

Úprava a charakterizace biopolymerních povrchů

Petronela Černá

Bakalářská práce
2020



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Petronela Černá**
Osobní číslo: **T17038**
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Materiálové inženýrství**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Úprava a charakterizace biopolymerních povrchů**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na dané téma.
2. Pomocí procesů fázové separace upravte povrchovou texturu biopolymerních vzorků na úrovni mikro a nanometrů.
3. Připravené povrchy charakterizujte pomocí skenovací elektronové mikroskopie, optické a mechanické profilometrie a mikroskopie atomárních sil.
4. Vybraná data z měření podrobte obrazové analýze.
5. Výsledky práce podrobně diskutujte a uveďte hlavní závěry.

Forma zpracování bakalářské práce: **Tištěná/elektronická**
Jazyk zpracování: **Slovenština**

Seznam doporučené literatury:

1. Vance, A., Atomic Force Microscopy, Scitus Academics, 2017, ISBN: 978-1-68117-212-5
2. Page, L., Scanning Electron Microscopy, NY Research Press, 2015, ISBN: 978-1-63238-406-5
3. Friedbacher, G., et al., Surface and Thin Film Analysis, Wiley, 2011, ISBN: 978-3-527-32047-9
4. E. Wrzecionko, et al., Variations of Polymer Porous Surface Structures via the Time-Sequenced Dosing of Mixed Solvents, ACS App. Materials & Interfaces 9(7) (2017) 6472-6481.
5. L.J. Xue, et al., Phase separation induced ordered patterns in thin polymer blend films, Progress in Polymer Science 37(4) (2012) 564-594.

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

Datum zadání bakalářské práce: **3. února 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **22. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Mgr. Aleš Mráček, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 17. února 2020

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně, dne: 20.5.2020

Jméno a příjmení studenta: Petronela Černá

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Boli skúmané možnosti úpravy povrchu fibroínových filmov v stave Silk I metódou fázovej separácie za rotácie alebo staticky a pomocou metódy „Breath figures“. Modifikačná zmes obsahovala hexafluoroizopropanol ako dobré rozpúšťadlo a dimetylsulfoxid ako zlé rozpúšťadlo. Bol posudzovaný vplyv procesných parametrov a pomeru týchto dvoch zložiek zmesi na výsledný charakter povrchovej textúry filmu. Pomocou statickej fázovej separácie je možné generovať vzájomne prepojené póry, naopak výsledkom modifikácie metódou „Breath figures“ sú separované póry symetrického tvaru. Rotácia vzorku počas modifikácie má nepriaznivý vplyv na jeho zmývanie a vlnitosť. Povrchy boli charakterizované pomocou mikroskopických metód a obrazovej analýzy. Transformácia sekundárnej štruktúry fibroínu po modifikácii bola overená pomocou infračervenej spektroskopie.

Kľúčové slová: hodváb, fibroín, filmy, povrchová úprava, povrchové liatie, spin-coating, Breath figures, fázová separácia, nano a mikro-textúra

ABSTRACT

The possibilities of surface treatment of fibroin films in the Silk I state by the method of phase separation under rotation or statically and by the method of Breath Figures were investigated. The modification mixture contained hexafluoroisopropanol as a good solvent and dimethyl sulfoxide as a bad solvent. The influence of process parameters and the ratio of these two components of the mixture on the final character of the surface texture was assessed. With the help of static phase separation it is possible to generate interconnected pores, on the contrary, the result of the modification by the „Breath figures“ method are separated pores of symmetrical shape. Rotation of the sample during modification adversely affects its washout and waviness. The surfaces were characterized by microscopic methods and image analysis. The transformation of the secondary structure of fibroin after modification was verified on the basis of infrared spectroscopy.

Keywords: silk, fibroin, films, surface treatment, surface casting, spin-coating, Breath Figures, phase separation, nano and micro-texture,

Rada by som sa poďakovala vedúcemu práce Ing. Antonínovi Minaříkovi, Ph.D za všetky odborné rady, konzultácie a vedenie pri spracovaní.

Podakovanie taktiež patrí Ing. Karolíne Kocourkovej, za množstvo venovaného času a pomoci pri laboratórnych experimentoch a ich vyhodnotení.

V neposlednej rade ďakujem svojej rodine za veľkú podporu počas celej doby štúdia.

Prehlasujem, že odovzdaná verzia bakalárskej práce a verzia elektronická nahraná do IS/STAG sú totožné.

„Naspät' cesta nemožná, napred sa ísť musí.“

Ludovít Štúr

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČASŤ	10
1 HODVÁBNY PROTEÍN	11
1.1 ŠTRUKTÚRA VLÁKNA	11
1.1.1 Konformačný prechod.....	12
1.2 FYZIKÁLNE A MECHANICKÉ VLASTNOSTI	13
1.3 SPRACOVANIE HODVÁBNEHO VLÁKNA	14
1.3.1 Degumming.....	14
1.3.2 Rozpustnosť fibroínu.....	15
1.4 DEGRADÁCIA	16
1.5 BIODROPATIBILITA	16
2 APLIKÁCIE	18
2.1 3D PORÉZNE SCAFFOLDY	18
2.1.1 Kompozitné scaffoldy	19
2.2 FIBROÍNOVÉ FILMY.....	20
2.2.1 Fibroínové filmy stabilné vo vode	21
2.3 FIBROÍNOVÉ VLÁKNA	22
2.4 HYDROGÉLY.....	22
3 ÚPRAVY POVRCHU HOVÁBNEHO FILMU	24
3.1 PATTERNING.....	24
3.2 METÓDY ZALOŽENÉ NA FÁZOVEJ SEPARÁCII	25
3.2.1 Breath figures	26
3.2.2 Metóda časovo sekvenovanej fázovej separácie za rotácie.....	29
II PRAKTICKÁ ČASŤ	31
4 POPIS EXPERIMENTU	32
4.1 POUŽITÉ MATERIÁLY A CHEMIKÁLIE	32
4.2 PRÍPRAVA FIBROÍNOVÝCH FILMOV	32
4.3 ÚPRAVA POVRCHU FILMU POMOCOU METÓDY ČASOVO SEKVENOVANEJ FÁZOVEJ SEPARÁCIE ZA ROTÁCIE.....	32
4.4 ÚPRAVA POVRCHU FILMU POMOCOU STATICKEJ MODIFIKÁCIE	33
4.5 ÚPRAVA POVRCHU FILMU POMOCOU METÓDY „BREATH FIGURES“	33
4.6 CHARAKTERIZÁCIA POVRCHU	34
4.6.1 FTIR	34
4.6.2 AFM	34
4.6.3 SEM.....	34

4.6.4	Profilometer.....	35
4.6.5	Optický mikroskop.....	35
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	36
5.1	FIBROÍNOVÉ FILMY V STAVE SILK I.....	36
5.2	ÚPRAVA POVRCHU FILMU POMOCOU METÓDY ČASOVO SEKVENOVANEJ FÁZOVEJ SEPARÁCIE ZA ROTÁCIE.....	37
5.3	ÚPRAVA POVRCHU FILMU POMOCOU STATICKEJ MODIFIKÁCIE	40
5.3.1	Stabilita filmov v stave Silk II vo vode.....	44
5.4	ÚPRAVA POVRCHU FILMU POMOCOU METÓDY „BREATH FIGURES“	46
	ZÁVER	52
	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	54
	ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK.....	59
	ZOZNAM OBRÁZKOV	60
	ZOZNAM TABULIEK	62

ÚVOD

Hodváb, získavaný z kokónov priadky morušovej vo forme kontinuálnych vlákien, patrí medzi prírodné materiály s výbornými mechanickými vlastnosťami. Po tisícročia bol považovaný za symbol luxusu najmä v textilnom priemysle, kde medzi ostatnými prírodnými tkaninami vynikal svojim leskom a pevnosťou. Napriek tomu, že globálna produkcia textilných vlákien z hodvábu klesá na úkor syntetických textílií, tento materiál získava čoraz viac uplatnení v oblasti medických aplikácií.

Vďaka svojej biokompatibilite a schopnosti biodegradácie v organizme bez významnej imunologickej odozvy je hodvábný proteín vhodný na pokročilejšie biomedicínske aplikácie, medzi ktoré patria obvazy na hojenie rán, obalové vrstvy implantátov alebo hydrogély urýchľujúce obnovu chrupavkových tkanív. Súčasťou vývoja nových možností použitia hodvábu sú taktiež nové spôsoby texturizácie jeho povrchu. Cieľom povrchovej modifikácie je vytvorenie špecifického reliéfu, ktorý zlepši adhéziu a proliferáciu buniek.

Teoretická časť práce sa zaoberá fyzikálnymi a chemickými vlastnosťami hodvábného vlákna, ktoré plynú zo štruktúry a zloženia jeho makromolekulárnych reťazcov. Pozornosť je venovaná širokej škále aplikácii a úprav hodvábného fibroínu v nadväznosti na biokompatibilitu *in vivo* a interakciu s bunkami. Ďalej sú popísané metódy úprav syntetických polymérnych povrchov a aplikácie týchto postupov pri modifikácii povrchu fibroínového filmu. Diskutovaná je najmä metóda fázovej separácie za rotácie vzorky a metóda „Breath figures“, ktorá je založená na tvorbe poréznych štruktúr vťahovaním kondenzovanej kvapky zlého rozpúšťadla do nabobtnaného povrchu.

V praktickej časti boli vyhodnocované možnosti mikro a nano-texturizácie povrchu fibroínového filmu v prevažne amorfnom stave Silk I, bez predošlej stabilizácie a transformácie jeho sekundárnej štruktúry. Pomocou porovnania infračervených spektier (FTIR) pred a po úprave povrchu filmu bola overovaná aktuálna konformácia fibroínu. Na vyhodnotenie charakteru pripravených štruktúr a drsnosti modifikovaných filmov boli použité profilometrické merania a mikroskopia atomárnych síl (AFM).

I. TEORETICKÁ ČASŤ

1 HODVÁBNY PROTEÍN

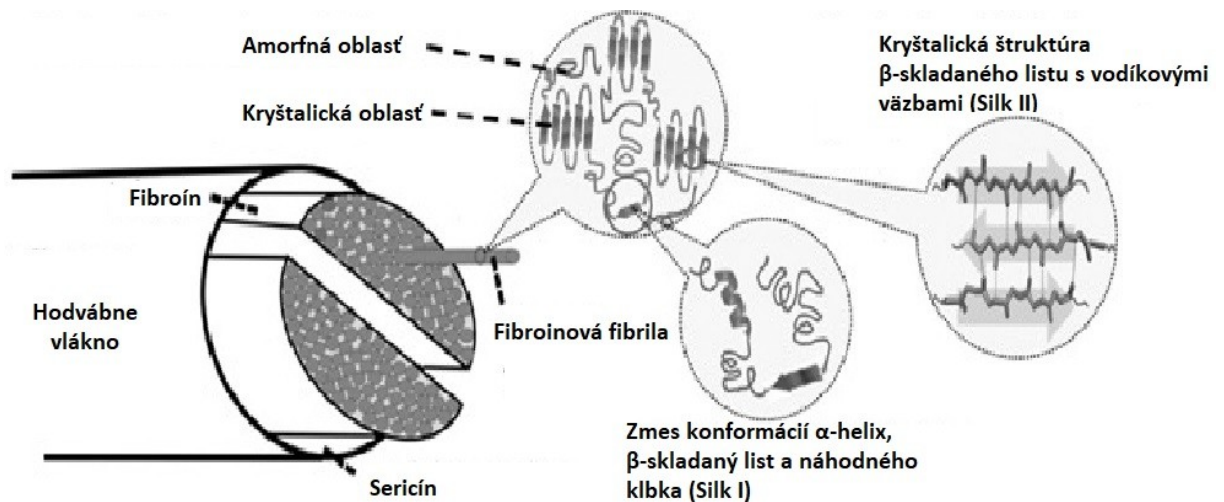
Hodváb, rovnako ako bavlna, kašmír, vlna a ľan, patrí medzi prírodné vlákna a je produkovaný radou článkonožcov stovky miliónov rokov. Môže byť extrahovaný z kokónov priadky morušovej, čo predstavuje najčastejší zdroj, nakoľko jej chov je ekonomicky nenáročný. Viac ako 4000 rokov sa hodváb používa na výrobu textilných vlákien, uplatnenie získal aj v medicíne. Pozostáva z dvoch hlavných zložiek a to fibroínu a sericínu, ktorý tvorí vonkajší obal. [1]

1.1 Štruktúra vlákna

Hodvábne vlákna priadky morušovej sa skladajú z fibroínových vlákien s priemerom 10 až 25 μm , tvorených ľahkými reťazcami fib-L (26 kDa) a ťažkými reťazcami fib-H (390 kDa) v molárnom pomere 1:1. Tieto reťazce sú spojené disulfidovou väzbou, ktorá vzniká vďaka prítomnosti cysteínu na konci reťazcov. Kokóny hodvábu obsahujú okrem fibroínu 25-30 hmotnostných percent sericínu, ktorým sú fibroínové vlákna obalené. Sericín, ktorý spĺňa obalovú funkciu fibroínových vlákien, sa pred spracovaním odstraňuje v procese zvanom „degumming“. [2] Štruktúra hodvábneho vlákna je znázornená na obr. 1.

Primárna štruktúra fib-H reťazcov je tvorená najmä troma najjednoduchšími aminokyselinami a to glycínom (43-46%), alanínom (25-30%) a serínom (12%). Ďalšími zastúpenými aminokyselinami sú tyrozín, kyselina asparágová, valín, fenylalanín, izoleucín, kyselina gluténová, treonín, leucín, polín, arginín, lyzín a histidín. Fib-H reťazce sú tvorené 12 hydrofóbnymi repetitívnymi doménami, ktoré sa striedajú s 11 hydrofilnými nerepetitívnymi doménami. Hydrofóbné domény sú tvorené najmä opakujúcou sa sekvenciou aminokyselín Gly-Ala-Gly-Ala-Gly-Ser. Sú schopné sa organizovať do antiparalelných β -skladaných listov pomocou vodíkových mostíkov, van der Waalsových síl a hydrofóbných interakcií, ktoré vedú k tvorbe kryštalických regiónov orientovaných v smere vlákna. Hydrofilné domény, obsahujúce kyselinu glutámovú, kyselinu asparágovú, arginín a lyzín, vytvárajú semi-amorfne regióny, ktoré umožňujú stáčanie reťazca. Fib-H reťazce tvoria hlavný štruktúrny komponent zodpovedný za vynikajúce mechanické vlastnosti. Sekvencia fib-L reťazcov nie je súčasťou štruktúry β -skladaného listu a teda nie je spojená s tvorbou kryštalických regiónov. Na fib-L a fib-H reťazce je viazaný proteín fibrohexamerín/p25 a spolu vytvárajú elementárnu štruktúrnu jednotku fibroínových vlákien. [3,4]

Sericín je zložený z polypeptidových reťazcov bohatých na serín (28%), kyselinu asparágovú (18%) a glycín (16%). Jeho molekulová hmotnosťou sa pohybuje medzi 24 až 400 kDa a závisí od konkrétneho genotypu a post-translačných modifikácií. [5]

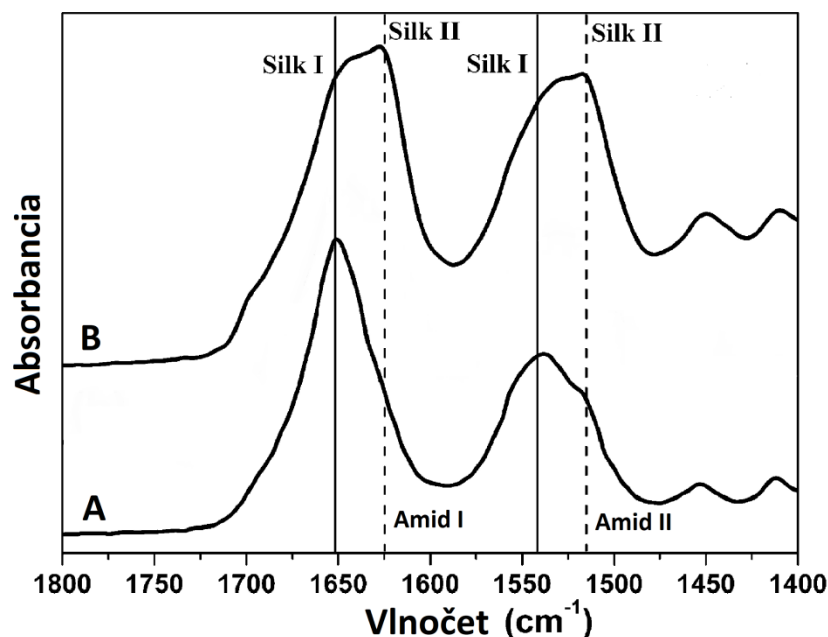


Obr. 1: Znáozornenie štruktúry hodvábneho vlákna [6]

1.1.1 Konformačný prechod

Fibroín sa vyskytuje v dvoch hlavných konformáciách a to Silk I a Silk II. Silk I je nestabilná forma rozpustná vo vode, v ktorej prevládajú amorfné regióny s usporiadaním reťazcov do náhodného kľbka. Prechod do stavu Silk II je možné indukovať ošetrením vodou, parami metanolu alebo mechanickým namáhaním. Po ošetrení začne prevládať štruktúra β -skladaného listu v dôsledku vzniku vodíkových mostíkov medzi peptidovými reťazcami. Konformácia Silk II je stabilná a nerozpustná vo vode. [7] Takto indukovaný stav Silk II je porovnateľný so stavom prírodného hodvábneho vlákna, ktorého štruktúra po zvláknení pozostáva z približne 55% kryštálov β -skladaného listu dispergovaných v amorfnej alebo menej kryštalickej matici. [8]

Zmena konformácie je indikovateľná pomocou FTIR spektroskopie, kde sa prejaví zmenou absorpcie pre skupiny Amid I a Amid II v rozmedzí 1700 až 1500 cm^{-1} (obr. 2). Maximá pre neošetrený film v konformácii Silk I sa v páse Amid I pohybujú v rozsahu 1648 až 1654 cm^{-1} a v páse Amid II od 1535 až 1542 cm^{-1} . Po indukcii kryštalickej štruktúry a zmeny konformácie filmu na Silk II dochádza k posunu maxima v páse Amid I na 1610 až 1630 cm^{-1} a v páse Amid II na 1510 až 1520 cm^{-1} . [9]



Obr. 2: FTIR spektra hodvábného filmu A) v stave Silk I a B) v stave Silk II [9]

1.2 Fyzikálne a mechanické vlastnosti

Mechanické vlastnosti sú podmienené štruktúrou makromolekuly. Aminokyseliny s nízkou molekulovou hmotnosťou tvoria kryštalické regióny a zabezpečujú vysokú húževnatosť. Zvyšok aminokyselín s vyššou molekulovou hmotnosťou je súčasťou amorfného regiónu. Vďaka prítomnosti oboch regiónov sa vlákno vyznačuje vysokou pevnosťou, elasticitou a flexibilitou.

Tab. 1: Porovnanie mechanických vlastností hodvábného proteínu *Bombyx mori* a ďalších prírodných materiálov. [5,10]

Materiál	Pevnosť v ťahu (MPa)	Modul pružnosti (GPa)	Predĺženie (%)
<i>Bombyx mori</i> so sericínom	500	5-12	19
<i>Bombyx mori</i> bez sericínu	610-690	15-17	4-16
Pavúčí hodváb	1100	10	27
Vlna	200	0,5	50
Kolagén	0,9-7,4	0,0018-0,046	24-68

Hodváb je jediný prírodný materiál, ktorý sa prirodzene vyskytuje vo forme kontinuálnych vlákien, pričom jeden kokón priadky morušovej môže obsahovať až 1600 metrov vlákien. Trojuholníkový prierez a hladký povrch hodvábného vlákna poskytuje vynikajúcu

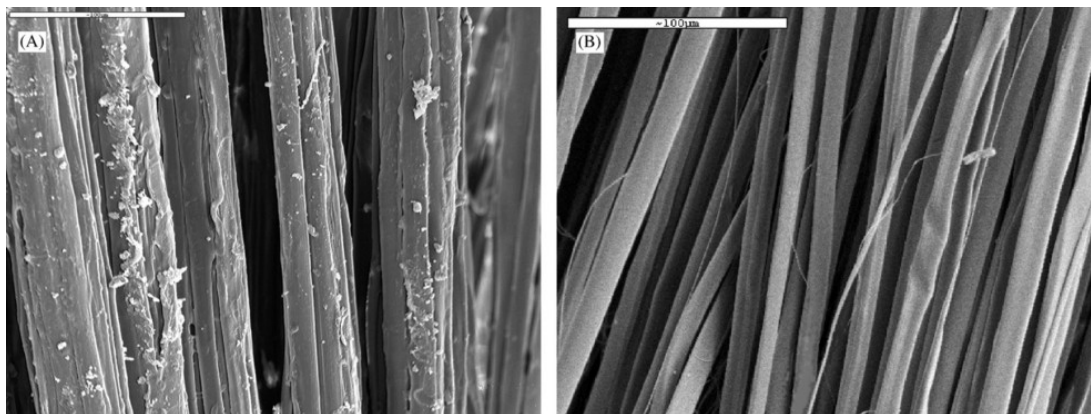
schopnosť odrazu svetla, čo je dôvodom jeho vysokého lesku. Hodváb dokáže absorbovať až 30 hmotnostných percent vody, pričom sa uvoľňuje zmáčacie teplo. [2] Hustota bez sericínu bolo stanovená na $1,30\text{--}1,38\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. [1] Odstránením sericínu dochádza k zlepšeniu pevnosti a pružnosti proteínu. [5,10]

1.3 Spracovanie hodvábneho vlákna

Pred spracovaním fibroínu do požadovaného výrobku alebo pred jeho lyofilizáciu a uskladnením je nutné odstrániť sericínový obal. Následne sa získava čistý roztok regenerovaného fibroínu rozpusteného v organickom rozpúšťadle. [11]

1.3.1 Degumming

Proces degummingu je odstránenie sericínu z hodvábu v surovom stave, čím sa zlepši jeho spracovateľnosť a biokompatibilita. Na obr. 3 je porovnanie štruktúry vlákna fibroínu pred a po extrakcii sericínu.



Obr. 3: Fibroínové vlákno A) pred a B) po procese degummingu [11]

V priemysle sa sericín odstraňuje vo vodnom roztoku varom s použitím zásaditých mydiel s pH 10 a uhličitanu sodného. Výhodou procedúry sú nízke náklady, avšak veľké množstvo zásaditého odpadu spôsobuje znečistenie životného prostredia. Najpoužívanejšou metódou degummingu v laboratórnych podmienkach je rozpustenie sericínu v prítomnosti 0,02 M roztoku uhličitanu sodného za varu po dobu 30 až 60 minút. Namiesto uhličitanu sodného môže byť použitý bromid lítny alebo organické kyseliny ako kyselina jantárová, či kyselina citrónová. [5] Týmto procesom sa vyselektuje roztok sericínu, ktorý sa pri izbovej teplote správa ako gélovitá kvapalina s vysokou viskozitou. [12] Podľa niektorých štúdií sericín nevyvoláva významnú aktiváciu makrofágov ani silnú imunologickú reakciu, napriek tomu sa z hodvábu určeného na biomedicínske aplikácie úplne odstraňuje. [13]

1.3.2 Rozpustnosť fibroínu

Fibroín v stave Silk II je nerozpustný vo vode a bežných organických rozpúšťadlách, kvôli vodíkovým mostíkom a hydrofóbnej povahe kryštalických regiónov. [5,14] Na jeho rozpustenie pred spracovaním do požadovanej formy môžu byť použité rôzne chemické látky.

- Kyseliny

Medzi dobré rozpúšťadlá patria koncentrované kyseliny ako kyselina mravčia, kyselina fosforečná alebo kyselina trifluoroctová. Ich nevýhodou je degradácia peptidových väzieb medzi aminokyselinami fibroínu.

- Chaotropné soli

Ďalším typom rozpúšťadiel sú koncentrované roztoky chaotropných solí. Patria medzi ne roztoky LiBr-etanol-voda, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -metanol a CaCl_2 -etanol-voda. Lítiové soli musia byť kvôli toxicite odstránené dialýzou pred použitím na biomedicínske aplikácie. Rozpúšťanie v roztoku LiBr je navyše časovo náročné a zaberie približne 4 dni. Skladovanie fibroínu bez odstránenia LiBr a lyofilizácie vedie k jeho degradácii po 3 mesiacoch.

- Fluórované organické rozpúšťadlá

Výhodou rozpúšťadiel ako 1,1,1,3,3,3-hexafluoroizopropanol (HFIP) a hexafluoroacetón je nenarušenie proteínovej štruktúry fibroínu. Obe látky sú prchavé a môžu spôsobiť respiračné problémy.

- N-metylmorfolín N-oxid (NMMO)

Táto látka sa priemyselne používa najmä pri spracovaní celulózy do vlákien. Jej miera obnoviteľnosti je až 99%, preto je vo veľkom využívaná pri komerčnom spracovaní. Rozpúšťanie fibroínu pomocou NMMO sa vykonáva pri vysokých teplotách (90-110 °C) a výsledný roztok môže byť priamo použitý na spriadanie vlákien. Výhodou použitia NMMO je nízka miera degradácie fibroínového reťazca.

- Iónove rozpúšťadlá

Rozpustnosť fibroínu je úmerná schopnosti iónov narušiť vodíkové mostíky v konformácii β -skladaného listu. Vplyv na rozpustnosť má povaha kationu aj aniónu, pričom anión má výrazne väčší efekt. Medzi iónové rozpúšťadlá patrí

1-butyl-3-metylimidazolium chlorid, pomocou ktorého je možné získať 13,2% roztok fibroínu, a 1-ethyl-3-metylimidazolium chlorid, v ktorom je rozpustnosť fibroínu až 23,3 %. Iónové rozpúšťadlá sa z roztoku následne vypierajú pomocou organických rozpúšťadiel ako metanol, či acetonitril alebo sa odstraňujú pomocou dialýzy. [14]

1.4 Degradácia

Miera degradácie závisí najmä na kryštalinite, ale aj od iných faktorov, ako je molekulová hmotnosť, pH, porozita, spracovanie a umiestnenie implantátu. Degradácia regenerovaného fibroínu je oveľa rýchlejšia ako degradácia surového hodvábného fibroínu. Dôvodom je proces extrakcie, ktorý narúša štruktúru β -skladaného listu, čo vedie ku zníženiu kryštalinity. [5] Na rozdiel od syntetických materiálov, degradácia fibroínu v organizme nespôsobuje významnú imunologickú odozvu. Fibroín patrí medzi látky citlivé na degradáciu proteolytickými enzýmami, ako je chymotrypsin, aktináza, kolagenáza a karboxyláza. Enzymatická degradácia fibroínového implantátu je dvojkrokový proces. V prvom kroku sa enzým adsorbuje na povrch materiálu. Druhým krokom je štiepenie väzieb za vzniku aminokyselín, ktoré sa ľahko absorbujú v prostredí *in vivo*. To je jedna z hlavných výhod hodvábných biomateriálov používaných na biomedicínske aplikácie. [7]

Zaujímavé je, že priadka morušová produkuje inhibitor proteolytických enzýmov v hodvábnnej žľaze, ktorý chráni ľahké reťazce fibroínu pred predčasnou degradáciou a je súčasťou výsledného kokónu. Inhibitor je možné izolovať z vodného extraktu hodvábných kokónov pri spracovaní. [15]

Ďalším faktorom, ktorého vplyv na degradáciu hodvábného fibroínu bol skúmaný, je pôsobenie gama žiarenia. Nárast gama žiarenia spôsobuje úbytok kryštalického podielu vo fibroíne, pokles pevnosti vlákien v ťahu a degradáciu proteínov najmä s nízkou molekulovou hmotnosťou. [16]

1.5 Biokompatibilita

Biokompatibilita *in vitro* je prvým predpokladom, ktorý musí byť splnený, aby sa dal materiál použiť na medicínske aplikácie. Cytokompatibilita fibroínu bola skúmaná *in vitro* pre rôzne typy buniek, vrátane ľudských mezenchymálnych kmeňových buniek, endoteliálnych buniek hladkého svalstva a astrocytov. Biokompatibilita bola testovaná aj

v prostředí *in vivo* na tkanivách vrátane kože, svalov a kostí. [5] Vo všeobecnosti platí, že implantáty s dlhšou dobou degradácie zasadené do mäkkých tkanív vyvolávajú väčšiu imunologickú odozvu. Dôležité je, že imunitná reakcia nezahŕňa aktiváciu adaptívneho imunitného systému a tvorbu protilátok. Zápalová reakcie vrcholí 1 až 3 týždne po zavedení implantátu, čo sa prejaví zvýšením telesnej teploty. Pozorovaná reakcia organizmu na hodvábnny fibroín je podobná ako reakcia na kolagénové implantáty. Výhodou fibroínu oproti kolagénovým implantátom je jeho väčšia pevnosť v ťahu a pomalšia degradácia, čo umožňuje lepšiu interakciu s hostiteľským tkanivom. Mineralizácia tkanív spôsobená hodvábnom nebola zaznamenaná, s výnimkou umiestnenia v kalcifikovaných tkanivách. Niektoré aplikácie vyžadujú lepšiu bunkovú interakciu ako poskytuje samotný hodváb. V takýchto prípadoch sa kombinuje s rastovými alebo inými signalizačnými faktormi, aby sa zlepšila alebo špecificky modulovala bunková reakcia. [17]

2 APLIKÁCIE

Hodváb sa už desaťročia komerčne používa ako medicínsky šijací materiál a už pred tisícročiami získal uplatnenie v textilom priemysle.

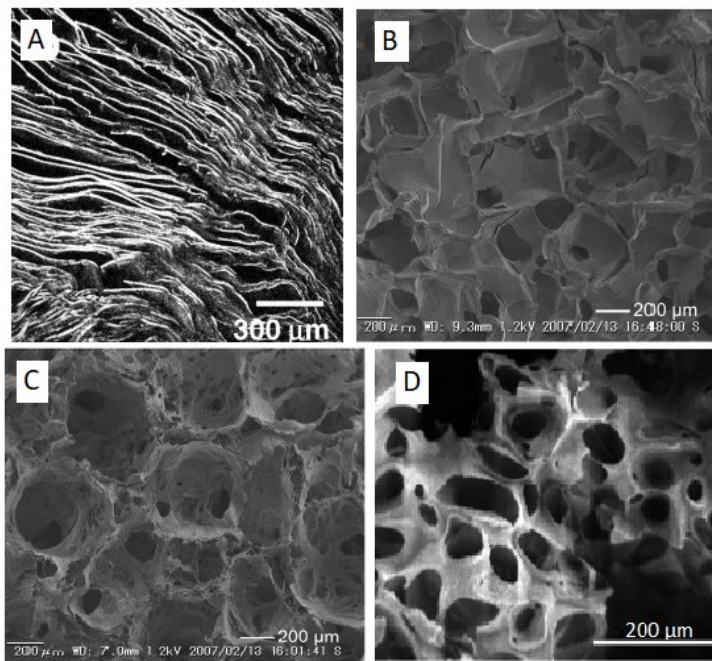
Ďalšie aplikačné možnosti, ako napríklad hydrogély, biomateriály pre tkanivové inžinierstvo a nanovlákná, sú predmetom štúdií. Potenciál hodvábu spočíva v jeho vysokej pevnosti v ťahu, priepustnosti vody a kyslíka, nízkej imunologickej odpovedi a relatívne pomalej degradácii v porovnaní s inými prírodnými materiálmi. [11]

2.1 3D porézne scaffoldy

Medzi hlavné oblasti využitia scaffoldov patrí tkanivové inžinierstvo. Spracovať fibroín do podoby scaffoldov je možné viacerými spôsobmi. Konvenčným spôsobom tvorby poréznej štruktúry je lyofilizácia, ktorá pozostáva zo zmrazovania a následného sušenia materiálu. Veľkosť pórov a ich vzájomné prepojenie je regulovateľné chladiacou teplotou alebo koncentráciou fibroínu v roztoku metanolu alebo 2-propanolu. Touto metódou je možné generovať anizotropné porézne scaffoldy s laminárnou morfológiou (Obr. 4: A). Nevýhodou tejto metódy je obsah zvyškového organického rozpúšťadla vo výslednom produkte. [18]

Ďalšou technikou prípravy poréznych scaffoldov, ktorá bola skúmaná, je ponorenie granúl sacharózy do roztoku fibroínu v HFIP. Potom, čo roztok prestúpi ich pórmí, sa granule ponoria do metanolu, kde je indukovaná štruktúra β -skladaného listu. Zbytkový podiel sacharózy sa rozpustí vo vode a výsledný scaffold je získaný po 36 hodinách lyofilizácie (Obr. 4: B). HFIP môže byť v tomto postupe nahradený vodou a sacharóza soľným roztokom, v tomto prípade nie je nutné indukovať štruktúru β -skladaného listu pomocou metanolu, keďže voda má rovnaký účinok (Obr. 4: C). Oblasť využitia takto pripravených scaffoldov môže zahŕňať liečbu defektov chrupavky alebo kostí. [19]

Na generáciu pórov môže byť okrem už zmienených metód použitý aj plyn, ako napríklad hydrogenuhličian amónny (Obr. 4: D) [20] alebo oxid dusný [21]. Výsledné scaffoldy dosahujú vysokú pevnosť v tlaku a veľkú mieru prepojenia pórov, čo prispieva k jednoduchšej migrácii buniek. [22]



Obr. 4: Příklad scaffoldů připravených A) lyofilizací [18], B) lúhovaním granúl sacharózy v roztoku fibroínu [19], C) lúhovaním granúl soli v roztoku fibroínu [19], D) použitím hydrogenuhličitanu amónneho ako porogénu [20]

2.1.1 Kompozitné scaffoldy

Riešením nedostatkov hodvábného fibroínu, ako napríklad krehkosť alebo pomerne veľká hydrofóbnosť, predstavuje tvorba kompozitných scaffoldov pridaním iných prírodných polymérov.

- Hodvábný fibroín/chitosan

Chitosan je enzymaticky degradovateľný biomateriál, schopný tvoriť s fibroínom vodíkové mostíky a zvyšovať elasticitu a flexibilitu scaffoldov. [22] Bol preukázaný jeho pozitívny vplyv na rast chrupavkového tkaniva a adhéziu chondrogénnych buniek [23]

- Hodvábný fibroín/kolagén

Kolagén je proteín, ktorý je v tele zastúpený ako jedna z hlavných zložiek extracelulárnej matrice a vyznačuje sa vysokou biokompatibilitou. Jeho začlenenie do fibroínového scaffoldu zvyšuje bunkovú afinitu a napomáha rastu buniek. Fibroínová zložka má pozitívny vplyv na pevnosť scaffoldu. [22]

- Hodvábny fibroín/kyselina hyaluronová

Pridanie kyseliny hyalurónovej zlepšuje elasticitu a podporuje rast chondrogénnych buniek, nakoľko je prirodzenou súčasťou chrupavkových tkanív. Kyselina hyalurónová taktiež prispieva k tvorbe sulfátovaného glykozaminoglykánu, ktorý slúži na udržanie vody a na hydratáciu buniek. Fibroín v tomto prípade zlepšuje mechanické vlastnosti a stabilitu scaffoldu. [22]

2.2 Fibroínové filmy

Ďalšou formou spracovania regenerovaného fibroínu sú filmy, ktoré majú širokú škálu využitia, ako sú napríklad obvazy na urýchlenie hojenia rán, obalové vrstvy implantátov, kontaktné šošovky alebo systémy pre kontrolované uvoľňovanie liečiv. Možnosti prípravy zahŕňajú tlač, máčanie alebo odlievanie z vodného roztoku kyselín, solí alebo organických rozpúšťadiel. Sekundárna štruktúra filmu je závislá od použitého rozpúšťadla. Fluórované rozpúšťadlá, ako napríklad HFIP indukujú štruktúru α -závitnice, zatiaľ čo filmy odliate z roztoku kyseliny mravčej majú vyšší obsah štruktúry β -skladaného listu. [24] Ošetrením filmu metanolom alebo žíhaním vodou dochádza a k jeho stabilizácii v dôsledku vzniku kryštalických regiónov, čo vedie k zníženiu rýchlosti biodegradácie. [2] Filmy ošetrené metanolom majú väčšiu schopnosť absorpcie vody a priepustnosti kyslíku. Naopak, filmy ošetrené vodnou parou vykazujú usporiadanejšiu sekundárnu štruktúru. Štruktúru β -skladaného listu je možné indukovať aj pomocou zvýšenej teploty alebo mechanickým namáhaním. [24]

Vlastnosti filmov, ako mikroštruktúra a poréznosť, môžu byť následne ovplyvnené chemickou modifikáciou. Tieto vlastnosti sú dôležité pre zabezpečenie interakcií s bunkami a zväčšujú rozsah použitia fibroínových filmov v biomedicíne. [25,26]

Fibroínové filmy, vyrobené technikou namáčania do roztoku, môžu nájsť uplatnenie vo vaskulárnych aplikáciách ako mikrotrubičky s kontrolovateľnou porozitou. Výsledky naznačujú, že mikrotrubičky s priemerom 0,1 až 6 mm sú schopné odolávať fyziologickému tlaku, umožňujú migráciu buniek a difúziu proteínov. Preto môžu byť využité ako aktívny biomateriál pre mikrovaskulárne transplantácie. [27]

Ďalšou z možných medicínsky aplikácii je použitie filmov ako funkčného obvazového materiálu. V tejto súvislosti bolo skúmané samorozpínacie správanie fibroínových filmov ošetrených roztokom glycerolu. Molekuly glycerolu difundujú do objemu filmu a trvalo

zlepšujú jeho flexibilitu. Oproti fibroínovým hydrogélom na báze vody nedochádza k ich krehnutiu z dôvodu vysychania. [28]

Modifikácia filmu pomocou začlenenia frakcie glukózy (5 až 15 % w/w) zlepšuje flexibilitu filmu a adhéziu buniek. Takto upravený film môže takisto nájsť uplatnenie ako obväzový materiál na ošetrovanie rán. Glukóza spĺňa úlohu zmäkčovadla, zvyšuje drsnosť povrchu a zároveň neovplyvňuje sekundárnu štruktúru fibroínu. [29]

Ďalším spôsobom prípravy transparentných filmov je odlievanie z roztoku fibroínu v zmesi iných polymérov. Transparentné filmy odliate z roztoku fibroínu a celulózy dosahujú lepšie mechanické vlastnosti v porovnaní s fibroínom samotným. Kombináciou fibroínu s kolagénom poskytujú odliate filmy naočkované hepatocytmi lepšiu životaschopnosť buniek. Prítomnosť keratínu vo fibroínovom filme zase znižuje zrážanlivosť krvi. [2]

2.2.1 Fibroínové filmy stabilné vo vode

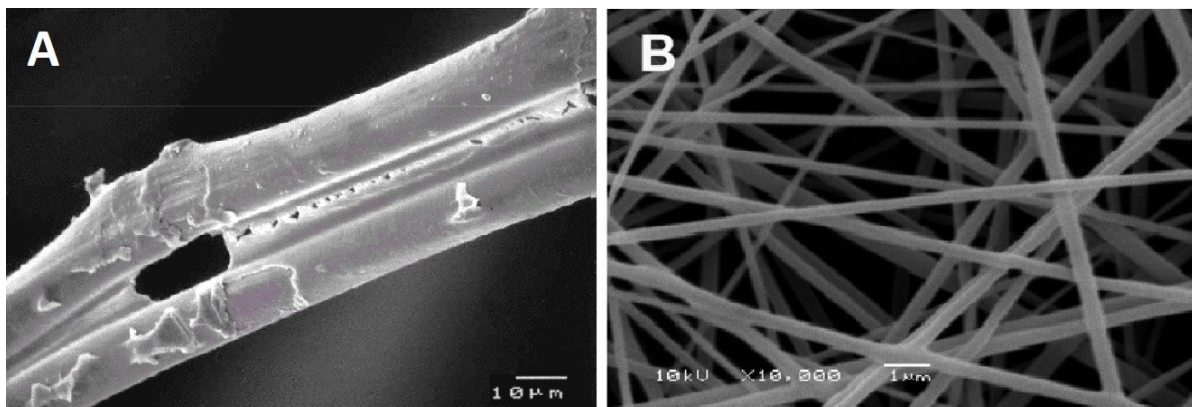
Nerozpustnosť vo vode je dominujúcou vlastnosťou najmä fibroínu v konformácií β -skladaného listu, ktorá prevažuje v stave Silk II. Vo vode nerozpustné filmy so zvýšeným obsahom konformácie Silk I je možné pripraviť odliatím z vodného roztoku fibroínu za špecifických podmienok. Vďaka pomalému sušeniu za prítomnosti viečka vznikajú filmy so zvýšeným obsahom štruktúry Silk I. Takto pripravený film dosahuje lepšiu elasticitu a rýchlejšiu biodegradáciu oproti filmov ošetrovaných metanolom alebo vodnou parou, čo môže rozšíriť biomedicínske aplikácie na prípady, kde je potrebné urýchliť dobu degradácie *in vivo*. Ďalšie mechanické vlastnosti filmov nerozpustných vo vode sú uvedené v tabuľke 2. [26]

Tab. 2: Porovnanie mechanických vlastností vo vode nerozpustných fibroínových filmov [26]

Fibroínový film	Pevnosť v ťahu (MPa)	Modul pružnosti (MPa)	Predĺženie (%)
<i>pripravený pomalým sušením</i>	1,4 ± 0,1	4,6 ± 0,8	260 ± 24
<i>ošetrovaný vodnou parou</i>	3,1 ± 0,5	10,5 ± 1,3	200 ± 20
<i>ošetrovaný metanol</i>	3,9 ± 0,9	17,6 ± 3,2	142 ± 60

2.3 Fibroinové vlákna

Najčastejšou a najvýhodnejšou metódou prípravy mikro a nanovlákien je elektrostatické zvlákňovanie, ktoré je založené na napínaní viskoelastického roztoku fibroínu pomocou elektrostatickej sily. Tento postup umožňuje reguláciu mechanických vlastností, polomeru a štruktúry vlákien už počas výrobného procesu. [27] Ako vidno na obr. 5, nanovlákná dosahujú približne desaťnásobne menší priemer ako vlákno prírodného fibroínu po degummingu.



Obr. 5: Porovnanie A) prírodného fibroinového vlákna a B) nanovlákná pripraveného elektrostatickým zvlákňovaním z roztoku [27]

Rovnako ako u fibroinových filmov, podiel štruktúry β -skladaného listu vo fibroinových vláknach je regulovateľný pomocou ošetrovania metanolom. U tkanív z nanovlákien, ktoré boli takto ošetrované, je pozorovateľný pokles porézności zo 76% na 68% z dôvodu dehydratácie. [2] Morfológia povrchu tkanív z nanovlákien pripomína extracelulárny matrix, vďaka čomu sú vytvorené vhodné podmienky na rast buniek *in vivo*. Napriek tomu sú ich možnosti využitia, najmä v oblasti náhrady kostného a chrupavkového tkaniva, obmedzené kvôli svojej nízkej pevnosti. [30] Nanovlákná môžu nájsť uplatnenie pri výrobe obvazov alebo materiálu na tvorbu náhradných krvných ciev. Pri spracovaní takéhoto materiálu sa využíva zvlákňovanie vo viacerých vrstvách v mriežkovej formácii, aby implantát odolával dynamickému toku, ktorému je v podmienkach *in vivo* vystavený. [31]

2.4 Hydrogély

Fibroinové hydrogély majú štruktúru trojrozmerných polymérnych sietí v konformácii β -skladaného listu a sú odolné voči napučievaniu vo vodnom roztoku. Formujú sa pomocou sol-gélovej metódy z vodného roztoku fibroínu za prítomnosti kyselín,

dehydratačných činidiel alebo sonifikáciou. Sol-gél prechod vodného roztoku fibroínu môže trvať niekoľko dní až týždňov a preto sa urýchľuje chemickými alebo fyzikálnymi metódami. Rýchlosť gelácie zvyšuje koncentrácia proteínu, prídanie Ca^{2+} iónov, zníženie pH alebo zvýšenie teploty. [32-34] Na zvýšenie pevnosti hydrogélu sa používa zosieťovanie pomocou glutaraldehydu alebo prírodných sieťovadiel ako sú genipin či tyrozín. Ďalšou spôsobom sieťovania, ktorá navyše eliminuje potrebu pridávania činidla, je ionizujúce žiarenie, ktoré podporuje vznik voľných radikálov. [34]

Možnosti použitia hydrogélom na báze fibroínu zahŕňajú systémy na dodávanie liekov, s riadeným uvoľňovaním, ktoré je kontrolované hydrofilnými/hydrofóbnymi interakciami medzi hydrogélom a podávanou látkou. [35] Na rýchlosť uvoľňovania látok má vplyv relatívny obsah vody, pričom je možné dosiahnuť stabilizáciu vakcín a protilátok až po dobu 6 mesiacov. [36]

Fibroínové hydrogély sú často používané pri regenerácii chrupavky, kde sa využíva ich pomerne dlhá doba degradácie oproti hydrogélom pripravených z iných biopolymérov, ako je napríklad kyselina hyaluronová [37,38]

3 ÚPRAVY POVRCHU HOVÁBNEHO FILMU

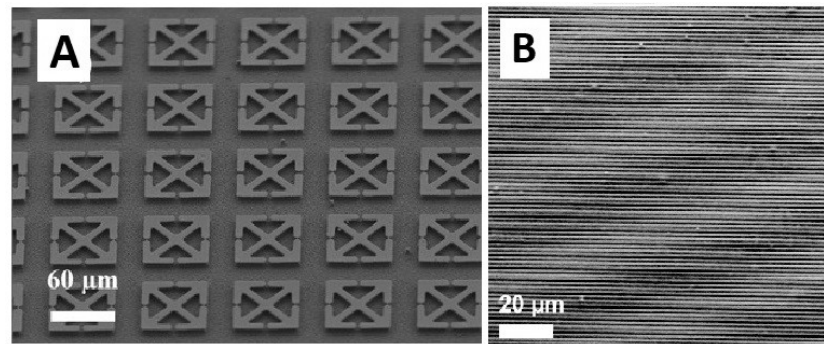
Úprava povrchovej topografie hodvábných filmov významne ovplyvňuje vlastnosti a správanie povrchovej vrstvy. Texturizácia povrchu je dôležitá nie len pre adhéziu a proliferáciu buniek, ale taktiež rozširuje možnosti použitia v oblasti elektroniky a biosenzorov.

3.1 Patterning

Aplikácie hodvábného proteínu sa čoraz viac rozširujú nie len v rámci biomedicíny ale aj v oblasti elektronických a senzorických systémov, optike a biofotonike. V týchto oblastiach sa využíva metóda textúrovania povrchu – patterning na úrovni mikro až nanometrov pomocou šablón.

Jednou z možností výroby veľkoplošných flexibilných fibroínových filmov s mikroštruktúrou je patterning filmu pomocou kremíkovej dosky s fotolitografickou textúrou z hliníku alebo zlata. Sušenie odliateho hodvábného filmu trvá približne 12 hodín pri izbovej teplote. Počas sušenia dochádza k naviazaniu kovových prvkov na povrch hodvábného filmu. Adhézia prvkov je spôsobená vytvorením tiolových väzieb so zlatom, alebo interakciami oxidov hliníka s hydroxylovými skupinami aminokyselín. Po zlupnutí filmu poskytujú prenesené kovové vzory masku v následnom procese reaktívneho iónového leptania, (obr. 6: A). Takto upravené filmy si zachovávajú svoju biokompatibilitu a mohli by nájsť využitie ako kompozity v spojení s kovmi s potenciálnou aplikáciou ako biosenzory *in vivo*. [39]

Okrem kremíkových dosiek bola taktiež skúmaná texturizácia pomocou šablóny z polydimetylsiloxanu (PDMS) v požadovanom dizajne. Roztok fibroínu sa na PDMS šablónu odlieva metódou spin-coating a následne sa film spolu so šablónou ponára do metanolu, čím sa zabezpečí jeho kryštalizácia, až potom je možné film zo šablóny odlúpnúť. Výška znakov vytlačených na hodvábnom filme po vysušení zodpovedá 80-85 % pôvodnej výšky znakov na šablóne, (obr. 6: B). [40]

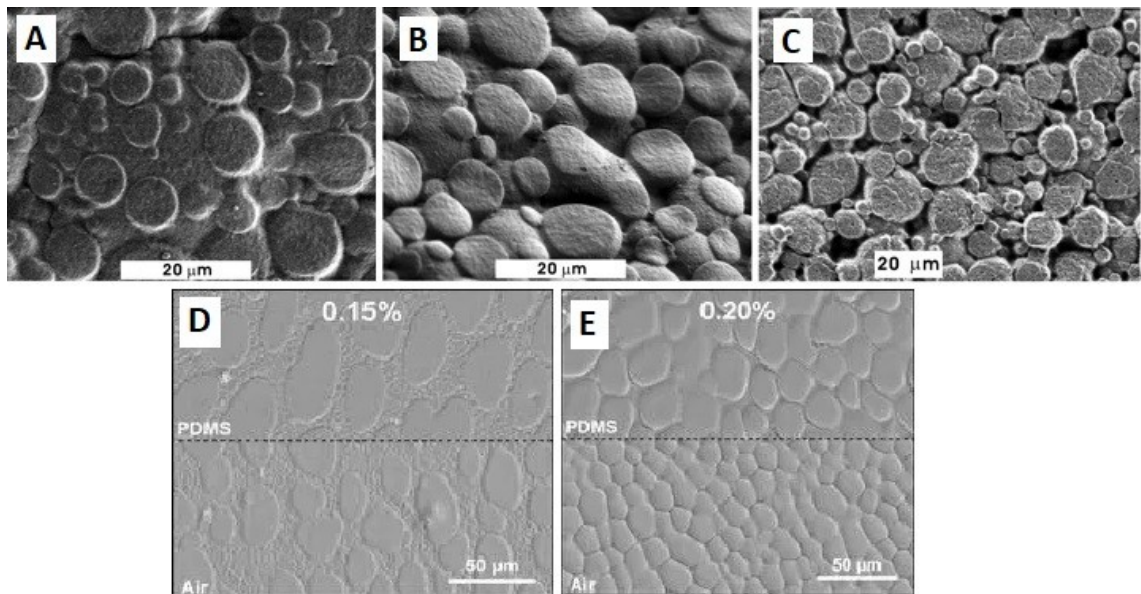


Obr. 6: Príklady texturizácie povrchov metódou patterning s použitím A) kremikovej šablóny [39] a B) PDMS šablóny [40]

3.2 Metódy založené na fázovej separácii

Fázová separácia predstavuje rýchly a ekonomický postup pri výrobe 2D a 3D štruktúr. Táto metóda úpravy povrchu využíva nestabilitu povrchu tenkých polymérnych filmov voči rozpúšťadlu. Počas fázovej separácie dochádza k zmenám vlastností systému ako je zloženie, molekulová hmotnosť a hrúbka filmu. Taktiež vedie k zmenám morfológie povrchu filmu, ktoré sa prejavujú vznikom pórov. Tvorbu a výslednú štruktúru vzorov ovplyvňuje mnoho faktorov vrátane teploty, typu rozpúšťadla, hrúbku filmu, koncentrácie a chemického zloženia polymérneho roztoku. Dôležitým parametrom je rýchlosť odparovania rozpúšťadla, ktorá ovplyvňuje veľkosť a symetriu vzniknutých pórov. [41]

Tvorba pravidelnej mikroštruktúry povrchu pomocou fázovej separácie bola testovaná aj u zmesi vodného roztoku fibroínu a polyetylén oxidu (PEO). PEO bol vybraný s ohľadom na jeho vysokú biokompatibilitu a rozpustnosť vo vode, nakoľko filmy boli odlievajú z vodného roztoku. Tým sa predišlo použitiu organických rozpúšťadiel, ktoré by mohli výslednú biokompatibilitu znížiť. Filmy boli následne stabilizované metanolom alebo vodnou parou. PEO môže byť vyextrahovaný do vody, čím sa zvýši drsnosť povrchu filmu. Príklady morfológie povrchov po fázovej separácii fibroínového roztoku a PEO sú zobrazená na obr. 7. [42,43]



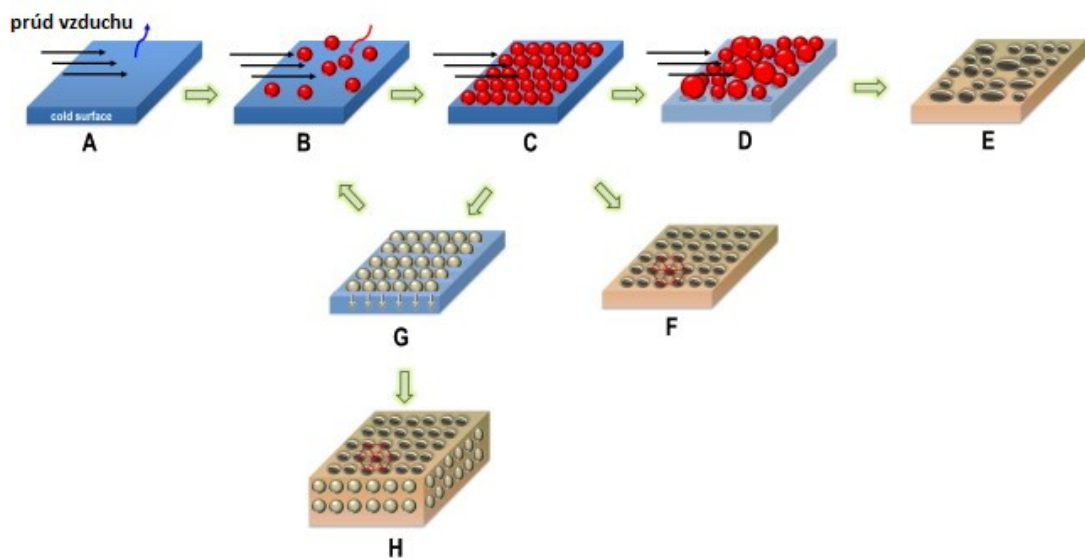
Obr. 7: Príklady texturizácie po fázovej separácii fibroínového roztoku a PEO A) pred stabilizáciou B) po stabilizácii metanolom C) po stabilizácii metanolom a extrakcii PEO [42] D) a E) po stabilizácii vodnou parou [43]

3.2.1 Breath figures

Metóda „Breath figures“ (BF) je jeden z najpoužívanějších spôsobov prípravy poréznych polymérnych povrchov najmä pre svoju jednoduchosť. Predpríprava textúrovaných šablón nie je nutná, čo je veľkou výhodou tejto metódy. Úlohu šablóny nahrádza matica kvapiek vody, ktoré po odparení vytvárajú pravidelné usporiadanie „honeycombs“. Veľkosť pórov sa dá regulovať pomocou vstupných parametrov ako je teplota, vlhkosť, koncentrácia polyméru.

Texturizácia povrchu pomocou BF sa skladá z niekoľkých krokov. Polymér rozpustený v prchavom rozpúšťadle je vystavený prúdu vzduchu s vysokou vlhkosťou. V počiatočnej fáze dochádza k endotermickému vyparovaniu rozpúšťadla, čo spôsobuje ochladenie povrchu filmu, (obr. 8: A). Následne na ňom začínajú kondenzovať a rásť kvapky vody z okolitého vzduchu, (obr. 8: B). Kvapky sú termodynamicky stabilné a preto sa v tejto fáze neodparujú. Keď sa teplota povrchu vyrovná teplote okolia, rozpúšťadlo aj skondenzovaná voda sa odparí, čím sa vytvorí voštinová štruktúra. Symetrická hexagonálna štruktúra vzniká za predpokladu, že odparovanie rozpúšťadla je dostatočne dlhé na vyrovnanie rastu vodných kvapiek a získanie úplného pokrytia povrchu, (obr. 8: C). Ak je doba odparovania krátka, vznikajú póry s náhodným usporiadaním. V dôsledku koalescencie kvapiek na povrchu, (obr. 8: D), vznikajú heterogénne póry, (obr. 8: E). V prípade, že sa rozpúšťadlo stihne odpariť pred zhukovaním kvapiek, vzniká

monovrstva izolovaných pórov podobnej veľkosti, (obr. 8: F). Ak dôjde ku stabilizácii kondenzovanej kvapky v polyméri a zároveň sa zabráni zrážaniu, môže skondenzovaná kvapka poklesnúť do roztoku, (obr. 8: G). Tento jav nastáva, ak je hustota rozpúšťadla nižšia ako hustota kondenzovanej vody a film je má dostatočnú hrúbku. Následne môže dôjsť ku kondenzácii novej kvapky vody a vzniku viacvrstvovej poréznej štruktúry, (obr. 8: H). [44]



Obr. 8: Princíp metódy „Breath figures“ v jednotlivých krokoch [44]

Riadením parametrov experimentu je možné získať pravidelné štruktúry s rozmermi 0,2 až 20 μm . Najdôležitejšie parametre, ktoré treba pri metóde BF brať do úvahy sú:

- Vlhkosť

Zvýšenie vlhkosti privádzaného vzduchu zvyčajne vedie k väčším pórom.

- Prúd vzduchu

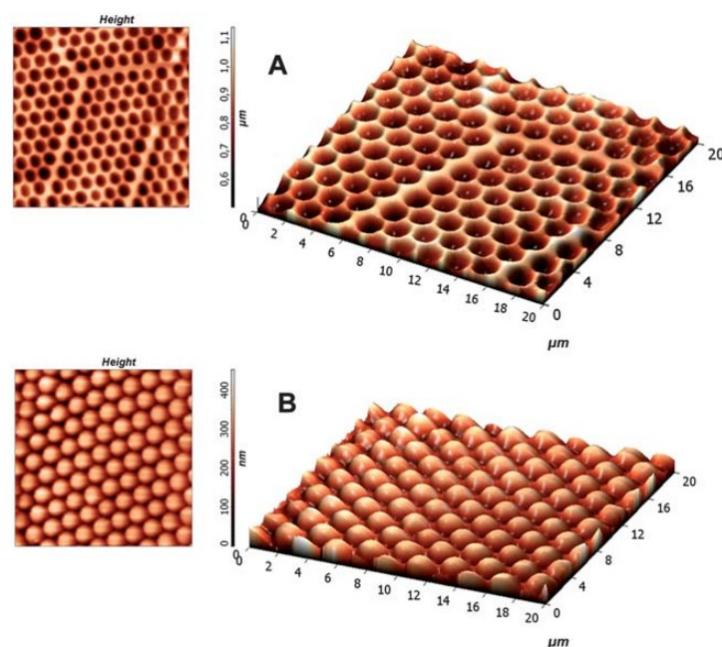
Rýchlejšie prúdenie vzduchu znižuje veľkosť pórov, pretože dochádza ku skráteniu celkového času odparovania rozpúšťadla.

- Koncentrácia roztoku

Znížením koncentrácie polyméru v roztoku dochádza k zväčšeniu priemeru pórov. Avšak, v niektorých konkrétnych prípadoch nenastáva žiadna zmena veľkosti ovplyvnená koncentráciou.

- Molekulová hmotnosť polyméru
Zvýšenie molekulovej hmotnosti vedie ku zväčšeniu priemernej veľkosti pórov.
- Rozpúšťadlo
Nižšia prchavosť rozpúšťadla umožňuje dlhšiu kondenzáciu kvapiek vody a vznik väčších pórov.
- Teplota
Rýchlosť odparovania sa znižuje so znižovaním teploty, čo vedie k vzniku väčších kondenzovaných kvapiek a väčších pórov. [44]

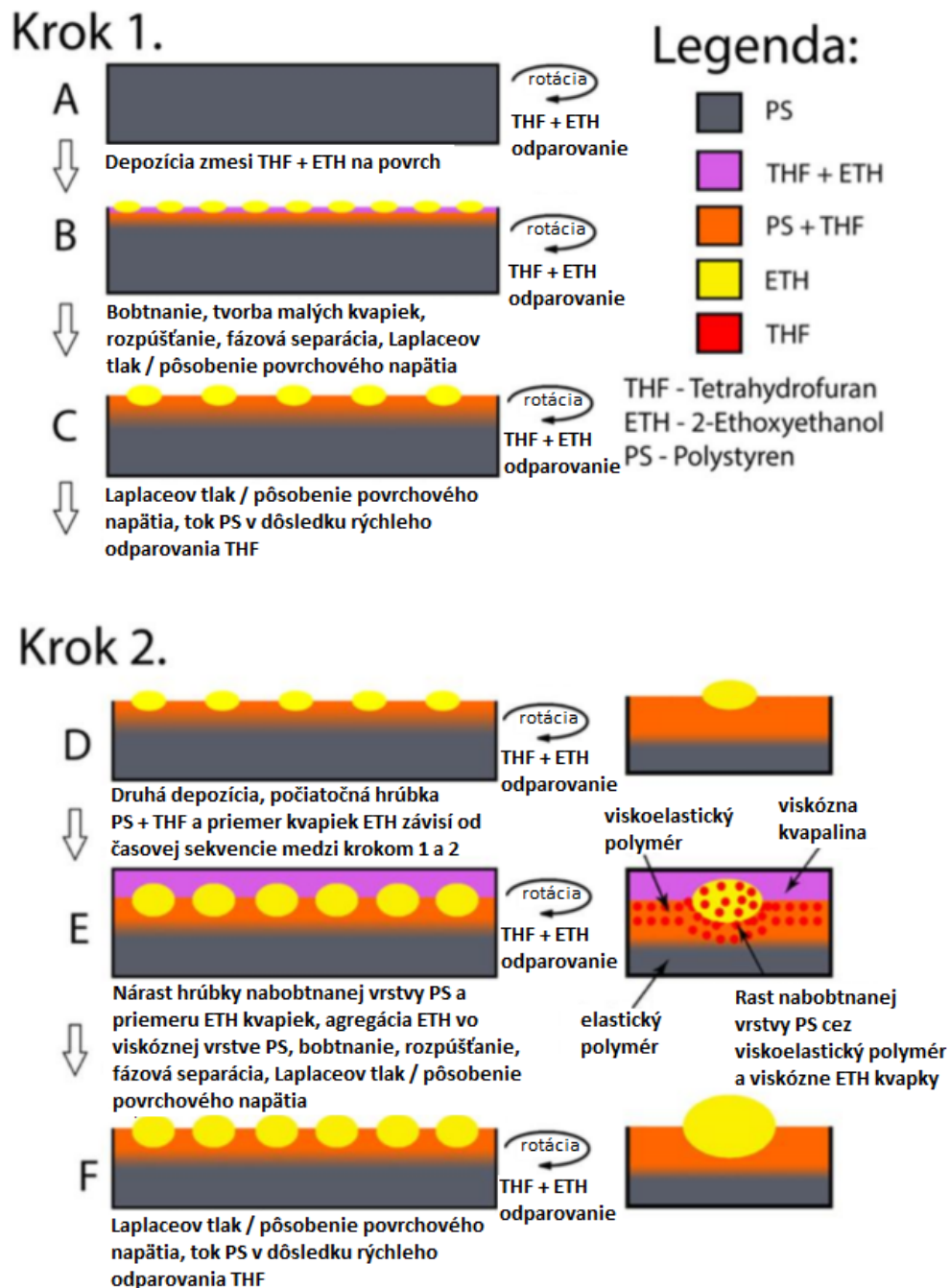
V literatúre bola popísaná tvorba voštinových vzorov na fibroínovom filme metódou transkripcie pomocou šablóny z polydimetylsiloxanu alebo polymetylmakrylátu, (obr. 9). Na túto šablónu bola generovaná voštinová štruktúra pomocou „Breath figures“. Následne na ňu bol odliaty roztok fibroínu, ktorý bol po uschnutí opatrne odstránený a ponorený do metanolu po dobu 2 hodín na podporu usporiadania do konformácie β -skladaného listu. [45] Priama metóda „Breath figures“ nebola pre fibroínové filmy literárne popísaná.



Obr. 9: Vzorované fibroínové filmy pripravené transkripciou zo PDMS šablóny upravenej pomocou BF A) fibroínový film s mikro-pórmí B) s mikro-výstupkami [45]

3.2.2 Metóda časovo sekvenovanej fázovej separácie za rotácie

Proces úpravy povrchovej textúry pomocou časovo sekvenovaného dávkovania zmesi dobrého a zlého rozpúšťadla na rotujúci povrch polystyrénového filmu bol popísaný v práci A. Minaříka, E. Wrzecionka a kol. Ako dobré rozpúšťadlo polystyrénu bol použitý tetrahydroxyfuran (THF) a ako zlé rozpúšťadlo bol zvolený etoxyetanol (ETH). Postup je popísaný v dvoch krokoch na obr. 10. [46]



Obr. 10: Schéma modifikácie povrchu polystyrénu metódou časovo sekvenovanej fázovej separácie za rotácie [46]

Princípom metódy je dávkovanie zmesi dobrého rozpúšťadla, ktoré zabezpečí bobtnanie povrchu filmu a zlého rozpúšťadla, ktoré je separované na povrchu v podobe mikrokvapiiek a umožňuje jeho formovanie. Opakované pridávanie zmesi po menších dávkach vedie k zväčšeniu hrúbky nabobtnanej vrstvy a rastu mikrokvapiiek zlého rozpúšťadla. V poslednom kroku dochádza vplyvom rotácie k odpareniu najskôr dobrého a potom zlého rozpúšťadla. Výsledný charakter povrchovej textúry závisí od procesných parametrov ako je pomer rozpúšťadiel, veľkosť a počet dávok ale aj frekvencia dávkovania a rýchlosť otáčok spin-coatru. V závislosti od týchto parametrov je možné generovať povrchové nerovnosti v podobe sieťových štruktúr a izolovaných pórov. [46]

Možnosti modifikácie fibroínových filmov touto metódou boli popísané v diplomovej práci K. Kocourkovej. V rámci tejto práce bolo zistené, že výsledok modifikácie nie je v tomto prípade ovplyvnený len procesnými parametrami, ale aj sekundárnou štruktúrou fibroínu. Už mierna zmena konformácie do stavu Silk II poskytuje možnosť generovania mikro a nano-textúry povrchu fibroínového filmu. Prechod fibroínu zo stavu Silk I do Silk II podmieňuje vznik nano, mikro a makro povrchových nerovností. [47]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 POPIS EXPERIMENTU

Cieľom práce bola modifikácia povrchu fibroínových filmov metódou časovo sekvenovanej fázovej separácie za rotácie, statickej modifikácie a metódou „Breath figures“. Vzniknuté štruktúry boli popisované pomocou AFM, SEM, optického mikroskopu, optického a mechanického profilometra. Okrem toho bola posudzovaná stabilita filmov a ich transformácia zo stavu Silk I do Silk II pomocou FTIR.

4.1 Použité materiály a chemikálie

Použitý regenerovaný fibroín *Bombyx mori* bol pripravený a spracovaný do lyofilizovanej formy na UFMI, FT UTB v Zlíne. Kokóny *Bombyx mori* boli zbavené sericínu v 0,02 M Na_2CO_3 . Následne boli rozpustené v roztoku LiBr pri teplote 60°C počas štyroch hodín. Nežiaduce ióny boli z roztoku odstránené dialýzou. Roztok bol centrifugovaný a lyofilizovaný. Pred odliatím filmov bol pripravený 2 % (w/v) roztok fibroínu v 1,1,1,3,3,3-hexafluoroizopropanolu (HFIP).

Všetky fibroínové filmy boli odlievané do polystyrénových misiek TPP Techno Plastic Products AG s priemerom 34 mm.

Modifikačná zmes na úpravu textúry fibroínového filmu obsahovala hexafluoroizopropanol p.a. 99 % od abcr DmbH ako dobré rozpúšťadlo a dimetylsulfoxid p.a. 99,99% od VWR Chemicals ako zlé rozpúšťadlo.

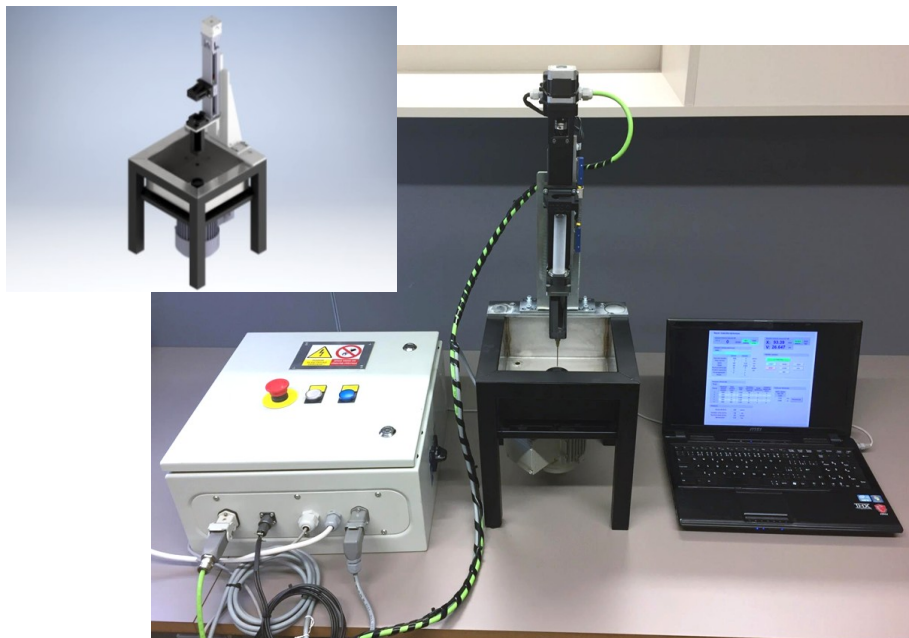
4.2 Príprava fibroínových filmov

Z 2% roztoku fibroínu v HFIP boli filmy odlievané do polystyrénových Petriho misiek z 490 μl roztoku a následne sušené v inertnej atmosfére dusíka v exsikátore po dobu 24 hodín prikryté viečkom. Takto pripravené filmy vykazovali štruktúru Silk I a pred modifikáciu boli uchovávané v exsikátore kvôli ochrane pred vzdušnou vlhkosťou.

4.3 Úprava povrchu filmu pomocou metódy časovo sekvenovanej fázovej separácie za rotácie

Fibroínové filmy v stave Silk I boli modifikované zmesou HFIP, dimetylsulfoxidu (DMSO) a vody v pomere 7:0,2:4, ktorá bola postupne dávkovaná po 5 ž 10 sekundách v množstve 100 až 200 μl pri rýchlosti 1500 až 2400 otáčok za minútu. Na úpravu povrchu za rotácie bol použitý spin-coater zostrojený na UFMI, FT UTB v Zlíne. Zariadenie

pozostáva z rotujúceho držiaka na vzorku, dávkovača modifikačnej zmesi a riadiacej jednotky, obr. 11.



Obr. 11: Spin-coater na texturizáciu povrchu filmov metódou časovo sekvenovaného dávkovania rozpúšťadiel za rotácie [46]

4.4 Úprava povrchu filmu pomocou statickej modifikácie

Statická modifikácia je založená na deponovaní modifikačnej zmesi na nerotujúce vzorky fibroínových filmov v stave Silk I. Modifikácia prebiehala v exsikátore v atmosfére prúdiaceho dusíku. Bol pozorovaný vplyv rôznych pomerov dobrého rozpúšťadla HFIP a zlého rozpúšťadla DMSO v modifikačnej zmesi na charakter vzniknutých povrchových štruktúr. Zmes sa samovoľne odparovala po dobu 24 hodín. Misky boli počas toho prikryté viečkom, aby nedochádzalo k zvlneniu povrchu pôsobením prúdiaceho dusíku. Pomocou FTIR bol vyhodnotený konformačný prechod takto upravených filmov a ich stabilita vo vode.

4.5 Úprava povrchu filmu pomocou metódy „Breath figures“

Úprava povrchu fibroínového filmu metódou „Breath figures“ prebiehala v dvoch krokoch. Najskôr bol na film deponovaný HFIP, čo viedlo k nabobtnaniu povrchovej vrstvy. HFIP bol čiastočne odparený v atmosfére dusíka alebo vzduchu. Ihneď nato bol film vystavený parám DMSO, ktoré vznikali zahrievaním DMSO na 45 °C a na film boli privádzané pomocou prúdiaceho dusíka. Filmy sa nechali úplne vysušiť na vzduchu alebo

v exsikátore, v ktorom boli následne skladované. Pomocou AFM, optického a mechanického profilometra boli skúmané zmeny povrchových štruktúr filmov v závislosti od nastavenia procesných parametrov tejto metódy.

4.6 Charakterizácia povrchu

Povrch upravených fibroínových filmov bol charakterizovaný pomocou AFM, SEM, optického mikroskopu, optického a mechanického profilometra. Výsledky boli spracované v programoch Gwyddion vo verzii 2.51 a ImageJ vo verzii 1.52a. Zmeny konformácie fibroínu boli potvrdené na základe meraní FTIR spektier.

4.6.1 FTIR

Sekundárna konformácia a prechody fibroínu zo stavu Silk I do Silk II boli analyzované pomocou FTIR spektrometra Nicolet iS5 s Ge kryštálom. Metóda je založená na meraní absorpcie infračerveného žiarenia, ktorá je spojená so zmenami rotačne vibračných energetických stavov, ktoré závisia od zmeny dipólového momentu molekuly. Rozsah merania bol od 400 do 4000 cm^{-1} s opakovaním 32 skenov. Vyhodnocované boli najmä posuny pre skupiny Amid I a Amid II v oblasti od 1700 po 1500 cm^{-1} , v ktorých sa konformačný prechod fibroínu zo stavu Silk I do Silk II najviac prejavuje.

4.6.2 AFM

Zmena topografie povrchu po modifikáciách bola pozorovaná a charakterizovaná pomocou mikroskopie atomárnych síl. Meranie prebiehalo v okolitej atmosfére pri laboratórnej teplote 23 °C. Na charakterizáciu bol použitý prístroj NTEGRA-Prima vyrobeným spoločnosťou NT-MDT. Povrch bol skenovaný pomocou sondy NSG01, tiež od firmy NT-MDT, určenej na meranie v semikontaktnej móde. Frekvencia skenovania bola nastavená v rozmedzí od 0,4 do 0,7 Hz a rozlíšenie výsledných snímok bolo 512 x 512 dpi. Veľkosť zobrazovanej plochy sa pohybovala od 10 do 50 μm .

4.6.3 SEM

Na zobrazenie povrchovej štruktúry bol použitý skenovací elektrónový mikroskop SEM Phenom G2 PRO vyrobený firmou Phenom World. Kvôli charakteru tejto metódy a nestabilite vzorky fibroínového filmu bolo nutné povrch filmov pred umiestnením do SEM pokovovať. Pre tento účel bola použitá naprašovačka značky Quorum mini SC7620. Urýchľovacie napätie elektrónov v mikroskope bolo nastavené na 10 kV. Vzorky boli

zobrazované pri zväčšení 730x, pri väčšom zväčšení dochádzalo k deformácii povrchu. Veľkosť pozorovanej plochy bola 400 x 400 μm .

4.6.4 Profilometer

Profilové rezy a parametre drsnosti boli spracované a vyhodnotené na základe meraní na mechanickom profilometri Dektak XT od firmy Bruker s diamantovým hrotom s prítlakom 5 mg a s polomerom krivosti 2,5 μm . Povrchová topografia filmov bola vyhodnotená aj na základe meraní na optickom profilometri ContourGT-K takisto od firmy Bruker s použitím bieleho svetla a so zväčšením 20x.

4.6.5 Optický mikroskop

Na pozorovanie makroskopických zmien štruktúry po modifikácii pomocou „Breath figures“ bol použitý optický mikroskop značky NIKON Eclipse 50i. Bolo zvolené zväčšenie 4x a 10x, čo umožnilo pozorovanie štruktúr na plochách s veľkosťou niekoľkých mm.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

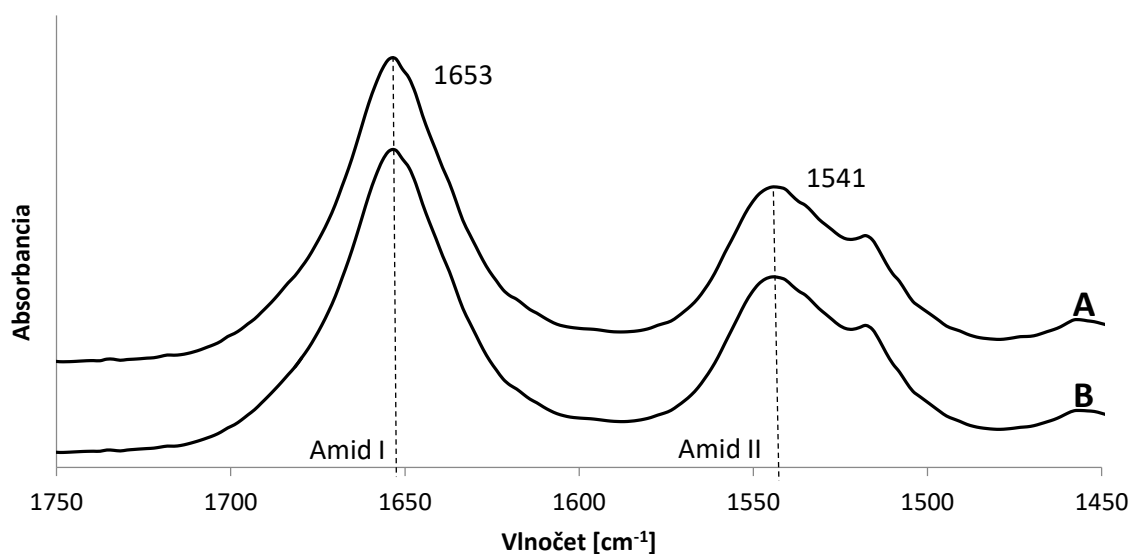
Experimentálna časť práce bola zameraná na testovanie viacerých postupov úpravy povrchovej topografie fibroínového filmu v stave Silk I, bez nutnosti predošlej stabilizácie parami metanolu. Základné pomery dobrého a zlého rozpúšťadla v modifikačnej zmesi boli zvolené na základe poznatkov z diplomovej práce K. Kocourkovej [47].

Typ sekundárnej štruktúry fibroínového filmu v závislosti od konkrétnej metódy modifikácie bol analyzovaný pomocou FTIR. Taktiež bola testovaná stabilita filmu vo vode a v atmosfére vzduchu.

Mikroskopické aj makroskopické zmeny povrchovej štruktúry boli charakterizované pomocou mikroskopie atomárnych síl (AFM), optického mikroskopu (OM) a skenovacieho elektrónového mikroskopu (SEM). Na zobrazenie profilov filmov a analýzu parametrov drsnosti bol využitý optický a mechanický profilometer.

5.1 Fibroínové filmy v stave Silk I

Po vysušení odliateho filmu z roztoku HFIP bola potvrdená jeho konformácia pomocou FTIR analýzy. Na obr. 12 je znázornená vybraná časť absorpčného spektra, v ktorej dochádza k posunom pri zmene konformácie fibroínu zo Silk I na Silk II. V páse Amid I je maximum v 1653 cm^{-1} a v páse Amid II v 1541 cm^{-1} . Z týchto výsledkov, ktoré boli porovnané s literatúrou [9], je zrejmé, že sekundárna štruktúra filmu sa nachádzala v amorfnom stave Silk I. Meranie bolo opakované po 6 dňoch, počas ktorých bol film vystavený vzdušnej vlhkosti. Absorpčné spektrum v oboch prípadoch vykazovalo rovnaké polohy maxím. Napriek stabilite fibroínového filmu v atmosférických podmienkach, boli filmy až do modifikácie skladované v exsikátore.



Obr. 12: FTIR absorpčné spektrum fibroínového filmu A) po dosušení B) po 6 dňoch vystavenia vzdušnej vlhkosti

5.2 Úprava povrchu filmu pomocou metódy časovo sekvenovanej fázovej separácie za rotácie

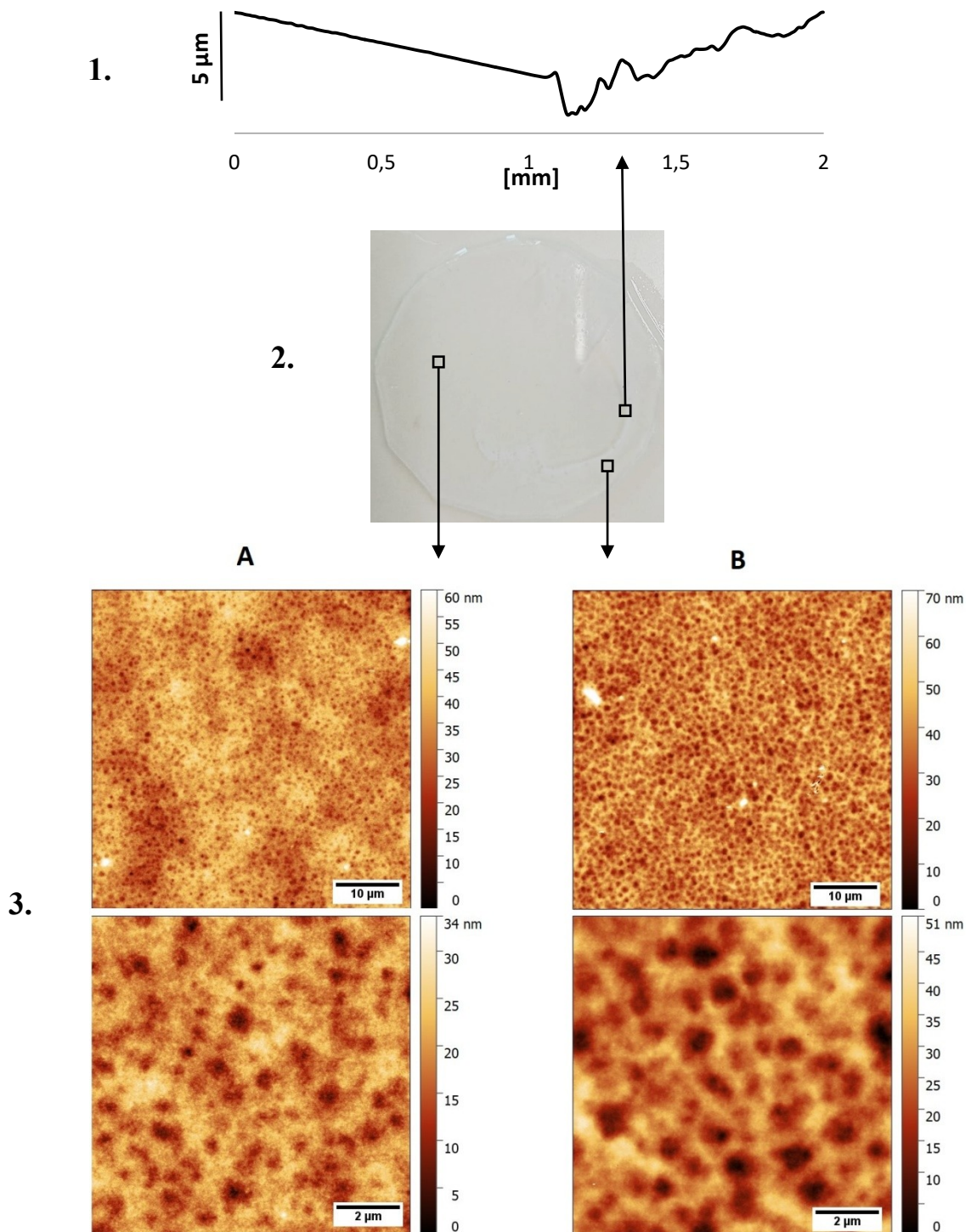
Prvou testovanou metódou modifikácie fibroínových filmov v stave Silk I bolo nanášanie zmesi dobrého a zlého rozpúšťadla za rotácie. Pomery HFIP, DMSO a vody zostávali v modifikačnej zmesi rovnaké a to 7:0,2:4. Menili sa procesné parametre ako rýchlosť rotácie, počet dávok, dávkovaný objem a interval medzi dávkami. V tab. 3 sú uvedené vybrané postupy modifikácie, ktoré podľa predchádzajúcich štúdií vedú ku vzniku poréznej štruktúry na fibroínových filmoch v stave Silk II [47] a v rámci tejto práce boli testované na fibroínových filmoch v stave Silk I.

Tab. 3: Procesné parametre vybraných postupov modifikácie fibroínových filmov pomocou fázovej separácie za rotácie

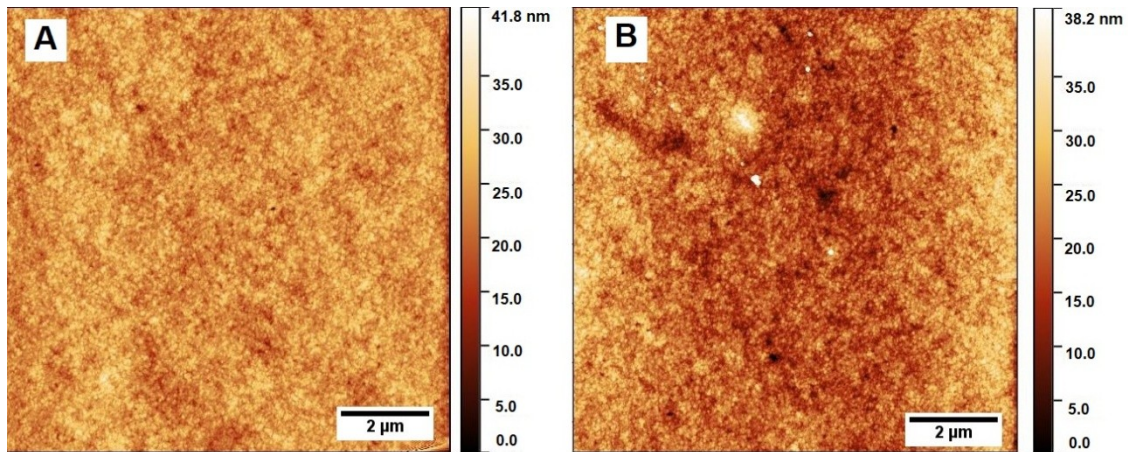
Postup	Otáčky/min	Počet dávok	Dávkovaný objem [μ l]	Interval medzi dávkami [s]
1	2400	10	200	5
2	1500	40	100	10
3	1500	10	100	10

Povrchová topografia upravených filmov bola pozorovaná pomocou AFM. Ako vidno na obr. 13 a obr. 14, touto metódou bolo ťažké dosiahnuť homogénnu poréznu štruktúru.

Vo väčšine prípadov dochádzalo k miernemu zdrsneniu povrchu na úrovni nanometrov. Nevýhodou metódy bolo taktiež čiastočné zlievanie filmu k okrajom Petriho misky počas rotácie, spôsobené rýchlou rozpustnosťou amorfného fibroínu v stave Silk I vo vode a v HFIP. Výsledkom bola nehomogenita povrchu filmu, pozorovateľná voľným okom.

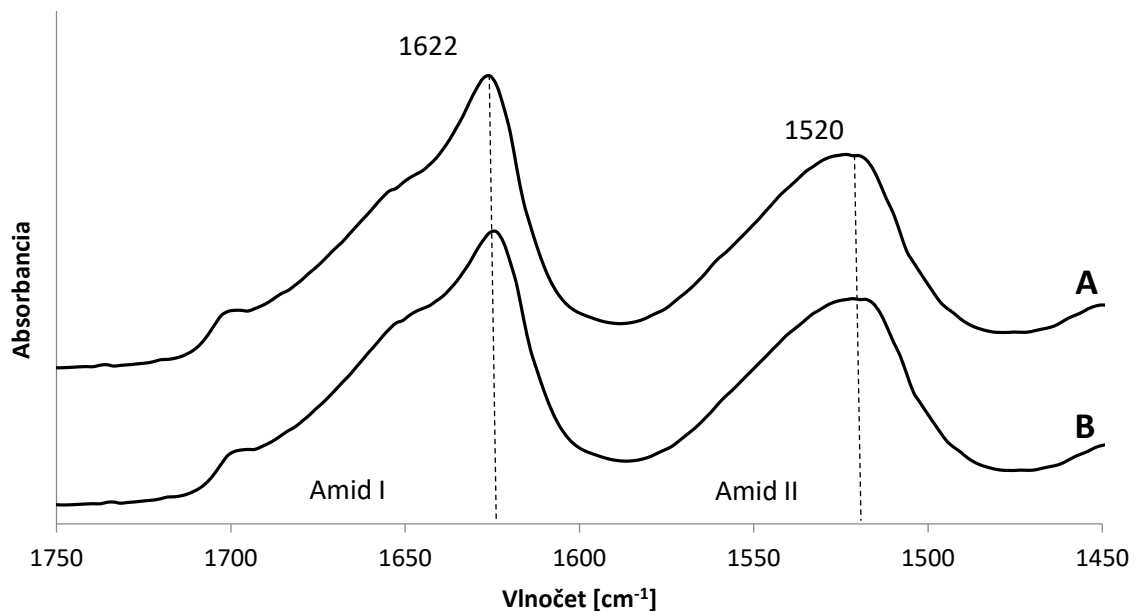


Obr. 13: Film modifikovaný postupom 3 z tab. 3, 1. zobrazenie čiastočného zmytia filmu na mechanickom profilometri, 2. fotka čiastočne zmytého filmu, 3. AFM zobrazenie A) miesta s čiastočne zmytým filmom B) miesta s prebytkom filmu



Obr. 14: AFM zobrazenie povrchov filmu zo stredu Petriho misky po modifikácii postupmi A) 1 a B) 2 uvedených v tab. 3

Miera pokrytia Petriho misky filmom bola študovaná na základe meraní FTIR spektier. Ako je vidno na obr. 15, zmytie filmu nebolo úplné, čo potvrdzuje prítomnosť fibroínu v strede misky. Posun maxím v oblasti Amid I na hodnotu 1622 cm^{-1} a v oblasti Amid II na 1520 cm^{-1} dokazuje, že metóda modifikácie za rotácie spôsobila transformáciu sekundárnej štruktúry filmu do stavu Silk II. Dôvodom bola prítomnosť vody v modifikačnej zmesi. Vzhľadom na tieto experimenty boli ďalšie modifikácie povrchu vykonávané staticky, aby sa predišlo zmývaniu filmu ku okrajom misky.



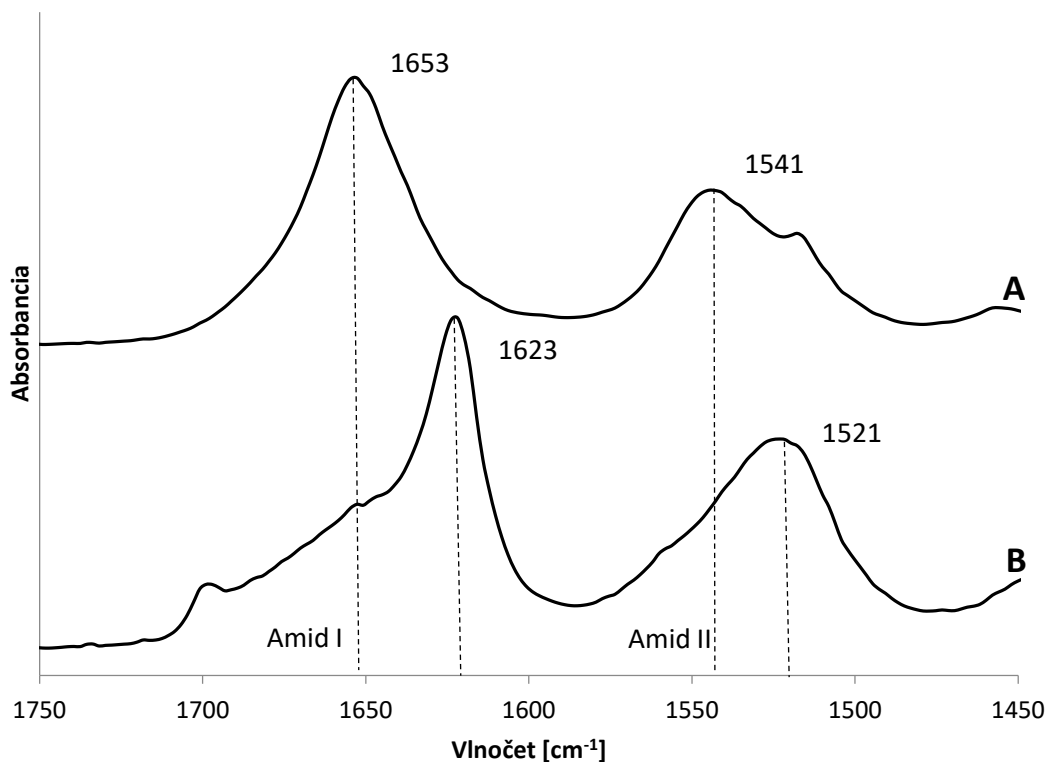
Obr. 15: FTIR absorpčné spektrum fibroínového filmu A) na okraji B) v strede, s čiastočným zmytím

5.3 Úprava povrchu filmu pomocou statickej modifikácie

Na základe predošlých pozorovaní vyplynulo, že fibrínové filmy v stave Silk I sú počas modifikácie za rotácie nestabilné. Preto bol zvolený prístup statickej modifikácie, povrchového liatia zmesi rozpúšťadiel. Modifikácia prebiehala nanášaním 450 μl zmesi dobrého a zlého rozpúšťadla v rôznych pomeroch na suchý film v stave Silk I. Odparovanie zmesi trvalo 24 hodín, počas ktorých boli filmy umiestnené v exsikátore v atmosfére dusíka a prikryté viečkom. Bol pozorovaný vplyv pomeru dobrého a zlého rozpúšťadla na výsledný charakter povrchovej úpravy. Použitá modifikačná zmes HFIP, DMSO a vody bola pripravená v týchto pomeroch (HFIP:DMSO:H₂O):

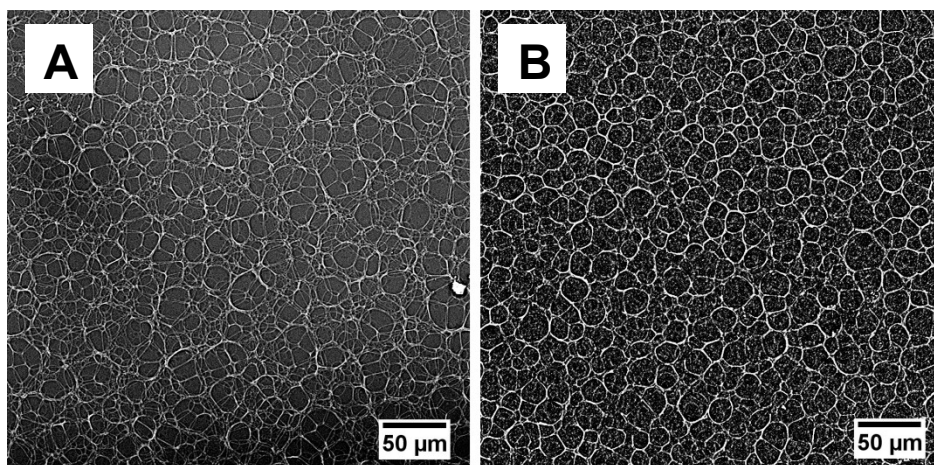
- 7:0,1:4,
- 7:0,2:4
- 7:0,4:4.

Po odparení zmesi bola skontrolovaná sekundárna štruktúra filmu. Z FTIR analýzy na obr. 16 vyplýva, že počas modifikácie došlo ku transformácii filmu do stavu Silk II, čo sa prejavilo ako posun maxima v oblasti Amid I z 1653 cm^{-1} na 1623 cm^{-1} a v oblasti Amid II z 1541 cm^{-1} na 1521 cm^{-1} . Zmenu sekundárnej štruktúry je možno vysvetliť prítomnosťou vody v modifikačnej zmesi. Výsledkom úpravy sú filmy v stave Silk II, aj keď pred modifikáciou nebola cielene indukovaná transformácia do tohto stavu pomocou metanolu ani vodnej pary, ako to je popísané v literárnych zdrojoch [7], ktoré sa venujú problematike úpravy povrchu fibroínových filmov.



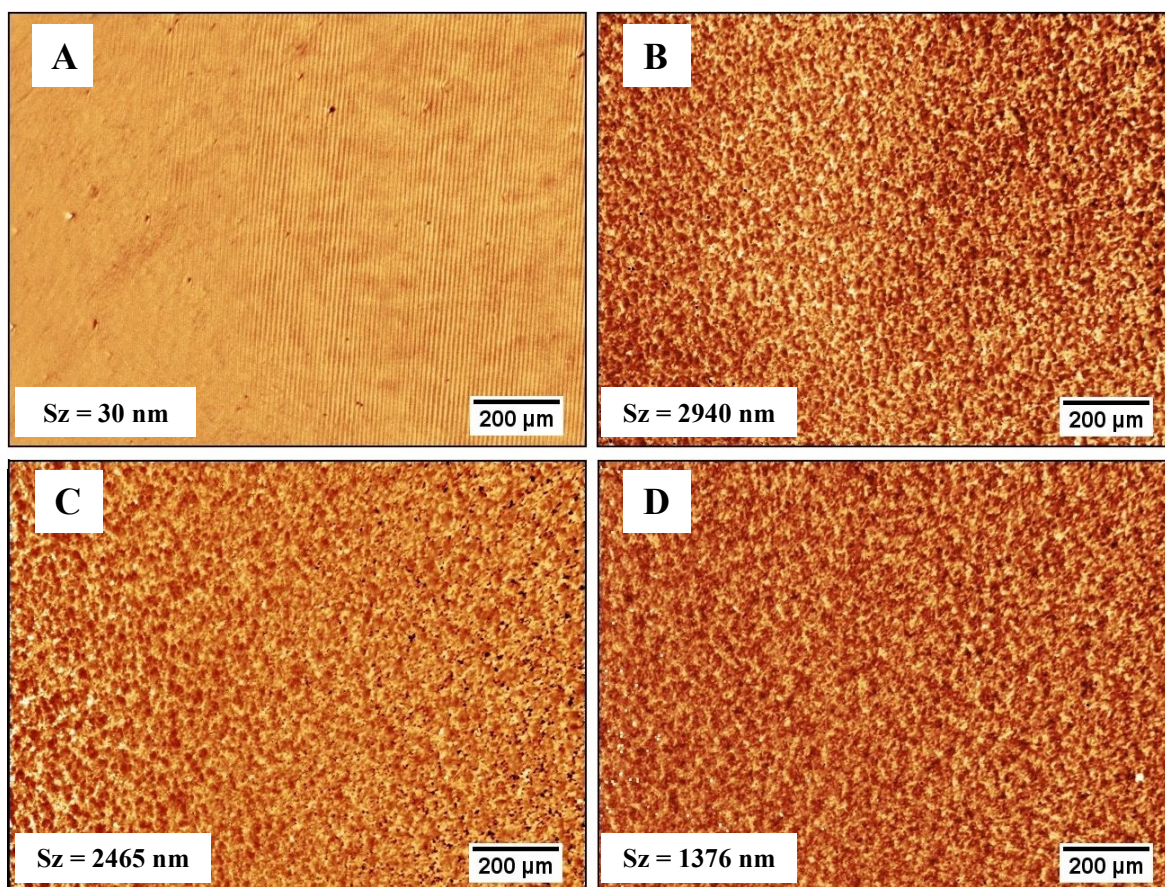
Obr. 16: FTIR absorpčné spektrum fibroínového filmu A) pred modifikáciou povrchovým liatím v stave Silk I B) po modifikácii povrchovým liatím v stave Silk II

Vybrané vzorky boli zobrazené pomocou SEM (obr. 17). Aj napriek pokovovaniu vzoriek pred zavedením do elektrónového mikroskopu, spôsoboval prúd elektrónov pri väčšom zväčšení degradáciu filmov a ich povrchovej textúry. Preto bolo možné filmy na SEM zobrazit' len pri malom zväčšení.

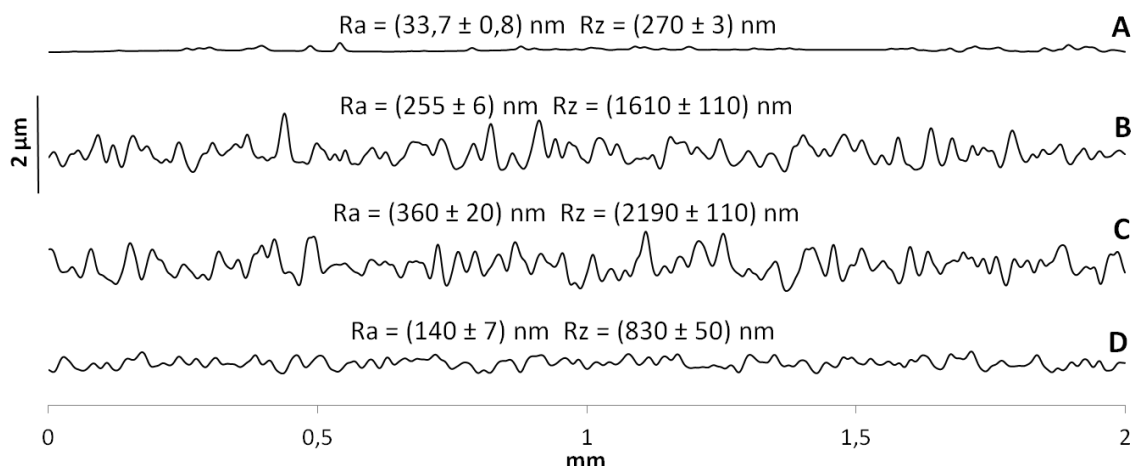


Obr. 17: SEM zobrazenie povrchu fibroínového filmu upraveného staticky modifikačnou zmesou, metódou povrchového liatia HFIP, DMSO a vody v pomere A) 7:0,1:4 B) 7:0,2:4

Zmeny povrchovej textúry boli taktiež vyhodnotené pomocou profilových rezov získaných z meraní na optickom a mechanickom profilometri a AFM (obr. 18, obr. 19, obr. 20, obr. 21). Dĺžka pozorovaných profilov na AFM bola 50 μm , na mechanickom profilometre 2 mm, preto sa môžu líšiť aj parametre drsnosti. Profilové rezy získané z AFM potvrdili, že stredná aritmetická odchylka profilu R_a , najväčšia výška profilu R_z aj priemerná drsnosť povrchu S_a a najväčšia výška plus hĺbka na meranom povrchu S_z začínajú klesať po prekročení medznej hodnoty obsahu DMSO v modifikačnej zmesi. Avšak, najvyššie hodnoty parametrov R_a a R_z podľa meraní na mechanickom profilometri dosahuje film modifikovaný zmesou HFIP, DMSO a vody v pomere 7:0,2:4. Modifikáciou pomocou zmesi v pomere 7:0,4:4 vzniká povrch s najnižšou texturizáciou a najnižšími parametrami drsnosti, čo potvrdilo vyhodnotenie všetkých profilových rezov.

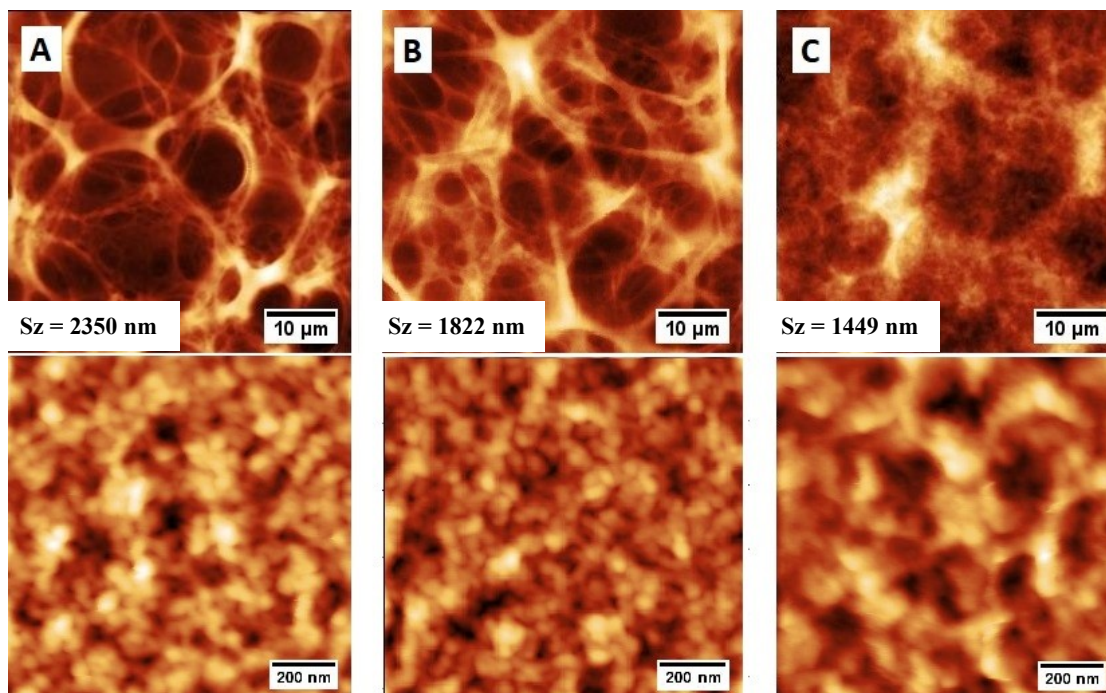


Obr. 18: Povrchová textúra filmov zobrazené na optickom profilometri A) film bez modifikácie povrchu B) film upravený modifikačnou zmesou HFIP, DMSO a vody v pomere 7:0,1:4 C) v pomere 7:0,2:4 D) v pomere 7:0,4:4. S_z vypovedá o maximálnom pozorovanom prevýšení.

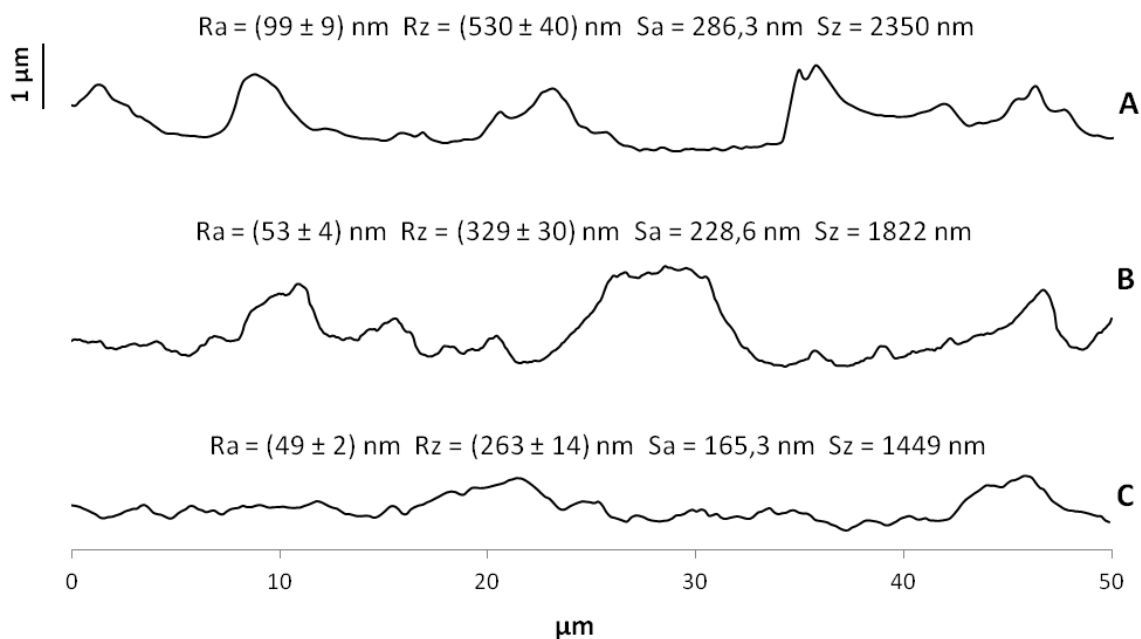


Obr. 19: Povrchová textúra filmov zobrazené na mechanickom profilometri A) film bez modifikácie povrchu B) film upravený modifikačnou zmesou HFIP, DMSO a vody v pomere 7:0,1:4 C) v pomere 7:0,2:4 D) v pomere 7:0,4:4

Z meraní na AFM je vidno, že statickou modifikáciou je možné generovať vzájomne prepojené póry, najmä pri nižšom obsahu DMSO v modifikačnej zmesi. Veľkosť pórov vzoriek A aj B je heterogénna a pohybuje sa od 5 do 30 μm . Pri najvyššom testovanom obsahu DMSO v zmesi dochádzalo ku zdrsneniu povrchu filmu, ale tvorba poréznej štruktúry nebola pozorovaná. Výrezy pod jednotlivými zobrazeniami ukazujú, že počas modifikácie došlo k zmenám povrchovej textúry aj na úrovni nanometrov.



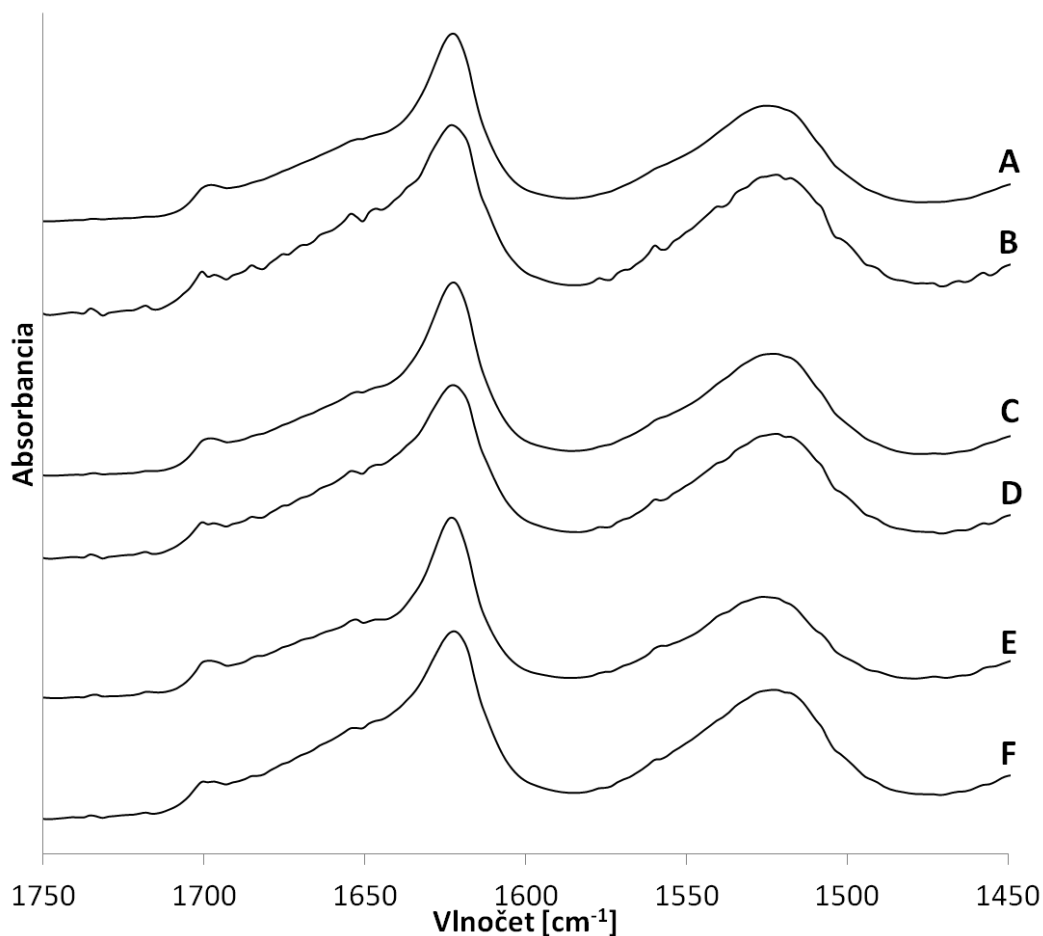
Obr. 20: AFM zobrazenie povrchu fibroinového filmu upraveného staticky modifikačnou zmesou HFIP, DMSO a vody v pomere A) 7:0,1:4 B) 7:0,2:4 C) 7:0,4:4. S_z vypovedá o maximálnom pozorovanom prevýšení.



Obr. 21: Povrchová textúra filmov zobrazená na AFM A) film upravený modifikačnou zmesou HFIP, DMSO a vody v pomere 7:0,1:4 B) v pomere 7:0,2:4 C) v pomere 7:0,4:4

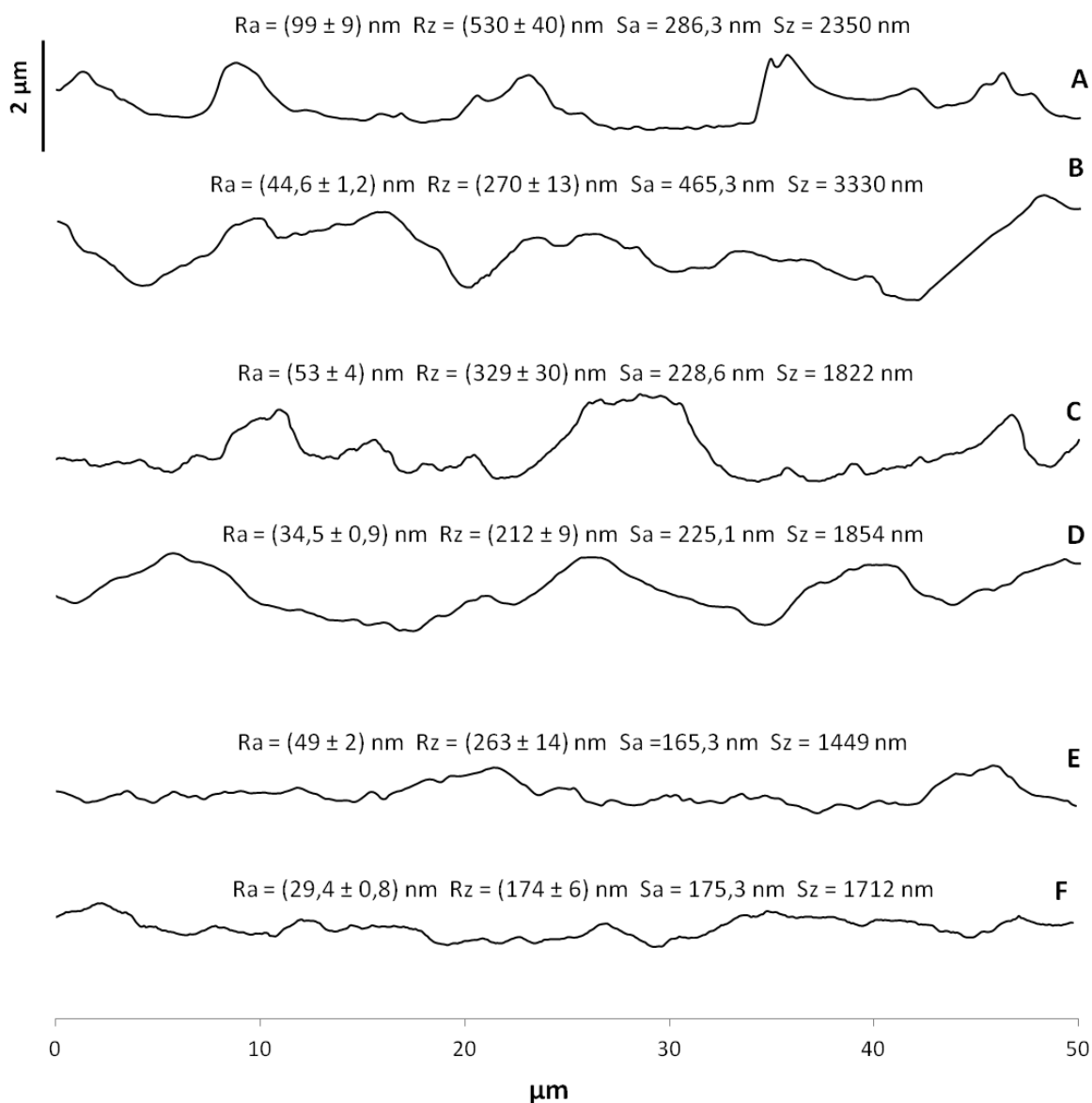
5.3.1 Stabilita filmov v stave Silk II vo vode

Modifikované fibroínové filmy boli na 24 hodín vystavené vodnému prostrediu s cieľom overiť ich stabilitu. Po vysušení boli filmy podrobené FTIR analýze, podľa ktorej nedochádza k ďalšej transformácii filmov vplyvom vody. Stabilitu je možné vysvetliť charakterom sekundárnej štruktúry Silk II, ktorá vznikla vďaka pôsobeniu modifikačnej zmesi a vyznačuje sa nerozpustnosťou vo vode. Maximá v oblasti Amid I zostali v rozsahu 1621 až 1623 cm^{-1} a v oblasti Amid II v rozsahu 1520 až 1521 cm^{-1} , čo odpovedá stavu Silk II. Na obr. 22 je porovnanie FTIR spektier filmov po statickej modifikácii a po následnom vystavení vodnému prostrediu.



Obr. 22: FTIR spektra filmu A) po statickej modifikácii zmesou HFIP, DMSO a vody v pomere 7:0,1:4 B) a po 24 hodinách v prostredí vody, C) po statickej modifikácii zmesou HFIP, DMSO a vody v pomere 7:0,2:4 D) a po 24 hodinách v prostredí vody, E) po statickej modifikácii zmesou HFIP, DMSO a vody v pomere 7:0,4:4 F) a po 24 hodinách v prostredí vody

Na obr. 23 sú porovnané profilové rezy z AFM meraní pred tým a po tom, ako boli modifikované filmy vystavené vodnému prostrediu. Z týchto meraní nemožno usudzovať zásadnejšie zmeny povrchového reliéfu. Hoci parametre Ra a Rz u vzoriek vystavených vodného prostredia klesajú, parametre Sa a Sz zostávajú nemenné. Pre jednoznačnejšie určenie vplyvu pôsobenia vodného prostredia bude potrebné vykonať väčšie množstvo experimentov a meraní. Z prvotných výsledkov vyplýva, že mikro-textúry pripravené metódou povrchového liatia sú vo vodnom prostredí stabilné, ako z hľadiska sekundárnej štruktúry, ako aj z pohľadu povrchových nerovností.



Obr. 23: AFM porovnanie povrchovej textúry A) film upravený modifikačnou zmesou v pomere 7:0,1:4 B) po ošetrení vodou C) film upravený modifikačnou zmesou v pomere 7:0,2:4 D) po ošetrení vodou E) film upravený modifikačnou zmesou v pomere 7:0,4:4 F) po ošetrení vodou

5.4 Úprava povrchu filmu pomocou metódy „Breath figures“

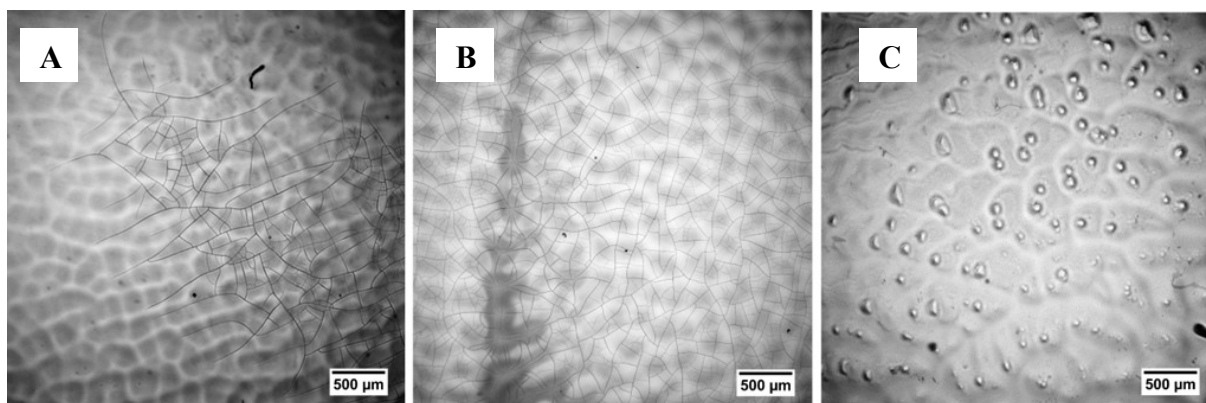
Cieľom modifikácie pomocou metódy „Breath figures“ bolo vytvorenie homogénnej poréznej štruktúry povrchu fibroínového filmu v stave Silk I. Procesné parametre, ktoré by viedli ku voštinovej štruktúre, charakteristickej pre túto metódu, doposiaľ neboli pre fibroínové filmy literárne popísané. Z tohto dôvodu boli zvolené rôzne kombinácie parametrov. Kľúčovými boli najmä množstvo a čas odparovania HFIP, počas ktorého dochádzalo k bobtnaniu filmu a čas v parách DMSO, ktorý mal vplyv na veľkosť

výsledných pórov. Odparovanie rozpúšťadiel prebiehalo v prostredí laboratórnej atmosféry alebo v exsikátore. Vybrané postupy modifikácie sú popísané v tab. 4.

Tab. 4: Procesné parametre vybraných postupov modifikácie fibroínových filmov pomocou „Breath figures“

Postup	Množstvo HFIP	Čas odparovania HFIP	Podmienky odparovania HFIP	Čas v parách DMSO	Dosušenie
1	450 μ l	5 min	v laboratórnej atmosfére, bez viečka	10 min	v laboratórnej atmosfére, s viečkom
2	500 μ l	10 min	v laboratórnej atmosfére, s viečkom	15 min	v laboratórnej atmosfére, s viečkom
3	500 μ l	10 + 5 min	v laboratórnej atmosfére, najskôr s viečkom, potom bez viečka	10 min	v laboratórnej atmosfére, s viečkom
4	500 μ l	5 min	v laboratórnej atmosfére, bez viečka	10 min	v laboratórnej atmosfére, s viečkom
5	450 μ l	5 min	v atmosfére N ₂ , bez viečka	10 min	v exsikátore, s viečkom
6	400 μ l	10 min	v atmosfére N ₂ , bez viečka	5 min	v exsikátore, s viečkom

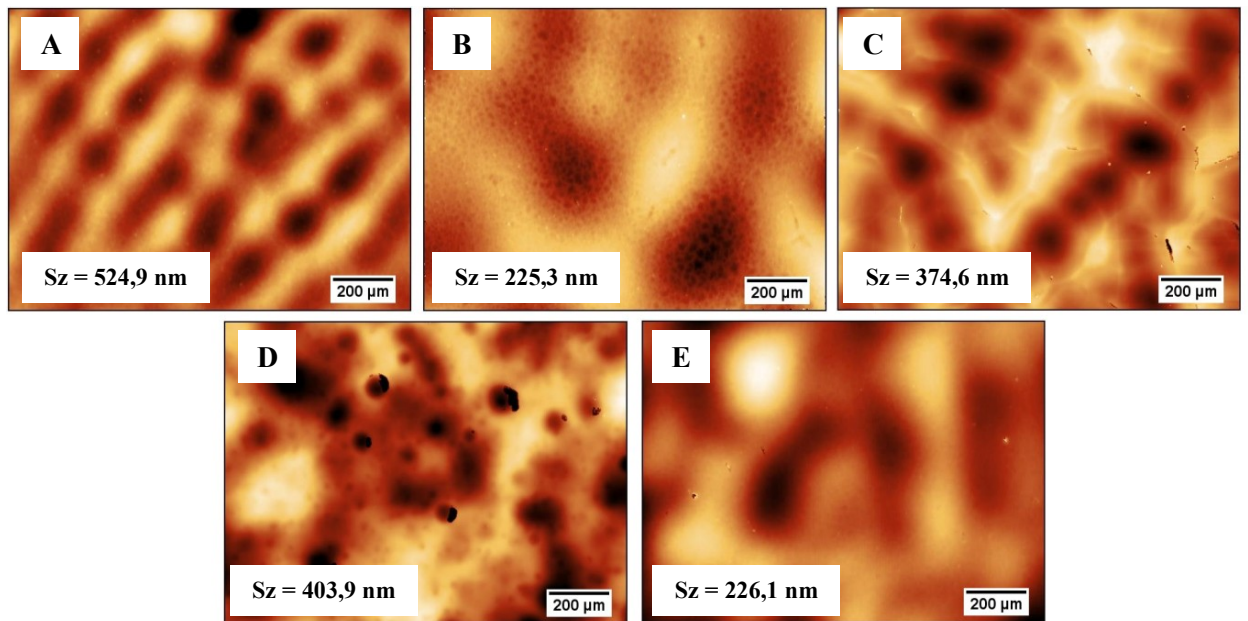
Povrchová topografia modifikovaných filmov na úrovni milimetrov až mikrometrov bola pozorovaná pomocou optického mikroskopu, (obr. 24). Okrem pórov a zvlnení sa na niektorých filmoch objavovali praskliny, ktoré mohli vzniknúť v dôsledku rýchleho odparenia dobrého rozpúšťadla z modifikovaného povrchu.



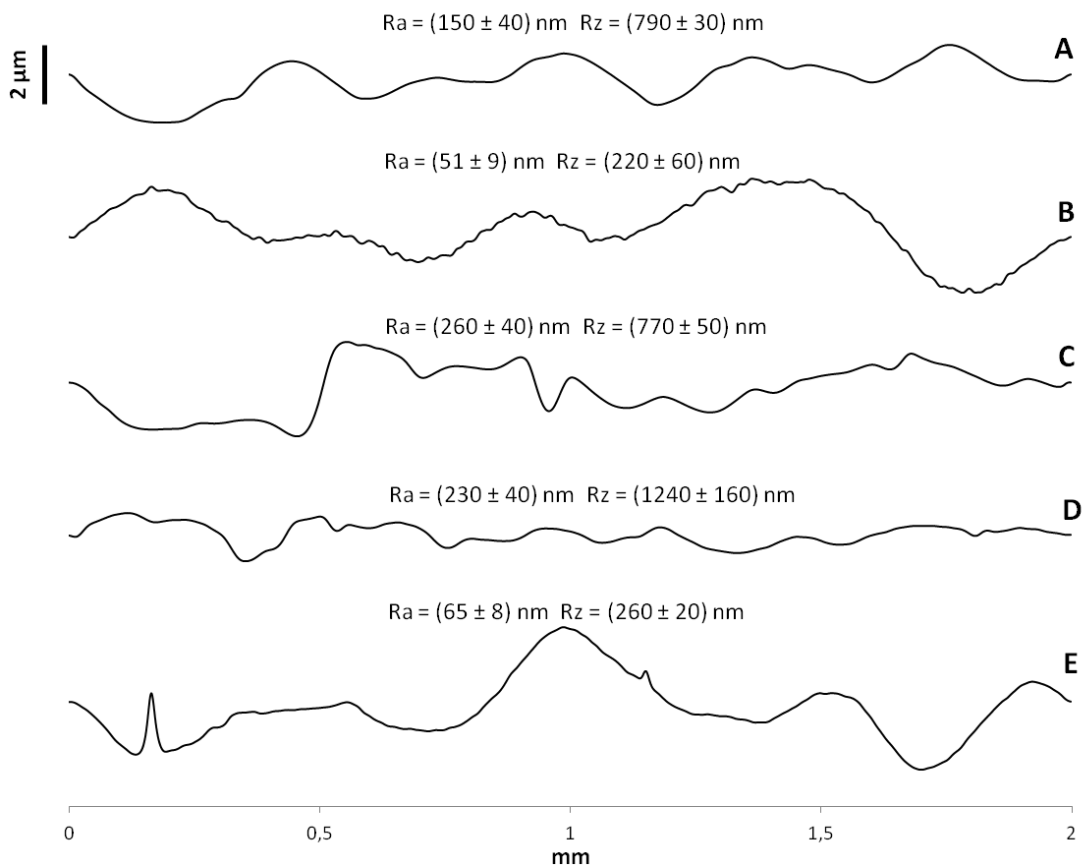
Obr. 24: Zobrazenie povrchu fibroínového filmu upraveného postupom A) 1 B) 3 C) 4 z tabuľky 4

Profilové rezy a následne parametre drsnosti Ra a Rz boli získané na základe meraní z optického a mechanického profilometra. Na obr. 25 je na niektorých vzorkách (B, D) pozorovateľná hierarchicky organizovaná textúra. Pozostáva z makro-priehlbín a zvrátení s veľkosťou stoviek mikrometrov (obr. 24), v ktorých sú uložené menšie póry

velké jednotky až desiatky mikrometrov (obr. 25, obr. 26) nasledované priehlbnami s veľkosťou v rádoch stoviek nanometrov (obr. 27).



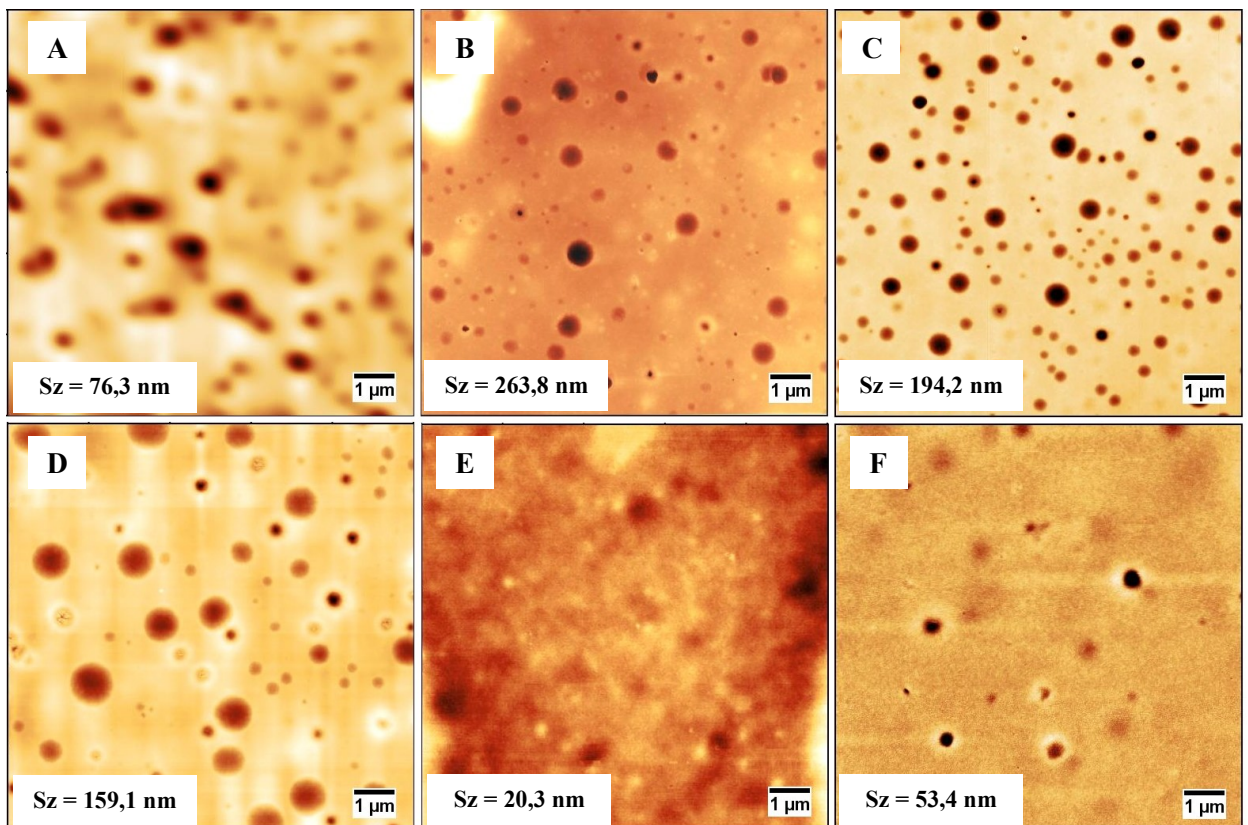
Obr. 25: Povrchová textúra filmov zobrazené na optickom profilometri A) film modifikovaný postupom 1 B) 2 C) 4 D) 5 E) 6 z tabuľky 4. Sz vypovedá o maximálnom pozorovanom prevýšení.



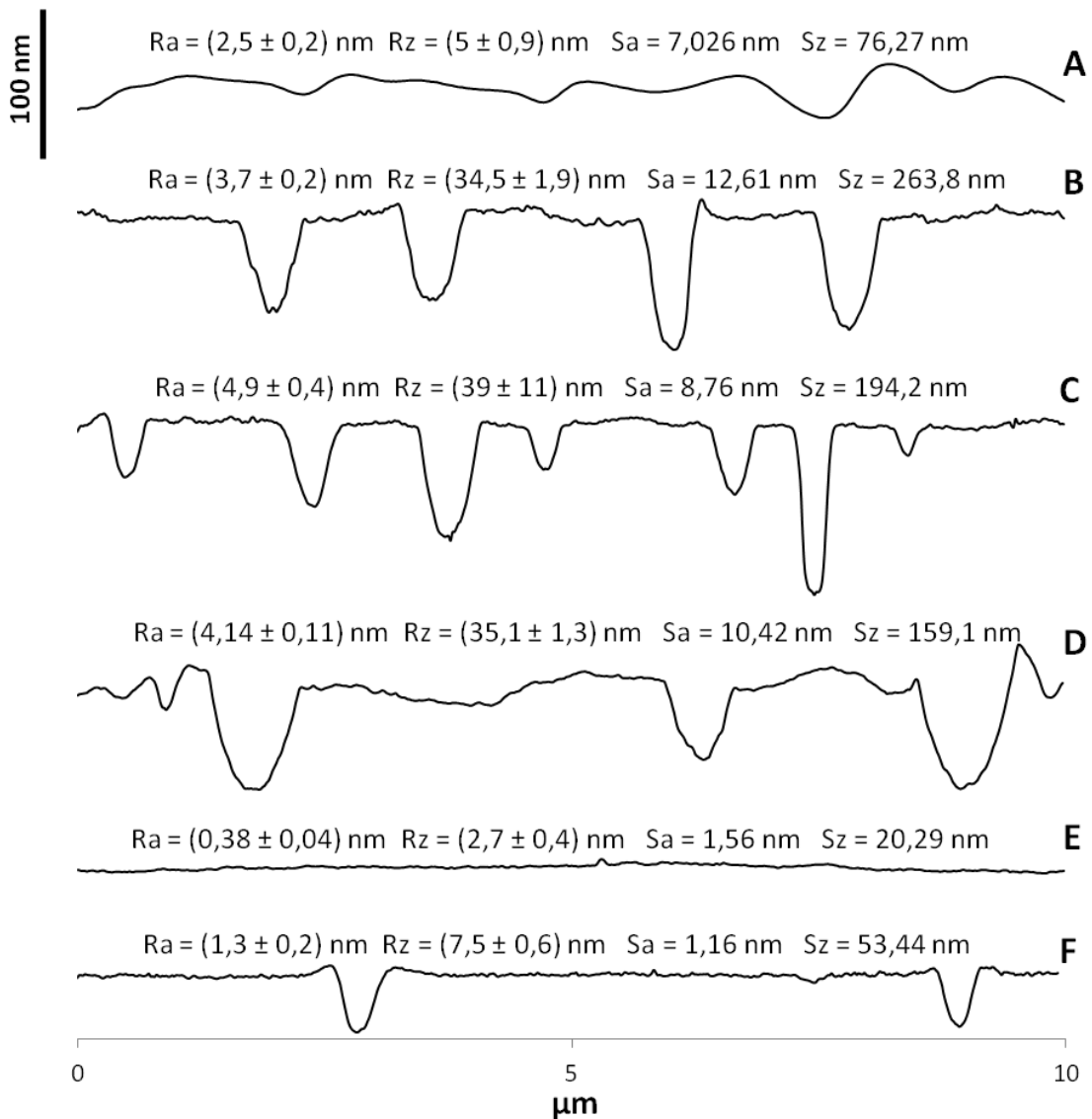
Obr. 26: Povrchová textúra filmov zobrazené na mechanickom profilometri A) film modifikovaný postupom 1 B) 2 C) 4 D) 5 E) 6 z tabuľky 4

Pomocou meraní na AFM bolo možné pozorovať špecifické povrchové zvrásnenia so šírkou a výškou v rádoch stoviek mikrometrov. Tieto submikronové priehlbné vnikajú na povrchu veľkých mikro a makro nerovností. Postupy 2, 3 a 4 z tabuľky 4, ktorých spoločným parametrom je nanosenie HFIP v množstve 500 μl , vedú ku tvorbe symetricky tvarovaných pórov formovaných kondenzáciou a oparením rozpúšťadla z povrchu filmu. Póry ale nevykazujú homogennu veľkosť ani praveďel'né usporiadanie.

Vzorky modifikované zvyšnými postupmi vykazujú nižšie pokrytie povrchu pórmí s nižšou symetriou a hĺbkou. Taktiež sa líšia nízkymi parametrami drsnosti, ako je možno vidieť na obr. 28.



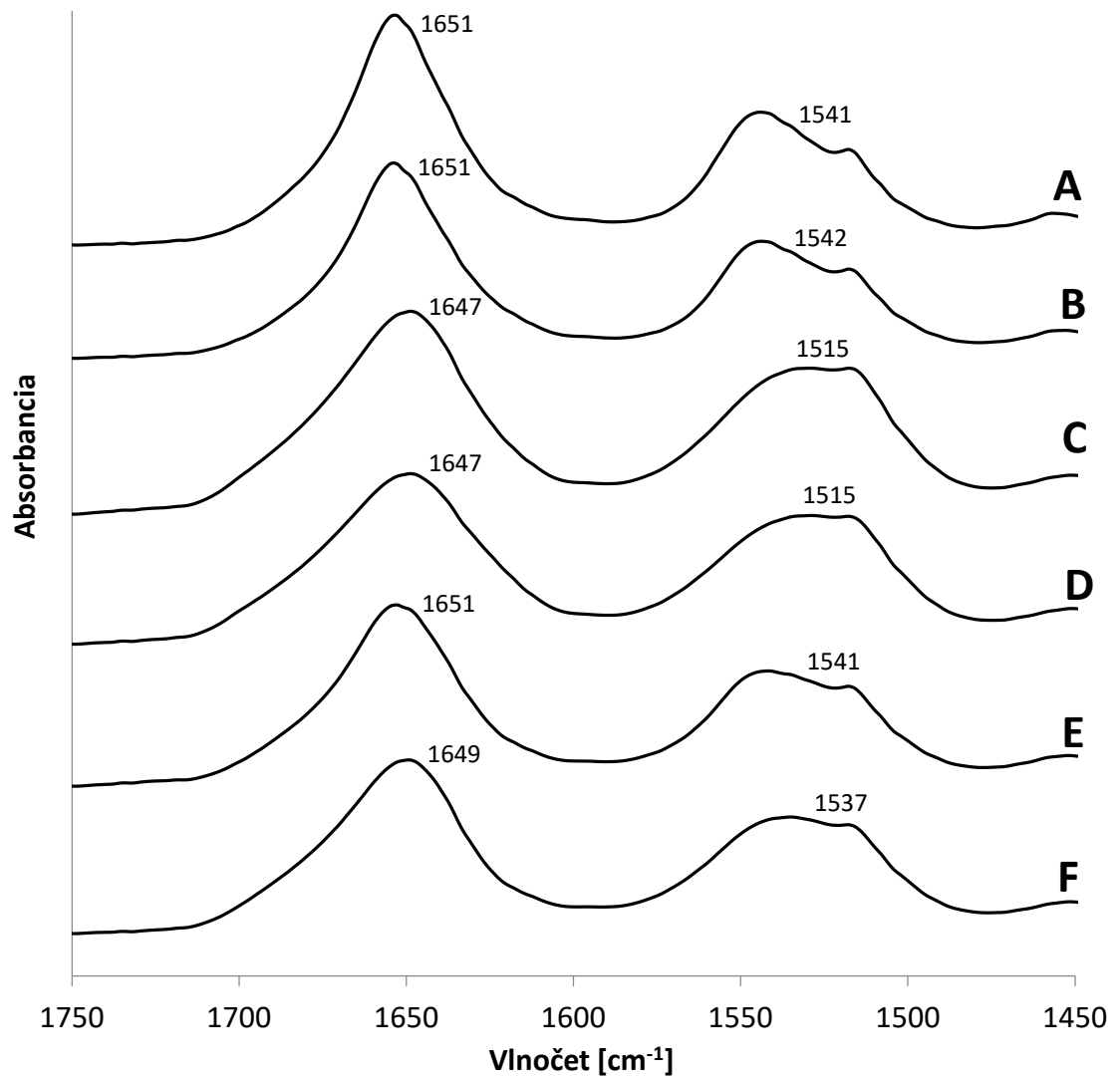
Obr. 27: AFM zobrazenie povrchu fibroínového filmu upraveného metódou „Breath figures“ postupom A) 1 B) 2 C) 3 D) 4 E) 5 F) 6 z tabuľky 4. Sz vypovedá o maximálnom pozorovanom prevýšení.



Obr. 28: AFM porovnanie povrchovej textúry filmu modifikovaného pomocou „Breath figures“ postupom A) 1 B) 2 C) 3 D) 4 E) 5 F) 6 z tabuľky 4

Na obr. 29 sú uvedené vybrané vzorky, ktoré boli po modifikácii podrobené FTIR analýze na porovnanie sekundárnej štruktúry s filmom v stave Silk I bez modifikácie (A). U filmov modifikovaných postupmi 1 (B), 5 (E) a 6 (F) sa v oblasti Amid I sa maximá pohybovali v rozsahu 1649 až 1651 cm^{-1} a v oblasti Amid II v rozsahu 1537 až 1541 cm^{-1} , čo odpovedá konformácií Silk I. U filmov, ktoré boli modifikované postupmi 2 (C) a 3 (D) z tabuľky 4 dochádzalo k čiastočnej transformácii sekundárnej konformácii. To sa prejavilo najmä posunom maxim v oblasti Amid II na 1515 cm^{-1} z 1541 cm^{-1} . Maximum v oblasti Amid II

bolo na hodnote 1647 cm^{-1} , čo predstavuje mierny posun oproti pôvodnému stavu, vplyvom zvýšenej vlhkosti vzduchu použitého pri sušení rozpúšťadiel.



Obr. 29: Porovnanie FTIR spektier filmu A) bez modifikácie B) modifikovaným postupom 1 C) 2 D) 4 E) 5 F) 6 z tabuľky 4

ZÁVER

V tejto práci boli študované možnosti texturizácie povrchu fibroínového filmu v amorfnom stave Silk I, ktorý sa vyznačuje rozpustnosťou vo vode a menšou stabilitou ako fibroín v stave Silk II. Tým sa výrazne zjednodušil postup prípravy filmu vynechaním stabilizácie v parách metanolu alebo vodou, ako bolo prezentované v diplomovej práci K. Kocourkovej [47].

Prvou experimentálne testovanou metódou modifikácie bola časovo sekvenovaná fázová separácia za rotácie vzorky. Modifikácia sa prejavila miernym zdrsnením povrchu filmu na úrovni nanometrov. V dôsledku rýchleho rozpúšťania fibroínu v stave Silk I pomocou HFIP a vody spolu s rotáciou vzorky dochádzalo k neželanému zmývaniu filmu k okrajom misky. Preto je tento postup modifikácie vhodnejší na úpravu fibroínu v stave Silk II, ako je uvedené v práci K. Kocourkovej [47].

Oproti tomu, statická modifikácia (povrchové liatie) vedie ku vzniku homogénnych povrchových nerovností cez plochu upravovaného fibroínového filmu. Ďalšou výhodou tejto metódy je jednoduchosť a nenáročnosť prevedenia, ktoré spočíva v jedнокrokovom nanosení modifikačného roztoku a následnom voľnom odparení použitých rozpúšťadiel. Výsledkom sú fibroínové filmy so vzájomne prepojenými pórmí, ktoré štruktúrou pripomínajú fibroínové scaffoldy. Bolo zistené, že pre prípravu takýchto „porous-like“ povrchov je nevyhnutné použitie limitného množstva DMSO. Aplikáciou modifikačnej zmesi s vyšším objemom DMSO (3,5 %) vzniká na povrchu špecifické zvrásnenie bez jasne ohraničených priehlbín. Porovnanie FTIR spektier dokazuje, že vplyvom statickej modifikácie dochádza k transformácii sekundárnej štruktúry fibroínu zo stavu Silk I do stavu Silk II, čo je dôsledok prítomnosti vody v modifikačnej zmesi. Testy stability takto modifikovaného filmu vo vode potvrdzujú, že transformácia je konečná a nedochádza k ďalším posunom, ako z hľadiska konformácie, tak povrchových nerovností.

Vďaka menšej stabilite fibroínu v stave Silk I voči HFIP a parám DMSO bolo možné vhodnými procesnými nastaveniami generovať symetricky tvarované póry pomocou metódy „Breath figures“. Z experimentov venovaných tejto problematike vyplynulo, že pomocou zvolených procesných podmienok nebolo možné vytvoriť rovnomerné pokrytie povrchu symetrickým vzorom, ako je popísané pre úpravu iných typov polymérov metódou "Breath figures" [44]. Na povrchu vznikalo zvrásnenie na niekoľkých úrovniach, tj. od stoviek nanometrov po stovky mikrometrov. V podstate bolo

dokázané, že pomocou metódy "Breath figures" možno priamo pripraviť textúrové povrchy na báze fibroínu. Modifikácia touto metódou nemá za následok úplnú transformáciu sekundárnej štruktúry do stavu Silk II, u väčšiny vzoriek je aj po úprave pozorovateľný stav Silk I, prípadne jeho čiastočná transformácia. Tento fakt je daný minimálnou prítomnosťou vody v priebehu zvoleného modifikačného prístupu.

ZOZNAM POUŽITEJ LITERATURY

1. MIAO, Menghe a John H. XIN, 2018. *Engineering of high-performance textiles*. Cambridge, MA, United States: Woodhead Publishing is an imprint of Elsevier, s. 28. Textile Institute book series. ISBN 978-0-08-101273-4.
2. VEPARI, Charu a David L. KAPLAN, 2007. Silk as a biomaterial. *Progress in Polymer Science*. **32**(8-9), 992-993. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.013. ISSN 00796700.
3. KOH, Leng-Duei et al., 2015. Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials. *Progress in Polymer Science*. **46**, 86-110. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2015.02.001. ISSN 00796700.
4. ZHOU, C.-Z., 2000. Fine organization of Bombyx mori fibroin heavy chain gene. *Nucleic Acids Research*. **28**(12), 2413-2419. DOI: 10.1093/nar/28.12.2413. ISSN 13624962.
5. WÖLTJE, M. a M. BÖBEL, 2017. Natural biodegradable medical polymers. *Science and Principles of Biodegradable and Bioresorbable Medical Polymers*. Elsevier, 333-339. DOI: 10.1016/B978-0-08-100372-5.00012-X. ISBN 9780081003725.
6. VOLKOV, Vadim, Ana V. FERREIRA a Artur CAVACO-PAULO, 2015. On the Routines of Wild-Type Silk Fibroin Processing Toward Silk-Inspired Materials: A Review. *Macromolecular Materials and Engineering*. **300**(12), 1199-1216. DOI: 10.1002/mame.201500179. ISSN 14387492.
7. CAO, Yang a Bochu WANG, 2009. Biodegradation of Silk Biomaterials. *International Journal of Molecular Sciences*. **10**(4), 1514-1524. DOI: 10.3390/ijms10041514. ISSN 1422-0067.
8. JIN, Hyoung-Joon et al., 2002. Electrospinning Bombyx mori Silk with Poly(ethylene oxide). *Biomacromolecules*. **3**(6), 1233-1239. DOI: 10.1021/bm025581u. ISSN 1525-7797.
9. LU, Qiang et al., 2011. Degradation Mechanism and Control of Silk Fibroin. *Biomacromolecules*. **12**(4), 1080-1086. DOI: 10.1021/bm101422j. ISSN 1525-7797.

10. FEI, B., 2018. High-performance fibers for textiles. *Engineering of High-Performance Textiles*. Elsevier, 28. DOI: 10.1016/B978-0-08-101273-4.00002-0. ISBN 9780081012734.
11. ALTMAN, Gregory H et al., 2003. Silk-based biomaterials. *Biomaterials*. **24**(3), 401-416. DOI: 10.1016/S0142-9612(02)00353-8. ISSN 01429612.
12. FABIANI, C. et al., 1996. Treatment of waste water from silk degumming processes for protein recovery and water reuse. *Desalination*. **105**(1-2), 1-9. DOI: 10.1016/0011-9164(96)00050-1. ISSN 00119164.
13. PANILAITIS, Bruce et al., 2003. Macrophage responses to silk. *Biomaterials*. **24**(18), 3079-3085. DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00158-3. ISSN 01429612.
14. PHILLIPS, David M. et al., 2004. Dissolution and Regeneration of Bombyx mori Silk Fibroin Using Ionic Liquids. *Journal of the American Chemical Society*. **126**(44), 14350-14351. DOI: 10.1021/ja046079f. ISSN 0002-7863.
15. KURIOKA, Akira, , Masayoshi YAMAZAKI a Hisashi HIRANO, 1999. Primary structure and possible functions of a trypsin inhibitor of Bombyx mori. *European Journal of Biochemistry*. **259**(1-2), 120-126. DOI: 10.1046/j.1432-1327.1999.00030.x. ISSN 00142956.
16. KOJTHUNG, Amornthep et al., 2008. *Effects of gamma radiation on biodegradation of Bombyx mori silk fibroin*. **62**(4), 487-490. DOI: 10.1016/j.ibiod.2007.12.012. ISSN 09648305.
17. THURBER, Amy E. et al., 2015. In vivo bioresponses to silk proteins. *Biomaterials*. **71**, 145-157. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.08.039. ISSN 01429612.
18. OLIVEIRA, A.L. et al., 2012. Aligned silk-based 3-D architectures for contact guidance in tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. **8**(4), 1530-1542. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.12.015. ISSN 17427061.
19. MAKAYA, Kumiko et al., 2009. Comparative study of silk fibroin porous scaffolds derived from salt/water and sucrose/hexafluoroisopropanol in cartilage formation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **108**(1), 68-75. DOI:10.1016/j.jbiosc.2009.02.015. ISSN 13891723.

20. NAZAROV, Rina, et al., 2004. Porous 3-D Scaffolds from Regenerated Silk Fibroin. *Biomacromolecules*. **5**(3), 718-726. DOI: 10.1021/bm034327e. ISSN 1525-7797.
21. MANIGLIO, Devid et al., 2018. Silk fibroin porous scaffolds by N₂O foaming. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. **29**(5), 491-506. DOI:10.1080/09205063.2018.1423811. ISSN 0920-5063.
22. CHENG, Gu et al., 2018. Advanced Silk Fibroin Biomaterials for Cartilage Regeneration. *ACS Biomaterials Science and Engineering*. **4**(8), 2704-2715. DOI:10.1021/acsbiomaterials.8b00150. ISSN 2373-9878.
23. ALTMAN, Andrew M. et al., 2009. IFATS Collection: Human Adipose-Derived Stem Cells Seeded on a Silk Fibroin-Chitosan Scaffold Enhance Wound Repair in a Murine Soft Tissue Injury Model. *Stem Cells*. **27**(1), 250-258. DOI: 10.1634/stemcells.2008-0178. ISSN 10665099.
24. BORKNER, Christian B., et al., 2014. *Coatings and Films Made of Silk Proteins*. **6**(18), 15611-15625. DOI: 10.1021/am5008479. ISSN 1944-8244.
25. JIN, H.-J. et al., 2005. Water-Stable Silk Films with Reduced β -Sheet Content. *Advanced Functional Materials*. **15**(8), 1241-1247. DOI:10.1002/adfm.200400405. ISSN 1616-301X.
26. LU, Qiang et al., 2010. Water-insoluble silk films with silk I structure. *Acta Biomaterialia*. **6**(4), 1380-1387. DOI: 10.1016/j.actbio.2009.10.041. ISSN 17427061.
27. WANG, Danyan, Haifeng LIU a Yubo FAN, 2017. Silk fibroin for vascular regeneration. *Microscopy Research and Technique*. **80**(3), 280-290. DOI:10.1002/jemt.22532. ISSN 1059910X.
28. KAWAHARA, Yutaka, Keiko a Takeshi YAMAMOTO, 2006. Self-Expansion Behavior of Silk Fibroin Film. *Macromolecular Materials and Engineering*. **291**(5), 458-462. DOI: 10.1002/mame.200500350. ISSN 1438-7492.
29. SRIVASTAVA, Chandra Mohan et al., 2015. Flexible silk fibroin films for wound dressing. *Fibers and Polymers*. **16**(5), 1020-1030. DOI: 10.1007/s12221-015-1020-y. ISSN 1229-9197.
30. FINK, Johannes Karl, 2017. *Additives for high performance applications: chemistry and applications*. 1. Hoboken, New Jersey: Wiley, s. 147-149. ISBN 9781119363613.

31. FAN, SuNa et al., 2019. Silk materials for medical, electronic and optical applications. *Science China Technological Sciences*. **62**(6), 903-918.
DOI:10.1007/s11431-018-9403-8. ISSN 1674-7321.
32. KIM, Ung-Jin et al., 2004. Structure and Properties of Silk Hydrogels. *Biomacromolecules*. **5**(3), 786-792. DOI: 10.1021/bm0345460.
ISSN 1525-7797.
33. AYUB, Zuglul Haider a Mitsuo ARAI, 2014. Mechanism of the Gelation of Fibroin Solution. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **57**(11), 1910-1912.
DOI:10.1271/bbb.57.1910. ISSN 0916-8451.
34. CHEN, Yu, 2019. *Hydrogels based on natural polymers*. 2. Waltham: Elsevier, 164.
ISBN 9780128164211.
35. CHAO, Pen-Hsiu Grace et al., 2010. Silk hydrogel for cartilage tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. **95B**(1), 84-90. DOI: 10.1002/jbm.b.31686. ISSN 15524973.
36. GUZIEWICZ, Nicholas et al., 2011. Lyophilized silk fibroin hydrogels for the sustained local delivery of therapeutic monoclonal antibodies. *Biomaterials*. **32**(10), 2642-2650. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.12.023. ISSN 01429612.
37. ZHANG, Jeney et al., 2012. Stabilization of vaccines and antibiotics in silk and eliminating the cold chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **109**(30), 11981-11986. DOI: 10.1073/pnas.1206210109. ISSN 0027-8424.
38. PARK, Sang-Hyug et al., 2011. Silk-Fibrin/Hyaluronic Acid Composite Gels for Nucleus Pulposus Tissue Regeneration. *Tissue Engineering Part A*. **17**(23-24), 2999-3009. DOI: 10.1089/ten.tea.2010.0747. ISSN 1937-3341.
39. TSIORIS, Konstantinos et al., 2011. Rapid Transfer-Based Micropatterning and Dry Etching of Silk Microstructures. *Advanced Materials*. **23**(17), 2015-2019.
DOI:10.1002/adma.201004771. ISSN 09359648.
40. GUPTA, Maneesh K. et al., 2007. Patterned Silk Films Cast from Ionic Liquid Solubilized Fibroin as Scaffolds for Cell Growth. *Langmuir*. **23**(3), 1315-1319.
DOI:10.1021/la062047p. ISSN 0743-7463.

41. XUE, Longjian, Jilin ZHANG a Yanchun HAN, 2012. Phase separation induced ordered patterns in thin polymer blend films. *Progress in Polymer Science*. **37**(4), 564-594. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2011.09.001. ISSN 00796700.
42. JIN, Hyoung-Joon et al., 2004. Biomaterial Films of Bombyx Mori Silk Fibroin with Poly(ethylene oxide). *Biomacromolecules*. **5**(3), 711-717. DOI: 10.1021/bm0343287. ISSN 1525-7797.
43. LAWRENCE, Brian D. et al., 2008. Processing methods to control silk fibroin film biomaterial features. *Journal of Materials Science*. **43**(21), 6967-6985. DOI:10.1007/s10853-008-2961-y. ISSN 0022-2461.
44. MUÑOZ-BONILLA, Alexandra et al., 2014. Towards hierarchically ordered functional porous polymeric surfaces prepared by the Breath Figures approach. *Progress in Polymer Science*. **39**(3), 510-554. DOI:10.1016/j.progpolymsci.2013.08.006. ISSN 00796700.
45. GALEOTTI, Francesco et al., 2012. Precise surface patterning of silk fibroin films by Breath Figures. *Soft Matter*. **8**(17). DOI: 10.1039/c2sm25089f. ISSN 1744-683X.
46. WRZECIONKO, Erik et al., 2017. *Variations of Polymer Porous Surface Structures via the Time-Sequenced Dosing of Mixed Solvents*. **9**(7), 6472-6481. DOI:10.1021/acsami.6b15774. ISSN 1944-8244.
47. KOCOURKOVÁ, Karolína, 2019. *Příprava strukturovaných biopolymerních povrchů a studium jejich interakce s buňkami*. Zlín. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická. Vedoucí práce Antonín Minařík.

ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

FTIR	Infračervená spektroskopia s Fourierovou transformáciou
AFM	Mikroskop atomárných síl
SEM	Skenovací elektrónový mikroskop
OM	Optický mikroskop
Fib-L	Ľahké reťazce hodvábného vlákna
Fib-H	Ťažké reťazce hodvábného vlákna
Gly	Glycín
Ala	Alanín
Ser	Serín
LiBr	Bromid lítny
Ca(NO ₃) ₂	Dusičnan vápenatý
CaCl ₂	Chlorid vápenatý
HFIP	Hexafluoroizopropanol
NMMO	N-metylmorfín N-oxid
PDMS	Polydimetylsiloxan
PEO	Polyetylén oxid
BF	Breath figures
THF	Tetrahydroxyfuran
ETH	Etoxyetanol
Na ₂ CO ₃	Uhličitan sodný
Ge	Germánium

ZOZNAM OBRÁZKOV

<i>Obr. 1: Znárodnenie štruktúry hodvábného vlákna [6]</i>	<i>12</i>
<i>Obr. 2: FTIR spektra hodvábného filmu A) v stave Silk I a B) v stave Silk II [9]</i>	<i>13</i>
<i>Obr. 3: Fibroínové vlákno A) pred a B) po procese degummingu [11]</i>	<i>14</i>
<i>Obr. 4: Príklady scaffoldov pripravených A) lyofilizáciou [18], B) lúhovaním granúl sacharózy v roztoku fibroínu [19], C) lúhovaním granúl soli v roztoku fibroínu [19], D) použitím hydrogenuhličitanu amónneho ako porogénu [20]</i>	<i>19</i>
<i>Obr. 5: Porovnanie A) prírodného fibroínového vlákna a B) nanovlákná pripraveného elektrostatickým zvlákňovaním z roztoku [27]</i>	<i>22</i>
<i>Obr. 6: Príklady texturizácie povrchov metódou patterning s použitím A) kremíkovej šablóny [39] a B) PDMS šablóny [40]</i>	<i>25</i>
<i>Obr. 7: Príklady texturizácie po fázovej separácii fibroínového roztoku a PEO A) pred stabilizáciou B) po stabilizácii metanolom C) po stabilizácii metanolom a extrakcii PEO [42] D) a E) po stabilizácii vodnou parou [43]</i>	<i>26</i>
<i>Obr. 8: Princíp metódy „Breath figures“ v jednotlivých krokoch [44]</i>	<i>27</i>
<i>Obr. 9: Vzorované fibroínové filmy pripravené transkripciou zo PDMS šablóny upravenej pomocou BF A) fibroínový film s mikro-pórmí B) s mikro-výstupkami [45]</i>	<i>28</i>
<i>Obr. 10: Schéma modifikácie povrchu polystyrénu metódou časovo sekvenovanej fázovej separácie za rotácie [46]</i>	<i>29</i>
<i>Obr. 11: Spin-coater na texturizáciu povrchu filmov metódou časovo sekvenovaného dávkovania rozpúšťadiel za rotácie [46]</i>	<i>33</i>
<i>Obr. 12: FTIR absorpčné spektrum fibroínového filmu A) po dosušení B) po 6 dňoch vystavenia vzdušnej vlhkosti</i>	<i>37</i>
<i>Obr. 13: Film modifikovaný postupom 3 z tab. 3, 1. zobrazenie čiastočného zmytia filmu na mechanickom profilometri, 2. fotka čiastočne zmytého filmu, 3. AFM zobrazenie A) miesta s čiastočne zmytým filmom B) miesta s prebytkom filmu</i>	<i>38</i>
<i>Obr. 14: AFM zobrazenie povrchov filmu zo stredu Petriho misky po modifikácii postupmi A) 1 a B) 2 uvedených v tab. 3</i>	<i>39</i>
<i>Obr. 15: FTIR absorpčné spektrum fibroínového filmu A) na okraji B) v strede, s čiastočným zmytím</i>	<i>39</i>
<i>Obr. 16: FTIR absorpčné spektrum fibroínového filmu A) pred modifikáciou povrchovým liatím v stave Silk I B) po modifikácii povrchovým liatím v stave Silk II</i>	<i>41</i>

- Obr. 17: SEM zobrazenie povrchu fibroinového filmu upraveného staticky modifikačnou zmesou, metódou povrchového liatia HFIP, DMSO a vody v pomere A) 7:0,1:4 B) 7:0,2:4 41
- Obr. 18: Povrchová textúra filmov zobrazené na optickom profilometri A) film bez modifikácie povrchu B) film upravený modifikačnou zmesou HFIP, DMSO a vody v pomere 7:0,1:4 C) v pomere 7:0,2:4 D) v pomere 7:0,4:4. Sz vypovedá o maximálnom pozorovanom prevýšení. 42
- Obr. 19: Povrchová textúra filmov zobrazené na mechanickom profilometri A) film bez modifikácie povrchu B) film upravený modifikačnou zmesou HFIP, DMSO a vody v pomere 7:0,1:4 C) v pomere 7:0,2:4 D) v pomere 7:0,4:4 43
- Obr. 20: AFM zobrazenie povrchu fibroinového filmu upraveného staticky modifikačnou zmesou HFIP, DMSO a vody v pomere A) 7:0,1:4 B) 7:0,2:4 C) 7:0,4:4. Sz vypovedá o maximálnom pozorovanom prevýšení..... 43
- Obr. 21: Povrchová textúra filmov zobrazená na AFM A) film upravený modifikačnou zmesou HFIP, DMSO a vody v pomere 7:0,1:4 B) v pomere 7:0,2:4 C) v pomere 7:0,4:4 44
- Obr. 22: FTIR spektra filmu A) po statickej modifikácii zmesou HFIP, DMSO a vody v pomere 7:0,1:4 B) a po 24 hodinách v prostredí vody, C) po statickej modifikácii zmesou HFIP, DMSO a vody v pomere 7:0,2:4 D) a po 24 hodinách v prostredí vody, E) po statickej modifikácii zmesou HFIP, DMSO a vody v pomere 7:0,4:4 F) a po 24 hodinách v prostredí vody 45
- Obr. 23: AFM porovnanie povrchovej textúry A) film upravený modifikačnou zmesou v pomere 7:0,1:4 B) po ošetroení vodou C) film upravený modifikačnou zmesou v pomere 7:0,2:4 D) po ošetroení vodou E) film upravený modifikačnou zmesou v pomere 7:0,4:4 F) po ošetroení vodou..... 46
- Obr. 24: Zobrazenie povrchu fibroinového filmu upraveného postupom A) 1 B) 3 C) 4 z tabuľky 4..... 47
- Obr. 25: Povrchová textúra filmov zobrazené na optickom profilometri A) film modifikovaný postupom 1 B) 2 C) 4 D) 5 E) 6 z tabuľky 4. Sz vypovedá o maximálnom pozorovanom prevýšení. 48
- Obr. 26: Povrchová textúra filmov zobrazené na mechanickom profilometri A) film modifikovaný postupom 1 B) 2 C) 4 D) 5 E) 6 z tabuľky 4 48
- Obr. 27: AFM zobrazenie povrchu fibroinového filmu upraveného metódou „Breath figures“ postupom A) 1 B) 2 C) 3 D) 4 E) 5 F) 6 z tabuľky 4. Sz vypovedá o maximálnom pozorovanom prevýšení. 49
- Obr. 28: AFM porovnanie povrchovej textúry filmu modifikovaného pomocou „Breath figures“ postupom A) 1 B) 2 C) 3 D) 4 E) 5 F) 6 z tabuľky 4..... 50
- Obr. 29: Porovnanie FTIR spektier filmu A) bez modifikácie B) modifikovaným postupom 1 C) 2 D) 4 E) 5 F) 6 z tabuľky 4 51

ZOZNAM TABULIEK

<i>Tab. 1: Porovnanie mechanických vlastností hodvábného proteínu Bombyx mori a ďalších prírodných materiálov. [5,10]</i>	13
<i>Tab. 2: Porovnanie mechanických vlastností vo vode nerozpustných fibroínových filmov [26]</i>	21
<i>Tab. 3: Procesné parametre vybraných postupov modifikácie fibroínových filmov pomocou fázovej separácie za rotácie</i>	37
<i>Tab. 4: Procesné parametre vybraných postupov modifikácie fibroínových filmov pomocou „Breath figures“</i>	47