



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Disertační práce

**Příprava a charakterizace hierarchicky
organizovaných funkčních polymerních vrstev a
porózních systémů**

**Preparation and characterization of hierarchically organized
functional polymer layers and porous systems**

| | |
|-------------------|--|
| Autor: | Ing. Erik Wrzeczionko |
| Studijní program: | P2808 Chemie a technologie materiálů |
| Studijní obor: | 2808V006 Technologie makromolekulárních látek |
| Školitel: | doc. Ing. Antonín Minařík, Ph.D. |
| Konzultant: | Ing. Petr Smolka, Ph.D. |
| Oponenti: | prof. RNDr. Petr Ponížil, Ph.D. doc. Dr. Ing. Vladimír Pavlínek |

Zlín, srpen 2021

© Erik Wrzeczionko

Klíčová slova: *polymer, povrch, sekvenované dávkování, rozpouštědla, rotace, fázová separace, póry, buňky*

Key words: *polymer, surface, time sequenced dosing, solution, rotation, phase separation, pores, cells*

Abstrakt

Práce se zabývá přípravou strukturovaných polymerních povrchů. Jsou zde popsány rozdílné přístupy vedoucí ke vzniku porézních systémů vyznačujících se odlišnou symetrií a velikostí povrchových struktur. Pozornost je věnována procesům fázové separace v systému polymer / směs dobrého a špatného rozpouštědla. Popsány jsou dosavadní poznatky a hypotézy vysvětlující vznik povrchových a objemových pórů. Formování povrchového reliéfu v nabotnalé polymerní vrstvě je diskutováno s ohledem na vliv povrchového napětí, Laplaceova tlaku, kapilárních sil, proudění, viskoelastické fázové separace, kvality rozpouštědel, rychlosti odpařování a kondenzace par.

Tyto poznatky jsou shrnuty v nově navrženém modelu, který popisuje formování povrchu polystyrenu v průběhu časově sekvenovaného dávkování směsi rozpouštědel. V rámci výsledků práce je podrobně popsána konstrukce dvou speciálních zařízení, které umožňují kontrolovat procesní parametry formování polymerního povrchu v průběhu časově sekvenované fázové separace za rotace. Kromě polystyrenu byla řešena problematika úpravy povrchů na bázi hyaluronanu a hedvábného fibroinu. Experimentální výsledky věnované povrchovým úpravám těchto materiálů prokázaly, že nově navržený proces fázové separace lze aplikovat na strukturně složitější makromolekulární systémy. Strukturované polystyrenové a fibroinové vrstvy byly použity pro studium buněčných interakcí s materiálovými povrchy. Bylo prokázáno, že strukturované povrchy efektivně simulují nativní prostředí pro kultivované buňky. Mimo to určité typy hierarchicky strukturovaných povrchů mohou iniciovat diferenciační proces u kmenových buněk.

Abstract

The works deals with the preparation of structured polymeric surfaces. Different approaches leading to the formation of porous systems characterized by different symmetry and size of surface structures are described here. Attention is paid to the phase separation processes in the system of polymer / mixture of good and poor solvent. Current knowledge and hypotheses explaining the formation of surface and volume pores are described. Surface relief formation in the swollen polymer layer is discussed with respect to surface tension, Laplace pressure, capillary forces, flow, viscoelastic phase separation, solvent quality, evaporation rate and vapor condensation.

These findings are then summarized in a newly proposed model describing the formation of polystyrene surface in the process of time sequenced dosing of

solvent mixture. Within the work, the construction of two original instruments is described in detail. These instrument allow to control the process parameters of polymer surface forming at time sequenced phase separation at rotation. Apart from polystyrene surfaces, also the surface treatment of hyaluronan and silk fibroin based materials was addressed. Experimental results related to these surfaces suggest that the newly proposed process of phase separation can also be applied to structurally complex macromolecular systems.

Structured polystyrene and fibroin layers were then utilized for the study of cells interactions with artificially prepared surfaces. It was proved that structured surfaces efficiently simulate native environment for the cultivated cells. Besides, some specific types of hierarchically structured surfaces can initiate stem cells differentiation process.

Obsah

| | |
|--|----|
| Abstrakt | 3 |
| Abstract | 3 |
| 1. Úvod | 7 |
| 2. Současný stav řešené problematiky | 8 |
| 3. Cíle disertační práce | 10 |
| 4. Teoretický rámec | 10 |
| 4.1 Mechanismus fázové separace vyvolané špatným rozpouštědlem | 11 |
| 4.1.1 Výběr rozpouštědel | 16 |
| 4.1.2 Výběr polymeru | 18 |
| 4.1.3 Vliv koncentrace polymeru | 18 |
| 4.1.4 Volba a složení směsi se špatným rozpouštědlem | 19 |
| 4.1.5 Vliv teploty | 19 |
| 4.2 Metoda Breath Figures | 20 |
| 4.2.1 Mechanismus vzniku Breath Figures | 20 |
| 4.2.2 Současné působení směsi dobrého a špatného rozpouštědla | 25 |
| 4.2.3 Způsoby přípravy honeycomb porézních systémů | 26 |
| 4.3 Hierarchicky organizované struktury | 28 |
| 5. Experimentální část | 32 |
| 5.1 Použité materiály | 32 |
| 5.1.1 Syntetický polymer – polystyren | 32 |
| 5.1.2 Polysacharidy – hyaluronan sodný | 32 |
| 5.1.3 Protein - <i>Bombyx mori</i> fibroin | 33 |
| 5.2 Postupy úpravy polymerních povrchů | 33 |
| 5.3 Použitá zařízení pro charakterizaci studovaných materiálů | 34 |
| 6. Výsledky a diskuze | 35 |
| 6.1 Konstrukce zařízení pro řízenou úpravu polymerních povrchů | 35 |
| 6.1.1 Zařízení pro automatické dávkování roztoků | 36 |
| 6.1.2 Mobilní zařízení pro manuální dávkování roztoků | 48 |
| 6.2 Fázově separační úprava polystyrenových substrátů | 51 |
| 6.2.1 Model popisující formování pórů na povrchu PS | 53 |
| 6.2.1 Vliv časového intervalu dávkování | 56 |
| 6.2.2 Vliv poměru složek v modifikačním roztoku | 60 |
| 6.2.3 Vliv počtu dávek | 64 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 6.2.4 | Vliv teploty nanášeného rozpouštědla na vývoj povrchového reliéfu | 66 |
| 6.2.5 | Vliv typu špatného rozpouštědla | 70 |
| 6.2.6 | Kondenzace špatného rozpouštědla na povrchu postupně nanášeného roztoku PS ... | 71 |
| 6.2.1 | Porézní a strukturované PS vrstvy – fázová inverze | 74 |
| 6.2.2 | Hierarchicky strukturované PS povrchy - postupná fázová separace | 77 |
| 6.2.3 | Hierarchicky strukturované PS povrchy – plazmatické úpravy | 79 |
| 6.2.4 | Vliv mikroporézniých PS povrchů na chování buněk..... | 82 |
| 6.2.5 | Vliv hierarchicky strukturovaných PS povrchů na chování buněk..... | 84 |
| 6.3 | Fázově separační úprava substrátů na bázi hyaluronanu | 89 |
| 6.1 | Fázově separační úprava substrátů na bázi fibroinu | 93 |
| 6.1.1 | Vliv strukturovaných fibroinových povrchů na chování buněk | 105 |
| 7. | Přínos práce pro vědu a praxi..... | 106 |
| 8. | Závěr | 107 |
| | Seznam použité literatury | 110 |
| | Seznam obrázků..... | 124 |
| | Seznam použitých symbolů a zkratk..... | 131 |
| | Publikační aktivity autora | 133 |
| | Odborný životopis autora..... | 136 |

1. Úvod

Příprava hierarchicky organizovaných povrchů je předmětem zájmu současného výzkumu v mnoha vědních oblastech [1, 2]. Specifické uspořádání materiálu na fázovém rozhraní a velký měrný povrch rozšiřuje aplikační potenciál běžných materiálů. Tyto nové typy materiálů nachází uplatnění zejména v pokročilých optických, elektronických a biotechnických aplikacích [3-5]. Slouží jako antireflexní vrstvy [6], optické pasti [7], samočistící povrchy [8-10], mikroreaktory [11-13], místa pro zachytávání buněk [14-16] a scaffoldy [17].

Je popsána celá řada postupů umožňujících tvorbu povrchových struktur, mikro a nano pórů [18]. Velikost a distribuce povrchových struktur hraje klíčovou roli v izolačních [19], katalytických [20], senzorických [21], filtračních [22] a podpůrných [23] procesech. Z hlediska velikosti povrchových nerovností lze mluvit o makro (nad 50 μm), meso (10 μm – 50 μm), mikro (0,1-10 μm) a nano (pod 100 nm) strukturách [24].

Specifickou povrchovou texturu lze generovat na kovech [25], keramikách [26], syntetických [27] a přírodních [28] polymerech. Mikro porézní keramiky se používají jako náhrady kostí a pro povrchové úpravy biologických implantátů. Jejich hlavní výhodou je vysoká korozivní odolnost a biokompatibilita [29]. Porézní materiály na bázi kovů mají problém s korozivní odolností. Oproti keramikám se jednodušeji zpracovávají a nejsou tak křehké [30]. Z hlediska formování povrchu polymerních materiálů je nezbytné rozlišovat, zda se jedná o syntetický nebo přírodní polymer. Syntetické polymery jsou odolnější vůči širokému spektru způsobů povrchových úprav. Jejich hlavní nevýhodou bývá horší biologická kompatibilita a rozložitelnost [31]. Přírodní polymery jako proteiny (kolagen) nebo polysacharidy (kyselina hyaluronová) se snadno biologicky odbourávají, ale oproti syntetickým polymerům se vyznačují horšími mechanickými vlastnostmi a termální stabilitou [32].

Tato práce se bude zaměřovat na poslední dvě zmiňované kategorie, syntetické a přírodní polymerní materiály, konkrétně polystyren, hedvábný protein a hyaluronan sodný.

Pro vytvoření specifické povrchové textury polymerních materiálů lze použít celou řadu přístupů. Tyto metody lze rozdělit na fyzikálně chemické a biologické. Podle způsobu vazby na povrch je lze dále dělit na kovalentně vázané nebo fyzikálně sorbované. Z kovalentních lze zmínit chemické a fyzikální napařování, radiační a fotochemické roubování, silanizaci, plazmatické úpravy, chemické vázání proteinů. Z nekovalentních to jsou povlaky tvořené odléváním, použitím povrchově aktivních aditiv, zachytávání proteinů a polysacharidů. Poslední

kategorií je úprava originálního povrchu bez nanášení krycí vrstvy materiálu. Takovéto modifikace lze provádět leptáním pomocí iontového svazku, laseru, plazmatického výboje, působením chemických látek, či mechanickým opracování povrchu [33-36]. Mimo to lze použít různé typy šablon, které budou definovat vzhled výsledného povrchu. Využívají se uspořádané soustavy koloidních částic, které vytvářejí inverzní opálové struktury, fázová inverze, samoorganizované povrchově aktivní látky, elektrickým polem indukované blokové kopolymery, foto nebo elektrochemicky polymerované prekurzory a další přímé litografické metody. Hlavní nevýhodou použití šablon je, že po jejich použití musí být odstraněny, nehledě na možnou zbytkovou kontaminaci povrchu. Alternativou je použití přímých zpracovatelských postupů jako je 3D tisk [37], elektro spinning [38] nebo materiálů, které se po zformování porézní struktury odpaří. Sem lze zařadit zpěňování polymeru pomocí plynu [39], vymrazování [40] a fázové separace [41] pomocí dobrých a špatných rozpouštědel. Poslednímu zmiňovanému přístupu, to znamená formování polymerních povrchů pomocí fázové separace, bude věnována tato disertační práce.

2. Současný stav řešené problematiky

Fázovou separaci můžeme pozorovat v procesech mokrého a suchého lití [42-45]. Rozeznáváme teplotně indukovanou fázovou separaci [46], separaci vyvolanou špatným rozpouštědlem [47], chemickou reakcí [48] nebo smykovým namáháním [49]. V této práci bude pozornost věnována fázové separaci odehrávající se v procesu mokrého lití, tj. separaci vyvolané přítomností špatného rozpouštědla v systému polymer/dobré rozpouštědlo. Existují dva základní přístupy. První je založen na depozici směsi dobrého a špatného rozpouštědla na povrch formovaného materiálu, mluvíme o tzv. přímé metodě „Breath Figures (BF)“ [50, 51]. Druhý je založen na kondenzaci par na povrchu nabotnalého nebo rozpuštěného polymerního systému, mluvíme o normální metodě „BF“ [52-54]. Rayleigh and Aitken popsali BF na začátku 20. století [55, 56]. Mechanismus vzniku pro jednoduché kapaliny byl nastíněn později Knoblerem a kol.[57], kteří objasnili základy tohoto procesu. Drahos a Delong publikovali v roce 1960 práci o formování děr na povrchu filmu při odpařování nitrocelulóзовého roztoku za vysoké vlhkosti [58]. V případě normální metody BF tvoří šablonu kapky špatného rozpouštědla kondenzující na povrchu polymeru, z něhož se odpařuje dobré rozpouštědlo. Špatné rozpouštědlo se plně odpaří až v konečné fázi formování povrchu, kdy je v systému minimum dobrého rozpouštědla [59].

Většina literárně popisovaných přístupů využívajících tuto metodu je založena na depozici roztoku polymeru na nosný substrát s následným formováním povrchu do konečné podoby pomocí kontroly kompozice polymeru [60], rozpouštědel [61], koncentrace polymeru [62], regulace tlaku [63], relativní vlhkosti [64], nosného substrátu [65], tloušťky deponovaného roztoku polymeru [63] a teploty [66]. V kombinaci s různými přístupy zpracování (casting, dipcoating, spincoating) lze touto metodou připravovat texturované filmy s rovnoměrnou tloušťkou a nízkou povrchovou drsností na relativně velké ploše.

V práci Fukuhiry a kol. [67] bylo zjištěno, že tvorbu samoorganizovaných polymerních filmů metodou BF lze řídit pomocí kontroly mezifázového napětí. To znamená, že klíčovým faktorem, vedoucím k tvorbě pravidelného povrchového vzoru metodou BF, je kontrola stability formujících se kapiček špatného rozpouštědla [68]. Stabilitu kondenzovaných kapiček špatného rozpouštědla na povrchu upravovaného polymeru lze zajistit přidáním povrchově aktivních látek, jako jsou například fosfolipidy nebo jiné povrchově aktivní látky. Mimo to bylo v práci Bolognesiho a kol. [2] zjištěno, že typ vznikajících struktur na polymerním materiálu je podmiňován množstvím polárních skupin v polymerním povrchu.

Inverzní přístup k metodě BF je popsán v práci Pericet-Camara a kol. [69]. V tomto případě jsou na povrch polystyrenu nanášeny kapičky ethylenglykolu nebo vody a následně je systém vystaven nasyceným parám toluenu. Prvotně vytvořené kapičky slouží jako maska bránící rozptýlení toluenových par a změkčení povrchu polystyrenu pod zformovanými kapičkami.

U polymerních systémů je nutno uvažovat rovněž viskoelastickou fázovou separaci, definovanou Tanakou [70], vliv povrchového napětí a z něho plynoucího Laplaceova tlaku formujících se kapek špatného rozpouštědla [71] a toků indukovaných rychle se odpařujícím rozpouštědlem a teplotními spády [72-78]. Práce Tanaky [79] poukazuje na důležitou skutečnost, že za přítomnosti viskoelastické fázové separace mohou vznikat dva hlavní typy struktur, síťové a buněčné. Znalost a porozumění viskoelastickým účinkům na separaci fází, spolu s ostatními proměnnými umožňuje produkci bohaté palety různých morfologií povrchů.

V případě úpravy systémů obsahujících speciálně navržené blokové kopolymery [80-83], nanočástice [80-83] nebo směsi více polymerů [84-86] lze připravit hierarchicky organizované mikro – nanoporézní povrchy.

Postupy umožňující formování povrchů na bázi syntetických polymerů (PS, PMMA, PLA, atd.) pomocí metody BF jsou již v literatuře popsány [87-89]. Nicméně postup umožňující formování povrchů na bázi hedvábných proteinů

a hyaluronanu sodného zcela chybí. Další zcela nepopsanou technikou je navrhovaný postup časově sekvenovaného nanášení malých dávek směsného roztoku na rotující povrchu upravovaného polymerního materiálu.

3. Cíle disertační práce

- Cílem této disertační práce je navrhnout a popsat originální postup přípravy mikro a nano porézních systémů na bázi syntetických a přírodních polymerů.
- Vyvinout jednoduchý, rychlý a vysoce reprodukovatelný postup umožňující přípravu širokého spektra porézních systémů na ploše v řádech jednotek až desítek centimetrů čtverečních.
- Pro tyto účely využít proces fázové separace, na jehož konci zůstane pouze hierarchicky organizovaný polymerní povrch bez dalších příměsí či kontaminace.
- Modelově popsat děj odehrávající se na povrchu polymerního materiálu při formování pórů metodou časově sekvenované fázové separace za rotace.
- Sestavit zařízení, které umožní kontrolovat a řídit procesní parametry tvorby porézních systémů.
- Prostudovat vliv takto připravených povrchů na chování buněk.

4. Teoretický rámec

Jevy fázových separací lze pozorovat u různých druhů látek zahrnujících kovy, polovodiče, supravodiče, polymery, emulze či biologické materiály.

K fázové separaci v polymerní směsi může docházet v důsledku rozdílných hnacích sil. Díky různým kombinacím polymeru lze poměrně snadnou cestou tvořit struktury s diametrálně odlišnými povrchovými vlastnostmi. Hnací silou procesu fázové separace v polymerních systémech je nízká entropie jejich směsí. Mechanismy fázové separace u binárních polymerních směsí byly rozsáhle studovány a jsou dobře popsány [90, 91] a to jak v případě fázové separace tenkých filmů, tak také v objemu. Na rozdíl od objemových fázových separací jsou ty, které probíhají v tenkých filmech výrazně ovlivněny povrchem substrátu a rovněž rozhraním vzduch-polymer.

Fázová separace u polymerních směsí může vytvářet různé povrchové morfologie s mikroskopickými až nanoskopickými útvary. Tyto útvary mohou vznikat jak

v horizontální, tak vertikální rovině. Typickými příklady takových struktur jsou bikontinuální struktury, ostrovy, díry nebo vrstvené struktury.

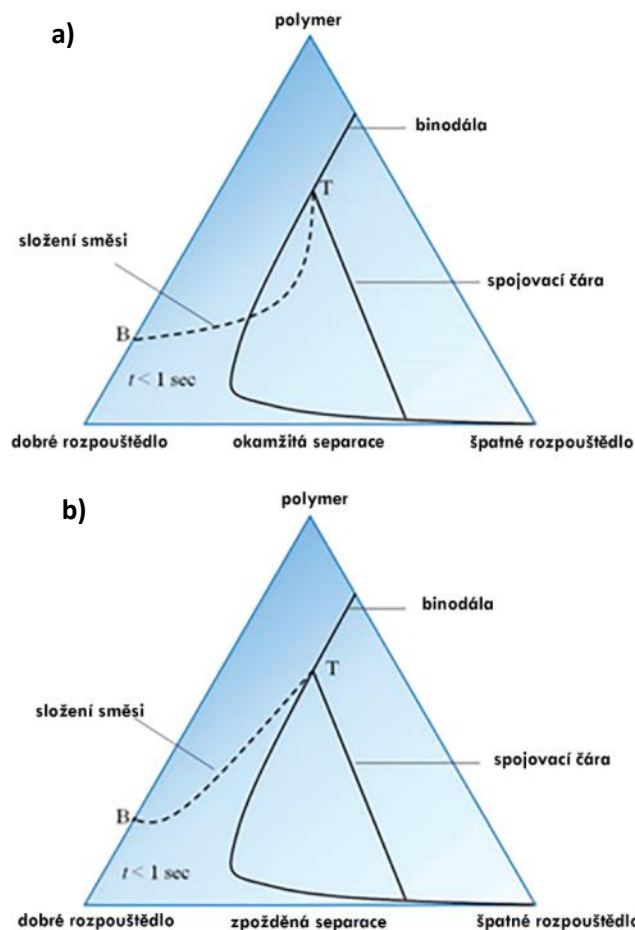
Tvar a konečná struktura povrchu po fázové separaci je charakterizována souhrou mnoha faktorů a působících procesů zahrnujících interakci mezi polymerem a substrátem, mezifázové napětí mezi jednotlivými polymery a povrchem, použitým rozpouštědlem pro formování tenkého filmu nebo samotný proces tvorby tenkých filmů. Kontrolou tvorby fázově separovaných struktur a jejich velikostí lze vytvářet polymerní filmy s požadovaným vzorem aplikovatelných při výrobě polovodičů na bázi polymerů, tvorbě antireflexních povlaků, porézních filmů nebo biočipů [92].

4.1 Mechanismus fázové separace vyvolané špatným rozpouštědlem

Jak bylo naznačeno výše, fázovou separaci lze vyvolat působením teploty, smykového namáhání, chemickou reakcí nebo působením rozpouštědel. Pro popis působení rozpouštědel použil Strathmann et al. terciární fázový diagram k vysvětlení termodynamických aspektů majících vliv na výslednou morfologii a vznik různých typů membrán [93]. Typický fázový diagram je uveden na Obr.1. V rozích trojúhelníku reprezentujícího tříložkový systém směsi jsou polymer, dobré rozpouštědlo a špatné rozpouštědlo. Jakýkoliv bod uvnitř tohoto trojúhelníku představuje směs o různých poměrech tohoto tříložkového systému. V první části jsou všechny komponenty neomezeně mísitelné, ovšem ve druhé části je systém pouze omezeně mísitelný a polymer se v něm sráží. Hranice mezi těmito dvěma stavy se označuje jako binodální křivka. Úsečka spojující body této binodály, které jsou spolu v rovnováze se označuje jako konoda, případně méně správným označením spojovací přímka. K určení bodů vypracovali Wijmans et al. dvě metody pro sestavení této binodální křivky zahrnující přímou a turbidimetrickou titrací [41].

Použitím tohoto ternárního fázového diagramu může být vyjádřena kompozice polymerního filmu v určitém konkrétním čase [94]. Z obrázku 1a (bod B-T) lze vidět, že při $t < 1$ s dráha složení překročí binodální linii, což znamená, že mísení začíná bezprostředně po ponoření odlévané polymerní vrstvy do srážecí lázně.

Obrázek 1b bod (B-T) ukazuje, že všechny kompozice přímo pod vrchní vrstvou zůstávají v jednofázové oblasti a jsou ještě mísitelné, což znamená, že bezprostředně po ponoření nedojde k žádnému míchání. Po delším časovém intervalu budou kompozice pod horní vrstvou překročeny a v tom případě dojde k fázové separaci.

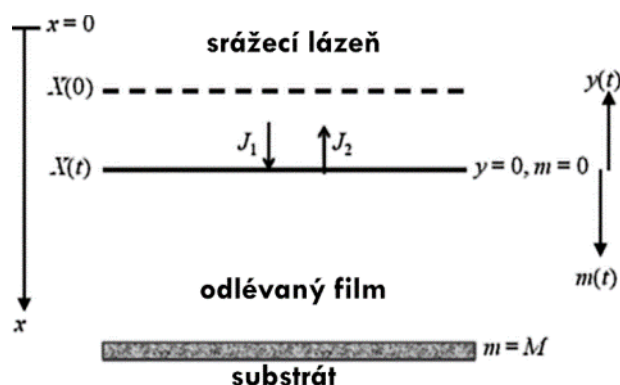


Obrázek 1 - Složení odlévaného filmu bezprostředně po ponoření do srážecí lázně ($t < 1$ s) ukazuje a) okamžité smíchání, b) opožděné smíchání, T a B představuje horní a dolní část odlévaného filmu.[94]

Z uvedeného plyne, že lze rozlišit dva výrazně odlišné separační procesy vyznačující se rozdílnou výslednou morfologií povrchu [94, 95]. Strathmann a kol. pozorovali tyto dvě zásadně odlišné struktury v závislosti na rychlosti srážení polymeru indukovaného přítomností špatného rozpouštědla [96]. Rychlost srážení se měří jako čas mezi ponořením odlévacího roztoku do srážecí lázně a času kdy se tento roztok umístěný na skleněný substrát srazí, tedy zbělá, nebo když se oddělí od substrátu. Výzkum Strathmanna a kol. ukázal, že při pomalém srážení vznikají povrchy s houbovitými morfologiemi. Naproti tomu při rychlém srážení vznikaly na povrchu struktury s velkými makrodutinami.

Model přenosu hmoty pro počáteční stádium fázové separace byl vyvinut Cohenem a kol. [97]. Vytvořili model pro difúzně řízenou tvorbu porézních struktur získanou pomocí fázové separace vyvolané přítomností špatného rozpouštědla. Předpokládali, že při fázové separaci vzniká trojrozměrná struktura tvořená dvěma rozptýlenými rovnovážnými fázemi. Tato dvoufázová struktura se

poté rozšíří na všechny kompozice pod binodálou. Předpokládali, že difúzní koeficienty dobrého a špatného rozpouštědla jsou stejné, takže pohlíželi na tok dobrého a špatného rozpouštědla jako na jednorozměrný difúzní proces, jak je ukázáno na Obr. 2. V čase t se rozvíjí propagační difúzní vrstva ohraničená na jedné straně špatným rozpouštědlem a na straně druhé výchozím roztokem. Při jejich difúzním modelu také potvrdili možnost nestabilní kompozice v roztoku polymeru při výměně dobrého a špatného rozpouštědla.



Obrázek 2 - Tok dobrého a špatného rozpouštědla zobrazený jako jednorozměrný difúzní proces.[98, 99]

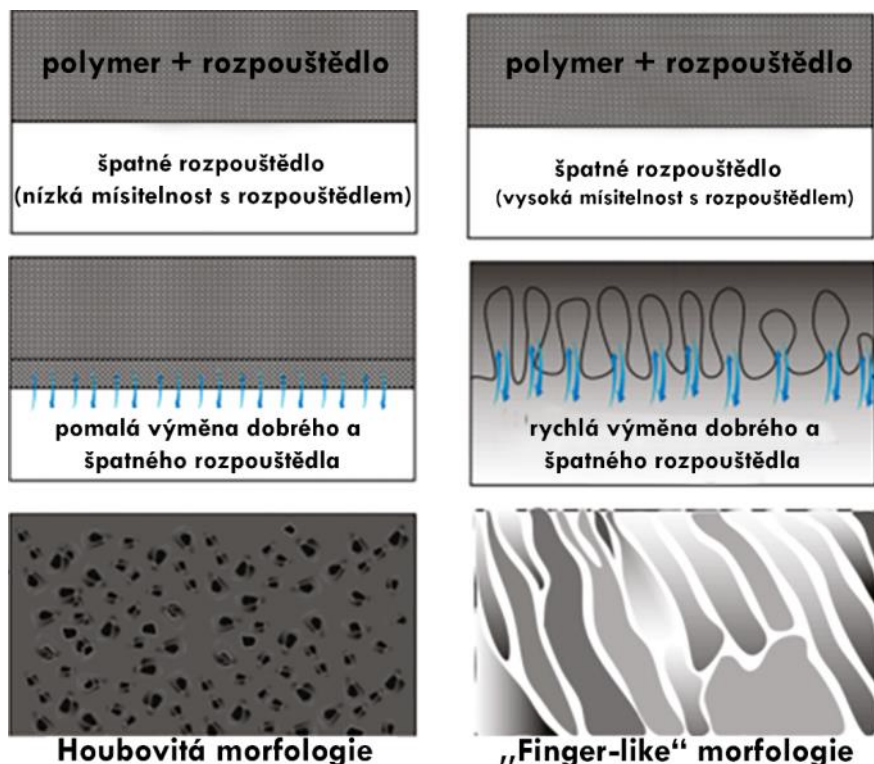
V návaznosti na práci Cohena, Reuverse a kol. [97], Tsaye a kol. [100], Radovanovic a kol. [99] predikovali možnosti srážení. Model popsany Radovanovicem a kol. [99] byl často používán k popisu fenoménů přenosu hmoty, ke kterému dochází během ponoření.

Difúzní model vysvětluje dva typy oddělování, které probíhají během procesu fázové separace a byly použity k předpovědi rozsahu počátečního složení odlévaného filmu. Pro výpočet kritických počátečních kompozic, u kterých se oddělování mění z okamžitého na zpožděné, musí být vyřešena difúzní rovnice pro film a pro lázeň.

Jestliže se složení směsi dotýká nebo překročí binodální čáru na Obr.1a, dojde k okamžité separaci polymeru a tvorbě pevného filmu. Tento typ vysrážení tvoří vysoce porézní substrukturu (s „prstovitými“ makropóry) a jemně porézní tenké vrstvy.

Pokud se profil kompozice nedotýká binodální čáry, Obr.1b, okamžitá separace je zpožděna, dochází k pomalému srážení a formování morfologie povrchu trvá

mnohem déle. Vznikají struktury s poměrně hustou horní vrstvou a houbovitou podkladovou konstrukcí. Struktury těchto dvou typů membrán jsou znázorněny na Obr. 3



Obrázek 3 - Různé morfologie povrchu způsobené různými typy separace. [101]

Asymetrické membrány se skládají z tenké horní vrstvy nesené pórovitou podvrstvou, která často obsahuje velké prázdné prostory nebo makro dutiny.

Tyto makro dutiny mohou vykazovat různé morfologie v závislosti na kinetice fázové separace a termodynamice. Makro dutiny mohou způsobit zhutnění nebo kolaps membrán a omezit tak použití v procesech s vysokým tlakem, jako je reverzní osmóza. Na druhou stranu makroskopická struktura je vhodná pro ultrafiltrační procesy a může být použita jako podpůrná vrstva pro kompozitní membrány [95].

Bylo navrženo několik mechanismů k popisu formace makro pórů. Matz [102], Frommer a Lancet [103] naznačili ve své práci, že za iniciaci makro pórů je zodpovědná mezifázová hydrodynamická nestabilita řízená gradientem povrchového napětí. Stratham a kol. zmínili, že úroveň makrostruktury je určena

rychlostí srážení [96]. Studie od Booma [104] a kol. a Smolderse a kol. [95] rovněž ukázala, že tvorba makro pórů při fázové separaci pramení z čerstvě vytvořených jader zředěné fáze, kdy složení před jádrem zůstává po relativně dlouhou dobu stabilní.

Difúze rozpouštědla vyloučeného z okolního polymerního roztoku způsobuje makroskopický růst. Makropóry se obecně vytváří v systémech, kde dochází k okamžitému smíchání, vyjma případů, kdy koncentrace polymerních aditiv a koncentrace špatného rozpouštědla v roztoku polymeru překračuje určitou minimální hodnotu [95, 104, 105]. Proto složení roztoku polymeru v blízkosti binodální čáry podporuje tvorbu houbovitých struktur.

Cohen a kol. [97] byli první, kteří vypočítali dráhu difúze pomocí ternárního fázového diagramu, který byl později vylepšen mnoha výzkumnými skupinami pro studium mechanismů tvorby membrán [98, 100, 106, 107].

Podle vypočítané dráhy difúze může okamžitá separace kapalina-kapalina zahájit tvorbu makro pórů. Rovněž bylo zjištěno, že mísitelnost mezi rozpouštědlem a koagulantem hraje důležitou roli při určování, zda dojde k fázové separaci okamžitě [98].

Důležitost mísitelnosti mezi rozpouštědlem a koagulantem byla rovněž zaznamenána v práci Termonia [108] a Chenga a kol. [109]. Komplexní pohled na mechanismus tvorby makro pórů uvádí práce Smolderse [95], Paulsena a kol. [110].

Pomalejší absorpce špatného rozpouštědla, které se vyskytuje při parami indukované fázové separaci upřednostňuje separaci pevná látka – kapalina (krystalizace polymeru) nad separací kapalina-kapalina, jako je tomu v případě např. přípravy membrány ze semikrystalického polymeru jako je polyvinyliden fluorid [111]. Li a kol. ukázali, že morfologie takovéto membrány připravené ze semikrystalického polymeru může být řízena kontrolou teploty rozpouštění polymeru [112]. Existují dva způsoby gelování: se zahájením krystalizace a bez zahájení krystalizace. Nad kritickou teplotou rozpouštění dochází ke gelaci pomocí zahájení krystalizace a vznikají uzlovité struktury. Naopak pod kritickou teplotou dominuje gelace bez krystalizace a vytvářejí se vláknité struktury. Řízení teploty je tedy kritickým parametrem při určování morfologie semikrystalického polymeru.

Lze tedy konstatovat, že faktory ovlivňující rychlost separace kapalina-kapalina, pevná látka-kapalina nebo srážení polymeru určují fyzikální morfologii membrán vzniklých fázovou separací indukovanou špatným rozpouštědlem.

4.1.1 Výběr rozpouštědel

Zvolení správné kombinace dobrého a špatného rozpouštědla pro daný polymer má zásadní vliv na výslednou morfologii povrchu. Nejdůležitější podmínkou je schopnost polymeru se ve zvoleném rozpouštědle zcela rozpustit, případně snadno dispergovat. Současně ovšem musí být dobré a špatné rozpouštědlo navzájem mísitelné.

Obecně existuje značný počet kompatibilních rozpouštědel, každé s vlastním termodynamickým chováním a mísitelností. Čím vyšší je afinita mezi dobrým a špatným rozpouštědlem, tím snáze bude docházet k separaci a tvorbě poréznější struktury. Naopak v případě nízké afinity dojde ke vzniku asymetrické, méně porézní struktury. Pro tvorbu požadované povrchové morfologie povrchu je tedy kromě jiných parametrů rozhodující zvolit vhodnou směs dobrého a špatného rozpouštědla [94].

V souvislosti s tím bylo navrženo několik přístupů ke stanovení rozpustnosti polymeru. Flory a Huggins vyvinuli pro popis polymerních roztoků dvojrozměrnou mřížku [113-115]. V tomto modelu předpokládají, že segmenty polymerních řetězců a molekuly rozpouštědla mají stejnou velikost a pouze jedna molekula nebo polymerní segment může zabírat jedno mřížkové místo [116].

Gibsova volná energie směšování se poté vypočítá podle vztahu (6):

$$\Delta G_m = kT(n_1 \ln \phi_1 + n_2 \ln \phi_2 + \chi_{12} n_1 \phi_2), \quad (6)$$

kde k je Boltzmanova konstanta ($1,38 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$), T je absolutní teplota, n_1 a n_2 jsou látkové množství rozpouštědla (složka 1) a polymeru (složka 2), ϕ je objemová frakce, χ_{12} je Floryho interakční parametr, což je bezrozměrný parametr charakterizující interakční energii polymer-rozpouštědlo. Floryho interakční parametr se nejběžněji určuje experimentálně pomocí inverzní plynové chromatografie [116].

Dalším parametrem pomáhajícím zvolit vhodné rozpouštědlo pro daný polymer je parametr rozpustnosti, který může sloužit k odhadnutí Floryho interakčního parametru. Parametry rozpustnosti rozpouštědel se vztahují k molární energii odpařování E_v a molárnímu objemu V čisté kapaliny podle následujícího vztahu:

$$\delta = \frac{\Delta E_v}{V} \quad (7)$$

Parametry rozpustnosti lze aproximovat řadou metod [117] nebo experimentálně stanovit ponořením polymeru do různých rozpouštědel, přičemž hodnota

parametru rozpustnosti je podobná jako hodnota rozpouštědla, které způsobí maximální nabotnění [116].

Floryho interakční parametr lze poté aproximovat na základě parametru rozpustnosti rozpouštědla (δ_1) a polymeru (δ_2) na základě použití následujícího vztahu:

$$\chi_{12} = \frac{v_1}{RT} (\delta_1 - \delta_2)^2, \quad (8)$$

kde v_1 je molární objem rozpouštědla a R je molární plynová konstanta [116].

Scatchard a Hildebrand spočítali na základě parametrů rozpustnosti polymeru a rozpouštědla teplo míchání ΔH_m podle následujícího vztahu:

$$\Delta H_m = V_m (\delta_1 - \delta_2)^2 \phi_1 \phi_2, \quad (9)$$

kde V_m je molární objem směsi [118, 119].

Výběr vhodných rozpouštědel pro daný polymer ve Scatchard-Hildebrandově rovnici se určuje s ohledem na minimalizaci tepla vznikajícího při jejich míchání. Ovšem tato rovnice platí pouze pro $\Delta H_m > 0$ a navíc nezahrnuje konkrétní interakce, jakou jsou například vodíkové vazby.

Hansen navrhl, aby celková energie odpařování kapaliny byla způsobena disperzními silami, stálými dipólovými permanentními silami a vodíkovými vazbami [120, 121]. Parametr rozpustnosti vztažený k celkové soudržné energii je poté rozdělen do tří složek: disperzní (δ_d), polární (δ_p) a vodíkové vazby (δ_h). Celkový, neboli Hildebrandův rozpustnostní parametr je pak vyjádřen v následující rovnici:

$$\delta = \sqrt{\delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2} \quad (10)$$

Výpočet disperzní (δ_d) a polární (δ_p) složky je popsán Blanksem a Prausnitzem [122]. Rovněž Hansen a Beerbower objevili vztah pro výpočet polární složky (δ_p) popsaný následující rovnicí:

$$\delta_p = 37,4 \frac{\mu}{V^{0,5}}, \quad (11)$$

kde μ je dipólový moment rozpouštědla a V je molární objem rozpouštědla. Složka vodíkových vazeb (δ_h) parametru rozpustnosti se obvykle vypočítává odečtením δ_d a δ_p od δ . Rovněž se dá δ_h vypočítat metodou skupinového příspěvků. Podle Hansena je metoda skupinového příspěvků nejlepší pro stanovení parametrů rozpustnosti pro polymery.

Skaarup [120] definoval parametr rozpustnosti Rp , což je „vzdálenost“ mezi polymerem a rozpouštědlem. Vyjadřuje jejich vzájemnou afinitu na základě jejich individuálních parametrů rozpustnosti vypočtenou pomocí následujícího vztahu:

$$Rp = \sqrt{4(\delta_{d2} - \delta_{d1})^2 + (\delta_{p2} - \delta_{p1})^2 + (\delta_{h2} - \delta_{h1})^2} \quad (12)$$

Na základě toho se poté definuje relativní rozdíl energie, který se rovná Rp/Ro , kde Ro je poloměr interakce koule a parametrů rozpustnosti Hansena. Relativní rozdíl energie nesmí překročit hodnotu jedna, v opačném případě se polymer v daném rozpouštědle nerozpouští. Rozpustnost se zvyšuje s klesající hodnotou relativní energie jdoucí k nule.

4.1.2 Výběr polymeru

Výběr vhodného typu polymeru je důležitý pro jeho budoucí aplikaci. Různě strukturovaný povrch má poté různou adsorpci par a plynů, hydrofilnost, tepelnou či chemickou stabilitu.

Pro neporézní membrány má volba polymeru přímý dopad na výkonnost membrány, jelikož vnitřní vlastnosti membránové separace (rozpustnost a difúzivita) závisí na chemické struktuře a tedy na volbě polymeru.

Ve fázové separaci vyvolané špatným rozpouštědlem má volba polymeru přímý dopad na výběr dobrého a špatného rozpouštědla. Rovněž hraje významnou roli s ohledem na jeho koncentraci během formování povrchového reliéfu [123].

4.1.3 Vliv koncentrace polymeru

Koncentrace polymeru v roztoku je dalším klíčovým parametrem ovlivňujícím morfologii membrány. Typická koncentrace polymeru ve směsi se pohybuje od 15 do 25 hm. % [124]. Zvýšená koncentrace polymeru v odlévaném roztoku vede k vyšší koncentraci polymeru na rozhraní špatného rozpouštědla [125]. To znamená, že se objemový podíl polymeru zvýší a tím vznikne morfologie

s nižší pórovitostí. Když je koncentrace vyšší než určitá kritická hodnota, výsledná membrána má nízkou pórovitost a tok čisté vody přes tuto membránu může být snížen na nulu, a to i přes okamžitou separaci. Strathmann a kol. [93, 96] se zaměřili ve své práci na vliv koncentrace polymeru na membránovou morfologii. Jejich výzkum ukázal, že různá počáteční koncentrace roztoku polymeru mění průběh srážení, což lze prokázat na ternárním fázovém diagramu. Byly získány dvě různé struktury v závislosti na různých způsobech srážení.

4.1.4 Volba a složení směsi se špatným rozpouštědlem

Volba špatného rozpouštědla má významný vliv na srážení. Když se roztok polymeru odleje jako tenký film na nosný substrát a pak se ponoří do špatného rozpouštědla, mísitelnost dobrého a špatného rozpouštědla a rovněž afinita mezi polymerem a špatným rozpouštědlem ovlivní rychlost separace a následnou konečnou membránovou strukturu [94]. Jako špatné rozpouštědlo se obecně nejčastěji používá voda nebo aceton či nižší alifatické alkoholy [126-129]. Přidání rozpouštědla do koagulační lázně je dalším parametrem, který ovlivňuje membránovou strukturu. Maximální množství rozpouštědla, které může být přidáno, je však určeno polohou binodální čáry ve fázovém diagramu. Přidáním rozpouštědla do koagulační lázně může být srážení okamžitě zastaveno. Dochází k odložení separace, což vede ke vzniku neporézní membrány. Tento efekt je neobvyklý, protože se zdá, že existují dva konkurenční procesy. Přidání rozpouštědla do koagulační lázně snižuje koncentraci polymeru na rozhraní filmu. To by vedlo ke vzniku více otevřené membrány [130]. Přidání rozpouštědla do koagulační lázně rovněž snižuje aktivitu špatného rozpouštědla a rychlost difúze do polymerního filmu, což dále zpomaluje separaci.

4.1.5 Vliv teploty

Změna teploty může být jedním z iniciátorů fázové separace. Mimo to teplota ovlivňuje viskozitu odlévacího roztoku. Díky tomu má významný vliv na fázovou separaci. Z toho důvodu je považována za významný parametr ovlivňující kinetiku tvorby membrány a morfologii povrchu [131-135].

Výzkum Tsai a kol. ukázal, že teplota koagulační lázně má obrovský vliv spolu s přidáním povrchově aktivních látek do odlévacího roztoku [131]. Zjistili, že teplota ovlivňuje velikost formování makro pórů.

Zheng a kol. [136] ukázali, že s rostoucí teplotou odlévacího roztoku se nesnižuje pouze viskozita, ale zároveň zvyšuje mísitelnost mezi dobrým a špatným

rozpouštědlem. Rovněž ukázali, že s nárůstem teploty se zvyšuje kinetický parametr tvorby membrány D_a ;

$$D_a = \frac{d^2}{t}, \quad (13)$$

kde d je tloušťka membrány a t je doba koagulace. Zheng a kol. také měřili morfologii membrán připravených při různých teplotách koagulační lázně a zjistili, že se zvyšující se teplotou roste velikost makro pórů [137].

4.2 Metoda Breath Figures

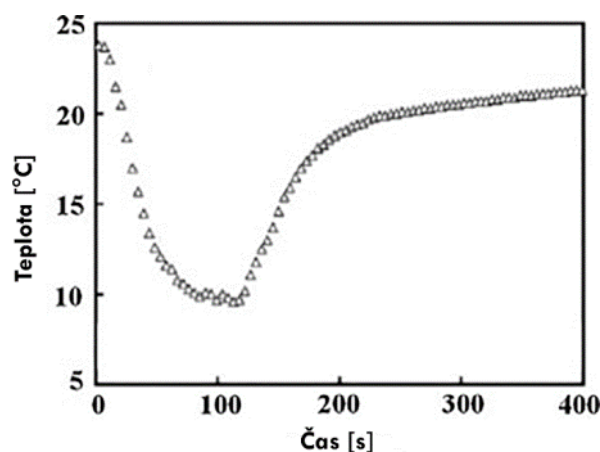
Jedním z přístupů tvorby strukturovaných polymerních povrchů je metoda „Breath figures“ (BF). V této metodě se šablonou pro tvorbu strukturovaných povrchů stávají kapičky vody, které lze snadno odstranit odpařením [138, 139]. Dalšími výhodami BF jsou krátká doba generace pórů a nízké náklady. Přístup BF lze využít pro úpravu širokého spektra materiálů od polymerů až po hybridní nanokompozity.

Metoda BF umožňuje přípravu topograficky různě strukturovaných rozhraní s různým chemickým složením mezi vnitřní a vnější částí póru a to vše v jednom kroku. Jednou z klíčových vlastností metody BF je možnost přípravy hierarchicky uspořádaných rozhraní. Inspirace pro přípravu takovýchto hierarchicky strukturovaných rozhraní pochází z přírody [140]. Mimo to je možné kontrolovat velikost a uspořádání 3D pórů jak v povrchu, tak v objemu, čímž lze výrazně ovlivňovat měrný povrch [141].

4.2.1 Mechanismus vzniku Breath Figures

Principem klasické metody BF je tvorba uspořádaných vodních kapek kondenzací na ochlazovaném povrchu. K ochlazování povrchu dochází v důsledku rychlého odpařování dobrého rozpouštědla z modifikovaného fázového rozhraní, Obr. 4 [55, 56, 142]. V okamžiku kdy se povrch dostane do kontaktu s vlhkým vzduchem, vlhkost kondenzuje na povrchu a vytváří vodní kapky, které během odpařování rozpouštědla dále rostou [138, 143-147].

Tvorba porézních systémů pomocí BF naznačuje Obr. 5 [148]. V počátečním stádiu (A) dochází k endotermnímu odpařování, klesá teplota povrchu, vodní pára začíná kondenzovat na fázovém rozhraní kapalina/plyn. V následujících fázích dochází ke zvyšování teploty, čímž se kompenzuje počáteční pokles teploty viz Obr. 4.



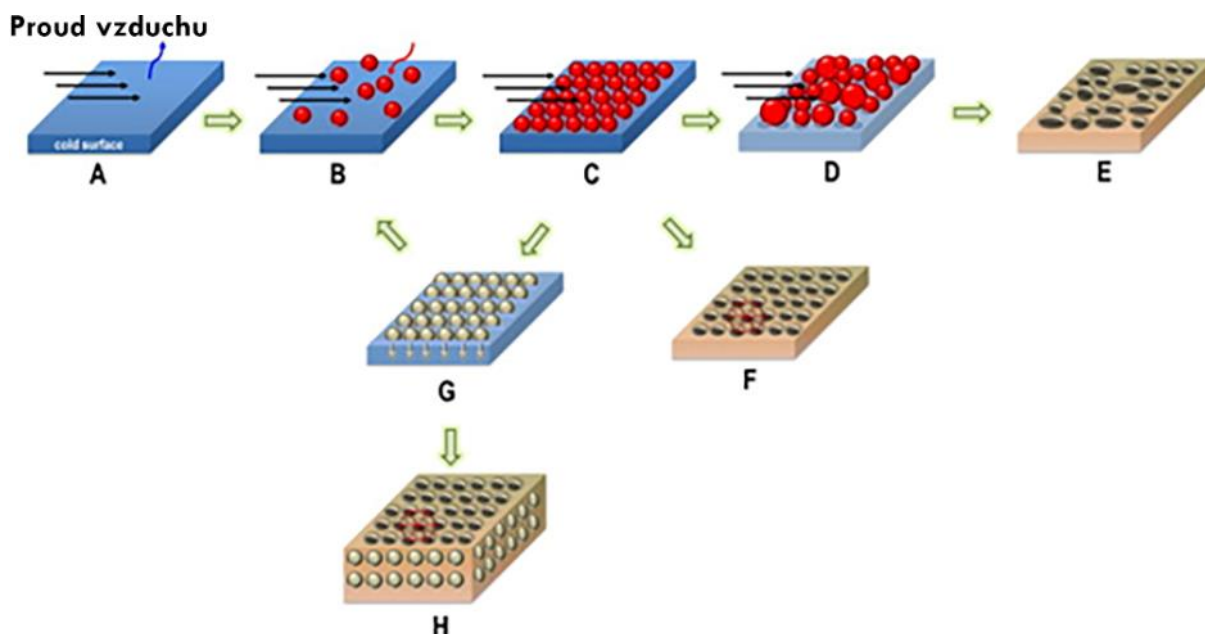
Obrázek 4 - Změna teploty filmů v závislosti na odpařování rozpouštědla [149].

Počáteční heterogenní nukleace tvoří na povrchu kapičky vody Obr. 5 (B). Tyto kapičky jsou termodynamicky stabilní a díky tomu nedochází k jejich odpařování. Množství kapiček po povrchu je v tomto kroku poměrně nízké. Vzniklé kapičky na povrchu substrátu rostou v závislosti na koncentraci vodních par okolní atmosféry. Jakmile se teplota filmu vrátí na teplotu okolí, kondenzovaná voda a zbytkové rozpouštědlo se odpaří. Důležitým aspektem míry kondenzace kapiček vody na povrchu je ochlazení povrchu substrátu, které se zvyšuje spolu se změnou tlaku rozpouštědla a rychlost proudění plynu nad povrchem materiálu.

Za předpokladu, že doba kondenzace je přiměřeně dlouhá k indukovaní růstu vodních kapiček, lze získat úplné pokrytí povrchu hexagonálním vzorem Obr. 5 (C). Naproti tomu dlouhá doba kondenzace bude mít za následek póry s náhodnou distribucí velikostí Obr. 5 (D). To znamená, že má-li dojít k vytvoření monovrstvy podobně velkých pórů, je nezbytné, aby došlo k odpaření rozpouštědel před začátkem koalescence vodních kapiček Obr. 5 (F).

Za určitých podmínek může první vrstva kondenzovaných kapiček klesat níže do roztoku. V tomto případě je nezbytné polymerní kapky stabilizovat tak, aby se v čase zabránilo jejich koagulaci Obr. 5 (G). Na pokles kapiček do polymerního roztoku bude mít zásadní vliv hustota použitého rozpouštědla. Jestliže bude hustota rozpouštědla menší než hustota vody, bude docházet k pronikání kapiček vody do polymerního roztoku a můžeme pozorovat vznik vícevrstevných struktur Obr. 5 (H). Jak již bylo zmíněno, polymer může zabránit koagulaci kapek špatného rozpouštědla prostřednictvím okamžitého srážení polymerní vrstvy kolem povrchu dané kapky. V případě, kdy dochází k odpařování rozpouštědla a polymer nedostatečně stabilizuje vodní kapičky, mohou se dvě kapičky na svém

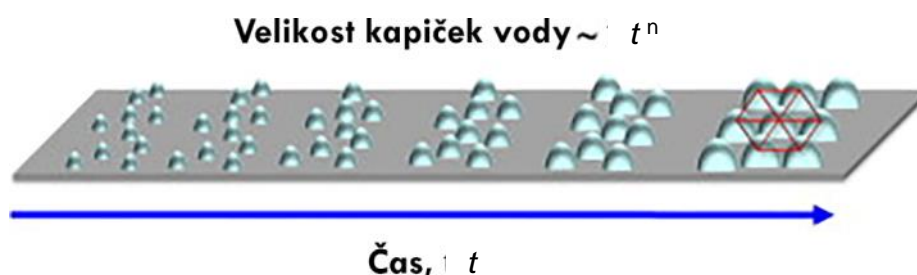
obvodu dostat do styku a vzájemně se ovlivňovat koalescencí. Po koalescenci vzniká nová kapka s objemem dvou velikostí kapek, ze kterých vznikla. Z hlediska energetického se jedná o výhodný stav, jelikož vytvořením této kapky klesá povrchová energie Obr. 5 (D). V důsledku procesu koalescence a po odpaření vodních kapiček a použitého rozpouštědla vzniká nesourodé pole pórů Obr. 5 (E).



Obrázek 5 - Model vzniku porézních systémů pomocí metody Breath figures. Nejprve se polymer rozpustí v těkavém rozpouštědle a vystaví se vlhkému prostředí (A). Během počáteční fáze kondenzuje vodní pára na povrchu ve formě kapiček (B). V důsledku odpařování rozpouštědla rostou kapičky vody na povrchu a tvoří uzavřené pole (C). V tomto stadiu se mohou vodní kapičky dále srůstat, což vede ke vzniku neuspořádaných heterogenních porézních filmů (D) a (E). V případě, že odpařování skončí před srůstáním kapiček do sebe, dojde ke vzniku porézních filmů s podobnou velikostí pórů (F). Kromě toho, v případě kdy použitý polymer stabilizuje kapičky kondenzované vody a zabraňuje jejich srůstání, může kondenzovaná kapička o vyšší hustotě klesnout do roztoku (G). Následně může na povrchu pokrytém rozpouštěným polymerem kondenzovat nová vodní kapka. Výsledkem toho je opakující se postup vytvoření vícevrstevných pórů (H) [150].

Existuje mnoho studií vysvětlující mechanismus a dynamiku, která řídí formování BF zejména na pevném nebo kapalném povrchu [139, 148, 151-153]. K dispozici je několik modelů vysvětlujících kinetiku těchto procesů [151, 152, 154, 155]. Bylo dokázáno, že poloměr jedné kapky v různých stupních růstu se zvyšuje s časem t podle mocninového zákona s variabilním exponentem n , který závisí na

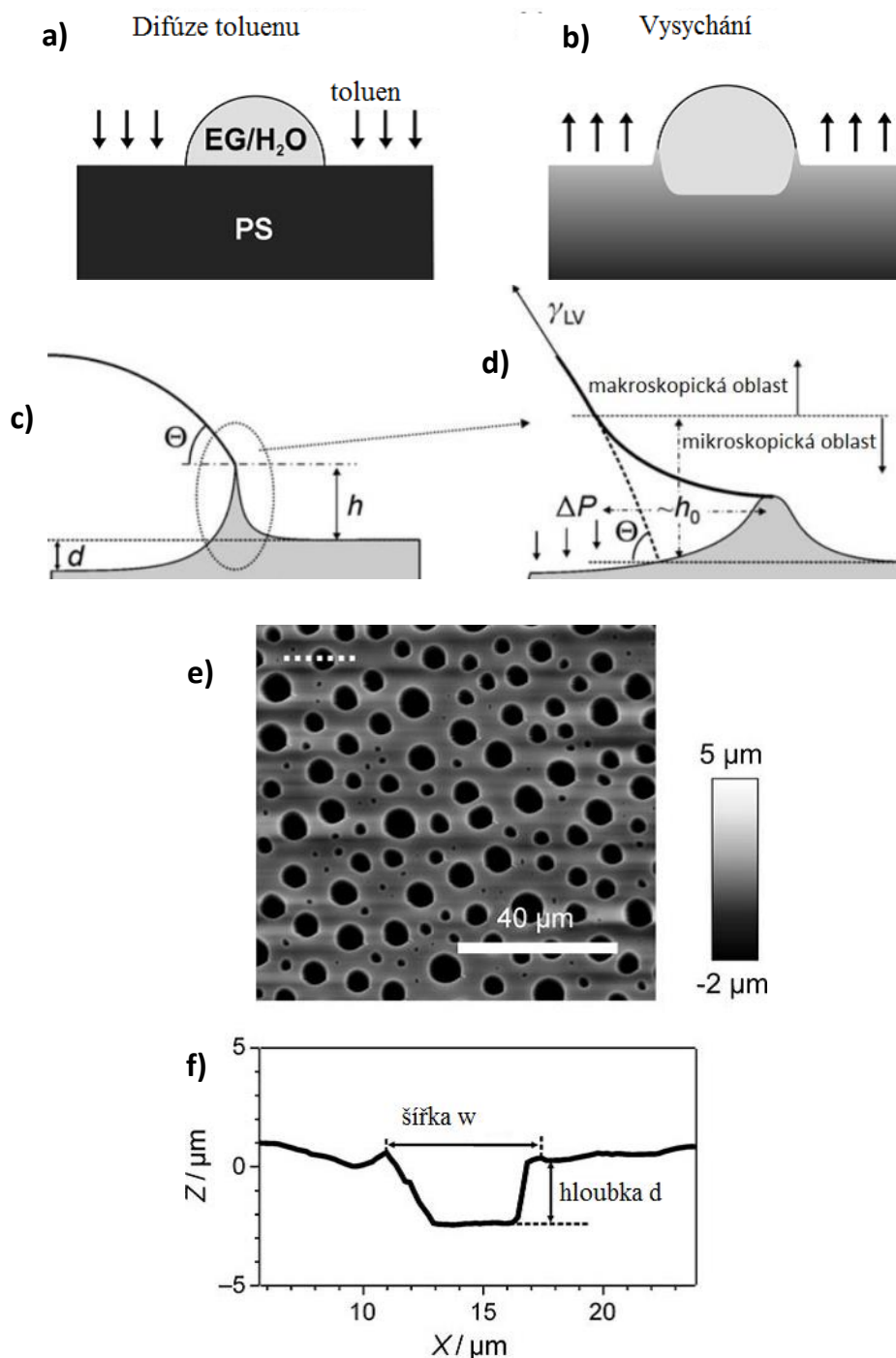
mechanismu růstu (difúzi nebo koalescenci), povrchových vlastnostech, teplotě, průtoku vlhkého vzduchu geometrii a dalším, viz Obr. 6.



Obrázek 6 - Růst kapiček vody jako funkce času. [156]

Podle Rogerse a kol. [157] může být růst kapičky popsán mocninovým zákonem $t^{1/4}$ za použití pouze modelu difúze. Fritter a kol. [154] a Steyer a kol. [158] zpracovali modely, které zvažují jak difúzi, tak koalescenci a dospěli k závěru, že v počátečním stádiu izolované kapičky rostou podle funkce $t^{1/3}$.

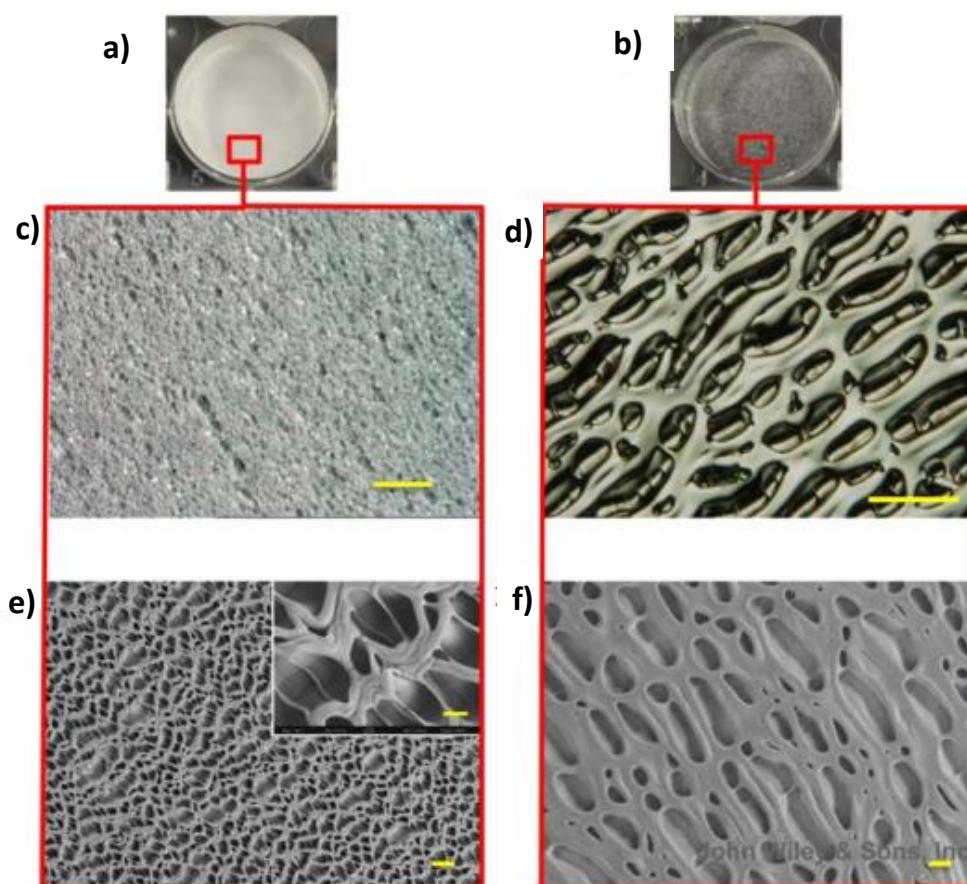
Pericet-Camara a kol. [71] ve své práci popsali chování polymeru okolo kapek špatného rozpouštědla. Pro popis tohoto děje v prvním experimentu byla na povrch polystyrenu deponována kapka o průměru 100 až 200 μm směsi vody a ethylenglykolu v poměru 1:1 pomocí techniky ink-jet. Následně byl povrch vystaven parám toluenu. Kapka sedící na povrchu zabraňuje penetraci par toluenu do polymeru v místě kontaktu mezi kapkou a povrchem PS, Obr. 7a. Toluén botná PS okolo nanesené kapky a ten vertikálně expanduje, Obr. 7b. Po odpaření toluenu lze na povrchu pozorovat kráterovitou strukturu, která odpovídá místu umístění kapky. Vtlačování špatného rozpouštědla do nabotnalé polymerní vrstvy schématicky naznačuje, Obr. 7c a 7d. Druhý experiment se od prvního lišil tím, že povrch polystyrenu byl vystaven atmosféře nasycené toluenem. Na změkklý povrch se pak nechaly kondenzovat kapky vody. Na rozdíl od výsledků prvního experimentu dochází k vytvoření kráterů náhodných průměrů, Obr. 7e a 7f [71].



Obrázek 7 - **a)** Difúze toluenu do polystyrenu pokrytého sedící kapkou směsi vody a ethylenglykolu. **b)** Vysychání expandovaného povrchu polystyrenu. **c)** Schéma elastické deformace povrchu pomocí přisedlé kapky. Tečovaná čára zobrazuje povrch bez deformace. Parametr θ je kontaktní úhel kapičky, h je maximální výška hřebene a d maximální hloubka prohlubně. **d)** zvětšené schéma vybraného místa. Povrchové napětí vytahuje hřeben, přičemž ohnutý meniskus působí na rozhraní ve vzdálenosti h_0 v důsledku interakce Van der Waalsových sil se substrátem. Hodnota ΔP je Laplaceův tlak vedoucí k poklesu kapičky do substrátu. **e)** Struktury na povrchu polystyrenu po 5 min. vystavení parám toluenu s následnou kondenzací mikrokapek vody. **f)** Výškový profil jednoho z kráterů na obrázku **e)** vlevo nahoře [71].

4.2.2 Současné působení směsi dobrého a špatného rozpouštědla

Povrchové prohlubně lze připravovat pomocí směsi dvou vzájemně mísitelných rozpouštědel, z nichž jedno lze vůči upravovanému polymeru považovat za špatné, separující se do podoby kapek. Typickým příkladem takového přístupu je úprava povrchu polystyrenu (PS) popsaná DeRosa a kol. [47]. Kolektiv těchto autorů zjistil, že v závislosti na typu použitého špatného rozpouštědla se dají připravit dva typy porézních povrchů na bázi PS. Při použití tetrahydrofuranu (THF) a isopropanolu (IPA) vznikl povrch charakteristický menšími prohlubněmi. Povrch PS se stal neprůhledným, mléčně zakaleným, Obr. 8a, c, e. Střední průměr prohlubní na tomto povrchu se pohyboval okolo 19 μm .



Obrázek 8 - a) Zakalený povrch PS upravený směsí THF a IPA. b) Průhledný povrch PS upravený směsí THF a H₂O. c) Obrázek ze stereomikroskopu pro povrch a), žluté měřítko 265 μm . d) Obrázek ze stereomikroskopu pro povrch b), žluté měřítko 265 μm . e) snímek ze SEM pro povrch a), měřítko 100 μm . Vložený SEM snímek je stejný vzorek, s měřítkem 25 μm . f) snímek ze SEM vzorku pro povrch b), měřítko 100 μm [47].

Větší póry na povrchu PS lze vytvořit použitím vody jako špatného rozpouštědla v poměru THF:H₂O 6:4. Při použití této směsi PS zůstal čirý a vyznačoval se

středním průměrem prohlubní okolo 115 μm , Obr. 8b, d, f. Vytvořené povrchové prohlubně, jak za použití IPA, tak H_2O tvoří hustou strukturu kráterů. Takto texturovaný povrch PS nachází uplatnění např. při kultivaci buněk, jak je popsáno v citované práci [47].

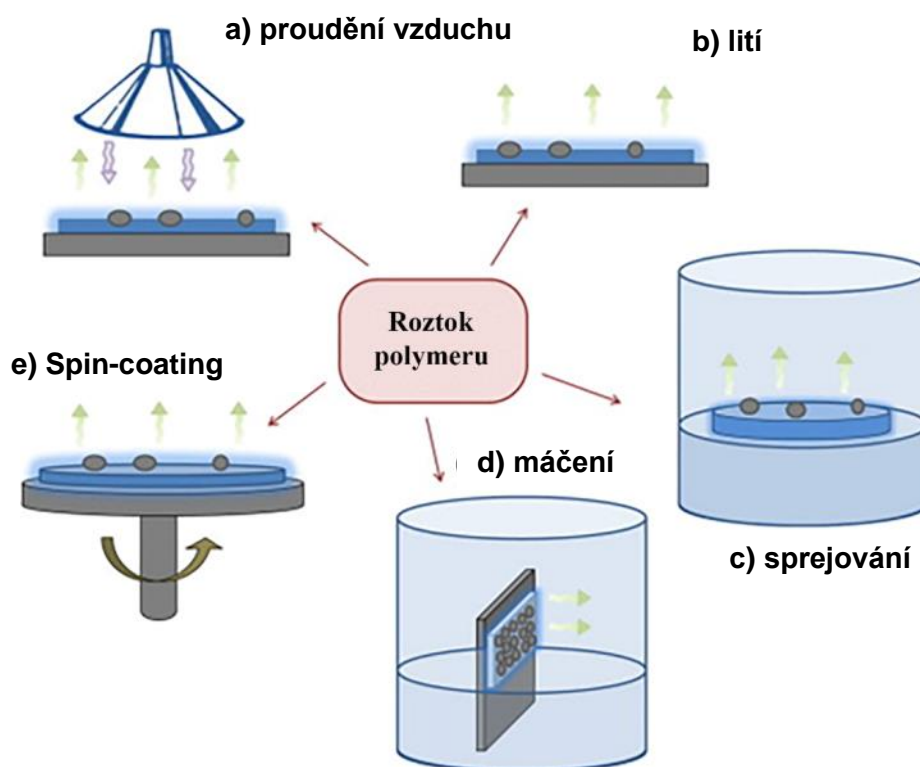
4.2.3 Způsoby přípravy honeycomb porézních systémů

Pro přípravu „honeycomb“ porézních vrstev a folií bylo vyvinuto několik přístupů, Obr. 9 [159]. Jedním z nejběžnějších přístupů je nanesení kapky roztoku polymeru na pevnou podložku, přičemž je důležité kontrolovat relativní vlhkost komory, která musí být vyšší než 50%. Za běžných podmínek jsou touto metodou lití zhotoveny vysoce uspořádané struktury. Například použitím chladné podložky [60] může být ovlivněna rychlost kondenzace a odpaření rozpouštědla. Pokles teploty způsobí zvýšení viskozity roztoku a rychlosti kondenzace, současně s tím dochází ke snížení rychlosti odpařování rozpouštědla. V důsledku toho vznikají více uspořádané honeycomb struktury [160, 161]. Další způsob ovlivňování procesu odpařování a kondenzace spočívá v regulaci rychlosti průtoku plynu nad vzorkem a kontrole jeho vlhkosti [162-164]. Větší průtok vzduchu způsobuje větší gradient teploty mezi povrchem a objemem v důsledku rychlejšího odpařování rozpouštědla. Proudění vzduchu také navíc podporuje konvekci v roztoku a rovněž ovlivňuje uspořádání vodních kapiček. Mimo to bylo rovněž zjištěno, že je potřeba kontrolovat úhel proudění vzduchu nad modifikovaným povrchem [139].

Nízká rychlost proudění vzduchu umožňuje kapičkám vody růst delší dobu, což má za následek vznik a rozvoj větších pórů. Oproti tomu příliš silné proudění vzduchu způsobuje rychlé odpařování rozpouštědla, v důsledku čehož dochází k omezení schopnosti kapiček růst a uspořádat se do pravidelného povrchového pole.

Metoda Spin-coating umožňuje přípravu filmů s rovnoměrnou tloušťkou a nízkou drsností povrchu [165, 166]. V kombinaci s BF lze tento přístup použít pro rovnoměrnou úpravu relativně velkých ploch do porézní podoby. Pro vytvoření optimálních vlhkostních podmínek se do prostoru rotační komory umísťuje nádoba s horkou vodou. Vyšší rychlosti rotace vzorku umožňují vznik pravidelnější porézní struktury, zatímco při nižších otáčkách se snižuje rychlost

odpařování a tím je umožněna výraznější koalescence kapiček [167]. Obecně se velikost pórů s rostoucí rychlostí rotace snižuje. Porovnáním metody spincoating s technikami odlévání nebo prouděním ukazuje, že tato metoda generuje méně uspořádané vzory. Navíc tvar získaných pórů je při použití metody spin-coating většinou spíše prodloužený než sférický.



Obrázek 9 - Metody pro přípravu pórovitých „honeycomb“ struktur prostřednictvím: a) proudění vzduchu, b) odlévání, c) sprejování, d) máčení anebo e) Spin-coating [156].

Metoda dip-coating je další metodou používanou v kombinaci s BF [168, 169]. V této metodě se mechanismus mění v důsledku vertikální polohy skleněného sklíčka a povrchu kapaliny. Klesání kapiček špatného rozpouštědla do polymerní vrstvy není v tomto případě způsobeno gravitací. V tomto případě hrají zásadní úlohu mezifázové síly a pohyb polymerního roztoku na povrchu nosného substrátu, který je vytahován z roztoku.

Emulzní technika generuje „honeycomb“ struktury pomocí systému voda-olej. Tedy tak, že je voda s olejem přímo zavedena do roztoku polymeru a systém je homogenizován sonikací [170]. Například pro přípravu porézních filmů za jinak

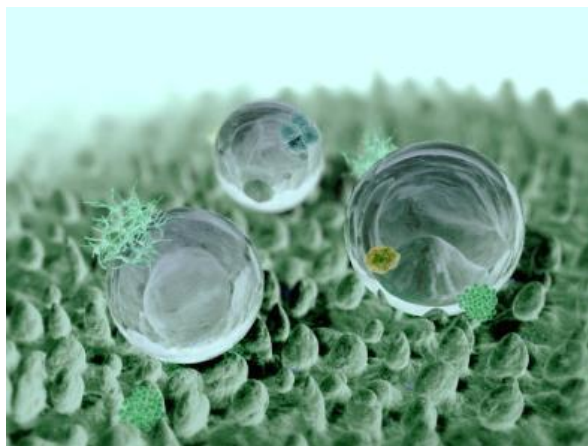
suchých podmínek bylo použito roztoku tetrahydrofuranu s přidáním malého množství vody [59].

Jak bylo zmiňováno výše, většina „honeycomb struktury byla až na pár výjimek připravována na pevných nosičích (skleněné nebo křemíkové pláty). Nishikawa a kol. připravili „honeycomb“ struktury na rozhraní vzduch/voda. Parametry mikrostruktury včetně velikosti pórů sítě a tloušťky filmu byly řízeny objemem odlitého filmu a teplotou vodní lázně. Hlavní výhodou této metody je fakt, že tento přístup poskytuje tvorbu samonosných folií [171].

4.3 Hierarchicky organizované struktury

Inspirace v podobě funkčních přírodních struktur vede ke snahám připravit umělé povrchy se specifickými vlastnostmi. Tyto unikátní vlastnosti nejsou zpravidla dány vnitřní strukturou těchto materiálů, ale souvisí s jedinečnou povrchovou mikro nebo nanotexturou [83].

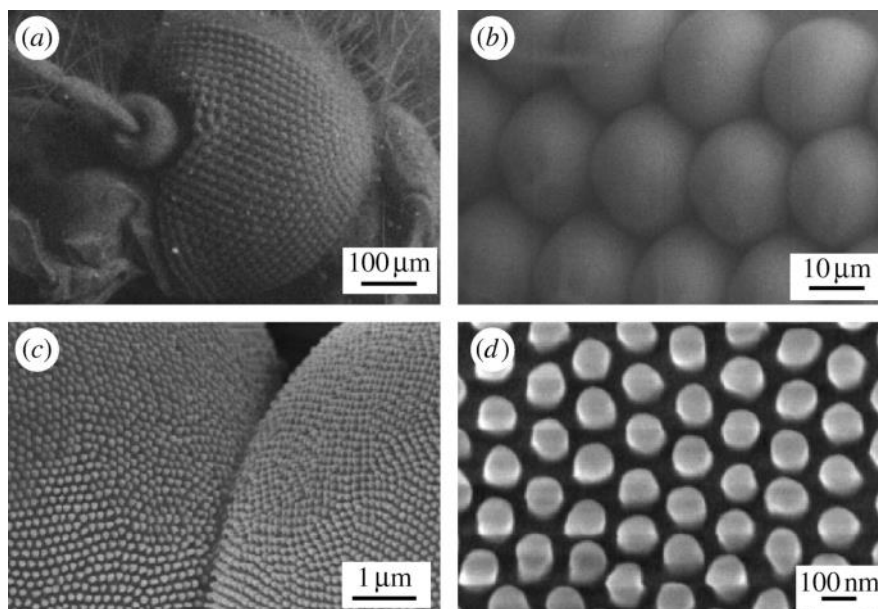
Vodu například odpuzuje mnoho biologických povrchů, zejména listů. Vysokou odpudivost vodních kapiček vykazuje například lotosový list. Tzv. lotosový efekt je u rostlin velmi běžný a má v praxi nezanedbatelný technologický význam viz. Obr. 10.



Obrázek 10 - Mikroskopický obraz lotosového listu s několika kapkami vody a prachu. [172]

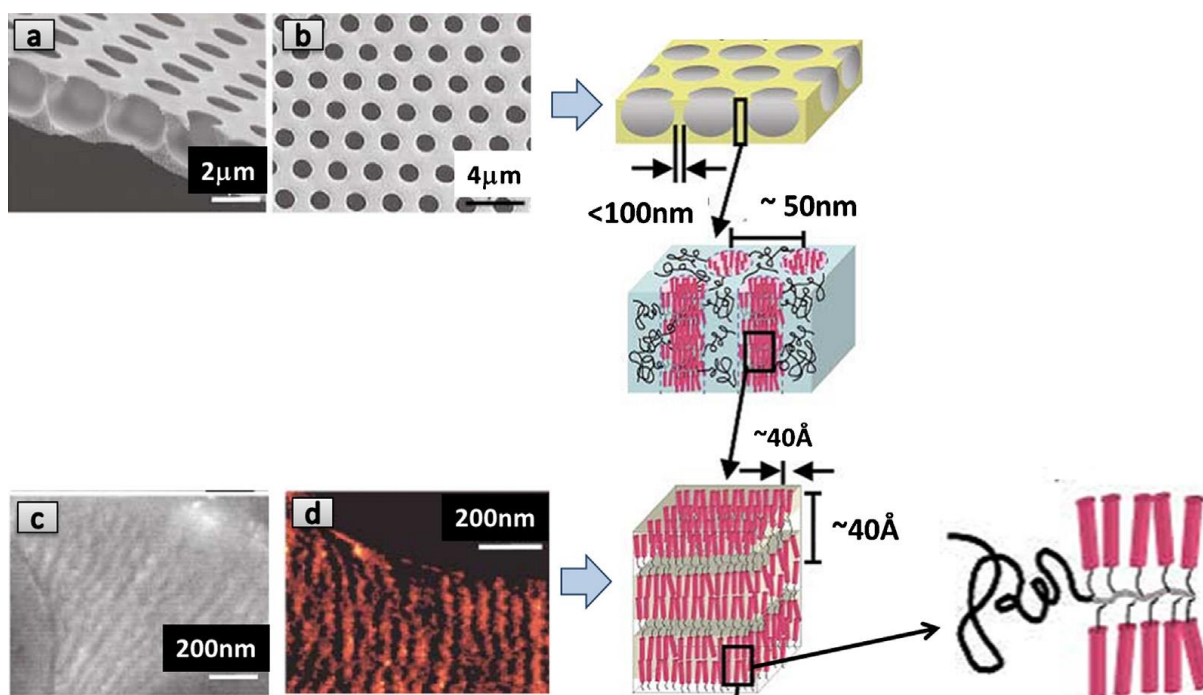
Takto hierarchicky strukturované povrchy tvořené mikro a nanoútvary spolu s vrstvou vosku vykazují tzv. superhydrofóbní vlastnosti (samočisticí efekt). Zvláštní uspořádání mikro a nano povrchových struktur může mít za následek nejen anizotropní smáčení, ale rovněž kontrolované smáčení. Nutno poznamenat, že dosavadní způsoby přípravy hierarchicky organizovaných struktur jsou značně

omezeny ve srovnání s dokonalostí struktur vyskytujících se v přírodě. Dalším příkladem komplexního povrchu mohou být oči komárů, Obr. 11. Tento typ povrchu se opět vyznačuje superhydrofóbními vlastnostmi, které jim poskytují účinný mechanismus pro udržení jasného vidění ve vlhkém prostředí.



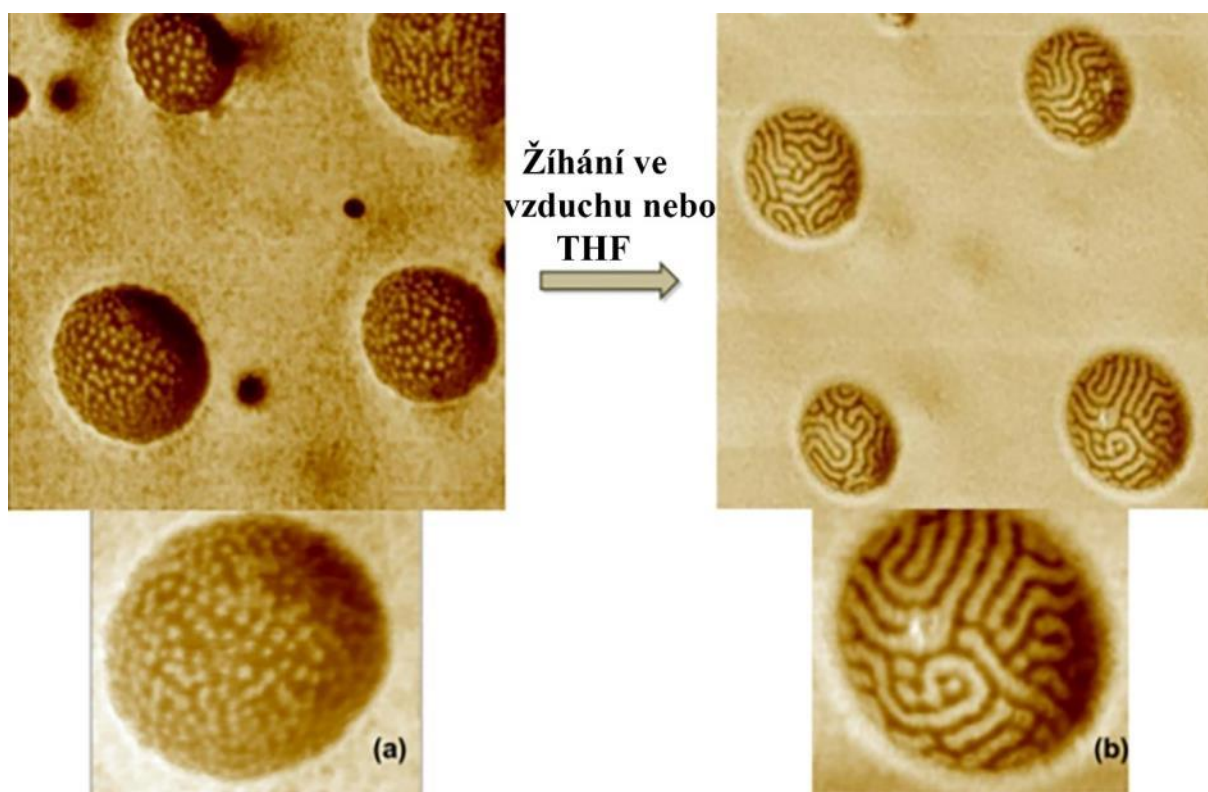
Obrázek 11 - SEM obrázky (a) jediného oka komára, (b) mikrohemisféry HCP (ommatidia), (c) dvou sousedních ommatidií a (d) hexagonálních nanovýčněleků pokrývajících ommatidiální povrch. [173]

Hierarchicky uspořádané struktury mohou být připraveny například kombinací metody BF s využitím samoorganizace blokových kopolymerů ve vzniklých pórech [174]. Tato strategie byla poprvé popsána Hakayamou a Horiuchim [80]. Pro tyto účely byl syntetizován blokový kopolymer styrenu a isoprenu s oligothiophenem modifikovaným bočními řetězci. Odléváním tohoto roztoku mohou vznikat tří stupňové organizované struktury Obr. 12. Ve spodní části oligothiophen tvoří molekuly orientované do rovinné krystalické struktury. Ve vyšším stupni se molekuly samovolně shromažďují v nanodoménách kolmo k substrátu s periodicitou přibližně 50 nm. Nakonec odpařování rozpouštědla podporuje produkci mono a vícevrstvých 3D mikroporézních filmů s velikostí pórů v rozmezí 1,2 až 4,5 μm, viz Obr. 12.



Obrázek 12 - Schematické znázornění samoorganizované hierarchické struktury blokového kopolymeru styrenu a isoprenu modifikovaného oligothiofenem s postranními řetězci [80].

Při použití amfifilních blokových kopolymerů vytvářeli Stenzel a kol. [175] víceúrovňové honeycomb struktury složené z mikrometrových pórů, v nichž byly pozorovány další nanometrové póry. Podle autorů se blokový kopolymer reorganizuje okolo kondenzovaných kapiček vody v důsledku hydrofilního charakteru jednoho z kopolymerů. V důsledku toho mají výsledné mikropóry hydrofilní povrch. Díky vzájemnému působení hydrofilního blokového kopolymeru s vlhkostí přechází voda do micel, vytvořených organizací blokového kopolymeru na stěnách pórů [88]. Alternativou k použití čistého blokového kopolymeru je použití směsi blokových kopolymerů ABC (poly(2,3,4,5,6pentafluorostyren)-b-polystyrene-b-poly(poly(ethylen glykol) methyl ether methakrylát) a polystyren [82]. Během odpařování rozpouštědel je směs blokových kopolymerů směřována ke kondenzované vodní kapce kvůli afinitě hydrofilního bloku. V důsledku toho je prostorová distribuce blokových kopolymeru na povrchu lokalizována v oblastech, kde byla vytvořena vodní kapka. Zbytek povrchu je pak tvořen především polystyrenem. Vytvořené mikropóry jsou poté obohaceny o blokové kopolymery, které se samoorganizují v nanostrukturovaném micelárním poli. Navíc může být taková nanostruktura pórů jednoduchým žiháním nebo vystavením parám tetrahydrofuranu změněna z micel na lamelární fázi, viz Obr. 13.



Obrázek 13 - Snímky fázové kontrastu pořízeného pomocí AFM. Zobrazení vnitřních struktur pórů polymerního filmu s 10 hm.% směsi blokových kopolymerů ABC, a.) po nanášení spincoatingem s relativní vlhkostí 57%, b.) po žihání při 80 °C po dobu 2 dnů [82].

5. Experimentální část

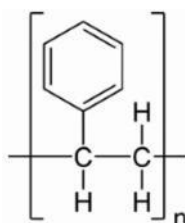
Úvodní podkapitola této části bude věnována použitým materiálům. Druhá část bude zaměřena na použité zařízení pro charakterizaci upravených materiálů. V této části nebude přímo řešeno klíčové zařízení používané pro úpravu polymerních povrchů fázovou separací. Toto zařízení bude podrobně popsáno a diskutováno v následující kapitole s ohledem na skutečnost, že se jedná o jeden z klíčových výstupů autorovy práce.

5.1 Použité materiály

V rámci řešené práce byly upravovány tři typy materiálů do podoby povrchově a objemově porézních vrstev. Ostatní použité chemické látky a rozpouštědla byly zakoupeny v p.a. čistotě od lokálních dodavatelů laboratorních potřeb, respektive od společnosti Merck.

5.1.1 Syntetický polymer – polystyren

Pro prvotní experimenty byl použit finančně dostupný polystyrenový substrát (PS), konkrétně polystyrenové Petriho misky, Obr. 14. Byly používány misky od dvou výrobců. Větší, o průměru 5,4 cm nesterilizované, neupravované misky od společnosti Gosselin. Dále pak menší misky o průměru 3,4 cm, sterilizované zářením, bez pyrogenů a DNA / RNA pro kultivaci buněk od společnosti TPP Techno Plastic Products AG. Větší nesterilizované PS misky byly před použitím oplachovány alkoholem a ultračistou vodou s odporem 18,2 MΩ.cm s následným sušením v sušárně bez nucené cirkulace vzduchu při 50 °C.

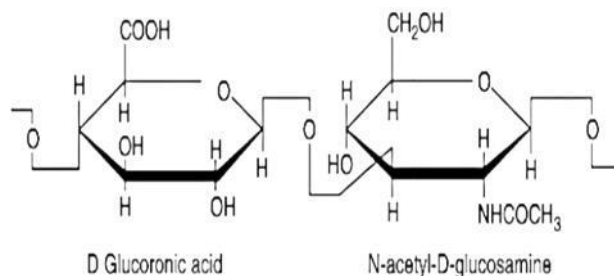


Obrázek 14 - Strukturální vzorec polystyrenu (PS).

5.1.2 Polysacharidy – hyaluronan sodný

Dalším využívaným materiálem byla kyselina hyaluronová. Ta se obvykle vyskytuje ve formě sodné soli, konkrétně hyaluronanu sodného (HA), Obr. 15. Skládá se z nerozvětveného glykosaminoglykanu, tedy z disacharidových jednotek D-glukoronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu. Pro použité experimenty byl zvolen hyaluronan sodný (HA) s různou střední molekulovou

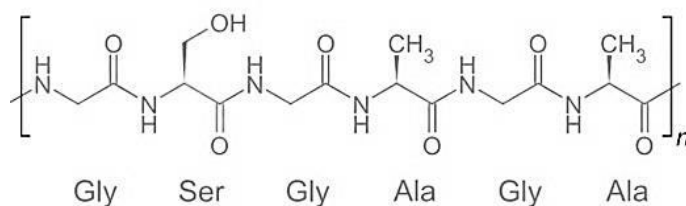
hmotností M_w (124 kDa, 243 kDa, 370 kDa, 600 kDa, 1,18 MDa, 1,5 MDa) zakoupený v kosmetické čistotě od firmy Contipro a.s. Dolní Dobrouč.



Obrázek 15 - Strukturální vzorec hyaluronanu sodného (HA) [176, 177].

5.1.3 Protein - *Bombyx mori* fibroin

Posledním využívaným materiálem byl hedvábný protein - *Bombyx mori* fibroin (BMF), Obr. 16, izolovaný z kokonů bource morušového na Ústavu biomateriálů, Univerzity v Bayreuthu podle literárně popsaného postupu [178].



Obrázek 16 - Strukturální vzorec hedvábného proteinu - fibroinu (BMF) [179-181].

5.2 Postupy úpravy polymerních povrchů

S ohledem na rozdílné požadavky úpravy materiálů na bázi syntetického polymeru, polysacharidu a proteinu budou podrobnější postupy úpravy těchto materiálů diskutovány ve výsledcích této práce. Začlenění souhrnu všech procesních postupů do jedné samostatné podkapitoly by bylo značně nepřehledné. Pro čištění materiálových povrchů (PS, sklo) bylo použito běžně dostupné laboratorní zařízení, jako jsou ultrazvukové lázně, laboratorní sušárny, atd. Stejně tak použité chemické látky a jejich roztoky byly temperovány v dostupných laboratorních sušárnách a průtočných temperačních nádobách. Zásobní roztoky byly skladovány při 5°C v lednici. Pokud není u daných výsledků uvedeno jinak, tak jich bylo dosaženo při laboratorní teplotě a vlhkosti (22°C, 50% RH). V případě úpravy povrchů za rotace byla rychlost otáčení 2200 ot/min, pokud není uvedeno jinak.

5.3 Použitá zařízení pro charakterizaci studovaných materiálů

Upravované povrchy a deponované vrstev byly charakterizovány pomocí různých druhů mikroskopů:

- SEM - skenovacích elektronových mikroskopů (Phenom Pro, FEI Nova NanoSEM),
- AFM - mikroskopů atomárních sil (NT-MDT Ntegra Prima, Bruker Dimension ICON),
- OM - optických mikroskopů (Nikon Eclipse 50i, Olympus IX51),
- KM - konfokálního mikroskopu (Olympus Fluoview FV 3000).

Změny výšek v povrchu upravovaných materiálů byly analyzovány, kromě AFM, pomocí kontaktních (Bruker DektakXT, DiaVite DH-8) a bezkontaktních (Bruker Contour GT-K, Taylor Hobson Talysurf CLI 500) profilometrů.

Změny smáčecích charakteristik upravovaných povrchů byly zkoumány pomocí optického goniometru (Krüss Drop Shape Analyzer DSA30).

Následná úprava připravených porézních povrchů probíhala pomocí plazmatického výboje nebo sekundární fázové separace metodou „Breath figures approach“ [182]. Pro tyto účely byl použit plazmatický reaktor značky Diener.

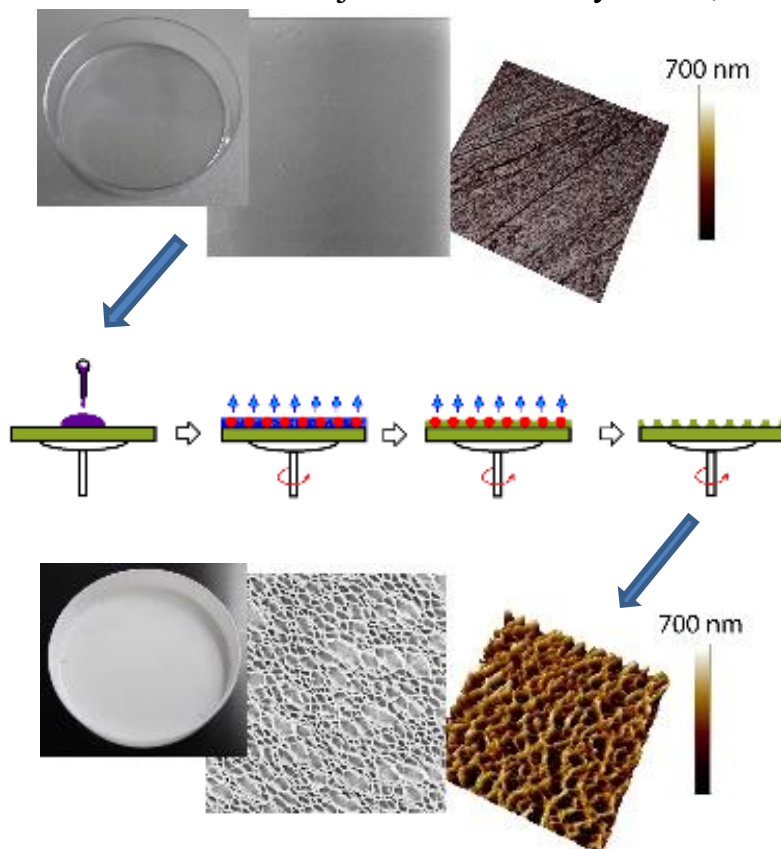
Vliv texturovaných povrchů na chování buněk byl studován s pomocí fluorescenčního (Olympus IX51) a konfokálního (Olympus Fluoview FV 3000) mikroskopu.

6. Výsledky a diskuze

Dosažené výsledky budou prezentovány ve čtyřech navazujících podkapitolách. V první bude představena konstrukce a funkce zařízení pro řízené dávkování směsných roztoků na modifikované polymerní povrchy. V následujících třech podkapitolách bude řešena problematika úpravy povrchu syntetického polymeru, polysacharidu a proteinu. V závěrečných částech druhé a čtvrté podkapitoly bude řešen vliv texturovaných povrchů na chování buněk.

6.1 Konstrukce zařízení pro řízenou úpravu polymerních povrchů

Navržený a v dalších podkapitolách podrobně diskutovaný princip změny povrchového reliéfu polymerního materiálu spočívá v postupném (časově sekvenovaném) nanášení směsi dobrého a špatného rozpouštědla na hladký povrch upravovaného materiálu rotujícího zvolenou rychlostí, Obr. 17.

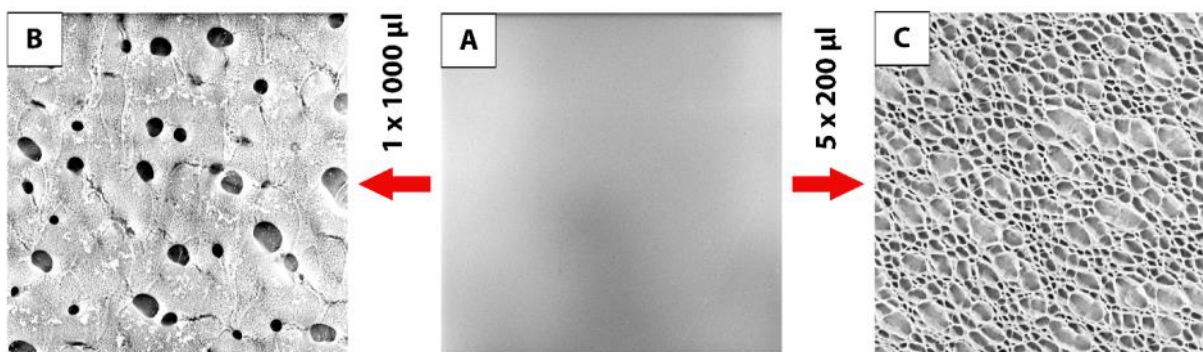


Obrázek 17 - Princip procesu úprava povrchu polystyrenu navrženou metodou časově sekvenované fázové separace.

Po depozici kapky na rotující povrch dojde k jejímu okamžitému rozprostření, dobré rozpouštědlo botná upravovaný materiál a špatné se separuje v povrchové vrstvě, kde tvoří šablonu pro vznikající povrchové nerovnosti. Následně dochází

k odpaření dobrého rozpouštědla a poté se odpaří špatné rozpouštědlo, které sloužilo jako šablona

Z prvotních experimentálních výsledků vyplynulo, že rozdělení srovnatelného objemu dávkované směsi dobrého a špatného rozpouštědla, určeného k úpravě povrchu polystyrenu (PS) na několik menších dávek umožňuje velmi jednoduše měnit vzhled a smáčecí charakteristiky upravovaného materiálu, Obr. 18. Nanese-li na povrch upravovaného PS (Obr. 18A) směs rozpouštědel v jednom kroku ($1 \times 1000 \mu\text{l}$) získáváme povrch vyznačující se mikrotrhlinami a menším množstvím $5 - 10 \mu\text{m}$ hlubokých pórů (Obr. 18B). Zatímco v případě použití více krokového přístupu ($5 \times 200 \mu\text{l}$ dávkovaných po 5 sekundách) získáváme mnohem kompaktnější povrch s velkým množstvím pórů rozdílného průměru a hloubky do $5 \mu\text{m}$ (Obr. 18C). Při zdůvodnění takovýchto změn je nutno brát v úvahu celou řadu proměnných: vzorek rotuje s danou rychlostí (2200 ot/min), dochází k jeho botnání, rozpouštění, fázové separaci [53, 70], rozdělení celého systému na elastickou, viskoelastickou, viskózní část, jsou zde generovány sekundární toky založené na koncentračně-difúzní mechanizmu spojeném s rychlým odpařováním rozpouštědla [73-75, 183], mění se povrchové napětí [71], atd.

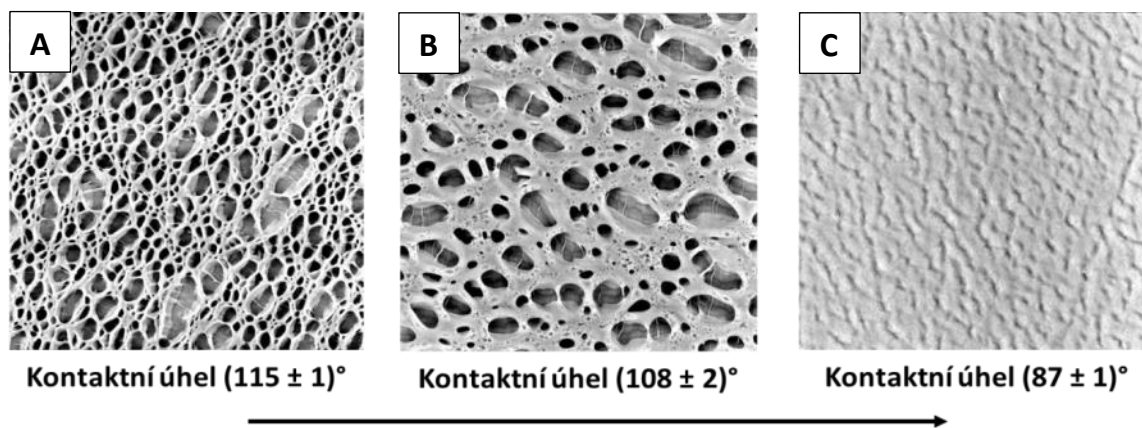


Obrázek 18 - Změna povrchového reliéfu PS v závislosti na rozdělení srovnatelného objemu modifikujícího roztoku do menších dávek. (A) výchozí povrch PS, (B) upravený povrch PS pomocí jedné dávky směsného rozpouštědla, (C) upravený povrch PS pomocí 5 dávek směsného rozpouštědla nanášených v 5 sekundových intervalech. Teplota úpravy 295 K . Složení roztoku: tetrahydrofuran (THF) : 2-ethoxyethanol (ETH) v objemovém poměru $1,5:8,5$. Obrázky o rozměru $134 \times 134 \mu\text{m}$ pořízeny pomocí SEM.

6.1.1 Zařízení pro automatické dávkování roztoků

S ohledem na výše uvedené poznatky bylo nezbytné navrhnout a zkonstruovat zařízení, pomocí kterého bude možné kontrolovat důležité procesní parametry úpravy povrchu. Těmito proměnnými jsou rychlost rotace a její změny, rychlost dávkování, prodlevy mezi dávkováním, počet opakovaných dávek a velikost jednotlivých dávek.

Jednou z klíčových funkcí vyvíjeného zařízení byla kontrola časového prodlevy mezi jednotlivými dávkami směsného roztoku deponovanými na povrchu upravovaného materiálu. Význam této proměnné je patrný z experimentálních výsledků uvedených na Obr. 19. Pro vznik specifické porézní struktury musí být zvolen odpovídající interval dávkování směsi dobrého a špatného rozpouštědla.



Obrázek 19 - Změna smáčecích charakteristik povrchu PS vodou s rostoucím časovým intervalem dávkování modifikující směsi rozpouštědel ve směru naznačené šipky. $5 \times 200 \mu\text{l}$ modifikačního činidla (THF : ETH v poměru 2:8) bylo dávkováno v intervalu: A) 5-ti sekund; B) 10-ti sekund, C) 20-ti sekund. Velikost obrázků pořízených pomocí SEM je $134 \times 134 \mu\text{m}$. [184]

Byl vytvořen návrh zařízení a ovládacího softwaru. Podle těchto návrhů bylo vyrobeno a otestováno TSSC (Time Sequenced Spin Coater) zařízení, ovládané vlastní řídicí elektronikou a softwarem, viz. Obr. 20.

Vývoj a konstrukce tohoto zařízení probíhala na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně. Elektroinstalace a ovládací software byly dodány externí firmou na základě zadaných požadavků. Hlavním řešitelem této problematiky byl autor této práce.

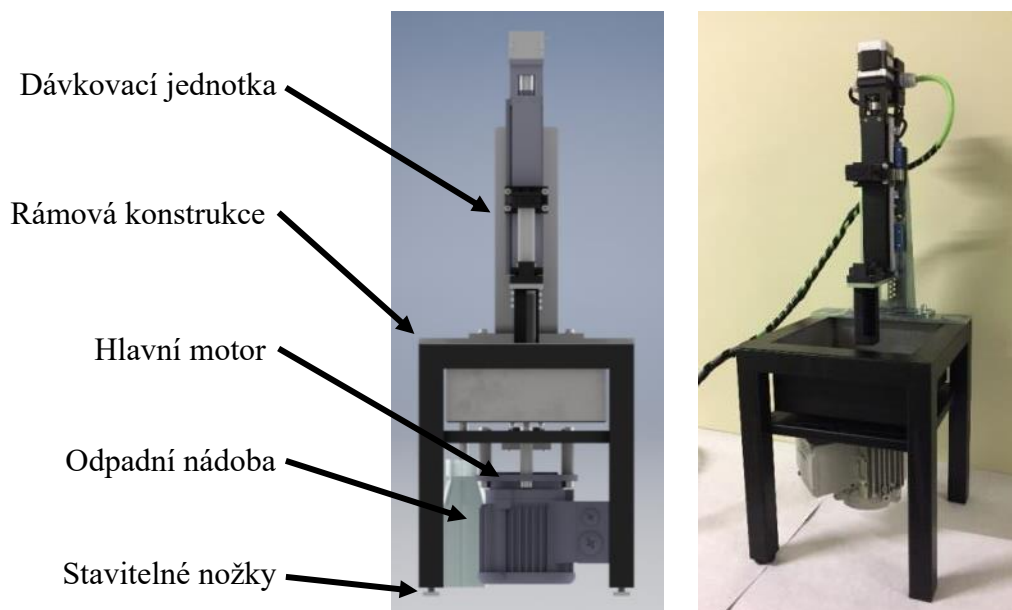
Zařízení na Obr. 20 složeno ze tří samostatných částí. První z nich je sestava motoru s rotorem, držákem vzorků a dávkovací jednotkou pro depozici směsných roztoků. Druhou částí je řídicí jednotka umístěná v samostatném rozvaděči. Třetí částí je počítač umožňující ovládání softwaru nahraného v řídicí jednotce.



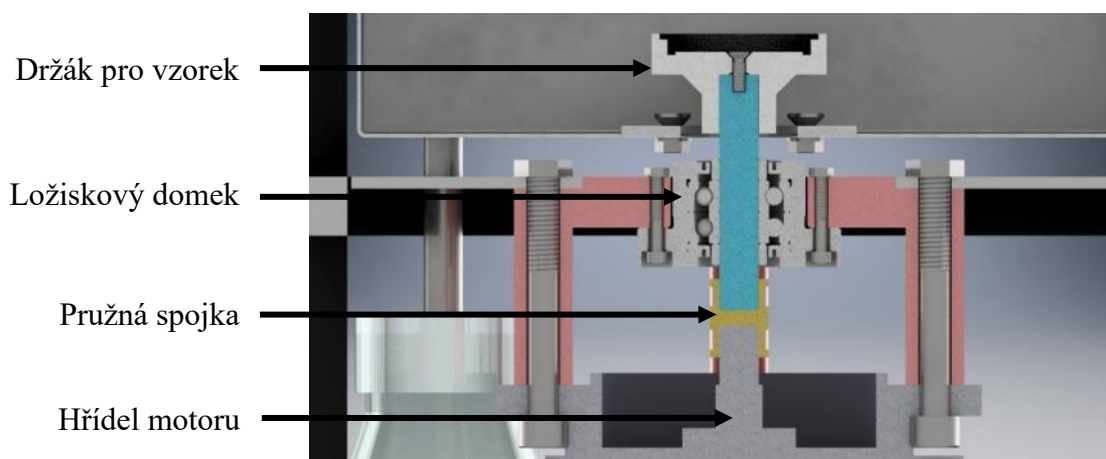
Obrázek 20 - Vyvinuté zařízení pro modifikaci povrchové topografie polymerů (TSSC) skládající se z nosiče vzorku na rotoru, dávkovacího zařízení, řídicí elektroniky a navrženého ovládacího SW.

První zmíněná část TSSC se skládá z hlavního motoru (Siemens 1LA7053-4AB11) s rychlostí rotace v rozmezí 300 - 3000 ot/min, Obr. 21. Tento motor je připojen na rámovou konstrukci zajišťující stabilitu systému a přichycení dalších funkčních částí zařízení. Nivelace rámové konstrukce je možná pomocí stavitelných nožek. V kovové rámové konstrukci je nad motorem osazena nerezová vana umožňující zachytávání a odtok odstříknutých směsných roztoků. Tato vana je spádována do jednoho rohu s otvorem napojených na odpadní nádobu.

Pro zajištění reprodukovatelnosti procesu modifikace je nezbytné eliminovat přenos vibrací a horizontální vyosení, k nimž dochází v důsledku rotace motoru a změny její rychlosti. Aby se tyto vlivy nepřenášely z motoru přes hřídel a pružnou spojku až na modifikovaný povrch je mezi držákem vzorku umístěn ložiskový domek, který tyto negativní vlivy významně eliminuje, Obr. 22.

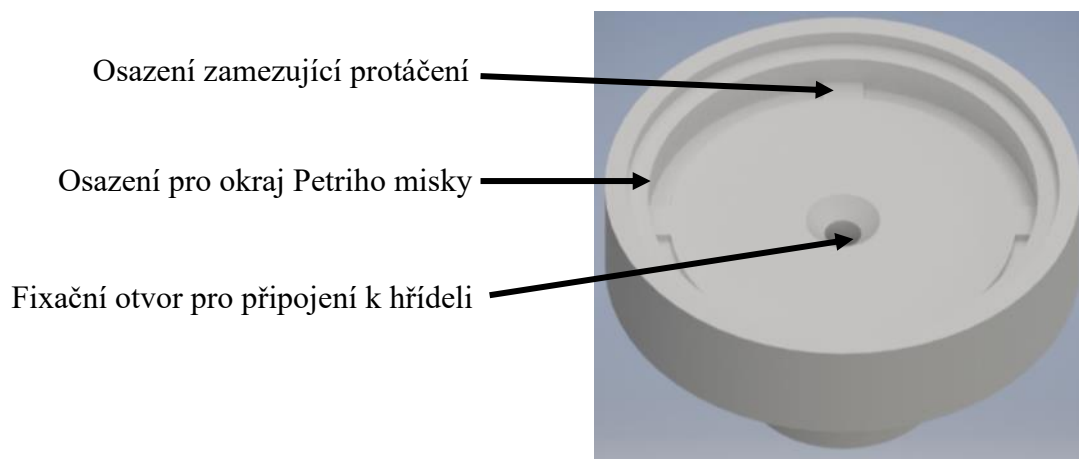


Obrázek 21 - Vlevo model centrální části TSSC zařízení s popisem hlavních konstrukčních prvků. Vpravo fotografie sestavené části zařízení.



Obrázek 22 - Řez modelem rotační části TSSC zařízení.

Upravovaný polymerní materiál je v TSSC zařízení umísťován do speciálně navrženého držáku. Uvedený nosič vzorků, Obr. 23, byl navržen pro Petriho misky o průměru 34 mm od společnosti TPP. Díky výčnělkům na dně tohoto držáku není nutné misky fixovat během jejich rotace. Pro výrobu tohoto držáku, stejně jako celé rady dalších komponent TSSC byly použity 3D tiskárny dostupné na Ústavu fyziky a materiálového inženýrství UTB ve Zlíně (Formlabs Form 2 a 3, Ultimaker S3). Spojení držáku s hřídelí umístěnou v ložiskovém domku, Obr. 22, je provedeno pomocí jednoho metrického šroubu. Toho lze následně s výhodou použít pro rychlou výměnu nosičů pro rozdílné typy vzorků, Petriho misky o rozdílných průměrech.



Obrázek 23 - Rotační držák vzorků TSSC zařízení.

K dávkování směsi rozpouštědel na povrch rotujícího substrátu slouží samostatná konstrukce skládající se z pozičně nastavitelného děrovaného plechu ve tvaru písmene L, k němuž je připevněno vysoce přesné lineární vedení s krokovým motorem opatřené ve své spodní části statickým uchycením pro vyměnitelné držáky různých typů injekčních stříkaček, Obr. 24. V horní části je toto lineární vedení opatřeno posuvným systémem s aretací pro píst stříkačky, z níže je na povrch materiálů dávkován směsný roztok. Pomocí technologie 3D tisku je opět možné vytisknout a osadit do této části zařízení libovolné typy adaptérů pro různé typy stříkaček a jejich tlačných systémů. Díky použití plechu ve tvaru písmene L je možné celé dávkovací zařízení snadno centrovat na střed upravovaného materiálu a měnit výšku jehly nad povrchem vzorku. Jehla s tupou špičkou je používána pro přesné nanášení mikrolitrových objemů kapaliny na povrch modifikovaného materiálu.

Po naplnění stříkačky modifikačním roztokem a vložení do držáku je píst stříkačky připojen k tlačnému systému. Tento systém se skládá z komerčně dostupného lineárního modulu značky Hiwin KK40 pro velmi přesný vertikální pohyb a krokového motoru. Lineární modul je osazen trapézovým šroubem s přesností 3 mm. Pracovní vzdálenost této lineární jednotky je 125 mm. Z hlediska bezpečnosti je lineární jednotka rovněž osazena koncovými spínači. Přesné dávkování roztoku na povrch probíhá prostřednictvím přítlaku, které je spojen pomocí polymerní spony s pístem použité skleněné stříkačky.

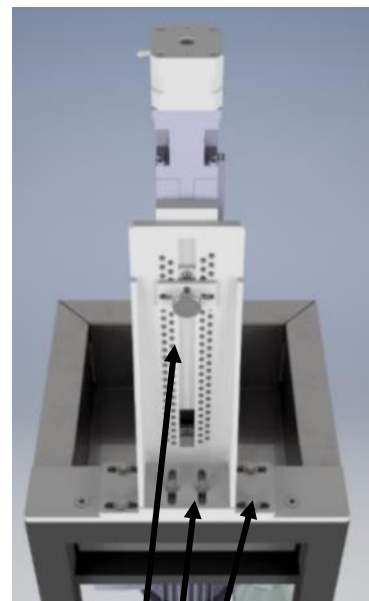
Pohled zepředu



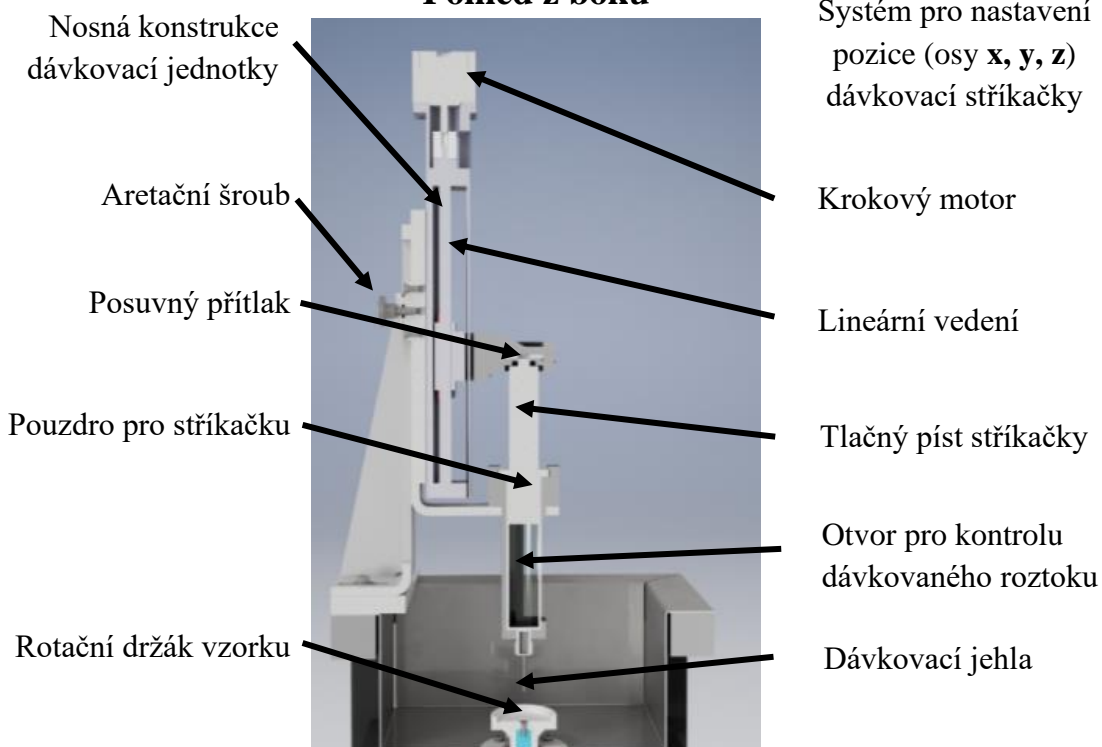
Pouzdro pro stříkačky



Pohled zezadu



Pohled z boku



Obrázek 24 - Konstrukční části dávkovací jednotky TSSC zařízení.

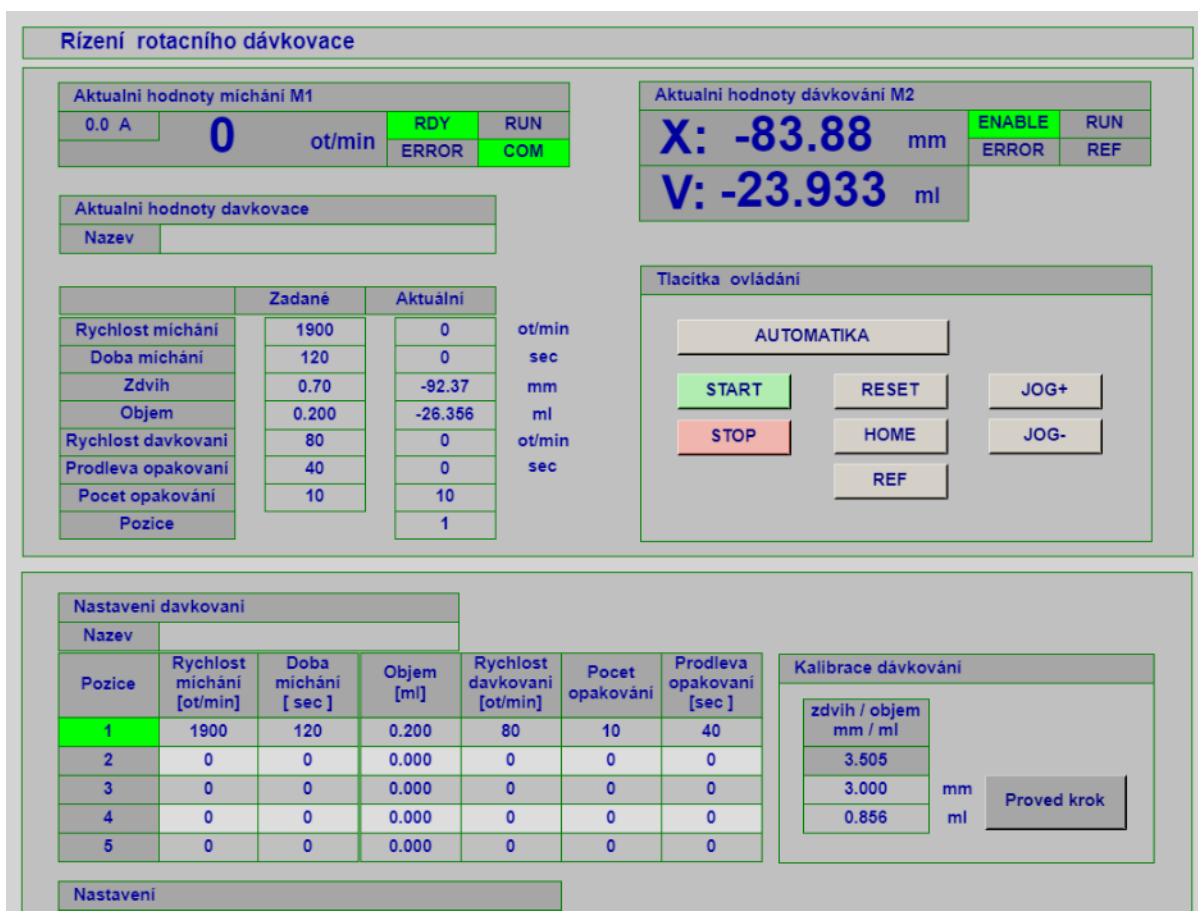
Před samotným dávkováním směsi rozpouštědel na povrch substrátu je nutné vystředit polohu dávkující jehly nad střed rotujícího substrátu, aby bylo možné zajistit rovnoměrnou distribuci směsi rozpouštědel po povrchu rotujícího substrátu. K tomuto účelu je celý kovový držák umístěn na stavitelný rám

umožňující nastavení přesné pozice (v ose x a y) dávkovací stříkačky pomocí aretačních šroubů. Vzhledem k nutnosti nastavovat také správnou výšku jehly nad středem substrátu je přístroj vybaven velmi jednoduchou soustavou děr s vzdáleností 2 mm. Povolením aretačního šroubu je možné s celým dávkovacím systémem pohybovat v ose z. Ve zvolené poloze se zasune čep procházející jezdcem až do pevné děrované konstrukce. Následným přitažením aretačního šroubu dojde k fixaci této polohy.



Obrázek 25 - Řídící jednotka TSSC zařízení. Vlevo pohled na přední stranu, uprostřed kontrolní systémy a elektroinstalace, vpravo hlavní vypínač.

Druhou částí TSSC je řídicí jednotka umístěná vedle přístroje v rozvaděčové skříni, Obr. 25. Tato řídicí jednotka je napájena 230 V. Obsahuje veškerou elektroinstalaci složenou z frekvenčního měniče, PLC jednotky, ovladače krokového motoru a jisticích prvků. Na rozvaděčové skříni se nachází z boční strany hlavní vypínač. Z přední strany je tato část TSSC zařízení vybavena červeným nouzovým vypínačem, který v případě potřeby ihned odstaví celý přístroj od elektrické energie. Mimo to je na přední straně umístěno tlačítko pro samostatné zapnutí řízení pohonné jednotky a modrá dioda signalizující chod zařízení. Uvnitř této jednotky je umístěn programovatelný logický ovladač známý jako PLC, frekvenční měnič umožňující nastavení otáček motoru otáčející substrátem, driver a zdroj napětí pro krokový motor.



Obrázek 26 - Softwarové okno TSSC zařízení.

Poslední částí zařízení je počítač sloužící k ovládání kontrolní jednotky, v níž je nahrán speciálně navržený software, Obr. 26. Připojování k PLC jednotce v níž je nahrán navržený software se provádí přes IP adresu. To znamená, že navržený software není třeba instalovat a lze jej ovládat z jakéhokoliv PC připojeného do sítě. S ohledem na skutečnost, že podrobná znalost ovládacího softwaru je klíčová pro budoucí uživatele, je této části zařízení věnována značná pozornost.

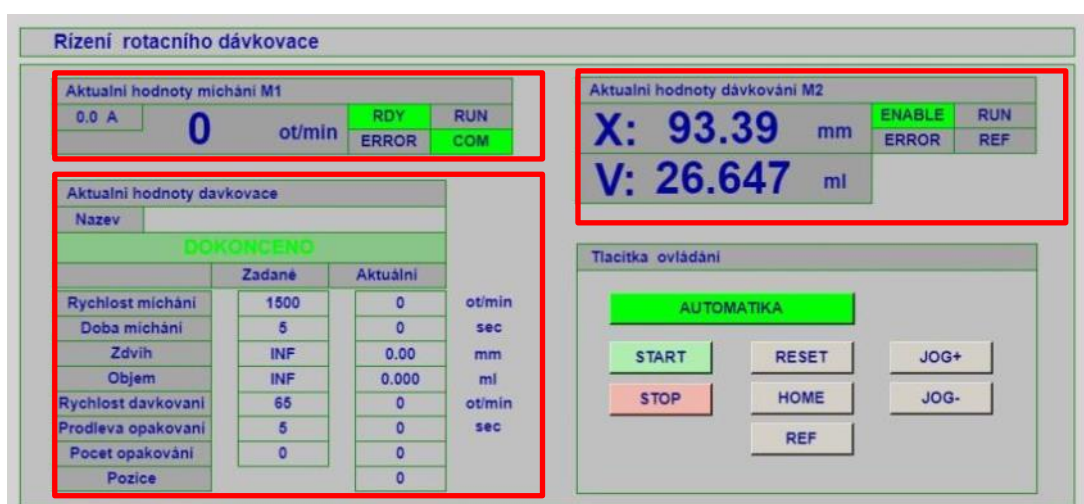
Tento program umožňuje kontrolovat rychlost rotace vzorku a pohyb dávkovacího zařízení. Lze v něm nastavovat:

- rychlost rotace vzorku,
- změnu rychlosti rotace v čase,
- dobu rotace,
- rychlost dávkování,
- objem dávkované směsi,
- počet deponovaných dávek,
- časovou prodlevu mezi jednotlivými dávkami.

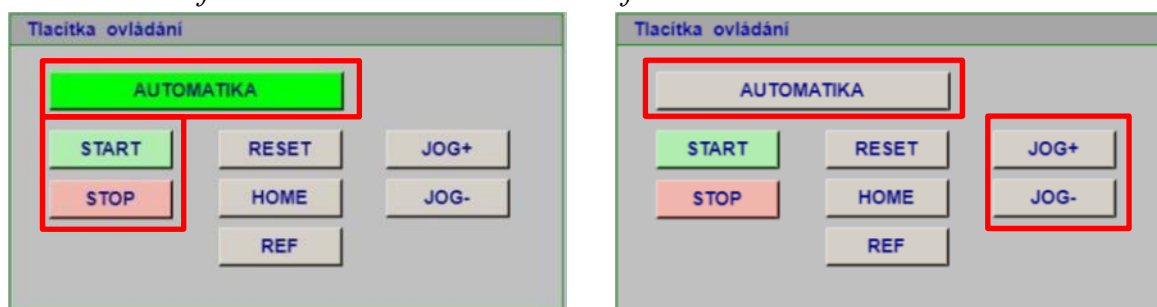
V softwarovém rozhraní lze dále nastavit až pětikrokový proces modifikace lišící se výše uvedenými proměnnými. Mimo to umožňuje manuálně ovládat pohyb dávkovacího zařízení a online kontrolovat celý proces úpravy povrchu.

Samotný software byl navržen a naprogramován dle zadaných požadavků řešitelského týmu na Ústavu fyziky a materiálového inženýrství UTB ve Zlíně. Je rozdělen do několika částí (tabulek).

První tři tabulky s názvem „Aktuální hodnoty M1“, „M2“ a „Aktuální hodnoty dávkovače“ zobrazují aktuální hodnoty probíhajících činností, Obr. 27.



Obrázek 27 - Informační okna v navrženém softwarové rozhraní TSSC zařízení.

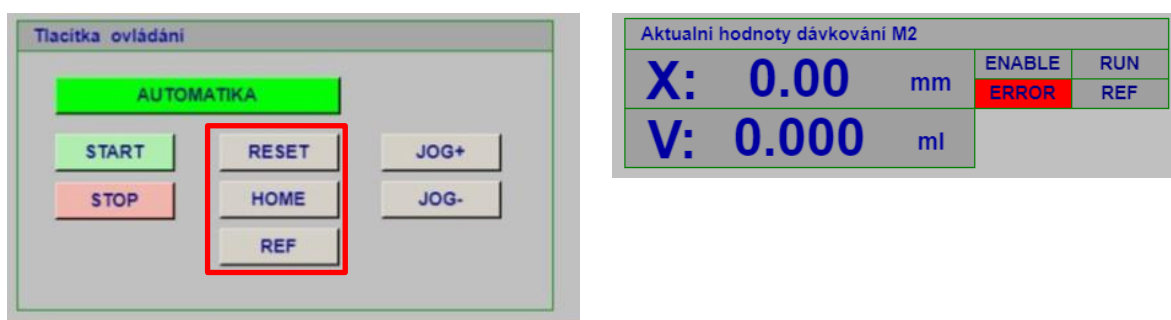


Obrázek 28 - Ovládací prvky v softwarové rozhraní TSSC zařízení. Vlevo aktivovaný automatický režim. Vpravo nastaven manuální režim.

Tlačítka na obrázku 28 slouží k ovládání přístroje v režimu AUTOMATIKA/Manuál. V případě, kdy tlačítko automatika svítí zeleně, je systém připraven provádět úkony dle tabulky „Nastavení dávkování“, Obr. 30. Tento mód se spouští tlačítkem START. V případě potřeby jej lze kdykoliv ukončit stisknutím tlačítka STOP. Při opětovném stisku tlačítka AUTOMATIKA

system přejde do módu manuál a tlačítko zešedne. V tomto případě je možné pohybovat s tlačným systémem nahoru a dolů pomocí tlačítek JOG+ a JOG-.

V případě dosažení krajních pozic dojde k aktivaci koncových snímačů a systém se vypne. Takovýto stav je indikován rozsvícením tlačítka ERROR v tabulce „Aktuální hodnoty dávkování M2“. Tuto blokaci lze vyrušit stiskem tlačítka RESET, Obr. 29. Tento software rovněž umožňuje nastavení zvolené referenční hodnoty tlačítkem „REF“. V případě potřeby ji lze z paměti systému vyvolat tlačítkem „HOME“, což způsobí okamžité najetí zařízení do této polohy a to maximální rychlostí.



Obrázek 29 - Nastavování referenční polohy a resetování mezní polohy v softwarové rozhraní TSSC zařízení.

V tabulce nastavení dávkování je možnost vytvořit časově sekvenovaný program, tedy za sebou jdoucí sled událostí, při kterých se můžou libovolně měnit rozdílné parametry, Obr. 30. Tento seznam má pět pozic. Lze měnit rychlost rotace substrátu, celkovou dobu, po kterou se bude substrát otáčet definovanou rychlostí a to včetně doby dosychání. Dalším parametrem je objem dávkované směsi rozpouštědel a rychlost tohoto dávkování. Poté lze nastavovat počet opakování dávkování daného objemu směsi rozpouštědel. Poslední proměnnou je prodleva opakování, tedy doba, kterou přístroj vykoná mezi jednotlivými dávkami. Po splnění všech podmínek z pozice 1, přejde systém automaticky na pozici 2 a tak pokračuje až do poslední pozice. V případě, že chceme přerušit tento automatický program dříve, je nutné mít ve sloupci počet opakování hodnotu 0. Tím dojde k ukončení programu dříve než v pozici číslo 5. Tuto automatickou sekvenci nastavených parametrů v tabulce Nastavení dávkování lze zapnout tlačítkem START a to pouze tehdy, je-li aktivní (tedy zelené) tlačítko AUTOMATIKA v tabulce „Tlačítka ovládání“, Obr. 28 vlevo.

| Nastavení dávkování | | | | | | |
|---------------------|---------------------------|--------------------|------------|-----------------------------|-----------------|--------------------------|
| Název | | | | | | |
| Pozice | Rychlost míchání [ot/min] | Doba míchání [sec] | Objem [ml] | Rychlost dávkování [ot/min] | Pocet opakování | Prodleva opakování [sec] |
| 1 | 1900 | 120 | 0.200 | 80 | 10 | 40 |
| 2 | 0 | 0 | 0.000 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 0 | 0.000 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 0 | 0.000 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 0 | 0 | 0.000 | 0 | 0 | 0 |

Obrázek 30 - Okno pro nastavené dávkovacího programu v softwarové rozhraní TSSC zařízení.

Vzhledem k možnosti měnit různé druhy stříkaček o různých průměrech, je nutné každou stříkačku kalibrovat v tabulce „Kalibrace dávkování“, Obr. 31 vlevo. Tato kalibrace se provádí vytlačení uvedené vzdálenosti v mm a to stiskem tlačítka „Proved krok“. Vytlačené množství je poté zachyceno do nádoby a zváženo. Tato získaná hodnota je poté dále přes hustotu přepočítána na objem zadaný do této tabulky v ml. Díky této kalibraci poté systém automaticky dávkuje, v tabulce „Nastavení dávkování“, objem v ml, Obr. 30. Tyto hodnoty dávkování, tedy vytlačený objem i vytlačenou vzdálenost, je možné kontrolovat v tabulce „Aktuální hodnoty dávkování“, Obr. 27 vlevo dole.

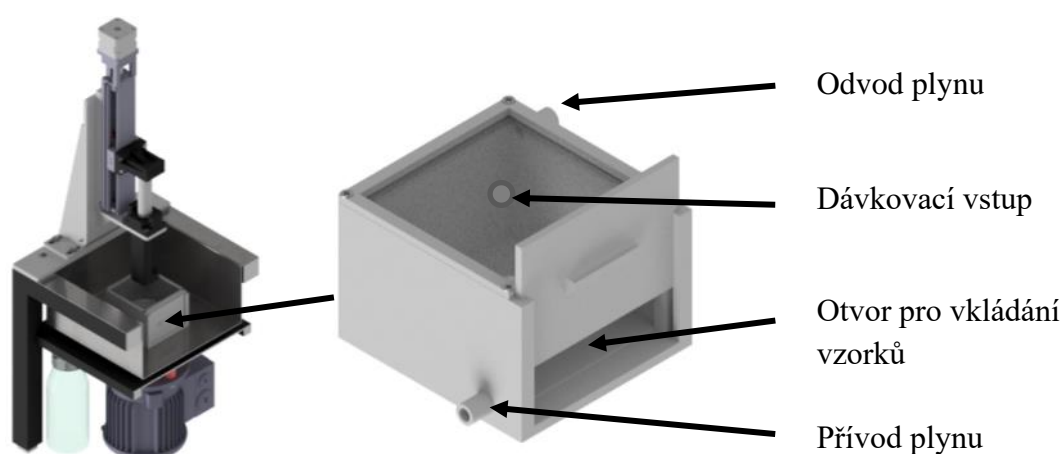
| Kalibrace dávkování | | Nastavení | |
|--------------------------|--|-----------------------|------------|
| zdvih / objem mm / ml | | Otacky M2 RUC | 600 ot/min |
| 3.505 | | Zpozdění revez.zdvihu | 100 ms |
| 3.000 | mm | Rychlost revez.zdvihu | 120 ot/min |
| 0.856 | ml | Reverz.zdvih | 0.30 mm |
| | <input type="button" value="Proved krok"/> | | |

Obrázek 31 - Kalibrační okno a pokročilé nastavení v softwarové rozhraní TSSC zařízení.

Vzhledem k rozdílnému povrchovému napětí kapalin vůči jehle stříkačky je možné nastavit po každém dávkování rozpouštědel reverzní zdvih zabraňující nežádoucímu odkapávání rozpouštědel z jehly stříkačky, Obr. 31 vpravo. Je možné měnit zpoždění reverzního zdvihu, tedy dobu po dávkování směsi rozpouštědel, po kterou systém vyčká, než provede reverzní zdvih. V případě viskózních kapalin lze také nastavit rychlost reverzního zdvihu. Dále lze

v nastavení měnit rychlost posuvu tlačného pístu v případě manuálního nastavování.

Jedním z klíčových faktorů mající vliv na výslednou morfologii upravovaných polymerních povrchu je míra okolní vlhkosti a rychlost proudění plynů [52]. Z toho důvodu byl dodatečně navržen, vymodelován a s pomocí 3D tiskárny vyroben speciální box, s jehož pomocí je možné kontrolovat tyto proměnné, Obr. 32.



Obrázek 32 - Průtočný box TSSC zařízení pro definovaný přívod/odvod plyných médií do prostoru modifikovaného vzorku.

Průtočný box znázorněný na Obr. 32 se skládá z bočních zásuvných dvířek pro vkládání upravovaných Petriho misek. S pomocí takového technického řešení lze jednoduše měnit vzorky, aniž by bylo nezbytné měnit pozici dávkovací jehly s modifikačním roztokem. Spolu s relativně malými rozměry (6 x 6 x 3 cm) dochází k velmi rychlé vyrovnání a stabilizaci procesních podmínek uvnitř navrženého boxu. Díky tomu lze velmi rychle a efektivně připravovat velké množství vzorků za poměrně krátký čas.

V horní části boxu je umístěn průhledný polymerní kryt s průchodem pro dávkovací jehlu. V levé dolní části je vstup pro pracovní plyn, s jehož pomocí lze z prostoru boxu kontinuálně odvádět případnou vlhkost, či ji definovaným způsobem měnit. Odvod tohoto pracovního plynu je umístěn v horní části boxu, viz Obr. 32 vpravo nahoře.

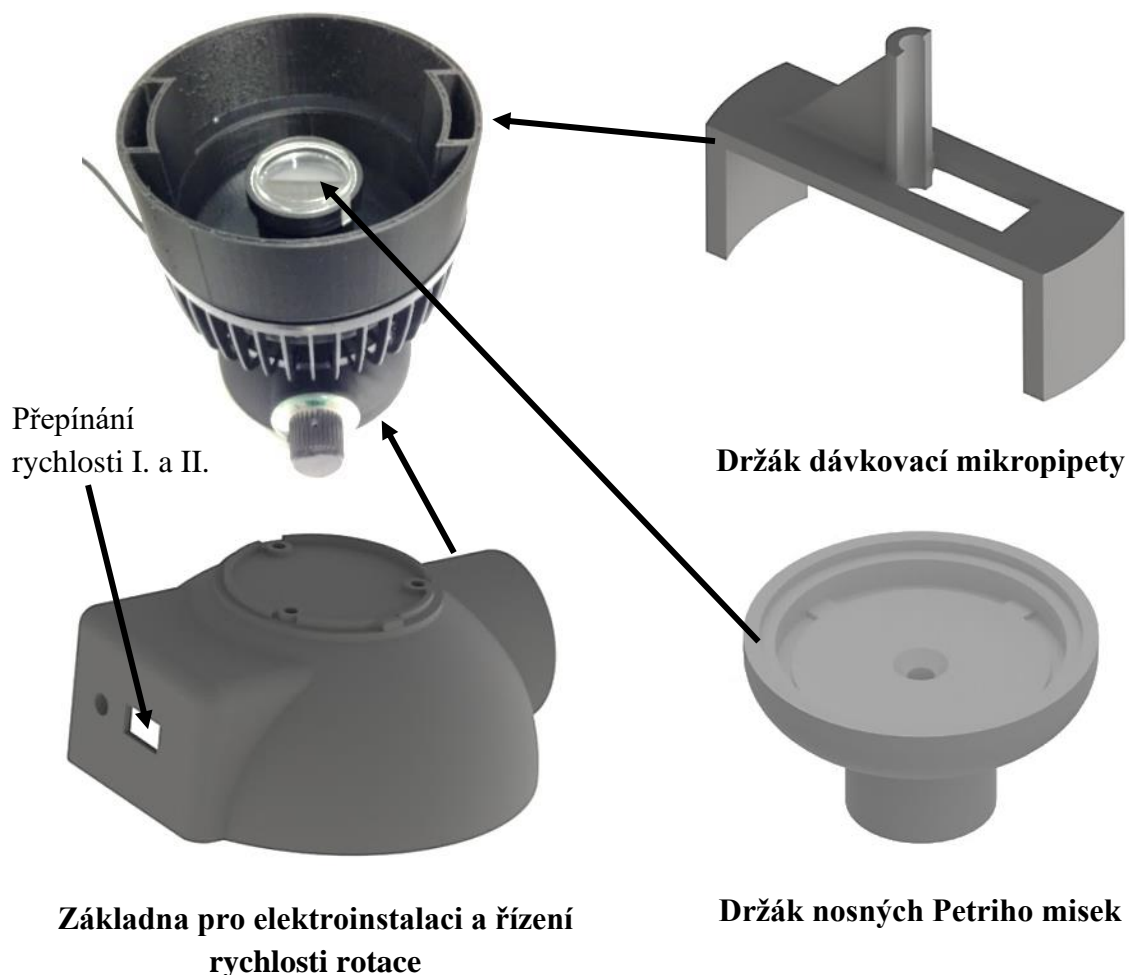
6.1.2 Mobilní zařízení pro manuální dávkování roztoků

Pro potřeby úpravy proteinových vrstev pomocí fázové separace na Univerzitě v Bayreuthu bylo navrženo a poté sestaveno malé, snadno transportovatelné zařízení (M-TSSC) umožňující provádět základní modifikační testy mimo Univerzitu Tomáše Bati ve Zlíně, Obr. 33. Konstrukce tohoto zařízení probíhala výhradně na Ústavu fyziky a materiálového inženýrství Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně a jeho hlavním autorem je E. Wrzecionko.



Obrázek 33 - Mobilní zařízení pro manuální dávkování roztoků na rotující polymerní povrch M-TSSC.

Tento mobilní spincoater (M-TSSC) se sestává z podstavce, ve kterém se nachází 12 V DC motor a sada za sebou jdoucích rezistorů s rozdílnými odpory. Použité části pro jeho sestavení byly namodelovány v programu Autodesk Inventor a vyrobeny s pomocí 3D tiskárny Ultimaker S3, Obr. 34.



Obrázek 34 - Hlavní konstrukční části M-TSSC zařízení.

Z konstrukčního hlediska je M-TSSC zařízení řešeno následovně. Motor umístěný v elektroinstalační základně, Obr. 34 vlevo dole, ústí do pracovní komory, která je opatřena ochranným silikonovým nátěrem odolávajícím používaným rozpouštědlům. Na rotoru 12 V DC motoru je umístěn standardní držák malých polystyrenových Petriho misek (průměr 3,4 cm). Tento držák byl namodelován, optimalizován a vytisknut tak, aby umožňoval jednoduchou výměnu Petriho misek. Mimo to je tento držák vybaven výčnělkou, do kterých

zapadnou drážky na spodní části použitých Petriho misek, které brání protáčení modifikovaného substrátu.

Aplikace směsného roztoku na povrch rotující Petriho misky probíhá pomocí mikropipety. Pro zajištění reprodukovatelnosti pozice nanášeného roztoku na modifikovaný povrch je mikropipeta přikládána k držáku dávkovací pipety, viz Obr. 34 vpravo nahoře. S pomocí tohoto nástavce lze vystředit pozici špičky pipety a jeho výšku nad substrátem.

Rychlost rotace modifikovaného vzorku lze nastavovat v rozsahu 450 až 5200 otáček za minutu. Změna rychlosti se nastavuje pomocí otočného prvku na základně zařízení, viz Obr. 35. Tento prvek je označen čísly od 0 po 10. Každému z číselných označení odpovídá jiný odpor a z něho plynoucí rychlost otáčení, viz tabulka na Obr. 35. Rychlost se dá přepínat ve dvou stupních I. a II. na zadní části základny zařízení, viz Obr. 34 vlevo dole.

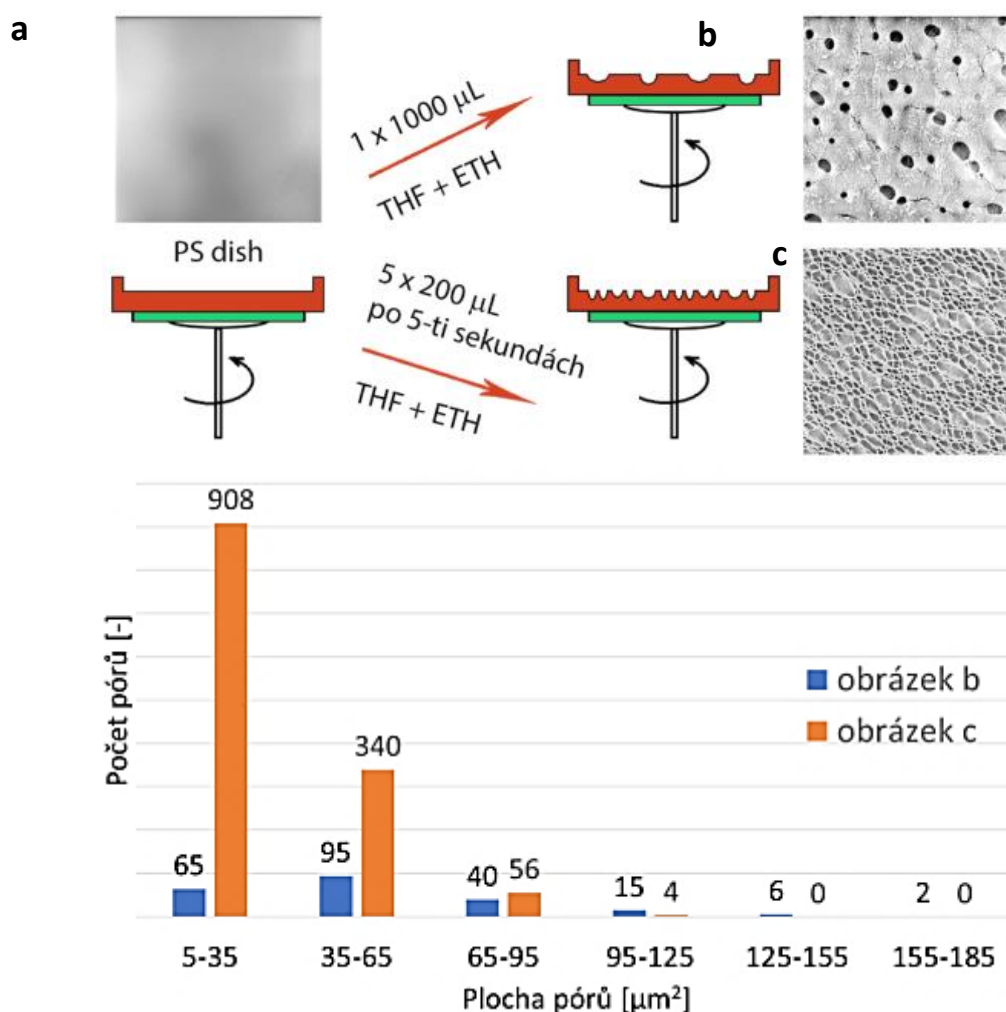


| Nastavené číslo | Rychlost rotace - I [ot/min] | Rychlost rotace- II [ot/min] | Aplikovaný odpor [Ω] |
|-----------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 0 | 5100 | 5200 | 0 |
| 1 | 4450 | 4500 | 27 |
| 2 | 3950 | 4000 | 54 |
| 3 | 3400 | 3500 | 81 |
| 4 | 2900 | 3000 | 102 |
| 5 | 2640 | 2740 | 120 |
| 6 | 2350 | 2400 | 132 |
| 7 | 2200 | 2250 | 144 |
| 8 | 1800 | 1900 | 166 |
| 9 | 450 | 500 | 266 |

Obrázek 35 - Možnosti nastavení rychlosti otáčení rotoru M-TSSC zařízení.

6.2 Fázově separační úprava polystyrenových substrátů

V této části práce bude řešena problematika úpravy povrchů na bázi polystyrenu (PS). Tento typ materiálu byl vybrán záměrně s ohledem na jeho aplikační potenciál v oblasti buněčných in-vitro testů, kde se používá jako nosný substrát kultivovaných buněk [14, 15, 71, 185, 186]. Částečně byla problematika úpravy PS povrchů naznačena na začátku předešlé podkapitoly, tak aby byl zřejmý význam konstrukce popisovaných zařízení TSSC a M-TSSC. Nutno poznamenat, že získané poznatky spojené s úpravou PS byly použity pro úpravu strukturně složitějších systémů, jako jsou polysacharidy a proteiny. Z toho hlediska bude úpravě povrchů PS věnována největší pozornost.

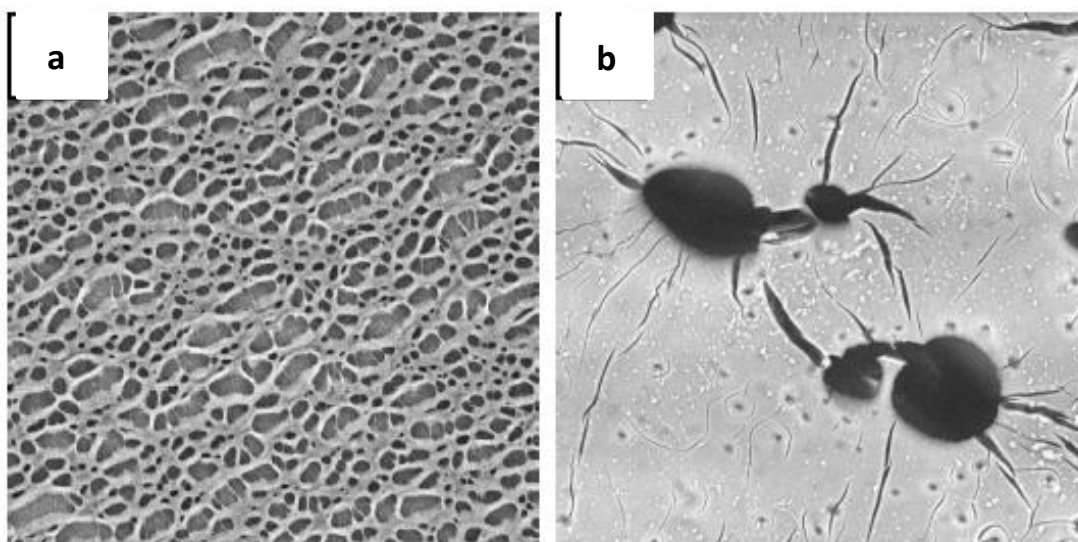


Obrázek 36 - Změna povrchového reliéfu v závislosti na rozdělení srovnatelného objemu roztoku do menších dávek. (a) výchozí povrch PS, (b) upravený povrch PS pomocí jedné dávky směsného rozpouštědla, (c) upravený povrch PS pomocí 5 dávek v 5s intervalech. Složení modifikačního roztoku tetrahydrofuran (THF):2-ethoxyethanol (ETH) v objemovém poměru 1,5:8,5. Obrázky (a), (b), (c) o rozměru 134x134 μm pořízeny pomocí SEM.

Nově navržený přístup úpravy PS substrátů spočívá ve využití časově sekvenovaného dávkování modifikačního roztoku na rotující povrch. To znamená, že oproti literárně popsaným postupům [14, 52, 54, 187, 188] se liší především postupným, vícekrokovým dávkováním směsi dobrého a špatného rozpouštědla s případnými aditivy, Obr. 36. V rámci následujícího textu bude demonstrováno, jak variace tohoto faktoru, spolu s dalšími proměnnými (teplota, poměr dobrého a špatného rozpouštědla, atd.), ovlivňuje velikost a hloubku vznikajících povrchových prohlubní - pórů na povrchu polystyrenu. Modelově bude nastíněn proces vzniku a prohlubování povrchových pórů spojený s viskoelastickou fázovou separací, povrchovým napětím a sekundárním tokem zapříčiněným rychlým odpařováním dobrého rozpouštědla.

Modifikačním roztokem je myšlena směs dvou rozpouštědel. V prvním z rozpouštědel je daný polymer rozpustný. V druhém se za daných podmínek sráží. Výběr směsi dobrého a špatného rozpouštědla pro experimenty spojené s úpravou PS vycházel z následujících požadavků: složky roztoku musí být vzájemně mísitelné, dobré rozpouštědlo se musí mnohem rychleji odpařovat oproti špatnému, aby mohlo dojít k fixaci vznikajících povrchových pórů na principu podobném přístupu „Breath figures approach“ [52]. Na základě Hansenova parametru rozpustnosti [120] a provedených experimentů byla pro úpravu povrchu PS zvolena kombinace dobrého rozpouštědla - tetrahydrofuranu (THF) s 2-ethoxyethanolem (ETH) nebo vodou jako špatnými rozpouštědly.

Z výsledků uvedených na Obr. 36 vyplynulo, že rozdělení srovnatelného objemu dávkované THF s ETH, na několik menších dávek umožňuje velmi jednoduše měnit vzhled PS povrchu. Naneseme-li na povrch, Obr. 36a, směs THF+ETH v jednom kroku, získáváme povrch vyznačující se menším množstvím velkých pórů, Obr. 36b. Zatímco v případě použití více krokového přístupu získáváme povrch rovnoměrně pokrytý povrchovými prohlubněmi Obr. 36c. Mimo to rozdělení modifikační směsi na více dávek přináší další nezanedbatelné pozitivum v podobě eliminace vnitřních pnutí a povrchových trhlin, ke kterým může docházet při použití jednokrokové úpravy, Obr. 37.



Obrázek 37 - Srovnání způsobu dávkování směsi THF s ETH (1,75:8,25) a) *spin-coating* 5x200 μl po 5s, b) *staticky* 1x1000 μl . Velikost obrázků ze SEM 134x134 μm .

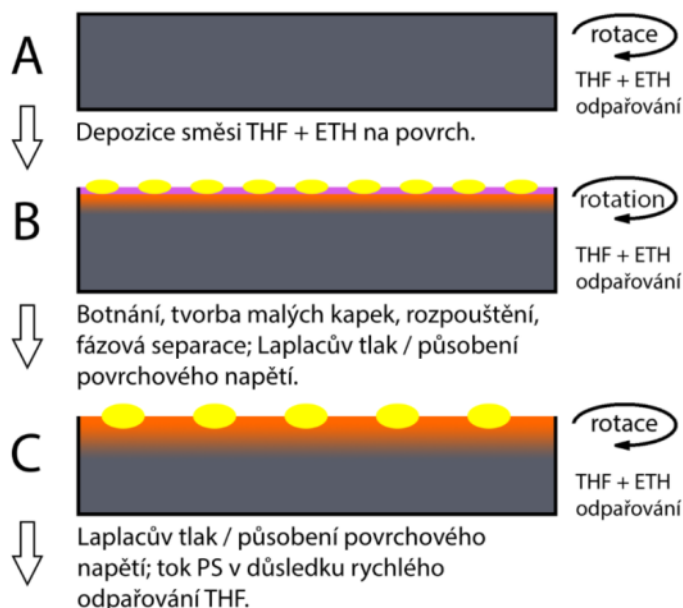
Dalším zásadním faktem je, že úprava povrchů neprobíhá ve statickém režimu, jak je běžně prezentováno v literatuře [14, 52, 71]. V rámci experimentálních výsledků prezentovaných v této práci byla použita metoda spin-coating. Mezi hlavní přednosti tohoto přístupu patří rychlé a rovnoměrnému pokrytí vzorku modifikačním roztokem. Díky tomu lze pozorovat až na 80% upravované plochy PS misky srovnatelný povrchový reliéf. Okrajové oblasti PS misky byly při analýzách zanedbávány z důvodu hromadění rozpouštědla při rotaci a artefaktům, které zde vznikají v důsledku nerovnoměrného rozložení povrchových napětí a reziduálním pnutím z procesu výroby PS misek.

Rotace vzorku sebou přináší specifickou deformaci vznikajících pórů, které nejsou striktně kruhově symetrické, Obr. 37a. Tato skutečnost je spojena jednak s odstředivou silou, proudění vzduchu v určitém směru s danou rychlostí [52] a rovněž s faktem, že při tomto procesu musíme uvažovat tzv. viskoelastickou fázovou separaci definovanou H. Tanakou [70, 189]. Menší mikropóry mezi velkými vznikají v důsledku přirozené snahy systému o maximální vyplnění upravované plochy.

6.2.1 Model popisující formování pórů na povrchu PS

Na základě experimentálních a teoretických poznatků [184] byl navržen model popisující formování povrchových pórů v průběhu časově sekvenovaného dávkování směsi dobrého a špatného rozpouštědla na polymerní povrch, Obr. 38.

Krok 1.

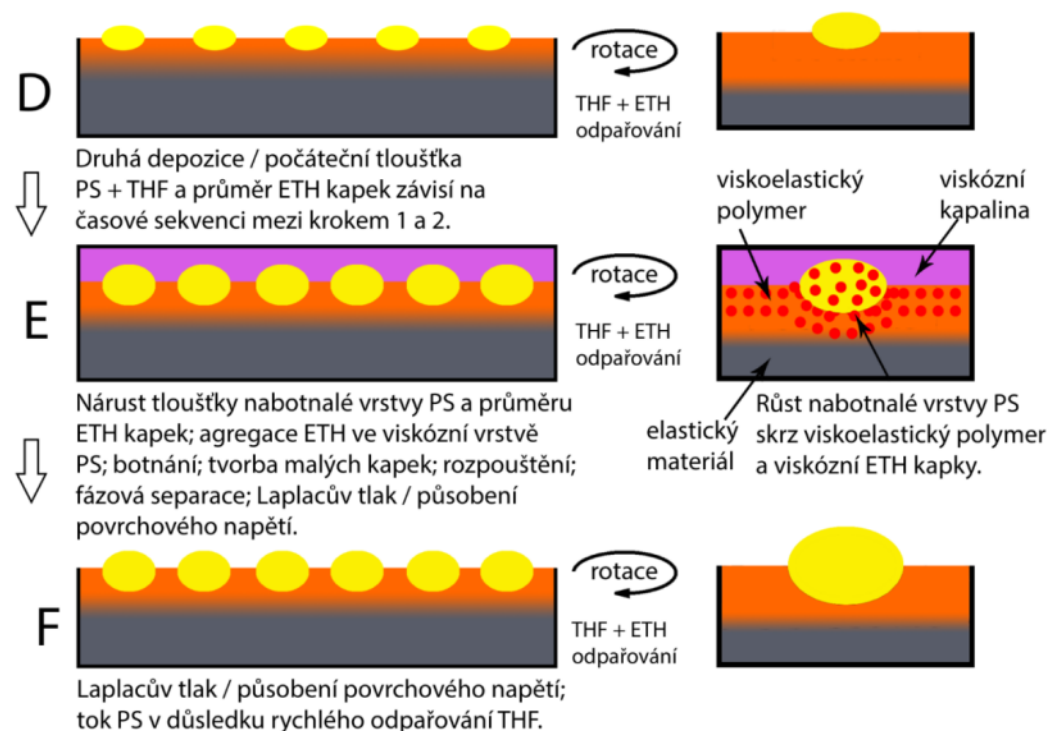


Legenda:



THF - Tetrahydrofuran
ETH - 2-Ethoxyethanol
PS - Polystyren

Krok 2.



Obrázek 38 - Model popisující průběh tvorby pórů při časově sekvenovaném dávkování směsi dobrého a špatného rozpouštědla. Model popisuje pro zjednodušení děj mezi prvním a druhým krokem dávkování, v následujících krocích se děje opakuje [184].

V prvním kroku, Obr 38-1A, je na rotující PS misku deponováno 200 μ l směsného rozpouštědla v rozmezí 1 až 2 objemové díly THF : 8 až 9 objemovým dílům ETH. Následně dochází k okamžitému pronikání THF do povrchu PS, který následně botná a v případě vysokých přídavků THF se rozpouští (3 a více obj. dílů

THF : 7 a méně obj. dílů ETH). Spolu s touto skutečností a přednostním odpařování THF v průběhu rotace vzorku dochází k fázové separaci ETH, který se na povrchu formuje do podoby kapiček, Obr. 38-1B. Tyto kapičky se přirozeně snaží minimalizovat svou povrchovou energii (zaujmout tvar koule), což napomáhá jejich vtlačování do povrchově nabotnalé vrstvy PS. V závěrečné fázi tohoto kroku, Obr. 38-1C, kdy na povrchu zůstává pouze ETH a THF je obsažen v nabotnalé vrstvě PS dochází k dalšímu vtlačování kapiček do viskoelastické povrchové vrstvičky v důsledku Laplaceova tlaku spojeného se snahou ETH minimalizovat svou povrchovou energii, jak jako je diskutováno v literatuře [71]. Tento děj je mimo to ovlivňován postupným odpařováním THF z nabotnalé vrstvy PS a ETH kapiček. Pokud by docházelo k přednostnímu nebo srovnatelnému odpařování ETH oproti THF, nemohlo by dojít k fixaci povrchového reliéfu.

Ukončení procesu úpravy povrchu po prvním kroku depozice směsného rozpouštědla nevede k výraznější změně povrchové textury. Pro zvýšení povrchových nerovností (generaci pórů o větším průměru a hloubce) je nezbytné celý proces opakovat, jak je patrné z Obr. 38B až F. Několika násobné opakování procesu depozice 200 μ l kapiček směsi THF : ETH má za následek růst průměrné výšky i hloubky pórů. Opakované přidání směsného rozpouštědla na povrch tvořený kapičkami špatného rozpouštědla a nabotnalou vrstvou, viz. Obr. 38D, má za následek růst tloušťky povrchově nabotnalé vrstvy PS – THF, migraci, agregaci (koalescenci) a růst separovaných mikrokapiček ETH, viz. Obr. 38E. Zmiňovaná migrace a agregace separovaných kapiček ETH je možná pouze díky rostoucí tloušťce povrchově nabotnalé vrstvy, která ve své vrchní části vykazuje čistě viskózní chování, které se s rostoucí hloubkou mění z viskoelastického na elastické. Součástí Obr. 38D až F je výřez naznačující mechanismus difúze dobrého rozpouštědla pod mikropapku ETH.

V tomto modelu se vychází z předpokladu, že transport dobrého rozpouštědla (THF) hnaný difúzním mechanismem probíhá nejen přes povrchově nabotnalou vrstvu PS, ale rovněž přes objem špatného rozpouštědla (ETH), jak naznačuje výřez vedle Obr. 38E. V konečné fázi tohoto kroku depozice, Obr. 38E, zůstává na povrchu pouze povrchově nabotnalá vrstva PS a mnohem větší kapky ETH, které neobsahují THF.

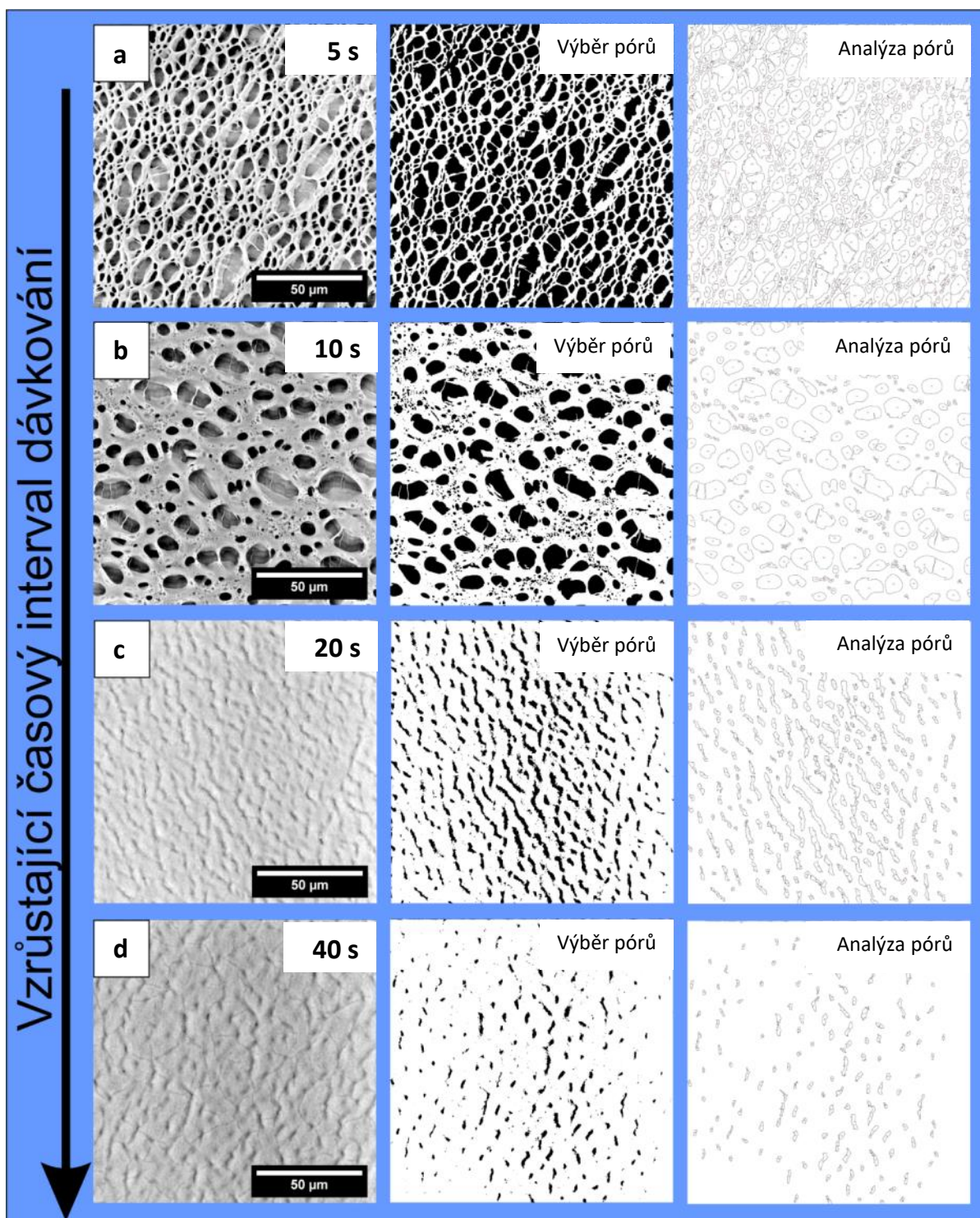
Proces formování povrchu PS je v tomto kroku, spojen s podobnými ději jako v předešlém kroku a dá se shrnout následovně: **difúze THF do PS, nárůst povrchově nabotnalé vrstvy PS, viskoelastická fázová separace, reformování**

(agregace) mikrokapek ETH, vtlačování mikrokapek ETH do povrchu PS v důsledku Laplaceova tlaku, deformace tvaru mikrokapek, odpařování jednotlivých složek směsného rozpouštědla, fixace povrchového reliéfu.

Jak bylo naznačeno výše v textu a vyplývá z experimentálních výsledků, druh povrchové textury není určován pouze časově sekvenovaným dávkováním směsných rozpouštědel. Typ povrchového reliéfu dále určuje: poměr a typ složek v roztoku; počet a objem deponovaných dávek; rychlost vytlačování směsného roztoku z dávkovacího zařízení; rychlost rotace; rychlost bobtnání a vysychání povrchu podmiňovaná prouděním plynu nad vzorkem, teplotou prostředí, teplotou vzorku a roztoku. Podrobněji bude vliv vybraných proměnných diskutován v následujících podkapitolách a je dále rozepsán v naší publikované práci [184].

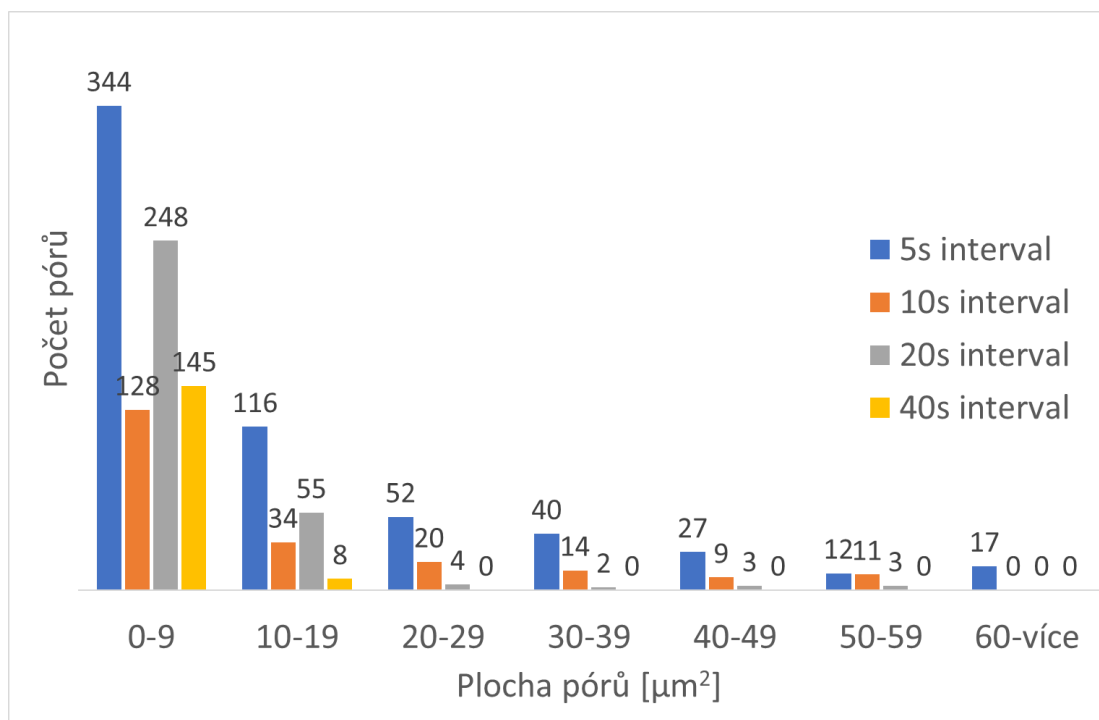
6.2.1 Vliv časového intervalu dávkování

Klíčovou proměnou nově navrženého postupu je časová prodleva mezi krokem 1 a 2 uvedeným na Obr. 38. Délka časové sekvence dávkování směsi THF s ETH zásadně ovlivňuje počet a velikost vznikajících povrchových pórů. Zvýšení časové sekvence z 5s na 10s má za následek snížení počtu pórů na povrchu a zvětšení jejich průměru, Obr. 39a, 39b. Po dalším zvýšení prodlevy mezi jednotlivými dávkami THF s ETH na 20s a 40s nepozorujeme na povrchu významné mikropóry, Obr. 39c, 39d a 40. Tyto změny se dají vysvětlit následovně. V případě příliš krátkého časového intervalu dávkování nemá systém dostatek času ke zformování a vtlačení mikrokapek špatného rozpouštědla do povrchově nabotnalého povrchu. Dochází k jejich smývání z povrchu a nevzniká významnější povrchový reliéf. Z tohoto důvodu výsledky pro krátké časové intervaly nejsou v přehledu na Obr. 36 až 42 prezentovány. Oproti tomu dlouhé časové intervaly 20 a více sekund mají opačný efekt. Systému v tomto případě poskytujeme velké množství času, které umožní zafixování primárně vzniklých prohlubní v důsledku odpaření dobrého rozpouštědla. Současně s tím však dojde k významnému odpaření špatného rozpouštědla, což má za následek zvětšení měrného povrchu, který se opětovně rozpouští a znovu reformuje do podoby zvrásněného povrchu bez výrazných prohlubní. Spolu se změnou povrchového reliéfu v podobě rozdílného množství prohlubní, Obr. 40, se mění jejich hloubka, Obr. 41, a především smáčecí charakter vodou, Obr. 42. Vliv povrchových nerovností na změnu smáčecích charakteristik povrchů je obecně znám [190, 191] a bez jejich přispění by nebylo možné připravovat povrchy vyznačující se superhydrofóbním charakterem a samočisticím vlastnostmi [12, 13, 18, 92].

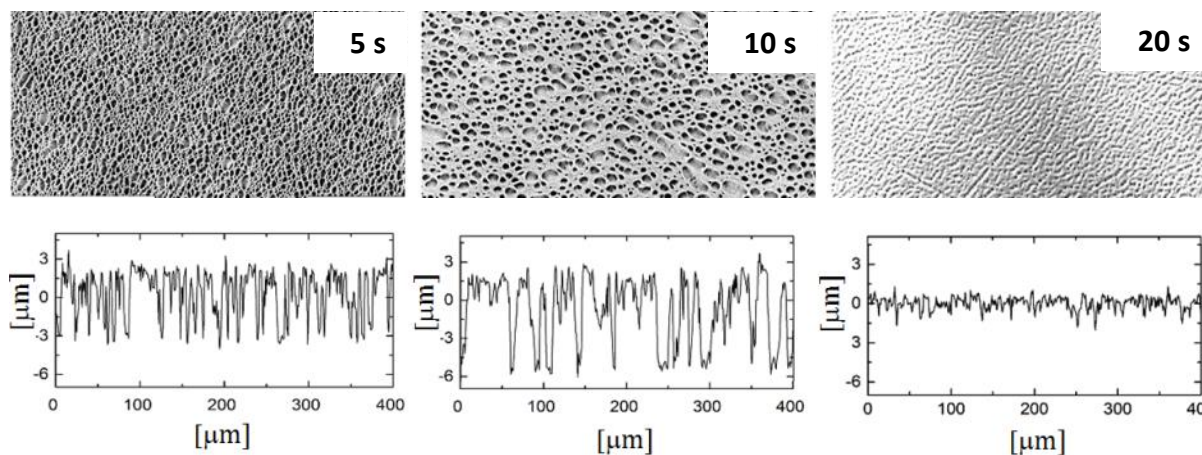


Obrázek 39 - Vliv časového intervalu dávkování 5 x 200 μl směsi THF:ETH v poměru 1,25: 8,75 na změnu povrchového reliéfu PS. Obrázky ze SEM.

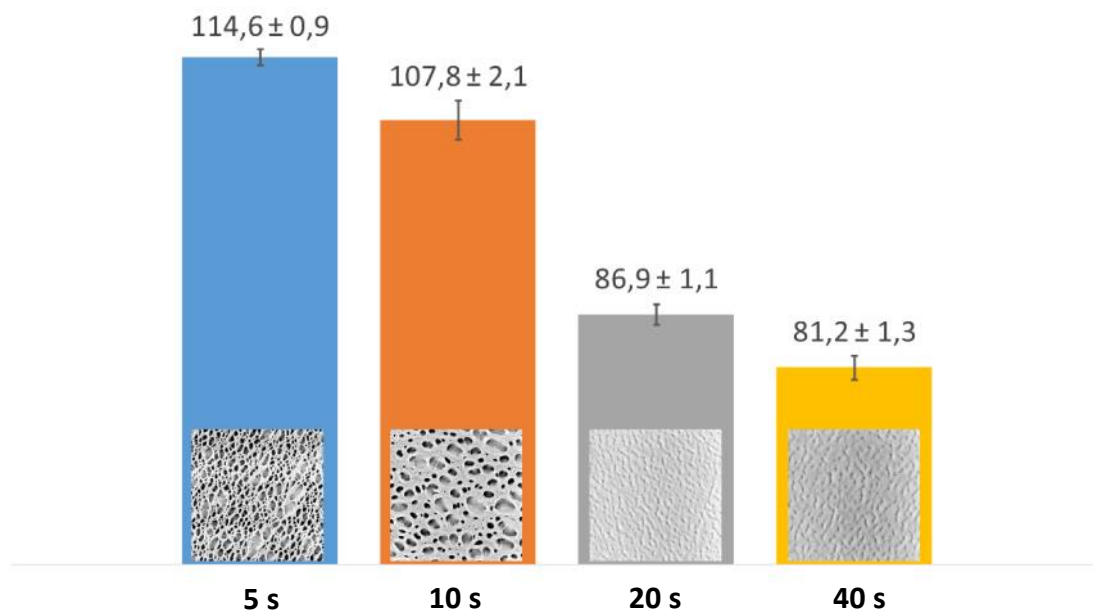
Prezentované obrazové analýzy povrchů – ploch zaujímaných jednotlivými prohlubněmi, Obr. 39, 40 byly provedeny pomocí programu ImageJ 1.5 software (Wayne Rasband, National Institutes of Health, United States).



Obrázek 40 - Vliv časového intervalu dávkování 5 x 200 μl směsi THF:ETH v poměru 1,25: 8,75 na změnu rozložení ploch povrchových prohlubní.



Obrázek 41 - Vliv časového intervalu dávkování 5 x 200 μl směsi THF:ETH v poměru 1,25: 8,75 na změnu hloubky povrchových prohlubní. Profilové řezy uvedené pod obrázky byly pořízeny pomocí kontaktního profilometru.



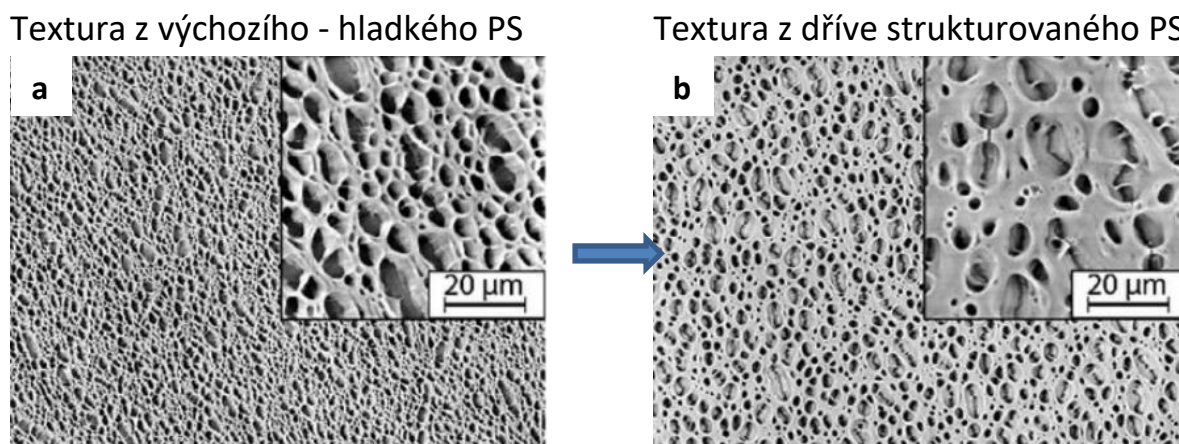
Obrázek 42 - **Změny kontaktních úhlů** smáčení vodou u povrchů připravených při rozdílných časových intervalech dávkování 5 x 200 μ l směsi THF:ETH v poměru 1,25:8,75. Obrázky ze SEM.

Výše zmíněná hypotéza o opětovné rozpouštění PS povrchu při dlouhých časových intervalech depozice směsi THF s EFH, 20 nebo 40s, Obr. 39c a 39d, byla potvrzena pomocí dodatečného experimentu uvedeného na Obr. 43. Z tohoto experimentu, vyplynulo, že opětovná depozice THF+ETH, 5 x 200 μ l dávkovaných po 5s pro první úpravu + 5 x 200 μ l dávkovaných po 5s pro druhou úpravu má za následek přechod k podobnému povrchového reliéfu, jako bychom formovali povrch 5 x 200 μ l dávkováním po 10s.

Tato skutečnost se dá vysvětlit na základě změny velikost výchozí měrné plochy povrchu, která následně definuje míru a rychlost pronikání THF do PS a s tím související vývoj tloušťky povrchově nabotnalé vrstvy, která v konečném důsledku determinuje možnosti agregace separovaných mikrokapiček ETH podobně jak bude diskutováno v části věnované vlivu poměru jednotlivých složek směsného rozpouštědla (THF : ETH). Dalším faktem je, že u dříve vytvořených povrchových pórech se při rotaci může zachytávat daleko větší množství směsného rozpouštědla, což umožňuje vznik dostatečně vysoké mobilní vrstvy PS + THF.

Z výše uvedeného tedy plyne závěr, že s rostoucí časovou prodlevou mezi jednotlivými kroky dávkování směsi THF s ETH, Obr. 38, dostává systém

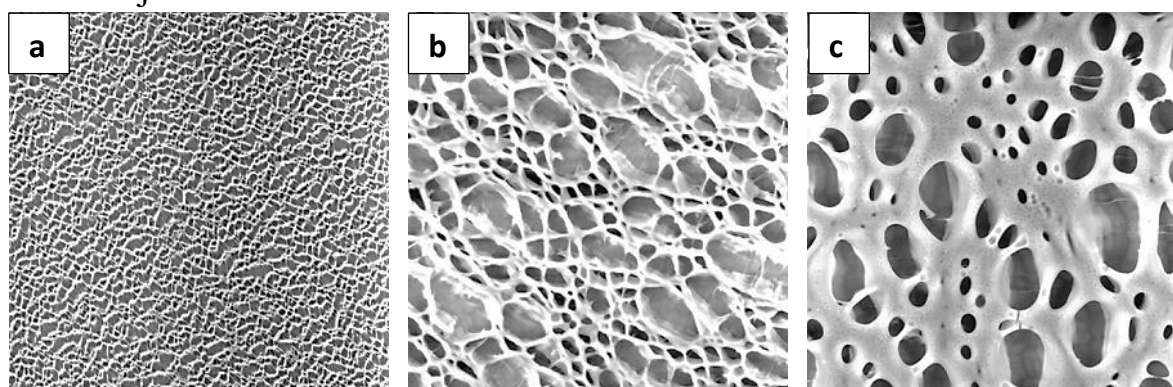
dostatečný prostor jednak ke vzniku vyšší povrchově nabotnalé vrstvy a s tím spojenou agregací jednotlivých mikrokapiček ETH do větších celků, Obr. 39b, 43b a nebo k odpaření jednotlivých rozpouštědel a ve své podstatě k neustálému opakování prvního modifikačního kroku, viz výsledky pro interval dávkování 20s nebo 40s, Obr. 39c, 39d.



Obrázek 43 - Změna vzhledu povrchového reliéfu po opětovné úpravě dřívě modifikovaného povrchu: **a) prvotní a b) následná úprava povrchu PS** probíhala za srovnatelných podmínek. Na povrch bylo nanášeno 5 x 200 µl THF:ETH v poměru 1,5 : 8,5. Obrázky ze SEM.

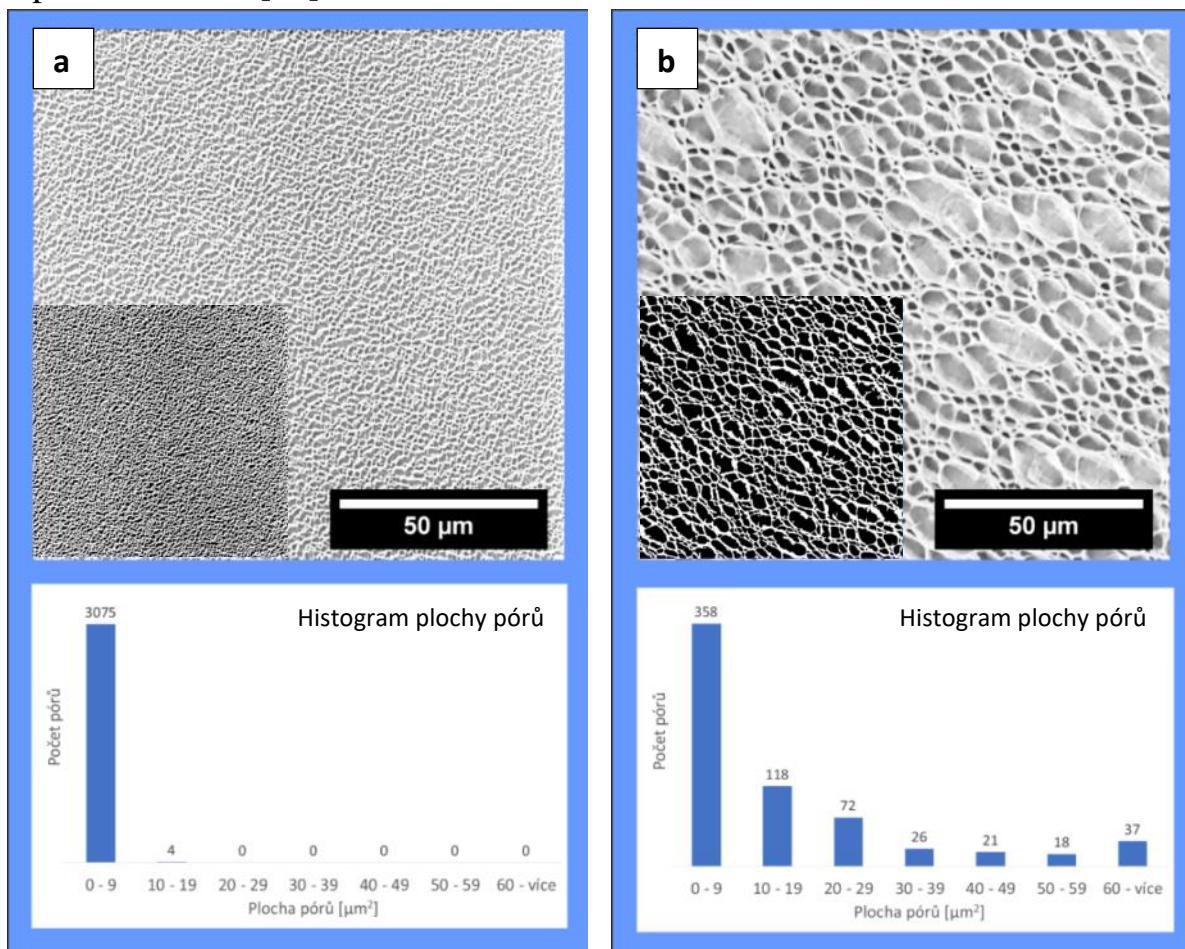
6.2.2 Vliv poměru složek v modifikačním roztoku

Z výše uvedeného a literárních poznatků [14, 52] plyne, že mezi rozhodující faktory podmiňující vznik specifického povrchového zvrásnění patří poměr složek ve směsi dobrého a špatného rozpouštědla. Význam této proměnné demonstruje Obr. 44.



Obrázek 44 - Vliv objemového poměru dobrého rozpouštědla (THF) : špatnému rozpouštědlu (ETH) na změnu povrchové reliéfu PS a jeho smáčecí charakteristiky vodou. Objemový poměr THF:ETH **a) 1: 9, b) 1,5: 8,5, c) 2: 8**. Časová sekvence nanášení 5 dávek o objemu 200 µl byla 5 sekund. Velikost obrázků pořízených pomocí SEM je 67x67 µm.

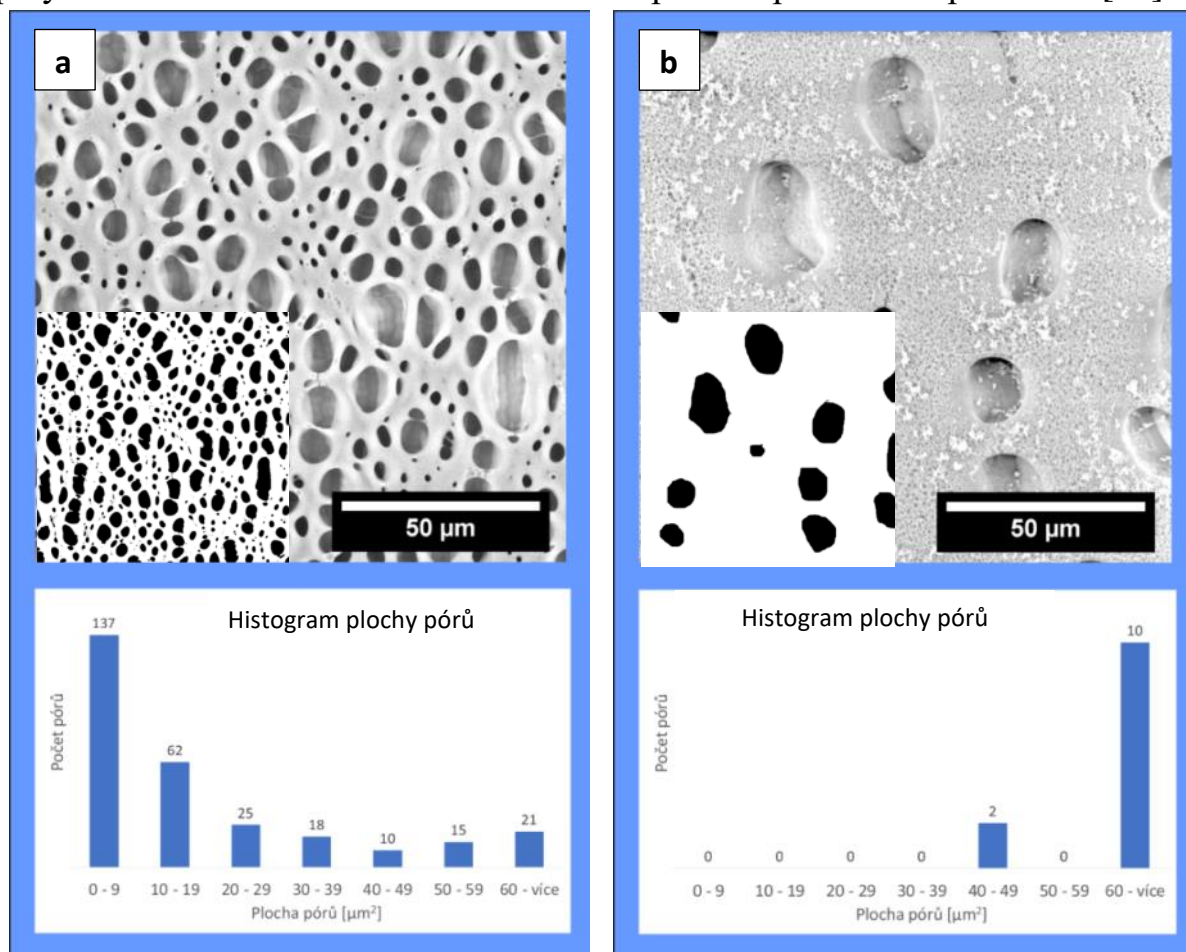
Nízký objemový podíl dobrého rozpouštědla k špatnému, 1 díl THF : 9 dílům ETH, Obr. 44a, 45a, má za následek vznik povrchového zvrásnění o průměru pórů v řádech jednotek mikrometrů s hloubkou v řádech desítek až stovek nanometrů. Generace tohoto typu reliéfu je zapříčiněna nemožností vzniku a vývoje dostatečně vysoké nabotnalé vrstvy PS+THF, s čímž souvisí znemožnění následné koalescence fázově separovaných kapiček ETH vznikajících v důsledku penetrace THF do PS. Nedostatečně nabotnalá povrchová vrstva PS se vyznačuje vysokou elasticitou, která omezuje klesání kapičky do PS v důsledku působícího Laplaceova tlaku [71].



Obrázek 45 - Analýzy povrchových prohlubní PS vznikajících při použití **THF:ETH** v poměru a) 1:9, b) 1,5:8,5. Modifikováno 5x 200 μl po 5 s při 22°C. Obrázky ze SEM.

Pětiprocentní nárůst podílu dobrého rozpouštědla ke špatnému, 1,5 díly THF : 8,5 dílům ETH, Obr. 44b, 44b celou situaci zásadně mění. V systému je přiměřeně velké množství dobrého rozpouštědla, které umožní vznik a vývoj dostatečně vysoké a nepříliš mobilní povrchově nabotnalé vrstvy. Ta se může díky vhodné zvolené časové sekvenci dávkování rozpouštědla vyvíjet do specifické síťové struktury vyznačující se zvýšenou hydrofobitou, $\theta = (110 \pm 3)^\circ$, Obr. 47. Vznik této

tzv. „síťové fázové separace“ definované H. Tanakou je spojen s faktem, že na omezený čas převažuje v polymerním systému deformační složka nad relaxační a polymer se může reformovat za současné separace špatného rozpouštědla [70].

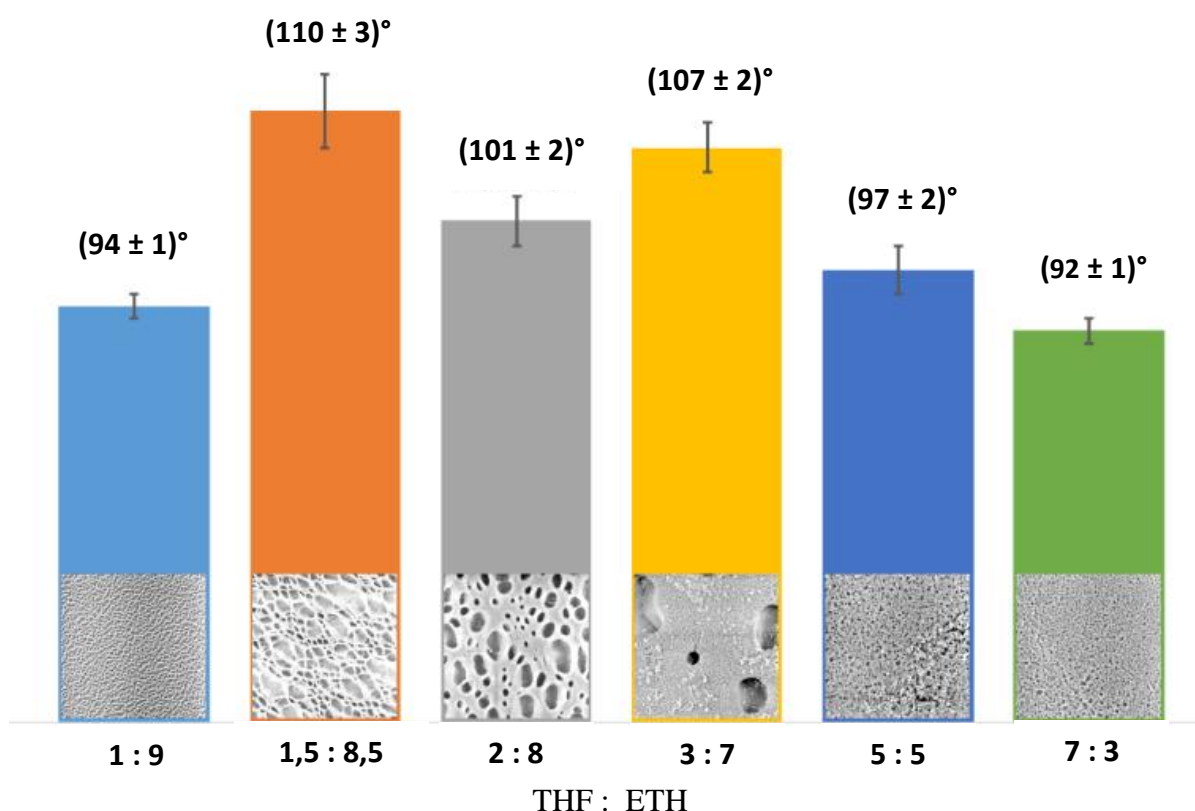


Obrázek 46 - Analýzy povrchových prohlubní PS vznikajících při použití **THF:ETH** v poměru a) 2:8, b) 3:7. Modifikováno 5x 200 μl po 5 s při 22°C. Obrázky ze SEM.

Další nárůst podílu THF:ETH (2:8), Obr. 44c, 46a posouvá celý systém v myšleném fázovém diagramu ještě dále, nepozorujeme již striktně síťový charakter vznikající struktury. Tento typ povrchového vzoru spíše připomíná „houbovou fázovou separaci“, v podobě izolovaných buněk [70]. Vznik takovéto struktury je úzce spojen s faktem, že v roztoku je dostatečné množství dobrého rozpouštědla, které umožní vznik silně nabotnalé vrstvy, v níž začíná převažovat viskózní složka nad elastickou, vytvořené kapičky špatného rozpouštědla se mohou spojovat do větších celků.

Na Obr. 46a pozorujeme převážně póry vyznačující se velkým průměrem a hloubkou. Hloubka těchto pórů je dána skutečností, že se zde mohl zcela dominovat vliv Laplaceova tlaku, kapka mohla zaujmout tvar s co nejmenší

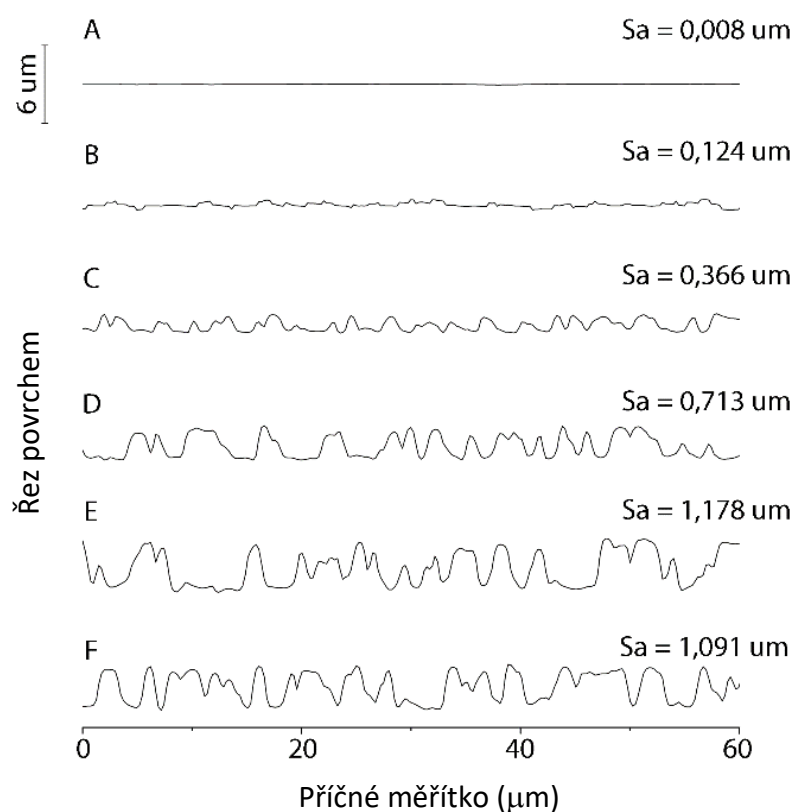
povrchovou energií. Další zvyšování podílu THF na úkor ETH, Obr. 46b, má za následek další agregaci špatného rozpouštědla za vzniku makrokapiček projevujících se na povrchu stále menším počtem velkých prohlubní. Tento fakt lze vysvětlit nízkým podílem ETH v roztoku a odvodem velkých kapek na okraj misky v důsledku odstředivé síly. Zajímavou skutečností je neočekávaný nárůst kontaktního úhlu smáčení vodou u vzorku na Obr. 46b, 47 (3:7). Tento pokles povrchové energie je způsoben mikroagregáty PS, které současně s velkými prohlubněmi vytváří hierarchicky strukturovaný povrch nezbytný pro dosažení samočistícího efektu [12]. Další zvyšování podílu THF na úkor ETH na poměr 5:5 a 7:3 má za následek vymizení velkých povrchových prohlubní. Z toho důvodu nebyl tento systém podrobován obrazové analýze, černě znázorněné povrchové póry uvedené na Obr. 45 a 46. Náhled na tento povrch je uveden v posledním sloupci ve srovnání kontaktních úhlů smáčení vodou na Obr. 47.



Obrázek 47 - Změny kontaktních úhlů smáčení vodou u povrchů připravených s pomocí rozdílných poměrů **THF:ETH**. Povrchy modifikovány $5 \times 200 \mu\text{l}$ po 5 s při 22°C . Obrázky ze SEM.

6.2.3 Vliv počtu dávek

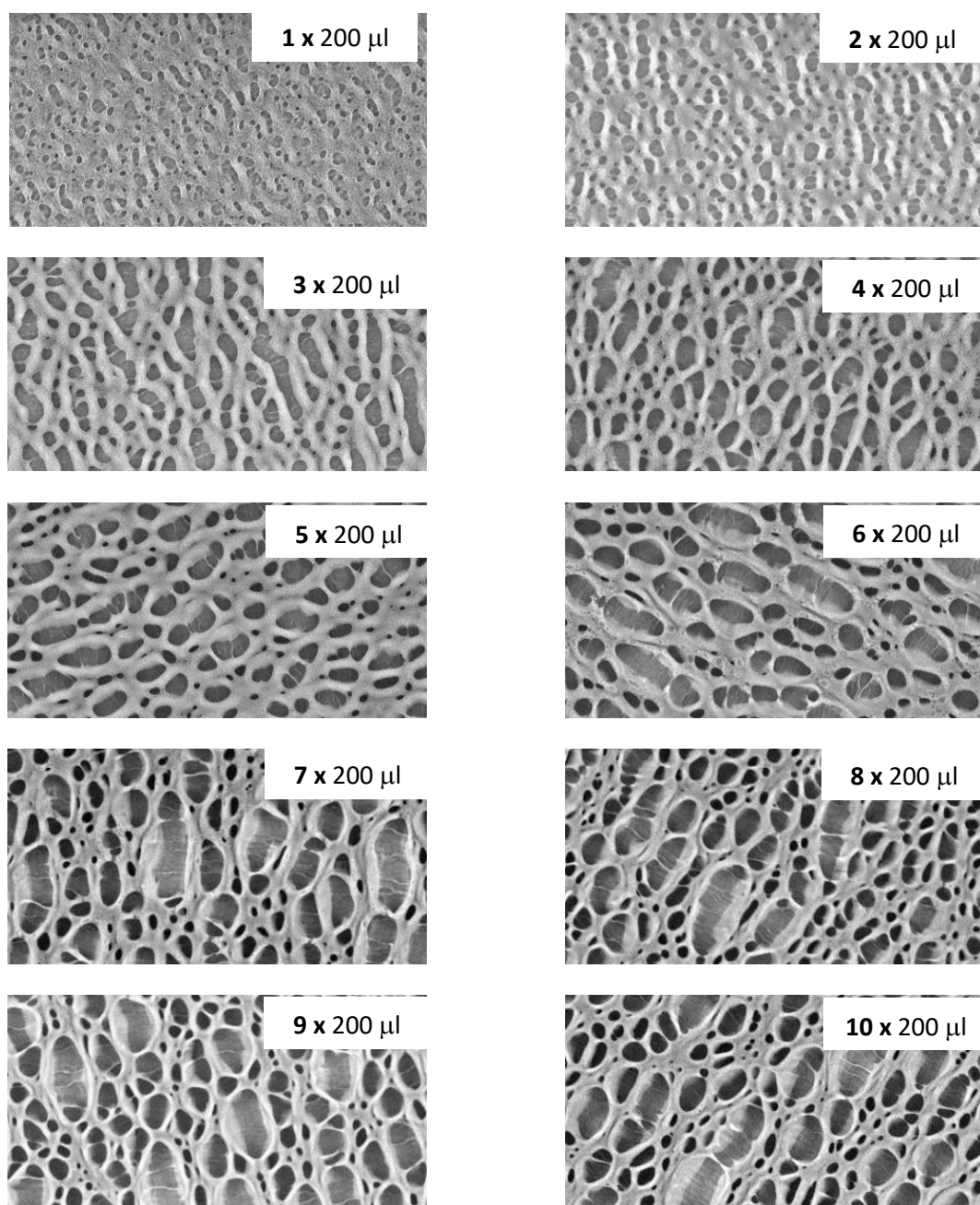
Další zásadní proměnou determinující velikost a hloubku povrchových prohlubní je počet deponovaných dávek směsi THF s ETH. Jak bylo diskutováno v rámci navrženého modelu, který popisuje vznik těchto prohlubní, postupné opakování depozice směsi dobrého a špatného rozpouštědla má za následek zvyšování tloušťky nabotnalé vrstvy a koalescenci kapek ETH do větších celků. Příмым důsledkem toho je vznik větších prohlubní vyznačujících se jak větší hloubkou, tak plošným průřezem Obr. 48, 49.



Obrázek 48 - Vývoj povrchového reliéfu PS v závislosti na počtu 200 µl dávek THF:ETH v poměru 1,1:8,9. A) 1 dávka, B) 2 dávky, C) 4 dávky, D) 6 dávek, E) 8 dávek, F) 10 dávek. Časový interval nanášení jednotlivých dávek byl 5s. Profilové řezy pořízeny pomocí bezkontaktní profilometrie. Součástí obrázků jsou uvedeny zjištěné hodnoty plošné drsnosti Sa.

V případě úpravy povrchů na bázi PS bylo v rámci experimentů spojených se studiem vlivu počtu deponovaných dávek na povrch zjištěno, že po překročení určitého počtu dávek o objemu 200 µl deponovaných na povrch PS misky o průměru 3,4 cm nedochází k dalším výrazným změnám generovaných povrchových prohlubní co do jejich průměru a hloubky, Obr. 48 pro 8-10 dávek

a Obr. 49 pro 7-10 dávek. Limitní počet dávek, po jejichž překročení nedochází k výrazné změny povrchového reliéfu závisí na poměru THF k ETH, jak plyne z Obr. 48, 49 a experimentů prezentovaných v bakalářské práci A. Metnára [192].



Obrázek 49 - Změna povrchové topografie PS v závislosti na počtu deponovaných dávek THF:ETH v poměru 2:8. Interval dávkování 5s při 25 °C. Obrázky ze SEM o rozměru 134 x 67 µm.

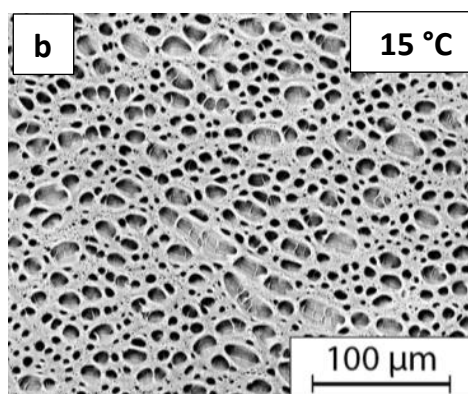
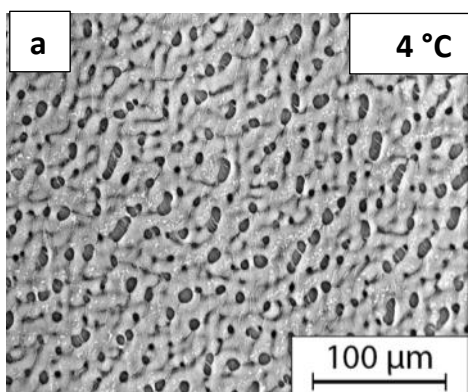
6.2.4 Vliv teploty nanášeného rozpouštědla na vývoj povrchového reliéfu

Výše uvedené úpravy povrchů pomocí směsí rozpouštědel probíhaly za laboratorní teploty. To znamená, že srovnatelnou teplotu měl jak polymerní povrch, tak směs THF s ETH a okolní atmosféra s definovanou vlhkostí.

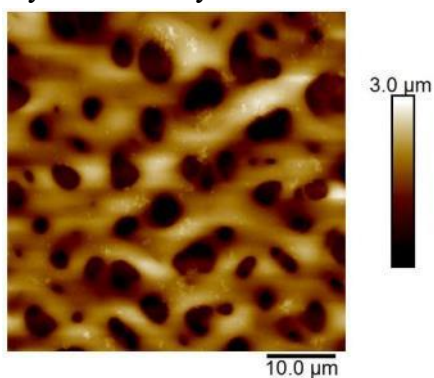
S teplotou se mění jak charakter polymerního systému, rychlost difúze (THF/PS), odpařování (THF, ETH), viskozita, atd. Jedním ze specifických projevů změny teploty, respektive teplotních gradientů je vznik organizovaných proudění v solidifikované vrstvě polymerního roztoku. [72, 74, 76, 77]. V případě polymerních vrstev, ze kterých se rychle odpařuje rozpouštědlo, mohou dále významnou roli hrát koncentrační gradienty [75, 193], které následně akcelerují vznikající toky materiálu na fázových rozhraních kapalina/plyn.

Z provedených experimentů bylo zjištěno, že změna teploty modifikační směsi rozpouštědel může iniciovat vznik právě takovýchto toků polymerního roztoku během jeho vysychání okolo kapek špatného rozpouštědla ETH. Tyto toky mající za následek přeuspořádáním polymerní matrice a s tím související fixaci reziduálních pnutí v povrchové vrstvě PS, které lze pozorovat na Obr. 50 z fázového kontrastu AFM. Na tomto místě je nezbytné poznamenat, že v případě povrchů modifikovaných za konstantních teplotních podmínek pozorujeme na povrchu pouze hladká rozhraní mezi jednotlivými prohlubněmi bez vnitřních pnutí.

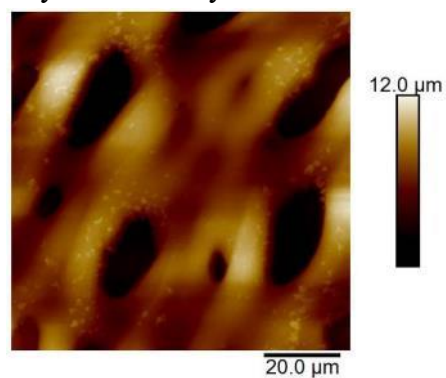
V rámci prvotních experimentů byla na povrch PS nanášena série 5 kapek podchlazené směsi rozpouštědel na 4°C nebo 15°C. Povrch PS byl temperován na 22°C. Nanesení směsi mnohem chladnějšího rozpouštědla na vytemperovaný povrch PS má za následek ohřívání směsného roztoku THF+ETH a chlazení povrchu PS, což spolu s vícenásobným opakováním tohoto kroku a koncentračními změnami v povrchové vrstvě polymeru zapříčiňuje vznik výše zmiňovaného organizovaného proudění ve svrchní viskoelastické vrstvě PS. To znamená teplejší (měně hustý) systémy stoupá vzhůru a chladnější klesá ke dnu, pozorujeme děj podobný Bénard – Marangonimu organizovanému proudění [75, 193].



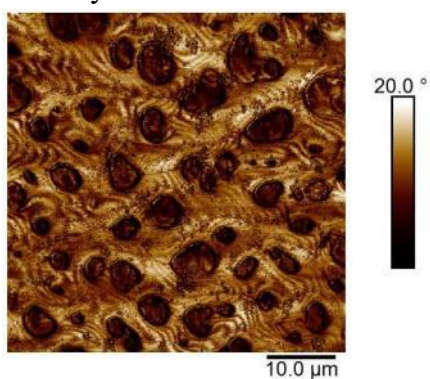
Výškové změny



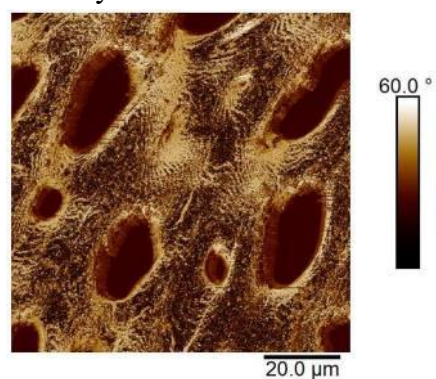
Výškové změny



Fázový kontrast



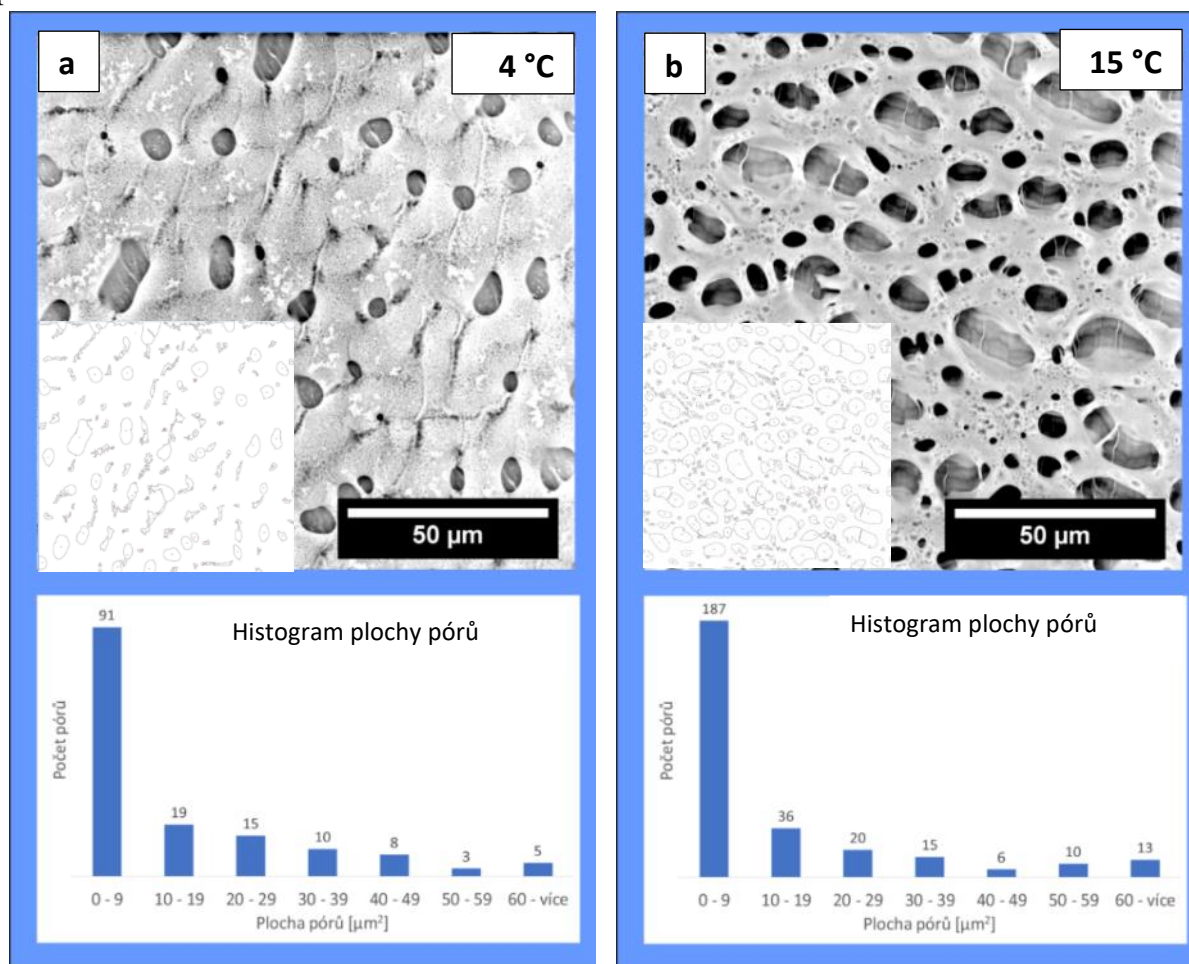
Fázový kontrast



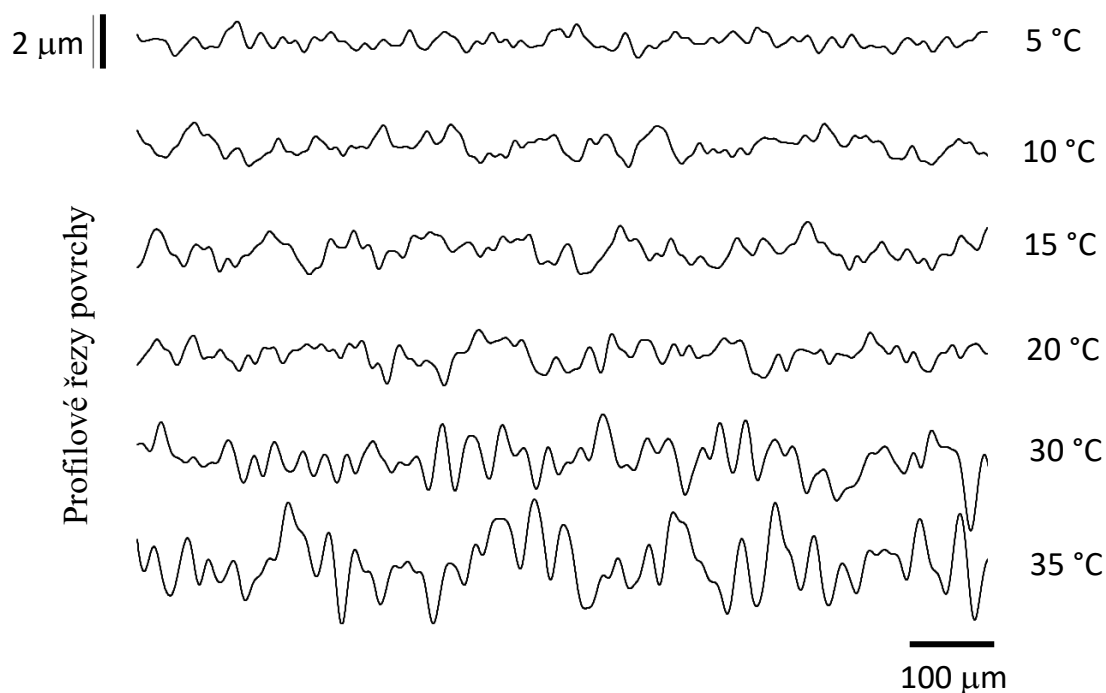
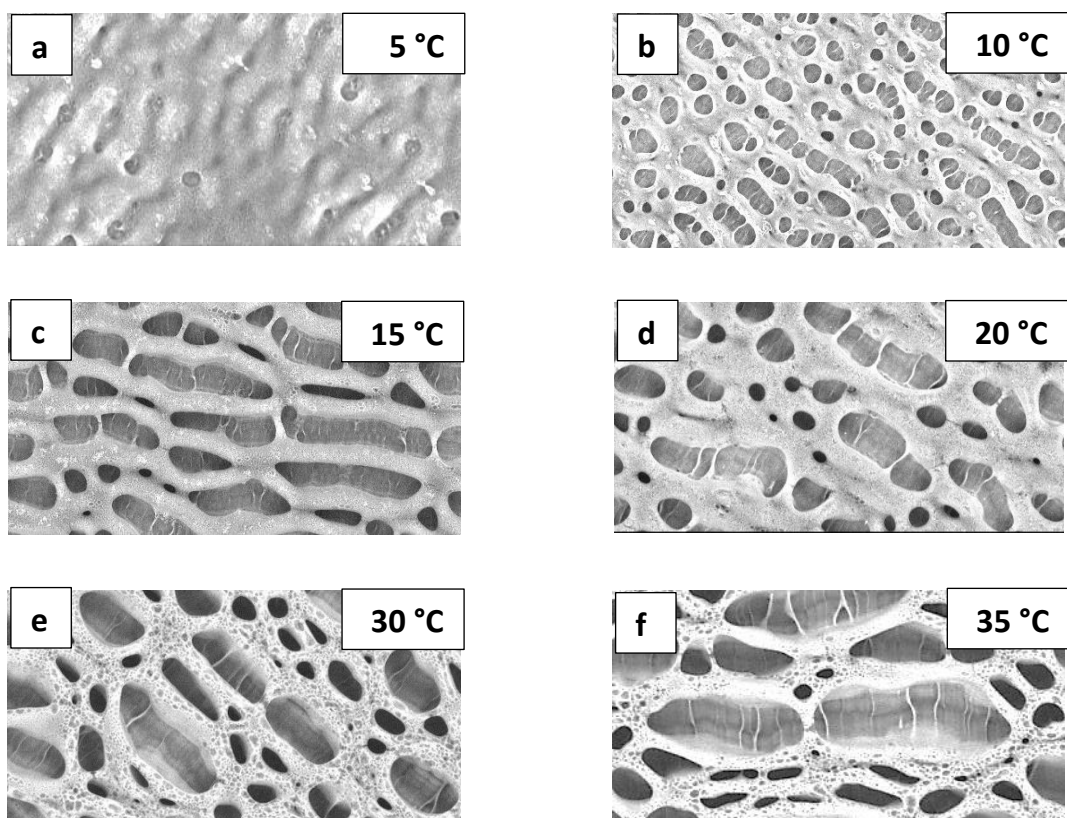
3D zobrazení
výškových s fázovými
změnami pomocí AFM

Obrázek 50 - Vliv teploty roztoku THF:ETH (2:8) na změnu povrchové reliéfu PS. Na povrch dávkováno 5 x 200 μl po 5s při teplotě THF:ETH **a) 4 °C (levý sloupec), b) 15 °C (pravý sloupec)**. Teplota PS a okolní atmosféry byla 22 °C. Nahoře obrázky ze SEM. Dole obrázky AFM.

Mechanismus změny velikosti a hloubky izolovaných pórů v polymerní matici, viz porovnání na Obr. 51, lze vysvětlit podobně jako v případě výše diskutovaném vlivu poměru dobrého a špatného rozpouštědla použitého pro úpravu PS, Obr. 44 až 46. Při nižší výchozí teplotě (4°C) roztoku dochází k výraznějšímu ochlazení povrchu PS a zároveň THF není schopno penetrovat do velké hloubky PS a s tím následně souvisí nemožnost vzniku dostatečně vysoké nabobtnalé vrstvy, která determinuje možnosti vtlačování kapek ETH do PS a možnosti agregace ETH do větších celků jako v případě roztoku zahřátých na 15°C nebo více stupňů, viz Obr. 52. Z porovnání prezentovaných na tomto obrázku je dále patrné, že při vyšší teplotě směsi THF s ETH, než je teplota povrchu, Obr. 52e a 52f, vznikají větší povrchové prohlubně. Mimo to, jsou tyto velké povrchové póry odděleny rozhraními, která obsahují malé sekundární prohlubně. To znamená, že pozorujeme samovolný vznik určitého typu hierarchicky strukturovaného povrchu na bázi tkáňového PS.



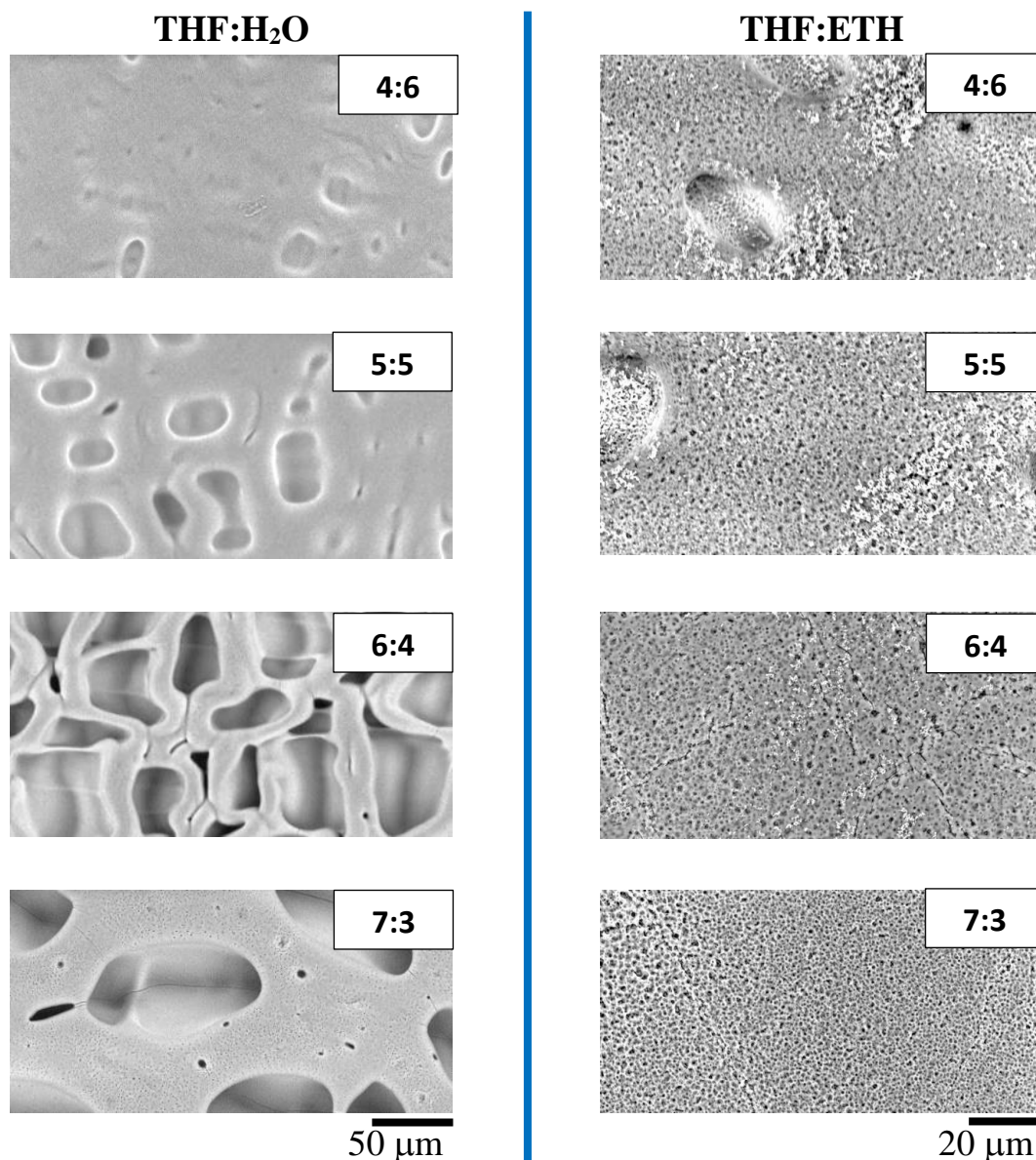
Obrázek 51 - Obrazová analýza rozložení velikosti povrchových prohlubní – pórů v závislosti na teplotě roztoku THF:ETH (2:8) použitého pro úpravu PS. Na povrch dávkováno 5 x 200 µl po 5s při teplotě THF:ETH a) 4 °C, b) 15 °C. Teplota PS a okolní atmosféry 22 °C. Obrázky ze SEM.



Obrázek 52 - Vliv teploty roztoku THF:ETH (2,5:7,5) na změnu povrchové reliéfu PS. Na povrch dávkováno 5 x 200 μl po 5s THF:ETH v rozmezí 5 až 35 $^{\circ}\text{C}$, Obr. a) až f). Teplota PS a okolní atmosféry 22 $^{\circ}\text{C}$. Obrázky ze SEM o rozměru 134 x 67 μm . Uvedené profilové řezy povrchy na Obr. a) až f) pořizeny pomocí kontaktního profilometru.

6.2.5 Vliv typu špatného rozpouštědla

Typ vznikajícího povrchového zvrásnění zásadně ovlivňuje výběr směsi špatného a dobrého rozpouštědla, jak bylo podrobněji diskutováno v teoretické části této práce a je známo z literatury [14, 52, 82].



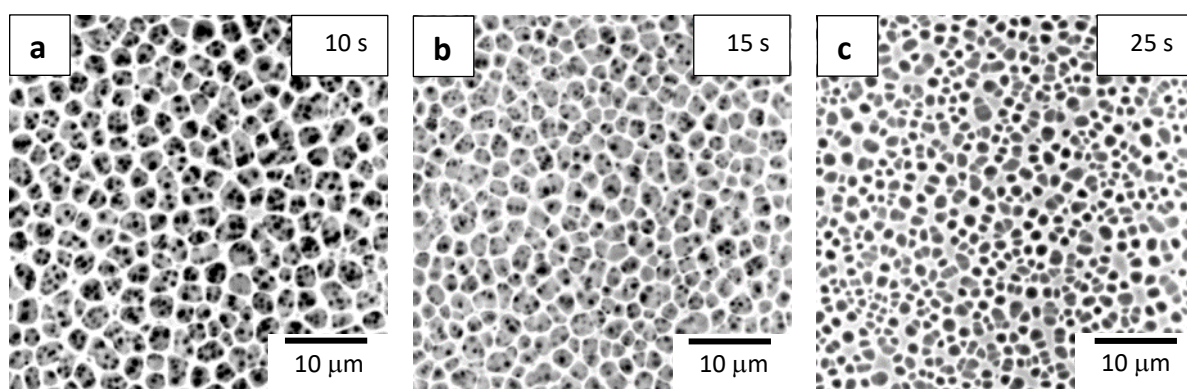
Obrázek 53 - Vliv typu použitého špatného rozpouštědla vzhledem k PS. V levém sloupci výsledky pro rozdílné poměry THF s H₂O, vpravo pro THF s ETH. Na povrch dávkováno 5 x 200 μl po 5s při laboratorní teplotě. Obrázky ze SEM, vlevo 268 x 134 μm, vpravo 134 x 67 μm.

Se změnou složek roztoku, který na polymerním povrchu vyvolává fázovou separaci, je nezbytné změnit jejich vzájemný poměr. Tato skutečnost je patrná z výsledků prezentovaných na Obr. 53. V případě použití směsi THF s H₂O je

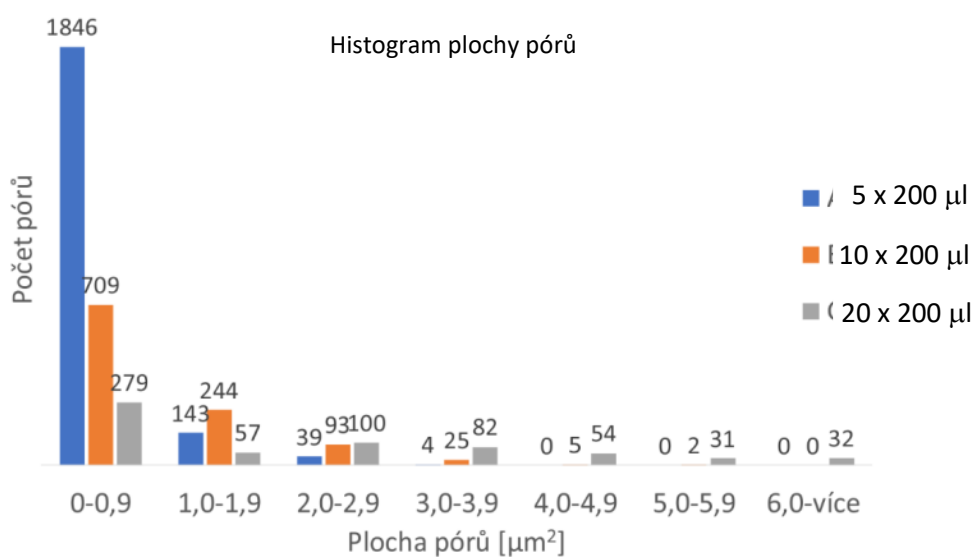
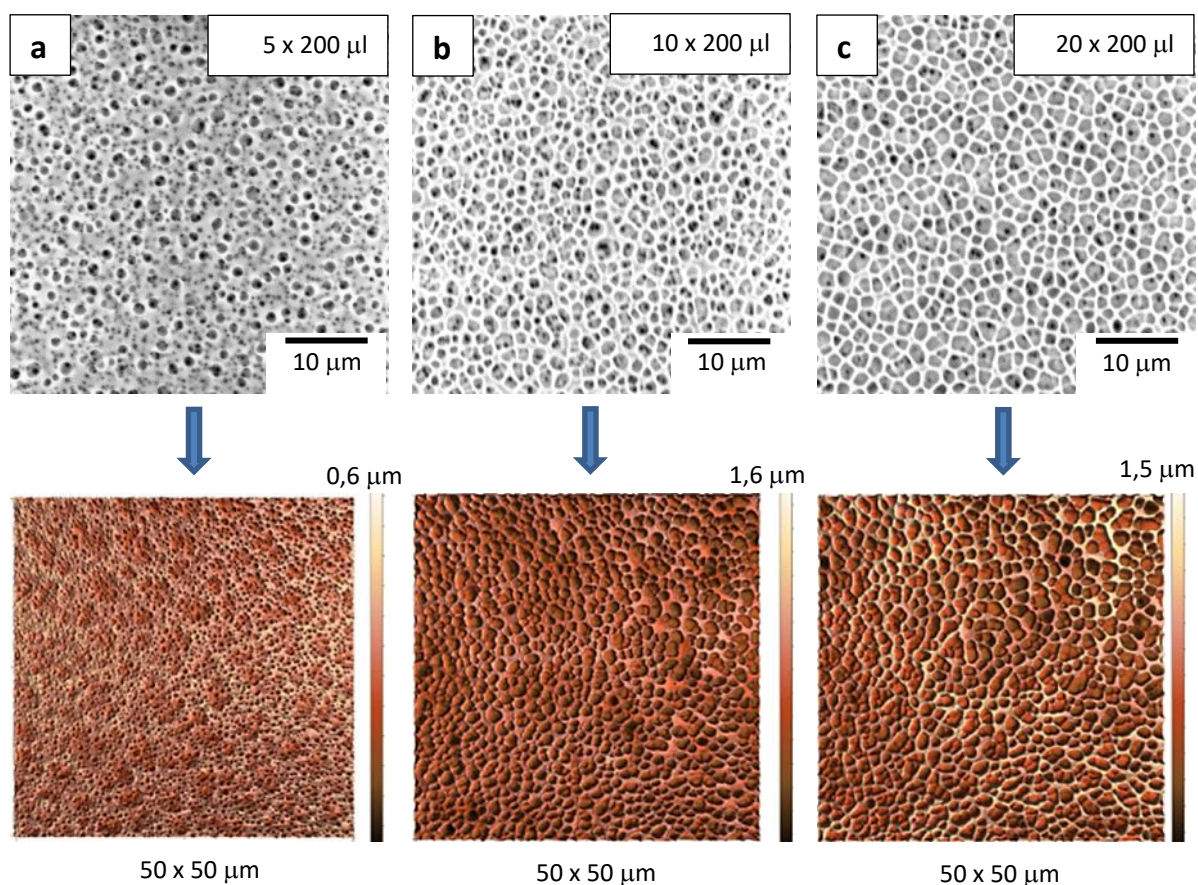
nezbytné použít zcela jiné poměry oproti THF s ETH. Problematice texturizace povrchů pomocí H₂O nebude věnována větší pozornost s ohledem na fakt, že tento problematika je popsána v odborné literatuře [14]. Nicméně co plyne z výsledků prezentovaných na Obr. 53 je skutečnost, že nově navržený postup časově sekvenované fázové separace lze aplikovat i s pomocí vody jako špatného rozpouštědla. V tomto případě ovšem není možné připravit stejné mikroporézní povrchy jako v případě použití směsi THF s ETH. Za přítomnosti vody v modifikačním roztoku vznikají na povrchu mnohem větší prohlubně než při použití ETH. Této skutečnosti bude dále využito při přípravě hierarchicky strukturovaných PS povrchu s pomocí postupného dávkování rozdílných typů směsný rozpouštědel, jak bude diskutováno v níže uvedené podkapitole.

6.2.6 Kondenzace špatného rozpouštědla na povrchu postupně nanášeného roztoku PS

Ve snaze o pochopení role vzdušné vlhkosti na proces tvorby porézní struktury na povrchu PS byl proveden experiment, během kterého byl na skleněný povrch deponován roztok PS v THF. To znamená, že do polymerní směsi nebylo přidáno špatné rozpouštědlo, ETH nebo H₂O, jako pórotvorná složka. Z výsledků tohoto experimentu vyplynulo, že pomocí nově navrženého časově sekvenovaného fázově separačního postupu lze připravovat porézní systémy vznikající na principu literárně popsané metody „Breath figures“ [60, 68, 89, 156]. To znamená, že šablonu pro vznikající povrchové prohlubně tvoří do podoby mikrokapek kondenzující vzdušná vlhkost, Obr. 54, 55.



Obrázek 54 - Změna povrchového reliéfu PS vrstvy připravené postupným dávkování směsi THF+PS na rotující skleněný povrch rychlostí 1200 ot/min. Na povrch skla dávkováno 10 x 200 μl roztoku s obsahem 2,68g PS v 10 ml THF v časovém intervalu: a) 10 s, b) 15 s, c) 25s. Obrázky ze SEM.



Obrázek 55 - Změna povrchového reliéfu PS vrstvy připravené postupným dávkováním směsi THF+PS na rotující skleněný povrch rychlostí 1200 ot/min. Na povrch skla dávkováno: **a) 5x, b) 10x, c) 20x 200 μl** roztoku s obsahem 2,68g PS v 10 ml THF v časovém intervalu 5s. Nahoře obrázky ze SEM, dole za AFM.

Pro přípravu struktur prezentovaných na Obr. 54 a 55 byl použit jako nosný substrát sklo s ohledem na sekundární záměr tohoto experimentu a to přípravu

porézní samonosné membrány. Bylo zjištěno, že po dokončení více krokového dávkovacího procesu a dosušení je možné připravenou vrstvu ze skla sloupnout v podobě samonosné folie.

Z výsledků prezentovaných na Obr. 54 a 55 vyplynul vliv vzdušné vlhkosti na tvorbu povrchových prohlubní na povrchu PS, ze kterého se rychle odpařuje THF. To znamená, že tento faktor nelze ignorovat ani v případě použití směsi THF s ETH. Proto byl v rámci experimentů spojených s použitím THF s ETH udržována srovnatelná vlhkost okolní atmosféry. Z porovnání výsledků uvedených na Obr. 54 a 55 s výše uvedenými výsledky pro THF s ETH, Obr. 39 až 52, je jednoznačně pozorovatelný dominantní vliv ETH na formování specifických povrchových prohlubní s šířkou v rozmezí v řádech jednotek až desítek mikrometrů. Mimo to přímý přídavek H₂O do THF neumožňuje přípravu povrchových prohlubní jako v případě kondenzace vody z vzdušné vlhkosti, viz srovnání Obr. 53 a Obr. 54 a 55.

Kombinaci klasického přístupu „Breath figures“ s námi navrženým časově sekvenovaným dávkováním roztoku PS v THF lze použít pro přípravu rozdílných povrchových reliéfů bez nutnosti změny koncentrace PS v THF nebo koncentrace vzdušné vlhkosti. Z výsledků uvedených na Obr. 54 je patrné jak lze povrchový reliéf měnit pomocí zvyšující se časové prodlevy mezi jednotlivými 200 μ l dávkami THF s PS. Stejně tak lze ovlivňovat typ vznikajícího povrchového reliéfu pomocí počtu nanášených 200 μ l dávek THF s ETH, Obr. 55.

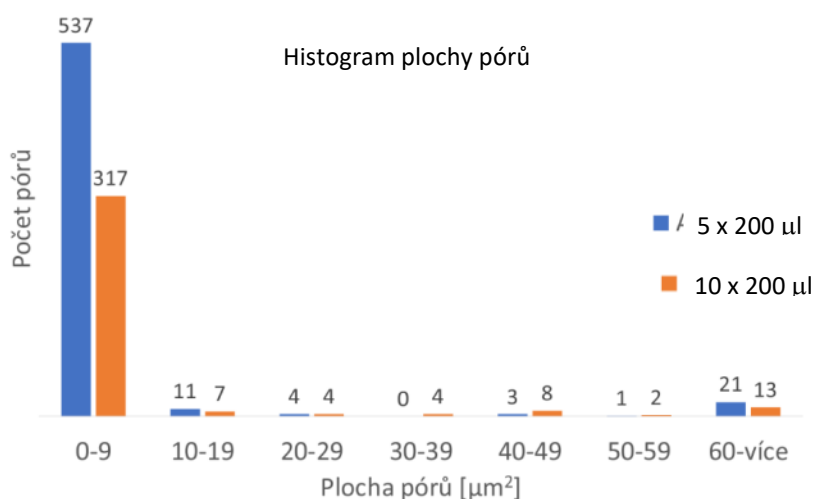
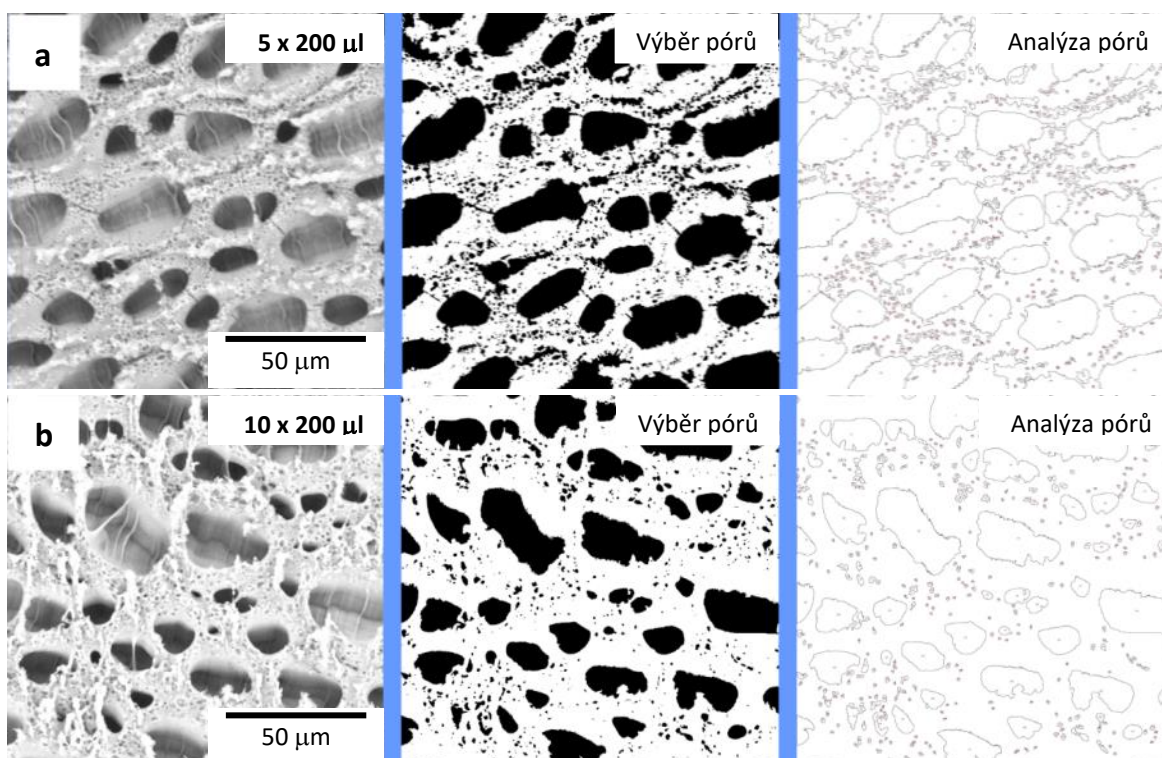
V případě využití kondenzujících kapek vody na povrchu roztoku PS v THF je možné použít mnohem delší časové intervaly depozice jednotlivých dávek oproti použití ETH, viz porovnání na Obr. 54c s Obr. 39c. V případě časového intervalu nad 20s, Obr. 39c, nepozorujeme v případě systému THF s ETH vznik povrchových nerovností, v důsledku rychlého odpaření těchto rozpouštědel. Strukturný povrch PS je opětovně rozpouštěn, jak bylo diskutováno v předešlých podkapitolách. Oproti tomu díky mnohem pomalejšímu odpařování H₂O z povrchu mohou vznikat porézní systémy i v případě nastavené časové prodlevy 25s Obr. 39. S touto skutečností je spojen další zajímavý jev projevující se vznikem více vrstvého systému prohlubní. To znamená, že v objemu vytvářené samonosné folie se vytváří póry, které lze pozorovat v podobě černých bodů uvnitř povrchových nerovností, viz Obr. 54 a 55 ze SEM.

6.2.1 Porézní a strukturované PS vrstvy – fázová inverze

V návaznosti na pokusy spojené s depozicí roztoku PS v THF na rotující povrch skla byl provedeny další experimenty, ve kterých byla směs PS s THF obohacena o špatné rozpouštědlo ETH. Příprava takového roztoku probíhala následovně: v prvním kroku byl v THF rozpuštěn PS, následně bylo do roztoku za neustálého míchání přidáváno špatné rozpouštědlo, tak by nedošlo k vysrážení PS.

Na tomto místě je nezbytné poznamenat, že v případě fázové separace z roztoku polymeru v dobrém rozpouštědle s přidavkem špatného rozpouštědla mluvíme o fázové inverzi, vyvolané přednostním odpařování dobrého rozpouštědla [93, 96, 105, 125, 132, 194]. Jak vyplynulo z provedených experimentů, zásadní proměnou v rámci těchto experimentů je nalezení nejvhodnějšího podílu PS a ETH v roztoku. Podíl polymerní složky v roztoku, musí být nastaven tak, aby k separaci PS z roztoku došlo ve správnou chvíli po jeho depozici na upravovaný povrch. V závislosti na nastaveném poměru těchto složek mohou vznikat dva rozdílné typy povrchových struktur.

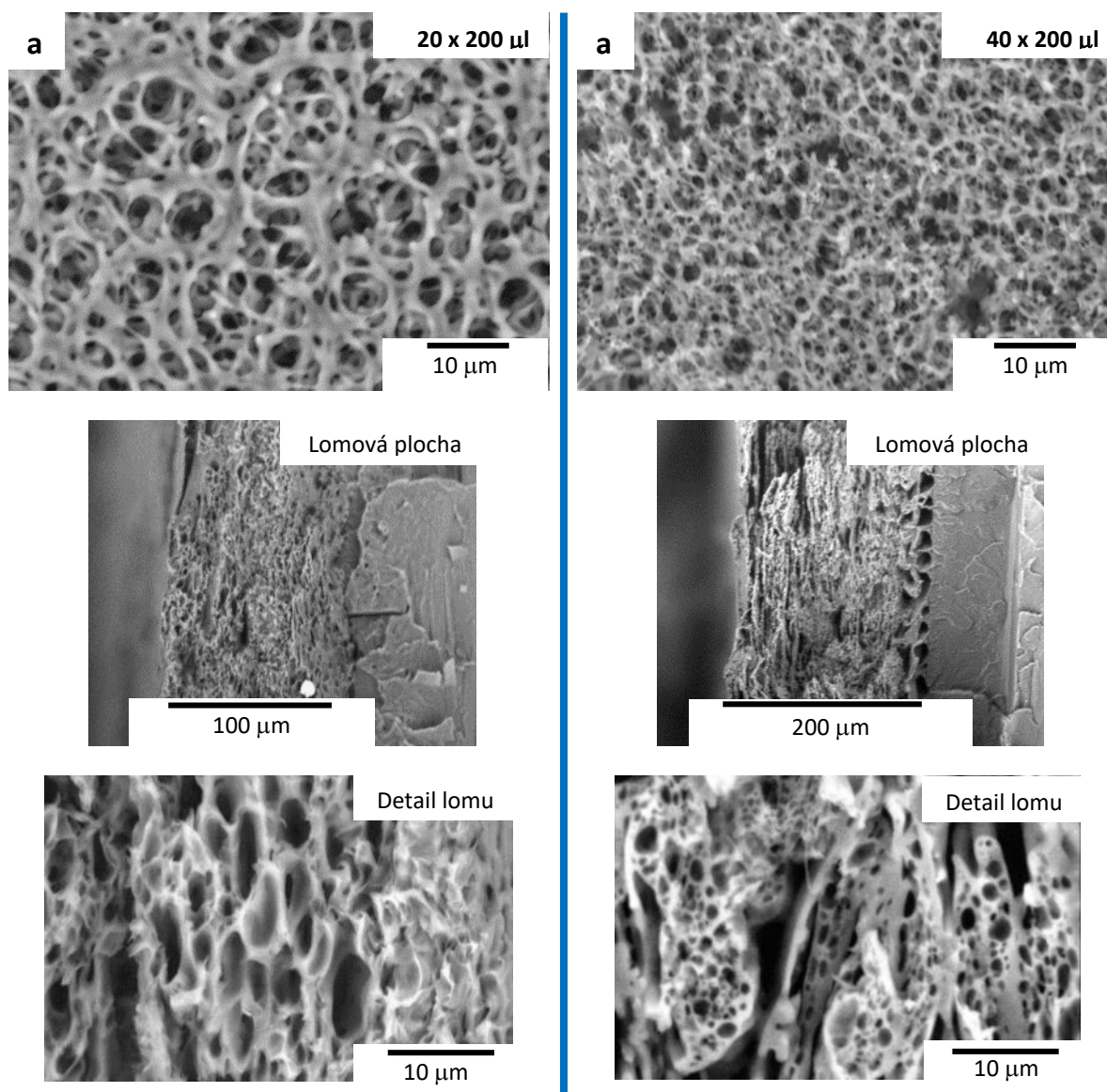
První typ struktur, Obr. 56, svým vzhledem připomíná struktury připravené pomocí THF s ETH, které byly před depozicí zahřáty na vyšší teplotu, Obr. 52e, 52f nebo struktury vznikající při vyšším podílu THF, Obr. 46. Tento typ struktur vzniká při podílu 32 ml ETH v roztoku 10 ml THF + 0,25 g PS, tj. v případě kdy systém obsahuje 3x více ETH vzhledem k THF, to odpovídá poměru cca 2,5:7,5 pro THF:ETH. Z výsledků prezentovaných na Obr. 56 je patrné, že malý přírůstek PS do modifikační směsi THF s ETH nemá zásadní vliv na vznik primárních prohlubní. Hlavní odlišností oproti postupům založeným na depozici směsi THF s ETH bez PS je v tvorbě drobných agregátů PS na rozhraní povrchových mikroprohlubní.



Obrázek 56 - Změna povrchového reliéfu PS vrstvy připravené postupným dávkování a) 5x, b) 10x 200 μl směsi 10 ml THF s 32 ml EHT a 0,25g PS v časové intervalu 5s na rotující PS povrch. Obrázky ze SEM.

Druhý a mnohem zajímavější typ struktur lze připravit v případě použití většího podílu rozpuštěného PS v THF na úkor obsahu ETH. Platí, že se zvyšujícím podílem PS v THF je nezbytné snižovat podíl ETH, tak aby všechny přítomné složky byly vzájemně mísitelné. To znamená, že v tomto případě byl roztok nastaven tak, aby po jeho depozici na povrch došlo k velmi rychlému separaci PS v důsledku poklesu podílu THF. Pro tyto účely byl připraven roztok obsahující 2,68 g PS v 10 ml THF s obsahem 20 ml ETH. S pomocí takto připraveného roztoku lze na povrchu PS připravovat objemově mikroporézní vrstvy s vzájemně

propojenými póry, Obr. 57. Jak vyplývá z analýzy lomových ploch, tloušťka těchto vrstev roste s počtem deponovaných dávek ve zvoleném časovém intervalu. Volba optimálního časového intervalu dávkování je v tomto případě zcela zásadní. Krátký dávkovací mezičas má za následek vznik popraskaného povrchu s minimálním množstvím pórů. Dlouhá naopak vede k překrývání vytvořené porézní vrstvy v důsledku předčasného odpaření špatného rozpouštědla.



Obrázek 57 - Vliv počtu deponovaných dávek a) 20x b) 40x 200 μl směsi 10 ml THF s 20 ml EHT a 2,68g PS v časové intervalu 7s na změnu tloušťky objemově porézní vrstvy. Obrázky ze SEM.

To znamená, že navržený postup víceetapové časově odstupňované fázové separace lze použít pro přípravu nejen povrchově strukturovaných vrstev, ale

rovněž objemově porézních systémů připomínajících polymerní pěnu s požadovaným počtem porézní vrstev.

6.2.2 Hierarchicky strukturované PS povrchy - postupná fázová separace

Jedním z cílů této práce bylo nalézt postupy přípravy hierarchicky strukturovaných vrstev, to znamená komplexních struktur vyznačujících se systematickými povrchovými nerovnostmi ve více rozměrových úrovních. Z rozměrového hlediska můžeme na rozdílné rozměrové úrovně v rámci této práce pohlížet následovně: **makro** (nad 50 μm), **meso** (10 μm – 50 μm), **mikro** (0,1-10 μm) a **nano** (pod 100 nm).

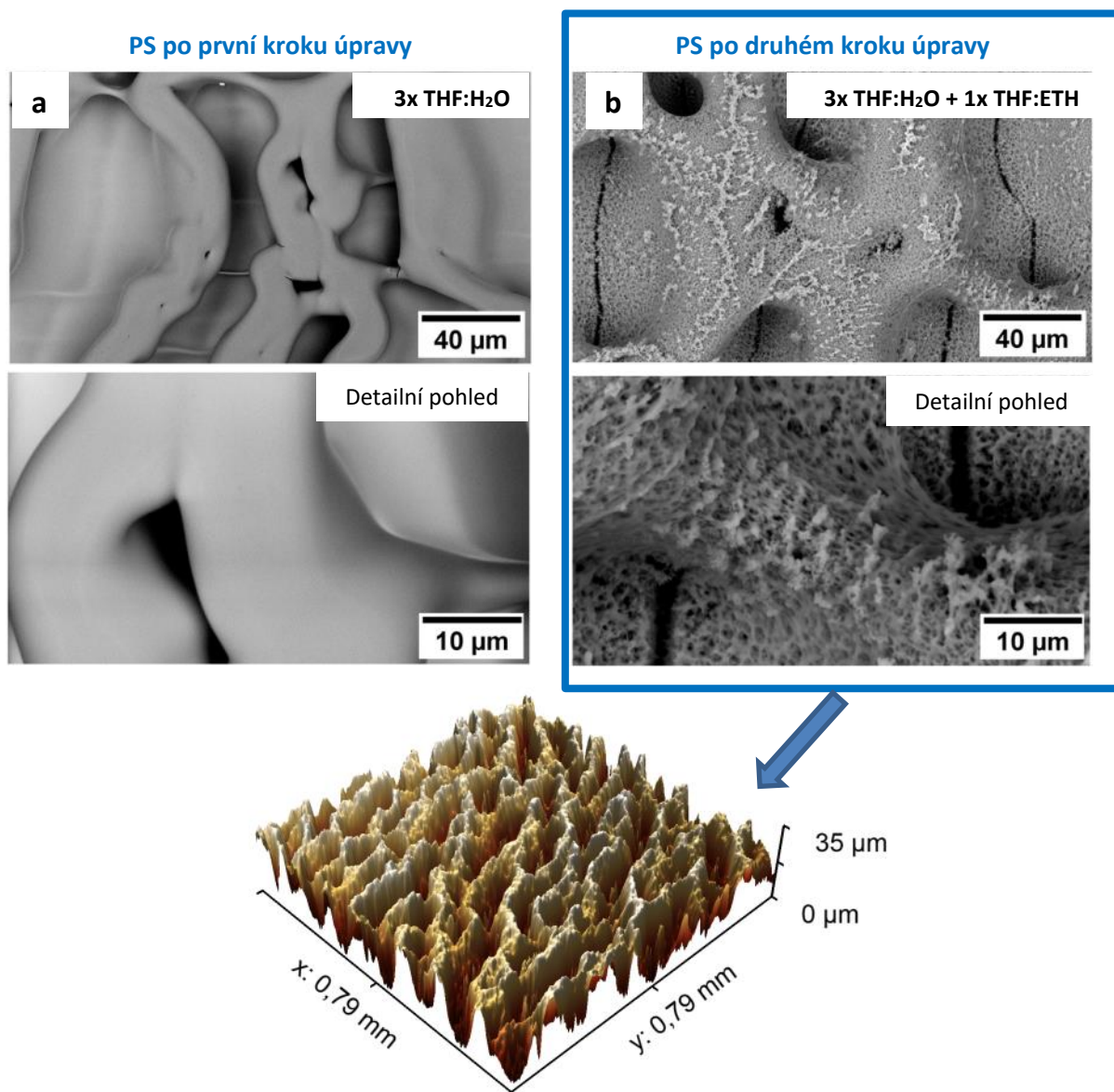
Zjednodušeně si lze hierarchicky strukturovaný povrch představit například jako makro porézní systémy pokryté mikronovými, submikronovými nebo nanometrovými strukturami.

V souladu s tímto cílem byl navrhnout fázově separační postup, který vede k přípravě takovýchto komplexních povrchů. Tento postup je založený na postupném časově sekvenovaném nanášení dvou rozdílných směsných roztoků na rotující povrch, Obr. 58. To znamená, že přímo vychází z poznatků prezentovaných v předešlých podkapitolách. Pro přípravu takovýchto povrchů je používáno nově navržené TSSC zařízení a lze pro jejich popis použít navržený fázově separační model.

Pro přípravu struktur uvedených na Obr. 58b byl v prvním kroku vytvořen makroporézní povrch pomocí směsi 5,6 ml THF s 4,4 ml H_2O (3x300 μl po 5 s, při 23 $^\circ\text{C}$ a 1500 ot/min). Ve druhém kroku je na povrch nanесena jedna 300 μl dávka směsi 10 ml THF s 20 ml ETH (při 23 $^\circ\text{C}$ a 1500 ot/min). Nanesení směsi THF s ETH vede k pokrytí makroporézního povrchu, Obr. 58a specifickou mikrostrukturou, Obr. 58b. Použití vody jako špatného rozpouštědla vychází z poznatků publikovaných v práci E. DeRosa [14] a bylo podrobněji diskutováno v podkapitole zabývající vlivem složení směsi rozpouštědel na typ vznikající povrchové struktury.

Při pohledu na vybrané výsledky v předcházejících podkapitolách, viz Obr. 46b, 52e, 52f, 56a, 56b, lze do určité míry na tyto povrchy pohlížet jako na hierarchicky strukturované. Tyto povrchy se oproti struktuře na Obr. 58b liší nehomogenním

pokrytím vnitřního prostoru velkých prohlubní sekundární strukturou. To znamená, že spodní část prohlubní je hladká a horní strukturovaná. Z toho porovnání plyne, že s pomocí pouze jednoho typu směsného rozpouštědla nelze přímo připravit rovnoměrně pokryté hierarchicky strukturované povrchy. Aplikační potenciál povrchů uvedených na Obr. 58b bude dále diskutován v podkapitole věnované jeho interakci s buňkami.



Obrázek 58 - Hierarchicky strukturované PS povrchy připravené pomocí dvou rozdílných směsí rozpouštědel: Hladký povrch PS misky byl upravován: **a) v prvním kroku** na povrchu dávkováno 3 x 300 μl **THF:H₂O** v poměru 5,6:4,4 v časovém intervalu 5s při 1500 ot/min., **b) v druhém kroku** na povrch deponováno 1 x 300 μl **THF:ETH** v poměru 1:2 při 1500 ot/min. Úprava povrchů probíhala při 23°C. Nahoře obrázky ze SEM, dole za AFM.

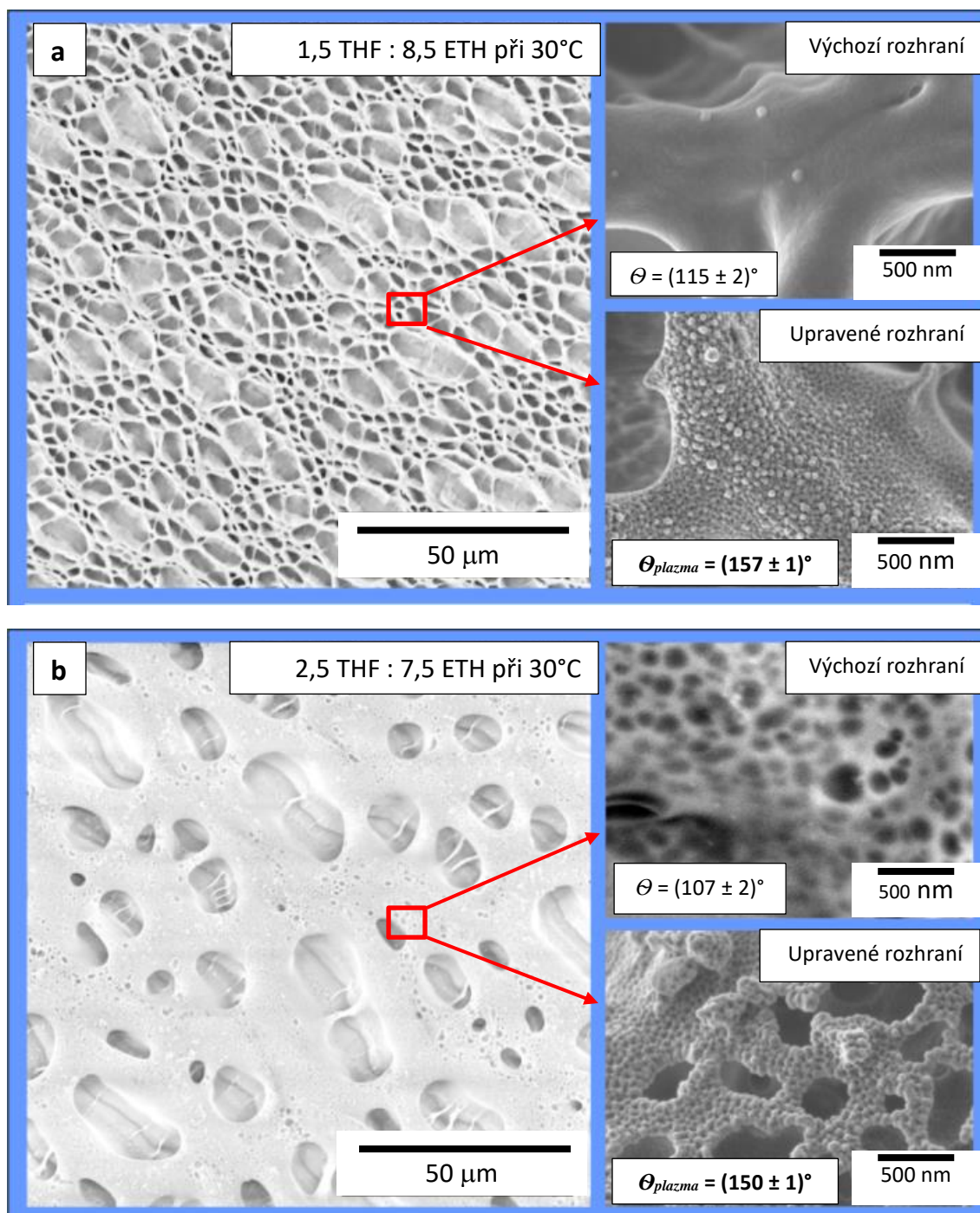
6.2.3 Hierarchicky strukturované PS povrchy – plazmatické úpravy

Další cestou, kterou lze použít k přípravě hierarchicky strukturovaných povrchů je použití plazmatického výboje. V rámci těchto experimentů byl strukturovaný povrch na bázi PS chemicky a strukturně modifikován pomocí induktivně vázaného plazmatu s procesními plyny Ar a CF₄. Z výsledků tohoto výzkumu vyplynulo, že pomocí vícenásobné expozice mikroporézního PS plazmatickému výboji lze na rozhraní pórů vytvořit nerovnosti v řádech nanometrů s funkčními skupinami >C(F)-, >CF₂, Obr. 59, 60. Takováto povrchová úprava nevede pouze ke vzniku specifických povrchových nerovností, ale má za následek změnu smáčecích charakteristik povrchu. Vzniká superhydrofobní povrch s kontaktním úhlem smáčení vody větším než 150°. Míru hydrofobity ovlivňuje distribuce velikostí povrchových mikroprohlubní a typ jejich rozhraní, jak je ukázáno na Obr. 60, 61 a podrobněji diskutováno v naší publikované práci [195]. Přehled procesních parametrů, které je nezbytné vzít v potaz při přípravě superhydrofobních povrchů na bázi PS je naznačen na Obr. 59.



Obrázek 59 - Procesní kroky vedoucí k přípravě hierarchicky strukturovaných PS povrchů vyznačujících se superhydrofóbními vlastnostmi.

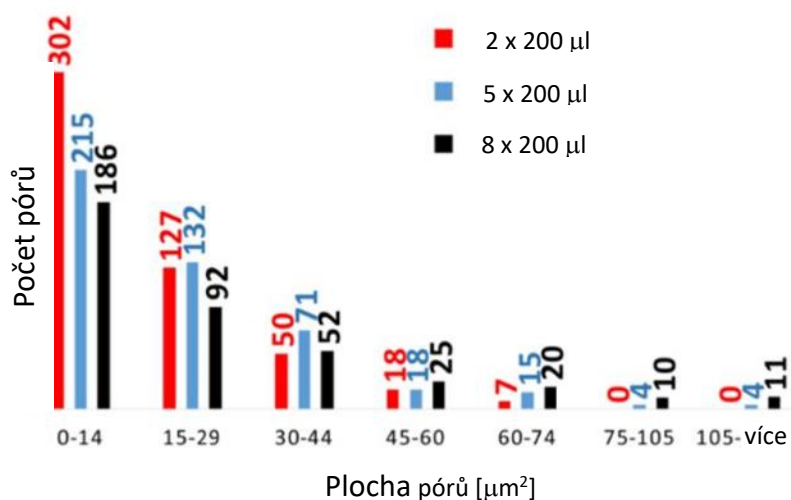
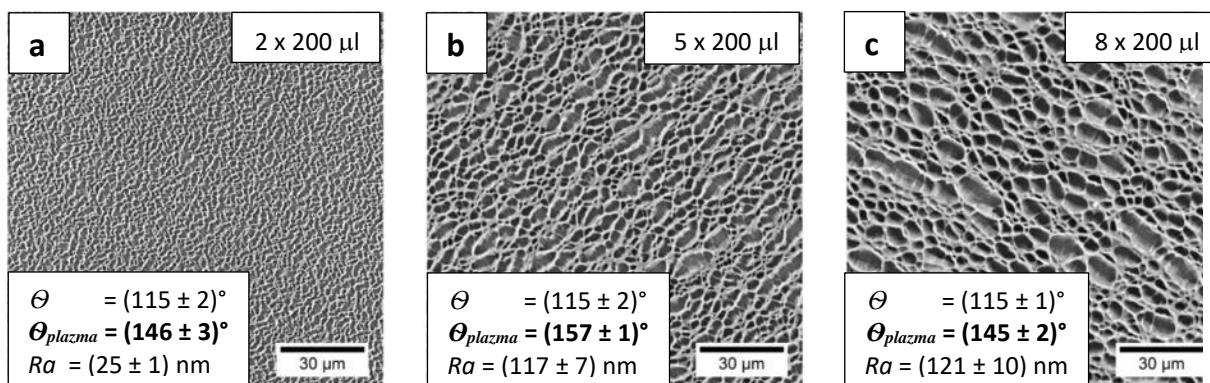
Z provedených experimentů dále vyplynulo, že nejlepšími výsledky z hlediska generace homogenního povrchového zvrásnění a vazby funkčních skupin >C(F)->CF₂ na povrchu PS, je nezbytné nastavit výkon plazma reaktoru na 300 W. Při tomto výkonu lze pozorovat největší nárůst kontaktního úhlu smáčení vodou (146±2)°. Při nižším výkonu (250W), nedochází k rovnoměrné povrchové modifikaci - uhel smáčení vodou (139±1)°. Naopak vyšší výkon reaktoru, 350W, způsobuje nechtěnou degradaci a stékání modifikovaného povrchu PS, hodnota kontaktního úhlu mírně klesá (143±1)°.



Obrázek 60 - Vliv plazmatické úpravy na změnu kontaktního úhlu smáčení vodou Θ plynoucí ze změny povrchového zvrásnění a chemického složení (CF_4) na rozhraní povrchových pórů připravených pomocí $5 \times 200 \mu\text{l}$ a) THF:ETH v poměru 1,5:8,5 při teplotě roztoku 22°C , b) THF:ETH v poměru 2,5:7,5 při teplotě 30°C . Výkon plazma reaktoru 300W. Obrázky ze SEM [195].

Z hlediska výsledné hodnoty kontaktního úhlu smáčení vodou po plazmatické úpravě je nutné uvažovat typ rozhraní mezi prohlubněmi generovanými pomocí navrženého vícekrokového fázově separačního procesu pomocí THF s ETH.

Jedním z výše diskutovaných přístupů vedoucích ke vzniku rozdílných mikroporézních rozhraní je použití modifikačních směsí s rozdílným poměrem THF:ETH a rozdílnou teplotou. Použití modifikační směsi složené THF:ETH v poměru 1,5:8,5 zahřáté na 22°C vede ke vzniku „úzkých“ rozhraní mezi jednotlivými povrchovými prohlubněmi, Obr. 60a. Po plazmatické úpravě pozorujeme v tomto případě vyšší hodnotu kontaktního úhlu smáčení vodou (157 ± 1)° oproti povrchu, který byl připraven z roztoku s poměrem THF:ETH 2,5:7,5 a vyšší teplotou depozice, 30°C, Obr. 60b.



Obrázek 61 - Vliv povrchové topografie PS na změnu kontaktního úhlu smáčení vodou θ po plazmatické úpravě. Povrchy pro plazmatickou úpravu připraveny s pomocí a) 2, b) 5, c) 8 x 200 µl a THF:ETH v poměru 1,5:8,5 při teplotě roztoku 22°C. Výkon plazma reaktoru 300W. Obrázky ze SEM [195].

Ze studia vlivu počtu dávek směsi THF s ETH na vývoj povrchových PS nerovností plyne, že znázorněné změny povrchové struktury na Obr. 61a až 61c nemají vliv na změnu smáčecích charakteristik vodou před plazmatickou úpravou. Zcela jiná situace nastává po plazmatické úpravě, kde pozorujeme statisticky

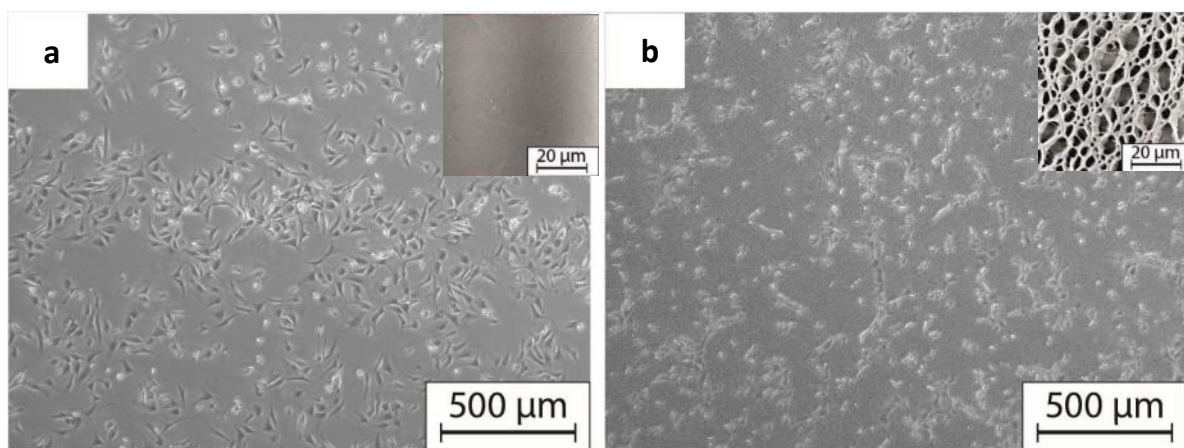
významné rozdíly v hodnotách výsledných kontaktních úhlů smáčení vodou. Toto pozorování potvrzuje dosavadní poznatky o zásadním vlivu povrchové struktury na možnosti přípravy superhydrofóbních vrstev [12, 18, 92, 190, 191, 196].

6.2.4 Vliv mikroporézních PS povrchů na chování buněk

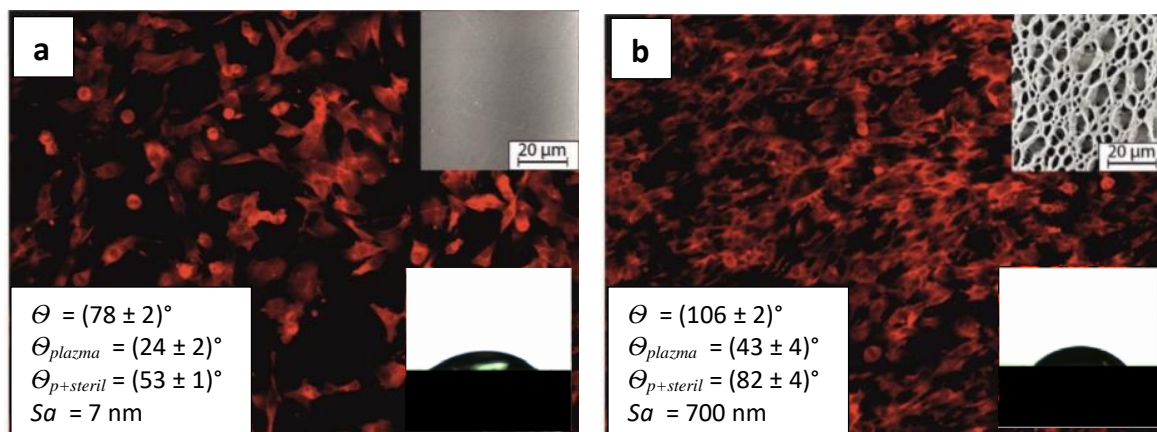
Jedním ze sekundárních cílů práce bylo prostudovat, jak připravené povrchové struktury ovlivňují chování buněk, Obr. 62, 63. Výzkum spojený se studiem buněčných interakcí s upravenými povrchy byl prováděn ve spolupráci s výzkumnou skupinou prof. Humpolíčka na UTB ve Zlíně, která se specializuje na tuto problematiku. První výsledky věnované vlivu povrchových mikroprohlubní na povrch tkáňového PS byly prezentovány v rámci námi publikované práce popisující nově navržený fázově separační postup [184].

Povrchové vlastnosti materiálu mohou významně ovlivnit nejen buněčnou adhezi, ale také buněčnou proliferaci, diferenciaci, genovou expresi a další buněčné vlastnosti [2, 197-199]. Porézní systémy na polymerní bázi mohou sloužit jako místa pro zachytávání buněk [14, 15, 200, 201] nebo jako scaffoldy [17, 30, 202]. Hlavním záměrem přípravy takovýchto struktur je snaha o napodobení extracelulárního prostředí a s tím spojený záměr poskytnout buňkám rozdílné signály podmiňující jejich chování. Spolu s povrchovými nerovnostmi podmiňují chování buněk smáčecí charakteristiky povrchu. Je obecně známo, že buňky nepreferují hydrofobní povrchy (kontaktní úhly smáčení vodou větší než 90°). Vzhledem ke skutečnosti, že většina zde prezentovaných fázově separačních postupů vede k nárůstu kontaktního úhlu smáčení, byly zkoumané povrchy před buněčnými testy plazmaticky upravovány. Proces plazmatické aktivace povrchu spolu s kultivačními podmínkami je podrobněji popsán v námi publikované práci [184]. Hodnota kontaktního úhlu smáčení vodou před a po plazmatické úpravě a následné UV sterilizaci je uvedena na Obr. 63 vlevo dole.

Povrch použitý pro studium vlivu povrchové struktury uvedený na Obr. 62b a 63b byl připraven pomocí 5 x 200 μ l THF:ETH v poměru 1,25:8,75 deponovaných v 5s intervalu na rotující PS povrch rychlostí 2200 ot/min při teplotě 22 °C. Jako referenční materiál byl v tomto případě použit neupravovaný PS povrch. V obou dvou případech se jednalo o tkáňový PS (TPP Techno Plastic Products AG) v podobě Petriho misek o průměru 3,4 cm.



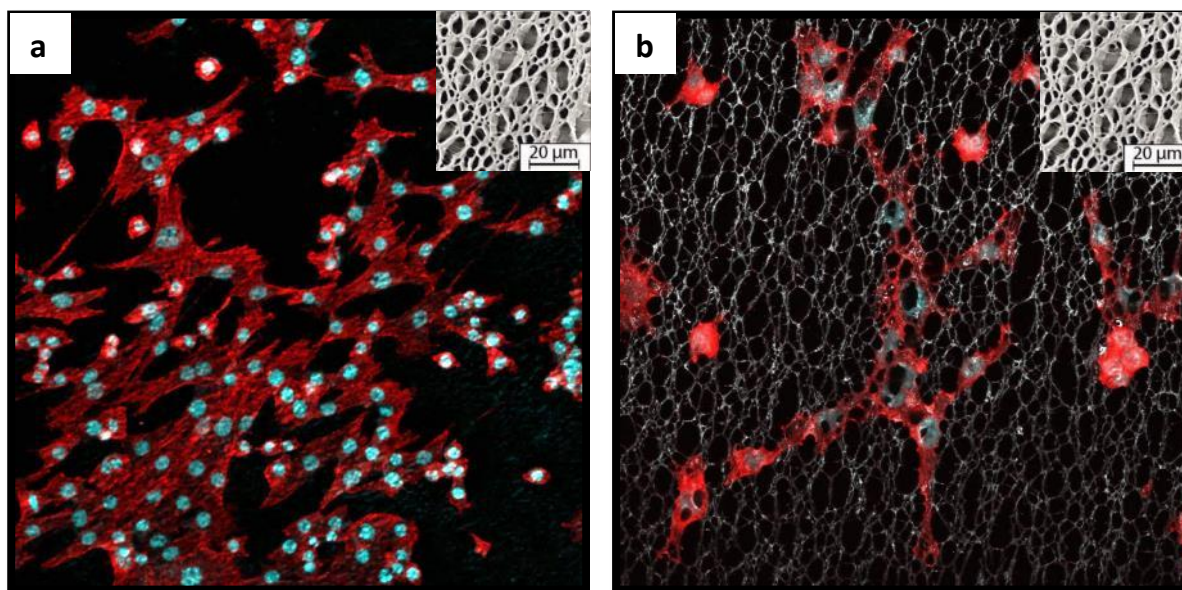
Obrázek 62 - Adheze NIH/3T3 stanovená 3 hodiny pro nasazení na **a) referenční hladký povrch PS, b) strukturovaný PS povrch**. Vpravo nahoře náhledy na povrch před depozicí buněk získané pomocí SEM. Obrázky buněk na površích pořizeny pomocí optického mikroskopu.



Obrázek 63 - Buňky (NIH/3T3) na **a) povrchu hladkého PS, b) strukturovaného PS**. Cytoskeleton byl označen fluorescenčním barvivem ActinRed. Úprava povrchu vzorku provedena pomocí plazmatického výboje o výkonu 50W, viz kontaktní úhel smáčení vodou θ_{plazma} a následně pak UV sterilizovány, viz kontaktní úhel smáčení vodou $\theta_{p+steril}$. V pravém dolním rohu smáčení povrchu vodou po plazmatické úpravě. V pravém horním rohu náhled na mikrostrukturu použitého povrchu. Obrázky ze SEM a fluorescenčního mikroskopu. Hodnoty povrchové drsnosti Sa byly stanoveny pomocí optického profilometru [184].

Na Obr. 62 jsou vyobrazeny buňky, které se přichytily k povrchu po 3 hodinách od jejich nasazení. Z tohoto porovnání je patrné, že adhezivní vlastnosti strukturovaného povrchu se výrazně neliší od výchozího hladkého PS. Tvar cytoskeletu, Obr. 63 a umístění jader buněk, Obr. 64 bylo analyzováno 48 h po nasazení buněk na povrch srovnávaných materiálů.

Z výsledků prezentovaných na Obr. 63 vyplynulo, že specificky strukturované povrchy mohou lépe simulovat nativní prostředí pro adherentní typy buněk. Bez ohledu na viabilitu buněk diskutovanou v publikované práci [184] lze na strukturovaných površích sledovat preferenční orientaci cytoskeletonu v souladu s orientací mikropórů. Jádro buněk je v tomto případě situováno uvnitř póru, jak plyne z 3D obrázků z konfokálního mikroskopu Obr. 64. Tato zjištění přináší další poznatky do problematiky věnované interakci buněk s mikrostrukturovanými povrchy na bázi polystyrenu [14, 15]. Podrobnější informace k chování buněk na rozdílně strukturovaných PS površích jsou rozvedeny v naší publikované práci [184].



Obrázek 64 - Znázornění cytoskeletu a jader buněk NIH/3T3 pomocí konfokálního mikroskopu. Jádra buněk jsou znázorněna modře. Na obrázku a) rozmístění buněk na povrchu bez zobrazení povrchových nerovností. Vpravo na obrázku b) znázorněno rozprostírání cytoskeletu přes rozhraní povrchových mikropórů. V pravém horním rohu náhledy na povrchovou mikrostrukturu získané pomocí SEM.

6.2.5 Vliv hierarchicky strukturovaných PS povrchů na chování buněk

V předešlé podkapitole a publikované práci [184] byl popsán vliv mikrostrukturovaných povrchů na chování myších embryonálních fibroblastů NIH/3T3. Tyto buňky byly deponovány na PS povrchy vyznačující se hladkými rozhraními. To znamená, že byly použity povrchy, které nepovažujeme za hierarchicky strukturované. Z literatury je ovšem známo, že strukturované

povrchy na více rozměrových úrovních mohou zásadním způsobem ovlivňovat chování kultivovaných buněk. Tato skutečnost není, až tak překvapující uvážíme-li skutečnost, že v živých organizmech hrají komplexní, hierarchicky strukturované systémy zásadní úlohu.

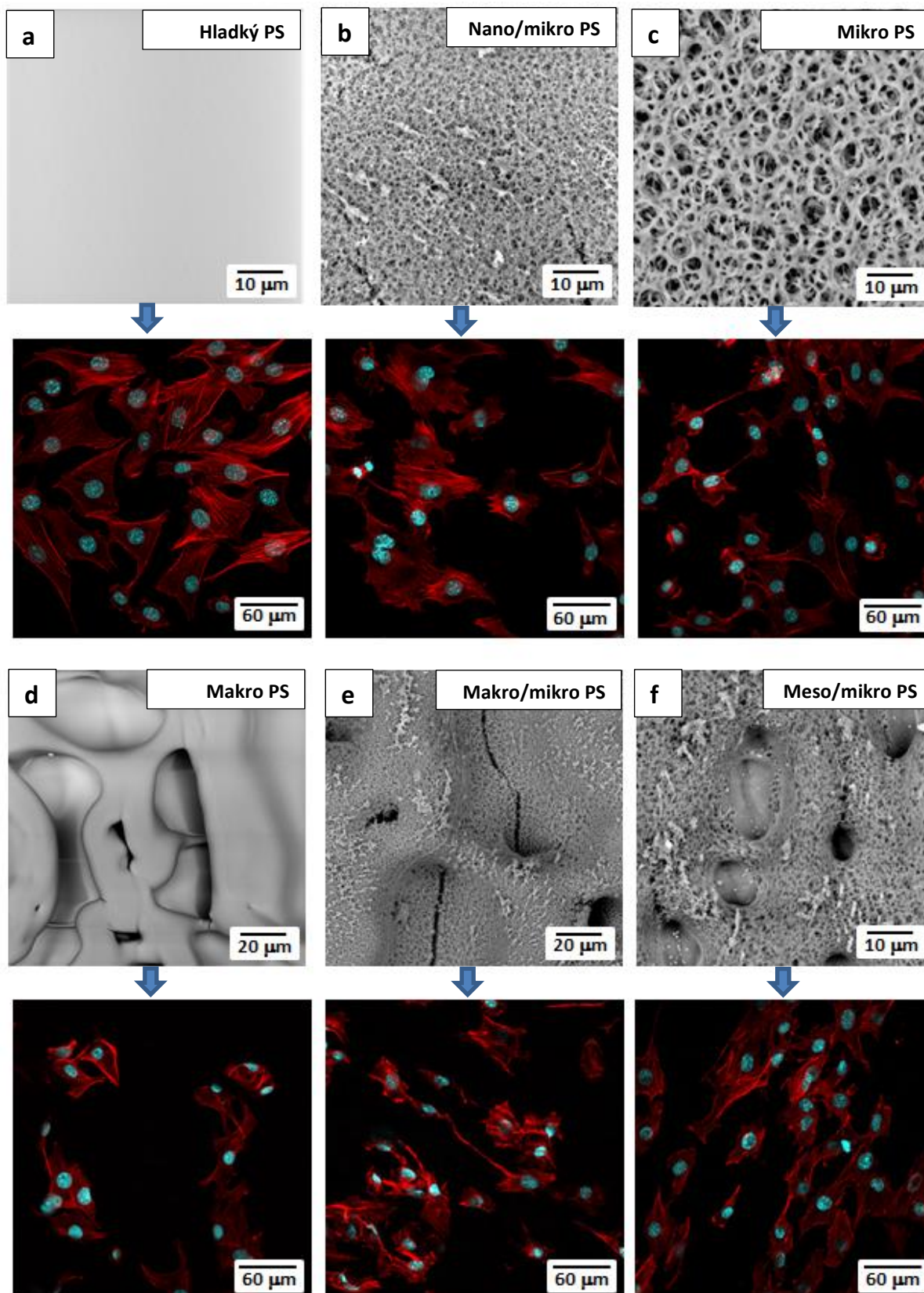
Z tohoto důvodu byly vybrané hierarchicky strukturované povrchy na bázi PS studovány s ohledem na jejich interakci s kultivovanými buňkami. Pro účely těchto testů byl použit povrch připravený pomocí dvou směsných roztoků dobrého a špatného rozpouštědla, popisovaný výše. To znamená, že byly v prvním kroku upravovány povrchy pomocí směsi THF s H₂O. Takto upravené makro strukturované povrchy byly následně upraveny pomocí směsi THF s EHT, viz Obr. 58b, 65e, 66e.

Srovnávanými povrchy v rámci tohoto experimentu, Obr. 65, 66, byly:

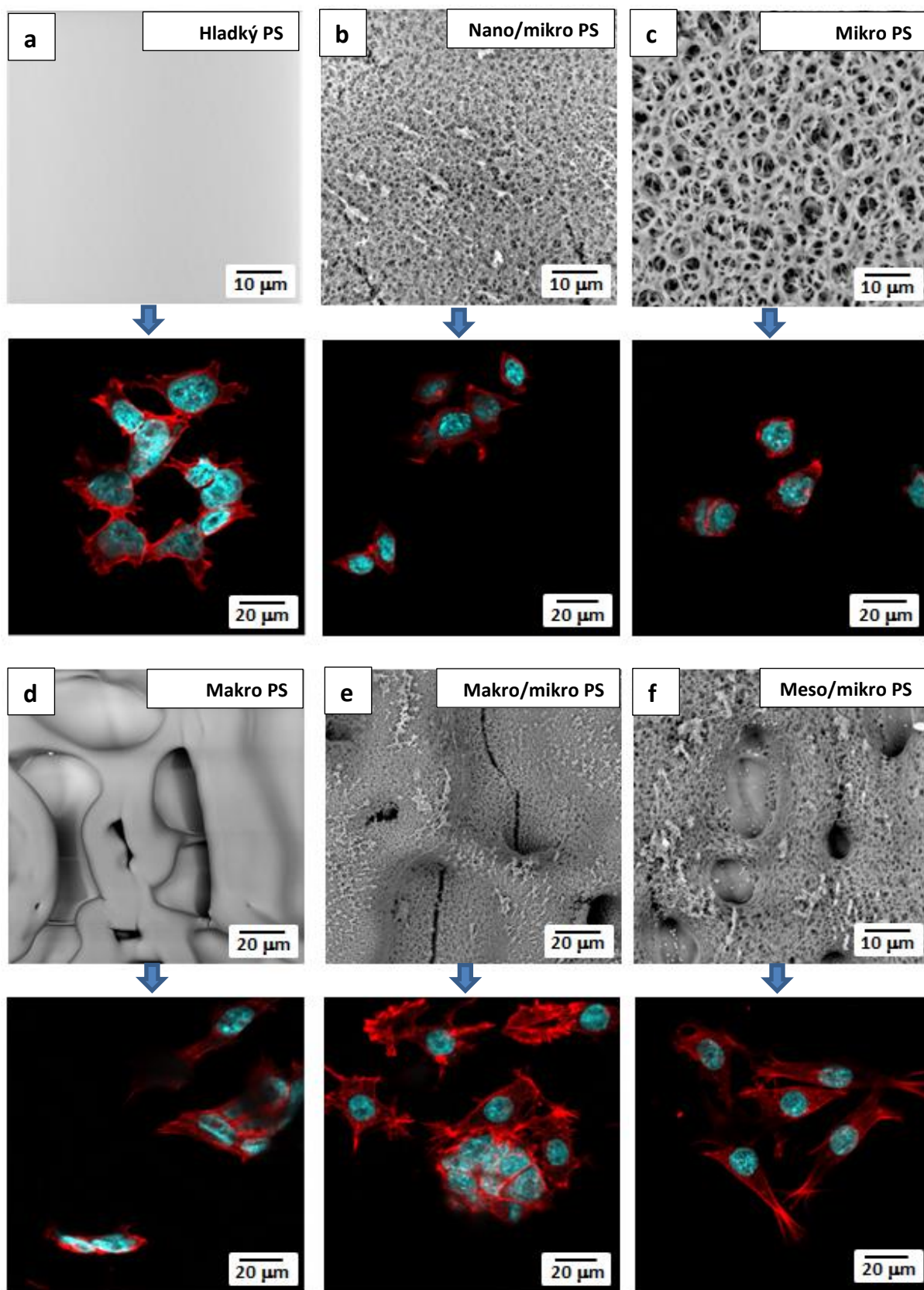
- **Hladký PS**, Obr. 65a, 66a.
- **Nano/mikro PS** připravený pomocí THF s ETH, Obr. 65b, 66b.
- **Mikro PS** v připravený pomocí fázové inverze ze směsi THF s EHT a PS, Obr. 65c, 66c.
- **Makro PS** upravený pomocí směsi THF s H₂O, Obr. 65d, 66d.
- **Makro/mikro PS** připravený pomocí dvou směsí rozpouštědel, THF s H₂O a THF s ETH, Obr. 65e, 66e.
- **Meso/mikro PS**, povrch připravený pomocí směsi THF s ETH, Obr. 65f, 66f.

Pro účely popisu vlivu těchto povrchů na chování buněk byly vybrány dvě buněčné linie. První byly výše zmiňované myší embryonální fibroblasty NIH/3T3, Obr. 65. Druhým byly embryonální kmenové buňky (ESCs), linie ES R1, Obr. 66.

Stejně jako v předešlé práci [184] byly povrchy před nasazením buněk plazmaticky aktivovány s cílem upravit jejich smáčecí charakteristiky vodou. Podrobnější informace věnované kultivačním podmínkám jednotlivých buněčných linií na strukturovaných PS površích jsou uvedeny v dříve publikované práci [184] a článku v recenzním řízení věnovaném vlivu strukturovaných povrchů na diferenciaci kmenových buněk, viz poslední příloha této práce.

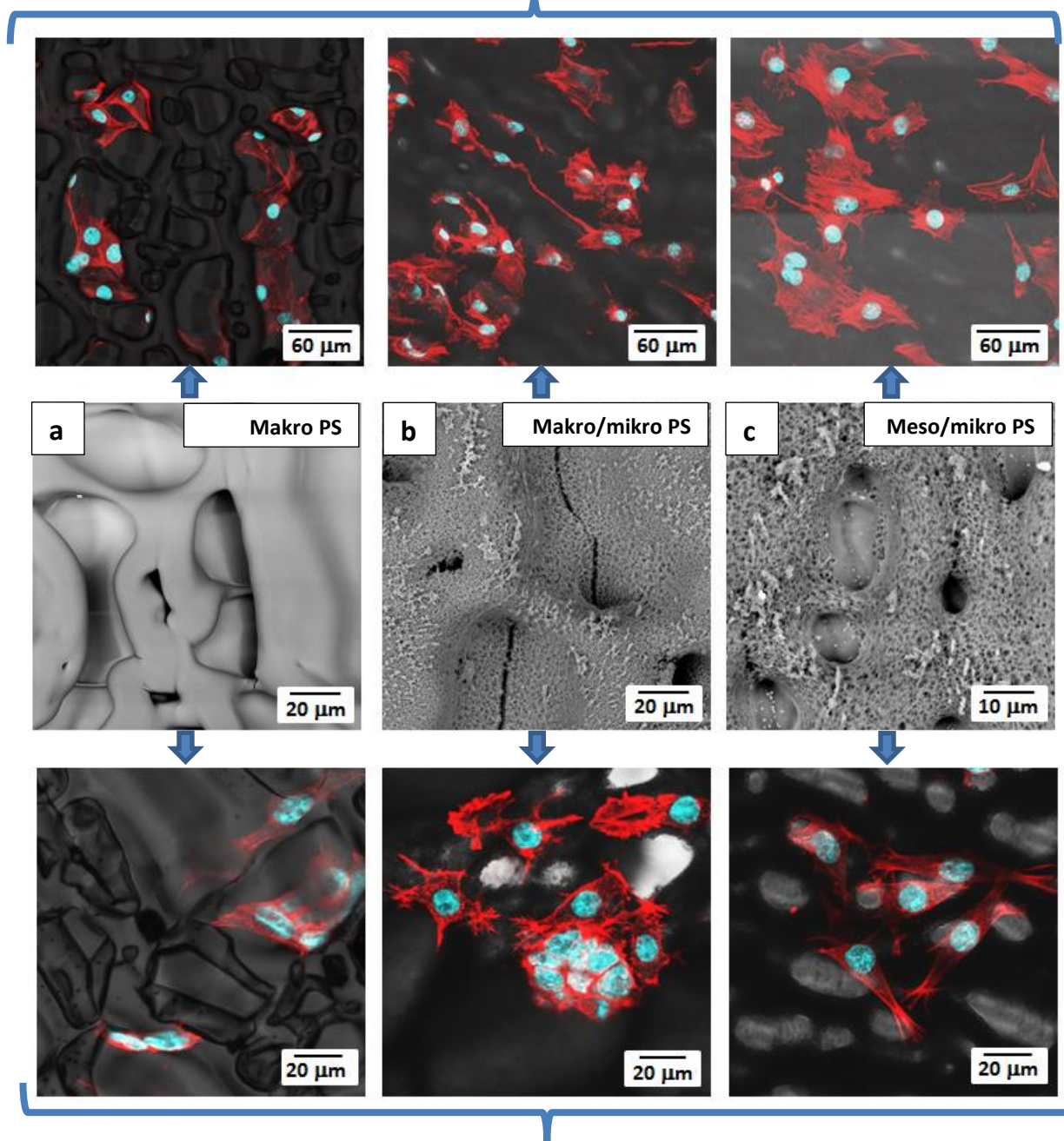


Obrázek 65 - Myší embryonální fibroblasty NIH/3T3 na povrchu rozdílně strukturovaného PS. Modře označena jádra buněk, červeně cytoskelet. PS povrchy připraveny pomocí časově sekvenované fázové separace. Obrázky povrchů ze SEM a konfokálního mikroskopu.



Obrázek 66 - Embryonální kmenové buňky (ESCs) na povrchu rozdílně texturovaného PS. Modře označena jádra buněk, červeně cytoskelet. PS povrchy připraveny pomocí časově sekvenované fázové separace. Obrázky ze SEM a konfokálního mikroskopu.

Myší embryonální fibroblasty NIH/3T3



Embryonální kmenové buňky (ESCs)

Obrázek 67 - Srovnání dvou buněčných linií na rozdílně strukturovaných PS povrchích. PS povrchy připraveny pomocí časově sekvenované fázové separace. Uprostřed obrázky povrchů ze SEM. Nahoře a dole obrázky z konfokálního mikroskopu se zobrazením podkladního povrchu, modře označenými jádry a červeně označeným cytoskeletem.

Z výsledků prezentovaných na Obr. 65 je patrné, že rozdílně strukturované povrchy ovlivňují především rozložení cytoskeletu myších embryonálních fibroblastů NIH/3T3. Cytoskelet je na těchto obrázcích označen červenou barvou,

jádra buněk jsou označena modře. Co do množství přichycených buněk nepozorujeme větší rozdíly mezi povrchy. Oproti těmto pozorování vyvstávají mnohem zajímavější skutečnosti v případě nasazení embryonálních kmenových buněk ESCs, Obr. 66. Pokud tento typ buněk necháme interagovat s hladkými, nano/mikro nebo čistě mikrostrukturovanými povrchy, Obr. 66a až 66c, nepozorujeme výraznější změny v jejich cytoskeletu (červená barva). Pozorovaným buňkám v tomto případě dominuje modře označené jádro typické pro tento typ buněk. Podobné chování ESCs vykazují na makrostrukturovaném PS povrchu, Obr. 66d. Zatímco v případě kontaktu s hierarchicky strukturovaným Makro/mikro PS respektive Meso/mikro PS lze pozorovat významné změny v jejich cytoskeletu, Obr. 66e a 66f. Tyto změny do jisté míry reflektují orientaci podkladních povrchových nerovností. Jádra buněk jsou preferenčně situované uvnitř povrchových pórů. Z těchto pozorování lze usuzovat na jejich diferenciaci podobně, jak je v literatuře diskutováno s ohledem na vliv povrchových nerovností na diferenační proces [203-205]. V souladu s tímto pozorováním je na Obr. 67 provedeno vzájemné porovnání dvou buněčných linií na třech typech povrchů. V rámci tohoto obrázku jsou kromě označených buněk kontrastovány strukturované povrchy, tak aby bylo jasné, na jakém místě povrchů jsou buňky situovány.

6.3 Fázově separační úprava substrátů na bázi hyaluronanu

Získané experimentální zkušenosti a poznatky spojené s úpravou povrchů na bázi polystyrenu byly následně aplikovány na dva biopolymerní systémy, hyaluronan a fibroin. V rámci této podkapitoly bude věnována pozornost prvním ze zmiňovaných, to znamená hyaluronanu sodnému. Na tomto místě nutno poznamenat, že v literatuře existuje velké množství postupů fázové separace vedoucí ke vzniku rozdílných povrchových struktur na bázi syntetických polymerů [14, 70, 71, 81, 156]. Oproti tomu takovéto postupy úpravy povrchů polysacharidů nebo fibrilárních proteinů zcela chybí. S ohledem na tuto skutečnost byla věnována pozornost těmto dvěma zmiňovaným systémům.

Skutečnost, že v odborné literatuře nelze nalézt fázově separační postup, který by umožňoval úpravu povrchů na bázi hyaluronanu (HA) je dána jednak strukturálními charakteristikami tohoto biopolymerního systému a do určité míry i jeho rychlou rozpustností ve vodném prostředí. Právě rychlá rozpustnost HA omezuje její následný aplikační potenciál s ohledem na kultivaci a podmiňování vývoje buněk. Z tohoto hlediska je třeba na níže uvedené poznatky pohlížet spíše jako na teoreticky přínosné. Rychlou rozpustnost HA lze řešit pomocí navázání funkčních

skupin na polymerní řetězec [206]. Pomocí takovýchto postupů vznikají hydrofobizované deriváty HA, vyznačující se omezenou rozpustností ve vodném prostředí.

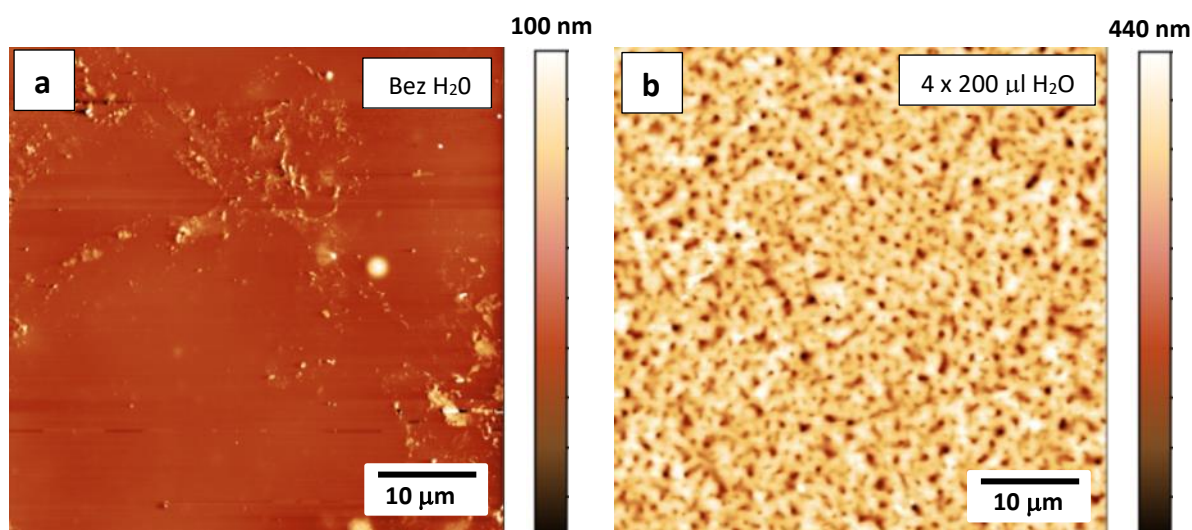
Vzhledem k výše uvedeným skutečnostem bude problematice úpravy povrchů HA věnována pouze omezená pozornost zaměřená na prokázání uplatnitelnosti nově navrženého postupu fázové separace na takovéto makromolekulární systémy.

Jak bylo naznačeno výše, aplikaci fázově separačních postupů na biopolymerní systémy omezuje především jejich strukturními odlišnostmi dané zásadní úlohou sekundárních vazeb (vodíkových můstků), které v případě biopolymerních systémů odpovídají za jejich skládání do výše organizovaných struktur. Typickým příkladem takového polymeru je HA, který může zaujímat řadu konformačních uspořádání [207, 208]. Tyto možnosti jsou dány hydrofilními a hydrofobními doménami v řetězci HA, jak je popsáno v pracích J.E. Scotta [176, 177, 209]. V případě HA pozorujeme jednak hydrofobně-hydrofobní interakce, které se vyskytují mezi antiparalelně posunutými řetězci HA. Dále pak elektrostatické repulze mezi zápornými náboji na řetězcích HA, které jsou kompenzovány hydrofilními interakcemi a vodíkovými můstky [209-212].

V rámci níže uváděných experimentů byly upravovány povrchy HA v podobě filmů deponovaných na povrchu tkáňového PS používaného v předcházejících experimentech. Příprava těchto vrstev probíhala v několika krocích. Prvním z nich bylo rozpouštění HA z práškové formy do vodného roztoku. Pro přípravu vodných roztoků byl používán komerčně dostupný HA o středních molekulové hmotnosti $M_w = 243$ kDa. Byly připravovány vodné roztoky s obsahem 3 hm. % HA při teplotě 50°C na magnetickém míchadle po dobu 24 hodin. Takto připravené roztoky byly odlévány do mikrostrukturně upravených PS misek o průměru 3,4 cm. Strukturní úprava povrchu PS misek byla volena záměrně tak, aby došlo k zvýšení adheze vytvářeného HA filmu na povrchu PS. V rámci kontrolních experimentů bylo následně potvrzeno, že nerovnosti na povrchu PS nemají vliv na typ vznikající struktury na povrchu HA. Pro úpravu nosného povrchu PS byl použit výše popsáný postup založený na časově sekvenovaném dávkování směsi THF s ETH. Pro tyto účely bylo použito 5 x 200 μ l THF:ETH v poměru 1,5:8,5, které byly deponovány na rotující povrch v 5s intervalu při 22°C. Pro následné odlévání připravených roztoků HA byl povrch dále plazmaticky aktivován pomocí reaktoru Diener Femto SRS v atmosféře vzduchu po dobu 60s a nastaveném výkonu 100 W. Tímto bylo docíleno maximálního zvýšení smáčivosti PS misky. Po vyjmutí misky z reaktoru bylo na takto upravený

povrch PS o průměru 3,4 cm nanese 6 ml roztoku HA, který byl následně solidifikován při 50 °C v laboratorní sušárně bez nucené cirkulace vzduchu. Výsledná tloušťka filmu se pohybovala okolo 100 μm. Jak se později ukázalo, proces sušení a skladování filmů před jejich fázově separační úpravou má zásadní význam s ohledem na obsah zbytkové vody ve vrstvě HA.

Z fázově separačních experimentů vyplynulo, že povrch HA nelze upravovat bez předešlého nabobtnání vodou, Obr. 68. Nutno poznamenat, že bobtnání není možné provádět v neomezeném rozsahu. Velké množství bobtnacích dávek (200 μl) má následek vytvoření mobilní polymerní vrstvy vyznačující se dostatečně nízkou viskozitou nezbytnou k tomu, aby mohlo dojít k jejímu smytí z povrchu v důsledku jeho rotace. Z těchto poznatků vyplynulo, že pro změnu povrchové struktury HA je nezbytné použít vícekrokový modifikační proces. Po prvním bobtnacím kroku byl povrch upravován směsí n-butanolu (nBT) s isopropylalkoholem (IPA).

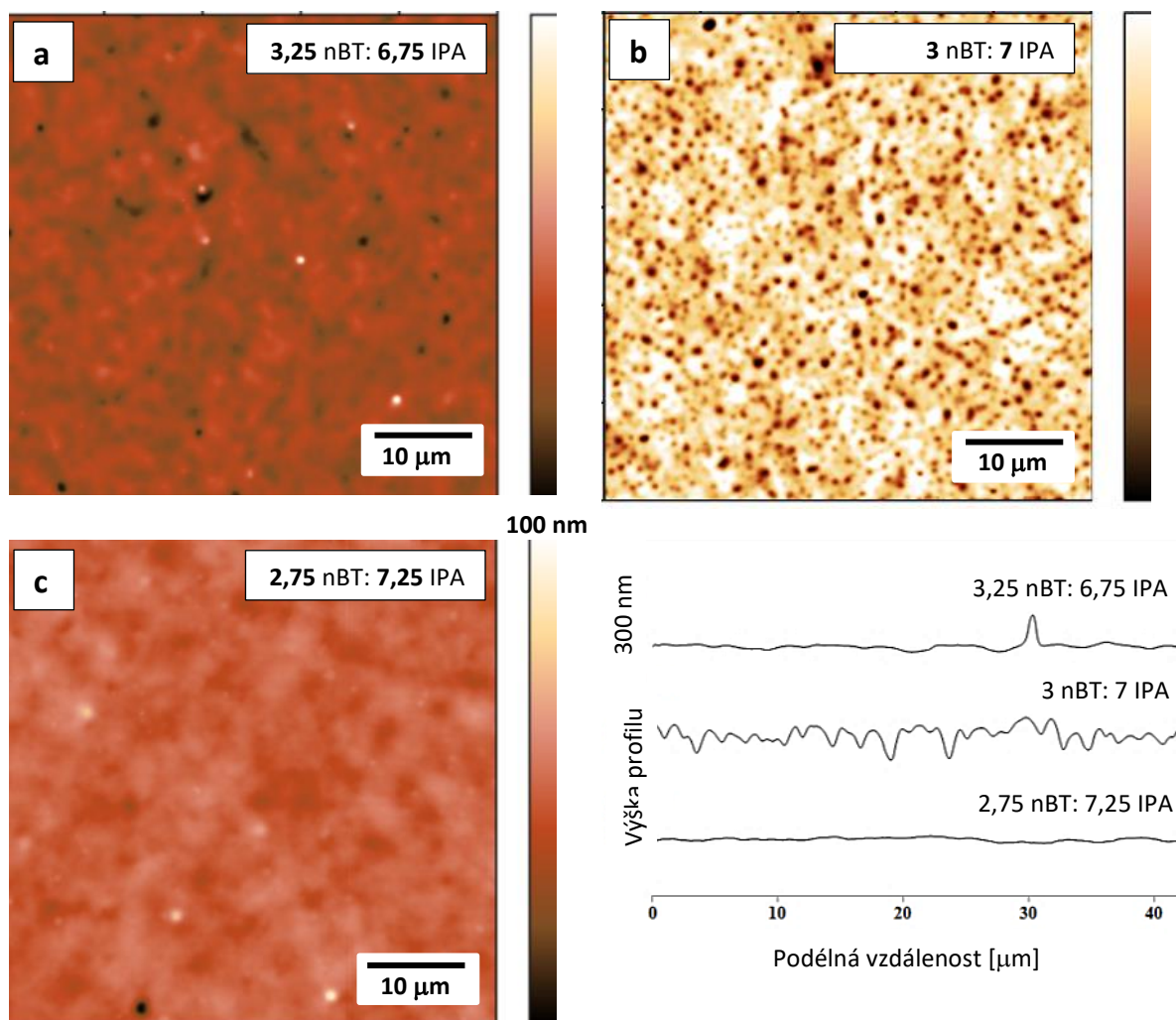


Obrázek 68 - Možnosti povrchového strukturování vrstvy HA v závislosti na bobtnání povrchu H₂O. V prvním kroku byla na povrch b) nanášena voda v časovém intervalu 5s při 23°C a 2100 ot/min. V následném kroku byly povrchy upravovány směsí 25 x 200 ml nBT:IPA v poměru 3:7 dávkovanou v intervalu 5s. Obrázky z AFM.

Jak bylo naznačeno výše typ vznikající povrchové struktury je závislý na zbytkovém obsahu vody v solidifikované vrstvě HA. Právě tato zbytková vlhkost ovlivňuje rychlost bobtnání povrchu před následnou úpravou pomocí nBT s IPA.

100 nm

100 nm



Obrázek 69 - Srovnání vlivu poměru nBT:IPA na vznik zvrásnění na povrchu HA. V prvním kroku bylo na povrch dávkováno 3 x 200 μl H_2O v 5s intervalech. V druhém kroku byla na povrch dávkována směs nBT:IPA v poměrech uvedených na obrázku a) až c). Na povrch bylo dávkováno 10 x 200 μl nBT s IPA v časovém intervalu 5s, při 23°C a 2100 ot/min. Obrázky a profilové řezy z AFM.

Další významnou proměnou vzhledem k možnosti vzniku nerovností na povrchu HA je poměr složek směsi dobrého a špatného rozpouštědla, podobně jak bylo diskutováno v případě úpravy povrchů na bázi PS. Z provedených experimentů spojených s úpravou HA vyplynulo, že pro úpravu takovýchto povrchů je nezbytné velmi přesně nastavit poměr mezi nBT a IPA. Změna v poměru těchto složek o pouhé 2,5% může mít za následek vznik řádově menších nerovností, jak plyne z porovnání uvedeného na Obr. 69.

Pro úpravu povrchů na bázi HA bylo použito TSSC zařízení stejně jako v případě úpravy PS. To znamená, že další významnou proměnou je časový interval

dávkování vody a směsi nBT s IPA. Mimo to je nezbytné vzít v potaz distribuci M_w použité HA, rychlost rotace povrchu, množství deponovaných dávek vody a nBT s IPA. Není ničím překvapující, že nastavení těchto proměnných se s ohledem na výše zmiňované strukturní odlišnosti HA zásadně odlišují od PS jak je podrobněji diskutována v diplomové práci Martiny Bradáčové a bakalářské práci Elišky Bognerové [213, 214]. Mezi další zmiňované odlišnosti modifikace HA oproti PS patří především nezbytnost použití velkého množství modifikačních dávek nBT s IPA (10 až 40 dávek) a jejich depozice v krátkých časových intervalech (2,5 až 5s).

6.1 Fázově separační úprava substrátů na bázi fibroinu

S ohledem na nemožnost přímé aplikace strukturovaných povrchů HA ve vodném prostředí byl vybrán jiný biopolymerní systém vyznačující se omezenou rozpustností ve vodném prostředí, biokompatibilitou a bioresorbovatelností. Takovýmto materiálem je například hedvábný fibrilární protein získaný z kokonů bource morušového (*Bombyx mori* fibroin – BMF).

Hedvábí je v přírodě produkováno ve vláknité formě bourcem morušovým a pavouky. Jedná se o vláknitý protein charakteristický překvapivými mechanickými vlastnostmi. Hedvábná vlákna se používají po staletí např. při šití stehů při operačních zákrocích. V poslední době s rozvojem 3D tisku a biotisku zaznamenaly opětovné využití ve formě regenerovaných hedvábných roztoků. V této formě se používají pro výrobu různých biomateriálů, jako jsou gely, houby a filmy pro lékařské aplikace [179, 215-220].

Pro přípravu BMF filmů byl použit regenerovaný fibroin v lyofilizované formě. Tento základní materiál byl izolován a purifikován podle literárně popsanych postupů [178] na Univerzitě v Bayreuthu následujícím postupem: Nejprve byl vstupní materiál zbaven sericinu a to varem v 0,02 M uhličitanu sodném. Poté byla směs propláchnuta deionizovanou vodou a rozpuštěna za zvýšené teploty (60 °C) po dobu 4 hodin v roztoku bromidu litného. Po úplném rozpuštění byly pomocí dialýzy odstraněny nežádoucí ionty. Následně byl roztok vložen do centrifugy a následně zfiltrován. Získaný roztok byl lyofilizován, aby jej bylo možné dlouhodobě skladovat.

Fibroinové vrstvy pro fázově separační experimenty byly připravovány odléváním do PS Petriho misek s následnou solidifikací při laboratorní teplotě

v digestoři. Pro odlévání filmů byl BMF rozpouštěn ve dvou typech rozpouštědel: kyselina mravenčí (Formic Acid – FA) a hexafluoroisopropanol (HFIP).

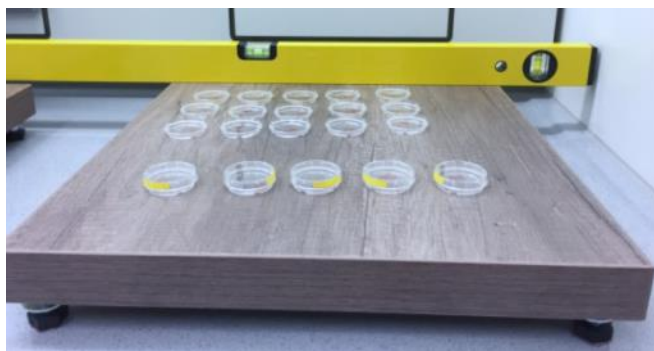
V rámci prvotních experimentů s tímto materiálem bylo nezbytné nalézt optimální koncentraci BMF v roztoku a objem nanášený na povrch PS misky o průměru 3,4 cm, tak aby bylo použito co nejméně proteinu, který se problematicky izoluje ve velkých množstvích. Z tohoto důvodu byl analyzován vliv na těchto parametřů na změnu tloušťky proteinové vrstvy na nosném podkladu. Výsledky těchto vyhledávacích experimentů jsou shrnuty v tabulkách na Obr. 70. Na základě zjištěných dat a fázově separačních experimentů byl vybrán pro přípravu BMF vrstev roztok s nejmenším podílem BMF (2 % w/v) a nejmenším objemem (450 μ l). Příprava roztoků BMF v FA nebo HFIP probíhala v uzavřené nádobě na třepacím stroji při laboratorní teplotě 23°C po dobu 24 hodin.

| a) | Koncentrace BMF v FA (w/v) | Objem deponovaného roztoku [μl] | Tloušťka vrstvy po vysušení [μm] | Množství BMF na ploše Petriho misky [mg/cm^2] |
|-----------|-----------------------------------|---|--|---|
| | 10 % | 450 | 25 \pm 6 | 5 |
| | 10 % | 900 | 41 \pm 2 | 10 |
| | 5 % | 900 | 12 \pm 3 | 5 |
| | 2 % | 450 | 6 \pm 1 | 1 |

| b) | Koncentrace BMF v HFIP (w/v) | Objem deponovaného roztoku [μl] | Tloušťka vrstvy po vysušení [μm] | Množství BMF na ploše Petriho misky [mg/cm^2] |
|-----------|-------------------------------------|---|--|---|
| | 10 % | 450 | 50 \pm 5 | 5 |
| | 10 % | 900 | 66 \pm 4 | 10 |
| | 5 % | 900 | 30 \pm 4 | 5 |
| | 2 % | 450 | 13 \pm 1 | 1 |

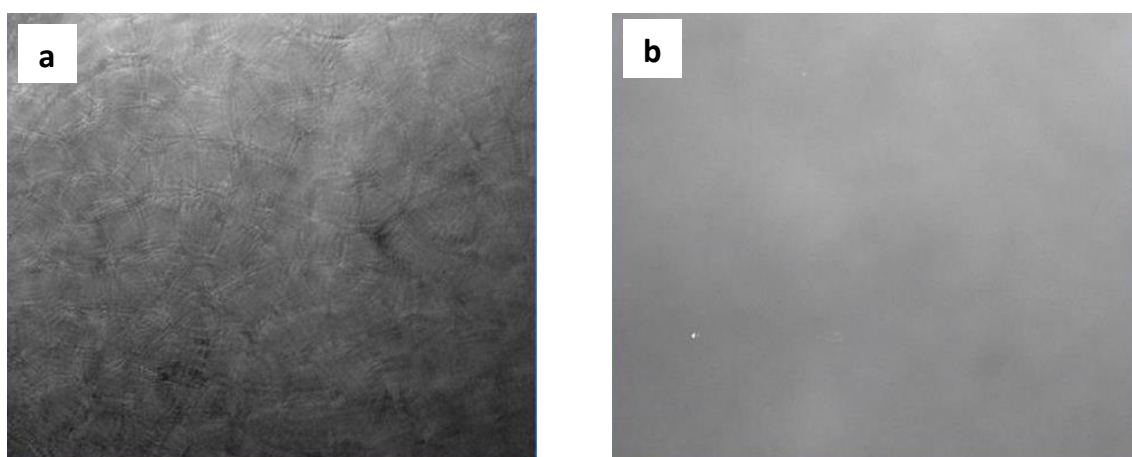
Obrázek 70 - Změna výška solidifikované vrstvy BMF na povrchu PS v závislosti na výchozí koncentraci BMF v roztoku **a)** FA, **b)** HFIP.

Vrstvy z BMF byly solidifikovány následujícím způsobem: 2% (w/v) roztok BMF v FA nebo HFIP byl odlévána na PS misku o průměru 3,4 cm. Solidifikace BMF do podoby tenkých vrstev probíhala v digestoři při laboratorní teplotě (23 °C) a vlhkosti (40 %) po dobu 12 hodin. Pro přípravu vrstev s rovnoměrně rozloženou výškou BMF přes plochu PS misky, bylo nezbytné tyto misky umístit na předem vyrovnanou podložku Obr. 71.



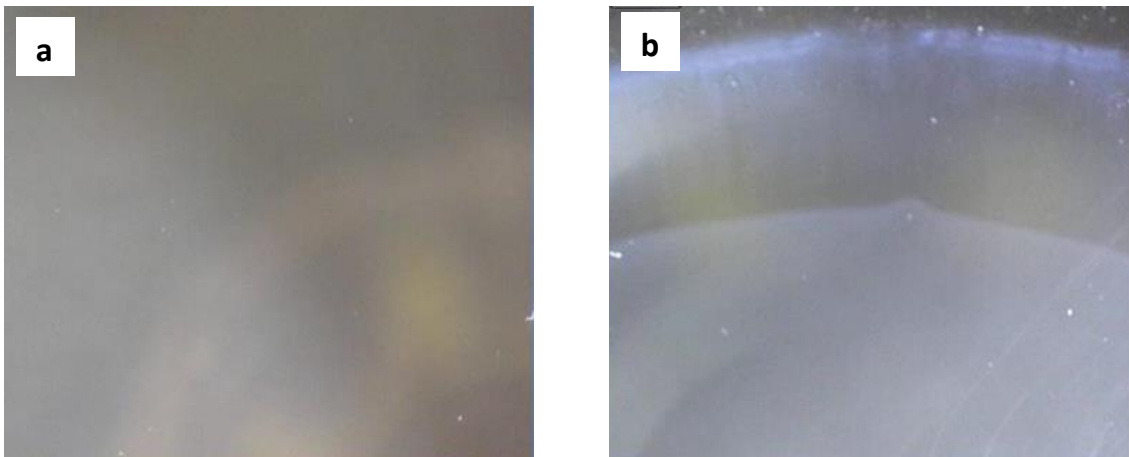
Obrázek 71 - Výškově nastavitelná podkladní deska pro přípravu tenkých BMF vrstev.

Jedním z klíčových faktorů přípravy rovnoměrné hladkého povrchu BMF bylo zajištění správných podmínky pro odpařování použitých rozpouštědel. Bylo zjištěno, že v případě odpařování HFIP z Petriho misek bez jejich zakrytí víčky dochází na povrchu BMF filmu k vzniku zvrásnění, které je zapříčiněno rychlým odpařování rozpouštědla, Obr. 72a. Toto rychlé odpařování rozpouštědla z polymerního roztoku vyvolává tok materiálů v důsledku teplotních a koncentračních gradientů, které zde vznikají. Příмым důsledkem takovýchto dějů je vznik povrchového zvrásnění spojeného s nerovnoměrným rozložením BMF přes plochu PS misky. Podrobnější popis těchto dějů lze nalézt v odborné literatuře [74, 77, 78, 221, 222]. Jak bylo naznačeno, řešení tohoto problému spočívá v umístění PS víčka na misku se solidifikovaným roztokem, Obr. 72b.



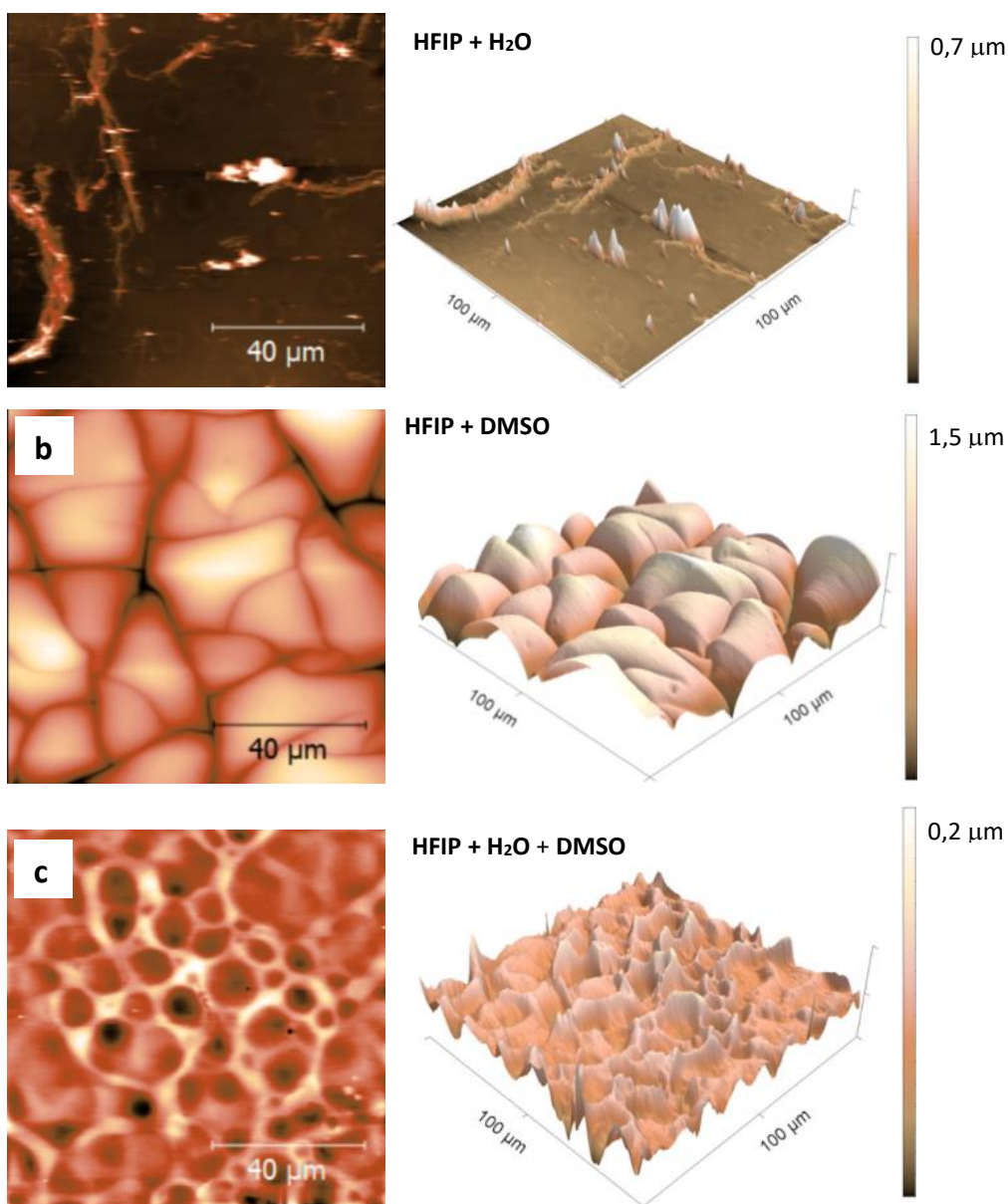
Obrázek 72 - Náhled na povrch BMF vrstvy na PS misce solidifikované z HFIP roztoku: a) bez víčka, b) s víčkem. Obrázky pořízeny digitální kamerou.

Opačný vliv, na výsledný povrch má víčko v případě solidifikaci BMF z roztoku FA. Tato skutečnost je dána daleko pomalejší rychlostí odpařování FA oproti HFIP, Obr. 73. To znamená, že hladký povrchu BMF z roztoků FA vzniká v případě použití nezakrytých misek, Obr. 73a



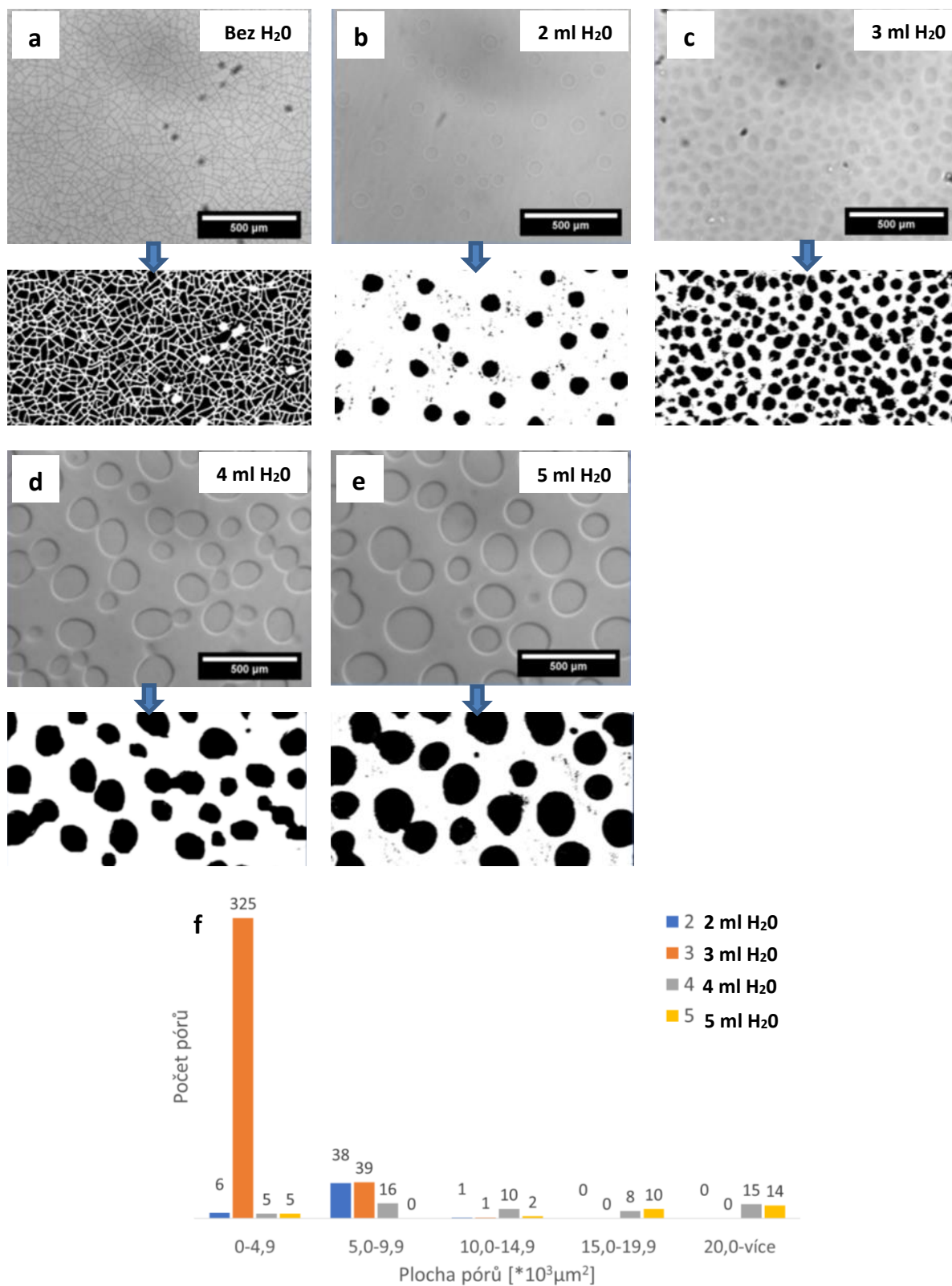
Obrázek 73 - Náhled na povrch BMF vrstvy na PS misce solidifikované z FA roztoku: a) bez víčka, b) s víčkem. Obrázky pořizeny digitální kamerou.

Hladké BMF vrstvy na Obr. 72b a 73a byly upravovány směsmi rozpouštědel, které byly deponovány na rotující povrchy pomocí TSSC a M-TSSC zařízení. Z prvotně provedených experimentů vyplynulo, že povrch BMF nelze efektivně strukturovat bez použití vody v modifikační směsi dobrého a špatného rozpouštědla. Voda v případě BMF funguje jako změkčovadlo. To znamená, že usnadňuje reformování jeho povrchových vrstev, viz Obr. 74 a 75. Z výsledků uvedených na Obr. 74 je dále patrné, že není dostačující použít pouze H₂O ve směsi s dobrým rozpouštědlem, HFIP. Voda jako taková nefunguje jako pórotvorná složka. Pro vytváření povrchově porézní struktury je nezbytné do modifikační směsi přidat dimethylsulfoxid (DMSO). Stejně tak nelze použít pouze směs HFIP s DMSO. Při použití takovéto směsi vzniká specifické zvrásnění uvedené na Obr. 74b a 75a. Tento typ zvrásnění je spojen se vznikem trhlin na povrchu BMF, to znamená, že modifikovaná vrstvy křehne. Problém s křehnutím upravovaného povrchu obecně vykazovaly filmy připravené z roztoků FA a vrstvy modifikované pomocí směsí s FA. Z tohoto důvodu byl nadále jako dobré rozpouštědlo používán pouze HFIP. Mimo to byl studován vliv množství přidané H₂O, DMSO, počtu dávek, časové prodlevy dávkování a rychlosti rotace modifikovaných povrchů na vznik rozdílných typů povrchových struktur.



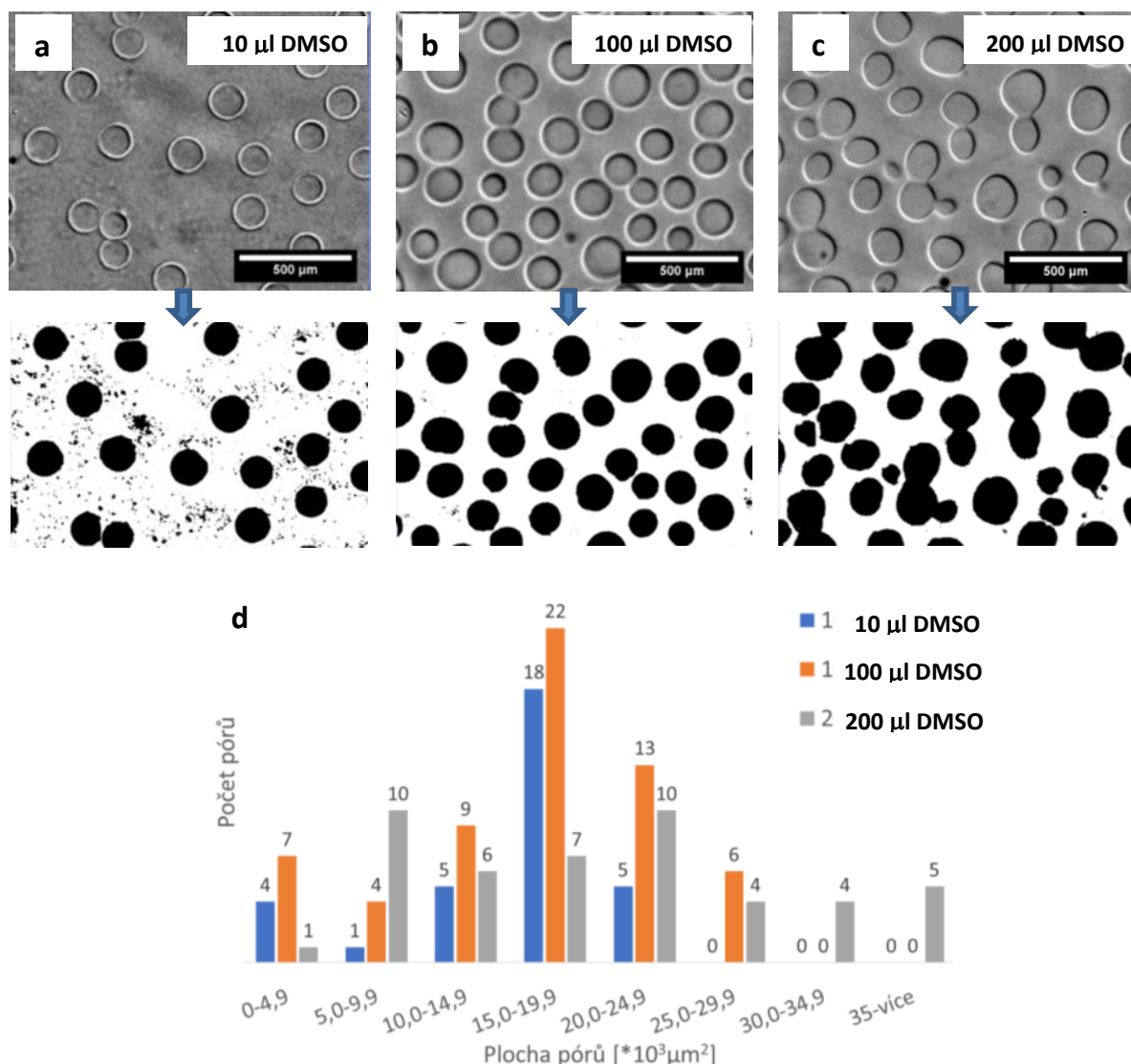
Obrázek 74 - Změny povrchové struktury BMF filmů připravených z FA roztoků po úpravě **a)** HFIP s H_2O , **b)** HFIP s DMSO, **c)** HFIP s H_2O a DMSO. Obrázky za AFM. Vlevo 2D náhled na výškové změny označené rozdílnými barvami. Vpravo 3D pohled na povrch vzorku.

Vliv množství přidané vody do modifikační směsi HFIP s DMSO, demonstruje porovnání uvedené na Obr. 75. Bez přidání vody do modifikační směsi vzniká povrch charakteristický povrchovými prasklinami bez prohlubní, Obr. 75a. Náznak vzniku povrchových pórů lze pozorovat hned po prvním přídavku H_2O , Obr. 75b. S rostoucím podílem vody roste i plošná velikost vznikajících prohlubní na úkor jejich počtu, viz. Obr. 75c až f. To znamená, že malé kapky zapříčiňující vznik husté sítě prohlubní na Obr. 75c se spojují do větších celků pozorovatelných na Obr. 75d, e.



Obrázek 75 - **Změny povrchové struktury BMF filmů** připravených z HFIP roztoků po úpravě roztokem HFIP s DMSO a rozdílným podílem H₂O. Obrázky z optického mikroskopu. f) histogram plošných průřezů pórů.

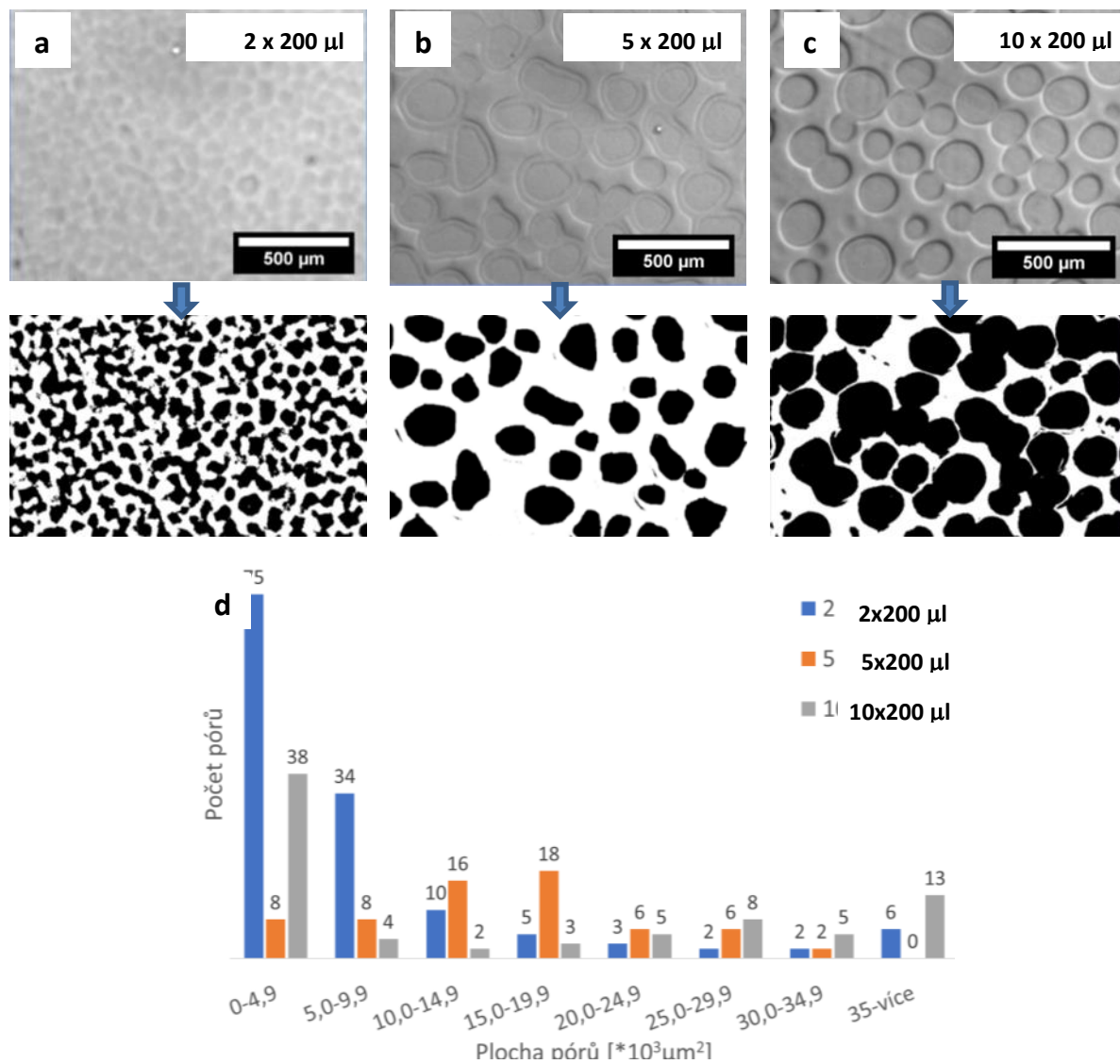
V rámci počátečních experimentů prezentovaných na Obr. 74 bylo zjištěno, že porézní strukturu na povrchu BMF nelze připravit bez přídavku DMSO do modifikační směsi. Na základě tohoto zjištění byl proveden experiment, kde do této směsi bylo přidáváno rozdílné množství DMSO. Z výsledků tohoto experimentu vyplynulo zjištění, že po překročení určitého množství DMSO v modifikační směsi nedochází k dalšímu nárůstu počtu povrchových prohlubní. Mírně roste jejich průměr daný koalescencí kapek DMSO do větších celků, Obr. 76.



Obrázek 76 - **Změny povrchové struktury BMF filmů** připravených z HFIP roztoků po úpravě roztokem HFIP s H_2O a rozdílným podílem DMSO. Obrázky z optického mikroskopu. d) histogram plošných průřezů póry.

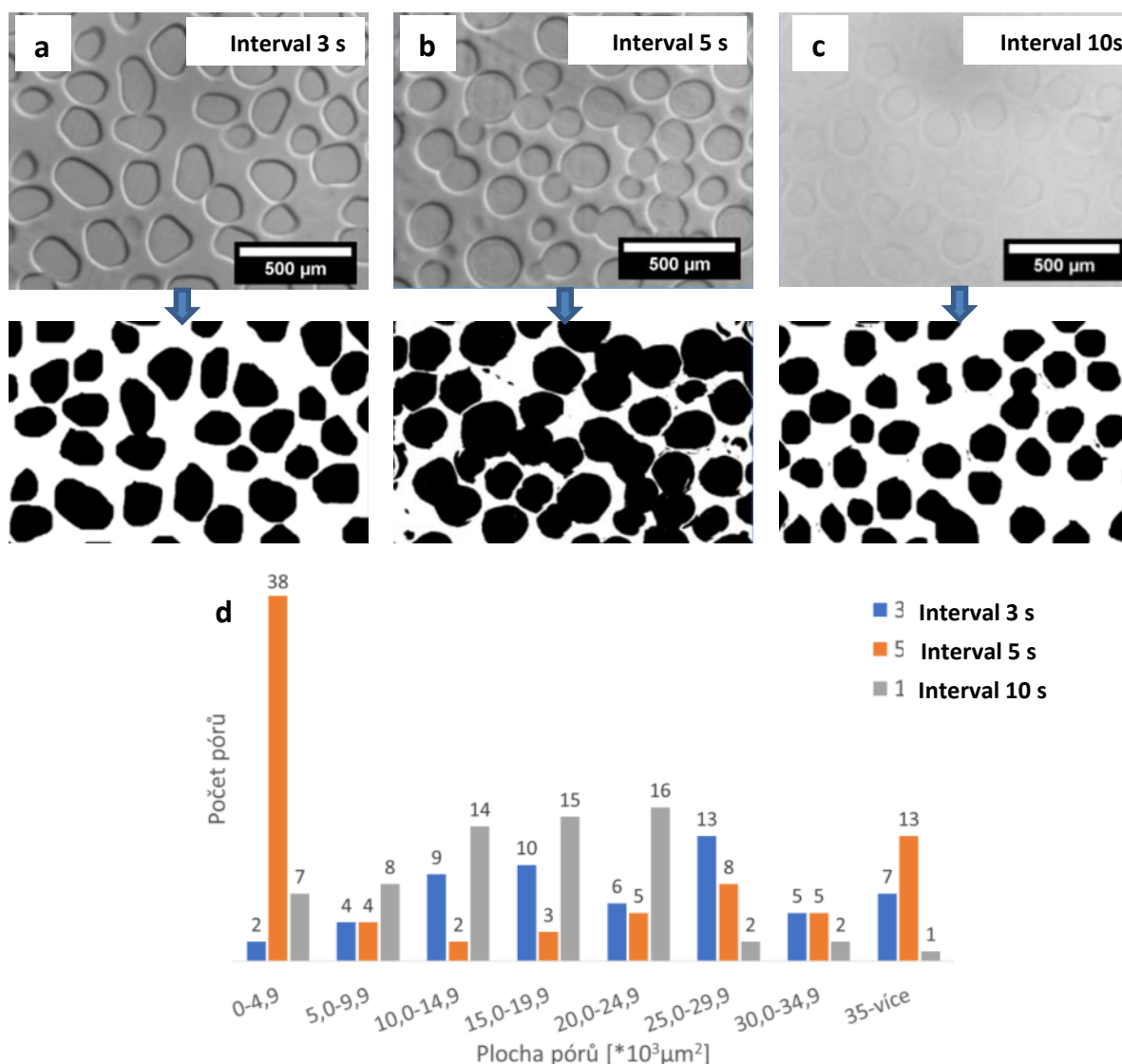
Se změnou počtu nanášených dávek směsi HFIP+ H_2O +DMOS na upravovaný povrch BMF roste velikost vznikajících prohlubní, Obr. 77, podobně jako

v případě úpravy povrchů na bázi PS a HA. Z obrázku 77b, c je patrné, že tyto změny jsou doprovázeny koalescencí vznikajících prohlubní do větších celků.



Obrázek 77 - Změny povrchové struktury BMF filmů připravených z HFIP v závislosti na počtu nanášených dávek HFIP+H₂O+DMSO. Obrázky z optického mikroskopu. d) histogram plošných průřezů póry.

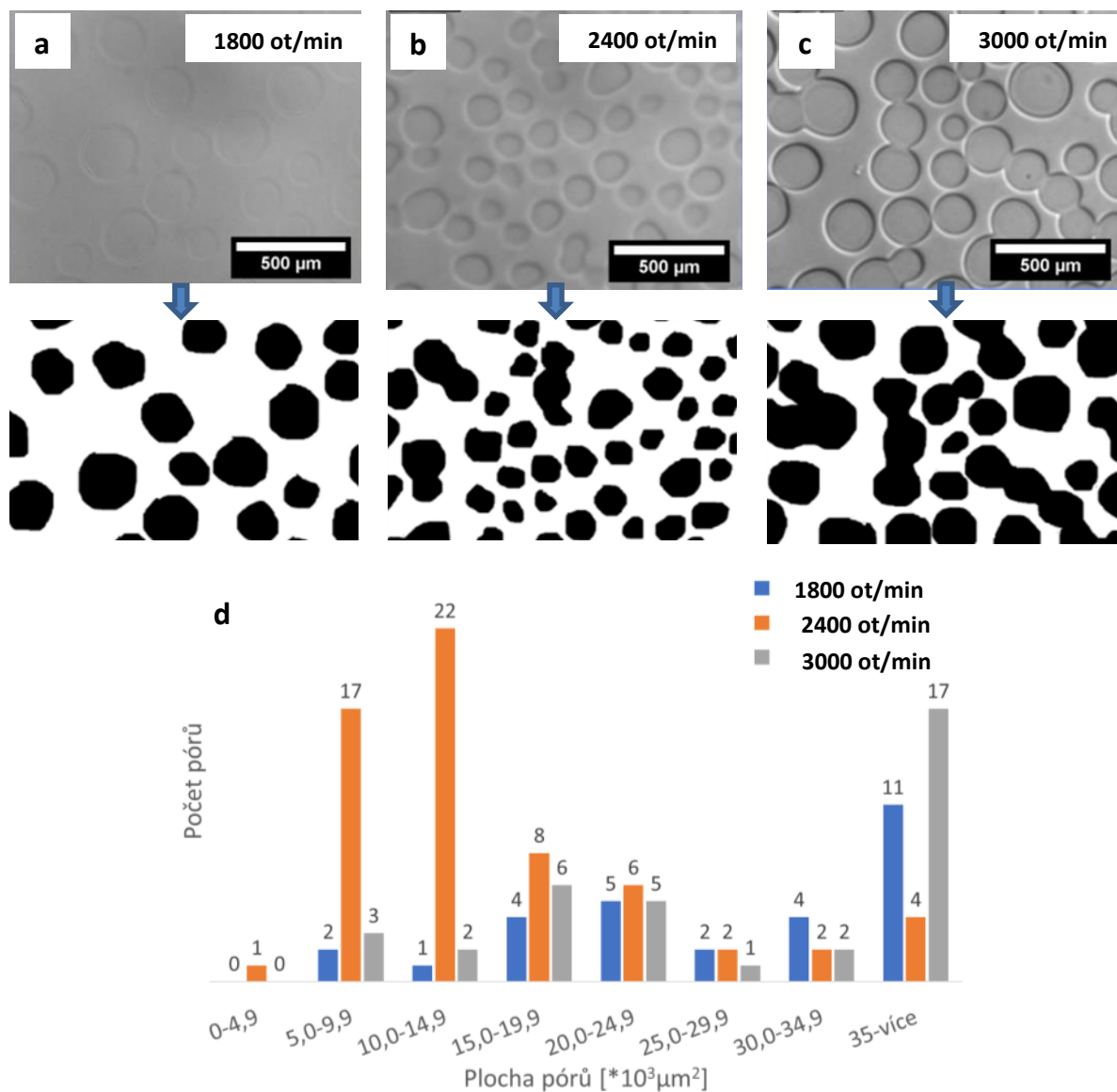
Stejně tak neméně důležitou roli hraje správné nastavení časové prodlevy mezi depozicemi jednotlivých dávek HFIP+H₂O+DMSO na povrch BMF, Obr. 78. Z experimentálních výsledků uvedených na tomto obrázku vyplynulo, že pro úpravu BMF povrchu je potřeba volit kratší časové prodlevy mezi depozicemi jednotlivých dávek podobně jako v případě úpravy povrchu HA.



Obrázek 78 - **Změny povrchové struktury BMF filmů** připravených z HFIP v závislosti na časovém intervalu mezi nanášenými 200 μl dávkami HFIP+H₂O+DMSO. Obrázky z optického mikroskopu. d) histogram plošných průřezů póry.

Úprava povrchů pomocí nově navrženého postupu fázové separace probíhala na TSSC a M-TSSC zařízení za rotace. Z toho plyne, že je potřeba brát v potaz rychlost rotace modifikovaných BMF vrstev. Rotace vzorku napomáhá jednak rychlému rozprostírání modifikačního roztoku HFIP+H₂O+DMOS po povrchu, stejně tak ovlivňuje jeho výšku. To znamená objem komponent, které budou působit na upravovaný povrch BMF. Zajímavou skutečností, je že s rostoucí rychlostí rotace pozorujeme na povrchu vznik výrazně hlubších makroprohlubní, Obr. 79. Takovéto chování lze vysvětlit pomocí poznatku zjištěného v rámci experimentů s buňkami, které budou diskutovány v následující podkapitole. Z těchto experimentů vyplynulo, že makroporézní struktury nejsou ve vodném

prostředí stabilní a po čase se vytrácí. To znamená, že v případě působení vyšší vrstvy H₂O na povrch BMF může docházet právě k tomuto nechtěnému ději, Obr. 79a.



Obrázek 79 - **Změny povrchové struktury BMF filmů připravených z HFIP v závislosti na rychlosti rotace upravovaného vzorku.** Obrázky z optického mikroskopu. d) histogram plošných průřezů póry.

Výše prezentované výsledky uvedené na Obr. 70 až 79 byly získány v rámci zahraniční stáže na Univerzitě v Bayreuthu. Při pokusu o následné zopakování těchto výsledků na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně bylo zjištěno, že typ vznikající povrchových struktur je závislý na podmínkách přípravy BMF vrstev. Zejména pak na relativní vlhkosti, při níž probíhá jejich solidifikace. Z následného studia odborné literatury [223-226] vyplynulo, že tyto podmínky

podmiňují přeskládání BMF z amorfního stav v podobě α helixů do stavu β skládaných listů. Systém s převažujícím množstvím α helixu je v literatuře označován jako Silk I, zatímco stav s β skládanými listy se označuje jako Silk II. BMF ve stavu Silk I je charakteristický lepší rozpustností a horšími mechanickými vlastnosti. Změnu přechodu BMF ze Silk I do Silk II stavu lze monitorovat pomocí měření infračervených spekter. Pozorujeme posun maxim Amidu I v FTIR spektrech z cca 1653 cm^{-1} pro Silk I na cca 1620 cm^{-1} pro Silk II [181, 215, 227, 228]. Tyto zjištění byla zcela zásadní a otevřela celou řadu cest vedoucích vzniku nano, mikro, meso, makro a hierarchicky strukturovaných povrchů. Podrobně je tato problematika řešena v rámci diplomové práce Karolíny Kocourkové [229] a bakalářské práce Petronely Černé [230].

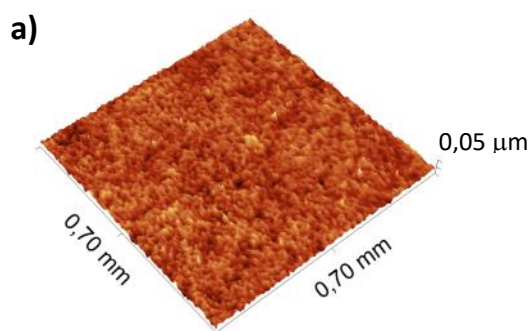
Na základě výše uvedených zjištění byl optimalizován postup přípravy BMF vrstev tak, aby došlo k eliminaci nekontrolovaného působení vzdušné vlhkosti na solidifikované BMF vrstvy. Sušení probíhalo v exikátoru profukovaném N_2 . Pomocí takového sušícího postupu lze připravovat vrstvy BMF ve stavu Silk I. Tento stav lze použít pro úpravu povrchů metodou „Breath figures“, což se doposud nepředpokládalo za možné. Středně transformované systémy ve stavu Silk I – Silk II lze upravovat do podoby nano, mikrostrukturovaných vrstev, které nejsou následně náchylné na změnu povrchových nerovností v důsledku působení vodného prostředí, Obr. 80b, 81a, b. Systémy ve stavu Silk II lze upravovat do podoby makroprohlubní uvedených na Obr. 80b, 81d. To znamená, že struktury uvedené výše na Obr. 75-79 byly připraveny ze stavu Silk II, což není ničím překvapující s ohledem na skutečnost, že v průběhu sušení byly vystaveny vzdušné vlhkosti v laboratoři.

Kombinací modifikačních postupů pro BMF ve stavu Silk I – Silk II s následnou modifikací takto upraveného povrchu ve stavu Silk II lze připravovat hierarchicky strukturované povrchy, Obr. 80c,d, obdobně jako v případě úpravy povrchů na bázi PS.

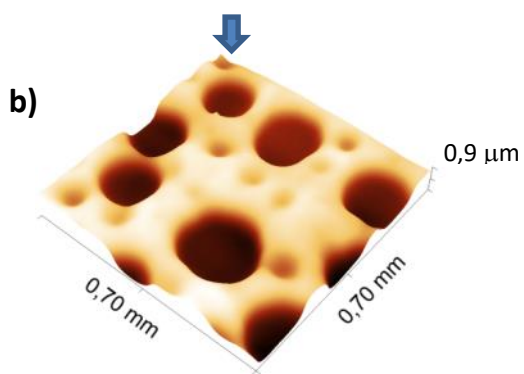
Silk I stav – solidifikace v atmosféře N₂
↓
Dlouhodobé působení par methanolu nebo vody



Silk II stav



Modifikace: 10x200 μl HFIP:DMSO:H₂O (7:0,2:4), dávkováno po 5s při 1500 ot/min



Makroporézní BMF povrch s hladkými rozhraními

Silk I stav – solidifikace v atmosféře N₂
↓
Krátkodobé působení par methanolu nebo vody

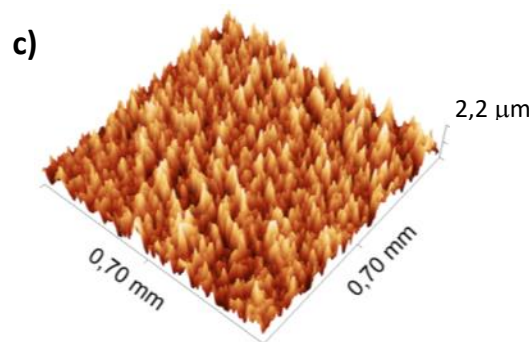


Silk I / Silk II přechodový stav

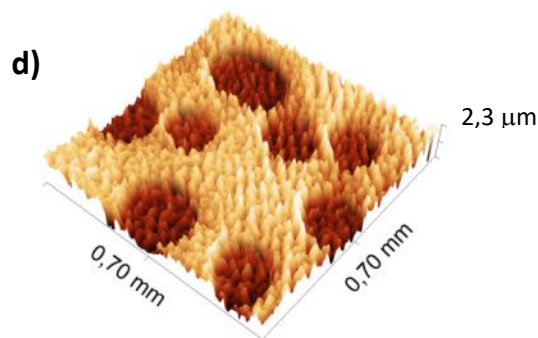
Modifikace: 40x100 μl HFIP:DMSO:H₂O (7:0,2:4), dávkováno po 5s při 1500 ot/min



Silk II stav



Modifikace: 10x200 μl HFIP:DMSO:H₂O (7:0,2:4), dávkováno po 5s při 2400 ot/min

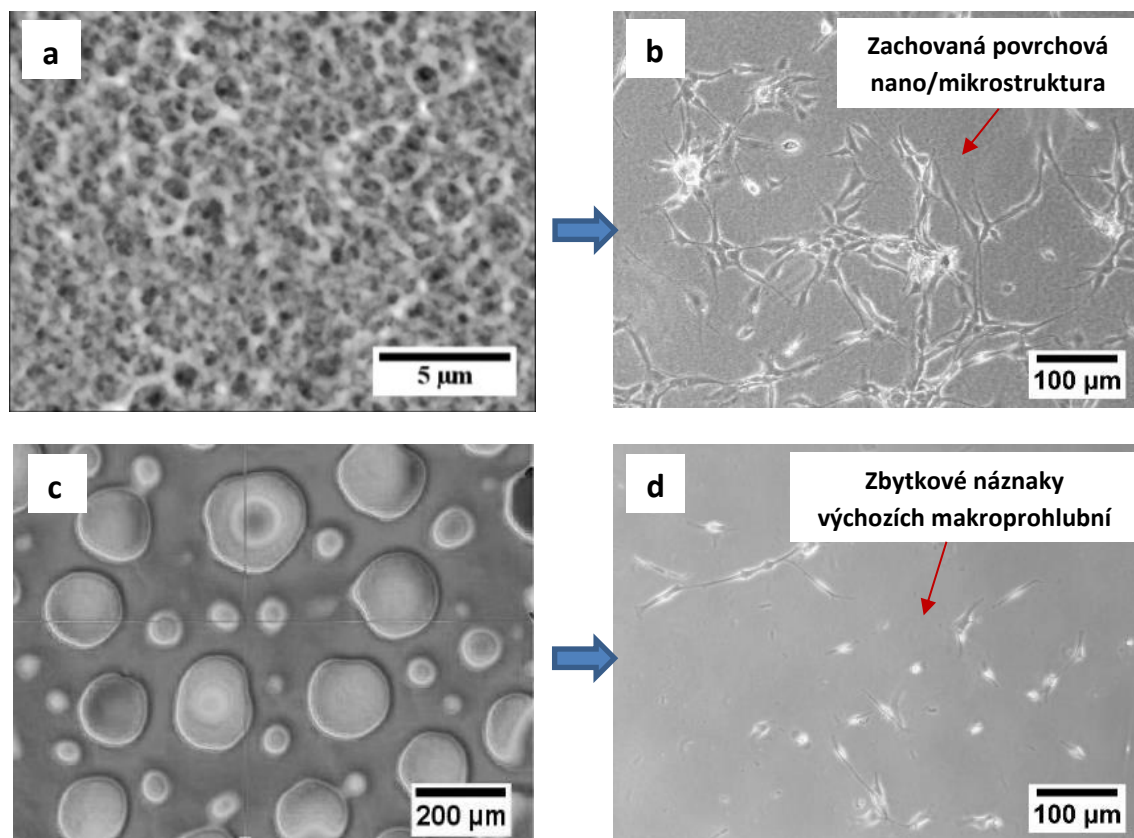


Hierarchicky strukturovaný BMF povrch

Obrázek 80 - Postup přípravy nano, mikro, makro a hierarchicky strukturovaných BMF povrchů pomocí časově sekvencovaného dávkování směsi HFIP s DMSO a H₂O. Obrázky z optického profilometru.

6.1.1 Vliv strukturovaných fibroinových povrchů na chování buněk

Stejně jako v případě strukturovaných povrchů na bázi PS byl u vybraných BMF povrchů studován jejich vliv na chování kultivovaných buněk, Obr. 81. Povrchová struktura uvedená na Obr. 81a odpovídá Obr. 80c. Struktura na Obr. 81c odpovídá Obr. 80b.



Obrázek 81 - Chování buněk na rozdílně strukturovaném povrchu BMF a), c). Buňky (osteoblasty, MC3T3-E1) na b) nano/mikrostrukturovaném, d) makrostrukturovaném povrchu BMF. Obrázky pořízeny pomocí AFM, optické profilometrie a mikroskopie.

Z hlediska bioresorbovatelnosti je BMF použitelný pro přímé aplikace v oblasti regenerativní medicíny [179, 219, 231, 232], zatímco PS se hodí spíše pro modelový popis vlivu rozdílně strukturovaných vrstev na chování buněk. Nevýhodnou konstruktů na bázi BMF je především nízká adheze buněk k jejich povrchu [233-237]. Jednou z cest, jak tento nedostatek odstranit je cílená strukturalizace BMF povrchů, jak vyplynulo z experimentálních výsledků uvedených na Obr. 81. Bylo zjištěno, že pro zvýšení adheze buněk na povrchu BMF je nezbytné připravit povrch vyznačující se nerovnostmi v rozmezí desetin až jednotek mikrometrů, viz Obr. 81a. Na takovémto povrchu můžeme pozorovat mnohem více zachycených buněk, Obr. 81b, v porovnání s povrchy

vyznačujícími se před depozicí buněk makroskopickými prohlubněmi, Obr. 81c, 81d. Skutečnost, že zde porovnávaný typ buněk (osteoblasty, MC3T3-E1) na tomto povrchu neodrží, může být do určité míry dána vytrácením těchto nerovností v průběhu kultivace buněk. To znamená, že připravené makroprohlubně se po čase na povrchu vytratí a studovaný povrch se jeví jako hladký. Zatímco v případě druhého typu povrchových nerovností, Obr. 81a, jsou tyto struktury stále po dobu celého kultivačního procesu. Z odborné literatury je známo, že makro a mikroprohlubně mohou sloužit pro zachytávání buněk [14, 238-240]. V okamžiku, kdy se nám takovéto struktury z povrchu po umístění do vodného prostředí vytráčí, není možné tento vliv brát v potaz. To znamená, že je třeba zvýšit kontaktní plochu mezi povrchem a buněčnými receptory [241], což se povedlo v případě povrchu uvedeného na Obr. 81a.

7. Přínos práce pro vědu a praxi

Z teoretického hlediska přináší práce nový pohled na formování makro, meso, mikro a nano pórů působením směsi dobrého a špatného rozpouštědla na polymerním povrchu.

Stejně tak z teoretického pohledu je přínosný nově navržený model popisující proces strukturování povrchu polystyrenu. V navrženém modelu je dána do souvislosti celá řada fyzikálních dějů podílejících se na vtlačování a růstu kapek špatného rozpouštědla v nabobtnalém polymerním povrchu.

Rozdělení nanášeného směsného roztoku na polymerní povrch do několika samostatných dávek spolu s rotací vzorku vnáší do systému nové proměnné, které lze využít pro přípravu širokého spektra nových struktur. Díky tomu není třeba měnit poměr složek v modifikační směsi, rychlost rotace vzorků, teplotu či rychlost proudění plynu nad modifikovaným povrchem.

Mimo to je zcela zásadní zjištění, že navržený postup lze aplikovat pro úpravu povrchů biopolymerních systémů vyznačujících se konformačně složitějším uspořádáním v porovnání se syntetickými polymery. To znamená, že navržený postup lze aplikovat na povrchy na bázi polysacharidů a proteinů. Z experimentů s těmito materiály vyplynuly velmi zajímavé poznatky spojené pochopením vlivu jejich sekundární struktury na možnosti jejich úpravy pomocí fázové separace.

Neméně zajímavá je možnost použití navrženého fázově separačního postupu pro přípravu objemově porézních struktur připomínajících polymerní pěny. Změnou časové prodlevy a počtu nanášených dávek směsi rozpouštědla s polymerní složkou lze připravovat samonosné vrstvy a porézní membrány s definovanou tloušťkou.

Praktický význam povrchových úprav materiálů není třeba diskutovat. Hlavní výhodou navrženého postupu fázové separace je jeho jednoduchost, robustnost a vysoká reprodukovatelnost. Modifikovaný materiálový povrch před úpravou není třeba speciálně připravovat. Všechny použité chemické komponenty jsou na povrch deponovány současně. Povrchový reliéf se formuje v řádu desítek sekund od počátku úpravy. Po zformování povrchu není materiál ničím kontaminován a to i v případě použití více typů modifikačních roztoků vedoucích ke vzniku hierarchicky strukturovaných vrstev.

Jak z teoretického, tak praktického pohledu jsou zajímavé poznatky o chování buněk na strukturovaných površích. Z provedených experimentů vyplynulo, že specificky strukturované povrchy lze použít po simulování nativního, trojrozměrného prostředí buněk. Mimo to bylo prokázáno, že hierarchicky strukturované povrchy mohou spouštět diferenciační proces v případě kmenových buněk. Tyto získané poznatky lze následně použít při návrhu materiálů určených pro tkáňové inženýrství.

8. Závěr

Tato práce se ve svém úvodu zabývala rozdílnými metodami a přístupy přípravy texturovaných materiálových povrchů a jejich aplikačním potenciálem. Pozornost byla věnována převážně úpravám povrchů syntetických a přírodních polymerů pomocí procesu fázové separace. Byl diskutován současný stav poznání v dané oblasti na vznik povrchových pórů v nabotnalé polymerní vrstvě.

V rámci popisu zvolených metod zpracování byla podrobně popsána konstrukce dvou nových typů zařízení pro formování povrchových pórů pomocí nově vyvinuté metody časově sekvenované fázové separace za rotace. Prvním popisovaným konstrukčním celkem bylo TSSC zařízení. Tento typ zařízení byl

navrhnout tak, aby umožňoval plně automaticky kontrolovat rychlost rotace vzorku, dávkování směsných roztoků a časové prodlevy mezi depozičními jednotlivých dávek. Pro tyto účely bylo navrženo softwarové rozhraní, které umožňuje vytvářet víceřadové modifikační programy a kontrolovat dávkování směsných roztoků. Druhým zařízením je zjednodušená, mobilní verze TSSC zařízení. Toto malé zařízení je určeno pro manuální nanášení směsných roztoků na rotující povrch rozdílnou rychlostí.

Pro úpravu polystyrenových povrchů byl vyvinut nový fázově separační postup založený na časově sekvenovaném dávkování směsi dobrého a špatného rozpouštědla. Z experimentálních výsledků spojených s úpravou tohoto typu polymeru vyplynulo, že s pomocí nově navrženého postupu lze připravovat širokou škálu povrchových zvrásnění. Tyto změny v povrchové struktuře lze vyvolat bez nutnosti zasahovat do složení modifikačních směsí, jejich teploty či rychlosti proudění plynu nad povrchem vzorku. Mimo to bylo ukázáno, že nově navržený postup je možné použít pro přípravu hierarchicky strukturovaných vrstev na bázi tkáňového PS. Vznik takových struktur lze vyvolat kombinací rozdílných směsných roztoků postupně nanášených na modifikovaný povrch. Dále bylo ukázáno, že s pomocí směsi dobrého a špatného rozpouštědla s přídavkem dispergované polymerní složky je možné připravovat objemově porézní systémy připomínající polymerní pěnu. Výška takových struktur se odvíjí od časové prodlevy a počtu deponovaných dávek na rotující podkladní povrch na bázi PS. Časově sekvenované dávkování roztoku PS v THF je dále možné použít pro přípravu mikroporézní samonosných folií, kde roli pórotvorné složky zastává na povrchu kondenzující voda, podobně jako v případě klasické metody „Breath figures“.

S ohledem na dosavadní stav poznání a získané experimentální poznatky spojené s úpravou povrchů PS byl navržen model popisující formování povrchových pórů při opakovaném dávkování směsných rozpouštědel. Tento model dává do souvislosti celou řadu literárně popsaných fyzikálních dějů podílejících se na formování porézní struktury.

Z experimentů spojených se studiem vlivu rozdílně povrchově strukturovaných PS vrstev na chování buněk vyplynulo, že povrchové mikropóry mohou lépe simulovat extracelulární prostředí. Buňky na strukturovaném povrchu nejsou deformovány jako na hladkém podkladu. Mimo to bylo zjištěno, že určité typy

hierarchicky strukturovaných povrchů na bázi PS mohou vyvolat diferenciační proces v případě kmenových buněk.

Získané poznatky spojené s časově odstupňovanou fázově separační úpravou povrchů PS byly dále aplikovány na strukturně složitější biopolymerní systémy. V rámci těchto experimentů byly upravovány povrchy na bázi hyaluronanu a hedvábného fibroinu.

V případě úpravy povrchů na bázi hyaluronanu je třeba použít více krokový modifikační proces. Z experimentů vyplynulo, že typ vznikající z povrchových struktur je závislý, jak na použité molekulové hmotnosti hyaluronanu, tak na zbytkovém množství vody v modifikované vrstvě. Dále bylo zjištěno, že povrch nelze povrchově strukturovat bez předešlého nabobtnání vodou. To znamená, že v prvním kroku je nezbytné povrch bobtnat a následně modifikovat pomocí časově sekvenovaného dávkování směsi rozpouštědel. Dále bylo zjištěno, že existuje pouze velmi úzký koncentrační a časový interval, který lze využít pro fázově separační úpravu tohoto typu materiálu.

Zásadním faktorem, který podmiňuje přípravu strukturovaných povrchů na bázi hedvábného fibroinu (*Bombyx mori* fibroin) je kontrola procesních podmínek přípravy tenkých vrstev před jejich úpravou. Zásadní úlohu hraje vzdušná vlhkost, která vede k transformaci polymerních řetězců z amorfního do semi-krytalického stavu. V závislosti na míře transformace proteinové vrstvy lze připravovat rozdílné povrchové struktury s nano, mikro, meso a makro prohlubněmi. Typ vznikajících povrchových prohlubní je podobně jako v případě polystyrenu a hyaluronanu závislý na složení modifikačního roztoku, objemu deponovaných dávek, časové prodlevě mezi jejich depozicí, rychlosti rotace, atd. Kombinací více modifikačních kroků spolu s kontrolou míry transformace proteinové struktury lze využít pro přípravu hierarchicky strukturovaných vrstev vyznačujících se rozdílnou stabilitou ve vodném prostředí.

Ze studia vlivu povrchové struktury fibroinových filmů na chování buněk bylo zjištěno, že určitý typy povrchových nerovností vede ke zlepšení adheze vybraných buněčných linií. Toto zjištění je zcela zásadní s ohledem na všeobecně známý problém spojený se špatnou adhezí buněk k povrchům na bázi hedvábného fibroinu.

Seznam použité literatury

- [1] Ingber DE. Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *Journal of Cell Science*. 2003;116:1157-73.
- [2] Jaggessar A, Shahali H, Mathew A, Yarlagadda PKDV. Bio-mimicking nano and micro-structured surface fabrication for antibacterial properties in medical implants. *Journal of Nanobiotechnology*. 2017;15:64.
- [3] Xu Y, Zhu X, Dan Y, Moon JH, Chen VW, Johnson AT, et al. Electrodeposition of Three-Dimensional Titania Photonic Crystals from Holographically Patterned Microporous Polymer Templates. *Chemistry of Materials*. 2008;20:1816-23.
- [4] Kyu T, Nwabunma D. Simulations of Microlens Arrays Formed by Pattern-Photopolymerization-Induced Phase Separation of Liquid Crystal/Monomer Mixtures. *Macromolecules*. 2001;34:9168-72.
- [5] Campoy-Quiles M, Ferenczi T, Agostinelli T, Etchegoin PG, Kim Y, Anthopoulos TD, et al. Morphology evolution via self-organization and lateral and vertical diffusion in polymer:fullerene solar cell blends. *Nature Materials*. 2008;7:158.
- [6] Luo J, Dornfeld D. Material Removal Mechanism in Chemical Mechanical Polishing: Theory and Modeling 2001.
- [7] Fardel R, Tsai Y-C, Arnold CB. Optical Trap Assisted Nanopatterning for Structured Surfaces. *Conference on Lasers and Electro-Optics 2010*. San Jose, California: Optical Society of America; 2010. p. CMR2.
- [8] Walheim S, Schäffer E, Mlynek J, Steiner U. Nanophase-Separated Polymer Films as High-Performance Antireflection Coatings. *Science*. 1999;283:520-2.
- [9] Schottner G. Hybrid Sol-Gel-Derived Polymers: Applications of Multifunctional Materials. *Chemistry of Materials*. 2001;13:3422-35.
- [10] Tserepi A, Gogolides E, Bourkoula A, Kanioura A, Kokkoris G, Petrou PS, et al. Plasma Nanotextured Polymeric Surfaces for Controlling Cell Attachment and Proliferation: A Short Review. *Plasma Chemistry and Plasma Processing*. 2016;36:107-20.
- [11] Aizenberg J, Black AJ, Whitesides GM. Control of crystal nucleation by patterned self-assembled monolayers. *Nature*. 1999;398:495.
- [12] Bhushan B, Jung YC, Koch K. Self-Cleaning Efficiency of Artificial Superhydrophobic Surfaces. *Langmuir*. 2009;25:3240-8.
- [13] Brown PS, Talbot EL, Wood TJ, Bain CD, Badyal JPS. Superhydrophobic Hierarchical Honeycomb Surfaces. *Langmuir*. 2012;28:13712-9.
- [14] E. DM, Yulong H, A. FR, Hongwei R. Microtextured polystyrene surfaces for three-dimensional cell culture made by a simple solvent treatment method. *Journal of Applied Polymer Science*. 2014;131.
- [15] Flemming RG, Murphy CJ, Abrams GA, Goodman SL, Nealey PF. Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. *Biomaterials*. 1999;20:573-88.
- [16] Tanev PT, Chibwe M, Pinnavaia TJ. Titanium-containing mesoporous molecular sieves for catalytic oxidation of aromatic compounds. *Nature*. 1994;368:321.

- [17] Li L, Chen C, Li J, Zhang A, Liu X, Xu B, et al. Robust and hydrophilic polymeric films with honeycomb pattern and their cell scaffold applications. *Journal of Materials Chemistry*. 2009;19:2789-96.
- [18] Li X-M, Reinhoudt D, Crego-Calama M. What do we need for a superhydrophobic surface? A review on the recent progress in the preparation of superhydrophobic surfaces. *Chemical Society Reviews*. 2007;36:1350-68.
- [19] Mori T, Takahashi T, Shiyama T, Tanaka A, Hira N, Tanaka N, et al. An easy preparation of 'monolithic type' hydrophilic solid phase: Capability for affinity resin to isolate target proteins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2006;14:5549-54.
- [20] Kaneko K. Determination of pore size and pore size distribution: 1. Adsorbents and catalysts. *Journal of Membrane Science*. 1994;96:59-89.
- [21] arghese OK, Gong D, Paulose M, Ong KG, Grimes CA, Dickey EC. Highly Ordered Nanoporous Alumina Films: Effect of Pore Size and Uniformity on Sensing Performance. *Journal of Materials Research*. 2011;17:1162-71.
- [22] Nakao S-i. Determination of pore size and pore size distribution: 3. Filtration membranes. *Journal of Membrane Science*. 1994;96:131-65.
- [23] McCutcheon JR, Elimelech M. Influence of membrane support layer hydrophobicity on water flux in osmotically driven membrane processes. *Journal of Membrane Science*. 2008;318:458-66.
- [24] Bacakova L, Filova E, Parizek M, Ruml T, Svorecik V. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology Advances*. 2011;29:739-67.
- [25] Yang Y, Yang J, Liang C, Wang H. Ultra-broadband enhanced absorption of metal surfaces structured by femtosecond laser pulses. *Opt Express*. 2008;16:11259-65.
- [26] Twigg MV, Richardson JT. Fundamentals and Applications of Structured Ceramic Foam Catalysts. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2007;46:4166-77.
- [27] Janne R, ten BG, Olli I. Supramolecular Polymeric Materials with Hierarchical Structure-Within-Structure Morphologies. *Advanced Materials*. 1999;11:777-80.
- [28] Zaidel-Bar R, Cohen M, Addadi L, Geiger B. Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes. *Biochemical Society Transactions*. 2004;32:416-20.
- [29] Bauer S, Schmuki P, von der Mark K, Park J. Engineering biocompatible implant surfaces: Part I: Materials and surfaces. *Progress in Materials Science*. 2013;58:261-326.
- [30] Ryan G, Pandit A, Apatsidis DP. Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications. *Biomaterials*. 2006;27:2651-70.
- [31] Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*. 2000;21:2335-46.
- [32] Villetti MA, Crespo JS, Soldi MS, Pires ATN, Borsali R, Soldi V. Thermal Degradation of Natural Polymers. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2002;67:295-303.
- [33] Ta VD, Dunn A, Wasley TJ, Li J, Kay RW, Stringer J, et al. Laser textured superhydrophobic surfaces and their applications for homogeneous spot deposition. *Applied Surface Science*. 2016;365:153-9.
- [34] Schulz U, Munzert P, Leitel R, Wendling I, Kaiser N, Tünnermann A. Antireflection of transparent polymers by advanced plasma etching procedures. *Opt Express*. 2007;15:13108-13.

- [35] Li WL, Tao NR, Lu K. Fabrication of a gradient nano-micro-structured surface layer on bulk copper by means of a surface mechanical grinding treatment. *Scripta Materialia*. 2008;59:546-9.
- [36] Cheng Z, Hou R, Du Y, Lai H, Fu K, Zhang N, et al. Designing Heterogeneous Chemical Composition on Hierarchical Structured Copper Substrates for the Fabrication of Superhydrophobic Surfaces with Controlled Adhesion. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2013;5:8753-60.
- [37] Li J, Leu MC, Panat R, Park J. A hybrid three-dimensionally structured electrode for lithium-ion batteries via 3D printing. *Materials & Design*. 2017;119:417-24.
- [38] Yang G, Li X, He Y, Ma J, Ni G, Zhou S. From nano to micro to macro: Electrospun hierarchically structured polymeric fibers for biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 2018;81:80-113.
- [39] K. GS, J. BE. Generation of microcellular polymeric foams using supercritical carbon dioxide. I: Effect of pressure and temperature on nucleation. *Polymer Engineering & Science*. 1994;34:1137-47.
- [40] O'Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, Gibson L. Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*. 2004;25:1077-86.
- [41] Wijmans JG, Kant J, Mulder MHV, Smolders CA. Phase separation phenomena in solutions of polysulfone in mixtures of a solvent and a nonsolvent: relationship with membrane formation. *Polymer*. 1985;26:1539-45.
- [42] Shojaie SS, Krantz WB, Greenberg AR. Dense polymer film and membrane formation via the dry-cast process part I. Model development. *Journal of Membrane Science*. 1994;94:255-80.
- [43] Shojaie SS, Krantz WB, Greenberg AR. Dense polymer film and membrane formation via the dry-cast process part II. Model validation and morphological studies. *Journal of Membrane Science*. 1994;94:281-98.
- [44] Altinkaya SA, Ozbas B. Modeling of asymmetric membrane formation by dry-casting method. *Journal of Membrane Science*. 2004;230:71-89.
- [45] Matsuyama H, Nishiguchi M, Kitamura Y. Phase separation mechanism during membrane formation by dry-cast process. *Journal of Applied Polymer Science*. 2000;77:776-83.
- [46] Onuki A. Late stage spinodal decomposition in polymer mixtures. *The Journal of Chemical Physics*. 1986;85:1122-5.
- [47] DeRosa M, Hong Y, Faris R, Rao H. Microtextured Polystyrene Surfaces for Three-Dimensional Cell Culture Made by a Simple Solvent Treatment Method. *Journal of Applied Polymer Science*. 2014;131.
- [48] Li W, Ryan AJ, Meier IK. Morphology Development via Reaction-Induced Phase Separation in Flexible Polyurethane Foam. *Macromolecules*. 2002;35:5034-42.
- [49] Matsuzaka K, Jinnai H, Koga T, Hashimoto T. Effect of Oscillatory Shear Deformation on Demixing Processes of Polymer Blends. *Macromolecules*. 1997;30:1146-52.
- [50] Huang C, Kamra T, Chaudhary S, Shen X. Breath Figure Patterns Made Easy. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2014;6:5971-6.
- [51] Farnaz F, Behzad P, Mehdi S. Direct breath figure formation on PMMA and superhydrophobic surface using in situ perfluoro-modified silica nanoparticles. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. 2013;51:441-51.

- [52] Munoz-Bonilla A, Fernandez-Garcia M, Rodriguez-Hernandez J. Towards hierarchically ordered functional porous polymeric surfaces prepared by the breath figures approach. *Progress in Polymer Science*. 2014;39:510-54.
- [53] Xue LJ, Zhang JL, Han YC. Phase separation induced ordered patterns in thin polymer blend films. *Progress in Polymer Science*. 2012;37:564-94.
- [54] Bunz U. Breath figures as a dynamic templating method for polymers and nanomaterials. *Advanced Materials*. 2006;18:973-89.
- [55] Aitkek J. Breath Figures. *Nature*. 1911;86:516.
- [56] Rayleigh. Breath Figures. *Nature*. 1912;90:436.
- [57] Knobler CM, Beysens D. Growth of Breath Figures on Fluid Surfaces. *EPL (Europhysics Letters)*. 1988;6:707.
- [58] Drahoš V, Delong A. A Simple Method for obtaining Perforated Supporting Membranes for Electron Microscopy. *Nature*. 1960;186:104.
- [59] Wang Y, Liu Z, Huang Y, Han B, Yang G. Micropatterned Polymer Surfaces Induced by Nonsolvent. *Langmuir*. 2006;22:1928-31.
- [60] H. SM, C. BK, P. DT. Formation of honeycomb-structured, porous films via breath figures with different polymer architectures. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 2006;44:2363-75.
- [61] Chun K-Y, Jang S-H, Kim H-S, Kim Y-W, Han H-S, Joe Y-i. Effects of solvent on the pore formation in asymmetric 6FDA-4,4'ODA polyimide membrane: terms of thermodynamics, precipitation kinetics, and physical factors. *Journal of Membrane Science*. 2000;169:197-214.
- [62] Hamzah S, Nora'aini A, M.A M. The Influence of Polymer Concentration on Performance and Morphology of Asymmetric Ultrafiltration Membrane for Lysozyme Separation 2010.
- [63] Alsari A, Kruczek B, Matsuura T. Effect of Pressure and Membrane Thickness on the Permeability of Gases in Dense Polyphenylene Oxide (PPO) Membranes: Thermodynamic Interpretation. *Separation Science and Technology*. 2007;42:2143-55.
- [64] H. C, P. M, A. D, C. D. Influence of the relative humidity on film formation by vapor induced phase separation. *Polymer Engineering & Science*. 2003;43:798-808.
- [65] Misdan N, Lau WJ, Ismail AF, Matsuura T. Formation of thin film composite nanofiltration membrane: Effect of polysulfone substrate characteristics. *Desalination*. 2013;329:9-18.
- [66] Cheng L-P. Effect of Temperature on the Formation of Microporous PVDF Membranes by Precipitation from 1-Octanol/DMF/PVDF and Water/DMF/PVDF Systems. *Macromolecules*. 1999;32:6668-74.
- [67] Fukuhira Y, Yabu H, Ijio K, Shimomura M. Interfacial tension governs the formation of self-organized honeycomb-patterned polymer films. *Soft Matter*. 2009;5:2037-41.
- [68] F. BUH. Breath Figures as a Dynamic Templating Method for Polymers and Nanomaterials. *Advanced Materials*. 2006;18:973-89.
- [69] Ramon PC, Elmar B, Karlheinz G. Microstructuring of Polystyrene Surfaces with Nonsolvent Sessile Droplets. *ChemPhysChem*. 2008;9:1738-46.
- [70] Tanaka H. Viscoelastic phase separation. *Journal of Physics-Condensed Matter*. 2000;12:R207-R64.

- [71] Pericet-Camara R, Bonaccorso E, Graf K. Microstructuring of polystyrene surfaces with nonsolvent sessile droplets. *Chemphyschem*. 2008;9:1738-46.
- [72] Bassou N, Rharbi Y. Role of Benard-Marangoni Instabilities during Solvent Evaporation in Polymer Surface Corrugations. *Langmuir*. 2009;25:624-32.
- [73] de Gennes P. Instabilities during the evaporation of a film: Non-glassy polymer plus volatile solvent. *European Physical Journal E*. 2001;6:421-4.
- [74] Sakurai S, Furukawa C, Okutsu A, Miyoshi A, Nomura S. Control of mesh pattern of surface corrugation via rate of solvent evaporation in solution casting of polymer film in the presence of convection. *Polymer*. 2002;43:3359-64.
- [75] de Gennes P. Solvent evaporation of spin cast films: "crust" effects. *European Physical Journal E*. 2002;7:31-4.
- [76] Minarik A, Perutka M, Urban P, Lapcik L, Juricka M. A special instrument for exact control of self-organized structures preparation in polymer layers. *International Journal of Heat and Mass Transfer*. 2010;53:5472-7.
- [77] Minarik A, Smolka P, Lapcik L. Preliminary investigation of factors determining self-organised structures preparation in polymer layers. *International Journal of Heat and Mass Transfer*. 2011;54:4135-42.
- [78] Minarik A, Rafajova M, Rajnohova E, Smolka P, Mracek A. Self-organised patterns in polymeric films solidified from diluted solutions - The effect of the substrate surface properties. *International Journal of Heat and Mass Transfer*. 2014;78:615-23.
- [79] Hajime T. Formation of Network and Cellular Structures by Viscoelastic Phase Separation. *Advanced Materials*. 2009;21:1872-80.
- [80] Teruaki H, Shin H. From Angstroms to Micrometers: Self-Organized Hierarchical Structure within a Polymer Film. *Angewandte Chemie*. 2003;115:2387-91.
- [81] Escalé P, Save M, Lapp A, Rubatat L, Billon L. Hierarchical structures based on self-assembled diblock copolymers within honeycomb micro-structured porous films. *Soft Matter*. 2010;6:3202-10.
- [82] Muñoz-Bonilla A, Ibarboure E, Papon E, Rodriguez-Hernandez J. Self-Organized Hierarchical Structures in Polymer Surfaces: Self-Assembled Nanostructures within Breath Figures. *Langmuir*. 2009;25:6493-9.
- [83] de León AS, del Campo A, Fernández-García M, Rodríguez-Hernández J, Muñoz-Bonilla A. Hierarchically Structured Multifunctional Porous Interfaces through Water Templated Self-Assembly of Ternary Systems. *Langmuir*. 2012;28:9778-87.
- [84] Cui L, Peng J, Ding Y, Li X, Han Y. Ordered porous polymer films via phase separation in humidity environment. *Polymer*. 2005;46:5334-40.
- [85] Hecht U, Schilz CM, Stratmann M. Influence of Relative Humidity during Film Formation Processes on the Structure of Ultrathin Polymeric Films. *Langmuir*. 1998;14:6743-8.
- [86] A. CL, G. QG. Preparation of Porous Poly(dimethylsiloxane)-Based Honeycomb Materials with Hierarchal Surface Features and Their Use as Soft-Lithography Templates. *Advanced Materials*. 2006;18:3024-8.
- [87] Sun H, Li H, Wu L. Micro-patterned polystyrene surfaces directed by surfactant-encapsulated polyoxometalate complex via breath figures. *Polymer*. 2009;50:2113-22.

- [88] Lin C-L, Tung P-H, Chang F-C. Synthesis of rod-coil diblock copolymers by ATRP and their honeycomb morphologies formed by the ‘breath figures’ method. *Polymer*. 2005;46:9304-13.
- [89] Madej W, Budkowski A, Raczowska J, Rysz J. Breath Figures in Polymer and Polymer Blend Films Spin-Coated in Dry and Humid Ambience. *Langmuir*. 2008;24:3517-24.
- [90] Huang JS, Goldburg WI, Bjerkaas AW. Study of Phase Separation in a Critical Binary Liquid Mixture: Spinodal Decomposition. *Physical Review Letters*. 1974;32:921-3.
- [91] Gelb LD, Gubbins KE. Studies of binary liquid mixtures in cylindrical pores: phase separation, wetting and finite-size effects from Monte Carlo simulations. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*. 1997;244:112-23.
- [92] Guo Z, Liu W, Su B-L. Superhydrophobic surfaces: From natural to biomimetic to functional. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2011;353:335-55.
- [93] Strathmann H, Kock K. The formation mechanism of phase inversion membranes. *Desalination*. 1977;21:241-55.
- [94] Fried JR. *Basic Principles of Membrane Technology* By Marcel Mulder (University of Twente, The Netherlands). Kluwer Academic: Dordrecht. 1996. 564 pp. \$255.00. ISBN 0-7823-4247-X. *Journal of the American Chemical Society*. 1997;119:8582-.
- [95] Smolders CA, Reuvers AJ, Boom RM, Wienk IM. Microstructures in phase-inversion membranes. Part 1. Formation of macrovoids. *Journal of Membrane Science*. 1992;73:259-75.
- [96] Strathmann H, Kock K, Amar P, Baker RW. The formation mechanism of asymmetric membranes. *Desalination*. 1975;16:179-203.
- [97] Claude C, B. TG, Stephen P. Diffusion-controlled formation of porous structures in ternary polymer systems. *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition*. 1979;17:477-89.
- [98] Reuvers AJ, van den Berg JWA, Smolders CA. Formation of membranes by means of immersion precipitation: Part I. A model to describe mass transfer during immersion precipitation. *Journal of Membrane Science*. 1987;34:45-65.
- [99] Radovanovic P, Thiel SW, Hwang S-T. Formation of asymmetric polysulfone membranes by immersion precipitation. Part I. Modelling mass transport during gelation. *Journal of Membrane Science*. 1992;65:213-29.
- [100] S. TC, J. MA. Mass transfer modeling of asymmetric membrane formation by phase inversion. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. 1990;28:1327-65.
- [101] Guillen GR, Pan Y, Li M, Hoek EMV. Preparation and Characterization of Membranes Formed by Nonsolvent Induced Phase Separation: A Review. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2011;50:3798-817.
- [102] Matz R. The structure of cellulose acetate membranes 1. The development of porous structures in anisotropic membranes. *Desalination*. 1972;10:1-15.
- [103] Frommer MA, Lancet D. The Mechanism of Membrane Formation: Membrane Structures and Their Relation to Preparation Conditions. In: Lonsdale HK, Podall HE, editors. *Reverse Osmosis Membrane Research: Based on the symposium on “Polymers for Desalination” held at the 162nd National Meeting of the American Chemical Society in Washington, DC, September 1971*. Boston, MA: Springer US; 1972. p. 85-110.

- [104] Boom RM, Wienk IM, van den Boomgaard T, Smolders CA. Microstructures in phase inversion membranes. Part 2. The role of a polymeric additive. *Journal of Membrane Science*. 1992;73:277-92.
- [105] Kimmerle K, Strathmann H. Analysis of the structure-determining process of phase inversion membranes. *Desalination*. 1990;79:283-302.
- [106] L. Y, J. MA. Analysis of nonsolvent–solvent–polymer phase diagrams and their relevance to membrane formation modeling. *Journal of Applied Polymer Science*. 1986;31:997-1018.
- [107] Liao-Ping C, An-Hwa D, C. GC. Membrane formation by isothermal precipitation in polyamide-formic acid-water systems II. Precipitation dynamics. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. 1995;33:223-35.
- [108] Yves T. Fundamentals of polymer coagulation. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. 1995;33:279-88.
- [109] Jao-Ming C, Da-Ming W, Fung-Ching L, Juin-Yih L. Formation and gas flux of asymmetric PMMA membranes. *Journal of Membrane Science*. 1996;109:93-107.
- [110] Paulsen FG, Shojaie SS, Krantz WB. Effect of evaporation step on macrovoid formation in wet-cast polymeric membranes. *Journal of Membrane Science*. 1994;91:265-82.
- [111] Young T-H, Cheng L-P, Lin D-J, Fane L, Chuang W-Y. Mechanisms of PVDF membrane formation by immersion-precipitation in soft (1-octanol) and harsh (water) nonsolvents. *Polymer*. 1999;40:5315-23.
- [112] Li C-L, Wang D-M, Deratani A, Quémener D, Bouyer D, Lai J-Y. Insight into the preparation of poly(vinylidene fluoride) membranes by vapor-induced phase separation. *Journal of Membrane Science*. 2010;361:154-66.
- [113] Flory PJ. Thermodynamics of High Polymer Solutions. *The Journal of Chemical Physics*. 1942;10:51-61.
- [114] Huggins ML. Solutions of Long Chain Compounds. *The Journal of Chemical Physics*. 1941;9:440-.
- [115] Huggins ML. Theory of Solutions of High Polymers I. *Journal of the American Chemical Society*. 1942;64:1712-9.
- [116] Fried JR. *Polymer Science and Technology: Prentice Hall Professional Technical Reference*; 2003.
- [117] A. SP. Some factors affecting the solubility of polymers. *Journal of Applied Chemistry*. 1953;3:71-80.
- [118] Huggins ML. The Solubility of Nonelectrolytes. By Joel H. Hildebrand and Robert S. Scott. *The Journal of Physical Chemistry*. 1951;55:619-20.
- [119] Scatchard G. Equilibria in Non-electrolyte Solutions in Relation to the Vapor Pressures and Densities of the Components. *Chemical Reviews*. 1931;8:321-33.
- [120] Hansen CM. The three dimensional solubility parameter and solvent diffusion coefficient : Their importance in surface coating formulation. Cph. [tr. Århus]: Danish Technical Press; 1967.
- [121] Wiśniewski R, Śmieszek E, Kamińska E. Three-dimensional solubility parameters: simple and effective determination of compatibility regions. *Progress in Organic Coatings*. 1995;26:265-74.

- [122] Blanks RF, Prausnitz JM. Thermodynamics of Polymer Solubility in Polar and Nonpolar Systems. *Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals*. 1964;3:1-8.
- [123] H. SRM, P. DT, G. FA, Vicki C. Porous Polymer Films and Honeycomb Structures Made by the Self-Organization of Well-Defined Macromolecular Structures Created by Living Radical Polymerization Techniques. *Angewandte Chemie*. 2001;113:3536-40.
- [124] Mohanty K, Purkait MK. *Membrane Technologies and Applications*: CRC Press; 2011.
- [125] Mosqueda-Jimenez DB, Narbaitz RM, Matsuura T, Chowdhury G, Pleizier G, Santerre JP. Influence of processing conditions on the properties of ultrafiltration membranes. *Journal of Membrane Science*. 2004;231:209-24.
- [126] Han M-J, Bhattacharyya D. Morphology and transport study of phase inversion polysulfone membranes 1994.
- [127] Yong SK, Hyo JK, Un YK. Asymmetric membrane formation via immersion precipitation method. I. Kinetic effect. *Journal of Membrane Science*. 1991;60:219-32.
- [128] Chen L-W, Young T-H. Effect of nonsolvents on the mechanism of wet-casting membrane formation from EVAL copolymers. *Journal of Membrane Science*. 1991;59:15-26.
- [129] Nechifor G, Popescu G. Asymmetric membranes prepared by immersion-precipitation technique 1990.
- [130] Chun KY, Jang SH, Kim HS, Kim YW, Han HS, Joe YI. Effects of solvent on the pore formation in asymmetric 6FDA-4,4'-ODA polyimide membrane: terms of thermodynamics, precipitation kinetics, and physical factors. *Journal of Membrane Science*. 2000;169:197-214.
- [131] Tsai HA, Li LD, Lee KR, Wang YC, Li CL, Huang J, et al. Effect of surfactant addition on the morphology and pervaporation performance of asymmetric polysulfone membranes. *Journal of Membrane Science*. 2000;176:97-103.
- [132] Kim J-H, Lee K-H. Effect of PEG additive on membrane formation by phase inversion. *Journal of Membrane Science*. 1998;138:153-63.
- [133] Ehsan S, Mohammad A, Toraj M. Effect of poly(vinyl pyrrolidone) concentration and coagulation bath temperature on the morphology, permeability, and thermal stability of asymmetric cellulose acetate membranes. *Journal of Applied Polymer Science*. 2009;111:2537-44.
- [134] Xuyun W, Lin Z, Dahai S, Quanfu A, Huanlin C. Effect of coagulation bath temperature on formation mechanism of poly(vinylidene fluoride) membrane. *Journal of Applied Polymer Science*. 2008;110:1656-63.
- [135] Yang YN, Zhang HX, Wang P, Zhang MY, Yang HD, Hu MZ, et al. Kinetic and thermodynamic research of Polysulfone/TiO₂ hybrid ultrafiltration membrane 2007.
- [136] Zheng Q-Z, Wang P, Yang Y-N. Rheological and thermodynamic variation in polysulfone solution by PEG introduction and its effect on kinetics of membrane formation via phase-inversion process. *Journal of Membrane Science*. 2006;279:230-7.
- [137] Zheng Q-Z, Wang P, Yang Y-N, Cui D-J. The relationship between porosity and kinetics parameter of membrane formation in PSF ultrafiltration membrane. *Journal of Membrane Science*. 2006;286:7-11.
- [138] Srinivasarao M, Collings D, Philips A, Patel S. Three-dimensionally ordered array of air bubbles in a polymer film. *Science*. 2001;292:79-83.

- [139] Widawski G, Rawiso M, Francois B. Self-Organized Honeycomb Morphology of Star-Polymer Polystyrene Films. *Nature*. 1994;369:387-9.
- [140] Ming W, Wu D, van Benthem R, de With G. Superhydrophobic films from raspberry-like particles. *Nano Lett*. 2005;5:2298-301.
- [141] Sel O, Kuang DB, Thommes M, Smarsly B. Principles of hierarchical meso- and macropore architectures by liquid crystalline and polymer colloid templating. *Langmuir*. 2006;22:2311-22.
- [142] Rayleigh. Breath Figures. *Nature*. 1911;86:416.
- [143] Bunz UHF. Breath Figures as a Dynamic Templating Method for Polymers and Nanomaterials. *Advanced Materials*. 2006;18:973-89.
- [144] Hernandez-Guerrero M, Stenzel MH. Honeycomb structured polymer films via breath figures. *Polymer Chemistry*. 2012;3:563-77.
- [145] Escalé P, Rubatat L, Billon L, Save M. Recent advances in honeycomb-structured porous polymer films prepared via breath figures. *European Polymer Journal*. 2012;48:1001-25.
- [146] Jenekhe SA, Chen XL. Self-Assembly of Ordered Microporous Materials from Rod-Coil Block Copolymers. *Science*. 1999;283:372-5.
- [147] Sun H. Ordered Honeycomb-Patterned Films via Breath Figures 2010.
- [148] Beysens D. Dew nucleation and growth. *Comptes Rendus Physique*. 2006;7:1082-100.
- [149] Kuo C-T, Lin Y-S, Liu T-K, Liu H-C, Hung W-C, Jiang IM, et al. Dynamics of single-layer polymer breath figures. *Opt Express*. 2010;18:18464-70.
- [150] Rodríguez-Hernández J. Chapter 4 - Nano-microporous structured surfaces prepared by the breath figures approach and their biorelated applications A2 - Grumezescu, Alexandru Mihai. *Surface Chemistry of Nanobiomaterials: William Andrew Publishing; 2016*. p. 107-33.
- [151] Beysens D, Steyer A, Guenoun P, Fritter D, Knobler CM. How does dew form? *Phase Transitions*. 1991;31:219-46.
- [152] Family F, Meakin P. Scaling of the Droplet-Size Distribution in Vapor-Deposited Thin Films. *Physical Review Letters*. 1988;61:428-31.
- [153] Fritter D, Knobler CM, Roux D, Beysens D. Computer simulations of the growth of breath figures. *Journal of Statistical Physics*. 1988;52:1447-59.
- [154] Fritter D, Knobler CM, Beysens DA. Experiments and simulation of the growth of droplets on a surface (breath figures). *Physical Review A*. 1991;43:2858-69.
- [155] Briscoe BJ, Galvin KP. Breath figures. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 1990;23:1265.
- [156] Muñoz-Bonilla A, Fernández-García M, Rodríguez-Hernández J. Towards hierarchically ordered functional porous polymeric surfaces prepared by the breath figures approach. *Progress in Polymer Science*. 2014;39:510-54.
- [157] Rogers TM, Elder KR, Desai RC. Droplet growth and coarsening during heterogeneous vapor condensation. *Physical Review A*. 1988;38:5303-9.
- [158] Steyer A, Guenoun P, Beysens D, Knobler CM. Two-dimensional ordering during droplet growth on a liquid surface. *Physical Review B*. 1990;42:1086-9.
- [159] Wong KH, Hernández-Guerrero M, Granville AM, Davis TP, Barner-Kowollik C, Stenzel MH. Water-assisted formation of honeycomb structured porous films. *Journal of Porous Materials*. 2006;13:213-23.

- [160] Govor LV, Bashmakov IA, Kiebooms R, Dyakonov V, Parisi J. Self-Organized Networks Based on Conjugated Polymers. *Advanced Materials*. 2001;13:588-91.
- [161] D. Angus S, Davis T. Polymer Surface Design and Infomatics: Facile Microscopy/Image Analysis Techniques for Self-Organizing Microporous Polymer Film Characterization 2002.
- [162] Yabu H, Tanaka M, Ijio K, Shimomura M. Preparation of Honeycomb-Patterned Polyimide Films by Self-Organization. *Langmuir*. 2003;19:6297-300.
- [163] Nishikawa T, Nonomura M, Arai K, Hayashi J, Sawadaishi T, Nishiura Y, et al. Micropatterns Based on Deformation of a Viscoelastic Honeycomb Mesh. *Langmuir*. 2003;19:6193-201.
- [164] Böker A, Lin Y, Chiapperini K, Horowitz R, Thompson M, Carreon V, et al. Hierarchical nanoparticle assemblies formed by decorating breath figures. *Nature Materials*. 2004;3:302.
- [165] Madej W, Budkowski A, Raczkowska J, Rysz J. Breath Figures in Polymer and Polymer Blend Films Spin-Coated in Dry and Humid Ambience 2008.
- [166] Park MS, Joo W, Kim J. Porous Structures of Polymer Films Prepared by Spin Coating with Mixed Solvents under Humid Condition 2006.
- [167] Pilati F, Montecchi M, Fabbri P, Synytska A, Messori M, Toselli M, et al. Design of surface properties of PET films: Effect of fluorinated block copolymers. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2007;315:210-22.
- [168] Roszol L, Lawson T, Koncz V, Noszticzus Z, Wittmann M, Sarkadi T, et al. Micropatterned Polyvinyl Butyral Membrane for Acid-Base Diodes 2010.
- [169] Hiwatari K-i, Serizawa T, Seto F, Kishida A, Muraoka Y, Akashi M. Graft Copolymers Having Hydrophobic Backbone and Hydrophilic Branches XXXIV. Fabrication and Control of Honeycomb Structure Prepared from Amphiphilic Graft Copolymers. *Polymer Journal*. 2001;33:669.
- [170] Kasai W, Kondo T. Fabrication of Honeycomb-Patterned Cellulose Films. *Macromolecular Bioscience*. 2004;4:17-21.
- [171] Nishikawa T, Nishida J, Ookura R, Nishimura S-I, Wada S, Karino T, et al. Honeycomb-patterned thin films of amphiphilic polymers as cell culture substrates. *Materials Science and Engineering: C*. 1999;8-9:495-500.
- [172] Thielicke W. Microscopic image of a lotus leaf with some drops of water.
- [173] X. G, X. Y, X. Y, L. X, K. Z, J. Z, et al. The Dry-Style Antifogging Properties of Mosquito Compound Eyes and Artificial Analogues Prepared by Soft Lithography. *Advanced Materials*. 2007;19:2213-7.
- [174] B. dB, U. S, H. N, G. H. Microporous Honeycomb-Structured Films of Semiconducting Block Copolymers and Their Use as Patterned Templates. *Advanced Materials*. 2000;12:1581-3.
- [175] Wong KH, Davis TP, Barner-Kowollik C, Stenzel MH. Honeycomb structured porous films from amphiphilic block copolymers prepared via RAFT polymerization. *Polymer*. 2007;48:4950-65.
- [176] Scott JE, Cummings C, Brass A, Chen Y. Secondary And Tertiary Structures Of Hyaluronan In Aqueous-Solution, Investigated By Rotary Shadowing Electron-

- Microscopy And Computer-Simulation - Hyaluronan Is A Very Efficient Network-Forming Polymer. *Biochem J.* 1991;274:699-705.
- [177] Scott JE, Heatley F. Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: A ¹³C NMR study. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:4850-5.
- [178] Rockwood DN, Preda RC, Yucel T, Wang XQ, Lovett ML, Kaplan DL. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin. *Nat Protoc.* 2011;6:1612-31.
- [179] Koh LD, Cheng Y, Teng CP, Khin YW, Loh XJ, Tee SY, et al. Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials. *Progress in Polymer Science.* 2015;46:86-110.
- [180] Zhou CZ, Confalonieri F, Medina N, Zivanovic Y, Esnault C, Yang T, et al. Fine organization of *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:2413-9.
- [181] Cheng GT, Wang X, Tao SJ, Xia J, Xu S. Differences in regenerated silk fibroin prepared with different solvent systems: From structures to conformational changes. *Journal of Applied Polymer Science.* 2015;132:8.
- [182] Zhang A, Bai H, Li L. Breath Figure: A Nature-Inspired Preparation Method for Ordered Porous Films. *Chemical Reviews.* 2015;115:9801-68.
- [183] Strawhecker K, Kumar S, Douglas J, Karim A. The critical role of solvent evaporation on the roughness of spin-cast polymer films. *Macromolecules.* 2001;34:4669-72.
- [184] Wrzecionko E, Minařík A, Smolka P, Minařík M, Humpolíček P, Rejmontová P, et al. Variations of Polymer Porous Surface Structures via the Time-Sequenced Dosing of Mixed Solvents. *ACS Applied Materials & Interfaces.* 2017;9:6472-81.
- [185] Manabe K, Nishizawa S, Shiratori S. Porous Surface Structure Fabricated by Breath Figures that Suppresses *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation. *ACS Applied Materials & Interfaces.* 2013;5:11900-5.
- [186] Bolognesi A, Mercogliano C, Yunus S, Civardi M, Comoretto D, Turturro A. Self-organization of polystyrenes into ordered microstructured films and their replication by soft lithography. *Langmuir.* 2005;21:3480-5.
- [187] Samuel A, Umapathy S, Ramakrishnan S. Functionalized and Postfunctionalizable Porous Polymeric Films through Evaporation-Induced Phase Separation Using Mixed Solvents. *ACS Applied Materials & Interfaces.* 2011;3:3293-9.
- [188] Bui V, Ko S, Choi H. Large-Scale Fabrication of Commercially Available, Nonpolar Linear Polymer Film with a Highly Ordered Honeycomb Pattern. *ACS Applied Materials & Interfaces.* 2015;7:10541-7.
- [189] Tanaka H. Formation of Network and Cellular Structures by Viscoelastic Phase Separation. *Advanced Materials.* 2009;21:1872-80.
- [190] Bormashenko E. *Wetting of Real Surfaces: De Gruyter;* 2019.
- [191] Bormashenko E. Progress in understanding wetting transitions on rough surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science.* 2015;222:92-103.
- [192] Metnar A. Příprava a charakterizace porézních povrchů na bázi polystyrenu [Bakalářská práce]: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně; 2017.
- [193] Bormashenko E, Balter S, Pogreb R, Bormashenko Y, Gendelman O, Aurbach D. On the mechanism of patterning in rapidly evaporated polymer solutions: Is temperature-

- gradient-driven Marangoni instability responsible for the large-scale patterning? *Journal of Colloid and Interface Science*. 2010;343:602-7.
- [194] Sukitpaneemit P, Chung T-S. Molecular elucidation of morphology and mechanical properties of PVDF hollow fiber membranes from aspects of phase inversion, crystallization and rheology. *Journal of Membrane Science*. 2009;340:192-205.
- [195] Minarik M, Wrzecionko E, Minarik A, Grulich O, Smolka P, Musilova L, et al. Preparation of Hierarchically Structured Polystyrene Surfaces with Superhydrophobic Properties by Plasma-Assisted Fluorination. *Coatings*. 2019;9:11.
- [196] Bhushan B, Jung YC. Natural and biomimetic artificial surfaces for superhydrophobicity, self-cleaning, low adhesion, and drag reduction. *Progress in Materials Science*. 2011;56:1-108.
- [197] Matsuzaka K, Walboomers X, Yoshinari M, Inoue T, Jansen J. The attachment and growth behavior of osteoblast-like cells on microtextured surfaces. *Biomaterials*. 2003;24:2711-9.
- [198] Martinez E, Engel E, Planell J, Samitier J. Effects of artificial micro- and nano-structured surfaces on cell behaviour. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*. 2009;191:126-35.
- [199] Lucchetta G, Sorgato M, Zanchetta E, Brusatin G, Guidi E, Di Liddo R, et al. Effect of injection molded micro-structured polystyrene surfaces on proliferation of MC3T3-E1 cells. *Express Polymer Letters*. 2015;9:354-61.
- [200] Martinez-Campos E, Elzein T, Bejjani A, Garcia-Granda M, Santos-Coquillat A, Ramos V, et al. Toward Cell Selective Surfaces: Cell Adhesion and Proliferation on Breath Figures with Antifouling Surface Chemistry. *Acs Applied Materials & Interfaces*. 2016;8:6344-53.
- [201] de Leon A, Rodriguez-Hernandez J, Cortajarena A. Honeycomb patterned surfaces functionalized with polypeptide sequences for recognition and selective bacterial adhesion. *Biomaterials*. 2013;34:1453-60.
- [202] Collins M, Birkinshaw C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering-A review. *Carbohydrate Polymers*. 2013;92:1262-79.
- [203] Jhala D, Vasita R. A Review on Extracellular Matrix Mimicking Strategies for an Artificial Stem Cell Niche. *Polym Rev*. 2015;55:561-95.
- [204] Kawano T, Sato M, Yabu H, Shimomura M. Honeycomb-shaped surface topography induces differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSCs): uniform porous polymer scaffolds prepared by the breath figure technique. *Biomater Sci*. 2014;2:52-6.
- [205] Dalby MJ, Gadegaard N, Tare R, Andar A, Riehle MO, Herzyk P, et al. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nature Materials*. 2007;6:997-1003.
- [206] Foglarova M, Chmelar J, Huerta-Angeles G, Vagnerova H, Kulhanek J, Tomankova K, et al. Water-insoluble thin films from palmitoyl hyaluronan with tunable properties. *Carbohydrate Polymers*. 2016;144:68-75.
- [207] Atkins E, Sheenan J. Hyaluronates - Relation Between Molecular Conformations. *Science*. 1973;179:562-4.
- [208] Hargittai I, Hargittai M. Molecular structure of hyaluronan: an introduction. *Struct Chem*. 2008;19:697-717.

- [209] Scott JE, Heatley F. Biological properties of hyaluronan in aqueous solution are controlled and sequestered by reversible tertiary structures, defined by NMR spectroscopy. *Biomacromolecules*. 2002;3:547-53.
- [210] Kogan G, Soltés L, Stern R, Gemeiner P. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett*. 2007;29:17-25.
- [211] Cowman MK, Matsuoka S. Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydr Res*. 2005;340:791-809.
- [212] Dicker KT, Gurski LA, Pradhan-Bhatt S, Witt RL, Farach-Carson MC, Jia XQ. Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomater*. 2014;10:1558-70.
- [213] Bradáčová M. Příprava mikro-strukturovaných povrchů na bázi polysacharidu [Diplomová práce]: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně; 2017.
- [214] Bognerová E. Pevné formy hyaluronanu sodného a jeho vlastnosti [Bakalářská práce]: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně; 2018.
- [215] Shen GT, Hu XY, Guan GP, Wang L. Surface Modification and Characterisation of Silk Fibroin Fabric Produced by the Layer-by-Layer Self-Assembly of Multilayer Alginate/Regenerated Silk Fibroin. *PLoS One*. 2015;10:19.
- [216] Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen JS, et al. Silk-based biomaterials. *Biomaterials*. 2003;24:401-16.
- [217] Altman GH, Horan RL, Lu HH, Moreau J, Martin I, Richmond JC, et al. Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments. *Biomaterials*. 2002;23:4131-41.
- [218] Rodriguez MJ, Brown J, Giordano J, Lin SJ, Omenetto FG, Kaplan DL. Silk based bioinks for soft tissue reconstruction using 3-dimensional (3D) printing with in vitro and in vivo assessments. *Biomaterials*. 2017;117:105-15.
- [219] Vepari C, Kaplan DL. Silk as a biomaterial. *Progress in Polymer Science*. 2007;32:991-1007.
- [220] Lawrence BD, Omenetto F, Chui K, Kaplan DL. Processing methods to control silk fibroin film biomaterial features. *J Mater Sci*. 2008;43:6967-85.
- [221] Minařík A. Studium transportu hmoty v gelových fázích biopolymerů [Disertační práce]: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně; 2008.
- [222] Minarik A, Smolka P, Minarik M, Mracek A, Rajnohova E, Minarikova M, et al. A special instrument for the defined modification of polymer properties in solutions and polymer layers. *Measurement*. 2017;97:218-25.
- [223] Andersson M, Johansson J, Rising A. Silk Spinning in Silkworms and Spiders. *Int J Mol Sci*. 2016;17:14.
- [224] Wilson D, Valluzzi R, Kaplan D. Conformational transitions in model silk peptides. *Biophysical Journal*. 2000;78:2690-701.
- [225] Kaplan DL. Fibrous proteins - silk as a model system. *Polym Degrad Stabil*. 1998;59:25-32.
- [226] Laity PR, Gilks SE, Holland C. Rheological behaviour of native silk feedstocks. *Polymer*. 2015;67:28-39.
- [227] Hu X, Kaplan D, Cebe P. Dynamic protein-water relationships during beta-sheet formation. *Macromolecules*. 2008;41:3939-48.

- [228] Chen X, Shao ZZ, Knight DP, Vollrath F. Conformation transition kinetics of Bombyx mori silk protein. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics*. 2007;68:223-31.
- [229] Kocourková K. Příprava strukturovaných biopolymerních povrchů a studium jejich interakce s buňkami [Diplomová práce]: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně; 2019.
- [230] Černá P. Úprava a charakterizace biopolymerních povrchů [Bakalářská práce]: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně; 2020.
- [231] Holland C, Numata K, Rnjak-Kovacina J, Seib FP. The Biomedical Use of Silk: Past, Present, Future. *Adv Healthc Mater*. 2019;8:26.
- [232] Kaewprasit K, Promboon A, Kanokpanont S, Damrongsakkul S. Physico-chemical properties and in vitro response of silk fibroin from various domestic races. *J Biomed Mater Res Part B*. 2014;102:1639-47.
- [233] Wang YC, Wang F, Xu S, Wang RY, Chen WJ, Hou K, et al. Genetically engineered bi-functional silk material with improved cell proliferation and anti-inflammatory activity for medical application. *Acta Biomater*. 2019;86:148-57.
- [234] Leal-Egana A, Scheibel T. Interactions of cells with silk surfaces. *Journal of Materials Chemistry*. 2012;22:14330-6.
- [235] Wohlrab S, Muller S, Schmidt A, Neubauer S, Kessler H, Leal-Egana A, et al. Cell adhesion and proliferation on RGD-modified recombinant spider silk proteins. *Biomaterials*. 2012;33:6650-9.
- [236] Thurber AE, Omenetto FG, Kaplan DL. In vivo bioresponses to silk proteins. *Biomaterials*. 2015;71:145-57.
- [237] Amornsudthiwat P, Mongkolnavin R, Kanokpanont S, Panpranot J, Wong CS, Damrongsakkul S. Improvement of early cell adhesion on Thai silk fibroin surface by low energy plasma. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*. 2013;111:579-86.
- [238] Lawrence BD, Pan Z, Liu AH, Kaplan DL, Rosenblatt MI. Human corneal limbal epithelial cell response to varying silk film geometric topography in vitro. *Acta Biomater*. 2012;8:3732-43.
- [239] Tien LW, Gil ES, Park SH, Mandal BB, Kaplan DL. Patterned Silk Film Scaffolds for Aligned Lamellar Bone Tissue Engineering. *Macromol Biosci*. 2012;12:1671-9.
- [240] Gil ES, Park SH, Marchant J, Omenetto F, Kaplan DL. Response of Human Corneal Fibroblasts on Silk Film Surface Patterns. *Macromol Biosci*. 2010;10:664-73.
- [241] McMillan JR, Akiyama M, Tanaka M, Yamamoto S, Goto M, Abe R, et al. Small-diameter porous poly (epsilon-caprolactone) films enhance adhesion and growth of human cultured epidermal keratinocyte and dermal fibroblast cells. *Tissue Eng*. 2007;13:789-98.

Seznam obrázků

| | | |
|-------------|--|----|
| Obrázek 1 - | Složení odlévaného filmu bezprostředně po ponoření do srážecí lázně ($t < 1$ s) ukazuje a) okamžité smíchání, b) opožděné smíchání, T a B představuje horní a dolní část odlévaného filmu.[94]..... | 12 |
| Obrázek 2 - | Tok dobrého a špatného rozpouštědla zobrazený jako jednorozměrný difúzní proces.[98, 99]..... | 13 |
| Obrázek 3 - | Různé morfologie povrchu způsobené různými typy separace. [101] | 14 |
| Obrázek 4 - | Změna teploty filmů v závislosti na odpařování rozpouštědla [149]. | 21 |
| Obrázek 5 - | Model vzniku porézních systémů pomocí metody Breath figures. Nejprve se polymer rozpustí v těkavém rozpouštědle a vystaví se vlhkému prostředí (A). Během počáteční fáze kondenzuje vodní pára na povrchu ve formě kapiček (B). V důsledku odpařování rozpouštědla rostou kapičky vody na povrchu a tvoří uzavřené pole (C). V tomto stadiu se mohou vodní kapičky dále srůstat, což vede ke vzniku neuspořádaných heterogenních porézních filmů (D) a (E). V případě, že odpařování skončí před srůstáním kapiček do sebe, dojde ke vzniku porézních filmů s podobnou velikostí pórů (F). Kromě toho, v případě kdy použitý polymer stabilizuje kapičky kondenzované vody a zabraňuje jejich srůstání, může kondenzovaná kapička o vyšší hustotě klesnout do roztoku (G). Následně může na povrchu pokrytém rozpouštěným polymerem kondenzovat nová vodní kapka. Výsledkem toho je opakující se postup vytvoření vícevrstvých pórů (H) [150]. | 22 |
| Obrázek 6 - | Růst kapiček vody jako funkce času. [156]..... | 23 |
| Obrázek 7 - | a) Difúze toluenu do polystyrenu pokrytého sedící kapkou směsi vody a ethylenglykolu. b) Vysychání expandovaného povrchu polystyrenu. c) Schéma elastické deformace povrchu pomocí přisedlé kapky. Tečovaná čára zobrazuje povrch bez deformace. Parametr θ je kontaktní úhel kapičky, h je maximální výška hřebene a d maximální hloubka prohlubně. d) zvětšené schéma vybraného místa. Povrchové napětí vytahuje hřeben, přičemž ohnutý meniskus působí na rozhraní ve vzdálenosti h_0 v důsledku interakce Van der Waalových sil se substrátem. Hodnota ΔP je Laplaceův tlak vedoucí k poklesu kapičky do substrátu. e) Struktury na povrchu polystyrenu po 5 min. vystavení parám toluenu s následnou kondenzací mikrokapek vody. f) Výškový profil jednoho z kráterů na obrázku a) vlevo nahoře [71]..... | 24 |
| Obrázek 8 - | a) Zakalený povrch PS upravený směsí THF a IPA. b) Průhledný povrch PS upravený směsí THF a H_2O . c) Obrázek ze stereomikroskopu pro povrch a), žluté měřítko 265 μm . d) Obrázek ze stereomikroskopu pro povrch b), žluté měřítko 265 μm . e) snímek ze SEM pro povrch a), měřítko 100 μm . Vložený SEM snímek je stejný vzorek, s měřítkem 25 μm . f) snímek ze SEM vzorku pro povrch b), měřítko 100 μm [47]..... | 25 |

| | | |
|--------------|---|----|
| Obrázek 9 - | Metody pro přípravu pórovitých „honeycomb“ struktur prostřednictvím: a) proudění vzduchu, b) odlévání, c) sprejování, d) máčení anebo e) Spin-coating [156]. | 27 |
| Obrázek 10 - | Mikroskopický obraz lotosového listu s několika kapkami vody a prachu. [172]. | 28 |
| Obrázek 11 - | SEM obrazy (a) jediného oka komára, (b) mikrohemisféry HCP (ommatidia), (c) dvou sousedních ommatidií a (d) hexagonálních nanovýčnělků pokrývajících ommatidiální povrch. [173]. | 29 |
| Obrázek 12 - | Schematické znázornění samoorganizované hierarchické struktury blokového kopolymeru styrenu a isoprenu modifikovaného oligothiofenem s postranními řetězci [80]. | 30 |
| Obrázek 13 - | Snímky fázové kontrastu pořízeného pomocí AFM. Zobrazení vnitřních struktur pórů polymerního filmu s 10 hm.% směsi blokových kopolymerů ABC, a.) po nanášení spincoatingem s relativní vlhkostí 57%, b.) po žíhání při 80 °C po dobu 2 dnů [82]. | 31 |
| Obrázek 14 - | Strukturní vzorec polystyrenu (PS). | 32 |
| Obrázek 15 - | Strukturní vzorec hyaluronanu sodného (HA) [176, 177]. | 33 |
| Obrázek 16 - | Strukturní vzorec hedvábného proteinu - fibroinu (BMF) [179-181]. | 33 |
| Obrázek 17 - | Princip procesu úprava povrchu polystyrenu navrženou metodou časově sekvenované fázové separace. | 35 |
| Obrázek 18 - | Změna povrchového reliéfu PS v závislosti na rozdělení srovnatelného objemu modifikujícího roztoku do menších dávek. (A) výchozí povrch PS, (B) upravený povrch PS pomocí jedné dávky směsného rozpouštědla, (C) upravený povrch PS pomocí 5 dávek směsného rozpouštědla nanášených v 5 sekundových intervalech. Teplota úpravy 295 K. Složení roztoku: tetrahydrofuran (THF) : 2-ethoxyethanol (ETH) v objemovém poměru 1,5:8,5. Obrázky o rozměru 134x134 μm pořízeny pomocí SEM. | 36 |
| Obrázek 19 - | Změna smáčecích charakteristik povrchu PS vodou s rostoucím časovým intervalem dávkování modifikující směsi rozpouštědel ve směru naznačené šipky. 5 x 200 μl modifikačního činidla (THF : ETH v poměru 2:8) bylo dávkováno v intervalu: A) po 5-ti sekund; B) 10-ti sekund, C) 20-ti sekund. Velikost obrázků pořízených pomocí SEM je 134x134 μm. [184]. | 37 |
| Obrázek 20 - | Vyvinuté zařízení pro modifikaci povrchové topografie polymerů (TSSC) skládající se z nosiče vzorku na rotoru, dávkovacího zařízení, řídicí elektroniky a navrženého ovládacího SW. | 38 |
| Obrázek 21 - | Vlevo model centrální části TSSC zařízení s popisem hlavních konstrukčních prvků. Vpravo fotografie sestavené části zařízení. | 39 |
| Obrázek 22 - | Řez modelem rotační části TSSC zařízení. | 39 |
| Obrázek 23 - | Rotační držák vzorků TSSC zařízení. | 40 |
| Obrázek 24 - | Konstrukční části dávkovací jednotky TSSC zařízení. | 41 |
| Obrázek 25 - | Řídicí jednotka TSSC zařízení. Vlevo pohled na přední stranu, uprostřed kontrolní systémy a elektroinstalace, vpravo hlavní vypínač. | 42 |
| Obrázek 26 - | Softwarové okno TSSC zařízení. | 43 |
| Obrázek 27 - | Informační okna v navrženém softwarové rozhraní TSSC zařízení. | 44 |

| | |
|--|----|
| Obrázek 28 - Ovládací prvky v softwarové rozhraní TSSC zařízení. Vlevo aktivovaný automatický režim. Vpravo nastaven manuální režim. | 44 |
| Obrázek 29 - Nastavování referenční polohy a resetování mezní polohy v softwarové rozhraní TSSC zařízení..... | 45 |
| Obrázek 30 - Okno pro nastavené dávkovacího programu v softwarové rozhraní TSSC zařízení. | 46 |
| Obrázek 31 - Kalibrační okno a pokročilé nastavení v softwarové rozhraní TSSC zařízení. | 46 |
| Obrázek 32 - Průtočný box TSSC zařízení pro definovaný přívod/odvod plyných médií do prostoru modifikovaného vzorku. | 47 |
| Obrázek 33 - Mobilní zařízení pro manuální dávkování roztoků na rotující polymerní povrch M-TSSC..... | 48 |
| Obrázek 34 - Hlavní konstrukční části M-TSSC zařízení..... | 49 |
| Obrázek 35 - Možnosti nastavení rychlosti otáčení rotoru M-TSSC zařízení. | 50 |
| Obrázek 36 - Změna povrchového reliéfu v závislosti na rozdělení srovnatelného objemu roztoku do menších dávek. (a) výchozí povrch PS, (b) upravený povrch PS pomocí jedné dávky směšného rozpouštědla, (c) upravený povrch PS pomocí 5 dávek v 5s intervalech. Složení modifikačního roztoku tetrahydrofuran (THF):2-ethoxyethanol (ETH) v objemovém poměru 1,5:8,5. Obrázky (a) , (b) , (c) o rozměru 134x134 μm pořízeny pomocí SEM..... | 51 |
| Obrázek 37 - Srovnání způsobu dávkování směsi THF s ETH (1,75:8,25) a) spin-coating 5x200 μl po 5s , b) staticky 1x1000 μl . Velikost obrázků ze SEM 134x134 μm | 53 |
| Obrázek 38 - Model popisující průběh tvorby pórů při časově sekvenovaném dávkování směsi dobrého a špatného rozpouštědla. Model popisuje pro zjednodušení děj mezi prvním a druhým krokem dávkování, v následujících krocích se děje opakují [184]..... | 54 |
| Obrázek 39 - Vliv časového intervalu dávkování 5 x 200 μl směsi THF:ETH v poměru 1,25: 8,75 na změnu povrchového reliéfu PS. Obrázky ze SEM. | 57 |
| Obrázek 40 - Vliv časového intervalu dávkování 5 x 200 μl směsi THF:ETH v poměru 1,25: 8,75 na změnu rozložení ploch povrchových prohlubní. | 58 |
| Obrázek 41 - Vliv časového intervalu dávkování 5 x 200 μl směsi THF:ETH v poměru 1,25: 8,75 na změnu hloubky povrchových prohlubní. Profilové řezy uvedené pod obrázky byly pořízeny pomocí kontaktního profilometru. | 58 |
| Obrázek 42 - Změny kontaktních úhlů smáčení vodou u povrchů připravených při rozdílných časových intervalech dávkování 5 x 200 μl směsi THF:ETH v poměru 1,25: 8,75. Obrázky ze SEM. | 59 |
| Obrázek 43 - Změna vzhledu povrchového reliéfu po opětovné úpravě dříve modifikovaného povrchu: a) prvotní a b) následná úprava povrchu PS probíhala za srovnatelných podmínek. Na povrch bylo nanášeno 5 x 200 μl THF:ETH v poměru 1,5 : 8,5. Obrázky ze SEM..... | 60 |

- Obrázek 44 - Vliv objemového poměru dobrého rozpouštědla (THF) : špatnému rozpouštědлу (ETH) na změnu povrchové reliéfu PS a jeho smáčecí charakteristiky vodou. Objemový poměr THF:ETH **a) 1: 9, b) 1,5: 8,5, c) 2: 8**. Časová sekvence nanášení 5 dávek o objemu 200 μ l byla 5 sekund. Velikost obrázků pořízených pomocí SEM je 67x67 μ m..... 60
- Obrázek 45 - Analýzy povrchových prohlubní PS vznikajících při použití **THF:ETH v poměru a) 1:9, b) 1,5:8,5**. Modifikováno 5x 200 μ l po 5 s při 22°C. Obrázky ze SEM. 61
- Obrázek 46 - Analýzy povrchových prohlubní PS vznikajících při použití **THF:ETH v poměru a) 2:8, b) 3:7**. Modifikováno 5x 200 μ l po 5 s při 22°C. Obrázky ze SEM..... 62
- Obrázek 47 - Změny kontaktních úhlů smáčení vodou u povrchů připravených s pomocí rozdílných poměrů **THF:ETH**. Povrchy modifikovány 5x 200 μ l po 5 s při 22°C. Obrázky ze SEM..... 63
- Obrázek 48 - Vývoj povrchového reliéfu PS v závislosti na počtu 200 μ l dávek THF:ETH v poměru 1,1:8,9. **A) 1 dávka, B) 2 dávky, C) 4 dávky, D) 6 dávek, E) 8 dávek, F) 10 dávek**. Časový interval nanášení jednotlivých dávek byl 5s. Profilové řezy pořízeny pomocí bezkontaktní profilometrie. Součástí obrázků jsou uvedeny zjištěné hodnoty plošné drsnosti Sa. 64
- Obrázek 49 - Změna povrchové topografie PS v závislosti na počtu deponovaných dávek THF:ETH v poměru 2:8. Interval dávkování 5s při 25 °C. Obrázky ze SEM o rozměru 134 x 67 μ m..... 65
- Obrázek 50 - Vliv teploty roztoku THF:ETH (2:8) na změnu povrchové reliéfu PS. Na povrch dávkováno 5 x 200 μ l po 5s při teplotě THF:ETH **a) 4 °C (levý sloupec), b) 15 °C (pravý sloupec)**. Teplota PS a okolní atmosféry byla 22 °C. Nahoře obrázky ze SEM. Dole obrázky AFM..... 67
- Obrázek 51 - Obrazová analýzy rozložení velikostí povrchových prohlubní – pórů v závislosti na teplotě roztoku THF:ETH (2:8) použitého pro úpravu PS. Na povrch dávkováno 5 x 200 μ l po 5s při teplotě THF:ETH **a) 4 °C, b) 15 °C**. Teplota PS a okolní atmosféry 22 °C. Obrázky ze SEM..... 68
- Obrázek 52 - Vliv teploty roztoku THF:ETH (2,5:7,5) na změnu povrchové reliéfu PS. Na povrch dávkováno 5 x 200 μ l po 5s THF:ETH v rozmezí 5 až 35°C, Obr. a) až f). Teplota PS a okolní atmosféry 22 °C. Obrázky ze SEM o rozměru 134 x 67 μ m. Uvedené profilové řezy povrchy na Obr. a) až f) pořízené pomocí kontaktního profilometru. 69
- Obrázek 53 - Vliv typu použitého špatného rozpouštědla vzhledem k PS. V levém sloupci výsledky pro rozdílné poměry THF s H₂O, vpravo pro THF s ETH. Na povrch dávkováno 5 x 200 μ l po 5s při laboratorní teplotě. Obrázky ze SEM, vlevo 268 x 134 μ m, vpravo 134 x 67 μ m..... 70
- Obrázek 54 - Změna povrchového reliéfu PS vrstvy připravené postupným dávkování směsi THF+PS na rotující skleněný povrch rychlostí 1200 ot/min. Na povrch skla dávkováno 10 x 200 μ l roztoku s obsahem 2,68g PS v 10 ml THF v časovém intervalu: **a) 10 s, b) 15 s, c) 25s**. Obrázky ze SEM. 71

| | | |
|--------------|--|----|
| Obrázek 55 - | Změna povrchového reliéfu PS vrstvy připravené postupným dávkování směsi THF+PS na rotující skleněný povrch rychlostí 1200 ot/min. Na povrch skla dávkováno: a) 5x, b) 10x, c) 20x 200 μl roztoku s obsahem 2,68g PS v 10 ml THF v časovém intervalu 5s. Nahoře obrázky ze SEM, dole za AFM. | 72 |
| Obrázek 56 - | Změna povrchového reliéfu PS vrstvy připravené postupným dávkování a) 5x, b) 10x 200 μl směsi 10 ml THF s 32 ml EHT a 0,25g PS v časové intervalu 5s na rotující PS povrch. Obrázky ze SEM. | 75 |
| Obrázek 57 - | Vliv počtu deponovaných dávek a) 20x b) 40x 200 μl směsi 10 ml THF s 20 ml EHT a 2,68g PS v časové intervalu 7s na změnu tloušťky objemově porézní vrstvy. Obrázky ze SEM. | 76 |
| Obrázek 58 - | Hierarchicky strukturované PS povrchy připravené pomocí dvou rozdílných směsí rozpouštědel: Hladký povrch PS misky byl upravován: a) v prvním kroku na povrchu dávkováno 3 x 300 μ l THF:H₂O v poměru 5,6:4,4 v časovém intervalu 5s při 1500 ot/min., b) v druhém kroku na povrch deponováno 1 x 300 μ l THF:ETH v poměru 1:2 při 1500 ot/min. Úprava povrchů probíhala při 23°C. Nahoře obrázky ze SEM, dole za AFM. | 78 |
| Obrázek 59 - | Procesní kroky vedoucí k přípravě hierarchicky strukturovaných PS povrchů vyznačujících se superhydrofóbními vlastnostmi. | 79 |
| Obrázek 60 - | Vliv plazmatické úpravy na změnu kontaktního úhlu smáčení vodou Θ plynoucí ze změny povrchového zvrásnění a chemického složení (CF ₄) na rozhraní povrchových pórů připravených pomocí 5 x 200 μ l a) THF:ETH v poměru 1,5:8,5 při teplotě roztoku 22°C, b) THF:ETH v poměru 2,5:7,5 při teplotě 30°C . Výkon plazma reaktoru 300W. Obrázky ze SEM [195]. | 80 |
| Obrázek 61 - | Vliv povrchové topografie PS na změnu kontaktního úhlu smáčení vodou Θ po plazmatické úpravě. Povrchy pro plazmatickou úpravu připraveny s pomocí a) 2, b) 5, c) 8 x 200 μl a THF:ETH v poměru 1,5:8,5 při teplotě roztoku 22°C. Výkon plazma reaktoru 300W. Obrázky ze SEM [195]. | 81 |
| Obrázek 62 - | Adheze NIH/3T3 stanovená 3 hodiny pro nasazení na a) referenční hladký povrch PS, b) strukturovaný PS povrch . Vpravo nahoře náhledy na povrch před depozicí buněk získaný pomocí SEM. Obrázky buněk na površích pořízeny pomocí optického mikroskopu. | 83 |
| Obrázek 63 - | Buňky (NIH/3T3) na a) povrchu hladkého PS, b) strukturovaného PS . Cytoskeleton byl označen fluorescenčním barvivem ActinRed. Úprava povrchu vzorku provedena pomocí plazmatického výboje o výkonu 50W, viz kontaktní úhel smáčení vodou Θ_{plazma} a následně pak UV sterilizovány, viz kontaktní úhel smáčení vodou $\Theta_{\text{p+steril}}$. V pravém dolním rohu smáčení povrchu vodou po plazmatické úpravě. V pravém horním rohu náhled na mikrostrukturu použitého povrchu. Obrázky ze SEM a fluorescenčního mikroskopu. Hodnoty povrchové drsnosti Sa byly stanoveny pomocí optického profilometru [184]. | 83 |

- Obrázek 64 - Znázornění cytoskeletu a jader buněk NIH/3T3 pomocí konfokálního mikroskopu. Jádra buněk jsou znázorněna modře. Na obrázku **a**) rozmístění buněk na povrchu bez zobrazení povrchových nerovností. Vpravo na obrázku **b**) znázorněno rozprostírání cytoskeletu přes rozhraní povrchových mikropórů. V pravém horním rohu náhledy na povrchovou mikrostrukturu získané pomocí SEM. 84
- Obrázek 65 - Myší embryonální fibroblasty NIH/3T3 na povrchu rozdílně strukturovaného PS. Modře označena jádra buněk, červeně cytoskelet. PS povrchy připraveny pomocí časově sekvenované fázové separace. Obrázky povrchů ze SEM a konfokálního mikroskopu. 86
- Obrázek 66 - Embryonální kmenové buňky (ESCs) na povrchu rozdílně texturovaného PS. Modře označena jádra buněk, červeně cytoskelet. PS povrchy připraveny pomocí časově sekvenované fázové separace. Obrázky ze SEM a konfokálního mikroskopu. 87
- Obrázek 67 - Srovnání dvou buněčných linií na rozdílně strukturovaných PS povrchích. PS povrchy připraveny pomocí časově sekvenované fázové separace. Uprostřed obrázky povrchů ze SEM. Nahoře a dole obrázky z konfokálního mikroskopu se zobrazením podkladního povrchu, modře označenými jádry a červeně označeným cytoskeletem. 88
- Obrázek 68 - Možnosti povrchového strukturování vrstvy HA v závislosti na bobtnání povrchu H₂O. V prvním kroku byla na povrch b) nanášena voda v časovém intervalu 5s při 23°C a 2100 ot/min. V následném kroku byly povrchy upravovány směsí 25 x 200 ml nBT:IPA v poměru 3:7 dávkovanou v intervalu 5s. Obrázky z AFM..... 91
- Obrázek 69 - Srovnání vlivu poměru nBT:IPA na vznik zvrásnění na povrchu HA. V prvním kroku bylo na povrch dávkováno 3 x 200 μl H₂O v 5s intervalech. V druhém kroku byla na povrch dávkována směs nBT:IPA v poměrech uvedených na obrázku a) až c). Na povrch bylo dávkováno 10 x 200 μl nBT s IPA v časovém intervalu 5s, při 23°C a 2100 ot/min. Obrázky a profilové řezy z AFM. 92
- Obrázek 70 - Změna výška solidifikované vrstvy BMF na povrchu PS v závislosti na výchozí koncentraci BMF v roztoku **a**) FA, **b**) HFIP. 94
- Obrázek 71 - Výškově nastavitelná podkladní deska pro přípravu tenkých BMF vrstev. 95
- Obrázek 72 - Náhled na povrch BMF vrstvy na PS misce solidifikované z HFIP roztoku: **a) bez víčka, b) s víčkem**. Obrázky pořízeny digitální kamerou. 95
- Obrázek 73 - Náhled na povrch BMF vrstvy na PS misce solidifikované z FA roztoku: **a) bez víčka, b) s víčkem**. Obrázky pořízeny digitální kamerou. 96
- Obrázek 74 - Změny povrchové struktury BMF filmů připravených z FA roztoků po úpravě **a**) HFIP s H₂O, **b**) HFIP s DMSO, **c**) HFIP s H₂O a DMSO. Obrázky za AFM. Vlevo 2D náhled na výškové změny označené rozdílnými barvami. Vpravo 3D pohled na povrch vzorku..... 97
- Obrázek 75 - **Změny povrchové struktury BMF filmů** připravených z HFIP roztoků po úpravě roztokem HFIP s DMSO a **rozdílným podílem H₂O**. Obrázky z optického mikroskopu. f) histogram plošných průřezů póry. 98

V rámci počátečních experimentů prezentovaných na Obr. 74 bylo zjištěno, že porézní strukturu na povrchu BMF nelze připravit bez přídavku DMSO do modifikační směsi. Na základě tohoto zjištění byl proveden experiment, kde do této směsi bylo přidáváno rozdílné množství DMSO. Z výsledků tohoto experimentu vyplynulo zjištění, že po překročení určitého množství DMSO v modifikační směsi nedochází k dalšímu nárůstu počtu povrchových prohlubní. Mírně roste jejich průměr daný koalescencí kapek DMSO do větších celků, Obr. 76. 99

- Obrázek 76 - **Změny povrchové struktury BMF filmů** připravených z HFIP roztoků po úpravě roztokem HFIP s H₂O a **rozdílným podílem DMSO**. Obrázky z optického mikroskopu. d) histogram plošných průřezů póry. 99
- Obrázek 77 - **Změny povrchové struktury BMF filmů** připravených z HFIP v závislosti na počtu nanášených dávek HFIP+H₂O+DMSO. Obrázky z optického mikroskopu. d) histogram plošných průřezů póry. 100
- Obrázek 78 - **Změny povrchové struktury BMF filmů** připravených z HFIP v závislosti na časovém intervalu mezi nanášenými 200 µl dávkami HFIP+H₂O+DMSO. Obrázky z optického mikroskopu. d) histogram plošných průřezů póry. 101
- Obrázek 79 - **Změny povrchové struktury BMF filmů** připravených z HFIP v závislosti na rychlosti rotace upravovaného vzorku. Obrázky z optického mikroskopu. d) histogram plošných průřezů póry. 102
- Obrázek 80 - Postup přípravy nano, mikro, makro a hierarchicky strukturovaných BMF povrchů pomocí časově sekvenovaného dávkování směsi HFIP s DMSO a H₂O. Obrázky z optického profilometru. 104
- Obrázek 81 - Chování buněk na rozdílně strukturovaném povrchu BMF **a), c)**. Buňky (osteoblasty, MC3T3-E1) na **b)** nano/mikrostrukturovaném, **d)** makrostrukturovaném povrchu BMF. Obrázky pořízeny pomocí AFM, optické profilometrie a mikroskopie. 105

Seznam použitých symbolů a zkratek

| | |
|--------------|---|
| BF | Breath Figures |
| PS | polystyren |
| PMMA | polymethylmethakrylát |
| PLA | kyselina polymléčná |
| ΔG_m | Gibsova volná energie směšování |
| K | Boltzmanova konstanta |
| T | absolutní teplota |
| \emptyset | objemová frakce |
| n1, n2 | látkové množství složek rozpouštědla a polymeru |
| χ_{12} | Floryho interakční parametr |
| E_v | molární energii odpařování |
| V | molárnímu objemu |
| R | molární plynová konstanta |
| δ | parametru rozpustnosti |
| ΔH_m | teplo míchání |
| μ | dipólový moment rozpouštědla |
| R_p | parametr rozpustnosti |
| R_o | poloměr interakce koule |
| Da | parametr tvorby membrány |
| d | tloušťka membrány |
| t | čas koagulace |
| θ | kontaktní úhel |
| ΔP | Laplaceův tlak |
| hm. % | hmotnostní procenta |
| ot/min | otáčky za minutu |
| p.a. | pro analýzu |
| RH | relativní vlhkost |
| DNA | Deoxyribonukleová kyselina |
| RNA | Ribonukleová kyselina |
| THF | Tetrahydrofuran |
| ETH | 2-ethoxyethanol |
| IPA | izopropylalkohol |
| HA | hyaluronan sodný |
| BMF | Bombyx mori fibroin |
| AFM | mikroskopie atomárních sil |

| | |
|-----------------|---|
| SEM | skenovací elektronový mikroskop |
| OM | optický mikroskop |
| KM | konfokální mikroskop |
| TSSC | časově sekvenovaný spin-coater (Time Sequenced Spin Coater) |
| M-TSSC | přenosný časově sekvenovaný spin-coater |
| PLC | programovatelný logický ovladač |
| Sa | plošná drsnot |
| Ar | argon |
| CF ₄ | tetrafluormethan |
| ESCs | embryonální kmenová buňka |
| NIH/3T3 | myší embryonální fibroblast |
| nBT | n-butanol |
| HFIP | hexafluoroisopropanol |
| FA | kyselina fluorovodíková |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| N ₂ | dusík |

Publikační aktivity autora

Články publikované v impaktovaných časopisech:

1. **WRZECIONKO, Erik**, Antonín MINAŘÍK, Petr SMOLKA, et al. Variations of Polymer Porous Surface Structures via the Time-Sequenced Dosing of Mixed Solvents. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2017, **9**(7), 6472-6481. ISSN 1944-8244. (IF = 7,504)
2. KOTĚNA, Jan, Antonín MINAŘÍK, **Erik WRZECIONKO**, et al. The effect of temperature gradient on the variation of surface topography and reflectivity of anisotropically etched silicon wafers. *Sensors and Actuators A: Physical*. 2017, **262**, 1-9. ISSN 09244247 (IF = 2,499)
3. KADLEČKOVÁ, Markéta, Antonín MINAŘÍK, SMOLKA Petr, Aleš MRÁČEK, **Erik WRZECIONKO**, et al. Preparation of textured surfaces on aluminum-alloy substrates. *Materials*. 2018, **12**(1), 109 (IF = 3,260)
4. REJMONTOVÁ, Petra, Petr HUMPOLÍČEK, Zdenka CAPÁKOVÁ, **Erik WRZECIONKO**, et al. The use of fractionated Kraft lignin to improve the mechanical and biological properties of PVA-based scaffolds. *RSC Advances*. 2019, **9**(22), pp. 12346–12353 (IF = 3,119)
5. MINAŘÍK, Martin, **Erik WRZECIONKO**, Antonín MINAŘÍK, Aleš MRÁČEK, et al. Preparation of hierarchically structured polystyrene surfaces with superhydrophobic properties by plasma-assisted fluorination. *Coatings*. 2019, **9**(3), 201 (IF = 2,436)
6. VÍTKOVÁ, Lenka, Lenka MUSILOVÁ, Antonín MINAŘÍK, **Erik WRZECIONKO**, Aleš MRÁČEK, et al. Electrospinning of hyaluronan using polymer coelectrospinning and intermediate solvent. *Polymers*. 2019, **11**(9), 1517 (IF = 3,426)
7. VAŇHAROVÁ, Ludmila, Markéta JULINOVÁ, Martin JURČA, Antonín MINAŘÍK, Štěpán VINTER, Dagmar ŠAŠINKOVÁ, **Erik WRZECIONKO**. Environmentally friendly polymeric films based on biocarbon, synthetic zeolite and PVP for agricultural chemistry. *Polymer Bulletin*. 2021, 1-28 (IF = 2,014)

8. KADLEČKOVÁ, Markéta, Kateřina SKOPALOVÁ, Barbora PTOŠKOVÁ, **Erik WRZECIONKO**, Antonín MINAŘÍK, et al. Hierarchically structured surfaces prepared by phase separation: Induction of stem cells differentiation. *Článek v recenzním řízení*.

Konferenční příspěvky:

WRZECIONKO, Erik, Antonín MINAŘÍK, Petr SMOLKA, Aleš MRÁČEK a Martin MINAŘÍK. Změna topografie povrchu polystyrenových substrátů metodou fázové separace. *PLASTKO 2016*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2016, s. 562-568. ISBN 978-80-7454-590-0

MRÁČEK, Aleš, Antonín MINAŘÍK, Martin MINAŘÍK, **Erik WRZECIONKO**, Petr SMOLKA, Ondřej GRULICH, Magda MINAŘÍKOVÁ, Lenka GŘUNDĚLOVÁ, Miran MOZETIC, Ita JUNKAR. Plasma surface modifications of structured polystyrene 6th Int. Conference on Advanced Plasma Technologie, Siem Reap, Cambodia, 11th to 18th December 2016

MRÁČEK, Aleš, Antonín MINAŘÍK, Martin MINAŘÍK, **Erik WRZECIONKO** a Petr SMOLKA. Surface modifications of PET fibers. In: STRÁŽNICKÝ, Přemysl a Petr SLOBODIAN. *International workshop on the application of nanomaterials*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2017. ISBN 978-80-7454-622-8

WRZECIONKO, Erik, Antonín MINAŘÍK, Petr SMOLKA, Martin MINAŘÍK, Magda MINAŘÍKOVÁ a Aleš MRÁČEK. Changing the polystyrene surface topography by phase separation. In: *MATERIAIS 2017*. Aveiro, Portugal: University of Aveiro, 2017, s. 348

MINAŘÍK, Antonín, Petr SMOLKA, Dagmar JUROŠKOVÁ, Martin MINAŘÍK, **Erik WRZECIONKO**, Magda MINAŘÍKOVÁ, Aleš Mráček a Lenka MUSILOVÁ. Influence of self-organized fluid flows on secondary and tertiary structure of bio-macromolecular system. In: *MATERIAIS 2017*. Aveiro, Portugal: University of Aveiro, 2017, s. 312

SMOLKA, Petr, Antonín MINAŘÍK, Martin MINAŘÍK, **Erik WRZECIONKO**, Jan KOTĚNA, Magda MINAŘÍKOVÁ a Aleš MRÁČEK. Effective anisotropic

etching of silicon wafers in temperature gradients – variation of surface topography and reflectivity with a specially designed apparatus. In: *MATERIAIS 2017*. Aveiro, Portugal: University of Aveiro, 2017, s. 23

MINAŘÍK, Martin, **Erik WRZECIONKO**, Aleš MRÁČEK, Antonín MINAŘÍK, Ondřej GRULICH, Petr SMOLKA, Miran MOZETIC, Ita JUNKAR a Petr SÁHA. Nanotextured Microporous Polystyrene Surfaces. In: SAHA 2018. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2018

Užitné vzory, funkční vzorky:

MINAŘÍK, Antonín, Petr SMOLKA, Martin MINAŘÍK, Aleš MRÁČEK a **Erik WRZECIONKO**. *Topná a/nebo chladící plocha s rovnoměrným rozvodem tepla či chladu ze zdroje*. Česká Republika. Užitný vzor 30540.

Odborný životopis autora

Jméno: **Ing. Erik Wrzecionko**
Datum narození: 2.8.1989
Adresa: Vřesovice 237, 696 48 Ježov, Czech Republic
Email: wrzecionko@utb.cz
Telefon: +420 721 109 567

Vzdělání

2014 – dosud Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav fyziky a materiálového inženýrství; doktorský studijní program: Technologie makromolekulárních látek.

Téma disertační práce: Příprava a charakterizace hierarchicky organizovaných funkčních polymerních vrstev a porézních systémů

2012 – 2014 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav fyziky a materiálového inženýrství; magisterský studijní program: Chemie a technologie materiálů - Materiálové inženýrství.

Závěrečná práce: Příprava a charakterizace polymerních vrstev ze zředěných roztoků.

2009 - 2012 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav fyziky a materiálového inženýrství; bakalářský studijní program: Chemie a technologie materiálů – Materiálové inženýrství

Závěrečná práce: Mechanické vlastnosti tenkých polymerních filmů solidifikovaných z roztoků polysacharidů

2004 – 2008 Střední průmyslová škola Otrokovice; Aplikovaná chemie – Analytická chemie

Zaměstnání

2015 – dosud Centrum polymerních systémů, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, třída Tomáše Bati 5678, 760 01 Zlín; Výzkumný projektový pracovník

Odborné stáže

2017 Měsíční stáž na Slovak University of Technology in Bratislava, Faculty of Materials Science and Technology STU

2017 Měsíční stáž na Univerzitě v Bayreuthu

Projekty

IGA/FT/2018/011 Příprava mikroporézních biopolymerních povrchů metodami fázové separace.

IGA/FT/2017/011 Plazmatické úpravy mikro a nano texturovaných povrchů a studium jejich vlivu na vývoj buněčných kultur.

IGA/FT/2016/013 Příprava a charakterizace strukturovaných povrchů určených pro formování polymerních materiálů

IGA/FT/2015/014 Analýza a modifikace adhezních vlastností vybraných materiálových soustav