

Povrchové modifikace polyanilinových filmů

Bc. Lucie Musilová

Diplomová práce
2016



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství polymerů

akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Musilová**
Osobní číslo: **T14473**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství polymerů**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Povrchové modifikace polyanilinových filmů**

Zásady pro vypracování:

Studentka se seznámí s dosud publikovanými studiemi o povrchových vlastnostech polyanilinu, možnostech jeho povrchové modifikace a charakterizace. V návaznosti na takto získané informace naplánuje a provede sérii experimentů za účelem změny interakce buněk a polyanilinových filmů. Takto upravené filmy následně charakterizuje z hlediska jejich povrchových a biologických vlastností. Studentka se detailně seznámí s prací v laboratoři buněčných kultur a s metodami syntézy, modifikace a charakterizace polyanilinových filmů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

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

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

DAVID A.P. BIZIOS R. Biological Interactions on Material Surfaces. ISBN 978-0-387-98160-4

Vedoucí diplomové práce:

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

Datum zadání diplomové práce:

15. ledna 2016

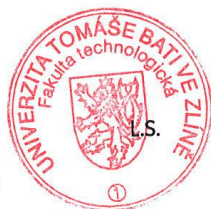
Termín odevzdání diplomové práce:

16. května 2016

Ve Zlíně dne 1. března 2016



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



Ing. Lubomír Beníček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: MUSILOVÁ LUCIE

Obor: INŽENÝRSTVÍ
POLYMERŮ

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 5.5.2016


.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

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

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

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

²⁾ *zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:*

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

³⁾ *zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:*

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

(2) *Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.*

(3) *Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihledne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.*

ABSTRAKT

Diplomová práce je zaměřena na přípravu, modifikaci a charakterizaci filmů elektricky vodivého polymeru, polyanilinu. V teoretické části jsou uvedeny vlastnosti a možnosti přípravy polyanilinových filmů. V praktické části je popsáno, jak byly syntetizovány polyanilinové filmy, které byly dopovány různými kyselinami a povrchově modifikovány. Následně byly měřeny materiálové vlastnosti filmů, jako povrchová energie, měrná elektrická vodivost, pH stabilita, morfologie a drsnost. Dále byly stanoveny biologické vlastnosti filmů a to buněčná adheze, proliferace a migrace. Výsledky poskytují přehled o materiálových a biologických vlastnostech polyanilinových filmů.

Klíčová slova: Polyanilin, vodivé polymery, polyanilinový film, plazma, buněčná aktivita

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on the preparation, modification and characterization of electrically conductive polymer, polyaniline. The properties and various preparation techniques of polyaniline films are summarized in the theoretical part. The practical part describes synthesis of polyaniline films, their doping with various acids and their surface modifications. Material properties of films were characterized by surface energy, electrical conductivity, pH stability, morphology and roughness. Biological properties were determined by testing of cellular adhesion, proliferation and migration. The results provide an overview of the materials and biological properties of polyaniline films.

Keywords: Polyaniline, conductive polymers, polyaniline film, plasma, cellular activity

Na tomto místě bych ráda poděkovat vedoucímu diplomové práce a to panu doc. Ing. Petru Humpolíčkovi, Ph.D., za odborné vedení, užitečné rady a cenné informace k této diplomové práci. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Zdence Kucekové Ph.D., za pomoc při práci v laboratoři a dr. Ita Junkar za ochotu a pomoc s částí experimentální práce, která byla provedena ve Slovinsku.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 VODIVÉ POLYMERY	12
1.1 VODIVOST	12
1.2 PŘÍPRAVA VODIVÝCH POLYMERŮ	14
1.3 VLASTNOSTI A VYUŽITÍ VODIVÝCH POLYMERŮ	15
1.3.1 Polyacetylen	15
1.3.2 Polypyrrol.....	16
1.3.3 Polythiofen	16
1.3.4 Poly-para-fenylen.....	17
1.3.5 Poly-para-fenylen-vinylen.....	17
2 POLYANILIN	18
2.1 STRUKTURY POLYANILINU	18
2.2 POLYANILINOVÝ FILM	19
2.3 POLYANILINOVÝ KOLOID	19
2.4 POLYANILINOVÁ NANOVLÁKNA	20
2.5 SYNTÉZA POLYANILINOVÝCH FILMŮ	21
2.5.1 Chemická syntéza.....	21
2.5.2 Elektrochemická syntéza.....	22
2.6 DOPOVÁNÍ POLYANILINU	23
3 APLIKACE POLYANILINU	25
3.1 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ	25
3.1.1 Polyanilinové filmy	26
3.1.2 Polyanilinové kompozity a směsi.....	26
3.1.2.1 Biosenzory	27
3.1.2.2 Kosterní svalovina	28
3.1.2.3 Srdeční svalovina.....	29
3.1.2.4 Nervové tkáně	30
3.1.3 Kopolymery polyanilinu	31
3.2 BIODROPATIBILITA	32
3.3 ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINKY	33
3.4 BIODEGRABILITA.....	33
4 BUNĚČNÉ INTERAKCE	35
4.1 BUNĚČNÁ INTERAKCE VE 2D A VE 3D.....	35
4.1.1 Buněčné integriny	37
4.1.2 Adheze k povrchu	38
4.1.2.1 Sérový albumin	39
4.2 ÚPRAVA POVRCHU PLAZMOU	39
5 CHARAKTERIZACE PANI FILMŮ	41
5.1 BIOLOGICKÁ CHARAKTERIZACE	41
5.1.1 <i>In vitro</i>	41
5.1.1.1 Buněčné kultury	42

5.2	TOPOGRAFIE.....	43
5.2.1	Mikroskopie atomárních sil.....	43
5.2.2	Možnosti analýzy	44
5.2.2.1	Kontaktní režim	44
5.2.2.2	Bezkontaktní režim.....	44
5.2.2.3	Pokleповý režim	45
5.2.3	Skenovací elektronový mikroskop.....	45
5.3	POVRCHOVÁ ENERGIE	45
5.4	ULTRAFIALOVO-VIDITELNÁ SPEKTROSKOPIE	46
II	PRAKTICKÁ ČÁST	47
6	MATERIÁL A METODIKA	48
6.1	POUŽITÉ BUNĚČNÉ KULTURY.....	48
6.2	PŘÍSTROJE	48
6.3	HOVĚZÍ SÉROVÝ ALBUMIN	48
7	EXPERIMENT	49
7.1	PŘÍPRAVA EXPERIMENTU.....	49
7.1.1	Kultivace a trypsinizace	50
7.1.2	Příprava filmu PANI hydrochloridu.....	50
7.1.3	Příprava PANI báze.....	51
7.1.4	Příprava PANI dopovaných různými kyselinami	51
7.1.5	Příprava hovězího sérového albuminu	51
7.1.6	Sterilizace plastiku pro tkáňové kultury.....	52
7.1.7	Ošetření plazmou	52
8	VÝSLEDKY	53
8.1	TEST BUNĚČNÉ PROLIFERACE	53
8.2	TEST BUNĚČNÉ MIGRACE.....	57
8.3	TEST BUNĚČNÉ ADHEZE NA VZORCÍCH UPRAVENÝCH PLAZMOU.....	60
8.4	TEST PROLIFERACE NA POVRŠÍCH MODIFIKOVANÝCH BSA	61
8.5	STANOVENÍ VODIVOSTI POLYANILINOVÝCH FILMŮ	64
8.6	STANOVENÍ POVRCHOVÉ ENERGIE POLYANILINOVÝCH FILMŮ	64
8.7	VLIV POVRCHOVÉ ÚPRAVY PLAZMOVÝM VÝBOJEM NA VODIVOST A TOPOGRAFII	65
8.8	MIKROSKOPIE ATOMÁRNÍCH SIL.....	66
8.9	UV-VIS	69
9	DISKUZE	72
	ZÁVĚR	76
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	77
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	88
	SEZNAM OBRÁZKŮ	89
	SEZNAM GRAFŮ	91
	SEZNAM TABULEK.....	92

ÚVOD

Makromolekulární látky polymerního charakteru jsou zastoupeny převážně elektricky nevodivými polymery, ale patří sem i několik zástupců, které se svou měrnou elektrickou vodivostí rovnají polovodičům. Jedním z nich je polyanilin, který je díky svým vlastnostem a možnostem aplikací stále více studovanou látkou.

Polyanilin existuje v několika strukturních formách, ovšem nejzajímavější je vodivá emeraldinová sůl. Tuto zelenou vodivou formu polyanilinu lze připravit několika způsoby například jako film, koloid, prášek nebo nanovlákna. Teoretická část práce je zaměřena zejména na polyanilinové filmy, jejich přípravu, možnosti dopování, vlastnosti a oblasti aplikace. Z aplikačního hlediska jsou popsány zejména možnosti využití polyanilinu v tkáňovém inženýrství, neboť právě pro tkáň jako jsou svalová a nervová je polyanilin vhodným kandidátem.

V praktické části je popsána příprava polyanilinových filmů s následnou protonací různými kyselinami. Polyanilinové filmy byly dále povrchově modifikovány, přičemž byly použity povrchové modifikace zvyšující možnosti použití polyanilinu v tkáňovém inženýrství a následně byly tyto povrchy charakterizovány. Na těchto filmech pak byly studovány biologické vlastnosti, jako je proliferace, adheze a migrace buněčné linie myších fibroblastů. Byla stanovena jejich elektrická vodivost, povrchová energie, drsnost a morfologie povrchu.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VODIVÉ POLYMERY

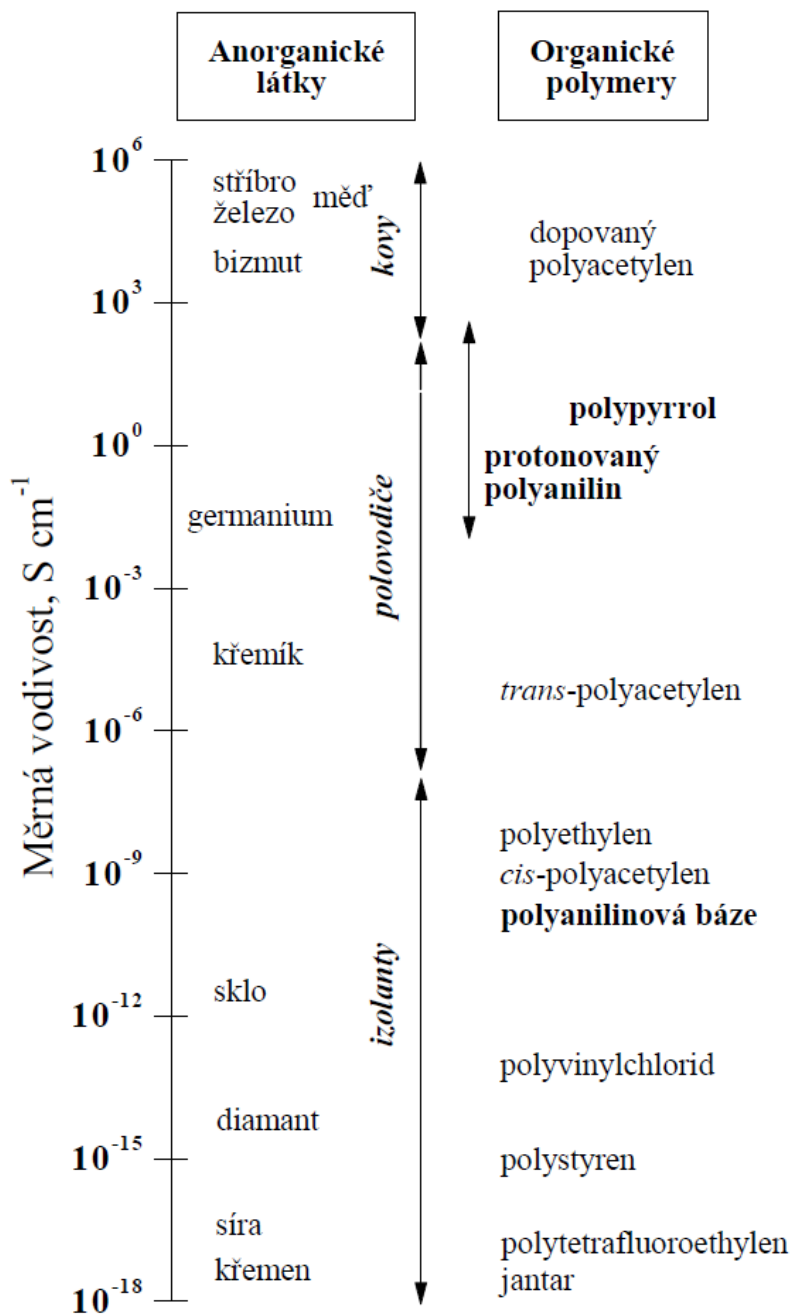
Vodivými polymery rozumíme látky, u kterých se kombinují zpracovatelské vlastnosti polymerů s elektrickými vlastnostmi polovodičů. K jejich výraznému rozvoji došlo v okamžiku, kdy se roku 1977 zjistilo, že lze polyacetylen dopovat jodem. Halogenací *trans*-polyacetylenu došlo ke zvýšení elektrické vodivosti o několik řádů (Shirakawa et al., 1977). Přestože měl polyacetylen poměrně vysokou měrnou vodivost ($38 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$), díky jeho omezené stabilitě se začala věnovat pozornost dalším vodivým polymerům se snadnější syntézou a lehce ovlivnitelnými elektrickými vlastnostmi. Od běžných nevodivých polymerů, které jsou nasycené a mají pevně vázané valenční elektrony, se ty vodivé liší tím, že vykazují vlastní elektrickou vodivost. Ta je umožněna díky systému konjugovaných dvojných vazeb, ve kterých se vyskytují π -elektrony zodpovídající za přenos náboje. Na řetězci dojde k delokalizaci elektronů, která je umožněna překrytím orbitalů π -vazeb podél řetězce. Delokalizace pak umožňuje přenos náboje po polymerním řetězci (Prokeš, Stejskal a Omastová, 2001). Mezi nejznámější představitele vodivých polymerů patří polyacetylen, polypyrrol, polyfenylen či polythiofen, přičemž pozornost je v současnosti věnována také polyanilinu (PANI), který si ji zasloužil díky své stabilitě, ovlivnitelné elektrické vodivosti, jednoduché syntéze a redoxním vlastnostem (Quazi, Rai a Boccaccini, 2014).

1.1 Vodivost

Schopnost materiálu vést proud nazýváme vodivost. Tuto vlastnost popisuje fyzikální veličina konduktivita nebo také měrná elektrická vodivost. Měří se v jednotkách Siemens (S) na jednotku vzdálenosti, kterou je nejběžněji centimetr. Vodivost je jedna z vlastností, která umožňuje využít vodivých polymerů v oblastech tkáňového inženýrství, zabývajících se elektrosenzitivními tkáněmi, jako jsou svaly, nervy a srdeční tkáň (Prokeš, Stejskal a Omastová, 2001).

Na obrázku č. 3 jsou pro lepší představu uvedeny hodnoty měrné vodivosti vybraných izolantů, polovodičů a vodičů. Elektrická vodivost souvisí s pásovou teorií a šířkou zakázaného pásu, tj. pásu mezi valenčním a vodivostním pásem. V případě izolantů je valenční pás zcela zaplněn a je od vodivostního oddělen širokým zakázaným pásem, pro jehož překonání je potřeba dodat značné množství energie. Naopak u vodičů valenční pás není zcela zaplněn a šířka zakázaného pásu je velmi malá (nulová), tedy jde snadno překonat. Polovodiče, stejně jako izolanty, mají prázdný vodivostní pás. Šířka zakázaného pásu ale není

tak široká, a proto mohou elektrony snáze přeskočit z valenčního pásu (Balint, Cassidy a Cartmell, 2014).



Obrázek 1 Elektrická vodivost vybraných anorganických látek a organických polymerů

(Stejskal, 2006, str. 2)

Jak již bylo uvedeno výše, za přenos vodivosti v polymerech jsou zodpovědné π -elektrony, které odpovídají pásům v polovodičích (Prokeš, Stejskal a Omastová, 2001). Šířka těchto zakázaných pásů má společně s teplotou vliv na vodivost polovodičů. Delokalizace

π -elektronů je umožněna díky p-orbitalům, které se překrývají a tím elektronům poskytují možnost pohybu mezi atomy (Balint, Cassidy a Cartmell, 2014).

Tabulka 1 Elektrická vodivost jednotlivých vodivých polymerů. Upraveno dle (Balint, Cassidy a Cartmell, 2014).

Polymer	Vodivost (S cm ⁻¹)
Polypyrrol	10 ² –7.5 × 10 ³
Polyanilin	30–200
Polythiophen	10–10 ³
Polyacetylen	10 ³ –1.7 × 10 ⁵
Poly(<i>p</i> -phenylen)	10 ² –10 ³
Poly(<i>p</i> -phenylenevinylen)	3–5 × 10 ³

1.2 Příprava vodivých polymerů

Vodivé polymery mohou být připraveny chemicky nebo také elektrochemicky, přičemž obě možnosti mají jak výhody, tak i nevýhody. Například vodivé polymery připravené elektrochemicky vykazují vyšší čistotu a vodivost než stejné polymery připravené chemicky (Balint, Cassidy a Cartmell, 2014). Mezi chemické syntézy patří kondenzační polymerizace, při které dochází k produkci nízkomolekulárního produktu (obvykle vody). Další chemickou metodou je adiční polymerizace, která může mít radikálový, aniontový nebo kationtový průběh. Výhodou chemické syntézy je možnost přípravy většího množství produktu (Guimard, Gomez a Schmidt, 2007).

Druhou možností je elektrochemická polymerizace. Při elektrochemické polymerizaci se využívá tři elektrody (pracovní, pomocná a referenční) v roztoku monomeru, rozpouštědla a příměsí. Po průchodu proudu přes roztok se na kladné elektrodě tvoří polymerní řetězce z monomeru. Výsledkem je tenká vrstva polymeru, jejíž tloušťku můžeme ovlivnit (Balint, Cassidy a Cartmell, 2014). Pro strukturní a elektrické vlastnosti je důležitá teplota, typ rozpouštědla, čas, elektrody a elektrolyt a množství produktu je limitováno geometrií elektrody (Guimard, Gomez a Schmidt, 2007). Podrobněji se syntéze budu věnovat dále v podkapitole 2.6.

1.3 Vlastnosti a využití vodivých polymerů

V posledních 30 letech se každým rokem zvyšuje zájem o vodivé polymery a s ním i počet jejich aplikací. Při srovnání s polovodiči jsou vodivé polymery zajímavé schopností měnit svou strukturu a s ní i vlastnosti v závislosti na okolním prostředí, což je možno využít v několika možných aplikacích (Freud a Deore, 2007). Příklady aplikací vodivých polymerů mohou být antikoroziní nátěry pro ochranu kovů (Baldisser a Ferreir, 2012) či antistatické povlaky ad. (Naarman, 2000).

Vodivé polymery jsou většinou hydrofobní a tato vlastnost je hlavním omezením k úspěšnému zachycení adhezních proteinů na jejich povrchu. Adheze proteinů je důležitá především pro aplikace v tkáňovém inženýrství. Nicméně, stále ještě není ujasněno jaké hodnoty nízké hydrofobnosti, drsnosti povrchu a vodivosti jsou optimální pro růst konkrétních buněčných linií (Ravichandran et al., 2010). Ačkoliv vodivé polymery mají poměrně dobré povrchové vlastnosti, pro aplikace v tkáňovém inženýrství by byla vhodnější menší křehkost, větší poddajnost a rozložitelnost (Guimard, Gomez a Schmidt, 2007). Více o této problematice bude řečeno v podkapitole 3.1 věnované tkáňovému inženýrství.

Vodivých polymerů je celá řada: Polypyrrole, Polyaniline, Poly(3,4-ethylenedioxythiophene), Polythiophen, Polythiophene-vinylene, Poly(2,5-thienylenevinylene), Poly(3-alkylthiophene), Poly(p-phenylene), Poly-p-phenylene-sulphide, Poly(p-phenylenevinylene), Poly(p-phenylene-terephthalamide), Polyacetylene, Poly(isothianaphthene), Poly(a-naphthylamine), Polyazulene, Polyfuran, Polyisoprene, Polybutadiene, Poly(3-octylthiophene-3-methylthiophene) a Poly(p-phenylene-terephthalamide). Nicméně těch významných a podrobněji zkoumaných je podstatně méně. Zkoumanými polymery jsou zejména ty, jež patří do skupiny polyheterocyklů, neboť vykazují dobrou stabilitu a vysokou vodivost. Do této skupiny patří právě polypyrrol, polyanilin a polythiofeny (Balint, Cassidy a Cartmell, 2014). V následujících podkapitolách bych se ráda krátce zmínila o vlastnostech a využití těchto nejvýznamnějších zástupců vodivých polymerů, přičemž polyanilinu bude věnována samostatná kapitola níže.

1.3.1 Polyacetylen

Polyacetylen byl prvním syntetickým vodivým polymerem a zároveň jde o nejjednodušší konjugovaný polymer. Poprvé byl připraven roku 1958 (Arsalani a Geckeler, 1995) jako černý prášek vysrážením z roztoku. Reakčními podmínkami, jako například teplotou, pH,

rozpouštědlem, lze ovlivnit morfologii konjugovaného polymeru. Je možné připravit prášek, gel, porézní hmotu nebo film, který lze i natahovat. Dopováním jódem lze dosáhnout měrné vodivosti až 10^{-5} S/cm. Nerozpustnost, netavitelnost a nestabilita na vzduchu představují problémy pro zpracování polyacetyleny. Tomuto problému bylo věnováno mnoho studií a rozpustný polyacetylen byl připraven substitucí halogenů (Kleist a Byrd, 1969). V tomto případě ovšem dojde ke snížení vodivosti, neboť se sníží délka konjugovaného řetězce (Organic Electronic Chemicals, 2008).

1.3.2 Polypyrrol

Polypyrrol (PPy) je jedním z nejvíce zkoumaných vodivých polymerů. Jeho řetězce jsou složeny z pyrrolových jader. Polymer lze snadno připravit chemicky i elektrochemicky. Chemicky může být polypyrrol připraven v kyselém prostředí oxidací peroxidem vodíku, přičemž vznikne nerozpustný černě zbarvený polymer. Elektrochemická syntéza probíhá ve vodném roztoku, kde polymer vzniká ve formě filmu na elektrodě, nicméně přesný průběh reakce není plně znám. Pro přípravu většího množství jsou vhodnější chemické polymerizace než elektrochemické (Prokeš, 2011). Mezi výhodné vlastnosti polypyrrolu patří snadná syntéza, komerční dostupnost, dobrá biokompatibilita *in vitro* i *in vivo*, schopnost vysoké elektrické vodivosti a chemická stabilita v prostředích jako je vzduch a voda (Ates et al., 2012). V současnosti se využívá v mnoha aplikacích, jako palivové články, antistatické povlaky, superkondenzátory, ochrana proti korozi, v počítačových displejích, mikrochirurgické nástroje, biosenzory a neuronové sondy (Balint, Cassidy a Cartmell, 2014).

1.3.3 Polythiofen

Polythiofenu se věnuje pozornost v posledních dvaceti letech a to především díky inertnosti k životnímu prostředí a tepelné stabilitě, což nabízí široké uplatnění. Polymery na bázi thiofenu mohou být využity v elektronice citlivé na světlo, neboť mohou reverzibilně měnit barvu zároveň se změnou redoxního stavu. Kombinací s polyalkylovými deriváty je možné dosáhnout lepší rozpustnosti a vyšší kapacity polythiofenu (Ates et al., 2012).

Dalšími zajímavými deriváty thiofenu jsou poly(3,4-etylendioxythiofen) (PEDOT) a polythiofenové deriváty (PTH). PEDOT vzniká polymerací bicyklického monomeru 3,4-etylendioxythiofenu. PEDOT má dobrou chemickou i elektrickou stabilitu a lepší vodivost a tepelnou stabilitu než polypyrrol. V současné době se PEDOT používá bioinženýrských

aplikacích např. v nervových elektrodách, náhradách srdečního svalu a jako biosenzory (Balint, Cassidy a Cartmell, 2014)

1.3.4 Poly-para-fenylen

V porovnání s ostatními vodivými polymery se poly(p-fenylen) (PPP) vyznačuje vysokou chemickou stabilitou i stabilitou na vzduchu. Navíc se od ostatních liší i přípravou. Není vyroben oxidační polymerací monomeru, ale nejběžněji je připravován oxidací benzenu s Friedel-Craftsovým katalyzátorem. Výsledkem takovéto reakce je polykrystalický prášek. Nejjednodušší poly(p-fenylen) je ale nerozpustný a nepoddajný, a proto se často používají deriváty substituované alkylovými skupinami. Tento polymer je také vhodný pro přípravu filmů a díky svým dobrým luminiscenčním vlastnostem je vhodný pro použití v organických LED (Organic Electronic Chemicals, 2008).

Poly(p-fenylendiamin) je derivátem PPP, který by také mohl nalézt využití v poli biomedicíny. Nedávno ale bylo zjištěno, že vykazuje cytotoxicitu a tím je omezeno jeho použití ve styku s buňkami a tkáněmi. Je zajímavé, že jeho analogický polymer poly(o-fenylendiamin) vykazuje lepší buněčnou adhezi, proliferaci a nevykazuje cytotoxicitu. To může být způsobeno odlišnou cytotoxicitou prekurzorů použitých při polymerizaci nebo odlišnou morfologií výsledných polymerů, která taktéž může ovlivňovat cytotoxicitu (Kucerkova et al., 2016).

1.3.5 Poly-para-fenylen-vinylen

Poly-para-fenylen-vinylen Patří mezi nejlépe rozpustné vodivé polymery a je vhodný pro přípravu tenkých filmů. Pokud je poly-para-fenylen-vinylen v orientovaném stavu, je krystalický, pevný a na vzduchu stálý. V porovnání s ostatními vodivými polymery má ale velmi nízkou vlastní vodivost. To lze zvýšit dopováním jódem, chloridem železitým, nebo kyselinami. Podobně jako PPP je vhodný pro elektronické aplikace, jako jsou fotovoltaické panely díky úzkému optickému zakázanému pásmu (Organic Electronic Chemicals, 2008).

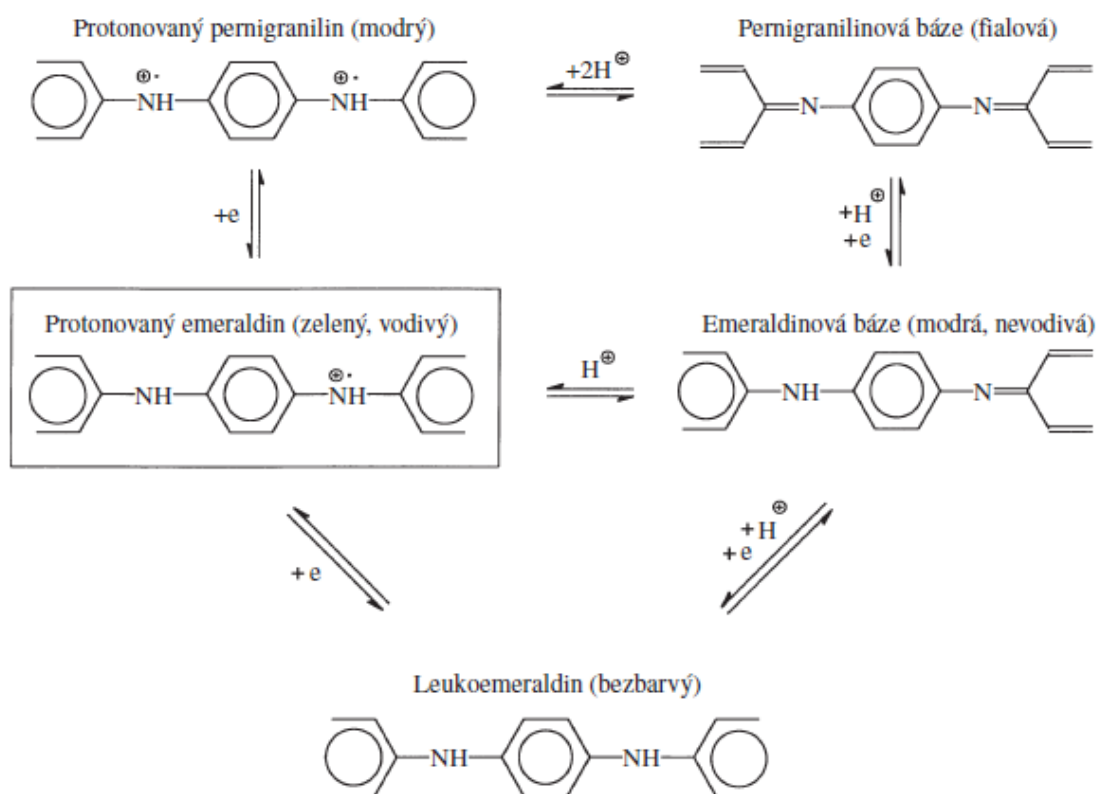
2 POLYANILIN

Polyanilin je polymerní materiál známý více než 150 let. Poprvé byl vytvořen roku 1840, kdy se J. Fritsche snažil získat nová syntetická barviva z indiga. Nicméně větší pozornosti se polyanilinu dostalo až v posledních 30-ti letech (Prokeš, Stejskal a Omastová, 2001). Výhodou polyanilinu ve srovnání s jinými vodivými polymery je, že anilin je poměrně levný a polymerizační proces je jednoduchý s vysokým výtěžkem. Vodivý polyanilin se vyznačuje dobrou chemickou stabilitou a zároveň relativně vysokými hodnotami elektrické vodivosti v rozmezí 5 – 15 S/cm. Elektrická vodivost polyanilinu je srovnatelná s hodnotami elektrické vodivosti polovodičů, které se pohybují v rozmezí 10^{-8} - 10^3 S/cm (Narkis et al., 2000). Díky těmto vlastnostem se polyanilin stal jedním z nejvíce studovaných vodivých polymerů poslední doby.

2.1 Struktury polyanilinu

Polyanilin je lineární polymer tvořený velkým množstvím monomerních jednotek – anilinu ($C_6H_5NH_2$) a může se vyskytovat v odlišných strukturních formách označovaných jako leukoemeraldin, protoemeraldin, nigranilin, pernigranilin a Esmeraldin (Pauley, 2000). Struktura jednotlivých forem je zobrazena na obrázku č. 1. Tyto formy se vzájemně liší svými chemickými i fyzikálními vlastnostmi (strukturou, stabilitou, zbarvením, vodivostí), které závisí na stupni oxidace či protonace. Nejčastější strukturou je zelená, vodivá sůl a modrá, nevodivá báze. Tyto dvě struktury na sebe mohou vratně přecházet při pH 5 – 6. Přejedou ze soli na bázi je dosaženo působením alkálií, což může být hydroxid amonný (Stejskal a Gilbert, 2002). V tkáních tento přechod může působit i problematicky. Pokud je pro danou aplikaci vyžadována vodivost a dojde k přechodu, polymer ztrácí vodivost a s ní i svou funkci. K tomu ale ve fyziologickém prostředí dojde, a proto je snaha vyvinout strukturu, která je stabilní při změně pH.

Strukturu polyanilinového produktu lze ovlivnit reakční teplotou. Při 20 °C je dosaženo amorfni struktury, kdežto při -50 °C dosáhneme semikrystalické struktury polyanilinu (Prokeš a Stejskal, 2004).



Obrázek 2 Formy polyanilinu (Prokeš, Stejskal a Omastová, 2001)

2.2 Polyanilinový film

Polyanilinový film vzniká v průběhu oxidační polymerace anilinu na substrátu, který je ponořen do reakční směsi. Povrch libovolného předmětu je následně pokryt tenkou vrstvou polyanilinu. Nejprve vznikají anilinové oligomery, které jsou hydrofobnější než původní anilinové kationty, a mají tedy tendenci oddělit se od vodného prostředí (Stejskal a Gilbert, 2002). Dochází k jejich adsorpci na povrch, který je v kontaktu s reakční směsí. Na oligomerech se pak polyanilinové řetězce tvoří přednostně a film následně roste, získává globulární vzhled a drsný povrch namísto původně hladkého povrchu (Stejskal a Sapurina, 2005). Tloušťka připraveného filmu závisí na zvolené metodě přípravy, o možnostech se zmíním v dalších podkapitolách. Vzniklý film má obvykle tloušťku v rozmezí 40 – 400 nm a může být připraven téměř na jakémkoliv povrchu, který je ponořen v reakční směsi a který je stálý v kyselém prostředí (Trchová et al., 2005).

2.3 Polyanilinový koloid

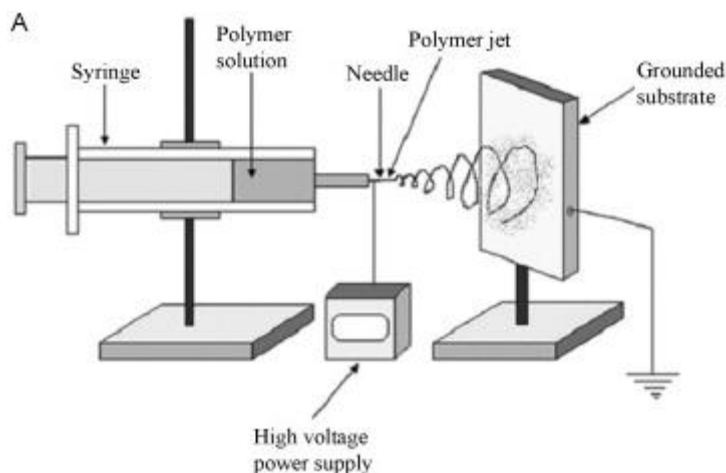
Polyanilinový koloid lze připravit polymerací anilinu ve vodném médiu obsahujícím vhodný, ve vodě rozpustný polymer, který má funkci stabilizátoru (například polyvinylpyrroloni-

don PVP). Princip růstu polymerního řetězce je obdobný jako v předchozím případě, kde roli pevného povrchu přebírá stabilizátor. Oligomery zde adsorbují na stabilizátoru za vzniku PANI jádra a následného růstu polymerního řetězce. Částice koloidního PANI mají nepravidelný tvar a jejich velikost je závislá na koncentraci stabilizátoru a stejně tak na koncentraci monomeru (Stejskal a Sapurina, 2005).

2.4 Polyanilinová nanovlákna

Metodou pro přípravu polyanilinových nanovláken je elektrostatické zvlákňování, kterému je věnováno stále více vědeckých studií. (Razak et al., 2015).

Principiálně jde o zvlákňování z jehly, přičemž samotná metoda je známá již od počátků 20. století. Z roztoku PANI báze jsou formovány nanovlákna a to s pomocí elektrického pole. Jehla/kapilára zde slouží jako jedna elektroda a druhou elektrodou pak kolektor, který vytvořené nanovlákna zachytává a je spojen se zdrojem vysokého napětí. Vysoké napětí je obvykle v rozmezí 10 – 30 kV a je v kontaktu s kapalinou (Beachleay a Wen, 2010). Díky tomuto napětí vzniká na povrchu kapaliny náboj. Dochází k deformaci povrchu kapaliny, čímž vzniká tzv. Taylorův kužel. Nabitý proud tekutiny je pak přitahován k uzemněnému kolektoru, který je v pevné vzdálenosti od kapiláry. V průběhu letu tekutiny dochází k odpaření rozpouštědla a na kolektor dopadají již suchá vlákna. Na morfologii vlákna má vliv celá řada faktorů a to procesní, systémové i okolní prostředí. Například elektrická vodivost roztoku, vzdálenost mezi elektrodami, průměr trysky, pohyb kolektoru, teplota a vlhkost vzduchu, ale také vlastnosti použitého materiálu, jako molekulová hmotnost, její distribuce, viskozita hustota ad (Razak et al., 2015). Mezi výhody této metody patří jednoduchá instalace, cenová dostupnost, vysoká kontrola průměru, mikrostrukturou a uspořádáním, vhodnost pro široké spektrum materiálů. Tento postup je navíc blízký biologickým postupům při vzniku nanovláken, jako je např. celulóza nebo kolagen. Nevýhodami jsou špatná infiltrace buněk dovnitř scaffoldů a používání často toxických rozpouštědel (Beachleay a Wen, 2010).



Obrázek 3 Schéma principu elektrostatického zvlákňování (Beachleay a Wen, 2010).

2.5 Syntéza polyanilinových filmů

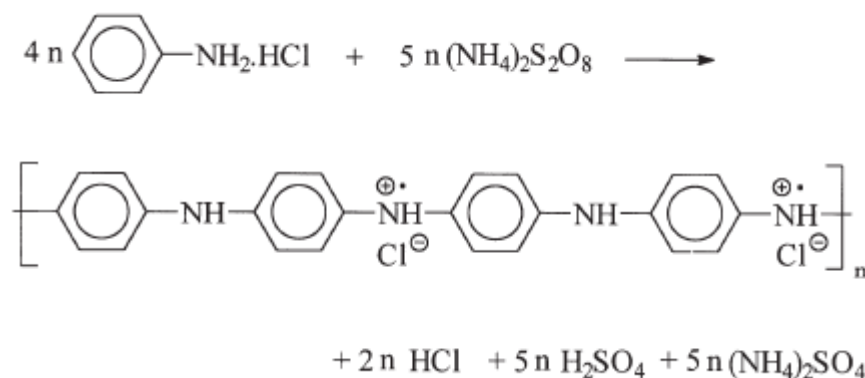
Při přípravě polyanilinových filmů jsou dvě možnosti. Můžeme zvolit chemickou, anebo elektrochemickou syntézu, které pak mají vliv na výslednou kvalitu a morfologii produktu. Pro výrobu prášků nebo silnějších filmů se používají chemické metody, naopak pro velmi tenké filmy se volí metoda elektrochemická.

2.5.1 Chemická syntéza

Nejběžněji se PANI připravuje chemickou metodou. Polyanilin je možné připravit jako film, prášek nebo koloidní disperzi. Syntéza polyanilinu je poměrně jednoduchá a levná zároveň. Běžně se polyanilin syntetizuje oxidací anilinu hydrochloridu peroxydvojsíranem amonným dle obrázku č. 2. V praxi se rozpustí zvláště anilin hydrochlorid ve vodě a peroxydvojsíran amonný také ve vodě. Oba roztoky o stejných objemech se smíchají a dojde k polymerizaci, během které se barva směsi mění z modré na tmavě zelenou. Jelikož se jedná o exotermickou reakci, není možné připravovat směs ve velkém objemu. Takto připravený film se oplachuje zředěnou kyselinou chlorovodíkovou, přičemž dojde k odplavení sraženin, zbytků monomeru a poté se film opláchne acetonem. Vzniklý film polyanilin hydrochloridu má měrnou vodivost $5 \text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$ (Prokeš, Stejskal a Omastová, 2001).

Výhodou chemické syntézy je možnost přípravy většího množství polymeru a širší možnosti modifikace polymerního řetězce. Nevýhodou ovšem je, že nelze připravit velmi tenké filmy a také komplikovanější syntéza (Guimard, Gomez a Schmidt, 2007). Při polymeraci

dochází k vzrůstu teploty reakční směsi z 20 °C na 38 °C, což při použití koncentrací nad 1 M, či větším množství reakční směsi může vést až k explozi (Stejskal a Gilbert, 2002).



Obrázek 4 Syntéza PANI z anilinu hydrochloridu a peroxydvojsíranu amonného (Stejskal a Gilbert, 2002).

2.5.2 Elektrochemická syntéza

Pro přípravu vodivého polymeru je nutné použít monomery schopné oxidace či redukce při tvorbě polymeru. V případě elektrochemické syntézy se častěji polymer připravuje v oxidačním režimu, neboli elektrochemickou anodickou oxidací a redukční katodická polymerace se používá ojedinelé. PANI se připravuje oxidací anilinu peroxydvojsíranu v kyselém prostředí. Nejčastěji se polymerace provádí pomocí tří elektrod v roztoku monomeru, vodného rozpouštědla a elektrolytu. Při průchodu proudem roztokem dochází k vysrážení polymeru na kladně nabitě elektrodě (anodě). Monomery na povrchu elektrody podstoupí oxidaci za vzniku radikál kationtu a ty reagují s jinými monomery nebo radikál kationty za vzniku nerozpustného polymerního řetězce na povrchu elektrody (Guimard, Gomez a Schmidt, 2007). Velkou výhodou této metody je, že výsledkem je již nadopovaný vodivý polymer, do něhož se dopanty (ionty opačného náboje než má řetězec polymeru), dostávají z kyselého elektrolytického média. Na výsledné vlastnosti má vliv použité rozpouštědlo a elektrolyt, pH, koncentrace monomeru, použitý proud, teplota, materiál a struktura povrchu elektrod (Stejskal, 2006).

Mezi další výhody elektrochemické syntézy patří možnost přípravy velmi tenkých filmů, jednoduchost syntézy a čistota připravených filmů. Navíc lze řídit rychlost polymerace a tloušťku připravovaného polymeru. Nevýhodami je obtížné odstranění připraveného filmu z povrchu elektrody a obtížná modifikace výsledného vodivého polymeru (Guimard, Gomez a Schmidt, 2007).

2.6 Dopování polyanilinu

Pro vznik vodivosti je ale obvykle nutno využít tzv. dopování pomocí sloučenin, které způsobí oxidaci (vznik kladného náboje odebráním elektronů) nebo redukci (vznik záporného náboje dodáním elektronů) polymeru (Malhotra a Singhal, 2003). Oxidace nebo redukce je tedy prováděna prostřednictvím aniontů nebo kationtů, které pak můžeme označit jako dopující látky. Dopováním polyanilinové báze organickou nebo anorganickou kyselinou dojde k dodání nebo odebrání elektronů do/od polymerního řetězce a k vytvoření polaronu nebo bipolaronu, které po aplikaci napětí putují po řetězci a tvoří elektrický proud. V PANI soli jsou tedy přítomny anionty, které vyvažují kladný náboj PANI řetězce. Přítomný anion je odvozen od kyseliny, která byla použita při dopování. Použitá kyselina a její koncentrace mají dále vliv na výslednou vodivost PANI filmu (Kohl a Kalendová, 2014).

Zatímco emeraldinová báze má poměrně nízkou měrnou elektrickou vodivost (10^{-10} S.cm⁻¹), sůl vytvořená změnou oxidačního stavu báze má měrnou elektrickou vodivost mnohem vyšší (30 S.cm⁻¹) (Balint, Cassidy a Cartmell, 2014). Je tedy patrné, že dopováním můžeme zvýšit měrnou vodivost polyanilinu až o 10 řádů (Prokeš, Stejskal a Omastová, 2001). Přesná vodivost závisí na způsobu přípravy a také na použité kyselině pro vznik soli, obsahu vody, příměsích, délce řetězců polymeru a jeho krystalizaci. Nárůst vodivosti při přeměně báze na sůl je vysvětlován změnou molekulární struktury polymeru. (Das, Datta a Contractor, 2014). Ve formě báze jsou řetězce svinuté, kdežto ve formě soli jsou díky vzniklému pozitivnímu náboji rozvinuté, neboť se řetězce odpuzují. Po rozvinutém řetězci se elektrony snadněji delokalizují a tím vodivost roste. Bylo zjištěno, že při fyziologických podmínkách si PANI dokázal udržet vodivost po dobu 100 hodin (Balint, Cassidy a Cartmell, 2014).

Kyseliny použité při dopování neovlivňují pouze vodivost, ale mohou mít vliv i na další povrchové vlastnosti připravených filmů. Použitím vhodných kyselin mohou filmy například získat antikoagulační účinky. Toho lze docílit methakrylovými kopolymerem, které obsahují funkční skupiny (sulfonové, karboxylové) podobné jako heparin, jež je známý právě svými antikoagulačními vlastnostmi (Humpolíček et al., 2015). Jednou z těchto kyselin je například poly(2-akrylamido-2-methyl-1-propansulfonová kyselina) (PAMPSA), která byla také použita v rámci mé diplomové práce.

Na vodivost polyanilinu mají vliv reakční podmínky. Pokud například použijeme při polymeraci kyselinu chlorovodíkovou v nadbytku, produkt má lepší vodivost a navíc reakce

probíhá rychleji. Stejně tak, pokud snížíme reakční teplotu na 0 – 2 °C, připravený PANI bude mít vodivost téměř dvojnásobnou. Pokud ale PANI připravíme ve větším množství, jeho vodivost se sníží, což pravděpodobně souvisí s vyšší reakční teplotou (Stejskal a Gilbert, 2002).

Pro dopování mohou být použity i jiné možnosti, než jsou chemická činidla. Lze využít i elektrochemické dopování, při kterém bude polymer připojen k elektrodě. Princip elektrochemického dopování je obdobný chemickému, pouze se zde pro provedení oxidace nebo redukce použije vnější zdroj napětí (Freund a Deore, 2007).

3 APLIKACE POLYANILINU

Polyanilin může být využit v řadě různých odvětví. Příkladem jeho aplikací mohou být povlaky odolné proti korozi (Mirmohseni a Oladegaragoze, 2000), flexibilní displeje (Kelly et al., 2013), lehké baterie (Gurunathan, Amalderkar a Trivedi, 2003), kondenzátory (Lu et al., 2007), elektrolyty (Tang et al., 2012), světelné diody (Jang, Ha a Kim, 2008), anti-statické vrstvy (Soto-Ovideo et al., 2006), v mikroelektronice (Beh et al., 1999), fotovoltaických článcích (Bejbouji et al., 2010), nebo na elektromagnetické stínění (Dhawan, Singh a Rodrigueus; 2003) díky pohlcování infračerveného a mikrovlnného záření (Pauley, 2000).

Možných aplikací polyanilinu je velmi mnoho a není možné je zde všechny popsat. Nicméně, lze konstatovat, že polyanilin může nalézt uplatnění v elektromechanice, elektronice, v oblasti antistatických materiálů, senzorů a biosenzorů, světlo emitujících a zobrazovacích zařízení a v mnoha dalších oblastech. Využití při ochraně proti korozi může najít využití i na raketoplánech ve vesmíru nebo odpalovacích rampách, na kterých díky kyselým výfukovým plynům dochází ke korozi. Polyanilin je zde výhodný, neboť je použit v tenké vrstvě, která konstrukci nezatíží a zároveň zabrání prostupu elektronů ke kovu, takže nedojde k oxidaci (Mirmohseni a Oladegaragoze, 2000). Zajímavou oblastí využití polyanilinu jsou i displeje využívající organických elektroluminiscenčních diod (OLED), které mají vysoké rozlišení a nepotřebují podsvícení. Další oblastí v elektronice jsou integrované obvody, které lze ohnout do pravého úhlu, aniž by došlo ke ztrátě funkčnosti, čímž se značně liší od součástek z anorganických materiálů (Jang, Ha a Kim, 2008).

Avšak možnosti použití jsou omezeny špatnou zpracovatelností, kvůli špatné rozpustnosti v běžných rozpouštědlech a nemožnosti převodu do taveniny. Další omezení souvisí s výslednými mechanickými vlastnostmi, které se ale dají vylepšit smícháním s jiným konvenčním polymerem, jenž umožní lepší zpracovatelnost a fyzikální vlastnosti (Narkis et al., 2000).

3.1 Tkáňové inženýrství

Oblast tkáňového inženýrství má za cíl regeneraci či náhradu poškozených nebo zničených tkání. Scaffold by měl napodobit vlastnosti a strukturu orgánu a funkci extracelulárního matrix pro podporu buněčného růstu. Je tedy zřejmé, že se nejedná o jednoduchou disciplínu, ale naopak o vysoce komplexní (Quazi, Rai a Boccaccini, 2014). Materiál, který má

být použit v lidském těle musí splňovat mnoho vlastností a kritérií zároveň a další požadavky, které souvisí se zamýšlenou aplikací jako je smáčivost, mechanická tuhost, pružnost, struktura povrchu ad. Například pro použití materiálu v tkáních jako jsou nervy, kosterní svalovina a srdeční svalovina je vhodná elektrická vodivost materiálu, neboť právě elektrická vodivost je jednou z klíčových vlastností pro správnou funkci výše zmíněných tkání. Navíc bylo prokázáno, že elektrické podněty mohou vyvolat žádoucí buněčné odezvy (Balint, Cassidy a Cartmell, 2014).

Dále je důležitá hydrofilita materiálu, která může být zlepšena vhodnou povrchovou modifikací. Například ošetření povrchu plazmou. Co se týče polyanilinu, tak ten může být využit jako substrát pro buněčnou stimulaci, jako biosenzory, bio-pohony, nosiče léků, multifunkční nanovlákna, anti-bakteriální substráty a v dalších aplikacích (Quazi, Rai a Boccaccini, 2014). Význam má také pro srdeční tkáňové inženýrství a diferenciaci myoblastů i neuronů (Moura a De Quieroz, 2011).

3.1.1 Polyanilinové filmy

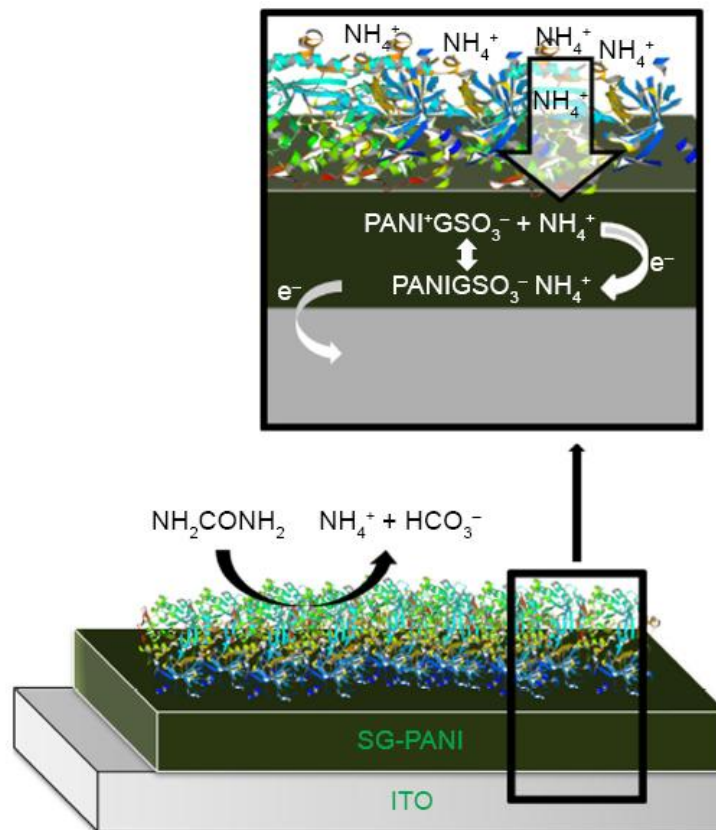
Samotný polyanilin nemá mnoho využití v oblasti tkáňového inženýrství. Jednou z aplikací samotného vodivého PANI filmu lze uvést řízení buněčného chování skrze elektrickou signalizaci. Jednou z výhod použití polymerů v tkáňovém inženýrství je možnost použití širokého spektra povrchových modifikací. Stejně tak v případě PANI filmu, mohou být na povrch absorbovány nebo chemicky navázány biomolekuly, například pro lepší porostení scaffoldů buňkami po povrchové úpravě PANI filmem (Quazi, Rai a Boccaccini, 2014). U čistých polyanilinových filmů vzniká problém se změnou pH. Změnou pH totiž dochází ke ztrátě vodivosti filmů. Dalším problémem je křehkost filmů a tedy špatné mechanické vlastnosti. Tento problém lze ale zlepšit použitím polyanilinových kompozitů.

3.1.2 Polyanilinové kompozity a směsi

Polyanilin v kombinaci s jinými biokompatibilními a biodegradovatelnými polymery může tvořit vodivé kompozity s ovlivnitelnými mechanickými a fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Možnost měnit mechanické vlastnosti jako je pevnost a elongace souvisí se změnou obsahu PANI. Výsledný kompozit může přesně napodobovat vlastnosti nativní tkáně, a proto může být využit pro její regeneraci nebo nahrazení (Quazi, Rai a Boccaccini, 2014).

3.1.2.1 Biosenzory

Jedním ze zařízení, kde se dá PANI využít, jsou biosenzory. Jde o zařízení monitorující a diagnostikující metabolity (glukóza, hormony, neurotransmitery, protilátky, antigeny) pro klinické účely. Biosenzor je složen ze snímacího prvku, tedy biologicky citlivé částice (biomolekula) a převodníku. Snímací prvek reaguje se zkoumanou látkou, přičemž dochází k produkci signálu (elektrony, hmotnost, světlo, teplo atd.), který je přenášen převodníkem a ten zároveň mění tento signál na elektrický (Balint, Cassidy a Cartmell, 2014). Vodivé polymery jsou široce využívány v biosenzorech, neboť mohou integrovat signály produkované biologickým snímacím prvkem, jako jsou například enzymy. Předpokládá se, že vodivý polymer zprostředkuje přenos elektronů mezi enzymem (oxidáza, dehydrogenáza) a konečnou elektrodou. Co se týče polyanilinu, může být využit v biosenzorech pro stanovení hladiny medicínsky důležitých látek, jako je koncentrace glukózy nebo cholesterolu v krevním oběhu (Guimard, Gomez a Schmidt, 2007). Například Andreau et al. (2005) popsali ve svém článku využití polyanilinu pro stanovení vitamínu C, díky absorpční změně polyanilinu při světelném záření o vlnové délce 700 nm. Dále bylo využito tenkého vodivého PANI filmu na destičce ze skla, oxidu india a cínu. Na tuto destičku lze imobilizovat cholesterol oxidázu, a tudíž může být využita jako biosenzor cholesterolu (Dhand et al., 2007).



Obrázek 5 Strukturální model biosenzoru. ITO – cínový oxid india, SG – sulfonovaný grafen. (Das a Yoon, 2015).

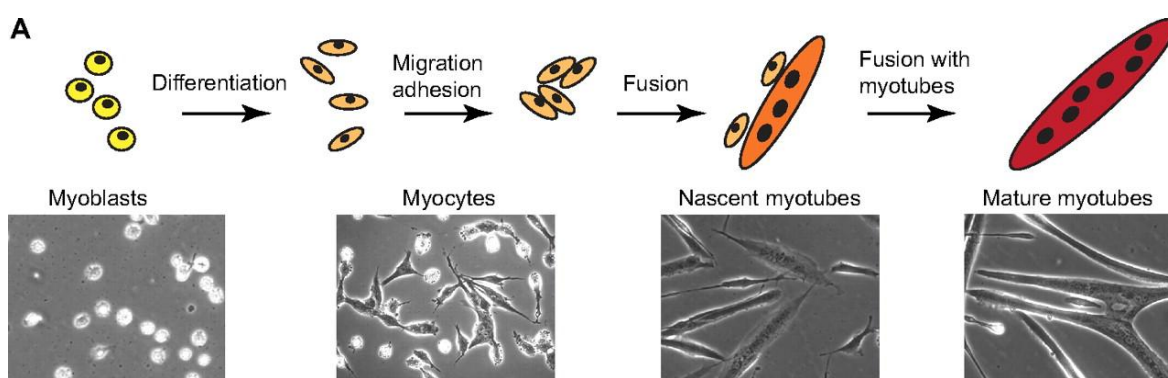
3.1.2.2 Kosterní svalovina

Další významnou aplikací PANI jako kompozitního materiálu v rámci tkáňového inženýrství je kosterní svalovina. Konkrétně tedy podpora diferenciací myoblastů na svalové buňky, které jsou nezbytnou součástí pro dobrou funkci svalu (Jun, Jeong a Shin, 2009). Průběh diferenciací myoblastů na svalové buňky je znázorněn na obrázku 6. Výchozí buňkou, která vede ke vzniku svalových vláken je myoblast. Myoblasty jsou jednojaderné vřetenovité buňky. Myotuby jsou mnohoaderné válcovité trubice, vzniklé splýváním myoblastů. Myofibrily vznikají činností organel ležících v sarkoplasmě myotub. Při další diferenciaci putují jádra k povrchu myotuby a myofibrily do centra. Myotuba tak dokončí vývoj ve svalové vlákno, které již není již schopné dělení (Abmayr a Pavlath, 2012).

Vlákna připravená elektrostatickým zvlákněním musí napodobit funkci i tvar příčně pruhované svaloviny. V *in vitro* studiích bylo dokázáno, že topografie vláken může aktivovat specifické funkce a napomocť regeneraci tkáně v *in vivo* (Jeong et al., 2008). Podobně se mohou využít kompozitní PANI vlákna při diferenciaci kmenových buněk na speciální

zované buňky (Lee, 2013). Zhang et al., 2016 zjistili, že elektrická stimulace zlepšuje osteogenní diferenciaci na mezenchymálních kmenových buňkách tukové tkáně. Buňky na filmu z polypyrrolu a polykaprolaktonu byly vystaveny stejnosměrnému proudu 200 μA 4 hodiny denně po dobu 21 dní. Zlepšení diferenciaci nastalo v důsledku změny otevření napětově řízených iontových kanálů.

Polyanilin při změně redoxních stavů může procházet objemovou změnou, čímž se nabízí k aplikacím jako umělé svaly. Podobně jako sval v těle, je PANI schopen vyvinout mechanickou sílu založenou na chemické reakci ve fyziologickém prostředí. Využití PANI je zde výhodné zejména proto, že pomocí nízkého napětí dojde k vysoké a rychlé deformaci. Vhodná je například kombinace PU/PANI, neboť polyuretanová vlákna jsou pevná, ale pružná a jsou použita jako šablona při chemické polymerizaci polyanilinu, čímž je jeho příprava poměrně usnadněna. Velký povrch jednotlivých vláken pokrytých PANI spolu s vysokou porézností dovolují efektivní začlenění iontů z elektrolytu popř. fyziologického prostředí. To způsobuje vysoké napětí a vysokou kapacitu náboje (Gu et al., 2009).



Obrázek 6 Diferenční kaskáda svalového vlákna. Upraveno dle Abmayr a Pavlath, 2012.

3.1.2.3 Srdeční svalovina

Polyanilin je také vhodným kandidátem na tvorbu tkáně s mezi-buněčnou komunikací, které je potřeba jako náhrada poškozené tkáně po infarktu myokardu. Buňky srdeční svaloviny potřebují být propojené pro šíření elektrických signálů (Li et al., 2002). K poškození této tkáně dochází právě po infarktu myokardu. Použitím PANI s jinými polymery (např. polyglycerol-sebakát) dojde ke zvýšení jeho biokompatibility. Díky svým vodivým a biologickým vlastnostem mohou kompozity zabezpečit účinnější stimulaci buněk a regeneraci myokardu (Borriello et al., 2011).

Srdce savců je tvořeno přirozeně vodivými vlákny (v řádu 10^{-4} S/cm) a dále je tvořeno, uzly a shluky buněk, které spolu s vlákny tvoří elektricky vodivý systém. Elektrické impulzy vychází ze sinatoriálního uzlu, který se nachází v pravé síni a jsou přenášeny dál myokardem přes atrioventikulární uzel a sítě Purkyňových vláken. Porézní scaffoldy, které jsou v současnosti používány v srdečním tkáňovém inženýrství, jsou elektricky nevodivé a zabraňují tedy komunikaci mezi přisedlými buňkami, a také mezi buňkami a nativní tkání. Řešením tohoto problému může být začlenění vodivých prvků do scaffoldů. Jedním z těchto prvků může být i polyanilin. Jak uvádí Quazi, Rai a Boccaccini et al., 2014 z polyanilinu a želatiny byly připraveny kompozitní nanovlákná a byly osazeny buněčnou linií krysích srdečních myoblastů (H9c2). Buňky se na nanovlákná snadno přichytily a v porovnání s kontrolou rychle proliferovaly. Vyšší proliferace byla způsobena vyšší plochou povrchu pro ulpívání buněk, která je dána nonovláknitou strukturou v porovnání s hladkým povrchem používaných scaffoldů. Navíc mezi pozitivně nabitými vodivými vlákny a záporně nabitými proteiny působí elektrická přitažlivost, která způsobuje zvýšenou adsorpci adhezních proteinů fibronektinu a lamininu. Tyto adhezní proteiny podporují následnou buněčnou adhezi (Li et al., 2006). Dále byly kultivovány kardiomyocyty krysích embryí, které byly podrobeny elektrické stimulaci (10 – 40 V, 5 Hz, 5 ms). Po 72 hodinové kultivaci bylo na filmu pouze 30 % životaschopných buněk, kdežto na nanovlákněch 75 % životaschopných buněk (Fernandez, Zucolotto a De Queiroz, 2012).

Nanovláknenné vodivé scaffoldy by tedy mohly být použity ke stimulaci kardiomyocytů pro synchronizované bití, před použitím *in vivo* jako srdeční náplast. Tímto krokem dojde k usnadnění elektrofyzilogického spojení mezi nativní tkání a použitými buňkami (Li et al., 2002).

3.1.2.4 Nervové tkáně

Další neméně významnou aplikací jsou nervové tkáně. Nervový systém funguje díky neuronům, které přenáší elektrický signál vysokou rychlostí. Polyanilin patří mezi elektroaktivní materiály, a proto lze vhodně využít při vývoji scaffoldů pro lepší buněčné osazení, proliferaci buněk, rychlejší regeneraci tkáně a zároveň umožňuje předávat elektrický signál (Ghasemi-Mobarakeh et al., 2011). Polyanilin umožňuje výbornou kontrolu elektrických stimulů, mají dobré elektrické vlastnosti a vysoký poměr vodivosti a hmotnosti. Přičemž elektrická stimulace vodivých polymerů je relativně jednoduchá metoda proveditelná jak *in vivo*, tak *in vitro*. Chování vzrušivých buněk, jako jsou i nervové buňky, může být modi-

fikováno použitím elektrického proudu prostřednictvím dvou vnějších elektrod. Proud jdoucí mezi elektrodami pak způsobí depolarizaci membrány nervových buněk. Vodivé polymery ve formě folie nebo jako scaffold mohou být použity jako anoda a například zlatý drát jako katoda, pro elektrickou stimulaci buněk (Balint, Cassidy a Cartmell, 2014).

Příznivé mechanické vlastnosti s pevností tahu odpovídající myšimu nervu bylo dosaženo kompozitními vlákny z PANI a směsi želatiny s polykaprolaktonem. Tato kombinace také vykazovala dostatečnou vodivost pro možnost elektrické stimulace a díky přítomnosti dvou biodegradovatelných polymerů je také možné řídit rychlost rozkladu (Quazi, Rai a Boccacini, 2014).

Dále, jak uvádí Prabhakaran et al. ve svém článku, na scaffoldech z kyseliny polymléčné a polyanilinu, které byly elektricky stimulovány, byl zaznamenán vyšší počet neuritů buněčné linie PC-12 a zároveň neurity dosahovaly větších rozměrů, než v případě bez stimulace. Důvodem zvýšené proliferace může být zvýšená adsorpce fibronektinu na vodivých polymerních scaffoldech v kombinaci s příznivým vlivem elektrického pole na proteiny a iontové kanály v buněčných membránách (Balint, Cassidy a Cartmell, 2014).

Důležité je ale i zmínit, že dlouhodobým působením elektrického proudu skrze vodivý polymer může vést ke zvýšení jeho rezistivity, čímž dojde k omezení doby použitelnosti. Zároveň dlouhodobé vystavení buněk vyššímu elektrickému proudu (nad 1 mA) může mít cytotoxický účinek (Richardson et al., 2007).

3.1.3 Kopolymery polyanilinu

Třetí možností, jak využít PANI v tkáňovém inženýrství, jsou jeho kopolymery. Jak již bylo zmíněno, PANI je biologicky nerozložitelný, ale anilinové oligomery jsou biologicky odbouratelné a zároveň mají podobnou elektrickou vodivost jako PANI. Nicméně, Zhang et al., 2012 testovali cytotoxicitu anilinových oligomerů (dimerů, trimerů a tetramerů) a zjistili, že nejvíce toxické pro buněčnou linii NIH/3T3 jsou trimery. Polovina maximální inhibiční koncentrace (IC50) byla stanovena po 24 hodinách kultivace. Pro dimery byla tato koncentrace 198,3, pro trimery 69,3 a pro tetramery 316,1 $\mu\text{g/ml}$ (Zhang et al., 2012).

Anilinový řetězec může být upraven hydrolyzovatelnými koncovými skupinami, které pak usnadňují jeho biologické odbourání. Makrofágy pak mohou zahájit degradaci a vyčistit tkáň, čímž se předejde k nepříznivým dlouhodobým efektům. Příkladem mohou být nanovlákna, která připravil Gizdavic- Nikolaidis a kolektiv, z kyseliny polymléčné (PLA)

a poly(anilin-co-3-aminobenzoová kyselina), a která byla použita jako obvaz na rány umožňující růst buněk, jejich proliferaci. Tato nanovlákná dokonce nanovlákná vykazovala antibakteriální účinky.

Dalším příkladem může být blokovaný kopolymer kyseliny polyléčné a anilinových pentamerů, který připravili Huang et al., 2007. Tento kopolymer má jedinečné vlastnosti, neboť je zároveň elektroaktivní a biodegradovatelný. Z tohoto materiálu mohou být připraveny scaffoldy pro nervové nebo kardiovaskulární tkáňové inženýrství.

3.2 Biokompatibilita

Pro biomedicínské aplikace je nezbytná odpovídající buněčná reakce na materiál. Interakce mezi materiálem a tkáněmi popisuje biokompatibilita, jež je vysoce komplexní vlastnost a je závislá na mnoha mechanismech (Williams, 2003). Biokompatibilitou tedy rozumíme snášenlivost látek v biologickém prostředí. Není-li materiál biokompatibilní dojde například k reakci imunitního systému a ta může vést například ke vzniku. Pro přijetí materiálu do živého systému jsou důležité mechanismy buněčné signalizace, které probíhají skrze signální molekuly, což může být prakticky jakákoli látka. Ta je jednou buňkou vyloučena do extracelulárního prostoru a jinou buňkou přijata. Buňka pak zahájí adekvátní odpověď na příchozí signál (Alberts, 2002).

Zájem o využití PANI výrazně vzrostl poté, co Kamalesh et al. v roce 2000 ověřili dlouhodobou *in vivo* biokompatibilitu PANI filmů, které byly na 90 týdnů implantovány pod kůži samců potkanů. Čistý PANI není úplně netoxický, ale opakovanou protonací a deprotonací dochází k jeho vyčištění a snížení jeho toxicity. Důležité ale je, že ve všech studiích *in vivo* byla reakce na PANI považována za přijatelnou a nedocházelo k zánětlivým reakcím nebo tvorbě nádorů. V současnosti jsou ale biomedicínské aplikace PANI značně omezeny díky poměrně malému počtu studií *in vivo*. Biokompatibilita PANI byla posuzována také v souvislosti s jeho biologickou nerozložitelností a jeho dlouhodobá existence uvnitř těla by mohla vést k nežádoucím účinkům. Negativní vliv mohou mít také kyseliny použité v nízkých koncentracích při dopování. Ve vodném prostředí se příměs může uvolňovat a způsobit tak lokální kyselé prostředí, což by v biologickém prostředí mohl být problém (Quazi, Rai a Boccaccini, 2014). Tento vliv byl pozorován i na buněčných liniích. Po osazení filmu buňkami docházelo nejprve k uvolňování kyselin do média a buňky proliferovaly menší rychlostí. Poté co se vyplavila všechna zbytková kyselina, k čemuž došlo v rozmezí 48 - 100 hodin po osazení, rychlost proliferace se zvýšila (Bidez et al., 2012).

Důležitý je také poznatek, že mnoho typů vodivých polymerů podporuje růst buněk různého typu. Výsledky týkající se biokompatibility PANI se liší. Co se týče nervových buněk, byla zjištěna dostatečná proliferace, adheze, biokompatibilita a nedošlo k zánětlivým reakcím. Dále u forem emeraldinu, nigranilinu a leucoemeraldinu nebyla u krys zjištěna zánětlivá reakce po dobu 90 dnů. Také byly stanoveny za necytotoxické, ale pokud se provede povrchová úprava zvyšující hydrofilitu, dojde ke zvýšení biologické kompatibility a adheze (Balint, Cassidy a Cartmell, 2014).

Biomateriály, které při své aplikaci mají přijít dlouhodobě do styku s krví, s sebou přinášejí možnost vyvolání trombózy. Proto je nutné, aby tyto biomateriály byly hydrofilní a nedocházelo k adsorpci proteinů a adhezi krevních destiček. Toho se například dosáhlo díky naroubování polyetylenoxidu na povrch PANI. Tento krok zvýšil biokompatibilitu PANI, na povrch se adsorbovalo o 80 % méně bílkovin a také se na povrchu ulpívalo méně krevních destiček (Li a Ruckenstein, 2004).

3.3 Antibakteriální účinky

Dalším významným problémem při aplikaci materiálu do těla je bakteriální infekce a tvorba biofilmu na biomateriálech, které mají vliv na jejich životnost a jejich správné fungování. Bylo zjištěno, že PANI ve formě kompozitu má antimikrobiální vlastnosti vůči různým bakteriím včetně *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* a dalším. Bylo zjištěno, že vodivý PANI je více účinný v inhibici růstu bakterií než nevodivý PANI. Antibakteriální účinky PANI mohou souviset s uvolněním kyselých dopujících iontů z vodivého polyanilinu, které reagují a zabíjí bakterie. Druhou možností je elektrostatická přilnavost mezi bakteriemi a PANI díky nábojům opačné polarity. Tím dojde k narušení buněčné stěny bakterie a její smrti (Quazi, Rai a Boccaccini, 2014).

3.4 Biodegradabilita

Biodegradabilitou rozumíme rozklad materiálu biologickými faktory v živém systému. V průběhu tohoto děje nastává rozpad původních složitých struktur na jednodušší. Může dojít ke ztrátě strukturní celistvosti materiálu a postupem času, dokonce k jeho úplnému rozložení či odstranění. V případě, kdy po daném prostředku požadujeme dlouhodobou stabilitu a inertnost je tento děj nežádoucí. Ovšem pro krátkodobé aplikace je požadována jejich biologická rozložitelnost, aby se zabránilo reakci související s dlouhodobou přítom-

ností cizích látek v těle. Během biodegradace ale mohou vznikat odpadní produkty, které mohou mít nepříznivý či příznivý vliv na okolní tkáň (Williams, 2003).

Z výše uvedených důvodů je tedy důležité porozumět tomu, jak se bude daný materiál rozkládat před tím, než se použije pro medicínské aplikace. Syntetické polymery nemusí být rozloženy v živém organismu pouze biologicky, tedy enzymy, ale může zde dojít i hydrolyze. Té podléhá mnoho polymerů, mezi které například patří polyestery, polyanhydridy a polyamidy. Chemická hydrolyza na rozdíl od enzymatické degradace probíhá v celém objemu materiálu. Enzymy jsou totiž makromolekulární látky, které nemohou proniknout do materiálu, proto enzymatická degradace začíná na povrchu a postupuje do středu daného materiálu (Bastioli, 2005).

Většinou ovšem vodivé polymery nebo polymery navržené pro tkáňové inženýrství nepodléhají biodegradaci. PANI ve všech oxidačních stavech je nebiodegradovatelný, což vede k výzkumu kopolymerů PANI a hydrolyzovatelných skupin pro umožnění širšího využití v tkáňovém inženýrství, neboť v kombinaci s degradovatelnými polymery může dojít ke změně rychlosti rozpadu, ale nedosáhneme úplného odstranění polymeru z těla (Quazi, Rai a Boccaccini, 2014). Přijatelná biodegradabilita byla dosažena kombinací želatinových a PANI hydrogelů, aniž by došlo k výraznému snížení vodivosti PANI. V *in vitro* podmínkách došlo k 80 – 90% úbytku hmotnosti v závislosti na hustotě zesíťování a obsahu PANI, nicméně jiné kombinace takovéto úspěšnosti nedosáhly (Li et al., 2014).

4 BUNĚČNÉ INTERAKCE

Interakce materiálu a okolní tkáně je nezbytným předpokladem pro úspěšné začlenění implantátu. Buněčná reakce úzce souvisí s biokompatibilitou materiálu a proto je nezbytné porozumět reakcím a interakcím na okolí, v němž se buňky nachází.

4.1 Buněčná interakce ve 2D a ve 3D

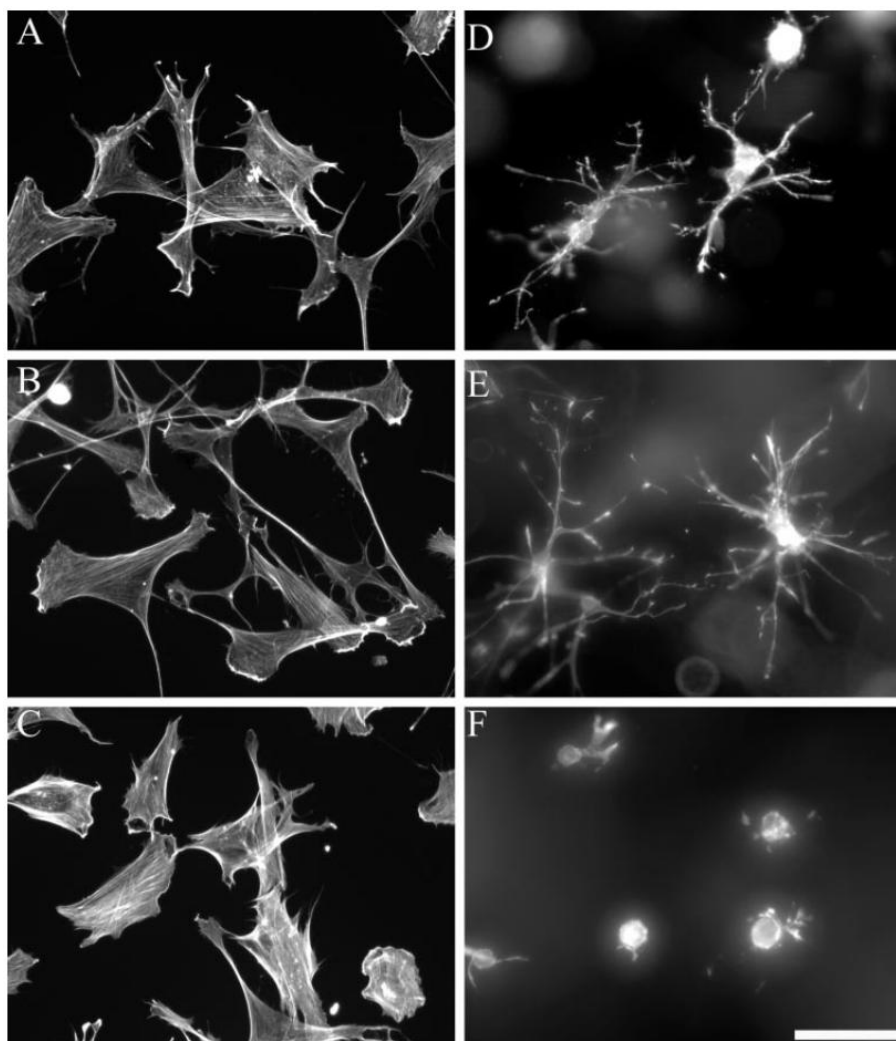
Při přechodu z 3D do 2D se z koule stane kruh, z jehlanu trojúhelník a z linky linka s pozměněnou délkou. Jednotlivé zobrazení 2D obrazu neposkytne úplný 3D objekt. Stejně neúplné mohou být různá měření provedená v 2D a využívaná v 3D prostoru. Tento nedostatek částečně odstraňuje počítačová tomografie, která poskytuje snímky ve 2D z různých pohledů, díky nimž můžeme získat lepší představu o skutečném 3D objektu. Co se týče buněčných struktur, klasická mikroskopie neposkytne plné informace o jejich struktuře. Pro 3D zobrazení buněk může být použito transmisní elektronové mikroskopie a konfokální mikroskopie (Meyer et al., 2009).

Buňky přisedlé na povrch s tímto povrchem tvoří vazby a interagují. Tyto vazby a interakce se budou lišit mezi dvojdimenzionálním prostorem a trojdimenzionálním prostorem. Příkladem 2D může posloužit klasická kultivační nádoba, na jejímž povrchu budou přisedlé buňky. Tyto buňky budou navazovat vazby jen s povrchem pouze jedním směrem. Pokud buňkami osadíme trojrozměrnou porézní strukturu, například scaffold, buňky budou tvořit vazby s povrchem hned na několika místech, budou dostávat zcela jiné informace ze svého okolí a budou se tedy odlišně chovat. Významnou roli v 3D strukturách hraje několik faktorů, jako například pórovitost, velikost pórů, jejich distribuce, mechanické vlastnosti a další. Jak důležitá je 3D struktura v lidském organismu můžeme vidět například na srdci, které je složeno z buněk srdeční svaloviny, dále z fibroblastů a buněk krevních cév (Hayes, 2012). Tyto buňky jsou organizovány v komplexu trojrozměrné struktury, která je rozhodující pro srdeční funkci a závisí na interakcích autokrinních, parakrinních a interakcích typu buňka – buňka. Nedávné studie také prokázaly, že některé typy buněk pěstované v trojrozměrných strukturách se více podobají buňkám *in vivo* a to jak z hlediska morfologie, tak i z hlediska jejich molekulární regulace. Diferenciace a proliferace buněk je ovlivňována i mechanickými vlivy a stejně tak přichycením buněk a tyto vlastnosti se blíží skutečnosti více, pokud jsou buňky inkubovány v 3D strukturách. V ideálním případě by měly srdeční buněčné kultury vykazovat důležité charakteristické znaky diferenciace myokardu,

jako vysoce organizované sarkomery, buněčné spoje a extracelulární matrix, jež obklopuje srdeční buňky (Soares et al., 2012).

Přestože 3D kultury jsou více blízké situaci *in vivo*, mnohé důležité informace byly získány a stále mohou být získány z 2D kultur. Při srovnání buněk ve 2D a 3D, které bylo provedeno na primární kultuře kuřecích srdečních buněk, byly objeveny rozdíly. Buňky se lišily ve své morfologii, schopnosti kontrakce, přítomnosti adhezních struktur, organizací myofibril, tvarem a velikostí mitochondrií, cytoskeletem, distribucí extracelulární matrix a produkovánými proteiny, jež značí diferenciaci srdečních buněk (Soares et al., 2012).

Rozdíl mezi buňkami kultivovanými ve 2D a 3D prostředí lze vidět z obrázku 7. Grinnell et al., 2003 srovnávali lidské fibroblasty kultivované v kolagenní matici s povrchem potaženým kolagenem. Na snímcích A – C jsou fibroblasty kultivované ve 2D prostředí a na snímcích D – F ve 3D prostředí.



Obrázek 7 Buňky lidských fibroblastů kultivovaných na kolagenem pokrytém povrchu (A – C) a v kolagení matrici (D –F). Měřítka 80 μm . (Grinnell et al., 2003).

4.1.1 Buněčné integriny

Jedná se o proteiny, jež umožňují interakce mezi buňkou a extracelulární matrix (ECM). Integriny jsou povrchové receptory, které propojují vnitřní buněčné prostředí s okolní extracelulární matrix. Jejich funkce spočívá v interakci s ECM a informování buňky skrze různé signální molekuly. Signály obdrženy integriny z okolí pak poskytují buňce informace významné pro její proliferaci nebo diferenciaci. Je tedy patrné, že informace získané skrz integriny jsou prvním krokem v mnoha důležitých buněčných procesech, jako je migrace, buněčný cyklus, či následný vývoj buňky (Albiges-Rizo et al., 2009).

Integriny patří díky svému složení do skupiny heterodimerů, tedy jsou složeny ze dvou různých glykoproteinových podjednotek alfa a beta. V současnosti je známo přes dvacet odlišných integrinů. Každá buňka vlastní několik typů integrinů pro možnost vazby na

různé molekuly ECM, mezi které patří fibronectin, kolagen, laminin a vitronektin, jež jsou proteiny tvořící ECM (Martino et al., 2009). Ví se, že odlišné typy extracelulární matrix ovlivňují diferenciaci buněk. Vliv na diferenciaci buněk ale mohou mít i konkrétní interakce mezi integrinem a extracelulární matrix. Vazba integrinů na extracelulární matrix indukují konformační změnu integrinu v beta podjednotce a iniciuje shlukování integrinů. Na ně se nabalí další proteiny, které obsahují vazebná místa pro aktin, a tím dojde k vytvoření adheze (Frith et al., 2012).

Diferenciace buněk na biomateriálových matricích může být zvýšena taktéž začleněním molekul extracelulární matrix, fibronectinu nebo adhezních ligandů na povrch (Frith et al., 2012). Fibronectin reguluje buněčné aktivity především skrze přímé interakce s integrinovými receptory na povrchu buněk. Fibronectin se může vázat až s dvaceti odlišnými integriny a má tedy vliv na mnoho různých tkání a buněk. Navázáním pouze malých fragmentů s funkčními doménami na povrch materiálu dojde k vysoké specifčnosti, neboť tyto krátké úseky obsahují pouze specifické integrinová vazebná místa (Martino et al., 2009).

4.1.2 Adheze k povrchu

Buňky pro rozlišení svého okolí využívají své vnější mikrometrové výčnělky, složené z aktinových vláken a pomocí filopodií, jež jsou menší. Tyto výčnělky slouží k buňkám k charakterizaci povrchu materiálu, vnímání extracelulární matrix a předání této informace dále do buňky, která pak může adekvátně reagovat na okolí, ve kterém se nachází. Filopodia taktéž mohou nalézt místo na povrchu, vhodné pro přichycení buňky a ta se následně skrze proteiny kadheriny a integriny naváže na povrch. Vazba buněk na povrch implantátu probíhá různou rychlostí, neboť je ovlivněna řadou faktorů, mezi které patří vliv prostředí, povrchových vlastností a také biologických molekul (Hynes, 1992).

V současné době je snaha napodobit chování extracelulární matrix v prostředí *in vitro*, aby došlo k procesu buněčné adheze, což je žádoucí zejména v oblasti tkáňového inženýrství. Jednou z možností je úprava povrchu scaffoldu pomocí proteinů, jež tvoří extracelulární matrix. Tyto proteiny pak umožní přichycení buněk skrze integriny (Zheong a Rescorla, 2012).

Pro zprostředkování adheze mezi umělým povrchem a buňkou bylo objeveno několik možností. Jednou z těchto možností je úprava povrchu proteinem pro umožnění řízení buněčné adheze. Pro její umožnění je důležité, aby proteiny, jimiž se bude povrch upravovat, měly zachovánu svou původní funkci v buněčné vaznosti, tedy aby zůstala zachována spe-

cifická místa a byla pro buňku přístupná. Dalším důležitým bodem je, aby tato proteinová vrstva odolávala kultivačnímu prostředí (Chen, 2008).

4.1.2.1 Sérový albumin

Jedná se o jeden z proteinů, které mohou posloužit pro úpravu umělých povrchů. Sérový albumin patří mezi globulární bílkoviny a jedná se o nejhojněji zastoupené molekuly v krvi i dalších tělních tekutinách. V krevní plazmě může tvořit 50 až 60 % všech proteinů. Jeho funkce spočívá v udržování osmotického tlaku. To je důležité proto, aby nedošlo k přesunu krevní plazmy do mezibuněčného prostoru. Dále slouží k přenosu látek nerozpustných ve vodě, což mohou být tuky, enzymy nebo hormony (Maurya et al., 2011). Je složen z hydrofobních částí uvnitř molekuly, které jsou tvořeny nepolárními koncovými částmi aminokyselin a umožňují navázání hydrofobních látek. Na povrch jsou orientovány polární skupiny a proto je možno albuminem pokrýt nepolární materiály, které mají přijít do styku s krví. Albuminová vrstva zabraňuje přímému kontaktu krve s povrchem materiálu a umožní buňkám adherovat i na nepolárních površích, což je důležité pro jejich následnou proliferaci a diferenciaci. Bylo prokázáno, že bovinní sérový albumin dokáže zvýšit citlivost i stabilitu biosenzorů. Platinový biosenzor potažený polyanilinovým filmem s BSA dokonce dokázal reagovat na širší spektrum koncentrací peroxidu vodíku, než biosenzor bez BSA (Chen, 2008).

4.2 Úprava povrchu plazmou

Plazma je označována jako ionizovaný plyn, a také jako čtvrté skupenství hmoty, neboť se svými vlastnostmi liší od zbývajících tří skupenství. Plazma se v současnosti hojně využívá pro úpravu povrchových vlastností. Její aplikací na povrch objektu má vliv na povrchové vlastnosti. Můžeme tedy pomocí plazmy změnit povrchové vlastnosti daných předmětů, bez vlivu na jejich objemové vlastnosti. Plazmou je možné ošetřit povrchy různých předmětů, včetně sypkých směsí, folií i rozměrných výrobků. Významná se plazma stala pro využití v biomedicíně, kde zlepšuje biokompatibilitu protetických předmětů. Lidské tělo pak cizí předmět snáze přijme a klesá riziko nepříznivé reakce organismu (Khorasani, Mirzadeh a Irani, 2008).

Pro lepší výsledný efekt se využívá podpurných plynů v plazmatu. Může jít o inertní plyny, kyslíkaté, dusíkaté a uhlovodíkové. Kyslík reaguje s různými povrchy, včetně polymerů, čímž mohou vznikat funkční skupiny, jako karboxylové, karbonylové ad. (Rosnagel,

1990). Takto ošetřený povrch může získat zcela odlišné vlastnosti, tzn., že z původně hydrofobního povrchu získáme povrch hydrofilní, který je pro mnohé aplikace výhodnější. Například v tkáňovém inženýrství jsou hydrofilní povrchy důležité pro buněčnou adhezi, která je nutná pro následnou buněčnou proliferaci, diferenciaci a migraci (Khorasani, Mirzadeh a Irani, 2008).

5 CHARAKTERIZACE PANI FILMŮ

Jak již bylo uvedeno výše, kromě PANI prášků nebo koloidních roztoků je možné jej připravit a používat v podobě tenkého filmu. Příprava je možná oxidací anilinu v kyselém prostředí, kde nejprve vznikají anilinové oligomery, které jsou více hydrofobní než anilinové kationty. Tyto oligomery mají tendenci se oddělit od vodného prostředí, ve kterém probíhá polymerace, například adsorpcí na dostupné plochy, jež jsou v kontaktu s vodnou reakční směsí. Adsorbované oligomery pak mají větší schopnost zahájit růst polymerních polyanilinových řetězců. To je princip heterogenní katalýzy, která předpokládá vyšší reaktivitu adsorbovaných molekul, v důsledku pozměnění rozložení elektronové hustoty (Stejskal, 2005).

Avšak před samotným použitím PANI filmů v jakékoli oblasti je důležitá jejich charakterizace. Jednou z významných charakteristik jsou povrchové vlastnosti filmů, mezi které patří morfologie a struktura povrchu neboli drsnost. Ta může být stanovena například pomocí mikroskopie atomárních sil. Co se týče vodivých materiálů, nezbytný je popis jejich vodivosti (Dominis, 2001). Další důležitou charakteristikou je měření kontaktního úhlu smáčení, který umožňuje určit, zda je povrch smáčivý či nesmáčivý, tedy hydrofilní či hydrofobní. Pro aplikace v tkáňovém inženýrství jsou vyžadovány smáčivé materiály. Pro tyto aplikace je také nutné stanovit vliv materiálu na buněčnou adhezi, migraci, morfologii a proliferaci. Vlastnosti PANI filmu můžeme ovlivnit vhodnou povrchovou úpravou nebo kombinací s jiným polymerem, který má sledované vlastnosti vhodnější než PANI (Wang et al., 2008).

5.1 Biologická charakterizace

Biologickou charakterizaci můžeme provádět *in vitro*, *in vivo* nebo *in silico*. V rámci této práce se budeme věnovat testování *in vitro*, pro které se využívají buněčné kultury živočišných nebo lidských buněk.

5.1.1 *In vitro*

Prostředky, které mají přijít do kontaktu s lidským organismem, musí splňovat legislativní požadavky, jež popisuje norma ČSN EN ISO 10993 „Biologické hodnocení zdravotnických prostředků“. V této normě jsou popsány požadavky, parametry a postupy, které se uplatňují při biologické charakterizaci těchto materiálů. Před použitím materiálu v lidském organismu musí být otestován například na cytotoxicitu, alergizaci, dráždivost, intrakután-

ní reaktivitu, systémovou toxicitu, genotoxicitu, implantaci a snášenlivost s krví (ČSN EN ISO 10993-1).

Mezi nejrozšířenější testy pro hodnocení biokompatibility materiálů jsou testy viability. Dalšími častými testy jsou testy na adhezi, migraci apoptózu či nekrózu. Viabilita (životaschopnost) buněk v *in vitro* je jedním z nejdůležitějších parametrů pro následné posouzení vhodnosti či nevhodnosti materiálu. Jedná se o určení podílu živých a mrtvých buněk, pro jehož stanovení se využívají fluorescenční a kolorimetrické testy (Conn, 1990).

5.1.1.1 *Buněčné kultury*

Buněčné kultury se staly nejrozšířenějším materiálem pro testování látek a materiálů pro biomedicínské aplikace. Buněčnou kulturu lze získat chirurgickým odstraněním buněk z organismu a jejich následným přesunutím do vhodného kultivačního prostředí. Prostedí musí umožňovat spojení, rozmnožení a růst buněk. Takto získané buňky nazýváme primární kulturou. Rozmnožení buněk lze zajistit dvěma způsoby: Malý kousek tkáně se v plastové nebo skleněné nádobě ponoří do kultivačního média a po uplynutí několika dnů se z tkáně uvolní jednotlivé buňky. Buňky se přesunou na dno kultivační nádoby, kde se následně začnou dělit a růst. Druhým způsobem je aplikace proteolytického enzymu (Donaldson a Bishop, 2015). Mezi tyto enzymy patří například trypsin nebo kolagenóza, které naruší vazby mezi buňkami. Tímto získáme suspenzi jednotlivých buněk, které lze rozdělit do kultivačních nádob, kde se budou dále dělit a růst. Tento druhý způsob je upřednostňován, neboť je rychlejší. Po té co buňky primární kultury spotřebují všechny substrát z média, je nutno je pastováním rozdělit a přesunout do dalších kultivačních nádob pro pokračování v růstu a dělení. Zde se opět používají proteolytické enzymy, které naruší proteinové vazby buněk s povrchem i mezi buňkami navzájem. Získaná buněčná suspenze se rozdělí do nových kultivačních nádob. Tímto způsobem mohou být buněčné kultury dále rozdělovány a uchovávány (Ryan, 2008).

Buněčné kultury jsou charakterizovány z hlediska jejich morfologie nebo funkce. Důležité je brát v potaz kultivační podmínky, které mají vliv na tvar buněk. Jejich funkce je zase dána původem buněčných kultur (srdce, svaly aj.) a také mírou adaptace ke kultivačním podmínkám enzymu (Donaldson a Bishop; 2015). Vlastnosti, jež buňky měly v živém prostředí, mohou být ztraceny nebo pozměněny díky umělému prostředí. U některých buněčných linií může dojít k zástavě dělení, naopak jiné se mohou stát nesmrtelnými a dělit se

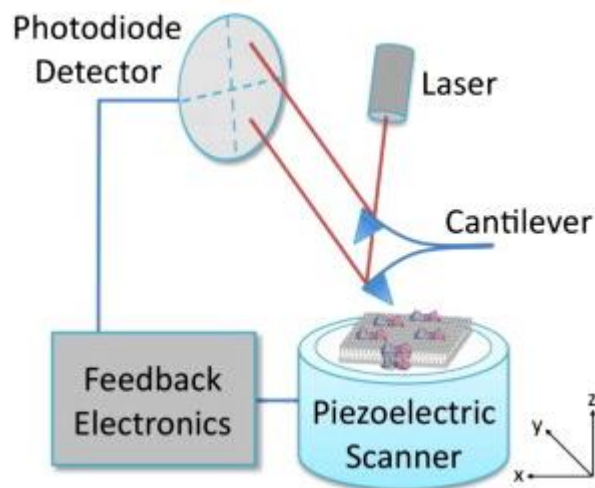
do nekonečna. K tomu může dojít samovolně nebo záměrně, například použitím léčiv, virů nebo ozáření (Ryan, 2008).

Jednou z metod sloužících pro stanovení počtu životaschopných buněk, tedy cytotoxicity testovaného materiálu je test MTT. V rámci tohoto testu není stanovena přímo viabilita, ale hodnotí se zde absorbance, která odpovídá viabilitě. Princip metody spočívá v přeměně barviva MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnitrazolium bromid) metabolickými procesy buněk a následné stanovení absorbance těchto metabolitů, jejichž množství je přímo úměrné počtu živých buněk (Molecular Probes, 2002).

5.2 Topografie

5.2.1 Mikroskopie atomárních sil

Jedná se o mikroskopickou metodu, která slouží k trojrozměrnému zobrazení povrchu vzorku. Poprvé byla mikroskopie atomárních sil představena v roce 1986, pro odstranění omezení souvisejících se skenovací tunelovou mikroskopií. Na rozdíl od tunelové mikroskopie, kde je pro detekci využito elektrické proudu, se zde využívá vzájemná meziatomová přitažlivost a lze detekovat i nevodivé povrchy (Vahabi, Salman a Javanmard; 2013). Jde o metodu s vysokým rozlišením a obraz je sestavován bod po bodu, přičemž je možné zobrazit i atomy. Mikroskopie atomárních sil slouží k zobrazení povrchu, nikoliv objemové struktury vzorků. Mapování povrchu je provedeno skrze velmi ostrý hrot upevněný na ohebném nosníku tzv. cantileveru, který funguje jako pružina a je tedy možné charakterizovat i biologické materiály. Vzorky ale musí být fixovány, a není tedy možné charakterizovat vzorky plavající v roztoku (Whited a Park, 2014). Nevýhodou ovšem je omezený rozsah velikosti obrázku a také pomalá rychlost snímání. Obrazy mohou být obvykle ve stovkách mikrometrů, přičemž sestavení obrazu trvá několik minut. Další omezení je ve výšce vzorku, která by měla být v desítkách mikrometrů. Problémy mohou nastat také díky velké blízkosti hrotu a vzorku, kdy může dojít k příliš silným interakcím, zachycení hrotu nebo jeho znečištění (Baró a Reifenger, 2012).



Obrázek 8 Schéma mikroskopu atomárních sil (Whited a Park, 2014).

Mezi základní součásti mikroskopu atomárních sil patří piezoelektrický scanner, flexibilní cantilever s ostrou sondou, laser a fotodetektor. Pohyb pružného raménka (cantileveru) s ostrou sondou je monitorován pomocí změn ve vychýlení laserového paprsku. Z odchylek laseru program sestaví 3D obraz daného povrchu (Baró a Reifenberger, 2012).

5.2.2 Možnosti analýzy

Měření je možno provádět v několika různých režimech, které jsou krátce zmíněny v následujících kapitolách.

5.2.2.1 Kontaktní režim

První možností je kontaktní režim, při kterém je hrot vtačován do vzorku. Výška konce nosníku je konstantní a v závislosti na nerovnosti povrchu vzorku se mění prohnutí nosníku, z jehož velikosti se sestaví obraz povrchu. Tento režim, ale není příliš šetrný k hrotu a stejně tak ke vzorku. Při velkých nerovnostech působí při přesunu hrotu velké třecí síly, které mohou vést k jeho poškození (Whited a Park, 2014).

5.2.2.2 Bezkontaktní režim

Další možností je nekontaktní režim, kdy se hrot pohybuje nad vzorkem, přičemž zde působí přitažlivé síly mezi hrotem a povrchem. Nosník má konstantní hodnotu ohnutí a jeho přiblížení, či oddálení od povrchu slouží k sestavení obrazu povrchu. Hrot a vzorek na sebe působí skrze Van der Waalsovy a elektrostatické síly (Whited a Park, 2014).

5.2.2.3 Poklepový režim

Třetí možností je režim poklepový, který spojuje vlastnosti kontaktního a nekontaktního režimu. Sonda je v tomto případě v kontaktu s povrchem přerušovaně a je vhodnější pro měkké nebo volně adsorbované vzorky, které mohou být při kontaktním režimu poškozeny (Baró a Reifenberger, 2012). Zde je monitorována amplituda kmitání, respektive její výchylky, které se liší od konstantní hodnoty. Pohyb sondy je zprostředkován piezoelektrickým krystalem, který je schopen deformace přivedeným napětím, čímž dochází k pohybu sondy (Kurland, Drira a Yadavalli, 2012).

5.2.3 Skenovací elektronový mikroskop

Skenovací elektronový mikroskop (SEM) umožňuje zobrazovat povrchy různých struktur včetně buněk. Jeho princip spočívá v ohybu elektronového paprsku v elektromagnetickém poli. Zobrazení povrchu je nejčastěji umožněno sekundárními elektrony nebo zpětně odraženými elektrony. Skenovacím elektronovým mikroskopem lze zjistit informace o mikrostrukturu, chemickém složení. Výhodou SEM je snadná příprava vzorku, který nemusí být tenký jako v případě transmisní elektronové mikroskopie (Yang, Mohammed a Zewail, 2010).

5.3 Povrchová energie

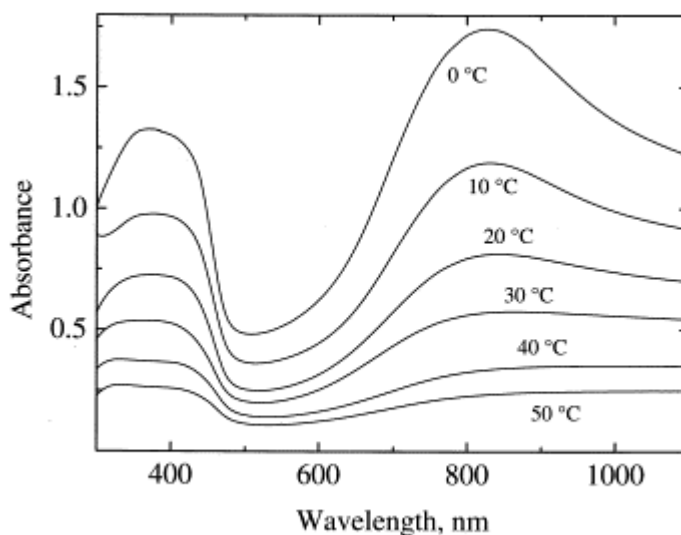
Povrchová energie souvisí s hydrofilitou a hydrofobitou a je důležitou vlastností při zpracování plastových materiálů. Čím má látka vyšší hydrofilitu, tím má vyšší povrchovou energii a naopak. Hydrofilita je další důležitou vlastností pro materiály používané v tkáňovém inženýrství. Je důležité, aby mohly buněčné kultury na povrchu adherovat a proliferovat. Nepolární povrchy lze různými postupy modifikovat, tak aby byly hydrofilnější, drsnější a vhodnější pro buněčnou adhezi (Gamble et al., 2012).

Pro stanovení povrchové energie se nejčastěji využívají metody nepřímé. Jednou z nejběžnějších metod je měření kontaktních úhlů smáčení. Kontaktní úhel vzniká mezi povrchem pevné látky a kapkou kapaliny a rozumíme jím úhel, který svírá tečna k povrchu kapky, vedená v bodě styku s rozhraním. Smáčivostí pak rozumíme schopnost kapaliny přilnout k povrchu pevných látek a je závislá na druhu těchto látek. Kapalina (voda) tedy může pevný povrch smáčet, kdy je kontaktní úhel menší než 90° . V druhém případě kapalina povrch nesmáčí a kontaktní úhel je větší než 90° . Smáčivý povrch pak označujeme jako

hydrofilní a nesmáčivý jako hydrofobní. Povrchová energie se následně vypočte z měření kontaktních úhlů smáčení pevného povrchu několika kapalinami (Mechlová, 2004).

5.4 Ultrafialovo-viditelná spektroskopie

Pomocí ultrafialového a viditelného záření (UV-Vis) procházející skrze polyanilinové filmy při různých pH, lze určit oblast pH, při které dochází k přechodu mezi zelenou vodivou PANI solí a modrou nevodivou (deprotonovanou) PANI bází. Pro vodivou formu PANI pak ve výsledném spektru budou pozorovatelné dva píky absorpčního maxima. Tyto maxima odpovídají přechodu $\pi-\pi^*$, tedy elektronům, které jsou přítomny v benzenových jádrech (cca 410 nm) a polárních vazbách (840 nm). S rostoucím pH dojde k přechodu z vodivé na nevodivou formu a tím k postupnému posunutí absorpčního maxima k nižším hodnotám, které odpovídají přechodu $n-\pi^*$ v chinonových kruzích. Znalost pH přechodu mezi jednotlivými formami PANI je důležitá pro posouzení jeho stability ve fyziologických podmínkách. K přechodu mezi polyanilinovou solí a bází dochází při pH 5 – 6. Zlepšení stability PANI, a tedy i dlouhodobějšího udržení vodivosti, lze dosáhnout například přidáním PAMPSy přímo do reakční směsi při tvorbě PANI filmů (Humpolíček et al., 2015).



Graf 1 Absorbční spektra polyanilinu připraveného při různých teplotách (Stejskal et al., 1999).

Z grafu 1, kde je absorbční spektrum PANI filmu ve formě emeraldinu lze vidět, že zeleně zbarvenému filmu odpovídají absorpance při vlnových délkách okolo 400 nm a nad 800 nm.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 MATERIÁL A METODIKA

6.1 Použité buněčné kultury

V rámci diplomové práce byla použita buněčná linie myších embryonálních fibroblastů NIH/3T3 (ATCC CRL-1658). Jako kultivační médium bylo použito Dulbecco's Modified Eagle's Medium (PAA The Cell Culture Company, Anglie), ke kterému bylo přidáno hovězí sérum (Biosera, Anglie) v koncentraci 10 % z celkového objemu. K médiu byla také přidána antibiotika Penicilin/Streptomycin 100 µg/ml (PAA Laboratories GmbH, Austria). Kultivace probíhala v inkubátoru Heracell 150i při teplotě 37 °C za přítomnosti oxidů uhlíčitých v koncentraci 5 % a při 90% relativní vlhkosti atmosféry.

6.2 Přístroje

Během experimentu byly využívány následující přístroje a zařízení: Biologický inkubátor Heracell 150i (Thermo Scientific, USA), mikroskop s fázovým kontrastem Olympus CKX 41 (Olympus, Japonsko), laminární box s řízenou cirkulací vzduchu HERAsafe KSP (Thermo Scientific, USA), spektrofotometr Sunrise (Tecan, Švýcarsko a centrifuga Eppendorf 5702 (Eppendorf, Německo) mikroskop atomárních sil (Solver PRO, NT-MDT, Russia). Tkáňový plastik byl od firmy TPP (Švýcarsko).

6.3 Hovězí sérový albumin

Hovězí sérový albumin (BSA) je jednou z bílkovin přítomných v krvi skotu. V krvi slouží jako nosič hydrofobních látek, které by bez něj měly velmi nízkou rozpustnost. Mezi takovéto látky můžeme zařadit například steroidní hormony. BSA má v krvi také funkci pufrčního činidla, což znamená, že napomáhá udržovat stabilní hodnotu pH krve. V experimentu byl použit hovězí sérový albumin od firmy Sigma-Aldrich.

7 EXPERIMENT

Samotná experimentální práce probíhala jednak na Centru polymerních systémů, Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně a jednak na Jožef Stefan Institute v Ljublaniv rámci zahraniční stáže, kterou jsem absolvovala v termínu od 1.9.2015 do 31.10.2015. V rámci experimentu byly PANI filmy připravené dle IUPAC dopované různými kyselinami či povrchově upraveny bovinním sérovým albuminem. Na takto modifikovaných PANI filmech byla porovnávána buněčná proliferace, migrace, dále byl měřen kontaktní úhel a elektrická vodivost. Tato část byla provedena zde, na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně.

Dále pak byly filmy modifikovány pomocí plazmy. Modifikace plazmou byla provedena ve Slovinsku na Institutu Jožefa Stefana v rámci studijní stáže. Z časových a kapacitních důvodů byly plazmou upravovány pouze vzorky PANI soli a báze.

Tabulka 2 Přehled provedených testů a použitých filmů

	PANI-S	PANI-B	PANI+PAMPSA	PANI+PHOSP	PANI+SULF	PANI+PAMPSA 1:1	PANI+PAMPSA 2:1	
Proliferace	X	X	X	X	X	X	X	
Migrace	X	X	X	X	X	X	X	
Adheze	X	X						*
BSA	X	X	X	X	X	X		#
Vodivost	X	X	X	X	X			#
Povrchová energie	X	X	X	X	X			#
Plazma	X	X						*
UV-Vis			X	X	X			#
AFM	X	X						*

* Mikroskopie atomárních sil a úprava povrchu plazmou byly provedeny pouze na PANI soli a bázi, kvůli kapacitním možnostem plazmového reaktoru na pracovišti JSI ve Slovinsku.

Pro stanovení povrchové energie, vodivosti, UV-Vis a proliferace s BSA nebyly použity všechny filmy kvůli jejich nedostupnosti

7.1 Příprava experimentu

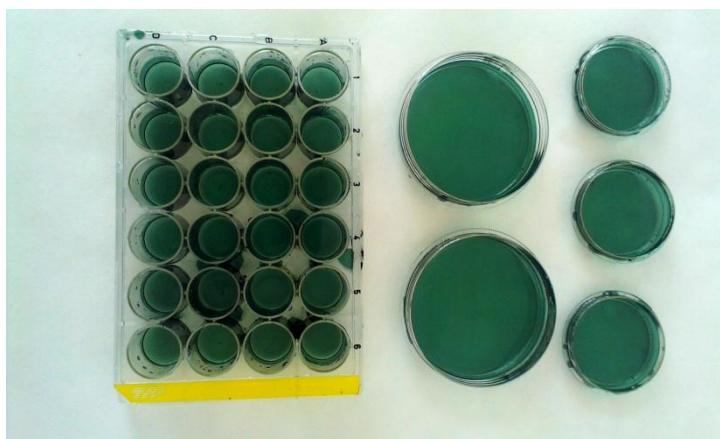
Následně je popsán postup při přípravě buněčných kultur, aplikaci vzorku a použité metody pro vyhodnocení testů.

7.1.1 Kultivace a trypsinizace

Pro experiment byly buňky získány rekultivací v kultivačních nádobách (T75), kde byly průběžně kontrolovány. Po dosažení konfluence byla kultivační nádoba přenesena do laminárního boxu a bylo z ní odsáto médium, tak aby nedošlo k poškození buněk přisedlých na dně. Buňky byly opláchnuty fosfátovým pufrům (PBS) o objemu $0,2 \text{ ml/cm}^2$, což odpovídá množství 15 ml. Opláchnutím došlo k odstranění zbytků média a následně byl pufr odsát. Dále bylo přidáno $0,1 \text{ ml/cm}^2$ trypsinu, což odpovídá objemu 4,5 ml, pro uvolnění buněk do suspenze a kultivační nádoba byla uložena do inkubátoru na 10 – 15 minut. Pomocí mikroskopu bylo průběžně kontrolováno uvolnění buněk od povrchu nádoby a přerušování mezibuněčných vazeb. Poté byl obsah kultivační nádoby přepipetován do 15ml zkumavky a bylo přidáno 7,5 ml média pro inaktivaci trypsinu. Zkumavka byla vložena do centrifugy vytemperované na $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Centrifugace probíhala 3,5 minuty při otáčkách 1100 rpm. Během této doby došlo k sedimentaci buněk, což umožnilo odsát médium s trypsinem. Počet sedimentovaných buněk byl přibližně 2×10^7 . Toto množství bylo následně zředěno médiem na požadovanou koncentraci 1×10^5 buněk/ml média.

7.1.2 Příprava filmu PANI hydrochloridu

Testovanou látkou v této diplomové práci byl polyanilinový film. Syntéza PANI filmu byla provedena dle metodiky IUPAC (Stejskal, 2002) z 0,2M anilinu hydrochloridu a 0,25M amonium persulfátu. Bylo tedy naváženo 2,59 g anilin hydrochloridu a v 50ml baňce bylo toto množství rozpuštěno v 50 ml ultračisté vody. Dále bylo naváženo 5,71 g amonium persulfátu a opět bylo toto množství rozpuštěno v 50 ml ultračisté vody. Následně byly tyto dva roztoky samostatně důkladně promíchány. Po odstání byly smíchány dohromady a tento roztok byl rychle rozléván v tenkých vrstvách do daných misek nebo plat. Pro testy migrace a proliferace byly zvoleny misky z tkáňového polystyrenu určeného pro buněčnou kultivaci o průměru 3,5 cm a hloubka 11 mm. V tomto kroku bylo nutné postupovat velmi rychle neboť po smíchání roztoků anilinu hydrochloridu a amonium persulfátu dojde k okamžité polymerační reakci. Následně probíhala polymerizace za pokojové teploty cca 30 minut a přebytečná směs pak byla slita. Vzniklé filmy byly promívány 0,2M kyselinou chlorovodíkovou dokud nedošlo k odstranění všech nežádoucích sraženin, které ulpěly na stěnách nebo na samotném filmu. Po důkladném promytí byly filmy opláchnuty metanolem pro lepší vyschnutí. Tloušťka takto připraveného filmu je zhruba 100 – 150 nm.



Obrázek 9 Připravené filmy polyanilinové soli

7.1.3 Příprava PANI báze

Poté co filmy PANI soli byly dostatečně vysušeny (po cca 24 h) byly filmy zality na 1 h demineralizovanou vodou. Po uplynutí této doby byla demineralizovaná voda vylita a filmy se pokryly vrstvou 1M hydroxidu amonného na 12 h. Tímto byl vytvořen film polyanilinové (PANI-B).

7.1.4 Příprava PANI dopovaných různými kyselinami

Vzniklé filmy PANI báze byly po 12 h opláchnuty metanolem a následně pokryty vrstvou kyseliny. Na filmy bylo nanášeno 6 různých kyselin, tak aby filmy byly plně pokryty. Byly použity následující kyseliny: 50% fosfowolframová kyselina (PANI+PHOSP), poly(2-akrylamido-2-methyl-1-propansulfonová kyselina) (PANI+PAMPSA), 1M amidosulfonová kyselina (PANI+SULF). Kyseliny se nechaly 24 h působit na filmy PANI-B a po této době byly kyseliny důkladně vymyty metanolem a filmy se nechaly vysušit. Tímto byly připraveny různé filmy PANI solí, lišících se použitou kyselinou. Před přidáním buněk byly misky nebo plata s PANI filmy vysterilizovány pomocí UV záření po dobu 30 min. Dále byly připraveny filmi PANI+PAMPSA 1:1 a PANI+PAMPSA 2:1, které nebyly připraveny dopováním, ale pozměněním polymerační reakce. Poměry vyjadřují poměr kyseliny a reakční směsi, do které byla PAMPSA přidána před smícháním roztoků anilinu hydrochloridu a amonium persulfátu.

7.1.5 Příprava hovězího sérového albuminu

Pro úpravu PANI filmů byl použit hovězí sérový albumin (Sigma-AldrichA9418). Roztok hovězího sérového albuminu byl připraven rozmícháním v ultračisté vodě, aby výsledná koncentrace odpovídala 50 mg hovězího sérového albuminu / 1 ml ultračisté vody. Tímto

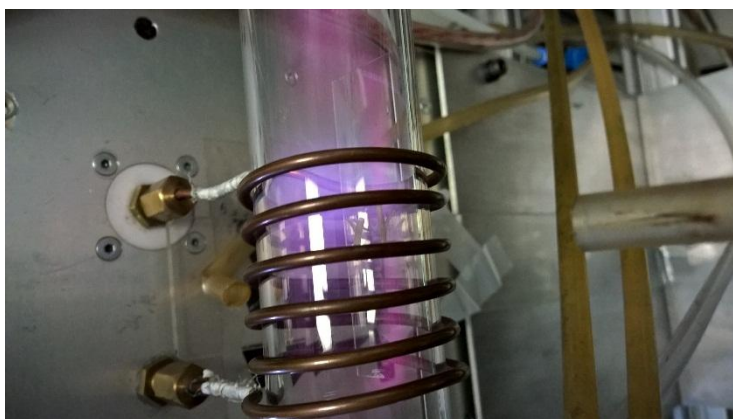
roztokem byly následně pokrývány PANI filmy na 20 minut (PANI-S, PANI-B, PANI+PHOSP, PANI+SULF, PANI+PAMPSA, PANI+PAMPSA 1:1).

7.1.6 Sterilizace plastiku pro tkáňové kultury

Sterilizace misek s připravenými polyanilinovými filmy probíhala pomocí UV záření v laminárním boxu HERAsafe KSP po dobu 30 minut.

7.1.7 Ošetření plazmou

Na fólii z polyethylentereftalátu (PET) byly připraveny vzorky PANI-S a PANI-B, dle výše uvedeného postupu. Velikost vzorků byla 1 x 1 cm. PANI filmy byly ošetřeny vysoce reaktivní kyslíkovou plazmou. Plazma byla vytvořena RF generátorem, pracujícím při frekvenci 27,12 MHz a výkonem 200 W. Tlak byl stanoven na 75 Pa. Při daných parametrech byla hustota iontů cca $2 \times 10^{15} \text{ m}^{-3}$ a neutrálních atomů $4 \times 10^{21} \text{ m}^{-3}$. Ošetření probíhalo po dobu 30 s.



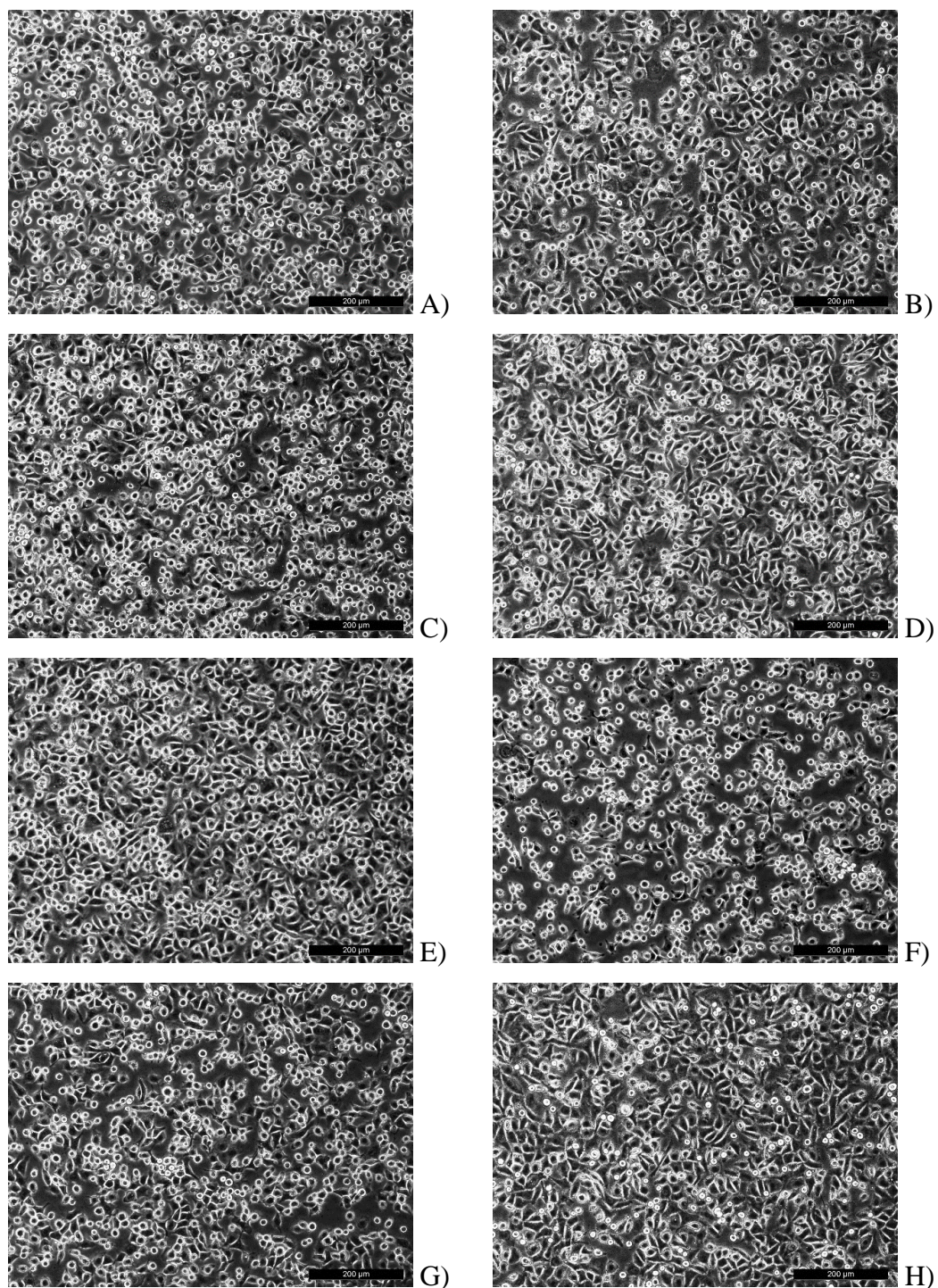
Obrázek 10 Oplazmování PANI filmů

8 VÝSLEDKY

Nyní budou uvedeny výsledky testování vlivu modifikací PANI filmů na buněčnou proliferaci a migraci. Schopnost migrace a proliferace byly posuzovány pomocí mikrofotografií pořízených na mikroskopu s fázovým kontrastem.

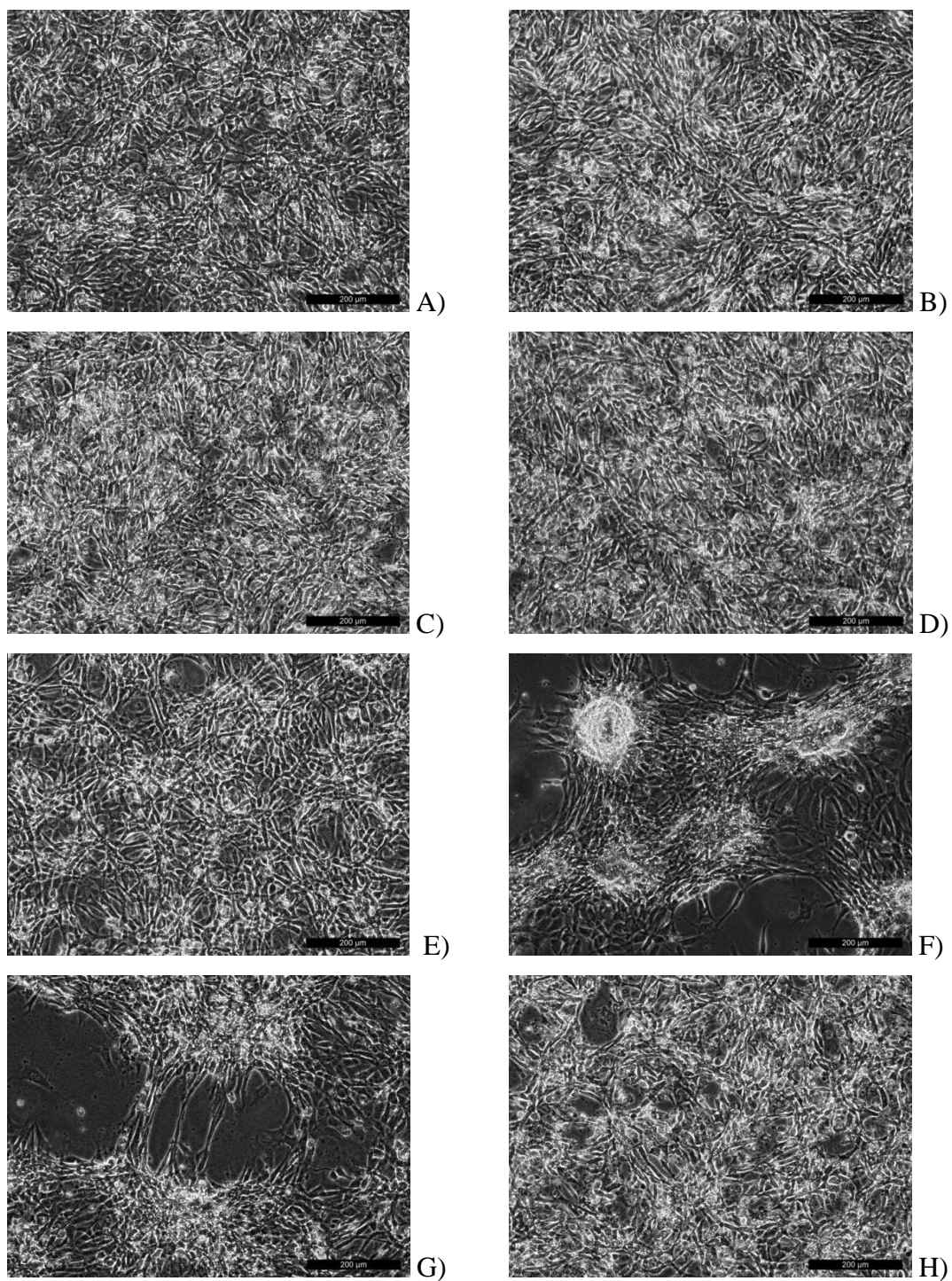
8.1 Test buněčné proliferace

Na vysterilizované misky s různě modifikovanými PANI filmy byly nanесeny 2 ml buněčné suspenze o koncentraci 10^5 buněk / 1 ml média a hodinu se buňky ponechaly kultivovat v inkubátoru. Následně byly pořízeny mikrofotografie při 40x zvětšení, které jsou zobrazeny na obrázku 10. Jak vidíme, mezi jednotlivými PANI filmy nejsou po uplynutí 1 h jednoznačně viditelné rozdíly.



Obrázek 11 Mikrofotografie proliferace buněčné linie NIH/3T3 po 1 h: A) reference (bez PANI), B) PANI+PHOSP, C) PANI-B, D) PANI-S, E) PANI+PAMPSA, F) PANI+PAMPSA 1:1, G) PANI+PAMPSA 2:1, H) PANI+SULF

Po uplynutí 72 hodin byly opět pořízeny mikrofotografie jednotlivých povrchů pro posouzení buněčné proliferace při 40x zvětšení. Buňky byly životaschopné a proliferovaly na všech pozorovaných površích a nejsou zde pozorovatelné poškozené nebo apoptické buňky. S referencí A) byl srovnatelný povrch pokrytý PANI+PHOSP B), PANI+ PAMPSA E), PANI+SULF. H), PANI-B C) a PANI-S D). Na površích pokrytých PANI filmy, kde do reakční směsi byla přidána PAMPSA tvořily buňky shluky. To můžeme vidět na snímku F), který odpovídá filmu z reakční směsi v poměru PAMPSA:PANI 1:1 a na snímku G), kde byl poměr PAMPSA:PANI 2:1.



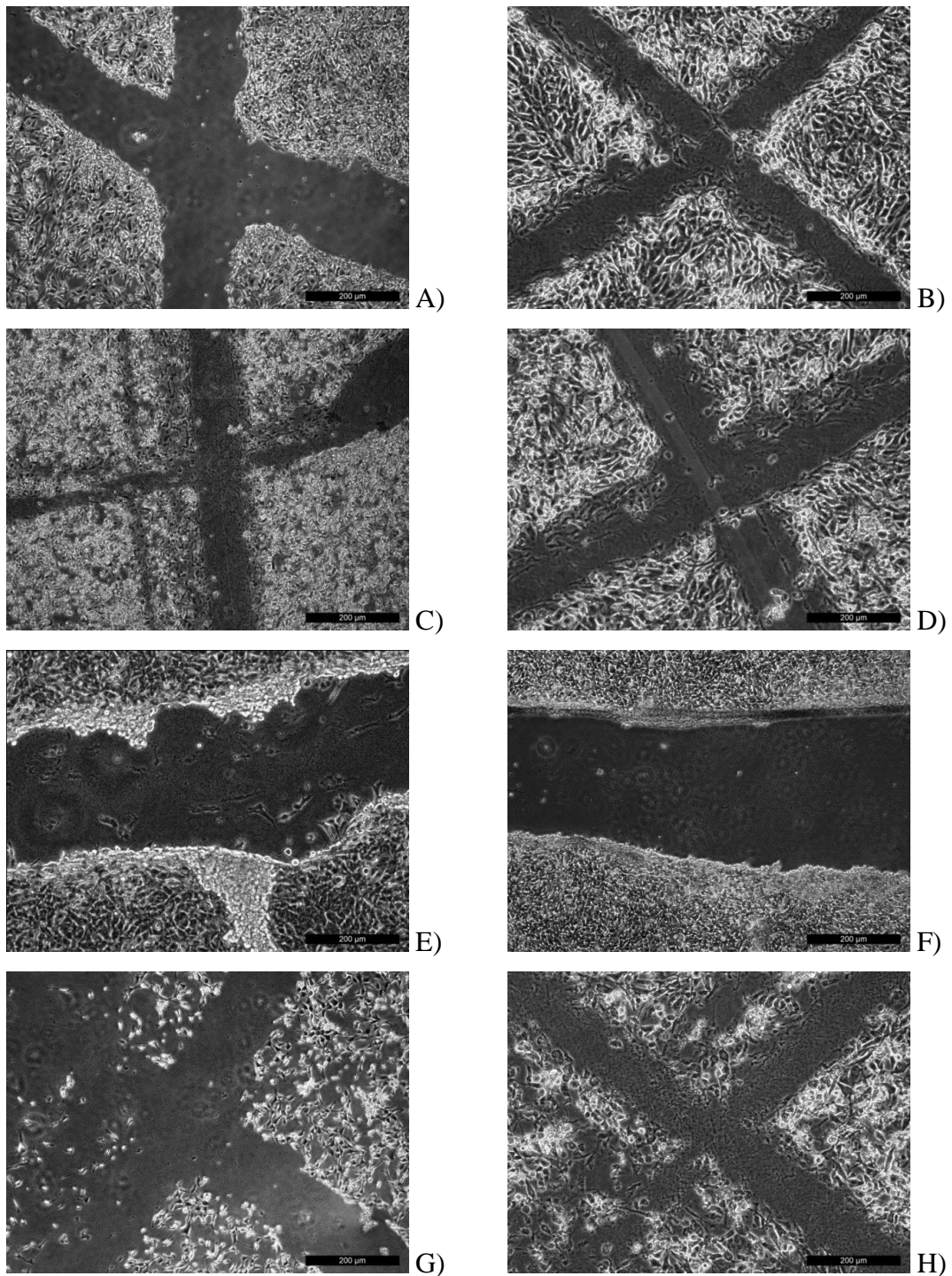
Obrázek 12 Mikrofotografie proliferace buněčné linie NIH/3T3 po 72 h: A) reference (bez PANI), B) PANI+PHOSP, C) PANI-B, D) PANI-S, E) PANI+PAMPSA, F) PANI+PAMPSA 1:1, G) PANI+PAMPSA 2:1, H) PANI+SULF

8.2 Test buněčné migrace

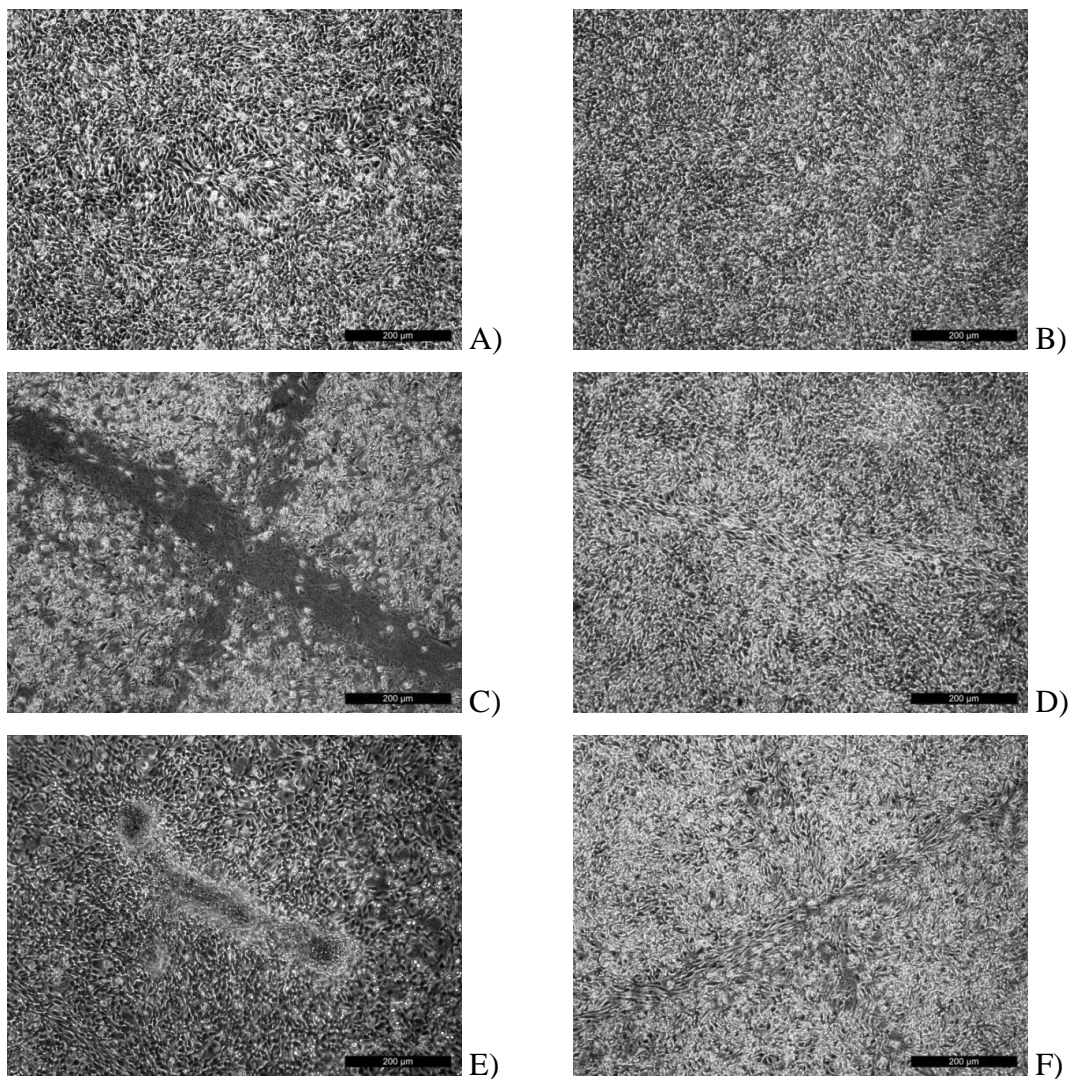
V mnohobuněčném organismu buňky migrují při mnoha důležitých procesech. K tomu dochází například při hojení ran, během embryonálního vývoje nebo při imunitních reakcích. V rámci této diplomové práce byla testována migrace na různých formách PANI filmů a na PANI filmech dopovaných různými kyselinami.

Na připravené filmy (PANI-S, PANI-B, PANI+PAMPSA, PANI+PAMPSA 1:1, PANI+PAMPSA 2:1, PANI+SULF, PANI+PHOSP) byly nanášeny buňky o koncentraci 10^5 /ml média. Buňky byly dva dny kultivovány v inkubátoru, aby vytvořili konfluentní populaci. Poté byly do vrstvy buněk udělány pipetou rýhy. Následně byly pořízeny mikrofotografie pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem. Snímky A) až H) z obrázku 12 byly pořízeny před kultivací buněk v inkubátoru pro následné posouzení buněčné migrace. Na snímcích G) a H) vidíme nižší stupeň konfluence než v ostatních případech, což může být způsobeno dodatečným uvolňováním kyselin, které byly použity pro dopování, díky čemuž buňky huře proliferovaly.

Po pořízení mikrofotografií se buňky kultivovaly v inkubátoru po dobu 24 hodin a byly opět pořízeny mikrofotografie jednotlivých filmů. Z obrázku 13 a snímku A) vidíme, že na referenční misce buňky migrovaly a došlo tedy k plnému pokrytí plochy, ze které byly buňky odstraněny. K obdobné migraci také došlo u filmu PANI-S D) a filmech PANI+PHOSP B), PANI+PAMPSA, PANI+PAMPSA 2:1 E). Na filmu PANI+SULF F) došlo téměř k zacelení vytvořené rýhy, nicméně vytvořená stopa je zde stále patrná, díky nižší proliferativní aktivitě. Nejvíce se lišil film PANI báze, kde buňky migrovaly jen velmi málo, a tedy nedošlo k pokrytí stopy vytvořené pipetou.



Obrázek 13 Mikrofotografie proliferace buněčné linie NIH/3T3 po 0 h: A) reference (bez PANI), B) PANI+PHOSP, C) PANI-B, D) PANI-S, E) PANI+PAMPSA, F) PANI+PAMPSA 1:1, G) PANI+PAMPSA 2:1, H) PANI+SULF

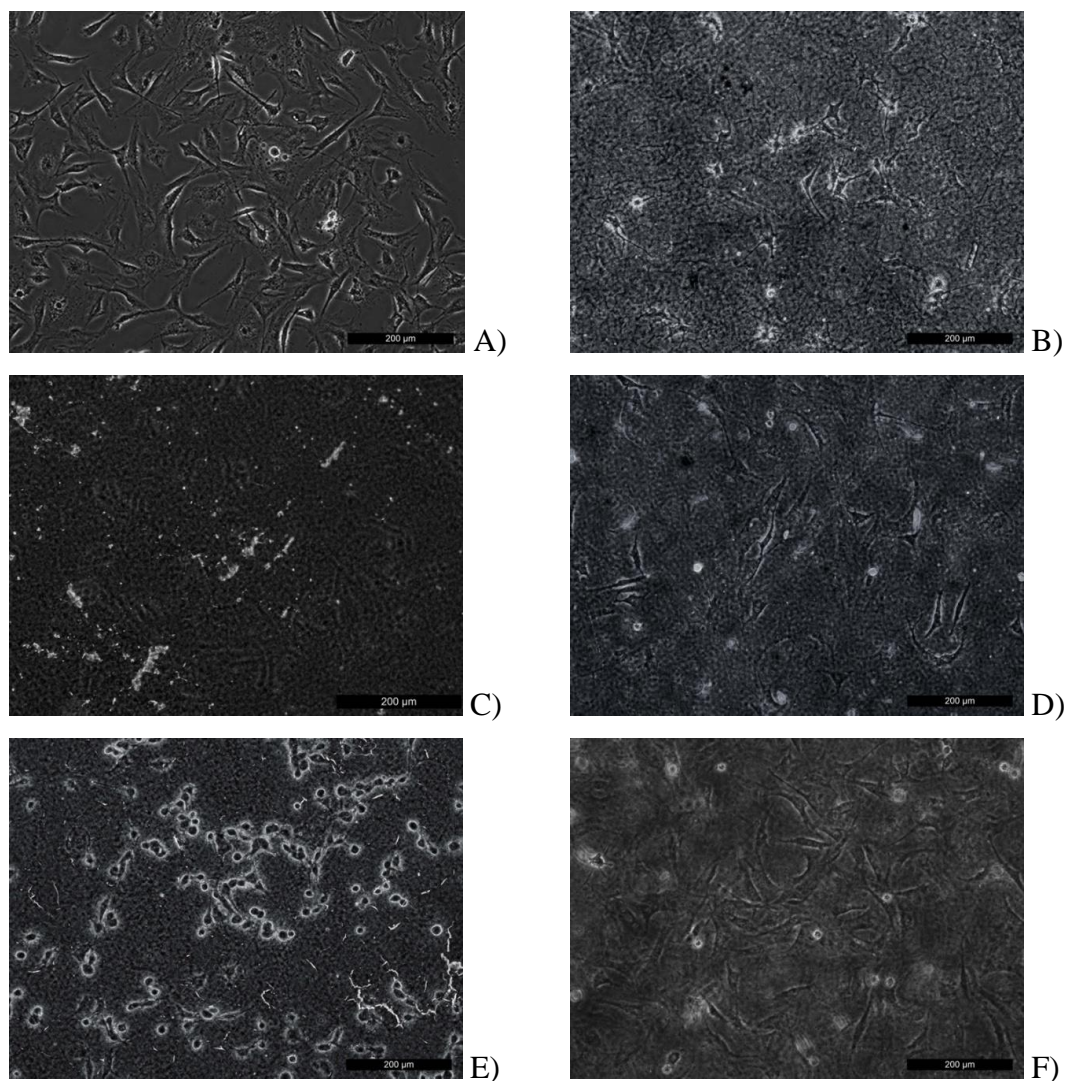


Obrázek 14 Mikrofotografie migrace buněčné linie NIH/3T3 po 24 h: A) reference (bez PANI), B) PANI+PHOSP, C) PANI-B, D) PANI-S, E) PANI+PAMPSA 2:1, F) PANI+SULF.

8.3 Test buněčné adheze na vzorcích upravených plazmou

Test buněčné adheze byl proveden na polyanilinové soli a bázi a na stejných vzorcích po úpravě plazmou. Filmy polyanilinové soli a báze byly připraveny dle uvedeného postupu a část vzorků byla upravena plazmou za výše popsaných podmínek. Časy oplazmování byly 5 s a 30 s. Po 14 dnech od použití plazmy byly připravené filmy pokryty buněčnou suspenzí o koncentraci 10^7 buněk / 1 ml média. Buňky byly kultivovány po dobu 3 hodin v inkubátoru. Po uplynutí doby bylo buňkám odsáto médium a pomocí mikropipety byly buňky jemně opláchnuty 1 ml pufrovaného fyziologického roztoku (PBS). Po odsátí PBS byly provedeno mikroskopem focení buněk, které adherovaly na testovaných površích.

Z obrázku 14 můžeme vidět rozdíly mezi jednotlivými filmy. Na snímku A) je reference, což byla pouze tkáňový polystyren. Na snímku B) je zobrazen film PANI-B, který byl ošetřen plazmovým výbojem po dobu 5 s. Jak vidíme, na tomto filmu je ve srovnání s referencí podstatně méně adherovaných buněk. Počet buněk je ale srovnatelný s filmem polyanilinové báze D), který nebyl ošetřen plazmou. Můžeme tedy říci, že doba plazmového výboje 5 s není dostatečná pro zlepšení buněčné adheze. Filmy polyanilinové soli před i po ošetření plazmou po dobu 5 s byly ve špatné kvalitě a byly silně poškozeny. Proto je zde zobrazen jen film polyanilinové soli před ošetřením plazmou C). Na filmech PANI-S E) a PANI-B F), které byly ošetřeny plazmou po dobu 30 s je srovnatelná buněčná adheze s referencí. Při srovnání filmů ošetřených plazmou po dobu 30 s s polyanilinovými filmy, které nebyly ošetřeny je viditelné větší množství adherovaných buněk. Lze tedy usoudit, že ošetření povrchu plazmovým výbojem po dobu 30 s má příznivý vliv na buněčnou adhezi.

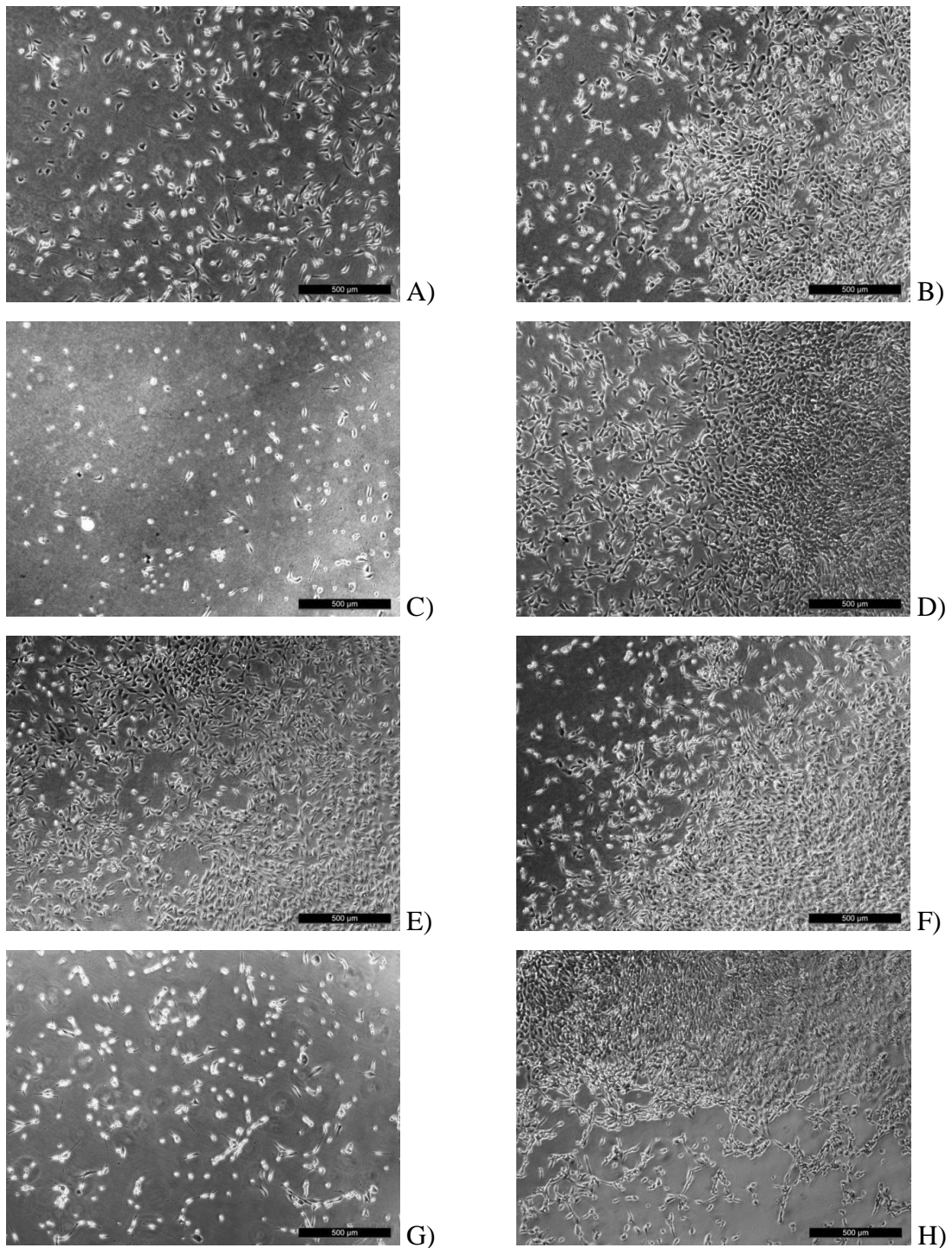


Obrázek 15 Mikrofotografie adheze buněčné linie NIH/3T3: A) reference (bez PANI), B) PANI-B 5 s, C) PANI-S, D) PANI-B, E) PANI-S 30 s, F) PANI-B 30 s.

8.4 Test proliferace na površích modifikovaných BSA

Na vysterilizované PANI filmy byl nanesen hovězí sérový albumin v koncentraci 0, 10, 25, 50 mg/ 1 ml ultračisté vody. Hovězí sérový albumin se nechal 20 minut působit na PANI filmy a poté byl odsát. Na takto upravené PANI filmy byly naneseny buňky o koncentraci 10^5 buněk / 1 ml média. Buňky se nechaly 1 h kultivovat v inkubátoru a následně byly jednotlivé vzorky nafoceny pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem. Jako reference byla použita čistá miska bez PANI filmu. Po uplynutí 72 hodin byly tytéž vzorky nafoceny znovu.

Pro testování proliferace na bovinním sérovém albuminu byly použity polyanilinová báze, sůl a polyanilin upravený kyselinami (amidosulfonová, PAMPSA, PAMPSA 1:1, fosfowolframová) a reference (čistá polystyrenová miska). BSA bylo použito v následujících koncentracích: 0, 10, 25, 50 mg/ml. Mikrofotografie byly pořízeny po 24h a 72h kultivaci v inkubátoru a byla posuzována jejich proliferace. Všechny fotografie v obrázku 15 byly pořízeny po 72 h, neboť rozdíly mezi miskami s albuminem a bez něj zde byly patrnější. U většiny testovaných povrchů platilo, že nebyly patrné velké rozdíly v proliferaci v závislosti na koncentraci použitého BSA. Rozdíly by mohly být patrnější při kratší době působení BSA na povrch, což bylo 20 minut. Na snímcích pořízených po 24 hodinách byly rozdíly patrné u PANI soli a u PANI upraveného PAMPSOU a amidosulfonovou kyselinou, po 72 hodinách tyto rozdíly byly patrnější a jsou zobrazeny v obrázku 15. Na PANI upraveném PAMPSOU a amidosulfonovou kyselinou byl po 72 hodinách velmi malý počet buněk, proto zde tyto snímky nejsou zobrazeny. Na zbylých površích po 24 hodinách nebyly patrné výrazné rozdíly mezi použitím BSA a bez něj. U PANI-S bylo po 72 h nejvíce buněk na povrchu s BSA o koncentraci 25 mg/ml. To platilo i u referenčních misek pokrytých pouze BSA. V ostatních případech bylo nejvíce buněk na površích pokrytých BSA o koncentraci 50 mg/ml, ale jak již bylo zmíněno, rozdíly mezi jednotlivými koncentracemi nebyly příliš velké. Jak je tedy patrné, na površích upravených bovinním sérovým albuminem proliferují buňky více než na PANI filmech nepokrytých BSA. Můžeme tedy říci, že bovinní sérový albumin dělá povrchy pokryté polyanilinem méně toxickými pro buněčnou linii myších fibroblastů.



Obrázek 16 Mikrofotografie proliferace buněčné linie NIH/3T3 po 72 h:
A) PANI-B, B) PANI-B + BSA 50 mg/ml, C) PANI+SULF, D) PANI+SULF + BSA
50 mg/ml, E) PANI+PAMPSA + BSA 50 mg/ml, F) PANI-S + BSA 25 mg/ml,
G) reference, H) BSA 25 mg/ml.

8.5 Stanovení vodivosti polyanilinových filmů

Vodivost PANI filmů byla měřena čtyřbodovou metodou van der Pauw, která lze použít pro tenké ploché vzorky. Dále musí být kontakty umístěny na obvodu vzorku a vzorek musí mít konstantní tloušťku. Pro měření bylo použito programovatelného elektroměru se zdrojem napětí SMU Keithley 237, multimetru Keithley 2010 a voltmetru s 10-ti kanálovou skenovací kartou 2000 SCAN (USA). Filmy byly připraveny dle výše uvedeného postupu na skleněných podložních sklíčkách. Měření bylo provedeno při pokojové teplotě.

Tabulka 3 Stanovené hodnoty elektrické vodivosti

Vzorek	Elektrická vodivost [S/cm]
PANI-S	$3,8522 \pm 0,0008$
PANI-B	Nevodivá
PANI+PAMPSA	$2,0949 \pm 0,0008$
PANI+PHOSP	$0,2710 \pm 0,0003$
PANI+SULF	$3,4218 \pm 0,0004$

Z tabulky 3 vidíme, že nejvyšších hodnot elektrické vodivosti dosahovala PANI-S, která je vodivá díky použitým reakčním složkám. Díky nim dojde k dopování již v průběhu reakce. Všechny měřené filmy vykazovaly elektrickou vodivost v jednotkách Siemens, polyanilinová sůl konkrétně $3,8522 \pm 0,0008$ S/cm. Polyanilinová báze je nevodivá, neboť na řetězcích nejsou přítomny kladné náboje, umožňující elektrickou vodivost. Z filmů, které byly dopovány kyselinami, měl největší elektrickou vodivost film dopovaný amidosulfonovou kyselinou a to $3,4218 \pm 0,0004$ S/cm. Nižší hodnotu elektrické vodivosti měl film dopovaný PAMPSOU $2,0949 \pm 0,0008$ S/cm a film dopovaný kyselinou fosfowolframovou vykazoval téměř nulovou elektrickou vodivost $0,2710 \pm 0,0003$ S/cm.

8.6 Stanovení povrchové energie polyanilinových filmů

Povrchová energie byla stanovena dle tzv. „Acid – Base“ teorie, pro kterou je nutno provést měření za použití alespoň tří kapalin. Úhel smáčení byl stanoven nepřímo, pomocí geometrické analýzy tvaru menisku. Hlavní charakteristikou byl tedy úhel, který svírá tečna k povrchu kapky, vedená bodem styku kapky s rozhraním pevné látky. Úhel smáčení byl stanoven pomocí *See systému 6.2*. Do měřicí části *See systému* bylo umístěno sklíčko

pokryté PANI filmem a pomocí mikropipety byla na povrch nanесena kapka o objemu 10 μl . Pomocí polohovacího zařízení bylo na kapku zaostřeno a byl vyfocen obrázek kapky. Tento postup byl opakován pro pět kapek vody, etylenglykolu a diiodometanu. Následně pomocí softwaru vyhodnotíme úhly smáčení třech daných kapalin a z nich program vypočítá celkovou povrchovou energii.

Tabulka 4 Stanovené povrchové energie pro jednotlivé PANI filmy

Vzorek	Povrchová energie [mJ/m^2]
PANI-S	47,34
PANI-B	53,73
PANI+PAMPSA	55,13
PANI+PHOSP	56,18
PANI+SULF	54,83

Jak lze vidět z tabulky č. 1, nejvyšší povrchovou energii a zároveň hydrofilitu měl polyanilinový film dopovaný kyselinou fosfowolframovou. Naopak nejméně hydrofilní byla polyanilinová sůl. Za zvýšenou hydrofilitu a povrchovou energii jsou pravděpodobně zodpovědné polární skupiny kyselin použitých pro dopování. Výsledky měření kontaktního úhlu jednotlivých povrchů a kapky třech různých kapalin a jejich následný přepočet na povrchovou energii dokazují vliv kyselin použitých při dopování na hydrofilitu polyanilinového filmu.

8.7 Vliv povrchové úpravy plazmovým výbojem na vodivost a topografii

Na fólii z polyethylentereftalátu (PET) byly připraveny vzorky PANI soli a PANI báze, dle výše uvedeného postupu. PANI filmy byly ošetřeny vysoce reaktivní kyslíkovou plazmou po dobu 30 s za výše uvedených podmínek.

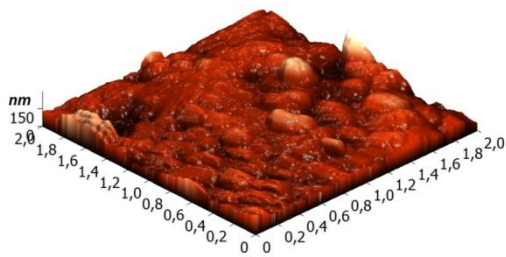
Tabulka 5 Stanovené povrchové energie pro jednotlivé PANI filmy Stanovené kontaktního úhlu před a po ošetření plazmou

	Vzorek	Kontaktní úhel [°]
Před ošetřením plazmou	PANI-S	56.01
	PANI-B	61.80
Po ošetření plazmou	PANI-S	31.27
	PANI-B	19.03
14 dnů po ošetření plazmou	PANI-S	62.52
	PANI-B	61.48

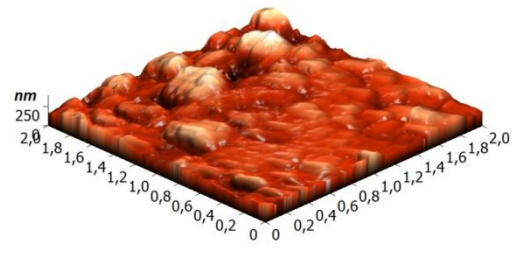
Hodnoty kontaktního úhlu vypovídají o hydrofilitě či hydrofobitě daných filmů. V tabulce 3 jsou uvedeny hodnoty kontaktního úhlu kapky vody a jednotlivých povrchů. Všechny filmy měly kontaktní úhel s kapkou vody menší než 90°, můžeme tedy říci, že všechny povrchy jsou hydrofilní. Jak vidíme, po ošetření plazmou došlo k poklesu kontaktního úhlu. Můžeme tedy říci, že díky ošetření plazmou došlo ke zvýšení hydrofility studovaných povrchů a to jak v případě PANI-S, tak i u PANI-B. U báze byl pokles znatelnější než u soli, lze tedy usoudit, že byla hydrofilnější. Po 14 dnech hodnoty kontaktních úhlů studovaných PANI filmů nabyly svých původních hodnot před ošetřením plazmou.

8.8 Mikroskopie atomárních sil

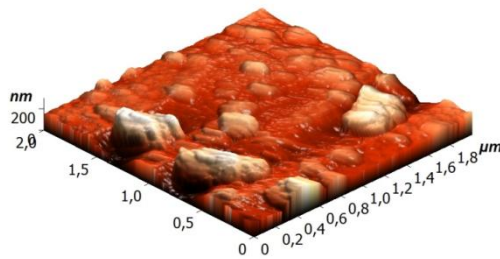
Charakterizace povrchu pomocí mikroskopie atomárních sil byla provedena na filmech PANI soli a PANI báze připravených na PET fólii 1 x 1 cm. Část vzorků byla ošetřena plazmou. Topografie vzorků byla stanovena na AFM (Solver PRO, NT-MDT, Russia) v poklepovém režimu. Vzorky byly skenovány pomocí standardního křemíkového cantileveru se silovou konstantou 22 N/m a při rezonanční frekvenci 325 kHz. Drsnost povrchu byla měřena na snímcích velikých 2 x 2 μm^2 .



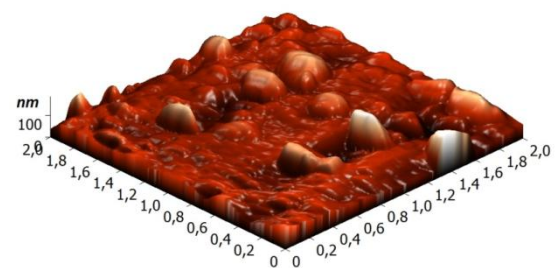
A)



B)



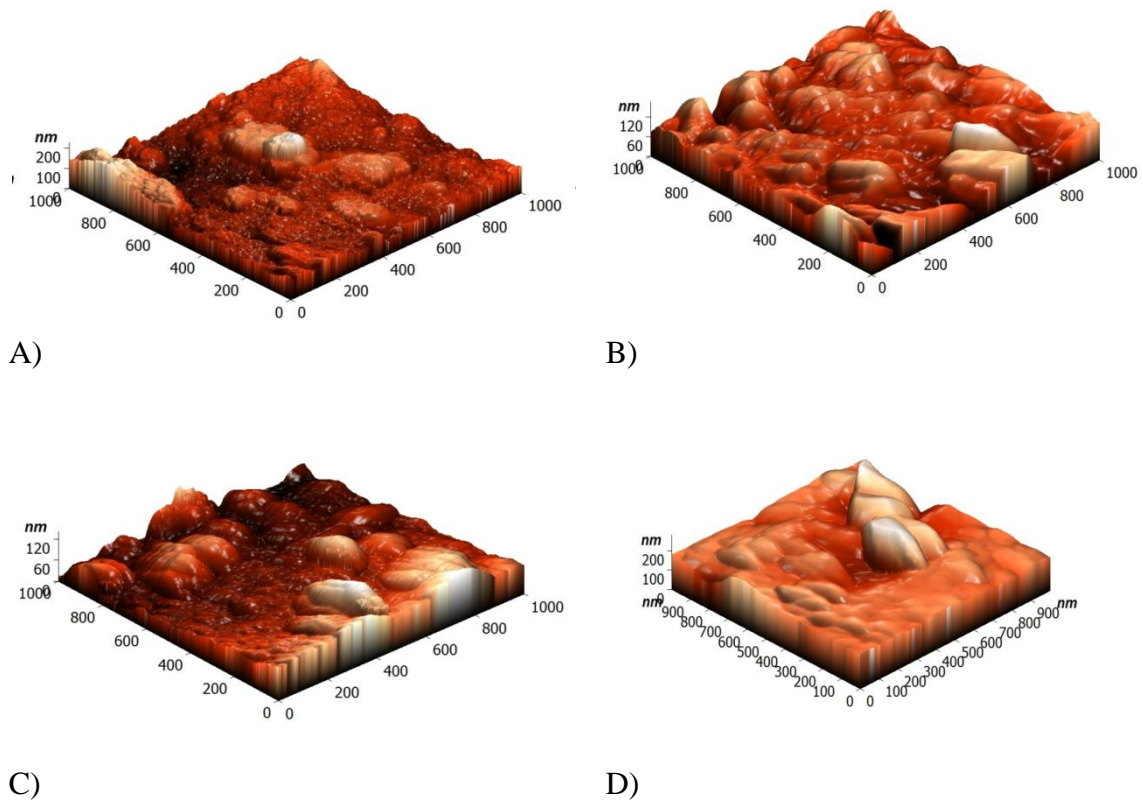
C)



D)

Obrázek 17 Snímky povrchu PANI filmů pořízených AFM 2 x 2 μm : A) PANI sůl, B) PANI sůl + plazma., C) PANI báze, D) PANI báze + plazma

Z těchto větších ploch byly vybrány vhodné oblasti, jejichž povrch byl opět změřen. Výsledné snímky měly velikost 1x1 μm^2 , které zobrazovaly více detailů.



Obrázek 18 Snímky povrchu PANI filmů pořízených AFM 1 x 1 μm : A) PANI sůl, B) PANI sůl + plazma., C) PANI báze, D) PANI báze + plazma

Povrchová drsnost byla vyjádřena průměrnou drsností vzhledem k průměrné výšce prvků na povrchu.

Tabulka 6 Stanovené hodnoty drsnosti pro jednotlivé filmy pomocí AFM [nm]

	2 x 2 μm		1 x 1 μm	
	neošetřeno	Ošetřeno	neošetřeno	ošetřeno
PANI S	22,1	30,2	23,4	15,8
PANI B	28,5	16,0	11,5	21,2

V tabulce 6 jsou uvedené drsnosti PANI soli, báze a stejně tak drsnosti těchto filmů před a po ošetření plazmou, které byly získány na mikroskopu atomových sil. Pokud srovnáme drsnost PANI soli před a po ošetření plazmou na ploše 2 x 2 μm , můžeme ze získaných

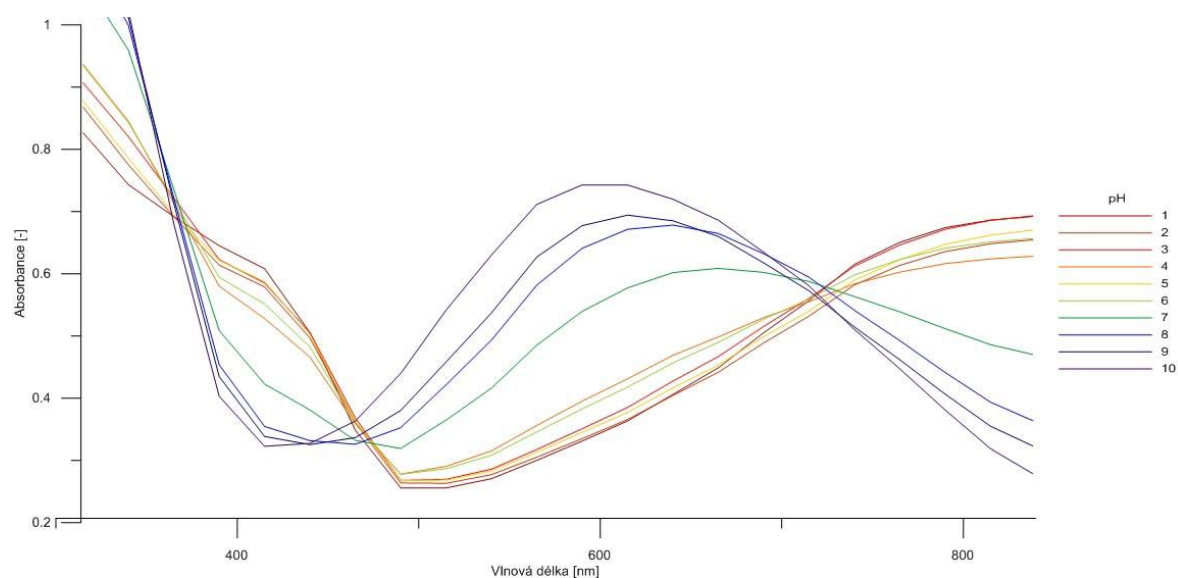
hodnot říci, že po ošetření plazmou je povrch drsnější. Pokud ale srovnáme plochu $1 \times 1 \mu\text{m}$, platí zcela opačné tvrzení. Při porovnání PANI báze dosáhneme také nesrovnalostí mezi oblastí o velikosti $2 \times 2 \mu\text{m}$ a $1 \times 1 \mu\text{m}$. Pokud bychom měřili přesně stejnou oblast daných povrchů, což je prakticky neproveditelné, k těmto neshodám by možná nedošlo.

Můžeme tedy říci, že nedošlo k jednoznačným změnám morfologie po ošetření povrchu plazmou, jak u polyanilinové soli, tak u polyanilinové báze.

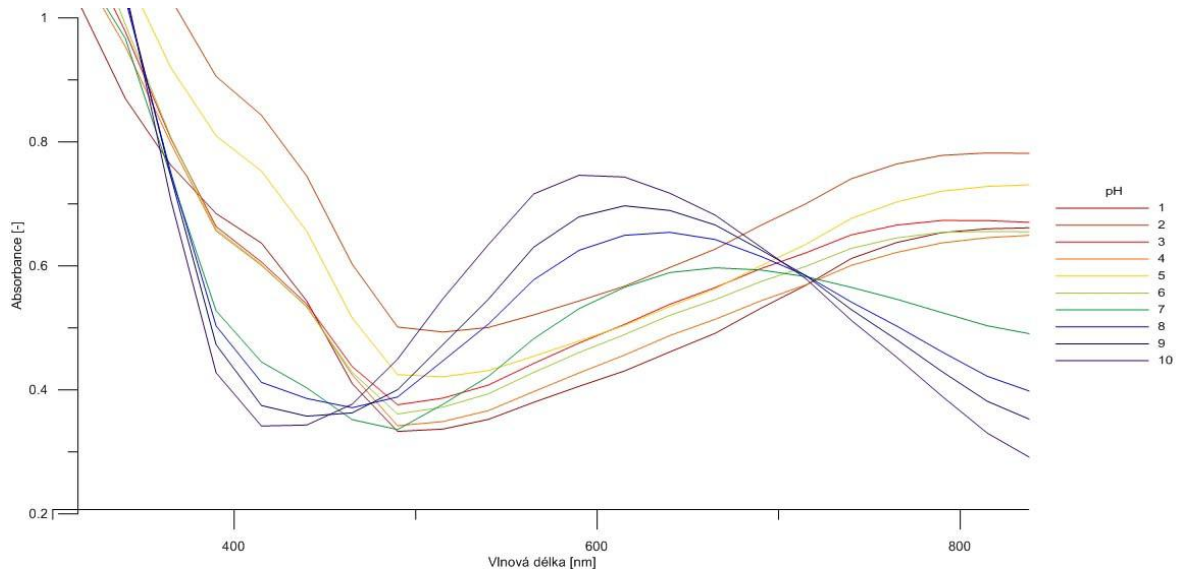
8.9 UV-Vis

Na PANI filmech protonovaných PAMPSou, kyselinou amidosulfonovou a fosfowolframovou byly charakterizovány UV-Vis spektra.

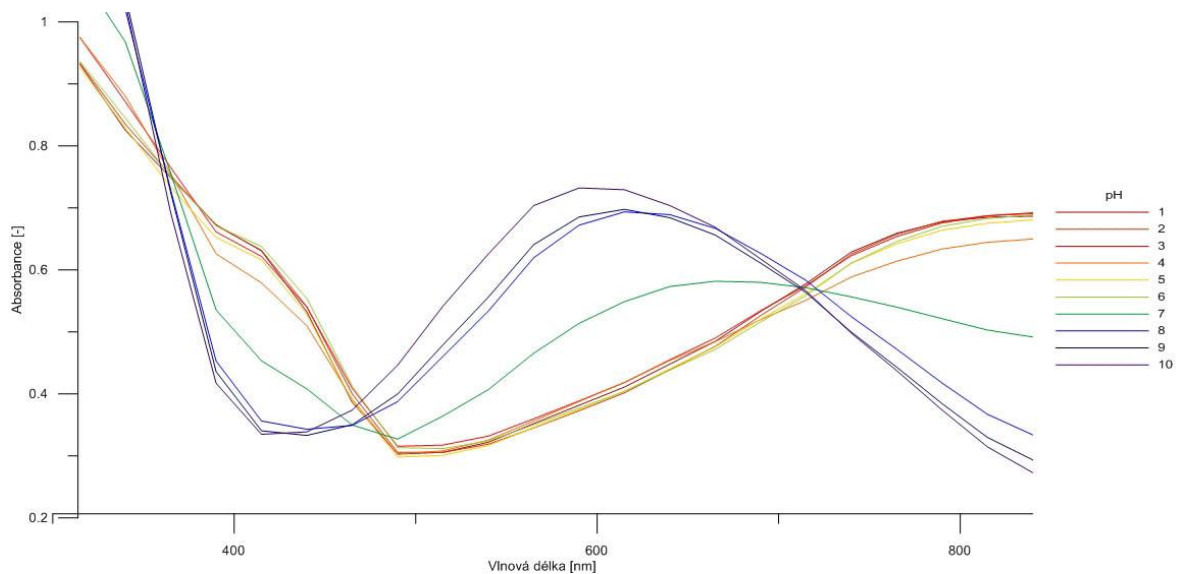
Nejprve byly připraveny zásobní roztoky chloridu draselného (KCl), kys. citronové, dekahydrátu tetraboritanu sodného ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), dihydrogenfosforečnanu draselného (KH_2PO_4) o koncentraci 0,0225 M. Z těchto zásobních roztoků a trisaminomethanu (tris), kyseliny chlorovodíkové (HCl), hydroxidu sodného (NaOH) pak byly připraveny pufrů v rozmezí pH 1 – 10. Na filmy připravené v 24-jamkových platech byl nalit vždy 1 ml pufru, který se nechal působit po dobu 1 hodiny. Následně byla změřena absorbance UV-Vis spektra v rozmezí vlnových délek 290 – 840 nm.



Graf 2 UV-Vis spektra PANI+PAMPSA v roztocích pufrů 1-10



Graf 3 UV-Vis spektra PANI+PHOSP v roztocích pufrů 1-10



Graf 4 UV-Vis spektra PANI+SULF v roztocích pufrů 1-10

UV-Vis spektra různých PANI filmů byla měřena pro zjištění pH, při kterém dojde k přechodu mezi vodivou a nevodivou formou. U nižších hodnot pH se objevují v rozmezí vlnových délek 250 – 900 nm dvě absorpční maxima (Stejskal a Gilbert, 2002), což je patrné i z přiložených grafů. Ty jsou typické pro vodivou formu PANI a odpovídají přechodu $\pi - \pi^*$ benzenových kruhů. Dále lze z grafů vidět, že při pH větších než 6, dojde k přechodu z vodivé formy na nevodivou formu. Tento přechod je doprovázen posunem absorpčního maxima v oblasti 800 nm k nižším hodnotám. Jak vidíme, přechod u filmu

PANI+PAMPSA je více pozvolný než u filmu PANI+SULF. U vyšších hodnot pH je absorpční maximum okolo 550 - 600 nm. To odpovídá přechodu $n - \pi^*$, přičemž film je plně deprotonovaný a nevodivý.

9 DISKUZE

Pro reprodukovatelnost a srovnatelnost výsledků byl zvolen postup a metodika praktické části na základě již publikovaných studií. Syntéza polyanilinových filmů byla provedena dle metodiky IUPAC publikované ve článku Stejskala et al., (2002). Dle tohoto postupu byl pro přípravu použit anilin hydrochlorid a peroxydvojsíran amonný, jejichž smíchání došlo k polymerizační reakci. Reakčním prostředím byla voda a reakce probíhala při pokojové teplotě po dobu 20 minut.

Z připravené polyanilinové soli byla pomocí 1M hydroxidu amonného připravena polyanilivoná nevodivá báze. Báze byla následně protonována různými kyselinami, které vedou k dopování polyanilinového řetězce. Byly použity následující kyseliny: fosfowolframová, amidosulfonová a poly(2-akrylamido-2-methyl-1-propansulfonová kyselina). Tyto jednotlivé kyseliny mají odlišný vliv na jejich elektrickou vodivost, biologické vlastnosti filmů a s nimi související hydrofilitu či hydrofobitu.

Jednotlivé filmy tedy byly porovnávány na základě vlastností, jako je povrchová energie, která byla stanovena na základě měření kontaktního úhlu kapek s povrchem, dále buněčné aktivity, která byla posuzována z výsledků proliferace a migrace buněk myších fibroblastů NIH/3T3 a na základě hodnot elektrické vodivosti.

Nejprve bych zhodnotila hodnoty měrné elektrické vodivosti. Elektrická vodivost povrchu ovlivňuje buněčnou migraci, proto je nutné se jí zabývat v souvislosti s vodivými polymery. Měrná elektrická vodivost byla také zhodnocena v článku Stejskala a Gilberta (2002), kde bylo měření provedeno různými institucemi. Byla měřena vodivá polyanilinová sůl, která zde dosahovala hodnot 2,07 – 6,41 S/cm. Hodnoty naměřené v rámci mé diplomové práce se pohybovaly v jednotkách S/cm, přičemž nejvyšší hodnota dosáhla 3,85 S/cm pro polyanilinovou sůl. Filmy dopované kyselinami měly hodnoty měrné elektrické vodivosti nižší než polyanilinová sůl, přičemž polyanilinová báze nebyla vodivá vůbec. Stejně tak, ve studii Humpolíček et al. (2015) byla u elektrochemicky připravených polyanilinových filmů s PANI naměřena nižší elektrická vodivost než v případě filmu PANI-S. Elektrická vodivost také byla stanovena ve článku Wang et al. (2008), kde také dopovali polyanilin různými kyselinami (chloristou, chlorovodíkovou, jablečnou a citronovou). Hodnoty elektrické vodivosti se pohybovaly v rozmezí 0,02 – 1 S/cm.

Povrchová energie připravených filmů byla stanovena na základě měření kontaktního úhlu tří různých kapalin (neionizované vody, diiodmethanu a etylenglykolu) nanesených na

povrch ve stejných objemech. Naměřené hodnoty povrchových energií se mezi jednotlivými filmy příliš nelišily a pohybovaly se v rozmezí 47,1 – 56,18 mJ/m². Nicméně filmy dopované kyselinami měly povrchovou energii vyšší než film PANI-S, tedy vyšší hydrofilitu. Můžeme tedy říci, že dopování kyselinami zvyšuje hydrofilitu. Dále byl pozorován vliv ošetření povrchu plazmou na hydrofilitu/hydrofobitu filmů. Byl porovnáván kontaktní úhel kapky vody na polyanilinové soli a bázi před a po ošetření. Plazma výrazně snížila kontaktní úhel v obou případech a to minimálně o polovinu. V případě polyanilinové soli došlo k poklesu z 56,01° na 31,27° a v případě polyanilinové báze z 61,80° na 19,3°. Nicméně dochází zde ke ztrátám účinku ošetření plazmou a po 14 dnech byly kontaktní úhly v obou případech stejné jako před ošetřením filmů plazmou. Vliv plazmového výboje na vlastnosti polyanilinových filmů nebyl doposud více popsán, proto uvedené výsledky není možné porovnat s publikovanými pracemi.

V rámci biologického tetování byly provedeny testy proliferace adheze a migrace buněčné linie myších fibroblastů NIH/3T3. Výsledky byly posuzovány na základě mikrofotografií. Vzorky filmů byly osazeny buňkami o koncentraci 1×10^5 / ml kultivačního média. Po uplynutí dané doby byla hodnocena migrace a proliferace pomocí mikrofotografií. Testy buněčné proliferace byly vyhodnoceny po 72 hodinách kultivace. Proliferace na PANI filmech byla srovnatelná s referencí a došlo k tvorbě souvislé vrstvy buněk, kromě PANI filmů s PAMPSou 1:1 a 2:1, kde došlo k tvorbě shluků buněk. Testy migrace byly vyhodnoceny po 24 hodinách kultivace od vytvoření rýhy do souvislé vrstvy buněk. U většiny filmů došlo ke kompletnímu zacelení oblasti bez buněk. Pouze na PANI-B došlo k minimální migraci. Zhoršená migrace v porovnání s referencí byla zaznamenána u PANI dopovaného k. amidosulfonovou. Dále byl posuzován vliv bovinního sérového albuminu na buněčnou aktivitu a to při použití různých koncentrací (0, 10, 25, a 50 mg / 1 ml ultračisté vody). Na površích pokrytých PANI filmy a ošetřených BSA byla zaznamenána vyšší proliferace než na PANI filmech, kde BSA nebylo použito. Ale mezi jednotlivými koncentracemi nebyly zaznamenány výrazné rozdíly.

Bidez et al. (2006) studovali adhezi a proliferaci srdečních myoblastů H9c2 na vodivých i nevodivých PANI filmech a zjistil, že oba substráty jsou biokompatibilní a buňky dosáhly plné konfluency po 6 dnech. Zvýšení proliferace v této době pravděpodobně souvisí se ztrátou vodivosti po 100 hodin ve vodném fyziologickém prostředí. Po uplynutí této doby došlo ke ztrátě vodivosti a k vyčerpání dopující kyseliny, což v tomto případě byla 1M kyselina octová. Uvolněné kyselé příměsi mohou souviset s horší adhezí na vodivých fil-

mech než na nevodivých. Proliferace na filmech použitých v této studii byla srovnatelná s referencí na polystyrenovém podkladu. Dále lze uvést studii, kterou provedl Wang et al. (2008) na PANI filmech připravených polymerizací roztoku anilinu metylchloridu roztokem amonium persulfátu v HCl. Polytetrafluorethylenové povrchy byly osazeny nervovými buňkami PC-12. Filmy v této studii byly vyhodnoceny jako biokompatibilní s adhezí a proliferací srovnatelnou s referencí. Ve studii Liu et al., (2010) byly filmy připraveny srážecí polymerací anilinu amonium persulfátem v přítomnosti HCl na křemíkový substrát. Také zde byly použity nervové buňky PC-12 a bylo zjištěno, že na površích ošetřených PANI filmem buňky vykazovaly lepší adhezi než na referenčních křemíkových substrátech.

Dále byla stanovena drsnost a morfologie PANI soli a PANI báze před a po ošetření plazmou pomocí mikroskopie atomárních sil. Z naměřených výsledků nelze jednoznačně říci, jestli má oplazmování PANI filmů mělo vliv na morfologii a drsnost. Hodnoty drsnosti filmu PANI-S jsou ale srovnatelné s článkem Wang et al. (2008), kde byla stanovena drsnost PANI filmů dopovaných různými kyselinami a také PANI-S. Naměřená drsnost byla 20,8 nm, což je hodnota srovnatelná s hodnotami PANI-S v mé diplomové práci, které byly 22,1 a 23,4 nm. Ve studii provedené na CPS (Humpolíček et al., 2015) byla také porovnávána morfologie a drsnost filmů PANI-S, PANI-B a PANI+PAMPSA. Také zde nebyly zjištěny jednoznačné rozdíly mezi jednotlivými filmy. Ačkoliv lze obecně drsnost označit za významný parametr ovlivňující buněčnou reakci na povrch, stanovené rozdíly se zdají být v této souvislosti spíše nevýznamné.

Posledním testem bylo stanovení pH, při kterém dojde k přechodu z vodivé na nevodivou formu pomocí UV-Vis spektrometrie. Různé PANI povrchy byly měřeny při vlnové délce 290 – 840 nm a byla měřena absorbance. Přejít mezi z vodivé na nevodivou formu byl u všech filmů při pH 6 – 7. Nejméně stabilní byl film PANI+PHOSP. Filmy PANI+PAMPSA a PANI+SULF byly srovnatelné, přičemž stabilnější byl PANI film dopovaný PAMPSo. Podobného výsledku bylo dosaženo ve článku Humpolíček et al. (2015), kde bylo stanovováno pH přechodu filmu PANI+PAMPSA z vodivé na nevodivou formu. PANI dopovaný PAMPSoU měl také zde vyšší stabilitu. K přechodu z vodivé na nevodivou formu došlo při pH vyšších než 7. Jak je uváděno v literatuře, u polyanilinové soli dochází běžně k přechodu z vodivé na nevodivou formu při pH 5 – 6 (Stejskal a Gilbert, 2002). Můžeme tedy říci, že dopování kyselinami PAMPSo a amidosulfonovou zvyšuje stabilitu polyanilinových filmů ve fyziologickém prostředí. Filmy tedy

zůstávají vodivé v širším rozsahu pH než polyanilinový sůl, což je výhodnější zejména pro aplikace v tkáňovém inženýrství.

ZÁVĚR

Polyanilin je polymer s mnoha pozitivními vlastnostmi, jako je například elektrická vodivost či snadná příprava, což z něj činí materiál, kterému je věnováno mnoho zájmu. Jeho použití v kombinaci s vnější elektrickou stimulací umožňuje ovlivňovat buněčnou odpověď a funkci.

V experimentální části této diplomové práce byly připraveny různé polyanilinové filmy. V první části experimentální práce, která byla provedena na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně, byly testovány PANI filmy dopované několika kyselinami (PAMPSou, fosfowolgramovou a amidosulfonovou). Vyhodnocena byla buněčná aktivita pomocí testování buněčné proliferace, migrace a vliv bovinního sérového albuminu na buněčnou proliferaci. Dále u těchto filmů byla stanovena povrchová energie, vodivost a spektroskopické. Druhá část experimentální práce byla provedena na Institutu Jožefa Stefana ve Slovinsku. Zde byly testovány filmy PANI soli a báze před a po úpravě povrchu pomocí plazmy. Na filmech byly charakterizovány materiálové vlastnosti, jako drsnost povrchu, morfologie, kontaktní úhel a byl posouzen vliv na buněčnou adhezi.

Pro stanovení buněčné aktivity byly jednotlivé filmy osazovány buňkami myší linie NIH/3T3. Z výsledků proliferace a migrace provedených na polyanilinových filmech dopovaných různými kyselinami, bylo zjištěno, že buňky jsou schopny adherovat na všech testovaných filmech. Za nejvíce vyhovující film pro aplikace v tkáňovém inženýrství lze označit polyanilinový film dopovaný PAMPSOU. Pokud byly filmy dopované kyselinami ošetřeny bovinním sérovým albuminem, došlo ke zvýšení proliferační aktivity buněk. Z výsledků elektrické vodivosti, povrchové energie se nejlépe jevil opět polyanilinový film dopovaný PAMPSOU. Při testování pH stability bylo zjištěno, že filmy dopované PAMPSOU a kyselinou amidosulfonovou jsou stabilnější v širším rozsahu pH než polyanilinová sůl.

Na filmech ošetřených plazmovým výbojem po dobu 30 s byla pozorována zlepšená buněčná adheze, což souvisí se zvýšenou hydrofilitou. Dále bylo zjištěno, že po ošetření plazmou nedojde ke změně morfologie filmů polyanilinové báze a soli.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ABMAYR, S. M; PAVLATH, G. K; 2012. Myoblast Fusion: Lessons from Flies and Mice. *Development*. 2012, vol. 139, no. 4, pp. 641 – 656. DOI: 10.1242/dev.068353
- ALBERTS, B; 2002. Molecular biology of the cell. 4th ed. New York: Garland Science, 2002. ISBN: 0-8153-3218-1
- ALBIGES-RIZO, C; BOUVARD, D; BOUIN, A-P; PLANUS, E; FAUROBERT, E; BLOCK, M. R; 2009. Talin, a Bodybuilder-like Protein for Integrin Mediated Force Transmission in Cells. *Médecine Sciences : M/S*. 2009, vol. 25, no. 11, pp. 909 - 911. DOI: 10.1051/medsci/20092511909
- ANDREU, Y; DE MARCOS, S; CASTILLO, J. R; GALBÁN, J; 2005. Sensor Film for Vitamin C Determination Based on Absorption Properties of Polyaniline. *Talanta*. 2005, vol. 65, no. 4, pp. 1045 - 1051. DOI: 10.1002/yea.1405
- ARSALANI, N; GECKELER, K. E; 1995. Conducting Isopolymers: Preparation, Properties, and Applications. *Journal für praktische Chemie*. 1995, vol. 337, pp. 1 - 11. DOI: 10.1002/prac.19953370102
- ATES, M; KARAZEHIR T; SARAC A. S; 2012. Conducting Polymers and their Applications. *Current Physical Chemistry*. 2012, vol. 2, pp. 224 - 240. DOI: 10.4028/www.scientific.net/MSF.42.207
- BALDISSERA, A. F; FERREIRA C. A; 2012. Coatings based on electronic conducting polymers for corrosion protection of metals. *Progress in Organic Coatings*. Vol. 75, no. 3, pp. 241 – 247. DOI: 10.1016/j.polymer.2007.05.033
- BALINT, R; CASSIDY, N. J; CARTMELL, S. H; 2014. Conductive Polymers: Towards a Smart Biomaterial for Tissue Engineering. *Acta Biomaterialia*. 2014, vol. 10, no. 6 pp. 2341 - 2353. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.02.015
- BARÓ, A. M; REIFENBERGER, R. G; 2012. *Atomic Force Microscopy in Liquid: Biological Applications*. John Wiley & Sons, 2012. ISBN: 978-3-527-32758-4
- BASTIOLI, C; 2005. Handbook of Biodegradable Polymers. Shawbury: Rapra Technology Limited. ISBN: 1-85957-389-4. Digitální kopie dostupná online: http://www.academia.edu/4243818/Handbook_of_Biodegradable_Polymers

- BEACHLEY, V; WEN, X; 2010. Polymer Nanofibrous Structures: Fabrication, Biofunctionalization, and Cell Interactions. *Progress in Polymer Science*. 2010, vol. 35, no. 7, pp. 868 - 892. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2010.03.003
- BEJBOUJI, H; VIGNAU, L; MIANE, J. L; DANG, M-T; OUALIM, M; HARMOUCHI, M; MOUHSEN, A; 2010. Polyaniline as a Hole Injection Layer on Organic Photovoltaic Cells. *Solar Energy Materials and Solar Cells*. 2010, vol. 94, no. 2, pp. 176 - 181. DOI: 10.1016/j.solmat.2009.08.018
- BEH, W. S; KIM, I. T; QIN, D; XIA, Y; WHITESIDES, G. M; 1999. Formation of Patterned Microstructures of Conducting Polymers by Soft Lithography, and Applications in Microelectronic Device Fabrication. *Advanced Materials*. 1999, vol. 11, no. 12, pp. 1038 - 1041. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4095(199908)11:12<1038::AID-ADMA1038>3.0.CO;2-L
- BIDEZ, P. R; LI, S; MACDIARMID, A. G; VENANCIO, E. C; WEI, Y; LELKES, P. I; 2006. Polyaniline, an Electroactive Polymer, Supports Adhesion and Proliferation of Cardiac Myoblasts. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2006, vol. 17, no. 1 - 2199. DOI: 10.1163/156856206774879180
- BORRIELLO, A; GUARINO, V; SCHIAVO, L; ALVAREZ-PEREZ, M. A; AMBROSIO, L; 2011. Optimizing PANI Doped Electroactive Substrates as Patches for the Regeneration of Cardiac Muscle. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*. 2011, vol. 22, no. 4, pp. 1053 - 1062. DOI: 10.1007/s10856-011-4259-x
- CONN, P. M; 1990. *Cell culture*. San Diego: Academic Press. ISBN: 0 12 185254 7
- ČSN EN ISO 1993-1, 2010. *Všeobecné podmínky a směrnice pro výrobky zdravotnické techniky – Biologické hodnocení prostředků zdravotnické techniky – Část 1: Hodnocení a zkoušení*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví. Katalogové číslo 86057
- DAS, D; DATTA, A; CONTRACTOR, A. Q; 2014. Doping of Polyaniline with 6-cyano-2-naphthol. *The Journal of Physical Chemistry. B*. 2014, vol. 118, no. 45, pp. 12993 – 13001. DOI: 10.1021/jp5060843
- DAS, G; YOON, H; 2015. Amperometric Urea Biosensors Based on Sulfonated Graphene/polyaniline Nanocomposite. 2015, vol. 2015, pp. 55 – 66. DOI: <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S88315>

- DHAND, C; DAS, M; DATTA, M; MALHOTRA, B. D; 2011. Recent Advances in Polyaniline Based Biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011, vol. 26, no. 6, pp. 2811 - 2821. DOI: 10.1016/j.bios.2010.10.017
- DHAWAN, S. K; SINGH, N; RODRIGUES, D; 2003. Electromagnetic Shielding Behaviour of Conducting Polyaniline Composites. *Science and Technology of Advanced Materials*. 2003, vol. 4, no. 2, pp. 105 - 113. DOI: 10.1016/S1468-6996(02)00053-0
- DOMINIS, A. J; 2001. Investigation of Polyaniline Emeraldine Salt for the Protection of Plain Carbon Steel. Doctor of Philosophy thesis, Department of Chemistry, University of Wollongong, 2001. <http://ro.uow.edu.au/theses/1158>
- DONALDSON, C D; BISHOP, K N. Cell Culture. *British Journal of Hospital Medicine*. 2015, vol. 76, no. 1, pp. C2-C5. DOI: 10.12968/hmed.2015.76.1.C2
- FERNANDES, E. G. R; ZUCOLOTTO, V; DE QUEIROZ, A. A; 2010. Electrospinning of Hyperbranched Poly-L-Lysine/Polyaniline Nanofibers for Application in Cardiac Tissue Engineering. *Journal of Macromolecular Science, Part a*. 2010, vol. 47, no. 12, pp. 1203 - 1207. ISSN:1060-1325. DOI: 10.1080/10601325.2010.518847
- FREUND, M. S; DEORE, B; 2007. Self-doped Conducting Polymers. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2007, s. 1 - 326. ISBN: 978-0-470-02969-5. Online dostupné z: https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=5ucJunRZjkC&oi=fnd&pg=PR5&dq=FREUND,+M.+S%3B+DEORE,+B%3B+2007.+Selfdoped+Conducting+Polymers.+2007,+s.+1+-+326.&ots=z4er2M3Jkg&sig=kObHaCPqRuOUsqKxf-BjAwLcHTs&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- FRITH, J. E; MILLS, R. J; HUDSON, J. E; COOPER-WHITE, J. J; 2012. Tailored Integrin–Extracellular Matrix Interactions to Direct Human Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *Stem Cells and Development*. 2012, vol. 21, no. 13, pp. 2442 - 2456. DOI: 10.1089/scd.2011.0615
- GAMBLE, J. F; LEANE, M; OLUSANMI, D; TOBYN, M; ŠUPUK, E; KHOO, J; NADERI, M; 2012. Surface Energy Analysis as a Tool to Probe the Surface Energy Characteristics of Micronized Materials - a Comparison with Inverse Gas Chromatography. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012, vol. 422, no. 1-2, pp. 238 - 244. DOI: 10.1016/j.ipharm.2011.11.002

- GHASEMI-MOBARAKEH, L; PRABHAKARAN, M. P; MORSHED, M; NASR-ESFAHANI, M. H; BAHARVAND, H; KIANI, S; AL-DEYAB, S. S; RAMAKRISHNA, S.; 2011. Application of Conductive Polymers, Scaffolds and Electrical Stimulation for Nerve Tissue Engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2011, vol. 5, no. 4, pp. e17 - e35. DOI: 10.1002/term.383
- GRINNELL, F; HO, Ch-H; TAMARIZ, E; LEE, D. J; SKUTA, G; 2003. Dendritic Fibroblasts in Three-dimensional Collagen Matrices. *Molecular Biology of the Cell*. 2003, vol. 14, no. 2, pp. 384 - 395. DOI: 10.1111/joa.12257
- GURUNATHAN, K; AMALNERKAR, D. P; TRIVEDI, D. C; 2003. Synthesis and Characterization of Conducting Polymer Composite (PAn/TiO₂) for Cathode Material in Rechargeable Battery. *Materials Letters*. 2003, vol. 57, no. 9 s. 1642-1648. DOI: 10.1016/S0167-577X(02)01045-5
- CHEN, C-C; GU, Yesong; 2008. Enhancing the Sensitivity and Stability of HRP/PANI/Pt Electrode by Implanted Bovine Serum Albumin. *Biosensors and Bioelectronics*. 2008, vol. 23, no. 6, pp. 765 - 770. DOI: 10.1016/j.bios.2007.08.014
- GU, B. K; ISMAIL, Y. A; SPINKS, G. A; KIM, S. I; SO, I; KIM, S. J; 2009. A Linear Actuation of Polymeric Nanofibrous Bundle for Artificial Muscles. *Chemistry of Materials*. 2009, vol. 21, no. 3, pp. 511 - 515. DOI:10.1021/cm802377d
- GUIMARD, N. K; GOMEZ, N; SCHMIDT, C. E; 2007. Conducting Polymers in Biomedical Engineering. *Progress in Polymer Science*. 2007, vol. 32, no. 8, pp. 876 - 92. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.012
- HAYES, J. S; CZEKANSKA, E. M; RICHARDS, R. G. The Cell-surface Interaction. *Advances in Biochemical Engineering/biotechnology*. 2012, vol. 126, pp. 1 - 31. DOI: 10.1007/10_2011_110
- HUANG, L; HU, J; LANG, L; WANG, X; WANG, X; ZHANG, P; JING, X; CHEN, X; LELKES, I; MACDIARMID, A; WEI, Y; 2007. Synthesis and Characterization of Electroactive and Biodegradable ABA Block Copolymer of Polylactide and Aniline Pentamer. *Biomaterials*. 2007, vol. 28, no. 10, pp. 1741 – 1751. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.12.007
- HUMPOLÍČEK, P; KUČEKOVÁ, Z; KAŠPÁRKOVÁ, V; PELKOVÁ, J; MODIC, M; JUNKAR, I; TRCHOVÁ, M; BOBER, P; STEJSKAL, J; LEHOČKÝ, M; 2015.

- Blood Coagulation and Platelet Adhesion on Polyaniline Films. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2015, vol. 133 pp. 278 - 285.
DOI:10.1016/j.colsurfb.2015.06.008
- HUMPOLÍČEK, P; RADASZKIEWICZ, K. A; KAŠPÁRKOVÁ, V; STEJSKAL, J;
TRCHOVÁ, M; KUČEKOVÁ, Z; VIČAROVÁ, H; PACHERNÍK, J;
LEHOCKÝ, M; MINAŘÍK, A. Stem Cell Differentiation on Conducting Polyaniline. *RSC Advances*. 2015, vol. 5. DOI: 10.1039/c5ra12218j
- HYNES, R. O; 1992. Integrins: Versatility, Modulation, and Signaling in Cell Adhesion. *Cell*. 1992, vol. 69, no. 1 s. 11-25. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90115-S
- JANG, J; HA, J; KIM, K; 2008. Organic Light-emitting Diode with Polyaniline-poly(styrenesulfonate) as a Hole Injection Layer. *Thin Solid Films*. 2008, vol. 516, no. 10, pp. 3152 – 3156. DOI: 10.1016/j.tsf.2007.08.088
- JEONG, S. I; JUN, I. D; CHOI, M. J; NHO, Y. C; LEE, Y. M; SHIN, H; 2008. Development of Electroactive and Elastic Nanofibers That Contain Polyaniline and Poly(L-lactide-co-epsilon-caprolactone) for the Control of Cell Adhesion. *Macromolecular Bioscience*. 2008, vol. 8, no. 7, pp. 627 - 637.
DOI: 10.1002/mabi.200800005
- JUN, I; JEONG, S; a SHIN, H; 2009. The Stimulation of Myoblast Differentiation by Electrically Conductive Sub-micron Fibers. *Biomaterials*. 2009, vol. 30, pp. 2038 - 2047. DOI:10.1016/j.biomaterials.2008.12.063
- KAMALESH, S; TAN P; WANG J; LEE E. T; a WANIG C. H, 2000. Biocompatibility of Electroactive Eolymers in Tissues. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2000, vol. 52, no. 3, pp. 467 - 478.
DOI: 10.1002/1097-4636(20001205)52:3<467::AID-JBM4>3.0.CO;2-6
- KELLY, F. M; MEUNIER, L; COCHRANE, C; KONCAR, V; 2013. Polyaniline: Application as Solid State Electrochromic in a Flexible Textile Display. *Displays*. 2013, vol. 34, no. 1 s. 1-7. DOI: 10.1016/j.displa.2012.10.001
- KHORASANI, M.T; MIRZADEH, H; IRANI, S, 2008. Plasma Surface Modification of Poly (L-lactic Acid) and Poly (Lactic-co-glycolic Acid) Films for Improvement of Nerve Cells Adhesion. *Radiation Physics and Chemistry*. 2008, vol. 77, no. 3, pp. 280 - 287. DOI: 10.1016/j.radphyschem.2007.05.013

- KLEIST, F. D. a BYRD N. R.; 1969. Preparation and Properties of Polyacetylene. *Polymer Chemistry*. 2003, vol. 7, iss. 12, pp. 3419 - 3425.
DOI: 0.1002/pol.1969.150071216
- KOHL, M; KALEDOVÁ, A., 2014. Hodnocení Vlivu Připravených Polyanilinových Solí Na Korozní Vlastnosti Organických Povlaků. *Koroze a Ochrana Materiálu*. 2014, vol. 58, no. 4113. DOI: 10.1515/kom-2015-0004
- KUCEKOVA, Z; REJMONTOVA, P; HUMPOLÍČEK, P; KAŠPÁRKOVÁ, V; BOBER, P; SÁHA, P; STEJSKAL, J; 2016. On the Cytotoxicity of Poly(p-phenylenediamine). *Chemical Papers*. Manuscript Draft.
- KURLAND, N. E; DRIRA, Z; YADAVALLI, V. K; 2012. Measurement of Nanomechanical Properties of Biomeolecules Using Atomic Force Microscopy. *Micron*. 2012, vol. 43, no. 2-3, pp. 116 – 128. DOI: 10.1016/j.micron.2011.07.017
- LEE, J. Y., 2013. Electrically Conducting Polymer-based Nanofibrous Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Polymer Revue*. Vol. 53, pp. 443 - 459. DOI: 10.1080/15583724.2013.806544
- LI, L; GE, J; GUO, B; MA, P. X, 2014. In Situ Forming Biodegradable Electroactive Hydrogels. *Polymer Chemistry*. 2014, vol. 5, no. 8, pp. 288 - 289.
DOI:10.1039/C3PY01634J
- LI, M; GUO, Y; WEI, Y; MACDIARMID, A. G; LELKES, P. I; 2006. Electrospinning Polyaniline-contained Gelatin Nanofibers for Tissue Engineering Applications. *Biomaterials*. 2006, vol. 27, no. 13, pp. 2705 - 2715. ISSN:0142-9612.
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2005.11.037
- LI, W; LAURENCIN, C. T; CATERSON, E. J; TUAN, R. S; KO, F. K; 2002. Electrospun Nanofibrous Structure: A Novel Scaffold for Tissue Engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2002, vol. 60, no. 4, pp. 613 - 621. ISSN:0021-9304.
DOI: 10.1002/jbm.10167
- LI, Z. F; RUCKENSTEIN, E, 2004. Grafting of Poly(ethylene Oxide) to the Surface of Polyaniline Films Through a Chlorosulfonation Method and the Biocompatibility of the Modified Films. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2004, vol. 269, no. 1, pp. 62 - 71. DOI: 10.1016/S0021-9797(03)00606-4
- LU, Jiongxin; MOON, Kyoung-Sik; KIM, Byung-Kook; WONG, C.P. High Dielectric Constant Polyaniline/epoxy Composites Via in Situ Polymerization for Embedded

- Capacitor Applications. *Polymer*. 2007, vol. 48, no. 6, pp. 1510 - 1516.
DOI: 10.1016/j.polymer.2007.01.057
- MALHOTRA, B; SINGHAL, R; 2003. Conducting Polymer Based Biomolecular Electronic Devices. *Pramana*. 2003, vol. 61, no. 2, pp. 331 - 343.
DOI: 10.1007/BF02708313
- MARTINO, M. M; MOCHIZUKI, M; ROTHENFLUH, D. A; REMPEL, S. A; HUBBELL, J. A; BARKER, T. H; 2009. Controlling Integrin Specificity and Stem Cell Differentiation in 2D and 3D Environments Through Regulation of Fibronectin Domain Stability. *Biomaterials*. 2009, vol. 30, no. 6, pp. 1089 - 1097.
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.10.047
- MAURYA, J; KUMARI, M; MIR, M-U-H; PATEL, R; 2011. Study the Effect of Synthesized Ionic Liquid on the Stability of Bovine Serum Albumine. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*. 2011, vol. 2, no. 3, pp. 126 – 251.
Dostupné z: <http://www.jnsbm.org/text.asp?2011/2/3/126/96246>
- MECHLOVÁ, E; 2004. *Molekulová fyzika 1*. Ostrava: Ediční středisko CIT OU.
ISBN: 80-7042-989-5.
- MEYER, M. G; FAUVER, M; RAHN, J. R; NEUMANN, T; PATTEN, F. W; SEIBEL, E. J; NELSON, A. C; 2009. Automated Cell Analysis in 2D and 3D: A Comparative Study. *Pattern Recognition*. 2009, vol. 42, no. 1, pp. 141 – 146.
DOI:10.1016/j.patcog.2008.06.018
- MIRMOHSENI, A; OLADGARAGOZE, A; 2000. Anti-corrosive Properties of Polyaniline Coating on Iron. *Synthetic Metals*. 2000, vol. 114, no. 2, pp. 105 - 108.
DOI: 10.1016/S0379-6779(99)00298-2
- MOLECULAR PROBES, 2002. *Vybrant MTT Cell Proliferation Assay Kit (V-12154)* [online]. [cit. 2015-01-26]. Life technologies.
Dostupné z: <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp13154.pdf>
- MOURA, R. M; DE QUEIROZ, A. A; 2011. Dendronized Polyaniline Nanotubes for Cardiac Tissue Engineering. *Artificial Organs*. 2011, vol. 35, no. 5, pp. 471 - 477.
DOI: 10.1111/j.1525-1594.2011.01257.x
- NAARMAN, H; 2000. Polymers, Electrically Conducting in: *Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

- NARKIS, M; HABA, Y; SEGAL, E; ZILBERMAN, M; TITELMAN, G. I; SIEGMANN, A; 2000. Structured Electrically Conductive Polyaniline/polymer Blends. *Polymers for Advanced Technologies*[online]. 2000, vol. 11, no. 8-12 pp. 665 – 673. DOI: 10.1002/1099-1581(200008/12)11:8/12<665::AID-PAT36>3.0.CO;2-V
- Organic Electronic Chemicals, LLC; 2008. [online]. [cit. 2015-09-11]. Dostupné online z: <http://archive.is/ScsWY#selection-873.0-873.7>
- PAULEY, B. W; 2000. Polyaniline. *Potentials, IEEE*. April-May 2000, no.2, pp. 7 - 9. DOI: 10.1109/45.839638
- PRABHAKARAN, M. P; GHASEMI-MOBARAKEH, L; JIN, G; RAMAKRISHNA, S; 2011. Electrospun Conducting Polymer Nanofibers and Electrical Stimulation of Nerve Stem Cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2011, vol. 112, no. 5, pp. 501 - 507. DOI: 10.1016/j.biosc.2011.07.010
- PROKEŠ, J; STEJSKAL, J; OMASTOVÁ, M; 2001. Polyanilin a Polypyrrol – Dva Představitelé Vodivých Polymerů. *Chemické listy* [online]. 2001, č, 95, pp. 484 - 492. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/archiv/2001/08-PDF/484-492.pdf>
- PROKEŠ, J; STEJSKAL, J; 2004. Polyaniline Prepared in the Presence of Various Acids. *Polymer Degradation and Stability*. Vol. 86, no. 1, pp. 187 – 195. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2004.01.012
- RAZAK, S. I; WAHAB, I. F; FADIL, F; DAHLI, F. N; KHUDZARI, A. Z; ADELI, H; 2015. A Review of Electrospun Conductive Polyaniline Based Nanofiber Composites and Blends: Processing Features, Applications, and Future Directions. *Advances in Materials Science and Engineering*. 2015, vol. 2015, 19 pages. DOI:10.1155/2015/356286
- RICHARDSON, R. T; THOMPSON, B; MOULTON, S; NEWBOLD, C; LUM, M. G; CAMERON, A; WALLACE, G; KAPSA, R; CLARK, G; O'LEARY, S, 2007. The Effect of Polypyrrole with Incorporated Neurotrophin-3 on the Promotion of Neurite Outgrowth from Auditory Neurons. *Biomaterials*. 2007, vol. 28, no. 3, pp. 513 - 523. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.09.008
- ROSSNAGEL, S. M; 1990. *Handbook of Plasma Processing Technology: Fundamentals, Etching, Deposition, and Surface Interactions*. Park Ridge, New Jersey: Noyes Publications, 1990, XXIII, 523 s. ISBN 978-0-8155-1220-2.

- RYAN, J. A., 2008. Introduction to Animal Cell Culture. In: *Corning* [online].
[cit. 2015-01-27]. Dostupné z: http://www.level.com.tw/html/ezcatfiles/vipweb20/img/img/20297/intro_animal_cell_culture.pdf
- QAZI, T. H; RAI, R; BOCCACCINI, A. R, 2014. Tissue Engineering of Electrically Responsive Tissues Using Polyaniline Based Polymers: A Review. *Biomaterials*. 2014, vol. 35, no. 33, pp. 9068 - 9086. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.07.020
- RAVICHANDRAN, R; SUNDARRAJAN, S; VENUGOPAL, J. R; MUKHERJEE, S; RAMAKRISHNA, S; 2010. Application of Conducting Polymers and Their Issues in Biomedical engineering. *J. R. Soc. Interface* 7, pp. 559 – 579. DOI: 10.1098/rsif.201.012.focus
- SHIRAKAWA, H; LOUIS, E. J; MACDIARMID, A. G; CHIANG, C. K; HEEGER, A. J; 1977. Synthesis of Electrically Conducting Organic Polymers: Halogen Derivatives of Polyacetylene, (CH)_x. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. 1977, pp. 578 - 580. DOI: 10.1039/C39770000578
- SIGMA ALDRICH, 2000. http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/b2518pis.pdf
- SOARES, C. P; MIDLEJ, V; DE OLIVEIRA, M. W; BENCHIMOL, M; COSTA, M. L; MERMELSTEIN, C; 2012. 2D and 3D-organized Cardiac Cells Shows Differences in Cellular Morphology, Adhesion Junctions, Presence of Myofibrils and Protein Expression. *PLoS ONE*. 2012, vol. 7, no. 5, pp. e38147 - e38110. DOI: 10.1371/journal.pone.0038147
- SOTO-OVIEDO, M. A; ARAÚJO, O. A; FAEZ, R; REZENDE, M. C; DE PAOLI, M-A; 2006. Antistatic Coating and Electromagnetic Shielding Properties of a Hybrid Material Based on Polyaniline/organoclay Nanocomposite and EPDM Rubber. *Synthetic Metals*. 2006, vol. 156, no. 18 s. 1249-1255. DOI: 10.1016/j.synthmet.2006.09.003
- SOUZA J. F. G; CARLOS PINTO, C. J; ALVES GARCIA, F; OLIVEIRA, G. E; BRUNO TAVARES, M. I; SILVA, A. M; DAHER PEREIRA, E; 2014. Modification of Coconut Fibers with Polyaniline for Manufacture of Pressure-sensitive Devices. *Polymer Engineering & Science*. 2014, vol. 54, no. 12, pp. 2887 - 2895. DOI: 10.1002/pen.23845

- STEJSKAL, J; SAPURINA, I; PROKEŠ, J; ZEMEK, J; 1999. In-situ Polymerized Polyaniline Films. *Synthetic Metals*. 1999, vol. 105, no. 3, pp. 195 - 202.
DOI: 10.1016/S0379-6779(99)00105-8
- STEJSKAL, J; GILBERT R. G; 2002. Polyaniline. Preparation of a conducting polymer. *International Union of Pure and Applied Chemistry*. 2002, vol. 74, no. 5, pp. 857 - 867. ISSN: 1365-3075. DOI: 10.1351/pac200274050857
- STEJSKAL, J; 2006. Polyanilin: Vodivý polymer. [online] [cit. 2015-07-23]. Online dostupné z: <http://archiv.otevrenaveda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/NH2006pdf/16.pdf>
- STEJSKAL, J; SAPURINA, I; 2005. Polyaniline: Thin films and colloidal dispersions. *Pure and Applied Chemistry*. 2005, vol. 74, no. 5, pp. 857 - 867.
DOI: 10.1351/pac200577050815
- TANG, Z. Y; WU, JH; L, Q; ZHENG, M; TANG, QW; LAN, Z; LIN, J. M; 2012. Preparation of Poly(acrylic Acid)/gelatin/polyaniline Gel-electrolyte and Its Application in Quasi-solid-state Dye-sensitized Solar Cells. *Journal of Power Sources*. 2012, vol. 203 s. 282-287. DOI: 10.1016/j.jpowsour.2011.11.039
- TRCHOVÁ, M; ŠEDĚNKOVÁ, I; STEJSKAL, J; 2005. In-situ Polymerized Polyaniline Films 6. FTIR Spectroscopic Study of Aniline Polymerisation. *Synthetic Metals*. 2005, vol. 154, no. 1, pp. 1 - 4. DOI: 10.1016/j.synthmet.2005.07.001
- VAHABI, S; NAZEMI SALMAN, B; JAVANMARD, A; 2013. Atomic Force Microscopy Application in Biological Research: A Review Study. *Iranian Journal of Medical Sciences*. 2013, vol. 38, no. 2, pp. 76 - 83.
- WANG, H; JI, L; LI, D; WANG, J-Y; 2008. Characterization of Nanostructure and Cell Compatibility of Polyaniline Films with Different Dopant Acids. *The Journal of Physical Chemistry*. 2008, vol. 112, no. 9, pp. 2671 - 2677.
DOI: 10.1021/jp0750957
- WHITED, A. M; PARK, P. S. H; 2014. Atomic force Microscopy: A Multifaceted Tool to Study Membrane Proteins and Their Interactions with Ligands. *Biochimica Et Biophysica Acta-biomembranes*. 2014, vol. 1838, no. 1, pp. 56 - 68. DOI: 10.1016/j.bbamem.2013.04.011
- WILLIAMS, D. F.; 2003. Biomaterials and tissue engineering in reconstructive Surgery. *Sadhana*. June/August 2003, vol 28, pp. 563 - 574. DOI: 10.1007/BF02706447

- YANG, D; MOHAMMED, O. F; ZEWAIL A. H; 2010. Scanning Ultrafast Electron Microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010, vol. 107, no. 34, pp. 14993 – 14998. DOI: 10.1073/pnas
- ZHONG, X; RESCORLA, F. J; 2012. Cell Surface Adhesion Molecules and Adhesion-initiated Signaling: Understanding of Anoikis Resistance Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Cellular Signalling*. 2012, vol. 24, no. 2, pp. 393 - 401. DOI: 10.1016/j.cellsig.2011.10.005

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

PANI	Polyanilin.
PPy	Polypyrrol
PTh	Polytiofen
PEDOT	Poly(3,4-ethylendioxythiofen)
PPP	Poly-para-fenylen
PAMPSA	Poly(2-akrylamido-2-methyl-1-prapansulfonová kyselina)
OLED	Organická elektroluminiscenční dioda
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
PLA	Kyselina polyléčná
ECM	Extracelulární matrix
BSA	Bovinní sérový albumin
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid
SEM	Skenovací elekttronová mikroskopie
UV-Vis	Ultrafialovo-viditelná spektroskopie
PET	Polyethylentereftalát

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Elektrická vodivost vybraných anorganických látek a organických polymerů (Stejskal, 2006, str. 2)	13
Obrázek 2 Formy polyanilinu (Prokeš, Stejskal a Omastová, 2001).....	19
Obrázek 3 Schéma principu elektrostatického zvlákňování (Beachleay a Wen, 2010).	21
Obrázek 4 Syntéza PANI z anilinu hydrochloridu a peroxydvojsíranu amonného (Stejskal a Gilbert, 2002).....	22
Obrázek 5 Strukturní model biosenzoru. ITO – cínový oxid india, SG – sulfonovaný grafen. (Das a Yoon, 2015).	28
Obrázek 6 Diferenciační kaskáda svalového vlákna. Upraveno dle Abmayr a Pavlath, 2012.....	29
Obrázek 7 Buňky lidských fibroblastů kultivovaných na kolagenem pokrytém povrchu (A – C) a v kolagenní matici (D –F). Měřítko 80 μm . (Grinnell et al., 2003).....	37
Obrázek 8 Schéma mikroskopu atomárních sil (Whited a Park, 2014).....	44
Obrázek 9 Připravené filmy polyanilinové soli	51
Obrázek 10 Oplazmování PANI filmů	52
Obrázek 11 Mikrofotografie proliferace buněčné linie NIH/3T3 po 1 h: A) reference (bez PANI),B) PANI+PHOSP, C) PANI-B, D) PANI-S, E) PANI+PAMPSA, F) PANI+PAMPSA 1:1, G) PANI+PAMPSA 2:1, H) PANI+SULF	54
Obrázek 12 Mikrofotografie proliferace buněčné linie NIH/3T3 po 72 h: A) reference (bez PANI),B) PANI+PHOSP, C) PANI-B, D) PANI-S, E) PANI+PAMPSA, F) PANI+PAMPSA 1:1, G) PANI+PAMPSA 2:1, H) PANI+SULF.....	56
Obrázek 13 Mikrofotografie proliferace buněčné linie NIH/3T3 po 0 h: A) reference (bez PANI),B) PANI+PHOSP, C) PANI-B, D) PANI-S, E) PANI+PAMPSA, F) PANI+PAMPSA 1:1, G) PANI+PAMPSA 2:1, H) PANI+SULF	58
Obrázek 14 Mikrofotografie migrace buněčné linie NIH/3T3 po 24 h: A) reference (bez PANI), B) PANI+PHOSP, C) PANI-B, D) PANI-S, E) PANI+PAMPSA 2:1, F) PANI+SULF.....	59
Obrázek 15 Mikrofotografie adheze buněčné linie NIH/3T3: A) reference (bez PANI), B) PANI-B 5 s, C) PANI-S, D) PANI-B, E) PANI-S 30 s, F) PANI-B 30 s.	61

- Obrázek 16 Mikrofotografie proliferace buněčné linie NIH/3T3 po 72 h: A) PANI-B, B) PANI-B + BSA 50 mg/ml, C) PANI+SULF, D) PANI+SULF + BSA 50 mg/ml, E) PANI+PAMPSA + BSA 50 mg/ml, F) PANI-S + BSA 25 mg/ml, G) reference, H) BSA 25 mg/ml. 63
- Obrázek 17 Snímky povrchu PANI filmů pořízených AFM 2 x 2 μm : A) PANI sůl, B) PANI sůl + plazma., C) PANI báze, D) PANI báze + plazma..... 67
- Obrázek 18 Snímky povrchu PANI filmů pořízených AFM 1 x 1 μm : A) PANI sůl, B) PANI sůl + plazma., C) PANI báze, D) PANI báze + plazma..... 68

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Absorbční spektra polyanilinu připraveného při různých teplotách.....	46
Graf 4 UV-Vis spektra PANI+PAMPSA v roztocích pufrů 1-10	69
Graf 5 UV-Vis spektra PANI+PHOSP v roztocích pufrů 1-10	70
Graf 6 UV-Vis spektra PANI+SULF v roztocích pufrů 1-10.....	70

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Elektrická vodivost jednotlivých vodivých polymerů. Upraveno dle (Balint, Cassidy a Cartmell, 2014).	14
Tabulka 2 Přehled provedených testů a použitých filmů.....	49
Tabulka 3 Stanovené hodnoty elektrické vodivosti	64
Tabulka 4 Stanovené povrchové energie pro jednotlivé PANI filmy.....	65
Tabulka 5 Stanovené povrchové energie pro jednotlivé PANI filmy Stanovené kontaktního úhlu před a po ošetření plazmou	66
Tabulka 6 Stanovené hodnoty drsnosti pro jednotlivé filmy pomocí AFM [nm]	68