



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

## MIKROSKOPIE ATOMÁRNÍCH SIL POLOTUHÝCH MATERIÁLŮ

ATOMIC FORCE MICROSCOPY OF SOFT MATERIALS

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

### AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Anna Šudáková

### VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.

BRNO 2021

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1674/2020 Akademický rok: 2020/21  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Anna Šudáková**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Jiří Smilek, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Mikroskopie atomárních sil polotuhých materiálů

### Zadání bakalářské práce:

- 1) prostudovat návod k obsluze mikroskopu atomárních sil
- 2) optimalizovat techniku AFM na vybraných modelových systémech
- 3) provést pilotní měření vybraných modelových systémů
- 4) diskutovat naměřené výsledky

### Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Anna Šudáková  
student(ka)

-----  
Ing. Jiří Smilek, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá prostudováním postupu měření a optimalizací podmínek měření pomocí mikroskopu atomárních sil (AFM) s budoucím výhledem na zobrazování a měření mechanických vlastností (např. adheze nebo tuhost materiálu) hydrogelů a polotuhých materiálů na mikroúrovni. Mikroskopie atomárních sil nabývá významu ve výzkumech vzhledem k univerzálnosti metody, kdy je schopná zobrazovat vodivé i nevodivé vzorky, ale zároveň měřit i jejich mechanické vlastnosti, jako je adheze, elasticita nebo tuhost. Výhodou oproti jiným metodám je, že AFM je schopné měřit mechanické vlastnosti nejen na makroúrovni, ale také na lokální úrovni. Optimalizace měřících módů se prováděla na standardním vzorku polystyrenových nanočástic o velikosti jeden mikrometr, kdy byly proměřeny jednotlivé režimy, jako jsou bezkontaktní metoda (*noncontact mode*, *AC Mode Imaging*) a kvantitativním režimem měření (*QI<sup>TM</sup> Advanced Imaging*), kterými lze měřit pomocí AFM. Následovalo měření PVA fólií, měření se provádělo z důvodu toho, že se jednalo o vysušené hydrogely (xerogely), což bude zájmem dalšího studování. Byly vytvořeny z polyvinylalkoholu a chitosanu. Vnitřní prostředí hydrogelů bylo modifikováno úpravou pH (NaOH) nebo změnou iontové síly (NaCl). Dále byl pozorován vliv mrazení na PVA fólii, jedná se o jednu z možností přípravy fyzikálně síťovaného hydrogelu. Tato práce zkoumá také vliv koncentrace fyzikálně síťovaného termoreverzibilního agarosového gelu na jeho porozitu.

## ABSTRACT

This bachelor thesis focuses on atomic force microscopy (AFM), mainly on studying the measurement procedure and optimization of measurement conditions with future perspective on imaging hydrogels and measuring mechanical properties (such as adhesion or stiffness) of hydrogels and semi-rigid materials at the microlevel. Atomic force microscopy is gaining significant importance in research due to its versatility, when it can provide topographical image of conductive and non-conductive samples while measuring mechanical properties of the samples, such as adhesion, elasticity or stiffness. Advantage of AFM method is that it can provide mechanical properties of the samples not only on macro levels as we are used to, for example, from rheology, but also on local level. Optimization was performed on standard sample, one micrometre polystyrene nanoparticles, when the individual modes were measured, such as non-contact (*AC Mode Imaging*) mode and quantitative mode (*QI<sup>TM</sup> Advanced Imaging*). This was followed by the measurement of a PVA foils, the measurement was performed because they are xerogels and will be studied more in the future. They were made with polyvinyl alcohol and chitosan. The internal environment of the hydrogels has been modified by adjusting the pH (NaOH) or by changing the ionic strength (NaCl). Furthermore, the effect of freezing on the PVA foils was observed, it is one of the possible ways of preparation of physically linked hydrogels. This work also examines the effect of porosity on concentration of physically linked thermoreversible agarose gels.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Mikroskopie atomárních sil, bezkontaktní metoda, střídavá kontaktní metoda, hydrogely, mechanické vlastnosti, adheze, optimalizace metod, polyvinylalkoholové fólie (PVA), agarosové gely.

## KEYWORDS

Atomic force microscopy, non-contact mode, tapping mode, hydrogels, mechanical properties, adhesion, method optimization, polyvinyl alcohol foils (PVA), agarose gels.

ŠUDÁKOVÁ, Anna. *Mikroskopie atomárních sil polotuhých materiálů*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/130550>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Jiří Smilek.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Mikroskopie atomárních sil polotuhých materiálů vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....  
Anna Šudáková

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucímu své bakalářské práce, Ing. Jirímu Smilkovi, Ph.D. za vedení, cenné připomínky, odborné rady, které pomohly k vypracování této bakalářské práce. Zároveň bych chtěla poděkovat Ing. Janě Szabové za pomoc při přípravě a měření vzorků, za každou její připomínku a rady při měření. Také děkuji Bc. Zuzaně Bayerové za poskytnuté PVA fólie. Na závěr bych ráda poděkovala své rodině za jejich podporu během celého studia.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>Teoretická část.....</b>	<b>8</b>
2.1	Mikroskopie atomárních sil .....	8
2.1.1	Zobrazovací režimy .....	10
2.1.2	Silová spektroskopie.....	12
2.1.3	Nosník ( <i>cantilever</i> ) a hrot ( <i>probe</i> ).....	13
2.1.4	Příprava vzorků.....	14
2.2	Hydrogely .....	16
2.2.1	Mechanické vlastnosti hydrogelů .....	16
2.2.2	Propustnost (permeabilita).....	18
2.2.3	Absorpce a stupeň pohlcení vody.....	18
2.2.4	Typy a použití hydrogelů.....	19
<b>3</b>	<b>Přehled současného stavu řešené problematiky .....</b>	<b>20</b>
3.1	Měření částic a jejich interakcí s biologickými makromolekulami metodou AFM.....	20
3.2	Použití AFM pro identifikaci účinku CdCl <sub>2</sub> na membránách krevních buněk .....	21
3.3	Aplikace AFM k posouzení morfologických změn erytrocytů u diabetu .....	23
3.4	Vlastnosti polyethylenglykolového hydrogelu měřeného mikroskopií atomárních sil.....	24
3.5	Měření elastických vlastností biologických hydrogelů metodou AFM .....	26
3.6	Souhrn získaných poznatků .....	26
<b>4</b>	<b>Experimentální část .....</b>	<b>28</b>
4.1	Chemikálie .....	28
4.2	Pracovní postup nastavení přístroje .....	28
4.3	Příprava vzorku polystyrenových částic .....	30
4.4	PVA fólie .....	31
4.5	Příprava vzorků agarosových hydrogelů.....	31
<b>5</b>	<b>Výsledky a diskuze .....</b>	<b>32</b>
5.1	Optimalizace kvantitativního zobrazování ( <i>QI<sup>TM</sup> Advanced Imaging</i> ) .....	32
5.1.1	Zvýšení kvality snímku ( <i>Pixels</i> ) .....	33
5.1.2	Snižování rychlosti měření .....	33
5.1.3	Zvyšování hodnoty <i>Setpoint</i> .....	35
5.1.4	Zvýšení hodnoty <i>Setpoint</i> a snížení rychlosti měření .....	36
5.1.5	Snižování hodnoty <i>Setpoint</i> .....	36
5.2	Optimalizace bezkontaktního režimu zobrazování ( <i>AC Mode Imaging</i> ).....	38
5.2.1	Snižování rychlosti měření .....	38
5.2.2	Změna relativní hodnoty <i>Setpoint</i> .....	39

5.3	Shrnutí optimalizace metod kvantitativního zobrazování ( <i>QI<sup>TM</sup> Advanced Imaging</i> ) a bezkontaktního režimu zobrazování ( <i>AC Mode Imaging</i> ) .....	41
5.4	Měření povrchu a velikosti pórů PVA fólií .....	41
5.5	Měření velikosti pórů agarosových hydrogelů.....	44
<b>6</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>45</b>
<b>7</b>	<b>Seznam použitých zdrojů .....</b>	<b>47</b>
<b>8</b>	<b>Seznam zkratk a symbolů .....</b>	<b>50</b>
8.1	Seznam zkratk.....	50
8.2	Seznam symbolů .....	50
<b>9</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>51</b>

# 1 ÚVOD

Mikroskopie atomárních sil (AFM) se v posledních několika letech začíná nabývat na důležitosti a více se zařazovat do výzkumů, jelikož je schopná poskytnout jak snímek povrchu vzorku, tak i mechanické vlastnosti (adheze nebo tuhost materiálu) na mikroúrovni. Jedná se o metodu řazenou do skupiny tunelové mikroskopie, která se oproti ní liší tím, že je schopna měřit vodivé i nevodivé vzorky, protože k měření nevyužívá elektrický proud, ale působení přitažlivých a odpuzivých sil mezi povrchem vzorku a hrotem (*probe*) nosníku (*cantilever*). To se projevuje změnou vychýlení nosníku, která se zaznamenává pomocí odraženého laserového paprsku na fotodiodu (detektor), odkud se signál převede do počítače. Může se jednat jak o destruktivní metodu, při použití kontaktního režimu, tak i nedestruktivní při použití bezkontaktního a semikontaktního režimu, kdy nám nad vzorkem nosník osciluje a odpuzivé síly udržují hrot nad povrchem vzorku což je přednost techniky mikroskopie atomárních sil (AFM). Metoda poskytuje trojrozměrné snímky povrchů vzorků a zároveň je možné získat informace o vlastnostech, jakými jsou adheze, koeficient tuhosti, Youngův modul pružnosti, apod.

Tato práce se zaměřuje především na prostudování jednotlivých metod měření na přístroji NanoWizard 4 od společnosti Bruker, kterými lze měřit. Jedná se především o bezkontaktní metodu (*non-contact mode, AC Mode Imaging*) anebo kvantitativní metodu (tzv. *tapping mode, QI<sup>TM</sup> Advanced Imaging*), kdy je zde věnována pozornost optimalizaci podmínek měření pro zvolenou metodu. Měření se provádí na standardním vzorku polystyrenových nanočástic o velikosti 1  $\mu\text{m}$ , které jsou zředěny deionizovanou vodou v poměru 1:100.

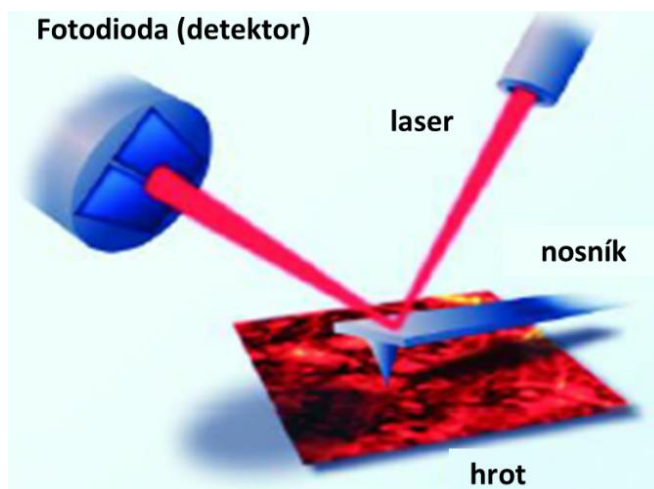
Dalším cílem této práce je měření a zobrazení xerogelů na bázi polyvinylalkoholu a chitosanu a závislosti velikosti pórů na použité koncentraci činidla (NaOH, NaCl) a také jaký vliv má mrazení na samotný PVA gel. Druhým gelem, u kterého se metodou mikroskopie atomárních sil (AFM) sleduje velikost pórů, je agarosa. Sleduje se v závislosti na koncentraci.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Mikroskopie atomárních sil

Mikroskopie atomárních sil (z anglického *Atomic Force Microscopy*, AFM) se řadí mezi metody tunelové mikroskopie, která se standardně používá k zobrazení vzorků na nano(mikro) úrovni [1]. Od tunelové mikroskopie se liší tím, že k detekci se nevyužívá elektrický proud, ale vzájemné přitažlivé/odpudivé síly mezi vzorkem a měřicí sondou. Díky tomuto je schopna zobrazovat i nevodivé vzorky. Aparatura se skládá z raménka (*cantilever*) s měřicím hrotem (*probe*), který se v závislosti na měřicím módu pohybuje buď nad povrchem vzorku (bezkontaktní metoda, *non-contact mode*, *AC Mode Imaging*) nebo je s ním v kontaktu (kontaktní metoda, *contact mode*). Další částí je laser, který slouží k detekci polohy hrotu a fotodioda, která slouží pro měření signálu. Zobrazovací schopnost tohoto zařízení spočívá v tom, že AFM je schopné měřit i velmi malé síly, např. přitažlivé a odpudivé síly jednotlivých atomů a molekul, které se navzájem dostávají do kontaktu a ovlivňují se [2].

Princip skenování je založený na měření přitažlivé anebo odpudivé síly mezi vzorkem a hrotem [1] (*probe*), který se nachází na ohebném nosníku (*cantilever*). Jedná se o pohyb po řadách, kdy se skenují jednotlivé body vzorku ve směru osy x a y. Během skenování se měří a zaznamenává vychýlení nosníku, který je vychylován vlivem přitažlivých nebo odpudivých sil vzorku a hrotu. Toto vychýlení je detekováno a převedeno na elektrický signál pomocí laserového paprsku, který dopadá na zadní stranu nosníku, zde se paprsek odráží a dopadá na detektor. Jedná se o princip tzv. optické páky [2] (Obrázek 1), kdy i malá změna úhlu nosníku je převedena do měřitelné výchylky ze změny polohy bodu na fotodiodě. Většina používaných fotodiód, které se používají pro mikroskop atomárních sil, je rozdělena do čtyř kvadrantů, tudíž je možné polohu laserového bodu vypočítat ve dvou směrech.

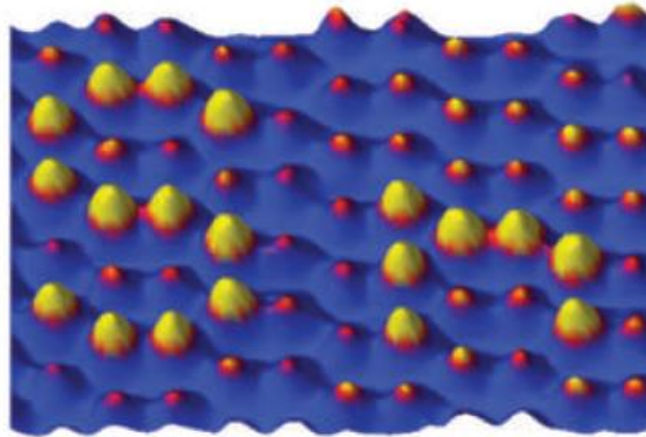


Obrázek 1 – Princip optické páky [2].

V praxi je AFM využíváno zejména v biologii, jelikož vzorky mohou být zobrazovány ve fyziologických podmínkách, není potřeba je nijak barvit, modifikovat a není potřeba, aby vzorek vedl elektrony. Díky velkému rozlišení je možné zobrazit buňky, ale i jednotlivé molekuly, jako jsou proteiny a DNA. Mikroskopie atomárních sil se používá k měření mechanických nebo adhezních vlastností a trojrozměrnému zobrazování povrchu, případně i k manipulaci se vzorkem. Manipulace vzorků [3] je založena na výměně jednotlivých atomů nebo molekul. První zmínka o manipulaci atomů pomocí mikroskopie atomárních sil je o selektivním odstranění atomu (atom ležící na povrchu krystalu) přiblížením oscilujícího hrotu k povrchu vzorku v konkrétním bodě. Po odpoutání atomu z původní polohy vznikne na jeho místě vakance, kterou je možné zaplnit jiným druhem atomu navázaným na špičce hrotu z jiného vzorku. Takto byly např. nahrazeny atomy germania (Ge) na povrchu vzorku atomy cínu (Sn), kdy atomy cínu mají jiný výškový profil a na získaném trojrozměrném obrazu je možné



pozorovat rozdílnou výšku jednotlivých atomů (Obrázek 2) [3]. Tyto manipulace vzorků je možné využít např. pro vytvoření polovodičových povrchů pomocí výměny atomů nebo molekul, provádět atomové manipulace na povrchu izolačních materiálů a měřit síly zapojené do manipulace s atomy/molekulami s možností kvantifikace tření v měřítku atomů.



Obrázek 2 - Manipulace atomů vzorku, nahrazení atomů germania (Ge) atomy cínu (Sn), který mají výrazně větší profil [3].

Při měření síly se zaznamenává velikost přitažlivých/odpudivých sil mezi hrotem a povrchem vzorku. To je využito pro měření mechanických vlastností [2], kdy jednou z možných informací o mechanických vlastnostech vzorku může být např. Youngův modul pružnosti.

Trojrozměrné zobrazování [2] je zajištěno skenováním povrchu a měřením vychýlení nosníku, což je zaznamenáno změnou polohy laserového paprsku na fotodiodě. Změna velikosti vychýlení je způsobena změnou velikosti sil, které jsou mezi hrotem a povrchem vzorku (bezkontaktní metoda). Když je použita kontaktní metoda, kdy je hrot v kontaktu s povrchem vzorku, tak dochází k vychýlení nosníku vlivem sledování topografie vzorku (reliéfu povrchu vzorku). Při zobrazování povrchů se využívá zpětné vazby (*feedback*), kdy tato zpětná vazba nastaví výšku nosníku hrotu, aby se výchylka nosníku obnovila na uživatelem přednastavenou hodnotu.

### ***Piezelektrický efekt***

Mikroskopie atomárních sil může zaznamenávat nejen výškové rozdíly v topografii, ale může zaznamenávat tzv. piezelektrický efekt [4]. Projevuje se schopností krystalu generovat elektrické napětí při své deformaci. Výhodou AFM je to, že je schopný měřit piezelektrický efekt na úrovni jednotlivých atomů a molekul. Takovýto druh měření můžeme nazvat jako piezelektrickou silovou mikroskopii [5] (z anglického *Piezoelectric Force Microscopy*, PFM).

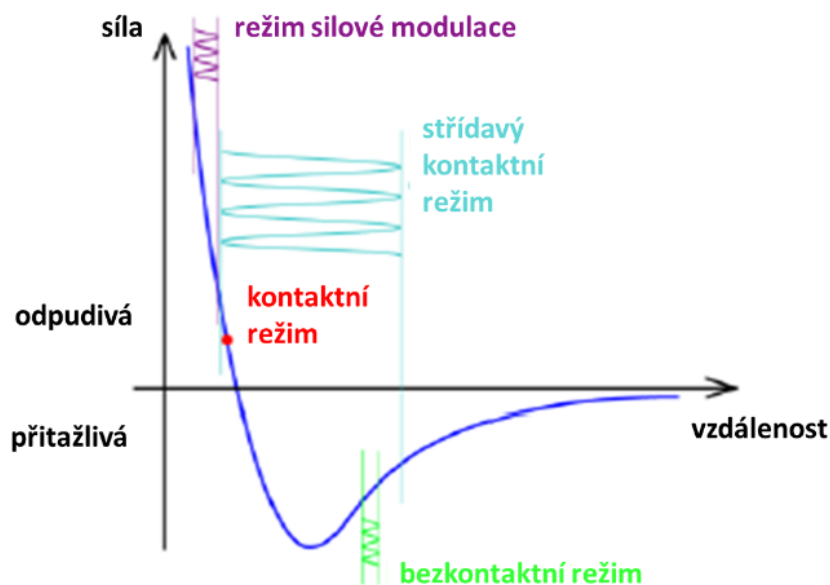
Používá se zde vodivý hrot, který se přivede do kontaktu s feroelektrickým nebo piezelektrickým materiálem, mezi povrch vzorku a hrot se vloží nastavené napětí a díky tomu se vytvoří vnější elektrické pole. Vlivem elektrostrikce nebo inverzním piezelektrickým účinkům těchto materiálů se vzorek lokálně smršťuje nebo rozšiřuje. Vzhledem k tomu, že je hrot v kontaktu s povrchem vzorku, taková expanze nebo smrštění způsobí vychýlení nosníku, které se zaznamenává na fotodiodu pomocí laserového paprsku a porovnává se s původním stavem před aplikací elektrického pole [5].

Vysoké napětí odpovídá nepatrným změnám v šířce krystalu. S touto šířkou krystalu lze manipulovat s lepší než mikrometrickou přesností, proto je možné je použít k polohování předmětů s extrémní přesností, např. k finálnímu přibližování nosníku ke vzorku.

### 2.1.1 Zobrazovací režimy

Zobrazování je možné díky silám, které působí mezi hrotem a povrchem vzorku. Mezi nejčastější síly, které ovlivňují chování hrotu vůči vzorku, jsou van der Waalsovy a kapilární síly [2]. Tyto síly působí na dlouhé vzdálenosti (1 Å až desítky nm) v rámci atomů a molekul. Jak se k sobě dva objekty, atomy nebo molekuly, přibližují, začínají na sebe působit přitažlivými silami. Jakmile se dostanou do bodu, kdy jsou u sebe atomy či molekuly příliš blízko, začnou se odpuzovat a vzdalovat. Odpudivé síly působí na krátkou vzdálenost (zhruba do 1 Å), což je vzdálenost, kdy se objekty dostanou do kontaktu a jejich elektronové obaly se začnou překrývat. Toto chování znázorňuje diagram, kde je vynesena závislost síly na mezimolekulární vzdálenosti. Pod osou x se nachází přitažlivé síly, které dosahují určitého minima, poté se síly stanou odpudivými a křivka strmě stoupá se zmenšující se vzdáleností.

Díky silám působícím mezi hrotem a povrchem vzorku můžeme rozlišit několik možností zobrazovacích režimů (Obrázek 3). Jedná se o kontaktní metody a režim silové modulace (metoda *force modulation*), střídavou kontaktní metodu (metoda *tapping*), bezkontaktní metoda, kvantitativní zobrazování a vysokorychlostní AFM, což je druh bezkontaktní metody měření. Každá z těchto metod pracuje v jiné části diagramu. Kontaktní metoda a režim modulace síly pracuje s odpudivými silami, tedy se nachází nad osou x. Střídavá kontaktní metoda se pohybuje na rozhraní přitažlivých a odpudivých sil, jelikož je schopna pracovat v obou podmínkách. Bezkontaktní metoda se nachází na diagramu v části přitažlivých sil. Střídavá kontaktní metoda a bezkontaktní metoda se řadí do skupiny dynamických metod, jedná se o metody, které místo statického vychýlování hrotu a nosníku využívají vibrace nosníku a poté se detekuje jeho oscilace [2].



Obrázek 3 – Diagram závislosti síly na vzdálenosti dvou těles a oblasti, ve kterých pracují jednotlivé metody [2].

#### **Kontaktní metoda**

Jedná se o nejjednodušší způsob měření na mikroskopu atomárních sil. Hrot je neustále v kontaktu se vzorkem a měří se vychýlení nosníku vlivem změny výšky (reliéfu) povrchu vzorku [6]. Kontaktní mód umožňuje využívat dva způsoby měření, a to tzv. režim konstantní síly (*constant force*), kdy mechanismus zpětné vazby je takový, že prohnutí, a tedy i síla, nosníku je konstantní. Jakmile dojde k prohnutí nosníku, je upravena výška, aby došlo k návratu na původní nastavenou hodnotu vychýlení (tzv. *Setpoint*). Druhým je režim modulace síly (*force modulation*), kdy je mechanismus zpětné vazby vypnutý a výška zůstává konstantní a je měřeno prohnutí nosníku pro získání topografického snímku. Tento režim je vhodný pro měkčí vzorky, které mají relativně hladký povrch s malými odchylkami, protože jinak dochází k poškození nosníku [2].

Kontaktní metoda se nejčastěji využívá pro zobrazování povrchů s vysokým rozlišením, např. pro anorganické krystaly, podjednotky proteinů apod. Boční síly poskytují informaci o třecí síle mezi hrotem a vzorkem, což může ukázat oblasti, které mají stejnou výšku, ale zcela odlišné chemické vlastnosti [2]. Jedná se o síly, které působí na hrot změnou součinitele tření na povrchu vzorku. Používají se pro měření nehomogenity povrchových materiálů, ale také jsou schopné vylepšit kvalitu snímku nehomogenního materiálu. Pro zobrazování se používají různé typy nosníků. V některých případech tyto síly mohou ovlivňovat měření, proto se jim v tomto případě snažíme zabránit, např. při měření ve vodném prostředí pomocí kontaktní metody.

### ***Dynamická metoda***

Dynamická metoda využívá vibrace nosníku, kdy je měřena oscilace místo statického vychýlování hrotu [2]. Existuje několik způsobů, jak může být docíleno oscilace nosníku. Jednou z nich je přímé rozvibrování nosníku pomocí piezoelektrického efektu, kdy nosník začíná vibrovat na budící frekvenci a postupným proměřením rozsahu frekvencí se najde vrchol ve frekvenčním spektru, který odpovídá rezonanční frekvenci nosníku. Druhou možností je použití magnetického pole. Zde je podmínkou, že nosník musí být potažen feromagnetickou vrstvou. Musí zde být nastavena oscilace, tedy amplituda a frekvence, a podle těchto parametrů se přizpůsobí výška pomocí zpětné vazby [7]. Jednou z možností dynamické metody je střídavá kontaktní metoda (*tapping mode*), dále bezkontaktní metoda (*non-contact mode*) a režim silové modulace (*force modulation mode*).

Střídavá kontaktní metoda patří mezi nejvyužívanější, protože je schopna poskytnout výhody jiných metod, např. jak nosník osciluje, tak hrot vytváří s povrchem odpudivý kontakt v nejnižším bodě oscilace a boční vychýlení pak bývá menší než při kontaktní metodě [2]. Při střídavé kontaktní metodě nosník osciluje blízko bodu rezonance. Amplituda oscilace je upravována pomocí velikosti piezoelektrického efektu. Pokud se výška vzorku zvýší, pak se amplituda sníží. Oscilace může poskytnout informaci o vzorku, např. o tuhosti, mechanických nebo adhezních vlastnostech. Rezonanční frekvence nosníku závisí na hmotnosti i konstantě pružnosti (*spring constant*), nosníky s větší konstantou pružnosti mají vyšší rezonanční frekvenci [2]. Tato metoda je jednou z nejvíce využívaných metod, protože poskytuje jako topografický snímek, ale zároveň i informace o vlastnostech vzorku, jako je adheze nebo třeba tuhost vzorku.

Fázový obraz je jedna z nepoužívanějších zobrazovacích metod, spadajících do střídavé kontaktní metody, které poskytují kontrastní snímky za pomoci materiálových vlastností vzorků. Nosník osciluje v blízkosti rezonanční frekvence a oscilační amplituda je udržována pomocí piezoelektrického efektu. Skenováním povrchu se bude tlumit amplituda s rostoucí výškou vzorku a zpětná vazba převede příslušné napětí na piezoelektrický vertikální pohyb nosníku, čímž dojde k obnovení nastavené hodnoty amplitudy. Fázový signál je citlivý na vlastnosti interakcí, které probíhají mezi hrotem a vzorkem, poskytuje tedy informaci o mechanických vlastnostech vzorku [2]. Tento režim je schopný zobrazit materiálové odlišnosti vzorku, aniž by se místa s rozdílnými vlastnostmi lišila ve výšce vzorku.

Při bezkontaktní metodě není hrot nosníku v kontaktu se vzorkem, pouze osciluje v jeho blízkosti [2]. Jedná se o metodu, která je šetrná ke vzorku (na rozdíl od kontaktní metody není destruktivní).

Režim silové modulace je kombinace kontaktního a dynamického režimu zobrazování. Nosník nebo vzorek sinusově osciluje ve vertikální ose z, zatímco sonda skenuje povrch vzorku a při tom je v neustálém kontaktu se vzorkem. Během měření se získává zároveň topografický snímek povrchu vzorku, ale i amplituda a fáze [6]. Ze znalosti tuhosti nosníku, tvaru hrotu sondy a plochy styku se vzorkem je možné získat kvantitativní informace o materiálových vlastnostech povrchu vzorku, jako je např. modul pružnosti.

## Kvantitativní metoda zobrazování

Kvantitativní metoda (*QI<sup>TM</sup> Advanced Imaging*) poskytuje data jako např. adheze a mechanické vlastnosti vzorků. Hrot začíná v ose  $z$  daleko od vzorku a postupně se k němu přibližuje díky piezoelektrickému efektu, dokud není dosaženo nastavené hodnoty (*Setpoint*), po dosažení této hodnoty dojde k opětovnému vzdalování hrotu od povrchu vzorku v ose  $z$  (vertikálně). Když je nosník zcela odtažen, nepůsobí na něj žádné boční síly, které by měření ovlivňovaly [2]. Tato metoda je vhodná pro jemné, mazlavé a volně ložené vzorky, ale i pro vzorky, které mají výrazné výškové rozdíly. Mezi takové vzorky se řadí živé buňky, jednotlivé molekuly v roztoku nebo slabě přichycené mikroorganismy. Metoda nejen že sbírá křivky závislosti síly na vzdálenosti pro každý jeden bod vzorku a poskytuje snímky vzorku ve vysoké kvalitě, ale zároveň i poskytuje informace o výšce vzorku, tuhosti povrchu a adhezi v jednotlivých místech vzorku [8].

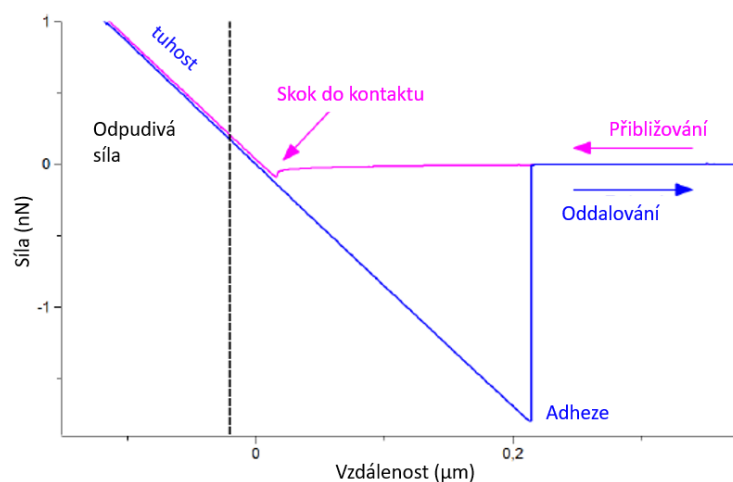
## Vysokorychlostní AFM

Vysokorychlostní mikroskopie atomární sil byla vyvinuta za účelem umožnění přímého snímání jednotlivých molekul proteinů, což je dynamický systém, tedy systém, který je v neustálém pohybu [9]. Klasické techniky nebyly schopny zachytit tyto dynamické biomolekulární procesy, protože pořízení bodu na snímku trvalo až 30 vteřin. Vysokorychlostní AFM snímá molekuly proteinů rychlostí 10-20 fps (*frames per second*) [9]. Tato metoda je běžně prováděna střídavou kontaktní metodou, kdy nosník osciluje ve směru osy  $z$  (vertikálně) nebo v blízkosti své rezonanční frekvence tak, aby špička hrotu přerušovaně poklepávala na povrch vzorku [10].

### 2.1.2 Silová spektroskopie

Silová spektroskopie, jakožto jeden z měřících módů v AFM, umožňuje měřit intermolekulární a intramolekulární síly vzorku. AFM umožňuje detekovat jedinou molekulu ze vzorku, pomocí specifické vazby mezi proteinem nebo peptidem a jejich ligandem, který je umístěn na hrotu [11].

Měření probíhá tak, že nosník se pohybuje vertikálně směrem k povrchu vzorku (Obrázek 4). Při měření ve vzduchu jsou počáteční síly natolik malé, že neovlivňují vychýlení nosníku, jakmile se však nosník s hrotem dostane do dostatečné blízkosti, kde už působí přitažlivé síly (van der Waalsovy a kapilární síly), začne se projevovat vychýlení nosníku. Společně s tím začínají stoupat i odpudivé síly. Tyto odpudivé síly začnou zvedat hrot a nosník od povrchu vzorku. Hrot ale stále zůstává v kontaktu se vzorkem, to je v důsledku adhezních sil. Jakmile se hrot od povrchu vzdálí dostatečně daleko, přestanou zde tyto interakce působit a nosník bude zmenšovat svoje vychýlení [2]. Stejný princip měření platí i ve vodném prostředí, jen výsledné křivky mají rozdílný profil.



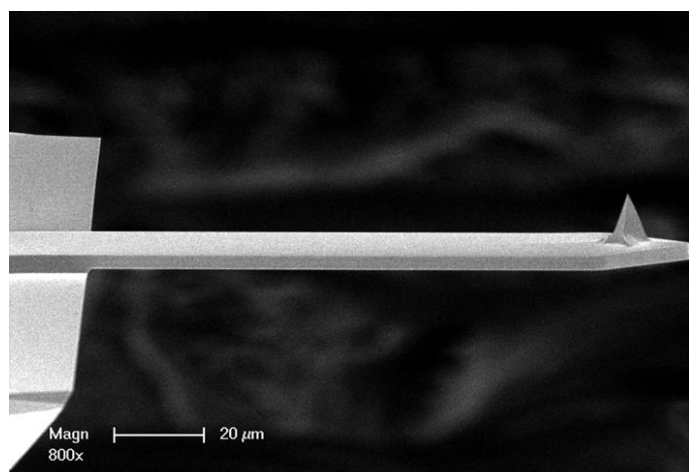
Obrázek 4 - Diagram znázorňující průběh přitažlivých a odpudivých sil mezi vzorkem a hrotem v režimu silové modulace [2].

Metodou silové spektroskopie je možné studovat jak přitažlivé, tak i odpuzivé síly vzorků. Hlavním typem síly, která se ve vzorcích vyskytuje, jsou van der Waalsovy síly při přibližování k povrchu. Na výsledných křivkách můžeme odečítat i různé vlastnosti materiálů ze závislosti použité síly ku síle odsazení, jak je hrot tlačěn směrem k povrchu. Je tedy možné stanovit viskoelasticitu biologických systémů, např. želatinových gelů nebo epiteliálních buněk. Adhezní síla se stanovuje z odpuzivé části křivky, adheze je způsobena kapilárními silami mezi hrotem a povrchem vzorku [11].

### 2.1.3 Nosník (*cantilever*) a hrot (*probe*)

Nosník (*cantilever*) je umístěný na čipu (*chip*), jeho délka bývá typicky zhruba 100  $\mu\text{m}$ , na samotném konci se nachází hrot (*probe*), který slouží ke snímání povrchu vzorků, jeho velikost bývá zhruba v jednotkách mikrometrů (Obrázek 5). Nosníky používané v mikroskopii atomárních sil bývají pokryty reflexní vrstvou, ve většině případů kovovou, na své zadní straně, to je z důvodu zvýšení odrazu laserového paprsku na detektor. Běžně se používá např. hliníkového povlaku, ale např. pro měření v kapalinách se používají pozlacené nosníky, protože jsou chemicky inertní [2].

Většina nosníků je vhodná jak pro použití v kontaktní metodě, tak i ve střídavé kontaktní metodě. Jedná se o velice křehké části, které je možné zničit samotným zacházením při instalaci do držáku, ale i při samotném měření, např. vlivem nastavení vysoké hodnoty *setpoint* v kontaktní metodě, případně nízké hodnoty *set-point* ve střídavé kontaktní metodě [2].



Obrázek 5 - Snímek nosníku s hrotem, typ TESP-V2 [12].

Nosníky, které budou používány v experimentální části, jsou od společnosti Bruker, jedná se o PEAKFORCE-HIRS-F-A, PEAKFORCE-F-B, MLCT, SNL SAMPLE, FESP-V2, TESP-V2. První jmenovaný typ (PEAKFORCE-HIRS-F-A) má ostrý hrot a doporučuje se pro střídavou kontaktní metodu v kapalném prostředí, nominální konstanta tuhosti je  $0,35 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$  a je vhodný pro zobrazování bio-vzorků (např. proteinové mřížky membrán). Druhý typ (PEAKFORCE-HIRS-F-B) má také ostrý hrot, používá se pro střídavou kontaktní metodu v kapalném prostředí, nominální konstanta tuhosti je  $0,12 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ , slouží však pro zobrazování jednotlivých biomolekul, jako je molekula DNA. Typ nosníku MLCT s nominální konstantou tuhosti  $0,07 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ , tento typ má tedy nízkou konstantu tuhosti, a proto je vhodný pro kontaktní režim, režim silové modulace v prostředí kapaliny, a nejvíc se hodí pro měření velmi měkkých vzorků jako jsou hydrogely. Dalším typem nosníku je SNL SAMPLE, nominální konstanta tuhosti  $0,35 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ , který je vhodný měření pomocí střídavé kontaktní metody. Jedná se o nejuniverzálnější nosník, protože je možné jej použít jak v kapalném prostředí, tak ve vzduchu. Nosník FESP-V2, konstanta tuhosti  $37 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ , se používá pro měření pomocí střídavé kontaktní metody a v režimu silové modulace v prostředí vzduchu. Posledním typem nosníku, který bude používán v experimentální části je typ TESP-V2, který má nominální konstantu tuhosti  $37 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$  a je vhodný pro střídavou kontaktní metodu a bezkontaktní metodu měření vzorku v prostředí vzduchu.

## ***Kontaktní metoda***

Obecně se jedná o nosníky s hroty, které mají nízkou konstantu síly, nízkou rezonanční frekvenci a jsou delší a tenčí. Většina nosníků má hodnotu konstanty pružnosti nižší než  $0,5 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$  [2]. Nosníky používané pro kontaktní metodu bývají s povlakem z nitridu křemíku, případně s diamantovým povlakem. Hroty z nitridu křemíku poskytují nejlepší výsledky pro tzv. měkké vzorky, jakými jsou hydrogely nebo buňky. Jedná se o tzv. měkké nosníky, protože mají nízkou konstantu tuhosti. Použitím příliš tuhých nosníků může dojít k vynaložení příliš velké síly na vzorek, což by ho poškodilo. Na tvrdých vzorcích, jako jsou krystaly nebo vysušené vzorky, může dojít naopak k poničení hrotu [2].

## ***Střídavá kontaktní metoda***

Zde se používají nosníky s vysokou konstantou síly, vysokou rezonanční frekvencí, které jsou kratší a tlustší. Jsou nazývané jako tuhé nosníky, protože jejich konstanta pružnosti je vyšší než  $10 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$  [2].

Pro měření v prostředí vzduchu se používají právě tyto tužší nosníky s rezonanční frekvencí vyšší než 100 kHz. Nejlepší výsledky poskytují při rezonanční frekvenci v rozmezí od 200 do 300 kHz. Je možné použít i měkké nosníky, které jsou určeny pro kontaktní metodu, ale je náročnější s nimi dosáhnout stabilních snímků. To je způsobeno tím, že vibrující nosník musí překonat tenkou vodní vrstvu na povrchu vzorku způsobenou vzdušnou vlhkostí [2]. Silná adheze vodní vrstvy na povrchu způsobuje zachycení nosníku na povrchu vzorku, čímž způsobuje nestabilní odezvu. Toto může být vyřešeno snížením vzdušné vlhkosti prostředí.

Pro střídavou kontaktní metodu ve vodném prostředí se často využívají měkkí nosníky určené pro kontaktní metodu [2], protože když jsou nosník a vzorek ponořeny v kapalině, nedochází pak k problému popsanému výše.

## ***Vysokorychlostní AFM***

Nosníky používané pro měření ve vodném prostředí mají konstantu pružnosti  $0,1\text{--}0,2 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ , při měření ve vzduchu je to  $0,8\text{--}1,2 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ , rezonanční frekvence těchto nosníků je 100–170 kHz [9]. Velikostně jsou daleko menší než běžně používané nosníky (6–12  $\mu\text{m}$ ) [10], aby bylo možné dosáhnout vysoké rezonanční frekvence.

### **2.1.4 Příprava vzorků**

Aby bylo možné správně zobrazovat vzorky pomocí mikroskopie atomárních sil je důležitá příprava vzorků a jejich připevnění k podkladu [13]. Pro pozorování biologických struktur v jejich nativním stavu je potřeba, aby byly pevně připoutány k hladkým povrchům a nedocházelo k nežádoucím pohybům vzorku působením hrotu.

## ***Podklady***

Prvním důležitým bodem je zvolení vhodného podkladu, mezi nejčastěji používané podklady se řadí slída, sklo a oxid křemičitý. Slída je nevodivý vrstvený minerál složený z jednotlivých tenkých vrstev (tloušťka 1 nm). Lze je snadno odštěpit pomocí lepicí pásky, díky tomu se vytvoří čisté a rovné povrchy, které jsou negativně nabitě. Jedná se o nejpoužívanější podkladový materiál používaný pro zobrazování biologických vzorků, např. dvouvláknové DNA, komplexy DNA-protein, proteinové řady, lipidové filmy a živočišné buňky. Slídový povrch může být modifikován silany buď kvůli zlepšení adheze nebo pro zlepšení kovalentních vazeb biomolekul [13].

Sklo je dalším vhodným podkladem pro zobrazování biologických vzorků pomocí AFM. Skleněná krycí sklíčka jsou dostatečně plochá pro zobrazování buněk a větších struktur, ale na druhou stranu jsou příliš drsná pro zobrazování adsorbovaných molekul [13]. Skleněné povrchy bývají potažené

organickými kontaminanty a částicemi, tudíž je potřeba je před použitím odstranit. Odstranění nečistot se provádí např. promytím koncentrovaným roztokem kyselin a následně v ultrazvukové vodní lázni.

V některých případech jsou preferovány hydrofobní substráty. Známým příkladem je třeba vysoce orientovaný pyrolytický grafit. Potažení slídového povrchu uhlíkem vytvoří hydrofobní povrch, který je vhodný pro imobilizaci DNA. Zvláknování polymerů (polystyrenu, polymethylmethakrylátu) je další vhodnou metodou pro vytvoření plochého, hydrofobního povrchu. Pro některé aplikace, které vyžadují specifický chemický povrch, se používají zlaté povrchy. Tyto povrchy jsou připravovány termálním vypařováním na slídovém, skleněném podkladu a podkladu z oxidu křemičitém. Typickým postupem přípravy takového povrchu je lepení zlata na povrchy pomocí epoxidového lepidla. Výhodou zlatých povrchů je jejich inertnost vůči působení kyslíku, jsou stabilní vůči radikálů, a mohou být modifikovány pomocí alkanthiolů, díky čemuž snadno adsorbují/navazují biomolekuly na svůj povrch [13].

### ***Biomolekuly***

Pro přípravu vzorků biomolekul na měření v prostředí vzduchu je několik možností. První z nich je jednoduchá imobilizace, která se provede kápnutím kapky roztoku makromolekul na podklad a následuje odpaření disperzního prostředí nebo vysušení pomocí dusíku. Alternativně může být substrát ponořen do roztoku, čímž se umožní adsorpce biomolekul po určité dobu. Následně je substrát opláchnut a vysušen na vzduchu. Poslední možností je nastříkání vodného roztoku se vzorkem, případně v přítomnosti glycerolu, na substrát [13]. Adsorpce v přítomnosti patřičných elektrolytů také umožňuje přímé měření a zobrazování vzorků ve vodném prostředí bez nutnosti sušení.

Široká skupina biomolekul, zejména pak proteiny a DNA adsorbované na podkladu ze slídy, již byly zkoumány pomocí mikroskopie atomárních sil. Používají se pro ně nejrůznější techniky podporující přichycení k podkladu. Pro molekuly DNA dojde nejprve k předčištění substrátu silany nesoucími aminoskupinu (např. 3-aminopropyltriethoxysilan), který přispívá k přichycení. Molekuly DNA se silně váží na slídu, když roztok obsahuje určité dvojmocné kationty ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ) o koncentraci 1 mM. Roztoky jednomocných kationtů ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ) prokázaly, že brání v adsorpci proteinů (lysozymu, streptavidinu) na podklad ze slídy [13]. Většinou se snaží dosáhnout kovalentního navázání makromolekul na podklady. Imobilizace proteinů na skle může být dosaženo pomocí foto-reaktivních síťovadel. Další možností je vytvoření *N*-hydroxysukcinimidových monovrstev na zlatém povrchu pomocí dithio-bis-sukcinimidylundekanoátu, na který se naváže protein kovalentní vazbou v prostředí vodného pufru za mírných podmínek [13]. Je dobré zmínit, že molekuly je možné připevnit nejen k podkladu, ale také na hroty pomocí kovalentní vazby, což slouží pro měření specifických biomolekulárních interakcí mezi komplementárními molekulami (např. antigen-protilátka) silové spektroskopie. Pro tyto účely se nejčastěji používá polyethylenglykol nebo karboxymethylamylosa.

## 2.2 Hydrogely

Hydrogely jsou disperzní soustavy tvořené disperzním prostředím v majoritním množství vody, ve kterém jsou rozpuštěny disperzní částice (pevné částice) [14, [16]. Z hlediska klasifikace disperzních soustav se hydrogely řadí mezi lyosoly. Velikost disperzních částic, které jsou koloidního charakteru, je v rozmezí 1–1 000 nm. Při pohlcování vody si zachovávají svoji strukturu díky chemickému nebo fyzikálnímu zesíťování jednotlivých řetězců. Schopnost pohlcovat vodu je způsobena přítomností hydrofilních skupin jako jsou  $\text{NH}_2$ -,  $-\text{COOH}$ -,  $-\text{SO}_3\text{H}$  [15].

Podle toho, jak hydrogely připravujeme, je možné je rozdělit na přírodní a syntetické. Přírodní hydrogely jsou skupinou, kam řadíme třeba kolagen, fibrin, kyselinu hyaluronovou a další přírodní deriváty jako je chitosan nebo alginát. Hydrogely z této skupiny se tedy vyskytují běžně v lidském těle nebo v přírodě. Syntetické hydrogely vznikají různými syntézami v laboratoři a jedná se např. o polyakrylamid nebo polyvinylalkohol [17]. Je možné je také rozdělit podle náboje, který mají na svém povrchu, tedy na kationtové, aniontové, či neutrální. Samotné hydrogely nemají na povrchu náboj, ale vystupují podle toho, z čeho jsou připraveny, např. chitosanové jsou kladně nabitě, alginátové záporně nabitě [15]. Další možností, jak třídit hydrogely, je podle způsobu jejich vzniku. Fyzikální hydrogely (želatina, karagen), které jsou drženy pospolu pomocí elektrostatických sil, vodíkových vazeb nebo hydrofobních interakcí, mění strukturu z kapaliny na gel změnou vnějších podmínek prostředí, např. teplota, iontová síla, pH [15]. Hydrogely chemického původu (polyakrylamid) využívají kovalentní vazby pro vytvoření gelové formy [14]. Tyto kovalentní vazby je daleko těžší rozrušit, proto změna vlastností hydrogelů chemického původu není tak jednoduchá jako v případě fyzikálního hydrogelu, chemicky zesíťované hydrogely je možné degradovat hydrolyzou nebo třeba enzymatickou reakcí. Ionově zesíťované gely vykazují nekontrolované degradační chování v důsledku difúze dvojmocných iontů z gelů za fyziologických podmínek [18].

Podle způsobu přípravy je možné hydrogely klasifikovat jako hydrogely s polo-prostoupenou sítí (z anglického *Semi-Interpenetrating Polymer Network*, Semi-IPN) nebo hydrogely s prostupující sítí (z anglického *Interpenetrating Polymer Network*, IPN) [19].

Hydrogely s polo-prostoupenou sítí vznikají, když jeden lineární polymer pronikne do druhého již zesíťovaného polymeru bez dalších chemických vazeb mezi nimi [19], Semi-IPN je možné připravit kombinací bramborového škrobu a polyakrylamidu. Tento typ hydrogelů účinně uchovává rychlost kinetické odezvy na pH nebo teplotu. To je díky absenci omezující penetrační elastické sítě, zatímco si uchovávají své výhody, jako je modifikovaná velikost pórů nebo pomalé uvolňování léčiva.

Tvorba hydrogelů s prostupující sítí probíhá kombinací dvou polymerů, např. chitosanu a akrylamidu, kdy jeden je přítomný v roztoku a druhý je syntetizován nebo zesíťován *in situ* [19]. Mezi těmito polymery se nevyskytují kovalentní vazby, avšak nelze je oddělit bez porušení vazeb. Jedná se o systém, ve kterém jsou zesíťované dvě složky, v případě hydrogelů s polo-prostupující sítí je zesíťována jen jediná složka [20].

### 2.2.1 Mechanické vlastnosti hydrogelů

Mechanické vlastnosti hydrogelů se odvíjí od jejich složení a struktury, jsou závislé především na koncentraci a pevnosti uzlů, protože i přes vysoký podíl vody vykazují viskoelastické chování s převahou elastické složky. Mezi faktory, které ovlivňují mechanické vlastnosti patří např. hustota zesíťování, podmínky polymerace nebo stupeň pohlcení vody [21, [22]. Chování hydrogelů se dá popsat jako viskoelastické [19]. Pro pochopení mechanických vlastností hydrogelů slouží elasticita a viskoelasticita, viz následující kapitola. Jedná se o teorie, kdy obnovení orientace řetězce a struktury je buď časově závislé nebo nezávislé.



## ***Elasticita a viskoelasticita***

Hydrogely jsou materiály, které mají kapalně disperzní prostředí, ale i tak vykazují mechanické vlastnosti typické pro pevné látky, i když obsahují až 99,9 % kapaliny. Jejich chování lze tedy označit za viskoelastické. Elasticita materiálu je díky vytvořené hydrogelové síti (uzlům – zesíťovaným polymerním řetězcům) a viskózní složka díky přítomnosti velkého množství disperzního prostředí (vody) [22]. Elasticitu je možné vypočítat pomocí Hookova zákona, který popisuje závislost mezi napětím a deformací:

$$\varepsilon = \frac{\sigma}{E} \quad (1)$$

kdy  $\varepsilon$  je poměrné prodloužení [-],  $\sigma$  je tečné napětí [Pa] a  $E$  je Youngův modul pružnosti v tahu [Pa]. Hookův zákon platí pro hydrogely a biologické vzorky, když splňuje dvě podmínky. Musí být splněno, že jde o elastické neboli vratné deformace a závislost mezi prodloužením a napětím je lineární [19]. Při nízkých teplotách mohou tyto hydrogely ztratit elastické vlastnosti a začnou tak vykazovat viskoelastické chování. Viskoelastická teorie posuzuje vztah mezi elasticitou, tokem a molekulárním pohybem v polymerních materiálech. Zatímco každý materiál projevuje elasticitu a tok, je to obvykle velikost polymerních molekul, která vede k viskoelastickému chování. Hydrogely obecně nejsou elastické materiály, ale viskoelastické. Aplikované napětí vede ke sledování pohybu segmentů polymerních řetězců na čase. Tento pohyb vyvolá vnitřní odezvu, která má za následek časově závislé vrácení do původního stavu, jakmile je vnější stimul odstraněn. Pokud dojde k navrácení do původního stavu po delší době, jedná se o viskoelastické chování, jestliže však nedojde k navrácení do původního stavu, jedná se o chování viskoplastické [23].

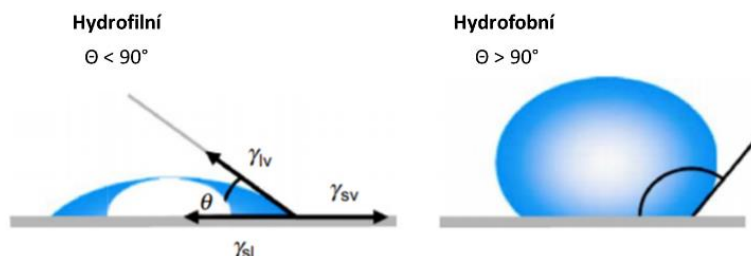
## ***Adheze a koheze***

Adheze (přilnavost) je vlastnost povrchových molekul látek přitahovat se navzájem pomocí mezimolekulárních vazeb (van der Waalovy síly, Londonovy síly, vodíkové můstky aj.) na fázovém rozhraní látek, se kterými jsou v kontaktu. Adheze je schopnost odlišných částic nebo povrchů přilnout nebo spojit se navzájem a je možné ji rozdělit na tři typy: chemická adheze, disperzní adheze a difúzní adheze [26]. Kromě mezimolekulárních a chemických adhezních sil může být do celkového jevu adheze zahrnuta také mikro-mechanická adheze.

Chemická adheze nastává v případě, když podklad s látkou na svém fázovém rozhraní vytváří sloučeninu pomocí iontové, kovalentní nebo vodíkové vazby. Vodíková vazba se vytvoří v případě, kdy je atom vodíku z jedné molekuly přitahován k atomu donoru elektronů, jakým je kyslík nebo dusík v jiné molekule. V případě disperzní adheze čili fyzisorpce, drží dva povrchy pospolu pomocí van der Waalových sil nebo vodíkových můstků. Některé materiály se mohou na fázovém rozhraní spojit pomocí difúze, poté hovoříme o tzv. difúzní adhezi (typ adheze), ta vzniká především u polymerů a je závislá na čase, teplotě a relativní molekulové hmotnosti [27]. Toto obvykle nastává, když jsou molekuly obou materiálů mobilní a/nebo navzájem rozpustné, to je většinou v případě polymerních řetězců, kdy jeden konec molekuly může difundovat do druhého řetězce. V případě, kdy hydrogely tečou po podkladu a vyplňují dutiny a póry povrchu a mechanicky se do sebe lepí, tak tento děj nazýváme jako mikro-mechanická adheze. Na adhezi je potřeba se dívat jak z mikroskopického hlediska, tak i z makroskopického. Mikroskopický pohled na adhezi zkoumá pevnost spojení dvou látek na úrovni chemických vlastností, jako jsou vazebné interakce, které nastávají mezi těmito látkami. Mezi tyto síly patří nejčastěji iontové, kovalentní, kovové vazby, vodíkové můstky a van der Waalovy síly. Další chemické vlastnosti, které ovlivňují adhezi na mikroskopické úrovni jsou chemické složení, polarita a volná povrchová energie. Proto můžeme zvýšit adhezi např. vytvořením nových funkčních skupin na rozhraní. V makroskopickém měřítku je potřeba se zaměřit na množství, hrubost a homogenitu studovaného materiálu [29].

Koheze je naopak vnitřní soudržnost látek, udává tedy sílu, jakou se k sobě přitahují stejné molekuly. Koheze je tvořena mezimolekulárními silami, jako jsou vodíkové můstky, Londonovy a van der Waalsovy síly. Mohou být také tvořeny pomocí chemických vazeb, které drží látku pospolu, zatímco adheze je spojení jednoho materiálu s druhým pomocí interakcí mezi povrchem a hydrogelem. Kohezní síla také souvisí se vzdáleností mezi molekulami, jedná se o nepřímou úměru, kdy s nárůstem vzdálenosti klesá kohezní síla [29].

Schopnost hydrogelu přilnout k povrchu nám udává smáčivost, kdy smáčení je schopnost kapaliny vytvářet rozhraní s pevným povrchem a hodnotí se zde tzv. kontaktní úhel ( $\theta$ ) mezi kapalinou a povrchem podkladu. Kontaktní úhel je funkcí jak disperzních adhezních sil, tedy interakcí mezi molekulami hydrogelu a podkladu, tak soudržností samotného hydrogelu. Jestliže je kontaktní úhel menší než  $90^\circ$  ( $\theta < 90^\circ$ ), pak podklad má vysokou povrchovou energii a adhezní síly mezi podkladem a hydrogelem jsou větší než kohezní uvnitř hydrogelu a ten se tak může rozprostřít po povrchu podkladu (Obrázek 6). V případě, že je kontaktní úhel větší než  $90^\circ$  ( $\theta > 90^\circ$ ), působí zde nízká povrchová energie a kohezní síly v hydrogelu jsou větší než adhezní, které působí mezi hydrogelem a podkladem. Dochází tak ke špatnému smáčení a na povrchu se vytvoří kapka (Obrázek 6) [28].



Obrázek 6 - Smáčivost hydrogelu k pevnému povrchu a vyznačení kontaktního úhlu [28].

## 2.2.2 Propustnost (permeabilita)

Propustnost čili permeabilita je schopnost látek nebo membrán propouštět částice vlivem koncentračního gradientu nebo vlivem rozdílných chemických potenciálů. Permeabilita se řídí Fickovými zákony difúze a může ji ovlivňovat např. velikost a polarita prostupující molekuly, koncentrační gradient, tloušťka a plocha membrány. Difúzní propustnost určuje, jak tyto částice rozpuštěné látky mohou difundovat přes membránu, a tedy snižovat koncentrační gradient během hromadného pohybu tekutiny [24].

Permeabilita nám např. určuje, jak rychle skrz gel prostupuje nebo vystupuje inkorporovaná aktivní látka (léčiva), a to slouží k cílenému uvolňování léčiv v organismu. Lze ji ovlivnit např. stupněm zesíťování, dále třeba kopolymerací s hydrofilní nebo hydrofobním monomerem [21]. Dalším důležitým odvětvím, kde je důležité sledovat propustnost je u kontaktních čoček, kdy se v posledních letech používají silikon hydrogelové, kde se sleduje schopnost tohoto hydrogelu propouštět kyslík [25, [28].

## 2.2.3 Absorpce a stupeň pohlčení vody

Další vlastností hydrogelů je schopnost pohlcovat vodu (absorpce). Polymerní řetězce hydrogelu reagují s rozpouštědlem a mají tendenci se rozpínat v plně rozpouštěném stavu, zatímco zesíťovaná struktura táhne řetězce dovnitř. Pro hydrogely můžeme vypočítat obsah vody a pohlcovací poměr [21].

$$\text{obsah vody} = \frac{m_{\text{voda}}}{m_{\text{gel}}} \cdot 100 \quad (2)$$

$$\text{pohlcovací poměr} = \frac{m_{\text{NG}}}{m_{\text{VG}}} \quad (3)$$

Kde  $m_{\text{voda}}$  je hmotnost vody [g],  $m_{\text{gel}}$  je hmotnost gelu [g],  $m_{\text{NG}}$  je hmotnost nabobtnalého gelu [g] a  $m_{\text{VG}}$  je hmotnost vysušeného gelu [g].

Pro použití v biochemických a farmaceutických aplikacích je důležité mít určeny charakteristiky bobtnání, protože poměr rovnovážného bobtnání ovlivňuje difúzní koeficient rozpuštěné látky, smáčitelnost a pohyblivost povrchu, dále také optické a mechanické vlastnosti hydrogelu [21]. Zvýšením počtu iontových skupin v hydrogelu dojde ke zvýšení kapacity stupně pohlcení vody, což se děje díky současnému zvýšení protiontů uvnitř hydrogelu. To má za následek zvýšení osmotického tlaku. Dalším úkazem v případě neiontových hydrogelů můžeme stupeň pohlcení naopak potlačit zvýšením koncentrace soli v roztoku, což způsobí snížení rozdílů koncentrace uvnitř gelu a mimo něj [30].

#### **2.2.4 Typy a použití hydrogelů**

Hydrogely, které se nejčastěji používají v praxi (biomedicína, biotechnologie, farmacie) jsou tzv. chytré hydrogely [15]. Tyto hydrogely změni své vlastnosti výrazně i jen díky malé změně fyzikálního nebo chemického podnětu. Reakcí může být třeba změna tvaru. Vlastnosti hydrogelů je možné měnit pomocí pH, teploty, iontové síly, tlaku, elektrického potenciálu nebo třeba chemickým a biochemickým působením.

##### ***Typy hydrogelů***

První skupinou jsou tzv. pH citlivé hydrogely [15, [16], které ve své struktuře obsahují kyselou (karboxylovou) nebo bazickou skupinu (amoniové soli) a buď dochází k protonizaci nebo naopak deprotonizaci. Velikost hydrogelu se mění v závislosti na pH prostředí, ve kterém se vyskytují. Tyto hydrogely je možné využívat pro cílenou léčbu nádorových buněk, protože extracelulární pH nádorových buněk je silně kyselé [16]. Hydrogely citlivé na teplotu [15, [16], též nazývané termogely, jsou schopny svoji strukturu ze stavu soli na gel měnit v závislosti na teplotě (sol-gel proces). Používají se pro distribuci léčiv v těle. Do této skupiny hydrogelů řadíme např. kolagen, agarosu, kyselinu hyaluronovou a chitosan. Dalším druhem jsou hydrogely citlivé na elektrický impuls [15, [16]. Jedná se o hydrogely které se buď smrští nebo naplní vodou v přítomnosti elektrického pole. Nejpoužívanějšími přírodními látkami pro přípravu tohoto typu hydrogelů jsou kyselina hyaluronová nebo alginát, ze skupiny syntetických látek se zde řadí vinylalkohol nebo kyselina methakrylová. Čtvrtým typem jsou hydrogely citlivé na světlo [15, [16], které mění své vlastnosti, pokud jsou vystaveny světlu s konkrétní vlnovou délkou. Jedním z hydrogelů citlivých na světlo jsou hydrogely kyseliny hyaluronové. Hydrogely reagující na glukosu [16] mají schopnost iniciovat sekreci endokrinního hormonu insulinu. Zasloužily si pozornost díky jejich použití jak pro rozvod insulinu, tak pro měření glukosy.

##### ***Použití hydrogelů***

Hydrogely jsou dobré pro distribuci léčiv [15], právě díky svým vlastnostem, které mohou být ovlivňovány při výrobě. Díky pórovité struktuře jsou hydrogely vysoce propustné pro nejrůznější typy léčiv, tyto léčiva se dostanou do hydrogelu a za určitých podmínek z něj mohou být uvolňovány. Hydrogel chrání léčivo před podmínkami v lidském těle, jako je např. pH. Hydrogelový obal se rozpadne pouze za jasně daných podmínek, které jsou v místě, kde je potřeba aby látka působila. Další možnosti využití hydrogelů jsou kontaktní čočky [15, [25]. Tkáňové inženýrství [15] se snaží najít přesný typ buněk a vykultivovat je ve vhodném systému *scaffold* („lešení“) za přesně daných podmínek. Hydrogely se používají, protože jejich struktura je podobná extracelulární matrix mnoha tkání, v tkáňovém inženýrství používat třeba pro vyplnění prázdných míst, jako nosiče pro bioaktivní molekuly nebo také jako podpora buněk při jejich regeneraci.

Motivací pro měření hydrogelů metodou mikroskopie atomárních sil je zejména to, že metoda AFM je schopna nejen zobrazit povrch vzorků (reliéf), ale zároveň je např. kvantitativním zobrazováním možné získat informace o mechanických vlastnostech vzorku, jako je adheze nebo tuhost vzorku. Zároveň je možné pozorovat strukturální změny povrchů gelů, např. v závislosti na koncentraci nebo i dalších podnětech.

### 3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

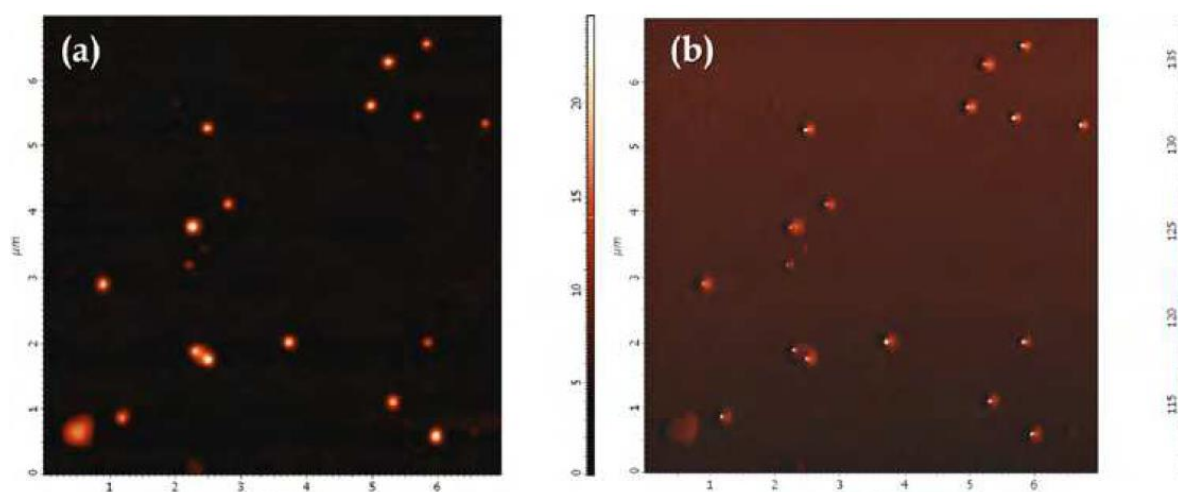
Během posledních let dochází k vývoji metod, které zkoumají částice hmoty a jejich interakce s biomolekulami. Tyto interakce se dále využívají v systémech jako biologické snímání, katalýza, cílená doprava a selektivní rozpoznávání. Pozorováním vazeb mezi částicemi a biomolekulami můžeme dojít k optimalizaci doby vystavení částic v jejich prostředí. Proto dochází k vývoji kvantitativních postupů pro studium materiálových vlastností s velkým rozlišením. Postupem času se ukázalo, že AFM poskytuje dostatečné výsledky, které se dají použít jako náhrada jiných technik, např. elektronové mikroskopie. Jednou ze zajímavých možností je možnost pozorování částic spojených s biologickými makromolekulami pomocí AFM [31]. Skenování metodou AFM poskytuje dobré výsledky s velkou přesností pro dispergované vzorky.

#### 3.1 Měření částic a jejich interakcí s biologickými makromolekulami metodou AFM

Příprava koloidních částic je nyní zaměřena na to, aby byly schopné pracovat v laboratorně dostupných podmínkách (teplota do 100 °C a atmosférický tlak) [31]. Za těchto podmínek mohou být koloidní částice charakterizovány polydisperzní distribucí velikosti a nehomogenními tvary. Zobrazování pomocí mikroskopie atomárních sil (AFM) poskytuje rychlé pozorování nanočástic bez nutnosti znát předem velikost distribuce a tvaru.

Zobrazování topografie vzorku pomocí AFM pomohlo získat informaci o mechanismu růstu nano krystalů sulfidu kadmnatého (CdS) připravených ve vodném prostředí termolýzou. Měření bylo provedeno po 30 minutách a 5 hodinách [31]. Analýza distribuce velikosti potvrdila, že velikost nano krystalů se zvyšovala s dobou.

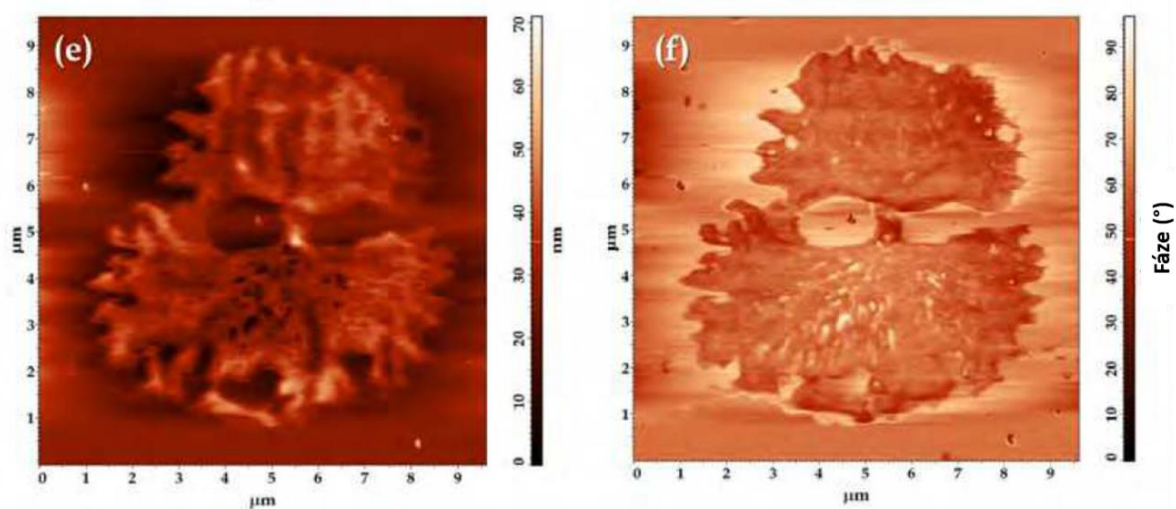
V případě kovových nanočásticových suspenzí je možné vidět rozdíly v topografii a fázovém obrazu. To umožnilo vytvořit hypotézu, že stabilizační vrstva (obal chránící částice před působením dalších chemických látek) nemůže být zanedbána. Jedním z takových příkladů jsou zlaté nanočástice připravené ve vodném prostředí pomocí redukce s citrátovými anionty, které zde hrají roli redukčního činidla i stabilizátoru. Snímek AFM (Obrázek 7) zobrazuje nanočástice (a) a zároveň i kontrast jednotlivých částic (b) [31]. Během fázového zobrazování se pozorovala větší frekvence oscilace v každém zrně (světlejší body). Podle toho se uvažovalo, že zrno je vlastně nanokompozitní materiál, který má částice, které interagují s hrotem AFM, díky kterému reagují jiným způsobem.



Obrázek 7 - Topografie Au nanočástic (a) a fázový obraz Au nanočástic (b) zobrazených pomocí AFM [31].

Dále byl pozorován efekt koncentrace citrátových iontů na velikosti částic. Příprava probíhala za stejné koncentrace zlatitých ( $\text{Au}^{3+}$ ) iontů a tentokrát byla použita poloviční koncentrace citrátu sodného [31]. Obraz získaný pomocí AFM ukázal, že průměrná velikost částic je menší a distribuce je užší. Toto pozorování umožnilo určit, že se zvyšující koncentrací citrátu se zvyšuje nukleace a je umožněna lepší kontrola růstu částice.

Interakce mezi koloidní částicí a biomolekulou byly studovány díky AFM analýze kdy se porovnávají data z měření vzorků, které obsahovaly biomolekuly a těmi, které neobsahovaly molekuly. Pro všechny měřené vzorky se ukázal prudký nárůst v rozměru zrna, jakmile se dostanou do kontaktu s proteinem nebo bakteriální DNA (Obrázek 8) [31]. Změny struktury mohou být vizuální v případě zlatých nanočástic, kdy se intenzivní červená barva zlaté suspenze změní na modrou po přidavku DNA (koncentrace řádově  $10^{-4}$  M) [31]. AFM záznam komplexu  $\text{Au}^{3+}$  nanočástic s DNA ukazuje, že koloidní částice nejsou detekovány samostatně, ale jako shluky částic v podobě agregátů. Ukázalo se tedy, že DNA vlákna mají tendenci se akumulovat kolem kovových částic, které částečně nahradí citrátové anionty, což vede k tvorbě agregátů.

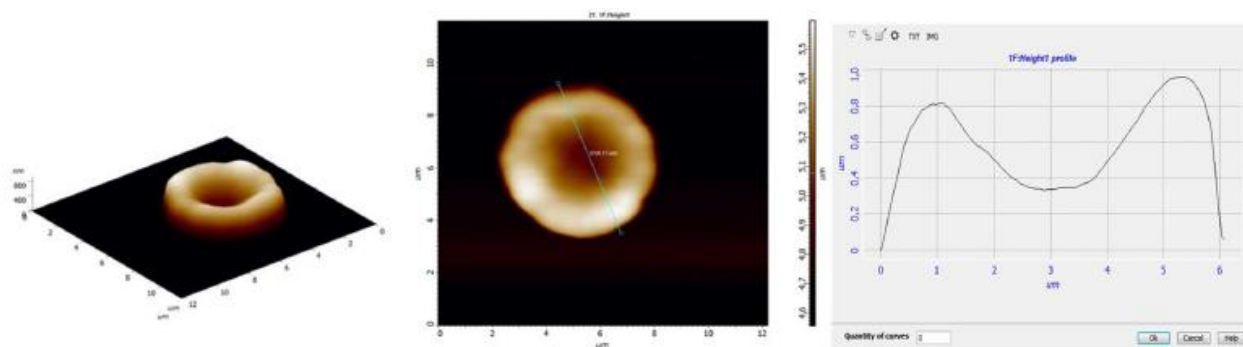


Obrázek 8 - Topografie komplexu  $\text{Au}^{3+}$  nanočástic s DNA (e) a fázový obraz tohoto komplexu (f) [31].

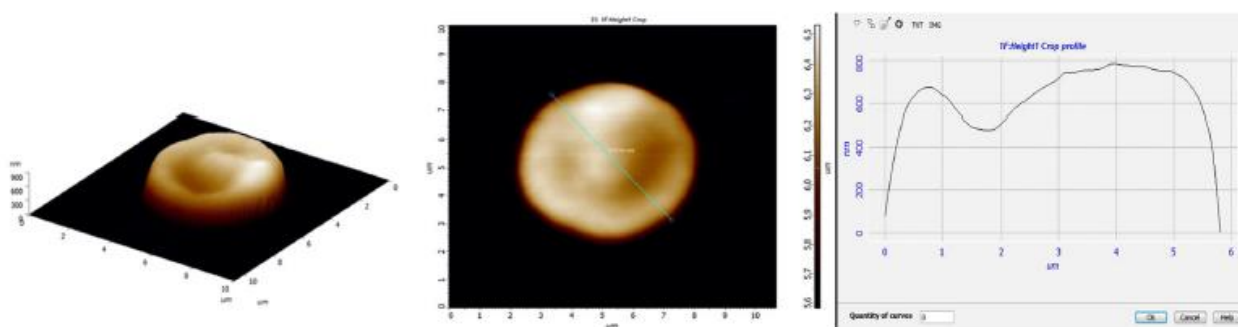
### 3.2 Použití AFM pro identifikaci účinku $\text{CdCl}_2$ na membránách krevních buněk

Při tomto výzkumu se studovala změna struktury krevní buňky po vystavení chloridu kadmnatému ( $\text{CdCl}_2$ ) pomocí trojrozměrného zobrazování jejich povrchů [32], sledovala se tedy modifikace povrchu membrány buňky. Vzorek krevních buněk byl z 50 ml suspenze, byl centrifugován a po separaci bylo inkubační médium promyto a byl přidán 1 ml 2,5% roztoku glutaraldehydu s 0,1 M pufrem HEPES (pH 7). K ochraně výsledných tvarů červených krvinek před poškozením byla zvolena metoda srážení ze suspenze na krycích sklech, které byly předem ošetřeny 1% glutaraldehydem. Měření se provedlo pomocí střídavé kontaktní metody s frekvencí 153 kHz, skenovaná oblast měla rozměry  $9,2 \times 9,2$   $\mu\text{m}$ . Použitý nosník HA\_NC měl konstantu pružnosti  $12 \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$  [32].

Autoři došli k závěru, že se zvyšující se koncentrací  $\text{CdCl}_2$  se zvyšuje počet výskytu abnormalit a poškození krevních buněk. Pro srovnání se zde měřily i normální krevní buňky (Obrázek 9), které nebyly vystaveny vlivu  $\text{CdCl}_2$ , z toho jen 8 % z nich mělo abnormální tvar, což odpovídá normálním parametrům. Když byla použita koncentrace  $1 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$  (Obrázek 10), abnormalitu vykazovalo 67 % buněk, při koncentraci  $10 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$  to bylo 80 %, při koncentraci  $100 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$  to bylo 98 % a při koncentraci  $1\,000 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$  vykazovalo abnormality 98 % krevních buněk [32].



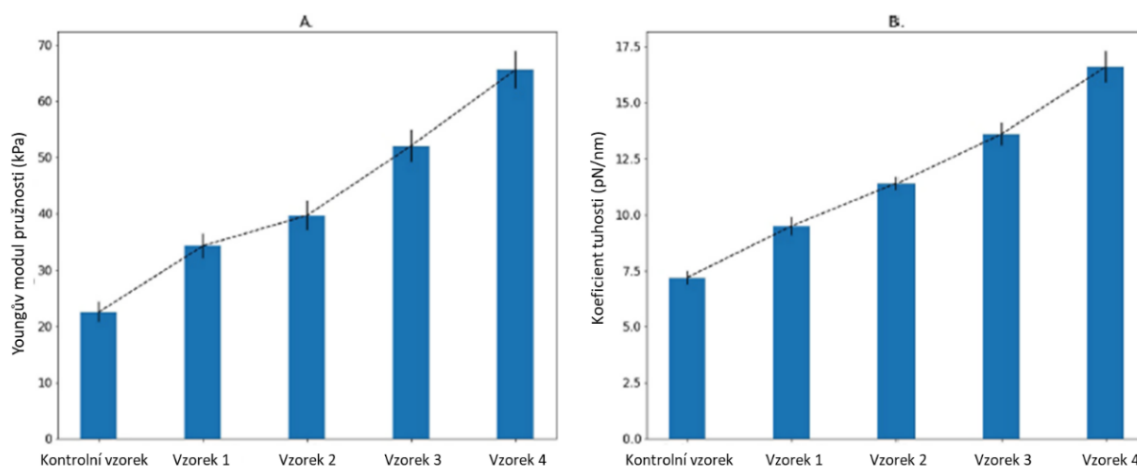
Obrázek 9 - 3D obraz a průřez zdravou krevní buňkou [32].



Obrázek 10 - 3D obraz a průřez krevní buňkou, která byla vystavena působení  $1 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3} \text{CdCl}_2$  [32].

Takto byly změřeny morfologické změny v membráně krevních buněk při různých koncentracích  $\text{CdCl}_2$ . Při nejnižší použité koncentraci  $\text{CdCl}_2$  ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) je vidět vznik vychlípeniny v místě, kde v normálním vzorku je dutina. Při zvýšení koncentrace na  $10 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$  už zde vznikají dvě vychlípeniny. Jakmile se zvýší koncentrace  $\text{CdCl}_2$  na  $100 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$  dojde k vytvoření vysokých okrajů buňky. Krevní buňka pak ztrácí svůj původní tvar při koncentraci  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$  [32].

Dále v tomto experimentu byl měřen koeficient tuhosti a Youngův modul pružnosti krevních buněk (Obrázek 11) pomocí silové spektroskopie, použitý typ nosníku byl NSG01 s kuželovým tvarem hrotu a konstantou pružnosti  $12 \text{N}\cdot\text{m}^{-1}$  [32]. Opět se zde porovnávaly hodnoty u zdravých buněk s těmi, které byly vystaveny již zmíněným koncentracím  $\text{CdCl}_2$ . V obou případech se opět ukázala závislost, že se zvyšující koncentrací se zvyšuje jak koeficient tuhosti i Youngův modul pružnosti krevních buněk.



Obrázek 11 - Porovnání hodnot Youngova modulu pružnosti (A) a koeficientu tuhosti (B) krevních buněk u zdravých krevních buněk a těch, které byly vystaveny působení koncentrací  $\text{CdCl}_2$  [32].

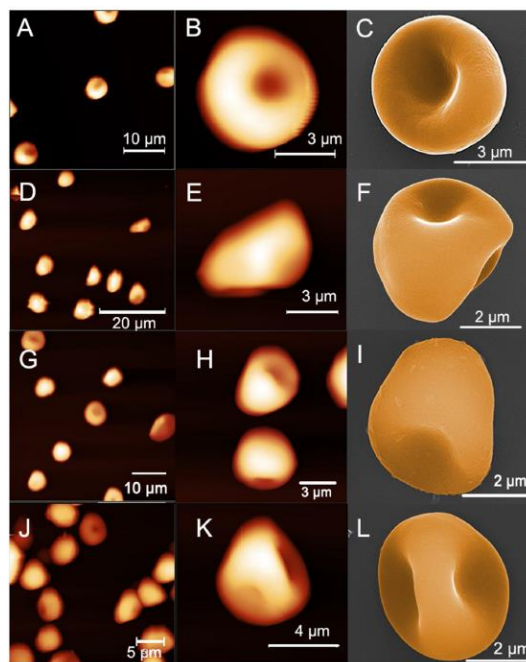
### 3.3 Aplikace AFM k posouzení morfologických změn erytrocytů u diabetu

Diabetes druhého druhu (*diabetes mellitus*) je jednou z nejrozšířenějších civilizačních chorob dnešní doby, toto onemocnění je nejen omezující samo o sobě, ale také může způsobit řadu dalších problémů, jako je selhání ledvin, riziko infarktu nebo mrtvice.

Tento článek se zaměřuje na pozorování morfologických změn erytrocytů. Tyto změny mohou nastat kvůli několika mechanismům, které v těle probíhají: (1) fosfolipidová translokace, odhalení fosfatidylserinu (normálně se nachází ve vnitřní membráně) do vnější membrány, (2) degradace proteinů obsažených v cytoskeletu, aktivaci calpeinu, (3) translokaci fosfatidylserinu [33]. Tyto změny mohou vést např. ke smrštění buňky erytrocytu, nebo ke změně tvaru buňky. Výše zmíněné změny je možné pozorovat pomocí AFM, kdy se zobrazují 3D povrchy erytrocytů.

Pro tuto studii se vytvořily čtyři skupiny, první z nich byli zdraví jedinci, druhou tvořili lidé se zvýšenou hladinou cukru v krvi, ve třetí skupině byli lidé s metabolickým syndromem a čtvrtou skupinu tvořili diabetici. Zúčastnění lidé byli muži i ženy ve věku od 18 do 57 let [33].

Atomová mikroskopie byla doplněna ještě skenovací elektronovou mikroskopií (SEM) pro přesnější zobrazování jednotlivých buněk. Na obrázku (Obrázek 12) je možné vidět obrazy erytrocytů od všech skupin. Erytrocyty zdravých lidí jsou na obrázcích A, B, C. Jedná se o normocyty (zdravé buňky), které mají kulatý, konkávní tvar. Obrázky D, E, F patří skupině lidí se zvýšenou hladinou cukru v krvi, je zde možné pozorovat nepravidelnost tvaru buňky a to, že konkávnost se nevyskytuje uprostřed erytrocytu. Pro skupinu lidí s metabolickým syndromem je možné pozorovat podobnou morfologii jako mají stomatocyty (buňky připomínají tvar otevřené pusy), jedná se o obrázky G, H, I. Poslední řádek obrázků (J, K, L) patří lidem s onemocněním *diabetes mellitus*, zde je možné pozorovat nepravidelnost buňky erytrocytu [33].



Obrázek 12 - Obrazy z AFM a SEM erytrocytů pro čtyři sledované skupiny [33].

Díky 3D obrazům vzorků bylo také možné pozorovat rozdíl tloušťky u zdravých buněk (normocytů) a buněk, které mají morfologické změny povrchu. Autoři došli k závěru, že normocyty tvoří mnohem tenčí vrstvu než buňky nemocných lidí. V závěru dále diskutují, že nejde říct, že by u jedné skupiny jedinců nastaly jedny konkrétní morfologické změny a každá buňka by tak vypadala stejně, ale jde říct, že u nemocných buněk je možné pozorovat morfologické změny struktury [33].

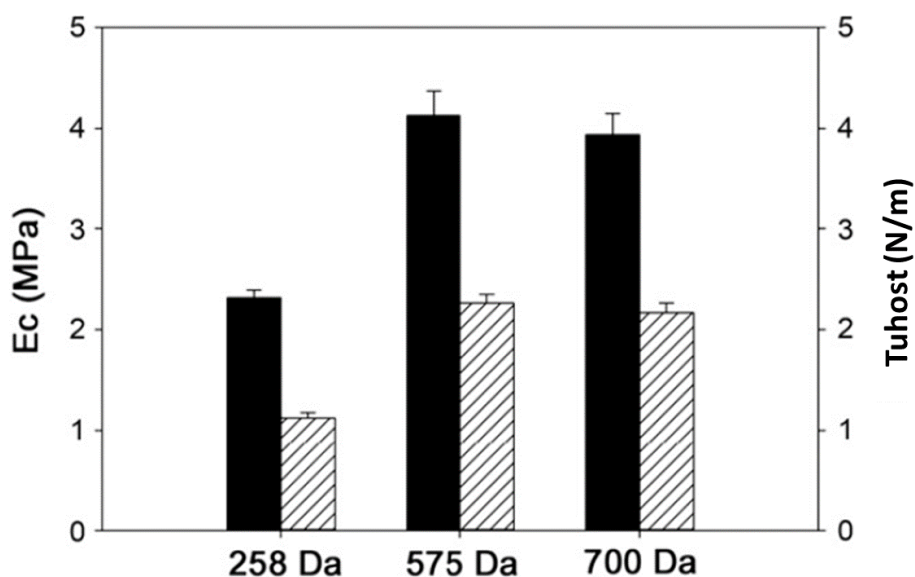
### 3.4 Vlastnosti polyethylenglykolového hydrogelu měřeného mikroskopii atomárních sil

Polyethylenglykol (PEG) je ve vodě rozpustný polymer, který má široké využití v biomedicině a biologii díky své biokompabilitě, hydrofilním vlastnostem a netoxicitě. Díky svým viskoelastickým vlastnostem, které můžeme lehce měnit, je schopný přenášet plyny a živiny a ulehčuje stavbu – proto se hojně používá v tkáňovém inženýrství [34].

Pro přípravu hydrogelu byly v tomto experimentu použity diakryláty polyethylenglykolu (PEG-DA) s molekulovými hmotnostmi 258, 575 a 700 Da. Aby došlo k tvorbě gelu, byl přidán fotoiniciátor Darocur 1173 a samotná fotoionizace proběhla v UV-komoře při vlnové délce 360 nm. 2 ml polymerního prekurzoru byly smíchány s 10  $\mu$ l fotoionizátoru Darocur 1173 (0,5%) a následně vortexovány (20 s), aby byla vytvořena dokonalá směs. Stejným postupem byly připraveny další dva roztoky, jediný rozdíl byl v koncentraci použitého fotoionizátoru (1% a 1,5%). Následovalo fotoionizace UV světlem po dobu 1–5 s, následně byly roztoky přelity do formy, kde byla směs ponechána tuhnout, výsledkem byly pláty o tloušťce přibližně 1,5 mm [34].

Nastavení mikroskopu atomárních sil bylo následující: měření bylo provedeno v bezkontaktním režimu, nosníky byly použity dva typy, prvním byl typ AC160 TS (konstanta pružnosti 30–40  $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$ ) a druhým byl typ PPP-ZEIHR (konstanta pružnosti 15–27  $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$ ). Na povrchu vzorku bylo vybráno 25 míst, kde nosník aplikoval sílu a měřil vlastnosti materiálu se zatížením 150 nN a 20 nN, dále pak s výtlakem 10 nm a 100 nm [34].

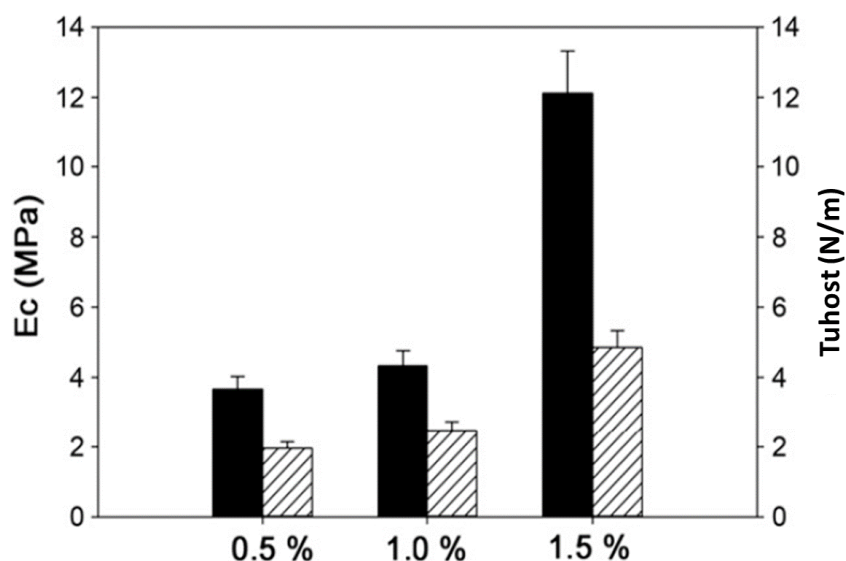
V první části experimentu byly studovány vlastnosti vzorku, elasticita a tuhost, u tří typů připravených polyethylenglykolových hydrogelů, které se lišily v molekulové hmotnosti (258, 575 a 700 Da). Tyto typy hydrogelů byly měřeny v suchém stavu. Následující graf ukazuje závislost elasticity a tuhosti materiálu na molekulové hmotnosti (Obrázek 13). Je zde možné pozorovat, že mechanické vlastnosti polymeru se zvyšují s rostoucí molekulovou hmotností, ačkoliv mají tendenci se vyrovnávat se zvyšující se molekulovou hmotností. Pro další měření byl vybrán polyethylenglykolový hydrogel s molekulovou hmotností 575 Da, který se běžně používá v biomedicínských aplikacích [34].



Obrázek 13 - Závislost elasticity a tuhosti na molekulové hmotnosti polyethylenglykolového hydrogelu [34].

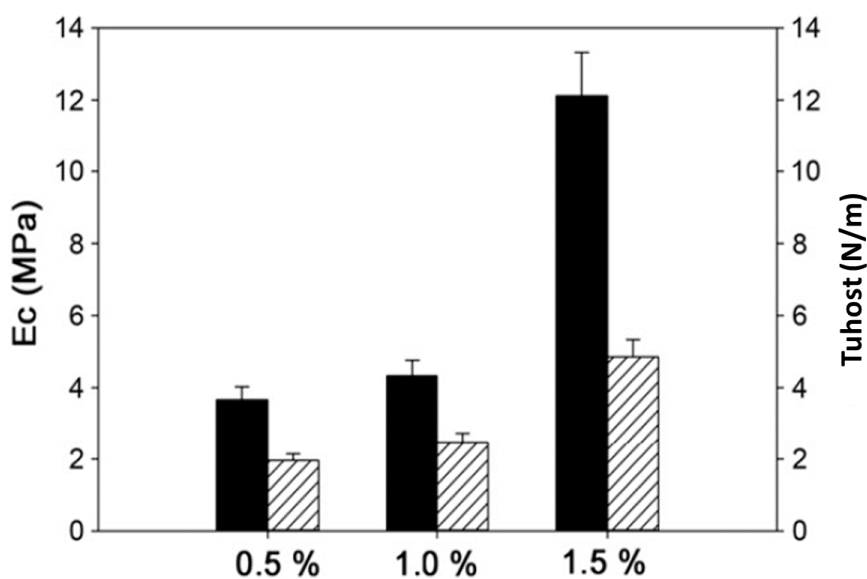


Zde byly připraveny vzorky polyethylenglykolu o molekulové hmotnosti 575 Da, lišily se však koncentrace použitého iniciátoru (0,5%; 1%; 1,5%), je zde možné pozorovat, že se zvyšující se koncentrací stoupá jak hodnota elasticity, tak i tuhosti (Obrázek 14). To ukazuje, že koncentrace iniciátoru ovlivňuje stupeň zesílení a s vyšší koncentrací nám vzniká tužší hydrogelová struktura [34].



Obrázek 14 - Závislost mechanických vlastností, elasticity a tuhosti, polyethylenglykolového hydrogelu na koncentraci použitého iniciátoru [34].

Pro poslední měření byly připraveny vzorky hydrogelu z polyethylenglykolu o molekulové hmotnosti 575 Da, který byl smíchán s 1% roztokem iniciátoru. V těchto vzorcích byly měřeny mechanické vlastnosti při různém obsahu vody (Obrázek 15). Měření se následně provedlo se suchým vzorkem, dále s obsahem vody 63, 83 a 100 % vody. Je možné pozorovat, že se zvyšujícím se obsahem vody klesá elasticita vzorku. Tuhost vzorku prvně mírně stoupá, při 83% obsahu vody vykazuje největší tuhost, poté znovu klesá. Tyto nepřesnosti mohou být způsobeny přítomností vody ve vzorku, kdy se zde začínají objevovat přitažlivé síly mezi vodou a hrotem, který vzorek skenuje [34].



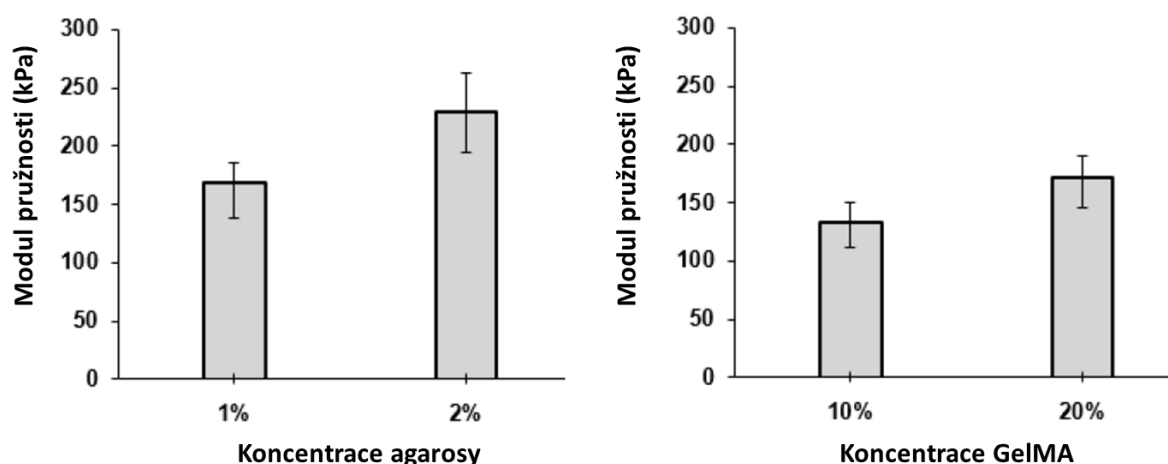
Obrázek 15 - Závislost mechanických vlastností polyethylenglykolového hydrogelu, elasticity a tuhosti, na procentuálním zastoupení vody [34].

### 3.5 Měření elastických vlastností biologických hydrogelů metodou AFM

Mechanické vlastnosti hydrogelů mohou ovlivnit funkci buněk, transdukci a buněčné chování, jako je růst, migrace, adheze a morfologie. Cílem této studie [35] bylo zkoumání elasticity dvou hydrogelů, prvním z nich je agarosový hydrogel, druhým typem je želatinový methakrylát (GelMA) pomocí mikroskopie atomárních sil.

Agarosový gel byl připraven s 1% a 2% hmotnostní koncentrací, tedy agarosový prášek o hmotnosti 1 g a 2 g byl rozpuštěn ve 100 ml deionizované vody a povařen 2 minuty v mikrovlnné troubě. Pro vytvoření GelMA o koncentraci 10 a 20 % byl použit roztok prekurzoru, který byl připraven rozpuštěním lyofilizovaného GelMA v deionizované vodě při 40 °C. Pro měření elasticity byl na AFM nastaven režim silové modulace, nosník měl konstantu pružnosti  $0,06 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ . Měření vlastností se provedlo třikrát na každém vzorku, ale pokaždé v jiném místě. Teplota, při které se měření provádělo, byla 25 °C [35].

Na následujícím obrázku je možné vidět výsledky měření, kdy na levém grafu je závislost elasticity na koncentraci agarosového hydrogelu (Obrázek 16), kdy průměrná elasticita byla 168 kPa (1% gel) a 230 kPa (2% gel). Podobné chování gelu je možné vidět i u GelMA, kdy průměrná elasticita u 10% gelu byla 133 kPa a u 20% gelu 171 kPa. V případě agarosového gelu byl přírůstek elasticity 35 %, v případě GelMA to bylo 38 % [35].



Obrázek 16 - Grafy závislosti elasticity na koncentraci připravených hydrogelů: agarosový (vlevo), želatinový methakrylát (vpravo) [35].

### 3.6 Souhrn získaných poznatků

Mikroskopie atomárních sil může sloužit pro pozorování nejrůznějších struktur a k určování jejich vlastností. Jedná se o poměrně novou metodu, která si své místo teprve získává. Výhodou je její použití pro nevodivé vzorky, je schopna zachytit i ty nejmenší detaily v řádech nanometrů. Může se jednat jak o destruktivní, tak i nedestruktivní metodu, protože je možné měřit ve třech režimech, těmi jsou kontaktní, bezkontaktní a střídavá metoda. Vybrané studie zkoumají především povrchy vzorků, ale také jejich vlastnosti (např. Youngův modul pružnosti).

V prvním popsaném experimentu se autoři nejprve zaměřili na pozorování nárůstu krystalů sulfidu kadmátového v čase [31], kdy jim pořízené snímky potvrdily, že s dobou krystaly dorůstají do větších velikostí. Druhou část věnovali pozorování zlatých nanočástic [31], nejprve vliv koncentrace citrátových iontů na jejich velikost, kdy se zjistilo, že se zvyšující se koncentrací citrátu sodného dojde k nukleaci a vznikají větší shluky. Dále se zde pozorovala interakce zlatých nanočástic s biomolekulami [31], jako je DNA, kdy došlo k agregaci.

Následující dva experimenty sledují struktury krevních buněk a jejich změny pomocí trojrozměrných snímků. První experiment se zaměřuje na změny struktury krevní buňky po přidání různých koncentrací chloridu kademnatého [32], kdy se zjistilo, že se zvyšující koncentrací se ničí struktura buňky. Zároveň se měřily i mechanické vlastnosti jako Youngův modul pružnosti a tuhost. Bylo zjištěno, že i tyto hodnoty se s rostoucí koncentrací soli zvyšují. Druhý experiment se zaměřuje na sledování morfologické změny krevních buněk [33] u čtyř skupin jedinců. První skupinou jsou zdraví lidé, druhou lidé se zvýšenou hladinou cukru v krvi, třetí lidé trpící metabolickým syndromem a čtvrtou lidé trpící onemocněním *diabetes mellitus*.

Mikroskopie atomárních sil je možné využít nejen pro zobrazování povrchů, ale také k měření vlastností studovaných vzorků, jako je elasticita, tuhost materiálu. Jeden z experimentů se zaměřil na studiu polyethylenglykolu [34], kdy v první části se zkoumala elasticita a tuhost v závislosti na molekulové hmotnosti (258, 575 a 700 Da). Poté byl vybrán hydrogel o molekulové hmotnosti 575 Da, který se nejčastěji využívá v praxi a u něj se pozorovala závislost elasticity a tuhosti na koncentraci použitého iniciátoru. V neposlední řadě se sledovala závislost elasticity a tuhosti na procentuálním zastoupení vody. Předchozí měření se prováděla v bezvodém stavu, tedy hydrogel byl zcela vysušen.

Poslední zmíněný experiment studoval závislost elasticity na koncentraci použitého gelu (agarosový a želatinového methakrylátu) [35].

## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část této práce se zaměřuje na postup měření na mikroskopu atomárních sil (AFM), přípravou agarosového gelu a přípravou vzorku polystyrenových nanočástic.

### 4.1 Chemikálie

#### Polystyrenové nanočástice

Polystyrenové monodisperzní částice o velikosti 1  $\mu\text{m}$ .

*Micro particle size standard based on polystyrene monodisperse (size: 1,0  $\mu\text{m}$ )*

Fluka Analytical

72938-10ML-F

#### Agarosa

Agarosa pro molekulární biologii (*Agarose for molecular biology*)

Sigma Aldrich

CAS: 9012-36-6

Číslo šarže: 05066-50G

MR: 306,264

#### Deionizovaná voda

### 4.2 Pracovní postup nastavení přístroje

Každý režim měření mikroskopem atomárních sil má své konkrétní způsoby nastavení. Obecně se postupuje následovně:

- 1) Prvním krokem je zapnutí počítače, kamery, která slouží ke sledování a upravování laseru na povrchu nosníku, a ovladače mikroskopu atomárních sil (viz příloha – Obrázek 43).
- 2) Následuje spuštění programu JPK SPM Desktop.
- 3) Pro každé měření je potřeba zvolit správný nosník, aby nedošlo ke zničení vzorku, případně i samotného nosníku (viz kapitola 2.1.3).
- 4) Pro upevnění nebo naopak vyndání nosníku slouží držák nosníku, který se umístí do podstavce pro výměnu (viz příloha – Obrázek 44).
- 5) Držák nosníku se umístí do podstavce a pootočí se o 90° proti směru a tato poloha se uzamkne (viz příloha – Obrázek 44).
- 6) Vybraný nosník se umístí do držáku a šroubem se upevní. Pro manipulaci s nosníkem se používá pinzeta, při vkládání do držáku je důležité, aby nedošlo k poškrábání průhledné části, protože přes tuto část prochází laserový paprsek a měření by mohlo být následně ovlivněno systematickou chybou (viz příloha – Obrázek 45).
- 7) Po upevnění nosníku do držáku je následně celý držák umístěn do hlavice mikroskopu atomárních sil, kde se zde opět po vložení otočí o 90° proti směru hodinových ručiček a tato poloha se uzamkne (viz příloha – Obrázek 46). Hrot nosníku musí pokaždé směřovat doprava, aby bylo možné dostat laser na hrot.
- 8) Vzorek určený ke snímání je umístěn do svorek, aby nedošlo k jeho posunutí při měření či manipulaci (viz příloha – Obrázek 47).
- 9) Hlavice AFM je umístěna nad vzorek (viz příloha – Obrázek 48).

- 10) V měřicím programu se vybere požadovaný režim měření (např. *AC Mode Imaging*, *QI™ Advanced Imaging*).
- 11) Následně se pomocí pozičních šroubů upraví poloha vzorku, aby se nosník nad ním nenacházel nad rozhraním kde končí vzorek a začíná podložní sklo. Po nalezení správné pozice se polohový šroub otočí o půl otáčky zpět, aby došlo k uzamčení této polohy a nedocházelo k nechtěným vibracím a posunutí.
- 12) V tomto kroku se zároveň upraví pozice laseru na hrotu nosníku pomocí šroubů, které upraví polohu vertikálně a horizontálně (viz příloha – Obrázek 49) správná pozice laserového paprsku se projeví největším možným signálem [V]. Pokud se odražený paprsek nenachází ve středu fotodiody (detektoru), upraví se poloha detektoru dvěma šrouby, aby paprsek byl přesně ve středu čtyřkvadrantového pole. Laserový paprsek je dobré nechat svítit na hrot nosníku minimálně po dobu 15 minut, protože dochází vlivem zahřívání hrotu k posunu signálu na detektoru mimo povolenou výseč (po 15 minutové temperaci je nutné pozici laserového paprsku na detektoru upravit tak, aby byl opět ve středu čtyřkvadrantového pole).
- 13) Dále se zde nastaví podmínky měření a provede se kalibrace nosníku. Díky této kalibraci se získá doporučené nastavení pro měření pomocí střídavé kontaktní metody (*QI™ Advanced Imaging*), především doporučená hodnota *Setpoint*.
- 14) Po provedené kalibraci se přejde k hrubému přiblížení nosníku ke vzorku, které se provádí manuálně pomocí kroků o velikosti 1 000, 500, 100, 50 a 10  $\mu\text{m}$ , toto pozoruje operátor s veškerou obezřetností tak, aby nedošlo k poničení nosníku a hrotu.
- 15) Jakmile dojde k dostatečnému přiblížení nosníku ke vzorku, je na řadě doostření pomocí piezoelektrického efektu. Ten nám hrot přesně přiblíží k povrchu vzorku konstantní rychlostí (*constant velocity*). Aby došlo k přiblížení, je potřeba mít nastavenou hodnotu *Setpoint*. Následně je možné začít měření. Na hlavici mikroskopu atomárních sil svítí kontrolka přiblížení (anglicky *Approached*) (viz příloha – Obrázek 50).
- 16) Měření se zapne pomocí velkého zeleného tlačítka start v měřicím programu, tímto se i měření vypíná (viz příloha – Obrázek 51).

### **Kvantitativní zobrazování (*QI™ Advanced Imaging*)**

Pracovní postup nastavení kvantitativního zobrazování se provede podle bodu 1) – 9) v obecném postupu a v bodě 10) obecného postupu se vybere režim *QI™ Advanced Imaging* a pokračuje se dále podle bodů 11) – 13). V tomto měřicím režimu je možné nastavit předpokládanou výšku a adhezi vzorku, stejně tak jaký je použit nosník, v jakém prostředí se měření provádí a teplota. Po tomto nastavení je možné provést kalibraci nosníku. A dále se již postupuje podle bodů 14) – 16). Po přiblížení k povrchu vzorku je možné spustit měření s přednastavenými hodnotami, které se získají kalibrací nosníku, nebo si je můžeme upravit podle potřeby.

Jako první je zde hodnota *Setpoint*, která udává, jakou silou bude hrot působit na povrch vzorku. Při kvantitativním zobrazování je výhodné zvyšovat hodnotu *Setpoint*, protože dochází ke zlepšení kvality snímku. Nemusí to však být podmínkou, většinou je dobré ponechat původní doporučenou hodnotu získanou kalibrací nosníku, protože příliš velkým zvýšením hodnoty *Setpoint* může dojít ke zničení hrotu nosníku.

Druhou hodnotou je *Z Length*, jedná se o vzdálenost, kterou hrot urazí během křivky síly. Tuto hodnotu je dobré ponechat na nastavené hodnotě 150 nm, protože zvýšením či snížením dochází k ovlivnění doby měření a tato hodnota byla experimentálně stanovena jako ideální na poměr kvalita/doba měření.

Naopak hodnotu *Z Speed* je dobré občas pozměnit, protože může dojít k vylepšení kvality snímku, např. když snímek vychází neostrý a nebo hrot nestíhá zobrazovat detaily na povrchu vzorku. To je proto, že se hrot nestíhá přizpůsobovat povrchu. Jedná se o rychlost měření.

Hodnota *Pixel Time* souvisí s rychlostí měření. Udává, jakou dobu bude hrot skenovat jeden pixel.

*Scan Size* určuje velikost výseče, kterou budeme měřit. Maximální plocha, kterou lze možné změřit je  $100 \times 100 \mu\text{m}$ . Obecně je dobré začít měřit první snímek s větší velikostí a menším rozlišením, kdy prvně získáme velký, ovšem relativně nekvalitní snímek, a postupně velikost měření snižovat, zvyšovat kvalitu a zaměřovat se tedy jen na konkrétní detaily. Jestliže se měření po chvilce zastaví a snímek se nedoměří, je dobré snížit velikost skenu. Toto je způsobeno tím, že hrot na velké ploše není schopen zaznamenat příliš malé detaily.

Poslední, co je možné změnit v nastavení, jsou *Pixels*, které udávají rozlišení výsledného snímku. Pro kvantitativní zobrazování je dobré tuto hodnotu nechat na  $256 \times 256$ , jelikož dává poměrně kvalitní snímky a zároveň měření netrvá příliš dlouhou dobu. Zvýšením kvality snímku se výrazně prodlužuje doba měření snímku.

### **Bezkontaktní režim (AC Mode Imaging)**

Pro bezkontaktní režim měření se postupuje podle bodu 1) – 9) a v bodě 10) se vybere bezkontaktní režim měření, tedy *AC Mode Imaging*. Následuje upravení polohy vzorku a laseru na hrot nosníku, body 11) – 12). Před samotnou kalibrací hrotu nosníku se nastaví podmínky měření (prostředí a teplota) a typ nosníku. V bezkontaktním režimu se nenastavuje předpokládaná výška vzorku a adheze, jelikož tato metoda slouží pouze pro zobrazování povrchu. Před přiblížením nosníku ke vzorku je nejprve nutné provést automatické ladění nosníku, aby se dosáhlo nastavené hodnoty konečné amplitudy (*Target Amplitude*) 1 V, což je nejběžnější hodnota pro většinu měření. V nastavení tohoto ladění se nechá nosník s hrotem chvíli oscilovat, po chvilce se zastaví a najde se rezonanční pík. Z něj se určí relativní hodnota *Setpoint* nižší než je *Target Amplitude* v rozmezí od 70 do 80 % (viz příloha – Obrázek 52). Jakmile je tato hodnota nastavena, je možné přiblížit nosník k povrchu vzorku pomocí hrubého přibližování a piezoelektrického efektu. Když dojde k přiblížení, může se začít měření nebo je možné pozměnit přednastavené hodnoty, které byly získány kalibrací nosníku.

První hodnotou je *Gain*, neboli přírůstek a jedná se o sílu zpětné vazby působící na vzorek. Pro tuto metodu je ideální ponechat přednastavenou hodnotu 150,0. Tato hodnota zároveň redukuje šum v získaném snímku a pro použítá měření byla tato přednastavená hodnota optimální a získané snímky byly velice kvalitní.

*Setpoint* je hodnota udávající sílu, která působí na vzorek. Během bezkontaktního režimu je pro získání kvalitnějšího snímku lepší snižovat tuto hodnotu. Příliš vysoká hodnota *Setpoint* může zničit jak vzorek, tak i hrot. Při bezkontaktní metodě, čím je nižší hodnota *Setpoint*, tím je větší tlumení a síla aplikovaná na povrch vzorku.

Relativní *setpoint* (*Relative Setpoint*) je hodnota *Setpoint* vyjádřená v procentech.

Velikost snímku udává tzv. *Scan Size*. Maximální rozsah je  $100 \times 100 \mu\text{m}$ .

*Pixels* udává kvalitu získaného snímku, pro tuto metodu je výhodné ponechat přednastavenou hodnotu  $512 \times 512$ .

Hodnota rychlosti měření (*Line Rate*) nejvíce ovlivňuje kvalitu měření, se snížením rychlosti dochází ke zlepšení snímku.

### **4.3 Příprava vzorku polystyrenových částic**

Optimalizace měřících režimů (*QI<sup>TM</sup> Advanced Imaging* a *AC Mode Imaging*) byly provedeny na standardním vzorku polystyrenových nanočástic o velikosti  $1 \mu\text{m}$ . Jako první byl měřen koncentrovaný vzorek polystyrenových nanočástic, ale docházelo ke shlukování jednotlivých částic do velkých agregátů, proto byl zvolen poměr 1:100 a tento koncentrovaný vzorek byl naředěn

deionizovanou vodou. K 0,1 ml roztoku nanočástic bylo naředěno 10 ml deionizované vody. Tento zředěný roztok byl následně nakapán na podložní sklíčko a voda byla odpařena v sušárně při teplotě přibližně 60 °C.

#### **4.4 PVA fólie**

PVA fólie byly připraveny Bc. Zuzanou Bayerovou v rámci její diplomové práce. Tyto fólie byly připraveny smícháním polyvinylalkoholu (PVA) a chitosanu, rozdíl v jednotlivých typech spočíval v přidavku rozdílných koncentracích hydroxidu sodného (NaOH) nebo chloridu sodného (NaCl). Přidávky těchto látek způsobily změnu pH a následnou velikost pórů fólií, která následně ovlivnila distribuci velikosti pórů ve finální hydrogelu (xerogelu). Takto popsané fólie byly zesíťované chemicky, jeden vzorek byl připraven fyzikálním zesíťováním, definovaným zmrazováním a rozmrazováním reakční směsí. Kompletní postup přípravy včetně navážek je uveden v publikaci zde (DOI: 10.1080/09205063.2013.833441).

Jednotlivé výřezy o velikosti 7×7 mm byly nalepeny na podloží sklíčka pomocí oboustranné lepicí pásky, aby nedocházelo k nechtěnému pohybu fólie během měření a aby byly vyhlazeny nerovnosti, které by znehodnotily měření.

#### **4.5 Příprava vzorků agarosových hydrogelů**

Pro přípravu 0,5% roztoku agarosy bylo naváženo 0,05 g, která byla rozpuštěna v 10 ml deionizované vody. Tato směs byla umístěna na magnetickou míchačku s ohřevem a směs byla ohřívána na teplotu 80 °C za konstantního míchání (RPM 250). Po rozpuštění byl 0,5% roztok agarosy kapátkem nakapán na podložní sklíčko a gel byl ponechán ztuhnout. Pro zbylé gely se postupovalo stejně, jen s rozdílnými navážkami, aby byly vytvořeny gely o koncentracích 1%, 2% a 4%.

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem této bakalářské práce bylo prostudování návodu mikroskopie atomárních sil a následné optimalizaci dvou měřících režimů, konkrétně kvantitativního zobrazování (*QI<sup>TM</sup> Advanced Imaging*), což je střídavá kontaktní metoda, a bezkontaktní režim zobrazování (*AC Advanced Imaging*). Optimalizace měření byla prováděna na standardním vzorku polystyrenových nanočástic o velikosti 1 μm, které byly naředěny deionizovanou vodou v poměru 1:100. Po provedení optimalizace měření byly změřeny PVA fólie, kde se sledovala jejich pórovitost v závislosti na použitých činidlech, jako je chlorid sodný (NaCl) a koncentrační řada hydroxidu sodného (NaOH). Byl také sledován vliv fyzikálních vlastností, konkrétně definované mražení a rozmrazování, na porozitu směsi polyvinylalkoholu s chitosanem. Následovalo měření velikosti pórů pro koncentrační řadu agarosy a měření velikosti pórů kolagenového xerogelu.

### 5.1 Optimalizace kvantitativního zobrazování (*QI<sup>TM</sup> Advanced Imaging*)

Optimalizace tohoto měřícího režimu se prováděla na vzorku polystyrenových nanočástic, který byl zředěn v poměru 1:100. Ředění bylo provedeno aby došlo k distribuci jednotlivých polystyrenových nanočástic a nedocházelo k agregaci. Pro měření byl vybrán nosník model FESP-V2.. Jedná se o typ nosníku, který je optimální pro měření kvantitativní metodou. Byly vyzkoušeny celkem dva modely nosníků, TESP-V2 a FESP-V2, po proměření obou byl vybrán právě model FESP-V2 s menší konstantou tuhosti, protože podával kvalitnější snímky. Po nalezení samostatné polystyrenové nanočástice bylo provedeno měření s přednastavenými hodnotami (základní nastavení), které byly získány kalibrací použitého nosníku (Obrázek 17). Základní nastavená hodnota *Setpoint* byla 49,397 nN, hodnota *Z length* 150 nm, rychlost měření (*Z speed*) byla 62,5 μm·s<sup>-1</sup>, a s tím související *Pixel Time* na 6,0 ms, velikost skenu (*Scan Size*) byla 3,0 μm×3,0 μm, hodnota kvality snímku (*Pixels*) byla nastavena na 256×256. Jedním z cílů této bakalářské práce bylo proměřit změny snímku v závislostech na změnách jednotlivých hodnot nastavení oproti přednastaveným hodnotám. Byly především testovány hodnoty *Setpoint*, *Pixel Time* a *Pixels*, protože nejvíce ovlivňovaly kvalitu výsledného snímku.

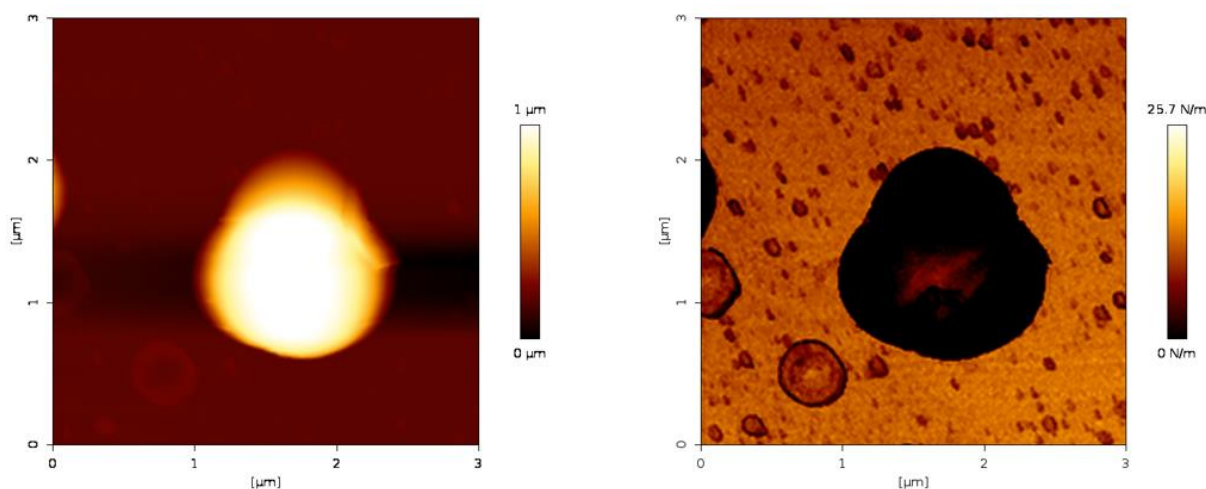
Je zde možné vidět snímek jedné polystyrenové nanočástice, který zobrazuje výšku (levý snímek) a tzv. *Slope fit* (pravý snímek).

Díky kvantitativní metodě zobrazování je možné získat zároveň topografický snímek (reliéf) vzorku, ale i snímek elastických vlastností. Systém generuje snímek změny síly (*force modulation image*, FMM), to je dáno v hodnotě *Slope fit* a výsledný snímek je tedy mapa elastických vlastností vzorku. Tato hodnota *Slope fit* se získá z měnící se hodnoty amplitudy nosníku podle vlastností vzorku (elasticity) [36]. *Slope fit* je hodnota, která byla získána měřením a jedná se o hodnotu, která vyjadřuje mechanické vlastnosti vzorku (tuhost materiálu nebo viskoelastické vlastnosti) [37]. Tuto hodnotu je možné získat s pomocí křivky závislosti síly na vzdálenosti (Obrázek 4). Díky hodnotám získaných při kalibraci nosníku (konstanta tuhosti a citlivosti detektoru) a s pomocí Hookova zákona:

$$F = -k \cdot x \quad (4)$$

kde  $F$  je síla [N],  $k$  je konstanta tuhosti [N·m<sup>-1</sup>] a  $x$  je vzdálenost [m], mohla být softwarem dopočítána hodnota *Slope fit*, která vyjadřuje tuhost materiálu. Informace o vychýlení nosníku tak byla převedena na sílu [37].

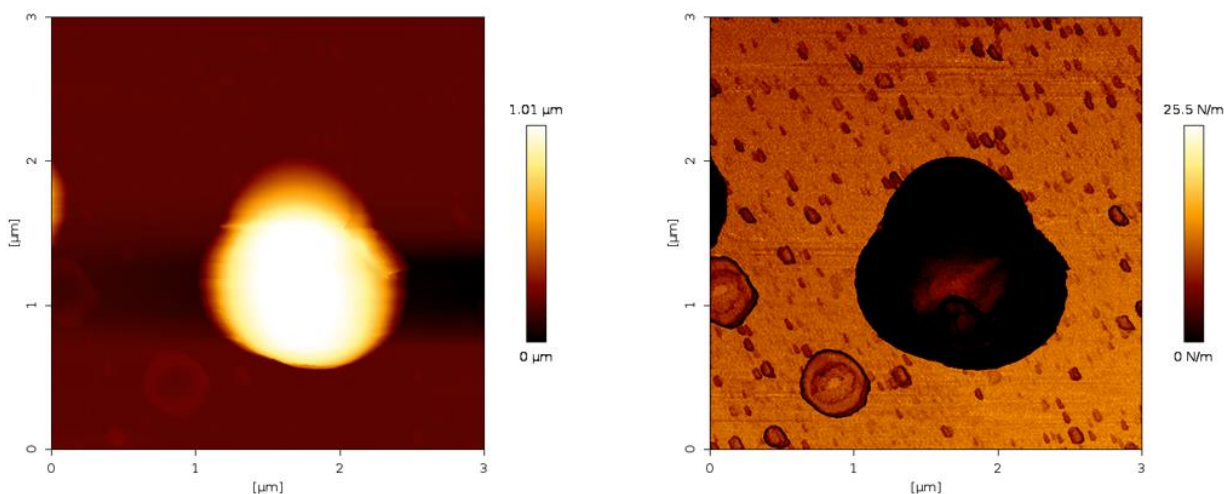




Obrázek 17 – Snímek zobrazující výšku a Slope fit polystyrenové nanočástice s původním nastavením.

### 5.1.1 Zvýšení kvality snímku (*Pixels*)

Po prvním měření se základním nastavením bylo provedeno měření, kdy byla zvýšena hodnota *Pixels* (Obrázek 18) z 256×256 na 512×512. Kvalita výsledného snímku se nepatrně zvýšila, ale ne moc výrazně, došlo k částečnému zaostření.



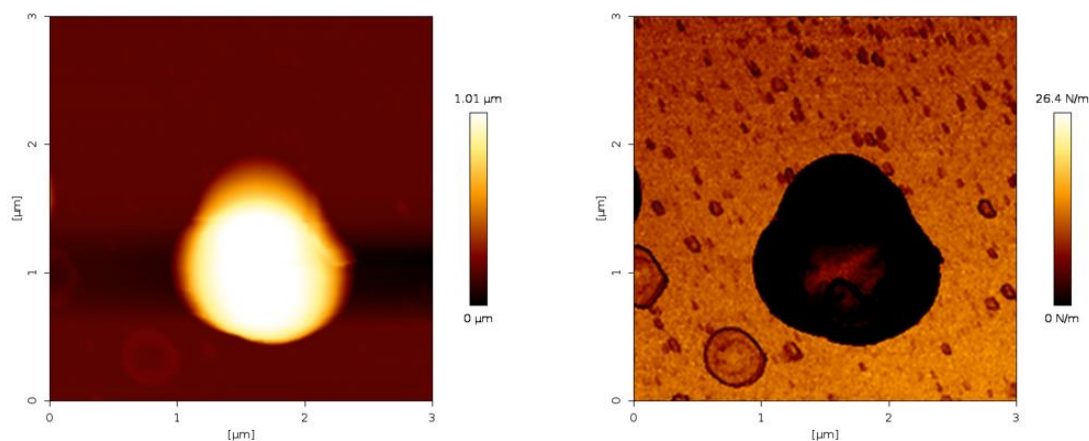
Obrázek 18 - Snímek zobrazující výšku a Slope fit polystyrenové nanočástice - zvýšení hodnoty *Pixels*.

Měření s přednastavenými hodnotami trvalo přibližně 6 minut, se zvýšenou hodnotou *Pixels* došlo k prodloužení doby měření na necelých 30 minut, tudíž v porovnání kvality snímku a rychlosti měření bylo zjištěno, že zvýšení této hodnoty neudělá velký rozdíl výsledného snímku. Pro další měření metodou kvantitativního zobrazování byla ponechána hodnota rozlišení *Pixels* na 256×256.

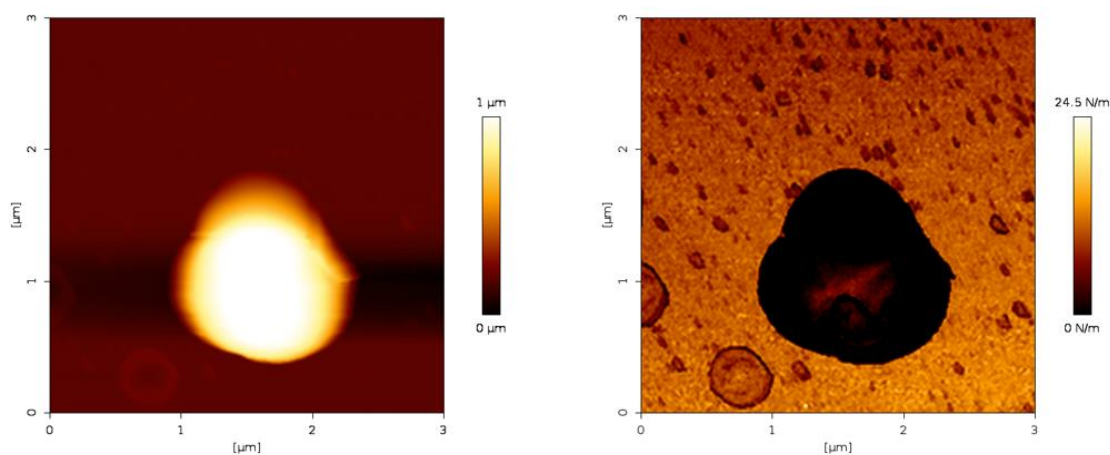
### 5.1.2 Snižování rychlosti měření

Hodnota *Pixels* byla nastavena opět na původních 256×256, ale byla snížena rychlost měření o 20 % (Obrázek 19), všechny ostatní hodnoty byly ponechány nezměněné, tedy bylo ponecháno nastavení dané kalibrací nosníku. Čas měření byl tedy prodloužen z 6 minut na 8 minut a došlo k mírnému zlepšení obrazu výšky. Následně byla rychlost měření opět snížena, konkrétně o 52 % z původní rychlosti, doba trvání byla tedy posunuta na zhruba 13 minut (Obrázek 20). Poslední snížení rychlosti měření o 68 % způsobilo prodloužení doby měření na 20 minut (Obrázek 21).

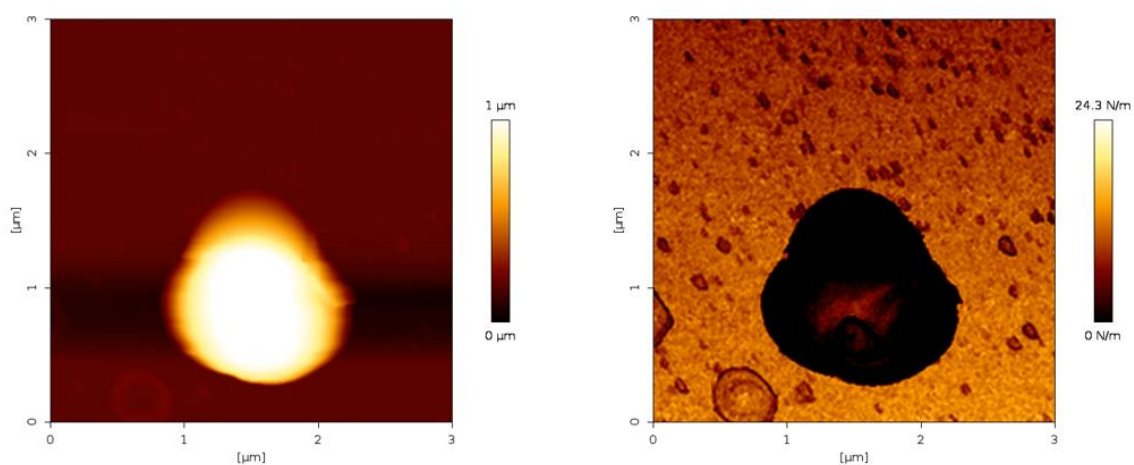
Snížením rychlosti měření bylo možné pozorovat malé zlepšení kvality získaného snímku, jelikož se hrot nosníku lépe přizpůsoboval povrchu vzorku a na snímku se tím pádem nevytvářely rozmazané stopy za částicemi. Jelikož snížení rychlosti měření o 68 % neposkytnulo o moc lepší kvalitu snímku, než snímek se sníženou rychlostí o 52 %, tak pro další měření bylo využíváno spíše snížení rychlosti o 52 % i z časových důvodů. Bylo možné pozorovat rozdíl ve snímcích se snížením rychlosti o 20 % a 68 %, kdy ve směru osy x docházelo k pohybu polystyrenové nanočástice vlivem působení hrotu nosníku.



Obrázek 19 - Snímek zobrazující výšku a Slope fit polystyrenové nanočástice - snížení rychlosti měření o 20 %.



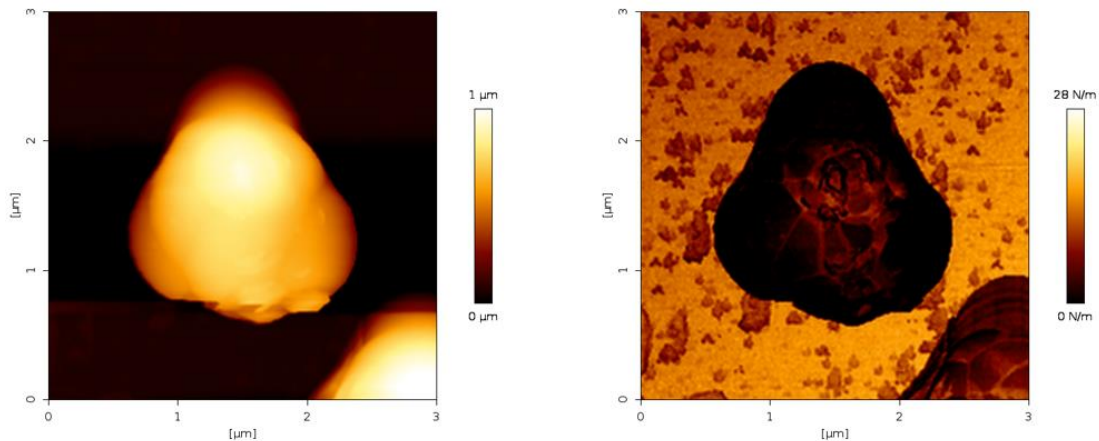
Obrázek 20 - Snímek zobrazující výšku a Slope fit polystyrenové nanočástice - snížení rychlosti o 52 %.



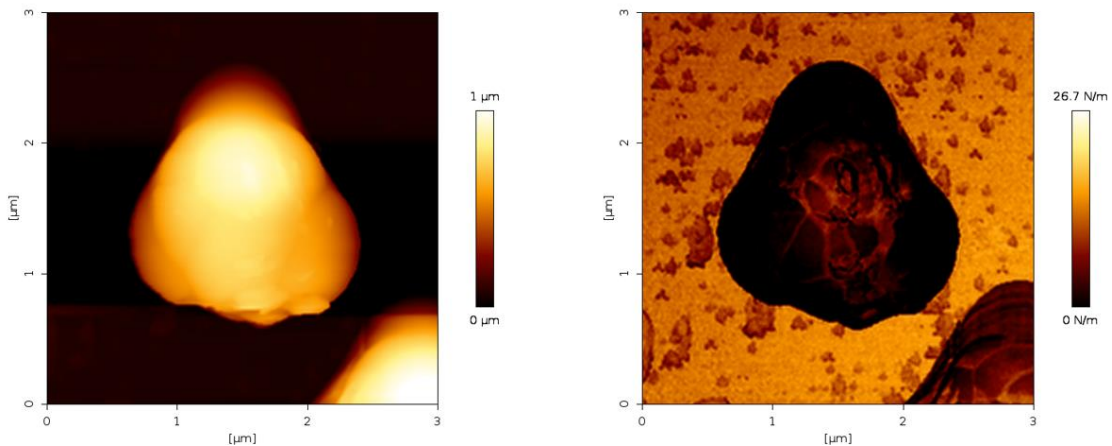
Obrázek 21 - Snímek zobrazující výšku a Slope fit polystyrenové nanočástice - snížení rychlosti o 68 %.

### 5.1.3 Zvyšování hodnoty *Setpoint*

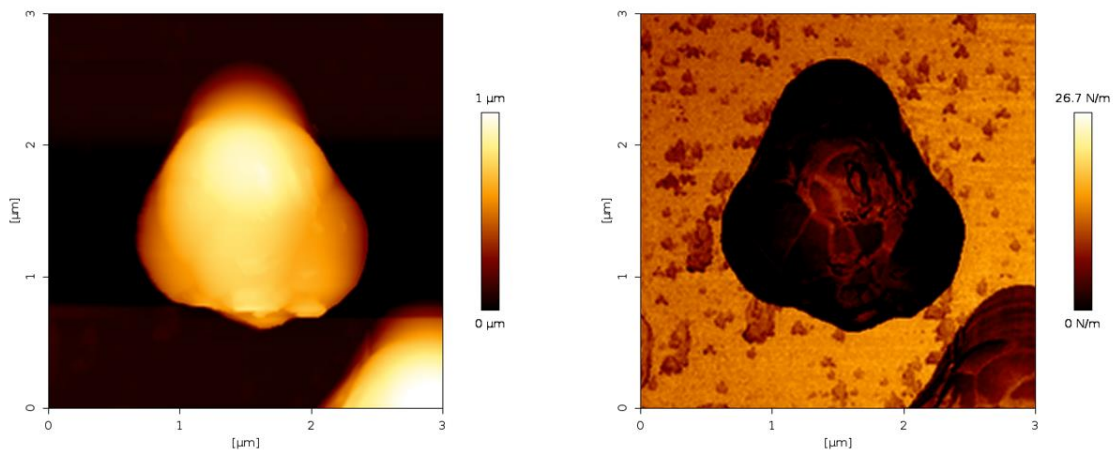
Druhá část optimalizace kvantitativního zobrazování byla zaměřena na zvyšování hodnoty *Setpoint*, tedy síly působící na povrch vzorku. Při tomto úkonu bylo třeba dbát, aby hodnota nebyla zvýšena příliš, jelikož hrozilo poničení hrotu nosníku nebo i samotného vzorku. Pro první měření byla hodnota *Setpoint* oproti doporučené hodnotě zvýšena o 1,2 % (Obrázek 22). Dále byl zvýšen *Setpoint*, konkrétně o 3,3 % (Obrázek 23) a o 9,3 % oproti původní hodnotě *Setpoint* (Obrázek 24). V získaném snímku bylo možné pozorovat zlepšení rozdílu hranice mezi polystyrenovou nanočásticí a podložním sklíčkem, ale také byla lépe zobrazena struktura polystyrenové nanočástice.



Obrázek 22 - Snímek zobrazující výšku a Slope fit polystyrenové nanočástice - zvýšení *Setpoint* o 1,2 %.



Obrázek 23 - Snímek zobrazující výšku a Slope fit polystyrenové nanočástice - zvýšení *Setpoint* o 3,3 %.

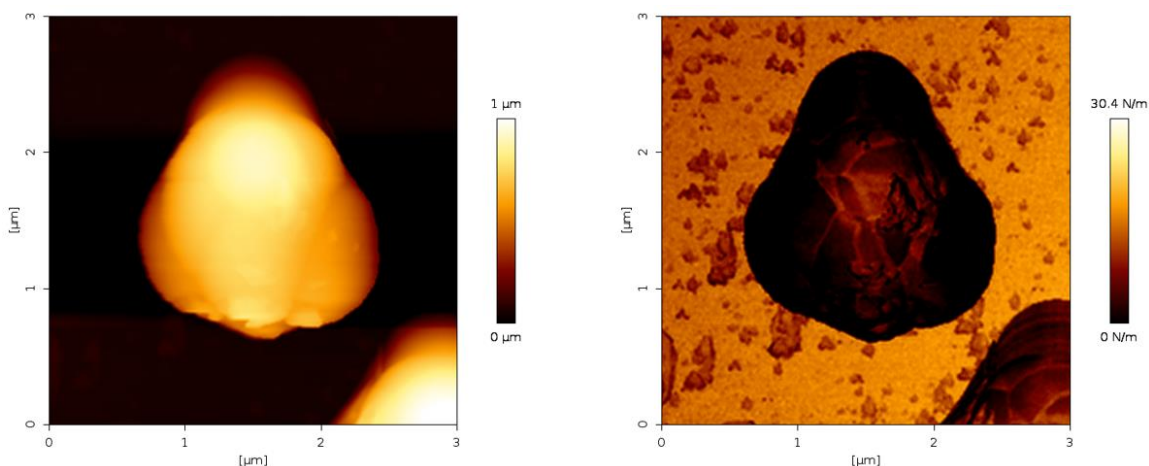


Obrázek 24 - Snímek zobrazující výšku a Slope fit polystyrenové nanočástice - zvýšení *Setpoint* o 9,3 %.

### 5.1.4 Zvýšení hodnoty *Setpoint* a snížení rychlosti měření

Pro většinu následujících měření střídavou kontaktní metodou bylo výhodné, když byl zvýšen *Setpoint* a byla snížena rychlost měření. Protože vlivem zvýšení hodnoty *Setpoint* došlo ke zvýraznění detailů na povrchu vzorku a snížením rychlosti se lépe přizpůsoboval hrot nosníku povrchu vzorku. V tomto případě byl *Setpoint* zvýšen o 9,3 % a rychlost byla snížena o 20 % (Obrázek 25).

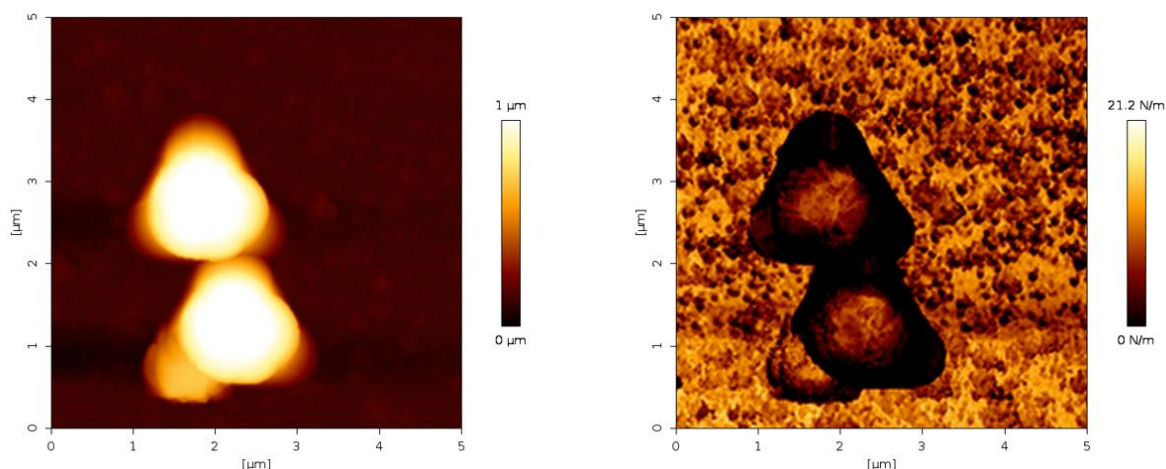
Zvyšování hodnoty *Setpoint* a snížení rychlosti měření (*Z Speed*) bylo nejčastěji využíváno pro úpravu snímku při měření kvantitativním režimem zobrazování (*QI<sup>TM</sup> Advanced Imaging*), protože hrot dokázal na vzorek působit větší silou a zobrazit jeho povrch precizněji. Snížením rychlosti se hrot dokázal lépe přizpůsobovat povrchu, na který působil.



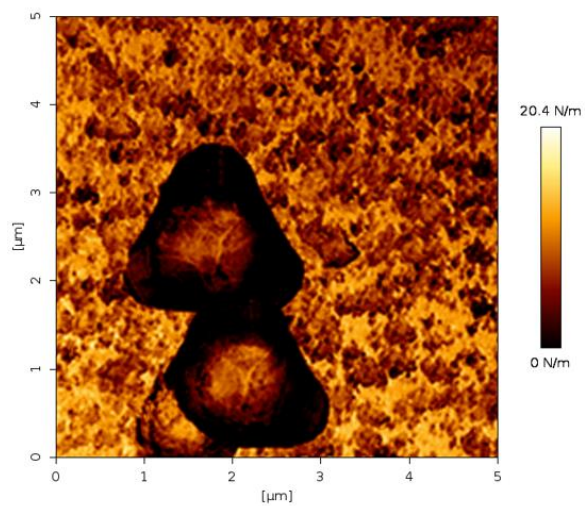
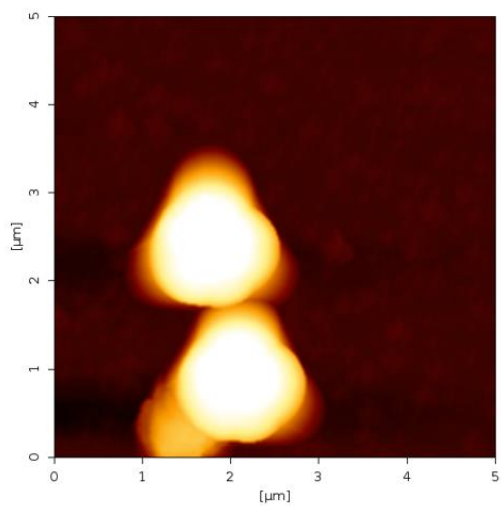
Obrázek 25 - Snímek zobrazující výšku a *Slope fit* polystyrenovou nanočástice - zvýšení *Setpoint* o 9,3 % a snížení rychlosti o 20 %.

### 5.1.5 Snižování hodnoty *Setpoint*

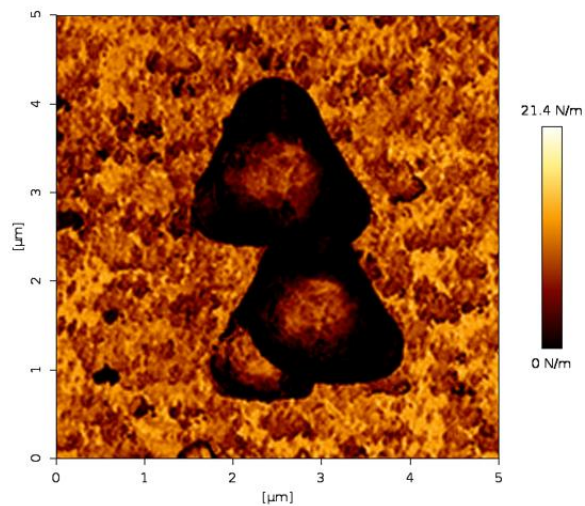
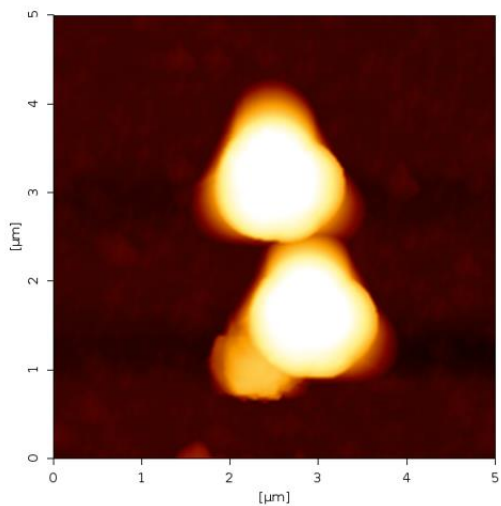
V případě kvantitativní zobrazovací metody snižování hodnoty *Setpoint* nedocházelo ke zlepšení kvality získaného snímku. Snímek v základním stavu (Obrázek 26), tedy proměřený s hodnotami doporučenými po kalibraci nosníku, zobrazil polystyrenové nanočástice s poměrně dobrým kulatým tvarem. Na získaných snímcích bylo možné pozorovat, že kraje nanočástic jsou zploštělé, to bylo způsobeno přichycením k podložnému sklíčku vlivem vysušení. Postupným snižování hodnoty *Setpoint* o 5 % (Obrázek 27), 10 % (Obrázek 28), 20 % (Obrázek 29) a 25 % (Obrázek 30) bylo pozorováno, že hranice mezi nanočásticí a podložním sklíčkem byla se snižující se hodnotou *Setpoint* více rozmazaná.



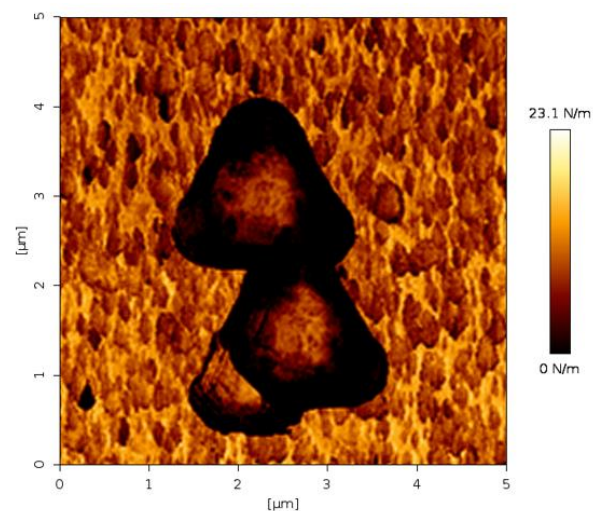
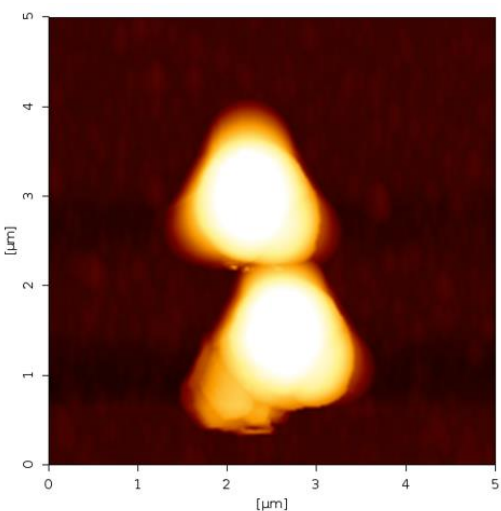
Obrázek 26 - Snímek zobrazující výšku a *Slope fit* polystyrenových nanočástic - základní nastavení.



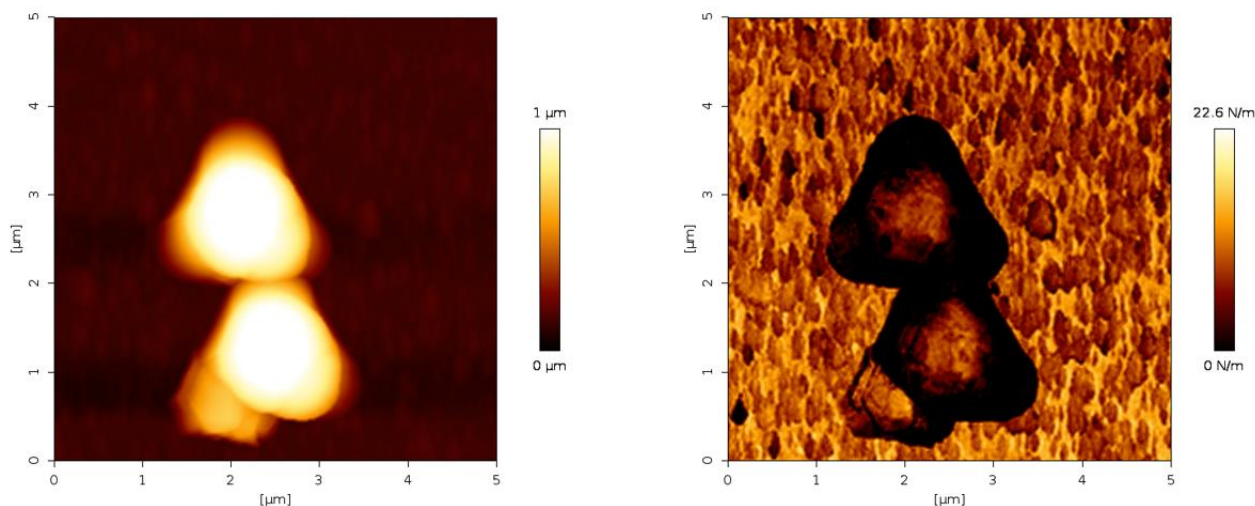
Obrázek 27 - Snímek zobrazující výšku a Slope fit polystyrenových nanočástic - snížení Setpoint o 5 %.



Obrázek 28 - Snímek zobrazující výšku a Slope fit polystyrenových nanočástic - snížení Setpoint o 10 %.



Obrázek 29 - Snímek zobrazující výšku a Slope fit polystyrenových nanočástic - snížení Setpoint o 20 %.



Obrázek 30 - Snímek zobrazující výšku a Slope fit polystyrenových nanočástic - snížení Setpoint o 25 %.

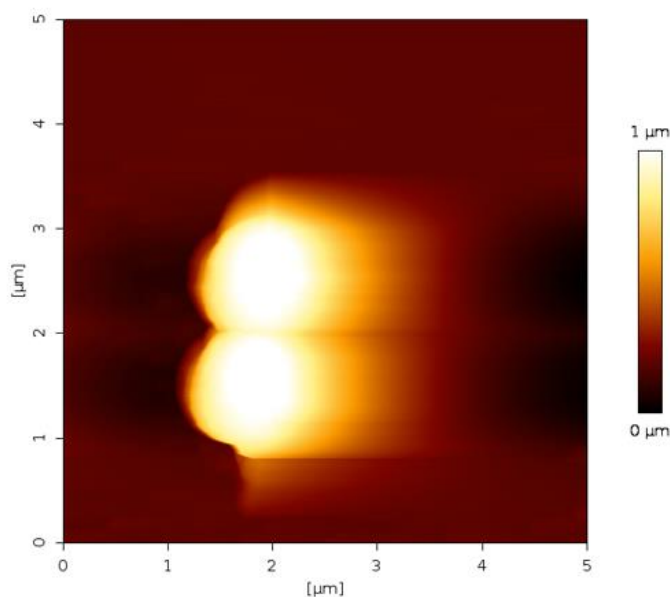
## 5.2 Optimalizace bezkontaktního režimu zobrazování (*AC Mode Imaging*)

Bezkontaktním režimem byly snímány polystyrenové nanočástice, které byly naředěny deionizovanou vodou v poměru 1:100. Pro tuto metodu byl použit nosník typu TESPA V2 z důvodu, že má vyšší rezonanční frekvenci (cca 320 kHz), což bylo pro tento typ měření vyžadováno. Během této optimalizace byl pozorován vliv rychlosti měření (*Line Rate*) a změna nastavené hodnoty *Setpoint*, který byl nastaven nejprve na 75 % a následně na 70 a 80 %.

### 5.2.1 Snižování rychlosti měření

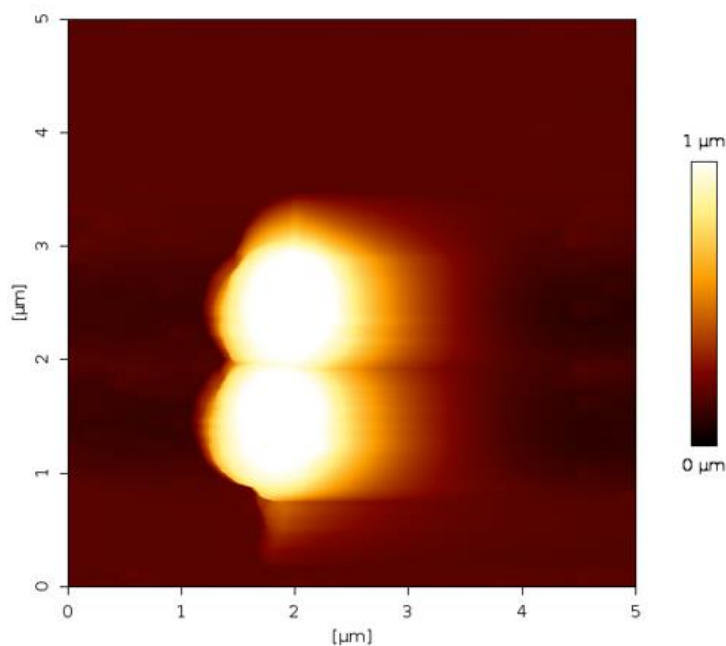
Relativní hodnota *Setpoint* byla nastavena na 75 %. Původní rychlost měření (*Line Rate*), která byla nastavena kalibrací na hodnotě 1 Hz, tato automaticky nastavená hodnota bývá příliš vysoká a mikroskop atomárních sil není schopen změřit polystyrenovou nanočástici.

Proto hned pro první měření byla rychlost upravena na hodnotu 0,3 Hz a pořízený snímek zobrazil dvě polystyrenové nanočástice. Na snímku je patrné rozmazání za polystyrenovými nanočásticemi, které vzniklo v důsledku příliš vysoké rychlosti (Obrázek 31). Hrot se nebyl schopný při velké rychlosti přizpůsobovat povrchu vzorku a muselo dojít k opětovnému snížení rychlosti měření.

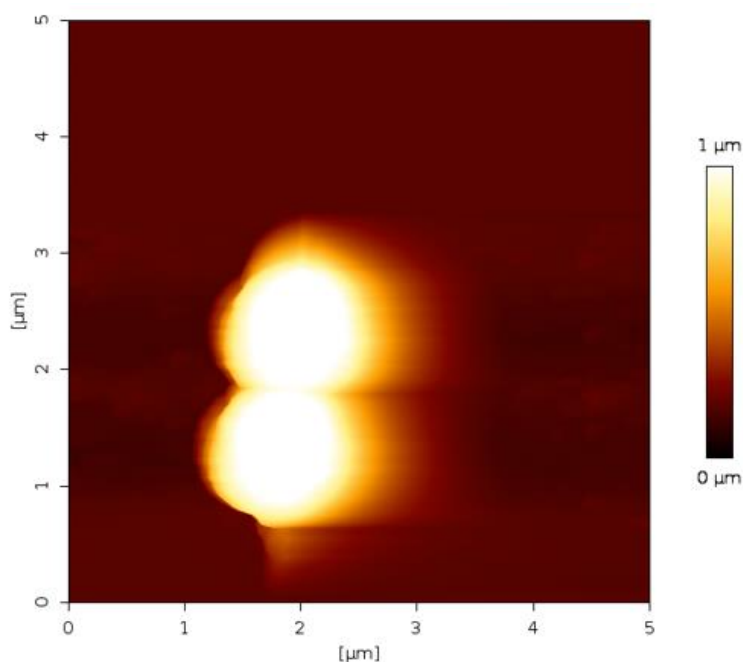


Obrázek 31 - Snímek zobrazující polystyrenové nanočástice - rychlost měření 0,3 Hz.

Další měření bylo nastaveno na hodnotu 0,2 Hz (Obrázek 32), kdy v získaném snímku bylo možné pozorovat zmenšené rozmazané části za polystyrenovými částicemi. Je tedy možné pozorovat, že vlivem snížení rychlosti pro bezkontaktní režim se zlepšuje kvalita snímku. Nejlépe to bylo možné pozorovat na rozdílu rychlostí 0,3 Hz a 0,15 Hz (Obrázek 33).



Obrázek 32 - Snímek zobrazující polystyrenové nanočástice - rychlost měření 0,2 Hz.



Obrázek 33 - Snímek zobrazující polystyrenové nanočástice - rychlost měření 0,15 Hz.

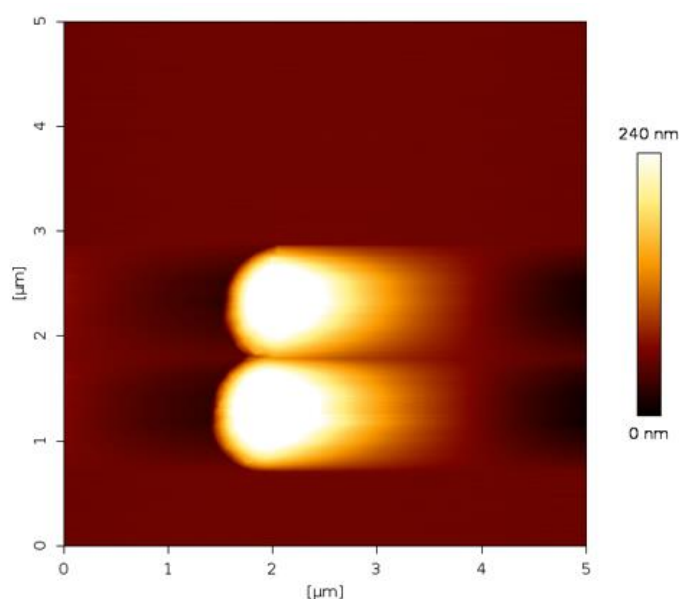
### 5.2.2 Změna relativní hodnoty *Setpoint*

Druhým faktorem, který ovlivňuje kvalitu snímku u bezkontaktního režimu měření (*AC Mode Imaging*) je relativní hodnota *Setpoint*, která při tomto režimu musí být nastavena v rozmezí od 70 do 80 %: při nižších relativních hodnotách *Setpoint*, pokud by došlo k překročení povolené hranice by mohlo dojít k poničení nosníku či vzorku. Při zvýšení relativní hodnoty *Setpoint* by naopak byla použita nedostatečná síla, tudíž by nedošlo k zobrazení detailů vzorku. Původní hodnota byla nastavena na 75 %

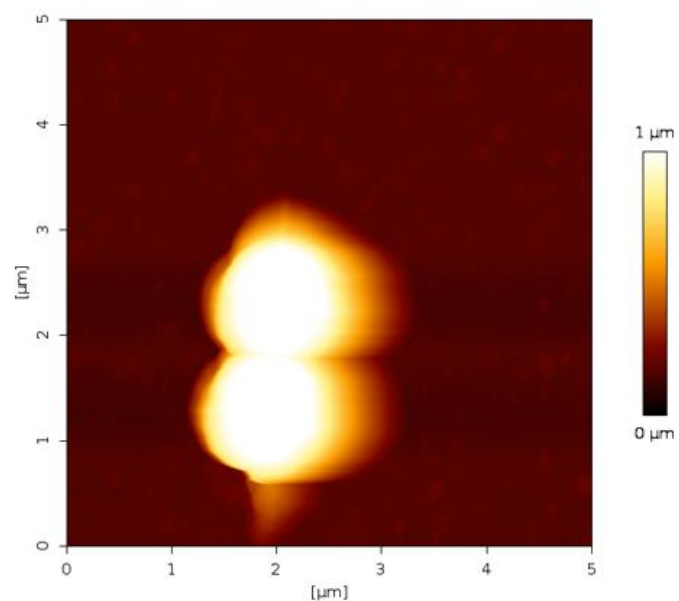
(Obrázek 31) a je možné pozorovat rozmazání za polystyrenovými nanočásticemi. Následně byla hodnota této síly hrotu, který působí na vzorek, zvýšena na 80 % (Obrázek 34) a poté snížena na 70 % (Obrázek 35) a byly sledovány změny ve výsledných snímcích.

Na snímcích polystyrenových nanočástic bylo možné vidět, že i když rychlost byla pořád stejná (0,3 Hz), tak snížením relativní hodnoty *Setpoint* došlo ke zlepšení kvality snímku a zvýšením se naopak kvalita zhorší. Pro další měření touto metodou je tedy nejlepším řešením kombinace snížení rychlosti měření a relativní hodnotu *Setpoint* nastavit zhruba na 70 %. Při bezkontaktním režimu měření došlo snížením rychlosti k výraznému nárůstu času měření.

Bezkontaktní metoda měření byla proměřena tak, že hrot na nosníku se pohyboval těsně nad povrchem vzorku a zaznamenával velikost síly působící mezi vzorkem a hrotem (např. van der Waalsovy, kapilární). Při bezkontaktní metodě měření bylo lepší, když hodnota *Setpoint* byla snižována. U této metody platilo, že čím byla použita nižší hodnota *Setpoint*, tím byla aplikovaná síla na povrch vzorku větší.



Obrázek 34 - Snímek zobrazující polystyrenové nanočástice - zvýšení hodnoty *Setpoint* na 80 %.



Obrázek 35 - Snímek zobrazující polystyrenové nanočástice - snížení hodnoty *Setpoint* na 70 %.



### 5.3 Shrnutí optimalizace metod kvantitativního zobrazování (*QI<sup>TM</sup> Advanced Imaging*) a bezkontaktního režimu zobrazování (*AC Mode Imaging*)

Při optimalizaci kvantitativního režimu zobrazování (*QI<sup>TM</sup> Advanced Imaging*) byl zkoumán vliv hodnoty rozlišení (*Pixels*), snižování rychlosti (*Z speed*), zvyšování a snižování hodnoty *Setpoint* na výsledný snímek.

Změnou hodnoty *Pixels*, neboli rozlišení, z 256×256 na 512×512 došlo pouze k vylepšení kontrastu mezi podložním sklíčkem a polystyrenovou částicí. Doba měření touto změnou hodnoty byla z 6 minut prodloužena na 30 minut, a proto bylo rozhodnuto, že přednastavená kvalita 256×256 je dostačující, protože čím déle působil hrot na vzorek, tím bylo zvýšeno riziko zničení buď hrotu nosníku anebo samotného vzorku. Druhou hodnotou, která byla měněna, byla rychlost měření, konkrétně docházelo ke snižování. Bylo možné pozorovat, že docházelo ke zvýšení kvality snímku, protože hrot měl více času na zaznamenání detailů povrchu vzorku. Zároveň byla určena optimální hodnota snížení rychlosti měření, to bylo o 52 % méně, než byla přednastavená hodnota, doba měření tak byla posunuta z 6 minut na 13 minut. Zvýšením hodnoty *Setpoint* docházelo k lepšímu zobrazování detailů na povrchu vzorku. Zároveň bylo zjištěno, že překročením hodnoty o více než 10 % oproti doporučené hodnotě dochází k většímu riziku poničení hrotu nosníku nebo i vzorku. Naopak snížením hodnoty *Setpoint* docházelo ke zhoršení kvality snímku a pro kvantitativní metodu zobrazování již dále nebylo využíváno.

Během optimalizace bezkontaktního režimu (*AC Mode Imaging*) byl sledován vliv snižování rychlosti měření (*Line Rate*) a změna relativní hodnoty *Setpoint* na kvalitu výsledného snímku.

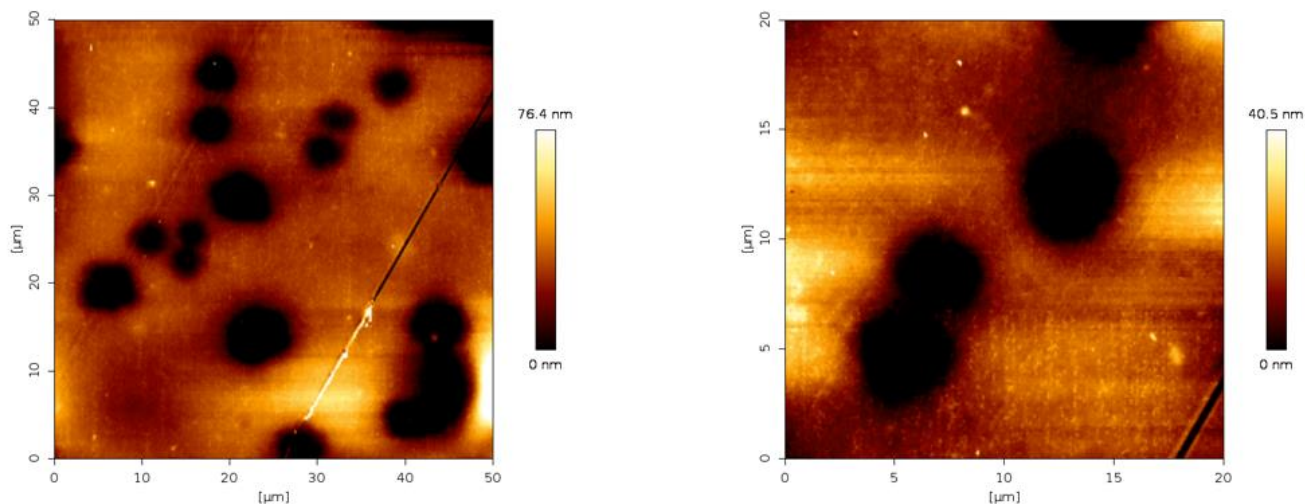
Snížení rychlosti mělo na kvalitu získaných snímků velký vliv, pokaždé bylo potřeba už ze začátku upravit rychlost měření z původní hodnoty 1 Hz alespoň na 0,3 Hz, aby došlo ke správnému zobrazení částic. Zároveň ale bylo důležité myslet na to, že snížením rychlosti měření docházelo k výraznému nárůstu doby měření, klidně až na 90 minut. Změna relativní hodnoty *Setpoint* z původně nastavených 75 % na 70% ukázala, že snížením dojde ke zlepšení kvality získaného snímku a zvýšením na 80 % dojde naopak ke zhoršení kvality snímku.

V obou případech měření, jak při kvantitativním i bezkontaktním režimu zobrazování, je většinou žádoucí úprava rychlosti snímku a zároveň i změna hodnoty *Setpoint* (případně relativní hodnoty *Setpoint*).

### 5.4 Měření povrchu a velikosti pórů PVA fólií

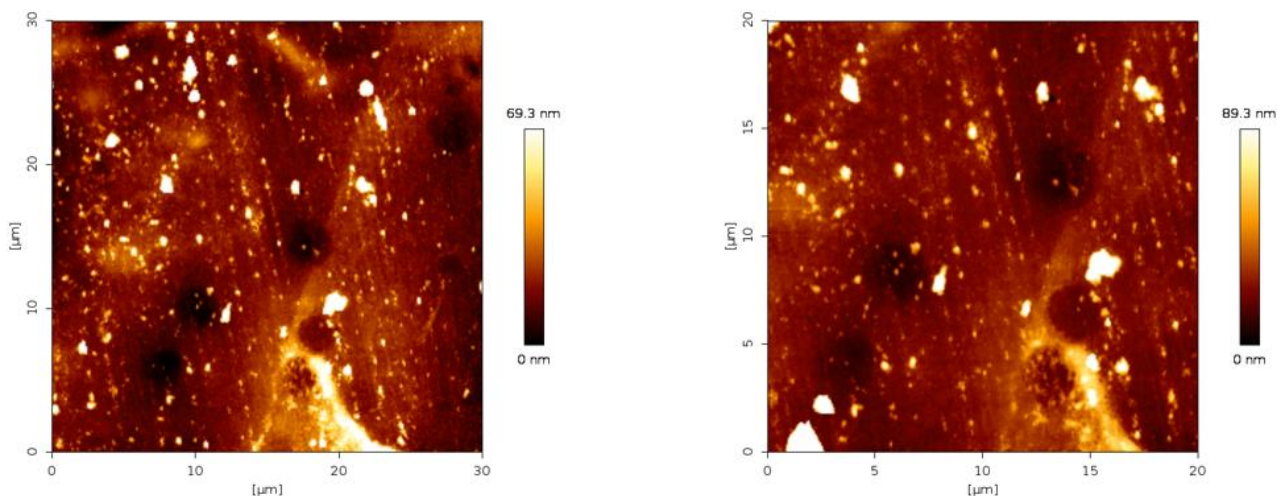
Fólie vzniklé z polyvinylalkoholu, chitosanu a různých koncentrací hydroxidu sodného (NaOH) a chloridu sodného (NaCl) byly měřeny režimem kvantitativního zobrazování (*QI<sup>TM</sup> Advanced Imaging*) a nosníkem TESP-V2, který měl vyšší hodnotu tuhosti a získané snímky byly kvalitnější, než s nosníkem typu FESP-V2. Rozdíl koncentrací těchto látek způsobil změnu pH a tím pádem došlo k vytvoření pórů různých velikostí, právě v závislosti na vnitřním pH xerogelu. V minulých kapitolách bylo studováno, co provádí změny jednotlivých parametrů na získané snímky. Získané poznatky byly dále použity pro úpravu nastavení měření kvantitativním zobrazováním. Pro měření PVA fólií byla v nastavení měněna pouze rychlost měření, protože hodnota *Setpoint* získaná kalibrací nosníku poskytovala dobré výsledky.

Prvním měřeným vzorkem byla směs polyvinylalkoholu, chitosanu a 0,15M NaCl (Obrázek 36), kdy bylo měření zapnuto a nastavení bylo ponecháno na hodnotách získaných kalibrací nosníku. Měření se nejprve provádělo na skenu o velikosti 50×50 μm, následovalo zmenšení velikosti snímku na 20×20 μm. Pomocí funkce změřit délku bylo zjištěno, že velikost pórů byla v rozmezí 5 ± 2 μm.



Obrázek 36 - PVA fólie připravená chemickým zesíťováním s 0,15M NaCl.

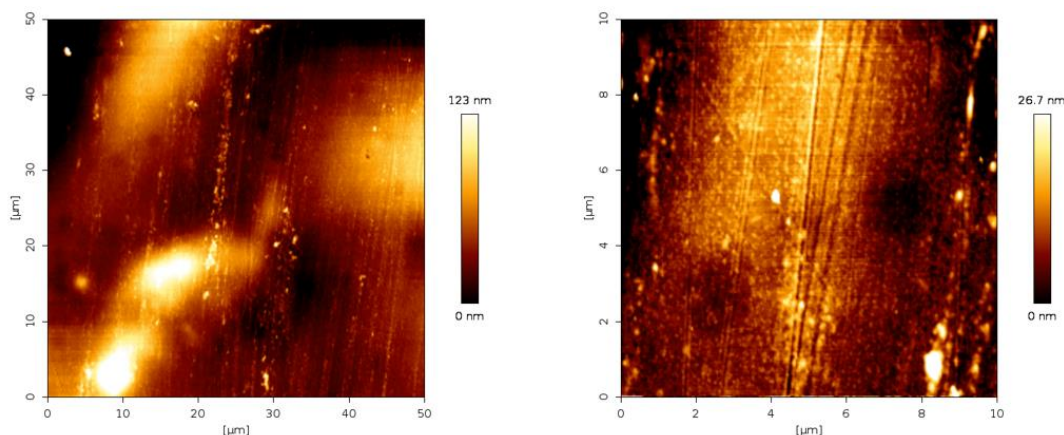
Následovalo měření zesíťovaných fólií polyvinylalkoholu s chitosanem bez jakéhokoliv přídavku další látky (Obrázek 37). Na získaných snímcích o velikosti  $30 \times 30 \mu\text{m}$ , oproti prvnímu zmíněnému vzorku mikroskop atomárních sil nebyl schopen doměřit snímek o velikosti  $50 \times 50 \mu\text{m}$ , proto byla jeho velikost upravena na  $30 \times 30 \mu\text{m}$ , a  $20 \times 20 \mu\text{m}$  bylo vidět, že se zde vyskytovaly póry o velikosti  $2,5 \pm 0,3 \mu\text{m}$ . Neměly však dostatečný kontrast, protože se ve vzorku nejspíše vyskytovaly nerozpustné částice, kvůli kterým nebylo možné získat lepší kontrast pórů a samotné PVA fólie.



Obrázek 37 - Fólie vzniklá směsí polyvinylalkoholu a chitosanu.

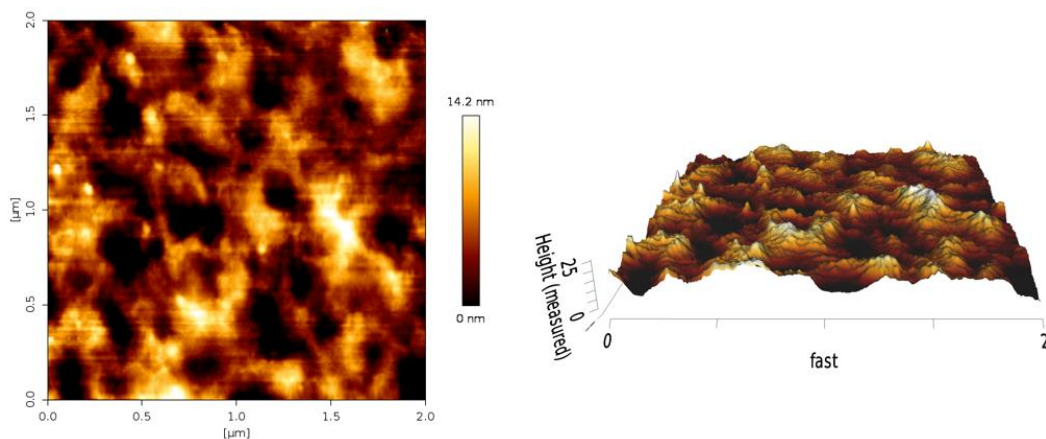
Chemicky zesíťovaná fólie s 0,5M NaOH měly velikost pórů přibližně  $1,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$ . První měření bylo provedeno o velikosti  $30 \times 30 \mu\text{m}$ , zde však nebyly póry viditelné, došlo ke zmenšení skenované oblasti na  $10 \times 10 \mu\text{m}$ .

Fólie vzniklé smícháním polyvinylalkoholu, chitosanu a 1M NaOH (Obrázek 38) byl nejprve měřen skenem o velikosti  $50 \times 50 \mu\text{m}$ , kde byly pozorovány malé póry, proto byla velikost skenu zmenšena na  $10 \times 10 \mu\text{m}$ . Po přiblížení na dva póry byla jejich velikost pórů stanovena na  $1,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$ .



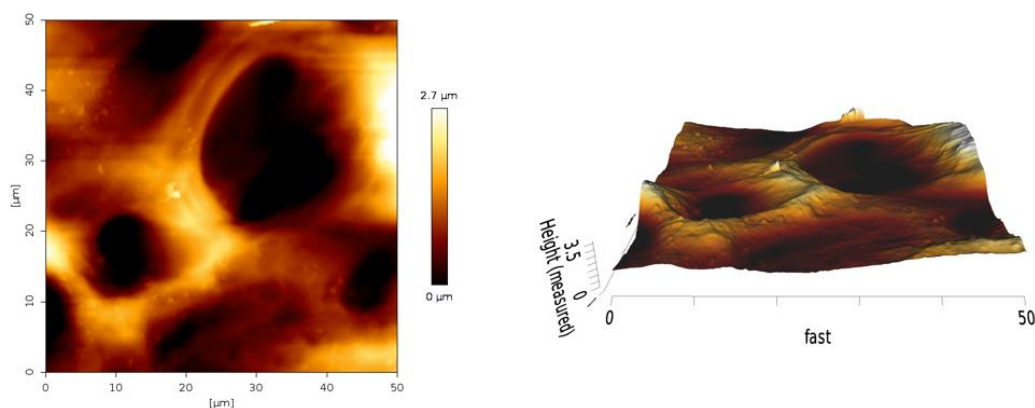
Obrázek 38 – Chemicky zesíťovaná fólie vzniklá smícháním polyvinylalkoholu, chitosanu a 1M NaOH.

Poslední vzorek fólie vzniklé chemickým zesíťením polyvinylalkoholu, chitosanu a 2M NaOH měly velikost pórů pouze  $0,2 \pm 0,05 \mu\text{m}$  (Obrázek 39). Na skenech s velkou plochou nebyly žádné póry objeveny a bylo důležité dostatečně zmenšit velikost skenování. Na obrázku je možné nejen vidět 2D snímek, ale i 3D snímek, který lze pomocí mikroskopie atomárních sil získat, čímž si můžeme zobrazit reliéf vzorku.



Obrázek 39 - Fólie vzniklá chemickým zesíťením polyvinylalkoholu, chitosanu a 2M NaOH (2D a 3D snímek).

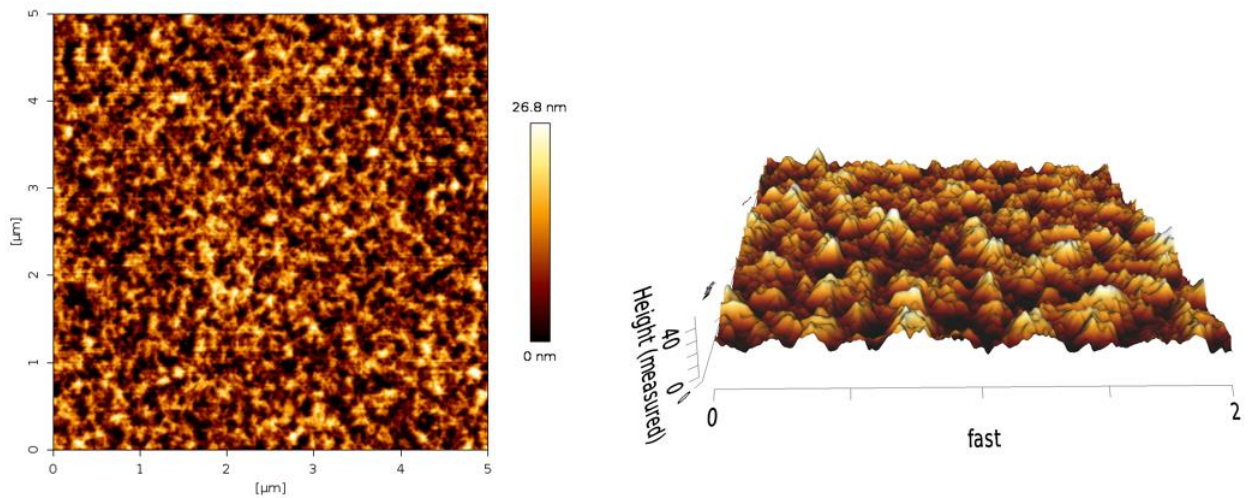
Posledním typem fólie, která byla poskytnuta na měření, byla fólie vzniklá fyzikálním zesíťením. Konkrétně se jednalo o směs polyvinylalkoholu a chitosanu, který byl zmražen (Obrázek 40). Na získaných snímcích (2D a 3D) bylo možné pozorovat póry o velikosti pár mikrometrů až po několik desítek mikrometrů. To je nejspíš z důvodu toho, že mražením do pórů vnikla voda, která strukturu gelu potrhala.



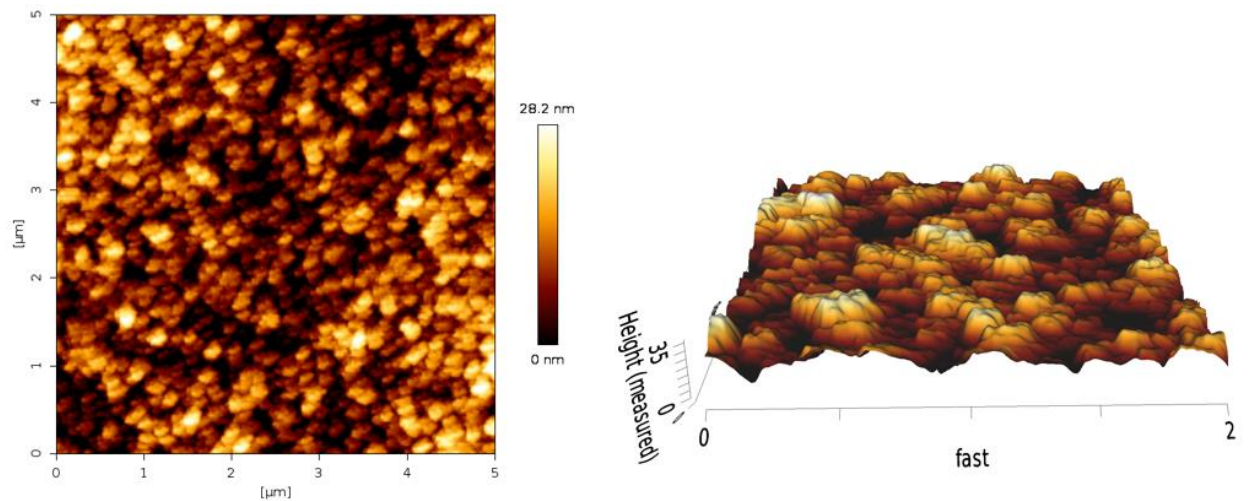
Obrázek 40 - Povrh fyzikálně zesíťené fólie polyvinylalkoholu a chitosanu pomocí mražení.

## 5.5 Měření velikosti pórů agarosových hydrogelů

Mikroskopií atomárních sil byl zkoumán vliv koncentrace agarosového gelu na porozitu. Nastavení měření snímků mělo ponechány hodnoty *Setpoint* a *Pixels* na přednastavených hodnotách, ale během měření byla snížena rychlost o 52 %, aby došlo ke zlepšení kvality snímku. První gel, který byl měřen, měl koncentraci 0,5% a velikost pórů byla 1,2  $\mu\text{m}$ . Následovalo měření 1% gelu agarosy, který měl velikost pórů v rozmezí 1,7 – 2,0  $\mu\text{m}$ . Tyto dva vzorky byly pravděpodobně chybné, protože velikosti pórů neodpovídají tabelovaným hodnotám, které by měly být v řádu nanometrů. Měřením 2% gelu agarosy (Obrázek 41) bylo zjištěno, že se velikost pórů zmenšila na 0,2  $\mu\text{m}$  a u posledního gelu, 4% (Obrázek 42), byla velikost pórů 0,3  $\mu\text{m}$ . Rozdíl mezi 2% a 4% gelem nebyl ve velikosti pórů, ale spíše v počtu, kdy na snímcích bylo možné pozorovat, že 2% gel agarosy má znatelně více pórů na svém povrchu.



Obrázek 41 - 2D a 3D snímek 2% agarosového gelu.



Obrázek 42 - 2D a 3D snímek 4% agarosového gelu.

## 6 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo seznámení se s novou technikou mikroskopie atomárních sil (v rámci skupiny BOKOL na FCH VUT). V rámci toho byl prostudován návod k tomuto přístroji a jednotlivé měřicí módy. V rámci této práce byly pro další měření vybrány dvě metody, první z nich byl kvantitativní režim zobrazování (*QI<sup>TM</sup> Advanced Imaging*) a druhý byl bezkontaktní režim zobrazování (*AC Mode Imaging*). Ty byly vybrány z důvodu, že se jedná o jedny z nejčastěji využívaných metod a také jedny ze základních, které jsou navíc poměrně šetrné jak ke vzorkům, tak i k samotnému hrotu a nosníku. Kvantitativní režim nám poskytuje nejen topografické snímky, ale také snímky zobrazující mechanické vlastnosti vzorků, jako je adheze nebo třeba elasticita. Bezkontaktní metoda byla vybrána proto, že je schopna poskytnout topografický snímek vzorku a zároveň je šetrná ke vzorku a hrotu.

Následovala optimalizace těchto režimů, které dále sloužily k dalším měřením. Optimalizace se prováděla na vzorku polystyrenových částic o velikosti 1  $\mu\text{m}$ . Mikroskopii atomárních sil byla dále sledována porozita fólií vzniklých smísením polyvinylalkoholu s epichlorhydrinem v přítomnosti chitosanu v závislosti na použitém modifikátoru vnitřního prostředí, buď hydroxidem sodným (NaOH), kdy docházelo ke změně pH, anebo chloridem sodným (NaCl), kdy se měnila iontová síla, ale také vliv fyzikálního zesílení. Takto připravené hydrogely byly vysušeny na xerogely a pomocí mikroskopie atomárních sil byla změřena velikost pórů jednotlivých xerogelů. Stejně tak jsme sledovali i distribuci velikosti pórů agarosového gelu v závislosti na připravené koncentraci.

Pro optimalizaci měřicích režimů byl vybrán vzorek polystyrenových nanočástic. Tento standardní vzorek byl naředěn deionizovanou vodou v poměru 1:100, jelikož při měření neředěného vzorku docházelo po vysušení na podložním sklíčku k agregaci a navrstvení polystyrenových nanočástic. A jelikož při měření jsme se chtěli zaměřit na měření jednotlivých nanočástic, byl experimentálně stanoven tento poměr (bylo zkoumáno více poměrů, ale nejlepší distribuci jednotlivých částic měl právě poměr 1:100). I při tomto zředění docházelo k mírné agregaci nanočástic odpařením vody, ale bylo možné najít jednotlivé polystyrenové nanočástice.

Optimalizaci metody kvantitativního zobrazování jsme prostudovali měřením vzorku pomocí doporučeného nastavení, které nám systém poskytl po kalibraci nosníku. Zároveň jsme zkoumali vliv rozlišení, stejně tak zvýšení a snížení hodnoty *Setpoint*, ale i vliv rychlosti měření. První měření jsme provedli s doporučenými hodnotami. Na získaném snímku bylo možné pozorovat, že je zde patrná polystyrenová nanočástice, zároveň však nemá ostré hrany, kvalita snímku tak nebyla dostatečná. Zvýšením hodnoty rozlišení *Pixels* nedošlo k výraznému zlepšení snímku, naopak došlo k prodloužení času měření, proto jsme se pro tuto metodu rozhodli používat přednastavenou hodnotu rozlišení 256 $\times$ 256. Snižováním rychlosti měření došlo ke zlepšení kvality snímku, hrot nosníku měl více času se zdržet na jednom bodě a důkladně ho prozkoumat, tedy se danému bodu přizpůsobit. Zároveň velké snižování rychlosti neudělalo s výsledným snímek těchto částic výrazný rozdíl. Proto jsme se rozhodli nepoužívat např. snížení rychlosti o 68 %, protože čím delší dobu je hrot nosníku v kontaktu se vzorkem, tím spíše může dojít k jeho poničení. Zvýšením síly působící na vzorek jsme docílili lepšího zobrazení povrchu nanočástice, nebylo však dobré příliš velké zvýšení *Setpoint*, protože by mohlo dojít ke zničení hrotu a zároveň nedošlo k velkému rozdílu v kvalitě výsledného snímku mezi zvýšením o 3,3 a 9,3 % oproti původní hodnotě. Pro další měření metodou kvantitativního zobrazování jsme zjistili, že je většinou výhodná kombinace zvýšení hodnoty *Setpoint* a snížení rychlosti měření. V poslední řadě jsme proměřili snímky se snížením hodnoty *Setpoint* a bylo možné pozorovat, že došlo k rozostření sledovaných polystyrenových nanočástic.

Bezkontaktní metoda sloužila pro získání topografického snímku polystyrenových nanočástic. Při tomto typu měření osciloval hrot nad vzorkem, a proto nedocházelo k jeho poničení. Zde jsme sledovali, jak výsledný snímek můžeme ovlivnit snižováním rychlosti měření. Snižováním rychlosti

měření došlo k lepšímu přizpůsobení a lepšímu zaznamenání povrchu vzorku polystyrenových nanočástic. Zároveň jsme pozorovali vliv relativní hodnoty *Setpoint*, kdy při prvním měření byl nastaven na 75 % a po proměření relativní hodnoty *Setpoint* 70 a 80 % bylo zjištěno, že v bezkontaktní metodě je spíše vhodné snižovat relativní hodnotu *Setpoint*, protože dojde ke zlepšení kvality získaného snímku.

Kvantitativním režimem zobrazování jsme snímali povrch PVA fólií a zároveň jsme měřili velikost jejich pórů. Pro tento experiment byly použity fólie vzniklé chemickým a fyzikálním zesítním. Prvním chemicky zesítným vzorkem byla fólie, která byla připravena zesítním polyvinylalkoholu, chitosanu a 0,15M NaCl, kdy výsledná velikost pórů byla v rozmezí 3 až 5  $\mu\text{m}$ . Byla také připravena fólie vzniklá smícháním pouze polyvinylalkoholu a epichlorhydrinu s chitosanem, velikost pórů této fólie byla  $2,5 \pm 0,3 \mu\text{m}$ . Další chemicky zesíťované fólie byly připraveny smícháním polyvinylalkoholu, chitosanu a různých koncentrací NaOH (0,5M, 1M, 2M). Bylo pozorováno, že s rostoucí koncentrací se snižuje velikost pórů. Velikost pórů fólie vytvořené s 0,5M NaOH byla  $1,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$ , s 1M byla tato velikost  $1,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$  a poslední fólie vytvořená s přídavkem 2M NaOH měla póry o velikosti  $0,2 \pm 0,05 \mu\text{m}$ . Fyzikálním zesítním vznikla fólie, která měla velikost pórů od pár mikrometrů až po několik desítek mikrometrů, jelikož mrazením došlo k potrhání pórů vlivem vody.

Pro měření porozity agarosového gelu jsme zvolili režim kvantitativního zobrazování (*QI<sup>TM</sup> Advanced Imaging*). Sledovali jsme závislost porozity tohoto gelu na koncentraci. Ze získaných snímků je patrné, že se zvyšující se koncentrací agarosy dochází ke zmenšování velikosti pórů.

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] How AFM Works. *Park Systems* [online]. Korea: Park Systems, 2020
- [2] *The NanoWizard AFM Handbook*. JPK Instruments [online]. Berlin, 2018.
- [3] CUSTANCE, Oscar, Ruben PEREZ a Seizo MORITA. Atomic force microscopy as a tool for atom manipulation. *Nature Nanotechnology* [online]. 2009, **4**(12), 803-810. ISSN 1748-3387. Dostupné z: doi:10.1038/nnano.2009.347
- [4] CHRISTMAN, J. A., R. R. WOOLCOTT, A. I. KINGON a R. J. NEMANICH. Piezoelectric measurements with atomic force microscopy. *Applied Physics Letters*. 1998, **73**(26), 3851-3853. ISSN 0003-6951. Dostupné z: doi:10.1063/1.122914
- [5] HERMES, Ilka a Romain STOMP. *Piezoelectric Force Microscopy (PFM)*. ParkSystems [online]. Germany, c2021.
- [6] JOHNSON, Daniel, Nidal HILAL a W. Richard BOWEN. *Basic Principles of Atomic Force Microscopy. Atomic Force Microscopy in Process Engineering* [online]. Elsevier, 2009, 2009, , 1-30. ISBN 9781856175173.
- [7] AFM Theory: *Dynamic Modes. Nanosurf* [online]. Switzerland: Nanosurf, c1997-2021
- [8] BHAT, Supriya V., Taranum SULTANA, André KÖRNIG, Seamus MCGRATH, Zinnat SHAHINA a Tanya E. S. DAHMS. Correlative atomic force microscopy quantitative imaging-laser scanning confocal microscopy quantifies the impact of stressors on live cells in real-time. *Scientific Reports* [online]. 2018, **8**(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-018-26433-1
- [9] ANDO, Toshio. High-speed atomic force microscopy and its future prospects. *Biophysical Reviews* [online]. 2018, **10**(2), 285-292. ISSN 1867-2450. Dostupné z: doi:10.1007/s12551-017-0356-5
- [10] ANDO, Toshio. High-speed AFM imaging. *Current Opinion in Structural Biology* [online]. 2014, **28**, 63-68. ISSN 0959440X. Dostupné z: doi:10.1016/j.sbi.2014.07.011
- [11] CARVALHO, Filomena A., Ivo C. MARTINS a Nuno C. SANTOS. Atomic force microscopy and force spectroscopy on the assessment of protein folding and functionality. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 2013, **531**(1-2), 116-127 . ISSN 00039861. Dostupné z: doi:10.1016/j.abb.2012.11.007
- [12] TESP-V2. *Bruker AFM Probes* [online]. c2021 [cit. 2021-7-8].
- [13] EL KIRAT, K., I. BURTON, V. DUPRES a Y. F. DUFRENE. Sample preparation procedures for biological atomic force microscopy. *Journal of Microscopy* [online]. 2005, **218**(3), 199-207. ISSN 0022-2720. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2818.2005.01480.x
- [14] What are Hydrogels. *Pittsburgh Plastics Manufacturing* [online]. Pittsburgh: Pittsburgh Plastics Manufacturing, 2012.
- [15] BAHRAM, Morteza, Naimeh MOHSENI a Mehdi MOGHTADER. An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications. *Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels* [online]. InTech, 2016, 2016-08-24. ISBN 978-953-51-2509-9. Dostupné z: doi:10.5772/64301
- [16] KHAN, Samiullah, Aziz ULLAH, Kaleem ULLAH a Nisar-ur REHMAN. Insight into hydrogels. *Designed Monomers and Polymers* [online]. 2016, **19**(5), 456-478. ISSN 1568-5551. Dostupné z: doi:10.1080/15685551.2016.1169380

- [17] YAHIA, LHocine. History and Applications of Hydrogels. *Journal of Biomedical Sciences* [online]. 2015, **04**(02) [cit. 2021-7-23]. ISSN 2254609X. Dostupné z: doi:10.4172/2254-609X.100013
- [18] LEE, Kuen Yong, Kamal H. BOUHADIR a David J. MOONEY. Controlled degradation of hydrogels using multi-functional cross-linking molecules. *Biomaterials* [online]. 2004, **25**(13), 2461-2466 [cit. 2021-7-23]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2003.09.030
- [19] PAPEŽÍKOVÁ, H. Příprava, charakterizace a aplikační potenciál hydrogelů na bázi (semi)interpenetrovaných polymerních sítí. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. 47 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D..
- [20] DRAGAN, Ecaterina Stela. Design and applications of interpenetrating polymer network hydrogels. *A review. Chemical Engineering Journal* [online]. 2014, **243**, 572-590. ISSN 13858947. Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2014.01.065
- [21] CHIPPADA, Uday. *NON-INTRUSIVE CHARACTERIZATION OF PROPERTIES OF HYDROGELS* [online]. New Brunswick, New Jersey, 2010. Disertace. Rutgers, The State University of New Jersey. Vedoucí práce Noshir A. Langrana.
- [22] HAVLÍKOVÁ, M. Uvolňování solubilizačních látek z fázově separovaných hydrogelů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. s 65. Vedoucí bakalářské práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.
- [23] ANSETH, Kristi S., Christopher N. BOWMAN a Lisa BRANNON-PEPPAS. Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination. *Biomaterials* [online]. 1996, **17**(17), 1647-1657. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/0142-9612(96)87644-7
- [24] SPÅNGBERG, Larz S. W. *Experimental Endodontics*. Florida: CRC Press, 1990, 224 s. ISBN 0-8493-4737-8.
- [25] WU, Bing, Meredith E. WISEMAN, Michelle E. SEITZ, Katarina TOMIĆ, Andreas HEISE, Dermot F. BROUGHAM a Victor M. LITVINOV. Impact of morphology on O<sub>2</sub> permeability in silicone hydrogel membranes: new insights into domain percolation from experiments and simulations. *Journal of Membrane Science* [online]. 2021, **621**. ISSN 03767388. Dostupné z: doi:10.1016/j.memsci.2020.118970
- [26] AWAJA, Firas, Michael GILBERT, Georgina KELLY, Bronwyn FOX a Paul J. PIGRAM. Adhesion of polymers. *Progress in Polymer Science* [online]. 2009, **34**(9), 948-968. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2009.04.007
- [27] VOPAVAL, Lukáš. *Adheze pneumatik a její měření*. Praha, 2013. Bakalářská práce. České vysoké učení technické v Praze, Fakulta dopravní. Vedoucí práce Tomáš Mičunek.
- [28] AGRAWAL, G., Y.S. NEGI, S. PRADHAN, M. DASH a S.K. SAMAL. Wettability and contact angle of polymeric biomaterials. *Characterization of Polymeric Biomaterials* [online]. Elsevier, 2017, 2017, 57-81. ISBN 9780081007372. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100737-2.00003-0
- [29] ŠINDELÁŘOVÁ, Anna. *Studium adhezních vlastností hydrogelových matric k pevným povrchům*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/115209>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Jiří Smilek.
- [30] OKAY, O. General Properties of Hydrogels. *Hydrogel Sensors and Actuators* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010, 2009-8-11, s. 1-14. Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors. ISBN 978-3-540-75644-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-540-75645-3\_1



- [31] LATTERINI, L. a L. TARPANI. AFM Measurements to Investigate Particulates and Their Interactions with Biological Macromolecules. *Atomic Force Microscopy Investigations into Biology - From Cell to Protein* [online]. InTech, 2012, 2012-03-07. ISBN 978-953-51-0114-7. Dostupné z: doi:10.5772/36213
- [32] DEMCHENKOV, E.L., A.A. NAGDALIAN, R.O. BUDKEVICH, N.P. OBOTUROVA a A.I. OKOLELOVA. Usage of atomic force microscopy for detection of the damaging effect of CdCl<sub>2</sub> on red blood cells membrane. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 2021, (208).
- [33] LOYOLA-LEYVA, Alejandra, Juan Pablo LOYOLA-RODRÍGUEZ, Yolanda TERÁN-FIGUEROA, Santiago CAMACHO-LOPEZ, Francisco Javier GONZÁLEZ a Simón BARQUERA. Application of atomic force microscopy to assess erythrocytes morphology in early stages of diabetes. A pilot study. *Micron* [online]. 2021, **141**. ISSN 09684328. Dostupné z: doi:10.1016/j.micron.2020.102982
- [34] DRIRA, Zouheir a Vamsi K. YADAVALLI. Nanomechanical measurements of polyethylene glycol hydrogels using atomic force microscopy. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* [online]. 2013, **18**, 20-28. ISSN 17516161. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmbbm.2012.09.015
- [35] ALAM, K, J UMER, M IQBAL a A HASAN. Measurements of Elastic Properties of Biological Hydrogels using Atomic Force Microscopy. *Journal of Physics: Conference Series* [online]. 2020, **1455**. ISSN 1742-6588. Dostupné z: doi:10.1088/1742-6596/1455/1/012012
- [36] ZANG, Ling. *Basics of Atomic Force Microscopy (AFM): Force Modulation Microscopy (FMM)* [online]. In: . Utah [cit. 2021-7-25].
- [37] Measuring and Understanding Force Distance Curves. In: AFM Workshop [online]. Signal Hill, s. 2-3 [cit. 2021-7-25].

## 8 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

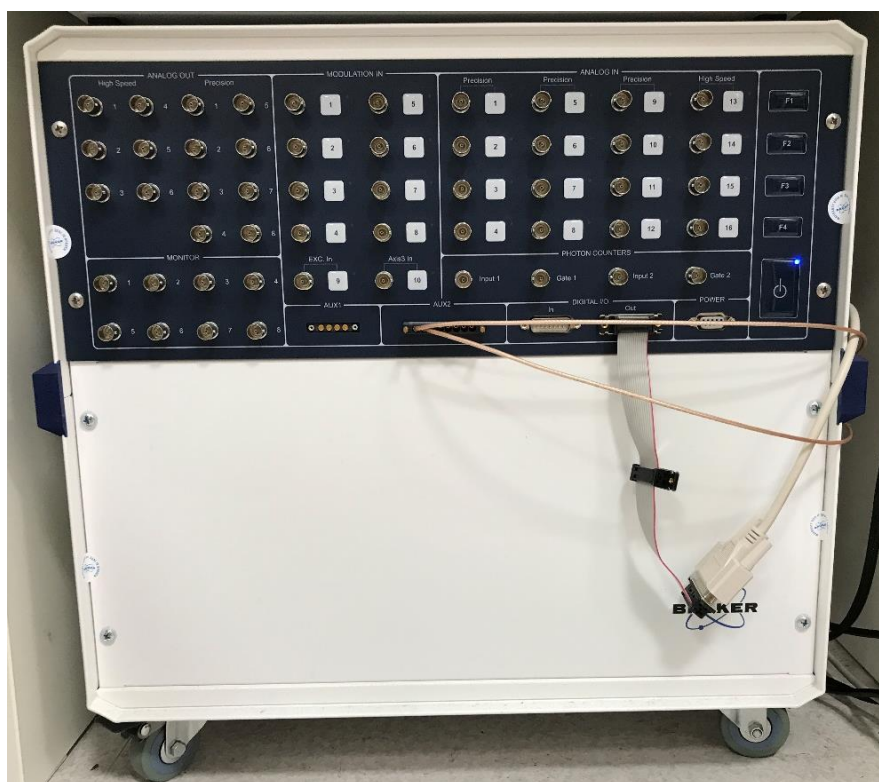
### 8.1 Seznam zkratek

AFM	mikroskopie atomární sil ( <i>Atomic Force Microscopy</i> )
PFM	piezoelektrická silová mikroskopie ( <i>Piezoelectric Force Microscopy</i> )
fps	obraz za vteřinu ( <i>frames per second</i> )
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Semi-IPN	polo-prostoupená síť (Semi-Interpenetrating Polymer Network)
IPN	prostoupená síť (Interpenetrating Polymer Network)
HEPES	4-hydroxy-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
PEG	polyethylenglykol
PEG-DA	diakrylát polyethylenglukolu
GelMA	želatinový methakrylát
PVA	polyvinylalkohol

### 8.2 Seznam symbolů

$\varepsilon$	poměrné prodloužení [-]
$\sigma$	tečné napětí [Pa]
$E$	Youngův modul pružnosti [Pa]
$\theta$	kontaktní úhel [°]
$m_{\text{voda}}$	hmotnost vody [g]
$m_{\text{gel}}$	hmotnost gelu [g]
$m_{\text{NG}}$	hmotnost nabobtnaného gelu [g]
$m_{\text{VG}}$	hmotnost vysušeného gelu [g]
$F$	síla [N]
$k$	konstanta tuhosti [ $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$ ]
$x$	vzdálenost [m]

## 9 PŘÍLOHY



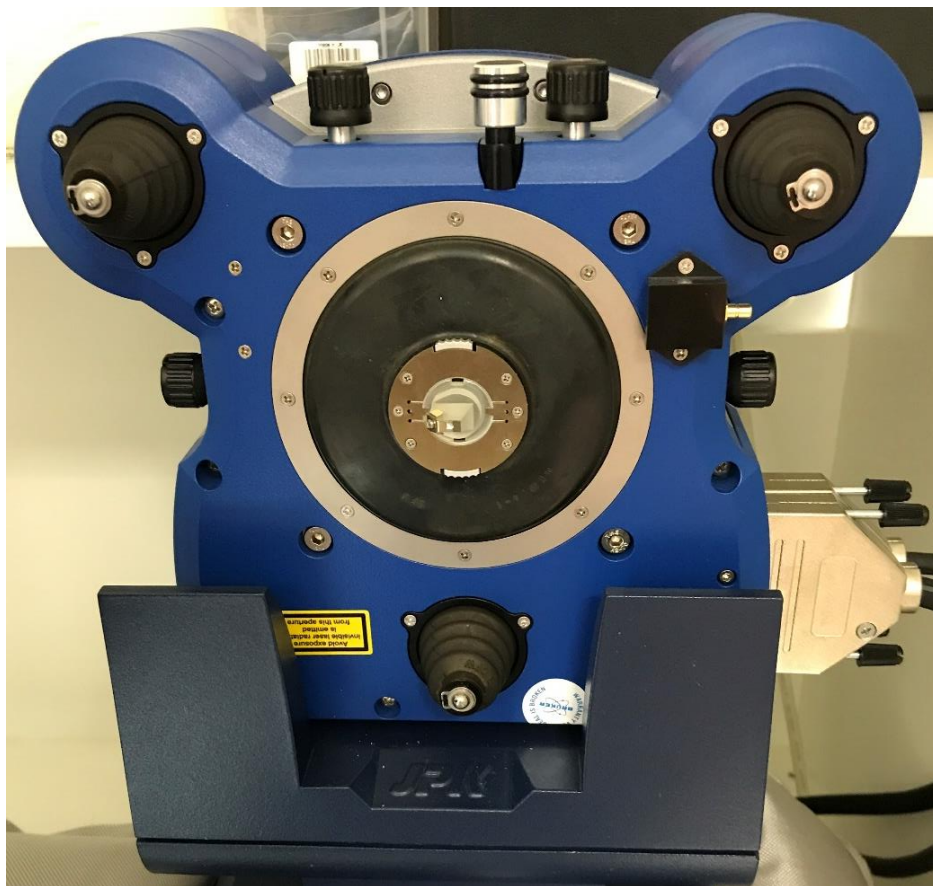
Obrázek 43 - Ovladač mikroskopu atomárních sil (AFM).



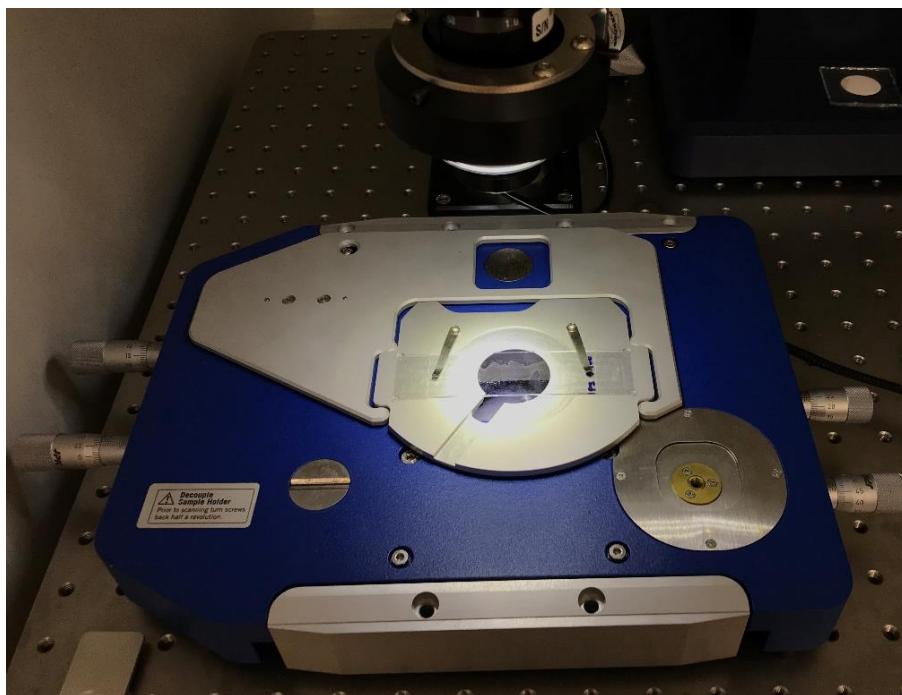
Obrázek 44 - Umístění držáku nosníku do podstavce pro výměnu.



Obrázek 45 - Umístění nosníku do držáku.



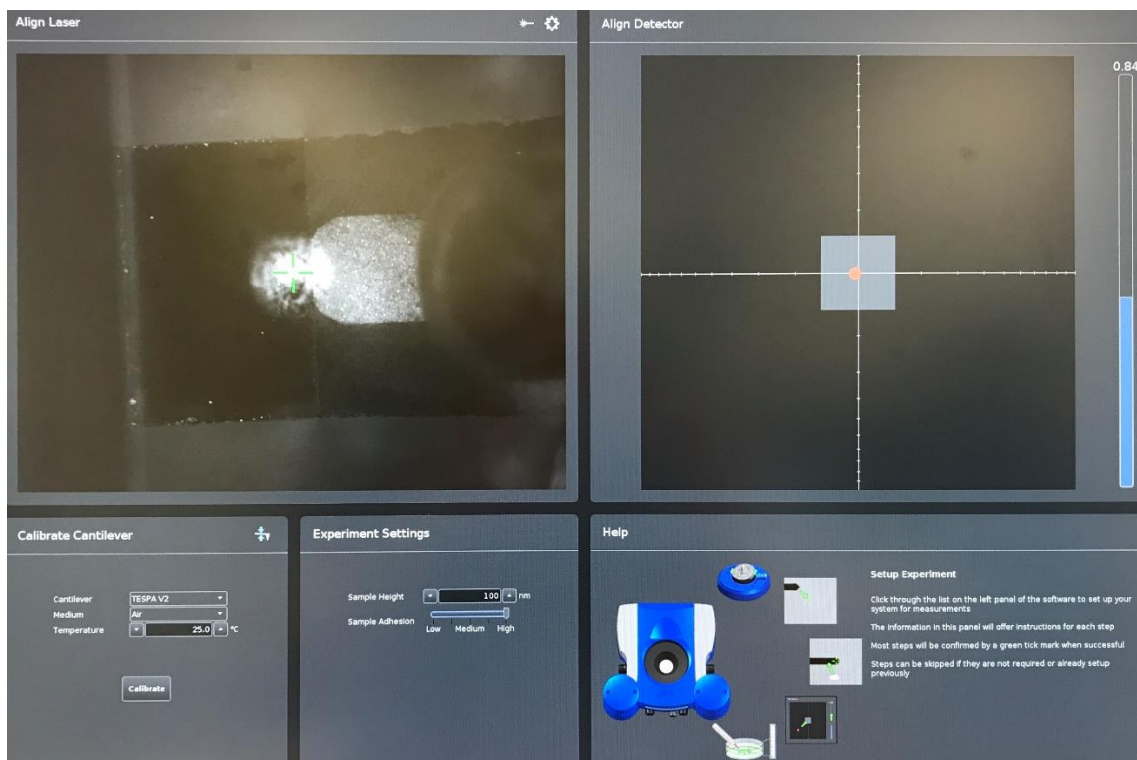
Obrázek 46 - Umístění držáku do hlavice mikroskopu atomárních sil (AFM).



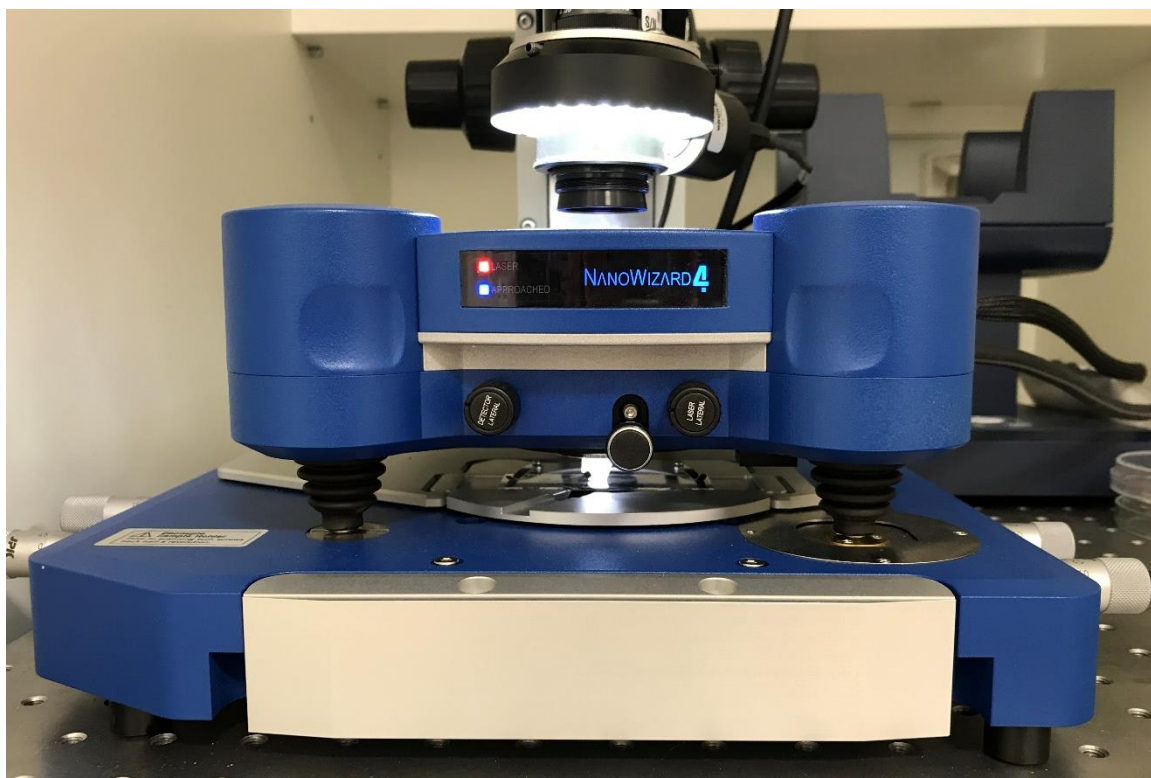
Obrázek 47 - Umístění vzorku do svorek.



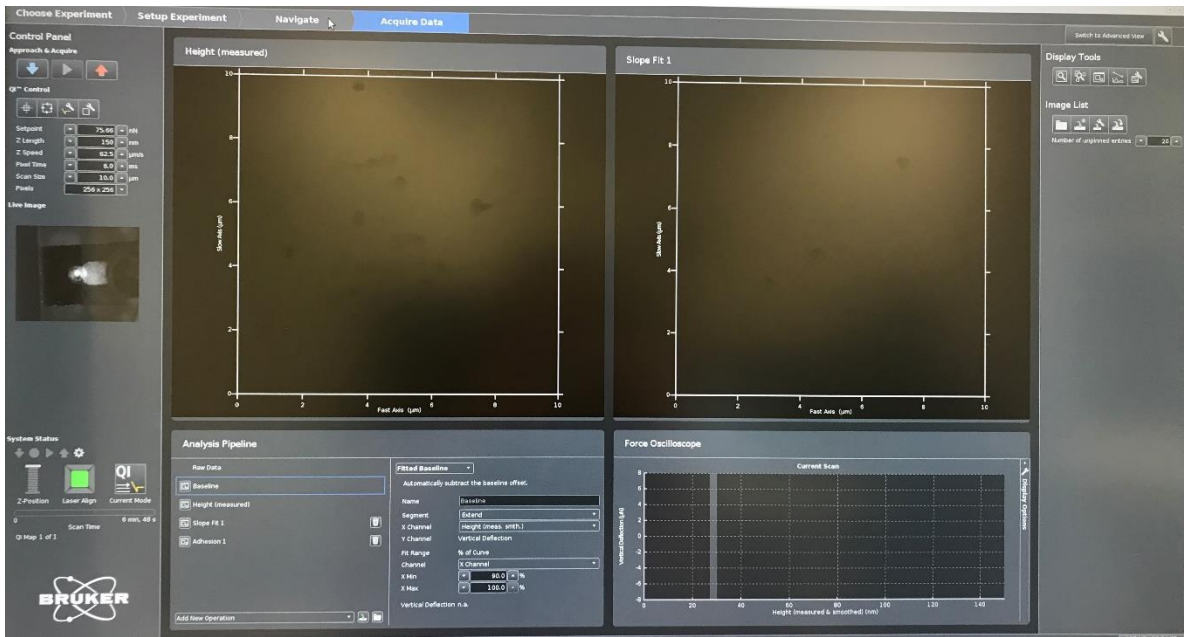
Obrázek 48 - Umístění hlavice mikroskopu atomárních sil (AFM) nad vzorek.



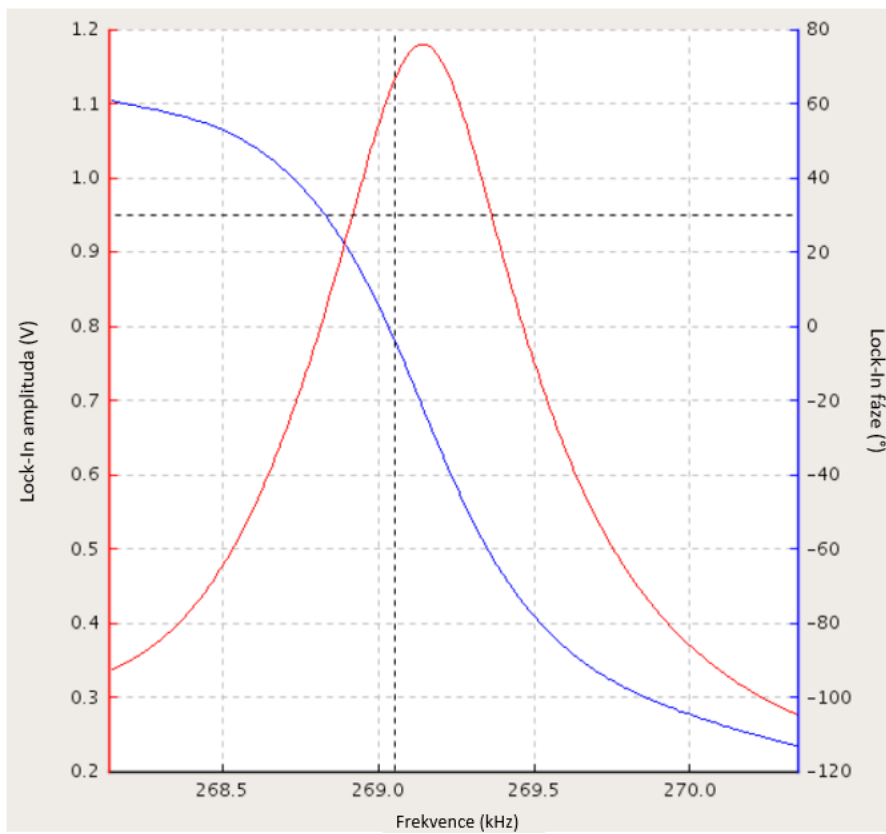
Obrázek 49 - Nastavení pozice laseru na hrot nosníku.



Obrázek 50 - Hlavice mikroskopu atomárních sil umístěná nad vzorkem a nosník přiblížen k povrchu vzorku, svítí modrá kontrolka přiblíženo (Approached).



Obrázek 51 - Nastavení měření (střídavá kontaktní metoda, QI™ Advanced Imaging).



Obrázek 52 - Nastavení hodnoty Setpoint pro bezkontaktní režim (AC Mode Imaging) [2].