

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

Ing. Erik Wrzecionko, Ph.D.

Teze disertační práce



**Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně**  
**Fakulta technologická**

Teze 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:	<b>Ing. Erik Wrzecionko, Ph.D.</b>
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

Vydala **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně** v edici **Doctoral Thesis Summary**.

Publikace byla vydána v roce 2021

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*

Plná verze disertační práce je dostupná v Knihovně UTB ve Zlíně.

ISBN 978-80-7678-031-6

## **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. Strukturné 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 Metoda Breath Figures .....	11
4.1.1 Mechanismus vzniku Breath Figures .....	11
4.2 Hierarchicky organizované struktury .....	15
5. Experimentální část .....	16
5.1 Použité materiály .....	16
5.1.1 Syntetický polymer – polystyren .....	16
5.1.2 Polysacharidy – hyaluronan sodný .....	17
5.1.3 Protein - <i>Bombyx mori</i> fibroin .....	17
5.2 Postupy úpravy polymerních povrchů .....	17
6. Výsledky a diskuze .....	17
6.1 Konstrukce zařízení pro řízenou úpravu polymerních povrchů .....	18
6.1.1 Zařízení pro automatické dávkování roztoků .....	18
6.2 Fázově separační úprava polystyrenových substrátů .....	22
6.2.1 Model popisující formování pórů na povrchu PS .....	22
6.2.1 Vliv časového intervalu dávkování .....	25
6.2.2 Vliv poměru složek v modifikačním roztoku .....	25
6.2.3 Vliv počtu dávek .....	26
6.2.4 Vliv teploty nanášeného rozpouštědla na vývoj povrchového reliéfu .....	27
6.2.5 Vliv typu špatného rozpouštědla .....	27
6.2.6 Kondenzace špatného rozpouštědla na povrchu postupně nanášeného roztoku PS ...	28
6.2.1 Porézní a strukturované PS vrstvy – fázová inverze .....	29
6.2.2 Hierarchicky strukturované PS povrchy - postupná fázová separace .....	30
6.2.3 Hierarchicky strukturované PS povrchy – plazmatické úpravy .....	31
6.2.4 Vliv mikroporézních PS povrchů na chování buněk .....	31
6.2.5 Vliv hierarchicky strukturovaných PS povrchů na chování buněk .....	32
6.3 Fázově separační úprava substrátů na bázi hyaluronanu .....	34
6.1 Fázově separační úprava substrátů na bázi fibroinu .....	36

6.1.1	Vliv strukturovaných fibroinových povrchů na chování buněk .....	39
7.	Přínos práce pro vědu a praxi .....	40
8.	Závěr .....	41
	Seznam použité literatury .....	44
	Seznam obrázků.....	51
	Seznam použitých symbolů a zkratk.....	51
	Publikační aktivity autora .....	52
	Odborný životopis autora.....	54

# 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  $\mu\text{m}$ ), meso (10  $\mu\text{m}$  – 50  $\mu\text{m}$ ), mikro (0,1-10  $\mu\text{m}$ ) 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, použití 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 nabetnalého 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 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 [93, 94]. 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 [95]. Mimo to je možné kontrolovat velikost a uspořádání 3D pórů jak v povrchu, tak v objemu, čímž lze výrazně ovlivňovat měrný povrch [96].

### **4.1.1 Mechanismus vzniku Breath Figures**

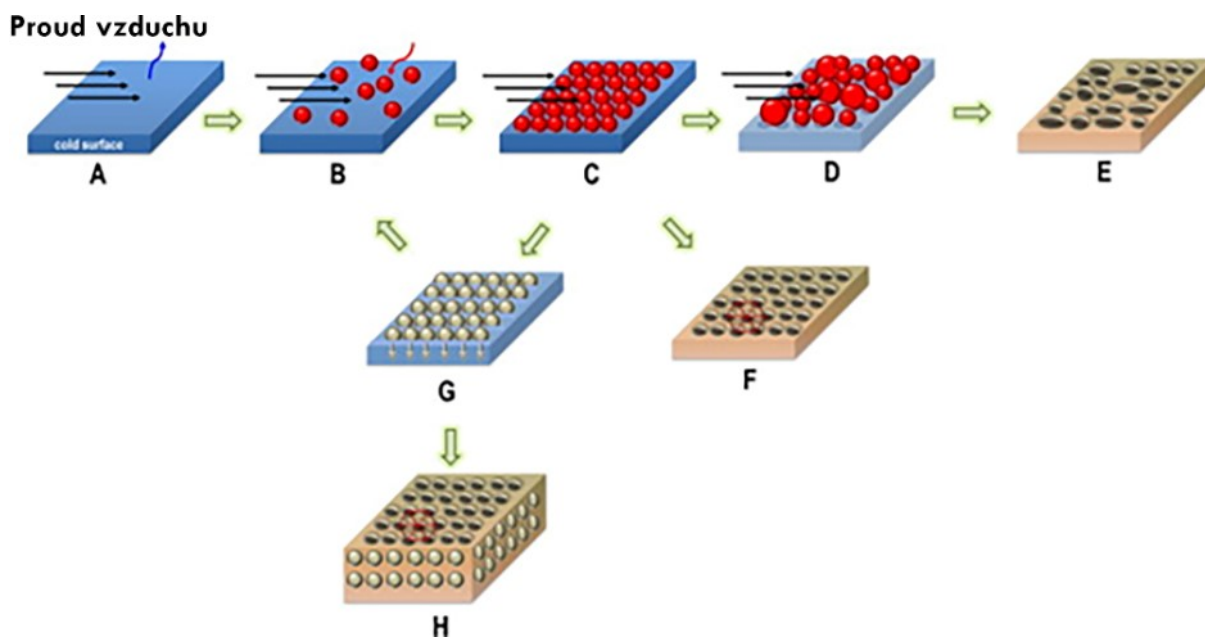
Principem klasické metody BF je tvorba uspořádaných vodních kapek kondenzací na ochlazovaném povrchu. K ochlazování povrchu dochází v důsledku rychlého odpařování dobrého rozpouštědla z modifikovaného fázového rozhraní [55, 56, 97]. V okamžiku kdy se povrch dostane do kontaktu s vlhkým vzduchem, vlhkost kondenzuje na povrchu a vytváří vodní kapky, které během odpařování rozpouštědla dále rostou [93, 98-102].

Tvorbu porézních systémů pomocí BF naznačuje Obr. 1 [103]. V počátečním stádiu (A) dochází k endotermnímu odpařování, klesá teplota povrchu, vodní pára začíná kondenzovat na fázovém rozhraní kapalina/plyn.

Počáteční heterogenní nukleace tvoří na povrchu kapičky vody Obr. 1 (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 indukování růstu vodních kapiček, lze získat úplné pokrytí povrchu hexagonálním vzorem Obr. 1 (C). Naproti tomu dlouhá doba kondenzace bude mít za následek póry s náhodnou distribucí velikostí Obr. 1 (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. 1 (F).

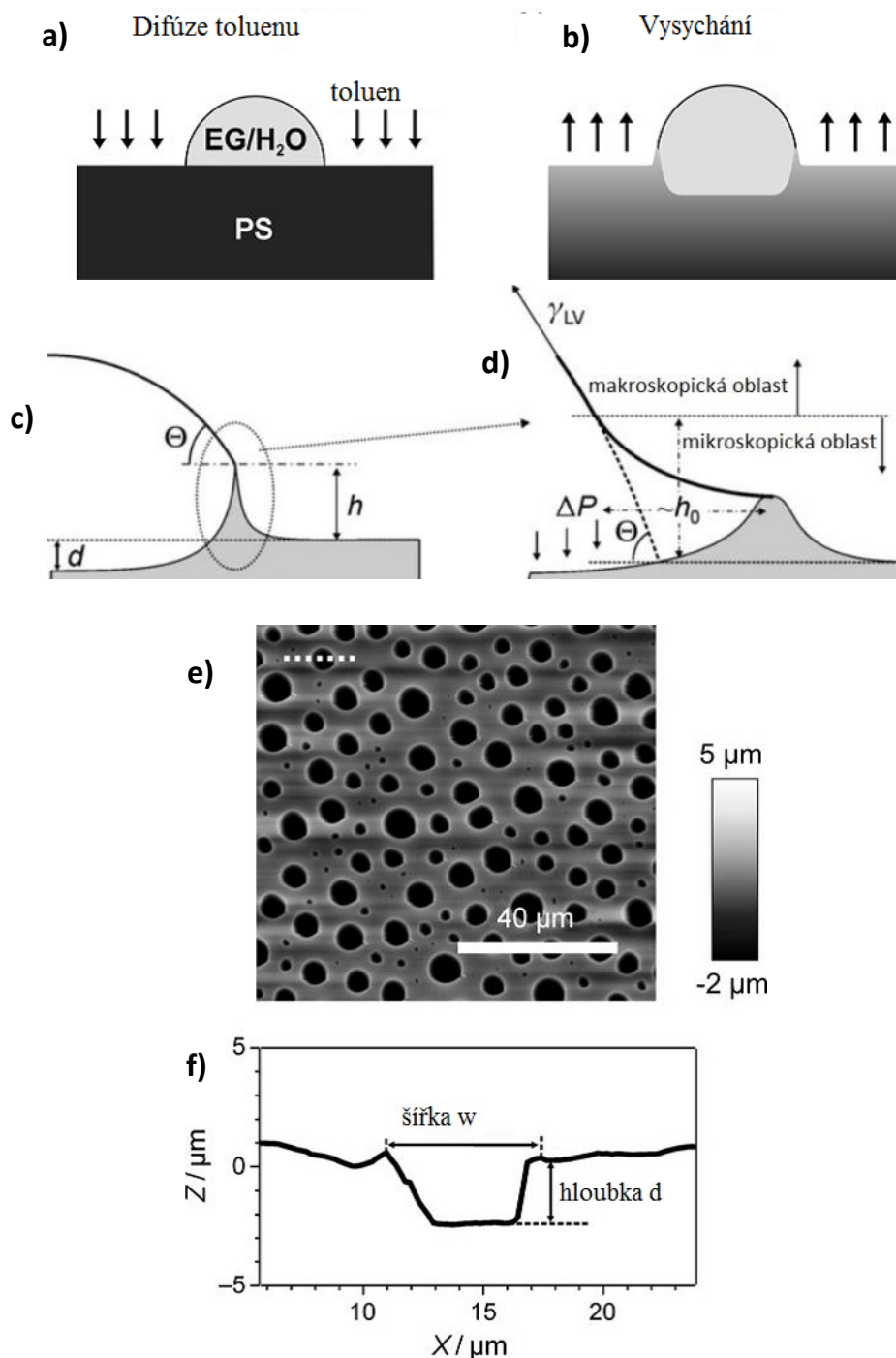
Za určitých podmínek může první vrstva kondenzovaných kapiček klesat níže do roztoku. V tomto případě je nezbytné polymerní kapky stabilizovat tak, aby se v čase zabránilo jejich koagulaci Obr. 1 (G). Na pokles kapiček do polymerního roztoku bude mít zásadní vliv hustota použitého rozpouštědla. Jestliže bude hustota rozpouštědla menší než hustota vody, bude docházet k pronikání kapiček vody do polymerního roztoku a můžeme pozorovat vznik vícevrstevných struktur Obr. 1 (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. 1 (D). V důsledku procesu koalescence a po odpaření vodních kapiček a použitého rozpouštědla vzniká nesourodé pole pórů Obr. 1 (E).



Obrázek 1 - 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 stádiu 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) [104].

Existuje mnoho studií vysvětlující mechanismus a dynamiku, která řídí formování BF zejména na pevném nebo kapalném povrchu [94, 103, 105-107]. K dispozici je několik modelů vysvětlujících kinetiku těchto procesů [105, 106, 108, 109]. 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.

Podle Rogerse a kol. [110] může být růst kapičky popsán mocninovým zákonem  $t^{1/4}$  za použití pouze modelu difúze. Fritter a kol. [108] a Steyer a kol. [111] zpracovali modely, které zvažují jak difúzi, tak koalescenci a dospěli k závěru, že v počátečním stádiu izolované kapičky rostou podle funkce  $t^{1/3}$ .

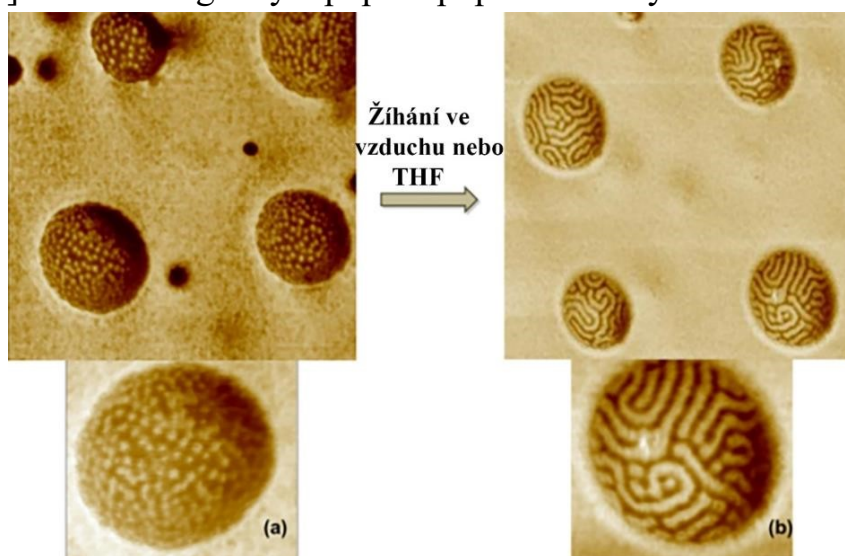


Obrázek 2 - **a)** Difúze toluenu do polystyrenu pokrytého sedící kapkou směsi vody a ethylenglykolu. **b)** Vysychání expandovaného povrchu polystyrenu. **c)** Schéma elastické deformace povrchu pomocí přisedlé kapky. Tečovaná čára zobrazuje povrch bez deformace. Parametr  $\theta$  je kontaktní úhel 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  $\Delta P$  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].

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  $\mu\text{m}$  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. 2a. Toluén botná PS okolo nanesené kapky a ten vertikálně expanduje, Obr. 2. Po odpaření toluenu lze na povrchu pozorovat kráterovitou strukturu, která odpovídá místu umístění kapky. Vtlačování špatného rozpouštědla do nabotnalé polymerní vrstvy schématicky naznačuje, Obr. 2c a 2d. 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. 2e a 2f [71].

## 4.2 Hierarchicky organizované struktury

Hierarchicky uspořádané struktury mohou být připraveny například kombinací metody BF s využitím samoorganizace blokových kopolymerů ve vzniklých pórech [112]. Tato strategie byla poprvé popsána Hakayamou a Horiuchim [80].



Obrázek 3 - Snímky fázové kontrastu pořizované 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].

Při použití amfifilních blokových kopolymerů vytvářeli Stenzel a kol. [113] 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 kopolymerů na povrchu lokalizována v oblastech, kde byla vytvořena vodní kapka. Zbytek povrchu je pak tvořen především polystyrenem, viz Obr. 3.

## **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. 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 M $\Omega$ .cm s následným sušením v sušárně bez nucené cirkulace vzduchu při 50 °C.

### 5.1.2 Polysacharidy – hyaluronan sodný

Dalším využívaným materiálem byla kyselina hyaluronová. Ta se obvykle vyskytuje ve formě sodné soli, konkrétně hyaluronanu sodného (HA). 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.

### 5.1.3 Protein - *Bombyx mori* fibroin

Posledním využívaným materiálem byl hedvábný protein - *Bombyx mori* fibroin (BMF), izolovaný z kokonů bource morušového na Ústavu biomateriálů, Univerzity v Bayreuthu podle literárně popsání postupu [114].

## 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.

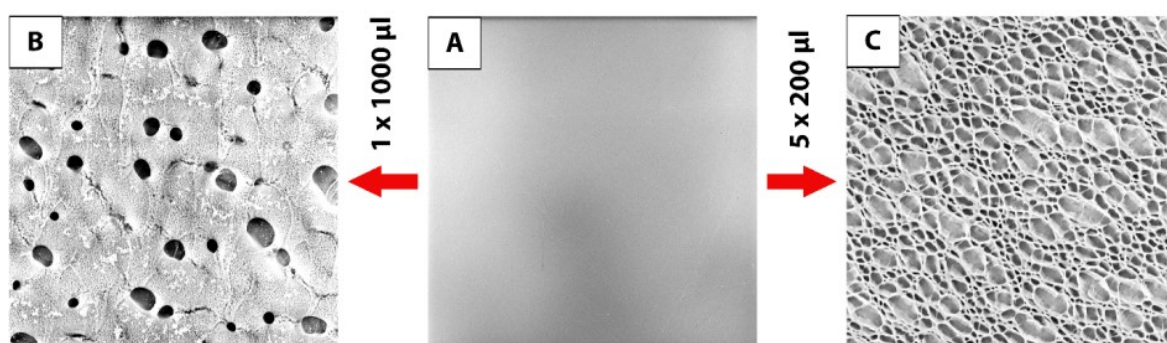
## 6. Výsledky a diskuze

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. 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 upravovaného materiálu, Obr. 4.



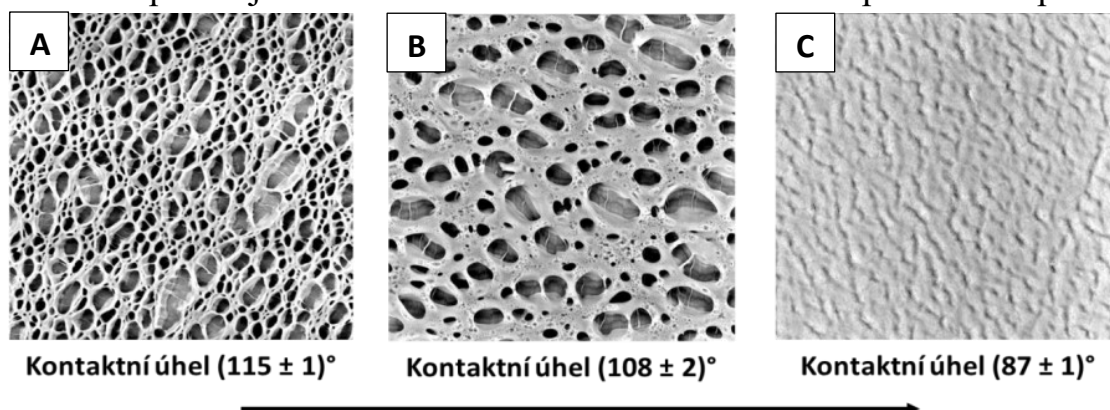
Obrázek 4 - Změna povrchového reliéfu PS v závislosti na rozdělení srovnatelného objemu modifikujícího roztoku do menších dávek. (A) výchozí povrch PS, (B) upravený povrch PS pomocí jedné dávky směsného rozpouštědla, (C) upravený povrch PS pomocí 5-ti dávek. Obrázky o rozměru 134x134  $\mu\text{m}$  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.

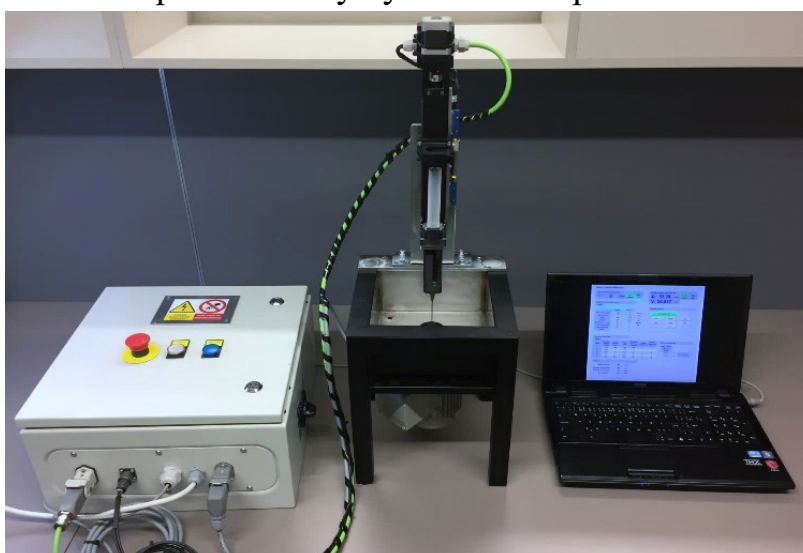
Jednou z klíčových funkcí vyvíjeného zařízení byla kontrola časové prodlevy mezi jednotlivými dávkami směsného roztoku deponovaného na povrch

upravovaného materiálu. Význam této proměnné je patrný z experimentálních výsledků uvedených na Obr. 5. Pro vznik specifické porézní struktury musí být zvolen odpovídající interval dávkování směsi dobrého a špatného rozpouštědla.



Obrázek 5 - 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  $134 \times 134 \mu\text{m}$ . [115]

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. 6. 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.



Obrázek 6 - Vyvinuté zařízení pro modifikaci povrchové topografie polymerů (TSSC) skládající se z nosiče vzorku na rotoru, dávkovacího zařízení, řídicí elektroniky a navrženého ovládacího SW.

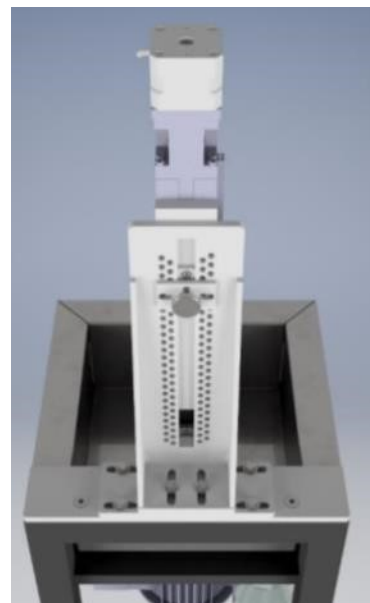
**Pohled zepředu**



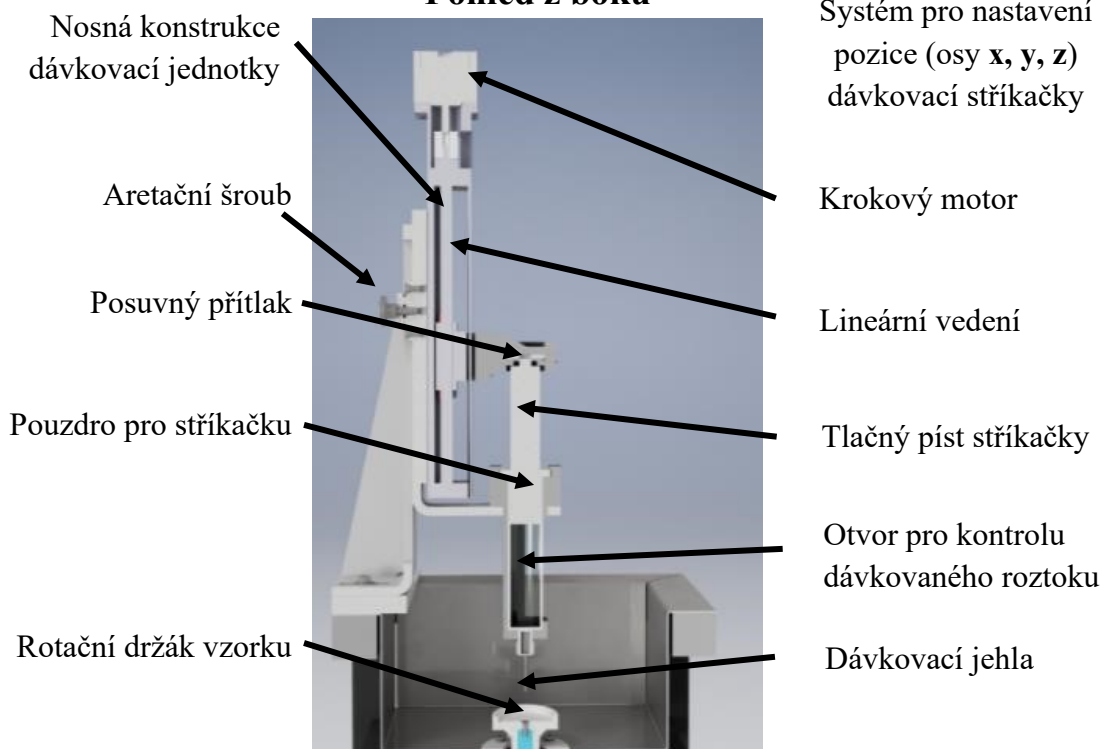
**Pouzdro pro stříkačky**



**Pohled zezadu**



**Pohled z boku**

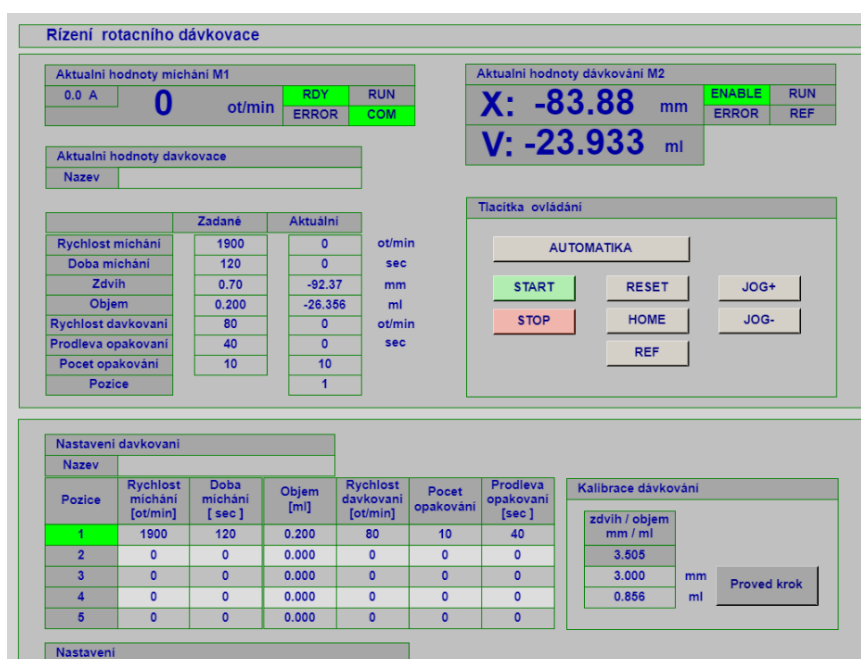


*Obrázek 7 - Konstrukční části dávkovací jednotky TSSC zařízení.*

Zařízení na Obr. 6 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.

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. 7.

Druhou částí TSSC je řídicí jednotka umístěná vedle přístroje v rozvaděčové skříni. Tato řídicí jednotka je napájena 230 V. Obsahuje veškerou elektroinstalaci složenou z frekvenčního měniče, PLC jednotky, ovladače krokového motoru a jisticích prvků.

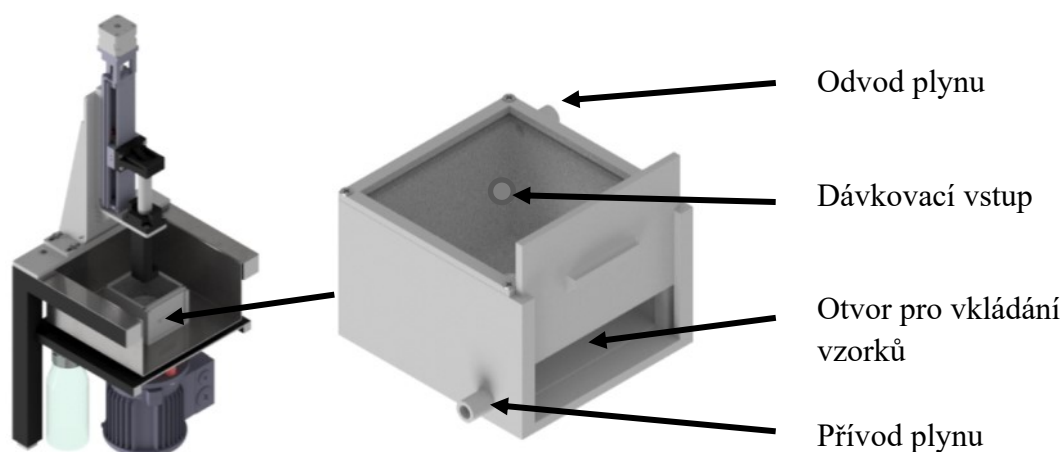


Obrázek 8 - Softwarové okno TSSC zařízení.

Poslední částí zařízení je počítač sloužící k ovládání kontrolní jednotky, v níž je nahrán speciálně navržený software, Obr. 8. 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 pěti-krokový proces modifikace lišící se výše uvedenými proměnnými. Mimo to umožňuje manuálně ovládat pohyb dávkovacího zařízení a online kontrolovat celý proces úpravy povrchu.

Jedním z klíčových faktorů mající vliv na výslednou morfologii upravovaných polymerních povrchů 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. 9.



Obrázek 9 - Průtočný box TSSC zařízení pro definovaný přívod/odvod plyných médií do prostoru modifikovaného vzorku.

## 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, 116, 117].

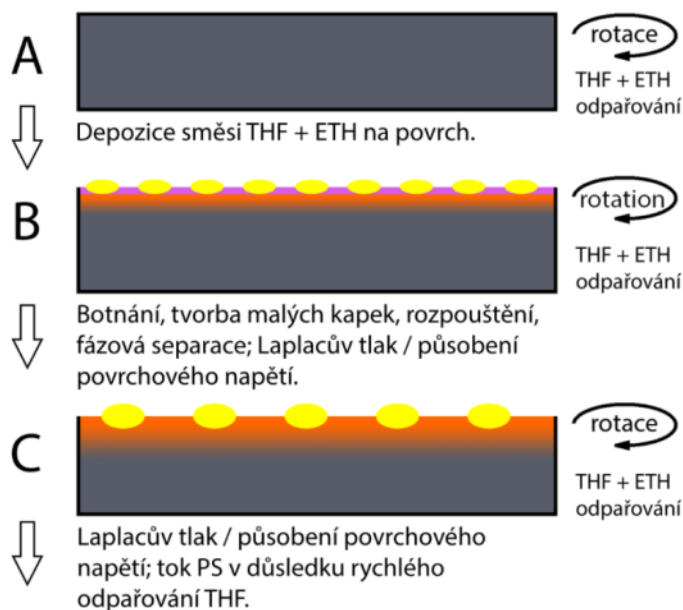
Nově navržený přístup úpravy PS substrátů spočívá ve využití časově sekvenovaného dávkování modifikačního roztoku na rotující povrch. To znamená, že oproti literárně popsaným postupům [14, 52, 54, 118, 119] se liší především postupným, vícekrokovým dávkováním směsi dobrého a špatného rozpouštědla s případnými aditivami.

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.

### 6.2.1 Model popisující formování pórů na povrchu PS

Na základě experimentálních a teoretických poznatků [115] byl navržen model popisující formování povrchových pórů v průběhu časově sekvenovaného dávkování směsi dobrého a špatného rozpouštědla na povrch, Obr. 10.

## Krok 1.

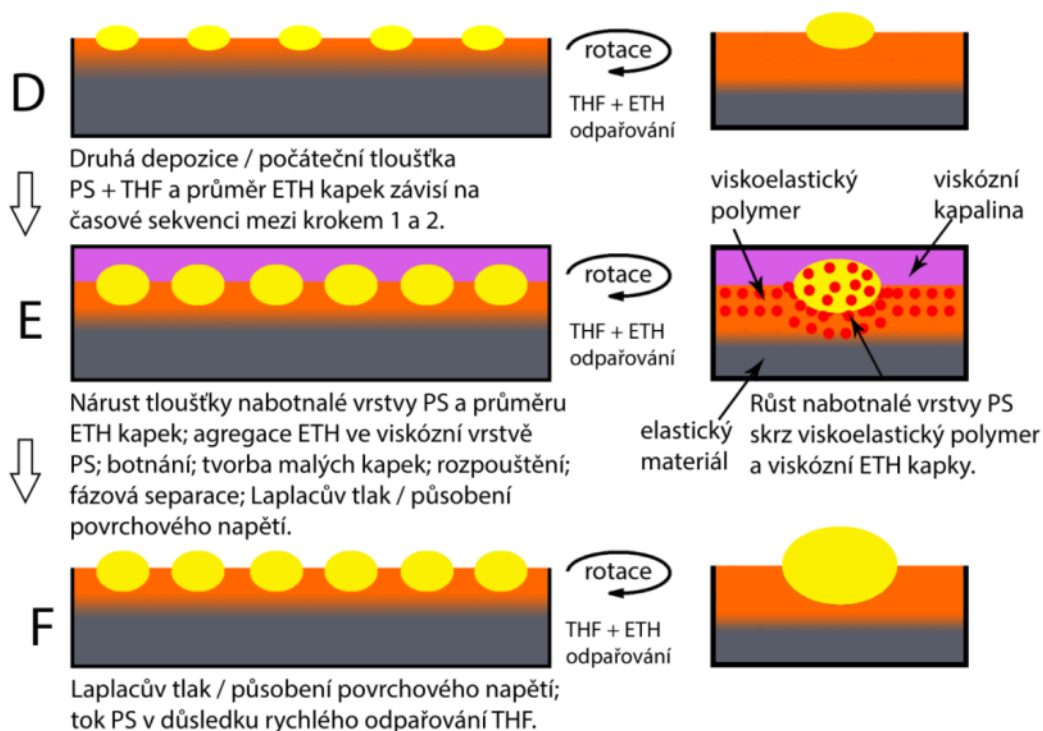


## Legenda:



THF - Tetrahydrofuran  
ETH - 2-Ethoxyethanol  
PS - Polystyren

## Krok 2.



Obrázek 10 - 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 [115].

V prvním kroku, Obr 10-1A, je na rotující PS misku deponováno 200  $\mu$ 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 přídavek 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. 10-1B. 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. 10-1C, 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 nerovnosti (generaci pórů o větším průměru a hloubce) je nezbytné celý proces opakovat, jak je patrné z Obr. 10B až F. Několika-násobné opakování procesu depozice 200  $\mu$ 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. 10D, má za následek růst tloušťky povrchově nabotnalé vrstvy PS – THF, migraci, agregaci (koalescenci) a růst separovaných mikrokapiček ETH, viz. Obr. 10E. 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. 10D 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. 10E. V konečné fázi tohoto kroku depozice, Obr. 10E, zůstává na povrchu pouze povrchově nabotnalá vrstva PS a mnohem větší kapky ETH, které neobsahují THF.

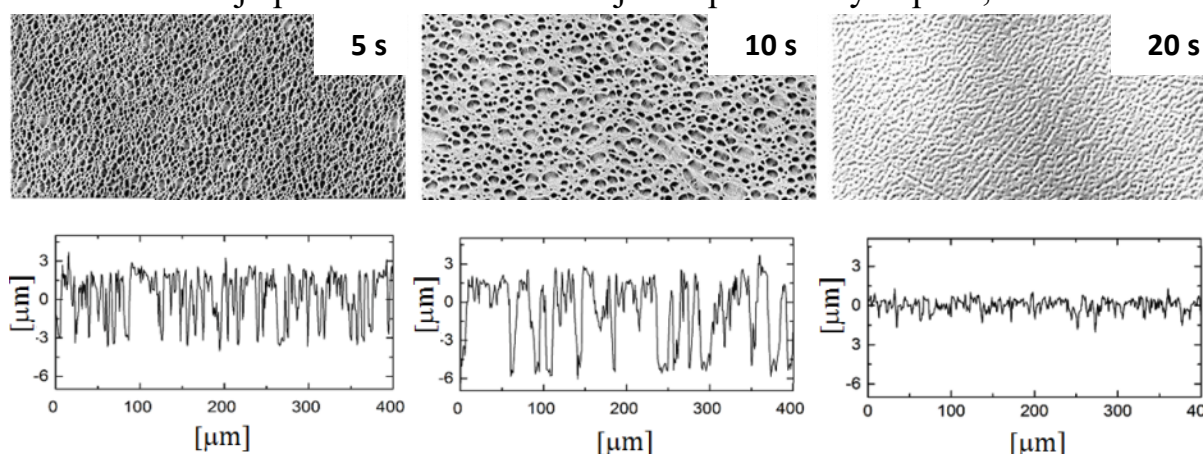
Proces formování povrchu PS je v tomto kroku, spojen s podobnými ději jako v předešlém kroku a dá se shrnout následovně: **difúze THF do PS, nárůst**

**povrchově nabotnalé vrstvy PS, viskoelastická fázová separace, reformování (agregace) mikrokapek ETH, vtačování 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 vyplynulo z experimentálních výsledků, druh povrchové textury není určován pouze časově sekvenovaným dávkování 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 podmínovaná prouděním plynu nad vzorkem, teplotou prostředí, teplotou vzorku a roztoku [115].

### 6.2.1 Vliv časového intervalu dávkování

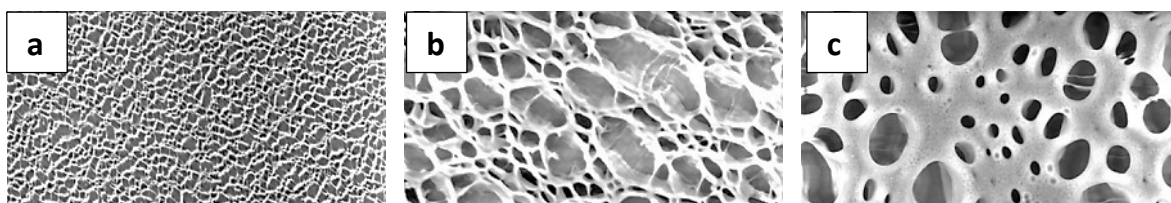
Klíčovou proměnou nově navrženého postupu je časová prodleva mezi krokem 1 a 2 uvedeným na Obr. 10. Délka časové sekvence dávkování směsi THF s ETH zásadně ovlivňuje počet a velikost vznikajících povrchových pórů, Obr. 11.



*Obrázek 11 - Vliv časového intervalu dávkování 5 x 200  $\mu\text{l}$  směsi THF:ETH v poměru 1,25: 8,75 na změnu hloubky povrchových prohlubní. Profilové řezy uvedené pod obrázky byly pořízeny pomocí kontaktního profilometru.*

### 6.2.2 Vliv poměru složek v modifikačním roztoku

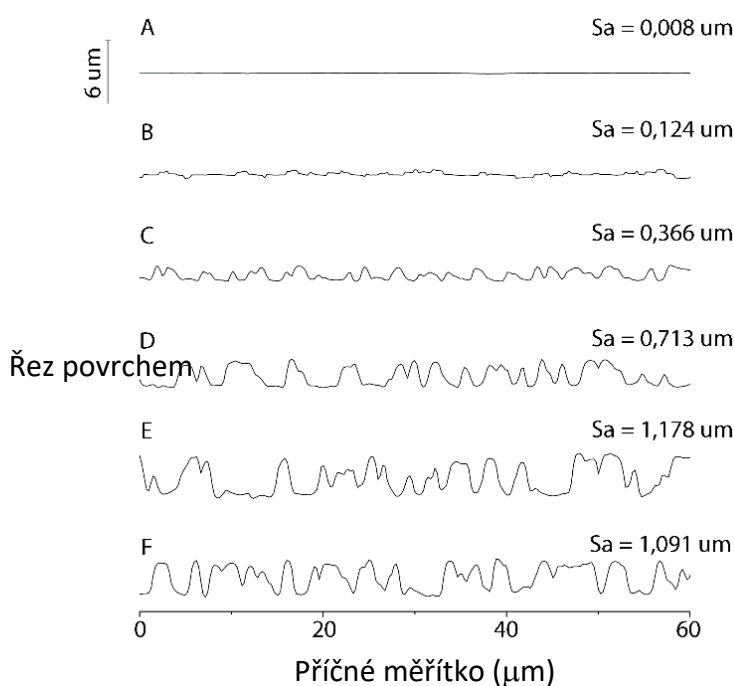
Z výše uvedeného a literárních poznatků [14, 52] plyne, že mezi rozhodující faktory podmiňující vznik specifického povrchového zvrásnění patří poměr složek ve směsi dobrého a špatného rozpouštědla. Význam této proměnné demonstruje Obr. 12.



Obrázek 12 - Vliv objemového poměru THF : ETH na změnu povrchové reliéfu PS. Objemový poměr THF:ETH a) 1: 9, b) 1,5: 8,5, c) 2: 8. Velikost obrázků pořízených pomocí SEM je 67x33  $\mu\text{m}$ .

### 6.2.3 Vliv počtu dávek

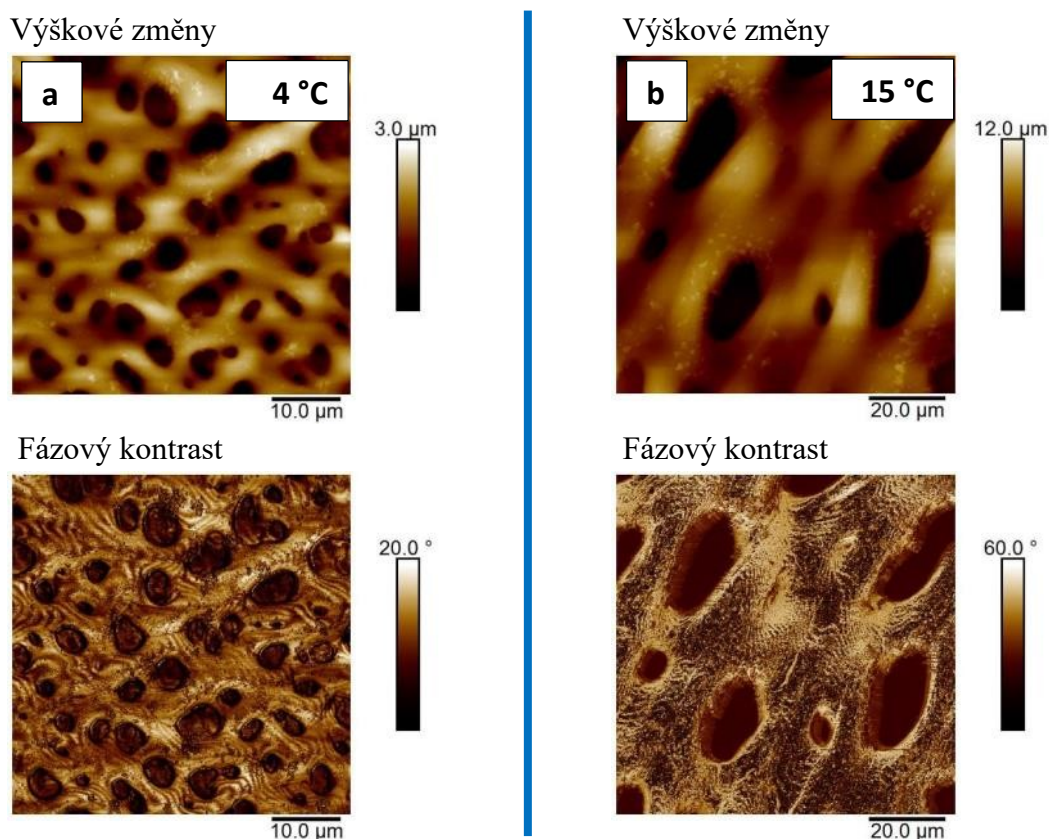
Další zásadní proměnou determinující velikost a hloubku povrchových prohlubní je počet deponovaných dávek směsi THF s ETH. Jak bylo diskutováno v rámci navrženého modelu, který popisuje vznik těchto prohlubní, postupné opakování depozice směsi dobrého a špatného rozpouštědla má za následek zvyšování 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. 13.



Obrázek 13 - Vývoj povrchového reliéfu PS v závislosti na počtu 200  $\mu\text{l}$  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.

#### 6.2.4 Vliv teploty nanášeného rozpouštědla na vývoj povrchového reliéfu

S teplotou se mění 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].

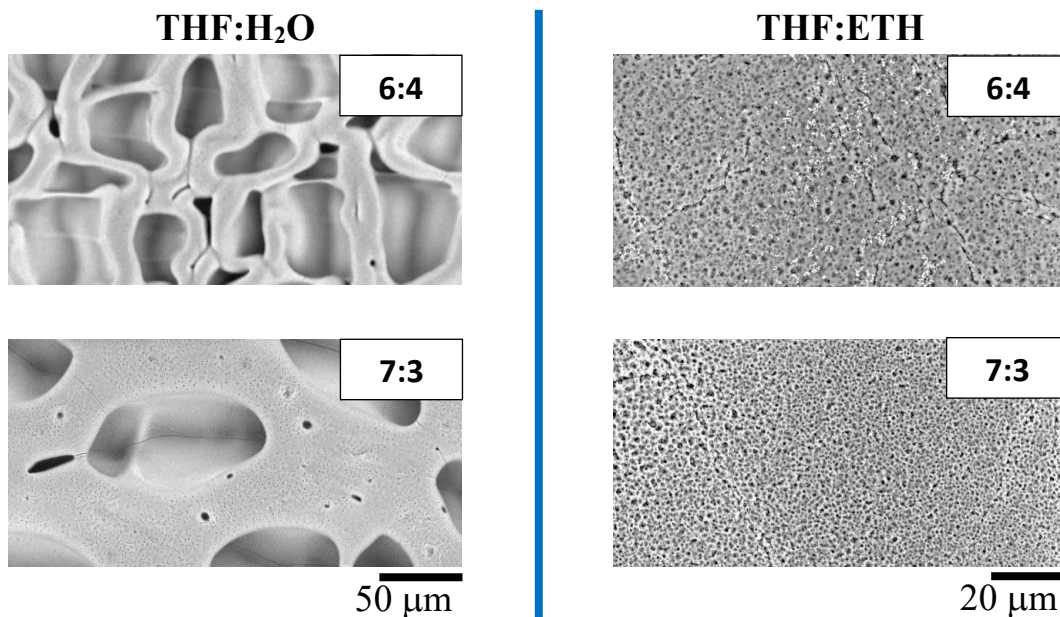


Obrázek 14 - Vliv teploty roztoku THF:ETH (2:8) na změnu povrchové reliéfu PS. Na povrch dávkováno 5 x 200  $\mu$ l po 5s při teplotě THF:ETH **a) 4 °C (levý sloupec), b) 15 °C (pravý sloupec)**. Teplota PS a okolní atmosféry byla 22 °C. Nahoře obrázky ze SEM. Dole obrázky AFM.

V případě polymerních vrstev, ze kterých se rychle odpařuje rozpouštědlo, mohou dále významnou roli hrát koncentrační gradienty [75, 121], které následně akcelerují vznikající toky materiálu na fázových rozhraních kapalina/plyn. 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 přeuspořádání polymerní matrice a s tím související fixaci reziduálních pnutí v povrchové vrstvě PS, které lze pozorovat na Obr. 14.

#### 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].

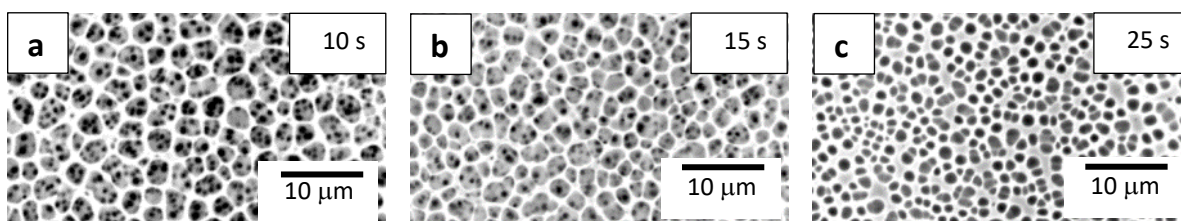


Obrázek 15 - Vliv typu použitého špatného rozpouštědla vzhledem k PS. V levém sloupci výsledky pro rozdílné poměry THF s H<sub>2</sub>O, vpravo pro THF s ETH. Na povrch dávkováno 5 x 200 μl po 5s při laboratorní teplotě. Obrázky ze SEM, vlevo 268 x 134 μm, vpravo 134 x 67 μm.

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. 15.

### 6.2.6 Kondenzace špatného rozpouštědla na povrchu postupně nanášeného roztoku PS

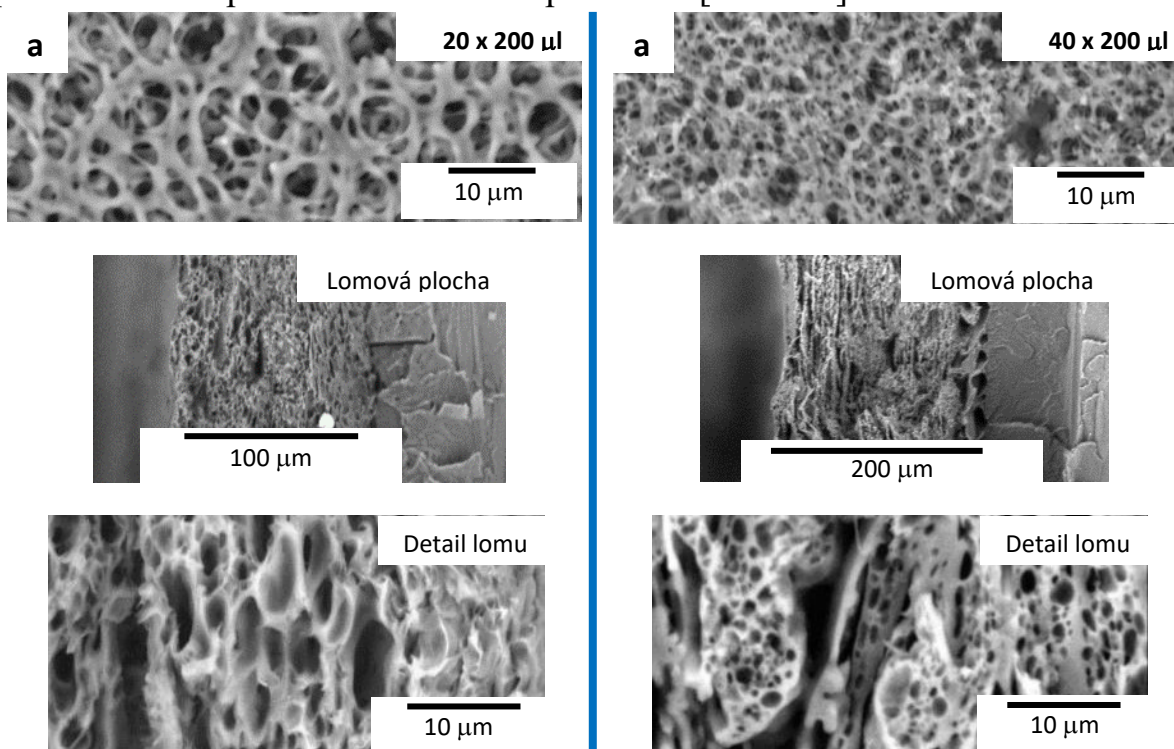
Ve snaze o pochopení role vzdušné vlhkosti na proces tvorby porézní struktury na povrchu PS byl proveden experiment, během kterého byl na skleněný povrch deponován roztok PS v THF. To znamená, že do polymerní směsi nebylo přidáno špatné rozpouštědlo, ETH nebo H<sub>2</sub>O, jako pórtvorná složka. Z výsledků tohoto experimentu vyplynulo, že pomocí nově navrženého časově sekvenovaného fázově separačního postupu lze připravovat porézní systémy vznikající na principu literárně popsání metody „Breath figures“ [60, 68, 89, 122]. To znamená, že šablonu pro vznikající povrchové prohlubně tvoří do podoby mikrokapek kondenzující vzdušná vlhkost, Obr. 16.



Obrázek 16 - 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.

### 6.2.1 Porézní a strukturované PS vrstvy – fázová inverze

V případě fázové separace z roztoku polymeru v dobrém rozpouštědle s přidavkem špatného rozpouštědla mluvíme o fázové inverzi, vyvolané přednostním odpařování dobrého rozpouštědla [123-128].



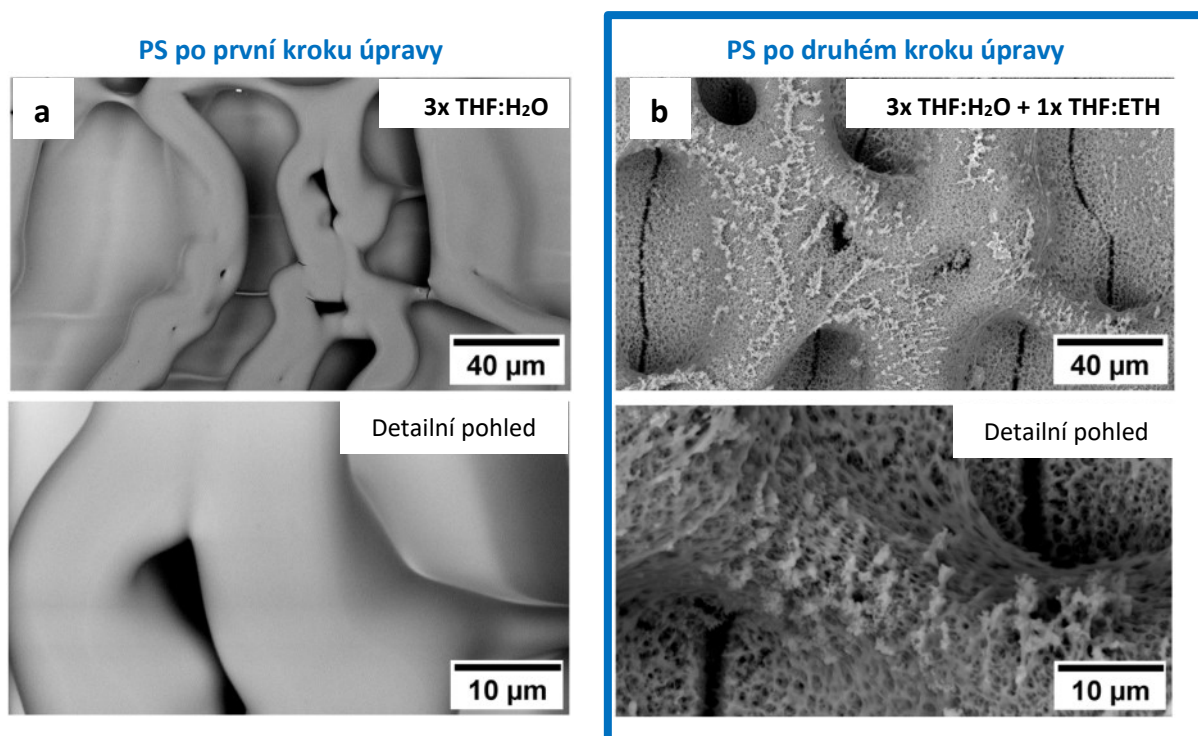
Obrázek 17 - Vliv počtu deponovaných dávek a) 20x b) 40x 200 µl směsi 10 ml THF s 20 ml EHT a 2,68g PS v časové intervalu 7s na změnu tloušťky objemově porézní vrstvy. Obrázky ze SEM.

Jak vyplynulo z provedených experimentů, zásadní proměnou v rámci těchto experimentů je nalezení nejvhodnějšího podílu PS a ETH v roztoku. 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. 17. Jak

vyplýnulo z analýzy lomových ploch, tloušťka těchto vrstev roste s počtem deponovaných dávek ve zvoleném časovém intervalu. 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

Zjednodušeně si lze hierarchicky strukturovaný povrch představit například jako makro porézní systémy pokryté mikronovými, submikronovými nebo nanometrovými strukturami. Z rozměrového hlediska můžeme na rozdílné rozměrové úrovně v rámci této práce pohlížet následovně: **makro** (nad 50  $\mu\text{m}$ ), **meso** (10  $\mu\text{m}$  – 50  $\mu\text{m}$ ), **mikro** (0,1-10  $\mu\text{m}$ ) a **nano** (pod 100 nm).

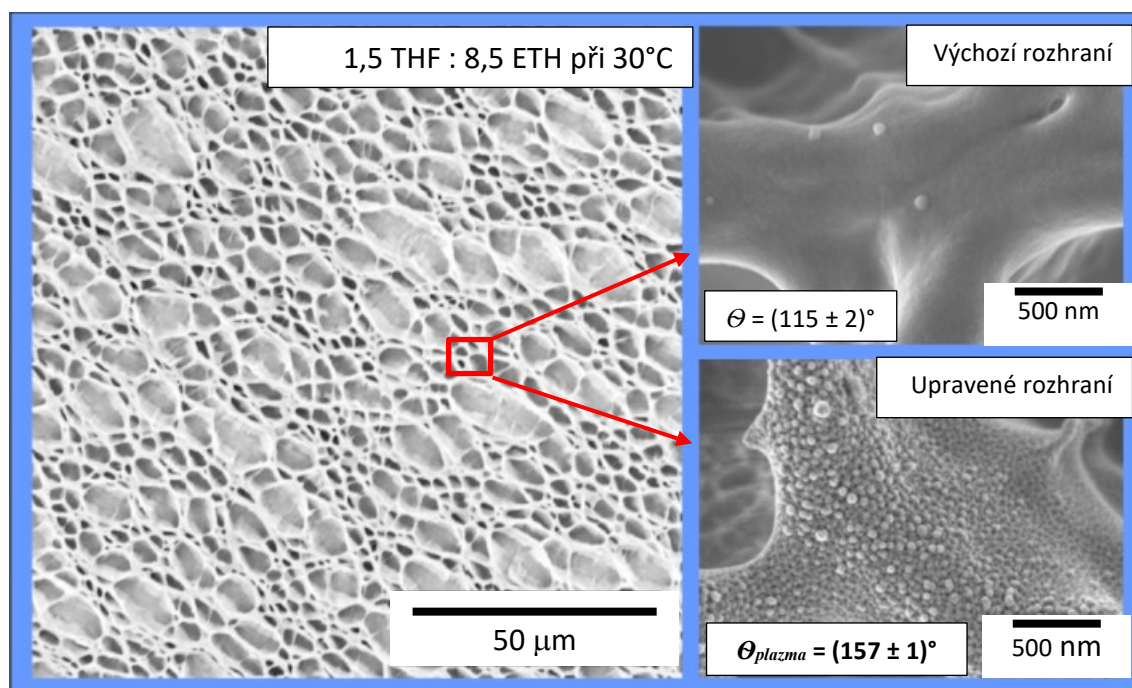


Obrázek 18 - Hierarchicky strukturované PS povrchy připravené pomocí dvou rozdílných směsí rozpouštědel: Hladký povrch PS misky byl upravován: **a) v prvním kroku** na povrchu dávkováno 3 x 300  $\mu\text{l}$  **THF:H<sub>2</sub>O** v poměru 5,6:4,4 v časovém intervalu 5s při 1500 ot/min., **b) v druhém kroku** na povrch deponováno 1 x 300  $\mu\text{l}$  **THF:ETH** v poměru 1:2 při 1500 ot/min. Úprava povrchů probíhala při 23°C. Obrázky ze SEM.

Byl navrhnout postupný fázově separační postup, který vede k přípravě hierarchicky povrchů, Obr. 18.

### 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  $CF_4$ . 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  $150^\circ$ , Obr. 19.



Obrázek 19 - Vliv plazmatické úpravy na změnu kontaktního úhlu smáčení vodou  $\theta$  plynoucí ze změny povrchového zvrásnění a chemického složení ( $CF_4$ ) na rozhraní povrchových pórů připravených pomocí 5 x 200 μl THF:ETH v poměru 1,5:8,5 při teplotě roztoku  $22^\circ C$ , při teplotě  $30^\circ C$ . Výkon plazma reaktoru 300W. Obrázky ze SEM [129].

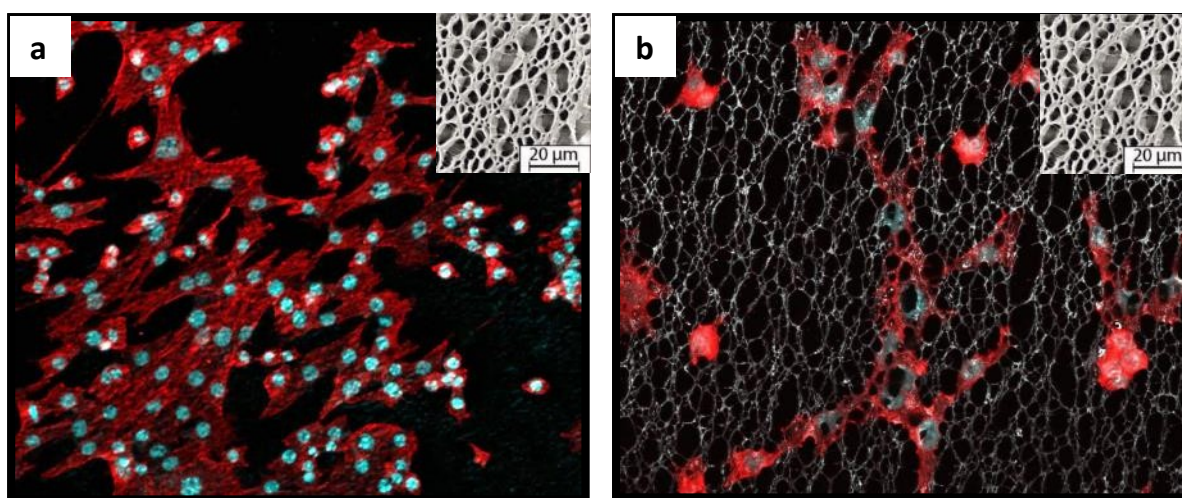
Z hlediska výsledné hodnoty kontaktního úhlu smáčení vodou po plazmatické úpravě je nutné uvažovat typ rozhraní mezi prohlubněmi generovanými pomocí navrženého vícekrokového fázově separačního procesu pomocí THF s ETH.

### 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. 20. První výsledky věnované vlivu povrchových mikroprohlubní na povrch tkáňového PS byly prezentovány v rámci naší publikované práce popisující nově navržený fázově separační postup [115].



Z výsledků prezentovaných na Obr. 20 vyplynulo, že specificky strukturované povrchy mohou lépe simulovat nativní prostředí pro adherentní typy buněk. Bez ohledu na viabilitu buněk diskutovanou v publikované práci [115] lze na strukturovaných površích sledovat preferenční orientaci cytoskeletonu v souladu s orientací mikropórů. Jádro buněk je v tomto případě situováno uvnitř póru. 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 [115].

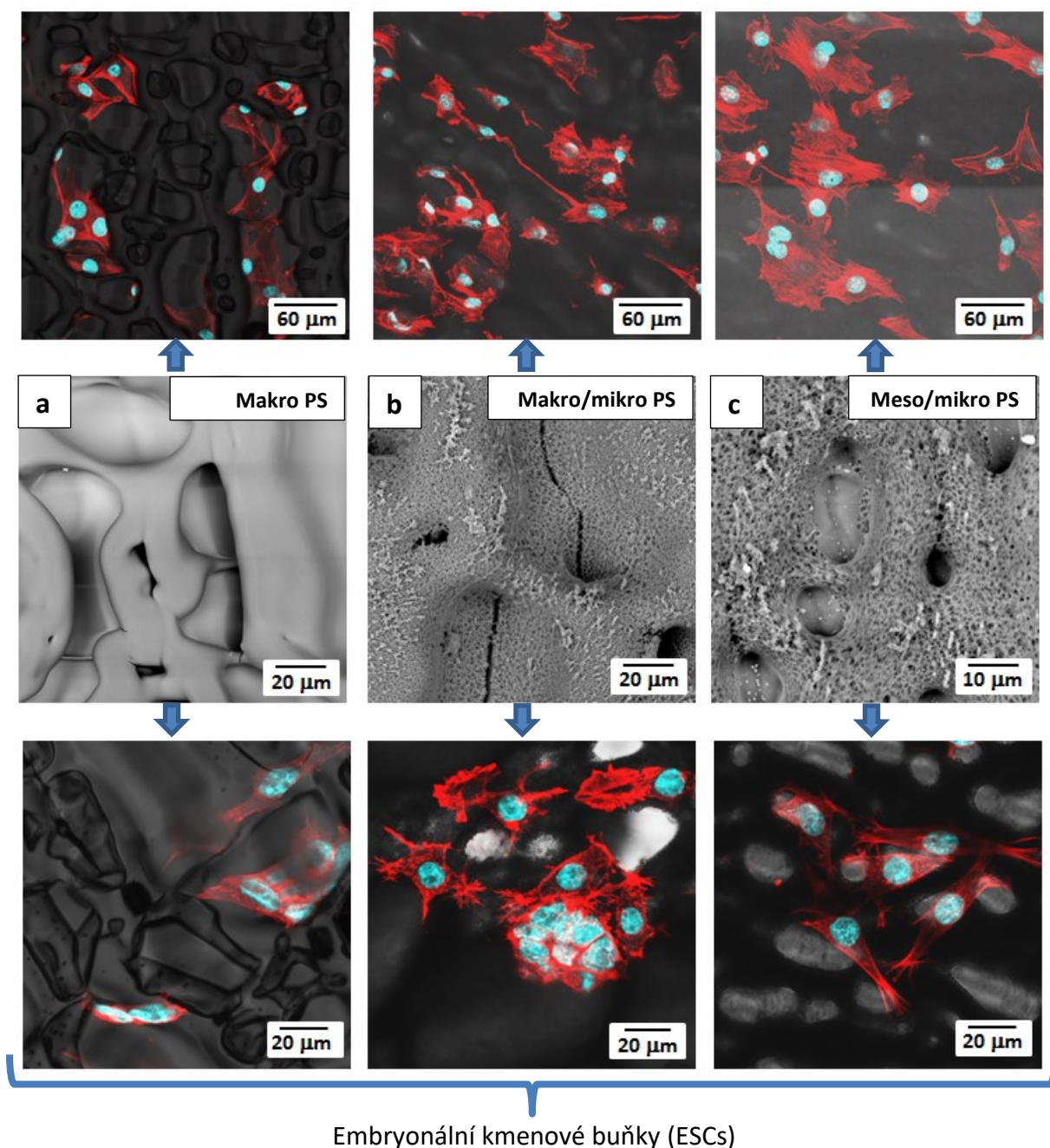


Obrázek 20 - Znárodnění cytoskeletu a jader buněk NIH/3T3 pomocí konfokálního mikroskopu. Jádra buněk jsou znázorněna modře. Na obrázku **a**) rozmístění buněk na povrchu bez zobrazení povrchových nerovností. Vpravo na obrázku **b**) znázorněno rozprostírání cytoskeletu přes rozhraní povrchových mikropórů. V pravém horním rohu náhledy na povrchovou mikrostrukturu získané pomocí SEM.

### 6.2.5 Vliv hierarchicky strukturovaných PS povrchů na chování buněk

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

Myší embryonální fibroblasty NIH/3T3



Embryonální kmenové buňky (ESCs)

*Obrázek 21 - Srovnání dvou buněčných linií na rozdílně strukturovaných PS površích. 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. 21 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. V případě kontaktu s hierarchicky strukturovaným Makro/mikro PS respektive Meso/mikro PS lze pozorovat

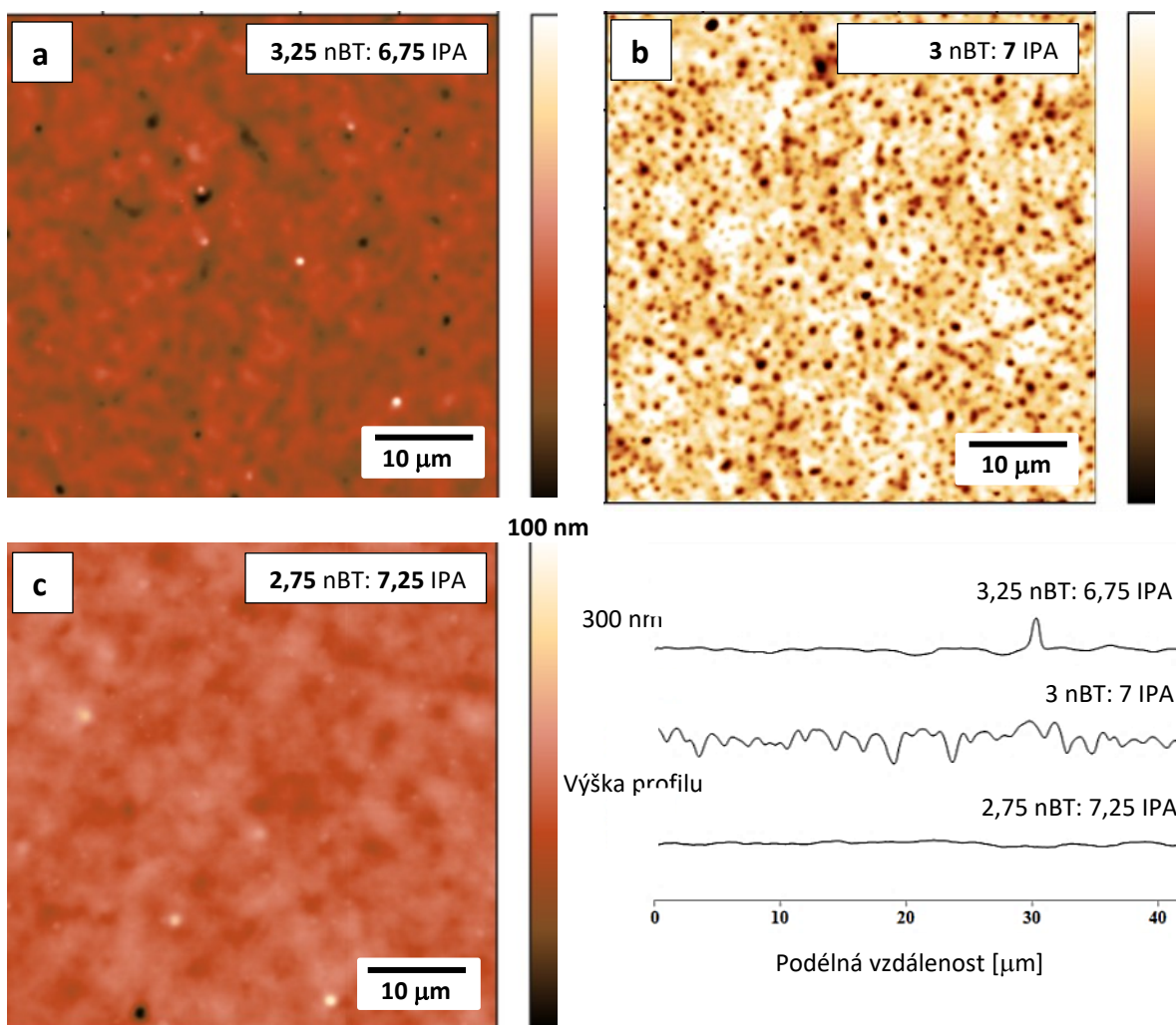
významné změny v jejich cytoskeletu, Obr. 21b, c. Tyto změny do jisté míry reflektují orientaci podkladních povrchových nerovností. Jádra buněk jsou preferenčně situované uvnitř povrchových pórů. Z těchto pozorování lze usuzovat na jejich diferenciaci podobně, jak je v literatuře diskutováno s ohledem na vliv povrchových nerovností na diferenciační proces [130-132].

### **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 hyaluronan sodný. 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, 122]. Oproti tomu takovéto postupy úpravy povrchů polysacharidů zcela chybí.

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.

Z fázově separačních experimentů vyplynulo, že povrch HA nelze upravovat bez předešlého nabobtnání vodou. 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. 22.



Obrázek 22 - Srovnání vlivu poměru nBT:IPA na vznik zvrásnění na povrchu HA. V prvním kroku bylo na povrch dávkováno 3 x 200  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  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  $\mu\text{l}$  nBT s IPA v časovém intervalu 5s, při 23°C a 2100 ot/min. Obrázky a profilové řezy z AFM.

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 překvapujícím, 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 [133, 134]. 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). Fibroinové vrstvy pro fázově separační experimenty byly připravovány odléváním do PS Petriho misek s následnou solidifikací při laboratorní teplotě v digestoři.

Z 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. 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. Byl studován vliv množství přidané H<sub>2</sub>O, DMSO, počtu dávek, časové prodlevy dávkování a rychlosti rotace modifikovaných povrchů na vznik rozdílných typů povrchových struktur.

Po překročení určitého množství DMSO v modifikační směsi nedochází k dalšímu nárůstu počtu povrchových prohlubní.

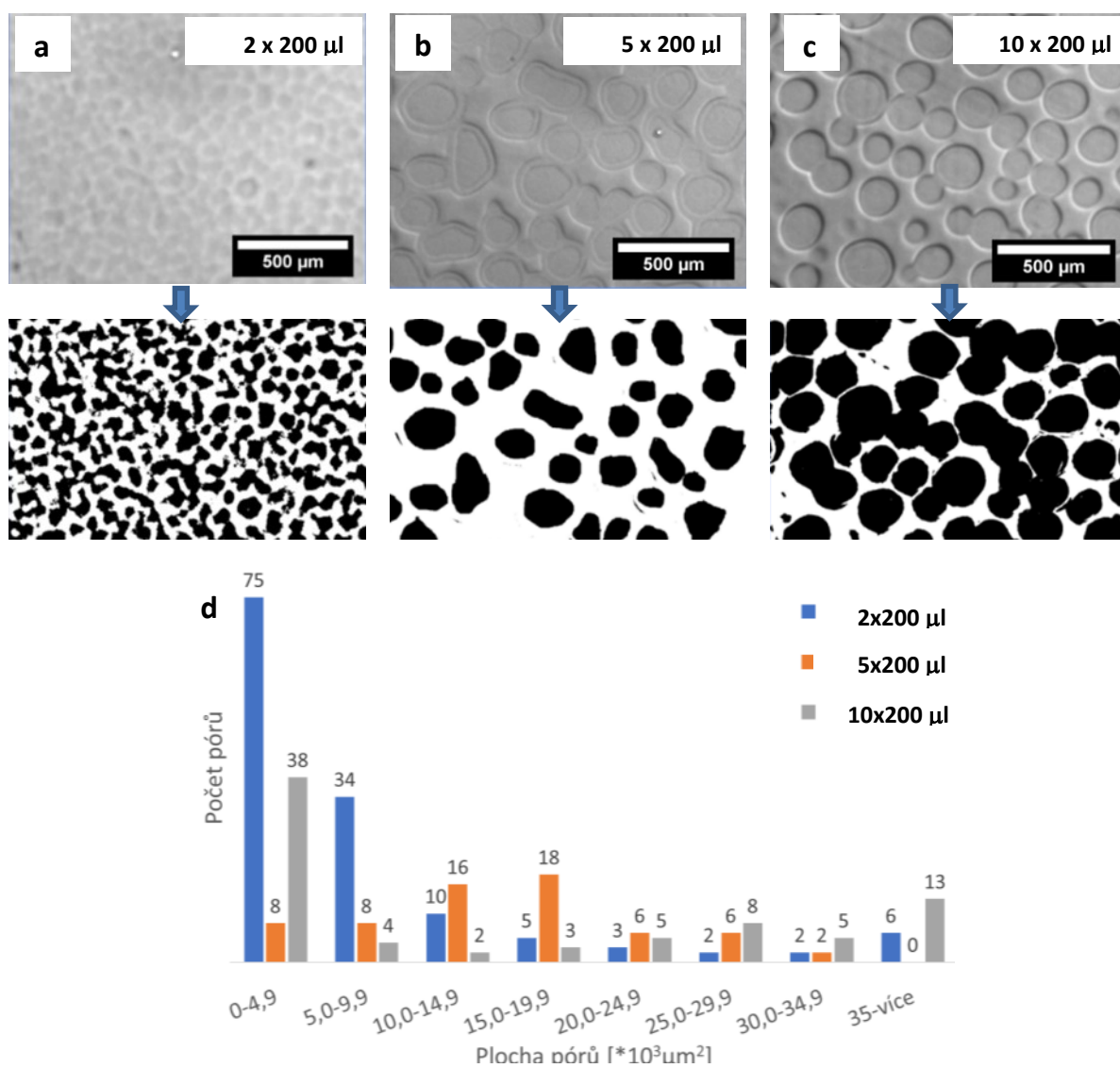
Se změnou počtu nanášených dávek směsi HFIP+H<sub>2</sub>O+DMSO na upravovaný povrch BMF roste velikost vznikajících prohlubní, Obr. 23, podobně jako v případě úpravy povrchů na bázi PS a HA. Z obrázku 23b, c je patrné, že tyto změny jsou doprovázeny koalescencí vznikajících prohlubní do větších celků.

Pro úpravu BMF povrchu je potřeba volit kratší časové prodlevy mezi depozičními jednotlivých dávek podobně jako v případě úpravy povrchu HA.

Rotace vzorku napomáhá jednak rychlému rozprostírání modifikačního roztoku HFIP+H<sub>2</sub>O+DMSO 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.

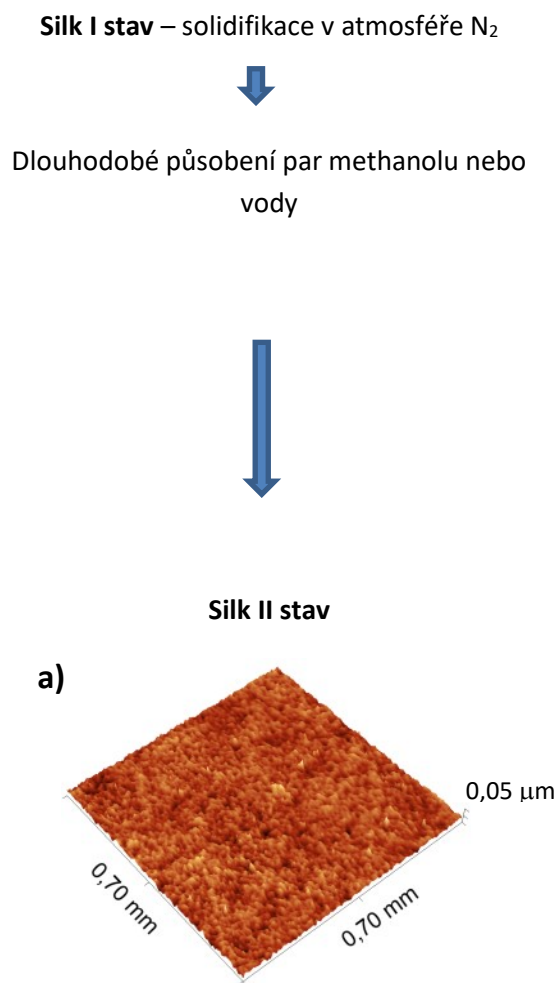
Z následného studia odborné literatury [135-138] vyplynulo, že tyto podmínky podmiňují přeskládání BMF z amorfního stavu v podobě  $\alpha$  helixů do stavu  $\beta$  skládaných listů. Systém s převažujícím množstvím  $\alpha$  helixu je v literatuře označován jako Silk I, zatímco stav s  $\beta$  skládanými listy se označuje jako Silk II. BMF ve stavu Silk I je charakteristický lepší rozpustností a horšími

mechanickými vlastnosti. 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 [139] a bakalářské práce Petronely Černé [140].

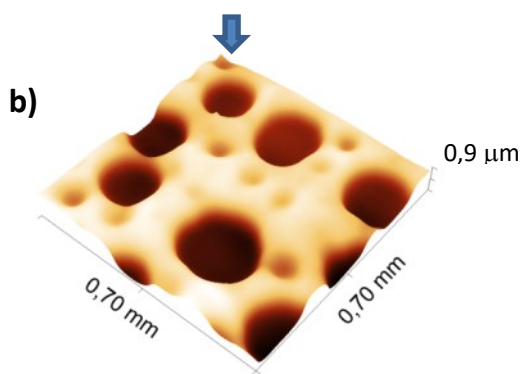


Obrázek 23 - Změny povrchové struktury BMF filmů připravených z HFIP v závislosti na počtu nanášených dávek HFIP+H<sub>2</sub>O+DMSO. Obrázky z optického mikroskopu. d) histogram plošných průřezů póry.

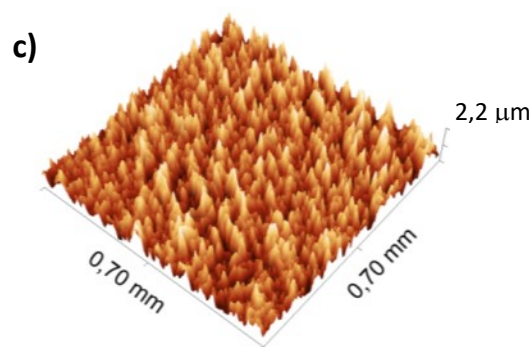
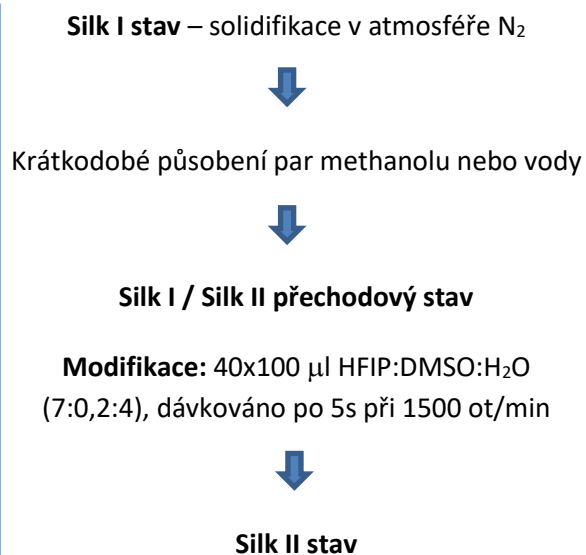
Na základě těchto zjištění byl optimalizován postup přípravy BMF vrstev tak, aby došlo k eliminaci nekontrolovaného působení vzdušné vlhkosti na solidifikované BMF vrstvy. Sušení probíhalo v exikátoru profukovaném N<sub>2</sub>. Pomocí takového sušícího postupu lze připravovat vrstvy BMF ve stavu Silk I. Tento stav lze použít pro úpravu povrchů metodou „Breath figures“, což se doposud nepředpokládalo za možné.



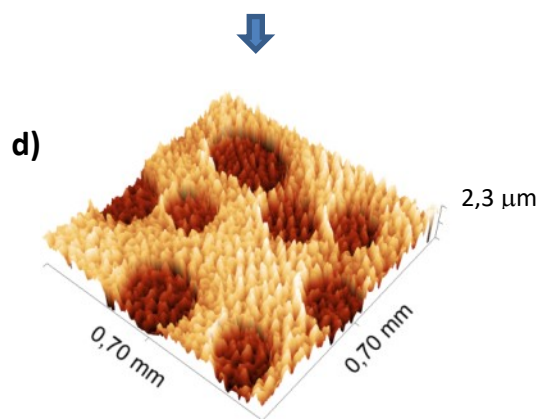
**Modifikace:** 10x200 μl HFIP:DMSO:H<sub>2</sub>O (7:0,2:4), dávkováno po 5s při 1500 ot/min



**Makroporézní BMF povrch s hladkými rozhraními**



**Modifikace:** 10x200 μl HFIP:DMSO:H<sub>2</sub>O (7:0,2:4), dávkováno po 5s při 2400 ot/min



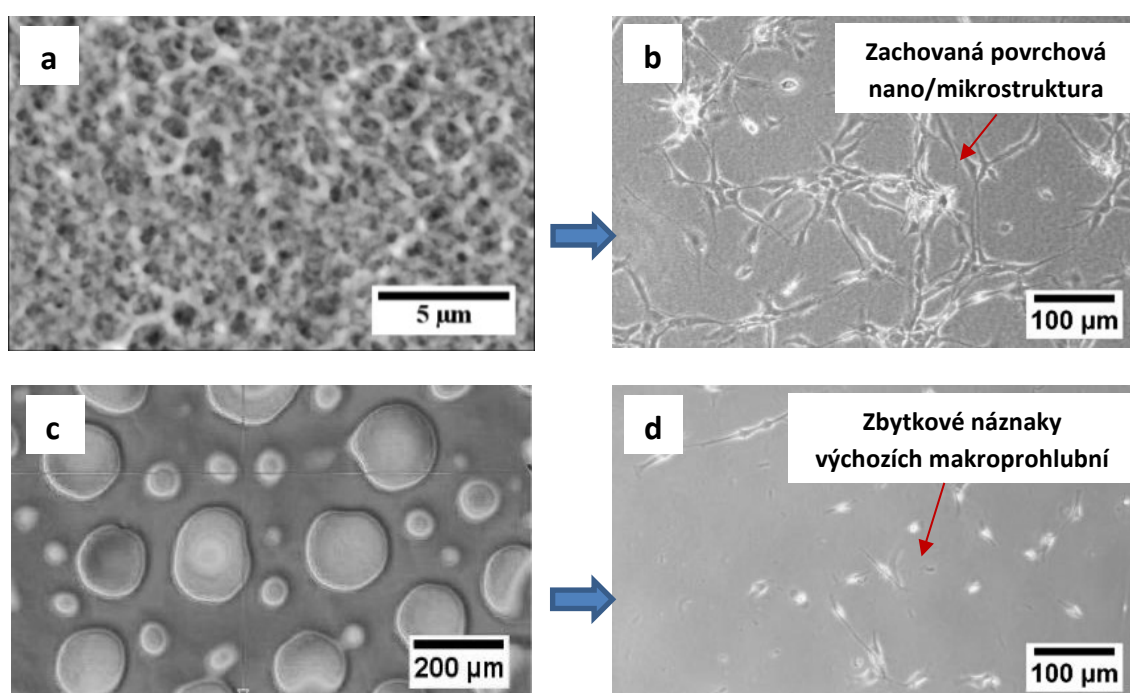
**Hierarchicky strukturovaný BMF povrch**

Obrázek 24 - Postup přípravy nano, mikro, makro a hierarchicky strukturovaných BMF povrchů pomocí časově sekvenovaného dávkování směsi HFIP s DMSO a H<sub>2</sub>O. Obrázky z optického profilometru.

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 vodního prostředí, Obr. 24a,b. Systémy ve stavu Silk II lze upravovat do podoby makroprohlubní uvedených na Obr. 24c,d.

### 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. 25. Povrchová struktura uvedená na Obr. 25a odpovídá Obr. 24c. Struktura na Obr. 25c odpovídá Obr. 24b.



Obrázek 25 - 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 [141-144], zatímco PS se hodí spíše pro modelový popis vlivu rozdílně strukturovaných vrstev na chování buněk. Nevýhodnou konstrukcí na bázi BMF je především nízká adheze buněk k jejich povrchu [145-149]. Jednou z cest, jak tento nedostatek odstranit je cílená strukturalizace BMF povrchů, jak vyplynulo z experimentálních výsledků uvedených na Obr. 25. 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. 25a. Na takovémto povrchu můžeme pozorovat mnohem více zachycených buněk, Obr. 25b, v porovnání s povrchy vyznačujícími se před depozicí buněk makroskopickými prohlubněmi, Obr. 25c, 25d. Skutečnost, že zde porovnávaný typ buněk (osteoblasty, MC3T3-E1) na tomto povrchu nedrží, 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. 25a, jsou tyto struktury stále po dobu celého kultivačního procesu. Z odborné literatury je známo, že makro a mikroprohlubně mohou sloužit pro zachytávání buněk [14, 150-152]. 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 [153], což se povedlo v případě povrchu uvedeného na Obr. 25a.

## **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 nabotnalém polymerním povrchu.

Rozdělení nanášeného směšného 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 depozicí jednotlivých dávek. Pro tyto účely bylo navrženo softwarové rozhraní, které umožňuje vytvářet vícekrokové 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 extracelulárních 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 botnat 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] Jaggesar 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, Svorcik 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] Escale 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] Srinivasarao M, Collings D, Philips A, Patel S. Three-dimensionally ordered array of air bubbles in a polymer film. *Science*. 2001;292:79-83.
- [94] Widawski G, Rawiso M, Francois B. Self-Organized Honeycomb Morphology of Star-Polymer Polystyrene Films. *Nature*. 1994;369:387-9.
- [95] Ming W, Wu D, van Benthem R, de With G. Superhydrophobic films from raspberry-like particles. *Nano Lett*. 2005;5:2298-301.
- [96] 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.
- [97] Rayleigh. Breath Figures. *Nature*. 1911;86:416.
- [98] Bunz UHF. Breath Figures as a Dynamic Templating Method for Polymers and Nanomaterials. *Advanced Materials*. 2006;18:973-89.
- [99] Hernandez-Guerrero M, Stenzel MH. Honeycomb structured polymer films via breath figures. *Polymer Chemistry*. 2012;3:563-77.
- [100] 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.
- [101] Jenekhe SA, Chen XL. Self-Assembly of Ordered Microporous Materials from Rod-Coil Block Copolymers. *Science*. 1999;283:372-5.
- [102] Sun H. Ordered Honeycomb-Patterned Films via Breath Figures 2010.
- [103] Beysens D. Dew nucleation and growth. *Comptes Rendus Physique*. 2006;7:1082-100.
- [104] 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.
- [105] Beysens D, Steyer A, Guenoun P, Fritter D, Knobler CM. How does dew form? *Phase Transitions*. 1991;31:219-46.
- [106] Family F, Meakin P. Scaling of the Droplet-Size Distribution in Vapor-Deposited Thin Films. *Physical Review Letters*. 1988;61:428-31.
- [107] Fritter D, Knobler CM, Roux D, Beysens D. Computer simulations of the growth of breath figures. *Journal of Statistical Physics*. 1988;52:1447-59.
- [108] 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.
- [109] Briscoe BJ, Galvin KP. Breath figures. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 1990;23:1265.
- [110] Rogers TM, Elder KR, Desai RC. Droplet growth and coarsening during heterogeneous vapor condensation. *Physical Review A*. 1988;38:5303-9.
- [111] 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.
- [112] 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.
- [113] 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.

- [114] 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.
- [115] Wrzeczionko 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.
- [116] 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.
- [117] 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.
- [118] Samuel A, Umopathy 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.
- [119] 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.
- [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] 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.
- [122] 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.
- [123] 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.
- [124] Kim J-H, Lee K-H. Effect of PEG additive on membrane formation by phase inversion. *Journal of Membrane Science.* 1998;138:153-63.
- [125] Strathmann H, Kock K. The formation mechanism of phase inversion membranes. *Desalination.* 1977;21:241-55.
- [126] Sukitpaneenit 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.
- [127] Kimmerle K, Strathmann H. Analysis of the structure-determining process of phase inversion membranes. *Desalination.* 1990;79:283-302.
- [128] Strathmann H, Kock K, Amar P, Baker RW. The formation mechanism of asymmetric membranes. *Desalination.* 1975;16:179-203.
- [129] Minarik M, Wrzeczionko 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.
- [130] Jhala D, Vasita R. A Review on Extracellular Matrix Mimicking Strategies for an Artificial Stem Cell Niche. *Polym Rev.* 2015;55:561-95.
- [131] 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.
- [132] 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.

- [133] Bradáčová M. Příprava mikro-strukturovaných povrchů na bázi polysacharidu [Diplomová práce]: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně; 2017.
- [134] Bognerová E. Pevné formy hyaluronanu sodného a jeho vlastnosti [Bakalářská práce]: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně; 2018.
- [135] Andersson M, Johansson J, Rising A. Silk Spinning in Silkworms and Spiders. *Int J Mol Sci.* 2016;17:14.
- [136] Wilson D, Valluzzi R, Kaplan D. Conformational transitions in model silk peptides. *Biophysical Journal.* 2000;78:2690-701.
- [137] Kaplan DL. Fibrous proteins - silk as a model system. *Polym Degrad Stabil.* 1998;59:25-32.
- [138] Laity PR, Gilks SE, Holland C. Rheological behaviour of native silk feedstocks. *Polymer.* 2015;67:28-39.
- [139] Kocourková K. Příprava strukturovaných biopolymerních povrchů a studium jejich interakce s buňkami [Diplomová práce]: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně; 2019.
- [140] Černá P. Úprava a charakterizace biopolymerních povrchů [Bakalářská práce]: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně; 2020.
- [141] Vepari C, Kaplan DL. Silk as a biomaterial. *Progress in Polymer Science.* 2007;32:991-1007.
- [142] Holland C, Numata K, Rnjak-Kovacina J, Seib FP. The Biomedical Use of Silk: Past, Present, Future. *Adv Healthc Mater.* 2019;8:26.
- [143] 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.
- [144] 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.
- [145] 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.
- [146] Leal-Egana A, Scheibel T. Interactions of cells with silk surfaces. *Journal of Materials Chemistry.* 2012;22:14330-6.
- [147] 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.
- [148] Thurber AE, Omenetto FG, Kaplan DL. In vivo bioresponses to silk proteins. *Biomaterials.* 2015;71:145-57.
- [149] 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.
- [150] 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.
- [151] 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.
- [152] 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.
- [153] 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 -	Model vzniku porézních systémů pomocí metody Breath figures.....	13
Obrázek 2 -	<b>a)</b> Difúze toluenu do polystyrenu pokrytého sedící kapkou .....	14
Obrázek 3 -	Snímky fázové kontrastu pořízeného pomocí AFM. Zobrazení.....	15
Obrázek 4 -	Změna povrchového reliéfu PS v závislosti na rozdělení.....	18
Obrázek 5 -	Změna smáčecích charakteristik povrchu PS vodou s rostoucím.....	19
Obrázek 6 -	Vyvinuté zařízení pro modifikaci povrchové topografie. ....	19
Obrázek 7 -	Konstrukční části dávkovací jednotky TSSC zařízení. ....	20
Obrázek 8 -	Softwarové okno TSSC zařízení. ....	21
Obrázek 9 -	Průtočný box TSSC zařízení pro definovaný přívod/odvod. ....	22
Obrázek 10 -	Model popisující průběh tvorby pórů při časově sekvenovaném .....	23
Obrázek 11 -	<b>Vliv časového intervalu</b> dávkování 5 x 200 $\mu$ l směsi THF:ETH. ....	25
Obrázek 12 -	Vliv objemového poměru THF : ETH na změnu povrchové.....	26
Obrázek 13 -	Vývoj povrchového reliéfu PS v závislosti na počtu. ....	26
Obrázek 14 -	Vliv teploty roztoku THF:ETH (2:8) na změnu povrchového reliéfu. ....	27
Obrázek 15 -	Vliv typu použitého špatného rozpouštědla vzhledem k PS. ....	28
Obrázek 16 -	Změna povrchového reliéfu PS vrstvy připravené postupným.....	29
Obrázek 17 -	Vliv počtu deponovaných dávek <b>a) 20x b) 40x 200 <math>\mu</math>l směsi.</b> ....	29
Obrázek 18 -	Hierarchicky strukturované PS povrchy připravené. ....	30
Obrázek 19 -	Vliv plazmatické úpravy na změnu kontaktního úhlu smáčení .....	31
Obrázek 20 -	Znázornění cytoskeletu a jader buněk NIH/3T3 pomocí. ....	32
Obrázek 21 -	Srovnání dvou buněčných linií na rozdílně strukturovaných. ....	33
Obrázek 22 -	Srovnání vlivu poměru nBT:IPA na vznik zvrásnění .....	35
Po překročení určitého množství DMSO v modifikační směsi nedochází.....		36
Obrázek 23 -	<b>Změny povrchové struktury BMF filmů</b> připravených. ....	37
Obrázek 24 -	Postup přípravy nano, mikro, makro a hierarchicky strukturovaných.....	38
Obrázek 25 -	Chování buněk na rozdílně strukturovaném povrchu BMF.....	39

## Seznam použitých symbolů a zkratk

BF	Breath Figures
PS	polystyren
PMMA	polymethylmethakrylát
PLA	kyselina polyléčná
hm. %	hmotnostní procenta
ot/min	otáčky za minutu
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 <sub>4</sub>	tetrafluormethan
ESCs	embryonální kmenová buňka
NIH/3T3	myší embryonální fibroblast
nBT	n-butanol
HFIP	hexafluoroisopropanol
FA	kyselina fluorovodíková
DMSO	dimethylsulfoxid

## 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, Markéra, 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, **Erik WRZECIONKO**, Antonín MINAŘÍK, et al. Hierarchically structured surfaces prepared by phase separation: Induction of stem cells differentiation. *Článek v recenzním řízení*.

#### **Konferenční příspěvky:**

1. **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
2. MRÁČEK, Aleš, Antonín MINAŘÍK, Martin MINAŘÍK, **Erik WRZECIONKO**, Petr SMOLKA, Ondřej GRULICH, Magda MINAŘÍKOVÁ, Lenka GRUNDĚLOVÁ, 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
3. 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
4. **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
5. 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
6. 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
7. 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 chladičí plocha s rovnoměrným rozvodem tepla či chladu ze zdroje*. Česká Republika. Užitný vzor 30540.

## Odborný životopis autora

Jméno: **Ing. Erik Wrzecionko, Ph.D.**  
Datum narození: 2.8.1989  
Adresa: Vřesovice 237, 696 48 Ježov, Czech Republic  
Email: [wrzecionko@utb.cz](mailto: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 – 2019 Centrum polymerních systémů, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, třída Tomáše Bati 5678, 760 01 Zlín;

### Odborné stáže

- 2017 Měsíční stáž na Slovak University of Technology in Bratislava,  
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.





Ing. Erik Wrzecionko, Ph.D.

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

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

Teze disertační práce

Vydala Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně,  
nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín.

Náklad: vyšlo elektronicky

Sazba: Ing. Erik Wrzecionko, Ph.D.

Publikace neprošla jazykovou ani redakční úpravou.

Rok vydání 2021

Pořadí vydání: první

ISBN 978-80-7678-031-6

