

Charakterizace polyanilinových filmů připravených za přítomnosti stabilizátorů

Karel Netík

Diplomová práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Karel Netík**
Osobní číslo: **T13380**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství polymerů**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Charakterizace polyanilinových filmů připravených za přítomnosti stabilizátorů**

Zásady pro vypracování:

Student se seznámí s dosud publikovanými informacemi o syntéze, vlastnostech a biologickém působení polyanilinu připraveného za přítomnosti různých stabilizátorů. Prakticky se seznámí s prací v laboratoři buněčných kultur a osvojí si pokročilé techniky práce v této laboratoři. V praktické části pak provede a vyhodnotí sérii testů zaměřených na stanovení vlastností polyanilinových filmů připravených za přítomnosti různých stabilizátorů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

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

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

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

Vedoucí diplomové práce:

doc. Ing. Petr Humpolíček, Ph.D.

Centrum polymerních materiálů

Datum zadání diplomové práce:

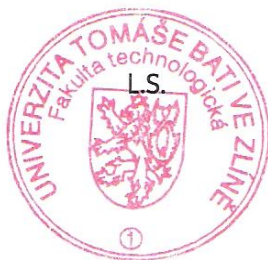
16. ledna 2015

Termín odevzdání diplomové práce:

15. května 2015

Ve Zlíně dne 2. března 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan



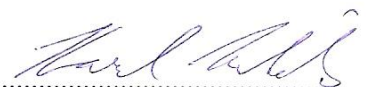

Ing. Lubomír Beníček, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu 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 dne 10. května 2015



.....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Diplomová práce se zaměřila na přípravu, modifikaci a charakterizaci filmů vodivého polymeru, polyanilinu. V teoretické části je shrnuto poznání o nativních polyanilinových disperzích a filmech, jejich vlastnostech a možnostech přípravy. V praktické části byly syntetizovány polyanilinové filmy za přítomnosti čtyř různých stabilizátorů ve dvou odlišných reakčních prostředích. Následně byly měřeny materiálové charakteristiky filmů jako povrchová energie, tloušťka a měrná elektrická vodivost. Z hlediska charakterizace biologické aktivity filmů byly provedeny testy buněčné adheze, proliferace a migrace. Výsledky poskytují komplexní vhled do materiálových i biologických vlastností polyanilinových filmů a jsou proto přínosné jako základní informace pro uplatnění těchto filmů jako biomateriálů.

Klíčová slova: Polyanilin, PANI, vodivé polymery, polyanilinové filmy, polyanilinová disperze, koloidní polyanilin, elektrická vodivost, povrchová energie, buněčná aktivita.

ABSTRACT

This diploma thesis focused on the preparation, modification and characterization of conducting, polyaniline films. The knowledge about the preparation and properties of polyaniline dispersions and films are summarized. In the practical part, the polyaniline films were synthesized in the presence of four stabilizers in two different reaction solutions. Subsequently the films were characterized in terms of their surface energy, thickness and electrical conductivity. Biological activity was measured by the cell adhesion, proliferation and migration tests. The results provide comprehensive view on both the material and biological properties of polyaniline films and are therefore important for an evaluation of polyaniline applicability as biomaterial.

Keywords: Polyaniline, PANI, conducting polymers, polyaniline films, polyaniline dispersion, colloidal polyaniline, electrical conductivity, cell activity.

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucímu diplomové práce, panu doc. Ing. Petru Humpolíčkovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a trpělivost při vzniku této práce. Dále slečně Ing. Zdence Kucekové, Ph.D., za bezbřehou trpělivost a ochotu při předávání zkušeností v laboratoři buněčných kultur, panu Ing. Robertovi Moučkovi, Ph.D., za pomoc při měření a vyhodnocování výsledků elektrické vodivosti a v neposlední řadě i panu Ing. Antonínovi Minaříkovi, Ph.D., za umožnění měření tloušťky pomocí mechanické profilometrie.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 POLYMERY	12
1.1 VODIVÉ POLYMERY	12
1.1.1 Dopování	14
1.1.2 Charakteristika měrné elektrické vodivosti.....	14
1.1.3 Aplikace vodivých polymerů	15
2 POLYANILIN	18
2.1 HISTORIE POLYANILINU.....	18
2.2 FORMY POLYANILINU	18
2.3 PŘÍPRAVA POLYANILINU.....	20
2.4 POTENCIÁLNÍ VYUŽITÍ POLYANILINU.....	21
3 KOLOIDNÍ PANI DISPERZE A FILMY	23
3.1 ZPŮSOBY PŘÍPRAVY KOLOIDNÍHO POLYANILINU	25
3.1.1 Příprava dle IUPAC	25
3.1.2 Enzymově katalyzovaná syntéza.....	27
3.1.3 Syntéza s podporou povrchově aktivní látky	27
3.2 MORFOLOGIE ČÁSTIC PANI DISPERZÍ	28
3.3 STABILITA PANI DISPERZE	30
3.4 PANI FILMY PŘIPRAVENÉ DISPERZNÍ POLYMERACÍ	30
4 BIOLOGICKÁ AKTIVITA PANI	33
4.1 BIODOPATIBILITA PANI.....	33
4.2 NATIVNÍ POLYANILINOVÉ FILMY	34
4.3 BUNĚČNÁ KOMPATIBILITA	37
4.3.1 Buněčná adheze.....	38
4.3.2 Buněčná proliferace	39
4.3.3 Buněčná migrace	40
4.3.4 Průtoková cytometrie	40
4.3.5 MTT test metabolické aktivity	41
5 CHARAKTERIZACE MATERIÁLOVÝCH VLASTNOSTÍ	42
5.1 MĚŘENÍ KONTAKTNÍHO ÚHLU SEDÍCÍ KAPKY.....	42
5.2 MIKROSKOPIE ATOMÁRNÍCH SIL.....	44
5.3 UV-VIS SPEKTROSKOPIE.....	46
5.4 MECHANICKÁ PROFILOMETRIE.....	47
5.5 MĚŘENÍ MĚRNÉ ELEKTRICKÉ VODIVOSTI PANI FILMŮ	48
II PRAKTICKÁ ČÁST	49
6 MATERIÁL A METODIKA	50
6.1 SYNTÉZA POLYANILINOVÝCH FILMŮ	50
6.1.1 Polyvinylpyrrolidon (PVP)	50
6.1.2 Dodecylsírán sodný (SDS).....	51
6.1.3 Tween 20.....	52
6.1.4 Pluronic F-108.....	53

6.1.5	Postup přípravy filmů.....	54
6.2	MECHANICKÁ PROFILOMETRIE.....	56
6.3	ČTYŘBODOVÁ METODA.....	57
6.4	KONTAKTNÍ ÚHEL SEDÍCÍ KAPKY.....	59
6.5	TESTY BUNĚČNÉ AKTIVITY.....	60
6.5.1	Vybavení laboratoře pro kultivaci buněk <i>in vitro</i>	60
6.5.2	Použité buněčné linie a kultivační média.....	60
6.5.3	Kultivace buněk.....	61
6.6	BUNĚČNÁ ADHEZE.....	61
6.7	BUNĚČNÁ PROLIFERACE.....	62
6.8	BUNĚČNÁ MIGRACE.....	63
7	VÝSLEDKY.....	65
7.1	PŘÍPRAVA FILMŮ.....	65
7.2	MECHANICKÁ PROFILOMETRIE.....	67
7.3	MĚRNÁ ELEKTRICKÁ VODIVOST.....	69
7.4	POVRCHOVÁ ENERGIE.....	71
7.5	BUNĚČNÁ ADHEZE.....	72
7.6	BUNĚČNÁ PROLIFERACE.....	74
7.7	BUNĚČNÁ MIGRACE.....	82
8	DISKUZE.....	84
	ZÁVĚR.....	91
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	92
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	104
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	105
	SEZNAM TABULEK.....	109

ÚVOD

Do poměrně velké skupiny makromolekulárních látek polymerního charakteru, které jsou v drtivé většině elektricky nevodivé, patří i skupina v tomto směru jedinečných, elektricky vodivých polymerů. Tyto látky vykazují hodnoty měrné elektrické vodivosti na úrovni polovodičů. Jedním ze zástupců této skupiny polymerů je polyanilin, který se pro svůj široký aplikační potenciál stal velmi intenzivně studovanou látkou.

Je známo, že při syntéze polyanilinu oxidační polymerací vznikají kromě sraženiny i polyanilinové filmy, pokrývající vnitřní povrch reakčních nádob či vnější povrch předmětů do reakční směsi ponořených. Polyanilin je kromě formy sraženiny možné připravit i ve jako koloidní disperzi polyanilinových částic. V tomto případě je do reakční směsi přidán stabilizátor, na jehož povrch přechází část rostoucích řetězců. Tento způsob přípravy vede stejně jako u srážecí polymerace ke tvorbě filmů a právě takto připravené filmy budou charakterizovány z hlediska některých materiálových vlastností a buněčné kompatibility.

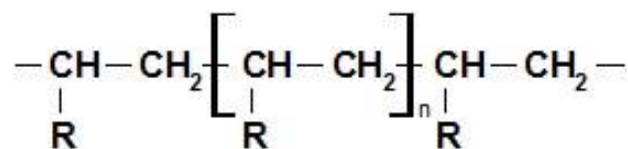
V praktické části bude pomocí disperzní polymerace připravováno celkově osm typů polyanilinových filmů, lišících se jak zvoleným stabilizátorem (polyvinylpyrrolidon, dodecylsírán sodný, Tween 20 a Pluronic F-108), tak i reakčním prostředím tvořeným neionizovanou vodou nebo 1 M roztokem kyseliny chlorovodíkové. Připravené filmy budou následně charakterizovány pomocí mechanické profilometrie pro získání informace o jejich tloušťce, dále pomocí čtyřbodové metody pro zjištění hodnot měrné elektrické vodivosti a měřena bude i povrchová energie filmů. Testy adheze, proliferace a migrace buněk linie fibroblastů následně umožní srovnat buněčnou kompatibilitu jednotlivých typů filmů.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 POLYMERY

Filmy, jejichž charakterizace je cílem této práce jsou tvořeny polyanilinem (PANI), tedy látkou polymerní povahy. Polymery jsou obecně označovány jako látky tvořené makromolekulami, které jsou charakteristické mnohonásobným opakováním konstitučních jednotek, tedy jedné nebo více skupin atomů, navzájem spojených v tak velkém počtu, že existuje řada chemických a fyzikálních vlastností, které se významně nezmění přidáním nebo odebráním jedné nebo několika konstitučních jednotek (Prokopová, 2007).

Polymery jsou známy a využívány jako izolanty elektrického proudu. Mají pro mnoho aplikací výhodné mechanické i chemické vlastnosti a dobře se zpracovávají (Prokeš, Nešpůrek, Stejskal, 2001).



Obrázek 1 – obecný vzorec polymeru (vytvořeno v programu ChemSketch)

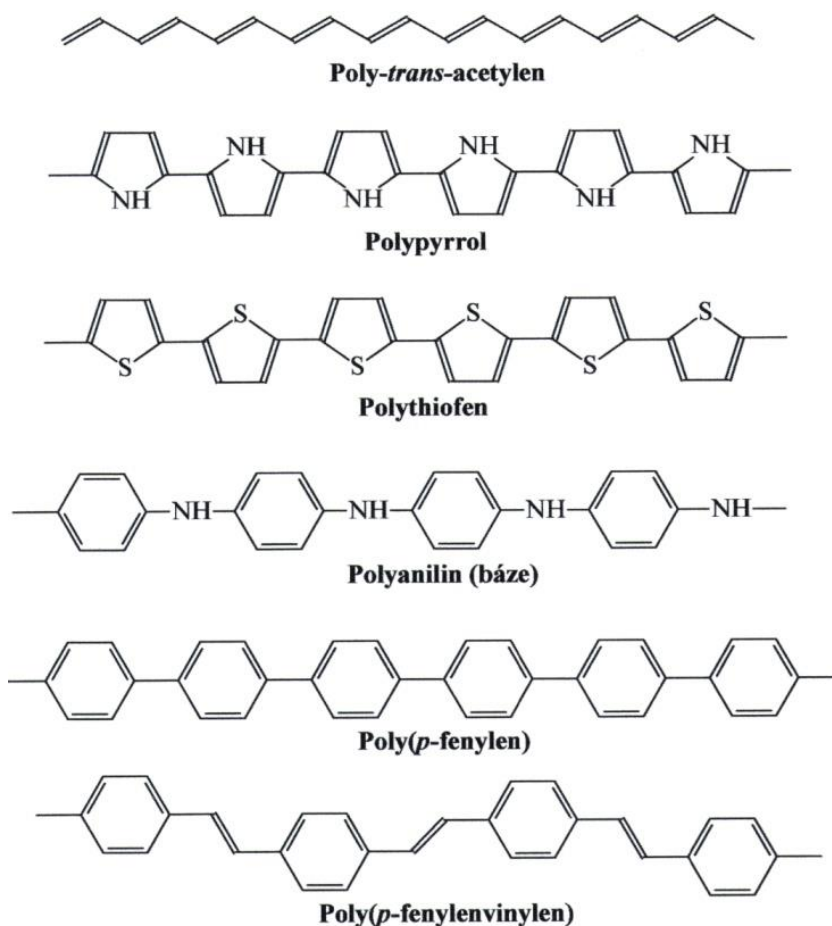
V minulosti (Shirakawa et al., 1977) však byla objevena a popsána skupina polymerů, které vykazují, na rozdíl od běžných polymerů, vlastní elektrickou vodivost. Nejvýznamnější z nich jsou polyacetylen, polypyrrol, polythiofen, polyanilin, polyfenylen či polyfenylenvinylen (Prokeš, Stejskal, Omastová, 2001). Elektrická vodivost těchto látek je srovnatelná s vodivostí anorganických polovodivých materiálů (Humpolíček et al., 2012a).

1.1 Vodivé polymery

Běžné, elektricky nevodivé polymery jsou nasycené, všechny čtyři valenční elektrony uhlíku mají použity v kovalentní vazbě. Jak již bylo uvedeno, existuje i skupina elektricky vodivých, konjugovaných polymerů, u kterých se elektronová konfigurace liší. U těchto polymerů vedou chemické vazby k jednomu nepárovému elektronu (π -elektronu) na jeden atom uhlíku. Navíc π -vazba, ve které se překrývají orbitály následujícího uhlíkového atomu podél hlavního řetězce, vede k elektronové delokalizaci kolem řetězce. Tato elektronická delokalizace poskytuje pomyslnou cestu pro přenos náboje po řetězci polymeru (Heeger, 2001).

Elektrické vlastnosti vodivých polymerů, které jsou obecně složeny z uhlíku, vodíku a jednoho heteroatomu, například dusíku či síry, tedy pochází z π -konjugace. Samotné vodivosti je dosaženo prostou oxidací nebo redukcí vedoucí k zavedení center náboje, které zprostředkovávají transport náboje po řetězci. Oxidace a redukce je prováděna anionty a kationty pojmenovanými jako dopující látky, celý proces je pak nazýván dopováním (Chandrasekhar, 1999).

Moderní historie vodivých polymerů začíná v roce kdy Shirakawa et al. (1977) objevili, že halogenace *trans*-polyacetyleny zvýšila jeho elektrickou vodivost o několik řádů. Polyacetylenové filmy vystavené účinkům par jodu vedly k produktu o měrné vodivosti $38 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$. I přes vysokou vodivost polyacetyleny, jeho omezená stabilita vedla k posunu pozornosti ve prospěch mnohem stabilnějších polymerů, polyanilinu a polypyrrolu (Prokeš, Stejskal a Omastová, 2001).



Obrázek 2 – strukturní vzorce hlavních zástupců vodivých polymerů, v případě polyanilinu opakující se anilínová konstituční jednotka (Prokeš, Stejskal a Omastová, 2001)

1.1.1 Dopování

Základním principem dopování je oxidace nebo redukce řetězce polymeru. Oxidace odebere elektrony působením akceptorů elektronů (např. I_2) a vzniká pozitivně nabitý polymer. Tento děj je popisován jako p-dopování. Podobně pak redukce produkuje působením donorů elektronů (např. Li) záporně nabitý řetězec polymeru, tento děj potom označujeme jako n-dopování (Freund a Deore, 2007). Odlišnost lze nalézt mezi dopováním anorganických a organických polovodičů. U anorganických polovodičů výrazně ovlivňují elektrické vlastnosti již stopové koncentrace dopující látky, zatímco u organických (polymerů) je potřeba vyšších koncentrací dopujících látek, řádově jednotky až desítky procent (Prokeš, Stejskal, Omastová, 2001). Dopování může být indukováno chemickým činidlem, existuje ale i možnost elektrochemického dopování, kdy se polymer připojí k elektrodě. Elektrochemické dopování probíhá v podstatě stejně jako chemické, s tím rozdílem, že hnačící sílu pro oxidaci nebo redukci poskytuje externí zdroj napětí (Freund a Deore, 2007).

1.1.2 Charakteristika měrné elektrické vodivosti

Konduktivita neboli měrná elektrická vodivost je fyzikální veličina, popisující schopnost látky vést elektrický proud. Látka, která je dobrým vodičem, má vysokou hodnotu konduktivity, špatné vodiče mají naopak nízkou vodivost (Drápala a Kursá, 2012).

Pokud známe elektrickou vodivost (konduktanci) G , která je převrácenou hodnotou elektrického odporu R , tedy $G = 1/R$ a její jednotkou je Siemens (S). Můžeme měrnou elektrickou vodivost vypočítat podle vztahu.

$$\sigma = \frac{l \cdot G}{S} [S \cdot m^{-1}]$$

kde l je délka tělesa, G je elektrická vodivost a S je plocha, kolmá na směr elektrického proudu (Rosina, 2013).

V případě některých metod měření konduktivity je využíváno detekce rezistivity (měrného elektrického odporu), která je převrácenou hodnotou měrné elektrické vodivosti podle vztahu $\sigma = 1/\rho$. Pro výpočet rezistivity lze použít vztah.

$$\rho = \frac{R \cdot S}{l} [\Omega \cdot m]$$

kde R je odpor vodiče, S je obsah příčného řezu a l je délka vodiče (Svoboda, 1998).

Pro příklad je možné uvést konduktivitu mědi (vodič elektrického proudu), která činí $56 \times 10^3 \text{ S.cm}^{-1}$ či skla (izolant), pohybující se v řádu $1 \times 10^{-14} \text{ S.cm}^{-1}$. U polovodičů konduktivitu ovlivňuje řada faktorů, zejména teplota, šířka zakázaného pásu [eV] či pohyblivost elektronů a děr. Z tabulky 1 je patrné, že se jejich měrná elektrická vodivost pohybuje od 1×10^{-8} do $1 \times 10^3 \text{ S.cm}^{-1}$. Vodivé polymery se z tohoto hlediska řadí mezi polovodivé materiály, jejich konduktivita se například podle publikace Prokeš a Stejskal (2004) pohybuje v řádu jednotek, maximálně stovek S.cm^{-1} .

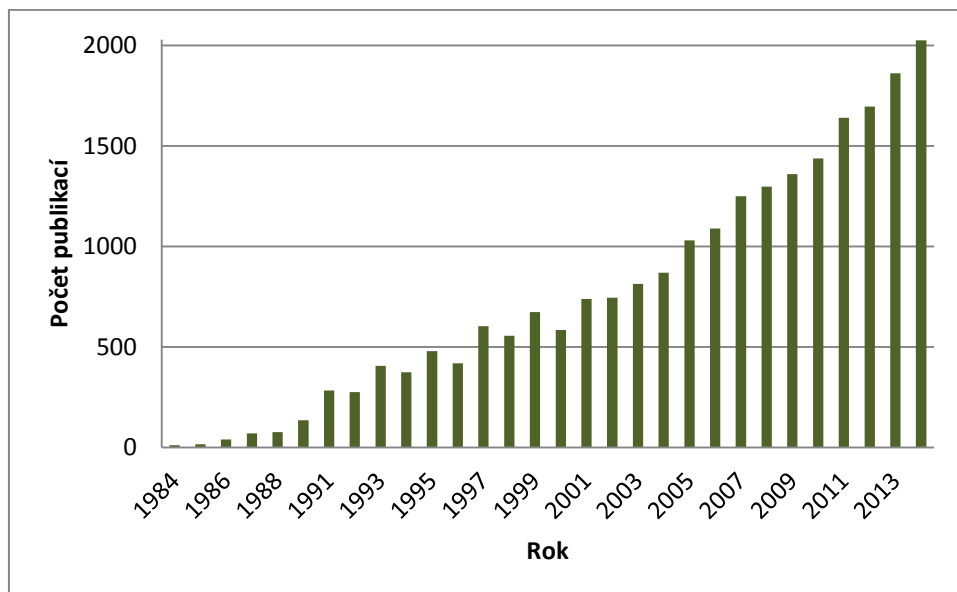
Druh materiálu	Měrná el. vodivost [S.cm^{-1}]
vodiče	1×10^3 až 1×10^6
polovodiče	1×10^{-8} až 1×10^3
izolanty	1×10^{-20} až 1×10^{-8}

Tabulka 1 – srovnání konduktivity vodičů, polovodičů a izolantů (Drápala a Kurša, 2012)

1.1.3 Aplikace vodivých polymerů

Vodivé polymery jsou atraktivní materiály pro použití ve stávajících i nově vznikajících technologiích díky nízkým výrobním nákladům a všestrannosti ve srovnání s ostatními standardními vodiči a polovodiči (Freund a Deore, 2007). Navíc, na rozdíl od běžných polovodičů, mohou vodivé polymery měnit svou strukturu, a tedy i své vlastnosti v reakci na okolní prostředí, což lze využít v řadě aplikací, jako jsou například biosenzory (Prokeš, Stejskal, Omastová, 2001). Fakt, že se vodivými polymery a jejich potenciálním využitím zabývají vědecké studie již více, než třicet let, dokládají mimo jiné studie jako například Kaneto et al. (1983) pojednávající o možnosti využití filmů polythiofenu a polypyrrolu pro zobrazovací zařízení v důsledku změny jejich barev v závislosti na jejich oxidaci (p-dopování) nebo redukci (n-dopování). Dále je možné zmínit práci Mizutani a Asai (1988), ve které autoři popisují senzor glukózy vytvořený za použití inkorporovaného polypyrrolu v polyvinylalkoholu jako podkladu pro imobilizovaný enzym glukóza-oxidázu a částice ferrocenu.

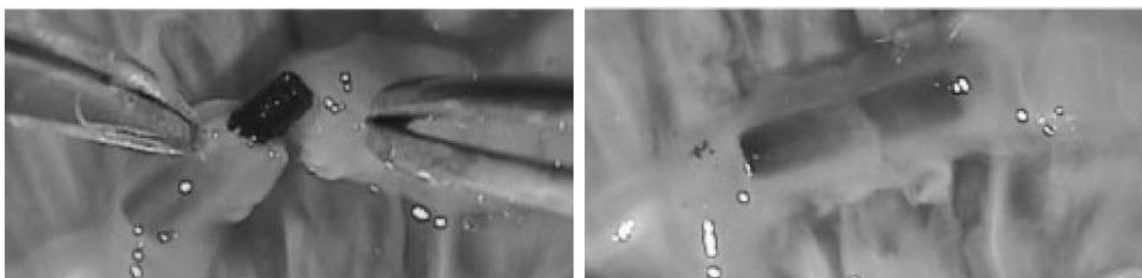
Počty vědeckých publikací v časopisech indexovaných v databázi Web of Science také dokládají zvyšující se zájem o tyto polymery. Časový vývoj počtu publikací, jež ve svém názvu obsahují slovo „Polyaniline“ uvedený na obrázku 3 tuto skutečnost dokládá.



Obrázek 3 – časový vývoj počtu publikací o polyanilinu (Web of Science, 2015)

Z novějších publikací pak stojí za zmínku například práce Baldissera a Ferreira (2012) zabývající se antikorozií ochranou kovů pomocí nátěrů na bázi epoxidové pryskyřice obsahující vodivý polymer jako antikorozií činidlo. Dále studie Nambiar a Yeow (2011) zaměřující se na využití vodivých polymerů jako již zmíněné biosenzory, tedy analytická zařízení, spojující prvky snímání (jako například enzymy, protilátky, nukleové kyseliny či buňky) pomocí elektronického snímače, který je vybaven elektronickým zesilovačem. Biosenzory zajišťují rychlou interaktivní informaci o daném vzorku a mají uplatnění v různých oblastech jako klinická diagnostika, monitorování biologických procesů, monitorování životního prostředí a zpracování potravin a zemědělských produktů (Dhand et al., 2011). Využitím vodivých polymerů se dále zabývá práce Manjunatha et al. (2010) studující uplatnění polypyrrolu jako materiálu pro anody dobíjecích lithiových baterií, či studie autorů Cortés a Moreno (2003), ve kterém je diskutována možnost tvorby umělých svalů za využití vodivých polymerů. S ohledem na nízkou cenu vodivých polymerů pak AlSalhi et al. (2011) shrnuje možné aplikace vodivých polymerů v elektronice, zobrazovacích zařízeních (displeje, televize), světelných diodách, tranzistorech, fotovoltaických článcích, senzorech a laserech. Z biomedicínského hlediska podle Rubinsonové a Marka (2003) může být ovlivňováno elektrochemické uvolňování ATP pomocí vrstvy polypyrrolového filmu s různou tloušťkou, pórovitostí a elektrochemickým potenciálem. Podle Schmidt et al. (1997) pak oxidovaný polypyrrol může sloužit jako pod-

klad pro zvýšení interakce poškozených nervových buněk. V publikaci Gao et al. (2014) je popsána aplikace polypyrrolu v nanokompozitu společně s grafenem, tento materiál je poté použit v mikroelektrodách pro detekci adeninu a guaninu, tedy elektropozitivních purinových bazí RNA a DNA. Velký potenciál má také využití vodivých polymerů v oblasti tkáňového inženýrství (Freund a Deore, 2007). Touto problematikou se blíže zabývali Bendoric et al. (2011), kteří ve své práci zmiňují tři základní přístupy tkáňového inženýrství, zahrnující použití tzv. instruktivního prostředí (bioaktivního materiálu), které nabírá a řídí hostující buňky. A to za účelem regenerace tkáně, dopravy zdravých buněk nebo bioaktivních faktorů do poškozené oblasti či pro kultivaci buněk na biomateriálovém scaffoldu v biorektoru za podmínek umožňujících pozdější implantaci. V této souvislosti zmiňuje Svirskis et al. (2010) systémy pro řízené uvolňování léčiv tvořené post-synteticky inkorporovaným léčivem (např. dopaminem či chlorpromazinem) v polypyrrolu. Vodivý polymer zde může opakovaně podstoupit ovladatelné redoxní reakce, které způsobují změnu ve vodivosti, náboji a objemu polymeru, a tedy i elektrochemicky kontrolované uvolňování léčiva. Vědecká publikace Smela (2003) představuje komerčně vyvinutou spojku velmi malých cév, kde je šití náročné jak z důvodů časových, tak kvůli pooperačním komplikacím. Spojka je tvořena dvouvrstvou zlata a polypyrrolu navíjenou na válec za použití redukčního potenciálu. Spojka se chirurgicky vkládá mezi oddělené konce cév během jedné až dvou minut. Dvouvrstva se po ukončení působení potenciálu spontánně navrácí do oxidovaného stavu a pasivně zvětšuje během několika minut svůj objem a drží oba konce cévy při sobě během hojení. Tento mechanismus podobný pružině je trvalý a nevyžaduje další aplikaci redukčního potenciálu. Spojka zůstává ve finální fázi inkorporována ve stěně cévy, není trombogenní ani jinak nezabraňuje v průtoku krve, je biokompatibilní a dokazuje stabilitu oxidovaného stavu.



Obrázek 4 – fotografie průběhu operačního zavedení cévní spojky (Smela, 2003)

2 POLYANILIN

2.1 Historie polyanilinu

Anilin byl jako produkt pyrolytické destilace indiga získán v roce 1826 německým chemikem Unverdorbenem. Při studiu jeho chemických vlastností popsal roku 1840 Fritze zelené oxidační produkty, které bychom v dnešní terminologii nazvali polyanilinem. V roce 1862 profesor Letheby při toxikologické identifikaci anilinu provedl elektrochemickou oxidaci, která vedla po alkalizaci k modrému zbarvení typickému pro polyanilinovou bázi. Britští chemici Green a Woodhead navrhli v roce 1910 pro oxidační produkty anilinu strukturu oktameru. Polymerní povaha oxidačních produktů anilinu byla prokázána až o mnoho desítek let později. Polyanilinové řetězce jsou složeny ze stovek až tisíců anilinových konstitučních jednotek - jde tedy o plnohodnotné polymery. Syntetické postupy vedoucí k polyanilinu byly popsány v Československu Honzlem a Tlustákovou (1968). Konduktivita polyanilinu pohybující se v řádu jednotek $S \cdot cm^{-1}$ je srovnatelná s měrnou vodivostí běžných polovodičů a byla známa již v šedesátých letech (Prokeš, Stejskal a Omastová, 2001).

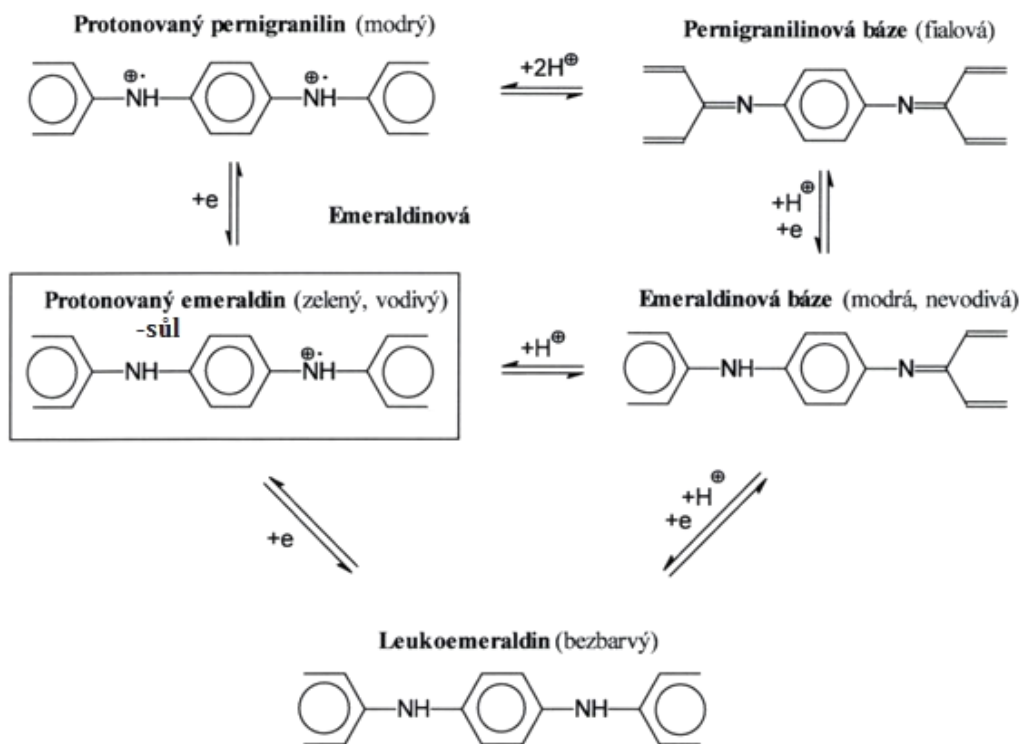
Vzhledem k dobré stabilitě polyanilinu, ovlivnitelné elektrické vodivosti, poměrně nenáročné, nenákladné syntéze a zajímavým redoxním vlastnostem, které jsou spojeny s heteroatomem dusíku v řetězci, se stal polyanilin jedním s nejrozsáhleji studovaných vodivých polymerů poslední doby (Kang et al., 1998).

2.2 Formy polyanilinu

Mechanismus elektrické vodivosti polyanilinu je oproti ostatním vodivým polymerům unikátní, ačkoli je dopován protonací, podobně jako je tomu například u *p*-dopování polypyrrolu. Protonace vede k formování solí na bázi dusíku spíše než karboniového iontu (karbokationt, C^+), jako je tomu u ostatních *p*-dopovaných polymerů. Konfigurace polyanilinu má totiž A-B povahu, zatímco většina ostatních vodivých polymerů je typu A-A. B komponenta představuje heteroatom elementárního dusíku, který je více zapojen do konjugace polyanilinu, v porovnání s heteroatomy v polypyrrolu a podobných polymerech. Vodivost polyanilinu tedy závisí jak na oxidační formě, tak na stupni protonace (Wallace et al., 2003).

Polyanilin existuje v řadě forem, navzájem se lišících svým stupněm oxidace či protonace. Odebíráním nebo dodáváním elektronů chemickou či elektrochemickou oxidací

a redukcí lze získat formy s různou chemickou strukturou, stabilitou, zbarvením a elektrickými vlastnostmi. Názvy jednotlivých oxidačních forem, nazvaných leukoemeraldin, emeraldin a pernigranilin, jsou v současnosti používány i pro odpovídající polymery (Prokeš, Stejskal, Omastová, 2001).



Obrázek 5 – oxidační formy polyanilinu (Prokeš, Stejskal, Omastová, 2001)

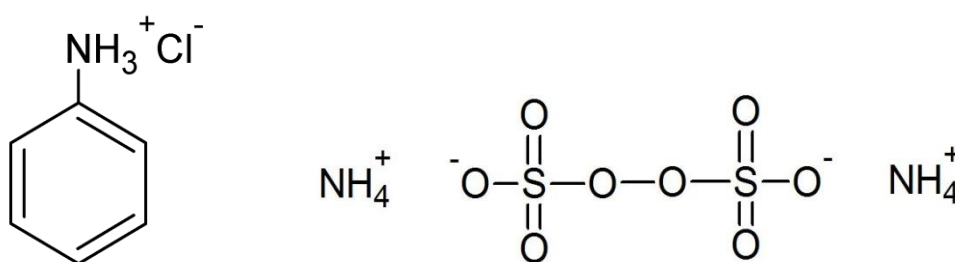
Nejběžnějšími formami jsou právě zelená, vodivá polyanilinová sůl a nevodivá, modrá báze. K přechodu mezi těmito dvěma formami dochází při pH 5 - 6. Pokud tedy polyanilin po přípravě vystavíme působení alkálií, např. 1 M hydroxidu amonného, změní se vodivost z jednotek $\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ na $10^{-9} \text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, tj. o devět řádů. Tento proces je vratný a bývá využíván při konstrukci aciditních senzorů (Stejskal a Gilbert, 2002).

Podle publikace Prokeš a Stejskal (2004) lze nastavením teploty reakční směsi srážecí polymerace určovat výsledkem amorfni (20 °C) či semikrystalickou (-50 °C) strukturu polyanilinového produktu. Stejskal et al. (1998) popisuje amorfni PANI jako sraženinu v práškovité formě. PANI. Vyšší krystalinita a molární hmotnosti poté vedou ke vzniku makroporézní morfologie. Prokeš a Stejskal (2004) dále uvádějí hodnoty měrné elektrické vodivosti tablet tvořených zalisovaným práškem z PANI sraženiny, přičemž vzorky PANI, se lišily druhem 1 M kyseliny, která tvořila reakční prostředí polymerace. Vodivost tablet se pohybovala v rozmezí od 1×10^{-2} (pro 1 M EDTA) do $15 \text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (pro prostředí 1 M HCl).

2.3 Příprava polyanilinu

Polyanilin je připravován oxidací anilinu, zpravidla peroxydisíranem amonným neboli amonium persulfátem (APS). Reakce probíhá v kyselém vodném prostředí, na vzduchu v otevřené nádobě, při laboratorní teplotě, bez nutnosti zahřívání nebo míchání, s prakticky stoprocentním výtěžkem. Exotermní reakce je ukončena během několika minut a produkt se odděluje filtrací. Při skladování má časově neomezenou stálost (Stejskal a Gilbert, 2002).

Standardně se polyanilin připravuje oxidací 0,2 M anilin hydrochloridu pomocí 0,25 M amonium persulfátu ve vodném prostředí. Při praktickém provedení je odděleně rozpuštěno 2,59 g (20 mmol) anilin hydrochloridu v 50 ml vody a 5,71 g (25 mmol) amonium persulfátu rovněž v 50 ml vody. Oba roztoky jsou poté smíseny. Reakční směs po chvíli zmodrá díky vzniku anilinových oligomerů. Zabarvení se prohlubuje, tvoří se pernigranilinová forma polyanilinu, která po skončení polymerace přechází na konečný tmavozelený emeraldin. Polymerace proběhne při laboratorní teplotě asi za 10 minut a teplota reakční směsi vzroste z 20°C na 38°C. (Použití vyšších koncentrací reakčních složek – nad 1 M, má za následek zvýšení teploty, což může vést až k výbuchu). Sraženina polyanilinu je promývána zředěnou (0,2 M) kyselinou chlorovodíkovou a poté důkladně acetonem nebo etanolem. Produkt se suší na vzduchu. Takto připravený polyanilin (emeraldin) v množství kolem 2 g má vodivost 4 S.cm⁻¹ (Stejskal a Gilbert, 2002).



Obrázek 6 – strukturní vzorec anilin hydrochloridu (vlevo) a amonium persulfátu (vpravo), (vytvořeno v programu ChemSketch)

2.4 Potenciální využití polyanilinu

Polyanilin je z hlediska využití jedním z nejslibnějších vodivých polymerů pro svou dobrou chemickou stabilitu, snadnou a poměrně levnou syntézu a v neposlední řadě pro relativně vysokou a navíc ovlivnitelnou elektrickou vodivost (Cruz-Silva et al., 2006). Jeho použití je však omezeno netavitelným charakterem a nízkou rozpustností ve většině organických rozpouštědel, polyanilin je rozpustný pouze z 20 hm. % v N-methylpyrrolidonu a z 60 hm. % v koncentrované kyselině sírové (Exnerová et al., 2012). Pro překonání těchto omezení jsou používány níže zmiňované disperzní polymerace anilinu, které zajišťují vznik ve vodě dispergovatelných koloidních částic (Cruz-Silva et al., 2007). Z těchto disperzí lze připravit kompozitní materiály obsahující až 70 hm. % elektricky vodivého polyanilinu dispergovaného v izolační matici, z hlediska využití tedy kompozity polyanilinu hrají důležitou roli (Stejskal, Kratochvíl, Helmstedt, 1996). Z hlediska aplikací v biomedicině či biotechnologiích je pak jeho omezení dáno toxicitou nečistot obsažených v polyanilinu, zejména se jedná o anilinové dimery a oligomery či benzidin (Humpolíček et al., 2012b).

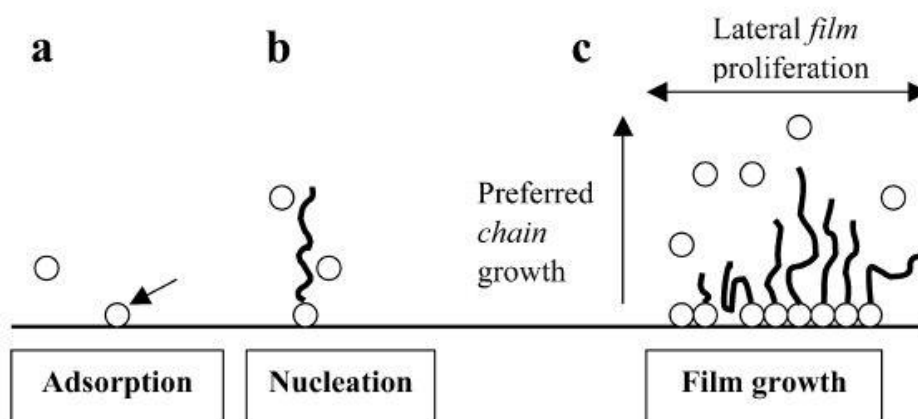
Skutečností, že je polyanilin přirozeně vodivý, může být podle studie Hosoda, Hino, Kuramoto (2007) využito pro průmyslovou výrobu vodivých nátěrů. Blinova et al. (2005) zmiňuje ve své práci vhodnost použití koloidního polyanilinu jako antikoroziní přísady a barevného markeru při dlouhodobém skladování nátěrů. Práce Hino, Taniguchi, Kuramoto (2005) popisuje syntézu vodivých lepidel na bázi epoxidové pryskyřice a polyanilinu. Publikace De Barros, Martins, Azevedo (2005) zmiňuje možnost aplikace polyanilinu ve vodivých inkoustech, kdy je vodivá polymerová suspenze či roztok vložena do cartridge inkoustové tiskárny a následně tiskárnou přenesena na podklad, působením UV záření jsou poté vytisknuté znaky vyvolány. Článek Bowman a Mattes (2005) přibližuje možnost syntézy polyanilinu o ultra vysoké hmotnostně průměrné molární hmotnosti (120.000 až 350.000 g/mol) pro výrobu antistatického textilu. Dále je možno využít zvyšování viskozity polyanilinové disperze se zvyšujícím se elektrickým polem. Tato vlastnost je výhodná pro aplikace v elektoreologických materiálech, které je možné využít v elektromechanických zařízeních, jako jsou tlumiče nárazů se stavitelnou tuhostí pro jejich reverzibilní přechod z tekutého do pevného stavu pod různým elektrickým polem (Bhadra et al., 2009). V práci Choi et al. (1997) je uvedena jako potenciální elektoreologická tekutina suspenze polyanilinu v silikonovém oleji.

Schopnosti polyanilinu měnit elektrickou vodivost a zbarvení při vystavení kyselým, zásaditým a některým neutrálním parám či kapalinám je možné využít v oblasti senzorů, biosenzorů, detektorů a indikátorů. Tedy zařízení, které měří fyzikální veličiny a převádí je na signál, který může být detekován pozorovatelem nebo detekčním zařízením (Bhadra et al., 2009). Je možné citovat práci Irimia-Vladu a Fergus (2006), ve které je popsán senzor oxidu uhličitého založený na kompozitním tenkém filmu emeraldinové báze polyanilinu a polyvinylalkoholu. Dále studii Bai et al. (2007) prezentující senzor amoniaku založený na kompozitním filmu polypyrrolu a sulfonovaného polyanilinu. Ke stejné aplikaci, tedy detekci plynného čpavku použili Park et al. (2006) kromě zlatých elektrod reakční matrix přímo z koloidního polyanilinu s částicemi v nanorozměrech. Článek Ashassi-Sorkhabi et al. (2013) popisuje techniku elektrochemické polymerace, pomocí které nanáší vrstvičku kompozitu nanokoloidního polyanilinu a nanokoloidního diamantu na povrch měkkého kovu, který byl takto ochráněn proti korozi v prostředí 0,5 M kyseliny sírové. Ashassi-Sorkhabi et al. (2014) poté popisuje v podstatě velmi podobný způsob ochrany měkkých kovů proti korozi i v přítomnosti 3,5 % roztoku chloridu sodného. Ve studii Talelaie et al. (2000) bylo využito vztahu mezi změnou vodivosti a barvy kompozitu polyanilinu a polypyrrolu pro detekci pH na platinové elektrodě. Článek Andreu et al. (2005) popisuje stanovení množství vitamínu C pomocí absorpční změny polyanilinu při světelném záření o vlnové délce 700 nm. Koloidního polyanilinu je využito v práci Dhand et al. (2007) pro výrobu vodivého filmu elektroforeticky umístěného na destičku ze skla oxidu india a cínu, který je schopen kovalentně imobilizovat cholesterol oxidázu a tím pádem být využitý jako biosenzor cholesterolu. Práce Kim et al. (2000) zmiňuje možnost konduktometrického měření aktivity protilátek specifických pro albumin pomocí imunosenzorů na bázi koloidního zlata a na něm začleněného polyanilinu. Hsiao et al. (2013) dále popisují aplikaci kompozitních vláken připravených elektrostatickým zvlákněním kopolymeru laktidu a kyseliny glykolové (PLGA) s polyanilinem. Vytvořená vlákna s konduktivitou v řádu $1 \times 10^{-2} \text{ S.cm}^{-1}$ byla použita jako elektricky aktivní scaffold pro myší buňky srdeční svaloviny, který prokázal výbornou buněčnou adhezi a především schopnost synchronizovat buněčný pohyb těchto buněk (tzv. cell beating).

Všechna potenciální využití polyanilinu není možné obsáhnout, lze však konstatovat, že může najít uplatnění v elektronice, elektromechanice, elektroeologii, v oblasti antistatických materiálů, senzorů a biosenzorů, světlo emitujících a zobrazovacích zařízení.

3 KOLOIDNÍ PANI DISPERZE A FILMY

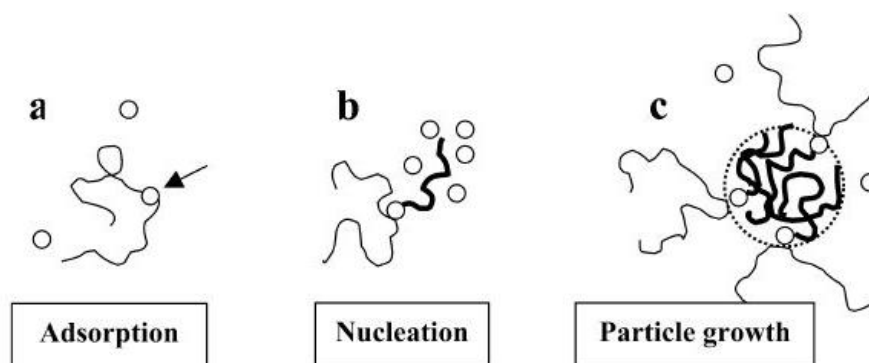
Oxidací anilin hydrochloridu amonium persulfátem ve vodném prostředí (srážecí polymerací) jsou produkovány nejprve anilinové oligomery. Ty mají hydrofobnější vlastnosti než původní anilinové kationty. Mají tedy tendenci oddělovat se od vodného prostředí, například adsorbováním na dostupném povrchu látek stálých v kyselém prostředí. Adsorbované oligomery mají vyšší reaktivitu a zahajují růst polyanilinových řetězců. První polyanilinový řetězec ukotvený na povrchu vytváří jádro budoucího filmu. Polymerace anilinu má automaticky se zrychlující mechanismus, což znamená, že nové oligomery vznikají a adsorbují blízko jádra a stimulují růst nových polyanilinových řetězců. Tyto řetězce vytvářejí film a množí se na povrchu. Ze stérických důvodů se přednostně orientují kolmo na podklad (Stejskal a Sapurina, 2005).



Obrázek 7 – a) adsorpce oligomeru na povrch, b) růst řetězce PANI, tvorba jádra, c) růst dalších řetězců PANI v důsledku mechanismu automatického zrychlování polymerace (Stejskal a Sapurina, 2005)

Tvorba polyanilinových filmů je tedy v podstatě adsorpce vznikajících anilinových oligomerů na dostupných površích stálých v kyselém prostředí při oxidaci anilin hydrochloridu amonium persulfátem. Postupným nárůstem řetězců polyanilinu dochází k vytvoření filmu tloušťky 40 – 400 nm na prakticky jakémkoli povrchu, který byl v kontaktu s reakční směsí (Trchová et al., 2005). V případě, že při oxidaci anilinu bude do reakční směsi ponořen libovolný předmět stálý v kyselém prostředí, pokryje jeho povrch vodivý polyanilinový film. Tímto způsobem je možné modifikovat povrchy jako např. sklo, textilní tkaninu či polymerní povrch.

Přidáme-li do polymerační směsi stabilizátor, který je ve vodném prostředí rozpustný (např. 2 hm. % polyvinylpyrrolidonu), získáme místo sraženiny koloidní polyanilinovou disperzi připomínající roztok, v tomto případě je možné hovořit o disperzní polymeraci. Podobný princip jako u tvorby filmu je totiž použitelný na formování koloidních částic. Částice jsou vytvářeny polymerací anilinu v prostředí obsahujícím složku, na kterou částečně přechází role povrchu – stabilizátor. Anilinový oligomer se na řetězci adsorbuje na stabilizátoru a produkuje jádro polyanilinu. Automaticky zrychlujícím mechanismem pokračuje polymerace v blízkém okolí. Polyanilinové částice dále rostou a zároveň se formují nové oligomery. I v případě vzniku koloidní disperze polyanilinu se oligomery adsorbují kromě stabilizátoru i na dostupném povrchu předmětu ponořeném v reakční směsi či na vnitřním povrchu reakční nádoby a tvoří tedy filmy (Stejskal a Sapurina, 2005).



Obrázek 8 – a) sorpce oligomeru na stabilizátor, b) stimulace růstu řetězce, produkce jádra, c) formování koloidní částice (Stejskal a Sapurina, 2005)

Jako stabilizátory se používají vhodné, v reakčním médiu (nejčastěji ve vodě) rozpustné syntetické polymery jako polyvinylalkohol a polyvinylpyrrolidon nebo také biologické makromolekuly jako např. deriváty celulózy nebo polysacharid chitosan (Cruz-Silva et al., 2007). Dle Güizado-Rodríguez et al. (2010) lze jako stabilizátor použít i polyvinylmethylether nebo speciálně přizpůsobené kopolymery. Armes et al. (1990) například připravili koloidní polyanilin s použitím kopolymeru 2-vinylpyridinu s aminostyrenem jako stabilizátoru. Stejskal et al. (1996) mezi možné stabilizátory doplňují polyetylen glykol a poly(2-vinylpyridin). Gospodinova et al. (1997) provedli oxidativní polymeraci polyanilinu v přítomnosti stabilizátoru dodecylbenzensulfonové kyseliny (DBSA) ve vodném prostředí. Stejskal et al. (1999a) použili k přípravě koloidního polyanilinu stérický stabilizátor hydroxypropylcelulózu.

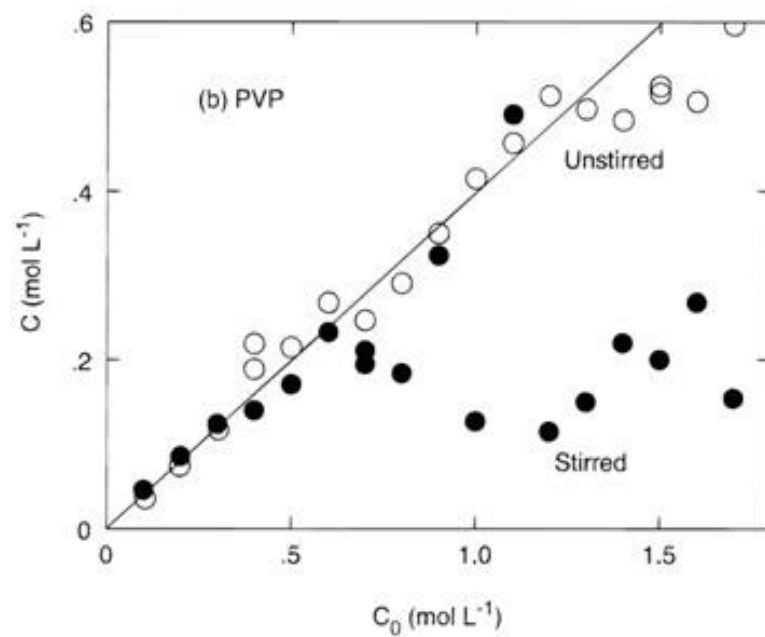
3.1 Způsoby přípravy koloidního polyanilinu

3.1.1 Příprava dle IUPAC

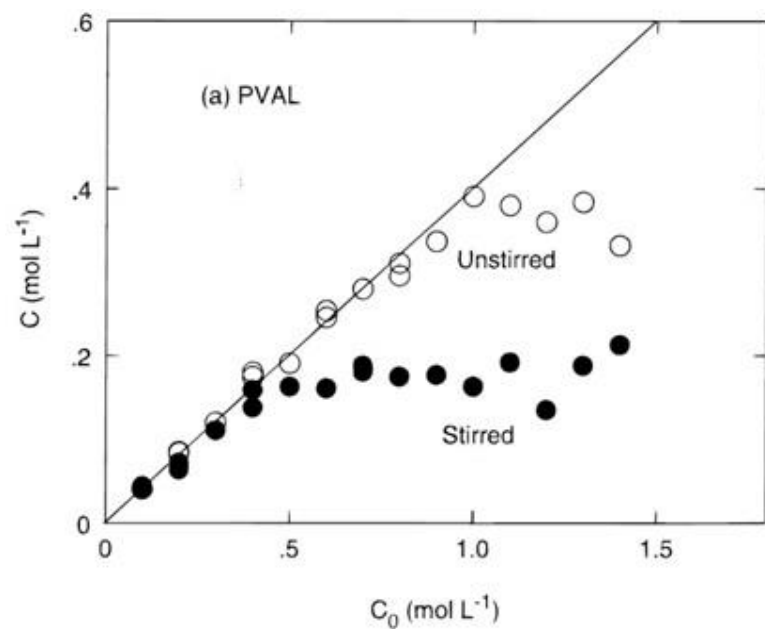
Příprava polyanilinové disperze se provádí oxidací 0,2 M anilin hydrochloridu 0,25 M amonium persulfátem v přítomnosti stabilizátoru, kterým jsou 2 hmotnostní % poly(N-vinylpyrrolidonu) (PVP). Anilin hydrochlorid v množství 0,259 g je rozpuštěn místo ve vodě, v 5 ml vodného roztoku PVP o koncentraci 40 g.l⁻¹. Polymerace anilinu začíná za pokojové teploty, přidáním 5 ml vodného roztoku obsahujícího 0,571 g amonium persulfátu. Směs se krátce míchá a poté se zanechá v klidu pro polymeraci. Polymerace je dokončena během několika minut. Koloidní disperze se následně ředí na požadovanou koncentraci pomocí 1 M HCl.

Průměrná velikost morfologicky nepravidelných částic takto připraveného koloidního polyanilinu je zpravidla 241 ± 50 nm. Stupeň polydisperzity velikosti částic pohybující se v rozmezí hodnot 0 – 1 (0 pro monodisperzní částice, 1 pro extrémě vysokou polydisperzitu velikosti částic) činí $0,26 \pm 0,12$ (Stejskal a Sapurina, 2005).

V souvislosti s přípravou PANI disperze dle IUPAC publikace Stejskal a Kratochvíl (1996) popisuje rozdíly výsledné polyanilinové disperze připravované oxidativní polymerací anilinu v přítomnosti stabilizátorů polyvinylalkoholu a poly(N-vinylpyrrolidonu) oba v koncentraci 2 hm. %. Ukázalo se, že poly(N-vinylpyrrolidon) je oproti polyvinylalkoholu účinnější stabilizátor a výtěžek polyanilinových částic závisí i na tom, zda je reakční směs míchána či nikoliv - výtěžek při míchání reakční směsi klesá.



Obrázek 9 - závislost molární koncentrace polyanilinu na molární koncentraci anilin hydrochloridu v nemíchané (○) a míchané (●) reakční směsi při použití stabilizátoru polyvinylpyrrolidonu (Stejskal a Kratochvíl, 1996)



Obrázek 10 - závislost molární koncentrace polyanilinu na molární koncentraci anilin hydrochloridu v nemíchané (○) a míchané (●) reakční směsi při použití stabilizátoru polyvinylalkoholu (Stejskal a Kratochvíl, 1996)

3.1.2 Enzymově katalyzovaná syntéza

Podle Cruz-Silva et al. (2006) lze připravit polyanilinovou disperzi enzymatickou syntézou ve vodném prostředí s použitím polyvinylalkoholu (PVAL) jako stabilizátoru. Během polymerace jsou jako dopující látky použity kyseliny chlorovodíková, toluensulfonová a kafrosulfonová. Postup tohoto způsobu přípravy je následující.

Do 50 ml trojhrdlé baňky je přidáno 18 ml roztoku PVAL o koncentraci 5,6 hm. %, anilinu o koncentraci $0,002 \text{ mol.l}^{-1}$ a dopující kyseliny (toluensulfonové či kafrosulfonové) o koncentraci $0,002 \text{ mol.l}^{-1}$. V případě použití kyseliny chlorovodíkové jako dopující látky je anilin nahrazen anilin hydrochloridem. Roztok je udržován za intenzivního míchání v lázni vody a ledu. Dále je do reakční směsi přidáno 2 ml čerstvě připraveného vodného roztoku křenové peroxidázy (HRP) o koncentraci 2,5 mg/ml. Reakce je zahájena postupným přidávkem 26 ml peroxidu vodíku o koncentraci 30 hm. %. Postupné přidávání peroxidu (osm přidávků 3,25 ml peroxidu vodíku po třech minutách) zabraňuje inaktivaci enzymu v důsledku přebytku peroxidu v reakčním prostředí. Po 2,5 hodinách reakční doby je získána tmavě zelená polyaniliová disperze. Výhodou tohoto způsobu přípravy je výrazně nižší uvolňování vedlejších produktů ve srovnání s tradiční chemickou syntézou dle IUPAC a dále absence automaticky se zrychlujícího mechanismu při oxidaci anilinu.

3.1.3 Syntéza s podporou povrchově aktivní látky

Yu et al. (2003) připravili vodnou disperzi polyanilinu s použitím dodecylsírany sodného (SDS) jako surfaktantu (povrchově aktivní látky).

V tomto případě je 4,6 g oxidačního činidla, peroxydisírany amonného o koncentraci $0,02 \text{ mol.l}^{-1}$ přidáno po rozmíchání ve 200 ml $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ kyseliny chlorovodíkové do roztoku obsahujícího 11,6 g SDS o koncentraci $0,04 \text{ mol.l}^{-1}$ a 1,9 ml anilinu o koncentraci $0,02 \text{ mol.l}^{-1}$, přičemž obě látky byly nejdříve rozpuštěny v 600 ml $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ kyseliny chlorovodíkové a poté po dobu 30 minut míchány dohromady. Následná reakce probíhá za stálého míchání po dobu pěti hodin.

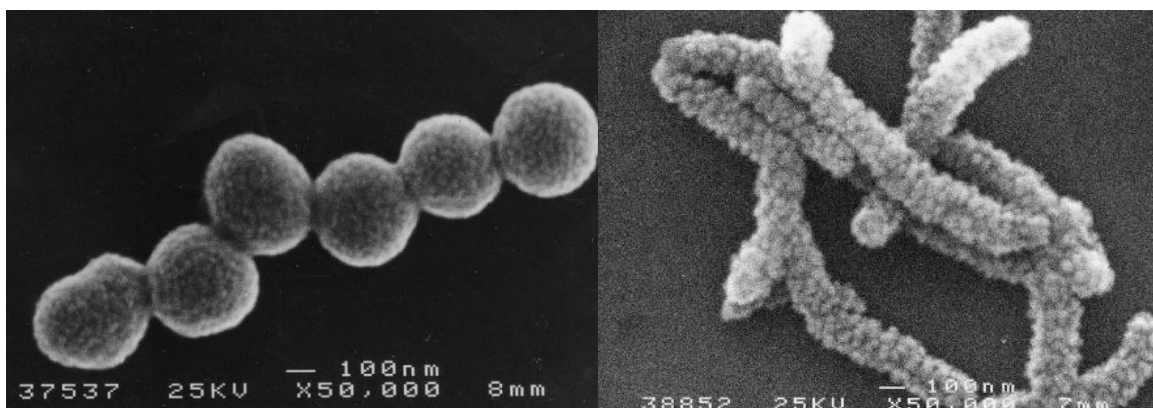
Měrná elektrická vodivost polyanilinu vysráženého z disperze připravené tímto způsobem činila více než 20 S.cm^{-1} . Výhodou je také ovlivnění výsledného pH disperze v rozmezí od 1 do 10 pomocí volby poměru SDS a anilinu.

Surfaktantu SDS využili také Kim et al. (2001), a to k přípravě disperze polyaniliových nanočástic sférického tvaru o průměru 10 – 30 nm a konduktivitě $4 - 9 \text{ S.cm}^{-1}$. Nano-

částicová disperze byla připravena pomocí polymerace v micelárním roztoku z 90 ml směsi 0,03 - 0,1 M anilinu a 0,2 M SDS ve vodě, do které bylo po dobu 15 minut za stálého míchání přikapáváno 10 ml roztoku APS v 0,1 M HCl (navážka APS odpovídala polovině použité navážky anilinu). Po ukončení přikapávání je reakce hotová za 40 minut.

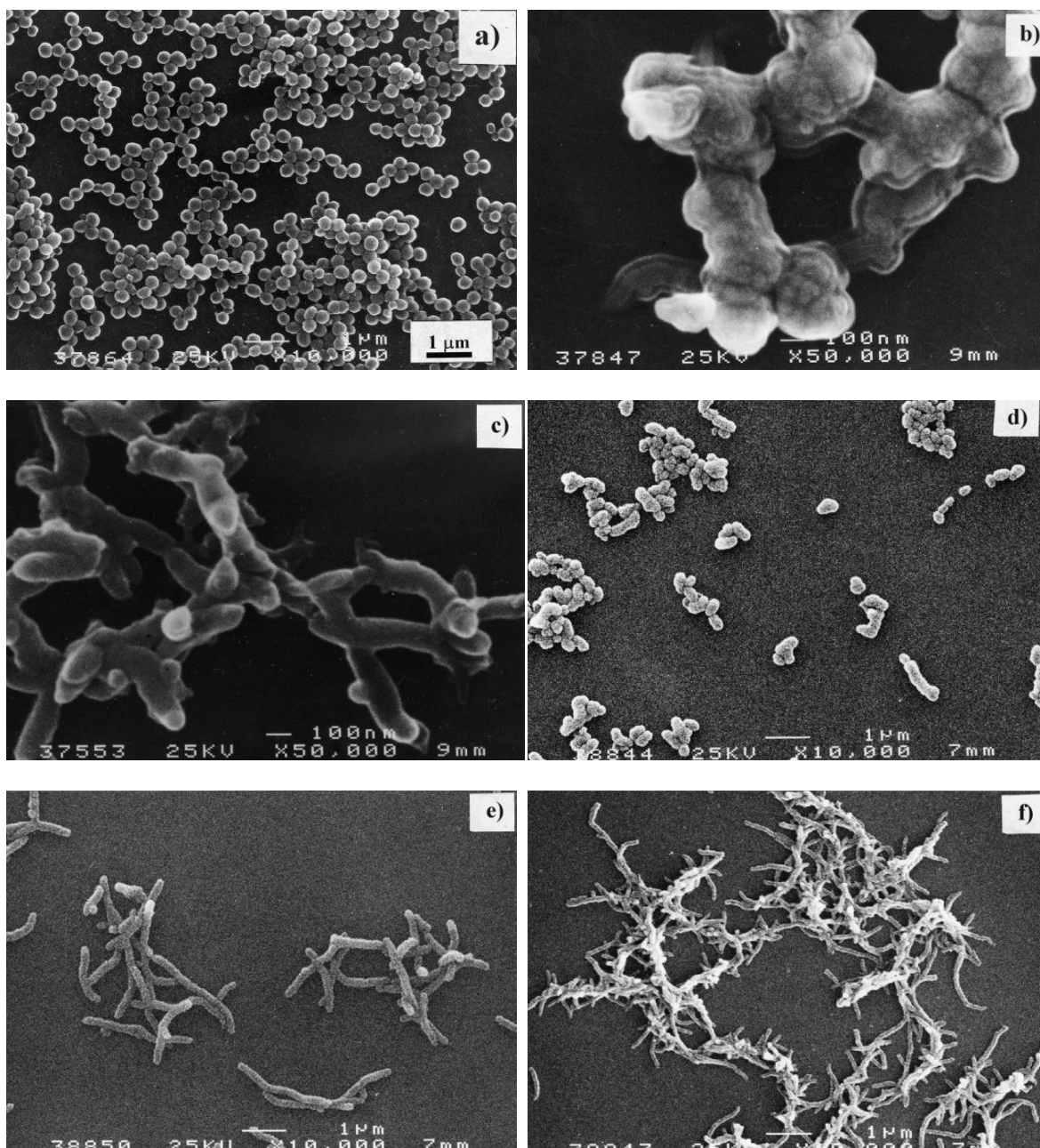
3.2 Morfologie částic PANI disperzí

V článku Stejskal et al. (1999a) je popisována možnost přípravy polyanilinových disperzí s různou morfologií částic. Disperze byla připravována oxidací anilin hydrochloridu peroxydisíranem amonným v kyselém, vodném prostředí za přítomnosti stabilizátoru hydroxypropylcelulózy. Morfologie částic byla ovlivňována pomocí odlišných teplot polymerace (0, 20 a 40°C) a různých koncentrací mediátoru *p*-fenylendiaminu, který zrychluje formování polyanilinu. Těmito způsoby bylo dosaženo morfologie částic tvaru korálů, rýžových zrn, válečků či fraktálních a kulových tvarů.



Obrázek 11 – detail kulovitých a korálovitých částice polyanilinové disperze stabilizované hydroxypropylcelulózou (Stejskal et al., 1999a)

Rozdíly v morfológiích i způsoby jejich dosažení jsou popsány na následujících fotografiích z elektronového mikroskopu.



Obrázek 12 – fotografie a), b) a c) zobrazují částice formované disperzní polymerací anilin hydrochloridu při a) 0°C; b) 20°C; c) 40°C. Fotografie d), e) a f) zobrazují produkty disperzní polymerace anilin hydrochloridu při použití mediátoru *p*-fenylendiaminu o koncentraci d) 2×10^{-5} ; e) 2×10^{-4} ; f) 2×10^{-3} při 0°C (Stejskal et al., 1999a)

3.3 Stabilita PANI disperze

Předmětem publikace Blinova et al. (2005) je stabilita koloidního polyanilinu, stabilizovaného poly(N-vinylpyrrolidonem). Zkoumána byla především chemická stabilita a stabilita hodnocena pomocí změn velikostí částic. Pro tyto účely bylo na látku působeno kyselým (1 M kyselina chlorovodíková), neutrálním a zásaditým (1 M hydroxid amonný) médiem při teplotě 105 °C. Dále byla vystavena opakovaným cyklům zmrazení a tání, navíc disperze podléhala ozařování ultrafialovým zářením a mechanická integrita koloidních částic byla kontrolována vystavením disperze ultrazvukovému vlnění

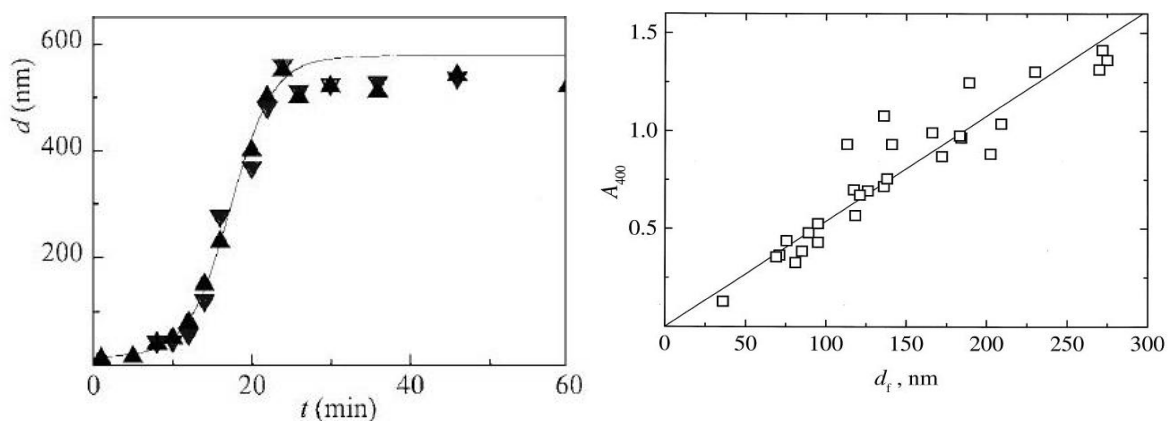
Výsledkem studie je skutečnost, že i po 1000 hodinách při 105°C je zachována koloidní stabilita a to jak v kyselých, tak tak i v zásaditých médiích. Pomocí optických spekter bylo po uplynutí 1000 h pozorováno snížení obsahu polyanilinu o 25 % bez prokazatelného rozdílu mezi kyselým a zásaditým médiem. Působení ultrazvukových vln, UV záření či opakované zmrazení nezpůsobuje nevratné poškození koloidu a velikost částic se významně nezměnila při skladování disperze po dobu 10 let.

3.4 PANI filmy připravené disperzní polymerací

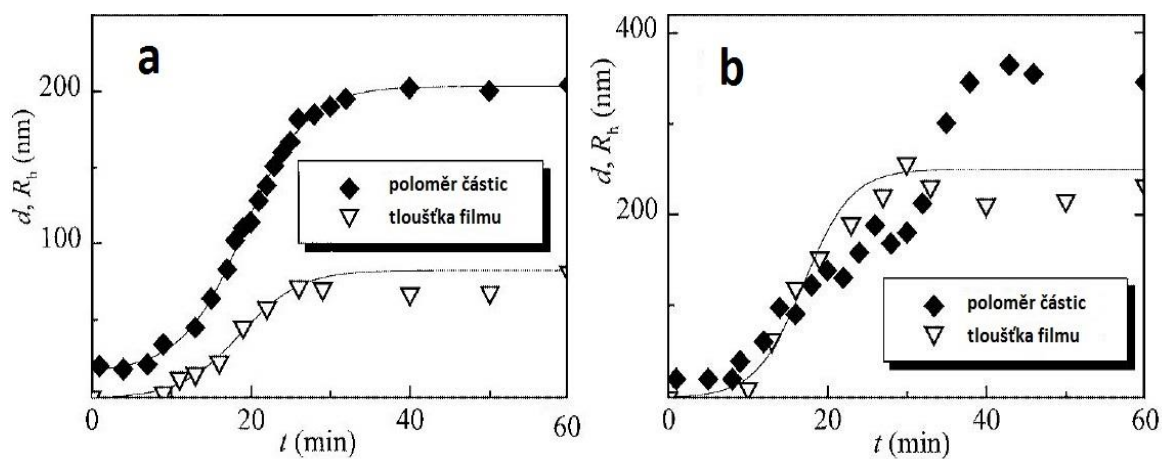
Jak již bylo zmíněno, polyanilinové filmy je možné připravit pomocí reakční směsi, ve které probíhá oxidace vodného roztoku anilin hydrochloridu, ve kterém je přítomen stabilizátor (např. PVP), s vodným roztokem amonium persulfátu. Vodné prostředí je možné nahradit 1 M HCl. Podle vědecké studie Riede et al., (2002), ve které byly polyanilinové filmy disperzní polymerací připravovány odpovídají koncentrace roztoků přípravě uvedené v kapitole 3.1.1., tedy přípravě koloidní PANI disperze. Doba polymerace byla v této práci stanovena na základě monitorování teploty reakční směsi na méně než jednu hodinu. Po vypláchnutí reakční směsi 0,2 M roztokem HCl, následným opláchnutím 0,2 M vodným roztokem anilin hydrochloridu, jsou zeleným polyanilinovým filmem pokryty reakční nádoby, misky či jiné povrchy ze skla, polystyrenu nebo jiného materiálu.

Riede et al., (2002) dále uvádějí grafické znázornění průběhu narůstání tloušťky filmu v průběhu polymerace. Pro srovnání uvádějí hodnoty pro filmy připravené z reakční směsi bez přídavku stabilizátoru (srážecí polymerací – obrázek 13) i pro filmy připravené za přítomnosti stabilizátoru polyvinylpyrrolidonu a hydroxypropylcelulózy (disperzní polymerace – obrázek 14). Filmy byly v tomto případě tvořeny na čirém podložním skle umožňující měření tloušťky pomocí optické absorbance při vlnové délce $\lambda = 400$ nm.

Tloušťka filmu připraveného za nepřítomnosti stabilizátoru se pohybovala kolem hodnoty 560 nm. V případě filmu z reakční směsi stabilizované 2 hm. % hydroxypropylcelulózy (HPC) činila výsledná tloušťka cca 80 nm, film stabilizovaný 2 hm. % polyvinylpyrrolidonu (PVP) vykazoval hodnoty tloušťky cca 200 nm.

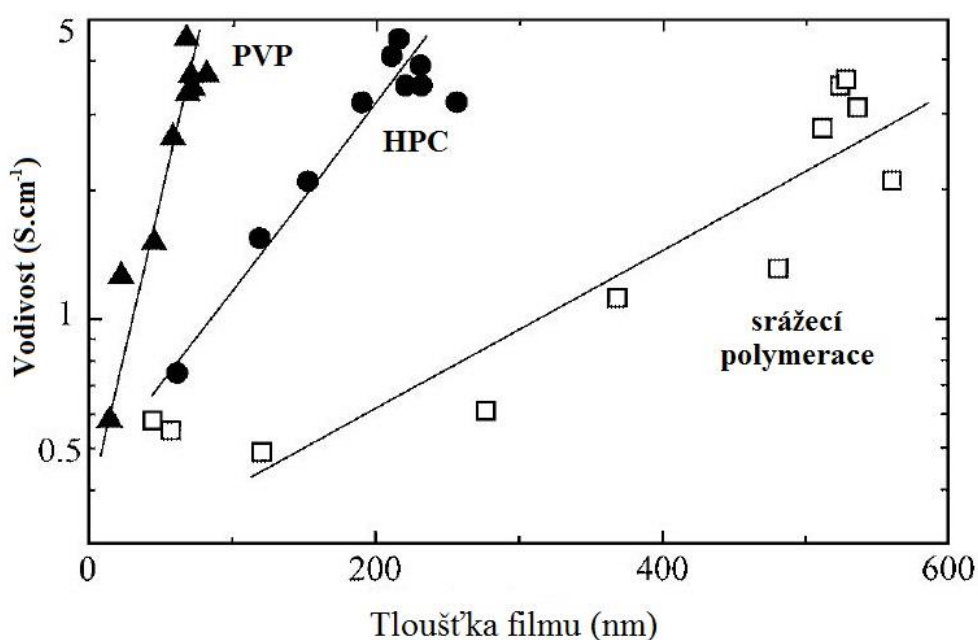


Obrázek 13 – vlevo závislost tloušťky PANI filmu na době polymerace (Riede et al., 2002), vpravo závislost absorbance při ($\lambda = 400$ nm) na tloušťce filmu (Stejskal et al., 1999)



Obrázek 14 – závislost tloušťky PANI filmu na době polymerace (a – stabilizátor HPC, b - stabilizátor PVP) (Riede et al., 2002)

V případě filmů připravených za přítomnosti stabilizátoru lze také konstatovat, že velikost koloidních částic polyanilinu rostla a ustálila se úměrně s tloušťkou filmu. Dále ze studie vyplývá, že měrná elektrická vodivost jednotlivých filmů roste s jejich tloušťkou, která byla ovlivňována zejména koncentrací reaktantů a v případě substrátů ponořených do reakční směsi i časem jejich vložení. Hodnoty měrné elektrické vodivosti filmů se ve všech případech (stabilizace PVP, HPC i srážecí polymerace) pohybovaly v řádu jednotek, maximálně pak dosáhly cca 5 S.cm^{-1} .



Obrázek 15 – závislost měrné elektrické vodivosti na tloušťce konkrétních filmů během polymerace (Riede et al., 2002)

Polyanilinové filmy připravené výše popsanou *In Situ* disperzní polymerací mají podle Deshpande et al., (2009) potenciální uplatnění v senzorech plynů, dle Mauro et al., (2011) také v světlo emitujících LED zařízeních, Li et al., (2009) zmiňují možnost použití polyanilinových filmů v nízkonákladových solárních článcích Stejskal et al., (1999b) také popisují možnost tvorby PANI filmů na vláknech jak hydrofilní (bavlna), tak hydrofobní (polypropylen, polyester) povahy.

4 BIOLOGICKÁ AKTIVITA PANI

4.1 Biokompatibilita PANI

Dle definice lze za biokompatibilní považovat pouze materiály, které nejsou toxické, alergenní, karcinogenní ani mutagenní a neovlivňují plodnost (Williams, 1986). Obecně je možno definovat biokompatibilní materiál jako takový, který nevyvolává v organismu žádnou negativní reakci. Tato charakterizace ve skutečnosti zahrnuje velké množství interakcí, charakteristik a testů, které jsou definovány v mezinárodních normách. Teprve souhrnné výsledky těchto testů určují, zda může být daný materiál v konkrétním zdravotnickém prostředí použit (Humpolíček a Kašpárková, 2012a).

V současné době existuje pouze omezené množství studií, které se zabývají biokompatibilitou nativního polyanilinu. Publikované práce lze rozdělit do dvou hlavních skupin. První se zaměřuje na *in vivo* testování implantability a post-implantačních změn tkání obklopující implantát. Druhá skupina se zabývá posuzováním *in vitro* proliferace a diferenciace buněk na povrchu polyanilinu. Ovšem v důsledku toho, že studie pokrývají různé oxidační stavy a formy polyanilinu včetně kopolymerů či jinak inkorporovaného polyanilinu docházelo k rozporuplným výsledkům. Dokazují to nesrovnalosti ve výsledcích *in vivo* testů. Například zatímco ve studii Kamalesh et al. (2000) nezpůsobila podkožní implantace polyanilinových filmů v oxidační formě emeraldinu samcům krys Sprague-Dawley po dobu 19 až 90 týdnů žádné zánětlivé reakce, studie Wang et al. (1999) při implantaci emeraldinových filmů identickému druhu laboratorních krys po dobu 19 až 50 týdnů naopak známky zánětlivé reakce prokázala. (Humpolíček et al., 2012b).

Studie Bendrea (2011) například považuje polyanilin za biokompatibilní jak *in vitro*, tak *in vivo*. Konkrétně zmiňuje případy použití PANI substrátů, které vykazují velmi dobrou adhezi, proliferaci a diferenciaci jak v případě buněčné linie srdečních myoblastů, tak nervových buněk.

Novější studie zabývající se některými aspekty biokompatibility byla publikována v roce 2012 (Humpolíček et al., 2012b). V této studii byl otestován vliv polyanilinu ve formě vodivé soli a nevodivé báze v kontextu dráždění a senzibilizace kůže a cytotoxicity. Z této studie vyplynulo, že ani jedna z forem nemá nepříznivý vliv na kůži. Nicméně obě formy vykazují průkaznou hladinu cytotoxicity, přičemž polyanilinová sůl vykazovala větší cytotoxický efekt.

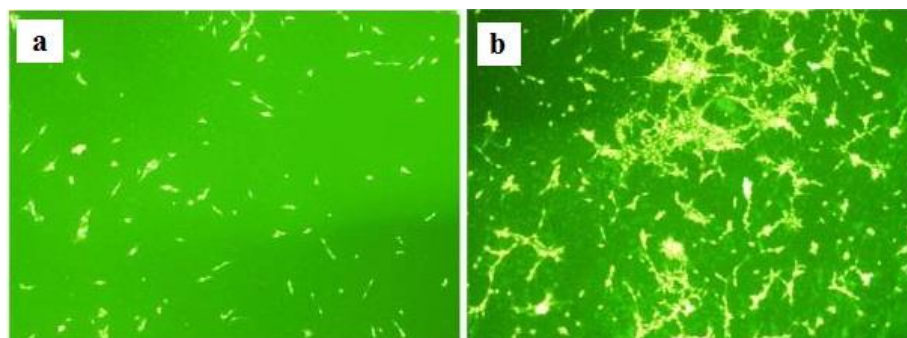
Cytotoxicita koloidního polyanilinu připraveného dle postupu IUPAC byla stanovována pomocí testu MTT v praktické části bakalářské práce, na kterou navazuje tato diplomová práce. Sledována byla cytotoxická disperze koloidního PANI ředěného kultivačním médiem na koncentrace 0,1 až 1 %. Účinkům byly vystaveny buňky linie lidských keratinocytů a myších fibroblastů. Výsledkem bylo prokázání cytotoxicity polyanilinu i ve formě disperze, jelikož všechny koncentrace koloidního polyanilinu použité v tomto testu statisticky průkazně vykazovaly nižší viabilitu buněk než hodnoty reference (čisté kultivační médium). Podle procentuálního vyjádření viability však cytotoxický efekt nevykazovaly koncentrace 0,1 % a 0,2 %, které nezpůsobily smrt více než 20 % buněk.

Přes známý aplikační potenciál polyanilinu mimo jiné i v oblasti biomedicíny, nejsou informace o jeho biologických vlastnostech, zejména o buněčné kompatibilitě dostatečně popsány. Poznání o této problematice bude shrnuto v následující části.

4.2 Nativní polyanilinové filmy

Polyanilinové filmy v nativní podobě byly dosud studovány jen velmi omezeně. Navíc jsou limitovány i různorodostí jejich formy či způsobem přípravy. Bidez et al. (2006) například film připravili z roztoku komerčně dostupného polyanilinového prášku o koncentraci 4 hm.% v n-methylpyrrolidonu, který poté přefiltrovali přes filtr se skelnou vatou. Přefiltrovaný roztok v množství 35 μ l rozpipetovali do kultivačních jamek. A následně sušili při 50°C ve vakuu za vytvoření polyanilinové vrstvy. Filmy byly poté dopovány působením 1 M HCl po dobu 15 minut. Testy buněčné proliferace buněk (neboli schopnosti buněk hojně se množit, závislé na mitotické aktivitě buněk v daném prostředí) linie myších myoblastů H9c2 u této studie prokázaly velmi dobré výsledky proliferace, srovnatelné s referenčními vzorky tkáňového polystyrenu. Wang et al., (2008) připravili polyanilinové filmy pomocí oxidační polymerace 50 ml 0,16 M roztoku anilinu v metylchloridu roztokem 50 ml APS v 1 M HCl o koncentraci 0,08 mol/l. Do roztoku následně ponořili polytetrafluorethylenový substrát na dobu 2 hodiny. Filmy byly následně dopovány 1 M HCl po dobu 30 minut a poté sušeny při 37°C za vakua. V tomto případě byla pro testy buněčné aktivity vybrána linie nervových buněk PC-12. Závěrem této studie je označení filmů za biokompatibilní, umožňující bezproblémovou buněčnou adhezi, proliferaci. Další studie Liu et al., (2010) pracuje s filmy připravenými na křemíkovém substrátu. Ten byl po úpravě směsí 98 % H₂SO₄ a 30 % H₂O₂ v poměru 7 : 3 vložen do 18 ml 0,18 M roztoku anilinu v prostředí 1,2 M HCl, ke kterému byl přidán chlazený roztok 0,18 M APS v 1,2 M HCl

o objemu 18 ml. Po 4 hodinách byly vzorky vyjmuty a sušeny proudem plynného dusíku. Buněčná aktivita těchto filmů byla studována na linii nervových buněk PC-12. Vzorky opatřené polyanilinovým filmem vykazovaly výrazně lepší buněčnou adhezi a proliferaci než referenční křemíkový vzorek.

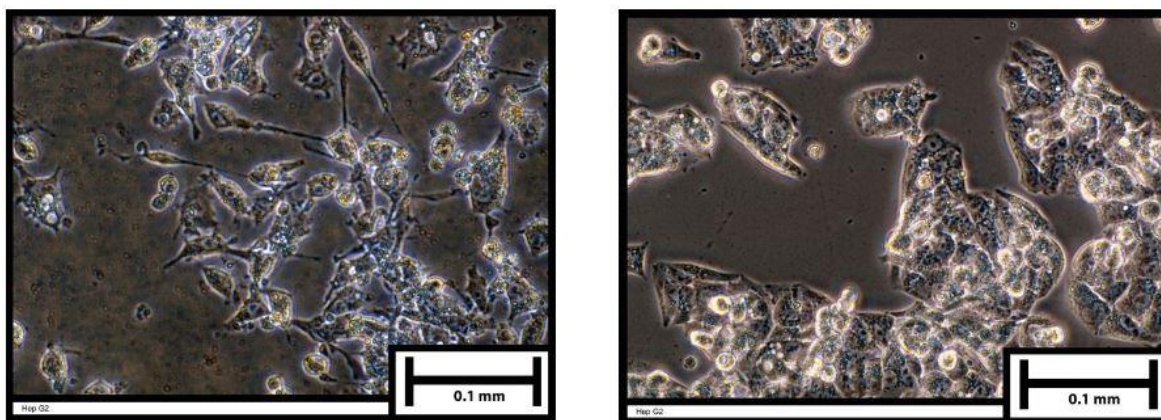


Obrázek 16 – fotografie fluorescenční mikroskopie pořízené 24 h od nasazení, a) buňky linie PC-12 na čistém referenčním vzorku, b) proliferující buňky na vzorku opatřeném PANI filmem. Zvětšení 40× (Wang et al., 2010)

Práce využívající ke tvorbě filmů postupu dle IUPAC jsou zejména publikace (Humpolíček et al., 2012a) a dále studie provedená v rámci Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně kolektivem laboratoře buněčné biologie v rámci Centra Polymerních Materiálů. Tato práce Humpolíček et al. (2015) je v současné době zaslána k recenznímu řízení.

V článku Humpolíček et al., (2012a) je studována adheze a proliferace buněk linie lidských hepatocelulárních buněk karcinomu jater (HepG2) na nativních polyanilinových filmech připravených *in situ* v kultivačních polystyrenových miskách. V přípravě vzorků bylo využito schopnosti vodné reakční směsi používané pro oxidaci anilinu vytvářet film na površích substrátů. Postup přípravy odpovídal postupu, uvedeném v kapitole 2.3. Reakce probíhala po dobu 10 minut a polyanilinová sraženina byla vypláchnuta pomocí 0,2 M HCl a následně metanolem. Tímto způsobem byly získány vzorky filmů polyanilinové soli (PANI-S). 50 % vzorků bylo působení 1 M hydroxidu amonného převedeno na polyanilinovou bázi (PANI-B). Z výsledků této studie je patrné, že se buňky dokážou bez obtíží adherovat na obou typech filmů. Následná proliferace buněk na sledovaných filmech ukázala, že vodivá polyanilinová sůl je pro růst buněk méně příznivá než polyanilinová báze. Zajímavostí je změna morfologie buněk na PANI filmech v porovnání s kontrolním vzorkem, kde buňky rostly na tkáňovém polystyrenu běžně užívaném pro kultivaci buněk. Ze

srovnání je patrné, že buňky ztrácely svůj typický tvar, ohraničení buněk bylo méně jasné, vznikalo více ektooplazmatických výběžků a pseudopodií.



Obrázek 17 – mikrografie zobrazující morfologii buněk rostoucích na filmu tvořeném polyanilinovou bází (vlevo) a na tkáňovém polystyrenu (vpravo), (Humpolíček et al., 2012a)

Studie provedená na pracovišti UTB ve Zlíně testuje biologickou aktivitu tenkých filmů připravených z čistého polyanilinu znovu jak ve formě vodivé polyanilinové soli s kyselinou chlorovodíkovou (PANI-S), tak ve formě nevodivé polyanilinové báze (PANI-B). Buněčná aktivita je v tomto případě sledována na buněčné linii myších fibroblastů (NIH/3T3). Níže popsané metody a výsledky budou porovnávány s výstupy praktické části této práce, která se bude zabývat PANI filmy připravenými za přítomnosti různých stabilizátorů.

Filmy ve zmiňované studii byly také připravovány polymerací v miskách ze tkáňového polystyrenu. Příprava polymerační směsi odpovídala postupu uvedenému v kapitole 2.3. Jednalo se tedy o oxidaci 0,2 M roztoku anilin hydrochloridu 0,25 M roztokem amonium persulfátu po dobu 1 hodiny. Vzniklá polyanilinová sraženina byla poté z destiček vypláchnuta 0,2 M kyselinou chlorovodíkovou, následně metanolem a nechává se sušit na vzduchu. Na destičkách zůstává vzniklý zeleně zbarvený polyanilinový film (PANI-S). Část filmů byla deprotonována ponořením do 1 M hydroxidu amonného na 12 hodin. Tímto způsobem vznikají modré, nevodivé polyanilinové filmy (PANI-B)

Polyanilinové filmy (PANI-S) a (PANI-B) byly nejprve charakterizovány z pohledu jejich mikrostruktury a elektrické vodivosti pomocí mikroskopie s fázovým kontrastem, mikroskopie atomárních sil a měření kontaktního úhlu. Z hlediska testování mikrobiolo-

gických vlastností *in vitro* byla zjišťována jejich buněčná kompatibilita ve smyslu buněčné adheze, proliferace a migrace za použití konkrétních buněčných linií.

4.3 Buněčná kompatibilita

In vitro testování s využitím buněčných kultur patří mezi nejvyužívanější biologické modely aplikované ve výzkumu. V porovnání s jinými metodami experimentů, například testy *in vivo* s použitím laboratorních zvířat mají několik výhod. Pokus je prováděn na jediném, jednoznačně charakterizovaném buněčném typu přičemž jeho výsledky nejsou ovlivněny interakcí s jinými orgány, tkáněmi či buněčnými populacemi. Tento fakt vede k bezproblémové reprodukovatelnosti výsledků vědeckých prací. Další výhodou je možnost provádění experimentů, při nichž dojde ke zničení buněk. Na druhou stranu má testování pomocí buněčných kultur i některá omezení či nevýhody. Kultivace buněk například neprobíhá ve fyziologickém prostředí tkání, v důsledku tohoto faktu mohou buňky v ojedinělých případech během kultivace dediferencovat či měnit svůj fenotyp. Pro práci s buněčnými kulturami je také nezbytná speciálně vybavená laboratoř, vyškolený personál, zvláštní spotřební materiál a chemikálie zbavené běžných kontaminantů (Davis, 2002).

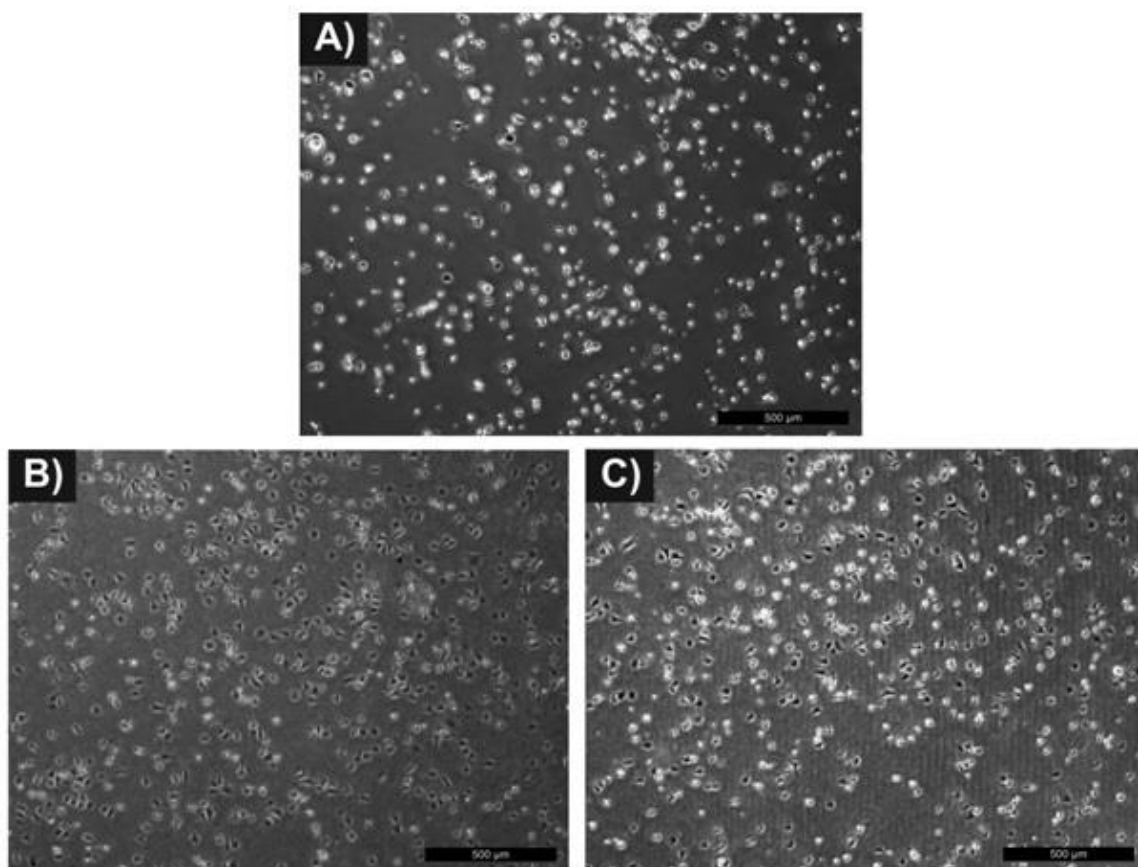
Základ buněčné kultury tvoří mechanická izolace určitého typu zvířecích, lidských, méně často i hmyzích či rostlinných buněk. První kulturu izolovaných buněk označujeme jako primární kulturu či primokulturu. Buňky bývají nejčastěji kultivovány jako adherované na vhodném povrchu, méně obvykle v suspenzi či zakotvené v matrix. Přičemž kultivační podmínky se snaží simulovat fyziologické podmínky *in vivo*. Buňky jsou kultivovány při tělesné teplotě ve speciálních nádobách, rostou v kultivačním médiu a udržují se zpravidla v atmosféře se zvýšeným parciálním tlakem oxidu uhličitého. Adherentní kultury jsou nejčastěji kultivovány v nádobách ze speciálně upraveného, tkáňového polystyrenu. Po dostatečném namnožení se adherentní buňky uvolní od kultivačního povrchu, nejčastěji pomocí enzymů proteáz. Buněčná suspenze je poté nasazena do nové kultivační nádoby, tento postup se obvykle označuje jako pasáž a vzniká jí sekundární kultura. U většiny buněčných linií roste počet buněk přibližně exponenciálně až do chvíle, kdy se buňky začnou těsně dotýkat. V důsledku kontaktní inhibice poté dochází ke zpomalení až zastavení růstu (Vejražka, 2008).

V dosud nepublikované studii provedené kolektivem laboratoře buněčné biologie UTB ve Zlíně bylo jako kultivační médium buněk bylo použito médium s telecím sérem. Buňky byly kultivovány jako adherentní kultura v polystyrenových kultivačních nádobách přičemž

ideální podmínky – teplota 37°C, konstantní relativní vlhkost a 5 % atmosféra oxidu uhličitého byly zajištěny pomocí inkubátoru. Linie NIH/3T3 byla vybrána jako jedna z nejčastěji používaných linií ve studiích zabývajících se interakcemi buněk a materiálu a tedy dobré reprodukovatelnosti výsledků.

4.3.1 Buněčná adheze

K testování schopnosti buněk adherovat se na polynilinových filmech byly filmy PANI-S a PANI-B spolu s referencí (čistá polystyrenová miska) osazeny buňkami ve formě suspenze buněk v médiu o koncentraci 1×10^7 buněk v 1 ml média. Po 1 hodině byly buňky jemně opláchnuty a pomocí mikroskopu Olympus CKX 41 byly pořízeny mikrofotografie pro porovnání buněčné adheze na testovaných površích.

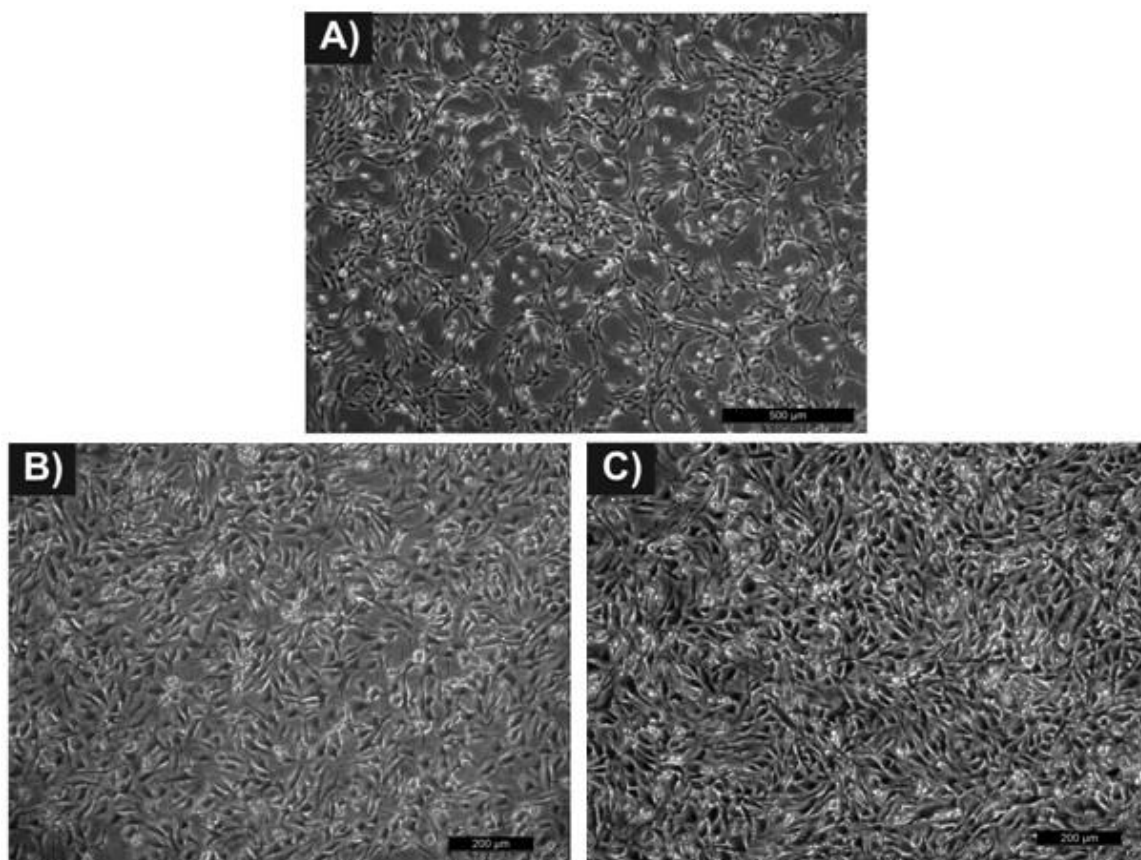


Obrázek 18 – mikrofotografie buněk linie NIH/3T3 adherovaných na testovaném povrchu po 1 hodině od osázení. A) Reference (polystyrenová miska), B) PANI-S, C) PANI-B (Humpolíček et al., 2015)

Na pořízených snímcích je možné sledovat velmi dobrou schopnost buněk adherovat se na polyanilinových filmech, což dokazuje předpoklad stanovený po testech povrchové energie filmů. Na první pohled je možné vidět, že polyanilinové filmy mají lepší buněčnou adhezi než povrch čisté polystyrenové misky. Filmy PANI-B i díky nižší povrchové energii oproti filmům PANI-S vykazují lepší buněčnou adhezi.

4.3.2 Buněčná proliferace

Pro porovnání buněčné proliferace buněk na daných površích je nejprve nutné zvolit dobu proliferace. Ta byla s ohledem na jiné studie proliferace na daném typu buněčné linie stanovena na 24 hodin. Koncentrace buněk byla stejným způsobem určena na 1×10^5 buněk v 1 ml média. Filmy s referencí byly osazeny buněčnou suspenzí a po uplynutí 24 hodin byly pořízeny mikrofotografie pomocí mikroskopu Olympus CKX 41.



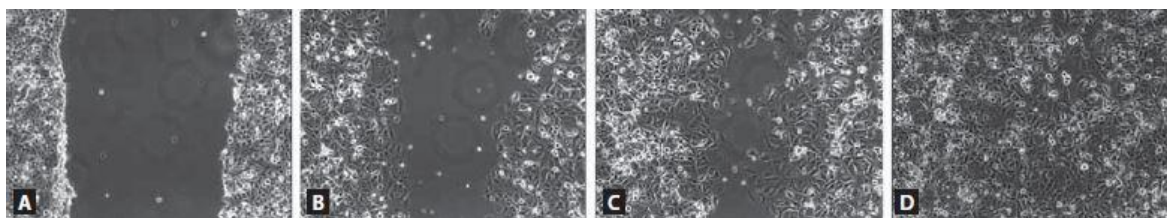
Obrázek 19 – mikrofotografie buněk linie NIH/3T3 po 24 hodinách od osazení. A) Reference (polystyrenová miska), B) PANI-S, C) PANI-B (Humpolíček et al., 2015)

Na vybraných mikrofotografiích lze pozorovat významné rozdíly v proliferaci buněk na různých površích. Je zjevné, že buňky na referenční polystyrenové destičce netvoří

splývající vrstvu buněk a je jich méně. V případě PANI-S a PANI-B filmů je proliferace velmi dobrá a slibná. Buňky tvoří souvislou vrstvu. V případě PANI-B filmu je v porovnání s PANI-S filmem proliferace vyšší. Nicméně je nutné zmínit snadnou oddělitelnost narostlých a pomnožených buněk od povrchu i po mírném oplachu, například při výměně média, a tedy i snížení počtu na povrchu adherovaných buněk.

4.3.3 Buněčná migrace

Pro měření základních parametrů buněčné migrace, jako jsou především rychlost migrace a polarita buněk, se běžně používá metoda zvaná Scratch-wound assay (zacelování rýhy). Buňky jsou kultivovány v běžném kultivačním médiu, dokud nevytvoří souvislou vrstvu. Následně je do této vrstvy špičkou pipety o definované velikosti vytvořena rýha. Buňky na okraji rýhy polarizují a začínají samovolně migrovat směrem ke středu rýhy ve snaze ji zacelit. Obvyklým způsobem monitorování pohybu buněk je intervalové snímání mikroskopem. Motilitu je možno kvantifikovat pomocí času nezbytného pro kompletní zacelení rýhy, k čemuž lze využít softwarové hodnocení pokrytí snímané oblasti buňkami. Důležité je však vzít v úvahu příspěvek proliferace buněk na samotné zacelování během experimentu. K její inhibici je nezbytné přidání inhibitorů proliferace do média (např. mitomycin C). Metoda je vhodná ke studiu procesu hojení mechanických poranění (Kovaříková et al., 2014)



Obrázek 20 – mikrofotografie čtyř stádií experimentu Scratch assay. A) do monovrstvy nádorových buněk MCF-7 je špičkou pipety vytvořena rýha, B) stejné místo po 24 hodinách – buňky na okraji rýhy polarizují a migrují směrem k jejímu středu ve snaze ji zacelit, C) stav po 72 hod, D) stav po 120 hod, rýha je zcela zacelena migrujícími buňkami. Zvětšení 40× (Kovaříková et al., 2014)

4.3.4 Průtoková cytometrie

Touto metodou se mimo jiné kvantitativně vyhodnocuje buněčná proliferace a adheze. Slouží k analýze částic a buněk, které protékají přístrojem v proudu nosné kapaliny. Využívá princip rozptylu světla, excitace a emise fluorochromních molekul k získání dat

z mikroskopických částic a buněk. Buňky jsou většinou značeny specifickými fluorochromy a hydrodynamicky soustředěny do tenkého proudu v kapiláře, kterou protékají vysokou rychlostí, přičemž jsou ozařovány monochromatickým koherentním zářením produkovaným laserem. Intenzita fluorescence jednotlivých buněk pak odpovídá množství struktur, které na sebe vážou fluorescenční barvivo (například propidium jodid vázající se na DNA po proniknutí narušenou membránou mrtvé buňky). Hlavními výhodami průtokové cytometrie jsou vysoká rychlost analýz velkých souborů jednotlivých buněk nebo částic, nedestruktivnost a také relativně nízké finanční náklady na analýzu jednoho vzorku (Slaninová et al., 2008).

4.3.5 MTT test metabolické aktivity

MTT test je používán ke stanovení životaschopnosti (viability) buněk nebo také k vyhodnocení testů cytotoxicity potenciálně toxických látek a léčiv (Scudiero et al., 1988). Poprvé byl proveden a popsán Mossmanem (1983) a stále patří mezi nejuniverzálnější a nejoblíbenější cytotoxické metody. Při tomto testu jsou buňky v určité fázi růstu vystaveny cytotoxické látce. Doba působení je dána dobou potřebnou pro maximální poškození buněk. Po odebrání cytotoxické látky je buňkám dovoleno proliferovat po dvě až tři doby zdvojnásobení populace (population-doubling times), aby se rozlišilo mezi životaschopnými buňkami, které jsou schopny proliferace a životaschopnými buňkami, které se již množit nemohou. Počet přeživších buněk je poté určován nepřímo pomocí redukce MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-tetrazolium bromidu), žlutého, ve vodě rozpustného tetrazoliového barviva, živými (metabolicky aktivními), ne však mrtvými buňkami na purpurový produkt formazán, který není rozpustný ve vodném prostředí. K redukci dochází na mitochondriální membráně respirační přeživších buněk. Množství vyprodukovaného MTT formazánu může být stanoveno spektrofotometricky za použití vhodného rozpouštědla při vlnové délce 540 nebo 570 nm, přičemž vyšší hodnoty absorbance (více redukovaného formazánu) ukazují na vyšší počet přeživších buněk (Freshney, 2005).

5 CHARAKTERIZACE MATERIÁLOVÝCH VLASTNOSTÍ

V dalším textu budou definovány klíčové parametry ovlivňující základní buněčné vlastnosti polyanilinových, nebo obecně polymerních, povrchů. Jedná se především o povrchovou energii, topografii povrchu, elektrickou vodivost filmu a optické vlastnosti. Tyto charakteristiky je možno studovat pomocí následujících metod.

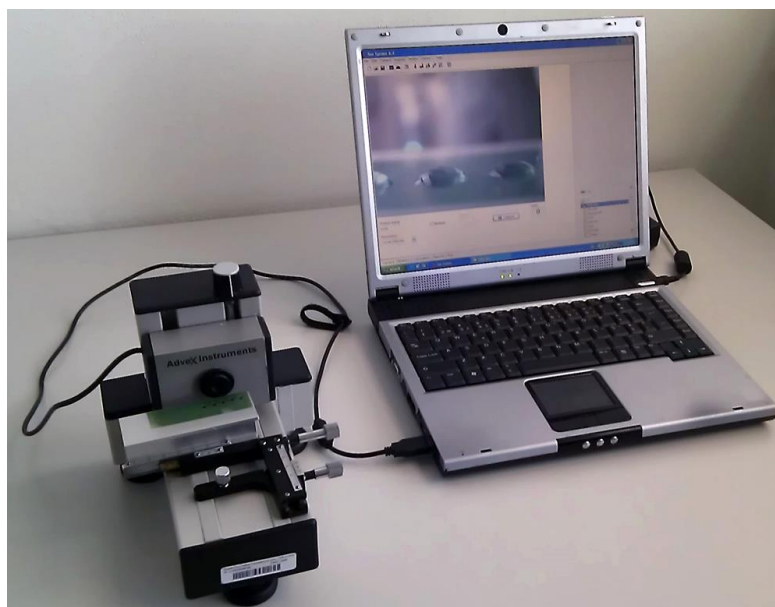
5.1 Měření kontaktního úhlu sedící kapky

Schopnost buněk přichytit se a růst na polymerních površích je dána především hydrofilitou či hydrofobicitou povrchu, která souvisí s volnou povrchovou energií a charakteristickými funkčními skupinami na povrchu filmů. Pozorovaná vazba a růst buněk na povrchu polyanilinu jsou tedy podmíněny jeho hydrofilitou (Humpolíček et al., 2012a).

Metoda měření kontaktního úhlu sedící kapky kapaliny na pevném podkladu je přesná, rychlá a levná metoda charakterizace povrchu pevných materiálů. Na základě zjištěného kontaktního úhlu lze vypočítat povrchovou energii daného materiálu. Kontaktní úhel je hlavní charakteristika tvaru kapky kapaliny na povrchu nerozpustné tuhé látky a zároveň jedna z mála přímo měřitelných vlastností fázového rozhraní. Měření je jednoduše provedeno stanovením úhlu, který svírá tečna k povrchu kapky vedená v bodě styku kapky s rozhraním. Povrch je smáčivý, pokud je naměřený kontaktní úhel na tomto povrchu menší než 90° . Naopak pokud je kontaktní úhel větší než 90° , jedná se o povrch nesmáčivý. V případě použití vody jako testovací kapaliny, pak mluvíme o hydrofilním, případně hydrofobním povrchu. Prakticky se měření provádí pomocí počítačového softwaru a kamery. Pro měření je zcela dostačující vzorek o velikosti několika čtverečních centimetrů, který se umístí před čočku kamery. Pomocí mikropipety je na vzorek umístěna kapka testovací kapaliny, dojde k okamžitému slícování profilu kapky a výpočtu kontaktního úhlu na základě jednoduché interpolace výšky a šířky oblouku opisujícího tvar dané kapky. Software umožňuje ukládání obrázků, zachycení časového vývoje profilu kapky, provedení výpočtu povrchové energie vzorku na základě různých výpočetních modelů i porovnání získané hodnoty se standardy (Kedroňová, 2012).

Podle Amaral et al. (2006) lze nejlepší buněčnou adhezi při interakci polyanilinu s buňkami očekávat v případě co nejbližších hodnota celkových povrchových energií. Proto byla ve studii pracoviště UTB ve Zlíně, povrchová energie pomocí SEE Systemu měřena jak u filmů PANI-S a PANI-B, tak i u vrstvy buněk linie NIH/3T3 získané důkladným

přefiltrováním buněčné suspenze přes filtrační papír. Jako zkušební kapaliny byly použity deionizovaná voda, etylenglykol a diiodmetan. Kontaktní úhel kapek všech zkušebních kapalin byl odečítán u každého vzorku filmu a pro výpočet povrchové energie acidobazickou metodou byla použita jeho průměrná hodnota.



Obrázek 21 – SEE Systém pro měření kontaktního úhlu sedící kapky použitý v praktické části této práce

Tímto postupem byly získány hodnoty celkové povrchové energie γ^{TOT} a také její disperzní γ^{LW} (představující disperzní síly uplatňující se mezi nepolárními molekulami) a polární γ^{AB} (především interakce vodíkových můstků) složky obou typů polyanilinových filmů PANI-S, PANI-B i hodnoty povrchové energie vrstvy buněk linie myších fibroblastů NIH/3T3.

vzorek	γ^{TOT} [mN/m]	γ^{LW} [mN/m]	γ^{AB} [mN/m]
film PANI-S	52	46	6
film PANI-B	51	47	4
buněk linie NIH/3T3	49	23	26

Tabulka 2 – hodnoty celkové povrchové energie a její disperzní a polární složky polyanilinových filmů PANI-S a PANI-B a vrstvy buněk linie NIH/3T3 (Humpolíček et al., 2015).

5.2 Mikroskopie atomárních sil

Mikroskopie atomárních sil (AFM z anglického atomic force microscopy) je mikroskopická technika, která se od roku 1986 používá k trojrozměrnému zobrazování povrchů. Obraz se v případě této metody sestavuje postupně, bod po bodu. Metoda dosahuje velmi vysokého rozlišení, přičemž může zobrazovat i atomy (Kubínek, 2003).

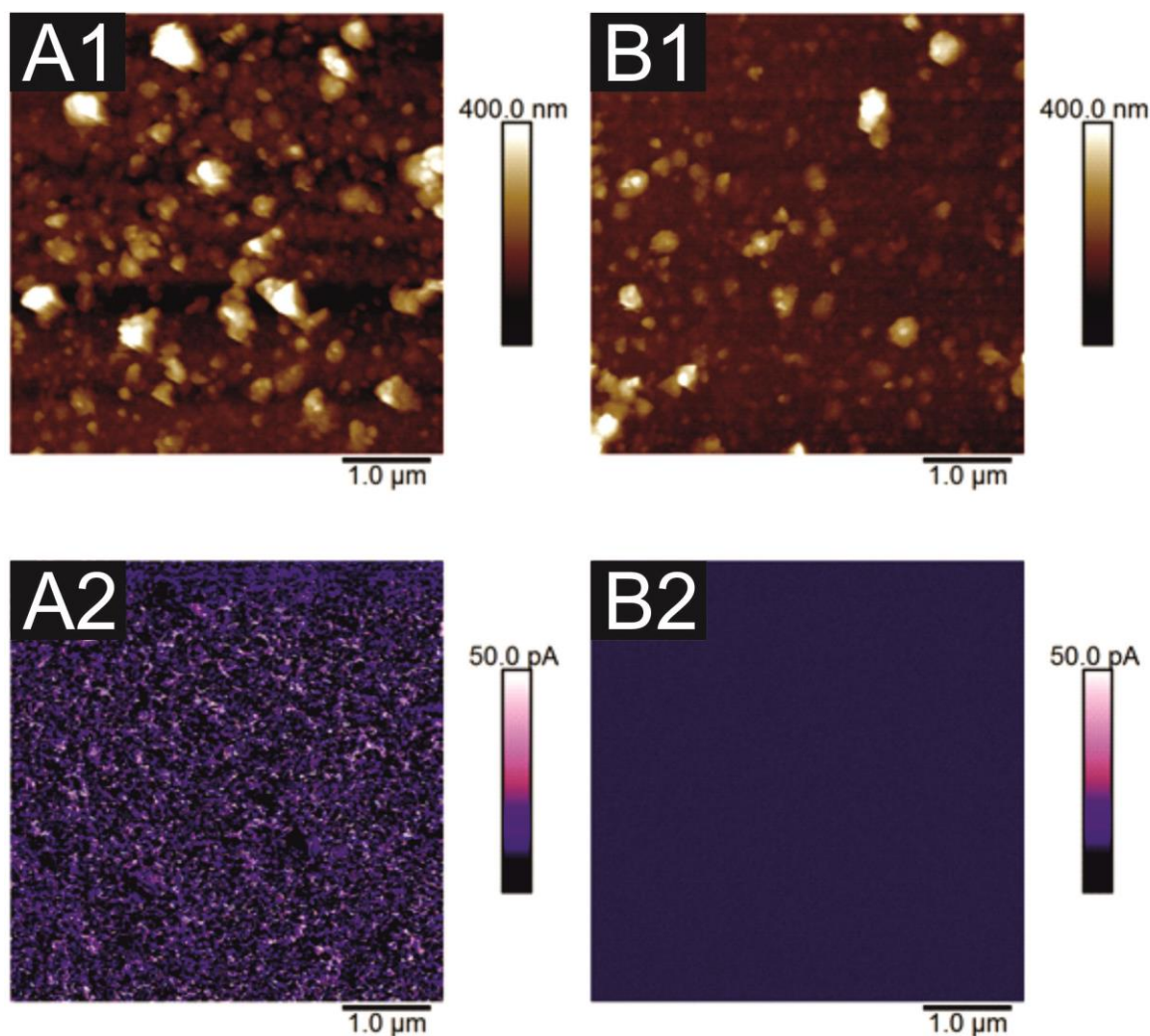
Obraz je snímán po jednotlivých řádcích sondou, jejíž vzdálenost od povrchu vzorku je řízena piezoelektrickým polohovacím zařízením. Vlastní sonda je tvořena miniaturním hrotem na konci mikropružiny. Při přibližování hrotu k povrchu vzorku na dostatečně malou vzdálenost působí mezi atomy hrotu a povrchu vzorku přitažlivé síly krátkého dosahu - van der Waalovy síly a síly delšího dosahu - magnetické a elektrostatické síly, při dalším přiblížení pak i odpudivé síly velmi krátkého dosahu. Podle typu interakce hrotu sondy se vzorkem může mikroskopie atomárních sil snímat povrch vzorku v kontaktním nebo nekontaktním režimu a získat tak informaci o pomyslné drsnosti vzorku v nanorozměrech (Janda a Weber, 1998).

Informace o lokální vodivosti jemných nanostruktur poskytuje vodivostní mikroskopie atomárních sil. Principem je skenování vzorků ostrým vodivým hrotem, kdy je vzorek a hrot zapojen do jednoho elektrického obvodu. Pokud na tento obvod přiložíme elektrické napětí, je možné měřit jak topografii vzorku, tak mapu lokální vodivosti s nanometrovým rozlišením. Pro stabilní elektrický kontakt mezi hrotem a vzorkem se při měření nejčastěji používá tzv. kontaktní či semikontaktní mód, kdy mezi hrotem a vzorkem působí síly 100-1000 nN (Vetushka et al., 2013)



Obrázek 22 –AFM mikroskop Dimension ICON
(Bruker, online)

V případě zdrojové studie byla měření prováděna pomocí mikroskopu atomárních sil Dimension ICON (Bruker Corporation, Německo) s použitím modulu PeakForceTUNA. Tento modul umožňuje zaznamenávání maximální síly kontaktu pro jednotlivé cykly přiblížení hrotu. Během každého cyklu je navíc hrot v kontaktu s povrchem vzorku po desítky nebo stovky mikrosekund, což je dostatečně dlouhá doba pro měření elektrického proudu mezi hrotem a vzorkem. Lokální vodivost byla detekována pomocí software NanoScope Analysis v 1.5 a je vyjádřena jako hodnota elektrického proudu detekována na více než 90 % měřených bodech za konstantního napětí 200 mV. Drsnost je detekována jako aritmetický průměr absolutních hodnot výškových odchylek od povrchu (jednotka R_a [nm]) a vyjádřena graficky pomocí barevné stupnice odpovídající vzdálenosti konkrétní části filmu od povrchu.

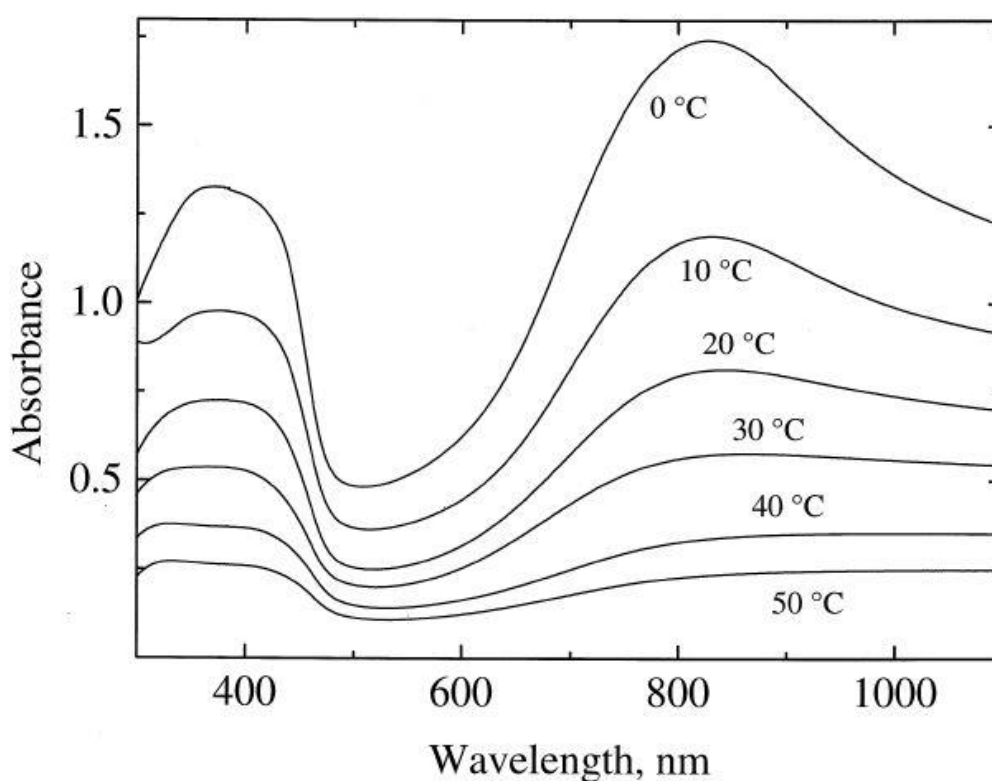


Obrázek 23 – AFM mikrofotografie zobrazující drsnost a vodivost polyanilinových filmů (PANI-S a PANI-B). A1) PANI-S drsnost, A2) PANI-S vodivost, B1) PANI-B drsnost, B2) PANI-B vodivost (Humpolíček et al., 2015)

Na obrázku 23 jsou prezentovány vybrané mikrofotografie polyanilinových filmů (PANI-S a PANI-B) z AFM mikroskopu. Je zjevné, že potvrzují i vyhodnocené výsledky. Co se drsnosti týče, byl zaznamenán výrazně drsnější povrch v případě vzorků filmů PANI-S ($R_a = 45$ nm) oproti vzorkům filmů PANI-B ($R_a = 28$ nm). Rozdíly v lokální vodivosti těchto dvou druhů polyanilinových filmů byly ještě výraznější. V případě zelených filmů polyanilinové soli PANI-S činila lokální vodivost 1120 ± 10 pA, u filmů polyanilinové báze PANI-B činila lokální vodivost jen $0,38 \pm 0,01$ pA. Tuto skutečnost dokazují i mikrofotografie, kde jsou barevnou škálou označeny oblasti s různými hodnotami lokální vodivosti ve formě odezvy elektrického proudu o různé velikosti.

5.3 UV-vis spektroskopie

Pomocí metod schopných vyhodnotit barevné změny vzorku je možné stanovovat oblasti přechodu vodivá – nevodivá forma neboli dopování a tzv. dedopování polyanilinu. K tomuto přechodu dochází při určitých hodnotách pH (často 5 – 6) a projevuje se změnou barvy (ze zeleného proponovaného emeraldinu na modrou nevodivou bázi a naopak).

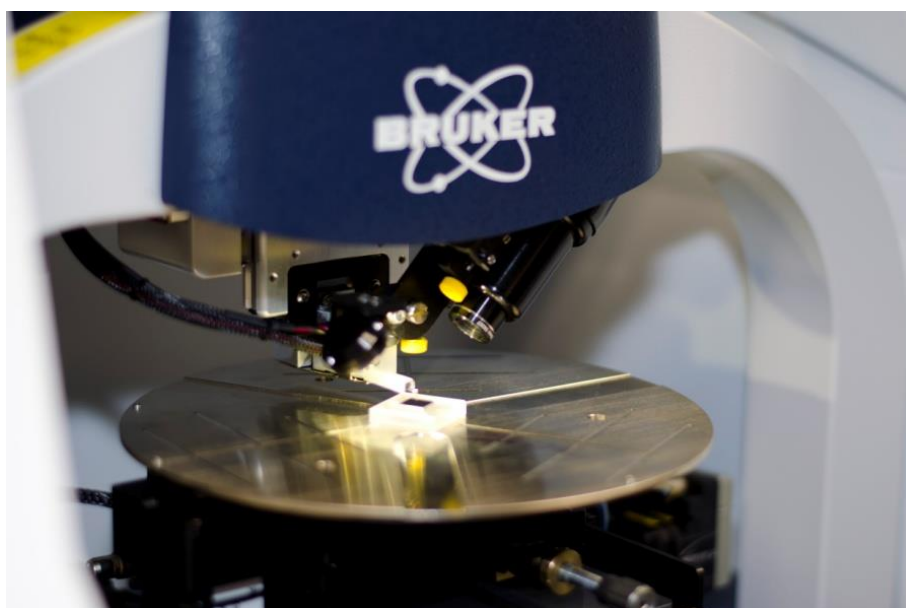


Obrázek 24 – závislost absorpance na vlnové délce (absorpční spektrum) PANI filmu ve formě emeraldinu připraveného při různých teplotách výchozí reakční směsi (Stejskal et al., 1999b)

Z obrázku 24, tedy absorpčního spektra polyanilinového filmu ve formě emeraldinu je patrné, že zelené barvě filmu odpovídají absorbance v oblastech vlnových délek blízkých 400 nm a nad 800 nm (Stejskal et al., 1999b). Práce Nekrasov a Vannikov (2009) dále popisuje absorpční spektra pro další formy. Oblast absorbance bezbarvé leukoemeraldinové formy se pohybuje od 300 do 350 nm, modrofialový pernigranilin vykazuje nejvyšší absorbanci při 550 – 650 nm.

5.4 Mechanická profilometrie

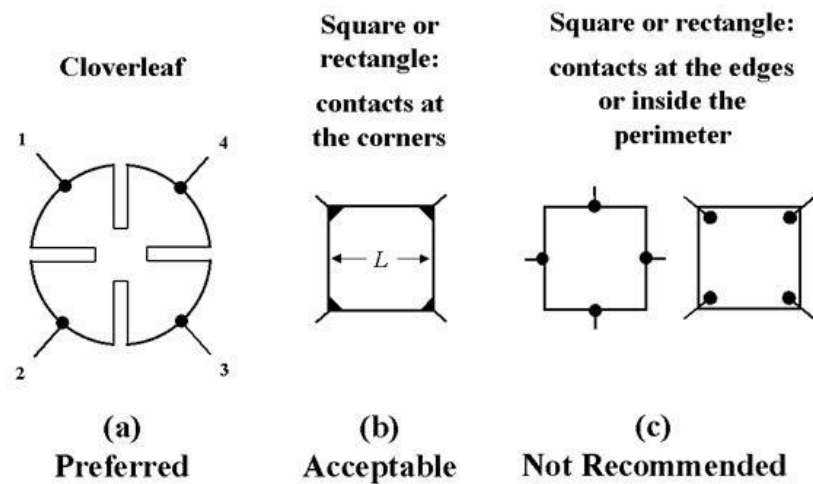
Pomocí mechanické profilometrie je možné analyzovat morfologii povrchu. Nejčastějším cílem této metody je zjištění tloušťky deponované tenké vrstvy. Obecně se profilometrem označuje zařízení, určeno k měření profilu povrchu, za účelem zjištění jeho drsnosti, tvaru povrchových struktur či již zmiňované tloušťky vrstvy. Svislé rozlišení přístroje se obvykle pohybuje v řádu nanometrů, vodorovné rozlišení je menší, nejčastěji v rozmezí od 20 nm do 25 μm , podle konkrétního rozměru měřicího hrotu a nastavení parametrů měření. Jelikož o mechanického profilometru dochází k přímému kontaktu hrotu se vzorkem, je nastavována přítlačná síla udávána ekvivalentní hmotností působící na hrot v mg a to v rozmezí od 0,03 do 15 mg. Při měření spočívá vzorek na podložce a pohybuje vůči nehybnému hrotu, který vykonává vertikální pohyb, měří tedy nerovnosti na vzorku. U některých profilometrů je tomu naopak. Jedná se o lehce pochopitelnou přímou metodu značně usnadňující manipulaci se vzorkem (Vorburger et al., 2007).



Obrázek 25 – detail pohyblivého stolku se vzorkem a nehybným měřícím hrotem (Ceplant, 2015)

5.5 Měření měrné elektrické vodivosti paní filmů

Prozištění měrné elektrické vodivosti polyanilinových filmů je možné použít čtyřbodovou metodu dle van der Pauwa. Metoda je určena pro ploché, tenké vzorky konstantní tloušťky v případě dostatečně malých kontaktů elektrod umístěných na obvodu vzorku. Jedná se o metodu měření relativně malých odporů pomocí čtveřice elektrod. Měření probíhá v cyklech, kdy je dvěma elektrodám dodáván konstantní proud I a výsledné hodnoty napětí U mezi druhým párem elektrod. Výsledky několika těchto cyklů jsou pomocí příslušného software využívající permutací, přepočítávány na měrný elektrický odpor, který je převrácenou hodnotou měrné elektrické vodivosti (Kim et al., 1999).



Obrázek 26 – doporučený tvar vzorků a umístění elektrod pro měření rezistivity čtyřbodovou metodou (van der Pauw, 1958)

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 MATERIÁL A METODIKA

V praktické části budou prezentovány postupy a výsledky měření materiálových charakteristik jako je tloušťka vrstvy, měrná elektrická vodivost a povrchová energie PANI filmů připravených za přítomnosti různých stabilizátorů ve dvou odlišných reakčních prostředích. Z hlediska buněčné kompatibility budou vyhodnocovány testy buněčné adheze, proliferace a migrace buněk linie myších fibroblastů NIH/3T3 na připravených filmech.

6.1 Syntéza polyanilinových filmů

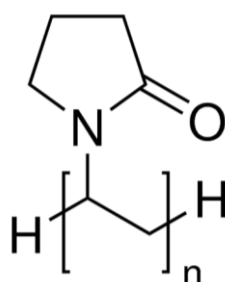
Pro přípravu vzorků, tedy pro syntézu polyanilinových filmů pomocí disperzní polymerace byl zvolen postup dle IUPAC popsáný v práci Stejskal a Sapurina (2005). Filmy byly připravovány polymerací ve dvou různých reakčních prostředích - v deionizované vodě a v 1 M roztoku HCl. Kromě popsáného stabilizátoru polyvinylpyrrolidonu, použitého v reakci pro adsorpci anilinových oligomerů a následně polyanilinových řetězců, který již prokazatelně v obou případech reakčních prostředí filmy tvoří, byly připravovány i filmy lišící se látkou v roli stabilizátoru. Konkrétně byl zvolen dodecylsírán sodný (SDS, L3771, Sigma-Aldrich Co.) na základě v kapitole 3.1.3. popsáných postupů Kim et al. (2001) a Yu et al. (2003). Zmiňované postupy byly pro syntézu filmů také vyzkoušeny, ale nevedly k uspokojivým výsledkům vzniku a případně kvality filmů. Jako další alternativní látky nahrazující PVP byly zvoleny látky použité v práci Kuczynska et al. (2010), která sleduje vliv surfaktantů použitých k přípravě modifikovaných polyanilinových prášků. Těmito látkami jsou neionický třiblokový kopolymer polyethylenglykolu a polypropylen glykolu (PEG-PPG-PEG, Pluronic F-108, 07579, Sigma-Aldrich Co.) a polyoxyethylensorbitanmonolaurát (Tween 20, P9416, Sigma-Aldrich Co.).

6.1.1 Polyvinylpyrrolidon (PVP)

Tento polymer se řadí mezi polyvinylacetyly, poprvé byl syntetizován před více než sedmdesáti lety Walterem Reppem. PVP je prášek světle béžové barvy, rozpustný ve vodě a jiných polárních rozpouštědlech. V roztoku má smáčivé vlastnosti a snadno tvoří film. Výborná rozpustnost je dána polární laktamovou skupinou, zvyšující hydrofilní vlastnosti. Lipofilita polyvinylpyrrolidonu je zajišťována nepolárními metylenovými skupinami. Nízká toxicita pro organizmy, vysoká biokompatibilita (prokázána tkáňová kompatibilita s kůží, očima a mukózní sliznicí) a chemická stabilita vedou k jeho širokému využití ve

farmaceutickém průmyslu pro různé obvazové materiály a prakticky pro všechny typy lékových podání (potahované tablety, injekční roztoky) (Liu et al., 2013).

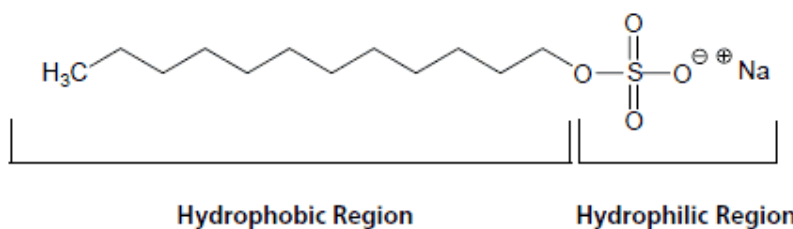
Průměrná molární hmotnost tohoto polymeru se pohybuje v rozmezí od 10000 do 360000 g/mol, hustota činí 1,2 g/cm³, teplota skelného přechodu se pohybuje v rozmezí 150 až 180 °C, hodnota pH vodného roztoku o koncentraci 10 g/l dosahuje hodnot 5 až 8 (Sigma-Aldrich Co., 2015a). Povrchové napětí vodných roztoků PVP o koncentracích v rozmezí řádově 1×10⁻⁶ až 1×10⁻⁴ mol/l, měřené pomocí kapkové metody zařízením FTA200, činí při teplotě 20 °C cca 69 mN/m. Pro srovnání tabulková hodnota povrchového napětí vody je 73 mN/m (Águila-Hernández et al., 2011).



Obrázek 27 – vzorec PVP (Sigma-Aldrich Co., 2015a)

6.1.2 Dodecylsírán sodný (SDS)

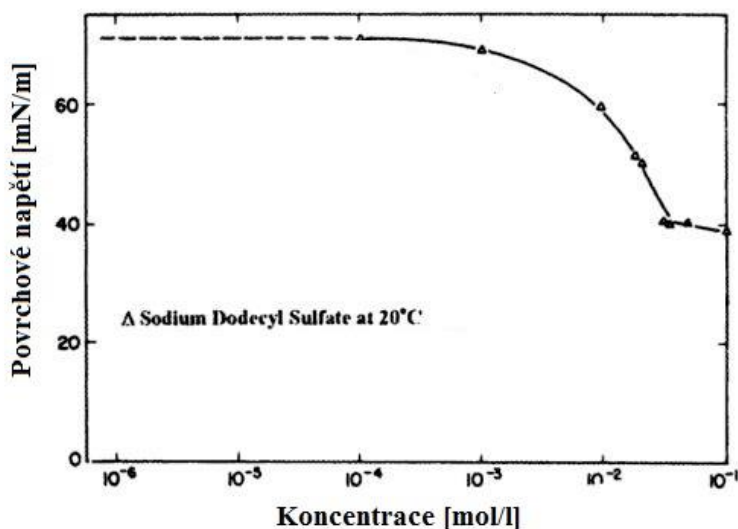
Jedná se o sodnou sůl organosulfátu se dvanácti uhlíky. Hydrofobní uhlíkatý řetězec je navázán na záporně nabitou, silně hydrofilní sulfátovou skupinu. Vykazuje tedy amfifilní charakter. SDS je aniontová povrchově aktivní látka (surfaktant) nacházející uplatnění v mnoha čistících (odstraňovače mastných skvrn) či hygienických (zubní pasty, pěny na holení) prostředcích (Dennison, 2002). Dodecylsírán sodný je také využíván v metodě elektroforetického stanovení molekulové hmotnosti proteinů SDS-PAGE (polyakrylamidová gelová elektroforéza), kde se váže na povrch proteinů a způsobuje jejich denaturaci (Káš, Kodíček a Valentová, 2005).



Obrázek 28 – struktura dodecylsíránu sodného (Sigma-Aldrich Co., 2015b)

Podle článku Marrakchi a Maibach (2006) zkoumajícího vliv působení vodného roztoku SDS o koncentraci 2 hm. % po dobu jedné hodiny na kůži lidského obličeje, může u citlivějších jedinců způsobovat vyrážku. Závěrečná zpráva v časopise *International Journal of Toxicology* (1983) posuzuje SDS jako nerakovinotvorný při aplikaci na kůži i při vnitřní konzumaci.

Molární hmotnost SDS činí 288,38 g/mol, hustota 0,37 g/cm³, teplota tání 204 až 207 °C, hodnota pH vodného roztoku o koncentraci 10 g/l činí 9,1. Kritická micelární koncentrace, tedy koncentrace povrchově aktivní látky, při které se začínají tvořit micely, dosahuje hodnoty 7×10^{-3} až 1×10^{-2} mol/l (Sigma-Aldrich Co., 2015b). Povrchové napětí SDS se v závislosti na koncentraci ve vodném prostředí mění, při koncentracích od 1×10^{-6} do 1×10^{-4} mol/l se pohybuje okolo 66 mN/m. V oblasti kritické micelární koncentrace (tj. od koncentrace 1×10^{-3} do 1×10^{-2} mol/l) se začíná povrchové napětí snižovat a s dalším zvyšováním koncentrace SDS klesá až na ustálenou hodnotu cca 38 mN/m při 20 °C (Rao a Leja, 2004).



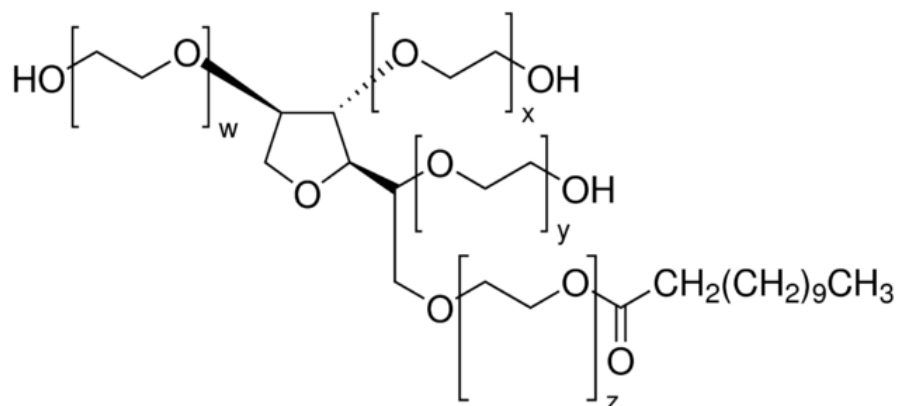
Obrázek 29 – závislost povrchového napětí vodného roztoku SDS na koncentraci (Rao a Leja, 2004)

6.1.3 Tween 20

Tween 20, neboli polyoxyethylensorbitan monolaurát, je neionická povrchově aktivní, viskózní, čirá tekutina nažloutlé barvy. Jedná se o syntetickou látku vyrobenou polymerací sorbitolu s etylenoxidem a estery kyseliny laurové. Je mísitelný s vodou a alkoholy. V potravinářství nese označení E432 a je používán jako emulgátor či stabilizátor pěn. Ve

zdravotnictví se používá ke stabilizaci vodných součástí léčiv nebo jako nosič látek ve vakcínách. Může být použit také pro extrakci periferních membránových proteinů například pro gelovou elektroforézu (Sigma-Aldrich Co., 2003). Dle WHO (1974) je limitní doporučená denní dávka této látky 0 až 25 mg na jeden kilogram hmotnosti.

Molární hmotnost Tweenu 20 je 1227,54 g/mol, hustota 1,1 g/cm³ a hodnota pH vodného roztoku o koncentraci 10 g/l činí 5 až 7 (Sigma-Aldrich Co., 2015c).

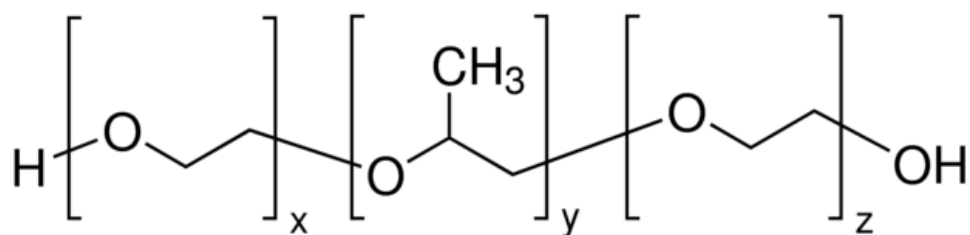


Obrázek 30 – strukturní vzorec Tweenu 20 (Sigma-Aldrich Co., 2015).

Povrchové napětí Tweenu 20 je popsáno pro koncentrace v řádu 1×10^{-3} do 1×10^{-1} mol/l a pohybuje se v rozmezí od 33 do 38 mN/m přičemž vyšší koncentrace vykazují nižší hodnoty povrchového napětí (Kothekar et al., 2007). Kritická micelární koncentrace je o dva řády nižší než v případě SDS a pohybuje se okolo $1,2 \times 10^{-5}$ mol/l (Sigma-Aldrich Co., 2015c).

6.1.4 Pluronic F-108

Pluronic F-108 je neionický tříblokový kopolymer polyethylenglykolu a polypropylenglykolu. Obsahuje centrální, hydrofobní řetězec polypropylenglykolu obklopený dvěma řetězci polyethylenglykolu. Díky své amfifilní struktuře má tento kopolymer využití jako surfaktant. Jedná se o bílou látku ve formě vloček (Nace, 2006).



Obrázek 31 – strukturní vzorec Pluronicu F-108 (Sigma-Aldrich Co., 2015d).

Molární hmotnost kopolymeru s hmotnostním podílem polyethylenglykolu 82,5 % činí cca 14600 g/mol, hustota 1,05 g/cm³, teplota tání je 60° C, pH vodného roztoku o koncentraci 25 g/l má hodnotu 6 až 7,4. Povrchové napětí vodného roztoku o koncentraci v řádu 1×10⁻³ mol/l činí při 25°C 41 mN/m (Sigma-Aldrich Co., 2015d).

6.1.5 Postup přípravy filmů

V praxi příprava vzorků polyanilinových filmů zahrnovala nejdříve volbu substrátu, který měl být filmem opatřen. Pro testy buněčné adheze, proliferace a migrace byly zvoleny misky o průměru 40 mm a hloubkou 11 mm z tkáňového polystyrenu určeného pro kultivaci buněk v médiu (TPP, Švýcarsko), jejich vnitřní povrch byl po ukončení syntézy a výplachu disperze pokryt souvislou vrstvou polyanilinového filmu. Měření měrné elektrické vodivosti vyžadovalo vzorky filmů deponované pouze na jedné straně skleněného substrátu, k tomuto účelu bylo použito podložní sklíčko z minerálního skla (Marienfeld, Německo) jehož jedna stana byla zalepena jednostrannou průhlednou lepící páskou (3M, Česká Republika). Pro měření povrchové energie filmů, pomocí zjišťování kontaktního úhlu sedící kapky a profilometrické zkoumání tloušťky filmů, byl zvolen substrát v podobě polypropylenové folie (Snopake, Anglie). Tyto substráty (podložní sklo s páskou i PP folie) byly opatřeny filmem ponořením do reakční směsi během začátku polymerace. Jako reakční nádoby v tomto případě sloužily skleněné Petriho misky.



Obrázek 32 – polyanilinová disperze vzniklá polymerací v polystyrenových a skleněných Petriho miskách. Po výplachu disperze zůstává na substrátech vrstva PANi filmu

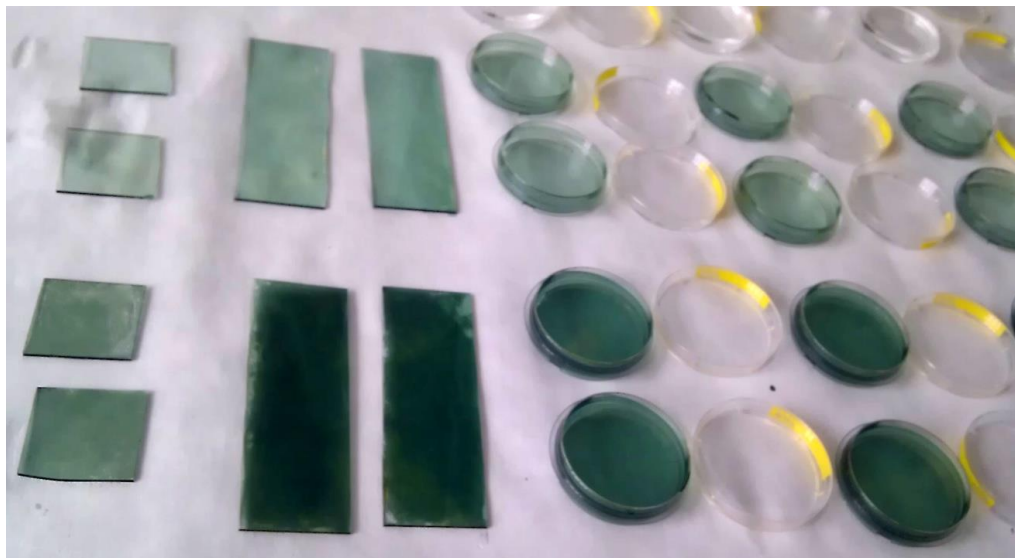
V další fázi bylo nutné připravit 50 ml roztoku stabilizátoru tak, aby jeho koncentrace v celkovém objemu reakční směsi (100 ml) odpovídala 2 hm. % a koncentrace v 50 ml roztoku činila 40 g/l (navážka stabilizátoru = 2 g). Po dostatečném rozpuštění daného stabilizátoru bylo přidáno 2,59 g anilin hydrochloridu (40008-CT0, Lach-Ner), koncentrace AH činila 0,2 mol/l. Tato směs byla následně oxidována 50 ml 0,25 M roztoku amonium persulfátu (A3678, Sigma-Aldrich Co.), navážka APS = 5,71 g. Po krátkém míchání na magnetickém míchadle byla reakční směs rozlita do reakčních nádob (Petriho misky a 40 mm misky z tkáňového polystyrenu).



Obrázek 33 – barevné změny reakční směsi složené z roztoků AH a APS; vlevo 0,2 M roztok AH; uprostřed 10 s po přidání roztoku APS; vpravo 20 s po přidání roztoku APS

Zvolené substráty byly ponořeny do směsi a následovala vlastní oxidační polymerace, během které docházelo k adsorpci nejprve anilinových oligomerů a následně polyanilinových řetězcu na dostupných površích.

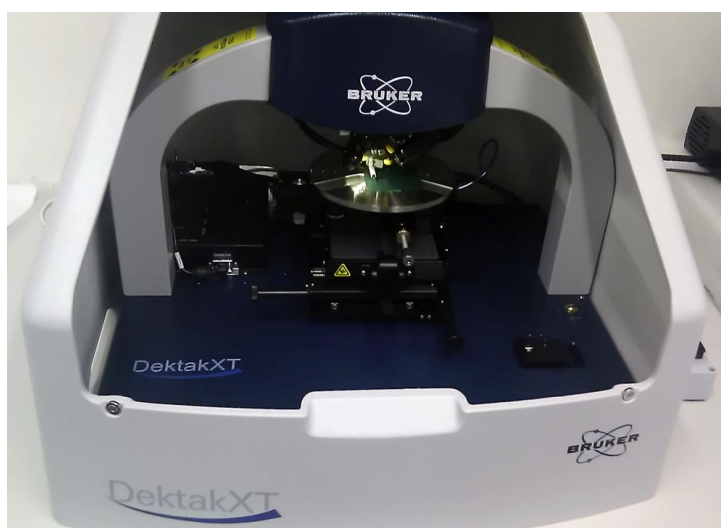
Reakční směs se bez následného míchání ponechala v klidu po dobu jedné hodiny za laboratorní teploty (20 °C). Během této doby bylo možné pozorovat změnu zbarvení reakční směsi od čiré bezbarvé, čiré fialové a modré (při vzniku prvních oligomerů) po temně modrou (vznik polyanilinových řetězcu v penigranilinové formě) až po typické zeleňočerné polyanilinové zbarvení formy emeraldinu. Po uplynutí dané doby polymerace byly misky vypláchnuty pomocí 0,2 M HCl z důvodu odstranění PANI disperze a stabilizace vodivé formy filmu a následně metanolem pro částečnou sterilizaci a rychlejší schnutí filmů. Tímto způsobem bylo vytvořeno osm různým PANI filmů lišících se jak stabilizátorem (PVP, SDS, Tween 20 a Pluronic F-108), tak i reakčním prostředím, kterým byla v jednom případě deionizovaná voda a ve druhém 1 M roztok HCl v deionizované vodě.



Obrázek 34 – vzorky PANI filmů připravené na skleněném a polystyrenovém substrátu

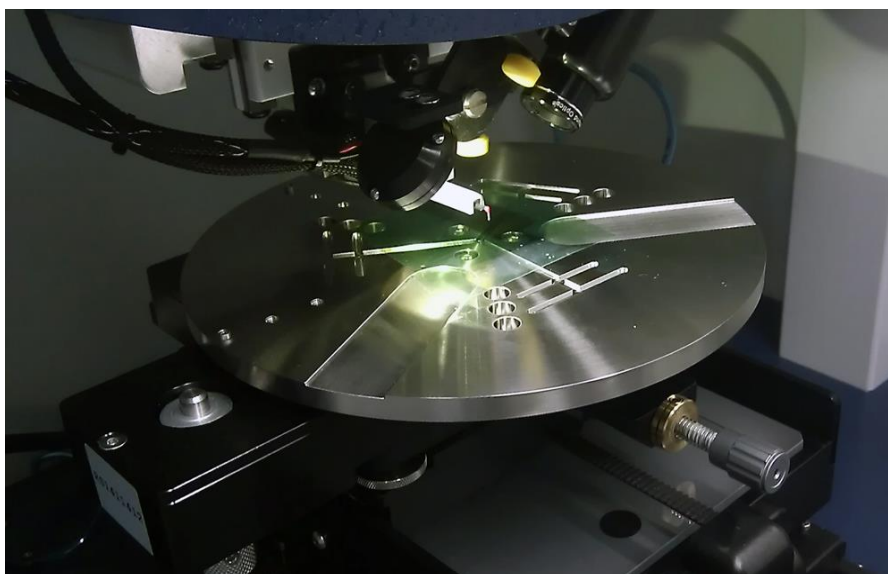
6.2 Mechanická profilometrie

Měření tloušťky pomocí hrotového profilometru DektaxXT™ (Bruker Corporation, Německo), probíhalo na vzorcích PANI filmů, připravených na polypropylenových foliích. Profilometr DektaxXT™ byl propojen se stolním počítačem vybaveným software Vision64 (Vision24, Německo). Pomocí HD kamery bylo možné v reálném čase sledovat z horní perspektivy oblast horizontálního pohybu hrotu po vzorku. Profilometr byl dále vybaven LVDT detektorem (magnetický snímač pro kontaktní detekci malých pohybů pevných předmětů využívající změn magnetického toku v lineárním proměnném diferenciálním transformátoru) a 16 bitovým A/D převodníkem analogového signálu na digitální.



Obrázek 35 – hrotový profilometr DektaxXT™ se vzorkem PANI filmu na PP folii

Na vzorcích bylo mechanicky vytvořeno rozhraní mezi oblastí folie s filmem a bez filmu. Vzorky byly následně umístěny na motorizovaný, automaticky posuvný stolek. Pomocí software a kamery bylo vybráno vhodné místo blízko oblasti s přechodem čisté folie na folii opatřenou filmem. Následně byla zadána měřicí zátěž hrotu 0,03 mg a horizontální vzdálenost, kterou má být hrot během měření v kontaktu se vzorkem. Pro všechny vzorky bylo měření provedeno na dráze dlouhé 1,5 mm, v případě filmu stabilizovaném pomocí SDS v prostředí H_2O , bylo pro úspěšné změření nutné vzdálenost zvýšit na 20 mm. Délka měřicího intervalu byla nastavena na 10 s, v případě filmu SDS v H_2O na 60 s. Na základně detekovaného pohybu hrotu byla získána 2D křivka profilu vzorku, neboli závislost vertikální polohy hrotu na horizontální dráze, kterou v kontaktu se vzorkem urazil.



Obrázek 36 – detail vzorku filmu umístěného na posuvném stolku, HD kamera umístěna vpravo nahoře

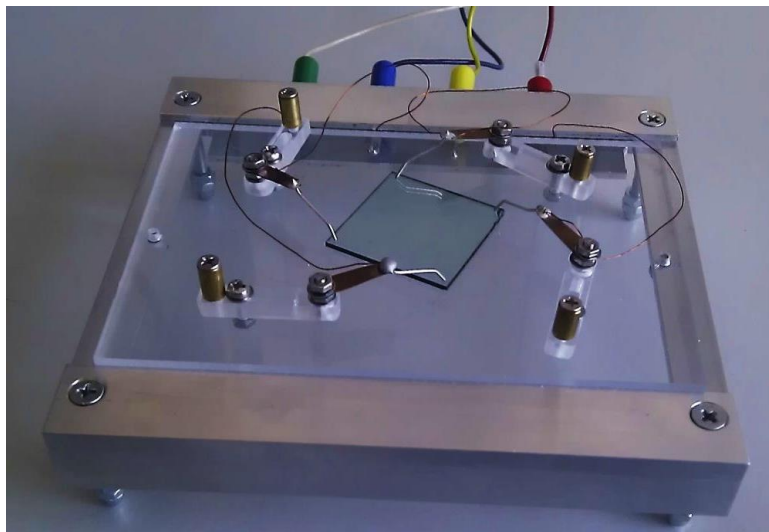
6.3 Čtyřbodová metoda

Pro zjištění měrné elektrické vodivosti polyanilinových filmů připravených na jedné straně podložních sklíček byla použita aparatura uspořádaná pro měření rezistivity tenkých vzorků čtyřbodovou metodou dle van der Pauwa. Aparatura sestává ze scanneru Keithley K7002 (Keithley Instruments, Inc., USA), spínací karty Keithley K7011-S (Keithley Instruments, Inc., USA), programovatelného napěťového zdroje Keithley K2410 (Keithley Instruments, Inc., USA), digitálního elektrometru Keithley K6517 (Keithley Instruments, Inc., USA) a osobního počítače vybaveného dvěma PCI kartami (GPIB a převodníkovou AD25PCI kartou).



Obrázek 37 – fotografie aparatury pro měření konduktivity PANI filmu čtyřbodovou metodou (osobní počítač, zdroj, scanner, elektrometr a stůl s elektrodami)

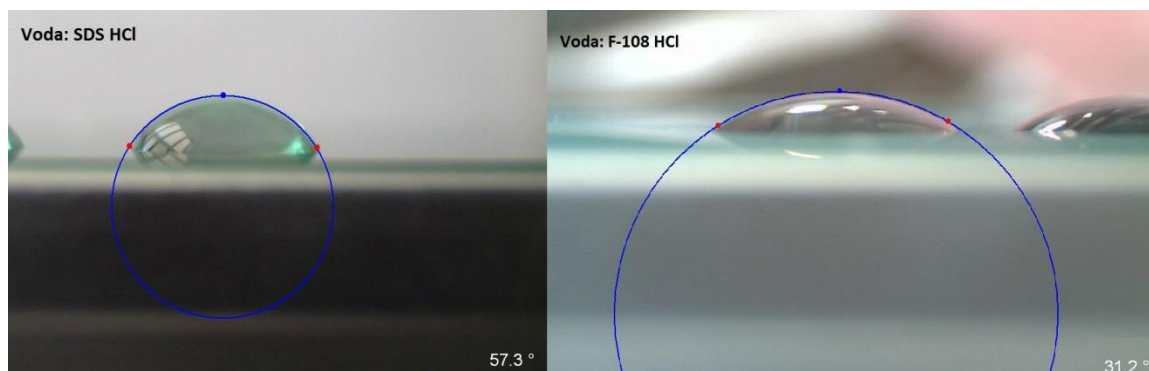
Samotné měření probíhá pomocí programu VDP, který provádí cyklické měření rezistivity při konstantní hodnotě proudu. Kromě této hodnoty byla před začátkem měření zadána tloušťka vzorku a maximální povolené napětí přiložené na elektrody. Hodnota měřícího proudu byla zvolena konstantních 1×10^{-5} A a hodnota maximálního napětí přiloženého na elektrody byla určena na 200 V. Zadávaná tloušťka filmů, která je přímo úměrná měrnému odporu, odpovídala hodnotám získaným při měření mechanické profilometrie. Vzorek byl vložen na měřící stůl tak, aby bodové kontakty elektrod byly rozmístěny po jeho obvodu, aby byl zajištěn dobrý kontakt se vzorkem, a zároveň, aby nedošlo k mechanickému poškození filmu. Vzorek byl následně protékán elektrickým proudem (jeden pár elektrod) za současného měření napětí (druhý pár elektrod) k tomu potřebného. Z takto získaných hodnot napětí a tloušťky vzorku byl spočítán měrný elektrický odpor daného typu polyanilinového filmu, a z něj byla následně vypočítána jeho měrná elektrická vodivost (kap. 1.1.2). Měření probíhalo u každého měřeného vzorku ve čtyřech cyklech odečítání, tedy tak, aby byly získány požadované hodnoty ze všech možných pozic elektrod.



Obrázek 38 – umístění vzorku podložního skla s polyanilinovým filmem na měřícím stolku s elektrodami při měření konduktivity

6.4 Kontaktní úhel sedící kapky

Pro měření kontaktního úhlu sedící kapky a následné vyhodnocení povrchové energie filmů byl použit SEE System (Advex Instruments, Česká Republika). V testu byla pro výpočet aplikována tzv. acidobazická metoda za použití tří měřících kapalin se standardizovanou hodnotou povrchové energie – deionizovaná voda, diiodmetan (158429, Sigma-Aldrich Co.) a etylenglykol (85978, Sigma-Aldrich Co.). Přičemž objem kapek byl stanoven na 100 μl a byl na film aplikován pomocí mikropipety. Pro vyhodnocení byla pomocí CCD kamery o rozlišení 1600 \times 1200 pixelů s vodorovně posuvným stolkem vyfocena série kapek jednotlivých kaplin a následně byl pomocí software SeeSystem 6.2, který umožňuje převádět profil kapky na kružnici pomocí tří bodů vyznačených na povrchu vyfocené kapky, spočítán kontaktní úhel kapky na daném povrchu.



Obrázek 39 – příklad chování kapky vody na filmu připraveného z disperze za přítomnosti SDS a Pluronicu F-108 v prostředí 1 M HCl

K vyhodnocení byly využity údaje změřených kontaktních úhlů, vždy pěti kapek každé ze tří měřících kapalin na jednotlivých typech filmů. Software (SeeSystem 6.2) po změření automaticky stanoví a zobrazí hodnoty kontaktních úhlů kapek pro jednotlivé kapaliny a přepočítá tyto hodnoty pomocí acido-bazické metody na celkovou povrchovou energii, včetně obou jejich složek (disperzní a polární) a stanovení chyb měření.

6.5 Testy buněčné aktivity

Pro vyhodnocování buněčné aktivity je potřeba specifického vybavení laboratoře a dodržování postupů kultivace buněk zvolené buněčné linie.

6.5.1 Vybavení laboratoře pro kultivaci buněk *in vitro*

Jedním z hlavních požadavků laboratoře pro kultivaci buněk *in vitro* je udržení sterility a zabránění kontaminacím. Je vhodné pracovat ve vyhrazené čisté laboratoři podléhající speciálnímu režimu. Mezi základní vybavení laboratoře patří laminární box s řízeným přívodem i odvodem vzduchu, inkubátor s regulací teploty, relativní vlhkosti a parciálního tlaku oxidu uhličitého. Pro kontrolu vzorků je nutný mikroskop vybavený fázovým kontrastem. Pro kultivaci buněk se používají sterilní jednorázové plasty a kulturační nádoby, mikropipety a chemikálie určené pro práci s buněčnými kulturami (Freshney, 2005).

6.5.2 Použité buněčné linie a kulturační média

V rámci zvolených testů byla použita buněčná linie myších fibroblastů NIH/3T3 (ATCC[®] CRL-1658[™]). Jedná se o buněčnou linii, kterou dodala firma American Type Culture Collection (USA). Jako kulturační médium bylo použito Dulbecco's Modified Eagle Medium (PAA The Cell Culture Company, Anglie), se zvýšeným obsahem glukózy. K médiu bylo dle návodu pro kultivaci buněk přidáváno 10 % fetálního bovinního, neboli telecího séra (Biosera, Anglie) a antibiotikum Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Austrálie) v koncentraci 100 µg/ml. Ideální kulturační podmínky (teplota 37° C, konstantní relativní vlhkost a 5 % atmosféra oxidu uhličitého) byly zajišťovány pomocí inkubátoru Heracell 150i (ThermoScientific, USA).

Média používaná pro kultivaci buněčných kultur jsou směsi aminokyselin, anorganických iontů, pufrující složky pro stabilizaci pH, vitaminů, růstových faktorů, stopových prvků, mastných kyselin, lipidů, specifických proteinů a peptidů podporujících buněčné dělení. Sérum slouží jako zdroj růstových faktorů (Sigma-Aldrich Co., 2010).

6.5.3 Kultivace buněk

Buňky byly kultivovány jako adherentní kultura v polystyrenových kultivačních nádobách přičemž ideální podmínky byly zajištěny pomocí inkubátoru Heracell 150i. Po dostatečném namnožení adherovaných buněk bylo nutné provést trypsinizaci a prekulivaci. Kultivační nádoba s adherovanými buňkami byla nejprve zkontrolována pomocí invertovaného světelného mikroskopu s fázovým kontrastem (Olympus XI 81, Japonsko) a poté přesunuta do laminárního boxu s řízenou cirkulací vzduchu HERAsafe KSP (ThermoScientific, USA). Zde bylo z kultivační nádoby s buňkami pomocí odsávacího zařízení co nejdokonaleji odsáto kultivační médium. Zbytky média a séra byly potom ještě odstraněny opláchnutím 15 ml fosfátového pufru (PBS, konc. 0,2 ml/cm²) a jeho následným odsátím. Dále bylo provedeno přerušení vazeb jak mezi adherovanými buňkami a kultivačním povrchem, tak i mezi jednotlivými buňkami pomocí 7,5 ml serinové proteázy, trypsinu (konc. 0,1 ml/cm²). Trypsin byl ponechán působit za průběžného kontrolování mikroskopem Olympus XI 81v inkubátoru Heracell 150i do oddělení buněk, nejdéle však po dobu 20 minut. Po oddělení buněk bylo v boxu HERAsafe KSP přidáno do kultivační nádoby 7,5 ml kultivačního média a roztok s buňkami byl pomocí pipety převeden do centrifugační zkumavky. Centrifugace probíhala v chlazené centrifuze Eppendorf 5702 R (Eppendorf, Německo) při teplotě 37°C, po dobu tří minut a 1100 rpm. Po centrifugaci byly buňky viditelně koncentrovány na dně zkumavky, což umožnilo odsátí supernatantu. Tímto postupem byl získán přibližný počet $2 \cdot 10^7$ buněk v 1 ml média, což odpovídá povrchu kultivační nádoby a hustotě buněk.

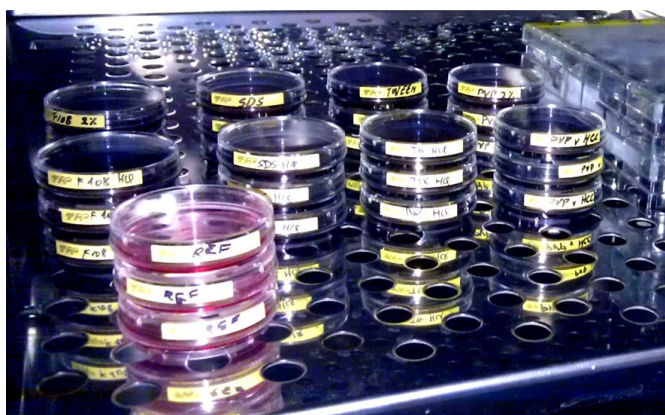
6.6 Buněčná adheze

K testování schopnosti buněk adherovat se na vytvořených polyanilinových filmech byly spolu s referencí (čistá polystyrenová miska) osazeny buňkami ve formě 1 ml suspenze buněk v médiu o koncentraci 1×10^7 buněk v 1 ml média, všechny typy filmů vytvořených na 40 mm miskách z tkáňového polystyrenu. Po 1 hodině v inkubátoru Heracell 150i, zajišťujícím ideální podmínky, bylo buňkám odsáto médium a následně bylo provedeno mikropipetou jemné opláchnutí pomocí 1 ml pufrovaného fyziologického roztoku (PBS, Gibco Life Technologies, USA). Po odsátí PBS následovala analýza a focení mikrofotografií buněk adherovaných na testovaných filmech za pomoci mikroskopu Olympus XI 81.

6.7 Buněčná proliferace

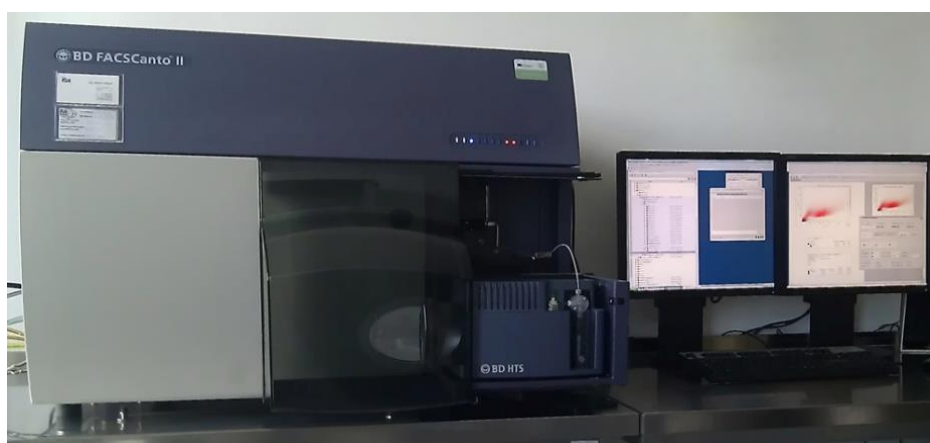
Pro porovnání buněčné proliferace buněk na konkrétním typu filmu byly pořízeny mikrofotografie mikroskopem Olympus XI 81 v čase 24, 48 a 72 hodin od osazení vzorků 2 ml suspenze o koncentraci 1×10^5 buněk v 1 ml média. Před každým focením (tedy po 24 hodinách) bylo v kultivačních miskách měněno médium za nově připravené. Pomocí inkubátoru Heracell 150i byla v průběhu proliferace zajištěna požadovaná teplota, konstantní relativní vlhkost a atmosféra CO_2 .

Polovina testovaných vzorků také prošla modifikací povrchu působením hovězího bovinního albuminu - BSA, Bovine Serum Albumine (Sigma-Aldrich). Albuminy jsou globulární proteiny rozpustné ve vodě, které jsou produkovány jaterními buňkami. U člověka se vyskytují zejména v krevní plazmě, kde udržují osmotický tlak krve. Zároveň, díky své struktuře, slouží jako transportní proteiny např. mastných kyselin, bilirubinu, mědi, zinku, vápníku, hořčíku, hormonů a některých léků či antibiotik. Jeho normální koncentrace v lidském těle se pohybuje okolo 40 g/l (Fusek, Káš a Ruml, 2008). Pro přiblížení fyziologických podmínek byla pro modifikaci filmů, mající teoreticky za následek vznik nových specifických skupin na povrchu filmu předpokládající zvýšenou proliferaci, použita právě koncentrace BSA 40 g/l v médiu. 2 ml tohoto roztoku byly odpipetovány do polystyrenových misek opatřených PANI filmem, po 1 hodině působení byl roztok BSA z misek odsát a dále následoval postup osazení vzorků buněčnými suspenzemi shodný s postupem aplikovaným u filmů bez modifikace BSA.



Obrázek 40 – suspenze buněk v médiu kultivované v inkubátoru

Pomocí průtokové cytometrie byla u vzorků albuminem nemodifikovaných PANI filmů vyhodnocena proliferace kvantitativně. Prakticky bylo toto měření provedeno po stanovené době proliferace (72 hodin) trypsinizací (rozrušení vazeb) vrstvy adherovaných buněk přidáním a působením 300 μ l trypsinu a to po dobu maximálně 20 minut. Po oddělení buněk od testovaného povrchu, bylo přidáno ekvivalentní množství média (300 μ l). Za pomoci mikropipety byla vzniklá suspenze buněk převedena do zkumavky kompatibilní s průtokovým cytometrem BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, Anglie). Zkumavka byla následně umístěna do přístroje a za pomoci software BD FASCDiva (BD Biosciences, USA) bylo spuštěno měření, které umožnilo kvantitativní vyhodnocení počtu přeživších buněk.



Obrázek 41 – průtokový cytometr BD FACSCanto™ II

6.8 Buněčná migrace

Pro zhodnocení parametrů buněčné migrace byla provedena metoda Scratch-wound assay napodobující proces hojení či zacelování rány. Buňky o koncentraci 1×10^5 buněk v 1 ml média byly v objemu 2 ml suspenze odpipetovány do jednotlivých misek s různými typy PANI filmů a následně byly ponechány v inkubátoru Heracell 150i při ideálních kultivačních podmínkách. Buňky byly kultivovány za pravidelné výměny čerstvého média (každých 24 hodin) po dobu potřebnou k růstu dostatečného množství buněk tvořících souvislou vrstvu.

Provedení testu buněčné migrace nedovolil stav buněk kultivovaných na filmech připravených za stabilizace polyvinylpyrrolidonem a to ani v případě modifikace pomocí BSA. V případě filmů připravených za přítomnosti Tweenu 20 a Pluronicu F-108 byly pro testy buněčné migrace použity pouze ty, které byly vytvořeny v reakčním prostředí 1 M

HCl a byly vystaveny působení BSA, jen ty totiž umožnily vytvoření souvislé vrstvy umožňující provedení rýhy. Tyto vrstvy buněk však nepokrývaly celou plochu kultivačních misek a tvořily útvary připomínající ostrůvky, nacházející se uprostřed misek. Scratch assay byl dále proveden na vrstvě buněk vytvořených na všech filmech připravených z disperze za přítomnosti SDS, a to jak u vzorků modifikovaných BSA, tak i u nemodifikovaných.

Do vrstvy buněk byla špičkou mikropipety vytvořena souvislá čára tak, aby došlo k oddělení buněk a zároveň k zachování filmu. Stav buněčné vrstvy a případná migrace buněk do volného prostoru byl ihned po provedení čáry mikropipetou (tedy v čase 0 h), následně v čase 5, 24 a 48 hodin od vytvoření čáry, zaznamenáván pomocí mikroskopu Olympus XI 81 s fázovým kontrastem.

7 VÝSLEDKY

7.1 Příprava filmů

Rozdílnost v přípravě jednotlivých druhů filmů je možné sledovat mimo jiné v rozpustnosti a chování daného stabilizátoru v reakční směsi. Z tohoto pohledu mezi PVP, Pluronicem F-108 a Tweenem 20, jejichž roztoky s anilin hydrochloridem zůstávaly i po smíchání s reakční směsí obsahující 0,25 M APS až do samotné polymerace čiré, vybočoval SDS. V jeho případě po rozpuštění 2 g ve vodě či 1 M HCl a po následném přidání 2,59 g AH vznikala micelární směs.



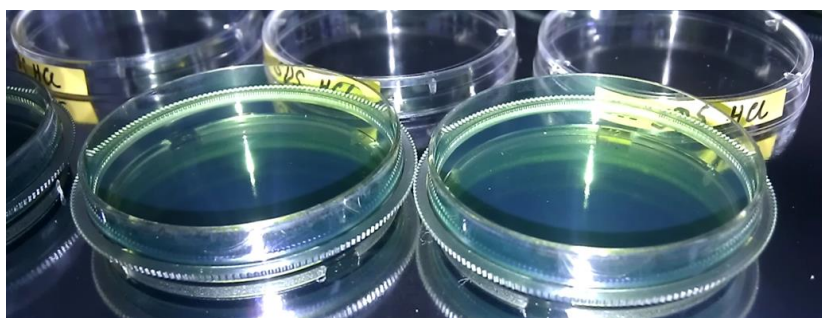
Obrázek 42 – micelární směs SDS a AH
v 1 M HCl

I v tomto případě však po smíchání s roztokem APS k polymeraci a vzniku polyanilinových filmů docházelo, i když se nástup polymerace pozorovatelný změnou barvy směsi posunul řádově z vteřin na minuty.



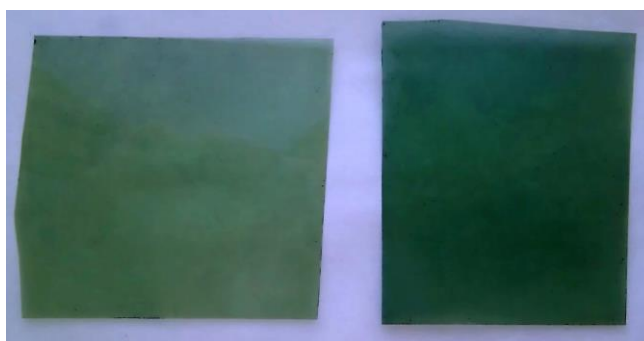
Obrázek 43 – polymerace polyanilinu v 1 M HCl za přítomnosti SDS (doba polymerace 1, 3 a 15 minut)

Z hlediska kvality filmů lze jednoznačně konstatovat nejlepší adhezi všech typů filmů na polymerních površích. V případě kultivační misek z tkáňového polystyrenu prakticky vždy došlo ke vzniku souvislé vrstvy polyanilinového filmu a to bez ohledu na použitý stabilizátor, či prostředí. Bezpochyby k tomu přispívá i ideální tvar misek, které jsou zároveň reakční nádobou i substrátem.



Obrázek 44 – PANI film připravený na polystyrenovém substrátu, stabilizátor SDS, reakční prostředí HCl

Další polymerní povrch, na kterém byly filmy tvořeny, představovala polypropylenová folie. U filmů lišících se použitým stabilizátorem, deponovaných na tomto substrátu, bylo možné pozorovat různou adhezi i kvalitu. Filmy připravené za přítomnosti Tweenu 20 vykazovaly (zejména v případě použití vody jako reakčního prostředí) poněkud méně odolný povrch případným mechanickým otěrům, například mírnému přejetí prstem. Navíc byl ve větší části připravených vzorků pozorován i nehomogenní povrch. V případě použití Pluronicu F-108 je adheze filmu k folii v porovnání s Tweenem 20 vyšší, ale na části vzorků byly také pozorovatelné nehomogenity povrchu. Nejlepší kvalitu filmu z hlediska homogenity i adheze vykazovaly postupy za použití PVP a SDS. Především druhý jmenovaný dával vznik velmi odolným a celistvým filmům, které odolávaly i větším intenzitám tření, například celulózovou průmyslovou utěrkou.

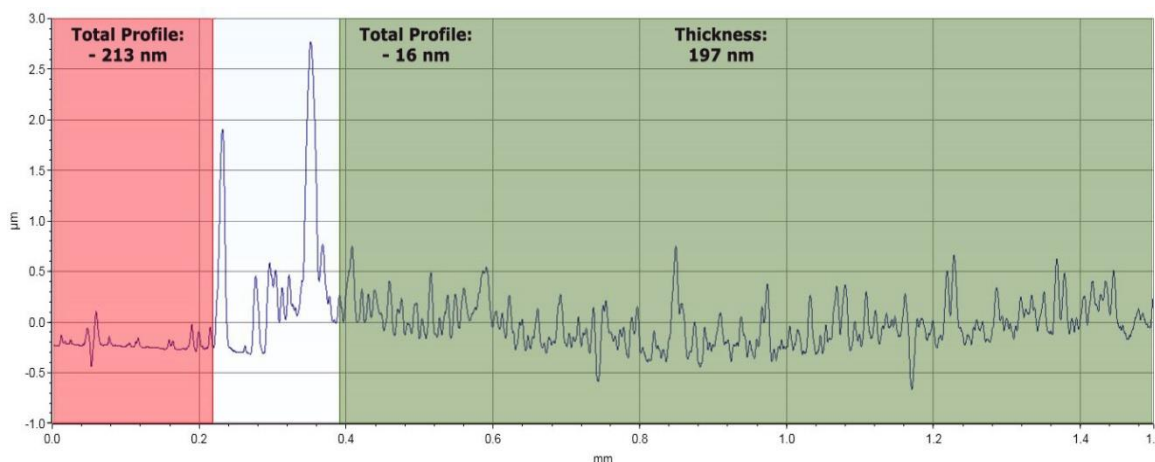


Obrázek 45 – PANI filmy na polypropylenové folii – vlevo SDS HCl, vpravo SDS H₂O

Na skleněném substrátu vykazovaly nejhorší adhezi filmy stabilizované Tweenem 20 a F-108. Vzorky celistvých filmů pro měření elektrické vodivosti byly ve velmi malém poměru oproti těm velmi nehomogenním, či filmům, které byly omyty hned při oplachu disperze. Ostatní filmy (zejména ty stabilizované PVP a SDS) prokazovaly poměrně dobrou adhezi ke sklu. Jako nejvhodnější úprava skleněných povrchů před ponořením do reakční směsi se osvědčilo mechanické otření substrátu buničinou.

7.2 Mechanická profilometrie

Pomocí hrotového profilometru byly získány 2D křivky profilu vzorku, vyneseny jako závislosti vertikální polohy hrotu, kontaktně kopírujícího profil vzorku na horizontální dráze, kterou hrot po vzorku urazil. Tloušťka filmu byla poté určována jako rozdíl mezi průměrnými hodnotami výšky vzorku ve vyznačených oblastech křivek (absolutní profily oblastí vzorku s a bez filmu v nm). Pomocí příslušného programu (Vision64) byly v křivkách vyznačeny oblasti pohybu hrotu po čistém substrátu, kde se film nenacházel, a zóny, na kterých hrot kopíroval povrch filmu. Následným odečtem rozdílů mezi průměrnými hodnotami profilů software vyhodnotil výslednou tloušťku charakterizovaného filmu.



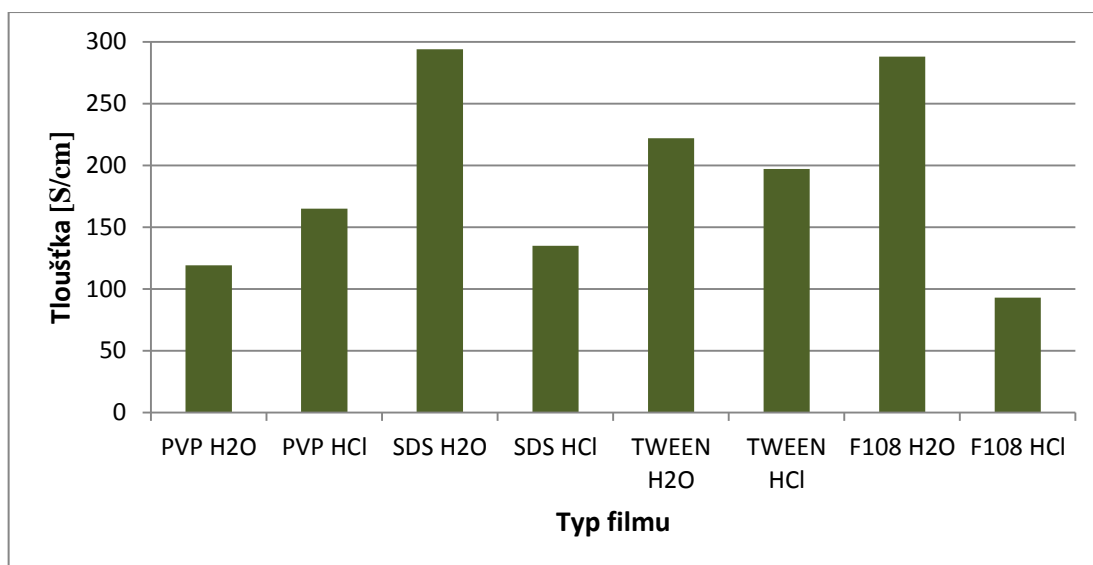
Obrázek 46 – příklad 2D křivky profilu povrchu filmu připraveném za použití stabilizátoru Tween 20 v prostředí 1 M HCl s vyhodnocením tloušťky vrstvy

Tloušťky polyanilinových filmů připravených za přítomnosti různých stabilizátorů jsou i s průměrnými hodnotami profilů vyznačených oblastí znázorněny v následující tabulce.

Stabilizátor	Prostředí	Průměrný profil oblasti bez filmu [nm]	Průměrný profil oblasti s filmem [nm]	Tloušťka [nm]
PVP	H ₂ O	-109	10	119
	1 M HCl	-149	16	165
SDS	H ₂ O	-273	21	294
	1 M HCl	-117	18	135
Tween 20	H ₂ O	-164	58	222
	1 M HCl	-213	-16	197
F-108	H ₂ O	-195	93	288
	1 M HCl	-63	30	93

Tabulka 3 – průměrné hodnoty profilů v oblastech vzorku s daným filmem či bez něj a hodnoty tloušťek filmů, které jsou jejich rozdílem

Pro názornější srovnání tloušťek jednotlivých filmů jsou výsledky prezentovány i formou sloupcového grafu.



Obrázek 47 – sloupcový graf znázorňující hodnoty profilometricky naměřených tloušťek jednotlivých typů polyanilinových filmů

Z uvedených výsledků profilometrického měření tloušťky PANI filmů vyplývá, že nejvyšší tloušťku vykazovaly filmy připravené za stabilizace pomocí SDS a F-108 v reakčním prostředí deionizované vody (filmy SDS H₂O a F-108 H₂O), konkrétně 294 a 288 nm. Naopak nejnižší tloušťka 93 nm, byla naměřena u filmu připraveného disperzní polymerací v reakčním prostředí 1 M HCl za přítomnosti stabilizátoru F-108 (film F-108 HCl).

U filmů vzniklých polymerací za přítomnosti surfaktantů (SDS, Tweenu 20 a Pluronicu F-108) je možné pozorovat trend, kdy reakční prostředí 1 M HCl vede ke vzniku tenších filmů v porovnání s vodným reakčním prostředím. V tomto ohledu filmy připravené za přítomnosti PVP neodpovídají danému trendu a tloušťka filmu připravených polymerací ve vodě (filmy PVP H₂O) je menší, než v prostředí 1 M HCl (filmy PVP HCl).

Průměrná hodnota filmů připravených za použití reakčního prostředí 1 M HCl činí 148 nm, v případě prostředí deionizované vody je průměrná tloušťka filmů 231 nm. Průměrná hodnota tloušťky všech připravených PANI filmů poté činí 189 nm.

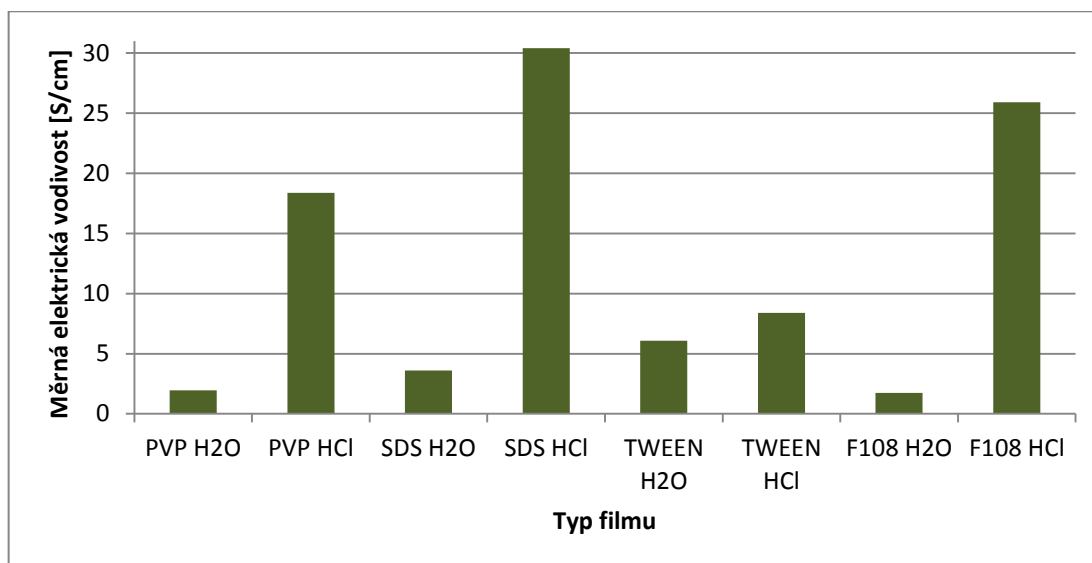
7.3 Měrná elektrická vodivost

Čtyřbodovou metodou měření elektrické vodivosti dle van der Pauwa byly zjištěny hodnoty měrného elektrického odporu různých druhů PANI filmů. Tyto výsledky byly přepočítány na měrnou elektrickou vodivost jednotlivých filmů s příslušnou směrodatnou odchylkou. Hodnoty měrné elektrické vodivosti jsou prezentovány pro tloušťky filmů naměřených pomocí mechanické profilometrie (σ_{PROFIL}). Výsledky měření jsou shrnuty následující tabulce.

Typ filmu	Měrný odpor _{PROFIL} [$\Omega \cdot \text{cm}$]	σ_{PROFIL} [S/cm]
PVP H ₂ O	0,510	1,963
smodch	0,002	0,009
PVP HCl	0,0544	18,4
smodch	0,0005	0,2
SDS H ₂ O	0,2776	3,60
smodch	0,0008	0,01
SDS HCl	0,0329	30,40
smodch	0,0001	0,08
TWEEN H ₂ O	0,1647	6,07
smodch	0,0009	0,03
TWEEN HCl	0,1192	8,39
smodch	0,0006	0,04
F-108 H ₂ O	0,573	1,74
smodch	0,004	0,01
F-108 1M HCl	0,0386	25,9
smodch	0,0002	0,1

Tabulka 4 – výsledky měření konduktivity vzorků čtyřbodovou metodou

Podobně jako v případě výsledků měření tloušky filmů budou i výsledky měření vodivosti prezentovány i formou přehlednějšího sloupcového grafu.



Obrázek 48 – sloupcový graf závislosti měrné elektrické vodivosti na typu filmu

Prezentované výsledky měrné elektrické vodivosti PANI filmů připravených za přítomnosti různých stabilizátorů dokazují vliv reakčního prostředí (H_2O či 1 M HCl) na hodnoty elektrické vodivosti filmů v důsledku jiného stupně dopování (protonace) polyanilinového řetězce. U všech typů filmů připravených v prostředí 1 M HCl byly naměřeny vyšší hodnoty měrné elektrické vodivosti v porovnání s jejich analogy připravenými v prostředí deionizované vody. Z výsledků je dále zjevné, že nejvyšší měrnou elektrickou vodivost vykazovaly filmy připravené polymerací za použití stabilizátoru SDS v 1 M HCl (film SDS HCl). Tento typ filmu dosahoval měrné elektrické vodivosti přes 30 S/cm. Vysokých hodnot vodivosti také dosahovaly filmy PVP HCl a F-108 HCl. Konduktivita prvního z těchto typů filmů dosahovala hodnot vyšších než 18 S/cm, u filmu F-108 HCl dosáhla téměř na hodnotu 26 S/cm. Filmy připravené z disperze stabilizované Tweenem 20 vykazovaly v případě reakčního média 1 M HCl (filmy TWEEN HCl) nejnižší hodnotu konduktivity ze všech filmů připravených v tomto prostředí, konkrétně přes 18 S/cm. Použití deionizované vody místo roztoku HCl však u tohoto typu stabilizátoru (filmy TWEEN H_2O) vedlo ke vzniku filmů s měrnou elektrickou vodivostí přes 6 S/cm, tedy hodnotou nejvyšší mezi ostatními filmy připravenými v tomto prostředí. Konduktivita filmů následně klesala v pořadí SDS, PVP, F-108 a SDS H_2O a odpovídala hodnotám od 1,7 do 3,6 S/cm.

7.4 Povrchová energie

Pomocí měřicí sestavy SEE Systém (Advex Instruments, Česká Republika) byly naměřeny hodnoty kontaktních úhlů tří různých kapalin - deionizovaná voda (H_2O), dijudmetan (DIM) a ethylenglykol (EG), na osmi různých PANI filmech, lišících se stabilizátorem a reakčním prostředím. Hodnoty naměřených kontaktních úhlů jsou uvedeny v následující tabulce.

Měřicí kapalina	kontaktní úhel [°]							
	PVP		SDS		TWEEN 20		F-108	
	H_2O	1M HCl	H_2O	1M HCl	H_2O	1M HCl	H_2O	1M HCl
H_2O	45 ± 4	30 ± 3	69 ± 4	58 ± 4	3 ± 3	27 ± 3	34 ± 5	37 ± 6
DIM	24 ± 6	24 ± 4	36 ± 4	37 ± 6	8 ± 2	11 ± 2	6 ± 3	7 ± 4
EG	21 ± 5	17 ± 6	40 ± 6	26 ± 4	6 ± 4	10 ± 2	10 ± 5	8 ± 3

Tabulka 5 – hodnoty naměřených kontaktních úhlů kapek jednotlivých měřících kapalin na osmi různých typech PANI filmů

Použití tří různých měřících kapalin: vody, dijudmetanu a etylenglykolu umožnilo zvolit v programu SEESystem 6.2 k vyhodnocení povrchové energie filmů acido-bazické metody. Tímto způsobem byly získány hodnoty celkové povrchové energie daných filmů γ^{TOT} včetně její disperzní a polární složky γ^{LW} a γ^{AB} .

	PVP		SDS		TWEEN 20		F-108	
	H_2O	1 M HCl	H_2O	1 M HCl	H_2O	1 M HCl	H_2O	1 M HCl
γ^{TOT} [mN/m]	49 ± 5	55 ± 4	43 ± 3	46 ± 2	69 ± 2	61 ± 2	59 ± 4	56 ± 4
γ^{LW} [mN/m]	46 ± 1	46 ± 1	41 ± 2	41 ± 1	50 ± 1	50 ± 1	51 ± 1	50 ± 1
γ^{AB} [mN/m]	3 ± 4	9 ± 3	2 ± 3	5 ± 2	19 ± 1	11 ± 2	8 ± 4	6 ± 4

Tabulka 6 - hodnoty celkových povrchových energií daných filmů γ^{TOT} včetně jejich disperzních γ^{LW} a polárních složek γ^{AB}

Výsledky měření kontaktního úhlu sedící kapky tří různých měřících kapalin a následný přepočítání na hodnoty povrchových energií, dokazují rozdíly mezi polyaniliovými filmy lišícími se látkou v roli stabilizátoru i v této materiálové charakteristice.

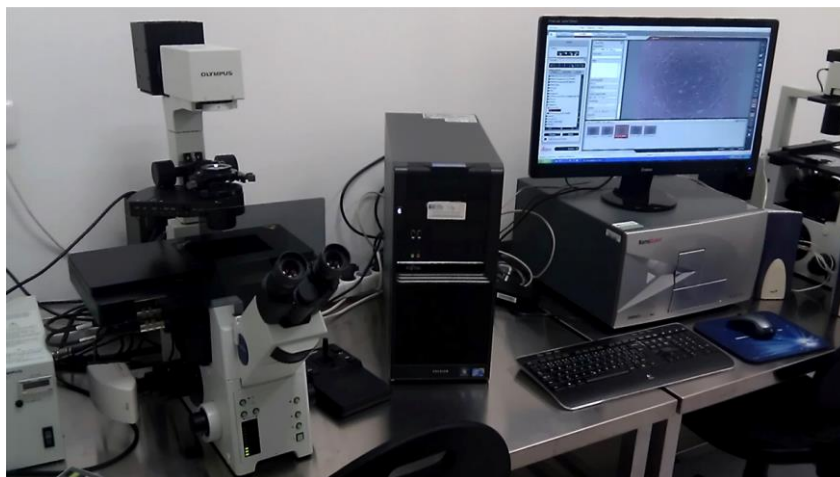
S ohledem na chybu měření, není možné statisticky průkazně odlišit hodnoty celkových povrchových energií filmů shodujících se stabilizátorem a lišících se v reakčním prostředí. V tomto směru pouze filmy stabilizované Tweenem 20 vykazují vyšší celkovou povrchovou energii v případě reakčního prostředí H₂O (69 ± 2 mN/m) v porovnání s celkovou povrchovou energií tohoto filmu připraveného v prostředí 1 M HCl (61 ± 2 mN/m). Filmy vzniklé z disperze stabilizované Tweenem 20 zároveň vykazovaly ze všech připravených typů PANI filmů nejvyšší hodnoty celkové povrchové energie. Povrchová energie dále klesá v řadě Tween 20, F-108, PVP a SDS.

Hodnoty kontaktního úhlu sedící kapky deionizované vody podávají informaci o hydrofilitě či hydrofobitě daných filmů. Naměřené hodnoty kontaktních úhlů kapek vody na všech připravených typech PANI filmů dosahovaly úhlů menších než 90°, ve všech případech se tedy jedná o povrchy hydrofilní. Voda nejvíce smáčela povrch filmu TWEEN H₂O, naopak nejvyšší kontaktní úhel kapky vody byl naměřen u filmů vzniklých z disperze za přítomnosti SDS.

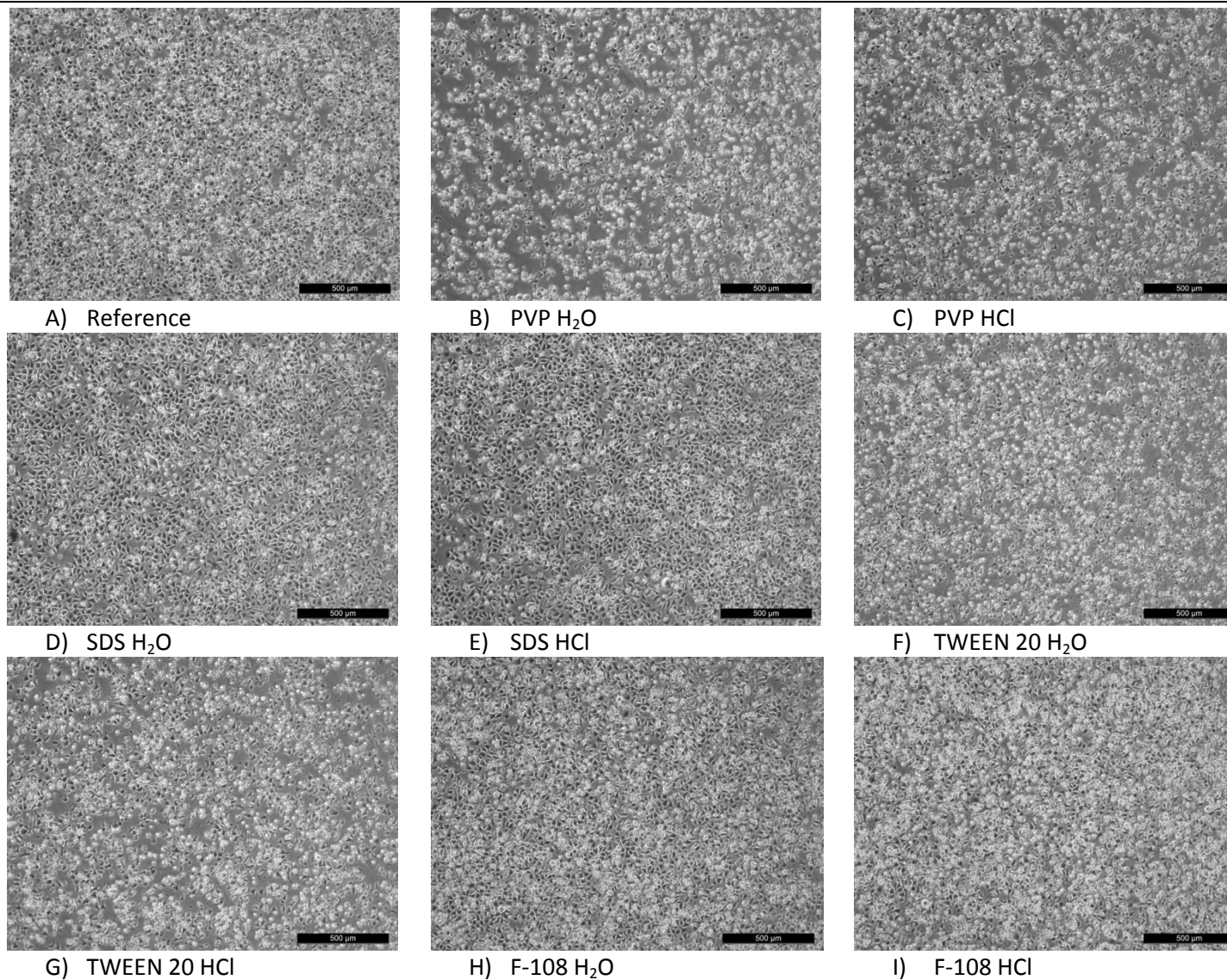
7.5 Buněčná adheze

Pro posouzení buněčné adheze byly, stejně jako v případě hodnocení buněčné proliferace a migrace, pořízovány mikrofotografie pomocí invertovaného mikroskopu s fázovým kontrastem Olympus XI 81 vybaveného digitálním zrcadlovým fotoaparátem s optikou Leica. Pro pořízení mikrofotografií byl využit software Leica, kterým byl opatřen stolní počítač propojený s mikroskopem.

Na obrázku 49 jsou prezentovány vybrané mikrofotografie buněk adherovaných na filmech po 1 hodině od osazení buněčnou suspenzí o koncentraci 1×10^7 buněk na 1 ml média.



Obrázek 49 – mikroskop Olympus XI 81 se stolním PC



Obrázek 50 – adheze NIH/3T3 buněk na testovaných filmech

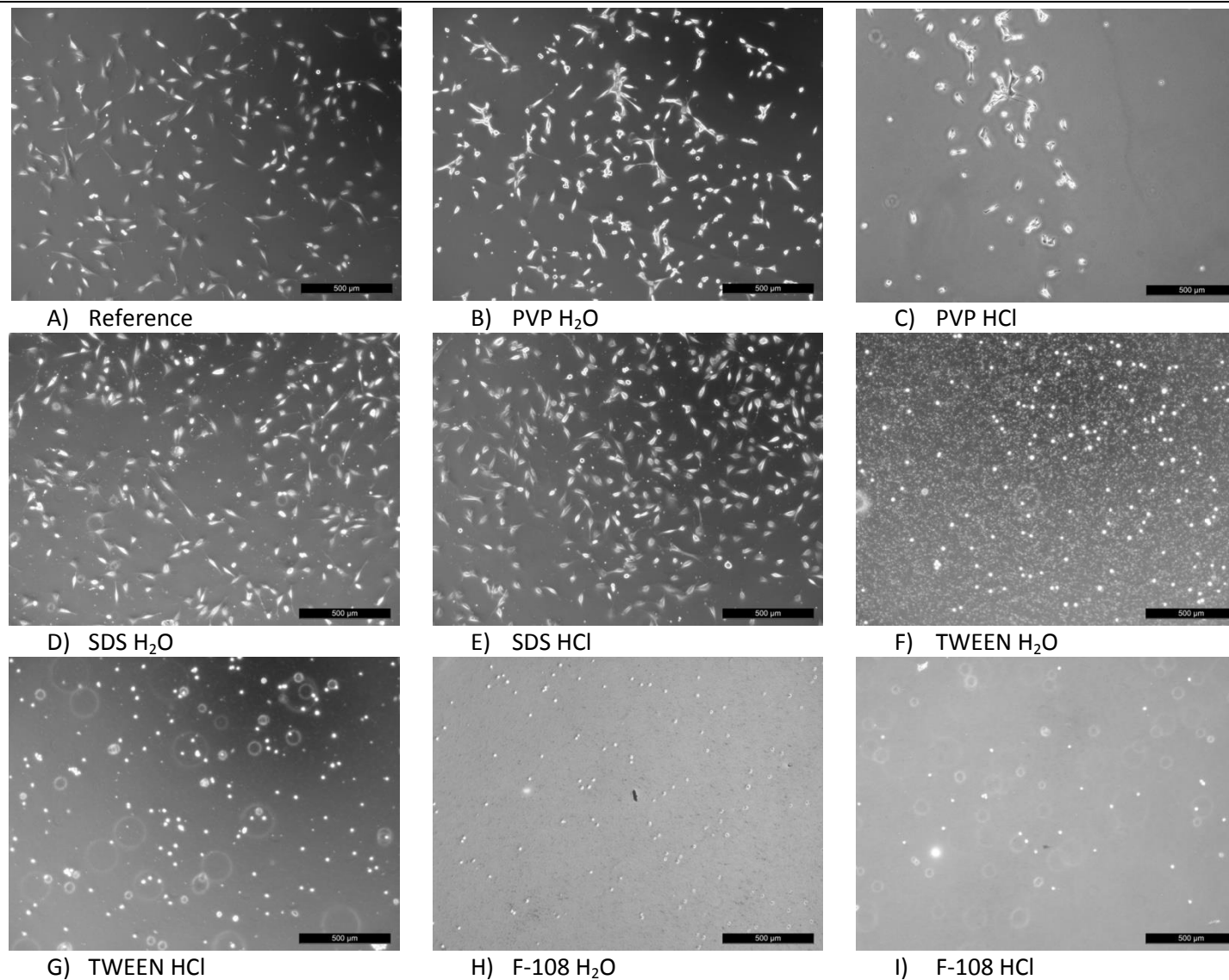
Z uvedených mikrofotografií je patrné, že se buňky linie myších fibroblastů NIH/3T3, v použité koncentraci buněk v médiu, dokázaly adherovat na povrchu všech typů připravených filmů. Patrné jsou však rozdíly v jejich morfologii a počtu zdravých, životaschopných buněk. Míra adheze se projevuje změnou tvaru buněk. Adherované buňky se v mikroskopu s fázovým kontrastem jeví, díky plochému tvaru přijímajícímu povrch substrátu, jako tmavě zbarvené. Oproti tomu buňky, které se dosud volně pohybují v médiu, zaujímají přibližně sférický tvar a v mikroskopu jsou pozorovány jako světlé útvary.

Nejvyšší počet zdravých, adherovaných buněk v porovnání s ostatními typy PANI filmů i referencí je pozorovatelný u filmů SDS H₂O a SDS HCl. V případě těchto filmů je patrná dobrá adheze buněk k povrchu s nízkým podílem neadherovaných buněk. Relativně velkou plochu vzorku také zaujímal buňky v případě filmů F-108 H₂O a F-108 HCl, podíl adherovaných buněk je však v tomto případě již výrazně nižší. Nejmenší povrch zaujímal buňky na filmech připravených za stabilizace Tweenem 20 a PVP. V případě těchto filmů byl u buněk patrný i nefyziologický tvar a vysoký podíl neadherovaných buněk. Z pohledu počtu buněk poskytoval nejméně vhodné podmínky pro adhezi film PVP H₂O. Na filmech TWEEN 20 H₂O i HCl pak mají buňky viditelně odlišnou morfologii.

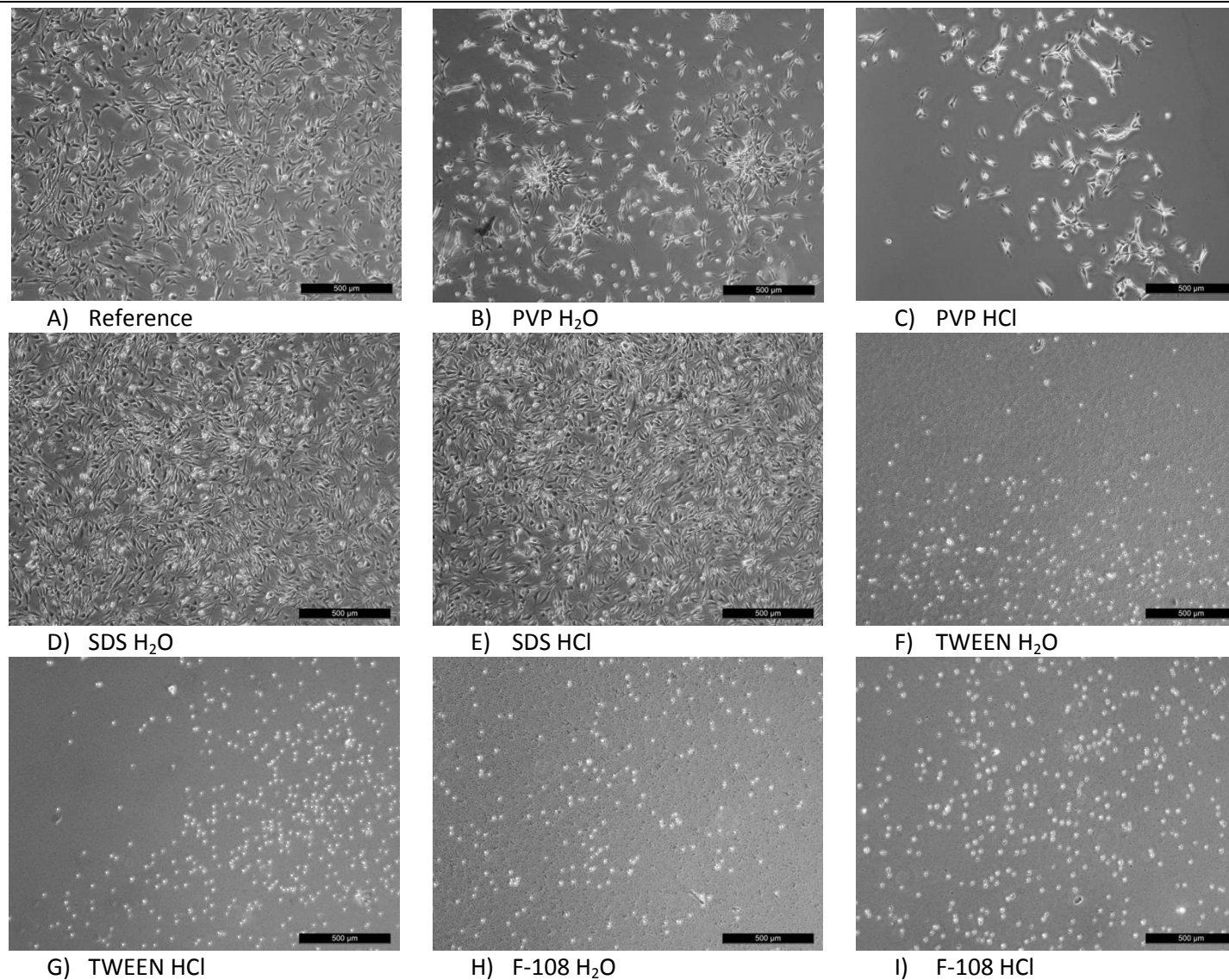
7.6 Buněčná proliferace

Výsledky buněčné proliferace budou představeny na sériích mikrofotografií (obrázky 51 až 54), pořízených po 24 a 72 hodinách od osazení testovaných filmů 2 ml suspenze o koncentraci 1×10^5 buněk linie myších fibroblastů NIH/3T3 v médiu. Bude také rozlišováno mezi vzorky modifikovanými pomocí sérového albuminu BSA (obrázky 53 a 54) a vzorky, které touto modifikací neprošly (obrázky 51 a 52).

Dále budou prezentovány výsledky kvantitativního vyhodnocení počtu namnožených buněk po 72 hodinách proliferace.

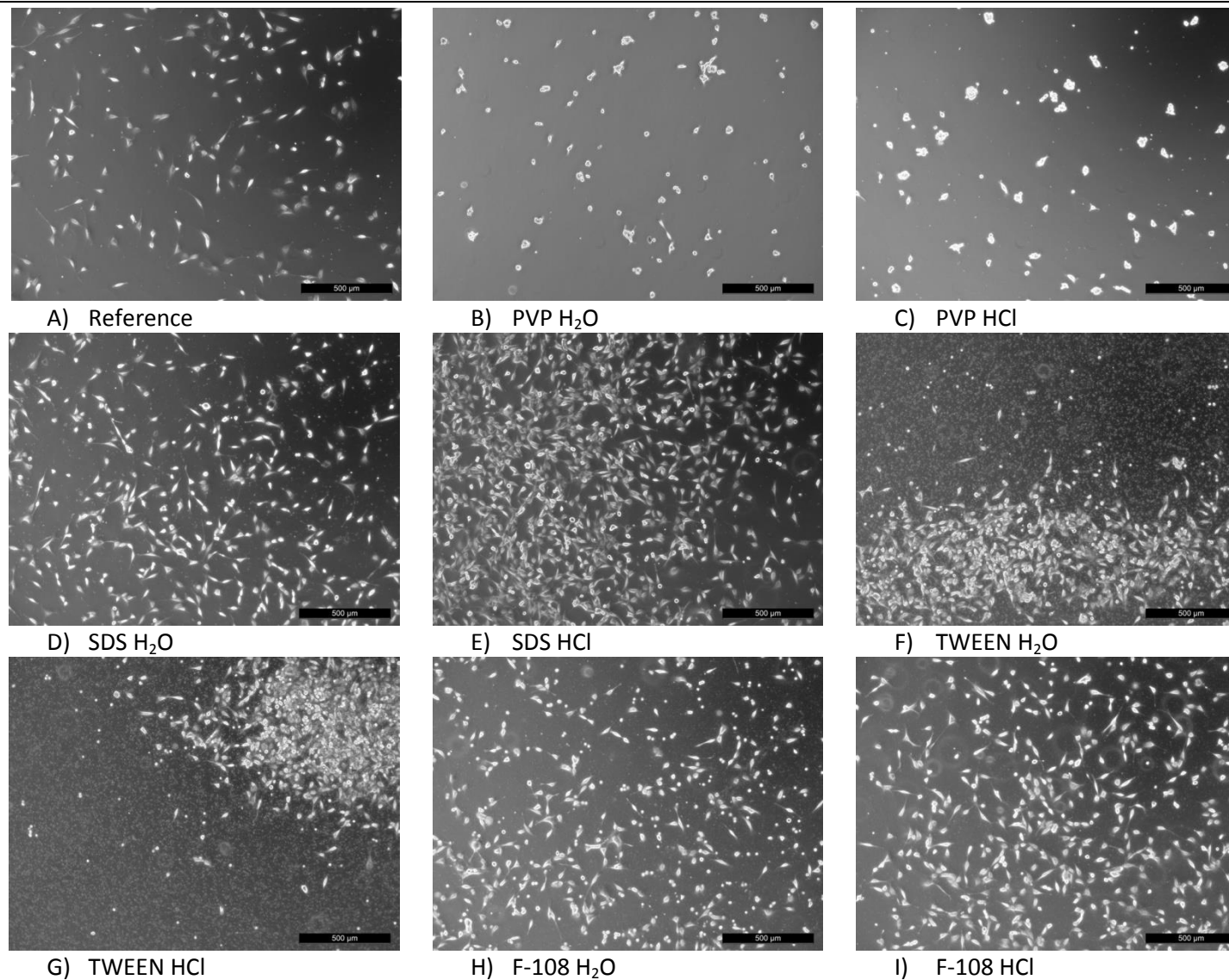


Obrázek 51 – proliferace NIH/3T3 buněk na testovaných filmech bez modifikace pomocí BSA (po 24 hodinách kultivace)

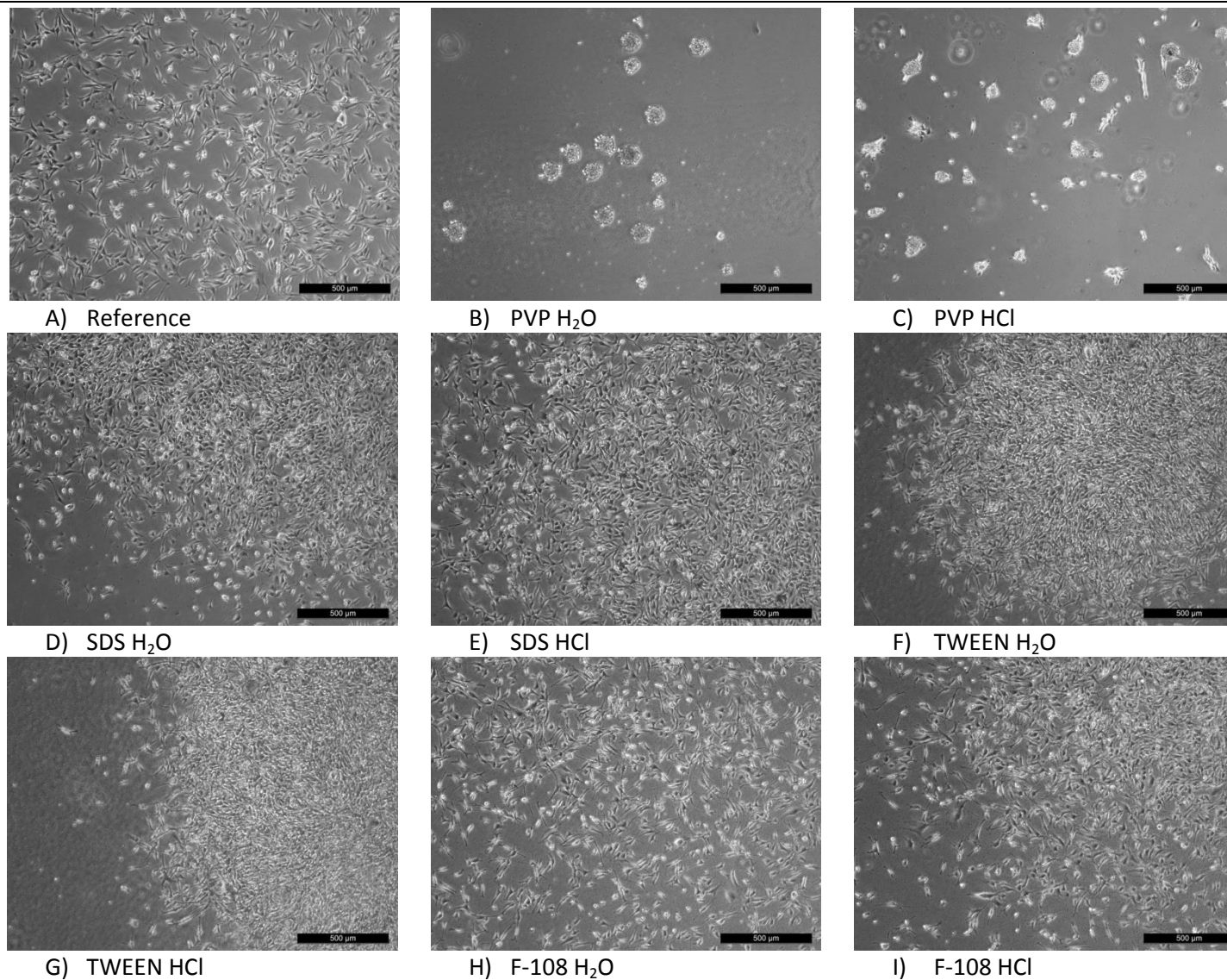


Obrázek 52 – proliferace NIH/3T3 buněk na testovaných filmech bez modifikace pomocí BSA (po 72 hodinách kultivace)

Na prvních dvou prezentovaných sériích mikrofotografií, hodnotících proliferaci (obrázky 51 a 52), jsou zobrazeny stavy buněk po době kultivace 24 a 72 hodin od osazení misek s různými polyanilinovými filmy, které nebyly modifikovány pomocí BSA, suspenzí o koncentraci 1×10^5 buněk v médiu. Na těchto mikrofotografiích, pořízených při celkovém zvětšení mikroskopu $40 \times$, můžeme pozorovat zcela odlišné počty proliferujících, adherovaných buněk na jednotlivých površích. Filmy TWEEN H_2O , TWEEN HCl, F-108 H_2O a F-108 HCl neumožnily buňkám v dané koncentraci zůstat životaschopné a proliferovat, z fotografií těchto filmů, pořizovaných v oblastech středu vzorků jsou již po 24 hodinách patrné pouze buňky mající nefyziologický tvar, buňky poškozené či apoptické a ve většině případů volně se pohybující v médiu. V kultivačních miskách pokrytých filmy připravenými z disperze stabilizované pluronicem F-108 však bylo možné na krajích vzorku nalézt místa s ložisky desítek živých buněk. Naopak velmi dobře se z hlediska buněčné proliferace fibroblastů jeví filmy jak SDS H_2O , tak i SDS HCl. Při hodnocení proliferace po 24 hodinách bylo u filmů SDS HCl pozorovatelné větší množství buněk než v případě referenčního vzorku. Na filmech SDS H_2O byl v porovnání s referencí počet buněk srovnatelný. Proliferující buňky na zmíněných typech filmů (SDS H_2O a HCl) byly v dobrém, fyziologickém stavu, proliferující, bez výrazného výskytu poškozených buněk. Buňky na filmech PVP H_2O narostly v o něco menší míře než v případě reference, zároveň bylo možné pozorovat oproti referenci či filmům SDS, zvýšené mezibuněčné interakce a počátky shlukování buněk. Filmy PVP HCl poskytovaly buňkám oproti analogům připraveným ve vodním prostředí o poznání horší podmínky a přeživší buňky bylo nutné na vzorku vyhledávat. Po 72 hodinách byla opět pozorována mohutná proliferací aktivita u buněk adherovaných na filmech SDS H_2O a SDS HCl, kdy oba tyto typy filmů byly zcela pokryty vrstvou buněk. Počet buněk bylo možné odhadnout, zejména opět v případě filmů SDS HCl, jako vyšší, než v případě reference. Na filmech PVP H_2O proliferace buněk nedosahovala takové míry jako u reference, buňky se však stále množily a vytvářely buněčné shluky. Vývoj stavu buněk byl sledován po dobu 192 hodin od osazení, zatímco buňky na filmech SDS a referenci se jeví jako konfluentní (stav buněk se již neměnil), na filmech PVP H_2O docházelo k rozšiřování shluků a pozorovatelnému narůstání tloušťky jejich středních částí.



Obrázek 53 – proliferace NIH/3T3 buněk na testovaných filmech modifikovaných pomocí BSA (po 24 hodinách kultivace)



Obrázek 54 – proliferace NIH/3T3 buněk na testovaných filmech modifikovaných pomocí BSA (po 72 hodinách kultivace)

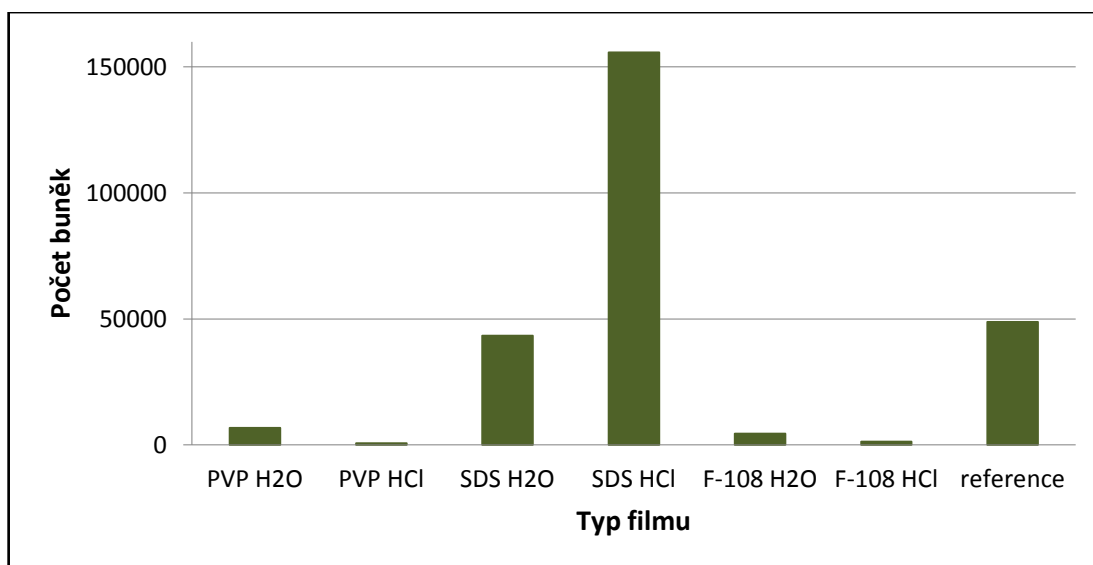
Další série mikrofotografií (obrázky 53 a 54) zachycují chování buněk na polyanilinových filmech modifikovaných po dobu 1 hodiny roztokem bovinního sérového albuminu BSA v deionizované vodě o koncentraci 40 g/l před osazením buněčnou suspenzí. Na mikrofotografiích pořízených po 24 i 72 hodinách proliferace je znatelná vyšší proliferační aktivita buněk, zejména u filmů TWEEN H₂O, TWEEN HCl, F-108 H₂O a F-108 HCl, které bez modifikace BSA proliferaci buněk neumožňovaly. Zároveň byla u všech vzorků polyanilinových filmů (reference a filmy PVP byli výjimkou), již po 24 hodinách pozorovatelná orientace buněk ke středu vzorku. Po 72 hodinách byly již okraje oblastí pokrytých vrstvou buněk znatelnější. Největší plochu buňky porostly na filmech SDS H₂O a SDS HCl. Ty spolu s filmy F-108 HCl a TWEEN HCl modifikovaných BSA tvořily vrstvu buněk dostatečně celistvou a velkou pro provedení testů buněčné migrace. Naopak velmi malá plocha vrstvy buněk byla pozorována u filmů TWEEN H₂O. Filmy PVP H₂O, PVP HCl po modifikaci BSA poté podněcovaly u buněk vznik shluků buněk v nefyziologickém stavu, nacházejících se separovaně adherované na povrchu filmu. Nedostatečná celistvost vrstvy buněk na filmech F-108 H₂O po modifikaci BSA také neumožnila zařadit vzorek do testů buněčné migrace.

Pomocí průtokové cytometrie byla suspenze buněk, vzniklá trypsinizací adherovaných buněk, kultivovaných po dobu 72 hodin na polyanilinových filmech bez modifikace pomocí BSA, podrobena kvantitativnímu vyhodnocení počtů buněk. Test nebyl prováděn v případě filmů TWEEN 20 H₂O a TWEEN 20 HCl, jak již bylo naznačeno výše, tyto filmy neumožnily přežití buněk a test by tedy byl bezpředmětný. V případě filmů F-108 H₂O a F-108 HCl, u kterých z mikrofotografií není patrná přítomnost živých buněk, bylo možné mikroskopem pozorovat oblasti s proliferujícími buňkami na krajích vzorků, proto byly tyto filmy do kvantitativního vyhodnocení zařazeny také. Výsledky počtů buněk nacházejících se po 72 hodinách po osazení 2 ml suspenze o koncentraci 1×10^5 buněk v 1 ml kultačního média, jsou zobrazeny v následující tabulce. Výsledky počtu buněk jsou uváděny jako průměr tří vedle sebe prováděných měření samostatných vzorků.

Typ filmu	Počet buněk
PVP H ₂ O	6811
PVP HCl	653
SDS H ₂ O	43402
SDS HCl	155686
F-108 H ₂ O	4474
F-108 HCl	1338
REFERENCE	48812

Tabulka 7 – kvantitativní vyhodnocení počtu buněk po 72 hodinách proliferace na polyanilinových filmech a referenčním vzorku, stanovené pomocí průtokové cytometrie

Pro přehlednost jsou výsledky počtu buněk na PANI filmech a referenci po 72 hodinách od osázení zobrazeny i graficky.



Obrázek 55 – sloupcový graf závislosti počtu buněk po 72 hodinách od osázení buňčné suspenze na typu polyanilinového filmu

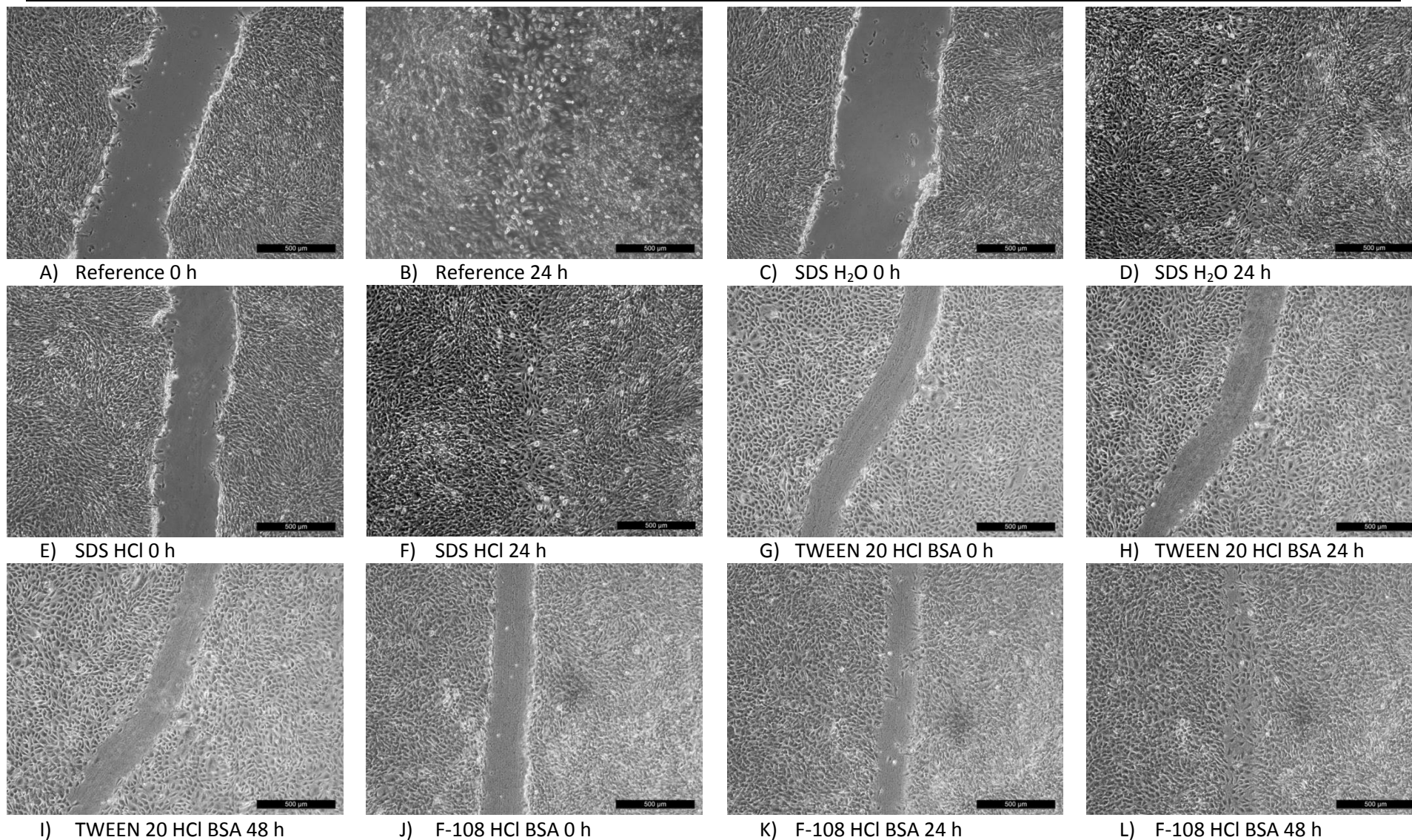
Z výsledků kvantitativního vyhodnocení počtu buněk nacházejících se v kultivačních miskách po proliferaci trvající 72 hodin, uvedených v tabulce 7 a na sloupcovém grafu (obrázek 55) lze zcela jednoznačně pozorovat, že polyanilinové filmy typu SDS HCl umožňovaly buňkám linie myších fibroblastů proliferaci ve výrazně vyšším měřítku než ostatní typy PANI filmů. V porovnání s referenčním vzorkem (tkáňovým polystyrenem)

bylo naměřené množství buněk na filmech SDS HCl trojnásobně vyšší. Filmy SDS H₂O vykazaly také, z hlediska míry proliferace, velmi slibné hodnoty počtů buněk. Dosahovaly však výrazně nižších počtů než jejich analogy připravené v prostředí 1 M HCl. I tak lze označit schopnost proliferace buněk na těchto filmech za srovnatelnou s referenčním vzorkem. Vyhodnocení čitelné z mikrofotografií potvrdily také výsledky kvantitativního vyhodnocení počtu buněk na filmech připravených z disperzí stabilizovaných pomocí PVP a F-108. U těchto typů filmů byly naměřeny výrazně nižší počty buněk v porovnání s filmy SDS H₂O, SDS HCl či referencí. V případě těchto filmů lze také pozorovat opačný vliv reakčního prostředí na míru proliferace než u filmů SDS, kde použití reakčního prostředí 1 M HCl vedlo k výraznému zvýšení počtu buněk. Filmy připravené v 1 M HCl, tedy F-108 HCl a PVP HCl vykazovaly nižší počty buněk než odpovídající filmy připravené v prostředí deionizované vody.

7.7 Buněčná migrace

Pro tento test bylo použito buněk kultivovaných (kromě reference) na površích poly-anilinových filmů SDS H₂O, SDS HCl, a to jak u vzorků modifikovaných pomocí BSA, tak i u nemodifikovaných. Dále byl test proveden na populaci buněk narostené na filmech TWEEN HCl BSA a F-108 HCl BSA.

Na mikrofotografiích prezentovaných na obrázku 55 je možné pozorovat, že buňkám na filmech SDS H₂O, SDS HCl a referenčnímu vzorku misky z tkáňového polystyrenu došlo k zacelení rýhy bez buněk již po 24 hodinách. Stav buněk byl nadále konfluentní. Se stejným výsledkem proběhl test migrace buněk u filmů stabilizovaných SDS modifikovaných pomocí BSA. Nižší schopnost regenerace buněčné vrstvy vykazaly buňky v případě filmů F-108 HCl modifikovaných pomocí BSA. Migrace buněk do prostoru rýhy probíhala výrazně pomaleji a k úplnému zacelení plochy bez buněk došlo až po 72 hodinách od provedení rýhy. Buňky kultivované na filmech TWEEN HCl modifikovaných BSA rýhu zacelit nedokázaly ani po uplynutí doby 72 hodin a prakticky vůbec nemigrovaly do prostoru rýhy.



Obrázek 56 – migrace NIH/3T3 buněk na testovaných filmech

8 DISKUZE

Na základě publikovaných studií, zabývajících se polyanilinem ve všech jeho formách, byl pro charakterizaci polyanilinových filmů připravených za přítomnosti různých stabilizátorů zvolen design a metodika praktické části, umožňující získat reprodukovatelné a srovnatelné výsledky.

Postup syntézy filmů byl zvolen dle metodiky IUPAC publikované ve článku Stejskal a Sapurina (2005). Tento postup využívá polyvinylpyrrolidon (PVP) jako stabilizátor disperzní polymerace polyanilinu. Jako reakční prostředí autoři uvádějí dvě alternativy: 1 M kyselinu chlorovodíkovou a vodu, přičemž reakce probíhá za laboratorní teploty. Ve stejné publikaci byly uvedeny také výsledky tloušťky a měrné elektrické vodivosti filmů. Přičemž tloušťka byla měřena pomocí hodnot optické absorbance při vlnové délce 400 nm a měrná elektrická vodivost pomocí čtyřbodové metody dle van der Pauwa.

S ohledem na zamýšlené testy buněčné kompatibility, jejichž výsledky v případě filmů zjevně souvisí i s povrchovou energií a s ní související hydrofobitou či hydrofilitou povrchů, byly kromě polyvinylpyrrolidonu zvoleny ještě tři odlišné látky, které byly použity ve stejném množství. Na základě postupů syntézy koloidního polyanilinu popsanych v publikacích Kim et al. (2001) a Yu et al. (2003), byly jako alternativy PVP zvoleny povrchově aktivní látky: aniontový dodecylsírán sodný (SDS) a dále dvě neionické povrchově aktivní látky použité například v práci Kuczynska et al. (2010), která sleduje vliv surfaktantů použitých k přípravě modifikovaných polyanilinových prášků. Těmito látkami jsou neionický tříblokový kopolymer polyethylenglykolu a polypropylenglykolu (PEG-PPG-PEG, Pluronic F-108) a polyoxyethylensorbitanmonolaurát (Tween 20). S ohledem na zjevné ovlivnění výsledné elektrické vodivosti použitým reakčním prostředím, byly všechny filmy připravovány v obou z nich (tedy ve vodě a v 1 M kyselině chlorovodíkové).

Vlastnosti připravovaných filmů budou dále porovnávány z hlediska hodnot povrchové energie získané metodou měření kontaktního úhlu sedící kapky a buněčné aktivity představované výsledky testů adheze, proliferace a migrace buněk myších fibroblastů linie NIH/3T3. Metodika těchto testů je inspirována dosud nepublikovanou studií provedenou na pracovišti UTB ve Zlíně studující polyanilinové filmy ve formě elektricky vodivé polyanilinové soli (PANI-S) a nevodivé polyanilinové báze (PANI-B) připravené pomocí srá-

žecí polymerace za nepřítomnosti stabilizátoru. Navíc budou výsledky buněčné proliferace vyhodnocovány i kvantitativně pomocí průtokové cytometrie.

Jako první budou diskutovány výsledky měření tloušťky a měrné elektrické vodivosti polyanilinových filmů se studii Stejskal a Sapurina (2005) a Riede et al. (2002). V první jmenované studii byla polyanilinovým filmům, připraveným za přítomnosti stabilizátoru polyvinylpyrrolidonu v reakčním prostředí vody - PVP H₂O, naměřena tloušťka 125 ± 9 nm a měrná elektrická vodivost 2,6 S/cm, filmy PVP HCl (reakční prostředí 1 M HCl) poté vykazovaly tloušťku 109 ± 10 nm a měrnou elektrickou vodivost 18,8 S/cm. Riede et al. (2002) uvádějí hodnoty pro filmy připravené z reakční směsi bez přídavku stabilizátoru i pro filmy připravené za přítomnosti stabilizátoru PVP (dle postupu IUPAC) a hydroxypropylcelulózy (HPC). Jako reakční prostředí autoři zvolili vodu. Tloušťka a elektrická vodivost filmů byla měřena stejným způsobem jako v předchozí citované studii. Tloušťka filmů připravených za nepřítomnosti stabilizátoru se pohybovala kolem hodnoty 560 nm. V případě filmů z reakční směsi stabilizované 2 hm. % HPC činila výsledná tloušťka cca 80 nm, film stabilizovaný 2 hm. % PVP vykazoval hodnoty tloušťky cca 200 nm. Hodnoty měrné elektrické vodivosti filmů se ve všech případech (stabilizace PVP, HPC i srážecí polymerace) pohybovaly v řádu jednotek, maximálně pak dosáhly cca $5 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Pro přehled je možné uvést také hodnoty měrné elektrické vodivosti tablet tvořených zalisovaným práškem z PANI sraženiny měřené v rámci studie Prokeš a Stejskal (2004). Vodivost tablet, lišících se druhem 1 M kyseliny, tvořící reakční prostředí polymerace, se pohybovala v rozmezí od 1×10^{-2} do $15 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

V případě polyanilinových filmů, připravených a charakterizovaných v rámci experimentální části této diplomové práce, byly naměřeny hodnoty tloušťky 119 nm a měrné elektrické vodivosti 2,0 S/cm u filmů PVP H₂O a 165 nm respektive 18,4 S/cm v případě filmů PVP HCl. Výsledky měření tloušťky i měrné elektrické vodivosti se tedy přibližují hodnotám publikovaných ve zmiňovaných studiích a lze je považovat za relevantní. Při měření těchto charakteristik se potvrdil vliv reakčního prostředí polymerace na výsledné hodnoty měrné elektrické vodivosti - ve všech případech reakční prostředí 1 M kyseliny chlorovodíkové vedlo ve srovnání s reakčním prostředím deionizované vody k vyšším hodnotám měrné elektrické vodivosti. Nejvyšší hodnoty měrné elektrické vodivosti vykazovaly filmy SDS HCl (30,4 S/cm) a F-108 HCl (25,9 S/cm). Nejnižší hodnoty měrné elektrické vodivosti byly naopak naměřeny u filmů F-108 H₂O (1,7 S/cm) a PVP H₂O (2,0 S/cm). Z hlediska tloušťky filmů byla mechanickou profilometrií naměřena nejvyšší

hodnota u filmů F-108 HCl (93 nm), nejvyšší v případě filmů SDS H₂O (294 nm) a F-108 H₂O (288 nm). Z těchto výsledků je také možno usuzovat, že použití reakčního prostředí 1 M HCl vede ve srovnání s vodným prostředím ke snižování tloušťky filmů připravených za přímosti povrchově aktivních látek (SDS, F-108 či Tweenu 20). V případě použití polymeru PVP jako stabilizátoru toto pravidlo neplatí. V souvislosti s tloušťkou polyanilinových filmů je možné vyslovit dvě teorie, první předpokládá, že tloušťka filmu, tvořeného PANI řetězci, je konstantní bez ohledu na metodu přípravy, a že na tuto vrstvu PANI pak přiléhají menší oligomerní řetězce této látky, které ovlivňují reálnou tloušťku filmů. Druhá pak, že tloušťka filmu PANI řetězců je odvislá od použitého stabilizátoru. Na základě provedených testů však není možné rozhodnout, která z uvedených teorií je pravdivá. Vzhledem k tomu, že elektrická vodivost je závislá na tloušťce, měla by být předmětem dalšího zkoumání otázka, zda elektrická vodivost probíhá pouze ve vrstvě polyanilinových řetězců nebo v celém objemu filmu.

Výsledky měření povrchové energie polyanilinových filmů budou porovnávány s dosud nepublikovanou studií provedenou na UTB ve Zlíně. Postup přípravy filmů odpovídal postupu, uvedeném v kapitole 2.3. Polyanilinová sraženina byla po 10 minutách polymerace vypláchnuta pomocí 0,2 M HCl a následně metanolem. Tímto způsobem byly získány vzorky filmů polyanilinové soli (PANI-S) a pomocí působení 1 M hydroxidu amonného byla část vzorků převedena na polyanilinovou bázi (PANI-B). Výsledky měření kontaktního úhlu kapek tří různých kapalin (deionizované vody, diiodmethanu a ethylen-glykolu) nanesených ve stejném objemu na filmy PANI-S a PANI-B, byly v této práci prezentovány jako přepočítané hodnoty povrchové energie - pro filmy PANI-S činila povrchová energie 52 mN/m, pro filmy PANI-B 51 mN/m. Výsledky měření povrchové energie PANI filmů v rámci experimentální části této diplomové práce ukazují na rozdílné vlastnosti povrchů filmů připravených za přítomnosti stabilizátorů. Nejvyšší povrchovou energii vykazovaly filmy TWEEN H₂O (69 ± 2 mN/m), nejnižší SDS H₂O (43 ± 3 mN/m) a SDS HCl (46 ± 2 mN/m). Důležitým faktorem z hlediska chování buněk na daných filmech je také kontaktní úhel kapky vody neboli míra hydrofility povrchu. V tomto ohledu nejnižší hodnoty kontaktního úhlu kapky vody vykazovaly filmy TWEEN H₂O (v řádu jednotek °) naopak jako nejméně hydrofilní se jevily filmy SDS H₂O (69 ± 4 °) a SDS HCl (58 ± 4 °).

Dále byly v rámci UTB ve Zlíně provedeny testy buněčné adheze, proliferace a migrace buněk linie myších fibroblastů NIH/3T3. Výsledky testů buněčné aktivity byly

v rámci diskutované studie stanoveny v podobě mikrofotografií. V případě buněčné adheze byly vzorky filmů PANI-S, PANI-B a referenčního vzorku čisté polystyrenové misky osazeny buněčnou suspenzí o koncentraci 1×10^7 buněk v 1 ml kultivačního média a po uplynutí 1 hodiny byly pořízeny fotografie (obrázek 18). Na snímcích je možné sledovat dobrou schopnost buněk adherovat se na PANI-S i PANI-B filmech, v porovnání s referencí dokonce lepší. Filmy PANI-B i díky nižší povrchové energii a menší drsnosti povrchu oproti filmům PANI-S, vykazovaly lepší buněčnou adhezi. Testy buněčné proliferace byly prezentovány stejným způsobem (obrázek 19), metodika se však lišila koncentrací buněčné suspenze, kterou byly vzorky osazovány - 1×10^5 buněk v 1 ml média a dobou pořizování fotografií (24 hodin). Na vybraných mikrofotografiích bylo možné pozorovat tvorbu souvislé vrstvy buněk v obou případech polyanilinových filmů oproti referenčnímu vzorku, na kterém proliferace neprobíhala v takové míře. V obou případech PANI filmů však autor uvádí snadnou oddělitelnost narostlých a pomnožených buněk od povrchu i po mírném oplachu, například při výměně média. Testy buněčné migrace vyhodnocované pomocí hodnocení mikrofotografií pořízených po 72 hodinách od provedení rýhy do vrstvy buněk narostlých na PANI filmech, neprokázaly schopnost buněk kompletně zacelit oblasti bez buněk. Buňky kultivované na filmu PANI-B v tomto ohledu nemigrovaly do oblasti rýhy prakticky vůbec, na filmu PANI-S byla viditelná tendence malé části buněk migrovat, k zacelení rýhy však nedošlo ani v tomto případě. V článku Humpolíček et al., (2012a) je u stejným způsobem vytvořených filmů PANI-S a PANI-B, studována adheze a proliferace buněk linie lidských hepatocelulárních buněk karcinomu jater HepG2. Z výsledků této studie je patrné, že se buňky dokázaly bez obtíží adherovat na obou typech filmů. Následná proliferace buněk na sledovaných filmech ukázala, že vodivá polyanilinová sůl je pro růst buněk méně příznivá než polyanilinová báze. Dále lze diskutovat článek Bidez et al. (2006), jehož předmětem je testování proliferace buněk linie myších myoblastů H9c2 na polyanilinových filmech připravených filtrací roztoku s obsahem 4 hm. % polyanilinového prášku a následným sušením. Filmy dle této studie vykazovaly velmi dobré výsledky proliferace, srovnatelné s referenčními vzorky tkáňového polystyrenu. Wang et al., (2008) připravili polyanilinové filmy oxidační polymerací 0,16 M roztoku anilinu v metylchloridu roztokem APS v 1 M HCl na polytetrafluorethylenových substrátech. Testy buněčné aktivity byly prováděny na linii nervových buněk PC-12. Závěrem této studie je označení vzorků za biokompatibilní s bezproblémovou buněčnou adhezí a proliferací. Další studie Liu et al., (2010) pracuje s filmy připravenými srážecí polymerací anilinu amonium persulfátem

v prostředí 1,2 M HCl, na křemíkovém substrátu. Buněčná aktivita těchto filmů byla studována na linii nervových buněk PC-12. Vzorky opatřené polyanilinovým filmem vykazovaly výrazně lepší buněčnou adhezi a proliferaci než referenční křemíkový vzorek.

Testy buněčné adheze, proliferace a migrace na polyanilinových filmech připravených za přítomnosti stabilizátorů PVP, SDS, F-108 a Tweenu 20 v různých reakčních prostředích, provedené v rámci experimentální části této diplomové práce, prokázaly rozdíly v interakci buněk linie myších fibroblastů s jednotlivými typy filmů.

Z hlediska míry adheze buněk NIH/3T3 bylo jak pomocí pozorování vzorků mikroskopem, tak z vybraných mikrofotografií (obrázek 50) patrné, že se buňky, v použité koncentraci buněk v médiu, dokázaly adherovat na povrchu všech typů připravených filmů. Nejvyšší počet adherovaných buněk byl v porovnání s ostatními typy testovaných PANI filmů včetně referenčního vzorku pozorován u filmů SDS H₂O a zejména u SDS HCl. V případě těchto filmů byla dobře patrná rychlá adheze buněk na povrchu s nízkým podílem dosud neadherovaných buněk. Relativně velkou plochu vzorku také zaujímaly buňky v případě filmů F-108 H₂O a F-108 HCl, podíl adherovaných buněk byl v tomto případě již výrazně nižší. Nejmenší povrch zaujímaly buňky na filmech připravených za stabilizace Tweenem 20 a PVP. V případě těchto filmů (zejména TWEEN H₂O a HCl) byl u buněk patrný nefyziologický tvar a vysoký podíl neadherovaných buněk. Z pohledu počtu buněk poskytoval nejméně vhodné podmínky pro adhezi film PVP H₂O.

Testy buněčné proliferace jak pomocí hodnocení mikrofotografií pořizovaných po stanovené době od osazení vzorků buněčnou suspenzí, tak pomocí kvantitativního hodnocení počtu buněk nacházejících se v kultivačních miskách po 72 hodinách kultivace potvrdily předpoklady slibné interakce buněk s filmy SDS HCl. Na sériích mikrofotografií, hodnotících proliferaci (obrázky 51 a 52), jsou zobrazeny stavy buněk po době kultivace 24 a 72 hodin od osazení misek s různými polyanilinovými filmy. Na těchto mikrofotografiích, můžeme pozorovat zcela odlišné počty adherovaných a proliferujících buněk na jednotlivých površích. Filmy TWEEN H₂O, TWEEN HCl, F-108 H₂O a F-108 HCl neumožňovaly buňkám v dané koncentraci zůstat životaschopnými a proliferovat. Naopak velmi dobře se z hlediska buněčné proliferace fibroblastů jeví filmy jak SDS H₂O, tak i SDS HCl. Při hodnocení proliferace po 24 hodinách bylo u filmů SDS HCl pozorovatelné větší množství buněk než v případě referenčního vzorku, na filmech SDS H₂O byl v porovnání s referencí počet buněk srovnatelný. Po 72 hodinách byla pozorována mohutná proliferační

aktivita u buněk adherovaných na filmech SDS H₂O a SDS HCl, kdy oba tyto typy filmů byly zcela pokryty vrstvou buněk. Výsledky kvantitativního vyhodnocení počtu buněk nacházejících se v kultivačních miskách po proliferaci trvající 72 hodin, uvedených v tabulce 7 následně potvrdily, že polyanilinové filmy typu SDS HCl umožňovaly buňkám linie myších fibroblastů proliferaci ve výrazně vyšším měřítku než ostatní typy PANI filmů. V porovnání s referenčním vzorkem (tkáňovým polystyrenem) bylo v případě tohoto filmu naměřeno trojnásobné množství buněk. Filmy SDS H₂O dosahovaly nižších počtů buněk než jejich analogy připravené v prostředí 1 M HCl. I tak lze označit schopnost proliferace buněk na těchto filmech za srovnatelnou s referenčním vzorkem. Vyhodnocení čitelné z mikrofotografií potvrdily také výsledky kvantitativního vyhodnocení počtu buněk na filmech připravených z disperzí stabilizovaných pomocí PVP a F-108. U těchto typů filmů byly naměřeny výrazně nižší počty buněk v porovnání s filmy SDS H₂O, SDS HCl či referencí. Počty buněk nacházejících se po kultivaci na ostatních typech polyanilinových filmů byly o jeden až o dva řády nižší než hodnoty reference.

Další série mikrofotografií (obrázky 53 a 54) zachycují chování buněk na polyanilinových filmech modifikovaných po dobu 1 hodiny roztokem bovinního sérového albuminu BSA. Na mikrofotografiích je zřejmá vyšší proliferační aktivita buněk, zejména u filmů TWEEN H₂O, TWEEN HCl, F-108 H₂O a F-108 HCl, které bez modifikace BSA proliferaci buněk neumožňovaly. Zároveň modifikace pomocí BSA umožnila provedení testu buněčné migrace u filmů SDS H₂O a SDS HCl, díky vytvoření dostatečně velké, souvislé vrstvy nacházející se uprostřed vzorku. Naopak velmi malá plocha vrstvy buněk byla pozorována u filmů TWEEN H₂O modifikovaných pomocí BSA. Filmy PVP H₂O, PVP HCl po modifikaci BSA podněcovaly u buněk vznik shluků buněk v nefyziologickém stavu.

Posledním testem buněčné aktivity prováděným v rámci experimentální části této práce bylo testování buněčné migrace pomocí zaznamenávání mikrofotografií po vytvoření rýhy do vrstvy buněk. Pro tento test bylo použito buněk kultivovaných na površích polyanilinových filmů SDS H₂O, SDS HCl a také na filmech TWEEN HCl BSA a F-108 HCl BSA. Na mikrofotografiích představených na obrázku 55 je možné pozorovat, že buňkám na filmech SDS H₂O, SDS HCl a na referenčním vzorku (misky z tkáňového polystyrenu) došlo k zacelení rýhy bez buněk již po 24 hodinách, přičemž byl stav buněk nadále konfluentní. Se stejným výsledkem proběhl test migrace buněk u filmů stabilizovaných SDS modifikovaných pomocí BSA. Nižší schopnost regenerace buněčné vrstvy vykazaly buňky v případě filmů F-108 HCl modifikovaných pomocí BSA. Migrace buněk do prostoru rýhy

probíhala výrazně pomaleji a k úplnému zacelení plochy bez buněk došlo až po 72 hodinách od provedení rýhy. Buňky kultivované na filmech TWEEN HCl modifikovaných BSA poté rýhu zacelit nedokázaly ani po uplynutí doby 72 hodin a prakticky vůbec nemigrovaly do prostoru rýhy.

Z hlediska biologické aktivity se tedy filmy SDS HCl jeví jako nejlepší z přípravených filmů. Na tomto povrchu byl po 72 hodinách proliferace naměřen nejvyšší počet buněk. Tento výsledek odpovídá předpokladu dobré interakce buněk s povrchy, které vykazují povrchovou energii filmů srovnatelnou s povrchovou energií vrstvy buněk použité linie. Navíc tyto filmy vykazují evidentně vhodnou míru hydrofility odvozenou z v porovnání s ostatními filmy poměrně vysokým kontaktním úhlem kapek vody. Tyto filmy vykazovaly také vysoké hodnoty měrné elektrické vodivosti, což je žádoucí pro potenciální aplikaci v oblasti biosenzorů či v tkáňovém inženýrství. Vysokou vodivost dále vykazovaly také filmy F-108 HCl a PVP HCl, u nich však vyšší hodnoty povrchové energie a hydrofility neposkytovaly buňkám prostředí vhodné pro přežití a proliferaci. Nevhodnost vysoké povrchové energie a silné hydrofility potvrdily také filmy TWEEN H₂O a TWEEN HCl, které na buňky NIH/3T3 působily silně toxicky. Dobrou biologickou aktivitu, potvrzenou druhým nejvyšším počtem buněk naměřeným po 72 hodinách proliferace (na úrovni referenční) měl také film SDS H₂O. Tomuto filmu byla naměřena také nejvyšší hydrofilita ze všech připravených filmů a naopak nejnižší povrchová energie. Vodivost filmů SDS H₂O byla relativně nízká, podobně jako u filmů PVP H₂O a F-108 H₂O, které však nevykazovaly dobrou proliferaci buněk. Z těchto dvou filmů však PVP H₂O umožňoval, pravděpodobně díky nízkým hodnotám povrchové energie blízkých se vrstvě adhezních buněk, lepší růst buněk za tvorby zřetelných buněčných shluků.

ZÁVĚR

V experimentální části této diplomové práce bylo připravováno osm různých typů polyanilinových filmů, lišících se typem stabilizátoru disperzní polymerace (PVP, SDS, Tween 20 a Pluronic F-108) a reakčním prostředím (voda nebo 1 M HCl). Filmy byly následně charakterizovány z hlediska materiálových vlastností, jako je tloušťka, měrná elektrická vodivost a povrchová energie. Vyhodnocována byla také jejich buněčná aktivita pomocí testování buněčné adheze, proliferace a migrace.

Z výsledků uvedených a diskutovaných v příslušných kapitolách stojí za připomenutí měrná elektrická vodivost připravených filmů. Jejich hodnoty se u filmů připravených v reakčním prostředí vody pohybují v řádu jednotek S/cm, konkrétně od 1,7 S/cm pro filmy F-108 H₂O do 6,1 S/cm pro filmy TWEEN H₂O. Filmy připravené v reakčním prostředí 1 M kyseliny chlorovodíkové obecně vykazovaly vyšší měrnou elektrickou vodivost v porovnání s jejich analogy, připravenými ve vodném prostředí. Hodnoty měrných elektrických vodivostí těchto filmů se pohybovaly od 8,4 S/cm filmů Tween HCl do hodnoty velmi zajímavých 30,4 S/cm, která byla změřena filmům SDS HCl.

Z hlediska buněčné aktivity byly prováděny testy buněčné adheze, proliferace a migrace pomocí osazování buňkami. Z výsledků těchto testů lze za typ polyanilinových filmů nejvíce vyhovující buňkám z hlediska míry adheze, proliferace a migrace, označit filmy SDS HCl. Ty se díky své vysoké elektrické vodivosti a v porovnání s ostatními typy připravovaných PANI filmů nízké povrchové energii a hydrofilitě, jeví jako nejvíce vhodné pro aplikace vyžadující rychlou adhezi velkého počtu buněk či vysokou proliferační aktivitu. Příkladem takové aplikace je možnost využití filmů v elektrodách elektrosenzitivních zařízení iniciujících kontrakce neuromuskulárního systému paralyzovaných či částečně ochrnutých svalů (Peckham a Knutson, 2005).

V započatých výzkumech polyanilinových filmů připravovaných za přítomnosti různých stabilizátorů se bude v laboratořích Univerzity Tomáše Bati i nadále pokračovat. Jako možné doplnění poznatků o daných filmech lze uvažovat měření stability elektrické vodivosti filmů za fyziologických podmínek (především pH) a dále měření měrné elektrické vodivosti u filmů připravených v reakčním prostředí různých kyselin o koncentraci vyšší než 1 mol/l. S ohledem na význam povrchových vlastností filmů na interakci s buňkami by bylo vhodné charakterizovat i morfologii jejich povrchu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ADVEX INSTRUMENTS. 2008. See System. [online]. Česká republika [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: <http://www.advex-instruments.cz/>

ÁGUILA-HERNÁNDEZ, Jacinto, Arturo TREJO a Blanca Estela GARCÍA-FLORES. Volumetric and Surface Tension Behavior of Aqueous Solutions of Polyvinylpyrrolidone in the Range (288 to 303) K. *Journal of Chemical & Engineering Data* [online]. 2011, vol. 56, issue 5, s. 2371-2378 [cit. 2015-04-07]. DOI: 10.1021/je101330b.

ALSALHI, M. Saleh et al., 2011. Recent Advances in Conjugated Polymers for Light Emitting Devices. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. Roč. 12, č. 12, s. 2036-2054 [cit. 2015-04-07]. ISSN 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms12032036.

AMARAL, P. F. F. et al., 2006. Cell surface characterization of *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682. *Yeast* [online]. Vol. 23, issue 12, s. 867-877 [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1002/yea.1405.

ANDREU, Y. et al., 2005. Sensor film for Vitamin C determination based on absorption properties of polyaniline. *Talanta* [online]. Roč. 65, č. 4, s. 1045-1051 [cit. 2015-04-15]. DOI: 10.1016/j.talanta.2004.08.036.

ARMES, S. et al., 1990. Aqueous colloidal dispersions of polyaniline formed by using poly(vinylpyridine)-based steric stabilizers. *Langmuir* [online]. Vol. 6, issue 12, s. 1745-1749 [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1021/la00102a007.

ASHASSI-SORKHABI, Habib a Moosa ES'HAGHI, 2013. Electro-Synthesis of Nano-Colloidal PANI/ND Composite for Enhancement of Corrosion-Protection Effect of PANI Coatings. *Journal of Materials Engineering and Performance*. 2013, vol. 22, issue 12, s. 3755-3761 [cit. 2015-04-11]. DOI: 10.1007/s11665-013-0638-4. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11665-013-0638-4>

ASHASSI-SORKHABI, Habib a Moosa ES'HAGHI, 2014. Corrosion protection of mild steel by nano-colloidal polyaniline/nanodiamond composite coating in NaCl solution. *Journal of Coatings Technology and Research*. 2014, vol. 11, issue 3, s. 371-380 [cit. 2015-04-11]. DOI: 10.1007/s11998-013-9546-7. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11998-013-9546-7>

BAI, Hua et al., 2007. Electrosynthesis of polypyrrole/sulfonated polyaniline composite films and their applications for ammonia gas sensing. *Polymer* [online]. Roč. 48, č. 14, s. 4015-4020 [cit. 2015-04-11]. DOI: 10.1016/j.polymer.2007.05.033.

BALDISSERA, A.F. a C.A. FERREIRA. 2012. Coatings based on electronic conducting polymers for corrosion protection of metals. *Progress in Organic Coatings* [online]. Vol. 75, issue 3, s. 241-247 [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1016/j.porgcoat.2012.05.004.

BHADRA, Sambhu et al., 2009. Progress in preparation, processing and applications of polyaniline. *Progress in Polymer Science* [online]. Roč. 34, č. 8, s. 783-810 [cit. 2015-04-11]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2009.04.003.

BLINOVA, Natalia et al., 2005. The chemical and colloidal stability of polyaniline dispersions. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2005, Roč. 88, č. 3, s. 428-434 [cit. 2015-04-11]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2004.11.014.

BLINOVA, Natalia et al., 2006.. Polyaniline prepared in solutions of phosphoric acid: Powders, thin films, and colloidal dispersions. *Polymer* [online]. Vol. 47, issue 1, s. 42-48 [cit. 2015-03-12]. DOI: 10.1016/j.polymer.2005.10.145.

BOWMAN, D. a B.R. MATTES, 2005. Conductive Fibre Prepared From Ultra-High Molecular Weight Polyaniline for Smart Fabric and Interactive Textile Applications. *Synthetic Metals* [online]. 2005, vol. 154, s. 29-32 [cit. 2015-04-11]. DOI: 10.1016/j.synthmet.2005.07.017.

BRUKER. 2014. Dimension Icon. [online]. Německo [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: <http://www.bruker.com/about-us.html>

BÜHLER, Volker, 2005. *Polyvinylpyrrolidone excipients for pharmaceuticals: povidone, crospovidone, and copovidone*. New York: Springer, 254 s. ISBN 35-402-3412-8.

CEPLANT. 2015. *3D profilometr Bruker* [online]. [cit. 2015-04-15]. Dostupné z: http://ceplant.cz/research/equipment/analytics/3d_profilometer/

CORTÉS, M. Teresa a Juan C. MORENO, 2003. Artificial muscles based on conducting polymers. *The scientific e-only polymer journal* [online]. Č. 41 [cit. 2015-03-24]. ISSN 1618-7229. Dostupné z: http://www.e-polymers.org/journal/papers/cortes_200803.pdf

CRUZ-SILVA, Rodolfo et al., 2006. Enzymatic synthesis of colloidal polyaniline particles. *Polymer* [online]. Roč. 47, č. 5, s. 1563-1568 [cit. 2015-04-11]. DOI: 10.1016/j.polymer.2005.12.082.

CRUZ-SILVA, Rodolfo et al., 2007. Enzymatic synthesis of pH-responsive polyaniline colloids by using chitosan as steric stabilizer. *European Polymer Journal* [online]. Roč. 43, č. 8, s. 3471-3479 [cit. 2015-04-11]. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2007.05.027.

DAVIS, M. John, 2002. *Basic Cell Culture: A Practical Approach*. 2. vyd. New York: Oxford University Press, 381 s. ISBN 01-996-3853-5.

DE BARROS, R.A., C.R. MARTINS a W.M. DE AZEVEDO, 2005. Writing with conducting polymer. *Synthetic Metals* [online]. Roč. 155, č. 1, s. 35-38 [cit. 2015-04-11]. DOI: 10.1016/j.synthmet.2005.05.014.

DENNISON, Clive. 2002. *A guide to protein isolation*. New York: Kluwer Academic, xii, 186 p. ISBN 0306468689.

DESHPANDE, N. G. Et al., 2009. Room-temperature gas sensing studies of polyaniline thin films deposited on different substrates. *Smart Materials and Structures* [online]. Vol. 18, issue 9 [cit. 2015-03-11]. DOI: 10.1088/0964-1726/18/9/095010.

DHAND, Chetna et al., 2007. Cholesterol biosensor based on electrophoretically deposited conducting polymer film derived from nano-structured polyaniline colloidal suspension. *Analytica Chimica Acta* [online]. Roč. 602, č. 2, s. 244-251 [cit. 2015-04-11]. DOI: 10.1016/j.aca.2007.09.028.

DHAND, Chetna et al., 2011. Recent advances in polyaniline based biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. Vol. 26, issue 6, s. 2811-2821 [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1016/j.bios.2010.10.017.

DRÁPALA, Jaromír a Miroslav KURSA, 2012. *Elektrotechnické materiály*. 1. vyd. Ostrava: VŠB – Technická univerzita Ostrava, 439 s. ISBN 978-80-248-2570-0.

EXNEROVÁ, Milena et al., 2012. ÚPRAVA VODIVÉHO POLYMERU, POLYANILINU, PRO BIOMEDICINÁLNÍ APLIKACE. *Chemické listy*. 2012, č. 106, s. 554-567 [cit. 2015-03-24]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_06_554-567.pdf

Final Report on the Safety Assessment of Sodium Lauryl Sulfate and Ammonium Lauryl Sulfate. 1983. *International Journal of Toxicology* [online]. Vol. 2, issue 7, s. 127-181 [cit. 2015-04-07]. DOI: 10.3109/10915818309142005.

FRESHNEY, R. Ian, 2005. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 5. vyd. Hoboken, N.J.: Wiley-Liss, 642 s. ISBN 04-714-5329-3.

FREUND, Michael S. a Bhavana DEORE, 2007. *Self-doped conducting polymers*. West Sussex: John Willey, 326 s. ISBN 978-0-470-02969-5.

FUSEK, M., KÁŠ, J., RUML, T., 2008. Bioléčiva [online]. Vydání první. Praha: Vydavatelství VŠCHT [cit. 2015-04-20]. ISBN: 978-80-7080-678-4. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-978-80-7080-678-4/pdf/049.pdf

GAO, Yan-Sha, Jing-Kun XU, Li-Min LU, Li-Ping WU, Kai-Xin ZHANG, Tao NIE, Xiao-Fei ZHU a Yao WU, 2014. Overoxidized polypyrrole/graphene nanocomposite with good electrochemical performance as novel electrode material for the detection of adenine and guanine. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. Vol. 62, s. 261-267 [cit. 2015-04-11]. DOI: 10.1016/j.bios.2014.06.044. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566314004576>

GOSPODINOVA, N. et al., 1997. A new route to polyaniline composites. *Polymer* [online]. Vol. 38, issue 3, s. 743-746 [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1016/s0032-3861(96)00698-2.

GÜIZADO-RODRÍGUEZ et al., 2010. Photosensitive polyaniline colloidal particles prepared by enzymatic polymerization using the azopolymer DMA-co-AZAAM as stabilizer. *Materials Chemistry and Physics* [online]. Roč. 124, č. 1, s. 389-394 [cit. 2015-04-11]. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2010.06.052.

HEEGER, J. Alan, 2001. Semiconducting and metallic polymers: the fourth generation of polymeric materials. *Synthetic Metals* [online]. HEEGER, Alan J. Semiconducting and metallic polymers: the fourth generation of polymeric materials. *Synthetic Metals* [online]. Vol. 125, issue 1, s. 23-42 [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1016/s0379-6779(01)00509-4.

HINO, Tetsuo, S. TANIGUCHI a N. KURAMOTO, 2005. Syntheses of conductive adhesives based on epoxy resin and polyanilines by using N-tert-butyl-5-methylisoxazolium perchlorate as a thermally latent curing reagent. *Journal of Polymer Science Part A: Poly-*

mer Chemistry [online]. Roč. 44, č. 2, s. 718-726 [cit. 2015-04-11]. DOI: 10.1002/pola.21085.

HONZL, J. a M. TLUSTĚÁKOVÁ, 1968. Polyaniline compounds. II. The linear oligoaniline derivatives tri-, tetra-, and hexaanilinobenzene and their conductive complexes. *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia* [online]. Roč. 22, č. 1, s. 451-462 [cit. 2015-04-11]. ISSN 04492994. DOI: 10.1002/polc.5070220137.

HOSODA, Masakazu, T. HINO a N. KURAMOTO, 2007. Facile preparation of conductive paint made with polyaniline/dodecylbenzenesulfonic acid dispersion and poly(methyl methacrylate). *Polymer International* [online]. Roč. 56, č. 11, s. 1448-1455 [cit. 2015-04-11]. DOI: 10.1002/pi.2304.

HSIAO, Chun-Wen et al., 2013.. Electrical coupling of isolated cardiomyocyte clusters grown on aligned conductive nanofibrous meshes for their synchronized beating. *Biomaterials*[online]. Vol. 34, issue 4, s. 1063-1072 [cit. 2015-04-11]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.10.065.

HUMPOLÍČEK, Petr et al., 2012a. Proliferace buněk na vodivém polymeru, polyanilinu. *Chemické listy* [online]. Č. 106, s. 380-383 [cit. 2015-04-11]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_05_380-383.pdf

HUMPOLÍČEK, Petr et al., 2012b. Biocompatibility of polyaniline. *Synthetic Metals* [online]. Roč. 162, s. 2012b 722-727 [cit. 2015-04-01]. ISSN 03796779. DOI: 10.1016/j.synthmet.2012.02.024.

CHANDRASEKHAR, Prasanna, 1999. *Conducting Polymers, Fundamentals and Applications: A Practical Approach*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 718 s. ISBN 0-7923-8564-0.

CHOI, H.J. et al., 1997. Electrorheological characterization of polyaniline dispersions. *European Polymer Journal* [online]. Roč. 33, č. 5, s. 699-703 [cit. 2015-04-15]. DOI: 10.1016/S0014-3057(96)00225-X.

IRIMIA-VLADU, Mihai a Jeffrey W. FERGUS, 2006. Suitability of emeraldine base polyaniline-PVA composite film for carbon dioxide sensing. *Synthetic Metals* [online]. Roč. 156, s. 1401-1407 [cit. 2015-04-11]. DOI: 10.1016/j.synthmet.2006.11.005.

JANDA, Pavel a Jan WEBER, 1998. Mikroskopie rastrovací sondou: Nové mikroskopické techniky. *Vesmír* [online]. Č. 77, s. 381-384 [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: <http://casopis.vesmir.cz/clanek/mikroskopie-rastrovaci-sondou>

KAMALESH, Sengothi et al., 2000. Biocompatibility of electroactive polymers in tissues. *John Wiley & Sons, Inc. Journal of Biomedical Materials Research* [online]. Roč. 52, č. 3, s. 467-478 [cit. 2015-04-1]. ISSN 0021-9304. DOI: 10.1002/1097-4636(20001205)52:3<467::AID-JBM4>3.0.CO;2-6.

KANETO, Keiichi et al., 1983. Characteristics of Electro-Optic Device Using Conducting Polymers, Polythiophene and Polypyrrole Films. *Japanese Journal of Applied Physics* [online]. Roč. 22, č. 7 [cit. 2015-04-07]. ISSN 0021-4922. DOI: 10.1143/JJAP.22.L412.

KANG, En-Tang et al., 1998. Polyaniline: A polymer with many interesting intrinsic redox states. *Progress in Polymer Science* [online]. Roč. 23, č. 2, s. 277-324 [cit. 2015-04-11]. ISSN 00796700. DOI: 10.1016/S0079-6700(97)00030-0.

KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ, 2005. *Laboratorní techniky biochemie*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 258 s. ISBN 80-7080-586-2.

KEDROŇOVÁ, Eva, 2012. Měření kontaktního úhlu sedící kapky jako metoda charakterizace povrchu. In: *CHEMPOINT vědci pro průmysl a praxi* [online]. Brno: Masarykova univerzita, [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: <http://www.chempoint.cz/mereni-kontaktniho-uhlu-sedici-kapky-jako-metoda-charakterizace-povrchu>

KIM, Byoung-Jin et al., 2001. Synthesis and characterization of polyaniline nanoparticles in SDS micellar solutions. *Synthetic Metals* [online]. Vol. 122, issue 2, s. 297-304 [cit. 2015-04-02]. DOI: 10.1016/s0379-6779(00)00304-0.

KIM, G. T. et al., 1999. Nonswitching van der Pauw technique using two different modulating frequencies. *Review of Scientific Instruments* [online]. Vol. 70, issue 4 [cit. 2015-03-11]. DOI: 10.1063/1.1149738.

KIM, Jeong-Hwan et al., 2000. Conductimetric membrane strip immunosensor with polyaniline-bound gold colloids as signal generator. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. Roč. 14, č. 12, s. 907-915 [cit. 2015-03-24]. ISSN 09565663. DOI: 10.1016/S0956-5663(99)00063-9.

KOTHEKAR, Shrinivas C., et al., 2007. Comparative Analysis of the Properties of Tween-20, Tween-60, Tween-80, Arlacel-60, and Arlacel-80. *Journal of Dispersion Science*

and Technology [online]. Vol. 28, issue 3, s. 477-484 [cit. 2015-04-11]. DOI: 10.1080/01932690601108045.

KOVAŘÍKOVÁ, P. et al., 2014. Metody studia buněčné migrace a invazivity nádorových buněk: Methods for Studying Tumor Cell Migration and Invasiveness. *Klinická onkologie: časopis České a Slovenské onkologické společnosti*. Vyd: Supplementum 1, s. 20-27. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/files/klinicka-onkologie/186/4471.pdf>

KUBÍNEK, Roman, 2003. *Mikroskopie skenující sondou*. 1. vyd. Olomouc: Vydavatelství Univerzity Palackého, 145 s. ISBN 80-244-0602-0.

LI, Zuopeng et al., 2009. Facile electropolymerized-PANI as counter electrode for low cost dye-sensitized solar cell. *Electrochemistry Communications* [online]. Vol. 11, issue 9, s. 1768-1771 [cit. 2015-03-11]. DOI: 10.1016/j.elecom.2009.07.018.

LIU, Xiaoli et al., 2013. Poly(N -vinylpyrrolidone)-Modified Surfaces for Biomedical Applications. *Macromolecular Bioscience* [online]. Roč. 13, č. 2, s. 147-154 [cit. 2015-04-07]. ISSN 16165187. DOI: 10.1002/mabi.201200269.

MANJUNATHA, H., G. S. et al. 2010. Electrode materials for aqueous rechargeable lithium batteries. *Journal of Solid State Electrochemistry* [online]. Vol. 15, issue 3, s. 431-445 [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.14711/thesis-b1333522.

MARRAKCHI, S. a H.I. MAIBACH. 2006. Sodium Lauryl Sulfate-Induced Irritation in the Human Face: Regional and Age-Related Differences. *Skin Pharmacology and Physiology* [online]. Vol. 19, issue 3, s. 177-180 [cit. 2015-04-07]. DOI: 10.1159/000093112.

MAURO, Anna De Girolamo et al. 2011. Immacolata Angelica GRIMALDI, Fulvia VILLANI a Carla MINARINI. Analysis of the performances of organic light-emitting devices with a doped or an undoped polyaniline-poly(4-styrenesulfonate) hole-injection layer. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. Vol. 122, issue 6, s. 3618-3623 [cit. 2015-03-11]. DOI: 10.1002/app.34773.

MIZUTANI, Fumio a Michihiko ASAI. 1988. Ferrocene-mediated enzyme electrode for glucose with the use of conducting polymer support. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* [online]. Vol. 61, issue 12, s. 4458-4460 [cit. 2015-03-31]. DOI: 10.1246/bcsj.61.4458.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* [online]. 1983, vol. 65, 1-2, s. 55-63 [cit. 2015-04-01]. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

NACE, Vaughn Mark, 1996. *Nonionic surfactants: polyoxyalkylene block copolymers*. New York: M. Dekker, X, 266 p. ISBN 0824797000.

NAMBIAR, Shruti a John T.W. YEOW. 2011. Conductive polymer-based sensors for biomedical applications. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. Vol. 26, issue 5, s. 1825-1832 [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.4053/er309-091102.

NEKRASOV, A. A. a A. V. VANNIKOV, 2011.. Spectroelectrochemical processes in polyaniline films prepared by different methods. *Russian Journal of Electrochemistry* [online]. Vol. 47, issue 1, s. 1-14 [cit. 2015-03-12]. DOI: 10.1134/s1023193511010137.

PARK, SooYeon et al. 2006. A nanometer gaped gas sensor with the colloid Pani. In: *2006 IEEE Nanotechnology Materials and Devices Conference* [online]. [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1109/nmdc.2006.4388822.

PECKHAM, P. Hunter a Jayme S. KNUTSON, 2005. FUNCTIONAL ELECTRICAL STIMULATION FOR NEUROMUSCULAR APPLICATIONS*. *Annual Review of Biomedical Engineering* [online]. Vol. 7, issue 1, s. 327-360 [cit. 2015-05-04]. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.6.040803.140103.

PROKEŠ, Jan a Jaroslav STEJSKAL. 2004. Polyaniline prepared in the presence of various acids. *Polymer Degradation and Stability* [online]. Vol. 86, issue 1, s. 187-195 [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2004.04.012.

PROKEŠ, Jan, J. STEJSKAL a M. OMASTOVÁ, 2001. Polyanilin a polypyrrol - dva představitelé vodivých polymerů. *Chemické listy* [online]. Č. 95, s. 380-383 [cit. 2015-04-11]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/archiv/2001/08-PDF/484-492.pdf>

PROKEŠ, Jan, S. NEŠPŮREK a J. STEJSKAL, 2001. Vodivé polymery, inteligentní materiály pro nové století. *Vesmír* [online]. Č. 80, s. 35-38 [cit. 2015-04-11]. ISSN 1214-4029. Dostupné z: <http://www.vesmir.cz/clanek/vodive-polymery>

PROKOPOVÁ, Irena, 2007. *Makromolekulární chemie*. 2. vyd. Praha: VŠCHT Praha, s. 13. ISBN 978-80-7080-662-3.

RAO, S a Jan LEJA. 2004. *Surface chemistry of froth flotation*. 2nd ed. /. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2. v. (xxxii, 744, 12 p.). ISBN 03064817902.

RIEDE, Andrea, Martin HELMSTEDT, Irina SAPURINA a Jaroslav STEJSKAL, 2002. In Situ Polymerized Polyaniline Films. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. Vol. 248, issue 2, s. 413-418 [cit. 2015-03-11]. DOI: 10.1006/jcis.2001.8197.

ROSINA, Jozef. 2013. *Biofyzika: pro zdravotnické a biomedicínské obory*. Vyd. 1. Praha: Grada, 224 s. ISBN 978-80-247-4237-3.

RUBINSON, Judith F. a Harry B. MARK, 2003. *Conducting Polymers and Polymer Electrolytes: From Biology to Photovoltaics*. Washington: American Chemical Society, 222 s. ISBN 0-8412-3770-0.

RUCINSKA, A, M ROSZCZYK a T GABRYELAK. 2008. Cytotoxicity of the isoflavone genistein in NIH 3T3 cells. *Cell Biology International* [online]. Roč. 32, č. 8, s. 1019-1023 [cit. 2013-05-22]. DOI: 10.1016/j.cellbi.2008.04.004.

SCUDIERO, A. Dominic et al., 1988. Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using human and Other Tumor Cell Lines. *Cancer Research* [online]. Roč. 48, č. 17, s. 4827-4833 [cit. 2015-04-11]. ISSN 0008-5472. Dostupné z: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/48/17/4827.full.pdf>

SHIRAKAWA, Hideki et al., 1977. Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives of polyacetylene, (CH) x. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* [online]. 1977, issue 16 [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1039/c39770000578.

SIGMA-ALDRICH Co., 2003. Product Information: Tween®20 [online]. [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/p2287pis.pdf

SIGMA-ALDRICH Co., 2010. Fundamental Techniques in Cell Culture. A Laboratory Handbook [online]. [cit. 2015-04-15]. Dostupné z: http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma-Aldrich/Instructions/1/ecacc_handbook.Par.0001.File.tmp/ecacc_handbook.pdf

SIGMA-ALDRICH Co., 2015a. Bezpečnostní list: Polyvinylpyrrolidone [online]. [cit. 2015-04-11]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=CZ&language>

e=cs&productNumber=PVP360&brand=SIGMA&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsigma%2Fpvp360%3Fflang%3Den

SIGMA-ALDRICH Co., 2015b. Bezpečnostní list: Sodium Dodecyl Sulfate [online]. [cit. 2015-04-11]. Dostupné z:

<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=CZ&language=cs&productNumber=862010&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2F862010%3Fflang%3Den>

SIGMA-ALDRICH Co., 2015c. Bezpečnostní list: Tween® 20 [online]. [cit. 2015-04-11]. Dostupné z:

<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=CZ&language=cs&productNumber=P9416&brand=SIGMA&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fsigma%2Fp9416%3Fflang%3Den>

SIGMA-ALDRICH Co., 2015d. Bezpečnostní list: Poly(ethylene glycol)-*block*-poly(propylene glycol)-*block*-poly(ethylene glycol) [online]. [cit. 2015-04-11]. Dostupné z:

<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=CZ&language=cs&productNumber=542342&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Faldrich%2F542342%3Fflang%3Den>

SLANINOVÁ, Iva et al., 2008. Fluorescenční vlastnosti kvartérních benzo[c]fenanthridinových alkaloidů a jejich využití jako supravitálních DNA sond. *Chemické listy* [online]. Č. 102, s. 427-433 [cit. 2015-04-11]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2008_06_427-433.pdf

SMELA, E. 2003. Conjugated Polymer Actuators for Biomedical Applications. *Advanced Materials* [online]. Vol. 15, issue 6, s. 481-494 [cit. 2015-03-31]. DOI: 10.1002/adma.200390113.

STEJSKAL, Jaroslav a Irina SAPURINA, 2005. Polyaniline: Thin films and colloidal dispersions (IUPAC Technical Report). *International Union of Pure and Applied Chemistry* [online]. Roč. 77, č. 5, s. 815-826 [cit. 2015-04-11]. ISSN 0033-4545. DOI: 10.1351/pac200577050815.

STEJSKAL, Jaroslav a R. G. GILBERT, 2002. Polyaniline. Preparation of a conducting polymer (IUPAC Technical Report). *International Union of Pure and Applied Chemistry*

[online]. Roč. 74, č. 5, s. 857-867 [cit. 2015-04-11]. ISSN 0033-4545. DOI: 10.1351/pac200274050857.

STEJSKAL, Jaroslav et al., 1996. Polyaniline Dispersions. 6. † Stabilization by Colloidal Silica Particles. *Macromolecules* [online]. Roč. 29, č. 21, s. 6814-6819 [cit. 2015-04-11]. DOI: 10.1021/ma9603903. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma9603903>.

STEJSKAL, Jaroslav et al., 1998. The effect of polymerization temperature on molecular weight, crystallinity, and electrical conductivity of polyaniline. *Synthetic Metals* [online]. Vol. 96, issue 1, s. 55-61 [cit. 2015-04-28]. DOI: 10.1016/s0379-6779(98)00064-2.

STEJSKAL, Jaroslav et al., 1999a. Polyaniline dispersions 8. The control of particle morphology. *Polymer* [online]. Vol. 40, issue 10, s. 177-188 [cit. 2015-03-12]. DOI: 10.1007/978-94-011-5512-0_12.

STEJSKAL, Jaroslav et al., 1999b. In-situ polymerized polyaniline films. *Synthetic Metals* [online]. Vol. 105, issue 3, s. 195-202 [cit. 2015-03-11]. DOI: 10.1016/s0379-6779(99)00105-8.

STEJSKAL, Jaroslav, P. KRATOCHVÍL a M. HELMSTEDT, 1996. Polyaniline Dispersions. 5. Poly(vinylalcohol) and Poly(N-vinylpyrrolidone) as Steric Stabilizers. *Langmuir* [online]. Roč. 12, č. 14, s. 3389-3392 [cit. 2015-04-11]. DOI: 10.1021/la9506483.

SVIRSKIS, Darren et al. 2010. Electrochemically controlled drug delivery based on intrinsically conducting polymers. *Journal of Controlled Release* [online]. Vol. 146, issue 1, s. 6-15 [cit. 2015-03-31]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.03.023.

SVOBODA, Emanuel. 1998. *Přehled středoškolské fyziky*. 3. vyd. Praha: Prometheus, 497 s. ISBN 8071961167.

TALAIE, A. et al., 2000. Dynamic sensing using intelligent composite: an investigation to development of new pH sensors and electrochromic devices. *Thin Solid Films* [online]. Roč. 363, s. 163-166 cit. 2015-04-11]. DOI: 10.1016/S0040-6090(99)00987-6.

Toxicological evaluation of some food additives including anticaking agents, antimicrobials, antioxidants, emulsifiers and thickening agents. Geneva: World Health Organization, 1974, 520, xix p. WHO food additives series, 5. ISBN 9241660058.

TRCHOVÁ, M., I. ŠEDĚNKOVÁ a J. STEJSKAL. 2005. In-situ polymerized polyaniline films 6. FTIR spectroscopic study of aniline polymerisation. *Synthetic Metals* [online]. Vol. 154, 1-3, s. 1-4 [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1016/j.synthmet.2005.07.001.

VAN DER PAUW L. J. 1958. A method of measuring the resistivity and Hall coefficient on lamellae of arbitrary shape. *Philips Res. Repts.* 1958, **13**, 1-9, (No. 1).

VEJRAŽKA, Martin, 2008. *Buněčné kultury. Molekulární medicína a biotechnologie: soubor přednášek*. 1. vyd. Praha: Galén pro 1. LF UK v Praze, s. 81-100. ISBN 978-807262-535-2.

VETUSHKA, Aliaksei et al., 2013. *Lokální vodivostní měření jemných nanostruktur pomocí mikroskopie atomárních sil*. Praha: Fyzikální ústav AV ČR, 2013.

VORBURGER, T. V. et al., 2007. Comparison of optical and stylus methods for measurement of surface texture. *The International Journal of Advanced Manufacturing Technology*[online]. Vol. 33, 1-2, s. 110-118 [cit. 2015-04-15]. DOI: 10.1007/s00170-007-0953-8.

WALLACE, G. Gordon et al., 2003. *Conductive Electroactive Polymers: Intelligent Materials Systems*. 2nd ed. /. Boca Raton: CRC Press LLC, 237 s. ISBN 1-58716-127-3.

WANG, C. H. et al., 1999. In-vivo tissue response to polyaniline. *Synthetic Metals* [online]. Roč. 102, č. 1-3, s. 1313-1314 [cit. 2015-04-01]. ISSN 03796779. DOI: 10.1016/S0379-6779(98)01006-6.

WANG, Hua-jie et al., 2008. Characterization of Nanostructure and Cell Compatibility of Polyaniline Films with Different Dopant Acids. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. Vol. 112, issue 9, s. 2671-2677 [cit. 2015-04-11]. DOI: 10.1021/jp0750957. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp0750957>

Web of Sciece. © 2015 THOMSON REUTERS. *Web of Sciece* [online]. 2015 [cit. 2015-03-24]. Dostupné z: webofknowledge.com

WILLIAMS, D. Franklyn, 1986. *Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials*. New York: Elsevier, 72 s. ISBN 04-444-2858-5

YU, Lei, et al., 2003. Preparation of aqueous polyaniline dispersions by micellar-aided polymerization. *Journal of Applied Polymer Science* [online]. Vol. 88, issue 6, s. 1550-1555 [cit. 2015-03-24]. DOI: 10.1002/app.12127.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AH	Anilin hydrochlorid
AFM	Mikroskopie atomárních sil
APS	Amonium persulfát
BSA	Bovine Serum Albumine
DBSA	Dodecylbenzensulfonové kyselina
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
eV	Elektronvolt
HCl	Kyselina chlorovodíková
HPC	hydroxypropylcelulóza
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
mN/m	Milnewton na metr, jednotka povrchové energie
PANI	Polyanilin
PBS	Phosphate – bufferes saline (pufrovanýfyziologický rozrok)
PVP	Polyvinylpyrrolidon
rpm	Počet otáček za minutu
S/cm	Siemens na centimetr, jednotka měrné elektrické vodivosti
SDS	Dodecylsíran sodný
UTB	Univerzita Tomáše Bati

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – obecný vzorec polymeru (vytvořeno.....	12
Obrázek 2 – strukturní vzorce hlavních zástupců vodivých polymerů, v případě polyanilinu opakující se anilinová konstituční jednotka (Prokeš, Stejskal a Omastová, 2001)	13
Obrázek 3 – časový vývoj počtu publikací o polyanilinu (Web of Science, 2015).....	16
Obrázek 4 – fotografie průběhu operačního zavedení cévní spojky (Smela, 2003)	17
Obrázek 5 – oxidační formy polyanilinu (Prokeš, Stejskal, Omastová, 2001).....	19
Obrázek 6 – strukturní vzorec anilin hydrochloridu (vlevo) a amonium persulfátu (vpravo), (vytvořeno v programu ChemSketch)	20
Obrázek 7 – a) adsorpce oligomeru na povrch, b) růst řetězce PANI, tvorba jádra, c) růst dalších řetězců PANI v důsledku mechanismu automatického zrychlování polymerace (Stejskal a Sapurina, 2005)	23
Obrázek 8 – a) sorpce oligomeru na stabilizátor, b) stimulace růstu řetězce, produkce jádra, c) formování koloidní částice (Stejskal a Sapurina, 2005).....	24
Obrázek 9 - závislost molární koncentrace polyanilinu na molární koncentraci anilin hydrochloridu v nemíchané (○) a míchané (●) reakční směsi při použití stabilizátoru polyvinylpyrrolidonu (Stejskal a Kratochvíl, 1996).....	26
Obrázek 10 - závislost molární koncentrace polyanilinu na molární koncentraci anilin hydrochloridu v nemíchané (○) a míchané (●) reakční směsi při použití stabilizátoru polyvinylalkoholu (Stejskal a Kratochvíl, 1996).....	26
Obrázek 11 – detail kulovitých a korálovitých částice polyanilinové disperze stabilizované hydroxypropylcelulózou (Stejskal et al., 1999a).....	28
Obrázek 12 – fotografie a), b) a c) zobrazují částice formované disperzní polymerací anilin hydrochloridu při a) 0°C; b) 20°C; c) 40°C. Fotografie d), e) a f) zobrazují produkty disperzní polymerace anilin hydrochloridu při použití mediátoru <i>p</i> -fenylendiaminu o koncentraci d) 2×10^{-5} ; e) 2×10^{-4} ; f) 2×10^{-3} při 0°C (Stejskal et al., 1999a)	29
Obrázek 13 – vlevo závislost tloušťky PANI filmu na době polymerace (Riede et al., 2002), vpravo závislost absorbance při ($\lambda = 400$ nm) na tloušťce filmu (Stejskal et al., 1999).....	31
Obrázek 14 – závislost tloušťky PANI filmu na době polymerace (a – stabilizátor HPC, b - stabilizátor PVP) (Riede et al., 2002).....	31

Obrázek 15 – závislost měrné elektické vodivosti na tloušťce konkrétních filmů během polymerace (Riede et al., 2002).....	32
Obrázek 16 – fotografie fluorescenční mikroskopie pořízené 24 h od nasazení, a) buňky linie PC-12 na čistém referenčním vzorku, b) proliferující buňky na vzorku opatřeném PANI filmem. Zvětšení 40× (Wang et al., 2010).....	35
Obrázek 17 – mikrografie zobrazující morfologii buněk rostoucích na filmu tvořeném polyanilinovou bází (vlevo) a na tkáňovém polystyrenu (vpravo), (Humpolíček et al., 2012a).....	36
Obrázek 18 – mikrofotografie buněk linie NIH/3T3 adherovaných na testovaném povrchu po 1 hodině od osázení. A) Reference (polystyrenová miska), B) PANI-S, C) PANI-B (Humpolíček et al., 2015).....	38
Obrázek 19 – mikrofotografie buněk linie NIH/3T3 po 24 hodinách od osázení. A) Reference (polystyrenová miska), B) PANI-S, C) PANI-B (Humpolíček et al., 2015).....	39
Obrázek 20 – mikrofotografie čtyř stádií experimentu Scratch assay. A) do monovrstvy nádorových buněk MCF-7 je špičkou pipety vytvořena rýha, B) stejné místo po 24 hodinách – buňky na okraji rýhy polarizují a migrují směrem k jejímu středu ve snaze ji zacelit, C) stav po 72 hod, D) stav po 120 hod, rýha je zcela zacelena migrujícími buňkami. Zvětšení 40× (Kovaříková et al., 2014).....	40
Obrázek 21 – SEE Systém pro měření kontaktního úhlu sedící kapky použitý v praktické části této práce	43
Obrázek 22 –AFM mikroskop Dimension ICON (Bruker, online).....	44
Obrázek 23 – AFM mikrofotografie zobrazující drsnost a vodivost polyanilinových filmů (PANI-S a PANI-B). A1) PANI-S drsnost, A2) PANI-S vodivost, B1) PANI-B drsnost, B2) PANI-B vodivost (Humpolíček et al., 2015).....	45
Obrázek 24 – závislost absorbance na vlnové délce (absorpční spektrum) PANI filmu ve formě emeraldinu připraveného při různých teplotách výchozí reakční směsi (Stejskal et al., 1999b).....	46
Obrázek 25 – detail pohyblivého stolku se vzorkem a nehybným měřicím hrotem (Ceplant, 2015).....	47
Obrázek 26 – doporučený tvar vzorků a umístění elektrod pro měření rezistivity čtyřbodovou metodou (van der Pauw, 1958)	48
Obrázek 27 – vzorec PVP (Sigma-Aldrich Co., 2015a).....	51

Obrázek 28 – struktura dodecylsíranu sodného (Sigma-Aldrich Co., 2015b).....	51
Obrázek 29 – závislost povrchového napětí vodného roztoku SDS na koncentraci (Rao a Leja, 2004)	52
Obrázek 30 – strukturní vzorec Tweenu 20 (Sigma-Aldrich Co., 2015).....	53
Obrázek 31 – strukturní vzorec Pluronicu F-108 (Sigma-Aldrich Co., 2015d).	53
Obrázek 32 – polyanilinová disperze vzniklá polymerací v polystyrenových a skleněných Petriho miskách. Po výplachu disperze zůstává na substrátech vrstva PANi filmu	54
Obrázek 33 – barevné změny reakční směsi složené z roztoků AH a APS; vlevo 0,2 M roztok AH; uprostřed 10 s po přidání roztoku APS; vpravo 20 s po přidání roztoku APS	55
Obrázek 34 – vzorky PANI filmů připravené na skleněném a polystyrenovém substrátu.....	56
Obrázek 35 – hrotový profilometr DektaxXT TM se vzorkem PANI filmu na PP folii	56
Obrázek 36 – detail vzorku filmu umístěného na posuvném stolku, HD kamera umístěna vpravo nahoře.....	57
Obrázek 37 – fotografie aparatury pro měření konduktivity PANI filmu čtyřbodovou metodou (osobní počítač, zdroj, scanner, elektrometr a stůl s elektrodami)	58
Obrázek 38 – umístění vzorku podložního skla s polyanilinovým filmem na měřícím stolku s elektrodami při měření konduktivity.....	59
Obrázek 39 – příklad chování kapky vody na filmu připraveného z disperze za přítomnosti SDS a Pluronicu F-108 v prostředí 1 M HCl.....	59
Obrázek 40 – suspenze buněk v médiu kultivované v inkubátoru	62
Obrázek 41 – průtokový cytometr BD FACSCanto TM II.....	63
Obrázek 42 – micelární směs SDS a AH v 1 M HCl.....	65
Obrázek 43 – polymerace polyanilinu v 1 M HCl za přítomnosti SDS (doba polymerace 1, 3 a 15 minut)	65
Obrázek 44 – PANI film připravený na polystyrenovém substrátu, stabilizátor SDS, reakční prostředí HCl	66
Obrázek 45 – PANI filmy na polypropylenové folii – vlevo SDS HCl, vpravo SDS H ₂ O.....	66
Obrázek 46 – příklad 2D křivky profilu povrchu filmu připraveném za použití stabilizátoru Tween 20 v prostředí 1 M HCl s vyhodnocením tloušťky vrstvy	67

Obrázek 47 – sloupcový graf znázorňující hodnoty profilometricky naměřených tloušťek jednotlivých typů polyanilinových filmů.....	68
Obrázek 48 – sloupcový graf závislosti měrné elektrické vodivosti na typu filmu.....	70
Obrázek 49 – mikroskop Olympus XI 81 se stolním PC.....	72
Obrázek 50 – adheze NIH/3T3 buněk na testovaných filmech	73
Obrázek 51 – proliferace NIH/3T3 buněk na testovaných filmech bez modifikace pomocí BSA (po 24 hodinách kultivace)	75
Obrázek 52 – proliferace NIH/3T3 buněk na testovaných filmech bez modifikace pomocí BSA (po 72 hodinách kultivace)	76
Obrázek 53 – proliferace NIH/3T3 buněk na testovaných filmech modifikovaných pomocí BSA (po 24 hodinách kultivace)	78
Obrázek 54 – proliferace NIH/3T3 buněk na testovaných filmech modifikovaných pomocí BSA (po 72 hodinách kultivace)	79
Obrázek 55 – sloupcový graf závislosti počtu buněk po 72 hodinách od osazení buněčné suspenze na typu polyanilinového filmu.....	81
Obrázek 56 – migrace NIH/3T3 buněk na testovaných filmech	83

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 – srovnání konduktivity vodičů, polovodičů a izolantů (Drápala a Kursa, 2012).....	15
Tabulka 2 – hodnoty celkové povrchové energie a její disperzní a polární složky polyanilinových filmů PANI-S a PANI-B a vrstvy buněk linie NIH/3T3 (Humpolíček et al., 2015).....	43
Tabulka 3 – průměrné hodnoty profilů v oblastech vzorku s daným filmem či bez něj a hodnoty tlouštěk filmů, které jsou jejich rozdílem.....	68
Tabulka 4 – výsledky měření konduktivity vzorků čtyřbodovou metodou.....	69
Tabulka 5 – hodnoty naměřených kontaktních úhlů kapek jednotlivých měřících kapalin na osmi různých typech PANI filmů.....	71
Tabulka 6 - hodnoty celkových povrchových energií daných filmů γ^{TOT} včetně jejich disperzních γ^{LW} a polárních složek γ^{AB}	71
Tabulka 7 – kvantitativní vyhodnocení počtu buněk po 72 hodinách proliferace na polynilinových filmech a referenčním vzorku, stanovené pomocí průtokové cytometrie.....	81