

Srovnání vybraných charakteristik vodivých polymerů

Bc. Lucie Kuklíková

Diplomová práce
2023



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Lucie Kuklíková**
Osobní číslo: **T21509**
Studijní program: **N0711A130011 Biomateriály a kosmetika**
Forma studia: **Kombinovaná**
Téma práce: **Srovnání vybraných charakteristik vodivých polymerů**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část:

Studentka vypracuje literární rešerši týkající se vodivých polymerů, a to hlavně s ohledem na jejich využití jako stimuli-responzivních biomateriálů.

Zaměří se i na popis materiálových vlastností požadovaných pro aplikace v tkáňovém inženýrství.

II. Praktická část:

V praktické části připraví vodivé polymery v různých formách.

Provede experimenty za účelem stanovení jejich materiálových i biologických charakteristik.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] Chandrasekhar, P. (2013). *Conducting polymers, fundamentals and applications: a practical approach*. Springer Science & Business Media.
- [2] Gomes, A. D. S. (Ed.). (2012). *New polymers for special applications*. BoD—Books on Demand.
- [3] Khang, G. (Ed.). (2017). *Handbook of intelligent scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine*. CRC Press.
- [4] Freshney, R. I. (2015). *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*. John Wiley & Sons.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Zdenka Víchová, Ph.D.**
Centrum polymerních systémů

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

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

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

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Oblast tkáňového inženýrství zažívá vzrušující pokroky směrem k výrobě inteligentních a biomimetických konstruktů jako alternativ ke klinickým terapiím. Elektricky vodivé materiály mohou mít významný dopad na tkáňové inženýrství, protože jejich elektrická stimulace zapříčiňuje stimulaci řízeného růstu buněk. Diplomová práce se právě proto věnovala přípravě a charakterizaci dvou vodivých polymerů, polypyrrolu a polyanilinu. Vodivé polymery byly v rámci experimentální práce připraveny ve dvou formách, jako koloidní disperze a jako tenké filmy. Pro vznik koloidů probíhala polymerace za přítomnosti stabilizátoru a to polyvinylalkoholu, polyvinylpyrrolidonu a nanokrystalické celulózy.

Tato diplomová práce se zaměřuje na porovnání charakteristik připravených vodivých polymerů. Připravený polyanilin a polypyrrol byl podroben testům materiálových charakteristik, jako je povrchová energie, vodivost a velikost částic. Rovněž byla zkoumána cytocompatibilita vodivých polymerů na buněčné linii NIH/3T3. Ta zahrnovala test buněčné adheze a proliferace a test cytocompatibility využitím testu MTT. Výsledky této práce naznačují, že oba polymery v kombinaci se všemi testovanými stabilizátory mohou mít potenciál pro aplikaci v tkáňovém inženýrství.

Klíčová slova: vodivé polymery, polyanilin, polypyrrol, tkáňové inženýrství, biomateriál, scaffold

ABSTRACT

The field of tissue engineering is experiencing exciting advances toward the production of intelligent and biomimetic constructs as alternatives to clinical therapies. Electrically conductive materials can have a significant impact on tissue engineering because their electrical stimulation induces the controlled growth of cells. Therefore, this thesis focused on the preparation and characterization of two conductive polymers, polypyrrole, and polyaniline. The conductive polymers were prepared in two forms in experimental work, as colloidal dispersions and as thin films. For the formation of colloids, polymerization took place in the presence of stabilizers such as polyvinyl alcohol, polyvinylpyrrolidone, and nanocrystalline cellulose.

This master's thesis focuses on comparing the characteristics of prepared conductive polymers. The prepared polyaniline and polypyrrole were subjected to tests for material characteristics such as surface energy, conductivity, and particle size. The cytocompatibility of the conductive polymers on the NIH/3T3 cell line was also examined. This included tests for cell adhesion and proliferation, as well as a cytokine compatibility test using the MTT assay. The results of this study suggest that both polymers, in combination with all tested stabilizers, may have potential for application in tissue engineering.

Keywords: conductive polymers, polyaniline, polypyrrole, tissue engineering, biomaterial, scaffold

Poděkování:

Děkuji své školitelce doc. Zdence Víchové, Ph.D. za trpělivé vedení mé diplomové práce, za cenné rady a připomínky a za vytvoření přátelského pracovního prostředí provázejícího během celé doby studia. Dále děkuji Kadiru Özaltinovi M.Sc., Ph.D., Ing. Simoně Kačerové, Ing. Martině Martínkové, a také všem ostatním kolegům z Centra polymerních systémů Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně za příjemnou pracovní atmosféru, ochotu pomoci a za výbornou spolupráci. V neposlední řadě bych také chtěla poděkovat své rodině za podporu během celého studia.

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

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČÁST	13
1 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ.....	14
1.1 REGENERATIVNÍ MEDICÍNA	16
1.2 TYPY BUNĚK PRO TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ.....	16
1.3 SCAFFOLDY	17
2 VODIVÉ POLYMERY.....	19
2.1 CHEMICKÉ A FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI VODIVÝCH POLYMERŮ.....	22
2.2 SYNTÉZA VODIVÝCH POLYMERŮ	24
2.2.1 Chemická polymerace	25
2.2.2 Elektrochemická polymerace	26
2.3 DOPOVÁNÍ POLYMERŮ.....	27
2.4 APLIKACE VODIVÝCH POLYMERŮ V TKÁŇOVÉM INŽENÝRSTVÍ.....	27
2.4.1 Vodivé polymery v regenerativní medicíně	28
2.4.2 Biosenzory.....	28
2.5 VYBRANÉ VODIVÉ POLYMERY A STABILIZÁTORY	30
2.5.1 Polyanilin	30
2.5.2 Polypyrrol.....	31
2.5.3 Polythiofen	32
2.5.4 Polyvinylpyrrolidon	32
2.5.5 Polyvinylalkohol	33
2.5.6 Nanokrystalická celulóza	34
2.6 KOMPOZITY VODIVÝCH POLYMERŮ PRO TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ.....	34
2.7 VODIVÉ KOPOLYMERNÍ FILMY PRO TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ.....	36
3 VODIVÉ BIOMATERIÁLY PRO APLIKACE V TKÁŇOVÉM INŽENÝRSTVÍ	37
3.1 BIODROPATIBILITA	38
3.1.1 Cytotoxicita	39
3.2 BIODEBRADABILITA	40
3.3 ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINKY	41
4 SROVNÁNÍ VYBRANÝCH CHARAKTERISTIK KOLOIDNÍCH DISPERZÍ A FILMŮ VODIVÝCH POLYMERŮ	42
4.1 MORFOLOGIE	42
4.2 STABILITA	43
II PRAKTICKÁ ČÁST	45
5 MATERIÁLOVÉ A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	46

5.1	POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	46
5.2	PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	47
5.3	POUŽITÝ SOFTWARE	48
5.4	MATERIÁLOVÉ VYBAVENÍ	48
5.5	BUNĚČNÁ LINIE	48
5.6	TESTOVANÉ POLYMERY	49
6	METODY	50
6.1	SYNTÉZA VODIVÝCH POLYMERŮ	50
6.1.1	Syntéza koloidní polyanilinové disperze	50
6.1.2	Syntéza koloidní polypyrrolové disperze	51
6.1.3	Postup přípravy filmů pomocí disperzní polymerace	51
6.2	MATERIÁLOVÉ TESTY	52
6.2.1	Velikost částic	52
6.2.2	Povrchová energie	53
6.2.3	Měrná elektrická vodivost	55
6.3	TESTY CYTOKOMPATIBILITY	57
6.3.1	Vybavení laboratoře pro kultivaci buněk <i>in vitro</i>	57
6.3.2	Buněčné kultury a kultivace buněk	57
6.3.3	Test cytotoxicity	58
6.3.4	Test buněčné adheze a proliferace	59
7	VÝSLEDKY	61
7.1	PŘÍPRAVA FILMŮ A KOLOIDŮ	61
7.2	MATERIÁLOVÉ TESTY	62
7.2.1	Velikost částic	62
7.2.2	Povrchová energie	65
7.2.3	Měrná elektrická vodivost	66
7.3	TESTY CYTOKOMPATIBILITY	67
7.3.1	Testy cytotoxicity	67
7.3.2	Test buněčné adheze a proliferace buněk	72
8	DISKUZE	74
8.1	PŘÍPRAVA FILMŮ	74
8.2	MATERIÁLOVÉ TESTY	75
8.2.1	Velikost částic	75
8.2.2	Povrchová energie	77
8.2.3	Měrná elektrická vodivost	78
8.3	TESTY CYTOKOMPATIBILITY	80
8.3.1	Testy cytotoxicity	80
8.3.2	Test buněčné adheze a proliferace	82
	ZÁVĚR	83

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	105
SEZNAM OBRÁZKŮ	107
SEZNAM TABULEK.....	110
SEZNAM ROVNIC	111

ÚVOD

Oblast tkáňového inženýrství (TI) je oborem s nesporným potenciálem. Celosvětová velikost trhu TI byla v roce 2020 odhadnuta na 7,65 miliard USD a uvádí se, že v období 2021 až 2027 poroste s ročním růstem přibližně 14,2 %. Také se očekává, že velikost globálního trhu TI dosáhne roku 2027 28,9 miliard USD. V roce 2020 oblast TI dosáhla významného úspěchu, jelikož FDA schválila tkáňově inženýrský produkt s názvem MACI pro opravu defektů chrupavky kolene u dospělých (Hulme *et al.*, 2021). Další z úspěchů TI byl zaznamenán, když vědci vytvořili fungující miniatury orgánů nazývané organoidy. Ty lze použít ke studiu nemocí a testování nových léků, což může urychlit proces vývoje léčiv (Kim *et al.*, 2020).

Pokroky v TI jsou závislé na vývoji nových výrobních technik a použití pokročilých materiálů. Vodivé polymery jsou skupinou materiálů vyznačujícími se jedinečnými elektrickými a fyzikálními vlastnostmi a získaly významné místo v oblasti TI. Zájem o vodivé polymery pro využití v TI, konkrétně o polypyrrol, polyanilin či polythiofen se během několika posledních desetiletí značně zvýšil z důvodu jejich laditelných elektrických vlastností, snadno oxidovatelné povaze, dobré rozpustnosti či šetrnosti k životnímu prostředí. Vodivé polymery tak kombinují elektrické vlastnosti polovodičů a materiálové vlastnosti organických polymerů. Jednou z nejvýznamnějších aplikací vodivých polymerů v medicíně je v oblasti neurálních protéz. Zde mohou vodivé polymery pomoci obnovit funkci pacientům s neurologickými poruchami, jako je ochrnutí tím, že poskytnou přímé rozhraní mezi nervovým systémem a externím zařízením. To je umožněno díky tomu, že vodivé polymery mohou být použity k vytvoření elektrod potřebných pro toto rozhraní, jelikož jsou flexibilní, biokompatibilní a schopné vést elektrické signály (Park *et al.*, 2019, Green and Abidian, 2015). Díky tomu představují vzrušující a rychle rostoucí oblast výzkumu materiálových věd a inženýrství.

Vodivé polymery mohou být tedy navrženy tak, aby napodobovaly vlastnosti přirozených tkání. Lze je totiž použít k vytvoření scaffoldů, které podporují růst a diferenciaci buněk. Začleněním vodivých polymerů do skeletů TI vědci doufají, že dají vzniknout takovému scaffoldu, který bude těsněji sladěn s přirozenými tkáněmi v těle. Důležitým úkolem je popsání charakterových vlastností takového polymeru a znalost ideálních charakterových vlastností pro výzkum TI. Mezi důležité charakterové vlastnosti vodivých polymerů spadá elektrická vodivost pro interakci s živými tkáněmi, snadný růst a diferenciaci buněk v živých tkáních bez nežádoucích účinků obecně nazvané biokompatibilita, degradabilita,

zpracovatelnost do různých tvarů a forem, které lze přizpůsobit konkrétním potřebám TI, a také mechanické vlastnosti, jako je tuhost, pružnost a pevnost (Katti, 2002, Qazi *et al.*, 2014a).

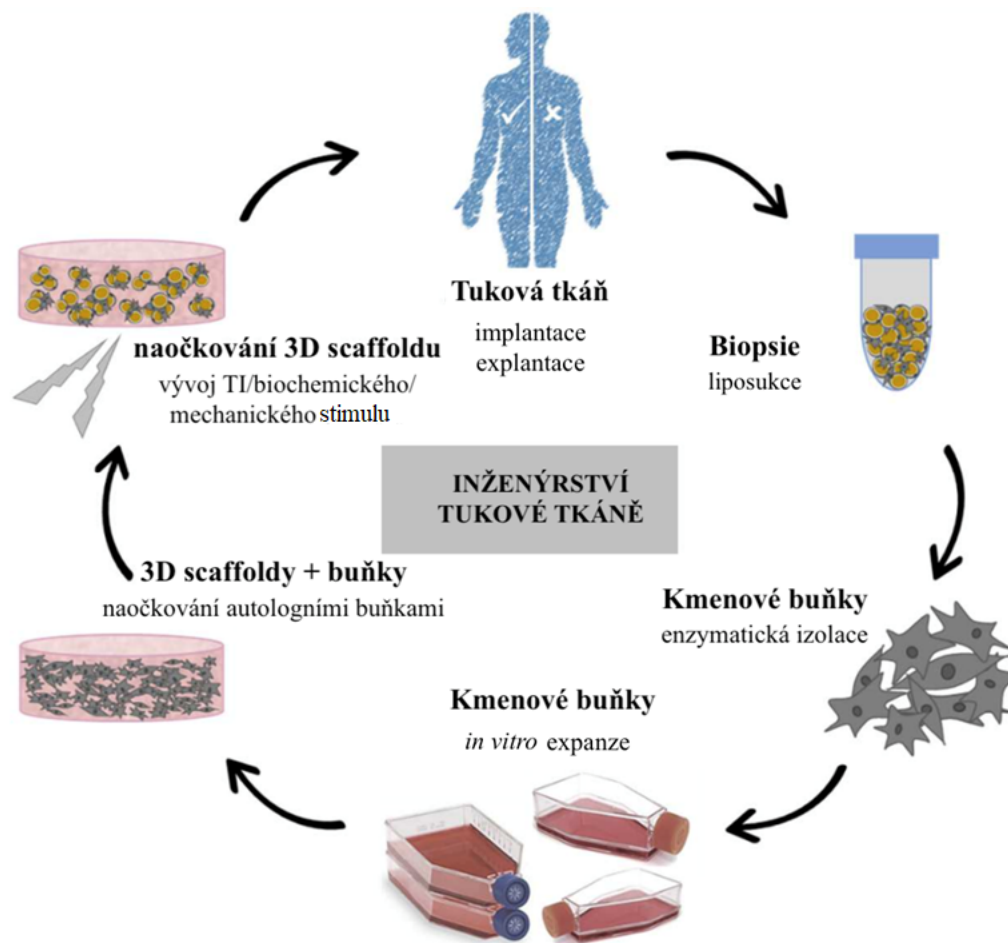
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ

Oblast TI, volně definována jako využití inženýrských principů a technologií k regeneraci živých tkání, má kořeny v mnoha odvětvích věd a inženýrství (Hacker and Mikos, 2006). Jedná se o multidisciplinární obor kombinující principy inženýrství, biologie a medicíny (Peppas and Langer, 1994), který vznikl teprve asi před třemi desetiletími (Kretlow and Mikos, 2008). Ve skutečnosti TI pochází z rekonstrukční chirurgie, kde se praktikuje přímá transplantace (alogenní) dárcovské tkáně. U této přímé transplantace dochází k nedostatku dárcovských orgánů, přenosu patogenů či odmítnutí dárcovského orgánu (Fuchs *et al.*, 2001, Saltzman, 2004). TI je tedy obor uplatňující principy a metody inženýrství a biologických věd k zásadnímu pochopení a vývoji biologických náhražek pro obnovu, udržení nebo zlepšení funkcí tkání (Vacanti and Langer, 1999). V základu se TI pokouší napodobit funkci přirozené tkáně. Pro optimalizaci vývoje funkčních biologických náhrad je proto nutné zásadně porozumět přirozeným podmínkám specifické tkáně. Biologické tkáně sestávají z buněk, signálních systémů a extracelulární matrix (ECM) [Lanza *et al.*, 2020]. Buňky jsou jádrem tkáně, avšak nemohou fungovat v nepřítomnosti signálních systémů anebo ECM. Signální systémy se skládají z genů, které při diferenciální aktivaci vylučují transkripční produkty a nabádají k podnětům pro tvorbu a diferenciace tkáně (Lanza *et al.*, 2020). ECM podporuje přichycení buněk a buněčnou proliferaci (Badylak, 2007). Na Obrázku 1 je znázorněn princip TI tukové tkáně.

TI přístupy lze obecně rozdělit na základě těchto tří jevů, které mohou být studovány buď samostatně nebo v kombinaci:

- buněčná terapie
- indukce tvorby tkáně rozpustnými signálními faktory
- biokompatibilní podpora umělým ECM (scaffold)



Obrázek 1: Princip inženýrství tukové tkáně v buněčných postupech. Buňky se izolují z biopsií tkáně dárce/pacienta a množí se *ex vivo* v lahvích pro tkáňové kultury (Wiesner, 2020).

Tento obor má potenciál vzbudit revoluci v medicíně poskytováním alternativních terapií pro širokou škálu zdravotních stavů, jako je selhání orgánů, popáleniny a defekty tkání (Dzobo *et al.*, 2018). TI je věda zabývající se výzkumem regenerace a obnovou poškozených či chybějících tkání za využití buněk, růstových faktorů či scaffoldů (Barbeck *et al.*, 2019). Náplní výzkumů je převážně vývoj nových biologických a biokompatibilních náhrad, jež slouží k regeneraci tkáně, udržení její funkce nebo k jejímu zlepšení. Každý typ tkáně vyžaduje odlišné podmínky prostředí, a proto je nutné pochopení specifického přirozeného biologického prostředí *in vivo*, aby bylo možné optimalizovat kultivaci *in vitro*. Suplementace rozpustných faktorů indukující vznik či růst tkáně může být kombinována v rámci přístupu založeného na využití scaffoldu určeného k řízení chování buněk aktivací specifických drah (Baud and Jacque, 2008, Chen and Alman, 2009, Landmesser *et al.*, 2009).

Hlavními oblastmi tkáňových náhrad v klinických studiích a aplikacích je kůže, kardiovaskulární systém, kosti a chrupavka (Saltzman, 2004, Fong *et al.*, 2006, Jawad *et al.*,

2007, Nesic *et al.*, 2006). Avšak v minulosti byla také navržena implantace TI dýchacích cest (Macchiarini *et al.*, 2008).

1.1 Regenerativní medicína

Regenerativní medicína a TI jsou úzce související obory, přičemž TI je klíčovou oblastí v jejím výzkumu. Regenerativní medicína je obor medicíny, který se zaměřuje na vývoj inovativních terapií k náhradě, opravě nebo regeneraci poškozených nebo nemocných tkání a orgánů. Tento přístup usiluje o využití přirozených hojivých procesů těla k podpoře regenerace a obnovy tkání spíše, než k léčbě příznaků nebo řízení progresu onemocnění. Procesy v regenerativní medicíně zahrnují použití kmenových buněk, genovou terapii a TI (Atala *et al.*, 2006).

V rámci regenerativní medicíny se zapsalo několik zásadních úspěchů, mezi nejvýznamnější osobnosti v oblasti výzkumu se řadí:

- Dr. Anthony Atala. Urolog a ředitel společnosti Wake Forest Institute for Regenerative Medicine. Jeho úspěch byl připsán v oblasti 3D tisku orgánů a tkání (Atala and Forgacs, 2019).
- Dr. Shinya Yamanaka. Výzkumník kmenových buněk na Kjótské univerzitě, který se proslavil objevem indukovaných pluripotentních kmenových buněk. V roce 2006 spolu se svým týmem objevili možnost odebrání dospělých kožních buněk a jejich následné přeprogramování na kmenové buňky, jež jsou schopny se vyvinout v jakýkoli typ buňky v těle, čímž došlo k eliminaci potřeby používat embryonální kmenové buňky (Takahashi and Yamanaka, 2006). Tento objev způsobil revoluci v oblasti regenerativní medicíny.
- Dr. Robert Lanza je hlavním vědeckým ředitelem pokročilé buněčné technologie Advanced Cell Technology a jeho výzkum se zabývá využitím kmenových buněk k růstu nových orgánů a tkání (Lanza *et al.*, 2005). V roce 2014 byl zařazen mezi 100 nejvlivnějších lidí světa (Alice Park, 2014, online).

1.2 Typy buněk pro tkáňové inženýrství

V TI se buňky využívají k vytvoření nebo regeneraci tkání a orgánů. Výběr typu buňky závisí na požadované tkáni nebo orgánu, který je třeba vytvořit či zregenerovat. Mezi běžně používané buňky pro TI se řadí mezenchymální kmenové buňky. Jedná se o dospělé

kmenové buňky, které se mohou diferencovat na různé typy buněk, jako jsou kostní, chrupavkové nebo tukové buňky. Jsou široce používány v aplikacích TI díky své schopnosti regenerovat poškozené tkáně (Caplan, 1991, Xi *et al.*, 2013).

Dále se v TI využívají fibroblasty. Buňky vazivové tkáně, které jsou zodpovědné za produkci extracelulární matrix, jež je nezbytná pro strukturu a funkci tkáně. Fibroblasty se běžně se využívají v aplikacích kožního TI (Qian *et al.*, 2022). Pro TI chrupavčité tkáně jsou naopak nejvíce aplikovány chondrocyty. Tyto buňky jsou schopny produkovat ECM, která tvoří většinu chrupavčité tkáně. Jeden z postupů používaných v chrupavčitém TI zahrnuje izolaci a expanzi chondrocytů z pacientovy vlastní chrupavčité tkáně, které jsou poté vysety na vhodné lešení a kultivovány za vhodných podmínek, aby se podpořila tvorba nové chrupavčité tkáně. Další postup zahrnuje použití mezenchymálních kmenových buněk, které lze za specifických podmínek diferencovat na chondrocyty (Vinatier *et al.*, 2009). Další buňky využívané v TI jsou myoblasty. Jsou zvláštní skupinou buněk pro svalové inženýrství, jelikož mají schopnost diferenciaci na myotuby, které jsou základními stavebními kameny svalové tkáně. Kromě toho jsou myoblasty schopny fúze se stávajícími svalovými vlákny, čímž podporují tvorbu nové svalové tkáně (Dellavalle *et al.*, 2007). Mezi další buňky využívané v TI patří hepatocyty, jež hrají roli v jaterním TI (Baptista *et al.*, 2011).

1.3 Scaffoldy

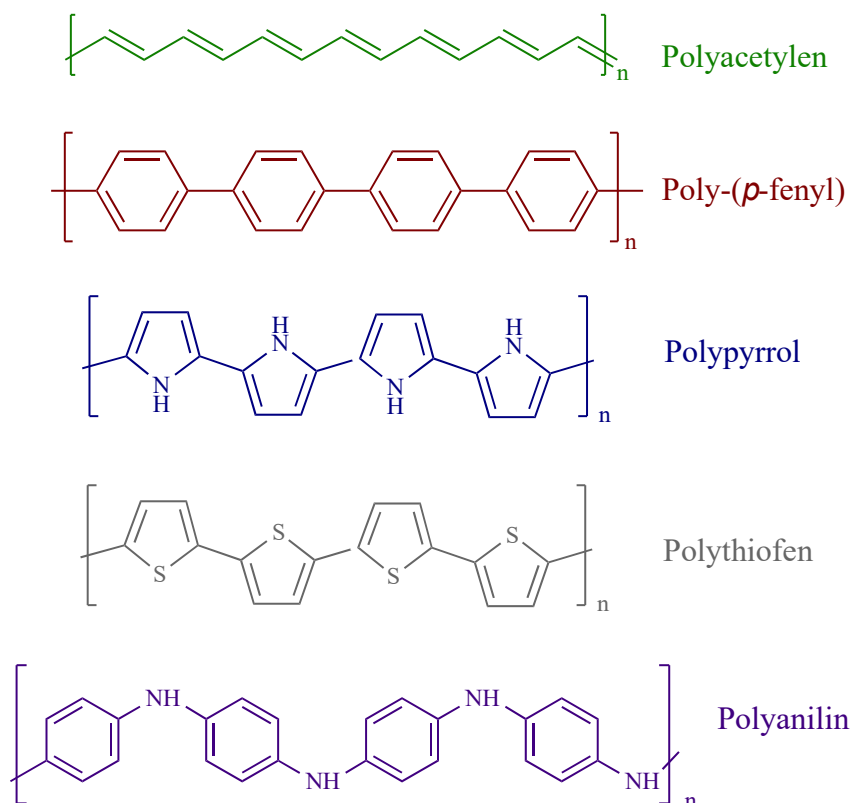
Buňky a tkáně v lidském těle jsou organizovány do trojrozměrné architektury. Aby bylo možné zkonstruovat tyto funkční tkáně a orgány, musí být scaffoldy vyrobeny do trojrozměrného prostoru napodobující architekturu nativní ECM (Ning *et al.*, 2018). Scaffoldy lze tedy využít k podpoře samoléčebného mechanismu lidského těla a k podpoře opětovného růstu poškozené tkáně. Použití scaffoldů v TI vykazovalo slibné výsledky při regeneraci různých typů tkání, včetně kostí, chrupavek a kůže (Hutmacher, 2000). Scaffoldy lze zkonstruovat z různých materiálů, mezi něž patří syntetické polymery, přírodní polymery nebo decelularizovaná tkáň (Gawlitta *et al.*, 2015).

Scaffoldy musí být vysoce porézní, to umožňuje tkáňový růst a zároveň degradaci scaffoldů po úspěšnou regeneraci tkáně, což minimalizuje imunitní reakci a nutnost revizní operace (Fiedler *et al.*, 2015). Pro regeneraci kosti musí být scaffoldy také osteoindukční a osteoinduktivní (Cao *et al.*, 2003). Jejich schopnost stimulovat buňky je také dalším důležitým požadavkem. Elektrické signály jsou kritickými fyziologickými podněty, které silně ovlivňují chování buněk (Mattioli-Belmonte *et al.*, 2003, Qazi *et al.*, 2014a) a řídí

buněčnou migraci, adhezi a diferenciaci, syntézu DNA a sekreci proteinů (Rivers *et al.*, 2002, Rangarajan *et al.*, 2014). Ideální scaffold by měl rovněž umožnit dostatečný přísun živin do buněk a eliminaci odpadu z buněk (Takezawa, 2003, Hollister, 2005, Badylak, 2007).

2 VODIVÉ POLYMERY

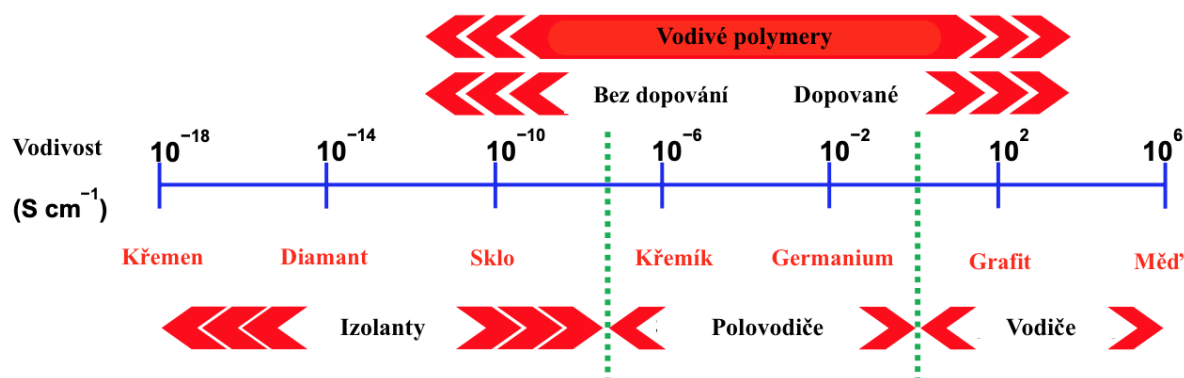
Vodivé polymery jsou speciální třídou polymerů, které jsou takzvaně vnitřně vodivé (Hess *et al.*, 2006). Jejich hlavním rysem je přítomnost π -konjugovaného systému (tj. střídání jednoduchých a dvojných vazeb) podél hlavního řetězce. Překrývání sousedních π orbitalů v konjugovaném systému usnadňuje delokalizaci π elektronů podél páteře molekuly, která je zodpovědná za elektrickou vodivost. V některých případech může být dvojná vazba v konjugovaném systému nahrazena heteroatomem s jediným párem ne vazebných elektronů, např. atomem N či S, jako v případě pyrrolových nebo thiofenových aromatických heterocyklů. Delokalizovaný π elektron podél páteře řetězce spolu se slabými meziřetězcovými interakcemi vytváří kvazi jedno-rozměrnou povahu a umožňují anizotropii (Potje-Kamloth, 2001). Vodivé polymery mají elektrické a optické vlastnosti spojené s polovodiči, stále si však zachovávají fyzikální vlastnosti konvenčních polymerů (Potje-Kamloth, 2001). Typickými vodivými polymery jsou polyanilin (PANI), polypyrrol (PPy), polythiofen, polyacetylen a další, viz Obrázek 2.



Obrázek 2: Chemická struktura nejznámějších vodivých polymerů.

Ačkoli byl acetylen poprvé syntetizován v roce 1958, díky své špatné zpracovatelnosti a nízké stabilitě vůči prostředí nezbudil v té době příliš velkou pozornost (Chien, 1984, Natta *et al.*, 1967). Deset let poté, v roce 1968, chemici Berets a Smith (1968) poprvé popsali elektrické vlastnosti polyacetyleny. Roku 1977 Shirakawa *et al.* (1977) popsali chování polyacetyleny při dopování halogenovanými plyny (Cl_2 , Br_2 , I_2). Odhalili, že dopování halogeny významně zvyšuje vodivost. Konkrétně při dopování jódem konduktivita polyacetyleny vzrostla téměř devětkrát (z $4,4 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$ na $38 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$). Tento nálezn odhalil atraktivní typ polymerů s elektrickými vlastnostmi kovů či polovodičů (Heeger, 2001). Objev byl v roce 2000 oceněn Nobelovou cenou za chemii, konkrétně za objev a vývoj nových polymerů. Mezi průkopníky v tématice vodivých polymerů lze považovat právě držitele Nobelovy ceny Alana J. Heegera, Alana G. MacDiarmida a Hideki Shirakawu (Moore, 2001).

Mezi typické vlastnosti vodivých polymerů patří jednoduchá syntéza, výborné optické vlastnosti, mechanická odolnost a vysoká stabilita vůči životnímu prostředí (Dubey and Leclerc, 2011, Lee *et al.*, 2015). Vodivé polymery vykazují velkou schopnost reagovat na různé podněty změnou jejich optického, elektrického, chemického anebo mechanického chování (Namsheer and Rout, 2021). Na základě elektrické vodivosti se materiály dělí na izolanty (vodivost je menší než $10^{-7} \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$), polovodiče (rozsah vodivosti se pohybuje mezi 10^{-7} – $100 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$) a vodiče (vodivost je větší než $100 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$). Vodivé polymery se mohou chovat jako izolanty, polovodiče i jako vodiče na základě úrovně jejich dopování, viz Obrázek 3.

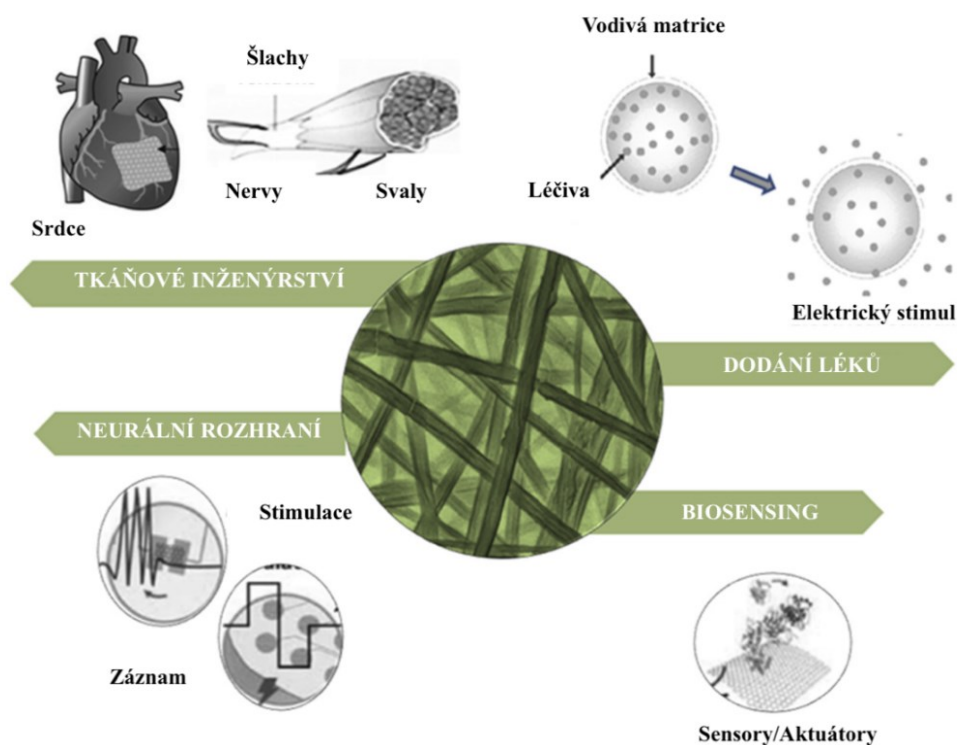


Obrázek 3: Elektrická vodivost vodivých polymerů v porovnání s jinými materiály (Kaur *et al.*, 2015).

Vodivé polymery našly své uplatnění v četných aplikacích jako složky biomateriálů sloužících k účinnému dodávání elektrických signálů z externího zdroje přímo do buněk. Jelikož několik typů buněk, jako jsou např. kardiomyocyty, neurony, osteoblasty apod.

reagují na elektrické signály zlepšením jejich funkčnosti. Jedním z nejpoužívanějších vodivých polymerů v TI je PANI, jelikož vykazuje žádoucí vlastnosti, jako je např. snadná syntéza, laditelná vodivost, či environmentální stabilita (Goswami *et al.*, 2023).

Účinky elektrických stimulů na tkáň jsou známy již od 60. let 20. století, kdy Bassett *et al.* (1964) prokázali, že stejnosměrné elektrické proudy o nízké intenzitě ovlivňují mechanismus tvorby kostí u dospělých psů. V dalším z výzkumů bylo zjištěno, že aplikace pulzní stimulace elektrického pole na myších osteoblastových buňkách vede k výraznému zvýšení syntézy DNA (Ozawa *et al.*, 1989). Stejnosměrné elektrické pole ovlivňuje shlukování a distribuci membránových proteinů na rozhraní buněčného substrátu a řídí směr buněčné lokomoce ve dvou fibroblastových buněčných liniích (Brown and Loew, 1994). Začlenění vodivých prvků do struktury materiálů umožňuje přenos elektrických signálů např. skrze buněčný scaffold. Takovýto tzv. „chytrý scaffold“ má pak také pomocí externích stimulů vliv na buněčné chování. Důležitým ukazatelem je biologická odbouratelnost biologického materiálu, jelikož zlato či uhlíkové částice zabudované ve scaffoldu obsahují ve své struktuře takové částice, jež nejsou biologicky odbouratelné a jejich dlouhodobé účinky *in vivo* nejsou zcela známé (Qazi *et al.*, 2014a). Z tohoto důvodu se pro takové účely jeví jako vhodní kandidáti právě vodivé polymery. Vodivé polymery lze využít v široké škále biomedicínských aplikací. Mezi hlavní oblasti využití spadá TI, řízené uvolňování léčiv, neurověda a biosensing (Obrázek 4).



Obrázek 4: Schéma hlavních aplikačních oblastí vodivého nanomateriálu (Zuppolini *et al.*, 2020).

2.1 Chemické a fyzikální vlastnosti vodivých polymerů

Fyzikálně-chemické vlastnosti vodivých polymerů, konkrétně jejich specifický povrch, vodivost, tepelné a mechanické vlastnosti jsou vysoce závislé na morfologii. Nanostrukturované vodivé polymery vykazují lepší elektrickou a elektrochemickou aktivitu, se zlepšenými optickými vlastnostmi a lepší biokompatibilitou ve srovnání s typickou granulární morfologií (Xue *et al.*, 2020, Al-Zohbi *et al.*, 2021, Zhang *et al.*, 2005).

Bylo zjištěno, že fyzikálně-chemické vlastnosti vodivých polymerů jsou vysoce řízeny jejich oxidačním stavem. PANI má různé reverzibilní oxidační stavy s alternativními optickými a vodivými vlastnostmi. Oxidační polymerací anilinu v kyselém prostředí vzniká protonovaná emeraldinová (zvaná také smaragdová) sůl, která je nejvodivější formou PANI (Stejskal *et al.*, 1996, Mottaghalab *et al.*, 2006). Smaragdová sůl může být snadno deprotonována na smaragdovou bázi, která je nevodivá anebo může být dále oxidována na formu zvanou pernigranilin (Kenwright *et al.*, 1992, D'Aprano *et al.*, 1992). Smaragdin lze také redukovat na bezbarvý leukoemeraldin, což je plně redukovaná nestálá forma PANI. Reverzibilní acidobazický přechod vodivé smaragdinové soli na nevodivou smaragdinovou bázi vzniká při pH 6-7 (Stejskal *et al.*, 1996). Smaragdinová sůl je nerozpustná v organických rozpouštědlech, částečně rozpustná ve vysoce polárních aprotických

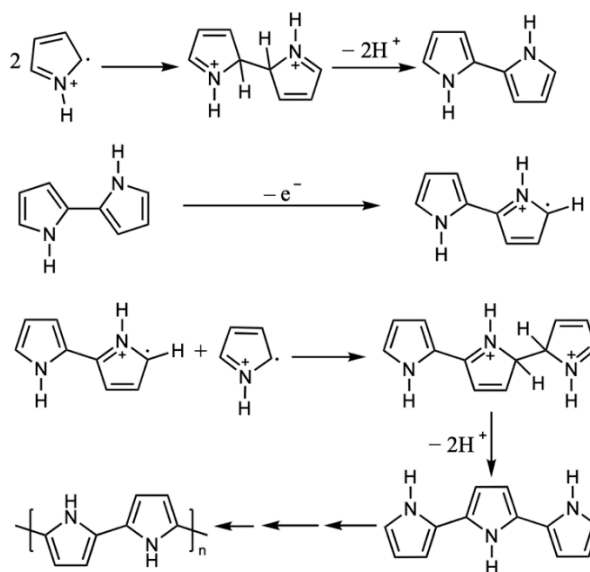
rozpouštědlech, jako je N-methyl-2-pyrrolidon (Jain and Gregory, 1995, Abe *et al.*, 1989), tetrahydrofuran, dimethylformamid (Sairam *et al.*, 2009) a N,N'-dimethylpropylen močoviny (Jain and Gregory, 1995). Nerozpustnost PANI je přisuzována jeho tuhé páteři ze silných interakcí vodíkových vazeb mezi sousedními polymerními řetězci (Deshmukh *et al.*, 2017). Lepší rozpustnost deprotonovaného PANI je způsobena vyšší neuspořádaností v polymerních řetězcích (Neetika *et al.*, 2017).

Změny oxidačního stavu vysoce ovlivňují i fyzikální, chemické a elektrické vlastnosti dalšího známého vodivého polymeru PPy (Stejskal *et al.*, 2016). PPy při ošetření zásaditými roztoky ($\text{pH} < 9$) podléhá deprotonaci a vzniká tak nevodivá forma PPy (Pei and Qian, 1991). Zpracování deprotonovaného PPy pomocí silně kyselých roztoků ($\text{pH} < 3$) vede k protonačnímu procesu spolu s výrazným vzrůstem vodivosti. Tento jednoduchý proces protonace/deprotonace je reverzibilní (Münstedt, 1986). Dlouhodobé působení silně alkalickými roztoky ($\text{pH} > 11$) zavádí hydroxylové a karbonylové skupiny do řetězce PPy a vede k nevratné reakci a po opětovné protonaci kyselými roztoky nelze obnovit počáteční vodivost (Pei and Qian, 1991). Chemicky nebo elektrochemicky připravený PPy není ani tavitelný ani rozpustný v běžných organických nebo polárních rozpouštědlech z důvodu silných inter/intramolekulárním interakcím a síťování polymerních řetězců (Dallas *et al.*, 2007, John *et al.*, 2018, Gähde, 1994). Rozpustných nebo dispergovaných forem vodivých polymerů lze dosáhnout dopováním objemnými funkcionalizovanými organickými kyselinami nebo přípravou koloidů pomocí sterických stabilizátorů. Příprava rozpustného PPy spočívá v chemické přípravě s ammonium persulfátem (APS) jako oxidantem a kyselinou dodecylbenzensulfonovou (Lee *et al.*, 1995) nebo kyselinou butylnaftalensulfonovou (Shen and Wan, 1998). Podobně PANI dopovaný kyselinou dodecylbenzensulfonovou je rozpustný v běžných organických rozpouštědlech (Cao *et al.*, 1992). Začlenění velkých příměsí brání intermolekulárním a intramolekulárním interakcím polymerních řetězců a následně zlepšuje jejich rozpustnost (John *et al.*, 2018, Lim *et al.*, 2005). Další strategií pro přípravu rozpustných PPy vodivých materiálů je chemická modifikace monomerů zavedením substituentů. Vhodné alkylové substituenty na thiofenovém kruhu zlepšují rozpustnost polythiofenů (Elsenbaumer *et al.*, 1986). Navíc zavedení objemných substituentů, jako je N-(benzylidenamin) do pyrrolového kruhu vytváří vysoce rozpustný polymer (Murakami and Yamamoto, 1999). Substituent skupiny sulfonové kyseliny na benzenovém kruhu anilinu vytváří ve vodě rozpustný samo-dopovaný PANI (Lin and Chen, 2000).

2.2 Syntéza vodivých polymerů

Vodivé polymery se syntetizují oxidativní polymerací jejich monomerů vyjma polyacetyleny, který se polymeruje z acetyleny adiční polymerací v přítomnosti Zieglerova katalyzátoru (Ito *et al.*, 1974). Chemické a elektrochemické polymerační cesty patří mezi hlavní postupy, kterými se vodivé polymery připravují (Skotheim, 1997, Diaz and Kanazawa, 1983). Uplatňují se tu zde buď chemické oxidanty nebo elektrický potenciál. V obou případech se však jedná o oxidaci monomerů na jejich radikálové kationty s následnou kopulací vedoucí k prodloužení polymerních řetězců zobrazené na Obrázku 5. Každá z metod má své výhody i nevýhody. Chemická cesta je např. vhodnější pro hromadnou výrobu s nízkými náklady, zatímco velkovýrobu vodivých polymerů syntéza elektrochemická (Xue *et al.*, 2020) doposud neumožňuje (Guimard *et al.*, 2007, Nguyen and Yoon, 2016). Elektrochemická polymerace oproti předchozímu umožňuje snadnou kontrolu tloušťky a drsnosti tenkého polymerního filmu, zatímco sypké prášky a filmy s nekontrolovatelnou velikostí tloušťky se typicky získávají cestou chemické polymerace. Další výhodou elektrochemické polymerace je i vyšší čistota výsledného polymeru ve srovnání s chemickou cestou (Gvozdenovi *et al.*, 2014).

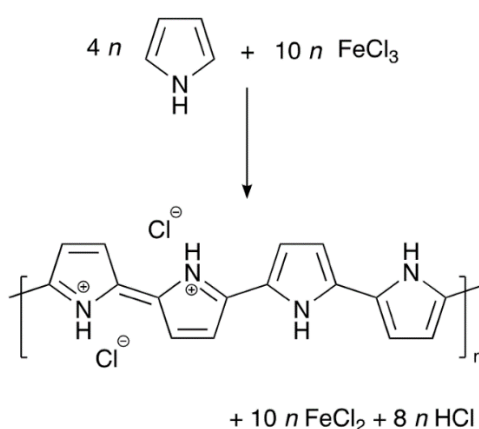
Kromě oxidativních chemických a elektrochemických hlavních polymeračních cest existuje i např. mechanochemická polymerace (Posudievsky *et al.*, 2010), polymerace v pevné fázi (Koh *et al.*, 2011), fotoindukovaná polymerace (Su and Peng, 2014) a radiační polymerace (Cui *et al.*, 2014).



Obrázek 5: Mechanismus oxidativní polymerace pyrrolu (Sadki *et al.*, 2000).

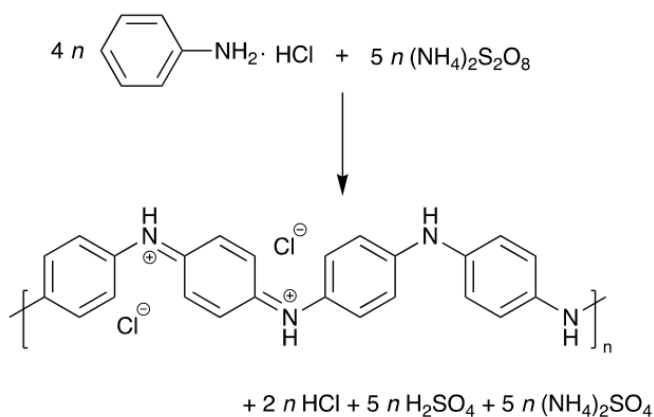
2.2.1 Chemická polymerace

První vodivý polymer, PPy, byl syntetizován roku 1916 (Myers, 1986), kdy byl pyrrol ošetřen okyseleným peroxidem vodíku za vzniku nerozpustného černého prášku zvaného pyrrolová čerň. Dnes je nejběžnějším oxidantem pro přípravu vysoce vodivého PPy chlorid železitý, jehož reakce je vyobrazena na Obrázku 6 (Seike *et al.*, 2022). Při chemické oxidaci jsou obecně oxidanty spotřebovávány stechiometricky (Pang *et al.*, 2021). Teoreticky jsou k polymeraci jednoho molu pyrrolu potřeba dva moly chloridu železitého (Omastová *et al.*, 2010), nicméně optimální molární poměr chloridu železitého k pyrrolu je 2,5:1 pro získání dopovaného PPy (Li *et al.*, 2017).



Obrázek 6: Chemická oxidace pyrrolu oxidem železitým na PPy hydrochlorid. (Li *et al.*, 2017).

Jak PPy, tak PANI lze syntetizovat chemicky oxidativní polymerací anilinu peroxydisulfátem amonným viz Obrázek 7. (Stejskal and Gilbert, 2002). Použit lze ale i chlorid železitý (Ayad *et al.*, 2012), dusičnan stříbrný (Bober *et al.*, 2011), manganistan draselný a dichroman draselný (Cao *et al.*, 1989).



Obrázek 7: Chemická oxidace anilinu hydrochloridu s peroxydisulfátem amonným na PANI sůl (Cao *et al.*, 1989).

Podmínky polymerace, jako je pH, teplota, molární poměr oxidantu a monomeru významně ovlivňují fyzikálně-chemické vlastnosti připravených vodivých polymerů, jako je vodivost či jejich konečná morfologie (Ferenets and Harlin, 2007, Lei *et al.*, 1992, Kassim *et al.*, 2002). Například v kyselých podmínkách se tvoří granulární a nanofibrilární PANI, zatímco alkalické prostředí vytváří oligomerní strukturu PANI (Stejskal *et al.*, 2008). S nižší (Navarchian *et al.*, 2013) teplotou během polymerace dochází ke zvýšení vodivosti produktu (Stejskal *et al.*, 1998). Rychlost chemické polymerace lze řídit molárním poměrem monomeru k oxidantu a pomocí pH polymeračního media (Navarchian *et al.*, 2013).

Chemickou polymerací je možné připravit mnohé formy vodivých polymerů. Mezi ně patří prášky, tenkovrstvé povlaky, koloidy, hydrogely, kryogely či volně stojící filmy. Koloidy lze připravit v přítomnosti povrchově aktivních látek (Zhang *et al.*, 2006) nebo vhodných sterických stabilizačních činidel, jako je poly(N-vinylpyrrolidon) [PVP] nebo poly(vinylalkohol) [PVA] (Woo *et al.*, 2010, Banerjee, 1998). Vodivé kryogely se získají zmrazením oxidační disperze, kdy k polymeraci dochází za mrazu a po rozmrazení dostáváme kryogel (Stejskal and Bober, 2018). Volně stojící filmy nedotčených vodivých polymerů lze připravit metodou mezifázové polymerace kapalina-kapalina nebo plyn-kapalina (Qi *et al.*, 2012, Lei *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2010, Garcia *et al.*, 1997).

2.2.2 Elektrochemická polymerace

Elektrochemická polymerační cesta využívá k oxidaci monomerů na vodivé polymery elektrický potenciál. Pyrrol i anilin lze elektrochemicky polymerovat např. v kyselině sírové, chlorovodíkové či dusičné (Garcia *et al.*, 1997, Mu *et al.*, 2004) nebo v organických rozpouštědlech, jako je acetonitril, dichloromethan nebo nitrobenzen (Pandey and Singh, 2002). Elektrochemická polymerace může být provedena za konstantního proudu galvanostaticky (Li *et al.*, 2005, Mello and Mulato, 2018), potenciostaticky, kdy je aplikován konstantní potenciál (Zhou *et al.*, 2007) nebo potenciodynamicky, jinak také nazývané jako cyklické voltametrické skenování (Cheung *et al.*, 1988, Martyak *et al.*, 2002). Pro přípravu tenkých filmů jsou preferovány potenciostatické podmínky, zatímco pro přípravu tlustých filmů se používají galvanostatické podmínky (Kumar and Sharma, 1998). Techniky elektrochemické polymerace poskytují účinný nástroj pro online monitorování a řízení tloušťky a drsnosti filmu (Palma-Cando *et al.*, 2014). Také se jedná o ekologičtější přístup, jelikož se zde nepoužívají agresivní oxidanty.

2.3 Dopování polymerů

Dopování polymerů je esenciální pro vodivost polymerů, jelikož skrze tento proces získávají svou vysokou vodivost (Ateh *et al.*, 2006a). Dopování je proces oxidace (p-dopování) nebo redukce (n-dopování) neutrálního polymeru a poskytnutí protianiontu nebo kationtu (dopant), čímž je umožněno řídit fyzikální vlastnosti polymerů. Po dopování vznikne systém vodivých polymerů s nulovým nábojem v důsledku těsné asociace protiiontů s nabitou páteří vodivého polymeru. Tento proces zavádí do polymeru nosiče náboje ve formě nabitých polaronů (radikálových iontů) nebo bipolaronů (dianiontů). Přitažlivost elektronů poskytuje mobilitu podél řetězce, způsobené přeskokováním elektronů. Uspořádaný pohyb těchto nosičů náboje podél konjugované páteře vodivého polymeru tvoří základ pro elektrickou vodivost. Čím menší je vzdálenost mezi vodivým pásem a valenční vrstvou, tím je polymer vodivější. Tuto vzdálenost, a s tím i vodivost polymeru ovlivňuje mnoho faktorů, včetně dopantu, úrovně oxidace (procento dopování), metody syntézy a použité teploty. Dopování může být provedeno chemicky nebo elektrochemicky a je závislé na oxidačním potenciálu. Oxidační potenciál oligomerů klesá s tím, jak se počet monomerů v řetězci zvyšuje. Tedy při elektrochemickém dopování dochází při polymeraci, protože oxidační potenciál pro dopování vodivých polymerů je nižší než požadovaný pro polymeraci vodivých polymerů. Vodivost lze zvýšit zvýšením procenta dopování a změnou dopantu. Chemická povaha dopantu neovlivňuje pouze elektroaktivitu, ale také objemové strukturální vlastnosti (Guimard *et al.*, 2007). Prozkoumáno bylo dopování PPy prostřednictvím dermatansulfátu pro zvýšení životaschopnosti keratinocytů (Ateh *et al.*, 2006b), dopování heparinem pro zvýšení proliferace endoteliálních buněk (Ateh *et al.*, 2006a) a dopování peptidy odvozenými od lamininu pro kontrolu adheze neuronů a astrocytů (Stauffer and Cui, 2006).

2.4 Aplikace vodivých polymerů v tkáňovém inženýrství

Vodivé polymery nacházejí široké uplatnění v biomedicínských oborech včetně bioaktuátorů, biosenzorů, nervových implantátů, systémů pro podávání léků a elektroaktivních scaffoldů. Také slouží jako električtí stimulanty pro regeneraci tkání (Guo and Ma, 2018).

2.4.1 Vodivé polymery v regenerativní medicíně

Regenerativní medicína vzbuzuje značný zájem po celém světě a zvýšení buněčné aktivity je jedním ze základních konceptů pro rozvoj regenerativní medicíny. Důležitou oblastí regenerativní medicíny je např. výzkum léčiv zaměřený na screening léčiv s cílem účinného hodnocení účinků léčiv. Pro výzkum léků je zásadní zvýšit buněčnou aktivitu v těle, protože rozdíl v buněčném stavu mezi *in vitro* a *in vivo* vede k mezerám v hodnocení léků. Regenerativní medicína je jedním z nejatraktivnějších oborů současného biomedicínského inženýrství a pro její rozvoj je nezbytné posílit buněčnou aktivitu (Nii and Katayama, 2021b). Technologie biomateriálů je nezbytná pro další rozvoj regenerativní medicíny, protože biomateriály účinně podporují buněčnou kulturu nebo buněčnou transplantaci při zachování vysoké životaschopnosti a aktivity buněk. V případě studií *in vivo* mohou biomateriály napomáhat buněčné aktivitě, jako je přirozený hojivý potenciál, což vede k účinné tkáňové obnově poškozené tkáně (Nii and Katayama, 2021a). Během posledních let byl zaznamenán vývoj v oblasti regenerativní medicíny, konkrétně při léčbě chrupavky, kůže, močového měchýře, svalů a kostí pomocí různých biomateriálů (Tang *et al.*, 2014).

V současné době je stále více s TI a regenerativní medicínou spojen pojem bioprinting. Jedná se o technologii kombinující 3D tisk a biotechnologii, kdy pomocí živých buněk jsou zkonstruovány trojrozměrné struktury. To zahrnuje přesné ukládání biologických materiálů takzvaně po vrstvách, za účelem vytvoření komplexních a funkčních živých struktur. Úspěch této technologie spočívá ve vývoji vhodných bioinkoustů a vodivých hydrogelů, které jsou specifické pro zamýšlenou tkáňovou aplikaci (Vijayavenkataraman *et al.*, 2019, Vijayavenkataraman *et al.*, 2018). Hydrogely, což jsou vysoce hydratované polymerní sítě, se běžně používají jako bioinkousty pro biotisk tkáňových konstruktů kvůli jejich strukturní podobnosti s přirozenou extracelulární matricí buňky (Merceron and Murphy, 2015). Bioprinting tak pomáhá při zkonstruování biomimetických tkáňových konstruktů a očekává se, že poskytne účinné řešení dlouhodobé krize nedostatku orgánů pro transplantaci tkání a orgánů.

2.4.2 Biosenzory

Zájem o vývoj a využívání analytických zařízení pro kvantifikaci, detekci a monitorování specifických chemických druhů a reakcí vedlo ke vzniku senzorů. Sensory jsou analytická zařízení, která se skládají z aktivního snímacího materiálu s převodníkem signálu. Obecně

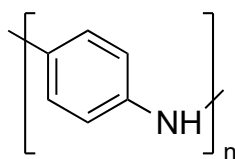
je lze rozdělit do dvou kategorií: aschemické senzory a biosenzory. Tato klasifikace se provádí na základě aspektů snímání, kde biosenzory snímají biochemické sloučeniny, jako jsou enzymy, protilátky, nukleové kyseliny, buňky a tkáně (Yogeswaran and Chen, 2008). Aplikace vodivých polymerů v bioanalytických vědách je velmi zajímavá z důvodu jejich kompatibility, která zvyšuje možnost jejich použití v *in vivo* aplikaci biosenzorů (Ahuja *et al.*, 2007). V aplikaci biosenzorů nabízejí vodivé polymery nejvýraznější vlastnosti, jako je laditelná citlivost úpravou syntetických proměnných, jako jsou zabudované protiionty a teplota polymerace, a také výroba sensorového pole pomocí elektrochemické depozice nebo lití do roztoku (Deepshikha and Basu, 2011). Navzdory výhodám vodivých polymerních biosenzorů existují také určitá omezení pro jejich praktické aplikace. Stabilita a vlastnosti vodivých polymerů mohou být ovlivněny okolním prostředím, jako je kyslík, kyseliny, zásady a redoxní reaktanty (Xia *et al.*, 2010). Kromě toho mohou být fyzikální vlastnosti vodivých polymerů pro určité aplikace omezením a je třeba je vzít v úvahu při výběru polymeru, který se má použít. Například je nutné udržovat vodivost při hodnotách pH vyšších než 4 v bioelektrochemických aplikacích. Ačkoli vodivost vodivého polymeru, jako je polythiofen nebo PPy, vykazuje velmi malou závislost na pH, vodivost PANI se snižuje při zvýšeném pH, což vede ke snížení dopingu protonů. Dále je důležité vzít v úvahu vliv inkorporace protiiontů z dopantu do polymeru během jeho syntézy a jeho vliv na stabilitu vodivého polymeru při změně pH (Xia *et al.*, 2010).

Mezi různými imobilizujícími materiály jsou k výrobě biosenzorů široce používány nanokompozity na bázi vodivých polymerů díky jejich vynikajícím vlastnostem, jako je žádoucí elektrokatalytická aktivita, vysoká vodivost a silná adsorpční schopnost ve srovnání s konvenčními vodivými polymery. Elektrochemické biosenzory hrají významnou roli při poskytování diagnostických informací a monitorování terapie v rychlém, jednoduchém a levném přenosném zařízení. (Naseri *et al.*, 2018). Příkladem takového biosenzoru je glukózový biosenzor na bázi PANI. Na základě jeho vlastností, byly také vyvinuty enzymové přepínače, pole biosenzorů a potenciometrický biosenzor pro detekci glukózy. Ve srovnání s PPy vykazoval PANI biosenzor dobrou elektrochemickou aktivitu a vynikající stabilitu pro konstrukci glukózových biosenzorů (Lai *et al.*, 2016).

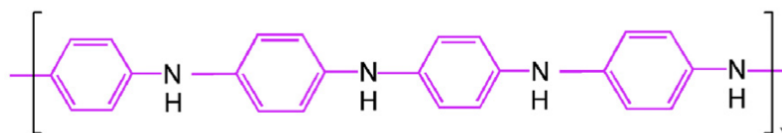
2.5 Vybrané vodivé polymery a stabilizátory

2.5.1 Polyanilin

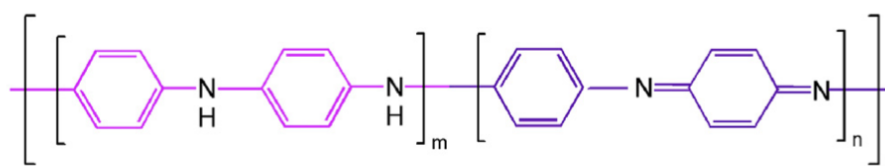
PANI (Obrázek 8) je hydrofilní vodivý polymer nerozpustný ve vodě a běžných organických rozpouštědlech. Přípravuje se chemickou oxidací anilinu nebo anilinových solí v přítomnosti oxidačního činidla. Mezi další metody syntézy PANI patří emulzní, disperzní, roztoková, mezifázová a samosestavující polymerace (Bhadra *et al.*, 2009). Jak uvádí několik skupin na základě testů *in vivo* a *in vitro*, PANI lze považovat za biokompatibilní, a také elektroaktivní materiál (Qazi *et al.*, 2014a, Qazi *et al.*, 2014b, Kamalesh *et al.*, 2000). Díky této vlastnosti byl zkoumán pro vývoj elektricky vodivých scaffoldů, protože výzkumné práce ukázaly, že vnitřní elektrická aktivita vede jak ke zvýšené rychlosti regenerace, tak ke zlepšení hojení poškozených tkání (Rai *et al.*, 2022). Avšak vzhledem k tomu, že není biologicky odbouratelný, dlouhodobá přítomnost PANI v těle pacienta by mohla vést k některým vedlejším účinkům. Navíc anilin a další vedlejší produkty reakce vznikající během syntézy PANI jsou aromatické aminy, o kterých je známo, že jsou karcinogenní (Humpolíček *et al.*, 2018). V průběhu let bylo dobře prokázáno, že k cytotoxicitě PANI dochází spíše působením vedlejších produktů syntézy polymeru, než v důsledku působení samotného PANI a že jeho biokompatibilitu lze významně zvýšit opakovaným čištěním, promýváním, deprotonací a reprotonačními cykly (Humpolíček *et al.*, 2018). Studie Kašpárkové *et al.* (2019) potvrdila, že biokompatibilita PANI může být značně ovlivněna a zlepšena výběrem správných reaktantů během syntézy, a dále zvolením správné dávky, protože reaktanty vykazují cytotoxicitu závislou na dávce. Vodivost PANI závisí na různých parametrech, jako je molekulová hmotnost, stupeň oxidace, uspořádání molekul, procento krystalinity, meziřetězcová separace a stupeň dopování (Bhadra *et al.*, 2009). Na rozdíl od všech ostatních vodivých polymerů, vodivost PANI závisí nejen na oxidační formě, ale také na stupni protonace PANI. Zejména, když je PANI z 50 % protonován, polaronová mřížková struktura poskytuje maximální vodivost (Wallace *et al.*, 2008). Důvodem rostoucího zájmu o PANI může být částečně skutečnost, že PANI je nejvíce adaptivní vodivý polymer, protože se vyskytuje v různých chemických strukturách (leukoemeraldin, emeraldin, pernigralin), viz Obrázek 9 (Bhandari, 2018). Kromě toho se PANI také používá jako systém pro dodávání léků při léčbě rakoviny. Studie ukázaly, že PANI má antibakteriální účinky proti gram pozitivním a gram negativním bakteriím, včetně *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus* (Gizdavic-Nikolaidis *et al.*, 2011, Robson, 1997).



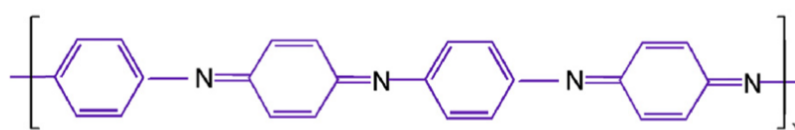
Obrázek 8: Základní strukturální jednotka PANI.



Leukoemeraldin (plně redukováný)



Emeraldin (parciálně redukováný a parciálně oxidováný)



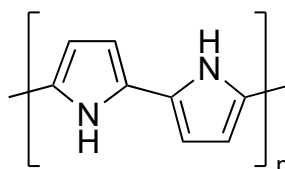
Pernigranilin (plně oxidováný)

Obrázek 9: Chemická struktura PANI v různých oxidačních stavech (Bhandari, 2018).

2.5.2 Polypyrrol

PPy (Obrázek 10) je tuhý a obtížně zpracovatelný vodivý syntetický polymer, nerozpustný v organickém rozpouštědle nebo vodě (Dallas and Georgakilas, 2015, Shi *et al.*, 2004), syntetizovaný chemickými nebo elektrochemickými procesy (Sadki *et al.*, 2000). Molekulární struktura obsahuje pětičlenné pyrrolové kruhy spojené navzájem v polohách 2 a 5. Poprvé byl syntetizován v roce 1963 pyrolýzou tetrajodpyrrolu (Nezakati *et al.*, 2018). Přidáním esterových vazeb k pyrrolovému monomeru činí PPy biologicky odbouratelný, což je důležitá vlastnost pro aplikaci TI (Rivers *et al.*, 2002). PPy je jeden z nejrozšířenějších vodivých polymerů v biomedicínských oblastech kvůli nízké ceně a dobrým elektrickým vlastnostem (Choudhary *et al.*, 2020). Další výhodou PPy jsou jeho mikrobicidní a antioxidační tažné vlastnosti, které byly připisovány kladným nábojům generovaných na páteři během syntézy. Na druhou stranu podle Ravichandran *et al.* (2010), hlavním omezením v cytocompatibilitě PPy je jeho hydrofobnost, která snižuje úspěšné zachycení proteinů na povrchu. Cytokompatibilita PPy je ovlivněna řadou proměnných vlastností, mezi které patří technika polymerace či různé parametry syntézy, např. použité rozpouštědlo,

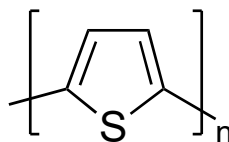
dopant a substrát, pH, teplota (Fonner *et al.*, 2008) a iniciátory polymerace – APS, chlorid železitý, peroxid vodíku, dichroman draselný a síran ceričitý, které jsou nejběžněji používanými oxidanty (Padmapriya *et al.*, 2019). Současným trendem je kombinovat PPy s jinými organickými nebo anorganickými materiály ke zlepšení biokompatibility konečného produktu (Ungureanu *et al.*, 2012, Theune *et al.*, 2019).



Obrázek 10: Základní strukturní jednotka PPy.

2.5.3 Polythiofen

Ačkoli PANI a PPy jsou nejrozsáhleji studovanými vodivými polymery pro TI, roste zájem o použití polythiofenových materiálů, jako je poly(3,4-ethylendioxythiofen) (PEDOT) a poly(3-thiofenmethylacetát) (P3TMA). Základní strukturní jednotka tohoto polymeru je na Obrázku 11. Po naočkování myšimi fibroblasty NIH/3T3 byly subkutánně tyto vodivé polymery implantovány. Výsledky *in vivo* ukázaly, že filmy PEDOT vykazují velmi nízkou vnitřní cytotoxicitu a zánětlivou odpověď po implantaci (Luo *et al.*, 2008). Del Valle *et al.* (2007) zkoumali účinek PEDOT filmů s epitelialními buňkami potvrzující jeho biokompatibilitu. Bohužel, ale podobně jako u jiných vodivých polymerů, hlavní nevýhodou polythiofenu je nedostatečná rozpustnost v důsledku jeho silných meziřetězcových interakcí, což má za následek omezenou zpracovatelnost. Ve vodě rozpustné, stabilní a vysoce vodivé polythiofenové deriváty byly připraveny kyselým dopováním kyselinou sulfonovou (Chayer *et al.*, 1997). Polythiofenový polymer má vysokou environmentální stabilitu a snadná zpracovatelnost polythiofenových kompozitů přinesla významnou pozornost pro další výzkum (Uygun Oksuz *et al.*, 2009).

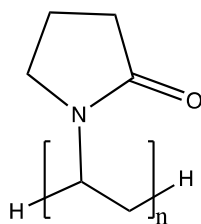


Obrázek 11: Základní strukturní jednotka polythiofenu.

2.5.4 Polyvinylpyrrolidon

PVP (Obrázek 12) je stabilizátor používaný při výrobě vodivých polymerů, kdy výsledným produktem je koloidní disperze. Řadí se mezi polyvinylacetyly. Poprvé byl syntetizován Walterem Reppem roku 1939. Získává se převážně radikálovou polymerací.

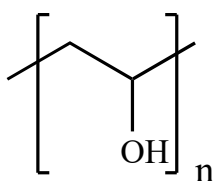
Produkty s vyšší molekulovou hmotností se polymerují ve vodném roztoku většinou za použití peroxidu vodíku jako iniciátoru (Haaf *et al.*, 1985). PVP může být použit k tvorbě hydrogelů a nanofibrilárních struktur, které mohou sloužit jako scaffoldy pro buněčné aplikace a regeneraci tkání. PVP má vynikající voděodolné vlastnosti a schopnost zachytávat molekuly vody, což z něj činí vhodný materiál pro hydrataci a udržení vlhkosti v oblastech aplikace TI (Bala Husain *et al.*, 2018).



Obrázek 12: Základní strukturní jednotka polyvinylpyrrolidonu.

2.5.5 Polyvinylalkohol

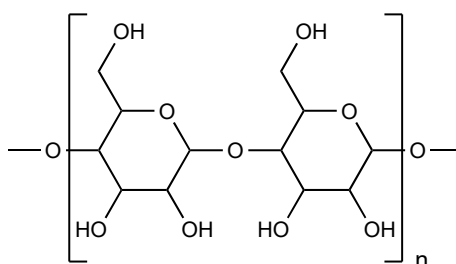
Další z používaných stabilizátorů, PVA (Obrázku 13), je semikrystalický, hydrofilní polymer s dobrou tepelnou a chemickou stabilitou. PVA se vyrábí hydrolyzací polyvinylacetátu s alkoholem. Acetátové skupiny jsou hydrolyzovány aniontem (CH_3O^-) za přítomnosti bazického katalyzátoru. Podle stupně polymerace produktů komerční třídy se PVA dělí na částečně hydrolyzované (10-15 mol % acetátových skupin), středně hydrolyzované (3-7 mol % acetátových skupin) a plně hydrolyzované (1-2 mol % acetátových skupin). Stupeň hydrolyzy ovlivňuje několik vlastností polymeru, jako je např. rozpustnost ve vodě nebo mechanické vlastnosti. Plně hydrolyzovaný PVA má nízkou rozpustnost ve vodě v porovnání s částečně hydrolyzovaným (Aruldass *et al.*, 2019). PVA je jedním z mála syntetických polymerů, který má C-C vazbu v hlavním řetězci a je biologicky odbouratelný (Hallensleben, 2000). U vysoce hydrolyzovaného polymeru platí, že čím je nižší molekulová hmotnost polymeru, tím se zvyšuje jeho rozpustnost. U méně hydrolyzovaného polymeru rozpustnost nezávisí na molekulové hmotnosti. Kombinací různých stupňů hydrolyzy a molekulové hmotnosti je umožněno vytvořit film s přesně nadefinovanými vlastnostmi (Chan *et al.*, 1999).



Obrázek 13: Základní strukturní jednotka polyvinylalkoholu (PVA).

2.5.6 Nanokrystalická celulóza

CNC (Obrázek 14) slouží jako stabilizátor používaný při syntéze vodivých polymerů v koloidní formě. Typickými zdroji celulózy je dřevo, bavlna, konopí, len, sláma, kůra moruše a další (Bangar and Whiteside, 2021). CNC (Obrázek 14) se získává kyselou hydrolyzou celulóзовých materiálů s následným odstraněním amorfních oblastí ve fibrilách. CNC tvoří protáhlá vlákna nanokrystalů s velkým povrchem, pevností v tahu a výbornou stabilitou (Grishkewich *et al.*, 2017). Ke kyselé hydrolyze se využívá kyselina sírová či kyselina fosforečná, jež na povrchu krystalů CNC indukuje tvorbu nabitých skupin, což přispívá k elektrostatickým interakcím (Cherhal *et al.*, 2016). CNC se vyznačuje nízkou hustotou, chemickou a environmentální stabilitou (Martó *et al.*, 2016). Vysoká krystalinita CNC zajišťuje velmi pevné, tuhé mechanické vlastnosti. Navíc, protože CNC disperze obsahuje mnoho hydroxylových skupin, snadno vytváří vodíkové vazby s vlastními nebo s jinými molekulami. To také poskytuje obrovské možnosti pro povrchové úpravy CNC (Khalil *et al.*, 2014).



Obrázek 14: Chemická struktura nanokrystalické celulózy (CNC).

2.6 Kompozity vodivých polymerů pro tkáňové inženýrství

Kompozity vodivých polymerů představují zajímavý způsob, jak dále vylepšit vlastnosti těchto materiálů pro různé aplikace, včetně oblasti TI. Kombinace vodivých polymerů s jinými materiály, jako jsou např. hydrogely, nanočástice nebo proteiny, může vést k novým materiálům se synergickými vlastnostmi, které mohou být využity pro tkáňové inženýrské aplikace (Yang *et al.*, 2017).

Hydrogely jsou vysoce hydratované polymerní sítě s vysokou sorpcí vody, které mohou napodobovat ECM tkání a jejich Youngův modul pružnosti je také velice blízký lidské tkáni (Agarwala, 2020). Hydrogely mají prostorově zesíťovanou řetězovou síť složenou z přírodních anebo syntetických hydrofilních polymerních řetězců, které mohou absorbovat velké množství vody při zachování 3D struktury, díky čemuž jsou vysoce kompatibilní pro biomedicínské aplikace (Hoffman, 2012). Pokud jsou vodivé polymery, jako je PPy nebo

PANI, začleněny do hydrogelů, mohou zlepšit svou elektrickou vodivost a mechanické vlastnosti při zachování své biokompatibility. Tyto kompozity mají potenciální využití v aplikaci inženýrství nervových tkání a inženýrství srdečních tkání (Rogers *et al.*, 2020). Jejich architektura a porézní struktury mohou být upraveny tak, aby podporovaly difúzi živin, odpadů a rozpuštěných látek a organizaci buněk, připojení a migraci (Luo *et al.*, 2014). Navíc jejich mechanické vlastnosti (např. elasticita, stlačitelnost a viskoelastické chování) mohou regulovat buněčný osud a funkci prostřednictvím mechanotransdukční signalizace (Drury and Mooney, 2003, Luo *et al.*, 2014). Pro vznik hydrogelů se využívá např. chitosan, přirozeně odvozený kationtový polymer, který může být degradován lidskými enzymy na produkt napodobující extracelulární matrix, což z něj činí široce používanou složku hydrogelových formulací (Ahmadi *et al.*, 2015). Syntetické hydrogely na bázi polyethylenglykolu (PEG) vykazují žádoucí vlastnosti, jako je biokompatibilita a nízká imunogenicita (Lin and Anseth, 2009). Navzdory jejich mnoha výhodám, některé hydrogelové platformy mají stále řadu omezení, která mohou omezit jejich použitelnost v terapeutických aplikacích. Čisté hydrogely mají často omezený mechanický výkon, což vede k suboptimálním charakteristikám pevnosti, stlačitelnosti a elasticity (Esmaeely Neisiany *et al.*, 2020b).

Hydrogelové kompozity jsou kombinací vodivých polymerů v kombinaci s nanočásticemi a hydrogely. Nanočástice mohou navíc poskytovat další funkce, jako je řízené uvolňování léčiv nebo růstových faktorů, zatímco elektricky vodivý hydrogel může poskytnout 3D lešení pro růst tkáně. Tyto kompozity mají potenciál při hojení ran a inženýrství kostní tkáně (Jiang *et al.*, 2020). Tyto materiály mohou být také navrženy s komponentami umožňující selektivní uvolnění za určitých podnětů, jako jsou chitosan/algínátové hydrogely, které se degradují v reakci na změny v pH nebo kovové nanočástice, které generují teplo v reakci na blízké infračervené záření (NIR) [Laroui *et al.*, 2010, Craciun *et al.*, 2017]. Pro aplikace TI mohou nanokompozitní hydrogely nabídnout lepší mechanickou pevnost oproti samotným hydrogelům a zvýšenou retenci výkonné části systému oproti samotným nanočásticím (Esmaeely Neisiany *et al.*, 2020a).

Použití kompozitu vodivého polymeru s hedvábným fibroinem se zkoumá zejména pro použití v inženýrství svalové a nervové tkáně. Hedvábný fibroin je přírodní materiál na bázi proteinů, který byl rozsáhle studován pro aplikace v TI díky své biokompatibilitě a mechanickým vlastnostem (Vilchez *et al.*, 2020, Yang *et al.*, 2007). Mezi další kompozity využívané v TI spadá kompozit vodivý polymer-kolagen. Kolagen je hlavní složkou ECM

v mnoha tkáních. Díky tomu zabudování jeho kompozitů do tkání poskytuje dobrou mezibuněčnou interakci, ale také pevnost v tahu a stabilitu (Keate *et al.*, 2021, Barberio *et al.*, 2022).

2.7 Vodivé kopolymerní filmy pro tkáňové inženýrství

Vodivé kopolymerní filmy získaly významnou pozornost v TI díky svým jedinečným vlastnostem, jež je činí specifickými pro různé biomedicínské aplikace. Tyto filmy jsou zpravidla složeny ze dvou a více různých monomerů, které jsou kopolymerovány za vzniku polymeru s vodivými i biokompatibilními vlastnostmi (Cui *et al.*, 2007). Například kopolymerní filmy používané pro inženýrství nervové tkáně jsou měkké a flexibilní, aby napodobovaly vlastnosti mozkové tkáně, zatímco kopolymerní filmy pro inženýrství kostní tkáně jsou tuhé a pevné, aby podporovaly regeneraci kosti (Kaliva *et al.*, 2020, Xu *et al.*, 2019). Vodivé kopolymerní filmy pro TI mohou být vyrobeny pomocí různých technik, včetně lití v roztoku, elektrostatického zvlákňování a sestavování vrstvy po vrstvě. Tyto techniky umožňují přesnou kontrolu nad tloušťkou, složením a morfologií filmu, které lze optimalizovat pro dosažení požadovaných vlastností pro konkrétní aplikaci TI (Shifeta *et al.*, 2022, Zhang *et al.*, 2019, Tolstova *et al.*, 2023).

Existuje několik konkrétních kopolymerních filmů, které byly navrženy a použity pro TI, např. PANI/PLA (Polyanilin/polylaktid), jež je kombinován z elektricky vodivého PANI s biodegradovatelným polylaktidem (Abd Razak *et al.*, 2015). PLA se úspěšně používá ke konstrukci těch lešení, které poskytují podporu Schwannovým buňkám, umožňující prodloužení axonů a podpoře vaskulárního růstu (Boni *et al.*, 2018, Farzamfar *et al.*, 2017). Stejně tak se PLA kombinuje i s PPy filmem pro regeneraci nervové tkáně (Zhou *et al.*, 2016b, Zhou *et al.*, 2016a). Poly(3,4-ethylenedioxythiofen)-polystyren (PEDOT/PSt) filmy jsou také elektricky vodivé a mechanicky pevné. Mohou tedy sloužit jako povrchy implantátů, jež zapříčiní zlepšení biokompatibility (Wu *et al.*, 2012, Abd Wahid *et al.*, 2021). Polyanilin-polykaprolakton (PANI/PCL) se zkoumá pro regeneraci kostní tkáně kvůli biologické odbouratelnosti PCL (Borriello *et al.*, 2011). Vývoj tohoto kopolymeru probíhá i ve formě scaffoldu (Wibowo *et al.*, 2020).

3 VODIVÉ BIOMATERIÁLY PRO APLIKACE V TKÁŇOVÉM INŽENÝRSTVÍ

Materiál, který je uveden do kontaktu s lidskou nebo zvířecí tkání, jako součást lékařského nebo kosmetického postupu, se obecně nazývá biomateriál. Jedna z prvních konvenčních definic biomateriálu uvádí, že biomateriál je „neživotaschopný materiál používaný v lékařském zařízení, určený k interakci s biologickými systémy“ (Kulinets, 2015). Podle Státního zdravotního ústavu lze biomateriál definovat jako „libovolnou látku (jinou než drogu) nebo kombinaci látek syntetického nebo přírodního původu, kterou lze používat po libovolnou dobu, jako celek nebo část systému, který ošetřuje, rozšiřuje nebo nahrazuje tkáň, orgán nebo funkci těla (Birla, 2014). Biomateriály lze klasifikovat např. podle toho, zda se jedná o keramiku, kovy, polymery nebo jiné kompozity (Binyamin *et al.*, 2006) nebo podle zdroje se dělí na přírodní a syntetické. Na základě degradace se rozdělují na biologicky odbouratelné a biologicky nerozložitelné.

Buněčná aktivita je vedle chemických gradientů a fyzikálních sil organizována směrem k tvorbě a opravě anatomických struktur vysokého řádu pomocí bioelektrických signálů (Huang *et al.*, 2005, Ben-Zvi *et al.*, 2011, von Dassow and Davidson, 2011, Nelson, 2009, Levin and Stevenson, 2012). Většina živých organismů má různé stupně regeneračních schopností, ale jak jsou tyto mechanismy regeneračních procesů řízeny, není stále zcela pochopeno. Z výzkumů plyne, že přirozeně se vyskytující bioelektrická napětí hrají instruktivní roli při regeneraci tkání, a také embryonálním vývoji (Tyler, 2017). Bioelektrina je označována, jako endogenní elektrická signalizace zprostředkována iontovými kanály na plazmatické membráně (Hronik-Tupaj and Kaplan, 2012). Transepiteliální elektrická pole regulují migraci buněk, jejich orientaci a růst nervů, ale také se podílejí na hojení ran (Adams *et al.*, 2013, Adams and Levin, 2013, Pan and Borgens, 2012). Bioelektrina vzniká na buněčné membráně díky nerovnováze náboje mezi intracelulárními a extracelulárními kompartmenty, způsobené průchodem iontů (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , atd.). Rozdílná distribuce těchto iontů na obou stranách buněčné membrány má za následek intracelulární a extracelulární rozdíly napětí, známé jako membránový potenciál (Levin *et al.*, 2019). Membránový potenciál je udržován pasivním a aktivním transportem iontů přes různé iontové kanály a transportéry umístěnými v buněčné membráně (Sundelacruz *et al.*, 2009).

V průběhu let několik studií demonstrovalo reakci buněk na různé vlastnosti biomateriálů, jako je např. smáčivost, mechanická tuhost (Pelham and Wang, 1997),

elasticita (Engler *et al.*, 2006) a povrchová topografie (Luo *et al.*, 2022). Použití elektroaktivních materiálů v TI má potenciál zlepšit funkční výstupy studií. Jeden z výzkumů uvádí, že pulzní stimulace myších osteoblastových buněk elektrickým polem vede k významnému zvýšení syntézy DNA (Ozawa *et al.*, 1989), zatímco stejnosměrné elektrické pole ovlivňuje shlukování a distribuci membránových proteinů na rozhraní buněčného substrátu, což zapříčiňuje možnost řídit směr buněčné lokomoce v případě dvou buněčných fibroblastových linií (Brown and Loew, 1994). Elektrická stimulace také zlepšila kontraktilní chování upravené srdeční tkáně (Tandon *et al.*, 2011), myogenní diferenciaci i ukládání kolagenu 1. typu (Park *et al.*, 2008). Začlenění vodivých materiálů umožňuje přenos elektrických signálů z vnějších zdrojů přes scaffoldy s nasazenými buňkami, aniž by bylo ohroženo jeho mechanické, biologické nebo degradační chování.

3.1 Biokompatibilita

Biomateriály používané v TI musí splňovat několik podmínek s ohledem na jejich vlastnosti. Jednou z těchto podmínek je biokompatibilita s tkání. Obecně se hodnotí výkonnost biomateriálu *in situ* biokompatibilitou, která odkazuje na měřený úspěch interakce mezi biomateriálem a buňkami pro specifický biomedicínský úkol (Vogler, 1998). Pokud biomateriál zpomaluje nebo negativně ovlivňuje přirozený biologický proces, kterému má napomáhat, biomateriál by byl považován za neslučitelný pro TI (Chu *et al.*, 2002).

Biomateriál musí být netoxický pro organismus, biokompatibilní s krví, nezáznětlivý, hypoalergenní a nekarcinogenní. (Hudecki *et al.*, 2019). Pro testování biokompatibility materiálu je třeba provést řadu různých testů, avšak přesné typy zkoušek závisí na předpokládaném budoucím využití materiálu. Jeden ze způsobů, jak zjistit, zda je biomateriál biokompatibilní, je stanovení jeho cytotoxicity (Przekora, 2019).

V průběhu let vzniklo několik definic pro biokompatibilitu. Aktuálně používaná definice biokompatibility zní: „Biokompatibilita je schopnost biomateriálu plnit svou požadovanou funkci s ohledem na léčebnou terapii, aniž by byl pacientovi vyvolán jakýkoli nežádoucí lokální nebo systémový účinek, ale aby byla generována nejvhodnější prospěšná buněčná nebo tkáňová odezva a aby byl optimalizován klinicky relevantní výkon této terapie“ (Williams, 2008). Velkým pokrokem v oblasti biokompatibility PANI bylo rozhodnutí Světové zdravotnické organizace (WHO), Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny,

klasifikovat anilin jako pravděpodobný karcinogen pro lidi (skupina 2A) [IARC Monographs, 2020, online].

3.1.1 Cytotoxicita

Jelikož se při aplikaci biomateriálů očekává, že budou v kontaktu s pacienty, stanovení bezpečnosti těchto materiálů je neodvratné. Hodnocení bezpečnosti prostředků užívaných v medicíně je propracovaný a přísný proces založený na mezinárodně uznávaných směrnících, které jsou značně rozmanité a závisí na zamýšleném použití biomateriálu nebo zdravotnického prostředku a slouží k pochopení rizika nepříznivých zdravotních účinků užívaného prostředku. S ohledem na skutečnost, že buňka je základní jednotkou života, téměř všechny regulační směrnice předepisují povinné testy cytotoxicity *in vitro*, bez ohledu na způsob a délku kontaktu. Tyto testy typicky sestávají z inkubace savčích buněk s materiálem, buď přímým nebo nepřímým způsobem, a poté dochází k ověření buněčné odpovědi různými metodami, včetně kvalitativních, semikvantitativních a kvantitativních testů. Interakce buněk s biomateriálem je klasifikována jako cytotoxicita a cytokompatibilita. Tyto testy jsou široce používány, protože jsou rychlé, reprodukovatelné, citlivé a cenově výhodné (Komeri *et al.*, 2022).

Cytotoxicita je definována jako „účinek nebo rozsah účinků, mikroskopických anebo vizuálních, spojených s přítomností testovaných materiálů“ (ISO 10993-5, 2009). Buňky jsou inkubovány v kontaktu s biomateriálem, zařízením anebo extrakty zařízení buď přímo, nebo prostřednictvím difúze. Rozpustné nebo nerozpustné vyluhovatelné látky z biomateriálů mohou narušit integritu buněčné membrány, inhibovat syntézu proteinů, bránit buněčnému dělení a vést k buněčné lýzi (Özlem Sultan, 2017). Časový rámec a kinetika cytotoxických jevů se liší v závislosti na typu buněk a povaze toxické sloučeniny. Proto je pro obecnou cytotoxickou studii zvažována toxicita pro fibroblastové buňky, které jsou přítomny ve většině tkání. Výběr buněk pro specifické testování cytotoxicity je také založen na buněčné linii, která přijde do kontaktu s materiálem při jeho konečné aplikaci nebo s převládajícím buněčným typem tkáně. Testy cytotoxicity lze provádět podle pokynů, jako jsou pokyny ISO (Mezinárodní organizace pro normalizaci) nebo ASTM (Americké normy pro testování materiálů) [Komeri *et al.*, 2022].

3.2 Biodegradabilita

Biodegradabilita je schopnost materiálu se biologickými procesy rozkládat na neškodné látky (Bowden and Ridler, 1936). Vlastnosti biodegradabilního materiálu se s časem mění a mohou být produkovány degradační produkty s různou úrovní tkáňové kompatibility ve srovnání s výchozím materiálem. Mezi důležité vlastnosti biodegradabilního biomateriálu lze zařadit (Lloyd, 2002):

- Materiál by neměl po implantaci do těla vyvolávat trvalou zánětlivou nebo toxickou reakci.
- Doba degradace materiálu by měla být zharmonizovaná s procesem hojení nebo regenerace.
- Materiál by měl mít vhodné mechanické vlastnosti pro uvedenou aplikaci a změny mechanických vlastností s degradací by měly být kompatibilní s procesem hojení nebo regenerace.
- Produkty rozkladu by měly být netoxické a schopné se metabolizovat.
- Materiál by měl mít vhodnou propustnost a zpracovatelnost pro zamýšlenou aplikaci.

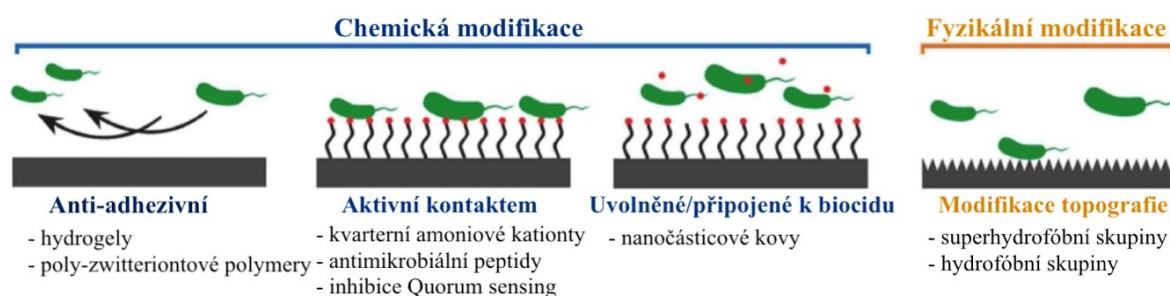
Biodegradace polymerních biomateriálů zahrnuje hydrolytické nebo enzymatické štěpení vazeb v řetězci polymeru vedoucí k jeho erozi (Katti *et al.*, 2002). V závislosti na způsobu degradace lze polymerní biomateriály dále rozdělit na hydrolyticky degradovatelné polymery a enzymaticky degradovatelné polymery. Hydrolyticky odbouratelné polymery jsou obecně preferovány jako implantáty kvůli jejich minimálním odchylkám od místa k místu a od pacienta k pacientovi ve srovnání s enzymaticky degradovatelnými polymery (Nair and Laurencin, 2007). Hydrolyticky odbouratelné polymery jsou polymery, které mají ve své páteři hydrolyticky labilní chemické vazby. Mezi funkční skupiny náchylné k hydrolýze patří estery, orthoestery, anhydridy, uhličitany, amidy, urethany, močoviny atd. (Li, 1999).

Většina přirozeně se vyskytujících polymerů podléhá enzymatické degradaci. Rychlost *in vivo* degradace enzymaticky degradovatelných polymerů se však významně mění s místem implantace a v závislosti na dostupnosti a koncentraci enzymů. Chemická modifikace těchto polymerů může rovněž významně ovlivnit rychlost jejich degradace (Nair and Laurencin, 2007).

3.3 Antibakteriální účinky

Biomateriály hrají zásadní roli při léčbě nemocí a zároveň napomáhají zlepšování zdravotní péče. Jejich rozmanitost stále každým rokem nabývá. Neopomenutelným faktem však je, že ročně zemře více než 700 000 pacientů kvůli choroboplodným zárodkům rezistentním vůči lékům. V důsledku toho se apeluje na vývoj nových antibakteriálních biomateriálů se zvýšenou bakteriální selektivitou a sníženou rezistencí na antibiotika (Cai and Liu, 2020). Jednou z možných příčin problémů při aplikaci biomateriálů je přichycení mikroorganismů na jejich povrchy, které vede k růstu biofilmu, což vážně omezuje funkční využití těchto systémů (Bazaka *et al.*, 2012). V tomto ohledu byly přírodní antibakteriální materiály jako zlato, stříbro a některé oxidy včetně oxidu zinečnatého, oxidu titaničitého a oxidu manganatého a deriváty kovů použity jako přísady k vytvoření kompozitů s antibakteriálními vlastnostmi pro biomedicínské aplikace (Lu *et al.*, 2016, Singh and Dubey, 2018, Campoccia *et al.*, 2013).

K účinnému boji proti těmto infekcím byla také vyvinuta a popsána řada přístupů, včetně povrchových chemických modifikací a diferenciací složení implantátů (Hasan *et al.*, 2013). Bakteriální připojení k povrchu je počáteční fází rozvoje infekcí cizích těles. Pokud je povrch ošetřen látkami odpuzujícími bakterie, nemohou ulpívat a tvořit kolonie (Choudhury *et al.*, 2020). Hydrofilní a nenabitě povrchy jsou účinné povrchy s nízkou schopností takového přilnutí. Současné přístupy k funkčním antivegetativním povlakům závisí na řadě strategií, jako je výroba polymerových kartáčů, zwitteriontových polymerů a hydrogelů nebo metoda povrchového roubování. Kromě změny chemického charakteru může být pro omezení uchycení bakterií také změněna topografie povrchu. Strategie povrchové úpravy biomateriálů pro antibakteriální aplikaci jsou shrnuta na Obrázku 15. Drsná a porézní rozhraní jsou ve skutečnosti vystavena na posílení bakteriálních interakcí a napomáhají mikrobiálnímu připojení (Choudhury *et al.*, 2020).



Obrázek 15: Strategie povrchové úpravy pro antibakteriální aplikaci (Unepetty *et al.*, 2022).

4 SROVNÁNÍ VYBRANÝCH CHARAKTERISTIK KOLOIDNÍCH DISPERZÍ A FILMŮ VODIVÝCH POLYMERŮ

Porovnáním charakteristik a vlastností koloidních disperzí a filmů vodivých polymerů mohou být poskytnuty důležité informace o jejich vhodnosti pro konkrétní aplikace. Mezi hlavní atributy, které by měly být zohledněny při srovnání těchto materiálů patří elektrická vodivost, mechanická pevnost, morfologie, stabilita, proces přípravy a cena (Nguyen and Yoon, 2016). Druh dopantu může mít významný dopad na morfologii povrchu vodivých polymerů, elektrochemickou stabilitu, biokompatibilitu a mechanickou pevnost. Obecným pravidlem je, že menší příměsi, jako je polythiofen, produkují hrubší, a tedy elektroaktivnější filmy, které jsou měkčí než větší příměsi, jako je polymerní polystyren sulfonát (Wen *et al.*, 2020, Wang *et al.*, 2013). Hrubé vodivé polymery vyrobené z menších dopantových aniontů, jako je PEDOT/polythiofen, však mají tendenci trpět takzvanými drobnými mechanismy, které jim brání v použití v implantovatelných zařízeních (Wen *et al.*, 2020, G. Dinku *et al.*, 2009). Hladší vodivé polymery, jako jsou filmy na bázi PEDOT/polystyren sulfonát nebo PPy, mají zlepšenou biokompatibilitu díky více soudržným vlastnostem filmu, na druhou stranu trpí sníženou kapacitou přenosu náboje a mohou se opakovaným elektrickým cyklem delaminovat. Nakonec je třeba udělat kompromis mezi mechanickými, elektrickými a biologickými vlastnostmi (G. Dinku *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2013). Obecně lze ale o PEDOT filmu říci, že má vysokou elektrickou vodivost a vynikající chemickou stabilitu (Groenendaal *et al.*, 2000, Heywang and Jonas, 1992).

Druhem dopantu může být modulována také vodivost. Dopanty používané pro tento účel se mohou lišit od malých iontů (ionty chlóru) po velké (polymery) [Kaur *et al.*, 2015]. Použitá příměs, zejména u velkých dopantů, ovlivňuje i vlastnosti povrchu, jako je např. drsnost nebo povrchová energie a tím i následně buněčné chování (Collier *et al.*, 2000).

4.1 Morfologie

Buněčná odezva na topografii je skutečně komplexní problematika a různé faktory povrchové geometrie mají potenciál různě měnit buněčné chování (Simitzi *et al.*, 2017, Boyan *et al.*, 2001, Guo *et al.*, 2012). Z toho důvodu je nezbytný pokročilý přístup ve snaze odhalit vztah mezi povrchovou topografií a chováním buněk (Unadkat *et al.*, 2011).

Kupříkladu zarovnaná elektroaktivní nanovlákna PANI s polystyren-sulfonátem elektroaktivního viru tabákové mozaiky (TMV/PANI/PSS) mohou řídit směr růstu neuritů,

zvýšit procento buněk a způsobit bipolární buněčnou morfologii. Výsledky ukázaly, že elektroaktivita a topografické podněty z nanovláken TMV/PANI/PSS podporují diferenciaci nervových buněk a vylučování neuritů (Wu *et al.*, 2015).

Topologie povrchu má velký dopad na buněčnou adhezi a proliferaci u povrchů s vyšší drsností, což zlepšuje výkonnost buněčné kultury (Simitzi *et al.*, 2017, Thapa *et al.*, 2003, Andersson *et al.*, 2003, Yang *et al.*, 2004). Studie Pires *et al.* (2015) se zabývala pozorováním změn v morfologii buněk po aplikaci vodivého filmu PEDOT/PSS. Zjistili, že populace fibroblastů byla o 1,3krát vyšší po aplikaci PEDOT/PSS než bez aplikace. PEDOT/PSS byl také poprvé použit k prodloužení lidských neurálních kmenových buněk prostřednictvím aplikace pulzního proudu, což mělo dopad na jejich diferenciaci směrem k neuronům a taktéž to přispělo k delším neuritům.

Kompozitní film PPy pod přímým elektrickým polem o síle 100 mV/mm výrazně zvýšil životaschopnost buněk. Později byl prozkoumán podrobný mechanismus PPy s poly-L-mléčnou kyselinou (PLLA) filmu podněcující hojení ran. Za zprostředkování elektrického pole (100 mV/mm⁻¹) by vodivý PPy/PLLA film mohl zvýšit životaschopnost lidských kožních fibroblastů modulací cytokinů interleukin 6 a interleukin 8 (Shi *et al.*, 2008). Rouabhia *et al.* (2013) mají vyrobenou heparinem dopovanou PPy/PLLA membránu. Při expozici elektrického pole vodivý film odhalil zvýšenou aktivitu dermálních fibroblastů s vyšší expresí fibroblastového růstového faktoru 1 a 2 a podpořil transdiferenciaci myofibroblastů s vyšší hladinou α -aktinu hladkého svalstva. Později na genetické úrovni prokázali, že PPy vodivý kompozitní film může modulovat expresi různých genů v procesu hojení ran (Park *et al.*, 2015).

Fólie, membrány a vlákna mající 2D strukturu mají obvykle dobrou propustnost pro kyslík, odolnost vůči vodě a houževnaté mechanické vlastnosti. Houby, pěna a hydrogel vlastnící 3D síť a porézní strukturu mají potenciál absorbovat velké množství exsudátu, udržovat vlhké prostředí a působit jako nosiče bioaktivních látek a buněk (Boateng and Catanzano, 2015, Liang *et al.*, 2021). Zejména, protože nanovlákna by mohla být naprogramována do zarovnané architektury podobné ECM, mají 3D síť také velký potenciál v kožních lešeních (Norouzi *et al.*, 2015).

4.2 Stabilita

Důležitým ukazatelem stability koloidních disperzí a filmů je zeta potenciál (ζ) jako funkce pH. Jeho velikost se odráží na stupni elektrostatického odpuzování mezi podobně

nabitými částicemi v disperzi. V kyselých podmínkách ($\text{pH} < 7$) je hodnota zeta potenciálu nízká, v důsledku čehož může docházet k rychlejší tvorbě agregátů. Naproti tomu při $\text{pH} 7$ a vyšším je elektrokinetický potenciál částic vysoký, což podpoří silné elektrostatické odpuzování mezi částicemi PANI. Film lze při neutrálním až vyšším pH považovat za koloidně stabilní a průměrná vzdálenost mezi částicemi je malá. Neutrální pH tak zabrání koagulaci během syntézy filmu (Banjar *et al.*, 2021, Shin *et al.*, 2005).

Stabilita koloidní disperze PANI stabilizované PVP byla testována expozicí $105\text{ }^\circ\text{C}$, ultrasonického míchání, cykly opakovaného zmrazení, tavení a ozařováním UV světlem. Výsledky Blinova *et al.* (2005) ukazují, že i po tisíci hodině při vystavení $105\text{ }^\circ\text{C}$ je zachována koloidní stabilita jak v kyselém, tak v alkalickém prostředí. Ošetření ultrazvukem, opakované zmrazení disperze nebo vystavení UV záření nezpůsobilo nevratné poškození koloidů. Velikost částic se během skladování koloidních disperzí po dobu deseti let významně nezměnila (Blinova *et al.*, 2005, Marie *et al.*, 2003). Ve studii byla také potvrzena dlouhodobá stabilita testováním PANI potažený platínovou elektrodou vystavením elektrické stimulace po dobu šesti měsíců (Di *et al.*, 2011).

PPy má n rozdíl od PANI relativně špatnou tepelnou stabilitu, zejména v oxidačních atmosférách, jako je vzduch. Výzkum Ansari (2006) se pokusil o syntézu vodivých polymerů se zlepšenými mechanickými vlastnostmi a tepelnou stabilitou. Toho lze dosáhnout zapouzdřením polymeru, modifikací struktury monomerních jednotek, protiiontů nebo řízením podmínek polymerace. Z výzkumu Thieblemont *et al.* (1993) plyne, že stabilita PPy syntetizovaného chemickou oxidační polymerací je vyšší než elektrochemickou oxidací.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 MATERIÁLOVÉ A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

5.1 Použité chemikálie

ActinRed™ 555	Invitrogen™ ThermoFisher Scientific, USA
Anilinchlorid	Lach-Ner, Česká republika
Avicel® PH-101	Sigma Aldrich, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, USA
Dijodmetan	Sigma Aldrich Co.
Ethanol	Penta ČR
Etylenglykol	Sigma Aldrich Co
Fetální bovinní sérum (FBS)	Biosera, Francie
Fosfátový pufr (PBS) (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	BioSera, Francie
Formaldehyd 36–38 %	Penta s. r. o., Česká republika
Hoechst 33258	Invitrogen™ ThermoFisher Scientific, USA
Chlorid sodný	Lach-ner, s.r.o., Česká republika
Chlorovodíková kyselina (HCl)	
DMEM médium (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Biosera, Francie
Mowiol® 4-88	Sigma Aldrich, USA
Mowiol® 18-88	Sigma Aldrich, USA
MTT	Duchefa Biochemie, Nizozemí
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid	
Nanokrystalická celulóza (CNC)	Cellulose Lab, Canada

12,2 wt % ve vodě

Penicilin-Streptomycin Solution 100X	Biosera, Francie
Persulfát amonný	Sigma Aldrich, USA
Poly(vinylalkohol) [PVA] M _w 89,000–98,000, 99+% hydrolyzed	Sigma Aldrich, USA
poly(vinylpyrrolidon) [PVP] M _w = 360 000	Honeywell Fluka, K 90
Triton™ X-100	Sigma Aldrich, USA
Trypsin	Biosera, Francie

5.2 Přístrojové vybavení

Analytické váhy	Radwag, ČR
Automatické pipety	Eppendorf, Německo
Centrifuga 5702 R	Eppendorf, ČR
CO ₂ inhubátor Heracell 150i	ThermoFisher Scientific, USA
Digestoř odtahovaná MERCI G NextGen	MERCI s. r. o., ČR
Digitální elektrometr Keithley K6517	Keithley Instruments, Inc., USA
Fluorescenční mikroskop Olympus IX81	Olympus, Japonsko
Inkubátor s příslušenstvím Heracell™ 150i	ThermoFisher Scientific, USA
Inverzní světelný mikroskop IX51	Olympus, Japonsko
Laminární box Bio130 A2 s příslušenstvím	Alpina, Polsko
Napěťový zdroj Keithley K2410	Keithley Instruments, Inc., USA
Scanner Keithley K7002	Keithley Instruments, Inc., USA
Spínací karta Keithley K7011-S	Keithley Instruments, Inc., USA
Vortex GENIE 2	Scientific Industries, USA
Další běžné laboratorní vybavení	

5.3 Použitý software

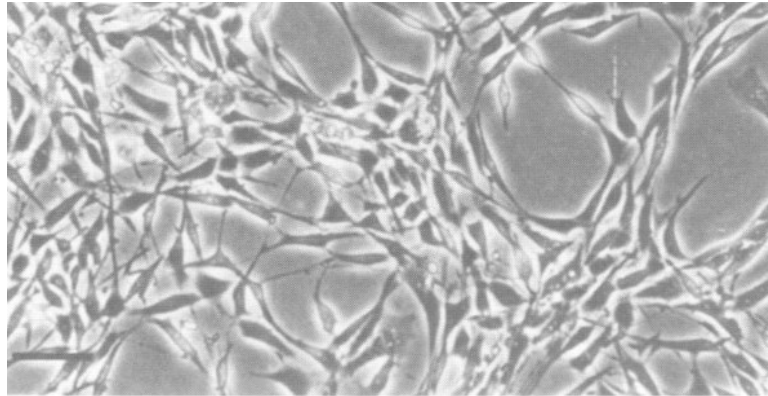
ChemDraw Professional 20.0	PerkinElmer, USA
Modulární reader INFINITE M200 PRO	Tecan, Švýcarsko
SEE Systém	Advex Instruments, Česká Republika
The Olympus Software cellSens Standard	Olympus, Řecko
Zetasizer Nano ZS	Malvern Instruments, UL

5.4 Materiálové vybavení

Sterilní tkáňový plastik	TPP, Švýcarsko
Centrifugační zkumavky (5, 10, 25 ml)	TPP, Švýcarsko
Podložní sklíčko z minerálního skla	Marienfeld, Německo
Další laboratorní vybavení	

5.5 Buněčná linie

K praktické části diplomové práce bylo na testování využito linie myších fibroblastů NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658TM, American Type Culture Collection, ATCC). Jedná se o linii široce používanou ve výzkumu biologických věd. Fibroblasty jsou nejdůležitějším buněčným typem v pojivové tkáni, protože produkují složky extracelulární matrix a určují architekturu tkáně. Jsou také velmi heterogenní a skládají se mimo jiné z podtypů specifických pro cílový orgán. Buněčná linie NIH/3T3 je proto s největší pravděpodobností složena z různých podtypů fibroblastů. NIH/3T3 byly původně odvozeny ze 17–19 dnů starého embrya myši (Todaro and Green, 1963). Tato buněčná linie byla izolována roku 1962 na lékařské fakultě v New York University. Její název „3T3“ pochází z angličtiny „3-day transfer, inoculum $3 \cdot 10^5$ cells“. V praxi to znamená, že buňky byly přeočkovány každý třetí den a inokulovány na misku o objemu 20 cm² a hustotou $3 \cdot 10^5$ buněk/ml. Po přibližně 20-30 generacích růstu *in vitro* se buněčná linie začne stabilizovat. Morfologie buněk je adherentní, fibroblastická a je považována za jednu z relativně snadno kultivovaných buněčných linií (NIH3T3 Cell line, online). Z toho důvodu je tato buněčná linie vhodná pro různé aplikace v buněčném a molekulárním výzkumu. Morfologie buněk je vyobrazena na Obrázku 16.



Obrázek 16: Morfologie buněčné linie NIH/3T3 (Andoniou *et al.*, 1994).

5.6 Testované polymery

V rámci praktické části diplomové práce byly studovány dva vodivé polymery – PANI a PPy. Oba polymery byly připravené ve dvou různých formách, a to ve formě koloidní disperze a ve formě vodivého polymerního filmu. Syntéza vodivých polymerů probíhala v přítomnosti stabilizátoru. Vodivý polymer PANI byl syntetizován se stabilizátorem nanokrystalickou celulórou (CNC), polyvinylpyrolidonem (PVP) a polyvinylalkoholem (PVA). Stejné stabilizátory byly použity i pro druhý testovaný polymer, PPy. Na připravených polymerech byly testovány biologické a materiálové vlastnosti. Vodivé polymery byly připraveny v rámci praktické části diplomové práce.

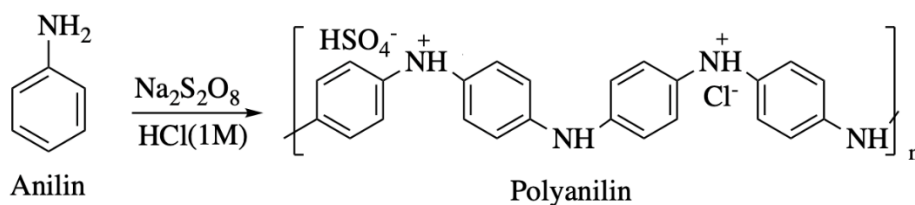
6 METODY

Praktická část diplomové práce byla zaměřena na testování materiálových charakteristik PANI a PPy vodivých polymerů a interakcí mezi testovaným materiálem a buňkami. Zkoumané vzorky byly podrobeny materiálovým testům, jako je měrná elektrická vodivost, povrchová energie a velikost částic. Dále se práce také zabývala biologickými testy z hlediska buněčné adheze, proliferace a cytotoxicitou buněk myších fibroblastů NIH/3T3 pro biomedicínské aplikace vodivých polymerů.

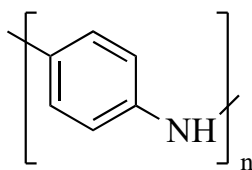
6.1 Syntéza vodivých polymerů

6.1.1 Syntéza koloidní polyanilinové disperze

Pro syntézu PANI koloidů byl zvolen postup dle IUPAC popsáný v Stejskal a Sapurina (2005). Hydrochlorid anilinu (0,2 M) byl nejprve oxidován peroxodisíranem amonným (0,25 M) v přítomnosti jednoho ze stabilizátorů. Používanými stabilizátory byl 2 % hmotn. PVP s molekulovou hmotností 360 000 kDa, 1 % hmotn. PVA s molekulovou hmotností 130 000 kDa a 1 % CNC (12,2 wt % ve vodě). Hydrochlorid anilinu (2590 mg) byl rozpuštěn ve vodném roztoku stabilizátoru na konečný objem 50 ml roztoku. Polymerace anilin hydrochloridu byla zahájena při laboratorní teplotě 20 °C přidáním 50 ml roztoku oxidačního činidla. Směs byla krátce míchána a následně ponechána v klidu po dobu 2 h. Výsledná tmavě zelená disperze hydrochloridu polyanilinu byla přenesena do dialyzační membrány (Spectra/Por 1, Spectrum Medical Instruments, USA, mezní hodnota molekulové hmotnosti 7 000 kDa) a důkladně dialyzována proti 0,2 M kyselině chlorovodíkové, pro odstranění zbytkových monomerů a vedlejších produktů reakce, jako je např. síran amonný. Takto připravené vzorky jsou dále v praktické části diplomové práce pojmenovány PANI/PVA, PANI/PVP, PANI/CNC. Reakce je znázorněna na Obrázku 17, monomer anilinu je vyobrazen na Obrázku 18.



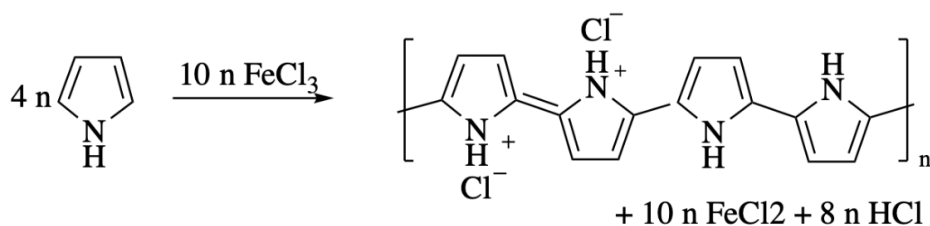
Obrázek 17: Oxidativní polymerace anilinu peroxodisíranem amonným.



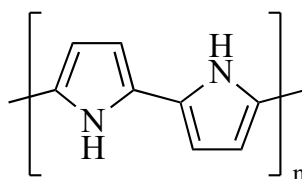
Obrázek 18: Monomer strukturní jednotky polyanilinu.

6.1.2 Syntéza koloidní polypyrrolové disperze

Pro syntézu PPy koloidu byl pyrrol (5mM) převeden k roztoku stabilizátoru (výsledná koncentrace 2 % hmotn. pro PVP a 1 % hmotn v případě PVA a CNC) a doplněn ultra čistou vodou Mili-Q do objemu 50 ml (dále v diplomové práci jen PPy/PVA, PPy/PVP, PPy/CNC). Tato směs byla 30 minut podrobena ošetření ultrazvuku. K roztoku bylo následně přidáno 50 ml roztoku chloridu železitého (5 mM). Směs byla ponechána při pokojové teplotě po dobu 24 h. Koloidní disperze byla dialyzována přes dialyzační trubici (Spectra/Por 1, Spectrum Medical Instruments, USA; mezní hodnota molekulové hmotnosti 7 000 kDa) proti 0,2 M kyselině chlorovodíkové pro odstranění nezreagovaných monomerů a iontů. Probíhající oxidační reakce je znázorněna na Obrázku 19. Obrázek 20 znázorňuje chemickou strukturu PPy.



Obrázek 19: Oxidativní polymerace pyrrolu chloridem železitým.



Obrázek 20: Chemická struktura PPy.

6.1.3 Postup přípravy filmů pomocí disperzní polymerace

Pro přípravu filmů bylo nutné vybrat vhodný substrát. Pro testy byly zvoleny Petriho misky z tkáňového polystyrenu a podložní sklíčko z minerálního skla. K tvorbě filmu dochází postupným nárůstem řetězců polymeru po dialýze. Polymerní filmy byly připraveny stejným postupem jako koloidní disperze. Po smíchání roztoku monomer/stabilizátor s roztokem oxidačního činidla byla vzniklá polymerační směs promíchána a dávkována na

misky a podložní sklíčka. Směs se nechala polymerovat v případě PANI i PPy po dobu 24 h. Následně byla polymerační směs odstraněna. Vzniklé filmy byly opláchnuty 0,2M HCl, poté methanolem, a nakonec byly vysušeny na vzduchu.

6.2 Materiálové testy

Po přípravě vodivých koloidních disperzí a pevných filmů PANI a PPy se třemi různými stabilizátory (PVA, PVP, CNC) byly testovány jejich materiálové vlastnosti. Vzorky koloidů byly podrobeny testům velikosti částic a indexu polydisperzity a vzorky na vzorkách filmů byla testována povrchová energie a měrná elektrická vodivost. Znalost těchto materiálových charakteristik je klíčové pro pozdější výzkum v oblasti TI.

6.2.1 Velikost částic

Velikost a distribuce částic byly stanoveny jednou z nejpoužívanějších metod kvalitativní analýzy, dynamickým rozptylem světla (DLS) resp. fotonovou korelační spektroskopií, za pomoci přístroje Zetasizer Nano ZS. DLS je metoda, která je ideální pro měření částic submikronových velikostí ($<1 \mu\text{m}$). Přístroj Zetasizer zaznamenává rozměry jednotlivých částic na základě měření náhodné změny intenzity světla laserového paprsku rozptýleného ze suspenze či roztoku. Měření hydrodynamických poloměrů koloidních částic, vyjádřených jako z-average, průměr vážený intenzitou světla, byl měřen při 25 °C. Intenzita rozptýleného světla ($\lambda = 633 \text{ nm}$) byla pozorována při úhlu rozptylu 90°. Před měřením byla použitím polystyrenových latexových nanočástic s nominální velikostí $92 \pm 3 \text{ nm}$ ověřena funkčnost přístroje. Následné analýzy se provedly naředěním výchozích dialyzovaných koloidních disperzí ve dvakrát filtrované 1M kyselině chlorovodíkové. Pro měření bylo 20 μl dialyzované koloidní disperze přidáno do 3 ml kyseliny chlorovodíkové. Z tohoto roztoku byl následně odpipetován do 1 ml kyvety. Stanovení probíhalo v polystyrenové kyvetě DTS0012 určené pro měření velikosti částic. Každý vzorek byl podroben třem měřením, průměr velikosti byl následně výsledkem stanovení.

Částice vzorku s podstatně menším průměrem, než je vlnová délka dopadajícího světla, v souladu s Raylegovým principem, rozptylují záření do všech možných směrů, přičemž energie rozptýlených fotonů zůstává konstantní. Tento rozptyl nastává jen v případě stacionárních částic, avšak v zdánlivě nehybném prostředí jsou částice vystavované vzájemným srážkám a vykazují neuspořádaný pohyb. S neustálým pohybem částic dochází k Dopplerovu jevu, provázeného kolísáním intenzity rozptýleného záření. Podstatou DLS přístroje je měření translačního difúzního koeficientu D , ze kterého je možné stanovit

výsledný průměr částice prostřednictvím Stokes-Einsteinovy rovnice, která popisuje vztah mezi velikostí částic a rychlostí pohybu (Rovnice 1).

Rovnice 1: Stokes-Einsteinova rovnice

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

$d(H)$ – hydrodynamický průměr; D – translační difuzní koeficient; k – Boltzmannova konstanta; T – termodynamická teplota a η – je viskozita.

Jedná se o neinvazivní techniku. Přístroj měří fluktuaci intenzity rozptýleného světla z laserového zdroje. Fluktuace úzce souvisí s interferenčním zeslabováním a zesilováním rozptýleného světla na nestacionárních částicích disperzní fáze podléhající Brownovu pohybu (Kvitek *et al.*, 1998), přičemž rychlost změn intenzity rozptýleného světla závisí na rychlosti pohybu částic. Fluktuovaný paprsek dopadá na optické zařízení, kde dochází k detekci. Přístrojové vybavení sestává ze zdroje světla pro koherentní světlo (laser), kolimační optiky, optické cely, fotodetektoru, elektronického systému včetně zesilovače a takzvaného korelátoru k měření autokorelační funkce (ACF) [Pabst and Gregorova, 2007]. Před samotným měřením byla přístroji Zetasizer Nano nastavena měřená látka, rozpouštědlo, ekvilibrační doba, teplota a typ kyvety. Ekvilibrační doba byla nastavena na 60 sekund.

Index polydisperzity (Pdl) je bezrozměrná veličina, jež udává rozptyl naměřených velikostí částic vzorku. Výsledkem je rozmezí hodnot od 0 do 1, přičemž platí, že čím menší Pdl je, tím je nanočásticová soustava více monodisperzní (Bhattacharjee, 2016). Za monodisperzní systém se mohou označit takové vzorky, jejichž Pdl vykazuje hodnoty $\sim 0,1$, zatímco vzorky s výslednou hodnotou větší než 0,7 jsou považovány za systém s velmi širokou distribucí velikosti. Přístroj po změření vzorku zpracoval data o velikosti částic a Pdl .

6.2.2 Povrchová energie

Metoda měření kontaktního úhlu a následné stanovení volné povrchové energie je průmyslově vhodnou metodou pro svou rychlost, finanční nenáročnost, vysokou přesnost a citlivost. Znalost povrchové energie je důležité pro zpracování a využití biomateriálů. Velikost povrchové energie je přímo úměrná hydrofilitě testovaného vzorku. Čím vzorek vykazuje vyšší povrchovou energii, tím je hydrofilnější. Pro výzkum v TI je nezbytně nutné, aby buněčné kultury na povrchu materiálu adherovaly a proliferovaly. Aby toto bylo možné,

je důležité, aby vzorek vykazoval určitou míru hydrofility (Gamble *et al.*, 2012). Jednou z metod pro zjištění povrchové energie je metoda měření kontaktního úhlu, který vzniká mezi povrchem testovaného vzorku a kapalinou. Smáčivost je označení pro schopnost kapaliny přilnout k povrchu. Nesmáčivý povrch je ten, při němž je kontaktní úhel mezi vzorkem a kapalinou větší než 90°. Naopak kapalina smáčí povrch testovaného vzorku, jestliže je kontaktní úhel menší než 90°. Výpočet povrchové energie pak probíhá z přepočtu kontaktních úhlů různě polárních kapalin se vzorkem. Stanovení povrchové energie dle kontaktního úhlu sedící kapky je metodou nepřímou, kdy úhel smáčení je stanoven pomocí geometrické analýzy tvaru menisku.

Acidobazická teorie umožňuje stanovení polárních a disperzních interakcí k určení celkové volné povrchové energie. Roli zde hrají jak elektron-donorové, tak i elektron-akceptorové složky polární části povrchové energie (Rovnice 2), kde γ^{TOT} je celková povrchová energie, γ^{LW} označuje celkovou disperzi Lifshitz-van der Wallsovy interakce a γ^{AB} označuje acidobazickou interakci Podle Lewise. Acidobazickou interakci lze určit z Rovnice 2-3.

Rovnice 2: Lifshitz-van der Wallsova interakce.

$$\gamma^{TOT} = \gamma^{LW} + \gamma^{AB}$$

Rovnice 3: Acidobazická interakce podle Lewise.

$$\gamma^{AB} = 2\sqrt{\gamma^+\gamma^-}$$

kde γ^+ – je elektro-donorová složka; γ^- – elektro-akceptorová složka acidobazické rovnice

K měření kontaktního úhlu sedící kapky a vyhodnocení povrchové energie byl použit program SEE System. Pro vypočtení byla aplikována acidobazická metoda za použití tří měřících kapalin se standardizovanou hodnotou povrchové energie. Mezi testované kapaliny patřil roztok deionizované vody, následně roztok diiodmethanu a etylenglykolu. Objem kapek byl stanoven na 100 μ l a pomocí mikropipety byly kapky aplikovány na koloidní film. Pro vyhodnocení byla vyfocena série kapek pomocí CCD kamery o rozlišení 1600 \times 1200 pixelů s vodorovně posuvným stolem. Software převedl profil jednotlivých kapek na kružnici pomocí tří bodů vyznačených na povrchu vyfocené kapky, z čehož bylo následně možné spočítat kontaktní úhel kapky na daném koloidním filmu. Pro vyhodnocení posloužily údaje kontaktních úhlů vždy z pěti kapek každé z měřících kapalin na jednotlivých koloidních filmech. Po zjištění kontaktních úhlů všech tří kapalin na

jednotlivých površích SEE Systém přepočítal pomocí acidobazické metody hodnoty na celkovou povrchovou energii, včetně stanovení disperzní a polární složky a chyby měření.

6.2.3 Měrná elektrická vodivost

Elektrická vodivost neboli měrná vodivost je základní materiálová vlastnost, která představuje schopnost materiálu vést elektrický proud. Dle definice je elektrická vodivost velikostí elektrického proudu procházející materiálem při jednotkovém napětí (Skotheim, 1997). Vodivost (σ) je převrácená hodnota elektrického odporu (ρ , Rovnice 5), který je definován dle Rovnice 4: Elektrický odpor.

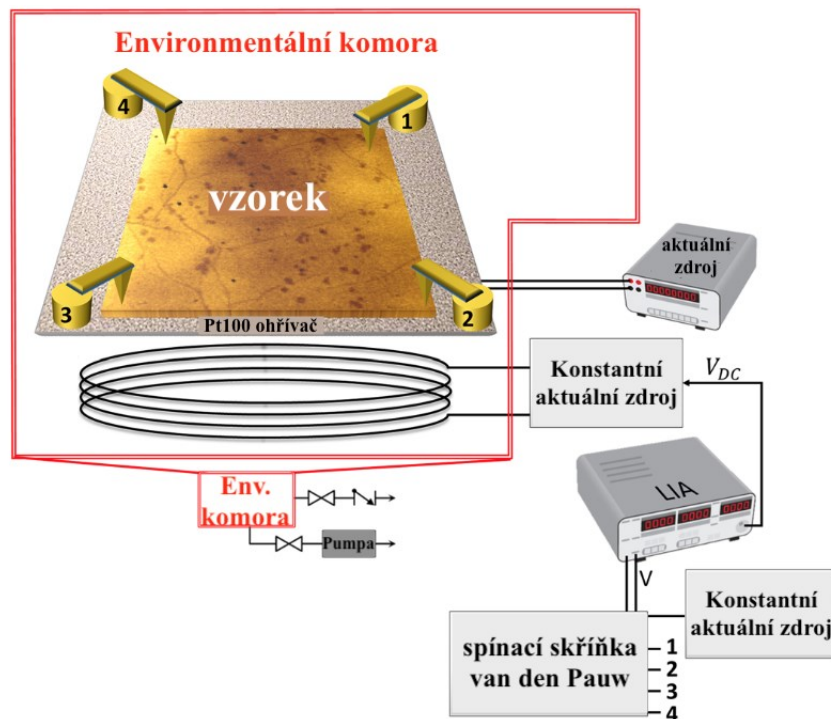
$$\rho = \frac{RA}{l} [\Omega]$$

kde R – elektrický odpor jednotného vzorku; l – délka; A – plocha průřezu vzorku materiálu

Rovnice 5: Vodivost.

$$\sigma = \frac{1}{\rho} [S]$$

Jednotka elektrické vodivosti se udává v jednotkách Ω^{-1} nebo S.



Obrázek 21: Experimentální uspořádání elektrod pro měření van der Pauwovy vodivosti (Melios *et al.*, 2020).

Čtyři elektrody jsou umístěny na okrajích obvodu vzorku, jak je znázorněno na Obrázku 21. Tato konfigurace umožňuje metodě van der Pauwa odhadnout průměrný měrný odpor vzorku, viz Rovnice 6.

Rovnice 6: Van der Pauwův odpor

$$\rho = \frac{\pi d}{\ln(2)} \frac{R_1 + R_2}{2} f\left(\frac{R_1}{R_2}\right)$$

kde d – tloušťka vzorku; $\frac{\pi}{\ln(2)}$ – van der Pauwova konstanta (Nepomuceno *et al.*, 2021); R – odpor, pro symetrické vzorky (disky s kontaktem 90°) $R_1=R_2$, odpor se vypočítá z lineárního řezu grafu jako $R = \frac{V}{I}$, kde V – napětí a I – proud, proto se vodivost vypočte podle

Rovnice 7: Vodivost.

$$\sigma = \frac{\ln(2) l}{\pi d V}$$

K měření měrné elektrické vodivosti byly využity vzorky PANI a PPy filmů deponované na jedné straně skelného substrátu. K tomuto testu bylo použito podložní sklíčko z minerálního skla.

Byla použita aparatura pro měření rezistivity tenkých vzorků čtyřbodovou metodou dle van der Pauwa. Tato aparatura sestává ze scanneru Keithley K7002, spínací karty Keithley K7011-S, programovatelného napěťového zdroje Keithley K2410, digitálního elektrometru Keithley K6517 a osobního počítače, vybaveného dvěma PCI kartami (GPIB a převodníkovou AD25PCI kartou). Měření proběhlo za pomoci softwaru VDP, jež cyklicky měří rezistivitu při konstantní hodnotě proudu. Před začátkem měření byla zadána tloušťka vzorku a maximální povolené napětí přiložené elektrody. Hodnota měřicího proudu byla nastavena na konstantních $1 \cdot 10^{-4}$ A a hodnota maximálního napětí přiloženého na elektrody byla zvolena na 50 V. Tloušťka vzorku byla nastavena na 0,0001 cm. Vzorek byl položen na měřicí stůlek tak, aby bodové kontakty elektrod byly rozmístěny po jeho obvodu pro zajištění dobrého kontaktu se vzorkem. Zároveň nesmí dojít k mechanickému poškození filmu. Pro změření známé hodnoty napětí vzorkem protékal elektrický proud. Ze získaných hodnot napětí a tloušťky vzorku byl spočítán měrný elektrický odpor daného filmu a z něj byla vypočítána měrná elektrická vodivost. Pro získání požadovaných hodnot všech možných pozic elektrod probíhalo měření ve čtyřech cyklech pro každý z filmů.

6.3 Testy cytokompatibility

Po testování materiálových vlastností následovalo testování cytokompatibility, jenž zahrnuje testování cytotoxicity a test buněčné adheze a proliferace. Tyto testy byly aplikovány na linii myších primárních fibroblastů NIH/3T3, kterou bylo nutné pro tyto testy kultivovat.

6.3.1 Vybavení laboratoře pro kultivaci buněk *in vitro*

Pro vyhodnocení testů cytotoxicity je zapotřebí specifického vybavení laboratoře a dodržování postupů pro udržení sterilního prostředí. Součástí těchto testů je práce v laminárních boxech s řízeným přívodem i odvodem vzduchu, inkubátor s regulací teploty a parciálního tlaku CO₂. Pro práci se využívají jednorázové sterilní rukavice, v ideálním případě je vhodné použití rukávníků. Buněčné kultury se inkubují v jednorázových plastových, kultivačních nádobách. Jednotlivé vzorky buněk se během inkubace kontrolují na mikroskopu s fázovým kontrastem.

6.3.2 Buněčné kultury a kultivace buněk

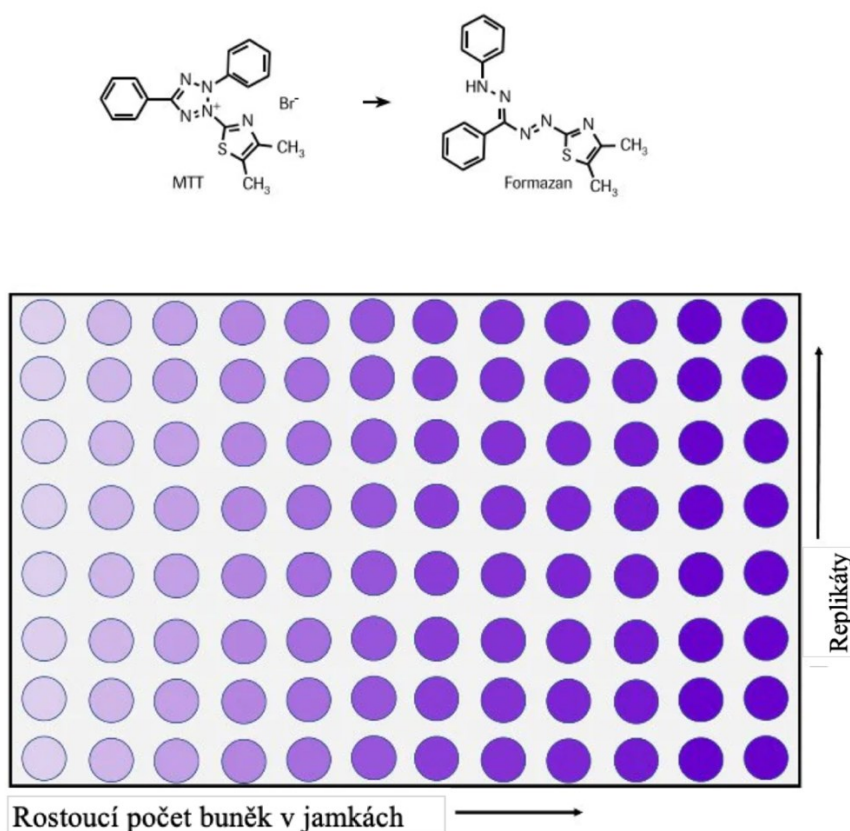
V rámci zvolených testů byla použita buněčná linie myších fibroblastů NIH/3T3. Jako kultivační médium bylo použito Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) se zvýšeným obsahem glukózy. K médiu bylo dle návodu pro kultivaci buněčné linie alikvotováno 10 % fetálního bovinního séra a antibiotikum Penicillin/Streptomycin v koncentraci 100 µg·ml⁻¹. Inkubátor Heracell 150i zajistil ideální kultivační podmínky (teplota 37 °C, konstantní relativní vlhkost a 5 % atmosféra oxidu uhličitého).

Buňky byly kultivovány v polystyrenových kultivačních nádobách v inkubátoru Heracell 150i. Po dosažení 80–90 % konfluency buněk byla vždy provedena trypsinizace a prekultivace, kdy kultivační nádoba s buňkami byla zprvu zkontrolována na světelném mikroskopu s fázovým kontrastem a následně přesunuta do laminárního boxu s řízenou cirkulací vzduchu HERAsafe KSP. Z kultivační nádoby bylo pomocí odsávacího zařízení odsáto kultivační médium tak, aby nedošlo k porušení vrstvy buněk. Zbytky média se sérem byly odstraněny oplachem 15 ml fosfátového pufru (PBS, konc. 0,2 ml/cm²) a jeho následným odsátím. Trypsinací, konkrétně přidáním 7,5 ml serinové proteázy (konc. 0,1ml/cm²) byly přerušeny vazby mezi adherovanými buňkami a kultivačním povrchem. Trypsinace probíhala v inkubátoru Heracell 150i nejdéle po dobu 20 minut. Následně bylo v boxu HERAsafe KSP alikvotováno 7,5 ml kultivačního média do kultivační nádoby

a buněčná suspenze byla pomocí pipety převedena do centrifugační zkumavky. Centrifugace probíhala v chlazené centrifuze Eppendorf 5702 R 3 minuty při 1100 rpm a při teplotě 37°C. Po centrifugaci byly buňky viditelně okometricky koncentrovány na dně zkumavky, čímž bylo umožněno odsát supernatant. Tímto postupem byl získán přibližný počet $2 \cdot 10^7$ buněk v 1 ml média.

6.3.3 Test cytotoxicity

K vyhodnocení cytotoxicity byl použit MTT test, který slouží ke kvantitativnímu hodnocení životaschopných buněk. Test je založen na redukci žluté tetrazoliové soli - MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid) na purpurové krystaly formazanu metabolicky aktivními buňkami (Obrázek 22). K reakci dochází vlivem mitochondriálních dehydrogenáz na mitochondriální membráně živých buněk, za vzniku NADH a NADPH. Koncentrace živých buněk je indikována množstvím redukovaného MTT. Tedy platí, že čím je roztok tmavší, tím větší je počet životaschopných, metabolicky aktivních buněk.



Obrázek 22: Redukce MTT na formazan životaschopnými buňkami. Znázorněno na 96-jamkové mikrotitrační destičce (převzato z Protocol Guide: MTT Assay for Cell Viability and Proliferation, online).

Testování cytotoxicity bylo provedeno na buněčné linii myších embryonálních fibroblastů. Buňky byly naočkovány na 96-jamkovou mikrotitrační destičku v koncentraci $2 \cdot 10^5$ /ml, v objemu 100 μ l a byly kultivovány po dobu 24 h. Kultivační médium bylo následně nahrazeno ředěnými PANI nebo PPy připravenými roztoky koloidních polymerů. Testované vzorky byly k buněčné suspenzi přidány v koncentracích 1; 2,5; 5; 7,5; 10 a 15 %. Jako reference poskytující 100 % buněčnou proliferaci byly použity buňky kultivované v čistém médiu. Buňky byly pozorovány mikroskopem s obráceným fázovým kontrastem. Pro posouzení cytotoxických účinků byl test MTT proveden po 24 h kultivace buněk v přítomnosti vodivých polymerů při podmínkách kultivace $37 \pm 0,1$ °C a 5 % CO₂. Testování proběhlo v pěti technických replikátech a jednom biologickém replikátu.

Po 24 h kultivaci buněk s vodivými polymery byl nejdříve připraven roztok MTT, připravený rozpuštěním 5 mg MTT v 1 ml UPW. Buňkám bylo odsáto médium a poté bylo do jednotlivých jamek alikvotováno 90 μ l média a 10 μ l roztoku MTT, který byl ponechán ke kultivaci v inkubátoru po dobu 4 h. Po uplynutí doby byl roztok MTT odsát a k buňkám se napipetovalo 80 μ l DMSO, jež sloužil k rozpuštění formazanových krystalů. Po uplynutí 15 minut byla změřena absorbance všech vzorků včetně vzorku referenčního. Absorpce byla měřena při vlnové délce 570 nm s referenční vlnovou délkou 690 nm pomocí spektrofotometru Infinite M200 Pro NanoQuant. K odstranění odlehlých hodnot byl využit Dixonův Q test a z technických replikátů byly vypočteny průměrné hodnoty absorbancí.

6.3.4 Test buněčné adheze a proliferace

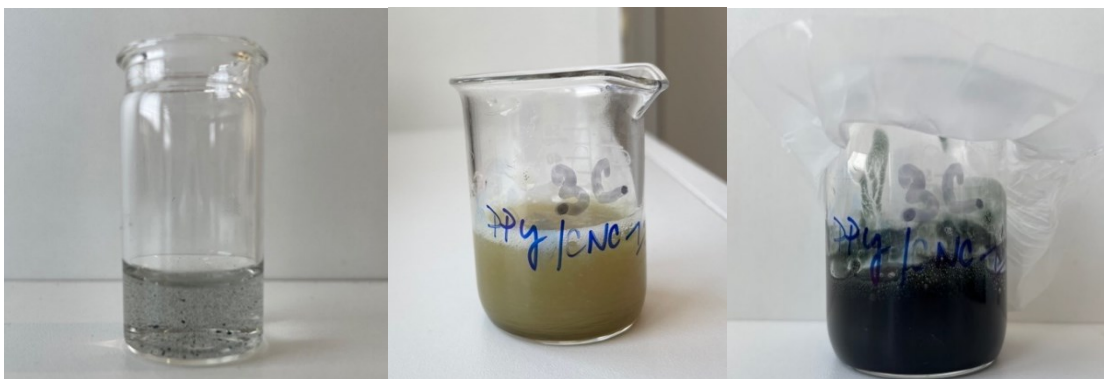
Buněčná adheze a proliferace je jedním z faktorů určujících biokompatibilitu materiálu. Pro stanovení schopnosti buněk proliferovat na površích byly buňky nasazeny v počáteční koncentraci $1 \cdot 10^5$ buněk/ml a kultivovány 48 h. Po 48 h byly buňky fixovány a fluorescenčně obarveny jejich jádra a cytoskelet. Pro fixaci byly buňky přelity 4 % roztokem formaldehydu a ponechány po dobu 15 minut. Poté byly buňky opláchnuty pomocí PBS a následovala jejich permeabilizace pomocí 0,5 % Tritonu-X, který byl na buňky nanesen a inkubován po dobu 5 minut. Buňky byly znovu důkladně propláchnuty roztokem PBS a poté byly obarveny. Barvení probíhalo barvivem Hoechst 33258 (5 μ g/ml) a ActinRed 555 (1 kapka/ml, Thermo Fisher). Obarvené buňky byly ponechány 30 minut ve tmě. Po uplynutí 30 minut byly pořízeny mikrofotografie buněk pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus IX 81.

Barvivo ActinRed 555 obarvuje struktury cytoskeletu v buňkách. Barvivo se váže na strukturu F-aktinu, excitace pak probíhá při 540 nm. Barvivo Hoechst 33258 slouží pro barvení nukleových kyselin, které po navázání na dsDNA emituje modrou fluorescenci. Barvivo se používá k vizualizaci jader a mitochondrií.

7 VÝSLEDKY

7.1 Příprava filmů a koloidů

Při přípravě filmů s různými stabilizátory bylo možné sledovat rozdílnou rozpustnost stabilizátorů v reakční směsi. Rovněž byla pozorovatelná jak odlišná barva koloidů před a po provedení dialýzy, tak intenzita zeleného zabarvení byla u každého z připravovaných koloidů odlišná. Rychlost samotné polymerace byla rovněž závislá na použitém stabilizátoru. Fotky z laboratorní práce jsou na vyobrazeny Obrázku 23 a Obrázku 24.



Obrázek 23: Fotografie z přípravy vodivých polymerů. Na levé straně fotografie je počátek polymerace vodivého polymeru, uprostřed je roztok PPy/CNC po uplynutí polymerace, avšak před dialyzací a na pravé straně je vzniklá koloidní disperze po proběhlé dialyzaci.



Obrázek 24: Na levé straně je zobrazena koloidní disperze PANI/CNC po dialýze, na pravé straně PANI/CNC film po rozlití do misky.

7.2 Materiálové testy

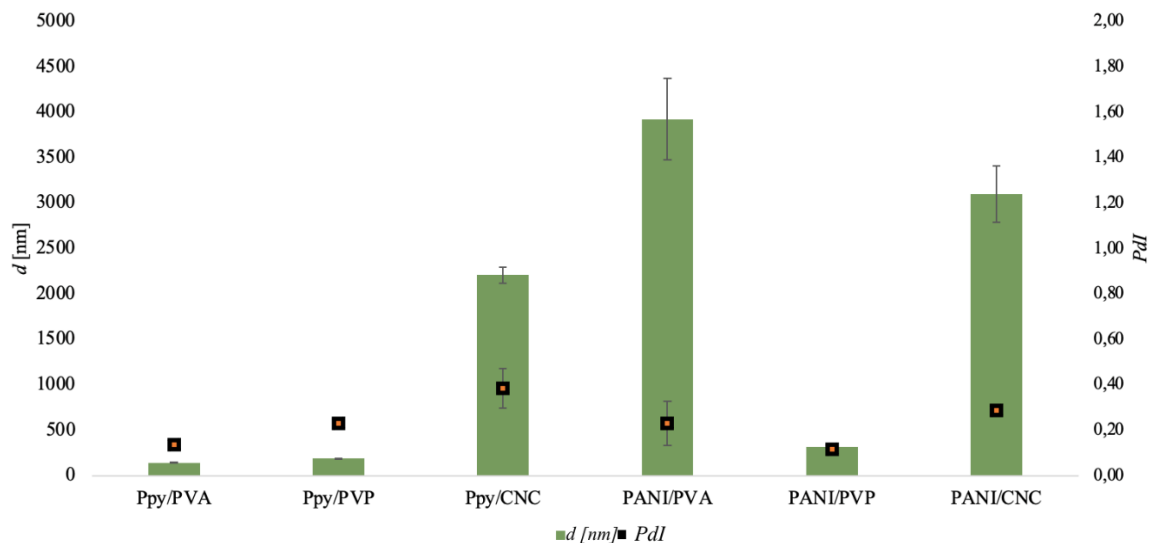
7.2.1 Velikost částic

Velikost částic disperze je jedním z rozhodujících parametrů ovlivňujících výkonnost koloidů v biologických aplikacích. Měření dynamického rozptylu světla ukázalo, že velikost částic disperze, vyjádřená jako z-průměr byla nejmenší (146 ± 5 nm) u PPy/PVA s $PdI = 0,14 \pm 0,002$ (Tabulka 1). Druhou nejmenší velikost částic vykazoval PPy/PVP při z-průměru 192 ± 3 nm, avšak PdI je při $0,23 \pm 0,014$ téměř dvojnásobný oproti PPy/PVA. U PANI/PVP s třetí nejmenší velikostí částic 314 ± 2 nm z testovaných vzorků byl zaznamenán $PdI = 0,12 \pm 0,018$, což je ze všech měřených vzorků nejmenší rozpětí velikostí vůbec.

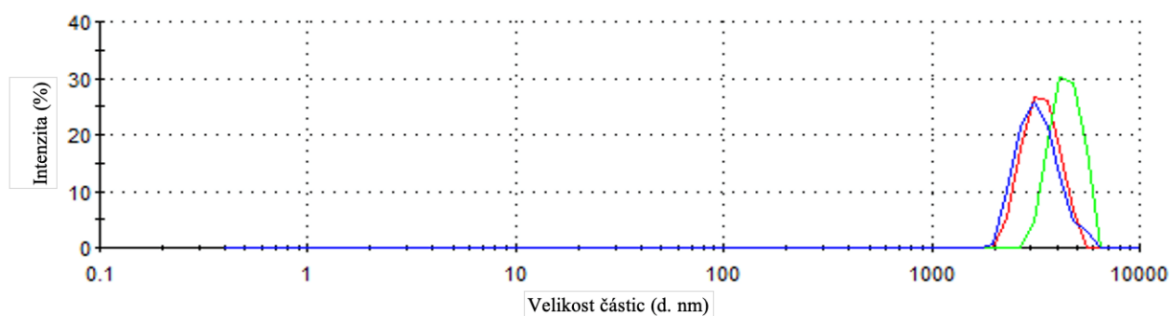
Na druhou stranu PPy/CNC, PANI/PVA a PANI/CNC vykazovaly nadměrnou velikost částic spolu s nežádoucím indexem polydisperzity. Tyto údaje naznačují, že vzorky nejsou příliš vhodné pro budoucí výzkum v TI. Graf jednotlivých velikostí částic spolu s indexem polydisperzity je znázorněn na Obrázku 25. Grafy zobrazující % zastoupení intenzity rozložení velikosti částic jsou na Obrázcích 26-31.

Tabulka 1: Výsledky měření velikosti dialyzovaných částic.

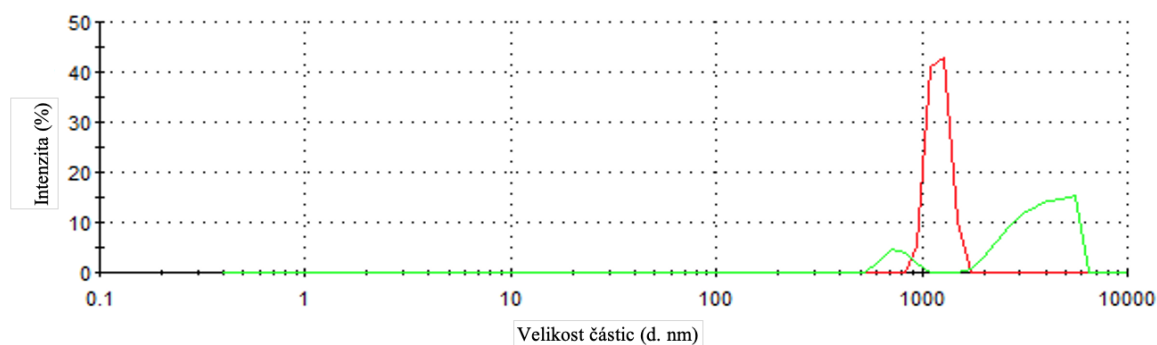
vzorek	velikost částic [nm]	index polydisperzity
PANI/PVA	3925 ± 450	$0,23 \pm 0,096$
PANI/PVP	314 ± 2	$0,12 \pm 0,018$
PANI/CNC	3101 ± 307	$0,29 \pm 0,215$
PPy /PVA	146 ± 5	$0,14 \pm 0,002$
PPy/PVP	192 ± 3	$0,23 \pm 0,014$
PPy/CNC	2209 ± 86	$0,39 \pm 0,087$



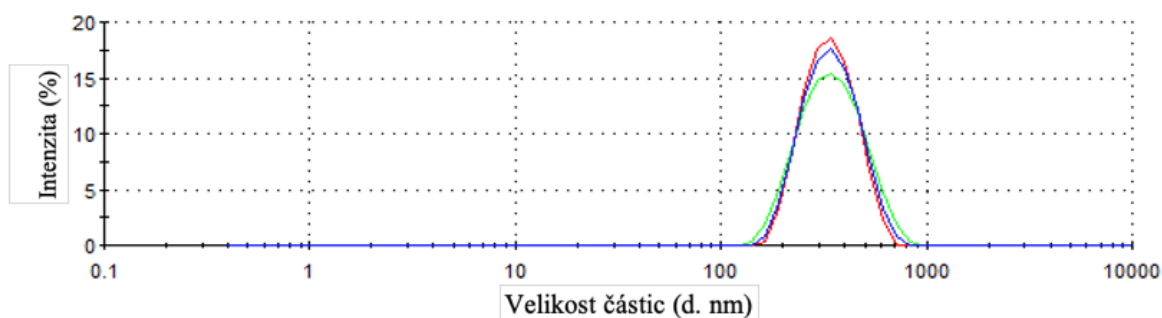
Obrázek 25: Porovnání velikostí částic a PdI testovaných vzorků.



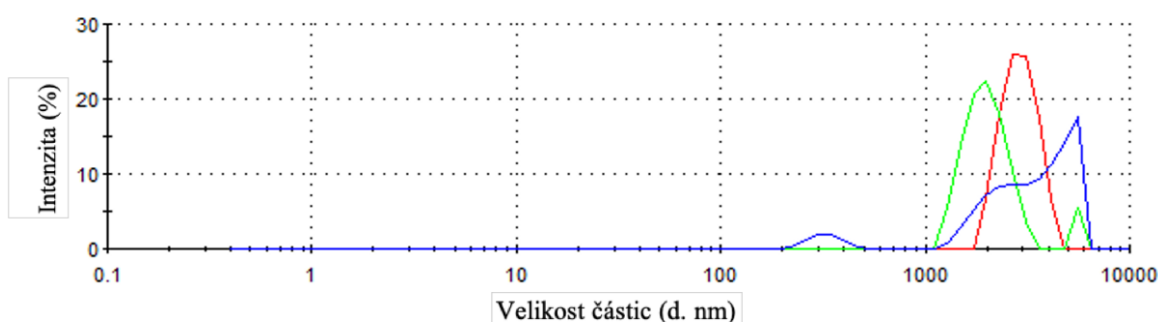
Obrázek 26: Intenzita (%) jednotlivých velikostí částic ve vzorku PANI/PVA při vzorkovaném objemu 20 μ l. Měření bylo provedeno ve třech opakováních (každá křivka zobrazuje jedno měření).



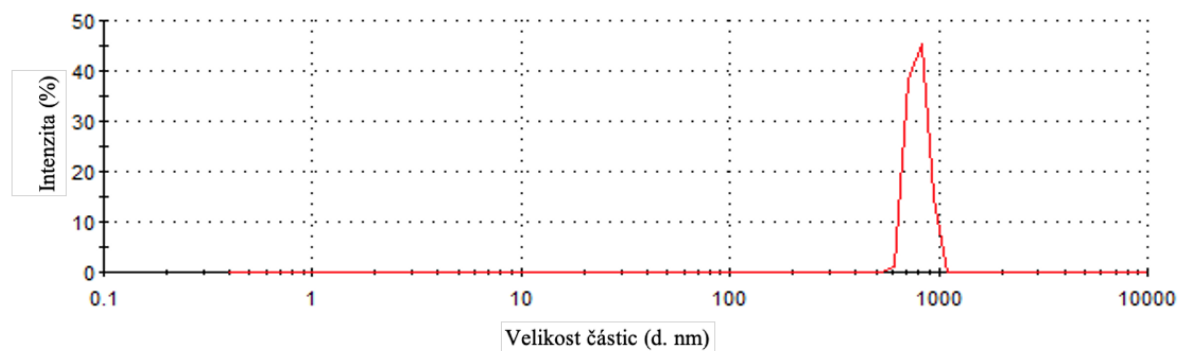
Obrázek 27: Intenzita (%) jednotlivých velikostí částic ve vzorku PANI/PVA při vzorkovaném objemu 10 μ l. Bylo provedeno znovuzměření za použití menšího objemu vzorku, jelikož intenzitu červeného a zeleného píku na předchozím grafu nebylo možné zanalyzovat.



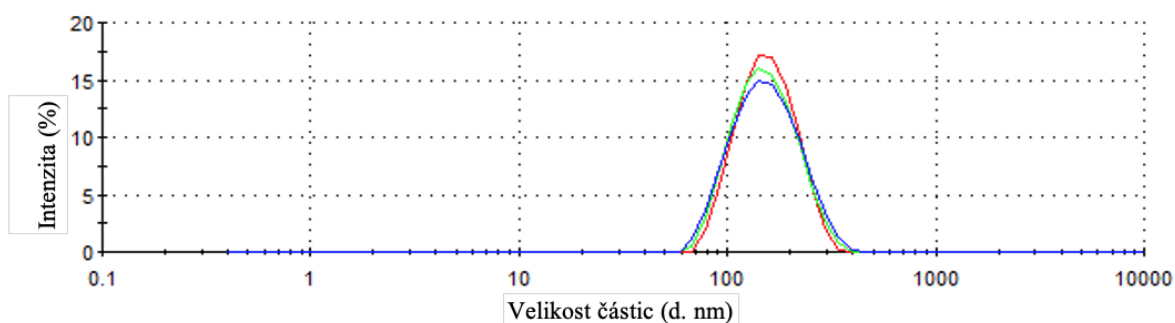
Obrázek 28: Intenzita (%) jednotlivých velikostí částic ve vzorku PANI/PVP při vzorkovaném objemu 20 µl. Měření bylo provedeno ve třech opakováních (každá křivka zobrazuje jedno měření).



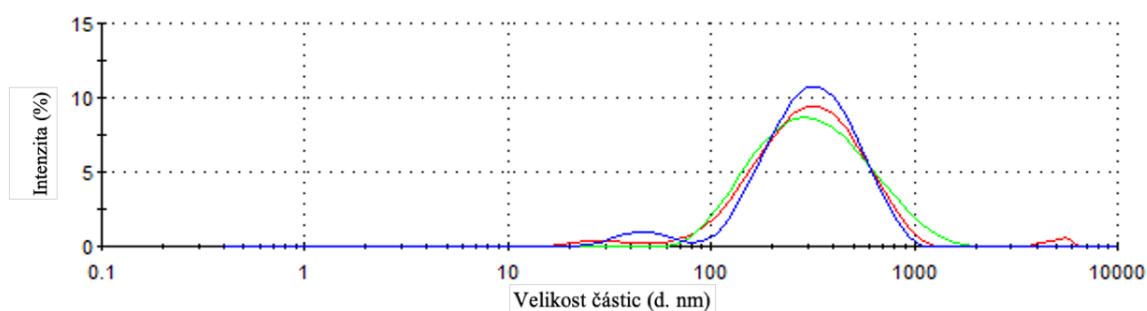
Obrázek 29: Intenzita (%) jednotlivých velikostí částic ve vzorku PANI/CNC při vzorkovaném objemu 20 µl. Měření bylo provedeno ve třech opakováních (každá křivka zobrazuje jedno měření).



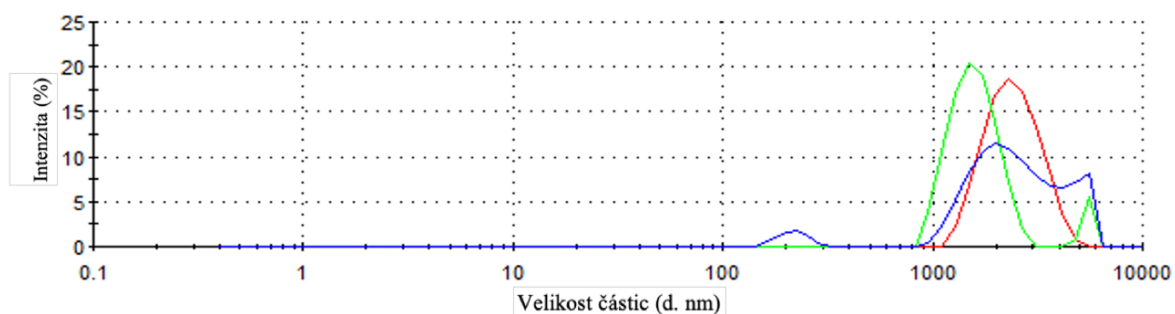
Obrázek 30: Intenzita (%) jednotlivých velikostí částic ve vzorku PANI/CNC při vzorkovaném objemu 10 µl. Bylo provedeno znovuzměření za použití menšího objemu vzorku, jelikož intenzitu červeného píku na předchozím grafu nebylo možné zanalyzovat.



Obrázek 31: Intenzita (%) jednotlivých velikostí částic ve vzorku PANI/PVA při vzorkovaném objemu 20 µl. Měření bylo provedeno ve třech opakováních (každá křivka zobrazuje jedno měření).



Obrázek 32: Intenzita (%) jednotlivých velikostí částic ve vzorku PANI/PVP při vzorkovaném objemu 20 µl. Měření bylo provedeno ve třech opakováních (každá křivka zobrazuje jedno měření).



Obrázek 33: Intenzita (%) jednotlivých velikostí částic ve vzorku PANI/CNC při vzorkovaném objemu 20 µl. Měření bylo provedeno ve třech opakováních (každá křivka zobrazuje jedno měření).

7.2.2 Povrchová energie

Pomocí měřicího zařízení SEE Systém byly naměřeny hodnoty kontaktních úhlů deionizované vody (H_2O), diiodomethanu (DIM) a ethylenglykolu (EG) [Chiang *et al.*, 1977] na testovaných filmech. Naměřené hodnoty úhlů jsou uvedeny v Tabulce 2. Všechny hodnoty dosahují menšího úhlu než 90° . Lze tedy s jistotou říci, že se jedná o povrchy hydrofilní. Vodou nejméně smáčený povrch lze považovat PANI/CNC.

Tabulka 2: Výsledky kontaktních úhlů jednotlivých kapalin na testovaných vzorcích.

Kontaktní úhel [°]						
Měřící kapalina	PANI/PVA	PANI/PVP	PANI/CNC	Ppy/PVA	PPy/PVP	Ppy/CNC
H ₂ O	61,93 ± 7,26	51,29 ± 2,55	68,01 ± 6,44	53,39 ± 2,52	53,13 ± 5,50	58,52 ± 2,20
DIM	8,51 ± 8,33	10,55 ± 16,63	24,23 ± 3,36	10,54 ± 0,66	16,33 ± 9,20	9,93 ± 0,00
EG	50,75 ± 6,02	33,09 ± 3,16	50,75 ± 6,02	44,22 ± 6,51	34,39 ± 3,75	38,06 ± 10,62

Rovněž byly získány hodnoty celkové povrchové energie γ^{TOT} , ale také hodnoty disperzní (γ^{LW}) povrchové energie, jež představuje síly uplatňující se mezi nepolárními molekulami, jinak také disperzní síly a γ^{AB} představující interakce vodíkových můstků. Konkrétní hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 3. Nejvyšší povrchovou energii, zároveň tedy i nejmenší hydrofilitu vykazuje PPy/PVA s hodnotou povrchové energie $68,69 \pm 3,24$ mN/m. Naopak nejvíce hydrofilní byl film PANI/PVA ($\gamma = 53,54 \pm 0,62$ mN/m) a PANI/CNC ($\gamma = 55,63 \pm 2,28$ mN/m). Z výsledků je zřejmé, že hodnota povrchové energie nezávisí pouze na použitém filmu, závisí i na použitém stabilizátoru.

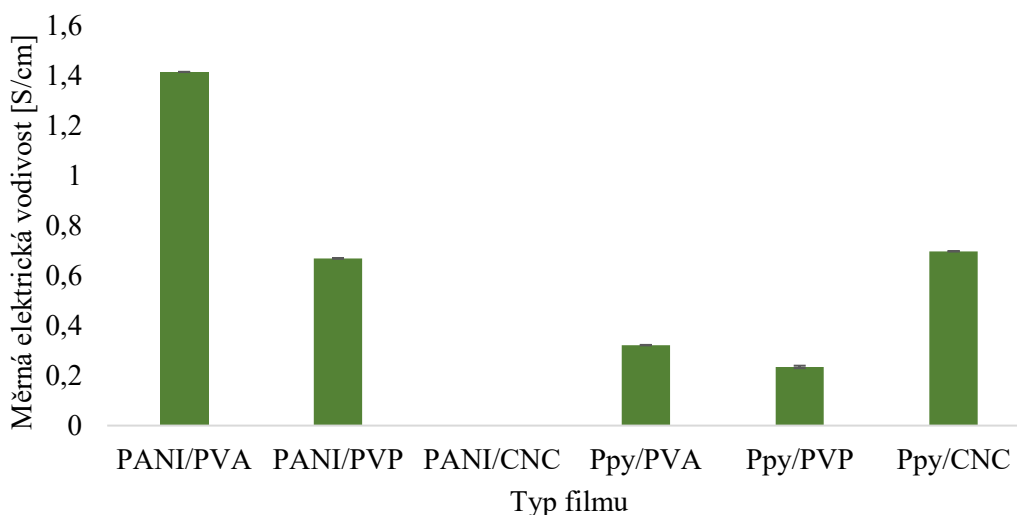
Tabulka 3: Výsledky celkové povrchové energie (γ^{TOT}), disperzní povrchové energie (γ^{LW}) a energie vodíkových můstků (γ^{AB}) jednotlivých testovaných vzorků.

Povrchová energie [mN/m]						
	PANI/PVA	PANI/PVP	PANI/CNC	Ppy/PVA	PPy/PVP	PPy/CNC
γ^{TOT}	53,54 ± 0,62	59,23 ± 1,48	55,63 ± 2,28	68,69 ± 3,24	56,75 ± 2,71	58,00 ± 1,68
γ^{LW}	50,24 ± 0,00	49,94 ± 0,02	46,42 ± 0,19	49,95 ± 0,08	48,77 ± 0,14	50,04 ± 0,00
γ^{AB}	3,30 ± 0,62	9,29 ± 1,45	9,21 ± 2,09	18,74 ± 3,15	7,98 ± 2,56	7,95 ± 1,68

7.2.3 Měrná elektrická vodivost

Vodivost filmů byla změřena čtyřbodovou metodou van der Pauwa, čímž byly zjištěny hodnoty měrného elektrického odporu filmů. Elektrický odpor byl přepočítán na měrnou elektrickou vodivost testovaných vzorků. Výsledky jsou znázorněny na sloupcovém grafu (viz Obrázek 34), konkrétní hodnoty měrné elektrické vodivosti filmů jsou v Tabulce 4. Ze šesti testovaných vzorků jeden vzorek nevykazoval známky vodivosti, konkrétně se jednalo o PANI/CNC. Naopak za nejvodivější vzorek s měrnou elektrickou vodivostí $1,4167 \pm 0,0002$ S·cm⁻¹ lze označit PANI/PVA. Dobrou vodivost však také vykazoval

PPy/CNC ($\sigma = 0,6983 \pm 00026 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$), dále pak PANI/PVP ($\sigma = 0,2351 \pm 0,0025 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$), PPy/PVA ($\sigma = 0,3223 \pm 0,0005 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$) a kromě nevodivého PANI/CNC lze vzorek PPy/PVP označit za vzorek s nejmenší hodnotou měrné elektrické vodivosti. Měrná elektrická vodivost PPy/PVP dosahuje konkrétně hodnoty $0,2351 \pm 0,0025 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$.



Obrázek 34: Hodnoty měrné elektrické vodivosti spolu s označením směrodatných odchylek jednotlivých vzorků.

Tabulka 4: Hodnoty měrné elektrické vodivosti spolu s hodnotami směrodatných odchylek jednotlivých vzorků.

Vzorek	σ [$\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$]
PANI/PVA	$1,4167 \pm 0,0002$
PANI/PVP	$0,6698 \pm 0,0004$
PANI/CNC	—
PPy/PVA	$0,3223 \pm 0,0005$
PPy/PVP	$0,2351 \pm 0,0025$
PPy/CNC	$0,6983 \pm 00026$

7.3 Testy cytotoxicity

7.3.1 Testy cytotoxicity

K určení cytotoxicity PANI a PPy koloidních disperzí byl použit MTT test. Životaschopnost buněk byla vyjádřena jako relativní viabilita buněk přítomných v odpovídajících koncentracích vzorku vzhledem k buňkám kultivovaným v čistém

růstovém médiu (životaschopnost = 1), přičemž koloidní disperze byly k buňkám alikvotovány v 1; 2,5; 5; 7,5; 10 a 15 % koncentraci. Během testování dochází v jamkách s živými buňkami k tvorbě krystalů formazanu doprovázené změnou zbarvení (vzniklé krystaly jsou fialové), intenzita fialového zbarvení je přímo úměrná koncentraci živých buněk (Obrázek 35). Výsledný barevný roztok se kvantifikuje změřením absorbance při vlnové délce 570 nm pomocí spektrofotometru. K určení cytotoxických účinků a porovnání s publikacemi bylo provedeno hodnocení dle normy ISO10993-5, kde se cytotoxicita hodnotí dle stupnice následovně:

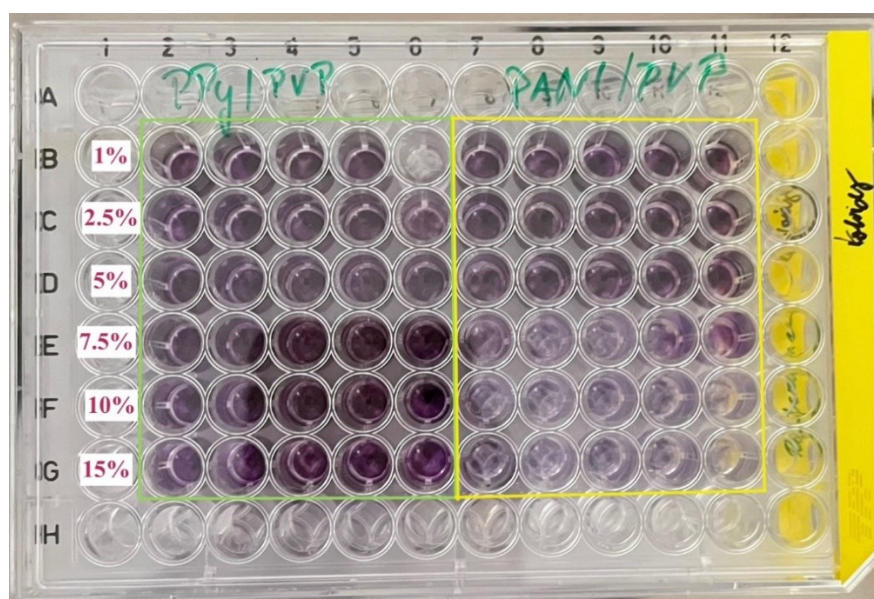
> 0,8 bez cytotoxického efektu

0,6 – 0,8 mírně cytotoxický efekt

0,4 – 0,6 slabě cytotoxický efekt

< 0,4 silně cytotoxický efekt

Výsledky měření jsou vyobrazeny na Obrázcích 36–41.

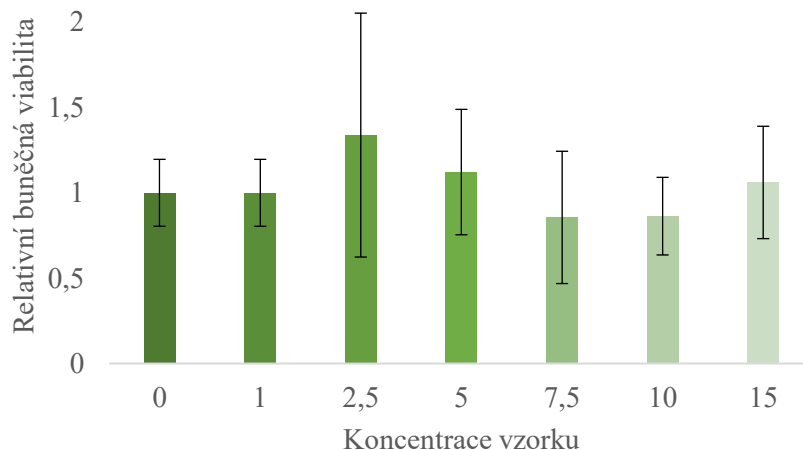


Obrázek 35: Zabarvení buněk v 96-jamkové mikrotitrační destičce v závislosti na počtu životaschopných buněk v jednotlivých jamkách po kultivaci s vodivými polymery v koncentračním rozsahu 1–15%.

- **PANI/PVA**

Cytotoxicita PANI/PVA na buněčné linii NIH/3T3 po 24 h inkubaci je znázorněna na Obrázku 36. Vzorek v žádné z přidávaných koncentrací nevykazoval cytotoxické účinky. Sporná by díky své velké odchylce mohla být koncentrace 2,5 % a 7,5 %, avšak jelikož nejvyšší koncentrace vzorku nelze s přesností označit ani za mírně cytotoxický (relativní

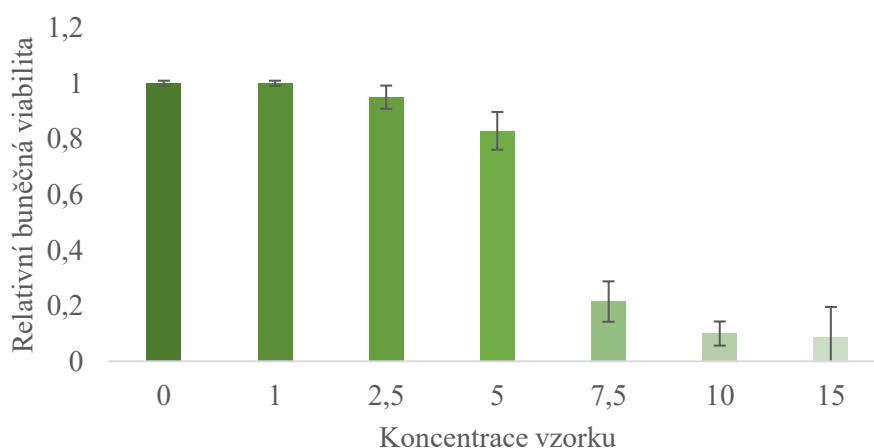
buněčná viabilita = $1,06 \pm 0,33$), jedná se pouze o chybu způsobenou lidským faktorem, a tedy existuje předpoklad, že PANI/PVA nepůsobil na NIH/3T3 toxicky.



Obrázek 36: Relativní životaschopnost buněčné linie NIH/3T3 po přidání PANI/PVA v koncentracích 1–15 %.

- **PANI/PVP**

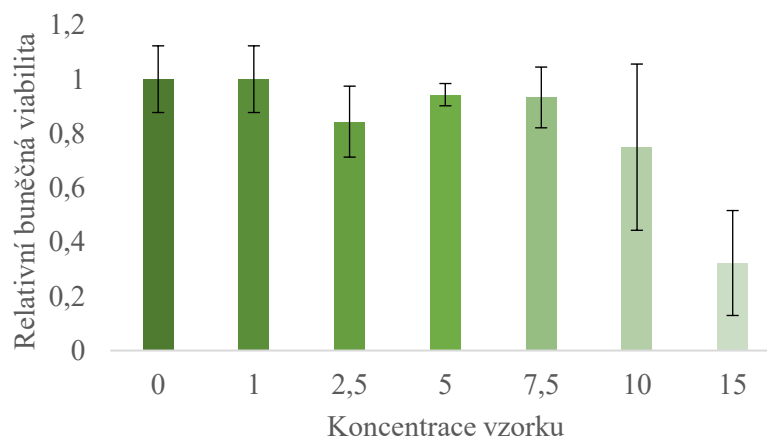
Vliv PANI/PVP na testovaných buňkách dopadl o mnoho hůře, než v předchozím případě u PANI/PVA. Koncentrace do 5 % lze vyhodnotit bez cytotoxického vlivu na buňky. Při vyšší koncentraci je však zaznamenán prudký pokles buněčné viability. Již koncentrace 7,5 % PANI/PVP působí silným cytotoxickým efektem (relativní buněčná viabilita = $0,22 \pm 0,11$).



Obrázek 37: Relativní životaschopnost buněčné linie NIH/3T3 po přidání PANI/PVP v koncentracích 1–15 %.

- **PANI/CNC**

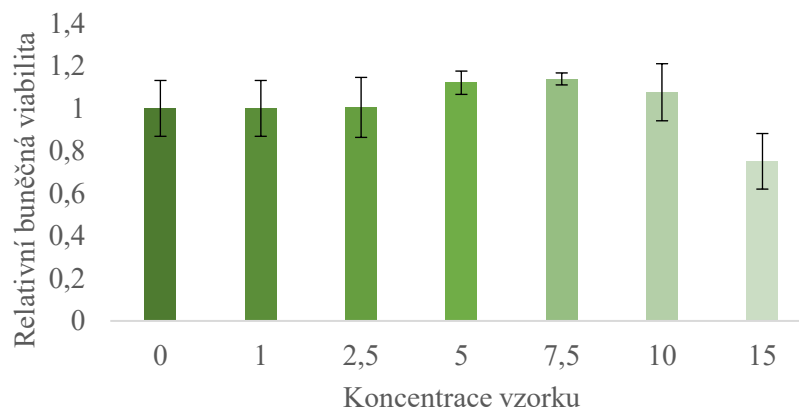
Z Obrázku 38 je patrné, že vzorek PANI/CNC lze do koncentrace 7,5 % považovat bez známek cytotoxického účinku. U koncentrace 10 % není možné konkrétně stanovit, zda se jedná o mírně cytotoxický účinek (0,8 – 0,6) či o slabě cytotoxický účinek (0,4 – 0,6) z důvodu vysoké odchylky. Koncentrace 15 % je pro buněčnou linii NIH/3T3 silně cytotoxická (relativní buněčná viabilita = $0,32 \pm 0,19$).



Obrázek 38: Relativní životaschopnost buněčné linie NIH/3T3 po přidání PANI/CNC v koncentracích 1–15 %.

- **PPy/PVA**

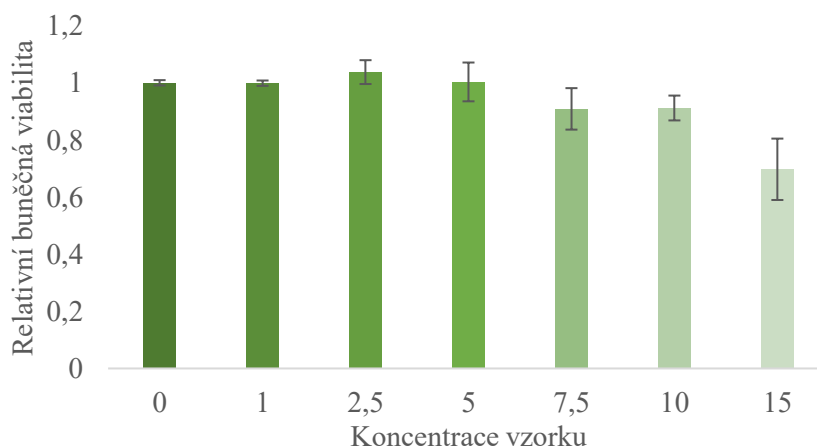
Stejně jak dobře v testech cytotoxicity obstál PANI/PVA, tak ani u PPy/PVA až do koncentrace 15 % nejsou zaznamenány žádné cytotoxické účinky. Koncentrace 15 % PPy/PVA se projevuje relativní buněčnou viabilitou $0,75 \pm 0,13$. Zdá se, že stabilizace polymerů PVA lze považovat za pozitivní z hlediska cytotoxického účinku na buněčnou linii NIH/3T3.



Obrázek 39: Relativní životaschopnost buněčné linie NIH/3T3 po přidání PPy/PVA v koncentracích 1–15 %.

- **PPy/PVP**

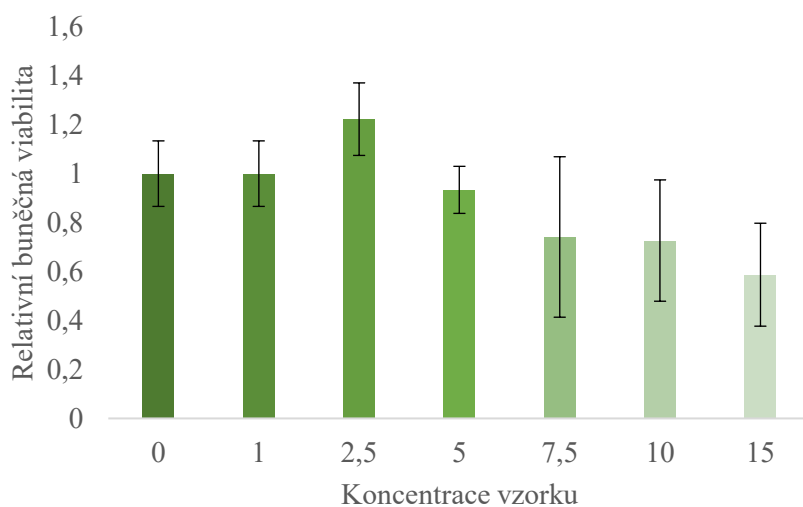
Relativní buněčná viabilita po přidání PPy/PVP klesla pod hodnotu relativní buněčné viability $0,69 \pm 0,11$ při 15 % koncentraci. Ostatní testované koncentrace polymeru byly bez pozorovatelného toxického účinku.



Obrázek 40: Relativní životaschopnost buněčné linie NIH/3T3 po přidání PPy/PVP v koncentracích 1–15 %.

- **PPy/CNC**

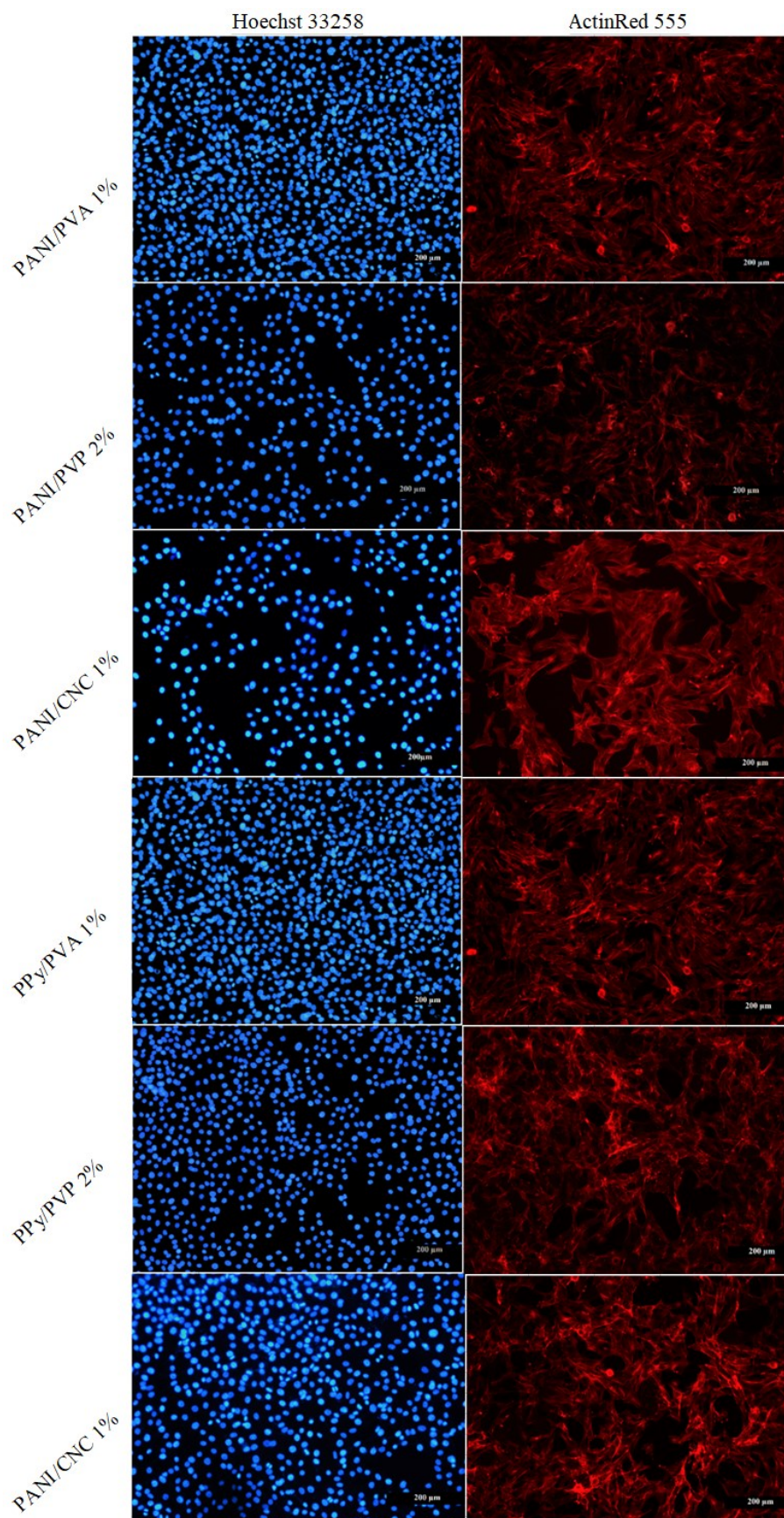
Cytotoxicita PPy/CNC, konkrétně pokles relativní buněčné viability pod 0,8 byl zaznamenán při 7,5 % koncentraci vodivého polymeru. Do koncentrace 7,5 % nebyl zpozorován cytotoxický účinek.



Obrázek 41: Relativní životaschopnost buněčné linie NIH/3T3 po přidání PPy/CNC v koncentracích 1–15 %.

7.3.2 Test buněčné adheze proliferace buněk

Proliferace a adheze byla stanovena pomocí fluorescenční mikroskopie, pozorováním buněčných kompartmentů, obarvených fluorescenčními barvivy. Buněčná linie NIH/3T3 byla nasazena na sterilní povrch v koncentraci $1 \cdot 10^5$ buněk/ml. Po 48 h inkubaci byly buňky fixovány, obarveny barvivem ActinRed 555 pro sledování buněčného cytoskeletu a barvivem Hoechst 33258, jež zobrazuje jádra buněk. Buňky byly následně pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem. Jak je vidět na Obrázku 42, ve všech případech buňky adherovaly na povrch a rovněž na něm proliferovaly. Fluoreskující buňky bylo možné snadno zaostřit ve všech případech testovaných vzorků.

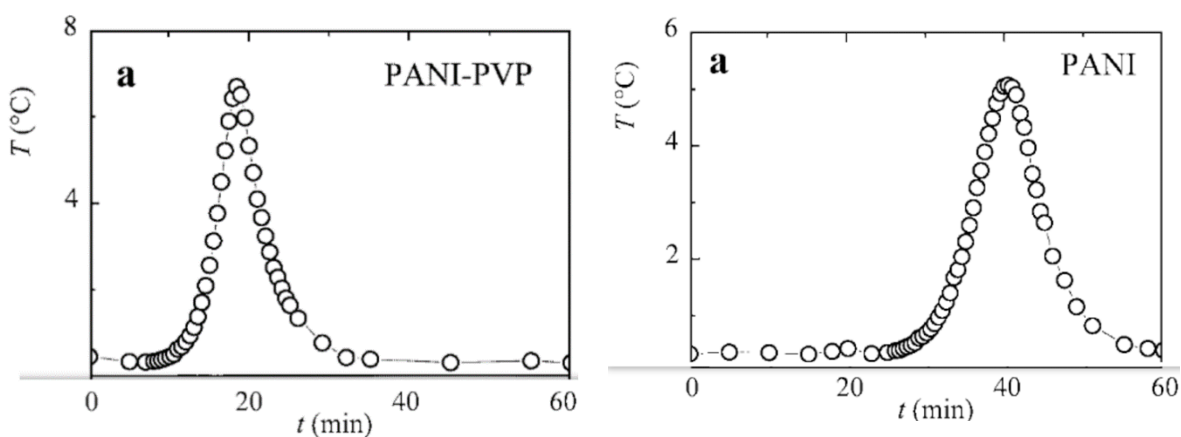


Obrázek 42: Mikrofotografie fluorescenční mikroskopie buněčné linie NIH/3T3 po 24 h inkubaci s polymery.

8 DISKUZE

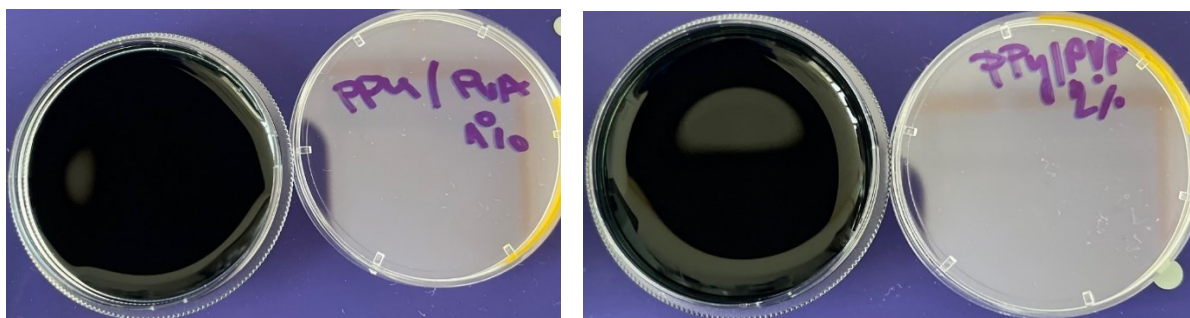
8.1 Příprava filmů

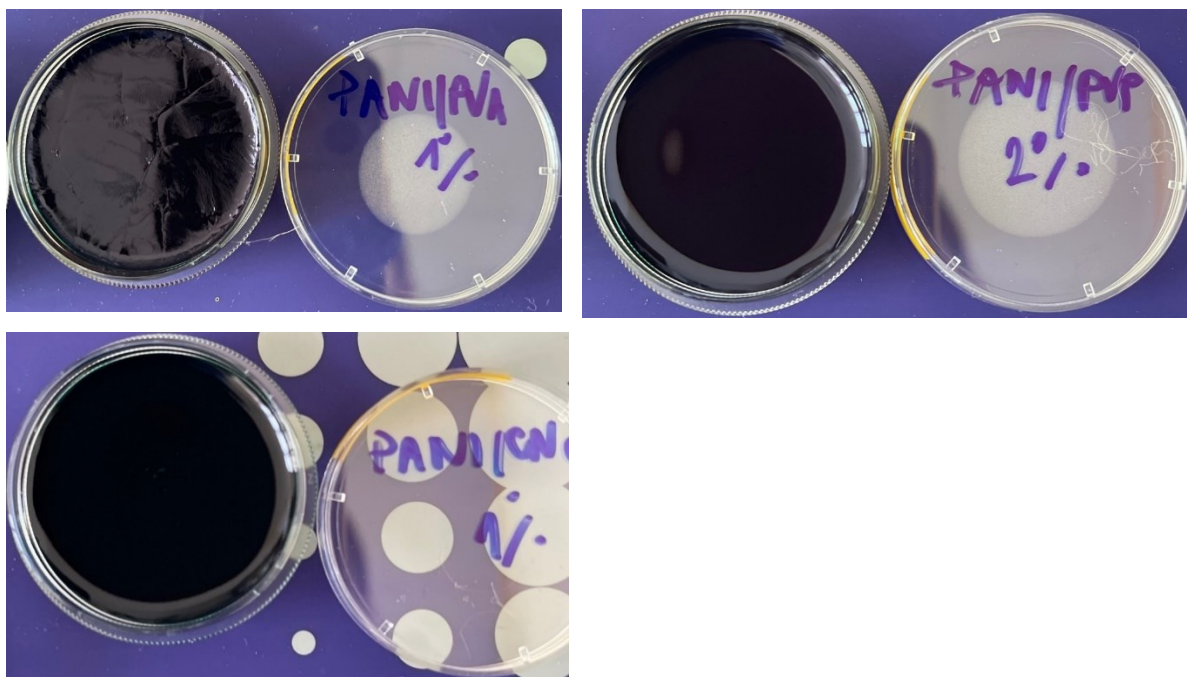
Při pozorování průběhu objemové reakce s použitím teploty bylo u Reide (2002) zjištěno, že přítomnost polymerního stabilizátoru, jako PVP má výrazný urychlující účinek na polymeraci anilinu (Obrázek 43, vlevo) ve srovnání se stejnou reakcí v jeho nepřítomnosti (Obrázek 43, vpravo). Doba polymerace u PANI se bez přítomnosti stabilizátoru může až zdvojnásobit. Výsledky Reide (2002) jsou v souladu s našimi výsledky, kdy v řádu pár minut již bylo možné pozorovat barevné změny, avšak po přibližně 15 minutách od počátku reakce začala rychlost reakce ustupovat.



Obrázek 43: Rychlost polymerace PANI se stabilizátorem PVP (vlevo) v porovnání s polymerací PANI bez přidavku stabilizátoru (vpravo) [Riede *et al.*, 2002].

Na Obrázku 44. jsou vyobrazeny jednotlivé připravené koloidní filmy. Filmy byly tmavě zeleného až černého zbarvení. Jediný PANI/PVA film se lišil od ostatních filmů, a to svou strukturou, jelikož na povrchu filmů byly znatelné praskliny. Ostatní filmy vykazovaly lesklý povrch bez prasklin. Taktéž zbarvení připravených filmů bylo téměř totožné.





Obrázek 44: Fotografie jednotlivých připravených koloidních filmů.

Při syntéze PPy je intenzita ultrazvuku jedním z důležitých parametrů, který hraje vedoucí roli v každé reakci (Sivakumar *et al.*, 2006). Proto je rozumné očekávat změnu velikosti reakce se změnou intenzity ultrazvuku. Při dalším možném testování by jednou z možných variant bylo sledování změn vlastností filmu PPy v závislosti na změně intenzity ultrazvuku.

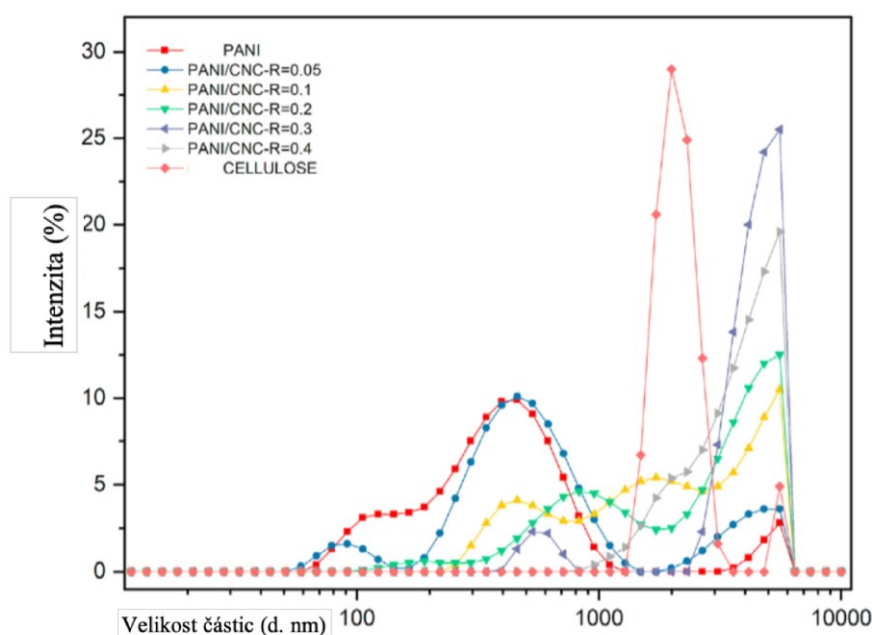
8.2 Materiálové testy

8.2.1 Velikost částic

Velikost a distribuce koloidních částic byly stanoveny dynamickým rozptylem světla pomocí přístroje Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UL). Velikost částic disperze je jedním z rozhodujících parametrů ovlivňující výkonnost koloidů v biologických aplikacích. PANI částice v disperzi mají typickou průměrnou velikost stovky nm. Měření dynamického rozptylu světla ukázalo, že velikost částic testované disperze PANI/PVP, vyjádřená jako z-průměr částic byla $226,5 \pm 0,5$ nm, s průměrným indexem polydisperzity $0,145 \pm 0,004$. Dle těchto údajů lze PANI/PVP považovat za homogenní disperzi s téměř jednotnou velikostí (Kucekova *et al.*, 2014). Koloidní PANI stabilizované PVP připravené disperzní polymerací vykazovala u Stejskala a Sapurina (2005) průměrnou velikost 241 ± 50 nm s $PDI = 0,26 \pm 0,12$, což je v porovnání s našimi výsledky téměř totožná průměrná velikost částic

naopak s vyšším PdI , avšak hodnoty Stejskala i Kucekové lze s našimi hodnotami považovat za srovnatelné.

Distribuce rozdělení částic PANI/CNC dle dat Nepomuceno *et. al.* (2021) nabývá nejvyšší intenzity okolo 1100 nm, přičemž Obrázek 45 znázorňuje různou velikost částic za použití různého poměru CNC. Z dat Nepomuceno plyne, že se zvyšující se koncentrací CNC roste i průměrná velikost částic. Při porovnání s námi naměřenými daty je průměrná velikost částic přibližně 3x větší, než je tomu v případě dat Nepomuceno.



Obrázek 45: Křivky znázorňující distribuci velikosti částic od čistého PANI, CNC, přes nanostrukturované PANI/CNC v různých poměrech – R (Nepomuceno *et al.*, 2021).

Velikost částic PPy/PVP udává hodnotu přibližně 268 nm s PdI přibližně 0,117, což jsou hodnoty srovnatelné s našimi výsledky měření. Na druhou stranu, třebaže nízká velikost částic spolu s malým PdI je považována za žádoucí, žádné stabilní micely a žádná mikro místa nemohou být za použití PVP v molekule PPy konstruována. Výsledná částice PPy vykazuje spolu s PVP větší velikost, než by tomu bylo za použití aniontové povrchově aktivní látky, např. za použití dodecylsulfátu sodného (SDS). Na druhou stranu silnější elektrostatickou interakci vykazují s polymery právě aniontové povrchově aktivní látky, čímž se získá vyšší hodnota PdI [Shuangxi and Guoku, 2007]. Pro porovnání, PPy ve formě prášku bez přidaného stabilizátoru má průměrnou velikost částic $d = 2\,649$ nm (Sandu *et al.*, 2012).

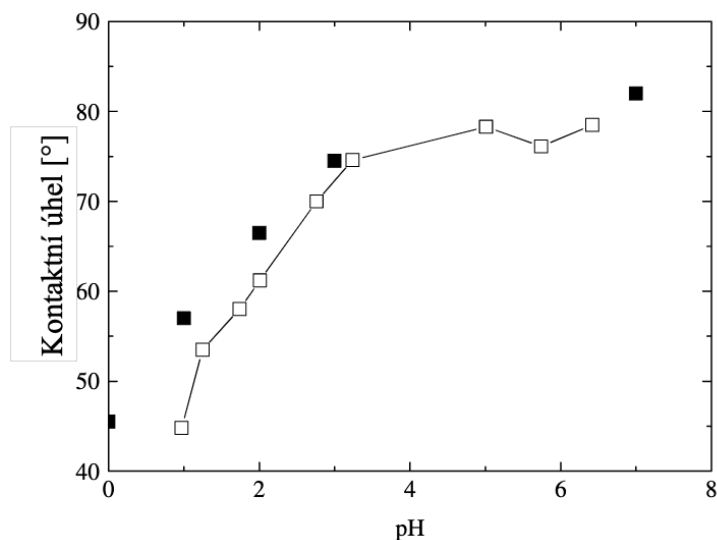
Dle našich výsledků nelze jednoznačně konstatovat, zda použitý stabilizátor má stejný vliv na velikost částic u PANI jako na PPy. Výsledné koloidní suspenze se dají považovat za homogenně polydisperzní systémy.

8.2.2 Povrchová energie

Z výsledků nelze jednoznačně říci, zda film PANI nebo PPy vykazuje vyšší povrchovou energii. Hodnoty povrchové energie závisí na kombinaci použitého filmu a připraveného stabilizátoru. Za námi připravený nejméně smáčivý film lze považovat PPy/PVA s hodnotou povrchové energie $68,69 \pm 3,24$ mN/m. Nejsmáčivější byly filmy PANI/PVA ($\gamma^{\text{TOT}} = 53,54 \pm 0,62$) a PANI/CNC ($\gamma^{\text{TOT}} = 55,63 \pm 2,28$). Obecně lze ale konstatovat, že všechny připravené vzorky dosahovaly podobné hodnoty povrchové energie, a dá se tedy usuzovat, že použitý stabilizátor neměl na hodnoty povrchové energie velký vliv. Zároveň jsou tyto výsledky podobné výsledkům ve studii Humpolíček *et al.* (2015), kde povrchová energie nativního PANI filmu dosahovala hodnoty 52,54 mN/m.

Povrchové vlastnosti lze považovat za důležitý faktor v interakcích PANI a PPy v interakci s povrchy. Smáčivost PANI filmů lze jednoduše změnit reprotonací kyselinou. Ve studii Stejskala *et al.* (1998) bylo použito 42 různých kyselin pro reprotonaci PANI. Zatímco kontaktní úhel samotného PANI hydrochloridu je přibližně 49° (Shishkanova *et al.*, 2005), naměřené kontaktní úhly po reprotonaci kolísaly mezi $29\text{--}102^\circ$. Lze učinit závěr, že reprotonace může, jak zvýšit, tak snížit smáčivost PANI filmů. Z výzkumů lze potvrdit, že chemická povaha PANI protiiontů ovlivňuje kontaktní úhly. Reprotonací je možné nastavit hodnotu kontaktních úhlů (Wan *et al.*, 1994).

Bylo také zjištěno, že existuje závislost mezi pH PANI filmu a kontaktním úhlem. Kontaktní úhly se u PANI filmů zmenšují s klesajícím pH (Obrázek 46). Dle obrázku 46. by pH našich PANI filmů mělo dle hodnot kontaktních úhlů odpovídat hodnotě přibližně $\text{pH} = 2$.



Obrázek 46: Závislost kontaktního úhlu na pH u PANI filmu (Blinova *et al.*, 2008).

Dalším aspektem, kterým lze modifikačním postupem změnit smáčivost PANI filmů, je změna jejich morfologie, kterou lze měnit podle kyselosti reakční směsi během polymerace, což umožňuje připravit filmy jak s globulární, tak nanofibrilární či nanotubulární morfologií (Stejskal *et al.*, 2015). Konkrétně globulární PANI se získá oxidací monomeru v silně kyselých podmínkách, zatímco nanofibrilární PANI se získá, pokud se polymerace provede v mírně kyselých podmínkách (Konyushenko *et al.*, 2006).

V případě PPy lze morfologii řídit polymerací prováděnou v přítomnosti různých azobarviv. Například ve studiích Hu *et al.* (2004) a Yang *et al.* (2005) byla použita methylová oranž k získání nanotubulů s kruhovými profily. V jiné práci vedlo nahrazení methylové oranže ethylovou oranží k PPy s globulární morfologií. Naproti tomu v jiné práci použili kyselou červeně pro syntézu PPy s pravoúhloú morfologií nanotubulů (Li *et al.*, 2017).

8.2.3 Měrná elektrická vodivost

Zda budou koloidní filmy vodivé či ne vyplývá z řady faktorů. Jedním ze základních faktorů pro vedení elektrické vodivosti je konjugovaný hlavní řetězec. Vyjma konjugace je dalším nezbytným předpokladem elektrické vodivosti přítomnost nositelů náboje, které zprostředkovávají jeho transport po řetězci. Ty vznikají procesem zvaným dopování (Prokes *et al.*, 2001). Mezi další faktory určující vodivost vzorku patří doba polymerace, koncentrace přidávaného stabilizátoru, tloušťka filmu a mnoho dalších.

Knihy Bagotskeho (2015) uvádí průměrnou měrnou elektrickou vodivost PANI (Obrázek 47) v rozmezí $0,1 - 0,5 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Naše výsledky jsou v rozmezí od naměřené nulové hodnoty vodivosti, přes $0,6698 \pm 0,0004$ až po $1,4167 \pm 0,0002 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$, což jsou v průměru téměř 3x

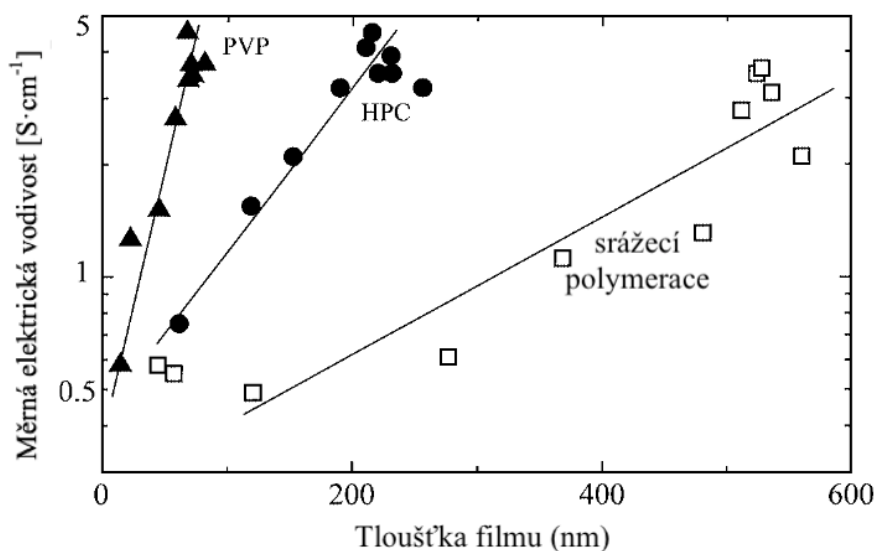
vyšší výsledky, než udává kniha. Vyšší vodivost, která je v našem případě žádoucí, je zapříčiněna použitím stabilizátorů. V kombinaci s PANI vykazuje nejlepší vodivost struktura PANI/PVA ($\sigma = 1,4167 \pm 0,0002 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$), dále pak PANI/PVP ($\sigma = 0,6698 \pm 0,0004 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$). Naproti tomu, kniha Bagotskeho (2015) uvádí průměrnou měrnou elektrickou vodivost PPy 10–50 $\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, což je v porovnání s našimi výsledky o 2 řády vyšší měrná elektrická vodivost. Vyšší vodivost může být přisuzována jiné tloušťce polymeru, způsobem výroby či použitým stabilizátorem. Na Obrázku 47 jsou rovněž znázorněny průměrné elektrické vodivosti Poly(3,4-ethylenedioxythiofenu) a polythiofenu.

Polymer	Vodivost (S/cm)
Polyanilin	0.1–5
Polypyrrol	10–50
Poly(3,4-ethylenedioxythiofenu)	300 – 500
Polythiofenu	300 – 400

Obrázek 47: Vodivost jednotlivých vodivých polymerů (Bagotsky *et al.*, 2015).

Průměrná vodivost PANI filmů připravených ve vodě u Stejskala *et al.* (2005) při tloušťce filmu $125 \pm 9 \text{ nm}$ byla $\sigma = 2,6 \pm 0,7 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Naše vzorky vykazovaly mírně nižší průměrnou elektrickou vodivost. Z výzkumu Stejskala *et al.* (2005) lze usoudit, že se snižující se tloušťkou filmu roste vodivost (Stejskal and Sapurina, 2005a). Toto tvrzení však vyvrací Reide *et al.* (2002), dle jeho výzkumu se vodivost filmů zvyšovala s rostoucí tloušťkou (Obrázek 48). Stejný účinek zaznamenali Kuhn *et al.* (1998) a pro PPy filmy Wu *et al.* (2001). Ve výzkumech bylo také zjištěno, že řetězce PANI rostou přednostně kolmo k nosiči (Wu *et al.*, 2001, Sapurina *et al.*, 2001). V případě, že by se toto tvrzení potvrdilo, pak by se vodivost stanovená čtyřbodovou metodou měřila v tenkých filmech ve směru kolmém na orientaci řetězce a byla by ovlivněna zejména meziřetězcovým přenosem náboje. V povrchové vrstvě řetězců jsou jednotlivé vrstvy méně organizované, tím se zvyšuje podíl efektivnějšího vnitřního řetězcového přenosu, a to se odráží ve zvýšené vodivosti. Dle Reide *et al.* (2002) vodivost filmů stejné tloušťky připravené v přítomnosti stabilizátoru byla vyšší než vodivost filmu vzniklého v jeho nepřítomnosti během srážecí polymerace. To je v souladu s očekávanou strukturou řetězce dezorganizovaného v důsledku snížené hustoty nukleace. Podporuje to i fakt, že stabilizátor není v PANI filmech zabudován na znatelné úrovni, jinak by se jeho přítomností snížila vodivost, což je v rozporu s pozorováním (Riede *et al.*, 2002). Filmy připravené v $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kyselině chlorovodíkové měly průměrnou vodivost $\sigma = 18,8 \pm 7,1 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$, v rámci experimentální chyby, opět podobnou vodivosti sraženiny PANI izolované za stejných podmínek, $\sigma = 11,9 \pm 5,2 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Stejskal and

Sapurina, 2005a). Pozorování, že je vodivost PANI v tenkých filmech a ve stlačených peletách srovnatelná, bylo již dříve popsáno v literatuře (Stejskal *et al.*, 1999). Je také nutné si uvědomit, že elektrické vlastnosti jsou citlivější na chybovost než optické vlastnosti, např. tenký škrábanec nemusí dramaticky snížit optickou absorpci, ale může omezit elektrický kontakt mezi dvěma částmi filmu.



Obrázek 48: Závislost elektrické vodivosti na tloušťce filmu při stabilizaci PVP, HPC za využití srážecí polymerace (Riede *et al.*, 2002).

8.3 Testy cytotoxicity

8.3.1 Testy cytotoxicity

Humpolíček *et al.* (2018) zkoumali vliv čištění PANI zajištěné opakovanou deprotonací a opětovnou protonací na jeho cytotoxické chování. Výsledky ukazují, že cytotoxicitu PANI lze snížit provedením dalších purifikačních kroků během syntézy nebo použitím komerčně dostupného PANI s vysokou čistotou. Dle Humpolíček *et al.* (2018) cytotoxicita PANI a PPy je v jejich příslušných formách srovnatelná. Přesněji řečeno, cytotoxicita více závisí na formě PANI nebo PPy (sůl versus báze) než na typu polymeru (PANI vs PPy). Z toho lze usuzovat, že v našem případě by měl mít na cytotoxicitu vliv především použitý stabilizátor než samotný polymer.

Jedním z prvních testů pro hodnocení biokompatibility testovaného vzorku na buněčných liniích je testování cytotoxicity, jež bývá založené na sledování metabolické nebo enzymatické aktivity buněk. Jedním z běžně používaných testů na stanovení cytotoxického účinku je test MTT, při kterém dochází k barevné změně po přidání některého z indikátorů buněčné viability. Buněčná viabilita může být zjišťována jednou z metabolických aktivit

v buňce, a tedy jeden z metabolických produktů udává vznik barevné změny, která je následně měřena spektrofotometricky. Způsobený cytotoxický účinek je následně vyjádřen jako míra úbytku buněčné viability vztažené ke spektrofotometrické odezvě buněk v čistém médiu čili bez přídavku testovacího vzorku. Podle našich výsledků byl nejmenší cytotoxický účinek zaznamenán u vzorku PANI/PVA, jež do koncentrace 15 % nepůsobil toxicky. Koncentrace 15 % se zdá být také bez toxických účinků (relativní buněčná viabilita = $1,06 \pm 0,33$). Testováním buněčné proliferace lze potvrdit, že vzorek PANI/PVA na buňky nepůsobil toxicky. Jako druhý nejméně cytotoxicky působící vzorek lze označit PPy/PVA, u kterého byl pokles buněčné viability zaznamenán při koncentraci 15 % vzorku, a to na relativní buněčnou viabilitu $0,75 \pm 0,13$. Výsledky téměř totožné s PPy/PVA se projevily u PPy/PVP s poklesem viability buněk při koncentraci 15 % na $0,70 \pm 0,11$. Větší cytotoxické účinky byly poté zaznamenány u PPy/CNC, avšak nejcytotoxičtěji ze všech testovaných vzorků působil PANI/PVP, u kterého byl výrazný pokles viability buněk NIH/3T3 zaznamenán při 7,5 % koncentraci vzorku a 15 % koncentrace testovaného vzorku způsobila pokles viability na $0,09 \pm 0,01$. Výsledek vzorku PANI/CNC se z hlediska toxických účinků pohyboval přibližně uprostřed z testovaných vzorků, avšak u tohoto vzorku byly zaznamenány větší směrodatné odchylky, a tedy nelze s jistotou cytotoxicitu PANI/CNC určit.

Studie Lee *et al.* (2009) a Yang *et al.* (2015) poukazují, že vodivé polymery PPy nejsou cytotoxické a podporují buněčnou proliferaci a adhezi. Lee *et al.* (2009) pěstoval PPy na uspořádaných elektrostatických nanovláčkách poly(laktid-co-glykolid) kyselině (PLGA), jež rovněž slouží k podpoře růstu a diferenciaci buněk PC12 (potkaní feochromocytom 12). Výsledky Lee *et al.* (2009) rovněž uvádí, že stimulace buněk na zarovnaných vláčkách vede k delším neuritům než stimulace na náhodných vláčkách. V budoucím výzkumu by bylo vhodné se zaměřit na topografii vzorků a cílit na zarovnané struktury. Yang *et al.* (2015) zmiňuje důležitost porézности vláčkových struktur, kde na porézních vláčkách byla průměrná délka neuritů větší než na neporézních. V závěru lze konstatovat, že použití PVA stabilizátoru vykazovalo nejlepší výsledky (nejmenší cytotoxicitu) v případě obou polymerů. Použití stabilizátoru CNC vykazovalo obdobné cytotoxické výsledky u PANI a PPy. Naopak při použití stabilizátoru PVP byl cytotoxický účinek mezi PANI a PPy velmi odlišný.

8.3.2 Test buněčné adheze a proliferace

Zkouška cytotoxicity přímým kontaktem byla testována naočkováním buněk na površích testovaných polymerů a následnou 48 h inkubací. K vizualizaci buněk posloužila barviva Hoechst 33258 a ActinRed 555. Následně bylo možné osazené buňky pozorovat na fluorescenčním mikroskopu.

V první řadě je nutné zmínit, že buňky nebyly homogenně porostlé celým povrchem, avšak polymer PPy/PVA lze považovat za jeden z nejvíce porostlý buňkami. Toto tvrzení je v souladu s testy cytotoxicity stanovených testem MTT, kde až 15 % koncentrace je mírně cytotoxická. Stejně tak PANI/PVA byl jeden z povrchů, kde byla zaznamenána jedna z největších proliferací. Test cytotoxicity MTT v tomto případě nebylo možné z důvodu velikých směrodatných odchylek s dostatečnou přesností určit, avšak z testů buněčné adheze se potvrzuje předpoklad, že ani PANI/PVA nevykazuje toxické účinky na buněčnou linii NIH/3T3.

Naopak na vzorcích PANI/CNC a PANI/PVP lze z pozorování usoudit, že buňky na těchto površích rostly nejméně. Vzorek PANI/PVP byl v testech cytotoxicity MTT testováním označen za nejvíce cytotoxický ze všech testovaných vzorků, a tedy je i toto tvrzení v souladu s testováním buněčné adheze a proliferace. PANI/CNC vykazoval v MTT testu při 15 % koncentraci silný cytotoxický účinek, obecně lze tedy test buněčné proliferace a adheze označit za doplňující k MTT testu. Výsledky korespondují s MTT testy.

Kromě sledování buněčné proliferace a adheze lze také pomocí mikroskopie pozorovat buněčnou morfologii. Z fotografií vzorků lze potvrdit, že žádný z testovaných povrchů neměl negativní vliv na buněčnou morfologii. Fibroblasty si ve všech případech zachovaly své typické tvary a chovaly se fyziologicky.

ZÁVĚR

V experimentální části diplomové práce bylo připraveno šest různých typů filmů se stejnojmennou koloidní disperzí – tři polyanilinové a tři polypyrrolové, pokaždé s jiným stabilizátorem (PVA, PVP, CNC). Filmy a koloidy byly podrobeny materiálovým testům a biologickému testování. Z materiálových charakteristik byla testována velikost částic v koloidní disperzi připravených vodivých polymerů, dále pak povrchová energie a měrná elektrická vodivost. Biologické testy zahrnovaly testy buněčné proliferace a adheze a MTT test. Všechny z testovaných charakteristik jsou neodmyslitelně podstatné pro další možné testování či využití vodivých polymerů. Nedá se tedy opomenout ani jedna z metod, a tedy je zapotřebí nahlédnout, jestli v některých z testů lze testovaný vzorek považovat za nevyhovující k dalšímu vývoji a testování.

Z materiálových charakteristik, konkrétně při měření velikostí částic výrazně dobře obstál vzorek PPy/PVA s velikostí částic 146 ± 5 nm a $PdI = 0,14 \pm 0,002$ a vzorek PPy/PVP s velikostí částic 192 ± 3 nm a $PdI = 0,23 \pm 0,087$. Taktéž PANI/PVP s velikostí částic 314 ± 2 nm a $PdI = 0,12 \pm 0,018$ lze považovat za pozitivní výsledek z měření velikosti částic. Naopak největší velikost částic obsahoval vzorek PANI/PVA, jehož hodnota dosáhla rozměrů 3925 ± 450 nm s $PdI = 0,23 \pm 0,096$. Stejně tak vzorkům PANI/CNC ($d = 3101 \pm 307$ nm) a PPy/CNC ($d = 2209 \pm 86$ nm) byla změřena nadměrná velikost částic.

Povrchová energie příslušných vzorků ani v jednom případě měření nezacházela do extrémních hodnot, rozdíl povrchové energie mezi vzorkem s nejvyšší a nejnižší hodnotou povrchové energie činí 22 %. Nejnižší povrchová energie byla naměřena u vzorku PANI/PVA ($\gamma^{\text{TOT}} = 53,54 \pm 0,62$ mN/m), naopak nejvyšší povrchovou energii, a zároveň tedy i nejnižší hydrofilitu vykazoval vzorek PANI/CNC ($\gamma^{\text{TOT}} = 68,01 \pm 6,44$ mN/m). Z těchto výsledků lze usoudit, že hodnota povrchové energie nezávisí na použitém filmu, nýbrž na typu použitého stabilizátoru.

Měření vodivosti je velice důležité pro další výzkumy daného vzorku pro použití v TI. Nejprve bylo tedy důležité zjistit, zdali všechny vzorky jsou vodivé. Tento předpoklad se nepotvrdil u vzorku PANI/CNC, jelikož přístroj pro tento vzorek nezaznamenal měřitelnou vodivost. U všech ostatních vzorků se podařilo vodivost filmů změřit. Nejvíce vodivý byl vzorek PANI/PVA ($\sigma = 1,4167 \pm 0,0002$ S·cm⁻¹), ale za také poměrně dobře vodivé vzorky lze označit PANI/PVP ($\sigma = 0,6698 \pm 0,0004$ S·cm⁻¹) a PPy/CNC ($\sigma = 0,6983 \pm 0,0026$ S·cm⁻¹).

Při testování cytotoxicity se jako nejvíce toxický jevil PANI/PVP, již 7,5 % hmotn. koncentrace vzorku působila na buněčnou linii NIH/3T3 silně cytotoxickým účinkem (relativní buněčná viabilita = $0,22 \pm 0,11$). Při dalším výzkumu by se jevilo žádoucí vzorek podrobit testování na jiné z buněčných linií, popř. na tkáni specifické pro konkrétní orgán či místo. Existuje možnost, že vzorek PANI/PVP bude mít žádoucí účinky bez známek cytotoxicity, avšak pro konkrétní buněčnou kulturu. Ostatní z testovaných vzorků ve většině vykazovaly mírný cytotoxický účinek při 15 % koncentraci. Pro ověření cytotoxicity posloužil test buněčné adheze a proliferace, kde došlo k potvrzení cytotoxických účinků PANI/PVP, jelikož se tento vzorek na Petriho misce pod fluorescenčním mikroskopem jevil jako nejméně porostlý buňkami a lze tedy říci, že buňkám se na misce s tímto povrchem dařilo nejméně. Druhý z nejméně profitujících polymerů s ohledem na testy cytotoxicity lze považovat PANI/CNC. Buňky byly taktéž jedny z nejméně porostlých což dohromady s relativní buněčnou viabilitou $0,32 \pm 0,19$ při přidavku 15 % hmotn. vzorku dává úsudek druhého nejméně vhodného testovaného vzorku z hlediska biologických testů. Na druhou stranu velice dobře obstál vzorek PPy/PVP i PPy/PVA. Vzorky PANI/PVA a PPy/CNC z výsledků MTT testu vykazovaly pro přesnější tvrzení o toxicitě vzorku na buněčnou linii NIH/3T3 nadměrnou směrodatnou odchylku. Testy buněčné adheze a proliferace však dokazují, že odchylka způsobená laboratorní prací nezachází do svých krajních bodů, a tedy ani tyto vzorky by dle tohoto úsudku neměly vykazovat horší cytotoxický účinek, nežli mírně cytotoxický při své maximální testované koncentraci 15 %.

Závěrem lze za jeden z nejvíce potencionálních vzorků pro využití v TI obecně označit PPy a to se všemi testovanými stabilizátory. PPy/PVA výborně obstál v testech cytotoxicity, kde se koncentrace vzorku 15 % hmotn. jevila poklesem buněčné viability na hodnotu $0,75 \pm 0,13$, což lze obecně označit za pokles buněčné viability vlivem mírného cytotoxického účinku při spodní možné hranici při započtení směrodatné odchylky. V testech buněčné adheze a proliferace se jednalo o jednu z nejvíce osazených misek, tedy ani zde nebyl zaznamenán cytotoxický účinek PPy/PVA. Tento vzorek rovněž ze všech z testovaných vzorků vykazoval nejmenší velikost částic ($d = 146 \pm 5$ nm), což je žádoucí pro možnou inkorporaci do tkání. Na druhou stranu vzorek vykazuje nejvyšší povrchovou energii ($\gamma^{\text{TOT}} = 68,69 \pm 3,24$ mN/m) a tedy lze soudit, že vzorek bude jeden z nejhůře smáčivých. Hodnotu povrchové energie je možno upravovat opakovanou reprotonací (Shishkanova *et al.*, 2005), a tedy při dalším výzkumu by se jevilo žádoucí tento krok při přípravě vzorků zařadit a sledovat změnu povrchové energie vzhledem k počtu provedených reprotonací. Měřením

elektrické vodivosti se zjistilo, že vzorek PPy/PVA je vodivý ($\sigma = 0,3223 \pm 0,0005 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$). Jeho vodivost by bylo možné ještě případně upravit tloušťkou připraveného filmu.

Pro vzorek PPy/PVP byla při 15 % hmotn. přídavku vzorku zaznamenána buněčná viabilita $0,70 \pm 0,11$, vzorek tedy na buňky při 15 % hmotn. koncentraci působil mírně cytotoxickým účinkem, buňky byly při testu buněčné adheze a proliferace o něco méně narostlé, než v případě PPy/PVA. Lze tedy usoudit, že tento vzorek působí o něco málo více cytotoxicky, nežli vzorek PPy/PVA. Dokonce i velikost částic tohoto vzorku je mírně větší ($192 \pm 3 \text{ nm}$). Na druhou stranu nižší povrchová energie ($\gamma^{\text{TOT}} = 56,75 \pm 2,71 \text{ mN/m}$) byla považována za žádoucí. Téměř srovnatelná, avšak opět mírně nižší, byla u tohoto vzorku naměřena elektrická vodivost ($\sigma = 0,2351 \pm 0,0025 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Vzorek, který lze z naměřených výsledků pomyslně umístit na třetí příčku, PPy/CNC byl na rozdíl od předchozích dvou zmiňovaných vzorků nejvodivější ($\sigma = 0,6983 \pm 0,0026 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$). Jeho povrchová energie $\gamma^{\text{TOT}} = 58,00 \pm 1,68 \text{ mN/m}$ napovídá požadované smáčivosti vzorku. Ovšem změřená velikost částic $2209 \pm 86 \text{ nm}$ je považována za nežádoucí. Při budoucím výzkumu PPy/CNC by bylo vhodné se zaměřit na úpravu velikosti částic při přípravě vzorku např. změnou teploty a regulací pěnovosti (Ma *et al.*, 2014).

Z naměřených výsledků lze usuzovat, že připravené vodivé polymery mají potenciál pro využití v TI a v biomedicínských aplikacích. Z výsledků také zároveň vyplývá, že použití stabilizátorů nemělo významný vliv na všechny zkoumané vlastnosti.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ABD RAZAK, S. I., WAHAB, I. F., FADIL, F., DAHLI, F. N., MD KHUDZARI, A. Z. & ADELI, H. 2015. A Review of Electrospun Conductive Polyaniline Based Nanofiber Composites and Blends: Processing Features, Applications, and Future Directions. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2015, 356286.
- ABD WAHID, N. A., HASHEMI, A., EVANS, J. J. & ALKAISI, M. M. 2021. Conductive Bioimprint Using Soft Lithography Technique Based on PEDOT:PSS for Biosensing. *Bioengineering (Basel)*, 8.
- ABE, M., OHTANI, A., UMEMOTO, Y., AKIZUKI, S., EZOE, M., HIGUCHI, H., NAKAMOTO, K., OKUNO, A. & NODA, Y. 1989. Soluble and high molecular weight polyaniline. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 1736-1738.
- ADAMS, D. S. & LEVIN, M. 2013. Endogenous voltage gradients as mediators of cell-cell communication: strategies for investigating bioelectrical signals during pattern formation. *Cell and Tissue Research*, 352, 95-122.
- ADAMS, D. S., TSENG, A. S. & LEVIN, M. 2013. Light-activation of the Archaerhodopsin H(+)-pump reverses age-dependent loss of vertebrate regeneration: sparking system-level controls in vivo. *Biol Open*, 2, 306-13.
- AGARWALA, S. 2020. Electrically Conducting Hydrogels for Health care: Concept, Fabrication Methods, and Applications. *Int J Bioprint*, 6, 273.
- AHMADI, F., OVEISI, Z., SAMANI, S. M. & AMOOZGAR, Z. 2015. Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications. *Res Pharm Sci*, 10, 1-16.
- AHUJA, T., MIR, I. A., KUMAR, D. & RAJESH 2007. Biomolecular immobilization on conducting polymers for biosensing applications. *Biomaterials*, 28, 791-805.
- ALICE PARK 2014. <https://time.com/collection-post/72173/robert-lanza-2014-time-100/> (online).
- AL-ZOHBI, F., GHAMOISS, F., SCHMALTZ, B., ABARBRI, M., ZAGHRIQUI, M. & TRAN-VAN, F. 2021. Enhanced storage performance of PANI and PANI/graphene composites synthesized in protic ionic liquids. *Materials*, 14, 4275.
- ANDERSSON, A.-S., BÄCKHED, F., VON EULER, A., RICHTER-DAHLFORS, A., SUTHERLAND, D. & KASEMO, B. 2003. Nanoscale features influence epithelial cell morphology and cytokine production. *Biomaterials*, 24, 3427-3436.
- ANDONIOU, C. E., THIEN, C. & LANGDON, W. Y. 1994. Tumour induction by activated abl involves tyrosine phosphorylation of the product of the cbl oncogene. *The EMBO Journal*, 13, 4515-4523.
- ANSARI, R. 2006. Polypyrrole conducting electroactive polymers: synthesis and stability studies. *E-Journal of Chemistry*, 3, 186-201.
- ARULDASS, S., MATHIVANAN, V., MOHAMED, A. & TYE, C. 2019. Factors affecting hydrolysis of polyvinyl acetate to polyvinyl alcohol. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 7, 103238.
- ATALA, A., BAUER, S. B., SOKER, S., YOO, J. J. & RETIK, A. B. 2006. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *The lancet*, 367, 1241-1246.
- ATALA, A. & FORGACS, G. 2019. Three-dimensional bioprinting in regenerative medicine: reality, hype, and future. Oxford University Press.
- ATEH, D., NAVSARIA, H. & VADGAMA, P. 2006a. Polypyrrole-based conducting polymers and interactions with biological tissues. *Journal of the royal society interface*, 3, 741-752.

- ATEH, D. D., VADGAMA, P. & NAVSARIA, H. A. 2006b. Culture of human keratinocytes on polypyrrole-based conducting polymers. *Tissue engineering*, 12, 645-655.
- AYAD, M. M., AMER, W. A. & WHDAN, M. 2012. In situ polyaniline film formation using ferric chloride as an oxidant. *Journal of applied polymer science*, 125, 2695-2700.
- BADYLAK, S. F. 2007. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials*, 28, 3587-3593.
- BAGOTSKY, V. S., SKUNDIN, A. M. & VOLFKOVICH, Y. M. 2015. *Electrochemical power sources: batteries, fuel cells, and supercapacitors*, John Wiley & Sons.
- BALA HUSAIN, M., GUPTA, A., AL-ASHWAL, B. & SHARMA, S. 2018. Synthesis of PVA/PVP based hydrogel for biomedical applications: a review. *Energy Sources Part A Recovery Utilization and Environmental Effects*, 40.
- BANERJEE, P. 1998. Carboxymethylcellulose stabilized polyaniline dispersions and conducting copolymer latex composites. *European polymer journal*, 34, 841-847.
- BANGAR, S. P. & WHITESIDE, W. S. 2021. Nano-cellulose reinforced starch bio composite films-A review on green composites. *International journal of biological macromolecules*, 185, 849-860.
- BANJAR, M., SUPHI, H., SARIZAN, M., YAHAYA, A., KHALIL, N. A., SINGH, M. & ZULKIFLI, M. 2021. Fundamental study of colloidal stability and dispersion of novel nanosized conductive polyaniline (PANI)/pre vulcanised latex (PVL) film for antimicrobial applications. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 1195, 012055.
- BAPTISTA, P. M., SIDDIQUI, M. M., LOZIER, G., RODRIGUEZ, S. R., ATALA, A. & SOKER, S. 2011. The use of whole organ decellularization for the generation of a vascularized liver organoid. *Hepatology*, 53, 604-617.
- BARBECK, M., JUNG, O., SMEETS, R. & KORŽINSKAS, T. 2019. *Biomaterial-Supported Tissue Reconstruction or Regeneration*, BoD-Books on Demand.
- BARBERIO, C., SAEZ, J., WITHERS, A., NAIR, M., TAMAGNINI, F. & OWENS, R. M. 2022. Conducting Polymer-ECM Scaffolds for Human Neuronal Cell Differentiation. *Adv Healthc Mater*, 11, e2200941.
- BASSETT, C. A. L., PAWLUK, R. J. & BECKER, R. O. 1964. Effects of Electric Currents on Bone In Vivo. *Nature*, 204, 652-654.
- BAUD, V. & JACQUE, E. 2008. The alternative NF- κ B activation pathway and cancer: friend or foe? *Medecine Sciences: M/S*, 24, 1083-1088.
- BAZAKA, K., JACOB, M. V., CRAWFORD, R. J. & IVANOVA, E. P. 2012. Efficient surface modification of biomaterial to prevent biofilm formation and the attachment of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95, 299-311.
- BEN-ZVI, D., SHILO, B.-Z. & BARKAI, N. 2011. Scaling of morphogen gradients. *Current Opinion in Genetics & Development*, 21, 704-710.
- BERETS, D. J. & SMITH, D. S. 1968. Electrical properties of linear polyacetylene. *Transactions of The Faraday Society*, 64, 823-828.
- BHADRA, S., KHASTGIR, D., SINGHA, N. K. & LEE, J. H. 2009. Progress in preparation, processing and applications of polyaniline. *Progress in Polymer Science*, 34, 783-810.
- BHANDARI, S. 2018. Chapter 2 - Polyaniline: Structure and Properties Relationship. In: VISAKH, P. M., PINA, C. D. & FALLETTA, E. (eds.) *Polyaniline Blends, Composites, and Nanocomposites*. Elsevier.
- BHATTACHARJEE, S. 2016. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337-351.

- BINYAMIN, G., SHAFI, B. M. & MERY, C. M. Biomaterials: a primer for surgeons. Seminars in pediatric surgery, 2006. Elsevier, 276-283.
- BIRLA, R. 2014. Introduction to tissue engineering: applications and challenges.
- BLINOVA, N. V., SAPURINA, I., KLIMOVIČ, J. & STEJSKAL, J. 2005. The chemical and colloidal stability of polyaniline dispersions. *Polymer Degradation and Stability*, 88, 428-434.
- BLINOVA, N. V., STEJSKAL, J., TRCHOVÁ, M. & PROKEŠ, J. 2008. Control of polyaniline conductivity and contact angles by partial protonation. *Polymer International*, 57, 66-69.
- BOATENG, J. & CATANZANO, O. 2015. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing--A Review. *J Pharm Sci*, 104, 3653-3680.
- BOBER, P., TRCHOVÁ, M., PROKEŠ, J., VARGA, M. & STEJSKAL, J. 2011. Polyaniline-silver composites prepared by the oxidation of aniline with silver nitrate in solutions of sulfonic acids. *Electrochimica Acta*, 56, 3580-3585.
- BONI, R., ALI, A., SHAVANDI, A. & CLARKSON, A. N. 2018. Current and novel polymeric biomaterials for neural tissue engineering. *J Biomed Sci*, 25, 90.
- BORRIELLO, A., GUARINO, V., SCHIAVO, L., ALVAREZ-PEREZ, M. A. & AMBROSIO, L. 2011. Optimizing PANi doped electroactive substrates as patches for the regeneration of cardiac muscle. *J Mater Sci Mater Med*, 22, 1053-62.
- BOWDEN, F. P. & RIDLER, K. E. W. 1936. Physical properties of surfaces - III—The surface temperature of sliding metals - The temperature of lubricated surfaces. *Proceedings of The Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 154, 640-656.
- BOYAN, B. D., LOHMANN, C. H., DEAN, D. D., SYLVIA, V. L., COCHRAN, D. L. & SCHWARTZ, Z. 2001. Mechanisms involved in osteoblast response to implant surface morphology. *Annual Review of Materials Research*, 31, 357-371.
- BROWN, M. J. & LOEW, L. M. 1994. Electric field-directed fibroblast locomotion involves cell surface molecular reorganization and is calcium independent. *J Cell Biol*, 127, 117-28.
- CAI, J. & LIU, R. 2020. Introduction to Antibacterial Biomaterials. *Biomater Sci*, 8, 6812-6813.
- CAMPOCCIA, D., MONTANARO, L. & ARCIOLA, C. R. 2013. A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. *Biomaterials*, 34, 8533-8554.
- CAO, T., HO, K.-H. & TEOH, S.-H. 2003. Scaffold design and in vitro study of osteochondral coculture in a three-dimensional porous polycaprolactone scaffold fabricated by fused deposition modeling. *Tissue engineering*, 9, 103-112.
- CAO, Y., ANDREATTA, A., HEEGER, A. J. & SMITH, P. 1989. Influence of chemical polymerization conditions on the properties of polyaniline. *Polymer*, 30, 2305-2311.
- CAO, Y., SMITH, P. & HEEGER, A. J. 1992. Counter-ion induced processibility of conducting polyaniline and of conducting polyblends of polyaniline in bulk polymers. *Synthetic metals*, 48, 91-97.
- CAPLAN, A. I. 1991. Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research*, 9, 641-650.
- COLLIER, J. H., CAMP, J. P., HUDSON, T. W. & SCHMIDT, C. E. 2000. Synthesis and characterization of polypyrrole-hyaluronic acid composite biomaterials for tissue engineering applications. *Journal of biomedical materials research*, 50, 574-584.
- CRACIUN, A. M., FOCSAN, M., MAGYARI, K., VULPOI, A. & PAP, Z. 2017. Surface Plasmon Resonance or Biocompatibility-Key Properties for Determining the Applicability of Noble Metal Nanoparticles. *Materials (Basel)*, 10.

- CUI, H., CHEN, Z., ZHONG, S., WOOLEY, K. L. & Pochan, D. J. 2007. Block copolymer assembly via kinetic control. *Science*, 317, 647-50.
- CUI, Z., COLETTA, C., DAZZI, A., LEFRANCOIS, P., GERVAIS, M., NÉRON, S. & REMITA, S. 2014. Radiolytic method as a novel approach for the synthesis of nanostructured conducting polypyrrole. *Langmuir*, 30, 14086-14094.
- D'APRANO, G., LECLERC, M. & ZOTTI, G. 1992. Stabilization and characterization of pernigraniline salt: the " acid-doped" form of fully oxidized polyanilines. *Macromolecules*, 25, 2145-2150.
- DALLAS, P. & GEORGAKILAS, V. 2015. Interfacial polymerization of conductive polymers: generation of polymeric nanostructures in a 2-D space. *Advances in colloid and interface science*, 224, 46-61.
- DALLAS, P., NIARCHOS, D., VRBANIC, D., BOUKOS, N., PEJOVNIK, S., TRAPALIS, C. & PETRIDIS, D. 2007. Interfacial polymerization of pyrrole and in situ synthesis of polypyrrole/silver nanocomposites. *Polymer*, 48.
- DEEPSHIKHA & BASU, T. 2011. A Review on Synthesis and Characterization of Nanostructured Conducting Polymers (NSCP) and Application in Biosensors. *Analytical Letters*, 44, 1126-1171.
- DEL VALLE, L., ARADILLA, D., OLIVER, R., SEPULCRE, F., GAMEZ, A., ARMELIN, E., ALEMÁN, C. & ESTRANY, F. 2007. Cellular adhesion and proliferation on poly (3, 4-ethylenedioxythiophene): benefits in the electroactivity of the conducting polymer. *European Polymer Journal*, 43, 2342-2349.
- DELLAVALLE, A., SAMPAOLESI, M., TONLORENZI, R., TAGLIAFICO, E., SACCHETTI, B., PERANI, L., INNOCENZI, A., GALVEZ, B. G., MESSINA, G. & MOROSETTI, R. 2007. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nature cell biology*, 9, 255-267.
- DESHMUKH, K., AHAMED, M. B., DESHMUKH, R., PASHA, S. K., BHAGAT, P. & CHIDAMBARAM, K. 2017. Biopolymer composites with high dielectric performance: interface engineering. *Biopolymer composites in electronics*. Elsevier.
- DI, L., WANG, L. P., LU, Y. N., HE, L., LIN, Z. X., WU, K. J., REN, Q. S. & WANG, J. Y. 2011. Protein adsorption and peroxidation of rat retinas under stimulation of a neural probe coated with polyaniline. *Acta Biomaterialia*, 7, 3738-3745.
- DIAZ, A. & KANAZAWA, K. 1983. Polypyrrole: An electrochemical approach to conducting polymers. *Extended Linear Chain Compounds: Volume 3*, 417-441.
- DRURY, J. L. & MOONEY, D. J. 2003. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, 24, 4337-4351.
- DUBEY, N. & LECLERC, M. 2011. Conducting polymers: efficient thermoelectric materials. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 49, 467-475.
- DZOBO, K., THOMFORD, N. E., SENTHEBANE, D. A., SHIPANGA, H., ROWE, A., DANDARA, C., PILLAY, M. & MOTAUNG, K. S. C. M. 2018. Advances in regenerative medicine and tissue engineering: innovation and transformation of medicine. *Stem cells international*, 2018.
- ELSENBAUMER, R., JEN, K. Y. & OBOODI, R. 1986. Processible and environmentally stable conducting polymers. *Synthetic Metals*, 15, 169-174.
- ENGLER, A. J., SEN, S., SWEENEY, H. L. & DISCHER, D. E. 2006. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*, 126, 677-689.
- ESMAEELY NEISIANY, R., ENAYATI, M. S., SAJKIEWICZ, P., PAHLEVANNESHAN, Z. & RAMAKRISHNA, S. 2020a. Insight into the current directions in functionalized nanocomposite hydrogels. *Frontiers in materials*, 7, 25.

- ESMAEELY NEISIANY, R., ENAYATI, M. S., SAJKIEWICZ, P., PAHLEVANNESHAN, Z. & RAMAKRISHNA, S. 2020b. Insight Into the Current Directions in Functionalized Nanocomposite Hydrogels. *Frontiers in Materials*, 7.
- FARZAMFAR, S., ESMAILPOUR, F., RAHMATI, M., VAEZ, A., MIRZAI, M., GARMABI, B., SHAYANNIA, A., EBRAHIMI, E., VAHEDI, H. & SALEHI, M. Poly-lactic Acid/Gelatin Nanofiber (PLA/GTNF) Conduits Containing Platelet-Rich Plasma for Peripheral Nerve Regeneration. 2017.
- FERENETS, M. & HARLIN, A. 2007. Chemical in situ polymerization of polypyrrole on poly (methyl methacrylate) substrate. *Thin solid films*, 515, 5324-5328.
- FIEDLER, T., VIDEIRA, A., BARTOLO, P., STRAUCH, M., MURCH, G. & FERREIRA, J. 2015. On the mechanical properties of PLC–bioactive glass scaffolds fabricated via BioExtrusion. *Materials Science and Engineering: C*, 57, 288-293.
- FONG, P., SHIN'OKA, T., LOPEZ-SOLER, R. I. & BREUER, C. 2006. The use of polymer based scaffolds in tissue-engineered heart valves. *Progress in Pediatric cardiology*, 21, 193-199.
- FONNER, J. M., FORCINITI, L., NGUYEN, H., BYRNE, J. D., KOU, Y.-F., SYEDANAWAZ, J. & SCHMIDT, C. E. 2008. Biocompatibility implications of polypyrrole synthesis techniques. *Biomedical materials*, 3, 034124.
- FUCHS, J. R., NASSERI, B. A. & VACANTI, J. P. 2001. Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction. *The Annals of thoracic surgery*, 72, 577-591.
- G. DINKU, A., OOSTERBAAN, W., VANDEWAL, K., BOLSÉE, J.-C., BERTHO, S., D'HAEN, J., LUTSEN, L., VANDERZANDE, D. & MANCA, J. 2009. Effect of Alkyl Side-Chain Length on Photovoltaic Properties of Poly(3-alkylthiophene)/PCBM Bulk Heterojunctions. *Advanced Functional Materials*, 19, 3300-3306.
- GÄHDE, J. 1994. Conjugated Polymers and Related Materials. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 186, 124-125.
- GAMBLE, J. F., LEANE, M., OLUSANMI, D., TOBYN, M., ŠUPUK, E., KHOO, J. & NADERI, M. 2012. Surface energy analysis as a tool to probe the surface energy characteristics of micronized materials—A comparison with inverse gas chromatography. *International journal of pharmaceutics*, 422, 238-244.
- GARCIA, B., FUSALBA, F. & BÉLANGER, D. 1997. Electrochemical characterization in nonaqueous electrolyte of polyaniline electrochemically prepared from aqueous media. *Canadian journal of chemistry*, 75, 1536-1541.
- GAWLITTA, D., BENDERS, K. E., VISSER, J., VAN DER SAR, A. S., KEMPEN, D. H., THEYSE, L. F., MALDA, J. & DHERT, W. J. 2015. Decellularized cartilage-derived matrix as substrate for endochondral bone regeneration. *Tissue Engineering Part A*, 21, 694-703.
- GIZDAVIC-NIKOLAIDIS, M. R., BENNETT, J. R., SWIFT, S., EASTEAL, A. J. & AMBROSE, M. 2011. Broad spectrum antimicrobial activity of functionalized polyanilines. *Acta biomaterialia*, 7, 4204-4209.
- GOSWAMI, S., NANDY, S., FORTUNATO, E. & MARTINS, R. 2023. Polyaniline and its composites engineering: A class of multifunctional smart energy materials. *Journal of Solid State Chemistry*, 317, 123679.
- GREEN, R. & ABIDIAN, M. R. 2015. Conducting polymers for neural prosthetic and neural interface applications. *Advanced Materials*, 27, 7620-7637.
- GRISHKEWICH, N., MOHAMMED, N., TANG, J. & TAM, K. C. 2017. Recent advances in the application of cellulose nanocrystals. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 29, 32-45.

- GROENENDAAL, L., JONAS, F., FREITAG, D., PIELARTZIK, H. & REYNOLDS, J. R. 2000. Poly (3, 4-ethylenedioxythiophene) and its derivatives: past, present, and future. *Advanced materials*, 12, 481-494.
- GUIMARD, N. K., GOMEZ, N. & SCHMIDT, C. E. 2007. Conducting polymers in biomedical engineering. *Progress in polymer science*, 32, 876-921.
- GUO, B., FINNE-WISTRAND, A. & ALBERTSSON, A.-C. 2012. Electroactive hydrophilic polylactide surface by covalent modification with tetraaniline. *Macromolecules*, 45, 652-659.
- GUO, B. & MA, P. X. 2018. Conducting Polymers for Tissue Engineering. *Biomacromolecules*, 19, 1764-1782.
- GVOZDENOVI, M., JUGOVI, B., STEVANOVI, J. & GRGUR, B. 2014. Electrochemical synthesis of electroconducting polymers. *Hem Ind* 68 (6): 673–684.
- HAAF, F. D., SANNER, A. D. & STRAUB, F. D. 1985. Polymers of N-Vinylpyrrolidone: Synthesis, Characterization and Uses. *Polymer Journal*, 17, 143-152.
- HACKER, M. C. & MIKOS, A. G. 2006. Trends in tissue engineering research. *Tissue Engineering*, 12, 2049-2057.
- HALLENSLEBEN, M. L. 2000. Polyvinyl compounds, others. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.
- HASAN, J., CRAWFORD, R. J. & IVANOVA, E. P. 2013. Antibacterial surfaces: the quest for a new generation of biomaterials. *Trends in Biotechnology*, 31, 295-304.
- HEEGER, A. J. 2001. Semiconducting and metallic polymers: the fourth generation of polymeric materials (Nobel lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, 40, 2591-2611.
- HESS, M., JONES, R. G., KAHOVEC, J., KITAYAMA, T., KRATOCHVÍL, P., KUBISA, P., MORMANN, W., STEPTO, R. F. T., TABAK, D., VOHLÍDAL, J. & WILKS, E. S. 2006. Terminology of polymers containing ionizable or ionic groups and of polymers containing ions (IUPAC Recommendations 2006). *Pure and Applied Chemistry*, 78, 2067-2074.
- HEYWANG, G. & JONAS, F. 1992. Poly(alkylenedioxythiophene)s—new, very stable conducting polymers. *Advanced Materials*, 4, 116-118.
- HOFFMAN, A. S. 2012. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 18-23.
- HOLLISTER, S. J. 2005. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature materials*, 4, 518-524.
- HRONIK-TUPAJ, M. & KAPLAN, D. L. 2012. A review of the responses of two- and three-dimensional engineered tissues to electric fields. *Tissue Eng Part B Rev*, 18, 167-80.
- HU, X., LU, Y. & LIU, J. 2004. Synthesis of Polypyrrole Microtubes with Actinomorphic Morphology in the Presence of a β -Cyclodextrin Derivative-Methyl Orange Inclusion Complex. *Macromolecular rapid communications*, 25, 1117-1120.
- HUANG, S., EICHLER, G., BAR-YAM, Y. & INGBER, D. E. 2005. Cell fates as high-dimensional attractor states of a complex gene regulatory network. *Phys Rev Lett*, 94, 128701.
- HUDECKI, A., KIRYCZYŃSKI, G. & ŁOS, M. J. 2019. Biomaterials, definition, overview. *Stem cells and biomaterials for regenerative medicine*. Elsevier.
- HULME, C. H., PERRY, J., MCCARTHY, H. S., WRIGHT, K. T., SNOW, M., MENNAN, C. & ROBERTS, S. 2021. Cell therapy for cartilage repair. *Emerg Top Life Sci*, 5, 575-589.
- HUMPOLÍČEK, P., KAŠPÁRKOVÁ, V., PACHERNÍK, J., STEJSKAL, J., BOBER, P., CAPÁKOVÁ, Z., RADASZKIEWICZ, K. A., JUNKAR, I. & LEHOČKÝ, M. 2018. The biocompatibility of polyaniline and polypyrrole: A comparative study of their

- cytotoxicity, embryotoxicity and impurity profile. *Materials Science and Engineering: C*, 91, 303-310.
- HUMPOLÍČEK, P., RADASZKIEWICZ, K. A., KAŠPÁRKOVÁ, V., STEJSKAL, J., TRCHOVÁ, M., KUČEKOVÁ, Z., VIČAROVÁ, H., PACHERNÍK, J., LEHOČKÝ, M. & MINAŘÍK, A. 2015. Stem cell differentiation on conducting polyaniline. *Rsc Advances*, 5, 68796-68805.
- HUTMACHER, D. W. 2000. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*, 21, 2529-2543.
- CHAN, L. W., HAO, J. S. & HENG, P. W. S. 1999. Evaluation of permeability and mechanical properties of composite polyvinyl alcohol films. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 47, 1412-1416.
- CHAYER, M., FAÏD, K. & LECLERC, M. 1997. Highly Conducting Water-Soluble Polythiophene Derivatives. *Chemistry of Materials*, 9, 2902-2905.
- CHEN, Y. & ALMAN, B. A. 2009. Wnt pathway, an essential role in bone regeneration. *Journal of cellular biochemistry*, 106, 353-362.
- CHERHAL, F., COUSIN, F. & CAPRON, I. 2016. Structural description of the interface of Pickering emulsions stabilized by cellulose nanocrystals. *Biomacromolecules*, 17, 496-502.
- CHEUNG, K., BLOOR, D. & STEVENS, G. 1988. Characterization of polypyrrole electropolymerized on different electrodes. *Polymer*, 29, 1709-1717.
- CHIANG, C. K., FINCHER, C. R., PARK, Y. W., HEEGER, A. J., SHIRAKAWA, H., LOUIS, E. J., GAU, S. C. & MACDIARMID, A. G. 1977. Electrical Conductivity in Doped Polyacetylene. *Physical Review Letters*, 39, 1098-1101.
- CHIEN, J. C. W. Polyacetylene: Chemistry, Physics, and Material Science. 1984.
- CHOUDHARY, R. B., ANSARI, S. & PURTY, B. 2020. Robust electrochemical performance of polypyrrole (PPy) and polyindole (PIIn) based hybrid electrode materials for supercapacitor application: A review. *Journal of Energy Storage*, 29, 101302.
- CHOUDHURY, H., PANDEY, M., LIM, Y. Q., LOW, C. Y., LEE, C. T., MARILYN, T. C. L., LOH, H. S., LIM, Y. P., LEE, C. F., BHATTAMISHRA, S. K., KESHARWANI, P. & GORAIN, B. 2020. Silver nanoparticles: Advanced and promising technology in diabetic wound therapy. *Materials Science and Engineering: C*, 112, 110925.
- CHU, P. K., CHEN, J. Y., WANG, L. P. & HUANG, N. 2002. Plasma-surface modification of biomaterials. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 36, 143-206.
- IARC Monographs – Volume 127, 2020. *Some aromatic amines and related compounds* <https://monographs.iarc.who.int/iarc-monographs-meetings/iarc-monographs-volume-127/>.
- ITO, T., SHIRAKAWA, H. & IKEDA, S. 1974. Simultaneous polymerization and formation of polyacetylene film on the surface of concentrated soluble Ziegler-type catalyst solution. *Journal of polymer science: polymer chemistry edition*, 12, 11-20.
- JAIN, R. & GREGORY, R. V. 1995. Solubility and rheological characterization of polyaniline base in N-methyl-2-pyrrolidinone and N, N'-dimethylpropylene urea. *Synthetic metals*, 74, 263-266.
- JAWAD, H., ALI, N., LYON, A., CHEN, Q., HARDING, S. & BOCCACCINI, A. R. 2007. Myocardial tissue engineering: a review. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 1, 327-342.
- JIANG, Y., KRISHNAN, N., HEO, J., FANG, R. H. & ZHANG, L. 2020. Nanoparticle-hydrogel superstructures for biomedical applications. *Journal of Controlled Release*, 324, 505-521.

- JOHN, J., SAHEEDA, P., SABEERA, K. & JAYALEKSHMI, S. 2018. Doped polypyrrole with good solubility and film forming properties suitable for device applications. *Materials Today: Proceedings*, 5, 21140-21146.
- KALIVA, M., GEORGOPOULOU, A., DRAGATOGIANNIS, D. A., CHARITIDIS, C. A., CHATZINIKOLAIDOU, M. & VAMVAKAKI, M. 2020. Biodegradable Chitosan-graft-Poly(l-lactide) Copolymers For Bone Tissue Engineering. *Polymers*, 12, 316.
- KAMALESH, S., TAN, P., WANG, J., LEE, T., KANG, E. T. & WANG, C. H. 2000. Biocompatibility of electroactive polymers in tissues. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 52, 467-478.
- KASSIM, A., BASAR, Z. B. & MAHMUD, H. E. 2002. Effects of preparation temperature on the conductivity of polypyrrole conducting polymer. *Journal of Chemical Sciences*, 114, 155-162.
- KAŠPÁRKOVÁ, V., HUMPOLÍČEK, P., STEJSKAL, J., CAPÁKOVÁ, Z., BOBER, P., SKOPALOVÁ, K. & LEHOČKÝ, M. 2019. Exploring the Critical Factors Limiting Polyaniline Biocompatibility. *Polymers (Basel)*, 11.
- KATTI, D. S., LAKSHMI, S., LANGER, R. & LAURENCIN, C. 2002. Toxicity, biodegradation and elimination of polyanhydrides. *Advanced drug delivery reviews*, 54, 933-961.
- KAUR, G., ADHIKARI, R., CASS, P., BOWN, M. & GUNATILLAKE, P. 2015. Electrically conductive polymers and composites for biomedical applications. *Rsc Advances*, 5, 37553-37567.
- KEATE, R. L., TROPP, J., SERNA, C., 3RD & RIVNAY, J. 2021. A Collagen-Conducting Polymer Composite with Enhanced Chondrogenic Potential. *Cell Mol Bioeng*, 14, 501-512.
- KENWRIGHT, A., FEAST, W., ADAMS, P., MILTON, A., MONKMAN, A. & SAY, B. 1992. Solution-state carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of polyaniline. *Polymer*, 33, 4292-4298.
- KHALIL, H. A., DAVOUDPOUR, Y., ISLAM, M. N., MUSTAPHA, A., SUDESH, K., DUNGANI, R. & JAWAID, M. 2014. Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: a review. *Carbohydrate polymers*, 99, 649-665.
- KIM, J., KOO, B.-K. & KNOBLICH, J. A. 2020. Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21, 571-584.
- KOH, J. K., KIM, J., KIM, B., KIM, J. H. & KIM, E. 2011. Highly efficient, iodine-free dye-sensitized solar cells with solid-state synthesis of conducting polymers. *Advanced Materials*, 23, 1641-1646.
- KOMERI, R., KASOJU, N. & ANIL KUMAR, P. R. 2022. 13 - In vitro cytotoxicity and cytocompatibility assays for biomaterial testing under regulatory platform. In: MOHANAN, P. V. (ed.) *Biomedical Product and Materials Evaluation*. Woodhead Publishing.
- KONYUSHENKO, E. N., STEJSKAL, J., ŠEDĚNKOVÁ, I., TRCHOVÁ, M., SAPURINA, I., CIESLAR, M. & PROKEŠ, J. 2006. Polyaniline nanotubes: conditions of formation. *Polymer International*, 55, 31-39.
- KRETLOW, J. D. & MIKOS, A. G. 2008. From material to tissue: Biomaterial development, scaffold fabrication, and tissue engineering. *AIChE Journal*, 54, 3048-3067.
- KUCEKOVA, Z., HUMPOLICEK, P., KASPARKOVA, V., PERECKO, T., LEHOČKÝ, M., HAUERLANDOVÁ, I., SÁHA, P. & STEJSKAL, J. 2014. Colloidal polyaniline

- dispersions: Antibacterial activity, cytotoxicity and neutrophil oxidative burst. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 116, 411-417.
- KUHN, H., CHILD, A., SKOTHEIM, T., ELSENBAUMER, R. & REYNOLDS, J. 1998. Handbook of conducting polymers. *TA Skotheim, RL Elsenbaumer and JR Reynolds, Eds*, 993.
- KULINETZ, I. 2015. 1 - Biomaterials and their applications in medicine. In: AMATO, S. F. & EZZELL, R. M. (eds.) *Regulatory Affairs for Biomaterials and Medical Devices*. Woodhead Publishing.
- KUMAR, D. & SHARMA, R. 1998. Advances in conductive polymers. *European polymer journal*, 34, 1053-1060.
- KVITEK, L., NOVOTNY, R. & PIKAL, P. 1998. Size Determination of Inorganic Particles by Dynamic Light Scattering. *Chemické listy*, 92.
- LAI, J., YI, Y., ZHU, P., SHEN, J., WU, K., ZHANG, L. & LIU, J. 2016. Polyaniline-based glucose biosensor: A review. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 782, 138-153.
- LANDMESSER, U., WOLLERT, K. C. & DREXLER, H. 2009. Potential novel pharmacological therapies for myocardial remodelling. *Cardiovascular research*, 81, 519-527.
- LANZA, R., GEARHART, J., HOGAN, B., MELTON, D., PEDERSEN, R., THOMAS, E. D. & THOMSON, J. 2005. *Essentials of stem cell biology*, Elsevier.
- LANZA, R., LANGER, R., VACANTI, J. P. & ATALA, A. 2020. *Principles of tissue engineering*, Academic press.
- LAROUI, H., DALMASSO, G., NGUYEN, H. T., YAN, Y., SITARAMAN, S. V. & MERLIN, D. 2010. Drug-loaded nanoparticles targeted to the colon with polysaccharide hydrogel reduce colitis in a mouse model. *Gastroenterology*, 138, 843-53.e1-2.
- LEE, J., KIM, D. & KIM, C. 1995. Synthesis of soluble polypyrrole of the doped state in organic solvents. *Synthetic Metals*, 74, 103-106.
- LEE, J. Y., BASHUR, C. A., GOLDSTEIN, A. S. & SCHMIDT, C. E. 2009. Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications. *Biomaterials*, 30, 4325-4335.
- LEE, S., HONG, J. Y. & JANG, J. 2015. A Comparative Study on Optical, Electrical, and Mechanical Properties of Conducting Polymer-Based Electrodes. *small*, 11, 5498-5504.
- LEI, J., CAI, Z. & MARTIN, C. R. 1992. Effect of reagent concentrations used to synthesize polypyrrole on the chemical characteristics and optical and electronic properties of the resulting polymer. *Synthetic Metals*, 46, 53-69.
- LEI, J., LI, Z., LU, X., WANG, W., BIAN, X., ZHENG, T., XUE, Y. & WANG, C. 2011. Controllable fabrication of porous free-standing polypyrrole films via a gas phase polymerization. *Journal of colloid and interface science*, 364, 555-560.
- LEVIN, M., SELBERG, J. & ROLANDI, M. 2019. Endogenous Bioelectrics in Development, Cancer, and Regeneration: Drugs and Bioelectronic Devices as Electroceuticals for Regenerative Medicine. *iScience*, 22, 519-533.
- LEVIN, M. & STEVENSON, C. G. 2012. Regulation of cell behavior and tissue patterning by bioelectrical signals: challenges and opportunities for biomedical engineering. *Annu Rev Biomed Eng*, 14, 295-323.
- LI, C., SUN, C., CHEN, W. & PAN, L. 2005. Electrochemical thin film deposition of polypyrrole on different substrates. *Surface and Coatings Technology*, 198, 474-477.
- LI, S. 1999. Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids. *J Biomed Mater Res*, 48, 342-53.

- LI, Y., BOBER, P., TRCHOVÁ, M. & STEJSKAL, J. 2017. Polypyrrole prepared in the presence of methyl orange and ethyl orange: nanotubes versus globules in conductivity enhancement. *Journal of Materials Chemistry C*, 5, 4236-4245.
- LIANG, Y., HE, J. & GUO, B. 2021. Functional Hydrogels as Wound Dressing to Enhance Wound Healing. *ACS Nano*, 15, 12687-12722.
- LIM, H., LEE, S., SONG, K., KIM, S. & KIM, K. 2005. Synthesis and properties of soluble polypyrrole doped with dodecylbenzenesulfonate and combined with polymeric additive poly (ethylene glycol). *Journal of applied polymer science*, 97, 1170-1175.
- LIN, C. C. & ANSETH, K. S. 2009. PEG hydrogels for the controlled release of biomolecules in regenerative medicine. *Pharm Res*, 26, 631-43.
- LIN, H.-K. & CHEN, S.-A. 2000. Synthesis of new water-soluble self-doped polyaniline. *Macromolecules*, 33, 8117-8118.
- LLOYD, A. W. 2002. Interfacial bioengineering to enhance surface biocompatibility. *Med Device Technol*, 13, 18-21.
- LU, H., LIU, Y., GUO, J., WU, H., WANG, J. & WU, G. 2016. Biomaterials with Antibacterial and Osteoinductive Properties to Repair Infected Bone Defects. *Int J Mol Sci*, 17, 334.
- LUO, J., WALKER, M., XIAO, Y., DONNELLY, H., DALBY, M. J. & SALMERON-SANCHEZ, M. 2022. The influence of nanotopography on cell behaviour through interactions with the extracellular matrix—a review. *Bioactive materials*, 15, 145-159.
- LUO, S.-C., MOHAMED ALI, E., TANSIL, N. C., YU, H.-H., GAO, S., KANTCHEV, E. A. & YING, J. Y. 2008. Poly (3, 4-ethylenedioxythiophene)(PEDOT) nanobiointerfaces: thin, ultrasoother, and functionalized PEDOT films with in vitro and in vivo biocompatibility. *Langmuir*, 24, 8071-8077.
- LUO, Y., ENGELMAYR, G., AUGUSTE, D. T., DA SILVA FERREIRA, L., KARP, J. M., SAIGAL, R. & LANGER, R. 2014. Chapter 24 - 3D Scaffolds. In: LANZA, R., LANGER, R. & VACANTI, J. (eds.) *Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition)*. Boston: Academic Press.
- MA, L., JIANG, W. & LI, W. 2014. Solvent-free fabrication of tissue engineering scaffolds with immiscible polymer blends. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 63, 510-517.
- MACCHIARINI, P., JUNGEBLUTH, P., GO, T., ASNAGHI, M. A., REES, L. E., COGAN, T. A., DODSON, A., MARTORELL, J., BELLINI, S. & PARNIGOTTO, P. P. 2008. Clinical transplantation of a tissue-engineered airway. *The Lancet*, 372, 2023-2030.
- MARIE, E., ROTHE, R., ANTONIETTI, M. & LANDFESTER, K. 2003. Synthesis of polyaniline particles via inverse and direct miniemulsion. *Macromolecules*, 36, 3967-3973.
- MARTO, J., ASCENSO, A., SIMOES, S., ALMEIDA, A. J. & RIBEIRO, H. M. 2016. Pickering emulsions: challenges and opportunities in topical delivery. *Expert opinion on drug delivery*, 13, 1093-1107.
- MARTYAK, N. M., MCANDREW, P., MCCASKIE, J. E. & DIJON, J. 2002. Electrochemical polymerization of aniline from an oxalic acid medium. *Progress in Organic Coatings*, 45, 23-32.
- MATTIOLI-BELMONTE, M., GIAVARESI, G., BIAGINI, G., VIRGILI, L., GIACOMINI, M., FINI, M., GIANTOMASSI, F., NATALI, D., TORRICELLI, P. & GIARDINO, R. 2003. Tailoring biomaterial compatibility: in vivo tissue response versus in vitro cell behavior. *The International journal of artificial organs*, 26, 1077-1085.
- MELIOS, C., HUANG, N., CALLEGARO, L., CENTENO, A., CULTRERA, A., CORDON, A., PANCHAL, V., ARNEDO, I., REDO-SANCHEZ, A. & ETAYO, D.

2020. Towards standardisation of contact and contactless electrical measurements of CVD graphene at the macro-, micro-and nano-scale. *Scientific Reports*, 10, 3223.
- MELLO, H. J. N. P. D. & MULATO, M. 2018. Influence of galvanostatic electrodeposition parameters on the structure-property relationships of polyaniline thin films and their use as potentiometric and optical pH sensors. *Thin Solid Films*, 656, 14-21.
- MERCERON, T. K. & MURPHY, S. V. 2015. Chapter 14 - Hydrogels for 3D Bioprinting Applications. In: ATALA, A. & YOO, J. J. (eds.) *Essentials of 3D Biofabrication and Translation*. Boston: Academic Press.
- MOORE, J. W. 2001. Nobel Prizes, 2000. *Journal of Chemical Education*, 78, 8.
- MOTTAGHITALAB, V., XI, B., SPINKS, G. M. & WALLACE, G. G. 2006. Polyaniline fibres containing single walled carbon nanotubes: Enhanced performance artificial muscles. *Synthetic Metals*, 156, 796-803.
- MTT Assay for Cell Viability and Proliferation, online. <https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt>.
- MU, S.-L., KONG, Y. & WU, J. 2004. ELECTROCHEMICAL POLYMERIZATION OF ANILINE IN PHOSPHORIC ACID AND THE PROPERTIES OF POLYANILINE. *Chinese Journal of Polymer Science (World Scientific Publishing Company)*, 22.
- MÜNSTEDT, H. 1986. Properties of polypyrroles treated with base and acid. *Polymer*, 27, 899-904.
- MURAKAMI, Y. & YAMAMOTO, T. 1999. Synthesis of new polypyrroles by oxidative polymerization of N-(benzylideneamino) pyrroles and properties of the polymers. *Polymer journal*, 31, 476-478.
- MYERS, R. E. 1986. Chemical oxidative polymerization as a synthetic route to electrically conducting polypyrroles. *Journal of electronic materials*, 15, 61-69.
- NAIR, L. S. & LAURENCIN, C. T. 2007. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, 32, 762-798.
- NAMSHEER, K. & ROUT, C. S. 2021. Conducting polymers: A comprehensive review on recent advances in synthesis, properties and applications. *RSC advances*, 11, 5659-5697.
- NASERI, M., FOTOUHI, L. & EHSANI, A. 2018. Recent Progress in the Development of Conducting Polymer-Based Nanocomposites for Electrochemical Biosensors Applications: A Mini-Review. *Chem Rec*, 18, 599-618.
- NATTA, G., MAZZANTI, G. & CORRADINI, P. 1967. Stereospecific polymerization of acetylene. *Stereoregular Polymers and Stereospecific Polymerizations*. Elsevier.
- NAVARCHIAN, A. H., HASANZADEH, Z. & JOULAZADEH, M. 2013. Effect of polymerization conditions on reaction yield, conductivity, and ammonia sensing of polyaniline. *Advances in polymer technology*, 32.
- NEETIKA, M., RAJNI, J., SINGH, P. K., BHATTACHARYA, B., SINGH, V. & TOMAR, S. 2017. Synthesis and properties of polyaniline, poly (o-anisidine), and poly [aniline-co-(o-anisidine)] using potassium iodate oxidizing agent. *High Performance Polymers*, 29, 266-271.
- NELSON, C. M. 2009. Geometric control of tissue morphogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1793, 903-10.
- NEPOMUCENO, N., SEIXAS, A., MEDEIROS, E. & MÉLO, T. 2021. Evaluation of conductivity of nanostructured polyaniline/cellulose nanocrystals (PANI/CNC) obtained via in situ polymerization. *Journal of Solid State Chemistry*, 302, 122372.

- NESIC, D., WHITESIDE, R., BRITTBERG, M., WENDT, D., MARTIN, I. & MAINIL-VARLET, P. 2006. Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. *Advanced drug delivery reviews*, 58, 300-322.
- NEZAKATI, T., SEIFALIAN, A., TAN, A. & SEIFALIAN, A. M. 2018. Conductive Polymers: Opportunities and Challenges in Biomedical Applications. *Chemical Reviews*, 118, 6766-6843.
- NGUYEN, D. N. & YOON, H. 2016. Recent advances in nanostructured conducting polymers: from synthesis to practical applications. *Polymers*, 8, 118.
- NIH3T3 Cell Line <https://nih3t3.com>.
- NII, T. & KATAYAMA, Y. 2021a. Biomaterial-Assisted Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci*, 22.
- NII, T. & KATAYAMA, Y. 2021b. Biomaterial-Assisted Regenerative Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 8657.
- NING, C., ZHOU, Z., TAN, G., ZHU, Y. & MAO, C. 2018. Electroactive polymers for tissue regeneration: Developments and perspectives. *Progress in polymer science*, 81, 144-162.
- NOROUZI, M., BOROUJENI, S. M., OMIDVARKORDSHOULI, N. & SOLEIMANI, M. 2015. Advances in skin regeneration: application of electrospun scaffolds. *Adv Healthc Mater*, 4, 1114-33.
- OMASTOVÁ, M., MOSNÁČKOVÁ, K., TRCHOVÁ, M., KONYUSHENKO, E. N., STEJSKAL, J., FEDORKO, P. & PROKEŠ, J. 2010. Polypyrrole and polyaniline prepared with cerium (IV) sulfate oxidant. *Synthetic Metals*, 160, 701-707.
- OZAWA, H., ABE, E., SHIBASAKI, Y., FUKUHARA, T. & SUDA, T. 1989. Electric fields stimulate DNA synthesis of mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) by a mechanism involving calcium ions. *J Cell Physiol*, 138, 477-83.
- ÖZLEM SULTAN, A. 2017. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In: MARCELO, L. L. & SONIA, S. (eds.) *Genotoxicity*. Rijeka: IntechOpen.
- PABST, W. & GREGOROVA, E. 2007. Characterization of particles and particle systems. *ICT Prague*, 122, 122.
- PADMAPRIYA, S., SUDHA, V. & HARINIPRIYA, S. 2019. Paratacamite doped polypyrrole for effective hydrogen storage. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44, 6773-6786.
- PALMA-CANDO, A. U., FRONTANA-URIBE, B. A., MALDONADO, J. L. & HERNÁNDEZ, M. R. 2014. Control of thickness of PEDOT electrodeposits on glass/ITO electrodes from organic solutions and its use as anode in organic solar cells. *Procedia Chemistry*, 12, 92-99.
- PAN, L. & BORGENS, R. B. 2012. Strict perpendicular orientation of neural crest-derived neurons in vitro is dependent on an extracellular gradient of voltage. *J Neurosci Res*, 90, 1335-46.
- PANDEY, P. C. & SINGH, G. 2002. Electrochemical polymerization of aniline in proton-free nonaqueous media: Dependence of microstructure and electrochemical properties of polyaniline on solvent and dopant. *Journal of the Electrochemical Society*, 149, D51.
- PANG, A. L., ARSAD, A. & AHMADIPOUR, M. 2021. Synthesis and factor affecting on the conductivity of polypyrrole: a short review. *Polymers for Advanced Technologies*, 32, 1428-1454.
- PARK, H., BHALLA, R., SAIGAL, R., RADISIC, M., WATSON, N., LANGER, R. & VUNJAK-NOVAKOVIC, G. 2008. Effects of electrical stimulation in C2C12

- muscle constructs. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 2, 279-287.
- PARK, H. J., ROUABHIA, M., LAVERTU, D. & ZHANG, Z. 2015. Electrical Stimulation Modulates the Expression of Multiple Wound Healing Genes in Primary Human Dermal Fibroblasts. *Tissue Engineering Part A*, 21, 1982-1990.
- PARK, Y., JUNG, J. & CHANG, M. 2019. Research progress on conducting polymer-based biomedical applications. *Applied Sciences*, 9, 1070.
- PEI, Q. & QIAN, R. 1991. Protonation and deprotonation of polypyrrole chain in aqueous solutions. *Synthetic metals*, 45, 35-48.
- PELHAM, R. J. & WANG, Y.-L. 1997. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 13661-13665.
- PEPPAS, N. A. & LANGER, R. 1994. New challenges in biomaterials. *Science*, 263, 1715-1720.
- PIRES, F., FERREIRA, Q., RODRIGUES, C. A., MORGADO, J. & FERREIRA, F. C. 2015. Neural stem cell differentiation by electrical stimulation using a cross-linked PEDOT substrate: Expanding the use of biocompatible conjugated conductive polymers for neural tissue engineering. *Biochim Biophys Acta*, 1850, 1158-68.
- POSUDIEVSKY, O. Y., GONCHARUK, O. & POKHODENKO, V. 2010. Mechanochemical preparation of conducting polymers and oligomers. *Synthetic metals*, 160, 47-51.
- POTJE-KAMLOTH, K. CONDUCTING POLYMER-BASED SCHOTTKY BARRIER AND HETEROJUNCTION DIODES AND THEIR SENSOR APPLICATION. 2001.
- PROKES, J., STEJSKAL, J. & OMASTOVA, M. 2001. Polyaniline and polypyrrole—Two representatives of conducting polymers. *Chemické listy*, 95.
- PRZEKORA, A. 2019. The summary of the most important cell-biomaterial interactions that need to be considered during in vitro biocompatibility testing of bone scaffolds for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*, 97, 1036-1051.
- QAZI, T. H., RAI, R. & BOCCACCINI, A. R. 2014a. Tissue engineering of electrically responsive tissues using polyaniline based polymers: A review. *Biomaterials*, 35, 9068-9086.
- QAZI, T. H., RAI, R., DIPPOLD, D., ROETHER, J. E., SCHUBERT, D. W., ROSELLINI, E., BARBANI, N. & BOCCACCINI, A. R. 2014b. Development and characterization of novel electrically conductive PANI-PGS composites for cardiac tissue engineering applications. *Acta biomaterialia*, 10, 2434-2445.
- QI, G., HUANG, L. & WANG, H. 2012. Highly conductive free standing polypyrrole films prepared by freezing interfacial polymerization. *Chemical Communications*, 48, 8246-8248.
- QIAN, H., SHAN, Y., GONG, R., LIN, D., ZHANG, M., WANG, C. & WANG, L. 2022. Fibroblasts in Scar Formation: Biology and Clinical Translation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022.
- RAI, R., ROETHER, J. A. & BOCCACCINI, A. R. 2022. Polyaniline based polymers in tissue engineering applications: a review. *Progress in Biomedical Engineering*.
- RANGARAJAN, S., MADDEN, L. & BURSAC, N. 2014. Use of flow, electrical, and mechanical stimulation to promote engineering of striated muscles. *Annals of biomedical engineering*, 42, 1391-1405.

- RAVICHANDRAN, R., SUNDARRAJAN, S., VENUGOPAL, J. R., MUKHERJEE, S. & RAMAKRISHNA, S. 2010. Applications of conducting polymers and their issues in biomedical engineering. *Journal of the Royal Society Interface*, 7, S559-S579.
- RIEDE, A., HELMSTEDT, M., SAPURINA, I. & STEJSKAL, J. 2002. In situ polymerized polyaniline films: 4. Film formation in dispersion polymerization of aniline. *Journal of colloid and interface science*, 248, 413-418.
- RIVERS, T. J., HUDSON, T. W. & SCHMIDT, C. E. 2002. Synthesis of a novel, biodegradable electrically conducting polymer for biomedical applications. *Advanced Functional Materials*, 12, 33-37.
- ROBSON, M. C. 1997. Wound infection: a failure of wound healing caused by an imbalance of bacteria. *Surgical Clinics of North America*, 77, 637-650.
- ROGERS, Z. J., ZEEVI, M. P., KOPPE, R. & BENCHERIF, S. A. 2020. Electroconductive Hydrogels for Tissue Engineering: Current Status and Future Perspectives. *Bioelectricity*, 2, 279-292.
- ROUABHIA, M., PARK, H., MENG, S., DERBALI, H. & ZHANG, Z. 2013. Electrical Stimulation Promotes Wound Healing by Enhancing Dermal Fibroblast Activity and Promoting Myofibroblast Transdifferentiation. *PLOS ONE*, 8, e71660.
- SADKI, S., SCHOTTLAND, P., BRODIE, N. & SABOURAUD, G. 2000. The mechanisms of pyrrole electropolymerization. *Chemical Society Reviews*, 29, 283-293.
- SAIRAM, M., LOH, X. X., LI, K., BISMARCK, A., STEINKE, J. H. G. & LIVINGSTON, A. G. 2009. Nanoporous asymmetric polyaniline films for filtration of organic solvents. *Journal of Membrane Science*, 330, 166-174.
- SALTZMAN, W. M. 2004. *Tissue engineering: engineering principles for the design of replacement organs and tissues*, Oxford university press.
- SANDU, T., SARBU, A., CONSTANTIN, F., SPATARU, C. I., GABOR, R. A., SOMOGHI, R. & IOVU, H. 2012. Characterization of functionalized polypyrrole. *Rev. Roum. Chim*, 5, 177-185.
- SAPURINA, I., RIEDE, A. & STEJSKAL, J. 2001. In-situ polymerized polyaniline films: 3. Film formation. *Synthetic Metals*, 123, 503-507.
- SEIKE, M., UDA, M., SUZUKI, T., MINAMI, H., HIGASHIMOTO, S., HIRAI, T., NAKAMURA, Y. & FUJII, S. 2022. Synthesis of Polypyrrole and Its Derivatives as a Liquid Marble Stabilizer via a Solvent-Free Chemical Oxidative Polymerization Protocol. *ACS omega*, 7, 13010-13021.
- SHEN, Y. & WAN, M. 1998. In situ doping polymerization of pyrrole with sulfonic acid as a dopant. *Synthetic metals*, 96, 127-132.
- SHI, G., ROUABHIA, M., WANG, Z., DAO, L. H. & ZHANG, Z. 2004. A novel electrically conductive and biodegradable composite made of polypyrrole nanoparticles and polylactide. *Biomaterials*, 25, 2477-2488.
- SHI, G., ZHANG, Z. & ROUABHIA, M. 2008. The regulation of cell functions electrically using biodegradable polypyrrole-polylactide conductors. *Biomaterials*, 29, 3792-3798.
- SHIFETA, N. T., HAMUKWAYA, S. L., AN, Q., HAO, H. & MASHINGAIDZE, M. M. 2022. Layer-by-Layer Fabrication of PAH/PAMAM/Nano-CaCO₃ Composite Films and Characterization for Enhanced Biocompatibility. *International Journal of Biomaterials*, 2022, 6331465.
- SHIN, J. S., KIM, J. H. & CHEONG, I. W. 2005. Colloidal and thermal stability of polyaniline-coated multi-core shell polystyrene latexes prepared using sulfonated N-hydroxyethyl aniline. *Synthetic Metals*, 151, 246-255.
- SHIRAKAWA, H., LOUIS, E. J., MACDIARMID, A. G., CHIANG, C. K. & HEEGER, A. J. 1977. Synthesis of electrically conducting organic polymers: halogen derivatives

- of polyacetylene,(CH)_x. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, 578-580.
- SHISHKANOVA, T., SAPURINA, I., STEJSKAL, J., KRÁL, V. & VOLF, R. 2005. Ion-selective electrodes: polyaniline modification and anion recognition. *Anal. Chim. Acta*, 553, 160-168.
- SHUANGXI, X. & GUOKU, Z. 2007. Preparation of highly stable polypyrrole dispersions in the mixed aqueous solution of sodium dodecyl sulfate and polyvinyl pyrrolidone. *e-Polymers*, 7.
- SIMITZI, C., RANELLA, A. & STRATAKIS, E. 2017. Controlling the morphology and outgrowth of nerve and neuroglial cells: The effect of surface topography. *Acta Biomaterialia*, 51, 21-52.
- SINGH, A. & DUBEY, A. K. 2018. Various Biomaterials and Techniques for Improving Antibacterial Response. *ACS Applied Bio Materials*, 1, 3-20.
- SIVAKUMAR, M., TOWATA, A., YASUI, K., TUZIUTI, T. & IIDA, Y. 2006. A new ultrasonic cavitation approach for the synthesis of zinc ferrite nanocrystals. *Current Applied Physics*, 6, 591-593.
- SKOTHEIM, T. A. 1997. *Handbook of conducting polymers*, CRC press.
- STAUFFER, W. R. & CUI, X. T. 2006. Polypyrrole doped with 2 peptide sequences from laminin. *Biomaterials*, 27, 2405-2413.
- STEJSKAL, J. & BOBER, P. 2018. Conducting polymer colloids, hydrogels, and cryogels: common start to various destinations. *Colloid and Polymer Science*, 296, 989-994.
- STEJSKAL, J. & GILBERT, R. 2002. Polyaniline. Preparation of a conducting polymer (IUPAC technical report). *Pure and applied chemistry*, 74, 857-867.
- STEJSKAL, J., KRATOCHVÍL, P. & JENKINS, A. D. 1996. The formation of polyaniline and the nature of its structures. *Polymer*, 37, 367-369.
- STEJSKAL, J., RIEDE, A., HLAVATÁ, D., PROKEŠ, J., HELMSTEDT, M. & HOLLER, P. 1998. The effect of polymerization temperature on molecular weight, crystallinity, and electrical conductivity of polyaniline. *Synthetic metals*, 96, 55-61.
- STEJSKAL, J. & SAPURINA, I. 2005a. Polyaniline: Thin films and colloidal dispersions (IUPAC Technical Report). 77, 815-826.
- STEJSKAL, J. & SAPURINA, I. 2005b. Polyaniline: Thin films and colloidal dispersions (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 77, 815-826.
- STEJSKAL, J., SAPURINA, I., PROKEŠ, J. & ZEMEK, J. 1999. In-situ polymerized polyaniline films. *Synthetic Metals*, 105, 195-202.
- STEJSKAL, J., SAPURINA, I., TRCHOVÁ, M. & KONYUSHENKO, E. N. 2008. Oxidation of aniline: Polyaniline granules, nanotubes, and oligoaniline microspheres. *Macromolecules*, 41, 3530-3536.
- STEJSKAL, J., TRCHOVÁ, M., BOBER, P., HUMPOLÍČEK, P., KAŠPÁRKOVÁ, V., SAPURINA, I., SHISHOV, M. & VARGA, M. 2015. Conducting Polymers: Polyaniline.
- STEJSKAL, J., TRCHOVÁ, M., BOBER, P., MORÁVKOVÁ, Z., KOPECKÝ, D., VRŇATA, M., PROKEŠ, J., VARGA, M. & WATZLOVÁ, E. 2016. Polypyrrole salts and bases: superior conductivity of nanotubes and their stability towards the loss of conductivity by deprotonation. *RSC advances*, 6, 88382-88391.
- SU, P.-G. & PENG, Y.-T. 2014. Fabrication of a room-temperature H₂S gas sensor based on PPy/WO₃ nanocomposite films by in-situ photopolymerization. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 193, 637-643.
- SUNDELACRUZ, S., LEVIN, M. & KAPLAN, D. L. 2009. Role of membrane potential in the regulation of cell proliferation and differentiation. *Stem Cell Rev Rep*, 5, 231-46.

- TAKAHASHI, K. & YAMANAKA, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *cell*, 126, 663-676.
- TAKEZAWA, T. 2003. A strategy for the development of tissue engineering scaffolds that regulate cell behavior. *Biomaterials*, 24, 2267-2275.
- TANDON, N., MARSANO, A., MAIDHOF, R., WAN, L., PARK, H. & VUNJAK-NOVAKOVIC, G. 2011. Optimization of electrical stimulation parameters for cardiac tissue engineering. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 5, e115-e125.
- TANG, X., THANKAPPAN, S. K., LEE, P., FARD, S. E., HARMON, M. D., TRAN, K. & YU, X. 2014. Chapter 21 - Polymeric Biomaterials in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. In: KUMBAR, S. G., LAURENCIN, C. T. & DENG, M. (eds.) *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*. Oxford: Elsevier.
- THAPA, A., WEBSTER, T. J. & HABERSTROH, K. M. 2003. Polymers with nano-dimensional surface features enhance bladder smooth muscle cell adhesion. *J Biomed Mater Res A*, 67, 1374-83.
- THEUNE, L. E., BUCHMANN, J., WEDEPOHL, S., MOLINA, M., LAUFER, J. & CALDERÓN, M. 2019. NIR- and thermo-responsive semi-interpenetrated polypyrrole nanogels for imaging guided combinational photothermal and chemotherapy. *Journal of Controlled Release*, 311-312, 147-161.
- THIEBLEMONT, J., PLANCHE, M., PETRESCU, C., BOUVIER, J. & BIDAN, G. 1993. Stability of chemically synthesized polypyrrole films. *Synthetic metals*, 59, 81-96.
- TODARO, G. J. & GREEN, H. 1963. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *The Journal of cell biology*, 17, 299-313.
- TOLSTOVA, T., DROZDOVA, M., POPYRINA, T., MATVEEVA, D., DEMINA, T., AKOPOVA, T., ANDREEVA, E. & MARKVICHEVA, E. 2023. Preparation and In Vitro Evaluation of Chitosan-g-Oligolactide Based Films and Macroporous Hydrogels for Tissue Engineering. *Polymers* [Online], 15.
- TYLER, S. E. B. 2017. Nature's Electric Potential: A Systematic Review of the Role of Bioelectricity in Wound Healing and Regenerative Processes in Animals, Humans, and Plants. *Front Physiol*, 8, 627.
- UNADKAT, H. V., HULSMAN, M., CORNELISSEN, K., PAPENBURG, B. J., TRUCKENMÜLLER, R. K., CARPENTER, A. E., WESSLING, M., POST, G. F., UETZ, M., REINDERS, M. J. T., STAMATIALLIS, D., VAN BLITTERSWIJK, C. A. & DE BOER, J. 2011. An algorithm-based topographical biomaterials library to instruct cell fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 16565-16570.
- UNEPUTTY A., DÁVILA-LEZAMA, A., GARIBO, D., OKNIANSKA, A., BOGDANCHIKOVA, N., HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, J. F. & SUSARREY-ARCE, A. 2022. Strategies applied to modify structured and smooth surfaces: A step closer to reduce bacterial adhesion and biofilm formation. *Colloid and Interface Science Communications*, 46, 100560
- UNGUREANU, C., PIRVU, C., MINDROIU, M. & DEMETRESCU, I. 2012. Antibacterial polymeric coating based on polypyrrole and polyethylene glycol on a new alloy TiAlZr. *Progress in Organic Coatings*, 75, 349-355.
- UYGUN OKSUZ, A., TURKOGLU, O., SEN GURSOY, S., ERSOY, E., YAVUZ, A. & BATIR, G. 2009. The Electrical Conductivity Properties of Polythiophene/TiO₂ Nanocomposites Prepared In the Presence of Surfactants. *Current Applied Physics*, 9, 866-871.

- VACANTI, J. P. & LANGER, R. 1999. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *The lancet*, 354, S32-S34.
- VIJAYAVENKATARAMAN, S., VIALLI, N., FUH, J. Y. H. & LU, W. F. 2019. Conductive collagen/polypyrrole-b-polycaprolactone hydrogel for bioprinting of neural tissue constructs. *Int J Bioprint*, 5, 229.
- VIJAYAVENKATARAMAN, S., YAN, W.-C., LU, W. F., WANG, C.-H. & FUH, J. Y. H. 2018. 3D bioprinting of tissues and organs for regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 132, 296-332.
- VILCHEZ, A., ACEVEDO, F., CEA, M., SEEGER, M. & NAVIA, R. 2020. Applications of Electrospun Nanofibers with Antioxidant Properties: A Review. *Nanomaterials*, 10, 175.
- VINATIER, C., BOUFFI, C., MERCERON, C., GORDELADZE, J., BRONDELLO, J.-M., JORGENSEN, C., WEISS, P., GUICHEUX, J. & NOËL, D. 2009. Cartilage tissue engineering: towards a biomaterial-assisted mesenchymal stem cell therapy. *Current stem cell research & therapy*, 4, 318-329.
- VOGLER, E. A. 1998. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 74, 69-117.
- VON DASSOW, M. & DAVIDSON, L. A. 2011. Physics and the canalization of morphogenesis: a grand challenge in organismal biology. *Phys Biol*, 8, 045002.
- WALLACE, G. G., TEASDALE, P. R., SPINKS, G. M. & KANE-MAGUIRE, L. A. 2008. *Conductive electroactive polymers: intelligent polymer systems*, CRC press.
- WAN, M., LI, M., LI, J. & LIU, Z. 1994. Structure and electrical properties of the oriented polyaniline films. *Journal of applied polymer science*, 53, 131-139.
- WANG, D., LI, Y.-X., SHI, Z., QIN, H.-L., WANG, L., PEI, X.-F. & JIN, J. 2010. Spontaneous growth of free-standing polypyrrole films at an air/ionic liquid interface. *Langmuir*, 26, 14405-14408.
- WANG, H.-J., TZENG, J.-Y., CHOU, C.-W., HUANG, C.-Y., LEE, R.-H. & JENG, R. J. 2013. Novel polythiophene derivatives functionalized with conjugated side-chain pendants comprising triphenylamine/carbazole moieties for photovoltaic cell applications. *Polymer Chemistry*, 4, 506-519.
- WEN, N., ZHANG, L., JIANG, D., WU, Z., LI, B., SUN, C. & GUO, Z. 2020. Emerging flexible sensors based on nanomaterials: recent status and applications. *Journal of Materials Chemistry A*, 8.
- WIBOWO, A., VYAS, C., COOPER, G., QULUB, F., SURATMAN, R., MAHYUDDIN, A. I., DIRGANTARA, T. & BARTOLO, P. 2020. 3D Printing of Polycaprolactone-Polyaniline Electroactive Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials (Basel)*, 13.
- WIESNER, M. 2020. *Stem Cell-based Adipose Tissue Engineering-Engineering of Prevascularized Adipose Tissue Constructs In Vitro & Investigation on Gap Junctional Intercellular Communication in Adipose-derived Stem Cells*. Universität Würzburg.
- WILLIAMS, D. F. 2008. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29, 2941-2953.
- WOO, H.-Y., JUNG, W.-G., IHM, D.-W. & KIM, J.-Y. 2010. Synthesis and dispersion of polypyrrole nanoparticles in polyvinylpyrrolidone emulsion. *Synthetic Metals*, 160, 588-591.
- WU, C.-G., YEH, Y.-R., CHEN, J.-Y. & CHIOU, Y.-H. 2001. Electroless surface polymerization of ordered conducting polyaniline films on aniline-primed substrates. *Polymer*, 42, 2877-2885.

- WU, C.-H., CHIU, W.-Y. & DON, T.-M. 2012. Conductive composite particles synthesized via pickering emulsion polymerization using conductive latex of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) as stabilizer. *Polymer*, 53, 1086-1092.
- WU, Y., FENG, S., ZAN, X., LIN, Y. & WANG, Q. 2015. Aligned electroactive TMV nanofibers as enabling scaffold for neural tissue engineering. *Biomacromolecules*, 16, 3466-3472.
- XI, J., YAN, X., ZHOU, J., YUE, W. & PEI, X. 2013. Mesenchymal stem cells in tissue repairing and regeneration: progress and future. *Burns & Trauma*, 1, 2321-3868.113330.
- XIA, L., WEI, Z. & WAN, M. 2010. Conducting polymer nanostructures and their application in biosensors. *Journal of colloid and interface science*, 341, 1-11.
- XU, Y., HUANG, Z., PU, X., YIN, G. & ZHANG, J. 2019. Fabrication of Chitosan/Polypyrrole-coated poly(L-lactic acid)/Polycaprolactone aligned fibre films for enhancement of neural cell compatibility and neurite growth. *Cell Proliferation*, 52.
- XUE, Y., CHEN, S., YU, J., BUNES, B. R., XUE, Z., XU, J., LU, B. & ZANG, L. 2020. Nanostructured conducting polymers and their composites: synthesis methodologies, morphologies and applications. *Journal of Materials Chemistry C*, 8, 10136-10159.
- YANG, A., HUANG, Z., YIN, G. & PU, X. 2015. Fabrication of aligned, porous and conductive fibers and their effects on cell adhesion and guidance. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 134, 469-474.
- YANG, F., XU, C. Y., KOTAKI, M., WANG, S. & RAMAKRISHNA, S. 2004. Characterization of neural stem cells on electrospun poly(L-lactic acid) nanofibrous scaffold. *J Biomater Sci Polym Ed*, 15, 1483-97.
- YANG, J., LIU, Y., LIU, S., LI, L., ZHANG, C. & LIU, T. 2017. Conducting polymer composites: material synthesis and applications in electrochemical capacitive energy storage. *Materials Chemistry Frontiers*, 1, 251-268.
- YANG, X., ZHU, Z., DAI, T. & LU, Y. 2005. Facile fabrication of functional polypyrrole nanotubes via a reactive self-degraded template. *Macromolecular rapid communications*, 26, 1736-1740.
- YANG, Y., DING, F., WU, J., HU, W., LIU, W., LIU, J. & GU, X. 2007. Development and evaluation of silk fibroin-based nerve grafts used for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, 28, 5526-35.
- YOGESWARAN, U. & CHEN, S.-M. 2008. A Review on the Electrochemical Sensors and Biosensors Composed of Nanowires as Sensing Material. *Sensors*, 8, 290-313.
- ZHANG, H., LIU, Y., CUI, K., ZHAO, Q., HUANG, J., MAO, S., JIANG, T. & MA, Z. 2019. Electrospun Ribbon-Like Microfiber Films of a Novel Guanidine-Based ABA Triblock Copolymer: Fabrication, Antibacterial Activity, and Cytotoxicity. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 220, 1900138.
- ZHANG, X., MACDIARMID, A. G. & MANOHAR, S. K. 2005. Chemical synthesis of PEDOT nanofibers. *Chemical communications*, 5328-5330.
- ZHANG, X., ZHANG, J., SONG, W. & LIU, Z. 2006. Controllable synthesis of conducting polypyrrole nanostructures. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110, 1158-1165.
- ZHOU, H., WEN, J., NING, X., FU, C., CHEN, J. & KUANG, Y. 2007. Comparison of the growth process and electrochemical properties of polyaniline films prepared by pulse potentiostatic and potentiostatic method on titanium electrode. *Journal of applied polymer science*, 104, 458-463.
- ZHOU, J., CHENG, L., SUN, X., WANG, X., JIN, S., LI, J. & WU, Q. 2016a. Neurogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells on aligned

electrospun polypyrrole/polylactide composite nanofibers with electrical stimulation. *Frontiers of Materials Science*, 10, 260-269.

ZHOU, J. F., WANG, Y. G., CHENG, L., WU, Z., SUN, X. D. & PENG, J. 2016b. Preparation of polypyrrole-embedded electrospun poly(lactic acid) nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Neural Regen Res*, 11, 1644-1652.

ZUPPOLINI, S., GUARINO, V. & BORRIELLO, A. 2020. Chapter 6 - Advanced organic electroactive nanomaterials for biomedical use. In: GUARINO, V., FOCARETE, M. L. & PISIGNANO, D. (eds.) *Advances in Nanostructured Materials and Nanopatterning Technologies*. Elsevier.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ACF	autokorelační funkce
Ag	stříbro
APS	peroxodisíran amonný
ASTM	Americké normy pro testování a materiálů
Au	zlato
CNC	nanokrystalická celulóza
DIM	diodomethan
DMSO	dimethylsulfoxid
ECM	extracelulární matric
EG	ethylenglykol
H ₂ O	voda
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci
MgO	oxid hořečnatý
MTT	3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazoliumbromid
NIH/3T3	buněčná linie myších fibroblastů
P3TMA	poly(3-thiofen methylacetát)
PANI	polyanilin
PANI/PLC	polyanilin-polykaprolakton
PBS	fosfátový pufr
PC12	potkaní feochromocytom 12
<i>PdI</i>	index polydisperzity
PEDOT	poly(3,4-ethylendioxythiofen)
PEDOT/PSS	poly(3,4-ethylendioxythiofen) s polystyren sulfonátem
PEDOT/PSt	Poly(3,4-ethylendioxythiofen) polystyren
PEG	polyethylenglykol

PLA	kyselina polylactidová
PLGA	poly(laktid-co-glykolid) kyselině
PLLA	kyselina poly-L-lactidová
PPy	polypyrrol
PVA	polyvinylalkohol
PVP	polyvinylpyrrolidon
SDS	dodecylsulfát sodný
TI	tkáňové inženýrství
TiO ₂	oxid titaničitý
TMV/PANI/PSS	polyanilin s polystyren sulfonátem viru tabákové mozaiky
UPW	ultra čistá a vysoce čištěná voda
WHO	Světová zdravotnická organizace
ZnO	oxid zinečnatý

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Princip inženýrství tukové tkáně v buněčných postupech. Buňky se izolují z biopsií tkáně dárce/pacienta a množí se <i>ex vivo</i> v lahvích pro tkáňové kultury (Wiesner, 2020).....	15
Obrázek 2: Chemická struktura nejznámějších vodivých polymerů.	19
Obrázek 3: Elektrická vodivost vodivých polymerů v porovnání s jinými materiály (Kaur <i>et al.</i> , 2015).....	20
Obrázek 4: Schéma hlavních aplikačních oblastí vodivého nanomateriálu (Zuppolini <i>et al.</i> , 2020).....	22
Obrázek 5: Mechanismus oxidativní polymerace pyrrolu (Sadki <i>et al.</i> , 2000).....	24
Obrázek 6: Chemická oxidace pyrrolu oxidem železitým na PPy hydrochlorid. (Li <i>et al.</i> , 2017).....	25
Obrázek 7: Chemická oxidace anilinu hydrochloridu s peroxydisulfátem amonným na PANI sůl (Cao <i>et al.</i> , 1989).....	25
Obrázek 8: Základní strukturní jednotka PANI.	31
Obrázek 9: Chemická struktura PANI v různých oxidačních stavech (Bhandari, 2018). ...	31
Obrázek 10: Základní strukturní jednotka PPy.....	32
Obrázek 11: Základní strukturní jednotka polythiofenu.....	32
Obrázek 12: Základní strukturní jednotka polyvinylpyrrolidonu.	33
Obrázek 13: Základní strukturní jednotka polyvinylalkoholu (PVA).	33
Obrázek 14: Chemická struktura nanokrystalické celulózy (CNC).....	34
Obrázek 15: Strategie povrchové úpravy pro antibakteriální aplikaci (Uneputti <i>et al.</i> , 2022).	41
Obrázek 16: Morfologie buněčné linie NIH/3T3 (Andoniou <i>et al.</i> , 1994).....	49
Obrázek 17: Oxidativní polymerace anilinu peroxidisíranem amonným.	50
Obrázek 18: Monomer strukturní jednotky polyanilinu.	51
Obrázek 19: Oxidativní polymerace pyrrolu chloridem železitým.	51
Obrázek 20: Chemická struktura PPy.....	51
Obrázek 21: Experimentální uspořádání elektrod pro měření van der Pauwovy vodivosti (Melios <i>et al.</i> , 2020).....	55
Obrázek 22: Redukce MTT na formazan životaschopnými buňkami. Znázorněno na 96 jamkové mikrotitrační destičce (převzato z Protocol Guide: MTT Assay for Cell Viability and Proliferation, online).	58
Obrázek 23: Fotografie z přípravy vodivých polymerů. Na levé straně fotografie je počátek polymerace vodivého polymeru, vprostřed je roztok PPy/CNC po uplynutí polymerace, avšak před dialyzací a na pravé straně je vzniklá koloidní disperze po proběhlé dialyzaci.	61
Obrázek 24: Na levé straně je zobrazena koloidní disperze PANI/CNC po dialýze, na pravé straně PANI/CNC film po rozlití do misky.	61
Obrázek 25: Porovnání velikostí částic a <i>PdI</i> testovaných vzorků.....	63

Obrázek 26: Intenzita (%) jednotlivých velikostí částic ve vzorku PANI/PVA při vzorkovaném objemu 20 μ l. Měření bylo provedeno ve třech opakováních (každá křivka zobrazuje jedno měření).....	63
Obrázek 27: Intenzita (%) jednotlivých velikostí částic ve vzorku PANI/PVA při vzorkovaném objemu 10 μ l. Bylo provedeno znovuzměření za použití menšího objemu vzorku, jelikož intenzitu červeného a zeleného píku na předchozím grafu nebylo možné zanalyzovat.	63
Obrázek 28: Intenzita (%) jednotlivých velikostí částic ve vzorku PANI/PVP při vzorkovaném objemu 20 μ l. Měření bylo provedeno ve třech opakováních (každá křivka zobrazuje jedno měření).....	64
Obrázek 29: Intenzita (%) jednotlivých velikostí částic ve vzorku PANI/CNC při vzorkovaném objemu 20 μ l. Měření bylo provedeno ve třech opakováních (každá křivka zobrazuje jedno měření).....	64
Obrázek 30: Intenzita (%) jednotlivých velikostí částic ve vzorku PANI/CNC při vzorkovaném objemu 10 μ l. Bylo provedeno znovuzměření za použití menšího objemu vzorku, jelikož intenzitu červeného píku na předchozím grafu nebylo možné zanalyzovat.	64
Obrázek 31: Intenzita (%) jednotlivých velikostí částic ve vzorku PANI/PVA při vzorkovaném objemu 20 μ l. Měření bylo provedeno ve třech opakováních (každá křivka zobrazuje jedno měření).....	65
Obrázek 32: Intenzita (%) jednotlivých velikostí částic ve vzorku PANI/PVP při vzorkovaném objemu 20 μ l. Měření bylo provedeno ve třech opakováních (každá křivka zobrazuje jedno měření).....	65
Obrázek 33: Intenzita (%) jednotlivých velikostí částic ve vzorku PANI/CNC při vzorkovaném objemu 20 μ l. Měření bylo provedeno ve třech opakováních (každá křivka zobrazuje jedno měření).....	65
Obrázek 34: Hodnoty měrné elektrické vodivosti spolu s označením směrodatných odchylek jednotlivých vzorků.	67
Obrázek 35: Zabarvení buněk v 96–jamkové mikrotitrační destičce v závislosti na počtu životaschopných buněk v jednotlivých jamkách po kultivaci s vodivými polymery v koncentračním rozsahu 1–15%.	68
Obrázek 36: Relativní životaschopnost buněčné linie NIH/3T3 po přidání PANI/PVA v koncentracích 1–15 %.	69
Obrázek 37: Relativní životaschopnost buněčné linie NIH/3T3 po přidání PANI/PVP v koncentracích 1–15 %.	69
Obrázek 38: Relativní životaschopnost buněčné linie NIH/3T3 po přidání PANI/CNC v koncentracích 1–15 %.	70
Obrázek 39: Relativní životaschopnost buněčné linie NIH/3T3 po přidání PPy/PVA v koncentracích 1–15 %.	70
Obrázek 40: Relativní životaschopnost buněčné linie NIH/3T3 po přidání PPy/PVP v koncentracích 1–15 %.	71
Obrázek 41: Relativní životaschopnost buněčné linie NIH/3T3 po přidání PPy/CNC v koncentracích 1–15 %.	71

Obrázek 42: Mikrofotografie fluorescenční mikroskopie buněčné linie NIH/3T3 po 24 h inkubaci s polymery.....	73
Obrázek 43: Rychlost polymerace PANI se stabilizátorem PVP (vlevo) v porovnání s polymerací PANI bez přídavku stabilizátoru (vpravo) [Riede <i>et al.</i> , 2002].	74
Obrázek 44: Fotografie jednotlivých připravených koloidních filmů.	75
Obrázek 45: Křivky znázorňující distribuci velikosti částic od čistého PANI, CNC, přes nanostrukturované PANI/CNC v různých poměrech – R (Nepomuceno <i>et al.</i> , 2021).....	76
Obrázek 46: Závislost kontaktního úhlu na pH u PANI filmu (Blinova <i>et al.</i> , 2008).....	78
Obrázek 47: Vodivost jednotlivých vodivých polymerů (Bagotsky <i>et al.</i> , 2015).....	80
Obrázek 48: Závislost elektrické vodivosti na tloušťce filmu při stabilizaci PVP, HPC za využití srážecí polymerace (Riede <i>et al.</i> , 2002)	81

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Výsledky měření velikosti dialyzovaných částic.....	62
Tabulka 2: Výsledky kontaktních úhlů jednotlivých kapalin na testovaných vzorcích	66
Tabulka 3: Výsledky celkové povrchové energie (γ^{TOT}), disperzní povrchové energie (γ^{LW}) a energie vodíkových můstků (γ^{AB}) jednotlivých testovaných vzorků.....	66
Tabulka 4: Hodnoty měrné elektrické vodivosti spolu s hodnotami směrodatných odchylek jednotlivých vzorků.	67

SEZNAM ROVNIC

Rovnice 1: Stokes-Einsteinova rovnice	53
Rovnice 2: Lifshitz-van der Wallsova interakce.....	54
Rovnice 3: Acidobazická interakce podle Lewise.....	54
Rovnice 4: Elektrický odpor	55
Rovnice 5: Vodivost	55
Rovnice 6: Van der Pauwův odpor	56
Rovnice 7: Vodivost	56