MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
ÚSTAV BIOCHEMIE

Účinek frakcí polyanilinových nanočástic na oxidační vzplanutí lidských neutrofilů

Bakalářská práce

Petra Antovská

Vedoucí práce: Mgr. Tomáš Perečko, Ph.D. **Brno 2016**

Bibliografický záznam

Autor:	Petra Antovská Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Ústav biochemie
Název práce:	Účinek frakcí polyanilinových nanočástic na oxidační vzplanutí lidských neutrofilů
Studijní program:	Aplikovaná biochemie
Studijní obor:	Aplikovaná biochemie
Vedoucí práce:	Mgr. Tomáš Perečko, Ph.D.
Akademický rok:	2015/2016
Počet stran:	42
Klíčová slova:	Polyanilin; Biokompatibilita; Neutrofily; Oxidační vzplanutí; Reaktivní metabolity kyslíku; Chemiluminiscence

Bibliographic Entry

Author	Petra Antovská Faculty of Science, Masaryk University Department of biochemistry
Title of Thesis:	The effect of polyaniline nanoparticles fractions on oxidative burst of human neutrophils
Degree programme:	Applied biochemistry
Field of Study:	Applied biochemistry
Supervisor:	Mgr. Tomáš Perečko, Ph.D.
Academic Year:	2015/2016
Number of Pages:	42
Keywords:	Polyaniline; Biocompatibility; Neutrophils; Oxidative burst; Reactive oxygen species; Chemiluminescence

Abstrakt

Polyanilin (PANI) je vodivý polymer se stále rostoucím významem na poli biomedicíny. Proto jsou syntetizovány stále nové a nové formy této látky, které jsou orientovány na co nejlepší zpracovatelnost a biokompatibilitu. V této bakalářské práci jsou testovány tři takové látky, frakce kopolymeru PANI s poly(2-akrylamido-2-metyl-1-propansulfonát)-em (PAMPSA). Konkrétně je zde zkoumán jejich vliv na produkci reaktivních metabolitů kyslíku (RMK) v plné krvi a izolovaných lidských neutrofilech. Navíc je zde testována schopnost jednotlivých frakcí působit na produkci RMK v bezbuněčném prostředí. Bylo zjištěno, že nízké koncentrace všech tří frakcí nemají na oxidační vzplanutí v plné krvi nebo izolovaných neutrofilech vliv a z tohoto hlediska by tudíž mohly být použity pro biomedicínské účely.

Abstract

Polyaniline (PANI) is a conducting polymer with evergrowing importance in the field of biomedicine. Therefore, new forms of this substance, oriented towards the best possible processability and biocompatibility, are being synthesized. In this bachelor thesis, three such substances, fractions of PANI copolymer with poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonate) (PAMPSA), were tested. Particularly, their effect on reactive oxygen species (ROS) production in whole blood and isolated neutrophils was examined. In addition, the ability of each fraction to affect ROS production in cell-free environment was tested. It was found out that low concentrations of all three fractions did not affect the oxidative burst, and thus, according to this criterion, they can be used for biomedical applications.

MASARYKOVA UNIVERZITA
Přírodovědecká fakulta

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Akademický rok: 2015/2016

Ústav: Ústav biochemie

Studentka: Petra Antovská

Program: Aplikovaná biochemie

Obor: Aplikovaná biochemie

Ředitel *Ústavu biochemie* PřF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje bakalářskou práci s tématem:

Téma práce: Účinek frakcí polyanilinových nanočástic na oxidační vzplanutí lidských neutrofilů

Téma práce anglicky: The effect of polyaniline nanoparticles fractions on oxidative burst of human neutrophils

Oficiální zadání:
Cílem bakalářské práce je testování biokompatibility polyanilinových frakcí na vybraném modelu. Student se po teoretickém seznámení s tématem a vypracováním literární rešerše naučí metodiku detekce reaktivních forem kyslíku v plné krvi a na izolovaných neutrofilech. Dále zvládne postup izolace lidských neutrofilů a detekci reaktivních metabolitů kyslíku v bezbuňkovém systému. Je vyžadována aktivní účast studenta na plánování a realizaci experimentů s pravidelnou docházkou do laboratoře. 1. Vypracování literární rešerše - význam neutrofilů v imunitní odpovědi - charakterizace oxidačního vzplanutí neutrofilů - metodické přístupy při stanovení produkce reaktivních metabolitů kyslíku v neutrofilech 2. Vypracování protokolu na stanovení oxidačního vzplanutí neutrofilů v plné krvi a v izolovaných neutrofilech 3. Účinek testovaných látek 4. Vypracování bakalářské práce

Jazyk závěrečné práce: čeština

Vedoucí práce: Mgr. Tomáš Perečko, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Lukáš Kubala, Ph.D.

Datum zadání práce: 22. 9. 2015

V Brně dne: 7. 10. 2015

Souhlasím se zadáním (podpis, datum):

Petra Antovská **studentka**	Mgr. Tomáš Perečko, Ph.D. **vedoucí práce**	doc. RNDr. Oldřich Janiczek, CSc. **zástupce ředitele Ústavu biochemie pro pedagogické záležitosti**

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce Mgr. Tomášovi Perečkovi, Ph.D. za všechny jeho cenné rady a trpělivost a doc. Ing. Petru Humpolíčkovi, Ph.D. za podněty k mé práci a poskytnuté informace. Dále bych ráda poděkovala celému týmu Oddělení patofyziologie volných radikálů Biofyzikálního ústavu AV ČR za příjemnou pracovní atmosféru. V neposlední řadě bych zde také chtěla poděkovat mé rodině a přátelům za jejich podporu po celou dobu mého studia.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Brno 30. dubna 2016 ……

Petra Antovská

Obsah

Seznam použitých zkratek 9

Úvod 10

Neutrofilní granulocyty 11

Mechanizmy mikrobicidní funkce 12

Migrace 12

Rozpoznávací mechanizmy 13

Fagocytóza 14

Degranulace 15

Tvorba extracelulárních pastí 16

Reaktivní metabolity kyslíku 17

Produkce RMK v neutrofilech a úloha v imunitní odpovědi 18

Měření oxidačního vzplanutí 19

Polyanilin 21

Testované vzorky 23

Metodika a materiál 25

Zásobní roztoky připraveny v naší laboratoři 25

Chemiluminiscenční stanovení produkce RMK v plné krvi 26

Izolace lidských neutrofilů 26

Chemiluminiscenční stanovení produkce RMK izolovanými neutrofily 27

Ovlivnění chemiluminiscence v bezbuněčném prostředí 27

Výsledky 29

Časový průběh měření 29

Plná krev 30

Izolované neutrofily 32

Bezbuněčné prostředí 34

Korelace 35

EC50 36

Diskuse 37

Závěr 39

Seznam použité literatury 40

Seznam použitých zkratek

BB	bezbuněčné prostředí
CAT	kataláza
CL	chemiluminiscence
CR	receptory sérového komplementu, z angl. Complement Receptor
DCFH-DA	dichlorfluorescein-diacetát
FcγR	Fcγ-receptory
GPX	glutationperxidáza
HBSS	Hanksův roztok, z angl. Hank's Balanced Salt Solution
HRP	křenová peroxidáza, z angl. HorseRadish Peroxidase
IN	izolované neutrofily
IS	imunitní systém
LPS	lipopolysacharidy
MPO	myeloperoxidáza
NETs	extracelulární pasti neutrofilů, z angl. Neutrophil Extracellular Traps
NOX	NADPH-oxidáza
OS	oxidační stres
OZP	opsonizovaný zymosan, z angl. Opsonized Zymosan Particles
PAMPs	molekulové vzory patogenity, z angl Pathogen-Associated Molecular Patterns
PAMPSA	poly(2-akrylamido-2-metyl-1-propansulfonát)
PANI	polyanilin
PBS	fosfátový pufr, z angl. Phosphate Buffered Saline
PHPA	*p*-hydroxyfenylacetát
PK	plná krev
PMA	4β-forbol-12β-myristát-13α-acetát
PRRs	receptory rozeznávající molekulové vzory, z angl. Pattern Recognition Receptors
RMK	reaktivní metabolity kyslíku
RT	pokojová teplota, z angl. Room Temperature
SEM	střední chyba průměru, z angl. Standard Error of the Mean
SOD	superoxiddismutáza
spo	spontánní aktivita

Úvod

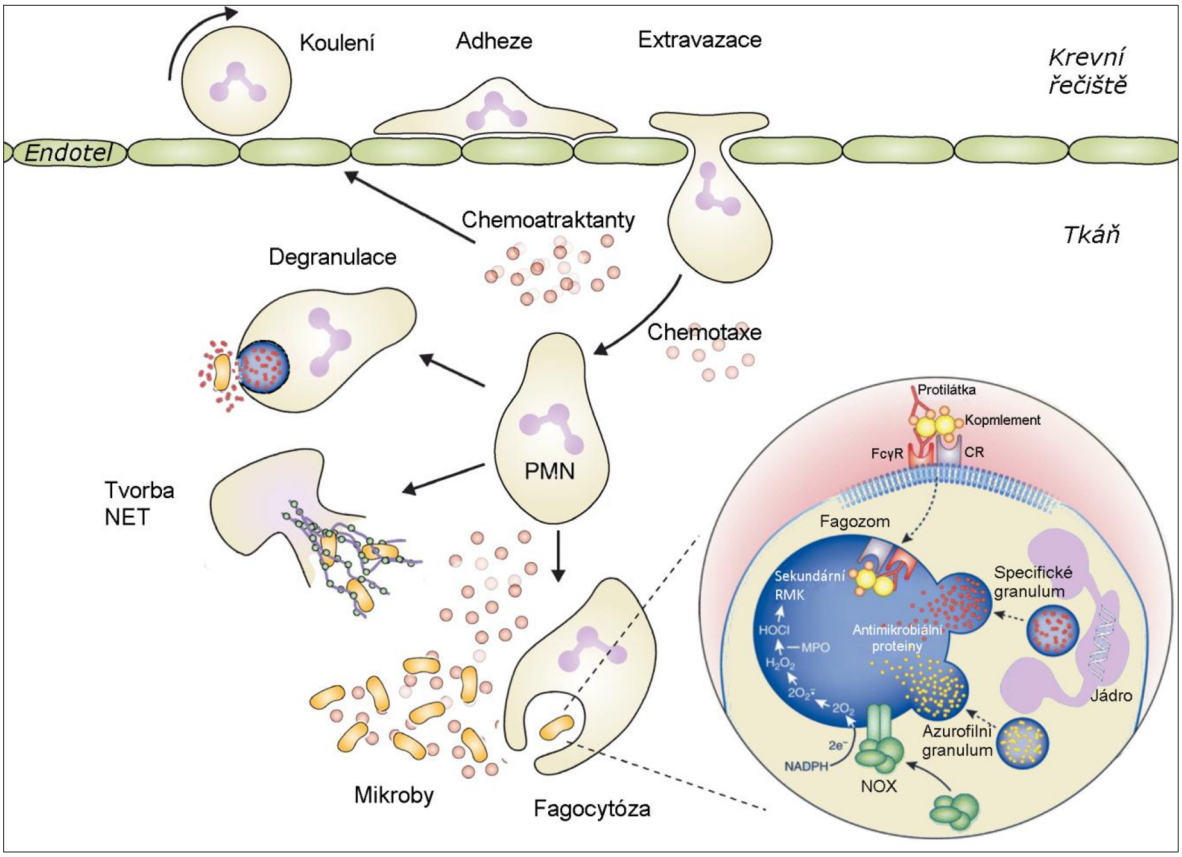
Vodivý polymer polyanilin (PANI) nachází stále víc uplatnění na poli biomedicíny. Z tohoto důvodu je poháněna vpřed syntéza takových jeho forem, které mají vlastnosti žádoucí pro účel použití a co nejlepší biokompatibilitu [1]. To také vedlo ke vzniku tří frakcí kompozitního PANI testovaných v téhle práci. Jednou ze součástí biokompatibility materiálu je jeho inertnost vůči imunitnímu systému (IS). Ten je definován jako soubor buněk, tkání a molekul, které zprostředkovávají rezistenci vůči infekcím. Jeho význam však sahá daleko za tuto primární funkci. Zasahuje nejen proti patogenům, ale i vlastním poškozeným nebo pozměněným buňkám (např. tumory), cizím buňkám (transplantace) nebo materiálům. Obranné mechanizmy lidského organizmu můžeme rozdělit na vrozenou (nespecifickou) a získanou (specifickou, adaptivní) imunitu [2], [3]. Systémy vrozené imunity jsou v organizmu přítomny už od narození a poskytují okamžitou, ale nespecifickou odpověď. Nezáleží tedy na závažnosti ohrožení, nebo jestli už se s ním organizmus setkal, odpověď bude pokaždé stejná. I když se s časem nevyvíjí, jde o velice efektivní první linii obrany. Skládá se z několika složek – mechanické bariéry (kůže, sliznice), chemické a fyzikální bariéry (hlen, žaludeční šťáva, pohyb cilií dýchacích cest), buňky IS (neutrofily, makrofágy, NK-buňky) a látky (komplement). Z komplexních mechanizmů sem můžeme zařadit kýchání, kašel, ale i zánět. Poslední jmenovaný děj se objevuje v reakci na jakoukoliv infekci nebo poranění. Jeho znaky jsou začervenání, lokální zvýšení teploty, otok a bolest [3]. Imunita adaptivní je evolučně mladší. Aktivuje se po setkání s cizorodými částicemi a jejím charakteristickým rysem je imunologická paměť. K úplnému rozvoji tohoto typu imunitní reakce je zapotřebí několika dní, někdy až týdnů. Avšak na každé další vystavení stejnému podnětu jsou tyto mechanizmy schopny reagovat rychleji a lépe. Specifická imunita je zprostředkována buňkami (T-lymfocyty) a humorálními mechanizmy (protilátky produkované B-lymfocyty) v reakci na specifické antigeny [4]. Protože se jako první z buněk IS (kromě makrofágů osídlujících tkáně) objevují v místě poškození tkáně, jsou neutrofily dobrým začátkem testování reakce IS na PANI. Po aktivaci se v neutrofilech spouští oxidační vzplanutí, proces, při kterém dochází k spotřebě kyslíku za vzniku jeho reaktivních metabolitů (RMK), jako je superoxidový aniont, peroxid vodíku nebo kyselina chlorná [5]. Naším cílem bylo zjistit, jakým způsobem, a jestli vůbec, ovlivňují testované frakce PANI aktivitu neutrofilů, a to skrz sledování jejich oxidačního vzplanutí.

Neutrofilní granulocyty

Nazývány též polymorfonukleární leukocyty, nebo zkráceně jen neutrofily, jsou tyto buňky nejpočetnějším druhem bílých krvinek v periferní krvi člověka. Celkové množství cirkulujících neutrofilů je 1800-7700 buněk na mikrolitr krve, co představuje 60-70 % všech leukocytů v krvi, avšak jenom 1-2 % z celkového množství dospělých, plně diferencovaných neutrofilů v organizmu. Zbytek je uložen v rezervě hlavně v kostní dřeni, v menším množství také v játrech, slezině a plicích [2], [4], [6], [7]. Zásobní a cirkulující frakce jsou v dynamické rovnováze, ovlivňované zánětlivými cytokiny a bakteriálními produkty. Protože jsou neutrofily krátce žijícími leukocyty s poločasem života v periferní krvi jen 6-8 hodin, probíhá v kostní dřeni jejich diferenciace z kmenových buněk přes myeloidní prekurzor nepřetržitě. Denní produkce může být až 2×10^{11} buněk [4]–[6]. Během dozrávání přechází neutrofil několika stádii, konkrétně myeloblast, promyelocyt, myelocyt, metamyelocyt, nesegmentovaný neutrofil a segmentovaný neutrofil. Přechod mezi myeloblastem a promyelocytem je charakterizován objevením granul v cytoplazmě, přičemž jejich počet a složení se dále vyvíjí zároveň s vývinem neutrofilu. Zralý cirkulující neutrofil má průměr 7-10 μm, jádro segmentované do třech až pěti spojených laloků a jeho cytoplazma obsahuje sekreční vezikuly a tři typy granul – azurofilní (primární), specifická (sekundární) a gelatinázová (terciární) [2], [5], [8]. Během diferenciace neutrofilu se jako první tvoří azurofilní granula. Jsou největší ze všech typů a mají za úkol splynout s fagozomem a zničit pohlcený mikroorganizmus. Jejich charakteristickou složkou je myeloperoxidáza (MPO), jeden z rozhodujících enzymů oxidativního vzplanutí. Dále obsahují defenziny, lysozym a množství hydrolytických a proteolytických enzymů, všechno v prostředí o pH 4-5. Následně se formují granula specifická, která jsou charakterizována přítomností laktoferinu. Také obsahují širokou škálu antimikrobiálních látek, včetně lysozymu. Tyto granula se spojují jak s fagozomem, tak s cytoplazmatickou membránou neutrofilu, uvolňujíc svůj obsah do extracelulárního prostoru. Poslední se tvoří gelatinázová granula, která jsou nejmenší. I když obsahují několik mikrobicidních látek, jejich hlavní úlohou je uskladňovat metaloproteinázy, například gelatinázu [4], [9]. Tohle tradiční dělení však úplně neodpovídá skutečnosti. Granula vznikají fúzí vezikul odštěpovaných z Golgiho aparátu, což je průběžný proces. Jak zrající neutrofil postupně mění svůj transkripční profil, obsah granul se mění. To vede ke kontinuu druhů granul s překrývajícími se obsahy, ne k jasně rozlišitelným třem druhům s přesně definovanými obsahy [9].

Mechanizmy mikrobicidní funkce

Neutrofily patří k stěžejním buňkám vrozené neboli nespecifické imunity. Jako první z celé řady bílých krvinek se objevují v místech zánětu, kam migrují na základě chemických signálů (cytokiny, chemokiny) a vykonávají zde svou mikrobicidní funkci třemi základními mechanizmy – fagocytózou, degranulací a tvorbou NETs – extracelulárních pastí neutrofilů [5]. Obrázek 1 obsahuje schematické znázornění těchto procesů.



Obrázek 1 Mechanizmy mikrobicidní funkce, upraveno dle [7], [10]

Kromě mikrobicidní funkce plní neutrofily také funkci prozánětlivou prostřednictvím produkce chemokinů a cytokinů (nejvíce interleukin 8), které mají klíčovou roli v náboru makrofágů, dendritických buněk, T-lymfocytů a dalších neutrofilů do místa zánětu a v modulaci jejich zánětlivých odpovědí. Naopak v pozdní fázi zánětu indukují neutrofily vlastní apoptózu a následné pohlcení a degradaci makrofágy, čím přispívají k ukončení zánětlivé reakce a omezují poškození vlastních tkání [9], [11].

Migrace

V reakci na prozánětlivé látky (histamin, RMK, interleukin 17 a další) produkované v poškozené tkáni exprimují přilehlé buňky endotelu na svůj luminální povrch E- a P-selektin. Ty tvoří s ligandy na povrchu neutrofilů jako jsou L-selektin, P-selektin glykoproteinový

ligand 1, E-selektin ligand 1 a CD44, reverzibilní vazbu, která zpomaluje jejich pohyb v krevním řečišti. Tahle fáze se nazývá kutálení („rolling“). Následuje adheze neutrofilů na endotel, která je zprostředkována ireverzibilní vazbou mezi leukocytárními integriny (CD11a/CD18, CD11b/CD18) neutrofilů a povrchovými glykoproteiny ICAM-1 endoteliálních buněk. Doprovodným jevem adheze je polarizace neutrofilního granulocytu na vedoucí okraj s lamellipodii (listovitými výběžky), kde jsou koncentrovány receptory pro chemokiny a indukci fagocytózy, a na chvostovou část obsahující kontraktilní aktinomyosinový systém. Dalším krokem je extravazace neutrofilů, teda jejich přestup z krve do tkáně, který může probíhat dvěma způsoby. Prvním a preferovaným je paracelulární (mezi endoteliálními buňkami), který vyžaduje uvolnění mezibuněčných spojení typu „tight junctions“. Druhým, podstatně méně využívaným a také méně prozkoumaným, je transcelulární způsob. Při něm jsou neutrofily obaleny membránou endoteliálních buňek a prostupují skrz ně do tkání. Tam následují gradient chemokinů až do ložiska zánětu, kde je jejich koncentrace nejvyšší a již zde neexistuje žádný rozeznatelný gradient. Hlavním chemoatraktantem pro neutrofily je interleukin 8, dále také reagují na komplementové fragmenty C3a a C5a, leukotrien B_4 (LTB_4), faktor aktivující destičky (PAF), chemotaktické peptidy z bakteriálních proteinů (nejznámější – fMLP – formyl-metionyl-leucyl-fenylalanin) [4], [5], [8], [12]. I když mají mnohé chemoatraktanty schopnost vyvolávat degranulaci a produkci RMK, aktivace neutrofilů zpravidla vyžaduje koncentrace stimulujících látek mnohem vyšší, než jsou potřebné pro chemotaxi. Tím je aktivace pravděpodobně pozdržena, až dokud neutrofily nedosáhnou místa infekce, kde jsou koncentrace stimulujících látek nejvyšší [10]. Aktivní pohyb tkání uskutečňují neutrofily tím, že do svého okolí vylučují hydrolytické enzymy, které částečně štěpí složky mezibuněčné hmoty a posunují se pomocí reverzibilních adhezivních interakcí svých povrchových adhezivních molekul s molekulami mezibuněčné hmoty [4].

Rozpoznávací mechanizmy

Neutrofily rozpoznávají množství bakteriálních produktů, rozpustných i vázaných na membrány, které se označují PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns). Jejich příkladem jsou lipopolysacharidy (LPS), lipoproteiny nebo flagelin. Neutrofily reagují také na DAMPs (Damage-Associated Molecular Patterns), látky uvolňované z poškozených nebo nekrotických lidských buněk, které vyvolávají neinfekční zánětlivou odpověď. Příkladem může být ATP, amfoterin (HMGB1 – High Mobility Group Protein B1) nebo také fragmentovaný kolagen. Všechny tyto látky jsou přímo rozpoznávány tzv. PRR receptory

(Pattern Recognition Receptors - receptory rozeznávající molekulové vzory), které jsou exprimovány na povrchu neutrofilů. K nim kromě jiných patří také Toll-like receptory (TLRs) a receptory pro *N*-formyl peptidy (FPRs – Formyl Peptide Receptors). Zapojení těchto receptorů aktivuje signální dráhy, které prodlužují životnost buněk, spouštějí fagocytózu, indukují uvolňování cytokinů a chemokinů, vyvolávají degranulaci a podněcují produkci RMK neboli oxidační vzplanutí, které je charakteristickým znakem aktivace neutrofilů, obvykle sledovaným u *in vitro* pokusů. Ke spuštění fagocytózy – pohybu neutrofilu a pohlcení mikroba skrz cesty ovlivňující reorganizaci cytoskeletu – výrazně přispívá opsonizace mikroorganizmu specifickými protilátkami nebo složkami komplementu. K tomu účelu neutrofily exprimují Fcγ-receptory (FcγR) a receptory sérového komplementu (CR). Tyto spolu s PRRs maximalizují rozpoznání a fagocytózu mikroorganizmů pronikajících do tkáně [5], [9], [10], [13].

Fagocytóza

Jde o hlavní mechanizmus odstraňování patogenů a odumřelé tkáně. Je to aktivní, receptory zprostředkovaný proces, během kterého je částice obepnuta membránou neutrofilu a pohlcena do vakuoly zvané fagozom. K tomuto účelu jsou neutrofily vybaveny specializovanými receptory, díky nimž jsou schopny pohltit jak opsonizované, tak i neopsonizované částice. I když je výsledek stejný, proces internalizace se liší a závisí na typu interakce mezi neutrofilem a mikroorganizmem. Ta může být přímá, prostřednictvím PRRs rozpoznávajících PAMPs, nebo zprostředkována opsoniny. Druhý případ je mnohem lépe popsán a dále se dělí dle typu opsoninů [9], [14]. Fagocytóza částic označených protilátkami IgG je zprostředkována FcγR (CD32 a CD16), kým CR (CD35 a CD11b/CD18) umožňují pohlcení částic označených složkami komplementu. Signální dráhy, jako i samotný proces fagocytózy spouštěn těmato dvěma třídami receptorů, jsou odlišné. Stimulace FcγR aktivuje kromě jiných PI3-kinázu a Rho proteiny (skupina malých GTPáz, které hrají důležitou roli v regulaci aktinového cytoskeletu), výsledkem čehož je formace pseudopodických výběžků membrány, které se natahují a pěvně přichytávají na povrch částice, obklopí ji a uvězní. Na druhou stranu fagocytóza cílů opsonizovaných C3b složkou komplementu membránové výběžky nevyžaduje, částice se do neutrofilu vnoří [12], [13]. Fagozom nezávisle na mechanizmu jeho vzniku slouží k omezení zdrojů živin pohlceného mikroorganizmu a poskytuje neutrofilu izolovaný prostor, který může naplnit řadou toxických, mikrobicidních látek. Vznikající fagozom je pro mikroorganizmus relativně neškodný. Své smrtící vlastností nabývá až po rychlém procesu zrání. Jde o postupný dynamický proces zahrnující fúzi

fagozomu s granuly a sekrečními váčky i odebírání složek fagozomu tvorbou vezikul. Tyto postupné interakce přinášejí obrovské změny ve složení obsahu i membrány fagozomu, spočívající hlavně v obdržení enzymů oxidačního vzplanutí a antimikrobiálních proteinů. Také pH ve fagozomu se postupně mění, zprvu je neutrální až mírně zásadité (do 8), a jenom pozvolna (během cca 30 minut) klesá do kyselých hodnot [9], [10], [14], [15]. Neutrofily používají ke zničení pohlcených částic víceré strategie, které můžeme rozdělit na závislé na kyslíku a nezávislé na kyslíku. V klasickém ponětí je aktivace neutrofilu úzce spjata s produkcí superoxidového aniontu $O_2^{\bullet -}$ a dalších RMK procesem závislým na kyslíku, nazývaným oxidační vzplanutí. Jeho prvním krokem je sestavení enzymatického komplexu NADPH-oxidázy (NOX) na membráně fagozomu z jeho složek. Jednou je membránově vázaný flavocytochrom b558, původem z membrány specifických granul, který slouží jako katalytické jádro komplexu a je přenašečem elektronů. Druhou složkou jsou cytoplazmatické proteiny ($p40^{phox}$, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$) sloužící jako kofaktory oxidázové aktivity. Při aktivaci neutrofilu migrují k membráně, kde se připojují k flavocytochromu b558 a vzniká aktivní NOX. Ta generuje velké množství $O_2^{\bullet -}$ a spouští tak celou kaskádu oxidačního vzplanutí popsanou v další kapitole. Antimikrobiální procesy nezávislé na kyslíku, ještě donedávna podceňovány a přehlíženy, výrazně přispívají k unikátní mikrobicidní kapacitě neutrofilu. Důkazem je schopnost neutrofilů zabíjet určité organizmy za anaerobních podmínek, kdy produkce RMK není přítomna. Jsou zprostředkovány proteiny, které se do fagozomu dostávají v procesu degranulace popsaným níže [10], [12].

Degranulace

Tento pojem označuje proces vylití obsahu granul neutrofilu do fagozomu nebo extracelulárního prostoru. Na místo určení jsou dopravovány řízenou mobilizací a cílenou fúzí. Přesná regulace a načasování zajišťuje efektivní dodání obsahu granul a zabraňuje poškození tkáně. Předpokládá se existence několika přepojených řídících mechanizmů, ty však nejsou ještě plně definovány. Kupříkladu jde o zvýšení intracelulární hladiny Ca^{2+} nebo aktivaci proteinkináz [12], [13], [16]. Fúze granul s cytoplazmatickou membránou obnáší proteinové interakce, které je ukotvují v jejich konečné destinaci, a proteiny podporující interakci mezi fosfolipidovou dvouvrstvou granula a jeho cílovou membránou. Pořadí degranulace a cíle jednotlivých druhů granul se liší. Nejsnáze jsou mobilizovány sekreční vezikuly, kterých obsah je důležitý v počátečních fázích zánětu. Obsahují víceré typy membránových receptorů, včetně CR a FcγR, a spojují se s membránou neutrofilu už ve fázi adheze na endotel. Následně, ihned po extravazaci, jsou mobilizována gelatinázová granula,

čím jsou exprimovány další receptory pro chemoatraktanty a do mimobuněčného prostoru se vylévají enzymy degradující složky extracelulární matrix. Po indukci fagocytózy jsou mobilizována specifická granula, která mohou splývat jak s cytoplazmatickou membránou, tak i vzniklým fagozomem [6], [10], [12], [16]. Obsahují různé antimikrobiální proteiny. Patří k nim rodina katelicidinů, které vytvářejí póry v membráně pohlceného mikroorganizmu. V granulu jsou uloženy v neaktivní formě, aktivují se po rozštěpení elastázou, co naznačuje spolupráci s azurofilními granuly. Dalšími příklady jsou laktoferin, který slouží k vychytávání železa, fosfolipáza A2 a lysozym. Také jsou zdrojem chemotaktických a opsoninových receptorů a flavocytochromu b558. NOX se tedy sestavuje i na cytoplazmatické membráně a dochází tak k extracelulární produkci RMK. Jako poslední jsou mobilizována azurofilní granula, která svůj obsah vylučují téměř výhradně do fagozomu a jsou zdrojem většiny antimikrobiálních proteinů do něj uvolňovaných. Příkladem jsou póry tvořící defenziny, které jsou účinné vůči Gram-negativním i Gram-pozitivním bakteriím. Kromě mikrobicidního působení jsou defenziny schopny regulovat zánětlivý proces vazbou na inhibitory proteáz. Dalším příkladem je BPI (Bactericidal/Permeability Increasing protein), který je jedním z nejaktivnějších účastníků v obraně proti Gram-negativním bakteriím. Jeho selektivita spočívá v schopnosti vázat se na LPS. Zvláštní skupinou mikrobicidních látek jsou proteázy, různě přítomné ve všech typech granul. V neutrofilech nacházíme jejich čtyři třídy - serinové (elastáza, proteináza 3), metaloproteinázy (kolagenáza, gelatináza), cysteinové a aspartátové. První dvě skupiny jsou nejaktivnější při neutrálním pH, hrají tak roli hlavně v degradaci extracelulárních proteinů. Zbývající dvě skupiny jsou aktivní v kyselém prostředí a účastní se intracelulárního rozkladu proteinů [10], [12], [16].

Tvorba extracelulárních pastí

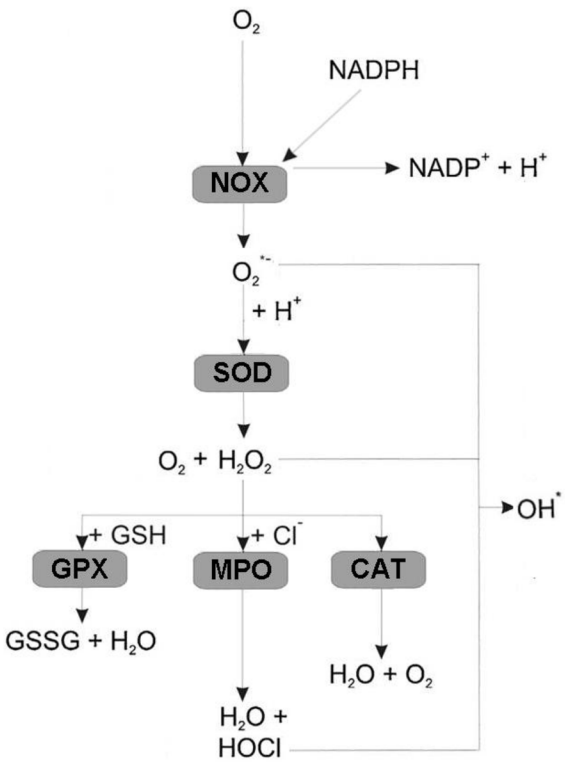
Vedle fagocytózy a degranulace byl objeven i třetí mikrobicidní mechanizmus neutrofilů. Ty mohou po stimulaci procházet tzv. NETózou, aktivní formou programované buněčné smrti. Mechanizmus jejího navození ještě není plně pochopen. Je však známo, že zahrnuje aktivitu NOX, dezintegraci obalu jádra i většiny membrán granul a rozvolnění jaderního chromatinu. Ukončena je zformováním NETs. Tyto vláknité struktury obsahují dekondenzovaný chromatin, histony a granulární i cytoplazmatické antimikrobiální proteiny. Jsou schopny vázat a pravděpodobně i zabíjet mikroby. Předpokládá se, že jejich účinek spočívá v omezení šíření mikroorganizmů a jejich usmrcení tím, že jsou vystaveny vysokým lokálním koncentracím mikrobicidních látek. Prozatím však pro toto tvrzení existují jenom nepřímé důkazy [9], [10], [17].

Reaktivní metabolity kyslíku

Jsou definovány jako látky obsahující kyslík, které jsou reaktivnější než samotný molekulární kyslík. Tyto vysoce chemicky reaktivní molekuly, produkované téměř ve všech organizmech vystavených kyslíku, byly objeveny, když se u fagocytujících leukocytů zjistilo, že spotřebovávají značné množství kyslíku v procesech, kterých se neúčastní mitochondrie. V normálně fungující buňce vznikají RMK převážně únikem elektronů z elektronového transportního řetězce mitochondrií, hlavně z koenzymu Q, na molekulární kyslík, přičemž vzniká superoxidový aniont. Dalšími endogenními zdroji RMK jsou NOX, xantinoxidáza, lipoxygenázy, cyklooxygenázy, cytochrom P450, měďnaté a železnaté ionty, hemové skupiny, metaloproteiny, elektronové transportní řetězce lokalizované v endoplazmatickém retikulu, cytoplazmatické membráně i obalu jádra a metabolizmy kyseliny arachidonové a oxid dusnatého. Příkladem exogenních zdrojů RMK jsou kouř nebo UV záření [18]–[21]. I když mají společné označení a je náročné je od sebe odlišit i specifickými analýzami, nemůžou být reaktivní metabolity kyslíku považovány za jedinou entitu. Jednotliví zástupci této skupiny se kromě chemického složení liší také ve stabilitě, reaktivitě i schopností procházet membránami. Typickými zástupci jsou superoxidový aniont, hydroxylový radikál a peroxid vodíku, dále sem patří též singletový kyslík, ozon, kyslíkaté kyseliny halogenů a organické peroxidy. Určité hladiny RMK v buňkách jsou fyziologické, mají totiž signální úlohu a zprostředkovávají víceré buněčné odpovědi, avšak jejich nadbytek může vést rozličnými mechanizmy až k buněčné smrti. Mnohé jejich účinky jsou protichůdné, v rámci jednotlivých buněk jsou zapojeny do růstu, nekrózy, apoptózy, aktivity proteáz, regulace funkce mitochondrií i exprese genů. Na úrovni systémů pak hrají roli v imunitních reakcích a plasticitě nervových synapsí, která je podstatou učení a tvorby vzpomínek. Jako při každém signalizačním mechanizmu se mohou RMK stát cytotoxickými, pokud je signál příliš silný, trvá příliš dlouho nebo se objeví na špatném místě nebo ve špatném čase. Proto je jejich regulace klíčová pro správné fyziologické funkce [9], [19], [20]. Živé organizmy jsou k tomuto účelu vybaveny komplikovanými vícestupňovými antioxidačními systémy, které pracují na principu eliminace RMK nebo minimalizace jejich negativních efektů. K přirozeným antioxidantům v lidském těle patří několik enzymů. Rodina glutationperoxidáz (GPX) je zodpovědná hlavně za vychytávání přebytečného H_2O_2 a redukci peroxidovaných lipidů. Také kataláza (CAT) reguluje hladinu peroxidu vodíku. Rozkládá ho na vodu a molekulární kyslík. Enzym superoxiddismutáza (SOD) zas hraje klíčovou roli v odklízení $O_2^{\bullet -}$. Jeho velikou výhodou je schopnost fungovat v širokém rozpětí pH, od 5 do 9,5.

Za zmínku stojí také neenzymové antioxidanty – vitamíny A, C, D, E, selen, mangan a další. Vystavení buněk chronickému nebo intenzivnímu stresu může vyvolat tak intenzivní produkci RMK, že překročí antioxidační kapacitu buňky. To vede ke vzniku oxidačního stresu (OS). Ten je v současnosti definován jako situace, kdy je koncentrace RMK přechodně nebo chronicky zvýšená tak, že narušuje metabolizmus a regulační mechanizmy buňky a poškozuje buněčné struktury. Dlouhodobý OS může vést až ke vzniku nejrůznějších nemocí. Příkladem je vznik nádorů nebo chronické selhání ledvin. Svou roli mají RMK také v některých plicních, kardiovaskulárních (ateroskleróza) a neurodegenerativních (Alzheimer, Parkinson) onemocněních [12], [19], [21].

Produkce RMK v neutrofilech a úloha v imunitní odpovědi



Obrázek 2 Schéma produkce RMK v neutrofilech, upraveno dle [6]

Jednou z hlavních biologických funkcí zahrnujících RMK je imunitní odpověď. Pro tento účel vznikají ve fagocytujících buňkách procesem oxidačního vzplanutí, při kterém dochází k spotřebě velkého množství kyslíku. Schematicky je zobrazen na obrázku 2. Začíná poskládáním enzymového komplexu NADPH-oxidázy. Fagocytární NOX má redoxní centrum, které přenáší elektron z cytoplazmatického NADPH na molekulu kyslíku ve fagozomu nebo extracelulárním prostředí, čímž generuje $O_2^{\bullet-}$. Přenos elektronu je vícekrokový proces, během kterého jsou elektrony postupně přepravovány několika složkami enzymu. Samotný superoxidový aniont má jenom malý mikrobicidní potenciál. Větší význam má jeho využití jako substrátu pro produkci širokého sortimentu sekundárních RMK [10], [15], [19]. $O_2^{\bullet-}$ dismutuje spontánně (v kyselém prostředí) nebo za katalýzy SOD na H_2O_2. Ten pak může zpětně reagovat se superoxidem a tvořit hydroxylový radikál a singletový kyslík. Druhou variantou je jeho zapojení do produkce halogenovaných oxidantů katalyzované myeloperoxidázou. Jde o hemoprotein lokalizovaný v monocytech a azurofilních granulech neutrofilů, který je při aktivaci těchto buněk uvolňován do fagozomu nebo extracelulárního prostředí. MPO má široký rozsah možných substrátu, co vede k široké

škále různých vedlejších produktů (např. chloraminy). Hlavním produktem je kyselina chlorná, účinné oxidační a mikrobicidní činidlo, vznikající z H_2O_2 a Cl^-. HOCl dále oxiduje hemoproteiny a nukleotidy (hlavně guanin) a vede ke vzniku chloračních produktů, peroxidu tyrosinu a reaktivních aldehydů [10], [12], [15]. Primárním místem působení chloračních reakcí je plazmatická membrána mikrobů. Smrt bakterií je tak zapříčiněna ztrátou funkcí lokalizovaných na membráně, včetně aktivního transportu metabolitů, přenosu elektronů, ATP-syntázové aktivity nebo translokace proteinů. V souhrnu, umocnění aktivity NADPH-oxidázy činností MPO umožňuje nejefektivnější odpověď proti patogenům [10], [22]. V rámci imunitního systému však RMK nemají jenom úlohu zabíjet jiné buňky. Místo toho mají fyziologickou roli v modulaci imunitních odpovědí signalizací, která pravděpodobně dosahuje ke všem druhům imunitních buněk. Příkladem může být reverzibilní regulace některých enzymů (včetně fosfatáz a metaloproteináz) přímou oxidací jejich cysteinových zbytků nebo funkce H_2O_2 jako chemoatraktantu. Novější studie též ukazují, že reaktivní metabolity kyslíku mají význam i ve funkci lymfocytů. Stimulace receptorů T- i B-lymfocytů vede k produkci RMK, i když v několikanásobně nižších koncentracích (kolem jedné desetiny), než je tomu u fagocytů. Zde jejich úloha spočívá v zesílení a přenosu signálu z receptorů na efektorové molekuly [9], [19], [20].

Měření oxidačního vzplanutí

Ideální technika pro měření buněčné produkce RMK by měla:

1) být specifická pro konkrétní kyslíkový metabolit;
2) být velice citlivá;
3) neinterferovat s funkcemi buňky;
4) rozlišovat, kde jsou RMK produkovány;
5) nevyžadovat příliš drahé nebo na obsluhu náročné laboratorní vybavení;
6) jít jednoduše standardizovat.

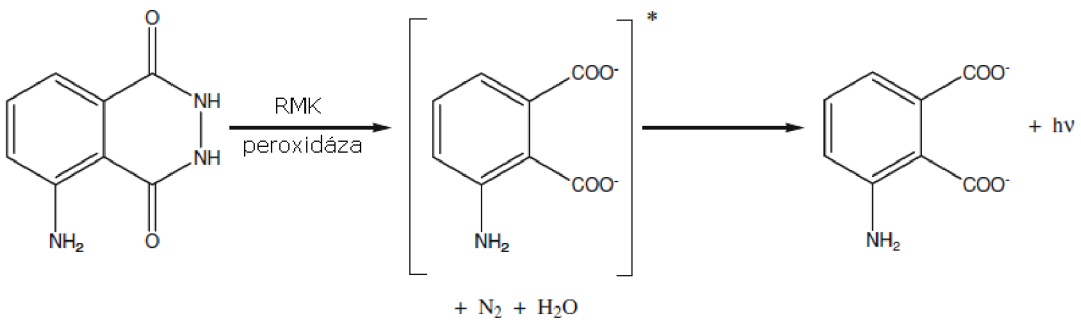
Zatím však žádná metoda splňující všechny podmínky nebyla objevena. K účelu sledování oxidačního vzplanutí však existuje poměrně široká škála metod a k dosažení co nejpřesnějších výsledků měření se často používá kombinace dvou nebo i vícerých technik. Jednotlivé metody se liší jak principy (fluorescence, precipitace a další), tak tím, co měří. Jsou metody zaměřené jen na intracelulární produkci RMK, jen na RMK objevující se extracelulárně, nebo k zjištění jejich celkové produkce. Metody se také můžou zaměřovat jenom na konkrétní druh RMK (obvykle $O_2^{\bullet-}$ nebo H_2O_2), nebo nespecificky stanovují téměř celé jejich spektrum. Specificity se obvykle dosahuje použitím různých inhibitorů [23]. Sledovat se může i spontánní produkce

RMK, častěji jsou však neutrofily uměle aktivovány. *In vitro* může být oxidační vzplanutí spuštěno rozpustnými faktory jako jsou některé chemoatraktanty a cytokiny, nebo například PMA (4β-forbol-12β-myristát-13α-acetát), který přímo aktivuje proteiny signálních drah působením na proteinkinázu C. Druhou možností je použití korpuskulárních stimulů, kterými mohou být jak opsonizované, tak i neopsonizované mikroorganizmy nebo jiné částice. Tyto vyvolávají fagocytózu a simulují tak reálnou interakci s patogeny. Většina metod využívá sondy od malých molekul až po proteiny, které s RMK tvoří relativně stabilní detekovatelné produkty [23]–[25]. Příklady metod pro detekci oxidačního vzplanutí jsou uvedeny v tabulce 1.

Princip	Příklad sondy	Detekovaný RMK	Produkce RMK
Chemiluminiscence	Luminol	Nespecificky	Celková
	Isoluminol	Nespecificky	Extracelulární
	Lucigenin	$O_2^{\bullet -}$	Extracelulární
Fluorescence	DCFH-DA	Nespecificky	Intracelulární
	PHPA	H_2O_2	Celková
Spektrofotometrie	Cytochrom C	$O_2^{\bullet -}$	Extracelulární
	Xylenolová oranž	H_2O_2, organické hydroperoxidy	Celková
Precipitace	Nitrotetrazoliová modř	$O_2^{\bullet -}$	Intracelulární

Tabulka 1 Příklady metod používaných pro detekci oxidačního vzplanutí, upraveno dle [23], [25]

V této práci byla pro detekci oxidačního vzplanutí neutrofilů používána metoda luminolem amplifikované chemiluminiscence (CL). Jejím principem je oxidace luminolu reaktivními metabolity kyslíku katalyzována MPO, která ho uvádí do excitovaného stavu. Při návratu do základního stavu vyzáří luminol energii ve formě záření (obrázek 3). Měří se intenzita tohoto záření, která odpovídá množství přítomných RMK [23].



Obrázek 3 Princip luminolem amplifikované luminiscence, upraveno dle [26]

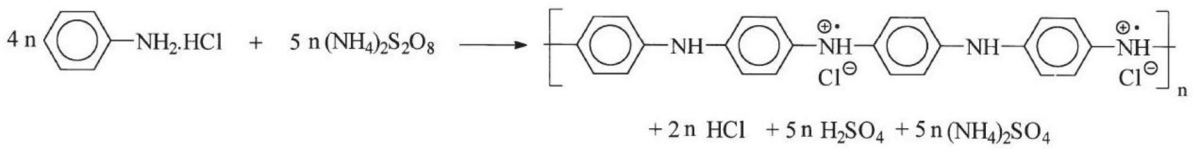
Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-ftalazindion) je nejvíce prozkoumanou a nejčastěji používanou chemiluminiscenční sondou na poli výzkumu volných radikálů. Jde o amplifikátor aktivity, a protože kvantový výtěžek této molekuly je velmi vysoký, je technika velice citlivá. Luminol je schopen procházet biologickými membránami a využívá se proto k detekci celkové produkce RMK. Naproti tomu isoluminol, lišící se jenom pozicí aminoskupiny na ftalátovém kruhu, membránami neprochází a používá se proto k měření množství extracelulárních RMK. V současnosti již existují i geneticky kódované biosenzory RMK, převážně fungující na zakódování fluorescenčních proteinů do genomu bakterií [23], [25].

Polyanilin

Je vodivý polymer, tedy látka se zpracovatelskými vlastnostmi polymerů a elektrickými vlastnostmi typickými pro kovy nebo polokovy. Jeho řetězce jsou složeny ze stovek až tisíců anilinových konstitučních jednotek a jde tedy o plnohodnotný polymer. Vodivost je zabezpečena konjugovaným systémem π elektronů a je možné ji upravovat oxidací nebo redukcí, jakož i dopováním vhodným aditivem, například HCl, H_2SO_4, kyselinou stearovou, ionty kobaltu nebo mědi. PANI má v závislosti na oxidačním stavu tři základní strukturní stavy - plně redukovaná leukoemeraldinová báze, plně oxidovaná pernigranilinová báze a částečně oxidovaná emeraldinová báze. První dvě struktury jsou spíše izolanty, zatímco protonovaná emeraldinová sůl (obrázek 4) je relativně vysoce vodivá a je tudíž ve středu zájmu vědců. PANI je díky své jednoduché syntéze, relativně levnému monomeru, upravitelným vlastnostem a lepší stabilitě oproti ostatním vodivým polymerům jednou z nejslibnějších a nejčastěji studovaných látek tohoto typu [27], [28]. Kromě jeho vodivých a optických vlastností přitahuje vědce také jeho schopnost tvořit různorodé nanostruktury. Standardní globulární nanočástice vznikají při oxidaci anilinu v silně kyselém vodním prostředí, nanotrubky v mírně kyselých roztocích a nanovlákna typicky v „zředěném režimu". Polyanilin má širokou škálu využití od analytických elektrod skrz ochranu proti korozi až po katalýzu organických reakcí. V nedávné době vedly zajímavé vlastnosti PANI k výzkumu jeho možných aplikací v biomedicíně a tkáňovém inženýrství vzrušivých tkání (srdeční i kosterní svalstvo, nervová tkáň). V těchto oborech mohou být vodivé polymery používány pro sledování životních funkcí organizmů, stejně jako pro jejich stimulaci. Smíšená elektronová a

Obrázek 4 Protonovaný emeraldin (zelené zbarvení, vysoká vodivost) [27]

protonová vodivost těchto polymerů je dělá unikátními materiály, které dokážou zprostředkovat mezifázový přenos signálu mezi iontovým a elektronovým transportem náboje na rozhraní biologických objektů a elektrod. Mnohé potenciální aplikace PANI však nejsou založeny na jeho vodivých vlastnostech. Příkladem můžou být antimikrobiální sloučeniny, podpora proliferace buněk nebo použití ve fototermické destrukci tumorů. V současnosti se také zkoumá možnost využití PANI v kontrolovaném podávání léků a jeho role ve vychytávání volných radikálů [1], [29], [30]. Právě řada aplikací v biomedicíně, které se v poslední době objevily, vznesla nároky na další vlastnosti tohoto vodivého polymeru, a to zejména biokompatibilitu (schopnost materiálu koexistovat s živými organizmy bez toho, aby je poškozoval nebo vyvolával imunitní odpověď). K polyanilinu se v tomhle ohledu vždy přistupovalo opatrně, protože jeho monomer i vedlejší produkty polymerizace (dimery, oligomery) jsou aromatické aminy, které jsou fyziologicky aktivní nebo až škodlivé. Největší známou hrozbou je karcinogenní efekt anilinového dimeru – benzidinu. Emeraldinová sůl ve formě prášku, připravená dle Technické zprávy IUPAC (viz [31] a obrázek 5), vykazuje značnou cytotoxicitu. Protože je PANI úplně nerozpustný a stabilní ve vodních prostředích, může být jen těžko toxický. Předpokládá se proto, že jeho pozorovaná cytotoxicita je spojena s přítomností složek s nízkou molekulární hmotností. Ty jsou dvojího typu. Prvním jsou oligomery anilinu a jiné vedlejší produkty polymerizační reakce, druhým kyseliny, které tvoří s PANI sůl. Pro biomedicínské využití je proto nutné polyanilin dále modifikovat. Jde hlavně o purifikační procedury, například metodami precipitace z kyseliny sírové v okyseleném metanolu nebo reprotonace [1], [29], [32].



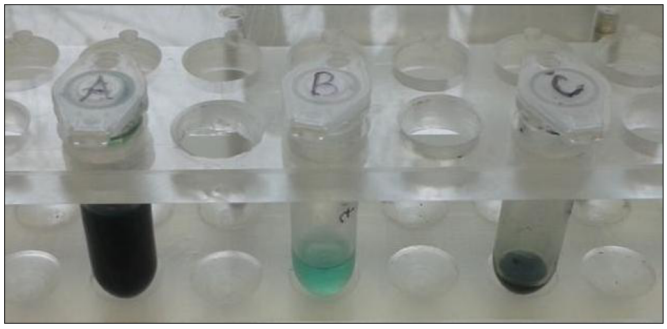
Obrázek 5 Oxidace anilin hydrochloridu peroxodisíranem amonným, vzniká polyanilin (emeraldin) hydrochlorid [27]

Dále jsou biologické aplikace PANI do jisté míry omezovány jeho nerozpustností ve vodním prostředí a jenom nízkou rozpustností dokonce i v organických rozpouštědlech, co silně ovlivňuje jeho zpracovatelnost. Značné úsilí je proto vynakládáno na přípravu lépe zpracovatelných forem tohoto polymeru. Řešením může být protonace kyselinami s dlouhými alkylovými řetězci, které zvýší jeho rozpustnost nebo kopolymerizace s nejrůznějšími látkami, od kovů a polokovů skrz nekovy až po mnohé anorganické i organické sloučeniny. Jiným přístupem je tvorba koloidních roztoků [30], [33]. Způsobů jak syntetizovat polyanilin,

a tedy i forem, ve kterých vzniká, existuje přehršel. Volba závisí na zamýšleném použití. PANI je typicky připravován oxidační polymerizací anilinu v kyselém vodním prostředí a získává se ve formě prášku. Pokud je do reakční směsi přidán vhodný ve vodě rozpustný polymer jako například polyvinylalkohol, místo sraženiny se formují koloidní částice PANI. Tento proces se označuje jako disperzní polymerace. Vyžaduje monomer rozpustný v reakčním prostředí, produkovaný polymer nerozpustný za stejných podmínek a sterický stabilizátor zabraňující makroskopické precipitaci. Vznikající polyanilinové částice mají typicky průměrnou velikost desítky až stovky nanometrů, jsou proto často považovány za nanokoloidy. Právě velikost částic disperzního roztoku je jedním z klíčových parametrů ovlivňujících chování koloidů v biologických aplikacích [28], [30], [32]. Jednou z možných metod syntézy kompozitního PANI je preparace *in situ* kopolymerizací. V této metodě jsou buď PANI i kopolymerační látka připravovány simultánně ve stejném médiu, nebo je anilin polymerován v roztoku či disperzi kopolymeru ve vhodném rozpouštědle, anebo je roztok či disperze PANI médiem pro polymeraci jeho kompozitního protějšku. Poměrně rozsáhlou skupinou kopolymeračních látek jsou polymerní kyseliny. Preparace PANI v jejich přítomnosti má několik výhod. Patří k nim zvýšená rozpustnost interpolymerních komplexů PANI ve vodě, stabilita vlastností těchto komplexů při zvýšených teplotách a ve vodním prostředí i při vysokých hodnotách pH, vysoký stupeň polymerizace PANI i při nízkých koncentracích výchozích látek a možnost upravovat strukturu PANI za účelem měnit jeho optické a elektrické vlastnosti [28], [34].

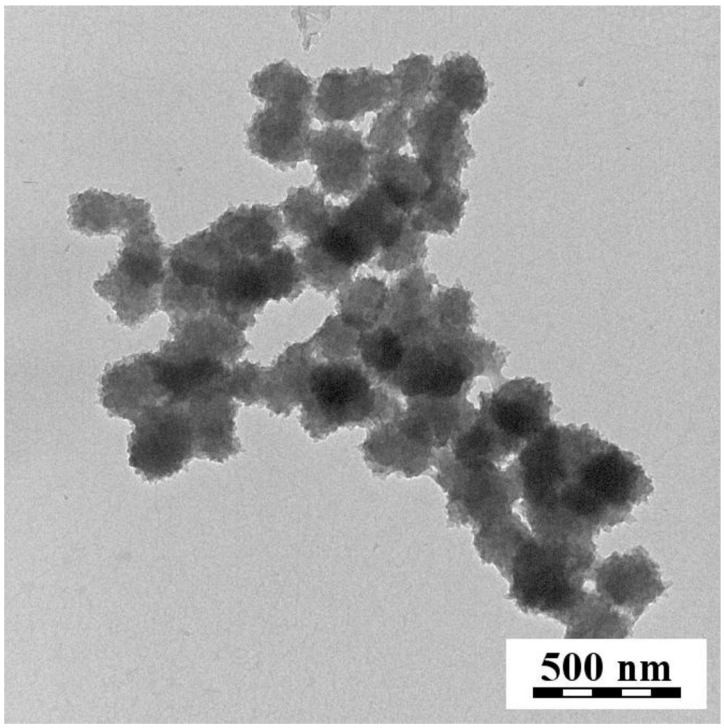
Testované vzorky

V této práci byly testovány tři látky syntetizované na Oddělení vodivých polymerů Ústavu makromolekulární chemie Akademie věd České republiky paní doktorkou Ing. Patrycja Bober, Ph.D.. Tyto látky jsou označeny jako frakce A, B a C (obrázek 6) a liší se velikostí částic nebo strukturou. Frakce A a B jsou koloidní disperzní roztoky polyanilin-poly(2-akrylamido-2-metyl-1-propansulfonát)-u (PANI-PAMPSA), připravené oxidací anilin hydrochloridu peroxodisíranem amonným o ekvimolární koncentraci ve vodním roztoku PAMPSA. Frakce A byla syntetizována z anilin hydrochloridu o koncentraci 0,1 M. Vznikají agregující částice (obrázek 7). Frakce B byla připravena ze základních látek

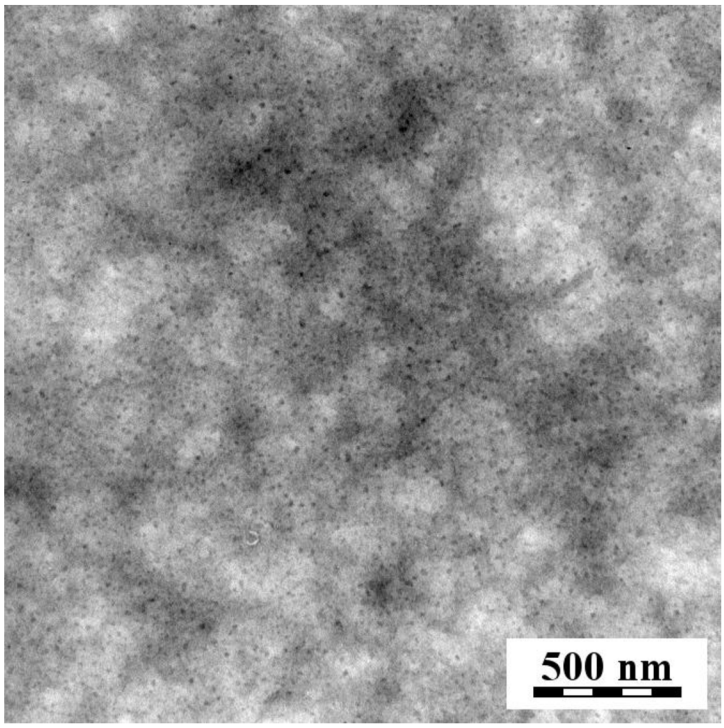


Obrázek 6 Testované frakce polyanilinu

o koncentraci 0,01 M a tvoří ji částice o tak malých rozměrech, že jsou nezměřitelné dostupným vybavením (obrázek 8). Měření velikosti částic a snímky ze světelného elektronového mikroskopu byly pořízeny na Ústavu makromolekulární chemie. Frakce C se liší svou strukturou, jde o polyanilin ve formě nanotrubek [35].



Obrázek 7 Frakce A – fotografie z elektronového mikroskopu [35]



Obrázek 8 Frakce B – fotografie z elektronového mikroskopu [35]

Metodika a materiál

Měření chemiluminiscence bylo prováděno na luminometru LM-01T (Immunotech, Česká republika). Všechny centrifugace byly provedeny na centrifuze Centrifuge 5804R (Eppendorf, Německo) nebo centrifuze Rotina 420R (Hettich Lab Technology, Německo). K měření chemiluminiscence i k izolaci neutrofilů byla použita nesrážlivá žilní krev zdravých dobrovolných dárců, kteří podepsali informovaný souhlas. Použitým antikoagulačním činidlem byl citrát sodný (Lachema, Česká republika) v poměru 100 µl citrátu na 1 ml krve. K zpracování získaných dat byly použity programy Microsoft Office Excel a GraphPad Prism. K vyloučení odlehlých hodnot byl použit Grubbsův test a k hodnocení statistické významnosti působení jednotlivých frakcí polyanilinu byl použit t-test. Nejistota měření je z důvodu interindividuální variability vyjádřena pomocí SEM (střední chyba průměru).

Zásobní roztoky připraveny v naší laboratoři

K přípravě roztoků byly používány komerčně dostupné chemikálie firem Sigma-Aldrich s.r.o. (Německo) a Lachema a.s. (Česká republika):

HBSS: 5,4 mM KCl; 0,44 mM KH_2PO_4; 0,81 mM $MgSO_4 \times 7\ H_2O$; 136,87 mM NaCl; 4,17 mM $NaHCO_3$; 0,335 mM $Na_2HPO_4 \times 12H_2O$; 5,05 mM glukóza; 1,26 mM $CaCl_2$; pH 7,4.

PBS: 136,9 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na_2HPO_4; 1,5 mM KH_2PO_4; 1,8 mM $CaCl_2$; 0,5 mM $MgCl_2 \times 6H_2O$; pH 7,4.

OZP: 200 mg zymosan A (ze *Saccharomyces cerevisiae*) se smíchá s 10 ml lidského krevního séra a 20 ml fyziologického roztoku. Směs se inkubuje 30 minut ve vodní lázni za neustálého třepání při 37 °C a následně je třikrát promyta (centrifugace 250 g, 10 minut) ve fyziologickém roztoku. Sediment je resuspendován ve 40 ml fyziologického roztoku, výsledná koncentrace je tedy 5 mg/ml. Směs je rozplněna do mikrozkumavek a zamrazena.

PMA: 1 mg PMA je rozpuštěn v 0,5 ml dimethylsulfoxidu. Výsledná koncentrace je 3,25 mM. Roztok je rozplněn do mikrozkumavek a zamrazen.

Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-ftalazindion): 1,99 mg luminolu je rozpuštěn v 1 ml PBS. Výsledná koncentrace je 10 mM. Roztok je rozplněn do mikrozkumavek a zamrazen.

Dextran (3%): 30 g/l dextranu 500 (z *Leuconostoc spp.*, MW 450,000-650,000) se rozpustí v 0,9% roztoku NaCl a filtruje přes 0,22 µm filtr. Roztok se skladuje v lednici.

Chemiluminiscenční stanovení produkce RMK v plné krvi

K ředění všech látek pro tento typ stanovení byl použit roztok HBSS. K plnění jamek mikrotitrační destičky byl použit luminol o koncentraci 1,25 mM, OZP o koncentraci 2,5 mg/ml, PMA o koncentraci 0,25 µM, všechny frakce polyanilinu o nejvyšší koncentraci 5 %, další pak klesaly desítkovou řadou až ke koncentraci 5×10^{-4} % a čerstvě odebraná krev zředěná 50krát. Látky byly na mikrotitrační destičku pipetovány dle tabulky 2, vždy jako duplikát. Všechny měřené jamky kromě *Pozadí* obsahovaly po 50 µl HBSS, luminolu a krve. Jamky *Kontrola* obsahovaly dalších 50 µl HBSS. Jamky *A1-5*, *B1-5* a *C1-5* obsahovaly navíc po 50 µl příslušné polyanilinové frakce, přičemž 1 označuje nejnižší a 5 nejvyšší koncentraci. Dále obsahovaly všechny S*pontánní* řádky po 50 µl HBSS a všechny *Aktivované* řádky po 50 µl PMA nebo OZP, dle typu měření. Jamky *Pozadí* obsahovaly 200 µl HBSS a 50 µl luminolu. Výsledné koncentrace v jednotlivých jamkách byly tedy následovné: luminol 250 µM, frakce polyanilinu v desítkové řadě 10 - 1×10^{-3} ‰ a OZP 0,5 mg/ml nebo PMA 0,05 µM.

<table>
<tr><th></th><th>1</th><th>2</th><th>3</th><th>4</th><th>5</th><th>6</th><th>7</th><th>8</th><th>9</th><th>10</th><th>11</th><th>12</th><th></th></tr>
<tr><td>A</td><td colspan="2">Kontrola</td><td colspan="2">A1</td><td colspan="2">A2</td><td colspan="2">A3</td><td colspan="2">A4</td><td colspan="2">A5</td><td>Spontánní</td></tr>
<tr><td>B</td><td colspan="2">Kontrola</td><td colspan="2">A1</td><td colspan="2">A2</td><td colspan="2">A3</td><td colspan="2">A4</td><td colspan="2">A5</td><td>Aktivovaná</td></tr>
<tr><td>C</td><td colspan="2">Kontrola</td><td colspan="2">B1</td><td colspan="2">B2</td><td colspan="2">B3</td><td colspan="2">B4</td><td colspan="2">B5</td><td>Spontánní</td></tr>
<tr><td>D</td><td colspan="2">Kontrola</td><td colspan="2">B1</td><td colspan="2">B2</td><td colspan="2">B3</td><td colspan="2">B4</td><td colspan="2">B5</td><td>Aktivovaná</td></tr>
<tr><td>E</td><td colspan="2">Kontrola</td><td colspan="2">C1</td><td colspan="2">C2</td><td colspan="2">C3</td><td colspan="2">C4</td><td colspan="2">C5</td><td>Spontánní</td></tr>
<tr><td>F</td><td colspan="2">Kontrola</td><td colspan="2">C1</td><td colspan="2">C2</td><td colspan="2">C3</td><td colspan="2">C4</td><td colspan="2">C5</td><td>Aktivovaná</td></tr>
<tr><td>G</td><td colspan="3">Pozadí</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td></td></tr>
<tr><td>H</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td><td></td></tr>
</table>

Tabulka 2 Základní rozložení látek na mikrotitrační destičce

Chemiluminiscence byla měřena po dobu 3600 sekund při teplotě 37 °C. Pro vyhodnocení byly použity hodnoty integrálu (plocha pod křivkou). V rámci zachování náhodnosti bylo v jednotlivých měřeních různě měněno pořadí řádků nebo pořadí koncentrací frakcí.

Izolace lidských neutrofilů

Čerstvě odebraná krev byla v poměru 2:1 opatrně promíchaná s 3 % dextranem a ponechána stát 35 minut při pokojové teplotě (RT – Room Temperature). Buffy coat (leukocyto-trombocytová vrstva zbylá jako supernatant po sedimentaci erytrocytů) byl navrstven na 10 ml Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, Německo), následovala centrifugace při 390 g/RT/30 min s akcelerací 1 a bez brzdy. Po odlití supernatantu byly erytrocyty, které

zůstaly v sedimentu, lyzovány přídavkem vody (Aqua pro injectione, Braun, Německo) a promícháváním pipetou po dobu 30 sekund. Hemolýza byla ukončena přidáním stejného objemu 1,8% roztoku NaCl, čímž vzniklo izotonické prostředí. Vzniklá suspenze byla doplněna PBS na 50 ml a centrifugována při podmínkách 190 g/RT/10 min s akcelerací a brzdou na hodnotě 9. Po odlití supernatantu byl sediment resuspendován v 1 ml PBS. Ve vzniklé suspenzi byl pomocí cytometru CASY model TT System (Roche Diagnostics, Německo) určen počet neutrofilů a jejich viabilita. Poté byla suspenze naředěna pomocí HBSS tak, aby měla koncentraci 1000 neutrofilů/µl.

Chemiluminiscenční stanovení produkce RMK izolovanými neutrofily

K ředění všech látek pro tento typ stanovení byl použit roztok HBSS. K plnění jamek mikrotitrační destičky byl použit luminol o koncentraci 25 µM, OZP o koncentraci 2,5 mg/ml, PMA o koncentraci 0,25 µM, všechny frakce polyanilinu o nejvyšší koncentraci 5 %, další pak klesaly desítkovou řadou až ke koncentraci 5×10^{-4} % a zředěná suspenze izolovaných neutrofilů. Látky byly na mikrotitrační destičku pipetovány dle tabulky 2, vždy jako duplikát. Všechny měřené jamky kromě *Pozadí* obsahovaly po 50 µl luminolu a 100 µl suspenze neutrofilů. Jamky *Kontrola* pak obsahovaly 50 µl HBSS a jamky *A1-5*, *B1-5* a *C1-5* po 50 µl příslušné polyanilinové frakce, přičemž 1 označuje nejnižší a 5 nejvyšší koncentraci. Dále obsahovaly všechny S*pontánní* řádky po 50 µl HBSS a všechny *Aktivované* řádky po 50 µl PMA nebo OZP, dle typu měření. Jamky *Pozadí* obsahovaly 200 µl HBSS a 50 µl luminolu. Výsledné koncentrace v jednotlivých jamkách byly tedy následovné: luminol 5 µM, frakce polyanilinu v desítkové řadě 10 - 1×10^{-3} ‰, neutrofily 100 000/jamku a OZP 0,5 mg/ml nebo PMA 0,05 µM. Chemiluminiscence byla měřena po dobu 3600 sekund při teplotě 37 °C. Pro vyhodnocení byly použity hodnoty integrálu. V rámci zachování náhodnosti bylo v jednotlivých měřeních různě měněno pořadí řádků nebo pořadí koncentrací frakcí.

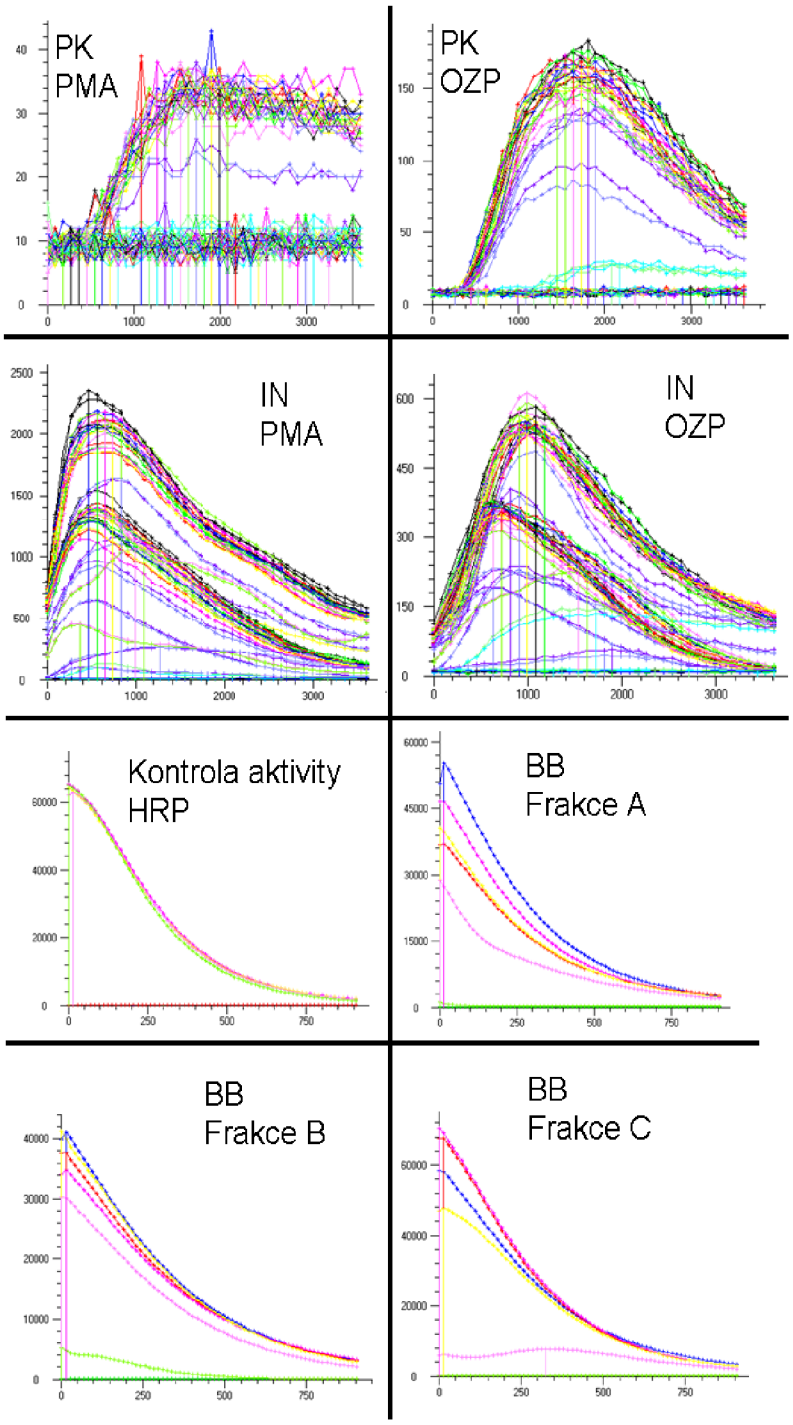
Ovlivnění chemiluminiscence v bezbuněčném prostředí

K ředění všech látek pro tenhle typ stanovení byl použit roztok PBS. K plnění jamek mikrotitrační destičky byl použit luminol o koncentraci 40 µM, H_2O_2 (Sigma-Aldrich, Německo) o koncentraci 400 µM, křenová peroxidáza (HRP - Horseradish Peroxidase) (Sigma-Aldrich, Německo) o koncentraci 8 U/ml a všechny frakce polyanilinu o nejvyšší koncentraci 4 %, další pak klesaly desítkovou řadou až ke koncentraci 4×10^{-4} %. Pro kontrolu aktivity HRP bylo měřeno osm jamek. První čtyři sloužily jako kontrola spontánní aktivity

HRP a obsahovaly po 50 µl luminolu a HRP a 100 µl PBS. Zbylé jamky obsahovaly po 50 µl luminolu, HRP, PBS a H_2O_2 a sloužily k sledování stimulované aktivity HRP. Výsledné koncentrace v jednotlivých jamkách byly tedy následovné: luminol 10 µM, HRP 2 U/ml a H_2O_2 100 µM. Samotná bezbuněčná analýza byla měřena taky na osmi jamkách s následným základním uspořádáním. První jamka – pozadí – obsahovala 150 µl PBS a 50 µl luminolu. Druhá jamka – kontrola – obsahovala 100 µl PBS a po 50 µl HRP a luminolu. Jamka třetí – stimulovaná kontrola – obsahovala po 50 µl PBS, HRP, luminolu a H_2O_2. Zbylé jamky obsahovaly po 50 µl HRP, luminolu, H_2O_2 a příslušné frakce polyanilinu (A, B nebo C) s klesající koncentrací. Výsledné koncentrace v jednotlivých jamkách byly tedy následovné: luminol 10 µM, HRP 2 U/ml, H_2O_2 100 µM a jednotlivé frakce polyanilinu v desítkové řadě 10 - 1×10^{-3} ‰. V rámci zachování náhodnosti bylo v jednotlivých měřeních měněno pořadí jamek. Chemiluminiscence byla měřena po dobu 900 sekund při RT. Pro vyhodnocení byly použity hodnoty integrálu.

Výsledky

Časový průběh měření



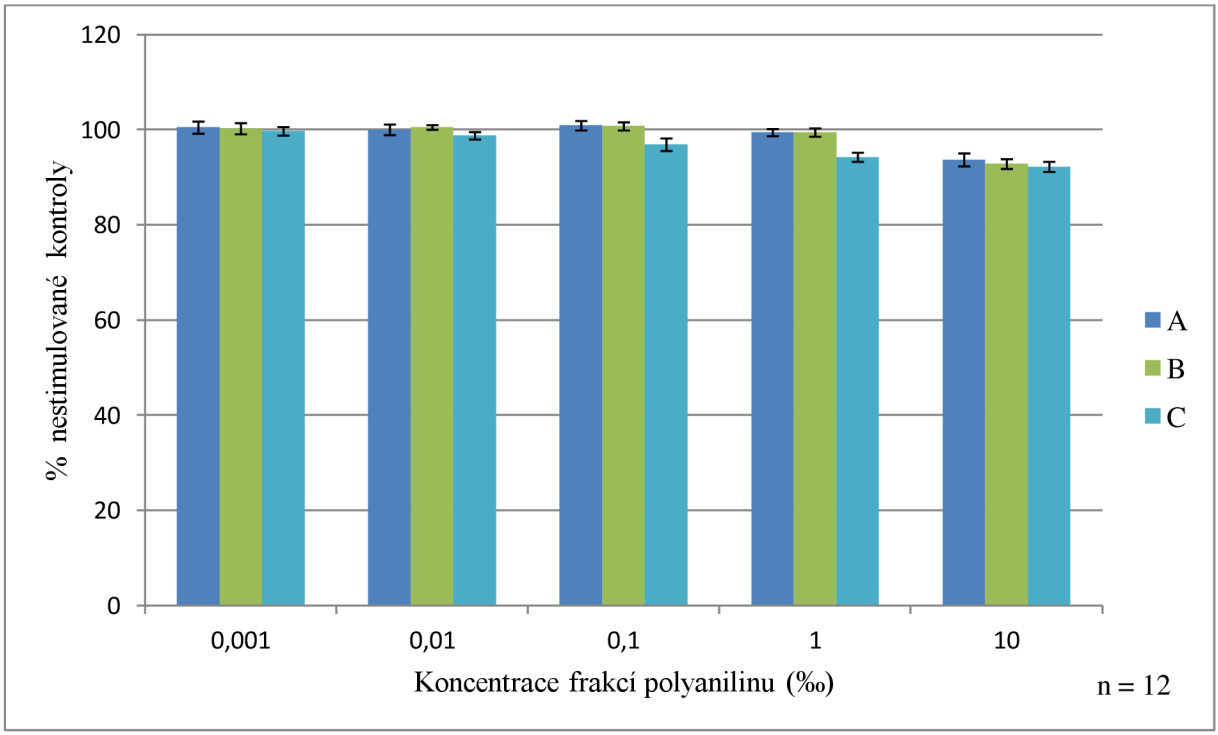
Obrázek 9 Ukázka průběhu jednotlivých typů měření

Na obrázku 9 jsou znázorněny ukázky průběhu měření v jednotlivých prostředích - plná krev (PK), izolované neutrofily (IN) a bezbuněčné prostředí (BB), ve kterém bylo oxidační vzplanutí nahrazeno přídavkem peroxidu vodíku a křenové peroxidázy. Ke spuštění oxidačního vzplanutí v buněčných systémech byly použité dva typy aktivátorů - jednak PMA, který oxidační vzplanutí aktivuje nereceptorovo, skrz přímou aktivaci proteinkinázy C, a pak OZP, částicový stimul fagocytován neutrofily, který simuluje reálnou interakci s mikrobem. Osy x znázorňují čas v sekundách, osy y intenzitu CL v jednotkách RLU (Relative Light Unit). V jednotlivých prostředích je vidět jednak různé průběhy reakcí, jednak různé intenzity. Obecně byly maximální dosažené intenzity v plné krvi až řádově nižší než u izolovaných neutrofilů a zdaleka nejvyšších intenzit bylo dosaženo v bezbuněčném prostředí. Maximální intenzity se lišily i mezi jednotlivými dárci, přičemž tyto rozdíly byly výraznější v plné krvi, které se používal určitý objem na jamku, než

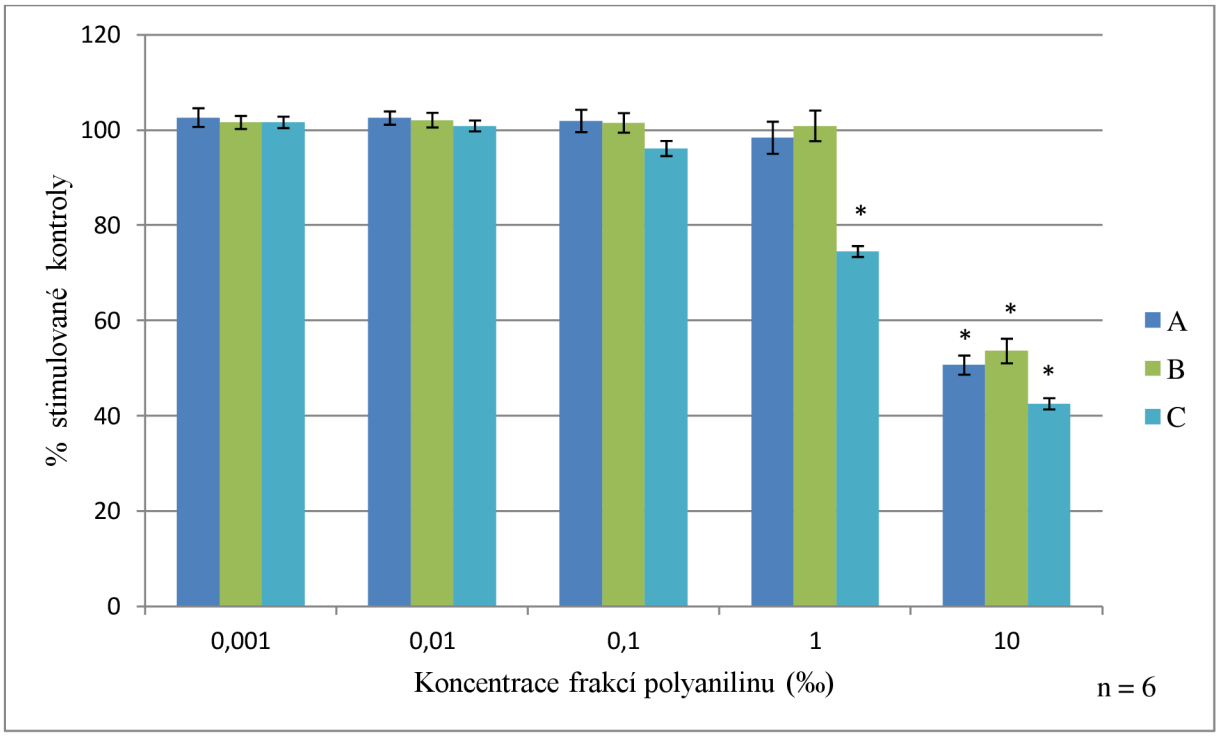
u izolovaných neutrofilů, kterých se na jamku používal definovaný počet 100 000. Intenzity a průběhy se liší také v závislosti na použitém aktivátoru. V bezbuněčném prostředí probíhalo nastartování chemiluminiscence po přidání H_2O_2 tak rychle, že na záznamech není zachycen nástup maxima. Pro účely našeho měření to však není podstatné, protože k výpočtům je použita plocha pod křivkou za určitý čas.

Plná krev

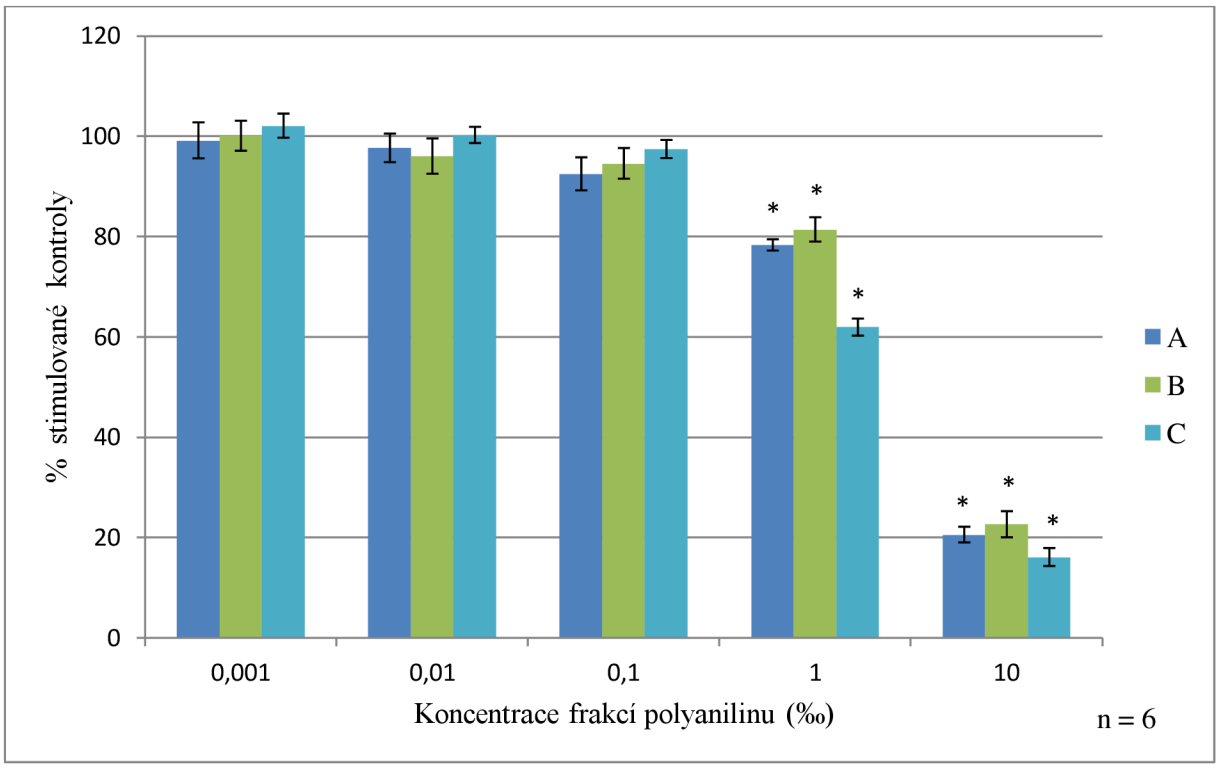
Bylo provedeno 12 měření pro spontánní aktivitu neutrofilů a po 6 měření s každým aktivátorem. V grafech je znázorněn vliv všech tří frakcí PANI, A, B, a C, rozlišených barevně, v pěti různých koncentracích vyznačených na ose x, na produkci RMK, co je znázorněno na ose y jako procento kontroly. V případě spontánní produkce RMK je jako kontrola použita krev bez stimulu a bez polyanilinu. V případě aktivovaných vzorků je kontrolou vzorek s daným stimulem bez přídavku polyanilinu. Hvězdičky pak označují inhibiční účinek PANI signifikantní na hladině významnosti α=0,01. V plné krvi nemá PANI na spontánní aktivitu neutrofilů žádný signifikantní účinek, aktivační ani inhibiční (graf 1). Při použití aktivátoru PMA je při koncentraci 1 ‰ signifikantně účinná pouze frakce C, ostatní frakce působí inhibičně až při koncentraci 10 ‰ (graf 2). Naproti tomu při aktivaci neutrofilů pomocí OZP je patrný významný inhibiční účinek na produkci RMK při koncentracích 1 a 10 ‰ u všech frakcí (graf 3).



Graf 1Plná krev – spontánní aktivita neutrofilů. Vliv polyanilinových frakcí A, B a C o různé koncentraci na produkci RMK v nestimulované plné krvi. Znázorněno jako průměr ± SEM, n = 12.



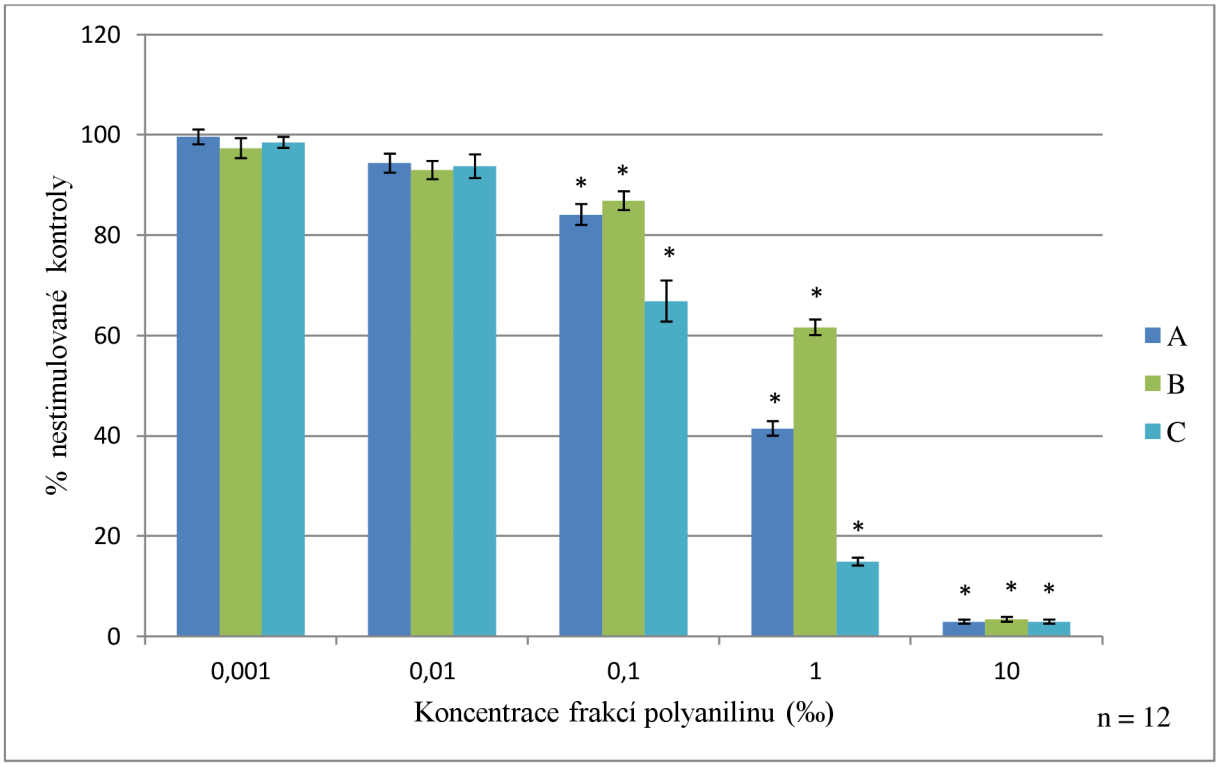
Graf 2 Plná krev – aktivace neutrofilů pomocí PMA Vliv polyanilinových frakcí A, B a C o různé koncentraci na produkci RMK v plné krvi stimulované PMA. Znázorněno jako průměr ± SEM, n = 6, * p<0,01.



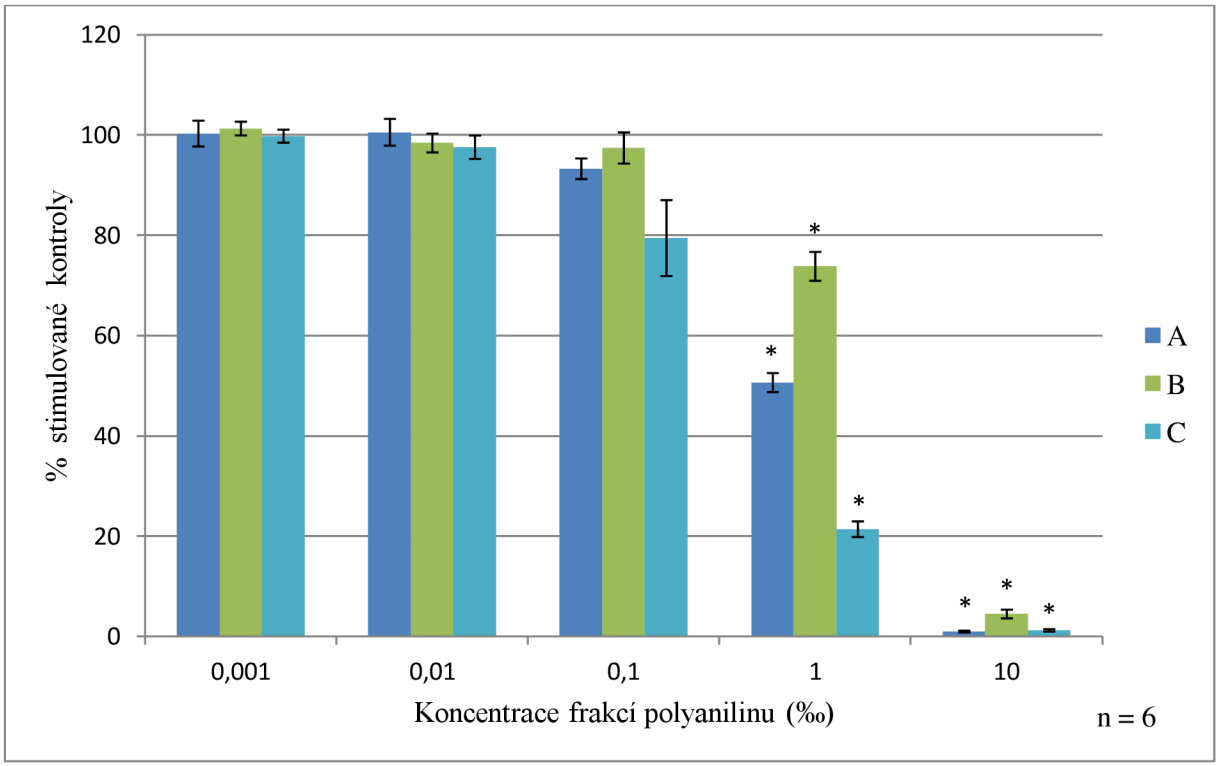
Graf 3 Plná krev – aktivace neutrofilů pomocí OZP Vliv polyanilinových frakcí A, B a C o různé koncentraci na produkci RMK v plné krvi stimulované OZP. Znázorněno jako průměr ± SEM, n = 6, * p<0,01.

Izolované neutrofily

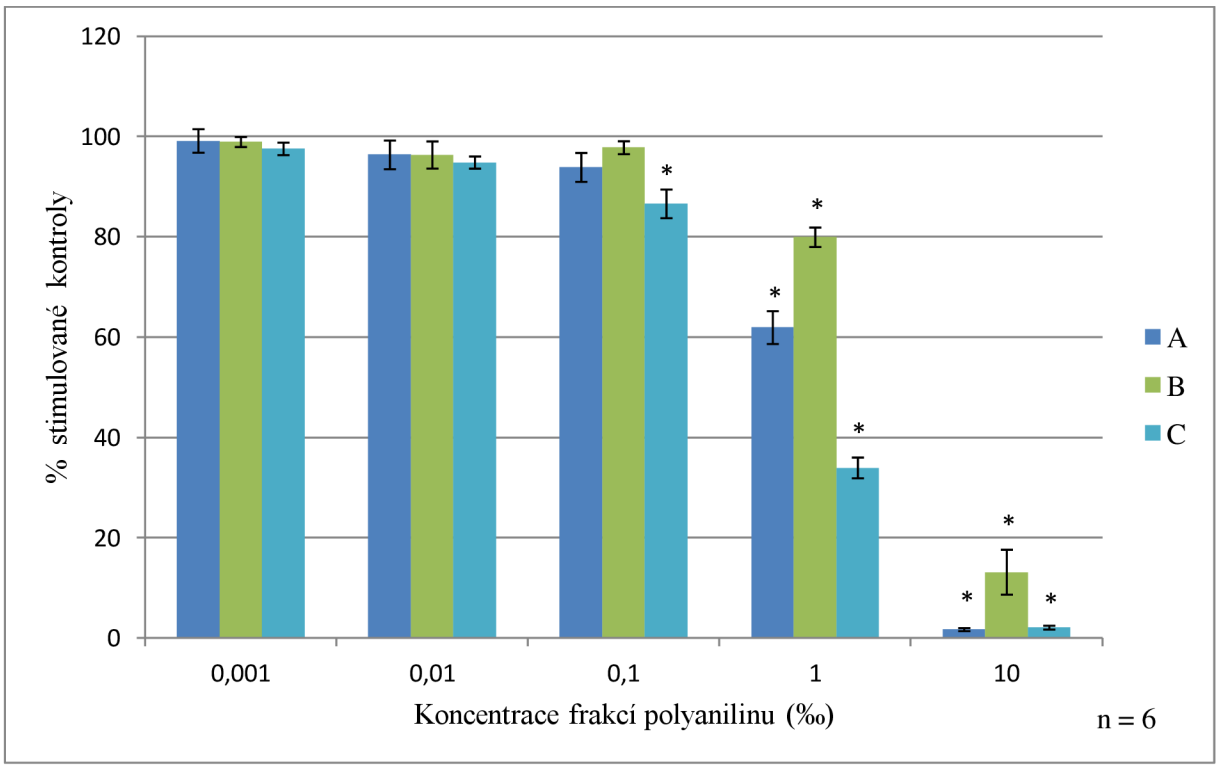
Stejně jako u plné krve bylo provedeno 12 měření pro spontánní aktivitu neutrofilů a po 6 měření s každým aktivátorem. Grafy zde mají stejné uspořádání jako u výsledků v plné krvi, zobrazují však účinek PANI na izolované neutrofily. Je zde vidět inhibiční účinek už i na spontánní aktivitu neutrofilů u všech frakcí PANI od koncentrace 0,1 ‰ (graf 4). To je pravděpodobně způsobeno tím, že se neutrofily aktivovaly manipulací při jejich izolaci. Jejich spontánní aktivita je tedy celkově výrazně vyšší než v plné krvi, co zviditelní účinek PANI na spontánní chemiluminiscenci. Při použití obou aktivátorů mají všechny frakce signifikantní účinek už při koncentraci 1 ‰ (graf 5, graf 6). V případě aktivace oxidačního vzplanutí pomocí OZP je frakce C účinná již při koncentraci 0,1 ‰.



Graf 4 Izolované neutrofily – spontánní aktivita Vliv polyanilinových frakcí A, B a C o různé koncentraci na produkci RMK v nestimulovaných izolovaných neutrofilech. Znázorněno jako průměr ± SEM, n = 12, * p<0,01.



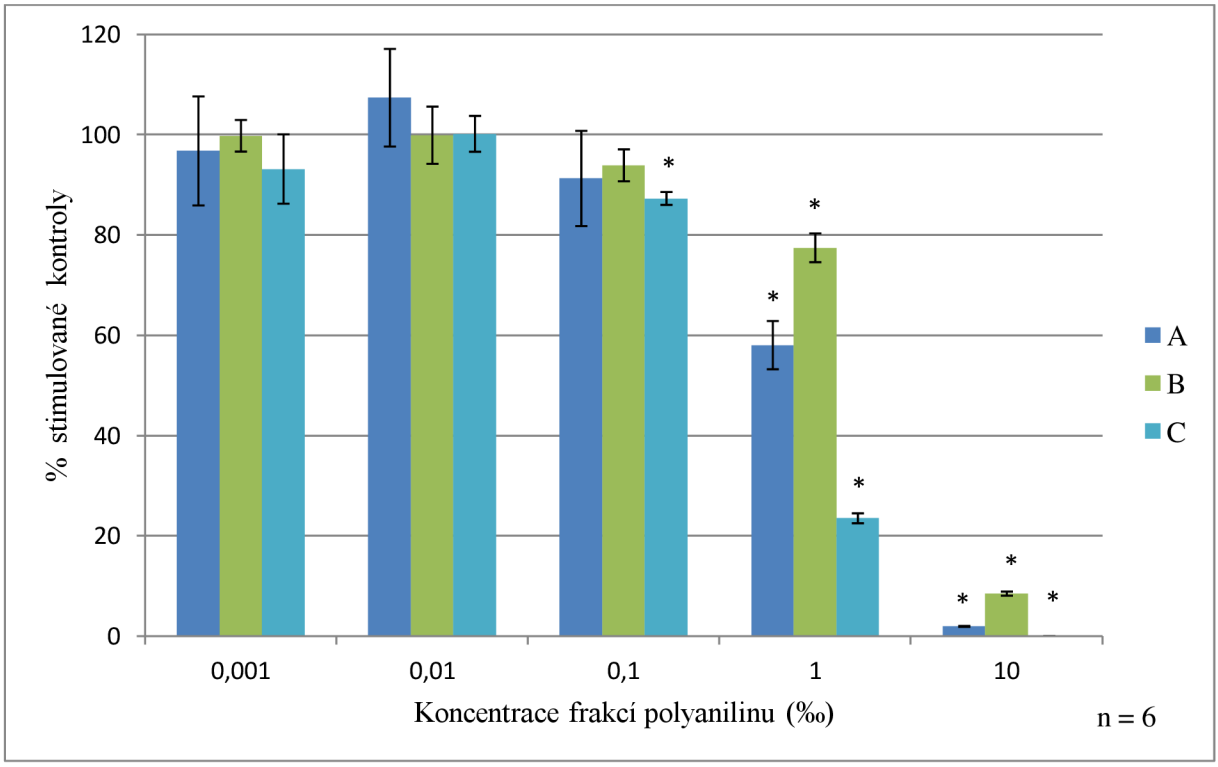
Graf 5 Izolované neutrofily – aktivace pomocí PMA Vliv polyanilinových frakcí A, B a C o různé koncentraci na produkci RMK v izolovaných neutrofilech stimulovaných PMA. Znázorněno jako průměr ± SEM, n = 6, * p<0,01.



Graf 6 Izolované neutrofily – aktivace pomocí OZP Vliv polyanilinových frakcí A, B a C o různé koncentraci na produkci RMK v izolovaných neutrofilech stimulovaných OZP. Znázorněno jako průměr ± SEM, n = 6, * p<0,01.

Bezbuněčné prostředí

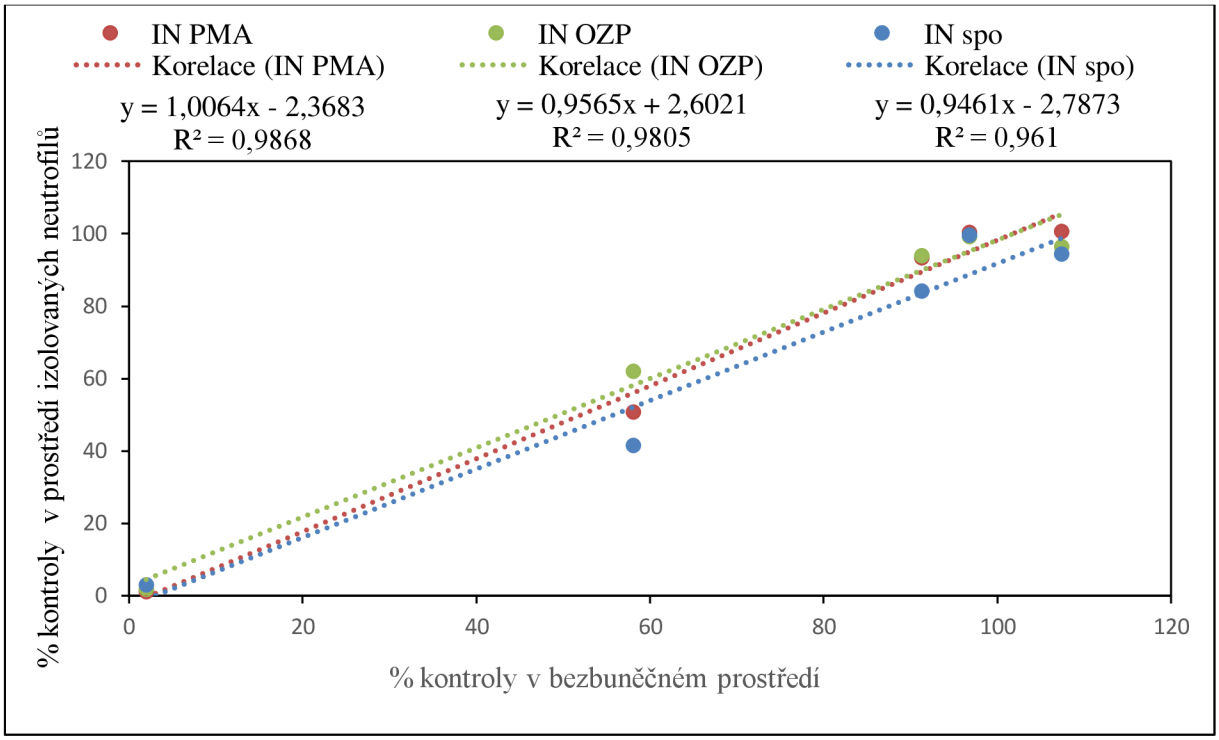
Účelem této části experimentu byla snaha o nastínění mechanizmu účinku polyanilinu. Jde o test, zda mají samotné frakce PANI schopnost zhášet chemiluminiscenci působením přímo na jednotlivé složky (luminol, peroxidáza, peroxid vodíku) chemického systému, který ji generuje. Pro každou frakci PANI bylo provedeno 6 měření. Stimulovanou kontrolu představuje jamka obsahující luminol, HRP a H_2O_2, nikoliv však PANI. Na grafu 7 je jasně vidět, že předpoklad o přímém účinku na chemický systém generující chemiluminiscenci se potvrdil, protože signifikantní snížení CL nastává u všech frakcí už při koncentraci 1 ‰. Frakce C je dokonce účinná již při koncentraci 0,1 ‰. Z toho vyplývá, že mechanizmus účinku PANI může spočívat ve vychytávání RMK. Na druhé straně může docházet k interferenci s jinými složkami bezbuněčného systému jako je peroxidáza či luminol.



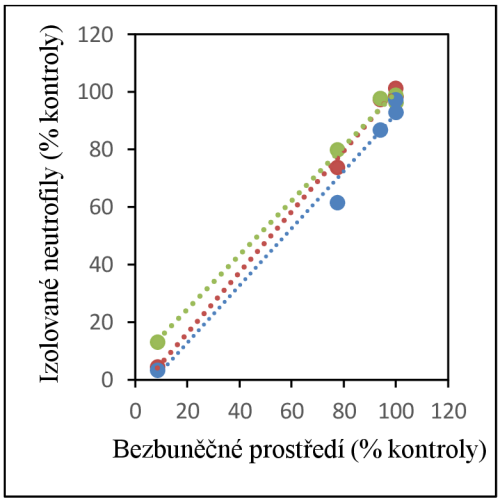
Graf 7 Měření v bezbuněčném prostředí Vliv polyanilinových frakcí A, B a C o různé koncentraci na chemický systém generující chemiluminiscenci. Znázorněno jako průměr ± SEM, n = 6, * p<0,01.

Korelace

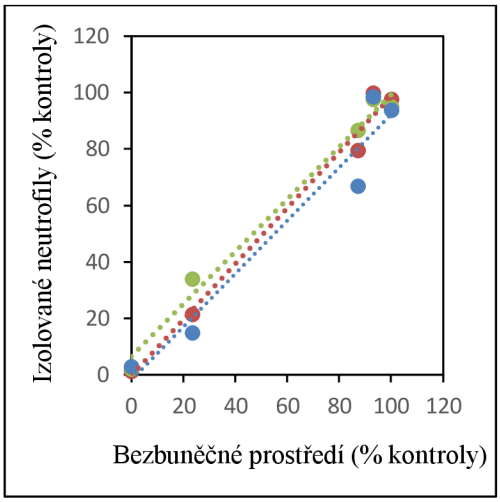
Pro ilustraci korelace výsledků z bezbuněčného prostředí (osa x) s výsledky v prostředí obsahujícím izolované neutrofily (osa y) je použita frakce A (graf 8). Jak směrnice křivek, tak korelační koeficienty u všech aktivit (spontánní, aktivovaná PMA, aktivovaná OZP) v prostředí IN jsou blízké 1, co značí souvislost mezi těmito měřeními. Korelační závislosti u frakcí B a C, ukázány na grafech 9 a 10 (osy i barevné rozlišení totožné s grafem 8), jsou velice podobné. Tato dobrá korelace výsledků podporuje předpoklad, že PANI působí jako antioxidant na vyprodukované RMK. Korelace s výsledky z plné krve se nedělala z důvodu velkého počtu faktorů, které mohou ovlivňovat chemiluminiscenci v plné krvi.



Graf 8 Korelace – izolované neutrofily, frakce A Vyjádření souvislosti mezi výsledky působení polyanilinové frakce A na chemický systém generující RMK a na izolované neutrofily.



Graf 9 Ukázka korelace: izolované neutrofily, frakce B Grafické vyjádření souvislosti mezi výsledky působení polyanilinové frakce B na chemický systém generující RMK a na izolované neutrofily.



Graf 10 Ukázka korelace: izolované neutrofily, frakce C Grafické vyjádření souvislosti mezi výsledky působení polyanilinové frakce C na chemický systém generující RMK a na izolované neutrofily.

EC50

Tento pojem je zkratkou pro efektivní koncentraci, která v našem případě označuje takovou koncentraci testovaných frakcí polyanilinu, která sníží intenzitu chemiluminiscence na polovinu. Tabulka 3 obsahuje hodnoty EC50 pro všechny frakce v prostředí izolovaných neutrofilů a bezbuněčném prostředí. Z této tabulky vyplývá, že nejsilnější účinek má frakce C, která má hodnoty EC50 nejnižší. Naopak nejméně účinná je frakce B, která pro dosažení stejného účinku jako frakce C potřebuje zhruba pět- až sedminásobnou koncentraci. Frakce A je se svou účinností mezi nimi. Hodnoty EC50 pro plnou krev zde uvedeny nejsou, protože jsme v ní nedosáhli inhibice blížící se 100%. Výpočty EC50 by tudíž byly nepřesné a výsledky zavádějící.

	A	B	C
Izolované neutrofily – spontánní aktivita	0,636	1,328	0,193
Izolované neutrofily – aktivace pomocí PMA	0,995	1,806	0,323
Izolované neutrofily – aktivace pomocí OZP	1,332	2,644	0,536
Bezbuněčné prostředí	1,217	2,203	0,417

Tabulka 3 Efektivní koncentrace 50 (‰)

Diskuse

Tato práce se zabývala vlivy tří frakcí kopolymeru PANI ve formě koloidních disperzních roztoků nebo nanotrubek na oxidační vzplanutí lidských neutrofilů. Šlo o jedno ze série měření, které mají za účel posoudit biokompatibilitu těchto nových forem PANI. Měření v plné krvi simuluje reálné prostředí a podmínky *in vivo*. Výsledky získané z těchto pokusů jsou ovlivněny řadou faktorů přítomných v krvi, jako je hemoglobin, krevní destičky nebo ostatní leukocyty. Protože jsou však tyto faktory běžně přítomné v organizmu, takto získané výsledky pravděpodobně lépe odrážejí účinek PANI na vrozenou imunitu člověka. Je proto povzbudivým zjištěním, že ani jedna frakce PANI nezpůsobuje zvýšení chemiluminiscence, nespouštějí tedy nespecifickou imunitní odpověď. Měření v prostředí izolovaných neutrofilů lépe ukazuje přímý účinek frakcí PANI na jejich oxidační vzplanutí. Definovaný počet buněk a vyloučení jiných faktorů, které by mohly ovlivňovat chemiluminiscenci, poskytuje lépe kvantifikovatelné výsledky. Zároveň zde však dochází k aktivaci neutrofilů již při jejich izolaci, co může zkreslovat získané výsledky, obzvláště při pozorování spontánní aktivity neutrofilů. Také to vede k maximálním intenzitám chemiluminiscence až řádově vyšším než v prostředí plné krve. Měření v bezbuněčném prostředí má za účel nastínit mechanizmus účinku polyanilinu na oxidační vzplanutí neutrofilů. Zhášení chemiluminiscence v tomto prostředí ukazuje na to, že mechanizmus účinku PANI spočívá alespoň částečně ve vychytávání RMK. Nemůžeme ale vyloučit vliv PANI na ostatní složky sytému jako působení na peroxidázu či luminol. Existuje vícero studií zabývajících se antioxidační aktivitou různých forem PANI (například [36]–[38]). Protože je dokázána schopnost PANI vychytávat volné radikály ([39]–[41]), dá se předpokládat, že i testované frakce PANI zhášejí chemiluminiscenci mechanizmem vychytávání RMK (v případě bezbuněčného prostředí konkrétně H_2O_2). Tento fakt však nevylučuje jiné účinky polyanilinu, jako je například působení na některou složku signálních drah neutrofilu nebo cytotoxická aktivita vůči neutrofilům. Pro zjištění přesného, kompletního mechanizmu účinku PANI na oxidační vzplanutí lidských neutrofilů by bylo nutné provést další experimenty. Použití dvou různých aktivátorů oxidačního vzplanutí – nereceptorového PMA a receptorového OZP – také přispívá k odhalení mechanizmu účinku polyanilinu. Oxidační vzplanutí může být spuštěno několika samostatnými signálními dráhami, např. stimulací komplementových a/nebo Fc receptorů (OZP) nebo přímým působením rozpustné chemické látky na aktivitu NADPH-oxidázy skrz aktivaci proteinkinázy C (PMA). Jednotlivé frakce PANI inhibovali produkci RMK stimulovanou jak OZP, tak PMA, z čeho se dá usuzovat, že

ovlivňují jak signalizaci vyvolanou fagocytózou, tak případnou přímou aktivaci NADPH-oxidázy. Dobrá korelace výsledků z bezbuněčného prostředí s výsledky na izolovaných neutrofilech také podporuje předpoklad o působení PANI jako antioxidantu. Není ale možné vyloučit případnou interferenci s jinými složkami bezbuněčného prostředí. Při porovnání jednotlivých frakcí PANI se na základě hodnot EC50 jako nejúčinnější inhibitor oxidačního vzplanutí jeví frakce C, následována frakcí A. Nejméně účinnou byla frakce B. Protože jde o nově syntetizované formy polyanilinu, v dosavadní literatuře neexistují výsledky, ke kterým by se tahle práce mohla přirovnávat. Biokompatibilita PANI-PAMPSA, avšak ve formě filmu, byla testována a potvrzena na 3T3 fibroblastech [46]. Jinak se dosavadní studie o biokompatibilitě různých forem PANI zabývaly buď *in vivo* implantáty ([42]), nebo jejich působením *in vitro* na proliferaci či diferenciaci různých buněk, případně jejich cytotoxicitou (například [43]–[45]). Testování biokompatibility na modelu oxidačního vzplanutí neutrofilů, kromě jiných, bylo publikováno i ve studii koloidního disperzního roztoku PANI v roce 2014 [30]. Výsledky v ní publikované korespondují se zjištěními uvedenými v téhle bakalářské práci. Konkrétně jimi testovaný PANI, stejně jako zde zkoumané frakce PANI, nepůsobí jako aktivátor oxidačního vzplanutí lidských neutrofilů, spíše naopak, jeho vyšší koncentrace mají inhibiční účinky spočívající pravděpodobně ve vychytávání reaktivních metabolitů kyslíku.

Závěr

Pro potencionální biomedicínské využití tří nových forem PANI, označených frakce A, B a C, je jejich biokompatibilita předmětem intenzivního výzkumu. V této práci byla prozkoumána jedna její část – účinek na oxidační vzplanutí lidských neutrofilů. Na základě provedených měření a získaných výsledků je možné udělat několik závěrů. Za prvé, PANI v testovaných koncentracích není aktivátorem oxidačního vzplanutí, co je zjištění příznivé pro zamýšlené biomedicínské využití tohoto polymeru. Naopak, PANI od koncentrace 1 ‰ má výrazný inhibiční vliv na činnost neutrofilů, a to pravděpodobně mechanizmem vychytávání RMK. Za druhé, pro biomedicínské použití by byly vhodné koncentrace těchto látek menší než 0,1 ‰, které nemají žádný signifikantní vliv na oxidační vzplanutí neutrofilů. Za třetí, z hlediska interakce s neutrofily by bylo nejvhodnější používat frakci B, která má na jejich činnost nejmenší vliv. V souhrnu může tato práce potvrdit biokompatibilitu všech tří zkoumaných frakcí PANI za předpokladu jejího zjednodušení na oxidační vzplanutí lidských neutrofilů a použití nízkých koncentrací PANI.

Seznam použité literatury

[1] P. Humpolicek, V. Kasparkova, P. Saha, a J. Stejskal, „Biocompatibility of polyaniline", *Synth. Met.*, roč. 162, č. 7–8, s. 722–727, kvě. 2012.

[2] A. K. Abbas, A. H. Lichtman, a S. Pillai, *Cellular and molecular immunology*, Eight edition. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2015.

[3] C. Hendry, A. Farley, E. McLafferty, a C. Johnstone, „Function of the immune system", *Nurs. Stand.*, roč. 27, č. 19, s. 35–42, led. 2013.

[4] V. Hořejší a J. Bartůňková, *Základy imunologie*, 3. vyd. Praha: Triton, 2005.

[5] E. Kolaczkowska a P. Kubes, „Neutrophil recruitment and function in health and inflammation", *Nat. Rev. Immunol.*, roč. 13, č. 3, s. 159–175, úno. 2013.

[6] M. P. Pruchniak, M. Arazna, a U. Demkow, „Life of neutrophil: From stem cell to neutrophil extracellular trap", *Respir. Physiol. Neurobiol.*, roč. 187, č. 1, s. 68–73, čer. 2013.

[7] A. Mócsai, „Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond", *J. Exp. Med.*, roč. 210, č. 7, s. 1283–1299, čvc. 2013.

[8] N. Borregaard, „Neutrophils, from Marrow to Microbes", *Immunity*, roč. 33, č. 5, s. 657–670, lis. 2010.

[9] B. Amulic, C. Cazalet, G. L. Hayes, K. D. Metzler, a A. Zychlinsky, „Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease", *Annu. Rev. Immunol.*, roč. 30, č. 1, s. 459–489, dub. 2012.

[10] K. M. Rigby a F. R. DeLeo, „Neutrophils in innate host defense against Staphylococcus aureus infections", *Semin. Immunopathol.*, roč. 34, č. 2, s. 237–259, bře. 2012.

[11] K. Theilgaard-Mönch, B. T. Porse, a N. Borregaard, „Systems biology of neutrophil differentiation and immune response", *Curr. Opin. Immunol.*, roč. 18, č. 1, s. 54–60, úno. 2006.

[12] V. Witko-Sarsat, P. Rieu, B. Descamps-Latscha, P. Lesavre, a L. Halbwachs-Mecarelli, „Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects", *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.*, roč. 80, č. 5, s. 617–653, kvě. 2000.

[13] D. C. Dale, L. Boxer, a W. C. Liles, „The phagocytes: neutrophils and monocytes", *Blood*, roč. 112, č. 4, s. 935–945, kvě. 2008.

[14] W. L. Lee, R. E. Harrison, a S. Grinstein, „Phagocytosis by neutrophils", *Microbes Infect.*, roč. 5, č. 14, s. 1299–1306, lis. 2003.

[15] D. Roos, R. van Bruggen, a C. Meischl, „Oxidative killing of microbes by neutrophils", *Microbes Infect.*, roč. 5, č. 14, s. 1307–1315, lis. 2003.

[16] P. Nordenfelt a H. Tapper, „Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils", *J. Leukoc. Biol.*, roč. 90, č. 2, s. 271–284, srp. 2011.

[17] Q. Remijsen, T. V. Berghe, E. Wirawan, B. Asselbergh, E. Parthoens, R. De Rycke, S. Noppen, M. Delforge, J. Willems, a P. Vandenabeele, „Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation", *Cell Res.*, roč. 21, č. 2, s. 290–304, úno. 2011.

[18] W. Freinbichler, M. A. Colivicchi, C. Stefanini, L. Bianchi, C. Ballini, B. Misini, P. Weinberger, W. Linert, D. Varešlija, K. F. Tipton, a L. Della Corte, „Highly reactive oxygen species: detection, formation, and possible functions", *Cell. Mol. Life Sci.*, roč. 68, č. 12, s. 2067–2079, čer. 2011.

[19] L. Zuo, T. Zhou, B. K. Pannell, A. C. Ziegler, a T. M. Best, „Biological and physiological role of reactive oxygen species - the good, the bad and the ugly", *Acta Physiol.*, roč. 214, č. 3, s. 329–348, čvc. 2015.

[20] C. Nathan a A. Cunningham-Bussel, „Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species", *Nat. Rev. Immunol.*, roč. 13, č. 5, s. 349–361, dub. 2013.

[21] V. I. Lushchak, „Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification", *Chem. Biol. Interact.*, roč. 224, s. 164–175, pro. 2014.
[22] J. K. Hurst, „What really happens in the neutrophil phagosome?", *Free Radic. Biol. Med.*, roč. 53, č. 3, s. 508–520, srp. 2012.
[23] C. Dahlgren a A. Karlsson, „Respiratory burst in human neutrophils", *J. Immunol. Methods*, roč. 232, č. 1–2, s. 3–14, pro. 1999.
[24] L. Liu, C. Dahlgren, H. Elwing, a H. Lundqvist, „A simple chemiluminescence assay for the determination of reactive oxygen species produced by human neutrophils", *J. Immunol. Methods*, roč. 192, č. 1–2, s. 173–178, čer. 1996.
[25] G. J. Maghzal, K.-H. Krause, R. Stocker, a V. Jaquet, „Detection of reactive oxygen species derived from the family of NOX NADPH oxidases", *Free Radic. Biol. Med.*, roč. 53, č. 10, s. 1903–1918, lis. 2012.
[26] C. A. Marquette a L. J. Blum, „Applications of the luminol chemiluminescent reaction in analytical chemistry", *Anal. Bioanal. Chem.*, roč. 385, č. 3, s. 546–554, čer. 2006.
[27] J. Prokeš, J. Stejskal, a M. Omastová, „Polyanilin a polypyrrol - dva představitelé vodivých polymerů.", *Chem. Listy*, roč. 95, č. 8, s. 484–492, 2001.
[28] S. Bhadra, D. Khastgir, N. K. Singha, a J. H. Lee, „Progress in preparation, processing and applications of polyaniline", *Prog. Polym. Sci.*, roč. 34, č. 8, s. 783–810, srp. 2009.
[29] J. Stejskal, M. Hajná, V. Kašpárková, P. Humpolíček, A. Zhigunov, a M. Trchová, „Purification of a conducting polymer, polyaniline, for biomedical applications", *Synth. Met.*, roč. 195, s. 286–293, zář. 2014.
[30] Z. Kucekova, P. Humpolicek, V. Kasparkova, T. Perecko, M. Lehocký, I. Hauerlandová, P. Sáha, a J. Stejskal, „Colloidal polyaniline dispersions: Antibacterial activity, cytotoxicity and neutrophil oxidative burst", *Colloids Surf. B Biointerfaces*, roč. 116, s. 411–417, dub. 2014.
[31] J. Stejskal a R. G. Gilbert, „Polyaniline. Preparation of a conducting polymer(IUPAC Technical Report)", *Pure Appl. Chem.*, roč. 74, č. 5, led. 2002.
[32] V. Kašpárková, P. Humpolíček, J. Stejskal, J. Kopecká, Z. Kuceková, a R. Moučka, „Conductivity, impurity profile, and cytotoxicity of solvent-extracted polyaniline: Properties and Cytotoxicity of Solvent-Extracted Polyaniline", *Polym. Adv. Technol.*, roč. 27, č. 2, s. 156–161, úno. 2016.
[33] G. Ćirić-Marjanović, „Recent advances in polyaniline research: Polymerization mechanisms, structural aspects, properties and applications", *Synth. Met.*, roč. 177, s. 1–47, srp. 2013.
[34] O. L. Gribkova, A. A. Nekrasov, V. F. Ivanov, O. A. Kozarenko, O. Y. Posudievsky, A. V. Vannikov, V. G. Koshechko, a V. D. Pokhodenko, „Mechanochemical synthesis of polyaniline in the presence of polymeric sulfonic acids of different structure", *Synth. Met.*, roč. 180, s. 64–72, zář. 2013.
[35] J. Stejskal a P. Bober, „Osobní korespondence".
[36] J. Wang, L. H. Zhu, J. Li, a H. Q. Tang, „Antioxidant activity of polyaniline nanofibers", *Chin. Chem. Lett.*, roč. 18, č. 8, s. 1005–1008, srp. 2007.
[37] A. V. Nand, S. Swift, B. Uy, a P. A. Kilmartin, „Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of biocompatible low density polyethylene/polyaniline blends", *J. Food Eng.*, roč. 116, č. 2, s. 422–429, kvě. 2013.
[38] A. V. Nand, S. Ray, A. J. Easteal, G. I. N. Waterhouse, M. Gizdavic-Nikolaidis, R. P. Cooney, J. Travas-Sejdic, a P. A. Kilmartin, „Factors affecting the radical scavenging activity of polyaniline", *Synth. Met.*, roč. 161, č. 13–14, s. 1232–1237, čvc. 2011.
[39] C. F. Hsu, H. Peng, C. Basle, J. Travas-Sejdic, a P. A. Kilmartin, „ABTS•+ scavenging activity of polypyrrole, polyaniline and poly(3,4-ethylenedioxythiophene)", *Polym. Int.*, roč. 60, č. 1, s. 69–77, 2011.

[40] M. Gizdavic-Nikolaidis, J. Travas-Sejdic, G. A. Bowmaker, R. P. Cooney, a P. A. Kilmartin, „Conducting polymers as free radical scavengers", *Synth. Met.*, roč. 140, č. 2–3, s. 225–232, 2004.
[41] M. Gizdavic-Nikolaidis, J. Travas-Sejdic, G. A. Bowmaker, R. P. Cooney, C. Thompson, a P. A. Kilmartin, „The antioxidant activity of conducting polymers in biomedical applications", *Curr. Appl. Phys.*, roč. 4, č. 2–4, s. 347–350, 2004.
[42] C. h. Wang, Y. q. Dong, K. Sengothi, K. l. Tan, a E. t. Kang, „In-vivo tissue response to polyaniline", *Synth. Met.*, roč. 102, s. 1313–1314, led. 1999.
[43] P. K. Prabhakar, S. Raj, P. R. Anuradha, S. N. Sawant, a M. Doble, „Biocompatibility studies on polyaniline and polyaniline–silver nanoparticle coated polyurethane composite", *Colloids Surf. B Biointerfaces*, roč. 86, č. 1, s. 146–153, srp. 2011.
[44] P. Bober, B. A. Zasonska, P. Humpolíček, Z. Kuceková, M. Varga, D. Horák, V. Babayan, N. Kazantseva, J. Prokeš, a J. Stejskal, „Polyaniline–maghemite based dispersion: Electrical, magnetic properties and their cytotoxicity", *Synth. Met.*, roč. 214, s. 23–29, dub. 2016.
[45] E. I. Yslas, P. Cavallo, D. F. Acevedo, C. A. Barbero, a V. A. Rivarola, „Cysteine modified polyaniline films improve biocompatibility for two cell lines", *Mater. Sci. Eng. C*, roč. 51, s. 51–56, čer. 2015.
[46] C. L. Bayer, I. J. Trenchard, a N. A. Peppas, „Analyzing polyaniline-poly(2-acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid) biocompatibility with 3T3 fibroblasts", *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, roč. 21, č. 5, s. 623–634, 2010.