

# **Texturované samonosné biopolymerní vrstvy**

Bc. Eliška Bognerová

---

Diplomová práce  
2020



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

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

Akademický rok: 2019/2020

## **ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE** (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. Eliška Bognerová  
Osobní číslo: T18294  
Studijní program: N2901 Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Technologie tuků, detergentů a kosmetiky  
Forma studia: Prezenční  
Téma práce: Texturované samonosné biopolymerní vrstvy

### **Zásady pro vypracování**

1. Vypracujte literární rešerši na dané téma. V této části se mimo jiné zaměřte na poznatky spojené s aplikací biopolymerních vrstev v kosmetice.
2. Připravte biopolymerní roztoky za rozdílných fyzikálních podmínek. Z modifikovaných roztoků připravte metodou časově sekvencovaného dávkování texturované polymerní vrstvy.
3. Připravené vrstvy charakterizujte pomocí optické mikroskopie, kontaktní profilometrie, skenovací elektronové mikroskopie a mikroskopie atomárních sil.
4. Experimentální výsledky přehledně diskutujte a uveďte hlavní závěry práce.

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

**Seznam doporučené literatury:**

1. 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.
2. 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
3. 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.
4. Friedbacher, G., *Surface and Thin Film Analysis*, Wiley, 2011, ISBN 97-3-527-32047-9

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Antonín Minařík, Ph.D.**  
Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání diplomové práce: **2. ledna 2020**  
Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2020**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

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

Ve Zlíně dne 20. února 2020

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

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

### **Prohlašuji,**

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

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## **ABSTRAKT**

Samonosné biopolymerní vrstvy na bázi hyaluronanu a hedvábného proteinu byly povrchově upravovány pomocí časově sekvenované fázové separace vyvolané směsí dobrého a špatného rozpouštědla s aditivními látkami. Připravované polymerní povrchy byly charakterizovány pomocí mikroskopických a profilometrických technik. V případě materiálů na bázi hyaluronanu byly vyhledávány nejvhodnější kompozice modifikačních směsí vedoucí ke vzniku specifických povrchových mikro a makro pórů. V případě hedvábného proteinu (*Bombyx mori* fibroinu) byly optimalizovány postupy selektivního značení povrchových pórů. Toho lze dosáhnout s pomocí rozdílné rozpustnosti použitých fluorescenčních barviv v jednotlivých komponentech modifikační směsi generující povrchovou makro texturu.

Klíčová slova: hyaluronan, hedvábný protein, fibroin, povrch, fázová separace, selektivní značení

## **ABSTRACT**

Self-supporting biopolymer layers based on hyaluronan and silk protein were surface treated by time-sequenced phase separation induced by a mixture of good and bad solvent with additives. The prepared polymer surfaces were characterized by microscopic and profilometric techniques. In the case of hyaluronan-based materials, the most suitable compositions of modifying mixtures leading to the formation of specific surface micro and macro pores were sought. In the case of silk protein (*Bombyx mori* fibroin), procedures for selective labeling of surface pores have been optimized. This can be achieved by means of the different solubility of the fluorescent dyes used in the individual components of the modification mixture generating a surface macro texture.

Keywords: hyaluronan, silk protein, fibroin, surface, phase separation, selective labeling

Ráda bych na tomto místě poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Antonínu Minaříkovi, Ph.D. za veškeré rady, pomoc, čas a trpělivost, kterou mi věnoval v průběhu činnosti na diplomové práci. Mé poděkování dále patří Dr. Martinu Humeníkovi z Univerzity Bayreuth za čas a cenné rady, které mi věnoval s ohledem na zpracování proteinů.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat Ing. Karolíně Kocourkové za poskytnuté rady při experimentálním provedení a Ing. Markétě Kadlečkové za pomoc při dokončování práce. Poděkování patří také celé mé rodině za veškerou podporu a trpělivost během celého studia.

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

# OBSAH

ÚVOD.....	8
<b>I TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>9</b>
<b>1 BIOPOLYMERY .....</b>	<b>10</b>
1.1 OBECNÉ VLASTNOSTI BIOPOLYMERŮ.....	10
1.1.1 Antibakteriální aktivita a biologická rozložitelnost .....	11
1.1.2 Dodávání léčiv a aktivních látek .....	12
1.1.2.1 Léčba genetických nemocí.....	15
1.1.3 Další aplikace biopolymerů.....	15
1.1.3.1 Biokatalyzátory .....	15
1.2 TKÁŇOVÉ INŽENÝRSTVÍ .....	16
1.2.1 Regenerace tkání .....	18
1.2.2 Skaffold .....	18
<b>2 SÍŤOVÁNÍ POLYMERŮ.....</b>	<b>21</b>
2.1 STABILIZACE POLYMERŮ.....	21
2.1.1 Síťování polymerů.....	21
2.1.1.1 Klasifikace síťování .....	22
2.1.1.2 Cytotoxicita síťovacích činidel.....	23
2.1.2 Vliv síťení na fyzikální vlastnosti biopolymerů .....	23
2.1.3 Identifikace výskytu síťování v biopolymerech.....	26
2.2 HEDVÁBNÉ PROTEINY .....	27
2.2.1 Vlastnosti.....	29
2.2.2 Zpracování hedvábného proteinu .....	29
2.2.2.1 Nativní hedvábné struktury.....	30
2.2.2.2 Regenerované hedvábí .....	30
2.2.2.3 Filmy .....	30
2.2.2.4 Elektricky zvlákněná a mokrá vlákna .....	31
2.2.2.5 Hydrogely .....	32
2.2.2.6 3D porézní skaffoldy.....	32
<b>3 TEXTUROVANÉ FILMY.....</b>	<b>33</b>
3.1 MODIFIKACE POVRCHU .....	34
3.1.1 Fázová separace pomocí směsí rozpouštědel .....	34
3.1.2 Metoda Breath figures .....	36
3.1.3 Fázová inverze .....	37
3.1.4 Odlévání vzorovaných filmů.....	38
3.2 RŮST BUNĚK.....	39
3.3 CÍLE PRÁCE .....	42
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>43</b>
<b>4 PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE SAMONOSNÝCH BIOPOLYMERNÍCH VRSTEV.....</b>	<b>44</b>

4.1	MATERIÁLY .....	44
4.2	ČIŠTĚNÍ SKLENĚNÝCH NÁDOB PRO ROZTOKY HA .....	46
4.3	PŘÍPRAVA FILMŮ .....	46
4.3.1	Vodné roztoky HA .....	46
4.3.2	Roztoky a odlévání proteinových filmů .....	47
4.4	MODIFIKACE POVRCHU FILMŮ POMOCÍ METODY ČASOVĚ SEKVENOVANÉ FÁZOVÉ SEPARACE .....	48
4.5	CHARAKTERIZACE POVRCHU .....	49
4.5.1	Optický mikroskop .....	49
4.5.2	Konfokální mikroskop .....	50
4.5.3	Mikroskopie atomárních sil .....	50
4.5.4	Skenovací elektronový mikroskop .....	50
4.5.5	Kontaktní profilometr .....	50
4.5.6	Optický profilometr .....	50
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>51</b>
5.1	EXPERIMENTY VĚNOVANÉ TEXTURIZACI POVRCHU NA BÁZI HA .....	52
5.1.1	Vliv složení modifikační směsi .....	52
5.1.2	Vliv přidávaného množství HA do modifikační směsi .....	55
5.1.3	Vliv počtu dávek modifikačního činidla nanášeného na povrch HA .....	56
5.1.4	Vliv časového intervalu depozice směsného roztoku na povrch HA .....	57
5.1.5	Vliv rychlosti rotace vzorku .....	58
5.1.6	Vliv objemu jedné modifikační dávky .....	59
5.1.7	Vliv množství DMSO v modifikační směsi .....	60
5.1.8	Vliv typu nosného substrátu HA o Mw 370 a 1180 kDa .....	60
5.1.9	Vliv poměrového zastoupení HA Mw 370 a 1180 kDa v modifikační směsi .....	61
5.1.10	Vliv zbytkové množství vody v modifikovaném HA povrchu .....	62
5.1.11	Analýza obrázků pomocí SEM .....	64
5.2	EXPERIMENTY VĚNOVANÉ TEXTURIZACI POVRCHŮ NA BÁZI HEDVÁBNÉHO PROTEINU .....	65
5.2.1	Vliv historie přípravy filmů .....	65
5.2.2	Modifikace povrchů BMF pomocí směsi rozpouštědel obsahujících rozpuštěný BMF .....	66
5.2.3	Vliv rozpuštění fluorescenčních aditiva v rozdílných složkách modifikační směsi na jeho selektivní depozici .....	67
5.2.4	Vliv molekulové hmotnosti dextranu jako nosiče fluorescenční barvy .....	68
5.2.5	Odlišnosti při použití fluorescenčně značeného isomeru a dextranu .....	69
5.2.6	Stálost modifikace BMF povrchu pomocí fluorescenčních značek .....	70
5.2.7	Vliv poměru zastoupení složek v modifikační směsi .....	72
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>74</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>75</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>82</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>84</b>



## ÚVOD

Biopolymery vyskytující se v přírodě jsou dostupným a obnovitelným zdrojem makromolekulárních systémů. Jejich výhodou je netoxicity, biokompatibilita, biologická rozložitelnost a flexibilita fyzikálních vlastností, díky čemuž je těmto materiálům věnována značná pozornost.

Mezi významné polymery vyskytující se v přírodě patří: hyaluronát sodný, alginát, chitosan, celulóza, hedvábné proteiny, agaróza, karagenan, želatina, dextran, xanthan, pektin atd.

Výzkum, který se týká výše jmenovaných významných polymerů, je v dnešní době zaměřen na vývoj nosičů pro inženýrské enzymy, výrobou kompozitních materiálů pro různá použití v biomedicíně, environmentálních, farmaceutických a potravinářských aplikacích. V rámci výzkumu chování enzymů v přítomnosti biopolymerů bylo zjištěno, že takto vázané systémy mají odlišné vlastnosti oproti volným polypeptidům.

Teoretická část práce se zabývá biopolymery, jejich vlastnostmi a využitím, dále pojednává o problematice stability biopolymerů a jejich možném síťování. Dalším tématem je kapitola věnována teorii proteinů a v poslední části této práce jsou popsány postupy umožňující měnit povrchovou morfologii polymerních materiálů.

Experimentální část pojednává o přípravě filmů z hyaluronátu sodného (HA) a z hedvábného proteinu (*Bombyx mori* fibroinu = BMF). Filmy na bázi HA byly modifikovány pomocí směsi dobrého a špatného rozpouštědla, který tvořil základ pro všechny modifikační roztoky používané v této práci. Následně byla modifikační směs obohacena o vodu, dimethylsulfoxid (DMSO) a vodný roztok HA. Kde byly tyto aditivní látky navzájem kombinovány. Cílem těchto kombinací bylo určení vlivu jednotlivých aditiv na změny topografie modifikovaných filmů s cílem připravit co nevíce homogenní „porous-like“ texturu.

Filmy na bázi hedvábí byly upravovány směsí dobrého a špatného rozpouštědla pomocí časově sekvenované fázové separace za rotace. Tato modifikační směs byla obohacována o aditivní látky za účelem selektivního fluorescenčního značení vznikajících pórů.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 BIOPOLYMERY

Biopolymery, z nichž jsou vyráběné samonosné substráty, představují zajímavou biologicky odbouratelnou alternativu k syntetickým polymerům vyráběných z ropy. Biopolymery lze rozdělit do tří hlavních skupin na základě jejich původu:

- a) biopolymery pocházející ze zemědělských zdrojů včetně polysacharidů (škrob), lignocelulózové výrobky (celulózy), proteiny (syrovátka a kolagen), lipidy (včelí vosk) a volné mastné kyseliny;
- b) biopolymery získávané mikrobiální fermentací, jako je pullulan a polyhydroxyalkanoáty;
- c) chemicky syntetizované biopolymery používající monomery získané z přírodních surovin, jako je polymléčná kyselina.

Zejména v potravinářském průmyslu je vynakládána snaha spojená s vývojem obalových materiálů, které udrží potraviny co nejdéle čerstvé bez ohledu na rozdílné vlivy, jako je působení mikroorganismů a jejich toxinů, ovlivňování vnějšími fyzikálními silami a chemickými látkami atd. Výhodou takovýchto materiálů je jejich šetrnost vůči životnímu prostředí [1, 2].

### 1.1 Obecné vlastnosti biopolymerů

Zvláštní pozornost věnovaná biopolymerům je dána již dříve zmiňovanou biologickou rozložitelností, biokompatibilitou, obnovitelností a relativně nízkými náklady při jejich získávání. Za biodegradaci polymerů jsou zodpovědné přirozeně se vyskytující mikroorganismy (bakterie, houby, řasy). Kromě biokompatibility, která je nezbytným předpokladem pro jakýkoliv biomateriál, musí odpovídat doba degradace době regenerace tkáně, což je kritickým požadavkem na buněčné skaffoldy. Biopolymery mají různou citlivost na teplo, pH, intenzitu světla a elektrické a magnetické pole. Změny způsobené jedním ze stimulantů se projevují na makroskopické úrovni, a to například tvorbou sraženiny, fázovou separací či v případě hydrogelu změnou velikosti. Například biopolymerní systémy na bázi kombinace několika polymerů mohou vykazovat změny, které se jeví jako reverzibilní. Tyto kombinované systémy mohou mít zvláštní „paměťový“ systém, který jim umožňuje získat původní tvar při vystavení polymeru specifickému podnětu. Tvarová „paměť“ v polymerech vzniká díky existenci dvou segmentů. Jeden segment je vysoce elastický a druhý je schopen výrazně snížit svou tuhost v přítomnosti určitého stimulu.

Biokompatibilní porézní skaffoldy, na bázi polymeru s „paměťovým“ efektem, byly vyvinuty především pro invazivní chirurgii a rychlou regeneraci nové kostní tkáně.

Biopolymery udržují buňky pohromadě, aby mohly tvořit tkáně a poskytovat buňkám chemické signály pro řízení jejich chování. Tyto látky přispívají k hydrataci a pružnosti kůže, přispívají ke snazšímu pohybu kloubů a gastrointestinálního traktu. Mezi jejich unikátní vlastnosti patří ochrana organismu před patogeny a to tak, že se nachází ve formě gelu pokrývající povrchy našich očí a dýchacích cest.

Využívání těchto materiálů v živých systémech při operačních zákrocích napomáhá snížení výskytu chronických zánětů nebo imunologických reakcí, které se vyskytují při vkládání implantátů do hostitele (kloubní náhrady, zubní implantáty atd).

Pro konkrétní aplikace jsou v některých případech požadovány chemicky modifikované biopolymery vyznačující se specifickými chemickými a elektrickými vlastnostmi. Materiály vyrobené z těchto molekul jsou měkké, elastické a v gelové konzistenci, mají vlastnosti ležící mezi pevnými a kapalnými látkami [3, 4].

### 1.1.1 Antibakteriální aktivita a biologická rozložitelnost

Podle studie Garavanda a kol. [5] zaměřené na antibakteriální vlastnosti bylo vyhodnoceno, že účinnost je závislá na typu biomateriálu a také na aditivech s antibakteriálním účinkem. Některé biomateriály mohou být nosiči mnoha funkčních složek, jako je antibakteriální látka, antioxidanty, dále aromatické látky a pigmenty pro zlepšení kvality výrobků.

Výše zmíněná studie [5] také prokázala, že u všech biopolymerních filmů dojde k degradaci v půdních podmínkách. Z toho vyplývá, že biopolymerní povlaky lze likvidovat na skládkách.

Většina filmů na bázi proteinů a polysacharidů se vyznačuje vhodnými bariérovými vlastnostmi pro kyslík při nízké a střední relativní vlhkosti, což je vhodné pro skladování potravin. Tyto filmy mají přijatelnou mechanickou pevnost.

Mezi nejvíce používaný antimikrobiální materiál v potravinářském průmyslu patří papír, který je snadno rozložitelný. Jeho nevýhodou je snadná navlhavost. Z tohoto důvodu je snaha používat v kombinaci s papírem i biopolymerní látky, a to v podobě fólie – jako povlaku, který nahradí komerčně používaný povlak z polyethylenu. Nejvhodnějšími biopolymery jsou polysacharidy, mezi něž patří především škrob vzhledem k jeho dostupnosti, nízkým nákladům a vysoké pevnosti v tahu.

Většinu biopolymerů je však obtížné zpracovat z důvodů hydrofilnosti, křehkosti a nestability. Tyto projevy biopolymerů brání jejich průmyslovým aplikacím v plném rozsahu. K zabránění těchto problémů Garavanda a kol. [5] navrhli zkombinovat více biopolymerů dohromady, což vede ke zlepšení vlastností filmů, například ke zlepšení bariérových a mechanických vlastností mezi něž patří zvýšení pevnosti v tahu.

Aktivní balení je slibnou technologií, která zahrnuje impregnaci filmotvorných materiálů s antibakteriální přísadou, která se uvolňuje postupně po stanovenou dobu, k docílení potlačení mikrobiální aktivity znehodnocující potraviny. Antibakteriální přísady používané v potravinách jsou získávány z rostlin.

Pro zlepšení biopolymerních vlastností folií je vyvíjen způsob postupného zesíťování. Jedná se o inovativní zlepšení mechanických, fyzikálních a tepelných vlastností biopolymerních folií.

Biopolymerní fólie založené na různých sacharidech a proteinech, v menším rozsahu na některých lipidech, mají příznivé bariérové charakteristiky. V některých případech však vykazují slabé mechanické, strukturální a tepelné vlastnosti, spolu s jejich citlivostí na vlhkost. V nedávné době byla věnována pozornost prozkoumání možností zlepšení permeability a termomechanických vlastností biopolymerů vytvářejících fólie zavedením síťovací reakce do polymerního systému. Síťovací reakce obecně umožňují přípravu materiálů s lepšími mechanickými, tepelnými a fyzikálně-chemickými vlastnostmi [3, 5, 6].

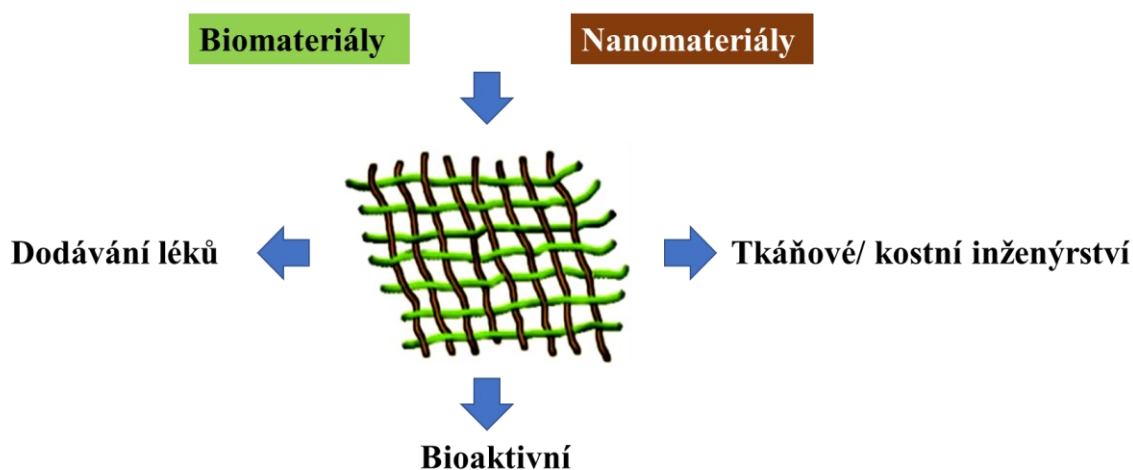
### 1.1.2 Dodávání léčiv a aktivních látek

Systémy pro řízené dodávání léčiv se používají k dosažení lepších terapeutických účinků farmaceutického léčiva nebo přírodních sloučenin na specifickém místě. Tyto systémy se skládají především z lipozomů, mikrosfér a gelů.

Existují různé metody zabudování léčiv do struktur, jako je extrakce superkritickou tekutinou, desolvatace, elektrosprejování, sušení rozprašováním, samosestavování po vrstvách, sušení vymrazováním a mikroemulze. Tyto systémy nosičů léčiv aktivně zvyšují jejich dodávání a mohou být použity v očních, transdermálních nebo dentálních aplikacích.

Povrch nanočástic lze modifikovat kovalentně vázanými syntetickými látkami nebo biopolymerem. V této oblasti je věnována pozornost biopolymerům z proteinů a polysacharidů, které vykazují biologickou rozložitelnost, biokompatibilitu, antibakteriální aktivitu a nízkou imunogenicitu.

Biopolymerní nanočástice mají schopnost transportovat bioaktivní sloučeniny do odlišných tkání, buněk a buněčných kompartmentů. Tyto nanomateriály mohou být použity jako nosiče léčiv nebo jako podklady pro kosti, chrupavky, srdce, kůži a tkáně využívající se v tkáňovém inženýrství. Obecná použití nanokompozitů ve farmacii jsou znázorněna na Obr. 1 a na Obr. 2, na kterých lze pozorovat mechanismus dodávání léčiv biopolymerními nanokompozicemi. Tyto biopolymery mohou být použity při léčbě nemocí typu rakovina, *Diabetes mellitus*, alergie, infekce.



Obr. 1. Přehled nanokompozic z biopolymerů a jejich farmaceutické využití [7]



Obr. 2. Schéma mechanismu dodávání léčiv za pomoci biopolymerních nanokompozic [7]

Existuje mnoho metod přípravy nanočástic na bázi bílkovin. Mezi nejčastější a nejjednodušší způsob výroby spadá metoda využívající rozpouštědla jako je ethanol nebo aceton.

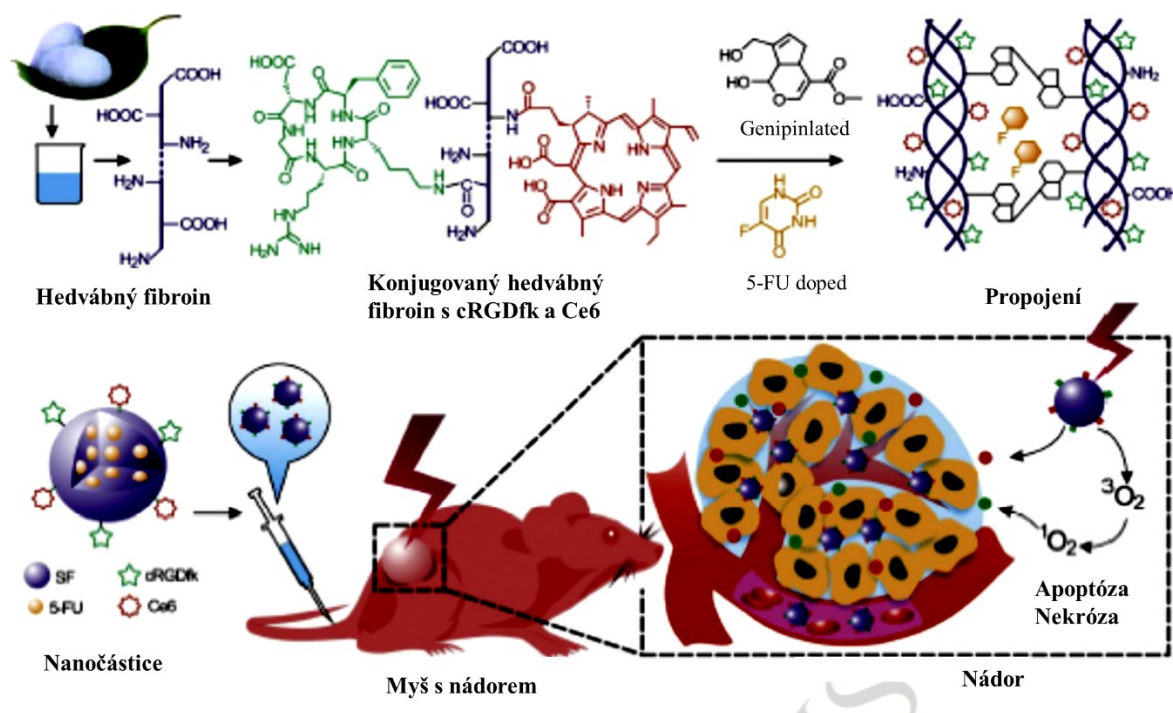
Polymery reagující na teplo jsou označovány jako termosenzitivní polymery. Jejich využití je vhodné pro solubilizaci léčiv, přičemž proces solubilizace probíhá zahřátím polymeru na teplotu vyšší, než je teplota lidského těla. Pokud je takto připravený polymer aplikován injekčně v kapalné formě do těla, dojde k fázové přeměně na gelovou strukturu a zároveň k postupnému uvolňování léčiva.

Aplikace polymerních gelů se jeví slibně především v oblasti modulovaného nebo pulzního uvolňování léčiv, které napodobí biologickou potřebu organismu. Avšak difúze léčiva je závislá na stavu polymerního gelu: mikrokapsle, lipidové dvojvrstvy, konformační přechod polymerů.

Uvolňování léčiva z biopolymerů v konkrétních místech je zajištěno síťováním biopolymerů. Biopolymerní gely jsou schopné v expandovaném stavu adherovat k cílovým buňkám pomocí interakce ligand-receptor za současného působení aktivních látek na cílovou buňku.

Pro přípravu nanočástic se nejvíce využívají proteiny živočišného původu, jako je hedvábný fibroin, kolagen, želatina a albumin, které jsou široce používány pro systémy dodávání léčiv.

Hedvábný fibroin je součástí přírodních vláken. Lze jej použít pro pomalé dodávání léčiv. Tento biomateriál může být použit ve formě hydrogelů, elektrospinnových vláken, filmů a trojrozměrných skaffoldů. Pro výrobu nanovláken pomocí různých metod se používají hlavně dva druhy proteinů, a to hedvábní bource morušového (*Bombyx mori*; *B. mori*) a pavoučí hedvábní (*Nephila clavipes*). Příklad zesíťovaného nanomateriálu na bázi hedvábného fibroinu použitého v cíleném dodávání léčiv je uveden na Obr. 3 [4, 7, 8].



Obr. 3. Schématické znázornění syntézy nanokompozic hedvábných fibroinů nasycených RGD a chlorin e6 a jejich in vivo aplikace [7]

Nanokompozitní materiály z *B. mori* hedvábných fibroinů a sericinu s oxidem křemičitým byly studovány s ohledem na možnost nést velké množství léčiva a trvale je dodávat *in vivo*. Bylo zjištěno, že tyto nanokompozitní materiály jsou velmi účinné při léčbě rakovinných buněk lidského karcinomu děložního čípku (buňky HeLa). Mimo to byla provedena studie Jacoba a kol. [7] používající kuličky hedvábných fibroinů s alginátem pro řízené uvolňování léku snižujícího cholesterol.

### **1.1.2.1 Léčba genetických nemocí**

Mezi jednu z používaných metod léčby genových onemocnění patří využití biopolymerů při jejich genovém dodávání. DNA je záporně nabitá hydrofobní molekula, kterou není možné dodávat do jádra buňky přes záporně nabitou hydrofobní buněčnou membránu.

Díky tomuto problému byly vyvinuty nosiče genů, které se také označují jako vektory nebo vehikula. Dříve se využívaly k přenosu genů viry, které způsobovaly imunitní reakci. Následně byly nahrazeny právě nevirovými polymery [4].

### **1.1.3 Další aplikace biopolymerů**

Biopolymery jsou pro svoji škálu vlastností, reagujících na nejrůznější stimuly, využívány ve velmi širokém odvětví biomedicínských aplikací, jak již bylo zmíněno.

Biomateriály jsou velmi flexibilní a vykazují dobrou adaptaci na lidský organismus. Výhodou jsou nízké náklady spojené s jejich pořízením. Mají mimo jiné zajímavý elektrický výkon, a proto se jeví jako slibné stavební kameny pro elektrická zařízení [9].

#### **1.1.3.1 Biokatalyzátory**

Významné úsilí v oblasti biopolymerů bylo zaměřeno na inženýrství enzymů, jako nových nosných materiálů pro různé aplikace v biomedicínském, environmentálním, farmaceutickém, potravinářském, kosmetickém a energetickém sektoru. Imobilizace enzymů na biopolymery by mohla být jedním ze slibných přístupů při vývoji biokatalyzátorů. Enzymy vázané s biopolymery jsou více stabilní, robustní a lépe obnovitelné než volné formy, a proto mohou být využívány pro kontinuální biokatalytické reakce.

Bylo potvrzeno, že enzymem zprostředkované katalytické bioprocessy vykazují mnoho výhod oproti konvenčním syntetizačním přístupům, a stávají se postupně důležitými



pro mnoho biotechnologických aplikací včetně biokatalýzy, ochrany životního prostředí, biomedicíny, bioenergie a potravinářského průmyslu.

Biokatalyzátory podporují ekologicky šetrné procesy z pohledu syntézy chemických látek a tvorby jakýchkoliv vedlejších toxických produktů během reakce.

Přírodní katalyzátory mají však několik nevýhod, mezi něž patří vysoké náklady na enzymy, nízká stabilita, deaktivace rozpouštědly, nedostatek účinného využití nebo omezená recyklovatelnost. Tyto nevýhody mohou být účinně překonány imobilizací enzymů na vhodný pevný substrát.

Imobilizované biokatalyzátory vykazují větší množství tepelné a provozní stability. Bylo vyvinuto několik různých imobilizačních metod. Doposud je používána adsorpce na nerozpustných materiálech, zachycení v polymerní gelové síti, enkapsulace, zesílení za použití bifunkčních činidel a kovalentní vazba na nerozpustný nosič [10].

## 1.2 Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství se vyvinulo jako rozvíjející se obor opravy orgánů a tkání, které jsou poškozené chorobami nebo zraněním. Jeho cílem je regenerace nebo nahrazení poškozené nebo nemocné tkáně, či generování náhradních orgánů pro širokou škálu zdravotních stavů, jako jsou srdeční onemocnění, cukrovka, cirhóza, osteoartritida a poranění míchy. Hlavní myšlenkou je vytvoření struktury skaffoldu, který bude vykazovat vhodné fyzikální, chemické a mechanické vlastnosti umožňující pronikání buněk a tvorbu tkání v 3D struktuře. Jednou ze základních myšlenek při výrobě skaffoldu je získání co nejvíce podobné struktury s ohledem na nahrazovanou část těla.

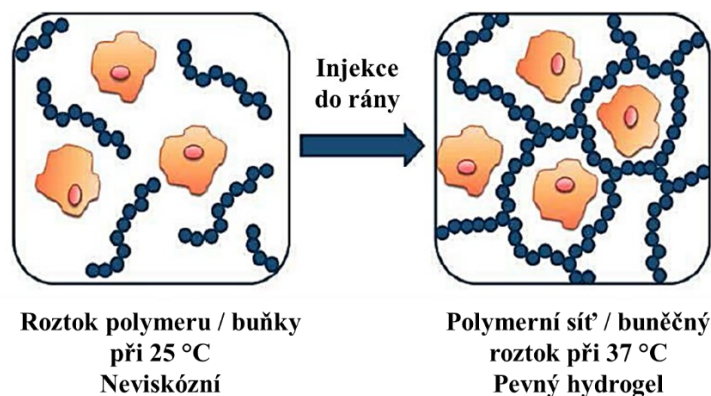
Za cíl je kladen růst nové tkáně ve skaffoldu pro integraci s hostitelskou tkání. Naopak skaffold poskytuje dočasnou podporu pro regeneraci, kde během procesu nebo po něm dochází k degradaci skaffoldu, který poté není nutné odstraňovat. Díky biopolymerním skaffoldům se předejde dalším případným komplikacím, které mohou nastat u materiálů, které se musí z těla následně odstranit.

Biopolymerní skaffoldy jsou definovány jako pevné, trojrozměrné porézní struktury navrženy pro provádění některých nebo všech procesů:

- a) podpora interakce mezi buňkami a biomateriály, buněčnou adhezi a depozici matrice;

- b) umožňují dostatečný transport plynů, živin a regulačních faktorů vhodných pro přežití, proliferaci a diferenciaci buněk;
- c) regulace rychlosti biodegradace, která koreluje s rychlostí regenerace tkání, a to za daných kultivačních podmínek;
- d) vyvolání minimálního zánětu nebo toxicity *in vivo*.

V tkáňovém inženýrství se termorezistentní polymery používají ve dvou případech, a to jako substrát umožňující růst a proliferaci buněk nebo jako injekčně podávané gely. V prvním případě se schopnost termosenzitivních polymerů používá k regulaci uchycení a oddělení buněk na povrchu. V druhém případě je zapouzdření buněk uvnitř 3D struktury. Tvorba buněčného skaffoldu umožňuje dodávání enkapsulovaných buněk, živin a růstových faktorů do poranění jakéhokoliv tvaru (Obr. 4).



Obr. 4. Tvorba skaffoldu z termorezistivního materiálu [4]

Přesný princip spočívá v tom, že termosenzitivní polymer je míchán při pokojové teplotě, kdy po injekčním vpravení do těla (37 °C) dochází k vytvoření polymerního gelu a zabudování buněk do 3D struktury. Pro tkáňové inženýrství je důležité umožnit růst různorodých buněk na povrchu, což velmi dobře umožňuje povrchová úprava pomocí polymerů.

Podobně kompozity hedvábných fibroinů s hydroxyapatitem se používají pro stavbu kostí v tkáňovém inženýrství.

Kostní morfogenetický protein-2 (BMP-2) zastává důležitou roli v osteogenezi. Porézní vláknitý protein napomáhá k průběžnému a pomalému uvolňování BMP-2. Hedvábný fibroin se zabudovaným BMP-2 v kombinaci s indukovanými kostními buňkami lidské kostní dřene (hMSC) může být použit při léčbě nemoci zvané osteogeneze.

U 3D skaffoldů může docházet ke spojení s peroxidem za použití ve vodě rozpustného léčiva napodobující různé typy enzymů a proteinů. Tento typ skaffoldu poskytuje nové příležitosti v oblasti biosenzorů a v tkáňovém inženýrství [4, 7, 11, 12, 13].

### 1.2.1 Regenerace tkání

Klíčovým přístupem k léčbě je regenerace tkání za použití buněk, skaffoldů a vhodných růstových faktorů selhávající tkáně nebo orgánů. Regenerace tkání je velmi důležitá ve všech odvětvích a nejvíce se uplatňuje v kosmetickém a medicínském odvětví. Neexistuje univerzální biomateriál splňující požadavky na skaffoldy pro všechny tkáně. Odlišné konstrukty vyžadují biomateriály se specifickými fyzikálními, mechanickými a degradačními vlastnostmi.

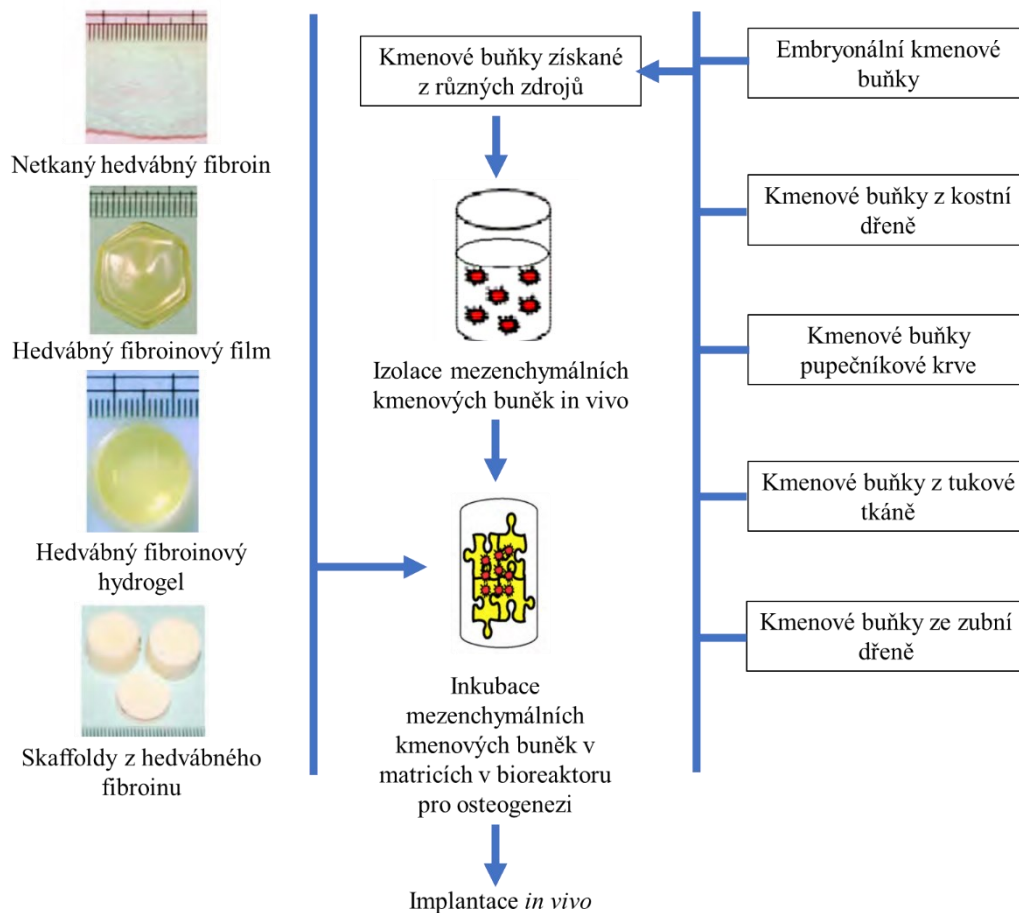
Fibroin z hedvábného proteinu může být účinně použit jako materiál pro skaffoldy při léčebných postupech. Protein je přirozenou součástí tkání a je tedy vhodnou volbou pro aplikaci v tkáňovém inženýrství. Aplikace hedvábí je možná u náhrad kostí, cév, nervů, kůže, chrupavek, vazů, šlach, srdečních, očních a močových tkání.

Regenerace funkční tkáně vyžaduje vhodné mikroprostředí, které napodobuje přirozené hostitelské prostředí pro buněčné reakce. Takové prostředí obvykle poskytují 3D tkáňové skaffoldy, které fungují jako architektonická šablona.

Po celou dobu degradace materiálu je nutná snaha o zachování stejných mechanických vlastností skaffoldu a také zajištění odvodu, pokud možno netoxických metabolitů z těla [3].

### 1.2.2 Skaffold

Zrychlení buněčné adheze pro osteoblasty a osteoprogenitorové buňky, urychlení migrace a diferenciaci buněk, ale také zrychlení syntézy homogenní kostní matrice zabraňující nekróze ve střední části tkáně je dosaženo morfologickou strukturou proteinů a vhodnou chemií (Obr. 5).



Obr. 5. Schéma znázorňující získání hedvábného fibroinu [15]

Skaffoldy působí také jako rezervoár signálních molekul a růstových faktorů, poskytují strukturální oporu a mechanické vlastnosti.

Regenerace založená na skaffoldu je zaměřena na defektní tkáň vyžadující biologické, mechanické a architektonické parametry. Mezi tyto parametry jsou řazeny vlastnosti jako je biokompatibilita, pomalá rozložitelnost, přilnavost buněk a fyzická podpora s vysoce propojenými póry pro homogenní růst buněk a tkání s dostatečnou vaskularizací v místě implantátu.

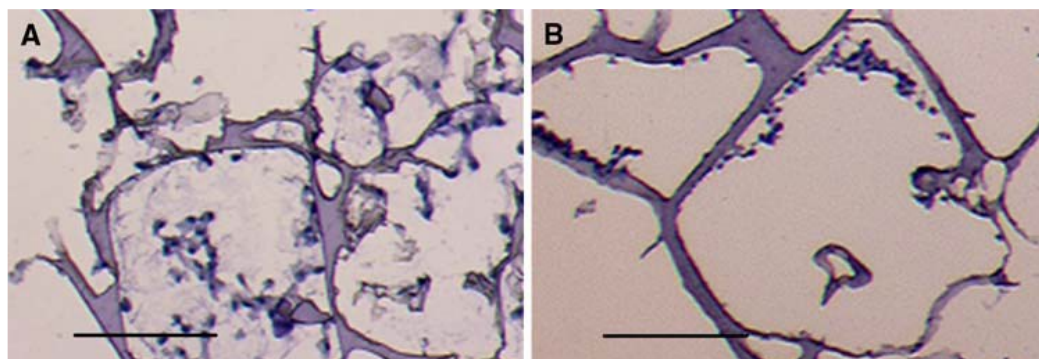
Pro léčbu opotřebované kloubní chrupavky se využívá injekční implantace chondrocytů, které jsou pěstovány *in vitro*. Injekční implantace chondrocytů nefunguje úplně jako náhradní tkáň, a to do té doby, dokud není chrupavka plně regenerována. V takovémto případě není distribuce buněk a organizace nově vytvořené extracelulární matrice řízená.

Jestliže se provede výsev chondrocytů v 3D skaffoldu, může se tím zlepšit homogenní růst buněk do té doby, dokud nebude chrupavka plně regenerována. Skaffoldy nesoucí buňky

odpovědné za regeneraci chrupavky mohou po implantaci pomoci převrstvit ránu uzdravené tkáně a zacelit mezery.

Nejčastějším problémem u těchto umělých matric je buněčná diferenciace. Kloubní chondrocyty vázané na biomateriály nebo ty, které jsou uzavřené v jiném prostředí, oproti původnímu prostředí *in vivo*, ztrácí schopnost vytvářet správnou extracelulární matici. Tento problém může být vyřešen pomocí vhodných růstových faktorů. Další problémy spojené s používáním skaffoldů jsou jejich neuspokojivé mechanické vlastnosti a rychlost biodegradace.

Ve studii Gellyncka a kol. [16] uvádějí, že vlákna *B. mori* byla testována na zánětlivou odpověď organismu a biologickou rozložitelnost. Na základě výsledků bylo hedvábí *B. mori* použito pro podporu růstu buněk. Jiné druhy hedvábí byly použity jako 3D skaffoldy, které byly získány sušením vymrazováním, vyluhováním solí (viz Obr. 6), pěněním v plynu nebo v provedení z ocelového lana. Na Obr. 6. se nachází rostoucí chondrocyty v hedvábných skaffoldech, vznikajících působením pomocí vyluhovaných solí: A) malé póry; buňky s extracelulární maticí vyplňují póry a jsou zachyceny v několika pórech. B) velké póry; buňky zůstávají připevněny na stěnách pórů [15, 16].



Obr. 6. Rostoucí chondrocyty v hedvábných skaffoldech vzniklých pomocí vyluhování soli [16]

## 2 SÍŤOVÁNÍ POLYMERŮ

Pro zlepšení biopolymerních vlastností folií je vyvíjena metoda postupného síťování. Jedná se o inovativní zlepšení mechanických, fyzikálních a tepelných vlastností biopolymerních fólií.

Již získané pozoruhodné výsledky zaměřené na síťování polymerů mají nežádoucí např. fyzikální, strukturní a mechanické vlastnosti. Tyto nežádoucí vlastnosti představují řadu komplikací pro jejich průmyslové využití.

Hlavním cílem u biopolymerních fólií na bázi proteinů je biologická rozložitelnost s dobrými bariérovými vlastnostmi pro plyny. Nicméně mechanické vlastnosti biopolymerů jsou stejně důležité jak pro udržení strukturální celistvost výrobku, tak i fyzickou ochranu s kontrolovatelnou rychlostí uvolňování aditiv v potravinách [2, 5].

### 2.1 Stabilizace polymerů

V posledních letech byly sledovány různé strategie k překonání nedostatků stability polymerů včetně chemických modifikací, přidavku plastifikátorů, míchání s jinými biologicky odbouratelnými polymery, zahrnutí nanočástic jako výstužných plnidel a přidání kompatibilizátorů pro zlepšení mísitelnosti s některými nekompatibilními atomy.

Chemické procesy jako esterifikace, roubování a síťování jsou schopné zabránit makromolekulárním reformacím [5].

#### 2.1.1 Síťování polymerů

Síťování je proces, který může strukturu polymerů modifikovat, a tudíž ovlivní jejich mechanické vlastnosti. Dále může dojít ke zlepšení začlenění hydrofilních vrstev, které mohou být představovány celulózovými nanokrystaly, umístěnými ve spojitě polymerní matici.

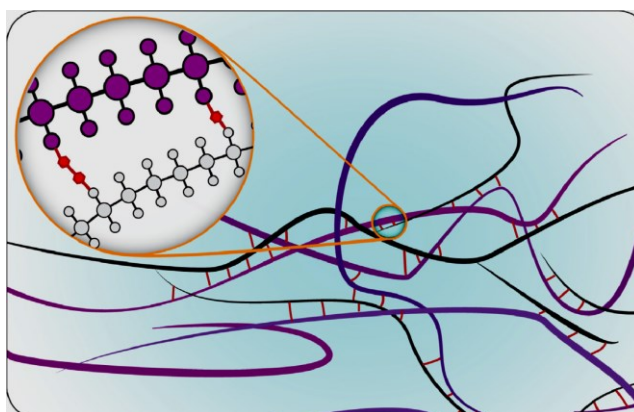
Polymer s integrovanou sítí může být získán síťovacím procesem, ve kterém jsou polymerní řetězce spojeny intermolekulárně kovalentními nebo nekovalentními vazbami. Síťovací činidla jsou vhodná pro biopolymerní materiály, a to zejména pro ty, které pocházejí z uhlovodíků nebo proteinů poskytujících látky v redukované formě. Síťovadla mohou překonat inherentní nedostatky mechanických a bariérových vlastností biopolymerů, což

je činí použitelnějšími. Biopolymery obsahující proteiny mají sklon podílet se více na reakcích indukovaných síťovadly díky přítomnosti různých reaktivních a funkčních skupin.

Lze konstatovat, že síťování je efektivní metoda ve srovnání s jinými metodami zesílení polymeru/pevnosti, např. zavedení nanomateriálů za účelem získání biopolymerních maticových kompozic, které představují podstatné nevýhody [5, 17].

### 2.1.1.1 Klasifikace síťování

Principem síťování polymerů je tvorba chemických vazeb mezi různými molekulovými řetězci pro vytvoření silnější trojrozměrné sítě. Tento proces je znázorněn na Obr. 7.



Obr. 7. Schéma účinku zesilovače v biopolymerních řetězcích [3]

Pro uskutečnění tohoto procesu je zapotřebí použít nejrůznější síťovací činidla, která podléhají různým způsobům klasifikace. Například klasifikace podle vzniklého druhu vazeb, což vede k dobře stabilizovanému síťování, tvorbě iontových vazeb a fyzikálnímu síťování vytvářející iontové vazby a Van der Waalsovy interakce.

V jiných klasifikacích jsou síťovadla klasifikována do tří hlavních skupin: fyzikální, chemické a enzymatické.

V případě polymerů se rozeznávají dva typy. V prvním případě se síťovací činidlo přidává přímo během přípravy polymeru, kdežto v druhém případě dochází k síťování až po vytvoření samotného polymeru.

Síťování polymeru se může provádět buď při pokojové teplotě nebo za zvýšené teploty. Integrované sítě termosensitivních polymerů jsou za účelem zlepšení energetické účinnosti vyvíjeny za laboratorní teploty. Při této teplotě mohou být použity různé základní funkční skupiny zahrnující reakce s karboxylovými kyselinami, reakce aktivující aminy

s karbonylovými skupinami a s acetalny. Dále lze použít síťovadla, která mohou reagovat s vodou a deriváty obsahující izokyanátové funkční skupiny. Při síťování by nemělo docházet k reakcím se silně reaktivními složkami, které by působily jako zesilovače. Síťování probíhající v rozmezí teplot je rozděleno na střední teploty 40–150 °C a vysoké teploty 150–300 °C. Takovéto reakce se používají pro posílení vlastností povlaků, kompozitních fólií, samohojících polymerů a povrchové úpravy textilií.

V biopolymerech se síťovací činidla mohou zavést do struktury v závislosti na chemickém uspořádání, přítomnosti aktivních skupin a molekulové hmotnosti polymeru, ale také na kompatibilitě síťovadla a polymeru za vzniku vhodných interakcí.

Biopolymery je nutné rozdělit do dvou skupin a to vysokomolekulární (více jak 105 g/mol) a nízkomolekulární (méně jak 104 g/mol). Nízkomolekulární polymery často vyžadují postupné síťování. Mezi tyto patří např. alginát, pektin, syrovátkový pektin, chitosan, škrob a želatina [3, 5, 17].

### **2.1.1.2 Cytotoxicita síťovacích činidel**

Bylo poukazováno na to, že syntetické síťovací prostředky jsou cytotoxické a nebezpečné pro lidské tělo i přírodu. Je proto potřeba poskytnout bezpečné síťovací činidlo, které bude použito nejen v obalových materiálech. Cílem je získání výsledného produktu s nízkou cytotoxicitou, vysokou stabilitou a biokompatibilitou. Přirozená síťovací činidla, jako jsou látky vzniklé mikrobiální fermentací s rostlinnými materiály, vykazují odpovídající potenciál jak v případě vytvoření silných vazeb mezi biopolymerními řetězci, tak i méně cytotoxický účinek. Transglutamináza, karboxylátové kyseliny a síťování pomocí Maillardovy reakce jsou příklady bezpečných a přirozeně se vyskytujících síťujících činidel aplikovaných v biopolymerních směsích. Některá síťovadla jsou nejen snadno dostupná, ale také přinášejí výhody pro životní prostředí [5].

### **2.1.2 Vliv síťení na fyzikální vlastnosti biopolymerů**

Síťování je prováděno u materiálů, konkrétně u polymerů, z důvodů jejich stabilizace a zlepšení či prohloubení některých vlastností. Některé vlastnosti však nemusí být optimální pro dané použití polymerů, a ne u každého polymeru je možné dosáhnout takového zvýšení účinku vlastností, které je žádoucí.



### Absorbance vody

Absorbance vody je nezbytným prostředkem pro předvídání stability a kvalitativních vlastností např. u obalových materiálů při nakládání, přepravě a skladování různých potravin. Zejména filmy na bázi polysacharidů posilují intramolekulární interakce vytvářením kovalentních vazeb. Tyto vazby vytvářejí přirozené intermolekulární vodíkové vazby, které posilují odolnost filmů vůči vodě [18].

### Propustnost vodní páry

Pro řízení permeability v polymerních matricích je velmi důležitá propustnost a difúze molekul vody. Filmy, které jsou založené na bázi biopolymerů obecně představují relativně vysoký sklon k propustnosti vodních par, jež je způsoben přítomností volných hydroxylových skupin v matrici, které silně interagují s migrující vodou. Většina chemického síťování vede ke zvýšení propustnosti vody. Pro snížení propustnosti je možné použít mimo jiné fyzikální síťování pomocí  $\alpha$  a  $\beta$ -záření. Síťování pomocí  $\alpha$ -záření je operativní technikou pro vytvoření bariérových a mechanických vlastností proteinových filmů. Z výše uvedených informací vyplývá, že lze ovlivnit propustnost vodních par pro biopolymerní fólie s ohledem na začlenění síťujícího činidla do struktury polymeru. Přebytké množství síťujícího činidla může následně působit jako změkčovaadlo.

Výsledná vlhkost proteinových filmů (absorbance vody, propustnost vodní páry) je závislá na propustnosti kyslíku. Špatné vlastnosti bariéry proti vlhkosti lze zlepšit přidáním hydrofobních materiálů, laminováním hydrofilního filmu jinou vrstvou nebo vytvořením kompozitní fólie, ve které se hydrofilní i hydrofobní složky dispergují, přičemž v konečném důsledku je výsledný film sušší.

Byl proveden výzkum ke zlepšení hydrofobních a mechanických vlastností filmů na bázi proteinu laminováním další vrstvy fólie s požadovanými vlastnostmi, přičemž dochází ke snížení přenosu vlhkosti přes póry. Bylo prokázáno, že dvouvrstvé filmy jsou dobrými překážkami k přenosu vodních par [2, 3, 5].

### Rozpustnost biopolymerních fólií

Rozpustnost biopolymerních fólií ve vodě podporuje jejich integritu. Generované esterové vazby mezi síťovacím činidlem a polymerem mají za následek hustší strukturu, která je zodpovědná za zhoršení rozpustnosti filmu ve vodě.

V důsledku použití síťujících činidel mohou polysacharidové filmy zvýšit odolnost proti vysoké vlhkosti, což snižuje absorbanci vody tvorbou několika vzájemných vazeb mezi molekulami polysacharidů [18].

#### Tloušťka filmů

Tloušťka fólií a povlaků, které se pohybují v rozmezí od 80  $\mu\text{m}$  do 200  $\mu\text{m}$ , hrají klíčovou roli v několika bariérových vlastnostech, například v transportu vodní páry a plynů. Propustnost vodní páry závisí na tloušťce, a to pravděpodobně kvůli rozdílu tlaků mezi vodní párou a aktuální vlhkostí na povrchu folie. Síťování je třeba provést směrem ven, protože díky tomu dochází ke zpevnění a vytvrzení vnitřních vazeb biopolymerních fólií. Využívá se různé hustoty kompozitů v závislosti na množství síťujícího činidla zabudovaného do struktury filmu [3, 5].

#### Světelná bariéra a průhlednost

V případě biopolymerních fólií jako obalových materiálů na potraviny ze spotřebitelského hlediska je preferovanější průhledný materiál. Kdežto z hlediska skladovatelnosti a uchovatelnosti potravin je vhodnější nižší transparentnosti obalů.

Zvláště oxidace lipidů je nežádoucí kvůli tvorbě pachutí a generování nebezpečných produktů. Vhodné jsou proto biopolymerní fólie, které jsou na bázi bílkovin a jsou dobrými protektory díky přítomnosti aromatických aminokyselin, které absorbují UV záření [19].

#### Změna barvy

Barva polymerních filmů je považována za jeden z důležitých faktorů při hodnocení jejich kvality. Ovlivnění barvy je způsobeno několika faktory jako jsou: pH, stupeň zesítnění, obsah změkčovadla, tepelný proces při pracovním postupu.

Barva biopolymerních fólií na bázi proteinu je více ovlivněna typem a koncentrací aminokyselin v proteinu než výše zmíněnými faktory. Většina filmů na bázi polysacharidů se jeví jako bezbarvá, až na výjimky v závislosti na síťovacím činidle a na tepelné stabilizaci, při které může dojít k zabarvení [20].

#### Mechanické vlastnosti

Udržování integrity a pevnosti v tahu obalových materiálů a polymerních fólií je velmi důležité. Obecně zabudování většího množství síťujícího činidla zlepšuje pevnost v tahu a tím prodlužuje protažení filmu před jeho přetržením.

Je prokázáno, že množství síťovadla a povaha filmotvorných složek jsou hlavní položky ovlivňující nutnou sílu pro přetržení filmů. Různé druhy a prostředky interakcí mezi změkčovadly a proteinovými řetězci s různou kombinací změkčovadel zabudovaných do oblastí polymerní matrice mají za následek ovlivnění mobility filmu.

Zodpovědnost za mechanickou charakteristiku nesou následně vydefinované vlastnosti: molekulová hmotnost, tvar a obsah aminokyselinových proteinů odvozených z nejrůznějších zdrojů. Mechanické vlastnosti biopolymerních filmů jsou velmi podobné vlastnostem polyvinylidenchloridu a polyethylenu.

U biopolymerních filmů jsou přidávána změkčovadla, jako jsou polyoly a mastné kyseliny. Často jsou přidávány pro změnu mechanických vlastností biopolymerních fólií, což může způsobit významné změny v bariérových vlastnostech materiálu.

Mechanické vlastnosti fólií jsou důležité pro zajištění dostatečné mechanické pevnosti a integrity fólií během přepravy, manipulace a jejich skladování [4, 5, 17, 27].

Tepelné a termogravimetrické vlastnosti

Stanovení termodynamické charakteristiky je důležité pro pochopení kvality látek v nejrůznějších prostředích v závislosti na teplotě, tlaku atd. Pro stanovení termofyzikálních vlastností materiálu se využívá: diferenciální skenovací kalorimetrie, termogravimetrické analýzy, diferenciální termální analýzy, dynamicko-mechanické analýzy, dilatometrie a dielektrické analýzy.

Termogravimetrická analýza je technika, ve které jsou změny hmotnosti materiálů určeny jako funkce teploty s konstantní rychlostí zahřívání. Umožňují studovat fyzikální jevy, jako jsou fázové přechody druhého řádu, včetně desorpce, adsorpce, odpařování a sublimace. Tato metoda však poskytuje informace i o chemických jevech včetně rozkladu, chemisorpce, desorpce a reakcí pevných látek. Termogravimetrická analýza se běžně používá k měření charakteristik substancí, které vykazují buď úbytek nebo zvětšení hmotnosti v důsledku oxidace, rozkladu nebo ztráty těkavých látek [5].

### 2.1.3 Identifikace výskytu síťování v biopolymerech

Identifikace biopolymerních mikrostruktur je nezbytná, protože určuje jejich mechanické a bariérové vlastnosti. Strukturální studie polymerů zlepší představu o reakcích síťování. Zkoumá fyzikální, mechanické nebo tepelné vlastnosti polymerů vystavených působení síťovacích činidel. Jedná se o způsob určení, zda se polymerní síť v polymerech vytváří

či nevytváří. Využívá se komplementárních metod, jako je rentgenová difrakční analýza (X-Ray Diffraction; XRD), infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (Fourier Transform Infrared Spectrometry; FTIR) a spektroskopie nukleární magnetické rezonance (Nuclear Magnetic Resonance; NMR) [3].

### XRD

Rentgenová krystalografie umožňuje identifikovat atomovou a molekulární strukturu krystalů. Díky tomu může být využita pro zkoumání vlivu síťovacího činidla na krystalizaci polymeru. Některé amorfni oblasti byly po zesítní orientovány takovým směrem, který se projevil zvýšenou intenzitou difrakce a snížením krystalinity zesíťovaných filmů [22].

### FTIR

Tato metoda je považována za praktickou a doplňkovou metodu pro charakterizaci mikrostruktur zasíťovaných polymerních filmů, která identifikuje možné funkční chemické skupiny a molekulární interakce.

Spektroskopie je ve srovnání s titračními metodami snadným, rychlým a přijatelným způsobem pro stanovení rychlosti tvorby esterových vazeb [5, 8].

### NMR

Jedná se o fyzikálně-chemickou metodu využívající interakce atomových jader s magnetickým polem. V magnetickém poli je zkoumáno rozdělení energií jaderného spinu a přechody mezi jednotlivými spinovými stavy způsobenými působením radiofrekvenčního záření. Tuto technologii lze použít k ověření existujícího zesítní polymerů [5].

## 2.2 Hedvábné proteiny

Hedvábná vlákna se získávají z různých zdrojů, jako jsou pavouci, *B. mori*, štíři, roztoči a mouchy. Hedvábí *B. mori* je dobrým zdrojem proteinu pro biomedicínské aplikace.

Fibroin z vlákna *B. mori* je běžně dostupný přírodní biopolymer s dlouhou aplikační historií při operačních zákrocích v podobě stehů. V současné době jsou hedvábné stehy používány na rtech, očích, při ústních operacích a u léčby kožních ran.

Výtěžek vlákna z jediného hedvábného kokonu je 600–1500 m. Hedvábí má několik významných výhod oproti jiným biomateriálům na bázi bílkovin, které jsou odvozeny z tkání xenogenního původu, kde je riziko infekce pro tyto materiály poměrně vysoké. Zpracování

těchto materiálů je také drahé vzhledem k proteinové izolační a purifikační metodě. Purifikace hedvábného vlákna se běžně provádí pomocí jednoduchého alkalického nebo enzymatického degumování. Tento postup poskytuje výchozí materiál pro izolaci fibroinu bez sericinu. Hedvábí má velkou molekulovou hmotnost (200–350 kDa i více). Skládá se z objemných opakujících se hydrofobních domén, které jsou přerušeny malými hydrofilními skupinami.

Hedvábné vlákno *B. mori* se skládá z těžkého a lehkého řetězce spojeného dohromady disulfidovou vazbou. Skládá se také z 25 kDa glykoproteinu, který je označován jako P25 a je nekovalentně vázán. Tvorba a vlastnosti hedvábných vláken závisí na opakování aminokyselin v hlavním proteinovém řetězci, což je fibroin těžkého řetězce.

Fibroinový lehký řetězec a P25 jsou proteinové složky hedvábného fibroinu s nízkou molekulovou hmotností, které jsou vylučovány ze zadní strany hedvábné žlázy *B. mori*. Hydrofobní domény těžkých řetězců obsahují Gly-X (X je Ala, Ser, Thr, Val), které se opakují a mohou tvořit strukturu nanokrystalů zvanou  $\beta$ -skládaný list. Lehký řetězec má hydrofilní povahu a je relativně elastický. Předpokládá se, že protein P25 hraje významnou úlohu při zachování integrity komplexu.

Těžké řetězce, lehké řetězce a P25 jsou v poměru 6:6:1 v hedvábí *B. mori* [3]. Protein P25 se sdružuje s komplexem těžkého a lehkého řetězce v primárně hydrofobní interakci, P25 je tedy glykoprotein obsahující vázané oligosacharidové řetězce. Kromě primární struktury hedvábného vlákna, existuje i sekundární a terciální uspořádání, která určují mnoho vlastností řetězce. Hydrofilní vazby mezi hydrofobními doménami jsou tvořené z objemných, polárních postranních řetězců, které tvoří amorfní část sekundární struktury. Konformace řetězce v amorfních blocích je v podobě náhlého klubka, které vykazuje pružnost.

Kritické faktory, které určují mechanické vlastnosti jakéhokoliv konkrétního hedvábní jsou: přesná velikost, počet, distribuce, orientace a prostorové uspořádání krystalických a nekrystalických domén v nanometrovém měřítku. Kromě sekundární struktury je také zřejmá hierarchická struktura molekulární organizace hedvábného vlákna. Hedvábí *B. mori* se skládá z mikrovlákných svazků širokých 0,5–2  $\mu\text{m}$ . Z nichž každý svazek je tvořen z nanokrystalů a polokrystalických domén [3, 23, 24, 25, 26, 27].

### 2.2.1 Vlastnosti

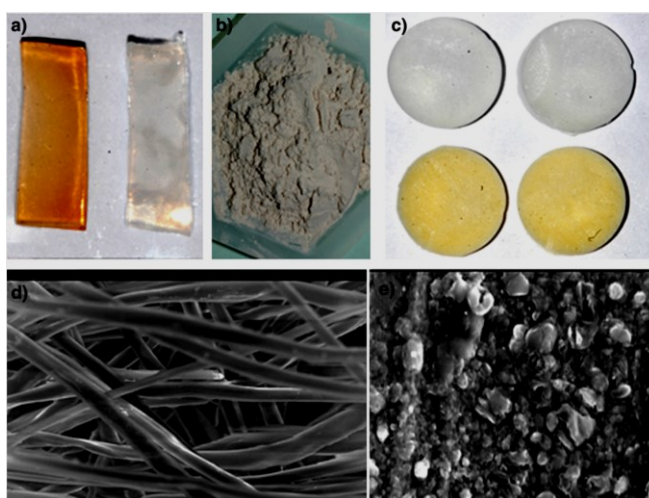
Hedvábí má dobrou biokompatibilitu a výborné mechanické vlastnosti. Jedinečná kombinace elasticity a pevnosti spolu s kompatibilitou s živočišnými buňkami činí hedvábný fibroin atraktivním materiálem pro tkáňové inženýrství. Dále má vynikající optickou průhlednost v celém viditelném rozsahu s pozoruhodnou hladkostí povrchu. To vše usnadňuje jeho použití v optice a jednodušší výrobu biosenzorů.

Hedvábí je velmi slibný přírodní materiál pro osteochondrální tkáňové inženýrství díky nízké hmotnosti ( $1,3 \text{ g/cm}^3$ ), vysoké pevnosti (přibližně 4,8 GPa, nejsilnější vlákno známé v přírodě), vynikající houževnatosti, pomalé biologické rozložitelnosti, elasticitě a možnosti kombinace s jinými materiály. Mechanické vlastnosti hedvábí spolu s jejich kompatibilitou s krví a propustností pro vodu a kyslík jej činí vhodným materiálem pro inženýrství kostních tkání [3, 15, 28].

### 2.2.2 Zpracování hedvábného proteinu

Degumování je proces odstraňující sericin v prvním kroku při zpracování hedvábných vláken. V některých případech, kde je problém s rozpuštěním vláken může být fibroin extrahován přímo ze žláz *B. mori* za použití vhodného pufovaného roztoku.

Různé pevné formy se pak připravují z roztoku hedvábí kapalným přenosem pevné fáze. Schémata různých biomateriálů na bázi hedvábí jsou znázorněna na Obr. 8. obsahuje a) hydrogely; b) lyofilizovaný prášek; c) 3D porézní skaffold; d) přírodní hedvábná rohož; e) hedvábné mikročástice [3, 28, 29].



Obr. 8. Znázorněné materiály vyrobené z hedvábného fibroinu [3]

### **2.2.2.1 Nativní hedvábné struktury**

Hedvábná vlákna zbavená sericinu mohou být použita k vytvoření různých struktur včetně lan, pletených a texturovaných přízí pro regeneraci tkání. Kokony se navíc používají také ke konstrukci netkaných struktur, pro použití tzv. šablon podporujících růst buněk, v místech, kde je zachováno uspořádání vláken v kokonu.

Alternativní způsob použití hedvábného vlákna je přímo v tkáňovém inženýrství vytváření pletené hedvábné struktury pro posílení 3D porézních tkáňových konstrukčních skaffoldů. Posílení skaffoldů zlepšuje mechanické vlastnosti pro aplikace v systému nosného tkáňového inženýrství, jako je např. vaz.

Hedvábný fibroin, který je pružným materiálem, může být zpracován několika různými způsoby od dvourozměrných vláken a filmů po trojrozměrné hydrogely a skaffoldy [3, 15, 16].

### **2.2.2.2 Regenerované hedvábí**

Při přípravě hedvábí pro regeneraci různých formátů je zapotřebí použít koncentrovaný roztok chaotropních solí jako je LiBr, CaCl<sub>2</sub>/ethanol/voda, LiSCN nebo iontové kapaliny. Pro většinu zpracování se používají žlázkové proteiny.

### **2.2.2.3 Filmy**

Fólie z hedvábného fibroinu lze vyrábět odléváním vodných, kyselých a iontových roztoků. Výroba fibroinových filmů je popsána jako proces povrchového potahování materiálů. Tenké vrstvy jsou připravovány litím, pomocí spin nebo dip coatingu.

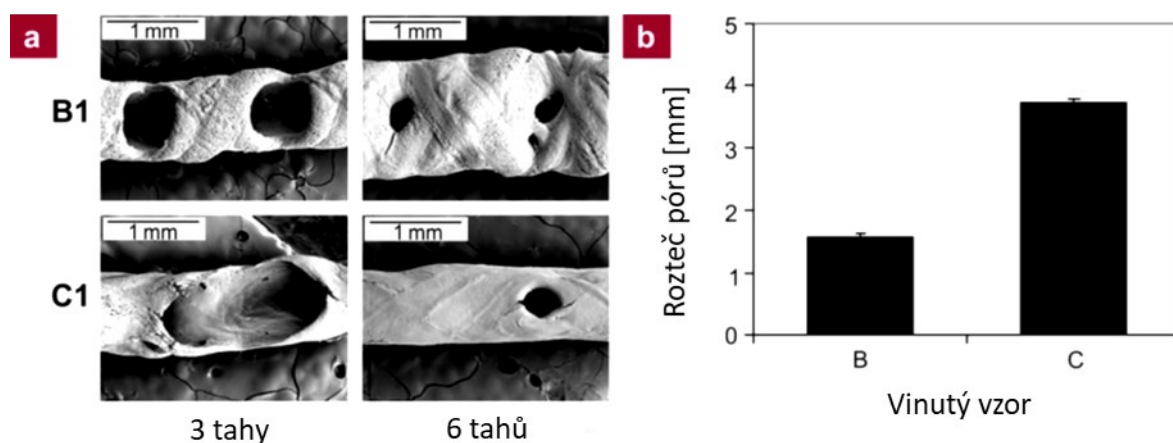
Stabilita litých filmů je nízká, proto se využívá techniky jako je: řízené sušení, vytvrzování vodou, strečink nebo ponoření do alkoholu pro zlepšení krystalinity. Často je nutné kontrolovat povrchové vlastnosti hedvábných filmů pro řízení a vylepšení buněčného růstu nebo je nutné změnit optické vlastnosti.

Použití 2D hedvábných fibroinových filmů je omezeno na hojení povrchových ran [3, 15, 30, 31].

#### 2.2.2.4 Elektricky zvlákněná a mokrá vlákna

Velká plocha povrchu a porézní struktura elektricky spředeného hedvábí do podoby nanovláknité rohože předurčuje tento materiál pro očkování buněk. Trojrozměrné konstrukty z nanovlákn se používají jako štěpy krevních cév a nervové vodící kanálky. Mokré zvláknění nebo zvláknění v tekutém roztoku je možné používat při výrobě regenerovaných hedvábných vláken. Vlákn zvlákněná za mokra mají obvykle mikrometrové průměry.

Gelové zvláknění hedvábných trubic je novou výrobní technologií. Tento přístup poskytuje dobrou kontrolu vlastností trubek pomocí vhodného výběru hedvábí. Hedvábí může být chemicky modifikováno funkčními skupinami které slouží pro specifické funkce. Tento proces napodobuje proces proteinového předení v bourci morušovém, kde je koncentrace fibroinu a fyzický stříh kritickým faktorem ve zvláknovací trysce. Gelové zvláknění ovlivňuje vlastnosti, jako je vzor vinutí, velikost pórů a složení, které mají být v novém procesu kontrolovány s dalšími kroky po zvláknění. Po zvláknění proběhne např. sušení na vzduchu nebo lyofilizace. Na Obr. 10 je znázorněno řízení velikosti a distribuce pórů hedvábné trubice: a) SEM – porézní hedvábná trubka vytvořená za použití různých vzorů vinutí a různého počtu tahů; b) graf rozteče pórů od středu ke středu na základě různých vzorů vinutí. Vzdálenost pórů mezi středy byla konstantní [3, 32].



Obr. 9. Znázornění řízení velikosti a distribuce pórů hedvábné trubice [32]



### 2.2.2.5 *Hydrogely*

Hedvábné hydrogely se vytvářejí jako sol-gely, které vznikají z roztoků hedvábných fibroinů dehydratací pomocí kyselin a iontů, za působení sonifikace a lyofilizace. Přechod může být urychlen zvýšením koncentrace proteinu, zvýšením teploty nebo také přidáním vápníku.

Hedvábné hydrogely mohou být užitečné pro injekční nebo subdermální aplikace. Dle mechanických vlastností hedvábí bylo zjištěno, že hydrogely jsou vhodné pro přípravu skaffoldů v tkáňovém inženýrství například při regeneraci chrupavky [3].

### 2.2.2.6 *3D porézní skaffoldy*

Hedvábné skaffoldy se připravují lyofilizací, pórogenní technikou loužení a pomocí pevných forem.

Jsou popsány postupy přípravy lyofilizovaných hub majících velikost pórů pod 100  $\mu\text{m}$ , přičemž velikost pórů lze regulovat úpravou teploty tuhnutí, pH roztoku a množstvím organických rozpouštědel. Pomocí opakovaného zmrazení a rozmrazení skaffoldů může dojít ke zvětšení velikost pórů až na hodnotu 250  $\mu\text{m}$  [3]. Avšak lepší kontrolu nad strukturou pórů lze získat metodou odlévání rozpouštědla nebo zpěňování plynem [3]. Pro získání dobrých mechanických a biologických vlastností je vhodné použití hedvábných 3D skaffoldů, anorganických či organických plniv, zajišťujících homogenní distribuci vytvářených pórů.

Kritické parametry při zpracování roztoku hedvábného fibroinu jsou: koncentrace, volba rozpouštědla a způsoby přípravy. Tyto parametry řídí topografii a geometrii skaffoldů [3, 15].

### 3 TEXTUROVANÉ FILMY

Cíl povrchových úprav materiálů spočívá v rozšíření jejich užitných vlastností v různých průmyslových odvětvích. Jedním z takovýchto odvětví je biomedicína a tkáňové inženýrství.

Pro kultivaci buněk na povrchu jakéhokoliv substrátu je velmi důležité předem definovat chemické podmínky. Mezi nejčastěji používané materiály pro tyto účely patří polymery, peptidy a proteiny, poskytující umělé mikroprostředí podobné extracelulární matici.

Použitelnost filmů je také ovlivněna elasticitou a drsností povrchů. Tyto parametry jsou důležité především při diferenciaci buněk na povrchu biomateriálů. Filmy, ve studii [34] byly fyzikálně sesít'ovány. Prokázalo se, že se zvyšujícím se obsahem tropoelastinu drsnost filmu roste. Drsnost povrchu souvisí s vlastnostmi materiálu a jeho následnou povrchovou úpravou. Drsnost filmu byla stanovována pomocí mikroskopie atomárních sil. Mechanické vlastnosti byly testovány pomocí zkoušek tahem a napětím. Obecně platí, že při zvýšení obsahu tropoelastinu dochází ke zvýšení tuhosti filmů.

Mechanické vlastnosti extracelulární matrice, zejména tuhost zprostředkovává buněčnou proliferaci, signalizaci a diferenciaci buněk. Tuhé substráty mohou podporovat tvorbu cytoskeletární organizace a lokální adheze pro některé buněčné kultury, kdežto měkké substráty nejsou vhodné pro jejich ukotvení, šíření nebo množení.

Při zkoumání tuhosti filmů tvořené lyzinem s hyaluronátem sodným, byla tuhost modulována pro počáteční adhezi a proliferaci buněk, ale také i pro diferenciaci. Měkké filmy umožnily diferenciaci po dobu pouze několika dní. Naproti tomu na tuhých filmech docházelo ke shlukování buněk, kde byly nalezeny podlouhlé, tenké a pruhované myofibrily po dobu až 2 týdnů.

Vzorky s povrchovou texturizací mikro a nano rozměrů neovlivňují diferenciaci buněk, pouze modulují jejich zarovnání. Například svalové buňky jsou citlivé na mechanické vlastnosti a drsnost, přičemž nejsou necitlivé na specifické mikro a nano vzory. Tudíž kombinace nízké drsnosti a vysoké tuhosti povrchu je příznivá pro proliferaci a diferenciaci svalových buněk. Na hedvábných filmech obohacených tropoelastinem bylo chování buněk nejvíce ovlivněno v případě průměrné drsnosti povrchu a materiální tuhosti. Chování kmenových buněk na površích se však od svalových buněk liší a buňky vyžadují jiný povrch pro optimální růst. Kmenové buňky preferují spíše drsnější povrch a povrchové

vzory v mikro a nano měřítku, které společně posilují proliferaci a osteogenní diferenciaci kmenových buněk [3, 34, 35, 36].

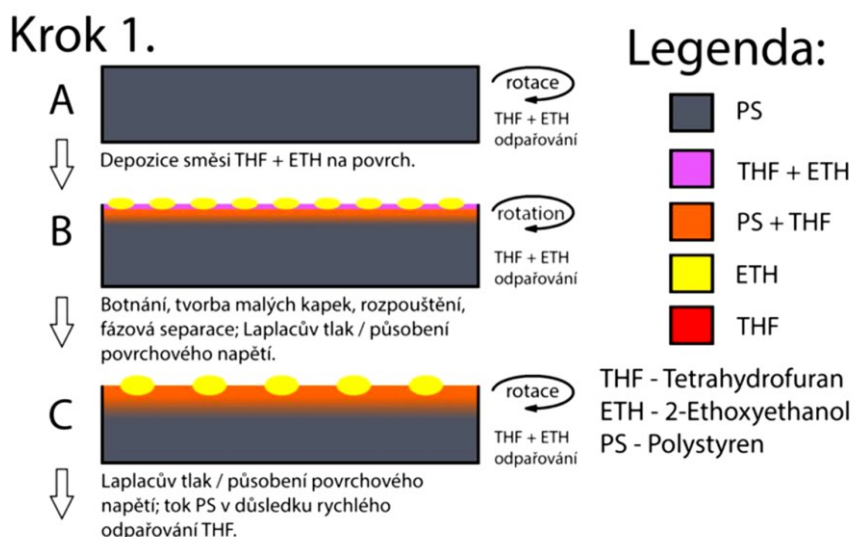
### 3.1 Modifikace povrchu

Využívá se imobilizačních strategií peptidů, které jsou inspirovány přilnavostí mušlí, a to díky přirozeně se vyskytujícímu dopaminu. Povrchy se modifikují proteiny nebo peptidy s funkčními skupinami, které ovlivňují imobilizaci buněk. Takto upravené substráty zvyšují adhezi, intracelulární interakci a aktivují řadu mechanosenzitivních signálních drah, které jsou kritické pro samovolnou obnovu kmenových buněk. Kultivace buněk na modifikovaném povrchu lze prodloužit po dobu 3 měsíců bez přívodu živin [33].

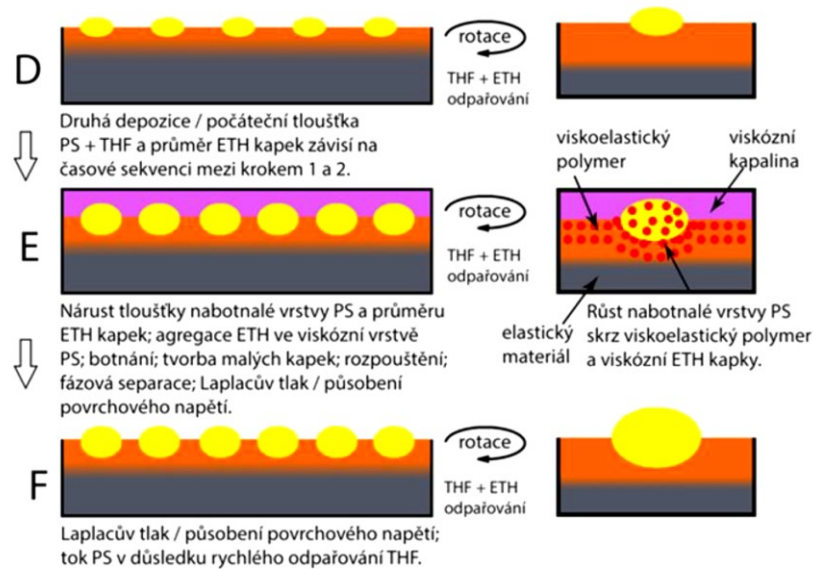
#### 3.1.1 Fázová separace pomocí směsí rozpouštědel

Povrchově texturované vrstvy je možné připravovat pomocí fázových separací odehrávajících se ve vrstvě nabitného polymeru s obsahem špatného rozpouštědla a případně další aditivní látky.

Jedním z příkladů takového postupu je proces spojený s modifikací povrchu na bázi PS. Tento proces je založený na postupném, časově sekvenovaném dávkování směsného roztoku na rotující povrch, jak je popsáno v práci Wrzecionka a kol. [37]. Princip této metody, je uveden na Obr. 10.



## Krok 2.



Obr. 10. Modifikace povrchu polymerního materiálu pomocí časově sekvenované fázové separace za rotace [37]

Na povrch polystyrenu (PS) je deponována směs dobrého a špatného rozpouštědla. V určitých časových intervalech je na povrch vzorku dávkováno celkem 1000  $\mu\text{l}$  směsného roztoku (nejčastěji bylo deponováno  $5 \times 200 \mu\text{l}$  směsi rozpouštědel). V rámci postupu, viz Obr. 10, byl použit jako dobré rozpouštědlo tetrahydrofuran (THF), který začíná nabobtnávat povrchovou vrstvu polymeru, viz Obr. 10 B, kde dochází k rozpouštění povrchu, fázové separaci a tvorbě malých kapek špatného rozpouštědla pro PS, 2-ethoxyethanolu (ETH). Opakované nanášení dalších dávek směsi THF : ETH má za cíl vyvolat děje zobrazené na Obr. 10 E. Postupným časově sekvenovaným opakováním jednotlivých kroků dochází k řízenému zvětšování obou fází a zejména pak kapiček, které tvoří povrchové póry. V posledním kroku se vzorek nechává rotovat a dochází nejdříve k odpaření dobrého a následně špatného rozpouštědla. Vytvoří se film s povrchovými mikropóry. Nezbytnou podmínkou pro vyvolání takovýchto změn na povrchu je vybrat optimální směs dobrého a špatného rozpouštědla. Vybraná rozpouštědla musí být vzájemně mísitelná a separovatelná až po kontaktu s polymerem. Dále je nutné nastavit nejvhodnější poměr těchto rozpouštědel ve směsi a zvolit optimální časovou sekvenci dávkování na povrch upravovaného polymerního materiálu. S výběrem ideální směsi rozpouštědel pomáhají Hansenovy rozpustností parametry [37, 38].

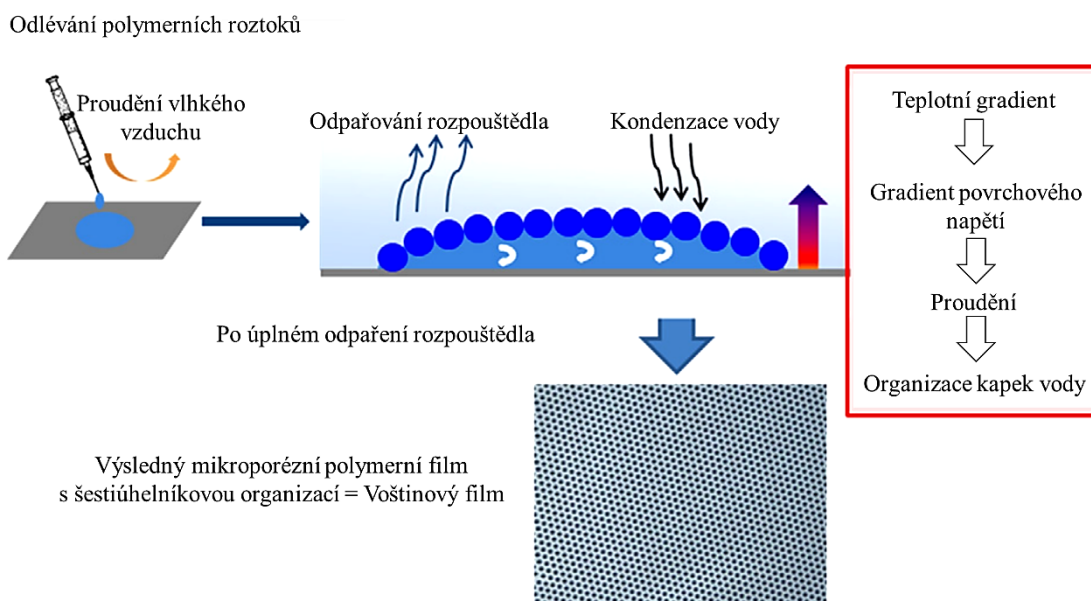
### 3.1.2 Metoda Breath figures

Breath figures je metoda, kterou lze připravit filmy vykazující hexagonální pole mikrometrických pórů získaných kondenzací kapiček vody během rychlého odpařování rozpouštědla ve vlhkém prostředí.

Tvorba povrchových pórů probíhá ve třech fázích, kdy v počátečním stádiu neexistuje žádná silná interakce mezi kapičkami vody.

Jeli polymerní roztok odléván při vysoké vlhkosti, dochází ke kondenzaci kapiček vody na povrchu odpařujícího se polymerního roztoku za vysoké organizace kapiček vody a vzniku vysoce organizované porózní struktury.

V prvním kroku dochází k odpařování rozpouštědla z roztoku spojeného s ochlazováním povrchu. Na povrchu dochází ke kondenzaci vlhkosti ve formě kapiček vody, které jsou uspořádány do pravidelné struktury. Po ochlazení roztoku na teplotu okolního prostředí dojde k odpaření zbylého množství rozpouštědla s následnou kondenzací vody za vzniku voštinové struktury (viz Obr. 11).



Obr. 11. Schématické znázornění voštinových polymerních filmů připravených metodou Breath figures [39]

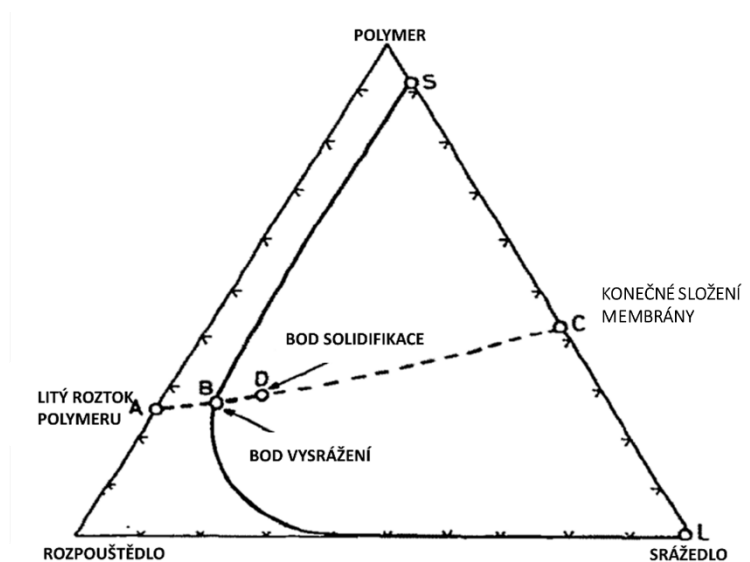
Byl také zkoumán vliv použitého rozpouštědla na tvorbu kapiček vody, z čehož vyplývá, že je nutné volit vhodné rozpouštědlo. Rozpouštědlo se volí podle jeho vlastností a dle kladených nároků: vysoký tlak par, nízký bod varu, nízká rozpustnost ve vodě, a především nižší hustota, než je hustota vody.

Při získávání porézního filmu je nutné, aby se kapičky vody na povrchu stabilizovaly a nerozpouštěly upravovaný polymerní povrch. A proto v případě úpravy fibroinových filmů dochází k nemožnosti využití této metody přímo, ale může dojít k tvorbě takto vytvořených texturovaných šablon s následným odlitím fibroinových filmů [39, 40, 41, 42].

### 3.1.3 Fázová inverze

Polymerní membrány lze tvořit pomocí fázové separace, ve které je homogenní roztok polymeru rozdělen na dvoufázový systém, a to na fázi bohatou, což je pevný polymer, který tvoří strukturu membrány a na fázi chudou, kterou je kapalný polymer tvořící póry membrány. Polymer tedy může být rozpuštěn ve směsi dobře těkavého a netěkavého rozpouštědla. Po odlití tohoto polymeru dojde k odpaření dobrého rozpouštědla, které postupně obohacuje odlitý film o špatné rozpouštědlo až do vysrážení polymerní složky. Změnou parametrů přípravy filmů tímto postupem dochází ke vzniku zcela odlišných struktur s odlišnými vlastnostmi.

Jako vhodný nástroj pro diskuzi o termodynamických aspektech v průběhu srážení polymerů slouží třífázový diagram srážedlo/polymer/rozpouštědlo. Třífázový diagram je znázorněn na Obr. 12.



Obr. 12. Schéma odlévání roztoku a tvorby pórovité membrány pro třífázový systém polymer/polymer/rozpouštědlo/srážedlo [43]

Každý z rohů diagramu představuje jednu složku. Jeden roh je polymer, druhý je rozpouštědlo a třetí je srážedlo, zatímco každý bod v trojúhelníku představuje směs tří složek. Systém se skládá ze dvou oblastí, a to jednofázové oblasti, kde všechny složky jsou mísitelné

a dvoufázové oblasti, kde se systém rozděluje na polymerně bohatou obecně tuhou fází a polymerem chudou obecně kapalnou fází. I přes to, že je jednofázová oblast ve fázovém diagramu termodynamicky spojitá, lze ji z praktických důvodů rozdělit na kapalnou a pevnou oblast. Při nízkých koncentracích polymeru je systém kapalina o nízké viskozitě, avšak se vzrůstající koncentrací polymeru se rychle zvyšuje viskozita, jenž dosahuje takových hodnot, že lze systém považovat za pevnou látku.

Při tvorbě membrány se systém mění z kompozice A, která představuje počáteční odlitý roztok na kompozici C, která představuje konečnou membránu. V konečné kompozici C jsou dvě fáze v rovnováze. Pevná fáze bohatá na polymer, která tvoří strukturu membrány je představována bodem S, a kapalná fáze chudá na polymer, tvořící membránové póry naplněné srážedlem, je reprezentovaná bodem L. Bod C leží na přímce S-L a určuje celkovou pórovitost membrány. Proces srážení je reprezentován cestou v třífázovém diagramu od bodu A do bodu C, během něhož je rozpouštědlo vyměněno za srážedlo. Koncentrace rozpouštědla/srážedla, při které dojde k prvnímu vysrážení polymeru je vyznačena bodem B. S postupujícím srážením dochází ke ztrátě rozpouštědla a ke zvyšování koncentrace polymeru v systému, až je viskozita tak vysoká, že se dá polymer označit za pevnou látku a brání se dalšímu hromadnému pohybu polymeru (bod D) [43]. Následně dochází k objemovým změnám při výměně rozpouštědla za srážedlo a ke smrštění fáze bohaté na polymer. Základní termodynamika separace, popřípadě srážení je u vícesložkových systémů stejná jako u dvousložkových systémů s nízkou molekulovou hmotností.

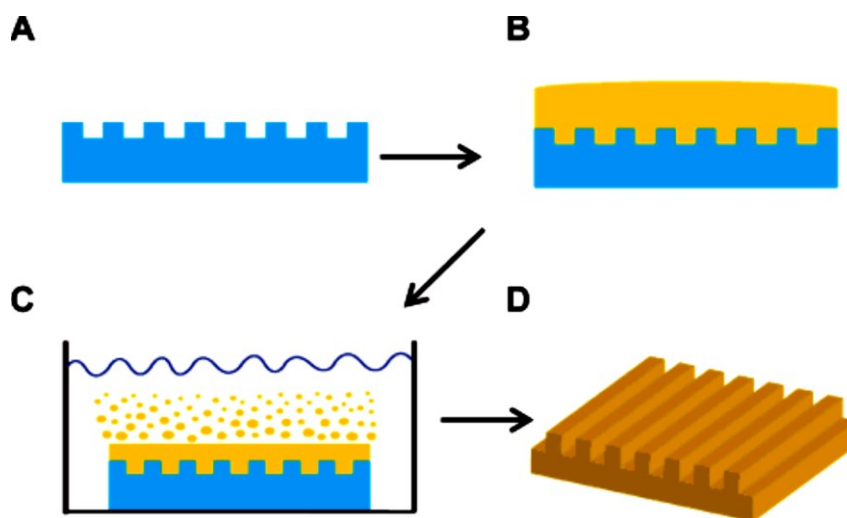
Při tvorbě membrány se vyskytují vysoké koncentrace polymeru, tudíž jsou nerovnovážné stavy zcela běžné. Již pouze malé změny koncentrace polymeru mohou vést k dramatickým změnám viskozity, které mohou bránit pohybu polymeru. Při zavedení srážedla do roztoku polymeru se stane ze stabilního systému nestabilní, který se spontánně rozdělí na dvě fáze. V nestabilním stavu je aktivita polymeru velmi zvýšená, difúzní koeficient se stává záporným a polymer je transportován proti jeho koncentračnímu gradientu. Dochází ke zvyšování koncentrace polymeru, až je systém rigidní a není možný další pohyb polymeru. Tento proces je zaznačen bodem D na Obr. 12 [43].

### 3.1.4 Odlévání vzorovaných filmů

Jedná se o velmi jednoduchou metodu výroby texturovaných filmů, které mají pravidelnou strukturu. Pravidelná textura je důležitá pro aplikaci v tkáňovém inženýrství, ale také při dodávání léčiv. Při odlévání jednotlivých filmů je velmi důležité, aby forma byla

z odlišného materiálu a nedošlo tedy k pevnému přilnutí odlévaného filmu, který je zapotřebí následně bez poničení vyjmout z formy.

Ve studii Guptyho a kol. [30] zaměřené na hedvábné proteiny *B. mori* je využita výroba vzorovaných filmů z kapalného iontového roztoku proteinu za použití proplachovací lázně s methanolem. Při ponoření filmu do metanolu se iontová kapalina extrahuje z proteinového roztoku do metanolové lázně, což má za následek stabilizaci hedvábného fibroinu. Pro vytvoření dané textury se využívá vzorovaných forem, z nichž se opticky čirý film následně odloupne viz Obr. 13 [30, 40].



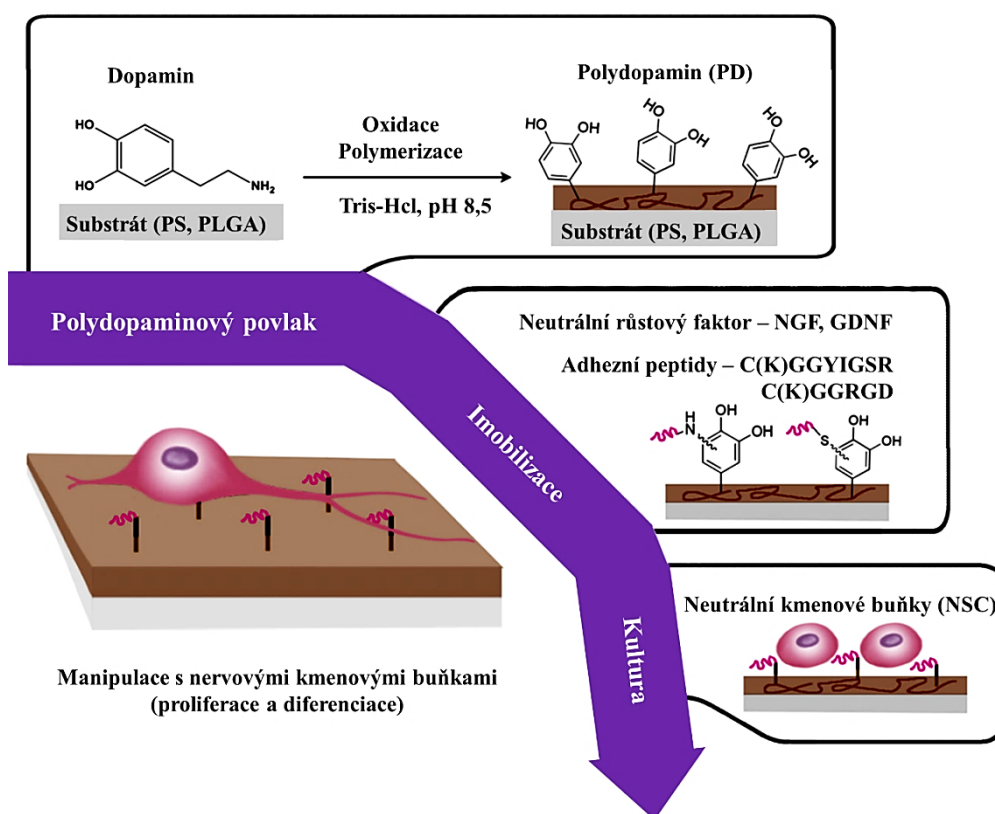
Obr. 13. Výroba texturovaných hedvábných filmů. (A) forma požadovaného designu. (B) Hedvábný roztok odlit na formu. (C) Potažená forma ponořená do metanolové lázně. (D) hedvábný film odloupnut z formy [30]

### 3.2 Růst buněk

Vývoj skaffoldů pro buněčnou kultivaci vyžaduje kromě biokompatibility a mechanických vlastností také vysokou pórovitost. A tak pro zlepšení růstu buněk na povrchu materiálu je nutná povrchová úprava. Funkční biopolymerní substráty a skaffoldy mohou vytvářet fyzikálně-chemické podněty, které zvyšují proliferaci a diferenciaci kmenových buněk. Proliferace a diferenciaci je důležitá pro účinnou regeneraci a obnovitelnost funkce poraněné tkáně prostřednictvím transplantace. Používané biomateriální substráty a skaffoldy by měly být zhotoveny tak, aby napodobovaly mikroprostředí, kde běžně kmenové buňky sídlí a podporují kontrolovanou proliferaci, diferenciaci a interakci mezi skaffoldem a buňkami. Na takovýchto substrátech a skaffoldech mohou být imobilizované aktivní molekuly

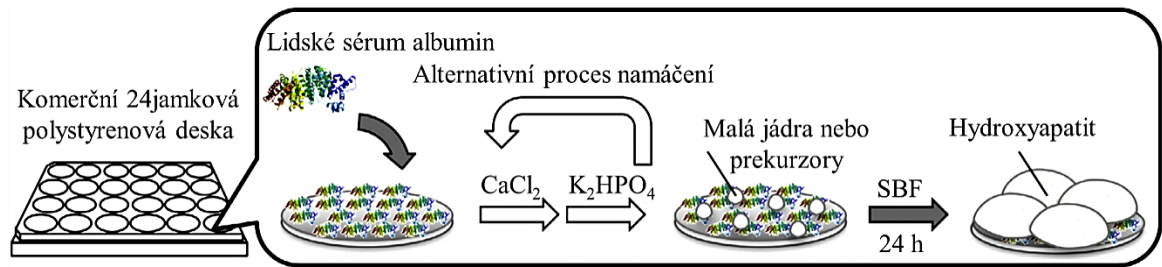


(viz Obr. 14). Aktivní místa mohou být zprostředkována také pomocí biopolymerů, které se naváží do lokalizovaných pórů, při jejich modifikaci, kde tvoří vhodné podmínky pro růst buněk. Pro immobilizaci peptidů na povrchu, jako aktivních látek, existují způsoby jako jsou: chemická konjugace či fyzikální adsorpce. Mezi chemické úpravy patří například plazmatické ošetření kyslíkem. V tomto případě může dojít ke změnám stavu substrátu, který se stává sypký. Jako alternativa tohoto problému se využívá fyzikální adsorpce. Jedná se o běžnou metodu immobilizace proteinů a peptidů, které mohou být nespecifické, tudíž i neúčinné. Proto je velmi důležitá jednoduchá a účinná immobilizace pro vývoj funkčních substrátů.



Obr. 14. Znárodnění immobilizace bioaktivních molekul zprostředkovaných polydopaminem (PD) (adhezivní peptidy odvozené od neurotrofních růstových faktorů). Pro neutrální kmenové buňky použity substráty polystyrenu (PS) a poly(kyselina mléčná-glykolová) (PLGA)s immobilizovanými bioaktivními látkami [44]

Další testování bylo zaměřeno na povrchy polystyrenových destiček, které byly potaženy hydroxyapatitovou adsorbční vrstvou a ošetřeny roztokem obsahujícím ionty vápníku a fosfátu (Obr. 15), nebo byly ošetřené vrstvou lidského séra albuminu na povrchu každé jamky. Strategii tohoto testování byla podpora růstu kostních buněk [42, 43, 45, 46, 47].



Obr. 15. Potahování komerčních 24jamkových polystyrenových destiček hydroxyapatitem za použití adsorpční vrstvy lidského sérového albuminu a předběžného ošetření alternativním máčením pomocí roztoků  $\text{CaCl}_2$  a  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  [47]

### 3.3 Cíle práce

S pomocí fázově separačních procesů připravit povrchově texturované vrstvy na bázi hyaluronanu a hedvábného proteinu (*Bombyx mori* fobroinu).

V případě filmů na bázi hyaluronátu sodného najít takové složení modifikační směsi, jež umožní přípravu nerovnosti v řádech desítek až stovek mikrometrů. Spolu s tím prozkoumat proměnné podmínující vznik takovýchto nerovností.

V případě filmů na bázi hedvábného proteinu připravit texturované povrchy se selektivně zachycenými fluorescenčními značkami uvnitř makro pórů.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 PŘÍPRAVA A CHARAKTERIZACE SAMONOSNÝCH BIOPOLYMERNÍCH VRSTEV

Pro přípravu povrchově texturovaných vrstev byly v prvním kroku připravovány hladké polymerní filmy na bázi HA a BMF.

Pro fázově separační modifikaci povrchů na bázi HA byla připravována směs n-butanolu (nBT) s isopropylalkoholem (IPA). K této směsi byly přidávány následující aditiva:

- a) voda
- b) dimethylsulfoxid (DMSO)
- c) voda a DMSO
- d) HA
- e) voda a HA
- f) DMSO a HA
- g) vodu, DMSO a HA

Mimo to byl sledován vliv množství jednotlivých dávek modifikační směsi, počtu a velikosti deponovaných dávek na povrch HA, časového intervalu dávkování, rychlosti rotace vzorku, molekulové hmotnosti HA a vlivu zbytkové vody v upravovaném filmu HA.

**Pozn.:** S ohledem na možné praktické využití texturovaných povrchů v medicínských aplikacích jsou povrchy na bázi HA spíše modelovým systémem. Tato skutečnost je dána rychlou rozpustností HA ve vodném prostředí. Pro praktické medicínské aplikace je výhodnější využít povrchů na bázi BMF, jež se vyznačují omezenou rozpustností ve vodě.

Pro úpravu povrchů na bázi BMF byla primárně používána směs hexafluoroisopropanolu (HFIP) s DMSO a vodou. Do této směsi byly následně přidávány rozdílné fluorescenční značky. U takto značených povrchů se sledovala jejich stálost ve vodných prostředích s ohledem na zamýšlenou aplikaci spojenou se selektivním zachytáváním kultivovaných buněk.

### 4.1 Materiály

Vodné roztoky HA byly připravovány z HA o střední molekulové hmotnosti ( $M_w$ ) 370 kDa, popřípadě 1180 kDa, jak bude uvedeno v textu. Hyaluronát sodný v kosmetické čistotě byl zakoupen od společnosti Contipro, a. s. Ultračistá voda ( $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ ), která byla používána jako rozpouštědlo, byla připravená pomocí zařízení Direct-Q, viz Obr. 16.



Obr. 16. Zařízení Direct-Q [48]

Pro přípravu modifikační směsi pro HA povrchy byly použity rozpouštědla nBT, IPA a DMSO v p. a. čistotě od společnosti Sigma-Aldrich.

Regenerovaný BMF v lyofilizované podobě byl předpřipraven následujícím způsobem. V prvním kroku bylo hedvábí zbaveno sericinu, a to zahřátím s intenzivním mícháním při 70 °C v hydrogenuhličitanu sodném o koncentraci 5 g/l po dobu 1 hod. Poté bylo hedvábí slito a promýváno destilovanou vodou přes Büchnerovu nálevku do doby, než bylo dosaženo pH 7. Následně bylo hedvábí zbaveno přebytečné vody a rozvrstveno do co nejtenčích vrstev pro usnadnění vysychání. V dalším kroku bylo hedvábí sušeno v sušárně při 50 °C po dobu 24 hod. Vysušené hedvábí bylo rozstříháno na drobné kousky do zkumavek po 2 g s přidavkem 50 g 9,3M bromidu lithného. Takto připravené zkumavky se nechaly míchat po dobu 24 hod. Následně byla provedena centrifugace po dobu 30 min při 20-25 °C na 8500 rpm. Po slítí supernatantu byl sediment přendán do dialyzačního střeva a dále byl dialyzován proti vodě po dobu 3 dnů s výměnou vody každých 12 hod za laboratorní teploty. Obsah střívka byl poté centrifugován a sediment byl podroben lyofilizaci.

Jako rozpouštědlo BMF byl používán 99% HFIP v p.a. čistotě od firmy Abcr GmbH, dále byl do modifikační směsi přidáván 99,8% DMSO od firmy Carl Roth GmbH + Co. KG.

Mimo to byl používán 100% methanol od firmy VWR Chemicals. NHS-Fluorescein a NHS-Rhodamine od firmy Thermo SCIENTIFIC. Dimethylformamide 100% od firmy VWR Chemicals. Síran amonný 99,5% v p.a. čistotě od firmy Carl Roth GmbH + Co. KG. Fluorescein isothiocyanate-dextran 20 MG, Fluorescein isothiocyanate-dextran 70 MG, Fluoresceinisothiocyanat Isomer od firmy Sigma Aldrich.

## 4.2 Čištění skleněných nádob pro roztoky HA

Před použitím skleněných nádob pro přípravu roztoků HA je nutné zajistit, aby tyto nádoby byly zbaveny kontaminace. Pro čištění skla byla použita sada čistících lázní, jak je znázorněno na Obr. 17.



Obr. 17. Schématické znázornění postupu čištění laboratorního skla [48]

Kyseliny jsou namíchaný v poměru 1:1 a peroxid vodíku je v 30% koncentraci. V každé lázni je sklo ponecháno alespoň 20 minut. Na závěr je sklo opláchnuto destilovanou vodou, acetonem, destilovanou vodou a ethanolem. Následně je vloženo na 20 minut do sušárny vyhřáté na 120 °C.

## 4.3 Příprava filmů

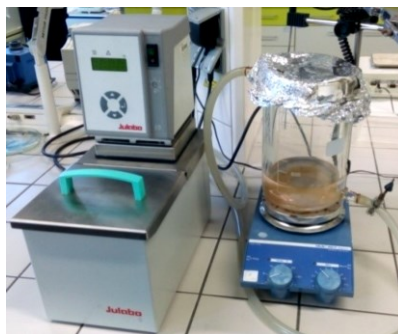
Pro přípravu filmů z jednotlivých biopolymerů byly použity specifické postupy, podrobněji popsáné u diskutovaných experimentálních výsledků.

V případě odlévání filmů z HA je nutné, aby byly PS misky před samotným odlitím filmu plazmaticky upraveny. Plazmatické ošetření povrchu se provádí z důvodu zlepšení adheze a zvýšení hydrofilnosti povrchu. Pro plazmatickou aktivaci povrchu byl použit nízkotlaký plazmareaktor značky FEMTI SRS od společnosti Dienerletronic. Misky byly upraveny v prostředí vzduchu po dobu 60 s, při výkonu reaktoru 100 W za sníženého tlaku.

### 4.3.1 Vodné roztoky HA

Vodné roztoky HA pro veškeré pokusy byly připravovány následujícím způsobem, pokud nebude v textu uvedeno jinak:

- 1) 3 hm. % HA o Mw 370 kDa nebo 0,7 hm % HA o Mw 1180 kDa pro odlévání filmu, 3 hm. % HA o Mw 370 kDa, nebo 1,5 hm % HA o Mw 1180 kDa jako aditivum bylo rozpuštěno v ultračisté vodě,
- 2) roztoky byly rozpouštěny v temperované nádobě na magnetickém míchadle při teplotě 50 °C po dobu 24 hod



Obr. 18. Magnetické míchadlo [48]

Po dokončení rozpouštění byl roztok ihned odlit na PS misku (TPP Techno Plastic Products AG). Použité Petriho misky jsou z výroby sterilizované radiací. Na plazmaticky ošetřené PS misky o průměru 3,4 cm bylo odváženo 5 g roztoku, tak aby výška vrstvy na počátku sušení byla okolo 6 mm.

Takto připravené misky s roztokem HA byly umístěny do sušárny bez nucené cirkulace vzduchu značky Memmert. Sušárna byla nastavena na 50 °C a sušení probíhalo po dobu 24 hod. Druhým způsobem sušení bylo použití klimakomory temperované na 50 °C při definované vlhkosti vzduchu, jak bude podrobněji rozvedeno v textu. Po dokončení procesu solidifikace byly filmy podrobeny povrchové modifikaci, nebo byly uskladněny v exikátoru nad vrstvou silikagelu, aby nedošlo k jejich navlhnutí před samotnou modifikací.

#### 4.3.2 Roztoky a odlévání proteinových filmů

Pro přípravu polymerních vrstev odléváním byly připravovány polymerní roztoky následujícím způsobem:

- 2 hm. % fibroinu bylo rozpuštěno v HFIP,
- roztok byl rozpuštěn při laboratorní teplotě na míchadle po dobu 12 hod



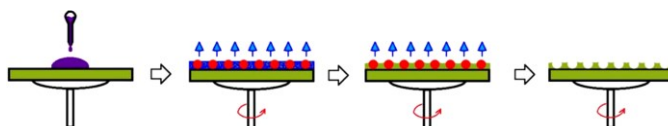


Obr. 19. Míchadlo

Filmy byly odlévány z roztoku proteinu na povrch polystyrenové Petriho misky o průměru 3,4 cm. Na povrch této misky bylo pipetováno 450  $\mu$ l 2% roztoku proteinu v HFIP. Misky byly následně vloženy do exsikátoru, kde byly sušeny v proudu dusíku, který zabezpečil konstantní podmínky sušení bez přítomnosti vlhkosti. Po vysušení filmů, které probíhalo 12 hod byly připravené vzorky vloženy na dalších 48 hod. do par methanolu, tak aby se daný proteinový film mohl transformovat ze SILK I do SILK II stavu, tj. z konformačního usprádaní v podobě  $\alpha$ -helixů do podoby  $\beta$ -skládaných listů [49].

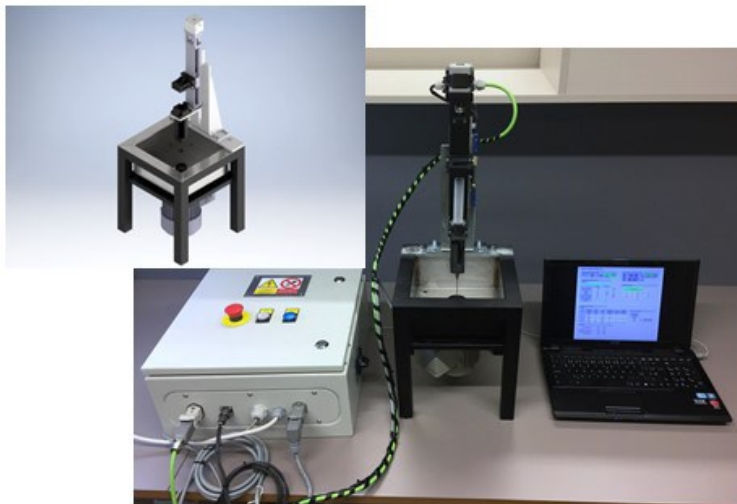
#### 4.4 Modifikace povrchu filmů pomocí metody časově sekvenované fázové separace

Povrchové modifikace filmů bylo dosaženo pomocí časově sekvenované fázové separace. Na polymerní povrch byl deponován směsný roztok s obsahem dobrého a špatného rozpouštědla, popř. aditiv (Obr. 20). Takovýto postup časově sekvenované fázové separace je popsán Wrzecionkem a kol. [37], v publikaci, jež popisuje princip této metody na polystyrenovém povrchu (viz teoretická část této práce).



Obr. 20. Schéma dávkování směsi rozpouštědel na rotující substrát [37]

Pro cílenou generaci povrchové porózní struktury bylo použito speciálně zkonstruované zařízení vyrobené Wrzecionkem a kol. na UFMI, UTB ve Zlíně. Toto zařízení vyobrazené na Obr. 21 se skládá z nosiče vzorků na rotoru, dávkovací a řídicí jednotky.



*Obr. 21. Použité zařízení pro modifikaci povrchové topografie polymeru metodou časově sekvenované fázové separace za rotace [37]*

Primární modifikace BMF povrchů byla založena na dříve popsaném postupu [49]: na povrch filmu bylo dávkováno v intervalu 5 sekund 10 dávek po 200  $\mu\text{l}$  modifikační směsi (HFIP:DMSO:H<sub>2</sub>O a to v objemovém poměru 7:0,2:4). Modifikace filmů HA byly založeny na postupu uvedeném v diplomové práci Bradáčové [51] a v mé bakalářské práci [48], kde základ modifikační směsi tvoří nBT a IPA v poměru 3:7 [48, 51].

## 4.5 Charakterizace povrchu

Povrchově texturované vrstvy byly charakterizovány pomocí mikroskopie atomárních sil, optického, konfokálního a skenovacího elektronového mikroskopu, kontaktního a bezkontaktního profilometru.

### 4.5.1 Optický mikroskop

Pro prvotní charakterizaci změn povrchu upravovaných polymerních filmů byl použit optický mikroskop Nikon Eclipse 50i vybavený fotoaparátem Cannon EOS2000D. Tyto snímky byly následně zpracovány v programu ImageJ.

#### 4.5.2 Konfokální mikroskop

Fluorescenčně značené vzorky byly charakterizovány pomocí konfokálního mikroskopu Olympus FV3000.

#### 4.5.3 Mikroskopie atomárních sil

Vzorky s povrchovou nano a mikro texturou byly charakterizovány pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM) značky NTEGRA-Prima od společnosti NT-MDT. Skenování povrchů probíhalo v semikontaktním módu. Měření bylo prováděno v prostředí vzduchu, při laboratorní teplotě. Pro všechna měření byla využita sonda NS601. Skenovaná plocha vzorku zaujímala plochu  $50 \times 50 \mu\text{m}$  s rozlišením  $512 \times 512 \text{ dpi}$ , rychlost skenování byla 0,5–0,7 Hz.

#### 4.5.4 Skenovací elektronový mikroskop

Mimo pozorování povrchové textury pomocí optického mikroskopu byl dále použit skenovací elektronový mikroskop (SEM) značky Nova NanoSEM 450 od společnosti FEI. Povrch vzorků byl zobrazován v prostředí vysokého vakua pomocí zpětně odražených elektronů.

#### 4.5.5 Kontaktní profilometr

Pro měření povrchové drsnosti filmů na bázi HA byl použit kontaktní profilometr Dektak XT (Bruker). Profilometr je opatřen diamantovým hrotem o poloměru křivosti  $12,5 \mu\text{m}$  s přítlakem 5 mg. Profil byl zaznamenán na více místech filmu pro ověření reprodukovatelnosti získaných dat.

#### 4.5.6 Optický profilometr

Pro analýzu povrchové topografie makro porézních povrchů byl použit optický profilometr ContourGT-K (Bruker), s objektivem se zvětšením 50x. Získaná data z tohoto zařízení byla následně analyzována v programu Gwyddion.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Práce byla zaměřena na vývoj nových postupů vedoucích k přípravě texturovaných povrchů na bázi HA a BMF pomocí časově sekvenované fázové separace za rotace. Z dřívějších studií [49–51] vyplynulo, že vznik rozdílných typů povrchových reliéfů je podmiňován změnami teploty, teplotních gradientů, rychlosti sušení, objemem dávkovaných rozpouštědel, způsobem přípravy filmu, viskozitou, distribucí molekulových hmotností. Tyto získané poznatky byly v rámci této práce dále rozvíjeny, jak bude diskutováno níže.

V případě povrchové modifikace filmů na bázi HA byl sledován vliv dalších proměnných majících za následek vznik specifických povrchových textur. Mezi tyto proměnné patří složení modifikační směsi.

Bylo studováno, jakým způsobem ovlivňuje vznik povrchové topografie přidavek vody, DMSO a HA do modifikační směsi založené na nBT a IPA. Z těchto primárních testů vyplynuly následující pokusy mající za cíl popsat:

- vliv přidávaného množství HA do směsi nBT + IPA + H<sub>2</sub>O + (DMSO),
- vliv počtu dávek deponovaných na povrch modifikovaného materiálu,
- vliv časového intervalu dávkování modifikační směsi,
- vliv rychlosti rotace vzorku,
- vliv objemu jedné modifikační dávky,
- vliv množství DMSO v modifikační směsi,
- vliv typu použité HA s ohledem na distribuci jejich molekulových hmotností,
- vliv poměrového zastoupení HA Mw 370 a 1180 kDa v modifikační směsi,
- vliv zbytkového množství vody v modifikovaném filmu na bázi HA, sušení vzorků v klimakomoře při 40% a 70 % relativní vlhkosti, sušárně bez regulace vlhkosti

Experimenty spojené s úpravou BMF filmů rozšiřovaly dosavadní postup přípravy povrchových makro pórů [49] o studium možností selektivní depozice fluorescenčních značek do povrchově vytvářených prohlubní. Spolu s tím byly prováděny experimenty mající za cíl prostudovat vliv přidaného BMF do modifikační směsi na změnu vznikající povrchové textury.

Primární modifikační směs pro BMF byla obohacována o následující aditiva:

- protein rozpuštěný v HFIP,
- modifikovaný protein NHS-Rhodamine rozpuštěný v HFIP,
- fluorescein isothiocyanate-dextran rozpuštěný v DMSO,
- chemicky či fyzikálně vázané barvivo rozpuštěné v DMSO

Jako poslední byla provedena kontrola stability navázaných látek na povrchu BMF ve vodné prostředí.

Veškeré experimenty byly opakovány minimálně třikrát z důvodů ověření reprodukovatelnosti získaných výsledků.

## 5.1 Experimenty věnované texturizaci povrchu na bázi HA

Pro úpravu povrchů filmů HA byla používána modifikační směs nBT a IPA v objemovém poměru 3:7 obohacená o výše uvedená aditiva. Základ modifikační směsi byl převzat z diplomové práce Martiny Bradáčové [51]. Počet dávek, objem jedné dávky a časové intervaly dávkování se u rozdílných experimentů liší, proto tyto parametry budou uvedeny v rámci diskuze získaných výsledků.

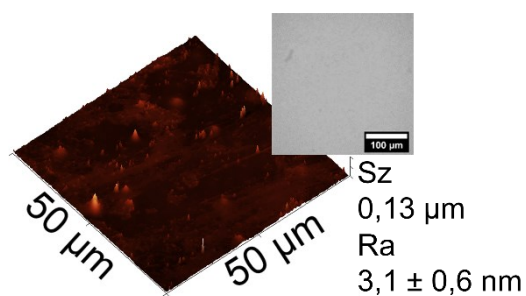
**Pozn.:** Pro zajištění odpaření zbytkových rozpouštědel z povrchu modifikovaných filmů byly upravené materiály ponechány v exsikátoru po dobu 24 hod.

### 5.1.1 Vliv složení modifikační směsi

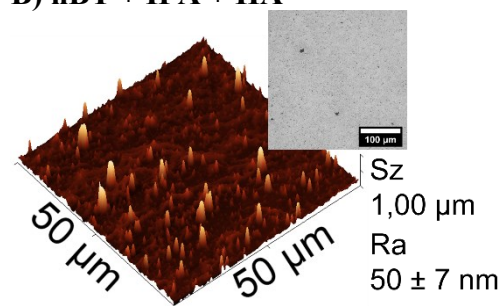
Modifikační směs byla obohacována o rozdílné aditivní látky. Experimenty spojené s postupným přidáváním aditiv do primární modifikační směsi (viz Obr. 23) ukazují význam jednotlivých komponent při vzniku povrchových textur na bázi HA.

Srovnávané povrchy uvedené na Obr. 22 byly připraveny při 2100 ot./min. Základem modifikační směsi byl nBT a IPA v objemovém poměru 3:7 o celkovém objemu 5 ml. Do takto připraveného základu byly přidávány aditivní látky, 0,5 ml DMSO, 1,1 ml superčisté vody a 2,3 ml 3 hm % HA o střední molekulové hmotnosti 370 kDa.

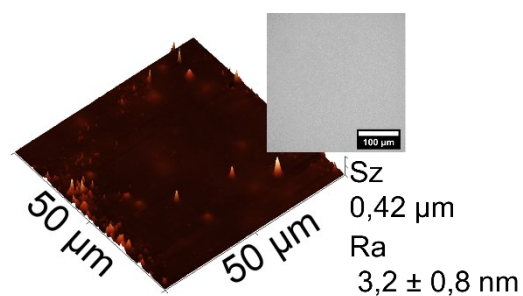
A) nBT + IPA



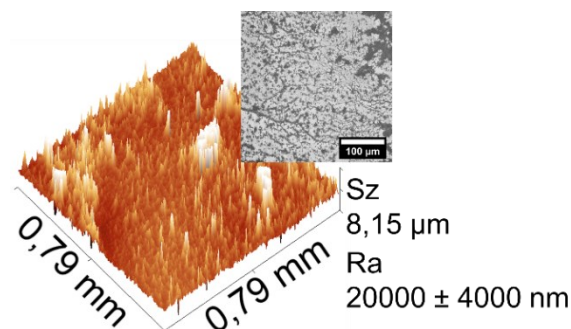
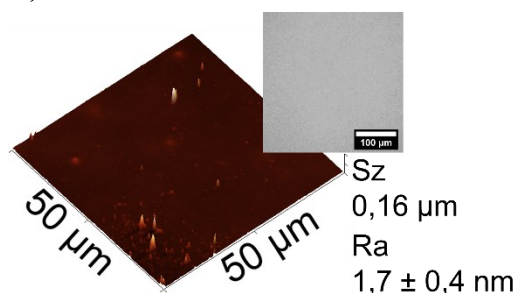
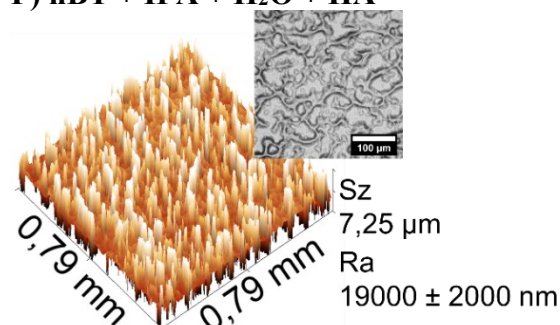
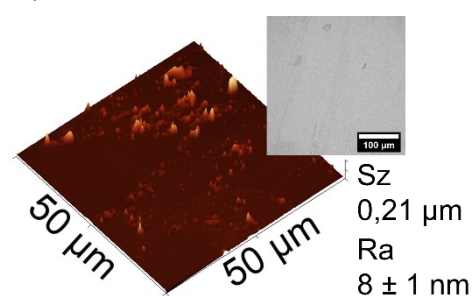
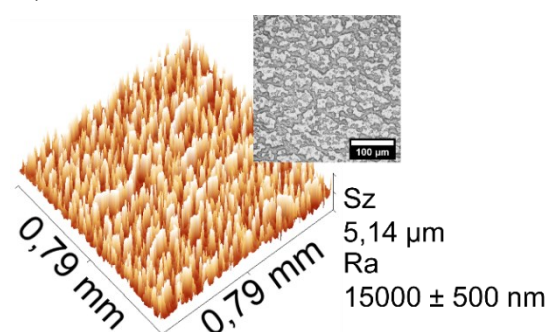
B) nBT + IPA + HA



C) nBT + IPA + DMSO

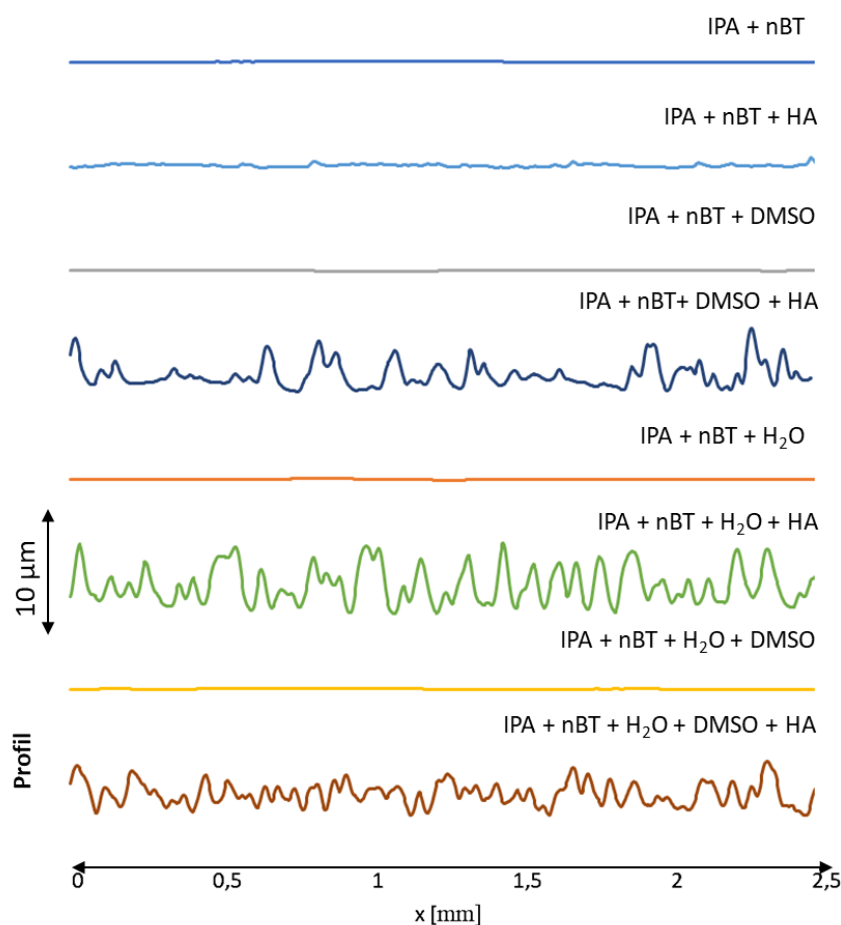


D) nBT + IPA + DMSO + HA

E) nBT + IPA + H<sub>2</sub>OF) nBT + IPA + H<sub>2</sub>O + HAG) nBT + IPA + H<sub>2</sub>O + DMSOH) nBT + IPA + H<sub>2</sub>O + DMSO + HA

Obr. 22. Závislost vzniku HA povrchových textur na přidávaném aditivu do směsi rozpouštědel. Parametr Sz určuje maximální převýšení povrchových nerovností a Ra průměrnou drsnost. Barevné snímky z AFM a optického profilometru, černobílé snímky z optického mikroskopu

Z výše uvedeného obrázku plyne, že modifikace filmů bez předešlého nabotnění povrchu vodou není účinná, na povrchu nevzniká „porou-like“ povrchová textura, jak je vidět na Obr. 22A až C. V případě, kdy se do modifikační směsi přidá HA, ale není přítomna voda, dojde k separaci drobných agregátů na povrchu filmů (Obr. 22B). Vysrážené struktury HA jsou zřetelné již v připraveném modifikačním roztoku. Pokud se přidá do modifikační směsi HA a DMSO dojde k separaci HA v již připravované směsi ještě před modifikací (Obr. 22D).



Obr. 23. Příklady profilových řezů získaných pomocí kontaktního profilometru pro vzorky uvedené na Obr. 22

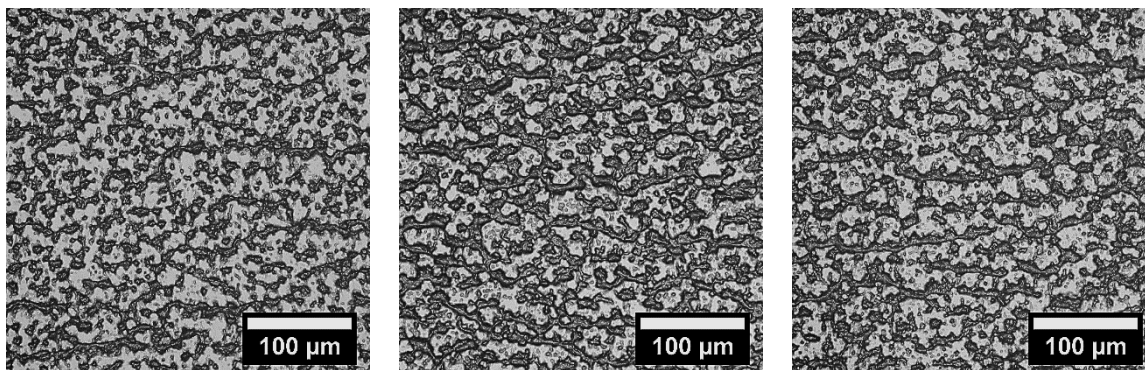
Obrázek 23 ukazuje, jak se mění povrchový profil modifikovaných filmů s a bez přídavku HA a vody. Vzorky upravované směsí rozpouštědel bez přídavku HA jsou v rámci provedeného srovnání prakticky hladké. Z čehož plyne zásadní význam přídavku polymeru. Druhou nejdůležitější složkou, kterou je nezbytné přidávat, je voda.

Podle jednotlivých profilů lze říci, že přidá-li se do modifikační směsi HA bez vody, dojde k separování jemných struktur na povrchu. Pokud se do modifikační směsi přidá voda, dojde k nabotnutí filmů a HA, které zde tvoří již výraznou texturu. Jestliže se do této směsi HA a H<sub>2</sub>O přidá také DMSO, dojde ke vzniku méně výrazných struktur. Z těchto pozorování plyne tento závěr. Pro přípravu „porous-like“ povrchů na bázi HA je nezbytné použít modifikační směs složenou z IPA, nBT, H<sub>2</sub>O a HA.

### 5.1.2 Vliv přidávaného množství HA do modifikační směsi

Z předchozího pokusu vyplynulo, že přídavek HA do modifikační směsi má zásadní vliv na povrchovou modifikaci. V této podkapitole bude řešeno, jak se na této skutečnosti podílí množství HA, která se přidává do polymerního roztoku v poměru k množství přidávané vody. To znamená, že roztoky byly připravovány tak, aby celkové množství vody ve směsi bylo konstantní a měnil se pouze podíl přidaného HA. Do směsi bylo přidáváno 2,1 až 2,5 ml 3 hm.% HA o Mw 370 kDa a 0,9 ml až 1,3 ml superčisté vody (Obr. 24). Vzorky byly modifikovány deseti dávkami směsi v časovém intervalu 40 s.

A) 1,3 ml H<sub>2</sub>O + 2,1 ml HA      B) 1,1 ml H<sub>2</sub>O + 2,3 ml HA      C) 0,9 ml H<sub>2</sub>O + 2,5 ml HA



Obr. 24. Vliv množství přidaného HA do modifikační směsi na změnu vznikající povrchové textury. Obrázky z optického mikroskopu

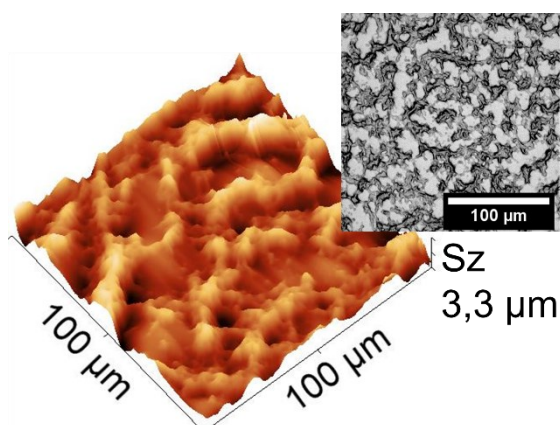
Z Obr. 24 vyplývá, že v případě přídavku většího množství HA dochází k výraznějšímu vysrážení HA na povrchu. Kdežto v případě menšího přídavku HA dochází ke vzniku izolovaných sraženin, které se nespojují do provázané povrchové sítě. Jako ideální přídavek se tedy jeví 2,3 ml 3 hm. % HA o Mw 370 kDa, 0,5 ml DMSO a 1,1 ml superčisté vody. Tento poměr byl používán v rámci dalších experimentů.



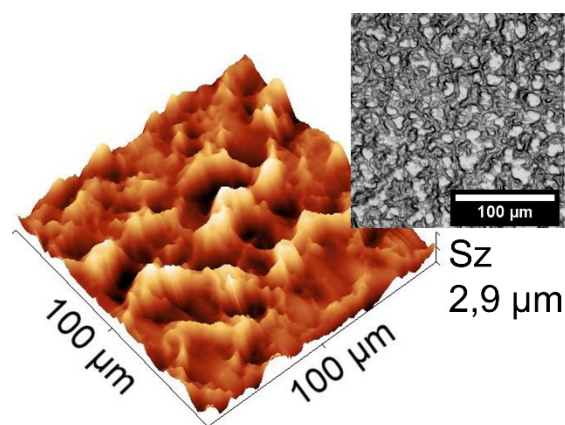
### 5.1.3 Vliv počtu dávek modifikačního činidla nanášeného na povrch HA

Další proměnnou je množství dávek nanášených na povrch modifikovaného filmu HA. Pro úpravu povrchů v rámci tohoto experimentu byla použita modifikační směs skládající se z 5 ml nBT + IPA (3:7) s přídavkem 2,3 ml HA (3 hm.%, Mw 370 kDa), 0,5 ml DMSO a 1,1 ml superčisté vody. Depozice jednotlivých dávek této směsi probíhala v intervalu 10 s.

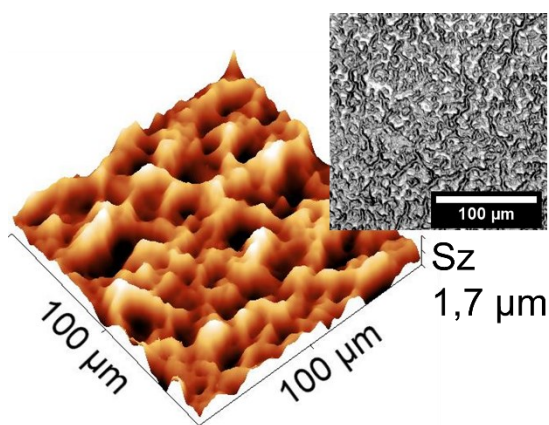
A) 6 dávek



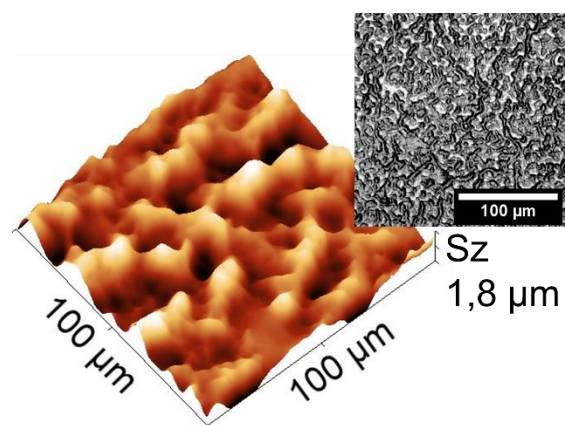
B) 7 dávek



C) 8 dávek



D) 9 dávek



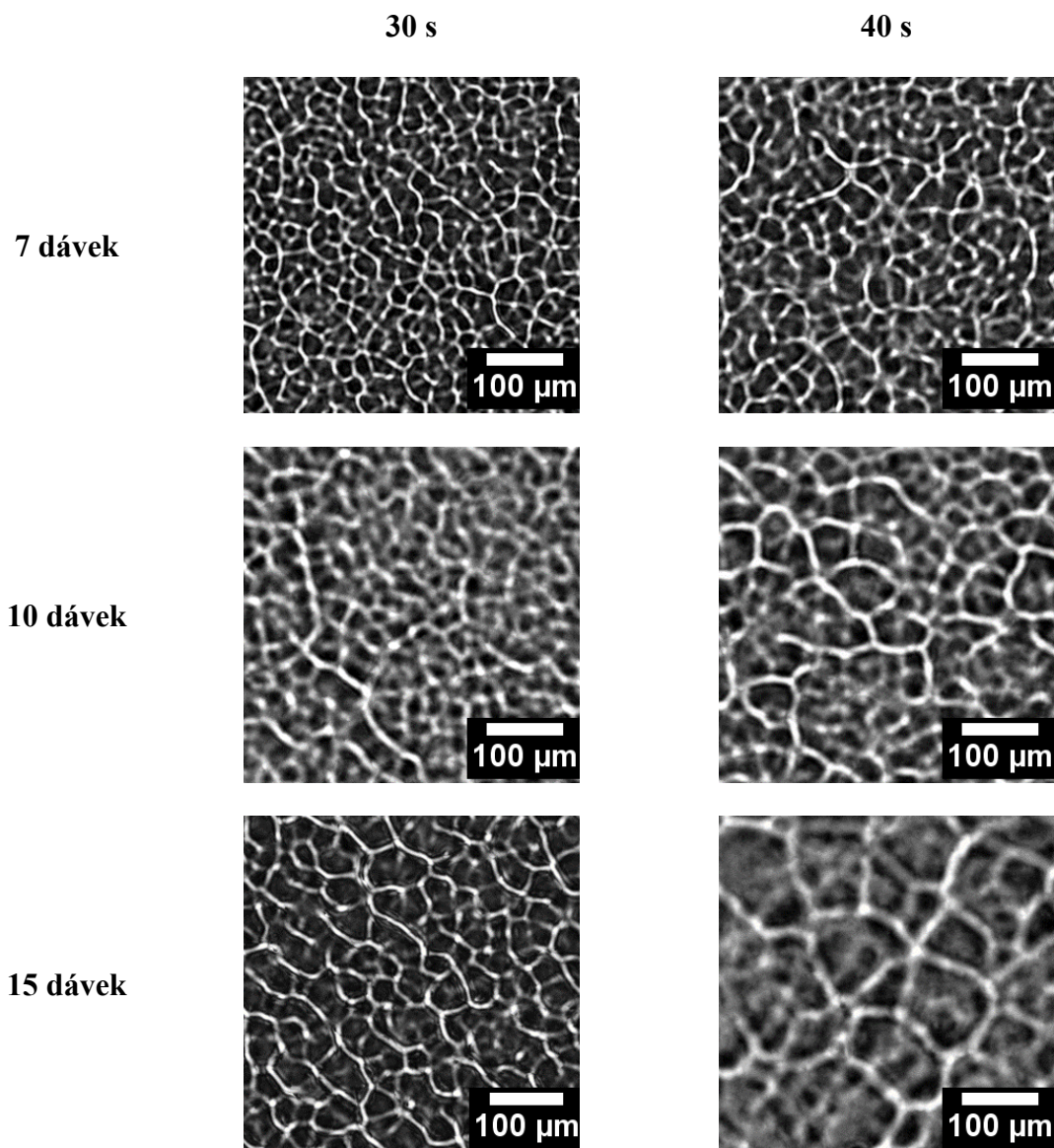
Obr. 25. Vliv počtu deponovaných dávek na změnu povrchové textury vznikající v průběhu časově sekvenovaného dávkování směsného roztoku. Parametr Sz uvádí maximální povrchové převýšení zaznamenané pomocí AFM. Černobílé obrázky pořízeny pomocí optického mikroskopu

Z výsledků uvedených na Obr. 25 plyne významný vliv počtu dávek na vznik propojených povrchových sítí. V případě 6 dávek modifikační směsi je patrné, že jsou pozorované nejvyšší agregáty, viz. parametr Sz. S rostoucím počtem dávek se zvětšuje míra propojení

agregátů HA a spolu s tím klesá výška pozorovaných povrchových nerovností. Dochází k překrývání povrchu vysráženou HA.

#### 5.1.4 Vliv časového intervalu depozice směsného roztoku na povrch HA

I přes to, že předchozí experiment pojednával o vlivu počtu dávek modifikační směsi, byl proveden pokus, kde spolu koreluje dva parametry, a to počet dávek a časový interval mezi jednotlivými dávkami. To znamená, že pro stanovený počet dávek se mezi jednotlivými dávkami měnil časový interval.



Obr. 26. Závislost velikosti a spojitosti agregátů HA do podoby pórů na množství deponovaných dávek a časovém intervalu mezi nimi. Obrázky pořízeny pomocí optického mikroskopu

Srovnávané filmy na Obr. 26 byly připravovány z modifikační směsi nBT + IPA, obsahující 2,3 ml HA (3 hm. %, Mw 370 kDa) 0,5 ml DMSO a 1,1 ml superčisté vody.

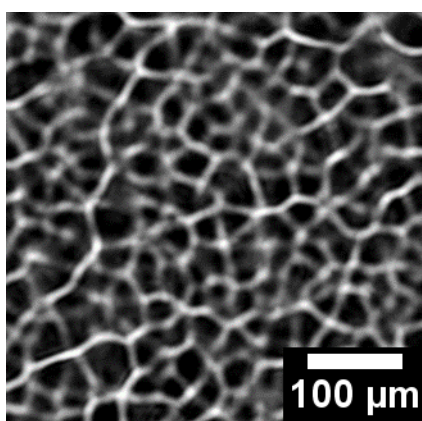
Z Obr. 26. je patrné, že byl potvrzen výše uvedený předpoklad, tj. se vzrůstajícím počtem dávek dochází k překryvu povrchových agregátů, které při vyšším počtu dávek začínají vytvářet povrchovou texturu připomínající póry („porous-like“). V případě sedmi dávek modifikační směsi roste velikost pórů se vzrůstajícím časovým intervalem. U filmů modifikovaných deseti dávkami je trend růstu totožný jako v předchozím případě, avšak v případě 40 s již dochází k velmi výraznému vrstvení pórů. Při patnácti dávkách směsi jsou póry větší, se vzrůstajícím časem jsou ale protáhlé do všech stran a působí rozmazaným dojmem.

Je tedy patrné, že je velmi důležité volit optimální počet dávek s optimálním časovým intervalem. Pro další výzkum byl vybrán časový interval 40 s po 10 dávkách modifikační směsi.

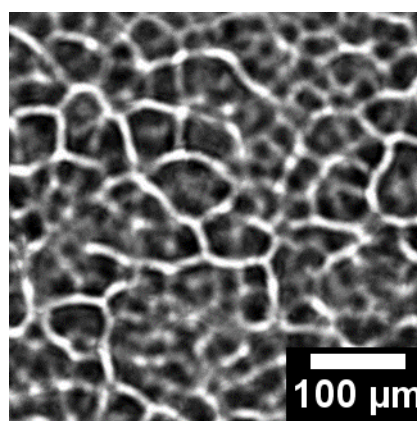
### 5.1.5 Vliv rychlosti rotace vzorku

Na vznik, velikost a pravidelnost agregovaných struktur do podoby pórů má vliv rychlost rotace upravovaného vzorku. Jedná se o parametr, který má také vliv na homogenitu povrchu. Vzorky byly modifikovány deseti dávkami směsi obohacené o 2,3 ml 3 hm. % HA Mw 370 kDa, 0,5 ml DMSO a 1,1 ml superčisté vody ve 40 s intervalech. Vliv této proměnné je demonstrován na Obr. 27.

1500 ot./min.



2100 ot./min.



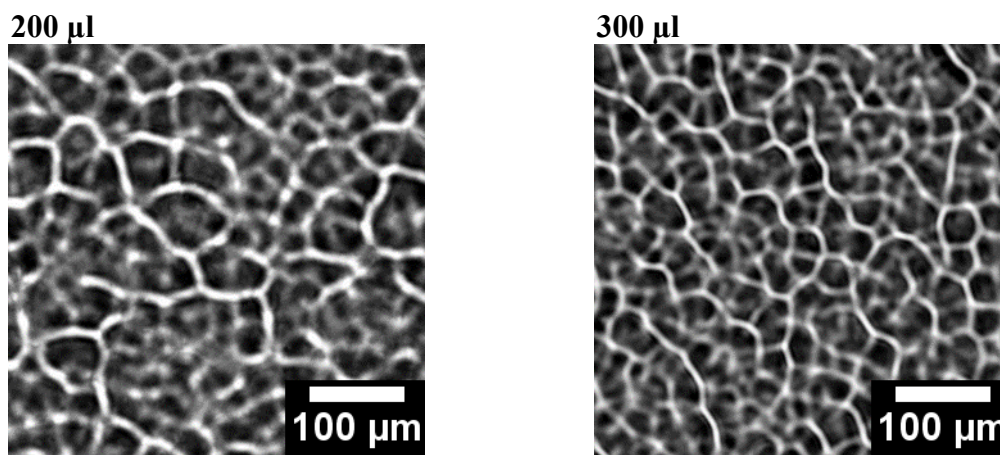
Obr. 27. Vliv rychlosti rotace upravovaného povrchu HA (370 kDa) pomocí 10 dávek modifikační směsi deponované v intervalu 40 s na změnu vznikajícího povrchového reliéfu. Obrázky z optického mikroskopu.

Ze získaných výsledků, které jsou porovnány na Obr. 27 a při pohledu na povrch misky vyplývá, že pro daný systém je vhodnější aplikovat vyšší rychlost rotace vzorku (2100 ot./min.), která umožní rovnoměrnější rozvrstvení modifikační směsi po povrchu polymerní fólie a to v dostatečně tenké vrstvě.

### 5.1.6 Vliv objemu jedné modifikační dávky

Objem modifikační dávky je dalším z podstatných parametrů, který ovlivňuje vznik, velikost, pravidelnost a homogenitu vznikajících povrchových textur. Jak rychlost rotace, tak objem jedné modifikační dávky ovlivní, jak vysoká bude vrstva rozpouštědel na modifikovaném filmu. Tento parametr má tedy velmi podobný vliv jako rychlost rotace vzorku.

Vzorky byly modifikovány 10 dávkami směsi obohacené o 2,3 ml 3 hm. % HA Mw 370 kDa, 0,5 ml DMSO a 1,1 ml superčisté vody ve 40 s intervalech. Objem jedné dávky směsi rozpouštědel byl 200 a 300  $\mu$ l. Získané výsledky jsou uvedené na Obr. 28.



*Obr. 28. Závislost velikosti a spojitosti pórů na množství dávek směsi rozpouštědel na filmu HA o střední molekulové hmotnosti 370 kDa, upravený na spin-coateru 10 × 200 nebo 300  $\mu$ l modifikační směsi ve 40 s intervalech (snímek z optického mikroskopu)*

Z vyplývajících výsledků na Obr. 28 je patrné, že při dávkování většího množství (300  $\mu$ l) modifikační směsi dochází k většímu vrstvení pórů nad sebou, kdežto v případě dávkování menšího (200  $\mu$ l) objemu modifikační směsi se póry jeví větší.

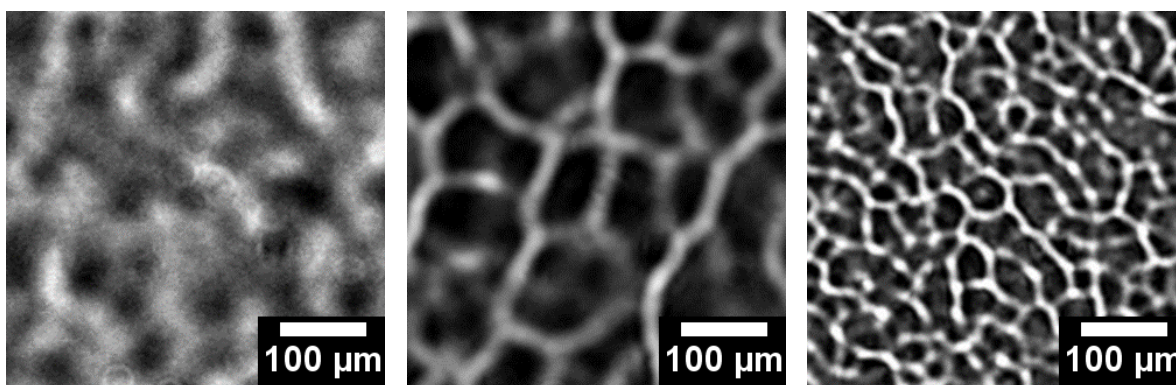
### 5.1.7 Vliv množství DMSO v modifikační směsi

Vznik povrchově agregovaných struktur ovlivňuje přítomnost a množství DMSO v modifikační směsi. Veškeré filmy byly připraveny deponováním 15 dávek směsi po 40 s intervalech. Modifikační směs se skládala z 5 ml nBT a IPA v obj. poměru 3:7 s přidavkem 2,3 ml 3 hm. % HA Mw 370 kDa, s 1,1 ml superčisté vody a s různým množstvím DMSO.

A) 0 ml DMSO

B) 0,2 ml DMSO

C) 0,5 ml DMSO



Obr. 29. Vliv přidaného množství DMSO na změnu agregačních schopností HA v průběhu časově sekvencované fázové separace. Upravován povrch HA o Mw 370 kDa. Obrázky z optického mikroskopu

V případě přidavku DMSO do modifikační směsi, dojde ke zvýšení agregační schopnosti HA. Z Obr. 29 plyne, že v nepřítomnosti DMSO vznikají výraznější póry připomínající struktury. V případě přidavku 200 µl dochází k tvorbě velkých povrchových pórů, které však nebyly rovnoměrně rozvrstveny po celém povrchu modifikovaného filmu. S přidavkem 0,5 ml DMSO jsou však póry zřetelné a pravidelné. Výsledek tohoto experimentu potvrzuje, že DMSO zlepšuje agregační schopnost HA, jak je popsáno Heatleyem a kol. ve studii [53].

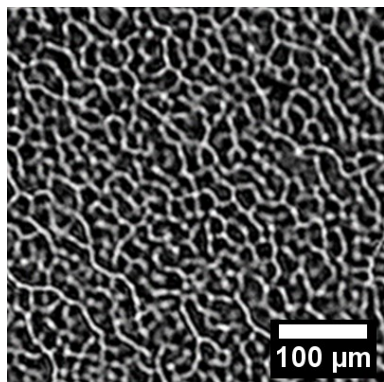
### 5.1.8 Vliv typu nosného substrátu HA o Mw 370 a 1180 kDa

Je známo, že se změnou střední molekulové hmotnosti se mění mechanické a fyzikálně-chemické vlastnosti daného polymerního materiálu. To znamená, že se mění i rychlost botnání polymerního povrchu. V rámci pochopení vlivu této proměnné byly připraveny filmy HA o rozdílných středních molekulových hmotnostech. Byly odlity filmy z 3 hm. % HA o Mw 370 kDa a 0,7 hm. % HA o Mw 1180 kDa, jež byly rozpouštěny ve vodě po dobu 24 hod. při 50 °C na magnetickém míchadle. Tyto filmy byly následně

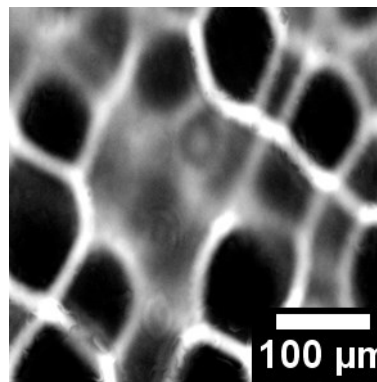
modifikovány ve 40 s intervalech 10 dávkami směsi o objemu 200  $\mu\text{l}$ , která byla obohacena o 2,3 ml 3 hm. % HA 370 kDa s přídavkem 1,1 ml superčisté vody a 0,5 ml DMSO.

Z výsledků uvedených na Obr. 30 plyne významný vliv typu použité HA pro přípravu filmu. V případě povrchů tvořených HA o Mw 1180 kDa dochází ke vzniku objemnějších porézních struktur.

Nosný substrát Mw 370 kDa



Nosný substrát Mw 1180 kDa



*Obr. 30. Vliv nosného substrátu HA (370 kDa a 1180 kDa) na změnu povrchového reliéfu HA při modifikaci 10 dávek modifikační směsi deponované v intervalu 40 s. Obrázky z optického mikroskopu*

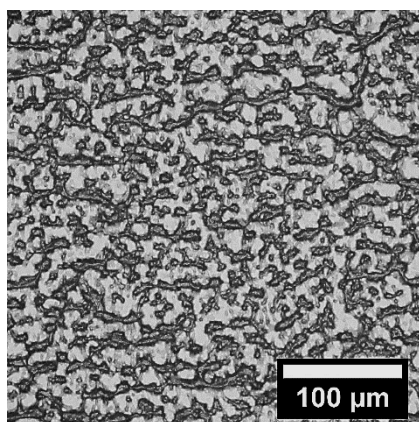
### 5.1.9 Vliv poměrového zastoupení HA Mw 370 a 1180 kDa v modifikační směsi

Vliv poměru zastoupení HA Mw 370 a 1180 kDa v modifikační směsi na nosný substrát (NS) o Mw 370 kDa. Filmy připravené z HA byly modifikovány modifikační směsí složené ze základních 5 ml nBT a IPA obohaceného o 0,5 ml DMSO a 2,3 ml HA v různém poměrovém zastoupení HA Mw 370 a 1180 kDa. Kde HA Mw 370 a 1180 kDa byly připraveny ve 2,5 hm. % (Obr. 31).

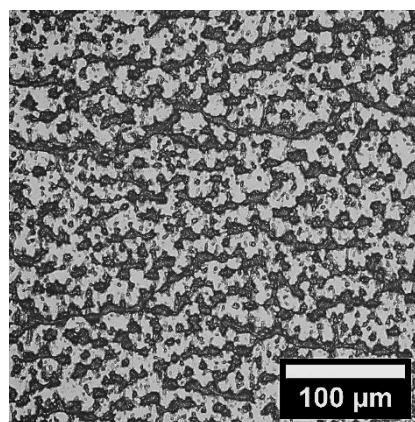
Na film bylo deponováno 10 dávek připravené modifikační směsi po 40 s intervalech o objemu jedné dávky 200  $\mu\text{l}$ .

Obrázek 32 ukazuje, že v případě nosného substrátu HA Mw 370 kDa vznikaly zcela odlišné povrchové textury než v případě největšího přídavku HA o vysoké Mw, tj. 1,6 ml HA Mw 370 kDa a 0,7 ml HA Mw 1180 kDa. U filmů s přídavkem HA o Mw 370 kDa dochází k tvorbě nejvýraznějších agregátů na povrchu filmů. S ubývajícím množstvím HA o Mw 370 kDa a vzrůstajícím množstvím HA Mw 1180 kDa dochází k tvorbě agregátů, které se přeskupí do pravidelné sítě.

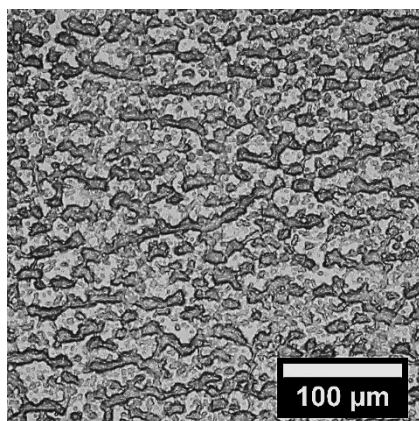
A) 2,5 ml HA Mw 370 kDa + 0 ml HA  
Mw 1180 kDa



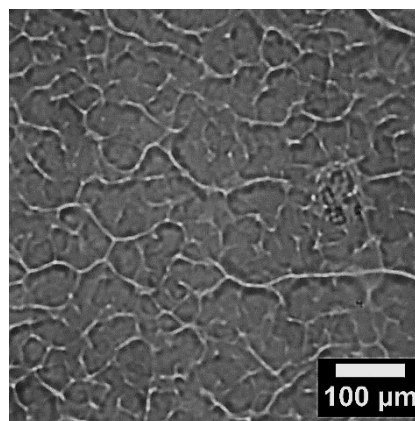
B) 2,1 ml HA Mw 370 kDa + 0,2 ml HA  
Mw 1180 kDa



C) 1,8 ml HA Mw 370 kDa + 0,5 ml HA  
Mw 1180 kDa



D) 1,6 ml HA Mw 370 kDa + 0,7 ml HA  
Mw 1180 kDa

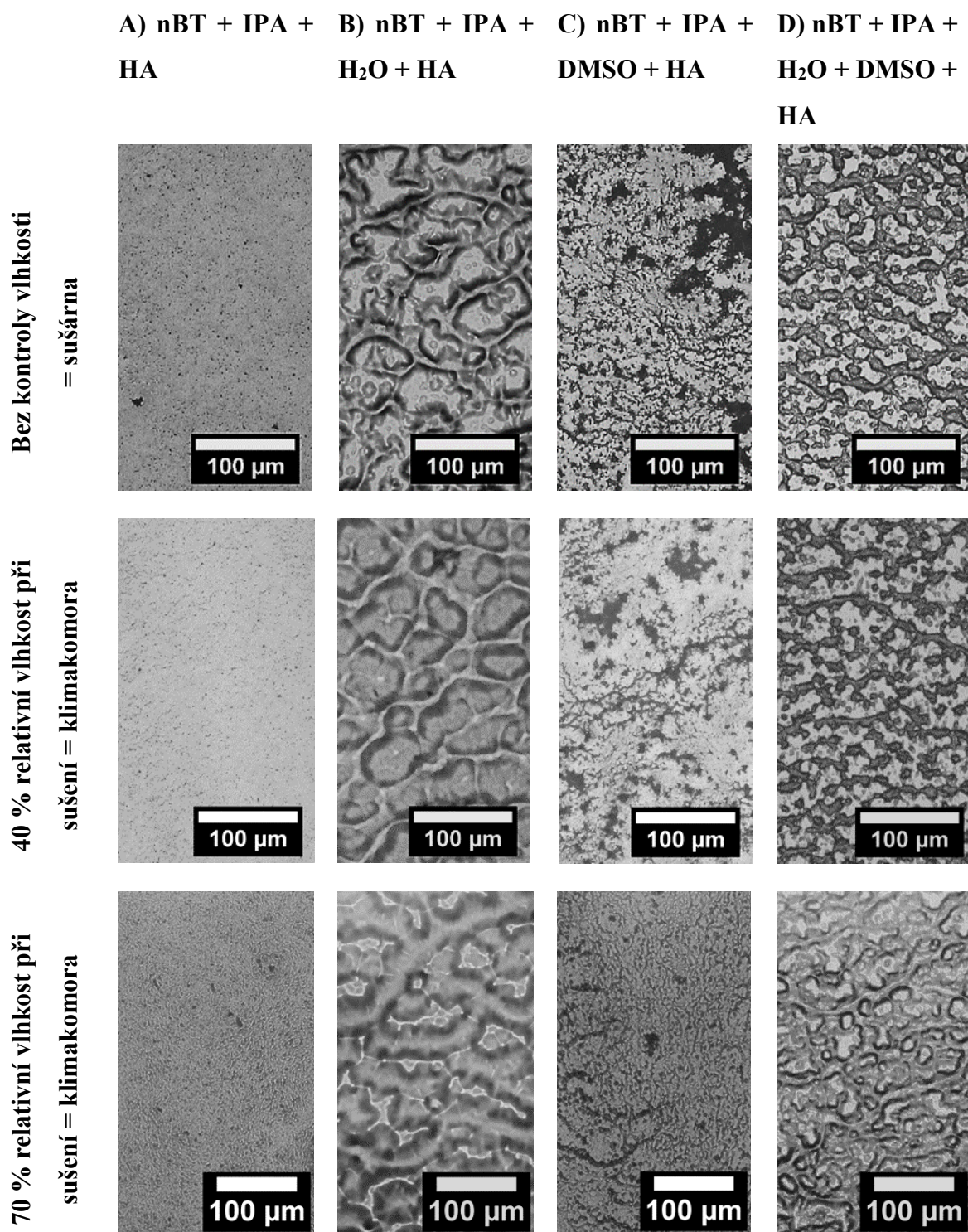


Obr. 31. Vliv přidavku směsi HA o Mw 370 a 1180 kDa do modifikační směsi při modifikaci filmu HA o Mw 370 kDa. Obrázky z optického mikroskopu

#### 5.1.10 Vliv zbytkové množství vody v modifikovaném HA povrchu

Pro ucelení experimentů zaměřujících se na pochopení vlivu okolního prostředí na přípravu filmu HA a jejich následnou modifikaci pomocí směsných roztoků, byly porovnávané vzorky solidifikovány bez a s kontrolovanou vlhkostí uvnitř sušícího zařízení. Sušení roztoků HA do podoby filmů probíhalo v klimakomoře při 40 a 70 % relativní vlhkosti, při 50 °C po dobu 48 hod. nebo v běžné sušárně při relativní vlhkosti mezi 40 až 60 %. Filmy z HA Mw 370 kDa, byly povrchově upravovány deseti dávkami modifikační směsi (objem jedné dávky činí 200  $\mu$ l), která byla obohacována postupně o jednotlivá aditiva. Aditiva byla o objemech: 1,1 ml superčisté vody, 0,5 ml DMSO a 2,3 ml HA. Jednotlivé dávky byly deponovány na polymerní povrch ve 40 s intervalech.

Pro znázornění rozdílů zde budou uvedeny pouze filmy, na kterých je viditelná povrchová topografie viz kapitola 5.1.1.



Obr. 32. Vliv vlhkosti při přípravě nosných substrátů HA o Mw 370 kDa pro modifikaci filmů pomocí časově sekvenované fázové separace. Obrázky z optického mikroskopu

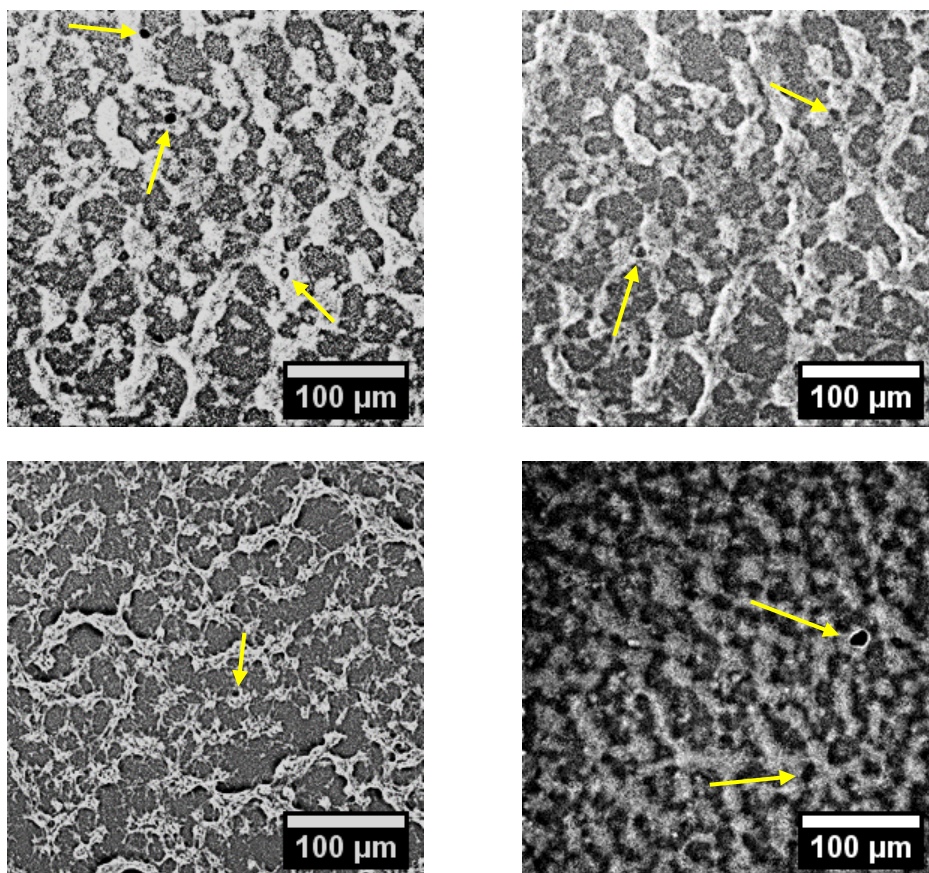


Z filmů zobrazených na Obr. 32 je zřetelné, že v čím vyšší vlhkosti je film sušen, tím výraznější struktury lze pozorovat. Z tohoto porovnání jasně plyne, jak je pro povrchovou modifikaci důležitá příprava filmů vzhledem k prostředí jejich solidifikace.

Je vhodné využívání klimakomory, kde je přesně stanovená vlhkost v průběhu sušení na rozdíl od sušárny bez nucené cirkulace vzduchu, kde je vlhkost ovlivněná vlhkostí laboratoře a ročním obdobím.

### 5.1.11 Analýza obrázků pomocí SEM

Podle zadání této diplomové práce, měla být pro zobrazování povrchových topografií použita skenovací elektronová mikroskopie. Při skenování povrchu pomocí této techniky se ukázalo, že povrch tohoto materiálu není dostatečně stabilní s ohledem na dopadající svazek elektronů. Přes pokovení zobrazovaných vzorků docházelo k lokálnímu vypalování děr do povrchové vrstvy. Z tohoto důvodu takto mikroskopická technika nebyla dále používána pro zobrazování porovnávaných reliéfů na bázi HA, viz. Obr. 33.



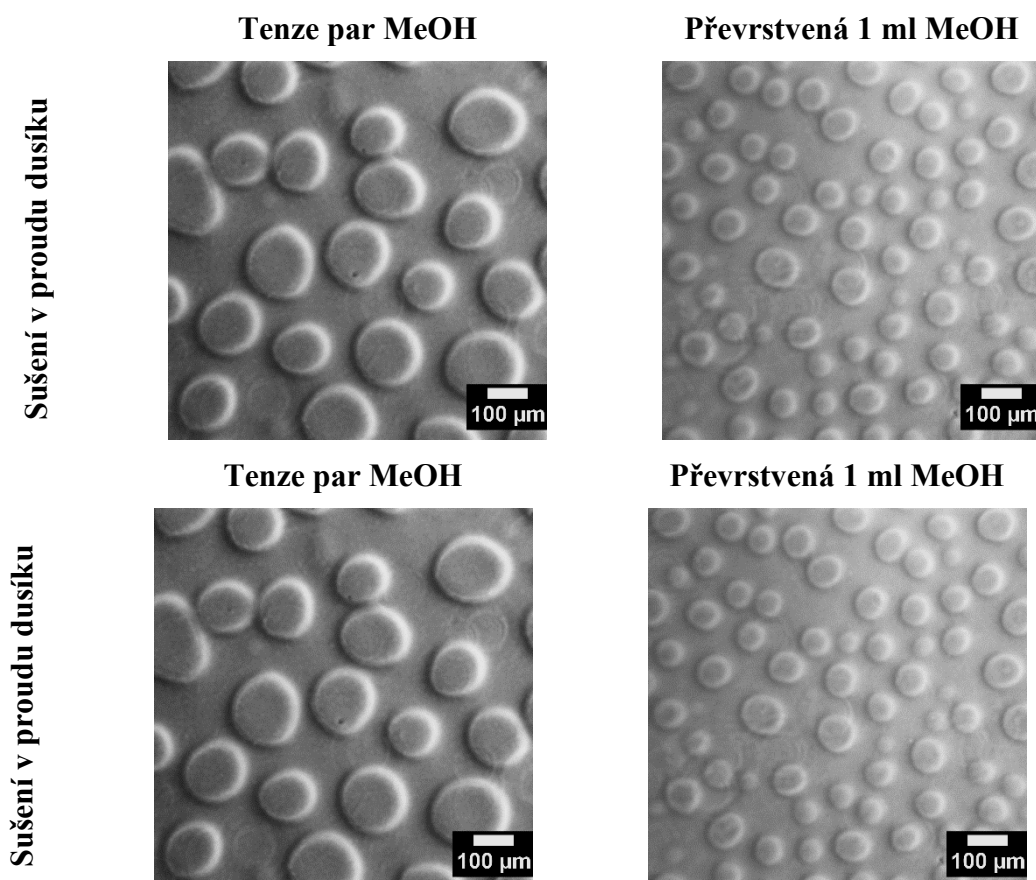
Obr. 33. Ukázka vzorků focených pomocí SEM. Šipkami jsou vyznačené vypálené díry

## 5.2 Experimenty věnované texturizaci povrchů na bázi hedvábného proteinu

Fibroinové filmy byly povrchově upravovány pomocí časově sekvenované fázové separace za rotace pomocí dobrého a špatného rozpouštědla. Ideální parametry modifikační směsi, rychlost rotace vzorků, počet dávek směsi, časový interval mezi jednotlivými dávkami byly převzaty z diplomové práce Kocourkové [49].

### 5.2.1 Vliv historie přípravy filmů

V předchozí studii [49] byly filmy sušeny v proudu dusíku pro eliminaci působení vzdušné vlhkosti na solidifikovaný BMF film. Následně byly filmy ponechány v exsikátoru v parách methanolu (MeOH) tak, aby došlo k jeho transformaci ze SILK I do SILK II stavu. V rámci této práce byl proveden pokus, ve kterém byl vzorek místo vystavení parám MeOH převrstven tímto alkoholem. To znamená, že na povrch filmu byl nanesen 1 ml MeOH.



Obr. 34. Vliv historie přípravy proteinových filmů, na jehož povrchu dochází povrchovou modifikací k tvorbě pórů. Obrázky jsou pořízené z optického mikroskopu

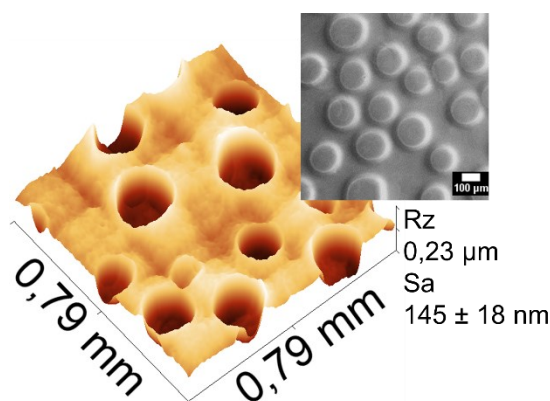
Z Obr. 34 je patrné, že v případě použití par MeOH dochází k tvorbě větších pórů na rozdíl od filmů, které byly převrstvené 1 ml MeOH. Také je patrný rozdíl v četnosti pórů na povrchu. V případě převrstvení filmu methanolem vzniká více menších pórů.

**Pozn.** V následujících experimentech byly filmy BMF upravovány pomocí par MeOH.

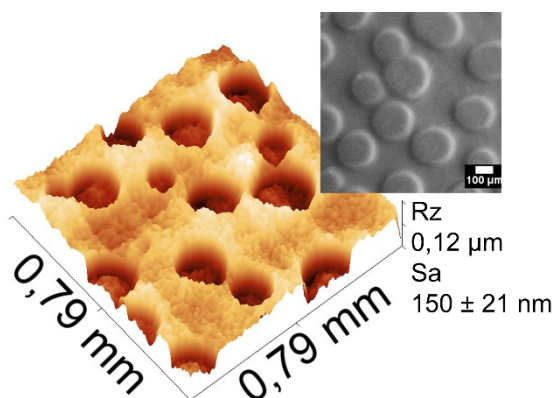
### 5.2.2 Modifikace povrchů BMF pomocí směsi rozpouštědel obsahujících rozpuštěný BMF

Cílem přidavku rozpuštěného BMF do modifikační směsi bylo prostudovat, jakým způsobem takto deponovaný BMF ovlivní vznikající povrchovou texturu generovanou na BMF filmech. *B. mori* fibroin jako aditivní látka byl do modifikační směsi přidáván spolu s HFIP v němž byl rozpuštěn. Výsledky z tohoto pokusu jsou zaznamenány na Obr. 35.

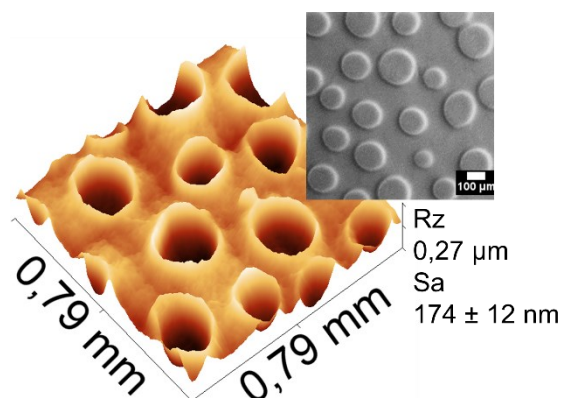
#### A) Bez přidaného proteinu



#### B) 0,1 hm. % protein rozpuštěný v HFIP



#### C) 0,01 hm. % protein rozpuštěný v HFIP



Obr. 35. Vliv přidavku proteinu rozpuštěného v HFIP na změnu povrchové topografie modifikovaných fibroinových filmů. Černobílé obrázky byly pořízené optickým mikroskopem. Barevné pomocí optického profilometru

Z Obr. 35 je patrné, že v případě přídavku proteinu rozpuštěného v HFIP nedochází k ovlivnění vzniku primárních makro pórů. V závislosti na množství přidaného proteinu vzniká pouze specifická mikro textura, jak je patrné z dat získaných pomocí optického profilometru.

### 5.2.3 Vliv rozpuštění fluorescenčních aditiva v rozdílných složkách modifikační směsi na jeho selektivní depozici

Pro zjištění principu cíleného značení vznikajících pórů bylo využíváno fluorescenčního barviva. Fluorescenční značení bylo zvoleno z důvodů jednoduché identifikace pórů a k ověření funkčnosti principu modifikace.

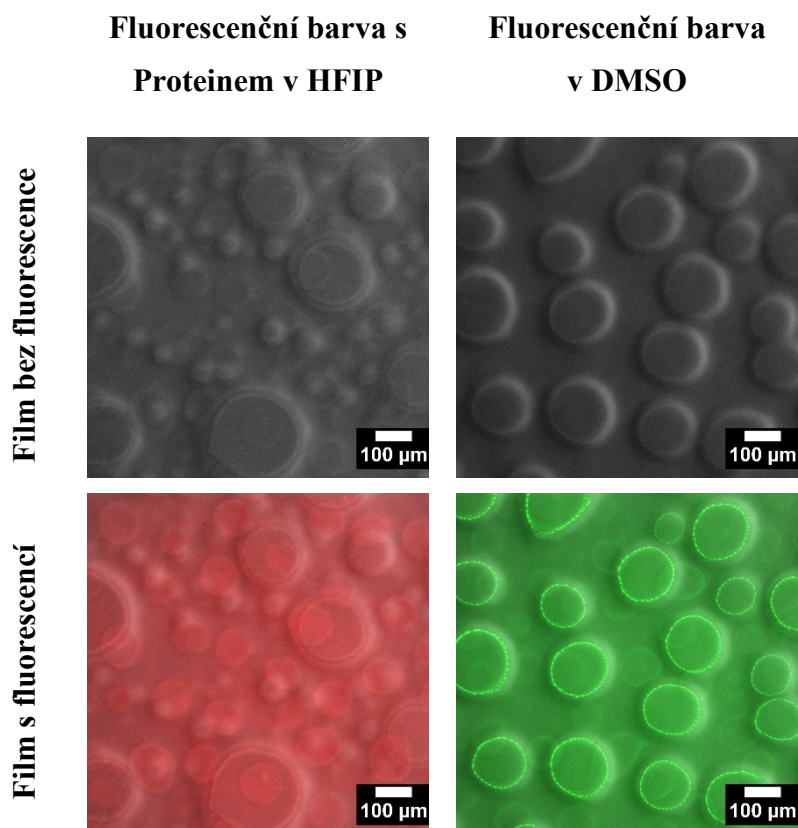
V návaznosti na předchozí experiment byl použit protein rozpuštěný v HFIP, jenž byl značen fluorescenční barvou. V poslední řadě se fluorescenční barvivo rozpustilo v přidávaném množství DMSO do modifikační směsi.

**Pozn.:** V tomto případě byly použity odlišné fluorescenční barvy s velmi podobnou molekulovou hmotností.

Z uvedených výsledků (Obr. 36) je zřetelné, že v případě přídavku fluorescenčně značeného proteinu rozpuštěného v HFIP nedojde k totožnému překrytí fluorescenčního značení se vznikajícími póry. Přídavek fluorescenčně značeného proteinu rozpuštěného v HFIP není vhodný pro cílené značení vznikajících pórů, jak je vidět na Obr. 36. V případě fluorescenčního barviva rozpuštěného v DMSO došlo k lokálnímu značení vznikajících pórů. Toto pozorování je v souladu s cílem těchto experimentů.

Tento experiment nám tedy vysvětluje, že za vznik pórů na povrchu filmu je zodpovědný DMSO, který je v tomto případě součástí modifikační směsi jako špatné rozpouštědlo. Při zanořování kapiček špatného rozpouštědla do nabotnané vrstvy dochází ke vzniku pórů a při jeho postupném odpařování se zde u okrajů pórů hromadí větší množství barvy.

**Pozn.:** V dalších experimentálních pokusech bylo fluorescenční barvivo přidáváno účelně jen do DMSO pro lokálním značení pórů.



Obr. 36. Vliv přidavku, fluorescenčně značeného proteinu rozpuštěného v HFIP nebo DMSO s fluorescenční barvou, do modifikační směsi používané pro generaci povrchových makro pórů na bázi BMF. Obrázky z optického mikroskopu

#### 5.2.4 Vliv molekulové hmotnosti dextranu jako nosiče fluorescenční barvy

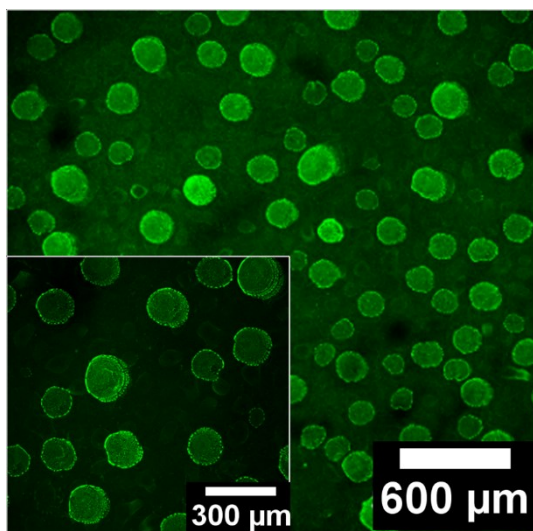
V rámci dalších experimentů byl jako nosič fluorescenční barvy používán dextran. U tohoto typu nosiče byl hodnocen vliv jeho molekulových hmotností.

**Pozn.:** Pro většinu experimentů byl využíván dextran s větší molekulovou hmotností až na výjimky, které jsou zaznamenány v textu.

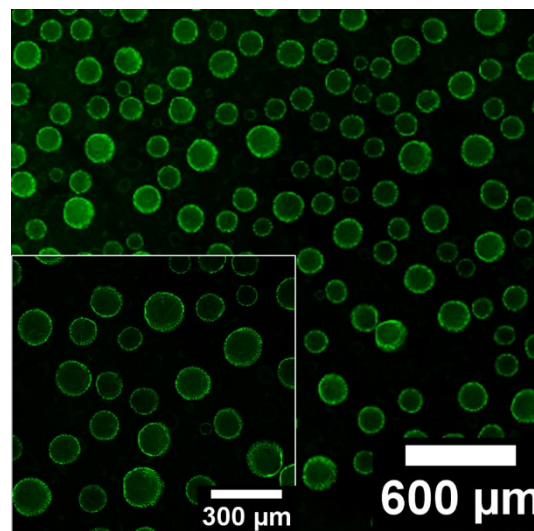
Pro zjištění vlivu molekulových hmotností se připravily totožné filmy za stejných podmínek ve stejném časovém období. Pro jednotlivé molekulové hmotnosti bylo rozpuštěno 0,5 hm. % dextranu v DMSO.

Z Obr. 37 je viditelné, že v případě přidavku fluorescenčně značeného dextranu jsou póry nepravidelné, nemají ostrý, kulovitý tvar, ale jsou celistvěji zabarvené. Kdežto v případě dextranu o větší molekulové hmotnosti jsou póry pravidelné, mají kulovitý tvar a jejich hrany jsou ostré a nerozplývají se do okolí.

Dextran – 20MG



Dextran – 70MG

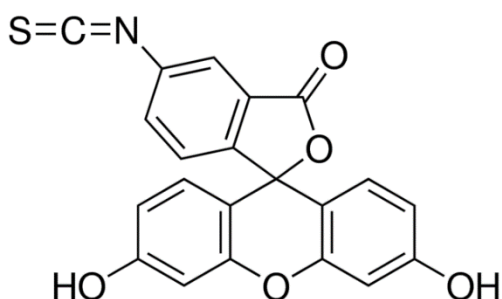


Obr. 37. Vliv molekulové hmotnosti fluorescenčně značeného dextranu přidávaného do DMSO pro modifikaci proteinových filmů. Obrázky jsou pořizené z optického mikroskopu

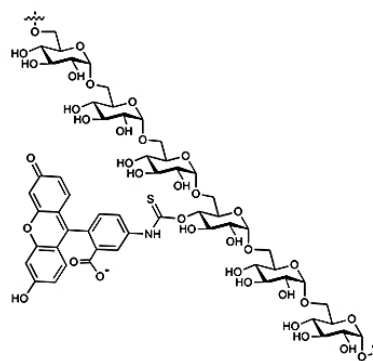
### 5.2.5 Odlišnosti při použití fluorescenčně značeného isomeru a dextranu

Základní rozdíl mezi použitými fluorescenčními chemikáliemi je ve velikosti jejich molekul. Fluorescenčně značený isomer (Fluorescein isothiocyanate isomer) má mnohem menší molekulu oproti fluorescenčně značenému dextranu (Fluorescein isothiocyanate dextran – 70MG), jak je možné vidět na Obr. 38.

A)



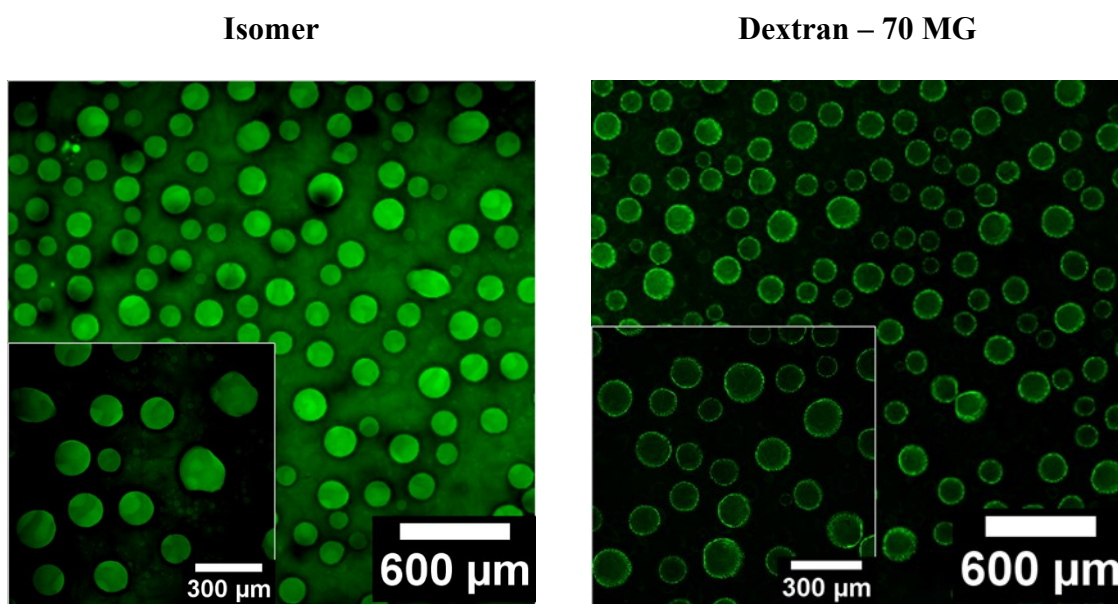
B)



Obr. 38. Struktura A) fluorescenčně značeného isomeru a B) fluorescenčně značeného dextranu [52]

Isomer je díky chemické struktuře molekuly schopen se chemickými vazbami navázat na povrch substrátu, kdežto dextran je díky své velké molekule zasazen do vznikajících pórů, ze kterých není schopen se příliš rychle uvolnit.

Pokus byl proveden přimísením 0,5 hm. % fluorescenčního barviva do DMSO s následnou modifikací.



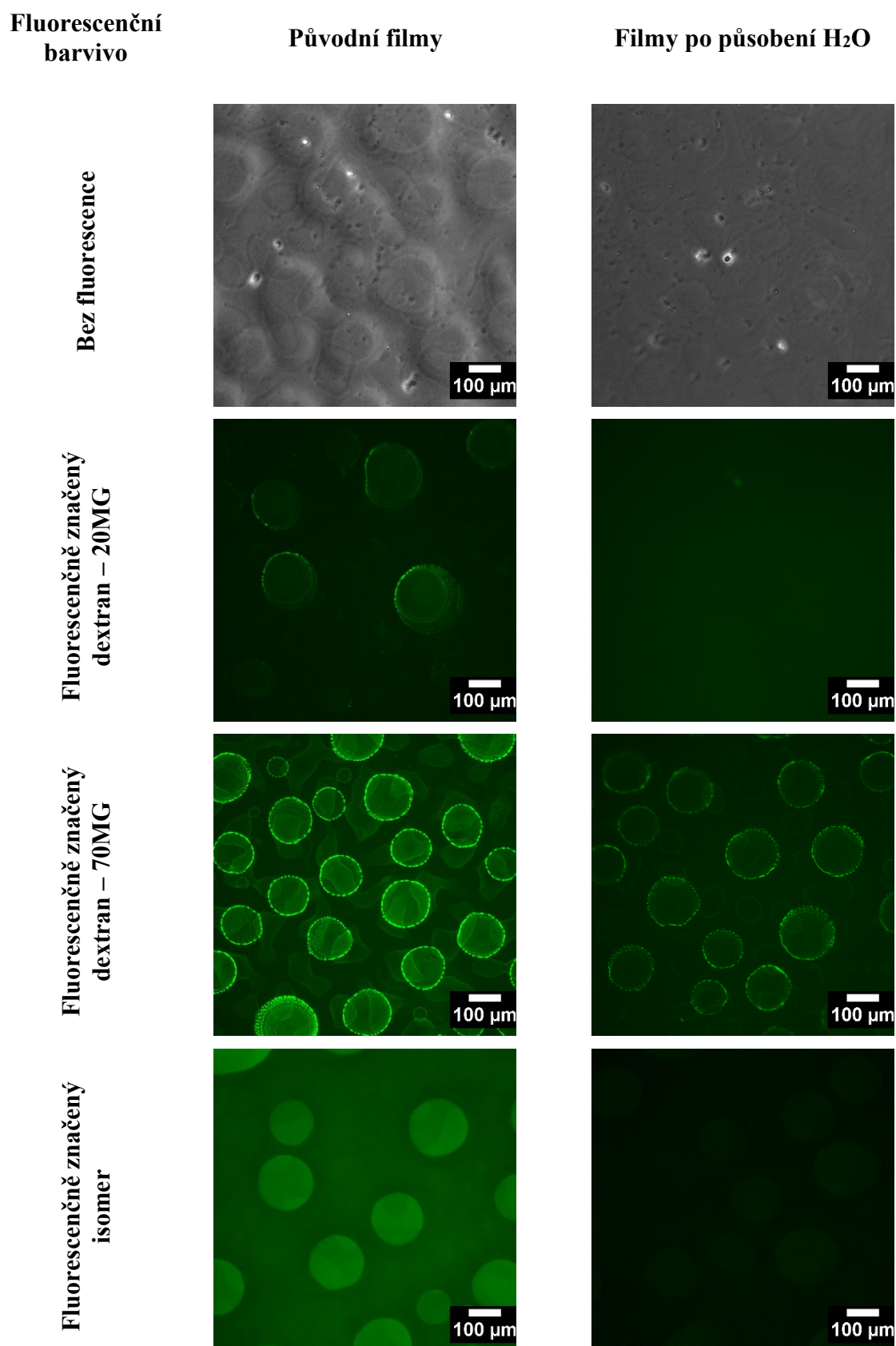
Obr. 39. Vliv molekulové hmotnosti fluorescenčně značeného dextranu přidávaného do DMSO pro modifikaci proteinových filmů. Obrázky jsou pořizené z optického mikroskopu ve dvou různých měřítkách

Dle výsledků (Obr. 39) je zřejmé, že isomer se lépe váže na povrch substrátu v celé ploše, a to i mimo póry, což je v našem případě nežádoucí. V případě dextranu jsou zabarvené především póry, které se vyznačují sytějším zabarvením na svých okrajích. Celkově je povrch filmu mimo póry méně zabarvený, což je oproti izomeru výhodnější.

### 5.2.6 Stálost modifikace BMF povrchu pomocí fluorescenčních značek

Bez ohledu na úspěšnou depozici fluorescenční značky dovnitř povrchových pórů je otázkou, jak je tato úprava stabilní ve vodném prostředí s ohledem na cílené použití pro lokalizovanou kultivaci buněk.

Je nutné, aby tato modifikace byla odolná i vůči dezinfekčním prostředkům, které se na materiály používají před nanesením buněk. Nicméně pro prvotní testování stability vyvolaných povrchových úprav bylo použito vodné prostředí. Texturované povrchy s fluorescenčními značkami byly převrstveny 2 ml vody po dobu 1 hod. Po uplynuté době byla voda slita a filmy se nechaly vyschnout. Po vyschnutí byly povrchy opětovně skenovány pomocí konfokálního mikroskopu. Následně se filmy opět převrstvily vodou a opakoval se totožný postup po dobu 3 hod., viz Obr. 40.



Obr. 40. Stálost modifikace proteinových filmů ve vodné prostředí bez a s fluorescenčními barvami. Obrázky pořízeny pomocí optického a konfokálního mikroskopu



Největší problém je se stálostí vznikajících pórů na povrchu BMF, které po vystavení vlhkosti botnají a póry zanikají, jak je vidět v horní části obrázku, Obr. 40. Otázkou zůstává, zda daná značka zůstane na daném místě a jak ovlivní toto botnání.

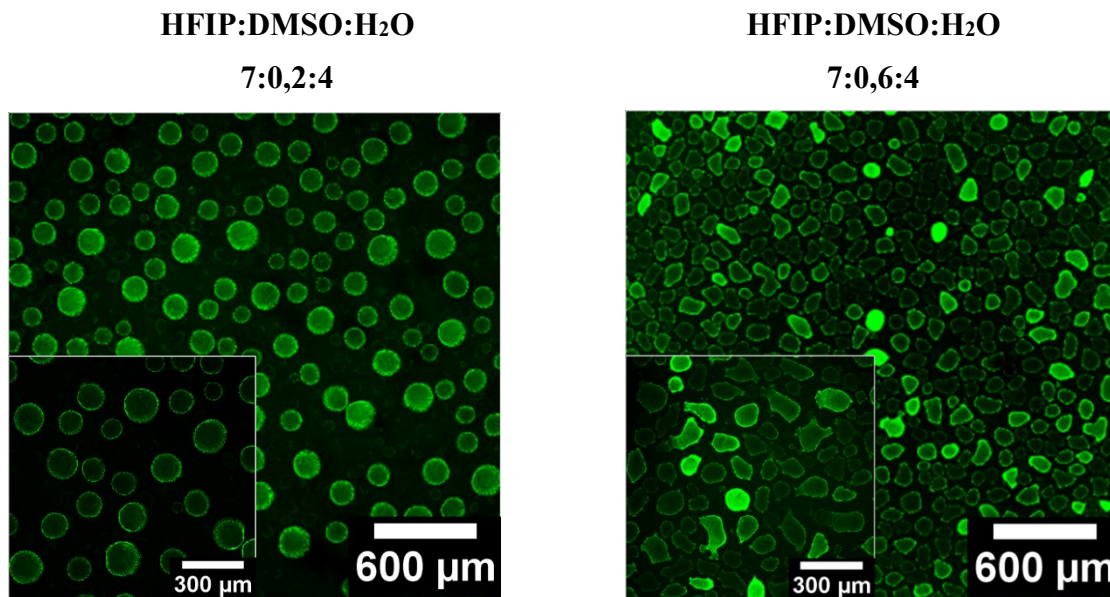
### 5.2.7 Vliv poměru zastoupení složek v modifikační směsi

Pro docílení pravidelných, kulovitých, samostatných pórů je využíváno modifikační směsi v obj. poměru 7:0,2:4, (HFIP:DMSO:H<sub>2</sub>O), kde tento poměr byl převzat z již zmíněné diplomové práce Kocourkové [49].

V této práci byl zachován postup modifikace a následně byly zkoušeny změny poměrů modifikační směsi. V modifikační směsi se měnilo množství DMSO, které jak již bylo zmíněno je zodpovědné za vznikající póry a lze jej tedy použít jako nosiče fluorescenčních značek.

Množství DMSO se z poměrového zastoupení 0,2 zvedlo na 0,6.

**Pozn.** Tak jako ve všech případech byl fluorescenčně modifikovaný dextran rozpuštěn v 0,5 hm. % v DMSO.



Obr. 41. Vliv poměru zastoupení DMSO v modifikační směsi. Obrázky byly pořízeny pomocí konfokálního mikroskopu.

Z Obr. 41. je zřetelné, že se zvyšujícím se množstvím DMSO dochází ke vzniku drobnějších, za to však početnějších pórů na povrchu BMF filmů.

Nutno dodat, že zvyšování množství DMSO v systému je limitováno jeho odmísením z modifikační směsi. Na Obr. 41 je dále pozorovatelné, že v případě větší koncentrace DMSO ztrácí póry svůj kulovitý tvar.

## ZÁVĚR

Byly studovány možnosti přípravy texturovaných povrchů na bázi biopolymerů. První část práce se zabývala fázově separačními úpravami povrchu HA. Druhá řešila selektivní vázání fluorescenčních značek do makroporézních povrchů na bázi BMF. Pro úpravu povrchové topografie těchto materiálů byl používán přístup založený na časově sekvenovaném dávkování směsných roztoků na rotující povrch.

Pro přípravu mikro a makro texturovaných povrchů na bázi HA byl navržen postup založený na použití více komponentní modifikační směsi, v níž klíčovou roli hrají alkoholy, dimethylsulfoxid, voda a přidaný polymer na stejné bázi jako je modifikovaný povrch. Spolu s těmito proměnnými určuje typ vznikající povrchové textury množství přidaného polymeru do modifikační směsi, počet a objem deponovaných dávek, časová prodleva mezi jednotlivými dávkami, rychlost rotace vzorku, množství přidaného dimethylsulfoxidu, distribuce molekulových hmotností HA a v neposlední řadě zbytkové množství vody v modifikované vrstvě na bázi HA. Kontrolou těchto proměnných lze připravit spektrum unikátních povrchových textur na bázi HA, vyznačujících se rozdílnou velikostí agregátů, povrchových sítí a póry připomínajících prohlubně.

Z experimentů zaměřených na selektivní vázání fluorescenčních značek do povrchu proteinových filmů vyplynula nezbytnost rozpuštění této komponenty do pórotvorné složky modifikační směsi, tj. do DMSO. Pomocí tohoto přístupu se podařilo potvrdit roli DMSO při formování povrchových makro pórů na bázi BMF. Z řady experimentů věnovaných různým typům fluorescenčních značek, jejich vázání k povrchu nebo umístění na nosič v podobě dextranu či proteinu vyplynulo několik přístupů umožňujících jejich selektivní vázání k upravovanému BMF povrchu. Na základě následných stabilizačních testů ve vodném prostředí, byla vybrána jako nejstabilnější fluorescenční značka, navázaná na BMF, dextran o vyšší molekulové hmotnosti. Takto připravené povrchy lze využít pro další testy zaměřené na selektivní zachytávání a řízenou proliferaci buněčných kultur.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BILAL, M., H. M.N. IQBAL. Naturally-derived Biopolymers: Potential Platforms for Enzyme Immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019, s. 462-482. ISSN: 0141-8130
- [2] GHANBARZADEH, B., A. R OROMIEHI. Biodegradable biocomposite films based on whey protein and zein. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. Elsevier B.V, 2008, s. 209-215 [cit. 2019-07-11]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2008.05.006. ISSN 01418130.
- [3] KUNDU, S. C, B. KUNDU, R. RAJKHOWA, X. WANG. Silk fibroin biomaterials for tissue regenerations. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. Elsevier B.V, 2013, 457-470 [cit. 2019-07-20]. DOI: 10.1016/j.addr.2012.09.043. ISSN 0169409X.
- [4] PATTANASHETTI, N. A., G. B. HEGGANAVAR, M. Y. KARIDURAGANAVAR. Smart Biopolymers and their Biomedical Applications. *Procedia Manufacturing* [online]. Elsevier B.V, 2017, 263-279 [cit. 2019-07-07]. DOI: 10.1016/j.promfg.2017.08.030. ISSN 23519789.
- [5] GARAVAND, F., M. ROUHI, S. hadi RAZAVI, I. CACCIOTTI, R. MOHAMMADI. Improving the integrity of natural biopolymer films used in food packaging by crosslinking approach. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. Elsevier B.V, 2017, 687-707 [cit. 2019-07-13]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.06.093. ISSN 01418130.
- [6] MUSTAPHA, F. A., J. JAI, N. H. NIK RAIKHAN, Z. I. M. SHARIF a N. M. YUSOF. Response surface methodology analysis towards biodegradability and antimicrobial activity of biopolymer film containing turmeric oil against *Aspergillus niger*. *Food Control* [online]. 2019, 106-113 [cit. 2020-02-17]. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.12.042. ISSN 09567135.
- [7] JACOB, J., J. HAPONIUK, S. THOMAS, S. GOPI. Biopolymer based nanomaterials in drug delivery systems. *Materials Today Chemistry* [online]. Elsevier, 2018, 43-55 [cit. 2019-07-19]. DOI: 10.1016/j.mtchem.2018.05.002. ISSN 24685194.

- [8] ROUHI, M., S. hadi RAZAVI a S. mohammad MOUSAVI. Optimization of crosslinked poly(vinyl alcohol) nanocomposite films for mechanical properties. *Materials Science* [online]. Elsevier B.V, 2017, 1052-1063 [cit. 2019-07-13]. DOI: 10.1016/j.msec.2016.11.135. ISSN 09284931.
- [9] FENG, G., Y. ZHAO, J. JIANG. Lightweight flexible indium-free oxide TFTs with AND logic function employing chitosan biopolymer as self-supporting layer. *Solid State Electronics* [online]. Elsevier, 2019, 16-22 [cit. 2019-07-10]. DOI: 10.1016/j.sse.2018.12.015. ISSN 00381101.
- [10] BILAL, M., H. M. N IQBAL. Naturally-derived biopolymers. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. Elsevier B.V, 2019, **130**, 462-482 [cit. 2019-07-17]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.152. ISSN 01418130.
- [11] LU, G., S. LIU, S LIN, D. L. KAPLAN, Q. LU. *Silk porous scaffolds with nanofibrous microstructures and tunable properties* [online]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014, 120, 28-37. DOI: 10.1016/j
- [12] ZHOU, Q., O. CASTAÑEDA OCAMPO, C. GUIMARÃES, P. KUHN, T. VAN KOOTEN, P. VAN RIJN. Screening Platform for Cell Contact Guidance Based on Inorganic Biomaterial Micro/nanotopographical Gradients. *ACS Applied Materials* [online]. Amer Chemical Soc, 2017, 31433-31445 [cit. 2019-08-12]. DOI: 10.1021/acsami.7b08237. ISSN 19448244.
- [13] KARAGEORGIU, V., M. TOMKINS, R. FAJARDO, et al. Porous silk fibroin 3-D scaffolds for delivery of bone morphogenetic protein-2 in vitro and in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research Part a* [online]. Wiley Subscription Services, Inc., a Wiley Company, 2006, 324-334 [cit. 2019-07-19]. DOI: 10.1002/jbm.a.30728. ISSN 15493296.
- [14] VEPARI, Ch. P, D. L. KAPLAN. Covalently immobilized enzyme gradients within three-dimensional porous scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. Wiley-blackwell, 2006, 1130-1137 [cit. 2019-07-19]. DOI: 10.1002/bit.20833. ISSN 00063592.
- [15] KUNDU, S. C., B. KUNDU. Osteogenesis of human stem cells in silk biomaterial for regenerative therapy. *Progress in Polymer Science* [online]. Elsevier, 2010,

- 1116-1127 [cit. 2019-07-20]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2010.04.004. ISSN 00796700.
- [16] GELLYNCK, K., P. VERDONK, E. VAN NIMMEN, et al. Silkworm and spider silk scaffolds for chondrocyte support. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. Springer US, 2008, 3399-3409 [cit. 2019-07-23]. DOI: 10.1007/s10856-008-3474-6. ISSN 09574530.
- [17] ROUHI, M., S. hadi RAZAVI, S. mohammad MOUSAVI. Optimization of crosslinked poly(vinyl alcohol) nanocomposite films for mechanical properties. *Materials Science* [online]. Elsevier B.V, 2017, 1052-1063 [cit. 2019-07-18]. DOI: 10.1016/j.msec.2016.11.135. ISSN 09284931.
- [18] MIGNEAULT, I., C. DARTIGUENAVE, M. J. BERTRAND, K. C. WALDRON. Glutaraldehyde. *BioTechniques* [online]. Future Science, 2004, 790-802 [cit. 2019-07-12]. DOI: 10.2144/04375RV01. ISSN 07366205.
- [19] LEERAHAWONG, A., R. ARII, M. TANAKA, K. OSAKO. Edible film from squid (*Todarodes pacificus*) mantle muscle. *Food Chemistry* [online]. Elsevier, 2011, 177-182 [cit. 2019-07-13]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.06.005. ISSN 03088146.
- [20] SU, J., Z. HUANG, X. YUAN, X. WANG, M. LI. Structure and properties of carboxymethyl cellulose/soy protein isolate blend edible films crosslinked by Maillard reactions. *Carbohydrate Polymers* [online]. Elsevier, 2010, 145-153 [cit. 2019-07-13]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2009.07.035. ISSN 01448617.
- [21] FANG, J. M., P. S. FOWLER, C. ESCRIG, R. GONZALEZ, J. A COSTA, L. CHAMUDIS. Development of biodegradable laminate films derived from naturally occurring carbohydrate polymers. *Carbohydrate Polymers* [online]. Elsevier, 2005, 39-42 [cit. 2019-07-13]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2004.11.018. ISSN 01448617.
- [22] WANG, S., L SHEN, W. ZHANG, Y. TONG. Preparation and mechanical properties of chitosan/carbon nanotubes composites. *Biomacromolecules* [online]. Amer Chemical Soc, 2005, 3067-3072 [cit. 2019-07-13]. DOI: 10.1021/bm050378v. ISSN 15257797.

- [23] OMENETTO, F. a D. KAPLAN. New Opportunities for an Ancient Material. *Science* [online]. American Association for the Advancement of Science, 2010, 528-531 [cit. 2019-07-20]. DOI: 10.1126/science.1188936. ISSN 00368075.
- [24] SEHNAL, F., M. ŽUROVEC. Construction of silk fiber core in lepidoptera. *Biomacromolecules* [online]. Amer Chemical Soc, 2004, 666-674 [cit. 2019-07-21]. DOI: 10.1021/bm0344046. ISSN 15257797.
- [25] TANAKA, K., S. INOUE, S. MIZUNO. Hydrophobic interaction of P25, containing Asn-linked oligosaccharide chains, with the H-L complex of silk fibroin produced by *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* [online]. Elsevier, 1999, 269-276 [cit. 2019-07-21]. DOI: 10.1016/S0965-1748(98)00135-0. ISSN 09651748.
- [26] PUTTHANARAT, S., N. STRIBECK, S. A. FOSSEY, R. K. EBY, W. W. ADAMS. Investigation of the nanofibrils of silk fibers. *Polymer* [online]. Elsevier, 2000, 7735-7747 [cit. 2019-07-21]. DOI: 10.1016/S0032-3861(00)00036-7. ISSN 00323861.
- [27] POZA, P., J. PÉREZ-RIGUEIRO, M. ELICES, J. LLORCA. Fractographic analysis of silkworm and spider silk. *Engineering Fracture Mechanics* [online]. Elsevier, 2002, 1035-1048 [cit. 2019-07-21]. DOI: 10.1016/S0013-7944(01)00120-5. ISSN 00137944.
- [28] BORKNER, Ch. B., M. B. ELSNER, T. SCHEIBEL. Coatings and films made of silk proteins. *ACS Applied Materials and Interfaces* [online]. Amer Chemical Soc, 2014, 15611-15625 [cit. 2019-08-12]. DOI: 10.1021/am5008479. ISSN 19448244.
- [29] MANDAL, B. B., S. C. KUNDU. Novel method for dissolution and stabilization of non-mulberry silk gland protein fibroin using anionic surfactant sodium dodecyl sulfate. *Biotechnology and Bioengineering* [online]. Wiley Subscription Services, Inc., a Wiley Company, 2008 1482-1489 [cit. 2019-07-23]. DOI: 10.1002/bit.21699. ISSN 00063592.
- [30] GUPTA, M. K., S. K. KHOKHAR, D. M. PHILLIPS, L. A. SOWARDS, L. F. DRUMMY, M. P. KADAKIA, R. R. NAIK. Patterned silk films cast from ionic

- liquid solubilized fibroin as scaffolds for cell growth. *Langmuir* [online]. Amer Chemical Soc, 2007, 1315-1319 [cit. 2019-07-23]. DOI: 10.1021/la062047p. ISSN 07437463.
- [31] WANG, X., H. joo KIM, P. XU, A. MATSUMOTO, D. L. KAPLAN. Biomaterial coatings by stepwise deposition of silk fibroin. *Langmuir* [online]. Amer Chemical Soc, 2005, 11335-11341 [cit. 2019-07-23]. DOI: 10.1021/la051862m. ISSN 07437463.
- [32] LOVETT, M. L., Ch. M. CANNIZZARO, G. VUNJAK-NOVAKOVIC, D. L. KAPLAN. Gel spinning of silk tubes for tissue engineering. *Biomaterials* [online]. 2008, 4650-4657 [cit. 2020-02-17]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.08.025. ISSN 01429612.
- [33] PARK, H., K. YANG, Mun-jung KIM, Jiho JANG, Mihyun LEE, Dong-wook KIM, Haeshin LEE a Seung-woo CHO. Bio-inspired oligovitronectin-grafted surface for enhanced self-renewal and long-term maintenance of human pluripotent stem cells under feeder-free conditions. *Biomaterials* [online]. Elsevier, 2015, 127-139 [cit. 2019-08-25]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.01.015. ISSN 01429612.
- [34] HU, X., S. PARK, E. seok GIL, X. XIA, A. S. WEISS, D. L. KAPLAN. Influence of elasticity and surface roughness on myogenic and osteogenic-differentiation of cells on silk-elastin biomaterials. *Biomaterials* [online]. Elsevier, 2011, 8979-8989 [cit. 2019-08-28]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.08.037. ISSN 01429612.
- [35] REN, K., T. CROUZIER, Ch. ROY, C. PICART. Polyelectrolyte multilayer films of controlled stiffness modulate myoblast cell differentiation. *Advanced Functional Materials*[online]. Wiley-v C H Verlag, 2008, 1378-1389 [cit. 2019-08-28]. DOI: 10.1002/adfm.200701297. ISSN 1616301X.
- [36] CHAREST, J. L., A. J. GARCÍA, W. P. KING. Myoblast alignment and differentiation on cell culture substrates with microscale topography and model chemistries. *Biomaterials* [online]. Elsevier, 2007, 2202-2210 [cit. 2019-08-28]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.01.020. ISSN 01429612.



- [37] 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], 6472–6481.
- [38] 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], 4669–4672.
- [39] ESCALÉ, P., L. RUBATAT, L. BILLON, M. SAVE. Recent advances in honeycomb-structured porous polymer films prepared via breath figures. *European Polymer Journal* [online]. Elsevier, 2012, 1001-1025 [cit. 2019-09-29]. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2012.03.001. ISSN 00143057.
- [40] XUE, L. J., J. L., ZHANG, Y. C., HAN, Phase Separation Induced Ordered Patterns in Thin Polymer Blend Films. *Prog. Polym. Sci.* 2012, 564-594
- [41] GALEOTTI, F., A. ANDICSOVA, S. YUNUS, Ch. BOTTA. Precise surface patterning of silk fibroin films by breath figures. *Soft Matter* [online]. Royal Soc Chemistry, 2012, 4815-4821 [cit. 2019-09-29]. DOI: 10.1039/c2sm25089f. ISSN 1744683X.
- [42] MUNOZ-BONILLA, A., F., M., J., RODRIGUEZ-HERNANDEZ, Towards Hierarchically ordered Functional Porous Polymeric Surfaces Prepared by the Breath Figures *Approach*. *Prog. Polym. Sci.* 2014, 510-554.
- [43] STRATHMANN, H., K. KOCK. The formation mechanism of phase inversion membranes. *Desalination* [online]. 1977, 241-255 [cit. 2020-04-22]. DOI: 10.1016/S0011-9164(00)88244-2. ISSN 00119164
- [44] YANG, K. Polydopamine-mediated surface modification of scaffold materials for human neural stem cell engineering. *Biomaterials* [online]. Elsevier, 2012, 6952-6964 [cit. 2019-08-12]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.06.067. ISSN 01429612.
- [45] LEIPZIG, N. Differentiation of neural stem cells in three-dimensional growth factor-immobilized chitosan hydrogel scaffolds. *Biomaterials* [online]. Elsevier, 2010, 57-64 [cit. 2019-08-12]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.09.031. ISSN 01429612.

- [46] NAKAJI-HIRABAYASHI, T.. Oriented immobilization of epidermal growth factor onto culture substrates for the selective expansion of neural stem cells. *Biomaterials* [online]. Elsevier, 2007, 3517-3529 [cit. 2019-08-12]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.04.022. ISSN 01429612.
- [47] IJIMA, K., R. SUZUKI, A. IIZUKA, H. UENO-YOKOHATA, N. KIYOKAWA, M. HASHIZUME. Surface functionalization of tissue culture polystyrene plates with hydroxyapatite under body fluid conditions and its effect on differentiation behaviors of mesenchymal stem cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. Elsevier B.V, 2016, 351-359 [cit. 2019-08-12]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.08.020. ISSN 09277765.
- [48] BOGNEROVÁ, E. Pevné formy hyaluronanu sodného a jeho vlastnosti. Zlín. 2018. *Bakalářská práce*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická.
- [49] KOCOURKOVÁ, K. Příprava strukturovaných biopolymerních povrchů a studium jejich interakce s buňkami. Zlín, 2019. *Diplomová práce*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická
- [50] MINAŘÍK, A., Petr SMOLKA a Lubomír LAPČÍK. Preliminary investigation of factors determining self-organised structures preparation in polymer layers. *International Journal of Heat* [online]. 2011, 4135-4142 [cit. 2020-02-05]. DOI: 10.1016/j.ijheatmasstransfer.2011.03.025. ISSN 00179310.
- [51] BRADÁČOVÁ, M. Příprava mikro-strukturovaných povrchů na bázi polysacharidu. Zlín, 2017. *Diplomová práce*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická.
- [52] Fluorescenčně značený isomer a dextran. *Merk* [online] Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com>.
- [53] HEATLEY, F. a J.E. SCOTT. A water molecule participates in the secondary structure of hyaluronan. *Biochemical Journal* [online]. 1988, 489 - 493 [cit. 2020-04-23]. DOI: 10.1042/bj2540489. ISSN 02646021.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

AFM	Mikroskopie atomárních sil
Ala	Alanin
<i>BMF</i>	<i>Bombyx mori</i> fibroin
<i>B. mori</i>	<i>Bombyx mori</i>
BMP-2	Kostní morfologický protein-2
CaCl <sub>2</sub>	Chlorid vápenatý
DMSO	Dimethylsulfoxid
ETH	2-ethoxyethanol
FTIR	Fourier transform infrared, Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
HA	Hyaluronát sodný
Gly	Glycin
HeLa	Rakovinotvorné buňky karcinomu děložního čípku
HFIP	Hexafluoroisopropanol
hMSC	Buňky lidské kostní dřevě
IPA	Isopropylalkohol
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Hydrogenfosforečnan draselný
LiBr	Bromid litný
LiSCN	Thiokyanát lithný
MeOH	Methanol
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
Mw	Střední molekulová hmotnost
nBT	N-butylalkohol
NMR	Nuclear magnetic resonance, Spektroskopie nukleární magnetické rezonance
NS	Nosný substrát

---

pH	Potenciál vodíku
PLGA	Poly(kyselina mléčná-glykolová)
PS	Polystiren
Sa	Průměrná drsnost
SEM	Skenovací elektronový mikroskop
Ser	Serin
Rz	Plošná drnrost
THF	Tetrahydrofuran
Thr	Threonin
Val	Valin
XRD	X-Ray Diffraction, Rentgenová difrakční analýza

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1.	<i>Přehled nanokompozic z biopolymerů a jejich farmaceutické využití [7] ....</i>	13
Obr. 2.	<i>Schéma mechanismu dodávání léčiv za pomoci biopolymerních nanokompozic [7] .....</i>	13
Obr. 3.	<i>Schématické znázornění syntézy nanokompozic hedvábných fibroinů nasycených RGD a chlorin e6 a jejich in vivo aplikace [7] .....</i>	14
Obr. 4.	<i>Tvorba skaffoldu z termorezistivního materiálu [4] .....</i>	17
Obr. 5.	<i>Schéma znázorňující získání hedvábného fibroinu [15] .....</i>	19
Obr. 6.	<i>Rostoucí chondrocyty v hedvábných skaffoldech vzniklých pomocí vyluhování soli [16].....</i>	20
Obr. 7.	<i>Schéma účinku zesilovače v biopolymerních řetězcích [3].....</i>	22
Obr. 8.	<i>Znázorněné materiály vyrobené z hedvábného fibroinu [3] .....</i>	29
Obr. 9.	<i>Znázornění řízení velikosti a distribuce pórů hedvábné trubice [32].....</i>	31
Obr. 10.	<i>Modifikace povrchu polymerního materiálu pomocí časově sekvenované fázové separace za rotace [37] .....</i>	34
Obr. 11.	<i>Schématické znázornění voštinových polymerních filmů připravených metodou Breath figures [39].....</i>	36
Obr. 12.	<i>Schéma odlévání roztoku a tvorby pórovité membrány pro třífázový systém polymer/polymer/rozpouštědlo/srážedlo [43] .....</i>	37
Obr. 13.	<i>Výroba texturovaných hedvábných filmů. (A) forma požadovaného designu. (B) Hedvábný roztok odlit na formu. (C) Potažená forma ponořená do metanolové lázně. (D) hedvábný film odloupnut z formy [30] .....</i>	39
Obr. 14.	<i>Znázornění imobilizace bioaktivních molekul zprostředkovaných polydopaminem (PD) (adhezivní peptidy odvozené od neurotrofních růstových faktorů). Pro neutrální kmenové buňky použity substráty polystyrenu (PS) a poly(kyselina mléčná-glykolová) (PLGA)s imobilizovanými bioaktivními látkami [44].....</i>	40
Obr. 15.	<i>Potahování komerčních 24jamkových polystyrenových destiček hydroxyapatitem za použití adsorpční vrstvy lidského sérového albuminu a předběžného</i>	

	<i>ošetření alternativním máčením pomocí roztoků <math>\text{CaCl}_2</math> a <math>\text{K}_2\text{HPO}_4</math> [47].....</i>	<i>41</i>
Obr. 16.	<i>Zařízení Direct-Q. [48].....</i>	<i>45</i>
Obr. 17.	<i>Schématické znázornění postupu čištění laboratorního skla [48].....</i>	<i>46</i>
Obr. 18.	<i>Magnetické míchadlo [48].....</i>	<i>47</i>
Obr. 19.	<i>Míchadlo.....</i>	<i>48</i>
Obr. 20.	<i>Schéma dávkování směsi rozpouštědel na rotující substrát [37].....</i>	<i>48</i>
Obr. 21.	<i>Použité zařízení pro modifikaci povrchové topografie polymeru metodou časově sekvenované fázové separace za rotace [37].....</i>	<i>49</i>
Obr. 22.	<i>Závislost vzniku HA povrchových textur na přidávaném aditivu do směsi rozpouštědel. Parametr Sz určuje maximální převýšení povrchových nerovností a Ra průměrnou drsnost. Barevné snímky z AFM a optického profilometru, černobílé snímky z optického mikroskopu.....</i>	<i>53</i>
Obr. 23.	<i>Příklady profilových řezů získaných pomocí kontaktního profilometru pro vzorky uvedené na Obr. 22.....</i>	<i>54</i>
Obr. 24.	<i>Vliv množství přidaného HA do modifikační směsi na změnu vznikající povrchové textury. Obrázky z optického mikroskopu.....</i>	<i>55</i>
Obr. 25.	<i>Vliv počtu deponovaných dávek na změnu povrchové textury vznikající v průběhu časově sekvenovaného dávkování směsného roztoku. Parametr Sz uvádí maximální povrchové převýšení zaznamenané pomocí AFM. Černobílé obrázky pořízeny pomocí optického mikroskopu.....</i>	<i>56</i>
Obr. 26.	<i>Závislost velikosti a spojitosti agregátů HA do podoby pórů na množství deponovaných dávek a časovém intervalu mezi nimi. Obrázky pořízeny pomocí optického mikroskopu.....</i>	<i>57</i>
Obr. 27.	<i>. Vliv rychlosti rotace upravovaného povrchu HA (370 kDa) pomocí 10 dávek modifikační směsi deponované v intervalu 40 s na změnu vznikajícího povrchového reliéfu. Obrázky z optického mikroskopu.....</i>	<i>58</i>
Obr. 28.	<i>Závislost velikosti a spojitosti pórů na množství dávek směsi rozpouštědel na filmu HA o střední molekulové hmotnosti 370 kDa, upravený na spin-coateru 10 × 200 nebo 300 μl modifikační směsi ve 40 s intervalech (snímek</i>	

- z optického mikroskopu)..... 59*
- Obr. 29. *Vliv přidaného množství DMSO na změnu agregačních schopností HA v průběhu časově sekvenované fázové separace. Upravován povrch HA o Mw 370 kDa. Obrázky z optického mikroskopu..... 60*
- Obr. 30. *Vliv nosného substrátu HA (370 kDa a 1180 kDa) na změnu povrchového reliéfu HA při modifikaci 10 dávek modifikační směsi deponované v intervalu 40 s. Obrázky z optického mikroskopu..... 61*
- Obr. 31. *Vliv přídavku směsi HA o Mw 370 a 1180 kDa do modifikační směsi při modifikaci filmu HA o Mw 370 kDa. Obrázky z optického mikroskopu ..... 62*
- Obr. 32. *Vliv vlhkosti při přípravě nosných substrátů HA o Mw 370 kDa pro modifikaci filmů pomocí časově sekvenované fázové separace. Obrázky z optického mikroskopu ..... 63*
- Obr. 33. *Ukázka vzorků focených pomocí SEM. Šipkami jsou vyznačené vypálené díry ..... 64*
- Obr. 34. *Vliv historie přípravy proteinových filmů, na jehož povrchu dochází povrchovou modifikací k tvorbě pórů. Obrázky jsou pořízené z optického mikroskopu ..... 65*
- Obr. 35. *Vliv přídavku proteinu rozpuštěného v HFIP na změnu povrchové topografie modifikovaných fibroinových filmů. Černobílé obrázky byly pořízené optickým mikroskopem. Barevné pomocí optického profilometru ..... 66*
- Obr. 36. *Vliv přídavku, fluorescenčně značeného proteinu rozpuštěného v HFIP nebo DMSO s fluorescenční barvou, do modifikační směsi používané pro generaci povrchových makro pórů na bázi BMF. Obrázky z optického mikroskopu . 68*
- Obr. 37. *Vliv molekulové hmotnosti fluorescenčně značeného dextranu přidávaného do DMSO pro modifikaci proteinových filmů. Obrázky jsou pořízené z optického mikroskopu..... 69*
- Obr. 38. *Struktura A) fluorescenčně značeného isomeru a B) fluorescenčně značeného dextranu [52] ..... 69*
- Obr. 39. *Vliv molekulové hmotnosti fluorescenčně značeného dextranu přidávaného do DMSO pro modifikaci proteinových filmů. Obrázky jsou pořízené*

---

	<i>z optického mikroskopu ve dvou různých měřítkách.....</i>	<i>70</i>
<i>Obr. 40.</i>	<i>Stálost modifikace proteinových filmů ve vodné prostředí bez a s fluorescenčními barvami. Obrázky pořízeny pomocí optického a konfokálního mikroskopu.....</i>	<i>71</i>
<i>Obr. 41.</i>	<i>Vliv poměru zastoupení DMSO v modifikační směsi. Obrázky byly pořízeny pomocí konfokálního mikroskopu .....</i>	<i>72</i>