

Cytotoxicita různých forem polyanilinu

Bc. Lenka Onderková

Diplomová práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství polymerů
akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lenka Onderková**
Osobní číslo: **T13381**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství polymerů**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Cytotoxicita různých forem polyanilinu**

Zásady pro vypracování:

Studentka se seznámí s dosud publikovanými informacemi o syntéze, vlastnostech a biologickém působení polyanilinu v různých formách. Prakticky se seznámí s prací v laboratoři buněčných kultur a osvojí si pokročilé techniky práce v této laboratoři. V praktické části pak provede a vyhodnotí sérii testů zaměřených na stanovení cytotoxicity různých forem polyanilinu na eukaryotické buňky.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

SNUSTAD, D.P., SIMMONS, M.J., RELICHOVÁ, J. et al. Genetika. Brno: Masarykova univerzita, 2009.

ALBERTS B. et al. Molecular Biology of the Cell 5th ed. Garland Science.

ROSYTAL, S. Nový přehled biologie. . Praha: Scientia, 2003. ISBN 10: 80-7183-268-5

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Petr Humpolíček, Ph.D.
Centrum polymerních materiálů

Datum zadání diplomové práce:

16. ledna 2015

Termín odevzdání diplomové práce:

15. května 2015

Ve Zlíně dne 2. března 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




Ing. Lubomír Beníček, 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 ¹⁾;
- 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 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ 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 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užit 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 13.5.2015


.....

¹⁾ 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.

²⁾ 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).

³⁾ 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 užit 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 přihlíží k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Cílem diplomové práce je stanovit cytotoxicitu přečištěných polyanilinových prášků. Jako přečišťovací média budou použita metanol a kyselina chlorovodíková. Práce navazuje na dříve publikované studie zabývající se cytotoxicitou polyanilinu ve formě prášku a jeho přečištěním. Polyanilin je zkoumán hlavně pro svou schopnost vést elektrický proud. Polyanilin se vyskytuje ve třech různých formách, ale jenom jedna je stabilní a to semi-oxidovaná forma, emeraldine. Emeraldine se dále vyskytuje ve dvou formách a to 1) zeleně zbarvená, vodivá forma polyanilinu – emeraldinová sůl, jejíž vodivost se pohybuje v řádech 100 Sm^{-1} a 2) emeraldinová báze, což je nevodivá forma polyanilinu. Emeraldinovou sůl lze převést na emeraldinovou bázi pomocí změny pH. Vyhodnocení bude probíhat na extraktech připravených z předem syntetizovaného a přečištěného polyanilinového prášku. Metody vyhodnocení budou MTT test, který je vhodný pro stanovení viability buněk a průtoková cytometrie, která je vhodná k rozeznání typu buněčné smrti.

Klíčová slova: polyanilin, apoptóza, nekróza, MTT test, flow cytometry

ABSTRACT

The aim of my thesis is to determine cytotoxicity of purified polyaniline powders. The methanol and hydrochloric acid will be chosen as the purification media. The cytotoxicity of the standard polyaniline has been already determined and published. The thesis is therefore a follow up study based on the results of those studies. Polyaniline is examined mainly for its conductivity. The polyaniline exists in three different forms, but only one is stable. The stable form of polyaniline is semi-oxidated and is called emeraldine. Emeraldine further exists in two forms, and that is 1) green coloured, conducted form of polyaniline – emeraldine salt, whose conductivity is in the range of 100 Sm^{-1} and 2) emeraldine base, which is nonconductive form of polyaniline. The emeraldine salt could be transferred to emeraldine base by the change of pH. The evaluation of cytotoxicity will be determined on the extracts of polyaniline powder. The polyaniline powder will be synthesized and modified. The evaluation methods will be MTT test, which is suitable for determination of viability of cells and flow cytometry, which is suitable for identifying the type of cell death.

Keywords: Polyaniline, apoptosis, necrosis, MTT test, flow cytometry

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu diplomové práce a to panu doc. Ing. Petru Humpolíčkovi, Ph.D., za odborné vedení, užitečné rady a cenné informace k tématu diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Zdence Kucekové Ph.D., za pomoc při práci v laboratoři. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat za morální podporu celé své rodině, příteli a kamarádům.

Motto

„Alea iacta est“

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

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 BIOMATERIÁLY	12
1.1 BOKOMPATIBILITA	13
1.1.1 Možnosti ovlivnění biokompatibility	13
2 VODIVÉ POLYMERNÍ MATERIÁLY	15
2.1 OBJEV VODIVÝCH POLYMERNÍCH MATERIÁLŮ.....	15
2.2 POLYPYRROL.....	16
2.3 POLY(FENYLENDIAMIN)	17
2.4 POLYANILIN	18
2.4.1 Struktura PANI.....	18
2.4.2 Syntéza PANI.....	19
2.4.3 Cytotoxicita PANI prášku	21
2.4.4 Nečistoty v PANI	22
3 METODY STANOVENÍ BIOLOGICKÝCH CHARAKTERISTIK	24
3.1 BUNĚČNÁ ADHEZE.....	24
3.2 BUNĚČNÁ PROLIFERACE	26
3.3 BUNĚČNÁ MIGRACE.....	27
3.4 MUTAGENITA	27
3.5 TESTY BUNĚČNÉ SMRTI	27
3.5.1 Nekróza	28
3.5.2 Apoptóza	28
3.5.3 Autofagie.....	30
3.6 METODY VYHODNOCENÍ	30
3.6.1 Průtoková cytometrie	30
3.6.2 Fluorescenční mikroskopie	33
3.6.3 Kolorimetrické metody	34
3.6.4 Clonogenic assay.....	35
4 METODY STANOVENÍ MATERIÁLOVÝCH CHARAKTERISTIK	36
4.1 MĚŘENÍ ELEKTRICKÉ VODIVOSTI.....	36
4.2 MIKROSKOPIE ATOMÁRNÍCH SIL (AFM).....	38
4.3 MĚŘENÍ POVRCHOVÉ ENERGIE.....	39
II PRAKTICKÁ ČÁST	41
5 MATERIÁL A METODIKA	42
5.1 SYNTÉZA PANI PRÁŠKU.....	42
5.2 POSTUP PŘEČIŠTĚNÍ PANI PRÁŠKU	42
5.3 STANOVENÍ VODIVOSTI PRÁŠKOVÉHO PANI.....	43
5.3.1 Tvorba PANI tablet	43
5.3.2 Měření vodivosti	43

5.4	POUŽITÉ BUNĚČNÉ LINIE	44
5.5	PODMÍNKY KULTIVACE	44
5.6	EXPERIMENTÁLNÍ USPOŘÁDÁNÍ.....	44
5.6.1	Extrakty PANI.....	45
5.6.2	Prekultivace buněk	45
5.6.3	Přídavek extraktů PANI	46
5.6.4	MTT	46
5.6.5	Mikroskopování	46
5.6.6	Průtoková cytometrie	46
6	VÝSLEDKY	48
6.1	MĚŘENÍ VODIVOSTI	48
6.2	CYTOTOXICITA POMOCÍ MTT	48
6.3	STANOVENÍ POMĚRU ŽIVÝCH, NEKROTICKÝCH A APOPTICKÝCH BUNĚK POMOCÍ PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE	51
6.3.1	Cytotoxicita extraktu PANI-HCl.....	52
6.3.2	Cytotoxicita extraktu PANI-MeOH	55
6.3.3	Cytotoxicita extraktu PANI-HCl+MeOH	57
7	DISKUZE VÝSLEDKŮ	59
	ZÁVĚR	62
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	64
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	74
	SEZNAM OBRÁZKŮ	76
	SEZNAM TABULEK.....	77

ÚVOD

Diplomová práce se zabývá studiem polyanilinu, což je jeden z hlavních zástupců vodivých polymerů. Za objev této skupiny polymerů byla v roce 2000 udělena Nobelova cena za chemii (The Nobel Prize in Chemistry, 2000). Polyanilin se vyskytuje ve třech různých formách, ale jednom jedna je stabilní. Tato stabilní forma polyanilinu je semi-oxidovaná a nazývá se emeraldine (Boyer, et al., 1998). Emeraldine se dále vyskytuje ve dvou formách a to zeleně zbarvená, vodivá forma polyanilinu – emeraldinová sůl, jejíž vodivost se pohybuje v řádech 100 Sm^{-1} . Emeraldinovou sůl lze převést na nevodivou formu polyanilinu, emeraldinovou bázi (Stejskal, 2002). Cytotoxicita polyanilinu byla již stanovena a vzhledem k tomu, že je příliš vysoká, se další práce zabývají jejím snížením. V práci Humpolíček et al. (2012) studovali reprotonovaný a deprotonovaný polyanilin a zjistili, že míra cytotoxicity je způsobena nízkomolekulárními vedlejšími produkty, které vznikají při syntéze. Další práce Stejskal et al. (2014), kteří polyanilin zkoušeli přechistit pomocí N-metylpyrolidonu a kyseliny sírové (96%). Tato metoda snižuje cytotoxicitu polyanilinu, ale ne na požadovanou úroveň.

Cytotoxicita bude zkoumána podle metod uvedených v ČSN EN ISO 10 993-5 „Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro*“. V této práci se bude cytotoxicita stanovovat pomocí metod MTT a průtoková cytometrie. Vzorky budou připraveny pomocí metody uvedené v ČSN EN ISO 10 993-12 „Příprava vzorků a referenčních materiálů“. Bude připraven polyanilinový prášek syntézou podle IUPAC (Stejskal, 2002). Prášek bude dále modifikován pomocí přečištění v médiu. Jako předčišťovací médium bude zvoleno 0,2M kyselina chlorovodíková a metanol. Budou připraveny tři modifikované prášky 1) modifikace pomocí kyseliny chlorovodíkové, 2) modifikace pomocí metanolu a 3) modifikace pomocí kyseliny chlorovodíkové a následně metanolu. Z takto připravených prášků se budou studovat extrakty na předem kultivovaných buňkách z buněčné linie myších fibroblastů NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™, USA). Extrakty budou přidány ve snižující se řadě koncentrací a bude vyhodnoceno, jaká koncentrace již není cytotoxická. Stanovení viability buněk bude provedeno pomocí testu MTT. Případné rozeznání typu buněčné smrti u odumřelých buněk bude vyhodnoceno pomocí průtokové cytometrie. Kde jako fluorochromy budou použity Annexin V-FITC a PI.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOMATERIÁLY

Termín biomateriál může být aplikován pro přírodní materiály nacházející se běžně v těle, jako jsou kosti, pojivové tkáně, chrupavky atd., ale i pro syntetické materiály, jež nahrazují ty přírodní, jako je nerezová ocel, kobalt, chrom, slitiny titanu, polymery, keramika a kompozity (Milles, Gheduzzi, 2012). V obecné rovině jsou tímto termínem označovány látky, které jsou v kontaktu s tkání (Robinson, et al., 2001). Nejvýstižnější definice byla publikována v rámci konference Clinical Applications of biomaterials (NIH Consensus Statement, 1982): biomateriály byly definovány jako látky (jiné než léčiva) nebo kombinace látek, syntetických nebo přírodního původu, které mohou být použity po libovolnou dobu, jako celek nebo jako část systému, který posuzuje, zvyšuje, nebo nahradí kteroukoli tkáň, orgán, nebo funkci těla.

V poslední době se stává pole biomateriálů interdisciplinární vědou také díky molekulární biologii, která vědcům umožňuje navrhnout materiál, jež bude obsahovat specifickou biologickou funkci (Daw a Tonzani, 2009). Povrchy materiálů hrají důležitou roli při návrhu a vývoji biomateriálů v oblasti biomedicínských aplikacích, jelikož se většina biologických interakcí odehrává na povrchu materiálu. Již v 19. století bylo pozorováním stanoveno, že povrchy ovlivňují biologické reakce. Pokrok v uplynulém čtvrtstoletí výrazně zvýšil schopnost charakterizovat povrchové složení a molekulární strukturu biomateriálů. Další významný pokrok byl dosažen i v oblasti materiálové a v oblasti molekulární biologie. Kombinace těchto pokroků umožnily vývoj biologického modelu pro studování povrchových vlastností materiálů. Hlavním cílem vytvoření biologického modelu je získat podrobné znalosti o tom, jak povrchové vlastnosti ovlivňují biologickou interakci buněk s tímto povrchem (Castner a Ratner, 2002).

Topografii povrchu lze ovlivnit například zavedením nanostruktury. Zavedená nanostruktura může způsobit, že hydrofobní povrch se stává více hydrofobní a hydrofilní povrch více hydrofilní (Li et al., 2014). Tento fakt vysvětluje Wenzelův model, což je metoda vhodná pro zkoumání povrchu a jeho hydrofobity v závislosti na drsnosti povrchu. Wenzelův model popisuje úhel smáčení a jeho rozdílnost mezi hladkým a drsným povrchem. Úhel smáčení je následně vypočten z rovnice (Jamaguchi, et al., 2014). Topografie povrchu může zlepšit biologické vlastnosti, například materiál Pluronic® - směs s obsahem polyuretanu je odolná proti navázání proteinů a zavedení správné topografie povrchu podobné lotosovému květu může ještě dále snížit adsorpci proteinů (Li et al., 2014). Měření

kontaktního úhlu vody prokázalo, že hydrofobilita vzniklého materiálu Pluronic® byla zvýšena díky topografii povrchu podobné lotosovému květu (Zheng et al., 2014). Pochopení toho jak spolu korelují povrch materiálu a mezifázové vlastnosti s biologickými funkcemi materiálu je nutné pro další vývoj biomateriálů. Polymery zde hrají čím dál větší roli jak v přípravě dobře definovaných povrchových struktur tak i ve výrobě výrobků s daným povrchem, které se vyrábí pomocí chemické modifikace (Li et al., 2014).

1.1 Biokompatibilita

Obecnou definicí tohoto pojmu se rozumí přijetí materiálu do tkáně jako celek (Park a Bronzino, 2003). Tím pádem je možno konstatovat, že všechny biomateriály by měli být biokompatibilní s biologickým systémem ve kterém se budou nacházet. Což znamená, že by materiál měl být netoxický, nekarcinogenní, neindukující imunologickou reakci, nemutagenní, a neměl by způsobit žádné podráždění nebo alergickou reakci, ať už místní nebo systémovou (Shi, 2004). Jelikož mezi lidskou tkání a ostatním materiálem, který bychom chtěli dát s tkání do kontaktu, je mnoho rozdílů (Black, 2006), proto přesná a jednoznačná definice biokompatibility neexistuje (Park a Bronzino, 2003). Pojmem biokompatibilita je označována vlastnost materiálu, která popisuje interakce, probíhající mezi biomateriály a tkání těla (Williams, 2003). Všechny tyto interakce probíhají mezi biomateriálem a buňkami tkáně a extracelulárním matrixem (ECM). ECM je mimobuněčná hmota složená z bílkovin, které poskytují platformu pro buněčnou adhezi a aktivaci vysoce regulovaných signálních drah (Rahmany a Van Dyke, 2013).

Pro určení stupně biokompatibility je nutné provést sérii testů (Ahad et al., 2013). Soubor pravidel pro testování těchto a dalších vybraných vlastností zdravotnických prostředků je uveden v souboru norem ČSN ISO 10 993 „Biologické hodnocení zdravotnických prostředků“.

1.1.1 Možnosti ovlivnění biokompatibility

Polymerní materiály jsou často používány v oblasti biomedicínských aplikací, ale interakce polymerů s buňkami i krevními bílkovinami vyvolává nežádoucí odpověď. Bylo vyvinuto několik metod pro povrchovou modifikaci polymerů s cílem zlepšit jejich biologickou kompatibilitu (Recek et al., 2014). Mezi tyto metody patří jak fyzikální tak i chemické metody. Často využívané metody jsou například ošetření povrchu plasmou či ionto-

vým nebo UV-zářením. Nicméně tyto metody jsou často spojeny s negativními vedlejšími účinky (Ahad et al., 2014).

Jako příklad možného ovlivnění biokompatibility uvádím experiment, který byl proveden na Slovinské univerzitě vědci Recek. et al. (2014). Porovnávali standardní polystyren (PS) a oplasmovaný PS dvěma různými druhy plasmou – buď O₂ plasmou nebo plasmou CF₄. Test byl prováděn na lidských buňkách HMEC (ATCC® CRL-3243™), kde se sledovala proliferace a adheze proteinu albuminu na samotný povrch vzorku. Výsledky přilnavosti proteinu byly porovnány pomocí rentgenové fotoelektronové spektroskopie (XPS), viabilita buněk a jejich morfologie byla studována pomocí MTT testu a skenovací elektronovou mikroskopií (SEM). Měření XPS ukázala, že množství adsorbovaného proteinu byla pro oba vzorky oplasmovaného PS vyšší než u standardního PS neošetřeného plasmou. MTT test prokázal lepší buněčnou proliferaci na povrchu vzorku PS ošetřeného pomocí O₂ plasmou.

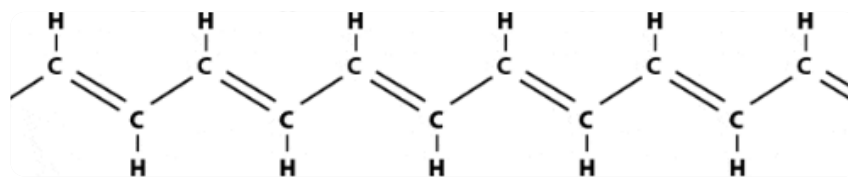
2 VODIVÉ POLYMERNÍ MATERIÁLY

Vodivé polymerní materiály jsou skupina látek, které vykazují odlišné chování od běžných polymerů, jejich vlastnosti se mění v závislosti na elektrochemickém potenciálu (Freund a Deore, 2007). To znamená, že vykazují elektrickou vodivost a to v rozmezí odpovídající vodivosti anorganických polovodičů, tj. $0,01 - 30 \text{ Scm}^{-1}$ (Stejskal, Kratochvíl a Jenkins, 1996).

Vodivé polymery se vyznačují konjugovaným systémem dvojných vazeb (tj. pravidelné střídání vazeb jednoduchých a dvojných), mezi nejvýznamnější zástupce patří polypyrol, polythiopentan a polyanilin (Freund a Deore, 2007).

2.1 Objev vodivých polymerních materiálů

Na konci 20. století byla objevena nová skupina materiálů - vodivých polymerů, tím se použití polymerů posouvá i do jiných oblastí technického použití a to zejména do oblasti energetických (Freund a Deore, 2007). Nejčastěji nacházejí použití v oblasti výroby palivových článků (Wang, et al., 2009). Tento významný objev byl uznán vědeckou komunitou v r. 2000, kdy byla za objev vodivých polymerů udělena Nobelova cena za chemii vědcům Hideki Shirakawa, Alan J. Heeger a Alan G. MacDiarmid (Freund a Deore, 2007). Zabývali se polyacetylenem, který i když byl v roce 1974 připraven jako stříbřitý film připomínající kov, byl stále nevodivý. Tito vědci však v roce 1977 zjistili, že oxidace chlorovými, bromovými nebo jodidovými párami na polyacetylenové fólii zvýší její vodivost 109 krát. Vystavení polyacetylenové fólie proti halogenu bylo nazváno „dopování“ analogicky s dopováním polovodičů. Dopovaná forma polyacetyleny měla vodivost 105 Sm^{-1} což byla hodnota pro polymery naprosto nevídaná. Pro srovnání polytetrafluoretylen (PTFE) má vodivost $10-16 \text{ Sm}^{-1}$ a vodivost stříbra a mědi je 108 Sm^{-1} . Tím bylo objeveno, že klíčovou vlastností vodivých polymerů je přítomnost konjugovaných dvojných vazeb podél hlavního řetězce polymeru (The Nobel Prize in Chemistry, 2000). Pro znázornění konjugovaných dvojných vazeb je na obrázku č. 1 uveden strukturní vzorec polyacetyleny, který ve své struktuře konjugované dvojně vazby obsahuje.



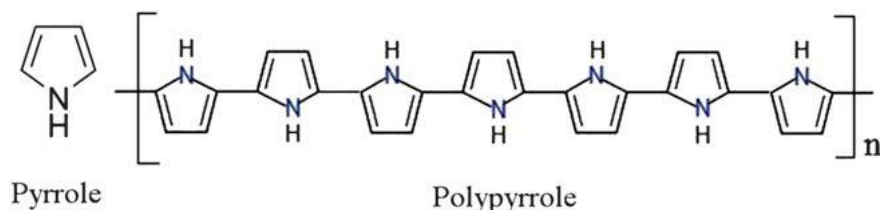
Obrázek 1 – strukturní vzorec polyacetyleny

(The Nobel Prize in Chemistry, 2000)

Nicméně, konjugované vazby nejsou dostatečným jevem k tomu, aby byl polymer vodivý. Podstatnou roli hrají legovací látky (anglicky se označují dopant nebo doping agent) což jsou příměsi, které jsou do látky vloženy v malých koncentracích a jsou tedy nosičem náboje, buď ve formě extra elektronu, nebo „díry“. Díra je pozice, kde elektron chybí a může být zaplněna jiným elektronem, ovšem po přeskočení elektronu se vytvoří nová „díra“, která může migrovat na velké vzdálenosti (The Nobel Prize in Chemistry, 2000).

2.2 Polypyrrol

Polypyrrol neboli zkráceně PPY je velmi významný zástupce skupiny vodivých polymerů, který má také významný biomedicínský potenciál. PPY je intenzivně studován díky své biokompatibilitě *in vitro* i *in vivo*, snadné syntéze a hlavně elektrické vodivosti. *In vitro* studie prokázaly, že PPY podporuje adhezi a růst různých typů buněk. Ve studii Vaitkuvienė et al. (2014) byl vytvořen povrch z PPY na zlatých destičkách na kterém byla studována adheze a proliferace myších kmenových buněk z kostní dřeně. Výsledky ukázaly, že jsou tyto substráty vhodné pro adhezi a proliferaci myších kmenových buněk. V další studii Kai et al. (2011) se PPY jeví jako vhodný materiál pro tvorbu kompozitu pro rekonstrukci tkáně srdce. Například po infarktu myokardu. Kompozity obsahující 15% PPY nanovláken vykazují nejlepší vlastnosti, které jsou vyžadovány pro regeneraci srdeční tkáně. Konkrétně jsou to vlastnosti v oblasti vodivosti, mechanické vlastnosti a biologická rozložitelnost. V další studii Park et al. (2012) byl PPY studován jako součást antimikrobiálních činidel proti Gram pozitivním i Gram negativním bakteriím. Z PPY byly vytvořeny nanotrubičky, na kterých byly obsaženy stříbrné nanočástice. Výsledky ukazují, že inhibiční zóna se zvyšuje s vyšší koncentrací stříbrných nanočástic na podkladu z PPY. Strukturní vzorec PPY je vyobrazen na obrázku č. 2.

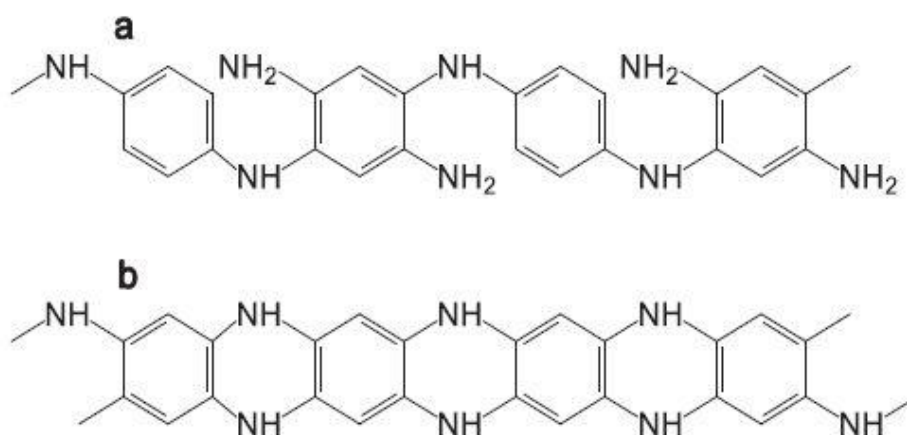


Obrázek 2 – strukturní vzorec pyrrolu a následně polypyrrolu

(Miah et al., 2012)

2.3 Poly(fenylendiamin)

Fenylendiaminy úzce souvisí s anilinem a mohou být obdobně jako on oxidovány na odpovídající oligomerní či polymerní jednotky, které lze snadno připravit chemickou nebo elektrochemickou oxidací. Vodivost fenylendiaminů je mnohem nižší ve srovnání s polyanilinem. Chemická podobnost struktury polyanilinu a polyfenylendiaminu způsobuje podobné vlastnosti obou skupin jako je například redoxní potenciál (tj. schopnost převést jednoho z reakčních partnerů do oxidovaného stavu). I když je vodivost důležitý parametr pro vodivé polymery, není vyžadován jako jediný pro aplikaci vodivých polymerů. Polymery odvozené od fenylendiaminů jsou v poslední době stále více studovány v oblasti biomateriálů. Zde mohou najít své uplatnění v aplikacích, kde se vyskytují obavy z potenciální toxicity způsobené anilinem či jeho oligomery (Stejskal, 2015). Strukturní vzorec polyfenylendiaminu je znázorněn na obrázku č. 3.



Obrázek 3 – idealizovaná struktura polyfenylendiaminu vytvořená oxidací z a) jednoho nebo b) obou aminových skupin p-fenylendiaminu (Stejskal, 2015)

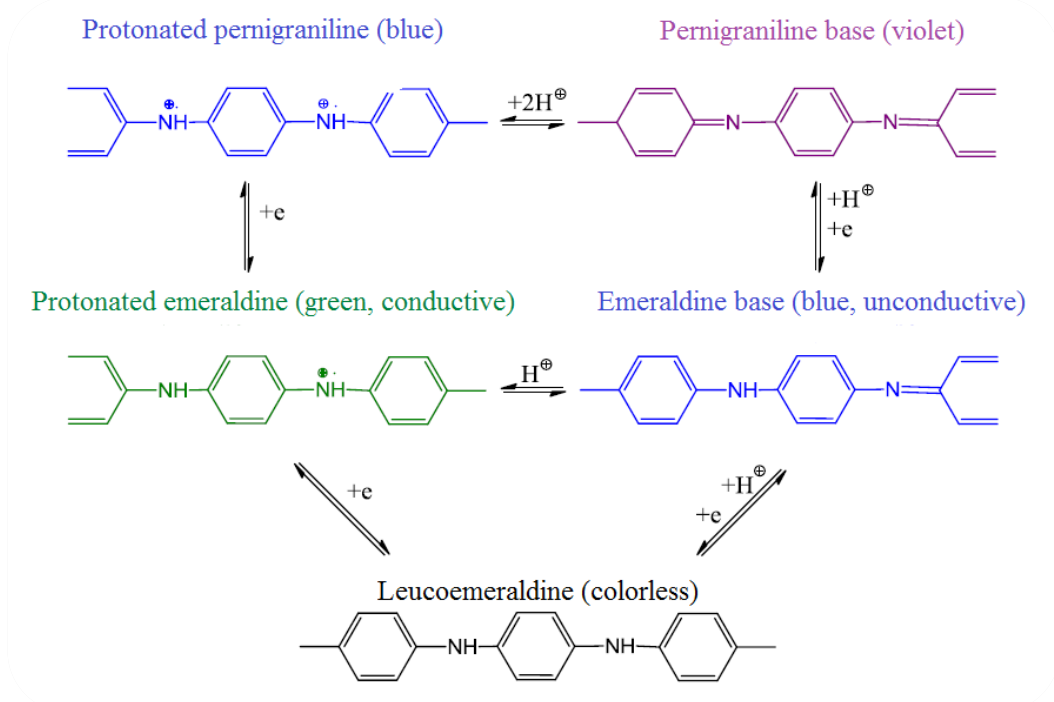
2.4 Polyanilin

Polyanilin (PANI) je další významný zástupce vodivých polymerů. Objevení PANI se datuje již před 180 lety, má tedy nejdelší historii ze všech vodivých polymerů. První pokus provedl německý analytický chemik F. F. Runge (1795 - 1867), který v roce 1834 publikoval svou práci o barevné změně PANI z tmavě zelené na černou. Do podvědomí jako vodivý polymer se dostal až v roce 1960, kdy vědci Josefowicz a další objevili, že pečlivě připravený emeraldine (polyanilinová sůl) má vysokou vodivost. Vodivost PANI byla objevena o desetiletí dříve než samotný objev vodivých polymerů (Ćirić-Marjanović, 2013).

Důležité aspekty, proč je PANI studován, jsou jeho nízké náklady na výrobu a ekologická stabilita. Vyrábí se z něj například světlo emitující diody, palivové články, antikorozní barvy nebo antistatické zařízení (El Khalki et al., 2003). V oblasti medicíny a biologie jsou slibné oblasti pro využití PANI i jiných vodivých polymerů, současně se nejčastěji zkoumá polypyrrol. Pro uplatnění PANI se jeví slibně například monitorování životních funkcí v živých organismech, i jejich stimulaci (Guimard, et al., 2007). Dále se jeho výzkum zaměřuje především pro uplatnění v regeneraci srdeční či nervové tkáně (McKeon, et al., 2010) a to zejména díky schopnosti přenosu náboje na rozhraní biologických objektů a elektrod (Stejskal et al., 2009). Další potenciální uplatnění není založeno na vodivosti, mezi tyto aplikace patří například antimikrobiální prostředky (Boomi a Prabu, 2013) nebo použití při fototermální destrukci nádorů (Ibarra, et al., 2013).

2.4.1 Struktura PANI

PANI se vyskytuje v mnoha formách, které se mezi sebou liší v množství atomů dusíku ve dvou formách. 1) redukovaných (aminových, NH-skupin), plně redukovaná forma se nazývá Leucoemeraldine a 2) oxidovaných (iminových, N-skupin), plně oxidovaná forma se nazývá Pernigraniline (Bagheri et al., 2013). Tyto dvě formy PANI jsou nestabilní, ale existuje i stabilní forma PANI, která je intenzivně studována. Tato stabilní forma je semi-oxidovaná a nazývá se Emeraldine. U Emeraldinu a Pernigranilinu se vyskytují souběžně oxidované a redukované jednotky. Vodivý PANI lze získat buď oxidováním Leucoemeraldinu nebo protonováním Emeraldinu (Boyer et al., 1998). Emeraldin se dále vyskytuje ve dvou formách. 1) zeleně zbarvená, vodivá (protonovaná) forma polyanilinu – emeraldinová sůl (PANI-H), jejíž vodivost se pohybuje v řádech 100 Sm^{-1} . Emeraldinovou sůl lze převést na 2) nevodivou formu, modrou polyanilinovou, emeraldinovou bázi (PANI-B) (Stejskal, 2002). Strukturní vzorce všech forem PANI jsou zobrazeny na obrázku č. 4.



Obrázek 4 – Strukturní vzorce všech forem PANI (Sapurina a Stejskal, 2008)

K přechodu mezi emeraldinovou solí a emeraldinovou bází dochází při změně pH a to konkrétně při hodnotě pH 5 – 6, v této oblasti pH dojde i k poklesu vodivosti PANI až na hodnoty řádově 10^{-9} Sm^{-1} . Obě výše uvedené formy PANI vykazují odlišné vlastnosti, jak v oblasti vodivosti, tak i v oblasti biokompatibility s živými organismy, tkáněmi či jednotlivými buňkami (Humpolíček et al., 2012).

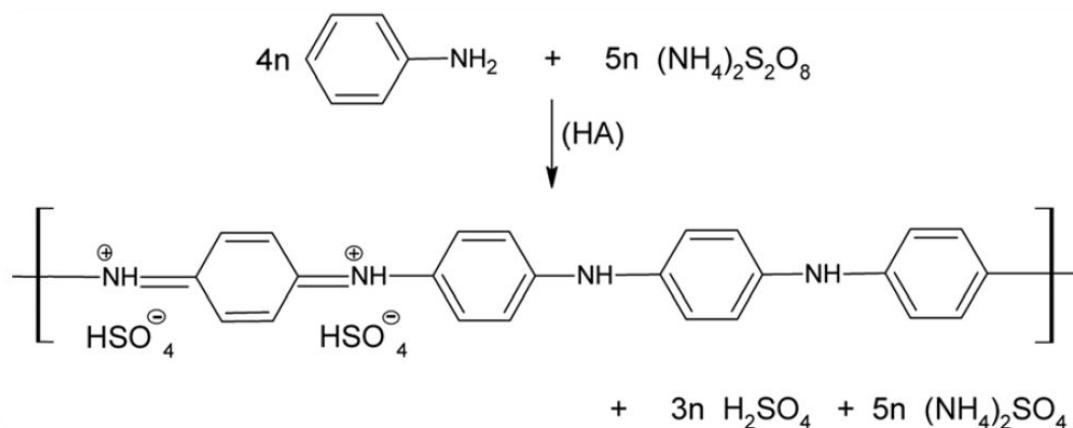
2.4.2 Syntéza PANI

Přesná syntéza práškového PANI byla provedena a ozkoušena po celém světě, podle předpisu vytvořeném kolektivem pana Jaroslava Stejskala v roce 2002, následně byla uznána společností IUPAC jako závazný dokument, podle nějž je PANI syntetizován.

Syntéza je založena na smíchání vodného roztoku anilin hydrochloridu a hydroxy-sulfátu amonného při pokojové teplotě. PANI vzniká ve formě sraženiny, která je oddělena filtrací a sušením. Pro IUPAC studii byla vybrána kyselina chlorovodíková v ekvimolárním poměru k anilinu, protože efektivní polymerace anilinu bylo dosaženo pouze v kyselém prostředí. Pro syntézu byly použity různé kyseliny, jak anorganické, tak organické. Výsledný PANI se lišil rozpustností, stabilitou a hlavně vodivostí. Jako monomer byl použit anilin hydrochlorid. Jako okysličovadlo byla zvolena amonná sůl peroxydisulfátu. Samotný peroxydisulfát je běžné oxidovadlo. Amonná sůl peroxydisulfátu je lépe rozpustná ve vodě. Koncentrace anilin hydrochloridu byla stanovena na 0,2M. Kvů-

li minimalizaci přítomnosti zbytkového anilinu a pro získání lepšího výnosu PANI byl ve studii IUPAC stanoven stechiometrický poměr mezi peroxydisulfátem a anilin hydrochloridem na hodnotu 1,25 (Stejskal, 2002).

Mechanismus polymerace se skládá ze čtyř základních kroků. Iniciace polymerace je započata oxidací anilinu na radikál. V dalším kroku dochází ke vzniku meziprojektu paraaminodifenylamin procesem opětovné aromatizace na dvojmocném kationtu. Následně během oxidace dvojmocného kationtu vniká plně oxidovaná pernigranilinová sůl polyanilinu, což vyplývá z vysoké oxidační schopnosti oxidantu. Nakonec po vyčerpání veškerého oxidantu je pernigranilinová sůl redukována nezreagovaným anilinem. Vzniká zelená emeraldinová sůl (Sapurina a Shishov, 2012). Schéma oxidace anilinu je zobrazeno na obrázku č. 5.



Obrázek 5 – schéma oxidace anilinu (Sapurina a Stejskal, 2008)

Chemická oxidace PANI je vysoce exotermní reakcí, při níž dochází ke změně entalpie o -105 ± 1 kcal/mol. I když reakční teplo je do značné míry neměnné výsledný produkt závisí na reakčních podmínkách a i poměru výchozích monomerů (Fu a Elsenbaumer, 1994). PANI lze tedy získat jednoduchou chemickou polymerací ve vodném roztoku. Můžeme tak připravit PANI ve formě prášku, tenkých filmů, vláken a koloidní suspenzi (Blinova, et al., 2005). Dále je možné z PANI připravit kromě klasické globulární struktury i nanostrukturální materiály (Long, et al., 2011). Lze připravit nanotrubičky, ty se připravují v roztocích středně kyselých (Konyushenko, et al., 2006) a nanovlákná ty jsou připravována taktéž ve zředěných roztocích (Long, et al., 2011).

2.4.3 Cytotoxicita PANI prášku

Ačkoliv je PANI vodivý polymer se širokým aplikačním potenciálem v oblasti biotechnologie a medicíny, nejsou údaje o jeho biokompatibilitě dostačující. Důvod nedostatečných informací o biokompatibilitě PANI prášku je zřejmě založen na skutečnosti, že PANI je používán velmi opatrně. Monomer (anilin) a jeho reakční meziprodukty (anilinové dimery a oligomery) jsou aromatické aminy, které mohou být fyziologicky aktivní nebo dokonce škodlivé. Anilinové dimery i benzidin (aromatický derivát anilinu) vykazují karcinogenní účinky, nicméně PANI sám o sobě ve vodném prostředí rozpustný není, proto jen stěží může být toxický. Všechny výše uvedené nízkomolekulární produkty vznikající při syntéze PANI prášku mohou způsobovat určité problémy (Humpolíček, et al., 2012).

Publikované studie zabývající se PANI biokompatibilitou lze rozdělit do dvou skupin: 1) *in vivo* testování schopnosti implantace a následně post implantačních změn tkáně v okolí implantátu (Wang, et al., 1999) a 2) převažující skupina metod testování biokompatibility se zabývá hodnocením proliferace *in vitro* a/nebo diferenciací buněk na PANI povrchu (Bidez, et al., 2006). Dříve publikované studie se zabývali PANI komplexy (Bayer, et al., 2010), PANI kompozity (Fernandes et al., 2010) anebo elektrickými PANI směsi (McKeon, et al., 2010). Studie, které se zabývají těmito kombinovanými materiály a modifikovanými PANI povrchy mohou poskytnout pouze omezené informace o biokompatibilitě a chování PANI jako takového (Humpolíček et al., 2012).

Současné studie PANI se zaměřují na práškovou formu toho polymeru. To umožňuje zobecnění získaných výsledků a jejich uplatňování v případech, kdy se PANI používá v kombinaci s jinými polymery nebo materiály. Výsledky těchto studií cytotoxicity mohou aproximovat základní buněčnou odpověď na testované látky (Humpolíček, et al., 2012).

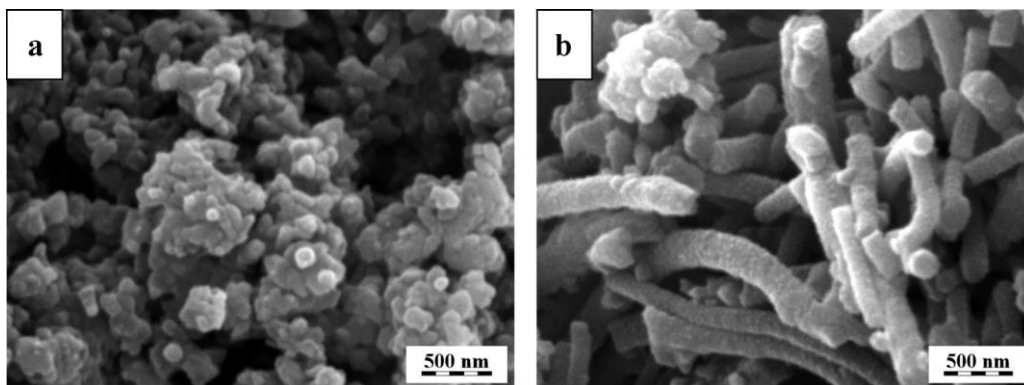
Studie Humpolíček et al. (2012) se zabývá cytotoxicitou práškového PANI. Test byl proveden na dvou buněčných liniích HaCaT (lidské keratinocyty) a HepG2 (lidské hepatocelulární karcinomní buňky). Vzorky PANI byly připraveny podle studie IUPAC (Stejskal, et al., 2002) reakcí anilin hydrochloridu a peroxidisulfátuamonného. Uvedenou reakcí vzniká PANI-H. Následně byl připraven vzorek i PANI-B, který vzniká z PANI-H změnou jeho pH. Tato změna byla vyvolána přidávkem hydroxidu amonného, takto vzniklá suspenze PANI-H a hydroxidu amonného se ponechala 24 hodin, poté byl již výsledný produkt PANI-B odfiltrován. Za účelem testování vlivu možných nečistot ve vzorcích, byly připraveny další vzorky a to reprotonovaný PANI (R-PANI-H). Což bylo provedeno pono-

řením PANI-B do 1M kyseliny chlorovodíkové, výsledný produkt (R-PANI-H) se pak odfiltruje jako ostatní vzorky. Poslední typ PANI byl připraven z již reprotonovaného vzorku, kdy se jeho část opět deprotonuje ponořením do 1M hydroxidu amonného a tím získáme deprotonovanou PANI bázi (DR-PANI-B). Výsledky získané touto studií jasně dokazují, že cytotoxicita PANI úzce souvisí s koncentrací PANI extraktu. Dále bylo pozorováno, že PANI-B vykazuje nižší cytotoxicitu než PANI-H. Ale vzhledem k širce možného biologického využití byly hodnoty cytotoxicity u PANI-H i PANI-B považovány za velmi vysoké. Reprotonované/deprotonované vzorky PANI vykazují pozitivní účinek ve snížení cytotoxicity PANI. Tento test prokazuje, že cytotoxicita PANI je způsobena hlavně nízkomolekulárními nečistotami ve vzniklém polymeru, jak již bylo řečeno výše, samotný PANI není rozpustný ve vodě.

2.4.4 Nečistoty v PANI

Obecně se v PANI vyskytují dva typy nízkomolekulárních látek a to jsou 1) vedlejší produkty a oligomery na bázi anilinu (Zhang, et al., 2012) a 2) kyseliny, které tvoří s PANI soli. Čištění PANI je z důvodu redukce prvního typu nízkomolekulárních látek velice důležité. Používá se k tomu metoda přesrážení, je to běžně užívaná metoda v polymerní technologii, která slouží k odstranění zbytkových monomerů a jakékoliv jiné nízkomolekulární látky přítomné ve vzorku. Polymer je rozpuštěn ve vhodném rozpouštědle a po kapkách je přidán do velkého přebytku látky, kde se vysráží pouze polymer, a nízkomolekulární látky zůstanou rozpuštěny. Polymer může být snadno separován (Stejskal, et al., 2014).

Na tuto možnost odstranění nečistot v PANI a tím tak snížení jeho cytotoxicity navázal výzkum Stejskal et al. (2014). Byly připraveny vzorky, jak globulárního, tak i nanotubulárního PANI-H. Významnou roli vzniklé morfologie PANI hraje prostředí, ve kterém je syntéza prováděna. Globulární PANI vzniká v prostředí velmi kyselém a nanotubulární PANI vzniká v prostředí mírně kyselém až zásaditém. Vzniklé nanotubulární oligomery již nejsou vodivé. Rozdíl mezi oběma připravenými morfologiemi lze pozorovat na obrázku č. 6.



Obrázek 6 – Morfologie PANI: a) globulární morfologie, b) nanotubulární morfologie (Stejskal et al., 2014)

Část připravených vzorků byla přečištěna pomocí koncentrované kyseliny sírové (96%) a část pomocí N-metylpyrrolidonu (NMP). V obou těchto rozpouštědlech byl PANI-H rozpuštěn a následně po 30 dnech se nerozpustná část odfiltruje a rozpuštěný PANI-H se přidá po kapkách do 1,5 l metanolu a 15 ml koncentrované kyseliny sírové. Sraženina PANI se shromáždí na filtru a vysuší se při pokojové teplotě. Aby na těchto vzorcích byl stanoven test cytotoxicity, muselo u nich dojít ještě ke sterilizaci pomocí suchého tepla na 121°C po dobu 20 minut. Samotný test cytotoxicity byl proveden na myších embryonálních fibroblastech buněčné linie NIH/3T3. Výsledky ukázaly, že tento způsob čištění snižuje cytotoxicitu, ale ne na požadovanou úroveň. Co se týče rozdílu mezi globulární a nanotubulární formou PANI-H jsou jejich výsledky podobné, i když pro globulární strukturu jsou mírně vyšší.

3 METODY STANOVENÍ BIOLOGICKÝCH CHARAKTERISTIK

Testování materiálů, jež přijdou do kontaktu s lidskou tkání, podrobně popisují české i mezinárodní normy. Nejdůležitější série dokumentů v České legislativě je norma: ČSN EN ISO 10993 „*Biologické hodnocení zdravotnických prostředků*“. Tento rozsáhlý spis je platný od listopadu 2009 a je složen z 20 dokumentů, které definují používané postupy, požadavky a parametry nutné pro zařazení materiálu jako vhodného ke kontaktu s lidským organismem.

Pro práci s PANI je důležité stanovit jeho cytotoxicitu *in vitro*, což se provádí podle páté části této normy, jež nese název „*Zkoušky na cytotoxicitu in vitro*“. Zde je přesně definováno, jakými metodami, jak a za jakých podmínek daný materiál otestovat. Testy jsou voleny s ohledem na typ vzorku, místo aplikace a charakter použití. V normě jsou definovány tři různé metody a to 1) zkouška extraktu připraveného z testovaného materiálu, 2) zkouška přímým kontaktem a 3) zkouška nepřímým kontaktem. Dále je v normě definováno i jak správně připravit vzorky a referenční materiály, aby výsledky mohly být srovnávány a uznány za spolehlivé (ČSN EN ISO 10993, 2009).

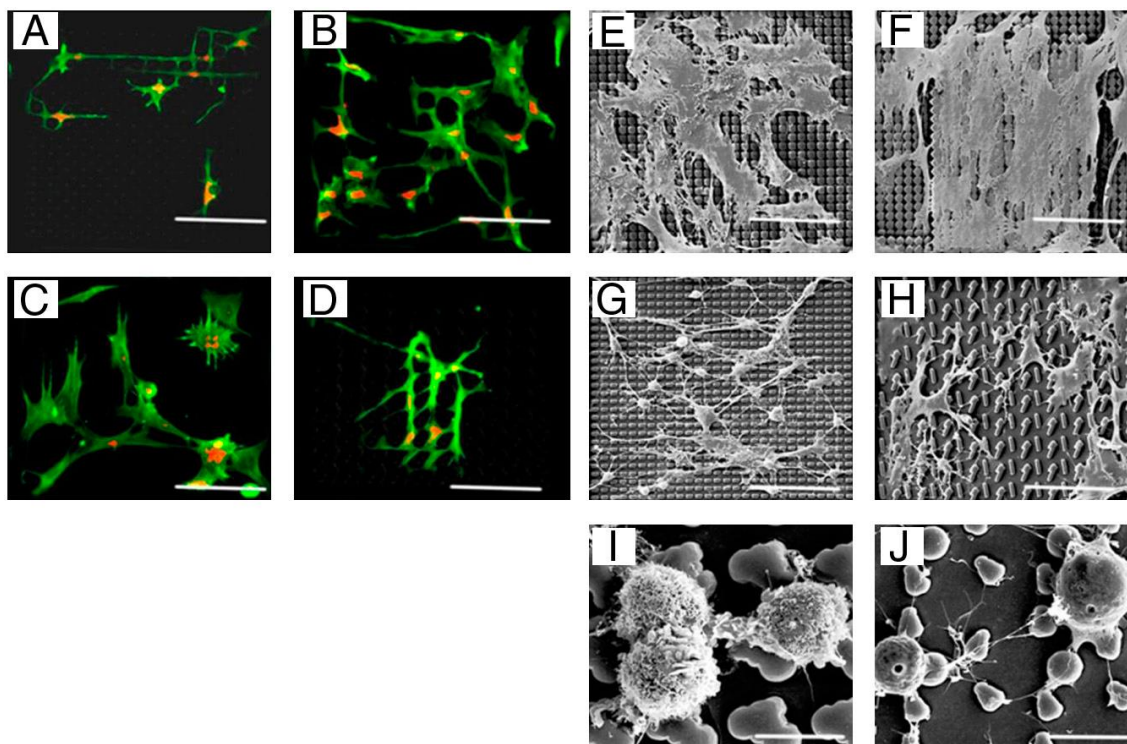
3.1 Buněčná adheze

Zkoušky buněčné adheze nejsou uvedeny v normě ČSN EN ISO 10 993, jelikož není považována za test dostatečně vypovídající o chování materiálu v biologickém prostředí. Nicméně zda buněčná adheze proběhne či nikoli je důležitý faktor pro posouzení, zda bude materiál do biologického prostředí přijat. Buňky kultivované *in vitro* se začnou dělit, až se přichytí adhezivními plaky k podložce. Jakmile se buňka přichytí k podložce, spouští svůj buněčný cyklus. Mechanismus působení adheze na mitózu buněk zatím není uspokojivě vysvětlen. V buněčné kultuře se setkáváme s jevem zvaným kontaktní inhibice, což znamená, že se buňky dělí, dokud nesousedí s jinou buňkou. Jakmile buňky porostou celý povrch, tak se jejich buněčný cyklus zastavuje (Nečas, 2000). Adheze materiálu v biologickém prostředí je především ovlivněna typem povrchu a i typem buněk, které mají materiál osídlit (Ahad et al., 2013).

Komplexní mechanismus buněčné adheze a mnoha dalších pochodů je zajišťován prostřednictvím interakce buněk s ECM (Berrier a Yamada, 2007). Jak již bylo popsáno výše, ECM je komplexní směs proteinů. Složky ECM jsou proteoglykany, což je jeden z typů glykoproteinu (protein s kovalentně vázanými cukry), kolageny, rozpustné multi-

adhezní proteiny (například laminin či fibronectin) a další látky. Složení a fyzikální vlastnosti ECM se liší v závislosti na typu tkáně, umístění a jeho fyziologickém stavu. Komponenty ECM tvoří síť navázáním k sobě a komunikují s buňkami vazbou na adhezní receptory. Adhezní receptory jsou membránové proteiny zvané integriny. Tyto proteiny mají externí část, jež se váže na specifické složky ECM například na kolagen nebo fibronectin a cytoplazmatickou část, kde jsou vázány na aktin cytoskeletu (Lodish, 2013). Rozsáhlý výzkum zabývající se strukturou a biologickým vlivem ECM na chování a zánik buněk prokázal, že pro návrh biomimetického materiálu (= syntetický materiál založený na podobnosti s biologickou strukturou) jsou podstatné tři informace od ECM. 1) fyzikální vlastnosti jako ECM (pružnost, tuhost) podle místa aplikace, 2) specifické chemické signály z ECM a 3) nanotopografie povrchu (Mark, et al., 2009).

Dalším příkladem výzkumu buněčné adheze je tvorba tzv. topochipů, což jsou malé destičky $2 \times 2 \text{ cm}^2$ a uvnitř nich jsou jamky o velikosti $280 \times 280 \text{ }\mu\text{m}$, které se nazývají „topounits“. Topochipy mají různou topografii povrchu vytvořenou z materiálů vhodných pro biomedicínské aplikace. V práci autorů Unadkat a et al. (2011) byly pro analýzu bioaktivity povrchu použity lidské mezenchymální buňky (hMSCs, ATCC® PCS-500-041), které byly nasazeny na PLA (polymlečná kyselina) topochip. Po 8 hodinách byly buňky snímkovány, jak vidíme na obrázku č. 7. V částech A-D lze pozorovat obarvený cytoskelet buněk. Podle rozdílné topografie se buňky chovají jinak. V částech E-J jsou SEM snímky buněk opět na odlišných topografiích a můžeme pozorovat jejich odlišnou morfologii.



Obrázek 7 – snímky adheze buněk na topochipu (Unadkat, et al., 2011)

Počáteční fyzikální a chemické postupy vhodné pro zlepšení interakce biomateriálu s biologickým prostředím byly v poslední době doplněny o pokusy zvýšit biologickou aktivitu biomateriálů například potažením makromolekulami z ECM. Rozvoj nanotechnologií v poslední době otevřel možnost výstavby biomimetického povrchu s definovanou nanotopografií, která dokáže stimulovat vhodnou interakci s interginy (Mark, et al., 2009).

3.2 Buněčná proliferace

Měření proliferace se často používá pro zjištění buněčné odpovědi na konkrétní stimuly nebo toxiny. Stanovení buněčné proliferace se používá i v běžných kvantifikačních metodách jako jsou například sledování stavu buněčné kultury, odhad nejlepšího času pro tvorbu subkultury či volba optimálního ředění buněk. Počet buněk se stanovuje po několikaleté kultivaci. Výsledný efekt daného stimulu nebo toxinu vyžaduje růstovou křivku, které může být připravena například pomocí testu MTT nebo clonogenic assay (Freshney, 2005).

3.3 Buněčná migrace

Studium migrace buněk je důležité v mnoha oblastech biologie i medicíny. Například hlavním rysem vývoje zvířat je migrace buněk dána podle předem určených drah. Buněčnou migraci iniciuje vytvoření velkého membránového výstupku na čele buňky. Hlavním cílem tohoto pohybu je polymerizace aktinu na membráně. Aktinová vlákna jsou na čele buňky rychle zesíťované do svazků a sítě. Tyto struktury se nazývají lamelipodium a díky jejich kontaktu s povrchem (například ECM) se buňka pohybuje (Lodish, 2013).

Metoda vhodná k testování buněčné migrace se nazývá Scratch assay. Buňky jsou pěstovány v Petriho misce s růstovými faktory, které zaručí jejich růst. Po vytvoření souvislé monovrstvy se dělení zastaví, jak jsem uvedla již výše v části buněčné adheze. Následně dojde k "poškrábání" monovrstvy a odstranění pásu buněk, generujeme tím vznik rány, která obsahuje volný okraj buněk. Buňky na okraji cítí ztrátu svých sousedů a v reakci na komponenty ECM se přesunou a zaplní tak prázdnotu (Lodish, 2013).

3.4 Mutagenita

Mutagenita je schopnost látek vyvolat mutace, což je stálá změna pořadí nukleotidů v DNA (deoxyribonukleová kyselina). Nejvýznamnější test mutagenity je Amesův test, který se provádí na bakteriích *Salmonella typhimurium*. Používá se při něm mutantní kmen bakterií, které nejsou schopny syntetizovat histidin, a proto nemůže růst na půdách, které tuto stavební aminokyselinu neobsahují. Testovaná látka se přidává ve zvolených koncentracích k živné půdě bez histidinu a sleduje se růst kolonií bakterií. Pokud má látka mutagenní účinek dochází u mutantů ke zpětným mutacím a ty pak mohou růst. Mutagenita je rozhodujícím faktorem pro iniciaci procesu karcinogeneze (vznik rakovinného bujení), ale samotný faktor mutagenity k rozvoji rakoviny nestačí. Mutagenita není ani samotnou podmínkou karcinogenity. Existuje skupina epigenetických karcinogenů, které nepůsobí genotoxicky, ale ovlivňují vznik nádoru jinými mechanismy, nejčastěji podporou proliferace buněk (Linhart, 2014).

3.5 Testy buněčné smrti

Buněčná smrt má různé formy a utváří podstatu života (Chaabane, et al., 2013). Nastávají převážně dva typy buněčné smrti. 1) Neprogramovaná buněčná smrt nastává v okamžiku, kdy se buňka dostane do okolí, které je neslučitelné s její existencí. Tato smrt se může označit jako náhodná (=akcidentální), katastrofická (Nečas, 2000). 2) Programo-

vaná buněčná smrt je vysoce regulovaná buněčná odpověď. Historicky byly popsány tři typy buněčné smrti na základě morfologických kritérií, 1) apoptóza, 2) autofagie a 3) nekróza (Liu a Levine, 2014). Někteří autoři, nekrotickou programovanou smrt označují jako necroptosis (Galluzi et al., 2014).

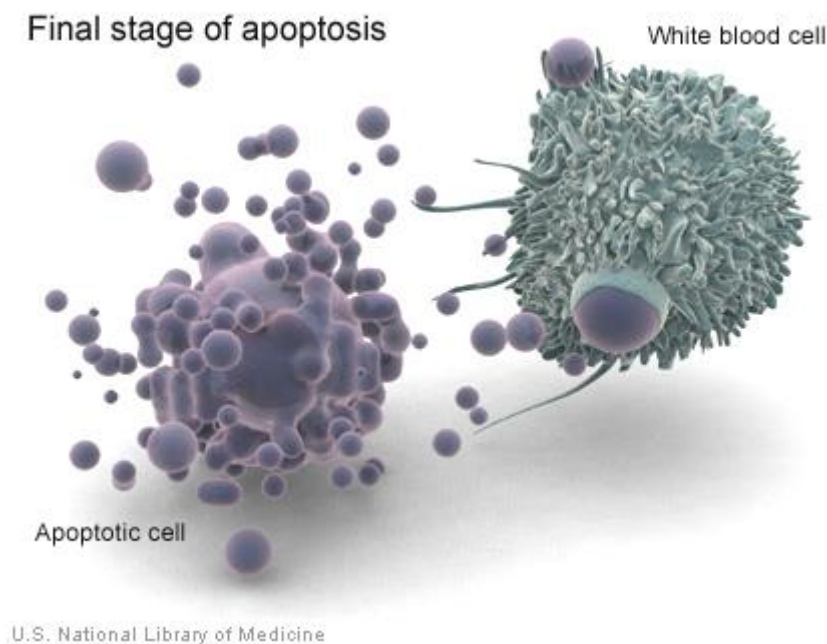
3.5.1 Nekróza

Pojem nekróza byl zaveden v 19. století chirurgickými patology k popisu destrukci tkáně (Sun a Wang, 2014). K nekróze dochází tehdy, je-li nevratně poškozena některá ze základních buněčných funkcí. Příčiny, které způsobují toto poškození, mohou být různorodé, například vniknutí chemických látek, které znemožňují metabolismus, infekce buňky, atd. Dochází-li k nekróze v mnohobuněčném organismu, reaguje okolní tkáň postižené buňky zpravidla zánětlivou reakcí. Konečným procesem nekrózy je zvětšování objemu buňky, otok organel, nakonec dochází k prasknutí plazmatické membrány a vylití cytosolu do mezibuněčného prostoru (Nečas, 2000).

Od 80. let 20. století se vědci začali domnívat, že i nekróza lze regulovat, obdobně jako apoptóza, tato domněnka byla v roce 2005 potvrzena. Tým vědců kolem Junying Yuan objevil skupiny molekul, které části procesu nekrotické buněčné smrti regulují. Tím pádem nyní rozlišujeme 2 typy nekrózy a to akcidentální - nekrózu a geneticky regulovanou – nekroptózu (Galluzzi, et al., 2014).

3.5.2 Apoptóza

Slovo apoptóza pochází z řeckého *apo* = od a *ptosis* = pád. Má charakteristické morfologické i biologické projevy v buňce. Nápadné jsou hlavně změny na jádře, zde dochází ke kondenzaci chromatinu a ten se soustřeďuje na periferii jádra. Kondenzace chromatinu je doprovázena degradací DNA endonukleázami, jež štěpí DNA mezi jednotlivými nukleosomy, vznikají fragmenty o násobcích 180 bází. Buňka zmenšuje svůj objem i jádro se zmenšuje. Od buňky se odštěpují tzv. apoptická tělíska, která obsahují části vnitrobuněčných organel. Nakonec se celá buňka změní v apoptická tělíska, která jsou fagocytována okolními buňkami, jak ilustruje obrázek č. 8 (Nečas, 2000).



Obrázek 8 – poslední stádium apoptické buňky; převzato z <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/apoptosismacrophage>

Mechanismus apoptózy slouží například k udržení homeostázy, je to kontrolní mechanismus pro sledování velikostí a tvarů tkání v různých vývojových stádiích, dále se využívá ke zmenšování počtu imunitních buněk po vymáčení patogenu (Chaabane et al., 2013). V lidském organismu jsou denně apoptózou likvidovány miliony buněk a to takovým způsobem, že není vyvolána zánětlivá reakce, protože nevznikají žádné antigenní látky. Po fagocytóze apoptických tělísek makrofágy může být mnoho chemických sloučenin znovu použito pro výživu jiných buněk (White a Sullivan, 1998). Vlastní mechanismus apoptózy je spouštěn prostřednictvím 2 signálních drah. 1) Vnější cesta, navázání ligandu na transmembránový protein exprimovaný na buněčném povrchu a 2) vnitřní cesta je odpověď buňky na fyzikální nebo chemické podněty například hypoxie (nedostatek kyslíku), stresové signály atd. Obě tyto dráhy aktivují proteiny kaspázy (proteázy s cysteinem v aktivním místě), které jsou odpovědné za signální dráhu vedoucí k apoptickému zániku buňky (Millimouno, et al., 2014).

3.5.3 Autofagie

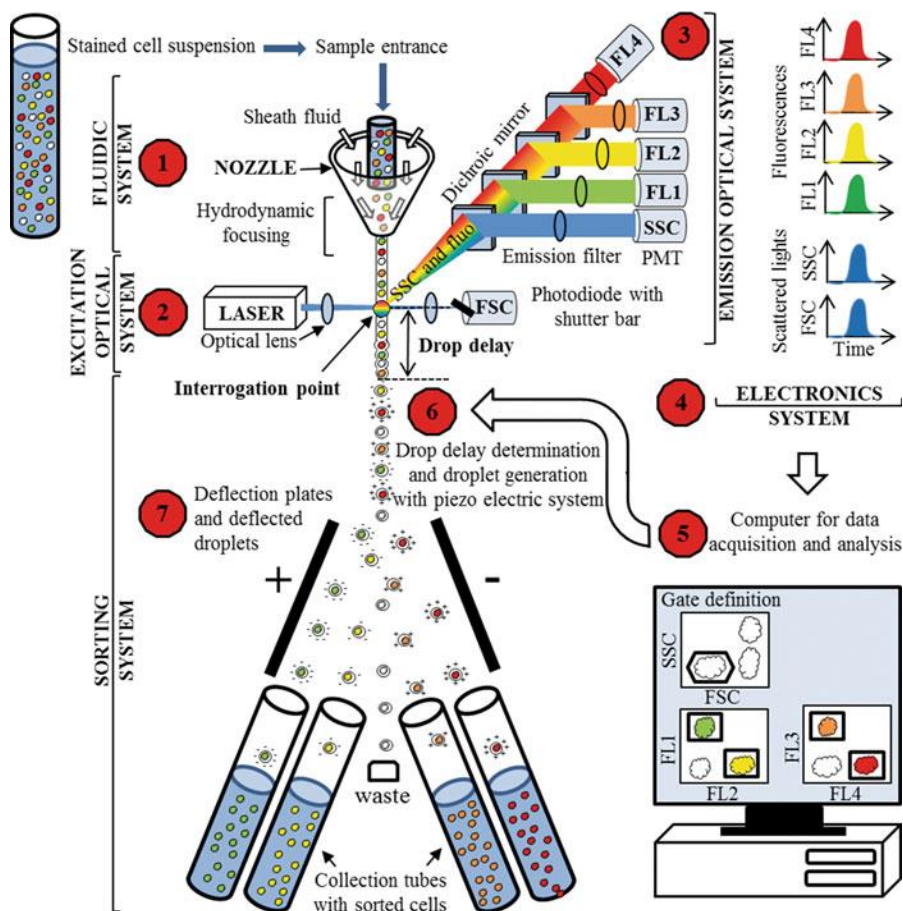
Název pochází z řečtiny a v překladu znamená „jíst sama sebe“ (Nikoletopoulou, Papandreou a Tavernarakis, 2014). Autofagie obsahuje tři typy mechanismů a všechny typy způsobují degradaci buněčného materiálu pomocí lysozomů (Glick et al., 2010). Tento termín je obecně klasifikován jako všudypřítomný katabolický proces, který zahrnuje degradaci cytoplazmatických komponent, včetně celých organel. Je vysoce regulován velkou skupinou různých proteinů, které řídí zapouzdření části cytoplazmatického nákladu do dvojité membránové vezikuly. Vezikuly se nazývají autofagozóm (Denton, Xu a Kumar, 2014).

Autofagie je popisována jednak jako proces důležitý pro přežití buňky a jednak jako proces, jež může být příčinou buněčné smrti (Zhang et al., 2011). Mechanismus, jenž je příčinou buněčné smrti, je často pozorován v souvislosti s jiným zánikem buňky, nejčastěji apoptózou. Mnohdy je příčinou tohoto typu smrti buněčný stres (Denton et al., 2011). Proto, aby mechanismus autofagie mohl být považován za typ buněčné smrti je nutno, aby byly splněny následující požadavky: 1) nesmí být závislý na apoptóze, 2) lze jej inhibovat farmakologicky a 3) nakonec dojde ke zvýšení autofagického toku, nikoliv pouze zvýšení markerů pro autofagii – dokončení autofagie (Denton, Xu a Kumar, 2014).

3.6 Metody vyhodnocení

3.6.1 Průtoková cytometrie

Anglicky Flow cytometry (FCM) je komplexní technologie, která umožňuje studovat buněčné populace s vysokou přesností. Tato technologie poskytuje výkonnou analýzu mnoha jednotlivých parametrů buněk z heterogenních populací. Používá se například k vyhodnocení proliferace (=rozmnožení) buněčné populace k počítání buněk v dané populaci, určování velikosti buněk a po navázání fluorescenčního barviva na jakýkoliv protein lze sledovat výskyt tohoto obarveného proteinu atd. (Picot et al., 2012).



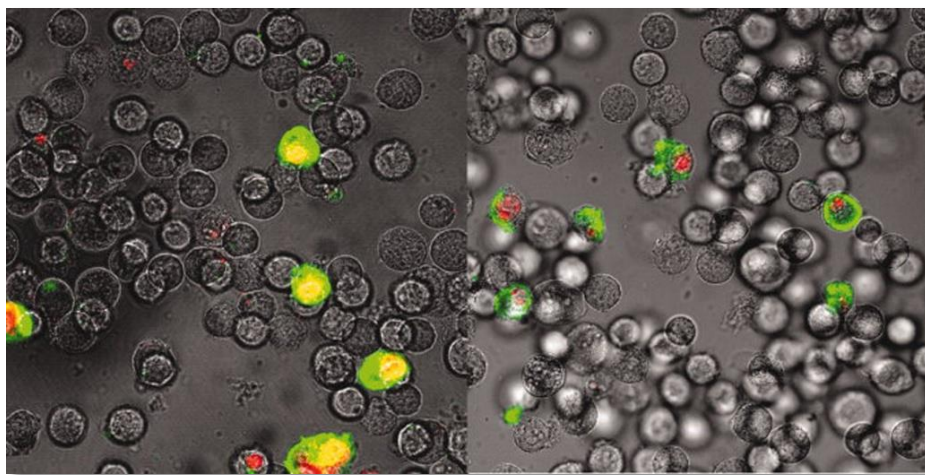
Obrázek 9 – princip průtokové cytometrie (Picot et al., 2012)

Průtoková cytometrie využívá přístroje, do kterého se umístí vzorek buněčné populace ve formě suspenze. Součástí přístroje je tenká kapilára, kterou jsou buňky i s médiem nasávány jedna po druhé do analyzující části, jak vidíme na obrázku č. 9 v části 1 (Sawai et al., 2011). Analyzující část obsahuje sadu laserů, které osvětlují jednotlivé buňky. Vyhodnocení probíhá pomocí přenosu signálu rozptýleného světla v několika úhlech, což je zobrazeno na obrázku č. 9 v části 2. Pokud je ve vzorku přítomno luminiscenční barvivo vyhodnocuje se pomocí emise fluorescence, zobrazeno na obrázku č. 9 v části 3. Poslední součástí přístroje je elektronický systém, který digitalizuje signál z rozptýleného světla i emise fluorescence a přenáší jej do příslušného softwaru, vyobrazeno na obrázku č. 9 v části 5 a 6 (Picot et al., 2012).

Průtoková cytometrie má dva hlavní lasery, které rozdělují heterogenní populaci buněk podle velikosti a vnitřní uspořádanosti buněk. Laser, který určuje velikost buněk, se označuje FSC. Zkratka FSC pochází z anglického forward scatter light, neboli česky přední rozptýl světla. Druhý důležitý laser, který rozděljuje buňky podle jejich vnitřní uspořáda-

nosti, se nazývá SSC. Tato zkratka SSC pochází z anglického side scatter light, neboli česky boční rozptyl světla (Picot et al., 2012).

Pro hodnocení biokompatibility materiálů se využívá testů hodnocení buněčné smrti, které jsou díky průtokové cytometrii relativně přesné a reprodukovatelné (Wang, et al., 2010). K provedení testu je nutné provést dvojí barvení buněk pomocí Annexinu V a propidium jodidu (PI) (Sawai et al., 2011). Annexin V – FITC je detekční soustava pro posouzení apoptózy pomocí vazby na protein zvaný Annexin V. Tento 36 kDa vazebný protein, má velkou afinitu k fosfatidylserinu membránového fosfolipidu. Pomocí Annexinu V jsou tedy detekovány fosfatidylserinové zbytky, které byly transportovány do vnějších vrstev a projevují se jako zelené zbarvení. Druhé barvivo PI se používá k identifikaci nekrotické buňky. Annexin V nerozlišuje mezi apoptickou a nekrotickou buňkou, a proto se váže na všechny vzniklé fosfatidylserinové zbytky. Nekrotické buňky se nám jeví dvakrát zbarvené a to 1) Annexinem V – zeleně a 2) PI – červeně při použití fluorescenčního mikroskopu. Snímek z mikroskopu je zobrazen na obrázku č. 10 (Wang et al., 2010). Výstupem z průtokové cytometrie při testu buněčné smrti je graf, kde na osách jsou vynesena barviva PI a Annexin V a jednotlivé buňky se koncentrují v příslušné části grafu. Apoptické buňky se koncentrují v pravé dolní části grafu – jsou na Annexin V pozitivní a na PI negativní. Nekrotické buňky se koncentrují v pravé horní části grafu – jsou pozitivní, jak na Annexin V, tak na PI. Buňky, u kterých k buněčné smrti nedošlo – tedy živé buňky, se koncentrují v levé dolní části grafu, což znamená, že jsou na obě použítá barviva negativní (Sawai et al., 2011).

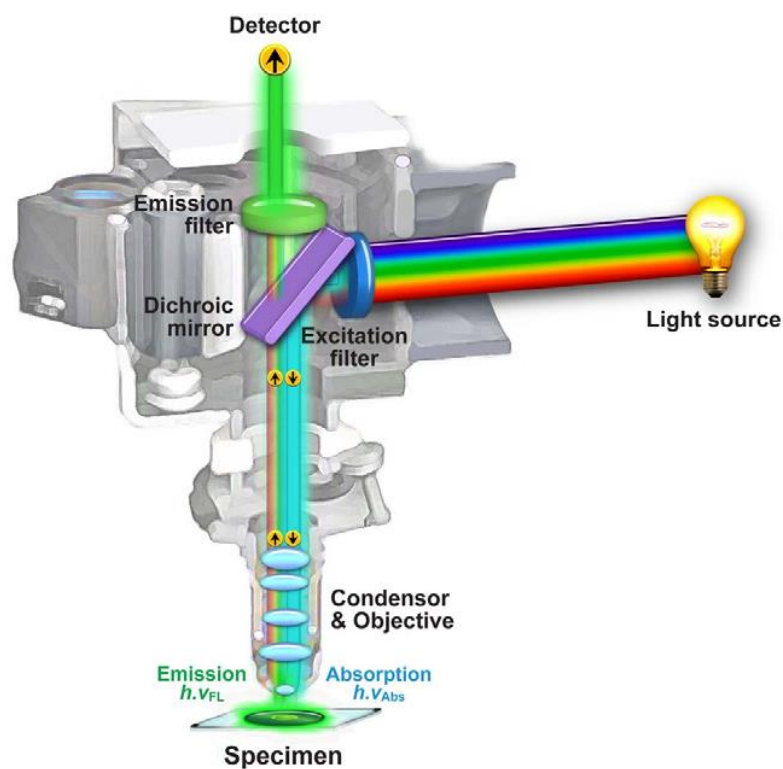


Obrázek 10 - snímek z invertovaného fluorescenčního mikroskopu buněk v apoptickém i nekrotickém stádiu, zvětšení 200x (Wang et al., 2010)

3.6.2 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescence jako jev je součástí větší skupiny příbuzných luminiscenčních procesů. Tyto procesy jsou založeny na absorpci světelného kvanta citlivou látkou, následně dochází k excitaci elektronu v látce po danou dobu a následně vrácení zpět do původní pozice. Fluorescenční procesy lze rozdělit do dvou skupin a to 1) fluorescence a 2) fosforescence. Sloučeniny, jež vykazují fluorescenční vlastnosti, se označují jako fluorochromy (Ishikawa-Ankerhold, et al., 2012).

Fluorescenční mikroskopie poskytuje jedinečný přístup ke studiu přichycené živé buňky. První fluorescenční mikroskopy byly objeveny na počátku 20. století. Těmito mikroskopy bylo možné sledovat autofluorescenční biologické vzorky. Možnost označení protilátek fluorescenčními barvivy byla možná až ve 40. letech 20. století. Vynález laserů nabídl fluorescenční mikroskopii to, co jiný světelný zdroj nedokázal a to monochromatický, koherentní paprsek, který může být zaměřen na malé místo, čímž se dosáhne vysoké lokální intenzity záření. Dalším vývojem bylo dosažení možnosti zobrazovat samostatné signály jednotlivých fluorochromů pomocí vhodných filtrů (Ishikawa-Ankerhold, et al., 2012). Obrázek fluorescenčního mikroskopu je zobrazen na obrázku č. 11.



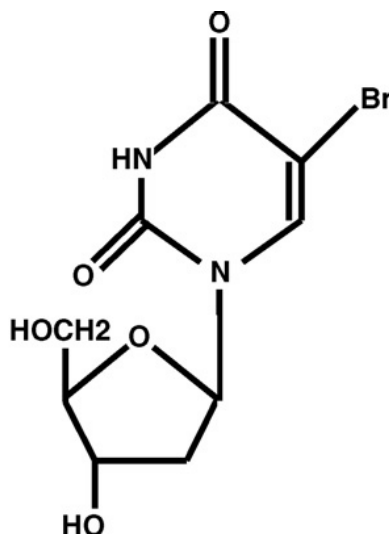
Obrázek 11 – schéma fluorescenčního mikroskopu

(Ishikawa-Ankerhold, et al., 2012)

3.6.3 Kolorimetrické metody

Jedním z hlavních zástupců kolorimetrických metod je MTT, metoda je nazvaná podle látky (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid), která se zkráceně označuje MTT. Tato metoda je vhodná pro stanovení počtu životaschopných buněk v proliferaci a pro vyhodnocení cytotoxických studií (Sylvester, 2011). MTT je založena na absorpci a redukci této látky, jež se do buněk dostává pomocí endocytózy (Trevisi, et al., 2006). Tetrazoliová sůl přijímá elektrony od oxidovaných substrátů a mění se ze žluté soli na modré krystalky, které mohou být rozpuštěny v organickém rozpouštědle (Atterwill, 1995). Tento produkt je následně uložen v cytoplazmě buněk, a poté je přeměněn na rozpustnou formu, která generuje modrou barvu (Wang et al., 2011). Množství vyrobeného formazanu je přímo úměrné počtu živých buněk během provedení MTT testu (Sylvester, 2011).

Další kolorimetrickou metodou je tzv. BrdU (5-brom-2'-deoxyuridin), což je halogenpyrimidin. Strukturální vzorec BrdU je zobrazen na obrázku č. 12. Jedná se o toxickou a mutagenní látku. Tento analog thimidinu, který se začleňuje do DNA dělících se buněk během S-fáze buněčného cyklu se používá ke sledování buněčné proliferace. BrdU může být detekován imunohistochemicky za použití monoklonální látky, která se váže na jednovláknovou DNA obsahující BrdU (Taupin, 2006).



Obrázek 12 – strukturální vzorec BrdU

(Taupin, 2006)

3.6.4 Clonogenic assay

Clonogenic assay neboli test tvorby kolonií daných buněk je založen na schopnosti jedné buňky růst do kolonií. Termínem kolonie je definován shluk nejméně 50 buněk. Clonogenic assay je metodou vhodnou např. pro stanovení buněčné smrti po ošetření ionizujícím zářením, ale také může být použit ke stanovení účinnosti cytotoxických látek. Kolonie jsou pro vyhodnocení fixovány glutaraldehydem, obarveny krystalovou violetí a počítány pomocí stereomikroskopu (Franken, et al., 2006).

4 METODY STANOVENÍ MATERIÁLOVÝCH CHARAKTERISTIK

Při syntéze PANI je metodou IUPAC dána příslušná vodivost, kterou by měla vodivá forma PANI, PANI-H vykazovat. Proto je nutno tuto charakteristiku produktu změřit, aby mohla být potvrzena reprodukovatelnost samotné syntézy PANI i vyhodnocených biologických charakteristik.

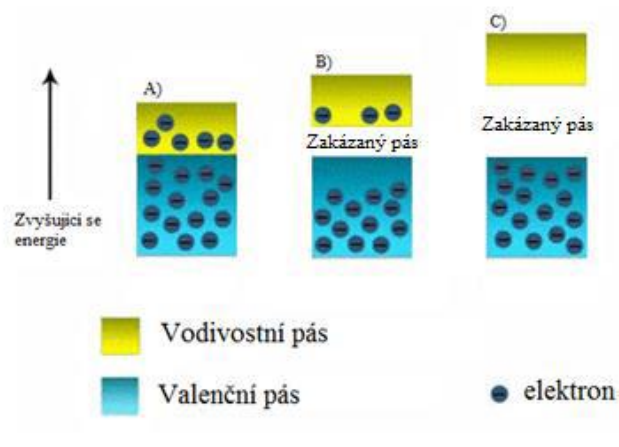
4.1 Měření elektrické vodivosti

Elektrická vodivost neboli konduktance je vyjádřena poměrem elektrického proudu procházejícího skrze těleso a napětí na tělese. Jednotkou elektrické vodivosti G je Siemens ($G = [S = AV^{-1}]$). Převrácenou hodnotou vodivosti je odpor. Další hojně využívanou veličinou v oblasti elektrické vodivosti je konduktivita σ , dříve označována jako měrná vodivost, která je vyjádřena jako poměr plošné hustoty elektrického proudu a intenzity elektrického pole. Její jednotkou je Sm^{-1} . Převrácenou hodnotou konduktivity je rezistivita neboli měrný odpor ρ (Meissner a Zilvar, 1987). Rovnice č. 1 vyjadřuje výpočet měrné vodivosti, kde S je plocha průřezu vodiče, neboli plocha, kterou prochází elektrický proud, l je délka vodiče a R je odpor vodiče. Rovnice č. 2 pak zobrazuje výpočet měrné elektrické vodivosti (Quinn, 2009).

$$\rho = \frac{R \cdot S}{l} \quad (1)$$

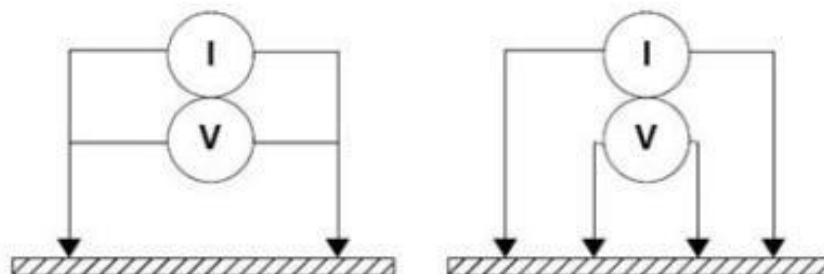
$$\sigma = \frac{1}{\rho} \quad (2)$$

Elektrická vodivost je jev, který se vyskytuje v látkách díky pohybu volných nosičů náboje, nejběžněji elektronů v objemu daného tělesa. V pevné látce (krystalické) jsou atomy uspořádány pravidelně, ale elektrony jsou zde delokalizované (tzn. nelze přesně určit kterému atomu patří). Tyto elektrony vzájemně interagují a vytvářejí pás povolených energií. Aby látka mohla být považována za vodivou, je nutné, aby její valenční elektrony přeskočili vlivem tepelné excitace z valenčního pásu do pásu vodivostního. Obecně se mezi oběma pásy může vyskytovat ještě zakázaný pás, jež tyto dva pásy odděluje. U vodičů se však nevyskytuje, proto tyto látky jednoduše vedou elektrický proud. U polovodičů se zakázaný pás vyskytuje, ale jeho velikost je malá, a tudíž k přeskoku dochází. Nevodiče mají již zakázaný pás tak velký, že žádný elektron jej nedokáže překonat, k přeskoku zde nedochází (Kittel, 1996). Díky této pásové teorii lze jednoduše rozlišit vodič, polovodič a nevodič, jak je zobrazeno na obrázku č. 13.



Obrázek 13 – schéma principu pásové teorie
v pevných látkách (Kittel, 1996)

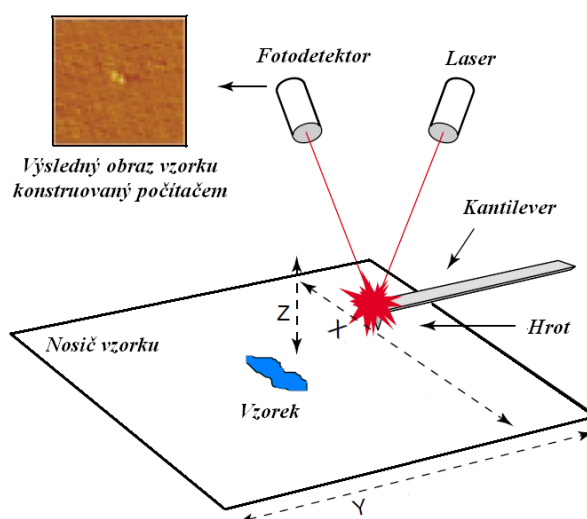
Praktické měření elektrické vodivosti se provádí přes měření měrného odporu. Jsou dvě hlavní metody měření: 1) dvoubodově a 2) čtyřbodově. Dvoubodové měření je jednoduchá metoda založená na připojení vnějšího zdroje proudu do měřícího obvodu a odečítání napětí na tělese, u nějž chceme znát odporovou charakteristiku. Tato metoda je však použitelná pro aplikace, kde stanovujeme velké výstupní odpory ve srovnání s odpory přírodnými. Čtyřbodová metoda je založena na dvou párech externích kontaktů. Pár vnějších kontaktů přivádí proud do dané struktury a pár vnitřních kontaktů měří reálnou hodnotu napětí na daném tělese (Schuetze, et al., 2004). Rozdíl mezi dvoubodovou a čtyřbodovou metodou je zobrazen na obrázku č. 14. O rozvoj čtyřbodové metody se zasloužil L. J. Van der Pauw (1958), který vynalezl novou geometrii, aby bylo možno potlačit chyby měření způsobené velikostí kontaktů.



Obrázek 14 – znázornění zapojení obvodu pro dvoubodovou
a čtyřbodovou metodu měření rezistivity (Schuetze, et al., 2004)

4.2 Mikroskopie atomárních sil (AFM)

AFM je moderní experimentální metoda, jež byla poprvé představena v roce 1986 odborníky G. Binnigem, C. F. Quantem a Ch. Gerberem (Wickramasinghe, 2000). Mikroskopie byla vyvinuta, aby překonala jeden z hlavních omezení STM (skenovací tunelová mikroskopie) a to nutnost vodivosti vzorků (Paredes, et al., 2003). Nespornou výhodou této metody je tedy možnost zobrazení, jak vodičů, tak i organických materiálů, dále i izolátorů, keramických látek, polymerů, skel, biologických makromolekul a žijících i nežijících buněk. Další významnou výhodou je možnost zobrazení materiálů v různých prostředích, jako je například vzduch, kapaliny, roztoky či vakuum. Z těchto všech výhod vyplývá možnost dynamického studování jevů v buňkách v reálném čase. Ovšem nejčastější použití metody AFM je zobrazování topografie povrchu vzorku, následně pak fázové zobrazení či zkoumání mechanických vlastností (Tománková et al., 2006).



Obrázek 15 – Schéma principu AFM

(Edwardson a Henderson, 2004)

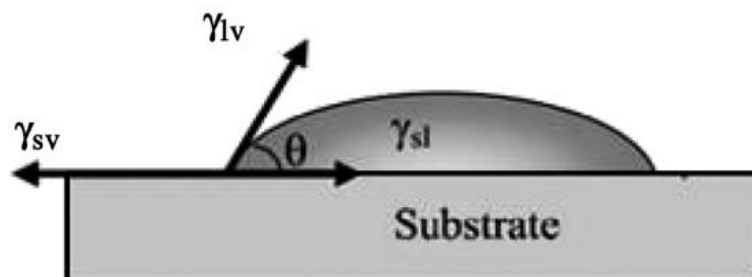
AFM je založena na interakci sil krátkodobých i dlouhodobých, přitažlivých i odpuzivých, které existují mezi atomy a molekulami. Pro měření interakce slouží tzv. kantilever, který má na jednom konci hrot a druhým koncem je připevněn k pružné páce. Podle typu zjištěných sil mezi hrotem a vzorkem může být mikroskop používán v různých režimech. Nejrozšířenější použití je tzv. kontaktní režim. Hrot je zde přiveden do fyzického kontaktu se vzorkem a systém využívá odpuzivé síly, která klesá s oddálením hrotu od povrchu vzorku. Tento typ měření je velmi invazivní metoda, a proto není vhodná pro měkké materiály. Další typy snímání povrchu hrotem jsou založeny na bezkontaktním mě-

ření, kdy se jako zpětná vazba využívá například přitažlivých sil (Paredes, et al., 2003). Pohyb hrotu způsobuje ohyb kantilevru, který je detekován pomocí piezokeramického členu. Tento člen zajišťuje vrácení kantilevru na původní místo pomocí přivedeného napětí. Soubor dat je pak stanoven z přivedeného napětí na piezokeramický člen (Tománková et al., 2006)

4.3 Měření povrchové energie

Proces smáčení pevné látky kapalinou je velice důležitá materiálová charakteristika v technickém světě. Některé aplikace vyžadují dobré smáčení mezi kapalinou a materiálem, zatímco jiné aplikace vyžadují špatné smáčení kapalinou či dokonce odpuzování kapaliny z daného materiálu (Kumar a Prabhu, 2007). Při procesu smáčení dochází ke styku tří fází a to pevné látky, kapaliny a vzduchu (nebo jiné kapaliny - nemísitelné). Vznikající kontaktní úhel mezi pevnou látkou a kapalinou je výsledkem rovnováhy mezimolekulárních interakcí mezi kapalinou a pevnou látkou. V případě, že soudržné síly mezi molekulami kapaliny jsou silnější než adhezni síly mezi pevným povrchem a kapalinou pak kapalina vytváří kapku, která má tendenci minimálně se dotýkat povrchu. V opačném případě vznikají na povrchu kapky, které mají tendenci na povrchu vytvářet film (Erbil, 2014).

Smáčení nejspíše jako první rozpoznal Galileo, následně rovnice kontaktního úhlu ideálních ploch byla popsána v roce 1805 Thomasem Youngem. Ten ji vyjádřil bez důkazů, které byly později vysvětleny (Erbil, 2014). Kontaktní úhel byl vypracován v místě trojného bodu, to znamená že když kapka sedí na pevném povrchu kontaktní úhel je v místě, kde se stýká pevný povrch materiálu kapalina a plynná fáze. Na obrázku č. 16 je zobrazena sedící kapka na pevném podkladu vysvětlen kontaktní úhel.



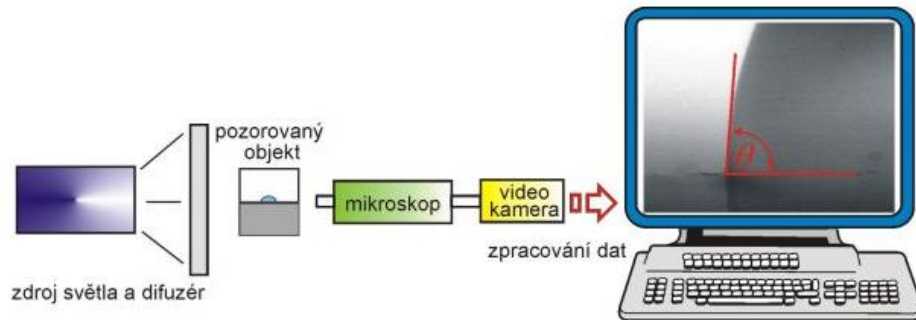
Obrázek 16 – kontaktní úhel sedící kapky

(Kumar a Prabhu, 2007)

Pomocí obrázku 16 lze odvodit Young-Dupré rovnici podle které je kontaktní úhel počítán. Young-Dupré rovnice je zobrazena jako rovnice č. 3 (Kumar a Prabhu, 2007).

$$W_{sl} = \gamma_{1v}(1 + \cos\theta) \quad (3)$$

V dnešní době se kontaktní úhel měří pomocí metody přisedlé kapky a pomocí videokamery, mikroskopu a pc, jak je znázorněno na obrázku č. 17.



Obrázek 17 – schéma metody přisedlé kapky pro měření kontaktního úhlu
(Bartovská a Šišková, 2005)

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 MATERIÁL A METODIKA

Cílem této práce bylo zjistit, jak snížit cytotoxicitu PANI prášku. Jako slibná metoda se jeví přechištění PANI prášku pomocí přesrážení, které mělo účinně odstranit vedlejší nízkomolekulární produkty vzniklé syntézou PANI prášku.

5.1 Syntéza PANI prášku

Syntéza byla provedena podle studie IUPAC (Stejskal, 2002). Smícháním roztoků 0,25M amonium persulfátu a 0,2M anilin hydrochloridu. Nejprve byly připraveny samostatně roztoky obou potřebných látek ve vodě. Zde byla použita ultračistá voda Simplicity UV (Millipore s.a.s, Francie). Z důvodu dobrého rozpuštění daných látek bylo nutné nechat vzniklé roztoky 1 hodinu stát při laboratorní teplotě. Po uplynutí doby 1 hodiny a po zhodnocení, že látky jsou dokonale rozpuštěny, byly oba roztoky smíchány. Samotná syntéza PANI prášku probíhala 24 hodin, i když podle předpisu IUPAC postačí mnohem kratší doba, zde byl zvolen delší časový úsek, aby byl zajištěn co nejlepší výtěžek reakce. Následně byl vzniklý PANI filtrován na Büchnerově nálevce. Filtrační koláč byl ještě promýván třikrát 100 ml 0,2M kyselinou chlorovodíkovou a to tak, že po každém promytí bylo třeba polymer dokonale vysušit odsátím veškerého matečného louhu, až z Büchnerovy nálevky nekapala žádná kapalina. Následně byl filtrační koláč třikrát promyt 100 ml acetonu, dvakrát za použití vakua a jedenkrát byl aceton nechán pouze volně prokapat. Takto získaný filtrační koláč se nechal vysušit volně v digestoři při laboratorní teplotě. Vzniklé suché aglomeráty byly rozdrceny pomocí třecí misky. Výsledným produktem byl polyanilin hydrochlorid (PANI-H).

5.2 Postup přechištění PANI prášku

Jak bylo dle studie Humpolíček et al. (2012) zjištěno, zůstává v připraveném PANI prášku mnoho nečistot, které se podílejí na jeho cytotoxicitě. Vzniklý PANI prášek je vhodné přechistit. V rámci výzkumných aktivit spolupracujícího týmu, byla provedena Soxhletova extrakce, kde se PANI prášek nechal rozpouštět různými rozpouštědly. Podle dosud nepublikovaných výsledků se jako dobré čisticí médium jeví metanol a 0,2M kyselina chlorovodíková. Tato extrakce je zdlouhavá a náročná, proto bylo vyzkoušeno toto přechištění provést pomocí pouhého ponechání PANI prášku v daném rozpouštědle.

Postup přechištění byl zvolen následovně. Dle metodiky popsané v kapitole 5.1 byly připraveny tři stejné vzorky PANI, které byly dále přechištěny. První vzorek byl přechištěn

pouze 0,2M kyselinou chlorovodíkovou (PANI-HCl), druhý vzorek metanolem (PANI-MeOH) a třetí vzorek byl přečištěn oběma čistícími médii postupně po sobě (PANI-HCl+MeOH). Přečištění se provedlo tak, že PANI prášek o předem zvolené hmotnosti byl smíchán s čistícím médiem v poměru 2 g PANI/100 ml média. Vzorky, které byly přečištěny pouze jedním médiem, byly nechány po dobu 24 hodin na třepačce KS 130 basic (IKA, Německo) za laboratorní teploty. Třetí vzorek PANI, který podstoupil přečištění pomocí obou medií, byl smíchán ve stejném poměru, ale lišila se doba jeho třepání na třepačce, což bylo jen 12 hodin s jedním médiem a 12 hodin s druhým médiem. Po uplynutí této doby byly vzorky odsáty na Büchnerově nálevce, promyty acetonem a dosušeny v digestoři při laboratorní teplotě.

5.3 Stanovení vodivosti práškového PANI

Při zkoumání výsledných vlastností přečištěných PANI prášků je nutno stanovit i jejich měrnou vodivost. Měrná vodivost je důležitá materiálová charakteristika a proto je důležité, aby ji přečištění zásadně neovlivňovalo.

5.3.1 Tvorba PANI tablet

Vodivost se měří na pevných vzorcích, proto bylo nutno z PANI prášku vytvořit tablety. Tablety byly lisovány na ručním lise za použití lisovací formy na tablety. Do přístroje bylo vloženo 0,2 g práškového materiálu PANI a po sestavení přístroje byl vyvozen tlak na tabletu 50 N po dobu 5 minut. Po uplynutí doby byly tablety z přístroje vyjmuty a změřena jejich tloušťka.

5.3.2 Měření vodivosti

Měření vodivosti bylo provedeno čtyřbodovou metodou dle Van der Pauwa (1958). Měřicí sestava se skládala z digitálního elektrometru 6517B (Keithley, USA), napětového zdroje 2410 (Keithley, USA) a scanneru K7002 (Keithley, USA). Vyhodnocování probíhalo pomocí aplikace „VdP“ na PC.

Experiment byl proveden tak, že do držáku se čtyřmi elektrodami byl připevněn měřený vzorek. Do programu v PC byly nastaveny potřebné hodnoty a to tloušťka každého vzorku, konstantní proud – 0,001 A a maximální elektrické napětí – 200 V. Měření bylo zahájeno. Přístroj čtyřikrát za sebou změřil hodnoty měrného elektrického odporu ρ vzorku. Vyhodnocení bylo uloženo ve formě textového dokumentu, z nějž byly vypočteny

hodnoty měrné elektrické vodivosti σ . σ je převrácená hodnota měrného elektrického odporu ρ , jak ilustruje rovnice č. 3.

$$\sigma = \frac{1}{\rho} \quad (3)$$

5.4 Použité buněčné linie

Pro stanovení cytotoxicity byly použity buňky myších fibroblastů, které nesou označení NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658™, USA). Buňky byly odebrány z myšního embrya, spadají do biosafety level 1 (tzn. s buňkami lze pracovat bez jakéhokoliv omezení, neobsahují patogen, který by mohl způsobit onemocnění a pro pracovníky laboratoře a životní prostředí představují minimální riziko). Tyto buňky byly použity například při zkoumání účinku kyseliny valproové a trichostatinu A (inhibitory histondiacetylázy a mají schopnost epigeneticky ovlivňovat chromatin). Byla stanovena viabilita buněk po různém přidavku těchto látek (Felisbino, et al., 2014).

5.5 Podmínky kultivace

Buňky se nechaly kultivovat v inkubátoru Heracell 150i (ThermoScientific, USA). Pro kultivaci buněk NIH/3T3 je důležité, aby inkubátor udržoval následující parametry: koncentrace oxidu uhličitého (CO₂) 5%, teplota 37,0 °C a stabilní vlhkost. Buňky byly kultivovány v přítomnosti kultivačního média, Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM (PAA The Cell Culture Company, Anglie), ve kterém je obsažen nejvyšší podíl chloridu sodného (6400 mg/l), z aminokyselin je zde nejvíce zastoupen L-lysin (146 mg/l), dále jsou obsaženy vitamíny a další komponenty. Do média je přidáno 10 % fetálního hovězího séra (Biosera, Anglie) a 1% antibiotik – penicilin a streptomycin v koncentraci 100 µg/ml (PAA Laboratories GmbH, Austrálie).

5.6 Experimentální uspořádání

Testování biologických vlastností je možné provádět v různých experimentálních nastaveních. Pro testování třech různě modifikovaných PANI prášků byl s ohledem na dříve publikované výsledky zvolen postup testování extraktů. Samotné testování pak proběhlo dle postupu definovaného v ČSN EN ISO 10 993-5 „Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro*“

5.6.1 Extrakty PANI

Tři různě modifikované extrakty prášku PANI byly připraveny dle ČSN EN ISO 10 993-12 „Příprava vzorků a referenčních materiálů“. PANI prášek byl smíchán s kultivačním médiem vhodným pro použité buňky o koncentraci 0,2 g PANI prášku/ml kultivačního média. Připravené suspenze se ponechaly 24 h míchat na třepačce, při teplotě 37 °C. Po uplynutí doby následovala centrifugace pomocí centrifugy Ependorf 5702 R (Ependorf, Německo) a dále odsátí supernatantu, který byl následně přidáván k buňkám ve zvolených koncentracích.

5.6.2 Prekultivace buněk

Před zahájením experimentu bylo nutno prekultivovat buňky po dobu 24 h. Z buněk kultivovaných v kultivační nádobě bylo nejprve odsáno médium, následně byly opláchnuty PBS (PAA Laboratories GmbH, Austrálie) o koncentraci 0,2 m

l/cm². PBS dokonale odstraní veškeré stopy média. Dále se k buňkám přidá Trypsin (PAA Laboratories GmbH, Austrálie) o koncentraci 0,1 ml/cm², takto připravené buňky byly nechány kultivovat v inkubátoru Heracell. Působení Trypsinu bylo nejdéle 20 minut, ale nejlépe do oddělení buněk od podložky, což bylo průběžně kontrolováno Invertovaným mikroskopem s fázovým posunem (Olympus CKX 41, Japan). Po ukončení působení Trypsinu bylo do kultivační nádoby přidáno stejné množství kultivačního média jako Trypsinu. Poté byly buňky odpipetovány do zkumavky vhodné k centrifugaci, která se provedla pomocí centrifugy Ependorf 5702 R (Ependorf, Německo). Parametry na centrifuze – doba centrifugace 3 min., teplota 37 °C a rychlost 1,1.10³ rpm. Po vyjmutí zkumavky z centrifugy byly buňky koncentrovány ve spodní části zkumavky, pak bylo médium nad buňkami odsáto. Koncentrace buněk ve zkumavce byla 2.10⁷ buněk/ml, následně se buňky ředily na požadovanou koncentraci 1.10⁵ buněk/ml.

Připravená koncentrace buněk byla rozpipetována do 96-jamkových destiček (každá jamka obsahovala 100μl buněčné suspenze o koncentraci 1.10⁵ buněk/ml) a do 12-jamkových destiček (každá jamka obsahovala 1 ml buněčné suspenze o koncentraci 1.10⁵ buněk/ml). Celkem byly připraveny tři 96-jamkové destičky. První destička v levé části pro PANI-MeOH a v pravé části pro PANI-HCl. Druhá destička v levé části pro PANI-HCl+MeOH. Třetí destička pro referenci. Destičky byly použity pro stanovení MTT. Dále byly připraveny čtyři 12-jamkové destičky. První destička pro PANI-HCl. Druhá destička pro PANI-MeOH. Třetí destička pro PANI-HCl+MeOH. Čtvrtá destička pro referenci.

Destičky byly použity pro průtoková cytometrie. Připravené destičky se nechaly kultivovat 24 h v inkubátoru Heracell.

5.6.3 Přídavek extraktů PANI

Po uplynutí doby potřebné k prekulivaci buněk byly do připravených destiček přidány extrakty z PANI prášku. Samotné přidání extraktů bylo provedeno 1) odsátí média z destičky, 2) přidání extraktu v předem zvolené koncentraci. Pro 96-jamkovou destičku byly zvoleny koncentrace: 100%, 75%, 50%, 25%, 10% a 5%. Pro 12-jamkovou destičku byly zvoleny koncentrace: 50%, 25%, 10% a 5%. Zvolené koncentrace extraktu byly vytvořeny podle objemu jamky. 100% koncentrace znamená zaplnění celého objemu jamky pouze extraktem. Dále se snižující se koncentrací extraktu je do jamky přidáváno médium. Připravené destičky s extrakty se nechaly kultivovat 24 hodin v inkubátoru Heracell.

5.6.4 MTT

Po 24 hodinové kultivaci buněk s extrakty se veškerý supernatant nad buněčnou populací odsál a byl nahrazen čistým médiem. Poté bylo k buňkám přidáno MTT (Duchefa Biochemie, Nizozemsko) v koncentraci 0,5 mg/ml média. Působení MTT na buňky bylo po dobu 4h v inkubátoru. Po této době se z jamek odsálo 80 μ l a přidalo 70 μ l DMSO (dimetylsulfoxid, >99,9%, Duchefa Biochemie, Nizozemsko), doba působení DMSO byla 15 minut. Následně byla změřena absorbance na Mikrotitiračním měřiči absorbance Sunrise (Tecan, Švýcarsko) při vlnové délce 570 nm.

5.6.5 Mikroskopování

Pro další kontrolu buněčné populace bylo použito snímkování buněk pomocí mikroskopu. K tomuto účelu byl použit mikroskop s fázovým kontrastem (Olympus IX81, Japonsko)

5.6.6 Průtoková cytometrie

Pro stanovení buněčné smrti byly NIH/3T3 připraveny do 12-jamkových destiček s výchozí koncentrací $1 \cdot 10^5$ buněk/ml. Následující den byly k buňkám přidány extrakty PANI prášku, jak bylo uvedeno výše. Po uplynutí potřebné doby k působení extraktů byla buněčná smrt stanovena na přístroji BD FACSCanto II (BD Biosciences, Anglie). Na analýzu výsledků byl použit software BD FACSDiva (BD Biosciences, Anglie). K rozlišení typu buněčné smrti bylo použito fluorescenční barvivo PI (propidium jodid) – roztok o

koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ v PBS (BD Biosciences, Anglie), který interaguje s DNA, v kombinaci s proteinem annexin V (BD Biosciences, Anglie) konjugovaným s FITC (fluorescein isothiokyanát) interagující s fosfatidylserinem.

Rychlost průtoku vzorku byla nastavená na 30 $\mu\text{l/sec}$, objem analyzovaného vzorku byl 100 μl , konečná koncentrace propidium jodidu 10 $\mu\text{g/ml}$ a Annexin V-FITC 5 $\mu\text{g/ml}$.

6 VÝSLEDKY

V následující části práce jsou uvedeny výsledky měření vodivosti i testů cytotoxicity třech různě modifikovaných PANI prášků.

6.1 Měření vodivosti

Vodivost PANI prášku je velice důležitá charakteristika, proto je potřeba sledovat jaký má přečištění PANI prášku vliv na jeho vodivost. V tabulce č. 1 jsou zobrazeny výsledky měření vodivosti a tloušťka tablety d , která byla připravena na ručním lise.

Tabulka 1 – Výsledky měrné elektrické vodivosti tablet PANI

Vzorek	ρ [$\Omega \cdot \text{cm}$] \pm SD	σ [S/cm] \pm SD	d [cm]
PANI_HCl	0,1915 \pm 0,0004	5,223 \pm 0,011	0,1330
PANI_MeOH	0,2030 \pm 0,0006	4,926 \pm 0,015	0,1245
PANI_HCl_MeOH	0,282972 \pm 0,000004	3,53391 \pm 0,00005	0,1284

Podle reportu IUPAC má PANI prášek měrnou elektrickou vodivost $4,4 \pm 1,7$ S/cm (Stejskal, 2002). Přečištění PANI prášku pomocí HCl nebo metanolu vodivost mírně zvyšuje, zatímco přečištění oběma látkami najednou vodivost PANI prášku snižuje oproti standardnímu nemodifikovanému PANI prášku.

6.2 Cytotoxicita pomocí MTT

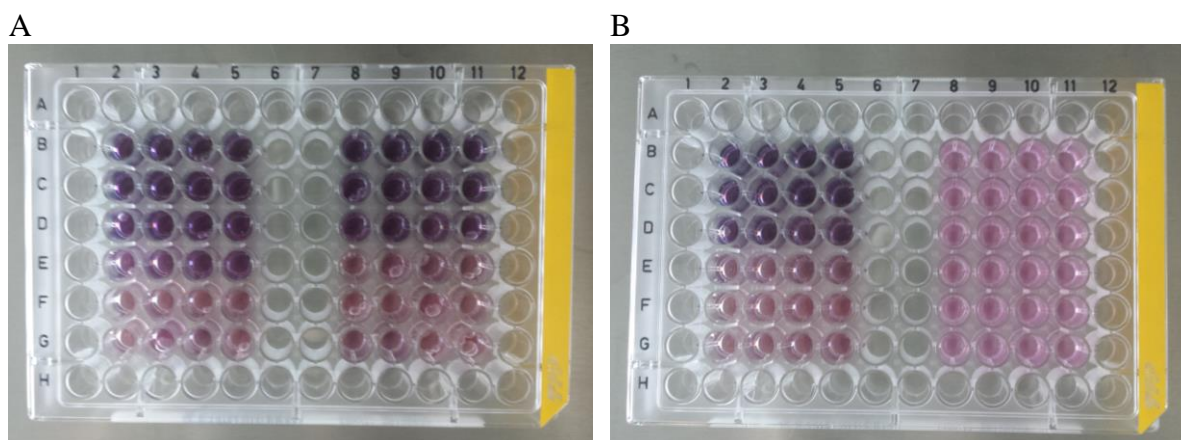
S ohledem na princip metody MTT byl proveden nejprve slepý pokus, ve kterém bylo ověřeno, zda extrakty testovaných vzorků interagují s MTT. Slepý pokus byl proveden tak, že byly do jamek napipetovány pouze extrakty připravené z modifikovaných PANI prášků, bez přítomnosti buněk. Následně byla provedena MTT analýza za stejných podmínek jako v případě testu za přítomnosti buněk. Výsledky slepého pokusu jsou zobrazeny v tabulce č. 2 a ukazují, že se snižující se koncentrací extraktů se zvyšuje absorbance, tedy dochází k interakci MTT s extrakty. Jak v tabulce můžeme pozorovat 50% extrakt až 100% extrakt vykazují hodnoty blízké 0, což znamená, že se oproti referenci (prázdňé jamce) vůbec nelišily. V těchto koncentracích žádný formazan nevznikl. Na druhou stranu koncentrace extraktů nižší než 50% vykazují hodnoty vyšší než 0, což odpovídá vzniku formazanu.

Tabulka 2 – Výsledky slepého pokusu MTT

Koncentrace	PANI-HCl	PANI-MeOH	PANI-HCl+MeOH
100%	0,00	-0,03	0,00
75%	-0,07	0,00	0,01
50%	-0,03	0,01	0,03
25%	0,68	0,02	0,46
10%	0,46	0,52	0,31
5%	0,23	0,31	0,24

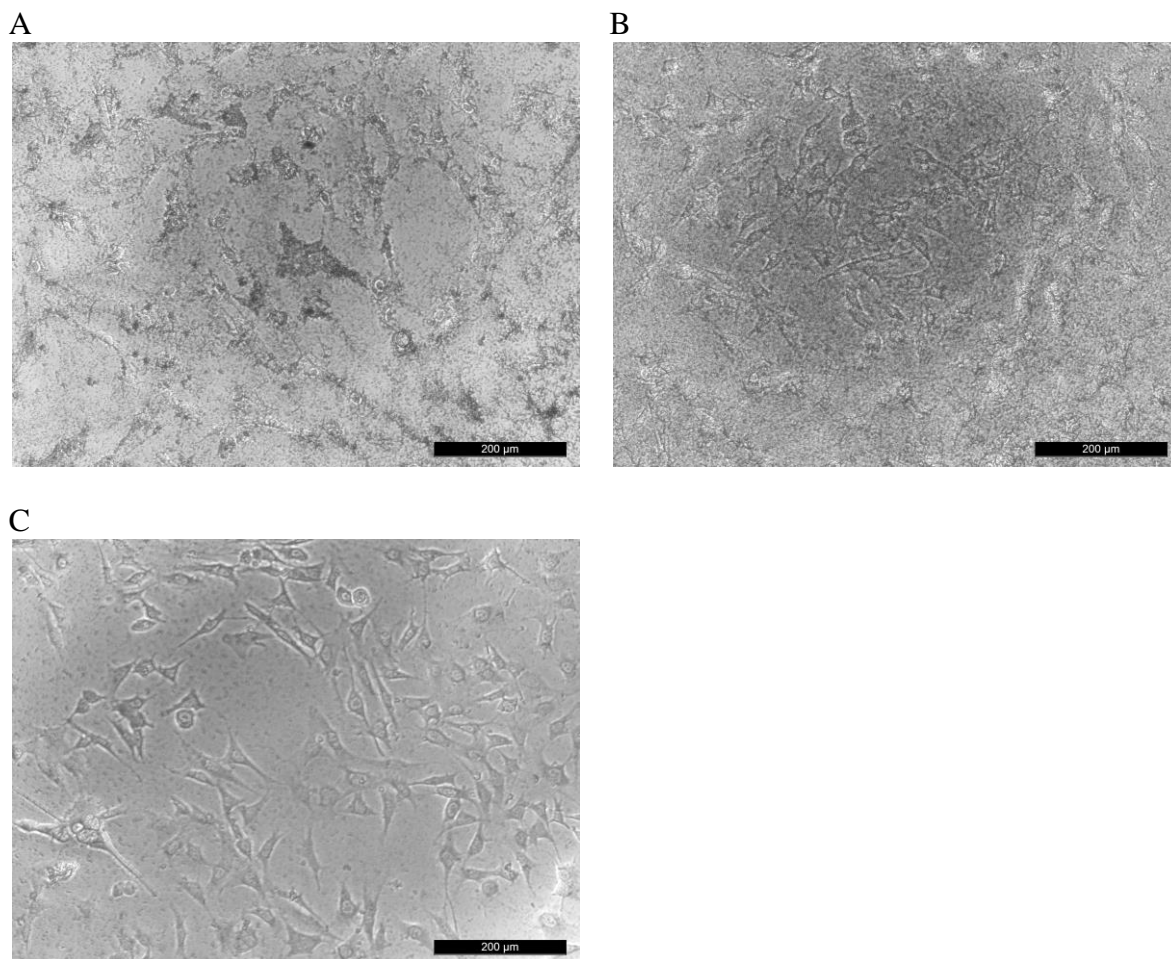
Výsledky stanovení buněčné viability pomocí metody MTT tedy mohou být zatíženy chybou. Samotné testy jsou totiž prováděny tak, že extrakt je nejprve odstraněn a teprve následně se přidává MTT. Teoreticky by tedy nemělo dojít k interakci mezi extrakty a MTT. Odsátí extraktů však nemusí být naprosto dokonalé a buňky není s ohledem na výsledek vhodné oplachovat, aby nedošlo k jejich uvolnění. Vzhledem k tomuto faktu jsou tu výsledky prezentovány jen jako ilustrační fotografie, které doplňují hlavní výsledky získané pomocí metody průtokové cytometrie .

Po přidavku MTT k buňkám bylo pozorováno, že zbylý extrakt interaguje s barvivem, a proto nakonec test MTT vyhodnocen nebyl. Na následujícím obrázku č. 18 lze pozorovat, jak je supernatant nad buňkami obarven.



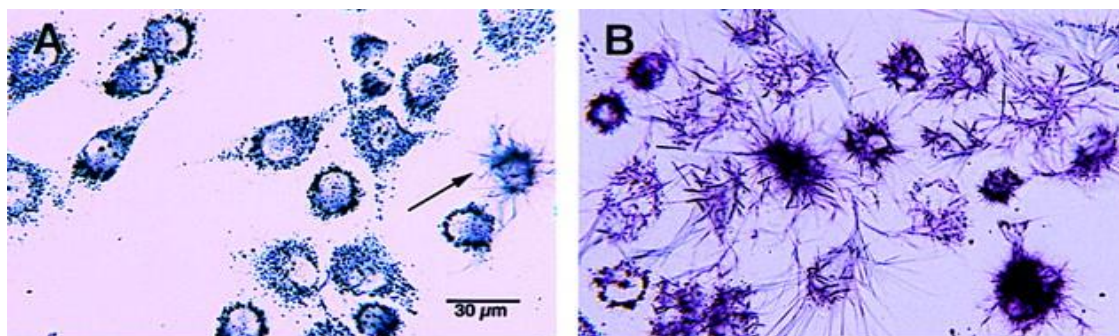
Obrázek 18 – fotografie 96-jamkových destiček A) levá část extrakty PANI-MeOH, pravá část extrakty PANI-HCl; B) levá část extrakty PANI-HCl+MeOH

Na obrázku č. 19 můžeme pozorovat snímky z mikroskopu, které nám lépe potvrzují přítomnost barevného supernatantu, aniž by byly obarveny buňky. To všechno znamená, že metoda MTT není vhodná pro stanovení cytotoxicity modifikovaných PANI extraktů.



Obrázek 19 – Fotografie buněk kultivovaných A) 100% koncentraci PANI-HCl;
B) 100% kultivaci PANI-HCl+MeOH; C) 75% koncentraci PANI-MeOH

Na následujícím obrázku č. 20 je ilustrační foto buněk obarvených barvivem MTT. Lze pozorovat, jak je barvivo navázáno na jednotlivé buňky, a nejsou vytvořeny krystaly v okolním médiu. Obrázek č. 20 je převzat ze studie Liu et al., (1998) zabývající se změnami vnitřního uspořádání Amyloidu β . Na obrázku č. 20 je v části A zobrazen účinek MTT po 30 minutách, šipka směřuje k buňce s jehlicovitými formazanovými krystaly. V části B je zobrazen účinek MTT po 3 hodinách.



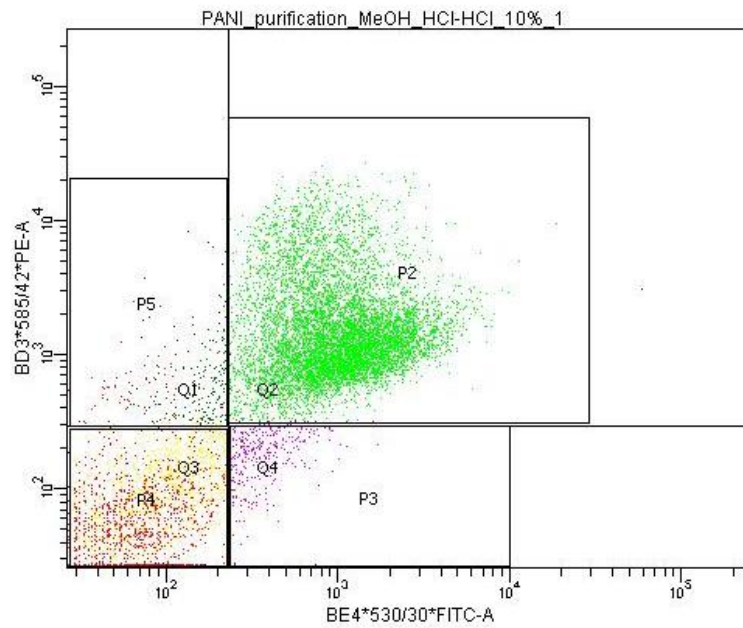
Obrázek 20 – ilustrační foto reference s MTT (upraveno dle Liu et al., 1998)

6.3 Stanovení poměru živých, nekrotických a apoptických buněk pomocí průtokové cytometrie

Průtoková cytometrie je progresivní metoda, která nám umožňuje rozlišení mnoha buněčných parametrů. V této práci je metoda použita pro stanovení buněčné smrti, kde se rozlišuje apoptóza a nekróza pomocí dvojího barvení. Zde bylo zvoleno barvení fluorescenčním Annexinem V a PI. Populace buněk, která je na Annexin V pozitivní, ale na PI negativní je považována za apoptickou populaci buněk. Naopak populace buněk, které jsou pozitivní na obě barviva, jsou považovány za nekrotickou buněčnou populaci (Sawai et al., 2011).

Vzhledem k interakci metody MTT s testovanými extrakty byl dále stanoven typ buněčné smrti pomocí průtokové cytometrie. Při provedení testu se objevil problém, kdy buňky dle všeho nemetabolizují ani je nelze pomocí Trypsinu uvolnit z tkáňového plastiku. Uvolnění buněk do suspence bylo proto provedeno pomocí „škrabky na buňky“ Cell Scrapper“ (TPP, Švýcarsko)

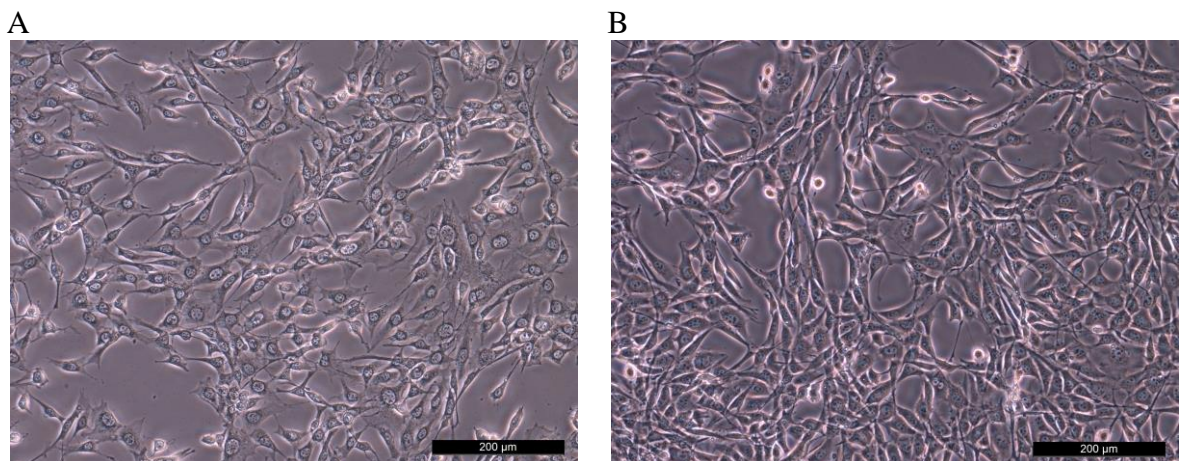
Na obrázku č. 21 je zobrazen graf, který byl vytvořen softwarem BD FACSDiva, na základě měření. Na ose y je vyneseno fluorochrom, který snímá buňky reagující s PI. Na ose x je vyneseno fluorochrom, jež snímá buňky interagující s Annexinem V. Graf je rozdělen do čtyř hlavních částí a to z důvodu interakce buněk s danými barvivy. Oblast P2 označuje buňky nekrotické, protože jak již bylo objasněno výše, jsou to buňky interagující jak s PI tak i s Annexinem V. Oblast P3 obsahuje buňky apoptické, jak již bylo uvedeno výše, jsou to buňky interagující pouze s Annexinem V. V oblasti P4 se koncentrují buňky živé a to protože neinteragují ani s jedním barvivem. Oblast P5 nevyjadřuje žádný typ buněčné smrti, ani buňky přeživší.



Obrázek 21 – ukázkový graf z průtokové cytometrie

6.3.1 Cytotoxicita extraktu PANI-HCl

Na obrázku č. 22 jsou zobrazeny snímky z mikroskopu, na kterých jsou v části A buňky kultivovaných v extraktu PANI-HCl a v části B buňky reference. Jak lze pozorovat buňky nejsou zcela zničeny působícím extraktem, ale jejich morfologie vykazuje výrazné změny ve srovnání s referenčními buňkami kultivovanými klasickým způsobem.



Obrázek 22 – Snímky buněk kultivovaných v A) 5% extraktu PANI-HCl; B) reference (zvětšení 100x)

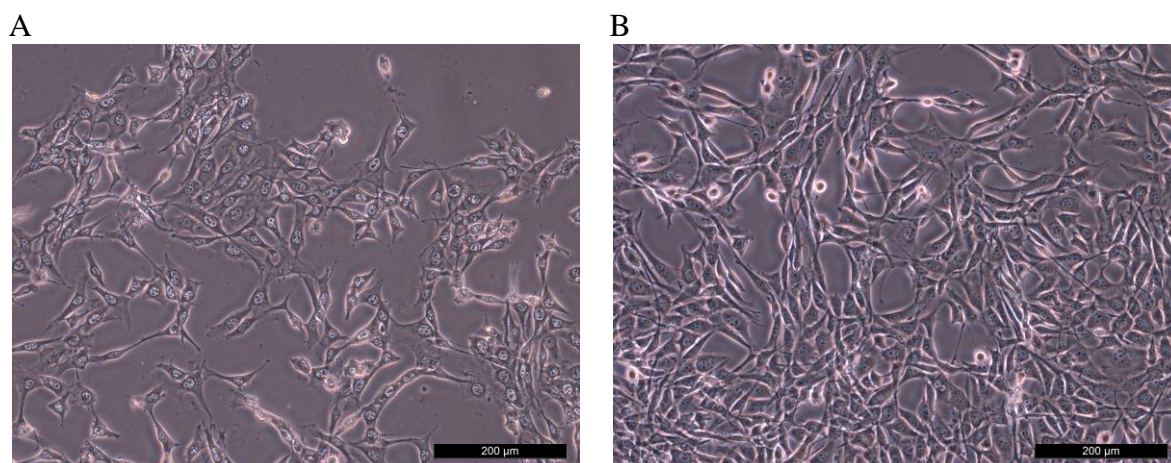
V tabulce č. 3 jsou uvedeny výsledky cytokompatibility extraktů PANI-HCl z průtokové cytometrie pro předem zvolené koncentrace. V tabulce je uvedena průměrná hodnota z obou stanovení. Dále jsou v tabulce zobrazeny počty buněk a procentuální vyjádření z celkového počtu zachycených buněk pro každou skupinu – živé, nekrotické a apoptické. Z tabulky je patrné, že nejvíce buněk bylo ve zkumavce s referencí, u níž nebyl problém s převedením buněk do suspenze pomocí Trypsinu. I když ostatní jamky byly pro převedení do suspenze seškrabány, obsahovala výsledná suspenze dostatečné množství buněk pro vyhodnocení. Dále lze pozorovat, že trend klesajícího počtu mrtvých buněk se zde neprojevil. Tento snižující se trend by mohl představovat snižující se cytotoxicitu zkoumaného extraktu. Což prokazují jak hodnoty živých buněk, tak i hodnoty buněk nekrotických. Většina buněk se jeví nekroticky jak v tabulce, tak i v ilustračním grafu. Počet nekrotických buněk je více než 80% ve všech případech, jen 50% extrakt PANI-HCl vykazuje 78 % nekrotických buněk. Tento rozdíl není statisticky možno prokázat jako nižší a proto všechny koncentrace extraktů jsou považovány za cytotoxické. Počet buněk, u kterých se projevila apoptóza lze pozorovat i v referenci. Apoptické buňky jsou nejvíce přítomné v 50% extraktu a dále se jejich koncentrace snižuje.

Tabulka 3 – Výsledky stanovení cytotoxicity pomocí metody průtokové cytometrie pro extrakt PANI-HCl

Koncentrace	Všechny buňky	živé buňky		nekrotické buňky		apoptické buňky	
		počet buněk	% buněk	počet buněk	% buněk	počet buněk	% buněk
50%	9889,00	469,50	4,87	7733,00	78,56	1264,00	12,32
25%	7009,50	210,50	2,98	6123,50	87,54	458,00	6,39
10%	8008,50	424,00	5,01	7054,00	88,44	322,50	4,09
5%	9965,67	696,33	6,68	8615,33	86,76	450,33	4,45
Reference	43277,50	31451,00	72,91	1155,00	2,72	5274,50	11,96

6.3.2 Cytotoxicita extraktu PANI-MeOH

Na obrázku č. 23 jsou zobrazeny snímky z mikroskopu, na kterých jsou v části A buňky kultivované ve 25% extraktu PANI-MeOH oproti referenci v části B. Opět lze pozorovat, že buňky nejsou zcela zničeny působícím extraktem. Nejsou ovšem ani obdobné jako referenční buňky kultivované klasickým způsobem, morfologie buněk kultivovaných s extraktem PANI-MeOH je výrazně pozměněna.



Obrázek 23 – Snímky buněk kultivovaných v A) 25% extraktu PANI-MeOH; B) reference (zvětšení 100x)

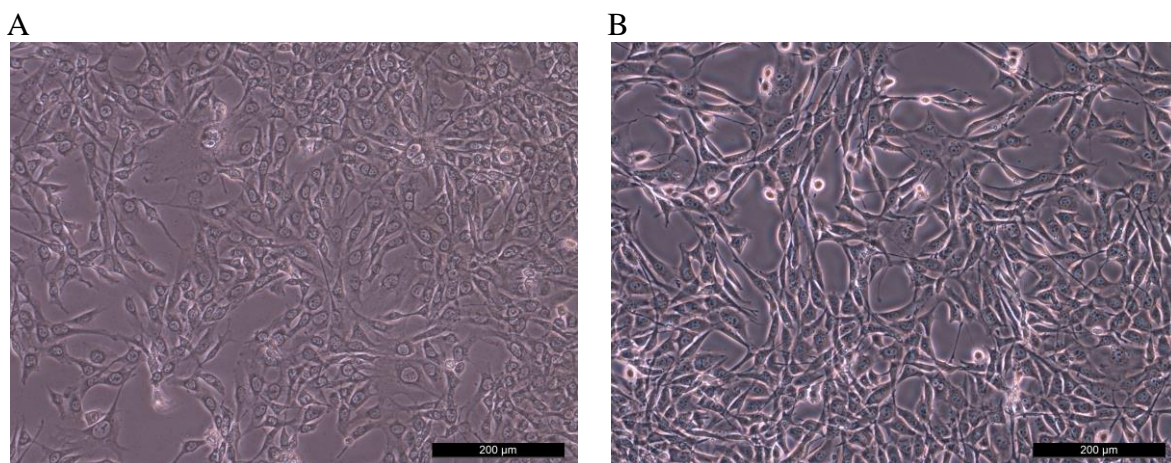
V tabulce č. 4 jsou uvedeny výsledky cytotoxicity extraktů PANI-MeOH z průtokové cytometrie pro předem zvolené koncentrace. V tabulce jsou pro přehlednost uvedeny průměrné hodnoty. Dále tabulka obsahuje počty všech buněk zachycených měřením. Pro každou skupinu - živé, nekrotické i apoptické buňky obsahuje počet všech buněk a procentuální zastoupení dané populace. Z tabulky lze pozorovat rozdíl v počtu celkově zachycených buněk měřením obdobně jako u extraktu PANI-HCl, ale v tomto případě je zachycených buněk více. Obdobně jako u PANI-HCl je většina buněk usmrcena nekroticky, jen u 50% extraktu je tímto typem vyhodnoceno pouze 50 % zachycených buněk. Tento jev může být způsoben širokou distribucí nekrotických buněk a tím pádem populace zasahuje i do jiných oblastí. Tento jev může být způsoben vyhodnocením, které probíhalo pro všechny vzorky stejně z důvodu možnosti porovnání. Dále lze pozorovat obdobný trend jako u PANI-HCl a to ten, že populace apoptických buněk se s nižší koncentrací extraktu také snižuje. Populace živých buněk ve všech koncentracích je velmi malá a proto se extrakt PANI-MeOH jeví jako cytotoxický.

Tabulka 4 – Výsledky stanovení cytotoxicity pomocí metody průtokové cytometrie pro extrakt PANI-MeOH

Koncentrace	Všechny buňky	živé buňky		nekrotické buňky		apoptické buňky	
		počet buněk	% buněk	počet buněk	% buněk	počet buněk	% buněk
50%	13905,00	1328,50	9,53	6700,50	48,18	4904,00	35,30
25%	12308,50	812,00	6,70	10132,00	82,32	1115,50	8,96
10%	13032,00	469,50	3,57	12356,50	94,81	187,00	1,45
5%	11748,50	261,50	2,32	11077,00	94,20	339,00	2,90
Reference	43277,50	31451,00	72,91	1155,00	2,72	5274,50	11,96

6.3.3 Cytotoxicita extraktu PANI-HCl+MeOH

Na Obrázku č. 24 jsou zobrazeny snímky z mikroskopu, na kterých jsou v části A buňky kultivované v 10% extraktu PANI-HCl+MeOH oproti referenci v části B. Na snímku nelze pozorovat totální zničení buněk působícím extraktem, ale oproti referenčním buňkám kultivovaných klasickým způsobem mají značně pozměněnou morfologii.



Obrázek 24 – Snímky buněk kultivovaných v A) 10% extraktu PANI-HCl+MeOH; B) reference (zvětšení 100x)

V tabulce č. 5 jsou uvedeny výsledky cytotoxicity extraktů PANI-HCl+MeOH z průtokové cytometrie pro předem zvolené koncentrace. V tabulce jsou pro přehlednost uvedeny průměrné hodnoty. Dále jsou v tabulce zobrazeny počty všech buněk zachycených měřeními. Dále obsahuje tabulka počty buněk v dané populaci a jejich procentuální vyjádření pro každou skupinu buněk, pro živé, nekrotické a apoptické. Z tabulky vyplývá, že nejvíce buněk zachycených měřeními bylo opět v referenci, měření buněk přítomných v extraktech je zde nejvíce různorodé ze všech stanovovaných extraktů. Ovšem co se týče výsledku cytotoxicity extraktu je toto stanovení nejvíce podobné. Opět zde není možné pozorovat trend snižující se úmrtnosti buněk se snižující se koncentrací extraktu. Všechny koncentrace extraktu vykazují přes 80 % nekrotických buněk. Co se týče buněk živých, v 5% koncentraci extraktu množství přežitých buněk vzrostlo na 13,21 %. Číslo se sice zvýšilo, ale i tak nelze potvrdit nižší cytotoxicitu extraktu. Opět obdobně jako u předchozích výsledků se koncentrace apoptických buněk snižuje s koncentrací extraktu.

Tabulka 5 – Výsledky stanovení cytotoxicity pomocí metody průtokové cytometrie pro extrakt PANI-HCl+MeOH

Koncentrace	Všechny buňky	živé buňky		nekrotické buňky		apoptické buňky	
		počet buněk	% buněk	počet buněk	% buněk	počet buněk	% buněk
50%	7647,00	477,00	6,22	6289,50	82,19	751,00	9,90
25%	10951,50	452,00	4,06	9745,00	89,15	577,00	5,19
10%	12871,00	283,50	2,19	11516,00	89,48	875,50	6,81
5%	8264,67	1055,67	13,21	6778,33	82,18	371,67	4,03
Reference	43277,50	31451,00	72,91	1155,00	2,72	5274,50	11,96

7 DISKUZE VÝSLEDKŮ

Polyanilin neboli zkráceně PANI ve formě prášku se stal hlavním předmětem této práce. PANI je vodivý polymer, který je intenzivně zkoumán v oblasti biomateriálů, kde by mohl nalézt uplatnění např. ve formě nanovláken například pro tkáňové inženýrství (Jeong, et al. 2008). Dále by mohl nalézt uplatnění v oblasti regenerace srdeční či nervové tkáně (McKeon, et al., 2010).

V předcházejících studiích, které byly provedeny na UTB bylo zjištěno, že vyšší koncentrace PANI jsou cytotoxické. Následně bylo dalším zkoumáním zjištěno, že PANI obsahuje nízkomolekulární nečistoty, které se na jeho cytotoxicitě mohou podílet. Tento fakt byl ověřen ve studii Humpolíček et al. (2012), kde bylo vyzkoušeno opětovně PANI protonovat a deprotonovat, tzn. převést PANI-S opět na PANI-H. Tento výsledek měl pozitivní vliv na cytotoxicitu a tím byla podpořena teorie, že hlavním důvodem jeho cytotoxicity jsou nízkomolekulární vedlejší produkty, které vznikají během syntézy PANI prášku. Další studie zajímaví se o snížení cytotoxicity využívá metody přesrážení vniklého polymeru ve vhodných rozpouštědlech. Výsledky této studie Stejskal et al. (2014) potvrzují snížení cytotoxicity PANI prášku, ale výsledek není uspokojivý. Jako další možnost přečištění PANI prášku byla zvolena Soxletova extrakce, zde byly zkoumány různé rozpouštědla a jako vhodné rozpouštědla se jeví MeOH a 0,2M HCl. Studie, kterou byly tyto vhodné rozpouštědla prokázány, byla provedena na UTB a dosud nebyla publikována.

Diplomová práce se zabývá přečištěním PANI prášku pomocí MeOH a 0,2M HCl a to pouze jako médium, ve kterém je PANI prášek ponechán po definovanou dobu. Byly připraveny tři modifikované PANI prášky, 1) PANI-HCl po době působení 24h, 2) PANI-MeOH po době působení 24h a 3) PANI-HCl+MeOH zde každé médium mělo dobu působení 12h. Dále jsou prezentovány výsledky změny PANI vodivosti i testů cytotoxicity PANI extraktů připravených z modifikovaných PANI prášků.

Měření vodivosti prokazuje změny oproti standardnímu, nemodifikovanému PANI prášku. Modifikování pomocí MeOH nebo HCl vodivost zvyšuje oproti standardně připravenému PANI prášku dle metodiky IUPAC (Stejskal, 2002). Nejvyšší vodivosti dosahuje modifikovaný PANI prášek pomocí 0,2M HCl a to hodnoty $5,223 \pm 0,011$ S/cm. Naproti tomu vodivost modifikovaného PANI prášku pomocí HCl i MeOH klesá oproti standardnímu PANI prášku na hodnotu $3,53391 \pm 0,00005$ S/cm.

Testy cytotoxicity byly provedeny nejprve pomocí metody MTT a následně pomocí průtokové cytometrie. Cytotoxicita byla zkoumána pomocí metod definovaných v ČSN EN ISO 10 993-5 „Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro*“. V této části normy jsou popsány tři metody stanovení cytotoxicity, které se odlišují podle typu vzorku. Jsou to 1) zkouška extraktu připraveného z testovaného vzorku, 2) zkouška přímým kontaktem se vzorkem a 3) zkouška nepřímým kontaktem. V této práci byla zvolena metoda zkoušky extraktu připraveného z PANI prášku. Vzorky z PANI prášku byly připravovány pomocí oddílu 12 normy ČSN EN ISO 10 993, která se jmenuje „Příprava vzorků a referenčních materiálů“. Metoda MTT je kolorimetrická metoda založená na absorpci formazanu při vlnové délce 570 nm (protokol MTT, Vybrant 2002). Průtoková cytometrie využívá přístroje, který ozařuje buňky v kapalném prostředí sadou laserů. Analýza probíhá pomocí detektoru, který snímá prošlé záření. Průtoková cytometrie je multiparalelní metoda, která lze využít například na rozeznání typu buněčné smrti (Wang, et al., 2010). V této studii byly použity fluorochromy – PI a Annexin V-FITC.

Bylo zjištěno, že metodu MTT nelze použít pro měření PANI extraktů připravených z modifikovaných PANI prášků a to z důvodu interakce barviva MTT s extraktem. Byl změřen blank (tzn. pouze extrakt bez buněčného osídlení s barvivem MTT), ze kterého vyplývá, že se snižující se koncentrací extraktu se zvyšuje intenzita interakce extraktu s MTT. Při měření s buněčnou populací by to neměl být problém, protože před přidáním barviva MTT je přítomný extrakt odstraněn. Protože nelze zcela odsát veškerý extrakt, nebyla metoda MTT vůbec využita. V práci jsou zobrazeny pouze snímky z mikroskopu, na kterých lze vidět vzniklý formazan v médiu a nikoli v samotných buňkách. MTT jako vyhodnocovací metoda pro modifikované PANI prášky byla zamítnuta. Následně byla cytotoxicita modifikovaných PANI prášků stanovována pomocí průtokové cytometrie. Zde je nutné buňky převést do suspenze, aby je přístroj dokázal analyzovat. Z neznámého důvodu se buňky nedařilo pomocí Trypsinu oddělit. Důvodem může být blokáda účinku Trypsinu zbytky extraktů či poškození buněčné vazby, tak že Trypsin není schopen narušit vazbu cadherinů k povrchu tkáňového polystyrenu. Proto bylo nutno buňky z povrchu uvolnit pomocí „buněčné škrabky“. Výsledky, které byly pomocí průtokové cytometrie obdrženy ukazují, že všechny koncentrace modifikovaných PANI extraktů způsobují více než 70% úmrtnost buněk nekrotickou buněčnou smrtí. Nelze tedy predikovat trend snižující se úmrtnosti buněk se snižující se koncentrací extraktů. Koncentrace živých buněk přítomných ve všech modifikovaných extraktech PANI prášku je velmi malá. Dále se nevysky-

tuje ani staticky významný rozdíl v míře cytotoxicity mezi jednotlivými modifikacemi PANI prášku.

Získané výsledky prokazují, že všechny modifikace PANI prášku pomocí MeOH, 0,2M HCl i oběmi rozpouštědly zároveň nesnižuje cytotoxicitu PANI prášku, ale právě naopak.

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo stanovit míru cytotoxicity modifikovaných PANI prášků. Modifikace byla provedena pomocí MeOH a 0,2M HCl. Cytotoxicita byla stanovena pomocí metod ustanovených v ČSN EN ISO 10 993-5. Jak již bylo stanoveno v bakalářské práci, samotný PANI vykazuje vysokou míru cytotoxicity, a proto se další zkoumání zaobírá snahou o snížení cytotoxicity. Byly provedeny dvě stěžejní výzkumné práce (Humpolíček, et al., 2012 a Stejkal et al., 2014), které prokazují, že míra cytotoxicity PANI je způsobena hlavně nízkomolekulárními nečistotami, které vznikají při jeho syntéze. Vhodná metoda přečištění byla stanovena pomocí Soxletovy extrakce. Byly voleny různé rozpouštědla a jako nejvýhodnější se jevílo použití MeOH a 0,2M HCl. Vědecká publikace, které toto přečištění provedla, zatím nebyla publikována.

Byly připraveny tři modifikované PANI prášky 1) PANI-HCl, 2) PANI-MeOH a 3) PANI-HCl+MeOH. Modifikované PANI prášky se lišily v použití přečišťovacího média a doby působení média. První dva prášky byly přečišťovány po dobu 24 hodin, zatímco třetí prášek byl přečištěn po dobu 12 hodin 0,2M HCl a následně po dobu 12 hodin MeOH. Vyhodnocení cytotoxicity bylo provedeno pomocí metody MTT a průtokové cytometrie. Výsledky obdržené metodou MTT nejsou relevantní, protože přítomný extrakt reaguje s barvivem MTT. Vzhledem k tomuto faktu nelze metodu MTT pro stanovení cytotoxicity modifikovaných PANI prášků použít. Relevantní výsledky byly obdrženy díky využití metody průtokové cytometrie, kde ovšem vznikl problém při převedení buněk do suspenze. Na buňky z neznámého důvodu neúčinkuje enzym Trypsin, který by měl zaručit jejich od-poutání od povrchu, na němž byly kultivovány (v laboratoři nebyly k dispozici další látky pro uvolnění buněk jako např. collagenáza a nebylo tedy možné provést pokus uvolnění jinými postupy). Problém byl vyřešen použitím speciální škrabky na buňky. Obdržené výsledky ukazují, že většina buněk přítomných ve zkumavce byla nekrotická. Mezi jednotlivými přečišťujícími médii není v míře cytotoxicity pozorovatelný rozdíl. Všechny tři typy vzorků vypadají obdobně. Dále nelze pozorovat ani snižující se míra cytotoxicity se snižující se koncentrací extraktu. Diplomová práce tedy potvrzuje nevhodnost použití přečištění pomocí HCl a MeOH z důvodu imortalizace buněčné populace. Příčina proč přečištěný PANI prášek způsobuje popsané změny, které u standardního PANI prášku nebyly pozorovány, zatím objasněna nebyla.

Dále byla na modifikovaných vzorcích PANI prášku měřena vodivost. Oproti standardnímu PANI prášku se vodivost modifikovaných PANI prášků lišila. Použití jednotlivých médií na přečištění PANI prášku samostatně zvyšuje vodivost PANI prášku. Nejvíce ji zvyšuje použití 0,2M HCl jako přečišťovacího média. Naproti tomu použití obou přečišťovacích médií vodivost PANI prášku snižuje oproti standardnímu PANI prášku.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- "The Nobel Prize in Chemistry 2000 - Advanced Information". *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2014. Web. 7 May 2015. <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2000/advanced.html>
- AHAD, Inam Ul, Andrzej BARTNIK, Henryk FIEDOROWICZ, Jerzy KOSTECKI, Barbara KORCZYC, Tomasz CIACH a Dermot BRABAZON. Surface modification of polymers for biocompatibility via exposure to extreme ultraviolet radiation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2013, vol. 102, issue 9, s. 3298-3310 [cit. 2015-03-26]. DOI: 10.1002/jbm.a.34958.
- ATTERWILL, Edited by Sheila O'Hare and Chris K. *In vitro toxicity testing protocols*. Totowa, N.J: Humana Press, 1995. ISBN 9781592595303.
- BAGHERI, Habib, Zahra AYAZI a Mehrnoush NADERI. Conductive polymer-based microextraction methods: A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2013, vol. 767, s. 1-13 [cit. 2015-05-07]. DOI: 10.1016/j.aca.2012.12.013.
- BARTOVSKÁ L., ŠIŠKOVÁ M.: *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vydavatelství VŠCHT 2005, Praha. ISBN 80-7080-579-X.
- BAYER, Carolyn L., Isis J. TRENCHARD a Nicholas A. PEPPAS. Analyzing Poly-aniline-poly(2-acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid) Biocompatibility with 3T3 Fibroblasts. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. 2010, vol. 21, issue 5, s. 623-634 [cit. 2015-02-25]. DOI: 10.1163/156856209x434647.
- BERRIER, Allison L. a Kenneth M. YAMADA. Cell–matrix adhesion. *Journal of Cellular Physiology* [online]. 2007, vol. 213, issue 3, s. 565-573 [cit. 2015-04-02]. DOI: 10.1002/jcp.21237.
- BIDEZ, Paul R., Shuxi LI, Alan G. MACDIARMID, Everaldo C. VENANCIO, Yen WEI a Peter I. LELKES. Polyaniline, an electroactive polymer, supports adhesion and proliferation of cardiac myoblasts. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. 2006, vol. 17, 1-2, s. 199-212 [cit. 2015-02-25]. DOI: 10.1163/156856206774879180.
- BLACK, Jonathan. *Biological performance of materials: fundamentals of biocompatibility*. 4th ed. Boca Raton: CRC Taylor & Francis, 2006, 497 p. ISBN 9780849339592.

- BLINOVA, Natalia V., Irina SAPURINA, Josef KLIMOVÍČ a Jaroslav STEJSKAL. The chemical and colloidal stability of polyaniline dispersions. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2005, vol. 88, issue 3, s. 428-434 [cit. 2015-0-25]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2004.11.014.
- BOOMI, Pandi a Halliah Gurumallesh PRABU. Synthesis, characterization and anti-bacterial analysis of polyaniline/Au–Pd nanocomposite. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2013, vol. 429, s. 51-59 [cit. 2015-02-20]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2013.03.053.
- BOYER, M.-I., S. QUILLARD, E. REBOURT, G. LOUARN, J. P. BUISSON, A. MONKMAN a S. LEFRANT. Vibrational Analysis of Polyaniline: A Model Compound Approach. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 1998, vol. 102, issue 38, s. 7382-7392 [cit. 2015-03-07]. DOI: 10.1021/jp972652o.
- CASTNER, David G. a Buddy D. RATNER. Biomedical surface science: Foundations to frontiers. *Surface Science* [online]. 2002, vol. 500, 1-3, s. 28-60 [cit. 2015-03-26]. DOI: 10.1016/s0039-6028(01)01587-4.
- ČIRIĆ-MARJANOVIĆ, Gordana. Recent advances in polyaniline research: Polymerization mechanisms, structural aspects, properties and applications. *Synthetic Metals* [online]. 2013, vol. 177, s. 1-47 [cit. 2014-11-05]. DOI: 10.1016/j.synthmet.2013.06.004.
- Clinical Applications of Biomaterials. NIH Consensus Statement Online 1982 Nov 1-3 [cit. 2014-09-07]; 4(5):1-19.
- ČSN EN ISO 10 993. *Biologické hodnocení zdravotnických prostředků*. 2009. Praha.
- ČSN EN ISO 10 993. *Biologické hodnocení zdravotnických prostředků: 5 - zkoušky na cytotoxicitu in vitro*. Praha, 2010.
- ČSN EN ISO 10 993. *Biologické hodnocení zdravotnických prostředků: 12 - Příprava vzorků a referenční materiály*. Praha, 2009.
- DAW, Rosamund a Stefano TONZANI. Biomaterials. *Nature* [online]. 2009, vol. 462, issue 7272, s. 425-425 [cit. 2014-11-24]. DOI: 10.1038/462425a.
- DENTON, D, S NICOLSON a S KUMAR. 2011. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell Death and Differentiation* [online]. vol. 19, issue 1, s. 87-95 [cit. 2015-05-07]. DOI: 10.1038/cdd.2011.146. ISSN 1350-9047.

- DENTON, Donna, Tianqi XU a Sharad KUMAR. Autophagy as a pro-death pathway. *Immunology and Cell Biology* [online]. 2014, vol. 93, issue 1, s. 35-42 [cit. 2015-03-31]. DOI: 10.1038/icb.2014.85.
- ERBIL, H. Yildirim. The debate on the dependence of apparent contact angles on drop contact area or three-phase contact line: A review. *Surface Science Reports*[online]. 2014, vol. 69, issue 4, s. 325-365 [cit. 2015-05-02]. DOI: 10.1016/j.surfrep.2014.09.001.
- FELISBINO, Marina Barreto, Maria Silvia Viccari GATTI a Maria Luiza S. MELLO. Changes in Chromatin Structure in NIH 3T3 Cells Induced by Valproic Acid and Trichostatin A. *Journal of Cellular Biochemistry* [online]. 2014, n/a-n/a [cit. 2015-04-28]. DOI: 10.1002/jcb.24865.
- FERNANDES, Edson G.R., Valtencir ZUCOLOTTO a Alvaro A.A. De QUEIROZ. Electrospinning of Hyperbranched Poly-L-Lysine/Polyaniline Nanofibers for Application in Cardiac Tissue Engineering. *Journal of Macromolecular Science, Part A* [online]. 2010, vol. 47, issue 12, s. 1203-1207 [cit. 2015-02-25]. DOI: 10.1080/10601325.2010.518847.
- FRANKEN, Nicolaas A P, Hans M RODERMOND, Jan STAP, Jaap HAVEMAN a Chris VAN BREE. 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols* [online]. vol. 1, issue 5, s. 2315-2319 [cit. 2015-04-14]. DOI: 10.1038/nprot.2006.339. ISSN 1754-2189.
- FRESHNEY, R. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 5th ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Liss, c2005, 642 p. ISBN 0471453293.
- FREUND, M. S. a B. DEORE. Self-doped conducting polymers. *West Sussex: Wiley*, c2007, xii, 326 s. ISBN 978-0-470-02969-5.
- FU, Yueping a Ronald L. ELSENBAUMER. Thermochemistry and Kinetics of Chemical Polymerization of Aniline Determined by Solution Calorimetry. *Chemistry of Materials* [online]. 1994, vol. 6, issue 5, s. 671-677 [cit. 2015-02-25]. DOI: 10.1021/cm00041a018.
- GALLUZZI, Lorenzo, Oliver KEPP, Stefan KRAUTWALD, Guido KROEMER a Andreas LINKERMANN. Molecular mechanisms of regulated necrosis. *Seminars in Cell & Developmental Biology* [online]. 2014, vol. 35, s. 24-32 [cit. 2015-03-10]. DOI: 10.1016/j.semcdb.2014.02.006.

- GLICK, Danielle, Sandra BARTH a Kay F. MACLEOD. 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of Pathology* [online]. vol. 221, isme 1, s. 3-12 [cit. 2015-03-31]. DOI: 10.1002/path.2697. ISSN 00223417.
- GUIMARD, Nathalie K., Natalia GOMEZ a Christine E. SCHMIDT. Conducting polymers in biomedical engineering. *Progress in Polymer Science* [online]. 2007, vol. 32, 8-9, s. 876-921 [cit. 2014-11-24]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.012.
- HUMPOLICEK, Petr, Vera KASPARKOVA, Petr SAHA a Jaroslav STEJSKAL. Biocompatibility of polyaniline. *Synthetic Metals* [online]. 2012, vol. 162, 7-8, s. 722-727 [cit. 2015-01-20]. DOI: 10.1016/j.synthmet.2012.02.024.
- CHAABANE, Wiem, Sirma D. USER, Mohamed EL-GAZZAH, Roman JAKSIK, Elaheh SAJJADI, Joanna RZESZOWSKA-WOLNY a Marek J. ŁOS. Autophagy, Apoptosis, Mitoptosis and Necrosis: Interdependence Between Those Pathways and Effects on Cancer. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* [online]. 2012, vol. 61, issue 1, s. 43-58 [cit. 2015-04-01]. DOI: 10.1007/s00005-012-0205-y.
- IBARRA, L E, E I YSLAS, M A MOLINA, C R RIVAROLA, S ROMANINI, C A BARBERO, V A RIVAROLA a M L BERTUZZI. Near-infrared mediated tumor destruction by photothermal effect of PANI-Np in vivo. *Laser Physics* [online]. 2013, vol. 23, issue 6 [cit. 2015-02-20]. DOI: 10.1088/1054-660x/23/6/066004.
- ISHIKAWA-ANKERHOLD, Hellen C., Richard ANKERHOLD a Gregor P. C. DRUMMEN. Advanced Fluorescence Microscopy Techniques—FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules* [online]. 2012, vol. 17, issue 12, s. 4047-4132 [cit. 2015-04-02]. DOI: 10.3390/molecules17044047.
- J. M Edwardson, R. M. Henderson, *Atomic forcemicroscopy and drugdiscovery*, DDT Vol. 9, No. 2 January (2004).
- JOHN J. QUINN, John J. Kyung-Soo Yi. *Solid state physics principles and modern applications*. Online-Ausg. Dordrecht [The Netherlands]: Springer, 2009. ISBN 9783540922315.
- K. Tománková, H. Kolářová, R. Kubínek, M. Vůjtek a H. Dušková, *Mikroskopie atomárních sil v biologických aplikacích*, Čs. čas. fyz. 56 (2006).
- KAI, Dan, Molamma P. PRABHAKARAN, Guorui JIN a Seeram RAMAKRISHNA. Polypyrrole-contained electrospun conductive nanofibrous membranes for cardiac tis-

- sue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2011, 99A, issue 3, s. 376-385 [cit. 2015-05-07]. DOI: 10.1002/jbm.a.33200.
- KHALKI, Abdelmalik El, Alain GRUGER a Philippe COLOMBAN. Bulk–surface nanostructure and defects in polyaniline films and fibres. *Synthetic Metals* [online]. 2003, vol. 139, issue 2, s. 215-220 [cit. 2014-11-24]. DOI: 10.1016/s0379-6779(03)00129-2.
 - KITTEL, Ch. *Introduction to solid state physics*. New York: Chichester: Wiley, 1996, 7, s. 673.
 - KONYUSHENKO, Elena N, Jaroslav STEJSKAL, Ivana ŠEDĚNKOVÁ, Miroslava TRCHOVÁ, Irina SAPURINA, Miroslav CIESLAR a Jan PROKEŠ. 2006. Polyaniline nanotubes: conditions of formation. *Polymer International* [online]. **55**(1) [cit. 2015-05-07]. DOI: 10.1002/pi.1899. ISSN 0959-8103.
 - KUMAR, G a K PRABHU. Review of non-reactive and reactive wetting of liquids on surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. 2007, vol. 133, issue 2, s. 61-89 [cit. 2015-05-02]. DOI: 10.1016/j.cis.2007.04.009.
 - LI, Dan, Qing ZHENG, Yanwei WANG a Hong CHEN. Combining surface topography with polymer chemistry: exploring new interfacial biological phenomena. *Polym. Chem* [online]. 2014, vol. 5, issue 1, s. 14-24 [cit. 2015-03-26]. DOI: 10.1039/c3py00739a.
 - LINHART, Igor. *Toxikologie: interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky*. 2., upr. a rozš. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2014, 410 s. ISBN 978-80-7080-877-1.
 - LIU, Y a B LEVINE. 2014. Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death and Differentiation* [online]. **22**(3): 367-376 [cit. 2015-05-07]. DOI: 10.1038/cdd.2014.143. ISSN 1350-9047.
 - LIU, Y., D. A. PETERSON a D. SCHUBERT. Amyloid peptide alters intracellular vesicle trafficking and cholesterol homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1998, vol. 95, issue 22, s. 13266-13271 [cit. 2015-05-09]. DOI: 10.1073/pnas.95.22.13266.
 - LODISH, Harvey F. *Molecular cell biology*. 7th ed. New York: W. H. Freeman, c2013, xxxiii, 1154 s. ISBN 9781429234139.

- LONG, Yun-Ze, Meng-Meng LI, Changzhi GU, Meixiang WAN, Jean-Luc DUVAIL, Zongwen LIU a Zhiyong FAN. Recent advances in synthesis, physical properties and applications of conducting polymer nanotubes and nanofibers. *Progress in Polymer Science* [online]. 2011, vol. 36, issue 10, s. 1415-1442 [cit. 2015-02-25]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2011.04.001.
- MARK, Klaus von der, Jung PARK, Sebastian BAUER a Patrik SCHMUKI. Nanoscale engineering of biomimetic surfaces: cues from the extracellular matrix. *Cell and Tissue Research* [online]. 2009, vol. 339, issue 1, s. 131-153 [cit. 2015-04-23]. DOI: 10.1007/s00441-009-0896-5.
- MCKEON, K. D., A. LEWIS a J. W. FREEMAN. Electrospun poly(D,L-lactide) and polyaniline scaffold characterization. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. 2010, vol. 115, issue 3, s. 1566-1572 [cit. 2015-05-07]. DOI: 10.1002/app.31296.
- MEISSNER, Bohumil a Václav ZILVAR. Fyzika polymerů: Struktura a vlastnosti polymerních materiálů. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1987, 306 s.
- MIAH, Musharraf, Zafar IQBAL a Edward P. C. LAI. Rapid CE-UV evaluation of polypyrrole-coated magnetic nanoparticles for selective binding of endocrine disrupting compounds and pharmaceuticals by aromatic interactions. *Analytical Methods* [online]. 2012, vol. 4, issue 9 [cit. 2015-05-02]. DOI: 10.1039/c2ay25343g.
- MILES, A.W. a S. GHEDUZZI. Basic biomechanics and biomaterials. *Surgery (Oxford)* [online]. 2012, vol. 30, issue 2, s. 86-91 [cit. 2015-05-07]. DOI: 10.1016/j.mpsur.2011.11.004.
- MILLIMOUNO, F. M., J. DONG, L. YANG, J. LI a X. LI. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer and Perspectives with Natural Compounds from Mother Nature. *Cancer Prevention Research* [online]. 2014, vol. 7, issue 11, s. 1081-1107 [cit. 2015-03-10]. DOI: 10.1158/1940-6207.capr-14-0136.
- NEČAS, O. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3., přeprac. vyd. Jinočany: H & H, 2000, 554 s. ISBN 8086022463.
- NIKOLETOPOULOU, V, M-E PAPANDREOU a N TAVERNARAKIS. 2014. Autophagy in the physiology and pathology of the central nervous system. *Cell Death and Differentiation* [online]. **22**(3): 398-407 [cit. 2015-03-10]. DOI: 10.1038/cdd.2014.204. ISSN 1350-9047.

- PAREDES, J.I, A MARTÍNEZ-ALONSO a J.M.D TASCÓN. Application of scanning tunneling and atomic force microscopies to the characterization of microporous and mesoporous materials. *Microporous and Mesoporous Materials*[online]. 2003, vol. 65, 2-3, s. 93-126 [cit. 2015-05-02]. DOI: 10.1016/j.micromeso.2003.07.001.
- PARK, Eunyu, Hyunyoung KIM, Jooyoung SONG, Hyuntaek OH, Hee SONG a Jyongsik JANG. Synthesis of silver nanoparticles decorated polypyrrole nanotubes for antimicrobial application. *Macromolecular Research* [online]. 2012, vol. 20, issue 10, s. 1096-1101 [cit. 2015-05-02]. DOI: 10.1007/s13233-012-0150-y.
- PARK, J. B. a J. D. BRONZINO. *Biomaterials: principles and applications*. Boca Raton: CRC Press, c2003, 250 s. ISBN 0-8493-1491-7.
- PAUW, L. J. van der. A method of measuring the resistivity and Hall coefficient on lamellae of arbitrary shape. *Philips Res. Repts.* 1958, 13, 1-9, (No. 1).
- PICOT, Julien, Coralie L. GUERIN, Caroline Le Van KIM a Chantal M. BOULANGER. Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology* [online]. 2012, vol. 64, issue 2, s. 109-130 [cit. 2015-04-02]. DOI: 10.1007/s10616-011-9415-0.
- RAHMANY, Maria B. a Mark Van DYKE. Biomimetic approaches to modulate cellular adhesion in biomaterials: A review. *Acta Biomaterialia* [online]. 2013, vol. 9, issue 3, s. 5431-5437 [cit. 2015-04-01]. DOI: 10.1016/j.actbio.2012.11.019.
- RECEK, Nina, Miran MOZETIC, Morana JAGANJAC, Lidija MILKOVIC, Neven ZARKOVIC a Alenka VESEL. Adsorption of Proteins and Cell Adhesion to Plasma Treated Polymer Substrates. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* [online]. 2014, vol. 63, issue 13, s. 685-691 [cit. 2015-03-26]. DOI: 10.1080/00914037.2013.854243.
- ROBINSON, J.; P. M. SAINT LOUIS a A. PADMARAJU. *Polymer in medicine*. 2001, s. 24.
- SAPURINA, I.Yu. a M.A. SHISHOV. 2012. Oxidative Polymerization of Aniline: Molecular Synthesis of Polyaniline and the Formation of Supramolecular Structures. *New Polymers for Special Applications* [online]. InTech [cit. 2015-05-07]. DOI: 10.5772/48758. ISBN 978-953-51-0744-6.
- SAPURINA, Irina a Jaroslav STEJSKAL. 2008. The mechanism of the oxidative polymerization of aniline and the formation of supramolecular polyaniline structures.

- res. *Polymer International* [online]. **57**(12): 1295-1325 [cit. 2015-02-20]. DOI: 10.1002/pi.2476. ISSN 09598103.
- SAWAI, Hirofumi a Naohika DOMAE. Discrimination between primary necrosis and apoptosis by necrostatin-1 in Annexin V-positive/propidium iodide-negative cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2011, vol. 411, issue 3, s. 569-573 [cit. 2015-04-02]. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.06.186.
 - SHI, D., *Biomaterials and tissue engineering*. 1st ed. Berlin: Springer, 2004, xi, 246 s. ISBN 3-540-22203-0.
 - SCHUETZE, Andrew P., Wayne LEWIS, Chris BROWN a Wilhelmus J. GEERTS. A laboratory on the four-point probe technique. *American Journal of Physics* [online]. 2004, vol. 72, issue 2 [cit. 2015-05-02]. DOI: 10.1119/1.1629085.
 - STEJSKAL, J. and R. G. GILBERT. 2002. POLYANILINE. Preparation of a conducting polymer (IUPAC Technical Report)., roč. 74, č. 5, s. 857–867.
 - STEJSKAL, Jaroslav, Milena HAJNÁ, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Petr HUMPOLÍČEK, Alexander ZHIGUNOV a Miroslava TRCHOVÁ. Purification of a conducting polymer, polyaniline, for biomedical applications. *Synthetic Metals* [online]. 2014, vol. 195, s. 286-293 [cit. 2015-05-07]. DOI: 10.1016/j.synthmet.2014.06.020.
 - STEJSKAL, Jaroslav, Olga E BOGOMOLOVA, Natalia V BLINOVA, Miroslava TRCHOVÁ, Ivana ŠEDĚNKOVÁ, Jan PROKEŠ a SAPURINA. 2009. Mixed electron and proton conductivity of polyaniline films in aqueous solutions of acids: beyond the 1000 S cm⁻¹ limit. *Polymer International* [online]. **58**(8) [cit. 2015-05-07]. DOI: 10.1002/pi.2605. ISSN 09598103.
 - STEJSKAL, Jaroslav, Pavel KRATOCHVÍL a Aubrey D. JENKINS. The formation of polyaniline and the nature of its structures. *Polymer* [online]. 1996, vol. 37, issue 2, s. 367-369 [cit. 2014-07-10]. DOI: 10.1016/0032-3861(96)81113-x.
 - STEJSKAL, Jaroslav. Polymers of phenylenediamines. *Progress in Polymer Science* [online]. 2015, vol. 41, s. 1-31 [cit. 2015-05-02]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2014.10.007.
 - SUN, Liming a Xiaodong WANG. A new kind of cell suicide: mechanisms and functions of programmed necrosis. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 2014, vol. 39, issue 12, s. 587-593 [cit. 2015-03-10]. DOI: 10.1016/j.tibs.2014.10.003.

- SYLVESTER, Paul W. *Optimization of the Tetrazolium Dye (MTT) Colorimetric Assay for Cellular Growth and Viability* [online]. : 157 [cit. 2015-04-02]. DOI: 10.1007/978-1-61779-012-6_9.
- TAUPIN, Philippe. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: Paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Research Reviews* [online]. 2007, vol. 53, issue 1, s. 198-214 [cit. 2015-04-07]. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2006.08.002.
- TREVISI, Lucia, Isabella PIGHIN, Sara BAZZAN a Sisto LUCIANI. Inhibition of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) endocytosis by ouabain in human endothelial cells. *FEBS Letters* [online]. 2006, vol. 580, issue 11, s. 2769-2773 [cit. 2015-04-02]. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.04.040.
- UNADKAT, H. V., M. HULSMAN, K. CORNELISSEN, B. J. PAPENBURG, R. K. TRUCKENMULLER, A. E. CARPENTER, M. WESSLING, G. F. POST, M. UETZ, M. J. T. REINDERS, D. STAMATIALIS, C. A. van BLITTERSWIJK a J. de BOER. An algorithm-based topographical biomaterials library to instruct cell fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2011, vol. 108, issue 40, s. 16565-16570 [cit. 2015-04-30]. DOI: 10.1073/pnas.1109861108.
- VAITKUVIENE, Aida, Vilma RATAUTAITE, Lina MIKOLIUNAITE, Vytautas KASETA, Giedre RAMANAUSKAITE, Gene BIZIULEVICIENE, Almira RAMANAVICIENE a Arunas RAMANAVICIUS. Some biocompatibility aspects of conducting polymer polypyrrole evaluated with bone marrow-derived stem cells. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2014, vol. 442, s. 152-156 [cit. 2015-05-02]. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2013.06.030.
- Vybrant ® MTT Cell Proliferation Assay Kit (V-13154). Molecular Probes, 2002. Dostupné z URL: <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp13154.pdf>
- WANG, C.H., Y.Q. DONG, K. SENGOTHI, K.L. TAN a E.T. KANG. In-vivo tissue response to polyaniline. *Synthetic Metals* [online]. 1999, vol. 102, 1-3, s. 1313-1314 [cit. 2015-02-25]. DOI: 10.1016/s0379-6779(98)01006-6.
- WANG, Xue, Yang XIA, Laikui LIU, Mei LIU, Ning GU, Hanbing GUANG a Feimin ZHANG. Comparison of MTT assay, flow cytometry, and RT-PCR in the evaluation of cytotoxicity of five prosthodontic materials. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* [online]. 2010, 95B, issue 2, s. 357-364 [cit. 2015-04-02]. DOI: 10.1002/jbm.b.31723.

- WANG, Yue, Henry D. TRAN a Richard B. KANER. Template-Free Growth of Aligned Bundles of Conducting Polymer Nanowires. *The Journal of Physical Chemistry C* [online]. 2009, vol. 113, issue 24, s. 10346-10349 [cit. 2014-11-05]. DOI: 10.1021/jp903583e.
- WHITE, Blaine C. a Jonathon M. SULLIVAN. Apoptosis. *Academic Emergency Medicine* [online]. 1998, vol. 5, issue 10, s. 1019-1029 [cit. 2015-02-10]. DOI: 10.1111/j.1553-2712.1998.tb02785.x.
- WICKRAMASINGHE H. K., *Progress in Scanning Probe Microscopy*, Acta Materialia 48 (2000) 347-358.
- WILLIAMS, D. F. Biomaterials and tissue engineering in reconstructive surgery. *Sadhana*, 2003, 28.3-4: 563-574.
- YAMAGUCHI, Masaki, Shojiro SUZUKI, Shinya SASAKI, Tsuyoshi CHIBA, Nobuyuki ITOH a Morihisa HOGA. Fabrication of nano-periodic structures and modification of the Wenzel model to estimate contact angle. *Sensors and Actuators A: Physical* [online]. 2014, vol. 212, s. 87-92 [cit. 2015-04-22]. DOI: 10.1016/j.sna.2014.03.006.
- ZHANG, Nan, Yali CHEN, Ruixuan JIANG, Erwei LI, Xiuling CHEN, Zhijun XI, Yinglu GUO, Xingzhong LIU, Yuguang ZHOU, et al. 2014. PARP and RIP 1 are required for autophagy induced by 11'-deoxyverticillin A, which precedes caspase-dependent apoptosis. *Autophagy* [online]. vol. 7, issue 6, s. 598-612 [cit. 2015-03-10]. DOI: 10.4161/auto.7.6.15103. ISSN 1554-8627.
- ZHANG, Xiaoyong, Hongxu QI, Shiqi WANG, Lin FENG, Yan JI, Lei TAO, Shuxi LI a Yen WEI. 2012. Cellular responses of aniline oligomers: a preliminary study. *Toxicology Research* [online]. 1(3): 2012 [cit. 2015-05-07]. DOI: 10.1039/c2tx20035j. ISSN 2045-452x.
- ZHENG, Jun, Wei SONG, He HUANG a Hong CHEN. Protein adsorption and cell adhesion on polyurethane/Pluronic® surface with lotus leaf-like topography. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2010, vol. 77, issue 2, s. 234-239 [cit. 2015-04-22]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2010.01.032.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

NIH/3T3	myší fibroblasty	mouse fibroblast
ECM	Extracelulární matrix	extracellular matrix
PS	Polystyren	polystyrene
XPS	Rentgenová fotoelektronová spektroskopie	X-ray photoelectron spectroscopy
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie	scanning electron microscopy
HMEC	lidské prsní epiteliální buňky	human mammary epithelial cell
PTFE	Polytetrafluoretylen	polytetrafluoroethylene
PPY	polypyrrol	polypyrrole
PANI	Polyanilin	polyaniline
PANI-H	Emeraldinová sůl	Emeraldine salt
PANI-B	Emeraldinová báze	Emeraldine base
HaCaT	Lidské keratinocyty	human keratinocyte
HepG2	Lidské hepatocelulární karcinomní buňky	human liver hepatocellular carcinoma
R-PANI-H	Reprotonovaná emeraldinová sůl	reprotonated Emeraldine salt
DR-PANI-B	Deprotonovaná emeraldinová báze	deprotonated Emeraldine base
NMP	N-metylpyrrolidonu	N-methylpyrrolidone
hMSCs	lidské mezenchymální buňky	human mesenchymal cell
PLA	kyselina polymléčná	polylactic acid
DNA	deoxyribonukleová kyselina	deoxyribonucleic acid
FCM	průtoková cytometrie	flow cytometry
FCS	forward scatter light	forward scatter light
SSC	side scatter light	side scatter light

PI	propidium jodid	propidium iodide
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
BrdU	5-brom-2'-deoxyridin	5-bromo-2'-deoxyuridine
G	elektrická vodivost	electric conductivity
σ	měrná elektrická vodivost	specific electric conductivity
ρ	měrný odpor	specific resistivity
S	plocha průřezu vodiče	area cross-section of conductor
l	délka vodiče	conductor length
R	odpor vodiče	resistence wires
AFM	mikroskopie atomárních sil	atomic force microscopy
MeOH	metanol	methanol
HCl	kyselina chlorovodíková	hydrochloric acid
PANI-HCl	modifikovaný polyanilinový prášek pomocí kyseliny chlorovodíkové	modified polyaniline powder using hydrochloric acid
PANI-MeOH	modifikovaný polyanilinový prášek pomocí metanolu	modified polyaniline powder using methanol
PANI-HCl+MeOH	modifikovaný polyanilinový prášek pomocí kyseliny chlorovodíkové a metanolu	modified polyaniline powder using hydrochloric acid and methanole
rpm	otáčky za minutu	round per minute
DMSO	dimetylsulfoxid	dimethylsulfoxide
SD	směrodatná odchylka	standard deviation

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – strukturní vzorec polyacetyleny	16
Obrázek 2 – strukturní vzorec pyrrolu a následně polypyrrolu	17
Obrázek 3 – idealizovaná struktura polyfenylendiaminu	17
Obrázek 4 – Strukturní vzorce všech forem PANI (Sapurina a Stejskal, 2008).....	19
Obrázek 5 – schéma oxidace anilinu (Sapurina a Stejskal, 2008)	20
Obrázek 6 – Morfologie PANI: a) globulární morfologie, b) nanotubulární	23
Obrázek 7 – snímky adheze buněk na topochipu (Unadkat, et al., 2011)	26
Obrázek 8 – poslední stádium apoptické buňky; převzato z http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/apoptosismacrophage	29
Obrázek 9 – princip průtokové cytometrie (Picot et al., 2012).....	31
Obrázek 10 - snímek z invertovaného fluorescenčního mikroskopu buněk.....	32
Obrázek 11 – schéma fluorescenčního mikroskopu	33
Obrázek 12 – strukturní vzorec BrdU	34
Obrázek 13 – schéma principu pásové teorie	37
Obrázek 14 – znázornění zapojení obvodu pro dvoubodovou	37
Obrázek 15 – Schéma principu AFM	38
Obrázek 16 – kontaktní úhel sedící kapky.....	39
Obrázek 17 – schéma metody přisedlé kapky pro měření kontaktního úhlu.....	40
Obrázek 18 – fotografie 96-jamkových destiček A) levá část extrakty PANI-MeOH, pravá část extrakty PANI-HCl; B) levá část extrakty PANI-HCl+MeOH.....	49
Obrázek 19 – Fotografie buněk kultivovaných A) 100% koncentraci PANI-HCl;.....	50
Obrázek 20 – ilustrační foto reference s MTT (upraveno dle Liu et al., 1998).....	51
Obrázek 21 – ukázkový graf z průtokové cytometrie.....	52
Obrázek 22 – Snímky buněk kultivovaných v A) 5% extraktu PANI-HCl; B) reference (zvětšení 100x)	52
Obrázek 23 – Snímky buněk kultivovaných v A) 25% extraktu PANI-MeOH; B) reference (zvětšení 100x)	55
Obrázek 24 – Snímky buněk kultivovaných v A) 10% extraktu PANI-HCl+MeOH; B) reference (zvětšení 100x)	57

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – Výsledky měrné elektrické vodivosti tablet PANI.....	48
Tabulka 2 – Výsledky slepého pokusu MTT.....	49
Tabulka 3 – Výsledky stanovení cytotoxicity pomocí metody průtokové cytometrie pro extrakt PANI-HCl.....	54
Tabulka 4 – Výsledky stanovení cytotoxicity pomocí metody průtokové cytometrie pro extrakt PANI-MeOH.....	56
Tabulka 5 – Výsledky stanovení cytotoxicity pomocí metody průtokové cytometrie pro extrakt PANI-HCl+MeOH.....	58