

Příprava a charakterizace vodivých nanotubulárních materiálů

Bc. Martina Šeršeňová

Diplomová práce
2025



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Bc. Martina Šeršeňová
Osobní číslo:	T23262
Studijní program:	N0711A130011 Biomateriály a kosmetika
Forma studia:	Kombinovaná
Téma práce:	Příprava a charakterizace vodivých nanotubulárních materiálů

Zásady pro vypracování

Vodivé polymery nacházejí široké uplatnění využití v oblasti biomateriálů.
Přidavkem různých barviv během syntézy vodivých polymerů může být řízena jejich výsledná morfologie.
Ta má následně vliv na jejich nejen materiálové, ale také biologické vlastnosti.
Teoretická část práce bude zaměřena na vodivé polymery a to především polypyrol a jeho přípravu za různých podmínek.
V praktické části bude syntetizován nanotubulární polypyrol, který bude následně inkorporován do vhodné matrice.
Takto připravené materiály bude charakterizováno jak z materiálového tak i z biologického hlediska.

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: **10. února 2025**

Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Lucie Urbánková, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že

- odevzdáním diplomové práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb., v platném znění bez ohledu na výsledek obhajoby;
- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a bude dostupná k nahlédnutí;
- jedno vyhotovení diplomové práce v listinné podobě bude ponecháno Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně k uložení;
- 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 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 na diplomové práci pracoval(a) samostatně a použitou literaturu jsem řádně citoval(a); v případě publikace výsledků budu uveden(a) jako spoluautor;
- odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne

.....
podpis autora

ABSTRAKT

Diplomová práca sa venovala syntéze, charakterizácii a biokompatibilite vodivých polymérov polyanilínu a polypyrrolu pre biomedicínske aplikácie. V rámci teoretickej práce boli popísané vodivé polyméry, ich syntéza, charakterizácia a aplikácie. Následne, v rámci časti praktickej, boli polyméry pripravené chemickou oxidáciou s aniónovými farbivami (Metyloranž, Acid Blue 25, Acid Blue 129) vo forme práškov a filmov. Následne prebehla materiálová charakterizácia za využitia metód UV-Vis a SEM. Pre stanovenie vhodnosti pre biomedicínske aplikácie bola stanovená cytotoxicita za využitia MTT testu. A skúmaná bola i schopnosť bunkovej proliferácie na pripravených filmoch.

Kľúčové slová: vodivé polyméry, polyanilín, polypyrrol, chemická oxidácia, aniónové farbivá, SEM, cytotoxicita

ABSTRACT

The diploma thesis was focused on the synthesis, characterization, and biocompatibility of conductive polymers, namely polyaniline and polypyrrole, for biomedical applications. The theoretical part described conductive polymers, their synthesis, characterization, and applications. Subsequently, in the practical part, the polymers were prepared by chemical oxidation with anionic dyes (Methyl Orange, Acid Blue 25, Acid Blue 129) in the form of powders and films. Subsequently, material characterization was carried out using UV-Vis and SEM methods. Cytotoxicity was determined using the MTT test to assess samples suitability for biomedical applications. The ability of cell proliferation on the prepared films was also investigated.

Keywords: conductive polymers, polyaniline, polypyrrole, chemical oxidation, anionic dyes, SEM, cytotoxicity

V prvom rade by som sa chcela poďakovať vedúcej mojej diplomovej práce doc. Ing. Zdenke Víchovej, Ph.D. za jej odborné vedenie, cenné rady, trpezlivosť a čas, ktorý mi počas celej doby konzultácií a práce v laboratóriu venovala.

Taktiež by som sa chcela poďakovať môjmu priateľovi, rodine a kamarátom za neustálu podporu pri štúdiu na univerzite Tomáša Baťu.

OBSAH

ÚVOD.....	11
I TEORETICKÁ ČASŤ	12
1 ÚVOD DO VODIVÝCH POLYMÉROV.....	13
2 HISTÓRIA VODIVÝCH POLYMÉROV	15
3 SYNTÉZA VODIVÝCH POLYMÉROV	16
3.1 ELEKTROCHEMICKÁ SYNTÉZA	16
3.2 CHEMICKÉ SYNTÉZA.....	21
3.3 MODIFIKÁCIA VODIVÝCH POLYMÉROV	23
3.3.1 Princíp interakcie	24
3.3.2 Metyloranž	25
3.3.3 Acid Blue 25	26
3.3.4 Acid blue 129	26
4 CHARAKTERIZÁCIA VODIVÝCH POLYMÉROV	27
4.1 MORFOLÓGIA A ŠTRUKTÚRA	27
4.1.1 Skenovacia elektrónová mikroskopia (SEM).....	28
4.2 VODIVÉ VLASTNOSTI A DOPOVANIE	28
5 APLIKÁCIE VODIVÝCH POLYMÉROV.....	31
5.1 BIOELEKTRINA	31
II PRAKTICKÁ ČASŤ.....	33
6 CIEĽ PRÁCE	34
7 MATERIÁLY	35
7.1 CHEMIKÁLIE.....	35
7.2 BIOLOGICKÝ MATERIÁL	36
7.3 PRÍSTROJOVÉ A LABORATÓRNE VYBAVENIE.....	36
7.4 SOFTWARE	36
8 METÓDY	37
8.1 SYNTÉZA VODIVÝCH POLYMÉROV	37
8.1.1 Príprava polypyrrolu	37
8.1.2 Príprava polyanilínu	38
8.2 UV-VIS CHARAKTERIZÁCIA	39
8.3 CHARAKTERIZÁCIA MORFOLÓGIE POMOCOU SEM	40
8.4 BIOLOGICKÉ TESTOVANIE	41
8.4.1 Kultivácia a pasážovanie buniek	41
8.4.2 Príprava extraktov z polymérov	42
8.4.3 Expozícia buniek extraktom a MTT test	42
8.4.4 Kultivácia buniek na polymérnych filmoch a fluorescenčné farbenie.....	43

9	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	44
9.1	UV-VIS SPEKTROSKOPIA POLYMÉRNÝCH FILMOV	44
9.2	MORFOLÓGIA POLYMÉROV – VÝSLEDKY SEM	45
9.2.1	Morfológia filmov	46
9.2.2	Morfológia práškov	49
9.3	CYTOTOXICITA PRÁŠKOVÝCH FORIEM	52
9.4	CYTOTOXICITA FILMOV	60
9.5	BUNKOVÝ RAST NA FILMOCH	62
	ZÁVER.....	71
	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	73
	ZOZNAM OBRÁZKOV	77
	ZOZNAM TABULIEK.....	79
	ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK	80

ÚVOD

Vodivé polyméry predstavujú skupinu materiálov, ktoré kombinujú vlastnosti klasických polymérov s elektrickou vodivosťou typickou pre kovy. Práve táto kombinácia im umožňuje uplatniť sa v širokom spektre oblastí – od elektroniky až po biomedicínu. V biomedicínskom výskume vzbudzujú záujem najmä pre svoju schopnosť ovplyvňovať bunkové správanie a interagovať s biologickým prostredím, čo ich predurčuje na vývoj nových materiálov s potenciálom v tkanivovom inžinierstve či kontrolovanom uvoľňovaní liečiv.

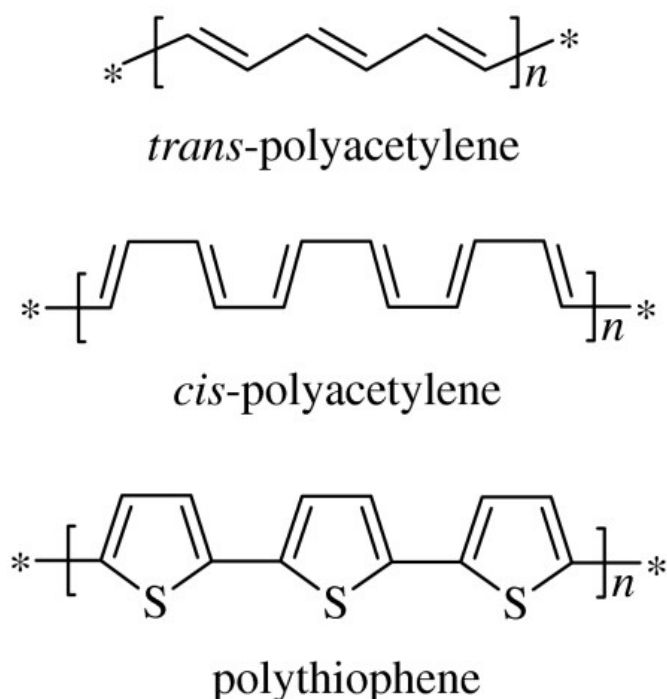
Medzi najviac skúmané vodivé polyméry patrí polyanilín (PANI) a polypyrrol (PPy), ktoré sú známe nielen svojou vodivosťou, ale aj možnosťou relatívne jednoducho modifikovať ich štruktúru a povrchové vlastnosti už počas syntézy. Práve morfológia výsledného polyméru môže výrazne ovplyvniť interakciu materiálu s bunkami a jeho výslednú cytokompatibilitu. Jedným zo spôsobov, ako morfológiu vodivých polymérov cielene ovplyvniť, je prídavok organických farbív počas polymerizácie. Predpokladá sa, že tieto molekuly môžu pôsobiť ako šablóny, ktoré usmerňujú rast polymérneho reťazca a tým vytvárajú odlišné nano alebo mikroštruktúry. Takto pripravené polyméry môžu vykazovať rozdielne biologické vlastnosti.

Cieľom tejto diplomovej práce je preto syntetizovať polypyrrol a polyanilín s použitím vybraných farbív – metyloranž, acid blue 25 a acid blue 129 a následne vyhodnotiť, ako tieto prídavky ovplyvňujú výslednú morfológiu a cytokompatibilitu materiálov. Ako referenčné vzorky budú slúžiť polyméry pripravené za rovnakých podmienok, avšak bez prídavku farbív. Morfológia vzoriek bude analyzovaná pomocou skenovacej elektrónovej mikroskopie (SEM) a biologická odozva bude hodnotená pomocou MTT testu a fluorescenčného farbenia buniek po kultivácii na polymérnych filmoch.

I TEORETICKÁ ČASŤ

1 ÚVOD DO VODIVÝCH POLYMÉROV

Príprava vodivých polymérnych materiálov (CP) sa stala významnou súčasťou výskumu materiálov. Nanoštrukturované vodivé polyméry, ako napríklad polypyrrol (PPy) alebo polyanilín (PANI) sú syntetizované rôznymi metódami chemickej alebo elektrochemickej oxidácie.¹ Všetky vodivé polyméry majú spoločnú konjugovanú štruktúru s alternujúcimi dvojitémi väzbami medzi atómami uhlíka, ktorá je zobrazená na Obrázku 1. Práve táto špecifická štruktúra im poskytuje vlastnosti ovplyvňujúce energetické úrovne, ako sú nízkoenergetické optické prechody, ionizačné potenciály a vysoké afinity k elektrónom. Najdôležitejším aspektom konjugovaného polyméru z elektrochemického hľadiska je jeho schopnosť fungovať ako elektrický vodič. Táto vlastnosť je navyše regulovaná redoxným prepínaním pri špecifických potenciáloch, ktoré sprevádza pohyb dopantových iónov dovnútra alebo von z materiálu v závislosti od celkového náboja polyméru. Vďaka novým poznatkom z molekulárnej biológie a biofyzikálnych súvislostí materiálových povrchových vlastností sú miestne interakcie medzi bunkami a ich bezprostredným mikroprostredím čoraz lepšie pochopené a využívané pri návrhu praktických biomateriálov.²



Obrázok 1: Príklady štruktúr vodivých polymérov.

Konjugovaná štruktúra pozostávajúca z alternujúcich dvojítých väzieb medzi atómami uhlíka je spoločná pre všetky vodivé polyméry.

Prevzaté z ref.²

Okrem PPy a PANI si získali zvláštnu pozornosť v oblasti nanovedy a nanotechnológie aj vodivé polyméry ako sú polyacetylén (PA), poly(p-fenylén-vinylén) (PPV), poly(3,4-etyléndioxythiofén) (PEDOT), polyfuran (PF) a ďalšie deriváty polytiofénu (PTh). Medzi ich vlastnosti patrí okrem vodivého mechanizmu aj reverzibilný proces dopovania/de-dopovania, kontrolovateľné chemické a elektrochemické vlastnosti a jednoduchá spracovateľnosť.³

2 HISTÓRIA VODIVÝCH POLYMÉROV

Termín „polymér“ zaviedol Jacob Berzelius už v roku 1832, iba dva roky pred prvou zmienkou o materiáli, ktorý dnes poznáme ako polyanilín. Polyanilín považujeme za prvý plne syntetický polymér. Jeho dnešný názov však nebol bežne používaný až do 60. rokov 20. storočia. Predtým bol známy názvami odvodených od farieb ako emeraldín, azurín, anilínová čerň a iné.⁴ V roku 1834 v Berlíne F. Ferdinand Runge pripravil tmavozeleno-čierny materiál oxidáciou dusičnanovej soli anilínu pomocou oxidu medi v kyslom prostredí. Runge ukázal, že podobný výsledok nastáva aj pri použití rôznych medených solí alebo dichromanu draselného. Zistil, že tieto farebné produkty môžu mať praktické využitie napríklad pri farbení vlny. To predchádzalo komerčnému zvedeniu anilínových farbív v roku 1856. Neskôr Henry Letheby v roku 1862 pripravil modrofialové materiály elektrochemickou oxidáciou anilínu v kyseline sírovej, čím zaznamenal najskorší známy príklad elektropolymerizácie konjugovaného polyméru.⁵

V roku 1915 pripravil Angelo Angeli čierny prášok oxidáciou pyrrolu peroxidom vodíka a kyselinou octovou. Tento produkt, podobný anilínovej čerňi, bol jedným z prvých známych príkladov polymerizovaného pyrrolu. V roku 1968 tím na Univerzite v Parme pripravil prvý známy príklad elektropolymerizovaného polypyrrolu vo forme filmu, pričom vznikali lamelové filmy z roztokov pyrrolu v kyseline sírovej aplikáciou konštantného prúdu 100 mA na platínovej elektróde počas dvoch hodín. Následne bol polypyrrolový film prepláchnutý destilovanou vodou a vysušený vo vákuu. Röntgenová analýza ukázala, že film bol amorfný, a merania vodivosti pri izbovej teplote dosiahli hodnotu $7,54 \text{ S cm}^{-1}$.⁶

3 SYNTÉZA VODIVÝCH POLYMÉROV

Vodivé polyméry sa získavajú procesom polymerizácie.⁷ Tá pozostáva z troch hlavných krokov: oxidácia, tvorba väzieb (coupling) a deprotonizácia.⁸ Po ich príprave môžu byť ďalej modifikované, napríklad dopovaním. Dopovanie vodivých polymérov je proces, pri ktorom sa pridávajú dopanty, aby sa zvýšila ich elektrická vodivosť. Po dopovaní vodivosť polymérov môže vzrásť až na úroveň kovov. Dopanty spôsobujú redoxné procesy, ktoré buď pridávajú alebo odoberajú elektróny, čím vytvárajú nábojové nosiče, ako sú polárne a bipolárne ióny alebo solitóny. V p-typ dopovaní dopant odoberá elektróny, čím vznikajú kladné diery (miesta bez elektrónov), zatiaľ čo v n-typ dopovaní dopant pridáva elektróny. P-dopovanie je bežnejšie, pretože záporné náboje pri n-dopovaní sú menej stabilné.⁹

Vodivé polyméry sa môžu syntetizovať chemicky alebo elektrochemicky. Elektrochemická syntéza je všeobecne bežnejšia, pretože je rýchla a hlavne umožňuje presnú kontrolu. Elektrochemická polymerizácia vytvára tenké filmy s hrúbkou niekoľkých mikrometrov na povrchu elektródy, zatiaľ čo chemická oxidácia vedie k tvorbe jemnozrnného materiálu. Na rozdiel od elektrochemickej polymerizácie, pri ktorej je možné vytvoriť len tenké filmy polymérov, pri chemickej polymerizácii vznikajú rôzne formy výsledných polymérov. V závislosti od typu polyméru je možné pripraviť prášky, filmy, koloidné suspenzie alebo hydrogély/kryogély.^{7,10} Výťažnosť a kvalita výsledných polymérov sú ovplyvnené niekoľkými faktormi, vrátane typu a koncentrácie monoméru, prítomného proti-iónu, použitého rozpúšťadla, elektrochemických podmienok (elektroda, aplikované napätie), teploty a pH.⁸ Jedným z najúspešnejších polymérov z hľadiska objemu syntézy je PEDOT:PSS. Jeho produkcia dosahuje viac ako 100 ton ročne.⁷

3.1 Elektrochemická syntéza

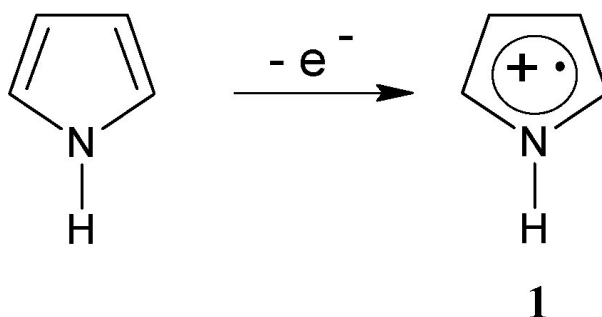
Elektrochemická syntéza umožňuje kontrolu hrúbky a morfológie výsledného polymérneho filmu. Elektronicky vodivé polyméry sa zvyčajne ukladajú na povrch elektródy prostredníctvom anodickej oxidácie (elektropolymerizácia) príslušného monoméru v prítomnosti elektrolytového roztoku. Pri tomto procese môžu byť použité rôzne techniky, vrátane potenciostatickej (konštantný potenciál), galvanostatickej (konštantný prúd) a potenciodynamickej (skenovanie potenciálu, napríklad cyklická voltametria) metódy.¹¹

Pri elektrochemickej syntéze je dôležitá voľba rozpúšťadla a elektrolytu, ktoré musia byť stabilné pri oxidačnom potenciáli. Organické rozpúšťadlá ako sú acetonitril alebo propylénkarbonát majú veľký potenciálový rozsah a vysokú permitivitu, čo umožňuje dobrú disociáciu elektrolytu a zabezpečuje vhodnú iónovú vodivosť. Keďže pyrrol má relatívne nízky oxidačný potenciál, je jeho polymerizácia možná aj vo vodnom prostredí.^{7,11}

Proces polymerizácie začína tvorbou radikálového kationu z monoméru, ktorý sa následne spája s ďalšími monomérmi v roztoku, čím sa najprv vytvárajú oligomérne produkty a neskôr samotný polymér. Rozšírená konjugácia v polyméri znižuje oxidačný potenciál v porovnaní s monomérom. Syntéza a dopovanie polyméru prebiehajú súčasne: dopujúci anión sa inkorporuje do polyméru, aby zabezpečil elektroneutralitu filmu a na konci reakcie vzniká polymérny film s kontrolovanou hrúbkou.^{11,12}

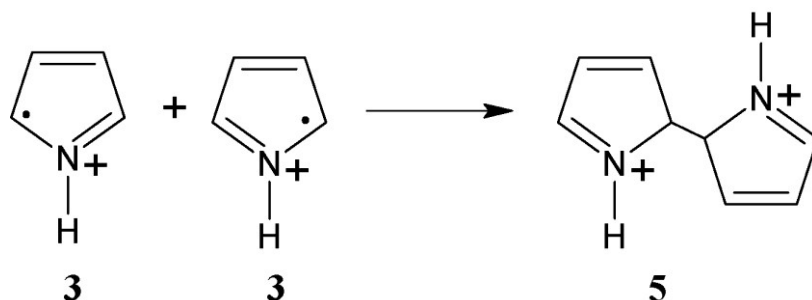
Mechanizmus elektropolymerizácie pyrrolu prebieha v nasledujúcich krokoch:^{12,13}

- 1. Oxidácia monoméru:** Monomér sa na povrchu elektródy oxiduje a vytvorí radikálový kation (R^+). Kvôli rýchlemu prenosu elektrónov sa v blízkosti elektródy vytvorí vysoká koncentrácia radikálových kationov. (Obr. 2)^{12,13}



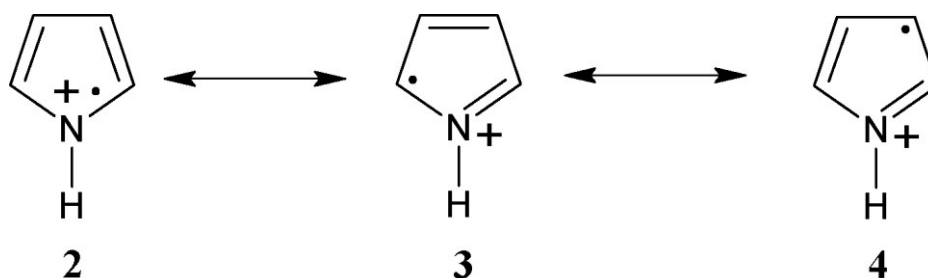
Obrázok 2: Oxidácia monoméru pyrrolu. Pyrrol stráca elektrón a vzniká radikálový kation. Prevzaté z ref.¹²

Podľa rozloženia elektrónovej hustoty vznikajú rôzne rezonančné formy radikálového kationu čo znamená, že kladný náboj a nespárovaný elektrón môžu byť rozložené po celej molekule. (Obr. 3)^{12,13}



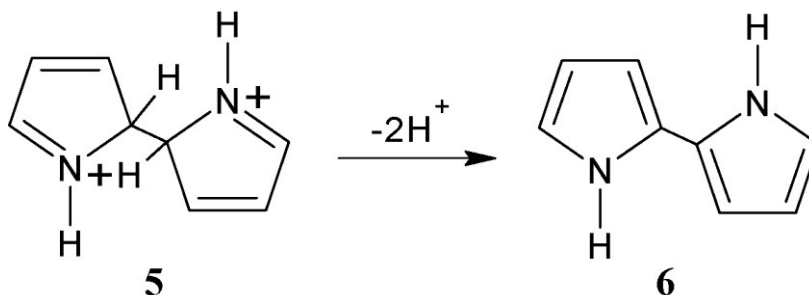
Obrázok 3: V tomto kroku sa dva radikálové kationy pyrrolu (označené ako 3) spoja prostredníctvom väzby medzi ich α -polohami. Prevzaté z ref.¹²

2. **Vznik diméru:** Radikálový kation $R^{+\bullet}$ má vysokú hustotu voľného elektrónu v α -polohe a spojí sa s iným radikálovým kationom za vzniku diméru. (Obr. 4)^{12,13}



Obrázok 4: Rezonančné formy radikálového kationu pyrrolu. Prevzaté z ref.¹²

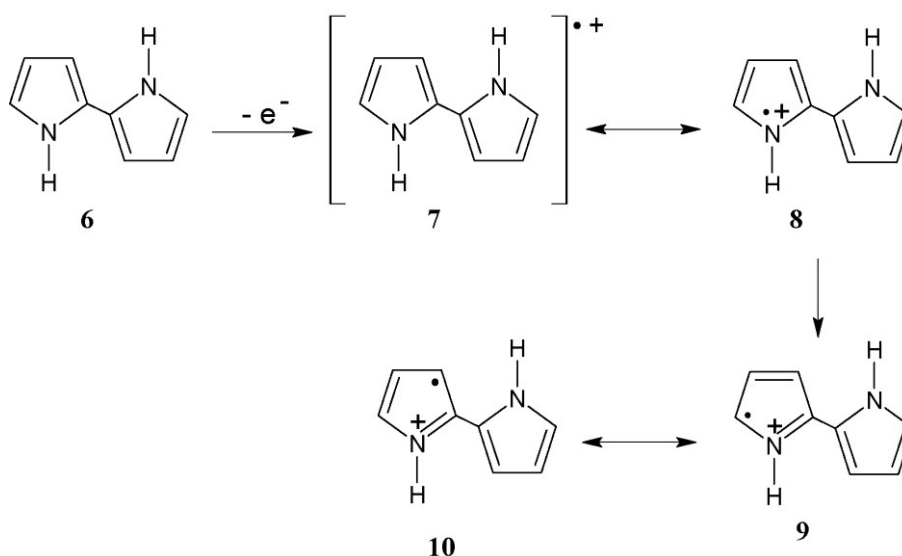
3. **Stabilizácia:** Dimér stráca dva protóny, čo vedie k vytvoreniu aromatického diméru, ako je zobrazené na obr. 5. Vzniká stabilnejšia štruktúra, ktorá obsahuje plne konjugované π -elektróny, čo je nevyhnutné pre ďalší rast polyméru.^{12,13}



Obrázok 5: Vznik aromatického diméru. Prevzaté z ref.¹²

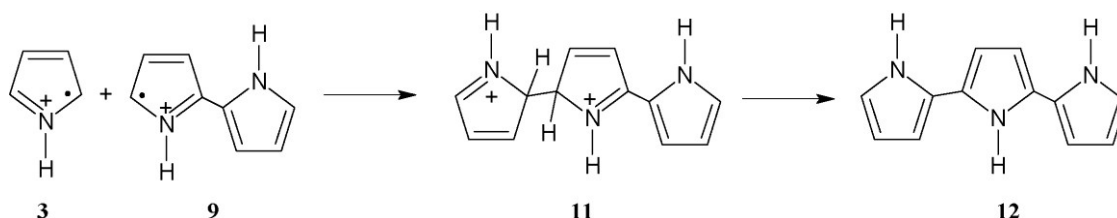
4. **Ďalšia polymerizácia:** Polymerizačná reakcia prebieha oxidáciou diméru (6) na radikálový kation (7), zobrazené na obr. 6. Keďže nespárovaný elektrón je teraz delokalizovaný cez dva kruhy, oxidačný potenciál diméru (6) je nižší, ako oxidačný

potenciál monoméru. Dimér sa preto ľahšie oxiduje pri aplikovanom potenciáli, ktorý zodpovedá oxidačnému potenciálu monoméru. Ďalším dôsledkom tejto stabilizácie je, že radikálový kation diméru je menej reaktívny ako monomér. Pozície 5-5' sú stále najreaktívnejšie miesta, pričom rezonančná forma (9) je dominantná v porovnaní s 8 a 10. Tento proces je kľúčový pre rast polymérneho reťazca.^{12,13}



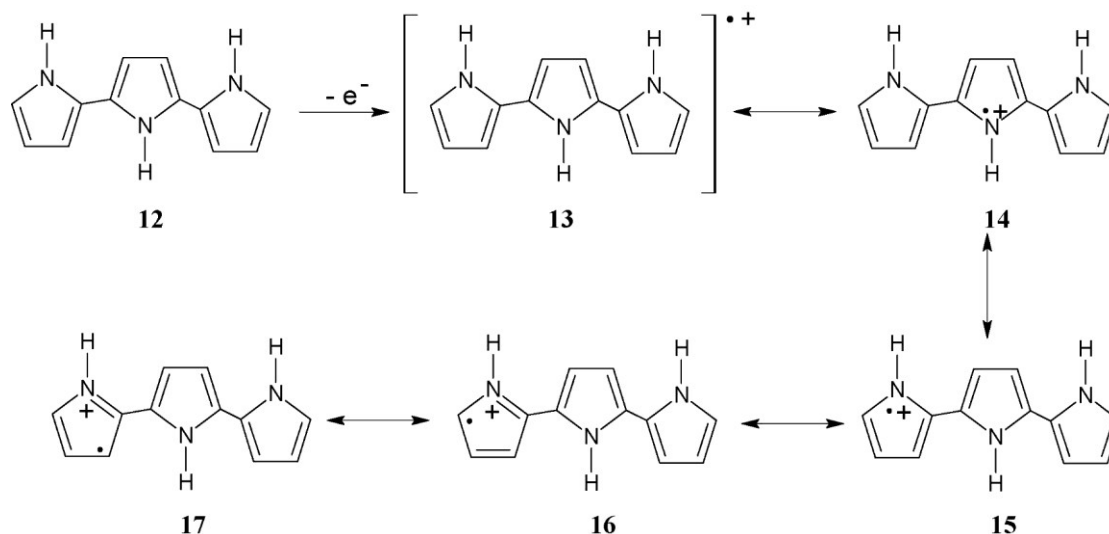
Obrázok 6: Oxidácia diméru pyrrolu (6) na radikálový kation (7) a jeho rezonančné formy (8,9,10). Prevzaté v ref.¹²

5. Reakcia s ďalším monomérom: Rezanančná forma (9) reaguje na pozícii 5' alebo 5 s radikálovým kationom monoméru (3) zobrazenom na obr. 4, čím vzniká trimérový dikation (11), ktorý stratou protónov tvorí neutrálny trimér (12), ako je znázornené na obr. 7.^{12,13}



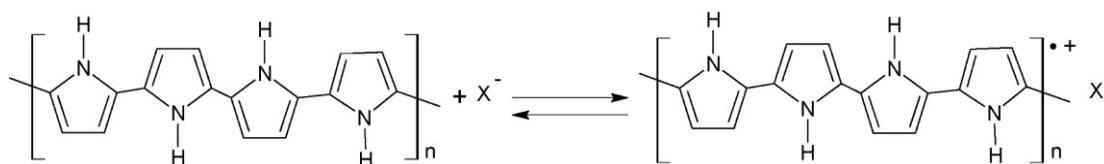
Obrázok 7: Vznik neutrálneho triméru. Prevzaté z ref.¹²

6. Pokračovanie oxidácie: Elektrooxidáciou triméru (12) vzniká radikálový kation (13), vid'. obr. 8.



Obrázok 8: Vznik radikálového kationu (13) a jeho rezonančné formy (14,15,16,17), ktoré stabilizujú štruktúru a umožňujú ďalšiu rast polymérneho reťazca. Prevzaté z ref.¹²

7. Pokračovanie polymerizácie: Polymerizačný proces pokračuje opakovaním rovnakého sledu reakcií: oxidácia, spojovanie (coupling) a deprotonácia, až kým sa nevytvorí konečný polymér (obr. 9). Ako sa reťazec predlžuje, vznikajú nové väzby medzi monomérnymi jednotkami, pričom dominantné zostávajú väzby na α -pozíciách. Avšak pri dlhších reťazcoch začínajú byť prítomné aj β -väzby, ktoré sú zodpovedné za nízku kryštalickosť PPy.¹²⁻¹⁴



Obrázok 9: Oxidácia PPy na jeho dopovanú vodivú formu, kde záporný anión (X^-) kompenzuje kladný náboj vznikajúci na polymérnom reťazci. Prevzaté z ref.¹²

Elektrochemické metódy polymerizácie majú však určité obmedzenia. Prvým je, že je náročné pripraviť väčšie množstvo polyméru, pretože polymerizácia prebieha iba na povrchu elektródy. Druhým obmedzením je, že elektrochemicky syntetizovaný polypyrrol je často nerozpustný v bežných organických rozpúšťadlách aj vo vode.¹⁵

3.2 Chemická syntéza

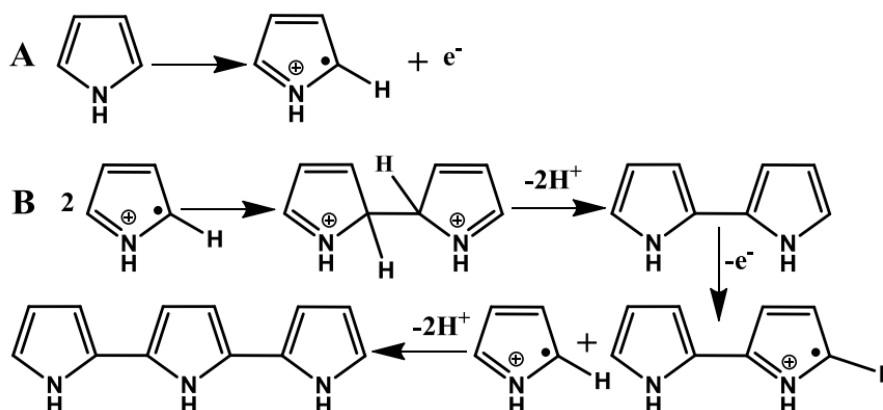
Popri elektrochemickej polymerizácii, ktorá umožňuje presnú kontrolu morfológie a hrúbky vrstvy, je chemická polymerizácia tradičným a stále používaným spôsobom na prípravu polymérov, najmä vo forme práškov alebo kompozitov.¹⁶

Chemická polymerizácia má svoje výhody najmä v jednoduchosti a možnosti prípravy väčších množstiev materiálu, pretože výsledný polymér sa získava ako amorfná suspenzia precipitovaná v celkovom objeme polymerizačného roztoku.^{15,16} Pri optimalizácii podmienok dokáže táto metóda poskytnúť polyméry s vysokou vodivosťou a polymérnou štruktúrou.¹⁶ Na druhej strane chemická polymerizácia, oproti elektrochemickej, vedie k vyšším koncentráciám nežiaducich vedľajších produktov, čo je dôležité predovšetkým pre aplikácie v biomedicínskych oblastiach, kde sa vyžaduje biokompatibilita materiálu.¹⁷

V posledných troch desaťročiach bola optimalizácia polymerizačného procesu predmetom intenzívneho výskumu. Napriek tomu, že bolo publikovaných viacero štúdií o polymerizácii v organických rozpúšťadlách, reakcie vo vodných médiách pri nízkom pH zostávajú najviac skúmanými metódami. Na chemickú polymerizáciu pyrrolu boli testované rôzne anorganické oxidanty, ako napríklad amóniumpersulfát ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$), peroxid vodíka (H_2O_2), chlorid železitý (FeCl_3), meďnatý perchlorát ($\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$) alebo hexakynoželezitan draselný ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$). Tieto oxidačné činidlá dokážu oxidovať pyrrol v iniciačnom kroku polymerizácie.^{13,15,17}

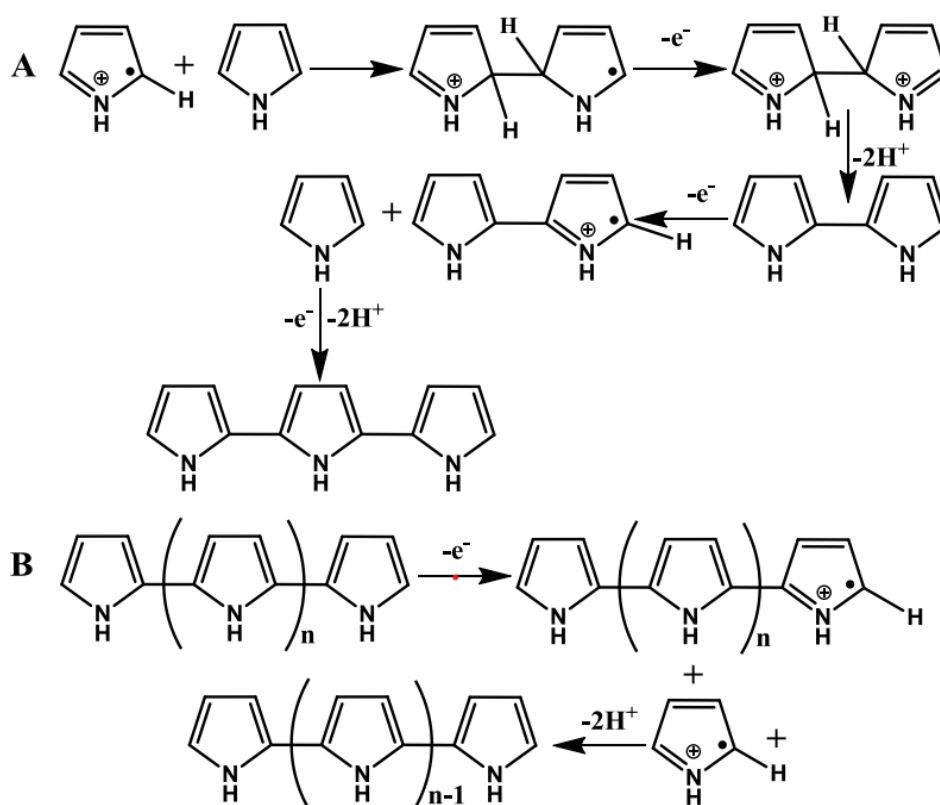
Mechanizmus chemickej polymerizácie pyrrolu môže prebiehať dvoma spôsobmi:

- 1. Spojenie dvoch radikálových katiónov** – dochádza tu k oxidácii monoméru pyrrolu, čím vznikajú chemicky aktívne radikálové katióny (obr. 10A). Spojením dvoch radikálových katiónov v iniciačnom kroku sa vytvorí radikálový katión diméru, ktorý následnou deprotonáciou produkuje bipyrrol. Ďalej je bipyrrol opäť oxidovaný a spája sa s ďalšou oxidovanou molekulou (obr. 10B).¹⁵



Obrázok 10: Oxidácia monoméru pyrrolu (A) a vznik diméru a triméru (B).
Prevzaté z ref.¹⁴

2. Reakcia radikálového katiónu a neutrálneho monoméru – Alternatívny mechanizmus chemickej polymerizácie pyrrolu navrhli Tan a Ghandi.¹⁸ Tento mechanizmus naznačuje, bežne používaný spôsob polymerizácie pyrrolu, založený na spájaní radikálových katiónov (obr. 10B), nie je dostatočne vhodný na opis tvorby polypyrrolu (PPy) vo vodnom prostredí. Namiesto toho tento nový mechanizmus navrhuje, že pyrrolový monomér je napadnutý radikálovým katiónom, čo vedie k jeho priamej reakcii s oxidovaným oligomérom pyrrolu (obr. 11A). Pri tomto procese sa pyrrol oxiduje a polymerizuje na pozíciách 2 a 5, čo vedie k lineárnemu reťazcovému rastu. Súčasne sa oxidujú a priečne viažu protóny na pozíciách 3 a 4 pyrrolu, čo prispieva k vzniku trojrozmernej štruktúry (obr. 11B). Tento mechanizmus zohľadňuje rýchlu oxidáciu pyrrolu a jeho následnú interakciu s oxidovanými oligomérmi, čo umožňuje presnejší popis polymerizácie vo vodnom prostredí.¹⁵



Obrázok 11: Iniciácia polymerizácie oxidáciou pyrrolového monoméru (A) a rast polymérneho reťazca (B). Prevzaté z ref.¹⁴

3.3 Modifikácia vodivých polymérov

Modifikácia vodivých polymérov je kľúčovým procesom na zlepšenie ich elektrických, mechanických a chemických vlastností, čo umožňuje ich širšie využitie v rôznych technologických oblastiach. Modifikácia môže prebiehať viacerými prístupmi, ktoré môžu zahŕňať zmeny v štruktúre polyméru, dopingové techniky, kombinovanie s inými materiálmi alebo napríklad zmenu ich fyzikálnych vlastností.¹⁹

Vodivé polyméry, ako sú polyanilín a polypyrrol, vykazujú schopnosť interakcie s organickými farbivami, čo je spôsobené podobnosťou v konjugovanej molekulovej štruktúre oboch zložiek. Interakcia vodivých polymérov s organickými farbivami sa prejavuje tromi hlavnými spôsobmi, ktoré boli doteraz skúmané oddelene. Prvým z nich je zlepšenie vodivosti a kontrola morfológie pri použití organických farbív ako šablón pri príprave polypyrrolu. Druhou oblasťou je adsorpcia farbív na vodivé polyméry, ktorá sa využíva najmä pri čistení znečistenej vody. Tretím smerom je fotokatalytický rozklad organických farbív, ktorý má taktiež environmentálne využitie. Posledné dve aplikácie

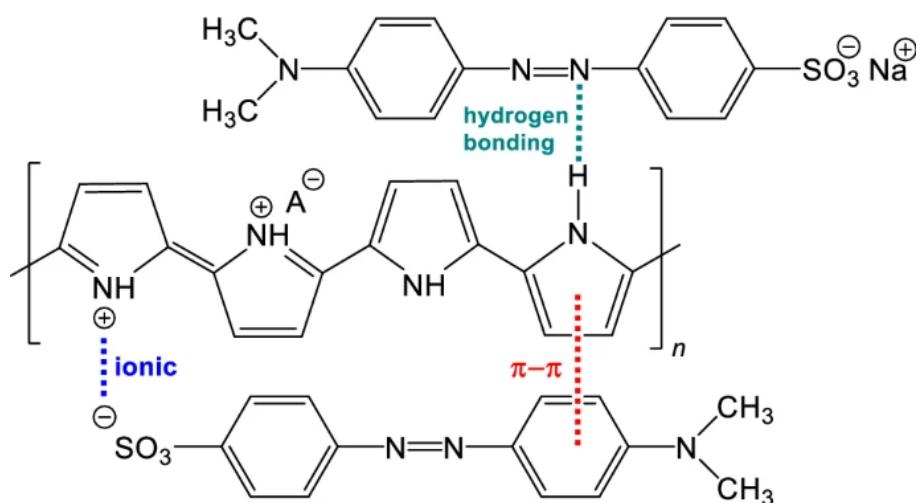
nevyžadujú prítomnosť vodivosti, ktorá je inak kľúčovou vlastnosťou vodivých polymérov.²⁰

Zatiaľ čo vodivé polyméry majú polymérny charakter a obsahujú polaróny ako nosiče náboja zodpovedné za vodivosť, farbivá sú nízkomolekulové zlúčeniny, ktoré sa správajú ako elektrické izolanty.^{20,21}

3.3.1 Princíp interakcie

Existujú štyri základné spôsoby, akými vodivé polyméry a farbivá interagujú:

1. π - π interakcia medzi vodivými polymérmi a organickými farbivami vzniká zdieľaním π -elektrónov medzi aromatickými kruhmi oboch látok, čo je energeticky výhodné (obr.12). Táto interakcia pravdepodobne dominuje v ich vzájomnom pôsobení. Okrem toho môžu vznikať komplexy s prenosom náboja medzi farbivami a reťazcami polymérov, čo ovplyvňuje ich vlastnosti.²²



Obrázok 12: Ilustrácia π - π interakcií, iónových väzieb a vodíkových väzieb medzi vodivým polymérom polypyrrolom a organickým farbivom metyloranž (MO). Prevzané z ref.²⁰

2. Vodíkové väzby medzi vodivými polymérmi a farbivami vznikajú interakciou vodíkových atómov s dusíkovými atómami v polyméroch a dusíkovými alebo kyslíkovými skupinami vo farbivách. Tieto väzby sú pravdepodobne dôvodom nerozpustnosti vodivých polymérov vo vode a zohrávajú kľúčovú úlohu pri adsorpcii farbív na polyméry.²⁰
3. Vodivé polyméry, ako polyanilín a polypyrrol, môžu iónovo interagovať s aniónovými farbivami vďaka svojmu kladnému náboju. Tieto interakcie môžu

viest' k tvorbe solí alebo zosieťovaniu, najmä ak farbivá obsahujú viac sulfoskupín. Dôkazy o týchto väzbách sú zatiaľ obmedzené, ale predpokladá sa ich význam pri viazaní farbív na polyméry.²⁰

4. Vznik kovalentných väzieb medzi vodivými polymérmi a farbivami je veľmi zriedkavý a zvyčajne neprebieha spontánne.²³

Interakcia vodivých polymérov s organickými farbivami ovplyvňuje ich morfológiu, vodivosť, adsorpčné vlastnosti a fotokatalytickú degradáciu farbív, čím rozširuje ich aplikačné možnosti. Farby môžu výrazne ovplyvniť morfológiu polymérov, pričom prítomnosť niektorých farbív, ako je metyloranž (MO), podporuje tvorbu nanotrubíc namiesto globulárnych štruktúr, čo vedie k lepšej vodivosti a širšiemu využitiu v biomedicínskych aplikáciách.^{20,24} Tieto štrukturálne zmeny úzko súvisia so zvýšením vodivosti, kde nízke koncentrácie farbív môžu podporiť lepší prenos náboja medzi polymérnymi reťazcami, zatiaľ čo vyššie koncentrácie môžu vodivosť znižovať. Ďalšou významnou vlastnosťou je adsorpcia farbív, ktorá umožňuje využitie vodivých polymérov pri úprave vody, pričom kontrolované uvoľňovanie farbív môže byť riadené zmenou pH alebo elektrochemickými procesmi. Okrem toho môže fotokatalytická degradácia farbív podporená vodivými polymérmi a ich nanokompozitmi s oxidmi kovov prispievať k efektívnejšiemu rozkladu znečisťujúcich látok. Tieto vlastnosti robia z vodivých polymérov perspektívne materiály pre environmentálne a technologické aplikácie, vrátane biosenzorov, čistenia vody a biomedicíny.^{20,25,26}

Mnohé organické farbivá môžu existovať vo viacerých formách v závislosti od pH prostredia, zvyčajne ako kyseliny alebo ich soli. Táto zmena ovplyvňuje ich rozpustnosť a adsorpčné vlastnosti na vodivých polyméroch. Napríklad MO je pri nízkom pH prítomný ako hydrofóbna kyselina, zatiaľ čo pri vyššom pH sa premieňa na dobre rozpustnú soľ. Podobné správanie sa prejavuje aj pri iných farbivách, pričom adsorpcia na polymérnom povrchu môže byť výrazne ovplyvnená kyslosťou alebo zásaditosťou prostredia. Kationické farbivá sa vo všeobecnosti lepšie viažu na polyméry v alkalickom prostredí, zatiaľ čo aniónové farbivá vykazujú vyššiu adsorpciu pri nižších hodnotách pH.^{20,27,28}

3.3.2 Metyloranž

MO zohráva významnú úlohu pri syntéze a modifikácii vodivých polymérov, najmä PPy. Jeho hlavnou funkciou je usmerňovanie morfológie PPy z typickej globulárnej štruktúry na dobre definované nanorúrky, čo je kľúčové pre zlepšenie elektrických vlastností

polyméru. Táto kontrola morfológie je pripisovaná tvorbe templátu, keď MO prechádza z rozpustnej soľnej formy na nerozpustnú kyselinovú formu v kyslom prostredí. Tento templát umožňuje jednorozmerný rast polypyrrolu, čo vedie k vzniku nanorúrok s výrazne vyššou vodivosťou v porovnaní s globulárnymi štruktúrami.²⁹ Výsledok však ovplyvňuje forma MO – či sa používa vo forme sodnej soli alebo kyseliny; sodná soľ podporuje tvorbu nanorúrok, zatiaľ čo kyselinová forma tento účinok nevykazuje. Štruktúra MO je zobrazená na obr. 12.²⁶

3.3.3 Acid Blue 25

Acid Blue 25 sa používa ako činidlo ovplyvňujúce výslednú štruktúru pri syntéze PPy, pričom jeho prítomnosť vedie k tvorbe nanodrôtov a významnému zvýšeniu elektrickej vodivosti. Pridanie Acid Blue 25 do polymerizačnej zmesi spôsobuje premenu globulárnej morfológie PPy na vláknitú štruktúru, pričom vodivosť stúpa až na 60 S cm^{-1} . Tento jav je spôsobený tým, že Acid Blue 25 v kyslom prostredí vytvára nerozpustný templát, na ktorý sa adsorbujú pyrrolové oligoméry, čím sa podporuje rast jednorozmerných nanoštruktúr. Napriek týmto výhodám je PPy pripravený s Acid Blue 25 vo svojej natívnej forme cytotoxický, čo môže obmedziť jeho využitie v biomedicíne. Cytotoxicita však môže byť odstránená purifikačnými krokmi, ktoré eliminujú zvyškové farbivá a oligoméry, čím sa zlepšuje biokompatibilita materiálu.¹

3.3.4 Acid blue 129

Acid Blue 129 ovplyvňuje polymerizáciu PPy tak, že zvyšuje jeho elektrickú vodivosť, pričom nemení jeho morfológiu. Na rozdiel od Acid Blue 25, ktoré pôsobí ako templát na tvorbu nanodrôtov, Acid Blue 129 nevytvára v kyslom prostredí nerozpustný templát pred polymerizáciou, čo vedie k tomu, že PPy si zachováva globulárnu morfológiu. Aj keď Acid Blue 129 neovplyvňuje štruktúru PPy, stále zvyšuje jeho vodivosť, hoci v menšej miere ako Acid Blue 25. Z hľadiska biokompatibility PPy pripravený s Acid Blue 129 vykazuje výrazne nižšiu cytotoxicitu v porovnaní s PPy syntetizovaným s Acid Blue 25, čím je vhodnejší pre biomedicínske aplikácie, ako sú biosenzory alebo tkanivové inžinierstvo. Po purifikácii sa cytotoxicita ešte viac redukuje, čo zlepšuje potenciál tohto materiálu pre využitie v biologických systémoch.^{1,30}

Výber vhodného farbiva môže slúžiť ako šablóna na riadenie morfológie vodivých polymérov, čo má priamy vplyv na ich fyzikálne vlastnosti. Táto kontrola morfológie a vodivosti je kľúčová pre optimalizáciu vodivých polymérov pri rôznych aplikáciách.²⁶

4 CHARAKTERIZÁCIA VODIVÝCH POLYMÉROV

Štruktúra a morfológia polymérov majú zásadný vplyv na ich konečné vlastnosti, vrátane elektrickej vodivosti a ich odpovede na biologické systémy. Kontrola procesu nukleácie z homogénneho roztoku alebo tuhej fázy zohráva kľúčovú úlohu pri formovaní základnej štruktúry polymérov. Následná systematická kontrola rastu reťazca a procesu usporiadania štruktúry je rozhodujúca pre dosiahnutie požadovaných materiálových vlastností. Správne usporiadanie štruktúrnych jednotiek a optimalizácia morfológických vlastností umožňujú zlepšenie výkonu týchto materiálov v rôznych aplikáciách, pričom ich vlastnosti možno ovplyvniť vhodným výberom podmienok syntézy.³¹

Vodivé polyméry majú čiastočne kryštalickú a čiastočne amorfnú štruktúru. Obsahujú lokalizované aj delokalizované elektrónové stavy, pričom rozsah delokalizácie π -väzieb je silne ovplyvnený štruktúrnou neusporiadanosťou. Táto delokalizácia hrá kľúčovú úlohu pri generovaní nábojových nosičov, ako sú polaróny, bipolaronóny a solitóny, ktoré umožňujú prechod materiálu z izolantu na vodivý stav.³²

4.1 Morfológia a štruktúra

Existuje mnoho štruktúrnych vlastností, ako sú dĺžka bočných reťazcov, stupeň polymerizácie a prítomnosť nekonjugovaných monomérnych jednotiek, ktoré môžu ovplyvniť mechanické vlastnosti konjugovaných polymérov.³³

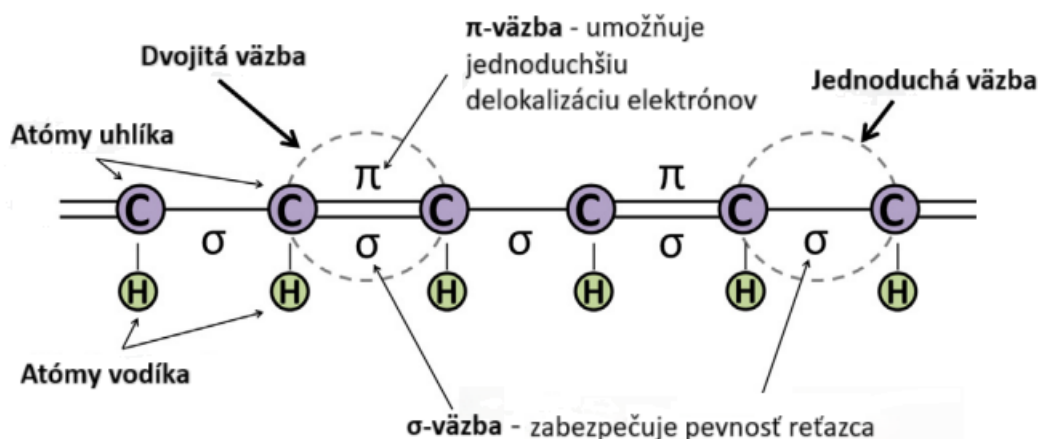
Vodivé polyméry sa môžu vyskytovať v rôznych formách – od tenkých vrstiev (filmov) a drobných častíc až po hydrogelové siete či tyčinkové útvary. Každá z týchto foriem disponuje špecifickými vlastnosťami, pokiaľ ide o elektrickú vodivosť, mechanickú pevnosť a optické charakteristiky.^{32,34} Tieto polyméry sú často zmesou kryštalických a amorfných oblastí, pričom stupeň kryštalizácie závisí od podmienok syntézy. Polyméry s vyšším podielom usporiadaných oblastí majú lepšiu vodivosť vďaka efektívnejšiemu transportu náboja, zatiaľ čo amorfné oblasti môžu zlepšiť pružnosť a spracovateľnosť materiálu. Na sledovanie morfológie polymérov sa využívajú zobrazovacie mikroskopické techniky ako sú napríklad röntgenová difrakcia, skenovacia transmisná elektrónová mikroskopia, mikroskopia atómových síl, či často využívaná skenovacia elektrónová mikroskopia (SEM).^{32,35}

4.1.1 Skenovacia elektrónová mikroskopia (SEM)

SEM umožňuje detailné skúmanie organických aj anorganických materiálov v mikroskopickom mierke tým, vytvára trojrozmerné pôsobiace obrazy povrchov rôznych materiálov s vysokým rozlíšením, pričom využíva interakciu zaostreného elektrónového lúča so vzorkou. Pri dopade na vzorku elektróny vyvolávajú rôzne signály, ktoré sa dajú zachytiť a použiť na vytvorenie obrazu. Medzi ne patria sekundárne elektróny, späťne odrazené elektróny a röntgenové žiarenie, pričom každé z nich poskytuje iné informácie o povrchu a zložení materiálu. Obraz v SEM sa vytvára najmä pomocou sekundárnych elektrónov, ktoré sa uvoľňujú z povrchu vzorky. Tie umožňujú detailné zobrazenie topografie povrchu s vysokým rozlíšením. Vďaka vysokému rozlíšeniu, veľkej hĺbke ostrosti a možnosti analyzovať chemické zloženie vzorky je SEM široko využívaná technika v materiálových vedách, biologických vedách, forenznnej analýze a nanotechnológiách.³⁶

4.2 Vodivé vlastnosti a dopovanie

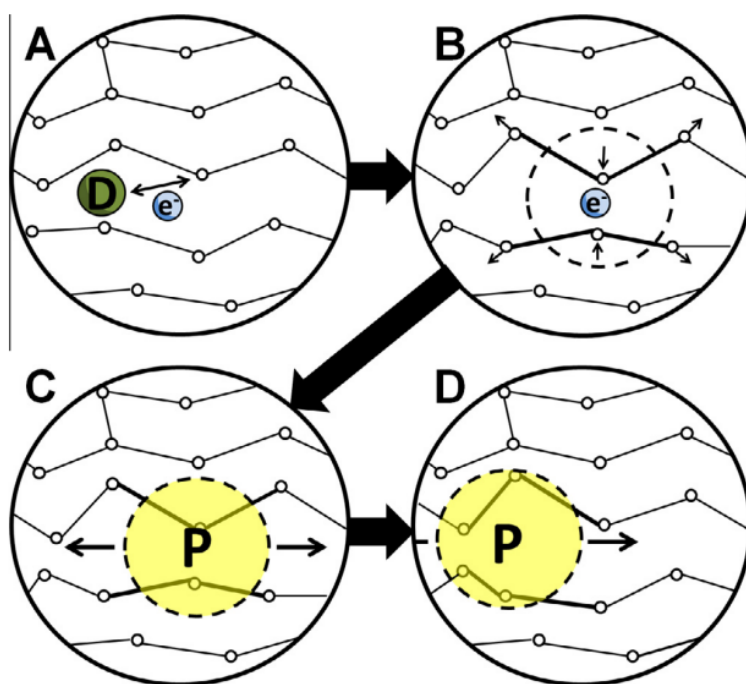
Vodivé polyméry vedú elektrický prúd vďaka schopnosti elektrónov pohybovať sa v rámci polymérnych reťazcov a taktiež medzi nimi. Ich vodivosť je podmienená viacerými faktormi, pričom kľúčovú úlohu zohráva konjugovaná štruktúra polyméru, ktorá obsahuje striedajúce sa jednoduché (σ) a dvojité ($\sigma + \pi$) väzby. Jednoduché väzby (σ -väzby) sú pevné a lokalizované medzi dvoma atómami, zatiaľ čo dvojité väzby obsahujú okrem σ -väzby aj π -väzbu, ktorej orbitály sa môžu prekrývať, čo umožňuje delokalizáciu elektrónov ako je zobrazené na obr. 13. Tieto elektróny sa tak voľne pohybujú v celej polymérnej štruktúre, čím prispievajú k vodivosti materiálu.^{37,38}



Obrázok 13: Zjednodušená schéma konjugovanej kostry: reťazec obsahujúci striedajúce sa jednoduché a dvojité väzby. Prevzaté a preložené z ref.³⁸

Ďalším rozhodujúcim faktorom je dopant, ktorý stabilizuje konjugovanú kostru polyméru a funguje ako zdroj nábojových nosičov. Dopant (často anión) môže odoberať alebo pridávať elektróny k polymérnemu reťazcu, čím sa v materiáli vytvárajú polaróny a bipolaróny – nabité útvary sprevádzané lokálnou deformáciou štruktúry (zobrazené na obr. 14).³⁹

Molekulárne dopanty sú nevyhnutné na vyváženie kladného náboja, ktorý vzniká na kostre vodivého polyméru počas polymerizácie. Dopanty môžeme rozdeliť podľa veľkosti – od malých iónových dopantov (Cl^- , NO_3^-) až po veľké polyelektrolytové dopanty (napr. PSS). V porovnaní s malými iónovými dopantmi zvyšuje začlenenie veľkých polyelektrolytových dopantov elektrochemickú stabilitu vodivých polymérov. Tento efekt je spôsobený tým, že dopant je imobilizovaný a pevne zakotvený v kostre vodivého polyméru, aj keď je polymér redukovaný a jeho kladný náboj odstránený.⁴⁰ Keď je na polymér aplikované elektrické pole, malé dopanty sa môžu pohybovať dovnútra alebo von z materiálu, čím narúšajú stabilitu polymérnej kostry a umožňujú transport elektrického náboja cez polaróny a bipolaróny. Tento proces je základom vodivosti vodivých polymérov.^{38,39}



Obrázok 14: Zjednodušené vysvetlenie elektrickej vodivosti vodivých polymérov: (A) Dopant odstráni alebo pridá elektrón do polymérneho reťazca, čím vytvorí delokalizovaný náboj. (B) Z energetického hľadiska je výhodné, aby sa tento náboj lokalizoval a obklopil lokálnou deformáciou kryštálovej mriežky. (C) Náboj obklopený touto deformáciou sa nazýva polaron (radikálny ión spojený s deformáciou mriežky). (D) Polaron sa môže pohybovať pozdĺž polymérneho reťazca, čo umožňuje vodivosť elektrického prúdu.

Prevzané z ref.³⁸

5 APLIKÁCIE VODIVÝCH POLYMÉROV

Vďaka svojim unikátnym vlastnostiam sa vodivé polyméry využívajú v oblasti regeneratívnej medicíny, tkanivového inžinierstva, elektricky indukovaných systémov na ciele uvoľňovanie liečiv a kultivácie buniek.⁴¹ Tiež je možné využiť tieto vodivé materiály v elektronických zariadeniach a antikoročných povlakoch.⁴²

V posledných rokoch sa výskum v oblasti vodivých polymérov zameriava aj na ich integráciu do pokročilých 3D systémov, ako sú scaffoldy pre tkanivové inžinierstvo. Tieto štruktúry poskytujú oporu pre rast buniek a zároveň umožňujú vedenie elektrického signálu, čo je výhodné najmä pri regenerácii nervového alebo svalového tkaniva. Jednou z možností je použitie PVA (polyvinylalkoholových) hydrogelov, ktoré sú známe svojou biokompatibilitou, dobrými mechanickými vlastnosťami a schopnosťou viazať vodu. PVA scaffoldy môžu byť modifikované napríklad lignínom na zlepšenie pevnosti a antibakteriálnych vlastností, alebo sieťované pomocou dialdehydovej celulózy (DAC), ktorá je biologicky prijateľnejšia než bežne používaný glutaraldehyd. Tieto hydrogely sa ukázali ako netoxické voči keratinocytoch a fibroblastom, pričom v kombinácii s aktívnymi látkami, ako napríklad protinádorovým liečivom fenantriplatínu, prejavili synergický cytotoxický účinok voči nádorovým bunkám. Zaujímavou aplikáciou sú aj tenké hydrogelové filmy, pripravené z PVA s rôznou molekulovou hmotnosťou, ktoré sa dajú ďalej upraviť vodivými polymermi. Tieto materiály vykazujú dobrú bioadhéziu, vysokú poréznosť a vhodnosť pre transdermálny prenos liečiv, čo z nich robí ideálnych kandidátov na vývoj vodivých náplastí podporujúcich hojenie rán.^{43,44}

5.1 Bioelektrina

Bioelektrina predstavuje prirodzené elektrické potenciály vznikajúce v bunkách a medzi bunkami v dôsledku prúdenia iónov cez bunkové membrány. Tieto membránové potenciály sú tvorené najmä aktivitou iónových kanálov a púmp, ktoré udržiavajú rozdielne koncentrácie sodíkových, draslíkových, vápenatých a chlórových iónov vo vnútri a mimo bunky. Takto vzniknuté elektrické napätie (tzv. membránový potenciál) zohráva dôležitú úlohu nielen pri prenose nervových impulzov, ale aj pri regulácii procesov ako sú bunková proliferácia, diferenciácia, migrácia a apoptóza. Ukazuje sa, že bioelektrické signály sú aktívnym činiteľom v procese regenerácie tkanív a vývoja organizmu. Nie sú to len pasívne parametre, ale signály schopné meniť správanie buniek a ovplyvňovať ich osud. Bunky sú navyše schopné medzi sebou komunikovať prostredníctvom tzv. gap junctions –

špecializovaných medzibunkových spojení umožňujúcich šírenie elektrických signálov v rámci tkaniva. Týmto spôsobom vznikajú bioelektrické siete, ktoré môžu koordinovať morfogénu a tkanivovú organizáciu.^{45,46}

Okrem významného ovplyvňovania správania jednotlivých buniek hrá bioelektrina dôležitú úlohu aj pri vývoji a regenerácii zložitejších tkanív a orgánov. Zmeny v membránovom potenciáli (V_{mem}) medzi bunkami môžu vytvárať vopred definované vzorce elektrického napätia (prepattern), ktoré slúžia ako signály určujúce, kde a ako sa majú tvoriť konkrétne štruktúry. Napríklad bolo preukázané, že manipuláciou V_{mem} možno u žiab a planárií vyvolať vznik očí alebo hláv aj na miestach, kde by sa za normálnych okolností netvorili. To naznačuje, že bioelektrické signály môžu niesť informáciu o identite a priestorovom usporiadaní orgánov v rámci vyvíjajúceho sa alebo regenerujúceho tkaniva. Tieto signály nemusia byť len lokálne – bunky spolu komunikujú nie len cez gap junctions, ale aj cez prenášané molekuly ako serotonín či butyrát. Takto vzniká sieť bioelektrickej regulácie, ktorá môže ovplyvniť správanie buniek aj vo vzdialených častiach tkaniva. Vďaka týmto vlastnostiam sa bioelektrina považuje za sľubný nástroj pre regeneratívnu medicínu (napr. (kde by sa dala využiť na stimuláciu hojenia a obnovy tkanív), vývojovú biológiu (pre hlbšie pochopenie embryogenézy) aj syntetickú biológiu (pre ciele riadenie bunkových procesov). Keďže tieto siete sú riadené rýchlo a do značnej miery nezávisle od génovej expresie, ponúkajú nový spôsob, ako cielene ovplyvňovať správanie buniek a komplexných tkanív s vysokou presnosťou.⁴⁷

II PRAKTICKÁ ČÁST

6 CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto diplomovej práce je syntetizovať a charakterizovať vodivé polyméry – polypyrrol aj polyanilín a skúmať, ako prídavok rôznych farbív (metyloranž, acid blue 25, acid blue 129) ovplyvňuje ich morfológiu a následne biologickú kompatibilitu. Polyméry budú pripravené vo forme práškov aj filmov, pričom ich morfológia bude analyzovaná pomocou skenovacej elektrónovej mikroskopie (SEM). Cytotoxicita práškov bude stanovená z extraktov pripravených podľa normy ISO 10993 – časť 12 a následne vyhodnotená podľa tej istej ISO normy časti 5 za využitia MTT testu na myších fibroblastoch (bunková línia NIH/3T3). Okrem testovania extraktov z práškov budú bunky nasadené priamo na polymérne filmy, pričom ich rast bude sledovaný pomocou fluorescenčnej mikroskopie; na farebné značenie sa využije Hoechst pre bunkové jadrá a ActinRed pre cytoskelet. Taktiež bude bunková životaschopnosť na filmoch vyhodnotená pomocou MTT testu. Výsledky tejto práce umožnia porovnať vplyv jednotlivých farbív na morfológiu a cytokompatibilitu oboch vodivých polymérov, čo prispieva k lepšiemu pochopeniu ich potenciálneho využitia v oblasti biomateriálov.

7 MATERIÁLY

7.1 Chemikálie

Na syntézu vodivých polymérov boli použité monoméry:

- Pyrrol (Reagent grade 98%, firma Sigma-Aldrich)
- Anilín hydrochlorid (firma Sigma-Aldrich)

Ako oxidačné činidlá boli použité:

- Chlorid železitý (Anhydrát, firma Merck KGaA) pri syntéze polypyrrolu
- Persíran amónny (Reagent grade 98%, firma Sigma-Aldrich) pri syntéze polyanilínu

Na modifikáciu vlastností výsledných polymérov boli pridané farbivá:

- Metyloranž (Dye content 85%, firma Sigma-Aldrich)
- Acid blue 25 (Dye content 45%, firma Sigma-Aldrich)
- Acid blue 129 (Dye content 25%, firma Sigma-Aldrich)

Na biologické testovanie bolo využité:

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, firma Gibco)
- Fyziologický roztok pufrovaný fosfátom (PBS, firma Biosera)
- Trypsín (firma Biosera)
- Formaldehyd (36-38%, firma Penta)
- Triton X-100 (firma Sigma-Aldrich)
- 3-(4,5-dimethylthiazol-1-yl)-2,5-difenyl tetrazolium bromide (MTT, Duchefa Biochemie B.V.)

Na farbenie buniek pri fluorescenčnej mikroskopii boli použité farbivá:

- ActinRedTM 555 (firma Thermo Fisher Scientific) na označenie cytoskeletu
- Hoechst 33258 (firma Sigma-Aldrich) na farbenie jadier

7.2 Biologický materiál

Na biologické testovanie boli použité myšie fibroblasty NIH/3T3, ktoré slúžia ako modelová bunková línia.

7.3 Prístrojové a laboratórne vybavenie

- Nova NanoSEM 450 – elektrónový mikroskop
- HERAcell 150i - biologický inkubátor
- IKA - trepačka
- Eppendorf 5702R - centrifúga
- Olympus IX81 s fázovým kontrastom - fluorescenčný mikroskop
- Alpina - laminárny box
- Tecan Infinite M200 PRO – spektrofotometer

7.4 Software

- Tecan i-control – program na vyhodnocovanie dát nameraných spektrofotometrom
- xT Microscope Control v6.3.4 – program na získavanie a spracovanie SEM snímok

8 METÓDY

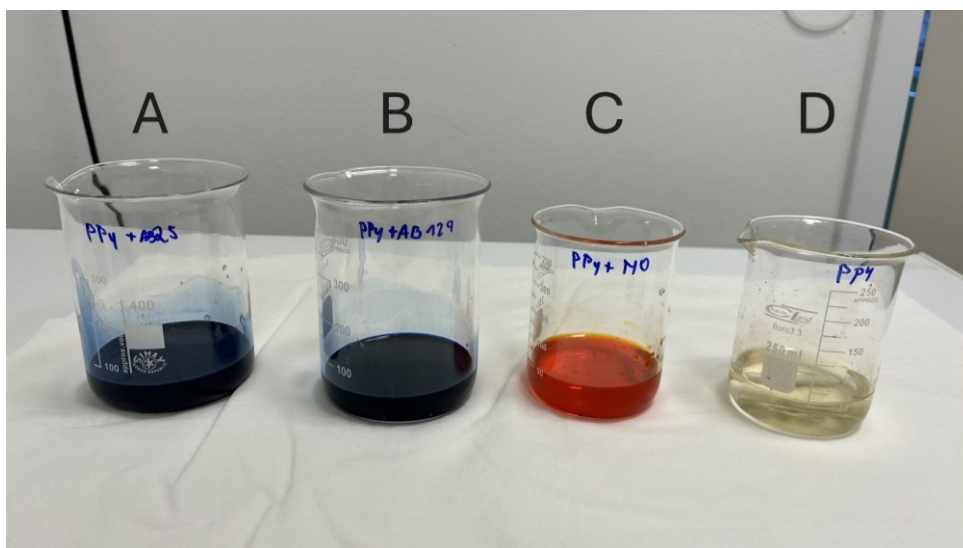
8.1 Syntéza vodivých polymérov

PPy a PANI boli pripravené oxidačnou polymerizáciou vo vodnom prostredí, pričom reakcie boli iniciované vhodným oxidačným činidlom. Tento postup umožňuje vytvorenie homogénnych polymérnych štruktúr. Na ovplyvnenie výsledných vlastností polymérov boli do reakčnej zmesi pridané farbivá, ktoré môžu riadiť usporiadanie polymérnych reťazcov počas polymerizácie.

8.1.1 Príprava polypyrrolu

Najskôr bol pripravený roztok farbiva rozpustením MO (0,5 mM), AB25 (0,01 M) a AB129 (0,01 M) v 50 ml deionizovanej vody. Roztoky boli miešané na magnetickom miešadle, aby sa zabezpečilo úplné rozpustenie farbiva.

Po rozpustení farbív bol do roztokov pridaný pyrrol (0,2 M), pričom boli zmesi opäť miešané na magnetickom miešadle, aby sa monomér dôkladne rozpustil a vytvoril homogénny roztok (obr. 15). Zároveň bol pripravený i roztok samotného pyrrolu o rovnakej koncentrácii na prípravu čistého PPy.



Obrázok 15: Pripravené roztoky samotného monoméru a monoméru s farbivami – (A) PPy + AB25, (B) PPy + AB129, (C) PPy + MO, (D) PPy

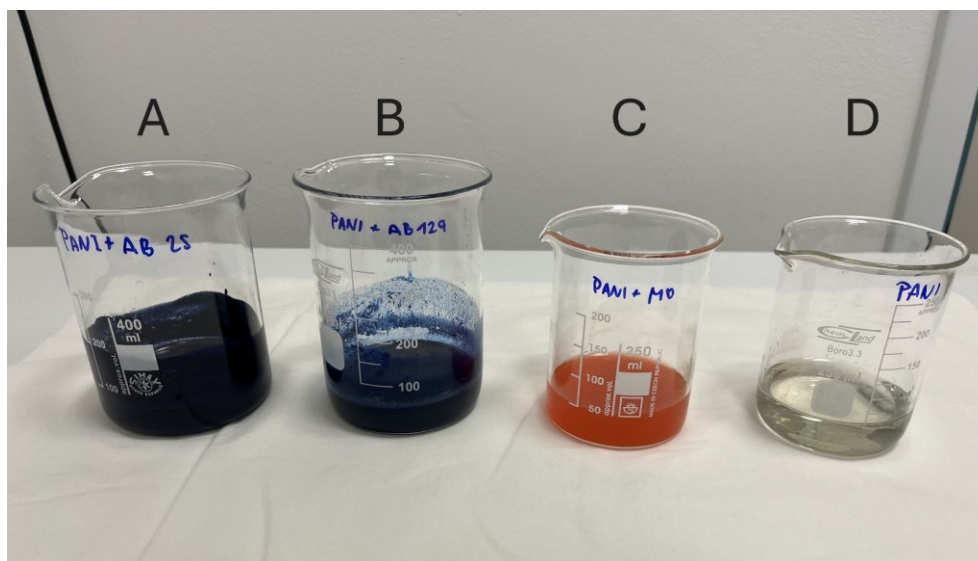
Samostatne bol pripravený roztok FeCl_3 (0,2 M) v 50 ml deionizovanej vody. Ten bol následne za stáleho miešania pridaný k roztokom pyrrolu, aby sa zabezpečila rovnomerná polymerizácia. Časť polymerizačnej zmesi bola napipetovaná do polystyrenových 24-jamkových mikrotitračných doštičiek aj do Petriho misiek s vekom

s priemerom 34 mm. Do každej jamky mikrotitračnej doštičky bol napipetovaný 1 ml zmesi, do všetkých Petriho misiek boli pridané 2 ml zmesi. Práškové vzorky boli pripravené v kadičkách. Polymerizácia trvala 24 hodín. Reakcia prebiehala pri laboratórnej teplote. Po jej ukončení boli vzorky z kadičiek prefiltrované, premyté 0,1 M HCl až dokiaľ nebol filtrát číry a následne boli prášky ešte 3krát premyté acetónom, usušené a uskladnené v exikátore na ďalšiu analýzu. Filmy pripravené na tkanivovom plastiku boli dôkladne vymyté 0,1 M HCl a následne opláchnuté 70% etanolom.

8.1.2 Príprava polyanilínu

Polymerizácia PANI prebiehala rovnakým spôsobom ako pri polypyrrole. Najskôr boli pripravené roztoky farbív MO (0,5 mM), AB25 (0,01 M) a AB129 (0,01 M) v 50 ml deionizovanej vody (obr. 16).

Po rozpustení farbiva bol pridaný anilín hydrochlorid (0,2 M) a zmes bola dôkladne premiešaná na magnetickom miešadle. Taktiež bol pripravený i roztok anilín hydrochloridu bez pridania farbív. Samostatne bol pripravený roztok persíranu amónneho (0,25 M) v 50 ml deionizovanej vody. Ten bol pridaný k roztoku anilínu za neustáleho miešania.



Obrázok 16: Pripravené roztoky samotného monoméru a monoméru s farbivami – (A) PANI + AB25, (B) PANI + AB129, (C) PANI + MO, (D) PANI

Ďalej pokračovala príprava obdobne ako u PPy v kapitole 8.1.1. Časť polymerizačnej zmesi bola napipetovaná do polystyrénových 24-jamkových mikrotitračných doštičiek (1 ml na jamku) a do Petriho misiek s vekom s priemerom 34 mm (2 ml na miskú). Práškové vzorky boli pripravené oddelene v kadičkách. Polymerizácia trvala 24 hodín a po jej

ukončení boli vzorky prefiltrované a premyté rovnakým spôsobom ako vzorky PPy a uskladnené v exikátore.

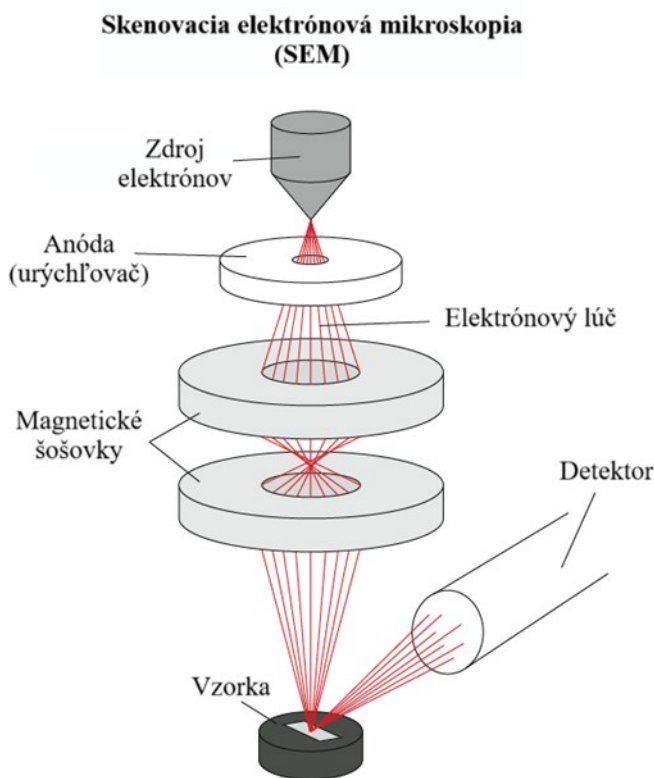
8.2 UV-Vis charakterizácia

Polymérne filmy pripravené v polystyrénových 24-jamkových mikrotitračných dosičkách boli podrobené UV-Vis spektroskopii. Na stanovenie spektier bol použitý spektrofotometer Tecan Infinite M200PRO, ktorý umožňuje analýzu priamo v mikrotitračných dosičkách. Rozsah vlnových dĺžok, pri ktorom meranie prebiehalo, bol stanovený na 300 až 800nm.

Prístroj Tecan Infinite M200 PRO pre stanovenie UV-Vis absorbancie využíva širokospektrálny svetelný zdroj (zvyčajne Xenónovú výbojku) a optický systém s monochromatormi na výber požadovaných vlnových dĺžok. Svetlo zvolenej vlnovej dĺžky následne prechádza vertikálne cez vzorku umiestnenú v jamke mikroplatničky. Detektor na druhej strane meria intenzitu prechádzajúceho svetla a na základe porovnania s referenčnou intenzitou dopadajúceho svetla softvér automaticky vypočíta hodnotu absorbancie pre danú vlnovú dĺžku.

8.3 Charakterizácia morfológie pomocou SEM

Skenovacia elektrónová mikroskopia (SEM) umožňuje zobrazíť povrch materiálu vo vysokom rozlíšení pomocou elektrónového lúča. Ten dopadá na vzorku a vyvoláva uvoľňovanie rôznych typov elektrónov z jej povrchu. Zaznamenaním týchto elektrónov sa vytvorí podrobný obraz, ktorý ukazuje štruktúru a nerovnosti povrchu materiálu. Princíp fungovania skenovacej elektrónovej mikroskopie je znázornený na obr. 17. Elektróny sú generované v zdroji, následne urýchléné anódou a pomocou magnetických šošoviek zamerané na povrch vzorky. Interakcia elektrónového lúča so vzorkou vedie k uvoľňovaniu sekundárnych elektrónov, ktoré sú zachytené detektorom a použité na vytvorenie detailného obrazu povrchu.



Obrázok 17: Schéma princípu SEM (prevzaté a preložené z ref.⁵⁵)

Analýza bola realizovaná pre vzorky vo forme práškov aj filmov. Pred samotným meraním boli vzorky pripevnené na držiaky vhodné pre pozorovanie v elektrónovom mikroskope. Filmy boli vystrihnuté z Petriho misiek a fixované pomocou obojstrannej vodivej pásky. Práškové vzorky, z ktorých niektoré mali tvrdšiu a kompaktnú konzistenciu, bolo potrebné pred nanesením mechanicky nadržviť na jemnejší prášok. Tento krok bol

nevyhnutný na zabezpečenie rovnomerného povrchu, ktorý umožňuje kvalitné snímanie v SEM.

Následne boli všetky vzorky naprášené tenkou vodivou vrstvou zmesi kovov. Tento krok zlepšil vizualizáciu detailov povrchu a zároveň eliminoval problémy spôsobené povrchovým nabíjaním vzoriek počas merania.

Merania boli uskutočnené pri rôznych zväčšeniach, ktoré sa pohybovali v rozsahu od $500\times$ až po najvyššie možné priblíženie, ktoré prístroj umožňoval pri zachovaní dobrej kvality zobrazenia. Zväčšenia boli zvolené individuálne pre každú vzorku tak, aby bolo možné detailne zachytiť povrchovú morfológiu a zároveň porovnávať medzi jednotlivými typmi materiálov.

8.4 Biologické testovanie

8.4.1 Kultivácia a pasážovanie buniek

Bunková línia NIH/3T3 bola kontinuálne kultivovaná v kultivačných nádobách v inkubátore pri 37°C . Pred pasážovaním bola vizuálne skontrolovaná životaschopnosť buniek pomocou inverzného svetelného mikroskopu, aby sa overila ich vhodnosť na ďalšiu manipuláciu.

Pasážovanie prebiehalo v sterilných podmienkach laminárneho boxu. Najprv bolo z kultivačných nádob opatrne odsaté médium a bunky boli prepláchnuté 15 ml PBS, aby sa odstránili zvyšky séra. Následne bolo pridané 4 ml trypsínu, ktorý pokryl celú plochu nádoby s adherovanými bunkami. Trypsín pôsobil 5 minút v inkubátore, kde enzymaticky narušil väzby medzi bunkami navzájom aj medzi bunkami a povrchom nádoby, čím umožnil ich uvoľnenie.

Po inkubácii bol trypsín neutralizovaný pridaním rovnakého objemu kultivačného média (4 ml DMEM doplneného o 10 % FBS). Celý obsah bol prenesený do centrifugačnej skúmavky a centrifugovaný 3 minúty pri 1100 ot/min. Supernatant bol odstránený a bunkový pelet bol rozsuspendovaný v 1 ml čerstvého kultivačného média, čím sa dosiahla koncentrácia 2×10^7 buniek/ml. Táto suspenzia bola následne riedená 100-násobne na výslednú koncentráciu 2×10^5 buniek/ml, ktorá bola použitá na následné nasadenie buniek do 96-jamkovej platne. Bunky boli po nasadení do platne kultivované 24 hodín, aby sa stihli adherovať pred expozíciou extraktom polymérov. Zároveň boli bunky nasadené v rovnakej koncentrácii i na polymérne filmy.

8.4.2 Príprava extraktov z polymérov

Práškové polyméry boli testované nepriamo, prostredníctvom ich extraktov, pripravených v súlade s odporúčaniami normy ISO 10993-12, ktorá stanovuje štandardný pomer 0,2 g materiálu na 1 ml kultivačného média. Z každého pripraveného polyméru (PPy, PANI a ich variant s farbivami) bol odvážený zodpovedajúci podiel prášku, ku ktorému bol pridaný roztok DMEM.

Vzhľadom na silne absorbčný charakter niektorých vzoriek ktorý komplikoval získanie dostatočného množstva použiteľného extraktu, bolo potrebné pomer z normy modifikovať a niektoré polyméry nariediť vyšším množstvom kultivačného média. Výsledné riedenia sú zobrazené v tabuľke č.1. Vzorky boli následne inkubované 24 hodín pri 37°C za neustáleho trepania. Po inkubácii boli extrakty centrifugované a prefiltrované pomocou 0,22 µm filtrov na zaistenie sterility extraktov.

Tabuľka 1: Riedenie extraktov z polymérov

Vzorka	Extrakčný pomer (g/ml)
PPy	0,020
PPy + MO	0,020
PPy + AB25	0,067
PPy + AB129	0,200
PANI	0,200
PANI + MO	0,100
PANI + AB25	0,050
PANI + AB129	0,100

8.4.3 Expozícia buniek extraktom a MTT test

Na hodnotenie cytotoxicity extraktov pripravených z polymérnych práškov bol použitý MTT test, ktorý predstavuje kolorimetrickú metódu založenú na premene žltého tetrazólium soľného substrátu MTT (3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-tetrazóliumbromidu) na tmavofialový formazan. Táto premena prebieha v mitochondriách metabolicky aktívnych buniek, kde dochádza k redukcii MTT enzýmami dehydrogenázového typu. Množstvo vytvoreného formazanu, ktorý sa po rozpustení kvantifikuje spektrofotometricky, je priamo úmerné počtu životaschopných buniek.

Bunky nachystané podľa kapitoly 8.2.1 boli vystavené prefiltrovaným polymérnym extraktom, aplikované boli v šiestich rôznych riedeniach: 100%, 75%, 50%, 25%, 10% a 1%. Riedenia boli pripravené pomocou čerstvého kultivačného média (DMEM s 10% FBS a 1% P/S). Každá koncentrácia bola testovaná v piatich technických replikátoch, pričom bunková kultúra bez extraktu slúžila ako kontrola (referencia = 100 % viability).

Po expozícii extraktom boli bunky inkubované 24 hodín pri 37 °C v CO₂ inkubátore. Následne bol do každej jamky pridaný roztok MTT v koncentrácii 0,5 mg/ml, a platňa bola inkubovaná ďalšie 4 hodiny. Metabolicky aktívne bunky redukovali MTT na nerozpustný formazan, ktorý sa následne rozpustil pridaním 100 µl DMSO do každej jamky.

Absorbancia bola meraná pri vlnovej dĺžke 570 nm pomocou spektrofotometra Tecan Infinite M200 PRO. Získané hodnoty boli spracované v programe Excel, kde boli z jednotlivých replikátov vypočítané priemerné hodnoty absorbancie. Výsledky boli vyjadrené ako percentuálna životaschopnosť buniek voči kontrole, ktorá predstavovala 100% životaschopnosť. Ako necytotoxické sa podľa normy ISO 10993-5 považujú hodnoty viability nad 70%.

8.4.4 Kultivácia buniek na polymérnych filmoch a fluorescenčné farbenie

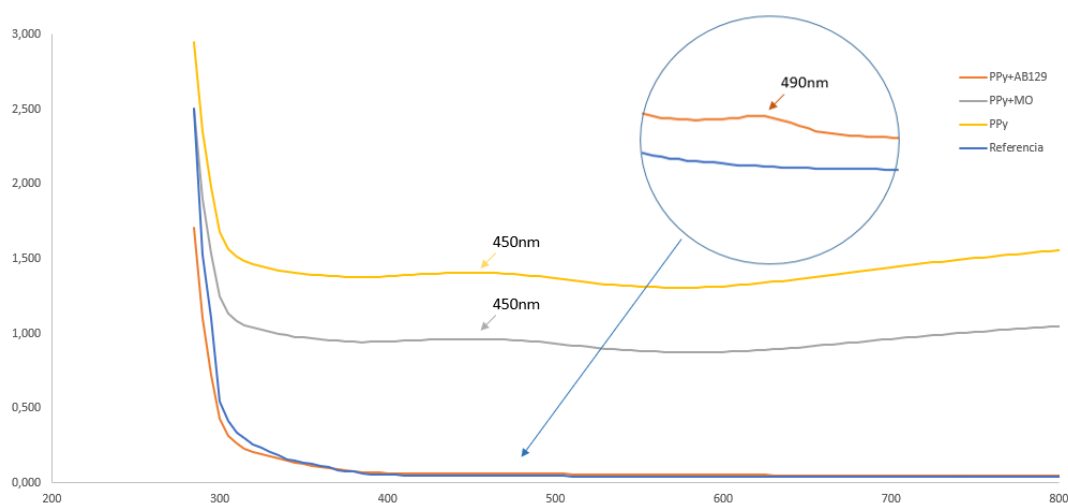
Schopnosť bunkovej životaschopnosti bola vyhodnotená nielen na extraktoch z práškov, ale aj pripravené polymérne filmy boli testované ako substrát pre adhéziu a rast buniek. Na pripravené filmy boli nasadené bunky línie NIH/3T3. Následne boli inkubované 48 hodín pri 37 °C v CO₂ inkubátore, aby sa umožnila adherencia a rast buniek priamo na povrchu materiálu.

Po ukončení kultivácie bola bunková životaschopnosť vyhodnotená ako kvantitatívne, tak kvalitatívne. Kvantitatívne vyhodnotenie prebiehalo pomocou MTT testu obdobne ako v kapitole 8.2.3. Jediná zmena bola pred meraním absorbancie, kedy po rozpustení formazanu pomocou DMSO, bol roztok prepitovaný do transparentnej platne, aby sa zamedzilo ovplyvneniu výslednej absorbancie polymérnymi filmami. Pre kvalitatívne vyhodnotenie boli bunky fixované a podrobené fluorescenčnému farbeniu. Na vizualizáciu jadier buniek bol použitý fluorescenčný marker Hoechst, ktorý sa viaže na DNA a umožňuje identifikáciu všetkých buniek. Na zobrazenie cytoskeletu bol aplikovaný marker ActinRed, ktorý sa špecificky viaže na filamenty aktínu, čím poskytuje informáciu o morfológii a rozložení buniek na povrchu polymérneho filmu.

9 VÝSLEDKY A DISKUSIA

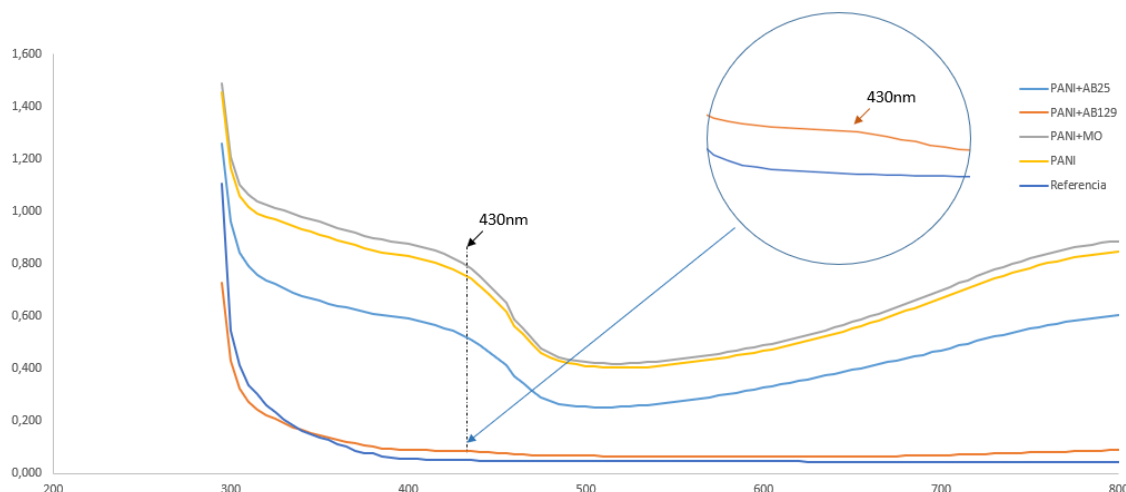
9.1 Uv-Vis spektroskopia polymérnych filmov

Tvorba polymérnych filmov bola potvrdená za využitia UV-Vis spektroskopie. Keďže pri vzorke PPy+AB25 bolo jasne pozorovateľné, že sa film nevytvoril, táto vzorka nebola meraniu podrobená. Zo spektier zobrazených na obr. 18 a 19 je zrejmé, že tvorba finálneho produktu je ovplyvnená typom pridaného farbiva. Obrázok 18 zobrazuje polypyrrolové filmy a obrázok 19 filmy polyanilínové.



Obrázok 18: Uv-Vis spektroskopia polypyrrolových filmov

PPy má podľa literatúry typický pík okolo 450 nm, ktorý zodpovedá $\pi-\pi^*$ prechodu benzoidných jednotiek.⁴⁸ Pri vzorkách čistého PPy a PPy+MO sa vyskytuje pík práve v tejto oblasti. Zatiaľ čo pri vzorke PPy+AB129 je tento prechod posunutý na 490 nm. Všetky tri spektrá však zodpovedajú polarónovému pásu, ktorý je typický pre oxidovanú formu polypyrrolu a indikuje jeho tvorbu. Keďže filmy boli pripravené na substráte z tkanivového polystyrénu (PS), bolo zmerané spektrum i samotného PS. V porovnaní s týmto spektrom je z obrázka 18 viditeľné, že pri vzorkách PPy, PPy+MO i PPy+AB129 došlo k vytvoreniu filmu. Avšak pri vzorke PPy+AB129 sa vytvoril veľmi tenký film a do budúcnosti by bolo vhodnejšie pripraviť film aspoň v dvoch vrstvách.



Obrázok 19: Uv-Vis spektroskopia polyanilínových filmov

Obdobná situácia nastala i pri PANI filmoch, kedy PANI v kombinácii s AB129 vytvoril taktiež veľmi tenký film. Na základe toho sa dá povedať, že použité farbivo má vplyv nielen na výslednú morfológiu polymérov, ale i na hrúbku pripravených filmov. Rozdiel medzi PPy a PANI nastal ale pri použití farbiva AB25, kedy v kombinácii s PANI bol vytvorený polymérny film. Z obrázku XY je zreteľné, že PANI filmy sa vytvorili pri všetkých použitých farbivách. Typické spektrum UV-Vis PANI je závislé na jeho oxidačnom stave a stupni protonácie.⁴⁹ Tieto faktory taktiež ovplyvňujú pozície absorpčných pásov. PANI vo forme protonovanej emeraldinovej soli má obvykle pásy v oblasti medzi 400 a 450 nm a v blízkej infračervenej oblasti – od 700 nm, ktoré odpovedajú polarónovým prechodom v protónovaných konjugovaných reťazcoch.^{50,51} Z obrázka 19 je zrejmé, že spektrá pripravených PANI filmov zodpovedajú práve spektru emeraldinovej soli a zároveň potvrdzujú vznik PANI filmov. Zároveň ukazujú, že aj napriek prítomnosti farbív sa v prípade PANI podarilo vytvoriť súvislú vrstvu, vhodnú na ďalšie biologické hodnotenie.

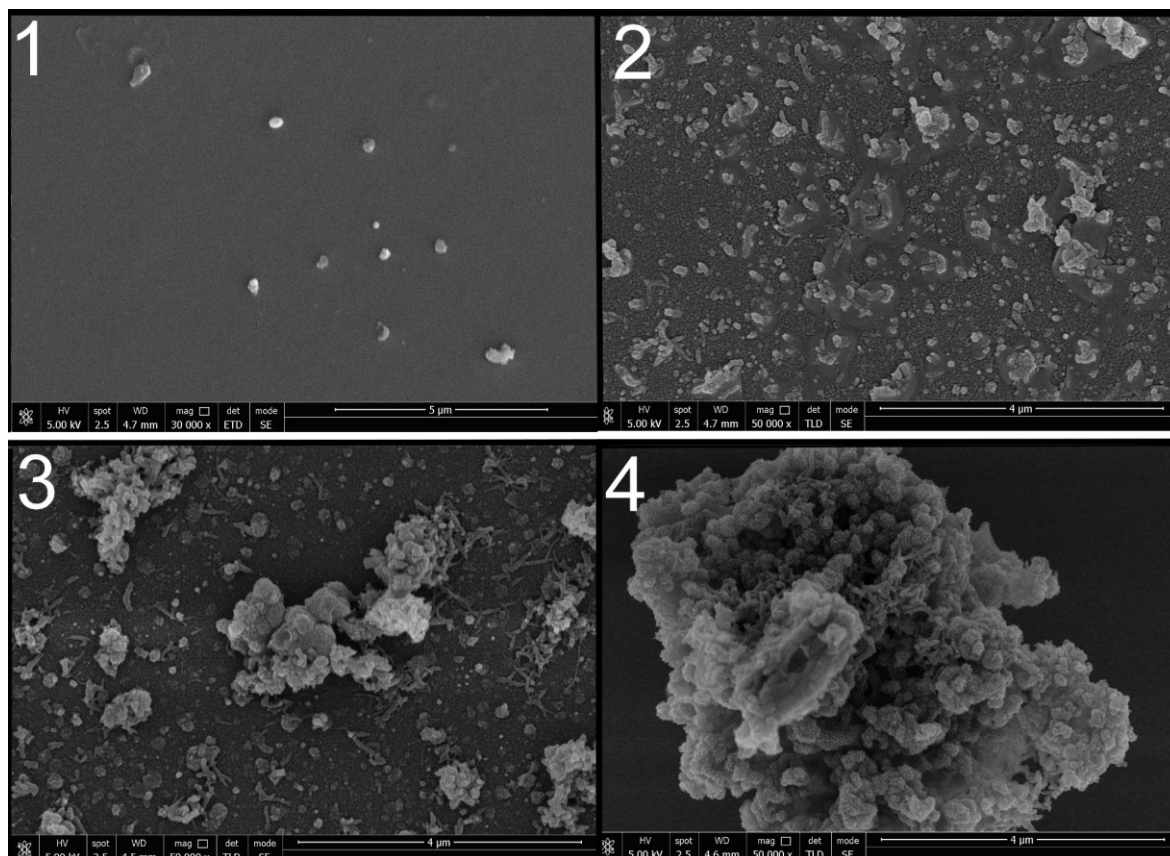
9.2 Morfológia polymérov – výsledky SEM

Morfológia materiálov, t.j. ich štruktúra, tvar častíc, povrchová textúra a prítomnosť rôznych defektov na mikro- a nanoúrovni, má zásadný význam pre ich vlastnosti a funkčnosť. Pre vodivé polyméry ako polyanilín a polypyrrol je detailné pochopenie morfológie kľúčové, pretože ich štruktúrna organizácia priamo a významne ovplyvňuje ich fyzikálne, chemické a elektrochemické vlastnosti. Na charakterizáciu morfológie pripravených vzoriek bola použitá metóda SEM. SEM predstavuje výkonný a štandardný analytický nástroj, ktorý poskytuje obrazy povrchu vzorky s vysokým rozlíšením. Táto technika je mimoriadne vhodná pre analýzu práškových aj filmových vzoriek, pretože

umožňuje vizualizovať detailné povrchové znaky, ako je veľkosť a distribúcia častíc, ich agregácia, či štruktúra polymérneho filmu. V nasledujúcich častiach budú prezentované a interpretované elektrónové mikrofotografie získané pre jednotlivé vzorky, s diskusiou pozorovaných morfológických znakov.

9.2.1 Morfológia filmov

Na obrázku 20 sú znázornené SEM snímky pripravených filmov PANI, ktoré boli syntetizované buď samotné, alebo v prítomnosti aniónových farbív. Obrázky zachytávajú rozdiely v povrchovej morfológii filmov, ktoré nastávajú dôsledkom použitého farbiva počas syntézy.



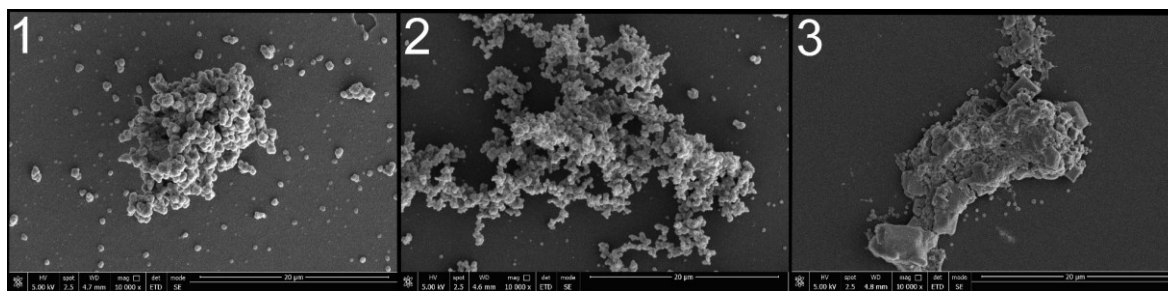
Obrázok 20: SEM snímky PANI filmov,
1 – PANI, 2 – PANI+AB25, 3 – PANI+MO, 4 – PANI + AB129

Snímky na obr. 20 boli zhotovené s priblížením 50 000× s rozdielom snímky 1 – PANI, tá bola vyhotovená s priblížením 30 000×. Pri snímaní PANI pri väčšom priblížení sa výrazne zhoršila ostrosť a kvalita záznamu. Dôvodom môže byť napríklad veľmi tenká vrstva filmu, čo pri vyššom zväčšení spôsobuje nabíjanie vzorky, zhoršený signál sekundárnych elektrónov a tým pádom rozmazanie a šum obrazu.⁵²

- (1) PANI - Povrch je tvorený súborom globulárnych agregátov, ktoré sú vzájomne zlievajúce sa a vytvárajú relatívne hladkú, nepravidelnú vrstvu. Morfológia je hustá, s nízkou pórovitosťou a len minimálnou štruktúrnou variabilitou. Niektoré častice sa mierne odlišujú veľkosťou, no celkovo ide o homogénne usporiadaný povrch bez výskytu vláknitých štruktúr.
- (2) PANI+AB25 - Tento film vykazuje relatívne rovnomerné rozloženie guľovitých štruktúr s jemným povrchom. Morfológia je viac kompaktná, so zreteľne definovanými útvarmi. AB25 tak pravdepodobne podporuje usporiadaný a rovnomerný rast polymérnych vrstiev.
- (3) PANI+MO - Povrchová morfológia je heterogénna, s výskytom väčších agregátov a jemnejších častíc. Štruktúry sú čiastočne guľovité, s miestami vláknitým charakterom. Prítomnosť farbiva MO ovplyvnila rast polyméru smerom k tvorbe drobných zhlukov bez výrazného usporiadania.
- (4) PANI+AB129 - Kombinácia vláknitých a globulárnych štruktúr. Zreteľne sú prítomné elongované vláknité formácie, ktoré tvoria sieťovitú, poréznu štruktúru. Tento typ heterogénneho usporiadania môže byť dôsledkom synergického vplyvu farbiva AB129 na polymerizačný proces, kde dochádza k paralelnej tvorbe vláknitých aj sférických polymérnych domén. Výsledná morfológia tak poskytuje vysoký špecifický povrch a potenciálne priaznivé vlastnosti pre interakciu s bunkami.

Z výsledkov SEM analýzy vyplýva, že prítomnosť aniónových farbív počas chemickej polymerizácie výrazne ovplyvňuje morfológiu vzniknutého polyanilínového filmu. Vzorka pripravená bez farbiva (3) zodpovedá typickému vzhľadu PANI filmu opísanému v práci Shishov, M. et al.⁵³ kde sa tiež vyskytujú kompaktné a globulárne agregáty s hladkým a málo výrazným povrchom.

Po analýze filmov PANI boli rovnakým spôsobom hodnotené aj morfologické vlastnosti filmov PPy, zobrazené na obrázku 21.



Obrázok 21: SEM snímky PPy filmov,
1 – PPy, 2 – PPy+MO, 3 – PPy+AB129

SEM snímky filmov PPy s 10 000 $\times$ priblížením vykazujú rozdiely v morfológii v závislosti od prítomnosti aniónových farbív. Zatiaľ čo čistý PPy vytvára kompaktné globulárne štruktúry, dopované vzorky vykazujú buď vetvené agregáty, alebo splývajúce, ploché častice.

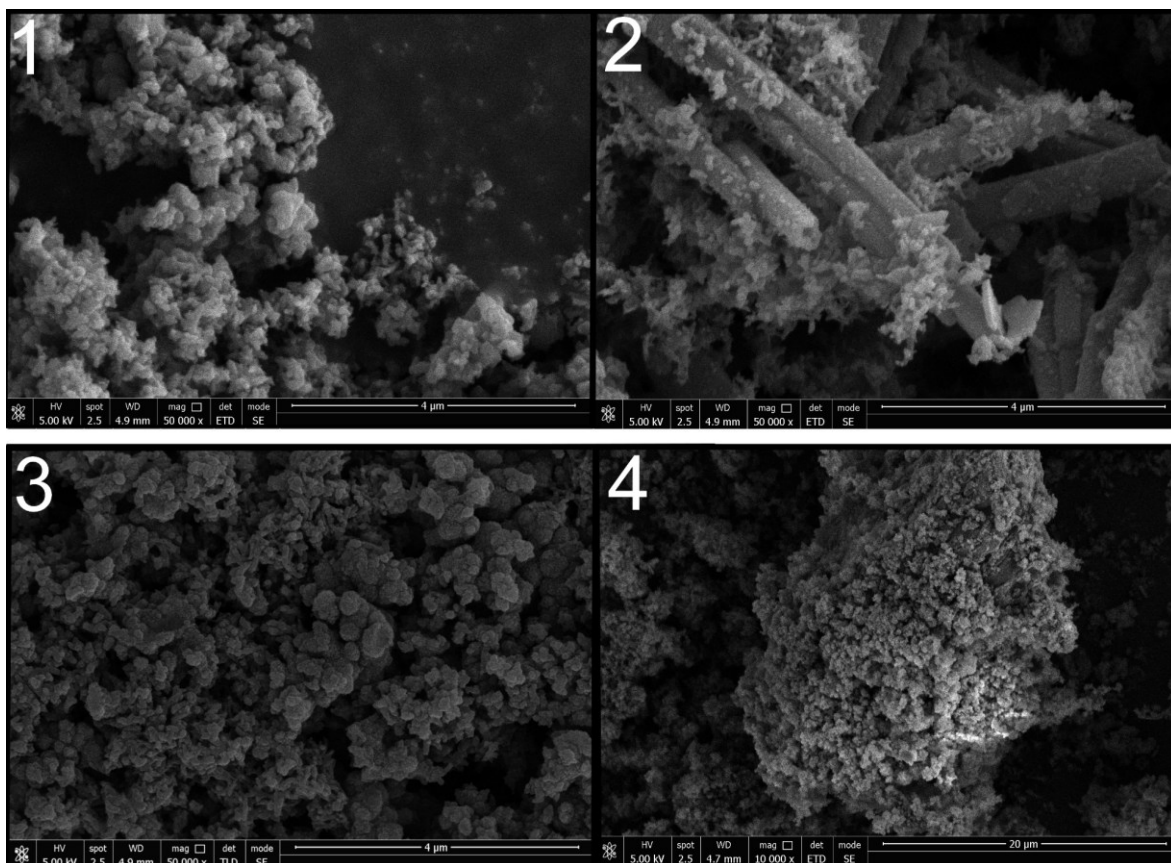
- (1) PPy - Povrch ukazuje kompaktnejšiu, centrálne zhluknutú aglomeráciu sférických častíc. Okolie je rozptýlené drobnými časticami, ale celkový vzhľad je hladší a menej členitý ako pri dopovaných vzorkách. Tento typ štruktúry je typický pre PPy pripravený bez aditív – polymerizácia prebieha rovnomerne, ale s nižšou mikroštruktúrnou variabilitou.
- (2) PPy+MO – Morfológia tejto vzorky je charakterizovaná reťazcovitou a agregovanou štruktúrou, tvorenou globulárnymi časticami, ktoré vytvárajú nepravidelné, vetvené útvary. Povrch je členitý, čo môže zvýšiť špecifický povrch, a teda aj interakciu s bunkami. Prítomnosť MO podporila vznik poréznych štruktúr.
- (3) PPy+AB129 - Morfológia je heterogénna, pozorované sú ploché, deformované a splývajúce častice, ktoré vytvárajú nepravidelný agregát s hladkým povrchom. Táto štruktúra sa zásadne líši od vláknitých morfológií pozorovaných pri PANI+AB129 a poukazuje na odlišnú interakciu AB129 s pyrrolom v porovnaní s anilínom. Povrchová členitosť je nízka, čo môže znížiť aplikačný potenciál v oblastiach, kde je požadovaný vysoký špecifický povrch.

Aj keď bol pripravený aj film PPy+AB25, vzorka analyzovaná nebola, keďže pri vizuálnej kontrole sme nepozorovali vzniku súvislého filmu na Petriho miske. Absencia filmu môže byť spôsobená buď inhibíciou polymerizácie samotným farbivom, alebo nevhodnými podmienkami pre vznik adherentnej vrstvy.

Rozdiely v snímkach na obr. 21 poukazujú na vplyv dopantu na priebeh polymerizácie a výslednú architektúru polymérneho filmu. Rozdielna morfológia môže ďalej ovplyvniť fyzikálno-chemické vlastnosti materiálu.

9.2.2 Morfológia práškov

Obdobným spôsobom ako pri filmoch boli následne analyzované aj práškové vzorky pripravené chemickou oxidáciou. Cieľom bolo zistiť, či použitie rôznych farbív ovplyvňuje nielen morfológiu filmov, ale aj polymérov v práškovej forme. SEM snímky týchto vzoriek umožnili porovnať veľkosť, tvar a usporiadanie jednotlivých častíc, ako aj celkový charakter agregácie práškového materiálu. Na obr. 22 sú zobrazené snímky práškových vzoriek PANI.



Obrázok 22: SEM snímky PANI práškov
1 – PANI, 2 – PANI+AB25, 3 – PANI+MO, 4 – PANI+AB129

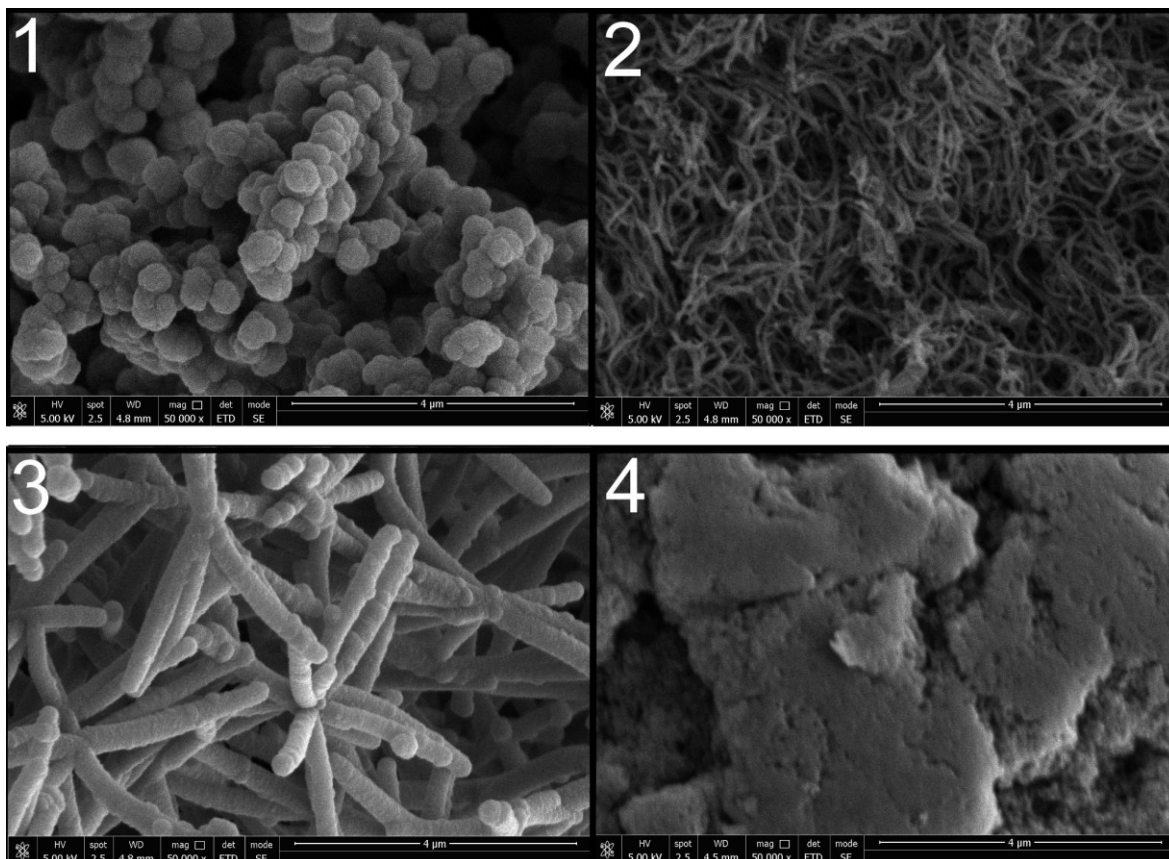
SEM snímka vzorky PANI+AB129 (Obrázok 22-4) bola získaná pri nižšom zväčšení (10 000×) ako ostatné vzorky (50 000×), a to z dôvodu, že pri vyššom priblížení sa výrazne zhoršila kvalita obrazu v dôsledku preexpozície – niektoré oblasti boli príliš presvetlené, čo viedlo k strate detailov snímky. Tento efekt vzniká vtedy, keď je v mieste dopadu elektrónového lúča príliš silný signál sekundárnych elektrónov – napríklad kvôli nahromadenému náboju, príliš vysokej intenzite lúča alebo príliš dlhej expozícii v jednej

oblasti. Následkom toho sa svetlé miesta na snímke „prepália“ a jemná štruktúra povrchu sa stráca. Aj napriek tomu je možné pozorovať dominantné morfológické znaky vzorky, najmä kompaktný agregát s jemne zrnitým povrchom.

- (1) PANI - Sférické častice s tendenciou k nepravidelnej agregácii, povrch s nízkou štruktúrnou usporiadanosťou. Typická globulárna morfológia, ktorá zodpovedá polymerizácii bez aditív ovplyvňujúcich orientáciu reťazcov.
- (2) PANI+AB25 – Dominujú nanotubulárne útvary, ktoré naznačujú templátový efekt AB25 a dokazujú, že toto farbivo v kombinácii s PANI podporuje rast do vláknitých štruktúr.
- (3) PANI+MO - Vzorka PANI pripravená v prítomnosti MO vykazuje prevažne agregovanú morfológiu z guľovitých častíc. Na niektorých miestach je však možné vidieť aj predĺžené štruktúry, ktoré trochu pripomínajú tyčinky. Tie by mohli naznačovať, že farbivo MO do určitej miery ovplyvnilo rast polyméru a podporilo vznik čiastočne usporiadaných útvarov. Napriek tomu tieto štruktúry netvoria súvislú vláknitú sieť.
- (4) PANI+AB129 - Zreteľný agregát s členitým povrchom, pozorovaný pri nižšom zväčšení. Štruktúra je neusporiadaná, hrubozrnná, bez známk vláknitého rastu. AB129 tu pravdepodobne pôsobil len ako dopant, nie ako šablóna a neusmerňoval rast PANI do určitých tvarov.

Pozorované výsledky ukazujú, že morfológia práškoveho PANI je silne ovplyvnená prítomnosťou aniónových farbív. Zatiaľ čo AB25 podporuje vznik vláknitých štruktúr, ostatné dopanty (MO, AB129) tento templátový efekt nevykázali. Čistý PANI bez dopanta vytvára typickú globulárnu štruktúru bez usmerneneho rastu.

Ďalej boli rovnakým spôsobom analyzované aj práškové vzorky PPy (obr. 23), aby sa zistilo, či sa obdobné vplyvy dopantov prejavajú aj pri tomto type vodivého polyméru.



Obrázok 23: SEM snímky PPy práškov
1 – PPy, 2 – PPy+AB25, 3 – PPy+MO, 4 – PPy+AB129

Všetky SEM snímky boli získané pri rovnakom priblížení 50 000×, čo umožňuje priame porovnanie jednotlivých vzoriek. Zreteľne je viditeľné, že použité farbivá ovplyvnili výslednú nanoštruktúru práškoveho PPy – zatiaľ, čo niektoré vzorky vykazujú vlákňitú alebo rúrkovitú štruktúru, iné sú tvorené guľovitými alebo kompaktnými agregátmi.

- (1) PPy - Typická globulárna morfológia s kompaktnými, sférickými časticami. Neprítomnosť akéhokoľvek templátového pôsobenia viedla k nerovnomernému rastu reťazcov, ktoré sa zhľukujú do zrazeniny bez orientácie. Táto morfológia je štandardná pre chemickú oxidáciu PPy bez aniónových šablón.⁵⁴
- (2) PPy+AB25 - Vlákňitá štruktúra tvorená tenšími a dlhšími vláknami než pri MO. Vlákná sú spletené a vytvárajú sieťovitý charakter, čo poukazuje na templátový efekt AB25.
- (3) PPy+MO - Tieto tyčinkovité štruktúry sú výrazne hrubšie a pevnejšie než pri AB25. MO tu jednoznačne pôsobil ako templát, ktorý naviedol polymerizáciu pyrrolu do orientovaných štruktúr.

- (4) PPy+AB129 – Vzorka má kompaktný a celistvý vzhľad, povrch pôsobí hladko a bez výrazných detailov. Nevidno žiadne vlákna ani poréznu štruktúru. Je pravdepodobné, že farbivo AB129 ovplyvnilo len chemické vlastnosti polyméru ako dopant, ale neovplyvnilo spôsob, akým sa polymér pri tvorbe usporiadal. Dôvodom kompaktného vzhľadu vzorky môže byť to, že polymerizácia mohla prebiehať príliš rýchlo a bez usmernenia, takže polymér sa zrážal do väčších zhlukov.

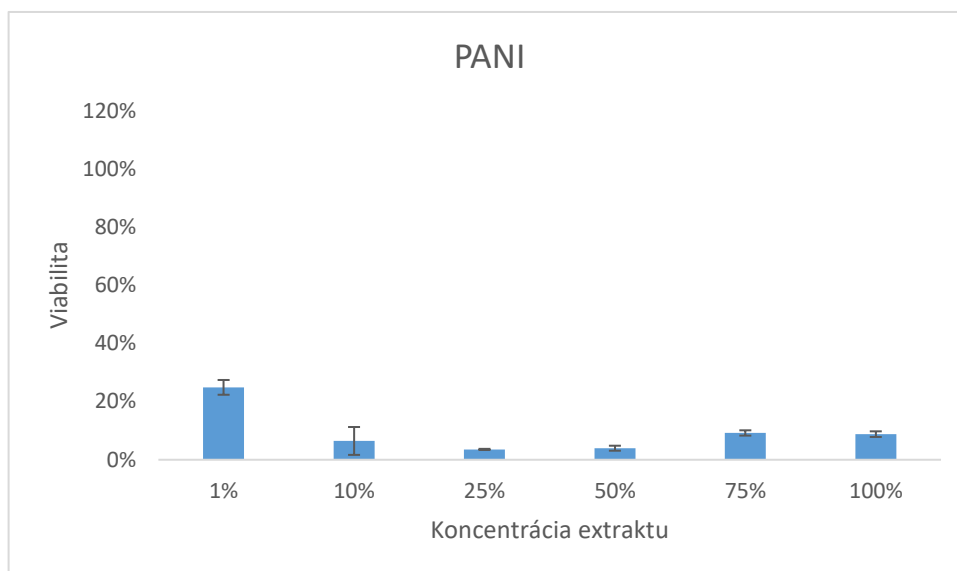
SEM snímky ukázali, že prítomnosť aniónových farbív počas chemickej oxidácie ovplyvňuje výslednú morfológiu vodivých polymérov. Výrazné rozdiely boli pozorované medzi jednotlivými vzorkami, aj v závislosti od toho, či išlo o film alebo práškovú formu. Kým práškové vzorky pripravené s acid blue 25 vykazovali vlákňitú až nanotubulárnu morfológiu, pri filmoch sa takýto templátový efekt výraznejšie neuplatnil. Zaujímavý fakt je i to, že pri polymerizácii práškov za prítomnosti metyloranže vznikali pri PANI predovšetkým globulárne štruktúry, zatiaľ čo pri PPy bola štruktúra jednoznačne vlákňitá. Naopak, vzorky s acid blue 129 a bez farbiva mali skôr kompaktnú alebo globulárnu štruktúru. Tieto rozdiely v štruktúre môžu mať vplyv aj na vlastnosti materiálov ako je možná interakcia s bunkami, čo predstavuje dobrý základ pre ďalší výskum.

9.3 Cytotoxicita práškových foriem

V oblasti vývoja materiálov pre biomedicínske účely predstavuje testovanie cytotoxicity základnú a nevyhnutnú charakteristiku. Cytotoxicita hodnotí potenciál materiálu spôsobiť poškodenie, zmeny v bunkových funkciách alebo dokonca smrť buniek pri priamom či nepriamom kontakte. Toto testovanie je kľúčové pre zaistenie biokompatibility, teda schopnosti materiálu vykonávať svoju zamýšľanú funkciu v biologickom prostredí bez vyvolania nežiaducich lokálnych alebo systémových reakcií. Získané výsledky poskytujú prvotný a zásadný indikátor bezpečnosti materiálu a sú nevyhnutné pre splnenie regulačných požiadaviek pred akýmkoľvek ďalším vývojom či potenciálnym klinickým použitím. Ignorovanie hodnotenia cytotoxicity by mohlo viesť k použitiu materiálov, ktoré by mohli poškodiť tkanivá, vyvolať zápalové reakcie alebo ohroziť celkovú funkciu medicínskeho prostriedku či implantátu. Preto je dôkladné posúdenie cytotoxicity integrálnou súčasťou procesu vývoja a charakterizácie nových biomateriálov a preto bola cytotoxicita preskúmaná i v rámci tejto diplomovej práce.

Cytotoxicita extraktov pripravených z práškových vzoriek bola hodnotená pomocou MTT testu. Tento test je založený na meraní metabolickej aktivity buniek, pričom nižšia

absorbancia MTT produktu (formazánu) môže naznačovať prítomnosť cytotoxických látok v testovanom extrakte. Výsledky sú vyjadrené ako percentuálna životaschopnosť buniek v porovnaní s kontrolou, ktorá sa nastavila ako 100% bunková viabilita. Na grafe 1 je znázornená závislosť cytotoxicity extraktov PANI v rôznych koncentráciách.

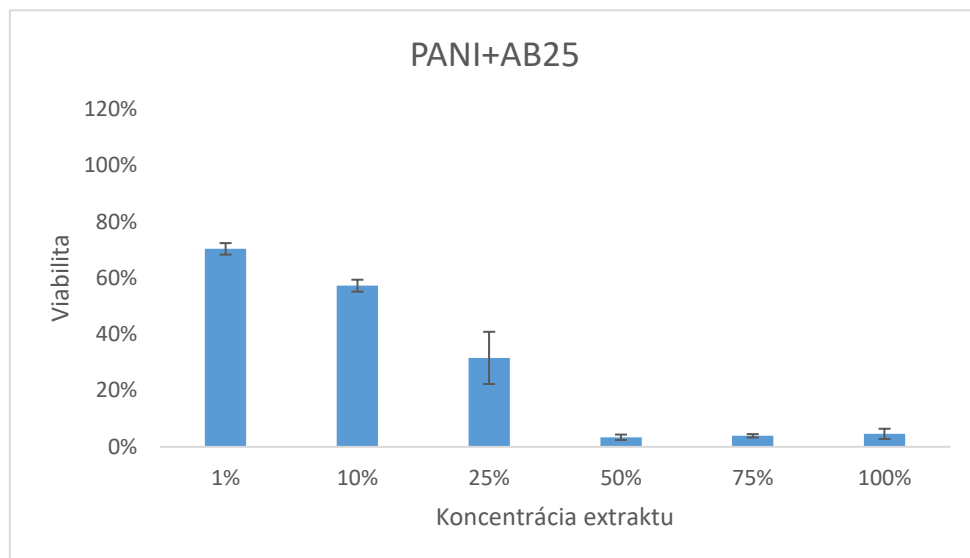


Graf 1: Percentuálna životaschopnosť buniek po 24-hodinovej expozícii extraktu PANI.

Zo získaných výsledkov vyplýva, že extrakty pripravené z čistého PANI mali veľmi nízku životaschopnosť buniek vo všetkých testovaných koncentráciách. Najnižšia cytotoxicita bola pozorovaná pri 1 % koncentrácii, kde životaschopnosť dosiahla približne 25 %. Avšak aj táto viabilita predstavuje vysoký cytotoxický účinok. Pri všetkých vyšších koncentráciách bola viabilita výrazne znížená a pohybovala sa pod hranicou 10 %, čo podľa normy ISO 10993-5 zodpovedá výraznej cytotoxicite.

Táto toxicita môže súvisieť s prítomnosťou zvyškov reaktantov po syntéze (napr. dopanty, oxidanty alebo oligoméry), ktoré sa z PANI uvoľnili do extraktu. Mierne zvýšenie životaschopnosti buniek pri vyšších koncentráciách extraktu je pravdepodobne spôsobené prirodzenou variabilitou biologického testu a nepredstavuje významný biologický trend.

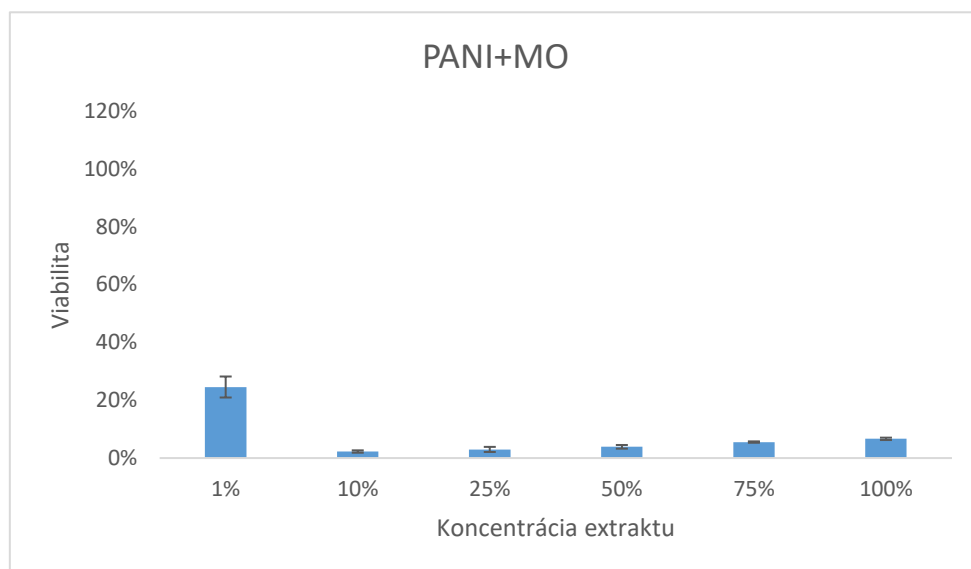
V grafe 2 sú znázornené výsledky merania cytotoxicity extraktu prášku PANI+AB25 pri rôznych koncentráciách.



Graf 2: Životaschopnosť buniek po 24-hodinovej expozícii extraktu PANI+AB25 v rôznych koncentráciách; chybové úsečky znázorňujú smerodajnú odchýlku

Extrakt pripravený z PANI syntetizovaného za prítomnosti AB25 vykazovali výrazne nižšiu cytotoxicitu pri nižších koncentráciách (1 % a 10 %), kde životaschopnosť buniek zostala nad 50 %. Pri 1% extrakte dosahovala bunková viabilita viac ako 70%. Takáto viabilita sa podľa ISO normy 10993-5 považuje za necytotoxickú. Pri vyšších koncentráciách (nad 50%) však viabilita prudko klesla pod 10 %, čo poukazuje na výrazný toxický účinok vo vyššom dávkovaní. Tento vývoj môže súvisieť s typom použitého farbiva a spôsobom jeho uvoľňovania do média – pri vyššej koncentrácii extraktu sa mohlo uvoľniť väčšie množstvo látok ovplyvňujúcich metabolizmus buniek. Celkovo je možné zhodnotiť, že polymerizácia PANI za prítomnosti AB25 znížila cytotoxicitu oproti čistému PANI.

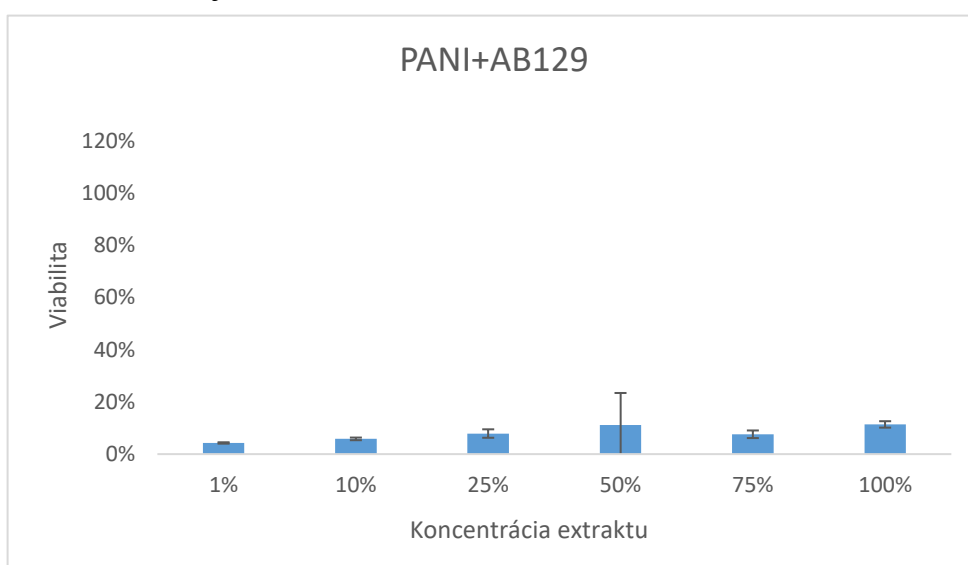
Graf č. 3 zobrazuje výsledky namerané pri MTT teste s využitím extraktu PANI+MO. Chybové úsečky znázorňujú smerodajnú odchýlku.



Graf 3: Životaschopnosť buniek po 24-hodinovej expozícii extraktu PANI+MO v rôznych koncentráciách

V prípade PANI polymerizovaného s MO bola životaschopnosť buniek nízka už pri najnižšej testovanej koncentrácii (1 %) a vo vyšších koncentráciách klesla pod 5 %. Tieto výsledky poukazujú na výraznú cytotoxicitu extraktu, ktorá môže súvisieť buď s chemickým zložením samotného farbiva, alebo s jeho rozkladnými produktmi. Na rozdiel od AB25 sa tu nepozoroval postupný pokles viability – toxický účinok sa prejavil už pri minimálnom dávkovaní. Tento efekt nie je prekvapivý, keďže je preukázané, že MO má vysoko toxický efekt a pôsobí i karcinogénne, mutagénne, či teratogénne. K zníženiu cytotoxicity by mohlo dopomôcť zaradenie dôslednejšieho premývania výsledného produktu do postupu prípravy.

Graf č.4 zobrazuje závislosť koncentrácie extraktu PANI+AB129 na viabilite buniek.

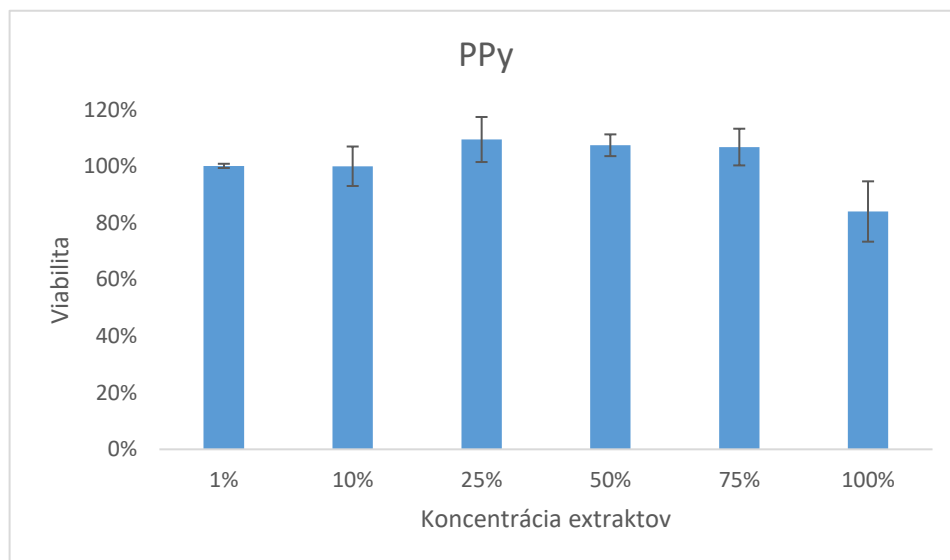


Graf 4: Životaschopnosť buniek po 24-hodinovej expozícii extraktu PANI+AB129 v rôznych koncentráciách

Extrakt z PANI dopovaného AB129 vykazovali vo všetkých koncentráciách nízku životaschopnosť buniek – pohybujúcu sa okolo 5–10 %. Cytotoxická bola výrazná a pomerne konzistentná naprieč koncentraciami, bez výrazného poklesu alebo nárastu. To naznačuje, že látky zodpovedné za toxický účinok sa uvoľňovali do extraktu už v malých množstvách a ich účinok nezávisel priamo od koncentrácie extraktu.

Pri príprave extraktov sa zohľadňovala rôzna schopnosť jednotlivých práškov absorbovať kultivačné médium, preto sa niektoré vzorky museli extrahovať v nižšom pomere (g/ml), aby bolo možné získať dostatočný objem extraktu na testovanie. Spomedzi všetkých testovaných vzoriek vykazoval PANI+MO najvyššiu cytotoxicitu, s veľmi nízkou životaschopnosťou buniek už pri 1 % koncentrácii. Tento silný toxický účinok sa prejavil aj napriek tomu, že extrakt bol pripravený s polovičným extrakčným pomerom (0,1 g/ml), čo naznačuje prítomnosť biologicky aktívnych látok s výrazným účinkom. Čistý PANI (0,2 g/ml) a PANI+AB129 (0,1 g/ml) tiež vykazovali výraznú cytotoxicitu, no ich hodnoty viability boli mierne vyššie a rozdiely medzi koncentraciami menej výrazné. PANI+AB25 bol jediný prípad, kde životaschopnosť buniek pri nižších koncentráciách (1 % a 10 %) presahovala 50 %. Tento extrakt bol pritom pripravený s najnižším extrakčným pomerom (0,05 g/ml), čo mohlo prispieť k celkovo nižšej cytotoxicite. Na základe realizovaného testovania sa dá skonštatovať, že všetky pripravené PANI vzorky vo forme práškov dosahovali veľmi vysoký cytotoxický účinok voči použitej bunkovej línii myších fibroblastov. Tento výsledok naznačuje, že z pripravených materiálov sa uvoľňujú látky, ktoré majú negatívny vplyv na životaschopnosť buniek. Tieto látky môžu byť reziduálny monomér (anilínu), oxidačné činidlo (napríklad persulfátu amónneho), nízkomolekulárne oligoméry polyanilínu, prípadne nenaviazané alebo len slabo viazané molekuly použitých farbív, ktoré sa uvoľňujú do extrakčného média. Pre zaistenie biokompatibility testovaných polyanilínových práškov a umožnenie ich potenciálneho využitia v biomedicíne je preto nevyhnutné zamerať sa na odstránenie týchto nežiaducich rozpustných zložiek. Premývanie vhodným rozpúšťadlom (napríklad destilovanou vodou, etanolom alebo ich zmesou, v závislosti od rozpustnosti predpokladaných toxických rezíduí) by malo viesť k efektívnemu odstráneniu väčšiny nízkomolekulárnych a nenaviazaných toxických látok. Optimalizácia procesu premývania (typ rozpúšťadla, objem, počet cyklov) by mala byť predmetom ďalšieho výskumu s cieľom dosiahnuť minimálnu možnú cytotoxicitu extraktov, ktorá by spĺňala požiadavky príslušnej normy pre biologické hodnotenie medicínskych pomôcok.

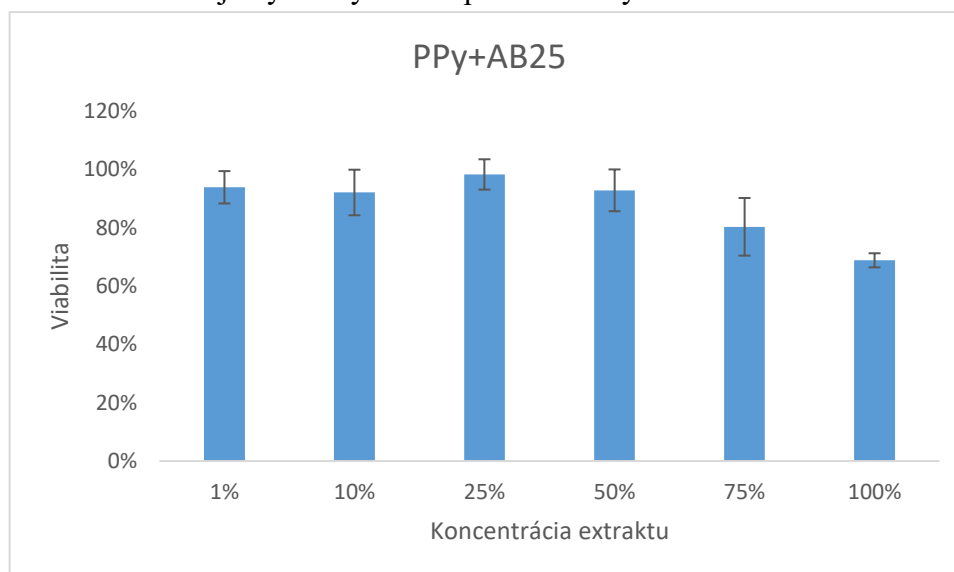
Rovnakým spôsobom ako pri PANI vzorkách boli spracované výsledky merania cytotoxicity čistého PPy a PPy s farbivami. Na grafe č. 5 sú zobrazené výsledky MTT testu s využitím extraktu PPy.



Graf 5: Životaschopnosť buniek po 24-hodinovej expozícii extraktu PPy v rôznych koncentráciách

Extrakty pripravené z čistého PPy nevykazovali žiadny cytotoxický účinok – životaschopnosť buniek zostala vysoká vo všetkých koncentráciách, vo väčšine dokonca nad 100 %. To poukazuje na veľmi dobrú biokompatibilitu materiálu, pričom žiadna koncentrácia nespôsobila pokles viability pod hranicu cytotoxicity.

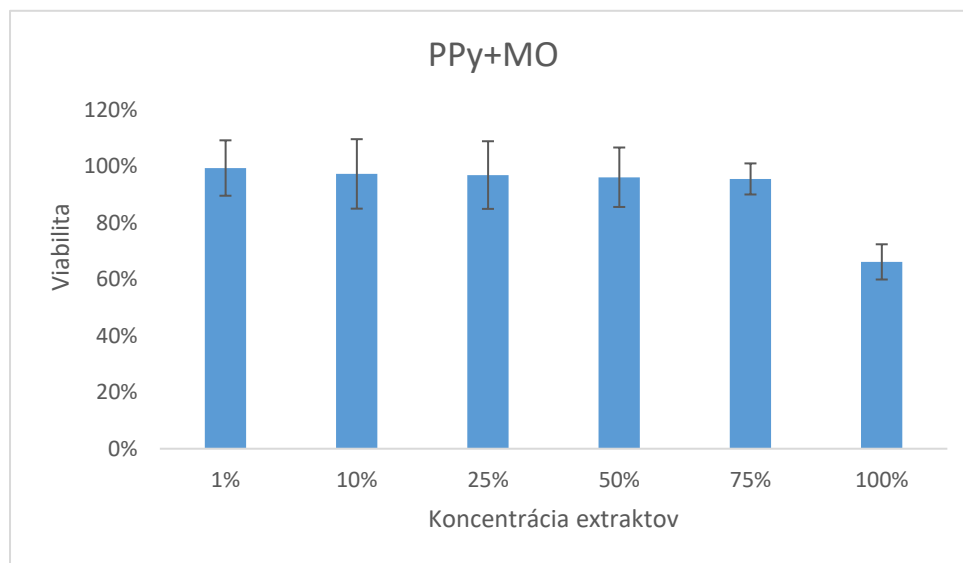
Graf č. 6 zobrazuje výsledky testu s použitím PPy+AB25.



Graf 6: Životaschopnosť buniek po 24-hodinovej expozícii extraktu PPy+AB25 v rôznych koncentráciách

Životaschopnosť buniek po expozícii extraktom PPy+AB25 zostala vo väčšine koncentrácií vysoká, pričom hodnoty nad 90 % boli zaznamenané do koncentrácie 50 %. Pri vyšších koncentráciách (75 % a 100 %) bol pozorovaný mierny pokles viability, no stále nad úroveň cytotoxicity. Výsledky naznačujú, že AB25 v kombinácii s PPy nevykazuje výrazný toxický účinok, a materiál možno považovať za cytokompatibilný.

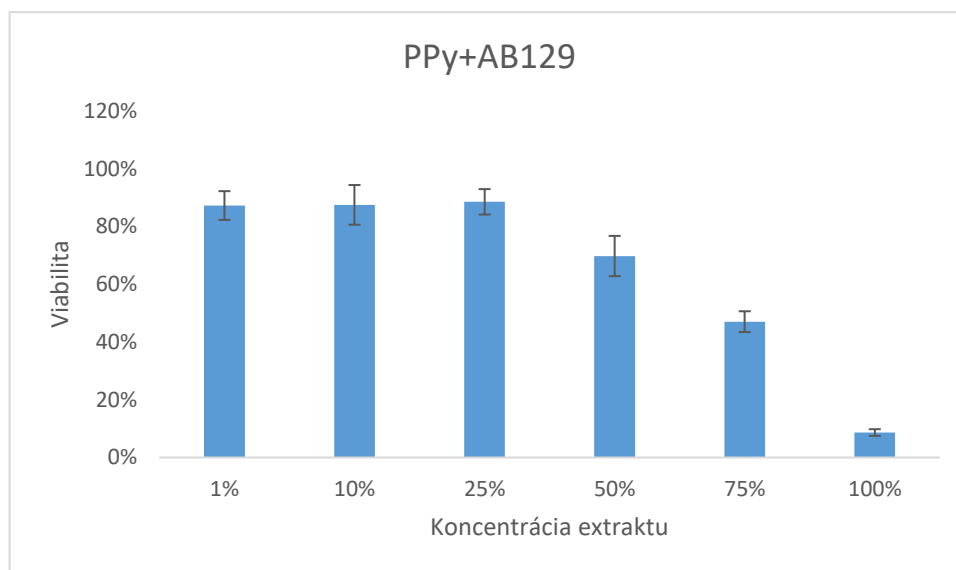
Graf č. 7 zobrazuje životaschopnosť buniek po expozícii extraktu PPy dopovaného MO.



Graf 7: Cytotoxicita extraktov vzorky PPy+MO pri rôznych koncentráciách

Viabilita buniek po expozícii extraktom PPy+MO zostala vysoká vo všetkých koncentráciách okrem 100 %, kde bol pozorovaný výraznejší pokles na približne 65 %. To naznačuje, že pri plnej koncentrácii extraktu môže dôjsť k uvoľneniu väčšieho množstva škodlivých látok ovplyvňujúcich metabolickú aktivitu buniek.

Graf č. 8 ukazuje výsledky získané s využitím PPy+AB129.



Graf 8: Životaschopnosť buniek po 24-hodinovej expozícii extraktom PPy dopovaného farbivom AB129 v rôznych koncentráciách

Pri nízkych koncentráciách (1–25 %) si extrakty z PPy+AB129 zachovali vysokú životaschopnosť buniek. Od koncentrácie 50 % však dochádza k postupnému poklesu viability, pričom 100 % extrakt vykazuje výraznú cytotoxicitu. Napriek tomu je 50% extrakt stále na hranici cytotoxicity. Tento trend naznačuje, že pri vyšších dávkach sa z materiálu môžu uvoľňovať zložky, ktoré majú negatívny vplyv na bunky, hoci v nižších koncentráciách bol materiál dobre tolerovaný.

Pri príprave extraktov sa rovnako ako v prípade PANI zohľadňovala rôzna schopnosť jednotlivých práškov absorbovať kultivačné médium, preto boli vzorky extrahované v rôznych pomeroch (g/ml).

Čistý PPy a PPy+MO boli extrahované pri najnižšom pomere (0,02 g/ml), čo sa prejavilo aj na najvyššej životaschopnosti buniek naprieč všetkými koncentraciami. Vysoká viabilita bola v tomto prípade očakávaná vzhľadom na nízky obsah extrahovaných látok. PPy+AB25 bol extrahovaný pri vyššom pomere (0,067 g/ml) a pri vyšších koncentráciách (75 % a 100 %) bol pozorovaný pokles viability pod 80 %, čo môže súvisieť s vyšším množstvom uvoľnených látok. Najvyšší extrakčný pomer a to presne podľa ISO normy (0,2 g/ml) mal PPy+AB129, pričom pri 100 % koncentrácii extraktu bola zaznamenaná výrazná cytotoxicita (viabilita ~10%). Avšak pri tejto vzorke dochádzalo k strate cytotoxicity pri koncentrácii pod 50%.

Tieto výsledky poukazujú na to, že cytotoxicita závisí nielen od zloženia polyméru a použitého farbiva, ale samozrejme aj od extrakčného pomeru, ktorý ovplyvňuje koncentráciu potenciálne škodlivých zložiek v extrakte.

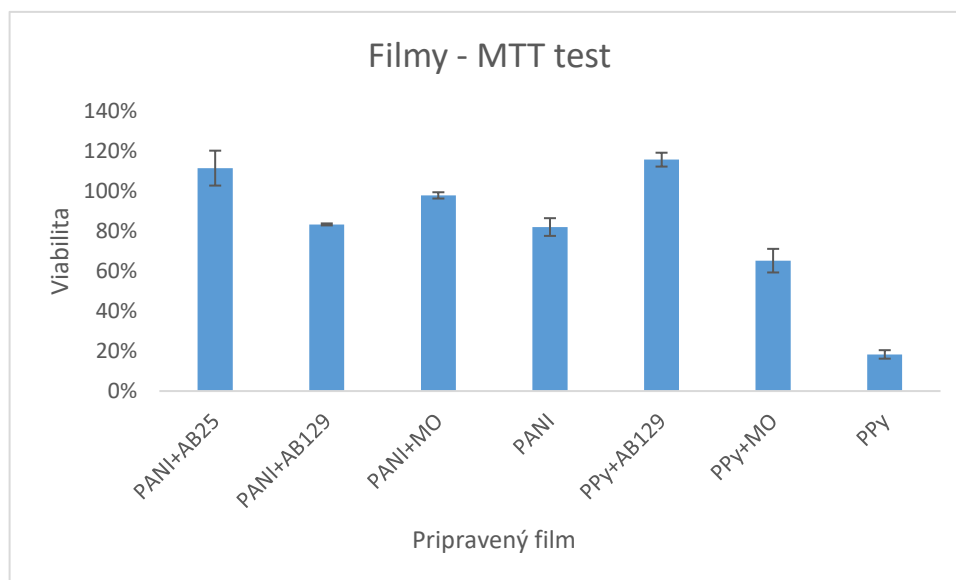
Výsledky MTT testu ukázali výrazný rozdiel v cytotoxickom správaní medzi vzorkami polyanilínu (PANI) a polypyrrolu (PPy). Všetky PANI vzorky, vrátane dopovaných, vykazovali zníženú životaschopnosť buniek už pri nízkych koncentráciách extraktov, pričom viabilita často klesala pod 10 %. Najvyššiu cytotoxicitu mala vzorka PANI+MO, zatiaľ čo PANI+AB25 si udržala čiastočne vyššiu viabilitu pri nižších koncentráciách. Výsledky zároveň ukázali, že aj malé rozdiely v extrakčnom pomere (napr. 0,05 g/ml vs. 0,2 g/ml) môžu ovplyvniť nameranú cytotoxicitu. Naopak, PPy vzorky boli ako celok oveľa cytokompatibilnejšie. Väčšina vzoriek dosahovala životaschopnosť nad 80 % naprieč koncentraciami. Čistý PPy a PPy+MO, pripravené pri najnižšom extrakčnom pomere (0,02 g/ml), nevykazovali prakticky žiadny cytotoxický účinok. Výraznejší pokles viability sa objavil iba pri PPy+AB129 a to až pri 100 % koncentrácii, čo koreluje s jeho najvyšším extrakčným pomerom (0,2 g/ml). Tu je však nutné poznamenať, že kvôli rôznym extrakčným pomerom, nie je jednoduché jednotlivé vzorky medzi sebou zrovnávať. Napriek tomu, ak sa vezme do úvahy extrakčný pomer a výsledky cytotoxicity, je možné jednoznačne usúdiť, že ako najlepšia vzorka v kontexte cytotoxicity sa javila vzorka PPy+AB129.

Na základe pozorovaných výsledkov je možné predpokladať, že cytotoxicitu extraktov, ako už bolo zmienené vyššie, by mohlo znížiť premytie práškov pred prípravou extraktov. Premytie by mohlo odstrániť voľné zvyšky reaktantov alebo vedľajších produktov polymerizácie, ktoré sa podieľajú na toxicite, a tým zlepšiť biokompatibilitu výsledných materiálov.

9.4 Cytotoxicita filmov

Ako bolo spomínané v predošlej kapitole, stanovenie cytotoxicity je základným parametrom hodnotenia materiálov využívaných v biomedicínskych aplikáciách. Preto bola cytotoxicita testovaná aj na filmoch pripravených chemickou oxidáciou. Cieľom bolo zistiť, či odlišná forma vzoriek a ich morfológia ovplyvňujú metabolickú aktivitu buniek pri priamom kontakte s materiálom. Bunky boli inkubované na povrchu jednotlivých filmov počas 48 hodín a výsledky sú vyjadrené ako percentuálna životaschopnosť buniek v porovnaní s kontrolou.

Na grafe č. 9 sú zobrazené výsledky testov na pripravených filmoch. Test nebol prevedený na filme PPy+AB25 z rovnakého dôvodu ako pri SEM snímkach – po vizuálnej kontrole bolo vyhodnotené, že sa na povrchu Petriho misky žiaden film nevytvoril.



Graf 9: Životaschopnosť buniek po 48-hodinovej inkubácii na povrchu jednotlivých filmov

Výsledky ukazujú rozdiely v cytotoxicite jednotlivých filmov. Najvyššiu životaschopnosť (>100 %) vykazovali filmy PANI+AB25 a PPy+AB129, čo naznačuje veľmi dobrú biokompatibilitu týchto vzoriek. Pri prepojení výsledkov s morfológiou pozorovanou pomocou SEM snímok sa ukazuje, že filmy s homogénnejším a rovnomernejším povrchom (ako PANI+AB25 alebo PANI+MO) boli lepšie tolerované bunkami. Naopak, filmy s hrubšou alebo menej súvislou štruktúrou (napr. PPy) vykazovali nižšiu životaschopnosť, čo môže byť spôsobené horšou adherenciou buniek alebo prítomnosťou zvyškov toxických látok. Celkovo sa teda zdá, že kompaktnější a hladšia povrchová morfológia mohla prispieť k lepšej cytotoxicite filmov, avšak výsledky naznačujú, že chemické zloženie materiálu malo pravdepodobne ešte významnejší vplyv než samotná štruktúra povrchu. Celkovo možno zhrnúť, že polyanilinové filmy a polypyrrolový film s AB129 boli necytotoxické. Film PPy+MO bol tesne pod hranicou cytotoxicity, t.j. bunková viabilita na filme dosahovala 65%. A jediný film, ktorý neumožňoval bunkový rast bol film z čistého polypyrrolu.

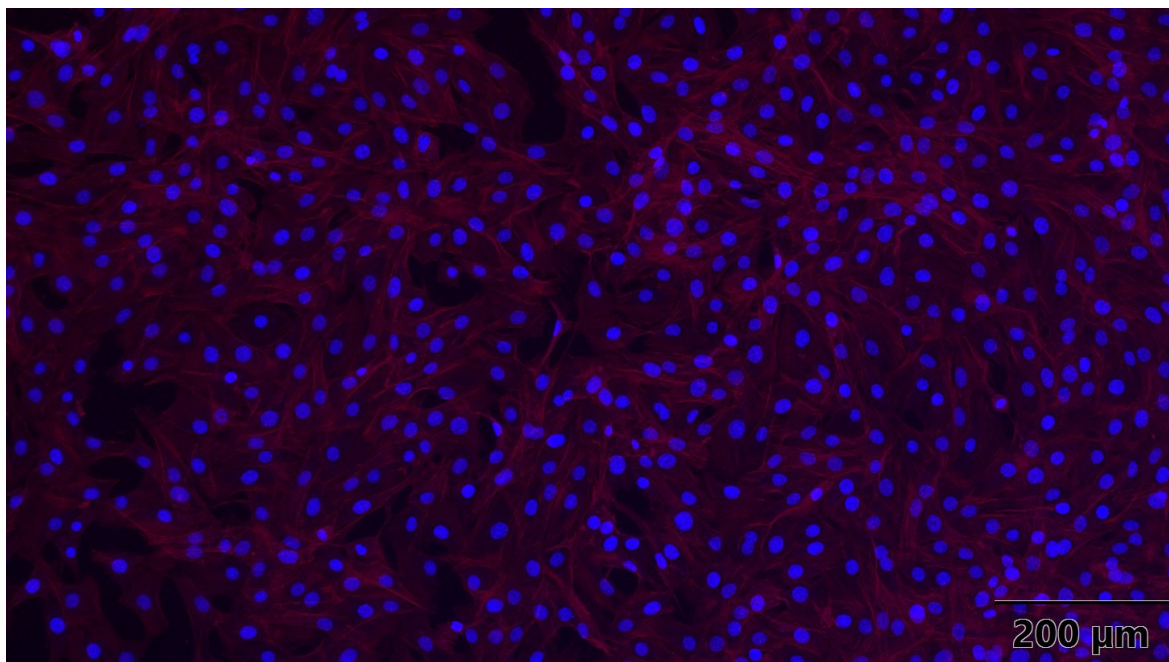
Výsledky testovania cytotoxicity pre filmové vzorky sa výrazne líšia v porovnaní s výsledkami získanými pre práškové formy. Táto odlišnosť pramení z fundamentálne rozdielných fyzikálno-chemických vlastností materiálu vo forme prášku a filmu, predovšetkým z hľadiska povrchovej plochy, morfológie a potenciálu uvoľňovania rozpustných zložiek. Kľúčový rozdiel spočíva aj v samotných metódach stanovenia cytotoxicity. Zatiaľ čo pri práškových vzorkách bolo primárne sledované uvoľňovanie cytotoxických látok do extrakčného média, testovanie cytotoxicity filmov sa vykonávalo

metódou priameho kontaktu, hodnotením rastu a adhézie buniek priamo na ich povrchu. V druhom prípade (pri filmoch) totiž biokompatibilita nezávisí len od prítomnosti uvoľniteľných toxických látok, ale zásadnú úlohu hrajú aj vhodné fyzikálno-chemické vlastnosti povrchu, ktoré musia umožniť efektívnu adhéziu, proliferáciu a celkovú vitalitu buniek. Tieto rozdiely v metodike a forme materiálu je preto nevyhnutné zohľadniť pri komplexnom hodnotení ich potenciálu pre biomedicínske aplikácie.

9.5 Bunkový rast na filmoch

Aj keď testovanie cytotoxicity extraktov poskytuje základné informácie o potenciálnom uvoľňovaní toxických látok z materiálu, a kvantitatívne stanovenie bunkovej proliferácie indikuje jeho schopnosť podporovať rast buniek, pre komplexné zhodnotenie biokompatibility povrchov, akými sú polymérne filmy, je nevyhnutné doplniť tieto analýzy o vizuálne hodnotenie. Mikroskopické sledovanie a farbenie kľúčových bunkových štruktúr umožňuje detailne posúdiť interakciu buniek priamo s povrchom filmu. Na rozdiel od kvantitatívnych metód, vizuálna analýza poskytuje kritické informácie o tom, či bunky na materiáli nielen prežívajú a množia sa, ale či aj správne adherujú, rozprestierajú sa (tzv. cell spreading) a udržiavajú si zdravú, fyziologickú morfológiu, čo sú zásadné predpoklady pre úspešnú integráciu materiálu v živom systéme. Preto bol na doplnenie kvantitatívnych výsledkov cytotoxicity následne realizovaný test bunkovej proliferácie pomocou fluorescenčného farbenia, ktorý umožnil vizuálne zhodnotiť morfológiu, stav a rozloženie buniek na povrchu filmov. Na vizualizáciu buniek bol použitý marker Hoechst, ktorý sa viaže na DNA a umožňuje zobrazenie jadier všetkých buniek modrou fluorescenciou. Na zobrazenie cytoskeletu bol aplikovaný marker ActinRed, ktorý špecificky farbí filamenty aktínu, čím poskytuje informáciu o morfológii, rozložení a príľnavosti buniek na testovanom povrchu.

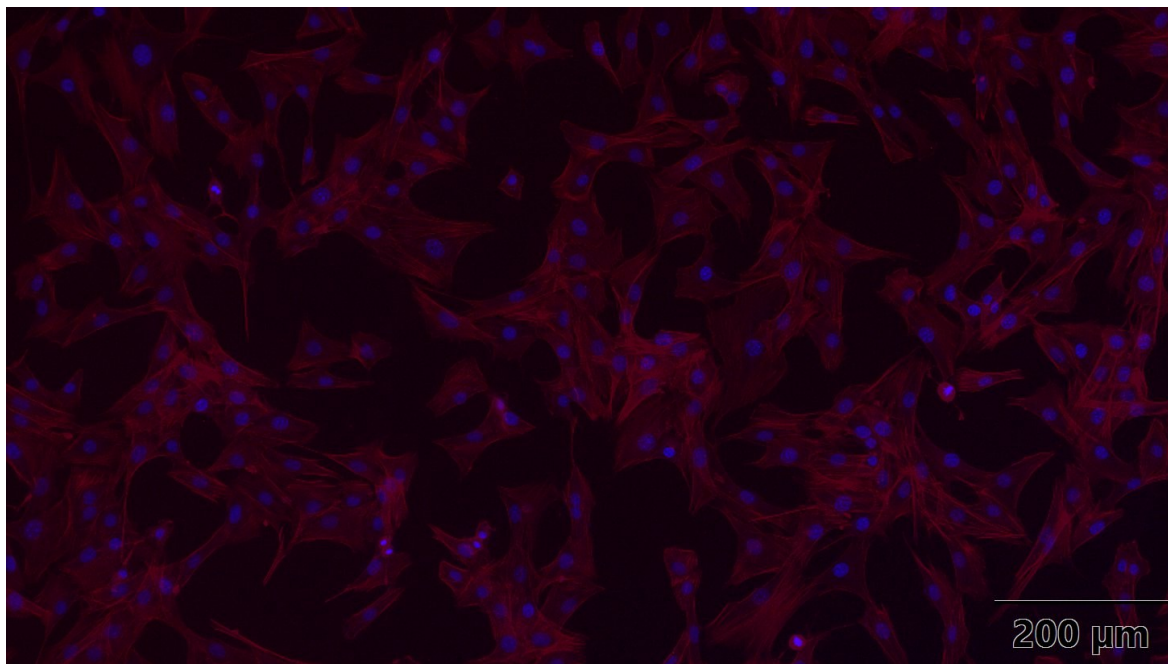
Na obrázku 24 je zobrazená referenčná (bunky kultivované na tkanivovom polystyréne) fotografia zafarbených buniek vyfotených fluorescenčným mikroskopom.



Obrázok 24: Fluorescenčné zobrazenie referenčnej vzorky bunkovej línie

Na povrchu referenčnej vzorky je viditeľné husté pokrytie životaschopnými bunkami s typickou fibroblastovou morfológiou. Bunky sú rovnomerne rozložené, ich jadrá sú intenzívne zafarbené (modrá fluorescencia, Hoechst) a dobre organizovaný aktínový cytoskelet (červená fluorescencia, ActinRed) naznačuje zdravý a funkčný stav buniek.

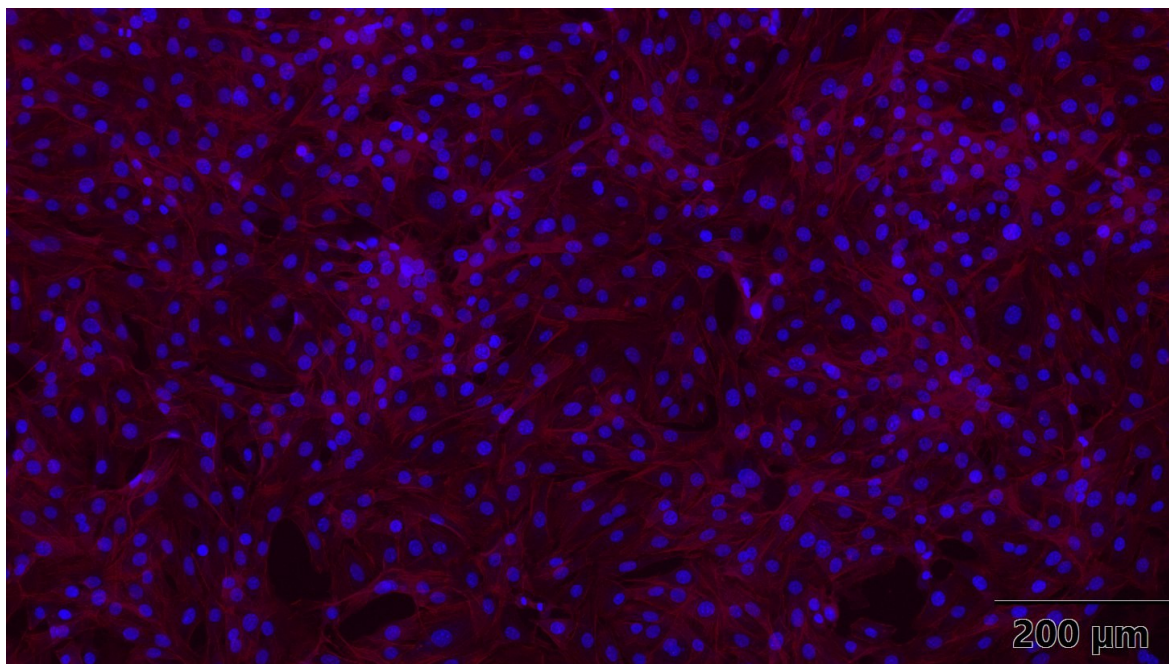
Fluorescenčná snímka na obr. 25 zobrazuje životaschopné bunky na filme PANI.



Obrázok 25: Fluorescenčné zobrazenie bunkovej línie na filme PANI

Na filme PANI je možné pozorovať nižšiu hustotu buniek v porovnaní s referenčnou vzorkou. Bunky majú predĺžený, mierne vretienkovitý tvar a dobre zreteľné aktínové filamenty, čo naznačuje ich adhérenciu na povrch. Rozloženie buniek je nerovnomerné, niektoré oblasti sú hustejšie osídlené, iné redšie. Výsledky fluorescenčného farbenia potvrdzujú, že film PANI umožňuje adhérenciu buniek, avšak v menšej hustote ako referenčný povrch. Avšak nejedná sa o výrazne nižšiu hustotu a tento výsledok korešponduje aj s výsledkami MTT testu, kde bunková viabilita dosahovala 82%. Predĺžená morfológia buniek s dobre organizovaným cytoskeletom však naznačuje, že tie bunky, ktoré prežili, sú schopné normálne sa prichytiť a štrukturálne sa rozvíjať.

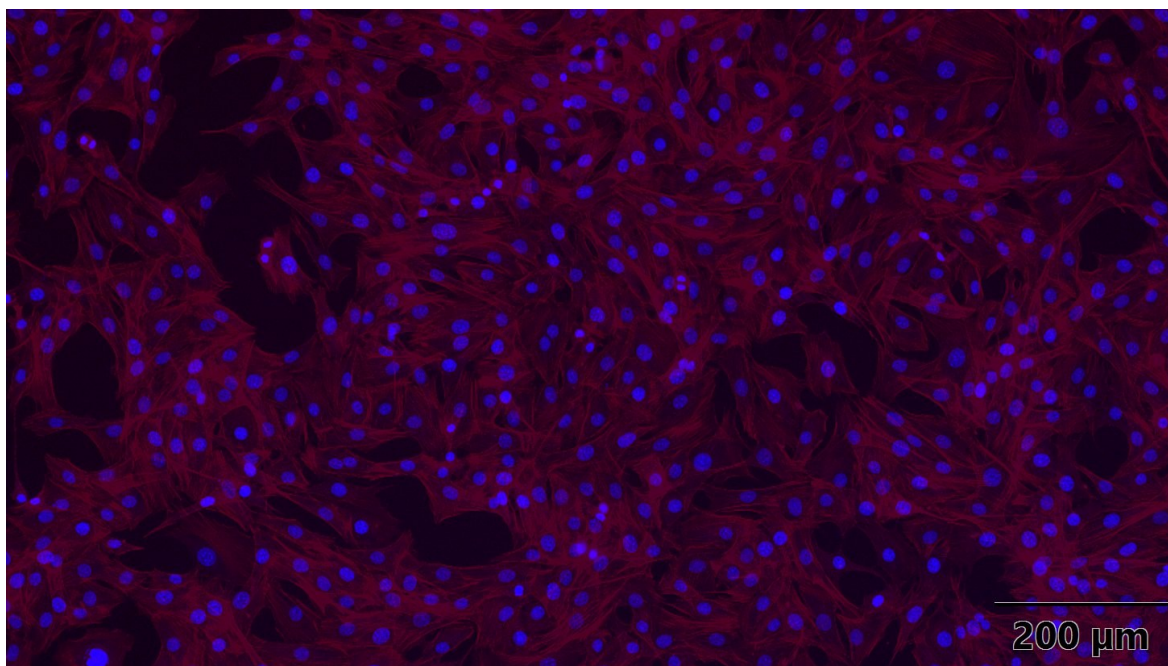
Obrázok 26 dokumentuje stav buniek na filme PANI+AB25 pozorovaný fluorescenčnou mikroskopiou.



Obrázok 26: Fluorescenčné zobrazenie bunkovej línie na filme PANI+AB25

Na filme PANI+AB25 je viditeľná vysoká hustota buniek s rovnomerným rozložením po celom povrchu. Bunky majú dobre definovaný pretiahnutý tvar a výrazne organizovaný cytoskelet. Výsledky farbenia ukazujú, že film PANI+AB25 podporuje vysokú adhérenciu aj životaschopnosť buniek, čo korešponduje s výsledkami MTT testu, kde bunková životaschopnosť dosiahla až 111%. Homogénne pokrytie a pretiahnutá morfológia buniek naznačujú, že povrch filmu bol vhodný pre bunkový rast a nevyvolával cytotoxické účinky. Tento výsledok môže súvisieť s pravidelnou a kompaktnou morfológiou filmu pozorovanou na SEM snímkach.

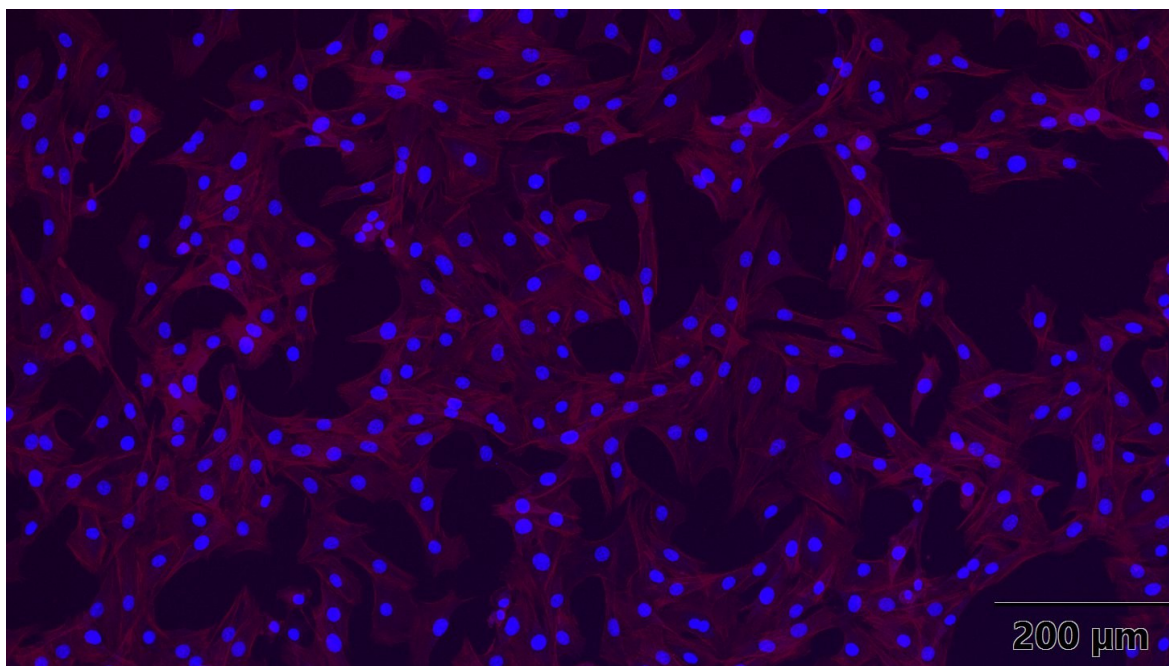
Fluorescenčná snímka na obr. 27 zobrazuje zafarbený cytoskelet a jadrá životaschopných buniek na filme PANI+MO.



Obrázok 27: Fluorescenčné zobrazenie bunkovej línie na filme PANI+MO

Na filme PANI+MO sú pozorované adherentné bunky s pretiahnutou morfológiou, ich hustota je porovnateľná s referenciou. Bunky na filme PANI+MO si zachovali dobrú morfológiu a rovnomerné rozloženie, čo naznačuje, že povrch bol pre bunky relatívne priaznivý. V porovnaní s filmom PANI+AB25 je však o niečo nižšia hustota buniek, čo korešponduje s mierne nižšou (98%) životaschopnosťou detegovanou v MTT teste. Povrchová morfológia tohto polyméru bola podľa SEM snímok relatívne homogénna a obsahovala väčšie agregáty.

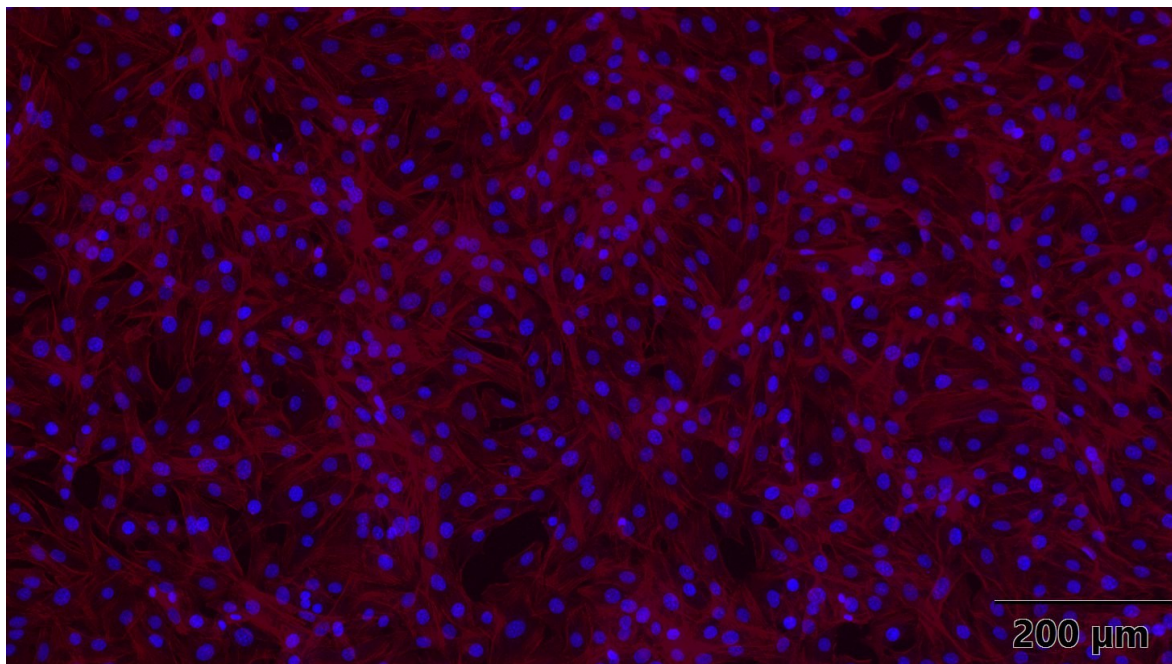
Fluorescenčný snímok na obrázku 28 ukazuje životaschopné bunky na filme PANI+AB129.



Obrázok 28: Fluorescenčné zobrazenie bunkovej línie na filme PANI+AB129

Na filme PANI+AB129 sú pozorované rozptýlené bunky s pretiahnutou morfológiou, pričom miestami sú viditeľné väčšie prázdne oblasti bez buniek. Hustota buniek na filme PANI+AB129 je nižšia v porovnaní s referenciou, čo naznačuje, že tento povrch mal negatívnejší vplyv na bunkovú adhéziu a prežitie. Napriek tomu si bunky, ktoré adherovali, zachovali pretiahnutý tvar. Hustota bunkového rastu na tomto povrchu je porovnateľné s rastom na čistom PANI filme, čo odpovedá i kvantitatívnym výsledkom, kde životaschopnosť na PANI+AB129 dosahovala 83% a na PANI 82%. Výrazné pórovité agregáty pozorované v SEM snímkach mohli spôsobiť nerovnomerné rozloženie buniek a vytváranie prázdnych miest. Nerovný povrch nemusí byť pre všetky bunky priaznivý – niektoré bunky tam nemusia priľnúť dobre alebo odumrieť skôr.

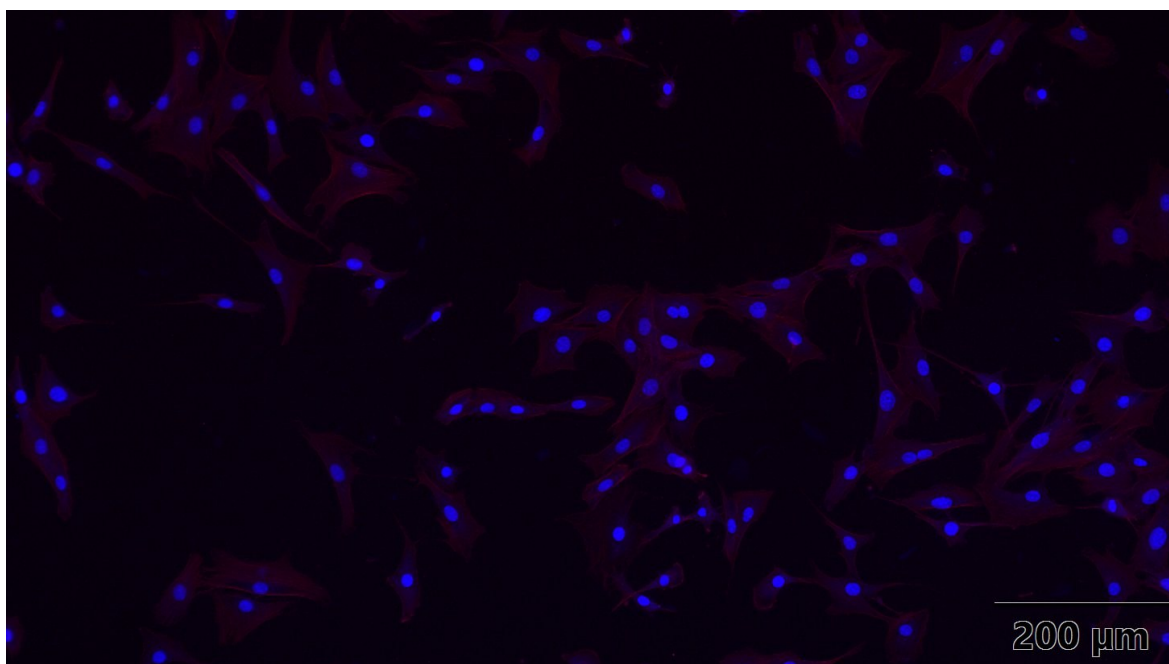
Na obrázku 29 sú zobrazené živé bunky na filme PPy+AB129.



Obrázok 29: Fluorescenčné zobrazenie bunkovej línie na filme PPy+AB129

Na povrchu filmu PPy+AB129 je pozorovateľné veľmi dobré pokrytie buniek, pričom väčšina buniek si zachovala pretiahnutú morfológiu a jasnú štruktúru aktínového cytoskeletu. Počet buniek je vysoký a ich rozloženie je pomerne rovnomerné, čo naznačuje, že film podporoval dobrú adhéziu aj proliferáciu buniek. Tento výsledok je v súlade s výsledkami MTT testu, kde bola zaznamenaná najvyššia životaschopnosť (116%) spomedzi všetkých testovaných polymérnych filmov.

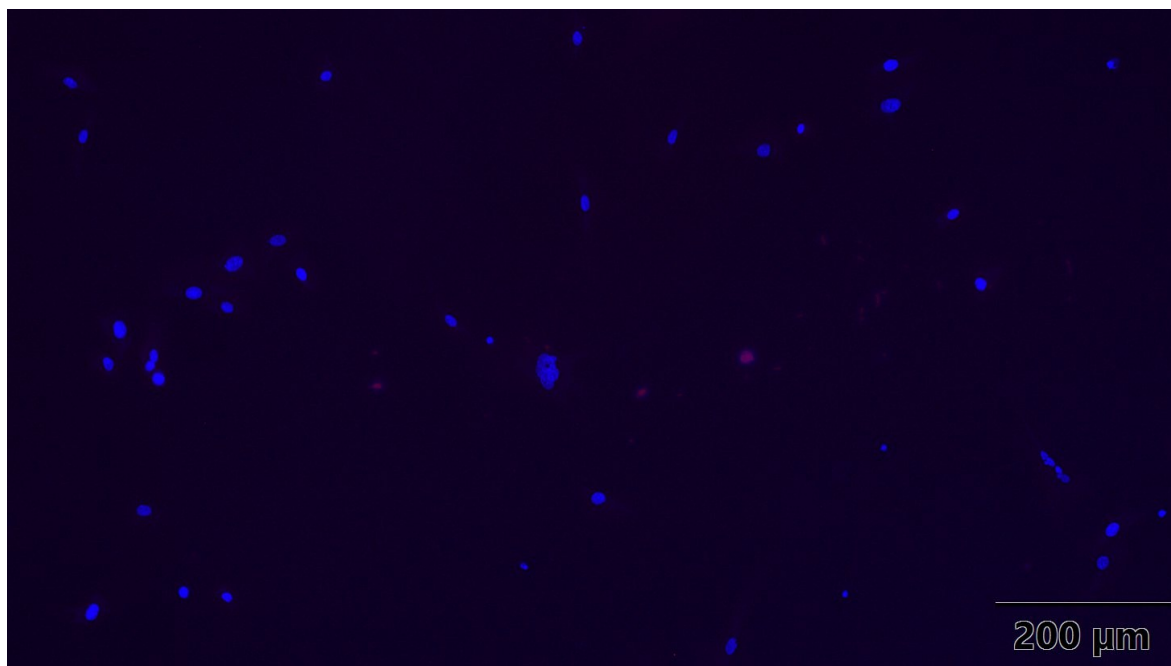
Snímok na obrázku 28 ukazuje životaschopné bunky na filme PPy+MO.



Obrázok 30: Fluorescenčné zobrazenie bunkovej línie na filme PPy+MO

Na obrázku 30 možno pozorovať zníženú hustotu buniek v porovnaní s referenciou, čo naznačuje, že rýchlosť ich proliferácie bola potlačená. Napriek tomu si adherované bunky zachovávajú svoj fyziologický tvar, čo svedčí o tom, že materiál síce mierne brzdí rast, no nie je vysoko toxický. Tento pozorovaný jav korešponduje s výsledkami MTT testu, kde bola viabilita mierne znížená.

Na obrázku 31 môžeme pozorovať fluorescenčné zobrazenie životaschopných buniek na filme z čistého PPy.



Obrázok 31: Fluorescenčné zobrazenie bunkovej línie na filme PPy

Na obrázku je zjavné, že buniek adherovalo veľmi málo a prakticky nie je pozorovateľný žiadny cytoskeletárny signál. Viditeľné sú len ojedinelé jadrá, čo naznačuje, že film z PPy výrazne bránil priľnutiu a rastu buniek. Výsledky potvrdzujú veľmi nízku biokompatibilitu tohto materiálu, čo bolo pozorované aj v MTT teste, kde vykazoval najnižšiu životaschopnosť spomedzi všetkých filmov.

Výsledky fluorescenčného farbenia buniek potvrdili trendy pozorované v MTT teste. Filmy PPy+AB129 a PANI+AB25 vykazovali najlepšiu podporu bunkovej adhézie a proliferácie, čo sa prejavilo hustým pokrytím povrchu a dobre vyvinutým aktínovým cytoskeletom. Filmy PANI a PANI+AB129 vykazovali menej husté osídlenie a miestami narušenú morfológiu buniek, čo korešponduje s ich mierne nižšou viabilitou zistenou v kvantitatívnych testoch. Značne nižšia bunková hustota a nerovnomerné osídlenie bolo zaznamenané na filme PPy+MO. A ako nevhodný povrch sa ukázal čistý PPy, ktorý prakticky neumožňoval bunkový rast. Celkovo sa ukázalo, že všetky povrchy okrem čistého polypyrrolu do vyššej, či nižšej miery umožnili schopnosť buniek adherovať a rásť na polymérnych filmoch.

ZÁVER

Táto diplomová práca bola zameraná na syntézu, charakterizáciu a biologické hodnotenie vodivých polymérov polyanilínu (PANI) a polypyrrolu (PPy) vo forme práškov a filmov, pripravených chemickou oxidáciou s využitím rôznych aniónových farbív a to Metyloranž - MO, Acid Blue 25 - AB25 a Acid Blue 129 - AB129. Cieľom bolo preskúmať vplyv použitého farbiva a formy materiálu na ich štruktúrne vlastnosti a biologickú interakciu s bunkami, čo je kľúčové pre ich potenciálne využitie v oblasti biomedicínskych aplikácií, ako sú napríklad tkanivové inžinierstvo či biosenzory.

V rámci štruktúrnej charakterizácie bola tvorba polymérnych filmov úspešne potvrdená za využitia UV-Vis spektroskopie. Spektrá pripravených filmov zároveň potvrdili vznik vodivej formy PANI (protonovaná emeraldinová soľ) a PPy (oxidovaná forma), čo je kľúčové pre ich funkčnosť v mnohých aplikáciách. Analýza spektier však ukázala, že úspešnosť vytvorenia súvislých filmov a ich hrúbka boli významne ovplyvnené typom pridaného farbiva. Zatiaľ čo PANI filmy sa podarilo spoľahlivo pripraviť so všetkými použitými farbivami, pri PPy vzorke s AB25 sa film nevytvoril vôbec. V prípadoch PANI+AB129 a PPy+AB129 sa vytvorili filmy, avšak boli pozorované ako veľmi tenké.

Následne bola pomocou SEM detailne analyzovaná povrchová morfológia pripravených vzoriek. Bolo preukázané, že použité farbivá výrazne ovplyvnili výslednú povrchovú morfológiu a to ako pri práškových formách, tak aj pri filmoch. Napríklad, zatiaľ čo AB25 silne podporilo vznik vlákнитých/nanotubulárnych štruktúr v práškovej forme oboch polymérov (výraznejšie pri PPy), pri PANI filmoch viedlo skôr k uniformnej globulárnej morfológii a pri PPy filmoch dokonca inhibovalo tvorbu súvislej vrstvy. Podobne, MO podporilo vláknitú štruktúru PPy prášku, ale pri PANI prášku a filmoch sa tento efekt prejavil len čiastočne alebo odlišne. Vzorky s AB129 a bez farbiva mali vo všeobecnosti skôr kompaktnú alebo globulárnu štruktúru. Tieto morfologické odlišnosti sú kľúčové, pretože významne ovplyvňujú fyzikálno-chemické vlastnosti materiálu a jeho interakciu s okolím, vrátane biologického prostredia.

Biologické hodnotenie zahŕňalo testovanie cytotoxicity práškových vzoriek prostredníctvom hodnotenia cytotoxicity ich extraktov a následné hodnotenie bunkovej odpovede v priamom kontakte na polymérnych filmoch, vrátane kvantitatívneho stanovenia cytotoxicity a kvalitatívnej vizuálnej analýzy morfológie buniek (farbením jadier a cytoskeletu). Testovanie extraktov z práškových foriem ukázalo, že všetky pripravené

prášky vykazujú pomerne vysokú mieru cytotoxicity, pravdepodobne v dôsledku prítomnosti reziduálnych reaktantov alebo nízkomolekulárnych oligomérov. Na rozdiel od práškov, testovanie filmových vzoriek priamym kontaktom odhalilo významné rozdiely v cytokompatibilite v závislosti od chemického zloženia a povrchovej morfológie materiálu. Bolo zistené, že filmy PANI+AB25 a PPy+AB129 podporovali najvyššiu životaschopnosť a proliferáciu buniek a bunky na ich povrchu vykazovali dobrú adhéziu a fyziologickú, rozprestretú morfológiu. Naopak, čistý PPy film vykazoval najnižšiu bunkovú viabilitu a proliferáciu, pričom vizuálna analýza potvrdila slabšiu adhéziu buniek na tomto povrchu. Tieto výsledky zdôrazňujú, že biokompatibilita vodivých polymérov pre priamy kontakt s bunkami nezávisí len od absencie uvoľniteľných toxických látok, ale zásadným spôsobom je ovplyvnená aj fyzikálno-chemickými vlastnosťami ich povrchu, vrátane topografie a štruktúry, ktoré regulujú bunkovú adhéziu a správanie.

Výsledky naznačujú, že vhodná povrchová štruktúra, v kombinácii s optimalizovaným chemickým zložením, môže významne ovplyvniť biokompatibilitu vodivých polymérov. Výsledky tiež potvrdzujú, že vhodnou voľbou dopantu a optimalizáciou podmienok polymerizácie je možné významne ovplyvniť štruktúru a biologickú bezpečnosť vodivých polymérov.

Vzhľadom na vysokú cytotoxicitu extraktov práškov je nevyhnutné optimalizovať metódy ich čistenia (napríklad opakovaným premývaním vhodnými rozpúšťadlami), aby sa odstránili reziduálne toxické zložky a zhodnotila sa ich biokompatibilita po purifikácii, ak je prášková forma pre danú aplikáciu relevantná.

Zistenia predloženej diplomovej práce potvrdzujú, že vodivé polyméry, konkrétne polyanilín a polypyrrol, syntetizované za prítomnosti špecifických farbív, majú značný potenciál ako biokompatibilné materiály pre rôznorodé biomedicínske aplikácie, ak sú ich vlastnosti, najmä povrchová morfológia a potenciál uvoľňovania toxických zložiek, starostlivo kontrolované a optimalizované.

ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- (1) Bober, P.; Li, Y.; Acharya, U.; Panthi, Y.; Pflieger, J.; Humpolíček, P.; Trchová, M.; Stejskal, J. Acid Blue Dyes in Polypyrrole Synthesis: The Control of Polymer Morphology at Nanoscale in the Promotion of High Conductivity and the Reduction of Cytotoxicity. *Synth Met* **2018**, *237*, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2018.01.010>.
- (2) Ateh, D. D.; Navsaria, H. A.; Vadgama, P. Polypyrrole-Based Conducting Polymers and Interactions with Biological Tissues. *J R Soc Interface* **2006**, *3* (11), 741–752. <https://doi.org/10.1098/rsif.2006.0141>.
- (3) Das, T. K.; Prusty, S. Review on Conducting Polymers and Their Applications. *Polymer - Plastics Technology and Engineering*. January 2012, pp 1487–1500. <https://doi.org/10.1080/03602559.2012.710697>.
- (4) Rasmussen, S. C. Revisiting the Early History of Synthetic Polymers: Critiques and New Insights. *Ambix* **2018**, *65* (4), 356–372. <https://doi.org/10.1080/00026980.2018.1512775>.
- (5) Ze Zhang; Mahmoud Rouabhia; Simon E. Moulton. *Conductive Polymers: Electrical Interactions in Cell Biology and Medicine*; CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2017.
- (6) Rasmussen, S. C. Conjugated and Conducting Organic Polymers: The First 150 Years. *Chempluschem* **2020**, *85* (7), 1412–1429. <https://doi.org/10.1002/cplu.202000325>.
- (7) Kuznetsova, L. S.; Arlyapov, V. A.; Plekhanova, Y. V.; Tarasov, S. E.; Kharkova, A. S.; Saverina, E. A.; Reshetilov, A. N. Conductive Polymers and Their Nanocomposites: Application Features in Biosensors and Biofuel Cells. *Polymers (Basel)* **2023**, *15* (18), 3783. <https://doi.org/10.3390/polym15183783>.
- (8) N., R.; Madhu; Awasthi, R. Polypyrrole Composites: Electrochemical Synthesis, Characterizations and Applications. In *Electropolymerization*; InTech, 2011. <https://doi.org/10.5772/29083>.
- (9) Le, T.-H.; Kim, Y.; Yoon, H. Electrical and Electrochemical Properties of Conducting Polymers. *Polymers (Basel)* **2017**, *9* (4), 150. <https://doi.org/10.3390/polym9040150>.
- (10) Balint, R.; Cassidy, N. J.; Cartmell, S. H. Conductive Polymers: Towards a Smart Biomaterial for Tissue Engineering. *Acta Biomater* **2014**, *10* (6), 2341–2353. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.015>.
- (11) Guo, B.; Ma, P. X. Conducting Polymers for Tissue Engineering. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (6), 1764–1782. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00276>.
- (12) Sabouraud, G.; Sadki, S.; Brodie, N. The Mechanisms of Pyrrole Electropolymerization. *Chem Soc Rev* **2000**, *29* (5), 283–293. <https://doi.org/10.1039/a807124a>.
- (13) Della Pina, C.; Falletta, E.; Rossi, M. Conductive Materials by Metal Catalyzed Polymerization☆. *Catal Today* **2011**, *160* (1), 11–27. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2010.05.023>.
- (14) Ghosh, R. A Method for Suppressing PH Excursion during Elution in Ion-Exchange Chromatography. *Journal of Chromatography Open* **2024**, *6*, 100179. <https://doi.org/10.1016/j.jcoa.2024.100179>.
- (15) Kausaite-Minkstimiene, A.; Mazeiko, V.; Ramanaviciene, A.; Ramanavicius, A. Evaluation of Chemical Synthesis of Polypyrrole Particles. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* **2015**, *483*, 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.05.008>.

- (16) Machida, S.; Miyata, S.; Techagumpuch, A. Chemical Synthesis of Highly Electrically Conductive Polypyrrole. *Synth Met* **1989**, *31* (3), 311–318. [https://doi.org/10.1016/0379-6779\(89\)90798-4](https://doi.org/10.1016/0379-6779(89)90798-4).
- (17) Bocchi, V.; Chierici, L.; Gardini, G. P.; Mondelli, R. On Pyrrole Oxidation with Hydrogen Peroxide. *Tetrahedron* **1970**, *26* (17), 4073–4082. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)93048-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)93048-0).
- (18) Tan, Y.; Ghandi, K. Kinetics and Mechanism of Pyrrole Chemical Polymerization. *Synth Met* **2013**, *175*, 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2013.05.014>.
- (19) K, N.; Rout, C. S. Conducting Polymers: A Comprehensive Review on Recent Advances in Synthesis, Properties and Applications. *RSC Adv* **2021**, *11* (10), 5659–5697. <https://doi.org/10.1039/D0RA07800J>.
- (20) Stejskal, J. Interaction of Conducting Polymers, Polyaniline and Polypyrrole, with Organic Dyes: Polymer Morphology Control, Dye Adsorption and Photocatalytic Decomposition. *Chemical Papers* **2020**, *74* (1), 1–54. <https://doi.org/10.1007/s11696-019-00982-9>.
- (21) MOHAMAD, N.; SALLEH, N. M.; MAHMUD, H. N. M. E. Investigation of Polypyrrole and Polypyrrolepolyethyleneimine as Adsorbents for Methyl Orange Dye Adsorption. *Journal of Polymer Materials* **2024**, *40* (3–4), 165–189. <https://doi.org/10.32381/JPM.2023.40.3-4.4>.
- (22) Gospodinova, N.; Tomšík, E. Hydrogen-Bonding versus π - π Stacking in the Design of Organic Semiconductors: From Dyes to Oligomers. *Prog Polym Sci* **2015**, *43*, 33–47. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2014.10.010>.
- (23) Jangid, N. K.; Chauhan, N. P. S.; Punjabi, P. B. Novel Dye-Substituted Polyanilines: Conducting and Antimicrobial Properties. *Polymer Bulletin* **2014**, *71* (10), 2611–2630. <https://doi.org/10.1007/s00289-014-1210-6>.
- (24) Sapurina, I.; Stejskal, J.; Šeděnková, I.; Trchová, M.; Kovářová, J.; Hromádková, J.; Kopecká, J.; Cieslar, M.; Abu El-Nasr, A.; Ayad, M. M. Catalytic Activity of Polypyrrole Nanotubes Decorated with Noble-Metal Nanoparticles and Their Conversion to Carbonized Analogues. *Synth Met* **2016**, *214*, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2016.01.009>.
- (25) Li, X.; Lu, H.; Zhang, Y.; He, F. Efficient Removal of Organic Pollutants from Aqueous Media Using Newly Synthesized Polypyrrole/CNTs-CoFe₂O₄ Magnetic Nanocomposites. *Chemical Engineering Journal* **2017**, *316*, 893–902. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.02.037>.
- (26) Li, Y.; Bober, P.; Trchová, M.; Stejskal, J. Polypyrrole Prepared in the Presence of Methyl Orange and Ethyl Orange: Nanotubes versus Globules in Conductivity Enhancement. *J Mater Chem C Mater* **2017**, *5* (17), 4236–4245. <https://doi.org/10.1039/C7TC00206H>.
- (27) Sadykov, T. T.; Syakaev, R. S.; Andriianova, A. N.; Mustafin, A. G. Adsorption of Anionic Methyl Orange Dye by Polyaniline, Poly(O-methylaniline) and Poly(O-methoxyaniline). *Int J Chem Kinet* **2024**, *56* (2), 81–95. <https://doi.org/10.1002/kin.21693>.
- (28) Tanzifi, M.; Hosseini, S. H.; Kiadehi, A. D.; Olazar, M.; Karimipour, K.; Rezaiemehr, R.; Ali, I. Artificial Neural Network Optimization for Methyl Orange Adsorption onto Polyaniline Nano-Adsorbent: Kinetic, Isotherm and Thermodynamic Studies. *J Mol Liq* **2017**, *244*, 189–200. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.08.122>.
- (29) Sapurina, I.; Li, Y.; Alekseeva, E.; Bober, P.; Trchová, M.; Morávková, Z.; Stejskal, J. Polypyrrole Nanotubes: The Tuning of Morphology and Conductivity. *Polymer (Guildf)* **2017**, *113*, 247–258. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2017.02.064>.

- (30) Trchová, M.; Stejskal, J. Resonance Raman Spectroscopy of Conducting Polypyrrole Nanotubes: Disordered Surface versus Ordered Body. *J Phys Chem A* **2018**, *122* (48), 9298–9306. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.8b09794>.
- (31) Levon, K.; Park, K. C.; Cai, C. Structure Formation in Conducting Polymers. *Synth Met* **1997**, *84* (1–3), 335–338. [https://doi.org/10.1016/S0379-6779\(97\)80770-9](https://doi.org/10.1016/S0379-6779(97)80770-9).
- (32) K, N.; Rout, C. S. Conducting Polymers: A Comprehensive Review on Recent Advances in Synthesis, Properties and Applications. *RSC Adv* **2021**, *11* (10), 5659–5697. <https://doi.org/10.1039/D0RA07800J>.
- (33) Choudhary, K.; Chen, A. X.; Pitch, G. M.; Runser, R.; Urbina, A.; Dunn, T. J.; Kodur, M.; Kleinschmidt, A. T.; Wang, B. G.; Bunch, J. A.; Fenning, D. P.; Ayzner, A. L.; Lipomi, D. J. Comparison of the Mechanical Properties of a Conjugated Polymer Deposited Using Spin Coating, Interfacial Spreading, Solution Shearing, and Spray Coating. *ACS Appl Mater Interfaces* **2021**, *13* (43), 51436–51446. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c13043>.
- (34) Abd Razak, S. I.; Wan Abdul Rahman, W. A.; Hashim, S.; Yahya, M. Y. Polyaniline and Their Conductive Polymer Blends: A Short Review. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences* **2014**, *9* (2). <https://doi.org/10.11113/mjfas.v9n2.86>.
- (35) Soroush, M.; Grady, M. C. Polymers, Polymerization Reactions, and Computational Quantum Chemistry. In *Computational Quantum Chemistry*; Elsevier, 2019; pp 1–16. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815983-5.00001-5>.
- (36) Goldstein, J. I.; Newbury, D. E.; Echlin, P.; Joy, D. C.; Lyman, C. E.; Lifshin, E.; Sawyer, L.; Michael, J. R. *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*; Springer US: Boston, MA, 2003. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0215-9>.
- (37) Ghasemi-Mobarakeh, L.; Prabhakaran, M. P.; Morshed, M.; Nasr-Esfahani, M. H.; Baharvand, H.; Kiani, S.; Al-Deyab, S. S.; Ramakrishna, S. Application of Conductive Polymers, Scaffolds and Electrical Stimulation for Nerve Tissue Engineering. *J Tissue Eng Regen Med* **2011**, *5* (4), e17–e35. <https://doi.org/10.1002/term.383>.
- (38) Balint, R.; Cassidy, N. J.; Cartmell, S. H. Conductive Polymers: Towards a Smart Biomaterial for Tissue Engineering. *Acta Biomater* **2014**, *10* (6), 2341–2353. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.015>.
- (39) Ravichandran, R.; Sundarrajan, S.; Venugopal, J. R.; Mukherjee, S.; Ramakrishna, S. Applications of Conducting Polymers and Their Issues in Biomedical Engineering. *J R Soc Interface* **2010**, *7* (suppl_5). <https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0120.focus>.
- (40) Liu, X.; Gilmore, K. J.; Moulton, S. E.; Wallace, G. G. Electrical Stimulation Promotes Nerve Cell Differentiation on Polypyrrole/Poly (2-Methoxy-5 Aniline Sulfonic Acid) Composites. *J Neural Eng* **2009**, *6* (6), 065002. <https://doi.org/10.1088/1741-2560/6/6/065002>.
- (41) Guo, B.; Ma, P. X. Conducting Polymers for Tissue Engineering. *Biomacromolecules* **2018**, *19* (6), 1764–1782. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.8b00276>.
- (42) Liu, S.; Pan, T. J.; Wang, R. F.; Yue, Y.; Shen, J. Anti-Corrosion and Conductivity of the Electrodeposited Graphene/Polypyrrole Composite Coating for Metallic Bipolar Plates. *Prog Org Coat* **2019**, *136*, 105237. <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2019.105237>.
- (43) Capáková, I. Z. *Conducting Polymer Scaffolds-the Technology of Preparation and Cytocompatibility Vodivé Polymerní Scaffoldy-Technologie Přípravy a Cytokompatibilita*.
- (44) Morandim-Giannetti, A. de A.; Rubio, S. R.; Nogueira, R. F.; Ortega, F. dos S.; Magalhães Junior, O.; Schor, P.; Bersanetti, P. A. Characterization of

- PVA/Glutaraldehyde Hydrogels Obtained Using Central Composite Rotatable Design (CCRD). *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **2018**, 106 (4), 1558–1566. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33958>.
- (45) Blackiston, D. J.; McLaughlin, K. A.; Levin, M. Bioelectric Controls of Cell Proliferation: Ion Channels, Membrane Voltage and the Cell Cycle. *Cell Cycle* **2009**, 8 (21), 3527–3536. <https://doi.org/10.4161/cc.8.21.9888>.
- (46) Levin, M. Molecular Bioelectricity in Developmental Biology: New Tools and Recent Discoveries. *BioEssays* **2012**, 34 (3), 205–217. <https://doi.org/10.1002/bies.201100136>.
- (47) Levin, M. Molecular Bioelectricity: How Endogenous Voltage Potentials Control Cell Behavior and Instruct Pattern Regulation in Vivo. *Mol Biol Cell* **2014**, 25 (24), 3835–3850. <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-12-0708>.
- (48) Káčerová, S.; Víchová, Z.; Valášková, K.; Vícha, J.; Münster, L.; Kašpárková, V.; Vašíček, O.; Humpolíček, P. Biocompatibility of Colloidal Polypyrrole. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2023**, 232, 113605. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113605>.
- (49) de Albuquerque, J. E.; Mattoso, L. H. C.; Faria, R. M.; Masters, J. G.; MacDiarmid, A. G. Study of the Interconversion of Polyaniline Oxidation States by Optical Absorption Spectroscopy. *Synth Met* **2004**, 146 (1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2004.05.019>.
- (50) Paul, S. J.; Gupta, B. K.; Chandra, P. Probing the Electrical and Dielectric Properties of Polyaniline Multi-Walled Carbon Nanotubes Nanocomposites Doped in Different Protonic Acids. *Polymer Bulletin* **2021**, 78 (10), 5667–5683. <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03399-7>.
- (51) Jamadade, V. S.; Dhawale, D. S.; Lokhande, C. D. Studies on Electrosynthesized Leucoemeraldine, Emeraldine and Pernigraniline Forms of Polyaniline Films and Their Supercapacitive Behavior. *Synth Met* **2010**, 160 (9–10), 955–960. <https://doi.org/10.1016/j.synthmet.2010.02.007>.
- (52) Steyer, A.; Schwab, Y.; Heidelberg, E. *Fundamentals of Scanning Electron Microscopy in Life Science Research*.
- (53) Shishov, M. A.; Moshnikov, V. A.; Sapurina, I. Yu. Nanostructures of Oligoaniline and Polyaniline and Their Properties. *Glass Physics and Chemistry* **2011**, 37 (1), 106–110. <https://doi.org/10.1134/S1087659611010135>.
- (54) Stejskal, J.; Bober, P. Conducting Polymer Colloids, Hydrogels, and Cryogels: Common Start to Various Destinations. *Colloid Polym Sci* **2018**, 296 (5), 989–994. <https://doi.org/10.1007/s00396-018-4303-1>.
- (55) *The Scanning Electron Microscope (SEM)*. University of Cambridge. <https://www.eng-atoms.msm.cam.ac.uk/RoyalSocDemosSEM/> (accessed 2025-04-22).

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obrázok 1: Príklady štruktúr vodivých polymérov. Konjungovaná štruktúra pozostávajúca z alternujúcich dvojitých väzieb medzi atómami uhlíka je spoločná pre všetky vodivé polyméry. Prevzaté z ref. ²	13
Obrázok 2: Oxidácia monoméru pyrrolu. Pyrrol stráca elektrón a vzniká radikálový kation. Prevzaté z ref. ¹²	17
Obrázok 3: V tomto kroku sa dva radikálové kationy pyrrolu (označené ako 3) spoja prostredníctvom väzby medzi ich α -polohami. Prevzaté z ref. ¹²	18
Obrázok 4: Rezonančné formy radikálového kationu pyrrolu. Prevzaté z ref. ¹²	18
Obrázok 5: Vznik aromatického diméru. Prevzaté z ref. ¹²	18
Obrázok 6: Oxidácia diméru pyrrolu (6) na radikálový kation (7) a jeho rezonančné formy (8,9,10). Prevzaté v ref. ¹²	19
Obrázok 7: Vznik neutrálneho triméru. Prevzaté z ref. ¹²	19
Obrázok 8: Vznik radikálového kationu (13) a jeho rezonančné formy (14,15,16,17), ktoré stabilizujú štruktúru a umožňujú ďalší rast polymérneho reťazca. Prevzaté z ref. ¹²	20
Obrázok 9: Oxidácia PPy na jeho dopovanú vodivú formu, kde záporný anión (X^-) kompenzuje kladný náboj vznikajúci na polymérnom reťazci. Prevzaté z ref. ¹²	20
Obrázok 10: Oxidácia monoméru pyrrolu (A) a vznik diméru a triméru (B). Prevzaté z ref. ¹⁴	22
Obrázok 11: Iniciácia polymerizácie oxidáciou pyrrolového monoméru (A) a rast polymérneho reťazca (B). Prevzaté z ref. ¹⁴	23
Obrázok 12: Ilustrácia π - π interakcií, iónových väzieb a vodíkových väzieb medzi vodivým polymérom polypyrrolom a organickým farbivom metyl oranž (MO). Prevzané z ref. ²⁰ ...	24
Obrázok 13: Zjednodušená schéma konjugovanej kostry: reťazec obsahujúce sa jednoduché a dvojité väzby. Prevzaté a preložené z ref. ³⁸	29
Obrázok 14: Zjednodušené vysvetlenie elektrickej vodivosti vodivých polymérov: (A) Dopant odstráni alebo pridá elektrón do polymérneho reťazca, čím vytvorí delokalizovaný náboj. (B) Z energetického hľadiska je výhodné, aby sa tento náboj lokalizoval a obklopil lokálnou deformáciou kryštálovej mriežky. (C) Náboj obklopený touto deformáciou sa nazýva polaron (radikálový ión spojený s deformáciou mriežky). (D) Polaron sa môže pohybovať pozdĺž polymérneho reťazca, čo umožňuje vodivosť elektrického prúdu. Prevzané z ref. ³⁸	30
Obrázok 15: Pripravené roztoky samotného monoméru a monoméru s farbivami – (A) PPy + AB25, (B) PPy + AB129, (C) PPy + MO, (D) PPy.....	37
Obrázok 16: Pripravené roztoky samotného monoméru a monoméru s farbivami – (A) PANI + AB25, (B) PANI + AB129, (C) PANI + MO, (D) PANI.....	38
Obrázok 17: Schéma princípu SEM (prevzaté a preložené z ref. ⁵⁵).....	40
Obrázok 18: Uv-Vis spektroskopia polypyrrolových filmov	44
Obrázok 19: Uv-Vis spektroskopia polyanilínových filmov	45
Obrázok 20: SEM snímky PANI filmov, 1 – PANI, 2 – PANI+AB25, 3 – PANI+MO, 4 – PANI + AB129	46

Obrázok 21: SEM snímky PPy filmov, 1 – PPy, 2 – PPy+MO, 3 – PPy+AB129.....	48
Obrázok 22: SEM snímky PANI práškov 1 – PANI, 2 – PANI+AB25, 3 – PANI+MO, 4 – PANI+AB129	49
Obrázok 23: SEM snímky PPy práškov 1 – PPy, 2 – PPy+AB25, 3 – PPy+MO, 4 – PPy+AB129	51
Obrázok 24: Fluorescenčné zobrazenie referenčnej vzorky bunkovej línie	63
Obrázok 25: Fluorescenčné zobrazenie bunkovej línie na filme PANI.....	64
Obrázok 26: Fluorescenčné zobrazenie bunkovej línie na filme PANI+AB25	65
Obrázok 27: Fluorescenčné zobrazenie bunkovej línie na filme PANI+MO	66
Obrázok 28: Fluorescenčné zobrazenie bunkovej línie na filme PANI+AB129	67
Obrázok 29: Fluorescenčné zobrazenie bunkovej línie na filme PPy+AB129.....	68
Obrázok 30: Fluorescenčné zobrazenie bunkovej línie na filme PPy+MO	69
Obrázok 31: Fluorescenčné zobrazenie bunkovej línie na filme PPy.....	70

ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1: Riedenie extraktov z polymérov	42
---	----

ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

PPy	Polypyrrol
PANI	Polyanilín
MO	Metyloranž
AB25	Acid blue 25
AB129	Acid blue 129
SEM	Skenovacia elektrónová mikroskopia
MTT	[3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-2,5-difenylterazoliumbromid]
PBS	Phosphate Buffered Saline (pufrovaný fyziologický roztok)
PVA	Polyvinylalkohol
UV-VIS	Ultrafialová a viditeľná spektroskopia
V_{mem}	Membránový potenciál
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
PS	Tkanivový polystyrén