

Polyazulen a jeho biologické vlastnosti

Bc. Soňa Stuchlíková

Diplomová práce
2023

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Bc. Soňa Stuchlíková
Osobní číslo:	T22590
Studijní program:	N0711A130011 Biomateriály a kosmetika
Forma studia:	Kombinovaná
Téma práce:	Polyazulen a jeho biologické vlastnosti

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část:

Student/ka připraví literární rešerši týkající se přípravy a vlastností polyazulenu.

II. Praktická část:

V rámci praktické části pak připraví prášky či filmy polyazulenu a stanoví jejich vlastnosti, včetně vlastností biologických.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] FRESHNEY, R. I. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 5th ed. Hoboken, NJ.: Wiley-Liss, c2005, xxvii, 642 s. ISBN 0471453293.
- [2] Electronic Structure of Polyazulene. Polymer Journal, Vol. 22, No. 11, pp 1001-1006 (1990).
- [3] CAMPBELL, D., R. A. PETHRICK a J. R. WHITE. Polymer characterization: physical techniques. 2nd ed. Boca Raton: CRC, 2000, viii, 481 s. ISBN 9780748740055.
- [4] Gradzka, E; Makowska, P and Winkler, K. Chemically formed conducting polyazulene: From micro-to nanostructures, Synthetic Metals, 246 , 115-121 (2018).

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Leona Mahelová**
Centrum polymerních systémů

Datum zadání diplomové práce: **1. února 2023**
Termín odevzdání diplomové práce: **12. května 2023**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou 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;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou 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);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové 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.

Prohlašuji,

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zaměřuje na studium polyazulenu, vodivého polymeru, který má teoretický potenciál pro využití v oblasti biomedicíny, a hlavně v tkáňovém inženýrství, ale doposud nebyly jeho biologické vlastnosti studovány. V první části práce jsou popsány vlastnosti a využití vodivých polymerů se zaměřením na polyazulen, jeho strukturu a syntézu. Experimentální část práce se zaměřuje na výrobu filmů a prášků z polyazulenu, polyanilinu, a polypyrolu a stanovení jejich vlivu na životaschopnost myších fibroblastů a embryonálních kmenových buněk. Dle výsledků polyazulen ostatní vodivé polymery značně převyšuje svojí cytocompatibilitou a potvrzuje tak svůj dosud neodhalený biologický potenciál.

Klíčová slova: polyazulen, vodivý polymer, buněčná viabilita, azulen, tkáňové inženýrství

ABSTRACT

This master thesis focuses on the study of polyazulene, a conductive polymer with the theoretical potential for use in the field of biomedicine, particularly in tissue engineering, but its biological properties have not yet been studied. The first part of the thesis describes the properties and applications of conductive polymers with a focus on polyazulene, its structure, and synthesis. The experimental part of the thesis focuses on the production of films and powders of polyazulene, polyaniline, and polypyrrole and the determination of their impact on the viability of mouse fibroblasts and embryonic stem cells. According to the results, polyazulene is significantly superior to other conducting polymers in its cytocompatibility, confirming its yet-undiscovered biological potential.

Keywords: polyazulene, conductive polymer, cell viability, azulene, tissue engineering

Ráda bych poděkovala své vedoucí Ing. Leoně Mahelové za její vedení, podporu a trpělivost v průběhu mého výzkumu a psaní této diplomové práce. Také bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za jejich podporu a povzbuzení během mých studií.

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

OBSAH

OBSAH	7
ÚVOD	9
I.	10
TEORETICKÁ ČÁST	10
1 POLYMERY	11
2 VODIVÉ POLYMERY	12
2.1 HISTORIE VODIVÝCH POLYMERŮ	13
2.2 PRINCIP VODIVOSTI POLYMERU	13
2.3 PŘÍPRAVA VODIVÝCH POLYMERŮ	14
2.4 VLASTNOSTI VODIVÝCH POLYMERŮ	14
2.4.1 OPTICKÉ VLASTNOSTI.....	15
2.4.2 MAGNETICKÉ VLASTNOSTI.....	15
2.4.3 ELEKTRICKY-VODIVÉ VLASTNOSTI.....	16
2.4.4 SMÁČIVOST	16
2.4.5 MECHANICKÉ VLASTNOSTI.....	17
2.4.6 OSTATNÍ VLASTNOSTI	17
2.5 APLIKACE VODIVÝCH POLYMERŮ	18
2.5.1 SENZORY A DETEKTORY	19
2.5.2 OPTOELEKTRONICKÁ ZAŘÍZENÍ	21
2.5.3 ELEKTROCHEMIE.....	23
2.5.4 VYUŽITÍ V OBLASTI BIOMEDICÍNY	24
I 3 AZULEN	26
3.1 VLASTNOSTI AZULENU	26
3.2 SYNTÉZA AZULENU	27
3.3 AZULEN V POLYMERECH	28
3.4 VLASTNOSTI AZULENU VYUŽITELNÉ V MEDICÍNĚ	28
3.4.1 ANTIVIROVÁ A ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITA.....	29
3.4.2 PROTIZÁNĚTLIVÁ AKTIVITA	29
3.4.3 PROTIVŘEDOVÁ AKTIVITA.....	29
3.4.4 ANTINEOPLASTICKÁ AKTIVITA	30
3.4.5 ANTIDIABETICKÁ AKTIVITA	30
3.5 VYUŽITÍ AZULENU	30

4 POLYAZULEN	31
4.1.1 HOMOPOLYMERY AZULENU	31
4.1.2 ALTERNUJÍCÍ KOPOLYMERY	32
4.1.3 HETEROATOMEM PROPOJENÉ POLYMERY	32
4.1.4 DALŠÍ DRUHY POLYMERŮ	33
4.2 VZNIK POLYAZULENU	33
4.2.1 ELEKTROPOLYMERIZACE	34
4.2.2 CHEMICKÁ POLYMERIZACE	34
4.3 VLASTNOSTI A VYUŽITÍ	37
II.....	39
PRAKTICKÁ ČÁST.....	39
5 CÍLE PRÁCE	40
6 PRAKTICKÁ ČÁST	41
6.1 PŘÍPRAVA POLYAZULENU	41
6.2 PŘÍPRAVA POLYANILINU.....	43
6.3 PŘÍPRAVA POLYPYROLU	44
6.4 KULTIVACE BUNĚK.....	44
6.5 TESTOVÁNÍ VIABILITY BUNĚK.....	46
6.5.1 MTT TEST	46
6.5.2 FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE	49
7 VÝSLEDKY	51
7.1 MTT TEST.....	51
7.2 TEST VIABILITY BUNĚK	55
8 DISKUZE	59
ZÁVĚR.....	63
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	64
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	73
SEZNAM OBRÁZKŮ	74
SEZNAM TABULEK	76

ÚVOD

Vodivé polymery jsou skupinou materiálů, které mají neuvěřitelný potenciál pro řešení problémů moderního světa, jako je udržitelná energetika, elektronika a biomedicína. V posledních desetiletích byl výzkum v této oblasti intenzivní a vyvolal značný zájem vědecké komunity, průmyslu i široké veřejnosti. Mezi nejznámější vodivé polymery patří polypyrol, polyanilin, polythiofen a řadíme sem také polyazulen.

Polyazuleny jsou zajímavou skupinou organických sloučenin, které se v posledních letech staly předmětem výzkumu díky svým vodivým a mnoha dalším vlastnostem. V rámci této diplomové práce se zaměřím na doposud nezkoumané biologické vlastnosti a jejich potencionální využití v lékařství, terapii a jiných oborech. Polyazulen je organická sloučenina s charakteristickou azulenovou strukturou, která obsahuje několik atomů dusíku. Poprvé byl syntetizován v roce 1986 a od té doby byl intenzivně studován pro jeho vlastnosti jako organického polovodiče. Mezi tyto vlastnosti patří vysoká elektrická vodivost a nízká energetická mez, které dělají z polyazulenu materiál ideální pro využití v organických tranzistorech, fotovoltaických buňkách a dalších elektronických zařízeních.

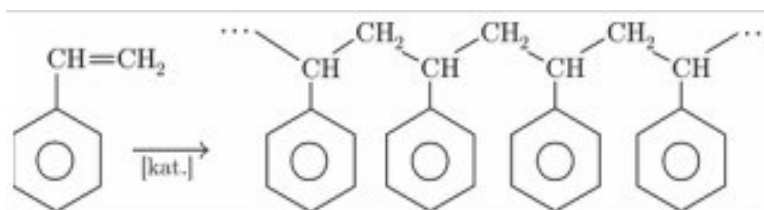
U monomeru azulenu pozorujeme antimikrobiální, antivirové, antioxidační a protizánětlivé účinky, což ho činí zajímavým pro biomedicínské aplikace. Azulen je sloučenina s charakteristickou modrou barvou, kterou v přírodě nalezneme v některých rostlinách, například v heřmánku. U polyazulenu doposud nebyly biologické vlastnosti prozkoumány a tato diplomová práce si to klade za cíl.

Celkově lze říct, že polyazulen je polymerní materiál s různými zajímavými vlastnostmi, díky kterým je atraktivní pro mnoho biomedicínských i průmyslových aplikací. Díky jeho vodivosti a teplotní stabilitě se používá jako materiál pro výrobu elektronických součástek a izolací vodičů. Výsledky této práce by mohly přispět k rozšíření stávajících poznatků v oblasti polyazulenu a podpořit další výzkum a vývoj tohoto materiálu pro budoucí aplikace v průmyslu a biomedicíně.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 POLYMERY

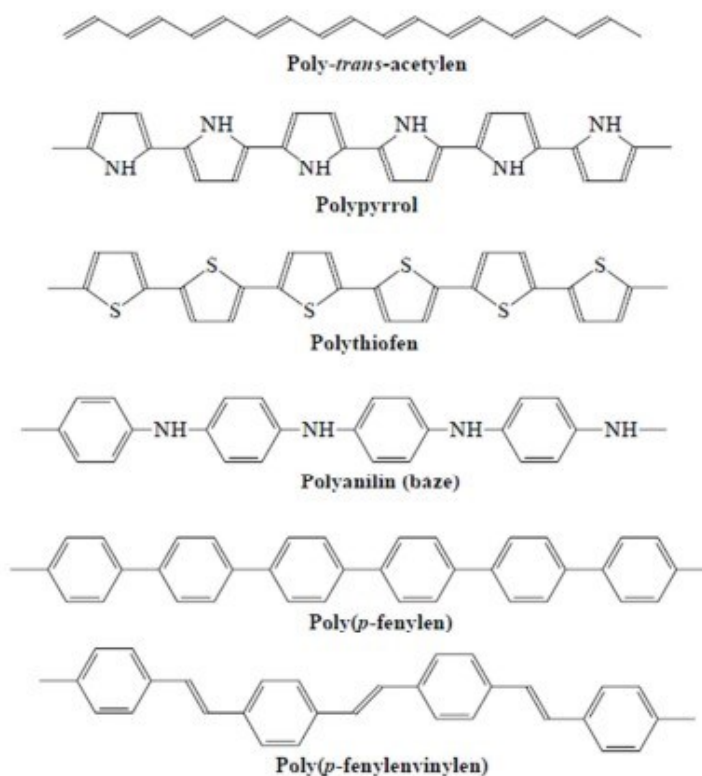
Polymery jsou makromolekuly, z chemického hlediska organické látky, sestávající z jednoho nebo více druhů atomů většinou se jedná o atomy uhlíku, vodíku, kyslíku často také křemíku, chloru nebo dusíku. Mohou být přírodního nebo syntetického původu. Mezi přírodní polymery řadíme kaučuk, z jehož kůry se získává latex, dále celulosu (buničina), která je výchozí látkou pro výrobu hedvábí, celofánu nebo také škrob, bílkoviny nebo jantar (Prokopová, 2007). Polymery jsou molekulové systémy tvořené atomy vázanými chemickými vazbami do dlouhých řetězců, to můžeme vidět na obrázku 1. Řetězce jsou tvořeny pravidelně se opakující částí – stavební nebo monomerní jednotkou. Polymerační stupeň je veličina, která udává počet stavebních jednotek. Oligomery jsou sloučeniny s nízkým polymeračním stupněm do hodnoty polymeračního stupně 10, nad tuto hodnotu sloučeniny nazýváme polymery (Campbell, 2000).



Obrázek 1 Přeměna styrenu na polystyren (Elsevier, 2011)

2 VODIVÉ POLYMERY

Vodivé polymery jsou látky, u kterých najdeme podobné elektrické vlastnosti jako u většiny anorganických vodivých či polovodivých materiálů. Díky tomu získáme u těchto látek kombinaci vlastností elektrických anorganických materiálů spolu s dobrými mechanickými vlastnostmi a snadnou zpracovatelností. Strukturně se tyto látky mohou měnit a také, v závislosti na reakci okolního prostředí, mohou měnit i své fyzikální vlastnosti. Díky těmto schopnostem se vodivé polymery nazývají inteligentní materiály, které v posledních letech přitahují přirozeně pozornost. Jedním z hlavních důvodů je široká možnost jejich využití. Vodivost polymerů je umožněna střídáním jednoduchých a dvojných vazeb neboli konjugací v rámci molekulární struktury a také přítomností pohyblivých nosičů náboje, které umožní přenos po řetězci. Mezi nejznámější vodivé polymery řadíme polyanilin, polypyrrol nebo polyacetylen, jejich vzorce jsou zobrazeny na obrázku 2 (Berlin, Heidelberg, 2008).



Obrázek 2 Nejvýznamnější vodivé polymery (Stejskal, 2001)

2.1 Historie vodivých polymerů

Na výzkumu vodivých polymerů se podíleli tři vědci, kteří byli za tento objev oceněni Nobelovou cenou, byli to Alan G. Macdiarmid, profesor chemie, který zkoumal přípravu a vlastnosti polyanilinu i jeho oligomerů a soustředil se na oblast jejich aplikací jako senzorů. Dalším vědcem byl Hideki Širakawa. Hideki Širakawa byl profesorem chemie, objevil možnost zavedení nositele náboje do polymerní látky procesem dopování. Posledním vědcem z oceněné trojice byl Alan J. Heeger, profesor fyziky, který se zabýval objasněním vodivosti polymerních materiálů. Ukázal, že vodivost záleží na tom, jak se elektrony v polymeru pohybují a také jak jsou rozloženy. Tyto znalosti následně uplatnil hlavně v oblasti konstrukce diod a laserů. Všichni tři vědci se sešli v Pensylvánii, kde společně pracovali, výsledky pak publikovali v roce 1977, Nobelovou cenou byli oceněni v roce 2000 (Prokeš et. al. 2001).

Strukturně nejjednodušší syntetizovaným vodivým polymerem byl v roce 1974 polyacetylen. Byl syntetizován vědci, později oceněnými Nobelovou cenou (Macdiarmid, Heeger, Širakawa), kteří ho připravili ve formě polyacetylenové vrstvy neboli filmu. Konkrétně to byl vysoce kvalitní a flexibilní cis-izomer měděné barvy a trans-izomer stříbrné barvy, na přípravu využili Zieglerovy-Nattovy katalyzátory a vypracovali postup, při kterém je kontrolovaný poměr cis a trans izomerů ve výsledném produktu. Základním objevem bylo zjištění, že když tento polyacetylenový film dopujeme parami halogenu (konkrétně chloru, bromu nebo jodu), tak dojde ke zvýšení elektrické vodivosti až milionkrát. Prvním krokem tohoto procesu je odebrání elektronu z řetězce polymeru, tento elektron se poté přenese k molekule halogenu, která se nabije záporně a polyacetylenová molekula má tak kladný pohyblivý náboj (Louis, et. al, 1977). Tento objev odstartoval rozvoj řady dalších vodivých organických polymerů.

2.2 Princip vodivosti polymeru

Vodivost je umožněna díky tomu, že v rámci polymeru mají oxidová centra kladný náboj. Tyto kladné náboje se musí vyrovnat obráceně nabitými ionty z roztoku elektrolytu, který byl použit při přípravě polymeru. Nezbytná je také přítomnost dlouhých řetězců konjugovaných dvojných vazeb (obsahující π -elektrony), kvůli snadnému pohybu elektronů. Nosičem náboje jsou buď ionty, elektrony nebo díry, jejich přítomnost je také nezbytná pro vznik vodivosti. Vlastnosti polymeru jak elektrochemické, tak i mechanické jsou ovlivněny velikostí a pohyblivostí dopujícího iontu (Gottwald, 2010).

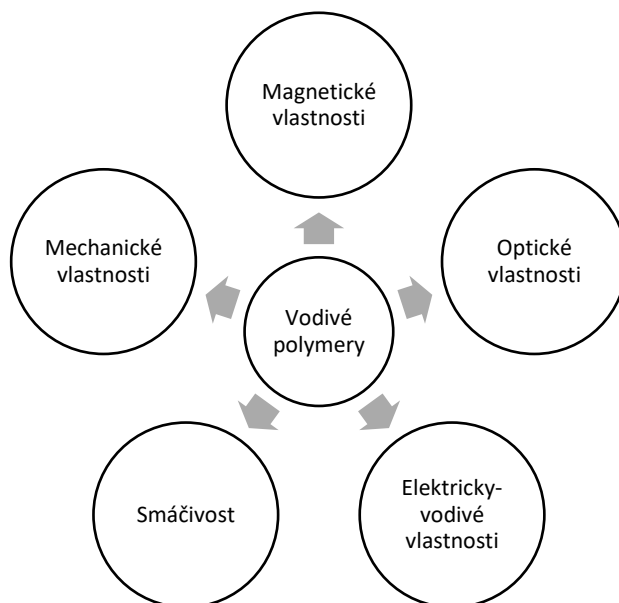
Vodivost konjugovaných polymerů, které nejsou dopovány, je díky existenci vodivé vazby stejná jako v kovech. V konjugovaných polymerech 3 ze 4 valenčních elektronů vytváří silnou σ vazbu přes sp^2 hybridizaci, kde jsou elektrony silně lokalizovány. Zbývající nepárový elektron z každého uhlíkového atomu zůstává v p_z orbitalu. Tam se překrývá se sousedním p_z orbitalem a formují π -vazbu. Tyto π -elektrony z konjugovaných p_z orbitalů formují prodloužený p_z orbitalový systém, ve kterém se mohou elektrony volně pohybovat. Nedopované polymery mají nižší vodivost než polymery dopované, pouze pokud je elektron odstraněn z valenční vrstvy pomocí oxidace (p-doping) nebo naopak přidán do vodivé vazby redukcí (n-doping), získá tak polymer vysokou vodivost (Epstein, 1999).

2.3 Příprava vodivých polymerů

Na přípravu vodivých polymerů je nutné použít monomery, které obsahují skupiny schopné oxidace či redukce za vytvoření polymeru (Gottwald, 2010). Hlavní čtyři metody elektronového dopingu jsou redoxní p-doping – některé z π vazeb jsou oxidovány pomocí ošetření polymeru oxidačním činidlem, jako je například jód, chlór atd. Redoxní n-doping je metoda, při které jsou některé z π vazeb redukovány, díky zavedení redukčních látek například lithiem nebo naftalenem sodným. Elektrochemický p- a n-doping je způsob, kterého dosáhneme katodickou redukcí (p) nebo anodickou oxidací (n). Poslední metodou je fotoindukovaný doping, při kterém je polymer vystaven vysoko energetické radiaci, která umožní elektronům přemístit se na vodivou vazbu (Sariciftci, 1998). Nejčastěji využívanou metodou je elektrochemická anodická oxidace. Kvalita a struktura polymeru se poté odvíjí od zvolené metody, použitých rozpouštědel, elektrolytu, pH, koncentraci monomeru a dalších parametrech (Gottwald, 2010).

2.4 Vlastnosti vodivých polymerů

Vodivé polymery jsou typem organických polymerů, které mají schopnost vést elektrinu. Mají mnoho jedinečných vlastností jako vlastnosti elektrické, optické a magnetické (viz. Obrázek 3), to je dělá velice dobře využitelným materiálem v řadě aplikací, jako jsou senzory, baterie, různá elektronická zařízení.



Obrázek 3 Vlastnosti vodivých polymerů, převzato (Tapan K. Das & Smita Prusty, 2012)

2.4.1 Optické vlastnosti

Optické vlastnosti u vodivých polymerů, byly rozsáhle zkoumány kvůli možnosti jejich využití v nanofotonických zařízeních (Tapan K. Das & Smita Prusty, 2012). Nanofotonika je vědní obor, který se zaměřuje na interakci mezi fotony a nanostrukturami, jako jsou například uhlíkové nanotrubičky, nano kovové částice, tkáň nebo DNA (Mahmoud Nasrollahzadeh, 2019). Vodivé polymery vykazují různé optické vlastnosti, které mohou být modulovány vnějšími vlivy. Řadíme mezi ně fosforescenci i fluorescenci, což záleží na spinových stavech excitovaných a nižších hladin. Fluorescence se objeví skoro okamžitě po absorpci světla, zatímco fosforescence má prodlevu až dokud nenastane emise. Při dopování polymerů fullereny se projevuje nová optická vlastnost, která umožní materiálu absorbovat světlo a přeměnit ho na elektrickou energii, označuje se jako sloučení elektronů. Fulleren je výhodný, protože je vysokoúčinným elektronovým akceptorem, což pomáhá zlepšit také celkovou vodivost polymeru. Využití optických vlastností kromě nanofotoniky najdeme například v OLED diodách, solárních buňkách. Unikátní optické vlastnosti nabízejí mnoho možností pro vývoj nových technologií na poli optoelektroniky (Namsheer, Rout, 2021).

2.4.2 Magnetické vlastnosti

Studium magnetických vlastností vodivých polymerů poskytuje důležité informace o druzích přenášející náboj a nepárových spinech v rámci řetězce. Tímto výzkumem se zabýval pan Luetal, který studoval magnetické vlastnosti polyanilinu ve formě nanotrubic

syntetizovaných technikou ultrazvukového ozařování (Lu et al, 2006). Dalším vědcem, který se zabýval studiem magnetických vlastností, byl pan Long na rozdíl od pana Lueta studoval polyanilin ve formě nanotyčinek zformovaných technikou samosestavení (Tapan, et al, 2012). Samosestavení je proces, při kterém se komponenty systému (molekuly, polymery, koloidy, makroskopické částice) zorganizují do uspořádaných případně funkčních struktur nebo vzorů v důsledku specifických, lokálních interakcí mezi komponentami navzájem bez vnějšího směru (Latypov et al, 2015). Ve srovnání těchto dvou výzkumů víme, že vzorky připravené metodou ultrazvukového ozařování usnadňují výdej částice Fe_3O_4 a také vykazují superparamagnetické vlastnosti (Tapan, et al, 2012).

2.4.3 Elektricky-vodivé vlastnosti

Jak již bylo zmíněno v kapitole Příprava vodivých polymerů, vodivost je zajištěna elektronovým dopingem. Po dopingů může vodivost dosáhnout až úrovně vodivosti kovů (Tapan, et. al, 2012). Vodivost může být kontrolována změnou úrovně dopingů, což zahrnuje přidávání nebo odebrání elektronu z řetězce. Dopingů může být dosaženo chemickou reakcí nebo expozicí polymeru určitým plynům a roztokům. Fyzikální faktory mohou vodivost také ovlivňovat například teplota, vlhkost vzduchu nebo vystavení světlu. Vodivé polymery mohou existovat v různých formách – film, nanočástice, nebo vlákna každá forma má jiné vodivé vlastnosti. Nejvyšší vodivost mají tendenci vykazovat tenké filmy nebo prášky s vysokým stupněm uspořádání a krystalinity (Long et al, 2005). Mezi další zajímavé rysy v rámci vodivosti patří elektrochromismus neboli změna barvy v závislosti na aplikovaném napětí a elektroaktivita jako schopnost uložit a uvolnit náboj (Hanifi, 1999).

2.4.4 Smáčivost

Smáčivost je jednou z nejdůležitějších vlastností pevných povrchů, které vedou k aplikacím jako samočisticí povrchy, mikrofluidika, řízené dodávání léčiv nebo bio-separace. Vodivé polymery jsou v obecném měřítku hydrofilní materiály, to znamená, že jsou schopny vázat vodu nebo se v ní rozpouštět (Tapan et. al, 2012). Tuto vlastnost mají díky jejich složení a přítomnosti polárních skupin aminů, karboxylových kyselin a hydroxylových skupin v polymerním řetězci. Stupeň hydrofility závisí na specifickém polymeru a podmínkách zpracování. Smáčivost lze ovlivnit množstvím faktorů jako je přítomnost dopujících skupin, stupni polymerizace, podmínkách zpracování, povrchové morfologii polymeru. Přítomnost dopujících molekul zvyšuje hydrofilitu polymeru vytvořením ionických vazeb, které mohou interagovat s vodou. I když obecně jsou vodivé polymery hydrofilní při změně

struktury mohou mít i oleofilní vlastnosti a toho lze využít v aplikacích. Superhydrofilní (absorpce a transport vody) vlastnosti se využívají u senzorů, v systémech na doručování léčiv. Superoleofobní vlastnosti se mohou využívat u povlaků proti znečištění, aplikace pro separaci oleje a vody (Darmanin, Guittard, 2014).

2.4.5 Mechanické vlastnosti

Mechanické vlastnosti se dají také označit jako fyzikální charakteristika materiálu, která charakterizují jeho reakci na mechanické vlivy, jako jsou napětí, stlačení, ohyb a další. Mezi běžné mechanické vlastnosti řadíme pevnost, tvrdost, houževnatost, pružnost, tažnost nebo tuhost. Mechanické vlastnosti jsou důležité pro předpoklad chování materiálů za různých podmínek a v různých aplikacích. Při srovnání mechanických vlastností u polymerů záleží na zvoleném typu polymeru, složení monomeru, času a teplotě polymerizace, krystalinitě a dalších. Krystalické polymery mají lepší vlastnosti než amorfni semi-krystalické polymery. Klíčovým faktorem je také molekulová mobilita, kterou ovlivňují faktory: tlak, teplota a větvení. Mechanické vlastnosti jsou zkoumány na polymerových filmech (Burman et al, 2008).

Při srovnání vodivých polymerů polyanilinu a polypyrolu zjistíme, že v rámci adheze má polypyrol větší sílu než polyanilin, z čehož vyplývá že polypyrolové filmy jsou schopné lépe přilnout k substrátu. Koeficient tření je naopak vyšší u filmu z polyanilinu, to nám říká, že polypyrol má lepší povrchovou úpravu a je odolnější tření. Odolnost proti opotřebení vykazují shodně oba polymerové filmy vyšší na substrátu vyrobenému z hliníku než ocelovém. To naznačuje, že oba filmy je vhodnější používat na měkčí materiály (Wang, et al, 2009).

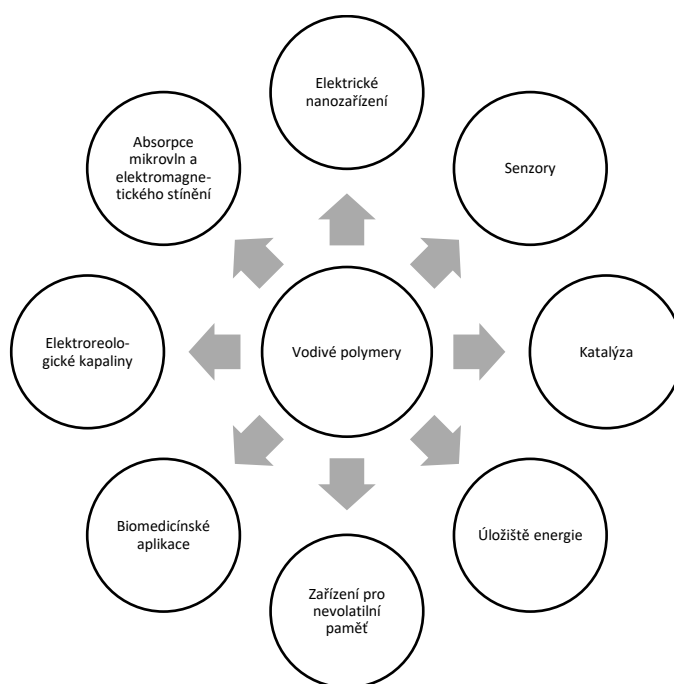
2.4.6 Ostatní vlastnosti

Mezi další vlastnosti vodivých polymerů řadíme schopnost absorbovat mikrovlnné záření. Tato vlastnost závisí na elektrické vodivosti, magnetických vlastnostech polymeru. Polymer s vysokou elektrickou vodivostí a vysokou dielektrickou ztrátou absorbuje mikrovlnné záření účinněji. Můžeme to využít v aplikacích jako je elektromagnetická interference (Tapan, Prusty, 2012).

Tepelná vodivost je u vodivých polymerů nízká, to je dělá vhodné pro aplikace vyžadující izolace. Zároveň mají vysokou tepelnou stabilitu, což je účinné v aplikacích vyžadujících vysokou teplotu (Rausch et al, 2013).

Mezi další vlastnosti vodivých polymerů řadíme citlivost k plynům. Dají se nazývat jako chemické senzory plynů, pracují na principu změny elektrické vodivosti polymeru, když je vystaven určitým plynům. Plyny jsou rozpoznány na základě jejich chemické struktury a vlastnostech, rozpoznávají například kyslík, oxid uhličitý, oxid dusičitý, oxid siřičitý, metan a další. Tato vlastnost se dá využít v aplikacích senzorů plynu, které jsou schopny detekovat koncentrace plynu v okolním prostředí. Senzory fungují tak, že je vodivý polymer vystaven plynu a sleduje se změna vodivosti. Tuto změnu může způsobit reakce plynu s polymerem, adsorpce plynu na povrchu polymeru nebo jiné změny vlastností polymeru způsobené interakcí s plynem. Výhoda senzorů s vodivými polymery oproti jiným je vysoká citlivost, nízká spotřeba energie, jednoduchá výroba a možnost integrace do elektrických obvodů (Rorigues, et. al, 2023).

2.5 Aplikace vodivých polymerů



Obrázek 4 Využití vodivých polymerů, převzato (Tapan K. Das & Smita Prusty, 2012)

Vodivé polymery mají široké spektrum využití v různých oblastech, různorodost využití ukazuje i obrázek 4. Možnost takto rozsáhlých aplikací v mnoha oblastech mají díky výjimečným fyzikálním a chemickým vlastnostem. Mezi nejčastější oblasti využití patří elektrochemické zařízení, senzory a detektory, elektromagnetická ochrana, elektroluminiscenční zařízení nebo biomedicínské aplikace. Obecně lze tedy říct, že se dají využít od průmyslu po medicínu a zobrazovací technologie.

2.5.1 Senzory a detektory

Principem fungování senzorů založených na vodivých polymerech je změna vlastností elektrických nebo mechanických polymerů v reakci na změnu analytu v okolí tohoto senzoru. Změny mohou být různého typu například to může být změna konformace polymeru, solvatace polymerového řetězce nebo změna mobility elektronů. Tato aktivita je následně snímána a převedena na mechanický případně elektrický signál. Využití senzorů vodivých polymerů je vhodné pro různé druhy analytů jako jsou plyn, teplota, napětí, tlak, biologické molekuly nebo vlhkost (Wang et al., 2019).

2.5.1.1 Senzory na detekci plynu

Tyto senzory fungují na principu změny elektrického odporu vrstvy polymeru, když dojde k vystavení specifickému plynu případně chemické sloučenině. Ve chvíli, kdy se plyn dostane na povrch polymerové vrstvy, dojde k adsorpci částice plynu na polymerový řetězec. To má za efekt změnu vodivosti polymeru, která vede ke změně elektrického odporu senzoru. Různé plyny jsou rozeznány na základě toho, že mají různé chemické vlastnosti, jako příklad lze uvést velikost molekuly nebo polarita. Tyto vlastnosti se poté projeví při interakci plynu s polymerem, tato interakce je specifická pro každý plyn a polymer a umožňuje sensorům rozlišovat různé plyny mezi sebou. Vodivé polymery je možné v senzorech kombinovat a optimalizovat jejich vlastnosti a tím vytvořit vysoce citlivé a selektivní senzory pro určité plyny a chemické sloučeniny (Bai, Shi, 2007).

2.5.1.2 Senzory pro analýzu potravin

Vodivé polymery se dají využít také v senzorech pro analýzu potravin i léčiv, zde se detekují specifické sloučeniny jako organické kyseliny, alkoholy, aminy a další látky vyskytující se v potravinách a léčivech. Díky vysoké citlivosti a odezvě vodivých polymerů je možné detekovat i nízké koncentrace látek. U těchto senzorů je také důležitá stabilita, protože potraviny a léčiva mohou být vystaveny širokému spektru teplot, chemických látek i vlhkosti. V praxi se tyto senzory využily například na detekci kyseliny askorbové v ovoci a zelenině nebo pesticidů v potravinách, alkoholu v nápojích, kofeinu v kávě nebo také léčivech v krvi (Lin et al., 2021).

2.5.1.3 Senzory pro detekci kovů

V těchto senzorech se využívají vodivé polymery, které se připojí k elektrodám, a díky tomu je možné změřit koncentraci těžkých kovů v analyzovaných vzorcích. Detekovat lze široké spektrum kovů mezi ně řadíme olovo, rtuť, zinek, chrom, nikl a další. Při srovnání s tradičními analytickými metodami tyto senzory nabízejí výhody, jsou obvykle malé, rychlé, levné na výrobu a také snadno použitelné. Tyto senzory lze využít v reálném čase a místě, takže vzorky není nutné posílat do laboratoře (Wang, 2019).

2.5.1.4 Senzory pro detekci teploty

Vodivé polymery se dají využít i v senzorech pro detekci teploty. Principem jsou tyto senzory podobné jako senzory předcházející – na základě změny teploty dojde ke změně vodivosti vodivého polymeru. Tato změna se poté dá měřit a použít jako indikace změny teploty. Teplotní senzory na bázi vodivých polymerů mají obvykle tvar tenkého filmu, který se umístí na substrát (např. kovová elektroda). Výhody v použití vodivých polymerů v teplotních senzorech jsou vysoká citlivost, nízká hmotnost a flexibilita. Citlivost může být ovlivněna množstvím faktorů, jako jsou použitý substrát, chemické modifikace polymeru a další. Senzory mohou být vyrobeny různými způsoby, mezi které patří elektropolymerizace, chemická polymerizace, depozice polymerů z plynné fáze nebo přímou litografií (Megha et al, 2018). Senzory mají různorodé využití v odvětvích průmyslu, elektrotechniky, životního prostředí nebo biomedicíny konkrétně se pro příklad senzory na bázi polypyrrolu využívají pro měření teploty v letadlech a motorových vozidlech, polyanilinu pro senzory teploty v elektrotechnických aplikacích nebo pro monitorování v enviromentální oblasti a další (Mezhr et al, 2021).

2.5.1.5 Senzory pro detekci pH

Využití vodivých polymerů v senzorech pro detekci vodíkového exponentu představuje slibný způsob detekce, který má uplatnění v mnoha různých oblastech. Na rozdíl od tradičního senzoru, zde není vyžadován referenční elektrodový systém ani elektrolyt. Senzor je tvořen tenkou vrstvou vodivého polymeru citlivého na změnu pH v roztoku. Vodivost polymeru se poté mění, když se dostane do kontaktu s roztokem v závislosti na koncentraci iontů v tomto roztoku. Tato změna se poté zaznamená a převádí na hodnotu pH přes kalibrační křivku. Výhodou tohoto senzoru je vysoká citlivost – umí zaznamenat i velmi malé změny v pH, tato citlivost se dá také snadno upravovat na určité rozmezí pH (Talaie, 1997).

2.5.1.6 *Senzory pro biologické aplikace*

V oblasti biologie se pomocí senzorů s vodivými polymery dají detekovat biologické molekuly jako proteiny, DNA, buněčné analyty (Contractor et al, 1994), ale také se dají využít na detekci glukózy v krvi nebo sledování srdeční aktivity v tzv. biomedicínských aplikacích (Nambiar, Yeow, 2011). Princip fungování je totožný pro všechny biologické aplikace. Senzor je tvořen vodivým polymerem ve formě tenké vrstvy, při kontaktu polymeru s analytem se mění jeho vodivost v závislosti na vlastnostech analytu. Změna vodivosti se následně stanoví a převede na požadovanou informaci (změna pH, koncentrace atd.). Možnosti využití jsou široké v různých odvětvích. V průmyslu se senzory používají ke sledování vlastností jako koncentraci látek, hodnotě pH při průmyslových procesech (výroba potravin, farmaceutik, chemických látek). Využití mají také v rámci ochrany životního prostředí konkrétně na monitorování kvality vzduchu, půdy nebo vody, detekují těžké kovy, pesticidy nebo toxické plyny. Ve zdravotnictví jsou to biomedicínské aplikace, jak již bylo uvedeno, a umísťují se často do tělesných implantátů – kardiostimulátory. Aplikaci mají také v rámci bezpečnosti – senzory pro detekci nebezpečných látek v bezpečnostních aplikacích (detekce náloží na letištích) (Park, et al, 2019).

2.5.2 **Optoelektronická zařízení**

Využití vodivých polymerů v optoelektronických zařízeních je jedním z nejrozšířenějších způsobů využití těchto látek. Mají pro tuto aplikaci ideální vlastnosti, snadnou syntézu, schopnost snadné zpracovatelnosti do různých forem – vlákna, filmy, tenké vrstvy. Optoelektronických zařízení existují různé typy OLEDs, OPVs, senzory a další, vodivé polymery se využívají ve všech uvedených. Princip využití se liší u jednotlivých typů zařízení. Obecně se dá říct, že se vodivé polymery využívají jako aktivní materiály absorbující světlo a generující nosiče náboje (Leclers, Morin, 2010).

2.5.2.1 *OPVs*

OPVs neboli organické fotovoltaické zařízení využívají vrstvu vodivých polymerů pro absorpci světla a následnou generaci nosičů náboje. V těchto zařízeních jsou umístěny dvě elektrody, jedna sloužící jako anoda a druhá jako katoda, mezi nimi je vrstva vodivého polymeru. Při vstupu fotonu do aktivní vrstvy může dojít k absorpci vodivým polymerem a excitaci elektronů, tím v molekule polymeru vznikají díry po excitovaných elektronech. Excitované elektrony a vzniklé díry se poté oddělí vlivem elektrického pole mezi elektrodami a migrují k nim. U elektrod se přeskupují, a to vede k vytvoření elektrického

proudu. Polymery musejí mít správnou energetickou hladinu HOMO¹ a LUMO² a také schopnost vysoké absorpce fotonů v blízké IČ oblasti spektra. Konkrétní příklad využití najdeme v solárních panelech, integrovaná fotovoltaická okna a další (Cao, et al, 2014).

2.5.2.2 OLED

OLED jinak také organické světelné diody jsou dalším druhem optoelektronického zařízení, ve kterém se využívají vodivé polymery. Princip je mírně rozdílný od OPVs. Vodivé polymery zde fungují jako transportní a emisní vrstvy. Jsou aplikovány na anodovou elektrodu, tvořenou vodivým materiálem (často indium, cín, oxid – ITO). Aktivní vrstva tvořená vodivým polymerem funguje jako transportní vrstva na přepravu děr (po excitovaných elektronech) z anodové elektrody na emisní vrstvu tvořenou organickými molekulami. Po transportu částic k emisní vrstvě dochází k rekombinaci elektronů a děr a vzniknou částice zvané excitony, ty následně emitují světlo. Konkrétně se tento druh zařízení používá v některých druzích smartphonů, televizorů, chytrých hodinek, osobních počítačích a další (Chen et al, 2010).

2.5.2.3 OTFT

OTFT je zkratka pro organické tranzistory, zařízení, které využívají organické materiály jako aktivní vrstvu pro transport elektronů. Vodivé polymery se v OTFT užívají jako polovodiče, které jsou schopny zformovat kanál pro proudění náboje v organickém polovodiči. Principem je, že polymerová vrstva, která je mezi elektrodami umožní regulaci proudu procházejícím přes tranzistor. Při aplikaci elektrického napětí na polymerovou vrstvu dojde k vytvoření elektrického pole, které ovlivní proud tekoucí přes polymer. V závislosti na polaritě a velikosti napětí dojde k nárůstu nebo poklesu proudu. Typická aplikace vodivých polymerů je pomocí inkoustové tiskárny, depozice z roztoku případně parní depozice. Po aplikaci na substrát dojde k oxidaci nebo redukci, aby dosáhly požadovaných elektrických vlastností. Využití najdeme například ve flexibilních displejích, které mají díky využití OTFT vysoký kontrast a nízkou spotřebu energie. Existují také paměťová zařízení nebo fotovoltaické články využívající toto zařízení (Allard, Leclerc, 2014).

¹ HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) – Nejvyšší obsazený molekulový orbital

² LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) – Nejnížší neobsazený molekulový orbital

2.5.3 Elektrochemie

Mezi další významnou oblast využití vodivých polymerů patří elektrochemie. Elektrochemie je vědní obor věnující se studiu chemických reakcí odehrávajících se na elektrodách, které jsou spojeny s transportem elektronů mezi elektrolytem a elektrodou (O'Mullane, 2013). Vodivé polymery jsou zde vhodné k využití díky následujícím vlastnostem. Klíčová vlastnost je vodivost, která se liší podle chemické struktury vodivého polymeru. Stabilita v prostředí s vysokým pH a také v oxidujícím a redukujícím prostředí umožňuje využití u procesů za různých podmínek. Dalšími vlastnostmi jsou elektroaktivita neboli schopnost vodivého polymeru interagovat s elektrolytem a elektrodou, selektivita umožňující detekci určitého analytu a také flexibilita dovolující se polymerům přizpůsobovat různým tvarům a povrchům elektrod (Terán-Alcocer, et al, 2021).

2.5.3.1 Elektrochemické senzory

Elektrochemické senzory využívají vodivé polymery jako elektrody, kde jsou nejčastěji využívané polypyrrol, polythiofen nebo polyanilin. Dají se využít jako způsob modifikace elektrod a tím zvýšit citlivost k určitému analytu případně jako nosiče katalyzátorů či nanomateriálů. Jsou to senzory detekující chemické sloučeniny nebo analyty v prostředí díky jejich elektrochemickým vlastnostem. Existují různé typy senzorů např. ampérometrický, voltametrický. Detekovat jimi lze rozmanité druhy analytů v reálném čase – kovy, organické sloučeniny, biologické molekuly a další, díky tomu je lze využít v mnoha oblastech od lékařství přes potravinářství až po ochranu životního prostředí (Moon et al, 2018).

2.5.3.2 Elektrokatalýza

Elektrokatalýza je dalším významnou oblastí využití vodivých polymerů v rámci elektrochemie. Často dochází k aplikacím vodivých polymerů jako alternativě k tradičním katalyzátorům. Oproti tradičním katalyzátorům mají výhody nízkých nákladů na přípravu, snadnost výroby i úpravy, vysoké stability a selektivitě. Mechanismus urychlení elektrochemické reakce je závislý od konkrétního typu polymeru a aplikace, obecně snižují aktivační energii a mají schopnost přenosu náboje. Konkrétním mechanismem poté může být například adsorpce a koncentrace reaktantů na povrchu vodivého polymeru umožňující vyšší efektivitu průběhu reakce. Mezi reakce katalyzované elektrokatalyzátory jsou řazeny elektrokatalytické redukce kyslíku a oxidace organických sloučenin (Singh et al, 2017).

2.5.4 Využití v oblasti biomedicíny

V oblasti biomedicíny najdeme pro vodivé polymery široké spektrum aplikací, mohou být využity jako nosiče léčiv a biomateriálů, senzory, materiál na výrobu implantátů a dalších biomedicínských zařízeních.

2.5.4.1 *Nosiče léčiv*

Nosiče léčiv mohou vzniknout modifikací vodivých polymerů vázající se na cílové buňky a tkáně. Na takto modifikované polymery se poté připojí léčivo a aplikuje se do cílové oblasti. V cílové oblasti poté dochází k cílenému uvolňování léčiva umožněnému vysokou afinitou k buňkám a tkáním. Uvolňování léčiv lze ovlivnit modifikacemi polymerů, jak již bylo zmíněno, konkrétně modifikací povrchu polymeru, aby se vázal na specifické cílové molekuly. Lze také ovlivnit, v jakém prostředí dojde k rozpouštění polymerů (kyselé nebo zásadité). Takto lze ovlivnit kinetiku uvolnění léčiv z nosičů a umožní to více přesné uvolňování léčiv v těle (Puiggali-Jou et al, 2019). Další alternativou využití vodivých polymerů je vytvoření nových druhů implantátů pokrytých vrstvou vodivého polymeru. Takto modifikovaný implantát poté může být naprogramován na uvolňování léčiva podle potřeb pacienta. Vodivé polymery jsou v této oblasti velkou šancí pro vytvoření nových a inovativních léčebných postupů a cílené léčbě s menšími vedlejšími účinky (Paramshetti et al, 2023).

2.5.4.2 *Biosenzory*

Biosenzory jsou široce využívanou modifikací vodivých polymerů v oblasti biomedicíny. O principu jejich fungování a využití již bylo více napsáno v kapitole Senzory pro biologické aplikace. Kromě již dříve zmíněného využití lze vodivé polymery v oblasti biosenzorů použít také jako transduktory. Transduktor je zařízení převádějící jednu formu energie na jinou, je to změna elektrického signálu způsobena interakcí molekul s analytem převáděna na detekovatelný signál (změnu elektrického proudu nebo napětí). Vodivé polymery jsou schopny konvertovat elektrickou energii na jiné formy energie jako je teplo nebo světlo, což rozšiřuje využití detekčních metod a optické metody jako absorbanci, fluorescenci nebo Ramanovu spektroskopii. Další možností využití transduktorů z vodivých polymerů je pomocí změn v elektrochemické aktivitě vodivých polymerů po interakci s analytem. Potenciál v této oblasti je velký a má množství výhod oproti tradičním metodám stejně jako využití v oblasti nosičů léčiv (Thévenot et al, 2001).

2.5.4.3 Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství nebo také regenerativní medicína je vědním oborem, který se zabývá tvorbou umělých tkání a orgánů využitelných pro opravu případně náhradu poškozených tkání v lidském organismu (Freshney, 2005). Vodivé polymery v této oblasti mají roli díky jejich elektrickým a mechanickým vlastnostem. Používají se jako substráty pro růst a diferenciaci buněk nebo jako elektrody pro elektrostimulaci buněk, která může podpořit růst, adhezi a diferenciaci buněk. Využívají se v různých strukturních formách jako vlákna, sítě, tenké vrstvy, membrány nebo hydrogely. Důležité je, aby vodivé polymery byly modifikovány na formu biokompatibilní s buněčnou tkání, aby byly akceptovány jako součást vlastního těla. Konkrétně se vodivé polymery využívají například jako substrát pro kultivaci neuronů a kardiomyocytů, umožňuje růst buněk a tvorbu sítě mezibuněčných spojnic, což může přispět k úspěšnějšímu propojení tkání po transplantaci. Jednou z dalších alternativ využití je vytvoření elektricky vodivých materiálů pro regeneraci kostní tkáně, které stimuluje osteogenezi a urychlí hojení zlomenin nebo modifikace vodivých polymerů s bioaktivními molekulami jako jsou růstové faktory, které podporují buněčnou diferenciaci a proliferaci (Guimard et al, 2007).

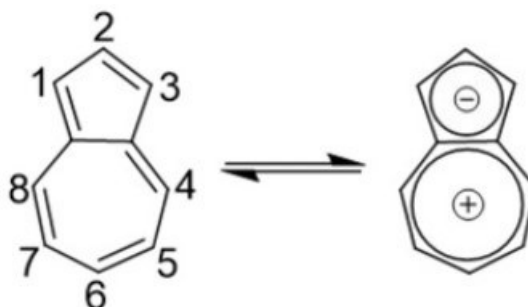
Vodivé polymery se dají využít také na regeneraci nervového systému, konkrétně jako substráty pro růst neuronů a podporu axonálního růstu. Využívají se zde hlavně elektroaktivní polymery, protože mají schopnost přenášet elektrický náboj a vytvářet elektrochemické reakce. Z vodivých polymerů se připraví elektrody umožňující stimulaci růstu neuronů a propojení deformovaných nervových drah. Tyto elektrody se dají také využít k měření signálu nervových buněk a jejich interakcí s okolní tkání, což umožní lepší porozumění některým neurologickým poruchám. Příkladem využití jsou implantáty elektrod, které se umístí přímo do poškozené oblasti nervové tkáně. Elektrody poté můžou být připojeny k externímu zdroji elektrického napětí umožňujícímu stimulaci růstu neuronů. Lze také vytvořit umělé nervové vlákno složené z vodivých polymerů, které se následně využije k nahrazení poškozených nervových drah a regeneraci poškozené tkáně pomocí propojení s okolními tkáněmi a jejich stimulací. Využití vodivých polymerů k regeneraci nervového systému může být slibnou cestou k léčbě poranění páteře a také neurologických poruch (Guo, et al, 2018).

3 AZULEN

Azulen je aromatický uhlovodík, který má unikátní chemické a biologické vlastnosti. Deriváty azulenu jako guaiazulene nebo chamazulene se vyskytují v přírodě jako součást řady rostlin a hub jako jsou například Heřmáněk pravý, Pelyněk pravý, Řebříček obecný, Ryzec indigový. Kvůli jeho fyzikálně chemickým vlastnostem je azulen i jeho deriváty hojně využívány v technologickém odvětví, zejména v optoelektronických zařízeních. V odvětví medicíny se přísady z azulenu používají v širokém měřítku stovky let. Má charakteristickou tmavě modrou barvu (Bakun, et al, 2021).

3.1 Vlastnosti azulenu

Jak již bylo uvedeno azulen je aromatický uhlovodík, díky aromatické povaze má stabilní elektronovou strukturu, konkrétně díky cyklopentadienylovým kruhům. Umožňuje mu to být reaktivní a interagovat s dalšími molekulami jako oxidy dusíku, oxidy síry nebo halogenidy. Z chemického hlediska azulen podléhá celé řadě reakcí, může být oxidován pomocí oxidačních činidel například peroxidů na azulenoxid, který je stabilní aromatickou sloučeninou. Podléhá také substitucím pomocí reakcí Grignardovy nebo Friedel-Craftsovy acylace. Polymerace je prováděna pomocí různých druhů katalyzátorů jako organokovových sloučenin nebo Lewisových kyselin. Dochází také k reakcím, při kterých vznikají komplexy, jsou to komplexy s kovovými ionty (měď nebo železo). U těchto komplexů je poté možné pozorovat zajímavé vlastnosti – antioxidační účinky, fotokatalytickou aktivitu (Murfin, Lewis, 2021).



Obrázek 5 Vzorec azulenu (Huang et al, 2020)

Na azulenovém jádře najdeme různé pozice s různým využitím v organické syntéze. Podle rezonanční delokalizace vyplývá, že bohatší na elektrony jsou pozice 1, 3, 5 a 7, díky tomu mohou snadněji reagovat s elektrofilny. Pozice 2, 4, 6 a 8 jsou na elektrony chudší a reagují díky tomu snadněji s nukleofily graficky to zobrazuje obrázek 5.

- Pozice 1 je často využívaným místem při organické syntéze pro reakce jako připojení dalšího substituentu například alkylu, alkoxyly, aminu nebo karboxylové skupiny. Také je to pozice pro vznik heterocyklické sloučeniny jako pyrazolu, oxazulu nebo thiazolu. Mohou to být také důležité meziprodukty pro přípravu molekulárních sond a senzorů.
- Pozice 2 je využívána zejména pro syntézu pyrroloazulenů a furanoazulenů, což jsou látky zajímavé pro své biologické a optické vlastnosti, využít se dají jako organické polovodiče, fluorescenční barviva.
- Pozice 3 může být využita na tvorbu azuleno-3-karboxylových kyselin. Tyto kyseliny jsou důležitým meziproduktem v organické syntéze, dají se totiž využít pro přípravu různých organických sloučenin.
- Pozice 5 je důležitou, protože zde lze připravit vysokoenergetické sloučeniny azobenzenu a diazenů. Uplatnění nachází jako barviva nebo jako součást organických polovodičů.
- Pozice 8 je místem pro přípravu derivátů azulenové kyseliny, zajímavé pro své biologické a farmakologické vlastnosti. Využívají se jako protizánětlivé, protirakovinné nebo antioxidační látky (Zeng et al, 2020).

3.2 Syntéza azulenu

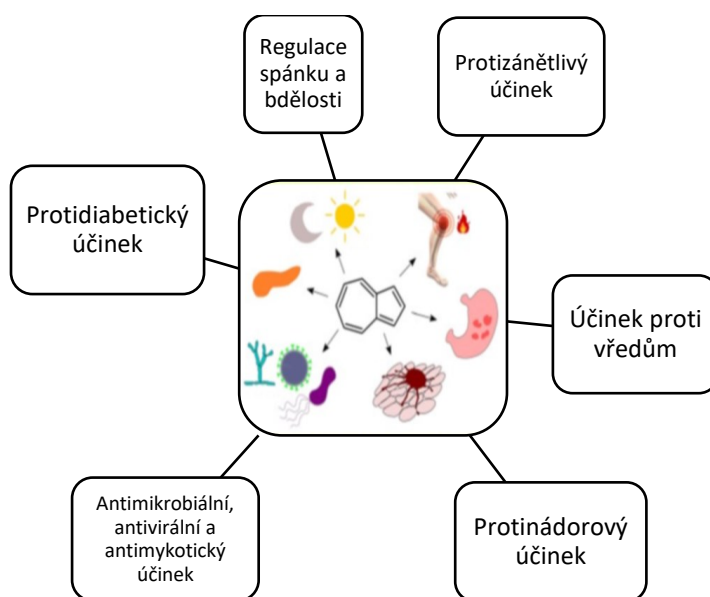
K syntéze azulenu může docházet různými způsoby. Mezi nejčastější patří použití různých prekurzorů jako 1,3-dikarboxylové sloučeniny, resorcinol nebo bicyklické sloučeniny. Wittigova reakce a Pd-katalyzovaná cykloadice jsou další způsoby syntézy. Jednodušší metodou syntézy azulenu je reakce resorcinolu s oxidem mědnatým za vzniku meziprojektu dále přeměněného na azulen (Lemal, Goldman, 1988). Ring-closing metathesis, je metoda umožňující vznik nového cyklického produktu spojením dvou nebo více dvojných vazeb v molekule s vytvořením vazby nové. Nutností je přítomnost katalyzátorů složených z přechodných kovů např. Grubbsův katalyzátor. Pro průmyslovou metodu je využíván způsob ring-closing metathesis, protože umožňuje syntetizovat azulen s vysokou výtěžností (Langhals, Eberspacher, 2018).

3.3 Azulen v polymerech

Azulen a jeho deriváty v průběhu let zaujali chemiky díky jejich výjimečným vlastnostem, objeven byl v roce 1863. Pro tvoření polymerů je důležitá struktura – sedmičlenný kruh azulenu nese částečně pozitivní náboj, zatímco pětičlenný azulenový kruh nese částečně záporný náboj. Toto rozložení vede k dipólovému momentu.

V polymerech je azulen použit jako monomer k tvorbě polyazulenu nebo jako komonomer k přípravě různých variací kopolymerů založených na azulenu. Polymery obsahující azulen mohou být rozděleny podle jejich spojení na azulenovém jádře. Nejčastějším výchozím bodem je spojení -1,3- protože v tomto místě je vysoká reaktivita. Nejčastějším způsobem vzniku polymerů azulenu je elektropolymerizace (Zeng et al, 2020). Metodou, která je použita na přípravu polymeru, lze ovlivnit vlastnosti vznikajícího polymeru jako elektrickou vodivost nebo optické vlastnosti. Další vlastností, která je z azulenu přenášena na jeho polymery, je vysoká reaktivita a aromatický charakter (Huang, Zhao, 2020).

3.4 Vlastnosti azulenu využitelné v medicíně



Obrázek 6 Využití azulenu v medicíně, převzato (Bakun et al, 2021)

Grafické rozdělení působení azulenového monomeru a jeho různých oblastech působení v rámci medicíny naznačuje obrázek 6. Každá oblast je více dopodrobna rozebrána v následujících odstavcích.

3.4.1 Antivirová a antimikrobiální aktivita

Objev antibiotik byl jeden z největších úspěchů lidstva v rámci medicíny přibližně před 100 lety. Na poli antibakteriálních léčiv k dalším významným objevům v posledních letech nedochází a pouze přibývá více bakteriálních kmenů rezistentních k dostupným antibiotikům. Mezi další významné problémy patří výskyt virů ovlivňujících lidské životy, jako jsou například AIDS, epidemie španělské chřipky v roce 1918, SARS v letech 2002-2004, MERS v roce 2012 nebo také COVID19 v letech 2019-2021 (Yang, et al, 2020). Deriváty azulenu mohou poskytnout nové poznatky a řešení těchto problémů. Jedním ze způsobů využití je antimikrobiální fotodynamická terapie neboli PACT, která využívá toxicity molekul azulenu hlavně spojených s fototoxickými vlastnostmi (Chiang et al, 2010). Další ze studií se zaměřovala na vliv azulenu na mononukleární buňky v periferní krvi viabilitu a formování singletového kyslíku *in vitro* (Damrongrungruang et al, 2018).

3.4.2 Protizánětlivá aktivita

Zánět je fyziologickou reakcí organismu, když je vystaven stresovým faktorům jako tkáňovému poškození, zranění, rakovině a dalším. Dvě nejvýznamnější skupiny protizánětlivých léčiv jsou nesteroidní protizánětlivé léky (NSAID), které působí mechanismem inhibice cyklooxygenázy a glukokortikoidů potlačujících imunitní odpověď a inhibicí syntézy prostaglandinů a leukotrienů. Tyto léčiva mají řadu vedlejších efektů, proto jsou zkoumány různé jejich alternativy, mezi které se řadí i deriváty azulenu. Tradičně využívané rostliny jako heřmánek a řebříček vykazují protizánětlivý efekt právě díky přítomnosti azulenových derivátů (Srivastava et al, 2009). Studie provedená Ma a jeho spolupracovníky dokazuje, že chamazulen významně chrání před kompletním osteoartritickým zánětem vyvolaným Freundovým adjuvancem (Ma et al, 2020).

3.4.3 Protivředová aktivita

V rámci protivředové aktivity jsou významnou skupinou léčiv inhibitory protonových pump (PPI), které snižují uvolňování kyseliny chlorovodíkové v žaludku. I když jsou PPI považovány za bezpečné, mají vedlejší efekty, a proto se hledají jiné skupiny protivředových léků. Egualen což je sodná sůl 3-ethyl-7-propan-2-yl-azulenu-1-sulfonické soli se využívá k léčbě žaludečních vředů pod názvem Azuloxa v Japonsku (NIH, 2020).

3.4.4 Antineoplastická aktivita

Rakovina je stále celosvětově jednou z hlavních příčin smrti i přes rozsáhlý výzkum nové medicíny. Azulen vzbuzuje velkou naději na účinné protirakovinná léčiva. Fotodynamická aktivace s červeným laserovým světlem a guiazulenem odhalila generování singletového kyslíku a supresi zánětlivých markerů v periferní krvi mononukleárních buněk. Esenciální oleje bohaté na chamazulene z rostliny Pelyněk stromovitý sbírané na Sicílii ukazují slibnou aktivitu na studiích buněk melanomu s potenciálem způsobit apoptickou smrt (Russo et al, 2020).

3.4.5 Antidiabetická aktivita

Cukrovka je metabolickou chorobou charakterizována rezistencí inzulinu a přetrvávající hyperglykemií. Každý rok na cukrovku v USA umírá přibližně 85 tisíc lidí. Mnoho výzkumných skupin navrhuje terapeutika nová, účinnější a přívětivější pro pacienty. Různé modifikace azulenu mají potenciál v neoplastických aktivitách. K těmto účelům skupina vědců v čele s Ikegai syntetizovali řadu C-glukosidů s azulenem. Je očekávána inhibující aktivita proti lidskému sodíkovo-glukózovému transportnímu proteinu 1 a 2 (hSGLT1/2) (Ikegai et al, 2013).

3.5 Využití azulenu

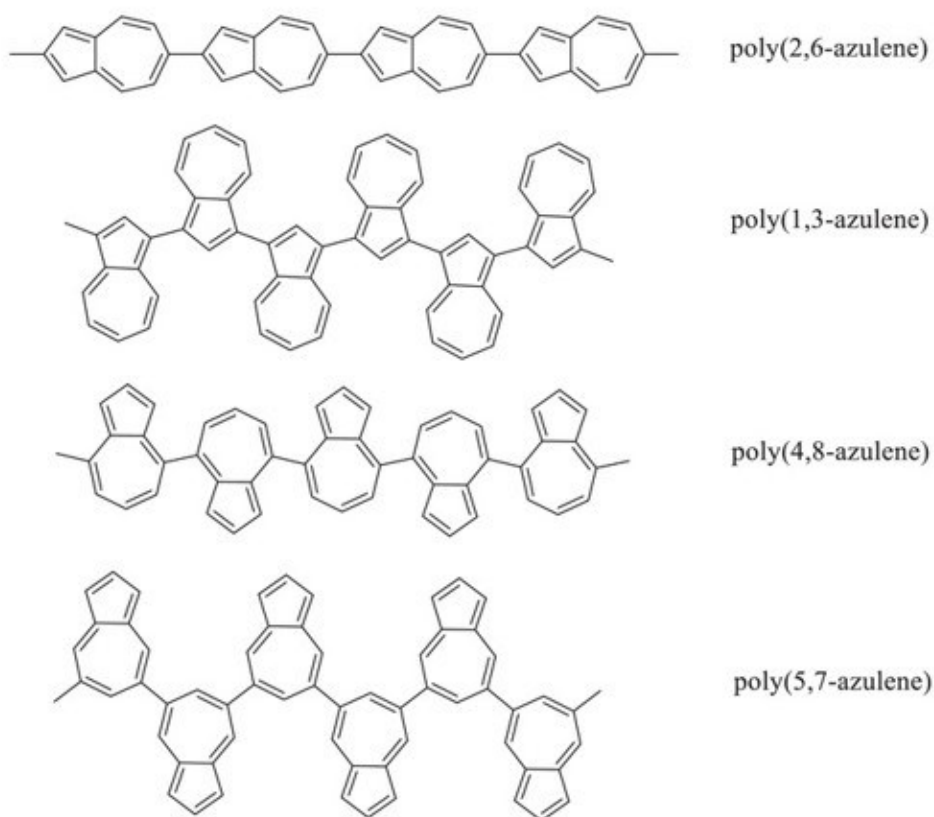
Kromě využití v lékařství jsou další oblasti, ve kterých je možné azulen využít. V kosmetice se využívá díky svým protizánětlivým účinkům v přípravcích jako jsou krémy a tonika. Kromě toho také zmírňuje podráždění pokožky a zarudnutí (Bakun et al, 2021). V potravinářství není využití tak rozšířené jako v kosmetice nebo lékařství, ale azulen může být využit jako přírodní barvivo v potravinách konkrétně v sýrech. Využívá se také jako složka v parfémeh a esenciálních olejích, protože má charakteristickou vůni. V neposlední řadě v chemickém průmyslu jako základ pro syntézu organických sloučenin například pigmentu v nátěrových hmotách (Ou et al, 2019).

4 POLYAZULEN

Polyazulen je polymerní látka s lineární molekulovou strukturou, obsahuje několik azulenových jader spojených n-typem konjugace, tvořící řetězec. Azulen je vhodnou molekulou pro polymerizaci díky přítomnosti jednoduché konjugované vazby a cykloheptatrienového kruhu. Azulenové polymery mohou být syntetizovány různými způsoby, ale na rozdíl od ostatních polymerizací musí být dodrženy jisté podmínky, například kvůli špatné rozpustnosti azulenu v běžných organických rozpouštědlech nebo vysoké náchylnosti k oxidačnímu štěpení (Gradzka et al, 2018).

4.1.1 Homopolymery azulenu

Nejjednoduším azulenovými polymery jsou homopolymery, jejich hlavní řetězec tvoří pouze azulenové monomery. U azulenu byly zaznamenány čtyři polyazulenové homopolymery, u těchto homopolymerů byla provedena studie založená na teoretických výpočtech a syntéze (Huang et al, 2020). Orientaci těchto homopolymerů v prostoru zobrazuje obrázek s číslem 7.



Obrázek 7 Azulenové homopolymery (Huang et al, 2020)

Byl syntetizován oligomer 1,3-polyazulenu se silným, modrým zbarvením, syntézou 1,3-dibromazulenu s $\text{Ni}(\text{COD})_2$. Tento polyazulen měl průměrnou molekulovou hmotnost odpovídající 130 azulenovým jednotkám. Spektra nukleární magnetické rezonance a infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací vykazují signály podobné signálu azulenu. Vodivost tohoto oligomeru při vystavení halogenovým parám (jod, trifluoroctové kyselina) byla vysoká po několik dní. Zatímco oligomer 1,3-polyazulen byl důkladně studován, zbývající polyazulenové polymery nebyly studovány do takové hloubky. Profesor Dias provedl teoretickou studii vlastností těchto zbývajících oligomerů. Prvním bodem bylo vypočítat elektronové vlastnosti polyazulenů s koplanárním uspořádáním azulenových jednotek. Poté byly určeny dihedrální úhly k modelaci oligomerů, u nichž nejsou azulenové jednotky v koplanární rovině (v jedné rovině) (Dias, 2007). Kromě 1,3-polyazulenu známe některé vlastnosti dalšího lineárního polymeru a to 2,6-polyazulenu. Oba oligomery mají vysokou tepelnou stabilitu, u 2,6-polyazulenu je stabilita dokonce vyšší než u druhého oligomeru, to stejné platí o rozpustnosti v organických rozpouštědlech (Hui et al, 2020).

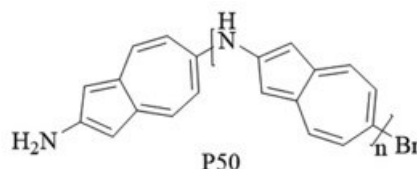
4.1.2 Alternující kopolymery

Jsou to polymery složené z dvou nebo více strukturních jednotek uspořádaných střídavě v polymerovém řetězci. Azulen je vhodnou základní jednotkou pro toto uspořádání díky svým fotofyzikálním vlastnostem a chování v kyselém prostředí. Strukturní jednotky objevující se v alternujících kopolymerech jsou thiofenové, benzothiadiazolové, diketopyrrolové, fluorenové nebo thiadiazolové. Tyto strukturní jednotky způsobí zlepšení vodivosti, slouží často jako donorové skupiny v organických polovodičích. Ovlivňují vlastnosti jako rozpustnost, vodivost v organických rozpouštědlech, která se v kopolymerech zvyšuje a umožní lepší využití v elektronických a optoelektronických zařízeních (Huang et al, 2020).

4.1.3 Heteroatomem propojené polymery

Dalším druhem azulenových polymerů jsou polymery propojené heteroatomy v hlavním řetězci místo uhlíkovými atomy v páteři jako tomu bylo u předchozích typů. Příkladem takového polymeru je 2,6-polyaminoazulen (viz. obrázek 8) syntetizovaný Buchwald-Hartwigovým párováním odpovídajících látek. Řetězce tohoto polymeru jsou propojeny atomy dusíku v hlavním řetězci. Takto uspořádaný azulenový polymer je podobný struktuře polyanilinu.

Přítomnost aminového můstku zvyšuje konjugaci mezi azulenovými jednotkami, může vzrůst také elektronová hustota, a to kvůli elektrondonorové povaze amino skupin. Využití takového polymeru poté najdeme v kyselých a zásaditých chemických prostředcích hlavně díky přirozené alkalitě aminu spojeného s amino skupinou (Ito et al, 2005).



Obrázek 8 Vzorec 2,6-polyaminoazulenu (Huang et al, 2020)

4.1.4 Další druhy polymerů

Kromě dříve zmíněných polymerů existují i další azulenové polymery, jsou to například připojené nebo implantované polymery. Je to druh polymerních látek vznikající tak, že se do hlavního řetězce polymeru připojí vedlejší řetězec z jiného monomeru. Výsledný polymer tedy obsahuje dva nebo i více druhů monomerů, to může vést k synergickým efektům využitelným při aplikacích, jako jsou polymerní povlaky. Při účasti azulenu v takovém druhu polymeru využijeme toho, že je azulen hydrofobní dipól a poskytne polymeru výjimečné elektronické vlastnosti (Puodziukynaite et al, 2014).

Lineární koordinační polymery jsou anorganicko-organické látky, tvořené kovovým kationtem v centru a organickými ligandy. Velkou výhodou u takových polymerů je, že mají výhody rozpustných konjugovaných polymerů a luminiscenčních kovových organických komplexů, to jsou například vysoká tepelná stabilita nebo elektro-luminiscenční účinnost. S azulem takové polymery vznikly v roce 2014, vzorcem $\infty[\text{Ni}(\text{L}^1)\text{Gd}(\text{NO}_3)_3(\text{azbbpy})]\cdot\text{CH}_3\text{CN}$ zkráceně P59, azulen zde byl použit jako ligand (Ion et al, 2014).

4.2 Vznik polyazulenu

Vznik polyazulenu může probíhat různými způsoby, ale obecně se jedná o polymerizaci monomeru azulenu pomocí různých chemických reakcí. Nejčastější typy reakcí jsou podrobněji rozebrány v následujících kapitolách.

4.2.1 Elektropolymerizace

Elektropolymerizace je jednou z nejčastějších metod přípravy polyazulenu. Je to proces, při kterém se azulenové monomery přeměňují na polymerové řetězce pomocí elektrochemických reakcí. Reakce se odehrává v elektrochemické buňce, obsahující elektrody ponořené do roztoku azulenu. Na elektrodách vzniká elektrické pole a dojde k oxidaci nebo redukci azulenových molekul na povrchu elektrod, tím vzniknou volné radikály. Takto vzniklé radikály se dále spojují v polymerické řetězce (Zeng et al, 2020). Tato metoda je velmi citlivá na použitý elektrolyt, používají se například ionty tetraethylamonium bromidu, což vede k tvorbě homogenních polymerů. Zatímco použití tetraethylamonium percholátu vede ke tvorbě velkých krystalů místo polymerů. Další faktory ovlivňující elektropolymerizaci jsou napětí, koncentrace azulenu a elektrolytu, rychlost nebo teplota. Polymery vznikající touto metodou jsou vysoce stabilní, pevné a vodivé (Noll et al, 2011).

4.2.2 Chemická polymerizace

Chemická polymerace je reakce, při které dochází k polymeraci azulenu pomocí chemických reaktantů většinou za přítomnosti katalyzátorů. K průběhu reakce je nutné aktivovat dvojně vazby v molekule azulenu, využívají se k tomu halogenující činidla jako brom a chlor. Po aktivaci dvojných vazeb může dojít k reakci s dalšími molekulami azulenu a vzniku polymerního řetězce (Razus, 2022).

4.2.2.1 *Friedel-Craftsova acylace*

Metoda, která umožňuje tvorbu polymerních látek z monomerů s aromatickým kruhem. Průběh reakce je následující, připraví se acylační činidlo, sloužící jako zdroj acylační skupiny, k němu se pak přidá monomer obsahující aromatický kruh. Katalyzátorem reakce je Lewisova kyselina, obvykle AlCl_3 působí jako elektrofil přitahující elektrony z aromatického jádra azulenu a umožňuje připojení acylačního činidla na aromatický kruh. Vzniká meziprodukt s acylovaným azulenovým jádrem, důsledkem se molekuly azulenu propojí a vytvoří polymerní řetězce a vzniká polyazulen. Takto vzniklý polyazulen má vysokou molekulovou hmotnost a dobrou rozpustnost v organických rozpouštědlech (Enache et al, 2020).

4.2.2.2 *Yamamotova metoda*

Tento druh syntézy je často využívaným pro přípravu polyazulenu především v akademické sféře v oblasti výzkumu a vývoje polymerů. Výhody této metody jsou vysoké výtěžky z reakce a dobře říditelné podmínky reakce. Obecně se tato metoda organické syntézy využívá k tvorbě sloučenin s aromatickými cykly. Průběh reakce je následovný, karboxylová kyselina reaguje s thionylchloridem na acylový chlorid. Následuje reakce acylového chloridu s aromatickým substrátem (azulendion) za použití kovového katalyzátoru (Pd, Ni) a organického redukčního činidla. Pro vznik polyazulenu se využije monomer s více reaktivními centry reagujícími s acylovým chloridem a organohořečnatým činidlem. Řetězec se vytváří postupnými reakcemi. Dalším krokem obvykle bývá reakce s činidly umožňující vznik požadovaného produktu. Tak se dají modifikovat vlastnosti vzniklého polymeru (Huang et al, 2020).

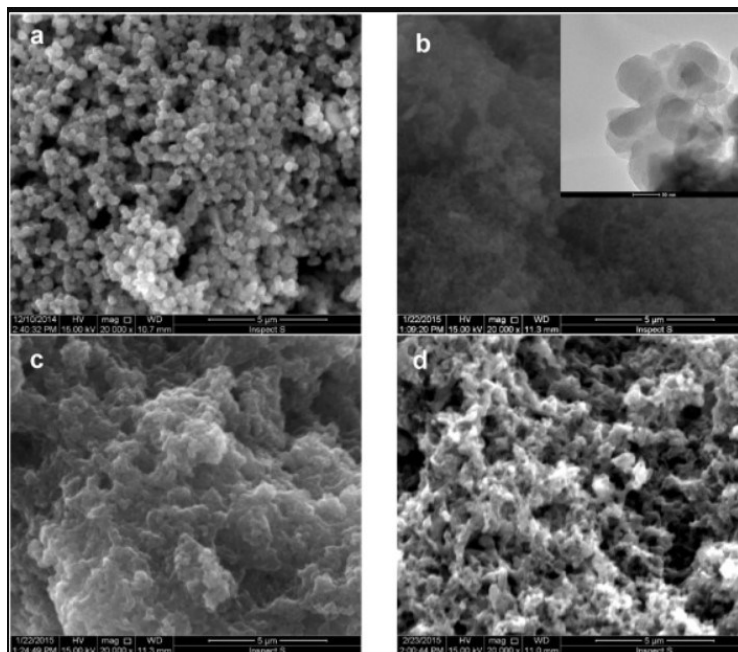
4.2.2.3 *Oxidativní polymerace*

Oxidativní polymerace je chemickou reakcí, při které vznikají polymerní řetězce tím, že se oxidují monomery v přítomnosti oxidačního činidla (Mezhuev et al, 2021). Polyazulen tímto způsobem vzniká za použití azulenového monomeru a oxidačního činidla například FeCl_3 . Díky oxidačnímu činidlu dojde ke vzniku radikálových meziproduktů, ty se propojují a formuje polymerový řetězec. Po dokončení reakce je výsledný polymer čištěn extrakcí, frakční destilací nebo chromatografií (Shetti,2021).

4.2.2.4 *Kumadžova polymerace*

Kumadžova polymerace je metoda využívající se na syntézu různých organických polymerů jako polystyren. U polyazulenu není tato metoda využívána tak často jako ostatní zmíněné, ale umožňuje vysokou chemickou stabilitu, přesnou kontrolu molekulární hmotnosti a dalších vlastností polymeru. Nevýhodou je, že tato metoda je náchylná k tvorbě vedlejších produktů, to může být příčinou snížení výtěžnosti a kvality polymeru (Huang et al, 2020). Principem této polymerace je reakce mezi organickými halogenidy a organickými sloučeninami obsahující násobnou vazbu, která umožňuje vytvoření polymerního řetězce. U polyazulenu slouží organický halogenid jako monomer. Reakce se odehrává za přítomnosti katalyzátorů (Wen et al, 2013).

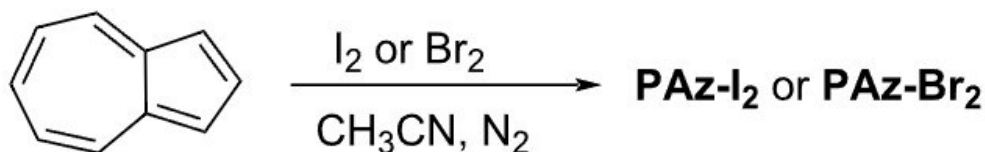
Na všechny druhy syntézy mají vliv různé faktory, které výsledný produkt ovlivní. Jedním z takových faktorů je vliv rozpouštědla, které ovlivňuje morfologii syntetizovaných materiálů. V závislosti na rozpouštědle je možné získat různé struktury polyazulenu.



Obrázek 9 Různé morfologie polyazulenu v závislosti na rozpouštědle
(Grądzka et al, 2018)

Na obrázku č. 9 vidíme různé struktury polyazulenu podle použitého rozpouštědla. Obrázek s označením *a* je polyazulen připravený v ethanolu, kde se tvoří dobře definované kulaté nano částice, *b* je v acetonitrilu, ten vede k velmi hladké textuře složené z agregovaných kulatých nanočástic, tyto částice se často shlukují, a to komplikuje jejich analýzu. Ve vodě, obrázek *c*, kde tvoří hladkou a kompaktní strukturu s nízkou porozitou a *d* v dichlormethanu vykazuje vláknitou strukturu (Grądzka et al, 2018).

První chemická syntéza azulenu byla popsána v roce 1988 vědci Neohem, Kangem a Tanem. Jejich postupem byla oxidativní polymerizace azulenu pomocí bromu nebo jodu. Vzorec této chemické reakce najdeme na obrázku 10. Vznikají komplexy polyazulenu-jod/brom, komplex s jodem byl zcela nerozpustný, zatímco s bromem byl špatně rozpustný ve většině organických rozpouštědel. Tato syntéza neposkytla žádné informace o struktuře, ale na základě elementární analýzy vědci poskytli vzorec komplexů (Neoh et al, 1988).



Obrázek 10 První syntéza polyazulenu (Shetti, 2021)

4.3 Vlastnosti a využití

Polyazulen má obdobné využití a vlastnosti jako je popsáno v předcházejících kapitolách o vodivých polymerech. Odlišuje se velmi vysokou elektrickou vodivostí při srovnání s dalšími vodivými polymery, to umožňuje jeho využití v elektrochemických aplikacích (Tanaka et al, 1990). Má také vysokou stabilitu v oxidovaném stavu, důležité pro využití v elektrochemických aplikacích, kde je nutné dosáhnout vysokých proudových hodnot. V aplikacích s vysokými teplotami je také dobře využitelný díky jeho vysoké teplotní stabilitě a odolnosti vůči oxidaci (Wang et al, 2003). Mimo jiné má i vynikající optické vlastnosti, což umožňuje jeho využití v displejích a solárních článcích. Jeho vysoká chemická a termická stabilita umožní jeho využití v náročných podmínkách. Od ostatních vodivých polymerů ho odlišuje jeho struktura, je to lineární nevětvený řetězec, to mu dává vyšší krystalinitu a stabilitu oproti polypyrolům, nebo polythiofenům (Grądzka et al, 2018).

Polyazulen se dá využít jako materiál vhodný pro použití v superkapacitorech, to jsou elektrochemické zařízení používaná pro ukládání a uvolňování chemické energie. Mají mnohem větší kapacitu než běžné kondenzátory. Superkapacitory na bázi polyazulenu jsou připraveny pomocí vrstvení, jsou schopny uchovávat své vlastnosti i při opakovaných cyklech nabíjení a vybíjení proto jsou vhodné pro využití v průmyslových aplikacích (Suominen et al, 2018).

Elektrochemické senzory využívají polyazulen jako elektroaktivní materiál pro detekci analytů. Je to možné díky jeho elektrochemické aktivitě a schopnosti tvorby specifických molekulárních interakcí s analyty. Využívá se v elektrochemických senzorech pro detekci kyslíku, glukózy, DNA a dalších organických sloučenin. Dále se v oblasti elektrochemie využívá jako materiál pro elektrody v senzorických aplikacích nebo jako citlivá vrstva v potenciometrických senzorech pro detekci iontů a dalších analytů (Grodzka et al, 2010).

Využití polyazulenu nachází také v termoelektrických aplikacích. To jsou zařízení přeměňující teplo na elektrickou energii. Polyazulen má vysokou elektrickou vodivost

a termoelektrickou výkonnost, díky tomu může efektivně přeměňovat teplo na elektrickou energii a v zařízeních umožní snižovat teplotu při této transformaci. Využitelný je díky tomu v široké oblasti zařízení jako v tepelných čerpadlech, solárních panelech, generátorech termoelektrické energie pro odpadní teplo a dalších (Grodzka et al, 2010).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍLE PRÁCE

Cílem experimentální části této práce je příprava polyazulenu, včetně optimalizace metodiky a podmínek reakce, a následné stanovení jeho biologických vlastností.

Chemická oxidativní syntéza polyazulenu, polyanilinu a polypyrolu

- do formy prášku
- do formy tenkého filmu (povrchový coating tkáňového plastiku)

Charakterizace biokompatibility polyazulenu, polyanilinu a polypyrolu

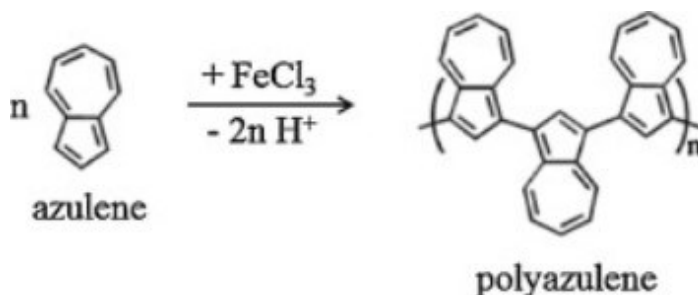
- stanovení cytotoxicity extraktů MTT testem
- hodnocení cytocompatibility s fibroblasty a embryonálními kmenovými buňkami fluorescenční mikroskopii

6 PRAKTICKÁ ČÁST

V praktické části jsem se zabývala přípravou polyazulenu, a to do dvou výsledných forem: prášek a film. Takto připravený polyazulen jsem poté využila jako substrát pro test toxicity látky sledováním viability buněk fibroblastů a následně i buněk kmenových. První fáze testu viability spočívala v MTT testu, který byl proveden pro polyazulen, polyanilin a polypyrrol, aby tyto tři vodivé polymery mohly být porovnány. V druhé fázi byla viabilita testována pomocí vysazení buněk na polyazulenové filmy. Buňky, které zde přežily, byly nabarveny a vyfoceny pomocí fluorescenčního mikroskopu.

6.1 Příprava polyazulenu

Polyazulen byl připraven metodou oxidativní polymerace, podle postupu popsáno v článku (Chemically formed conducting polyazulene: From micro-to nanostructures) od vědců Emilia Gradzka, Partycja Makowska a Krzysztof Winkler (schéma viz obrázek 11).



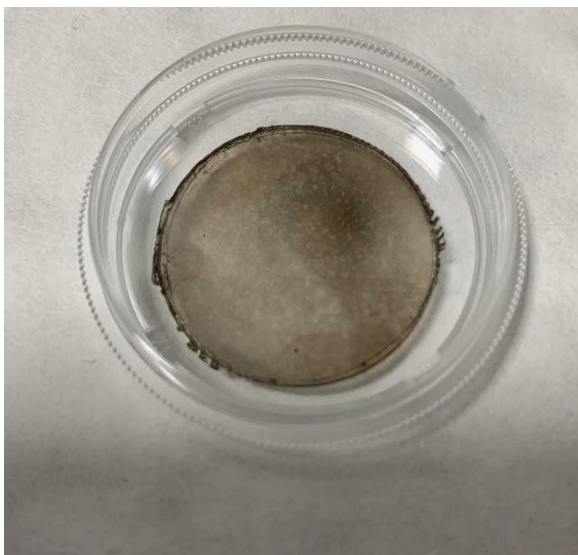
Obrázek 11 Reakce použitá u přípravy polyazulenu (Gradzka et al, 2018)

V tomto konkrétním případě jsme chtěli připravit 40ml roztoku. V 20ml ethanolu bylo rozpuštěno 43,6mg práškového monomeru azulenu, čímž bylo dosaženo molární koncentrace 8,5 mM. Odděleně bylo připraveno oxidační činidlo, což v tomto případě byl chlorid železitý, v 20ml ethanolu bylo rozpuštěno 399,7 mg chloridu železitého pro výslednou molární koncentraci 61,6 mM. Po rozpuštění monomeru azulenu a chloridu železitého v ethanolu byly oba roztoky promíchány a dávkovány na tkáňové Petriho misky o průměru 34 milimetrů, po 2 ml. Pro lepší manipulaci v rámci testu proliferace buněk byla polyazulenovým filmem pokryta také kolečka o průměru 26 mm, předem vyříznuta laserem z tkáňových Petriho misek, to můžeme vidět na obrázku 12.



Obrázek 12 Podklad pro polyazulenový film, tkáňové Petriho misky naplněné smíchanými roztoky azulenu a chloridu železitého

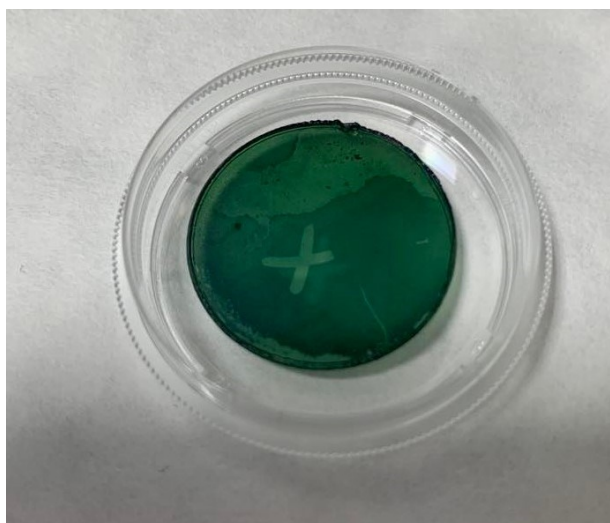
V miskách docházelo k polymerizaci po 24 hod, po tomto čase byly odstraněny nezreagované zbytky monomeru pomocí promývání 2 M kyselinou chlorovodíkovou a methanolem. Po očištění a vysušení, dostaneme povrch pokrytý polyazulenovým filmem vhodným k použití pro další testování. Vzniklý produkt, lze vidět na obrázku 13. Pro získání polyazulenu ve formě prášku, byly smíchané roztoky monomeru a oxidačního činidla po 24 hod reakce přefiltrovány s podtlakem přes Büchnerovu nálevku na předem zvážený filtrační papír. Produkt byl vysušen v exikátoru a dále využit při přípravě vzorků pro MTT test.



Obrázek 13 Polyazulenový film

6.2 Příprava polyanilinu

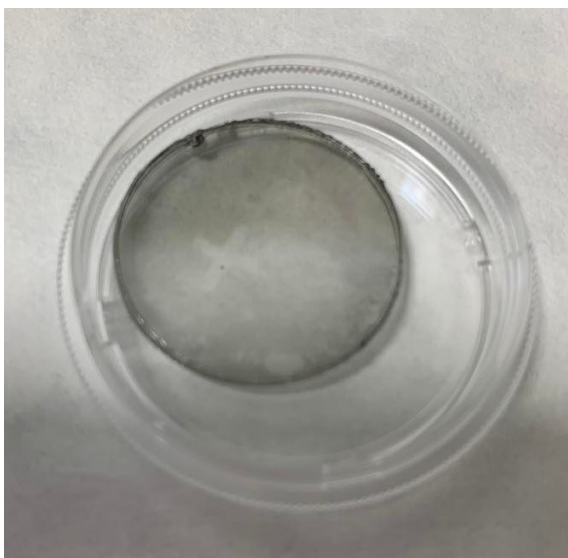
Kromě polyazulenu byl připraven i další vodivý polymer, a to polyanilin, tento polymer byl připraven kvůli srovnání s vlastnostmi polyazulenu. Aktuálně je využíván v praktických aplikacích mnohonásobně více než polyazulen, takže porovnání vlastností je vhodné, kvůli případnému využití polyazulenu. Příprava polyanilinu probíhá také oxidativní polymerací, konkrétně je to reakce anilin hydrochloridu, který zde působí jako monomer, a amonium persulfátu jako oxidačního činidla. Připravili jsme 30 ml roztoku, postup je stejný jako u polyazulenu. Molární koncentrace 0,2 M monomeru byla dosažena rozpuštěním 777,5 mg anilinu hydrochloridu a 1714,3 mg amonium persulfátu pro molární koncentraci 0,25 M. Na rozdíl od polyazulenu u polyanilinu použijeme k rozpuštění monomeru a oxidačního činidla ultra čistou destilovanou vodu. Polymerace probíhá 1 hod a poté jsou misky a kolečka očištěny 2 M kyselinou chlorovodíkovou a methanolem. Výsledný produkt je viditelný na obrázku 14. Stejně jako v případě polyazulenu, byl i polyanilin zpracován i ve formě prášku filtrací a vysušením na filtračním papíru.



Obrázek 14 Polyanilinový film

6.3 Příprava polypyrolu

Polypyrol (viz obrázek 15) byl připraven smícháním monomeru pyrolu s chloridem železitým jako oxidačním činidlem. Připraveno bylo 30 ml roztoku s postupem totožným jako u polyanilinu. Smícháno bylo konkrétně 406,6 mg monomeru pyrolu ve vodném roztoku o molární koncentraci 0,2 M s 1214,5 mg chloridu železitého ve vodném roztoku o molární koncentraci 0,25 M a po cca 1 min polymerizace očištěno pomocí 2 M kyselinou chlorovodíkovou a methanolem.



Obrázek 15 Polypyrolový film

6.4 Kultivace buněk

Pro kultivaci buněk byla použita linie myších fibroblastů s označením NIH/3T3 a také myší embryonální kmenové buňky s označením ES R1. Kultivace proběhla v inkubátoru při teplotě 37 °C a atmosféře o 5 % obsahu CO₂. Pro fibroblasty bylo použito komerčně dostupné médium Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) s přidavkem 10 % telecího séra a 1 % kombinace antibiotika penicilinu a streptomycinu. Kultivace buněk ES R1 proběhla také pomocí komerčně dostupného média DMEM, ale s jinými přidanými látkami. Pro buňky ES R1 bylo do média přidáno 16,5 % telecího séra, 1% kombinace antibiotika penicilinu a streptomycinu, dále 100 mM neesenciálních aminokyselin, 0,05 mM beta-merkapt ethanolu a faktor inhibující leukemii o koncentraci 5ng/ml. Uvedená procentuální zastoupení látek jsou vztaženy na celkový objem médií. Kmenové buňky byly pěstovány v nediferenciovaném stavu na tkáňových miskách s povrchem upraveným 0,1 % vodným roztokem vepřové želatiny.

Buněčná kultivace vyžadovala použití přístrojů:

- Inkubátor HERAcell 150i (Thermo Scientific, USA),
- Inverzní mikroskop Olympus IX 81 (Olympus, Japan) s fotoaparátem Leica DFC480 (Leica Microsystems, Japan),
- Spektrofotometr NanoQuant infinite M200PRO (Tecan, Switzerland),
- Laminární flowbox HERAsafe (Thermo Scientific, USA),
- Centrifuga Eppendorf 5702 R (Eppendorf, Germany), a další.

Buněčná kultivace probíhá do dosažení požadované míry konfluence, což je asi

80 % porostu misky a poté dojde k pasáži. Buněčná pasáž fibroblastů probíhala následujícím způsobem:

1. Bylo odsáto médium z kultivační láhve T75
2. Do lahve byl přidán fyziologický roztok s fosfátovým pufrem (PBS) na očištění zbytku media a následně odsáto
3. Byl přidán trypsin (7,5ml) a ponechán působit na cca 5 min
4. Následně bylo přidáno 7,5 ml média
5. Roztok byl převeden do zkumavky
6. Zkumavka s roztokem byla centrifugována po 3 min na 1100 rpm při teplotě 37°C
7. Médium s trypsinem bylo odsáto
8. Buněčný pelet byl rozsuspendován v 1 ml média a pipetováno do nové kultivační lahve

V případě kmenových buněk probíhala pasáž obdobným způsobem:

1. Bylo odsáto médium z 34 mm tkáňové Petriho misky
2. Do misky bylo dvakrát přidáno a odsáto PBS na očištění zbytku media
3. Byl přidán trypsin (150 μ l) a ponechán působit na cca 3 min
4. Následně byly buňky rozsuspendovány v 1 ml média a pipetovány na nové poželatinované misky

6.5 Testování viability buněk

Test viability buněk spočívá ve zkoušení schopnosti buněk přežít a udržet své funkce a aktivitu. Buněčná viabilita závisí na různých faktorech jako stáří buněk, dostatek živin, expozice toxinům nebo léčivům, infekci, stresových podmínkách a dalších faktorech. V našem případě testujeme viabilitu buněk v přítomnosti polyazulenu, polyanilinu a polypyrolu nebo jejich roztoků. Nejdříve byl proveden MTT test pro kvantitativní stanovení cytotoxicity extraktů jednotlivých syntetizovaných prášků. Poté následoval test adheze a proliferace buněk na vytvořených filmech s kvalitativním vyhodnocením buněčné morfologie pomocí fluorescenční mikroskopie.

6.5.1 MTT test

MTT test je často používaný test na kvantitativní hodnocení buněčné viability. Princip spočívá v tom, že se MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid) redukuje na tmavě fialovou krystalickou látku mitochondriálními enzymy přítomnými v metabolicky aktivních buňkách. Reakce probíhá v mitochondriích, kde se MTT vstřebává buňkami a enzymy a dochází k redukci na tmavě fialovou krystalickou formazanovou látku. Ta je nerozpustná v kultivačním mediu a ukládá se uvnitř buněk. Rozpustit se dá pomocí organického rozpouštědla dimethylsulfoxidu a vznikne tmavě fialový roztok. Absorbance tohoto roztoku se poté měří spektrofotometricky.

Příprava extraktů

Příprava extraktů byla provedena z připravených polymerních prášků ve filtračních papírech s postupem podle ISO normy 10993-12 (viz tabulka 1). Čistý filtrační papír byl použit jako kontrolní membrána k porovnání získaných výsledků.

Tabulka 1 Příprava extraktů

Tloušťka (mm)	Extrakční poměr (plocha povrchu nebo hmotnost/objem)	Formy materiálu
Nepřavidelně tvarované porézní prostředky (materiálny o nízké hustotě)	0,1 g/ml	Membrány

Pro omezené množství a finanční nákladnost připravených vzorků bylo ředění extraktů (viz tabulka 2) zvýšeno na dvojnásobek – 0,1 g/2 ml.

Tabulka 2 Příprava extraktů

Polymer	Hmotnost filtračního papíru	Objem média
Polyazulen	0,13805 g	2,7610 ml
Polyanilin	0,30237 g	6,0474 ml
Polypyrol	0,22685 g	4,5370 ml
Kontrolní membrána	0,31451 g	6,2920 ml

- Kromě vzorků a kontroly byl testován i čistý azulenový prášek o navážce 0,130 g na objem média 2,6 ml
- Materiály byly před extrakcí rozřezány na malé kousky, aby se usnadnilo jejich ponoření do extrakčního média (viz obrázek 17)
- Extrakce byla prováděna za stálého míchání při teplotě 37 °C po 24 hod



Obrázek 16 Příprava extraktů. Zleva: kontrolní membrána, azulen, polyanilin, polypyrol, polyazulen.

Expozice buněk extraktům byla provedena v 96 jamkové destičce. Tato destička je tvořena osmi řadami od A po H a dvanácti sloupci. Rozvržení destičky bylo tak, aby se otestovali různé koncentrace extraktů: 100, 90, 75, 50, 25 % a také reference obsahující 0 % extraktu. Konkrétní pipetované poměry jsou uvedeny v následujících tabulkách 3 až 6.

Tabulka 3 Rozvržení destičky

Označení řady	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													
B													
C													
D		Kultivační médium s buňkami											
E													
F													
G													
H													

Tabulka 4 Destička pro polyazulen a kontrolní membránu

Označení řady	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		Polyazulen					Kontrola					
A												
B	100μl média	100μl média	100μl média	100μl média	100μl média	100μl média	100μl média	100μl média	100μl média	100μl média	100μl média	100μl média
C	25μl extraktu + 75μl média	25μl extraktu + 75μl média	25μl extraktu + 75μl média	25μl extraktu + 75μl média	25μl extraktu + 75μl média	25μl extraktu + 75μl média	25μl extraktu + 75μl média	25μl extraktu + 75μl média	25μl extraktu + 75μl média	25μl extraktu + 75μl média	25μl extraktu + 75μl média	25μl extraktu + 75μl média
D	50μl extraktu + 50μl média	50μl extraktu + 50μl média	50μl extraktu + 50μl média	50μl extraktu + 50μl média	50μl extraktu + 50μl média	50μl extraktu + 50μl média	50μl extraktu + 50μl média	50μl extraktu + 50μl média	50μl extraktu + 50μl média	50μl extraktu + 50μl média	50μl extraktu + 50μl média	50μl extraktu + 50μl média
E	75μl extraktu + 25μl média	75μl extraktu + 25μl média	75μl extraktu + 25μl média	75μl extraktu + 25μl média	75μl extraktu + 25μl média	75μl extraktu + 25μl média	75μl extraktu + 25μl média	75μl extraktu + 25μl média	75μl extraktu + 25μl média	75μl extraktu + 25μl média	75μl extraktu + 25μl média	75μl extraktu + 25μl média
F	90μl extraktu + 10μl média	90μl extraktu + 10μl média	90μl extraktu + 10μl média	90μl extraktu + 10μl média	90μl extraktu + 10μl média	90μl extraktu + 10μl média	90μl extraktu + 10μl média	90μl extraktu + 10μl média	90μl extraktu + 10μl média	90μl extraktu + 10μl média	90μl extraktu + 10μl média	90μl extraktu + 10μl média
G	100μl extraktu	100μl extraktu	100μl extraktu	100μl extraktu	100μl extraktu	100μl extraktu	100μl extraktu	100μl extraktu	100μl extraktu	100μl extraktu	100μl extraktu	100μl extraktu
H												

Stejné rozvržení koncentrace extraktů jako vidíme u tabulky 4 bylo aplikováno i na destičku s azulenovým a destičku s extrakty s polyanilinu a polypyrolu.

Postup MTT testu

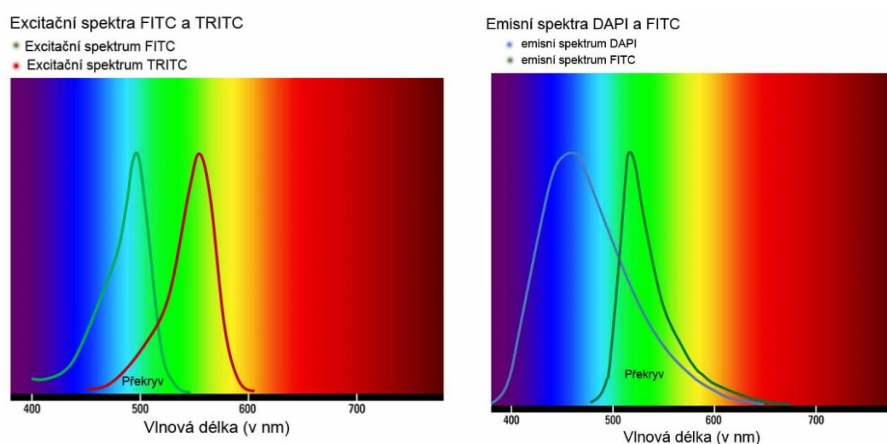
1. První den byly nasazeny na 96 jamkovou destičku buňky NIH/3T3 v koncentraci 1×10^5 buněk/1 ml média po 100 μ l na jamku
2. První den byly také přichystány extrakty podle dříve zmíněného postupu
3. Druhý den bylo odsáto médium a přidány extrakty
4. Třetí den byla provedena kontrola buněk pomocí mikroskopu
5. Bylo odsáto médium
6. Destička byla zbavena zbytku média pomocí oplachu PBS
7. V poměru 9:1 bylo přidáno médium a roztok MTT 5 mg/ml (0,02 g MTT + 4 ml vody) - tedy 90 μ l média a 10 μ l roztoku MTT
8. MTT působilo 4 hodiny na buňky v inkubátoru při teplotě 37 °C
9. MTT bylo odsáto
10. Bylo přidáno 80 μ l DMSO
11. Destička byla promíchána na třepačce
12. Vyhodnocení bylo provedeno měřením absorbance na spektrofotometru při vlnové délce 570 nm a referenční vlnové délce 690nm

6.5.2 Fluorescenční mikroskopie

Pro vyhodnocení morfologie buněk byla zvolena metoda barvení buněk fluorescenčními barvivy a následná fluorescenční mikroskopie. Použita byla buněčná linie NIH/3T3, což je označení pro fibroblasty získané z myší, a také kmenové buňky s označením ES R1. Buňky byly nasazeny na tkáňové Petriho mističky nebo vyřezaná kolečka potažená tenkým filmem z vodivých polymerů v koncentraci 1×10^5 buněk/1 ml a kultivovány 3 dny.

Poté byly buňky nabarveny následujícím postupem:

1. Bylo odsáto médium
2. Buňky byly očištěny pomocí PBS
3. Následně byl přidán 4 % formaldehyd na 15 min (fixace buněk)
4. Formaldehyd byl odsát a jeho zbytky očištěny pomocí PBS
5. Byl přidán 0,5 % triton po dobu 5 min (permeabilizace buněčné membrány)
6. Následovalo očištění pomocí PBS opakované 3x
7. Byl přidán 1 ml PBS do něhož se přidaly barvy
8. Hoechst 20 μ l (barví DNA v jádře, vlnová délka DAPI, Obrázek 16)
9. AktinRed nebo AktinGreen 2 kapky (barví aktinová vlákna cytoskeletu, vlnová délka FITC/TRITC, obrázek 16)
10. Barvy se nechaly působit na 20-30 min ve tmě
11. Bylo odsáto PBS a přidáno 1 ml nového PBS
12. Focení pomocí fluorescenční mikroskopie, program Cellsens



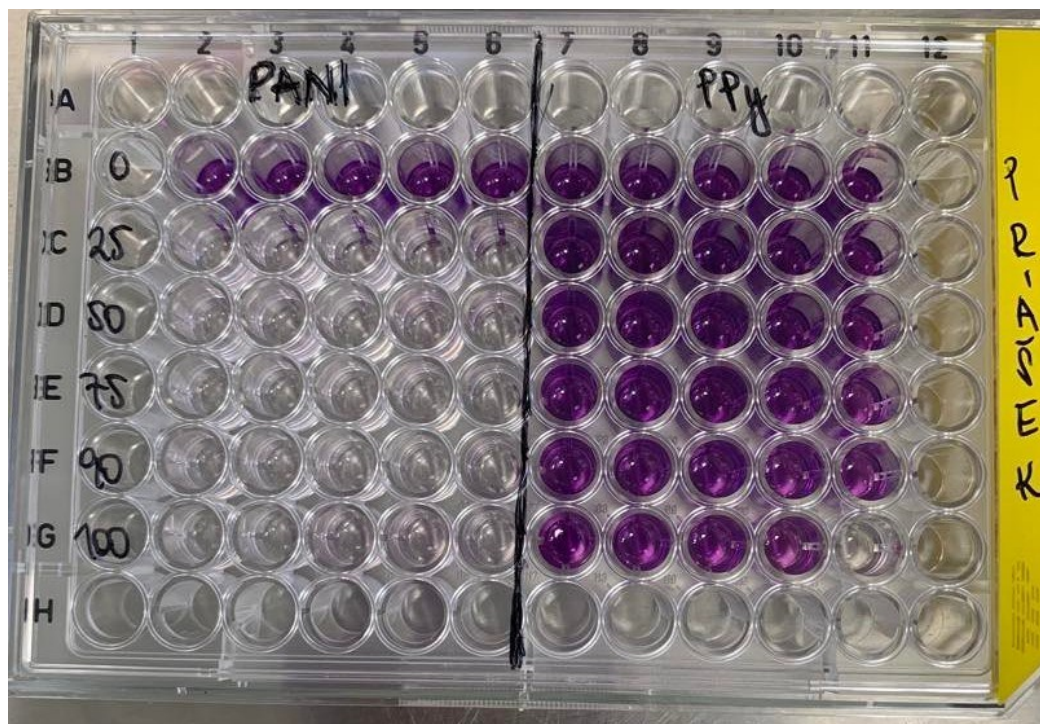
Obrázek 17 Vlnové délky zachytávající barvy Hoechst a AktinRed (Lakowicz, 2006)

7 VÝSLEDKY

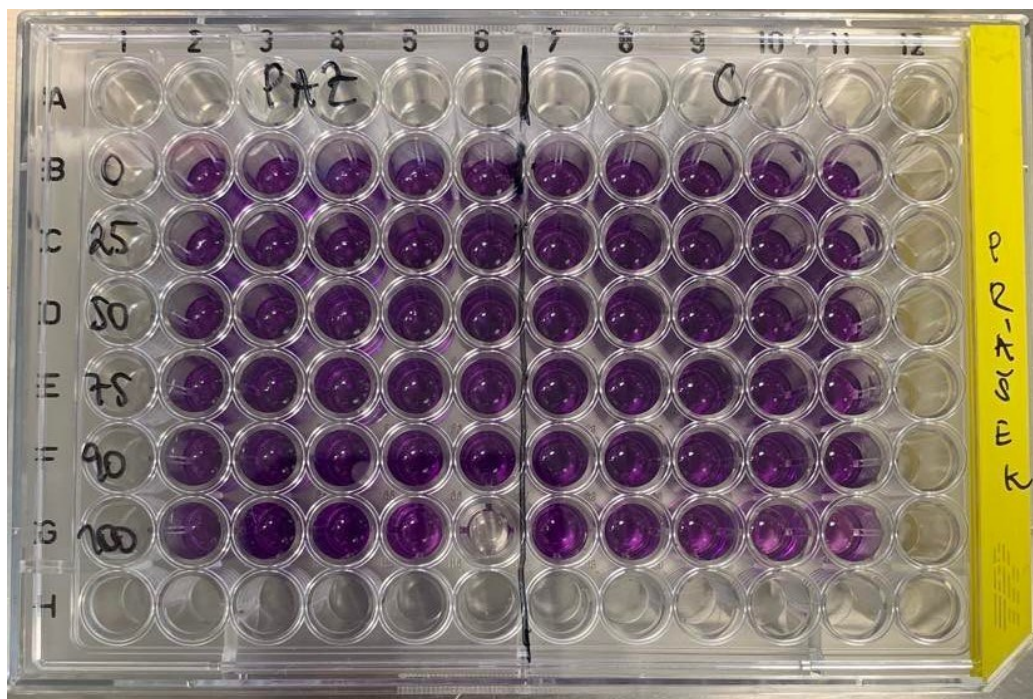
V praktické části diplomové práce byly připraveny filmy a prášky z vodivých polymerů z polyazulenu a kvůli srovnání vlastností také filmy polyanilinové a polypyrolové. Cytotoxicita byla stanovena pomocí MTT testu, kde dochází ke stanovení metabolické aktivity buněk v přítomnosti extraktů z prášků polyazulenu, polyanilinu, polypyrolu a monomeru azulenu. Připravené filmy byly použity na test buněčné viability pomocí buněk fibroblastů a NIH/3T3 a kmenových buněk ES R1 metodou barvení buněk.

7.1 MTT test

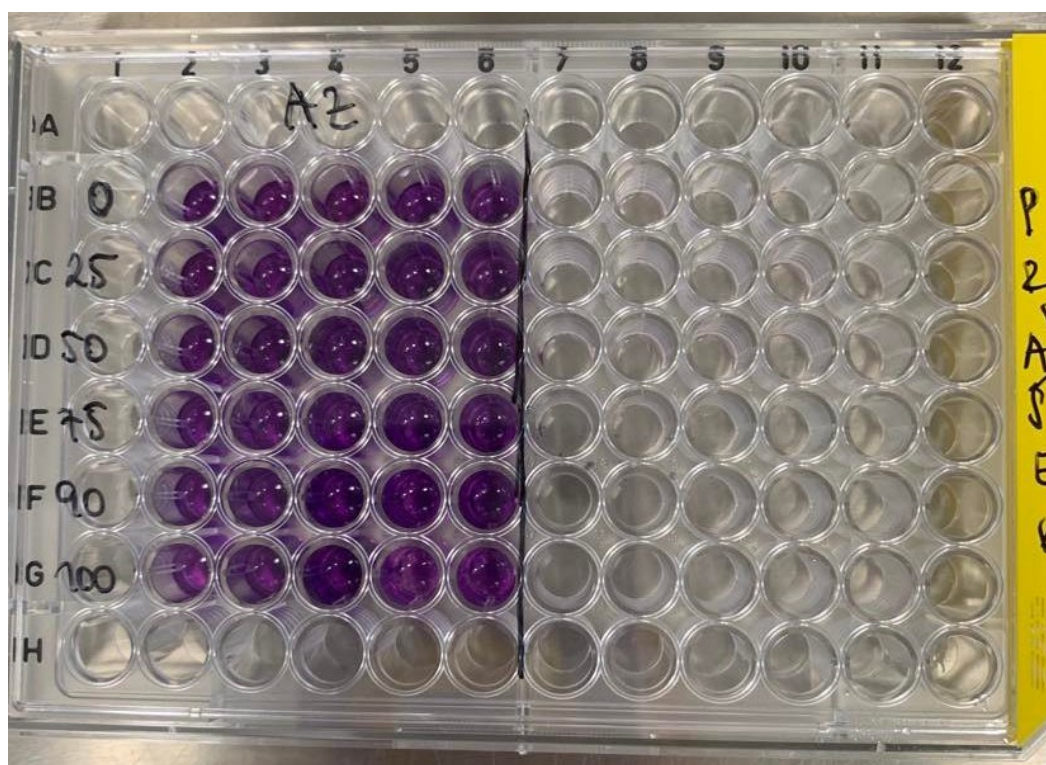
Po třech dnech kultivace buněčných linií NIH/3T3 a ES R1 s testovanými látkami polyazulenových, polyanilinových, polypyrolových a azulenového prášku byla hodnocena cytotoxicita pomocí MTT testu. Jednotlivé koncentrace byly na destičce v pěti opakováních. Ředící řada začínala na 100 % obsahu testované látky a končila na 25 %. Výsledkem tohoto testu jsou 3 tabulky (viz obrázky 18-20) naměřených absorbancí, kdy absorbance referenčního vzorku byla zvolena jako 100 % a ostatní hodnoty se s touto porovnály. Tyto hodnoty byly sestaveny do tabulky a podrobeny testu odlehlosti a následně z nich byly vytvořeny grafy. Absorbance je přímo úměrná životaschopnosti buněk, čím tmavší je barva tím vyšší je koncentrace.



Obrázek 18 Hodnocení MTT testu pro polyanilin a polypyrol

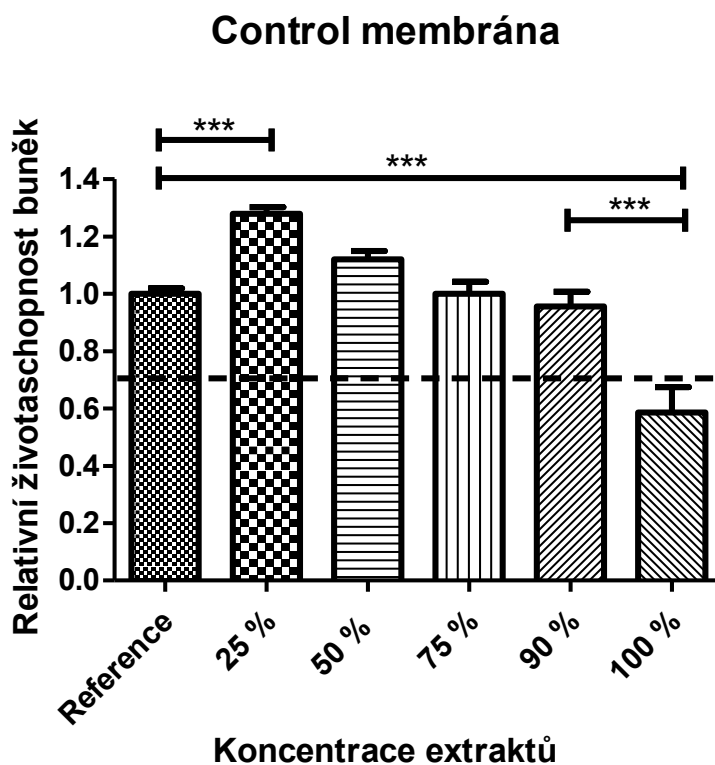


Obrázek 19 Hodnocení MTT testu pro polyazulen a kontrolu

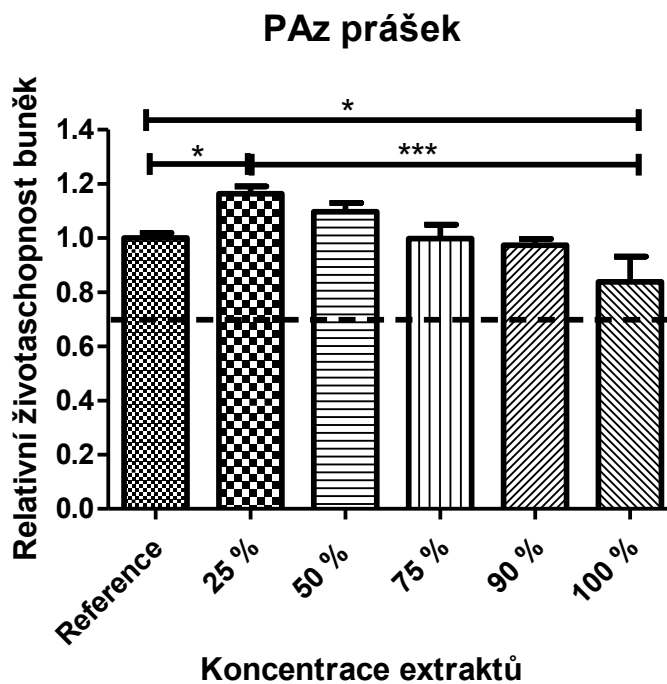


Obrázek 20 Hodnocení MTT testu pro monomer azulenu

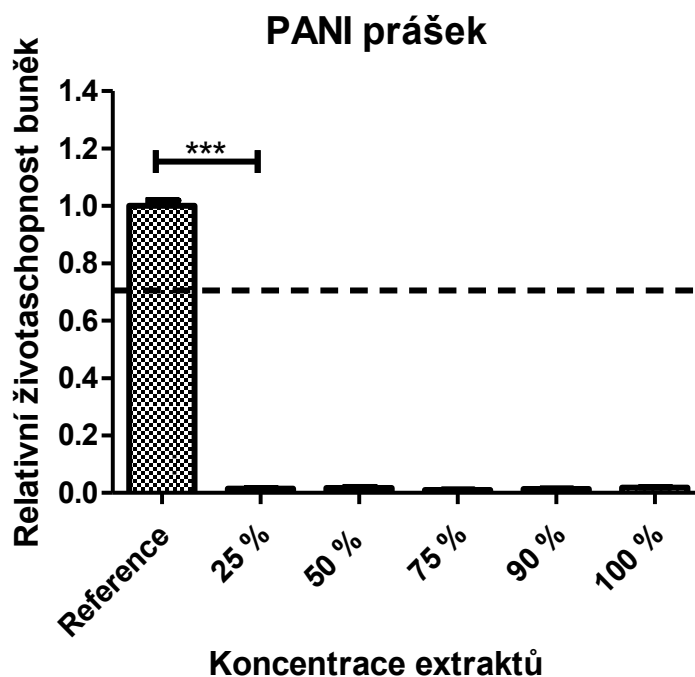
Získané hodnoty byly vyneseny do grafů (viz obrázek 21-25) a byly proloženy přímkou v 70% relativní životaschopnosti buněk, která vypovídá o toxicitě použitých extraktů.



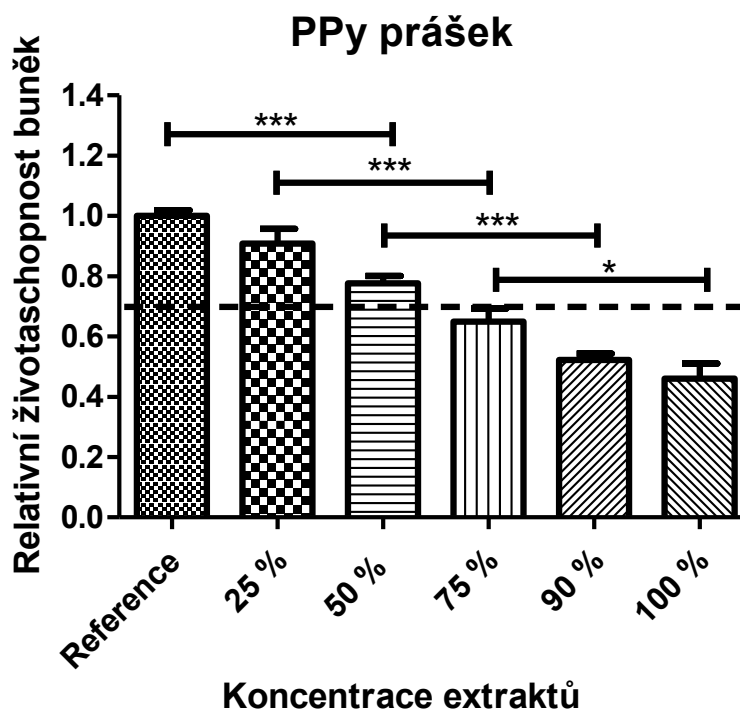
Obrázek 21 Vyhodnocení MTT testu kontrolního vzorku. . Statistická odlišnost byla stanovena testy ANOVA a Tuckey na hladinách významnosti $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) nebo $p \leq 0,001$ (***).



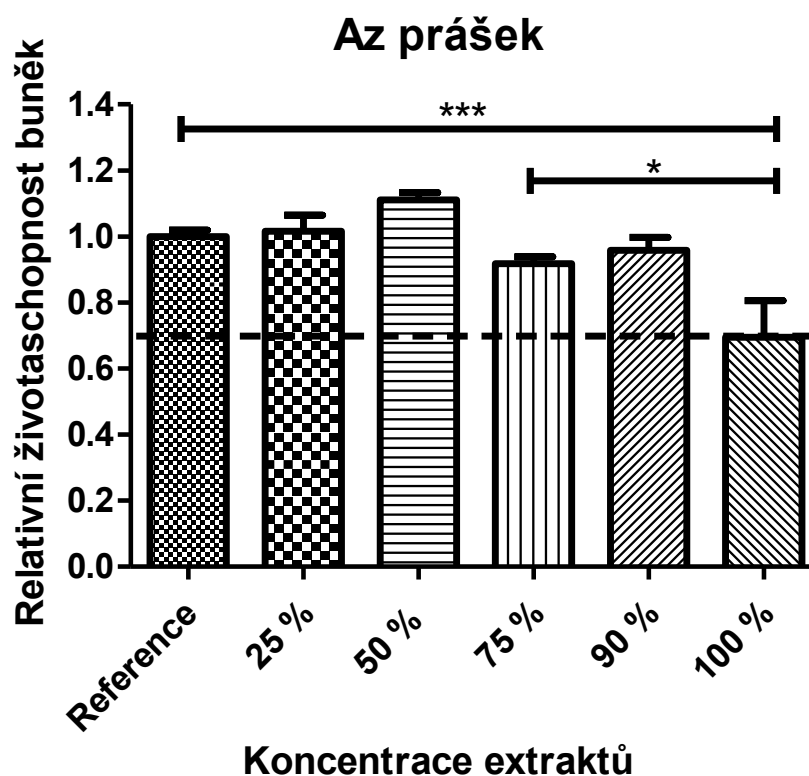
Obrázek 22 Vyhodnocení MTT testu pro polyazulenu . Statistická odlišnost byla stanovena testy ANOVA a Tuckey na hladinách významnosti $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) nebo $p \leq 0,001$ (***).



Obrázek 23 Vyhodnocení MTT testu pro polyanilin. Statistická odlišnost byla stanovena testy ANOVA a Tuckey na hladinách významnosti $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) nebo $p \leq 0,001$ (***).



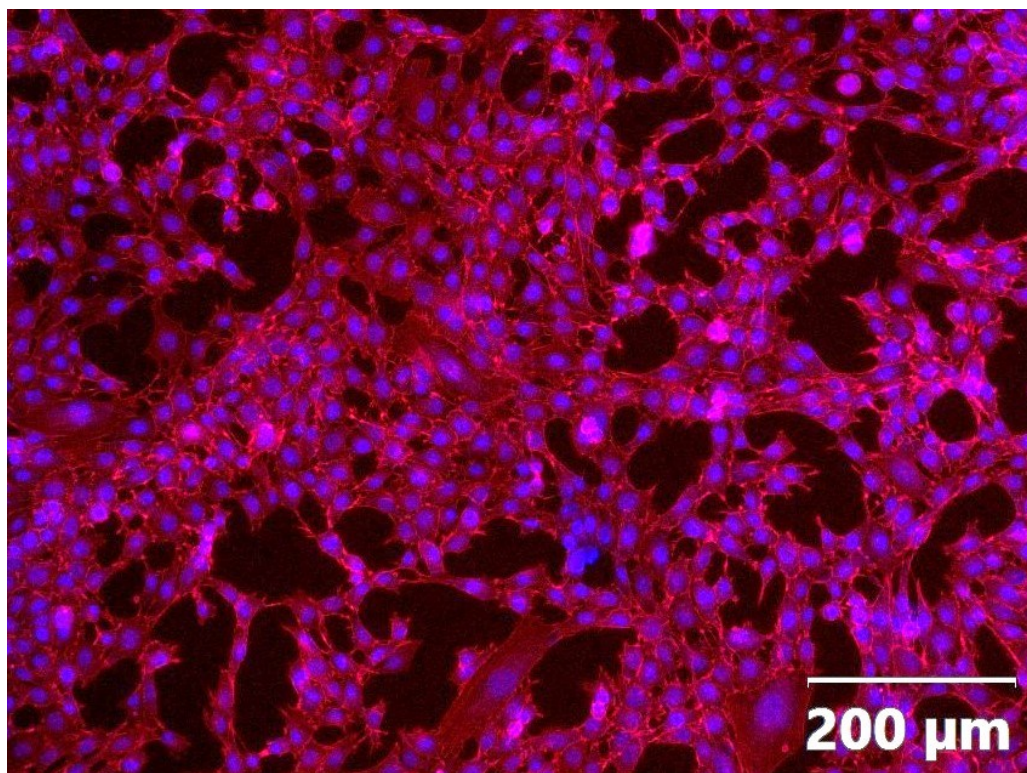
Obrázek 24 Vyhodnocení MTT testu pro polypyrol. Statistická odlišnost byla stanovena testy ANOVA a Tuckey na hladinách významnosti $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) nebo $p \leq 0,001$ (***).



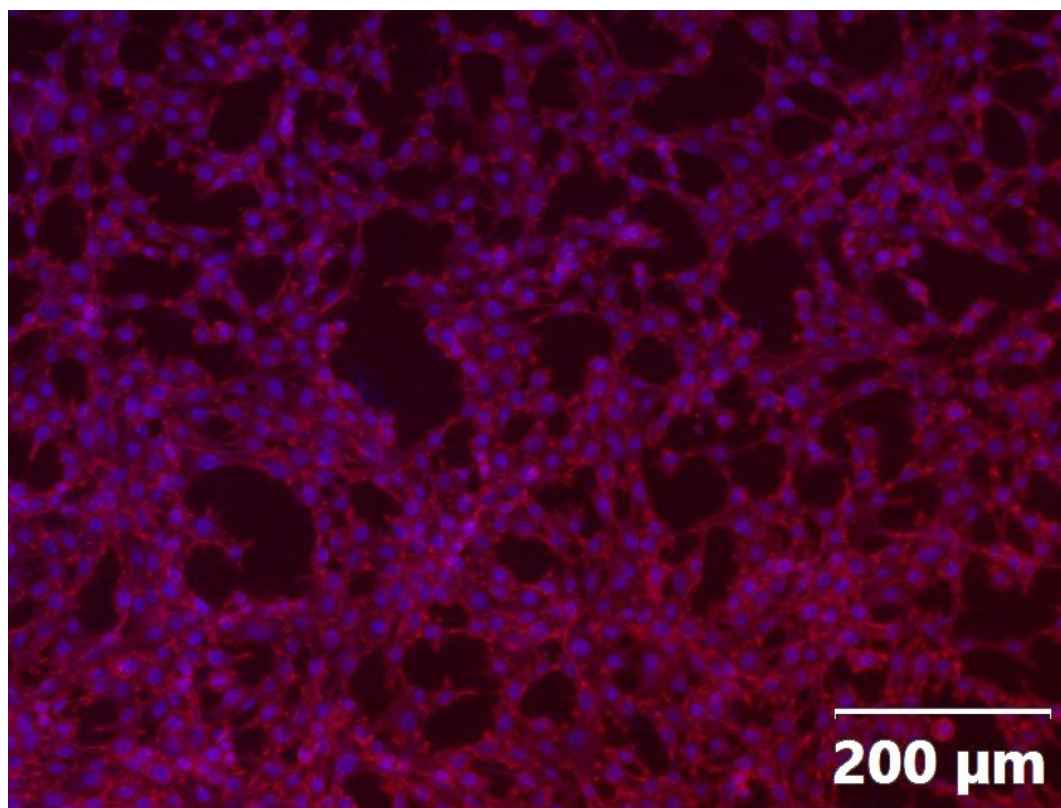
Obrázek 25 Vyhodnocení MTT testu pro monomer azulenu. Statistická odlišnost byla stanovena testy ANOVA a Tuckey na hladinách významnosti $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) nebo $p \leq 0,001$ (***).

7.2 Test viability buněk

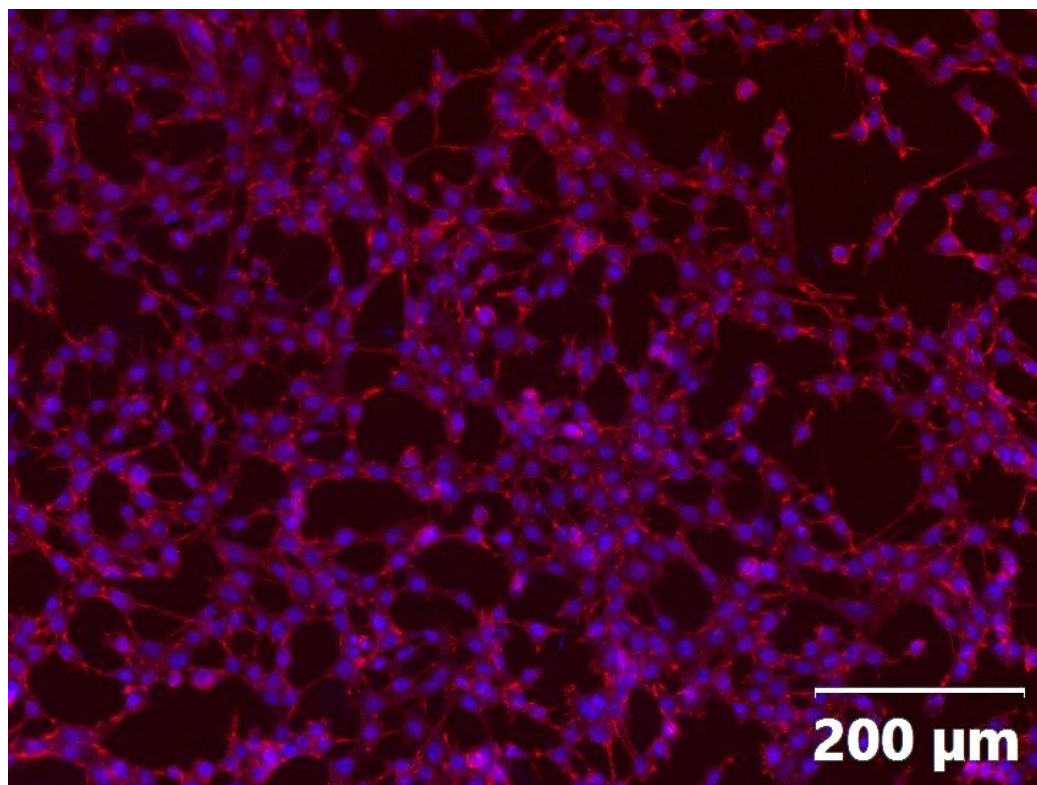
Test viability buněk byl proveden barvením popsáním postupem pomocí komerčních barviv. Focení proběhlo pomocí fluorescenčního inverzního mikroskopu a vyhodnocení proběhlo kvalitativně pomocí mikrofotografií. Pro lepší viditelnost rozdílů v buněčné morfologii byly pomocí fluorescence zvýrazněny jádra buněk a buněčný cytoskelet. Testování proběhlo u dvou buněčných linií byly to fibroblasty NIH/3T3 a embryonální kmenové buňky ES R1. Výsledky jsou zobrazeny na obrázcích 26-31.



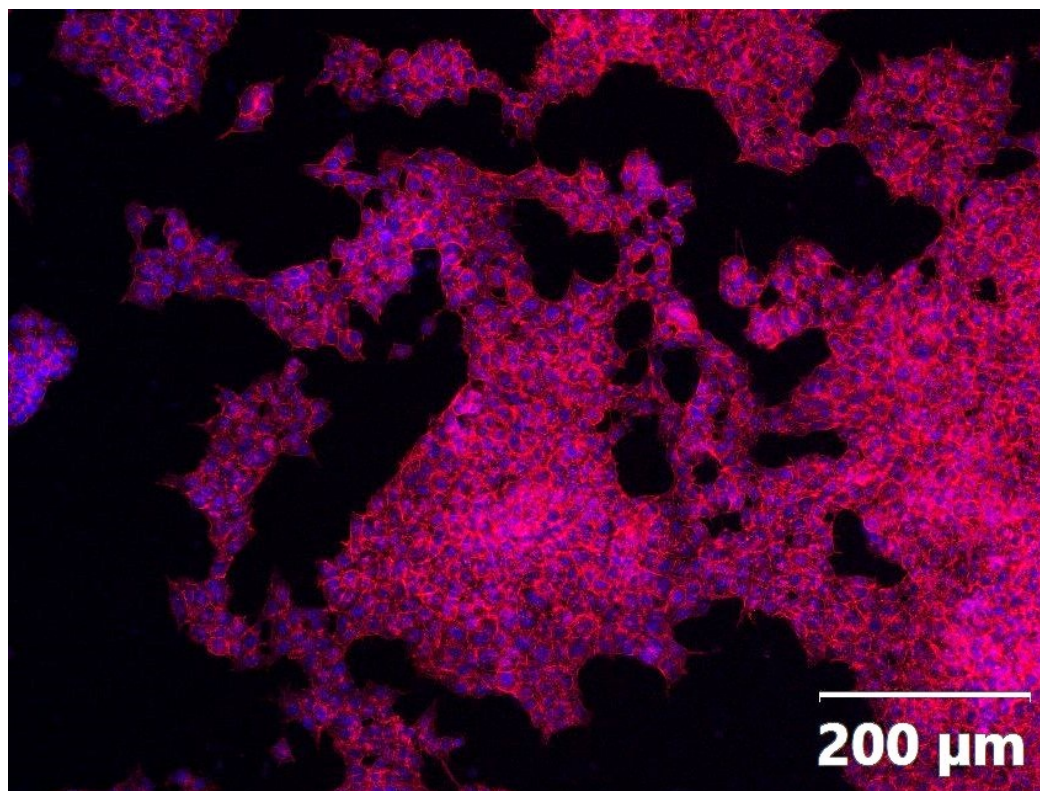
Obrázek 26 Fibroblasty NIH/3T3 na referenčním povrchu (tkáňový plastik). Modrá barva – jádro, červená barva – cytoskelet



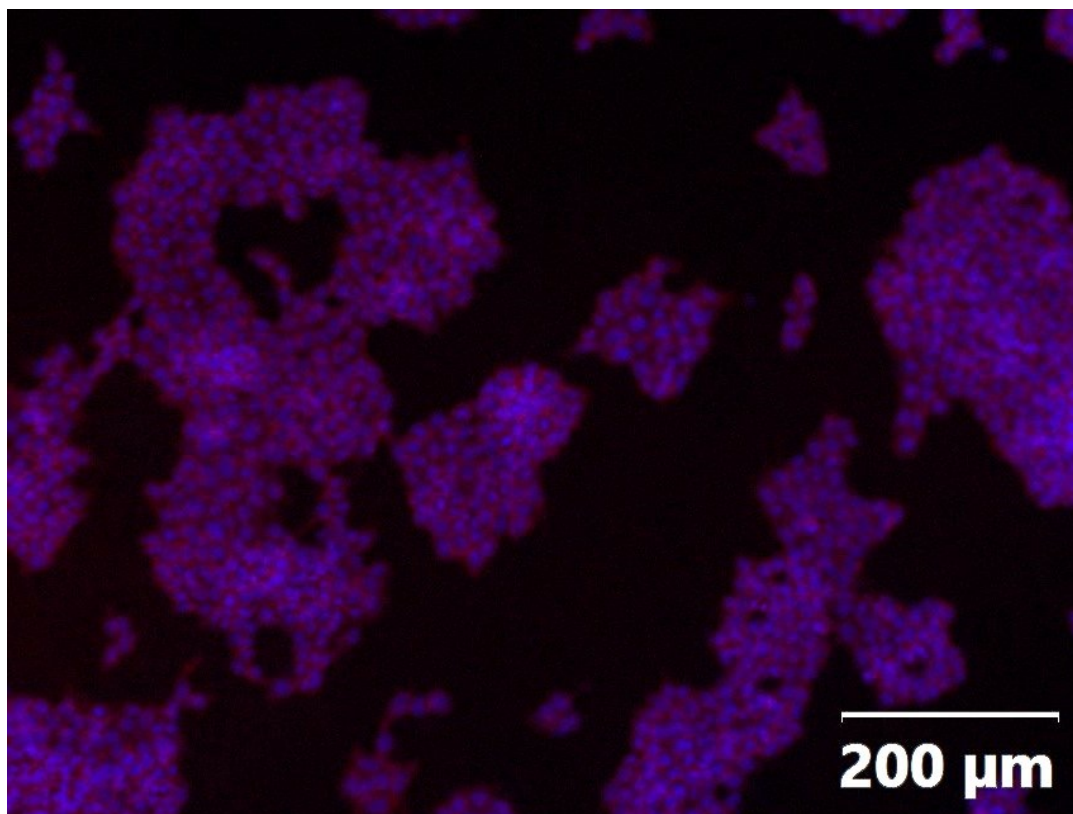
Obrázek 27 Fibroblasty NIH/3T3 na povrchu pokrytém polyazulenovým filmem (tkáňový plastik). Modrá barva – jádro, červená barva – cytoskelet



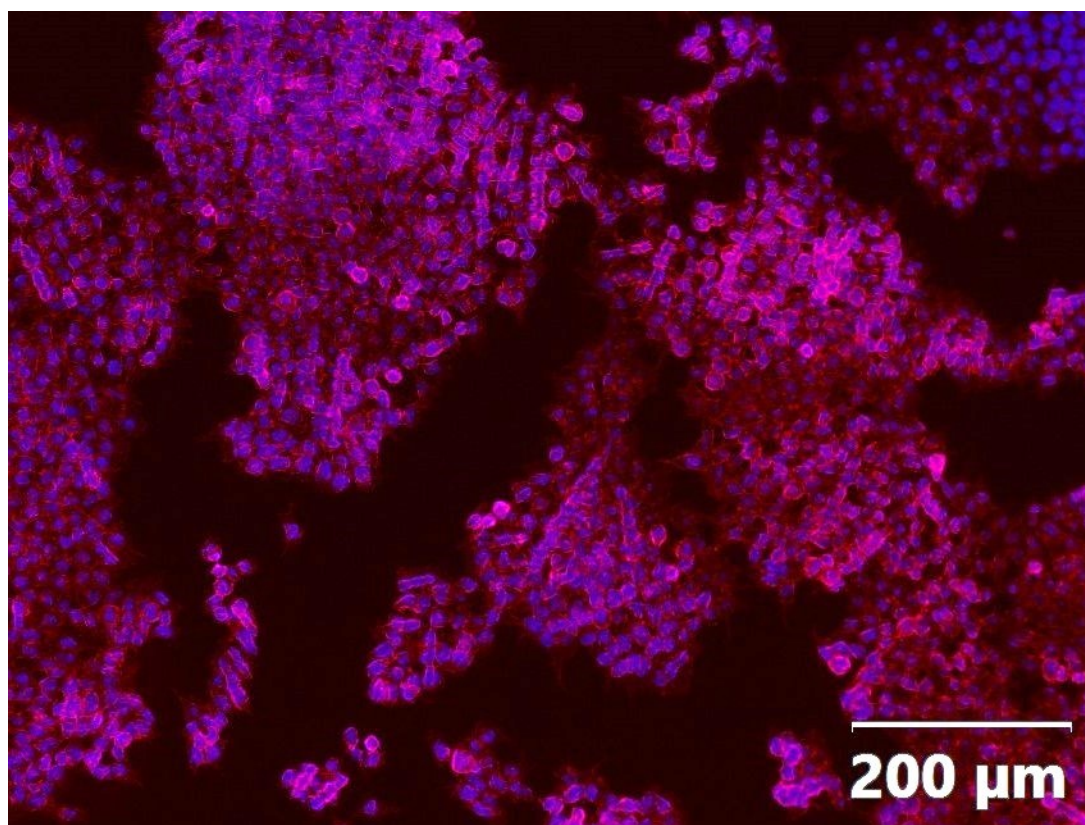
Obrázek 28 *Fibroblasty NIH/3T3 na povrchu pokrytém polypyrolovým filmem (tkáňový plastik). Modrá barva – jádro, červená barva – cytoskelet*



Obrázek 29 *Embryonální kmenové buňky ES R1 na referenčním povrchu (tkáňový plastik). Modrá barva – jádro, červená barva – cytoskelet.*



Obrázek 30 Embryonální kmenové buňky ES R1 na polyazulenovém povrchu (tkáňový plastik). Modrá barva – jádro, červená barva – cytoskelet.



Obrázek 31 Embryonální kmenové buňky ES R1 na polypyrrolovém povrchu (tkáňový plastik). Modrá barva – jádro, červená barva – cytoskelet

8 DISKUZE

Výsledky experimentální části mé diplomové práce nejsou optimálně porovnatelné s dostupnými publikacemi hlavně kvůli tomu, že polyazulen doposud nebyl podroben testům buněčné viability a cytotoxicity. Další připravené vodivé polymery, což jsou polyanilin a polypyrol jsou v této oblasti více studovány a jejich vlastnosti jsou více experimentálně prozkoumány a jsou proto ideální pro srovnání při podrobení stejným testům jako polyazulen. Vybrané vodivé polymery byly podrobeny MTT testu a zkoumány pomocí fluorescenční mikroskopie, což jsou testy vhodné k určení buněčné viability a cytotoxicity.

V první fázi experimentální práce jsem se zabývala výrobou vybraných vodivých polymerů, což probíhalo chemickou polymerační reakcí. Při přípravě polyazulenu bylo nutné použít na rozpuštění reagujících látek ethanol místo vody, protože monomer azulenu je hydrofobní molekulou a je nutné použít alespoň částečně nepolární rozpouštědla na jeho rozpuštění. Polymery byly připraveny ve formě tenkých filmů na tkáňové Petriho misce nebo na laserem vyříznutých kolečkách ze stejného materiálu a také ve formě prášku.

Na obrázcích 18-20 jsou zobrazeny destičky použité pro MTT test. V tomto testu se aplikované MTT redukuje metabolicky aktivními buňkami na tmavě modrou krystalickou formu. V případě, že jsou buňky metabolicky aktivní a živé MTT se redukuje na modrou formu hromadící se ve vnitřním prostoru buněk. K vyhodnocení testu je nutné extrahovat MTT z buněk pomocí organického rozpouštědla dimethylsulfoxid. Tímto procesem je způsobeno, že se modré krystalky přemění na fialový roztok. Čím intenzivnější je fialová barva roztoku, tím více se vyskytuje živých buněk v testovaném vzorku.

Obrázek 18 zobrazuje polyanilin a polypyrol, u polyanilinu vidíme, že roztok je bezbarvý, což znamená, že zde nejsou metabolicky aktivní buňky schopné přeměnit MTT látku jejich buněčnou aktivitou na barevný roztok. Polypyrol vykazuje rovnoměrnou intenzitu fialové barvy i přes různé koncentrace extraktu, v jedné jamce vidíme bezbarvý roztok, ale to je způsobeno pouhým nedostatkem extraktu daného vzorku a hodnota je statisticky vyřazena z dalšího zpracování. Obdobné výsledky vidíme i na obrázku 19 s polyazulenovým a kontrolním extraktem odpovídající. Test byl proveden také pro monomer azulenu (obrázek 20) pro srovnání zachování biomedicínských vlastností popsaných v kapitole Vlastnosti azulenu využitelné v medicíně, v polymeru. Barva roztoku je intenzivně fialová, z toho lze usoudit, že jsou zde biologicky aktivní buňky.

Jak již bylo zmíněno hlavním výstupem z MTT testu je měření absorbance, byla proměřena při 570 a 690 nm. Výsledky absorbance byly převedeny na relativní životaschopnost buněk. Absorbance referenčního vzorku byla zvolena za 100 % životaschopnost a ostatní hodnoty s ní byly porovnány. Po přepočtu byly hodnoty podrobeny testu odlehlosti, jednofaktorové analýze rozptylu (ANOVA), která se používá k porovnání středních hodnot mezi více než dvěma skupinami. Byl použit také test rozsahu Tuckey, který se používá k ověření, které páry skupin mají statisticky významné odlišné střední hodnoty. Statisticky významná odlišnost naměřených byla stanovena na hladinách významnosti $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) nebo $p \leq 0,001$ (***). U každého grafu byla v hodnotě 0,7 relativní životaschopnosti buněk vynesena křivka, což je běžně používaným prahem vyhodnocení cytotoxicity látek.

Na obrázku 21 je graf vyhodnocení MTT testu pro kontrolní membránu. Médium tohoto vzorku bylo bez vodivého polymeru, extrakt byl vyroben z čistého filtračního papíru s médiem. Očekávaný výsledek grafu byla hodnota relativní životaschopnosti okolo 1 pro všechny koncentrace extraktu. Graf se vyvíjí tak, že do 90 % koncentrace extraktu relativní životaschopnost buněk roste nad hodnotu reference, to naznačuje, že v extraktu se vyskytují látky podporující růst buněk. Filtrační papír je vyroben z celulózových vláken, spojených dohromady pomocí pryskyřice. Celulóza může být pro růst buněk užitečná hlavně u buněk rostlinných, u použitých buněk fibroblastů nebyl očekávaný nárůst životaschopnosti. Při použití 100 % extraktu životaschopnost buněk prudce klesá na cca 0,6 referenční hodnoty, což by mohlo být způsobeno pro změnu negativním vlivem celulózy a také pryskyřice na růst živočišné buněčné kultury, neposkytují žádné přímé signály nebo živiny nutné pro buněčný růst. Vzhledem k tomuto výsledku je očekáván pokles relativní životaschopnosti buněk s rostoucím zastoupením extraktu i u ostatních testovaných vzorků vodivých polymerů na stejném filtračním papíru.

Na grafu zobrazeném na obrázku 22 vidíme vliv působení extraktu obsahujícím polyazulen. Při 25 a 50 % koncentraci extraktu došlo k nárůstu relativní životaschopnosti buněk, polyazulen mohl teoreticky buněčný růst podpořit. Zvyšující se koncentrace extraktu už buněčný růst nepodporuje, ve srovnání k referenci, ale nedochází ani k inhibici. Celkově v celém rozsahu použití extraktu s obsahem polyazulenu nedošlo k poklesu relativní životaschopnosti buněk pod kritickou hodnotu 0,7. Z tohoto testu tedy vyplývá, že polyazulen není pro životaschopnost buněk toxický.

Obrázek číslo 23 zobrazuje graf pro MTT test zobrazující extrakty s polyanilinem. V tomto grafu lze pozorovat, že i nejmenší koncentrace extraktu je pro relativní životaschopnost

buněk toxická a neumožňuje buněčný růst. Důvodem může být chemická povaha polyanilinu. Při interakci s buňkami může polyanilin měnit pH v okolním prostředí buněk, může také vyvolávat reakce s volnými radikály, které mohou poškozovat buňky a jejich složky. Tato látka má také tendenci k tvorbě agregátů, které mohou být velké a obtížně rozpustné, což může vést ke zhoršené biologické dostupnosti a snížené efektivitě látky.

Dalším testovaným byl extrakt obsahující polypyrol, graf je viditelný na obrázku 24, do koncentrace 50 % extraktu je relativní životaschopnost buněk nad kritickou hodnotou 0,7. Při vyšší koncentraci extraktu už relativní životaschopnost buněk klesá pod kritickou hodnotu cytotoxicity. Polypyrol může omezovat buněčný růst vyvoláním tvorby reaktivních sloučenin kyslíku, které mohou poškodit buňky a jejich složky, DNA nebo zvýšit oxidativní stres. Může ovlivnit také funkci buněčných membrán, ovlivnit jejich strukturu a funkci. Vysoké koncentrace polypyrolu mohou způsobit nekrózu buněk.

Poslední látkou podrobenou MTT testu byl monomer azulenu, výsledky vidíme na obrázku 25. Azulen není považován za toxický pro buněčný růst, ale jeho účinek může být závislý na koncentraci a délce expozice. Azulenový extrakt tomuto tvrzení odpovídá do koncentrace 100 %, při plné koncentraci extraktu relativní životaschopnost buněk klesá na hraniční hodnotu 0,7, což je orientační hodnota pro hodnocení cytotoxicity, protože při této hodnotě se obvykle projevuje narušení buněčného růstu a přežití.

Připravené tenké filmy byly využity na test buněčné adheze a proliferace, který byl proveden nabarvením buněk postupem uvedeným v kapitole Test viability buněk. Využité barvy jsou fluorochromy, což jsou látky, které mají schopnost absorbovat určité vlnové délky světla a následně fluoreskovat světlo při jiné vlnové délce. Hoechst jsou modré fluorochromy vázající se na DNA a tím umožňují vizualizaci buněčných jader. AktinRed či AktinGreen se váží na aktinová vlákna v cytoskeletu a umožňují jejich zobrazení. K aktivaci fluorochromů musí být zvolena vhodná vlnová délka pro Hoechst je to UV světlo s vlnovou délkou okolo 350-360 nm a pro ActinRed je to vlnová délka okolo 540-590 nm. Výsledky tohoto měření byly vizualizovány pomocí inverzního fluorescenčního mikroskopu a zaznamenány na obrázcích 26-31. Na tento test byly použity dvě řady buněčných linií, a to NIH/3T3, izolovány z embryonální myši tkáň a kmenové buňky ES R1. Kmenové buňky jsou citlivější na toxické látky pravděpodobně kvůli tomu, že se nachází ve stadiu aktivního dělení a jsou náchylnější na poškození DNA než fibroblasty, které nejsou aktivně se dělící.

Na obrázku 26 jsou zobrazeny buňky NIH/3T3 pěstované bez toxických látek pouze v médiu na tkáňovém plastiku použité jako referenční hodnota hustoty porostu buněk. Na obrázku 27

najdeme buňky NIH/3T3 rostoucí na misce s polyazulenovým filmem, pokud tyto obrázky srovnáme s referenčním snímkem, vidíme, že hustota porostu je srovnatelná, místy byla i větší. Buňky mají zachovalá jádra i cytoskelet s typickou morfologií pro fibroblasty a můžeme soudit, že polyazulenový film nijak nenarušil jejich životaschopnost, naopak vzhledem k hustě porostlým místům je možné usoudit, že buněčnou proliferaci podporuje, což je v souladu s výsledky získanými z MTT testu. Polypyrolový film je zobrazen na obrázku 28 a při srovnání s referenčním vzorkem taktéž nevykazuje změnu buněčné morfologie, nicméně oproti referenci a polyazulenu zde došlo k mírnému zhoršení viability buněk NIH/3T3, stejně jako tomu bylo i u provedeného MTT testu.

Obrázek 29 zobrazuje embryonální kmenové buňky ES R1 rostoucí s čistým médiem na referenčním tkáňovém plastiku. Červený cytoskelet i modrá buněčná jádra jsou viditelná a buňky jsou shluknuté do klastrů, což je pro embryonální kmenové buňky pěstované *in vitro* normální. Co se týče testovaných vzorků, polyazulenový film (obrázek 30) a polypyrolový film (obrázek 31) jsou porostlé buňkami s morfologií i hustotou srovnatelnou s referencí. V rámci testu buněčné adheze a proliferace lze tedy usoudit, že polyazulen a polypyrol jsou kompatibilní s fibroblasty i kmenovými buňkami. Na filmech vyrobených z těchto vodivých polymerů buňky adherovaly a proliferovaly na srovnatelné úrovni jako buňky pěstované pouze s médiem na referenčním tkáňovém plastiku.

Filmy z polyanilinu zde zobrazeny nenajdeme, pro buňky NIH/3T3 i ES R1 je tento film nevhodným substrátem a pomocí fluorescenčního mikroskopu nebyly zobrazeny ani jádra ani buněčný cytoskelet, přitom že barvení i nastavení mikroskopu bylo provedeno stejným způsobem jako u předchozích vzorků, takže chyba v těchto aspektech se dá vyloučit. Důvodem může být tvrdost nebo drsnost polyanilinového filmu ztěžující adhezi buněk na povrch a také narušující interakci buněčných membrán s povrchem. Další problém v této oblasti může být také špatná hydrofilie povrchu, která může vést k nedostatečnému navázání adhezivního proteinu a snížení adheze buněk. Vzhledem k tomu, že i výsledky z MTT testu vedly k velmi nízké viabilitě buněk, můžeme usoudit, že polyanilin je toxický jak pro odolnější fibroblasty, tak pro citlivější kmenové buňky.

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo připravit prášky a filmy polyazulenu a stanovit jejich biologické vlastnosti. Spolu s polyazulenem byly připraveny i prášky a filmy polyanilinové a polypyrolové. Na připravených materiálech bylo provedeno stanovení biologických vlastností pomocí testů viability, konkrétně to byl test MTT a zobrazení aparátů nabarvených fluorochromy pomocí inverzního fluorescenčního mikroskopu. Na základě výsledků z těchto testů lze vyvodit, že polyazulen je polymer, který nepůsobí cytotoxicky. V MTT testu cytotoxicity extraktů měl polyazulen nejlepší výsledek ze všech testovaných vodivých polymerů a prokázal se jako materiál s nejlepší cytokompatibilitou. MTT testu se podrobil i monomer azulenu, který se prokázal také jako cytotoxicky nezávadný a dá se proto předpokládat, že vlastnosti monomeru se přenášejí i na polymer, alespoň v této oblasti. Dále na snímkách z fluorescenčního mikroskopu, kde vidíme, že testované buňky, jak fibroblasty, tak i embryonální kmenové buňky, na polyazulenových filmech rostly zcela bez omezení. Kmenové buňky jsou citlivé na podmínky buněčného růstu a to, že rostou na polyazulenových filmech, je pozitivním znakem toho, že nejsou cytotoxické. Oproti tomu polypyrolové filmy vedly k mírnému poklesu proliferace a polyanilin prokázal silnou cytotoxicitu v obou testech, je tedy pro růst buněk nevhodný. Polyanilin je i přes to kvůli svým vlastnostem v biomedicíně často využíván, musí pouze dojít k úpravám, aby se toxicita snížila. Může to být například přidáním hydrofilní skupiny, která změní chemickou strukturu nebo povrchová úprava polyanilinu a další.

Polyazulen je obecně málo využívaný vodivý polymer i přes to, že jeho biologické vlastnosti jsou v mnoha ohledech lepší nebo srovnatelné s ostatními vodivými polymery. Z experimentální části toto tvrzení můžeme podpořit. Nízká míra využití polyazulenu může být způsobena náročným procesem získávání monomeru azulenu. Azulen není syntetizován komerčně, ale je získáván především z přírodních zdrojů – extrakcí z rostlin. Azulen je vždy přítomen pouze v omezeném množství, a proto může být jeho těžba nákladná. Ve srovnání s monomery anilinem a pyrolem, které jsou syntetickými monomery, je získání azulenu nákladnější. I když je polyazulen vlastnostmi velmi slibným vodivým polymerem vhodným i pro využití v biomedicínských aplikacích, v současné době jeho využití ani výzkum není tak rozsáhlý jako u dalších vodivých polymerů jako polyanilinu nebo polypyrolu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ALLARD, N. a M. LECLERC. 6. Conjugated polymers for organic electronics. In: LECLERC, Mario a Robert GAUVIN, ed. *Functional Materials* [online]. DE GRUYTER, 2014, 2014-12-31, s. 121-138. ISBN 978-3-11-030781-8. Dostupné z: doi:10.1515/9783110307825.121

Applied Plastics Engineering Handbook [online]. Elsevier, 2011 [cit. 2023-05-07]. ISBN 9781437735147. Dostupné z: doi:10.1016/C2010-0-67336-6

BAI, Hua a Gaoquan SHI. Gas Sensors Based on Conducting Polymers. *Sensors* [online]. 2007, 7(3), 267-307. ISSN 1424-8220. Dostupné z: doi:10.3390/s7030267

BAKUN, Paweł, Beata CZARCZYNSKA-GOSLINSKA, Tomasz GOSLINSKI a Sebastian LIJEWSKI. In vitro and in vivo biological activities of azulene derivatives with potential applications in medicine. *Medicinal Chemistry Research* [online]. 2021, 30(4), 834-846. ISSN 1054-2523. Dostupné z: doi:10.1007/s00044-021-02701-0

BAKUN, Paweł, Beata CZARCZYNSKA-GOSLINSKA, Tomasz GOSLINSKI a Sebastian LIJEWSKI. In vitro and in vivo biological activities of azulene derivatives with potential applications in medicine. *Medicinal Chemistry Research* [online]. 2021, 30(4), 834-846. ISSN 1054-2523. Dostupné z: doi:10.1007/s00044-021-02701-0

BURMAN, Michael, Arkadii ARINSTEIN a Eyal ZUSSMAN. Free flight of an oscillated string pendulum as a tool for the mechanical characterization of an individual polymer nanofiber. *Applied Physics Letters* [online]. 2008, 93(19). ISSN 0003-6951. Dostupné z: doi:10.1063/1.3000016

CAMPBELL, D., R.A. PETHRICK a J.R. WHITE. *Polymer Characterization* [online]. CRC Press, 2017. ISBN 9781315274706. Dostupné z: doi:10.1201/9781315274706

CAO, Weiran a Jiangeng XUE. Recent progress in organic photovoltaics: device architecture and optical design. *Energy & Environmental Science* [online]. 2014, 7(7). ISSN 1754-5692. Dostupné z: doi:10.1039/c4ee00260a

Conducting Polymers [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. Monographs in Electrochemistry. ISBN 978-3-540-75929-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-540-75930-0

CONTRACTOR, A.Q., T.N. SURESHKUMAR, R. NARAYANAN, S. SUKEERTHI, Rakesh LAL a R.S. SRINIVASA. Conducting polymer-based biosensors. *Electrochimica*

Acta [online]. 1994, **39**(8-9), 1321-1324 . ISSN 00134686. Dostupné z: doi:10.1016/0013-4686(94)E0054-4

DAMRONGRUNGRUANG, Teerasak, Nuaefah KITCHINDAOPAT, Patreeya THANASOTHON, Kriravee THEERANUT, Patcharaporn TIPPAYAWAT, Chaiyapong RUANGSUWAN a Banyong SUWANEE. Effects of photodynamic therapy with azulene on peripheral blood mononuclear cell viability and singlet oxygen formation. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* [online]. 2018, **24**, 318-323. ISSN 15721000. Dostupné z: doi:10.1016/j.pdpdt.2018.10.015

DARMANIN, Thierry a Frederic GUITTARD. Wettability of conducting polymers: From superhydrophilicity to superoleophobicity. *Progress in Polymer Science* [online]. 2014, **39**(4), 656-682. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2013.10.003

DAS, Tapan K. a Smita PRUSTY. Review on Conducting Polymers and Their Applications. *Polymer-Plastics Technology and Engineering* [online]. 2012, **51**(14), 1487-1500. ISSN 0360-2559. Dostupné z: doi:10.1080/03602559.2012.710697

DIAS, Jerry Ray. Electronic and structural properties of biazulene, terazulene, and polyazulene isomers. *Journal of Physical Organic Chemistry* [online]. 2007, **20**(6), 395-409. ISSN 08943230. Dostupné z: doi:10.1002/poc.1159

EPSTEIN, Arthur J. Electrical Conductivity in Conjugated Polymers. In: *Conductive Polymers and Plastics* [online]. Elsevier, 1999, 1999, s. 1-9. ISBN 9781884207778. Dostupné z: doi:10.1016/B978-188420777-8.50002-3

FRESHNEY, R. I. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. 5th ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Liss, c2005, xxvi, 642 s. ISBN 0471453293.

GOTTWALD, Tomáš a Petr DVOŘÁK. *Vodivé polymery a jejich využití v superkondenzátorech: Conducting polymers and their use in supercapacitors*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2010.

GRĄDZKA, Emilia, Patrycja MAKOWSKA a Krzysztof WINKLER. Chemically formed conducting polyazulene: From micro- to nanostructures. *Synthetic Metals* [online]. 2018, **246**, 115-121. ISSN 03796779. Dostupné z: doi:10.1016/j.synthmet.2018.10.002

GRODZKA, Emilia, Krzysztof WINKLER, Beatriz Meana ESTEBAN a Carita KVARNSTROM. Capacitance properties of electrochemically deposited polyazulene

films. *Electrochimica Acta* [online]. 2010, **55**(3), 970-978. ISSN 00134686. Dostupné z: doi:10.1016/j.electacta.2009.09.054

GUIMARD, Nathalie K., Natalia GOMEZ a Christine E. SCHMIDT. Conducting polymers in biomedical engineering. *Progress in Polymer Science* [online]. 2007, **32**(8-9), 876-921. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.012

GUO, Baolin a Peter X. MA. Conducting Polymers for Tissue Engineering. *Biomacromolecules* [online]. 2018, **19**(6), 1764-1782. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biomac.8b00276

HANIFI, A., P. H. ALFREDSSON, A. V. JOHANSSON a D. S. HENNINGSON, ed. *Transition, Turbulence and Combustion Modelling* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 1999. ERCOFTAC Series. ISBN 978-94-010-5925-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-011-4515-2

HUANG, Jiaqian, Senhe HUANG, Yazhen ZHAO, et al. Azulene-Based Molecules, Polymers, and Frameworks for Optoelectronic and Energy Applications. *Small Methods* [online]. 2020, **4**(10). ISSN 2366-9608. Dostupné z: doi:10.1002/smt.202000628

CHEN, Shufen, Lingling DENG, Jun XIE, Ling PENG, Linghai XIE, Quli FAN a Wei HUANG. Recent Developments in Top-Emitting Organic Light-Emitting Diodes. *Advanced Materials* [online]. 2010, **22**(46), 5227-5239. ISSN 09359648. Dostupné z: doi:10.1002/adma.201001167

CHIANG, Hsiu-Mei, Jun-Jie YIN, Qingsu XIA, Yuewei ZHAO, Peter P. FU, Kuo-Ching WEN a Hongtao YU. Photoirradiation of azulene and guaiazulene—Formation of reactive oxygen species and induction of lipid peroxidation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* [online]. 2010, **211**(2-3), 123-128. ISSN 10106030. Dostupné z: doi:10.1016/j.jphotochem.2010.02.007

IKEGAI, Kazuhiro, Masakazu IMAMURA, Takayuki SUZUKI, et al. Synthesis and biological evaluation of C-glucosides with azulene rings as selective SGLT2 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus: Discovery of YM543. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [online]. 2013, **21**(13), 3934-3948. ISSN 09680896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2013.03.067

ION, Adrian E., Simona NICA, Augustin M. MADALAN, Catalin MAXIM, Miguel JULVE, Francisc LLORET a Marius ANDRUH. One-dimensional coordination polymers

constructed from di- and trinuclear {3d–4f} tectons. A new useful spacer in crystal engineering: 1,3-bis(4-pyridyl)azulene. *CrystEngComm* [online]. 2014, **16**(3), 319-327. ISSN 1466-8033. Dostupné z: doi:10.1039/C3CE41592A

ITO, Shunji, Takahiro KUBO, Noboru MORITA, Tadaaki IKOMA, Shozo TERO-KUBOTA, Jun KAWAKAMI a Akio TAJIRI. Azulene-Substituted Aromatic Amines. Synthesis and Amphoteric Redox Behavior of N , N -Di(6-azulenyl)- p -toluidine and N , N , N ‘, N ‘-Tetra(6-azulenyl)- p -phenylenediamine and Their Derivatives. *The Journal of Organic Chemistry* [online]. 2005, **70**(6), 2285-2293. ISSN 0022-3263. Dostupné z: doi:10.1021/jo048489s

K, Namsheer a Chandra Sekhar ROUT. Conducting polymers: a comprehensive review on recent advances in synthesis, properties and applications. *RSC Advances* [online]. 2021, **11**(10), 5659-5697 [cit. 2023-05-07]. ISSN 2046-2069. Dostupné z: doi:10.1039/D0RA07800J

LAKOWICZ, Joseph R., ed. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* [online]. Boston, MA: Springer US, 2006. ISBN 978-0-387-31278-1. Dostupné z: doi:10.1007/978-0-387-46312-4

LANGHALS, Heinz a Moritz EBERSPÄCHER. A Convenient Synthesis of Azulene. *Synthesis* [online]. 2018, **50**(09), 1862-1866. ISSN 0039-7881. Dostupné z: doi:10.1055/s-0036-1591906

LATYPOV, A. a T.H. COSKUN. The inverse directed self-assembly problem. In: *Directed Self-assembly of Block Co-polymers for Nano-manufacturing* [online]. Elsevier, 2015, 2015, s. 235-255. ISBN 9780081002506. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100250-6.00009-2

LECLERC, Mario; MORIN, Jean-François (ed.). *Design and synthesis of conjugated polymers*. John Wiley & Sons, 2010.

LEMAL, David M. a Glenn D. GOLDMAN. Synthesis of azulene, a blue hydrocarbon. *Journal of Chemical Education* [online]. 1988, **65**(10). ISSN 0021-9584. Dostupné z: doi:10.1021/ed065p923

LIN, Chia-Hsin, Jia-Hui LIN, Chien-Fu CHEN, Yoshihiro ITO a Shyh-Chyang LUO. Conducting polymer-based sensors for food and drug analysis. *Journal of Food and Drug Analysis* [online]. 2021, **29**(4), 544-558. ISSN 2224-6614. Dostupné z: doi:10.38212/2224-6614.3374

LONG, Yunze, Zhaojia CHEN, Jean Luc DUVAIL, Zhiming ZHANG a Meixiang WAN. Electrical and magnetic properties of polyaniline/Fe₃O₄ nanostructures. *Physica B: Condensed Matter* [online]. 2005, **370**(1-4), 121-130. ISSN 09214526. Dostupné z: doi:10.1016/j.physb.2005.09.009

LU, Xiaofeng, Hui MAO, Danming CHAO, Wanjin ZHANG a Yen WEI. Ultrasonic synthesis of polyaniline nanotubes containing Fe₃O₄ nanoparticles. *Journal of Solid State Chemistry* [online]. 2006, **179**(8), 2609-2615. ISSN 00224596. Dostupné z: doi:10.1016/j.jssc.2006.04.029

MA, Ding, Jinlong HE a Dapeng HE. Chamazulene reverses osteoarthritic inflammation through regulation of matrix metalloproteinases (MMPs) and NF- κ B pathway in in-vitro and in-vivo models. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [online]. 2020, **84**(2), 402-410. ISSN 0916-8451. Dostupné z: doi:10.1080/09168451.2019.1682511

MEGHA, R., Farida A. ALI, Y.T. RAVIKIRAN, C.H.V.V. RAMANA, A.B.V. KIRAN KUMAR, D.K. MISHRA, S.C. VIJAYAKUMARI a D. KIM. Conducting polymer nanocomposite based temperature sensors: A review. *Inorganic Chemistry Communications* [online]. 2018, **98**, 11-28. ISSN 13877003. Dostupné z: doi:10.1016/j.inoche.2018.09.040

MEZHUEV, Yaroslav O., Igor Y. VOROBEEV, Ivan V. PLYUSHCHII, et al. Chemical Oxidative Polymerization of Methylene Blue: Reaction Mechanism and Aspects of Chain Structure. *Polymers* [online]. 2021, **13**(13). ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym13132188

MOON, Jong-Min, Neeta THAPLIYAL, Khalil Khadim HUSSAIN, Rajendra N. GOYAL a Yoon-Bo SHIM. Conducting polymer-based electrochemical biosensors for neurotransmitters: A review. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2018, **102**, 540-552. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2017.11.069

MURFIN, Lloyd C. a Simon E. LEWIS. Azulene—A Bright Core for Sensing and Imaging. *Molecules* [online]. 2021, **26**(2). ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules26020353

NAMBIAR, Shruti a John T.W. YEOW. Conductive polymer-based sensors for biomedical applications. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2011, **26**(5), 1825-1832. ISSN 09565663. Dostupné z: doi: 10.1016/j.bios.2010.09.046

NASROLLAHZADEH, Mahmoud, Zahra ISSAABADI, Mohaddeseh SAJJADI, S. Mohammad SAJADI a Monireh ATAROD. Types of Nanostructures. In: *An Introduction to Green Nanotechnology* [online]. Elsevier, 2019, 2019, s. 29-80. Interface Science and Technology. ISBN 9780128135860. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-813586-0.00002-X

NEOH, K.G., E.T. KANG a T.C. TAN. Chemical synthesis and characterization of electroactive and partially soluble polyazulene. *Polymer Bulletin* [online]. 1988, **19**(4). ISSN 0170-0839. Dostupné z: doi:10.1007/BF00263932

NÖLL, Gilbert, Jörg DAUB, Michaela LUTZ a Knut RURACK. Synthesis, Spectroscopic Properties, and Electropolymerization of Azulene Dyads. *The Journal of Organic Chemistry* [online]. 2011, **76**(12), 4859-4873. ISSN 0022-3263. Dostupné z: doi:10.1021/jo200080v

O'MULLANE, A.P. Electrochemistry. In: *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* [online]. Elsevier, 2013, 2013. ISBN 9780124095472. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.05344-0

OU, Liang, Yunyun ZHOU, Bin WU a Liangliang ZHU. The unusual physicochemical properties of azulene and azulene-based compounds. *Chinese Chemical Letters* [online]. 2019, **30**(11), 1903-1907. ISSN 10018417. Dostupné z: doi:10.1016/j.ccllet.2019.08.015

PARAMSHETTI, Sharanya, Mohit ANGOLKAR, Adel AL FATEASE, Sultan M. ALSHAHRANI, Umme HANI, Ankitha GARG, Gundawar RAVI a Riyaz Ali M. OSMANI. Revolutionizing Drug Delivery and Therapeutics: The Biomedical Applications of Conductive Polymers and Composites-Based Systems. *Pharmaceutics* [online]. 2023, **15**(4). ISSN 1999-4923. Dostupné z: doi:10.3390/pharmaceutics15041204

PARK, Yohan, Jaehan JUNG a Mincheol CHANG. Research Progress on Conducting Polymer-Based Biomedical Applications. *Applied Sciences* [online]. 2019, **9**(6). ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app9061070

PROKOPOVÁ, Irena, 2007. Makromolekulární chemie. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT. ISBN 978-807-0806-623.

PUIGGALÍ-JOU, Anna, Luis J. DEL VALLE a Carlos ALEMÁN. Drug delivery systems based on intrinsically conducting polymers. *Journal of Controlled Release* [online]. 2019, **309**, 244-264. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2019.07.035

PUODZIUKYNAITE, Egle, Hsin-Wei WANG, Jimmy LAWRENCE, Adam J. WISE, Thomas P. RUSSELL, Michael D. BARNES a Todd EMRICK. Azulene Methacrylate Polymers: Synthesis, Electronic Properties, and Solar Cell Fabrication. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2014, **136**(31), 11043-11049. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja504670k

RAUSCH, S., D. RAUH, C. DEIBEL, S. VIDÍ a H. P. EBERT. Thin-Film Thermal-Conductivity Measurement on Semi-Conducting Polymer Material Using the 3ω Technique. *International Journal of Thermophysics* [online]. 2013, **34**(5), 820-830. ISSN 0195-928X. Dostupné z: doi:10.1007/s10765-012-1174-4

RAZUS, Alexandru C. Dancing with Azulene. *Symmetry* [online]. 2022, **14**(2). ISSN 2073-8994. Dostupné z: doi:10.3390/sym14020297

RODRIGUES, Jolina, Shilpa JAIN a Navinchandra Gopal SHIMPI. Conducting polymer-based gas sensors. In: *Carbon-Based Nanomaterials and Nanocomposites for Gas Sensing* [online]. Elsevier, 2023, 2023, s. 181-232. ISBN 9780128213452. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-821345-2.00006-1

RUSSO, Alessandra, Maurizio BRUNO, Rosanna AVOLA, Venera CARDILE a Daniela RIGANO. Chamazulene-Rich Artemisia arborescens Essential Oils Affect the Cell Growth of Human Melanoma Cells. *Plants* [online]. 2020, **9**(8). ISSN 2223-7747. Dostupné z: doi:10.3390/plants9081000

SARICIFTCI, Niyasi Serdar. *Primary Photoexcitations in Conjugated Polymers: Molecular Exciton Versus Semiconductor Band Model* [online]. WORLD SCIENTIFIC, 1998 [cit. 2021-10-1]. ISBN 978-981-02-2880-4. Dostupné z: doi:10.1142/3299

SHETTI, Vijayendra S. Chemical syntheses and salient features of azulene-containing homo- and copolymers. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* [online]. 2021, **17**, 2164-2185. ISSN 1860-5397. Dostupné z: doi:10.3762/bjoc.17.139

SINGH, Sandeep Kumar, Xavier CRISPIN a Igor V. ZOZOULENKO. Oxygen Reduction Reaction in Conducting Polymer PEDOT: Density Functional Theory Study. *The Journal of Physical Chemistry C* [online]. 2017, **121**(22), 12270-12277. ISSN 1932-7447. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jpcc.7b03210

SRIVASTAVA, Janmejai K., Mitali PANDEY a Sanjay GUPTA. Chamomile, a novel and selective COX-2 inhibitor with anti-inflammatory activity. *Life Sciences* [online]. 2009, **85**(19-20), 663-669. ISSN 00243205. Dostupné z: doi:10.1016/j.lfs.2009.09.007

STEJSKAL, Jaroslav a Patrycja BOBER. Progress in research and applications of conducting polymers: topical issue. *Chemical Papers* [online]. 2021, **75**(10), 4979-4980. ISSN 0366-6352. Dostupné z: doi:10.1007/s11696-021-01792-8

SUOMINEN, Milla, Suvi LEHTIMÄKI, Rahul YEWALE, Pia DAMLIN, Sampo TUUKKANEN a Carita KVARNSTRÖM. Electropolymerized polyazulene as active material in flexible supercapacitors. *Journal of Power Sources* [online]. 2017, **356**, 181-190. ISSN 03787753. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpowsour.2017.04.082

TANAKA, Kazuyoshi, Michio Toriumi, Sheng Tao Wang and Tokio Yamabe. "Electronic Structure of Polyazulene." *Polymer Journal* 22 (1990): 1001-1006.

TERÁN-ALCOCER, Álvaro, Francisco BRAVO-PLASCENCIA, Carlos CEVALLOS-MORILLO a Alex PALMA-CANDO. Electrochemical Sensors Based on Conducting Polymers for the Aqueous Detection of Biologically Relevant Molecules. *Nanomaterials* [online]. 2021, **11**(1). ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano11010252

THÉVENOT, Daniel R., Klara TOTH, Richard A. DURST a George S. WILSON. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification | International Union of Pure and Applied Chemistry. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2001, **16**(1-2), 121-131. ISSN 09565663. Dostupné z: doi:10.1016/S0956-5663(01)00115-4

WANG, Fuke, Yee-Hing LAI, N. M. KOCHERGINSKY a Yu. Yu. KOSTESKI. The First Fully Characterized 1,3-Polyazulene: High Electrical Conductivity Resulting from Cation Radicals and Polycations Generated upon Protonation. *Organic Letters* [online]. 2003, **5**(7), 995-998. ISSN 1523-7060. Dostupné z: doi:10.1021/ol0274615

WANG, Hemin. Polymer-based Electrochemical Sensing Platform for Heavy Metal Ions Detection - A Critical Review. *International Journal of Electrochemical Science* [online]. 2019, 8760-8771. ISSN 14523981. Dostupné z: doi:10.20964/2019.09.22

WANG, Xi-Shu, Hua-Ping TANG, Xu-Dong LI a Xin HUA. Investigations on the Mechanical Properties of Conducting Polymer Coating-Substrate Structures and Their

Influencing Factors. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2009, **10**(12), 5257-5284. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms10125257

WANG, Yanmin, Aiping LIU, Yongqin HAN a Tingxi LI. Sensors based on conductive polymers and their composites: a review. *Polymer International* [online]. 2019, **69**(1), 7-17. ISSN 0959-8103. Dostupné z: doi:10.1002/pi.5907

WEN, Haibo, Ziyi GE, Ying LIU, Tsutomu YOKOZAWA, Liang LU, Xinhua OUYANG a Ze TAN. Efficient synthesis of well-defined polycarbazoles via catalyst-transfer Kumada coupling polymerization. *European Polymer Journal* [online]. 2013, **49**(11), 3740-3743. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2013.08.016

YANG, Yongshi, Fujun PENG, Runsheng WANG, Kai GUAN, Taijiao JIANG, Guogang XU, Jinlyu SUN a Christopher CHANG. The deadly coronaviruses: The 2003 SARS pandemic and the 2020 novel coronavirus epidemic in China. *Journal of Autoimmunity* [online]. 2020, **109**. ISSN 08968411. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaut.2020.102434

ZENG, Hui Ning, Zhuang Mao PNG a Jianwei XU. Azulene in Polymers and Their Properties. *Chemistry – An Asian Journal* [online]. 2020, **15**(13), 1904-1915. ISSN 1861-4728. Dostupné z: doi:10.1002/asia.202000444

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ANOVA – analýza rozptylu

DAPI - 4',6-diamidin-2-fenylindol

DMEM – Dulbecco Modified Eagle Medium

DMSO – dimethylsulfoxid

HOMO – nejvyšší obsazený molekulový orbital

hSGLT1/2 – glukózový transportní protein

LUMO – nejnižší neobsazený molekulový orbital

MERS – blízkovýchodní respirační syndrom

MTT - (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid)

NIH – národní ústav zdraví

NSAID – nesteroidní protizánětlivé léky

OLED – organická dioda

OPVs – organické fotovoltaické zařízení

OTFT – organické tranzistory

P59 - $\infty[\text{Ni}(\text{L}1)\text{Gd}(\text{NO}_3)_3(\text{azbbpy})] \cdot \text{CH}_3\text{CN}$

PACT – antimikrobiální fotodynamická terapie

PBS – fosfátový pufr

PPI – inhibitory protonových pump

SARS – těžký akutní respirační syndrom

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1 Přeměna styrenu na polystyren (Elsevier, 2011)</i>	11
<i>Obrázek 2 Nejvýznamnější vodivé polymery (Stejskal,2001)</i>	12
<i>Obrázek 3 Vlastnosti vodivých polymerů, převzato (Tapan K. Das & Smita Prusty, 2012).....</i>	15
<i>Obrázek 4 Využití vodivých polymerů, převzato (Tapan K. Das & Smita Prusty,2012)</i>	18
<i>Obrázek 5 Vzorec azulenu (Huang et al, 2020).....</i>	26
<i>Obrázek 6 Využití azulenu v medicíně, převzato (Bakun et al, 2021)</i>	28
<i>Obrázek 7 Azulenové homopolymery (Huang et al, 2020)</i>	31
<i>Obrázek 8 Vzorec 2,6-polyaminoazulenu (Huang et al, 2020).....</i>	33
<i>Obrázek 9 Různé morfologie polyazulenu v závislosti na rozpouštědle</i>	36
<i>Obrázek 10 První syntéza polyazulenu (Shetti, 2021)</i>	37
<i>Obrázek 11 Reakce použité u přípravy polyazulenu (Grądzka et al, 2018)</i>	41
<i>Obrázek 12 Podklad pro polyazulenový film, tkáňové Petriho misky naplněné smíchanými roztoky azulenu a chloridu železitého</i>	42
<i>Obrázek 13 Polyazulenový film</i>	42
<i>Obrázek 14 Polyanilinový film</i>	43
<i>Obrázek 15 Polypyrolový film</i>	44
<i>Obrázek 16 Příprava extraktů. Zleva: kontrolní membrána, azulen, polyanilin, polypyrol, polyazulen.</i>	47
<i>Obrázek 17 Vlnové délky zachytávající barvy Hoechst a AktinRed (Lakowicz, 2006).....</i>	50
<i>Obrázek 18 Hodnocení MTT testu pro polyanilin a polypyrol.....</i>	51
<i>Obrázek 19 Hodnocení MTT testu pro polyazulen a kontrolu.....</i>	52
<i>Obrázek 20 Hodnocení MTT testu pro monomer azulenu</i>	52
<i>Obrázek 21 Vyhodnocení MTT testu kontrolního vzorku. . Statistická odlišnost byla stanovena testy ANOVA a Tuckey na hladinách významnosti $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) nebo $p \leq 0,001$ (***).</i>	53
<i>Obrázek 22 Vyhodnocení MTT testu pro polyazulenu . Statistická odlišnost byla stanovena testy ANOVA a Tuckey na hladinách významnosti $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) nebo $p \leq 0,001$ (***).</i>	53
<i>Obrázek 23 Vyhodnocení MTT testu pro polyanilin Statistická odlišnost byla stanovena testy ANOVA a Tuckey na hladinách významnosti $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) nebo $p \leq 0,001$ (***).</i>	54
<i>Obrázek 24 Vyhodnocení MTT testu pro polypyrol. Statistická odlišnost byla stanovena testy ANOVA a Tuckey na hladinách významnosti $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) nebo $p \leq 0,001$ (***).</i>	54
<i>Obrázek 25 Vyhodnocení MTT testu pro monomer azulenu. Statistická odlišnost byla stanovena testy ANOVA a Tuckey na hladinách významnosti $p \leq 0,05$ (*), $p \leq 0,01$ (**) nebo $p \leq 0,001$ (***).</i>	55

<i>Obrázek 26 Fibroblasty NIH/3T3 na referenčním povrchu (tkáňový plastik). Modrá barva – jádro, červená barva – cytoskelet</i>	<i>56</i>
<i>Obrázek 27 Fibroblasty NIH/3T3 na povrchu pokrytém polyazulenovým filmem (tkáňový plastik). Modrá barva – jádro, červená barva – cytoskelet.....</i>	<i>56</i>
<i>Obrázek 28 Fibroblasty NIH/3T3 na povrchu pokrytém polypyrolovým filmem (tkáňový plastik). Modrá barva – jádro, červená barva – cytoskelet.....</i>	<i>57</i>
<i>Obrázek 29 Embryonální kmenové buňky ES R1 na referenčním povrchu (tkáňový plastik).Modrá barva – jádro, červená barva – cytoskelet.....</i>	<i>57</i>
<i>Obrázek 30 Embryonální kmenové buňky ES R1 na polyazulenovém povrchu (tkáňový plastik).Modrá barva – jádro, červená barva – cytoskelet.....</i>	<i>58</i>
<i>Obrázek 31 Embryonální kmenové buňky ES R1 na polypyrolovém povrchu (tkáňový plastik).Modrá barva – jádro, červená barva – cytoskelet.....</i>	<i>58</i>

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1 Příprava extraktů</i>	46
<i>Tabulka 2 Příprava extraktů</i>	47
<i>Tabulka 3 Rozvržení destičky</i>	48
<i>Tabulka 4 Destička pro polyazulen a kontrolní membránu</i>	48