

Pevné formy hyaluronanu sodného a jeho vlastnosti

Eliška Bognerová

Bakalářská práce
2018



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky
akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Eliška Bognerová**
Osobní číslo: **T15200**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie výroby tuků, kosmetiky a detergentů**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Pevné formy hyaluronanu sodného a jeho vlastnosti**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte literární rešerši na dané téma. V literární rešerši se mimo jiné věnujte využití folii na bázi hyaluronanu sodného v kosmetice.
2. Připravte vrstvy na bázi hyaluronanu sodného a upravte jejich povrchovou topografii.
3. Připravené systémy charakterizujte pomocí mikroskopie atomárních sil.
4. Výsledky přehledně diskutujte a zhodnoťte.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

1. Xue, L. J.; Zhang, J. L.; Han, Y. C., Phase Separation Induced Ordered Patterns in Thin polymer Blend Films. Prog. Polym. Sci. 2012, 37 (4), 564–594.
2. Munoz-Bonilla, A.; Fernandez-Garcia, M.; Rodriguez-Hernandez, J., Towards Hierarchically ordered Functional Porous Polymeric Surfaces Prepared by the Breath Figures Approach. Prog. Polym. Sci. 2014, 39 (3), 510–554.
3. Minařík, A.; Smolka, P.; Lapčík, L., Preliminary Investigation of Factors Determining Self-Organised Structures Preparation in Polymer Layers. Int. J. Heat Mass Transfer 2011, 54 (17-18), 4135–4142.
4. Temenoff, J.S.: Biomaterials: The Intersection of Biology and Materials Science, Rice University, 2009, ISBN-13: 9780130097101
5. Brundle, C. R., Evans, Ch. A. jr. Wilson, S. Encyklopedia of Materials Characterization, Surfaces, Interface, Thin Films. Elsevier, 1992. ISBN 0-7506-9168-9

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Antonín Minařík, Ph.D.

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

5. února 2018

Termín odevzdání bakalářské práce:

18. května 2018

Ve Zlíně dne 5. února 2018



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



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

Příjmení a jméno: Eliška Bognerová Obor: Technologie výroby tuků, kosmetiky a detergentů

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 15. 5. 2018

.....
Bognerová

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Filmy hyaluronanu sodného byly povrchově upravovány pomocí časově sekvenované fázové separace za rotace pomocí směsných roztoků (dobrých a špatných rozpouštědel). Připravené porózní povrchy byly charakterizovány pomocí mikroskopie atomárních sil a obrazové analýzy. S ohledem na možnosti generace povrchových pórů byl zkoumán vliv teploty rozpouštění polymerního roztoku pro přípravu filmů, obsahu zbytkové vody v upravovaných filmech, rychlosti vytlačování směsných roztoků, rychlost rotace vzorků a vliv povrchové textury nosného substrátu filmů hyaluronanu sodného. Z experimentálních výsledků vyplynulo, že minimální změny v historii přípravy filmů ovlivňují množství a velikost vznikajících povrchových pórů.

Klíčová slova: hyaluronan sodný, povrch, fázová separace, spin-coater, póry, mikroskopie atomárních sil

ABSTRACT

Sodium hyaluronate films were surface-treated using time-sequenced phase separation on rotation with mixed solutions (good and bad solvents). The porous surfaces prepared were characterized by atomic force microscopy and image analysis. With regard to possible surface pore generation, the effect of the dissolution temperature of the polymer solution for film preparation, the residual water content in the treated films, the rate of extrusion of the mixed solutions, the rotation speed of the samples, and the influence of the surface texture of the sodium hyaluronate film bearing substrate have been investigated. Experimental results show that minimal changes in the history of film preparation affect the amount and size of the resulting surface pores.

Keywords: sodium hyaluronate, surface, phaseseparation, spin-couter, testuringpores, atomicforce mikroskopy

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Antonínu Minaříkovi, Ph. D za veškeré rady, pomoc, čas a trpělivost, kterou mi v průběhu tvorby poskytoval. Mé poděkování patří také Ing. Erikovi Wrzcionkovi, který mi věnoval cenné rady nejen v laboratoři, ale i při zpracovávání bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala rodině a kamarádům za veškerou podporu při studiích.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 STRUKTUROVANÉ MATERIÁLY NA BÁZI POLYSACHARIDŮ A JEJICH APLIKAČNÍ MOŽNOSTI	12
1.1 PŘÍKLADY APLIKACÍ STRUKTUROVANÝCH MATERIÁLŮ	12
1.1.1 V kosmetice.....	13
1.1.2 V biomedicíně	16
1.1.3 Nosné materiály pro kultivaci a studium buněk.....	19
1.1.4 Další aplikační možnosti	20
1.1.4.1 Superhydrofóbní a superhydrofilní povrchy.....	21
1.1.4.2 Vodivé a magnetické vrstvy	21
1.1.4.3 Membrány	21
2 ZPŮSOBY ZMĚN POVRCHOVÉHO RELIÉFU POLYMERNÍCH MATERIÁLŮ	23
2.1 FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ METODY	23
2.1.1 Plazmatické úpravy	24
2.1.2 Úpravy laserem	24
2.1.3 Mechanické úpravy povrchu	25
3 METODY ZALOŽENÉ NA FÁZOVÉ SEPARACI	26
3.1 METODA BREATHFIGURE.....	26
3.2 TEXTURIZACE PŮSOBENÍM SMĚSÍ ROZPOUŠTĚDEL NA ROTUJÍCÍ POVRCH	27
II PRAKTICKÁ ČÁST	29
4 PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE PORÉZNÍCH FILMŮ Z HA	30
4.1 POUŽÍVANÉ CHEMICKÉ LÁTKY	30
4.2 PŘÍPRAVA NÁDOB PRO ROZPOUŠTĚNÍ HA	31
4.3 PŘÍPRAVA VODNÝCH ROZTOKŮ HA.....	32
4.4 ÚPRAVA NOSNÝCH SUBSTRÁTŮ PRO ODLÉVÁNÍ FILMŮ HA.....	32
4.5 ODLÉVÁNÍ VODNÝCH ROZTOKŮ	33
4.6 SUŠENÍ ROZTOKŮ – TVORBA HLADKÝCH FILMŮ.....	33
4.7 GENERACE POVRCHOVÉ MIKRO A NANO TEXTURY	34
4.8 CHARAKTERIZACE PORÓZNÍCH FILMŮ HA POMOCÍ AFM	34
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	38
5.1 PŘÍPRAVA TEXTUROVANÝCH FILMŮ NA BÁZI HA	38
5.1.1 Vliv historie přípravy polymerních roztoků pro přípravu filmů HA	39
5.1.2 Vliv historie skladování filmu hyaluronanu sodného na vznik pórů	41
5.1.3 Vliv rychlosti dávkování směsných rozpouštědel.....	43
5.1.4 Vliv rychlosti rotace vzorku.....	45
5.1.5 Vliv povrchové textury nosného substrátu na bázi PS.....	47

ZÁVĚR	50
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	51
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	56
SEZNAM OBRÁZKŮ	57
SEZNAM TABULEK.....	60

ÚVOD

Kyselina hyaluronová je látka vyskytující se ve všech živých organismech, kde plní nej-různější funkce jako opora buněk, imobilizuje vodu ve tkáních, čímž mění kožní objem a stlačitelnost. Vyznačuje se neimunogenně a má silný negativní náboj. Může být také primárně součástí extracelulární, perikulární a intracelulární matrix atd. Pro svou funkci se hojně uplatňuje v mnoha odvětvích jako je kosmetický průmysl, farmacie, biomedicína a tkáňové inženýrství.

Jednou z nejdůležitějších funkcí kyseliny hyaluronové z kosmetického pohledu je její schopnost adsorpce a retence vody. Kyselina hyaluronová se v kosmetice často používá v kombinaci s chitosanem upraveným pomocí pufrů. Kůže ošetřená filmem chitosanu s kyselinou hyaluronovou vydrží mnohem déle hydratovaná.

Fyzikálně-chemické vlastnosti a biologické funkce hyaluronanu úzce souvisejí s jeho molekulovou hmotností. Jednou z hlavních aplikačních oblastí kyseliny hyaluronové je oblast medicíny, kde se může používat jako marker nádorů u různých typů rakoviny, dále se využívá při hojení ran v kombinaci s chitosanem v podobě netkané textilie jako obvaz. Mimo to se z ní vytváří lešení (scaffoldy), které lze taktéž aplikovat například při hojení ran. Je známo, že procesy hojení ran nebo obecně interakce proteinů a buněk s povrchy materiálů jsou podmiňovány nejen jejich prvkovým složením, ale rovněž povrchovou texturou. Z tohoto hlediska jsou studovány rozdílné postupy přípravy definovaně texturovaných (porózních) povrchů.

S ohledem na zaměření této bakalářské práce se první podkapitoly teoretické části zabývají povrchově strukturovanými polymery a jejich využitím v odvětví kosmetiky, biomedicíny, při diferenciaci buněk atd. Zvýšená pozornost je dále věnována fázové separaci jako nástroji pro změnu povrchu reliéfu modifikovaného materiálu.

V praktické části se tato práce zabývá přípravou filmů z hyaluronanu sodného a jeho povrchovou úpravou pomocí časově sekvenované fázové separace za rotace. Diskutovanými proměnnými parametry jsou: tepelná historie přípravy filmu, historie skladování filmu s ohledem na zbytkovou vodu ve filmu, rychlost dávkování směsi rozpouštědel, rychlost rotace vzorku a vliv nosného substrátu filmu HA.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 STRUKTUROVANÉ MATERIÁLY NA BÁZI POLYSACHARIDŮ A JEJICH APLIKAČNÍ MOŽNOSTI

Povrchové vlastnosti polymerů mohou podmiňovat změny v buněčné struktuře kultivovaných buněk. Pro přípravu strukturovaných povrchů jsou často používány polymery jako polylaktid, polykaprolakton a jejich kopolymery [1]. Tyto polymery jsou hojně používány díky své vysoké biologické rozložitelnosti (biokompatibilitě), mechanickým vlastnostem a kontrolovatelné rychlosti biodegradace. Je známo, že například biokompatibilita, biodegradace a funkčnost přírodních a umělých membrán je určována vlastnostmi povrchu materiálu a jeho mechanickými vlastnostmi.

Bylo prokázáno, že tuhost substrátu ovlivňuje proliferaci buněk a různé typy buněk reagují na různé rozsahy tuhosti. Malé změny v elasticitě substrátu mohou způsobovat velké buněčné změny. Pro zlepšení biologické kompatibility lze využít celou řadu dalších povrchových úprav.

Například lze připravovat polymerní membrány pomocí metody fázové inverze, kde změna povrchu polymeru je prováděna hydrolyzou v přítomnosti NaOH. Aplikace NaOH pro úpravu povrchu má za následek zlepšení adheze buněk na povrchu v důsledku vzniku optimálního množství karboxylových skupin na povrchu membrán. Jak je prezentováno v literatuře [1], keratinocyty pěstované na takto upravených membránách byly pružné. Pružnost byla závislá na tuhosti membrány, která byla ovlivněna různou koncentrací NaOH použitého pro úpravu povrchu [1].

1.1 Příklady aplikací strukturovaných materiálů

Aplikační potenciál strukturovaných povrchů s obsahem kyseliny hyaluronové v kosmetickém průmyslu lze nalézt při vývoji a použití například snadno bobtnajících filmů, které budou hydratovat cílené prostředí – pokožku.

Strukturované povrchy jsou hojně využívány v oblasti medicíny, kde zlepšují adhezi buněk, což v konečném důsledku může akcelarovat průběh procesu hojení ran.

Různě strukturované povrchy jsou využívány ve farmacii při potahování tablet, které korigují postupné uvolňování léčiv.

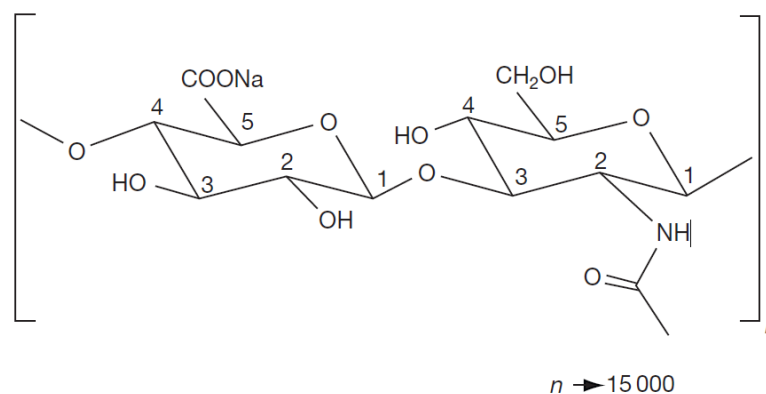
Z teoretického pohledu je velmi důležité pochopení problematiky diferenciacce buněk na rozdílně strukturovaných površích.

1.1.1 V kosmetice

Stárnutí obličeje je výsledkem interakcí mezi vnitřními a vnějšími faktory, které na nás působí během života. Jedná se o důsledek kontinuálního procesu, při kterém dochází k poškození životního prostředí v exponovaných podmínkách. Například při opalování dochází ke snížení množství složek kolagenu, elastinu a glykosaminoglykanů, což vede ke snížení pružnosti pokožky. Pokožka je méně hydratována, což se projevuje suchým vzhledem a to dále vede ke vzniku drobných vrásek a hyperpigmentaci [2].

Kyselina hyaluronová je známá svojí přítomností v pokožce a díky schopnosti vázat vodu je do pokožky také dodávána. Je-li kyselina hyaluronová dodávána ve formě gelu, proniká do bazální vrstvy epidermis, dermis a do lymfatického endotelu. Penetraci kyseliny hyaluronové lze vysvětlit existencí hydrofóbních domén v jejím řetězci a přítomností receptorů v celé kožní tkáni [2].

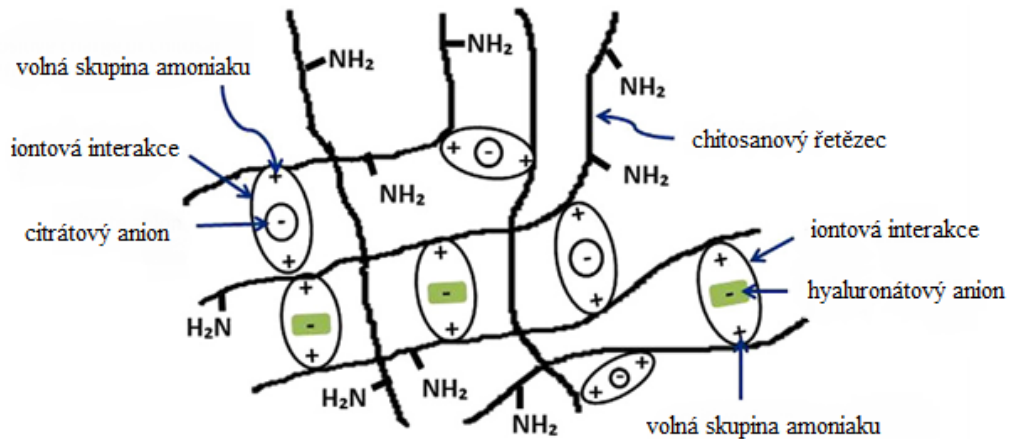
Kyselina hyaluronová, viz Obr. č. 1, s nízkou molekulovou hmotností může proniknout do *Stratum corneum*, kde zadržuje vodu, což vede ke snížení hloubky vrásek [2]. Schopnost zadržovat vodu je jednou ze základních vlastností kyseliny hyaluronové, jak bylo naznačeno výše.



Obr. č. 1: Struktura kyseliny hyaluronové [3].

Filmy kyseliny hyaluronové jsou velmi často aplikovány na další přírodní polymery jako je například chitosan. Chitosan s vodou vytváří kationické sítě, které integrují s negativně nabitými zbytky na povrchu kůže. Proto je chitosan používán v kosmetice jako prostředek na ochranu pleti a tónující regulátor. Nevýhodou takovýchto filmů je jejich špatná stabilita. Proto je nutné, aby byl proveden neutralizační krok, který zajistí zlepšení jejich stability. Neutralizace se provádí pomocí pufrčních látek, nejčastěji za pomoci acetátu a citrátu. Vnitřní struktura takto připravených filmů je uvedena na Obr. č. 2. Po neutralizaci jsou

chitosanové filmy tuhé, avšak pro aplikaci na pokožku je potřeba folie, která se vyznačuje snadnou manipulací. Aby došlo ke zlepšení manipulace přidává se glycerol, který zde působí jako změkčující látka [2].

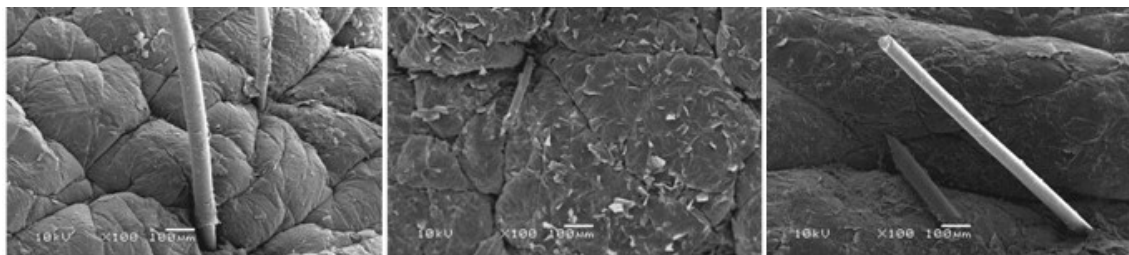


Obr. č. 2: Struktura polymerní sítě chitosanového filmu neutralizovaného v citrátovém pufru bez změkčovadla za přítomnosti kyseliny hyaluronové [2].

Takto připravené filmy se využívají při léčbě suché kůže. Jejich působením dochází k tomu, že *Stratum corneum* je měkčí a pružnější. Mimo to se takovéto filmy upravují za pomoci pufrů, aby co nejvíce odpovídaly pH pokožky, které je mezi 4,5–6,5 [2]. Kyselý kožní film hraje důležitou roli při bariérové homeostázi a antibakteriální ochraně.

Chitosanové filmy připravené bez přídavku glycerolu se oproti výše uvedenému vyznačují větší integritou své struktury, z čehož plyne nižší rozpustnost v kyselém prostředí. Mimo to je nižší celková rozpustnost v kyselém prostředí důsledkem přítomnosti kyseliny citrónové, která vytváří iontové „mosty“ mezi negativně a pozitivně nabitými částmi chitosanu [2].

Jak plyne z níže citované práce, chitosanové filmy neutralizované v citrátovém pufru bez glycerolu ztrácí tzv. krystalizační vodu [2]. V prvním stupni došlo k úbytku hmotnosti vody o 9 %, což naznačuje vysokou interakci pokožky s vodou. Pokožka ošetřená filmem na bázi chitosanu s přídavkem kyseliny hyaluronové vykazuje lepší hydrataci, jak lze pozorovat z Obr. č. 3 [2].



Obr. č. 3: Obrázky ze SEM kožních úseků: První – bez léčby, druhý – s filmy obsahující kyselinu hyaluronovou a třetí – s gelem obsahujícím kyselinu hyaluronovou [2].

Jedním z dalších příkladů využití materiálů na bázi kyseliny hyaluronové je její směs s β -cyklodextrinem v podobě hydrogelů, která se využívá k podpoře uvolňování epiteliálních buněk rohovky [4]. Fyzikálně-chemické vlastnosti takového směsí zapříčiňují její vysokou kompatibilitu s přírodními tkáněmi.

Filmy tvořené z hydrogelu kyseliny hyaluronové a β -cyklodextrinu sušené při pokojové teplotě jsou snadno manipulovatelné s dobrou schopností vstřebávat vodu a následně botnat [4].

Kryogely hyaluronanu podporují růst a depozici matrice dermálních fibroblastů. Kryogely jsou účinnými 3D substráty, které tvoří vysoce porózní lešení. Buňky ve vnitřní struktuře kryogelů mohou proliferovat po dobu minimálně 28 dnů. Hydrofilní charakter takového kryogelů na bázi biopolymeru je dalším předpokladem pro efektivní buněčnou kultivaci. Pokud je dále kryogel tvořen otevřenými póry, vznikají podmínky pro efektivní transport živin a kyslíku do buněk a transport metabolických odpadů z buňky [5].

Takovéto kryogely mohou být využívány při hojení ran nebo aplikovány jako kosmetické přípravky v podobě hydrogelu.

Obecně pórovité matrice lze vyrobit několika možnými způsoby jako je například: sušením za nízké teploty, s využitím mikroemulzí, pomocí fázové separace atd. Za pórovité kryogely lze obecně považovat 3D struktury vyznačující se vzájemně propojenými póry o velikosti od 1 do 100 μm . Hlavní nevýhodou takového materiálů je jejich horší mechanická stabilita v porovnání s klasickými hydrogely nebo jejich hydratovanou formou. Z pohledu vlastností má hyaluronan vynikající schopnost zadržovat vlhkost, jak bylo uváděno mnohokrát výše, nicméně je snadno degradovatelný hyaluronidázou na povrchu kůže. S vázaným objemem vody v kůži je ovlivňována její stlačitelnost, což souvisí s regulací růstu buněk, jejich diferencí nebo opravami [5]. Stárnutí kůže je způsobeno hlavně vnějšími podněty jako jsou: sluneční záření, znečišťující látky a kouření, což vede k postupnému

úbytku kyseliny hyaluronové v těle. Z tohoto důvodu se jeví jako výhodné modifikovat kyselinu hyaluronovou tak, aby se zlepšila její odolnost vůči degradaci. Za tímto účelem jsou v literatuře popsány postupy úpravy kyseliny hyaluronové tak, aby byla více rezistentní vůči UVA záření [6]. To znamená, že je možné připravovat deriváty kyseliny hyaluronové mající UV-ochranné vlastnosti spolu s velkou kapacitou pro absorpci vody [6].

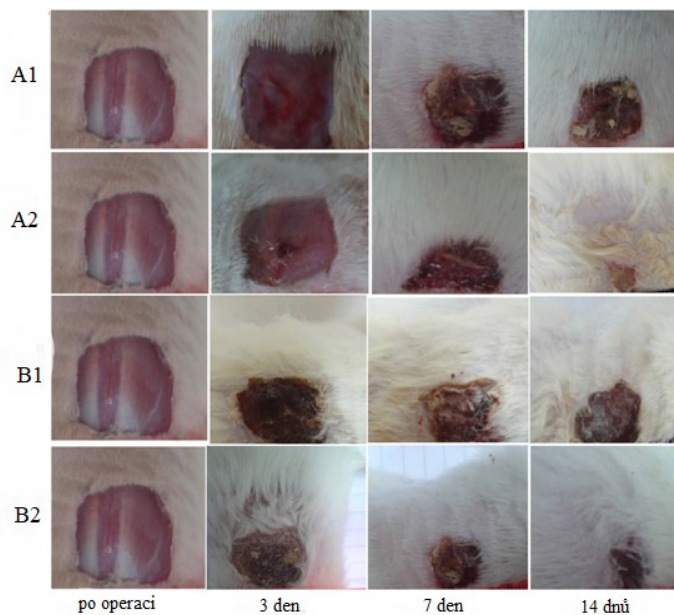
1.1.2 V biomedicině

Jedním s hlavních a významných uplatnění v biomedicině je například využití materiálů na bázi kyseliny hyaluronové při cévní vaskularizaci [7]. Strukturované povrchy zde hrají důležitou roli pro přežití tkáně tak, že podporují transport metabolických produktů, kyslíku a živin do tkání. Částečnou nevýhodnou kyseliny hyaluronové může být její snadná rozpustnost ve vodě, proto se vyvíjí celá řada síťovaných forem tohoto materiálů, což dosti často zapříčiní ztrátu biokompatibility systému [7].

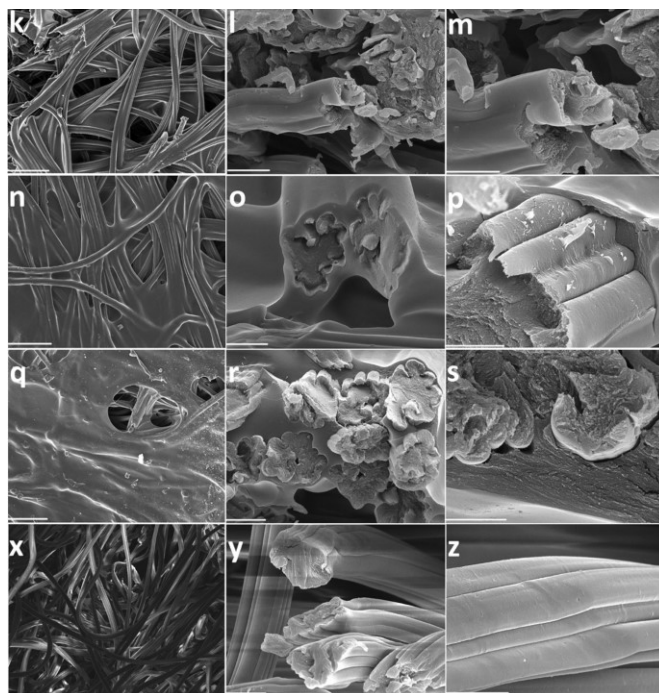
Mimo to se materiály na bázi kyseliny hyaluronové aplikují s cílem zlepšit účinnost léků v místních aplikacích. Nosiče na bázi tohoto materiálu jsou schopny zvýšit akumulaci kožních léků a lokální biologickou dostupnost, čímž dochází k omezení systémové toxicity a usnadnění penetrace léčiv do kůže [8].

Mezi jedny z nově používaných technologií patří postupy založené na botnání a imobilizaci fosfolipidových vehikul v předem vytvořené a strukturované síti hyaluronanu sodného.

Obvazy v podobě netkaných textilií na bázi chitosan-hyaluronanu jsou další typy materiálů hojně využívaných v biomedicině. Aplikují se při hojení rány, tj. složitý proces obnovy celulární struktury a epidermálních tkání. Příklad takového typu materiálu je uveden na Obr. č. 5. Hlavní výhodou chitosanu jsou jeho protizánětlivé účinky, zatímco kyselina hyaluronová ovlivňuje především viskoelasticitu extracelulárního prostředí. Takto vyrobené obvazy urychlují a zjednodušují proces hojení ran i u diabetiků, lze je použít také jako nosiče léků, které mohou podporovat proces hojení ran. Funkčnost takovýchto typů netkaných textilií byla testována in-vivo na nediabetických i diabetických krysách. Výsledky z tohoto testování jsou uvedeny na Obr. č. 4 [9].



Obr. č. 4: Vizuální pozorování hojení ran po 0, 3, 7 a 14 dnech: A1 – obvazem na rány, A2 – ošetření obvazem chitosan/hyaluronanem u nediabetických krys; B1 – obvazem na rány, B2 – ošetření obvazem chitosan/hyaluronanem u diabetických krys [9].



Obr. č. 5. Struktura netkaných textílií zobrazená pomocí SEM: (k – m) – netkaná bavlněná tkanina s 0,5% citrátem chitosanu a 0,5% hyaluronanem, (n – p) – netkaná bavlněná tkanina s 1% citrátem chitosanu a 0,5% hyaluronanem, (q – s) – netkaná bavlněná tkanina s 2% citrátem chitosanu a 0,5% hyaluronanem, (t – z) – netkaná bavlněná tkanina. Měřítka uvedené v prvním sloupci odpovídá 100 μm, v druhém 10 μm a třetím 5 μm [9].

Alternativou k netkaným textiliím na bázi chitosan-hyaluronanu může být chitosan-hyaluronové kompozitní houbovitě lepidlo. Hlavní složkou pro možnost aplikace jsou vehikula, která slouží jako lešení, zvyšující koncentraci konečných formulací. Lipidové nanočástice podporují hojení ran, ale neexistuje zatím žádná studie, kde by bylo toto lešení použito pro jejich obohacení [10].

V rámci literárně popsané studie bylo zjištěno, že připravené nanočásticové struktury zlepšily kontrolované uvolňování léčiv po dobu 48 hodin. Postupné uvolňování je způsobeno zabudováním léčiva do nosné matrice [10].

Alginátové hyalurongely modifikované nízkomolekulárním HA jsou využívány pro regeneraci chrupavky [11]. Alginát byl použit jako kostra, do které byl HA s nízkou molekulovou hmotností vpraven, a to do zadní části vyrobeného alginát hyaluronového hydridu, který byl spojen s ethylendiaminem. Předpokladem těchto hyalurongelů, za použití vysokomolekulární HA, je stejná funkčnost jako při vpravování HA injekčně přímo do kloubů. Nízkomolekulární HA může být využita jako spojovací činidlo, které je roubované na alginátové řetězce s použitím ethylendiaminu. Pro zavedení biofunkčnosti a regulace buněčného chování v závislosti na specifických cílech jako je buněčná migrace, adheze, proliferace a diferenciací se využívá alginát s bioaktivními molekulami. Hydrogely využívané pro regeneraci chrupavky mají diferenciované polymerní kompozice a přesně stanovené mechanické vlastnosti. Tyto hydrogely úspěšně regulují diferenciaci chondrocytů a udržují jejich fenotyp. Díky tomu mohou být dodávány do těla s cílem regenerovat chrupavky [11].

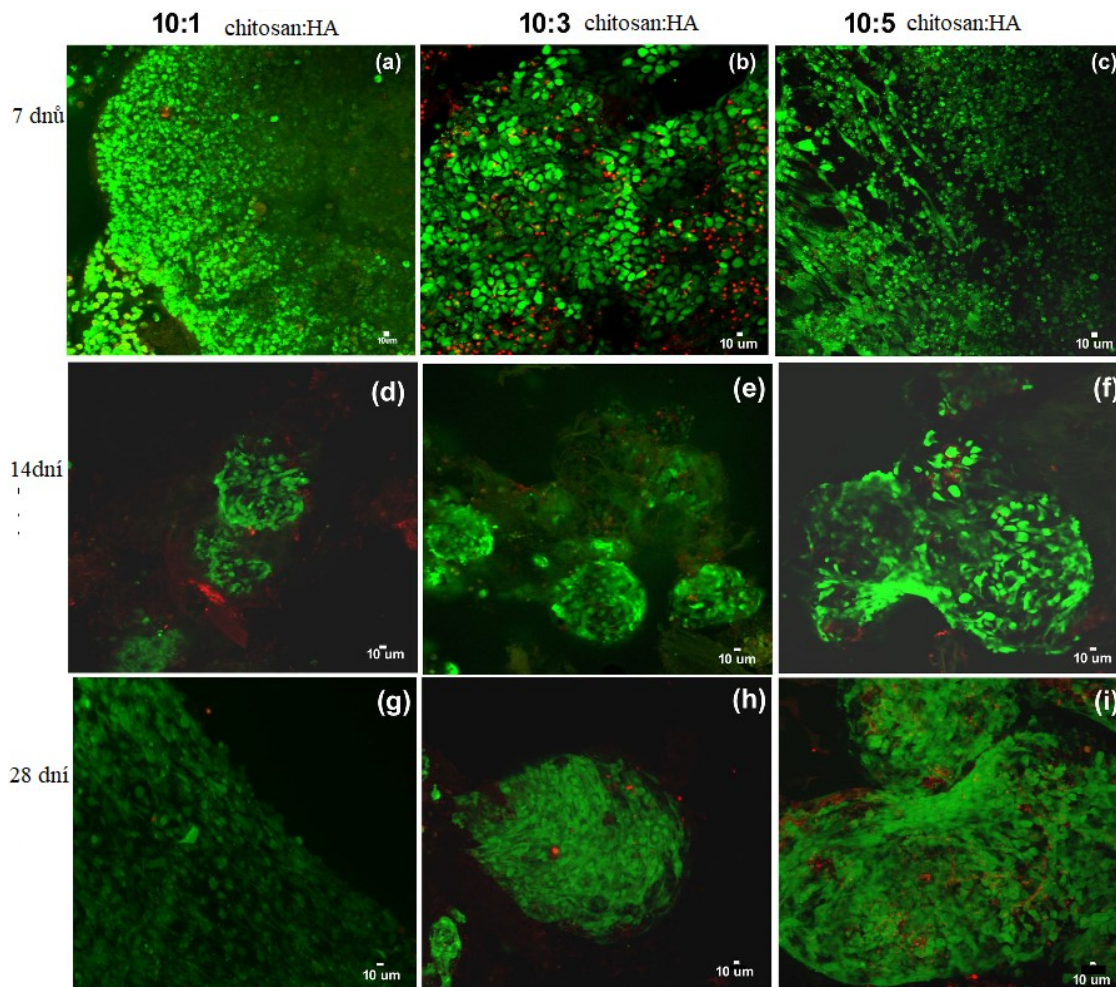
V biomedicíně je hojně využívána bakteriální celulóza s přídavkem HA. Z hlediska požadavků každého biomedicínského materiálu musí být biokompatibilní. Membrány hydridní bakteriální celulózy a HA byly vyráběny ve fermentačním procesu, kde je na počátku přidána HA. Přídavek HA ovlivňoval především drsnost povrchu, ale také dosažení vyšší krystalické a tepelné stability filmu. Aplikace bakteriálních celulózových membrán vede k lepšímu hojení ran vzniklých při popálení, ale i zlepšení hojení chronických ran. Mohou být využívány pro potřebnou migraci buněk, proliferaci a diferenciaci lidských hladkých svalů. Tyto materiály jsou vhodné pro regeneraci chrupavky, kosti, močové trubice, močového měchýře a umožňují interagovat s buňkami a ostatními tkáněmi díky schopnosti tvořit lešení s dobrými mechanickými vlastnostmi [12].

1.1.3 Nosné materiály pro kultivaci a studium buněk

Jedním z popsaných materiálů využívaným v tkáňovém inženýrství jsou pórovité kryogely kyseliny chitosan-hyaluronové připravované za studena. Tyto kryogely tvoří přírodní lešení, které má makroporézní architekturu s 90–95% pórovitostí. Kryogely by měly být schopné nahradit léčivý tkáňový biomateriál, avšak musí mít upravený povrch umožňující připojení živých buněk. To znamená, že musí mít strukturu, která dokáže opravit poškozenou tkáň a umožňuje diferenciaci a proliferaci buněk. HA zodpovídá za větší flexibilitu a delší trvanlivost kryogelů. Z testů in-vitro bylo zjištěno, že kryogely jsou vhodné i pro vývoj buněk [13].

Na životaschopnosti a růstu enkapsulovaných chondrocytů na filmu z kyseliny chitosan-hyaluronové se podílí především tuhost a elasticita gelu. Tuhost gelu hraje hlavní roli v mikroprostředí, při udržování fenotypové integrity. V případě tuhých gelů byla životaschopnost buněk identifikována po dobu 7 dnů kultivace na rozdíl od méně tuhých gelů. Z toho vyplývá, že je velmi důležité zvolit správnou konzistenci polymeru [14].

Znalost chování chondrocytů v gelových matricových systémech s různou tuhostí napomáhá v navrhování vhodné tuhosti vyráběných matic. Chování chondrocytů je zobrazené na Obr. č. 6. Vyráběné matrice manipulují a řídí chování buněk při vývoji hyalinní tkáně chrupavky [14].



Obr. č. 6: Konfokální mikroskopické snímky chondrocytů, které byly obarveny ve třech gelech 10 : 1, 10 : 3 a 10 : 5 chitosan: HA pro zjištění životaschopnosti buněk, které byly zapouzdřené. Zeleně fluoreskující buňky jsou živé a červené jsou odumřelé [14].

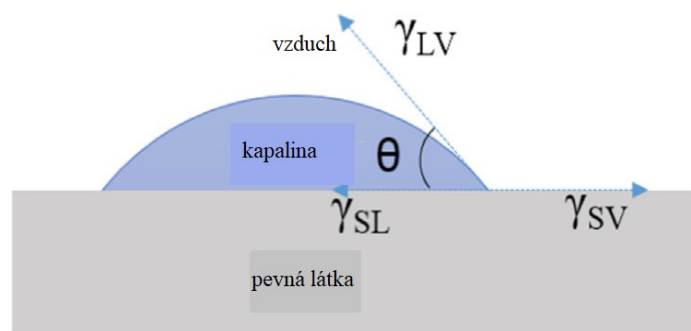
Pro vyvolání selektivního chování buněk jsou navrhovány modifikace polyanilinového nanostrukturovaného povrchu. Díky nejrůznějším technologiím bývá nejčastěji měněna smáčivost, drsnost, měkkost a náboj takovýchto povrchů [15]. Díky těmto změnám dochází k významnému ovlivňování životaschopnosti buněk. Modifikované nano-strukturované povrchy je možné využít při hojení ran nebo například jako biosenzory.

1.1.4 Další aplikační možnosti

Strukturované povrchy se uplatňují také v jiných odvětvích, nejen v kosmetickém průmyslu a medicíně. Strukturované povrchy jsou hojně využívány při potahování různých materiálů za použití jiného materiálu, který slouží jako potahující látka. Například potahování materiálu nitridem titanu. Tohoto potahování se využívá ke snížení abraze v kombinaci s olejovým mazivem.

1.1.4.1 Superhydrofóbní a superhydrofilní povrchy

Superhydrofóbní povrch je takový, který má schopnost udržet vodu na povrchu ve tvaru kapky s co největším kontaktním úhlem smáčení, kdežto superhydrofilní je takový, který má schopnost udržet vodu na povrchu v podobě filmu (s minimálním kontaktním úhlem smáčení). Superhydrofilita je jednou z důležitějších vlastností v mnoha praktických aplikacích. Takový typ materiálu by měl mít mikrostruktury s vysokým poměrem stran. Tudiž se zvyšující se drsností povrchu se zvyšuje hydrofilita materiálu. Drsnost snižuje zdánlivý kontaktní úhel (Obr. č. 7). Schopnost vody ležet na povrchu ve formě filmu ovlivňuje mnoho praktických aplikací [16].



Obr. č. 7: Kontaktní úhel: γ_{LV} - povrchové napětí kapalina – plyn; γ_{SV} - povrchové napětí pevná látka – plyn; γ_{SL} - povrchové napětí kapalina – pevná látka [16].

1.1.4.2 Vodivé a magnetické vrstvy

Příkladem nanostrukturovaných materiálů může být oxid měďný, který se syntetizuje termolýzou za pomoci prekursoru uhličitanu při různých teplotách. U těchto vzorků se elektrická vodivost zvyšuje se zvyšující se velikostí krystalků, kde velikost krystalků roste s rostoucím rozkladným teplem [17].

Prostřednictvím odlévání, vstřebávání nebo potahování disperzí se získávají třírozměrné magneticky vodivé struktury s předpokládaným použitím jako extrémně selektivního a citlivého snímače s rychlou odezvou [18].

Zásadní vliv na elektrickou vodivost má přídavek polyanilinu, který zvyšuje vodivost filmů z Nylonu 6. Zvýšenou elektrickou vodivost vykazují především nanovláknité filmy [19].

1.1.4.3 Membrány

Multifunkční membrány z acetátu celulózy se vyznačují zvýšenou hemokompatibilitou, antibakteriální a antioxidační aktivitou. Bylo zjištěno, že vícevrstvé modifikované mem-

brány výrazně zlepšují biokompatibilitu v prostředí krve včetně odolnosti vůči nespecifické adsorpci proteinů, potlačení adheze a aktivace destiček, prodloužení koagulačních časů a snížení hemolýzy krve. Mimo to takovéto systémy vykazují silnou inhibici růstu bakterií [20]. Díky svým antioxidačním vlastnostem jsou tyto filmy navrhovány k použití v biomedicínských aplikacích jako membrány sloužící k čištění krve.

Polysacharidové membrány se používají v biomedicíně jako systémy, které zlepšují účinnost léků při hojení ran a v oblasti tkáňového inženýrství. Pro zlepšení mechanických vlastností membrán jsou tyto systémy často síťovány. Výsledky studií ukázaly, že více zesíťované membrány umožňují účinnější diferenciaci myoblastů [21].

2 ZPŮSOBY ZMĚN POVRCHOVÉHO RELIÉFU POLYMERNÍCH MATERIÁLŮ

Pro selekci buněk je velmi důležitý reliéf povrchu. Upravený povrch reguluje buněčnou mobilitu a tím ovlivňuje růst a šíření buněk na povrchu. Povrchová struktura a vlastnosti jsou tedy důležitým faktorem v bioinženýrství a biotechnologiích. Je známo, že jakákoliv změna vlastností povrchu může ovlivnit chování buněk.

Pro změnu povrchové topografie byla vyvinuta celá řada metod. Mezi nimi jsou nejvíce využívány především ty, které umožňují vznik specifické mikro/nano struktury. Jsou vyvíjeny takové postupy, které umožní připravit povrchy podobné extracelulární matici. Při těchto úpravách se mění smáčivost, drsnost, modul tuhosti a náboj povrchu, jak již bylo zmiňováno výše.

Jednou z možností, jak definovaně texturovat povrch materiálu, je měkká litografie. Pomocí takovéhoho přístupu lze strukturovat upravovaný materiál z obou stran a tím nastavovat chování daného systému [15].

Dalšími používanými metodami jsou laserové a plazmatické úpravy, metody fázové separace, chemické a fyzikální leptání atd.

2.1 FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ METODY

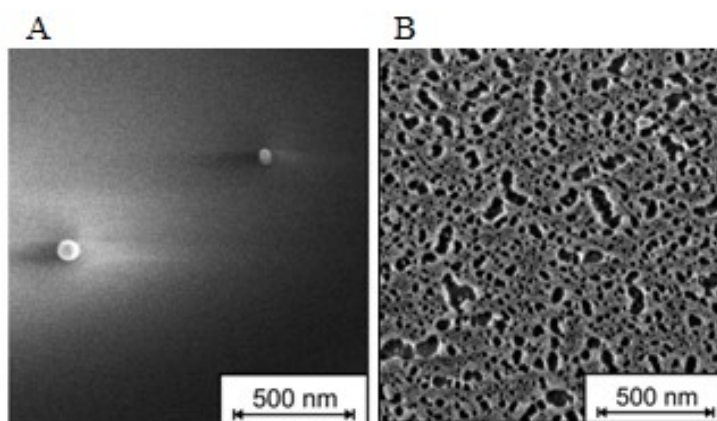
Povrchovou texturu lze měnit celou řadou přístupů založených na fyzikálně-chemickém působení na daný materiál. Tyto přístupy úpravy povrchu mohou být aplikovány jak na syntetické, tak na bio-polymery.

Vlivem chemického působení na povrch upravovaného materiálu se velmi často mění jeho smáčivost a schopnost sorbovat na svůj povrch proteiny [22].

Fyzikálně-chemické metody lze rozdělit na nekovalentní (nanášení rozpouštědel, povrchově aktivních aditiv, depozice par atd.), kovalentně vázané (foto roubování, plazmatické úpravy, radiační roubování, iontové rozprašování, chemické roubování, biologické modifikace, silanizace atd.), modifikace originálního povrchu (plazmatické leptání, koronový výboj, UV ozařování, výměny iontů, iontové leptání, laserové úpravy, broušení, fázové separace) [23].

2.1.1 Plazmatické úpravy

Jednou z literárně popsaných úprav povrchu jsou plazmové úpravy polymerů. Pomocí této techniky lze vytvářet nanostrukturované reliéfy vyznačující se zvýšenou antioxidační aktivitou, odolností vůči nečistotám, zlepšení přilnavosti k lepidlům a dalším povlakům. V případě tohoto přístupu, vlastnosti povrchové struktury a její aplikace závisí především na složení, morfologii a typu krystalů ve zpracovávaných polymerech. Výsledné nanostruktury mohou vykazovat pravidelné rozložení pórů na povrchu s přibližně stejnou velikostí pohybující se v řádech nanometrů (Obr. č. 8) [24].

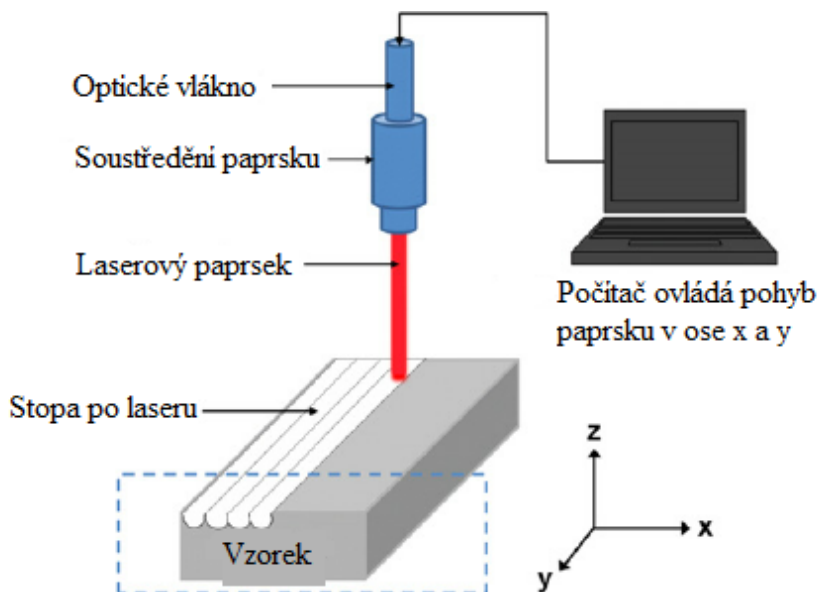


Obr. č. 8: SEM – obrázky: A) neupraveného povrchu laku, B) je nanostrukturovaný lak upravený metodou plazmatického leptání [24].

2.1.2 Úpravy laserem

K vytvoření strukturovaného povlaku na povrchu materiálu se využívají femtosekundové lasery. Velmi často se používá femtosekundový laserový impulz (30 fs) s vlnovou délkou 790 nm s frekvencí 1 kHz. Pomocí takového periodického laserového působení lze, vytvářet povrchové mikro a nano struktury, Obr. č. 9 [25].

Obecně platí, že laserové metody, používané na polymerních filmech, umožňují připravovat struktury s vysokým prostorovým rozlišením. Pro dosažení požadovaných nanostruktur jsou používány laserové zdroje různých vlnových délek. Různého typu povrchového reliéfu lze dosáhnout změnou parametrů použitého laseru a změnou procesních parametrů úpravy [26].



Obr. č. 9: Modifikace povrchové topografie pomocí laseru [25].

Povrchové struktury získané úpravou za pomoci laseru vykazují širokou škálu povrchových vlastností, čímž je podmíněn jejich aplikační potenciál v různých oblastech. Pulzní laserové ozáření je uplatňováno v případě tvorby mřížkových reliéfů [27].

2.1.3 Mechanické úpravy povrchu

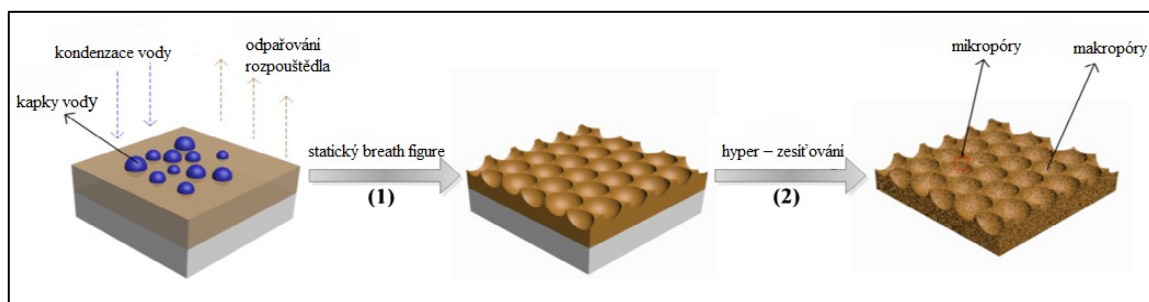
Další možností úpravy reliéfů povrchů je využití speciálních brusných kotoučů. Jedním z literárně popsanych postupů je použití dvou typů brusných kotoučů [28]. Aby bylo možné vytvořit definovaně strukturované plochy, je nezbytné vytvořit masku, která se přenesse na povrch použitého brusného kola, jímž se upravuje povrch do požadované podoby.

3 METODY ZALOŽENÉ NA FÁZOVÉ SEPARACI

Jedním z perspektivních přístupů generace povrchových mikro a nanopórů je technika založená na procesu fázové separace. V odborné literatuře z poslední doby je této problematice věnována značná pozornost s ohledem na skutečnost, že pomocí tohoto přístupu lze relativně jednoduše a rychle generovat na povrchu upravovaného polymerního materiálu specifickou povrchovou mikro a nano texturu [29].

3.1 Metoda BreathFigure

Jedním z přístupů, který je založený na procesu fázové separace, je metoda BreathFigure (BF). Jedná se o relativně jednoduchý proces umožňující vznik pórů bez jakékoliv šablony. Postup generace pórů pomocí této techniky lze vysvětlit na následujícím příkladu. Po odlití roztoku polymeru nebo nabití povrchové vrstvy polymerního filmu se nechá na povrchu kondenzovat nemísitelná kapalina vzhledem k použitému polymeru a jeho rozpouštědlu. Kondenzace kapek vody na povrchu je podporována rychle se odpařujícím rozpouštědlem polymeru, tj. procesem, který má za následek ochlazení povrchu, na němž dochází ke kondenzaci nano a mikro kapiček. Kapalný systém je volen tak, aby se tyto kapičky odpařovaly pomaleji než použité rozpouštědlo pro daný polymer [29, 30, 31]. Tento jednoduchý proces je schématicky znázorněn na Obr. č. 10.



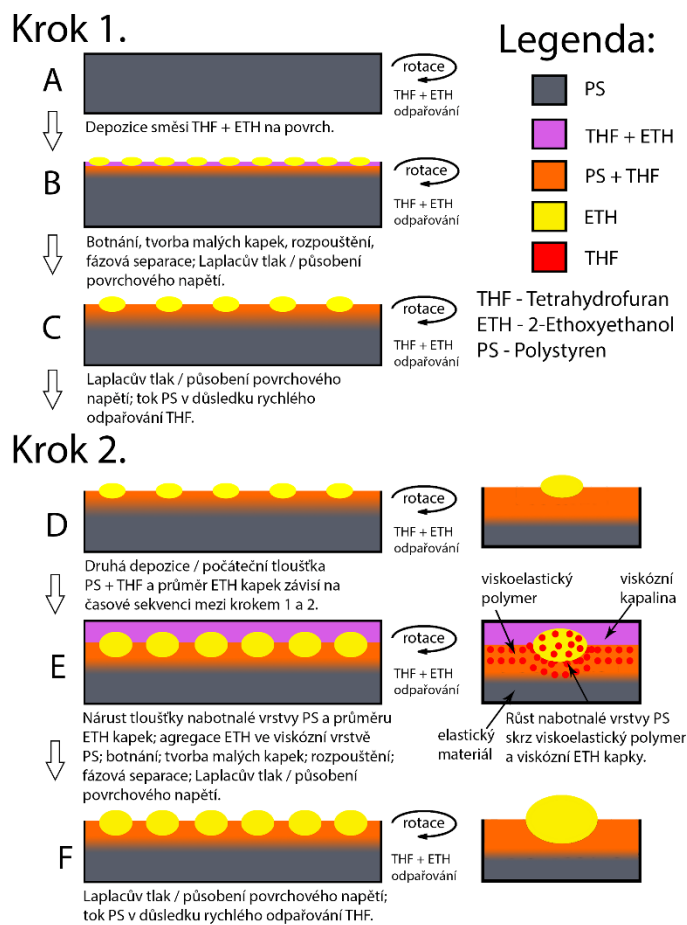
Obr. č. 10: Princip přípravy mikroporézního povrchu metodou BreathFigure [30].

Tímto přístupem lze připravit pravidelné struktury, které zajišťují silnější elektrokatalýzu a vodivost, což vede ke zlepšení biosenzibilizačních vlastností takto upravených filmů [32].

Velikost pórů je závislá na koncentraci polymeru a rychlosti odpařování. Čím vyšší je koncentrace polymeru, tím déle se odpařuje rozpouštědlo. Při pomalém odpařování a vysokých koncentracích kondenzujících par může docházet ke spojování kapek do větších celků, tudíž se rozšiřuje distribuce velikosti pórů [30].

3.2 Texturizace působením směsí rozpouštědel na rotující povrch

Povrchovou mikro a nano texturu lze generovat i v suchém prostředí, to znamená, že na povrch materiálu nebudou kondenzovat žádné kapky z okolního plynného prostředí. Na místo toho se na polymerní povrch deponuje směsný roztok, který obsahuje dobré a špatné rozpouštědlo a případná aditiva. Jedním z takovýchto přístupů je metoda založená na časově sekvenovaném dávkování směsi rozpouštědel za rotace popsaná E. Wrzecionkem a kol. [33]. Princip tohoto přístupu, který byl využíván v rámci této práce, je uveden na Obr. č. 11 a popsán níže.



Obr. č. 11: Modifikace povrchu polymerního materiálu metodou časově sekvenované fázové separace za rotace [33].

Na povrch PS (polystyrenu) je deponována směs dobrého a špatného rozpouštědla. Vzorek rotuje danou rychlostí. V určitých časových sekvencích je na povrch vzorku dávkováno celkem 1000 μ l směsného roztoku (nejčastěji bylo deponováno 5×200 μ l směsi rozpouštědel). V rámci tohoto postupu, viz Obr. č. 11, byl použit tetrahydrofuran (THF) jako dobré rozpouštědlo, které začíná nabotnávat povrchovou vrstvu polymeru, viz Obr. č. 11 B, při-

čemž dochází k rozpouštění povrchu, fázové separaci a tvorbě malých kapek špatného rozpouštědla pro PS, 2-ethoxyethanolu (ETH). Opakované nanášení dalších kapek směsi THF : ETH má za cíl vyvolat děje vyobrazené na Obr. č. 11 E. Postupným časově sekvencovaným opakováním jednotlivých kroků dochází k postupnému zvětšování obou fází a zejména pak kapiček, které tvoří povrchové póry. V posledním kroku se vzorek nechá rotovat a dochází nejdříve k odpaření dobrého a pak špatného rozpouštědla. Vytvoří se film obsahující povrchové mikropóry [33]. Nezbytnou podmínkou pro vyvolání takovýchto změn na povrchu je vybrat optimální směs dobrého a špatného rozpouštědla. Vybraná rozpouštědla musí být taková, která jsou vzájemně mísitelná a separují se až po kontaktu s polymerem. Dále pak nastavit nejvhodnější poměr těchto rozpouštědel ve směsi a zvolit optimální časovou sekvenci dávkování na povrch upravovaného polymerního materiálu. S výběrem nejvhodnější směsi rozpouštědel mohou pomoci Hansenovy rozpustnostní parametry [34].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE PORÉZNÍCH FILMŮ Z HA

Cílem této práce bylo upravit povrchovou texturu filmů připravených z vodných roztoků hyaluronanu sodného (HA). V prvním kroku byly čištěny láhve pro přípravu polymerních roztoků. Následně byla rozpouštěna HA o jedné střední molekulové hmotnosti v ultračisté vodě. Připravené roztoky byly odlévány do plazmaticky upravených hladkých nebo texturovaných misek, v nichž byly sušeny. Takto připravené filmy byly po vysušení dosušovány, botnány nebo ihned vystaveny účinku časově sekvenované fázové separace za rotace. Po odpaření zbytků roztoků z procesu generace povrchových pórů byly vzorky charakterizovány pomocí mikroskopie atomárních sil. Získané obrazové záznamy byly následně podrobeny obrazové analýze.

4.1 Používané chemické látky

Vodné roztoky HA byly připravovány z HA o střední molekulové hmotnosti 370 kDa (označení v této práci M370). Používaná HA byla zakoupena v kosmetické čistotě od společnosti Contipro, a. s.

Pro rozpouštění HA byla použita ultračistá voda ($18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) připravená pomocí zařízení Direct-Q, viz Obr. 12.

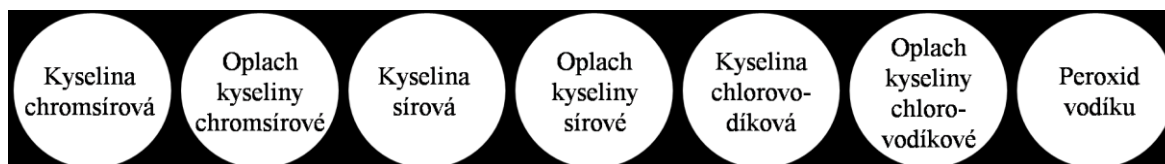


*Obr. č. 12: Použité zařízení Direct-Q
pro výrobu ultračisté vody.*

Dále byly používány rozpouštědla pro úpravu nosného povrchu polystyrenu (PS), jako jsou tetrahydrofuran a 2-ethoxyethanol v p.a. čistotě zakoupené u společnosti Sigma-Aldrich. Chemickými látkami používanými pro modifikaci povrchu filmu HA byly: n-butanol a izopropylalkohol v p.a. čistotě od společnosti Sigma-Aldrich.

4.2 Příprava nádob pro rozpouštění HA

Před přípravou roztoku byly veškeré nádoby podrobeny komplexnímu procesu čištění, který spočíval v umístění všech skleněných nádob do série roztoků, viz Obr. č. 13 a 14. Tento krok byl volen záměrně, aby se minimalizovala možnost chemické a biologické kontaminace připravovaných roztoků.



Obr. č. 13: Schéma složení lázní pro mytí laboratorního skla.

Veškeré použité kyseliny pro čištění nádob byly ředěny vodou v poměru 1 : 1, peroxid vodíku byl ředěn na 5% koncentraci. V každé lázni bylo sklo ponecháno alespoň 20 minut. V závěrečném kroku bylo sklo opláchnuto destilovanou vodou, acetonem, znovu destilovanou vodou a ethanolem. Po celém procesu bylo sklo vloženo alespoň na 20 minut do sušárny vyhřáté na 120 °C.



Obr. č. 14: Lázně kyselin a jejich oplachy pro mytí skla.

Magnetické a polystyrenové pomůcky byly čištěny vodou s následným vložením na nejméně 20 minut do peroxidu vodíku. Poté byly tyto materiály opláchnuty destilovanou vodou, acetonem, znovu destilovanou vodou a ethanolem. Sušení těchto pomůcek probíhalo opět ve vytemperované sušárně na 120 °C po dobu 20 minut.

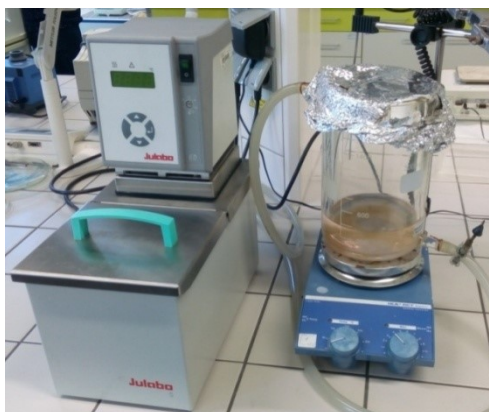
Jako jediné polystyrenové Petriho misky zakoupené od firmy TPP Techno PlasticProducts AG, využívané pro odlévání filmů, nebyly umývány a ani znovu používány. Tyto misky byly dodávány jako sterilní, proto je nebylo třeba speciálně čistit před povrchovou modifikací a plazmatickou úpravou.

4.3 Příprava vodných roztoků HA

Veškeré vodné roztoky HA, pro jednotlivé pokusy, byly připravovány následujícím způsobem, pokud není uvedeno v textu jinak:

- 3 hm. % HA o $M_w = 370$ kDa bylo rozpouštěno v ultračisté vodě,
- roztoky byly rozpouštěny při pokojové teplotě na třepacím zařízení nebo v temperační nádobě na magnetickém míchadle za neustálého míchání při teplotě 50 °C, doba rozpouštění byla 24 hod.

Po uplynutí doby rozpouštění byl roztok ihned odlit na PS misky, jak bude podrobně rozebráno níže.



Obr. č. 15: Použitá temperační lázeň na magnetickém míchadle napojená na termostat.

4.4 Úprava nosných substrátů pro odlévání filmů HA

Před odlitím roztoku bylo zapotřebí upravit povrch PS misek pro lepší adhezi solidifikovaných filmů HA tak, aby nedocházelo k odlepování filmu. Povrch byl upravován na spin-couteru pomocí 5 dávek směsi rozpouštědel (tetrahydrofuran a 2-ethoxyethanol, v poměru 1,5 : 8,5), každá dávka byla o objemu 200 μ l, dávkování probíhalo v časovém intervalu 5 s. Podrobněji je postup úpravy povrchu PS popsán v práci E. Wrzecionka [33].

Pro zajištění optimální adheze bylo nezbytné před depozicí roztoku na texturovaný nebo hladký povrch zvýšit hydrofilitu těchto povrchů. Pro tyto účely byl použit plazmatický výboj. Jako plazmareaktor byl použit nízkotlaký reaktor značky FEMTO SRS od společ-

nosti Diener electronic (Obr. č. 16). PS misky byly upravovány v prostředí vzduchu za sníženého tlaku po dobu 60 s, při výkonu reaktoru 100 W.



Obr. č. 16: Použitý plazmareaktor značky FEMTO SRS.

4.5 Odlévání vodných roztoků

Roztoky pro přípravu filmů byly odlévány na PS misky průměru 3,4 cm. Do každé misky bylo dávkováno 5 g roztoku, výška vrstvy roztoku na počátku sušení byla 6 mm.

4.6 Sušení roztoků – tvorba hladkých filmů

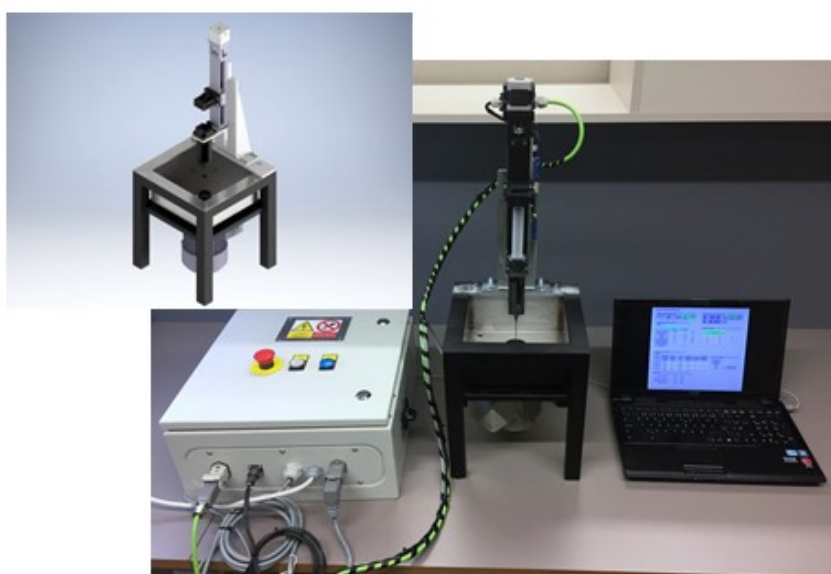
Po odlití roztoků do misek probíhalo jejich sušení v sušárně bez nucené cirkulace vzduchu. Pro tyto účely byla využívána sušárna Memmert (Obr. č. 17), nastavena na teplotu 50 °C. Roztok HA byl plně solidifikován do podoby filmu po 24 hod. Po vyjmutí ze sušárny byl vzorek povrchově upravován nebo skladován v exikátoru, aby došlo k odstranění zbytkové vody.



Obr. č. 17: Použitá sušárna značky Memmert.

4.7 Generace povrchové mikro a nano textury

Připravené filmy byly povrchově upravovány za pomoci směsi rozpouštědel za rotace. Tato směs dobrého a špatného rozpouštědla spolu s optimální nastavením procesu dávkování a rotací vyvolá v povrchu fázovou separaci, z čehož následně plyne vznik povrchových mikro a nanopórů. Pro generaci povrchové porózní struktury bylo použito speciálně zkonstruované zařízení E. Wrzecionkem a kolektivem na UFMI, UTB ve Zlíně, viz Obr. č. 18. Toto zařízení se skládá z nosiče vzorků na rotoru, dávkovací jednotky a řídicí elektroniky.



Obr. č. 18: Použité zařízení pro modifikaci povrchové topografie polymeru metodou časově sekvenované fázové separace za rotace.

Na povrch upravované HA byly deponovány 200 μl dávky směsných roztoků a vody v časovém intervalu dávkování 5 s. Po nanesení poslední dávky směsi rozpouštědel byl vzorek ponechán rotovat na spin-couteru po dobu 2 minut, aby došlo k úplnému odpaření zbytkových rozpouštědel. Vzorky byly pak nadále skladovány v exikátoru po dobu 24 hod a následně charakterizovány pomocí AFM.

4.8 Charakterizace porózních filmů HA pomocí AFM

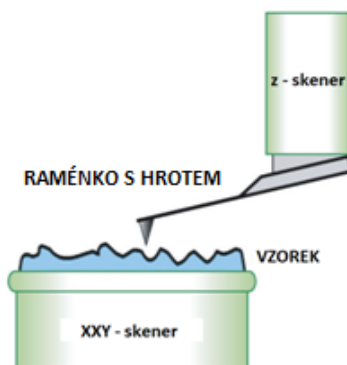
Upravené povrchy na bázi polystyrenu nebo HA byly charakterizovány pomocí mikroskopie atomárních (AFM). Studované filmy a povrchy byly situovány uvnitř – na dně Petriho misky. Z tohoto důvodu bylo nezbytné vyseknout ze středu misky vzorek i s nosným mate-

riálem. Takto připravené vzorky byly přichyceny k nosiči vzorků pro AFM pomocí oboustranné lepící pásky.

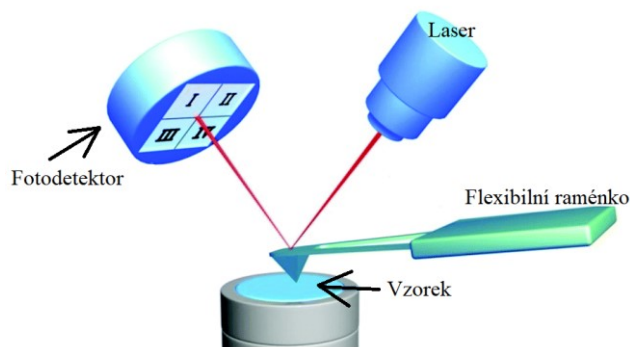
Pozn.: Vzorky byly vysekávány ze středu misky tak, aby bylo na všech miskách měřeno přibližně stejné místo a mohli jsme zanedbat okrajové poruchy filmů vznikající u hran Petriho misek.

Princip mikroskopie atomárních sil je naznačen na Obr. č. 19 až 21. Tato technika se používá pro charakterizaci biomedicínských systémů, díky své šetrnosti s ohledem k možnému poškození studovaných vzorků. Vzorky lze charakterizovat ve vzduchu, definované atmosféře nebo v kapalině (fyziologickém prostředí). Pomocí této techniky lze získat informace nejen o 3D profilu povrchu, ale rovněž o fyzikálních vlastnostech povrchu. Rozlišovací schopnost této techniky se pohybuje v řádech desetin až setin nanometru [35].

Zobrazování studovaného povrchu pomocí AFM spočívá ve skenování vzorku po jednotlivých bodech a řádcích. Povrch vzorku je zkoumán pomocí tenkého hrotu, který je umístěn na raménku s horní reflexní vrstvou, od které se odráží dopadající laserový paprsek. Změna polohy raménka vůči hrotu se projeví ve změně polohy odraženého laserového paprsku na čtyř segmentálním detektoru, viz Obr. č. 19 a 20 [46].

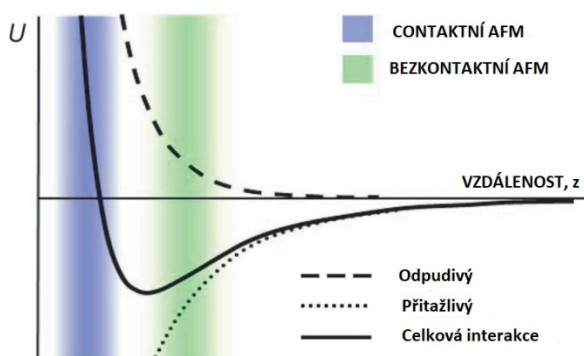


Obr. č. 19: Skenovací systém AFM [36].



Obr. č. 20: Princip měření AFM.

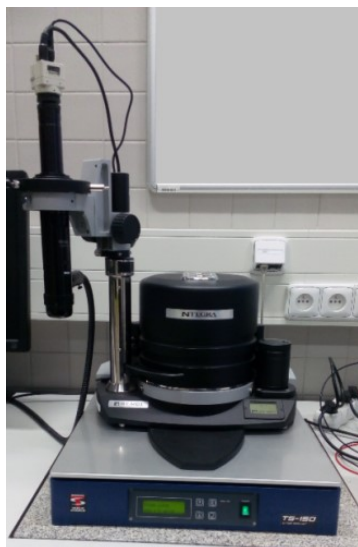
Pohyb vzorku s přesností v řádech desetin až setin nanometru zprostředkovávají piezokry-
talické materiály. S ohledem na vzdálenost sondy od povrchu vzorku a silové interakci
mezi sondou a vzorkem rozlišujeme tři základní měřící módy AFM (kontaktní, semikon-
tactní a bezkontaktní), viz Obr. č. 21.



Obr. č. 21: Měřící režimy AFM znázorněné v grafu závislosti síla/vzdálenost.

Semikontaktní režim je mezi modrou a zelenou oblastí [36].

Pro měření byl použit přístroj NTEGRA-Prima, od společnosti NT-MDT, viz Obr. č. 22. Měření probíhalo v prostředí vzduchu při laboratorní teplotě 23 °C. Vzorky byly skenová-
ny rychlostí 0,5 Hz s rozlišením 512 × 512 px. Pro měření byla použita silikonová nitrido-
vá sonda NSG01, TipsNano.



Obr. č. 22: Použitý mikroskop atomárních sil Ntegra-Prima.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem této práce bylo prozkoumat možnosti přípravy mikro a nano porózních povrchů na bázi hyaluronanu sodného (HA) metodou časově sekvenované fázové separace za rotace. Základní proměnné (poměr mezi dobrým a špatným rozpouštědlem, počet dávek a časová sekvence dávkování), podmiňující vznik specifického povrchového zvrásnění HA byly optimalizovány v rámci diplomové práce Martiny Bradáčové [37]. V rámci této práce byly studovány další proměnné, které ovlivňují možnost vzniku specifického povrchového reliéfu. Těmito proměnnými jsou:

- historie přípravy polymerního roztoku,
- způsob skladování polymerního filmu a jeho dosychání respektive botnání,
- vliv nosného substrátu,
- rychlost rotace vzorku,
- rychlost dávkování směsného rozpouštědla na povrch.

Veškeré níže uvedené experimenty byly minimálně třikrát opakovány pro ověření reprodukovatelnosti získaných výsledků.

5.1 Příprava texturovaných filmů na bázi HA

Podle dříve získaných poznatků [37] byl v rámci této části práce pro úpravu povrchů používán následující postup, pokud není uvedeno jinak: na povrch filmu HA byly dávkovány v intervalu 5 sekund 4 dávky po 200 μ l superčisté vody a 40 dávek po 200 μ l směsi rozpouštědla (N-butanol a isopropylalkohol poměru 3 : 7). Příprava filmů probíhala za srovnatelných podmínek, jak je definováno výše, pokud není v textu uvedeno jinak.

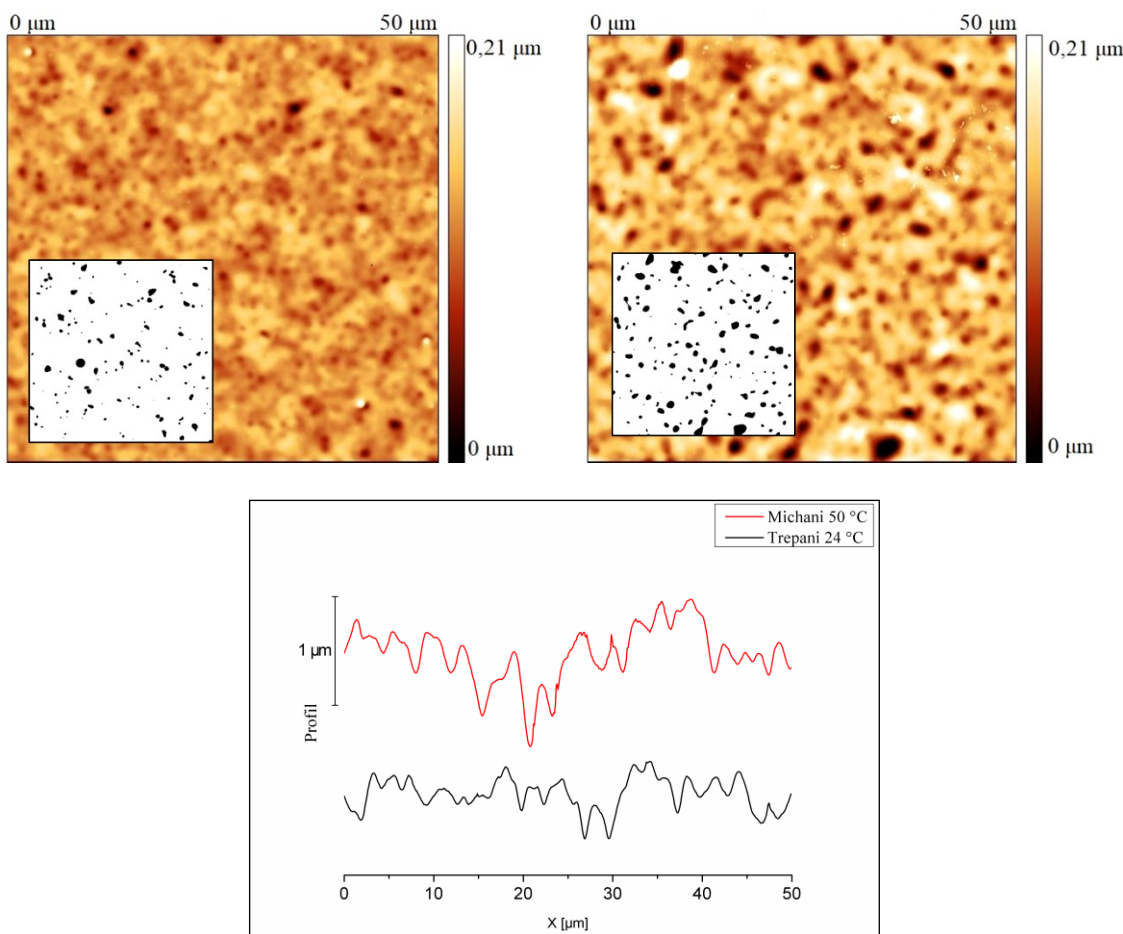
Pozn.: Veškeré filmy byly po modifikaci skladovány 24 hod. v exikátoru a následně charakterizovány pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM). Získané záznamy byly podrobeny obrazové analýze, jejíž výsledky jsou v následujícím textu prezentovány v podobě výškových změn (2D barevný obrázek), profilových řezů a histogramů průměrné plochy pórů. V rámci jednotlivých ploch byla hodnocena maximální výška póru, plošná drsnost (S_a), plošná střední kvadratická drsnost (R_{ms}), šikmost a špičatost, celkový počet pórů a procentuální pórovitost povrchu.

5.1.1 Vliv historie přípravy polymerních roztoků pro přípravu filmů HA

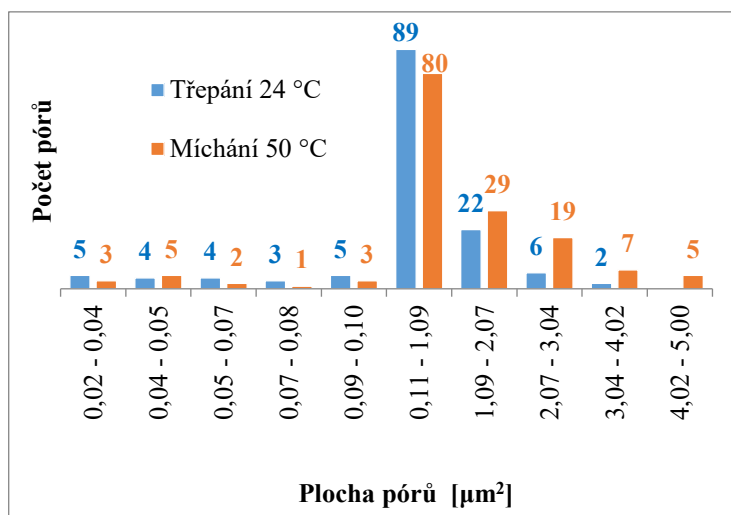
Z literatury je známo, že kyselina hyaluronová může v roztoku zaujímat různé konformace v závislosti na tepelné historii přípravy polymerního roztoku [38, 39]. Na základě těchto poznatků byl zkoumán vliv tepelné historie polymerního systému na možnosti vzniku povrchových pórů. Srovnávané vzorky HA, Obr. č. 23, byly připravovány z roztoků rozpouštěných při 24 °C nebo 50 °C.

A) třepaný roztok při 24 °C

B) míchaný při 50 °C



Obr. č. 23: Vliv tepelné historie přípravy polymerního roztoku, ze kterého byl připravován film, na jehož povrchu docházelo k tvorbě pórů. Výškové změny z AFM (barevně), prahované obrázky pro obrazovou analýzu (černobíle), porovnání profilů povrchů získaných ze středu pořízených skenů z AFM (dole). Povrch HA modifikován ihned po vysušení.



Obr. č. 24: Zastoupení pórů v daném rozmezí ploch odpovídající povrchům prezentovaným na Obr. č. 23.

Z Obr. č. 23 je patrné, že v případě filmů připravovaných z roztoků rozpuštěných při vyšší teplotě (50 °C) lze na upraveném povrchu pozorovat více větších pórů. Toto pozorování potvrzuje Obr. č. 24, kde v histogramu vidíme posun rozložení pórů k větším průměrům. Narůstá počet pórů o ploše 1 až 5 μm^2 . Z profilů a maximálních výškových změn prezentovaných na Obr. č. 23 a v Tab. č. 1 nelze pozorovat výraznější změny mezi jednotlivými vzorky. Výsledky obrazové analýzy shrnuté v Tab. č. 1 ukazují, že v případě filmů odlévaných z roztoků připravených při vyšší teplotě roste pórovitost z 3,6 na 6,5 %, zvětšuje se významněji povrchová drsnost (S_a) a narůstá počet pórů.

Tab. č. 1: Souhrnné parametry získané z obrazové analýzy odpovídající povrchům prezentovaným na Obr. č. 23.

	Maximum [nm]	S_a [nm]	Rms [nm]	Šikmost [1]	Špičatost [1]	Pórovitost [%]	Počet pórů
Třepání 24 °C	210	13,1	17,3	-0,9	4,1	3,6	145
Míchání 50 °C	210	22,0	29,0	-0,8	1,8	6,5	155

S ohledem na skutečnosti zjištěné v rámci tohoto experimentu byly veškeré dále diskutované filmy připravovány z roztoků o vyšší teplotě rozpouštění (roztoky připravovány na míchadle při 50 °C).

5.1.2 Vliv historie skladování filmu hyaluronanu sodného na vznik pórů

Další proměnnou, která ovlivňuje možnost vzniku povrchových pórů na filmech z HA je množství zbytkové vody v polymerním filmu. Voda v daném systému funguje jako dobré rozpouštědlo a do jisté hranice jako výrazný plastifikační činitel. Při samotné generaci povrchových mikropórů metodou časově sekvenované fázové separace je nezbytné v prvním kroku na povrch filmu HA deponovat několik dávek vody tak, aby došlo k jeho povrchovému nabotnění. V rámci níže diskutovaných experimentů byl hodnocen vliv související s touto proměnnou. To znamená, že byla studována historie dosušování polymerních filmů v exikátoru po jejich přípravě, respektive jejich botnání při zvýšené vlhkosti na možnosti generace porózní struktury.

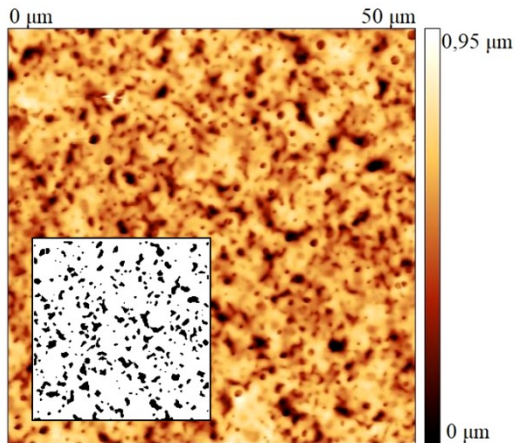
Pozn.: Obsah zbytkové vody byl okrajově určován pomocí průběžného vážení vzorků. Přesněji by ho bylo možné stanovit například pomocí termogravimetrické analýzy, která nebyla v rozsahu této práce řešena.

Byly srovnávány tři vzorky. Prvním vzorkem byl polymerní film, který byl modifikován ihned po odpaření vody, tj. po 24 hodinách sušení v sušárně. Druhým vzorkem byl film, který byl po vysušení v sušárně a 14 dnech skladování v exikátoru, nechán botnat za zvýšené vlhkosti při 24 °C po dobu 24 hodin. Třetím vzorkem byl film, který byl dosušován v exikátoru po dobu minimálně 14 dnů od své přípravy v sušárně.

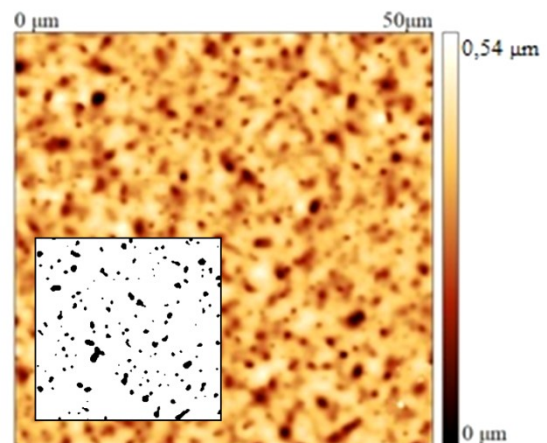
Pozn.: Botnání vybraných filmů probíhalo v uzavřené plastové nádobě s těsněním, na jejímž dně byl umístěn filtrační papír nasycený vodou. Botnaný film po 24 hodinách zvýšil svou hmotnost o více jak 130 %.

Z výsledků uvedených na Obr. č. 25, 26 a v Tab. č. 2 plyne dominantní vliv obsahu zbytkové vody v upravovaných filmech na možnosti generace povrchových pórů metodou časově sekvenované fázové separace. Na povrchu filmů se zvýšeným obsahem zbytkové vody (botnaný film) nelze pozorovat větší množství pórů oproti filmům, které byly dlouhodobě dosušovány v exikátoru (vysušený film). V případě botnaných systémů dochází v první fázi modifikace, kde se deponují 4 dávky vody, ke vzniku mobilní – povrchově viskózní vrstvičky, která může být před depozicí směsi dobrého a špatného rozpouštědla odstříknuta na okraj misky, což následně znemožní generaci většího množství povrchových pórů. Z těchto pozorování se jeví jako nejlepší povrch dosušovaný v exikátoru, případně „čerstvě“ připravený povrch, u něhož je nezbytné kontrolovat obsah zbytkové vody.

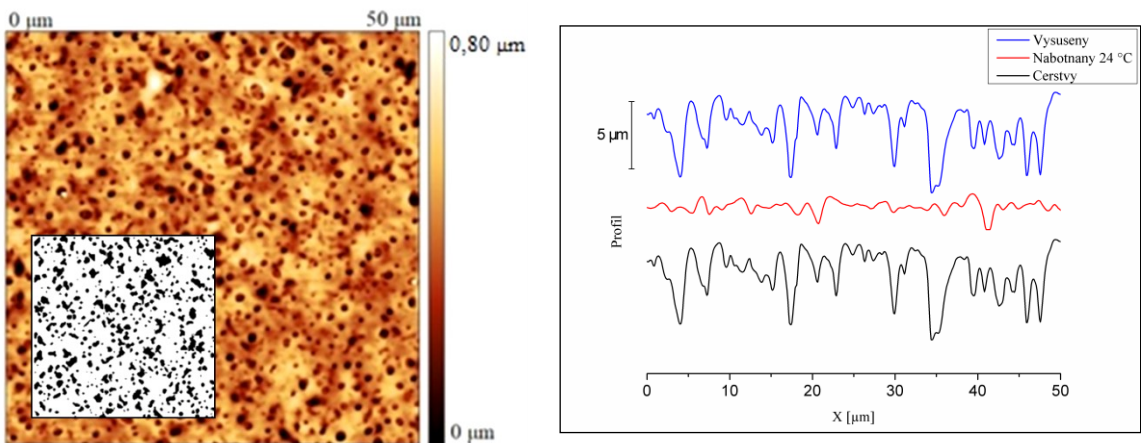
A) „čerstvý“ film HA



B) nabotnaný film HA



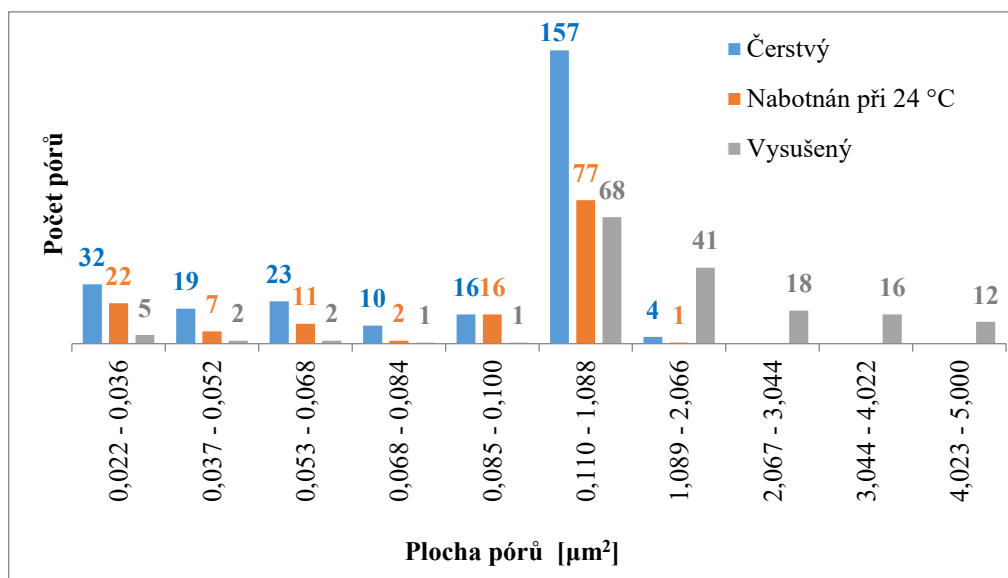
C) dlouhodobě vysušený film HA



Obr. č. 25: Vliv historie skladování filmu hyaluronanu sodného na vznik pórů. Výškové změny z AFM (barevně), prahované obrázky pro obrazovou analýzu (černobíle), porovnání profilů povrchů získaných ze středu pořízených skenů z AFM (dole vpravo).

Tab. č. 2: Souhrnné parametry získané z obrazové analýzy odpovídající povrchům prezentovaným na Obr. č. 25.

	Maximum [nm]	Sa [nm]	Rms [nm]	Šikmost [1]	Špičatost [1]	Pórovitost [%]	Počet pórů
Čerstvý film	950	112	245	-1,1	1,2	14	266
Nabotnaný film	838	101	133	-1,0	1,0	6	143
Vysušený film	800	101	133	-1,0	1,0	21	424



Obr. č. 26: Zastoupení pórů v daném rozmezí ploch odpovídající povrchům prezentovaným na Obr. č. 25.

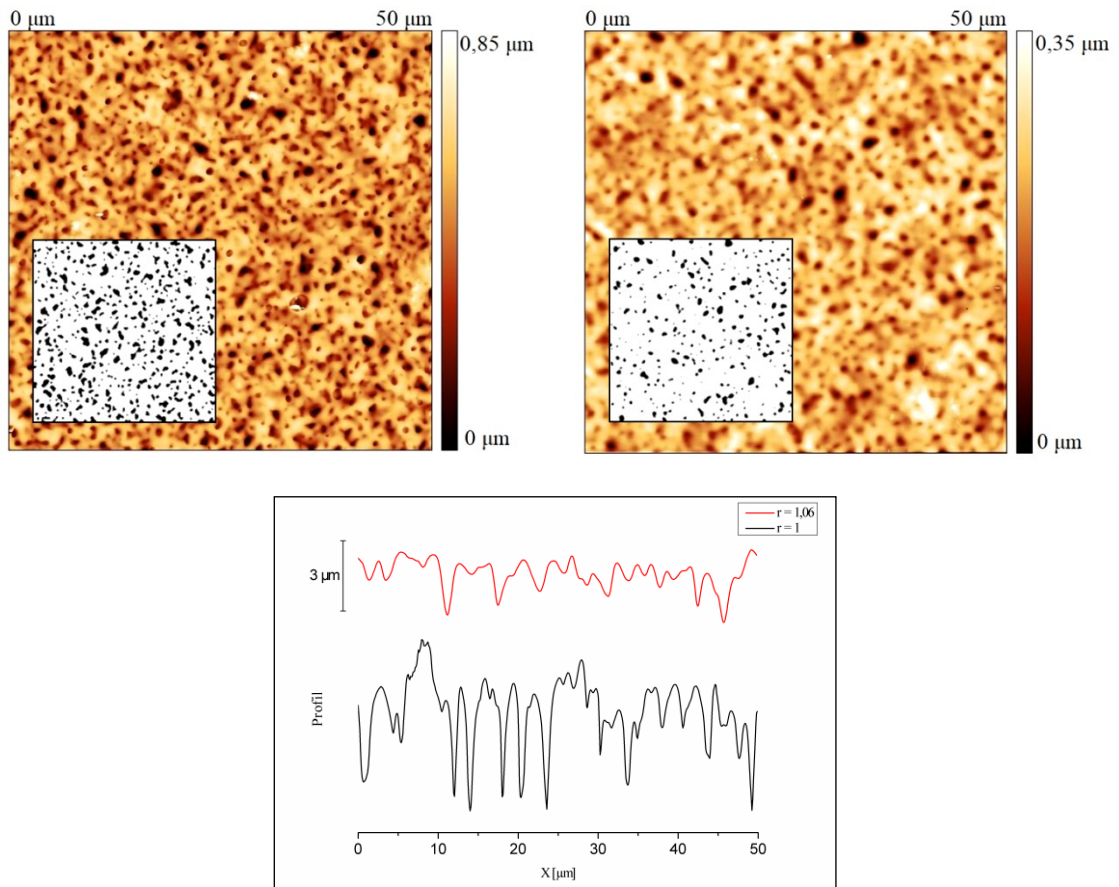
5.1.3 Vliv rychlosti dávkování směsných rozpouštědel

Rychlost dávkování směsi dobrého a špatného rozpouštědla ovlivňuje nejen vznik, velikost a pravidelnost pórů, ale jak bylo experimentálně zjištěno i homogenitu generace pórů na povrchu HA filmů. Vznik homogenního rozložení povrchových pórů je podmiňován rozprostřením směsi rozpouštědla po celém povrchu filmu v co nejkratším čase po depozici. Na tuto skutečnost má vliv několik proměnných, mezi něž patří právě rychlost vytlačování směsi rozpouštědel z dávkovací části použitého zařízení. V rámci prvotních experimentů s použitým zařízením byla vyhledávána optimální rychlost dávkování. Níže uvedený experiment ukazuje, jak relativně malá změna rychlosti určuje počet a velikost vznikajících pórů, viz. Obr. č. 27 a 28, Tab. č. 3. Změna rychlosti vytlačování směsných rozpouštědel o pouhých 6 % má za následek pokles počtu pórů z 257 na 182. Celková pórovitost klesá na polovinu. Mimo to výrazně klesá hodnota S_a ze 105 nm na 38 nm, stejně tak maximální výška profilu klesá z 850 na pouhých 350 nm. Z hlediska rovnoměrnosti pokrytí povrchu póry vychází lépe vzorky připravované při nižší rychlosti vytlačování. Z tohoto důvodu byly veškeré prezentované vzorky připravovány při $r = 1 = 80$ ot./min. v rámci použitého zařízení.

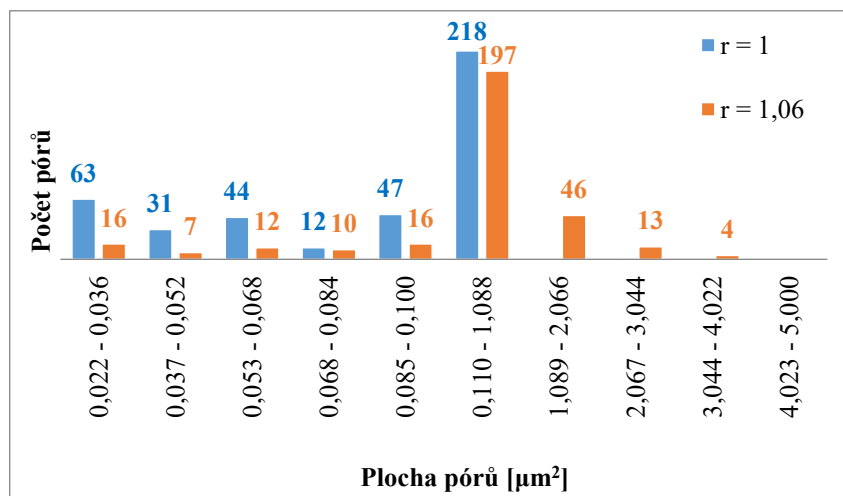
Výše uvedené lze vysvětlit kumulací velkého množství rozpouštědel v krátkém čase uprostřed upravovaného povrchu s následným nerovnoměrným odstříknutím v důsledku rotace vzorku.

A) rychlost dávkování $r = 1$

B) rychlost dávkování $r = 1,06$



Obr. č. 27: Vliv rychlosti depozice dávkovaných směsných rozpouštědel na vznik pórů v povrchu HA filmů. Výškové změny z AFM (barevně), prahované obrázky pro obrazovou analýzu (černobíle), porovnání profilů povrchů získaných ze středu pořízených skenů z AFM (dole).



Obr. č. 28: Zastoupení pórů v daném rozmezí ploch odpovídající povrchům prezentovaným na Obr. č. 27.

Tab. č. 3: Souhrnné parametry získané z obrazové analýzy odpovídající povrchům prezentovaným na Obr. č. 27.

	Maximum [nm]	Sa [nm]	Rms [nm]	Šikmost [1]	Špičatost [1]	Pórovitost [%]	Počet pórů
Rychlost $r=1$	850	105	135	-0,9	1,0	15,3	437
Rychlost $r=1,06$	350	38	49	-0,7	1,3	7,1	324

5.1.4 Vliv rychlosti rotace vzorku

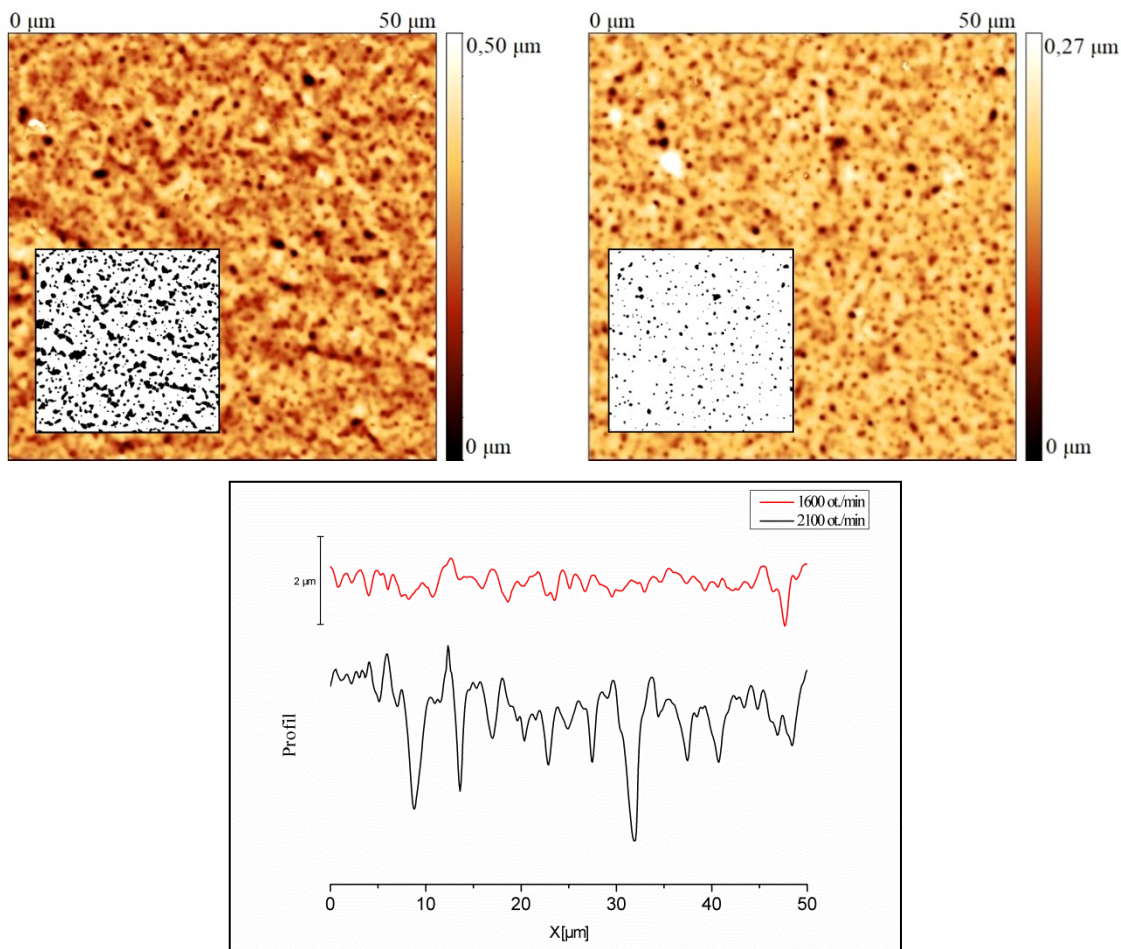
Rychlost rotace vzorku ovlivňuje vznik, velikost a pravidelnost pórů na povrchu filmů HA. Vliv této proměnné je demonstrován na Obr. 29 a 30, v Tab. č. 4. Z porovnání získaných výsledků plyne, že pro daný systém (polymer/směs rozpouštědel) je nezbytné aplikovat vyšší rychlost rotace (2100 ot./min.), která zajistí rovnoměrnější rozvrstvení rozpouštědel po povrchu polymerní folie v dostatečně tenké vrstvě. Tenká vrstva rozpouštědel na povrchu neumožní vznik příliš vysoké viskózní vrstvy HA, která by mohla být odvedena na okraj misky v důsledku rotace vzorku. Naopak nízká rychlost rotace vzorku (1600 ot./min.) způsobuje s nejvyšší pravděpodobností nedostatečné rozprostření rozpouštědel, které se hromadí ve větším množství na povrchu. To má za následek podobný efekt jako bychom upravovaný film nechali před modifikací botnat v prostředí s vyšší vlhkostí. Vzorky připravené při nižší rychlosti rotace se vyznačují menším průměrem pórů, počet pórů klesá na polovinu. Oproti vzorkům připravovaným při vyšší rychlosti rotace u těchto vzorků klesá maximální hloubka pórů z 500 na 270 nm, pórovitost klesá o 15 % a plošná drsnost klesá ze 47 na 21 nm.

Tab. č. 4: Souhrnné parametry získané z obrazové analýzy odpovídající povrchům prezentovaným na Obr. č. 29.

	Maximum [nm]	Sa [nm]	Rms [nm]	Šikmost [1]	Špičatost [1]	Pórovitost [%]	Počet pórů
Rotace 2100 ot./min	500	47	61	-0,7	1,2	18,9	613
Rotace 1600 ot./min	270	21	28	-1,2	3,6	3,5	339

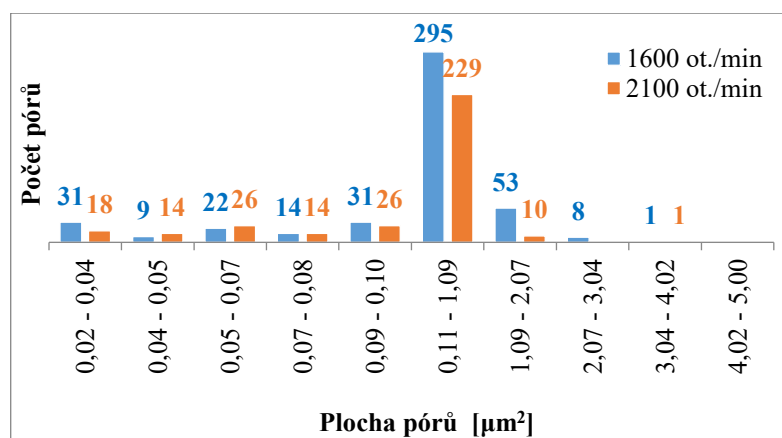
A) rychlost rotace vzorku 2100 ot./min

B) rychlost rotace vzorku 1600 ot./min



Obr. č. 29: Vliv rychlosti rotace upravovaných filmů HA. Výškové změny z AFM (barevně), prahované obrázky pro obrazovou analýzu (černobíle), porovnání profilů povrchů získaných ze středu pořízených skenů z AFM (dole).

Povrch HA modifikován ihned po vysušení.



Obr. č. 30: Zastoupení pórů v daném rozmezí ploch odpovídající povrchům prezentovaným na Obr. č. 29.

5.1.5 Vliv povrchové textury nosného substrátu na bázi PS

Z experimentálních zkušeností vyplynulo, že pro zvýšení adheze sušených filmů HA na povrchu nosného materiálu (polystyrenové Petriho misky) je nezbytné povrch polystyrenu plazmaticky upravit, aby došlo ke zvýšení jeho hydrofility. Mimo to je možné zvýšit adhezi sušeného filmu tak, že na povrchu nosného materiálu se vygeneruje mikroporózní struktura obdobnou metodou jako v případě film HA.

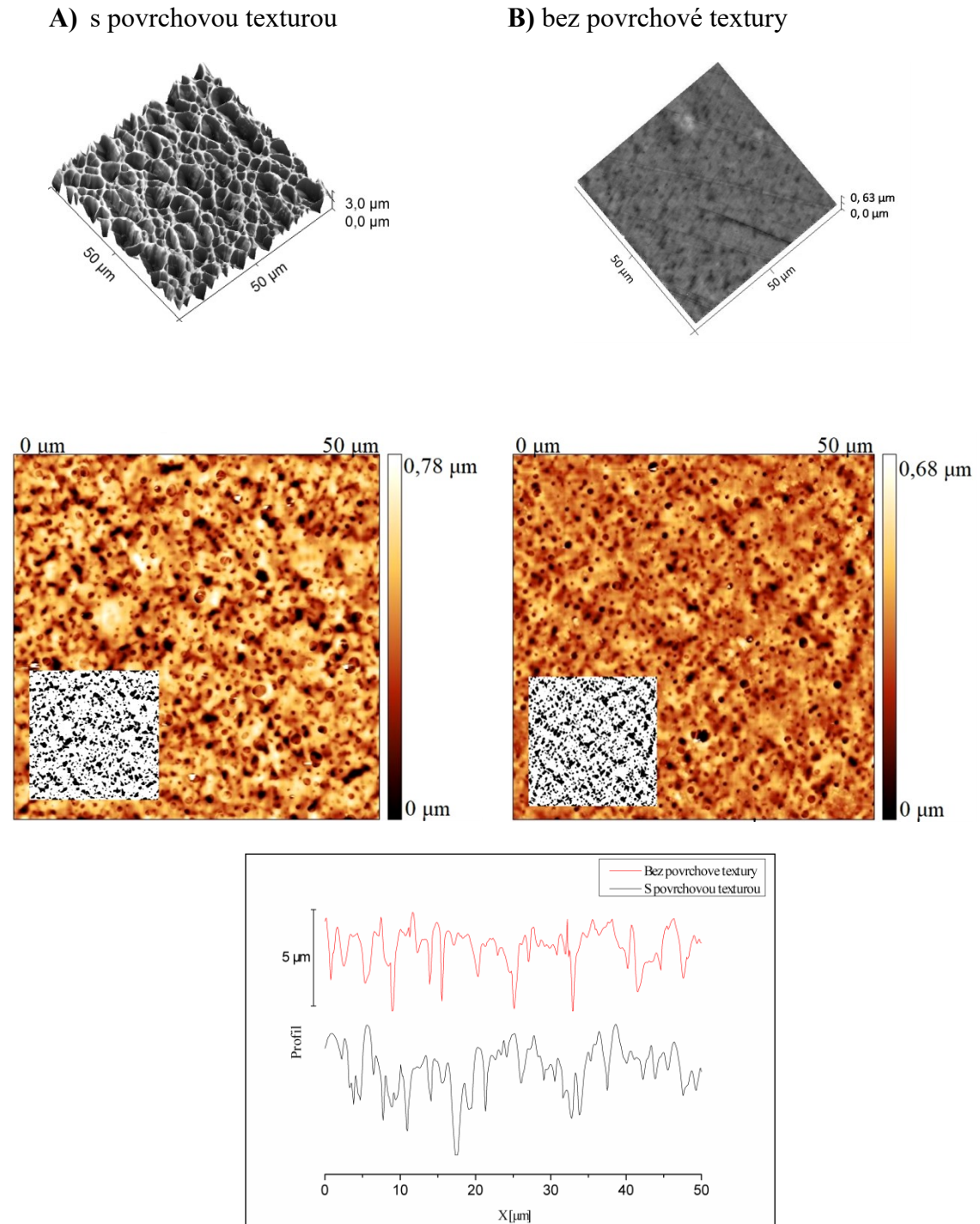
Pozn.: Povrchové mikropóry na PS nosných substrátech byly generovány za použití směsi tetrahydrofuranu a ethoxyethanolu v poměru 1,5 : 8,5, na povrch PS bylo nanášeno 5 dávek o objemu 200 μ l s intervalem 5 s mezi jednotlivými dávkami.

Pozn.: Plazmatická úprava probíhala v případě všech nosných substrátů v prostřední vzduchu za sníženého tlaku po dobu 60 s, při nastaveném výkonu reaktoru 100 W.

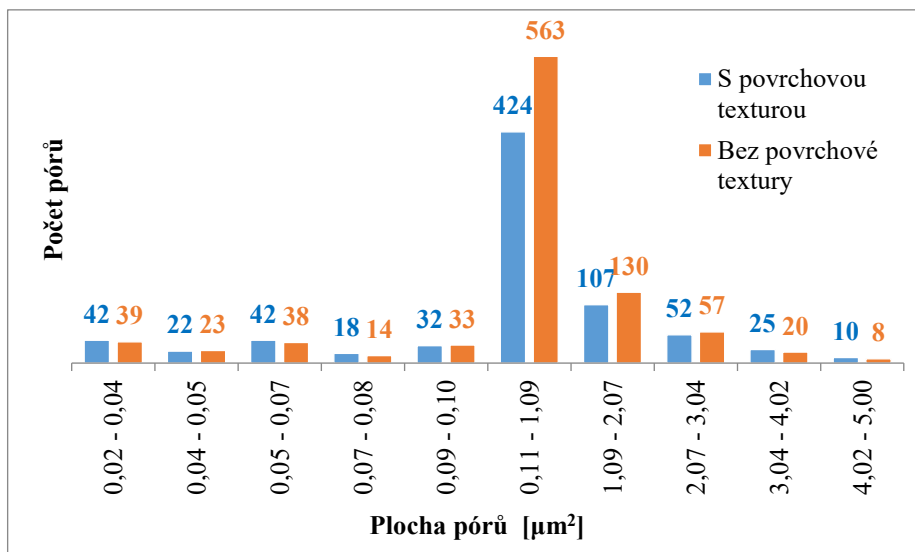
Cílem těchto experimentů bylo zjistit, zda nemůže povrchová mikrotextura nosného substrátu (PS misky) ovlivňovat vznik povrchových pórů na filmech HA, které byly na takovémto substrátu vysušeny. Z výsledků uvedených na Obr. č. 31 a 32 plyne, že typ nosného podkladu neovlivňuje vznik povrchových mikropórů na filmech z HA. Toto tvrzení dokládá podobný vzhled porózních povrchů uvedený na Obr. č. 31, stejně tak výškové profily ze středu vyobrazených obrázků. Co do počtu pórů a celkové porozity povrchu jsou oba srovnávané povrchy velmi podobné.

Tab. č. 5: Souhrnné parametry získané z obrazové analýzy odpovídající povrchům prezentovaným na Obr. č. 31.

	Maximum [nm]	Sa [nm]	Rms [nm]	Šikmost [1]	Špičatost [1]	Pórovitost [%]	Počet pórů
S povrchovou texturou	780	112	142	-0,7	0,4	22,2	793
Bez povrchové textury	680	72	94	-0,8	0,9	24,6	939



Obr. č. 31: Vliv typu povrchové textury nosného PS, pro generaci povrchových pórů na vysušený film HA. Specifická povrchová textura nosného substrátu PS připravená metodou fázové separace (3D obrázky výškových změn nahoře). Výškové změny ve filmech HA (barevně uprostřed), prahované obrázky pro obrazovou analýzu (černobíle uprostřed), porovnání profilů povrchu získaných ze středu pořizovaných skenů z AFM (dole). Povrch HA modifikován po 14 dnech skladování v exikátoru. Obrázky pořizeny pomocí AFM.



Obr. č. 32: Zastoupení pórů v daném rozmezí ploch odpovídající povrchům prezentovaným na Obr. č. 31.

ZÁVĚR

Byly studovány faktory ovlivňující vznik mikroporózního povrchu na bázi hyaluronanu sodného. Porózní struktura byla generována metodou časově sekvenované fázové separace za rotace. Poměr složek dobrého a špatného rozpouštědla, počet dávek a časová sekvence dávkování byly stanoveny v rámci dřívější práce M. Bradáčové [37]. V rámci této práce byly studovány další proměnné, jako je historie přípravy polymerního roztoku, obsah zbytkové vody v polymerním filmu (jeho skladování), rychlost dávkování směsných roztoků na povrch, rychlost rotace upravovaného vzorku a vliv povrchové textury nosného substrátu na změnu porózní struktury modifikovaných filmů HA.

Z výsledků experimentů věnovaných vlivu teploty přípravy roztoků HA pro odlévání filmů vyplynulo, že filmy připravené z roztoků s rozdílnou tepelnou historií se vyznačují odlišnou schopností tvořit mikroporózní povrch. V případě filmů z roztoků připravených při vyšší teplotě (50 °C) lze pozorovat nárůst množství pórů o větším průměru. Zvyšuje se povrchová drsnost a celková porozita povrchu.

Dále bylo zjištěno, že obsah zbytkové vody ve filmu HA, případně jeho nabotnění, negativně ovlivňuje schopnost tvořit povrchové póry pomocí zvoleného postupu. K největšímu pokrytí povrchů póry došlo na površích, které obsahovaly nejnižší množství zbytkové vody, tj. u vzorků dosušovaných 14 dnů po přípravě v exikátoru.

Nezanedbatelný vliv má rychlost vytlačování dávkované směsi roztoku na povrch modifikovaného filmu HA. Relativně malý nárůst (o 6 %) rychlosti pohybu dávkovacího zařízení může mít za následek pokles v množství generovaných povrchových pórů.

Z hlediska rychlosti rotace modifikovaného povrchu HA bylo zjištěno, že pro vznik většího množství pórů a rovnoměrnějšího pokrytí povrchu porózní strukturou je nezbytné nechat rotovat vzorek při vyšší rychlosti, aby byl povrch polymeru pokryt tenkou vrstvou směsného roztoku v každém kroku úpravy.

V rámci posledního experimentu bylo zjištěno, že v případě výše popsáných postupů přípravy polymerního filmu textura nosného substrátu nemá vliv na vznik povrchových pórů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KOBILA, T., MILNER-KRAWCZYK, M., ŁUKOWSKA, E., DOBRZYŃSKI, P., LUKES, J., BOBECKA-WESOŁOWSKA, K. a CHWOJNOWSKI, A. The effect of polymeric membrane surface on HaCaT cell properties. *Micron* [online]. Elsevier Ltd. 2017, 162-169. DOI: 10.1016/j.msec.2017.07.006. ISBN 07-923-5989-5.
- [2] LIBIO, I. C., DEMORI, R., FERRÃO, M., LIONZO, M. a DA SILVEIRA, N. Films based on neutralized chitosan citrate as innovative composition for cosmetic application. *Materials Science* [online]. Elsevier B.V, 2016, 115-123. DOI: 10.1016/j.msec.2016.05.009. ISSN 09284931.
- [3] DUCHEYNE, P.; HEALY, K.; KIRKPATRICK, C. J.; HUTMACHER, D. E; GRAINGER, D. W. *Comprehensive Biomaterials*. 2011, 241. ISBN 9780080553009
- [4] FIORICA, C., PALUMBO, FS., PITARRESI, G., BONGIOVI F., a GIAMMONA, G. Hyaluronic acid and beta cyclodextrins films for the release of corneal epithelial cells and dexamethasone. *Carbohydrate Polymers* [online]. Elsevier Sci, 2017, 281-289. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.02.071. ISSN 01448617.
- [5] THÖNESA, S., KUTZ, LM., OEHMICHEN, S., et al. New E-beam-initiated hyaluronan acrylate cryogels support growth and matrix deposition by dermal fibroblasts. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. Elsevier Science Bv, 2017, 611-619. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.10.065
- [6] SUN, F., NIU, H., WANG, D., WU, Y., MU, H., MA, L. a DUAN, J. Novel moisture-preserving derivatives of hyaluronan resistant to hyaluronidase and protective to UV light. *Carbohydrate Polymers* [online]. Elsevier, 2017, 1198. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.10.086. ISSN
- [7] ZHOU, J., ZHANG, B., LIU, X., et al. Facile method to prepare silk fibroin/hyaluronic acid films for vascular endothelial growth factor release. *Carbohydrate Polymers* [online]. Elsevier, 2016, 301-308. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.01.023. ISSN 01448617.
- [8] MANCA, ML, CASTANGIA, I., ZARU, M., NACHER, A., VALENTI, D., FERNANDEZ-BUSQUETS, X., FADDA, AM. a MANCONI, M. Development

- of curcumin loaded sodium hyaluronate immobilized vesicles (hyalurosomes) and their potential on skin inflammation and wound restoring. *Biomaterials* [online]. Elsevier Sci, 2015, 100-108. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.08.034. ISSN 01429612.
- [9] ABDEL-RAHMAN, RM., ABDEL-MOHSEN, AM., HRDINA, R., BURGERT, L., FOHLEROVA, Z., PAVLINAK, D., SAYED, ON. a JANCAR. J. Wound dressing based on chitosan/hyaluronan/nonwoven fabrics: Preparation, characterization and medical applications. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. Elsevier Science Bv, 2016, 725-726, 730-735. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.087. ISSN 01418130.
- [10] SANAD, R. A. a ABDEL-BAR, H. M. Chitosan–hyaluronic acid composite sponge scaffold enriched with Andrographolide-loaded lipid nanoparticles for enhanced wound healing. *Carbohydrate Polymers* [online]. Elsevier Ltd. 2017, 441-449. DOI: doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.05.098.
- [11] PARK, H, LEE, HJ., AN, H. a LEE, KY. Alginate hydrogels modified with low molecular weight hyaluronate for cartilage generation. *Carbohydrate Polymers* [online]. Elsevier Sci, 2017, 100-109. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.01.045. ISSN 01448617.
- [12] LOPES, TD., RIEGEL-VIDOTTI, IC., GREIN, A., TISCHER, CA. a FARIATISCHER, PCD. Bacterial cellulose and hyaluronic acid hybrid membranes: Production and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. Elsevier Science Bv, 2014, 400-408. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.03.047. ISSN 01418130.
- [13] KUTLUSOYA, T., OKTAYA, B., APOHANA, N. K., SÜLEYMANOĞLU, M. a KURUCABA, S. E. Chitosan-co-Hyaluronic acid porous cryogels and their application in tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2017, 366-377. DOI: doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.067.
- [14] GAJENDIRAN, M., CHOI, J., KIM, K., KIM, K., KIM, SJ., SHIN, H. a KOO, HJ. Conductive biomaterials for tissue engineering applications. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* [online]. Elsevier B.V, 2017, 13-24. DOI: 10.1016/j.jiec.2017.02.031. ISSN 1226086X.

- [15] THOMAS, L. V., VG, R. a NAIR P. D. Effect of stiffness of chitosan-hyaluronic acid dialdehyde hydrogels on the viability and growth of encapsulated chondrocytes. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. Elsevier Ltd, 2017, 1925-1934. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.116>.
- [16] OTITOJU, TA., AHMAD, AL. a OOI., BS. Superhydrophilic (superwetting) surfaces: A review on fabrication and application. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* [online]. Elsevier Science, 2017, 20. DOI: 10.1016/j.jiec.2016.12.016. ISSN 1226086X.
- [17] RUIZ-CABELLO, F. F. IBÁÑEZ-IBÁÑEZ, JM., P., GÓMEZ-LOPERA, J. F., MARTÍNEZ-AROZA, J., CABRERIZO-VÍLCHEZ, M. a A RODRÍGUEZ-VALVERDE, M. Testing the performance of superhydrophobic aluminum surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. Elsevier, 2017, 129-136. DOI: 10.1016/j.jcis.2017.08.032. ISSN 00219797.
- [18] ZONG, BY., HO, P. a WUANG, SC. Synthesis and multi-applications of conductive magnetic stable polypyrrole dispersion with phase-convertible characteristics. *Materials Chemistry and Physics* [online]. Elsevier Science, 2015, 156-157. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2014.09.058. ISSN 02540584.
- [19] JABUR, A. R. Effect of polyaniline on the electrical conductivity and activation energy of electrospun nylon films. *Hydrogen energy* [online]. 2017, 1-6. DOI: doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.04.005.
- [20] PENG, LC., LI, H. a MENG, YH. Layer-by-layer structured polysaccharides-based multilayers on cellulose acetate membrane: Towards better hemocompatibility, antibacterial and antioxidant activities. *Applied Surface Science* [online]. Elsevier Science Bv, 2017, 25-37. DOI: 10.1016/j.apsusc.2016.12.235. ISSN 01694332.
- [21] MUN, S., C., PARK, J., J., PARK, Y., T., et al. High electrical conductivity and oxygen barrier property of polymer-stabilized graphene thin films. *Carbon* [online]. Elsevier Ltd, 2017, 1-21. DOI: 10.1016/j.carbon.2017.09.088. ISSN 00086223.
- [22] BUNK, J., K.G, U POSPIECH, D., EICHHORN, KJ., et al. Studying the influence of chemical structure on the surface properties of polymer films. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. Elsevier B.V, 2010, 47-57. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2010.03.039. ISSN 09277757.

- [23] Temenoff JS, Mikos AG. Biomaterials : The Intersection of Biology and Materials Science. *Pearson Prentice Hall*; 2008.
- [24] STEINER, C., FICHTNER, J. a FAHLTEICH, J. Nanostructuring of polymer surfaces by magnetron plasma treatment. *Surface & Coatings Technology* [online]. Elsevier Ltd. 2017, 1-7. ISBN doi.org/10.1016/j.surfcoat.2017.09.023.
- [25] Moncayo M a Santhanakrishnan S, Vora HD, Dahotre NB. Computational modeling and experimental based parametric study of multi-track laser processing on alumina. *Opt Laser Technol.* 2013, 570-579. doi:10.1016/j.optlastec.2012.11.019.
- [26] REBOLLAR, E.,CASTILLEJO, M. a EZQUERRA, TA. Laser induced periodic surface structures on polymer films: From fundamentals to applications. *European Polymer Journal* [online]. Pergamon-elsevier Science, 2015, 162-171. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2015.10.012. ISSN 00143057.
- [27] SAVA, E.,SIMIONESCU, B., HURDUC, N. a SAVA I. Considerations on the surface relief grating formation mechanism in case of azo-polymers, using pulse laser irradiation method. *Optical Materials* [online]. Elsevier Science Bv, 2016, 174-179. DOI: 10.1016/j.optmat.2016.01.055. ISSN 09253467.
- [28] SILVA, EJ., KIRSCH, B., BOTTENE, AC., SIMON, A., AURICH, JC. a OLIVEIRA, JFG. Manufacturing of structured surfaces via grinding. *Journal of Materials Processing Technology* [online]. Elsevier Science, 2017, 170–183 DOI: 10.1016/j.jmatprotec.2016.12.009. ISSN 09240136.
- [29] XUE, L., ZHANG, J. a HAN, Y. Phase separation induced ordered patterns in thin polymer blend films. *Progress in Polymer Science (Oxford)* [online]. Pergamon-elsevier Science, 2012, 583-597. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2011.09.001. ISSN 00796700.
- [30] DING, L.,ZHANG, AJ., LI,WQ., BAI, H., a LI, H. Multi-length scale porous polymer films from hypercrosslinked breath figure arrays. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. Academic Press Inc Elsevier Science, 2016, 189. DOI: 10.1016/j.jcis.2015.09.031. ISSN 00219797.
- [31] SERVOLI, E., A RUFFO G. a MIGLIARESI, C. Interplay of kinetics and interfacial interactions in breath figure templating – A phenomenological interpretati-

- on. *Polymer* [online]. Elsevier, 2010, 2343. DOI: 10.1016/j.polymer.2010.03.039. ISSN 00323861.
- [32] CHU, Z., LIU, Y. a JIN, W. Recent progress in Prussian blue films: Methods used to control regular nanostructures for electrochemical biosensing applications. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. Elsevier Ltd. 2017 21. ISBN doi.org/10.1016/j.bios.2017.04.036.
- [33] WRZECIONKO, E., et al. Variations of Polymer Porous Surface Structures via the Time-Sequenced Dosing of Mixed Solvents. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2017 [cit. 2017-04-17], 9 (7), s. 6472–6481.
- [34] STRAWHECKER, K. E., et al. The critical role of solvent evaporation on the roughness of spin-cast polymer films. *Macromolecules*. 2001 [cit. 2017-04-24], 34 (14), s. 4669–4672.
- [35] Atomic Force Microscopy Peter Eaton and Paul West. *MRS Bulletin* [online]. Cambridge University Press, 2014, 1. DOI: 10.1557/mrs.2014.72. ISSN 08837694.
- [36] AFM. *Park SYSTEMS* [online]. Dostupné z: <http://www.parkafm.com/index.php/park-spm-modes/standard-imaging-mode/217-true-non-contact-mode>.
- [37] BRADÁČOVÁ, M. Příprava mikro-strukturovaných povrchů na bázi polysacharidu. Zlín, 2017. *Diplomová práce*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická.
- [38] MINAŘÍK, A., SMOLKA, P., MINAŘÍK, M., MRÁČEK, A. et al., A special instrument for the defined modification of polymer properties in solutions and polymer layers, *Measurement* 97 (2017) 218-225.
- [39] DAY, A. J. a J. K. SHEEHAN. Hyaluronan: polysaccharide chaos to protein organisation. *Current opinion in structural biology*. 2001, 617–622.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AFM	Mikroskopie atomových sil
BF	BreathFigure
CuO	Oxid měďnatý
ETH	Ethoxyethanol
HA	Hyaluronan sodný
M370	Kyselina hyaluronová o molekulové hmotnosti 370 kDa
Mw	Molekulová hmotnost
NaOH	Hydroxid sodný
NH ₂	Aniont amidů
pH	Potenciál vodíku
PS	Polystyren
r	Rychlost dávkování směsi roztoku
Rms	Střední kvadratická drsnost
Sa	Průměrná drsnost
SEM	Skenovací elektronový mikroskop
THF	Tetrahydrofuran
UFMI	Ústav fyziky a materiálního inženýrství
UTB	Univerzita Tomáše Bati
UV	Ultrafialové záření
UVA	Ultrafialové záření typu A
UVB	Ultrafialové záření typu B
$\gamma_{LV, SU, SL}$	Povrchové napětí

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. č. 1 *Struktura kyseliny hyaluronové [3].....13*
- Obr. č. 2 *Struktura polymerní sítě chitosanového filmu neutralizovaného v citrátovém pufru bez změkčovadla za přítomnosti kyseliny hyaluronové [2].....14*
- Obr. č. 3 *Obrázky ze SEM kožních úseků: První – bez léčby, druhý – s filmy obsahující kyselinu hyaluronovou a třetí – s gelem obsahujícím kyselinu hyaluronovou [2].....15*
- Obr. č. 4 *Vizuální pozorování hojení ran po 0, 3, 7 a 14 dnech: A1 – obvazem na rány, A2 – ošetření obvazem chitosan/hyaluronanem u nediabetických krys; B1 – obvazem na rány, B2 – ošetření obvazem chitosan/hyaluronanem u diabetických krys [9].....17*
- Obr. č. 5 *Struktura netkaných textilií zobrazená pomocí SEM: (k – m) – netkaná bavlněná tkanina s 0,5% citrátem chitosanu a 0,5% hyaluronanem, (n – p) – netkaná bavlněná tkanina s 1% citrátem chitosanu a 0,5% hyaluronanem, (q – s) – netkaná bavlněná tkanina s 2% citrátem chitosanu a 0,5% hyaluronanem, (t – z) – netkaná bavlněná tkanina. Měřítka uvedené v prvním sloupci odpovídá 100 μ m, v druhém 10 μ m a třetím 5 μ m [9].....17*
- Obr. č. 6 *Konfokální mikroskopické snímky chondrocytů, které byly obarveny ve třech gelech 10 : 1, 10 : 3 a 10 : 5 chitosan: HA pro zjištění životaschopnosti buněk, které byly zapouzdřené. Zeleně fluoreskující buňky jsou živé a červené jsou odumřelé[14].....20*
- Obr. č. 7 *Kontaktní úhel: γ_{LV} - povrchové napětí kapalina – plyn; γ_{SV} - povrchové napětí pevná látka – plyn; γ_{SL} - povrchové napětí kapalina – pevná látka [16]....21*
- Obr. č. 8 *SEM – obrázky: A) neupraveného povrchu laku, B) je nanostrukturovaný lak upravený metodou plazmatického leptání [24].....24*
- Obr. č. 9 *Modifikace povrchové topografie pomocí laseru. [25].....25*
- Obr. č. 10 *Princip přípravy mikroporézního povrchu metodou Breath Figure [30]26*
- Obr. č. 11 *Modifikace povrchu polymerního materiálu metodou časově sekvenované fázové separace za rotace [33].....27*

<i>Obr. č. 12</i>	<i>Použité zařízení Direct-Q pro výrobu ultračisté vody.....</i>	<i>30</i>
<i>Obr. č. 13</i>	<i>Schéma složení lázni pro mytí laboratorního skla.....</i>	<i>31</i>
<i>Obr. č. 14</i>	<i>Lázně kyselin a jejich oplachy pro mytí skla.....</i>	<i>31</i>
<i>Obr. č. 15</i>	<i>Použitá temperační lázeň na magnetickém míchadle napojená na termostat.....</i>	<i>32</i>
<i>Obr. č. 16</i>	<i>Použitý plazmareaktor značky FEMTO SRS.....</i>	<i>33</i>
<i>Obr. č. 17</i>	<i>Použitá sušárna značky Memmert.....</i>	<i>33</i>
<i>Obr. č. 18</i>	<i>Použité zařízení pro modifikaci povrchové topografie polymeru metodou časově sekvenované fázové separace za rotace.....</i>	<i>34</i>
<i>Obr. č. 19</i>	<i>Skenovací systém AFM [36].....</i>	<i>35</i>
<i>Obr. č. 20</i>	<i>Princip měření AFM.....</i>	<i>36</i>
<i>Obr. č. 21</i>	<i>Měřicí režimy AFM znázorněné na závislosti síla/vzdálenost. Semikontaktní režim je mezi modrou a zelenou oblastí [36].....</i>	<i>36</i>
<i>Obr. č. 22</i>	<i>Použitý mikroskop atomárních sil NtegraPrima.....</i>	<i>37</i>
<i>Obr. č. 23</i>	<i>Vliv tepelné historie přípravy polymerního roztoku, ze kterého byl připravován film, na jehož povrchu docházelo k tvorbě pórů. Výškové změny z AFM (barevně), prahované obrázky pro obrazovou analýzu (černobíle), porovnání profilů povrchů získaných ze středu pořízených skenů z AFM (dole). Povrch HA modifikován ihned po vysušení.....</i>	<i>39</i>
<i>Obr. č. 24</i>	<i>Zastoupení pórů v daném rozmezí ploch odpovídající povrchům prezentovaným na Obr. č. 23.....</i>	<i>40</i>
<i>Obr. č. 25</i>	<i>Vliv historie skladování filmu hyaluronanu sodného na vznik pórů. Výškové změny z AFM (barevně), prahované obrázky pro obrazovou analýzu (černobíle), porovnání profilů povrchů získaných ze středu pořízených skenů z AFM (dole vpravo).....</i>	<i>42</i>
<i>Obr. č. 26</i>	<i>Zastoupení pórů v daném rozmezí ploch odpovídající povrchům prezentovaným na Obr. č. 25.....</i>	<i>43</i>
<i>Obr. č. 27</i>	<i>Vliv rychlosti depozice dávkovaných směsných rozpouštědel na vznik pórů v povrchu HA filmů. Výškové změny z AFM (barevně), prahované obrázky</i>	

- pro obrazovou analýzu (černobíle), porovnání profilů povrchů získaných ze středu pořízených skenů z AFM (dole).....44*
- Obr. č. 28 Zastoupení pórů v daném rozmezí ploch odpovídající povrchům prezentovaným na Obr. č. 27.....44*
- Obr. č. 29 Vliv rychlosti rotace upravovaných filmů HA. Výškové změny z AFM (barevně), prahované obrázky pro obrazovou analýzu (černobíle), porovnání profilů povrchů získaných ze středu pořízených skenů z AFM (dole). Povrch HA modifikován ihned po vysušení.....46*
- Obr. č. 30 Zastoupení pórů v daném rozmezí ploch odpovídající povrchům prezentovaným na Obr. č. 29.....46*
- Obr. č. 31 Vliv typu povrchové textury nosného PS, pro generaci povrchových pórů na vysušený film HA. Specifická povrchová textura nosného substrátu PS připravená metodou fázové separace (3D obrázky výškových změn nahoře). Výškové změny ve filmech HA (barevně uprostřed), prahované obrázky pro obrazovou analýzu (černobíle uprostřed), porovnání profilů povrchu získaných ze středu pořízených skenů z AFM (dole). Povrch HA modifikován po 14 dnech skladování v exikátoru. Obrázky pořízeny pomocí AFM.....48*
- Obr. č. 32 Zastoupení pórů v daném rozmezí ploch odpovídající povrchům prezentovaným na Obr. č. 31.....49*

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. č. 1</i>	<i>Souhrnné parametry získané z obrazové analýzy odpovídající povrchům prezentovaným na Obr. č. 23.....</i>	<i>40</i>
<i>Tab. č. 2</i>	<i>Souhrnné parametry získané z obrazové analýzy odpovídající povrchům prezentovaným na Obr. č. 25.....</i>	<i>42</i>
<i>Tab. č. 3</i>	<i>Souhrnné parametry získané z obrazové analýzy odpovídající povrchům prezentovaným na Obr. č. 27.....</i>	<i>45</i>
<i>Tab. č. 4</i>	<i>Souhrnné parametry získané z obrazové analýzy odpovídající povrchům prezentovaným na Obr. č. 29.....</i>	<i>45</i>
<i>Tab. č. 5</i>	<i>Souhrnné parametry získané z obrazové analýzy odpovídající povrchům prezentovaným na Obr. č. 31.....</i>	<i>47</i>