



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 VRSTEV METODOU PLAZMOVÉ
POLYMERACE A JEJICH CHARAKTERIZACE**

PREPARATION OF LAYERS BY PLASMA POLYMERIZATION AND THEIR CHARACTERIZATION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Kseniia Kostyleva

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Mgr. Věra Mazánková, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1394/2019 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Kseniia Kostyleva**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Věra Mazánková, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Příprava vrstev metodou plazmové polymerace a jejich charakterizace

Zadání diplomové práce:

Práce je zaměřena na tvorbu a charakterizaci polymerních vrstev na bázi propanu a butanu. V průběhu práce budou deponovány vrstvy metodou plazmové polymerace v dielektrickém bariérovém výboji za atmosférického tlaku. Vrstvy budou připravovány pro různé depoziční podmínky v závislosti zejména na teplotě substrátu a na koncentraci monomeru. Deponované vrstvy by měly podporovat růst buněk.

Postup řešení:

1. Proveďte rešerši na téma příprava a použití polymerních vrstev na bázi propanu a butanu.
2. Seznamte se s metodou plazmové polymerace a připravte navržené vrstvy.
3. Proveďte základní charakterizace vrstev, jak biologické (antibakteriální testy a test na cytokompatibilitu), tak i fyzikálně–chemické diagnostiky (SEM, FTIR a stanovení povrchové energie).
4. Získané výsledky vyhodnoťte z hlediska antibakteriálních účinků a růstu buněk na připravených vrstvách.

Termín odevzdání diplomové práce: 30.7.2021:

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

Bc. Kseniia Kostyleva
student(ka)

doc. Mgr. Věra Mazánková, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Diplomová práce se věnuje přípravě biokompatibilních hydrofilních vrstev ze směsi propanbutanu metodou plazmové polymerace. Následná charakterizace vrstev byla provedena pomocí jak biologických (antibakteriální testy a test na biokompatibilitu), tak i fyzikálně-chemických diagnostik (SEM, OES a stanovení povrchové energie).

V teoretické části je uveden základní princip dielektrického bariérového výboje, jeho využití a různé druhy, včetně povrchového dielektrického bariérového výboje (SDBD), který byl použit během depozice. Dál byly popsány buněčné kultury, morfologie buňky a objasnění termínu biokompatibilita. Na konci teoretické části jsou rozepsány všechny diagnostiky použité v experimentální části.

V experimentální části je uveden postup depozice hydrofilních vrstev a celkový popis aparatury, která byla využita během depozice. Před charakterizací vzorků byla provedena diagnostika výboje pomocí optické emisní spektroskopie. Dál byla stanovena úroveň hydrofility vrstev a jejich elementární složení na povrchu. Biologické testy na biokompatibilitu a na antibakteriální vlastnosti poskytly informace ohledně životaschopnosti buněk na vrstvách a jejich antibakteriální účinky.

KLÍČOVÁ SLOVA

Plazma, biokompatibilita, SDBD, plazmová polymerace

ABSTRACT

The diploma work deals with the preparation of biocompatible hydrophilic layers from a propane-butane mixture by plasma polymerization. Subsequent characterization of the layers was performed using both biological (antibacterial tests and biocompatibility test) and physico-chemical diagnostics (SEM, OES and surface energy determination).

The theoretical part presents the basic principle of dielectric barrier discharge, its use and various types, including surface dielectric barrier discharge (SDBD), which was used during deposition. Next, cell cultures, cell morphology and clarification of the term biocompatibility were described. At the end of the theoretical part, all used during the experimental part of the diagnostics were also described.

In the experimental part, the procedure of deposition of hydrophilic layers and the overall apparatus, which was used during deposition, were presented. Prior to the characterization of the samples, the discharge was diagnosed using optical emission spectroscopy. Furthermore, the level of hydrophilicity of the layers and their elemental composition on the surface was determined. Biological tests for biocompatibility and antibacterial properties provided information on the viability of the cells on the layers and their antibacterial effects.

KEYWORDS

Plasma, biocompatibility, SDBD, plasma polymerization

KOSTYLEVA, Kseniia. *Příprava vrstev metodou plazmové polymerace a jejich charakterizace* [online]. Brno, 2021 [cit. 2021-07-09]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/123957>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Věra Mazánková.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí diplomové práce doc. Mgr. Věře Mazánkové, Ph.D. za vedení a pomoc při vypracování práce. Mé poděkování patří také Mgr. Janu Čechovi, Ph.D. a Bc. Radku Horňákovi za pomoc s diagnostikou výboje.

Obsah

OBSAH	3
1 ÚVOD	5
2 TEORETICKÁ ČÁST	6
2.1 Plazma	6
2.1.1 Klasifikace plazmatu	6
2.1.2 Generace plazmatu	7
2.2 Dielektrický bariérový výboj	7
2.2.1 Objemový dielektrický bariérový výboj (VDBD).....	8
2.2.2 Povrchový dielektrický bariérový výboj (SDBD).....	9
2.2.3 Koplanární bariérový výboj (CDBD).....	9
2.3 Využití bariérového výboje	11
2.3.1 Generování ozonu v dielektrickém bariérovém výboje.....	13
2.3.2 Plazmová úprava povrchu	13
2.4 Biokompatibilita.....	15
2.4.1 Morfologie živé buňky	15
2.4.2 Diferenciace	15
2.4.3 Buněčné kultury	16
2.5 Diagnostika a charakterizace vlastností polymerních vrstev	19
2.5.1 Volná povrchová energie a smáčivost.....	19
2.5.2 Antibakteriální testy	20
2.5.3 Infračervená spektroskopie (IR a FTIR).....	21
2.5.4 Elektronová mikroskopie (TEM a SEM)	24
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1 Depoziční aparatura	27
3.2 SEE system	29
4 VÝSLEDKY.....	30
4.1 Diagnostika výboje pomocí optické emisní spektroskopie.....	30

4.2	Stanovení kontaktního úhlu	34
4.3	Stanovení elementárního složení na povrchu vrstev pomocí skenovací elektronové mikroskopie 36	
4.4	Testy biokompatibility	38
4.5	Antibakteriální testy	40
4.6	FTIR.....	43
5	ZÁVĚR.....	45
6	LITERATURA	47
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	52

1 ÚVOD

Tenká vrstva je tenká plocha materiálu o tloušťce několika nanometru (jednovrstvá) až několika mikrometrů. Řízená syntéza materiálů ve formě tenkých vrstev (proces zvaný depozice) je základním krokem v mnoha aplikacích. Vytvoření tenkých vrstev a povlaků na povrchu materiálu umožňuje výrazně změnit jeho vlastnosti, aniž by to ovlivnilo objem, anebo kombinovat vlastnosti dvou nebo více materiálů [1].

Tenké vrstvy jsou široce používány jako funkční, výztužné, reflexní, vodivé a dielektrické materiály při vytváření kontaktů, výrobě desek plošných spojů, prvků integrovaných obvodů v mikroelektronice, vytváření světelných filtrů a základních prvků optoelektroniky. Díky intenzivnímu experimentálnímu a teoretickému výzkumu ve vývoji technologie tenkých vrstev bylo v posledních letech dosaženo významného pokroku. Jelikož ke změně informací v oblasti tenkovrstvých technologií dochází relativně rychle, je třeba si udělat představu o hlavních technologických postupech, které se v současnosti používají, a také o jejich vlastnostech při tvorbě tenkých vrstev a povlaků různé povahy [2].

Tenké vrstvy mohou být pevné nebo kapalné (méně často - plynné). Pro depozice pevných vrstev se častěji využívají metody PVD (physical vapor deposition) a CVD (chemical vapor deposition). Na základě nastavených podmínek, vlastností zvoleného substrátu a zvolené konfiguraci elektrod je možné nadeponovat buď hydrofobní či hydrofilní vrstvy [1].

Metodou PECVD (plasma enhanced chemical vapour deposition) se dají připravit tzv. superhydrofilní vrstvy. Dané vrstvy našly své uplatnění například v biomedicínských aplikacích jako prostředí pro růst endotelních buněk anebo při modifikaci polyethylentereftalátu (PET) [3].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Plazma

Plazma lze definovat jako ionizovaný plyn, jehož částice vykazují kolektivní chování a kvazineutralitu [1]. Ionizovaný plyn je soubor nabitých i neutrálních částic v různých kvantových stavech, o kterém platí, že koncentrace kladně nabitých iontů a záporně nabitých elektronů v oblastech plazmatu je přibližně stejná. Tato vlastnost se nazývá kvazineutralita. O tomto ionizovaném plynu – plazmatu - také říkáme, že se jedná o tzv. čtvrté skupenství látek [5].

Kromě kvazineutrality je plazma charakterizováno dalšími významnými fyzikálními vlastnostmi, např. elektrickou vodivostí. Díky elektrické vodivosti působí na plazma i silné magnetické pole, jehož silové účinky pocházejí od Lorentzovy síly, která působí na pohybující se volné elektrické náboje v plazmatu. Magnetické pole zmenšuje koeficient difúze nabitých částic ve směru kolmém na magnetické siločáry, a tak brání jejich úniku. Toho lze využít pro izolaci vysokoteplotního plazmatu při teplotách, kterým není schopen odolávat žádný materiál. S rostoucí koncentrací nabitých částic se mění i koeficienty tepelné vodivosti a dynamické viskozity ionizovaného plynu. V případě vysokoteplotního plazmatu jeho tepelná vodivost určuje elektronový plyn. U nízkoteplotního plazmatu se mohou uplatňovat i jiné mechanismy přenosu tepla, spočívající v přenosu energie při disociaci, excitaci a ionizaci molekul [1].

2.1.1 Klasifikace plazmatu

Podle teploty se rozlišují dva druhy plazmatu - vysokoteplotní a nízkoteplotní plazma. Vysokoteplotní plazma má střední energii nabitých částic větší než 100 eV, což odpovídá řádově 1 MK. Na základě tohoto kritéria považujeme plazma v experimentech s řízenou termonukleární syntézou za vysokoteplotní. Opačná situace je u nízkoteplotního plazmatu, které se vyskytuje např. v zářivkách a výbojkách a jeho teplota je kolem 10^5 K [1].

Také lze rozlišit plazma podle teploty částic, které se v plazmatu nachází. Tak rozlišujeme plazma neizotermické a izotermické. V neizotermickém plazmatu teplota elektronů převažuje nad teplotou ostatních typů částic. Taková situace nastává díky rozdílu v hmotnosti iontů a elektronů, což komplikuje proces výměny energie. Příčinou je odlišná teplota iontů (kolem několika 100 K) a elektronů (kolem několika 1000 K).

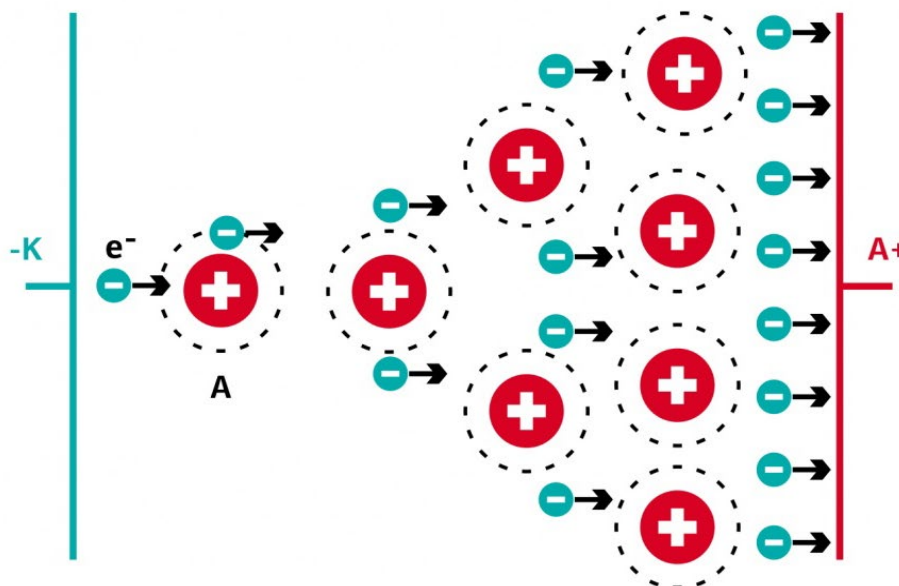
Další typ je izotermické plazma, pro které platí, že všechny částice mají stejnou teplotu, přestože pro ionizační proces jsou nezbytné teploty podobné ionizačnímu potenciálu, izotermické plazma je obvykle vysokoteplotní. Vznik jednoho nebo druhého druhu závisí především na způsobu, jakým byla plazmatu dodávána energie.

Plazma se nachází zejména v mezigalaktickém, mezihvězdném a meziplanetárním prostoru. Hvězdy jsou vyrobeny z plazmatu. Dalším příkladem přírodního výskytu plazmatu je blesková činnost, která vzniká při silné elektrifikaci mraků a země [5], [6].

2.1.2 Generace plazmatu

Metoda generace plazmatu konvenčním zahříváním látky se nepoužívá často. Chceme-li tepelně dosáhnout úplné ionizace plazmatu většiny plynů, musíme je zahřát na teploty desítek nebo dokonce i stovek tisíc stupňů Celsia. Pouze u par alkalických kovů (jako je například draslík, sodík nebo cesium) lze elektrickou vodivost plynu zaznamenat již při 2000–3000 °C. Je to způsobeno tím, že v atomech monovalentních alkalických kovů elektron vnějšího obalu je mnohem slaběji vázán na jádro než v atomech jiných prvků periodické tabulky (tj. mají nižší ionizační energii). V takových plynech je při výše uvedených teplotách dostatečný počet částic k vytvoření slabě ionizovaného plazmatu [6].

Nejběžnějším způsobem generace plazmatu je pomocí elektrického výboje, který využívá vytvoření elektrického pole v plazmatu při průchodu proudu. V elektrickém poli elektrony přebírají kinetickou energii, která je schopna ionizovat molekuly plynu, a tak kompenzovat úbytek nabitých částic na povrchu a v objemu plazmatu [1]. Pro udržení proudu v plazmatu je nutné, aby záporná elektroda (katoda) emitovala do plazmatu elektrony (Obrázek 1). Elektronové emise z katody lze dosáhnout různými způsoby, například zahřátím katody na dostatečně vysokou teplotu (termionická emise) nebo ozářením katody nějakým krátkovlnným zářením (rentgenové záření, g-záření), které dokáže vyzářit elektrony z kovu (fotoelektrický efekt) [6].



Obrázek 1 Emise elektronů z katody [7]

2.2 Dielektrický bariérový výboj

Bariérový výboj (dielektrický bariérový výboj, dielectric barrier discharge, DBD) vzniká, jestli aspoň jedna z elektrod je oddělena od plynu dielektrickou bariérou. Jako materiál

pro dielektrikum se nejčastěji používá sklo, křemičité sklo, keramické nebo polymerní materiály. Dielektrická bariéra slouží jako sériově připojený kondenzátor omezující elektrický proud v prostoru mezi elektrodami.

Bariérový výboj je nestálý, patří do skupiny nerovnovážného plazmatu a existuje v širokém rozsahu tlaků. Při atmosférickém tlaku prostor mezi elektrodami se většinou pohybuje v rozmezí několika desetin mm až k několika cm v závislosti na požadované aplikaci. Napětí mezi elektrodami je obvykle v rozsahu 1–100 kV. Působením střídavého napětí na elektrody dochází k rozkladu plynu za vzniku proudových impulsů a rychlé akumulaci nábojů na dielektriku. Následkem lokálního nabíjení bariéry je pokles napětí v plynu a snížení doby trvání mikrovýbojů. V tomto případě se plyn nestihne zahřát a velká část elektrické energie se vynakládá na excitaci atomů, molekul plynu a na záření - výboj svítí [8].

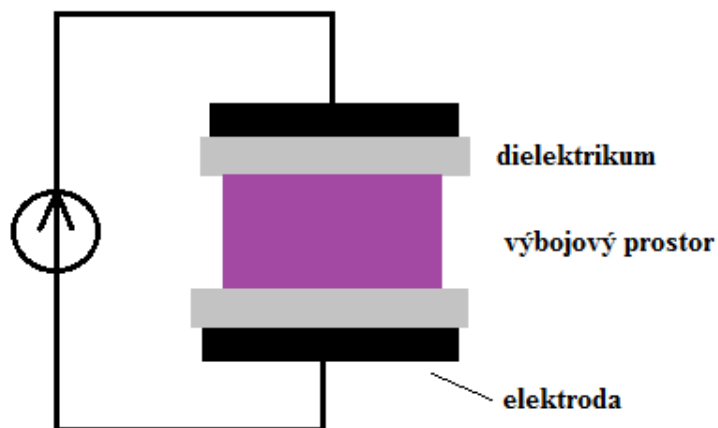
Za atmosférického tlaku se DBD většinou vyskytuje v tzv. filamentárním módu. To znamená, že výboj má podobu velkého množství výbojových kanálů, nazývaných filameny. Každý z filamentů je prostorově výrazně ohraničen, jeho průměr bývá řádově 0,1–1 mm a trvání od několika nanosekund po jednotky mikrosekund. K iniciaci výboje v prostoru naplněném plynem při atmosférickém tlaku dochází při vkládání napětí v rozmezí několika stovek V až několik kV [9].

U dielektrického bariérového výboje jsou dvě základní uspořádání elektrod – rovinné nebo prostorové. DBD můžeme rozdělit na objemové a povrchové. Toto dělení je podle orientace výbojových filamentů vůči dielektrické vrstvě [10].

2.2.1 Objemový dielektrický bariérový výboj (VDBD)

Při tomto uspořádání objemový výboj se generuje v mezielektrodevém prostoru, vyplněném plynem mezi paralelními rovinnými či válcovými elektrodami a volt-ampérová charakteristika toho prostoru je lineární.

Jedna nebo obě elektrody musí být izolovány od prostoru dielektrickou vrstvou (Obrázek 2). Výbojové filameny jsou orientovány kolmo na dielektrickou vrstvu a jejich počet roste se zvyšující se intenzitou střídavého napětí [10].



Obrázek 2 Schéma objemového dielektrického bariérového výboje

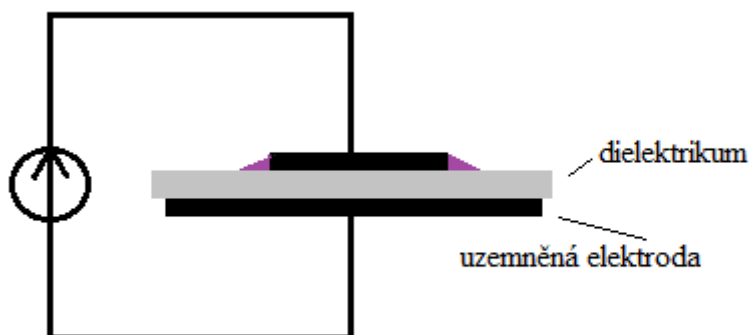
Dielektrikum slouží k omezování jak množství náboje přeneseného mezi elektrodami, tak i množství energie dodané výboji. Čím je jeho permitivita větší, tím je intenzita elektrického výboje ve výbojové oblasti vyšší. V případě objemového DBD je rozložení potenciálu homogenní, což je jeho výhodou. Průměr výbojového kanálu je řádově 10 μm , čas trvání cca 100 ns [11]. Počet mikrovýbojů se zvětšuje s rostoucí amplitudou napětí nebo se zmenšující se vzdáleností elektrod [9].

2.2.2 Povrchový dielektrický bariérový výboj (SDBD)

Elektrodotový systém je tvořen rovinným, většinou korundovým páskem (Al_2O_3), na jedné straně dielektrické vrstvy se nachází elektroda ve tvaru samostatného pásku nebo hřebenová elektroda na povrchu keramického pásku, na opačné straně je plošná uzemněná elektroda (Obrázek 3). Oxid hlinitý se používá jako dielektrikum na základě jeho vynikajících vlastností jako vysoká tepelná vodivost, vysoká chemická odolnost a dielektrická pevnost [11].

Vzniklý mikrovýboj se pak šíří po povrchu dielektrika, což umožňuje bezproblémový kontakt plazmatu s povrchem opracovaného materiálu [12]. Na rozdíl od objemového DBD při povrchovém výboji rozložení potenciálu je značně nehomogenní. Délka mikrovýboje při atmosférickém tlaku je 1–3 mm. Doba existence mikrovýboje je několik desítek nanosekund s amplitudou proudu několik desetin ampérů [10].

Hlavní nevýhodou tohoto uspořádání je nízká životnost elektrod v důsledku vzniku eroze na jejich povrchu při přímém kontaktu elektrody s generovaným plazmatem.



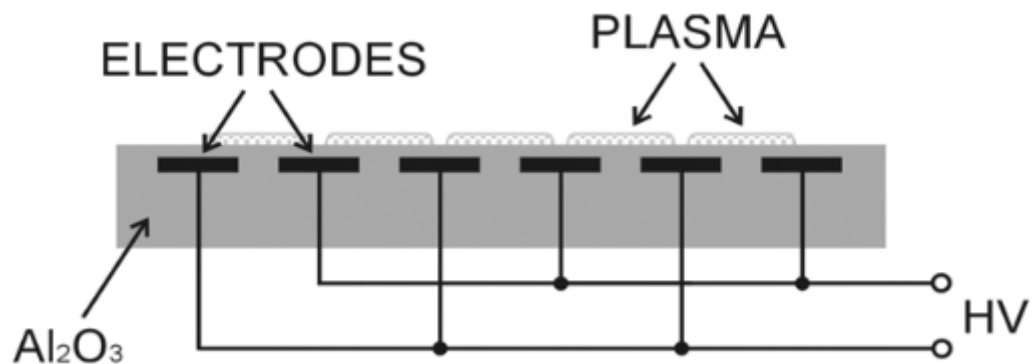
Obrázek 3 Schéma povrchového dielektrického bariérového výboje

2.2.3 Koplanární bariérový výboj (CDBD)

Elektrodotový systém koplanárního bariérového výboje je tvořen dvěma a více paralelními elektrodami opačné polarity, které jsou umístěny v dielektriku blízko jeho povrchu. Elektrody jsou představeny jako tenké pásky o stejné velikosti, které jsou vzdáleny od sebe řádově 1 mm (Obrázek 4).

Rozložení elektrického pole se nachází ve stavu nehomogenním s maximem mezi elektrodami uvnitř dielektrika. Velikost elektrického pole je závislá na vzdálenosti elektrod,

jejich tvaru, na permitivitě a hrubosti dielektrika. Koplanární DBD výboj kombinuje výhody objemového a povrchového DBD výboje: na rozdíl od SDBD u koplanárního uspořádání nedochází k erozi kovových elektrod a je možné dodávat do výboje větší výkon [13].



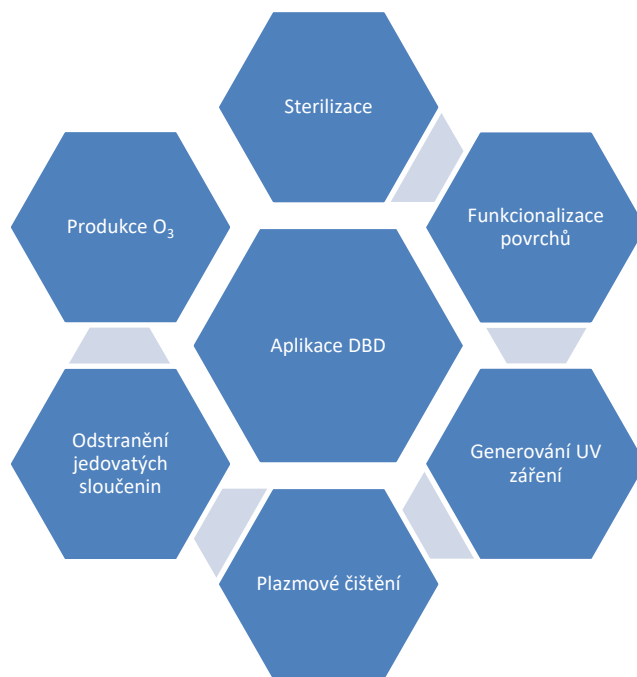
Obrázek 4 Schéma koplanárního dielektrického bariérového výboje [13]

2.3 Využití bariérového výboje

Dielektrický bariérový výboj může být použit pro generování záření při relaxaci excitovaných částic v plazmatu. Jednou z významných aplikací je generování UV záření. Tyto ultrafialové lampy emitují světlo s krátkou vlnovou délkou, které lze použít k produkci ozonu v průmyslovém měřítku. Ozon je stále široce používán v průmyslovém čištění vzduchu a vody. DBD se také používá k modifikaci nebo čištění (plazmové čištění) povrchu materiálů (například polymerů, polovodičových povrchů), které mohou také působit jako dielektrická bariéra [14].

Dielektrické bariérové výboje byly použity k získání relativně velkého objemu difúzního plazmatu za atmosférického tlaku a poprvé byly použity k inaktivaci bakterií v 90. letech, což nakonec vedlo k vývoji nové oblasti použití – plazma pro biomedicínské aplikace. V oblasti biomedicínských aplikací se objevily tři hlavní přístupy: přímá terapie, povrchová modifikace a depozice polymeru v prostředí plazmatu. Plazmové polymery mohou řídit a manipulovat s interakcí biologických materiálů s biomateriály (tj. adhezí, proliferací a diferenciací) nebo inhibicí bakteriální adheze [15].

Jeho nízká teplota, jen nevýznamně zvýšená oproti teplotě okolí, jej pak předurčuje k využití v různých oborech biologie a medicíny, kde se již ustavil nový obor zvaný plazmatická medicína. Plazmové ošetření často pomáhá stavům kůže a plazmatická medicína může být vhodná k léčbě mnoha kožních problémů např. k léčbě bakteriálních a plísňových infekcí a jejich vedlejších účinků, jakož i chronických ran [15].



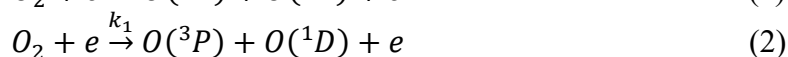
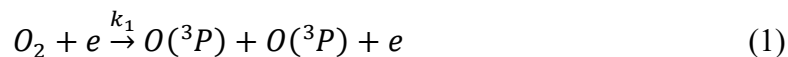
Obrázek 5 Shrnutí metod aplikace dielektrického bariérového výboje [15]

V průmyslu dielektrický bariérový výboj je jednou z metod plazmového zpracování textilních výrobků při atmosférickém tlaku a pokojové teplotě. Například DBD lze použít při

úpravě povrchových vlastností textilních materiálů, tj. ke zlepšení smáčivosti, zlepšení absorpce barviv a k sterilizaci. DBD plazma poskytuje suché zpracování, které nevyžaduje vodu a sušení, jen několik kilovoltů střídavého napětí v rozmezí od 1 do 100 kHz [10] [15]. Na Obrázek 5 jsou popsány všechny nejpoužívanější aplikace bariérového výboje v průmyslu.

2.3.1 Generování ozonu v dielektrickém barierovém výboje

Dielektrický bariérový výboj je složen z jednotlivých mikrovýbojů, z nichž každý trvá desítky nanosekund. Disociační reakce molekul kyslíku probíhá ve výbojových kanálech, které omezují tvorbu ozonu [16].



Na základě experimentálních výsledků uvedených v různých vědeckých člancích [16], lze říct, že druhá reakce (2) je třikrát pravděpodobnější než první. Vzniklé volné radikály jsou schopny samostatné existence. Ve svém elektronovém obalu obsahují minimálně jeden nespárovaný elektron, z čehož vyplývá jejich vysoká reaktivita, kdy se snaží dosáhnout stabilní elektronové konfigurace. V metastabilním stavu 1D kyslík je extrémně aktivní během srážkových procesů. Zároveň daná forma kyslíku může existovat pouze v přítomnosti kanálu mikrovýboje. Následnou reakcí vzniklých radikálů kyslíku s molekulami kyslíku vzniká ozon:



Jedná se o silná oxidační činidla, které např. způsobují nevratné procesy na povrchu buněčné membrány. Ozon je známý svým negativním vlivem na proces buněčného dýchání. Nejčastěji se ozon využívá při dezinfekci vody, kde nahrazuje zdravotně méně výhodnou chloraci pitné vody. Reakce přípravy ozonu se skládá z několika kroků, které jsou uvedeny v rovnicích (4),(5).

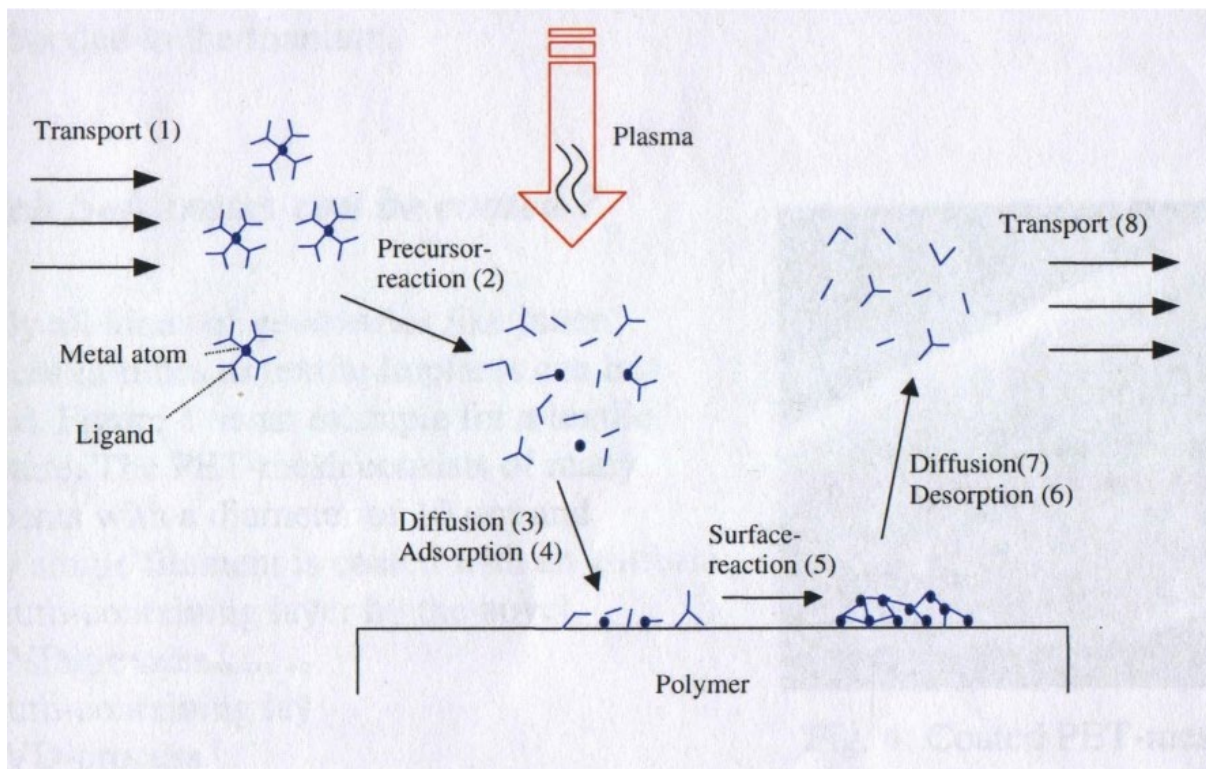


kde M je částice, které radikál O_3^* dodává energie při sražení [16].

2.3.2 Plazmová úprava povrchu

PECVD (Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition) je metoda, umožňující nanášení tenké vrstvy neboli filmu na povrch pevného substrátu během působení plazmatu s reakčním plynem. Výhodou jsou poměrně nízké pracovní teploty a vznik polymerních vrstev při radikálovém štěpení pracovního plynu.

K depozici dohází při zavedení reakčního a nosného plynu mezi paralelními elektrody - uzemněnou a vysokofrekvenční. V prostoru mezi nimi vzniká elektrický výboj, který způsobuje vznik vysoce energetických elektronů. Dále probíhá reakce elektronů s reaktantem za vzniku volných radikálů, které pak putují na substrát, a vytváří tenkou vrstvu. Podrobný mechanismus plazmové aktivace plynů je uveden na Obrázek 6. Substrát, který je umístěn na uzemněné elektrodě, je typicky zahříván na 250 °C až 350 °C, v závislosti na specifických požadavcích. Nižší depoziční teploty jsou užitečné v mnoha aplikacích, např. při povrchové úpravě materiálů s nízkým bodem tání (plasty anebo hliník), kde vyšší teploty mohou způsobit poškození vyráběných materiálů.



Obrázek 6 Reakce ne povrchu substrátu během plazmové aktivace [17]

2.4 Biokompatibilita

Důležitý parametr, definující možnost využití materiálu na živých tkáních, je jeho biokompatibilita. Biokompatibilní materiál je takový, který nevyvolává v organismu žádnou negativní reakci. Tento pojem zahrnuje v sobě celou řadu komplikovaných interakcí, charakteristik a testů. Příkladem takových testů může být stanovení přichycení živých buněk na různě modifikovaných površích. Dalším příkladem testů je stanovení vlivu samotného materiálu či z něj uvolňovaných látek na růst buněk. Jedná se o cytocompatibilní zkoušku. Pro hodnocení cytotoxicity existuje celá řada systémů, které zahrnují morfologické posouzení poškození buněk, měření růstu buněk anebo měření specifických aspektů buněčného metabolismu. Zkoušky se provádějí in vitro a využívají buněčných linií kultivovaných za specifických podmínek [18].

2.4.1 Morfologie živé buňky

Buňka je strukturální a funkční základní jednotka všech organismů. Obvykle obsahují genetický materiál, vlastní metabolismus a jsou schopné se dělit. Existují dva základní, různě vnitřně uspořádané a různě fylogeneticky pokročilé typy buněk – prokaryotické a eukaryotické. Obsah buňky je od vnějšího prostředí oddělen plazmatickou membránou neboli plazmalemou. Uvnitř obsahuje cytoplazmu, ve které jsou umístěny různé organely a buněčné inkluze, stejně jako genetický materiál ve formě molekuly DNA. Každá z buněčných organel vykonává svou vlastní specifickou funkci a v souhrnu všechny určují vitální aktivitu buňky jako celku. Eukaryoty jsou to organismy, které na rozdíl od prokaryot mají vytvořené buněčné jádro. Je ohraničeno dvojitou membránou a genetický materiál je uchován ve formě DNA, které jsou zevnitř připojeny k membráně buněčného jádra a ve většině případů tvoří komplex s histonovými proteiny – chromatin. V eukaryotických buňkách existuje systém vnitřních membrán, které kromě jádra tvoří řadu dalších organel (endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát atd.) [19],[20].

2.4.2 Diferenciace

Mnohobuněčné organismy se skládají z buněk, které se do určité míry liší strukturou a funkcí. Například v těle člověka se nalézá na 230 různých typů buněk, přestože vznikly dělením z jediného oplozeného vajíčka. Diferenciace ve většině případů není doprovázena změnou genetické informace v buňce, ale je zajištěna regulací genové aktivity. Odlišné specializace je dosaženo tím, že je realizována v jednotlivých buňkách jen její část, tj. jsou aktivovány jen některé geny [20][21].

Buňky, které již jednou svou specializaci získaly, ztratí schopnost se specializovat na jiný typ buněk. Z totipotentních buněk (např. zygota) lze vytvořit celý organismus. Pluripotentní buňky (např. buňky blastocysty) mají schopnost se diferenciovat do mnoha různých typů buněk, ale extraembryonální tkáň se z nich nemohou vyvinout, a tedy nový jedinec [22][23]. Multipotentní kmenová buňka je schopna diferenciace (dělení) do mnoha typů buněk, ale pouze

v rámci daného typu tkáně (resp. orgánu). Buňky, které mohou produkovat pouze jediný typ buněk, ale mají schopnost se plně samy obnovit, se nazývají unipotentní. Některé konečně diferencované buňky (například neurony, erytrocyty) zcela ztrácí schopnost se dělit a opouští buněčný cyklus. V některých případech lze pozorovat tzv. vratnou diferenciaci neboli dediferenciaci, která je zodpovědná za regenerační procesy (např. regenerace po poranění) [23].

2.4.3 Buněčné kultury

Buněčné kultury se nejčastěji využívají v nejrůznějších oblastech biologie, medicíny a zemědělství. Používají se při řešení takových biologických problémů, jako je objasnění mechanismů diferenciaci a proliferace, interakci buněk s vnějším prostředím, adaptaci, stárnutí, biologické mobility atd. Důležitou roli hrají buněčné kultury v biotechnologii při výrobě biologicky aktivních látek ve vakcínách. Jsou výchozím materiálem pro vytváření buněk-producentů, které se používají ke zvýšení produktivity zemědělských zvířat a k vývoji nových odrůd rostlin. Buněčné kultury se používají k diagnostice a léčbě dědičných chorob, jako objekty pro testování nových farmakologických látek [24].

Buněčnou kulturu lze připravit různými postupy. Volba kultivačního procesu závisí nejen na potřebách organismu, ale také na tom, k čemu bude kultura použita, tj. na konečném cíli experimentu. Kultivované buňky se pěstují v umělém kultivačním mediu a v kultivačních nádobách. Pro kultivace určitého druhu buněk je nutné nastavit specifické podmínky: přítomnost kyslíku (aerobní či anaerobní), množství fermentů, přítomnost míchaní (dynamické či statické) atd.

Podle stáří můžeme živočišné buněčné kultury rozdělit do tří skupin: primární linie, buněčné kmeny, buněčné linie.

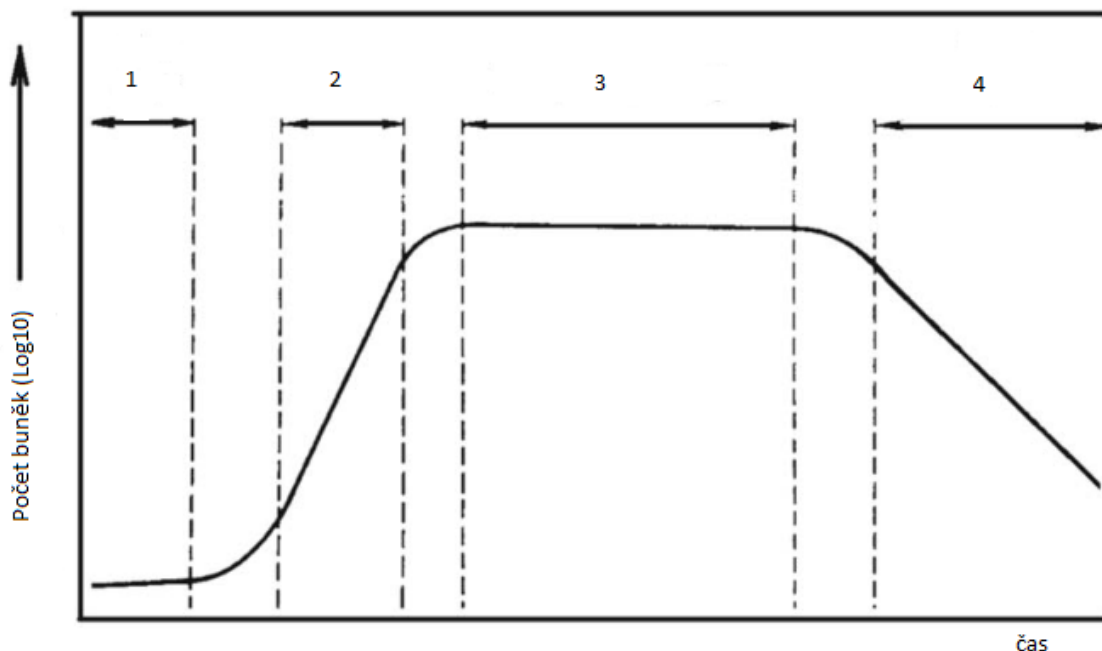
Primární kultury skládají se z buněk přímo odebraných z organismu, ale však chybí mnoho buněk přítomných v původní tkáni, protože existují buňky, které nejsou schopné se připojit k substrátu a přežít v podmínkách *in vitro*. Tento typ kultury má pouze krátkou životnost, která se počítá jen na několik dní, poté je třeba buňky převést do nového média (pasážování). Subkultivace poskytuje možnost prodloužení existence kultury (získání buněčné linie), klonování, výzkumu a uchování buněk, jakož i získání homogennějších populací. Hlavní výhodou získávání buněčných linií z primárních kultur je produkce velkého množství stabilního materiálu vhodného pro dlouhodobé použití.

Buněčné kmeny vznikají na základě primárních kultur z buněk, které byly už alespoň jednou pasážovány. Jedná se o kulturu normálních diploidních buněk, častěji získané z embryonálních tkání, zachovávající diploidní sadu chromozomů až do 50 pasážování, které se pak transformují do buněčných linií.

Buněčná linie je kultura, která vzniká z buněčných kmenů procesem transformace, nebo mohou být izolovány přímo z živé tkáně. Mají určité výhody: prakticky neomezenou životnost, vysokou rychlost růstu, neomezené buněčné dělení, možnost dosažení vyšší hustoty, a proto vyšší výtěžek biomasy; schopnost používat levnější média. Mají také nevýhody - zvýšenou

nestabilitu chromozomů, odchylku od fenotypu dárce a ztrátu specifických markerů [24][25][26].

Růst buněk v kultuře probíhá charakteristicky a lze ho popsat pomocí tzv. růstové křivky (Obrázek 7), která se skládá ze čtyř částí: Lag fáze, Log fáze, Stacionární fáze a Fáze odumírání.



Obrázek 7 Růstová křivka bakteriální kultury [24]

Lag fáze – první fáze, počet buněk nejprve mírně klesne (adaptace buněk na médiu) a pak začíná narůstat. Při zavádění buněk z kultury ve stacionární fázi do čerstvého media, jejich počet začíná narůstat až po té době, během které dojde ke změně jejich chemického složení. Délka adaptační periody může být různá, ale obvykle je přímo úměrná délce předchozí stacionární fáze. V novém mediu doba trvání Lag fáze závisí na množství a stáří použitého materiálu, jakož i na změnách ve složení a koncentraci výživných složek během zavádění inokula. Pokud jsou buňky přeneseny do bohatějšího media, tak výživné složky jsou vynaloženy na zvýšení aktivity enzymů nezbytných ke zvýšení aktivity metabolismu. Ale jestli buňky byly přeneseny do media s nižší úrovní živin, tak jsou schopné okamžitě, i když při nízké rychlosti, vstoupit do exponenciální fáze růstu.

Log fáze – počet buněk exponenciálně roste, ale není podporován po dlouhou dobu. Kromě toho je omezen z důvodu vyčerpání živin, akumulace toxických metabolických produktů v růstovém prostředí, anebo z důvodu některých změn ve fyzikálních vlastnostech prostředí. V důsledku toho se rychlost růstu snižuje a nakonec se růst zastaví.

Stacionární fáze – růst buněk se zastaví, začíná se projevovat vyčerpání živin, hromadění metabolitů a toxinů. Změny ve fyzikálním a chemickém složení prostředí vedou k přechodu

kultury do stacionární fáze, ve které nedochází ke zvýšení počtu buněk. Přejchod z exponenciální fáze do stacionární fáze zahrnuje období nevyváženého růstu, kdy jsou různé buněčné složky syntetizovány s různou rychlostí. Proto se ve stacionární fázi liší chemické složení buněk od jejich složení v exponenciální fázi. Menší buňky jsou méně citlivé na fyzikální a chemické vlivy. Ve stacionární fázi zůstává množství biomasy konstantní.

Fáze odumírání – konečná fáze, udržení kultury již není možné, protože došlo k vyčerpání živin, poklesu pH, hromadění metabolitů (např. CO₂) a toxinů. Je pozorován prudký exponenciální pokles počtu životaschopných buněk [24][25].

2.5 Diagnostika a charakterizace vlastností polymerních vrstev

2.5.1 Volná povrchová energie a smáčivost

Fáze je homogenní část soustavy oddělená od ostatních fází rozhraním, v němž se vlastnosti mění nespojitě – skokem. Ustavují-li se rovnováhy mezi dvěma nebo více fázemi, tj. v heterogenní soustavě, jde o fázové heterogenní rovnováhy. V soustavě mohou probíhat fázové přeměny - fyzikální děje vyznačující se diskontinuitní změnou některé vlastnosti soustavy, k níž dochází při přesně definovaných hodnotách teploty a tlaku [26][27].

Volnou povrchovou energii (Jm^{-2}) látek můžeme definovat jako množství práce W potřebné pro vytvoření nového povrchu o jednotkové ploše ΔA . Číselně i rozměrově je rovna povrchovému napětí γ (Nm^{-1}), které se využívá převážně při popisu kapalin (6):

$$W = \gamma \cdot \Delta A \quad (6)$$

V případě pevných látek je nutno vzít do úvahy i vliv povrchového pnutí, kvůli čemuž stanovení povrchové energie je komplikovanější. Volná povrchová energie pevných látek pak může být popsána jako míra narušení chemických vazeb při vytváření nového povrchu [27].

Mimo mezifázového napětí a energie se pro popis fázových rozhraní používají ještě další veličiny. Práce potřebná na roztržení souvislého sloupce kapaliny o jednotkovém průřezu na dvě části tak, aby se v prostoru mezi nimi vytvořila pára, se nazývá kohezní práce (W_k):

$$W_k = 2 \cdot \gamma_{lg} = 2 \cdot \gamma \quad (7)$$

kde γ je povrchové napětí

Práce potřebná na odtržení kapalně a pevné fáze a vytvoření fázových rozhraní kapalina-pára a pevná látka-pára vztažená na jednotkovou plochu se nazývá adhezní práce (W_a):

$$W_a = \gamma_{lg} + \gamma_{sg} - \gamma_{sl} \quad (8)$$

Rozdíl mezi adhezní a kohezní prací je Harkinsův rozestírací koeficient (S_R) [28]:

$$S_R = W_a - W_k = \gamma_{sg} - \gamma_{sl} - \gamma_{lg} \quad (9)$$

Možnosti přímého stanovení povrchové energie pevných látek jsou dost omezené a většina z nich je použitelná pouze pro určitou skupinu pevných látek. Nejjednodušším způsobem, jak odhadnou povrchovou energii pevné látky je měření povrchové energie kapaliny. K experimentálnímu stanovení povrchové energie pevné látky je možné použít metody založené na měření úhlu smáčení [26].

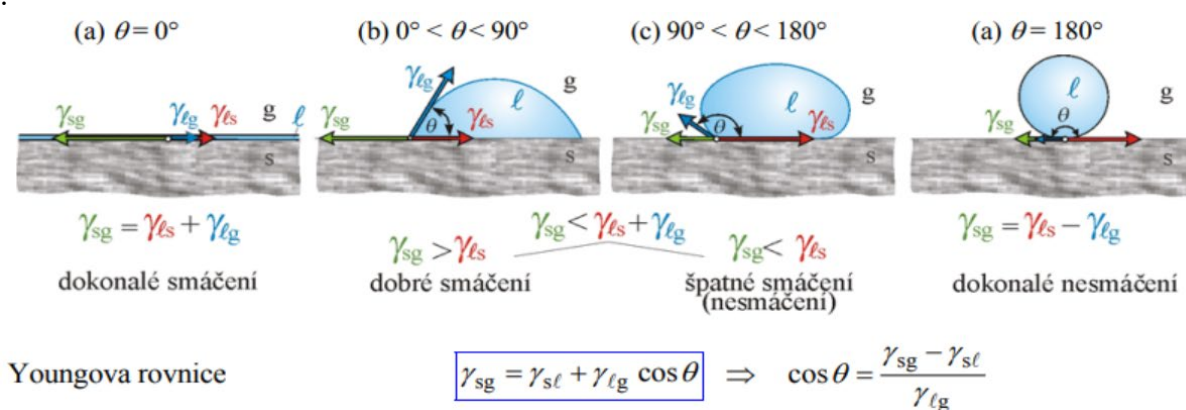
Při umístění kapky kapaliny na pevný povrch, existuje několik možností v chování kapaliny, např. může dojít k rozestírání, smáčení anebo k nesmáčení.

Pokud je mezifázová energie γ_{sg} větší než součet $\gamma_{lg} + \gamma_{lg}$, kapalina se rozetře po povrchu pevné látky. Dochází tak k úplnému smáčení pevné fáze kapalinou.

Jestliže je naopak mezifázová energie γ_{sg} menší než součet $\gamma_{lg} + \gamma_{lg}$, k rozestírání nedojde a utvoří kapalina na povrchu kapky. V rovnováze je součet vektorů mezifázových napětí nulový, z čehož lze odvodit vztah nazývaný Youngova rovnice (10):

$$\gamma_{sg} = \gamma_{sl} + \gamma_{lg} \cdot \cos \theta \quad (10)$$

kde θ je úhel smáčení, tedy úhel, který vytvoří kapalná fáze při styku s povrchem. Podle hodnoty tohoto úhlu rozeznáváme čtyři případy (Obrázek 8). Jestli úhel smáčený je ostrý ($\theta < 90^\circ$), v tomto případě kapalina dobře smáčí nebo jen smáčí povrch tuhé látky. Povrchy dobře smáčené kapalinami jsou označovány jako lyofilní. Pokud úhel bude tupý ($\theta > 90^\circ$), tak kapalina nesmáčí, popř. špatně smáčí povrch tuhé látky. Povrchy špatně smáčené kapalinami jsou označovány jako lyofobní. Ostatní dva případy byly popsány minule, což je dokonalé smáčení neboli rozestírání, při němž kontaktní úhel je nulový a při úplném nesmáčení kontaktní úhel se rovná 180° i povrch pevné látky zcela nesmáčí a zaujímá jistý tvar [26][28]



Obrázek 8 Tuhé částice na rozhraní mezi dvěma fázemi [26]

2.5.2 Antibakteriální testy

Antibakteriální aktivita je nejdůležitější charakteristikou lékařských textilií, které se používají k ochraně před mikroorganismy. Je obecnou definicí pro všechny látky, které zabraňují růstu bakterií, mikrobiální kolonizaci a ničí mikroorganismy. Antibakteriální testy jsou nezbytné pro prevence infekce a dalších chorob, které jsou způsobeny mikroorganismy [29].

2.5.2.1 Sterilita

Sterilita je nepřítomnost životaschopných mikroorganismů. Vyžaduje se především tam, kde hrozí nebezpečí šíření infekčních onemocnění.

Test sterility se provádí dvěma způsoby: přímým očkovaním nebo membránovou filtrací. Metoda membránové filtrace se používá ve všech případech, kdy povaha média a jeho fyzikálně-chemické vlastnosti umožňují jeho filtrování přes membránové filtry.

Ke kontrole antimikrobiálního účinku se používají stejné testovací kmeny jako při hodnocení růstových vlastností živých médií. Stanovení antimikrobiálního účinku se provádí stejnými metodami a za stejných podmínek jako testy sterility.

Po převedení požadovaného množství vzorku na filtr přidává se do poslední části promývací kapaliny kolem 100 CFU ("počet jednotek tvořících kolonie") testovacích kmenů mikroorganismů.

Pro přímé očkování se připraví suspenze testovaných kmenů s konečnou koncentrací do 100 CFU na 1 ml. Zkouška se provádí s každým typem mikroorganismu. Pro každý testovací kmen se používá 4 zkumavky (nebo jiné sterilní pomůcky) s 10 ml příslušného kultivačního média. Do prvních dvou zkumavek s kulturou mikroorganismu se přidá 1 ml testovaného vzorku a do dalších dvou zkumavek 1 ml rozpouštědla (pozitivní kontrola). Do všech čtyř zkumavek se přidává 1 ml odpovídajícího testovacího kmene.

Výsledky se porovnávají mezi testovanými kmeny mikroorganismů v experimentálních a kontrolních vzorkách. Pokud je detekovaný růst ve zkumavkách vizuálně srovnatelný s růstem v kontrolních kulturách, které neobsahují testovaný vzorek, dá se říct, že léčivo za testovacích podmínek nemá antimikrobiální účinek. V tomto případě se test sterility provádí standardními metodami. Pokud je u kontroly pozorován růst testovacího kmene, ale v experimentu nedochází k žádnému růstu, z toho vychází, že testovaný vzorek má antimikrobiální účinek, který by měl být odstraněn [30].

2.5.2.2 *Biofilmy*

Biofilmy jsou populace nebo společenství mikroorganismů (bakterie, houby, řasy) existující ve formě sliznic, které se tvoří na povrchu různých substrátů. V biofilmech jsou mikroorganismy obvykle uzavřeny v extracelulárních polysacharidech, které si samy syntetizují. Biofilmy lze najít na téměř každém povrchu, který je dostatečně navlhčený. U živočichů se biofilmy z normální mikroflóry tvoří na povrchu kůže, zubů, dýchacích cest, slizniční vrstvy gastrointestinálního a urogenitálního traktu; hrají ochrannou roli, ale za určitých podmínek se mohou stát faktorem patogenity. Biofilmy tvoří základ mnoha přetrvávajících a chronických bakteriálních a mykobakteriálních infekcí [31][32].

2.5.3 **Infračervená spektroskopie (IR a FTIR)**

Nejběžnější metodou pro stanovení chemického složení nadeponovaných tenkých vrstev je infračervená (IČ) spektroskopie. Je to kvalitativní metoda, která poskytuje velice přesnou identifikaci izolované látky. Pomocí IR spektroskopie lze rychle a spolehlivě identifikovat různé funkční skupiny: karbonyl, hydroxyl, karboxyl, amid, amino, kyano atd.; stejně jako různé nenasycené fragmenty: dvojně a trojně vazby uhlík-uhlík, aromatické nebo heteroaromatické systémy. Intra- a intermolekulární interakce, například tvorba vodíkových vazeb, jsou studovány pomocí IR spektroskopie [33].

Infračervená spektroskopie je využívána při analýze makroskopických vzorků, její podstatou je interakce mikročástic (molekul) tvořících tento makroskopický vzorek s infračerveným zářením. Metoda je založena na absorpci infračerveného záření při průchodu

vzorkem, při které proběhnou změny rotačně vibračních energetických stavů molekuly v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly [33][34].

Při průchodu infračerveného záření látkou, dochází k excitaci vibračních pohybů molekul nebo jejich jednotlivých fragmentů. V tomto případě je pozorováno oslabení intenzity světla procházejícího vzorkem. K absorpci však nedochází v celém spektru dopadajícího záření, ale pouze na těch vlnových délkách, jejichž energie odpovídá energiím buzení vibrací ve studovaných molekulách. V důsledku toho mohou vlnové délky (nebo frekvence), při kterých je pozorována maximální absorpce IR záření, naznačovat přítomnost určitých funkčních skupin a dalších fragmentů ve vzorcích molekul, což je široce používáno v různých oblastech chemie pro stanovení struktury sloučenin [35].

Infračervenou spektroskopii můžeme rozdělit na emisní, kde probíhá vyzáření fotonu, a absorpční, kde naopak probíhá pohlcení fotonu. Infračerveným zářením rozumíme elektromagnetické záření v rozsahu vlnočtů $12\,500$ až 20 cm^{-1} a vlnových délek 800 nm až $0,5\text{ mm}$ [34]. Nejpoužívanější jednotkou v infračervené spektroskopii je vlnčet, který je svázán s vlnovou délkou vztahem (11):

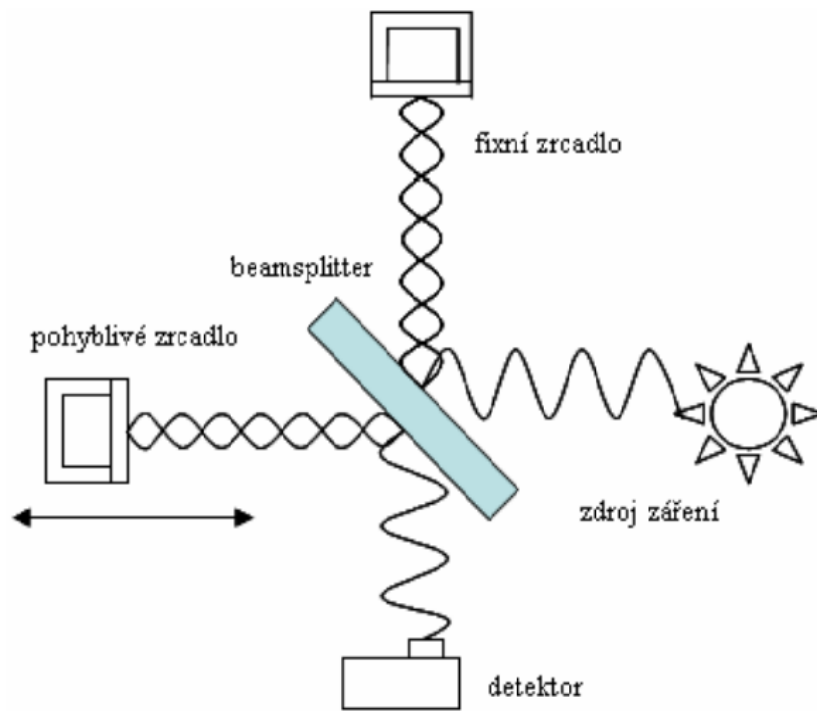
$$\nu = 1/\lambda \quad (11)$$

Většina vibračních přechodů v molekulách organických sloučenin je realizována v rozsahu vlnových délek od $2,5$ do $25\text{ }\mu\text{m}$ a vlnočtů 4000 až 400 cm^{-1} . [33][34].

Infračervená spektra látek se měří ve stavu plynném, kapalném (resp. v roztocích) nebo v pevném. K měření používáme většinou kyvet, zhotovených z vhodného optického materiálu, který je propustný pro infračervené záření [36].

Výsledné infračervené spektrum je funkční závislostí energie, většinou vyjádřené v procentech transmitance nebo jednotkách absorbance na vlnové délce dopadajícího záření. Transmitance (propustnost) je definována jako poměr intenzity záření, které prošlo vzorkem (I), k intenzitě záření vycházejícího ze zdroje (I_0). Absorbance je definována jako dekadický logaritmus $1/T$. Závislost energie na vlnové délce je logaritmická, proto se používá vlnčet, který je definován jako převrácená hodnota vlnové délky a tedy uvedená závislost energie na vlnočtu bude funkcí lineární [37].

Infračervená spektrometrie využívá dva typy měřicích zařízení – FTIR spektrometr (infračervený spektrometr s Fourierovou transformací) a disperzní spektrometr. Při infračervené spektrometrii s Fourierovou transformací (FTIR) se interferometricky získaný signál převede matematickou operací - Fourierovou transformací - na infračervené spektrum. U FTIR spektrometrů radiační zdroj vyzařuje infračervené záření, které dopadá na interferometr, kde je modulováno. Od interferometru toto záření prochází přes vzorkový prostor na detektor. Základem FTIR spektrometru je např. Michelsonův interferometr. Na Obrázek 9 je znázorněn princip tohoto interferometru. [36][38].

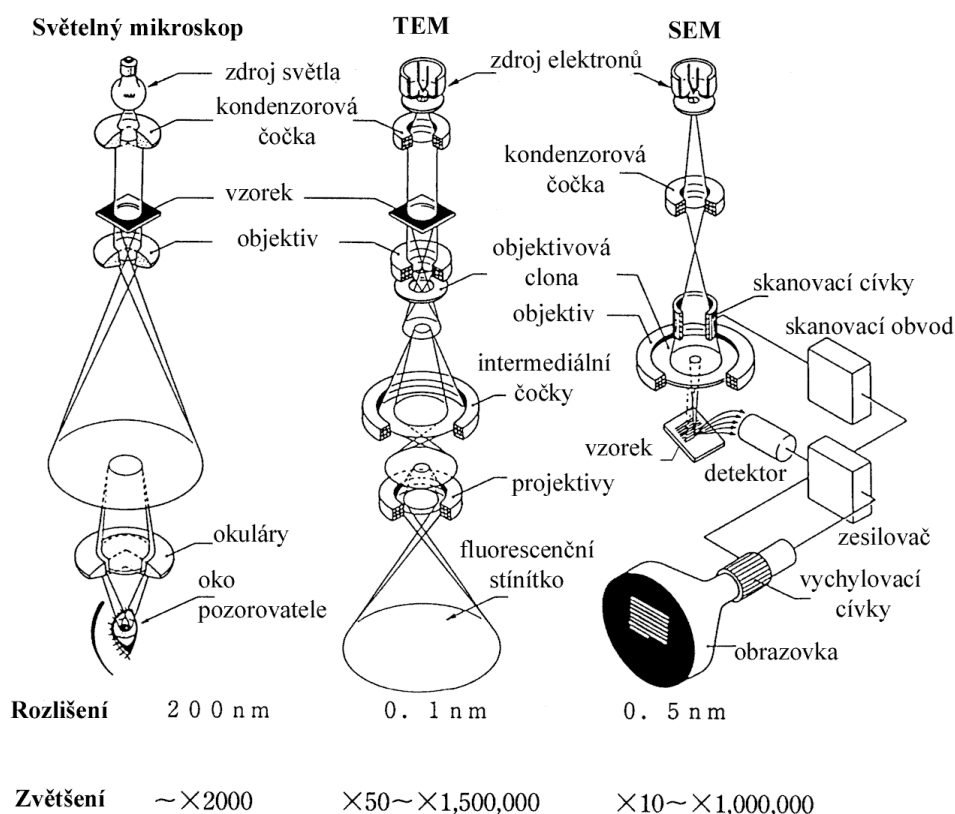


Obrázek 9 Michelsonův interferometr [38]

2.5.4 Elektronová mikroskopie (TEM a SEM)

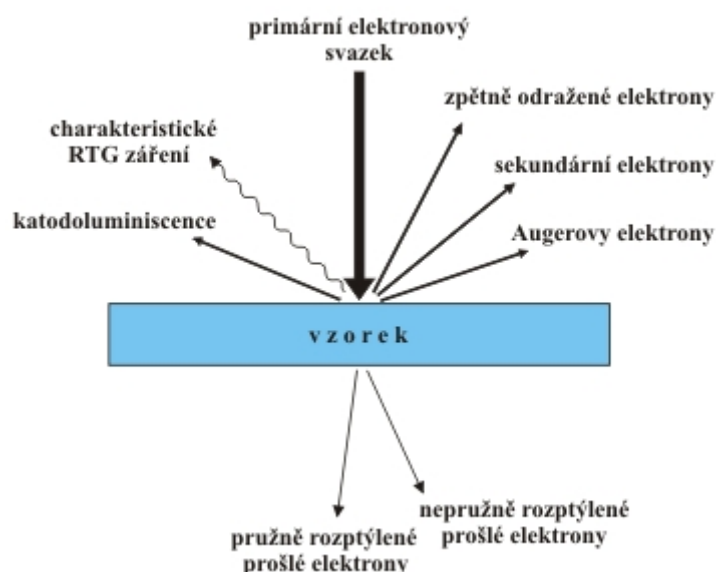
Pro pozorování struktury materiálu nebo různých buněk je možné využít elektronovou mikroskopii. Elektronové mikroskopy pracují s proudem elektronů ve vakuu.

Proud elektronů je záření velmi malé vlnové délky. Elektromagnetické pole vytvářené elektromagnetickými cívkami slouží jako „čočka“ pro zaostřování elektronů. Výsledný obraz elektronového mikroskopu je pozorován na fluorescenční obrazovce a fotografován. Elektronové mikroskopy se dělí na dva druhy: transmisní elektronový mikroskop TEM a rastrovací (skenovací) elektronový mikroskop SEM (Obrázek 10).



Obrázek 10 Schematické znázornění konstrukce světelného, SEM a TEM mikroskopů [41]

U rastrovacího elektronového mikroskopu SEM na vzorek dopadá tenký svazek elektronů, který dopadá postupně na všechna místa vzorku. Odražený (emitovaný) paprsek se převádí na viditelný obraz. Elektrony svazku interagují se vzorkovaným materiálem a generují různé typy signálů: sekundární elektrony, zpětně odražené elektrony, Augerovy elektrony, rentgenové záření a další (Obrázek 11) [39]. Interakce mezi elektrony a atomy vzorku lze rozdělit na dvě skupiny: nepružné kolize (neelastické) a pružné kolize (elastické). Rozdíl spočívá v tom, že při nepružné kolize dochází k předávání energie primárních elektronů atomům vzorku a následnému uvolnění sekundárních a Augerových elektronů, a takže RTG záření [40].



Obrázek 11 Dopad primárního elektronového svazku na vzorek a vznik různých signálů [44]

Konstrukce rastrovacího elektronového mikroskopu SEM umožňuje získat informace o povrchové struktuře pomocí zpětně odražených elektronů (BSE) anebo sekundárních elektronů (SE). Kontrast sekundárních elektronů je určen povrchovým reliéfem a odražené částice obsahují informace o distribuci elektronové hustoty. Existují taky tzv. augerové elektrony, které jsou vyráženy z materiálu a zjištěním jejich energie lze provádět prvkovou (kvalitativní) analýzu. Na obrázku budou oblasti prvků s vyššími atomovými čísly vypadat mnohem jasněji [39].

Transmisní mikroskopie se provádí pomocí transmisních elektronových mikroskopů (TEM), ve kterých skrz tenkovrstvý vzorek prochází paprsek zrychlených elektronů s energií 50-200 keV. Elektrony vstupují do systému magnetických čoček, které na luminiscenční obrazovce vytvářejí obraz vnitřní struktury objektu. Rozptýlené elektrony jsou zadržovány membránami, jejichž průměr do značné míry určuje kontrast obrazu. Při studiu objektů s velkým rozptylem jejich obrazy jsou v tmavém poli mnohem informativnější.

Rozlišení a informační obsah obrazů TEM jsou do značné míry určeny charakteristikami objektu a způsobem jeho přípravy. Při zkoumání tenkých vrstev, řezů polymerních materiálů a biologických tkání se kontrast zvyšuje úměrně s jejich tloušťkou, ale zároveň se snižuje rozlišení. Proto se používají velmi tenké (cca 0,01 μm) filmy a řezy, u kterých se zvyšuje kontrast při zpracování se sloučeninami těžkých kovů (Os, U, Pb atd.), selektivně interagujících se složkami mikrostruktury (chemické kontrastní látky). Ultratenké řezy polymerních materiálů (10 až 100 nm) se získávají pomocí ultramikrotomů, kromě toho porézní a vláknité materiály se předem impregnují a pak se přidávají do epoxidových sloučenin.

Kovy jsou zkoumány ve formě ultratenké fólie získané chemickým nebo iontovým leptáním. Ke studiu tvaru a velikosti mikročástic (mikrokryсталů, aerosolů, virů, makromolekul)

oni se aplikují ve formě suspenzí nebo aerosolů na substráty vyrobené z formvar (polyvinylformal) nebo amorfního C, propustného pro elektronový paprsek a kontrastované stínování nebo negativní kontrast

Struktura gelů, suspenzí, emulzí a biologických tkání s vysokým obsahem vody může být zkoumána metodami kryoreplikace: vzorky jsou podrobeny ultrarychlému zmrazení a pak jsou umístěny do vakuové jednotky, kde je vzorek rozdělen a amorfní C i stínovací kovový film se nanáší na povrch čerstvého štěpeného kousku. Výsledná replika, opakující se mikrorelief povrchu štěpení, je analyzována v TEM. Byly také vyvinuty metody, které umožňují vytvářet ultratenké řezy zmrazených objektů a přenášet je bez rozmrazování v TEM na kryostolek, který udržuje teplotu objektu během pozorování na $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ (kryoultratomie a kryomikroskopie).

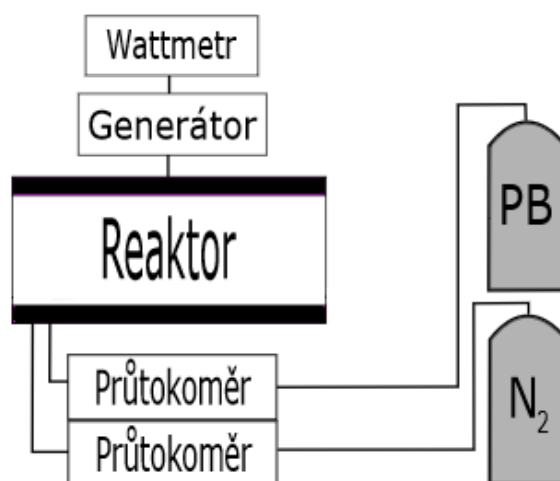
TEM také poskytuje difrakční obrazy (elektronové difrakční obrazy), které umožňují stanovení krystalové struktury objektů a přesně měřit parametry krystalových mřížek. V kombinaci s pozorováním krystalových mřížek v TEM s vysokým rozlišením je tato metoda jedním z hlavních nástrojů pro studium ultratenké struktury pevné látky. [42][43].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Depoziční aparatura

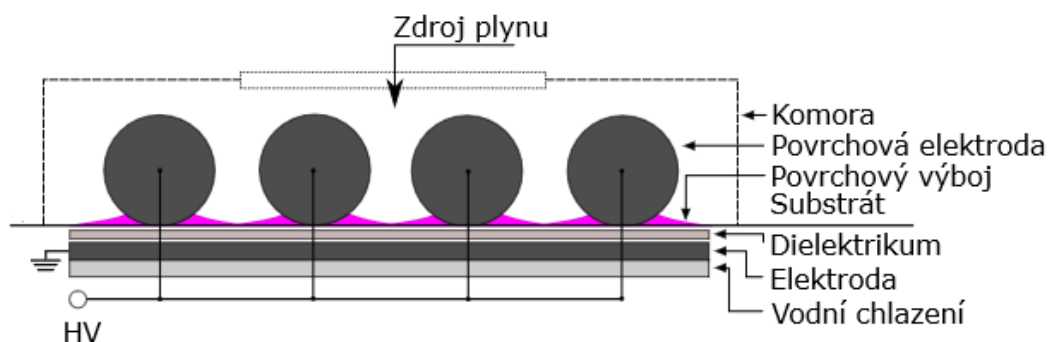
Experimentální část této diplomové práce se věnuje depozici hydrofilních tenkých vrstev v povrchovém dielektrickém bariérovém výboji. Experimenty byly provedeny na Ústavu fyzikální elektroniky Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity.

Schématické znázornění aparatury je představeno na Obrázek 12. Depoziční aparatura se skládá z reaktoru, generátoru vysokého střídavého napětí a nádob s reakční směsí plynů. V reaktoru probíhá depozice tenkých vrstev na substrátu z reakční směsi plynů pomocí generovaného povrchového dielektrického bariérového výboje. Jako substrát bylo zvoleno sodnovápenaté sklo ve tvaru destiček o velikosti 15×10 cm a o tloušťce 1,2 mm. Skleněný substrát byl před depozicí očištěn ve směsi cyklohexanu a isopropylalkoholu (1:1) a důkladně vysušen. Reakční směs plynů je tvořena dusíkem a propan-butanem (směs obsahovala 84 % propanu, 15 % butanu a 1 % uhlovodíků C2 a C5), jejich koncentrace byla nastavena objemovými průtokoměry.



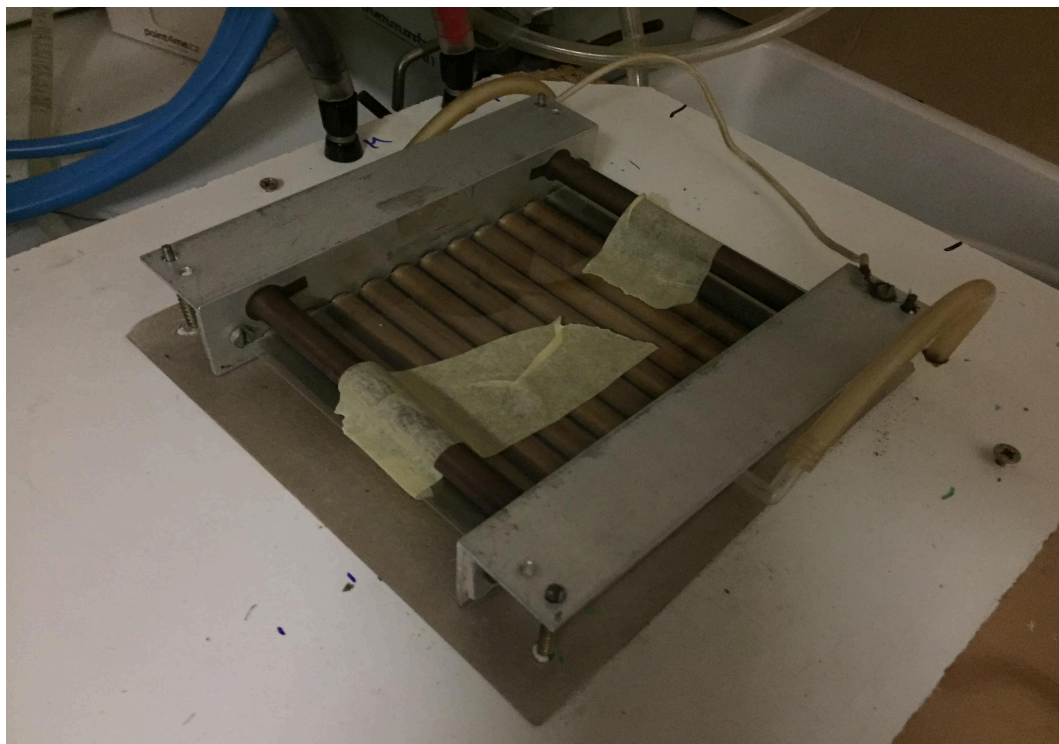
Obrázek 12 Schéma použité depoziční aparatury

Další obrázek znázorňuje vnitřní uspořádání depozičního reaktoru (Obrázek 13). V reaktoru se nachází elektrodový systém v povrchovém uspořádání dielektrického bariérového výboje.



Obrázek 13 Schématické znázornění uspořádání elektrod a bočního průřezu reaktoru

Elektrodotový systém se skládá z 11 povrchových elektrod válcového tvaru (Obrázek 14) z mosazi o délce 10.4 cm a průměrem 1 cm, mezi kterými jsou mezery o šířce 2 mm. Na jedné straně dielektrické vrstvy se nachází 11 povrchových elektrod, na opačné straně je plošná uzemněná elektroda. Dielektrikum je představeno slídovým epoxidem, omezující elektrický proud v prostoru mezi elektrodami. Mezi elektrodami a dielektrikem byl vložen substrát, na kterém byly deponovány vrstvy. Uzemněná elektroda je spojena s vodní chladicí aparaturou, ve které protéká voda o teplotě cca 20°C. Chlazení spodní elektrody je nutné, aby nedocházelo k přehřátí deponovaných vrstev a tím i ke zničení vzniklých vazeb a ztrátám požadovaných vlastností.

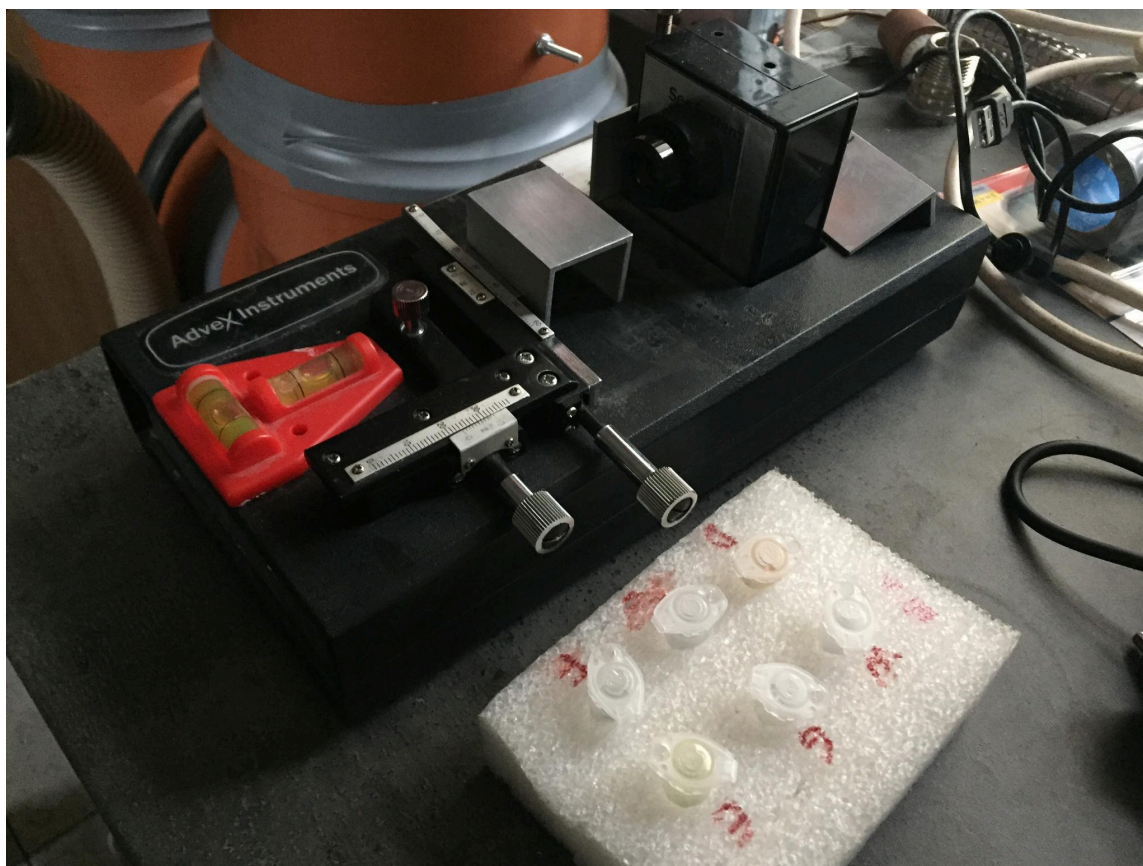


Obrázek 14 Použitý elektrodotový systém v povrchovém uspořádání

Depozice hydrofilních vrstev probíhala ve směsi plynů při koncentraci dusíku 6,5 l/s a koncentraci propan-butanu 0,0025; 0,0045; 0,0065; 0,0085; 0,0105; 0,0125 l/s. Deponování vrstev bylo provedeno 5 krát s intervalem 1 minuta pro každý průtok. Výkon byl nastaven na 150 W pro každé měření.

3.2 SEE system

SEE System (Surface Energy Evaluation System) (Obrázek 15) je přenosný přístroj navržený pro jednoduché měření kontaktního úhlu a určování povrchové energie. Pro měření kontaktního úhlu byly zvoleny tři vhodné kapaliny: voda, ethylenglykol a diiodmethan. Na každý vzorek byly opatrně nanášeny kapky testovaných kapalin pomocí automatické pipety o objemu 1 μ l. Pro každou vrstvu bylo provedeno minimálně 10 měření s každou kapalinou. Kapky kapalin byly vyfoceny pomocí kamery s vysokým rozlišením a následně byla spočítána celková povrchová energie pomocí Softwaru SEE systému.



Obrázek 15 Snímek použitého SEE systému

4 VÝSLEDKY

4.1 Diagnostika výboje pomocí optické emisní spektroskopie

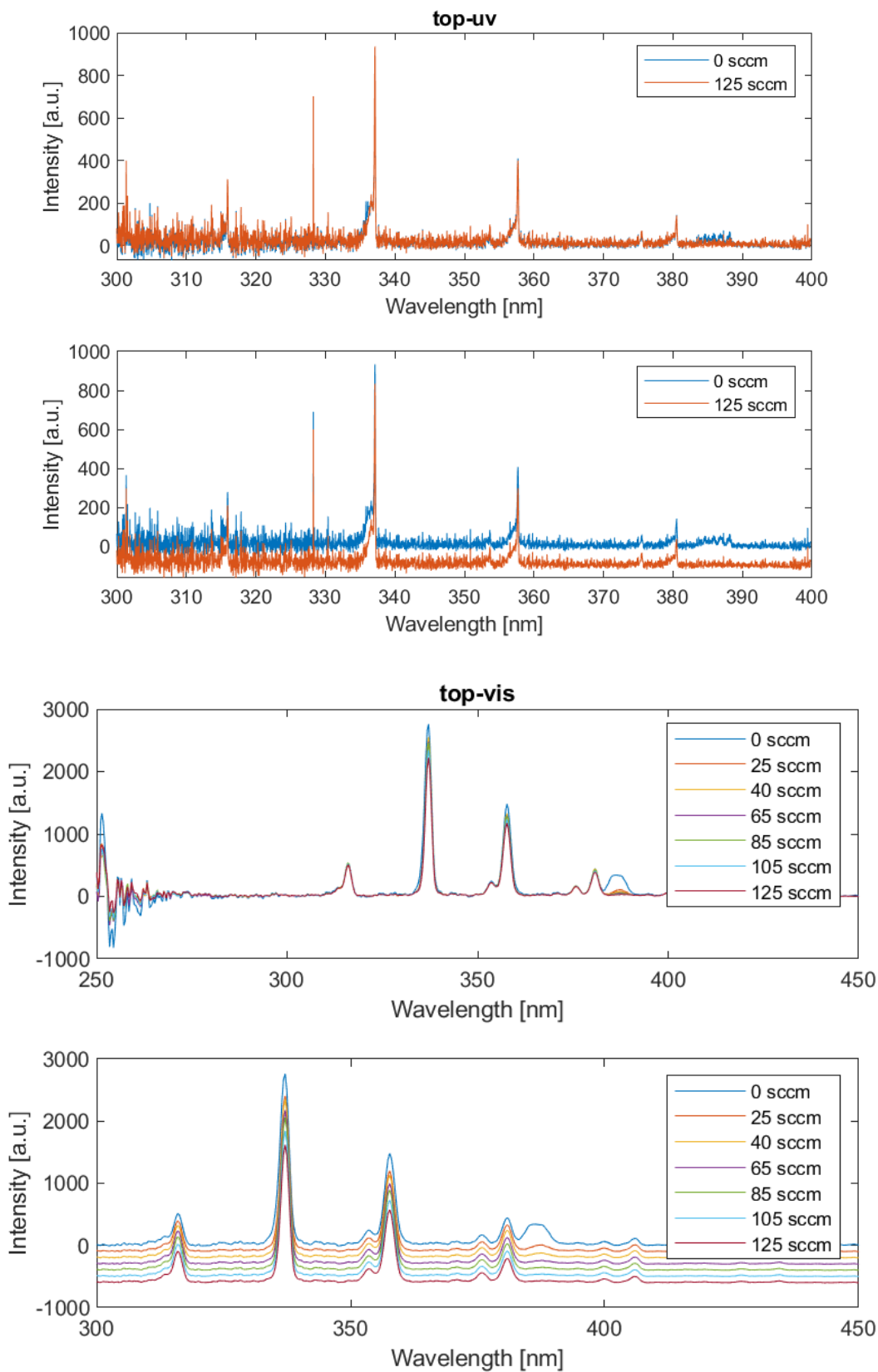
Optická emisní spektroskopie je běžně užívána metoda pro diagnostiku výbojů. Je založena na registrování fotonů vzniklých přechody valenčních elektronů z vyšších energetických stavů na stavy nižší. Při OES se měří záření emitované atomy nebo ionty v excitovaném stavu, které vzniká jejich zářivou deexcitací. Emisní spektrum má čárový charakter, tzn., že při příslušných vlnových délkách zaznamenáváme spektrální čáry odpovídající jednotlivým přechodům [45].

Při měření byly využity 3 spektrometry AVANTES AvaSpec ULS3648TEC-USB2. První je přehledový spektrometr v rozsahu 200-1100 nm s pevnou štěrbinou 25 μm . Teoretické rozlišení je přibližně 1,1 nm. Druhý je UV spektrometr v rozsahu 295-395 nm s pevnou štěrbinou 10 μm a teoretickým rozlišením 0,1 nm. Třetí je NIR spektrometr v rozsahu 740-924 nm s pevnou štěrbinou 25 μm .

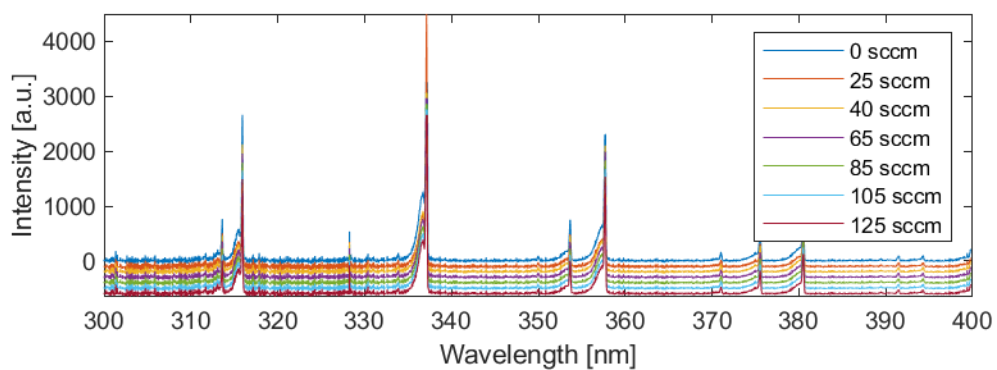
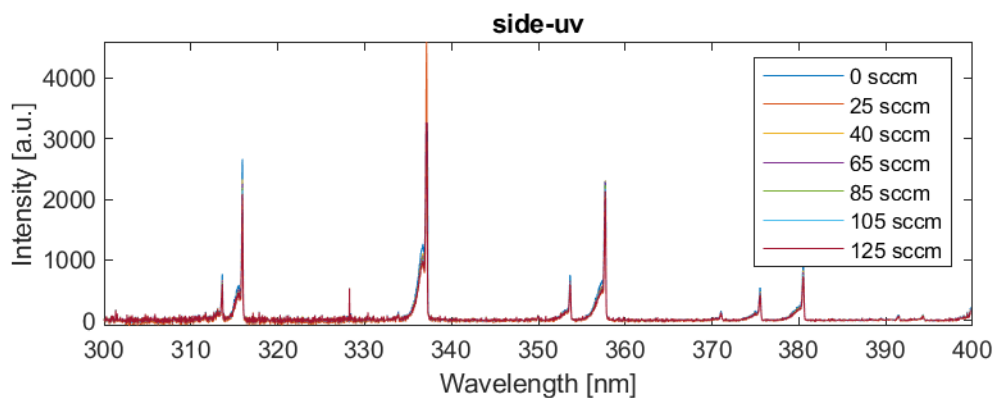
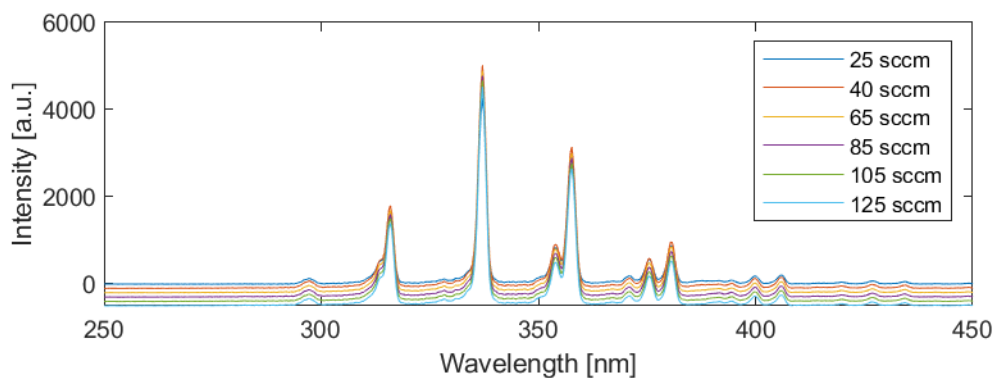
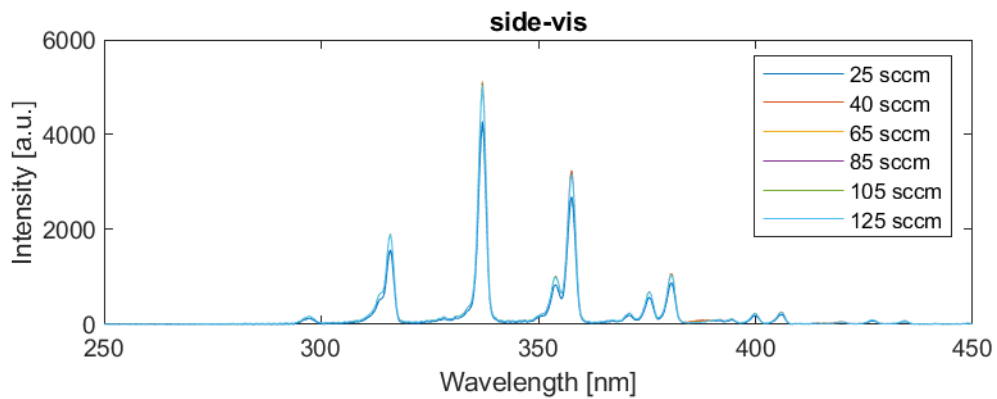
Vzhledem ke konfiguraci výboje a umístění ve skleněném reaktoru byla spektra snímána ze dvou různých míst. Byla zvolena poloha optického vlákna shora a z boční části reaktoru. Ve spektrech snímaných v horní části byl patrný útlum v oblasti UV z důvodu snímání přes skleněnou stěnu reaktoru. Spektra byla zpracována pomocí programu Matlab, bylo odečteno pozadí s následující opravou na citlivost spektrometru a propustnost skleněné desky na SDBD reaktoru.

Měření shora bylo provedeno stejným způsobem jako měření z boční části na všech třech spektrometrech. Na Obrázek 16 je možné vidět největší molekulový pás (cca 340 nm), který odpovídá kyano- skupině (CN). Kromě toho obrázek znázorňuje, jak se mění intenzita signálu produktů v závislosti na koncentraci puštěného propan-butanu, tj. se zvyšující se koncentrací výrazně klesá naměřená intenzita. Pro zřejmější znázornění rozdílu ve spektrech mezi pásy, byla base line u čistého dusíku a další pásy propan-butanu o různých koncentracích posunuty v každém spektru, viz Obrázek 16, Obrázek 17, Obrázek 18.

Na Obrázek 17 jsou znázorněny píky energetických přechodů mezi hladinami u dusíku. Nejintenzivnější a dominantní pás patří k druhému pozitivnímu systému (SPS) dusíku, který je vidět v rozmezí vlnových délek 330-340 nm a odpovídá přechodu 0-0. Při vlnové délce 360 nm se vyskytuje další přechod mezi energetickými stavy molekuly tzv. první pozitivní systém dusíku (FPS), který je mnohem slabší než druhy pozitivní systém, odpovídající přechodu 0-1.

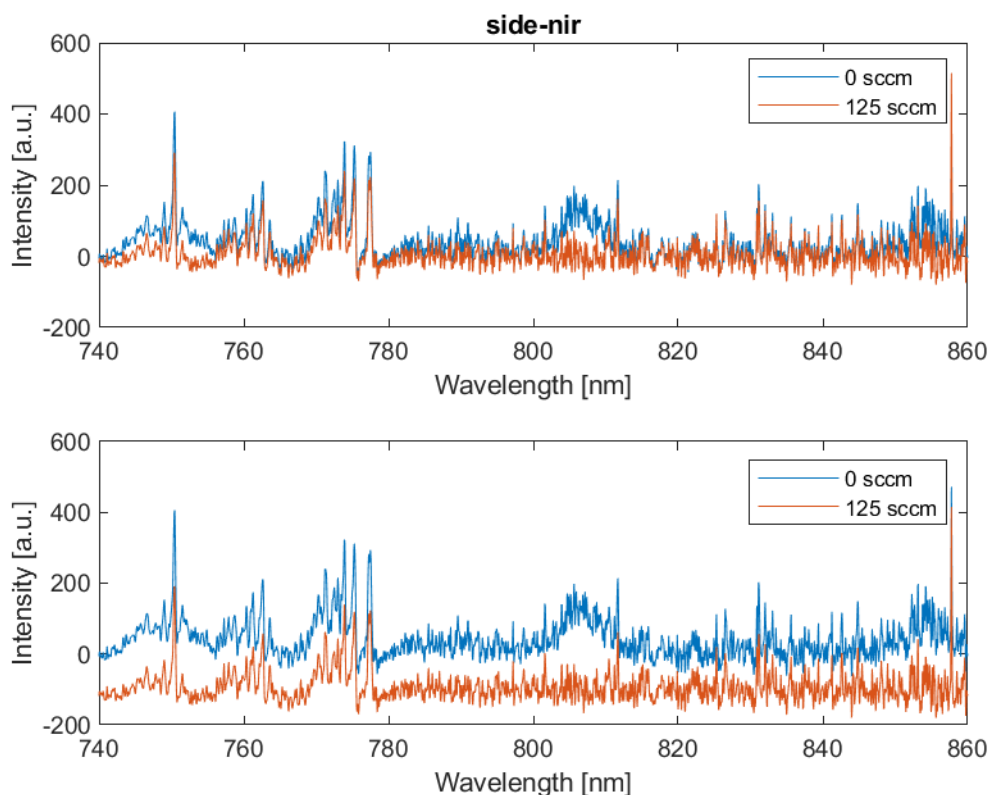


Obrázek 16 Závislost intenzity signálu na vlnové délce při TOP měření ve viditelné a ultrafialové oblasti



Obrázek 17 Závislost intenzity signálu na vlnové délce při SIDE měření ve viditelné a ultrafialové oblasti

Na Obrázek 18 je vidět další molekulový pás, který odpovídá tripletu kyslíku na 777 nm. Kyslíkový triplet byl detekován pouze při měření z boční strany. Vznik tripletu se dá vysvětlit tím, že měření probíhalo za konstantní teploty a tlaku a mohlo docházet ke kontaminaci reakčního a nosného plynu okolním vzduchem, který do aparatury vnikal právě z boční strany.

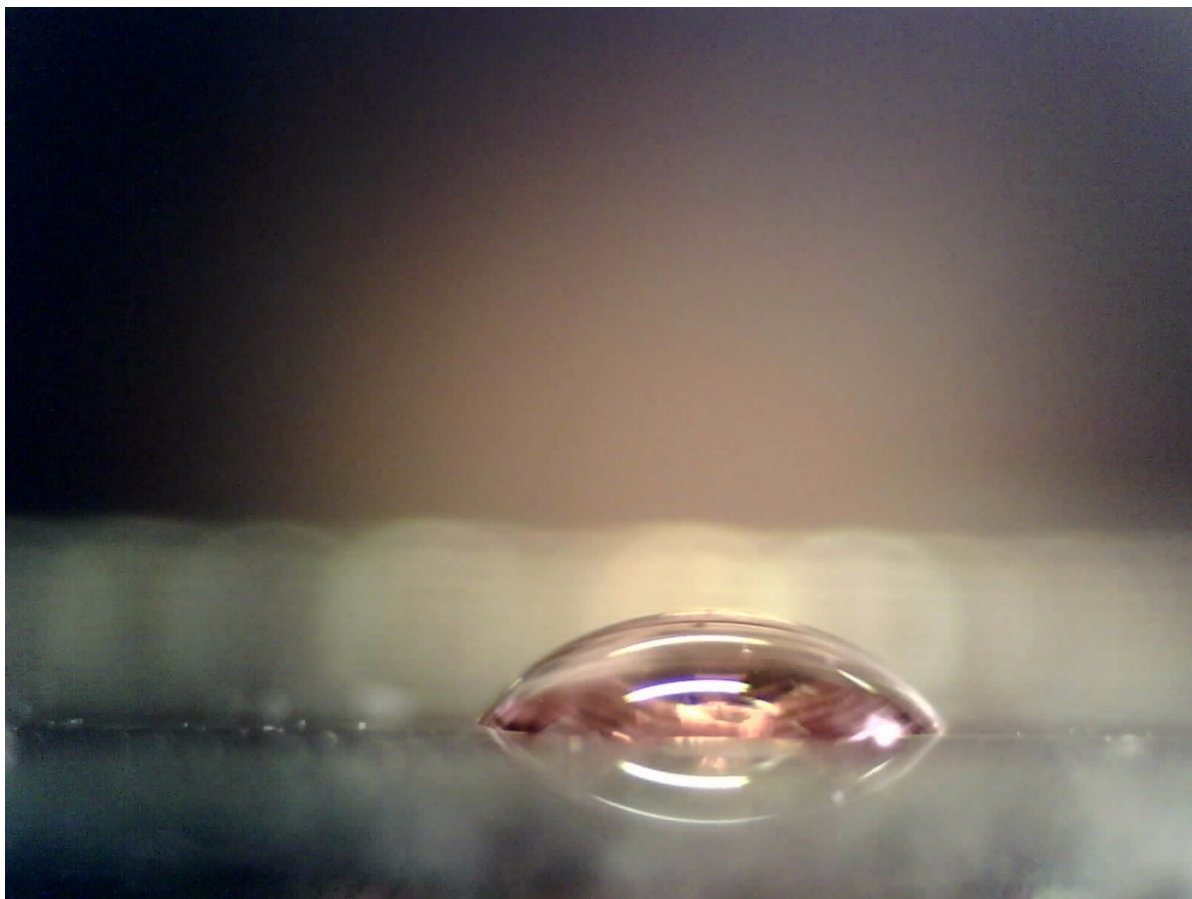


Obrázek 18 Závislost intenzity signálu na vlnové délce při SIDE měření v blízké infračervené oblasti

Ve spolupráci s kolegy z Masarykovy univerzity (dr. Jan Čech) byla ze spekter spočtena rotační a vibrační teplota energetických přechodů. Obě teploty byly spočteny z dusíkových pásů. Pro vyhodnocení dat byly použity programy massiveOES a Spectrum Analyzer [46]. Vibrační teplota byla konstantní pro různé průtoky propan-butanu, ale lišila se v závislosti na poloze optického vlákna při snímání spekter. Při měření shora teplota činila kolem 1800 K a při měření z boku kolem 3100 K. Rotační teplota byla také konstantní pro různé průtoky propan-butanu, její hodnota při měření shora byla přibližně 340 K a z boku 450 K. Ze získaných výsledků je vidět, že byl substrát během deponování ohříván, a proto je nutné, pro udržení konstantní teploty, použití chladicího vodního okruhu.

4.2 Stanovení kontaktního úhlu

Volná povrchová energie byla stanovována na základě měření kontaktního úhlu testovaných kapalin na povrchu superhydrofilních vrstev a substrátu. Měření se provádělo pomocí přístroje SEE systém popsáném v kapitole 3.2. V Tabulce 1 jsou uvedeny kontaktní úhly kapalin a volné povrchové energie jednotlivých vrstev. Na Obrázek 19 je snímek kapky diiodmethanu na substrátu, který byl vyfocen kamerou přístroje SEE Systém.



Obrázek 19 Snímek kapky diiodmethanu na povrchu substrátu čistého skla

Celková volná povrchová energie superhydrofilních vrstev se výrazně zvětšila ve srovnání s povrchovou energií čistého skla. Konečná hodnota energie se skládá z hodnot Lifshitz-Van der Waalsovy interakce (LW) a acidobazické interakce (AB). LW interakce jsou nekovalentního a neelektrostatického charakteru mezi molekulami a mají svůj původ v interakci náhodně uspořádaných dipólů. Acidobazické interakce popisují interakce mezi biopolymery a nízkoenergetickými povrchy a vychází z Lewisovy teorie zobecněných kyselin (elektronových akceptorů) a zásad (elektronových donorů) [47]. Z naměřených kontaktních úhlů je vidět, že všechny vrstvy jsou superhydrofilní s nejistotou cca 15%, takže u každé z nich se snížil

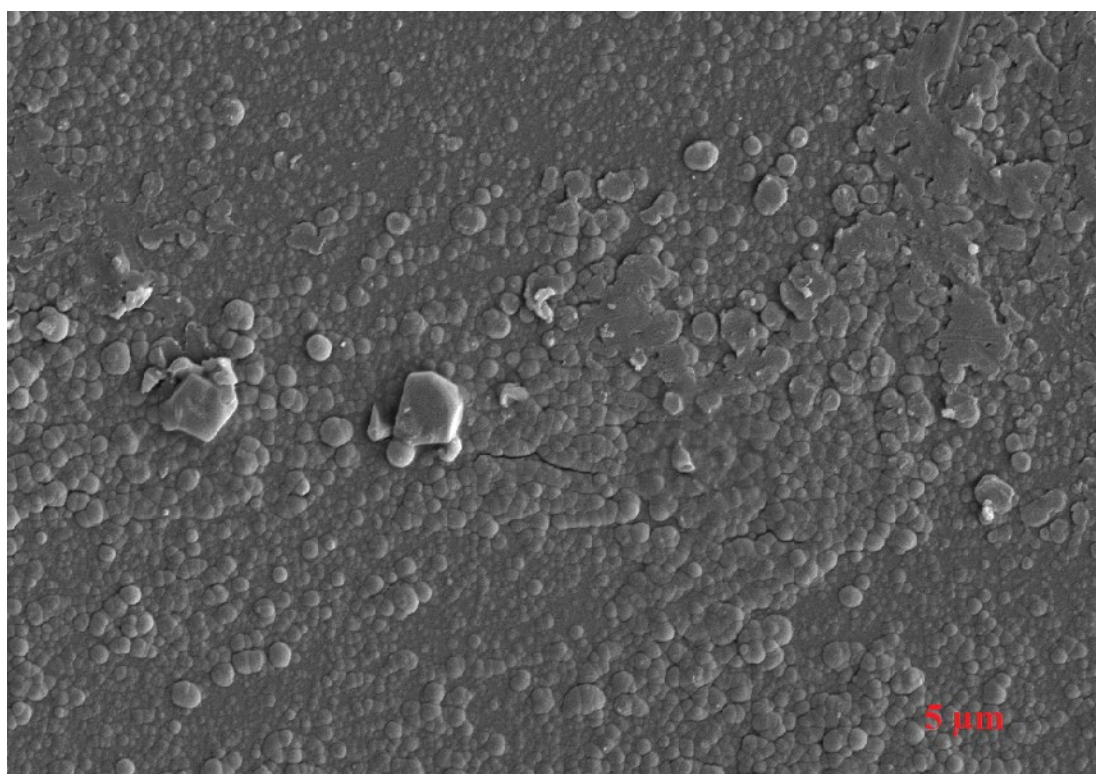
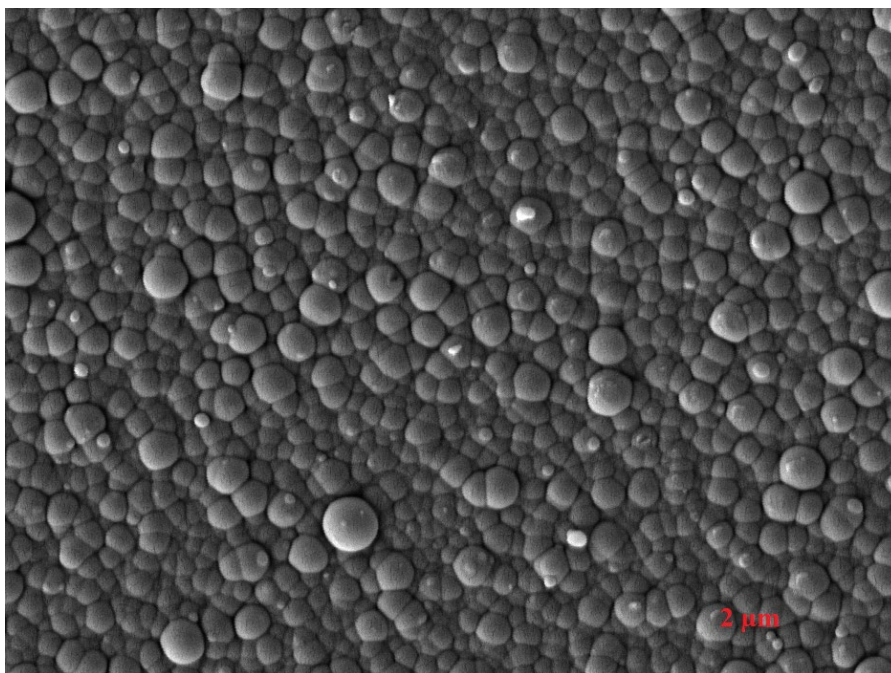
kontaktní úhel a zvýšila se povrchová energie. Kontaktní úhel testovací kapaliny vody je menší než 10° a volná povrchová energie se pohybuje kolem 41,60 až 59,24 mJ/m².

Tabulka 1 Kontaktní úhly testovaných kapalin a volné povrchové energie deponovaných vrstev

koncentrace propan- butanu [l/s]	kontaktní úhel [°]			volná povrchová energie [mJ/m ²]		
	voda	dijodomethan	ethylenglykol	celková	gLW	gAB
Čisté sklo	28,64	53,45	30,45	33,52	32,33	1,19
0,025	11,78	44,79	13,94	39,31	37,12	2,18
0,045	10,49	30,41	11,35	55,02	44,05	10,97
0,065	7,90	25,22	8,58	59,24	46,07	13,17
0,085	10,02	42,70	12,27	41,60	38,23	3,38
0,105	8,73	40,24	15,01	46,22	39,49	6,73
0,125	9,79	35,27	23,58	58,01	41,90	16,10

4.3 Stanovení elementárního složení na povrchu vrstev pomocí skenovací elektronové mikroskopie

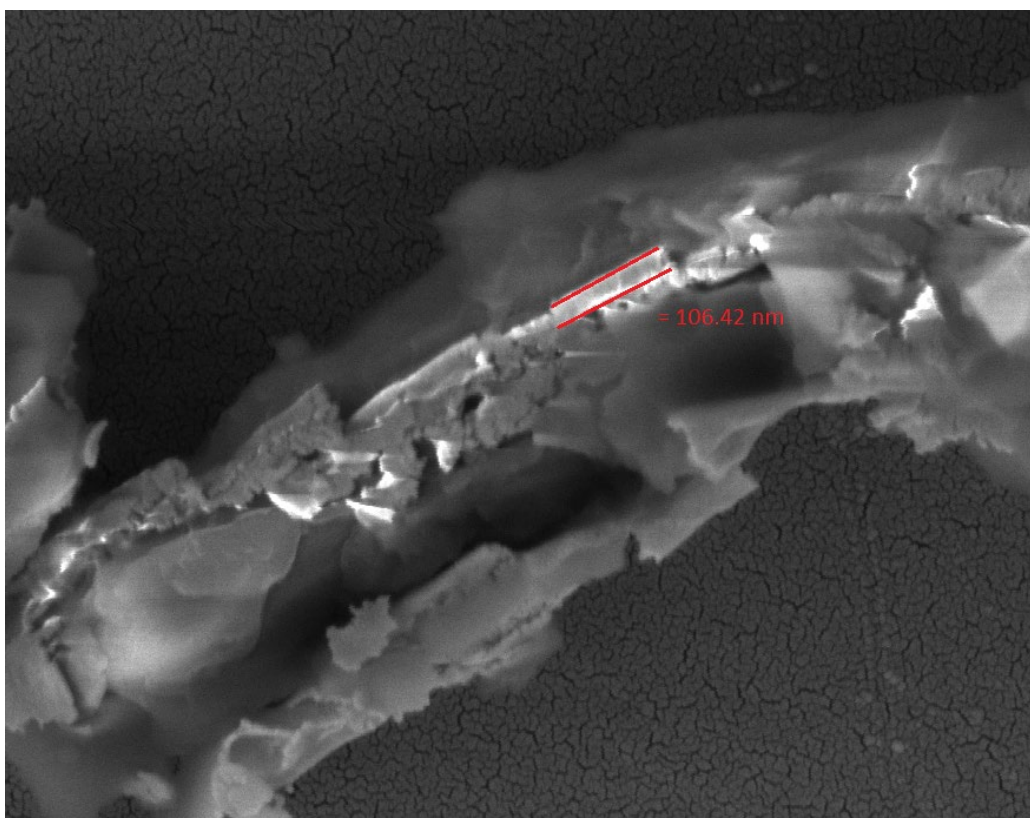
K zjištění elementárního složení a morfologických vlastností připravených vrstev byl použit skenovací elektronový mikroskop MIRA3 TESCAN. Měření bylo provedeno na Masarykově univerzitě dr. Janou Jurmanovou. Pomocí mikroskopu byly znázorněny povrchy vzorků o několika vybraných koncentracích a následně byly vyfoceny. Na obr. 20 je vidět, že povrch není homogenní a odpovídá polymerní vrstvě.



Obrázek 20 Snímek polymerního povrchu vrstvy při zvětšení 2 a 5 μm

Kromě toho byla změřena tloušťka polymerní vrstvy na zlomu vrstvy. Tloušťka vrstvy činila cca 106,45 nm (viz obrázek 21). Tato metoda stanovení tloušťky vrstvy však není příliš přesná, protože při poškrábání vrstvy mohlo dojít k její deformaci.

Dále pomocí detekčního systému bylo stanoveno elementární složení povrchů vrstev. Detekční systém je představen EDS detektorem, který umožňuje provést elementární analýzu na základě analýzy emise energie rentgenového spektra. Pomocí paprsku elektronů jsou atomy zkoumaného vzorku excitovány a vyzařují rentgenové paprsky charakteristické pro každý chemický prvek.



Obrázek 21 Snímek deponované polymerní vrstvy

V tabulce 2 je představeno elementární složení vrstev při různých koncentracích propanbutanu.

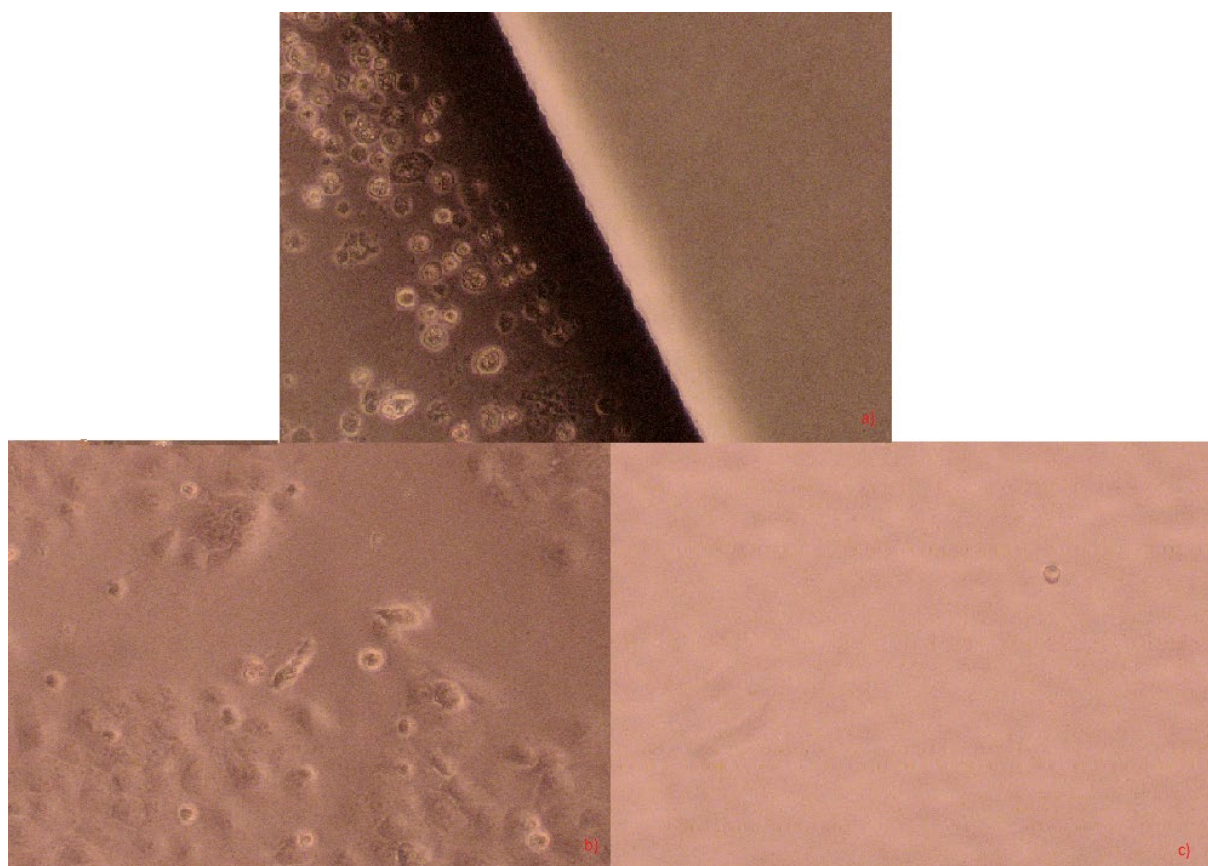
Tabulka 2 Elementární složení povrchu vrstev v závislosti na koncentraci reakčního plynu

prvek (%)	koncentrace propan-butanu [l/s]		
	0,045	0,065	0,085
N	29,4	32,0	33,3
C	48,7	53,5	61,1
O	22,0	14,5	5,9

Procentuální obsah dusíku a uhlíku se zvyšuje s koncentrací reakčního plynu propan-butanu. Naproti tomu množství kyslíku klesá při zvyšování koncentrace. Dá se to objasnit tvorbou nových funkčních skupin na povrchu při předání koncentrovanějšího plynu, například zvětvení počtu kyano- skupin (CN).

4.4 Testy biokompatibility

Testy biokompatibility byly provedeny na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity ve spolupráci s dr. Jiřinou Medalovou. Testy byly provedeny in vitro za použitím krysích buněk hladkého svalstva cév VSMC (Vascular smooth muscle cells), které byly kultivovány v médiu DMEM (Dulbecovo modifikované Eaglovo médium; Dulbeco's modified Eagle's medium, High glucose, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Čistý substrát a vzorky s nadeponovanými vrstvami byly rozřezány a vloženy do jamek pro kultivaci buněk. Pro každý vzorek a substrát byly vyhrazeny 3 jamky. Pro experimenty byly buňky naočkovány v koncentraci 2×10^5 buněk na jednu jamku se vzorkem. Dál bylo přidáno 0,5 ml živného media do každé jamky.

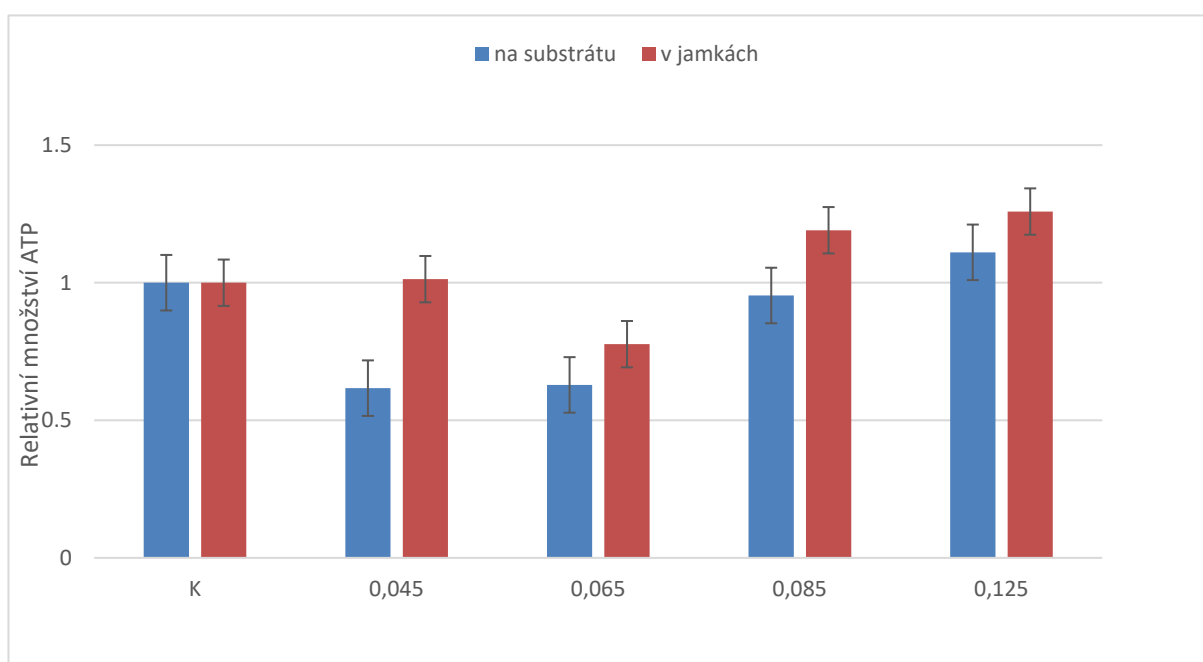


Obrázek 22 Snímek c) nedeponované vrstvy při koncentraci 0,085 l/s propan butanu, b) čistého substrátu s kultivovanými na nich buňkami VSMC a a) rozhraní mezi nimi

Kultivace buněk probíhala za stálých podmínek v inkubátoru (teplota 37 °C, 5% CO₂ a 95 % vlhkost) v kultivačním mediu po dobu 72 hodin. Po kultivaci byly jamky se vzorky prosvíceny a vyfoceny inverzním světelným mikroskopem firmy Olympus (obr. 22).

Dál byla provedena metoda stanovení relativního množství ATP pro určení buněčné viability (životaschopnosti). Metoda je založena na chemiluminiscenci ATP z lyzátu buněk kultivovaných na modifikovaných površích. Byly proměřeny dvě sady vzorku pro porovnání počtu nakultivovaných buněk. V prvním případě bylo stanoveno množství buněk narostlých přímo na modifikovaném povrchu tj. na substrátu s vrstvou a v druhém byl spočítán počet buněk v jamkách kolem substrátu.

Na začátku měření bylo kultivační medium odsáto a substrát s vrstvami přenesen do nových jamek. Dál jamky se sklíčky a jamky s kultivovanými buňkami na dně byly opláchnuty PBS (phosphate-buffered saline) a poté do každé jamky bylo přidáno 200 µl lyzačního pufru Somatic cell ATP releasing reagent (Sigma Aldrich) a na 10 minut byly nechány na třepačce. Po 10 minutách bylo odebráno 20 µl lyzátu a toto množství pak bylo smícháno s 20 µl roztoku ATP mix (191013 Cot, BioThema, Handen, Švédsko), který obsahoval směs luciferázy s luciferinem. Aby nedošlo k rozpadu aktivních sloučenin v reakčních roztocích, vzorky byly co nejrychleji proměřeny na luminometru LMT 01 (Immunotech, Monrovia, USA) a pomocí programu Microwin 2000 byl stanoven počet živých buněk.



Obrázek 23 Relativní množství ATP v buňkách kultivovaných na substrátu s vrstvami při různé koncentraci propan butanu a bez substrátu-skla

Výsledky měření jsou uvedeny na obr. 23. Na obrázku je porovnání relativního počtu buněk, který byl stanoven podílem k původnímu počtu buněk - hodnota 1, neboli 100 %. Z grafu je

patrné, že vzorky s koncentrací propan butanu 0,045 a 0,065 l/s nepodporují proliferaci buněk a naopak ji zastavují a chovají se jako toxické pro buňky. Dané výsledky jsou neočekávané a dají se mimo jiné objasnit např. mechanickým poškozením nadeponovaných vrstev. Naměřené hodnoty v jamkách bez substrátu jsou ve všech případech větší než neměřené hodnoty s ním. Z grafu je také patrné, že se zvyšující se koncentrací propan butanu se zvyšuje relativní množství ATP buněk. Dalo by se říct, že vrstvy nedeponované při koncentraci 0,125 l/s propanbutanu podporují životaschopnost buněk.

4.5 Antibakteriální testy

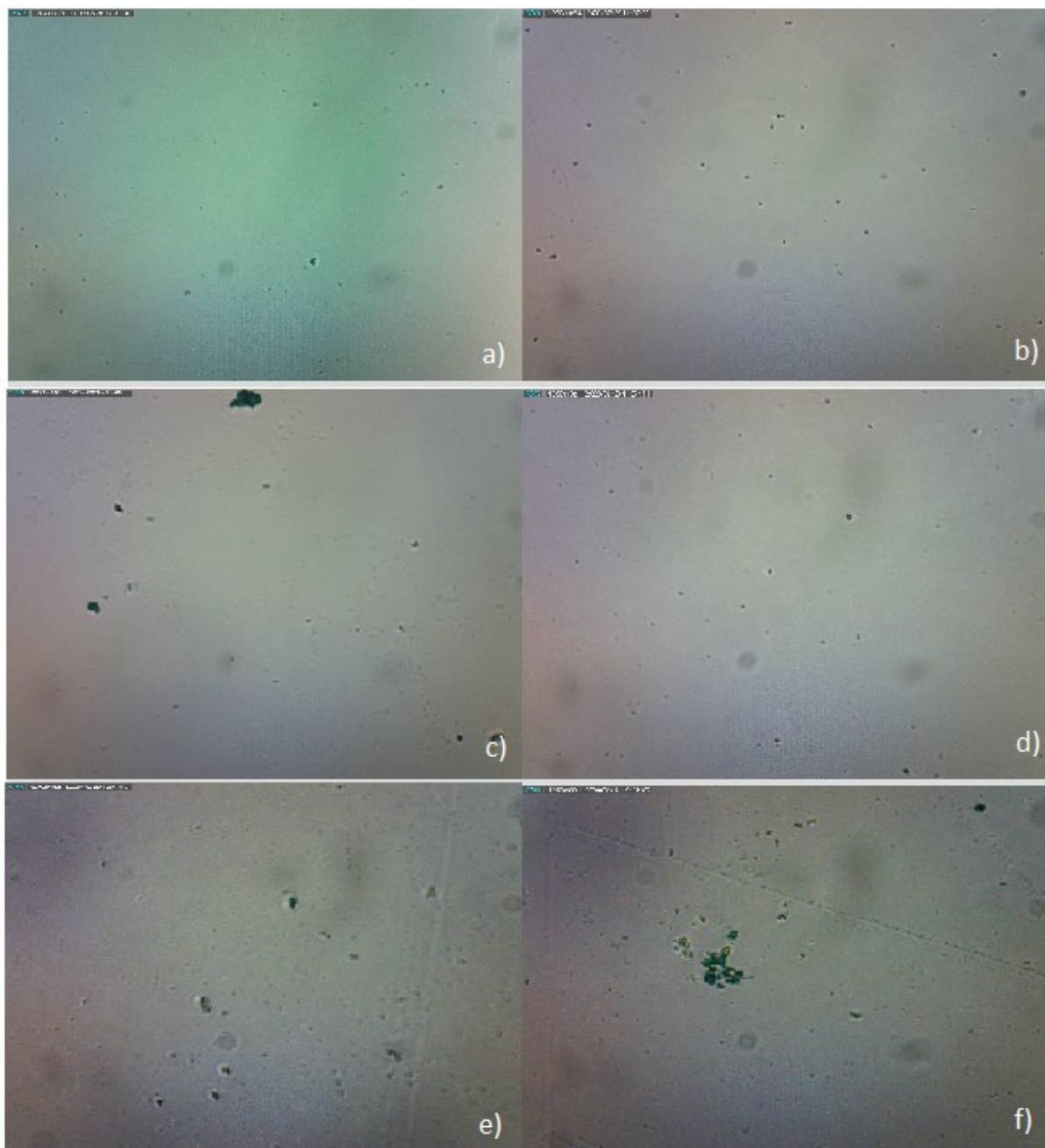
Antibakteriální testy s bakteriální kulturou *Staphylococcus epidermidis* (CCM 4418) byly provedeny dr. Petrou Matouškovou na Ústavu chemie potravin a biotechnologií Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně. Daná kultura byla poskytnuta z České sbírky mikroorganismů (CCM – Czech Collection of Microorganisms) se sídlem v Brně. Tento mikroorganismus se vyskytuje na povrchu kůže a sliznic jakéhokoli zdravého člověka a nezpůsobuje žádné poškození zdraví. Pokud však tato bakterie pronikne do krve člověka s oslabeným imunitním systémem, anebo při použití nesprávně zpracovaných nástrojů, katétrů během operace, dojde k otravě krve, což vede k zánětu vnitřní výstelky srdce [49].

Před kultivováním vzorky vrstev nadeponovaných při různých koncentracích reakčního plynu byly promyty jednou a pak dva krát sterilní vodou Milli-Q pro zajištění stability vrstev.

Bakteriální kultura *S. epidermidis* byla kultivována v tekutém mediu BHI (Brain Heart Infusion Brothinfuze, HiMedia, Mumbai, Indie), jehož základem je infuze srdeční a mozkové tkáně. Pěstování probíhalo za standartních podmínek při kultivační teplotě 37 °C a během 24 hodin. Dál bakteriální kultura byla zředěna novým sterilním médiem na 1×10^8 CFU/ml na základě zákalu (NanoPhotometerTMP300, Implen, Mnichov, Německo).

Následně byla ke každému vzorku přidána suspenze *Staphylococcus epidermidis* o objemu 0,5 ml. Bakterie byly na povrchu vrstev inkubovány po dobu 24 hodin, aby se umožnila tvorba biofilmů. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí optické mikroskopie (Intraco Micro LM 666 PC se softwarem Dino-Capture 2.0, Tachlovice, Česká republika).

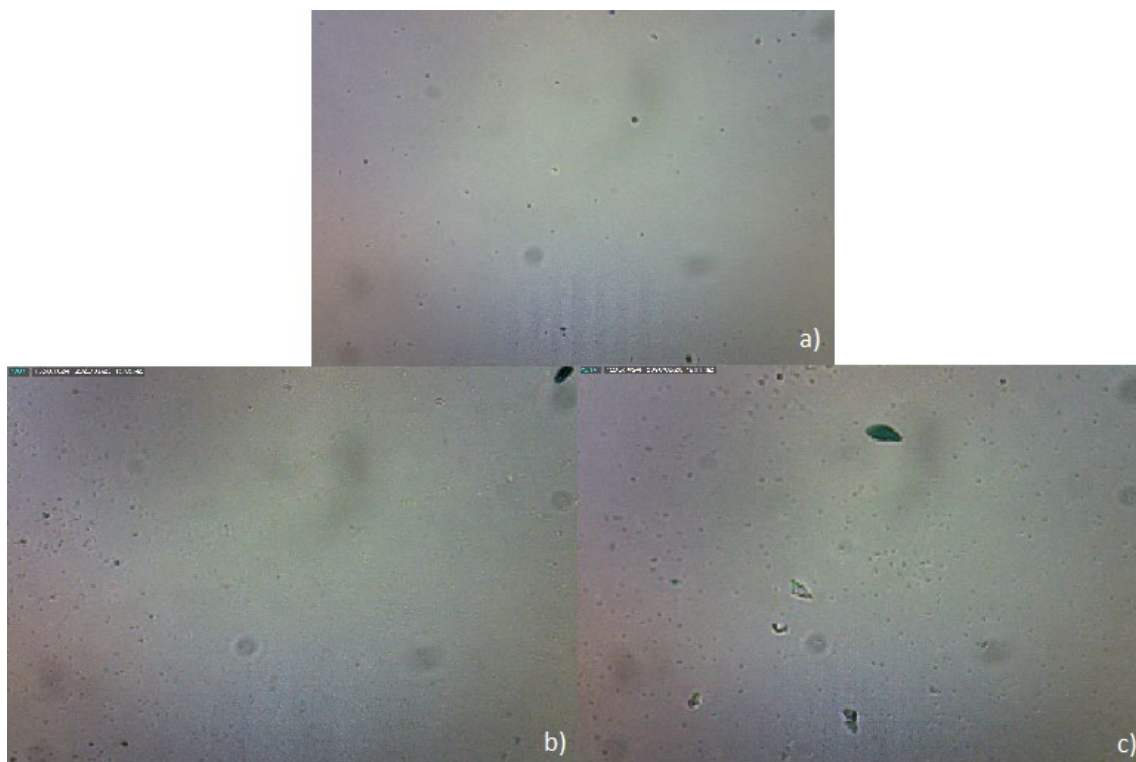
Na obrázku 24 jsou představeny snímky nadeponovaných vrstev s kultivovanými na nich bakterií *Staphylococcus epidermidis*. Z obrázku je patrné, že při rostoucí koncentraci reakčního plynu propan-butanu, zvyšuje se i počet buněk bakterií na vrstvách. Vychází to z toho, že při zvýšení koncentrace plynu se zvýší hydrofilita vrstev na substrátu, jak bylo zjištěno při měření kontaktního úhlu. Kromě toho bakterie nebyly schopny tvořit biofilm a vyskytovaly se jednotlivě nebo tvořily malé kolonie.



Obrázek 24 Snímky nadeponovaných vrstev při použití různých koncentrací (l/s) propan-butanu s bakteriální kulturou *S.epidermidis* a)0,025 b) 0,045 c)0,065 d)0,085 e)0,105 f)0,125

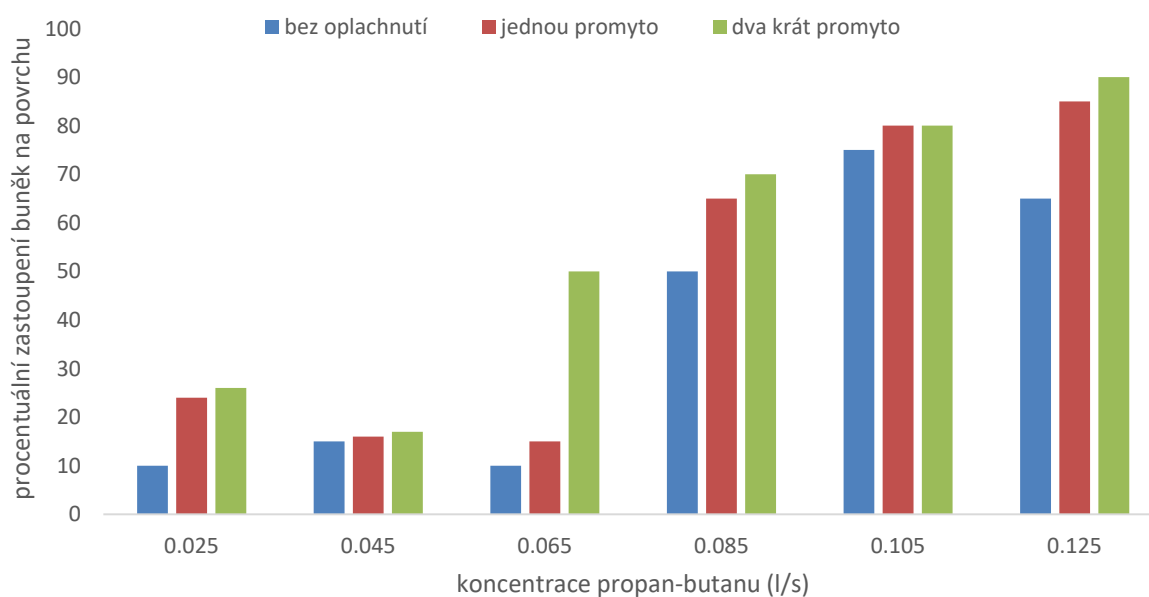
Před samotným antibakteriálním testem vzorky byly jednou a pak dvakrát opláchnuty destilovanou vodou. Každý vzorek před a po opláchnutí byl vyfocen minimálně 12 krát pro stanovení přesnějšího počtu buněk na vrstvách. Přehledový rozdíl mezi vrstvami je uveden na obrázku 25, kde jsou jako příklad ukázány snímky vrstev nadeponovaných při koncentraci 0,085 l/s propan-butanu.

Z obrázku je vidět, že se při každém opláchnutí vrstev zvyšuje počet bakteriálních buněk. Dá se to objasnit tím, že vrstvy jsou hydrofilní a tím pádem podporují růst buněk.



Obrázek 25 Snímky vrstev před a po opláchnutím destilovanou vodou a) bez opláchnutí b) po jednom opláchnutí c) po dvou opláchnutí

Na základě udělaných snímků nadeponovaných vrstev, byl sestaven graf závislosti množství nakultivovaných bakterií na koncentraci použitého propan butanu během depozice (obr 26).



Obrázek 26 Procentuální množství buněk *S. epidermidis* kultivovaných na površích vzorků nadeponovaných při různých koncentraci propan butanu

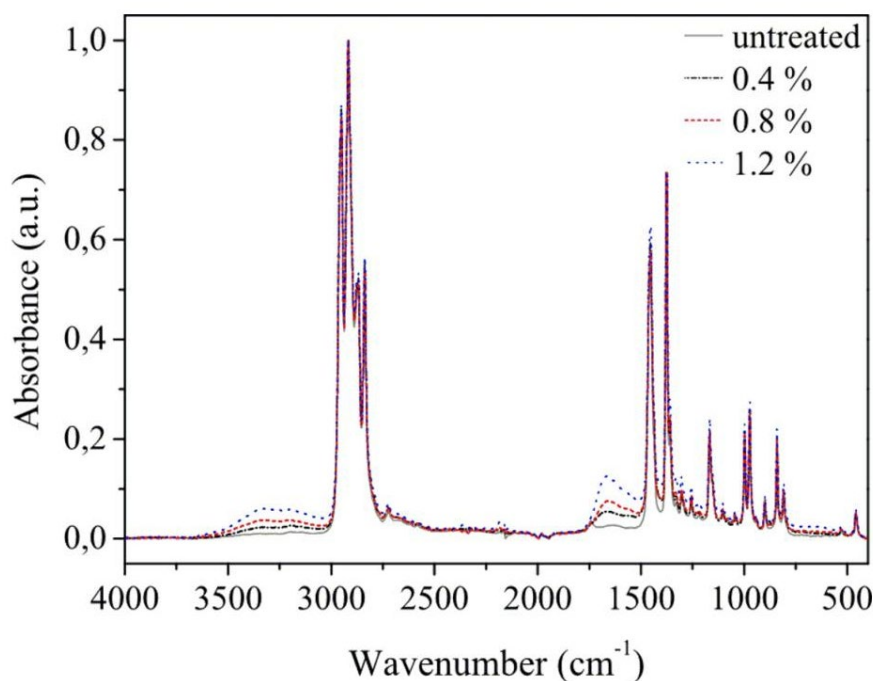
Přibližné procentuální zastoupení bakterie na povrchu je možné vidět na obr. 26. a dané výsledky byly získány pomocí všech pořízených snímků povrchů substrátu s bakterií. Z grafu je patrné, že při zvýšení koncentrace propan-butanu stoupá i počet bakterií na povrchu vrstev. Kromě toho vrstvy s koncentrací propan-butanu 0,085; 0,105 a 0,125 l/s výrazně podporují růst buněk. Jak už bylo zjištěno u provedených testů na biokompatibilitu vrstvy s koncentrací 0,045 a 0,065 l/s jsou cytotoxické pro buňky.

4.6 FTIR

Měření bylo provedeno Mgr. Hanou Dvořákovou, dr. Janem Čechem na Masarykově univerzitě. Výsledky byly opublikovány v článku Fast Surface Hydrophilization via Atmospheric Pressure Plasma Polymerization for Biological and Technical Applications v časopisu Polymers [48].

Deponování vrstev probíhalo na stejné aparatuře za stejných podmínek. Rozdíl spočívá v tom, že koncentrace reaktivního plynu byla jiná a činila 0,004, 0,008, 0,0120 l/s. Takže doba depozice byla kratší a trvala kolem 15 vteřin. Jako substrát byl použit polypropylen (PP) s plochou povrchu $25 \times 95 \text{ mm}^2$. Před zpracováním substrát byl promyt isopropylalkoholem a důkladně vysušen během 72 hodin při pokojové teplotě. Měření FTIR bylo provedeno na čistém substrátu a na substrátu se vzorkem.

Infračervené spektrum bylo získáno spektrometrem FTIR Tensor 27 vybaveným jedním odrazovým diamantem Platinum ATR (Bruker Optics, Ettlingen, Německo) a je ukázáno na obr. 26.



Obrázek 27 Infračervené spektrum čistého substrátu a nadeponovaných vrstev při koncentraci propan-butanu 0,004, 0,008 a 0,012 l/s [47]

V infračerveném spektru nadeponovaných vrstev byly nalezeny další dva spektrální pásy. První z nich, mezi cca 3 500 a 3 000 cm^{-1} , souvisí s hydroxylovými skupinami karboxylových kyselin a N-H skupinou aminů či amidů. Druhý pás, mezi 1730 a 1650 cm^{-1} , odráží přítomnost karbonylové skupiny aldehydů, ketonů, karboxylových kyselin a amidů, konjugovaných karbonylů a iminů. Karbonylové skupiny jsou často pozorovány v infračerveném spektru polypropylenu upraveného ve vzduchové plazmě nebo v metan/kyslík plazmě [47].

5 ZÁVĚR

Hlavním cílem této práce byla příprava vrstev metodou plazmové polymerace a jejich charakterizace. Vrstvy by měly vykazovat zvýšenou hydrofilitu, biokompatibilitu a podporovat růst bakteriálních buněk.

Při depozici jako substrát bylo zvoleno čisté sklo a polymerizace probíhala ve směsi reakčního plynu propan-butanu a dusíku. Depozice probíhala za atmosférického tlaku a při konstantní teplotě. Kromě toho byly nastaveny určité koncentrační průtoky propan butanu pro každé měření. Než byly charakterizovány nadeponované vrstvy byla provedena diagnostika výboje pomocí optické emisní spektroskopie. Ve spolupráci s kolegy z Masarykovy univerzity (dr. Jan Čech) byla spočítána vibračně rotační teplota přechodů a z výsledných spekter odečteny nejdůležitější molekulové pasy. Měření bylo provedeno dvěma způsoby na základě polohy optického vlákna z hora a z boku. Největšímu molekulovému pasu (cca 340 nm) odpovídá kyano- skupina (CN), další důležitý molekulový pas (cca 777 nm) patří k tripletu kyslíku, který byl detekován pouze z boční strany. Nejintenzivnější a dominantní pás patří k druhému pozitivnímu systému (SPS) dusíku, který je vidět v rozmezí vlnových délek 330-340 nm.

Následně byly charakterizovány připravené vrstvy pomocí fyzikálně-chemických diagnostik. První diagnostikou bylo stanovení volné povrchové energie na základě měření kontaktních úhlů kapalin s různou viskozitou. Bylo prokázáno, že každá připravena vrstva byla hydrofilní případně superhydrofilní. Dalším úkolem bylo stanovení elementárního složení povrchu vrstev pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Měření bylo provedeno na Masarykově univerzitě dr. Janou Jurmanovou. Největší procentuální zastoupení bylo u uhlíku (cca 50 %), pak u dusíku (cca 30 %), i nakonec u kyslíku (cca 12 %). Procentuální obsah dusíku a uhlíku se zvyšuje s koncentrací reakčního plynu propan-butanu. Naproti tomu množství kyslíku klesá při zvyšování koncentrace. Tloušťka polymerní vrstvy činila cca 106,45 nm.

Dál byly provedeny biologické testy na biokompatibilitu a antibakteriální vlastnosti. Testy biokompatibility byly provedeny na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity ve spolupráci s dr. Jiřinou Medalovou. Testy byly provedeny in vitro za použitím krysích buněk hladkého svalstva cév VSMC. Pro určení buněčné viability (životaschopnosti) byla provedena metoda stanovení relativního množství. Výsledky tohoto testu nejsou jednoznačné, protože vrstvy nadeponované při koncentraci propan-butanu 0,045 a 0,065 l/s jsou spíše toxické a proto nepodporují proliferaci buněk, ale naopak je zastavují. Ostatní vzorky podporovaly životaschopnost buněk a nejlepší výsledek byl u koncentrace 0,125 l/s, kde viabilita činila kolem 120 %. Antibakteriální testy s bakteriální kulturou *Staphylococcus epidermidis* (CCM 4418) byly provedeny dr. Petrou Matouškovou na Ústavu chemie potravin a biotechnologií Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně. Některé výsledky byly, stejně jako u testu na biokompatibilitu, neočekávané, protože vrstvy s menší koncentrací zase vykazovaly toxické vlastnosti. Naproti tomu vrstvy nadeponované při vyšší koncentraci propan butanu 0,085; 0,105 a 0,125 l/s podporovaly růst bakterií což bylo cílem daného testu.

Další diagnostika byla provedena pomocí FTIR Mgr. Hanou Dvořákovou, dr. Janem Čechem na Masarykově univerzitě. Výsledky byly publikovány v článku Fast Surface Hydrophilization via Atmospheric Pressure Plasma Polymerization for Biological and Technical Applications v časopisu Polymers. V infračerveném spektru nadeponovaných vrstev byl nalezen spektrální pás (cca cca 3 500 a 3 000 cm^{-1}) související s hydroxylovými skupinami karboxylových kyselin a N-H skupinou aminů či amidů a takže druhý pás, mezi 1730 a 1650 cm^{-1} , odráží přítomnost karbonylové skupiny aldehydů, ketonů, karboxylových kyselin a amidů, konjugovaných karbonylů a iminů [48].

Na závěr bych chtěla říct, že cíle diplomové práce byly splněny a výsledky jsou nové a neočekávané. Dane téma je velice zajímavé a důležité, proto bych chtěla pokračovat ve zkoumání dané problematiky i dále.

6 LITERATURA

- [1] МАСКАЕВА, Л.Н., Е.А. ФЕДОРОВА а В.Ф. МАРКОВ. Технология тонких пленок и покрытий. 1. Екатеринбург: Урал, 2019. ISBN ISBN 978-5-7996-2560-3. Dostupné z: https://elar.urfu.ru/bitstream/10995/73905/1/978-5-7996-2560-3_2019.pdf
- [2] РОГОВ, В.А. Технология конструкционных материалов. Нанотехнологии [online]. 2. Москва: Юрайт, 2019 [cit. 2021-04-02]. ISBN 978-5-534-00528-8. Dostupné z: https://studme.org/248566/tehnika/tehnologiya_konstruktsionnyh_materialov_nanotehnolog
- [3] VESEL, A a M MOZETIC. Modification of PET surface by nitrogen plasma treatment. *Journal of Physics: Conference Series* [online]. 2008, 100(1) [cit. 2021-04-02]. ISSN 1742-6596. Dostupné z: doi:10.1088/1742-6596/100/1/012027
- [4] MARTIŠOVITŠ, Viktor. *Základy fyziky plazmy: učebný text pre magisterské štúdium*. Bratislava: Vydavateľstvo UK, 2006. ISBN 80-223-1983-X.
- [5] SCHMIEDT, Lukáš. *Úvod do fyziky plazmatu* [online]. [2006] [cit. 2014-11-25]. Dostupné z: <http://physics.mff.cuni.cz/kfpp/s4r/plazma/?p=0>
- [6] VANTEEV, P.M. a N.A. PERMYAKOV. GENERATION OF PLASMA. *Scienceforum.ru* [online]. Russia, 2018 [cit. 2019-10-16]. Dostupné z: <http://files.scienceforum.ru/pdf/2018/9576.pdf>
- [7] LIVANOV, Sergey. GENERATION OF PLAZMA. *DIPOL* [online]. Russia, 2016 [cit. 2019-10-16]. Dostupné z: <https://www.dipaul.ru/pressroom/generatsiya-plazmy/>
- [8] SAMOILOVICH, V. G., V. I. GIBALOV a K. V. KOZLOV. *Fyzikální chemie bariérového výboje*. Moskva: Izd-vo Moskovskogo universiteta, 1989. ISBN 5211004159.
- [9] KOGELSCHATZ, Ulrich. *Plasma Chemistry and Plasma Processing* [online]. **23**(1), 1-46 [cit. 2019-11-05]. DOI: 10.1023/A:1022470901385. ISSN 02724324. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1022470901385>
- [10] GUSLIN, A.S. *Prostorový a časový vývoj bariérového výboje* [online]. Petrohrad, 2017 [cit. 2019-10-30]. Dostupné z: <http://elib.spbstu.ru/dl/2/v17-3105.pdf/download/v17-3105.pdf>. Závěrečná práce. Petrohradská státní polytechnická univerzita. Vedoucí práce N. P.KORENUGIN.
- [11] Obloukový výboj. *České vysoké učení technické: Fakulta strojní* [online]. Praha, 2012 [cit. 2019-11-05]. Dostupné z: http://fyzika.fs.cvut.cz/subjects/pm/lectures/pm_prednaska9.pdf
- [12] XU, Xueji. Dielectric barrier discharge — properties and applications. *Thin Solid Films* [online]. 2001, **390**(1-2), 237-242 [cit. 2019-11-05]. DOI: 10.1016/S0040-6090(01)00956-7. ISSN 00406090. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040609001009567>

- [13] M. Černák, I. Černáková, I. Hudec, D. Kováčik, A. Zahoranová. Diffuse Coplanar Surface Barrier Discharge and its applications for in-line processing of low-added-value materials. *European Physical Journal: Applied Physics, EDP Sciences*, 2009, 47 (2), pp.1-6. doi.10.1051/epjap/2009131.hal-00497324
- [14] AVTAEVA, S.V. *Bariérový výboj. Vývoj a aplikace*. A 22. Beškek: Kyrgyz Russian Slavic University (KPCY), 2009.- 290s. ISBN 978-9967-05-539.
- [15] KOLTOVOI, N.A. Kirlian Photography. History electrophotographic research. *Electronic mathematical and biomedical journal "Mathematical morphology"* [online]. Moscow-Smolensk, 2017(1), 69-81 [cit. 2019-11-06]. ISSN 1819-3730. Dostupné z: <http://www.sci.rostelecom67.ru/user/sgma/MMORPH/N-55-html/koltovoi/08.pdf>
- [16] ANDREEV, V. V. INVESTIGATION OF SURFACE DIELECTRIC BARRIER DISCHARGE, CREATED BY PARALLEL PLANAR ELECTRODES. *Vestnik Moskevské státní technické univerzity (MGTU im. H.Э.Баумана)* [online]. Ul'yanov Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation, 2013, , 15-26 [cit. 2019-11-07]. ISSN 1812-3368. Dostupné z: <https://cyberleninka.ru/article/v/issledovanie-poverhnostnogo-dielektricheskogo-bariernogo-razryada-sozdavaemogo-parallelnymi-ploskimi-elektrodami>
- [17] KOLOUCH, Aleš. *Plazmatické metody pro úpravu povrchů* [online]. In: . *Technická Univerzita v Liberci*, s. 47 [cit. 2019-12-02]. Dostupné z: https://www.integrita.zcu.cz/download/skola1/liberec_kmt_prez4.pdf
- [18] HUMPOLÍČEK, Petr. Jak stanovit biologické vlastnosti materiálů. *Technický týdeník* [online]. Centrum polymerních systémů, 2014 [cit. 2020-12-03]. Dostupné z: https://www.technickytydenik.cz/rubriky/archiv-medicinska-technika/jak-stanovit-biologicke-vlastnosti-materialu_26025.html
- [19] ЧЕНЦОВ, Ю.С. *Введение в клеточную биологию*. 4. М.: Академкнига, 2004. ISBN 5-94628-105-4.
- [20] HRSTKA, Miroslav. *Obecná biologie*. Vyd. 2. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2007, 111 s.:il. ISBN 978-80-214-3464-6.
- [21] ЯРЫГИН, В.Н., В.И ВАСИЛЬЕВА, И.Н ВОЛКОВ а В.В. СИНЕЛЬЩИКОВА. *БИОЛОГИЯ*. 5. Москва: «Высшая школа», 2003. ISBN 5-06-004588-9. Dostupné také z: <https://studfile.net/preview/1567430/>
- [22] MITALIPOV, Shoukhrat a Don WOLF. Totipotency, Pluripotency and Nuclear Reprogramming. MARTIN, Ulrich, ed. *Engineering of Stem Cells* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009, 2009-3-27, s. 185-199 [cit. 2020-09-30]. ISBN 978-3-540-88805-5. Dostupné z: doi:10.1007/10_2008_45
- [23] ALBERTS, Bruce. *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York: Garland Science, c2008. ISBN 978-0-8153-4105-5.

- [24] БЛАЖЕВИЧ, О. В. *Культивирование клеток. Курс лекций* [online]. Минск: БГУ, 2004 [cit. 2020-11-26]. ISBN 985-485-293-8. Dostupné z: http://www.bio.bsu.by/microbio/files/kurs_cult_cells_Blazhevich.pdf.
- [25] VEJRAŽKA, Martin. *Buněčné kultury* [online]. Ústav lékařské biochemie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze, 2008 [cit. 2020-09-30]. Dostupné z: <https://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>
- [26] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 4. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2002. ISBN 80-7080-475-0.
- [27] *Volná povrchová energie* [online]. Přírodovědecká fakulta MUNI, 2015, s. 1-24 [cit. 2020-11-26]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/sci/jaro2015/F8542/um/Volna_povrchova_energie_modely_ucebni_material.pdf?lang=en
- [28] NOVÁK, Josef. *Fyzikální chemie: bakalářský a magisterský kurz*. Praha, 2016. Dostupné také z: <https://ufch.vscht.cz/files/uzel/0013874/0029~c3P2MPFNL9Iry0wtBwA.pdf?redirected>
- [29] *Kultivace buněk in vitro* [online]. Ústav patologické fyziologie LF MU [cit. 2020-09-30]. Dostupné z: https://www.med.muni.cz/patfyz/tmbg/Tkanovky_MM09.pdf
- [30] *Общая фармакопейная статья: Стерильность* [online]. Registration of Drugs in Russia and EAEU (CIS): МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РФ, 2016 [cit. 2020-11-26]. Dostupné z: <http://www.eurasiancommission.org/ru/act/tehnreg/deptexreg/LS1/Documents/2.6.1.%20Стерильность.pdf>
- [31] BURSOVÁ, Šárka, Lenka NECIDOVÁ a Marta DUŠKOVÁ. *Mikrobiologie potravin a mikrobiologické laboratorní metody*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-741-1.
- [32] NIKOLAEV, Yu. A. a V. K. PLAKUNOV. Biofilm—“City of microbes” or an analogue of multicellular organisms? *Microbiology* [online]. 2007, 76(2), 125-138 [cit. 2020-11-26]. ISSN 0026-2617. Dostupné z: doi:10.1134/S0026261707020014
- [33] ВАСИЛЬЕВ, А. В., Е. В. ГРИНЕНКО, А. О. ЩУКИН а Т. Г. ФЕДУЛИНА. *ИНФРАКРАСНАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ И ПРИРОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ: Учебное пособие для студентов химических и химико-технологических специальностей высших учебных заведений* [online]. СПб: СПбГЛТА, 2007 [cit. 2020-11-26]. Dostupné z: <http://window.edu.ru/resource/003/66003/files/PosobIRshort.pdf>

- [34] KANIA, Patrik. Infračervená spektrometrie [online]. Praha : VŠCHT v Praze, 2014. [cit. 2020-02-26]. Dostupné z: <https://uanlch.vscht.cz/files/uzel/0012437/0007~~M9f1dAYA.pdf>
- [35] COLTHUP, Norman B., Lawrence H DALY a Stephen E WIBERLEY. *Introduction to infrared and Raman spectroscopy*. Third edition. San Diego: Academic Press, 1990, xii, 547 stran : ilustrace ; 24 cm. ISBN 0-12-182554-X.
- [36] INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE: IČ praktika analytiky [online]. Přírodovědecká fakulta UK. s. 1-12 [cit. 2020-11-26]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/ftir.pdf>
- [37] INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE [online]. Praha : VŠCHT v Praze. [cit. 2020-02-26]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/lms/Zverze/Infrared.htm>
- [38] INFRAČERVENÁ SPEKTROMETRIE [online]. NTC - Nové technologie - výzkumné centrum - Západočeská univerzita v Plzni, kapitola 3 [cit. 2020-11-26]. Dostupné z: https://ftp.zcu.cz/files/projects/frvs-3892007/skripta_kap3_irspektrometrie.pdf
- [39] Кристаллография и рентгеноструктурный анализ РАСТРОВАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ: РАСТРОВАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ [online]. In: . Московский физико-технический институт, 2013 [cit. 2020-12-03]. Dostupné z: https://mipt.ru/upload/medialibrary/a90/Кристаллография_и_рентгеноструктурный_анализ_-_Приложение_3_SEM.pdf
- [40] KOSTELÁNSKÁ, Klára a Jan GAJDZIOK. Elektronová mikroskopie pro předmět „Instrumentální analytické metody ve farmaceutické technologii“ [online]. Brno : VFU Brno, 2017. [cit. 2020-12-03]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/110961010-Veterinari-afarmaceuticka-univerzita-brno-elektronova-mikroskopie-pro-predmet-instrumentalnianalyticke-metody-ve-farmaceuticke-technologie.htm>
- [41] Elektronová mikroskopie transmisní a rastrovací. *Učební texty FEI VUT v Brně* [online]. Opava [cit. 2021-7-9]. Dostupné z: http://jointlab.upol.cz/soubusta/OSYS/El_mikr/El_mikr.html
- [42] SJINDO, D. a T. OIKAWA. *Analytical transmission electron microscopy*. 1. Moscow: Technosfera, 2006. ISBN 5-94836-064-4.
- [43] Elektronová mikroskopie. *Mikrosystemy: Olympus* [online]. Moskva, 2020 [cit. 2021-7-9]. Dostupné z: <https://www.microsystemy.ru/info/articles/elektronnaya-mikroskopiya/>
- [44] JÄGER, A. a V. GÄRTNEROVÁ. Elektronovým mikroskopem do nitra materiálů aneb jak vypadá jejich struktura. *Fyzikální ústav akademie věd České republiky* [online]. **8.9.2017**, 2 [cit. 2021-5-28]. Dostupné z: <https://www.fzu.cz/aktuality/elektronovym-mikroskopem-do-nitra-materialu-aneb-jak-vypada-jejich-struktura>

- [45] OPTICKÁ EMISNÍ SPEKTROMETRIE. *Informační systém UPCE* [online]. [cit. 2021-6-8]. Dostupné z: <https://dokumenty.upce.cz/FCHT/kbbv-vk/instrumentalni-met-anal/opticka-emisni-spektrometrie.pdf>
- [46] Navratil, Z., Trunec, D., Smid, R., Lazar, L. (2006) *A software for optical emission spectroscopy - problem formulation and application to plasma diagnostics*. Czechoslovak Journal of Physics **56**, p. B944. DOI 10.1007/s10582-006-0308-y
- [47] Volná povrchová energie. *Informační systém Masarykovy univerzity* [online]. [cit. 2021-5-28]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/sci/jaro2015/F8542/um/Volna_povrchova_energie_modely_ucebni_material.pdf
- [48] DVOŘÁKOVÁ, ČECH, STUPAVSKÁ, PROKEŠ, JURMANOVÁ, BURŠÍKOVÁ, RÁHEL' a ST'AHEL. Fast Surface Hydrophilization via Atmospheric Pressure Plasma Polymerization for Biological and Technical Applications. *Polymers* [online]. 2019, **11**(10) [cit. 2021-7-9]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: [doi:10.3390/polym11101613](https://doi.org/10.3390/polym11101613)
- [49] MÉRIC, Guillaume, Leonardos MAGEIROS, Johan PENSAR, et al. Disease-associated genotypes of the commensal skin bacterium *Staphylococcus epidermidis*. *Nature Communications* [online]. 2018, **9**(1) [cit. 2021-7-20]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: [doi:10.1038/s41467-018-07368-7](https://doi.org/10.1038/s41467-018-07368-7)

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

UV	ultrafialové záření
DBD	dielektrický bariérový výboj
Hz	hertz
CDBD	koplanární bariérový výboj
SDBD	povrchový dielektrický bariérový výboj
K	kelvin
PECVD	Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition
°C	stupeň Celsia
eV	elektronvolt
μm	mikrometr
ns	nanosekunda
VDBD	objemový bariérový výboj