fluorescenčním mikroskopu (Olympus CKX 41, Japan). Vzorky byly před pozorováním barveny fluorescenčním barvivem Hoechst 33258 o koncentraci 10  $\mu$ g/ml.



Obrázek 13 – chemická struktura fluorescenčních barviv řady Hoechst (Molecular Probes, 2005)

Hoechst 33258 je modré fluorescenční barvivo řady Hoechst, schopné vázat se na jadernou, dvouřetězcovou DNA v oblastech nejméně tři párů bází adenin – thymin. Jeho excitační maximum se pohybuje okolo 350 nm, emisní potom v oblasti kolem 450 nm. Může tedy být efektivně excitován pomocí záření xenonové výbojky, rtuťové obloukové lampy nebo UV laseru. Této jeho vlastnosti je možné využít pro detekci a stanovení množství DNA, tím pádem i pro stanovení počtu buněk (Molecular Probes, 2005).



Obrázek 14 – fluorescenční excitační a emisní spektrum barviva Hoechst 33258 vázaného na DNA (Molecular Probes, 2005)

## 7 VÝSLEDKY

Cílem práce je stanovit cytotoxicitu koloidního polyanilinu, jakožto slibného polymerního materiálu pro biotechnologické aplikace. Jedná se o prvotní studii, protože cytotoxicitě koloidního polyanilinu se zatím nevěnovala pozornost. V rámci práce tak byla provedena série testů různých koncentrací koloidního polyanilinu v kultivačním médiu. V práci jsou poté prezentovány pouze výsledky limitních koncentrací. Vyhodnocení cytotoxicity bylo provedeno v souladu s ISO normou 10 993-5 „Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro*“ a vyhodnoceno pomocí MTT testu. Výsledky jsou prezentovány několika různými způsoby. Jednak vyhodnocením průkaznosti rozdílů mezi průměrnými hodnotami absorbance jednotlivých vzorků a reference, jednak dle ISO normy pomocí procentuálního vyjádření buněčné viability ve srovnání s referencí a také pořízením mikrofotografií prostřednictvím invertovaného mikroskopu s fázovým kontrastem a fluorescenčního mikroskopu.

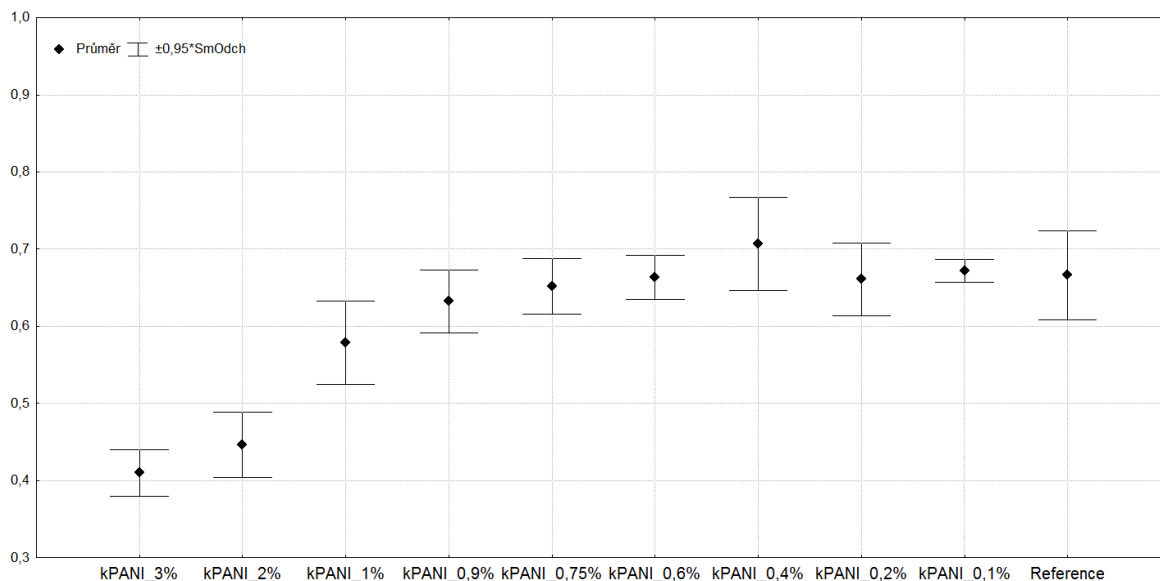
### 7.1 pH roztoků koloidního polyanilinu

Z důvodu možného vlivu pH roztoků koloidního polyanilinu, jehož normální pH je 2,280 jsme pomocí pH metru inoLab® pH 7310 (WTW, Německo) a elektrody SenTix® Mic-D (WTW, Německo) stanovovali pH jednotlivých roztoků s kultivačním médiem. Hodnoty pH jsou důležité z hlediska možného ovlivnění interakcí buněk. Kultivační médium obsahuje pufr, které mohou pH výrazně ovlivňovat. V našem případě byly hodnoty pH u 3 % roztoku stanoveny na hodnotu pH = 8,025, u 1 % roztoku pak 7,995. Z výše uvedeného plyne, že nebylo nutné upravovat pH testovaných koncentrací koloidního polyanilinu.

### 7.2 Cytotoxicita stanovená u linie HaCaT

V grafu č. 1 jsou uvedeny výsledky cytotoxicity koloidního polyanilinu u buněk linie HaCaT, vyjádřeny pomocí absorbance v rámci MTT testu. Z grafu č. 1 je zřejmé, že se zvyšující se koncentrací se snižuje absorbance, která je vyjádřením počtu životaschopných buněk. V případě dvou nejvyšších koncentrací (3 % a 2 %) koloidního polyanilinu v kultivačním médiu je zřejmý výrazný pokles viability buněk. Oproti tomu, všechny nižší koncentrace vykazují viabilitu blížící se referenci. Z grafu je také zřejmé, že v rámci testů byly naměřeny přiměřené odchylky jednotlivých hodnot.





Graf 1 – výsledky cytotoxicity koloidního polyanilinu u buněk linie HaCaT

Trend pozorovaný v rámci grafu č. 1 byl potvrzen a upřesněn pomocí statistického vyhodnocení, konkrétně pomocí T-testu. Další formou vyhodnocení cytotoxického vlivu, jenž je v souladu s ISO normou, je vyjádření procentuálního poklesu buněčné viability při srovnání s referencí. Oba typy výsledků jsou uvedeny v tabulce č. 2. Z tabulky je patrné, že koncentrace 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,75; 0,9 a 1 % nevykazovaly statisticky průkazně nižší viabilitu buněk než reference. Jejich vliv na buňky byl tedy nízký. Tento výsledek je potvrzen také pomocí procentuálního vyjádření, ze kterého je zřejmé, že tyto vzorky jsou v procentuálním vyjádření mezi 80 až 100 % viabilitou, tedy nejsou cytotoxické. Oproti tomu koncentrace 2 % a 3 % již vykazují statisticky průkazně odlišnou buněčnou viabilitu, a to na hladině významnosti  $p = 0,0003$  v případě 3 % roztoku a  $p = 0,0012$  v případě 2 % roztoku koloidního polyanilinu. Tento výsledek, stejně jako u nižších koncentrací, pak odpovídá i vyhodnocení dle ISO normy. Koncentrace 2 % a 3 % koloidního polyanilinu v kultivačním médiu jsou dle tohoto přístupu slabě cytotoxické. Z grafu č. 1 i z tabulky č. 2 je zjevné, že koncentrace vyšší než jsou zde prezentovány, budou mít vyšší vliv na buněčnou viabilitu a budou tedy více cytotoxické. Naopak koncentrace nižší již nemají žádný vliv na buněčnou viabilitu.

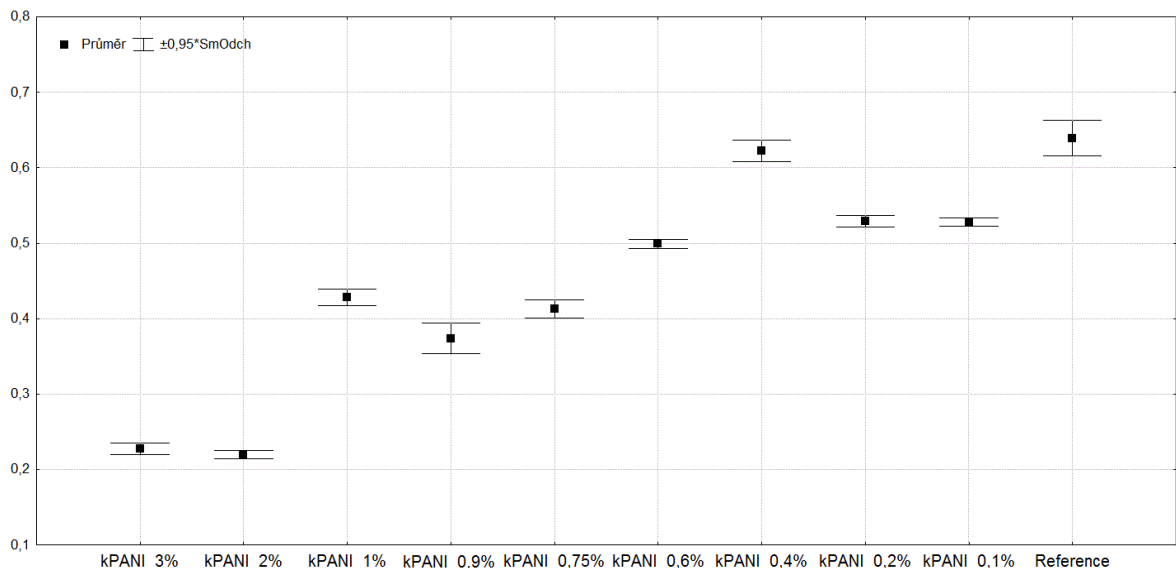
Koncentrace koloidního polyanilinu	Průměr ± SD	p	%
3	0,4097 ± 0,0322	0,0003	62
2	0,4462 ± 0,0450	0,0012	67
1	0,5790 ± 0,0569	0,0820	87
0,9	0,6321 ± 0,0432	0,3989	95
0,75	0,6518 ± 0,0375	0,7041	98
0,6	0,6636 ± 0,0298	0,9437	100
0,4	0,7068 ± 0,0635	0,4290	106
0,2	0,6608 ± 0,0494	0,9230	99
0,1	0,6722 ± 0,0156	0,8735	101
Reference	0,6660 ± 0,0610		

Poznámka: p vyjadřuje hladinu významnosti při porovnání s referencí. % 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.

Tabulka 2 – průměrné absorbance, směrodatné odchylky a hladiny významností různých koncentrací koloidního polyanilinu spolu s procentuálním vyjádřením buněčné viability u buněk linie HaCaT

### 7.3 Cytotoxicita stanovená u linie NIH/3T3

Graf č. 2 uvádí výsledky cytotoxicity koloidního polyanilinu u buněk linie NIH/3T3, vyjádřené pomocí absorbancí naměřených pomocí MTT testu. Z grafu lze vyčíst, tendenci snižování absorpance, tedy i počtu životoschopných buněk se zvyšující se koncentrací. Je však patrné, že koncentrace 1 % a 0,4 % koloidního polyanilinu v kultivačním médiu z tohoto trendu vybočují. Odchyłka je pravděpodobně způsobena chybou měření. Dvě nejvyšší koncentrace koloidního polyanilinu v kultivačním médiu (2 % a 3 %) vykazují oproti ostatním koncentracím zřetelný pokles viability buněk. Se snižováním koncentrace koloidního polyanilinu viabilita roste, ale referenční hodnotě se dle tohoto grafu s výjimkou vybočující 0,4 % koncentrace žádná jiná koncentrace neblíží. Z grafu je také zjevné, že odchylky naměřených hodnot absorpance jsou přiměřené.



Graf 2 – výsledky cytotoxicity koloidního polyanilinu u buněk linie NIH/3T3

Tendence pozorovaná v grafu č. 2 a tabulce č. 3 byla potvrzena a upřesněna pomocí statistického vyhodnocení, konkrétně pomocí T-testu. Dále je prezentováno vyhodnocení cytotoxického vlivu v souladu s ISO normou, tedy vyjádření procentuálního poklesu buněčné viability při srovnání s referencí. V tabulce č. 3 jsou uvedeny oba typy výsledků. Tato tabulka lze potvrdit, že všechny koncentrace s výjimkou koncentrace 0,4 %, pravděpodobně ovlivněné chybou měření, vykazovaly statisticky průkazně odlišnou buněčnou viabilitu vůči referenci, a to na hladině významnosti  $p = 0,0000$ .

Z tabulky je dále patrné, že koncentrace 0,1 % a 0,2 % statisticky průkazně vykazovaly nižší viabilitu buněk než hodnoty reference. Lze však říci, že jejich vliv na buňky byl nízký. To je potvrzeno pomocí procentuálního vyjádření, ze kterého je zřejmé, že tyto vzorky jsou mezi 80 až 100 % viabilitou, vykazují tedy necytotoxický efekt. Koncentrace 0,6 % a 0,75 % vykazovaly také statisticky průkazně nižší viabilitu buněk než hodnoty reference. Podle procentuálního vyjádření buněčné viability, které se u těchto koncentrací nachází mezi 60 až 80 % lze však tvrdit, že vykazují slabou cytotoxicitu. Koncentrace 0,9 % vykazovala statisticky průkazně nižší viabilitu buněk než hodnoty reference a dle procentuálního vyjádření buněčné viability, nacházejícího se mezi 40 až 60 %, je možné tuto koncentraci označit jako středně cytotoxickou. Koncentrace 2 % a 3 %, které vykazovaly statisticky průkazně nižší viabilitu buněk než hodnoty reference, lze na základě procentuálního vyjádření viability (< 40 %) pokládat za silně cytotoxické.

O koncentracích, které byly pravděpodobně ovlivněny chybou měření, je možné podle tabulky č. 3 uvést následující: Koncentrace 0,4 % jako jediná nevykazuje statisticky průkazně odlišné hodnoty buněčné viability oproti referenci a to na hladině významnosti  $p = 0,3003$ . Hodnota procentuálního vyjádření viability je vyšší než 80 % a bylo by ji možné klasifikovat jako necytotoxickou. Koncentrace 1 % vykazuje statisticky průkazně nižší hodnoty buněčné viability než reference. Procentuální vyjádření viability mezi 60 až 80 %, podle kterého by tato koncentrace měla být slabě cytotoxická, však neodpovídá nižší koncentraci 0,9 % se střední cytotoxicitou.

Koncentrace koloidního polyanilinu	Průměr ± SD	p	%
3	0,2273 ± 0,0083	0,0000	36
2	0,2197 ± 0,0053	0,0000	34
1	0,4281 ± 0,0115	0,0000	67
0,9	0,3738 ± 0,0216	0,0000	59
0,75	0,4128 ± 0,0122	0,0000	65
0,6	0,4992 ± 0,0062	0,0000	78
0,4	0,6227 ± 0,0152	0,3003	97
0,2	0,5289 ± 0,0079	0,0000	83
0,1	0,5281 ± 0,0059	0,0000	83
Reference	0,6389 ± 0,0249		

Poznámka: p vyjadřuje hladinu významnosti při porovnání s referencí. % 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.

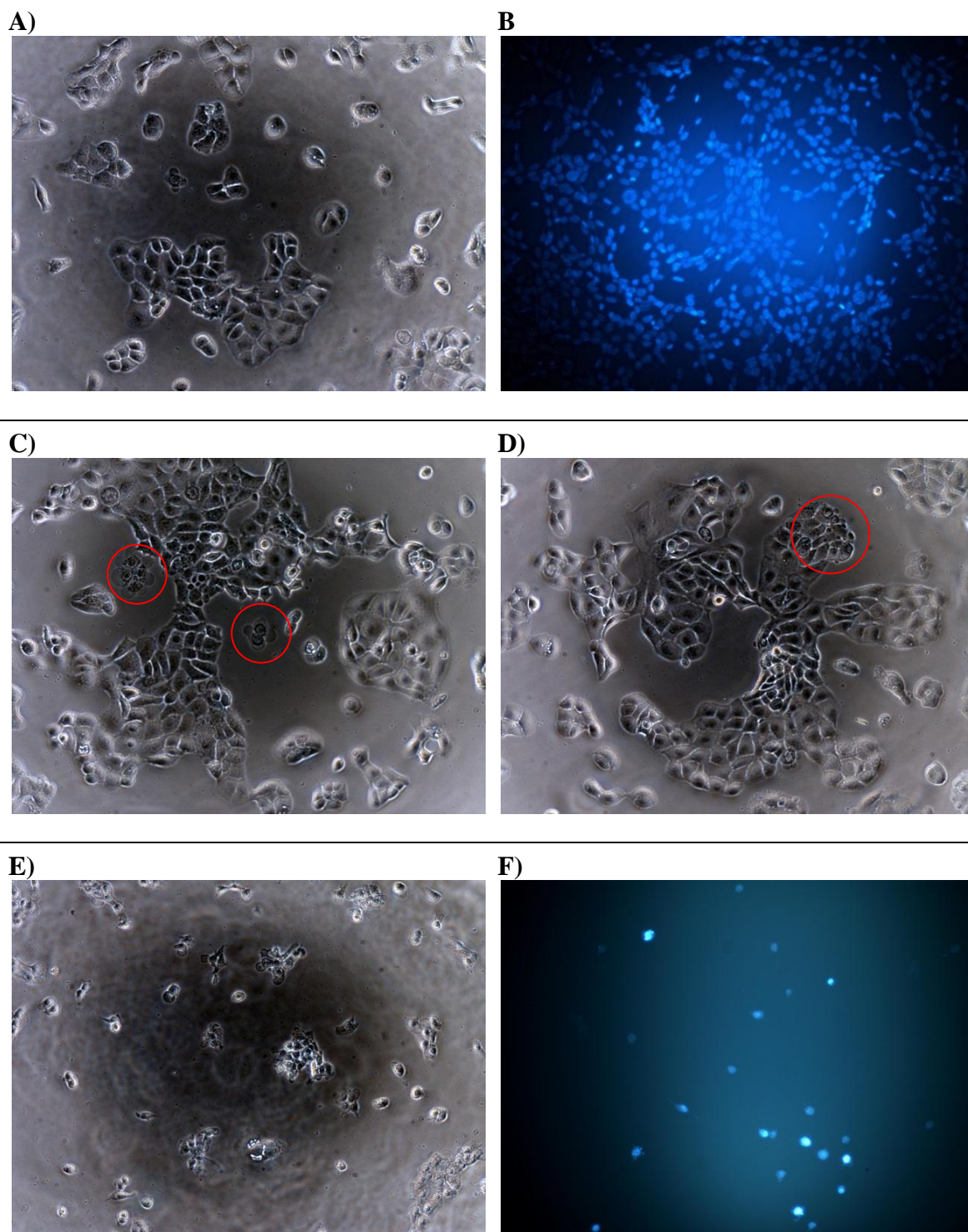
Tabulka 3 – průměrné absorbance, směrodatné odchylky a hladiny významností různých koncentrací koloidního polyanilinu spolu s procentuálním vyjádřením buněčné viability u buněk linie NIH/3T3

## 7.4 Mikrofotografie buněk kultivovaných za přítomnosti koloidního polyanilinu

Vyhodnocení pomocí MTT testu poskytuje jednoznačný obraz o kvantitativním vlivu na buněčné linie, nicméně mikrofotografie mohou doložit další vliv, například na morfologii buněk či výskyt apoptických buněk. Z tohoto důvodu jsme u všech vzorků také prováděli focení pomocí fluorescenčního mikroskopu a mikroskopu s fázovým kontrastem.

Na obrázku č. 12 jsou prezentovány vybrané mikrofotografie z testů cytotoxicity koloidního polyanilinu při zvětšení 100x. Konkrétně jsou prezentovány následující vzorky: reference, 0,5 %; 0,75 % a 2 % roztok koloidního polyanilinu; reference a 2 % roztok jsou prezentovány také pomocí fluorescenční mikroskopie, přičemž je obarvena jaderná DNA. Z obrázku je patrné, že buňky v referenčním vzorku jsou v dobrém fyziologickém stavu, proliferující, bez výskytu poškozených buněk. U 0,5 % a 0,75 % roztoku koloidního polyanilinu jsou patrné první známky poškození některých buněk (na obrázku zvýrazněny červeně). Jedná se o apoptické buňky prodávající programovanou buněčnou smrt projevující se rozpadem buněčných struktur a tvorbou bublin cytoplazmatické membrány. Celkově jsou však buňky v dobré kondici, proliferující a rozdíl oproti referenci není nijak výrazný. Oproti tomu, u koncentrace 2 % koloidního polyanilinu je zjevný výrazný úbytek buněk a především jejich poškození. Buňky mají nefyziologický tvar, vyskytují se zde buňky apoptické a silně poškozené, či pouze jejich zbytky. Tento výsledek je patrný také z obrázku s obarvenou DNA.

Výsledky mikrofotografií korespondují s výše uvedenými výsledky kvantitativního vyhodnocení pomocí MTT testu.



Obrázek 15 – mikrofotografie buněčných linií HaCaT a NIH/3T3 z testu cytotoxicity: A) reference – HaCaT; B) reference – DNA obarvena pomocí Hoechst – NIH/3T3; C) 0,4% koloidní polyanilin – HaCaT; D) 0,75% koloidní polyanilin – HaCaT; E) 2% koloidní polyanilin – HaCaT; F) 2% koloidní polyanilin – DNA obarvena pomocí Hoechst – NIH/3T3. Zvětšení u všech fotografií je 100×

## 7.5 Srovnání cytotoxicity u jednotlivých buněčných linií

Z grafů 1 a 2 a tabulek 2 a 3 je zjevné, že byly prokázány očekávané tendence poklesu buněčné viability s rostoucí koncentrací koloidního polyanilinu. Rychlost poklesu viability s koncentrací a míra cytotoxických účinků jednotlivých koncentrací koloidního polyanilinu se ale v porovnání linií lidských keratinocytů HaCaT a myších fibroblastů NIH/3T3 poměrně výrazně lišily.

U linie HaCaT, stejně jako u linie NIH/3T3 vykazovaly nejvyšší a statisticky průkaznou cytotoxicitu koncentrace koloidního polyanilinu 2 % a 3 %. Avšak zatímco v případě linie HaCaT tyto koncentrace způsobovaly slabou cytotoxicitu, u linie NIH/3T3 stejné koncentrace koloidního polyanilinu v médiu vykazovaly silnou cytotoxicitu. Rozdíl procentuálního vyjádření viability mezi těmito liniemi tedy činil u 3 % koncentrace 26 % a u 2 % koncentrace 33 %.

Nižší koncentrace koloidu (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,75; 0,9 a 1%) u linie HaCaT již nevykazovaly statisticky průkazně nižší buněčnou viabilitu než reference. Procentuální vyjádření viability u těchto koncentrací nekleslo pod 80 % a mohly proto být klasifikovány jako necytotoxické. U linie NIH/3T3 již koncentrace koloidu 0,9 % statisticky průkazně vykazovala střední cytotoxicitu. Koncentrace 0,75 % a 0,6 % byly statisticky průkazně vyhodnoceny jako slabě cytotoxické. Až nejnižší koncentrace 0,2 % a 0,1 % koloidního polyanilinu mohly být statisticky průkazně označeny za necytotoxické. Mezi koncentracemi 0,9 % a 0,75 % koloidního polyanilinu u různých buněčných linií byl rozdíl procentuálního vyjádření viability cca 35 %. U koncentrace 0,6 % činil rozdíl procentuálního vyjádření viability 22 % a u nejnižších koncentrací 0,2 % a 0,1 % byl rozdíl cca 17 %.

Jak již bylo uvedeno, koncentrace 1 % a 0,4 % u linie NIH/3T3 byly s největší pravděpodobností zatíženy chybou měření. Obecně lze konstatovat, že jednotlivé buněčné linie mohou reagovat odlišně na různé chemické látky. Je to dáno jejich rozdílnou fyziologií, která odpovídá i jejich funkci v organismu. Z našich výsledků se pro obecné využití zdají být více využitelné výsledky na linii NIH/3T3, která je pro tento typ studií běžně využívána.



## 8 DISKUZE

Doposud byl koloidní polyanilin zkoumán v několika souvislostech. Byly studovány metody jeho přípravy a volby vhodných stabilizátorů. V této souvislosti lze citovat práci Cruz-Silva et al. (2006), popisující enzymatickou syntézu koloidního polyanilinu a všeobecně uznávaný postup přípravy dle IUPAC uvedený ve článku Stejskal a Sapurina (2005), zmíněný postup je blíže popsán v teoretické části této práce. Dalším předmětem studia koloidního polyanilinu byla jeho stabilita v kyselém, neutrálním a zásaditém prostředí. Zkoumána byla také stabilita při teplotách nad 100 °C i během opakovaných cyklů zmrazení a tání, dále při působení ultrazvukového záření nebo při ozařování ultrafialovým zářením (Blinova et al., 2005). Studována byla i měrná elektrická vodivost této formy polyanilinu, a to ve studii Sulimenko et al. (2001). Velká pozornost byla, a dosud stále je, zaměřena na možná využití koloidního polyanilinu v oblasti elektroniky, dle Dhand et al. (2007) i v oblasti biotechnologických aplikací.

Z hlediska cytotoxicity se však koloidním polyanilinem dosud nikdo nezabýval. Zveřejněna byla pouze studie Humpolíček et al. (2012b), která se jako jediná zabývá cytotoxickými testy polyanilinu, konkrétně vlivu vodivé polyanilinové soli a nevodivé báze na buněčnou linii keratinocytů HaCaT a linii hepatocytů HepG2 pomocí MTT testu. Jak již bylo řečeno v teoretické části, ze studie vyplynulo, že obě formy polyanilinu vykazují průkaznou hladinu cytotoxicity, s tím, že polyanilinová sůl vykazovala větší cytotoxický efekt než polyanilinová báze. Jelikož se v praktické části této bakalářské práce pracovalo s buněčnou linií HaCaT, budou uvedeny publikované výsledky cytotoxicity polyanilinové soli a báze z práce Humpolíček et al. (2012b) pro buněčnou linii HaCaT. U soli i báze byly testovány 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, a 1% extrakty. Přičemž podle procentuálního vyjádření viability po působení různých koncentrací polyanilinové soli byly výsledky následující: 100 %, 50 %, 25 %, 10 % a 5 % extrakty vykazovaly střední cytotoxicitu a až nejnižší koncentrace, tedy 1 % extrakt byl vyhodnocen jako necytotoxický. Procentuálního vyjádření viability po působení různých koncentrací polyanilinové báze potom poskytlo tyto výsledky: 100 % extrakt vykázal střední cytotoxicitu, 50 % a 25 % extrakt slabou cytotoxicitu, 10 %, 5 % a 1 % extrakty se jeví jako necytotoxické.

Dalším možným zdrojem informací o potenciální cytotoxicitě koloidního polyanilinu jsou například práce Firoze et al. (1993) zabývající se *in vivo* testováním toxicity monomeru polyanilinu, tedy anilin hydrochloridu, na potkanech. Výsledkem jejich práce je zjištění

negativního vlivu na játra, slezinu a varlata. Dále článek Last et al. (1982) pojednávající o *in vivo* testech toxicity látky oxidující monomer při výrobě polyanilinu, peroxydisíranu amonného. V tomto článku byla stanovena hodnota  $1 \text{ mg/m}^3$  peroxydisíranu amonného jako maximální koncentrace této látky, která nevyvolává při inhalaci u králíků toxický účinek. Cytotoxicitou anilin hydrochloridu a peroxidisíranu amonného se zabývá práce Kuceková et al. (2012), v této práci nebyla anilin hydrochloridu v koncentraci 0,03 až 0,25 mg/ml prokázána cytotoxicita a peroxidisíran amonný vykazoval cytotoxické účinky v koncentracích od 0,5 až 25 mg/ml. Obě látky byly testovány na buněčné linii lidských keratinocytů HaCaT. Zkoumán byl také vliv oligomerů anilinu. Ze studie Zhang et al. (2012) vyplývá, že dimery, trimery i teramery mají cytotoxické účinky na buňky linie HaCaT i linie lidských alveolárních buněk A549. Nejvyšší cytotoxicitu z testovaných oligomerů vykazovaly trimery.

Vyhodnocení cytotoxicity koloidního polyanilinu, které je cílem této práce, je tedy prvotní studií, která rozšiřuje dosavadní znalosti o koloidním polyanilinu. Podle prezentovaných výsledků cytotoxicity lze za necytotoxické považovat koncentrace 0,2 % a 0,1 % koloidního polyanilinu v kultivačním médiu. Tyto koncentrace nevykazovaly cytotoxicitu u linie lidských keratinocytů HaCaT ani u linie myších fibroblastů NIH/3T3, která vykazovala vyšší citlivost. Buněčná linie NIH/3T3 je běžně ve výzkumu cytotoxicity používanou linií, o čemž svědčí řada publikovaných prací jako například článek Rucinska, Roszczyk, Gabryelak (2008) vyhodnocující cytotoxicitu isoflavonoidu genisteinu u této buněčné linie nebo práce Kathirvel a Ravi (2012), která zkoumá cytotoxicitu esenciálního oleje získaného z bazalky na řadě buněčných linií, mezi kterými je i linie NIH/3T3.

Koncentrací 0,2 % a 0,1 % koloidního polyanilinu je díky jejich konduktivitě dle Sulimenko et al. (2001) možné použít pro aplikace v biotechnologiích, například v biosenzoru pro cholesterol, o kterém pojednává článek Dhand et al. (2007). Navíc je možné považovat koncentrace 0,2 % a 0,1 % za šetrné k životnímu prostředí.

## ZÁVĚR

V praktické části této bakalářské práce byl stanovován cytotoxický vliv koloidního polyanilinu na buněčné linie lidských keratinocytů HaCaT a myších fibroblastů NIH/3T3 pomocí MTT testu, tedy měření absorbance vzorků buněk s různými koncentracemi koloidního polyanilinu s přídavkem MTT v koncentraci 0,5 mg/ml kultivačního média. Výsledky byly vyhodnoceny jednak pomocí průkaznosti rozdílů mezi průměrnými hodnotami absorbancí jednotlivých vzorků vůči referenci a jednak dle ISO normy pomocí procentuálního vyjádření buněčné viability ve srovnání s referencí. Pro kontrolu morfologie, počtu buněk, fyziologických a patologických jevů po působení různých koncentrací koloidního polyanilinu na buněčné linie keratinocytů HaCaT a fibroblastů NIH/3T3 bylo použito mikrofotografií z invertovaného mikroskopu s fázovým kontrastem a mikrofotografií z fluorescenčního mikroskopu po obarvení vzorků pomocí fluorescenčního barviva Hoechst 33258.

Z výsledků lze usoudit, že koloidní polyanilin vykazoval větší cytotoxické účinky na buněčnou linii NIH/3T3. Toto tvrzení potvrzuje fakt, že u linie fibroblastů bylo procentuální vyjádření viability nižší o 17 % až 35 % než u linie keratinocytů.

Pro buněčnou linii HaCaT lze konstatovat skutečnost, že koncentrace 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,75; 0,9 a 1 % koloidního polyanilinu nevykazovaly statisticky průkazně nižší viabilitu buněk, než reference. Tento výsledek potvrzuje také procentuální vyjádření viability, ze kterého je zřejmé, že tyto vzorky se nejevily jako cytotoxické. Oproti tomu koncentrace 2 % a 3 % již vykazovaly statisticky průkazně odlišnou buněčnou viabilitu než reference a dle procentuálního vyjádření cytotoxicity je lze pokládat za slabě cytotoxické.

Pro buněčnou linii NIH/3T3 z výsledků vyplývá následující: všechny koncentrace koloidního polyanilinu použité v tomto testu statisticky průkazně vykazovaly nižší viabilitu buněk než hodnoty reference. Koncentrace 0,1 % a 0,2 % však podle procentuálního vyjádření viability nevykazovaly cytotoxický efekt. U koncentrací 0,6 % a 0,75 % procentuální vyjádření buněčné viability prozradilo slabou cytotoxicitu. Koncentraci 0,9 % dle procentuálního vyjádření buněčné viability bylo možné označit jako středně cytotoxickou. Koncentrace 2 % a 3 %, lze na základě procentuálního vyjádření viability (< 40 %) pokládat za silně cytotoxické. Koncentrace 0,4 % a 1% v závěrečném vyhodnocení uvedeny nebudou, jelikož byly s největší pravděpodobností ovlivněny chybou měření.

Za necytotoxické koncentrace koloidního polyanilinu v médiu lze tedy pokládat pouze 0,1 % a 0,2 % roztoky. Z výše uvedených výsledků je možné konstatovat, že využití koloidního polyanilinu v biotechnologických aplikacích lze pouze v koncentracích 0,1 % a 0,2 %.

V započatých výzkumech toxického vlivu koloidního polyanilinu na různé buněčné linie se bude v laboratořích Univerzity Tomáše Bati i nadále pokračovat.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

AHMAD, Shama et al., 2006. Cholesterol Interferes with the MTT Assay in Human Epithelial-Like (A549) and Endothelial (HLMVE and HCAE) Cells. *International Journal of Toxicology* [online]. Roč. 25, č. 1, s. 17-23 [cit. 2013-04-07]. ISSN 1091-5818. DOI: 10.1080/10915810500488361.

ALSALHI, M. Saleh et al., 2011. Recent Advances in Conjugated Polymers for Light Emitting Devices. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. Roč. 12, č. 12, s. 2036-2054 [cit. 2013-04-07]. ISSN 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms12032036.

ALTMAN, A. Steven et al., 1993. Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnology Progress* [online]. Roč. 9, č. 6, s. 671-674 [cit. 2013-04-07]. ISSN 8756-7938. DOI: 10.1021/bp00024a017.

ANDREU, Y. et al., 2005. Sensor film for Vitamin C determination based on absorption properties of polyaniline. *Talanta* [online]. Roč. 65, č. 4, s. 1045-1051 [cit. 2013-05-15]. DOI: 10.1016/j.talanta.2004.08.036.

BAI, Hua et al., 2007. Electrosynthesis of polypyrrole/sulfonated polyaniline composite films and their applications for ammonia gas sensing. *Polymer* [online]. Roč. 48, č. 14, s. 4015-4020 [cit. 2013-05-15]. DOI: 10.1016/j.polymer.2007.05.033.

BALDISSERA, F. Alessandra a Carlos. A. FERREIRA, 2012. Coatings based on electroconductive polymers for corrosion protection of metals. *Progress in Organic Coatings* [online]. Roč. 75, č. 3, s. 241-247 [cit. 2013-04-07]. ISSN 03009440. DOI: 10.1016/j.porgcoat.2012.05.004.

BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ, 2005. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. 5. přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 244 s. ISBN 80-708-0579-X.

BENZIDANE, Yassine et al., 2011. Neonicotinoid insecticides imidacloprid and clothianidin affect differently neural Kenyon cell death in the cockroach *Periplaneta americana*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* [online]. Roč. 101, č. 3, s. 191-197 [cit. 2013-04-07]. ISSN 00483575. DOI: 10.1016/j.pestbp.2011.09.005.

- BHADRA, Sambhu et al., 2009. Progress in preparation, processing and applications of polyaniline. *Progress in Polymer Science* [online]. Roč. 34, č. 8, s. 783-810 [cit. 2013-05-15]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2009.04.003.
- BLINOVA, Natalia et al., 2005. The chemical and colloidal stability of polyaniline dispersions. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2005, Roč. 88, č. 3, s. 428-434 [cit. 2013-05-22]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2004.11.014.
- BOWMAN, D. a B.R. MATTES, 2005. Conductive Fibre Prepared From Ultra-High Molecular Weight Polyaniline for Smart Fabric and Interactive Textile Applications. *Synthetic Metals* [online]. 2005, vol. 154, s. 29-32 [cit. 2013-05-15]. DOI: 10.1016/j.synthmet.2005.07.017.
- BÜHLER, Volker, 2005. *Polyvinylpyrrolidone excipients for pharmaceuticals: povidone, crospovidone, and copovidone*. New York: Springer, 254 s. ISBN 35-402-3412-8.
- CORTÉS, M. Teresa a Juan C. MORENO, 2003. Artificial muscles based on conducting polymers. *The scientific e-only polymer journal* [online]. Č. 41 [cit. 2013-04-07]. ISSN 1618-7229. Dostupné z: [http://www.e-polymers.org/journal/papers/cortes\\_200803.pdf](http://www.e-polymers.org/journal/papers/cortes_200803.pdf)
- CRUZ-SILVA, Rodolfo et al., 2006. Enzymatic synthesis of colloidal polyaniline particles. *Polymer* [online]. Roč. 47, č. 5, s. 1563-1568 [cit. 2013-05-13]. DOI: 10.1016/j.polymer.2005.12.082.
- CRUZ-SILVA, Rodolfo et al., 2007. Enzymatic synthesis of pH-responsive polyaniline colloids by using chitosan as steric stabilizer. *European Polymer Journal* [online]. Roč. 43, č. 8, s. 3471-3479 [cit. 2013-05-13]. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2007.05.027.
- DAVIS, M. John, 2002. *Basic Cell Culture: A Practical Approach*. 2. vyd. New York: Oxford University Press, 381 s. ISBN 01-996-3853-5.
- DE BARROS, R.A., C.R. MARTINS a W.M. DE AZEVEDO, 2005. Writing with conducting polymer. *Synthetic Metals* [online]. Roč. 155, č. 1, s. 35-38 [cit. 2013-05-15]. DOI: 10.1016/j.synthmet.2005.05.014.
- DHAND, Chetna et al., 2007. Cholesterol biosensor based on electrophoretically deposited conducting polymer film derived from nano-structured polyaniline colloidal suspension. *Analytica Chimica Acta* [online]. Roč. 602, č. 2, s. 244-251 [cit. 2013-05-18]. DOI: 10.1016/j.aca.2007.09.028.

DHAND, Chetna et al., 2011. Recent advances in polyaniline based biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. Roč. 26, č. 6, s. 2811-2821 [cit. 2013-04-07]. ISSN 09565663. DOI: 10.1016/j.bios.2010.10.017.

DRÁPALA, Jaromír a Miroslav KURSA, 2012. *Elektrotechnické materiály*. 1. vyd. Ostrava: VŠB – Technická univerzita Ostrava, 439 s. ISBN 978-80-248-2570-0.

FIROZE, K. M. et al., 1993. Subchronic toxicity of aniline hydrochloride in rats. In: *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* [online]. Roč. 24, č. 3, s. 368-374 [cit. 2013-05-22]. DOI: 10.1007/BF01128736.

FRESHNEY, R. Ian, 1992. *Animal Cell Culture: A Practical Approach*. 2. vyd. New York: IRL Press at Oxford University Press, 329 s. ISBN 01-996-3213-8.

FRESHNEY, R. Ian, 2005. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 5. vyd. Hoboken, N.J.: Wiley-Liss, 642 s. ISBN 04-714-5329-3.

FREUND, Michael S. a Bhavana DEORE, 2007. *Self-doped conducting polymers*. West Sussex: John Willey, 326 s. ISBN 978-0-470-02969-5.

GOMEZ, A. Luis, 1997. Use of the MTT Assay in Adult Ventricular Cardiomyocytes to Assess Viability: Effects of Adenosine and Potassium on Cellular Survival. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* [online]. Roč. 29, č. 4, s. 1255-1266 [cit. 2013-04-07]. ISSN 00222828. DOI: 10.1006/jmcc.1996.0363.

GÜİZADO-RODRÍGUEZ et al., 2010. Photosensitive polyaniline colloidal particles prepared by enzymatic polymerization using the azopolymer DMA-co-AZAAM as stabilizer. *Materials Chemistry and Physics* [online]. Roč. 124, č. 1, s. 389-394 [cit. 2013-05-15]. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2010.06.052.

HEEGER, J. Alan, 2001. Semiconducting and metallic polymers: the fourth generation of polymeric materials. *Synthetic Metals* [online]. Roč. 125, č. 1, s. 23-42 [cit. 2013-04-07]. ISSN 03796779. DOI: 10.1016/S0379-6779(01)00509-4.

HINO, Tetsuo, S. TANIGUCHI a N. KURAMOTO, 2005. Syntheses of conductive adhesives based on epoxy resin and polyanilines by using N-tert-butyl-5-methylisoxazolium perchlorate as a thermally latent curing reagent. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* [online]. Roč. 44, č. 2, s. 718-726 [cit. 2013-05-15]. DOI: 10.1002/pola.21085.

HONZL, J. a M. TLUSTŤÁKOVÁ, 1968. Polyaniline compounds. II. The linear oligoaniline derivatives tri-, tetra-, and hexaanilinobenzene and their conductive complexes. *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia* [online]. Roč. 22, č. 1, s. 451-462 [cit. 2013-04-07]. ISSN 04492994. DOI: 10.1002/polc.5070220137.

HOSODA, Masakazu, T. HINO a N. KURAMOTO, 2007. Facile preparation of conductive paint made with polyaniline/dodecylbenzenesulfonic acid dispersion and poly(methyl methacrylate). *Polymer International* [online]. Roč. 56, č. 11, s. 1448-1455 [cit. 2013-05-15]. DOI: 10.1002/pi.2304.

HUMPOLÍČEK, Petr et al., 2012a. Proliferace buněk na vodivém polymeru, polyanilinu. *Chemické listy* [online]. Č. 106, s. 380-383 [cit. 2013-04-07]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012\\_05\\_380-383.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_05_380-383.pdf)

HUMPOLÍČEK, Petr et al., 2012b. Biocompatibility of polyaniline. *Synthetic Metals* [online]. Roč. 162, s. 722-727 [cit. 2013-04-07]. ISSN 03796779. DOI: 10.1016/j.synthmet.2012.02.024.

HUMPOLÍČEK, Petr a Věra KAŠPÁRKOVÁ, 2012. Polymerní materiály ve zdravotnických prostředcích a jejich biologické vlastnosti. *Plasty a kaučuk*. Roč. 49, č. 7-8, s. 196-199. ISSN 0322-7340.

HUVENEERS-OORSPRONG, M.B.M. et al., 1997. The use of the MTT test for determining the cytotoxicity of veterinary drugs in pig hepatocytes. *Toxicology in Vitro* [online]. Roč. 11, č. 4, s. 385-392 [cit. 2013-04-07]. ISSN 08872333. DOI: 10.1016/S0887-2333(97)00022-2.

CHANDRASEKHAR, Prasanna, 1999. *Conducting Polymers, Fundamentals and Applications: A Practical Approach*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 718 s. ISBN 0-7923-8564-0.

CHOI, H.J. et al., 1997. Electrorheological characterization of polyaniline dispersions. *European Polymer Journal* [online]. Roč. 33, č. 5, s. 699-703 [cit. 2013-05-15]. DOI: 10.1016/S0014-3057(96)00225-X.

IRIMIA-VLADU, Mihai a Jeffrey W. FERGUS, 2006. Suitability of emeraldine base polyaniline-PVA composite film for carbon dioxide sensing. *Synthetic Metals* [online]. Roč. 156, s. 1401-1407 [cit. 2013-05-15]. DOI: 10.1016/j.synthmet.2006.11.005.



JASZCZYSZYN, Agata et al., 2008. Limitations of the MTT Assay in Cell Viability Testing. *University of Medicine Wroclaw* [online]. Roč. 17, č.5, s. 525-529 [cit. 2013-04-07]. ISSN 1230-025X. Dostupné z: <http://www.advances.am.wroc.pl/pdf/2008/17/5/525.pdf>

KAMALESH, Sengothi et al., 2000. Biocompatibility of electroactive polymers in tissues. *John Wiley & Sons, Inc. Journal of Biomedical Materials Research* [online]. Roč. 52, č. 3, s. 467-478 [cit. 2013-04-07]. ISSN 0021-9304. DOI: 10.1002/1097-4636(20001205)52:3<467::AID-JBM4>3.0.CO;2-6.

KANETO, Keiichi et al., 1983. Characteristics of Electro-Optic Device Using Conducting Polymers, Polythiophene and Polypyrrole Films. *Japanese Journal of Applied Physics* [online]. Roč. 22, č. 7 [cit. 2013-04-07]. ISSN 0021-4922. DOI: 10.1143/JJAP.22.L412.

KANG, En-Tang et al., 1998. Polyaniline: A polymer with many interesting intrinsic redox states. *Progress in Polymer Science* [online]. Roč. 23, č. 2, s. 277-324 [cit. 2013-04-07]. ISSN 00796700. DOI: 10.1016/S0079-6700(97)00030-0.

KATHIRVEL, Poonkodi a Subban RAVI, 2012. Chemical composition of the essential oil from basil (*Ocimum basilicum* Linn.) and its in vitro cytotoxicity against HeLa and HEP-2 human cancer cell lines and NIH 3T3 mouse embryonic fibroblasts. *Natural Product Research* [online]. Roč. 26, č. 12, s. 1112-1118 [cit. 2013-05-22]. DOI: 10.1080/14786419.2010.545357.

KIM, Jeong-Hwan et al., 2000. Conductimetric membrane strip immunosensor with polyaniline-bound gold colloids as signal generator. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. Roč. 14, č. 12, s. 907-915 [cit. 2013-04-07]. ISSN 09565663. DOI: 10.1016/S0956-5663(99)00063-9.

KRUŽÍK, Pavel et al., 2006. In-vitro diagnostika, Analyzátoary buněk a částic. *Immunotech* [online]. Č. 3, s. 4-5 [cit. 2013-04-07]. Dostupné z: [http://www.immunotech.cz/pdf/IVD\\_3.pdf](http://www.immunotech.cz/pdf/IVD_3.pdf)

KUCEKOVÁ, Zdenka et al., 2012. Cytotoxicity of polyaniline precursors. In: *Chemické listy* [online]. Roč. 49 [cit. 2013-05-22]. ISSN 0322-7340.

*Kultivace buněk in vitro* [online]. 2009. Brno: Ústav patologické fyziologie lékařské fakulty Masarykovy Univerzity, [cit. 2013-05-16]. Dostupné z: [http://www.med.muni.cz/patfyz/tmbg/Tkanovky\\_MM09.pdf](http://www.med.muni.cz/patfyz/tmbg/Tkanovky_MM09.pdf)

LAST, J.A. et al., 1982. Inhalation toxicology of ammonium persulfate, an oxidant aerosol, in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. Roč. 63, č. 2, s. 257-263 [cit. 2013-05-22]. DOI: 10.1016/0041-008X(82)90047-3.

LIU, Xiaoli et al., 2013. Poly( N -vinylpyrrolidone)-Modified Surfaces for Biomedical Applications. *Macromolecular Bioscience* [online]. Roč. 13, č. 2, s. 147-154 [cit. 2013-04-07]. ISSN 16165187. DOI: 10.1002/mabi.201200269.

MANJUNATHA, H. et al., 2011. Electrode materials for aqueous rechargeable lithium batteries. *Journal of Solid State Electrochemistry* [online]. Roč. 15, č. 3, s. 431-445 [cit. 2013-04-07]. ISSN 1432-8488. DOI: 10.1007/s10008-010-1117-6.

MISHELL, B. Barbara a Stanley M. SHIIGI, 1980. *Selected methods in cellular immunology*. San Francisco: W. H. Freeman, s. 16-19. ISBN 07-167-1106-0.

MOLECULAR PROBES, 2002. *Vybrant MTT Cell Proliferation Assay Kit (V-12154)* [online]. [cit. 2013-04-07]. Life technologies corporation. Dostupné z: <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp13154.pdf>

MOLECULAR PROBES, 2005. *Hoechst stains* [online]. [cit. 2013-04-07]. Life technologies corporation. Dostupné z: <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp21486.pdf>

MOSMANN, Tim, 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* [online]. Roč. 65, s. 55-63 [cit. 2013-04-07]. ISSN 00221759. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

NAARMANN, Herbert, 1987. Synthesis of new conductive polymers. *Synthetic Metals* [online]. Roč. 17, č. 1-3, s. 223-228 [cit. 2013-04-07]. ISSN 03796779. DOI: 10.1016/0379-6779(87)90741-7.

NAMBIAR, Shruti a John T.W. YEOW, 2011. Conductive polymer-based sensors for biomedical applications. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. Roč. 26, č. 5, s. 1825-1832 [cit. 2013-04-07]. ISSN 09565663. DOI: 10.1016/j.bios.2010.09.046.

NASR-ESFAHANI, M. Hossein et al., 2002. Sperm MTT Viability Assay: A New Method for Evaluation of Human Sperm Viability. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* [online]. Roč. 19, č. 10, s. 477-482 [cit. 2013-04-07]. ISSN 10580468. DOI: 10.1023/A:1020310503143.

- NEČAS, Oldřich et al., 2000. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3. vyd. Jinočany: H & H Vyšehradská, s.r.o., s. 44-51. ISBN 80-86022-46-3.
- POUCHLÝ, Julius, 2008. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. 3. vyd. Praha: VŠCHT Praha, s 9. ISBN 978-80-7080-674-6.
- PROKEŠ, Jan, S. NEŠPŮREK a J. STEJSKAL, 2001. Vodivé polymery, inteligentní materiály pro nové století. *Vesmír* [online]. Č. 80, s. 35-38 [cit. 2013-04-07]. ISSN 1214-4029. Dostupné z: <http://www.vesmir.cz/clanek/vodive-polymery>
- PROKEŠ, Jan, J. STEJSKAL a M. OMASTOVÁ, 2001. Polyanilin a polypyrrol - dva představitelé vodivých polymerů. *Chemické listy* [online]. Č. 95, s. 380-383 [cit. 2013-04-07]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/archiv/2001/08-PDF/484-492.pdf>
- PROKOPOVÁ, Irena, 2007. *Makromolekulární chemie*. 2. vyd. Praha: VŠCHT Praha, s. 13. ISBN 978-80-7080-662-3.
- PULZ, Otto, 2007. The test of anti-tumoral effectiveness of the preparation Biocrush® in vitro. [online]. Nuthetal: IGV GmbH [cit. 2013-05-18]. Dostupné z: <http://www.famepharma.com/scientific-biocrush.htm>
- RUCINSKA, A, M ROSZCZYK a T GABRYELAK. 2008. Cytotoxicity of the isoflavone genistein in NIH 3T3 cells. *Cell Biology International* [online]. Roč. 32, č. 8, s. 1019-1023 [cit. 2013-05-22]. DOI: 10.1016/j.cellbi.2008.04.004.
- RUBINSON, Judith F. a Harry B. MARK, 2003. *Conducting Polymers and Polymer Electrolytes: From Biology to Photovoltaics*. Washington: American Chemical Society, 222 s. ISBN 0-8412-3770-0.
- SHIRAKAWA, Hideki et al., 1977. Synthesis of Electrically Conducting Organic Polymers: Halogen Derivates of Polyacetylene. *Journal of the Chemical Society Chemical Communications* [online]. S. 578-580 [cit. 2013-04-07]. Dostupné z: <http://www.rsc.org/pdf/chemcomm/com474.pdf>
- SCHMIDT, E. Christine et al., 1997. Stimulation of neurite outgrowth using an electrically conducting polymer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. Roč. 94, č. 17, s. 8948-8953 [cit. 2013-04-07]. ISSN 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.94.17.8948.
- SIGMA-ALDRICH Co., 2010. Fundamental Techniques in Cell Culture. A Laboratory Handbook [online]. [cit. 2013-05-22]. Dostupné z:

[http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma-Aldrich/Instructions/1/ecacc\\_handbook.Par.0001.File.tmp/ecacc\\_handbook.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma-Aldrich/Instructions/1/ecacc_handbook.Par.0001.File.tmp/ecacc_handbook.pdf)

SCUDIERO, A. Dominic et al., 1988. Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Research* [online]. Roč. 48, č. 17, s. 4827-4833 [cit. 2013-04-07]. ISSN 0008-5472. Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/48/17/4827.full.pdf>

SLANINOVÁ, Iva et al., 2008. Fluorescenční vlastnosti kvartérních benzo[c]fenanthridinových alkaloidů a jejich využití jako supravitálních DNA sond. *Chemické listy* [online]. Č. 102, s. 427-433 [cit. 2013-04-07]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008\\_06\\_427-433.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_06_427-433.pdf)

STEJSKAL, Jaroslav et al., 1996. Polyaniline Dispersions. 6. † Stabilization by Colloidal Silica Particles. *Macromolecules* [online]. Roč. 29, č. 21, s. 6814-6819 [cit. 2013-05-14]. DOI: 10.1021/ma9603903. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma9603903>

STEJSKAL, Jaroslav, P. KRATOCHVÍL a M. HELMSTEDT, 1996. Polyaniline Dispersions. 5. Poly(vinylalcohol) and Poly(N-vinylpyrrolidone) as Steric Stabilizers. *Langmuir* [online]. Roč. 12, č. 14, s. 3389-3392 [cit. 2013-05-13]. DOI: 10.1021/la9506483.

STEJSKAL, Jaroslav a R. G. GILBERT, 2002. Polyaniline. Preparation of a conducting polymer (IUPAC Technical Report). *International Union of Pure and Applied Chemistry* [online]. Roč. 74, č. 5, s. 857-867 [cit. 2013-04-07]. ISSN 0033-4545. DOI: 10.1351/pac200274050857.

STEJSKAL, Jaroslav a Irina SAPURINA, 2005. Polyaniline: Thin films and colloidal dispersions (IUPAC Technical Report). *International Union of Pure and Applied Chemistry* [online]. Roč. 77, č. 5, s. 815-826 [cit. 2013-04-07]. ISSN 0033-4545. DOI: 10.1351/pac200577050815.

SULIMENKO, Tetyana et al. 2001. Conductivity of colloidal polyaniline dispersions. *European Polymer Journal* [online]. Roč. 37, č. 2, s. 219-226 [cit. 2013-05-15]. DOI: 10.1016/S0014-3057(00)00104-X.

TALAIE, A. et al., 2000. Dynamic sensing using intelligent composite: an investigation to development of new pH sensors and electrochromic devices. *Thin Solid Films* [online]. Roč. 363, s. 163-166 [cit. 2013-05-15]. DOI: 10.1016/S0040-6090(99)00987-6.

VEJRAŽKA, Martin, 2008. *Buněčné kultury. Molekulární medicína a biotechnologie: soubor přednášek*. 1. vyd. Praha: Galén pro 1. LF UK v Praze, s. 81-100. ISBN 978-807262-535-2.

WALLACE, G. Gordon et al., 2003. *Conductive Electroactive Polymers: Intelligent Materials Systems*. 2nd ed. /. Boca Raton: CRC Press LLC, 237 s. ISBN 1-58716-127-3.

WANG, C. H. et al., 1999. In-vivo tissue response to polyaniline. *Synthetic Metals* [online]. Roč. 102, č. 1-3, s. 1313-1314 [cit. 2013-04-07]. ISSN 03796779. DOI: 10.1016/S0379-6779(98)01006-6. .

WILLIAMS, D. Franklyn, 1986. *Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials*. New York: Elsevier, 72 s. ISBN 04-444-2858-5

ZHANG, Xiaoyong et al., 2012. Cellular responses of aniline oligomers: a preliminary study. *Toxicology Research* [online]. Roč. 1, č. 3, s. 201- [cit. 2013-05-26]. DOI: 10.1039/C2TX20035J.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

DNA Deoxyribonukleová kyselina

DMSO Dimethylsulfoxid

IUPAC International Union of Pure and Applied Chemistry

rpm Počet otáček za minutu

SEM Skenovací (rastrovací) elektronová mikroskopie

S.cm<sup>-1</sup> Siemens na centimetr, jednotka měrné vodivosti

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 – obecný vzorec polymeru .....	12
Obrázek 2 – nejdůležitější vodivé polymery (Prokeš, Stejskal, Omastová, 2001).....	12
Obrázek 3 – oxidační formy polyanilinu (Prokeš, Stejskal, Omastová, 2001).....	17
Obrázek 4 – přechod vodivé formy polyanilinu na nevodivou bázi v alkalickém prostředí hydroxidu amonného (Stejskal a Gilbert, 2002) .....	18
Obrázek 5 – oxidace anilinu peroxydisíranem amonným v kyselém vodném prostředí poskytující polyanilin (Stejskal a Gilbert, 2002).....	19
Obrázek 6 – a) adsorpce oligomeru na povrch, b) růst řetězce PANI, tvorba jádra, c) růst dalších řetězců PANI v důsledku mechanismu automatického zrychlování polymerace (Stejskal a Sapurina, 2005).....	19
Obrázek 7 – a) sorpce oligomeru na stabilizátor, b) stimulace růstu řetězce, produkce jádra, c) formování koloidní částice (Stejskal a Sapurina, 2005).....	20
Obrázek 8 – SEM snímek kompozitu obs. 26 váh. % polyanilinových částic dispergovaných v matrici polyvinylalkoholu (Stejskal, Kratochvíl, Helmstedt, 1996).....	22
Obrázek 9 – příklad výsledku testu viability nervových buněk švábů po působení dvou druhů neonikotinoidů (druh insekticidů) - imidaclopridu (IMI) a clothianidinu (CLO) na snímcích ze světelného mikroskopu. A) působení 50 $\mu$ M CLO po dobu 8 hodin, B) působení 50 $\mu$ M IMI po dobu 8 hodin, C) působení 100 $\mu$ M CLO po dobu 24 hodin, D) působení 100 $\mu$ M IMI po dobu 24 hodin. Měřítka 10 $\mu$ m (Benzidane et al., 2011) .....	28
Obrázek 10 – lineární závislost absorbance na počtu živých buněk při vlnové délce 570 nm (Molecular Probes, 2002).....	29
Obrázek 11 – redukce ve vodě rozpustného MTT na nerozpustný formazán (Pulz, 2007).....	30
Obrázek 12 – růstová křivka buněčné kultury (Kultivace buněk <i>in vitro</i> , 2009) .....	33
Obrázek 13 – chemická struktura fluorescenčních barviv řady Hoechst (Molecular Probes, 2005).....	38
Obrázek 14 – fluorescenční excitační a emisní spektrum barviva Hoechst 33258 vázaného na DNA (Molecular Probes, 2005) .....	39
Obrázek 15 – mikrofotografie buněčných linií HaCaT a NIH/3T3 z testu cytotoxicity: A) reference – HaCaT; B) reference – DNA obarvena pomocí	

Hoechst – NIH/3T3; C) 0,4% koloidní polyanilin – HaCaT; D) 0,75% koloidní polyanilin – HaCaT; E) 2% koloidní polyanilin – HaCaT; F) 2% koloidní polyanilin – DNA obarvena pomocí Hoechst –NIH/3T3. Zvětšení u všech fotografií je 100×..... 47



**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 – srovnání konduktivity vodičů, polovodičů a izolantů (Drápala a Kurša, 2012).....	13
Tabulka 2 – průměrné absorbance, směrodatné odchylky a hladiny významností různých koncentrací koloidního polyanilinu spolu s procentuálním vyjádřením buněčné viability u buněk linie HaCaT.....	42
Tabulka 3 – průměrné absorbance, směrodatné odchylky a hladiny významností různých koncentrací koloidního polyanilinu spolu s procentuálním vyjádřením buněčné viability u buněk linie NIH/3T3.....	45

**SEZNAM GRAFŮ**

Graf 1 – výsledky cytotoxicity koloidního polyanilinu u buněk linie HaCaT.....	41
Graf 2 – výsledky cytotoxicity koloidního polyanilinu u buněk linie NIH/3T3 .....	43