



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

VYUŽITÍ MIKROSKOPIE ATOMÁRNÍCH SIL KE STUDIU HYDROGELOVÝCH SYSTÉMŮ

THE UTILIZATION OF ATOMIC FORCE MICROSCOPY FOR STUDY ON HYDROGELS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Kateřina Lišková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.

BRNO 2022

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1674/2021 Akademický rok: 2021/22
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Kateřina Lišková**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Jiří Smilek, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Využití mikroskopie atomárních sil ke studiu hydrogelových systémů

Zadání bakalářské práce:

- 1) prostudovat současný stav řešené problematiky mikroskopie atomárních sil s ohledem na měření hydrogelových matic
- 2) seznámit se s mikroskopem atomárních sil z experimentálního hlediska
- 3) optimalizace měřicí procedury mikroskopu atomárních sil pro měření hydrogelových systémů
- 4) provést sérii měření vedoucí k charakterizaci různě síťovaných hydrogelů
- 5) diskutovat naměřené výsledky a zhodnotit použitelnost mikroskopie atomárních sil k charakterizaci hydrogelů

Termín odevzdání bakalářské práce: 27.5.2022:

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

Kateřina Lišková
studentka

Ing. Jiří Smilek, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Předložená bakalářská práce se zabývá studiem mikroskopie atomárních sil (AFM), zejména optimalizací měřicí procedury pro zobrazování povrchu různě síťovaných hydrogelů v hydratovaném stavu. Největší pozornost byla věnována fyzikálně síťovanému polysacharidovému hydrogelu (termoreverzibilní agaróza) v nabotnaném stavu, kdy byl měřen povrch vzorků o hmotnostních koncentracích 4, 2, 1, 0,75 a 0,5 hm. %. Následně byl měřen povrch iontově síťovaného 2 hm. % alginátové gelu s vápenatými ionty. Na základě literární rešerše byla měření provedena ve vodě za použití metody kvantitativního zobrazování (*QITM Advanced Imaging*), která je vhodná zejména pro měkké vzorky s nerovným povrchem. Pro měření bylo testováno více nosníků, nakonec byl vybrán nosník SNL-10, který se jevil jako nejvhodnější pro zobrazování vzorků v jakémkoliv měřicím prostředí, zejména ve vodném. Pomocí obrazové analýzy *ImageJ* byly sledovány velikosti pórů agarózových hydrogelů. Pro měření hydrogelů v nabotnaném stavu byla optimalizována procedura měření jejich povrchu pomocí mikroskopie atomárních sil, avšak pro různé druhy hydrogelů bude potřeba individuální optimalizace jak přípravy, tak nastavení přístroje.

ABSTRACT

The presented bachelor thesis deals with the study of atomic force microscopy (AFM), especially the optimization of the measuring procedure for imaging the surface of variously crosslinked hydrogels in the hydrated state. The most attention was given to the physically crosslinked polysaccharide hydrogel (termoreversible agarose) in hydrated state, where the surface of the samples with mass concentration of 4, 2, 1, 0,75 and 0,5 % was measured. Subsequently, the surface of the ionically crosslinked 2 % alginate gel with calcium ions was measured. Based on a literature research, measurements were performed in water using the method of quantitative imaging (*QITM Advanced Imaging*), which is especially suitable for soft samples with uneven surfaces. Multiple cantilever were tested for measurement, finally the SNL-10 cantilever was selected, which showed versatility for imaging samples in any measuring environment, especially aqueous. The pore sizes of the agarose hydrogels were monitored by image analysis *ImageJ*. For the measurement of hydrogels in the swollen state, the procedure of measuring their surface using atomic force microscopy has been optimized, but for different types of hydrogels, individual optimization of both preparation and instrument setup will be required.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mikroskopie atomárních sil, režimy zobrazování, poklepový režim, hydrogely, agaróza, alginát.

KEYWORDS

Atomic force microscopy, modes of imaging, tapping mode, hydrogels, agarose, alginate.

LIŠKOVÁ, Kateřina. *Využití mikroskopie atomárních sil ke studiu hydrogelových systémů*. Brno, 2022. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138854>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Jiří Smilek.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
Kateřina Lišková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu své bakalářské práce Ing. Jiřímu Smilkovi, Ph.D. za cenné rady, optimistický přístup, který mi dodával energii, ochotu a čas, jež mi věnoval při řešení dané problematiky. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Janě Szabové za pomoc při experimentální činnosti, poskytnuté rady, podnětné připomínky, trpělivost a milý přístup. Velké poděkování patří také mé rodině a přátelům za psychickou podporu.

Obsah

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Hydrogely.....	8
2.1.1	Vlastnosti a využití hydrogelů	8
2.1.2	Chemické gely	9
2.1.3	Fyzikální gely	10
2.2	AFM – mikroskopie atomárních sil	11
2.2.1	Kontaktní režim	12
2.2.2	Bezkontaktní režim	12
2.2.3	Pokleповý režim	12
2.2.4	Nosník a hrot.....	14
2.2.5	Nanoindentace	16
2.2.6	Hertzův model.....	17
2.2.7	Analýza silových křivek	17
2.3	Problémy při měření hydrogelů pomocí AFM.....	18
2.3.1	Nevýhody AFM	19
2.3.2	Výhody AFM.....	19
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	21
3.1	Topografická heterogenita v PVA hydrogelech studovaná pomocí AFM.....	21
3.2	Mechanické vlastnosti PEG hydrogelů	22
3.3	Topografie alginátových hydrogelů pomocí mikroskopie atomárních sil	23
3.4	Siloxan-hydrogelové kontaktní čočky	25
3.5	Studování povrchu kontaktních čoček na bázi pHEMA.....	26
3.6	Zobrazování alginátové matrice pomocí AFM	26
3.7	Shrnutí poznatků z literární rešerše o dané problematice	28
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
4.1	Použité chemikálie pro přípravu hydrogelů	29
4.2	Instrumentální vybavení.....	29
4.2.1	Používané přístroje	29
4.2.2	Používané nosníky a hroty	29
4.3	Nastavení přístroje	30
4.3.1	Kvantitativní zobrazování (<i>QITM Advanced Imaging</i>)	32

4.4	Příprava agarózových hydrogelů	32
4.5	Příprava alginátového hydrogelu	33
5	CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE.....	34
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	35
6.1	Xerogely – experimentální seznámení s přístrojem.....	35
6.2	Optimalizace přípravy agarózového hydrogelu v hydratovaném stavu.....	35
6.3	Výběr vhodného nosníku a hrotu	36
6.4	Optimalizace měřicího režimu (<i>QITM Advanced Imaging</i>)	37
6.4.1	Měření agarózového hydrogelu	37
6.4.2	Měření 2 hm. % alginátového hydrogelu.....	43
7	ZÁVĚR.....	44
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	46
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	52
9.1	Seznam zkratk	52
9.2	Seznam symbolů	52

1 ÚVOD

Hydrogely v posledních letech získávají významnou pozornost, jelikož nacházejí uplatnění v široké škále biomedicínských aplikací, tkáňovém inženýrství, v zemědělství a vykazují jedinečné fyzikálně-chemické vlastnosti.

Z toho vychází, že je podstatné znát strukturu hydrogelů v nativním stavu. Metoda, která umožňuje trojrozměrně zobrazovat strukturu povrchu hydrogelů, se nazývá mikroskopie atomárních sil (AFM), která spadá pod mikroskopii skenující sondou (SPM), jež vznikla v 80. letech minulého století. AFM dokáže zobrazovat povrchy různých materiálů v jakémkoliv prostředí s vysokým rozlišením.

Cílem této bakalářské práce je analyzovat povrch různě síťovaných gelů v hydratovaném stavu. Největší pozornost je věnována fyzikálně síťovanému termoreverzibilnímu agarózovému hydrogelu, se který máme na FCH VUT dlouholeté zkušenosti a jeho příprava je snadná a reprodukovatelná. Dále byl měřen iontově síťovaný 2 hm. % alginátový gel s vápenatými ionty.

Teoretická část bakalářské práce se věnuje všeobecnému popisu hydrogelů, jejich vlastnostem a rozdělení. Dále zahrnuje představení mikroskopie atomárních sil, uplatnění této metodiky, popis jednotlivých měřicích režimů a druhy nosníků a hrotů. Pozornost je také věnována problémům, výhodám a nevýhodám AFM s ohledem na měření hydrogelových matic. Vypracovaná literární rešerše se zaměřuje na zkoumání a charakteristiku různých hydrogelů pomocí mikroskopie atomárních sil, přičemž užitečné poznatky byly použity v navazující experimentální části. Ta zahrnuje použité materiály a přístroje, postup měření, charakterizuje měřicí režim (*QITM Advanced Imaging*) a v něm nastavitelné hodnoty, a nakonec přípravu hydrogelových vzorků. Další část je věnována získaným výsledkům a diskuzi.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Hydrogely

Hydrogely jsou tvořeny z polymerů, což jsou makromolekuly stejného či rozdílného původu, které se ve struktuře pravidelně opakují. Tyto makromolekuly se spojují do řetězců, které jsou navzájem propojeny sekundárními vazbami a v hydrogelech tak vytváří polymerní síť. Volná místa mezi řetězci makromolekul (póry) vyplňuje voda. Proces, kdy se ze solu vytváří gel, se nazývá gelace [1]. Hydrogely jsou vysoce hydrofilní – mohou zadržovat velké množství vody díky přítomnosti hydrofilních funkčních skupin (karboxylové, hydroxylové, amidové, sulfonové) v jejich trojrozměrných sítích a zvětšit svůj objem (v porovnání s xerogelem – disperzní podíl bez disperzního prostředí) bobtnáním až 1000krát.

Hydrogely jsou typicky připraveny ze syntetických nebo přírodních polymerních řetězců. Mezi materiály, ze kterých lze získat hydrogely přírodního původu patří kolagen, chitosan, kyselina hyaluronová, fibroin, želatina, agaróza, gellan a alginát [2].

Přírodní hydrogely jsou postupně nahrazovány syntetickými, z důvodu vyšší absorpční kapacity a delší kinetické a teplotní stability [3]. Vykazují vyšší vstřebatelnost a mechanickou pevnost, jelikož obsahují silné kovalentní vazby. Mezi syntetické polymery patří polyhydroxyethylmethakrylát, polyvinylalkohol, polypropylen fumarát, polyethylenglykol. Kombinací přírodního a syntetického polymeru vznikají kompozitní polymery, které mají vynikající mechanickou odolnost díky vzniklé hybridní struktuře.

2.1.1 Vlastnosti a využití hydrogelů

Jednou z nejdůležitějších vlastností hydrogelových materiálů jsou jejich mechanické vlastnosti, díky kterým jsou hydrogely naprosto unikátní. Tyto vlastnosti souvisejí s jejich složením, stupněm síťování, způsobem síťování a obsahem vody [4]. Vysoký obsah vody umožňuje rychlou difúzi aktivních složek hydrogelem (případně uvolňování aktivní složky z hydrogelové matrice), ale také vykazuje nedostatečné mechanické vlastnosti, jako je nízký modul pevnosti [5]. Z hlediska finálních aplikací hydrogelových materiálů jsou naprosto stěžejní jejich transportní vlastnosti, úzce související s výše diskutovanými mechanickými vlastnostmi. Volbou vhodných parametrů přípravy hydrogelů lze dosáhnout materiálu s různými transportními vlastnostmi, a proto se hydrogely velmi často využívají jako nosiče aktivních složek s řízeným uvolňováním z jejich vnitřní struktury. Mají vynikající transportní vlastnosti a reagují na změny vnějších podmínek (tj. teplota, pH, rozpouštědlo, tlak, iontová síla a elektrický potenciál) [6]. Jelikož mají hydrogely porézní strukturu, jsou vysoce propustné pro různé typy aktivních látek, jako jsou například léčiva, která mohou být za vhodných podmínek z hydrogelu uvolněna na správném místě, dokonce po dlouhou dobu, jedná se o cílené uvolňování [7].

Díky své elasticitě mohou být využity jako kontaktní čočky, prsní implantáty, kloubní chrupavky a membrány [8]. Velké využití nacházejí ve tkáňovém inženýrství, kde se používají pro více účelů. Například v břišní chirurgii jako prevence proti vytvoření pooperačních srůstů, kdy hydrogel vyplní prázdný prostor, a vytvoří tak dočasnou bariéru mezi vrstvami narušené tkáně. Tyto hydrogely vykazují vysokou biokompatibilitu, kdy v organismu nevyvolávají žádné negativní reakce. Jako antiadhezivní materiál jsou nejčastěji

využívány syntetické hydrogely, přičemž polyethylenglykol se používá k prevenci pooperačních srůstů [8].

Mohou fungovat jako nosiče pro dodání bioaktivních molekul a využívat se jako 3D struktury pro tvorbu náhradní tkáně a jako podpora buněk. V současné době se hodně využívá hydrogelový *scaffold* pro tvorbu tkání včetně svalů, kostí, chrupavek, jater a neuronů. Díky své biokompatibilitě se uplatňují v biosenzorech, kde plní ochrannou funkci v podobě povlaku na části senzoru, aby nedocházelo k nežádoucím interakcím s biologickými molekulami nebo buňkami. Lze je využít jako imobilizační matrici pro biosnímací prvky a poskytují vhodné prostředí pro enzymy, jelikož udržují jejich aktivní a funkční struktury [9]. Hydrogely urychlují hojení ran, jelikož jsou schopné udržet optimální vlhkost. Své využití nacházejí i v zemědělství, kde ukládají vodu a živiny pro růst rostlin.

2.1.2 Chemické gely

Hydrogely lze dělit podle mechanismu jejich vzniku na fyzikálně a chemicky zesítené hydrogely. Polymerní řetězce chemických hydrogelů jsou síťovány kovalentními vazbami, takže vykazují vysokou stabilitu a velmi dobrou mechanickou odolnost ve srovnání s fyzikálními hydrogely. Označují se jako nereverzibilní gely, jelikož je nelze převést z gelu zpět do solu. Chemicky síťované hydrogely mohou vznikat například radikální polymerací, enzymaticky katalyzovanou reakcí, reakcí funkčních skupin nebo působením vysokoenergetického záření, například gama záření a elektronovými paprsky [11]. Chemické síťování se používá převážně pro vylepšení mechanických vlastností konečného materiálu (např. pevnost, kinetická stabilita).

Existují různé metody syntézy chemických hydrogelů. Hydrofilní polymery, které obsahují hydroxylové skupiny (např. polyvinylalkohol) mohou být síťovány pomocí glutaraldehydu za daných podmínek (vysoká teplota a nízké pH) [12]. Dále mohou reagovat síťovací činidla (např. BIS) s funkčními skupinami (např. -OH, -COOH, -NH₂) hydrofilních polymerů prostřednictvím adiční reakce. Hydrogely na bázi polyamidů a polyesterů mohou být připravovány pomocí kondenzačních reakcí. Vysoce účinným činidlem pro síťování hydrofilních polymerů s amidovými skupinami je N,N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylkarbodiimid (EDC) [13]. Nevýhodou chemických hydrogelů je, že některá používaná síťovací činidla vykazují toxicitu, která je nežádoucí při použití hydrogelu jako biologického materiálu [14].

PVA hydrogel

Jedním z příkladů chemicky síťovaného hydrogelu může být hydrogel na bázi syntetického polyvinylalkoholu síťovaný například aldehydy (např. glutaraldehyd, glyoxal) nebo anhydridy (dianhydrid EDTA) [15].

Jedná se o hydrofilní, netoxický a biokompatibilní syntetický polymer. Je mechanicky pevný, což vyplývá ze síťování pomocí vodíkových vazeb. Díky svým vlastnostem je vhodnou náhradou cévního materiálu a je používán pro kultivaci živých buněk. Stále více se uplatňuje ve tkáňovém inženýrství pro regeneraci orgánů a tkání [16,17]. Využití nachází i ve farmacii jako činidlo zvyšující viskozitu, přidává se do povrchových nátěrů, filmů a do očních kapek.

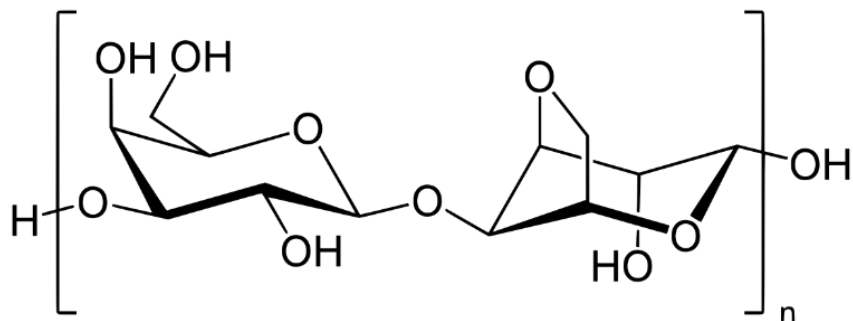
2.1.3 Fyzikální gely

Na rozdíl od chemického síťování hydrogelů, fyzikální síťování probíhá bez přítomnosti jakéhokoliv síťovacího činidla. Tvoří se vlivem změny vnějšího prostředí, jako je teplota, pH, iontová síla, atd. Fyzikální hydrogely mohou být síťovány pomocí krystalizace, vodíkových můstků, iontových a hydrofobních interakcí. Fyzikální gely jsou oproti chemickým méně pevné, tuhé a jsou termoreverzibilní. Hojně využívanými materiály, ze kterých mohou tyto hydrogely vznikat jsou agar, želatina, alginát a gellan.

Schopnost samouspořádání ve vodném médiu vykazují amfifilní roubované a blokové polymery, přičemž vznikají hydrogely. Fyzikální hydrogely mohou vznikat teplotním namáháním [18]. Například polyvinylalkohol vytvoří gel při pokojové teplotě jen s malou mechanickou pevností. Pokud je podroben cyklickému procesu zmrazování – rozmrazování vznikne vysoce tuhý a elastický gel. Dále může síťování probíhat prostřednictvím iontů. Příkladem je alginát sodný, který je síťován pomocí vápenatých iontů při fyziologickém pH a pokojové teplotě [19]. Nachází velké využití v medicíně, uvolňuje léky na určených místech na základě změny prostředí a využívá se na enkapsulaci živých buněk. Některé z fyzikálně síťovaných hydrogelů vykazují termoreverzibilní vlastnosti, tj. mohou přecházet v sol zahřátím na vyšší teplotu a následným ochlazením dochází opět k fázovému přechodu na hydrogel. Jedním z takových typů jsou níže uvedené agarózové hydrogely [20].

Agarózový hydrogel

Agaróza je přírodní polysacharid, který se skládá z opakujících se jednotek střídajících se skupin β -D-galaktopyranosy a 3,6-anhydro- α -L-galaktopyranosy extrahovaných z červených mořských řas (obrázek 1). Agaróza tvoří velmi rychle po rozpuštění ve vodě termoreverzibilní gel a je nerozpustná v organických rozpouštědlech, kromě dimethylfumarátu (DMF) a dimethylsulfoxidu (DMSO). Během gelace se jednotlivé řetězce spojí pomocí vodíkových vazeb za vzniku dvojitých šroubovic a další ochlazování vede ke spojení těchto šroubovic [21]. Vykazují synerezi, což je samovolné vytékání kapaliny z gelu v důsledku jeho stárnutí. S klesající koncentrací agarózy se synereze zvyšuje, což znamená, že s rostoucí koncentrací pevného podílu roste i kapacita zadržování vody. Běžně se používá při elektroforéze, ale v posledních letech poutá pozornost ve tkáňovém inženýrství díky své biokompatibilitě a biodegradabilitě [22].

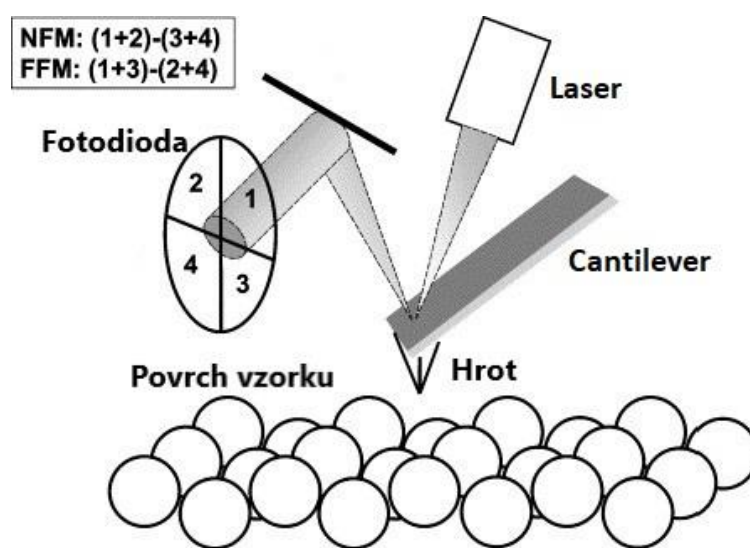


Obrázek 1: Struktura agarózy [21]

2.2 AFM – mikroskopie atomárních sil

V roce 1986 byl vynalezen mikroskop atomárních sil, jako nástupce skenovacího tunelového mikroskopu (STM), který dokázal měřit jen vodivé vzorky [23]. STM byl vynalezen v roce 1981 německým fyzikem Gerdem Dinnigem, který spolu s Heinrichem Rohrerem získal o 5 let později Nobelovu cenu. Dokáže měřit sílu o velikosti až 10 N a je měřen proud mezi povrchem vzorku a hrotem. S nástupem mikroskopu atomárních sil bylo možné měřit nevodivé vzorky a biomolekuly ve fyziologickém prostředí při vysokém rozlišení. Přičemž není sledován proud, ale interakce zahrnující přitažlivé a odpuzivé síly mezi hrotem a povrchem vzorku. Základem je ostrý hrot s poloměrem v jednotkách nanometrů, který je upevněn na ohebném nosníku (z angl. *cantilever*). Dalším důležitým prvkem je laser, který detekuje ohyb nosníku s hrotem a fotodioda, která zpracovává signál (obrázek 2).

Hrot snímá povrch vzorku a zaznamenávají se interakce, které zahrnují přitažlivé a odpuzivé síly, elektrostatické a van der Waalsovy síly. Tyto interakce způsobují vychýlení nosníku ve vertikálním směru. Jakmile se nosník pohne, laserový paprsek, který se odráží od jeho zadní strany, změní úhel odrazu a dopadne tak na jinou část fotodiody (detektor). Ta je tvořena ze čtyř kvadrantů a polohu laseru lze pozorovat ve dvou směrech – horizontální a vertikální. Počítač následně zpracovává elektrický signál fotodiody a generuje zpětný signál pro piezoskenner, aby udržel konstantní přitlačnou sílu na hrotu [24].



Obrázek 2: Schéma měření AFM [25]

K přesnému rozlišení přispívá piezoskenner, který převádí elektrické signály do mechanického pohybu a umožňuje skenování vzorku v rovině x–y pomocí subnanometrové přesnosti. Pro udržení konstantní síly mezi hrotem a povrchem vzorku se pohybují ve směru osy z. Piezoskenery by měly být kalibrovány jednou za několik měsíců, aby bylo dosaženo spolehlivých prostorových měření. Kalibrace se provádí skenováním atomově plochých vzorků, jako je grafit nebo slída s vysokým rozlišením [26].

Mikroskopie atomárních sil neposkytuje jen topografické informace, ale i mechanické vlastnosti. Rozlišení AFM silně závisí na tvaru hrotu. Pro dosažení velice ostrého obrazu je nejlepší ostrý hrot. Při skenování velice plochých a pevných povrchů dokáže AFM dosáhnout až atomového rozlišení [25].

Původní záměr AFM bylo měření vzorků pomocí hrotu, na jehož konci byl pouze jeden atom. Takové měření by bylo možné, pokud by byl povrch plochý na atomové úrovni, což je například čerstvě rozštěpená slída. Při nerovném povrchu mohou skupiny atomů mezi sebou interagovat, což může zhoršovat rozlišení a je měřena drsnost povrchu v mikroměřítku [27].

2.2.1 Kontaktní režim

AFM může pracovat v několika různých režimech. V kontaktním režimu je hrot v neustálém kontaktu se vzorkem a je měřeno různé vychýlení nosníku, díky odlišné výšce povrchu vzorku a působícím silám. Jelikož je hrot se vzorkem v neustálém kontaktu, smykové síly působící na vzorek jsou významné a mohly by poškodit slabě vázané molekuly na povrchu vzorku. V kontaktním režimu může být měřeno vychýlení nosníku vlivem třecích sil, v tomto případě se jedná o mikroskopii třecí síly (*Friction Force Microscopy* – FFM) [28]. Hrot může být opatřen funkčními skupinami, jako je hydrofobní $-CH_3$, nebo hydrofilní $-COOH$, přičemž jsou sledovány adhezivní a třecí síly mezi modifikovaným hrotem a povrchem vzorku (viz Modifikace hrotu). Lze tak skenovat povrch vzorku a detekovat prostorové rozložení funkčních skupin. Jedná se o mikroskopii chemické síly (*Chemical Force Microscopy* – CFM) [29].

Kontaktní režim je vhodný pro zobrazování tvrdých povrchů a umožňuje vysoké rozlišení. U měření měkkých a lepivých materiálů je hrot náchylný na ulpívání a sklouzávání po povrchu, kdy může povrch vzorku poškodit a prostorové rozlišení bývá sníženo vlivem bočních a adhezních sil. Používají se zde nosníky s nízkou konstantou pružnosti o hodnotě menší než 0,5 N/m a také s nízkou rezonanční frekvencí okolo 15 kHz. Tento režim je vhodný pro měření v kapalině, ve vzduchu i vakuu. Třecí síla mezi hrotem a vzorkem není vždy vítána, zejména při měření měkkých povrchů. Z tohoto důvodu byly vyvinuty další režimy, které nezahrnují tyto nežádoucí síly a destruktivní charakter [30].

2.2.2 Bezkontaktní režim

Bezkontaktní režim (*non-contact mode*) využívá síly delšího dosahu, jako jsou van der Waalsovy síly a síly elektrostatické. Hrot se nedotýká vzorku, ale pohybuje se ve vzdálenosti od 1 do 10 nm nad ním. Nosník je rozkmitán a jsou detekovány změny v rezonanční frekvenci, když se hrot přibližuje a oddaluje od povrchu vzorku. Bezkontaktní režim poskytuje vysokou citlivost a aplikaci malých sil, proto je vhodný pro měření měkkých a biologických materiálů, kdy nedochází k poškození hrotu ani povrchu vzorku [31]. Nevýhodou je, když je amplituda kmitu příliš velká, hrot se dostane do kontaktu se vzorkem a následně nemusí mít dostatečně velkou energii na uvolnění, proto musí být použit tužší nosník s vyšší konstantou pružnosti a vyšší rezonanční frekvencí. Rychlost zobrazení povrchu je pomalejší a s nižším rozlišením než u režimu kontaktního, díky vzdálenosti, která je udržována mezi hrotem a povrchem vzorku. K lepšímu rozlišení v bezkontaktním režimu je doporučeno mapovat povrch ve vakuu [32].

2.2.3 Pokleповý režim

Pokleповý režim (*tapping mode*) je kombinací předchozích dvou uvedených režimů a zahrnuje výhody jak kontaktního, tak i bezkontaktního režimu. Je používán hrot, který kmitá

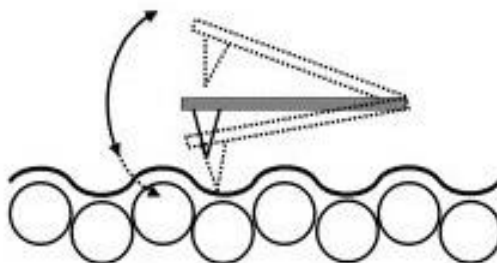
s frekvencí 50–500 Hz ve vzduchu a v kapalinách řádově 10 kHz s konstantou pružnosti větší než 10 N/m [32].

Hrot je v přerušovaném kontaktu se vzorkem a poskytuje dokonce více informací než kontaktní režim, jelikož interakce mezi povrchem a hrotem vedou nejen ke snížení amplitudy oscilace, ale také k posunu ve fázi oscilace (obrázek 3). Díky tomuto posunu lze získat informace o vlastnostech materiálu (např. adheze). Poklepový režim funguje také v tekutém prostředí, proto se nejčastěji využívá pro biologické materiály [24].

S poklepovým režimem úzce souvisí režim modulace síly (*force modulation*). Na nosník je aplikována sinusová modulace a hrot skenuje povrch. Z průhybu nosníku lze získat informace o mechanických vlastnostech (např. tuhost vzorku) s vysokým bočním rozlišením. Neudává absolutní hodnoty tuhosti vzorku, ale jeví se na povrchu jako oblasti s rozdílným zbarvením v obraze FMM (*force modulation microscopy*) [34].

Při poklepovém režimu je vhodné použít tužší nosník, který má konstantu pružnosti vyšší než 10 N/m, jelikož je schopný při zaboření do vzorku překonat kapilární síly. Kapilární síly vytvořené kondenzací vodní vrstvy přitahují hrot k povrchu vzorku a vzniká tak meniskus. Pokud je však nosník příliš tuhý, může docházet k poškození povrchu vzorku.

Poklepový režim je vhodný pro zobrazování měkkých vzorků, protože boční síly nejsou tak velké a poskytuje lepší rozlišení než režim bezkontaktní. Jedním z problémů poklepového režimu je nestabilita, která je způsobena přitažlivými silami, když se hrot dotkne vzorku. Pro překonání této nestability je vhodné použít vyšší amplitudu kmitu, která však může způsobit deformaci vzorku nebo poškození hrotu v důsledku vyšších odpudivých sil. Jednou z možností je použít tužší nosník s vyšší konstantou pružnosti, což může vést k lepšímu překonání působících sil. Měkčí nosníky poskytují lepší charakterizaci materiálu měkkých vzorků, ale jsou mnohem náchylnější na nestabilitu. Ideální nosník pro poklepový režim AFM pro měkké vzorky by se měl při kontaktu hrotu se vzorkem chovat jako měkký, aby se omezily odpudivé síly a pro překonání přitažlivých sil by měl být nosník tuhý. Zehra Parlak a spol. [35] představili metodu, kdy byl při poklepovém režimu využitý integrovaný odečet síly a aktivní hrot. Hrot je zasouván do nosníku, jakmile je překročena síla mezi hrotem a vzorkem, která je dána uživatelem. Metoda umožňuje lepší zobrazování a snižuje odpudivé síly a poskytuje přesnější topografii vzorku. Tato metoda je velice přínosná, zejména pro měkké a heterogenní materiály [35].



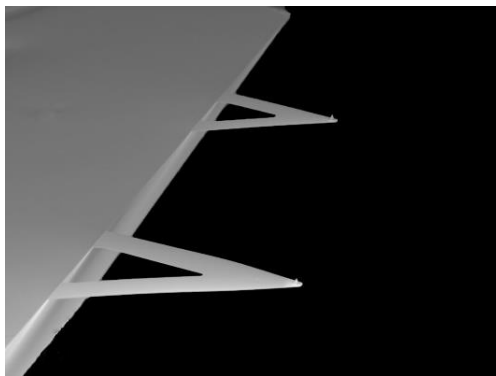
Obrázek 3: Poklepový režim [26]

Režim PeakForce byl vyvinut společností Bruker v roce 2010 a je široce využíván pro studium biomolekul. Vzdálenost hrot – vzorek je modelována sinusovým pohybem při amplitudách pod 100 nm a při frekvencích 1 nebo 2 kHz v režimu PeakForce Tapping.

Výhodou je, že když se hrot přibližuje k povrchu vzorku, rychlost hrotu se blíží nule. To zajišťuje kontrolu síly interakce mezi hrotem a vzorkem, takže jsou chráněny před poškozením a umožňuje zobrazování v kapalinách při silách pod 100 pN. Režim PeakForce Tapping je rychlejší ve srovnání s jinými zobrazovacími režimy a umožňuje vytvořit tisíce silových křivek za sekundu. Umožňuje získat nanomechanické vlastnosti jako například Youngův modul pružnosti a adhezi, zároveň s topografií povrchu vzorku. Režim PeakForce měří Youngův modul pružnosti v rozsahu od 1 MPa do 50 GPa a adhezi od 10 pN do 10 μ N [36].

2.2.4 Nosník a hrot

Rozlišení AFM silně závisí na tvaru a rozměrech hrotu. K dispozici je řada různých druhů nosníků a hrotů s širokým rozsahem konstant pružnosti, rezonanční frekvencí, různě velkými poloměry a tvary hrotů, což umožňuje vybrat vhodný nosník a hrot pro vzorek. Základem pro měření je hrot, který je umístěn na ohebném nosníku. Velikost hrotu je řádově několik μ m, přičemž existují různé geometrie hrotů, kdy nejběžnější je tvar pyramidový, dále se vyrábí i obdélníkové s kulatým zakončením. Nosník bývá obvykle ve tvaru písmene V (obrázek 4), aby se zvýšila jeho boční tuhost a je často vyráběn z křemíku nebo nitridu křemíku [37]. Bývá pokryt reflexní kovovou vrstvou, pro lepší odraz laserového paprsku na detektor. Při měření v kapalině se používá pozlacený nosník, aby byl chemicky inertní. Nosník je jednou stranou pevně umístěn na čipu a bývá dlouhý 100–200 μ m, každé raménko je dlouhé 20–40 μ m a široké 0,5–1 μ m. Nosníky se na čip připevňují ve sklonu od 7° do 20°, aby se vzorku dotkl jako první hrot a ne čip, čímž se zvyšuje efektivní konstanta pružnosti o 10–20 % [38].



Obrázek 4: Snímek trojúhelníkového nosníku SNL-10 na jehož konci je hrot [39]

Důležitými hodnotami, které výrobci u každého nosníku s hrotem uvádějí, jsou konstanta pružnosti a rezonanční frekvence. Vyrábějí se nosníky s konstantami pružnosti od 0,005 N/m do 40 N/m a čím vyšší je konstanta pružnosti, tím je nosník kratší a tlustší a má i vyšší rezonanční frekvenci. Čím vyšší je rezonanční frekvence nosníku, tím méně se na něj přenášejí vnější vibrace z budovy, stolu nebo hluku [37]. Krátké a tenké nosníky jsou měkké, mají vysokou citlivost a rezonanční frekvenci. Nejmenší vyrobené nosníky jsou 10 μ m dlouhé, 0,1–0,3 μ m vysoké a 3–5 μ m široké. Jejich velikost už je téměř nemožné zmenšit, protože je obtížné vyrobit malé hroty a zaměřit laserový paprsek na tak malou plochu [40].

Modifikace hrotu

Běžně jsou používány hroty, které jsou vyrobeny z křemíku nebo nitridu křemíku [41]. Komerčně dostupné hroty bývají vyrobeny bez důkladné kontroly chemického složení a jsou často náchylné k náhodné kontaminaci. Mohou obsahovat nečistoty, jako je prach nebo organické látky. Pro jejich odstranění a zabránění kontaminaci zkoumaného vzorku se doporučuje provést krok čištění v UV nebo ozonové komoře. Hydrofilní povaha nemodifikovaných hrotů zvyšuje silné interakce s měkkými hydrofilními biologickými materiály a může být pro povrch vzorku destruktivní. Roste nástup chemicky a biochemicky modifikovaných hrotů, které rozšiřují pole AFM experimentů. Jednou z nejjednodušších úprav hrotu je kompletní oxidace celého povrchu pomocí UV záření v atmosféře bohaté na ozon či vystavení kyslíkové plazmě. Povrch tak bude obsahovat Si -OH funkční skupiny, které však způsobují snadnou kontaminaci kvůli vysoké povrchové volné energii [42]. Nejběžnější metodou modifikace hrotu je imobilizace molekul alkylthiolu na pozlacený hrot. Výhodou je snadná příprava a široká škála možných funkčních skupin. Dále se využívají alkylsilany k úpravě křemíkových nebo silikátových AFM hrotů. Vzniklé monovrstvy vykazují stabilitu vůči mechanickému a chemickému namáhání a není nutné pokovování hrotu. Vysokou odolnost vůči mechanickému poškození vykazují rovněž hroty z uhlíkových nanotrubic (CNT) [43]. Dále bývá využíván oxid křemičitý ve formě kuličky, která je přidělána na konec nosníku. Tím se zvětší poloměr hrotu, takže působí nedestruktivně, avšak neposkytuje příliš vysoké rozlišení [42].

Kalibrace a výpočet konstanty pružnosti k

Vazebná energie pro iontově vázané vzorky je menší než 10 eV a pro krystaly organických sloučenin, je vazebná energie 10 MeV. Odpudivé síly působí ve vzdálenosti 0,02 nm. Lze tedy použít rovnici

$$F = -\Delta U \Delta x, \quad (1)$$

kde F definuje sílu vyvíjenou hrotem, ΔU vazebnou energii a Δx vzdálenost působení odpudivých sil. Pro iontově vázané vzorky by síla vyšla 10^{-7} N a pro krystaly organických sloučenin 10^{-11} N. Nosníky, které jsou používány pro měkké biologické vzorky, mají konstanty pružnosti v rozmezí od 0,0006–2 N/m, což pomáhá minimalizovat síly aplikované na vzorek [24].

Výrobci udávají hodnoty konstanty pružnosti, které se však od reality často liší. Prvním důvodem může být neznámá výška nosníku, jelikož nejsou homogenní po celé délce. U nitridu křemíku není známá výška vrstvy oxidu, a potažmo ani vrstva zlata, která se někdy přidává pro zvýšení odrazu a chemické odolnosti. Zvýšením hmotnosti nosníku se zvyšuje i rezonanční frekvence a je ovlivněna konstanta pružnosti. Je tedy nutné konstantu pružnosti před každým měřením experimentálně stanovit [44]. Konstanty pružnosti jsou obecně vypočteny z geometrie nosníku a nejsou experimentálně změřeny. Výpočet pro konstantu pružnosti nezávisí na hmotnosti nosníku, přičemž rezonanční frekvence ano. Pro nosníky ve tvaru písmene V lze konstantu pružnosti vypočítat následovně

$$k = \frac{E \cdot w}{4} \left(\frac{t}{l}\right)^3. \quad (2)$$

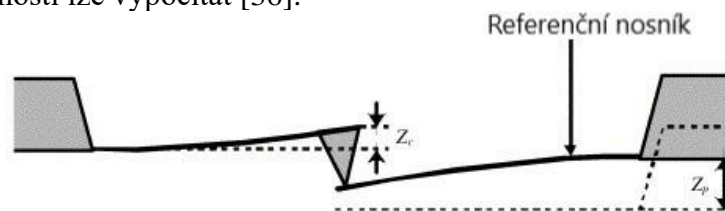
Přičemž E je Youngův modul pružnosti, w je šířka nosníku, t je tloušťka a l je jeho délka [44]. Pro výpočet rezonanční frekvence se uvádí vztah

$$f = \frac{(1,8751)^2}{2\pi} \cdot \frac{t}{l^2} \sqrt{\frac{E}{12\rho}}, \quad (3)$$

kde ρ je hustota materiálu nosníku. Rovnice platí pro pravoúhlé nosníky. Vysoká rezonanční frekvence nosníku by měla mít vliv na rychlejší skenování. Vypočtená hodnota konstanty pružnosti, nebo hodnota daná kalibrací, se od hodnoty uvedené výrobcí většinou liší v rozmezí od 10 do 20 %. Pro měření s různými nosníky se používá kalibrace referenčního nosníku a poté pomocí něj zkalibrovat ostatní nosníky (obrázek 5). Jeden z nosníků bývá připevněn na piezoelektrický translátor. Konstanta pružnosti je dána následujícím vztahem (4), kdy k_{ref} je pružinová konstanta nosníku, Z_c je průhyb nosníku a Z_p je poloha piezoelektrického translátoru.

$$k_c = k_{ref} \frac{Z_p - Z_c}{Z_c} = k_{ref} \frac{1 - Z_c/Z_p}{Z_c/Z_p} \quad (4)$$

Jako referenční nosníky se využívají mikroskopické nebo makroskopické nosníky, kde konstantu pružnosti lze vypočítat [36].



Obrázek 5: Schéma výpočtu nosníku pomocí zatlačení do referenčního nosníku a měření vychýlení Z_c a Z_p [45]

Velice používanou metodou pro kalibraci konstanty a výpočet rezonanční frekvence je přidání známé hmoty na konec hrotu, v podobě kuličky ze zlata nebo wolframu. Není nutné použití lepidla, jelikož adheze je dostatečně silná a nedestruktivní [46]. Hmotnost kuličky je vypočtena pomocí optické nebo elektronové mikroskopie, kdy je zjištěn její poloměr. Metoda může být destruktivní, ale není potřeba znát hmotnost nosníku.

Metoda, kterou navrhli Hutter a Bechhofer je analýza tepelného šumu [47]. Je to rychlá metoda, která se používá i pro měření v kapalině a probíhá prostřednictvím softwarové analýzy. Je široce využívána, avšak závisí na konkrétním tvaru nosníku. Dále je třeba počítat s různými druhy vibrací. Metoda je založena na měření volných tepelných fluktuací nosníku a je vhodná pro měkké nosníky, které mají konstantu pružnosti menší než 0,05 N/m, jelikož je amplituda kmitu malá.

2.2.5 Nanoindentace

Nanoindentace je metoda, která měří mechanické vlastnosti materiálu vtlačováním hrotu do měřeného materiálu v řádech nm– μ m. Původně byla vyvinuta pro zkoumání anorganických materiálů (různé kovy a keramika) a měření jejich tvrdosti a pružnosti. Umožňuje měřit velmi tenké vrstvy, přičemž je nutné malé zatížení.

Během indentace se analyzuje aplikované zatížení a hloubka vtisku hrotu do vzorku. Získané nanoindentační křivky (síla-vzdálenost) slouží k výpočtu tvrdosti a modulu pružnosti vzorku [24]. Metoda sleduje také tečení (*creep*), fázový přechod a trhliny. Pro zkoumání tvrdých vzorků se využívají ostré hroty, naopak pro měkké materiály, jako jsou polymery nebo biologické vzorky, jsou vhodné sférické indentory, které jsou tupé. Nanoindentační nástroj se od AFM zobrazování liší tím, že je hrot značně zatížen, aby pronikl skrz povrch, přičemž režim AFM je nedestruktivní. Lze zakoupit AFM nástavec jako doplněk k nanoindentačnímu zařízení, který poskytuje lepší rozlišení a lze sledovat povrch vzorku před a během skenování [48].

2.2.6 Hertzův model

Jednou z hlavních mechanických vlastností a charakteristickou veličinou pro daný materiál je Youngův modul pružnosti. Lze jej definovat jako poměr napětí a jím vyvolané deformace.

Pro stanovení modulu pružnosti se nejčastěji využívá Hertzův model. Je dán vztahem

$$F = \frac{4E}{3(1-\nu^2)} \sqrt{R}(D)^{3/2}, \quad (5)$$

kde E je Youngův modul, R je kontaktní poloměr, F je síla, ν je Poissonovo číslo a D je vzdálenost mezi hrotem a povrchem vzorku [49]. Hertzův model předpokládá, že materiál je elastický a homogenní, což je velká překážka pro měření polymerů a biologických materiálů. Dále nepočítá s přesným tvarem hrotu a aproximuje jej na tvar kuželovitý. Hloubka vtisku je určována nepřímo pomocí AFM měření, tudíž bývají malé vtisky zatíženy velkými chybami díky kolísání hrotu, tepelné fluktuaci a šumu. Tyto okolnosti ovlivňují hodnotu Youngova modulu a je složité jej přesně určit [50].

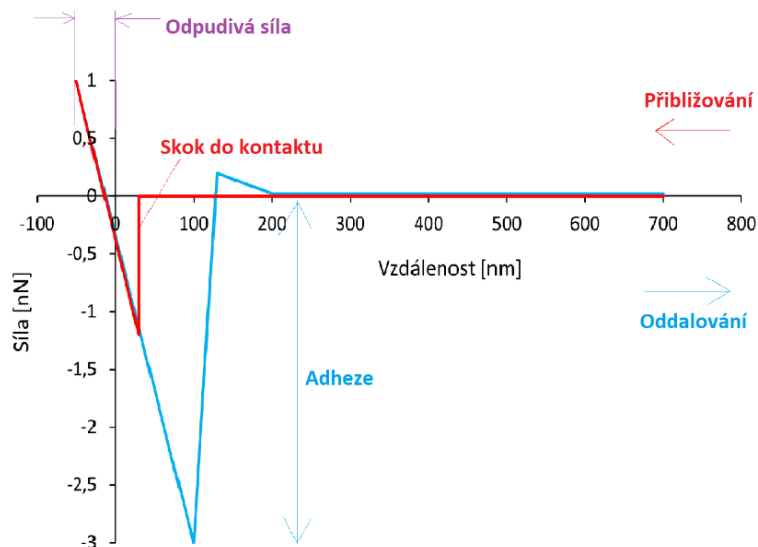
2.2.7 Analýza silových křivek

Mikroskopie atomárních sil umožňuje zobrazovat nejen povrch vzorků ve vysokém rozlišení, ale také dokáže měřit křivky síly jako funkce vzdálenosti, které poskytují informace o vlastnostech materiálu, jako je například adheze, hustota povrchového náboje, tvrdost, elasticita, dokonce i interakce mezi částicemi. Sílu mezi hrotem a vzorkem lze využít pro získání vlastností jak vzorku, tak média okolo něj. Při měření síly se hrot pohybuje směrem ke vzorku a poloha hrotu a prohnutí nosníku jsou převedeny na křivky síla-vzdálenost ($F=F(r)$), neboli silové křivky.

Obecně lze křivku síla-vzdálenost rozdělit na tři části: pohyb směrem ke vzorku, kontakt se vzorkem a oddálení od povrchu vzorku. První část křivky poskytuje informace o odpuzivých a přitažlivých silách mezi hrotem a povrchem vzorku (např. elektrostatické, van der Waalsovy síly). Druhá část křivky odpovídá kontaktnímu režimu, kdy se hrot dotýká vzorku a poskytuje informace o mechanických vlastnostech vzorku, jako je Youngův modul, relaxační čas a viskozita buněk či hydrogelů. Poslední část křivky, která zahrnuje oddálení hrotu od vzorku poskytuje informace o adhezních nebo lomových silách a rozbalování polymerů (obrázek 6).

Při přiblížení hrotu ke vzorku se nosník vychýlí ze své původní polohy. Při vzdálenosti větší než 10 nm mezi hrotem a povrchem vzorku převládají elektrostatické a hydrofobní

interakce a nosník je ohýbán směrem ke vzorku. Jakmile je vzdálenost mezi hrotem a vzorkem menší než 10 nm, působí převážně van der Waalsovy síly. Pokud jsou přitažlivé síly větší než konstanta pružnosti nosníku, dojde k rychlému kontaktu hrotu se vzorkem, kde jej drží adhezní a kapilární síly. Kapilární síly jsou důležité při měření sil ve vzduchu, jelikož mohou být větší než intramolekulární síly [51].



Obrázek 6: Křivka síla-vzdálenost ($F-d$) [52]

Pro získání přesných křivek síla-vzdálenost je nutné použít kalibrované nosníky o známé konstantě pružnosti k . Síla, která působí na nosník je dána vztahem

$$F = -kz, \quad (6)$$

kde k je konstanta pružnosti nosníku a z je průhyb nosníku ve směru kolmo ke vzorku. Drsnost povrchu vzorku nebo hrotu je problémem pro interpretaci silokřivek [34]. U deformovatelných povrchů může být přítomnost povrchových sil problém, protože mohou vést k výrazné deformaci ještě předtím, než dojde ke kontaktu. Je prakticky nemožné přesně určit, kdy dochází ke kontaktu hrotu s povrchem vzorku. Pro lepší zobrazení měkkých biologických vzorků je potřeba co nejmenší síla mezi hrotem a povrchem vzorků. První pokusy o snížení sil byly již v roce 1989, kdy Weisenhornem a spol. [51] zjistili, že zobrazování vzorků v kapalině tyto interakce výrazně snižuje.

2.3 Problémy při měření hydrogelů pomocí AFM

Při měření hydrogelů pomocí AFM se může vyskytnout několik problémů, kterým je potřeba zabránit. Vzorky musí být co nejvíce připevněny k podkladu, aniž by byla porušena jejich struktura, jelikož může být podstavec mírně nakloněný a mohlo by dojít k posunu vzorku. Jako podklad nejlépe slouží materiál, který je chemicky čistý s hladkým povrchem. Nejvhodnější materiál je slída s atomárně rovným povrchem, který je snadné nalámat a díky cenové dostupnosti jde o nejvíce používaný materiál. Druhým nejběžnějším materiálem je sklo, které není tak hladké, ale lze jej využít pro sledování větších vzorků [53].

Jedním z nejdůležitějších kroků měření je výběr nosníku s hrotem a s vhodnou konstantou pružnosti k a rezonanční frekvencí f_0 . Při příliš vysoké hodnotě konstanty pružnosti by mohlo dojít k poškození vzorku. Při měření kolagenových a polyakrylamidových gelů Gimenez

a spol. [54] použili nosníky s konstantou pružnosti v rozmezí 0,01–0,1 N/m. Podle zkušeností byly pro nejměkčí vzorky využity konstanty pružnosti s nejnižší hodnotou. I když její hodnota bývá uvedena výrobcem, je vhodné ji změřit před každým experimentem (jedná se o tzv. kalibraci nosníku). Zouheir Drira a spol. [55] měřili konstantu pružnosti nosníku na tvrdém a čistém slídovém povrchu metodou tepelné fluktuace na různých místech. Následně použili průměrnou hodnotu takto stanovené konstanty pružnosti. V průběhu měření může hrot ztratit svoji původní ostrost a geometrii, což vede k další ztrátě přesnosti měření.

Dalším důležitým parametrem je heterogenita hydrogelů. Pro správné vyhodnocení jak mechanických, tak elastických vlastností je vhodné měřit vzorek na více místech a naměřené hodnoty zprůměrovat.

Dalším zdrojem chyb jsou interakce povrchu hrotu se vzorkem, kdy se v nanoměřítku stávají van der Waalsovy síly výraznější, což může vést k adhezi mezi povrchem vzorku a hrotem. Chyby mohou nastat i při nanoindentaci. Pro měkké vzorky je vhodné použít Oliver–Pharr model, což je analytický model popisující základní vlastnosti materiálu (Youngův modul pružnosti a tvrdost) a také chemicky modifikovat materiál hrotu [56].

Síly, které mohou za vychýlení nosníku, jsou elektrostatické a van der Waalsovy síly mezi povrchem vzorku a hrotem. Někdy však mohou působit i jiné síly, například kapilární, které se vyskytují na povrchu vzorku při kondenzaci vody a komplikují měření. Měkké vzorky by proto měly být zobrazeny v tekutém prostředí, jako je roztok pufru nebo voda, přičemž se kapilární síly snižují a lze měkké vzorky lépe měřit [57].

2.3.1 Nevýhody AFM

Měření hydrogelů pomocí mikroskopie atomárních sil má určité nevýhody. Vysoký obsah vody může vést k problémům v dimenzování sítě a může dojít k poškození vzorku při použití kontaktního módu. Měření se získá nedostatek chemických informací, což ale lze získat použitím doplňkové SFG mikroskopie (*sum frequency generation spectroscopy*), která poskytuje chemické informace o povrchu zkoumaného vzorku, jeho složení, případně posouzení dehydratace na povrchu vzorku [58]. Rozsah AFM skenerů je omezen i vertikálně, tudíž zakřivené vzorky nelze měřit. Pro měření s vysokým rozlišením je důležité mít připravené ploché a čisté vzorky.

2.3.2 Výhody AFM

Jednou z hlavních výhod AFM je snadná příprava vzorku. Je to velký přínos pro zobrazování biologických vzorků, které mohou být měřeny ve fyziologickém roztoku. Měření se může provádět ve vodě, vzduchu i ve vakuu a není potřeba speciální příprava vzorku ani určité rozmezí teplot. Měření ve vodném prostředí je přínosné pro zkoumání biologických materiálů, kdy může probíhat za téměř fyziologických podmínek [57]. Mikroskopie atomárních sil poskytuje trojrozměrné topografické informace, kdy dokáže poskytovat vysoké vertikální rozlišení, i mechanické vlastnosti nebo adhezi. K pozorování není nutný vodivý vzorek. Pro měření je důležité, aby byl vzorek hladký pouze v měřítku s poloměrem zakřivení hrotu. Povrch měkkých materiálů lze vyhladit odebráním hladké šablony. Například, když je polymer nataven na slídu nebo křemíkovou destičku, po ochlazení a před experimentem se šablona sloupne a hladký povrch polymeru může být měřen. AFM je jedinou příležitostí,

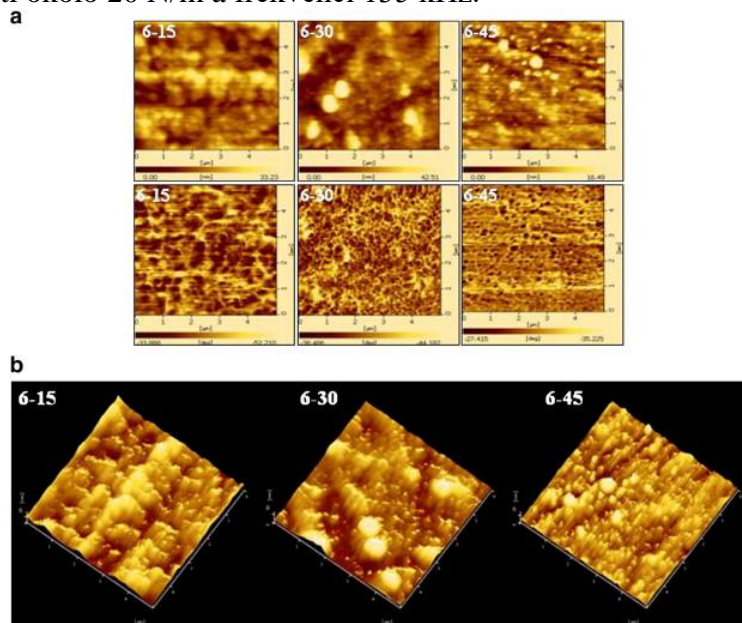
jak sledovat povrch materiálu nebo buněk, jejich morfologii, nanomechanické vlastnosti, reakce na okolí a interakce s prostředím.

Potenciál AFM není jen v zobrazování povrchu vzorků, ale dokáže zaznamenat síly již od 10 pN. V režimu silové spektroskopie dokáže zaznamenat křivky síla-vzdálenost, kdy je síla vykreslena jako funkce vzdálenosti mezi hrotem a vzorkem. Tyto křivky mohou být skrze různé fyzikální modely přepočteny na nanomechanické a nanoadhezivní vlastnosti daného materiálu. Také jsou ve světě čím dál více používány hroty, které jsou opatřeny živými buňkami a biomolekulami, což otevírá nové cesty ke zkoumání interakcí mezi těmito vylepšenými hroty a buněčnými povrchy. Stále více článků se zabývá zkoumáním účinků léků na buňky pomocí AFM [59].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

3.1 Topografická heterogenita v PVA hydrogelech studovaná pomocí AFM

V této studii Ashit Kuman Pramanick a spol. [60] studovali hydrogely na bázi polyvinylalkoholu syntetizované metodou zmrazování a rozmrazování pomocí bezkontaktní AFM. Byl pozorován vliv zpracování na výslednou topografii. Roztoky byly připraveny rozpuštěním vhodného množství PVA v destilované vodě při 80 °C, aby se získaly roztoky s koncentracemi 6 %, 10 % a 14 %. Poté byly nality do forem o průměru 18 cm a tloušťce 1,5 cm a následně byly zmrazovány po dobu 8 hodin při 0 °C a rozmrazovány 16 hodin při teplotě 37 ± 2 °C. Vzorky byly vystaveny 15, 30 a 45 cyklům zmrazování a rozmrazování. Byly získány fyzikálně síťované PVA hydrogelové filmy o tloušťce 1–1,5 mm. Část vzorku ve středu filmu byla vyříznuta a přilepena na slídovou fólii pomocí dvojité pásky. Byl použit bezkontaktní režim NC-AFM a použitý hrot byl z nitridu křemíku na nosníku SI-DF20 s konstantou tuhosti okolo 20 N/m a frekvencí 135 kHz.



Obrázek 7: a) AFM snímky 6 % PVA hydrogelů, po 15, 30 a 40 cyklech zmrazení – rozmrazení, b) Trojrozměrné snímky 6 % PVA hydrogelů po 15,30, a 40 cyklech zmrazení – rozmrazení [60]

U 6 % PVA hydrogelu byl pozorován viditelný účinek cyklů, jelikož docházelo ke strukturálnímu přeskupení v polymerních řetězcích. U hydrogelu, který byl vystaven 45 cyklům zmrazení a rozmrazení, je pozorováno značné snížení počtu tmavých amorfních oblastí, tudíž byla zvýšena krystalinita. Z binárních snímků a pomocí softwaru pro analýzu obrazu (*Image J*) byl vypočten objemový zlomek krystalitů v 6 % hydrogelu. Bylo zjištěno, že největší podíl je u hydrogelu se 45 cykly zmrazení a rozmrazení, menší je u hydrogelu s 15 cykly a nejmenší počet krystalických oblastí se nachází u hydrogelu se 30 cykly zmrazení a rozmrazení [60].

Řady podlouhlých krystalů, které jsou uspořádány vedle sebe, lze sledovat u 10 % PVA hydrogelu po 45 cyklech zmrazení, kdy dochází v hydrogelu k samosestavení a formování struktury. Hydrogel po 15 cyklech zmrazení vykazoval největší drsnost a to 85 nm. Evidentně se opakovaním zmrazení a rozmrazení přeskupují polymerní řetězce a povrch se stává

hladším. 14 % PVA hydrogel po 45 cyklech rozmrazení vykazoval maximální velikost krystalitů a viditelné póry o velikosti 200–250 nm (obrázek 7) [60].

3.2 Mechanické vlastnosti PEG hydrogelů

Zouheir Drira a spol. [55] měřili mechanické vlastnosti polyethylenglykolových hydrogelů, jako je modul pružnosti, tuhost a vliv molekulové hmotnosti monomeru, koncentrace iniciátoru a rychlost dehydratace na mechanickou pevnost. Polyethylenglykol je rozpustný ve vodě a díky své biokompatibilitě a netoxicitě má uplatnění v medicínských a biologických oblastech. Mechanické vlastnosti PEG hydrogelů lze upravit na základě délky polymerního řetězce a zesílení. Vzorky hydrogelu polyethylenglykol diakrylátu (PEG-DA) byly připraveny dvoustupňovým procesem popsáným v dřívější studii [54]. 2 ml polymerního prekurzoru byly smíchány s 10 μ l 0,5 % fotoiniciátoru (Darocuru 1173) a vortexovány 20 sekund. Postup byl opakován s 1 % a 1,5 % iniciátory. Byla provedena fotopolymerace v UV komoře při vlnové délce 360 nm a byly získány vzorky PEG-DA obdélníkového tvaru o tloušťce 1,5 mm. Obsah vody ve vzorku byl stanoven zvážením hydratované a vysušené formy. Při měření byly použity dva různé nosníky s odlišnými konstantami pružnosti k , které byly měřeny na tvrdém a čistém slídovém povrchu metodou tepelné fluktuace. První se pohybovala v rozmezí od 30 do 40 N/m a druhá od 15 do 27 N/m (PPP-ZEIHR). Byly zkoumány hydrogely se třemi různými molekulovými hmotnostmi monomeru (258, 575 a 700 Da) a iniciátory. Pro zjištění mechanických vlastností v hydratovaném stavu byl použit PEG-DA o molekulové hmotnosti 575 Da s 1 % iniciátorem. Vzorky byly měřeny pomocí bezkontaktního módu, který nepoškozoval hrot ani vzorek. Pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM) byl hrot zkoumán před i po měření. Fotoiniciátor v kombinaci s UV zářením vytváří volné radikály, což vede ke tvorbě vysoce zesíťovaných sítí různých tvarů a délek. Bylo zjištěno, že koncentrace iniciátoru ovlivňuje stupeň síťování polymerů a mění se tak jeho fyzikální i chemické vlastnosti [55].

Míra hydratace znatelně ovlivňuje mechanické vlastnosti PEG-DA, což vede k nižším hodnotám modulu pružnosti a tuhosti v porovnání s vysušenými hydrogely. Byly zkoumány částečně hydratované vzorky s molekulovou hmotností 575 Da a s obsahem vody 63 % a 86 %. Po fotopolymerizaci byly vzorky promývány vodou 8–10 minut. Před měřením byly vzorky vysušeny mírným proudem vzduchu, aby se zabránilo hydrostatické přitažlivosti mezi hrotem a povrchem vzorku. U vzorku s molekulovou hmotností 575 Da a obsahem vody 63 % byl modul pružnosti vypočten na $4,33 \pm 0,28$ MPa a tuhost $2,48 \pm 0,27$ N/m. S 86 % obsahem vody klesl modul pružnosti na $2,85 \pm 0,35$ MPa a tuhost se zvýšila na $4,32 \pm 0,12$ N/m.

Hydrogel s vysokým obsahem vody (téměř 100 %) byl měřen přímo pod vodou. V kapalině nemohl být použit měkký nosník, jelikož interakce sil i stupeň přilnavosti byl výrazný. Data byla získávána pouze s vysokým zatížením a použitím tuhého nosníku.

Jejich průzkum ukázal, že vzorky měly ploché povrchy s drsností ± 4 nm na ploše velké 20–50 μ m. Při větším obsahu vody ve vzorcích klesal modul pružnosti, zatímco tuhost rostla. S přidáním síťovacího činidla rostla jak hodnota modulu pružnosti, tak i tuhost. U hydrogelů s vyšší molekulovou hmotností byl sledován vyšší modul pružnosti. Modul pružnosti hydrogelu se v suchém stavu pohyboval v rozmezí 2 až 5 MPa, v plně hydratovaném stavu pak činil 1 MPa [55].

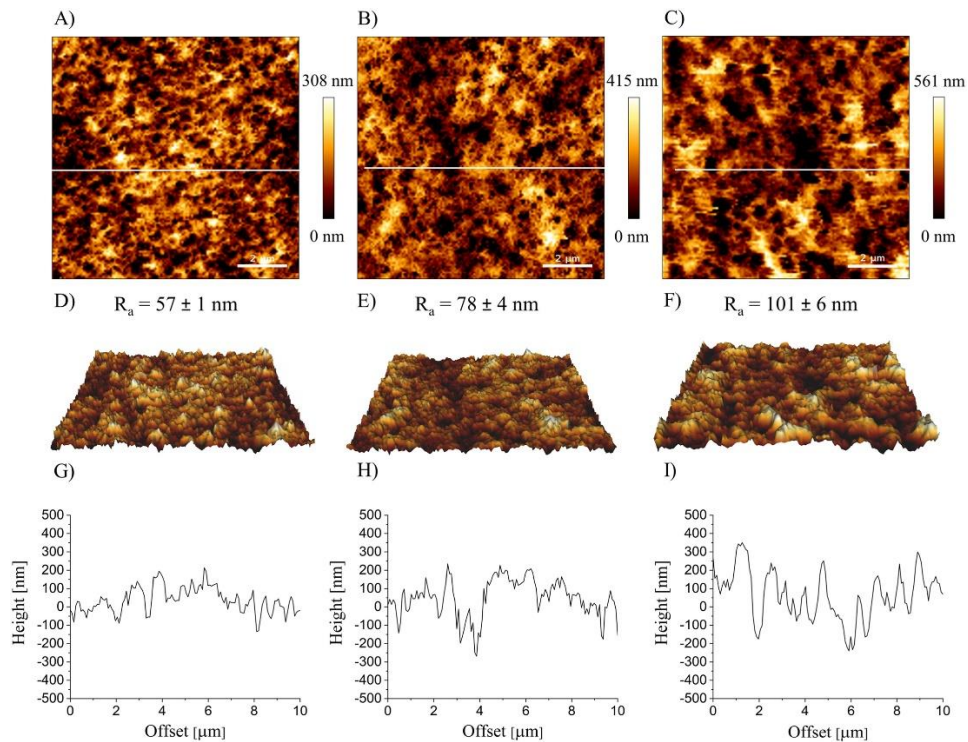
3.3 Topografie alginátových hydrogelů pomocí mikroskopie atomárních sil

Alginát je lineární polysacharid obsahující dvě složky – α -L-guluronát (G) a β -D-manurát (M) spojené β -1,4-glykosidovou vazbou. G bloky jsou zodpovědné za iontové zesílení s vápenatými ionty. Alginátový hydrogel je vhodný pro použití v buněčné terapii a ve tkáňovém inženýrství, jelikož iontové zesílení alginátu je téměř nezávislé jak na teplotě, tak i na pH nad 4. Algináty neinteragují s buňkami, jsou netoxické a s vícemocnými ionty tvoří hydrogely. Mechanické vlastnosti závisí na hustotě síťování a jsou ovlivněny jak koncentrací alginátu, tak koncentrací síťujících iontů. V této studii Anita Solbu a spol. [61] zkoumali pomocí AFM neznámou topografii a modul pružnosti Ca^{2+} – alginátových hydrogelů v hydratovaném stavu.

Hydrogel alginátu sodného s vápenatými ionty byl připraven vnitřní gelací smícháním alginátu, uhličitanu vápenatého a pomalu hydrolyzující kyseliny glukonové. Veškeré hydrogely byly připraveny v citrátovém pufru o pH 7,4 složeného z 14 mM citrátu sodného, 56 mM fruktózy, 25 mM činidla HEPES a 70 mM NaCl.

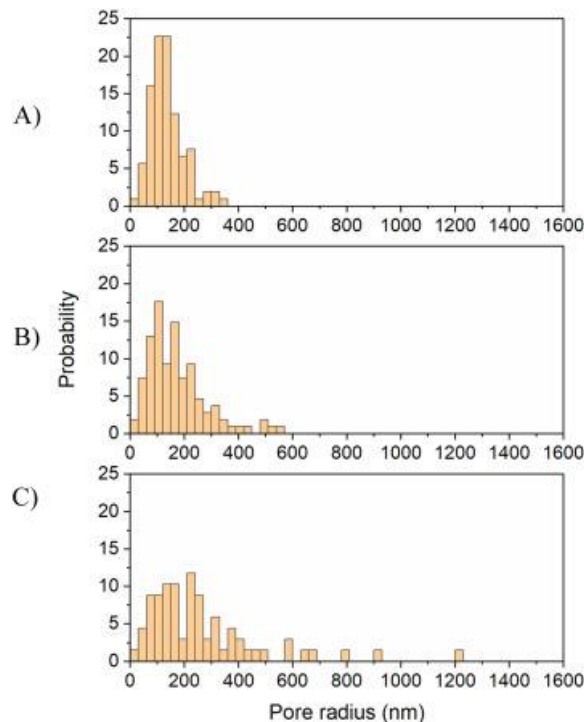
Alginátové hydrogely byly nality na Petriho misku o rozměrech 35×10 mm a zakryty, aby se do měření nevysušily (asi 20 hodin). Těsně před měřením byly na povrch hydrogelu přidány kapky vody. Během měření nebylo pozorováno botnění hydrogelu, ani synerize, takže objem zůstal pořád stejný. Vzorky nebyly podrobeny žádnou úpravou a byly zkoumány v hydratovaném stavu.

Pro zobrazení povrchu hydrogelů byl používán QI (kvantitativní zobrazování) režim, který je vhodný pro měkké vzorky, jelikož doba interakce hrotu se vzorkem je krátká, byly nastavené nízké hodnoty síly (*Setpoint*) a neobjevovaly se boční pohyby hrotu, jelikož nosník se pohybuje nahoru a dolů a většinu času je nosník v tomto režimu nad vzorkem. Rychlost skenování byla $35 \mu\text{m/s}$ a velikost skenu činila $10 \times 10 \mu\text{m}$. Byl použit nosník CB-2qp-BioAC-CI, který je určen pro měření měkkých a biologických vzorků s poloměrem hrotu 30 nm, rezonanční frekvencí okolo 50 kHz a nominální konstantou pružnosti 0,072 N/m. Větší poloměr hrotu zabraňuje nosníku přílišnému zaboření do měkkých vzorků. Doba měření se lišila v závislosti na měkkosti vzorku. U měkčích vzorků měření trvalo déle, jelikož docházelo k vyššímu šumu [61].



Obrázek 8: Zobrazení výšky alginátových hydrogelů (A-C), Relativní drsnost (R_a) různě koncentrovaných gelů (D-F), povrchový profil hydrogelů (G-I), hydrogely s různými koncentracemi alginátu a vápníku: 2,0 % (w/v) alginát a 22 mM CaCO_3 (A,D,G), 1,0 % alginát a 18 mM CaCO_3 (B,E,H) a 0,5 % (w/v) alginátu a 15 mM CaCO_3 (C,F,I) [61]

První část byla zaměřena na zobrazení měkkých hydrogelů alginátu a vliv změny koncentrace na topografii. 3D snímky zobrazují relativní drsnost a profil povrchu alginátových gelů s různými koncentracemi alginátu a vápníku. Střední hodnota drsnosti pro 0,5 % (w/v) alginát byla vyhodnocena pomocí softwaru na $R_a = 57 \pm 1$ nm, pro 1,0 % $R_a = 78 \pm 4$ nm a pro 2,0 % alginát $R_a = 101 \pm 6$ nm. Z čehož vyplývá, že se zvyšující koncentrací alginátu dochází ke snižování drsnosti povrchu, což lze pozorovat na snímcích povrchových profilů (obrázek 8).



Obrázek 9: Distribuce velikosti pórů hydrogelu alginátu vápenatého pro koncentrace: 2,0 % alginát a 22 mM CaCO₃ (A), 1,0 % alginát a 18 mM CaCO₃ (B) a 0,5 % alginát a 15 mM CaCO₃ (C) [61]

Byly sledovány distribuce velikosti pórů různě koncentrovaných alginátových hydrogelů. Rozsah velikostí pórů se zvyšoval s klesající koncentrací alginátu. Pro 2,0 % alginát byla průměrná velikost pórů vypočtena na 136 ± 62 nm, pro 1,0 % alginát 172 ± 110 nm a pro 0,5 % alginát 265 ± 213 nm. Největší poloměr pórů byl 1230 nm u 0,5 % alginátu (obrázek 9).

3.4 Siloxan-hydrogelové kontaktní čočky

Výrobci kontaktních čoček se snaží získat materiály s nízkými hodnotami modulu pružnosti, dostačující propustností pro kyslík a s dobrou úrovní smáčivosti. Clara Abadías a spol. [62] se ve studii zaměřili na získání topografických a mechanických vlastností siloxan-hydrogelových měkkých čoček. Čočky byly ze dvou různých materiálů – asmoofilcon A dostupný od PremiO (P) a Lotrafilcon B dostupný od Air Optics (AO). PremiO čočky byly používány po dobu 15 dnů, zatímco Air Optix byly používány po dobu 30 dní a maximálně 6 hodin denně. Vzorky byly opláchnuty vodou, byl vyříznut malý kousek střední části a upevněn lepidlem na čistou teflonovou podložku na magnetickou desku. Na vzorek byly před pozorováním dány 3–4 kapky 0,9 % roztoku NaCl a před zobrazením promíchány. Byl použit režim PeakForce pro získání nanomechanických vlastností, jako je adheze nebo Youngův modul. Byly používány hroty z nitridu křemíku s nízkou konstantou pružnosti o hodnotě 0,1–1 N/m s rezonanční frekvencí od 2 do 20 kHz. Místnost byla udržována při teplotě 20 °C a 50 % vlhkosti. Pomocí metody tepelného šumu a slídového povrchu byla získána přesná hodnota konstanty pružnosti a následná kvantitativní hodnota Youngova modulu. Pro topografické analýzy byly použity 3 parametry – střední drsnost, šikmost a špičatost. Tyto 3 parametry byly vyšší pro neopotřebované čočky, kdežto modul pružnosti

a adheze byly nižší. Střední drsnost byla u AO čoček nižší než u P čoček, které byly také méně pohodlné [62].

3.5 Studování povrchu kontaktních čoček na bázi pHEMA

Ve studii Seong Han Kim a spol. [58] studovali dva typy povrchů měkkých kontaktních čoček – neutrální a iontové hydrogely pomocí AFM. Byla měřena topografie, tření, adheze a modul pružnosti hydrogelových kontaktních čoček pomocí mikroskopie atomárních sil (Autoprobe M5, ThermoMicroscopes, CA). Byly měřeny v kontaktním režimu pomocí dvou různých nosníků. Jeden byl z nitridu křemíku ve tvaru V se zakřivením hrotu 50 nm a konstantou pružnosti 0,03 a 0,5 N/m. Na druhém nosníku z nitridu křemíku ve tvaru V byla připevněna polystyrenová kulička s konstantou pružnosti 0,38 N/m. Průměr polystyrenové kuličky byl změřen pomocí skenovacího elektronového mikroskopu a byl vypočten na 2,03 μm .

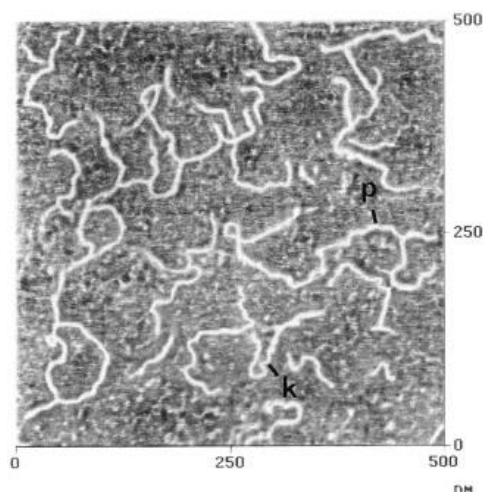
Kontaktní čočky byly vyrobeny buď z homopolymeru 2-hydroxyethylmethakrylátu (pHEMA), nebo z kopolymeru 2-hydroxyethylmethakrylátu a kyseliny methakrylové p(HEMA + MA). Jako síťovací činidlo byl použit ethylenglykol dimethacrylát. Čočky nabotnaly ve fyziologickém roztoku 0,15 M NaCl pufovaném na pH = 7. Čočka pHEMA obsahovala 38 % vody a čočka pHEMA + MA 55 % vody. Před měřením byly všechny čočky omyty fyziologickým roztokem a umístěny na polypropylenovou formu, která byla ponořena v solném roztoku.

Pomocí křivek síla-vzdálenost byl vypočten modul pružnosti a adheze povrchu. Předpokládali, že nedocházelo k deformaci polystyrenové kuličky a konstanta pružnosti činila 0,38 N/m. Modul pružnosti pro čočku pHEMA byl vypočten na $1,34 \pm 0,13$ MPa a pro čočku p(HEMA+MA) $0,47 \pm 0,04$ MPa. Byla sledována drsnost na ploše $10 \times 10 \mu\text{m}^2$, která pro čočku pHEMA činila 19 ± 3 nm a pro čočku p(HEMA+MA) 23 ± 5 nm [58].

3.6 Zobrazování alginátové matrice pomocí AFM

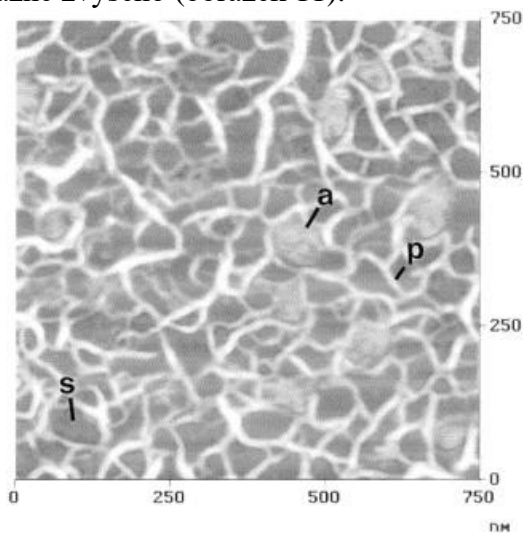
Alan W. Decho [63] studoval alginát jak ve stavu gelu, tak v solu. Snímky byly získávány prostřednictvím mikroskopie atomárních sil pomocí pokleповého režimu. Pro měření hydratovaných vzorků byl použit nosník dlouhý 200 μm a široký 20 μm s trojúhelníkovým hrotem, který byl umístěn do držáku (BioScope).

Pro pozorování jednotlivých molekul byly použity velmi zředěné koncentrace alginátu sodného 10^{-10} M, který byl rozpuštěn v destilované vodě. Na čerstvě rozštěpenou slídu bylo nanášeno 100 μl alginátu po dobu 5 s. Následně byl objem odstraněn pipetou a sušen na vzduchu v bezprachovém prostředí po dobu 1 hodiny.



Obrázek 10: Molekuly alginátu zobrazené pomocí AFM, náhlé zalomení (*k*) ve tvaru polymeru (*p*) [63]

Pro zobrazení alginátových hydrogelů byla použita uměle připravená mořská voda, která obsahovala ionty Ca^{2+} a Mg^{2+} . Alginát sodný byl rozpuštěn v deionizované vodě, čímž byl vytvořen 2 % roztok alginátu (obrázek 10). Vrstvy gelu, které byly větší než 40–50 μm , měly tendence na slídovém povrchu vykazovat nescifické vibrace, a přestože byly umístěny na stole, který tyto vibrace snižuje, nemohly být použity. Proto byly připraveny velmi tenké vrstvy tak, že na čistý slídový povrch byl koncentrovaný roztok alginátu sodného rozmazán a byl přidán 1 ml připravené mořské vody. Pomocí kationtů Ca^{2+} a Mg^{2+} v mořské vodě byl rozmazaný roztok přeměněn na tenkou vrstvu hydrogelu, byly sníženy nescifické vibrace a rozlišení snímků bylo výrazně zvýšeno (obrázek 11).



Obrázek 11: 2% alginátový hydrogel ponořen v mořské vodě [63]

Byla sledována síť dutin vytvořená rozpouštědlem a polymerní vlákna. Rozměry vláken se pohybovaly od 3,74 nm do 18,2 nm a průměr dutin byl stanoven od 22 nm do 58 nm. Jelikož jednotlivé polymerní molekuly mají rozměry 1–3 nm, bylo odhadováno, že polymerní vlákna se seskupily a vytvořily agregát. Takové uspořádání by mohlo vytvořit fyzikálně pevnější hydrogel [63].

3.7 Shrnutí poznatků z literární rešerše o dané problematice

Z literární rešerše je zřejmé, že mikroskopie atomárních sil je vhodnou metodou pro zobrazování povrchu různě síťovaných hydrogelů, i pro získávání jejich mechanických vlastností, jako je modul pružnosti, adheze a tuhost. Největší úsilí bude v experimentální části věnováno fyzikálně síťované agaróze, která ovšem není zmíněna v literární rešerši vzhledem k nedostatku odborných článků. Rešeršní kapitola je z velké části výhled, co by bylo možné realizovat v budoucnosti, jako například měření mechanických vlastností hydrogelů pomocí mikroskopie atomárních sil, potažmo modifikace hrotů.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část této bakalářské práce popisuje použité chemikálie, přípravu hydrogelů, nastavení a práci s mikroskopem atomárních sil JPK NanoWizard® 4 NanoScience, používané hroty a nastavení zobrazovacího režimu (*QITM Advanced Imaging*).

4.1 Použité chemikálie pro přípravu hydrogelů

Pro přípravu hydrogelů měřených pomocí mikroskopie atomárních sil, byly použity následující chemikálie.

- Agaróza (Sigma-Aldrich, CAS: 9012-36-6, číslo šarže: 05066-36-6, EEO: 0,23–0,27)
- Alginát sodný (Sigma-Aldrich, číslo šarže: W201502-1KG)
- Chlorid vápenatý bezvodý (Lach:ner, p.a., 1000 g)
- Demineralizovaná voda (Milli-Q)
- Destilovaná voda

4.2 Instrumentální vybavení

4.2.1 Používané přístroje

- Magnetická míchačka
- Vícemístná magnetická míchačka POLY 15 VARIOMAG®
- Teploměr
- Analytické váhy Ohaus Pioneer PA214CM
- Mikroskop atomárních sil JPK Nano Wizard® 4

Měření probíhalo pomocí mikroskopu atomárních sil JPK NanoWizard® 4 NanoScience od společnosti Bruker. Mikroskop je postaven na speciální podložce (*IsoPlate*) od společnosti Thorlabs, která odstraňuje okolní otřesy a vibrace a je uložen na místě, kde je snížena pravděpodobnost průvanu, akustických vjemů a dalších vlivů, které by mohly výrazně negativně ovlivnit měření.

4.2.2 Používané nosníky a hroty

Na základě studia literatury a dostupnosti spotřebního materiálu v podobě hrotů na FCH VUT, byly pro měření hydrogelových matric v nabotnaném stavu použity následující hroty a nosníky, které budou zmíněny níže. Účelem tohoto výběru bylo nalezení vhodné měřicí sondy, univerzální pro zobrazování povrchu hydrogelů.

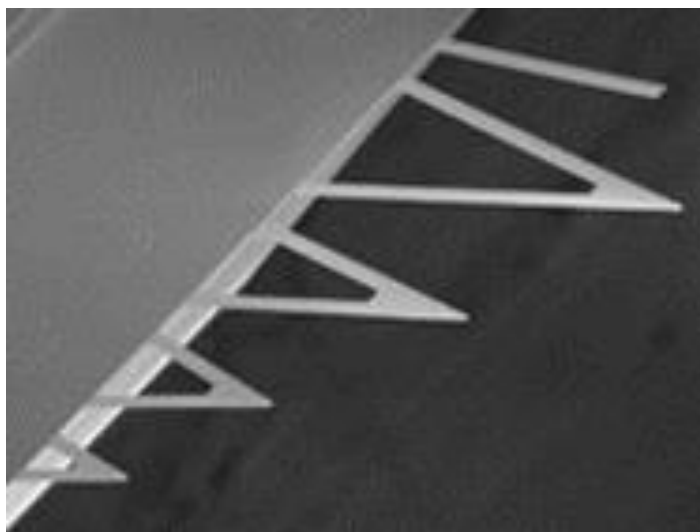
SNL-10

K měření byly použity zejména hroty SNL-10 (obrázek 4), které mají trojúhelníkový tvar a jsou univerzální pro měření jakéhokoliv vzorku v jakémkoliv médiu. Zadní strana nosníku je potažena zlatem. Konstanty pružnosti uváděné výrobcem se pohybují v intervalu od 0,03 N/m do 0,7 N/m. Rezonanční frekvence se pohybují od 12 kHz do 80 kHz a poloměr hrotu činí okolo 12 nm.

MLCT

Další hroty, které byly použity pro měření hydrogelových médií v nabotnaném stavu, jsou MLCT (obrázek 12). Každý čip obsahuje 6 nosníků, přičemž se jejich konstanty pružnosti

pohybují od 0,005 N/m do 1,2 N/m a rezonanční frekvence od 4 kHz do 160 kHz. Hroty mají trojúhelníkový tvar s poloměrem 20 nm až 60 nm a horní část nosníku je potažena vrstvou zlata. Hroty MLCT jsou ideální pro měření extrémně měkkých vzorků v kontaktním režimu a v kapalinách.



Obrázek 12: čip MLCT na jehož konci je 5 nosníků s hroty

FESP-V2

Dalším vyzkoušeným nosníkem byl FESP-V2, který má hrot s obdélníkovým tvarem a jeho poloměr se pohybuje kolem 10 nm. Konstanta pružnosti uváděna výrobcem činí 1–5 N/m a rezonanční frekvence 50–100 kHz. Tento nosník s hrotem je vhodný pro pokleповý režim a pro měření na vzduchu.

TESPA-V2

Nosník TESPA-V2 má konstantu pružnosti pohybující se od 19 do 55 N/m a rezonanční frekvenci od 270 do 370 kHz. Hrot je obdélníkového tvaru s poloměrem 7 nm. Tento nosník je vhodný pro pokleповý a bezkontaktní režim a jelikož je velmi tuhý, je vhodný spíše pro měření pevnějšího materiálu.

MLCT-SPH-1UM-DC

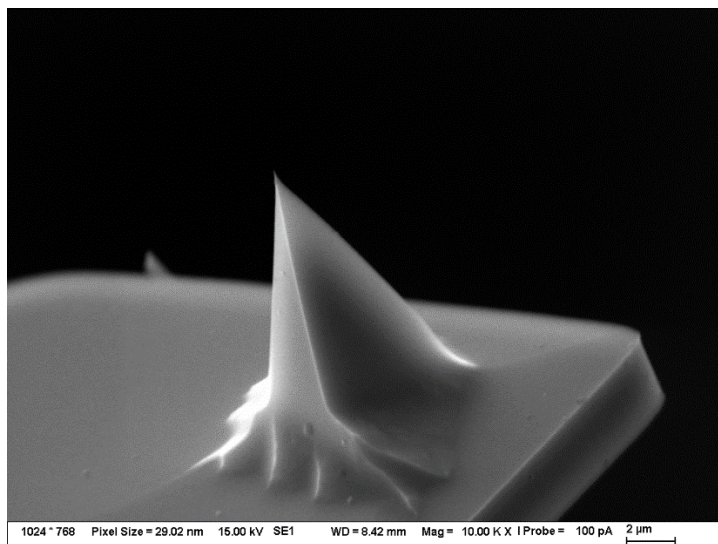
Posledními vyzkoušenými nosníky byly MLCT-SPH-1UM-DC, které nám byly doporučeny výrobcem, jakožto vhodné nosníky pro měření povrchu hydrogelů. Obsahují kulaté hroty s nízkou konstantou pružnosti pohybující se od 0,01 N/m do 0,5 N/m a s rezonanční frekvencí od 6 kHz do 85 kHz. Jsou určeny pro kvantitativní nanomechanické mapování živých buněk, tkání a hydrogelů, zejména ve vodě. Horní strana nosníku je pokryta reflexní vrstvou zlata.

4.3 Nastavení přístroje

Po zapnutí přístroje a programu JPK SMP Desktop byl vybrán vhodný nosník pro měření. Nosník byl pomocí pinzety umístěn a upevněn do držáku (*holder*). Následně byl držák vložen do hlavice mikroskopu, kde byl pootočen o 90° doleva a uzamknut. Zkoumaný vzorek byl umístěn na podstavec mikroskopu, kde se nacházejí svorky na jeho přidržení. Nakonec byla umístěna hlavice spolu s držákem a nosníkem nad zkoumaný vzorek.

V programu byl vybrán kvantitativní režim zobrazování (*QITM Advanced Imaging*). Jedním z nejdůležitějších kroků při měření je nastavení laserového paprsku tak, aby směřoval na nosník a vytvořil co nejvyšší odrazový signál dopadající na detektor. Laserový paprsek je ovládán horizontálně i vertikálně pomocí dvou šroubů na pravé straně mikroskopu a jeho signál je sledován na monitoru počítače v pravém sloupci. Pokud se objeví slabý, nebo dokonce žádný signál laseru, lze jej posílit pootočením zrcátka. Zrcátko se používá hlavně při změně prostředí, ve kterém je měření prováděno, kvůli odlišným indexům lomu světla. Na levé straně mikroskopu se nachází další dva šrouby, kterými je koordinována pozice detektoru, jež se musí nacházet uprostřed pole, tvořeného čtyřmi kvadranty. Jakmile je laser nastavený tak, že jeho odraz vytvoří nejvyšší signál pro detektor, nastává kalibrace nosníku.

Z dostupného seznamu v programu byl vybrán nosník, který byl používán, dále bylo zvoleno médium, ve kterém probíhalo měření a teplota okolí. Tyto informace jsou důležité pro výpočet konstanty pružnosti nosníku. Poté probíhala kalibrace nosníku pomocí softwaru JPK SPM. Kalibrace nastaví doporučené hodnoty pro přesnější měření v QI režimu, které jsou diskutovány níže (např. *Setpoint*, *Z Speed*, *atd.*). Kromě toho se získá přesná hodnota konstanty pružnosti a rezonanční frekvence nosníku. Tyto dvě hlavní hodnoty lze porovnat s hodnotami uvedenými výrobcem, avšak se jedná pouze o hodnoty orientační a experimentálně stanovené. Měřením se ovšem hrot namáhá (hlavně v kontaktním módu), což s sebou nese i změnu rezonanční frekvence a konstanty pružnosti. Proto je nutné experimentálně stanovit přesné hodnoty těchto dvou klíčových parametrů vždy před každým měřením. Jelikož je potřeba hlídat kvalitu hrotu, je doporučeno vytvořit snímek pomocí skenovacího elektronového mikroskopu, aby bylo ověřeno, zda není hrot deformovaný, opotřebovaný či znečištěný (obrázek 13).



Obrázek 13: Pořízený snímek hrotu MLCT pomocí SEM (10 000x zvětšení)

Po dokončení kalibrace bylo provedeno manuální přiblížení nosníku k povrchu vzorku, které se provádí po krocích o velikosti 1 000, 500, 100, 50 a 10 μm . Je pozorováno přiblížení hrotu k vzorku tak, aby se do něj nezanořil a nezničil. Pro přesné přiblížení je používán piezoelektrický translátor, který se pohybuje na základě nastavené hodnoty *Setpoint*. Poté, co se hrot dostane těsně nad povrch měřeného vzorku, může být spuštěno měření.

4.3.1 Kvantitativní zobrazování (*QITM Advanced Imaging*)

Veškeré skenování vzorků probíhalo pomocí kvantitativního zobrazovacího režimu (*QITM Advanced Imaging*). Tento režim je určený pro nestandardní vzorky, jejichž měření vyžaduje individuální nastavení, nejedná se tak o rutinní analýzu. Hydrogely jsou právě takovými vzorky. Dále se tento režim používá pro vzorky, které se složitě přichycují k podkladu (bakterie ve vodě), pro měkké materiály (hydrogely nebo biomolekuly), přičemž měření může probíhat v jakémkoliv médiu (voda, vzduch, atd.). QI mód může být použit i pro vzorky s nerovným povrchem v nanoměřítku, poskytuje vysoké rozlišení a zároveň dodává informace o vlastnostech měřeného materiálu, jako je například tuhost, adheze a Youngův modul. V našem případě jsme tento mód používali v zobrazovacím režimu, mechanické vlastnosti jsou v této práci ponechány stranou.

Průběh měření ovlivňují hodnoty jako je *Setpoint*, který udává silové působení mezi hrotem a povrchem vzorku a uvádí se v jednotkách nN. Pokud by byla příliš zvýšena jeho hodnota, mohlo by dojít k poškození hrotu i vzorku, naopak při nízkých hodnotách se hrot nemusí dostatečně přiblížit k povrchu vzorku.

Další parametr, který lze měnit, je *Z Speed*. Udává se v $\mu\text{m/s}$ a jedná se o rychlost skenování povrchu vzorku. Pro dosažení rychlejšího skenování je dobré tuto hodnotu zvýšit, avšak může dojít k rozmazání snímku, kdy hrot nestíhá kvalitně zobrazit povrch. Rychlost skenování se může pohybovat řádově od jednotek $\mu\text{m/s}$ až po stovky $\mu\text{m/s}$, což výrazně ovlivňuje kvalitu skenování a zásadně prodlužuje dobu měření, což je u gelů problém, jelikož se hrot postupně zanořuje do povrchu skenovaného vzorku.

Dalším parametrem, který mění kvalitu snímku, i dobu měření je *Pixels*. Jedná se o rozlišení skenu, který se pohybuje od 128×128 až po 1024×1024 . Zvýšením pixelů se prodlužuje doba skenování z jednotek minut až na několik hodin. Nejčastěji jsou používány hodnoty 256×256 a 512×512 , což je rozumná varianta kvalita snímku vs. rychlost skenování.

V neposlední řadě lze nastavit velikost snímku pomocí parametru *Scan Size*. Největší možný snímek může zobrazit oblast měřeného vzorku o velikosti $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$. Nejmenší možný sken může být v řádech jednotkách nanometrů. Změna velikosti skenu nijak neovlivňuje dobu měření.

Posledním nastavitelným parametrem je *Z Length*, který udává vzdálenost, kterou hrot urazí během křivky síly. Při velkých interakci a výškových rozdílech na povrchu vzorku musí být nastavena vysoká hodnota, aby se hrot dostatečně oddálil od vzorku. Čím je nastavena vyšší hodnota, tím se také prodlužuje doba skenování.

4.4 Příprava agarózových hydrogelů

Pro přípravu koncentrační řady agarózových hydrogelů bylo naváženo množství agarózy tak, aby výsledné hmotnostní koncentrace činily 0,5, 0,75, 1, 2 a 4 hm. %. Prášková agaróza v kádince byla zalita deionizovanou vodou a ponechána na magnetické míchačce při 250–300 otáčkách za minutu. Po dobu přípravy teplota v disperzním systému neklesla pod $80 \text{ }^\circ\text{C}$. Jakmile suspenze agarózy přešla v sol, což bylo indikováno tím, že pevný podíl agarózy již nebyl rozeznatelný od kapalného disperzního prostředí, byly vzorky nality do Petriho misek tak, aby vytvořily tenkou rovnou vrstvu. Po vychladnutí při laboratorní teplotě (minimálně po dobu 15 minut) byly zality deionizovanou (destilovanou) vodou, aby nedocházelo

k vysušení a tím pádem k zakoncentrování vzorku. Vzorky byly připraveny vždy 24 hodin před samotným měřením. Uchovávány při laboratorní teplotě pod vrstvou deionizované vody. Pro porovnání s vysušeným gelem byl zahřátý roztok agarózy nakapán na podložní sklíčko, kde byl ponechán ztuhnout a po vysušení do fáze xerogelu byl měřen.

4.5 Příprava alginátového hydrogelu

Dalším vzorkem, kterého bylo v této práci využíváno, byl iontový hydrogel vzniklý interakcemi záporně nabitých skupin na řetězcích alginátu s kladně nabitými dvoumocnými ionty vápníku, připravený Ing. Martinem Kadlecem. V první řadě byly připraveny zásobní roztoky obou sloučenin. Roztok alginátu byl připraven navážením prášku alginátu sodného na analytických vahách a doplněním odpovídajícího množství demineralizované vody tak, aby vznikl 2 hm. % sol. Pro důkladné rozmíchání byla použita magnetická míchačka (300 ot/min), přičemž sol byl míchán přes noc do druhého dne (16 hodin). Druhý zásobní roztok, jež byl zdrojem vápenatých iontů, byl připraven navážením bezvodého chloridu vápenatého do odměrné baňky a následným doplněním demineralizovanou vodou tak, že vznikl roztok o koncentraci $0,1 \text{ mol/dm}^3$. Tento roztok byl také míchán na magnetické míchačce do druhého dne. Samotná příprava hydrogelu spočívala v odměření 6 ml solu alginátu, jež byl převeden do Petriho misky, na který byly rozprašovačem aplikovány 3 ml roztoku chloridu vápenatého. Gel byl tedy připraven v objemovém poměru 2:1. Gel vznikl ihned po kontaktu obou látek, přesto však byl před samotným měřením ponechán přes noc při laboratorní teplotě z důvodu dostatečného času na důkladné zesítnění a pod vrstvou deionizované vody, aby nedošlo k vysušení.

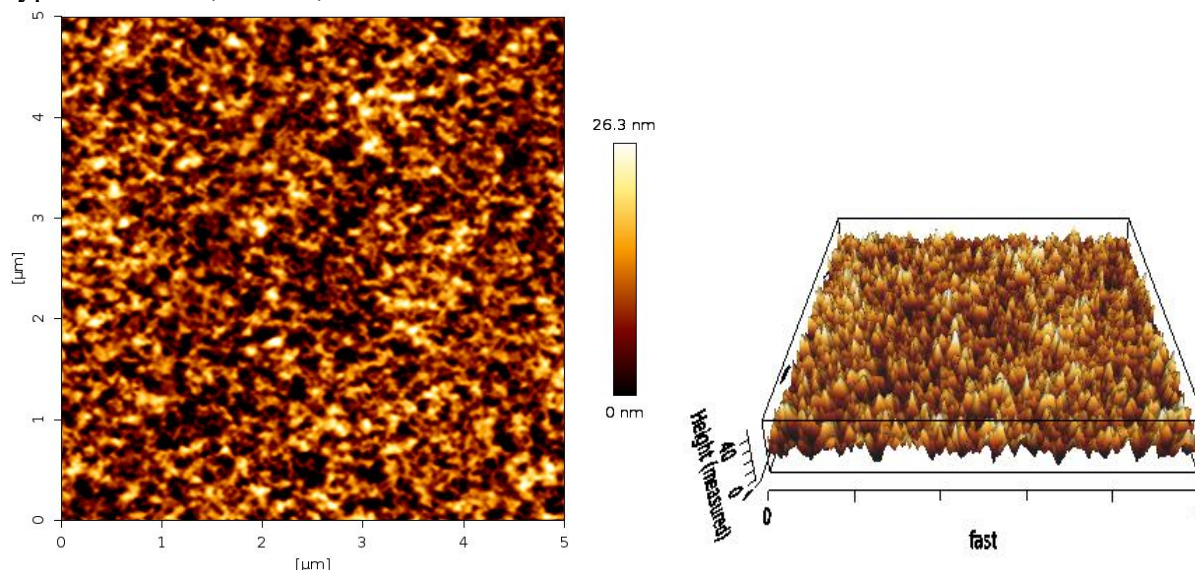
5 CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo prostudovat současný stav měření hydrogelů v hydratovaném stavu pomocí mikroskopie atomárních sil, seznámení se s problematikou z experimentálního hlediska a optimalizovat metodu pro měření hydrogelových systémů v hydratovaném stavu. Pro optimalizaci byl vybrán kvantitativní režim zobrazování (*QITM Advanced Imaging*) a na základě literární rešerše bylo veškeré úspěšné měření prováděno ve vodě, kdy byly vzorky v Petriho miskách zality deionizovanou (destilovanou) vodou. Byla naměřena koncentrační řada fyzikálně síťovaného agarózového hydrogelu. Také byl měřen 2 hm. % alginátový hydrogel síťovaný vápenatými ionty.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Xerogely – experimentální seznámení s přístrojem

Pro seznámení se s přístrojem a určení různého vlivu parametrů na výsledek měření byl měřen 4 hm. % agarózový xerogel. Jednou z největších překážek u měření pomocí mikroskopu atomárních sil, je uchycení vzorku tak, aby byl dokonale zafixovaný. Sol agarózy byl proto nakapán na podložní sklíčko, kde ztuhl v gel a následně se vysušil až do fáze xerogelu. Nejlepším podkladem pro vzorek je materiál s dostatečně rovným povrchem, a proto bylo dle dostupnosti na fakultě zvoleno podložní sklíčko, které vykazovalo dostatečnou rovnost pro měření xerogelů. Prvním používaným nosníkem byl FESP-V2, který je vhodný pro pokleповý režim ve vzduchu a jeho konstanta pružnosti je 3 N/m a rezonanční frekvence činí 75 kHz. Hodnota *Z lenght* byla nastavena na 100 nm, *Setpoint* činil 9,418 nN a *Z Speed* byla nastavena na 20 $\mu\text{m/s}$. Rozlišení (*Pixels*) bylo nastaveno na 256 \times 256, přičemž měření bylo ukončeno za 13 minut a 54 sekund (obrázek 14). Pomocí programu *ImageJ* byla provedena obrazová analýza, jež slouží k získání průměrné velikosti pórů ve zkoumaném vzorku. Na grafu (obrázek 16) jsou znázorněny velikosti poloměrů pórů ve vysušené formě 4 hm. % agarózového gelu, porovnány s velikostmi v hydratované formě. Velikosti pórů v xerogelu se pohybovaly od 5 nm do 120 nm, přičemž průměrná velikost pórů byla vypočtena na $40,73 \pm 21,32$ nm.



Obrázek 14: Povrch a 3D snímek 4 hm. % agarózového xerogelu

6.2 Optimalizace přípravy agarózového hydrogelu v hydratovaném stavu

Po seznámení se s přístrojem a měření xerogelu, byla pozornost věnována hydratovaným systémům, jež jsou předmětem zkoumání této bakalářské práce. Pro první pokus měření byl agarózový gel připraven stejně jako u xerogelu, avšak gel na podložním sklíčku byl ponechán 24 hodin v exsikátoru s deionizovanou vodou, aby nedošlo k jeho vysušení. Měření bylo neúspěšné, jelikož docházelo ke značnému klesání hrotu k povrchu vzorku. To mohlo být způsobeno tím, že se voda na povrchu hydrogelu rychle odpařuje a porušuje tak síly mezi hrotem a vzorkem, přičemž se hrot do vzorku významně zanořuje. Dalším problémem u takto

připraveného hydratovaného gelu je vytvoření příliš nerovného povrchu na podložním sklíčku, což může být velkou překážkou při realizaci samotného měření, kdy dokonce může dojít k poškození hrotu i vzorku.

Pro odstranění tohoto problému, byl zahřátý sol agarózy nalit do Petriho misky, kde vytvořil rovnou vrstvu a ztuhl v gel. Přes noc byla vrstva hydrogelu zalita deionizovanou vodou a na druhý den byla na vzduchu měřena. Měření bylo neúspěšné, jelikož opět docházelo k poklesu hrotu do vzorku, pravděpodobně vlivem synereze, kdy dochází ke stárnutí gelu a v důsledku smršťování struktury je na povrch vytlačována voda, ke které má hrot větší adhezi než k povrchu vzorku a vytvořené kapilární síly ve vrstvě vody stahují hrot do hydrogelu. Na základě literární rešerše (viz. kapitola 3.2) bylo dalším rozhodnutím provádět měření ve vodě, aby byly sníženy silové interakce mezi povrchem vzorku, nosníkem a kondenzovanou vodou. Měření ve vodě bylo stěžejní, jelikož byly také sníženy nespecifické vibrace z okolí, které při měření na vzduchu negativně ovlivňují experiment a zhoršují kvalitu snímku.

Při přípravě hydrogelů je vhodné těsně před měřením nalít na hydrogel novou čistou deionizovanou vodu, pro odstranění uvolněných nízkomolekulárních frakcí z gelu (např. sulfátové skupiny), popřípadě nečistot a prachu, které by mohli narušovat silovou rovnováhu při měření.

6.3 Výběr vhodného nosníku a hrotu

V mikroskopii atomárních sil je jeden z hlavních komponent nosník, pomocí kterého probíhají veškerá měření. Správný výběr nosníku je stěžejní pro dosažení kvalitních snímků a mechanických vlastností měřeného vzorku. Pokud je zvolený nosník příliš tuhý, může dojít k poškození vzorku. Naopak při volbě měkkého nosníku pro skenování tužších povrchů může dojít až ke zlomení nosníku či hrotu.

Jako první byly vyzkoušeny hroty TESP-V2 a FESP-V2, které jsou vhodné hlavně pro měření ve vzduchu v kontaktním a poklepovém režimu. Konstanta pružnosti u TESP-V2 je 37 N/m a u FESP-V2 odpovídá hodnotě 3 N/m. Tyto hodnoty jsou pro měření hydratovaných gelů dost vysoké a tyto nosníky jsou vhodnější spíše pro skenování tužších materiálů. Proto byl následně zvolen podstatně měkký nosník MLCT s konstantou pružnosti k od 0,005 N/m do 1,2 N/m a rezonanční frekvencí f_0 od 4 kHz do 160 kHz. I přesto, že obě zmíněné hodnoty jsou vhodné pro zobrazování hydrogelů, měření s tímto nosníkem bylo neúspěšné. Nejspíše proto, že MLCT je vhodné převážně pro kontaktní režim. Jelikož všechny výše zmíněné nosníky, mají ostré hroty, které by mohly lehce proniknout do vzorku, byly nám výrobcem (*Bruker*) doporučeny nosníky MLCT-SPH-1UM-DC, které se od MLCT lišily tím, že obsahovaly kulaté hroty. Měření s nimi bylo neúspěšné, takže byla vyloučena možnost toho, že chyba byla v ostrosti hrotu.

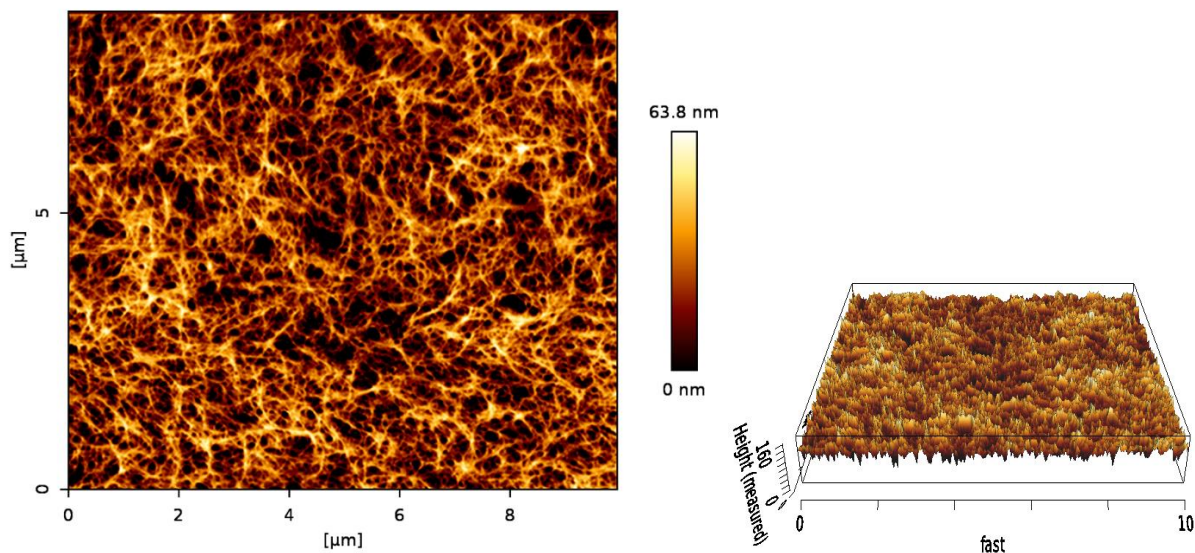
Nakonec byl vybrán nosník SNL-10, jehož konstanta pružnosti se pohybuje od 0,03 N/m do 0,7 N/m a rezonanční frekvence od 12 kHz do 80 kHz. Tento nosník je vhodný do jakéhokoliv média a jelikož nakonec všechna měření byla provedena ve vodě, byl tento nosník vybrán jako nejvhodnější pro následující měření hydrogelů.

6.4 Optimalizace měřicího režimu (*QITM Advanced Imaging*)

Při experimentální práci bylo zjištěno, že hydrogely v hydratovaném stavu nelze měřit déle než 45 minut, kvůli postupnému pronikání hrotu do vzorku, proto musely být přednastavené hodnoty výrazně změněny, aby se urychlil proces zobrazování povrchu zkoumaného hydrogelu a zároveň nebyla zhoršena kvalita obrazu. Znatelně byla měněna hodnota *Z Speed*, která oproti přednastavené rychlosti (78,12 $\mu\text{m/s}$) byla při některých měření zvýšena až na 350 $\mu\text{m/s}$, čímž se výrazně zkrátila doba skenování. Hodnota *Z Length* oproti přednastavené hodnotě (150 nm) musela být výrazně navýšena (až na 1 000 nm), jelikož při velkých výškových rozdílech na povrchu vzorku a vysokých interakcích musí být tato hodnota vysoká, aby byl hrot dostatečně oddálen od povrchu vzorku. Hodnota *Setpoint* byla většinou ponechána na přednastavené hodnotě dle kalibrace, někdy změněna o pár desetin nN.

6.4.1 Měření agarózového hydrogelu

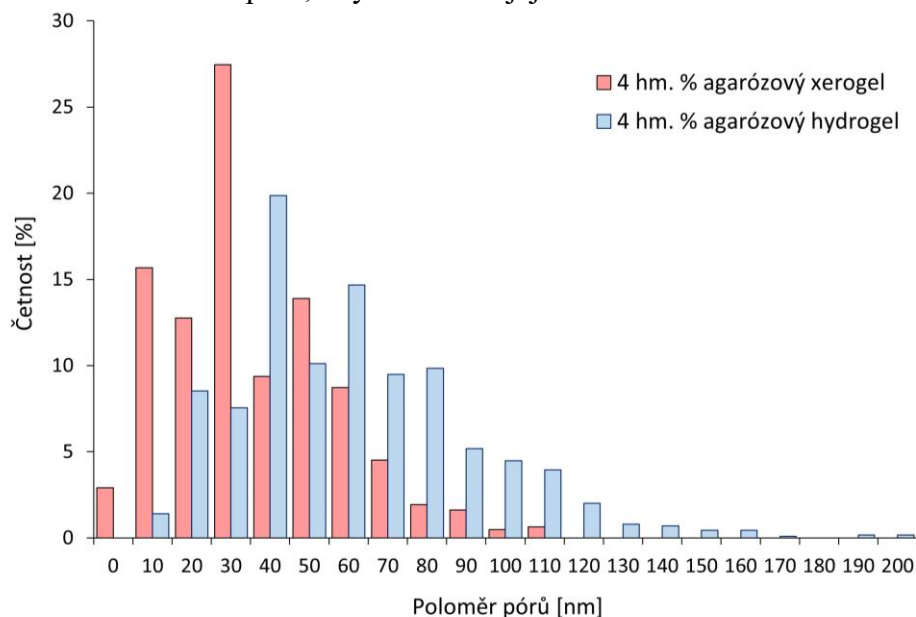
První byl měřen agarózový gel obsahující 4 hm. % agarózy v hydratovaném stavu v Petriho misce zalitý deionizovanou vodou. Hodnota *Z Speed* byla nastavena na 250 $\mu\text{m/s}$, *Setpoint* činil 4,99 nN a hodnota *Z Length* byla 700 nm. Velikost snímku činila $8 \times 10 \mu\text{m}$ a pixely byly nastaveny na 256×256 (obrázek 15). Měřítka vedle snímku udává výškové rozdíly v naměřené ploše. Pro získání lepšího rozlišení a zachycení veškerých detailů hrotem je vhodné, aby tato hodnota byla co nejnižší. Vysoce kvalitní snímky poskytují plochy s výškovými rozdíly v řádech desítek nanometrů. Najít místo s rovným povrchem lze posouváním vzorku, či výběrem jiné plochy v programu (JPK SPM Desktop). Mikroskopie atomárních sil zobrazuje i 3D snímky, kde lze pozorovat reliéf povrchu vzorku.



Obrázek 15: Povrch a 3D snímek 4 hm. % agarózového hydrogelu

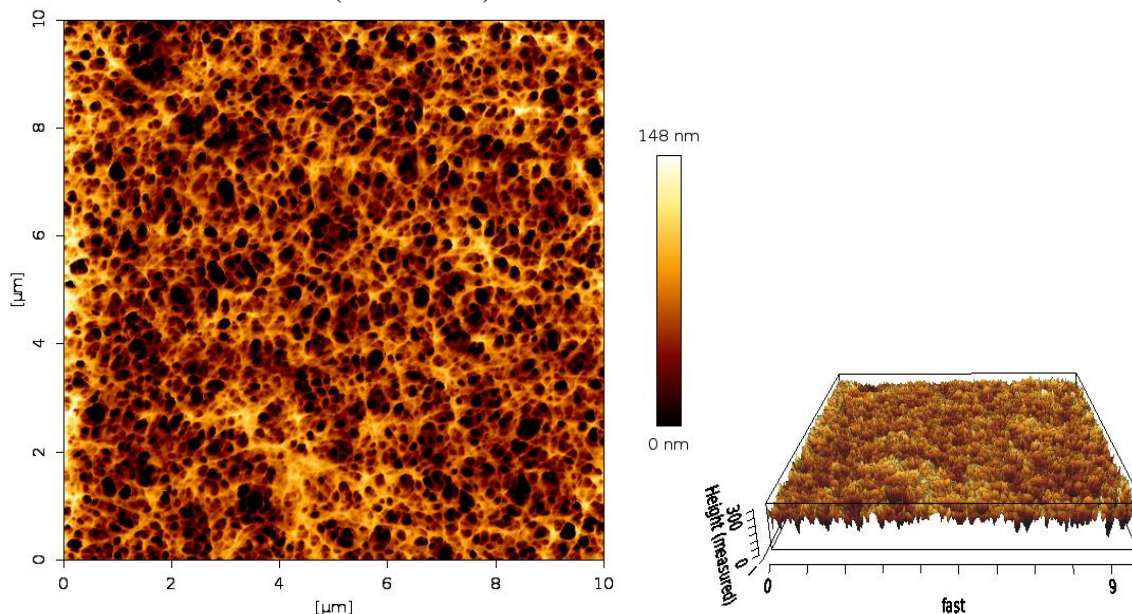
Po provedení obrazové analýzy byly získány velikosti pórů v hydratovaném 4 hm. % agarózovém gelu, které se pohybovaly od 5 nm do 195 nm. Průměrná velikost pórů byla vypočtena na $55,77 \pm 30,06$ nm. Získané velikosti pórů byly porovnány s velikostmi získaných v odborném článku [64] pomocí reometrie, kde průměrná velikost pórů ve 4 hm. % agarózového hydrogelu činila 4 nm a s velikostmi získaných pomocí kryo-skenovací elektronové mikroskopie, kde velikost pórů činila 150 nm [64].

Z grafu (obrázek 16), kde jsou velikosti pórů v hydratované formě gelu porovnány s velikostmi pórů ve vysušené formě 4 hm. % agarózového gelu je zřejmé, že ztráta vody v matici má vliv na velikost pórů, kdy dochází k jejich zmenšení.



Obrázek 16: Graf znázorňující procentuální četnosti velikostí pórů ve vysušeném a hydratovaném 4 hm. % agarózovém hydrogelu

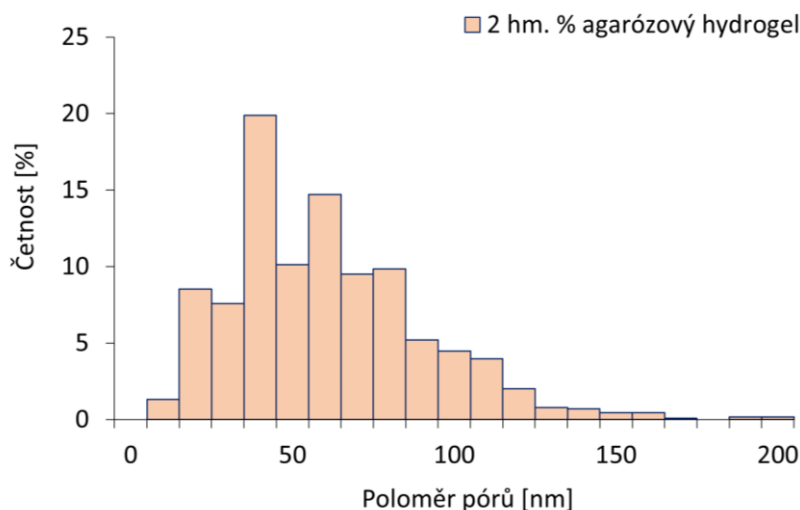
Při měření 2 hm. % agarózového hydrogelu byl *Setpoint* nastaven na 9,0 nN a hodnota *Z Length* na 900 nm. Velikost skenu činila $10 \times 10 \mu\text{m}$ a hodnota *Pixels* byla nastavena na 512×512 . Takto vysoké rozlišení výrazně prodlužuje dobu měření (až na několik hodin), avšak byla značně zvýšena hodnota *Z Speed*, která činila $350 \mu\text{m/s}$, tudíž byl snímek vytvořen již za 28 minut a 36 sekund (obrázek 17).



Obrázek 17: Povrch a 3D snímek 2 hm. % agarózového hydrogelu

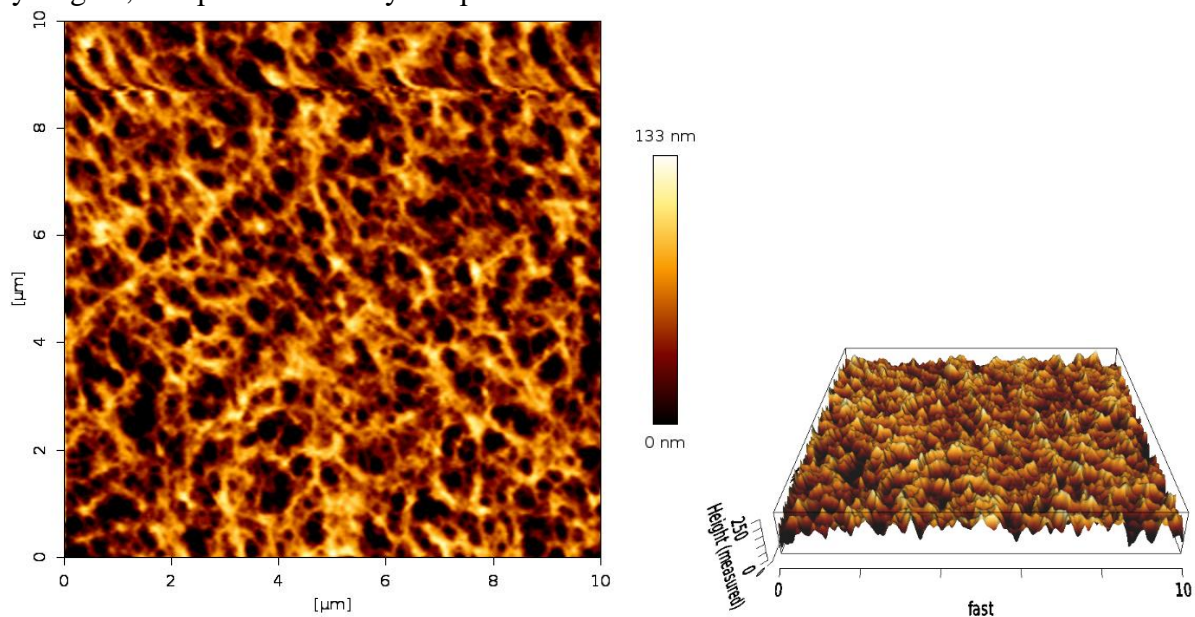
Na grafu uvedeném níže (obrázek 18) je znázorněna procentuální četnost různých velikostí pórů ve 2 hm. % agarózovém hydrogelu. Rozmezí velikosti pórů bylo stejné jako

u 4 hm. % agarózového hydrogelu (od 5 do 195 nm). Největší procentuální zastoupení tvoří póry o velikosti 40 nm. Průměrná velikost pórů ve 2 hm. % agarózovém hydrogelu byla vypočtena na $60,66 \pm 30,03$ nm. Průměrná velikost pórů zjištěná pomocí reometrie činila 5 nm a průměrná velikost pórů sledovaná pomocí kryoSEM odpovídala 200 nm [64]. Narayanan a spol. [65] stanovili průměrnou velikost pórů ve 2 hm. % agarózovém hydrogelu pomocí turbidimetrie, která činila 200 nm.



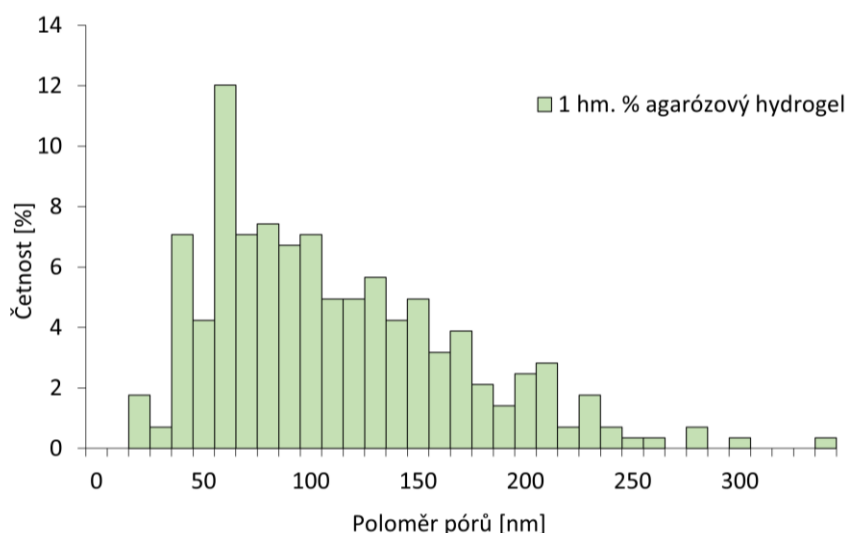
Obrázek 18: Graf znázorňující procentuální četnosti různých velikostí pórů ve 2 hm. % agarózovém hydrogelu

Následně byl měřen 1 hm. % agarózový hydrogel. Hodnota *Setpoint* odpovídala 1,12 nN a hodnota *Z Lenght* činila 1 000 nm. Rychlost skenu byla nastavena na 300 $\mu\text{m/s}$, přičemž hodnota *Pixels* činila 256×256 (obrázek 19). Rozlišení bylo zvoleno nižší než u měření 2 hm. % agarózového hydrogelu, tudíž i doba skenování trvala kratší dobu a to 9 minut a 21 sekund. V horní části snímku lze pozorovat mírné horizontální rozmazání, které může být způsobeno vlivem příliš vysoké rychlosti skenování, nebo přilepením hrotu na povrch hydrogelu, či ulpěním nečistoty na špičce hrotu.



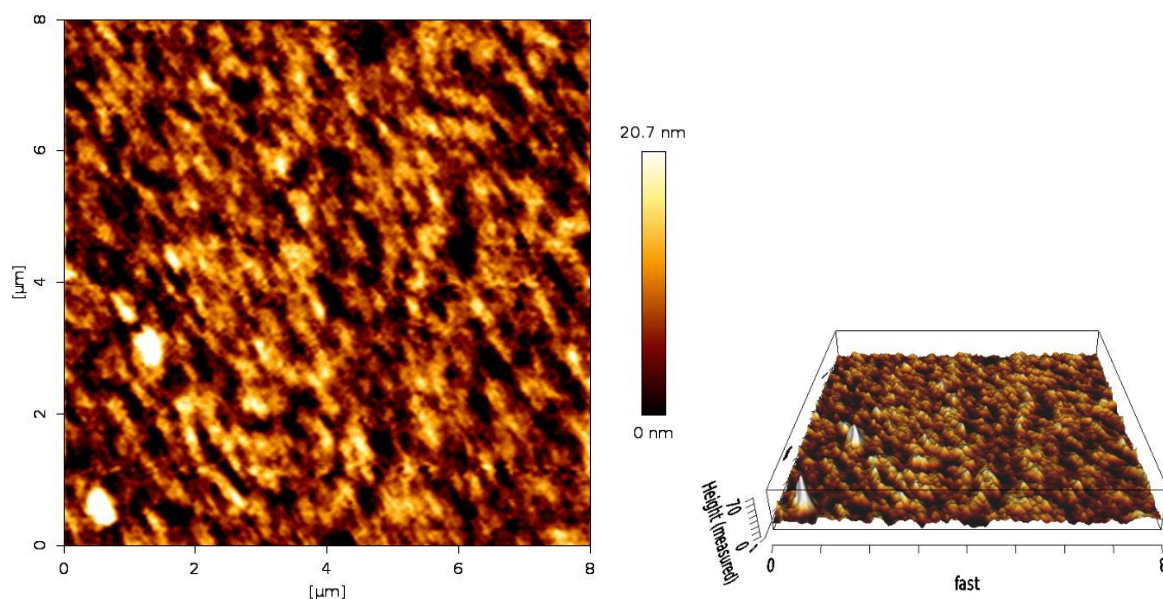
Obrázek 19: Povrch a 3D snímek 1 hm. % agarózového hydrogelu

Na grafu (obrázek 20) lze vidět procentuální zastoupení různých velikostí pórů v 1 hm. % agarózovém hydrogelu, přičemž se velikosti pohybovaly od 17 nm do 337 nm. Z grafu je zřejmé, že se v hydrogelu nejvíce nacházejí póry o velikosti 60 nm. Průměrná velikost pórů v 1 hm. % agarózovém hydrogelu byla vypočtena na $106,21 \pm 57,55$ nm. Pro porovnání průměrných velikostí pórů byl vybrán článek [64], kde pomocí reometrie byla velikost pórů stanovena na 10–12 nm a dle kryoSEM průměrná velikost pórů v 1 hm. % agarózovém hydrogelu činila 300 nm. Za použití turbidimetrie byla tato hodnota stanovena na 600 nm [65].



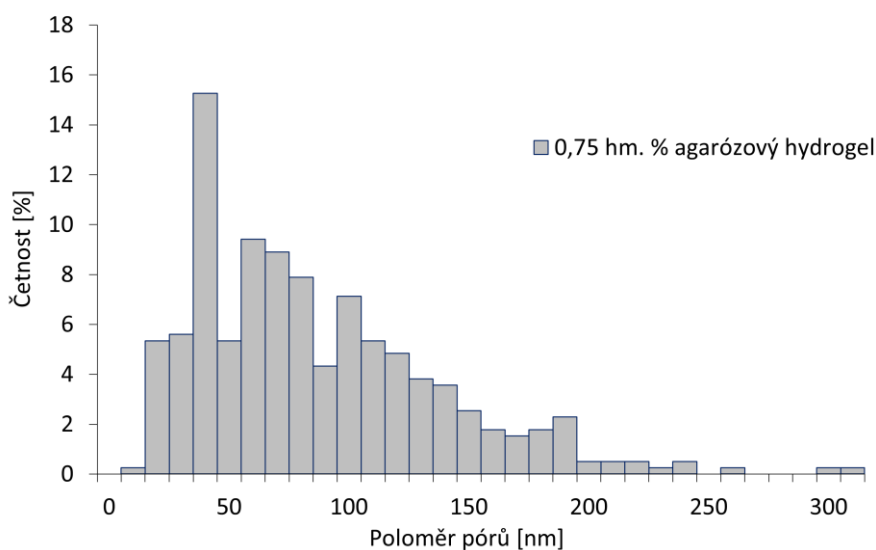
Obrázek 20: Graf znázorňující procentuální četnosti různých velikostí pórů v 1 hm. % agarózovém hydrogelu

Při měření agarózového hydrogelu o hmotnostní koncentraci 0,75 hm. % byla hodnota *Setpoint* dle kalibrace ponechána na 4,77 nN. Hodnota *Z Length* byla nastavena na 700 nm, rychlost skenu činila 120 $\mu\text{m/s}$ a velikost snímku byla $8 \times 8 \mu\text{m}$ (obrázek 21). Z měřítka vedle snímku lze poznat, že byl skenován velice rovný povrch, kdy výškové rozdíly na povrchu hydrogelu činily maximálně 20,7 nm. V levé části skenu lze pozorovat dvě bílé oblasti, které jsou na 3D snímku zobrazeny jako vystouplé útvary, jež mohly být vytvořeny při přípravě hydrogelu.



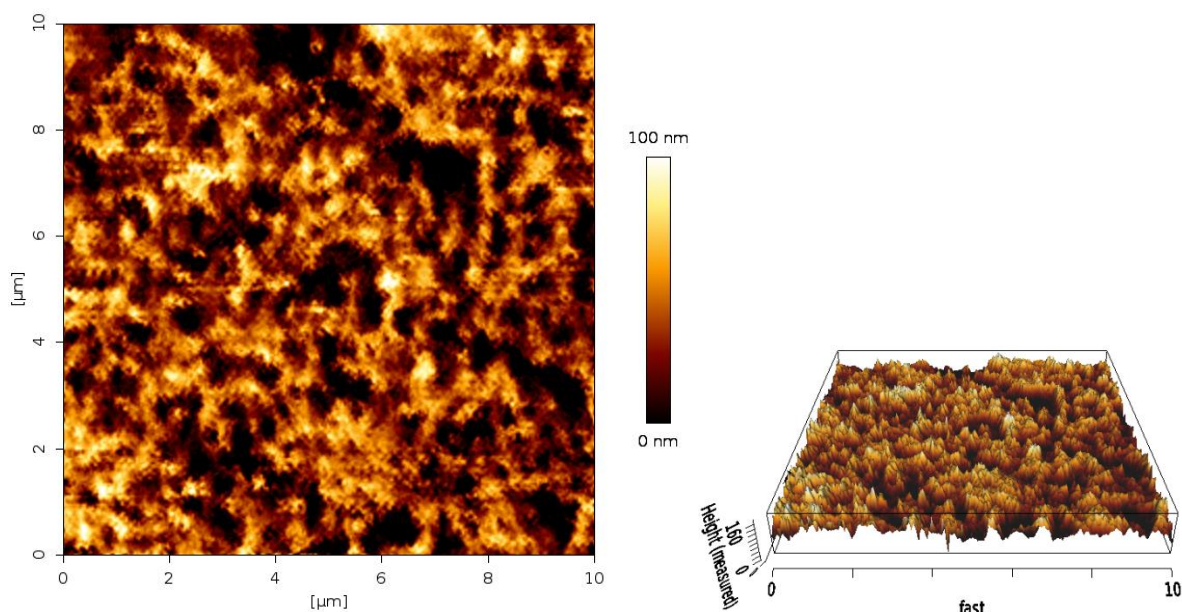
Obrázek 21: Povrch a 3D snímek 0,75 hm. % agarózového hydrogelu

Velikosti pórů v 0,75 hm. % agarózovém hydrogelu se pohybovaly od 8 nm do 305 nm. Na grafu (obrázek 22) lze sledovat největší procentuální zastoupení pórů o velikostech 40 nm. Průměrná velikost pórů byla vypočtena na $81,69 \pm 51,08$ nm.



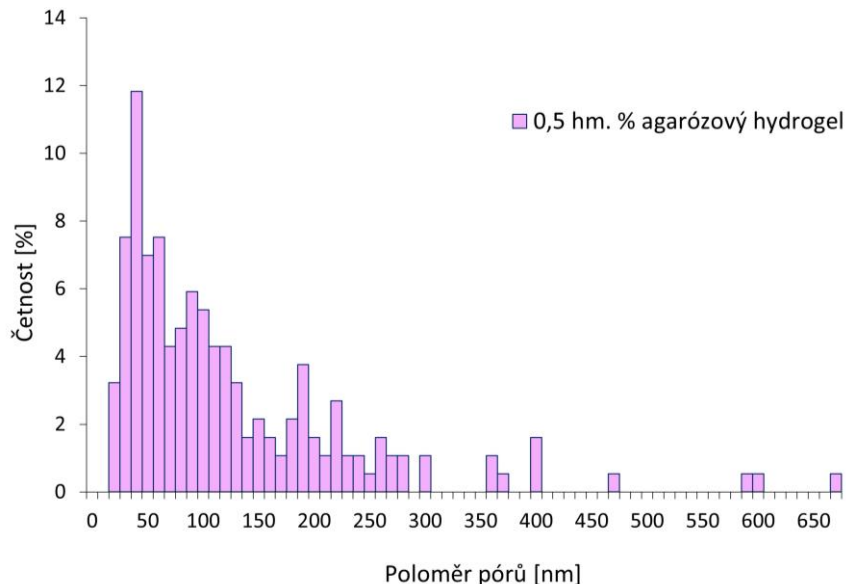
Obrázek 22: Graf znázorňující procentuální zastoupení různých velikostí pórů v 0,75 hm. % agarózovém hydrogelu

Posledním měřeným hydrogelem z koncentrační řady byl 0,5 hm. % agarózový hydrogel. Hodnota *Setpoint* při měření byla nastavena na 300 pN a hodnota *Z Length* činila 500 nm. Pro zlepšení kvality snímku, byla rychlost měření nastavena pouze na 20 $\mu\text{m/s}$, čímž se výrazně prodloužila doba skenování. Hodnota *Pixels* činila 256×256 a velikost snímku odpovídala $10 \times 10 \mu\text{m}$ (obrázek 23).



Obrázek 23: Povrch a 3D snímek povrchu 0,5 hm. % agarózového hydrogelu

Ze snímku i grafu (obrázek 24) je zřejmé, že agarózový hydrogel o hmotnostní koncentraci 0,5 hm. % vykazoval největší velikosti pórů, které se pohybovaly od 11 nm do 666 nm. Z grafu lze pozorovat, že největší procentuální zastoupení tvořily póry o velikosti 40 nm a průměrná velikost pórů byla vypočtena na $119,42 \pm 109,45$ nm. V odborném článku [64] byla stanovena průměrná velikost pórů v 0,5 hm. % agarózovém hydrogelu pomocí kryosem na 350 nm a pomocí reometrie na 18 nm.



Obrázek 24: Graf znázorňující procentuální zastoupení různých velikostí pórů v 0,5 hm. % agarózovém hydrogelu

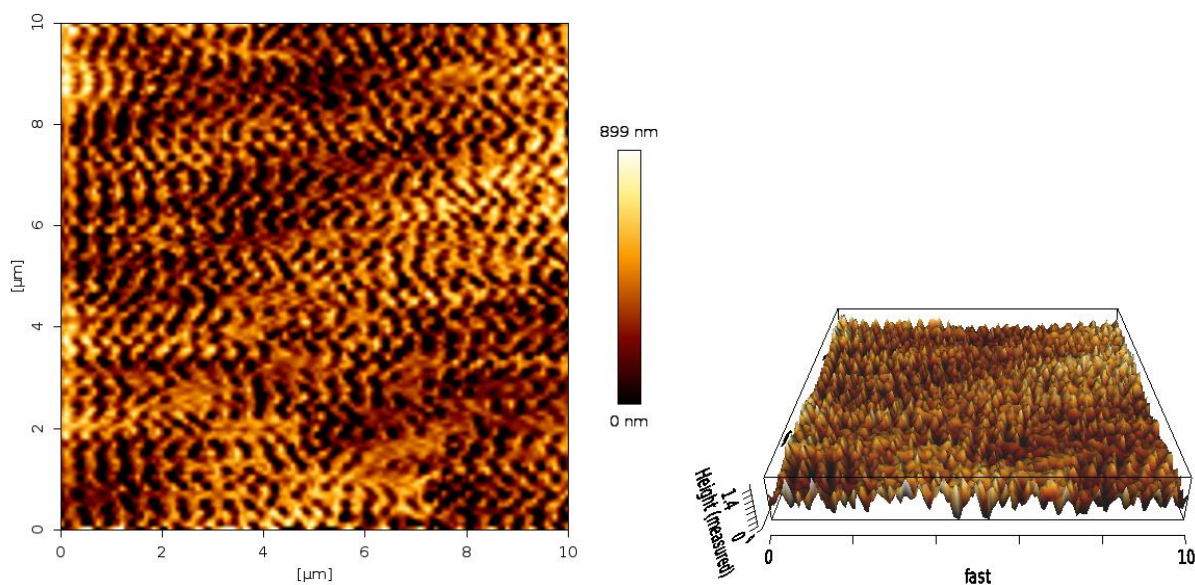
V tabulce (tabulka 1) lze vidět průměrné velikosti pórů se směrodatnými odchylkami pro koncentrační řadu agarózových hydrogelů (včetně xerogelu). Ze získaných velikostí pórů je zřejmé, že se snižující koncentrací gelu roste průměrná velikost pórů. Všechny vzorky agarózových hydrogelů nevykazovaly uniformní velikost pórů, naopak byla sledována velká distribuce velikostí od jednotek nanometrů až po stovky nanometrů.

Tabulka 1: Souhrn průměrných velikostí pórů v agarózových hydrogelech

Hmotnostní koncentrace agarózových hydrogelů [hm. %]	Průměrná velikost pórů [nm]
4,0 (xerogel)	40,73 ± 21,32
4,0	55,77 ± 30,06
2,0	60,66 ± 30,03
1,0	106,21 ± 57,55
0,75	81,69 ± 51,08
0,5	119,42 ± 109,45

6.4.2 Měření 2 hm. % alginátového hydrogelu

Posledním vzorkem, který byl měřen pomocí mikroskopie atomárních sil, byl 2 hm. % alginát síťovaný vápenatými ionty. Při měření byla hodnota *Setpoint* nastavena na 859,5 pN, hodnota *Z lenght* činila 600 nm a rychlost skenování povrchu byla nastavena na 93,8 μm/s. Přílišné zvyšování rychlosti měření poskytovalo nekvalitní snímky. Zhoršená kvalita snímku mohla být způsobena nerovným povrchem, kdy výškové rozdíly na měřeném povrchu vzorku dosahovaly až 899 nm (obrázek 25). Pro dosažení plochého povrchu by nejspíše bylo potřeba změnit přípravu alginátového gelu.



Obrázek 25: Povrch a 3D snímek 2 hm. % alginátového hydrogelu síťovaný vápenatými ionty

7 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo prostudovat metodu mikroskopie atomárních sil s potenciálním využitím při měření hydrogelových systémů, seznámit se s přístrojem AFM z experimentálního hlediska a optimalizovat měřicí proceduru pro měření hydrogelů, připravených různým typem síťování. Veškerá měření byla provedena pomocí kvantitativního režimu zobrazování (*QITM Advanced Imaging*), který je vhodný pro měření polotuhých materiálů, které vykazují nerovný povrch v nanoměřítku a je šetrný ke vzorku i k hrotu. Poskytuje kvalitní topografické snímky i mechanické vlastnosti, jako je Youngův modul pružnosti či adheze (stanovení mechanických vlastností nebylo součástí cílů práce).

Pro experimentální část byl vybrán jako modelový materiál fyzikálně síťovaný agarózový hydrogel, kvůli dostatečným zkušenostem s touto hydrogelovou maticí na FCH VUT a snadné a reprodukovatelné přípravě. Pro seznámení se s přístrojem byl nejprve měřen 4 hm. % agarózový gel ve fázi xerogelu, který byl ve fázi solu nakapán na podložní sklíčko a po vysušení bez problémů změřen (obrázek 14). Následovalo měření hydratovaného agarózového gelu o různých hmotnostních koncentracích a 2 hm. % alginátového gelu síťovaný vápenatými ionty.

Díky provedené literární rešerši byl vyřešen častý problém u měření pomocí AFM, a to dostatečné uchycení vzorků a vytvoření rovného povrchu tak, aby nebylo znehodnoceno měření či poničen hrot nebo samotný vzorek. Proto byly vzorky hydrogelů nality do Petriho misek, kde vytvořily rovný povrch a následující den byly měřeny.

Na základě odborných článků byla provedena měření v deionizované vodě, v důsledku čehož bylo zabráněno odpařování disperzního prostředí, byly zmenšeny silové interakce mezi hrotem a povrchem vzorku a také sníženy nespécifické vibrace z okolí, které negativně ovlivňují skenování a kvalitu snímků.

Byla vyzkoušena řada různých nosníků, ale jen nosník SNL-10 byl použitelnou variantou pro měření hydratovaných gelů ve vodném prostředí. Má nízkou konstantu pružnosti (0,03–0,7 N/m) a rezonanční frekvenci (12–80 kHz), což je ideální pro měření měkkých vzorků.

Podářilo se optimalizovat metodu AFM zejména pro měření koncentrační řady agarózového hydrogelu, kdy byly výrazně změněny přednastavené hodnoty v kvantitativním režimu zobrazování (*QITM Advanced Imaging*). Převážně hodnota *Z Speed*, která byla ve většině měření několikanásobně zvýšena, a tím byla zkrácena doba měření. Jelikož byly skenovány vzorky s výškovými rozdíly na povrchu, musela být také zvýšena hodnota *Z Length*, aby se hrot dostatečně oddálil od povrchu vzorku. Hodnota udávající *Setpoint* byla ve většině případů ponechána na přednastavené hodnotě.

Byly získány kvalitní snímky agarózových hydrogelů, na nichž byly možné sledovat póry, které se zmenšovaly se zvyšující se hmotnostní koncentrací agarózy v gelu. Ze získaných dat je patrné, že struktury hydrogelů nejsou homogenní (obrázek 17) a velikosti pórů se pohybují ve velkém rozmezí. Získané průměrné hodnoty velikosti pórů pomocí AFM byly porovnány s velikostmi získanými v odborných člancích pomocí reometrie a kryoSEM [64] a turbidimetrie [65]. Průměrné hodnoty velikosti pórů získané pomocí AFM se pohybovaly mezi hodnotami získaných pomocí reometrie a kryoSEM.

Na závěr byl měřen 2 hm. % alginátový hydrogel síťovaný vápenatými ionty, u kterého byly zřejmé větší výškové rozdíly na povrchu vzorku, což může do budoucna být odstraněno jiným postupem přípravy samotného hydrogelu. Je třeba velmi dbát na přípravu vzorku, pro úspěšné měření a dosažení snímků s vysokým rozlišením.

Závěrem je zřejmé, že lze měřit hydrogely pomocí mikroskopie atomárních sil v hydratovaném stavu, avšak je jisté, že pro různé druhy hydrogelů bude potřeba provést individuální optimalizaci měření, aby bylo dosaženo kvalitnějších snímků. Doposud objevené poznatky mohou být využity pro následující měření dalších hydrogelů, které by mohlo zahrnovat i stanovení mechanických vlastností.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] GULREZ, Syed KH; AL-ASSAF, Saphwan; PHILLIPS, Glyn O. Hydrogels: methods of preparation, characterisation and applications. *Progress in molecular and environmental bioengineering-from analysis and modeling to technology applications* [online]. InTech Rijeka, 2011, 117150 [cit. 2022-02-26]. DOI:10.5772/24553
- [2] GYLES, Desireé Alesa, Lorena Diniz CASTRO, José Otávio Cerrera SILVA JR. a Roseane Maria RIBEIRO-COSTA. A review of the designs and prominent biomedical advances of natural and synthetic hydrogel formulations. *European Polymer Journal* [online]. Elsevier, 2017, 88, 373-392 [cit. 2022-01-06]. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2017.01.027
- [3] AHMED, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research* [online]. 2015, 6(2), 105-121 [cit. 2022-01-06]. ISSN 2090-1232. DOI: 10.1016/j.jare.2013.07.006.
- [4] KONG, Weili, Yongli GAO a Qingli LIU. The effects of chemical crosslinking manners on the physical properties and biocompatibility of collagen type I/hyaluronic acid composite hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, 160, 1201-1211 [cit. 2021-12-07]. ISSN 0141-8130. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.05.208.
- [5] WATERS, Dale J., Kristin ENGBERG, Rachel PARKE-HOUBEN, Christopher N. TA, Andrew J. JACKSON, Michael F. TONEY a Curtis W. FRANK. Structure and Mechanism of Strength Enhancement in Interpenetrating Polymer Network Hydrogels. *Macromolecules* [online]. 2011, 44(14), 5776-5787 [cit. 2022-01-06]. DOI: 10.1021/ma200693e
- [6] KUMAR, Anuj a Sung Soo HAN. PVA-based hydrogels for tissue engineering: A review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* [online]. 2017, 66(4), 159-182 [cit. 2022-01-06]. DOI: 10.1080/00914037.2016.1190930
- [7] CASTAÑEDA-PÉREZ, Eduardo, Karina JIMÉNEZ-MORALES, Luis CHEL-GUERRERO a David BETANCUR-ANCONA. Enzymatic protein hydrolysates and ultrafiltered peptide fractions from Cowpea *Vigna unguiculata* L bean with in vitro antidiabetic potential. *Journal of the Iranian Chemical Society* [online]. 2019, 16, 1773-1781 [cit. 2022-01-06]. DOI: 10.1007/s13738-019-01651-0
- [8] HAJEBI, Sakineh, Navid RABIEE, Lobat TAYEBI, Lobat, Hossein ROGHANI-MAMAQANI, Mohammadreza TAHRINI, Lobat TAYEBI a Michael R. HAMBLIN. Stimulus-responsive polymeric nanogels as smart drug delivery systems. *Acta Biomaterialia* [online]. Elsevier, 92, 1-18 [cit. 2022-01-06]. ISSN 1742-7061. DOI: 10.1016/j.actbio.2019.05.018
- [9] DRURY, Jeanie L. a David J. MOONEY. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials* [online]. Elsevier, 2003, 24(24), 4337-4351 [cit. 2022-01-06]. ISSN 0142-9612. DOI: 10.1016/S0142-9612(03)00340-5
- [10] MATEESCU, Anca, Yi WANG, Jakub DOSTALEK a Ulrich JONAS. Thin Hydrogel Films for Optical Biosensor Applications. *Membranes* [online]. 2012, 2(1), 40-69 [cit. 2022-01-06]. DOI: 10.3390/membranes2010040
- [11] ALLA, Safaa G. Abd, Murat SEN a Abdel Wahab M. EL-NAGGAR. Swelling and mechanical properties of superabsorbent hydrogels based on Tara gum/acrylic acid synthesized by gamma radiation. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2021, 89(2), 478-485 [cit. 2022-01-06]. ISSN 0144-8617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.03.031.

- [12] ZU, Yuangang, Ying ZHANG, Xiuhua ZHAO, Chang SHAN, Shuchong ZU, Kunlun WANG, Yong LI a Yunlong GE. Preparation and characterization of chitosan–polyvinyl alcohol blend hydrogels for the controlled release of nano-insulin. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. Elsevier, 2012, 2012, 50(1), 82-87 [cit. 2022-01-06]. ISSN 0141-8130. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2011.10.006.
- [13] MA, Shuaijiang, Shiwei WANG, Qian LI, Yuting LENG, Lianhui WANG a Guo-Hau HU. A Novel Method for Preparing Poly(vinyl alcohol) Hydrogels: Preparation, Characterization, and Application. *Industrial & Engineering Chemistry Research* [online]. 2017, 56(28), 7971-7976 [cit. 2022-01-06]. DOI: 10.1021/acs.iecr.7b01812
- [14] HORMAN, Allan S., Patrick S. STAYTON, Volga BULMUS, Guohua CHEN, Jingping CHEN a Chuck CHEUNG. Really smart bioconjugates of smart polymers and receptor proteins. *Journal of Biomedical Materials Research* [online]. 2000, 52(4), 577-586 [cit. 2022-01-06]. DOI: 10.1002/1097-4636(20001215)52:4<577::AID-JBM1>3.0.CO;2-5
- [15] MÜNSTER, Lukáš, Jan VÍCHA, Jiří KLOFÁČ, Milan MASAŘ, Anna HURAJOVÁ a Ivo KUŘITKA. Dialdehyde cellulose crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels: Influence of catalyst and crosslinker shelf life. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2018, 198, 181–190 [cit. 2022-02-24]. ISSN 0144-8617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.06.035
- [16] MILLON, Leonardo E., Mu-Ping NIEH, Jeffrey L. HUTTER a Wankei WAN. SANS Characterization of an Anisotropic Poly(vinyl alcohol) Hydrogel with Vascular Applications. *Macromolecules* [online]. 2007, 40(10), 3655-3662 [cit. 2022-01-06]. DOI: 10.1021/ma062781f
- [17] FÖRSTER, Stephan a Markus ANTONIETTI. Amphiphilic Block Copolymers in Structure-Controlled Nanomaterial Hybrids. *Advanced Materials* [online]. 1999, 10(3), 195-217 [cit. 2022-01-06]. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4095(199802)10:3<195::AID-ADMA195>3.0.CO;2-V
- [18] JING, Houchao, Jianping SHI, Peipei GUOAB, Shuang GUAN, Hai FU a Wei CUI. Hydrogels based on physically cross-linked network with high mechanical property and recasting ability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2021, 611 [cit. 2021-12-07]. ISSN 0927-7757. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2020.125805
- [19] GHEBREMEDHIN, Marta, Sebastian SEIFFERT a Thomas A. VILGIS. Physics of agarose fluid gels: Rheological properties and microstructure. *Current Research in Food Science* [online]. Elsevier, 2021, 4, 436-448 [cit. 2022-01-06]. DOI: 10.1016/j.crfs.2021.06.003
- [20] PANDEY, Sharad Prakash, Tripti SHUKLA, Vinod Kumar DHOTE, Dinesh K. MISHRA, Rahul MAHESHWARI a Rakesh K. TEKADE. Chapter 4 - Use of Polymers in Controlled Release of Active Agents. *Basic Fundamentals of Drug Delivery: In Advances in Pharmaceutical Product Development and Research*. 2019, s. 113-172. ISBN 9780128179093. DOI: doi.org/10.1016/B978-0-12-817909-3.00004-2
- [21] RENN, Donald W. Agar and agarose: indispensable partners in biotechnology. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development* [online]. 1984, 23(1), 17-21 [cit. 2022-02-27]. DOI: 10.1021/i300013a004

- [22] ROBERTS, J.J. a P.J. MARTENS. Engineering biosynthetic cell encapsulation systems. In: *Biosynthetic Polymers for Medical Applications* [online]. B.m.: Elsevier, 2016, s. 205–239. ISBN 9781782421139. DOI: 10.1016/B978-1-78242-105-4.00009-2.
- [23] MILLER, Ethan J., William TREWBY, Amir Farokh PAYAM, Luca PIANTANIDA, Clodomiro CAFOLLA a Kislou VOÏTCHOVSKY. Sub-nanometer Resolution Imaging with Amplitude-modulation Atomic Force Microscopy in Liquid. *Journal of Visualized Experiments* [online]. 2016 [cit. 2022-01-06]. DOI: 10.3791/54924
- [24] PENG, Jinbo, Jing GUO, Runze MA a Ying JIANG. Water-solid interfaces probed by high-resolution atomic force microscopy. *Surface Science Reports* [online]. 2021 [cit. 2022-01-06]. ISSN 0167-5729. DOI: 10.1016/j.surfrep.2021.100549
- [25] BENNEWITZ, Roland. Friction force microscopy. *Materials Today* [online]. 2005, 8(5), 42-48 [cit. 2022-01-06]. ISSN 1369-7021. DOI: 10.1016/S1369-7021(05)00845-X.
- [26] HÖRBER, J.K.Heinrich. Chapter 1 - Local Probe Techniques. *Methods in Cell Biology* [online]. 2002, s. 1-31 [cit. 2022-01-06]. ISBN 9780125441711. DOI: 10.1016/S0091-679X(02)68002-1.
- [27] FRISBIE, C D, L F ROZSNYAI, A NOY, M S WRIGHTON a C M LIEBER. Functional group imaging by chemical force microscopy. *Science* [online]. 1994, 265(5181) [cit. 2022-01-06]. DOI: 10.1126/science.265.5181.2071.
- [28] MARTIN, Y., C.C. WILLIAMS a H.K. WICKRAMASINGHE. Atomic force microscope–force mapping and profiling on a sub 100-Å scale. *Journal of Applied Physics* [online]. 1987, 61(10), 4723-4729 [cit. 2022-01-06]. ISSN 00218979. DOI: 10.1063/1.338807
- [29] ZHONG, Q., D. INNIS, K. KJOLLER a V.B. ELINGS. Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy. *Surface Science Letters* [online]. 1993, 290(1-2), 688-692 [cit. 2022-01-06]. ISSN 0167-2584. DOI: 10.1016/0167-2584(93)90906-Y
- [30] HAMED, Y.S., K.M. ALBOGAMY a M. SAYED. Nonlinear vibrations control of a contact-mode AFM model via a time-delayed positive position feedback. *Alexandria Engineering Journal* [online]. 2021, 60(1), 963-977 [cit. 2022-02-24]. ISSN 1110-0168. DOI: 10.1016/j.aej.2020.10.024.
- [31] DEMANET, CM. Scanning force microscopy investigation of ion bombarded InP. *Applied Surface Science* [online]. 1998, 135(1-4), 53-58 [cit. 2022-01-06]. ISSN 0169-4332. DOI: 10.1016/S0169-4332(98)00306-7
- [32] YANG, Chih-Wen, Ing-Shouh HWANG, Yen Fu CHEN, Chia Seng CHANG a Din Ping TSAI. Imaging of soft matter with tapping-mode atomic force microscopy and non-contact-mode atomic force microscopy. *Nanotechnology* [online]. IOP Publishing, 2007, 18(8) [cit. 2022-02-27]. DOI: 10.1088/0957-4484/18/8/084009
- [33] TORRENT-BURGUÉS, J. a F. SANZ. AFM in mode Peak Force applied to the study of un-worn contact lenses. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2014, 121, 388-394 [cit. 2022-01-06]. ISSN 0927-7765. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.06.026.
- [34] BUTT, Hans-Jürgen, Brunero CAPPELLA a Michael KAPPL. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surface Science Reports* [online]. Elsevier, 2005, 2005, 59(1-6), 1-152 [cit. 2022-01-06]. ISSN 0167-5729. DOI: 10.1016/j.surfrep.2005.08.003

- [35] PARLAK, Zehra, Rameen HADIZADEH, Mujdat BALANTEKIN a F. Levent DEGERTEKIN. Controlling tip–sample interaction forces during a single tap for improved topography and mechanical property imaging of soft materials by AFM. *Ultramicroscopy* [online]. 2009, 109(9), 1121-1125 [cit. 2021-12-07]. ISSN 0304-3991. DOI: 10.1016/j.ultramic.2009.04.006.
- [36] HUTTER, Jeffrey L. Comment on Tilt of Atomic Force Microscope Cantilevers: Effect on Spring Constant and Adhesion Measurements. *Langmuir* [online]. 2005, 21(6), 2630-2632 [cit. 2022-01-06]. DOI: 10.1021/la047670t
- [37] BOISEN, Anja, Ole HANSEN a Sieba BOUWSTRA. AFM probes with directly fabricated tips. *Journal of Micromechanics and Microengineering* [online]. 1997, 6(58) [cit. 2022-01-06]. ISSN 0960-1317. DOI: 10.1088/0960-1317/6/1/012
- [38] VIANI, M.B., T.E. SCHÄFFER, G.T. PALOCZI, L.I. PIETRASANTA, B.L. SMITH, J.B. THOMSON a M. RICHTER. Fast imaging and fast force spectroscopy of single biopolymers with a new atomic force microscope designed for small cantilevers. *Review of Scientific Instruments* [online]. 1999, 70(11) [cit. 2022-01-06]. DOI: 10.1063/1.1150069
- [39] SNL-10. *Bruker: Probes* [online]. [cit. 2022-01-06]. Dostupné z: <https://www.brukerafmprobes.com/p-3693-snl-10.aspx>
- [40] IDOWU, Ademola a Sandra S.F CHAN. Modified tips: molecules to cells. *Materials Today* [online]. 2003, 6(2), 22-29 [cit. 2022-01-06]. ISSN 1369-7021. DOI: 10.1016/S1369-7021(03)00232-3
- [41] WONG, Stanislaus S., James D. HARPER, Peter T. LANSBURY a Charles M. LIEBER. Carbon Nanotube Tips: High-Resolution Probes for Imaging Biological Systems. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 1998, 120(3), 603-604 [cit. 2022-01-06]. DOI: 10.1021/ja9737735
- [42] SADER, John E. Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers. *Review of Scientific Instruments* [online]. 1999, 70(10) [cit. 2022-01-06]. DOI: 10.1063/1.1150021
- [43] ALBRECHT, T.R., S. AKAMINE, T.E. CARVER a C.F. QUATE. Microfabrication of cantilever styli for the atomic force microscope. *Journal of Vacuum Science & Technology A* [online]. 1990, 8(4) [cit. 2022-01-06]. DOI: 10.1116/1.576520
- [44] CLEVELAND, J.P. a S. MANNE. *A nondestructive method for determining the spring constant of cantilevers for scanning force microscopy* [online]. 1993, 62(2) [cit. 2022-01-06]. DOI: 10.1063/1.1144209
- [45] HUTTER, Jeffrey L. a John BECHHOEFER. Calibration of atomic-force microscope tips. *Review of Scientific Instruments* [online]. 1993, 64(7) [cit. 2022-01-06]. DOI: 10.1063/1.1143970
- [46] FISCHER-CRIPPS, Anthony C. Applications of Nanoindentation. *Nanoindentation* [online]. Springer, New York, NY, 2011 [cit. 2022-01-06]. ISBN 978-1-4419-9872-9. DOI: 10.1007/978-1-4419-9872-9_12
- [47] CHEN, Jinju a Guoxing LU. Finite element modelling of nanoindentation based methods for mechanical properties of cells. *Journal of Biomechanics* [online]. Elsevier, 2012, 45(16), 2810-2816 [cit. 2022-01-06]. ISSN 0021-9290. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2012.08.037
- [48] LEKKA, M. a P. LAIDER. Applicability of AFM in cancer detection. *Nature Nanotech* [online]. 2009, 4(72) [cit. 2022-01-06]. DOI: 10.1038/nnano.2009.004

- [49] WEISENHORN, A. L. a P.K. HANSMA. Forces in atomic force microscopy in air and water. *Applied Physics Letters* [online]. 1989, 54(26) [cit. 2022-01-06]. DOI: 10.1063/1.101024
- [50] H. GULREZ, Syed K., Saphwan AL-ASSAF a Glyn O. Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. CARPI, Angelo, ed. *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications* [online]. InTech, 2011, 2011-08-01 [cit. 2022-02-20]. DOI: 10.5772/24553
- [51] DRAKE, B., C. B. PRATER, A.L. WEISENHORN, et al. *Imaging Crystals, Polymers, and Processes in Water with the Atomic Force Microscope* [online]. 1989, 243(4898), 1586-1589 [cit. 2022-02-27]. DOI: 10.1126/science.2928794
- [52] The NanoWizard AFM Handbook. JPK Instruments [online]. Berlin, 2018.
- [53] WAGNER, Peter. Immobilization strategies for biological scanning probe microscopy. *FEBS Letters* [online]. Elsevier, 1998, 430(1-2), 112-115 [cit. 2022-02-27]. ISSN 0014-5793. DOI: 10.1016/S0014-5793(98)00614-0
- [54] GIMÉNEZ, Alicia, Juan José URIARTE, Joan VIEYRA, Daniel NAVAJAS a Jordi ALCARAZ. Elastic properties of hydrogels and decellularized tissue sections used in mechanobiology studies probed by atomic force microscopy. *Microscopy Research and Technique* [online]. 2016, 80(1), 85-96 [cit. 2022-02-24]. DOI: 10.1002/jemt.22740
- [55] DRIRA, Zouheir a Vamsi K. YADAVALLI. Nanomechanical measurements of polyethylene glycol hydrogels using atomic force microscopy. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* [online]. 2013, 2013, 18, 20-28 [cit. 2021-06-07]. ISSN 1751-6161. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2012.09.015
- [56] WANG, Ke, Kevin G. TAYLOR a Lin MA. Advancing the application of atomic force microscopy (AFM) to the characterization and quantification of geological material properties. *International Journal of Coal Geology* [online]. 2021, 247 [cit. 2021-12-07]. ISSN 0166-5162. DOI: 10.1016/j.coal.2021.103852
- [57] JANDT, Klaus D. Atomic force microscopy of biomaterials surfaces and interfaces. *Surface Science* [online]. Elsevier, 2001, 491(3), 303-332 [cit. 2022-01-06]. ISSN 0039-6028. DOI: 10.1016/S0039-6028(01)01296-1
- [58] KIM, Seong Han, Aric OPDAHL, Chris MARMO a Gabor A SOMORJAI. AFM and SFG studies of pHEMA-based hydrogel contact lens surfaces in saline solution: adhesion, friction, and the presence of non-crosslinked polymer chains at the surface. : *Biomaterials* [online]. Elsevier, 2002, 23(7) [cit. 2021-12-07]. ISSN 0142-9612. DOI: 10.1016/S0142-9612(01)00292-7
- [59] DEMIR-YILMAZ, Irem, Pascal GUIRAUD a Cécile FORMOSA-DAGUE. The contribution of Atomic Force Microscopy (AFM) in microalgae studies: A review. *Algal Research* [online]. 2021, 60 [cit. 2021-12-07]. ISSN 2211-9264. DOI: 10.1016/j.algal.2021.102506
- [60] PRAMANICK, Ashit Kumar, Siddhi GUPTA, Trilochan MISHRA a Arvind SINHA. Topographical heterogeneity in transparent PVA hydrogels studied by AFM. *Materials Science and Engineering: C* [online]. Elsevier, 2012, 32(2), 222-227 [cit. 2021-12-07]. ISSN 0928-4931. DOI: 10.1016/j.msec.2011.10.022

- [61] SOLBU, Anita Akbarzadeh, Andre KOERNIG, Joachim S. KJESBU, Daria ZAYTSEVA-ZOTOVA, Marit SLETMOEN a Berit L. STRAND. High resolution imaging of soft alginate hydrogels by atomic force microscopy. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2022, 276 [cit. 2021-12-07]. ISSN 0144-8617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2021.118804
- [62] ABADÍAS, Clara, Carme SERÉS a Juan TORRENT-BURGUÉS. AFM in peak force mode applied to worn siloxane-hydrogel contact lenses. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2015, 128, 61-66 [cit. 2021-12-07]. ISSN 0927-7765. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.02.020
- [63] DECHO, Alan W. Imaging an alginate polymer gel matrix using atomic force microscopy. *Carbohydrate Research*. 1999. ISSN 0008-6215. DOI: 10.1016/S0008-6215(99)00006-3
- [64] TRUDICOVA, Monika, Jiri SMILEK, Michal KALINA, Marcela SMILKOVA, Katerina ADAMKOVA, Kamila HRUBANOVA, Vladislav KRZYZANEK a Petr SEDLACEK. Multiscale Experimental Evaluation of Agarose-Based Semi-Interpenetrating Polymer Network Hydrogels as Materials with Tunable Rheological and Transport Performance. *Polymers* [online]. 2020, 12(11) [cit. 2022-05-07]. ISSN 2073-4360 DOI: 10.3390/polym12112561
- [65] NARAYANAN, Janaky, Jun-Ying XIONG a Xiang-Yang LIU. Determination of agarose gel pore size: Absorbance measurements vis a vis other techniques. *Journal of Physics: Conference Series* [online]. 2006, 28, 83-86 [cit. 2022-05-07]. DOI: 10.1088/1742-6596/28/1/017

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

9.1 Seznam zkratek

BIS	N,N-methylendiakrylamid
EDC	N,N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylkarbodiimid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
DMF	dimethylfumarát
DMSO	dimethylsulfoxid
AFM	mikroskopie atomárních sil
STM	skenovací tunelový mikroskop
FFM	mikroskopie třecí síly
CFM	mikroskopie chemické síly
CNT	uhlíková nanotrubička
SFG	generování součtové frekvence (<i>sum-frequency generation</i>)
PVA	polyvinylalkohol
PEG	polyethylenglykol
PEG-DA	polyethylenglykol diakrylát
SEM	skenovací elektronová mikroskopie
pHEMA	polyhydroxyethyl methakrylát

9.2 Seznam symbolů

k	konstanta pružnosti nosníku	[N/m]
f	rezonanční frekvence nosníku	[kHz]
E	Youngův modul pružnosti	[Pa]
F	síla	[N]
ΔU	vazebná energie	[eV]
Δx	vzdálenost působení odpudivých sil	[nm]
W	šířka nosníku	[nm]
t	tloušťka nosníku	[nm]
l	délka nosníku	[nm]
Z_p	průhyb nosníku	[nm]
Z_c	poloha piezoelektrického translátoru	[nm]
k_{ref}	konstanta pružnosti referenčního nosníku	[N/m]
R	kontaktní poloměr	[nm]
ν	Poissonovo číslo	[-]
D	vzdálenost mezi hrotem a vzorkem	[nm]