

# Toxicita koloidního polyanilinu

Monika Konečná

---

Bakalářská práce  
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2013/2014

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Monika Konečná**  
Osobní číslo: **T12346**  
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Polymerní materiály a technologie**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Toxicita koloidního polyanilinu.**

Zásady pro vypracování:

**Zásady pro vypracování:** Studentka se seznámí s dosud publikovanými informacemi o vztahu polyanilinu, především ve formě koloidu, na toxicitu a další biologické vlastnosti. V teoretické části práce zpracuje informace o přípravě a vlastnostech koloidního polyanilinu a jeho biologických vlastnostech. Prakticky se seznámí s prací v laboratoři buněčných kultur a osvojí si základní techniky práce v laboratoři. V praktické části provede a vyhodnotí testy toxicity koloidního polyanilinu.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

**Polymers for regenerative medicine. Publisher: Berlin ; New York : Springer, (2006) ISBN 3540333533.**

**Biomedical technology and devices handbook. Publisher: Boca Raton : CRC Press, (2004) ISBN 0-8493-1140-3**

**Cell Biology: A Laboratory Handbook, Four Volume Set. Publisher: Academic Press, 3 edition (July 18, 2005). ISBN-10: 0121647307.**

**Culture of Animal Cells: A manual of Basic Technique. Publisher: Wiley-Liss; 5 edition (July 29, 2005) ISBN-10: 0471453293.**

**Culture of Cells for Tissue Engineering. Publisher: Wiley-Liss; 1 edition (February 3, 2006) ISBN-10: 0471629359.**

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Petr Humpolíček, Ph.D.**

Centrum polymerních materiálů

Datum zadání bakalářské práce:

**10. ledna 2014**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**28. května 2014**

Ve Zlíně dne 7. února 2014

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



  
Ing. Lubomír Beníček, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: Konečná Monika

Obor: Polymerní materiály a technologie

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 16.5.2014

Monika Konečná

<sup>21)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

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

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

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

<sup>22)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

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

<sup>23)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

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

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo 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 přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Tato bakalářská práce se zabývá vodivými polymery, a to konkrétně polyanilinem ve formě koloidu. Jsou zde popsány jeho vlastnosti, příprava, formy, které vytváří a jeho potenciální využití. Dále se zabývá cytotoxicitou a metodami jejího testování za využití *in vitro* technik a buněčných kultur. Mezi metody je možno zařadit například testy viability, metabolické aktivity, proliferace a detekci genové exprese. Poslední část teoretického oddílu pojednává o kultivaci buněčných kultur, diferenciaci a proliferaci buněk. V praktické části jsou vyhodnoceny testy cytotoxicity koloidního polyanilinu.

**Klíčová slova:** Vodivé polymery, koloidní polyanilin, cytotoxicita, testování *in vitro*, kultivace buněk

## **ABSTRACT**

Conductive polymers, namely polyaniline in colloidal form, are the topic of presented bachelor thesis. Its properties, preparation, forms and potential applications are described. The *in vitro* techniques and cell culturing use able for cytotoxicity testing are described in theoretical part. Mainly the tests of viability, metabolic activity, proliferation and detection of gene expression are mentioned. The last part of the theoretical section discusses the cell biology, differentiation and cell proliferation. In the practical part the test of colloidal polyaniline cytotoxicity is evaluated.

**Keywords:** Conductive polymers, colloidal polyaniline, cytotoxicity, *in vitro* testing, cell culture

Na tomto místě bych chtěla především poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce, panu doc. Ing. Petru Humpolíčkovi, Ph.D., za trpělivost, cenné rady a odborné vedení při vzniku této práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Zdence Kucekové za pomoc a vedení v laboratoři buněčných kultur.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 POLYMERY</b> .....	<b>12</b>
1.1 VODIVÉ POLYMERY .....	12
<b>2 DISPERZNÍ SOUSTAVY</b> .....	<b>14</b>
2.1 KLASIFIKACE DISPERZNÍCH SOUSTAV .....	14
2.2 KOLOIDNĚ DISPERZNÍ SOUSTAVY .....	15
2.2.1 Klasifikace koloidních soustav .....	15
2.2.2 Význam koloidních systémů .....	16
2.2.2.1 Koloidní systémy v regenerativní medicíně .....	16
<b>3 POLYANILIN (PANI)</b> .....	<b>18</b>
3.1 HISTORIE POLYANILINU.....	18
3.2 FORMY POLYANILINU .....	18
3.2.1 Morfologie polyanilinu .....	19
<b>4 KOLOIDNÍ POLYANILIN</b> .....	<b>20</b>
4.1 TENKÉ FILMY A KOLOIDNÍ DISPERZE .....	20
4.1.1 Tvorba polymerních filmů .....	20
4.1.2 Tvorba polyanilinových koloidů .....	21
4.2 PŘÍPRAVA POLYANILINU.....	21
4.2.1 Standardní příprava PANI.....	21
4.3 VLASTNOSTI A VYUŽITÍ POLYANILINU .....	22
4.3.1 Biosenzory.....	23
<b>5 TOXICITA MATERIÁLU</b> .....	<b>24</b>
5.1 CYTOTOXICITA .....	24
5.2 TESTY CYTOTOXICITY NA BUŇKÁCH PĚSTOVANÝCH <i>IN VITRO</i> .....	24
5.2.1 Viabilita.....	25
5.2.2 Proliferace .....	25
5.2.3 Metabolická aktivita.....	26
5.2.4 Detekce genové exprese .....	26
<b>6 METODY TESTOVÁNÍ BUNĚČNÉ TOXICITY</b> .....	<b>27</b>
6.1 TESTY VIABILITY .....	27
6.1.1 Testování trypanovou modří .....	27
6.1.2 Testování propidium jodidem .....	27
6.1.3 LDH test .....	28
6.2 TESTY METABOLICKÉ AKTIVITY .....	28
6.2.1 XTT test .....	28
6.2.2 MTTtest.....	29
6.2.3 WST-1 test .....	31
6.3 TESTY NA APOPTÓZU .....	31
6.3.1 Průtoková cytometrie .....	31
<b>7 KULTIVACE BUNĚČNÝCH KULTUR</b> .....	<b>33</b>



7.1	ZÁKLADY BUNĚČNÝCH KULTUR .....	33
7.2	KULTIVACE BUNĚČNÝCH KULTUR A KULTIVAČNÍ MÉDIA .....	33
7.2.1	Adheze buněk .....	33
7.3	BUNĚČNÁ PROLIFERACE .....	34
7.3.1	Kontrola buněčné proliferace .....	35
7.4	DIFERENCIACE BUNĚK .....	35
7.5	BUNĚČNÁ SIGNALIZACE .....	36
7.5.1	Typy přenosu signálu .....	37
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>38</b>
<b>8</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA .....</b>	<b>39</b>
8.1	PŘÍPRAVA KOLOIDNÍHO PANI .....	39
8.2	INFORMACE O POUŽITÝCH BUNĚČNÝCH LINIÍCH .....	40
8.2.1	Podmínky kultivace .....	40
8.3	EXPERIMENT .....	41
8.3.1	Trypsinizace a prekulivace .....	41
8.3.2	Přidání potenciálně toxické látky .....	42
8.4	MTT TEST .....	42
<b>9</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>43</b>
9.1	STANOVENÁ CYTOTOXICITA .....	44
9.1.1	pH upravené pomocí NaHCO <sub>3</sub> .....	44
9.1.1.1	Mikrofotografie buněk kultivovaných za přítomnosti NaHCO <sub>3</sub> .....	45
9.1.2	pH upravené pomocí NH <sub>4</sub> OH .....	48
9.1.2.1	Mikrofotografie buněk kultivovaných za přítomnosti NH <sub>4</sub> OH .....	49
<b>10</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>51</b>
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>53</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>54</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>63</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>64</b>
	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>66</b>
	<b>SEZNAM GRAFŮ .....</b>	<b>67</b>

## ÚVOD

Hlavním předmětem mé práce je stanovit cytotoxicitu koloidního polyanilinu. Ten se stal hlavním objektem mnoha výzkumných studií díky svým zajímavým vlastnostem jako je elektrická vodivost. Tyto vlastnosti jsou klíčové především pro růst vybraných buněčných linií a proto se polyanilin v různých formách stal slibným polymerem v oblastech medicínských a biotechnologických aplikací. V mé práci, jak teoretické, tak praktické části se budu zabývat především polyanilinem ve formě koloidu.

Polyanilin se vyskytuje ve dvou základních formách a to polyanilinová (emeraldinová) sůl, která je vodivou formou a nevodivá polyanilinová báze. Změny ve struktuře polyanilinu, které docílíme přidáním alkalického prostředí, vede ke snížení vodivosti a tím k vytvoření báze. Přechod na nevodivou formu nastává při pH 5–6 (Stejskal). V mé praktické části byla úprava pH koloidního polyanilinu docílena přidáním dvou látek, v prvním případě  $\text{NaHCO}_3$  a ve druhém  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Cílem práce bylo stanovit cytotoxicitu takto upraveného polyanilinu na buněčné linii NIH/3T3, což je linie myších fibroblastů. Vyhodnocení viability bylo zajištěno pomocí MTT testu. Metoda je založena na redukci tetrazoliové soli ([3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-difenyltetrazoliumbromid]), která je převedena na nerozpustný formazan (Lü et al., 2012). Poté je spektrofotometricky vyhodnocen počet životaschopných buněk. Výsledky jsou názorně zpracovány pomocí grafů a tabulek a poté prezentovány podle ISO normy 10 993-5 za pomoci procentuálního vyjádření životaschopnosti oproti referenci. Výstupní data z měření jsou poté doplněna o mikrofotografie, které nám poskytují podrobnější informace o morfologii buněk.

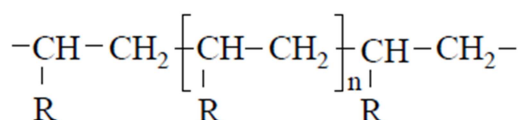
Teoretická část podává ucelený přehled o koloidním polyanilin, jeho vlastnostech a využití. Závěrem této části se zabývám metodami testování buněčné toxicity podle různých kritérií, jako je například viabilita či proliferace. Cytotoxicita koloidního polyanilinu, která je důležitým parametrem biokompatibility není stále objasněna a proto se stala náplní mé práce.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 POLYMERY

Polymery jsou chemické látky tvořené molekulami (makromolekulami) obsahující většinou atomy uhlíku, vodíku, kyslíku, často dusíku, chloru i jiných prvků (Ducháček, 2006). Je pro ně typické mnohonásobné opakování jednoho i více atomů nebo dokonce skupin atomů (konstitučních jednotek), které jsou navzájem spojeny do velkého počtu tak, že i když přidáme či odebereme několik konstitučních jednotek, nezměníme tím vlastnosti (Prokopová, 2007).

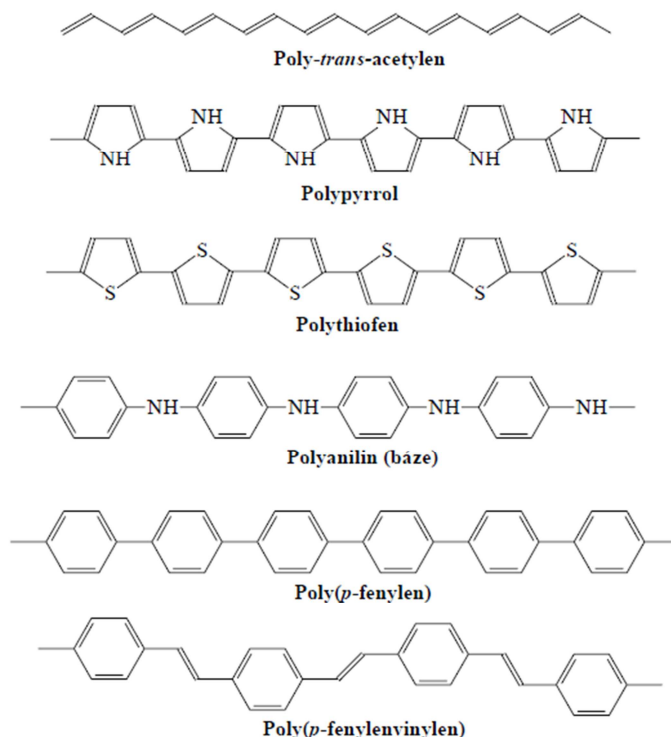
Velký rozmach výroby polymerů nastal za druhé světové války a po ní. Neobyčejně rychlé a všestranné rozšíření výroby a zpracování má několik hlavních příčin, mezi které patří jejich schopnost nahrazovat klasické materiály, jako jsou kovy, keramika, sklo, dřevo a další, jednak mohou mít vlastnosti zcela odlišné od těchto klasických surovin, které umožňují zcela nové aplikace a nová řešení materiálových problémů (Mleziva a Šňupárek, 2000).



Obrázek 1 – obecný vzorec polymeru  
(Prokopová, 2007)

### 1.1 Vodivé polymery

Běžné polymery, mezi které patří polyetylen nebo polyvinylchlorid, jsou všeobecně známy, jako izolanty tzn., že nevedou elektrický proud (Stejskal). Existují však polymery, které vykazují vlastní elektrickou vodivost. Příkladem takových polymerů je polyacetylen, polypyrrol, polythiofen, polyanilin, polyfenylen či poly(*p*-fenylen-vinylen). Elektrickou vodivost umožňuje pravidelné střídání jednoduchých a dvojných vazeb tzv. konjugace. Další důležitou podmínkou je přítomnost nositelů náboje, které zprostředkovávají transport po řetězci. Tento proces se nazývá dopování (Prokeš, Stejskal, Omastová, 2001). Musíme však rozlišovat dopování anorganických a organických polovodičů. U anorganických polovodičů již nepatrná koncentrace dopující látky výrazně ovlivňuje elektrické vlastnosti, na rozdíl u organických polymerů je potřeba koncentrace vyšší. Vodivost této skupiny polymerů se pohybuje v rozmezí 0,01–30 S.cm<sup>-1</sup>, je srovnatelná s anorganickými polovodiči, jako je např. germanium. V porovnání s kovy, jako je měď a stříbro, je tato vodivost mnohem nižší, ale na druhé straně je vyšší o mnoho řádů oproti běžným polymerům (Stejskal).



Obrázek 2 – nejdůležitější vodivé polymery (Stejskal)

Vodivé polymery (CP z anglického *conductive polymers*) jsou klasifikovány jako materiály, které díky neobvyklé kombinaci vlastností kovů a plastů, snadné syntézy a stabilitě přilákaly širokou oblast výzkumu (Bagheri, Ayazi, Naderi, 2013). Skutečnost, že některé tkáně reagují na elektrické pole a podněty, učinily CP atraktivní pro řadu biologických a lékařských aplikací (Guimard, Gomez, Schmidt, 2007). Vědecké studie o vodivých polymerech se nejčastěji zabývají polyacetylenem, polypyrrolem a polyanilinem. Historie vodivých polymerů začíná v roce 1977, kdy japonský vědec Shirakawa se svými studenty objevil, že halogenace *trans*-polyacetyleny zvýšila jeho elektrickou vodivost (Stejskal). Zásadním objevem bylo zjištění, že když tenký polyacetylenový film dopujeme parami jodu, vzroste elektrická vodivost přibližně milionkrát (Prokeš, Nešpůrek, Stejskal, 2001). I přesto, že je polyacetylen vysoce vodivý, jeho nevýhodou je omezená stabilita. Proto je pozornost kladena stabilnějším polymerům, a to polyanilinu a polypyrrolu. Více než samotná vodivost, je zajímavější u této skupiny polymerů, schopnost měnit svou vodivost v reakci na vnější prostředí. Proto se jim také někdy říká „inteligentní“ polymery (Stejskal).

## 2 DISPERZNÍ SOUSTAVY

Disperzní systém je tvořený alespoň dvěma fázemi nebo složkami, kdy jeden druh je rozptýlený ve druhém ve formě jemných částic. Rozptýlený druh se nazývá disperzní fáze (disperzní podíl) a druhá část soustavy disperzní prostředí (Novák a kolektiv, 2011). Pokud disperzní soustava obsahuje dvě fáze, z nichž jedna tvoří disperzní fázi a druhá disperzní prostředí, pak takovou soustavu nazýváme heterogenní. Mezi fází a prostředím existuje hranice tzv. fázové rozhraní. Příkladem je směs vody a oleje. Protřepáním kapičky oleje vytvoří disperzní fázi a voda disperzní prostředí. Obsahuje-li disperzní soustava dvě složky a jen jednu fázi, takový systém se nazývá homogenní. V tomto případě nemůžeme uvažovat o rozhraní, protože složka disperzní fáze je v disperzním prostředí rozptýlena ve velmi drobných částicích. Příkladem je rozpuštěný cukr ve vodě (Kvítek a Panáček, 2007).

### 2.1 Klasifikace disperzních soustav

Disperzní soustavy můžeme rozdělit podle různých kritérií, například podle velikosti či tvaru dispergovaných částic, dále podle skupenství disperzního prostředí nebo disperzní fáze (Šimek a Hrnčířík, 1979). Monodisperzní nazýváme soustavy, u kterých jsou částice stejné velikosti a naopak u polydisperzních soustav se vyskytují částice různých velikostí. Podle velikosti dispergovaných částic můžeme soustavy dělit na disperze analytické, koloidní a hrubé (Kvítek a Panáček, 2007).

analytické disperze	koloidní disperze	hrubé disperze
$d < 10^{-9} \text{ m}$ homogenní soustavy pravé roztoky nízkomolekulárních látek termodynamicky stálé nefiltrovatelné vysoká difúze a osmóza	$10^{-9} \text{ m} < d < 10^{-6} \text{ m}$ mikroheterogenní soustavy pravé roztoky látek vysokomolekulárních i nano či mikrodisperze dalších látek termodynamicky stálé i nestálé filtrovatelné přes ultrafiltry slabá difúze a osmóza	$d > 10^{-6} \text{ m}$ makroheterogenní soustavy nestálé filtrovatelné přes filtrační papír osmóza a difúze není

Obrázek 3 – druhy disperzních soustav podle velikosti dispergovaných částic a jejich základní vlastnosti (Kvítek a Panáček, 2007)

## 2.2 Koloidně disperzní soustavy

Koloidní stav je zvláštním stavem hmoty, do kterého může být převedena látka, pokud ji rozptýlíme do vhodného prostředí. Hlavním charakteristickým znakem je velikost dispergovaných částic, které mají větší rozměr než jednoduché molekuly, ale které nejsou zároveň viditelné optickým mikroskopem (Brdička a Dvořák, 1977). Koloidní disperze jsou zajímavé především díky svým fyzikálně chemickým vlastnostem (závislost absorpce světla na velikosti částic). Specifické chování také souvisí s jejich velkou plochou fázového rozhraní mezi disperzní fází a prostředím. Důležitou vlastností koloidních systémů je také schopnost tvořit gely (Kvítek a Panáček, 2007).

### 2.2.1 Klasifikace koloidních soustav

Koloidní soustavy můžeme třídit podle různých kritérií. Například podle skupenského stavu disperzní fáze a disperzního prostředí můžeme utvořit osm skupin (Obr. 4). V koloidní chemii se všechny systémy odpovídající koloidnímu stupni disperzity označují jako soly, předpona aero (aero = vzduch) označuje soly s plynným disperzním prostředím a předpona lyo (rozpouštědlo) označuje soly s kapalným prostředím. U koloidních systémů, u nichž disperzní prostředí tvoří organická kapalina, se označují jako organosoly (Vojuckij, 1984).

disperzní prostředí	disperzní fáze	označení koloidní disperze
plynné	plynný	netvoří koloid
	kapalný	aerosoly
	pevný	aerosoly
kapalné	plynný	pěny
	kapalný	emulze
	pevný	lyosoly
pevné	plynný	tuhé pěny
	pevný	tuhé emulze
	pevný	tuhé soly

Obrázek 4 – rozdělení soustav podle fázového složení (Kvítek a Panáček, 2007)

Další možnou klasifikací je podle vzájemného působení disperzní fáze a disperzního prostředí, kdy koloidy můžeme rozdělit do tří skupin. Rozlišujeme tak koloidy vratné nebo též lyofilní. Jsou to homogenní systémy, v nichž vzniká velmi neostře fázové rozhraní a disperzní podíl tvoří s disperzním prostředím jednu fázi. Tyto koloidní soustavy jsou

také nazývány koloidní roztoky. V případě, že mezi disperzní fází a prostředím vzniká ostře ohraničené fázové rozhraní, mluvíme o nevratných (lyofobních) koloidech. Toto fázové rozhraní výrazně ovlivňuje jejich vlastnosti. Specifickou skupinou jsou asociativní (micelární) koloidy, které tvoří koloidně disperzní částice – micely. Koloidní částice vzniká asociací malých organických molekul – povrchově aktivních látek (Kvítek, 2006).

### 2.2.2 Význam koloidních systémů

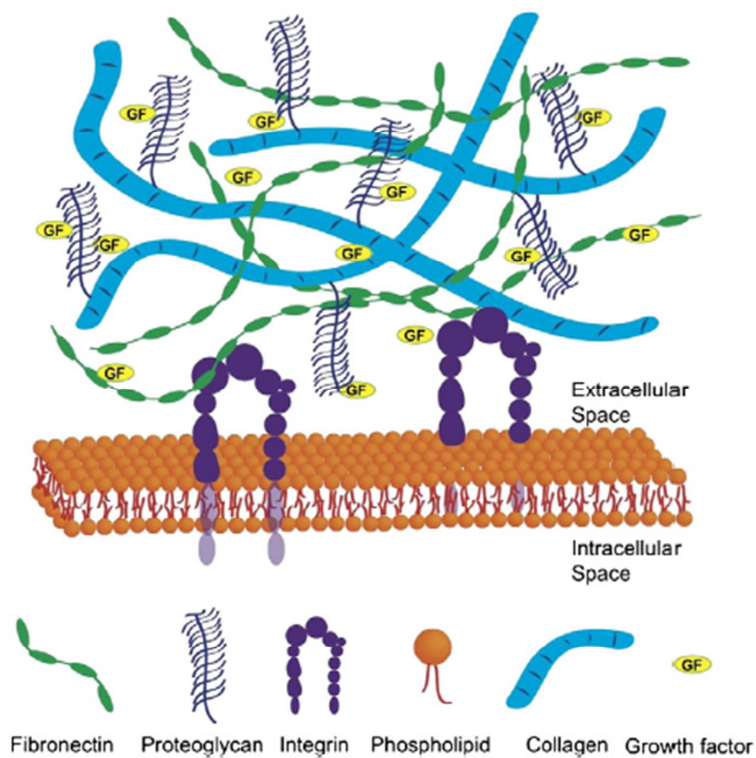
Koloidní systémy a děje na fázových rozhráních mají ohromný význam pro lidskou činnost. Mnoho oblastí, jako jsou technologické, biologické, fyziologické, s těmito jevy souvisejí. Jsou využitelné jak v chemickém výzkumu, tak i v průmyslu. Mnoho potravinových produktů, jako jsou sýry, jogurty, pečivo, pivo jsou přímo povahou koloidní, nebo se koloidní pochody podílejí na jejich vzniku. Stejně je tomu také v případě barev, barviv, farmaceutických i kosmetických preparátů. Velmi významnou roli hraje koloidní chemie při výrobě keramických výrobků, od porcelánu, přes nové velmi pevné keramické materiály, používané v raketové technice nebo lékařství na různé protézy (keramické kloubní náhrady, zubní protézy). Velkou úlohu hrají také koloidy v biologických systémech. Příkladem jsou tokové vlastnosti krve a tělních tekutin. Ty mohou být lépe prozkoumány, jestliže se na ně díváme jako na koloidní disperze. Byla také připravena vodná emulze, která je vhodná jako dočasná náhrada krve nebo moderní koloidní mikrokapsule, používané v lékařství. Ty slouží pro řízené podání léčiv a v některých případech i pro cílenou farmakoterapii orgánů (Bartovská a Šišková, 2005).

#### 2.2.2.1 Koloidní systémy v regenerativní medicíně

Jedna z oblastí tkáňového inženýrství se zaměřuje na napodobování přirozeného biochemického a biofyzikálního prostředí extracelulární matrix (ECM). V literatuře je uváděna široká škála použitelnosti a aplikace koloidů, které by mohly být užitečné při vývoji ECM systémů. Koloidy mohou v této oblasti posloužit jako stavební částice a jako potenciální složky, které by posílily rozvoj umělé ECM. Extracelulární matrix je konstrukčním prvkem, jehož prostřednictvím buňky a tkáň drží pohromadě. Podporuje přilnavost a hraje klíčovou roli při určování buněčného osudu. Složení proteinů a struktura ECM může ovlivnit buněčnou adhezi, signalizaci a dále například vazbu buněk na specifická místa ligandu přes povrchové receptory.



Extracelulární matrix je velmi složité, dynamické prostředí, přes které buňka řídí veškeré procesy. Oblast tkáňového inženýrství a regenerativní medicíny se snaží rozvíjet biomateriály schopné napodobit chování ECM ze syntetických nebo biosyntetických směsí se schopností regenerace poškozené tkáně. Kromě toho mohou tyto materiály vést k vytvoření přesných modelů pro studium chování buněk. Hydrogely se staly hlavní volbou pro ECM napodobeniny, díky svým mechanickým vlastnostem a vysokému obsahu vody. Spolu s přírodními polymery jako je kolagen, fibrin, laminin, kyselina hyaluronová umožňují integraci do trojrozměrné struktury tkáně (Clarke et al., 2013). Využívají se v mnoha oblastech medicíny jako implantáty, podpůrné materiály a hojivé gely (Strachota, 2012). Neexistuje však jediné řešení pro vytvoření ideální, umělé extracelulární matrix. Každý typ v těle představuje vlastní funkční a strukturní odlišnosti a je proto obtížné vytvořit jednu strukturu vhodnou pro jakýkoliv typ tkáně či orgánu. Nicméně koloidní struktury jsou důležitou stavební složkou, která plní nenahraditelnou funkci v ECM systémech (Clarke et al., 2013).



Obrázek 5 – zobrazení komponentů extracelulárního matrix (Clarke et al., 2013)

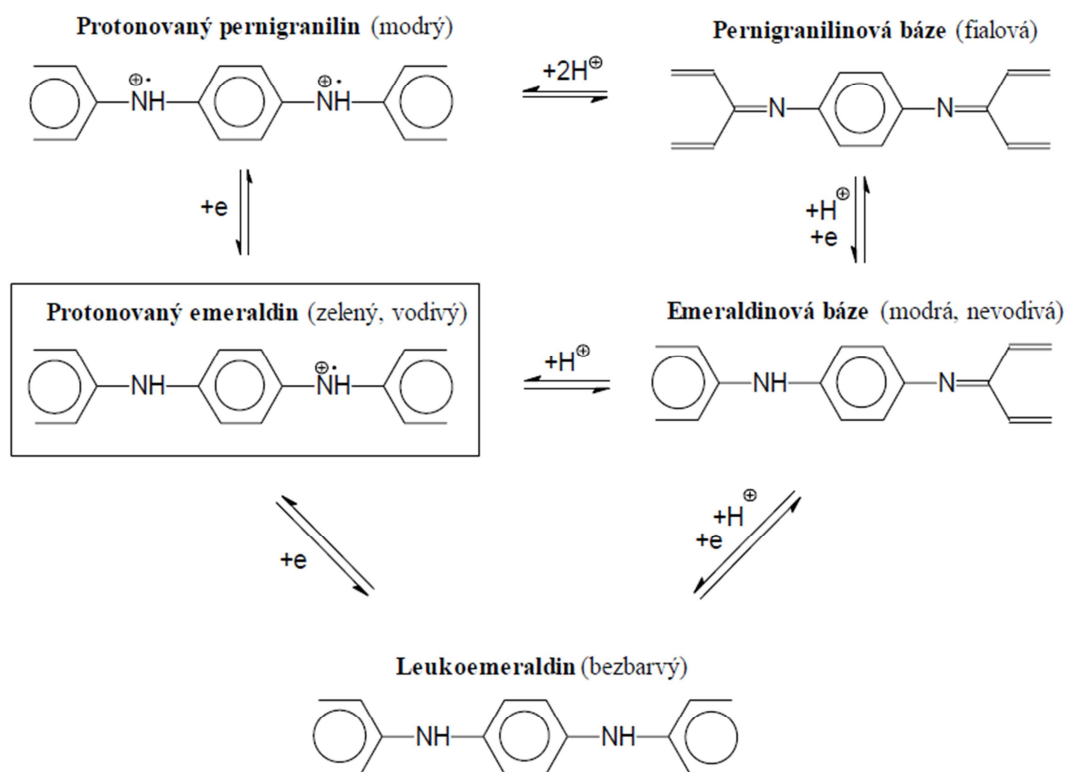
### 3 POLYANILIN (PANI)

#### 3.1 Historie polyanilinu

PANI je nejstarším syntetickým polymerem, který člověk vůbec vyrobil. V roce 1826 jej získal německý chemik Unverdorben pyrolytickou destilací indiga. Při studiu chemických vlastností anilinu byly již v roce 1840 popsány zelené produkty, které bychom dnes nazvali polyanilinem. V roce 1862 při toxikologické identifikaci anilinu, kterou provedl britský profesor chemie Letheby, vedla po alkalizaci k modrému zbarvení, které je typické právě pro polyanilinovou bázi. Polymerní povaha oxidačních produktů anilinu byla prokázána, až o mnoho desítek let později. Postupy vedoucí k syntéze polyanilinu byly popsány Honzlem a spol. již v roce 1968 (Prokeš, Stejskal, Omastová, 2001). Vzhledem ke své stabilitě, zpracovatelnosti koloidních disperzí a zajímavým redoxním vlastnostem spojené s heteroatomem dusíku, je polyanilin jedním z nejvíce rozsáhle studovaných vodivých polymerů v průběhu posledních deseti let (Kang, Neoh, Tan, 1998). Polyanilin se stal slibným polymerem z důvodu snadné syntézy a díky nízkým nákladům na výrobu monomeru (Bhadra et al., 2009).

#### 3.2 Formy polyanilinu

Polyanilin může existovat v několika formách, které se od sebe liší stupněm oxidace nebo protonace. Když odebereme či přidáme elektrony chemickou nebo elektrochemickou oxidací a redukcí získáme formy lišící se strukturou, stabilitou, zbarvením a elektrickými vlastnostmi (Stejskal). Asi nejzajímavější reakcí je protonace polyanilinu. Předáním protonu, organickou či anorganickou kyselinou, vzroste vodivost polyanilinu v rozmezí osmi až deseti řádů (Prokeš, Nešpůrek, Stejskal, 2001). Názvy forem, jako je leukoemeraldin, emeraldin a pernigranilin jsou v dnešní době používány i pro odpovídající polymery. Mezi nejběžnější formy patří zeleně zbarvená vodivá polyanilinová (emeraldinová) sůl a nevodivá, modrá báze. Při pH 5–6 dochází k přechodu mezi těmito formami a vodivost klesá z jednotek  $\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  na  $10^{-9} \text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  (Humpolíček et al., 2012a).



Obrázek 6 – formy polyanilinu (Stejskal)

### 3.2.1 Morfologie polyanilinu

V závislosti na podmínkách polymerace, můžeme získat produkty s různou morfologií (Stejskal). Existuje mnoho parametrů, které jsou důležité při kontrole morfologie a pH vodné reakční směsi je jedním z nejdůležitějších. Standardní polymerace produkuje tvar granulí. Pokud však polymeraci anilinu provedeme ve vodě nebo v mírně kyselém prostředí kyseliny octové, získáme v produktu z větší části podíl polyanilinových nanotrubic. pH se pohybuje z počáteční hodnoty 5 na konečnou hodnotu nižší než 2,5. Ty mají průměr 100–200 nm a délku až několik mikrometrů. Bylo také prokázáno, že přidavek organických rozpouštědel ovlivňuje morfologii PANI. Přechod z globulární struktury ve prospěch nanovláken a nanotrubic byl pozorován, když reakční směs obsahovala alkoholy, jako je metanol, etanol a další (Konyushenko et al., 2011). Vodivé polymery jsou proto zajímavé nejen svými elektrickými vlastnostmi, ale i díky nanostrukturám, které vytvářejí (Stejskal).

## 4 KOLOIDNÍ POLYANILIN

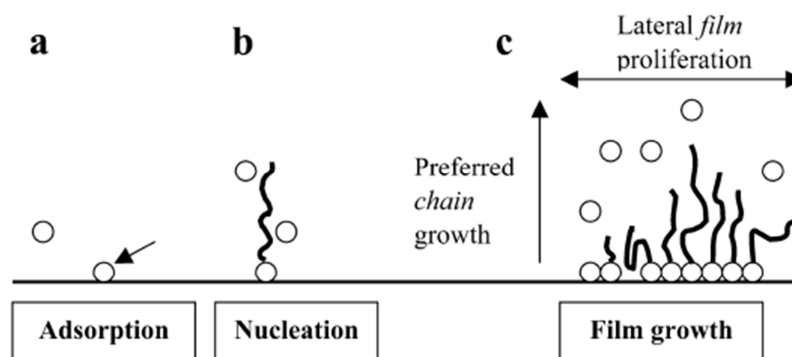
Vodivé polymery jsou v porovnání s jinými polymery obtížně zpracovatelné. V běžných rozpouštědlech se nerozpouštějí, pouze v koncentrovaných kyselinách. Nemůžeme je převést do taveniny a manipulace, například s kyselinou sírovou, přináší řadu technických potíží. Jednou z variant pro některé aplikace je využití vodných koloidních disperzí, které jsou obdobou polymerních latexů a je možno je využít pro přípravu vodivých polymerních filmů (Prokeš, Nešpůrek, Stejskal, 2001).

### 4.1 Tenké filmy a koloidní disperze

Oxidací anilinu v kyselém, vodném prostředí vznikají anilínové oligomery. Ty jsou mnohem více hydrofobní než anilínové kationty na počátku reakce. Mají tendenci oddělit se od vodného média například tím, že se adsorbují na dostupný povrch přicházející do styku s vodným roztokem reakční směsi. Tímto mechanismem vznikají anilínové filmy a koloidní disperze (Stejskal a Sapurina, 2005).

#### 4.1.1 Tvorba polymerních filmů

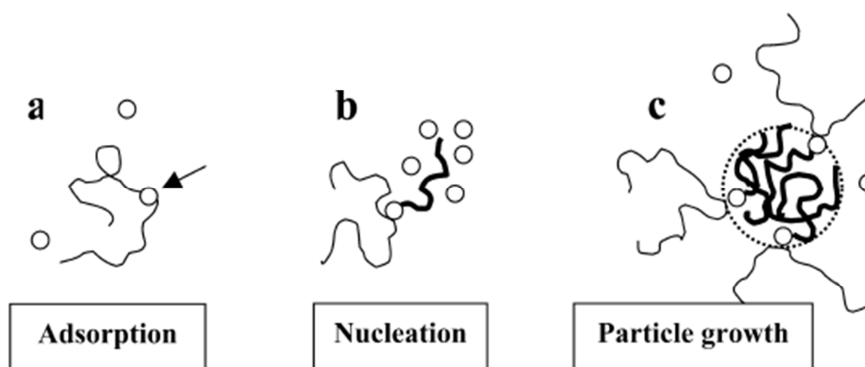
Adsorbované oligomery mají vyšší reaktivitu, což vede k zahájení růstu polyanilinových řetězců. Bylo skutečně pozorováno, že polymerace na povrchu předchází polymeraci v reakční směsi. První řetězec PANI zakotvený na povrchu vytváří jádro budoucího filmu. Jednotlivé oligomery jsou adsorbovány v blízkosti jádra a stimulují růst nových polyanilinových řetězců. Řetězce tvoří film podél povrchu a ze sterických důvodů jsou orientovány kolmo k podkladu (Stejskal a Sapurina, 2005).



Obrázek 7 – model tvorby filmu: a) adsorpce oligomerů na povrch, b) tvorba jádra, stimulace růstu PANI řetězců, c) růst filmu na povrchu (Stejskal a Sapurina, 2005)

### 4.1.2 Tvorba polyanilinových koloidů

Podobný koncept, jako pro tvorbu PANI filmů, je použitelný i pro vznik koloidních částic. Ty se vyrábějí polymerací anilinu v médiu, obsahující stabilizátor. Stabilizátorem je nejčastěji ve vodě rozpustný polymer. Oligomery adsorbují na stabilizátoru a vytvářejí PANI jádro. Tvorba nových oligomerů a polymerace probíhá v těsné blízkosti a polyanilinová částice roste. V některých dalších případech se stabilizační částice zachytí v rostoucích řetězcích, což vede k vytvoření skořápky, která zabraňuje agregaci částic (Stejskal a Sapurina, 2005).



Obrázek 8 – model tvorby koloidních částic: a) oligomery adsorbují na stabilizátoru, b) tvorba jádra, stimulace růstu PANI řetězců, c) další oligomery a nové řetězce jsou vyráběny v blízkosti jádra, koloidní částice roste (Stejskal a Sapurina, 2005)

## 4.2 Příprava polyanilinu

### 4.2.1 Standardní příprava PANI

Polyanilin se připravuje oxidací 0,2 M anilin hydrochloridu pomocí 0,25 M persíranu amonného ve vodném prostředí. 2,59 g (20 mmol) anilinu hydrochloridu se rozpustí v destilované vodě v odměrné baňce na 50 ml roztoku. Také se připraví 5,71 g (25 mmol) persíranu amonného v 50 ml vody. Oba roztoky jsou uchovány při pokojové teplotě po dobu jedné hodiny a poté jsou smíchány (Stejskal a Gilbert, 2002). Směs po chvíli postupně zmodrá vznikem anilinových oligomerů. Tvoří se pernigranilinová forma polyanilinu, která po dokončení polymerace přejde na tmavozelený emeraldin (Prokeš, Stejskal, Omasťová, 2001). Poté se nechají v klidu polymerovat. Vzniklá sraženina, která se promyje třemi podíly 100 ml 0,2 M kyseliny chlorovodíkové, se dále suší na vzduchu a pak ve vakuu při 60°C. Takto připravený polymer má konduktivitu 5 S.cm<sup>-1</sup> (Stejskal a Gilbert, 2002).

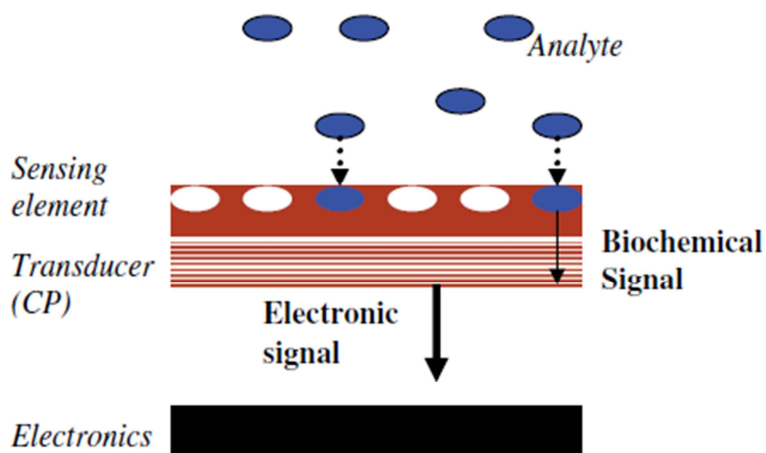
### 4.3 Vlastnosti a využití polyanilinu

Polyanilin je jedním z vodivých polymerů, pro nějž se hledalo využití především s ohledem na jeho schopnost reagovat změnou elektrické vodivosti na vnější podněty (např. změnou pH). Tato schopnost umožnila využití v oblastech senzorů, antikoročních nátěrů, u katalýzy organických reakcí či palivových článků. Velmi slibné je také využití polyanilinu v biomedicínských aplikacích. Výzkum a vývoj se zaměřuje především na regeneraci srdeční či nervové tkáně (Humpolíček et al., 2012a). Dále bych uvedla několik konkrétních případů využití polyanilinu, ať už přímo v průmyslu, nebo vědecké oblasti.

Velká možnost aplikací vyplývá z přítomnosti různých redoxních stavů a jejich přeměn. Tyto vlastnosti umožňují použití PANI v oblasti ochrany proti korozi, jako elektrody v akumulátorových bateriích a například pro fotoelektrické zařízení a světla (Kang, Neoh, Tan, 1998). Termomechanické vlastnosti je možné využít v různých sensorických systémech. Velká pozornost je také věnována schopnosti PANI absorbovat a odrážet elektromagnetické záření. Proto je PANI vhodným kandidátem pro stínění elektromagnetického záření, při využití mikrovlnných absorbérů. Za povšimnutí stojí také aplikace založené výhradně na elektrické vodivosti. Jsou to vodivé povlaky tzv. antistatické nátěry (Gospodionova a Terlemezyan, 1998). Dalším zajímavým využitím je vznik inteligentních košil, které mohou být použity ke sledování fyziologického stavu pacienta nebo vodivé polymerní suspenze vhodné k výrobě organických mikrostruktur pro mikroelektronické aplikace (Bhadra et al., 2009). Za účelem zlepšení vlastností a rozšíření využití, byly připraveny kompozity PANI, které přitáhly velkou pozornost. Kompozity, skládající se z PANI a jedné nebo více složek, jako jsou kovy, metaloidy, nekovy, anorganické i organické sloučeniny byly připraveny a charakterizovány mnoha výzkumnými skupinami (Ćirić-Marjanović, 2013). V posledních letech bylo prozkoumáno mnoho vlastností PANI, které podporovaly růst buněk. Vlastnosti, jako je biokompatibilita, vodivost, mechanická odolnost byly klíčové pro toto použití. Především studie biokompatibility vyvolala zájem využití PANI v tkáňovém inženýrství. V oblasti implantátů nebyl zaznamenán výrazný vznik zánětu nebo známky abnormalit svalových a tukových tkání. Ovšem několik studií uvedlo, že nemodifikovaný PANI prokazuje špatnou adhezi a růst buněk. Zlepšení vlastností polyanilinu, ale zároveň zachování jeho elektrických vlastností, jsou neustále předmětem výzkumu (Guimard, Gomez, Schmidt, 2007).

### 4.3.1 Biosenzory

Nebývalý zájem o rozvoj a využívání analytických přístrojů k detekci, kvantifikaci a sledování konkrétních chemických látek vedla ke vzniku biosenzorů (Gerard, Chaubey, Malhotra, 2002). Biosenzory slouží k monitorování a diagnostice metabolitů (např. glukózy, močoviny, hormonů, protilátek, antigenů atd.). První biosnímací zařízení bylo vytvořeno integrací enzymu do elektrody a během dvou desetiletí došlo k velkému pokroku, ať už v množství publikovaných článků nebo počtu aktivních výzkumníků, kteří se tímto tématem zabývají. Biosenzor se skládá ze snímacího prvku (tj. biomolekuly) a převodníku, který nakonec transformuje chemický signál na elektrický (Ahuja et al., 2007). Vodivé polymery jsou právě používány jako tyto převodníky. V závislosti, jak je chemický signál snímán a vyslán, můžeme biosenzory rozdělit do několika kategorií: ampérometrické, potenciometrické, konduktometrické, optické, kalorimetrické a další (Guimard, Gomez, Schmidt, 2007). PANI se stal zajímavým materiálem pro snímače a biosenzory, protože působí jako prostředník pro přenos elektronů v redoxních nebo enzymatických reakcích (Dhand et al., 2011). Slouží pro detekci molekul jako glukosaoxidasu nebo cholesterol oxidáza/esteráza (Guimard, Gomez, Schmidt, 2007).



Obrázek 9 – schéma biosenzoru (Guimard, Gomez, Schmidt, 2007)

## 5 TOXICITA MATERIÁLU

Toxicita je komplexní reakce organismu, u kterého dochází k přímému buněčnému poškození (Freshney, 2005). Cílem testování toxicity je získání informací, které pomohou určit bezpečnost nových produktů (Flint et al., 1998). *In vitro* testy, které identifikují nežádoucí změny buněčných systémů, se staly alternativou pro testy *in vivo*, kvůli snížení počtu pokusných zvířat (Mori a Hara, 2013). Ta jsou neustále podnětem mnoha diskuzí, jak z hlediska humánního, tak ekonomického (Freshney, 2005).

### 5.1 Cytotoxicita

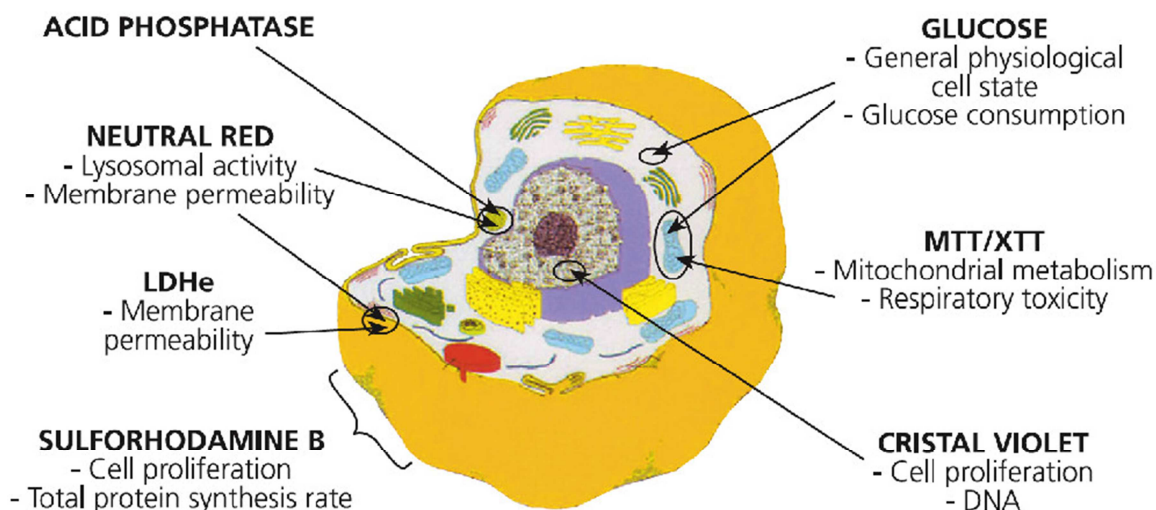
Definice cytotoxicity se liší v závislosti na povaze studie, a zda buňky odumírají nebo se mění jejich metabolismus. Pomocí testů cytotoxicity můžeme stanovit účinky na buněčné úrovni v *in vitro* systémech. Proto zavedení specializovaných buněčných linií a interaktivních orgánových kultur pro testování cytotoxicity má neodmyslitelný význam. Veškeré nové léky, kosmetika a potravinové přísady procházejí rozsáhlými testy cytotoxicity, než jsou propuštěny pro užívání veřejnosti (Freshney, 2005).

### 5.2 Testy cytotoxicity na buňkách pěstovaných *in vitro*

V posledních dvou desetiletích došlo k výraznému rozvoji a zdokonalení technik s embryonálními a dospělými kmenovými buňkami. Nedávné studie uvedly jejich nezastupitelné použití společně s buňkami nádorovými v *in vitro* testech cytotoxicity. Tyto aplikace nám poskytnou možnost posouzení toxických látek a popřípadě odhalit nové toxické a vývojové účinky (Mori a Hara, 2013). Například v počáteční fázi farmaceutického zkoumání, kdy známe velmi málo vlastností o nové sloučenině, je velmi vhodné provedení těchto testů (Flint, 1998). Obecně vývoj léčiv je časově a finančně náročný proces. A proto identifikace nepříznivých účinků v co nejranější fázi je rozhodující (Wiesinger et al., 2012). Ve většině případů jsou buňky inkubovány v multi-jamkových destičkách. Poté množství přežitých buněk za přítomnosti studované látky je odvozeno jako míra cytotoxicity (Mori a Hara, 2013). Volba testu bude záviset na povaze studie, na přirozené zpětné reakci a na konkrétních cílových buňkách (Freshney, 2005). Dále bych uvedla několik kritérií, podle kterých je hodnocena cytotoxicita materiálu.



## Cytotoxicity Test Systems



Obrázek 10 – schéma buňky a jejích organel užívané k měření cytotoxicity (Xenometrix IN CYTOTOX – Cytotoxicity Screening Test Systems, ©2014)

### 5.2.1 Viabilita

Testy životaschopnosti (viability) se používají k měření podílu živých buněk například po primárním rozčlenění nebo separaci buněk (Freshney, 2005). Většina testů je založena na metabolické aktivitě a integritě membrány. Používají se barviva, která se mohou vázat na lipidovou dvojvrstvu nebo na intracelulární proteiny (Juan-García et al., 2013). Porušením membrány dojde v buňce k zachycení barviva (trypanová modř) nebo propuštění barviva, které bude v buňce zadržováno (diacetyl fluorescein), (Freshney, 2005).

### 5.2.2 Proliferace

Proliferační testy založené na použití buněčných linií jsou nejpoužívanější testy *in vitro* pro stanovení vlastností sloučenin (Wang Si et al., 2012). Sledování proliferace buněk je nezbytná pro celou řadu aplikací, včetně optimalizace podmínek buněčné kultivace nebo stanovení aktivity cytokinů a růstových faktorů. Měření je velmi užitečné například v oblasti protinádorových léčiv (Cell Proliferation Assays, ©2004–2014). Například Coomassie Brilliant Blue (CBB) je test, který nám určí nárůst buněk změřením celkové koncentrace proteinů (Lü et al., 2007). Dále se třeba měří poměr ATP/ADP, který vykazuje energetický stav buňky (Fiore et al., 2001).

### 5.2.3 Metabolická aktivita

Detekce metabolické aktivity naznačuje absenci buněčného vymírání. Veškeré činnosti jako je enzymatická aktivita, aktivní transport, respirační činnost, biosyntéza makromolekul svědčí o přítomnosti metabolicky aktivních buněk (Juan-García et al., 2013). Tyto testy jsou alternativou k testům viability a díky funkci mitochondriálních dehydrogenáz dochází k redukci tetrazoliových solí (Berridge et al., 1996). Mezi tyto testy můžeme zařadit test MTT, XTT, WST-1, které jsem hlouběji popsala v kapitole 6.

### 5.2.4 Detekce genové exprese

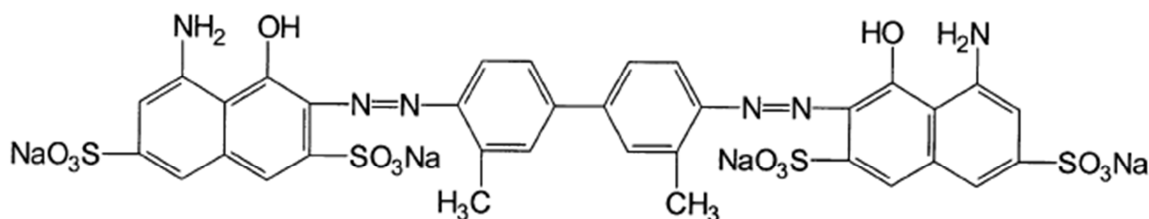
V roce 1990 byly vyvinuty DNA čipy (DNA microarray) jako nové experimentální technologie, které umožnily komplexní měření úrovně genové exprese stovek genů současně (Hanai, Hamada, Okamoto, 2006). Čipy jsou tvořeny pevným podkladem, který je tvořen skleněným, křemíkovým sklíčkem nebo nylonovou membránou. Na tento podklad je fixováno několik tisíc oligonukleotidů DNA. Při kontaktu destičky se vzorkem, oligonukleotidy začnou hybridizovat s komplementárními sekvencemi na čipu (Donatin a Drancourt, 2012). Pomocí fluorescenčních barviv je zjištěno, kde došlo k hybridizaci a jaké nukleotidy vzorek obsahoval (Charalambous a Matsopolous, 2013). Tato technologie našla uplatnění jak v oblastech molekulární biologie, v mikrobiální oblasti, bioinženýrství, v lékařských oborech, v oblastech toxicity a mnoha dalších (Hanai, Hamada, Okamoto, 2006). Pomocí DNA microarrays například zjistíme, jaký vliv má toxická látka na průběh genové exprese (Ju, Wells, Walter, 2007).

## 6 METODY TESTOVÁNÍ BUNĚČNÉ TOXICITY

### 6.1 Testy viability

#### 6.1.1 Testování trypanovou modří

Živé a mrtvé buňky můžeme rozlišit barvením pomocí trypanové modří. Spolu s barvením fluoreskujícím propidium jodidem se tato metoda stala nejčastěji používanou pro hodnocení viability. U buněk s porušenou plazmatickou membránou dochází k prostoupení barviva a tím k obarvení buňky, nepoškozené buňky zůstávají neobarvené. Pro vstup barvy musí být buněčná membrána značně poškozená, buňka je obarvena do modra (Testy cytotoxicity, ©2014).



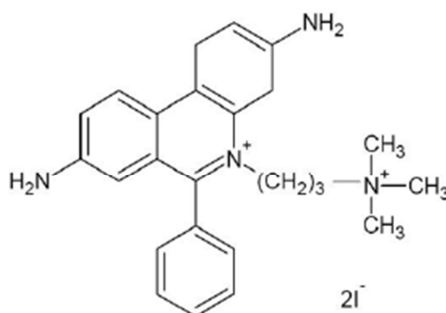
Obrázek 11 – struktura trypanové modří (Wollensak, Spörl, Pham, 2004)

V *in vitro* studii Rezai et al. (2004) byl zkoumán účinek trypanové modří na lidské buňky epitelu sítnice. Buňky byly inkubovány s trypanovou modří o koncentraci 0,5 %, 0,1 %, 0,05 % po dobu 5 až 30 minut. Kultivační médium bez barviv sloužilo jako kontrola. Nicméně, všechny koncentrace trypanové modří vyvolaly apoptózu. Mezi nevýhody této metody patří silné cytotoxické účinky, které trypanová modř vykazuje, hodnocení musí být ukončeno do 5 minut, od přidání látky, jinak začne trypanová modř prostupovat do živé buňky (Altman, Randers, Rao, 1993). Metoda je rychlá a jednoduchá, při hodnocení je používán světelný mikroskop (Kružík, Moos, Vlček, 2006).

#### 6.1.2 Testování propidium jodidem

Pokud je buněčná stěna porušená, mohou do ní projít látky, které se navážou na složky buněčné hmoty a dojde k zesílení nebo posunu spektra fluorescence. Výhradně se využívají látky, které se v buňce vážou na nukleové kyseliny, neboť ty se vyskytují ve všech buňkách v dostatečném množství. Do této skupiny můžeme zařadit vůbec nejrozšířenější fluorescenční sondu propidium jodid. Jde o činidlo, které se váže na nukleové kyseliny a

po vazbě dojde k posunu a zesílení intenzity fluorescence emitované v červené oblasti spektra (Branská et al., 2011).



Obrázek 12 – strukturní vzorec propidium jodidu (Branská et al., 2011)

### 6.1.3 LDH test

LDH neboli laktát dehydrogenáza je enzym, který je rozpustný v cytosolu většiny eukaryotických buněk a rychle se uvolňuje do buněčného kultivačního média po poškození plazmatické membrány (LDH – Cytotoxicity assays, ©2014). Z tohoto důvodu je stanovení LDH široce využíváno jako kvantitativní zkouška toxicity různých molekul a léků. Tato metoda probíhá jako dvoustupňový proces, kdy v prvním kroku LDH katalyzuje redukcí  $\text{NAD}^+$  na  $\text{NADH}$  a  $\text{H}^+$  a oxidaci laktátu na pyruvát. V druhém kroku enzym diaforáza využívá nově vytvořený  $\text{NADH}$  a  $\text{H}^+$  k redukcí tetrazoliové soli INT na červeně zbarvenou formazanovou sůl. Množství vytvořeného formazanu je úměrné počtu lyzovaných buněk. Formazan je ve vodě rozpustný a má široké spektrum absorpce s maximem přibližně 490 nm, zatímco tetrazoliová sůl před redukcí nemá žádnou specifickou absorpční vlnovou délku (Wang Gang et al., 2012). V práci Han et al. (2011) je pomocí testu LDH posuzována toxicita nanočástic. Dále například Lobner (2000) ve svém článku srovnává metodu MTT a LDH při neuronální apoptóze vystavené látkám staurosporin nebo nifedipin. Metoda se stala široce využívanou pro svoji spolehlivost, rychlost a jednoduché vyhodnocení (Fotakis a Timbrell, 2006).

## 6.2 Testy metabolické aktivity

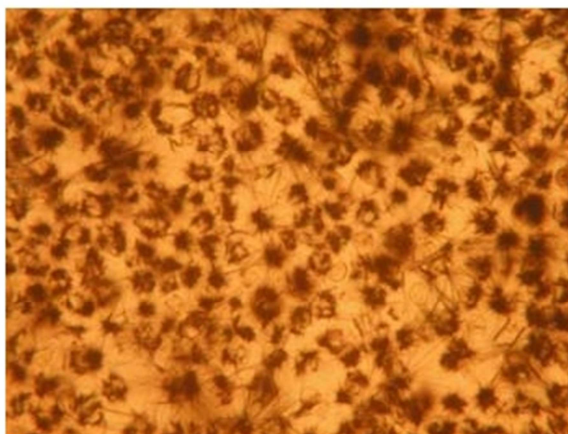
### 6.2.1 XTT test

Oba testy, jak MTT tak XTT, jsou si velmi podobné a používají se k odhadu životaschopných buněk. Jsou založeny na aktivitě mitochondriálních dehydrogenáz přítomných v

živých buňkách (Wang, Yu, Wicklife, 2011). Redukcí tetrazoliové soli XTT [(2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) pomocí metabolicky aktivních buněk vzniká oranžový, ve vodě rozpustný formazan (Chaieb et al., 2011). Dále například ve srovnání s testem MTT je XTT tetrazoliová sůl méně cytotoxická pro životaschopné buňky. Metoda se stala široce využívanou v oblasti imunologie a výzkumu rakoviny. Redukce XTT bylo poprvé popsáno jako citlivý indikátor pro metabolickou činnost srdečního svalu nebo srdečních chlopní při biopsii (Lu et al., 1997). Stevens a Olsen (1993) uvádí, že test XTT je stejně účinný jako test MTT, ale rychleji a snadněji se provádí.

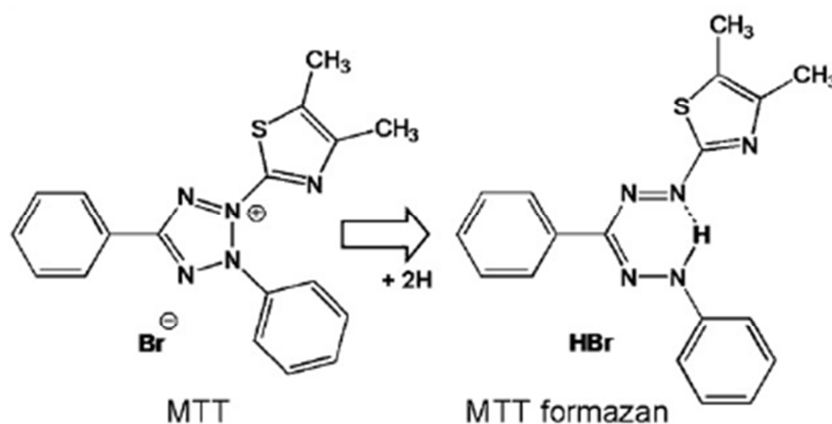
### 6.2.2 MTTtest

MTT [3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-difenyltetrazoliumbromid] je žlutá ve vodě rozpustná tetrazoliová sůl, která se používá pro měření počtu metabolicky aktivních buněk v *in vitro* testech. Metoda je založena na redukci žlutého MTT, který může do buňky přecházet prostřednictvím endocytózy a v mitochondriích je převeden na nerozpustný formazan (fialové krystalky hvězdicového tvaru), (Lü et al., 2012). Formazan se rozpustí přidáním silného detergentu a zbarvení se vyhodnocuje spektrofotometricky při vlnové délce 570 nm. Množství formazanu závisí na řadě parametrů, včetně počáteční koncentrace použitého MTT a také na fyziologických vlastnostech buněčné linie (Young, Phungtamdet, Sanderson, 2005). Po vyhodnocení je množství formazanu přímo úměrné metabolicky aktivním buňkám (Lü et al., 2012).



Obrázek 13 – MTT test po izolaci nádorových buněk (MTT test, ©1998)

Metoda MTT byla představena Mosmannem v roce 1983 jako tzv. kolorimetrický test. Do laboratorní praxe byl zaveden pro posouzení potenciálu nových protinádorových látek (Ciapetti et al., 1993). Nejen životaschopnost buněk, ale také lokalizace formazanu, která je stále nejasná, je hlavní náplní studie Stockert et al. (2012). Lokalizace byla studována přímým mikroskopickým pozorováním živých buněk HeLa a pomocí fluorescenčních sond. Granule formazanu nebyly zaznamenány v mitochondriích, ale po ošetření buněk slunečnicovým olejem, byly odhaleny v lipidových kapičkách. Tato metoda byla rozšířena a zlepšena několika autory (Aziz, Ahlswede, Enbergs, 2005). Dále pak v této studii Aziz, Ahlswede, Enbergs (2005) bylo zjištěno, že zkouška MTT je spolehlivou metodou pro odhad procenta životaschopných spermií u člověka a prasat. Dále pak v práci Scherließ (2011) bylo prokázáno, že MTT test je vhodný a citlivý pro stanovení akutní toxicity pomocných látek v *in vitro* systému založený na buňkách calu-3, které představují dobrý model pro epiteliální buňky dýchacích cest. V článku Huveneers-Oorsprong, Hoogenboom a Kuiper (1997) bylo metody MTT využito ke studiu toxicity veterinárních léčiv pomocí primárních kultur hepatocytů prasat. Autoři Žaloudík et al. (2000) uvádějí orientační informace o stupni chemorezistence *in vitro* u 60 primárně resekovanych bronchogenních karcinomů, karcinomů kolorekta a sarkomů měkkých tkání s využitím technologie primokultivace a MTT testu. Tato metoda se rozšířila ve vědecké sféře díky její přesnosti a rychlosti při měření životaschopných buněk. Stala se důležitou například při kvantifikaci lymfokinů, při testování chemosenzitivity pomocí protinádorových činidel a obecně pro měření růstu buněk. V poslední době je stále více využívána při měření cytotoxicity biomateriálu (Ciapetti et al., 1993).



Obrázek 14 – chemická struktura MTT a jeho redukováná forma formazanu (Stockert et al., 2012)

### 6.2.3 WST-1 test

WST-1 je jedním z testů metabolické aktivity, který využívá redukci tetrazoliové soli WST-1 (4-[3-(4iodophenyl)-2-(4nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3- benzenedisulfonate) na rozpustný formazan. Redukce probíhá díky metabolicky aktivním buňkám a umožňuje přímé měření jejich životaschopnosti a proliferace (WST-1 Cell Viability & Proliferation Assay, ©2014). Metoda WST-1 má několik výhod ve srovnání s dalšími dvěma tetrazoliovými solemi MTT a XTT. MTT je tradiční test proliferace buněk, ale nevýhodou je, že se štěpí na ve vodě nerozpustné krystaly formazanu, které musí být před měřením rozpuštěny. WST-1 stejně jako XTT činidlo, je rozpustné ve vodě, takže není potřeba provádět rozpouštěcí krok. Dále metoda WST-1 je mnohem stabilnější než metody MTT a XTT a je možné jej skladovat při teplotě 2–8 °C po dobu několika týdnů, aniž by došlo k významné degradaci (Fritz, 2007). Kolorimetrický test WST-1 je vhodný například pro stanovení glukózy-6-fosfát (G6P). Tento test je založený na oxidaci G6P v přítomnosti glukózy-6-fosfát dehydrogenázy a NADPH, tím dochází k redukci tetrazoliové soli WST-1 na rozpustný formazan žluté barvy. Užitečnost testu se projevuje při přesném měření koncentrace G6P ve fetálním hovězím séru (Zhu, Romero, Petty, 2011).

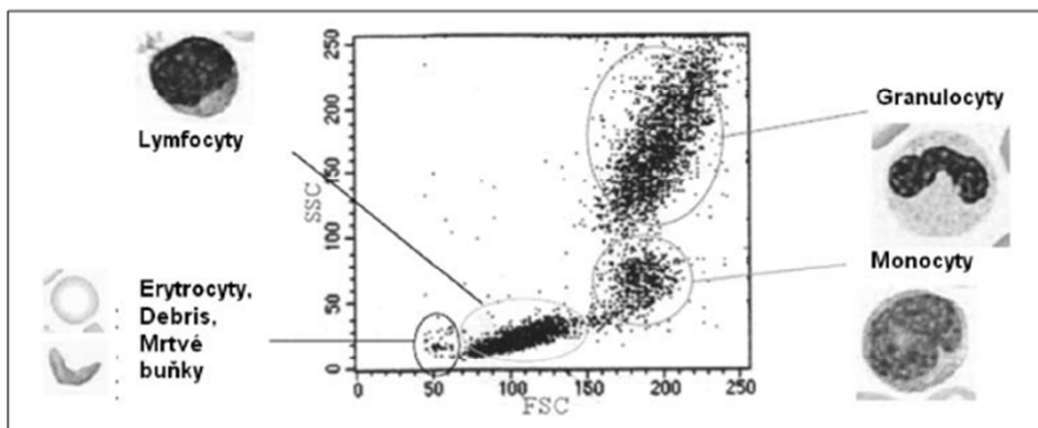
## 6.3 Testy na apoptózu

### 6.3.1 Průtoková cytometrie

Cytometrie zahrnuje metody měření fyzikálních nebo chemických vlastností buněk. Průtoková cytometrie je proces, ve kterém jsou tato měření prováděna, zatímco buňky prochází prostřednictvím měřicího přístroje v proudu nosné kapaliny (Mandy, Bergeron, Minkus, 1995). První prototyp průtokového cytometru byl sestaven v roce 1934 Andrew Moldavanem (Roubalová, 2012). V sedmdesátých letech se objevily první komerčně vyráběné průtokové cytometry, ale nevýhodou byla vysoká cena a náročná obsluha. V následujících letech, díky objevu fluorescenční mikroskopie, zažila průtoková cytometrie prudký rozvoj. Dnes můžeme říci, že tento přístroj je běžnou součástí většiny klinických laboratoří (Mandy, Bergeron, Minkus, 1995). Metoda využívá rozptylu světla, excitace a emise fluorchromních molekul k získání dat z mikroskopických částic a buněk. Buňky jsou značeny specifickými fluorchromy a jsou koncentrovány do tenkého proudu v kapiláře, kde protékají vysokou rychlostí. V kapiláře jsou ozařovány monochromatickým koherentním zářením, které produkuje laser (Slaninová, Slanina, Táborská, 2008). Přednost této metody

spočívá v rychlosti analýzy jednotlivých částic. Výhodou je také jednoduchá příprava vzorků a možnost provedení, jak kvalitativní, tak kvantitativní analýzy (Šinkorová a Zárybnická, 2008).

Průtokový cytometr se stal nepostradatelným nástrojem pro lékařský výzkum a to zejména v oblasti imunologie, hematologie a nádorové biologie. Pomocí něj můžeme měřit komplexní buněčné směsi s vynikající citlivostí a specifíčností (Tarrant, 2005). Například viry, chromozómy, fragmenty DNA a mnohé jiné. V klinické praxi je nejčastějším materiálem k analýze krev, kostní dřeň, buněčné kultury a další. V klinické imunologii se průtoková cytometrie používá k imunofenotypizaci lymfocytů, testování alergie atd. V nádorové biologii například k analýze buněčného cyklu, buněčné proliferaci, detekci apoptózy a sledování průniku léčiv do buněk (Roubalová, 2012). V článku Combrier et al. (1990) autoři srovnávají metodu průtokové cytometrie s dalšími metodami při posuzování *in vitro* toxicity xenobiotik. Dále například studie Xian et al. (2012) se zabývá studiem *in vitro* toxicity dusitanů na haemocyty garnátů. Průtoková cytometrie, která analyzuje jednotlivé buňky v krátké době, může poskytnout objektivní, reprodukovatelnou a citlivou charakteristiku velkého počtu haemocytů.



Obrázek 15 – dot-plot histogram suspenze buněk periferní krve (Roubalová, 2012)



## 7 KULTIVACE BUNĚČNÝCH KULTUR

### 7.1 Základy buněčných kultur

Proces kultivace buněčných kultur je metoda, při které jsou buňky pěstovány za kontrolovaných podmínek. Pro výrobu buněčných kultur jsou používány lidské, zvířecí nebo hmyzí buněčné linie (Houp, 2008). V dnešní době mají buněčné kultury celou řadu využití, především ve výrobě a hlavně slouží jako materiál pro výzkum. Ve srovnání s jinými typy biologických modelů jako jsou laboratorní zvířata, či lidské orgány, mají buněčné kultury v experimentální sféře nenahraditelné využití. Velkou výhodou buněčných kultur je jejich jednoduché namnožení do požadovaného množství a kultivace, což jiné biologické modely neumožňují (Vejška).

### 7.2 Kultivace buněčných kultur a kultivační média

*In vitro* pěstovaným buňkám je potřeba pro přežití a proliferaci zajistit vhodné podmínky, mezi které patří povrch kultivační nádoby, složení kultivačního média a další vlastnosti jako je teplota, pH, či složení atmosféry (Vejška). Kultivační média jim zajišťují živiny a všechna obsahují základní aminokyseliny, vitamíny, anorganické soli, glukózu, pyruvát a linolovou kyselinu. Médium je nutno doplnit 5–10 % krevního séra, které obsahuje růstové faktory. Při přípravě kultivačního média je potřeba dodržovat optimální podmínky, mezi které patří osmolarita, pH (7,4) a atmosféra musí obsahovat kromě kyslíku také oxid uhličitý, který hraje důležitou úlohu při udržování pH kultivačního média. Pěstované buňky se množí, vyčerpávají živiny a proto je po určité době potřeba přesadit (pasážovat) do čerstvého média. Buňky se od podkladu uvolní (mechanicky nebo enzymaticky pomocí trypsinu nebo kolagenázy) a jejich část se znovu nasadí do kultivační nádoby. Buněčné kultury je možno zmrazit a neomezeně skladovat (Nečas et al., 2000).

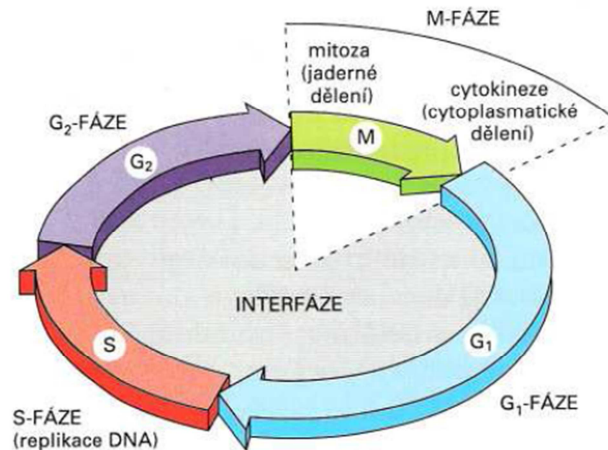
#### 7.2.1 Adheze buněk

Většina buněčných kultur je adherentní, tj. buňky rostou na vhodném povrchu kultivační nádoby v jedné vrstvě. Nejčastěji se používají nádoby z polystyrenu, jejichž povrch je různě upraven. Pro nádorové linie jsou vhodné pro adhezi elektrostaticky nabitě plasty. Různé typy buněčných linií vyžadují fixaci na substrát např. kolagen, laminin, elastin apod. Některé buňky, zejména krevního původu, je naopak nutné pěstovat v suspenzi. Buňky v suspenzi se udrží díky neustálému promíchávání kultury. Nádoby, ve kterých se

buňky kultivují, jsou umístěny na kývací míchačce. Dále je možné také využít válcové nádoby, které se otáčejí kolem vodorovné osy (Vejražka). Buňka je schopna adherovat k nebiologickým substrátům (sklo, plastik aj.), je to dáno vlastnostmi cytoplasmatické membrány nebo buněčného povrchu, která v místech kontaktu vylučuje ECM. Tři hlavní třídy transmembránových proteinů se podílejí na adhezi buněk k substrátu. Je to adheze buňka-buňka, tuto interakci zprostředkovávají kadheriny. Interakci buňka-substrát zprostředkovávají integriny. Třetí skupinou molekul buněčné adheze jsou transmembránové proteoglykany, ty také reagují s buněčnou matrix společně s dalšími proteoglykany nebo kolagenem (Freshney, 2005).

### 7.3 Buněčná proliferace

Všechny živé organismy od jednobuněčných bakterií po mnohobuněčné živočichy jsou výsledkem neustálého buněčného dělení a růstu. U každé buňky musí dojít ke zdvojení vnitřní hmoty a následného rozdělení buňky mateřské na dvě buňky dceřiné. Tento děj je známý jako buněčný cyklus. Nejdůležitější proces v buněčném cyklu je dělení jádra (proces zvaný mitóza) a dělení buňky (proces zvaný cytokineze). Jak proces mitózy, tak cytokineze spolu tvoří M fázi buněčného cyklu. Obdobím mezi dvěma mitózami se nazývá interfáze a je rozděleno do dalších tří fází, jsou to  $G_1$ , S a  $G_2$  fáze. Během  $G_1$  fáze buňka roste, dochází k tvorbě nukleotidů, proteinů a dalších organel, aby mohlo dojít k replikaci DNA. Následující fází je S fáze, kde hlavním úkolem je replikovat jadernou DNA. V  $G_2$  fázi musí dojít k tvorbě veškerých organel ve dvojnásobném množství, aby po rozdělení vznikly dvě plnohodnotné buňky (Alberts, 2001). Fáze  $G_1$  a  $G_2$  jsou zakončeny kontrolním uzlem, který má zjistit, zda je buňka připravena vstoupit do další fáze buněčného cyklu. Například důležitým bodem v  $G_1$  fázi je tzv. kontrolní uzel, který dokáže uvést dělení do  $G_0$  fáze, ve kterém se buňka nebude připravovat na dělení (Freshney, 2005).



Obrázek 16 – čtyři po sobě jdoucí fáze buněčného cyklu (Alberts, 2001)

### 7.3.1 Kontrola buněčné proliferace

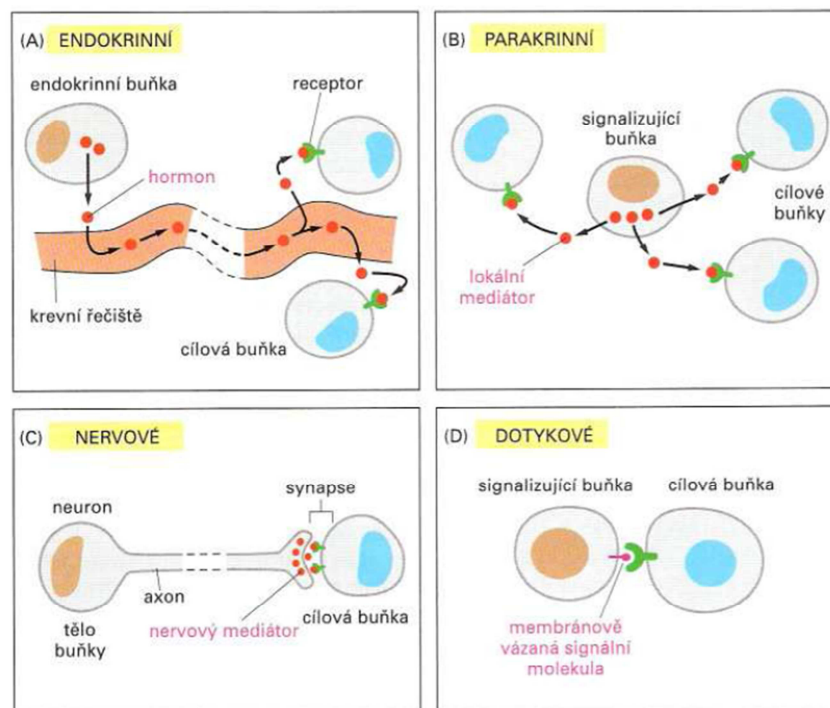
Průběh buněčného cyklu je řízen *systemem regulace buněčného cyklu*. Tento systém musí ve správné době aktivovat a deaktivovat jednotlivé kroky cyklu a je to uskutečňováno pomocí enzymů a různých proteinů. Musí také zajistit, aby každý krok cyklu byl dokončen dříve, než buňka postoupí do další fáze. Tento systém také zahrnuje kontrolu, zda buňka zahyne procesem zvaným programovaná buněčná smrt (apoptóza). Fosforylační reakce patří k nejčastějším způsobům, jakým buňka mění aktivitu proteinu. Tyto reakce provádí skupina proteinkináz, které jsou aktivovány v určité době cyklu a poté jsou opět rychle deaktivovány. Proteinkinázy jsou aktivovány pomocí cyklinů a proto se kinázy systému regulace buněčného cyklu nazývají cyklin-dependentní proteinkinázy (Cdk), (Alberts, 2001).

## 7.4 Diferenciace buněk

Diferenciace je proces, při kterém z nesespecializované buňky (např. embryonální, kmenové buňky) vznikají buňky strukturně i funkčně specializované. Takové buňky se nazývají diferenciované. Spousta diferenciovaných buněk nemá schopnost se samy dělit, a proto musí neustále docházet k jejich obnově. Do této skupiny buněk patří například červené krvinky, povrchové epidermální buňky a další. Buňky kmenové, které ještě nemají svoji specializaci, se vyskytují ve tkáních společně s buňkami diferenciovanými. Zvláštním případem jsou buňky krvetvorby, kdy všechny rozdílné typy vznikají z jediné hematopoetické kmenové buňky (Nečas et al., 2000).

## 7.5 Buněčná signalizace

Přenos signálu je jedním ze základních procesů v živých buňkách. Každá buňka potřebuje vnímat své okolí, aby mohla odpovídat na podněty. Různé druhy mechanismů zajistí, že se buňka přizpůsobí prostředí, ve kterém se vyskytuje. Na signál, který buňka přijímá, reaguje odpovědí, která může být v podobě proliferace, diferenciaci nebo tato informace vede až k buněčné smrti. Proto signální mechanismy, které jsou přítomné v buňce, hrají hlavní roli ve všech fázích života (Dhanasekaran, 1998). Signál je produkován signalizující buňkou, která určitou informaci předává cílové buňce prostřednictvím receptorového proteinu. Jakmile signál doputuje k cílové buňce, ta jej rozpozná a specificky na něj odpoví. Přicházející (=extracelulární) signál je převeden na signál intracelulární (Alberts, 2001). V plazmatické membráně se nacházejí skupiny receptorových proteinů, na které se váží signální molekuly neboli ligandy. Tato signální molekula se váže na extracelulární doménu v membráně a navázání způsobí konformační změnu, která v konečném důsledku vyvolá buněčnou odpověď (Lodish, 2008).



Obrázek 17 – formy signálu (Alberts, 2001)

### 7.5.1 Typy přenosu signálu

Jednou z nejrozšířenějších cest přenosu signálu je endokrinní signalizace. Signální molekulou jsou hormony, které jsou uvolněny do krevního řečiště a jsou produkovány endokrinními buňkami. Dalším typem je parakrinní signalizace, kdy signální molekuly působí jako lokální mediátory. Tyto signální molekuly difundují extracelulárním médiem a přenášejí signál na buňky v nejbližším okolí. Dalším způsobem komunikace je neuronová signalizace. Tento typ signalizace funguje na velké vzdálenosti a zprávy jsou předávány velmi rychle. Jakmile dojde k aktivaci neuronu od ostatních nervových buněk, popřípadě z okolí, signál se šíří pomocí elektrických impulsů až ke konci axonu (= dlouhý výběžek neuronu). Každý tento signál je převeden na chemickou formu, kdy je do synaptické štěrbině uvolněn nervový mediátor. Nejdokonalejším způsobem komunikace je přenos signálu přímým kontaktem. V plazmatické membráně je ukotvena signální molekula, která je předána cílové buňce. Tato buňka má v plazmatické membráně receptory, pomocí kterých tuto informaci zachytí (Alberts, 2001).

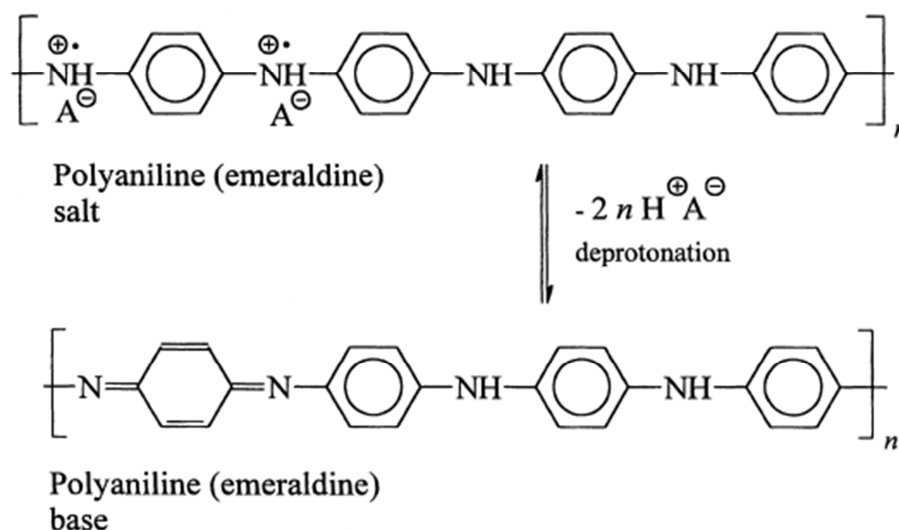
## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 8 MATERIÁL A METODIKA

### 8.1 Příprava koloidního PANI

V experimentální části jsem použila jako výchozí látku koloidní polyanilin, připravený na Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd v Praze a to RNDr. Jaroslavem Stejskalem podle postupu IUPAC.

Příprava koloidního polyanilinu se provádí oxidací anilin hydrochloridu ( $0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ ) persíranem amonným ( $0,25 \text{ mol.l}^{-1}$ ) v přítomnosti stabilizátoru. Jako stabilizátor byl použit poly(N-vinylpyrrolidon), (PVP;  $M_r = 360\,000$ ). Anilin hydrochlorid (259 mg) se rozpustí ve vodném roztoku PVP. Polymerace je zahájena při pokojové teplotě ( $20^\circ\text{C}$ ) přidáním 5 ml vodného roztoku, který obsahuje 571 mg persíranu amonného. Směs je krátce míchána a ponechána v klidu k polymeraci. Polymerace je dokončena během několika minut. Polyanilinová disperze připomíná roztok, který lze libovolně ředit. Zelené zbarvení zředěné kyselé disperze přechází po alkalizaci hydroxidem amonným na modré, které odpovídá polyanilinové bázi (Stejskal a Sapurina, 2005).



Obrázek 18 – přechod polyanilinové soli v alkalickém prostředí (např. hydroxid amonný) na polyanilinovou bázi (Stejskal a Gilbert, 2002)

Před samotným testováním buněk jsme pomocí pH metru inoLab® pH 7310 (WTW, Německo) a elektrody SenTix® Mic-D (WTW, Německo) hodnotili pH koloidního polyanilinu. Připravili jsme si dva vzorky a po změření počáteční hodnota pH činila 2,174 a 2,153. pH ovlivňuje interakce buněk a proto je nutné jej upravit. V našem případě jsme pH pozměnili pomocí dvou látek a to  $\text{NaHCO}_3$  a  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Upravením pH jsme dostali báze koloidního polyanilinu a u prvního vzorku jsme úpravou  $\text{NaHCO}_3$  dostali hodnotu 7,288 a u druhého vzorku úpravou  $\text{NH}_4\text{OH}$  hodnotu pH 7,240. Získané vzorky byly poté naředěny na potřebnou koncentraci a napipetovány na jednotlivé pláty s buňkami.

## 8.2 Informace o použitých buněčných liniích

V rámci mé práce byla použita buněčná linie NIH/3T3, což je linie myších fibroblastů. Jako kultivační médium bylo využito Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM (PAA) s vyšším obsahem glukózy. Toto médium je modifikací základního média Eagle (BME), obsahující různé koncentrace aminokyselin, vitamínů a dalších komponent. Původní formulace obsahovala 1000 mg/l glukózy a byla použita pro kultury embryonálních buněk myší. Od té doby byla upravena několika způsoby pro podporu růstu primární kultury myších a kuřecích buněk. Každá z těchto médií nabízí různé kombinace L-glutaminu a pyruvátu sodného. Kromě toho, byla hladina glukózy zvýšena na 4500 mg / l, což je vyjádřeno v názvu "DMEM /High" (DMEM: Classical Media and Salts, ©2014). K médiu se přidává 10% calf sérum a antibiotika, konkrétně Penicilin/Streptomycin, 100 U/ml (100 µg/ml), (PAA Laboratories GmbH, Austria).

### 8.2.1 Podmínky kultivace

Buňky byly kultivovány v polystyrenových kultivačních nádobách, přičemž ideální podmínky byly zajištěny pomocí inkubátoru Heracell 150i (ThermoScientific, USA). Buňky se kultivují při teplotě 37°C a využívá se atmosféry s 5% příměsí  $\text{CO}_2$  za konstantní relativní vlhkosti.



## 8.3 Experiment

### 8.3.1 Trypsinizace a prekulivace

Před zahájením samostatného testu je potřeba provést prekulivaci buněk, a to z důvodu fyziologických parametrů. Před započítáním práce byl stav zkontrolován pomocí světelného mikroskopu s fázovým kontrastem Olympus CKX 41 (Olympus, Japonsko). Prekulivace probíhala následovně: nejprve bylo z nádoby s buňkami co nejdokonaleji odsáto kulturační médium. Poté se zbytky média a séra odstranily opatrným opláchnutím 15 ml PbS ( $0,2 \text{ ml/cm}^2$ ), po důkladném opláchnutí bylo opět provedeno odsátí. Dále bylo do kulturační nádoby přidáno 7,5 ml serinové proteázy trypsinu ( $0,1 \text{ ml/cm}^2$ ). Ten se nechal působit za průběžného kontrolování pod mikroskopem Olympus CKX 41 v inkubátoru Heracell 150i až do důkladného oddělení buněk, nejdéle však 20 minut. Po oddělení buněk bylo do kulturační nádoby přidáno stejné množství média jako trypsinu, a to 7,5 ml. Následně byly buňky převedeny pomocí pipety do zkumavky vhodné pro centrifugaci. Centrifugace probíhala v centrifuze Eppendorf 5702 R (Eppendorf, Německo) při teplotě  $37^\circ\text{C}$ , rychlosti 1100 rpm po dobu tří minut. Po uplynutí tří minut byly buňky vydělány z centrifugy a bylo patrné, že jsou koncentrovány ve spodní části zkumavky. Médium bylo odsáto a přibližný počet buněk  $2 \cdot 10^7$  bylo poté možno naředit pomocí kulturačního média na požadovanou koncentraci  $1 \cdot 10^5$  buněk/ml. Buňky byly rozpipetovány do 96 jamkových polystyrenových testovacích plátů. Do každé jamky bylo nepipetováno 100  $\mu\text{l}$  a buňky byly poté ponechány v inkubátoru Heracell 150i po dobu 24 hodin.

### 8.3.2 Přidání potenciálně toxické látky

Následující den, po dostatečné prekultivaci, bylo ze zaplněných jamek odsáto veškeré médium. Po úpravě pH koloidního polyanilinu pomocí  $\text{NaHCO}_3$  a  $\text{NH}_4\text{OH}$  byly následně k buňkám přidány různé koncentrace koloidního polyanilinu a to v množství 100  $\mu\text{l}$ . Každá koncentrace vždy po čtyřech jamkách v řadě. Koloidní polyanilin pozměněný pomocí  $\text{NaHCO}_3$  byl naředěn v následujících koncentracích: 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,075%, 0,05%, 0,025%, 0,01%. Dále pak pozměněný pomocí  $\text{NH}_4\text{OH}$  byl naředěn koncentracemi: 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,075%, 0,05%, 0,025%, 0,01%. Tyto koncentrace jsme naředili pomocí čistého média a jako příklad bych uvedla ředění 10% koloidu, který jsme získali smícháním 300  $\mu\text{l}$  100% koloidu a 2700  $\mu\text{l}$  média. U obou měření bylo pak vždy do jedné čtveřice napipetováno čisté médium v množství 100  $\mu\text{l}$ , ty nám posloužily jako vzorky referenční. Po přidání všech koncentrací k buňkám jsme opět pláty ponechali kultivovat v inkubátoru po dobu 24 hodin.

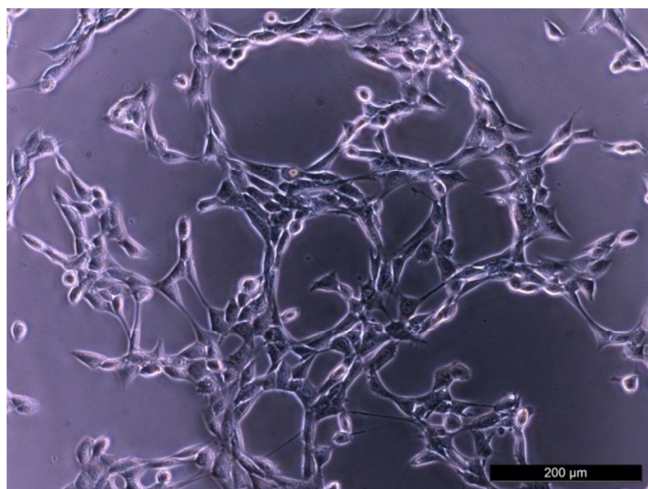
### 8.4 MTT test

Druhý den, po 24 hodinové kultivaci v přítomnosti různě koncentrovaných roztoků, bylo z jamek odsáto médium s koloidním polyanilinem. K buňkám bylo přidáno čisté médium a MTT o koncentraci 0,5 mg/ml média. Pláty s buňkami byly poté opět ponechány v inkubátoru po dobu 4 hodin. Poté bylo z jamek odebráno 40  $\mu\text{l}$  média, zbytek byl odsát a 40  $\mu\text{l}$  bylo vráceno do jamek. K médiu bylo přidáno 80  $\mu\text{l}$  dimethylsulfoxidu (DMSO). Ten byl v jamkách ponechán po dobu 15 minut a poté byla změřena absorbance pomocí spektrofotometrického přístroje.

## 9 VÝSLEDKY

V této práci jsou prezentovány výsledky cytotoxicity koloidního polyanilinu, a to ve formě báze. Jedná se o prvotní studii, protože koloidní polyanilin dosud nebyl v této souvislosti studován. Cytotoxicita polyanilinu byla především studována pomocí polyanilinových solí a koloidní formě nebyla zatím věnována přílišná pozornost. Viabilita buněk, která je hlavním měřítkem mé práce, je vyhodnocena a zobrazena pomocí grafů a tabulek. V tabulkách je vždy uveden průměr absorbance ze čtyř opakování. Vyhodnocení cytotoxicity bylo provedeno podle ISO normy 10 993-5 „Zkoušky na cytotoxicitu *in vitro*“. Výsledky mohou být demonstrovány několika možnými způsoby a to například vyhodnocením průkaznosti mezi průměrnými hodnotami absorbance jednotlivých vzorků v porovnání se vzorkem referenčním, dále například dle ISO normy pomocí procentuálního znázornění buněčné viability ve srovnání s referencí. A také například pořízením mikrofotografií pomocí invertovaného mikroskopu. Výsledky mé práce jsem hodnotila prostřednictvím mikrofotografií a ISO normy, přičemž je použit následující postup: hodnota rovná 100 znamená 100% přežitelnost buněk; >80 vyjadřuje necytotoxický efekt; 60–80 slabá cytotoxicita; 40–60 střední cytotoxicita; <40 silná cytotoxicita.

Na obrázku č. 19, který popisuje referenční vzorek, je patrné, že u buněk nedochází k žádnému ovlivnění okolní látkou, tudíž nedochází k jejich viditelnému poškození. Je patrné, že se buňky rozrůstají do délky, jsou v dobrém fyziologickém stavu a proliferyjí. Veškeré výsledky cytotoxicity koloidního PANI, jež byl deprotonizován pomocí  $\text{NaHCO}_3$  a  $\text{NH}_4\text{OH}$ , budou v dalších kapitolkách vztaženy právě ke vzorku referenčnímu.



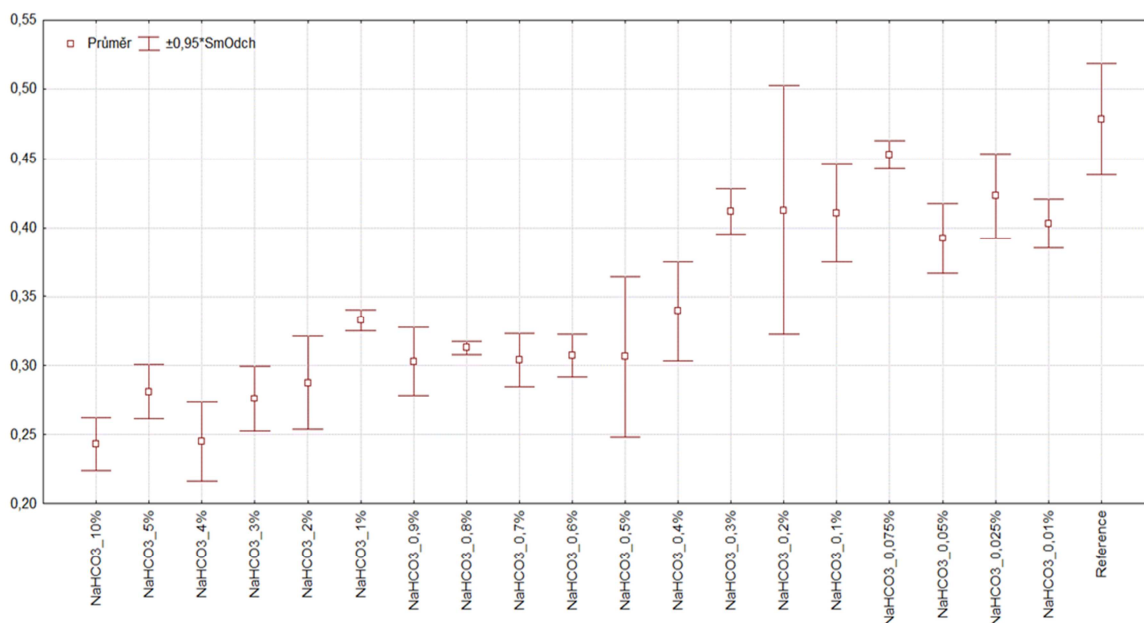
Obrázek 19 – buněčná linie NIH/3T3, referenční vzorek

## 9.1 Stanovená cytotoxicita

### 9.1.1 pH upravené pomocí $\text{NaHCO}_3$

Cytotoxicita báze koloidního PANI, která byla studována na buněčné linii NIH/3T3 je zobrazena v grafu č. 1. Výsledky vyjadřují absorbanci jednotlivých vzorků při testu MTT. pH koloidního PANI bylo v tomto případě upraveno pomocí látky  $\text{NaHCO}_3$ . Z grafu můžeme usoudit, že se zvyšující se koncentrací koloidního PANI se snižuje absorbance a tudíž viabilita buněk. Graf ukazuje přímou závislost i přes pár výkyvů, které budou pravděpodobně způsobeny chybou měření.

U koncentrace 0,4 % nastává výrazný pokles viability. Hodnoty nižších koncentrací (0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,075 %, 0,05 %, 0,025 %, 0,01 %) se přibližují referenci, oproti tomu vyšší koncentrace vykazují nízkou absorbanci. Tabulka č. 1 je doplněním grafu č. 1 a jsou zde vyjádřeny jednotlivé koncentrace koloidního PANI, průměry absorbancí společně se směrodatnými odchylkami a vyjádření viability v procentech, jenž je v souladu s ISO normou. Viabilita jednotlivých koncentrací je poté srovnána s referenční hodnotou. Veškeré informace, které můžeme vyčíst z grafu, jsou potvrzeny matematicko-statistickým vyhodnocením nacházející se v tabulce č. 1.

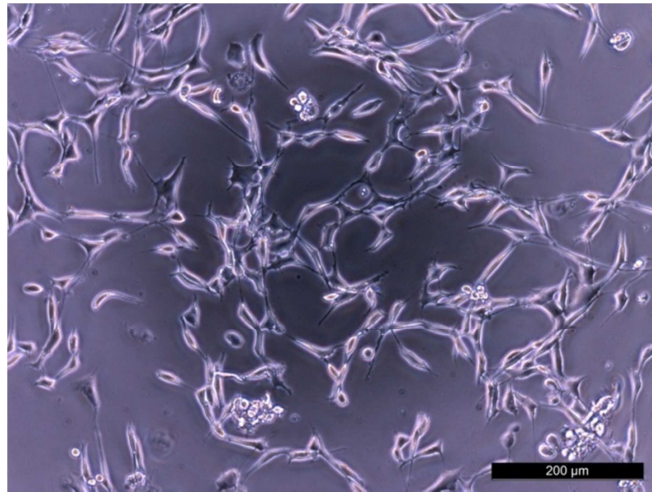


Graf 1 – výsledky cytotoxicity koloidního PANI deprotonizovaného pomocí  $\text{NaHCO}_3$

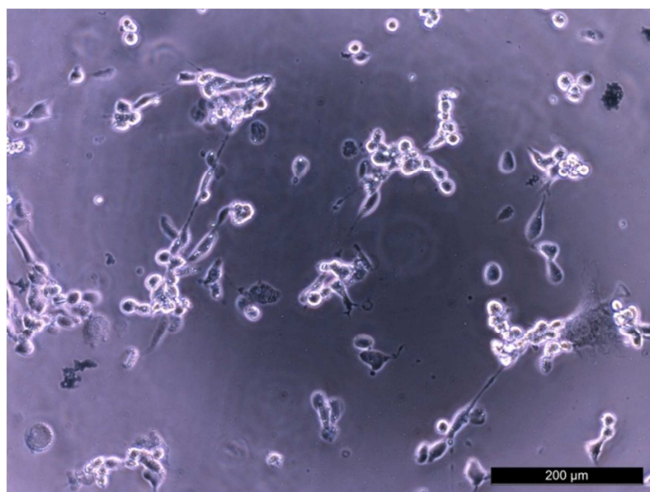
Zajímavým bodem v grafu je hodnota koncentrace 0,075 %, která odpovídá viabilitě 94,65 %. Tato koncentrace se nejvíce blíží referenci a spolu s koncentracemi 0,01 %, 0,025 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 % spadá do rozmezí 80–100 %, tedy nevykazující cytotoxicitu. Postupným zvyšováním koncentrace nad hodnotu 0,3 % se dostáváme do rozmezí 60–80 %, kde je vykazována slabá cytotoxicita. Do této skupiny zařadíme koncentrace 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, 0,8 %, 0,9 %, 1 % a 2 %. Hodnoty koncentrací 3 %, 4 %, 5 % a 10 % vykazují podle našich výsledků slabou cytotoxicitu, která spadá do rozmezí 40–60 %. Z grafu i z tabulky č. 1 můžeme usoudit, že při koncentracích nižších než jsme uvedli, bychom mohli předpokládat necytotoxický efekt, tudíž menší vliv na viabilitu. Oproti tomu vyšší koncentrace budou mít velký vliv na viabilitu a budou více cytotoxické.

#### **9.1.1.1 Mikrofotografie buněk kultivovaných za přítomnosti $\text{NaHCO}_3$**

Výsledky získané pomocí testu MTT nám podávají jednoznačný obraz o vlivu studované látky na buněčnou linii. Nicméně pořízení mikrofotografií nám poskytne doplňkové informace o vzhledu buněk, o jejich fyziologickém a morfologickém stavu. Pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem jsme získali fotografie dvou koncentrací, a to 0,1 % a 0,9 %, které můžeme porovnat se vzorkem referenčním. Na obrázku č. 20 můžeme vidět koncentraci 0,1 % a v porovnání s referencí nedochází k výrazné změně buněk. Můžeme pozorovat jen nepatrné odchylky, ale celkový stav buněk je dobrý. Buňky proliferují a i celkový počet hovoří o jejich dobrém stavu. Na další fotografii (obrázek č. 21) pozorujeme výrazný úbytek buněk. Koncentrace 0,9 % odpovídá viabilitě 63,31 % a vykazuje slabou cytotoxicitu. Buňky na obrázku jsou mírně poškozeny, mění tvar a jsou menší oproti předchozímu a referenčnímu snímku.



Obrázek 20 – mikrofotografie buněk NIH/3T3 kultivovaných v přítomnosti 0,1% koloidního PANI deprotonizovaného pomocí  $\text{NaHCO}_3$



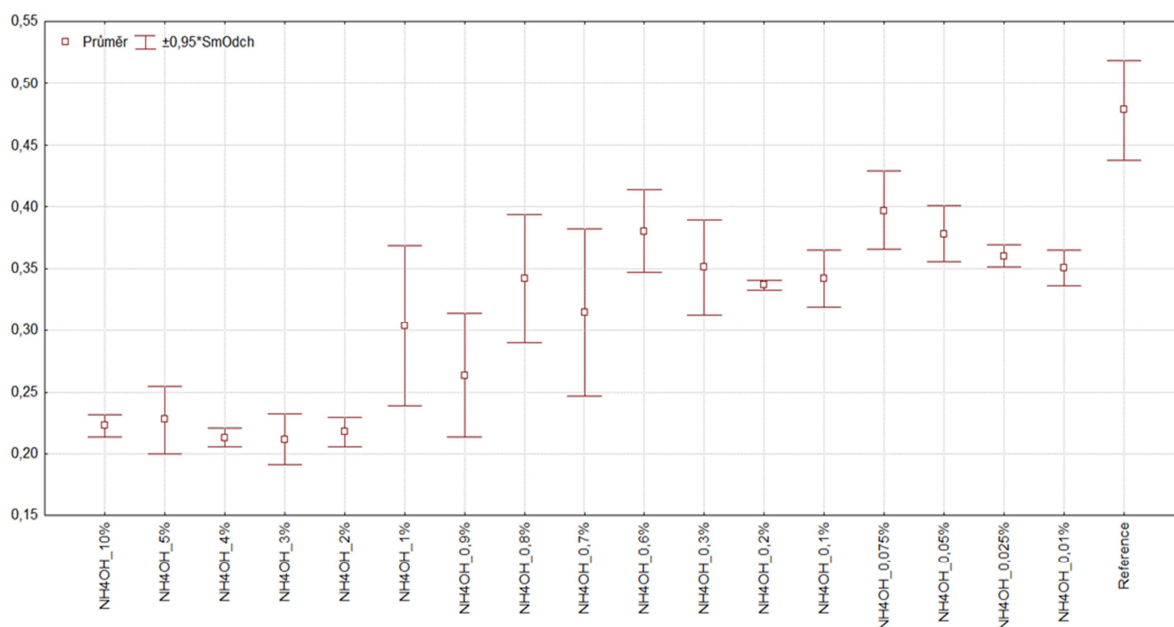
Obrázek 21 – mikrofotografie buněk NIH/3T3 kultivovaných v přítomnosti 0,9% koloidního PANI deprotonizovaného pomocí  $\text{NaHCO}_3$

Koncentrace koloidního polyanilinu [%]	Průměr ± SD	Viabilita [%]
10	0,2434±0,0172	50,86
5	0,2812±0,0177	58,77
4	0,2447±0,0261	51,16
3	0,2760±0,0215	57,68
2	0,2877±0,0306	60,11
1	0,3326±0,0069	69,51
0,9	0,3030±0,0223	63,31
0,8	0,3128±0,0043	65,36
0,7	0,3042±0,0174	63,57
0,6	0,3074±0,0138	64,23
0,5	0,3063±0,0529	64,01
0,4	0,3394±0,0325	70,92
0,3	0,4118±0,0153	86,05
0,2	0,4125±0,0819	86,19
0,1	0,4107±0,0324	85,83
0,075	0,4530±0,0093	94,65
0,05	0,3922±0,0231	81,96
0,025	0,4231±0,0279	88,41
0,01	0,4030±0,0159	84,20
Reference	0,4785±0,0440	100

Tabulka 1 – průměrné absorbance, směrodatné odchylky, procentuální zastoupení viability buněk koloidního PANI deprotonizovaného pomocí NaHCO<sub>3</sub>

### 9.1.2 pH upravené pomocí $\text{NH}_4\text{OH}$

Cytotoxicita druhého vzorku koloidního PANI, upravená pomocí  $\text{NH}_4\text{OH}$  je vyjádřena v grafu č. 2. Opět byla použita linie buněk NIH/3T3 a cytotoxicita byla stanovena pomocí upravené metodiky ISO normy. Z grafu můžeme opět vyčíst, že se snižující se absorbancí a tedy i počtu životaschopných buněk, se zvyšuje koncentrace. U vyšších koncentrací (10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %) nejsou patrné příliš velké směrodatné odchylky a viabilita buněk je nízká, tyto hodnoty jsou přibližně na stejné úrovni, tudíž vykazují téměř podobné hodnoty viability. U hodnot (1 %, 0,9 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0,3 %) vidíme postupný růst viability spolu se snižující se koncentrací. U koncentrace 0,2 %, 0,1 % pozorujeme zlom, který zahajuje postupné klesání viability (koncentrace 0,075 %, 0,05 %, 0,025 %, 0,01 %).



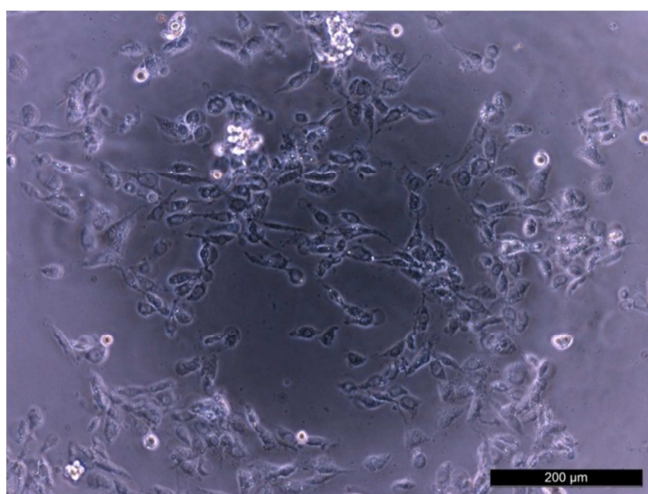
Graf 2 – výsledky cytotoxicity koloidního PANI deprotonizovaného pomocí  $\text{NH}_4\text{OH}$

Doplňující informace ke grafu nám podává tabulka č. 2. Žádná z koncentrací se plně neblíží referenční hodnotě, nejbližší je hodnota 0,075 %, která vyjadřuje necytotoxický efekt. Hodnoty koncentrací (1 %, 0,8 %, 0,7 %, 0,6 %, 0,3 %, 0,2 %, 0,1 %, 0,05 %, 0,025 %, 0,01 %) vykazují slabou cytotoxicitu. Oproti tomu vysoké koncentrace (10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %) spolu s koncentrací 0,9 % vykazují střední cytotoxicitu. Z tabulky můžeme také vyčíst velké kolísání hodnot viability a velký skok z 55,10 % (koncentrace 0,9 %) na 63,45 % (koncentrace 1 %), u kterého bychom předpokládali klesající tendenci. Vybočení hodnoty bude nejspíš způsobeno chybou měření.

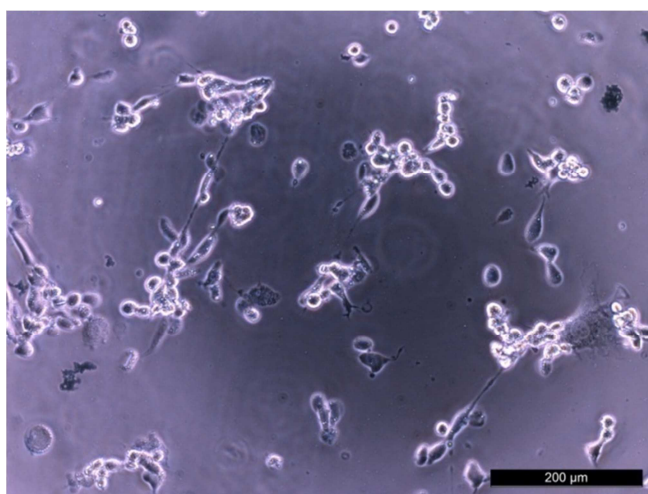


### 9.1.2.1 Mikrofotografie buněk kultivovaných za přítomnosti $\text{NH}_4\text{OH}$

Mikrofotografie buněk vytvořené fázovým mikroskopem nám opět poskytnou podrobnější informace o vlivu látky  $\text{NH}_4\text{OH}$  na buňky linie NIH/3T3. I ve druhém případě jsme použili stejné koncentrace 0,1 %, 0,9 % a budeme je také srovnávat se vzorkem referenčním. Na obrázku č. 22 vidíme buňky, které proliferují a vyskytují se v hojném počtu. Na druhou stranu však dochází ke změně morfologie a jsou na nich patrné známky poškození. Na obrázku č. 23 pozorujeme buňky, které jsou znatelně poškozeny. V porovnání s předchozí mikrofotografií a referencí také vidíme, že množství buněk radikálně kleslo.



Obrázek 22 – mikrofotografie buněk NIH/3T3 kultivovaných v přítomnosti 0,1% koloidního PANI deprotonizovaného pomocí  $\text{NH}_4\text{OH}$



Obrázek 23 – mikrofotografie buněk NIH/3T3 kultivovaných v přítomnosti 0,9% koloidního PANI deprotonizovaného pomocí  $\text{NH}_4\text{OH}$

Koncentrace koloidního polyanilinu [%]	Průměr ± SD	Viabilita [%]
10	0,2226±0,0081	46,53
5	0,2276±0,0249	47,55
4	0,2130±0,0066	44,51
3	0,2117±0,0186	44,24
2	0,2177±0,0108	45,48
1	0,3037±0,0591	63,45
0,9	0,2637±0,0456	55,10
0,8	0,3418±0,0472	71,42
0,7	0,3149±0,0617	65,80
0,6	0,3802±0,0306	79,46
0,3	0,3511±0,0353	73,36
0,2	0,3366±0,0035	70,33
0,1	0,3420±0,0207	71,47
0,075	0,3971±0,0291	82,98
0,05	0,3781±0,0210	79,01
0,025	0,3600±0,0081	75,22
0,01	0,3503±0,0129	73,20
Reference	0,4785±0,0440	100

Tabulka 2 – průměrné absorbance, směrodatné odchylky, procentuální zastoupení viability buněk koloidního PANI deprotonizovaného pomocí NH<sub>4</sub>OH

## 10 DISKUZE

V praktické části mé bakalářské práce byly prováděny testy cytotoxicity báze koloidního polyanilinu. Úprava pH, která pozmění strukturu polyanilinové soli na bázi, byla učiněna pomocí látek  $\text{NaHCO}_3$  a  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Z grafů a tabulek vyplývá, že s rostoucí koncentrací obou látek dochází ke snižování viability buněk. Z výsledků také můžeme usoudit, že se cytotoxické účinky u obou látek výrazně liší.

Z grafu č. 1 můžeme vidět hodnoty koncentrací, které tvoří téměř lineární křivku, nijak zvlášť nekolísají a nepatrně se přibližují referenci. U koncentrací látky  $\text{NH}_4\text{OH}$ , která vyjadřuje graf č. 2, se hodnoty referenci nepřibližují. Dochází ke vzniku skoků, jak je patrné například u koncentrací 0,01 %, 0,025 %, 0,05 %, 0,075 %, u kterých bychom spíše očekávali opačný průběh. Jak si můžeme všimnout u látky  $\text{NaHCO}_3$ , většinu nízkých koncentrací (0,01 %, 0,025 %, 0,05 %, 0,075 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %) můžeme dle ISO normy zařadit do kategorie vyjadřující necytotoxický efekt. Oproti tomu u koncentrace látky  $\text{NH}_4\text{OH}$  zde spadá pouze jediná hodnota a to koncentrace 0,075 %. Proto z výše uvedených výsledků vyplývá, že látka  $\text{NH}_4\text{OH}$  vykazuje větší cytotoxický efekt oproti látce  $\text{NaHCO}_3$ . Zajímavým poznatkem je také to, že u obou látek jak u  $\text{NaHCO}_3$  tak u  $\text{NH}_4\text{OH}$  dochází ke zvýšení hodnot viability vždy u koncentrace 0,075 %, která se nejvíce přibližuje referenci. U  $\text{NaHCO}_3$  dosahuje tato hodnota 94,64 % životaschopnosti, u látky  $\text{NH}_4\text{OH}$  hodnota činí 82,98 %. Doplnkové informace nám podávají mikrofotografie, které spolu s referencí byly vytvořeny mikroskopem s fázovým kontrastem. Tyto fotografie zachycují vzhled buněk, tvar, proliferaci, popřípadě výskyt vakuol a dalších komponent v mezibuněčných prostorech po rozpadu buňky. Na obrázku č. 20 vidíme koncentraci 0,1 %  $\text{NaHCO}_3$  a tyto buňky nevykazují nijak výrazné změny oproti referenci. Buňky proliferují, jejich tvar je zachovalý, viabilita odpovídá 85,83 %, což vyjadřuje necytotoxický efekt. V porovnání u buněk se stejnou koncentrací  $\text{NH}_4\text{OH}$  (obr. 21) je patrné větší cytotoxické poškození, které i podle procentuální hodnoty viability odpovídá 71,47 %. Tento číselný údaj hodnotíme jako slabou cytotoxicitu. Na obrázku č. 21, kde je koncentrace 0,9 %  $\text{NaHCO}_3$  vidíme značné poškození buněk. Došlo k jejich viditelnému úbytku a buňky značně změnily tvar. Jejich hodnota viability odpovídá 63,31 %, což se řadí do skupiny slabě cytotoxické. U hodnoty koncentrace 0,9 % látky  $\text{NH}_4\text{OH}$  (obr. 23) jsou buňky velmi poškozeny, na fotografii jsou zachyceny odumřelé zbytky buněk.

Cytotoxicita koloidního polyanilinu je v tuhle chvíli neprobádanou oblastí a proto bylo zveřejněno jen několik málo publikací. Studie Humpolíček et al. (2012b) se zabývá nevodivou polyanilinovou bází a polyanilinovou solí, které byly testovány v rámci cytotoxicity a citlivosti kůže. Obě formy prokázaly značnou cytotoxicitu, která byla vyšší u polyanilin hydrochloridu než u polyanilinové báze. Zásadní výsledky přináší článek Kuceková (2014), který pojednává o koloidní polyanilinové disperzi. Je to prvotní práce zabývající se polyanilinem ve formě koloidu. Hlavním cílem bylo zjistit vliv koloidu na prokaryotické a eukaryotické buňky pomocí vyhodnocení cytotoxicity. Bylo zjištěno, že citlivější buněčná linie NIH/3T3 byla poškozena ve větší míře oproti linii HaCaT. Průtoková cytometrie, která je schopna odlišit zdravé, apoptické a nekrotické buňky ukázala, že kritické koloidní koncentrace pro bezpečné aplikace činí  $150 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Závěrem bylo uvedeno, že koloidní polyanilin vykazuje nízkou cytotoxicitu a lze ho zařadit mezi slibné vodivé a elektroaktivní systémy, mající výhodné vlastnosti pro biomedicínské aplikace. Ve studii Netík (2013) byla cytotoxicita koloidního polyanilinu hodnocena pomocí buněčné linie HaCaT a NIH/3T3. Za necytotoxické byly považovány koncentrace 0,1 %, 0,2 % koloidního polyanilinu u obou buněčných linií. V porovnání s našimi výsledky koloidního PANI deprotonovaného pomocí  $\text{NaHCO}_3$ , koncentrace 0,1 %, 0,2 % vykazovaly necytotoxický efekt. Oproti tomu stejné koncentrace koloidního PANI deprotonovaného pomocí  $\text{NH}_4\text{OH}$  již vykazovaly slabou cytotoxicitu.

Experimentální část mé práce je prvotní studií, která podává výsledky o cytotoxicitě koloidního polyanilinu upraveného pomocí  $\text{NaHCO}_3$  a  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Z našich výsledků můžeme usoudit, že buňky hůře snášejí látku  $\text{NH}_4\text{OH}$ , která podle procentuálního vyjádření viability i podle mikrofotografií vykazuje vyšší cytotoxicitu. Musíme ale brát v úvahu testování pouze jedné linie, a to NIH/3T3. Každá buněčná linie s rozdílnou fyziologií a odpovídající funkcí v organismu může na studovanou látku reagovat odlišným způsobem.

## ZÁVĚR

Hlavní náplní této práce bylo zjistit cytotoxicitu báze koloidního polyanilinu v různých koncentracích, jehož pH bylo upraveno pomocí dvou látek  $\text{NaHCO}_3$  a  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Látka byla v obou případech testována na buněčné linii NIH/3T3, což je linie myších fibroblastů. Veškeré cytotoxické testování probíhalo podle kritérií ISO normy 10 993-5. Výsledky byly vyhodnoceny dvěma způsoby a to pomocí metody MTT, kterou jsme získali průměrné hodnoty absorbancí a procentuální vyjádření viability buněk a dále pomocí mikrofotografií, které nám poskytly podrobnější informace o tvaru a morfologii.

Z hodnot výsledků MTT dojdeme k závěru, že buňky hůře snášejí koloidní PANI upravený pomocí  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Tyto koncentrace vykazují vyšší cytotoxický efekt v porovnání s referencí. Tento fakt nám také potvrzují rozdílné procentuální hodnoty látky  $\text{NH}_4\text{OH}$  oproti  $\text{NaHCO}_3$ . U nejnižší koncentrace tento rozdíl činí 11 % a u nejvyšší koncentrace 4,33 %. Z výsledků také plyne, že viabilita klesá s rostoucí koncentrací testované látky. Nižší koncentrace koloidu upravené pomocí  $\text{NaHCO}_3$  (0,01 %, 0,025 %, 0,05 %, 0,075 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %) vykazují necytotoxický efekt a přibližují se referenci. U koloidního polyanilinu upraveného pomocí  $\text{NH}_4\text{OH}$  zde spadá pouze jediná hodnota a to koncentrace 0,075 %, které odpovídá životaschopnost 82,98 %. Jak je patrné z grafu a tabulky č. 2 hodnoty zde více kolísají, což bude pravděpodobně způsobeno chybou měření. I fotografie pořízené mikroskopem s fázovým kontrastem nám vypovídají o vyšší cytotoxicitě koloidního PANI upraveného  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Buňky jsou znatelně poškozeny, neproliferují a můžeme zde pozorovat výskyt bublin.

Závěrem bych chtěla podotknout, že za necytotoxické koncentrace využitelné například v biotechnologické aplikaci můžeme považovat koncentrace (0,01 %, 0,025 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %) koloidního PANI upraveného pomocí  $\text{NaHCO}_3$ .

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- AHUJA, T. et al., 2007. Biomolecular immobilization on conducting polymers for bio-sensing applications. *Biomaterials* [online]. Roč. 28, č. 5, s. 791-805 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.09.046.
- ALBERTS, Bruce, 2001. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero, xxvi, 630 s., ISBN 80-902906-2-0.
- ALTMAN, Steven A., Lisa RANDERS a Govind RAO, 1993. Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnology Progress* [online]. Roč. 9, č. 6, s. 671-674 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1021/bp00024a017.
- AZIZ, D. M., L. AHLWEDE a H. ENBERGS, 2005. Application of MTT reduction assay to evaluate equine sperm viability. *Theriogenology* [online]. Roč. 64, č. 6, s. 1350-1356 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2005.02.009.
- BAGHERI, Habib, Zahra AYAZI a Mehrnoush NADERI, 2013. Conductive polymer-based microextraction methods: A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. Roč. 767, s. 1-13 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/j.aca.2012.12.013.
- BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie Šišková, 2005. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav* [online]. Version 1.0. Praha: VŠCHT Praha, [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: [www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_isbn-80-7080-579-X/pages-img/>](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-80-7080-579-X/pages-img/). ISBN 80-7080-579-X
- BERRIDGE, Michael V. et al., 1996. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *BIOCHEMICA* [online]. Č. 4, s. 14-19 [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: [http://lifescience.roche.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/BIOCHEMICA\\_96\\_4\\_p14-19.pdf](http://lifescience.roche.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/BIOCHEMICA_96_4_p14-19.pdf)
- BHADRA, Sambhu et al., 2009. Progress in preparation, processing and applications of polyaniline. *Progress in Polymer Science* [online]. Roč. 34, č. 8, s. 783-810 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2009.04.003.
- BRANSKÁ, Barbora et al., 2011. Stanovení viability mikroorganismů pomocí fluorescenční analýzy. *Chemické listy* [online]. Č. 105, s. 586 – 593 [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: [www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011\\_08\\_586-593.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2011_08_586-593.pdf)
- BRDIČKA, Rudolf a Jiří DVOŘÁK, 1977. *Základy fyzikální chemie*. 2. přeprac. vyd. Praha: Academia, 850 s.

- Cell Proliferation Assays, ©2004–2014. *CELL BIOLABS, INC.* [online]. [cit. 2014-05-14]. Dostupné z: <http://www.cellbiolabs.com/cell-proliferation-assays?gclid=CPrD4dfclL0CFYMSwwodJCsAQg>
- CIAPETTI, G. et al., 1993. In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials* [online]. Roč. 14, č. 5, s. 359-364 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/0142-9612(93)90055-7.
- CLARKE, C. Kimberly et al., 2013. Colloid-matrix assemblies in regenerative medicine. *Current Opinion in Colloid* [online]. Roč. 18, č. 5, s. 393-405 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/j.cocis.2013.07.004.
- COMBRIER, E. et al., 1990. Comparative assessment of in vitro toxicity of xenobiotics using flow cytometry and spectrophotometry. *Toxicology in Vitro* [online]. Roč. 4, č. 6, s. 751-755 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/0887-2333(90)90044-T.
- ĆIRIĆ-MARJANOVIĆ, Gordana, 2013. Recent advances in polyaniline composites with metals, metalloids and nonmetals. *Synthetic Metals* [online]. Roč. 170, s. 31-56 [cit. 2014-05-14]. DOI: 10.1016/j.synthmet.2013.02.028.
- DHANASEKARAN, N., 1998. Cell Signaling: An overview. *Oncogene* [online]. Č. 17, s. 1329-1330 [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: <http://www.nature.com/onc/journal/v17/n11/pdf/1202170a.pdf>
- DHAND, Chetna et al., 2011. Recent advances in polyaniline based biosensors: polyaniline. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. Roč. 26, č. 6, s. 2811-2821 805 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/j.bios.2010.10.017.
- DMEM: Classical Media and Salts, ©2014. *SIGMA-ALDRICH* [online]. [cit. 2014-05-16]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/classical-media-salts/dmem.html>
- DONATIN, E. A M. DRANCOURT, 2012. DNA microarrays for the diagnosis of infectious diseases. *Médecine et Maladies Infectieuses* [online]. Roč. 42, č. 10, s. 453-459 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/j.medmal.2012.07.017.
- DUCHÁČEK, Vratislav, 2006. *Polymery: výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 278 s. ISBN 80-7080-617-6.
- FIORE, Christelle et al., 2001. Fluorometric detection of ADP/ATP carrier deficiency in human muscle. *Clinica Chimica Acta* [online]. Roč. 311, č. 2, s. 125-135 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/S0009-8981(01)00581-2.

- FLINT, O. P. et al., 1998. Recent advances in polyaniline based biosensors: polyaniline. *Toxicology in Vitro* [online]. Roč. 12, č. 5, s. 591-595 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/S0887-2333(98)00043-5.
- FOTAKIS, George a John A. TIMBRELL, 2006. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters* [online]. Roč. 160, č. 2, s. 171-177 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/j.toxlet.2005.07.001.
- FRESHNEY, R., 2005. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 5th ed. Hoboken, N. J.: Wiley-Liss, 642 s. ISBN 0471453293.
- FRITZ, Jamie, ©2007. Cell Proliferation Reagent WST-1 From Roche Applied Science. *Biocompare* [online]. [cit. 2014-05-14]. Dostupné z: <http://www.biocompare.com/Product-Reviews/40932-Cell-Proliferation-Reagent-WST-1-From-Roche-Applied-Science/>
- GERARD, M., A. Chaubey a B. D. Malhotra, 2002. Application of conducting polymers to biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. Roč. 17, č. 5, s. 345-359 [cit. 2014-05-13]. DOI: 10.1016/S0956-5663(01)00312-8.
- GOSPODINOVA, N. a L. TERLEMEZYAN, 1998. Conducting polymers prepared by oxidative polymerization: polyaniline. *Progress in Polymer Science* [online]. Roč. 23, č. 8, s. 1443-1484 [cit. 2014-04-30]. DOI: 10.1016/S0079-6700(98)00008-2.
- GUIMARD, Nathalie K., Natalia GOMEZ a Christine E. SCHMIDT, 2007. Conducting polymers in biomedical engineering: A review. *Progress in Polymer Science* [online]. Roč. 32, č. 8-9, s. 876-921 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.012.
- HAN, Xianglu et al., 2011. Validation of an LDH assay for assessing nanoparticle toxicity. *Toxicology* [online]. Roč. 287, č. 1-3, s. 99-104 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/j.tox.2011.06.011.
- HANAI, Taizo, Hiroyuki HAMADA a Masahiro OKAMOTO, 2006. Application of bioinformatics for DNA microarray data to bioscience, bioengineering and medical fields. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. Roč. 101, č. 5, s. 377-384 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1263/jbb.101.377.
- HOUP, Rachel C., 2008. Cell culture. *Biotech Processes* [online]. S. 46-49 [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: [http://www.ivtnetwork.com/sites/default/files/CellCultures\\_01.pdf](http://www.ivtnetwork.com/sites/default/files/CellCultures_01.pdf)



- HUMPOLÍČEK, Petr et al., 2012a. Proliferace buněk na vodivém polymeru, polyanilinu. *Chemické listy* [online]. Č. 106, s. 380-383 [cit. 2014-04-30]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012\\_05\\_380-383.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_05_380-383.pdf)
- HUMPOLÍČEK, Petr et al., 2012b. Biocompatibility of polyaniline. *Synthetic Metals* [online]. Roč. 162, 7-8, s. 722-727 [cit. 2014-05-13]. DOI: 10.1016/j.synthmet.2012.02.024.
- HUVENEERS-OORSPRONG, M. B. M., L. A. P. HOOGENBOOM a H. A. KUIPER, 1997. The use of the MTT test for determining the cytotoxicity of veterinary drugs in pig hepatocytes. *Toxicology in Vitro* [online]. Roč. 11, č. 4, s. 385-392 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/S0887-2333(97)00022-2
- CHAIEB, Kamel et al., 2011. XTT assay for evaluating the effect of alcohols, hydrogen peroxide and benzalkonium chloride on biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbial Pathogenesis* [online]. Roč. 50, č. 1, s. 1-5 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/j.micpath.2010.11.004.
- CHARALAMBOUS, Christoforos C. a George K. MATSOPOULOS, 2013. A new method for gridding DNA microarrays. *Computers in Biology and Medicine* [online]. Roč. 43, č. 10, s. 1303-1312 [cit. 2014-05-14]. DOI: 10.1016/j.combiomed.2013.06.005.
- JU, Zhenlin, Melissa C. WELLS a Ronald B. WALTER, 2007. DNA microarray technology in toxicogenomics of aquatic models: Methods and applications. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology* [online]. Roč. 145, č. 1, s. 5-14 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/j.cbpc.2006.04.017.
- JUAN-GARCÍA, Ana et al., 2013. Applications of flow cytometry to toxicological mycotoxin effects in cultured mammalian cells: A review. *Food and Chemical Toxicology* [online]. Roč. 56, s. 40-59 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/j.fct.2013.02.005.
- KANG, E. T., K. G. Neoh and K. L. Tan, 1998. Polyaniline: A polymer with many interesting intrinsic redox states. *Progress in Polymer Science*[online]. Roč. 23, č. 2, s. 277-324 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/S0079-6700(97)00030-0.
- KONYUSHENKO, Elena et al., 2011. Polyaniline prepared in ethylene glycol or glycerol. *Polymer* [online]. Roč. 52, č. 9, s. 1900-1907. DOI:10.1016/j.polymer.2011.02.047
- KRUŽÍK, Pavel, J. MOOS a R. VLČEK, 2006. Analyzátoři buněk a částic. *In vitro diagnostika* [online] č. 3 [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: <http://www.beckman.cz/Media/Default/IVD/IVD%202006-03.pdf>

- KUČEKOVÁ, Zdenka et al., 2014. Colloidal polyaniline dispersions: Antibacterial activity, cytotoxicity and neutrophil oxidative burst. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. Roč. 116, s. 411-417 [cit. 2014-05-13]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.01.027.
- KVÍTEK, Libor, 2006. *Metody studia koloidních soustav: Prozatímní učební text* [online]. [cit. 2014-04-30]. Dostupné z: <http://chemikalie.upol.cz/skripta/msk/msk.pdf>
- KVÍTEK, Libor a A. PANÁČEK, 2007. *Základy koloidní chemie* [online]. Olomouc, [cit. 2014-04-30]. Dostupné z: <http://fch.upol.cz/skripta/kol/koch.pdf>
- LDH-Cytotoxicity Assays, ©2014. *BioVision: BioVision Incorporated* [online]. [cit. 2014-05-14]. Dostupné z: <http://www.biovision.com/cell-proliferation-cytotoxicity-810/ldh-cytotoxicity-assays-815/>
- LOBNER, Doug, 2000. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis?. *Journal of Neuroscience Methods* [online]. Roč. 96, č. 2, s. 147-152 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/S0165-0270(99)00193-4.
- LODISH, Harvey F., 2008. *Molecular cell biology*. 6th ed. New York: W. H. Freeman & Company, 1150, [76] s. ISBN 978-0-7167-7601-7.
- LU, J. et al., 1997. XTT-Colorimetric Assay as a Marker of Viability in Cryoprocessed Cardiac Valve. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* [online]. Roč. 29, č. 4, s. 1189-1194 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1006/jmcc.1996.0354.
- LÜ, Lanhai et al., 2012. Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. *Toxicology in Vitro* [online]. Roč. 26, č. 4, s. 636-644 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/j.tiv.2012.02.006.
- LÜ, Xiaoying et al., 2007. Application of a modified Coomassie brilliant blue protein assay in the study of protein adsorption on carbon thin films. *Surface and Coatings Technology* [online]. Roč. 201, č. 15, s. 6843-6846 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/j.surfcoat.2006.09.019.
- MANDY, Francis F., Michele BERGERON a Tracy MINKUS, 1995. Principles of flow cytometry. *Transfusion Science* [online]. Roč. 16, č. 4, s. 303-314 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/0955-3886(95)00041-0.
- MLEZIVA, Josef a Jaromír ŠŇUPÁREK, 2000. *Polymery: výroba, struktura, vlastnosti a použití*. 2. přeprac. vyd. Praha: Sobotáles, 537 s. ISBN 8085920727.

- MORI, Hideki a Masayuki HARA, 2013. Cultured stem cells as tools for toxicological assays. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. Roč. 116, č. 6, s. 647-652 [cit. 2014-05-13]. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2013.05.028.
- MTT test, ©1998. *Laboratoř experimentální medicíny: Dětská klinika, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice v Olomouci* [online]. [cit. 2014-05-14]. Dostupné z: <http://lem.ocol.cz/cs/info/mtt-test>
- NEČAS, Oldřich et al., 2000. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3., přeprac. vyd. Jinočany: H & H. ISBN 80-86022-46-3.
- NETÍK, Karel, 2013. *In vitro* stanovení toxicity koloidního polyanilinu [online]. Zlín, Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Po přihlášení dostupné z aplikace: [portal.utb.cz](http://portal.utb.cz)
- NOVÁK, Josef a kol., 2011. *Fyzikální chemie: bakalářský a magisterský kurz* [online]. [cit. 2014-04-05]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/fch/cz/pomucky/FCH4Mgr.pdf>
- PROKEŠ, Jan, S. NEŠPŮREK a J. STEJSKAL, 2001. Vodivé polymery, inteligentní materiály pro nové století. *Vesmír* [online]. Č. 80, s. 35-38 [cit. 2014-05-13]. Dostupné z: <http://casopis.vesmir.cz/clanek/vodive-polymery>
- PROKEŠ, Jan, J. STEJSKAL a M. OMASTOVÁ, 2001. Polyanilin a polypyrrol-dva představitelé vodivých polymerů. *Chemické listy* [online]. Č. 95, s. 484-492 [cit. 2014-04-05]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/archiv/2001/08-PDF/484-492.pdf>
- PROKOPOVÁ, Irena, 2007. *Makromolekulární chemie*. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT. ISBN 978-807-0806-623.
- REZAI, Kourous A. et al., 2004. Trypan blue induces apoptosis in human retinal pigment epithelial cells. *American Journal of Ophthalmology* [online]. Roč. 138, č. 3, s. 492-495 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/j.ajo.2004.03.033.
- ROUBALOVÁ, L., 2012. Průtoková cytometrie. *Laboratorní technologie* [online]. S. 5-9 [cit. 2014-05-14]. Dostupné z: <http://web2.stapro.cz/bullfons/22012/labo1.pdf>
- SCHERLIEß, Regina, 2011. The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity in vitro on respiratory epithelial cells. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. Roč. 411, č. 1-2, s. 98-105 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.03.053.
- SLANINOVÁ, Iva, J. SLANINA a E. TÁBORSKÁ, 2008. Fluorescenční vlastnosti kvartérních benzo[c]fenanthridinových alkaloidů a jejich využití jako supravitálních

DNA sond. *Chemické listy* [online]. Č. 102, s. 427-433 [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008\\_06\\_427-433.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_06_427-433.pdf)

- STOCKERT, Juan C. et al., 2012. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica* [online]. Roč. 114, č. 8, s. 785-796 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/j.acthis.2012.01.006.
- STEJSKAL, Jaroslav. Polyanilin: vodivý polymer. *Ústav makromolekulární chemie Akademie věd ČR*. Dostupné z: <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/NH2006pdf/16.pdf>
- STEJSKAL, Jaroslav a R. G. GILBERT, 2002. Polyaniline. Preparation of a conducting polymer (IUPAC Technical Report). *International Union of Pure and Applied Chemistry* [online]. Roč. 74, č. 5, s. 857-867 [cit. 2014-04-30] DOI: 10.1351/pac200274050857.
- STEJSKAL, Jaroslav a Irina SAPURINA, 2005. Polyaniline: Thin films and colloidal dispersions (IUPAC Technical Report). *International Union of Pure and Applied Chemistry* [online]. Roč. 77, č. 5, s. 815-826 [cit. 2014-04-30]. DOI: 10.1351/pac200577050815.
- STEVENS, Mark G. a Steven C. OLSEN, 1993. Comparative analysis of using MTT and XTT in colorimetric assays for quantitating bovine neutrophil bactericidal activity. *Journal of Immunological Methods* [online]. Roč. 157, č. 1-2, s. 225-231 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/0022-1759(93)90091-K.
- STRACHOTA, Adam, 2012. Hydrogely s velmi rychlou mechanickou odezvou, tzv. „umělý sval“. *Akademie věd České republiky* [online]. [cit. 2014-05-13]. Dostupné z: [http://www.cas.cz/veda\\_a\\_vyzkum/vyznamne\\_a\\_zajimave\\_projekty/ziva\\_priroda\\_a\\_chemicke\\_vedy/Hydrogely\\_s\\_velmi\\_rychlou\\_mechanickou\\_odezvou-umely\\_sval.html](http://www.cas.cz/veda_a_vyzkum/vyznamne_a_zajimave_projekty/ziva_priroda_a_chemicke_vedy/Hydrogely_s_velmi_rychlou_mechanickou_odezvou-umely_sval.html)
- ŠIMEK, Lubomír a Josef HRNČIŘÍK, 1979. *Fyzikální chemie II: koloidní a makromolekulární systémy*. Vyd. 1. Brno: Vysoké učení technické, 84 s.
- ŠINKOROVÁ, Zuzana a L. ZÁRYBNICKÁ, 2008. Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda: I. část. *Vojenské zdravotnické listy* [online]. Č. 3, s. 98-103 [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: [http://www.pmfhk.cz/VZL/VZL3\\_2008/05-%C5%A0inkorov%C3%A11.pdf](http://www.pmfhk.cz/VZL/VZL3_2008/05-%C5%A0inkorov%C3%A11.pdf)
- TARRANT, Jacqueline M., 2005. The role of flow cytometry in companion animal diagnostic medicine. *The Veterinary Journal* [online]. Roč. 170, č. 3, s. 278-288 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/j.tvjl.2004.06.010.

- Testy cytotoxicity: Hodnocení viability buněk trypanovou modří, ©2014. *MEDETOX* [online]. [cit. 2014-05-14]. Dostupné z: <http://medetox.cz/metody/vyhodnocovani-toxicity/testy-cytotoxicity/>
- VOJUCKIJ, Sergej Sergejevič, 1984. *Kurs koloidní chemie*. 1. vyd. Praha: SNTL, 396 s.
- VEJRAŽKA, Martin. Buněčné kultury. *Ústav lékařské biochemie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze* [online]. [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: <http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>
- WANG, Gang et al., 2012. Understanding and correcting for carbon nanotube interferences with a commercial LDH cytotoxicity assay. *Toxicology* [online]. Roč. 299, 2-3, s. 99-111 [cit. 2014-05-14]. DOI: 10.1016/j.tox.2012.05.012.
- WANG, Shuguang, Hongtao YU a Jeffrey K. WICKLIFFE, 2011. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO<sub>2</sub>. *Toxicology in Vitro* [online]. Roč. 25, č. 8, s. 2147-2151 [cit. 2014-05-14]. DOI: 10.1016/j.tiv.2011.07.007.
- WANG, Si et al., 2012. Proliferation assays for estrogenicity testing with high predictive value for the in vivo uterotrophic effect: A review. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* [online]. Roč. 128, č. 3-5, s. 98-106 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2011.11.009.
- WIESINGER, Martin et al., 2012. Comparative analysis of perturbed molecular pathways identified in in vitro and in vivo toxicology studies: polyaniline. *Toxicology in Vitro* [online]. Roč. 26, č. 6, s. 956-962 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/j.tiv.2012.03.018.
- WOLLENSAK, Gregor, Eberhard SPÖRL a Duy-Thoai PHAM, 2004. Biomechanical changes in the anterior lens capsule after trypan blue staining. *Journal of Cataract* [online]. Roč. 30, č. 7, s. 1526-1530 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/j.jcrs.2003.11.031.
- WST-1 Cell Viability & Proliferation Assay, ©2014. *ScienCell: Research Laboratories* [online]. [cit. 2014-05-14]. Dostupné z: <http://www.sciencellonline.com/site/productInformation.php?keyword=8038>
- Xenometrix IN CYTOTOX – Cytotoxicity Screening Test Systems, ©2014. *BioAntares: Quality Toxicology* [online]. [cit. 2014-05-14]. Dostupné z: [http://www.bioantares.com/Cytotoxicity\\_Screening.html](http://www.bioantares.com/Cytotoxicity_Screening.html)

- XIAN, Jian-An et al., 2012. In vitro toxicity of nitrite on haemocytes of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*, using flow cytometric analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology* [online]. Roč. 156, č. 2, s. 75-79 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/j.cbpc.2012.04.001.
- YOUNG, Fiona M., Wichaya PHUNGTAMDET a Barbara J.S. SANDERSON, 2005. Modification of MTT assay conditions to examine the cytotoxic effects of amitraz on the human lymphoblastoid cell line, WIL2NS. *Toxicology in Vitro* [online]. Roč. 9, č. 8, s. 1051-1059 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/j.tiv.2005.05.001.
- ZHU, Aiping, Roberto ROMERO a Howard R. PETTY, 2011. An enzymatic colorimetric assay for glucose-6-phosphate. *Analytical Biochemistry* [online]. Roč. 419, č. 2, s. 266-270 [cit. 2014-05-11]. DOI: 10.1016/j.ab.2011.08.037.
- ŽALOU DÍK, J. et al., 2000. Výsledky MTT testů chemoresistence u karcinomů plic, kolorekta a sarkomů měkkých tkání. *Klinická onkologie* [online]. Č. 2, s. 37-38 [cit. 2014-05-11]. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/62/1467.pdf>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

S.cm-1	Měrná vodivost, siemens na centimetr
ATP	Adenosintrifosfát
ADP	Adenosindifosfát
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamid adenin dinukleotid (oxidovaná forma)
NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid (redukovaná forma)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
ISO	International Organization for Standardization
rpm	Otáčky za minutu
HaCaT	Buněčná linie lidských keratinocytů
HeLa	Buněčná linie lidských epiteliálních buněk

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 – obecný vzorec polymeru (Prokopová, 2007) .....	12
Obrázek 2 – nejdůležitější vodivé polymery (Stejskal) .....	13
Obrázek 3 – druhy disperzních soustav podle velikosti dispergovaných částic a jejich základní vlastnosti (Kvítek a Panáček, 2007) .....	14
Obrázek 4 – rozdělení soustav podle fázového složení (Kvítek a Panáček, 2007) .....	15
Obrázek 5 – zobrazení komponentů extracelulárního matrix (Clarke et al., 2013).....	17
Obrázek 6 – formy polyanilinu (Stejskal).....	19
Obrázek 7 – model tvorby filmu: a) adsorpce oligomerů na povrch, b) tvorba jádra, stimulace růstu PANI řetězců, c) růst filmu na povrchu (Stejskal a Sapurina, 2005).....	20
Obrázek 8 – model tvorby koloidních částic: a) oligomery adsorbují na stabilizátoru, b) tvorba jádra, stimulace růstu PANI řetězců, c) další oligomery a nové řetězce jsou vyráběny v blízkosti jádra, koloidní částice roste (Stejskal a Sapurina, 2005) .....	21
Obrázek 9 – schéma biosenzoru (Guimard, Gomez, Schmidt, 2007).....	23
Obrázek 10 – schéma buňky a jejich organel užívané k měření cytotoxicity (Xenometrix IN CYTOTOX – Cytotoxicity Screening Test Systems, ©2014).....	25
Obrázek 11 – struktura trypanové modři (Wollensak, Spörl, Pham, 2004).....	27
Obrázek 12 – strukturní vzorec propidium jodidu (Branská et al., 2011) .....	28
Obrázek 13 – MTT test po izolaci nádorových buněk (MTT test, ©1998).....	29
Obrázek 14 – chemická struktura MTT a jeho redukováná forma formazanu (Stockert et al., 2012) .....	30
Obrázek 15 – dot-plot histogram suspenze buněk periferní krve (Roubalová, 2012) .....	32
Obrázek 16 – čtyři po sobě jdoucí fáze buněčného cyklu (Alberts, 2001).....	35
Obrázek 17 – formy signálu (Alberts, 2001) .....	36
Obrázek 18 – přechod polyanilinové soli v alkalickém prostředí (např. hydroxid amonný) na polyanilinovou bázi (Stejskal a Gilbert, 2002).....	39
Obrázek 19 – buněčná linie NIH/3T3, referenční vzorek.....	43
Obrázek 20 – mikrofotografie buněk NIH/3T3 kultivovaných v přítomnosti 0,1% koloidního PANI deprotonizovaného pomocí NaHCO <sub>3</sub> .....	46
Obrázek 21 – mikrofotografie buněk NIH/3T3 kultivovaných v přítomnosti 0,9% koloidního PANI deprotonizovaného pomocí NaHCO <sub>3</sub> .....	46



- Obrázek 22 – mikrofotografie buněk NIH/3T3 kultivovaných v přítomnosti 0,1% koloidního PANI deprotonizovaného pomocí  $\text{NH}_4\text{OH}$ ..... 49
- Obrázek 23 – mikrofotografie buněk NIH/3T3 kultivovaných v přítomnosti 0,9% koloidního PANI deprotonizovaného pomocí  $\text{NH}_4\text{OH}$ ..... 49

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 – průměrné absorbance, směrodatné odchylky, procentuální zastoupení viability buněk koloidního PANI deprotonizovaného pomocí $\text{NaHCO}_3$ .....	47
Tabulka 2 – průměrné absorbance, směrodatné odchylky, procentuální zastoupení viability buněk koloidního PANI deprotonizovaného pomocí $\text{NH}_4\text{OH}$ .....	50

**SEZNAM GRAFŮ**

Graf 1 – výsledky cytotoxicity koloidního PANI deprotonizovaného pomocí NaHCO <sub>3</sub> .....	44
Graf 2 – výsledky cytotoxicity koloidního PANI deprotonizovaného pomocí NH <sub>4</sub> OH.....	48