



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

VZÁJEMNÁ KORELACE MECHANICKÝCH VLASTNOSTÍ HYDROGELŮ NA MIKRO/MAKRO-ÚROVNI ZKOUMANÁ POMOCÍ MIKROSKOPU ATOMÁRNÍCH SIL A OSCILAČNÍ REOMETRIE

CROSS-CORRELATION OF MECHANICAL PROPERTIES OF HYDROGELS ON MICRO/MACRO-SCALE
STUDIED BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY AND OSCILLATION RHEOMETRY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Pavel Kuzník

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1765/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Pavel Kuzník**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **Ing. Jiří Smilek, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Vzájemná korelace mechanických vlastností hydrogelů na mikro/makro–úrovni zkoumaná pomocí mikroskopu atomárních sil a oscilační reometrie

Zadání bakalářské práce:

- 1) Seznámit s principem mikroskopie atomárních sil a oscilační reometrie.
- 2) Vypracovat literární rešerši na téma mechanické vlastnosti hydrogelů na mikro– a makro–úrovni.
- 3) Připravit a charakterizovat hydrogelové vzorky lišící se různým způsobem/stupněm síťování.
- 4) Diskutovat naměřené výsledky mechanických vlastností hydrogelů získaných z mikroskopu atomární sil a oscilační reologie.

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2023:

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

Pavel Kuzník
student

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá měřením mechanických vlastností hydrogelů na lokální a makroskopické úrovni pomocí mikroskopu atomárních sil (AFM) respektive oscilační reometrie. Obě tyto techniky umožňují stanovení mechanických vlastností hydrogelu v hydratovaném stavu, čímž je zachována nativita vzorků a do měření nejsou vnášeny artefakty, které by mohly negativně ovlivnit výsledky měření. AFM má více módů měření, kdy pro účely této práce byl zvolen mód silového mapování pomocí kontaktního měření (*Contact mode force mapping*) realizovaného v oscilačním módu (*tapping mode*). Největší část práce se zabývá měřením agarózového hydrogelu, který je zástupcem fyzikálně síťovaného hydrogelu, konkrétně je zkoumán vliv koncentrace biopolymerní složky v hydrogelu a časové závislosti (synerese hydrogelu) pomocí obou technik. Použitelnost mikroskopu atomárních sil pro měření mechanických vlastností na lokální úrovni byla testována i na dalších materiálech (hydrogelech) s různým charakterem zesíťování. Testován byl hydrogel na bázi alginátu sodného zesíťovaný pomocí vícemocných (vápenatých) iontů. Dalšími měřenými gely byly chemické gely, a sice polyethylenglykolový (PEG) hydrogel a organogel ethylen-propylen-dienového monomeru (EPDM). U PEG hydrogelu byla měřena časová závislost (stárnutí hydrogelu), kdy byla pozorována vysoká absorpce vody a bobtnání, které přešlo v rozpouštění hydrogelu. Naproti tomu EPDM organogel je vůči vodě inertní, proto byl tento vzorek použit jako standard pro AFM měření. Krom Youngova modulu, coby základního parametru charakterizujícího mechanické vlastnosti na lokální úrovni pro hydrogel v nabobtnaném stavu, byla u EPDM pilotně testována i možnost stanovení adheze a adhezivní práce.

ABSTRACT

This bachelor thesis focuses on measurement of mechanical properties of hydrogels on local and macroscopic level by atomic force microscopy (AFM) and oscillation rheometry. Both techniques allows measurement of hydrogel in hydrated state which provides native state of measured samples and prevents them from inserting artefacts into measurements made by AFM, which could negatively change measured values. AFM has more measuring modes, but for measurement in this bachelor thesis was used tapping mode called Contact mode force mapping. The largest part of this work is concentrated on measurement of agarose hydrogel, which pertains to category of physical hydrogels, concretely concentration line and time dependency (syneresis of hydrogel) were measured by both techniques. Suitability of AFM for measuring of mechanical properties of hydrogels was tested on other hydrogel samples with different type of crosslinking. Hydrogel based on sodium alginate crosslinked by calcium ions (Ca^{2+}) was tested. Furthermore were measured two chemical gels including polyethylenglycol (PEG) hydrogel and organogel of ethylene-propylene-diene monomer (EPDM). Measurement of PEG hydrogel included time dependency due to its swelling and absorption behaviour, which led into dissolving of PEG hydrogel. EPDM organogel is not dissolving in water, so it was measured as a standard for AFM measurements. In addition to Young's modulus as a base parameter for measurement of hydrogels in swollen state, was adhesion and work of adhesion tested in case of EPDM gels.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mikroskop atomárních sil, oscilační mód, oscilační reometrie, hydrogely, polysacharidy, polyethylenglykol, Youngův modul pružnosti, adheze a adhezní práce.

KEY WORDS

Atomic force microscopy, tapping mode, oscillation rheometry, hydrogels, polysaccharides, polyethylenglycol, Young's modulus of elasticity, adhesion and work of adhesion.

KUZNÍK, Pavel. Vzájemná korelace mechanických vlastností hydrogelů na mikro/makro-úrovni zkoumaná pomocí mikroskopu atomárních sil a oscilační reometrie. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/147425>. 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 Vzájemná korelace mechanických vlastností hydrogelů na mikro/makro úrovni zkoumaná pomocí mikroskopu atomárních sil a oscilační reometrie vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. 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.

.....
Pavel Kuzník

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval vedoucímu své bakalářské práce, Ing. Jiřímu Smilkovi, Ph.D. za odborné a trpělivé vedení, věcné a rady a připomínky, za vytrvalý a optimistický přístup při vedení této práce. Zároveň bych svému vedoucímu chtěl poděkovat za veškerý čas, který mi věnoval, neboť jej nebylo málo. Dále bych chtěl poděkovat konzultantovi této bakalářské práce, Ing. Martinu Kadlecovi, který mi poskytoval odborné rady v oblasti oscilační reometrie a za pomoc při experimentální činnosti.

Obsah

| | |
|--|-----------|
| 1 Úvod | 8 |
| 2 Teoretická část | 9 |
| 2.1 Hydrogely | 9 |
| 2.2 Dělení hydrogelů | 9 |
| 2.2.1 Fyzikální hydrogely | 10 |
| 2.2.2 Chemické hydrogely | 10 |
| 2.2.3 Iontové hydrogely | 11 |
| 2.3 Příprava hydrogelů | 11 |
| 2.3.1 Základní možnosti přípravy | 11 |
| 2.4 Vlastnosti hydrogelů | 13 |
| 2.4.1 Mechanické vlastnosti | 13 |
| 2.4.2 Rozdíly ve vlastnostech na lokální a makroskopické úrovni | 16 |
| 2.5 Experimentální stanovení mechanických vlastností | 16 |
| 2.5.1 Mikroskop atomárních sil | 18 |
| 2.5.2 Oscilační reologie a reometrie | 21 |
| 3 Současný stav řešené problematiky | 24 |
| 3.1 PAAm a PVP hydrogely a silové spektrometrické mapování pomocí AFM | 24 |
| 3.2 Stanovení Poissonova poměru litografickou technikou | 25 |
| 3.3 Zkoumání termodynamických a transportních vlastností PAAm gelu | 25 |
| 3.4 Struktura a reologie vodných suspenzí a hydrogelů celulósových nano fibril | 26 |
| 4 Experimentální část | 27 |
| 4.1 Chemikálie | 27 |
| 4.2 Instrumentální vybavení | 27 |
| 4.2.1 Použité přístroje | 27 |
| 4.2.2 Použitý konzolový nosník s hroty | 27 |
| 4.3 Příprava agarózového hydrogelu | 29 |
| 4.4 Příprava alginátového hydrogelu | 30 |
| 4.5 Použití PEG hydrogelu a EPDM organogelu | 30 |
| 4.6 Nastavení AFM pro měření | 30 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.7 | Silově mapovací kontaktní mód AFM (Contact mode force mapping) | 32 |
| 4.8 | Vyhodnocování křivek z AFM | 33 |
| 4.8.1 | Nastavení vyhodnocování | 33 |
| 4.8.2 | Parametry vyhodnocování a export dat | 34 |
| 4.8.3 | Vyhodnocování exportovaných a upravených dat v programu MS Excel | 36 |
| 4.9 | Vyhodnocení adheze a adhezni práce | 37 |
| 4.10 | Nastavení reometru pro měření | 38 |
| 4.11 | Vyhodnocování silových křivek z reometru v MS Excel | 38 |
| 5 | Výsledky a Diskuze | 40 |
| 5.1 | Fyzikální hydrogely | 40 |
| 5.1.1 | Agarózový hydrogel | 40 |
| 5.1.2 | Alginátový hydrogel | 45 |
| 5.2 | Chemické gely | 45 |
| 5.2.1 | PEG hydrogel | 45 |
| 5.2.2 | EPDM organogel | 46 |
| 6 | Závěr | 48 |
| 7 | Seznam použitých zdrojů | 50 |
| 8 | Seznam symbolů a zkratk | 53 |
| 8.1 | Seznam zkratk | 53 |
| 8.2 | Seznam symbolů | 53 |
| 9 | Přílohy | 54 |

1 ÚVOD

Hydrogely jako polotuhé materiály, které jsou, je-li správně zvolena kompozice, často biokompatibilními materiály. Nabývají na své důležitosti v uplatnění v mnoha oblastech, mezi něž řadíme biomedicínské aplikace (krytí na rány), v průmyslu (pohlčovače vlhkosti), zemědělství a zahradnictví (závlahové systémy) atd.

Především kvůli uplatnění v biomedicínských aplikacích vyvstává požadavek na jednoznačné a předvídatelné určení mechanických vlastností jako je pružnost, viskoelasticita, kinetická stabilita, transportní vlastnosti a další. Především kvůli povaze těchto materiálů jako je anizotropie mechanických vlastností je třeba tyto materiály měřit v nabobtnalém (nativním) stavu. Pro tato měření je ideální technika, která v posledních letech nabírá na popularitě a získává si své místo na vědecké scéně a sice mikroskopie atomárních sil (AFM). Tato technika nám umožňuje prohloubit naše znalosti z oblasti makroskopického určení mechanických vlastností, pomocí rutinních a standardních technik jako je např. oscilační reometrie a propojit je s lokální strukturou až do řádu nanometrů (AFM). Takto jsme schopni nejen mapovat povrch těchto materiálů, ale taktéž měřit například pružnost, adheze či adhezní práci v jakémkoliv bodě měřeného vzorku a rozlišit tak jemné nuance v mechanických vlastnostech.

Cílem této bakalářské práce je zkoumání mechanických vlastností agarózového hydrogelu, polyethylenglykolového hydrogelu (PEG), hydrogelu alginátu sodného síťovaného vápenatými ionty a organogelu ethylen-propylen-dienového monomeru (EPDM). Dále porovnání lokálních a makroskopických vlastností u agarózového hydrogelu a dále je provedeno pilotní měření adheze a adhezní práce jakožto možných parametrů pro budoucí výzkum.

Teoretická část bakalářské práce se věnuje obecnému vysvětlení hydrogelů, možnostech jejich přípravy a jejich mechanickým vlastnostem. Dále se věnuje možnostem měření mechanických vlastností hydrogelů jak na lokální úrovni (AFM), tak z hlediska makroskopického. V rámci literární rešerše je ukázáno, jakou metodou lze efektivně stanovit Poissonův poměr a porovnání mechanických vlastností různých hydrogelů. Experimentální část je věnována přípravě jednotlivých hydrogelů, nastavení a vyhodnocování měření a výpis použitých chemikálií a přístrojů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Hydrogely

Jako hydrogely obecně označujeme polymerní látky, které vytvářejí ve vhodném disperzním prostředí trojrozměrnou síťovitou strukturu obsahující ve své struktuře vodu. Ta je trojího typu, pevně vázána přímo na polymerní řetězce, slabě vázaná, která se váže na vlákna bobtnajícího hydrogelu a volně se vyskytující voda. Toto je jejich specifikem oproti gelům, u kterých může být disperzním prostředím i jiná kapalina než voda, například ethanol, glycerol a další. Hydrogely jsou vysoce hydrofilní a mohou obsahovat až 99,9 % vody, a přesto vykazují mechanické vlastnosti charakteristické pro polotuhé materiály. Ve vodě však bývají nerozpustné [1].

Jedná se o látky na pomezí pevného a kapalného skupenství, které jsou schopné vlivem deformace měnit svůj tvar. Vzhledem k obsahu biopolymerních látek a svým mechanickým vlastnostem, které jsou podobné lidským tkáním, jsou hydrogely vysoce biokompatibilní [2]. Toto je jedním z hlavních důvodů, proč se nalézají v centru našeho výzkumného zájmu.

Hydrogely bývají velmi často rozlišovány na základě řady specifických vlastností, jako je druh polymerní jednotky, druh síťování, reverzibilita bobtnání a podobně [3]. Studium mechanických vlastností hydrogelů je nezbytným předpokladem pro jejich přesnou charakterizaci, úpravu jejich vlastností a použití v mnoha oborech zahrnujících medicínské aplikace [1], [4] jako implantáty a krytí na rány [5], oční čočky [6], nosičové systémy léčiv s řízeným uvolňováním účinné látky v závislosti na teplotě [7] a dalších faktorech. Dále se s nimi můžeme potkat v tkáňovém inženýrství [8], v analytické chemii v gelových permeačních kolonách, či v průmyslu (pohlcovače vlhkosti). Velmi přínosné pro uplatnění hydrogelů jakožto nosiče léčiv jsou jejich transportní vlastnosti – například postupné uvolňování aktivních složek v podobě léčiv. Díky své schopnosti reagovat na fyzikální či chemické podněty z okolí změnou svých vlastností, které mohou vyústit v uvolnění léčiva, jsou hydrogely někdy označovány jako „inteligentní gely“ či „chytré gely“ [1], [4].

2.2 Dělení hydrogelů

Hydrogely jsou tvořeny z přírodních či syntetických polymerních řetězců složených z jednotlivých polymerních jednotek. Příkladem přírodních polymerních řetězců mohou být například polysacharidy a polypeptidy jako jsou: kyselina hyaluronová (HA), alginát, kolagen, agar, celulóza či želatina. Syntetické pak mohou být tvořeny polyakrylamidem (PAAm), polyethylenglykolem (PEG), polyvinylpyrrolidonem (PVP), polyvinylakoholem (PVA), poly(2-hydroxyethylmetakrylátem) (polyHEMA) a podobně [1], [2], [9].

Dalším možným způsobem dělení je podle množství samostatných použitých hydrogelových sítí. Zatímco hydrogely tvořené jednou síťovitou strukturou jsou známy a používány již po několik desetiletí. Do této kategorie patří jak homopolymerní hydrogely, jejichž síť je tvořena jedním druhem polymerní jednotky neboli monomerem, tak i heteropolymerní hydrogely, jejichž síť je tvořena dvěma či více různými monomery propojenými do jedné sítě.

Druhou kategorií jsou multipolymerní hydrogely tvořeny dvojitou či vícenásobnou a na sobě vzájemně nezávislou síťovitou strukturou. Tyto řetězce díky své afinitě ke stejným řetězcům vytváří dvě a více nezávislých, avšak propojených struktur [1], [10]. Tato kategorie hydrogelů je předmětem současných výzkumů.

Dvousíťovitou strukturou v hydrogelech mohou být výrazně ovlivněny jejich mechanické vlastnosti. Jejich tuhost může být až o několik řádu vyšší než u jednoduchých hydrogelů [1]. Jako příklad dvousíťovitého gelu bychom mohli uvést hydrogel tvořený sítí polyakrylamidu a poly(2-akrylamido-2-methylpropanosulfonové kyseliny), který má při porovnání s oběma samostatnými hydrogely vyšší tuhost 100krát až 1000krát [11].

Mezi další možný způsob dělení patří rozdělení podle příslušného strukturního uspořádání. Dle konfigurace rozlišujeme hydrogely s krystalickou (PAAm hydrogel), amorfni (PEG hydrogel) a semikrystalickou (PVA hydrogel) strukturou, přičemž míra krystalinity závisí především na fyzikálních a chemických vlastnostech dané látky a ovlivňuje v případě amorfni struktury vlastnosti absorpční a v případě krystalických hydrogelů například pevnost.

Dále dělíme hydrogely podle elektrického náboje prostorové sítě. První kategorie má neutrální náboj (PEG hydrogel), další jsou iontové, kam patří kationtové (chitosanový hydrogel) a aniontové (alginátový hydrogel) hydrogely, poté amfoterní, kam náleží hydrogely obsahující kyselé (alginátový hydrogel) nebo zásadité skupiny (hydrogel akrylátu sodného) a Zwitterionové hydrogely (například polysulfobetain metakrylátový hydrogel) obsahující v každé strukturní jednotce iontové skupiny [10].

Hydrogely mohou být děleny podle typu vazeb mezi jednotlivými polymerními vlákny, a to na fyzikální neboli vratné, kde náleží například agarózový hydrogel a chemické, které bývají občas nazývány jako nevratné, mezi které řadíme například PEG. Zvláštním případem jsou hydrogely iontové, které náleží mezi tyto dvě skupiny. Někdy jsou řazeny také mezi fyzikální hydrogely, jejichž řetězce jsou stabilizovány přítomnými aniony či kationty, tudíž se na stabilizaci jejich prostorové struktury podílejí především iontové interakce. Patří zde například alginátový hydrogel, jenž je stabilizován vápenatými ionty [2].

2.2.1 Fyzikální hydrogely

U fyzikálních hydrogelů dochází k tvorbě jejich trojrozměrné struktury pomocí nekovalentních fyzikálních interakcí a jejich vznik i zánik je spojen se změnou teploty či pH, proto mají více labilní strukturu než gely chemické. Mezi hlavní interakce doprovázející jejich vznik patří samoprovázání, termokondenzace neboli tepelné slučování, specifické molekulární rozpoznávání, cívkové stočení jednotlivých vláken mezi sebou, hydrofobní interakce, tvorba vodíkových můstků, van der Waalových sil a iontových interakcí [2], [12], [13].

2.2.2 Chemické hydrogely

U chemických hydrogelů je vytvářena trojrozměrná síť polymerů za pomoci vzniku kovalentních vazeb v průběhu fáze polymerizace. Jedná se o řízenou chemickou reakci, kdy

vznikají pevné kovalentní vazby, které se na rozdíl od fyzikálních hydrogelů rozpojují vlivem reakčního činidla, a nikoliv změnou fyzikálních podmínek. Takto vzniklé uspořádání se vykazuje výraznější pevností, stabilitou i pravidelností polymerní kostry hydrogelu. K polymerizaci dochází pomocí radikálové polymerizace, vysokoenergetické radiace či reakce přítomných funkčních skupin polymerních jednotek [2], [12].

2.2.3 Iontové hydrogely

Iontové hydrogely jsou tvořeny dvěma podskupinami a sice aniontovými a kationtovými hydrogely. Aniontové obsahují záporně nabitě ionty stabilizující jejich strukturu a kationtové obsahují ve své struktuře kladně nabitě ionty. V tomto druhu hydrogelů má výrazný vliv na pórovitost přítomnost iontů, proto má značný vliv změna pH a iontová síla. Z tohoto důvodu lze na základě změny iontové hustoty v roztoku řízeně uvolňovat obsažené látky. Především díky této vlastnosti nacházejí rozsáhlé uplatnění při použití ve fyziologickém prostředí, neboť jsou schopny uvolňovat léčivou látku ve specifické oblasti lidského těla [14].

2.3 Příprava hydrogelů

Hydrogely jsme schopni připravovat jak ze syntetických, tak z přírodních polymerních jednotek. Hlavní rozdíl mezi syntetickými a přírodními polymery spočívá v tom, že oproti přírodním polymerům jsou syntetické chemicky stabilnější. Z tohoto vyplývá, že jejich mechanická pevnost je vyšší, avšak mají pomalejší rychlost degradace a tím je složitější odbourávání. Tyto vlastnosti by měly být brány v úvahu při výběru vhodného materiálu pro tvorbu specifického hydrogelu [10].

Při přípravě hydrogelu je třeba brát velký zřetel na účel použití takto připraveného materiálu. Zda jej používáme jako biokompatibilní materiál v lidském těle v aplikacích tkáňového inženýrství, jako nosiče léčiv, nebo jako vysoušedlo či látku pro postupné uvolňování vody v zemědělství. Kromě volby typu monomeru se bere v potaz i jeho koncentrace a další faktory. Například pro uvolňování proteinů a vylepšování biologické aktivity růstových faktorů byl vybrán přírodní želatinový hydrogel se známou rychlostí biodegradace, neboť jeho biokompatibilita je již dlouhodobě prokázána. Zároveň dochází k fyzikální, a nikoliv chemické imobilizaci látek potřebných pro regeneraci tkáně v místě aplikace, kdy dochází k indukci růstu chrupavek, kostí, kůže, tukové, a dokonce i nervové tkáně [15].

Syntetické polymery na bázi sacharidů nacházejí uplatnění jako biokompatibilní a biodegradabilní materiály v medicínských aplikacích, kdy se využívá jejich, v těle velmi frekventovaných, interakcí mezi oligosacharidy a lipidy. Z tohoto důvodu jsou syntetizovány hydrogely se sacharózou pro jejich uplatnění v tkáňovém inženýrství a jako nosičové systémy léčiv [16].

2.3.1 Základní možnosti přípravy

Jelikož hydrogely jsou především polymerní trojrozměrné struktury s navázanou vodou tvořící dohromady viskoelastickou strukturu podobnou svými mechanickými vlastnostmi

fyziologickým tkáním, lze je obecně připravit jakýmkoliv technikami, které jsou běžně užívány k tvorbě polymerních sítí z monomerních jednotek. Mezi hlavní techniky řadíme objemovou či síťovací polymerizaci, dále polymerizaci zářením a podobně.

Při přípravě hydrofilních materiálů pomocí syntézy z hydrofilních monomerních jednotek jsou k této přípravě taktéž využívány síťovací činidla, což jsou malé molekuly spojující jednotlivé monomery za vzniků kopolymerů, jako je například tetramethylethyldiamin (TEMED), formaldehyd či glutaraldehyd. Tato kopolymerační reakce či vytváření síťovité struktury pomocí volných radikálů vedou k tvorbě hydrogelů ze základních stavebních jednotek.

Příprava hydrogelů z přírodních či syntetických ve vodě rozpustných polymerů probíhá řadou způsobů. Do této skupiny patří spojení pomocí fyzikálních interakcí jako jsou elektrostatika či tvorba krystalitických oblastí, dále spojení polymerních řetězců chemickou reakcí nebo použití radikálové ionizace konců hlavního řetězce, které se mohou propojovat ve formě křížových spojení.

V roztoku při přípravě hydrogelových materiálů polymerací se vyskytují tři esenciální součásti. Jedná se o iniciátor polymerace, nezreagované monomerní částice a síťovací činidlo. Pro řízení reakce se používají rozpouštědla na bázi vody. Po proběhlé reakci je třeba nově připravený hydrogel očistit promytím od nečistot.

Objemová polymerizace

Objemová polymerizace je pravděpodobně nejjednodušší metodou přípravy. Pro správný průběh je třeba dostatečná koncentrace monomeru a v něm rozpuštěných iniciátorů polymerizace za přítomnosti malého množství síťovacího činidla. Během reakce dojde k vzniku tvrdé polymerní matrice, která po ponoření do vody a následném nabobtnání vytváří hydrogel.

Síťovací polymerizace

Síťovací polymerizace je technika, při které se v roztoku mísí monomery s multifunkčním síťovacím činidlem. Tento druh polymerizace zahrnuje iniciaci UV zářením či tepelně. K tvorbě heterogenního hydrogelu dochází, pokud je při polymerizaci v roztoku přítomno větší množství vody, než je potřebné k rovnovážnému bobtnání.

Polymerizace zářením

Polymerizace zářením používá pro iniciaci ionizující záření v podobě vysokoenergetického záření, kdy dochází pomocí elektronového nebo gama záření k ionizaci v roztoku polymerů za vzniku radikálů na řetězcích polymeru či ionizaci vody za vzniku hydroxylových radikálů, které poté interagují s polymerními řetězci za vzniku radikálů polymerů. Takto vytvořené makro radikály spolu vzájemně interagují za produkce kovalentních vazeb a tvorby zesíťované struktury. Výhodou iniciace zářením oproti chemické iniciaci je tvorba čistějších produktů [16].

2.4 Vlastnosti hydrogelů

Struktura hydrogelů má zásadní vliv na většinu jejich nejdůležitějších vlastností. Hydrogely vytvářejí prostorovou polymerní síť, která obsahuje navázanou vodu ve formě pevně vázaných molekul, kterých se nelze zbavit ani sušením, také ve formě slabě vázaných molekul, které se navazují v procesu bobtnání a v poslední řadě ve formě volných molekul, které se volně vyskytují v pórech. Rozdíl chemických a fyzikálních hydrogelů nespočívá pouze v druhu stabilizace vazebné sítě, ale i v jejich vlastnostech, jako je například stabilita, homogenita, viskoelasticita a poroelasticita [1]. V některých případech může být fyzikální i chemický hydrogel tvořen stejnou polymerní jednotkou – například želatina a alginát. Jak již bylo zmíněno, tak mechanické vlastnosti mají esenciální vliv při jejich použití v medicínských aplikacích obecně, proto jejich popisu bude věnována samostatná kapitola [1].

2.4.1 Mechanické vlastnosti

Variabilita mechanických vlastností hydrogelů není tak rozsáhlá, jak tomu může být u jiných látek, ale i přesto jejich povaha umožňuje široké využití. Z důvodu jejich uplatnění v medicínských aplikacích při tkáňovém inženýrství, nosičových systémech léčiv a podobně je potřeba jejich mechanické vlastnosti určit jak z makroskopického hlediska, tak i na lokální úrovni. Určení mechanických vlastností je nezbytné taktéž pro výzkum a vývoj nových hydrogelů s požadovanými vlastnostmi [1].

Mezi mechanické vlastnosti hydrogelů s největším vlivem na jejich funkčnost a použití náleží poroelasticita, viskoelasticita, mechanická síla, tuhost a bobtnání. Všechny tyto vlastnosti se odvíjejí od druhu polymerních jednotek tvořících gel, obsahu navázané a volně přítomné vody, strukturních defektů, orientace vláken v prostoru, distribuce a způsobu tvorby vazebných spojení.

Poroelasticita

Poroelasticita je jedna z hlavních mechanických vlastností hydrogelů nezbytná při jejich použití v medicínských aplikacích. Jedná se ve své podstatě o odpor hydrogelu vůči vyvíjenému tahu či tlaku na povrch, kdy má polymerní síť tendenci zachovat svůj původní tvar. Na posuzování poroelasticity jsou používány různé moduly v závislosti na charakteru měření a použité technice měření. Používáme Youngův modul pružnosti v tahu E , který je výstupem z měření tahových či tlakových měření nebo modul pružnosti ve smyku – také nazýván jako Coulombův modul G , který je získáván pomocí smykových měření. Za předpokladu, že máme dostatečně zesíťovaný hydrogel [1], [17], lze pro tyto materiály použít modul pružnosti pro kaučukovou elasticitu, kdy podle kaučukové teorie [18] při nízkém namáhání je přítomna lineární elastická odezva, která lze využít pro určení modulu pružnosti ve smyku G . Při použití tohoto modulu se musí do výsledného výpočtu ještě započítat bobtnací koeficient daného hydrogelu [1], [17].

Viskoelasticita

Viskoelasticita hydrogelů neboli odpor proti toku souvisí značně s prostorovou strukturou hydrogelu, s jeho složením, hustotou síťování a různými deformacemi v prostorové struktuře. Platí, že s vyšší hustotou síťování převažuje elastické chování gelu, roste odpor proti toku a klesá vnitřní toková permeabilita. Měření těchto vlastností je často spojeno s měřením modulu pružnosti [1]. Hydrogely jsou považovány za polotuhé viskoelastické materiály [2].

U hydrogelů se moduly pružnosti snižují vlivem jednotlivých defektů v prostorové struktuře, které snižují schopnost materiálu vydržet deformační působení. S vyšší koncentrací polymerního podílu vůči vodnímu podílu výrazně vzrůstají měřené hodnoty modulů pružnosti. Nicméně vzhledem k rozdílným výsledkům získaných z různých výzkumných prací vyplývá, že kvalitativně spolehlivá a opakovatelná měření těchto vlastností zůstávají stále neřešitelným problémem kvůli množství různých defektů a nepravidelností ve struktuře hydrogelů [1].

Bobtnání

Velmi důležitou vlastností hydrogelů je jejich schopnost vázat vodu a bobtnat. Tato schopnost je nezbytná pro jejich celkovou funkčnost a biokompatibilitu. Důležitým parametrem je takzvaný bobtnací koeficient, který se stanoví jako hmotnostní poměr nabobtnaného hydrogelu vůči hmotnosti vysušeného pevného podílu hydrogelu. Tato vlastnost značně ovlivňuje mechanické a transportní vlastnosti. Schopnost hydrogelů bobtnat je příčinou uvolnění předem uchycené biomolekuly v jeho struktuře při změně bobtnacích podmínek, čehož se využívá například při transportu léčiv na specifické místo v těle s daným pH či iontovou silou [2].

Hodnoty bobtnání se velmi liší napříč různými druhy hydrogelů z důvodu přítomnosti rozdílných stavebních jednotek a diverzity v 3D prostorové struktuře. Bobtnání má taktéž značný vliv na mechanické vlastnosti hydrogelů, neboť voda je zde hlavní komponentou. Difúze vody do polymerní sítě během bobtnání dramaticky mění prostorovou strukturu, mechanickou sílu a elasticitu. Bobtnání hydrogelů je výrazně spojeno s mikrostrukturou, neboť voda jakožto polární rozpouštědlo se váže k dalším polárním a hydrofilním skupinám přítomným jak v xerogelu, tak v hydrogelu. Z toho je patrné, že čím více je zde skupin dostupných k navázání vody, tím více je podpořeno bobtnání [1], [2], [13]. Hlavními faktory ovlivňujícími mikrostrukturu jsou pH, iontová síla vodného roztoku a hydrofobicita [2].

Adsorpce vody

Adsorpce vody do struktury hydrogelu je velmi důležitou vlastností těchto materiálů. Charakter vody přítomné v hydrogelech má na jejich vlastnosti signifikantní vliv. Jako primárně vázaná (nebo také pevně vázaná) voda se označuje ta, jež se váže přímo na strukturu polymerní sítě. Váže se na nejvíce hydrofilní skupiny hydrogelů ($-OH$, $-COOH$, $-NH_2$ a podobně), a tudíž je vázána nejpevněji. Během bobtnání xerogelu adsorpcí vody dochází k odhalování dalších hydrofilních skupin, na které se poté navazuje pomocí difúzního toku sekundárně neboli slabě vázaná voda, kdy dochází k vyplnění pórů, až je dosaženo bobtnací rovnováhy. Primárně a sekundárně vázaná voda se označuje společným pojmem jakožto celková vázaná voda.

Poté se zde vyskytuje volná voda, která je volně přítomna v pórech hydrogelu. Množství primární, sekundární a volné vody není jednoduché změřit, neboť dochází k vzájemné vnitřní přeměně volné a vázané vody ve struktuře hydrogelu [13]. Bylo zjištěno, že při zmrazení hydrogelu pod bod mrazu vody zmrzne pouze volná a slabě vázaná voda, zatímco silně vázaná voda stejně jako samotný polymer nezmrzne [2].

Velikost pórů

Uzly uvnitř hydrogelů vznikají vazebným spojením, které je buď chemické nebo fyzikální povahy. Velikost pórů je obecně lineární vzdálenost dvou sousedních vazebných spojů od sebe navzájem. Tato vzdálenost může sahát od jednotek nanometrů a až po řády mikrometrů. Velikost pórů je velmi výrazně ovlivněna chemií hydrogelu včetně vazebné hustoty. Dále na ni má vliv také vnější prostředí, ale především okolní teplota, kdy při zvyšování teploty dochází k častějším interakcím sousedících řetězců a k vyšší frekvenci tvorby vazeb. Na velikost pórů má taktéž výrazný vliv chemická povaha rozpouštědla, pH a iontová síla roztoku, neboť dochází k zvýšení protonace respektive deprotonace, tvorbě vodíkových vazeb a nábojovému stínění. Vyšší velikost pórů výrazně usnadňuje a urychluje difúzi, čímž zvyšuje permeabilitu hydrogelu. Nízká velikost pórů naopak difúzi inhibuje [1], [2].

Funkčnost změny difúze změnou stínění a velikosti pórů podmiňuje použití hydrogelů v tkáňovém inženýrství, kdy je třeba difúze skrz membránu stejně jako u buněk, při postupném uvolňování léčiv, či jako nosičové systémy léčiv [2].

Synereze

Jedná se o vlastnost hydrogelů, která souvisí s vypuzováním rozpouštědla z polymerní sítě vlivem stárnutí tohoto gelu. V důsledku této vlastnosti dochází k deformaci polymerní sítě a změně žádaných vlastností hydrogelu jako je třeba elasticita. K tomuto vypuzování dochází samovolně na povrch v závislosti na čase vlivem změny rovnovážné absorpce vody. Opačným dějem je nasávání, kdy dochází k dodatečné absorpci rozpouštědla. Toto chování se mění v závislosti na tom, zda je vypuzované rozpouštědlo z povrchu průběžně odstraňováno, v takovém případě dochází k rychlejšímu vypuzování, či je rozpouštědlo akumulováno na povrchu, a tudíž dochází k jeho vypuzování na základě oscilačního pulzování sítě. Tato vlastnost některých gelů je podobná funkci svalových buněk myokardu, kdy dochází k pravidelné pulzaci [19].

Transportní vlastnosti

Jedná se o vlastnost, která souvisí se strukturou a povahou polymerní sítě v hydrogelech. Vlivem schopnosti absorpce a desorpce velkého množství rozpouštědla a dalších látek mají unikátní transportní vlastnosti. Jejich transportní vlastnosti jsou ve velké části případů ovlivněny vnějšími faktory jako je pH, iontová síla prostředí, teplota či magnetické pole, což podmiňuje jejich uplatnění jako chytrých materiálů v nosičových systémech léčiv s řízeným uvolňováním léčivé látky či jako substráty pro buněčné kultury, kdy postupně uvolňují

absorbovanou vodu do prostředí. Látky, jež mají být transportovány ven z hydrogelové struktury, jsou nejdříve rozpuštěny a absorbovány a poté na základě změny prostředí difundují srze mezery v polymerní síti hydrogelu [20].

Adheze a adhezni práce

Adheze je jevem, jenž se vyskytuje mezi dvěma povrchy, mezi nimiž působí přitažlivé síly v podobě mezimolekulárních sil. Tato síla může působit na vzdálenost v řádu stovek pikometrů až po milimetry. Jedná se především o sílu působící mezi povrchy z různých materiálů. Důsledkem této síly je spojení povrchů látek, mezi nimiž síla působí a k jejich oddělení je potřeba síla v podobě adhezni práce. Existuje více adhezniích mechanismů, mezi něž patří adheze mechanická, elektrostatická, disperzní, difúzní a chemická. Dále se stávají atraktivními hydrogely, jejichž transportní vlastnosti jsou ovlivňovány magnetickým polem, a to zejména při řízeném uvolňování léčiv.

Mezi předměty na vzdálenost od stovek pikometrů po 100 nm působí adheze dominantně a je třeba vykonat vysokou adhezni práci k jejich oddělení. Při oddálení těchto předmětů na vzdálenost nad 10 μm již adheze nepůsobí a ke spojení látek je třeba využít lepidel [21]. Adheze tedy souvisí s typem působících sil a vzdáleností a adhezni práce s adhezí a plochou, kde k adhezni dochází.

2.4.2 Rozdíly ve vlastnostech na lokální a makroskopické úrovni

Hydrogely, jakožto polymerní materiály s navázanou vodou, jsou z makroskopického hlediska vcelku homogenními materiály. Při bližším pohledu na mikroskopickou či nanoskopickou škálu odhalujeme zásadní rozdíly při různých místech měření v rámci jednoho vzorku. Tyto nehomogenity mohou být způsobeny tím, že při měření v malém měřítku narazíme na místo, kde se nachází řetězec a jindy na místo v rámci póru, tyto proměnné jsou nezávislé na struktuře materiálu a dále ještě lokálními defekty v trojrozměrné struktuře hydrogelu. Pro měření a následné porovnání lokálních a makroskopických vlastností materiálů jsou nejčastěji využívány kombinace více měřících technik jako třeba technika malého úhlu rozptylu (*Small angle scattering*) a reologie, či tepelná gravimetrická analýza (TGA) a diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) [2]. V této práci bylo použito měření pomocí mikroskopu atomárních sil (AFM) a oscilační reologie.

2.5 Experimentální stanovení mechanických vlastností

Mechanické vlastnosti mohou být charakterizovány v hydratovaném či vysušeném stavu. Vysušeného stavu se dosahuje pomocí vysušení vzduchem při atmosférickém tlaku nebo lyofilizací. Hlavní nevýhodou sušení při atmosférickém tlaku je, že dochází k poruše a částečnému kolapsu hydrogelové polymerní sítě, tudíž měřený hydrogel nemá stejnou strukturu. U lyofilizace neboli vymražení vody z hydrogelu nedochází k tak závažnému porušení polymerní sítě jako v případě sušení. Zde se vyskytuje hlavní překážka stanovení mechanických vlastností, která spočívá v rozdílné struktuře hydratovaného a vysušeného

hydrogelu, kdy při vypaření nebo sublimaci vody ze struktury hydrogelu dochází k poškození či kolapsu jeho struktury, většinou se proto používá méně destruktivní lyofilizace. Proto jsou výsledné hodnoty při měření mechanických vlastností vysušeného hydrogelu rozdílné.

Avšak měření vlastností v hydratovaných hydrogelech s sebou také přináší určité komplikace. Samotný proces měření běžnými metodami (reometrie apod.) je složitější a výsledky jsou často poskytovány v nízkém rozlišení vzhledem k lokální struktuře hydrogelu. Z tohoto důvodu je výhodné používání mikroskopu atomárních sil, který měří vzorky v hydratovaném stavu a zároveň poskytuje kvalitní výsledky s vysokým rozlišením i při měření v řádech nanometrů [2]. Jelikož je tato metoda založena na působení slabých nevalebných interakcí, tak nám poskytuje vysokou citlivost měření. Používání hydrogelů v lidském těle s sebou přináší potřebu látku lépe charakterizovat, a proto se metody měření mikroskopem atomárních sil využívá stále více [1], [2].

Pro měření mechanických vlastností hydrogelů se využívá nespočet druhů technik, avšak jejich výsledky se napříč různými druhy často velmi liší. Rozdíl hodnot při měření za stejných podmínek provedených různými výzkumnými týmy je velmi markantní a často dosahuje násobně vyšších či nižších hodnot. Zatím nemáme žádnou techniku, která by se dala spolehlivě použít pro charakterizaci všech mechanických vlastností, a proto je třeba použité techniky kombinovat. K pochopení této skutečnosti může pomoci i fakt, že celá polymerní prostorová síť je řádově tři až čtyřikrát větší než velikost jednotlivých pórů. Každá použitá technika má své výhody, ale i svá omezení. Obecně se pro hydrogely často používá technika určená k měření mechanických vlastností polymerních materiálů, jako je například dynamická mechanická analýza (DMA) [1], [2].

Měří se především poroelasticita a viskoelasticita a s ní spojená permeabilita, strukturní morfologie, složení, obsah vázané a volné vody, termální vlastnosti, defekty ve struktuře, hustota a kvalita vazebného síťování, orientace polymerních vláken a silové mapování pomocí mikroskopu atomárních sil. Dále se měří změna vlastností a struktury při různých koncentracích vody, pH, teplotách či iontové síle prostředí.

Pro budoucí rozšíření hydrogelů v biomedicínských aplikacích je kladen důraz na detailnější popis jejich mechanických vlastností a defektů v jejich struktuře a následně upravení těchto parametrů při budoucí přípravě hydrogelů kvůli vysokým nárokům na jejich vlastnosti [2].

Zkouška tvrdosti vtiskem

Pro měření mechanických vlastností řady materiálů se používá a používala zkouška tvrdosti vtiskem. Pro měření používáme sondu o známé geometrii, která je přivedena do kontaktu s povrchem měřeného materiálu, zatlačena neboli vtisknuta do materiálu a znovu oddálena. Při tomto měření je rozhodující vliv odporu vůči vtlačení. Z techniky sloužící původně pro měření tvrdosti kovů se vlivem pokroku ve vědě a vylepšením vyhodnocovacích zařízení a výzkumu nových materiálů stala technika mikroskopie atomárních sil, jež je možno využít také pro měření vlastností hydrogelů. Hloubkově měřicí vtiskovací zkouška tvrdosti je v podstatě tlakovým testem, kdy je stlačená plocha výrazně menší než při tlakovém testování. Naproti

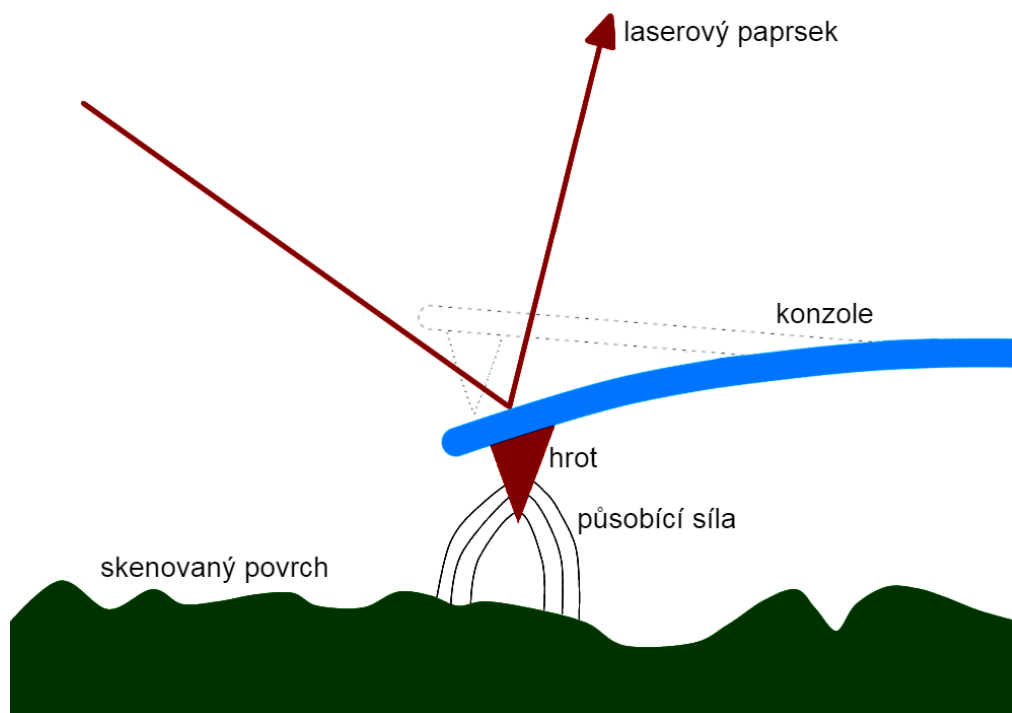
tomu při testování pomocí AFM jsou primárně měřeny nevazebné interakce mezi hrotem a povrchem a tudíž může, ale nemusí docházet ke kontaktu mezi povrchem vzorku a hrotem konzoly [1].

Pro tento druh měření není třeba výrazné úpravy vzorku a zároveň lze měřit gel v nabobtnaném stavu, což jsou jedny z hlavních důvodů popularity této techniky při měření materiálů s těžko definovatelnou prostorovou geometrií jako jsou například právě hydrogely. Vzhledem k nízkému požadavku na kvantitu vzorku lze měřit velké množství vzorků. Výhodou této metody je i schopnost měřit na lokální úrovni, čehož je u hydrogelů využíváno při zkoumání lokálních kvantitativních nehomogenit či k mapování silového působení v mikro a nano struktuře. Zároveň zůstávají vzorky hydratované během měření. Měřit lze ve velkém rozsahu velikostí, řádově od nanometrů až po milimetry, díky čemuž je technika velmi adaptabilní. Existuje řada testovacích sad a druhů pro testování tvrdosti vtiskem [1], [9].

Pomocí mikrovrtiskování, stejně jako u tlakového testování, může docházet k lokální povrchové dehydrataci, což zapříčiňuje odchylku od rovnovážného bobtnacího koeficientu pro daný hydrogel [17].

2.5.1 Mikroskop atomárních sil

Mikroskopie atomárních sil (AFM – *Atomic force microscopy*) je v současnosti nejpoužívanější technikou ze skupiny rastrovacích mikroskopů se sondou (SFM – *Scanning force microscopy*). Mikroskop atomárních sil byl vynalezen v roce 1985 vědci Quatem, Gerberem a Binnigem. Základní princip je založen na zaznamenávání polohy malé sondy a na ní umístěné konzoly, na jejímž konci je hrot ve vertikálním směru, která je pomocí zpětnovazební smyčky udržována v těsné blízkosti povrchu. Hrot je přitahován či odpuzován nevazebnými interakcemi jako jsou vodíkové můstky a van der Waalsovy síly, jenž způsobují vychýlení hrotu oproti stavu bez interakcí hrotu s povrchem vzorku. Je to metoda sloužící k trojrozměrnému zobrazování povrchů bod po bodu. Tato metoda má velmi kvalitní rozlišení, neboť může sloužit i k zobrazování atomů v molekule. Kvalita poskytnutých snímků je značně ovlivněna rozlišením sondy a podílem polymerních řetězců ve vzorku. Výzvou zůstává také vybrání vzorku o dostatečné velikosti, neboť v příliš hlubokém vzorku se pod sebou vyskytuje několik polymerních vrstev kvůli prostorové struktuře hydrogelů. Detekuje se síla působící mezi sondou a zkoumaným povrchem. Díky zkoumání povrchu vzorku v řádcích měříme topologii povrchu [2], [22], [23], [24], [25].



Obrázek 1: Schéma měření vzorku pomocí AFM [26]

Principiálně je tato metoda velice podobná tunelové mikroskopii, avšak k detekci slouží vzájemná meziatomová přitažlivost místo elektrického proudu, jako to je u tunelové mikroskopie, kdy se tunelový efekt využívá například v optických vláknech a hranolech. Tunelový efekt vychází z kvantové mechaniky a vysvětluje, že elektron s určitou pravděpodobností může přejít přes bariéru s vyšší potenciálovou energií, než je energie elektronu. Pomocí AFM lze vlivem druhů interakcí měřit i nevodivé vzorky různého druhu přes různé druhy polymerů, keramiky, skla a biologických vzorků. Základem tohoto mikroskopu je velmi ostrý a tenký hrot pevně upevněný na ohebném konzolovém nosníku. Existují techniky měření mikroskopie atomárních sil na základě všech možných druhů sil přes van der Waalsovy, elektrické, či magnetické.

Rozlišení mikroskopu atomárních sil je limitováno poloměrem použitého hrotu [9]. Nejčastější způsob detekce mezi hrotem a povrchem je pomocí využití deformace pružného konzolového nosníku, na kterém je připevněn hrot a detekce této deformace je prováděna pomocí laserového svazku a fotodiody jakožto detektoru dopadajícího laserového paprsku. Pro citlivost metody je nezbytné, aby tuhost konzolového nosníku byla co nejmenší [22], [23], [25].

Při použití grafu závislosti síly na vzdálenosti hrotu [18] si lze povšimnout, že zde působí přitažlivé i odpudivé síly. Přitažlivé síly lze zaznamenat při větší vzdálenosti a patří zde



Obrázek 2: Schématické znázornění rozmezí přitažlivých a odpudivých sil [27]

van der Waalsovy a elektrostatické a odpudivé síly působí v kratší vzdálenosti a jsou způsobeny překryvy jednotlivých elektronových oblaků. Pro kvantifikaci naměřených dat síla – vzdálenost je třeba provést kalibraci konstanty tuhosti konzolového nosníku. Pro dobrou návaznost měření se používá jako generátor síly a sensorického posunutí nanoindentoru tlaku vtiskem. V závislosti na silové interakční oblasti povrch – hrot určujeme několik standardních módů rastrování povrchů [22]. Na jednotlivé módy se zaměříme v následujících odstavcích.

Kontaktní mód

Prvním typem je takzvaný kontaktní mód. V tomto módu se hrot udržuje v blízké konstantní vzdálenosti v rozmezí odpudivých sil, kde přímo interaguje s povrchem vzorku. Dochází zde k ohybu konce nosníku s hrotem při rastrování a konec nosníku spojený se sondou je udržován v konstantní vzdálenosti. V případě nehomogenosti topografie vzorku dosahuje nosník různé velikosti ohnutí, díky čemuž jsme schopni při sledování závislosti ohnutí na poloze vzorku dosáhnout zvětšeného obrazu vzorku.

Nekontaktní mód

Druhým typem je takzvaný nekontaktní mód, kdy se hrot vyskytuje nad vzorkem v oblasti přitažlivých sil. Funguje na principu konstantního ohnutí, kdy oproti předchozímu módu hrot není udržován v konstantní výšce, ale v konstantním silovém působení. Funguje na principu zpětné vazby, kdy při nekonstantní silové odezvě je nosník posunut tak, aby byla přednastavená působící síla opět konstantní. Tato oscilace v ose z je způsobena konstantním posunem rezonanční frekvence nebo změnou amplitudy. Na rozdíl od kontaktního režimu nedochází k ničení hrotu, a tudíž lze tento typ použít i pro drsnější vzorky. Nevýhodou však je pomalejší průběh měření [22], [23].

Mód přerušovaného kontaktu

Třetím typem je mód přerušovaného kontaktu, kdy dochází k oscilaci hrotu na nosníku. Oscilace je prodloužená až do oblasti odpudivých sil. Tento mód je mezikrokem mezi kontaktním a nekontaktním módem, protože dochází v pravidelných intervalech ke kontaktu

hrotu s povrchem. Je nejpoužívanější, a kromě určení mechanických vlastností umožňuje určovat i topografii vzorkového povrchu [22], [23], [24].

Při měření pomocí tohoto módu musíme dodržet velikost oscilace, která musí být malá ve srovnání s velikostí konzoly, typicky je oscilace v rozměrech od 1 do 100 nanometrů, naproti tomu konzolový nosník má velikost větší než 500 nanometrů. K aproximaci využíváme popisu jednoho stupně volnosti, kdy díky periodickému kontaktu se vzorkem lze použít model rázového harmonického oscilátoru. Avšak při tomto módu se vyskytují i anharmonické frekvence vlivem nelineární odezvy kontaktu, kvůli čemuž musí být konzola popsána v rámci více stupňů volnosti, kdy pohyb je harmonický, ale kontakt hrot – vzorek není. Je třeba taktéž dodržet, aby vlnová délka kmitání konzolového nosníku byla nižší než tloušťka paprsku [28].

Dynamický mód

Čtvrtým a zároveň posledním základním typem je dynamický mód, který náleží taktéž k nekontaktním režimům. Měří se posun ve fázovém kmitání při působení harmonické síly, který je způsoben působícími atomárními silami. Při tomto cyklickém harmonickém kmitání je hrot maximálně vzdálen od povrchu při maximální výchylce. Na rozdíl od nekontaktního módu je hrot harmonicky oddalován a přibližován ke vzorku [23].

Pokročilé módy

Dále jsou používány i pokročilejší módy jako je vodivostní mód, elektrochemický mód a vrcholově pokleповý mód. Vrcholově pokleповý mód umožňuje měření citlivé ke vzorku, zároveň je citlivější ke hrotu díky měření při nižším silovém působení a neustálého kontrolování síly při kontaktu hrotu s povrchem vzorku. Tento mód dále umožňuje automatickou optimalizaci parametrů v průběhu měření. Dalším, ale ne posledním pokročilejším módem je mód kvantově nano-mechanický, pomocí kterého měříme lokální mechanické vlastnosti vzorku jako adhezi, Youngův modul, topologii, deformaci a další [24]. Tyto vlastnosti jsme schopni měřit v každém bodě a po změření celého vzorku získáme hodnoty těchto údajů pro celý vzorek [22].

2.5.2 Oscilační reologie a reometrie

Oscilační reologie

Reologie je vědecká disciplína, která se zabývá zkoumáním tokových a deformačních vlastností materiálů při jejich namáhání vnějším napětím. Jedná se o oblíbenou a značně rozšířenou disciplínu, která nachází své značné uplatnění v chemickém inženýrství či fyzikální chemii při měření tokových a mechanických vlastností materiálů. Informaci o těchto vlastnostech námi měřeného materiálu nám poskytuje se značnou spolehlivostí a opakovatelností.

Obecně lze konstatovat, že se materiály působením síly deformují. Na toto poukazuje Hookův zákon [29] pružnosti říkající, že u ideálně pružných těles probíhá elastická deformace a ta je přímo úměrná působícímu napětí. Používá se pro výpočet modulu pružnosti v tlaku

na základě známého zatížení. Při aplikaci napětí působí deformační síly jak na pevné, tak i tekuté látky. Komplexní materiály podléhající časové závislosti a vykazující elastické i viskózní chování se nazývají viskoelastické materiály, mezi něž patří i hydrogely.

Při aplikaci oscilačního smyku, který se vyznačuje pravidelnou oscilací s proměnlivou velikostí rotace, jsou výsledkem měření dva moduly. Prvním modulem je paměťový modul (modul elasticity), kdy dochází k akumulaci energie, která může být použita k částečné nápravě deformace. Současně je měřen ztrátový modul pružnosti, který prezentuje přítomné viskózní chování materiálu, který je kvantitativní složkou vyjadřující ztrátu energie v podobě tepla způsobenou vnitřním třením materiálu. U pevných materiálů je paměťový modul zpravidla vyšší než ztrátový. V momentě, kdy dojde ke zvýšení ztrátového modulu nad paměťový, se látka nadále chová více jako tekutá látka z pohledu tokových vlastností. Toto lze poznat podle překročení elasticity deformace, kdy se již měřená látka nevrátí do původní formy a dochází tak k destruktivní deformaci a odpor vůči toku a napětí se zároveň snižuje [30].

Reometrie

Reometrie je měřicí technika zabývající se měřením reologických vlastností a proměnných. Jedná se především o měření ztrátového a paměťového modulu, působícího normálového napětí, ztrátového úhlu a komplexní viskozity. Reometry jsou přístroje používané pro tato měření, přičemž moderní reometry jsou schopné využívat různé měřicí geometrie, které nám umožňují použití více módů na jednom přístroji.

Rozdělujeme několik druhů reometrů, jedná se o kapilární, soustavu kužel a deska, soustava dvou paralelních desek a reometr s koncentrickým válcem. Kapilární reometry patří mezi nejjednodušší a zároveň nejstarší skupinu reometrů. Používají se k měření viskozity průtokem tekutiny válcem s výrazně větší délkou než vnitřním průměrem. Rozlišujeme variantu, při které protéká kapalina volně trubici pouze za přítomnosti gravitačního pole, či variantu při které tlačí hydrostatický píst určitým tlakem na kapalinu a pozoruje se změna tlaku na druhé straně trubice.

Soustava kužel a deska je technickým řešením reometru, kdy se nachází rotující kužel nad nehybnou deskou. Tato sestava se používá pro měření polotuhých materiálů stejně jako soustava s paralelními deskami. Nevýhodou uspořádání kužel/deska je nemožnost nastavení pevné mezery mezi deskou a kuželem, vlivem čehož nejsme schopni měřit vzorky s většími částicemi. Zásadní výhodou naopak je, že smyková rychlost je (díky náklonu u kuželu) ve všech místech měřené štěrbině stejná [30].

Reometr s paralelními deskami se skládá ze dvou desek umístěných nad sebou, přičemž horní deska je rotující a spodní nehybná. Tento systém je doporučen pro měření gelů včetně hydrogelů, velmi viskózních polymerních materiálů a měkkých pevných materiálů. Oproti systému desky a kužele si můžeme libovolně nastavit mezeru mezi deskami, vlivem čehož jsme schopni měřit i vzorky s většími částicemi. Je zde vyhodnocováno případné prokluzování vzorku a vlivem nastavitelné mezery máme na výběr vyšší škálu smykových rychlostí. Výhodou tohoto systému jsou také nízké kvantitativní nároky na měřený vzorek a následné rychlé a snadné čištění, což umožňuje zrychlit a zefektivnit proces měření [30], [31].

Posledním z uvedených módů je reometr s koncentrickým válcem. Používá se pro měření tekutých či málo viskózních materiálů jako jsou emulze, polymerní roztoky či koncentrované suspenze. Měření funguje na principu dvou válců, mezi nimiž se nachází měřená látka. Je měřen točivý moment potřebný k udržení jednoho válce v klidovém stavu, zatímco se druhý otáčí. Nevýhodou jsou vyšší nároky na kvantitu měřené tekutiny oproti systémům desky a kužele a dvou paralelních desek [30].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

V této části bakalářské práce byla provedena rešerše k rozšíření přehledu teorie potřebné k pochopení problematiky hydrogelů, jejich mechanických vlastností a způsobu měření mechanických vlastností těchto materiálů. Tento přehled byl zaměřen na porovnání mechanických vlastností hydrogelů na lokální a makroskopické úrovni, stanovení Poissonova poměru a podobně.

Poissonova konstanta obecně popisuje relativní prodloužení tělesa vůči jeho relativnímu příčnému zkrácení, pokud je těleso namáháno v tahu. Její obrácená hodnota je označována jako Poissonovo číslo, nebo Poissonův poměr, je označován μ a nabývá hodnot z intervalu 0 až 0,5. Tento poměr je využíván v rovnici na přepočítání Youngova modulu E a modulu pružnosti ve smyku G .

$$G = E / 2 \cdot (1 + \mu) \quad (1)$$

3.1 PAAm a PVP hydrogely a silové spektrometrické mapování pomocí AFM

Pomocí silového spektroskopického mapovacího módu AFM byla ve studii M. V. Flores-Merino a kol. zjišťována homogenita PAAm a PVP hydrogelů na lokální úrovni. Šlo především o mapování rozložení Youngova modulu v prostorové mřížce z důvodu korelace mechanických vlastností na lokální a makroskopické úrovni, neboť velké množství článků se zabývalo pouze stanovením mechanických vlastností hydrogelů, které nemají v lokálním měřítku homogenní strukturu.

Tyto hydrogely byly připraveny pomocí radikálové polymerizace a poté byly měřeny a porovnány jejich naměřené mechanické vlastnosti pomocí mikroskopu atomárních sil. Při polymerizaci polyvinylpyrrolidonu proběhla polymerizace při zvýšené teplotě a trvala 24 hodin, zatímco u polyakrylamidu trvala 30 až 50 minut při laboratorní teplotě.

Pomocí módu přerušovaného kontaktu mikroskopu atomárních sil byla sledována topografie obou vzorků v podobě rozložení nanooblastí, zatímco byl zároveň měřen Youngův modul pružnosti, který byl následně porovnán s reologickým a tlakovým měřením. Bylo zjištěno, že výsledky kompresního testu se značně shodují s výsledky AFM pro PVP hydrogel, kdy se konkrétně pohybují hodnoty Youngova modulu od $4,5 \pm 0,5$ kPa pro nejnižší použitou koncentraci síťovacího činidla a $40,8 \pm 1,9$ kPa pro nejvyšší použitou koncentraci síťovacího činidla. Reologické výsledky se shodují s AFM u PAAm hydrogelu, kdy hodnoty Youngova modulu vycházely $2,8 \pm 0,3$ kPa pro nejmenší koncentraci síťovacího činidla a na $34,8 \pm 1,5$ kPa pro nejvyšší koncentraci síťovacího činidla.

Dále bylo zjištěno, že při srovnání prostorového rozložení modulu pružnosti vyšel PAAm gel jako více homogenní, což souviselo jak s pravidelnější velikostí nanooblastí, tak s jejich nižším výskytem. Rozdílný výskyt a velikost nanooblastí v obou hydrogelech by podle autorů mohl být způsoben jak rozdílnou teplotou použitou při přípravě PAAm a PVP, tak i rozdílnou dobou přípravy. Nicméně u PAAm hydrogelů byl pozorován na rozdíl od PVP jiný trend v aktivaci

tvorby polymerních shluků a nanooblastí. U PVP hydrogelů lze pozorovat přechod v aktivační energii při vyšší koncentraci zesilovacího činidla, které zvyšuje iniciaci.

Ačkoliv mechanismus vzniku nehomogenit u PVP není zcela znám, pravděpodobně má vliv efektivnější zesíťování u PAAm a zároveň kratší poměr relaxačních časů důležitý pro vznik nanooblastí. Zároveň vznik těchto nehomogenit by podle autorů mohl být užitečný a sehrát důležitou roli během diferenciací kmenových buněk [9].

3.2 Stanovení Poissonova poměru litografickou technikou

V tomto článku se autoři J. Cappello a kol. zaměřili na stanovení Poissonova poměru měkkých hydrogelových částic složených z PEG a různých druhů rozpouštědel pomocí litografické metody. Velkou výhodou použité metody je měření *in situ*, tudíž nebylo zapotřebí hydrogel sušit a měření probíhalo v nativním stavu.

Hydrogelové částice o přesně definované geometrii byly vyrobeny přímo uvnitř mikro kanálků za pomoci techniky fotolitografie. Rozměry tohoto kanálku byly menší, než jsou rozměry dané částice. Částice byly vyráběny bez přítomnosti průtoku v této oblasti kanálku a měly pravoúhlý tvar. Z důvodu zachování homogenní polymerizace hydrogelových částic byl maximální rozměr částice 1 mm v daném směru. Jako rozpouštědlo byla zvolena voda nebo roztok vody a PEG v poměru 1:2. Po naplnění kanálku roztokem s přítomností fotosenzitivního činidla byla syntetizována hydrogelová částice. Po syntéze částice následovalo její zavedení pomocí zvýšeného tlaku do zúžené části kanálku, načež byl průtok ukončen a byla provedena komprese v jednom směru. Poté byly pozorovány změny rozměru částice až do rovnovážného stavu. Následně byla částice tlakem opět přesunuta do širší části kanálku a změřena, přičemž bylo ověřeno, že docházelo pouze k vratné deformaci.

V potaz byly brány pouze výsledky, kdy nedocházelo ke kontaktu částice s horní a spodní částí mikro kanálku. Pomocí měření bylo zjištěno, že s vyšší koncentrací přítomného rozpouštědla klesá Poissonův poměr měřené částice, oproti tomu nejvyšší hodnoty okolo 0,5 byly naměřeny u částic bez přítomnosti rozpouštědla. Přesnost této metody je srovnatelná s technikou rentgenové difrakce a je o mnoho přesnější než techniky měřící dva nezávislé moduly pružnosti a počítající z nich Poissonův poměr [32].

3.3 Zkoumání termodynamických a transportních vlastností PAAm gelu

Chování hydrogelů je považováno do značné míry za předpověditelné pomocí Flory-Hugginsovy teorie [33], [34]. Tato teorie popisuje chování rozpouštědla a polymerů v roztoku pomocí mřížkového modelu. Popisuje entropii míšení v závislosti na termodynamice polymerních roztoků. Cílem studie Y. Lai a Y. Hu bylo demonstrovat, že pomocí této rovnice nelze zcela předpovědět chování ani neutrálního PAAm hydrogelu, neboť tato teorie, i když je velmi komplexní, nepočítá s reálnými roztoky polymeru, a proto dochází k odchylkám od této teorie. Při vzetí v potaz dynamicky proměnného bobtnání hydrogelu a absorpce vody lze předpovědět, že tyto parametry nebudou konstantní. Dle výše zmiňované rovnice lze vynést termodynamické parametry jako funkci bobtnacího poměru a ověřit toto chování.

Byly připraveny dvě sady vzorků po čtyřech různých koncentracích PEG roztoku, jedna pro měření bobtnacího poměru a druhá pro měření dynamických indentačních oscilací na AFM. Bylo zjištěno, že se zvyšující koncentrací PEG v roztoku klesá bobtnací poměr. Z provedených měření vyplývá, že je možné poukázat jak na poroelastické, tak i viskoelastické chování PAAm hydrogelu. Z naměřených dat dále vyplývá, že s rostoucím bobtnacím poměrem klesá smykový modul, neboť klesá hustota polymerní sítě. Poissonův poměr klesá mírněji, neboť s vyšším obsahem rozpouštědla v gelu může snadněji docházet k jeho uvolňování či přijímání. Naopak difuzivita řádově stoupá s bobtnacím poměrem, neboť je usnadněna difúze. Poroelasticita se projevovала lineární změnou, neboť při měření nanoindentací dochází ke stlačování pouze velmi malé oblasti, což by se nedalo uvažovat při měření na makro úrovni.

Vliv bobtnání je jak v podobě natažení řetězců, tak i míchání, které hraje roli především při vyšších bobtnacích poměrech, tudíž jsou si smykové moduly gelů s vysokými bobtnacími poměry hodnotově bližší, než by vyplývalo z lineárního chování. Z výsledků je taktéž patrné, že dochází k nelineární odezvě v podobě velikosti pórů v závislosti na bobtnání, neboť při vyšších poměrech bobtnání dochází taktéž k propletení a dalším interakcím jednotlivých polymerních řetězců. Dále v závislosti na okolním prostředí dochází k změně difuzivity neboli parametru vyjadřujícího rychlost průtoku rozpouštědla sítí, a to až o dva řády. Toto zvýšení je značně závislé na bobtnacím poměru. Mechanismus deformace gelů tudíž přesahuje rozsah Flory-Hugginsovy teorie [35].

3.4 Struktura a reologie vodných suspenzí a hydrogelů celulózných nano fibril

V práci F. Fneicha a kol. byl brán v potaz vliv iontové síly a objemové frakce při zkoumání a korelace vlastností hydrogelů z celulózných nano fibril (CNF) jakožto prekurzorů CNF aerogelů. K charakterizaci vysušených nanovláken a vyšetření jejich geometrie byl použit AFM. Při reometrických měřeních byl použit centrický válec.

Při měření suspenzí CNF bylo zjištěno, že iontová síla má výrazný vliv na snížení vnitřní viskozity této suspenze. Bylo zjištěno převažující viskoelastické, a tudíž i gelové chování u frakcí s vyšším objemovým podílem CNF v suspenzi. Na základě výsledků byl vytvořen předpoklad, že vyšší koncentrace nano fibril způsobuje přidavné zapletení, které je odpovědné za fenomén extra disipace. Zvýšení iontové síly má vliv na zvýšení modulu pružnosti ve smyku, neboť dochází k agregaci sousedních CNF.

Bylo zjištěno, že primární elektroviskozitní efekt je přítomen již při velmi nízké iontové síle a s jejím nárůstem rychle klesá. Dále bylo zjištěno, že se zvyšující koncentrací CNF dochází k vzniku trojrozměrné struktury, která se se zvyšující iontovou silou zeslabuje [36].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část této práce je zaměřena na měření vzorku pomocí mikroskopu atomárních sil (AFM), měření agarózového hydrogelu pomocí oscilační reometrie, přípravu pro měření oběma zvolenými technikami agarózového hydrogelu a hydrogelu na bázi alginátu sodného zesíťovaného dvojmocnými (vápenatými) ionty.

4.1 Chemikálie

Agaróza: Agaróza pro molekulární biologii, práškový; Sigma-Aldrich; CAS: 9012-36-6

Alginát sodný: Alginát sodný pro biochemii; Carl Roth; CAS: 9005-38-3; $M = 310 \pm 14$ kDa

Chlorid vápenatý: Chlorid vápenatý bezvodý práškový p.a.; Lach:ner; CAS: 10043-52-4; $M = 110,99$ g/mol

EPDM gel: Gel pro lékařské účely; Humimic medical; *DIY Ultrasound Phantom Gel*

Destilovaná voda

4.2 Instrumentální vybavení

4.2.1 Použité přístroje

Mikroskop atomárních sil: Bruker; JPK NanoWizard® 4; S/N: H-18-0136

Reometr: Discovery HR-2; TA Instruments

Geometrie k reometru: paralelní desky 25 mm (disk), paralelní desky 20 mm (šrafovaná) 115802, paralelní desky 40 mm (disk) 991914

Magnetická míchačka s ohřevem: Heidolph Instruments; Typ: MR Hei-Standard

Heidolph Instruments; Typ: MR 3002 S

Kontaktní teploměr: Heidolph Instruments; Typ: EKT Hei-Noc

Heidolph Instruments; Typ: EKT 3001 G

Analytické váhy: Denver Instruments; S-4002

4.2.2 Použitý konzolový nosník s hroty

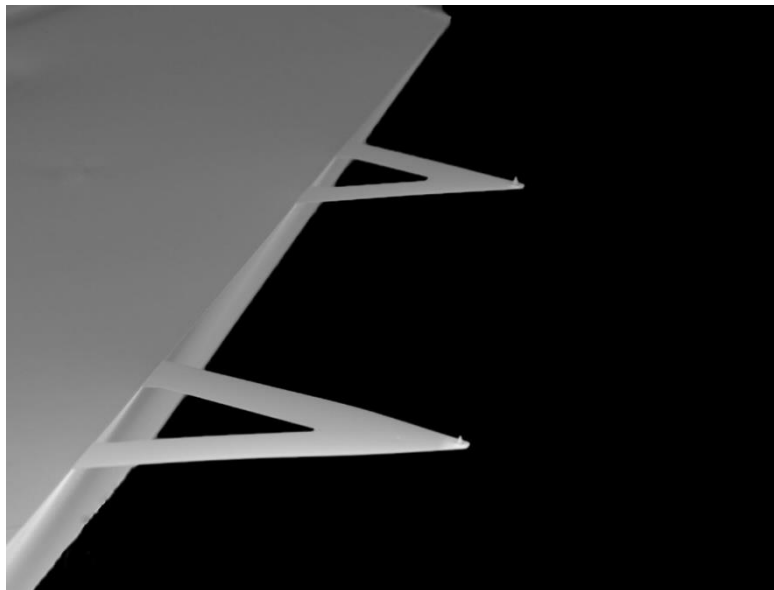
Na základě konzultace s vedoucím této závěrečné práce byla po jeho předchozích zkušenostech s měřením mechanických vlastností hydrogelů pomocí módu přerušovaného AFM při měření vzorku pod vodou vybrána sonda neboli konzolový nosník typu SNL-10 (*Sharp Nitride Lever*). Tento druh byl použit především proto, že gely jsou polotuhé materiály a tento nosník je vhodný

pro měkké a polotuhé materiály a je zároveň stavěn pro mód přerušovaného kontaktu. V případě, že nedošlo k poškození nosníků, tak byly tyto nosníky používány opakovaně.

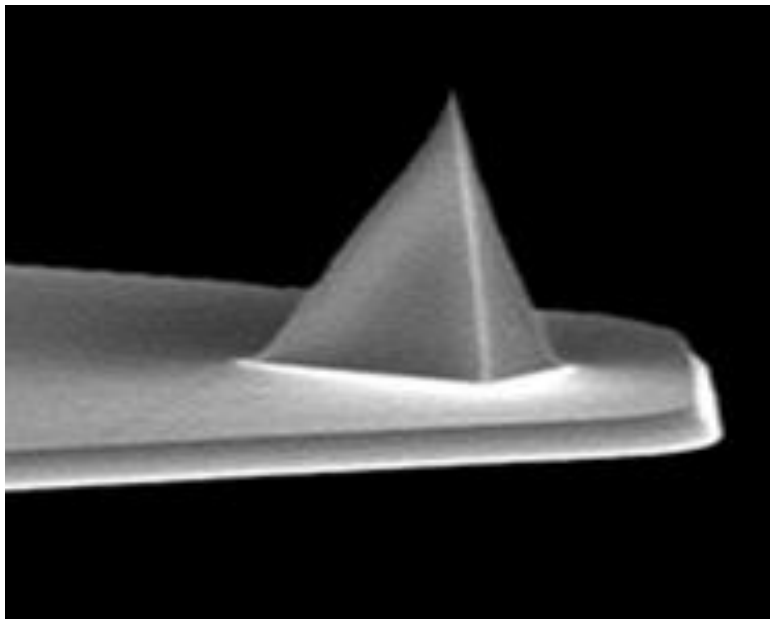
SNL-10

Sonda SNL-10 od firmy Bruker byla použita pro experimentální měření v této práci. Tento ostrý křemíkový hrot je používán pro měření při módu přerušovaného kontaktu v tekutém médiu. Dané sondy jsou vhodné pro měření různých druhů materiálů (především polotuhé povahy) v různých rozpouštědlech, přičemž poskytují vysokou citlivost a přesnost.

Na každé straně sondy jsou umístěny dvě různé konzoly (Obrázek 3) na jejichž konci je umístěn hrot (Obrázek 4), z něhož je také patrná geometrie hrotu, která je ve tvaru trojhranné pyramidy. Všechny čtyři konzoly mají jiné rezonanční frekvence a jinou konstantu tuhosti. Při měření v této práci byl používán nosník A, u něž výrobce uvádí interval hodnot rezonanční frekvence na 50–80 KHz a konstantou tuhosti 0,175–0,7 N/m. Tyto hodnoty sloužily především pro výběr vhodné konzoly, neboť před každým započatým měřením byly experimentálně stanoveny tyto parametry pomocí kalibrace dané konzoly [37].



Obrázek 3: Obrázek znázorňující konzole s hrotem na jejich konci [37]



Obrázek 4: Detail konce konzole se zobrazením hrotu [37]

4.3 Příprava agarózového hydrogelu

Agarózový hydrogel byl připraven coby zástupce fyzikálně síťovaného hydrogelu. Byl připravován jednocentní (hmotnostně), avšak posléze byla připravována i koncentrační řada, kde byl podíl agarózy 0,5; 1; 2; 4 hm. %. Pro ukázkou bude dále uvedeno, jakým způsobem byl připravován jednocentní agarózový hydrogel, přičemž ostatní koncentrace byly připravovány obdobným způsobem.

Nejdříve byly připraveny dvě stejně velké Petriho misky, které byly označeny datem a jménem, poté bylo v kádince naváženo 0,2 g práškové agarózy na analytických vahách. Do této kádinky bylo přidáno magnetické míchadlo odpovídající velikosti, poté bylo dělnou pipetou přidáno 19,8 ml destilované vody a otevřená část kádinky byla překryta a utěsněna alobalem. Takto připravená kádinka byla umístěna na magnetickou míchačku s ohřevem do větší kádinky s vodou, která sloužila jako vodní lázeň.

Do větší kádinky s vodou bylo taktéž umístěno teplotní čidlo, které bylo spojeno s magnetickou míchačkou. Byl zapnut ohřev u magnetické míchačky a nastaven přibližně na 250 °C, na ovládacím panelu teploměru byla nastavena cílová teplota na 90 °C a bylo nastaveno míchání na 500–700 otáček za minutu. Po ohřátí vody ve větší kádince na 90 °C byl pozorován úbytek tuhých částic a vznik homogenního roztoku, kdy takto vzniklý roztok byl další 1–2 minuty míchán za teploty na danou teplotu.

Poté byla míchačka vypnuta, kádinka vyjmuta z větší kádinky, vytáhnuo míchadlo a vzniklý sol byl za horka rovnoměrně přelit do připravených Petriho misek, kde byl sol ponechán gelovat po dobu 40 minut při laboratorní teplotě. Poté byly vzorky zality vrstvou destilované vody, Petriho misky byly následně utěsněny Parafilmem a umístěny do exsikatoru s vodou, který byl použit pro udržování konstantní vlhkosti, a to na dobu 2 až 24 hodin před měřením. Takto

připravený vzorek byl vytáhnout a měřen na AFM. V případě měření pomocí reometru nebyl vzorek zalit destilovanou vodou před umístěním do exsikátoru.

Agarózový hydrogelový film byl připraven pomocí formy připevněné svorkami, kdy do této formy byl nalit horký sol, jehož příprava je popsána výše. Po nalití dostatečného objemu solu byla forma utěsněna bez vzniku makroskopických bublin a vzorek byl ponechán gelovat. Po zatuhnutí mohl být vzorek měřen na reometru či s vrstvou destilované vody na Petriho misce na AFM.

4.4 Příprava alginátového hydrogelu

Hydrogel alginátu sodného zesíťovaný vápenatými ionty byl připraven jako zástupce iontově síťovaného hydrogelu. Byl připraven ze zásobních roztoků 2 hm. % alginátu sodného a 0,1M chloridu vápenatého.

Nejdříve bylo na Petriho misku pomocí odměrného válce nalito 10 ml alginátu sodného. Do sprejovací nádoby bylo napipetováno 5 ml chloridu vápenatého a tento roztok byl postupně nasprejován na vrstvu alginátu v Petriho misce. Poté byl vznikající gel v Petriho misce zabalen do Parafilmové fólie a umístěn do exsikátoru s vodou. Po 24 hodinách byl vzorek vytáhnout, stříčkou s destilovanou vodou byl vymyt supernatant nad hydrogelem, jenž byl po překrytí destilovanou vodou měřen na AFM.

4.5 Použití PEG hydrogelu a EPDM organogelu

V rámci experimentální části této práce byl použit PEG hydrogel, jehož příprava nebyla nutnou součástí práce, tudíž byl převzat již ve formě připravené k měření. Jedná se o chemicky síťovaný hydrogel.

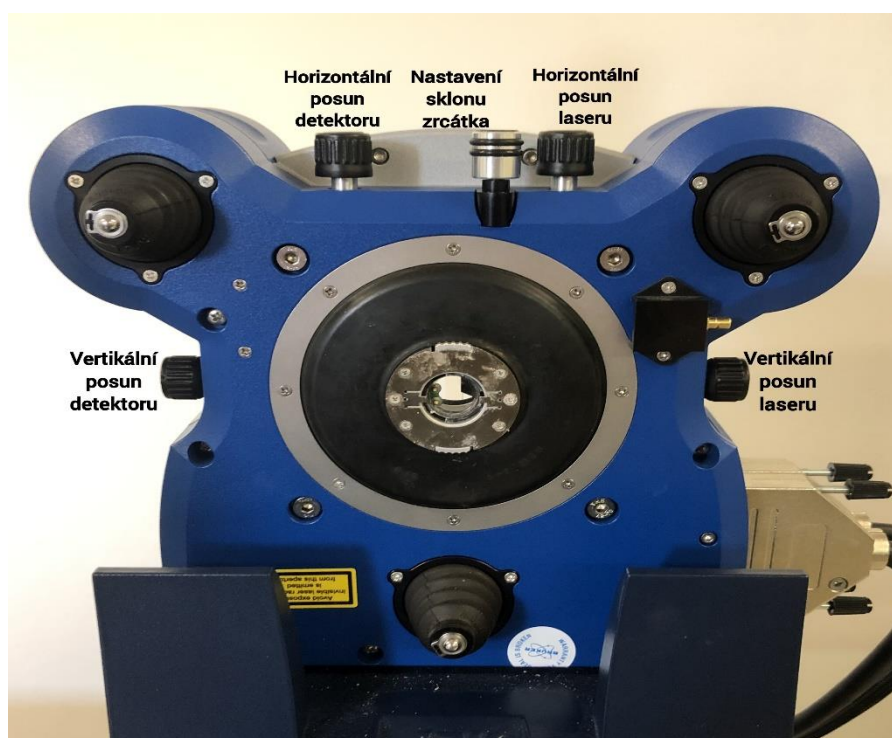
Ethylen-propylen-dienové monomery (EPDM) jsou syntetické pryže, které tvoří s vhodným organickým rozpouštědlem jakožto disperzním prostředím organogely. Jedná se o chemicky síťovaný gel a byl vybrán pro svou vysokou adhezi a druh síťování.

4.6 Nastavení AFM pro měření

Nejdříve byl zapnut ovládací počítač, posléze byl spuštěn software AFM. Dále byla spuštěna aplikace na ovládání a nastavení AFM *JPK SPM Desktop*, kde bylo vybráno námi používané zařízení JPK01553-H-18-0136. Do otočného držáku byl připevněn držák na sondu. Dalším krokem bylo určení vhodné sondy, která nese námi vybranou konzoli s potřebným hrotem. Po vybrání správné sondy byla tato sonda umístěna pinzetou do držáku a posléze upevněna pomocí plíšku utahovaného šroubkem. Následně byl držák se sondou přemístěn do měřicí hlavy a zajištěn a poté byla měřicí hlava umístěna nad připravený vzorek v Petriho misce s vodou.

V dříve zmiňovaném softwaru byl vybrán potřebný mód v záložce *Choose Experiment*, v této práci konkrétně *Contact mode force mapping* a bylo pokračováno na záložku *Setup Experiment*, kde bylo nastavování řízeno pomocí návodu v levé části obrazovky. Nejdříve byl zapnut laser

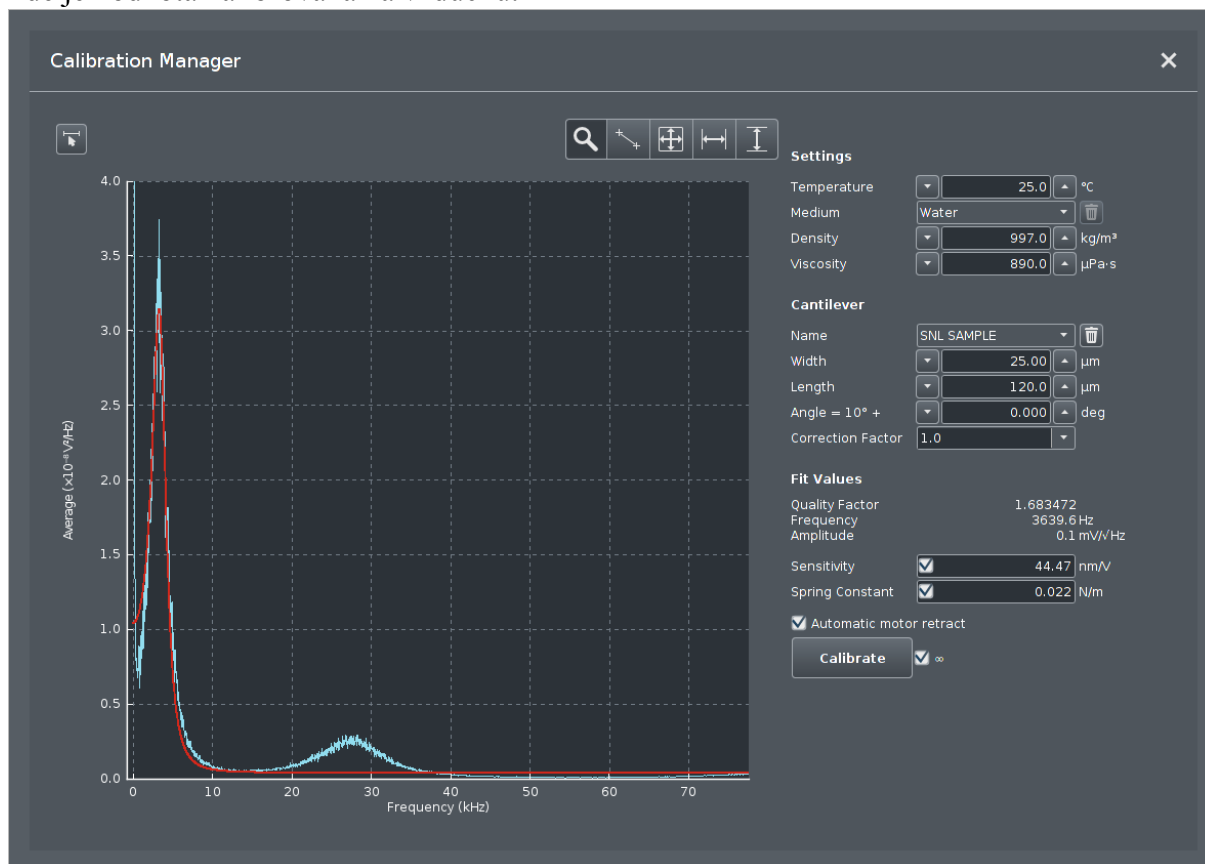
snímací kamery a ta byla fokusovaná do vzdálenosti pár centimetrů nad vrchní část měřicí hlavy, aby byl vzorek vidět a byl fokusován. Dále pomocí stříbrně zbarvených šroubů umístěných na pravé straně byla měřicí hlava posunuta do polohy, kdy nám kamera zobrazovala měřicí sondu. Došlo k posunu kamery do takové výšky, aby šly zřetelně rozeznat obě konzole jedné strany sondy a dále byl laser posunut ovládacím kolečkem laseru tak, aby mířil na odrazovou plochu sondy, což lze poznat tím, že byl zvýšen zachycený signál ve voltech. Poté bylo stlačeno a jemně otáčeno kolečkem zrcátka (Obrázek 5) tak, aby byla zaznamenána co nejvyšší intenzita signálu, kdy v ideálním případě se tato hodnota pohybovala nad 1,5 V. Tímto docházelo ke změně indexu lomu, který je rozdílný pro vodu a vzduch, proto jsme jej tímto způsobem nastavili pro vodu. Dále pomocí vertikálního a horizontálního kolečka pro ovládání laseru (Obrázek 5) byl posunut laser na námi vybranou konzoli. Tato konzole lze poznat podle její polohy, popřípadě i tvaru. Byl zde nalezen bod s nejvyšší intenzitou signálu pomocí koleček ovládajících horizontální a vertikální pozici detektoru (Obrázek 5) neboli posun ve směru osy x a y , kdy byl laser zaměřen do středu čtyř kvadrantů A, B, C, D. Tento krok bylo možné pozorovat v pravé části monitoru, přičemž bylo naším cílem zaměřit laser do středu kvadrantů. Po úspěšném zaměření bylo pokračováno kalibrací konzole.



Obrázek 5: Obrázek měřicí hlavy AFM s popisem koleček posunu

V dalším kroku byla provedena kalibrace, kdy se v části pod obrázkem z kamery nachází nastavení parametrů kalibrace. V horním poli se vybírá typ sondy nasazený v měřicí hlavě. Byla vybrána možnost *SNL SAMPLE*. Dále se vybíralo, zda bude vzorek měřen pod vodou, na vzduchu, či v jiném rozpouštědle, kdy v této práci byla vždy zvolena voda. A zároveň byla ponechána teplota 25 °C. Poté bylo stisknuto tlačítko *Calibrate* a následně byly zkontrolovány hodnoty vystupující z kalibrace (Obrázek 6), které by měly být podobné hodnotám uvedeným pro konzoli s označením A, jež byly uvedeny výše. Zde se jedná především o konstantu tuhosti,

kteřá je na Obrázku 6 uvedena jako *Spring Constant* a frekvenci, která je označena *Frequency*, a jejíž hodnota se vlivem přítomnosti vody výrazně snížila oproti hodnotě udávané výrobcem, kde je hodnota kalibrována na vzduchu.



Obrázek 6: Obrázek zachycující úspěšně provedenou kalibraci, kde byl vybrán pík s nejvyšší výškou

Po provedené kalibraci bylo v záložce *Navigate* postupně manuálně sjeto konzolí co nejbliže k povrchu námi měřeného vzorku. Byly na výběr možnosti 1000, 500, 100, 50 a 10 nm. Po přiblížení konzole na vzdálenost přibližně 100–300 nm od povrchu vzorku bylo přepnuto do záložky *Acquire Data*, kde jsou nastavovány samotné parametry experimentu, po jejichž nastavení byla v levé horní části obrazovky zmáčknuta modrá šipka otočená směrem dolů. Potom došlo k automatickému přibližování hrotu k povrchu až do oblasti nastavené silové odpovědi v nN. Poté byla zmáčknuta zelená šipka a měření bylo zahájeno.

4.7 Silově mapovací kontaktní mód AFM (*Contact mode force mapping*)

Tento mód byl použit v experimentální části této práce pro měření Youngova modulu pružnosti v tahu E . Tento režim je určen pro nedestruktivní měření mechanických vlastností měkkých vzorků, neboť při kontaktu povrchu tvrdého materiálu a hrotu by mohl být hrot, popřípadě vzorek, poškozen. Měření může probíhat pod vodou či jiným rozpouštědlem, ale i na vzduchu. Rozsah měřené plochy v rámci jednoho měření se pohybuje od řádu nanometrů až po milimetry. Rozhodujícím faktorem pro délku prováděného měření je mimo jiné použité rozlišení, kdy bylo na výběr mezi možnostmi 8×8 , 16×16 a další, avšak vyšší hodnoty nebyly použity.

Při měření dochází k přerušovanému kontaktu hrotu s povrchem, tedy hrot osciluje nad povrchem. Hrot konzole je konstantní rychlostí přibližován ke vzorku, kdy po dosažení nastavené hodnoty síly (*setpoint*) dochází opět k jeho oddálení do nastavené vzdálenosti od povrchu vzorku. Tento pohyb je vykonán v počtu opakování závislém na nastaveném rozlišení v pixelech.

V záložce *Acquire Data* byly upraveny parametry měření podle potřeby daného experimentu. V levé části obrazovky bylo vybráno nastavení *Basic* a následně byly upravovány jednotlivé parametry. Nejdříve se upravoval v nastavení *Setpoint*, který vyjadřuje silovou interakci mezi hrotem a vzorkem a nastavuje se jeho limitní hodnota, kdy se hrot již dále hlouběji nepohybuje, udává se v nN a je měněn v závislosti na tuhosti a elasticitě vzorku.

Další nastavitelnou veličinou je *Z Length*, neboli posun hrotu ve vertikálním směru v ose z, který udává intervalovou vzdálenost pohybu hrotu, kterou hrot periodicky vykonává mezi bodem, ve kterém dochází k dosažení silové interakce nastavené v nN a nastavenou vzdáleností směrem vzhůru od povrchu. Udává se v μm a ve většině experimentů jsme její velikost nechávali konstantní. *Z Speed* udává rychlost, jakou se sonda pohybuje ve vertikálním směru. Udává se v $\mu\text{m/s}$ a její hodnotu jsme ponechávali ve všech experimentech konstantně na $2 \mu\text{m/s}$. Další veličinou, jejíž hodnota zůstávala na konstantní hladině je *Contact Time*, která určuje, po jak dlouhou dobu zůstává hrot v kontaktu se vzorkem v pozici s přednastavenou silou v nN. Hodnota této veličiny byla nastavena na 1 s. V oblasti *Contact Type* byla ponechána možnost *Constant Force*, což značí, že pro přibližování a oddalování sondy ve vertikální poloze bylo navádění prováděno udržováním konstantní hodnoty síly v nN. Byla také zaškrtnuta možnost *Z Closed Loop*.

Hodnota *Scan Size* byla pro většinu experimentů ponechána na hodnotě $10 \mu\text{m}$, avšak v některých případech byla snižována až k hodnotám nm. Tato změna k nižším velikostem byla prováděna z důvodu snahy zjistit, zda v menším měřítku budou naměřeny stejné hodnoty Youngova modulu jako ve větším měřítku a zda bude mít směrodatná odchylka nižší hodnotu. Tato proměnná vyjadřuje velikost strany čtverce snímané oblasti pomocí naší sondy. A posledním měněným parametrem bylo *Pixels*, neboli rozlišení, pomocí kterého se určovalo, jak velké množství měřených bodů bylo vyžadováno. Hodnota rozlišení byla nejdříve použita 8×8 dávající 64 silových křivek a poté se přešlo na vyšší rozlišení 16×16 , což poskytnulo ve výsledku 256 křivek. Takto proběhlé měření bylo po vybrání příslušného měření uloženo do cílové složky pomocí ikonky v pravém horním rohu.

4.8 Vyhodnocování křivek z AFM

4.8.1 Nastavení vyhodnocování

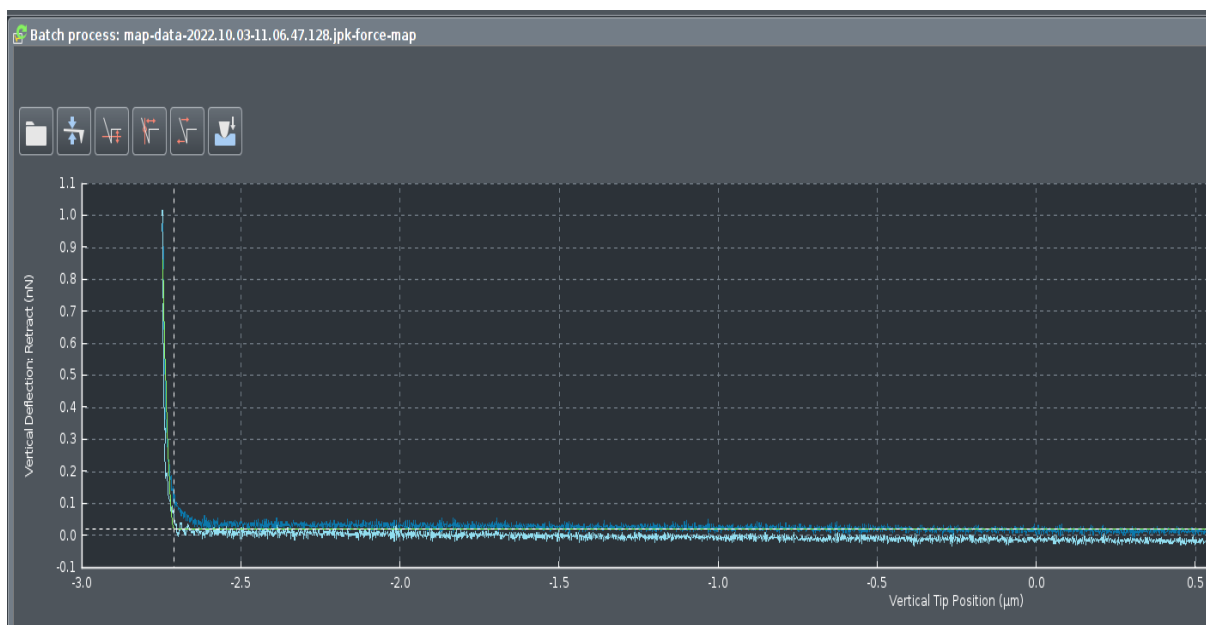
Po uložení naměřeného souboru dat byl tento soubor otevřen ve vyhodnocovacím programu *JPK Data Processing*, kdy v levém horním rohu pomocí ikonky souboru byl nalezen a vybrán uložený soubor dat. Dále byla vybrána možnost *Batch Processing*, načtež se v levé horní části objevil rámeček, kde se v nabídce z předdefinovaných procesů vybrala možnost *Hertz-fit*, poté

zmáčknuto *Next* a v dalším kroku se odkliknula předem zaškrtnutá možnost *Save force curves* a pokračovalo se pomocí tlačítka *Finish*.

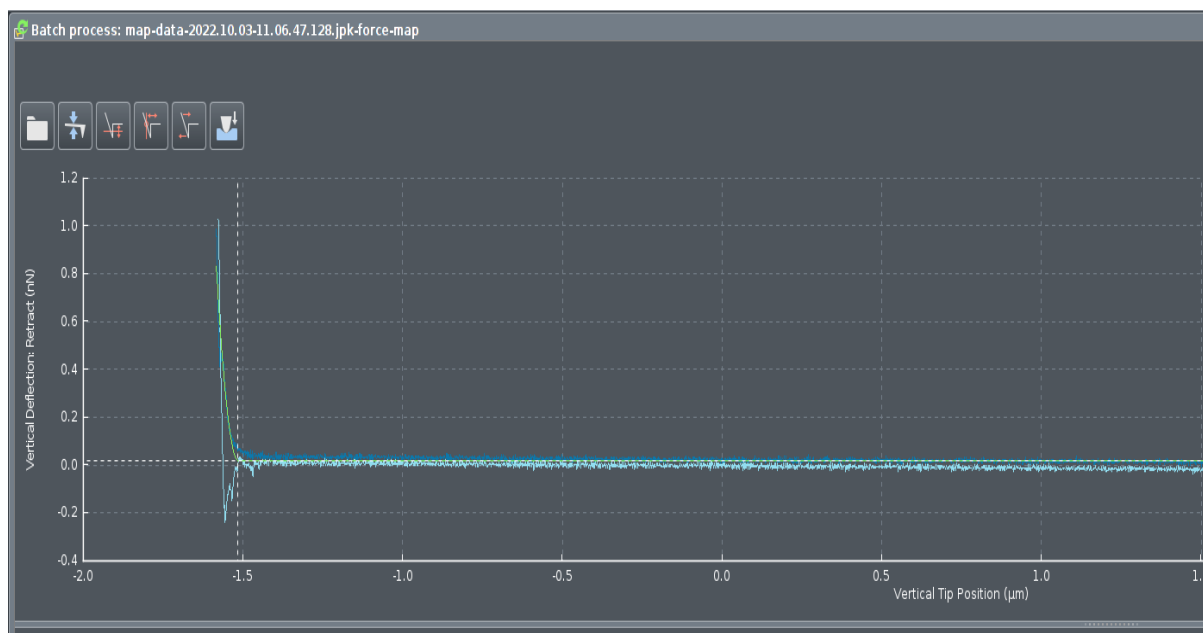
Po takto proběhlém otevření dat se v levé horní části obrazovky objevily dvě křivky ve dvojrozměrném grafu a nad ním se vyskytovalo šest okének, pomocí kterých se dají zjistit různá data o naměřených křivkách a podobně, avšak v případě měření Youngova modulu se překlíknulo do posledního okénka, které v pravé části obrazovky ukázalo nastavení potřebné pro výpočet Youngova modulu. V kolonce *Segment* bylo vybráno, zda bude počítáno s křivkou vzešlou z přibližování sondy ke vzorku (*Extend*) či jejího oddalování do původní polohy (*Retract*), kdy v naprosté většině případů vyhodnocování dat byla použita možnost *Extend*. Další pole pod tímto byla ponechána ve výchozím stavu až na *Tip Shape* neboli tvar hrotu, který je u sond typu SNL-10 v prostorovém uspořádání trojhranné pyramidy, tudíž byla vybrána možnost *Triangular Pyramid*.

4.8.2 Parametry vyhodnocování a export dat

Po přípravě na vyhodnocování byly stanoveny parametry, podle kterých se vyhodnocovaly jednotlivé křivky. Po několika uskutečněných měřeních byla stanovena akceptovatelná odchylka v daném bodě oproti směru ostatních křivek a šum ve směru osy *y*, která popisuje silovou interakci do velikosti 10 % nastavené síly v maximálním bodě při kontaktu hrotu se vzorkem, v nN. Další parametr byla vzdálenost od povrchu vzorku ve směru osy *z*, ovšem v rámci grafu je prezentována osou *x*, kdy minimální výška pro akceptování křivky byla 2 μm od povrchu vzorku po přednastavenou oddalovací výšku, která činila 7,5 μm . Ke změně posunu oddalovacího bodu ve vertikálním směru bylo dosaženo vlivem nerovnosti povrchu jako celku nebo v případě lokálních výkyvů v topografii povrchu, což mělo za cíl posun v oblasti měření ve vertikálním směru, kdy interval pro měření byl $\pm 7,5 \mu\text{m}$, přičemž při jeho překročení bylo měření automaticky zastaveno.



Obrázek 7: Grafické znázornění vyhovující silové křivky u agarózového hydrogelu



Obrázek 8: Grafické znázornění nevhovující silové křivky u agarózového hydrogelu

Pokud tyto parametry křivka splňovala (Obrázek 7), tak byla v pravé části obrazovky možnost *Keep*, čímž došlo k vyhodnocení této křivky a stanovení tím Youngova modulu, v opačném případě (Obrázek 8) byla vybrána možnost *Discard*, která křivku vyřadila z výběru. Tímto způsobem byly vyselektovány křivky splňující výše popsané parametry a pokračovalo se kliknutím na tlačítko s obrázkem histogramu, kdy se nám v levé části obrazovky objevil histogram vyjadřující počet křivek zastoupených v různých intervalech Youngova modulu pružnosti. V pravé spodní části okénka s histogramem se objevilo v záložce *Statistics* políčko *Data Count*, které vyjadřuje, kolik křivek bylo manuálně vybráno, dále *Mean Value*, které vyjadřuje průměrnou hodnotu Youngova modulu u vybraných křivek a *Std. Deviation*, které vyjadřuje standardní odchylku souboru dat od průměrné hodnoty. Tyto tři hodnoty byly zaznamenány do laboratorního deníku a poté byl klávesovou zkratkou *PrtSc* pořízen snímek

obrazovky zvětšeného histogramu, který byl posléze uložen do složky k příslušným datům. Dále bylo vybráno políčko *Save final results*, po jehož rozkliknutí se uprostřed obrazovky objevila tabulka s jednotlivými měřeními a vyhodnocovanými parametry, kdy v případě měření Youngova modulu byly zaškrtnuty možnosti v řádku s *Young's Modulus* v kolonce *Save to file* i *Show* a ostatní možnosti byly odškrtnuty. Poté byla ponechána zaškrtnuta možnost *Save to file* v sekci *Result Text File* a bylo vybráno příslušné umístění uložení dat.

Po stisknutí tlačítka *OK* dvakrát v řadě se zde nacházelo další okno s barevným dvojrozměrným obrázkem znázorňujícím naměřená data a s možnostmi upravení zobrazení. Z horních záložek byla vybrána záložka *View*, ve které byly zaškrtnuty možnosti *Show color scale*, která zobrazovala barevnou škálu a *Relative values*, která k této škále přiřadila hodnoty naměřených modulů. Dále byla v sekci *Lateral Scale* u části *Type* vybrána možnost *Axes*, která nám vytvořila osy x a y i s jejich popisem, následně byl obrázek uložen, kdy po kliknutí pravým tlačítkem myši na obrázek byla vybrána možnost *Export as Picture*, což nám obrázek exportovalo typově jako obrázek. Před zakliknutím políčka *Save* v pravém dolním rohu byl ve vedlejším políčku změněn typ souboru na *TIFF image (uncompressed)*.

4.8.3 Vyhodnocování exportovaných a upravených dat v programu MS Excel

Z vyhodnocených naměřených dat byl vybrán soubor typu *TSV*, ve kterém byla zapsána vyhodnocená data. Tato data byla zkopírována do MS Excel, kde z celého souboru byla ponechána pouze data ve sloupci s Youngovým modulem. Při každém provedeném experimentu byla provedena analýza dat ve třech až pěti náhodných bodech v rámci jednoho vzorku a ta byla mezi sebou porovnána. V záložce *Data* byla vybrána ikonka *Analýza dat*, kde z nabídky byl vybrán statistický test *Anova* jeden faktor, který sloužil jako prvotní analýza souboru dat z jednotlivých míst v rámci jednoho vzorku.

Anova je statistický test, který slouží k porovnání souboru dat na základě rozptylu dat jednotlivých datových řad od jejich středních hodnot a jejich vzájemnému porovnání a vychází z normálního rozložení dat. Do vstupní oblasti dat byly vybrány všechny sloupce analyzovaných dat včetně prázdných řádků. V sekci *Sdružit* byly vybrány *Sloupce*, *hladina významnosti Alfa* byla nastavená na 0,05 a poté byla pouze nastavena výstupní oblast.

Ve výstupní oblasti se objevila přehledová tabulka dat pod názvem *Faktor* a pod ní tabulka s názvem *Anova*, ve které byl zanalyzovaný soubor dat s výsledky. Hlavním parametrem pro analýzu byla výstupní hodnota F a F_{krit} . Pokud byla hodnota $F \leq F_{krit}$, tak bylo možno soubor dat považovat za data s normálním rozložením hodnot a jejich rozptylem, avšak při $F \geq F_{krit}$ data nedosahovala normálního rozptylu dat a pro posouzení jednotlivých datových řad v rámci jeho souboru byl proveden další statistický test. V případě, že $F \leq F_{krit}$, tak byly jednotlivé datové řady považovány v dostatečné shodě a již nebyly prováděny další statistické testy. V opačném případě byly jednotlivé datové řady mezi sebou porovnány pomocí dvouvýběrového *t-testu* s nerovností rozptylu (Obrázek 13).

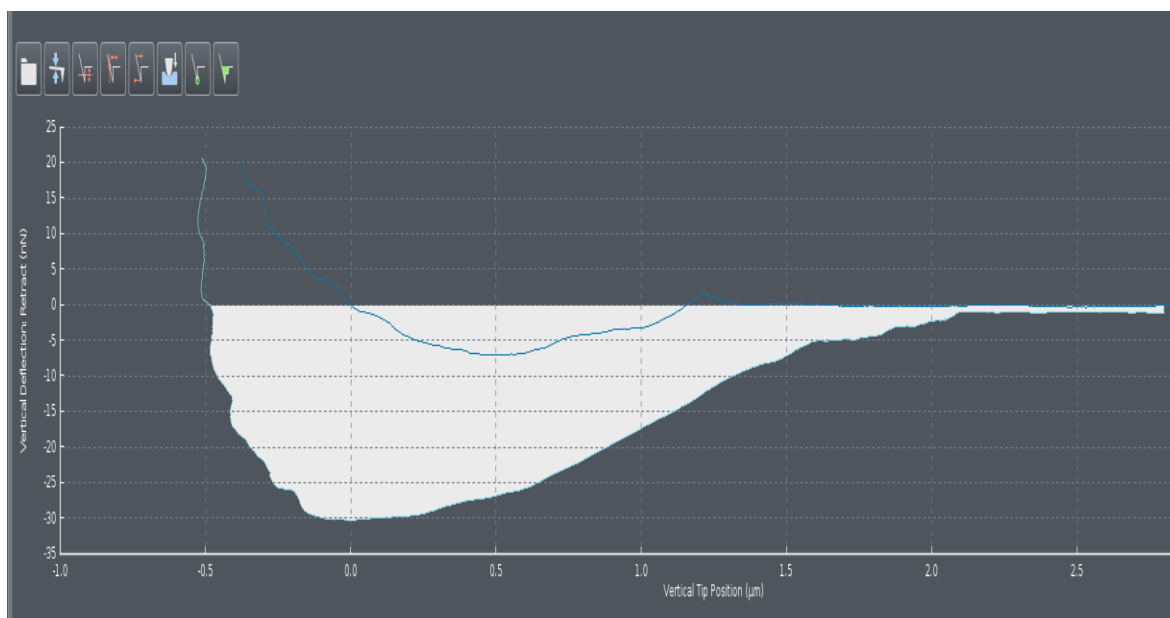
Tento *T-test* jsme použili především proto, abychom z jednotlivých měření v rámci jednoho vzorku byli schopni najít a případně vyloučit z výběru datové řady, které nám v něm vyšly jako

nekorelující. K tomuto mohla docházet už jenom z povahy měření pomocí AFM, kdy je snímám bod po bodu a je vždy vybrána pouze malá část vzorku k experimentálnímu měření, tudíž nemusí poskytovat referenční hodnoty pro celý vzorek a také proto, že hydrogely mají rozdílně rozložen Youngův modul ve své struktuře, proto mohl být občas změřen úsek s vysokou hustotou síťování a poté úsek s nižší hustotou síťování.

T-test je statistickým testem, který opět vychází z předpokladu náhodného rozložení dat a v případě dvouvýběrového *t-testu* se jedná o porovnání dvou nezávislých datových řad na základě jejich střední hodnoty a rozptylu jednotlivých souborů dat. Tento druh testu byl prováděn pro všechny datové řady v rámci měření mezi sebou a posléze i mezi některými sadami dat v rámci více měření stejného druhu vzorku. Test byl otevřen přes záložku Data, poté byl přes ikonku Analýza dat vybrán Dvouvýběrový *t-test* s nerovností rozptylů. Do oblasti 1. a 2. soubor byly vybrány porovnávané soubory dat, do kolonky pro Hypotetický rozdíl středních hodnot byla zadána 0. Hladina spolehlivosti Alfa byla opět nastavena na 0,05 a poté byla vybrána vhodná výstupní oblast.

Ve vybrané výstupní oblasti se objevila tabulka s daty o jednotlivých sadách dat a s hodnotami t_{Stat} , $t_{krit 1}$ a $t_{krit 2}$, podle nichž byla usuzována shodnost datových řad. Pokud byly hodnoty $t_{krit 1}$, $t_{krit 2} > t_{Stat}$, tak byly datové řady uvažovány jako ve shodě a vylučovacím způsobem byla nalezena jedna či více na sebe neseďících datových řad (Obrázek10).

4.9 Vyhodnocení adheze a adhezní práce



Obrázek 9: Obrázek znázorňující vyhovující křivku adhezní práce u EPDM organogelu

V programu *JKP Data processing* bylo postupováno stejným způsobem, jako při vyhodnocování silových křivek, akorát po překliknutí byly v horní liště vybrány navíc záložky *Adhesion* a *Area*, kdy v záložce *Area*, která určovala velikost adhezní práce, byly vybírány křivky, u kterých byla odchylka v daném bodě ve směru osy oproti ostatním křivkám y nižší,

než 20 % (Obrázek 9). Takto vyhodnocená data byla exportována do MS Excel stejným způsobem, jako v případě silových křivek, akorát byly navíc zaškrtnuty možnosti *Save* u řádků *Adhesion* a *Area*.

Takto exportované křivky byly otevřeny v programu Excel, byl udělán průměr u jednotlivých měření a příslušná směrodatná odchylka. Takto vyhodnocená data byla následně porovnána a posouzena v diskuzi a výsledcích této práce.

4.10 Nastavení reometru pro měření

Po spuštění softwaru *Trios* a vybrání správné geometrie byly spuštěny jednotlivé kalibrace. Poté bylo upraveno nastavení samotného experimentu. Pro oscilační testy byla hodnota *Oscillation Amplitude* nastavena na 8 bodů na zvětšení amplitudy o jeden řád, což způsobilo, že na každé zvýšení amplitudy oscilace desetkrát připadá osm bodů v grafu, dále frekvence byla nastavena na 1 Hz a rozpětí oscilací od 0,01–1000 %. Poté byl na spodní geometrii nanesen vzorek, byla zjištěna výška měření, a to bylo následně provedeno. K takto proběhnutému měření byla přidána data o *Oscillation stress* a *Axial force*, neboli oscilační stresové namáhání a axiální síla a soubor dat byl uložen v excelovém souboru, kde posléze proběhla analýza dat. V grafu závislosti modulu pružnosti na amplitudě oscilace v %, pravým tlačítkem myši bylo kliknuto na jakýkoliv bod v grafu, byla vybrána možnost *Analyze*, poté bylo vybráno *Modulus crossover* a byly zapsány hodnoty *Modulus crossover* v MPa a *crossover x value* v %, což jsou hodnoty modulu pružnosti v bodě překřížení ztrátové a paměťové složky tohoto modulu a procentuální hodnota namáhání v tomto bodě. Jedná se o oblast přechodu měřeného materiálu z elastického chování na viskózní.

V případě frekvenčního testu byla hodnota oscilace nastavena na 0,5 %, frekvence byla nastavena na rozpětí 0,01–100 Hz a počet bodů v grafu byl ponechán na počtu 8 za zvýšení amplitudy o jeden řád. K takto proběhlému měření byly přidány položky *Oscillation stress*, *Axial force*, *Gap* a *Frequency*, což představuje amplitudu deformace, axiální sílu, měřicí šterbinu a frekvenci v jednotlivých bodech. Data byla opět uložena v excelovém souboru pro pozdější vyhodnocení.

4.11 Vyhodnocování silových křivek z reometru v MS Excel

Soubor s daty byl otevřen v MS Excel, všechny veličiny byly převedeny na základní jednotky, poté byla výpočtem vymezena lineárně viskoelastická oblast, která byla stanovena z průměrných hodnot druhého až šestého bodu paměťového modulu a její konec byl ohraničen posledním bodem, jehož hodnota paměťového modulu byla \geq než 95 % hodnoty z výše zmíněného průměru. Na tomto řádku byla rovněž odečtena hodnota *Oscillation strain*, neboli amplituda deformace v %. Ve sloupci s *Raw phase* byla nalezena první hodnota \geq 90 a tento a další body již nebyly brány v potaz při následné tvorbě grafu a určení Youngova modulu.

Z takto připraveného souboru dat byl vytvořen graf závislosti ztrátového a paměťového modulu v Pa na amplitudě deformace v % při konstantní frekvenci oscilací. Dále byla vypočtena průměrná hodnota a její směrodatná odchylka pro druhou až šestou hodnotu

paměťového modulu, která představovala smykový modul G a pomocí rovnice (1) byl z těchto dat vypočten Youngův modul E a jeho směrodatná odchylka.

V případě frekvenčního testování byla v MS Excel otevřena naměřená data a před tvorbou grafu bylo provedeno vyřazení dat, u nichž byl ztrátový modul záporný. Po této selekci dat byl vytvořen graf závislosti paměťového a ztrátového modulu v Pa na frekvenci v Hz.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

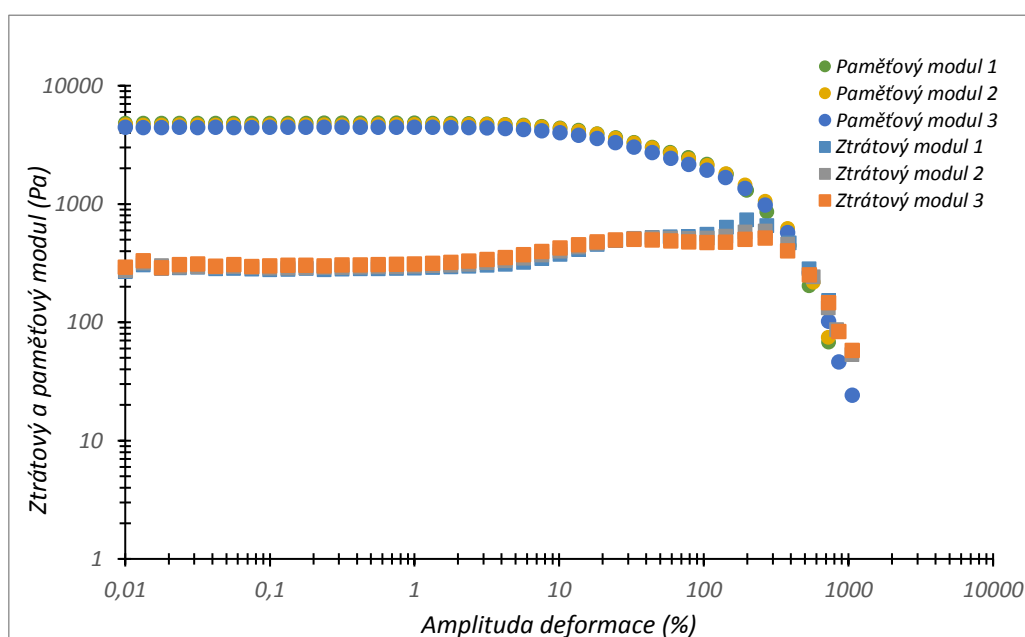
V této práci jsme se zaměřili především na měření mechanických vlastností pomocí mikroskopu atomárních sil (AFM). Dále v případě agarózového hydrogelu bylo provedeno srovnání výsledků AFM a oscilační reometrie. Postupně docházelo k optimalizaci vyhodnocování silových křivek a jejich statistickému vyhodnocování.

5.1 Fyzikální hydrogely

V rámci měřených fyzikálních hydrogelů byl vybrán agarózový gel, se kterým se na fakultě pracuje již dlouhou dobu, tím pádem jsou materiály velmi dobře charakterizovány. Další výhodou je fakt, že příprava těchto hydrogelů je poměrně jednoduchá a dobře reprodukovatelná. Dále byl z této kategorie vybrán hydrogel na bázi polysacharidu alginátu sodného, který by zesíťován přítomností vícemocných kationtů Ca^{2+} , lze jej tak zařadit mezi hydrogely iontové.

5.1.1 Agarózový hydrogel

Měření bylo prováděno pomocí oscilační reometrie za použití geometrií dvou desek, přičemž spodní deska byla neměnná a horní deska byla měněna, kdy byly používány 20 a 40 mm hladká deska a 25 mm zdrsňená deska. Zároveň byl připraven gel v podobě filmu o přesně definované výšce hydrogelu 4 mm. Dále byla připravena koncentrační řada o koncentracích agarózy 0,5; 1; 2 a 4 hm. %. Tato koncentrační řada byla připravena pro posouzení vlivu koncentrace na mechanické vlastnosti. Taktéž byla měřena časová závislost při měření gelu po 0, 24, 48 a 72 hodin po přípravě s cílem prokázat, že v krátkém časovém horizontu nedochází ke stárnutí připraveného vzorku a takto připravený vzorek lze uchovávat při vhodných podmínkách k použití po minimálně 72 hodin. Zároveň byl v rámci experimentální práce proveden



Obrázek 10: Graf znázorňující opakovatelnost měření pro 1% agarózový hydrogel

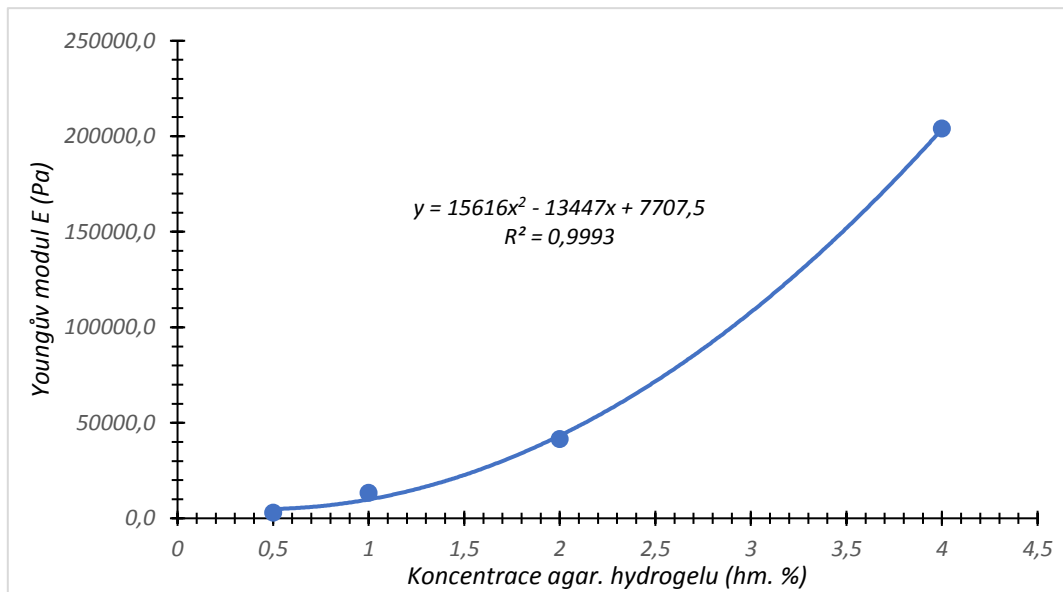
frekvenční test (Obrázek 13) u 1% agarózového hydrogelu s rostoucí frekvencí

od 0,01 do 100 Hz, kdy nedošlo k přechodu z pevného stavu na tekutý, díky čemuž mohl být vliv frekvence na měření smykového modulu G vyloučen. Poslední dva body nejsou zahrnuty v grafu, neboť došlo k tomu, že ztrátový modul dosáhl záporných hodnot.

Pomocí softwaru oscilačního reometru (*Trios*, TA Instruments) byly vyhodnocovány křivky paměťového a ztrátového modulu v závislosti na amplitudě deformace. Při zvyšování amplitudy deformace došlo k překročení lineárně viskoelastické oblasti (LVO) a z této oblasti poté byl pomocí lineární směrnice vypočten modul pružnosti ve smyku G , který mohl být následně přepočítán na Youngův modul E pomocí rovnice (1) pro srovnání s měřeními pomocí AFM, kdy hodnota Poissonova čísla μ byla uvažována jako 0,5, což je hodnota shodná s hodnotou pro gumové materiály. Tato hodnota není zcela přesná a jedná se především o aproximaci, neboť jsme v rámci experimentální práce tuto hodnotu nestanovovali, avšak její hodnota by měla být podobná, neboť hydrogely jsou elastické materiály a Poissonova čísla platí, že čím více je materiál elastický, tím se jeho hodnota více blíží 0,5. Při pohledu na (Obrázek 10) lze posoudit, že opakovatelnost měření pomocí oscilační reometrie pro 1% agarózový hydrogel je velmi vysoká. V grafu je pomocí teček znázorněn průběh paměťového modulu a pomocí čtverečků průběh ztrátových modulů. Tyto křivky vychází z měření pomocí horní desky 25 mm (*disk*), kdy se jedná o hrubou desku s průměrem 25 mm.

Tabulka 1: Tabulka průměrných hodnot modulů pružnosti za použití různých geometrií osc. reometru

| Použitá horní deska (průměr) | Koncentrace agar. hydrogelu (hm. %) | Smykový modul G (Pa) | Youngův modul E (Pa) |
|------------------------------|-------------------------------------|------------------------|------------------------|
| zdrsněná (25 mm) | 0,5 | 964 ± 3 | 2893 ± 8 |
| | 1 | 4456 ± 462 | 13368 ± 1387 |
| | 2 | 13 844 ± 204 | 41532 ± 611 |
| | 4 | 68 008 ± 98 | 204025 ± 293 |
| | 1 (4 mm film) | 9331 ± 865 | 27992 ± 2055 |
| hladká (20 mm) | 1 | 3546 ± 417 | 10638 ± 1250 |
| hladká (40 mm) | 1 | 3159 ± 685 | 9477 ± 2596 |



Obrázek 11: Graf záv. Youngova mod. na hm. konc. agar. hydrogelu měřeného pomocí osc. reometru

Na základě dat (Tabulka 1) lze vypočítat, že s rostoucí koncentrací pevného podílu v agarózovém hydrogelu roste Youngův modul přibližně kvadraticky (s nárůstem hmotnostní koncentrace agarózy na dvojnásobek dojde k nárůstu Youngova modulu přibližně na čtyřnásobek) viz. (Obrázek 11). Při měření agarózového filmu si lze všimnout, že hodnota jeho modulu je více než dvakrát vyšší než u hydrogelu se stejnou koncentrací. Tento rozdíl lze přisoudit ze značné části způsobu přípravy, kdy u agarózového filmu na rozdíl od přípravy ostatních agarózových hydrogelů, byl sol ponechán gelovat v zcela uzavřeném systému. Takto docházelo k pomalejšímu chladnutí celého systému, což mohlo mít za následek dokonalejší zesíťování hydrogelu a nižší výskyt anizotropických defektů, které snižují odolnost materiálu jako celku. V případě použití hladké desky jako horní části geometrie jsou naopak hodnoty modulů pružnosti nižší, to může být způsobeno například nižším prokluzem horní desky se senzorem.

Dále byla měřena a posuzována časová závislost, která byla spojena se synerezí neboli stárnutím gelu, kdy při vyloučení výskytu synereze v krátkodobém horizontu (72 hodin) mohl být připravený vzorek uchovávan v exsikátoru s vodou a měřen po období až 72 hodin od přípravy. Hydrogely byly ponechány v exsikátoru po danou dobu a poté proběhlo měření smykového modulu s drsnou deskou. Jak lze pozorovat (Tabulka 2), tak nelze vypočítat jednoznačnou souvislost a mezi stárnutím agarózového hydrogelu v krátkodobém horizontu 72 hodin od přípravy a změnou modulu pružnosti u 1% agarózového hydrogelu. Vlivem toho, že nedochází ke stárnutí gelu jej lze používat po delší dobu (minimálně 72 hodin).

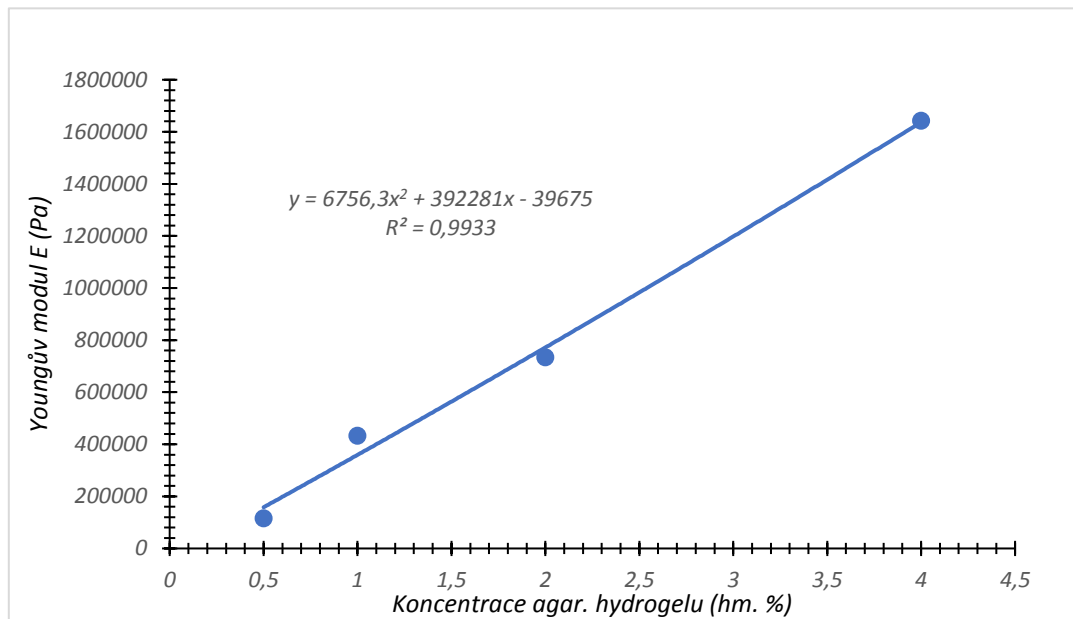
Tabulka 2: Tabulka časové závislosti smykového a Youngova modulu měřená oscilačním reometrem

| Čas od přípravy (hodiny) | Smykový modul G (Pa) | Youngův modul E (Pa) |
|--------------------------|------------------------|------------------------|
| 0 | 3958 ± 25 | $11\,873 \pm 74$ |
| 24 | 4540 ± 615 | $13\,619 \pm 1845$ |
| 48 | 3484 ± 559 | $10\,453 \pm 1677$ |
| 72 | 3921 ± 256 | $11\,764 \pm 766$ |

Dále bylo prováděno měření Youngova modulu pomocí AFM, kdy bylo opakováno několik sad měření, kdy v každé sadě byl měřen nový vzorek na 3 až 5 náhodně zvolených místech. Po statistickém vyhodnocení pomocí testů *Anova* jeden faktor a dvouvýběrového *t-testu* s nerovností rozptylu na normální rozdělení (rozptyl) dat (viz. obrázek 13) byla data náležitě do normálního rozložení dat zprůměrována a uvedena níže (Tabulka 3 a Tabulka 4). Stejně jako v případě měření reometrem byla měřena jak koncentrační závislost na mechanické vlastnosti, kdy byla použita identická koncentrační řada a sice 0,5, 1, 2 a 4 hm. % agarózy. U všech zmíněných koncentrací bylo provedeno měření oblastí o velikosti $10 \times 10 \mu\text{m}$, avšak u 1% vzorku bylo provedeno i měření oblastí $1 \times 1 \mu\text{m}$ a $0,1 \times 0,1 \mu\text{m}$. Jak je patrné z dat (Tabulka 3), tak velikost měřené oblasti při zprůměrování naměřených hodnot nehraje roli ve velikosti Youngova modulu, avšak lze pozorovat zvýšenou hodnotu směrodatné odchylky.

Tabulka 3: Tabulka průměrných hodnot Youngova modulu E v závislosti na koncentraci agar. hydrogelu

| Koncentrace agar. hydrogelu (hm. %) | Youngův modul E (Pa) |
|-------------------------------------|----------------------------|
| 0,5 | $115\,825 \pm 50\,328$ |
| 1 | $433\,439 \pm 322\,904$ |
| 1 ($1 \times 1 \mu\text{m}$) | $460\,045 \pm 831\,331$ |
| 1 ($0,1 \times 0,1 \mu\text{m}$) | $350\,354 \pm 1\,157\,286$ |
| 2 | $734\,874 \pm 384\,195$ |
| 4 | $1\,642\,843 \pm 750\,478$ |



Obrázek 12: Graf záv. Youngova mod. na hm. koncentraci agar. hydrogelu měřeného pomocí AFM

Na základě dat (Tabulka 3) byla provedena lineární aproximace podle které lze určit, že Youngův modul E v případě agarózového hydrogelu roste přibližně rovnoměrně s rostoucí hmotnostní koncentrací agarózy (při nárůstu hm. koncentrace agarózy na dvojnásobek dojde k nárůstu hodnoty Youngova modulu přibližně na dvojnásobek) viz (Obrázek 12).

Na základě dat (Tabulka 1 a Tabulka 3) bylo zjištěno, že získaná data Youngova modulu pomocí oscilačního reometru a AFM jsou výrazně odlišná jak pro 1% agarózový hydrogel, tak pro vliv koncentrační závislosti na vývoj hodnoty tohoto modulu, kdy pomocí reometru byla zjištěna kvadratická koncentrační závislost (Obrázek 11), zatímco při použití AFM byla získána lineární koncentrační závislost (Obrázek 12). Z těchto výsledků je zřejmé, že druh mechanické zátěže má výrazný vliv na hodnoty měřených veličin, kdy u měření pomocí oscilační reometrie je nárůst výrazně vyšší, tudíž odolnost hydrogelu vůči smykovému namáhání při vzrůstu koncentrace hmotnostního podílu polymeru je vyšší, než v případě tlakovém/takovém namáhání. Na základě těchto zjištění a vysoké časové náročnosti měření dvěma technikami byly ostatní hydrogely měřeny pouze pomocí AFM.

Pomocí AFM byla měřena stejně jako v případě měření reometrem časová závislost, akorát pouze v rozsahu 0, 24 a 48 hodin. Na základě dat (Tabulka 4) bylo zjištěno, že došlo k mírnému snížení Youngova modulu E v závislosti na čase, avšak tato změna je v rámci směrodatné odchylky, tudíž nelze jasně určit, že dochází ke stárnutí agarózového hydrogelu. Taktéž je možné si povšimnout vysokých hodnot směrodatných odchylek, což je způsobeno anizotropií mechanických vlastností při lokálních měřeních mechanických vlastností hydrogelů pomocí AFM. Dochází k měření hodnot jak v místě přítomnosti polymerního řetězce, tak v místě pórů, kde jsou rozdíly Youngova modulu E výrazně nižší.

Tabulka 4: Tabulka časové závislosti Youngova modulu u 1% agarózového hydrogelu

| Čas od přípravy (hodiny) | Youngův modul E (Pa) |
|--------------------------|------------------------|
| 0 | 423 610 ± 278 209 |
| 24 | 333 245 ± 273 767 |
| 48 | 375 626 ± 377 609 |

5.1.2 Alginátový hydrogel

Tento hydrogel byl vybrán jako zástupce iontového hydrogelu, zároveň byl brán zřetel na jeho opakovatelnost přípravy. Příprava tohoto hydrogelu je mírně složitější než v případě agarózového hydrogelu. Zároveň námi připravený hydrogel metodou sprejování vykazoval pravděpodobně vlivem přípravy nižší topografickou homogenitu, proto bylo jeho měření mírně složitější a bylo prováděno měření na více místech v rámci jednoho vzorku. Pomocí AFM byl měřen hydrogel alginátu sodného zesíťovaný vápenatými ionty ve vodném prostředí o koncentraci 2 hm. % po 24 hodinách od přípravy. Průměrná hodnota Youngova modulu E byla stanovena na $30\,225 \pm 17\,523$ Pa.

5.2 Chemické gely

Byly vybrány dva chemické gely a sice PEG hydrogel a EPDM organogel. PEG hydrogel byl vybrán jako nový materiál, který se v poslední době začíná připravovat a stanovovat na naší fakultě. EPDM organogel byl vybrán pro svou vysokou pružnost a také vysokou adhezi, která byla experimentálně měřena jakožto možný nástroj pro budoucí posuzování mechanických vlastností vybraných gelů.

5.2.1 PEG hydrogel

Jedná se o chemický hydrogel, jehož elasticita a bobtnání se výrazně liší v závislosti na přípravě. Měření tohoto hydrogelu bylo provedeno pomocí AFM vždy 24 hodin po přípravě, avšak zároveň z důvodu pozorované vysoké absorpce vody a bobtnání v průběhu uchovávání v exsikátoru s vodou bylo provedeno měření časové závislosti v době 0, 24 a 48 hodin od přípravy. Původně bylo plánováno i měření v čase 72 hodin od přípravy, avšak vlivem výrazného bobtnání a snížení hodnoty Youngova modulu nebylo možné toto měření provést.

Tabulka 5: Tabulka časové závislosti Youngova modulu E u PEG hydrogelu

| Čas od přípravy (hodiny) | Youngův modul E (Pa) |
|--------------------------|------------------------|
| 0 | 961 ± 363 |
| 24 | 314 ± 45 |
| 48 | 344 ± 59 |

Na základě dat (Tabulka 5) bylo zjištěno, že v průběhu času dochází k vyššímu bobtnání a absorpci vody a k částečnému rozpouštění PEG hydrogelu. Toto ovšem nelze zobecnit na PEG hydrogely obecně, neboť jejich vlastnosti se mohou významně měnit s rozdílnou přípravou. Z údajů o PEG hydrogelu a vývoji Youngova modulu a jeho směrodatné odchylky v čase lze odhadnout, že je v jeho struktuře přítomno více nehomogenit, které se dodatečným pohlčováním vody ztrácejí. Výsledek pro 48 hodin je pravděpodobně zkreslen tím, že vlivem snížené pružnosti hydrogelu musela být nalezena místa, která ještě bylo možné změřit. Tato selektivně vybraná místa byla pravděpodobně zároveň ta s nejvyššími moduly pružnosti.

5.2.2 EPDM organogel

Jedná se o chemický gel, jenž byl pořízen už v nabobtnaném stavu, a který při kontaktu s vodou nemění své mechanické vlastnosti. Z tohoto důvodu byl uchováván v exsikátoru s vodou ve vodném prostředí. Měření tohoto gelu probíhalo ihned po vytvoření vzorku o ideálních rozměrech a překrytím vodou. Byl měřen pomocí AFM a byl měřen Youngův modul pružnosti a poté byla vyhodnocena taktéž adheze a adhezní práce.

Tabulka 6: Tabulka naměřených hodnot veličin u EPDM gelu

| Veličina | Průměrná hodnota |
|------------------------|------------------------------|
| Youngův modul E (Pa) | $233\,963 \pm 92\,765$ |
| Adheze (N) | $2,8 \pm 0,3 \cdot 10^{-8}$ |
| Adhezní práce (J) | $4,4 \pm 0,8 \cdot 10^{-14}$ |

S ohledem na data (Tabulka 6) lze stanovit, že hodnota adheze i adhezní práce má výrazně nižší směrodatnou odchylku než Youngův modul, což vystavuje otázku, zdali nebude výhodné pro budoucí stanovování mechanických vlastností hydrogelů, u nichž dochází k výraznější adhezi, zvážit jako hlavní měřenou veličinu adheze nebo adhezní práce. Při adhezi dochází k přilnavosti dvou materiálů k sobě, přičemž tato přilnavost a její průběh je charakteristická pro daný materiál. Z tohoto důvodu je třeba zvážit, zda by u materiálů s významnou přítomností adheze mohla být adheze či adhezní práce použita pro jejich stanovení. Výhodou takového

stanovení na lokální úrovni naproti například Youngovu modulu je fakt, že hodnoty adheze jsou daleko méně proměnlivé a vykazují větší konzistenci, zároveň průběh křivky adhezní práce vykazuje vysokou opakovatelnost měření. Pokud bychom s podobnou úspěšností byli schopni stanovit a porovnat hodnoty adheze a adhezní práce na makroskopické úrovni, tak by v budoucích pracích mohly být použity jako hlavní veličiny korelující mechanické vlastnosti na lokální a makroskopické úrovni. Hodnota Youngova modulu E se v případě EPDM gelu nachází mezi 0,5% a 1% agarózovým hydrogelem.

Při měření pomocí AFM byly naměřeny výsledky s vysokými směrodatnými odchylkami, toto bylo způsobeno přesností měření a zároveň přítomností anizotropie ve struktuře hydrogelu, kdy občas byl změřen bod, ve kterém se nacházel polymerní řetězec a občas byla změřena oblast póru. Při porovnání mechanických vlastností hydrogelů napříč vzorky bylo zjištěno, že nejvyšší hodnotu Youngova modulu E naměřeného pomocí AFM má agarózový hydrogel, jehož hodnota pro 1% hm. koncentraci byla $433\,439 \pm 322\,904$ Pa, což činí více než desetinásobnou hodnotu oproti alginátovému hydrogelu ($30\,225 \pm 17\,523$ Pa), který však měl dvojnásobnou hmotnostní koncentraci přítomného alginátu. Rozdíl mezi alginátovým a PEG hydrogelem při měření po 24 hodinách od přípravy dosahuje ještě větších rozdílů, kdy naměřená hodnota Youngova modulu pro PEG hydrogel byla 314 ± 45 Pa, která je nižší o tři řády než v případě agarózového hydrogelu. Hodnota Youngova modulu pro EPDM organogel $233\,963 \pm 92\,765$ Pa je oproti 1% agarózovému hydrogelu přibližně poloviční. Z těchto výsledků lze říct, že agarózový hydrogel vykazuje nejvíce pevné síťování při zkoumání mechanických vlastností pomocí AFM. Pravděpodobně během jeho přípravy dochází k výraznému zpevnění v procesu bobtnání, což vysvětluje vysoký rozsah elastického chování.

6 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo seznámení se s měřením mechanických vlastností na lokální úrovni (vyjádřeno pomocí Youngova modulu) metodou mikroskopie atomárních sil (AFM). Hlavní přednosti této metody spočívají v tom, že AFM je schopno měřit polotuhé hydrogelové systémy v jejich nativním (nabotnaném) stavu, což ve srovnání s jinými zobrazovacími technikami (např. SEM) přináší bezesporu velké množství výhod (tj. absence artefaktů vznikajících během přípravy vzorku na měření).

Pro stanovení mechanických vlastností na lokální úrovni byl použit silově mapovací kontaktní mód (*Contact mode force mapping*) AFM a jeho použití pro měření Youngova modulu pružnosti v tahu E u vybraných typů hydrogelů. Byly vybrány hydrogely s různým stupněm a charakterem síťování, konkrétně se jednalo o: iontový (hydrogel na bázi alginátu sodného zesíťovaného pomocí vápenatých iontů), fyzikální (agarózový hydrogel), chemický (PEG hydrogel) a chemický (EPDM organogel). Kromě zjištění mechanických vlastností jednotlivých hydrogelů a tím pádem i vlivu síťování na mechanické vlastnosti bylo hlavní motivací i ověření, zda AFM v tomto módu je použitelné pro hydrogely s různým typem síťování a zda se tedy bude jednat o univerzální techniku použitelnou pro rozličné materiály.

U těchto gelů bylo provedeno měření na lokální úrovni, avšak u agarózového hydrogelu bylo zároveň provedeno měření smykového modulu pružnosti G pomocí oscilačního reometru, což nám poskytlo makroskopickou informaci o mechanických vlastnostech. Pro agarózový hydrogel s koncentrací agarózy 1 hm. % vyšel Youngův modul pomocí reometru 13368 ± 1387 Pa a pomocí AFM $433\,439 \pm 322\,904$ Pa. Na základě těchto dvou měření mohlo být provedeno srovnání makroskopického a lokálního měření pružnosti u agarózového hydrogelu, kdy bylo zjištěno, že takto nastavená měření nelze srovnávat, neboť docházelo k jinému druhu mechanického zatížení.

Dále byla měřena časová závislost u agarózového a PEG hydrogelu, přičemž u agarózového hydrogelu bylo provedeno měření na lokální úrovni i z makroskopického hlediska. U agarózového hydrogelu bylo zjištěno, že v krátkodobém časovém horizontu nedochází ke stárnutí gelu, díky čemuž mohl být gel uchovávan a měřen po období 72 hodin od přípravy, avšak u PEG hydrogelu bylo zjištěno, že dochází k zvýšené absorpci vody a k částečnému rozpouštění, které po 48 hodinách od přípravy již neumožňovalo další měření. U agarózového hydrogelu bylo provedeno měření koncentrační řady opět z makroskopického i lokálního hlediska, kdy při měření oscilačním reometrem byla určena přibližně kvadratická závislost růstu Youngova modulu s koncentrací a při měření pomocí AFM byla určena přibližně lineární závislost růstu Youngova modulu s rostoucím hmotnostním podílem agarózy. U agarózového hydrogelu byl proveden frekvenční test (Obrázek 14) a u EPDM organogelu byla vyhodnocena adheze a adhezní práce.

Při měření agarózového hydrogelu oscilační reometrií byla zjištěna kvadratická závislost růstu Youngova modulu E (Obrázek 11) s rostoucí koncentrací agarózy v hmotnostních procentech, avšak v případě lokálního měření pomocí AFM byla zjištěna přibližně lineární závislost růstu Youngova modulu (Obrázek 12) s rostoucí hmotnostní koncentrací agarózy. Při

frekvenčním testu provedeném na vzorku 1% agarózového hydrogelu nedošlo k přechodu hydrogel/sol, tudíž bylo možné vliv frekvence na měření smykového modulu G zanedbat. Při měření časové závislosti nebylo u agarózového hydrogelu prokázáno stárnutí gelu (synereze), tudíž mohl být vzorek uchovávan a měřen po dobu 72 hodin. Při porovnání hodnot Youngova modulu získaného z oscilačního reometru a z AFM byly naměřeny hodnoty lišící se více než o jeden řád. Z tohoto vyplývá, že nelze jednoduše porovnávat data naměřená těmito technikami. U hydrogelu alginátu sodného zesíťovaného pomocí vápenatých iontů byla naměřená hodnota Youngova modulu přibližně dvacetkrát nižší než u odpovídající hmotnostní koncentrace agarózového hydrogelu, tudíž měl tento gel mnohonásobně nižší hodnotu modulu pružnosti v tahu. Toto je způsobeno jak jiným způsobem namáhání při tlakovém/tahovém a smykovém měření, tak i geometrií hrotu při měření pomocí AFM. V našem experimentu byl použit hrot s tvarem trigonální pyramidy, kdy použitá geometrie hraje zásadní roli na hodnotu naměřených mechanických vlastností.

Dále byl měřen PEG hydrogel, který byl vybrán jako chemický hydrogel pro tuto práci. Tento hydrogel byl vybrán jakožto hlavní vzorek, který bude měřen v rámci grantu Akademie věd České republiky, který bude řešen od příštího roku v rámci naší fakulty. Z tohoto důvodu byl tento vzorek měřen v rámci základního screeningu. Byl měřen pomocí AFM a při měření denní závislosti došlo k výraznému snížení pružnosti vlivem absorpce vody a bobtnání, kdy se v příliš vysokém obsahu vody v řetězci začal hydrogel rozpouštět. V čase 72 hodin od přípravy už nebyl možné změřit Youngův modul a hydrogel spíše připomínal opět sol. Z tohoto důvodu bylo ideální PEG hydrogel měřit maximálně 24 hodin po přípravě, kdy hodnoty Youngova modulu E byly (314 ± 45 Pa) o dva řády nižší než hodnoty naměřené v případě hydrogelu na bázi alginátu sodného zesíťovaného vápenatými ionty ($30\,225 \pm 17\,523$ Pa).

Posledním vybraným gelem byl EPDM organogel, který byl vybrán pro svou vysokou hodnotu adheze a adhezní práce a pro svou inertnost vůči okolnímu vodnému prostředí, ve kterém byl uchovávan v exsikátoru s vodou a ve kterém byl měřen stejně jako ostatní vzorky. Naměřená hodnota Youngova modulu odpovídá polovině hodnoty 1% agarózového hydrogelu, což z něj dělá gel s nejvyšším Youngovým modulem pružnosti po agarózovém hydrogelu v rámci této práce (pokud nebyl brán v potaz 0,5% agarózový hydrogel). V rámci měření Youngova modulu pomocí AFM byla změřena taktéž adheze a adhezní práce, jejichž průměrné hodnoty mají výrazně nižší směrodatnou odchylku než Youngův modul u tohoto gelu. Z tohoto vyvstává otázka, zda by mohly být veličiny jako adheze či adhezní práce použity pro korelaci mechanických vlastností na lokální a makroskopické úrovni v případě vzorků, u nichž dochází k adhezi o pravidelné velikosti. Lze však předpokládat, že v případě vysoké opakovatelnosti výsledků adheze na lokální úrovni dojde k vysoké opakovatelnosti i v případě makroskopického stanovení, neboť se zvyšující se velikostí měřené oblasti dochází ke snižování vlivu jednotlivých anizotropických oblastí. Dle naměřených hodnot a při vzetí v povahu způsob měření těchto veličin, kdy například na hodnotu adheze má daleko menší vliv přítomnost anizotropie mechanických vlastností se ukazuje měření adheze a adhezní práce jako ideální a spolehlivá veličina. Avšak její omezení může být například u hydrogelů, u kterých se adheze výrazněji neuplatňuje.

Z uvedených výsledků lze říct, že pro korelaci makroskopické a lokální úrovně pomocí dat z oscilačního reometru a AFM výsledky v rámci této práce nevycházejí příznivě, tudíž by pro další pokusy mohly být zvoleny techniky, které vykonávají stejný druh mechanického testu (vtlačování či smyk) nebo by obdobný experiment mohl být proveden na jiném hydrogelu. Dále by mohlo být do budoucna předmětem zkoumání porovnávání adheze získané na makroskopické a lokální úrovni. Zároveň je možné, že více takto postavených výzkumů odhalí příčinu rozdílných hodnot získaných těmito technikami.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] OYEN, M. L. Mechanical characterisation of hydrogel materials. *International Materials Reviews* [online]. 2013, **59**(1), 44-59. Doi:10.1179/1743280413Y.0000000022
- [2] RAGHUWANSHI, V. S. a G. GARNIER. Characterisation of hydrogels: Linking the nano to the microscale. *Advances in Colloid and Interface Science* [online]. 2019, **274**. Doi:10.1016/j.cis.2019.102044
- [3] GYLES, D. A., L. D. CASTRO, J. O. C. SILVA a R. M. RIBEIRO-COSTA. A review of the designs and prominent biomedical advances of natural and synthetic hydrogel formulations. *European Polymer Journal* [online]. 2017, **88**, 373-392 [cit. 2023-05-09]. Doi:10.1016/j.eurpolymj.2017.01.027
- [4] GUPTA, P., K. VERMANI a S. GARG. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discovery Today* [online]. 2002, **7**(10), 569-579. Doi:10.1016/S1359-6446(02)02255-9
- [5] CORKHILL, P. H., C. J. HAMILTON a B. J. TIGHE. Synthetic hydrogels VI. Hydrogel composites as wound dressings and implant materials. *Biomaterials* [online]. 1989, **10**(1), 3-10. Doi:10.1016/0142-9612(89)90002-1
- [6] WICHTERLE, O. a D. LÍM. Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature* [online]. 1960, **185**(4706), 117-118. Doi:10.1038/185117a0
- [7] JEONG, B.; BAE, Y. H.; KIM, S. W. Biodegradable thermosensitive hydrogels for injectable drug delivery systems. *Trans. Soc. Biomater*, 2000, 1491.
- [8] WOERLY, S. Porous Hydrogels for Neural Tissue Engineering. *Materials Science Forum* [online]. 1997, **250**, 53-68. Doi:10.4028/www.scientific.net/MSF.250.53
- [9] FLORES-MERINO, M. V., S. CHIRASATITSIN, C. LOPRESTI, G. C. REILLY, G. BATTAGLIA a A. J. ENGLER. Nanoscopic mechanical anisotropy in hydrogel surfaces. *Soft Matter* [online]. 2010, **6**(18), 4466-4470. Doi:10.1039/c0sm00339e
- [10] AHMED, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. *Journal of Advanced Research* [online]. 2015, **6**(2), 105-121. Doi:10.1016/j.jare.2013.07.006
- [11] TANAKA, Y., R. KUWABARA, Y. NA, T. KUROKAWA, J. GONG a Y. OSADA. Determination of Fracture Energy of High Strength Double Network Hydrogels. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2005, **109**(23), 11559-11562. Doi:10.1021/jp0500790
- [12] LU, H., L. YUAN, X. YU, Ch. WU, D. HE a J. DENG. Recent advances of on-demand dissolution of hydrogel dressings. *Burns & Trauma* [online]. 2018, **6**. Doi:10.1186/s41038-018-0138-8
- [13] HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2012, **64**, 18-23. Doi:10.1016/j.addr.2012.09.010

- [14] AM ENDE, M.T., D. HARIHARAN a N.A. PEPPAS. Factors influencing drug and protein transport and release from ionic hydrogels. *Reactive Polymers* [online]. 1995, **25**(2-3), 127-137. Doi:10.1016/0923-1137(94)00040-C
- [15] TABATA, Y. Biomaterial technology for tissue engineering applications. *Journal of The Royal Society Interface* [online]. 2009, **6**(suppl_3). Doi:10.1098/rsif.2008.0448.focus
- [16] AHMED, E. M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. *Journal of Advanced Research* [online]. 2015, **6**(2), 105-121. Doi:10.1016/j.jare.2013.07.006
- [17] REALE, E. R. a A. C. DUNN. Poroelasticity-driven lubrication in hydrogel interfaces. *Soft Matter* [online]. 2017, **13**(2), 428-435. Doi:10.1039/C6SM02111E
- [18] KRÓL, D. J., A. WYMYSŁOWSKI a K. N. ALLAF. Adhesion work analysis through molecular modeling and wetting angle measurement. *Microelectronics Reliability* [online]. 2015, **55**(5), 758-764. Doi:10.1016/j.microrel.2015.02.006
- [19] BORAL, S., A. SAXENA a H.B. BOHIDAR. Syneresis in agar hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2010, **46**(2), 232-236. Doi:10.1016/j.ijbiomac.2009.12.008
- [20] LIMA-TENÓRIO, M. K., E. T. TENÓRIO-NETO, M. R. GUILHERME, F. P. GARCIA, C. V. NAKAMURA, E. A.G. PINEDA a A. F. RUBIRA. Water transport properties through starch-based hydrogel nanocomposites responding to both pH and a remote magnetic field. *Chemical Engineering Journal* [online]. 2015, **259**, 620-629. Doi:10.1016/j.cej.2014.08.045
- [21] FLORY, P. J. *Principles of polymer chemistry*. Ithaca: Cornell University Press, [1953]. George Fisher Baker non-resident lectureship in chemistry at Cornell University. ISBN 978-080-1401-343.
- [22] Mikroskopie atomárních sil. In: *Nanometrologie.cz* [online]. Brno: CMI, c2012. http://www.nanometrologie.cz/cz/techs_afm.php
- [23] *AFM mikroskop* [online]. online. http://fyzika.fce.vutbr.cz/file/kusak/AFM_mikroskopie.pdf
- [24] PODIVÍNSKÁ, Markéta a Juraj KOSEK. *Mikroskop atomárních sil (AFM) Dimension Icon Bruker* [online]. Praha: VŠCHT . <https://www.vscht.cz/files/uzel/0028814/MzGwVPDOL07NVnB0843PLkvMSUwCAA.pdf?redirected>
- [25] Mikroskopie atomových sil. In: *NanoScience instruments* [online]. Phoenix: Nanoscience Instruments, c2022. <https://www.nanoscience.com/techniques/atomic-force-microscopy/>

- [26] PODDANÝ, S. Od pralátky k zobrazování molekulárních orbitalů. In: *Aldebaran* [online]. Praha: Aldebaran, 2008. https://www.aldebaran.cz/ls/LS06/2005_13.html
- [27] KUBÍNEK, R., M. VŮJTEK a R. HOLUBOVÁ. Mikroskopie atomárních sil. In: *Atmilab* [online]. Olomouc, 2000–1. <http://atmilab.upol.cz/pub/v2.html>
- [28] STARK, R. W. a W. M. HECKL. Fourier transformed atomic force microscopy: tapping mode atomic force microscopy beyond the Hookian approximation. *Surface Science* [online]. 2000, **457**(1-2), 219-228. Doi:10.1016/S0039-6028(00)00378-2
- [29] MOYER, A. E. Robert Hooke's Ambiguous Presentation of "Hooke's Law." *Isis* [online]. 1977, **68**(2), 266-275. Doi:10.1086/351771
- [30] GHANBARI, A., Z. MOUSAVI, M.-C. HEUZEY, G. S. PATIENCE a P. J. CARREAU. Experimental methods in chemical engineering: Rheometry. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* [online]. 2020, **98**(7), 1456-1470. Doi:10.1002/cjce.23749
- [31] MEZGER, T.G. *Applied rheology: with Joe Flow on Rheology Road*. Graz: Anton Paar, 2015. ISBN 9783950401608.
- [32] CAPPELLO, J., V. D'HERBEMONT, A. LINDNER a O. DU ROURE. Microfluidic In-Situ Measurement of Poisson's Ratio of Hydrogels. *Micromachines* [online]. 2020, **11**(3). Doi:10.3390/mi11030318
- [33] FLORY, P. J. a W. R. KRIGBAUM. Thermodynamics of High Polymer Solutions. *Annual Review of Physical Chemistry* [online]. 1951, **2**(1), 383-402. Doi:10.1146/annurev.pc.02.100151.002123
- [34] HUGGINS, M. L. Solutions of Long Chain Compounds. *The Journal of Chemical Physics* [online]. 1941, **9**(5), 440-440. Doi:10.1063/1.1750930
- [35] LAI, Y. a Y. HU. Probing the swelling-dependent mechanical and transport properties of polyacrylamide hydrogels through AFM-based dynamic nanoindentation. *Soft Matter* [online]. 2018, **14**(14), 2619-2627. Doi:10.1039/C7SM02351K
- [36] FNEICH, F., J. VILLE, B. SEANTIER a T. AUBRY. Structure and rheology of aqueous suspensions and hydrogels of cellulose nanofibrils: Effect of volume fraction and ionic strength. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2019, **211**, 315-321. Doi:10.1016/j.carbpol.2019.01.099
- [37] SNL-10. In: *Bruker* [online]. Billerica: Bruker AFM Probes, c2023. <https://www.brukerafmprobes.com/p-3693-snl-10.aspx>

8 SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

8.1 Seznam zkratek

| | |
|----------|---|
| AFM | mikroskopie atomárních sil (<i>Atomic Force Microscopy</i>) |
| EPDM | ethylen-propylen-dienový monomer |
| PEG | polyethylenglykol |
| HA | kyselina hyaluronová |
| PAAm | polyakrylamid |
| PVP | polyvinylpyrrolidon |
| PVA | polyvinylalkohol |
| polyHEMA | poly(2-hydroxyethylmetakrylát) |
| TEMED | tetramethylethyldiamin |
| TGA | tepelná gravimetrická analýza |
| DSC | diferenciální skenovací kalorimetrie |
| DMA | dynamická mechanická analýza |
| SFM | skenovací silová mikroskopie (<i>Scanning Force Microscopy</i>) |
| CNF | celulózové nano fibrily |

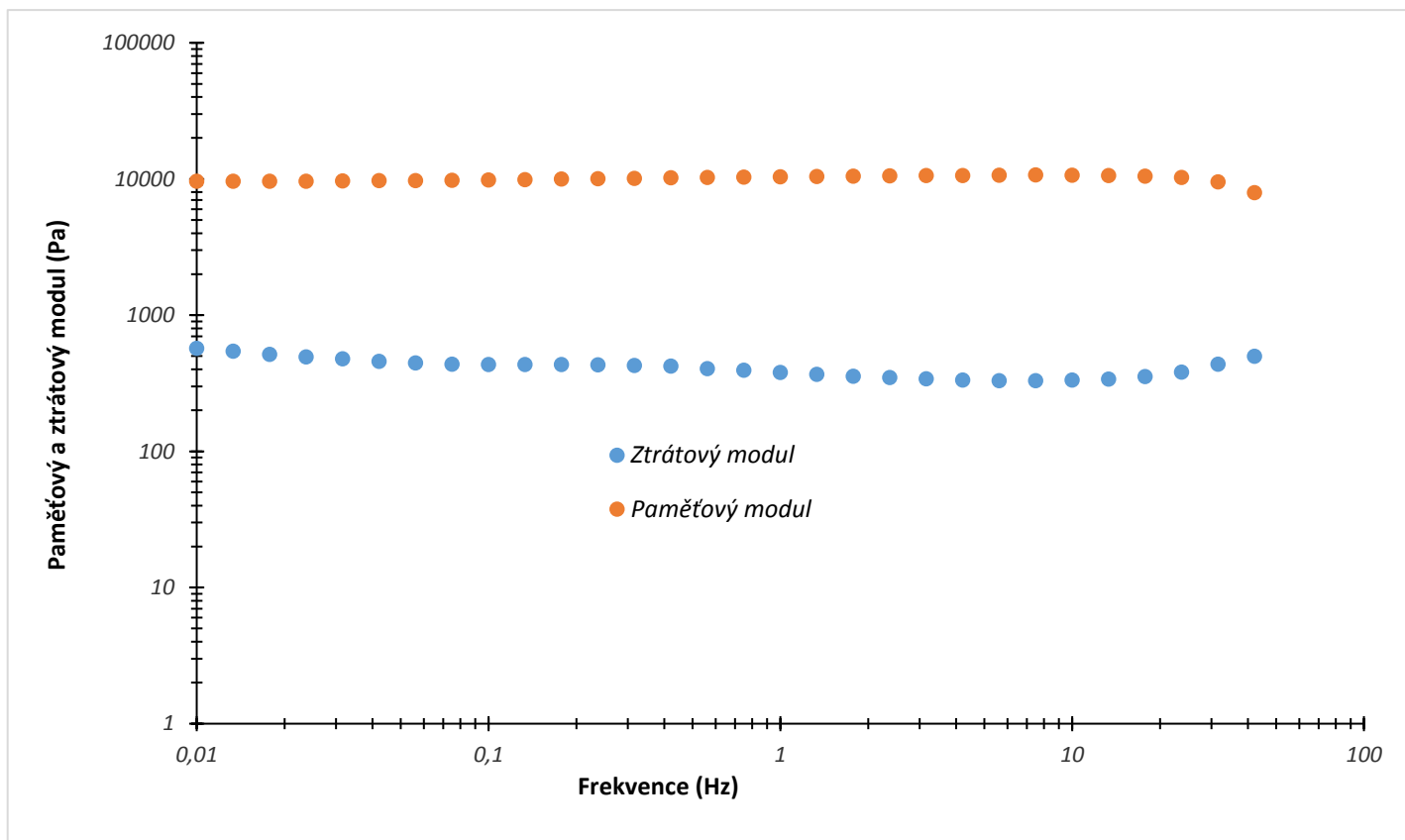
8.2 Seznam symbolů

| | |
|-------|--|
| E | Youngův modul pružnosti [Pa] |
| G | Coulombův (smykový) modul pružnosti [Pa] |
| μ | Poissonův poměr [-] |

9 PŘÍLOHY

| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O | P | Q | R | S | T | U | V | W |
|----|---------------|-------------|----------------------|---|---|---|---------------------|-------|--------|--------|---------|-----------|--------|---|---|----------|--------|---|---|---|------------------|----------|--------|
| 1 | 19.9.2022 | 19.9.2022 | 19.9.2022 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 1 | 2 | 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | Young's Modul | Young's Mod | Young's Modulus [Pa] | | | | Anova: jeden faktor | | | | | | | | Dvouvýběrový t-test s nerovností rozptylů | | | | | Dvouvýběrový t-test s nerovností rozptylů | | | |
| 4 | 577509,00 | 638803,00 | 338821,00 | | | | | | | | | | | | (1-2) | | | | | | (2-3) | | |
| 5 | 405093,00 | 252073,00 | 424223,00 | | | | Faktor | | | | | | | | Soubor 1 | Soubor 2 | | | | | Soubor 1 | Soubor 2 | |
| 6 | 315317,00 | 526504,00 | 601091,00 | | | | Výběr | Počet | Součet | Průměr | Rozptyl | | | | Stř. hodnc | 295967 | 391378 | | | | Stř. hodnc | 391378 | 369161 |
| 7 | 322571,00 | 371775,00 | 419505,00 | | | | Sloupec 1 | 107 | 3E+07 | 295967 | 9E+09 | | | | Rozptyl | 9E+09 | 2E+10 | | | | Rozptyl | 2E+10 | 3E+10 |
| 8 | 294986,00 | 339015,00 | 282725,00 | | | | Sloupec 2 | 183 | 7E+07 | 391378 | 2E+10 | | | | Pozorová | 107 | 183 | | | | Pozorová | 183 | 75 |
| 9 | 272741,00 | 355806,00 | 584905,00 | | | | Sloupec 3 | 75 | 3E+07 | 369161 | 3E+10 | | | | Hyp. rozd | 0 | | | | | Hyp. rozd | 0 | |
| 10 | 278557,00 | 362565,00 | 301679,00 | | | | | | | | | | | | Rozdíl | 288 | | | | | Rozdíl | 130 | |
| 11 | 566543,00 | 844794,00 | 319941,00 | | | | | | | | | | | | t Stat | -6,505 | 6,505 | | | | t Stat | 0,9926 | |
| 12 | 248303,00 | 309919,00 | 978928,00 | | | | ANOVA | | | | | | | | P(T<=t) (1) | 2E-10 | | | | | P(T<=t) (1) | 0,1614 | |
| 13 | 201487,00 | 188210,00 | 236913,00 | | | | Zdroj variabil | SS | Rozdíl | MS | F | Hodnota P | F krit | | t krit (1) | 1,6502 | | | | | t krit (1) | 1,6567 | |
| 14 | 254309,00 | 545212,00 | 634019,00 | | | | Mezi výbě | 6E+11 | 2 | 3E+11 | 15,29 | 4E-07 | 3,0207 | | P(T<=t) (2) | 3E-10 | | | | | P(T<=t) (2) | 0,3228 | |
| 15 | 170835,00 | 521264,00 | 317648,00 | | | | Všechny v | 7E+12 | 362 | 2E+10 | | | | | t krit (2) | 1,9682 | | | | | t krit (2) | 1,9784 | |
| 16 | 441351,00 | 386030,00 | 384081,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 17 | 202500,00 | 531829,00 | 818716,00 | | | | Celkem | 8E+12 | 364 | | | | | | | | | | | | | | |
| 18 | 331964,00 | 240547,00 | 417875,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 19 | 170290,00 | 411349,00 | 310389,00 | | | | | | | | | | | | Dvouvýběrový t-test s nerovností rozptylů | | | | | | 1. měření nesedí | | |
| 20 | 355485,00 | 647055,00 | 170350,00 | | | | | | | | | | | | (1-3) | | | | | | | | |
| 21 | 285796,00 | 368491,00 | 332651,00 | | | | | | | | | | | | Soubor 1 | Soubor 2 | | | | | | | |
| 22 | 199895,00 | 531235,00 | 358954,00 | | | | | | | | | | | | Stř. hodnc | 295967 | 369161 | | | | | | |
| 23 | 352933,00 | 349843,00 | 290858,00 | | | | | | | | | | | | Rozptyl | 9E+09 | 3E+10 | | | | | | |
| 24 | 137461,00 | 598719,00 | 218673,00 | | | | | | | | | | | | Pozorová | 107 | 75 | | | | | | |
| 25 | 552281,00 | 292336,00 | 401479,00 | | | | | | | | | | | | Hyp. rozd | 0 | | | | | | | |
| 26 | 276035,00 | 364858,00 | 247027,00 | | | | | | | | | | | | Rozdíl | 107 | | | | | | | |
| 27 | 282316,00 | 566549,00 | 878196,00 | | | | | | | | | | | | t Stat | -3,4461 | 3,4461 | | | | | | |
| 28 | 302753,00 | 258158,00 | 203005,00 | | | | | | | | | | | | P(T<=t) (1) | 0,0004 | | | | | | | |
| 29 | 518557,00 | 264813,00 | 219341,00 | | | | | | | | | | | | t krit (1) | 1,6592 | | | | | | | |
| 30 | 259609,00 | 210214,00 | 460196,00 | | | | | | | | | | | | P(T<=t) (2) | 0,0008 | | | | | | | |
| 31 | 234869,00 | 485542,00 | 279003,00 | | | | | | | | | | | | t krit (2) | 1,9824 | | | | | | | |
| 32 | 305598,00 | 420445,00 | 761602,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 33 | 305324,00 | 425806,00 | 674130,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 34 | 282889,00 | 472478,00 | 735339,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 35 | 212988,00 | 274604,00 | 429732,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 36 | 297217,00 | 637564,00 | 307779,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 37 | 220906,00 | 443558,00 | 204273,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 38 | 258648,00 | 868794,00 | 182909,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Obrázek 13: Obrázek znázorňující průběh vyhodnocování dat naměřených pomocí AFM v MS Excel



Obrázek 14: Graf znázorňující závislost paměťového a ztrátového modulu v závislosti na frekvenci