



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

PŘÍPRAVA AMINOVÝCH PLAZMOVÝCH POLYMERŮ A JEJICH INTERAKCE S ECM PROTEINY

AMINE PLASMA POLYMERS PREPARATION AND THEIR INTERACTION WITH ECM PROTEINS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Pavel Dvořák

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Mgr. Lenka Zajíčková, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1379/2018
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Pavel Dvořák**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Lenka Zajíčková, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název bakalářské práce:

Příprava aminových plazmových polymerů a jejich interakce s ECM proteiny

Zadání bakalářské práce:

Cílem práce je připravit sadu aminových plazmových polymerů, které mohou být vhodnou povrchovou úpravou materiálů pro tkáňové inženýrství. Tenké vrstvy aminových plazmových polymerů budou připravovány v nízkotlakém kapacitně vázaném radiofrekvenčním výboji ze směsi cyklopropylaminu (CPA) a argonu. Úkolem je charakterizovat základní vlastnosti těchto vrstev (např. pomocí elipsometrie, infračervené spektroskopie nebo rentgenovské fotoelektronové spektroskopie) a využít i principy QCM nebo SPR senzorů, zejména se pokusit prozkoumat interakci aminových plazmových polymerů s proteiny extracelulární matrix (ECM) neboli mimobuněčnou základní hmotou.

Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019

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

Pavel Dvořák
student(ka)

doc. Mgr. Lenka Zajíčková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá přípravou aminových plazmových polymerů, které byly připraveny v nízkotlakém pulzním radiofrekvenčním kapacitně vázaném výboji za použití monomeru cyklopropylaminu (CPA). Povrchy funkcionalizované aminovou skupinou nalézají uplatnění jako platformy pro imobilizaci biomolekul. V této práci byla zkoumána interakce plazmových polymerů s ECM proteiny, konkrétně s kolagenem.

ABSTRACT

The bachelor thesis deals with the preparation of amine plasma polymers which were prepared in low pressure radiofrequency capacitively coupled plasma discharge using cyclopropylamine (CPA) monomer. The amine functionalized surfaces find application as scaffolds for the immobilization of biomolecules. In this work, the interaction of plasma polymers with ECM proteins, specifically with collagen, was investigated.

KLÍČOVÁ SLOVA

plazma, PECVD, ECM proteiny, kolagen, cyklopropylamin, plazmová polymerizace

KEYWORDS

plasma, PECVD, ECM proteins, collagen, cyclopropylamine, plasma polymerization

DVOŘÁK, Pavel. *Příprava aminových plazmových polymerů a jejich interakce s ECM proteiny*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113570>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Lenka Zajíčková.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
Pavel Dvořák

Rád bych poděkoval vedoucí mé bakalářské práce doc. Mgr. Lence Zajíčkové, Ph.D. za osobitý přátelský přístup, odborné vedení, ale hlavně za její trpělivost. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Lucii Blahové, Ph.D. za poskytnutí výsledků z FTIR spektrometru a výsledků z elipsometru, ale hlavně za její drahocenný čas, který se mnou strávila. Také bych chtěl poděkovat doc. RNDr. Petrovi Skládalovi, CSc. a Mgr. Zdeňkovi Farkovi, PhD. za užitečné poznámky týkající se imobilizace kolagenu a v neposlední řadě Adéle Jurčíkové za jazykovou korekturu bakalářské práce. Tato práce byla provedena za podpory výzkumné infrastruktury CEITEC Nano (ID LM2015041, MŠMT, 2016–2019), CEITEC Vysoké učení technické v Brně.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Základní vlastnosti plazmatu	8
2.2	Kapacitně vázaný doutnavý výboj	9
2.3	Plazmochemická depozice z plynné fáze	10
2.3.1	Plazmová polymerizace	11
2.3.2	Pulzní plazmová polymerizace	12
2.3.3	Plazmové aminové polymery	13
2.4	Proteiny extracelulárního matrix	14
2.4.1	Kolagen	14
2.4.2	Imobilizace biomolekul	16
3	TEORIE POUŽITÝCH METOD CHARAKTERIZACE VRSTEV	17
3.1	Křemenné mikrováhy	17
3.1.1	Piezoelektrický jev	18
3.1.2	Rezonanční frekvence	19
3.2	Elipsometrie	21
3.3	Infračervená spektroskopie	22
3.3.1	Spektrometr	24
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
4.1	Použité materiály	25
4.2	Aparatura	25
4.3	Příprava plazmových polymerů	27
4.4	Interakce kolagenu s plazmovým polymerem	29
4.5	Křemenné mikrováhy	29
4.5.1	OpenQCM	30
4.6	Elipsometr	33
4.7	FTIR spektrometr	34
5	VÝSLEDKY A DISKUZE	35
5.1	Chemické složení	35
5.2	Tloušťka vrstvy	36
5.3	Měření vrstev pomocí QCM	37
5.4	Reakce aminového plazmového polymeru s kolagenem	37
5.4.1	Reakce kolagenu s vrstvou z první sady depozice	40
5.4.2	Reakce kolagenu s vrstvou ze druhé sady depozice	42

5.4.3	Reakce kolagenu s vrstvou ze třetí sady depozice	44
5.4.4	Reakce kolagenu s vrstvou ze čtvrté sady depozice	46
5.4.5	Reakce kolagenu s vrstvou z páté sady depozice	48
6	ZÁVĚR	51
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	53
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	56

1 ÚVOD

V dnešní době se klade velký důraz na výzkum nových materiálů, zvláště v medicíně a tkáňovém inženýrství. Na základě tohoto požadavku jsme v této práci vytvářeli sérii aminových plazmových polymerů, které jsou stabilní a jsou bohaté na funkční aminové skupiny. Tyto skupiny jsou velmi reaktivní a nacházejí široké uplatnění v biologických aplikacích, jelikož vytváří vazby mezi biomolekulami a povrchem. V našem případě jsme se pokoušeli na vytvořené aminové polymerní vrstvy navázat molekuly kolagenu, který se vyskytuje v extracelulárním matrix (ECM). Na základě zprostředkování tohoto spojení bychom v budoucnu mohli využít takto připravené vrstvy v tkáňovém inženýrství, případně k pokrytí kovových implantátů. Daný kov, např. titan, který je hojně využíván v medicíně díky jeho mechanickým vlastnostem, by byl následně pokrytý vrstvou kolagenu, který je tělu vlastní, a nedocházelo by tak k nežádoucím imunitním reakcím. Hovoříme např. o tvorbě bakteriálního filmu nebo fibrotické enkapsulaci, nebo o dlouhodobém odstraňování implantátu z důvodu resorpce kosti.

Plazmové polymery jsme vytvářeli ve vakuovém reaktoru za působení radiofrekvenčního nízkotlakého kapacitně vázaného výboje z par prekurzoru cyklopropylaminu (CPA). Aminové plazmové polymery jsme deponovali na křemenné mikrováhy (QCM), které byly klíčovým zdrojem pro kvantifikaci nanosené vrstvy. Vrstvy jsme dále charakterizovali metodou elipsometrie, pomocí které jsme zjistili tloušťku vytvořené vrstvy a poslední metodou charakterizace byla infračervená spektroskopie, pomocí které jsme určili, jaké funkční skupiny daná vrstva obsahuje. Po charakterizaci vrstev jsme zkoumali, jestli je možné na vytvořené vrstvy imobilizovat ECM proteiny, konkrétně kolagen.

V druhé kapitole je pojednáváno o základních vlastnostech plazmatu, plazmochemické depozici z plynné fáze (PECVD), plazmové polymerizaci a ECM proteinech. V třetí kapitole jsou objasňovány použité postupy, a to QCM, elipsometrie a infračervená spektroskopie. Čtvrtá kapitola se týká experimentu a v páté jsou probírány výsledky.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Základní vlastnosti plazmatu

Jedná se o čtvrté skupenství hmoty, které vznikne fázovým přechodem z plynné látky. V našem případě se jedná o plazma elektrického výboje v plynu, kde je aplikováno elektrické pole na ionizovaný plyn. Elektrické pole urychluje volné elektrony, které naráží do ostatních atomů, a ty pak ionizují. Aplikované elektrické pole dodává účinněji energii elektronům než iontům, proto je teplota elektronů v elektrickém výboji mnohem vyšší než teplota iontů. (Hovoříme tak o studeném plazmatu.) Dodáním dostatečné energie jsou tedy molekuly disociovány na atomy, a následně až na ionty, za tvorby ionizovaného plynu, který je kvazineutrální. To znamená, že ve větším měřítku obsahuje stejný počet záporně a kladně nabitých částic, a tím pádem je navenek neutrální. Zjednodušeně řečeno, plazma je ionizovaný kvazineutrální plyn, který splňuje určitá kritéria, která můžeme najít v publikaci od Bittencourta. [1]

Jedním z kritérií je tzv. Debyeova délka, což je veličina, která slouží k porovnání rozměru plazmatu. V publikaci [1] je popsáno, že pokud si vybereme určitou část sledovaného ionizovaného plynu (např. krychli o rozměru L), tak v případě, že se jedná o plazma, Debyeova délka bude mnohem menší než rozměr L . Debyeova délka je popsána vztahem

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\varepsilon_0 k T_e}{e^2 n_e}} \ll L, \quad (1)$$

kde ε_0 je permitivita vakua, k je Boltzmannova konstanta, T je teplota elektronu, n_e je koncentrace elektronů a e je elementární náboj. [1]

Jestliže tedy hovoříme o plazmatu, tak Debyeova délka nám určuje porovnání v rámci velikosti. Pro porovnání plazmatu v závislosti na čase se zavádí veličina zvaná plazmová frekvence ω_{pl} . Tato veličina určuje frekvenci kmitu elektronů v plazmatu. Představme si, že elektronový oblak je v jednu chvíli uvolněn ze svého stabilního stavu. Elektrony vylétnou od atomů, které se v tu chvíli nabijí kladně, což se projeví tím, že kladně nabití ionty se budou snažit elektrony k sobě přitáhnout. Elektrony se tedy budou pohybovat zpět, své počáteční pozice překročí a budou kmitat sem a tam, což vyjadřuje plazmová frekvence. Tento pohyb elektronů je tak rychlý, že kladně nabití ionty se ze svého místa ani nepohnou, takže je považujeme za stabilní. [2] Tento proces je vyjádřen vztahem (2), kde m_e je hmotnost elektronů.

$$\omega_{pl} = \sqrt{\frac{ne^2}{\varepsilon_0 m_e}} \quad (2)$$

Pokud hovoříme o plazmové frekvenci, je třeba zmínit i tzv. srážkovou frekvenci, pomocí které je určováno kritérium plazmatu. Jestliže jsou oscilace elektronů v plazmatu potlačovány díky srážkám mezi elektrony a neutrálními částicemi, tak není splněno kritérium plazmatu a nejedná se tedy o plazma. Toto kritérium je formulováno tak, že plazmová frekvence (ω_{pl}) musí být větší než srážková frekvence (ν_c), nebo že součin plazmové frekvence (ω_{pl}) a střední

doby mezi srážkami s neutrálními atomy (τ) musí být větší než jedna, kde obě vyjádření jsou popsány v následujících rovnicích. [3]

$$\omega_{pl} \gg v_c \quad (3)$$

$$\omega_{pl} \tau > 1 \quad (4)$$

Existuje mnoho typů plazmatu, ale tato práce se zabývá tzv. nerovnovážným plazmatem, kde elektrony, neutrální atomy, molekuly a ionty nejsou v termodynamické rovnováze. K vytvoření tohoto plazmatu je využíván tzv. kapacitně vázaný doutnavý výboj.

2.2 Kapacitně vázaný doutnavý výboj

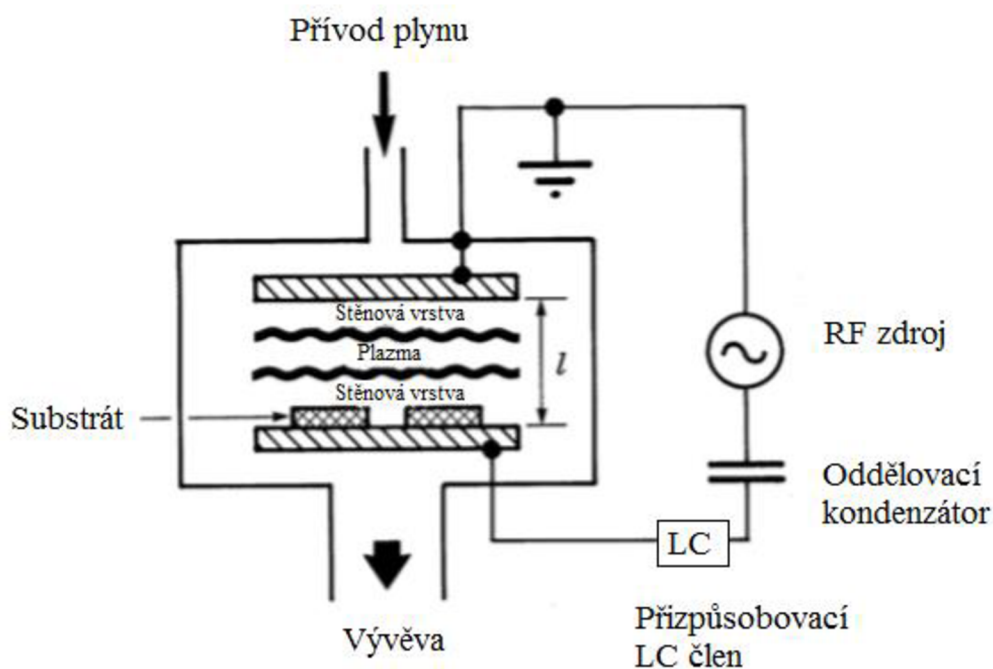
Jedná se o druh samostatného doutnavého výboje, který je generován vysokofrekvenčním zdrojem v radiofrekvenčním elektrickém poli mezi dvěma nebo více elektrodami. V našem případě se bude jednat o použití doutnavého výboje při depozicích tenkých vrstev. Pro ionizaci plynu se používá střídavé napětí, jelikož při zavedení stejnosměrného napětí dochází k polarizaci elektrod a k nabíjení případné rostoucí vrstvy. Doutnavý výboj lze rozdělit podle způsobu přivedení výkonu do plazmatu na ICP (indukčně vázaný doutnavý výboj; z angličtiny inductively coupled plasma) a CCP (z angličtiny capacitively coupled plasma), ale jelikož v práci byl použit pouze CCP, budeme se zabývat pouze jím.

Typické přiváděné radiofrekvenční napětí se pohybuje v rozmezí od 100 do 1000 V, pracuje se za nízkého tlaku převážně v rozmezí 1,3–13 Pa, hustota plazmatu se pohybuje řádově kolem 10^9 – 10^{11} cm⁻³ a teplota elektronů je zhruba 3 eV, což odpovídá teplotě okolo 35000 K. Pracujeme tedy s elektrony o velmi vysokých teplotách. Narozdíl od toho teplota neutrální a kladných iontů se rovná přibližně pokojové teplotě, což je patrné např. z faktu, že stěny plazmového reaktoru jsou chladné. [3]

Výboj se uskutečňuje v tzv. plazmovém reaktoru, který je většinou připojen přes oddělovací kondenzátor a přizpůsobovací LC člen k radiofrekvenčnímu generátoru, což je popsáno

na Obr. 1. Oddělovací kondenzátor zabraňuje toku stejnosměrného proudu elektrickým obvodem. Přizpůsobovací člen, tvořený kapacitami a indukčnostmi, je pak uzpůsoben tak, aby výstupní impedance generátoru byla stejná, jako výsledná impedance zátěže. Tím pádem dochází k minimalizaci odraženého výkonu dodávaného do plazmatu. Výboj lze iniciovat v širokém rozsahu tlaků, od jednotek po stovky Pascalů. [3]

Při CCP vzniká na buzené elektrodě záporné napětí, které je označováno jako samopředpětí U_b , což se projeví zrychlením toku iontů směrem k povrchu. Pokud zanedbáme srážky ve stěnové vrstvě, tak mají ionty optimální energii pro bombardování povrchu. Tento jev můžeme pozorovat např. v plazmovém leptání, příp. naprašování. [2]



Obr. 1: Schéma uspořádání kapacitně vázaného výboje, převzato a částečně upraveno. [3]

2.3 Plazmochemická depozice z plynné fáze

Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition neboli plazmochemická depozice z plynné fáze je metoda k přípravě tenkých vrstev. Základ této techniky byl odvozen z podobného postupu, a to CVD (chemical vapor deposition). Při CVD plynné reaktanty (nebo páry kapaliny) reagují s další molekulou v plynné fázi (nejčastěji za vysoké teploty) za tvorby požadované molekuly. Ta se nadeponuje na požadovaný povrch za vytvoření požadované vrstvy. Např. při vytvoření vrstvy SnO_2 se do komory zavádí SnCl_2 a H_2O , podrobnější informace lze nalézt v publikaci *The effect of substrate temperature on the electrical and optic properties of nanocrystalline tin oxide coatings produced by APCVD*. [4] Aktivační energie reakce tedy pochází ze zahřívání směsi a reakce probíhá v termodynamické rovnováze. [5]

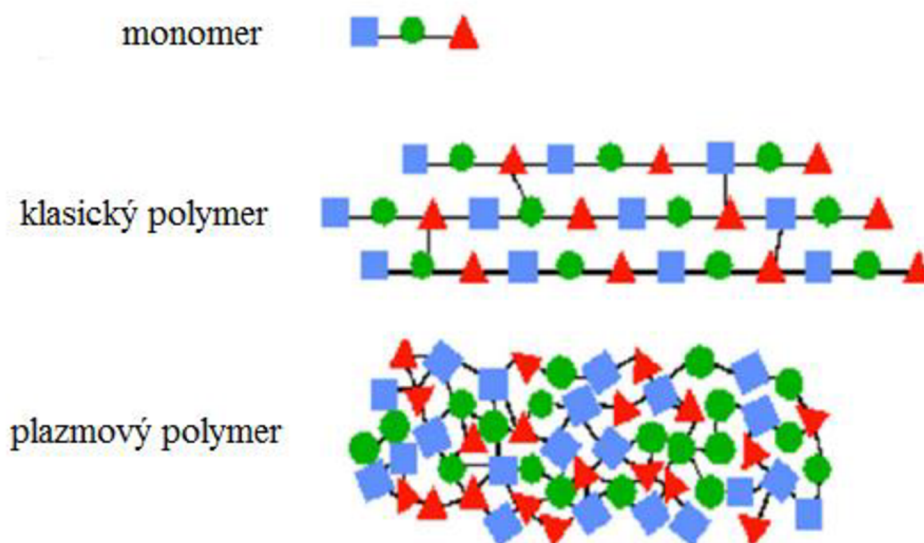
U PECVD je prekurzor přiveden do reakční komory v plynné fázi stejně jako u CVD, ale veškeré reakce probíhají za nízké teploty. Je to dáno tím, že v plazmatu horké elektrony způsobují excitaci a disociaci molekul reaktantů, čímž je dodána potřebná aktivační energie. Proto u PECVD lze použít méně toxické látky, které by u CVD nebyly schopné zreagovat. Hovoříme např. o cyklopropylaminu, který byl použit v této práci, u něhož bychom museli dosáhnout velmi vysokých teplot na rozštěpení jednoduché vazby mezi uhlíky. Další výhodou PECVD je, že, na rozdíl od CVD, lze deponovat na teplotně citlivé substráty, které by se u CVD kvůli vysokým teplotám nedaly použít. Jedinou nevýhodou je komplexnost reakcí, které probíhají v plazmatu. I pro relativně jednoduché reaktanty lze pozorovat desítky různých reakcí a tvorby odlišných produktů, což je někdy velmi obtížně popsát či predikovat. [5]

2.3.1 Plazmová polymerizace

Plazmová polymerizace je podtřídou PECVD a používá se na přípravu tenkých vrstev, kdy výsledkem plazmochemického depozičního procesu je tenká organická vrstva. Polymer vytvořený pomocí plazmové polymerizace má odlišné fyzikální i chemické vlastnosti, než kdyby byl vytvořený pomocí klasické polymerizace. U klasických polymerů se v řetězci pravidelně objevuje jednotka zvaná monomer. Monomer ve své struktuře většinou obsahuje dvojnou vazbu, díky které je uskutečňováno spojení s ostatními monomery a celková polymerizace se uskutečňuje ve třech fázích: iniciace, propagace a terminace. Na rozdíl od klasických polymerů plazmové polymery netvoří pravidelnou strukturu, ale jsou silně větvené a síťované, jelikož při průběhu plazmové polymerizace dochází k fragmentaci molekuly monomeru na velký počet různých částí. Schematické zobrazení rozdílů mezi klasickým polymerem a plazmovým polymerem je znázorněno na Obr. 2. [6]

Prvním seriózním výzkumem plazmových polymerů se zabývala dvojice německých vědců, Linder a Davis (1931), kteří popsali syntézu několika plazmových polymerů. [7] Následně na ně navazovala práce Hirotsugu Yasudy, který navrhl mechanismus založený na fragmentaci monomeru v plazmatu a zároveň jeho radikálovou rekombinaci na sledovaném povrchu. Snažil se připodobnit plazmovou polymerizaci k některému modelu klasické polymerizace a nakonec uznal, že nejlépe ji vystihuje polymerizace radikálová. Vytvořil také tzv. parametr Y (řídící parametr pro plazmovou polymerizaci), který společně s aktivační energií polymeru a geometrickým faktorem určuje depoziční rychlost. Parametr Y je vyjádřen rovnicí (5), kde W značí výkon, M molární hmotnost monomeru a F průtok monomeru. Rozměr parametru Y je tedy energie na hmotnost (J/kg). [8]

$$Y = \frac{W}{MF} \quad (5)$$

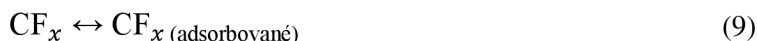
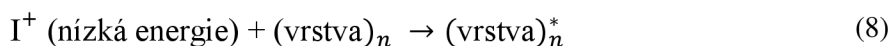
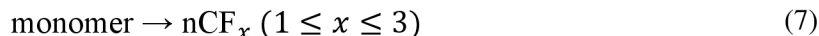


Obr. 2: Schematické porovnání výstavby monomeru, klasického polymeru a plazmového polymeru připraveného plazmovou polymerizací. Převzato a částečně upraveno. [9]

Při plazmové polymerizaci se uplatňuje také tzv. aktivovaný růstový model (activated growth model), jehož autorem je Ricardo d'Agostino. Jedná se o depoziční mechanismus, který vysvětluje roli prekurzorů od fragmentace monomeru v plynné fázi, a také iontové bombardování a teplotu substrátu během růstu vrstvy. Svůj výzkum praktikoval s CF_x , kde nejprve vytvořil prekurzor CF_x z monomeru. Jestliže v tomto kroku bylo vytvořeno hodně atomů F, probíhá buď leptání, anebo se vytvoří nadměrné množství radikálů, které mohou polymerizovat i mimo deponovanou vrstvu, např. v plazmatu, což vede k tvorbě oligomerů a k nehomogenním vrstvám. Poté následuje ion-aktivační krok, který záleží na energii iontů bombardujících rostoucí vrstvu. Při nízké energii iontů vznikají v rostoucí vrstvě mezery, ale na druhou stranu při vysoké energii dochází k rozprašování vrstvy. Následuje adsorbční a desorpční vyrovnaní CF_x radikálů na substrát. Tento celý proces je popsán rovnicemi (7)–(10), kde (7) značí fragmentaci monomeru v plazmatu, (8) značí iontovou aktivaci vrstvy (substrátu), (9) růst vrstvy a (10) plazmovou depoziční fluoropolymerových vrstev v různých režimech výboje. Tyto procesy jsou dále charakterizovány tzv. depoziční hodnotou R_p , kterou vyjadřuje rovnice

$$R_p = K[CF_x]f(I^+), \quad (6)$$

kde $f(I^+)$ je funkce nabitých částic bombardující povrch a $[CF_x]$ je koncentrace radikálů. [10, 11]



V našem případě jsme místo CF_x použili monomer s aminovou skupinou, konkrétně cyklopropylamin, o kterém budu mluvit níže, ale nejprve krátce zmíním pulzní plazmovou polymerizaci, která se uplatňovala při tvorbě plazmových polymerů.

2.3.2 Pulzní plazmová polymerizace

Jedná se o metodu, která se uplatňuje při tvorbě tenkých vrstev. Je založena na tzv. pulzním modu plazmatu, který je složen ze dvou fází. Nejprve je výboj zapnut pouze na určitou krátkou dobu (řádově několik mikrosekund) a po uplynutí tohoto úseku je výboj vypnut a proces se opakuje. Při zapnutém výboji dochází k aktivaci povrchu, fragmentaci monomeru a produkci radikálů. Při vypnutém výboji dochází k obměně monomeru, přičemž doba při vypnutém výboji (t_{off}) je mnohonásobně větší než při zapnutém výboji (t_{on}). Během vypnutého výboje dochází k reakci monomeru s aktivovaným povrchem a roste vrstva plazmového polymeru. Zároveň dochází k rekombinaci mezi elektrony a ionty, což vede

ke snížení jejich koncentrace, a tedy k poklesu bombardování povrchu. Po uplynutí tohoto procesu se celý cyklus opakuje. [12]

$$DC = \frac{t_{on}}{t_{on} + t_{off}} \quad (11)$$

Pravidelnost polymeru je dána depozičními podmínkami, jakými jsou např. střída (DC – duty cycle), která je definována podle vztahu (11), pulzní frekvencí, monomerem a charakterem růstu vrstvy v průběhu t_{off} . [12]

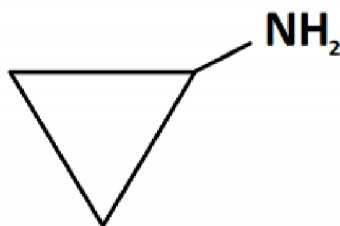
2.3.3 Plazmové aminové polymery

Jedná se o plazmové polymery, které ve své struktuře obsahují primární nebo sekundární aminy ($-NH_2$, $=NH$) a další dusíkaté skupiny. Jelikož se jedná o velmi reaktivní skupiny, které tvoří s $COOH$ skupinou velmi silné kovalentní vazby, jsou tyto látky předmětem biomedicínských aplikací zahrnujících např. imobilizaci biomolekul na QCM a SPR biosenzorech (senzory s povrchovou plazmovou rezonancí) [13] nebo imobilizaci proteinů [14].

Dalším faktorem, proč jsou v této práci vybrány právě aminové polymery, je fakt, že tyto polymery disponují značnou odolností proti vodě a lze je použít např. k buněčné adhezi. [15] Jedním z monomerů poskytující vznik těchto polymerů je např. allylamin, který byl zkoumán po mnoho let díky své dvojné vazbě, která umožňuje radikálovou polymerizaci. Později se však ukázalo, že tyto polymery po ponoření do vody ztrácí až 90 % své tloušťky a snižuje se u nich koncentrace dusíku. [16] Ve snaze k vytvoření lepších vlastností aminových vrstev různé skupiny vědců přistoupily k plazmové polymerizaci a využívaly různé monomery, mezi nimiž byl např. heptylamin [17], směs acetylenu a amoniaku [18] a cyklopropylamin (CPA) [19].

V této práci byl používán cyklopropylamin (Obr. 3), který je na rozdíl od allylaminu netoxický. Cyklopropylamin je kapalina s hodnotou tenze par 32 kPa při teplotě 20 °C. Za normálních podmínek by byl cyklopropylamin nereaktivní, ale jelikož na něj působíme radiofrekvenčním výbojem v kapacitně vázaném plazmatu, tak lze tuto látku rozštěpit na radikály a použít k vytvoření aminových plazmových polymerů. Také na rozdíl od allylaminu vytvořené vrstvy obsahují asi 9 at.% NH_x skupin a po ponoření do vody na 48 h vykazují ztrátu vrstvy jen asi 20 %, přičemž po překročení této doby se hodnota ztráty vrstvy již nemění. [16]

Jak bylo zmíněno v odstavci výše, jelikož plazmové polymery z cyklopropylaminu obsahují aminové skupiny, tak lze na ně navázat molekuly obsahující $COOH$ skupinu. Tuto podmínku splňují i ECM proteiny (např. kolagen), které jsou předmětem této práce.



Obr. 3: Strukturní vzorec cyklopropylaminu.

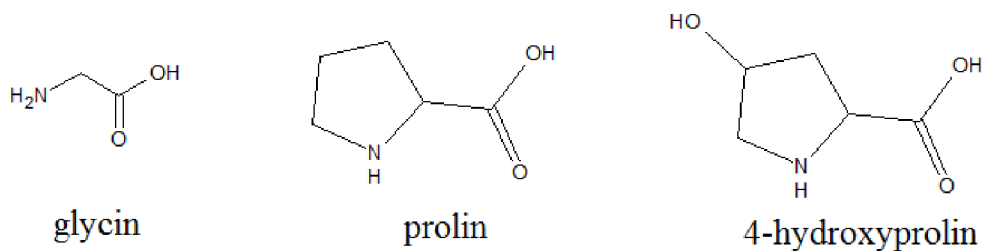
2.4 Proteiny extracelulárního matrix

Jedná se o látky vyskytující se v mezibuněčném prostoru. Extracelulární matrix je velmi organizovaná a uspořádaná síť buněk a nebuněčných komponent, která se vyskytuje ve všech tkáních a orgánech. ECM nejen že tvoří určitou stabilní strukturu, na které jsou upevněny jednotlivé buňky, ale také reguluje určité buněčné procesy zahrnující např. růst, migraci, diferenciaci, homeostázu a morfogenezi. Hlavními složkami ECM jsou proteiny tvořící vlákna, jako je např. kolagen, elastin a fibronektin. Ve většině tkání je však v největším zastoupení právě kolagen. [20]

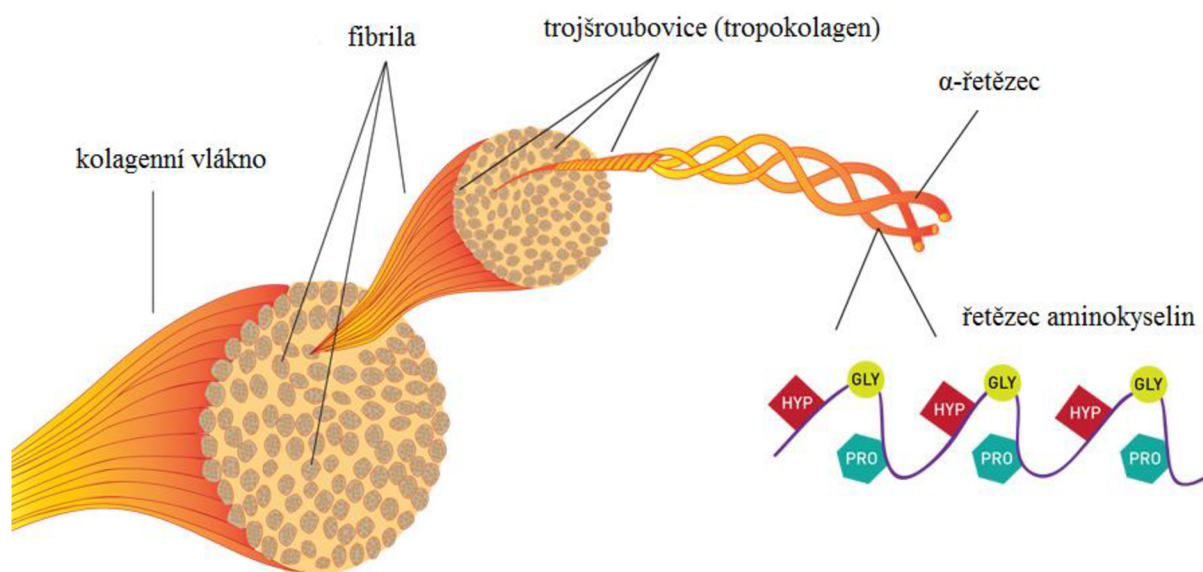
2.4.1 Kolagen

Jedná se o nejvíce zastoupený vláknitý protein v rámci intersticiálního ECM živočichů. Tvoří přibližně 30% zastoupení ze všech proteinů vyskytujících se v těle člověka a je syntetizován a vylučován převážně fibroblasty. Kolagen je rozdělen do 28 různých typů, kde jednotlivé typy jsou tvořeny z 46 různých polypeptidových řetězců (α -řetězců). Nejrozšířenějším typem kolagenu je kolagen I, který je základní stavební jednotkou tkáně. Vyskytuje se v kostech, kůži a ve šlachách a je formován do trojitých šroubovic, které následně vytváří vlákna. Jednotlivé typy kolagenů se odlišují např. tím, že některé typy jsou přerušovány ve struktuře trojité šroubovice a nesestavují tak vlákna a některé, např. transmembránové kolageny, představují dlouhé úseky přerušování struktury a hrají důležitou roli v buněčné signalizaci a adhezi buněk. [20]

Jak bylo zmíněno v odstavci výše, kolagen je tvořen ze tří polypeptidových α -řetězců, které tvoří pravotočivou šroubovici, tzv. tropokolagen. V každém α -řetězci se vyskytuje triplet složený z glycinu, prolinu a 4-hydroxyprolinu (Obr. 4), přičemž pořadí těchto aminokyselin se v jednotlivých typech kolagenů liší. α -řetězce mají tendenci samovolně vytvářet levotočivé šroubovice v důsledku přítomnosti vysokého obsahu prolinu, 4-hydroxyprolinu a glycinu bez vzniku vodíkových vazeb v rámci jednoho řetězce. Pokud však mluvíme o interakci mezi jednotlivými řetězci, tak vodíky z molekuly glycinu jsou orientovány dovnitř kruhu trojšroubovice a tvoří vodíkovou vazbu se sousedním α -řetězcem. Celá trojšroubovice vypadá tedy tak, že vodíky jsou směřovány dovnitř kruhu a tzv. „kruhy“ z molekuly prolinu a hydroxyprolinu jsou orientovány vně, což zajistí bližší a pevnější vazby v trojšroubovici. Jednotlivé trojšroubovice se pak spojují ve větší celky, které dávají vznik kolagenním vláknům (Obr. 5). [20]



Obr. 4: Strukturální vzorce jednotlivých molekul přítomných v molekule kolagenu, nakresleno v programu ACD/ChemSketch.



Obr. 5: Strukturální složení kolagenního vlákna, převzato a částečně upraveno. [21]

Kolagen použitý v této práci (bližší informace v *Collagen from calf skin*), patří mezi tzv. fibrilární kolageny. [22] Do této kategorie patří kolageny I, II, III, V, XI, XXIV a XXVII. Jsou široce rozšířeny ve tkáních a poskytují jim velkou pevnost v tahu. Lze je tedy použít k navázání na námi vytvořené plazmové aminové polymery. Nejpoužívanější principy navázání biomolekul na povrch jsou v krátkosti zmíněny v následující podkapitole. [20]

2.4.2 Imobilizace biomolekul

Existuje spousta přístupů, pomocí kterých lze navázat sledovanou látku na konkrétní povrch, ale všechny metody vyžadují určitou modifikaci nebo vlastnosti od sledovaného povrchu.

První možností je fyzikální adsorpce neboli fyzisorpce. Jedná se o nejjednodušší metodu přichycení proteinu na povrch, která využívá hydrofobní a elektrostatické interakce. Protein je tak vázán k povrchu nekovalentními vazbami.

Dalším typem je kovalentní imobilizace chemickými metodami, která využívá kovalentní vazby k přichycení proteinu na povrch. Tato metoda je založena na faktu, že povrch kovu i polymeru musí být upraven tak, aby mohla být uskutečněna kovalentní vazba. Ta může být uskutečněna buď přímo prostřednictvím funkčních skupin nebo nepřímo prostřednictvím jiné molekuly, tzv. linkeru. Jedná se o molekulu, která je uzpůsobena tak, aby byla schopna zajistit spojení mezi substrátem a proteinem.

V poslední době se však do popředí dostává poslední metoda a tou je kovalentní imobilizace fyzikálními metodami, která využívá zajištění kovalentních vazeb pomocí plazmatu. Povrch je pokryt plazmovým polymerem s funkčními skupinami, na které je navázán protein buď přímo nebo pomocí linkeru, který vazbu zprostředkuje. Na rozdíl od chemické imobilizace se jedná o metodu zcela, nebo alespoň částečně, suchou. [23]

3 TEORIE POUŽITÝCH METOD CHARAKTERIZACE VRSTEV

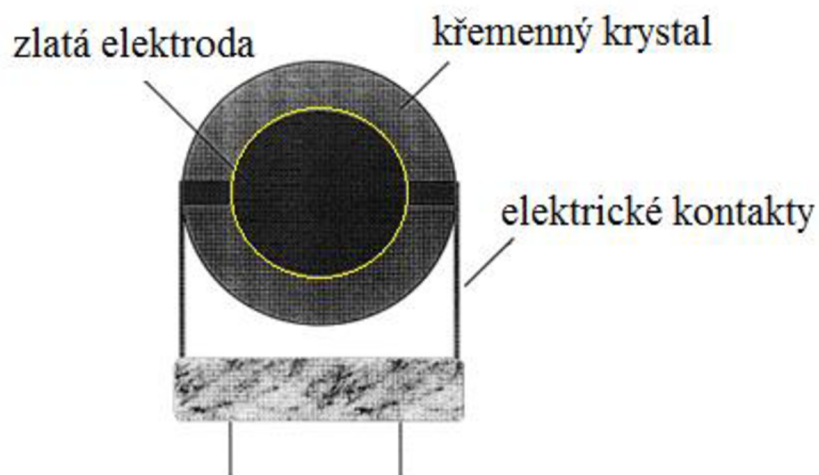
3.1 Křemenné mikrováhy

Veškeré experimenty se odehrávaly na tzv. křemenných mikrováhách (QCM), na které byla nanášena vrstva aminových plazmových polymerů a následně kolagen. Proto nejprve objasním princip těchto mikrovah.

Jedná se o zařízení, které funguje na principu piezoelektrického jevu popsaném v kapitole 3.1.1. Skládá se z velmi tenké křemenné desky, která je řezána buď z přírodního, nebo syntetického krystalu křemene. Na křemennou desku jsou pak napařeny z každé strany dvě elektrody (Obr. 6), na které je následně přiváděno střídavé elektrické napětí, které v krystalu vyvolá mechanické kmitání s velmi stabilní rezonanční frekvencí. Tato frekvence závisí na typu výbrusu, tvaru a je velice citlivá na změny hmotnosti materiálu na elektrodách. [24]

Při aplikaci vnitřního elektrického potenciálu na piezoelektrický materiál se vytváří vnitřní mechanické napětí. Jakmile se vytvoří piezoelektrický jev na QCM, oscilační elektrické pole působící napříč zařízením indukuje akustickou vlnu, která se šíří krystalem a vyrovnává minimální impedanci, kdy tloušťka zařízení je násobkem poloviční vlnové délky akustické vlny. QCM je zařízení smykového režimu, ve kterém se akustická vlna šíří ve směru kolmém na povrch krystalu. Aby mohl nastat tento jev, křemenná deska musí být řezána pod určitým úhlem vzhledem k osám křemenného krystalu (např. AT řezy pod úhlem $35^{\circ} 15'$ nebo BT řezy pod úhlem 49°). [24]

V dalších kapitolách je vysvětlen piezoelektrický jev, který je základním kamenem QCM, a také je zmíněna rezonanční frekvence, která se v našem případě pohybovala kolem 10 MHz.

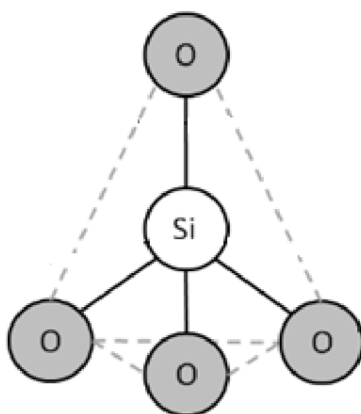


Obr. 6: Schéma typického QCM se žlutě vyznačenou oblastí elektrod. Převzato a částečně upraveno. [24]

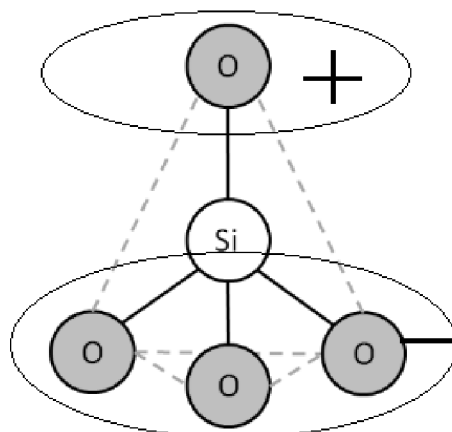
3.1.1 Piezoelektrický jev

Jedná se o jev, který je pozorován při deformaci některých krystalických látek, kde výsledkem této deformace je změna napětí na plochách krystalu. Tyto krystaly nejsou středově souměrné a k výrobě takového krystalu se používá materiál, v jehož krystalické mřížce jsou jak kladné, tak záporné ionty. Destička se vybrousí ve vhodné orientaci tak, aby na jedné ploše byly soustředěny náboje kladné a na druhé záporné. Tím se z vnějšího pohledu stává výbrus zdrojem elektrostatického pole, jehož intenzita, a zároveň i napětí, závisí na hustotě nábojů a na vzdálenosti nábojů uvnitř materiálu. Bude-li tedy taková destička stlačována nebo natahována kolmo k optické i elektrické ose, budou se kromě samotné destičky deformovat i molekuly, z nichž je destička složena. Tím se docílí změny polohy částic s nábojem a na protilehlých stěnách destičky tak vzniknou stejně velké opačné náboje. [25, 26]

V této práci je především využíván křemenný krystal, jehož prostorové uspořádání můžeme vidět na Obr. 7. Na této struktuře si můžeme objasnit dipólové momenty, které působí směrem od kladného křemíku k záporným kyslíkům. Tím pádem se bude na spodní straně akumulovat částečně záporný náboj a na vrchní straně částečně kladný náboj, jak je to znázorněno na Obr. 8.



Obr. 7 Prostorové uspořádání křemíkovo-kyslíkového tetraedru přítomného v QCM. [27]



Obr. 8: Znáornění vzniku částečných nábojů v důsledku působení mechanické deformace. Převzato a částečně upraveno. [27]

Při mechanické deformaci dochází ke změně směru a velikosti příslušných dipólových momentů. Tím je zapříčiněn přesun nábojů v rámci molekuly a vznik částečně kladného a částečně záporného náboje na opačných stranách molekuly. Pokud ovšem není krystal pod vlivem mechanické síly, tak se dipólové momenty navzájem vyruší a molekula je navenek neutrální. Pokud však na krystalovou destičku umístíme elektrody, je možné mezi nimi měřit piezoelektrické napětí. Jestliže bude na destičku působit opačná síla (destička bude natahována nebo stlačována), tak piezoelektrické napětí bude mít opačnou polaritu. Na destičce pak lze zaznamenat určitou stálou frekvenci, která je ovlivněna materiálem, velikostí a tloušťkou destičky. [25, 26]

3.1.2 Rezonanční frekvence

Jelikož QCM pracují s touto hodnotou, je třeba si ji více přiblížit. Jedná se o frekvenci, kdy přiložené napětí a proud protékající obvodem jsou ve fázi, a dochází tak k rezonanci. Tento jev byl známý již od počátků radiové komunikace. Předpokládalo se, že pokud budeme deponovat různý materiál na povrch např. křemenných krystalů, tak to povede ke změně rezonanční frekvence. Ačkoliv byl tento jev známý již dříve, teprve až v roce 1959 se podařilo vytvořit kvantitativní vztah (12). Tento vztah vytvořil Günter Sauerbrey, který své poznatky zaznamenal v publikaci *Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung*, a zároveň jako první představil křemenné mikrováhy. [28] Zjistil, že snížení rezonanční frekvence na křemenných krystalech je přímo úměrné hmotnosti deponovaného materiálu. [24]

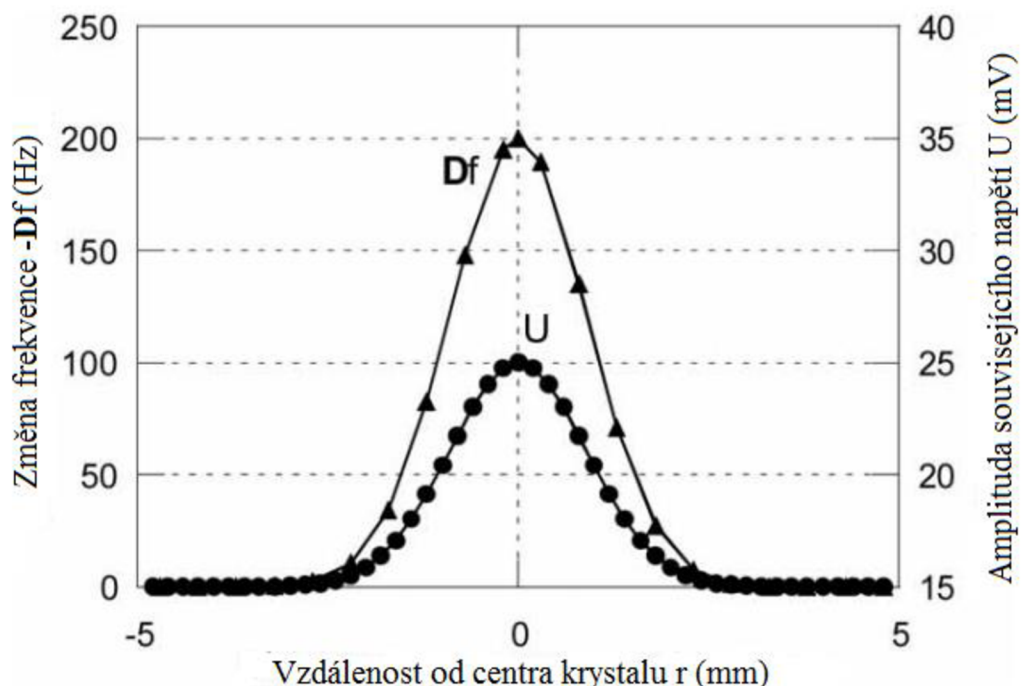
$$\Delta f = -\frac{2f_0^2}{A\sqrt{\rho_q\mu_q}}\Delta m \quad (12)$$

Vztah (12) tedy umožňuje vyjádřit hmotnost nanesené vrstvy na základě změny rezonanční frekvence. Δf značí změnu rezonanční frekvence udávanou v Hz, f_0 je počáteční rezonanční frekvence, A zastupuje piezoelektricky aktivní oblast (na povrchu elektrod) udávanou v cm^2 .

Dále ρ_q je hustota křemene, která je tabelována na $2,648 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, Δm je změna hmotnosti v gramech a μ_q je modul pružnosti v tahu křemene. Modul pružnosti se rozlišuje pro AT a BT řezu. Pro AT řez, který byl používán v této práci, je hodnota tabelovaná na $2,947\cdot 10^{11} \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$. [29]

Hlavním úkolem QCM je tedy v této práci na základě změny rezonanční frekvence určit hmotnost nadeponované vrstvy aminových plazmových polymerů, a následně po zaznamenání rezonanční frekvence QCM s vrstvou určit také hmotnost přichyceného kolagenu. Oproti klasickým vahám, které mají minimální detekovatelnou hmotnost 10^{-10} kg , jsou QCM mnohem citlivější. Jímí minimální detekovatelná hmotnost je 10^{-16} kg a můžeme je využít i mimo povrch Země, jelikož jejich přesnost nezávisí na gravitačním zrychlení. Hmotota, která se nadeponuje na křemenný krystal, je totiž vystavena zrychlení, které je způsobeno vibracemi křemenných krystalů. [30]

Další zajímavostí QCM je senzitivita hmotnosti, která se liší na určitých místech křemenného krystalu. Křemenné mikrováhy jsou senzitivní pouze v oblasti odpovídající ploše elektrody (Obr. 6). Zároveň platí, že senzitivita hmotnosti není závislá pouze na základní rezonanční frekvenci, ale velkou roli zde hraje i amplituda kmitání. Nejvyšších hodnot se tedy dosahuje přímo uprostřed krystalu a nejméně na kraji elektrody, jelikož amplituda kmitání i senzitivita hmotnosti nejsou stejně velké. Tuto vlastnost znázornil Mecea ve své publikaci pomocí Gaussovy křivky (Obr. 9). [30]



Obr. 9: Graf závislosti senzitivity hmotnosti vztážené na vzdálenost od centra křemenného krystalu. Převzato a částečně upraveno. [30]

3.2 Elipsometrie

Jedná se o optickou nedestruktivní metodu, pomocí které jsme schopni určit tloušťku námi pozorované vrstvy. Je založena na principu sledování změny polarizovaného světla po odražení, případně lomu od sledovaného vzorku, kde výsledné světlo je polarizované elipticky, z čehož je odvozen název této techniky. Ze změny polarizace světla jsme schopni určit optické konstanty vzorku typu indexu lomu n , indexu absorpce k , a zjistit tak i tloušťku vrstvy. Při dopadu elektromagnetického záření na vrstvu dochází k odrazu a lomu, tzn. že při odrazu se uplatňuje jev, kdy úhel odrazu ($\sin\theta_o$) se rovná úhlu dopadu ($\sin\theta_d$). Kdežto při lomu využíváme tzv. Snellův zákon. V elipsometrii je změna polarizovaného světla vyjádřena pomocí tzv. elipsometrického poměru ρ , který je určen vztahy (13) a (14), kde r_p a r_s jsou Fresnelovy koeficienty odrazu a t_p a t_s značí Fresnelovy koeficienty lomu pro p-polarizované a s-polarizované vlnění. Při p-polarizaci je vektor elektrické intenzity dopadajícího světla součástí roviny dopadu, kdežto u s-polarizace je tento vektor kolmý na rovinu dopadu. [31]

$$\rho = \frac{r_p}{r_s} \quad (13)$$

$$\rho = \frac{t_p}{t_s} \quad (14)$$

Dalšími veličinami určujícími elipsometrický poměr jsou tzv. elipsometrické úhly, konkrétně Δ a Ψ , kde Δ vyjadřuje fázový rozdíl p a s-polarizace a Ψ určuje změnu poměru intenzity jednotlivých složek polarizace. Tento vztah je vyjádřen rovnicí (15), kde, pokud pracujeme s odraženými paprsky, použijeme rovnici (13), a jestliže nás zajímá světlo lomené, využijeme rovnici (14). Ze závislosti změřených hodnot jsme pak na základě příslušného modelu schopni určit hodnotu tloušťky nadeponované vrstvy. [31]

$$\rho = \tan \psi e^{i\Delta} \quad (15)$$

Pro další charakterizaci vytvořených vrstev jsme použili tzv. infračervenou spektroskopii, která je krátce popsána v následující kapitole.

3.3 Infračervená spektroskopie

Infračervená spektroskopie, neboli Fourier transform infrared (spectroscopy) (FTIR), je jednoduchou a účinnou analytickou metodou, která má široké uplatnění nejen ve výzkumu, ale i v medicíně, farmacii a mnoha dalších odvětvích. Pomocí této metody jsme schopni určit jak kapaliny nebo plyny, tak i pevné látky nebo tenké vrstvy. Jedná se o senzitivní a nedestruktivní metodu, takže pro účely práce se jedná o ideální analytickou metodu.

Využívá infračervené záření, jehož vlnové délky se pohybují v oblasti od 0,78 do 1000 μm , což odpovídá rozsahu vlnočtu od 12500 do 10 cm^{-1} . Tento rozsah se navíc ještě dělí na tři oblasti, a to blízké infračervené záření (NIR–near infrared) s rozsahem 12 500–4 000 cm^{-1} (0,8–2,5 μm), střední infračervené záření (MIR–middle infrared) s rozsahem 4 000–400 cm^{-1} (2,5–25 μm) a dlouhé infračervené záření (FIR–far infrared) s rozsahem 400–10 cm^{-1} (25–1000 μm). Nejčastěji se však pracuje v oblasti MIR. Infračervené záření má vliv pouze na vibrační a rotační stav molekul. Analýza je založena na tom, že sledovaný vzorek absorbuje pouze určitou část záření. Na základě absorpce záření o určité frekvenci dochází ke změně vibračního a rotačního stavu. Tato změna stavu je vyjádřena podle rovnice (16), kde E_1 je energie vyššího stavu a E_0 je energie pro základní hladinu. Následně ve vztahu figuruje Planckova konstanta h , frekvence f , rychlost světla c a vlnočet ν . [32]

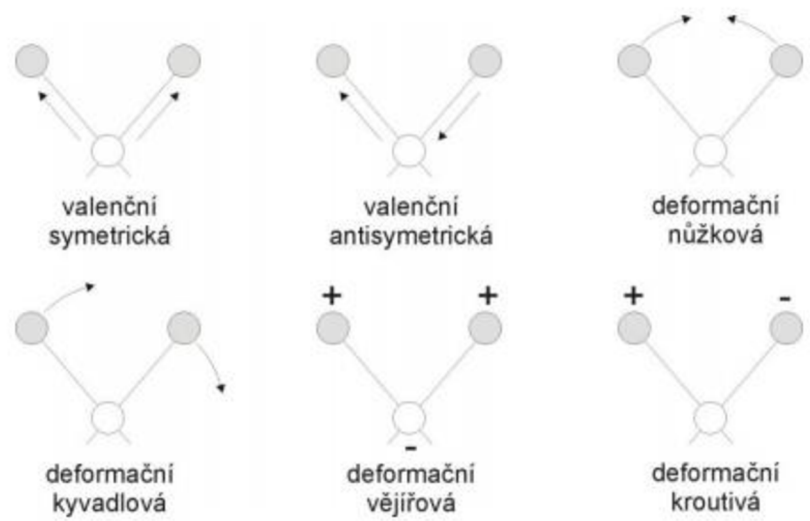
$$E_1 - E_0 = hf = h\nu c \quad (16)$$

Při aplikaci infračerveného záření, jak bylo zmíněno v odstavci výše, dochází k vibraci a deformaci molekul. Nejčastěji dochází ke změně vazebné délky (vibrace valenční) nebo ke změně vazebného úhlu (vibrace deformační). Některé typy vibrací jsem znázornil na Obr. 10. Tento jev je pro každou molekulu specifický a jsme schopni určit, na základě různé amplitudy výchylek jednotlivých atomů molekuly, o jakou funkční skupinu se jedná. Tato skutečnost pak umožnila sestavit tabulky vlnočtů pro typické funkční skupiny, což se využívá při analýze. [33]

Molekuly absorbují frekvence záření, které je charakteristické pro jejich strukturu. Abychom mohli detekovat molekulu pomocí FTIR, tak absorpce IČ záření je spojena se změnou dipólového momentu molekuly. To znamená, že pokud se ve vzorku bude nacházet látka absorbující IČ záření, projeví se to tzv. píkem na spektrogramu, který určuje kvalitativní ale i kvantitativní informaci vzorku. Spektrogram u IČ spektroskopie znázorňuje závislost transmitance, případně absorbance na vlnočtu. Transmitance (T) nebo absorbance (A) je pak vyjádřena Lambert-Beerovým zákonem (17).

$$A = \log \frac{1}{T} = -\log \frac{I}{I_0} = \epsilon c l \quad (17)$$

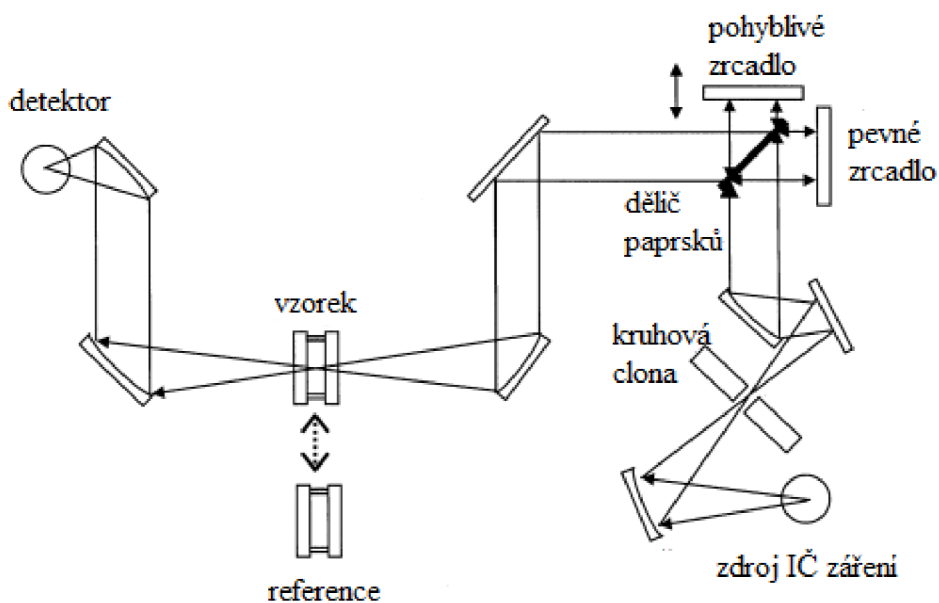
Označení I_0 vyjadřuje vstupní zářivý tok, I značí zářivý tok, který prošel vzorkem (výstupní zářivý tok). Další veličiny v tomto vztahu jsou koncentrace c , molární absorpční koeficient ϵ a délka absorpční vrstvy (většinou tloušťka květy) l . [34]



Obr. 10 Znáornění některých vibračních pohybů molekuly z pohledu klasické fyziky. [33]

3.3.1 Spektrometr

V dnešní době se již využívají tzv. FTIR spektrometry, kde základní složkou je interferometr, jako např. Michelsonův interferometr zobrazený na Obr. 11. Je složen z pevného a pohyblivého zrcadla, které umožňuje měnit rozdíl změny optické dráhy mezi dvěma paprsky, které dopadají na detektor. Emitované světlo ze zdroje je dopraveno na tzv. dělič paprsků (z angl. beam splitter), kde je rozděleno na dva paprsky. První paprsek je odražen na pevné zrcadlo, kde se následně odrazí zpátky a putuje zpátky do děliče paprsků, kde asi polovina paprsku projde do detektoru. Druhý paprsek původního zdroje záření prochází děličem paprsků směrem k pohyblivému zrcadlu. Tam se paprsek odrazí a putuje zpátky do děliče paprsků, a odtud putuje asi polovina záření směrem k detektoru. Jakmile se spojí oba dva paprsky putující k detektoru, tak na základě polohy pohyblivého zrcadla budeme na detektoru pozorovat buď konstruktivní nebo destruktivní interferenci. Toto zařízení tedy měří intenzitu světla na základě polohy posuvného zrcadla. Výstupem je tedy interferogram, který je pomocí Fourierovy transformace převeden na spektrum. Jakmile známe tuto informaci, tak jsme pak schopni určit, na základě píků ve spektrogramu, jaká funkční skupina se nachází ve vzorku, kterým prochází záření. [35]



Obr. 11 : Schéma typického FTIR spektrometru s Michelsonovým interferometrem. Převzato a částečně upraveno. [32]

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité materiály

V této práci byla použita řada materiálů a chemikálií. Do plazmového reaktoru byl přiváděn argon od firmy Messer Technogas s. r. o. o čistotě 99,998 % a páry cyklopropylaminu od firmy Sigma-Aldrich s.r.o. o čistotě 98 %. Jako substrát pro depozici a k měření elipsometrie a FTIR spektroskopie byl použit oboustranně leštěný křemík dopovaný borem o tloušťce 605 μm , odporu 7 Ωcm a orientací krystalu 100. Dále byl používán kolagen z telecí kůže od firmy Sigma-Aldrich s.r.o., který byl rozpuštěn v ledové (99,8 %) kyselině octové od firmy PENTA s.r.o. s čistotou p.a. (pro analýzu) naředit na koncentraci 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro přípravu roztoků byl také použit fosfátový pufr (PBS), který byl připraven smícháním 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,2 g KH_2PO_4 a 2,31 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a doplněním destilovanou H_2O do 1 l.

4.2 Aparatura

Jednotlivé vrstvy CPA byly vytvořeny v reaktoru s označením R2. Jedná se o válcový reaktor z oceli o vnitřním průměru 49 cm a výšce 24,6 cm. Reaktor je složený ze dvou planárních kruhových elektrod, kde horní elektroda, která je zemněná, má průměr 38 cm a spodní elektroda má v průměru 40 cm. Vzdálenost mezi jednotlivými elektrodami je 5,5 cm, kde na spodní elektrodu je přiváděno radiofrekvenční (RF) napětí. Horní zemněná elektroda je kuželovitého tvaru, podobná sprchové hlavici, kde na spodní straně jsou symetricky rozmístěny válcové otvory sloužící pro přívod plynu. Ten je tak rovnoměrný po celé ploše elektrody, proto je víceméně jedno, kam na spodní elektrodě položíme senzory QCM. V našem případě byly QCM umístěny kousek od středu elektrody. Do reaktoru byl také přidáván křemíkový substrát, který následně sloužil pro elipsometrické měření a infračervenou spektrometrii.

Vysokofrekvenční napětí bylo generováno generátorem Dressler Cesar 133 (Obr. 12) na frekvenci 13,56 MHz a následně přiváděno do reaktoru přes přizpůsobovací LC člen. Tlak v reaktoru byl měřen orientačně kombinovanou měrkou Balzers TPG251a (Obr. 14) a kapacitronem Ceravac CRT 90. Pomocí změny tlaku měřené kapacitronem můžeme určit natékání plynu do aparatury a případně tak upravit polohu jehlového ventilu, kterým regulujeme průtok monomeru do aparatury. Pro průtok plynu Q i pro malé změny tlaku Δp za čas Δt platí vztah

$$Q = \frac{\Delta p}{\Delta t} \frac{V}{p_a}, \quad (18)$$

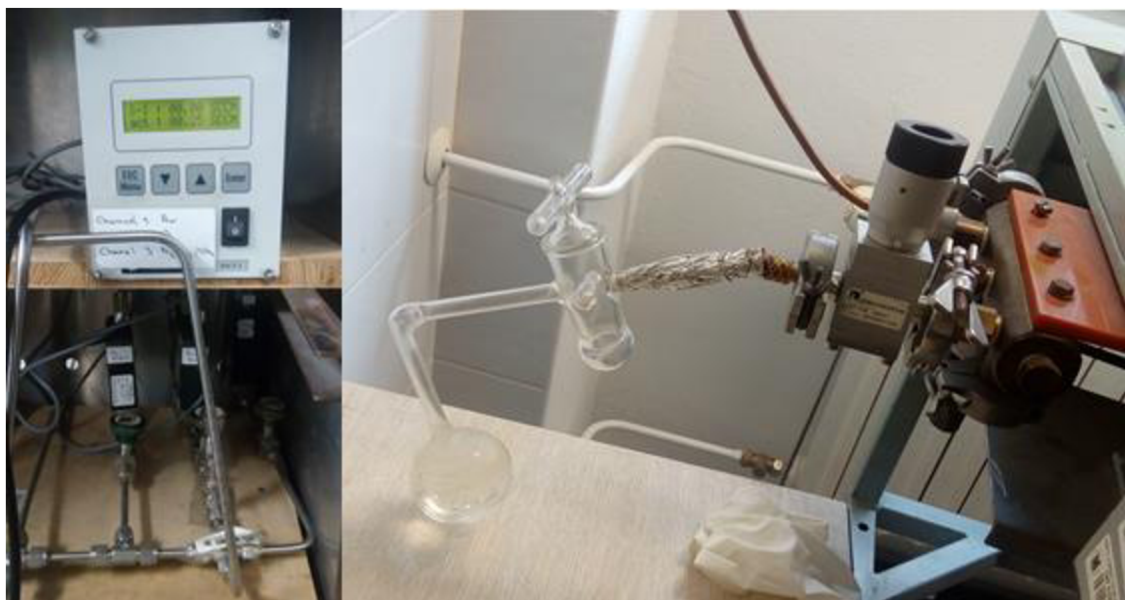
kde V určuje vnitřní objem reaktoru a p_a značí atmosférický tlak. Jednotkou průtoku plynu je sccm (standardní kubický centimetr za minutu), který vyjadřuje průtok molekul za sekundu při standardních podmínkách ($t = 0 \text{ }^\circ\text{C}$; $p = 101,325 \text{ kPa}$), kde $1 \text{ sccm} = 4,48 \cdot 10^{17} \text{ mc/s}$.

Výpočet průtoku je automaticky generován programem Baratron, který po určitou dobu zaznamenává údaje z kapacitronu. V práci se pracovalo při tlaku 50 Pa, který byl zajištěn

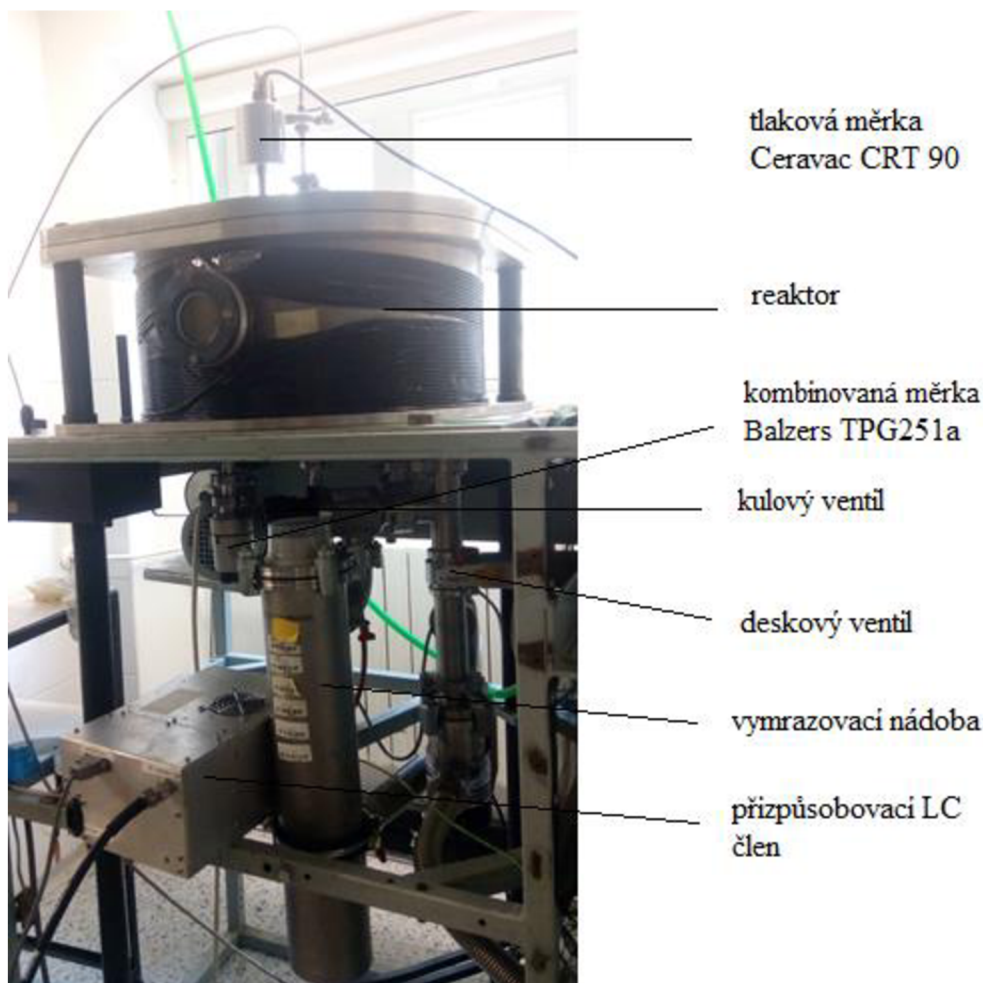
pomocí rotační vývěvy. Vyskytuje se zde také turbomolekulární vývěva, s tou se však nepracovalo. Páry CPA byly přiváděny z baňky (Obr. 13) přes skleněný uzavírací a jehlový dávkovací ventil směrem do aparatury, kde se těsně před vnikem páry ještě smísily s argonem, který byl dodáván z tlakové lahve. Celkový pohled na aparaturu je zobrazen na (Obr. 14).



Obr. 12: Zdroj RF napětí Dressler Cesar 133.



Obr. 13: Na levém obrázku je řídicí jednotka průtokoměrů a na pravém obrázku je způsob dávkování monomeru CPA bez izolace baňky s vodní lázní.



Obr. 14: Fotografie reaktoru R2, který byl použit pro depozici plazmových aminových polymerů na senzory QCM s popisem jednotlivých částí aparatury.

4.3 Příprava plazmových polymerů

Vrstvy plazmového aminového polymeru byly připraveny v reaktoru popsaném v předešlé kapitole. Vytváření aminové vrstvy sestávalo ze tří dílčích kroků, kterými byly měření natékání do aparatury, předúprava substrátů a vlastní depozice.

Aparatura byla nejprve ponechána čerpat dostatečně dlouhou dobu (ideálně přes noc), aby došlo k co nejlepšímu odstranění plynů nasorbovaných na stěnách reaktoru. Poté bylo přerušeno čerpání aparatury (uzavřením kulového ventilu) a za pomoci programu Baratron byla kontrolována hodnota průtoku plynu, která byla typicky menší než 0,01 sccm. Natékání do aparatury bylo stanoveno z důvodu, aby bylo ověřeno, že v aparatuře nebyly žádné zbytkové plyny, a že desorpce plynů ze stěn aparatury byla minimální. Opačný případ by se projevil právě zvýšeným natékáním.

Poté následovala předúprava substrátu, která se prováděla proto, aby byla zajištěna dobrá vazba mezi povrchem substrátu a rostoucí vrstvou. Po změření natékání do aparatury byl otevřen přívod argonu do aparatury a průtok argonu byl nastaven na 28 sccm. V této práci byla řídicí jednotka průtokoměrů (Obr. 13) kalibrována na dusík, proto se při nastavení průtoku argonu musela hodnota přepočítat pomocí konverzního faktoru, který pro argon

činil 1,4. Průtokoměr tedy ukazoval hodnotu 20 sccm. Regulací čerpací rychlosti kulovým ventilem se zajistil stálý tlak 50 Pa. Poté byl připojen přizpůsobovací člen, byly nastaveny parametry výboje (stejně jako při depozici viz Tabulka 1), zapnut RF výboj a provedena předúprava v argonovém plazmatu po dobu 5 min. Po uplynutí této doby byl vypnut RF výboj a uzavřen přívod argonu.

Poté následovala vlastní depozice. Jednalo se o poslední fázi, při které docházelo k vytvoření vrstvy plazmového polymeru na substrátu. Nejprve byl otevřen přívod monomeru do aparatury a na základě tlakové měrky a programu Baratron byl nastaven průtok CPA na zhruba 2 sccm. Při ustálení hodnot byl znovu otevřen přívod argonu, jeho průtok nastaven na 28 sccm a zapnut RF výboj. Deponovalo se tedy při 100 W v pulzním režimu po dobu 60 min a kondenzátory přizpůsobovacího členu se nastavily tak, aby odražený výkon byl 0 W. Po uplynutí jedné hodiny se RF výboj vypnul, odpojil se přizpůsobovací člen, následně byl vypnut přívod argonu a změřil se průtok CPA z důvodu zkontrolování stálosti průtoku monomeru. Poté byly uzavřeny všechny ventily přívodu plynů, byl odčerpán CPA, a nakonec byla zavzdušněna aparatura. Po tomto procesu bylo možné zvednout víko nad aparaturou a odebrat senzory QCM s již nadeponovanou vrstvou plazmového aminového polymeru, který byl následně použit pro další experimenty. Celkový přehled použitých depozičních podmínek je shrnut do Tabulky 1.

Tabulka 1: Přehled klasických depozičních podmínek používaných při mém měření.

Q_{CPA} (sccm)	Q_{Ar} (sccm)	P (W)	DC (%)	f (Hz)	t (min)	p (Pa)
2	28	100	33	500	60	50

4.4 Interakce kolagenu s plazmovým polymerem

Pro studium interakce kolagenu s plazmovým polymerem se použila metoda QCM. Bylo nutné zjistit hmotnost nadeponované vrstvy a následně změny hmotnosti při interakci s kolagenem. Proto jsem nejprve naměřil frekvenci každého použitého senzoru. Po depozici vrstev jsem zjistil změnu frekvence, která odpovídala hmotnosti vrstvy podle vztahu (12). Posléze byly na tyto mikrováhy nanášeny různé roztoky s rozpuštěným kolagenem a zjišťována změna frekvence.

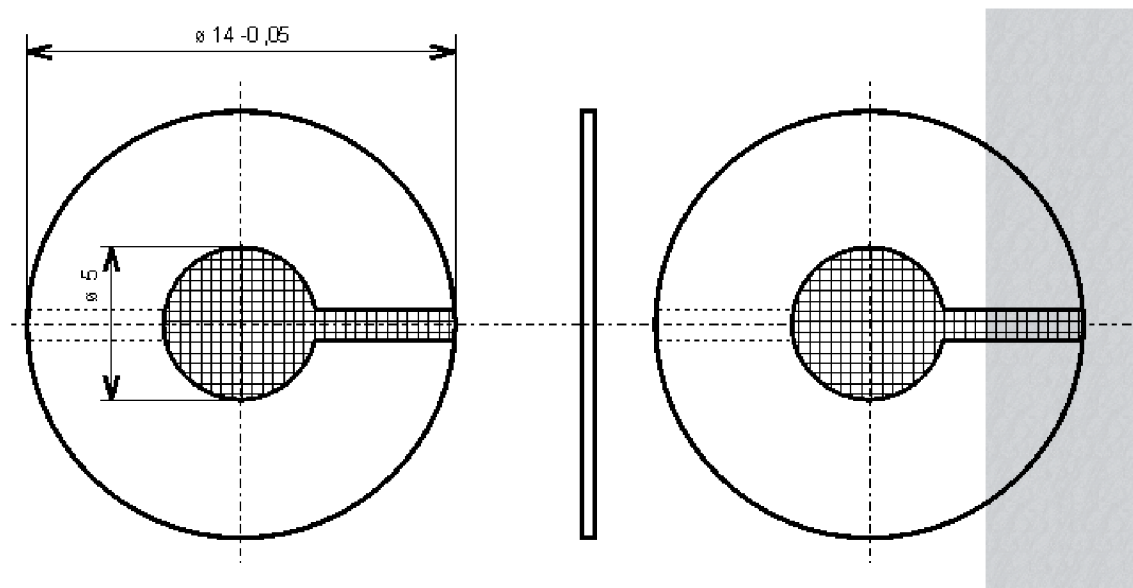
Zásobní roztok kolagenu byl vytvořen rozpuštěním 13 mg v 0,1 M kyselině octové (CH_3COOH), kde objem CH_3COOH odpovídal nasycenému roztoku a v jednotlivých případech se mírně lišil. Posléze byly z vytvořeného roztoku odpipetovány 2 ml do čisté vialky, ke které bylo přidáno na základě doporučení, buď 2 ml 0,1 M CH_3COOH , anebo 2 ml fosfátového pufru (PBS). Na QCM bylo aplikováno 6 μl roztoku kolagenu s CH_3COOH nebo roztoku s kolagenem, CH_3COOH a PBS. Po uskutečnění tohoto procesu se QCM nechaly inkubovat po dobu 5 nebo 16 hodin.

V průběhu experimentálního měření bylo zjištěno, že CH_3COOH a PBS mají negativní vliv na vytvořenou vrstvu, jelikož dochází k jejímu rozpouštění. Proto byl navíc proveden experiment zohledňující rozpouštění vrstvy. Jednalo se o nakapání 6 μl roztoku CH_3COOH o 0,1 M koncentraci na QCM s vrstvou polymeru, kde byly následně QCM podrobeny inkubaci po dobu 5 nebo 16 hodin. Stejný postup byl proveden i s roztokem PBS s CH_3COOH , který byl smíchán v poměru 1:1.

Před každým měřením frekvence QCM byl senzor opláchnut vodou kvůli odstranění zbytků inkubačního roztoku, a teprve potom se změnila frekvence. Po prvním měření se opláchnul senzor ještě jednou a frekvence se změnila znovu, abychom měli jistotu, že na senzoru nezbyl žádný roztok. Podrobnější popis jednotlivých měření je rozvinut ve výsledcích.

4.5 Křemenné mikrováhy

Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.1, jako substrát byly použity QCM neboli křemenné mikrováhy. V této práci byly použity QCM od firmy KRYSTALY, Hradec Králové a.s., ale lze je pořídit i od jiných firem, např. od firmy Phillip Technologies nebo od firmy INFICON. KRYSTALY, Hradec Králové nabízí tři druhy křemenných mikrovah s různým umístěním elektrod, kde schéma využívaného QCM můžeme vidět na Obr. 15. Jednalo se o model 3 s označením tvaru plan-plan, který měřil v průměru 14 mm a plocha elektrod měla v průměru 5 mm. Ostatní dva modely si lze prohlédnout na stránkách firmy. [36] V této práci byly používány QCM se zlatými elektrodami, jelikož zlato je velmi kvalitní materiál a nedochází na něm k oxidaci. Pro zaznamenání frekvence QCM bylo využíváno zařízení OpenQCM.



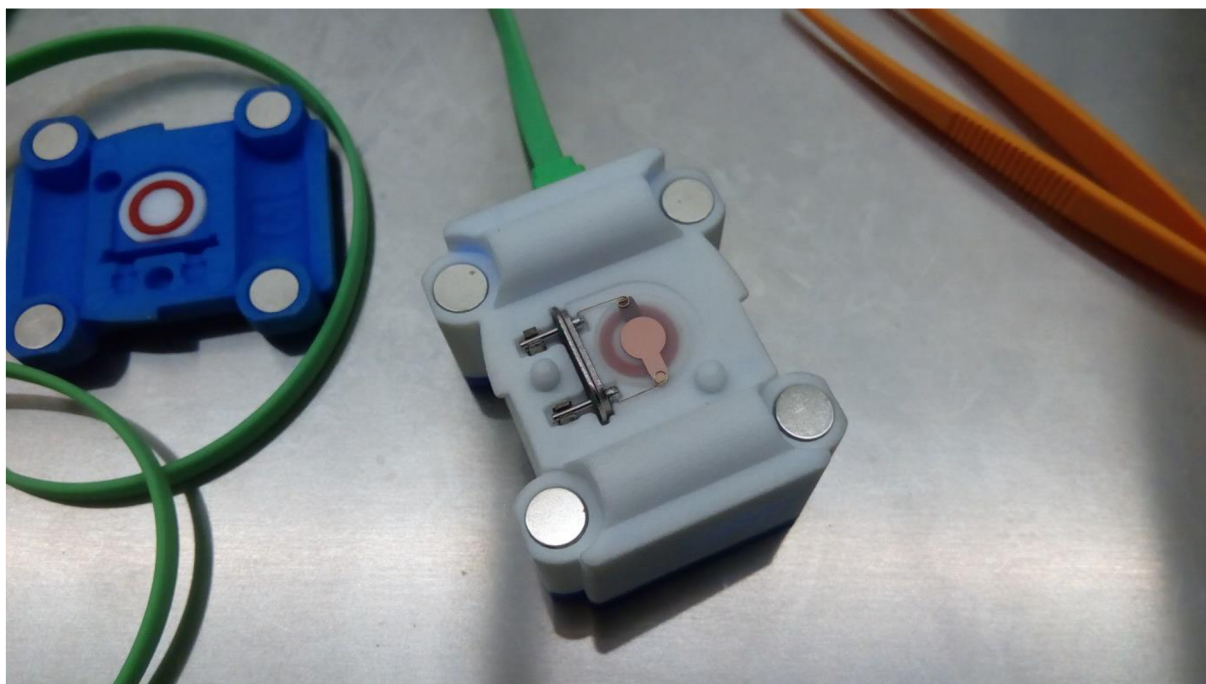
Obr. 15 Technické schéma mnou využívaného QCM. [36]

4.5.1 OpenQCM

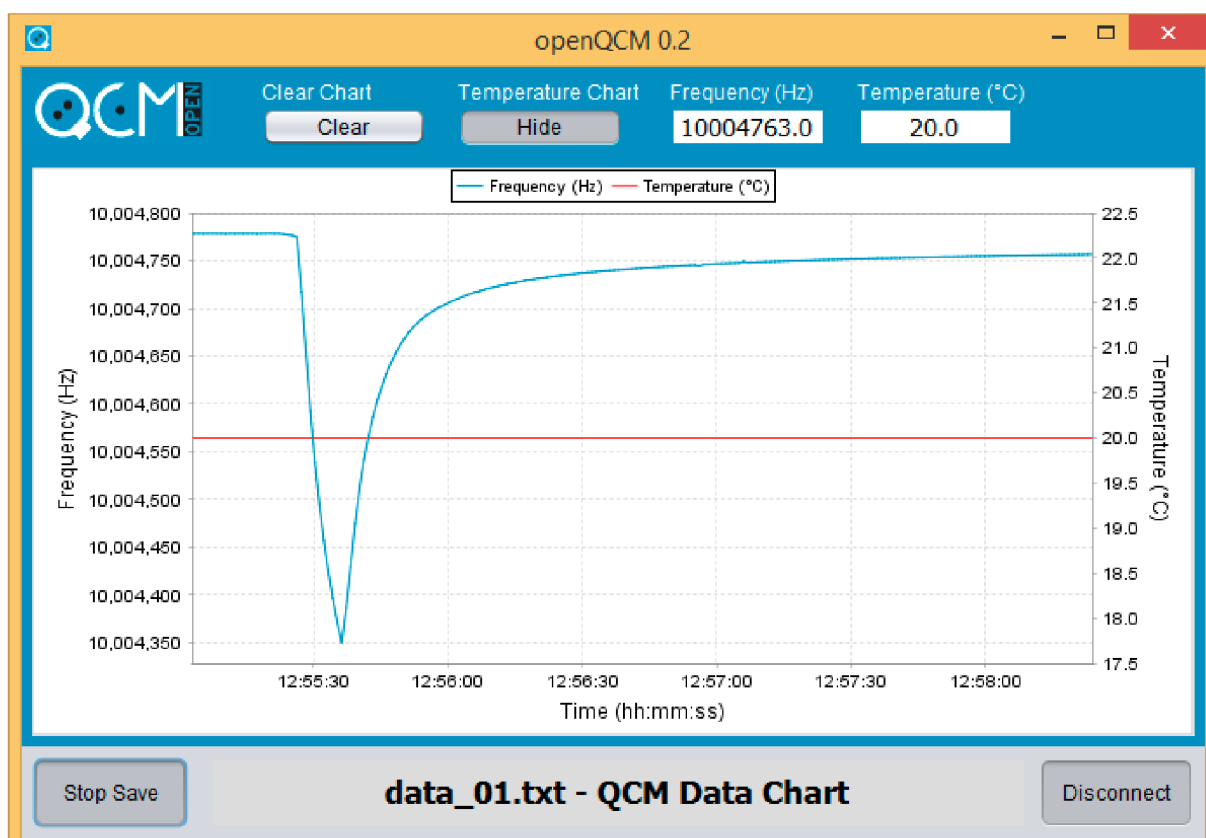
OpenQCM (Obr. 16) je zařízení používané v této práci, pomocí kterého jsme mohli změřit hodnoty rezonančních frekvencí křemenných krystalů. Křemenný krystal se umístil mezi elektrické kontakty (znázorněno na Obr. 6), a následně přenášený signál jsme zaznamenali v příslušném softwaru OpenQCM, který můžeme vidět na Obr. 17. OpenQCM je složen ze tří komponent, kterými jsou tzv. Arduino Micro board, QCM Arduino shield a teplotní senzor.

4.5.1.1 Arduino Micro

Jedná se o mikroprocesorovou desku v srdci OpenQCM, která je založená na mikrokontroléru ATmega32u4 s 8-bitovou centrální procesorovou jednotkou, která pracuje na maximální frekvenci 16 MHz. Díky tomuto zařízení lze OpenQCM napájet přímo přes USB připojení, dále změřit frekvenci krystalu tím, že přerušujeme časovač Arduino, přivádět energii do ovladače oscilátoru křemenného krystalu, a v neposlední řadě číst teplotu z analogového snímače. [37]



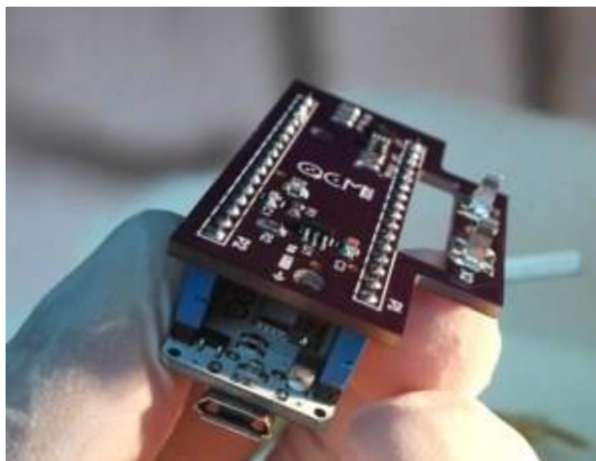
Obr. 16: Fotografie mnou využívaného OpenQCM.



Obr. 17: Klasický pohled na software OpenQCM potřebný k zaznamenání příslušné rezonanční frekvence. [38]

4.5.1.2 QCM Arduino shield

Arduino shield je elektronická deska, která je připevněna k systému Arduino Micro (znázorněno na Obr. 18) a rozšiřuje funkční vlastnosti systému Arduino. V mém případě se jedná o QCM Arduino shield, což se projevuje tím, že Arduino shield obsahuje ovladač oscilátoru křemenného krystalu (jedná se o tzv. Pierceův oscilátor). Pomocí něho jsme schopni určit hodnotu frekvence, která je díky tomuto zařízení stabilní. Arduino shield má také v sobě zabudovaný senzor na měření teploty, což je velká výhoda pro veškeré biologické experimenty. [37]



Obr. 18: Srdce QCM: QCM Arduino shield (nahore) spojený s Arduino Micro (dole, uchycen v prstech). [38]

4.6 Elipsometr

Při měření elipsometrie byl používán elipsometr od firmy J. A. Woollam s označením V-VASE (Obr. 19). Jedná se o nejpřesnější a všestranný elipsometr pro měření různých typů materiálů, polovodičů, dielektrik, polymerů, vícevrstevných materiálů atd. Kombinuje vysokou přesnost a preciznost v široké spektrální oblasti od 193 do 2000 nm. Variabilní vlnová délka a možnost nastavení úhlu dopadu umožňuje flexibilní možnosti měření, jako je např. reflexní a transmisní elipsometrie, intenzita reflektance a transmitance. Jednotlivé parametry tohoto elipsometru jsou shrnuty v Tabulce 2. [39]

Elipsometr byl využit k určení tloušťky vrstev na oboustranně leštěném křemíku. Elipsometrická spektra byla snímána v rozsahu 0,75–6,5 eV s krokem 0,05 eV pod úhlem dopadu 65°.

Tabulka 2: Shnutí parametrů elipsometru V-VASE od firmy J. A. Woollam

Spektrální rozsah	193–2000 nm
Retarder	ano
Držák vzorku	vertikální
Úhel dopadu	35–90°
Monochromátor	HS 190 (od firmy Woollam)



Obr. 19: Elipsometr V-VASE využívaný při měření tloušťky vrstvy. [39]

4.7 FTIR spektrometr

Pro indikaci funkčních skupin v plazmovém polymeru byl používán vakuový FTIR spektrometr Vertex80v (Obr. 20) od firmy Bruker. Jedná se o evakuované optické zařízení, které umožňuje měřit hodnotu transmitance v infračervené oblasti. Skládá se z Michelsonova interferometru, HeNe laseru a pracuje za sníženého tlaku <2,5 hPa. Přítomné vakuum je výhodné pro potlačení interferencí vzdušné vlhkosti ve spektru. [40]. FTIR spektra byla snímána v transmisičním módu za tlaku nižšího než 2 hPa v rozsahu $370\text{--}7500\text{ cm}^{-1}$ s rozlišením 4 cm^{-1} a počtem skenů 512.

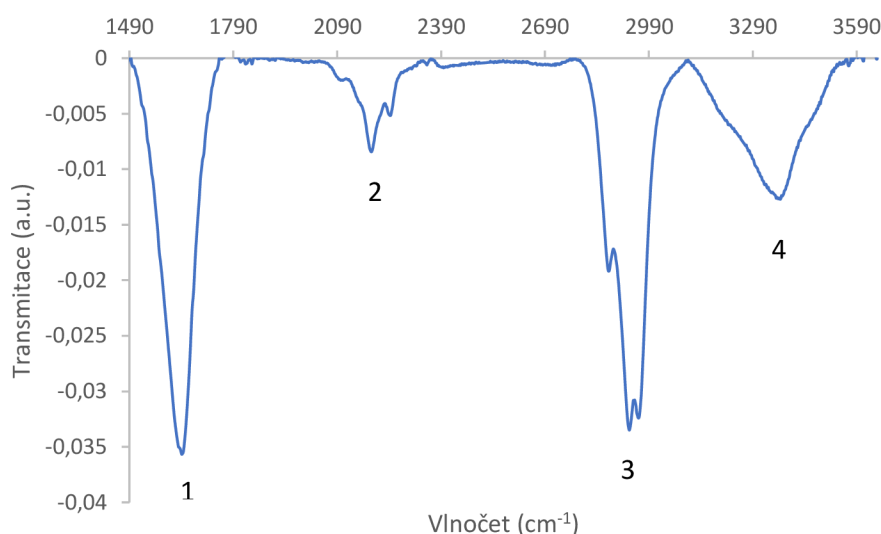


Obr. 20: FTIR spektrometr Vertex80v využívaný k identifikaci funkčních skupin v polymeru. [40]

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Chemické složení

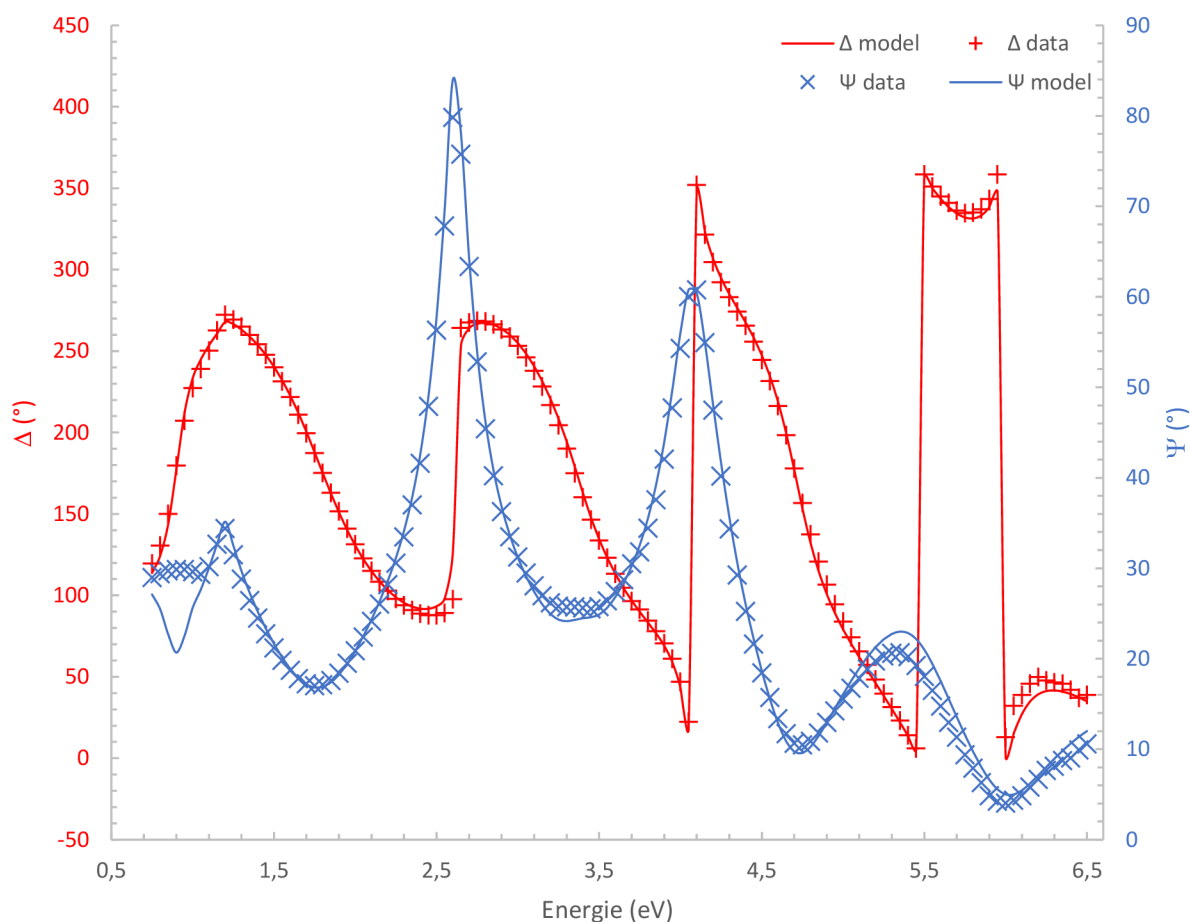
Pomocí FTIR spektrometru byl zaznamenán výskyt funkčních skupin ve vytvořeném plazmovém polymeru. Měření byla realizována s plazmovými polymery nanesenými na křemíkových substrátech. FTIR spektra byla snímána v transmisním módu za tlaku nižšího než 2 hPa v rozsahu vlnočtu 370–7500 cm^{-1} . Rozlišení bylo 4 cm^{-1} a počet skenů 512, kde jako pozadí se měřil křemík bez vrstvy a jeho spektrum pak bylo odečteno od spektra výsledného. FTIR spektra jsou zobrazena pouze v rozsahu od 1490 do 3650 cm^{-1} , protože nad tento rozsah nebyly identifikovány žádné významné absorpční píky, které by odpovídaly měřeným polymerům. U píků pod 1490 cm^{-1} byla obtížná identifikace absorpčních píků vrstvy z důvodu silných absorpčních píků křemíku. V přiloženém spektrogramu plazmového polymeru (Obr. 21) bylo identifikováno několik absorpčních pásů. Pík na 1641 cm^{-1} odpovídá N–H deformaci aminů ($-\text{NH}_2$, $>\text{NH}$), iminů ($-\text{CH}=\text{NH}$) a enaminů ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{NH}_2$). Píky v oblasti 2191–2245 cm^{-1} jsou přiřazeny nitrilům, isonitrilům a dalším nenasyceným vazbám ($-\text{C}\equiv\text{N}$, $-\text{N}\equiv\text{C}-$, $-\text{N}=\text{C}=\text{N}-$, $-\text{C}=\text{C}=\text{N}-$ nebo $-\text{C}\equiv\text{C}-$). Směs píků v rozmezí 2900–2960 cm^{-1} odpovídá C–H valenčním vibracím a pík 3371 cm^{-1} N–H valenčním vibracím. [41] Spektra plazmových polymerů připravených během různých depozic (se stejnými depozičními podmínkami) byla shodná.



Obr. 21: Spektrogram závislosti transmittance na vlnočtu s číselným označením jednotlivých píků neboli funkčních skupin přítomných v plazmovém polymeru. 1 – N–H_{def}, 2 – nitrily nebo isonitrily, 3 – C–H_{val}, a 4 – N–H_{val}.

5.2 Tloušťka vrstvy

Tloušťka vrstvy byla měřena na polymerech připravených na křemíkových substrátech pomocí elipsometru zmíněném v kapitole 4.6. Elipsometrická spektra (příklad viz Obr. 22) byla snímána v rozsahu 0,75–6,5 eV s krokem 0,05 eV pod úhlem dopadu 65°. Data byla fitována pomocí PJDOS modelu pro polymerní materiály podobné SiO₂ a strukturního modelu neuniformních tenkých vrstev. [42, 43] Jednotlivé tloušťky vrstev jsem zaznamenal do Tabulky 3, kde jsem navíc připojil i hodnoty průtoku monomeru před a po depozici. Přestože byly při každé depozici použity stejné parametry výboje, výsledné tloušťky vrstev nebyly stejné a pohybovaly se v rozsahu 230–330 nm. Tento jev se nepodařilo uspokojivě vysvětlit ani pečlivým zaznamenáváním průtoků monomeru před a po depozici. Předpokládáme, že všechny senzory použité při konkrétním měření měly stejnou tloušťku vrstvy jako vrstva na křemíku.



Obr. 22: Graf závislosti elipsometrických parametrů na energii pro 3. sadu depozice.

Tabulka 3: Hodnoty tloušťky aminových vrstev pro senzory použité při jednotlivých měřeních spolu s hodnotami průtoku CPA před a po depozici.

Číslo depozice	Tloušťka vrstvy d (nm)	Průtok monomeru před depozicí (sccm)	Průtok monomeru po depozici (sccm)
1	233 ± 2	2,07	2,07
2	326 ± 3	2,05	1,98
3	297 ± 2	2,12	2,14
4	246 ± 2	2,08	1,83
5	270 ± 2	2,09	2,03

5.3 Měření vrstev pomocí QCM

Před každou sadou depozice bylo nezbytné nejprve změřit hodnoty rezonančních frekvencí čistých QCM, a až poté bylo možné provádět depozici. Po vytvoření plazmového aminového polymeru se opět změnila hodnota rezonanční frekvence QCM, kde rozdílem z těchto dvou hodnot se získala hodnota změny rezonanční frekvence. Ze změny frekvence byla vypočítána hmotnost vytvořené vrstvy podle vztahu (12). Hustota materiálu vrstvy byla spočítána ze vztahu $\rho = m/V$, kde V byl vyjádřen na základě znalosti plochy elektrody QCM (5 mm) a tloušťky nadeponované vrstvy zjištěné elipsometrií. Vypočítané hodnoty ze všech sad depozic jsem shrnul do Tabulky 4.

Po vyhodnocení všech dat je z Tabulky 4 patrné, že ačkoliv se pracovalo za stejných podmínek, jednotlivé depozice se od sebe liší. Největších změn lze pozorovat mezi 2. a 5. sadou depozice, kde, ačkoliv jsou hustoty vytvořených polymerů stejné, na substrát (QCM) se nadeponovala jiná hmotnost. To souvisí s větší tloušťkou vrstvy v případě 2. sady depozice. Rozdílné hustoty mezi jednotlivými vrstvami by mohly být vysvětleny jinou tloušťkou vrstvy na QCM a Si, ale není zřejmé, proč by k tomu došlo. Je podezřelé, že vysoká hustota byla naměřena pro sadu 1. a 4., u kterých byla na Si zjištěna nejnižší tloušťka.

Ze všech hodnot byly vypočítány celkové průměrné hodnoty a jejich chyba. Tato chyba už není jen odhadem chyby způsobené náhodným rozptylem dat, ale zahrnuje i experimentální nejistoty experimentu, které jsou o řád vyšší než přesnost měření. Jelikož hustoty u 1. a 4. sady depozice vycházejí podezřele, byla průměrná hustota polymerní vrstvy stanovena z 2. 3. a 5. sady depozice, tedy na $1,28 \pm 0,06 \text{ g/cm}^3$.

5.4 Reakce aminového plazmového polymeru s kolagenem

Po depozici byl na vytvořené polymery nakapán kolagen rozpuštěný v CH_3COOH , anebo kolagen rozpuštěný v CH_3COOH a v pufru PBS, jak již bylo popsáno v kapitole 4.4. Cílem práce bylo navázat kolagen na plazmové aminové polymery z monomeru CPA. V průběhu experimentu bylo zjištěno, že plazmové polymery, charakterizované v Tabulce 4, jsou částečně rozpustné v příslušných rozpouštědlech kolagenu.

Tabulka 4: Tabulka s vypočítanými hodnotami změny frekvence QCM, hmotnosti a hustoty pro vytvořenou vrstvu plazmového aminového polymeru z monomeru CPA pro jednotlivé sady měření a celkový průměr těchto hodnot ze všech měření.

Sada depozice	Použité senzory	$\Delta\bar{f}$ (Hz)	$\Delta\bar{m}$ (μg)	ρ (g/cm^3)	$\Delta\bar{f}_{\text{celk}}$ (Hz)	$\Delta\bar{m}_{\text{celk}}$ (μg)	ρ_{celk} (g/cm^3)
1. sada	K, L, M, N	-8288 ± 106	$7,18 \pm 0,09$	$1,57 \pm 0,02$	-8550 ± 440	$7,4 \pm 0,9$	$1,4 \pm 0,2$
2. sada	1, 2, 3, 4	-9082 ± 72	$7,87 \pm 0,02$	$1,228 \pm 0,004$			
3. sada	16, 18, 20, 22	-9027 ± 35	$7,83 \pm 0,02$	$1,342 \pm 0,003$			
4. sada	23, 24, 25, 26	-8628 ± 87	$7,48 \pm 0,02$	$1,549 \pm 0,004$			
5. sada	27, 28, 29, 31, 32	-7721 ± 31	$6,69 \pm 0,01$	$1,263 \pm 0,003$			

Na senzory s označením 5 a 10 byl nanesen roztok CH_3COOH a byl inkubován po dobu 5 hodin, dále na senzory 7, 11 a Q byl nanesen roztok CH_3COOH a senzory byly inkubovány 16 hodin. Pro roztok PBS s CH_3COOH jsem vyčlenil senzory s označením 9 a 12, které byly inkubovány po dobu 5 hodin a nakonec senzory 13, 14 a R, které byly inkubovány po dobu 16 hodin. Po uplynutí daného časového horizontu byly senzory opláchnuty vodou, změřeny, následně opláchnuty podruhé, a opět byla změřena hodnota frekvence.

Bylo zjištěno, že při aplikaci CH_3COOH je vrstva plazmového polymeru rozpouštěna více než při aplikaci CH_3COOH s PBS. Výsledky jsem zaznamenal do Tabulky 5 a 6, kde v rámci Tabulky 5 byla rozpustnost měřena po prvním opláchnutí vodou a v Tabulce 6 jsou hodnoty pro ty samé senzory s tím rozdílem, že byly opláchnuty vodou ještě jednou.

Po prvním opláchnutí vodou při pětihodinové inkubaci byla vrstva polymeru v případě CH_3COOH rozpouštěna v rozmezí 6–9 % a v případě CH_3COOH s PBS v rozmezí 2,2–3,1 %. Jestliže jsme však inkubovali po dobu 16 hodin, tak v případě CH_3COOH byla vrstva rozpouštěna v rozmezí 9–13 % a v případě CH_3COOH s PBS v rozmezí 6–9 %. Z toho vyplývá, že při delší inkubaci dochází k většímu rozpouštění vrstvy. Odchylka průměrné rozpustnosti vrstvy byla vypočítána, tak jako by vypočítané hodnoty rozpustnosti vrstvy byly měřené veličiny. Tyto výchyly jsou zatíženy buď chybou měření nebo nedostatečným opláchnutím naneseného roztoku.

Oplachování vodou se dělalo z toho důvodu, aby byly smyty nanesené roztoky. V tomto případě CH_3COOH a CH_3COOH s PBS. Jakmile jsme opláchli senzory vodou podruhé, rozpustnosti v případě CH_3COOH byly 9,1–10,3 % (5 h) a 4–17 % (16 h) a v případě CH_3COOH s PBS 2–6 % (5 h) a 6–9 % (16 h). V případě 16 h rozpouštění u senzoru s označením 7 a Q je pozorována výchylka až o 6 %, což bylo pravděpodobně způsobeno nedostatečným opláchnutím CH_3COOH . Jinak jsou hodnoty rozpustnosti po 2. opláchnutí více méně stejné jako po 1. opláchnutí.

Nejnižší rozpustnosti se dosahuje při pětihodinové inkubaci za použití CH₃COOH a PBS a nejvyšší při šestnáctihodinové inkubaci za použití pouze CH₃COOH. Aminové plazmové polymery by neměly být rozpustné ve vodě, takže nepatrné rozdíly mezi jednotlivými senzory mohou být zatíženy chybou měření, případně dodatečným opláchnutím naneseného roztoku.

Tabulka 5: Vypočítaná procentuální rozpustnost vrstvy plazmových aminových polymerů při aplikaci roztoků CH₃COOH a CH₃COOH s PBS. Měřeno po prvním opláchnutí vodou.

Senzor	Čas inkubace (h)	Nanesený roztok	Po aplikaci roztoku		Před aplikací roztoku	Rozpustnost vrstvy (%)	Průměrná rozpustnost vrstvy (%)
			Δf (Hz)	Δm (μg)	Δm (μg)		
5	5	CH ₃ COOH	581 ± 33	-0,50 ± 0,03	7,97 ± 0,02	6	8 ± 2
10			686 ± 40	-0,60 ± 0,03	6,55 ± 0,03	9	
7	16	CH ₃ COOH	797 ± 41	-0,69 ± 0,03	7,72 ± 0,02	9	10 ± 2
11			727 ± 14	-0,63 ± 0,01	6,48 ± 0,01	10	
Q			1130 ± 26	-0,98 ± 0,02	7,70 ± 0,01	13	
9	5	CH ₃ COOH + PBS	284 ± 32	-0,25 ± 0,03	7,86 ± 0,01	3,1	2,7 ± 0,6
12			168 ± 11	-0,15 ± 0,01	6,56 ± 0,02	2,2	
13	16	CH ₃ COOH + PBS	596 ± 23	-0,52 ± 0,02	6,65 ± 0,01	8	8 ± 1
14			597 ± 30	-0,52 ± 0,03	8,05 ± 0,02	6	
R			795 ± 38	-0,69 ± 0,01	7,81 ± 0,02	9	

Tabulka 6: Vypočítaná procentuální rozpustnost vrstvy plazmových aminových polymerů při aplikaci roztoků CH₃COOH a CH₃COOH s PBS. Měřeno po druhém opláchnutí vodou.

Senzor	Čas inkubace (h)	Nanesený roztok	Po aplikaci roztoku		Před aplikací roztoku	Rozpustnost vrstvy (%)	Průměrná rozpustnost vrstvy (%)
			Δf (Hz)	Δm (μg)	Δm (μg)		
5	5	CH ₃ COOH	943 ± 37	-0,82 ± 0,03	7,97 ± 0,02	10,3	9,7 ± 0,8
10			615 ± 34	-0,53 ± 0,03	6,55 ± 0,03	9,1	
7	16	CH ₃ COOH	355 ± 31	-0,31 ± 0,03	7,72 ± 0,02	4	10 ± 6
11			807 ± 21	-0,70 ± 0,02	6,48 ± 0,01	10	
Q			1504 ± 35	-1,30 ± 0,03	7,70 ± 0,01	17	
9	5	CH ₃ COOH + PBS	509 ± 23	-0,44 ± 0,02	7,86 ± 0,01	6	4 ± 2
12			278 ± 23	-0,24 ± 0,02	6,56 ± 0,02	2	
13	16	CH ₃ COOH + PBS	644 ± 20	-0,56 ± 0,02	6,65 ± 0,01	8	8 ± 1
14			595 ± 42	-0,52 ± 0,04	8,05 ± 0,02	6	
R			840 ± 34	-0,73 ± 0,03	7,81 ± 0,02	9	

5.4.1 Reakce kolagenu s vrstvou z první sady depozice

Nejprve se studovala reakce kolagenu s vrstvou z první sady depozice. Byl připraven nasycený roztok kolagenu, který se skládal z 13 mg kolagenu a 7,5 ml 0,1 M CH_3COOH . Poté jsem se držel postupu popsáního v kapitole 4.4. Výsledná koncentrace roztoku kolagenu nanášeného na QCM s plazmovým polymerem tedy činila 0,87 mg/ml a tím pádem v pipetovaném objemu 6 μl bylo 5,2 μg kolagenu.

Po depozici byly vyčleněny 4 QCM senzory s označením K, L, M a N. Na senzor K byl nanesen roztok kolagenu s CH_3COOH a PBS a byl inkubován po dobu 5 hodin. Na senzor L byl nanesen také roztok kolagenu s CH_3COOH a PBS, který byl inkubován po dobu 16 hodin. Senzor N obsahoval kolagen s CH_3COOH a byl inkubován po dobu 5 hodin a na senzor M byl nanesen kolagen s CH_3COOH , a byl inkubován po dobu 16 hodin.

Veškeré výsledky z tohoto měření byly zaznamenány do Tabulky 7 a 8. V Tabulce 7 je zaznamenána interakce kolagenu s plazmovým polymerem, kde je nejprve zmíněna hmotnost vrstvy plazmového polymeru, která byla rozpuštěna, poté hmotnost kolagenu, která byla spočítána na základě vztahu (12) ze změny frekvence QCM, a v posledním sloupci je pak vypočítána finální nanesená hmotnost kolagenu, kde je započítána i rozpustnost plazmového polymeru. V Tabulce 8 platí stejný princip jako v Tabulce 7, s tím rozdílem, že v Tabulce 7 je senzor opláchnut vodou pouze jednou a v Tabulce 8 je senzor opláchnut podruhé. Po každém opláchnutí se čeká, než senzor uschne, a až po uschnutí je změřen. Hodnoty po druhém opláchnutí vodou slouží spíše jen pro kontrolu. V tomto případě nedošlo k žádným razantním změnám v hmotnosti imobilizovaného kolagenu. Senzor N byl při manipulaci zlomen, proto v Tabulce 8 nejsou zaznamenány žádné hodnoty.

Z tohoto měření vyplývá, že nejvíc kolagenu se přichytí při rozpuštění kolagenu v CH_3COOH , když se QCM nechá inkubovat po dobu 16 hodin. Tento výsledek nebyl očekáván, jelikož CH_3COOH rozpouští vrstvu nejvíce, tudíž se spíše očekávalo, že největších výtěžků se bude dosahovat při rozpuštění kolagenu v PBS. Navíc by PBS měl působit jako pufr a zajišťovat stálé podmínky v roztoku. Proto bylo provedeno další měření.

Tabulka 7: Vypočítané hodnoty pro senzory s kolagenem, se započítáním rozpustnosti vrstvy plazmového polymeru. Vztaženo po prvním opláchnutí.

Senzor	Čas inkubace (h)	Nanesený roztok	Rozpustnost vrstvy		Nanesený kolagen (bez rozpustnosti)		Nanesený kolagen (s rozpustností)
			Rozpustnost (%)	m (μg)	Δf (Hz)	Δm (μg)	Δm (μg)
N	5	CH ₃ COOH+ kolagen	7,72	0,53 ± 0,09	-384 ± 45	0,33 ± 0,04	0,9 ± 0,1
M	16	CH ₃ COOH + kolagen	10,49	0,79 ± 0,1	-970 ± 17	0,84 ± 0,01	1,6 ± 0,1
K	5	CH ₃ COOH + PBS + kolagen	2,68	0,19 ± 0,09	-422 ± 26	0,37 ± 0,02	0,56 ± 0,09
L	16	CH ₃ COOH + PBS + kolagen	7,69	0,55 ± 0,09	-412 ± 34	0,36 ± 0,03	0,9 ± 0,1

Tabulka 8: Vypočítané hodnoty pro senzory s kolagenem, se započítáním rozpustnosti vrstvy plazmového polymeru. Vztaženo po druhém opláchnutí.

Senzor	Čas inkubace (h)	Nanesený roztok	Rozpustnost vrstvy		Nanesený kolagen (bez rozpustnosti)		Nanesený kolagen (s rozpustností)
			Rozpustnost (%)	m (μg)	Δf (Hz)	Δm (μg)	Δm (μg)
N	5	CH ₃ COOH+ kolagen	9,69	0,67 ± 0,09	-	-	-
M	16	CH ₃ COOH + kolagen	10,23	0,77 ± 0,1	-836 ± 17	0,73 ± 0,01	1,5 ± 0,1
K	5	CH ₃ COOH + PBS + kolagen	3,93	0,28 ± 0,09	-452 ± 12	0,39 ± 0,01	0,67 ± 0,09
L	16	CH ₃ COOH + PBS + kolagen	7,85	0,56 ± 0,09	-509 ± 32	0,44 ± 0,03	1,0 ± 0,1

5.4.2 Reakce kolagenu s vrstvou ze druhé sady depozice

Ve druhé sadě experimentů se nejprve provedla depozice, následně byl namíchán roztok kolagenu, kde jsme nyní rozpustili 13 mg kolagenu v 8,5 ml 0,1 M roztoku CH_3COOH . Jiný objem kapaliny se volil z důvodu pohodlnější manipulace. Při přípravě roztoků k měření se postupovalo stejně, jak je zmíněno v kapitole 4.4, kde nyní finální koncentrace roztoku kolagenu činila 0,76 mg/ml, tím pádem v pipetovaném objemu bylo 4,6 μg .

Byly vyčleněny 4 senzory s označením 1, 2, 3 a 4. Na senzor 1 se nanese roztok kolagenu s CH_3COOH a PBS (inkubováno 5 hodin), na senzor 2 byl nanesen také roztok kolagenu s CH_3COOH a PBS, ale byl inkubován 16 hodin. Senzor 3 obsahoval kolagen s CH_3COOH a byl inkubován po dobu 5 hodin a na senzor 4 byl nanesen kolagen s CH_3COOH a byl inkubován po dobu 16 hodin.

Výsledky byly zaznamenány do Tabulky 9 a 10, kde postup stanovení byl stejný jako u prvního měření (5.4.1). V rámci druhého opláchnutí výsledky kolidují s hodnotami prvního měření. Je to pravděpodobně způsobeno dodatečným opláchnutím senzoru, anebo, v případě vyšší hodnoty v rámci druhého opláchnutí, nedostatečným vysušením.

Toto měření vyšlo podle původního očekávání. Nejvíce kolagenu se imobilizovalo na plazmovém polymeru v případě, když byl nanesen roztok kolagenu s PBS a CH_3COOH , a když byl inkubován po dobu 16 hodin. V případě druhého opláchnutí vodou se tedy imobilizovalo 3,09 μg . Jelikož jsme nanášeli roztok, který obsahoval 4,6 μg , můžeme prohlásit tuto sadu depozice za velmi úspěšnou. Výsledek byl velice slibný, ale jelikož byla tato hodnota odlišná od prvního měření, bylo nutné provést další sadu experimentů včetně depozice a potvrdit, či vyvrátit jedno či druhé.

Tabulka 9: Vypočítané hodnoty pro senzory s kolagenem, se započítáním rozpustnosti vrstvy plazmového polymeru. Vztaženo po prvním opláchnutí.

Senzor	Čas inkubace (h)	Nanesený roztok	Rozpustnost vrstvy		Nanesený kolagen (bez rozpustnosti)		Nanesený kolagen (s rozpustností)
			Rozpustnost (%)	m (μg)	Δf (Hz)	Δm (μg)	Δm (μg)
3	5	CH ₃ COOH+kolagen	7,72	0,62 ± 0,02	-459 ± 32	0,40 ± 0,03	1,01 ± 0,03
4	16	CH ₃ COOH+kolagen	10,49	0,80 ± 0,04	-1430 ± 42	1,24 ± 0,04	2,04 ± 0,05
1	5	PBS + CH ₃ COOH + kolagen	2,68	0,21 ± 0,02	-2643 ± 25	2,30 ± 0,02	2,51 ± 0,03
2	16	PBS + CH ₃ COOH + kolagen	7,69	0,58 ± 0,02	-3210 ± 26	2,79 ± 0,02	3,37 ± 0,03

Tabulka 10: Vypočítané hodnoty pro senzory s kolagenem, se započítáním rozpustnosti vrstvy plazmového polymeru. Vztaženo po druhém opláchnutí.

Senzor	Čas inkubace (h)	Nanesený roztok	Rozpustnost vrstvy		Nanesený kolagen (bez rozpustnosti)		Nanesený kolagen (s rozpustností)
			Rozpustnost (%)	m (μg)	Δf (Hz)	Δm (μg)	Δm (μg)
3	5	CH ₃ COOH+kolagen	9,69	0,77 ± 0,02	-536 ± 24	0,47 ± 0,02	1,24 ± 0,03
4	16	CH ₃ COOH+kolagen	10,23	0,78 ± 0,04	-1196 ± 44	1,04 ± 0,04	1,82 ± 0,05
1	5	PBS + CH ₃ COOH + kolagen	3,93	0,31 ± 0,02	-2651 ± 24	2,30 ± 0,02	2,61 ± 0,03
2	16	PBS + CH ₃ COOH + kolagen	7,85	0,60 ± 0,02	-2869 ± 24	2,49 ± 0,02	3,09 ± 0,03

5.4.3 Reakce kolagenu s vrstvou ze třetí sady depozice

Při třetím měření se opět nejprve provedla depozice a poté se namíchal roztok kolagenu, kde nyní bylo rozpuštěno 13 mg v 10,5 ml 0,1 M CH_3COOH . Důvod užití jiného objemu je zmíněn v kapitole 5.4.2. Nyní se však na vytvořený roztok působilo ultrazvukem po dobu 10 min. Ultrazvuk byl použit proto, aby došlo k lepšímu a rychlejšímu rozpuštění kolagenu v CH_3COOH . Poté bylo pokračováno v postupu jako v kapitole 4.4, kde nyní konečná koncentrace roztoku kolagenu činila 0,62 mg/ml.

Bylo vyčleněno 8 QCM senzorů, na které byly nanесeny stejné roztoky jako u prvního či u druhého měření o stejné délce inkubace. Pro každou operaci byly tedy vyčleněny 2 senzory, avšak senzory, které byly podrobeny pětihodinové inkubaci, byly mechanicky znehodnoceny. Zůstaly tedy senzory s označením 16 a 20, na které byl nanесen roztok kolagenu s CH_3COOH (inkubováno 16 hodin) a senzory s označením 18 a 22, na které byl nanесen roztok kolagenu s CH_3COOH a PBS (inkubováno 16 hodin). Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 11 a 12, kde postup stanovení výsledků je popsán v kapitole 5.4.1. Důvod rozdílných hodnot v případě prvního a druhého opláchnutí je stejný jako v kapitole 5.4.2.

Toto měření dopadlo ze všech nejhůře, jelikož se imobilizovalo malé množství kolagenu, a navíc pro stejné roztoky vycházely odlišné hodnoty. Je to vidět u senzorů s označením 16 a 20, kde na tyto senzory byl nanášen stejný roztok a byly zajištěny stejné podmínky, přesto se na senzor 16 imobilizovalo více kolagenu, než na senzor 20. Jedním z důvodů může být nedostatečné opláchnutí senzoru před měřením. V rámci této sady depozice byla navíc prokázána nejlepší imobilizace pro kolagen s CH_3COOH , což nebyl očekávaný výsledek. Další z příčin těchto výsledků mohl být např. použitý ultrazvuk, jelikož mohlo dojít k denuraci kolagenu vysokou teplotou. Proto se při dalším měření tato předúprava již neprováděla. Jelikož se nepodařilo zjistit, který roztok pro imobilizaci kolagenu je nejlepší, bylo nutné provést další měření.

Tabulka 11: Vypočítané hodnoty pro senzory s kolagenem, se započítáním rozpustnosti vrstvy plazmového polymeru. Vztaženo po prvním opláchnutí.

Senzor	Čas inkubace (h)	Nanesený roztok	Rozpustnost vrstvy		Nanesený kolagen (bez rozpustnosti)		Nanesený kolagen (s rozpustností)
			Rozpustnost (%)	m (μg)	Δf (Hz)	Δm (μg)	Δm (μg)
16	16	CH ₃ COOH+kolagen	10,49	0,81 ± 0,02	-829 ± 19	0,72 ± 0,02	1,53 ± 0,02
20	16	CH ₃ COOH+kolagen	10,49	0,77 ± 0,02	-226 ± 20	0,20 ± 0,02	0,97 ± 0,02
18	16	PBS + CH ₃ COOH + kolagen	7,69	0,58 ± 0,02	-682 ± 28	0,59 ± 0,02	1,18 ± 0,03
22	16	PBS + CH ₃ COOH + kolagen	7,69	0,61 ± 0,02	18 ± 18	-0,02 ± 0,02	0,59 ± 0,03

Tabulka 12: Vypočítané hodnoty pro senzory s kolagenem, se započítáním rozpustnosti vrstvy plazmového polymeru. Vztaženo po druhém opláchnutí.

Senzor	Čas inkubace (h)	Nanesený roztok	Rozpustnost vrstvy		Nanesený kolagen (bez rozpustnosti)		Nanesený kolagen (s rozpustností)
			Rozpustnost (%)	m (μg)	Δf (Hz)	Δm (μg)	Δm (μg)
16	16	CH ₃ COOH+kolagen	10,23	0,79 ± 0,01	-638 ± 19	0,55 ± 0,02	1,34 ± 0,02
20	16	CH ₃ COOH+kolagen	10,23	0,76 ± 0,02	109 ± 67	-0,1 ± 0,06	0,66 ± 0,06
18	16	PBS + CH ₃ COOH + kolagen	7,85	0,60 ± 0,03	-283 ± 30	0,25 ± 0,03	0,84 ± 0,04
22	16	PBS + CH ₃ COOH + kolagen	7,85	0,62 ± 0,02	286 ± 19	-0,3 ± 0,02	0,38 ± 0,03

5.4.4 Reakce kolagenu s vrstvou ze čtvrté sady depozice

Při čtvrtém měření se nejprve provedla depozice, poté se rozpustilo 13 mg kolagenu v 10,5 ml 0,1 M CH_3COOH . Poté se postupovalo stejně jako u prvního, druhého či třetího měření, ale nyní již nebyl použit ultrazvuk a výsledná koncentrace nanášeného roztoku kolagenu činila 0,62 mg/ml.

Byly označeny 4 QCM senzory, kde na senzor 23 byl nanesen roztok kolagenu s CH_3COOH (inkubováno 5 h), na senzor 24 byl nanesen roztok kolagenu (inkubováno 16 h), na senzor 25 byl nanesen roztok kolagenu s CH_3COOH a PBS (inkubováno 5 h) a na senzor 26 byl nanesen roztok kolagenu s CH_3COOH a PBS (inkubováno 16 h). Výsledky byly shrnuty do Tabulky 13 a 14, kde postup stanovení výsledků byl popsán v kapitole 5.4.1. a výsledky po prvním a druhém opláchnutí se mezi sebou výrazně neliší.

Tento experiment nebyl úspěšný, jelikož hodnoty vyšly v rámci obou roztoků přibližně stejně. Tuto skutečnost lze pozorovat např. v Tabulce 14, kde v rámci šestnácti hodinové inkubace se imobilizovalo 1,05 μg na senzoru 24 (CH_3COOH +kolagen) a 0,81 μg na senzoru 26 (CH_3COOH +PBS+kolagen).

Ze závislosti těchto a předchozích výsledků bylo usouzeno, že metoda, která byla prováděna doposud, není efektivní, protože v nanášeném objemu (6 μl) nemusí být pokaždé stejný poměr kolagenu. Navíc při kápnutí 6 μl na senzor je možné, že přímo v místě kápnutí se přichytí většina kolagenu obsaženého v roztoku a na další aktivní místa na povrchu připadá již menší poměr kolagenu. Jedná se tak o nerovnoměrné rozlití roztoku na povrchu. Na základě této myšlenky bylo provedeno ještě jedno měření.

Tabulka 13: Vypočítané hodnoty pro senzory s kolagenem, se započítáním rozpustnosti vrstvy plazmového polymeru. Vztaženo po prvním opláchnutí.

Senzor	Čas inkubace (h)	Nanesený roztok	Rozpustnost vrstvy		Nanesený kolagen (bez rozpustnosti)		Nanesený kolagen (s rozpustností)
			Rozpustnost (%)	m (μg)	Δf (Hz)	Δm (μg)	Δm (μg)
23	5	CH ₃ COOH+kolagen	7,72	0,60 ± 0,02	-57 ± 22	0,05 ± 0,02	0,64 ± 0,02
24	16	CH ₃ COOH+kolagen	10,49	0,80 ± 0,02	-442 ± 14	0,38 ± 0,01	1,18 ± 0,02
25	5	PBS + CH ₃ COOH + kolagen	2,68	0,20 ± 0,01	-637 ± 17	0,55 ± 0,01	0,75 ± 0,02
26	16	PBS + CH ₃ COOH + kolagen	7,69	0,56 ± 0,03	-449 ± 31	0,39 ± 0,03	0,95 ± 0,04

Tabulka 14: Vypočítané hodnoty pro senzory s kolagenem, se započítáním rozpustnosti vrstvy plazmového polymeru. Vztaženo po druhém opláchnutí.

Senzor	Čas inkubace (h)	Nanesený roztok	Rozpustnost vrstvy		Nanesený kolagen (bez rozpustnosti)		Nanesený kolagen (s rozpustností)
			Rozpustnost (%)	m (μg)	Δf (Hz)	Δm (μg)	Δm (μg)
23	5	CH ₃ COOH+kolagen	9,69	0,75 ± 0,02	-145 ± 23	0,13 ± 0,02	0,87 ± 0,03
24	16	CH ₃ COOH+kolagen	10,23	0,78 ± 0,02	-313 ± 11	0,27 ± 0,01	1,05 ± 0,02
25	5	PBS + CH ₃ COOH + kolagen	3,93	0,29 ± 0,01	-470 ± 24	0,41 ± 0,02	0,70 ± 0,02
26	16	PBS + CH ₃ COOH + kolagen	7,85	0,57 ± 0,03	-277 ± 32	0,24 ± 0,03	0,81 ± 0,04

5.4.5 Reakce kolagenu s vrstvou z páté sady depozice

V rámci pátého měření se přistoupilo k malé změně v postupu. Nejprve byla provedena depozice, a poté byl připraven roztok kolagenu, kde bylo rozpuštěno 13 mg kolagenu v 7,5 ml 0,1 M CH_3COOH . Poté byly připraveny roztoky stejným způsobem jako dříve, kde konečná koncentrace roztoku kolagenu byla 0,87 mg/ml.

Nyní se však nepipetovalo 6 μl určitého roztoku s kolagenem na daný senzor, ale celý senzor byl ponořen do Petriho misky, která obsahovala buď 4 ml roztoku kolagenu s CH_3COOH , nebo 4 ml roztoku kolagenu s CH_3COOH a PBS. Byly vyčleněny navíc ještě dvě Petriho misky, kde do první byly nality 4 ml roztoku CH_3COOH s PBS a do druhé byly nality 4 ml CH_3COOH (bez kolagenu). Poté se měřila rozpustnost vytvořené vrstvy plazmového polymeru, která nebyla zatížena tak velkou chybou jako v předchozích případech, jelikož nyní se pracovalo s konkrétním případem a hodnota rozpustnosti nebyla přepočítávána podle určitého koeficientu.

Pro toto měření bylo vyčleněno 6 QCM senzorů, kde se na senzorech 27 a 28 měřila rozpustnost vrstvy plazmového polymeru (27 s roztokem PBS a CH_3COOH a 28 s roztokem CH_3COOH), kde míra rozpustnosti plazmového polymeru je popsána v Tabulce 15. Pracovalo se pouze při pětihodinové inkubaci, kdy nedochází k tak značnému rozpouštění vrstvy, kde senzory 29 a 30 byly ponořeny do roztoku kolagenu s PBS a CH_3COOH a senzory 31 a 32 byly ponořeny do roztoku kolagenu s CH_3COOH . Při mechanické manipulaci byl senzor 30 znehodnocen.

Po inkubaci byl senzor opláchnut ponořením do vody a následně usušen. Až poté se měřila hodnota změny frekvence senzoru, kde výsledky jsou zaznamenány v Tabulce 16. Následně se provedlo kontrolní měření, kde se senzory ponechaly jeden den, nebo sedm dní bez jakéhokoliv zásahu sušit, a poté byla opět změřena hodnota změny frekvence (výsledky jsou shrnuty v Tabulce 17 a 18). Tento experiment byl proveden, jelikož bylo možné, že se při měření ihned po vizuálním uschnutí neodpařila veškerá voda ze senzoru.

Poslední experiment se ukázal jako nejefektivnější, jelikož bylo prokázáno, že nejvíce kolagenu se imobilizuje, jestliže kolagen rozpustíme v CH_3COOH s PBS. Protože byl v tomto případě senzor ponořen přímo do roztoku, molekuly kolagenu měly větší příležitost k imobilizování na aktivní místa v plazmovém polymeru. Proto lze považovat tento experiment za věrohodnější. Navíc byl potvrzen fakt ze druhého měření, a to že nejvíce kolagenu se přichytí v případě přítomnosti PBS. V tomto případě se imobilizovalo 36,27 μg (viz Tabulka 18), což je šestinásobně více než hmotnost imobilizovaného kolagenu v případě použití roztoku kolagenu s CH_3COOH . Také bylo prokázáno, že při delším sušení se hodnoty imobilizovaného kolagenu snížily pouze minimálně, tudíž bylo v předchozích případech vizuální uschnutí dostatečné, a tímto způsobem nebyla do výsledků zanášena chyba.

Z tohoto posledního měření nám vyplývá, že připravené vrstvy aminových polymerů jsou schopny imobilizovat ECM molekuly, v tomto případě kolagen. Bylo by ideální finální úspěšné měření ještě jednou zopakovat, ale z časových důvodů na to již nebyl prostor.

Různé výsledky pro stejné podmínky v rámci všech měření mohou být také způsobeny tím, že kolagen se na vrstvu může vázat i nespecificky pomocí elektrostatických interakcí, což může mít také vliv na rozdílné výsledky. V ideálním případě by bylo dobré imobilizaci vyzkoušet i s jiným ECM proteinem, např. fibronectinem, ale jak jsem již zmiňoval výše,

z časových důvodů to již nebylo možné provést v rámci mé práce. Nicméně by to mohlo být vhodným směrem pro další výzkum.

Tabulka 15: Tabulka zahrnující rozpustnost vrstvy plazmového aminového polymeru při ponoření senzoru do příslušného rozpouštědla (CH₃COOH nebo PBS s CH₃COOH). Tedy změnu frekvence a hmotnosti QCM.

Čas od usušení (dny)	Čas inkubace (h)	Senzor	Nanesený roztok	Δf (Hz)	Δm (μg)
0	5	28	CH ₃ COOH	1042 ± 16	-0,9 ± 0,01
		27	PBS + CH ₃ COOH	1233 ± 17	-1,07 ± 0,01
1	5	28	CH ₃ COOH	700 ± 18	-0,61 ± 0,02
		27	PBS + CH ₃ COOH	1039 ± 14	-0,9 ± 0,01
7	5	28	CH ₃ COOH	547 ± 16	-0,48 ± 0,01
		27	PBS + CH ₃ COOH	799 ± 15	-0,69 ± 0,01

Tabulka 16: Vypočítané hodnoty hmotností imobilizovaného kolagenu po ponoření celého senzoru do příslušného roztoku, se započítáním rozpustnosti vrstvy plazmového polymeru. Po inkubaci senzor ponořen do vody, usušen, a až poté měřen. Čas od usušení – 0 dní.

Senzor	Čas inkubace (h)	Nanesený roztok	Nanesený kolagen (bez rozpustnosti)		Nanesený kolagen (s rozpustností)
			Δf (Hz)	Δm (μg)	Δm (μg)
31	5	Kolagen + CH ₃ COOH	-4747 ± 21	4,12 ± 0,02	5,03 ± 0,02
32	5	Kolagen + CH ₃ COOH	-6092 ± 20	5,29 ± 0,02	6,20 ± 0,02
29	5	kolagen + PBS + CH ₃ COOH	-40542 ± 30	35,20 ± 0,03	36,23 ± 0,03

Tabulka 17: Vypočítané hodnoty hmotností imobilizovaného kolagenu po ponoření celého senzoru do příslušného roztoku, se započítáním rozpustnosti vrstvy plazmového polymeru. Po inkubaci senzor ponořen do vody, usušen, a až poté měřen. Čas od usušení – 1 den.

Senzor	Čas inkubace (h)	Nanesený roztok	Nanesený kolagen (bez rozpustnosti)		Nanesený kolagen (s rozpustností)
			Δf (Hz)	Δm (μg)	Δm (μg)
31	5	Kolagen + CH_3COOH	-5151 ± 23	$4,47 \pm 0,02$	$5,08 \pm 0,02$
32	5	Kolagen + CH_3COOH	-6306 ± 14	$5,48 \pm 0,01$	$6,09 \pm 0,01$
29	5	kolagen + PBS + CH_3COOH	-41052 ± 36	$35,64 \pm 0,03$	$36,54 \pm 0,03$

Tabulka 18: Vypočítané hodnoty hmotností imobilizovaného kolagenu po ponoření celého senzoru do příslušného roztoku, se započítáním rozpustnosti vrstvy plazmového polymeru. Po inkubaci senzor ponořen do vody, usušen, a až poté měřen. Čas od usušení – 7 dní.

Senzor	Čas inkubace (h)	Nanesený roztok	Nanesený kolagen (bez rozpustnosti)		Nanesený kolagen (s rozpustností)
			Δf (Hz)	Δm (μg)	Δm (μg)
31	5	Kolagen + CH_3COOH	-5041 ± 16	$4,38 \pm 0,01$	$4,85 \pm 0,01$
32	5	Kolagen + CH_3COOH	-6297 ± 15	$5,47 \pm 0,01$	$5,95 \pm 0,01$
29	5	kolagen + PBS + CH_3COOH	-40986 ± 42	$35,58 \pm 0,04$	$36,27 \pm 0,04$

6 ZÁVĚR

V rámci bakalářské práce byla připravena série plazmových polymerů ze směsi CPA a argonu v pulzním režimu nízkotlakého radiofrekvenčního kapacitně vázaného výboje. Vrstvy plazmových polymerů byly nanесeny na křemenné mikrováhy nebo na oboustranně leštěné křemíkové destičky. Na křemíku byla provedena analýza tloušťky vrstvy pomocí metody elipsometrie a pomocí FTIR spektroskopie bylo zjištěno, jaké funkční skupiny obsahuje vytvořená vrstva plazmových polymerů.

Bylo zjištěno, že tloušťka vrstvy plazmových polymerů je u každé depozice rozdílná (v rozmezí od 230 do 330 nm) a tento jev se nepodařilo uspokojivě vysvětlit změnou průtoku monomeru. Z výsledků FTIR spektroskopie bylo určeno, že plazmové polymery obsahují převážně dusíkaté funkční skupiny – primární a sekundární aminy, isonitrily nebo nitrily a nasycené nebo nenasycené uhlovodíky.

Hlavním cílem práce bylo zjistit, jestli je možné imobilizovat ECM proteiny na vytvořené aminové polymery. Z ECM proteinů byl vybrán kolagen, protože je nejvíce zastoupen ve většině tkání. Byl rozpuštěn v CH_3COOH nebo v CH_3COOH spolu s fosfátovým pufrém PBS. Během experimentální části bylo zjištěno, že CH_3COOH i PBS rozpouští vytvořenou vrstvu plazmového polymeru, proto bylo třeba tuto míru rozpustnosti kvantifikovat a zahrnout ji do výsledků imobilizace kolagenu. Co se týče imobilizace kolagenu, bylo praktikováno pět sad depozic, kde roztok kolagenu buď s CH_3COOH , nebo s CH_3COOH a PBS byl inkubován na QCM senzorech buď po dobu 5, nebo 16 hodin. Nejlepších výsledků imobilizace kolagenu na plazmových polymerech bylo v rámci prvních měření dosaženo při šestnáctihodinové inkubaci, ale v tomto případě docházelo k většímu rozpouštění vrstvy plazmových polymerů než v případě pětihodinové inkubace. Proto byla v případě pátého měření zvolena pětihodinová doba inkubace.

Největším problémem se ukázala metoda dávkování roztoku kolagenu na QCM. Při prvních čtyřech měřeních, kdy se nanášelo 6 μl příslušného roztoku na QCM, se nepodařilo jednoznačně určit, pro který roztok s kolagenem dopadla imobilizace na plazmové polymery nejlépe. Proto bylo až během pátého měření, kdy byl QCM úplně ponořen do příslušného roztoku s kolagenem, jednoznačně určeno, že nejlepší imobilizace probíhá při rozpuštění kolagenu v CH_3COOH spolu s PBS. Tento fakt byl také zpětně potvrzen při druhém měření, což nám zajistilo určitou zpětnou vazbu.

V rámci bakalářské práce tedy byla navržena metoda dávkování přesného objemu roztoku, která byla provedena při prvních čtyřech měřeních, a pro další postup by bylo lepší pracovat na základě postupu, který byl zvolen v pátém měření – tedy imobilizace ponořením do roztoku proteinu. Rozdílné výsledky pro stejné podmínky v rámci různých měření mohou být také způsobeny tím, že kolagen se na vrstvu může vázat i nespecificky pomocí elektrostatických interakcí. Proto by bylo dobré imobilizaci vyzkoušet i s jiným proteinem, např. fibronectinem.

Pro další výzkum v rámci této tematiky by bylo možné použít i jiné typy senzorů, než jsou QCM. V rámci této bakalářské práce se původně mělo využít i charakterizace vytvořené vrstvy pomocí SPR senzorů, ale jelikož výsledky imobilizace kolagenu byly nejednoznačné, bylo prioritou získat jistotu ve správném postupu imobilizace. Tudíž na charakterizaci imobilizovaného kolagenu pomocí SPR senzorů již nebyl prostor.

Závěrem lze tedy říci, že vytvořené aminové plazmové polymery jsou schopny na svém povrchu imobilizovat kolagen, což nás vede k možnosti dalšího výzkumu v této oblasti, jako je např. imobilizace jiných ECM proteinů (fibronektinu, fibrinu, ...) nebo imobilizace kolagenu na substrátech vhodných pro tkáňové inženýrství (např. na kovových implantátech nebo polymerních nanovlákních). Následně mohou imobilizované ECM proteiny sloužit jako mezičlánek umožňující/zlepšující adhezi a proliferaci potřebných buněk na povrchu modifikovaném funkčním plazmovým polymerem.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] BITTENCOURT, J.A. Fundamentals of Plasma Physics. 3. vydání. New York: Springer-Verlag New York, 2004. ISBN 978-1-4419-1930-4
- [2] CHEN, Francis F a Jane P CHANG. Lecture notes on principles of plasma processing. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. ISBN 978-0-306-47497-2.
- [3] LIEBERMAN, M. A. a Allan J. LICHTENBERG. Principles of plasma discharges and materials processing. 2nd ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, c2005. ISBN 04-717-2001-1.
- [4] KARSLIOĞLU, R., M. UYSAL a H. AKBULUT. The effect of substrate temperature on the electrical and optic properties of nanocrystalline tin oxide coatings produced by APCVD: A critical review. *Journal of Crystal Growth*. 2011, 327(1), 22-26. DOI: 10.1016/j.jcrysgro.2011.06.003.
- [5] MERCHE, Delphine, Nicolas VANDENCASTEELE a François RENIERS. Atmospheric plasmas for thin film deposition: A critical review. *Thin Solid Films*. 2012, 520(13), 4219-4236. DOI: 10.1016/j.tsf.2012.01.026.
- [6] FRIEDRICH, Jörg. The plasma chemistry of polymer surfaces: advanced techniques for surface design. Weinheim: Wiley-VCH, c2012. ISBN 978-3-527-31853-7.
- [7] LINDER, E. G. a A. P. DAVIS. Reactions of Hydrocarbons in the Glow Discharge. *The Journal of Physical Chemistry*. 1930, 35(12), 3649-3672. DOI: 10.1021/j150330a017.
- [8] YASUDA, Hirotsugu K. a A. P. DAVIS. Some Important Aspects of Plasma Polymerization. *Plasma Processes and Polymers*. 2005, 2(4), 293-304. DOI: 10.1002/ppap.200400071.
- [9] PEIGHAMBARDOUST, S.J., S. ROWSHANZAMIR a M. AMJADI. Review of the proton exchange membranes for fuel cell applications. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2010, 35(17), 9349-9384. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2010.05.017.
- [10] BIEDERMAN, Hynek. Plasma polymer films. London: Imperial College Press, 2004. ISBN 18-609-4467-1.
- [11] D'AGOSTINO, Riccardo, Pietro FAVIA a Francesco FRACASSI. Plasma processing of polymers. Boston: Kluwer Academic Publishers, c1997. NATO ASI series, no. 346. ISBN 07-923-4859-1.
- [12] FRIEDRICH, Jörg. The plasma chemistry of polymer surfaces: advanced techniques for surface design. Weinheim: Wiley-VCH, c2012. ISBN 978-352-7318-537.
- [13] MUGURUMA, Hitoshi. Plasma-polymerized films for biosensors II. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2007, 26(5), 433-443. DOI: 10.1016/j.trac.2007.03.003.
- [14] KIM, Jinmo, Heonyong PARK, Donggeun JUNG a Sunghoon KIM. Protein immobilization on plasma-polymerized ethylenediamine-coated glass slides. *Analytical Biochemistry*. 2003, 313(1), 41-45. DOI: 10.1016/S0003-2697(02)00563-8.
- [15] MANAKHOV, Anton, Lenka ZAJÍČKOVÁ, Marek ELIÁŠ, Jan ČECHAL, Josef POLČÁK, Jaroslav HNILICA, Štěpánka BITTNEROVÁ a David NEČAS. Optimization of Cyclopropylamine Plasma Polymerization toward Enhanced Layer Stability in Contact with Water. *Plasma Processes and Polymers*. 2014, 11(6), 532-544. DOI: 10.1002/ppap.201300177.
- [16] MANAKHOV, Anton, Ekaterina MAKHNEVA, Petr SKLÁDAL, David NEČAS, Jan ČECHAL, Lukáš KALINA, Marek ELIÁŠ a Lenka ZAJÍČKOVÁ. The robust bio-immobilization based on pulsed plasma polymerization of cyclopropylamine and glutaraldehyde coupling chemistry. *Applied Surface Science*. 2016, 360(6), 28-36. DOI: 10.1016/j.apsusc.2015.10.178.
- [17] VASILEV, Krasimir, Leanne BRITCHER, Ana CASANAL, Hans J. GRIESSER, Jan ČECHAL, Lukáš KALINA, Marek ELIÁŠ a Lenka ZAJÍČKOVÁ. Solvent-Induced Porosity in Ultrathin

- Amine Plasma Polymer Coatings. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2008, 112(35), 10915-10921. DOI: 10.1021/jp803678w.
- [18] CONTRERAS-GARCÍA, Angel; WERTHEIMER, Michael R. Low-pressure plasma polymerization of acetylene–ammonia mixtures for biomedical applications. *Plasma chemistry and plasma Processing*, 2013, 33.1: 147-163.
- [19] DENIS, Laurent, Philippe MARSAL, Yoann OLIVIER, Thomas GODFROID, Roberto LAZZARONI, Michel HECQ, Jérôme CORNIL a Rony SNYDERS. Deposition of Functional Organic Thin Films by Pulsed Plasma Polymerization: A Joint Theoretical and Experimental Study. *Plasma Processes and Polymers*. 2009, 112(35), NA-NA. DOI: 10.1002/ppap.200900131.
- [20] THEOCHARIS, Achilleas D., Spyros S. SKANDALIS, Chrysostomi GIALELI a Nikos K. KARAMANOS. Extracellular matrix structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, 97, 4-27. DOI: 10.1016/j.addr.2015.11.001.
- [21] THE COLLAGEN MOLECULE [online]. [cit. 2019-02-22]. Dostupné z: <https://www.protocol.com/blog/blog/collagen/>
- [22] Collagen from calf skin [online]. [cit. 2019-02-23]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c9791?lang=en&ion=CZ>
- [23] BAGNO, Andrea a Carlo DI BELLO. Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* [online]. 2004, 15(9), 935-949 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1023/B:JMSM.0000042679.28493.7f. ISSN 0957-4530. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/B:JMSM.0000042679.28493.7f>
- [24] O'SULLIVAN, C.K. a G.G. GUILBAULT. Commercial quartz crystal microbalances – theory and applications. *Biosensors and Bioelectronics*. 1999, 14(8-9), 663-670. DOI: 10.1016/S0956-5663(99)00040-8. ISSN 09565663. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956566399000408>
- [25] TICHÝ, Jan. *Fundamentals of Piezoelectric Sensorics: Mechanical, Dielectric, and Thermodynamical Properties of Piezoelectric Materials*. New York: Springer, [2010]. ISBN 978-354-0684-275.
- [26] REICHL, Jaroslav a Martin VŠETIČKA. *Encyklopedie Fyziky* (<http://fyzika.jreichl.com>) [online]. 2007 [cit. 2019-02-23]. Dostupné z: <http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/419-vysvetleni-jevu>
- [27] MULLER, Jacques. Evaluation of HCFeMn and SiMn slag tapping flow behaviour using physicochemical property modelling and analytical flow modelling. 2015. PhD Thesis. University of Pretoria.
- [28] SAUERBREY, Günter. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Physik*. 1959, 155(2), 206-222. DOI: 10.1007/BF01337937. ISSN 1434-6001. Dostupné také z: <http://link.springer.com/10.1007/BF01337937>
- [29] BUNDE, Renee L., Eric J. JARVI a Jeffrey J. ROSENRETER. Piezoelectric quartz crystal biosensors. *Talanta*. 1998, 46(6), 1223-1236. DOI: 10.1016/S0039-9140(97)00392-5. ISSN 00399140. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914097003925>
- [30] MECEA, Vasile Mihai, Eric J. JARVI a Jeffrey J. ROSENRETER. From Quartz Crystal Microbalance to Fundamental Principles of Mass Measurements. *Analytical Letters*. 2005, 38(5), 753-767. DOI: 10.1081/AL-200056171. ISSN 0003-2719. Dostupné také z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/AL-200056171>
- [31] FUJIWARA, Hiroyuki. *Spectroscopic ellipsometry: principles and applications*. Hoboken, NJ: John Wiley, c2007. ISBN 978-047-0016-084.

- [32] VO-DINH, Tuan a G. GAUGLITZ. Handbook of spectroscopy. Cambridge: Wiley-VCH, c2003. ISBN 35-272-9782-0.
- [33] KANIA, Patrik. Infračervená spektrometrie. PRAHA: VŠCHT PRAHA [cit. 2018-04-25]. Dostupné z: [https://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Infra% C4% 8Derven% C3% A1+spektrometrie.pdf](https://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Infra%C4%8Derven%C3%A1+spektrometrie.pdf), 2007.
- [34] STUART, Barbara. Infrared spectroscopy: fundamentals and applications. Hoboken, NJ: J. Wiley, c2004. ISBN 04-708-5427-8.
- [35] BARTH, Andreas. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2007, 1767(9), 1073-1101. DOI: 10.1016/j.bbabi.2007.06.004. ISSN 00052728. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005272807001375>
- [36] Quartz Crystal Monitor (QCM). KRYSTALY, Hradec Králové, a.s. [online]. [cit. 2019-03-05]. Dostupné z: <http://www.krystal.cz/en/Products/Wafers/Monitors>
- [37] MAURO, Marco. Hardware [online]. 2015 [cit. 2019-03-08]. Dostupné z: <https://openqcm.com/openqcm-has-arduino-inside-at-heart.html>
- [38] OpenQCM [online]. In: . [cit. 2019-03-12]. Dostupné z: <https://openqcm.com/openqcm>
- [39] NIR-UV spectroscopic ellipsometer J. A. Woollam V-VASE [online]. [cit. 2019-04-06]. Dostupné z: <http://nano.ceitec.cz/nir-uv-spectroscopic-ellipsometer-j-a-woollam-v-vase/>
- [40] VERTEX Series [online]. [cit. 2019-04-06]. Dostupné z: <https://www.brukeroptics.cz/products/ftir-spectrometers/vertex-series/v80v/>
- [41] MAKHNEVA, Ekaterina, Zdeněk FARKA, Petr SKLÁDAL a Lenka ZAJÍČKOVÁ. Cyclopropylamine plasma polymer surfaces for label-free SPR and QCM immunosensing of Salmonella. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2018, **276**, 447-455. DOI: 10.1016/j.snb.2018.08.055. ISSN 09254005. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400518314680>
- [42] FRANTA, Daniel, David NEČAS a Lenka ZAJÍČKOVÁ. Models of dielectric response in disordered solids. *Optics Express*. 2007, 15(24). DOI: 10.1364/OE.15.016230. ISSN 1094-4087. Dostupné také z: <https://www.osapublishing.org/oe/abstract.cfm?uri=oe-15-24-16230>
- [43] NEČAS, D, I OHLÍDAL a D FRANTA. Variable-angle spectroscopic ellipsometry of considerably non-uniform thin films. *Journal of Optics*. 2011, 13(8). DOI: 10.1088/2040-8978/13/8/085705. ISSN 2040-8978. Dostupné také z: <http://stacks.iop.org/2040-8978/13/i=8/a=085705?key=crossref.9631220a3ae325595df1fe68b902da77>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CPA – cyklopropylamin

QCM – quartz crystal microbalance, křemenné mikrováhy

SPR – surface plasmon resonance, senzory s povrchovou plazmovou rezonancí

ECM – extracellular matrix, mezibuněčná hmota

CCP – z angličtiny capacitively coupled plasma; kapacitně vázaný doutnavý výboj

ICP – z angličtiny inductively coupled plasma; indukčně vázaný doutnavý výboj

PECVD – Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition, plazmochemická depozice z plynné fáze

CVD – Chemical vapor deposition; chemická depozice z plynné fáze

DC – duty cycle, střída

CPA – cyklopropylamin

FTIR – Fourier transform infrared (spectroscopy); Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

IČ – infračervené záření

RF – radiofrekvenční

sccm – standard cubic centimeter per minute, standardní kubický centimetr za minutu

PBS – fosfátový pufr