

Charakterizace polymerních vrstev pomocí AFM

Petr Měrka

Bakalářská práce
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav fyziky a mater. inženýrství

akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Petr MĚRKA**
Osobní číslo: **T10619**
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Chemie a technologie materiálů**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Charakterizace polymerních vrstev pomocí AFM**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte rešerši na zadané téma s využitím doporučené literatury a databázových informačních zdrojů.
2. Optimalizujte proces přípravy polymerních vrstev na atomárně rovných površích.
3. Připravené vrstvy a povrchy s imobilizovanými polymerními částicemi charakterizujte pomocí Mikroskopie atomárních sil (AFM).
4. Získané záznamy z AFM podrobte obrazové analýze.
5. Všechny získané výsledky přehledně diskutujte a srovnajte v závěrečných kapitolách diplomové práce.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. Mironov, V.L.: **Fundamentals of Scanning Probe Microscopy**, The Russian Academy of Science, Nizhniy Novgorod, 2004.
2. Temenoff, J.S.: **Biomaterials: The Intersection of Biology and Materials Science**, Rice University, 2009, ISBN-13: 9780130097101.
3. Brundle, C. R., Evans, Ch. A. jr. Wilson, S.: **Encyklopedia of materials characterization, surfaces, interface, thin films**. Elsevier, 1992. ISBN 0-7506-9168-9.
4. Wagner, P.: **Immobilization strategies for biological scanning probe microscopy**, FEBS Letters 430, p. 112-115, 1998.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Antonín Minařík, Ph.D.

Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání bakalářské práce:

8. února 2013

Termín odevzdání bakalářské práce:

24. května 2013

Ve Zlíně dne 11. února 2013


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




Mgr. Aleš Mráček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno:

Obor:

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně

.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení. Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

V této práci byly studovány možnosti imobilizace polymerních řetězců a klubek hyaluronanu sodného (HA) na atomárně rovném povrchu slídy pomocí mikroskopie atomárních sil – AFM. Zkoumanými parametry byly střední molekulová hmotnost použitého polymeru, jeho koncentrace v roztoku, povrchový náboj slídy, čas depozice roztoku na povrchu slídy, následnost jednotlivých kroků celého procesu. Z výsledků vyplynulo, že za optimálních podmínek nastavení jednotlivých parametrů roztoku a vlastností povrchu lze připravit různě strukturované polymerní monovrstvy na povrchu slídy. Tyto vrstvy obsahují, zejména při vyšší výchozí koncentraci polymeru v roztoku, vzájemně propojenou síť agregovaných klubek a řetězců HA.

Klíčová slova: povrchy, polymerní vrstvy, mikroskopie atomární sil, fyzikální adsorbce, hyaluronan sodný

ABSTRACT

In this work were studied options for immobilization of polymer chains and coils of the hyaluronan sodium (HA) on atomic flat mica surface by atomic force microscopy – AFM. Observed parameters were these: molecular weight of used polymer, concentration of polymer solution, surface charge of mica, deposition time on mica surface, continuity of individual process steps. From results included that so with optimal condition setup of individual parameters of solution and properties of surface is possible to prepare different structures of polymer monolayers on mica surface. These layers contain interconnected network of aggregated coils and chains, mainly at higher concentrations of polymer solution.

Keywords: surfaces, polymer layers, atomic force microscopy, physical adsorption, hyaluronan sodium

Tímto bych rád poděkoval vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Antonínu Minaříkovi Ph.D za odborné rady, vedení, čas a trpělivost, kterou mi v průběhu vypracování této bakalářské práce poskytoval.

Dále bych chtěl poděkovat Ing. Magdě Rafajové za pomoc při měření vzorků na mikroskopu atomárních sil.

Chtěl bych také poděkovat mé rodině a přítelkyni za jejich podporu při mém studiu.

Motto:

„Věda je pouhou samoučelnou perversí, pokud jejím konečným cílem není zlepšení situace člověka.“

Nikola Tesla

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 MIKROSKOPIE SKENUJÍCÍ SONDOU - SPM	12
1.1 HISTORIE SPM	13
1.2 PŘEHLED SPM TECHNIK.....	14
1.2.1 STM - Rastrovací tunelová mikroskopie	14
1.2.2 AFM - Mikroskopie atomárních sil.....	15
1.2.3 LFM - Mikroskopie laterálních sil	18
1.2.4 FMM - Mikroskopie modulovaných sil	18
1.2.5 MFM - Mikroskopie magnetických sil	18
1.2.6 EFM - Mikroskopie elektrostatických sil.....	18
1.2.7 SCM - Rastrovací kapacitní mikroskopie	19
1.2.8 SThM - Rastrovací termická mikroskopie	19
1.3 HLAVNÍ KOMPONENTY AFM.....	20
1.3.1 Polohovací zařízení — skener.....	20
1.3.2 Sonda pro SPM	21
2 POLYMERNÍ VRSTVY	23
2.1 VÝZNAM POLYMERNÍCH VRSTEV.....	23
2.2 TLOUŠŤKA POLYMERNÍCH VRSTEV	23
2.3 ZPŮSOBY PŘÍPRAVY POLYMERNÍCH VRSTEV	24
2.3.1 Nekovalentní imobilizace (adsorpce).....	24
2.3.2 Kovalentní imobilizace	26
2.3.3 Imobilizace pomocí bivalentních iontů na slídu	26
2.3.4 Nejčastěji používané substráty pro modelové studium pomocí AFM	26
2.3.4.1 Slída	26
2.3.4.2 Křemíková destička	27
2.3.4.3 Sklo	28
2.3.4.4 Zlaté vrstvy	28
2.4 CHARAKTERIZACE POLYMERNÍCH VRSTEV	28
3 ZKOUMANÉ POLYMERY	29
3.1 HYALURONOVÁ KYSELINA (HA).....	29
3.1.1 Význam a vlastnosti kyseliny hyaluronová.....	29
3.1.2 Historický přehled	29
3.1.3 Chemická struktura	30
II PRAKTICKÁ ČÁST	33
4 PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO CHARAKTERIZACI POMOCÍ AFM	34
4.1 PŘÍPRAVA ZÁSObNÍCH ROZTOKŮ HA	34
4.2 ŘEDĚNÍ ZÁSObNÍCH ROZTOKŮ HA	35
4.3 PŘÍPRAVA POVRCHU SLÍDY A JEHO MODIFIKACE	36
4.4 IMOBILIZACE HA Z ROZTOKU NA POVRCH SLÍDY	36
5 ZKOUMÁNÍ VZORKŮ POMOCÍ AFM	38
6 VÝSLEDKY A DISKUZE	39
6.1.1 Povrch čerstvě štípané slídy	39

6.1.2	Vzorky nízkomolekulární HA (0,66 MDa) ředěné vodou	40
6.1.3	Vzorky nízkomolekulární HA (0,66 MDa) ředěné roztokem 0,15M NaCl	42
6.1.4	Vzorky vysokomolekulární HA (2,36MDa) ředěné vodou.....	44
6.1.5	Vzorky vysokomolekulární HA (2,36 MDa) ředěné roztokem 0,15M NaCl	50
ZÁVĚR		52
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....		53
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK		55
SEZNAM OBRÁZKŮ		56

ÚVOD

Díky technologickým pokrokům ve všech oblastech vědy se nám nabízí stále nové možnosti zkoumání světa kolem nás. Zvláště s rozvojem nanotechnologií roste potřeba zkoumat objekty na úrovni molekul a atomů. Dalo by se spíše říci, že možnost zkoumání tak malých objektů je nutnou podmínkou pro rozvoj nanotechnologií.

Nanotechnologie začínají mít v dnešní době široké využití v mnoha rozličných oborech lidské činnosti, jako jsou například: elektronika, bionika, medicína, genetika, textilní průmysl, armádní průmysl, kosmický výzkum, a tam kde zatím nemají, jistě brzy své uplatnění najdou. Nanotechnologie se postupně stávají neodmyslitelnou součástí našich životů a to zejména v podobě produktů, které nám usnadňují život. Nutno dodat, že nelze poukazovat pouze na pozitivní stránku nanotechnologií, ale nutno brát i stinnou stránku nanotechnologií, respektive nanočástic, které mohou snadno difundovat přes buněčné membrány a nepříznivě působit na naše zdraví a životní prostředí.

Rozvoj nanotechnologií začal zejména s objevením a rozvojem speciálních zobrazovacích a charakterizačních technik jako jsou EM (elektronová mikroskopie) a SPM (mikroskopie skenující sondou).

Hlavním cílem této práce je optimalizovat proces nespecifické imobilizace biopolymerních systémů (kyseliny hyaluronové) na atomárně rovném povrchu slídy s následnou charakterizací pomocí Mikroskopie atomárních sil, jenž spadá mezi výše zmiňované techniky SPM.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 MIKROSKOPIE SKENUJÍCÍ SONDOU - SPM

Mikroskopie skenující sondou (Scanning Probe Microscopy) je soubor mikroskopických technik, využívajících těsného přiblížení měřicí sondy ke vzorku – pracují v oblasti blízkého pole (pro optické metody velikost oblasti je menší než příslušná vlnová délka). Tak malá vzdálenost dovoluje dosáhnout rozlišení pod tzv. difrakční mezí, která je srovnatelná s vlnovou délkou, ovšem za cenu získání pouze lokální informace o vzorku. Pro charakterizaci celého povrchu vzorku je nutno provádět postupná měření ve více bodech – skenování sondou nad vzorkem. Metody poskytují trojrozměrný obraz v přímém prostoru, na rozdíl od třeba difrakčních technik nebo elektronové mikroskopie s vysokým rozlišením. Velká blízkost sondy a vzorku umožňuje snížení energie určené k měření a tím snížení energetického zatížení vzorku (zvláště v porovnání s elektronovou mikroskopií). Naopak, uvedená vzdálenost klade nároky na mechanickou stabilitu a řízení pohybu, protože může dojít k mechanickému poškození vzorku (i to lze využít, konkrétně k vytváření nanostruktur až na úrovni jednotlivých atomů). Metoda umožňuje zobrazovat výřezy vzorku ve velikostech od stovek mikrometru do jednotek nanometru, pro nejmenší oblasti až se subatomárním rozlišením. Z principu metody vyplývá různé rozlišení v rovině skenování (povrchu vzorku) a ve směru k ní kolmém (označovaném jako osa z). První z nich je dáno především velikostí sondy a měřicích rozestupu, druhé závisí na charakteru interakce a mechanické stabilitě mikroskopu. V nejlepších případech dosahují rozlišení hodnot setin až tisícín nanometru. Většina metod však dovoluje určení parametru pouze povrchových nebo těsně podpovrchových vrstev, neppracují v transmisním režimu. Techniky SPM tedy vhodně překrývají rozsahy dosažitelné pomocí optické a elektronové mikroskopie, čehož je možno využít k jejich vzájemným kombinacím. Orientace polohy na vzorku se často dosahuje použitím optického systému (se zvětšením asi 100×), naopak mikroskop se skenující sondou je možno zabudovat do prostoru elektronového mikroskopu. Malé rozměry umožňují rovněž zabudování do různých aparatur pro vytváření a přípravu vrstev (napařování, epitaxe apod.) Technika SPM nemusí být pouze zobrazovací, ale lze ji použít i k modifikaci povrchu až na atomární škále. Lze provádět litografické zpracování, mechanické odstraňování, manipulace s molekulami i jednotlivými atomy. Pro vědecké studium těchto mechanismů je zvláště výhodná možnost přetvářet i zobrazovat jedním zařízením, bez nutnosti přenosu vzorku.

Různé odnože SPM našly uplatnění především ve fyzice povrchů (první významnou aplikací bylo určení způsobu rekonstrukce povrchu křemíku), ale i v biologii (studium na živých buňkách), při studiu práškových nanočástic nebo v technologii testování integrovaných obvodů. Velké naděje jsou rovněž vkládány do použití SPM v záznamové technice, která umožní několikanásobně zvětšit hustotu dat oproti současným magnetickým médiím. [1] [2] [3]

1.1 Historie SPM

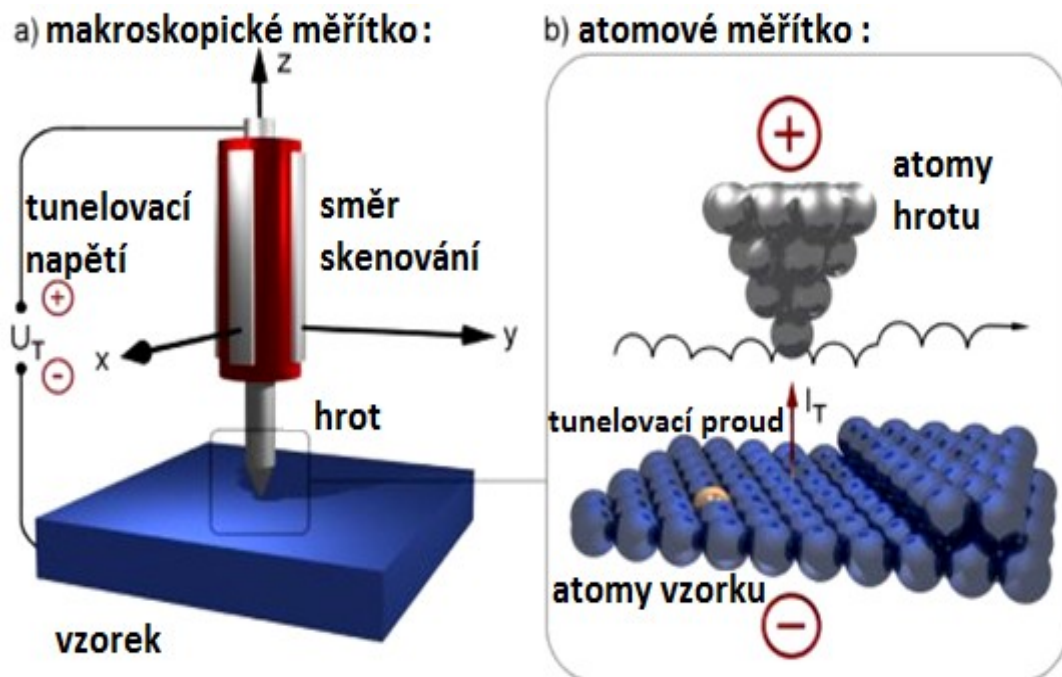
Mikroskopie skenující sondou prošla několika různě aktivními vývojovými fázemi:

- Historie metod v blízkém poli sahá do roku 1928, kdy Synge poprvé zavedl princip skenování ostrým skleněným hrotem velmi blízko povrchu tak, aby se světlo před průchodem vzorkem nestačilo laterálně rozšířit, čímž se odstraní závislost na vlnové délce světla. Návrh však zůstal bez povšimnutí, protože tehdejší stav technologií neumožňoval realizaci měření.
- Pan O'Keefe v roce 1956 znovuobjevil předchozí teoretický princip skenování.
- Experimentální ověření rozlišení pod vlnovou mezí s mikrovlnami o $\lambda = 3$ cm, rozlišení 150 μm provedl pan Ash v roce 1972.
- V ten samý rok 1972 došlo k sestrojení Topografineru panem Youngem, přístroje, který pracuje v emisním režimu, mapuje topografii vodivých vzorků s rozlišením 3 nm vertikálně a 400 nm horizontálně ve vzdálenosti 100nm nad povrchem. Také došlo k nastínění možnosti využití tunelového jevu pro lepší rozlišení. Atomárního rozlišení však nebylo dosaženo díky vzniklým problémům z důvodu značné nestability vzdálenosti hrotu od povrchu, které se nepodařilo vyřešit.
- Roku 1981 byla vyvinuta v laboratořích IBM v Curychu pracovníky Gerdem Binnigem a Henrichem Rohrerem technika STM (Scanning Tunneling Microscopy = Skenovací tunelovací Mikroskopie). Princip této techniky je založen na poznacích kvantové fyziky a tzv. tunelovacím jevu. Za tento jejich objev jim byla v roce 1986 udělena Nobelova cena. Je to jedna z mála metod, která je schopna poskytnout až atomární rozlišení, přičemž je zároveň vcelku jednoduchá. Přístroj pracuje ve vakuu, vibrace jsou tlumeny magnetickou levitací, je použita zpětná vazba a piezoelektrické pohybové členy.
- Jen do roku 1990 bylo od STM odvozeno více jak 20 nových technik, které spadají do SPM (AFM, MFM, EFM, SCM, LFM, atd...) [2]

1.2 Přehled SPM technik

1.2.1 STM - Rastrovací tunelová mikroskopie

Historicky první metodou ze skupiny SPM aplikací byla aplikace STM. Její funkce je založena na tom, že elektricky vodivá sonda je umístěna do velmi malé vzdálenosti k povrchu vodivého vzorku. Vzdálenost mezi sondou a povrchem je řádově 10^{-1} nm. Tato metoda je založena na poznacích kvantové fyziky, po nichž existuje nenulová pravděpodobnost průchodu elektronů energetickou bariérou, tj. dochází k tzv. tunelování. Bariéra je vytvořena prostorem, ve kterém dochází k parciálnímu překrytí vlnových funkcí atomu na špičce hrotu a atomů povrchu. Z výše uvedeného plyne, že po přiložení napětí mezi vzorek a ostrý hrot s teoreticky jedním atomem na jeho vrcholu můžeme měřit tunelovací proud, viz **Obrázek 1**



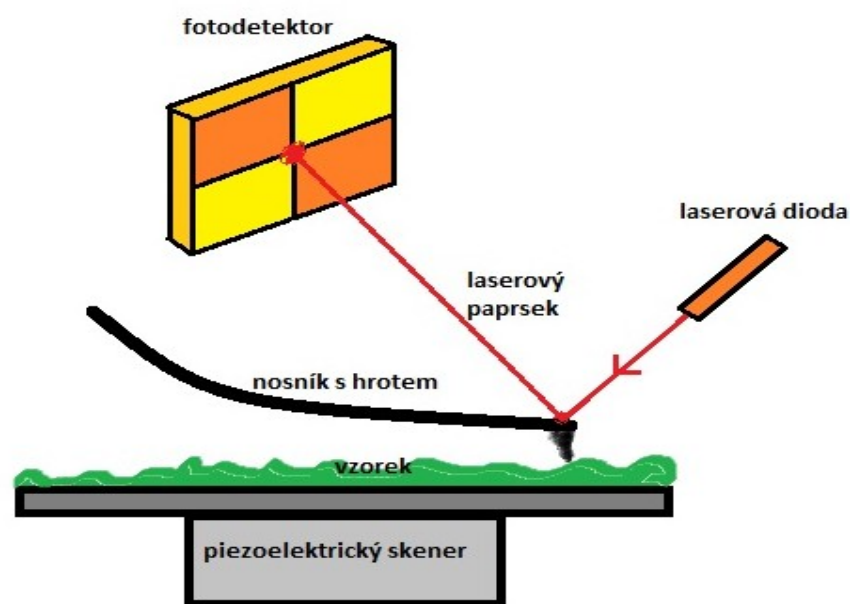
Obrázek 1: *Princip STM* [19]

Pro tunelový proud I pak platí:

$$I = aUe^{-b\phi\frac{d}{2}} \quad (1)$$

V této rovnici (1) je U napětí mezi hrotem a povrchem vzorku, Φ energetická výška bariéry, která je závislá na materiálu, ze kterého je vyroben hrot a materiálu, z něhož je tvořen vzorek. Proměnná d je vzdálenost hrotu a povrchu vzorku, a a b jsou konstanty.

Z tohoto vztahu může být patrné, že tunelový proud, který je vyjádřením pravděpodobnosti přechodu elektronů, se mění vzdáleností hrotu od povrchu vzorku a také závisí na napětí mezi vodivým hrotem a povrchem vodivého vzorku. Velikost tunelového proudu může být ovlivněna také nerovnoměrným obsazením energetických hladin. To znamená existenci prázdných energetických hladin v blízkosti Fermiho hladiny, tím pádem není obraz povrchu vzorku přímo dán topografií vzorku, ale rozložením vlnových funkcí atomů. Měřený signál může být dvojího druhu, podle toho v jakém režimu měření probíhá. V režimu konstantní výšky se udržuje konstantní hodnota výšky sondy nad povrchem a měří se velikost tunelového proudu. Díky tomuto režimu můžeme snímat obraz poměrně rychle, není totiž nutné pohybovat vzorkem, ale je méně přesný, protože při velkých vzdálenostech mezi hrotem a povrchem se proud dostane pod dobře měřitelnou úroveň. V režimu s konstantním proudem se udržuje stálá úroveň tunelového proudu pomocí zpětné vazby. Tento režim sice pomalý, zato nám ale umožní sledovat větší změny profilu povrchu. [1]



Obrázek 2: *Princip funkce detekčního zařízení AFM.*

1.2.2 AFM - Mikroskopie atomárních sil

Pomocí mikroskopie atomárních sil je na povrchu vzorku mapováno rozložení atomárních sil, které jsou vyvolány velmi těsným přiblížením hrotu k povrchu. Tím vzniká buď přitažlivá nebo odpudivá síla, která zapříčiní ohyb raménka (nosníku) s hrotem, viz **Obrázek 2**. Detekčním zařízením je toto ohnutí snímáno. S pomocí této metody můžeme studovat jak vodivé, tak i nevodivé vzorky.

Detekční zařízení je zhotoveno zpravidla z laserové diody a fotodetektoru. Laserová dioda míří laserovým paprskem na špičku nosníku, odražený paprsek dopadá na citlivý fotodetektor, rozdělený na čtyři části (kvadranty). Ohyb nosníku se projevuje posunutím odražené stopy laserového paprsku po kvadrantech plochy fotodetektoru, energie v jednotlivých kvadrantech tím pádem již nebudou stejné. Z velikosti jejich energií lze určit vychýlení nosníku. Také kromě vychylky nosníku ve vertikálním směru lze detekovat pohyb skvrny v horizontálním směru a tím určit zkrut nosníku. Když je hrot v těsné blízkosti povrchu působí na něj hlavně krátkodosahové odpudivé síly, které jsou elektrostatického původu, nebo dlouhodosahové přitažlivé van der Waalsovy síly.



Obrázek 3: Graf závislosti celkové síly na vzdálenosti hrotu od povrchu v kontaktním a bezkontaktním režimu.

Vztah pro výpočet sil mezi koncovým (vrchním) atomem hrotu a povrchem vzorku existuje přesný kvantově-mechanický výpočet, který je hodně složitý. Pro jednoduchost si vystačíme s grafem závislosti celkové síly na vzdálenosti hrotu od povrchu, viz **Obrázek 3**. Na křivce jsou vyznačeny úseky charakteristické pro kontaktní a bezkontaktní režimy mikroskopu atomární síly. V kontaktním režimu je vzdálenost hrotu malá a výsledná odpudivá síla vychyluje nosník od povrchu. Jestliže bude tuhost nosníku menší než efektivní tuhost držící pohromadě atomy povrchu, pak lze ohyb nosníku použít k měření. Jestliže bude tuhost nosníku větší, nosník se nehne a může způsobit poškození vzorku. Na ohyb nosníku mají vliv rovněž síly, které brání kvalitnímu zobrazení povrchu vzorku.

Mezi ně patří zejména kapilární síly, které mohou vznikat v kapičkách na povrchu zkondenzované vody. Další veličinou, kterou je nezbytné brát v úvahu je vlastní pružnost raménka.

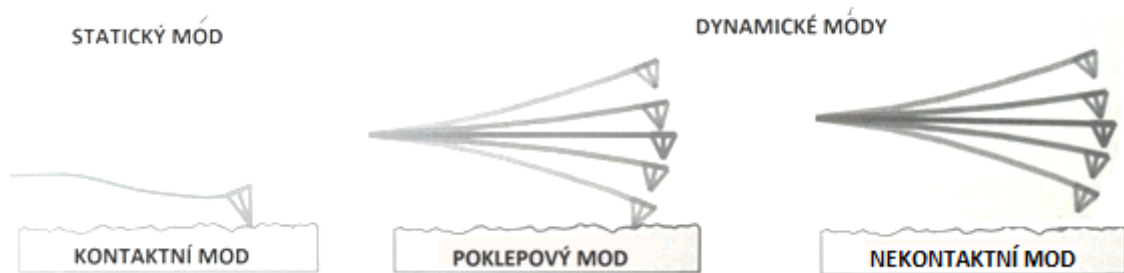
Kontaktní režim AFM můžeme provozovat v režimu konstantní výšky, kdy je udržována konstantní hodnota výšky skeneru z_0 přičemž se měří se ohyb raménka.

Druhým režimem AFM je režim konstantní síly, kde udržujeme konstantní ohyb raménka a posouvá se s hrotem nebo se vzorkem ve směru osy z. Tento způsob skenování vzorku je používán častěji, jelikož se lépe vyhneme závislosti prohnutí raménka na kapilárních silách a nemůže dojít k poškození vzorku nebo sondy.

V bezdotykovém režimu udržujeme vzdálenost mezi vzorkem a hrotem ve strmé (vzestupné) části závislosti, viz **Obrázek 3**. V této části působí van der Waalsovy síly, které mají řádově velikost 10^{-12} N, při vzdálenosti desítek až stovek nm. Hlavní výhodou této metody je to, že měříme bez mechanického kontaktu a to nám umožňuje měřit i měkké a elastické vzorky. Při bezdotykovém režimu je hrot ke vzorku přitahován. Při těchto vzdálenostech působí na nosník malé síly, ohyb nosníku je velmi malý a proto je i měřicí signál velmi slabý. Zejména z těchto důvodů se volí měřicí režim, kdy je celý nosník rozkmitáván blízko své rezonanční frekvence s amplitudou o velikosti v jednotkách nm. Měřenou veličinou, která vede k zobrazení povrchu, je změna rezonanční frekvence, ke které dojde po přiblížení hrotu k povrchu vzorku. Hlavní nevýhodu měření pomocí tohoto přístupu, je že hrot „kopíruje“ mikrokapky zkondenzované vody na povrchu vzorku.

Řešením nevýhod výše uvedených modů AFM, je měření v poklepovém režimu. Tento režim je velmi podobný předchozímu bezkontaktnímu režimu. Nicméně amplituda kmitů nosníku je tak velká, že občas dojde ke kontaktu hrotu s povrchem. Povrch je v tomto případě mapován na základě měření změn rezonanční frekvence.

Z výše uvedeného plyne, že měřicí módy AFM lze rozdělit na statické a dynamické, jak naznačuje **Obrázek 4**. [2], [1], [4], [19]



Obrázek 4: Rozdělení AFM módů na statické a dynamické [4]

1.2.3 LFM - Mikroskopie laterálních sil

LFM mapuje v kontaktním režimu změny mechanických vlastností vzorků s využitím třecích sil mezi hrotem a povrchem vzorku. V případě této metodiky je vyhodnocován vertikální ohyb (zkrut) nosníku. Nutno dodat, že LFM bývá velmi často aplikována spolu s metodou AFM. [1], [19]

1.2.4 FMM - Mikroskopie modulovaných sil

Mikroskopie modulovaných sil je metodou, která vychází z dotykového režimu AFM s konstantním ohybem nosníku. Používá se k měření elastických vlastností povrchu. Nosník s hrotem nebo vzorek je periodicky rozkmitán s frekvencí nad mezní hodnotu zpětné vazby. Elastické vlastnosti vzorku následně mění amplitudu kmitání hrotu. [1], [19]

1.2.5 MFM - Mikroskopie magnetických sil

Mikroskopie magnetických sil nám umožní zobrazit rozložení magnetických sil na povrchu vzorku. Hrot musí být potáhnut feromagnetickou vrstvou a to proto, že magnetické síly mají mnohokrát větší dosah než síly atomární. Z tohoto důvodu probíhá měření vzorku ve dvou krocích. V prvním je charakterizována topografie povrchu a v druhém (po oddálení sondy od povrchu) rozložení magnetických sil. [1], [19]

1.2.6 EFM - Mikroskopie elektrostatických sil

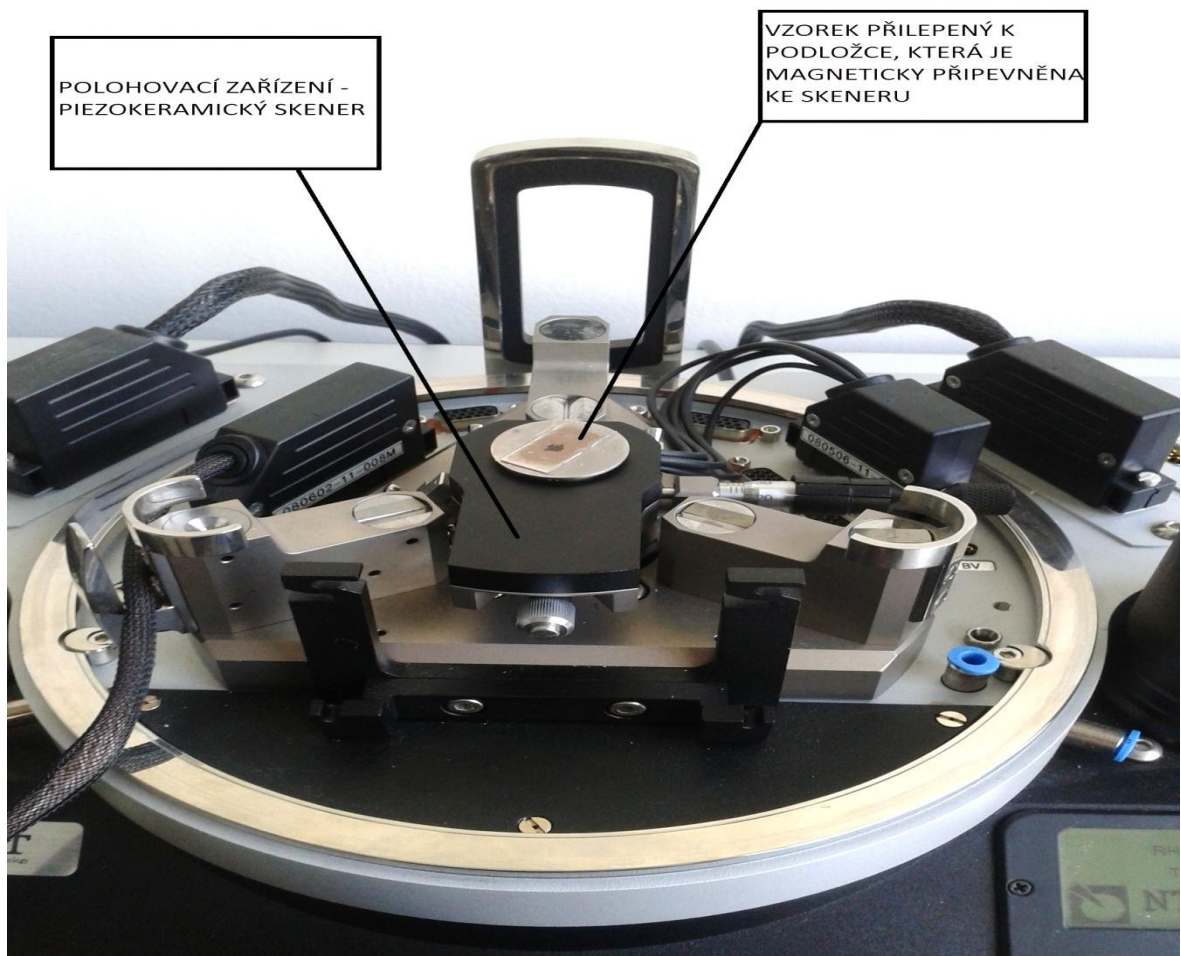
Mikroskopie elektrostatických sil mapuje rozložení elektrostatických nábojů na povrchu vzorků. Měření probíhá tak, že mezi hrot a povrch vzorku je přivedeno napětí, následně se hrot mírně vzdálí od povrchu a začíná skenování. Princip metody je založen na skutečnosti, že když se změní náboj na povrchu vzorku dojde k ohybu raménka s hrotem. Velikost ohybu je závislá na velikosti náboje. [1], [19]

1.2.7 SCM - Rastrovací kapacitní mikroskopie

Jestliže bereme hrot a vzorek jako elektrody kondenzátoru a mezeru mezi nimi jako dielektrikum, pak můžeme po přiložení napětí na elektrody vyhodnocovat kapacitu takto utvořeného kondenzátoru. Kapacita se mění v závislosti na lokální geometrii povrchu, vzdálenosti mezi hrotem a povrchem. Jinými slovy tato vzdálenost je vlastně tloušťka dielektrika mezi elektrodami kondenzátoru. [1], [19]

1.2.8 SThM - Rastrovací termická mikroskopie

Nosník je tvořen ze dvou rozdílných materiálů, které tvoří termočlánek. Takováto konstrukce hrotu umožňuje ve vybraných mikrooblastech povrchu vzorku měřit tepelnou vodivost nebo termoelektrické napětí. [1], [19]



Obrázek 5: Spodní pevná část přístroje AFM na němž je polohovací zařízení v podobě piezokeramického skeneru nesoucí měřený vzorek (vyfoceno v laboratoři na UFMI, FT, UTB ve Zlíně).

1.3 Hlavní komponenty AFM

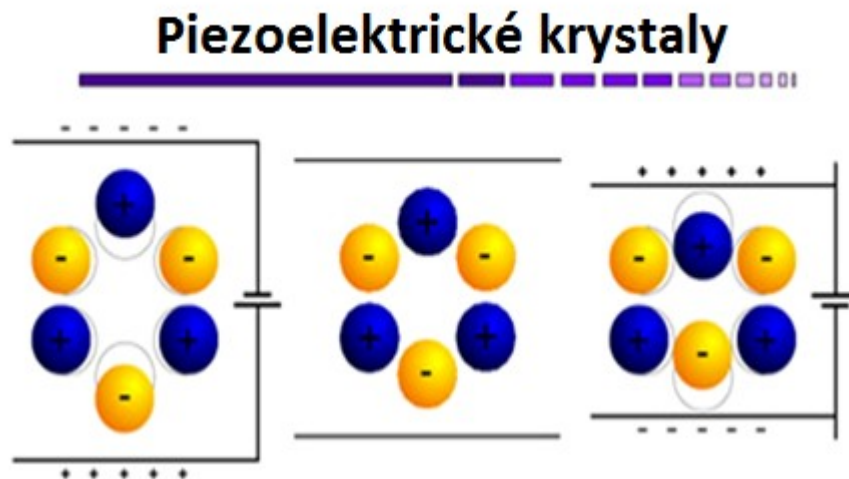
1.3.1 Polohovací zařízení — skener

Základem všech zařízení, které pracují na principu rastrování pomocí sondy, je polohovací zařízení, které zajistí přesnou pozici hrotu a jeho pohyb nad povrchem vzorku. Podle toho, jakým způsobem je realizován pohyb hrotu, který toto zařízení zajišťuje, se pro něj vžil pojem skener, viz **Obrázek 5**

Ideálním rastrem, který je tvořen skenerem při jeho pohybu, je pomyslná čtvercová mřížka. V jejich uzlech se vyskytují datové body. Když se skener pohybuje řádkem, tak jsou v pravidelných intervalech digitálně snímána data.

Mezery mezi jednotlivými datovými body se nazývají velikost kroku. Jeden krok je dán délkou řádku vydělenou počtem dat v jednom řádku. Délka řádku u AFM je od desítek nm po stovku μm . Počet bodů v řádku bývá 64, 128, 256, 512 nebo i 1024 datových bodů.

Velmi přesné pohyby scanneru jsou zajišťovány piezoelektrickou keramikou. Pro SPM přístroje jsou používána piezoelektrika z polykrystalického materiálu. Většinou je to materiál na bázi PbZrO_3 a PbTiO_3 . Slisováním a spečením (slinováním) zrn se elektrické dipóly jednotlivých zrn naorientovány náhodně a jejich účinek se vzájemně vyruší. Po výrobě skeneru se pak provádí jeho polarizace ve stejnosměrném elektrickém poli. Stárnutí, hysterese a tečení (creep) skeneru, jsou příspěvky k nelinearitám, které se musí korigovat například hardwarovou korekcí v podobě přídavného zařízení, nebo softwarovou korekcí v podobě korekčního programu. Chceme-li zabránit depolarizaci skeneru, je toho možné dosáhnout častým provozem, protože se pracovním napětím materiál cyklicky polarizuje. Princip funkce piezoelektrika je znázorněn viz **Obrázek 6**. Z hlediska konstrukce má skener pro skenování ploch ($100 \times 100 \mu\text{m}$) většinou podobu trojnožky. [2], [5],

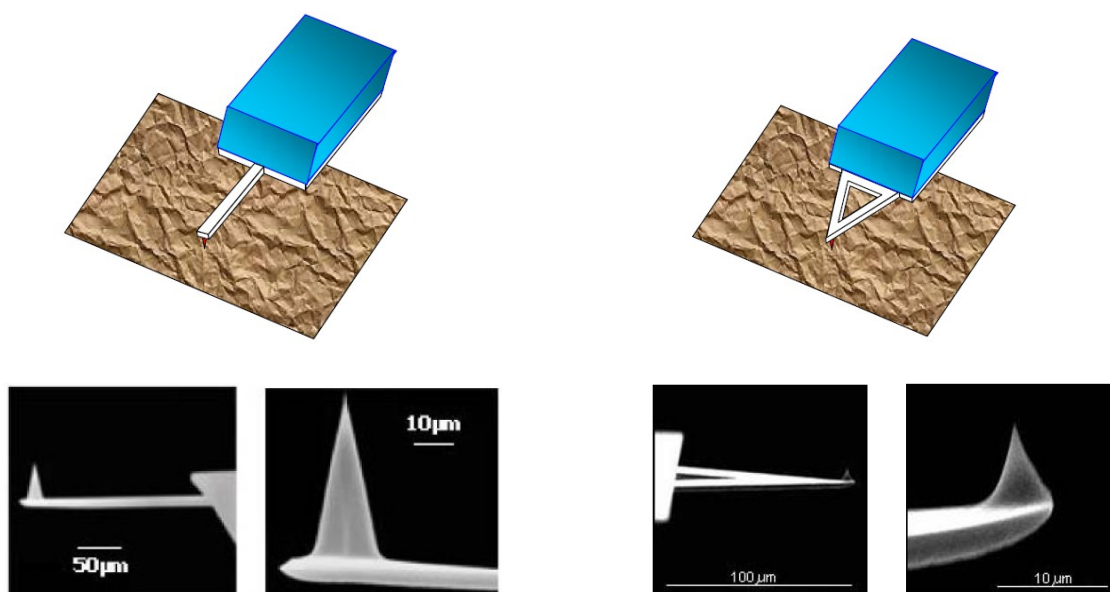


Obrázek 6: *Princip funkce piezoelektrik. [19]*

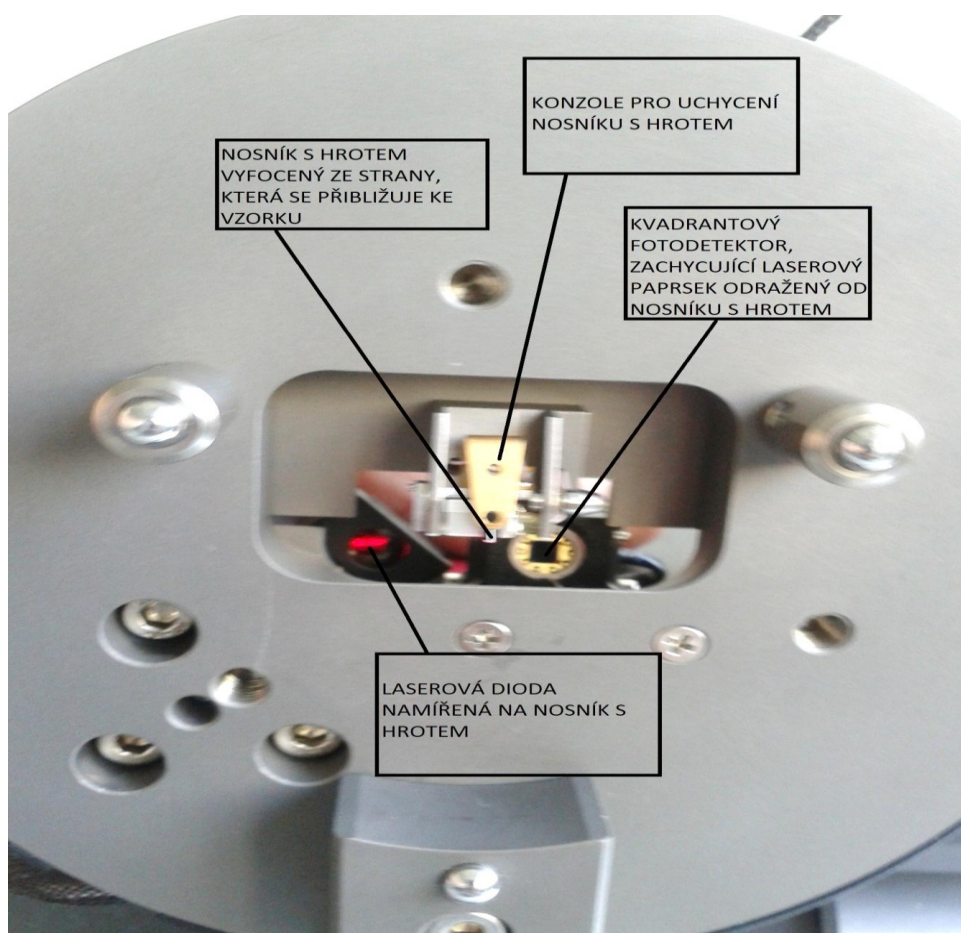
1.3.2 Sonda pro SPM

Raménko s hrotem je nedílnou komponentou přístroje AFM, zprostředkovávají sílu mezi hrotem a povrchem vzorku, viz **Obrázek 7**. Raménko, na jehož konci je umístěn hrot, který je velmi často vyroben z křemíku nebo nitridu křemíku. Nosníky s hrotem jsou připraveny většinou jako křemíková monovrstva s použitím fotolitografické techniky. Běžné nosníky jsou dlouhé od 100 do 200 μm , široké od 10 do 40 μm a jejich tloušťka bývá od 0,3 do 2 μm .

AFM vyžaduje ostrý hrot. Vyžaduje i nosník s optimalizovanou tuhostí (pružností). Ta by měla být nižší než je vazebná síla mezi atomy v pevných látkách. Tuhost nosníku je závislá na tvaru materiálu, ze kterého nosník vyroben. Vlastnosti nosníku jsou dány požadavky podle aplikace, ve které má být nosník s hrotem použit. V kontaktním režimu jsou zapotřebí měkké ohebné nosníky, aby se minimalizovalo poškození povrchu vzorku. V nekontaktním režimu jsou potřeba spíše tužší nosníky s vyšší rezonanční frekvencí. Komerčně dostupné nosníky mají tuhost od tisíců do desítek Nm^{-1} . Interakce mezi atomy hrotu a povrchem vzorku je závislá na křivosti hrotu. Hroty pro rozlišení jednoho až dvou nm musí mít poloměr křivosti okolo pěti nm. Na Obrázku 5 je znázorněno uložení sondy SPM do měřicí hlavy od firmy NT-MDT v laboratořích UFMI, FT, UTB ve Zlíně.



Obrázek 7: Sonda pro SPM složená z hrotu na obdélníkovém (vlevo) nebo trojúhelníkovém (vpravo) raménku. [19]



Obrázek 8: Horní odnímatelná část přístroje AFM nesoucí nosník s hrotem.

(vyfoceno v laboratoři na UFMI, FT, UTB ve Zlíně).

2 POLYMERNÍ VRSTVY

2.1 Význam polymerních vrstev

Materiály bývají běžně modifikovány rozličnými povrchovými vrstvami, z důvodu jejich ochrany a také pro jejich funkcionalizaci. Mezi z jednou nejvýznamnějších skupin povrchových úprav se řadí polymerní vrstvy. A to zejména díky tomu, že chemie syntetických polymerů je v dnešní době schopna produkovat obrovský počet různých makromolekul, požadované struktury a složení ve velkých množstvích za relativně nízkou cenu.

Ultratenké polymerní vrstvy hrají zásadní roli v mnoha procesech a mají velký rozsah použití začínající estetickou úpravou a ochranou materiálu proti množství degradačních vlivů jako například chemická koroze až po mikrofabrikační metody v mikroelektronice a medicínských zařízeních.

Rovněž nutno dodat, že polymerní monovrstvy a submonovrstvy na pevných površích hrají důležitou roli v mnoha technologických aplikacích, jako jsou nanomodelování a povrchové úpravy využívané v mikroelektronice, nebo z hlediska koloidní stability, flokulace (srážení), respektive vyztužování polymerů nanoplňivy, přípravy nezanášejících se biopolymerních povrchu, zvýšení biokompatibility medicínských implantátů, zlepšení adhezivních a lubrikačních, frikčních vlastností, atd. [3]

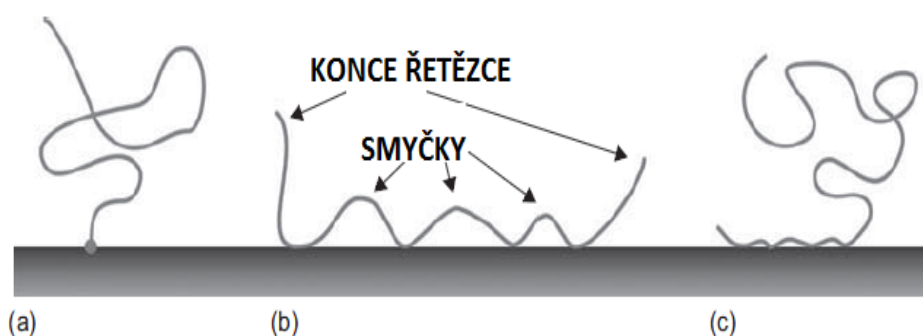
2.2 Tloušťka polymerních vrstev

Polymerní vrstvy jsou systémy, charakterizované tím, že jeden z jejich rozměrů je mnohem menší než ostatní dva. Na rozhraní polymeru a pevného povrchu je vždy vrstva polymerních řetězců, které jsou v přímém kontaktu s pevným povrchem. Celková vrstva může být tak tenká, že se dá říct, že je tvořena právě jednou mono-makromolekulární vrstvou. Takové monovrstvy jsou několik nm tlusté. Tloušťka monovrstvy je dána typickou velikostí jednoho polymerního řetězce. V mnoha případech se stává, že pevný povrch není zcela pokryt polymerními řetězci, a díky tomu můžeme pozorovat submonovrstvy nebo jednotlivé ostrůvky polymerních shluků. V závislosti na molekulárních, interakcích a počtu řetězců na povrchu (pokrytí povrchu) existuje celá řada typů vzorů a nanostruktur, které se mohou zformovat. [3]

2.3 Způsoby přípravy polymerních vrstev

2.3.1 Nekovalentní imobilizace (adsorpce)

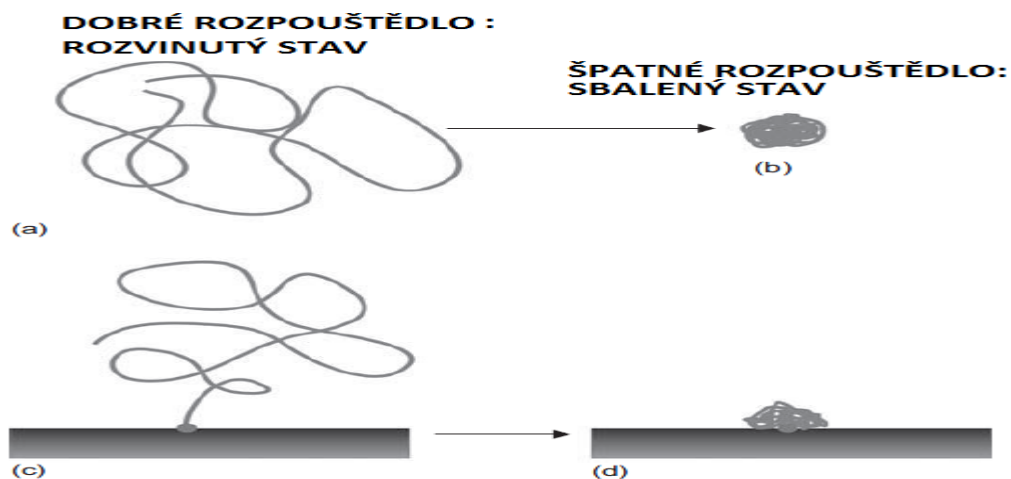
Nejjednodušší a nejčastěji používanou technikou pro imobilizaci biologických, respektive polymerních vzorků na povrch modifikovaného substrátu je fyzikální adsorpce z roztoku, kde přitažlivá síla táhne vzorek k pevnému substrátu. Na tomto procesu se podílejí různé síly, jako např.: Van der Waalsovy, elektrostatické, hydratační, nebo hydrofobní efekty. Adsorpční procesy jsou velice komplexní a závisí na koncentraci vzorku, jeho čistotě, distribuci náboje na povrchu vzorku a substrátu, podílu aniontů, velikosti a polaritě vzorku, iontové síle a pH. Počáteční adsorpční proces můžou doprovázet děje jako konformační změny, povrchová migrace, desorpce, agregace, denaturace, chemické reakce, posunutí skenovací sondou. Avšak hlavní výhodou této imobilizační strategie je její jednoduchost a také to, že nevyžaduje žádné nebo minimální kroky pro povrchovou funkcionalizaci. [6]



Obrázek 9: Způsoby imobilizace polymerního řetězce [3]

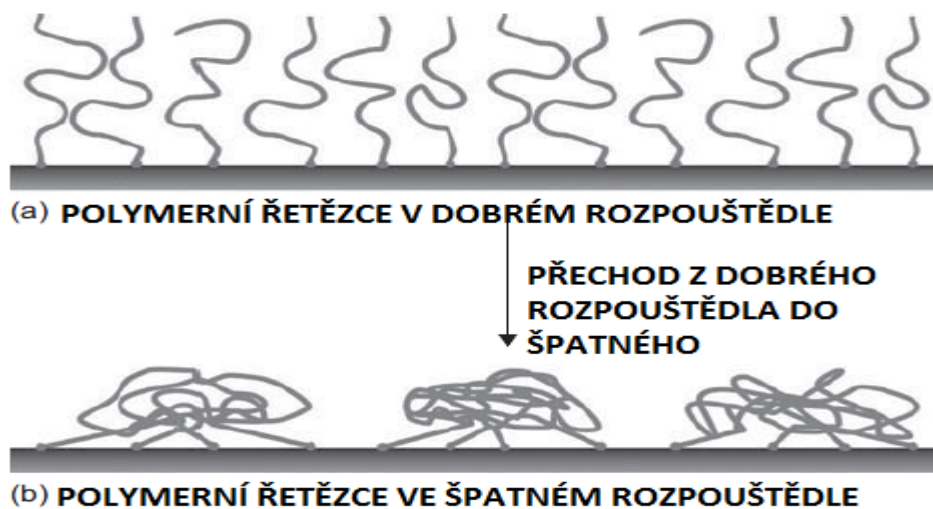
Způsob přichycení polymeru k povrchu pomocí fyzikální adsorbce nebo chemisorbce je znázorněn na Obrázku 9, kde jednotlivé části mají následující význam:

- Polymerní řetězec, rozvinutý v dobrém rozpouštědle, chemicky přichycený jedním jeho koncem k povrchu pevného substrátu.
- Polymerní řetězec fyzikálně adsorbovaný na povrch substrátu nespecifickými (fyzikálními) interakcemi podél jeho „páteře“ (na obrázku jsou čtyři kontaktní body), tvořícími tři smyčky a dva konce řetězce.
- Dvoublokový kopolymer v rozpouštědle přichycený k povrchu substrátu adsorpcí jednoho z dvou bloků. [3]



Obrázek 10: Závislost stavu polymerního řetězce na rozpouštědle [3]

Z hlediska typu a kvality rozpouštědla se mohou polymerní řetězce přichycovat k povrchu rozdílným způsobem, jak je naznačeno na Obrázku 10. Kde na obrázku (a) můžeme pozorovat polymerní řetězec v rozvinutém stavu, který přechází do sbaleného stavu (b) po změně rozpouštědla z dobrého na špatné. Ten samý přechod lze pozorovat u polymerního řetězce přichyceného jedním koncem k povrchu substrátu, viz. Obrázek 10 (c), (d). [3]



Obrázek 11: Závislost stavu polymerního kartáčku na rozpouštědle [3]

Na Obrázku 11 je schematické znázornění polymerního kartáčku, tvořeného z jednotlivých polymerních řetězců, z nichž je každý jedním koncem přichycen k povrchu substrátu. V případě (a) (viz Obrázek 11) odpovídá zobrazené uspořádání polymeru dobrým rozpouštěcím podmínkám a v případě (b) špatným. Při změně rozpouštěcích podmínek se polymerní řetězce samozorganizují v agregáty v měřítku nanometrů, tvořené malými individuálně do sebe sbalenými skupinami polymerních řetězců. [3]

2.3.2 Kovalentní imobilizace

U tohoto druhu imobilizace jde o chemické navázání nebo zasítování molekul na povrch substrátu. Tento způsob imobilizace vzorku zahrnuje vytvoření stabilní kovalentní vazby mezi určitou chemickou skupinou na zobrazované molekule vzorku a funkčními skupinami, které jsou na povrchu substrátu. V případech, kdy má vzorek zvýšenou tendenci k desorpci je kovalentní vazba pro uchycení vzorku důležitá. Při imobilizaci vzorku prostřednictvím kovalentní vazby je důležité, aby aktivita biomolekuly nebyla ovlivněna chemickou reakcí vazebných skupin a také to, aby byl vlastní imobilizační proces reprodukovatelný. [6]

2.3.3 Imobilizace pomocí bivalentních iontů na slídu

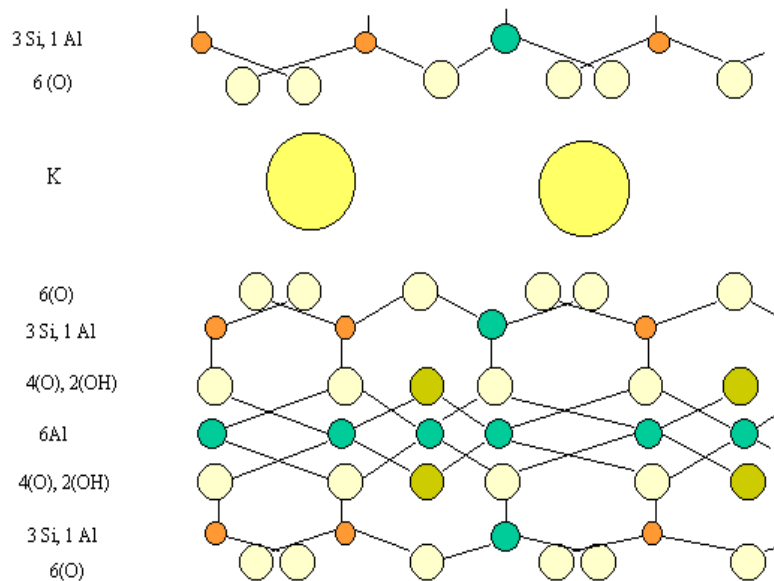
Někdy se může stát, že nám shodné náboje zkomplikují uchycení biomolekul na substrát. Proto je možno použít kationty kovů, které bývají přítomny v pufru. Typické je využití bivalentních kationtů Mg^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} nebo Cu^{2+} .

Princip této reakce spočívá ve výměně iontů. Jednomocné kationty ze struktury molekuly a jednomocné kationty z povrchu slídy jsou nahrazeny kationty kovů přítomných v roztoku pufru. Jedná se o výměnu dvojmocného kationtu kovu za jednomocný kationt třeba draselný. Vzniká tak přemostění mezi negativně nabitým povrchem slídy a negativně nabitými skupinami biomolekuly. [7]

2.3.4 Nejčastěji používané substráty pro modelové studium pomocí AFM

2.3.4.1 Slída

Slída patří mezi hlinitokřemičitany. Je to nejběžnější substrát používaný v modelových biologických experimentech. Díky snadné štípatelnosti svrchních vrstev, způsobené vrstevnatou strukturou je slída jako substrát velmi oblíbená. V prostorách mezi vrstvami jsou paralelně uloženy trojvrstvé komplexy vázané kationty (nejobvykleji K^+). Tyto kationty kompenzují záporné náboje mezi jednotlivými vrstvami slídy.

Obrázek 12: *Struktura slídy* [18]

V literatuře mineralogie je uvedeno asi 40 druhů slíd, ale uplatnění v aplikacích pro AFM má jen muskovit jehož chemický vzorec je $K[Al_2(AlSi_3)O_{10}(OH)_2]$. Po odštípnutí vrchních vrstev vykazuje tento druh slídy nejrovnější, nejčistší a nejméně defektní povrch. Slídové substráty pro vzorky zkoumané pomocí AFM se musí používat vždy čerstvě připravené. Toho dosáhneme tak, že ze slídové destičky odštípeme svrchní vrstvy třeba pomocí lepící pásky, kterou nalepíme na povrch destičky a poté strhneme. Muskovit se preferenčně štěpí v rovině obsahující draselné atomy. Vzniklé odštípnuté vrstvy jsou průsvitné až průhledné, cire nebo jen velmi světle zbarvené a skelné leskle. Při fixaci vzorku na povrch slídy je důležité si uvědomit to, že neupravený povrch slídy má ve vodných roztocích negativní povrchový náboj. Také je potřeba vzít v úvahu ještě jednu důležitou vlastnosti z hlediska uchycení vzorku na povrch slídy a tou je její hydrofilnost. [18], [5], [7]

2.3.4.2 *Křemíková destička*

Jako substrát pro aplikace AFM využívají také křemíkové destičky, nařezané z křemíkových ingotů, které se jinak používají v polovodičové technologii. Jsou dobrým podkladem pro tenké filmy a substrátem pro imobilizaci vzorků. Atomární rovnosti můžeme dosáhnout kontrolovanými oxidačními procesy, které vytvoří na povrchu destičky tenkou oxidovou vrstvu. Křemíková destička bude, díky na povrchu vystaveným OH skupinám, hydrofilní. Stejně jako sklo i křemíkové destičky je nutno před použitím důkladně očistit. [5], [7]

2.3.4.3 *Sklo*

Pro imobilizaci biologických vzorků se může použít kromě slídy a krycí skla. Když je vzorek imobilizován na skleněný povrch je důležité mít na paměti, že neupravený povrch nese ve vodném roztoku negativní povrchový náboj. Povrch je také hydrofilní. Povrch krycího skla je potřeba vždy očistit. Povrch skla je dostatečně rovný, pokud jde o zobrazování buněk, nebo ostatních vzorků, které jsou velké a relativně vysoké. [5], [7]

2.3.4.4 *Zlaté vrstvy*

Zlato je prvek, který s vysokou afinitou snadno váže organické thiolové skupiny či bisulfidy. Biologické makromolekuly proto také často bývají kovalentně imobilizovány právě zlatem. Zlato je chemicky inertní vůči kyslíku a odolné vůči radikálům, proto bývá používáno jako nosný substrát. Dostatečně rovný zlatý substrát lze připravit tak, že je zlato napařeno ve vakuu na sklo, křemík nebo slídu. Takto připravený povrch vykazuje zrnitou strukturu. Díky speciálním metodám (žihání) lze připravit zlatý povrch poskytující atomárně rovné oblasti, o jejichž velikost může být několik mikrometrů. [5], [7]

2.4 **Charakterizace polymerních vrstev**

Jedním z nejdůležitějších parametrů tenké vrstvy je její tloušťka, ta většinou určuje vlastnosti vrstvy. Měření tloušťky polymerní vrstvy lze provádět metodami rozdělenými do těchto skupin: Mechanická měření, elektrická měření, optická měření.

Některé metody měření tloušťky můžeme aplikovat jen na hotové vrstvy, pomocí jiných metod můžeme měřit tloušťku během procesu, kdy se vrstva vytváří. Aplikovat je lze i pro měření rychlosti růstu vrstvy a to jako měření přírůstku tloušťky v čase. Rychlost růstu je důležitý parametr, protože ovlivňuje strukturu a tím i také vlastnosti vrstvy. Tenké vrstvy nejsou většinou ideálně hladké, protože mají v různých místech jejich plochy trochu odlišnou tloušťku. [3]

3 ZKOUMANÉ POLYMERY

3.1 Hyaluronová kyselina (HA)

3.1.1 Význam a vlastnosti kyseliny hyaluronové

Kyselina hyaluronová je mnohdy považována pouze za molekulu extracelulárního matrixu. Minulý a současný výzkum však objevuje stále nové a nové funkce této molekuly jak na buněčné, tak na orgánové úrovni. Všechny získané znalosti o této molekule poukazují na to, že HA je molekula velkého významu. Její všudypřítomnost a účast na celé řadě biologických procesů, jako jsou angiogeneze, migrace a proliferace různých buněčných typů, účast na zánětlivých procesech, procesech hojení ran a dalších, poukazuje na celou řadu praktických využití této molekuly v biomedicínských aplikacích. [16], [17]

3.1.2 Historický přehled

V roce 1934 popsal Karl Meyer a jeho asistent, John Palmer, objevili postup izolace nového glykosaminoglykanu z hovězího sklivce. Objevili, že tato látka obsahuje uronovou kyselinu a aminocukr, ale ne sulfoester, který je pro glykosaminoglykany specifický. Látku nazvali hyaluronová kyselina (angl. *hyaluronic acid*) jako spojení slov *hyaloid* (sklovitý) a *uronic acid* (uronová kyselina).

Během 30. a 40. let 20. století byl hyaluronan (sodná sůl kyseliny hyaluronové) izolován z mnoha zdrojů, například ze sklivce, synoviální tekutiny, pupeční šňůry, kůže, kohoutích hřebínků (Meyer, 1947) a také ze streptokoků.

První fyzikálně-chemické charakterizace hyaluronanu byly prováděny v průběhu 50. a 60. let 20. století. Molekulová hmotnost této makromolekuly se pohybuje v řádech 10^7 Da. Fyzikální vlastnosti umožňují hyaluronanu regulovat vodní bilanci, osmotický tlak a odpor proti proudění, interagovat s proteiny a také působit jako síto a jako mazivo, dále stabilizovat strukturu na základě elektrostatických interakcí. Například v roce 1972 Hardingham a Muir objevili, že hyaluronan interaguje s chrupavkovými proteoglykany. Toto byl první příklad specifické interakce mezi hyaluronanem a proteinem, mnoho dalších takovýchto interakcí bylo objeveno během 90. let 20. století.

v 80. letech 20. století začal Balazs propagovat aplikaci hyaluronanu pro medicínské účely a vyrábět vysoce viskózní a protizánětlivé přípravky jako podporu pro oční lékařství a jako viskózní doplněk synoviální tekutiny u pacientů s osteoartritidou. [16], [17]

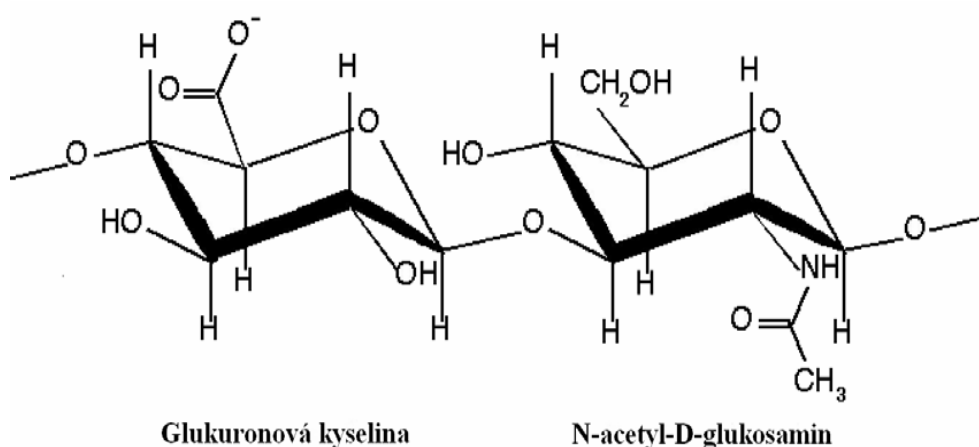
V 90. letech 20. století byly intenzívně studovány interakce hyaluronan-protein, dále byla klonována hyaluronansynthasa z různých zdrojů, každá schopná produkovat hyaluronan s rozdílnou délkou řetězce a v rozdílném množství.

Poslední dobou se ukazuje, že hyaluronan působí jako zesilovač pro aktivní proteinasy. Bylo již dlouho známo, že hyaluronan je velmi citlivý na oxygenní radikály, které způsobují jeho rozklad. Vznikající produkty rozkladu zprostředkovávají další důležité biologické funkce.

Tyto produkty vznikající při degradaci hyaluronanu jsou označovány jako HA oligosacharidy, které indukují angiogenezi a také aktivují lymfocyty. Radikálová degradace vytváří reaktivní aldehydy, které modifikují proteiny do hlavní/základní antigenní struktury revmatické artritidy. Tento objev posléze ukončil dlouhé a tíživé období neznalosti lékařsky významného problému a může případně vést k úspěšné léčbě těchto nemocí. [16], [17]

3.1.3 Chemická struktura

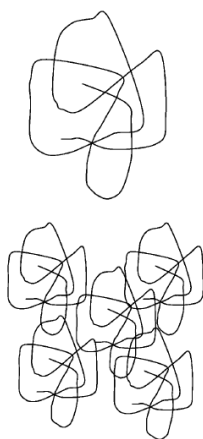
Hyaluronan se skládá ze základních disacharidových jednotek tvořených D-glukuronovou kyselinou a *N*-acetyl-D-glukosaminem vzájemně spojených střídající se β -1,3 a β -1,4 glykosidickou vazbou, viz **Obrázek 13**.



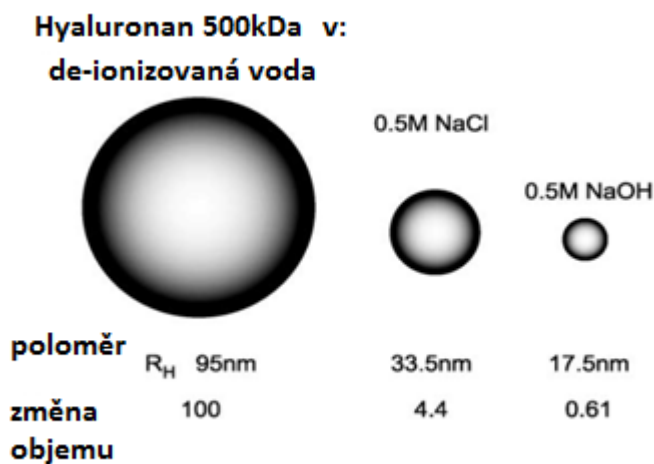
Obrázek 13: Chemický strukturní vzorec kyseliny hyaluronové.[16]

Oba sacharidy prostorově vycházejí z glukosy, která v beta konfiguraci dovoluje všem objemným skupinám (hydroxylové, karboxylové, acetamidové) být ve stericky příznivé ekvatoriální pozici, zatímco všechny malé atomy vodíku zaujímají méně stericky příznivé axiální polohy a tak je struktura disacharidu energeticky velmi stabilní. [16], [17]

Z hlediska konformace polymerů v roztoku krátké řetězce hyaluronanu (HA) vykazují lineární uspořádání, zatímco dlouhé se sbalují do náhodného „tuhého“ klubka. V případě nízké koncentrace polymerů v roztoku můžeme pozorovat izolované klubko, viz **Obrázek 14**. Při vysoké koncentraci dochází k proplétání jednotlivých klubek a jejich vzájemnému ovlivňování což determinuje viskoelastické vlastnosti roztoku [16].



Obrázek 14: Model polymerního klubka hyaluronanu ve zředěném (nahore) a koncentrovaném roztoku (dole) [16]



Obrázek 15: Porovnání hydrodynamických poloměrů Hyaluronanu ve vodě, NaCl a NaOH [16]

V závislosti na iontové síle a pH přechází polymerní klubko HA do rozdílných konformací s rozdílným hydrodynamickým poloměrem. Tento přechod je determinován faktem, že HA je polyelektrolytem, jehož chování na těchto parametrech (iontová síla a pH) silně závisí.

Podle výše uvedeného se na velikost polymerního klubka znázorněnou na **Obrázek 15** můžeme dívat jako na rozbalování a sbalování polymerního klubka v dobrém (voda) nebo špatném rozpouštědle (roztok NaOH). [16], [3]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO CHARAKTERIZACI POMOCÍ AFM

V experimentální části práce byly provedeny následující kroky před vlastní charakterizací imobilizované hyaluronanu na povrchu slídy:

1. byly připraveny dva typy zásobní roztoky hyaluronanu sodného (HA),
2. proběhlo ředění zásobních roztoků HA na požadovanou koncentraci,
3. proběhla příprava povrchů slídy a jejich modifikace,
4. proběhla depozice roztoků na povrch s následným sušením.

4.1 PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍCH ROZTOKŮ HA

Byly připravovány dva typy zásobních roztoků hayluronanu sodného:

- I. Vzorek HA o střední molekulové hmotnosti $MW = 0,66$ MDa
- II. Vzorek HA o střední molekulové hmotnosti $MW = 2,36$ MDa

Vzorky HA v podobě bílého prášku byly poskytnuty firmou Contipro Biotech, s.r.o. a to ve farmaceutické čistotě.

Vlastní příprava roztoků probíhal následovně:

- a) do plastové, sterilní (PP) nádoby bylo naváženo požadované množství HA o dané MW, tak aby výsledný roztok obsahoval 0,1 hm. % HA
- b) k naváženému vzorku bylo přidáno patřičné množství deionizované H_2O s vodivostí $0,7 \mu S/m$.
- c) vzorek byl připevněn k třepačce, viz **Obrázek 16**, a nechán třepat při pokojové teplotě po dobu 18 až 20 hodin.
- d) po dokončení rozpouštění (třepání) byl vzorek uložen do chladničky, v níž byl skladován pro další použití při teplotě cca $5^\circ C$. **Pozn.:** maximální doba skladování vzorku pro další použití byla 7 dnů ne déle, aby byla minimalizována možnost kontaminace a degradace zkoumaných vzorků.



Obrázek 16: Třepačka LT2 používaná pro rozpouštění vzorků HA.

4.2 ŘEDĚNÍ ZÁSObNÍCH ROZTOKŮ HA

Zásobní roztok byly před vlastní depozicí na povrch slídy ředěny na požadované koncentrace. Probíhalo ředění 10x, 20x, 50x, respektive 100x, tak aby hmotnostní podíl polymeru v roztoku se pohyboval v rozmezí 0,01 až 0,001 hm.%, což koresponduje s experimenty a koncentracemi diskutovanými v odborných publikacích. [9], [10], [11], [12], [13]

Vzorky HA o daných MW byly ředěny pomocí:

- de-ionizované vody s vodivostí 0,7 $\mu\text{S/m}$,
- 0,15 M roztoku NaCl v de-ionizované vodě,
- 10 mM roztoku MgCl_2

Ředění vzorků probíhalo pomocí mikropipet do 2 ml nádobek, vzhledem k minimálnímu požadovanému množství roztoku (20 μl), které je nezbytné pro depozici na povrch slídy. Po naředění zásobních roztoků byl vzorek řádně protřepán pomocí třepačky a následně deponován na povrch slídy.

4.3 PŘÍPRAVA POVRCHU SLÍDY A JEHO MODIFIKACE

Pro imobilizaci HA a její následnou charakterizaci pomocí AFM byly použity destičky slídy v kvalitě V-5 Grade dodané od společnosti SPI Supplies, viz **Obrázek 17**.



Obrázek 17: *Vzorky slídy používané pro imobilizaci HA.*

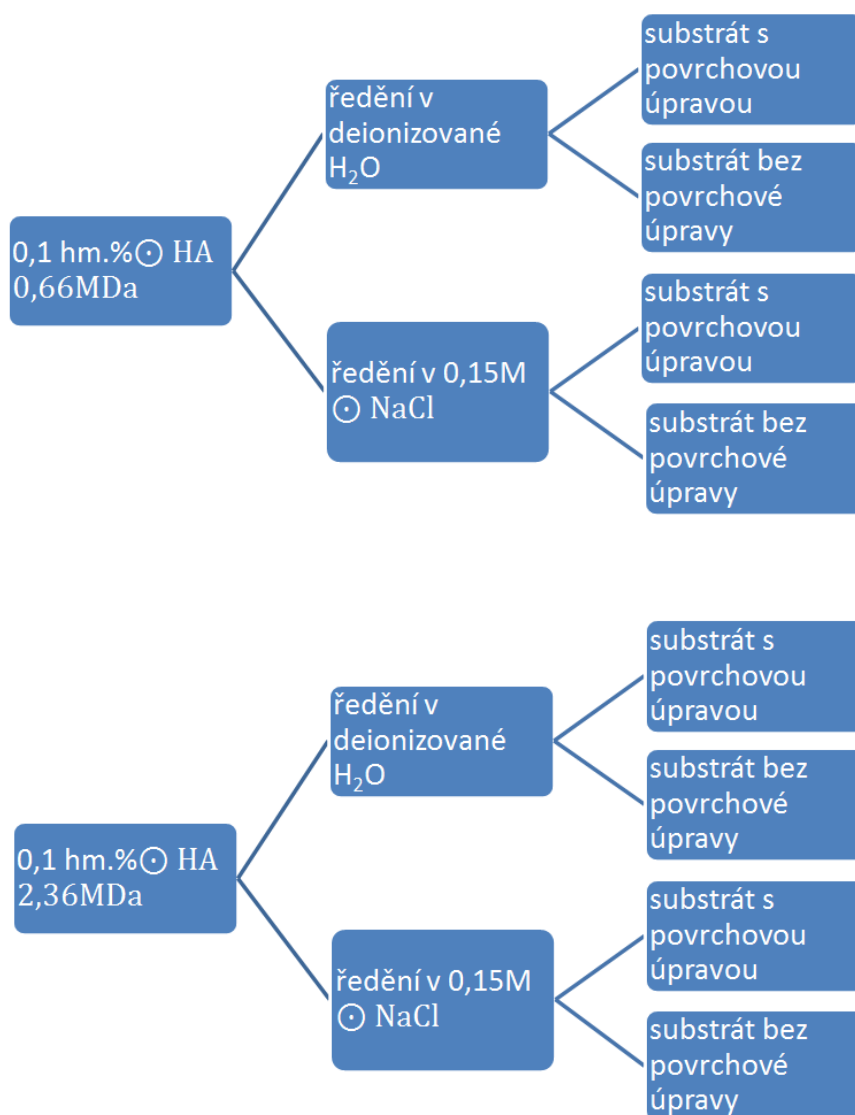
Postup přípravy vzorku byl následující:

- z obdélníkové destičky byl vstříhnut čtvercový vzorek,
- pomocí lepicí pásky byla odštipnuta svrchní vrstva slídy, abychom získali atomárně rovný čistý povrch,
- odštipnutý povrch byl okamžitě použit pro přímou imobilizaci HA z daného roztoku nebo byl ihned modifikován 10 mM roztokem MgCl_2 a to 20 μl po dobu 150 s. **Pozn.:** nutno dodat, že vzorek nebyl hydratován před vlastním použitím, jak se diskutuje v odborné literatuře [12], [13], [10], [9],
- po depozici roztoku MgCl_2 byl vzorek osušen pomocí proudu dusíku s vysokou čistotou z tlakové láhve.

4.4 IMOBILIZACE HA Z ROZTOKU NA POVRCH SLÍDY

Imobilizace HA na povrch slídy (nemodifikované nebo modifikované) probíhal tak, že na povrch připraveného vzorku slídy bylo deponováno 20 μl naředěného vzorku při pokojové teplotě a času inkubace 2,5min, 3min, 4min, 5min, 8min. Po tomto čase byl vzorek osušen v proudu dusíku a ihned připevněn pomocí oboustranné lepicí pásky ke kovovému terčíku, který se umísťuje na skener AFM.

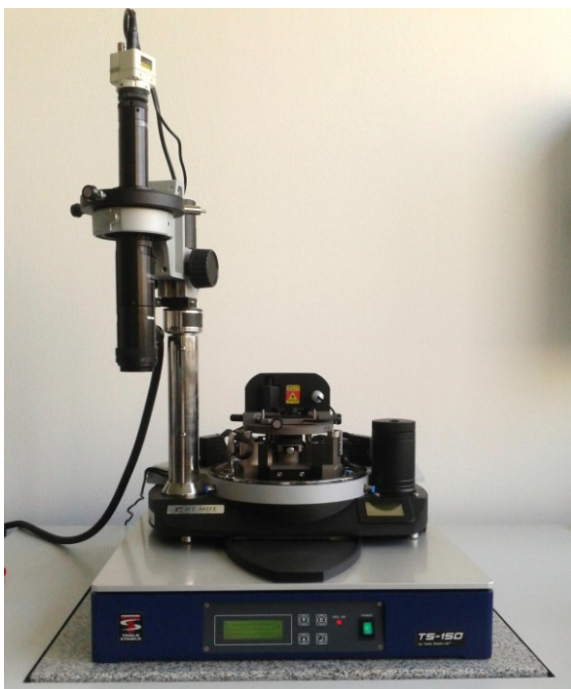
Proces přípravy roztoků (ředění) a imobilizace na upravený a neupravený povrch slídy lze shrnout pomocí následujících schémat uvedených na **Obrázek 18**. Pozn.: Nutno dodat, že ředění pomocí 10 mM MgCl₂, bylo odzkoušeno v prvotních experimentech, které nepřinesly pozitivní výsledky v podobě imobilizované HA na povrchu slídy. Z tohoto důvodu bylo upuštěno od tohoto typu ředění a probíhalo ředění pouze H₂O a roztoku 0,15 M NaCl, jak je uvedeno na níže vyobrazených schématech.



Obrázek 18: Schéma přípravy vzorků pro imobilizaci na povrchu slídy.

5 ZKOUMÁNÍ VZORKŮ POMOCÍ AFM

Pro charakterizaci povrchově imobilizovaných polymerních řetězců HA na povrchu slídy byl použit multi-módový mikroskop skenující sodnou od firmy NT- MDT, uvedený na **Obrázku 19**.



Obrázek 19: SPM- NTEGRA-Prima, od společnosti NT-MDT v laboratoři UFMI, FT, UTB ve Zlíně.

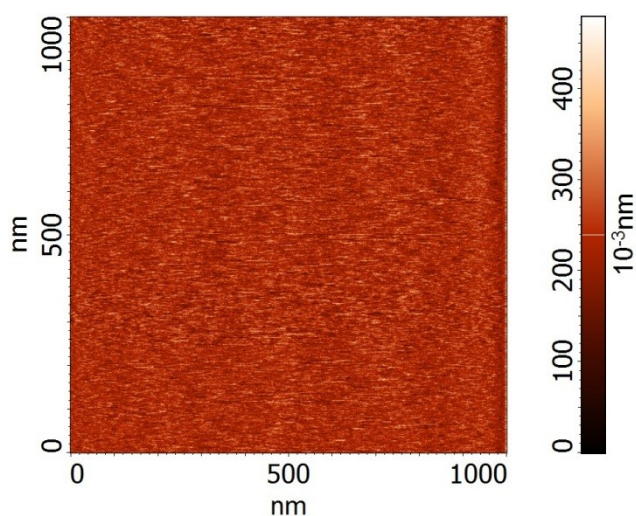
Použitý přístroj:	NTEGRA-Prima, od společnosti NT-MDT
Použitá metodika:	Mikroskopie atomárních sil – AFM
Měřicí mód:	Semikontaktní
Prostředí pro měření vzorku:	Vzduch (okolní atmosféra)
Teplota měření:	Laboratorní (25°C)
Použitá sonda pro AFM:	NSG10 pro nekontaktní módy, výrobce NT-MDT
Rychlost skenování:	cca 0,5 až 1 Hz
Rozlišení obrázků:	512x512 dpi
Skenovaná plocha:	1 x 1 μm

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

V souladu s hlavním cílem této práce byly imobilizovány deriváty HA na neupravené a upravené povrchy slídy z roztoků o rozdílné iontové síle, koncentraci a času depozice.

6.1.1 Povrch čerstvě štípané slídy

V prvním kroku byl skenován povrch čerstvě štípané slídy. Výsledek z tohoto měření je uveden na **Obrázek 20**. Z tohoto obrázku je patrné, že na povrchu slídy nejsou žádné částice a povrch je ideálně rovný jak přes velkou plochu 50 x 50 μm (tento sken není zobrazen), tak přes malou plochu 1x1 μm , viz níže. Z tohoto výsledku plyne, že povrch slídy je ideálním substrátem pro imobilizaci (fyzikální adsorbci) polymerních monovrstev nebo agregátů do výšky cca 2 nm.

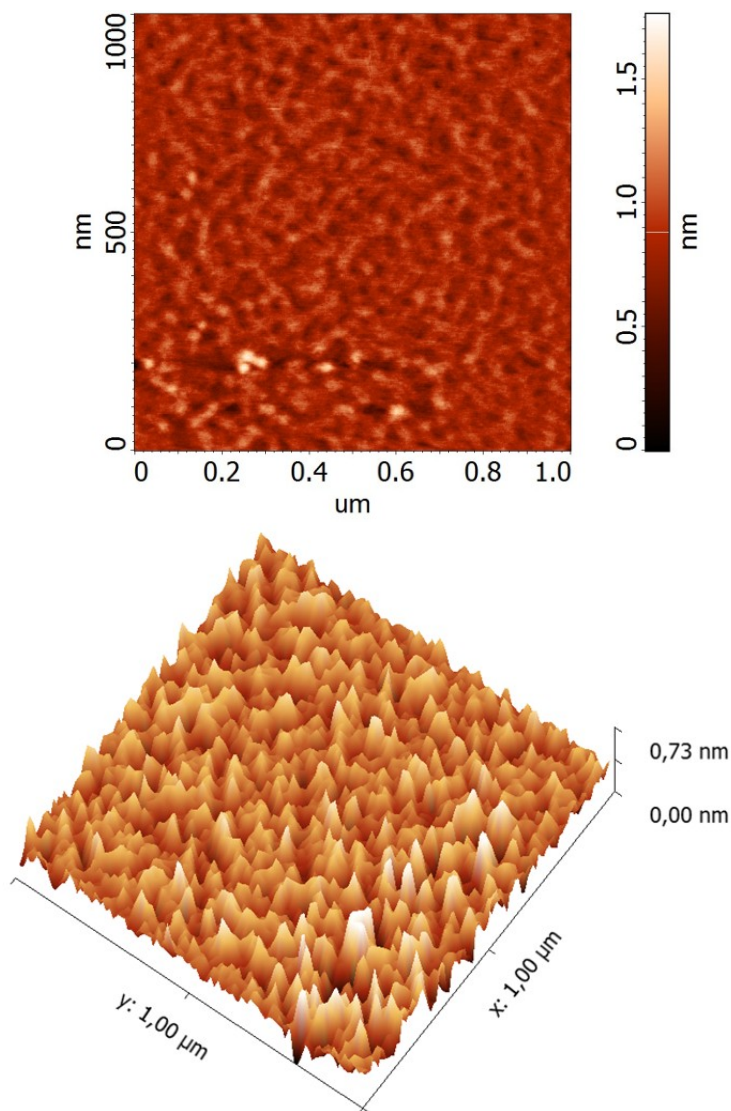


Obrázek 20: Topografie povrchu čerstvě štípané slídy.

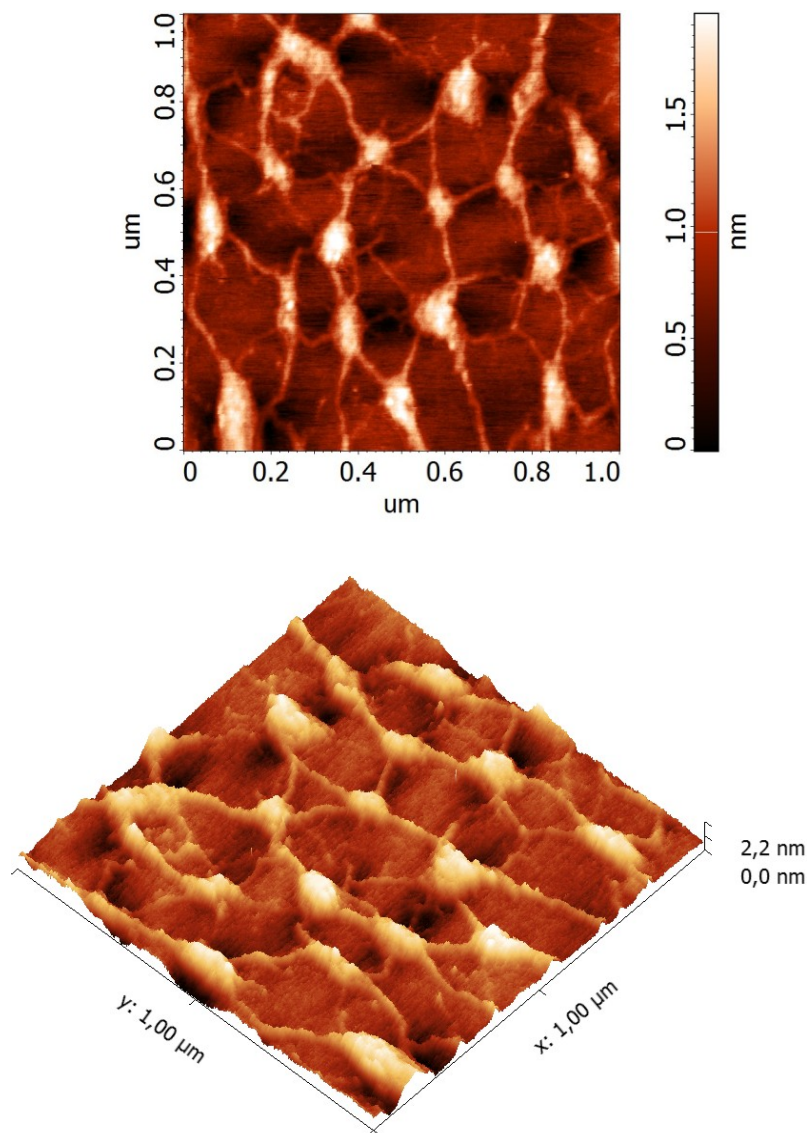
Pozn.: vzhledem ke snaze o zachování přehlednosti jednotlivých výsledků budou charakterizované experimenty rozděleny podle molekulové hmotnosti použitého vzorku a způsobu jeho ředění buďto pomocí vody nebo roztoku soli, jak bylo podrobněji popsáno v předešlé části práce.

6.1.2 Vzorky nízkomolekulární HA (0,66 MDa) ředěné vodou

V prvních experimentech byl na povrch nemodifikované slídy deponován roztok HA o MW = 0,66 MDa, ředěný vodou na koncentraci 0,01 hm. % s dobou depozice 240 s. Charakteristický povrchový reliéf takto připraveného vzorku je patrný z **Obrázek 21**. Na tomto obrázku může pozorovat hustou polymerní síť na povrchu slídy s nerovnostmi do cca 1,7 nm.



Obrázek 21: Topografie povrchu HA na slídě, imobilizované z 0,01 hm. % roztoku HA o MW = 0,66 MDa s dobou depozice 240 s.

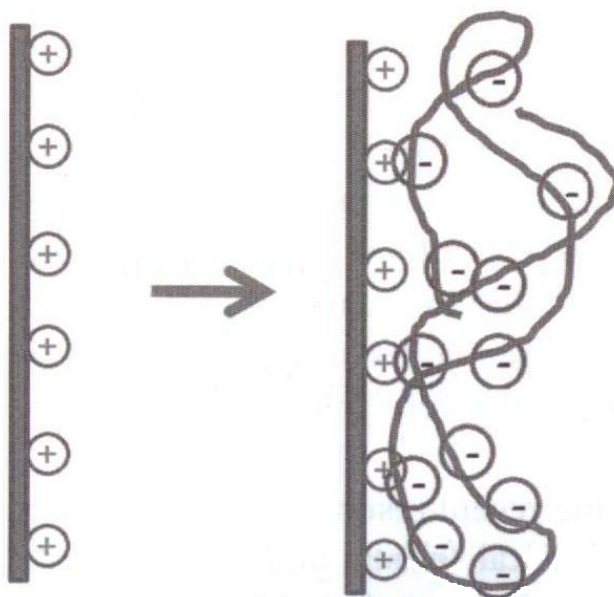


Obrázek 22: Topografie povrchu HA na kladně nabitě slídě, imobilizované z 0,01 hm. % roztoku HA o MW = 0,66 MDa s dobou depozice 150 s.

V dalším kroku byl výše popsán experiment opakován pro povrch modifikované slídy pomocí roztoku MgCl_2 , jak je popsáno v popisu experimentu. To znamená, že na povrch modifikované slídy byl deponován roztok HA o MW = 0,66 MDa, ředěný vodou na koncentraci 0,01 hm. % s dobou depozice 150 s. Nutno dodat, že doba depozice roztoku na povrch byla v případě tohoto experimentu kratší. Nicméně kontrolní experimenty s delší dobou neprokázaly výraznější rozdíly v typu povrchového reliéfu uvedeného na **Obrázek 22**. Na tomto obrázku můžeme pozorovat polymerní agregáty propojené izolovanými - lineárními shluky izolovaných řetězců HA.

Rozdíl mezi těmito dvěma vzorky uvedenými na **Obrázku 21 a 22**, je dán rozdílným mechanismem imobilizace na povrchu, který nebyl nebo byl předem pokryt vícemocným kationtem. Mechanismus vazby polyanionu (HA) na kladně nabitý povrch pro názornost uveden na **Obrázek 23**.

Z výše uvedeného plyne, že HA o nízké MW (0,66 MDa) lze z vodného roztoku imobilizovat jak na neupravený tak upravený povrch slídy, nicméně dostaneme zcela odlišné povrchové reliéfy s různým stupněm agregace a afinitou HA k povrchu.



Obrázek 23: Mechanismus vazby polyanionu na kladně nabitý povrch [16]

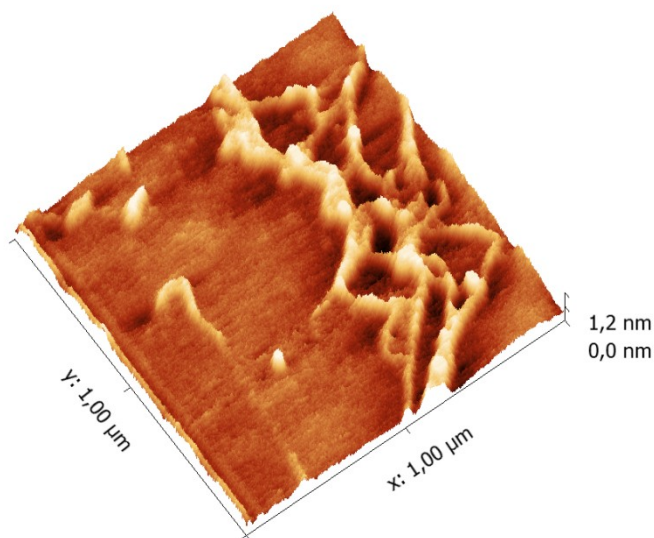
6.1.3 Vzorky nízkomolekulární HA (0,66 MDa) ředěné roztokem 0,15M NaCl

V dalších experimentech byl proveden test imobilizačních schopností nízkomolekulární HA (0,66 MDa), na povrch upravené a neupravené slídy, po naředění zásobního roztoku 0,15M roztokem NaCl. Z výsledků těchto experimentů vyplynulo, že takto naředěný roztok nelze dost dobře imobilizovat na povrch neupravené slídy (obrázky pro tento experiment z AFM nejsou zobrazeny, vzhledem k tomu, že na nich nelze nic pozorovat. Skutečnost, že nelze imobilizovat je pravděpodobně dána stericím stíněním polyanionu HA ionty NaCl v roztoku s nemožností vazby na záporně nabitý povrch slídy.

Nicméně na povrch modifikované (kladně nabitě) slídy pomocí MgCl_2 , lze velmi efektivně imobilizovat HA z roztoku ředěného 0,15 M NaCl, což lze pozorovat na **Obrázku 24**.

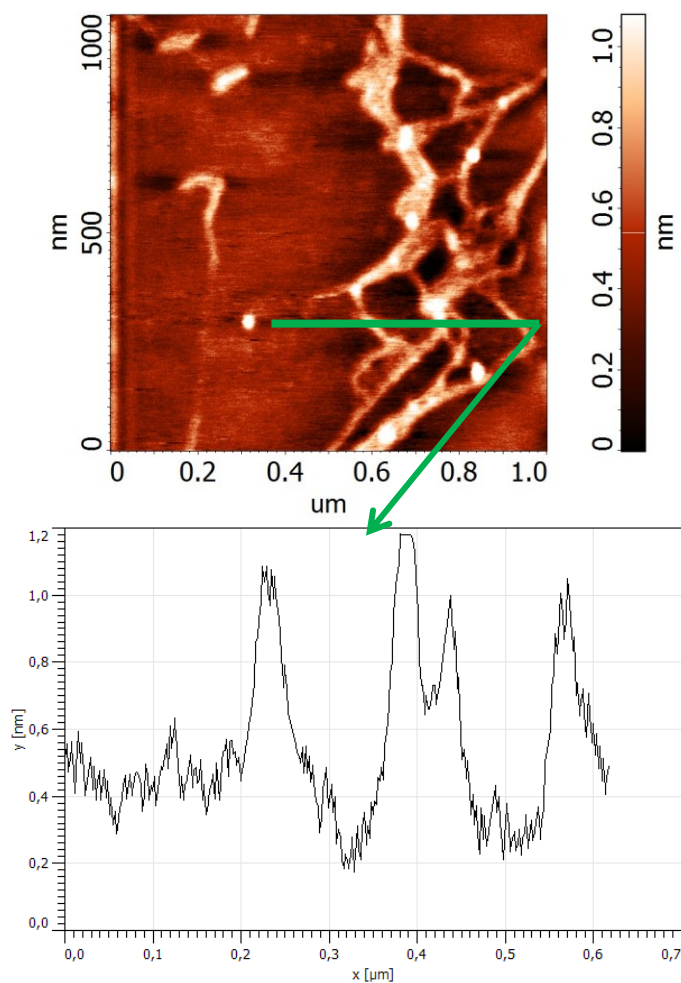
Na tomto obrázku můžeme sledovat izolované shluky polymerních řetězců s výškou okolo 1,1 nm.

Nutno dodat, že veškerá měření, byla prováděna ve vzduchu po vysušení vzorku pomocí proudu dusíku, z toho plyne, že veškeré imobilizované řetězce a shluky pomocí AFM, ať už na níže uvedeném obrázku nebo na ostatních se nacházejí v hydratovaném stavu.



Obrázek 24: 3D zobrazení topografie povrchu HA na kladně nabitě slídě, imobilizované z 0,01 hm. % roztoku HA o $MW = 0,66 \text{ MDa}$, ředěného 0,15M NaCl, s dobou depozice 150 s.

Na **Obrázku 25**, můžeme pozorovat 2D zobrazení výše uvedeného experimentu s uvedenými profily vzorku v různých místech. Z tohoto obrázku je jasně patrné jak se diametrálně liší výška profilu od jeho šířky, což potvrzuje fakt, že sledujeme agregáty polymerních řetězců fyzikálně sorbovaných k povrchu slídy do tenké monovrstvy z pohledu osy z.



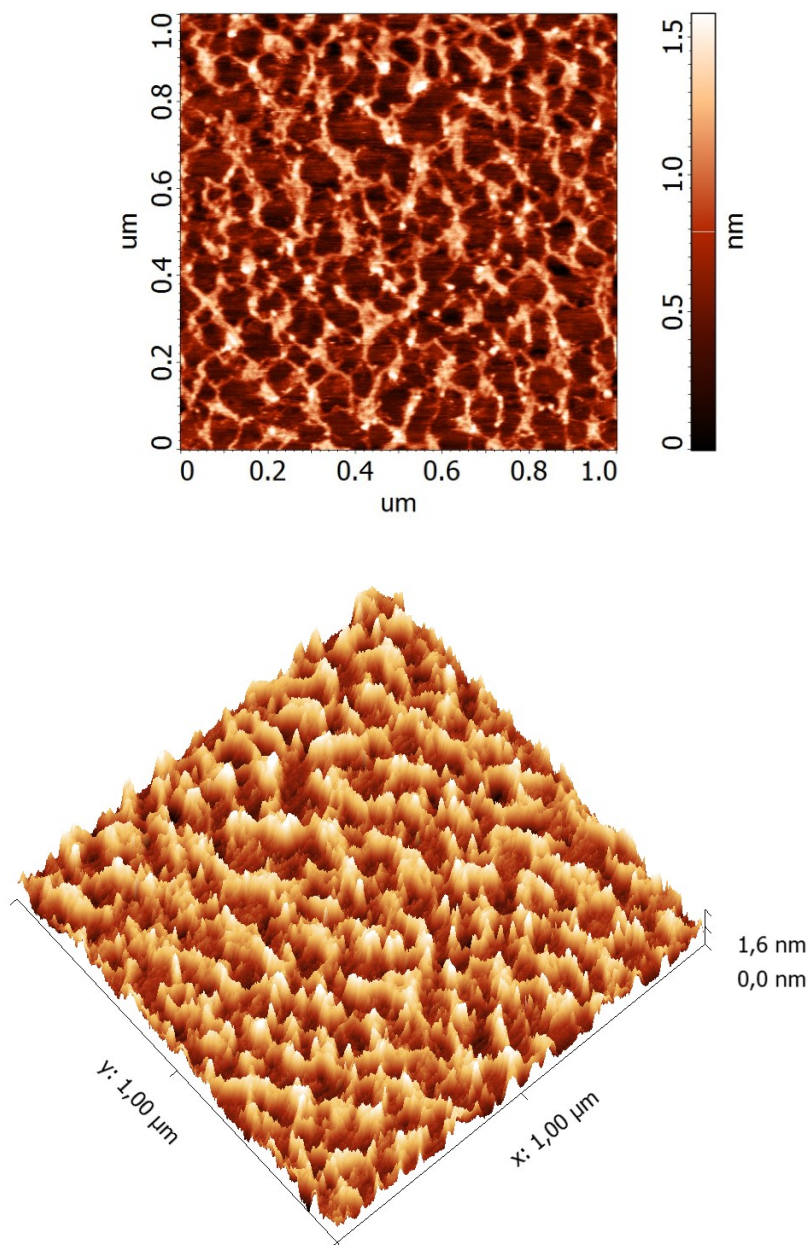
Obrázek 25: 2D zobrazení topografie a profilů pro výsledky experimentu popsané na obrázku 24

6.1.4 Vzorčky vysokomolekulární HA (2,36MDa) ředěné vodou

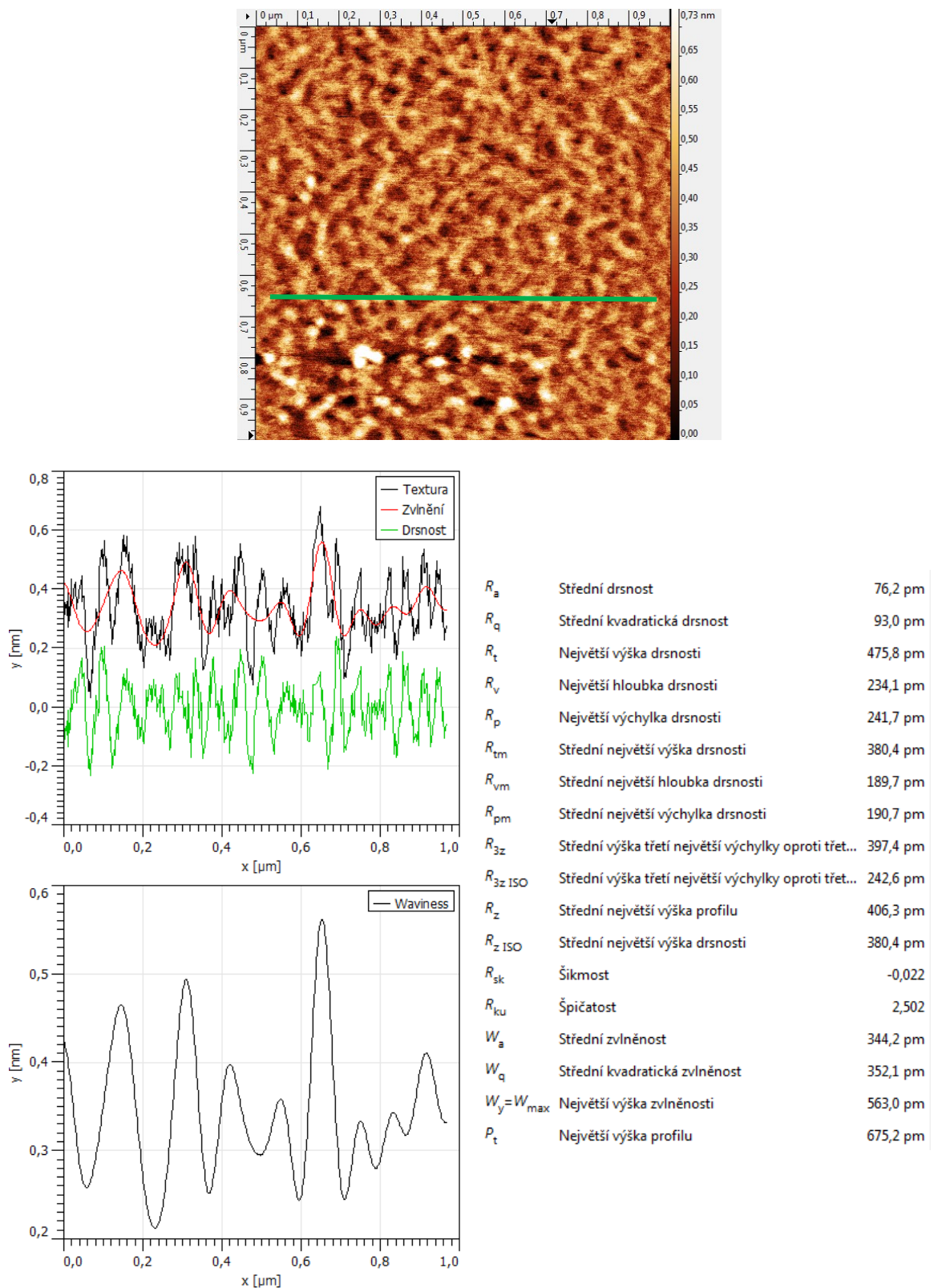
V dalších experimentech byly zacíleny na srovnání imobilizačních schopností vysokomolekulární HA (2,36 MDa) oproti výše diskutované nízkomolekulární HA (0,66 MDa). Experimenty byly provedeny obdobně, jak bylo popsáno výše. V prvním byla provedena imobilizace vysokomolekulární HA na povrch čerstvě našťípané slídy, přímo z vodného roztoku, kde koncentrace polymeru byla 0,01 hm.% a doba expozice 150 s., viz **Obrázek 26**. Na tomto obrázku můžeme pozorovat izolované shluky makromolekul, které se částečně prolínají, s výškou profilu v ose z do 1,6 nm. Porovnáme-li tento **obrázek 26** s dříve uvedeným výsledkem pro obdobný experiment, uvedený na **obrázku 21** pro nízkomolekulární HA můžeme pozorovat rozdílnou mikrostrukturu povrchu, což je dáno právě rozdílnou

nou molekulovou hmotností jednotlivých vzorků. Tento tvrzení je dále podpořeno výsledky z obrazové analýzy, s uvedenými parametry drsnosti povrchu, viz **Obrázek 27 a 28**.

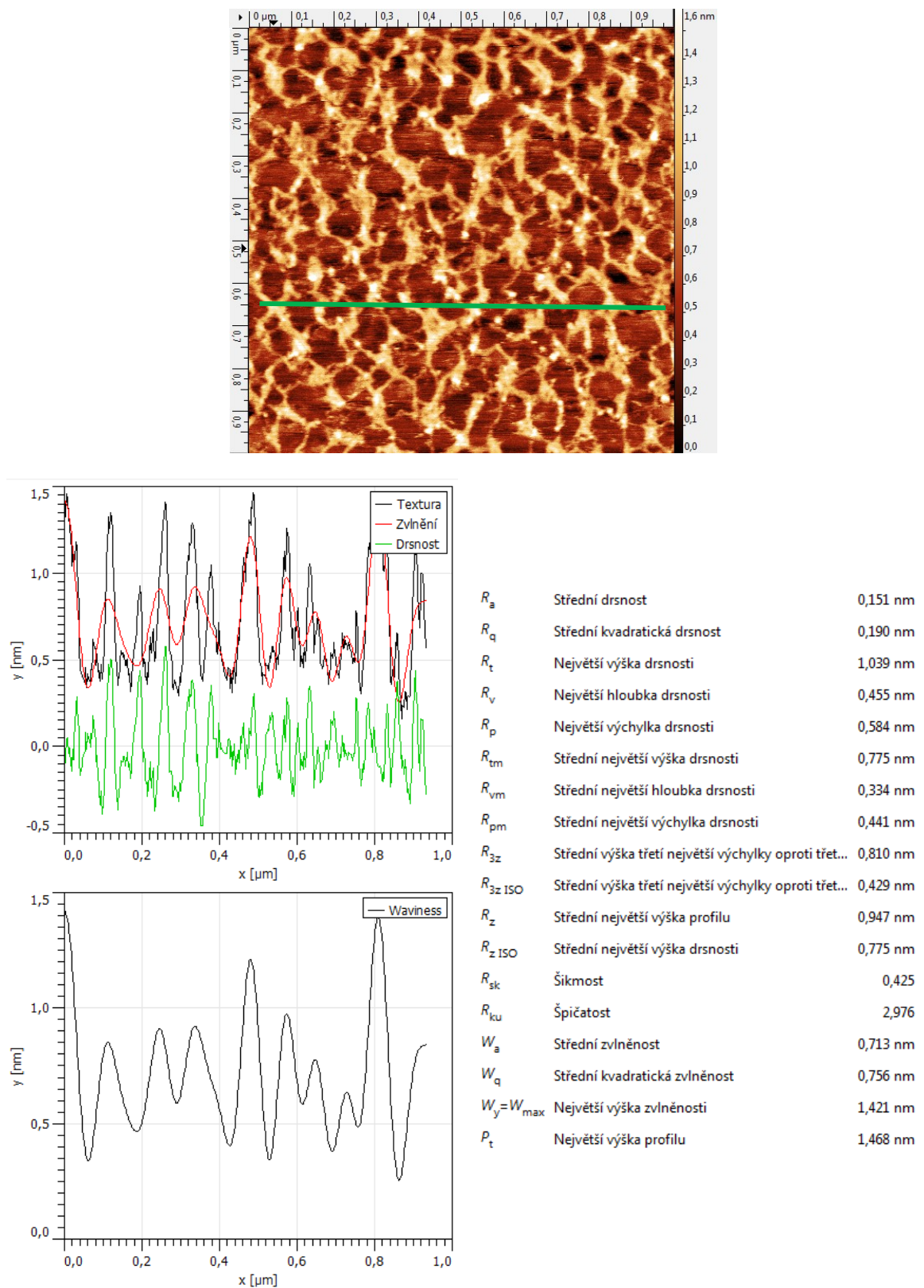
Pozn.: Obrazová analýza topografie (drsnosti) povrchu byla provedena v programu Gwyddion 2.3.



Obrázek 26: Topografie povrchu HA na slídě, imobilizované z 0,01 hm. % roztoku HA o MW = 2,36 MDa s dobou depozice 240 s.

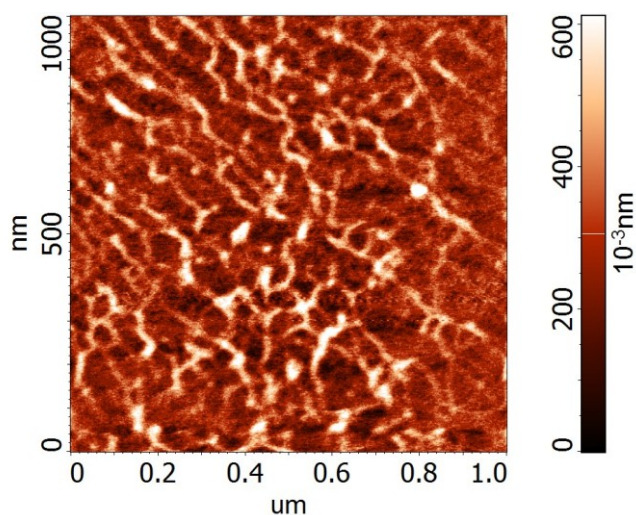


Obrázek 27: Výsledky obrazové analýzy pro nízkomolekulovou HA immobilizovanou z vodného roztoku na neupravený povrch slídy (výsledky korespondují s daty uvedenými na obrázku 21).



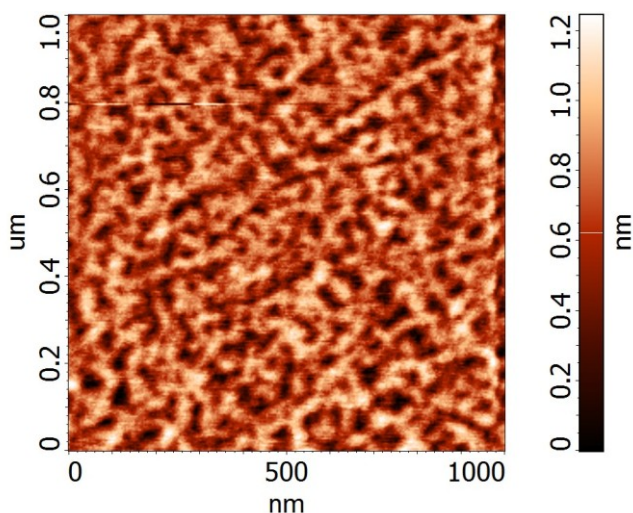
Obrázek 28: Výsledky obrazové analýzy vysokomolekulovou HA immobilizovanou z vodného roztoku na neupravený povrch slídy (výsledky korespondují s daty uvedenými na obrázku 26).

V souladu se členěním celého experimentu, byla v dalších krocích provedena imobilizace vysokomolekulární HA na povrch upravené slídy pomocí vícemocného kationu Mg^{2+} (s pomocí před-úpravy pomocí roztoku $MgCl_2$). Výsledky z tohoto experimentu jsou vyobrazeny na následujících třech obrázcích pro různé míry ředění. V prvním experimentu proběhlo desetinásobné ředění na koncentraci 0,01 hm.% pomocí H_2O s dobou depozice roztoku na povrch vzorku 150 s, viz **Obrázek 29**. Na tomto obrázku můžeme pozorovat lineárně protažené shluky makromolekulárních řetězců. Vzhled tohoto uspořádání se diametrálně liší od toho, co lze pozorovat na Obrázku 26, pro HA imobilizovanou na povrchu neupravené slídy za srovnatelných podmínek. Změna tohoto reliéfu je dána rozdílnou afinitou HA povrchu bez a s úpravou, může zde dále hrát roli rozdílná mobilita a schopnost přeuspořádání polymerních řetězců vázaných k povrchu pomocí vícemocného kationtu.

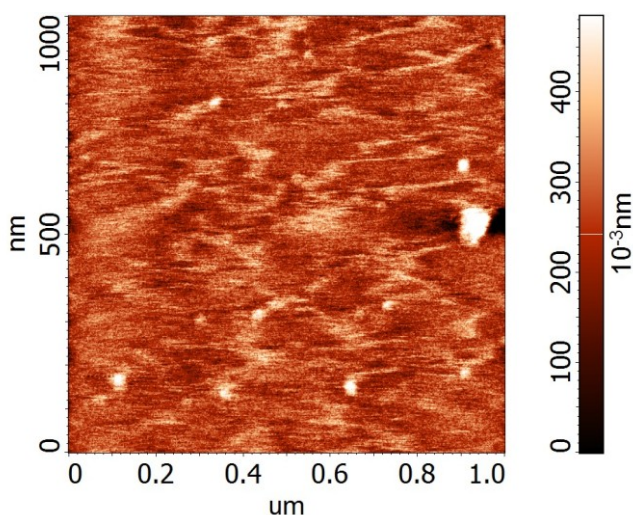


Obrázek 29: Topografie povrchu HA na kladně nabitě slídě, imobilizované z 0,01 hm. % roztoku HA o $MW = 2,36$ MDa s dobou depozice 150 s.

V dalších experimentech byla provedena imobilizace mnohem více zředěných roztoků HA na povrch upravené slídy. Proběhlo dvacetinásobné a stonásobné ředění roztoků. Pro dvacetinásobné zředění zásobního roztoku pomocí vody, je uveden výsledek z AFM na **Obrázku 30**. V případě tohoto obrázku můžeme pozorovat hustou polymerní síť shluků HA na povrchu nabitě slídy, což je částečně zářející, vzhledem k výše uvedenému výsledku na **Obrázku 29**, kde při poloviční koncentraci polymeru můžeme sledovat daleko menší pokrytí povrchu. Tento výsledek může být dán rozdílným (menším) ovlivňováním (prolínáním) jednotlivých makromolekulárních klubek v roztoku. Z čehož může vyplývat rozdílný mechanismus imobilizace a uspořádání polymeru na povrchu.



Obrázek 30: Topografie povrchu HA na kladně nabitě slídě, immobilizované z 0,005 hm. % roztoku HA o MW = 2,36 MDa s dobou depozice 150 s.



Obrázek 31: Topografie povrchu HA na kladně nabitě slídě, immobilizované z 0,001 hm. % roztoku HA o MW = 2,36 MDa s dobou depozice 150 s.

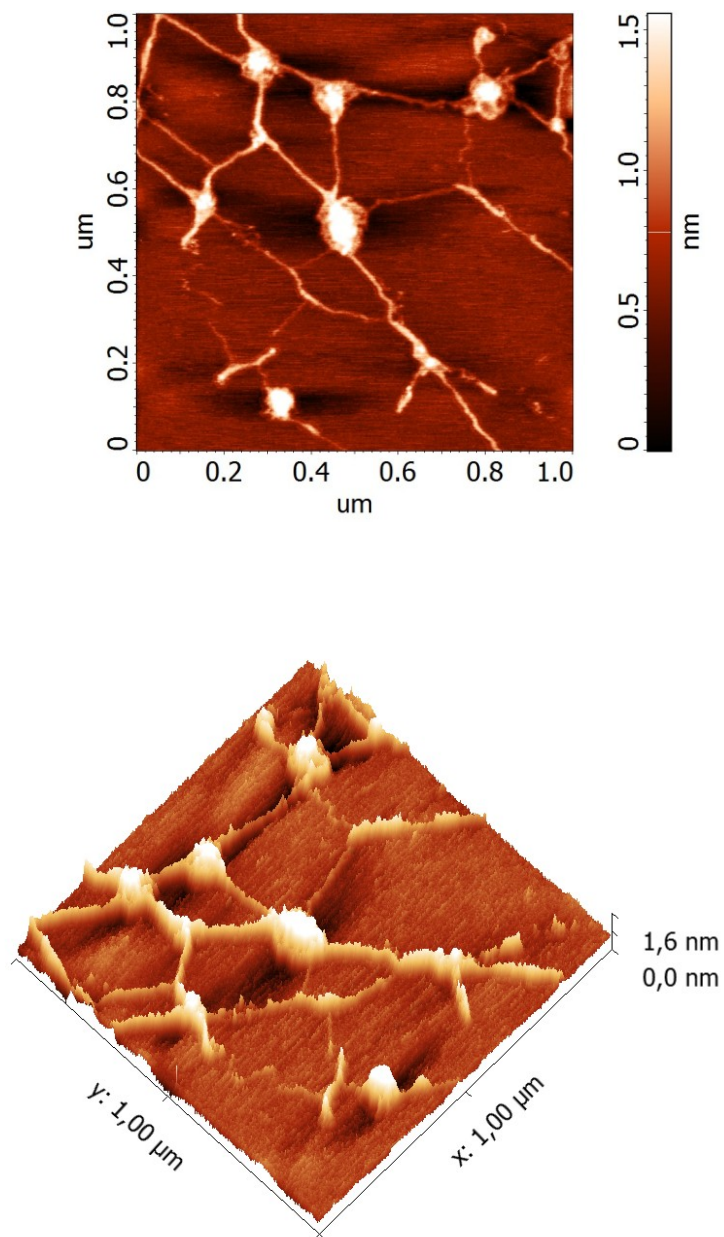
V posledním experimentu, bylo provedeno stonásobné zředění polymerního roztoku vodou. Při takovémto velkém ředění a krátké době (do 200 s) depozice polymerního roztoku na povrchu upravené slídy, nelze pozorovat výraznější struktury nebo shluky makromolekul HA, viz **Obrázek 31**. Na tomto obrázku můžeme pozorovat pouze rozmazané neostré náznaky adsorpce polymeru na povrch do výšky 0,5 nm, což začíná hraničit s rozlišovací schopností použitého SPM mikroskopu, vzhledem k hranici šumu tohoto zařízení ve směru osy Z.

6.1.5 Vzorčky vysokomolekulární HA (2,36 MDa) ředěné roztokem 0,15M NaCl

V závěrečných experimentech byl proveden test imobilizačních schopností vysokomolekulární HA (2,36 MDa), na povrch upravené a neupravené slídy, po naředění zásobního roztoku 0,15M roztokem NaCl, podobně jak bylo popsáno v případě HA (0,66 MDa). Stejně jako nízkomolekulovou HA, tak vysokomolekulovou HA nebylo možné dost dobře imobilizovat na povrch neupravené slídy (obrázky pro tento experiment z AFM nejsou znovu zobrazeny, vzhledem k tomu, že na nich nelze nic pozorovat). Byla provedena imobilizace desetkrát zředěného zásobního roztoku vysokomolekulární HA s následnou imobilizací polymeru na povrch kladně nabitě slídy s pomocí Mg^{2+} , po dobu 150 s a celkovým podílem HA v roztoku 0,01 hm. %. Výsledky z tohoto experimentu jsou uvedeny na **obrázku 32**. Na tomto obrázku můžeme pozorovat velké shluky makromolekul propojené lineárními shluky polymerních řetězců.

Zajímavou skutečností je, že se tento výsledek (uvedený na **obrázku 32**) podobá strukturám pozorovaným na **Obrázku 22**. Z těchto obrázků by se mohlo zdát, že nelze pozorovat výraznější rozdíl mezi imobilizovanou HA o nízké nebo vysoké molekulové hmotnosti. Nicméně je nutné si uvědomit, že v případě nízkomolekulové HA, viz **Obrázek 22**, byl vzorek naředěn H_2O , zatímco v případě vysokomolekulární HA bylo ředění provedeno roztokem soli (0,15M NaCl, viz **Obrázek 32**, z toho plyne, že můžeme čekat rozdílné hydrodynamické průměry polymerních klubek v roztoku, tj. můžeme očekávat rozdílný způsob imobilizace a velikosti polymeru na povrchu, jak je podrobněji diskutováno v teoretické části práce. Zjednodušeně lze říci, že roztok vody se chová vzhledem k HA jako dobré rozpouštědlo, zatímco roztok soli (0,15M NaCl), jako horší (špatné) rozpouštědlo.

Dále nutno dodat, že správně by měly být porovnávány výsledky uvedené na **Obrázku 24 a 32**, pro srovnatelný typ experimentu. Rozdílnost pozorovaných struktur na povrchu lze vysvětlit rozdílnou střední molekulovou hmotností použitého polymeru (HA) a snadnější agregací nízkomolekulových frakcí do souvislejších protáhlých shluků polymerních řetězců HA.



Obrázek 32: Topografie povrchu HA na kladně nabitě slídě, imobilizované z 0,01 hm. % roztoku HA o $MW = 2,36$ MDa, ředěného 0,15M NaCl, s dobou depozice 150 s.

ZÁVĚR

V souladu se zadáním a hlavními cíli této práce byla v teoretické části práce popsána metodiky zkoumání povrchů pomocí mikroskopie skenující sondou, respektive mikroskopie atomárních sil (AFM). Dále byly rozebrány polymerní vrstvy z hlediska jejich významu a mechanismu tvorby s vazbou na modelové substráty, na nichž lze provádět jejich studium pomocí AFM. V poslední části teoretické části práce byla diskutována kyselina hyaluronová, respektive hyaluronan sodný (HA), který byl předmětem experimentálního zájmu a studia.

V experimentální části práce byly připraveny roztoky HA o rozdílné molekulové hmotnosti, které byly dále ředěny vodou nebo roztokem soli na požadovanou koncentraci. Z takto připravených roztoků byly na povrch neupravené a upravené slídy imobilizovány polymerní řetězce HA s následnou charakterizací pomocí AFM.

Byla provedena optimalizace procesu modifikace slídy a imobilizace HA z roztoku. Zejména byla testována výchozí koncentrace jednotlivých roztoků, následnost jednotlivých kroků a jednotlivé časy depozic roztoků na povrchu slídy.

Z výsledků práce vyplynulo, že lze efektivně imobilizovat HA z vodného nebo solného roztoku na povrch kladně nabitě slídy. V případě záporně nabitě (čerstvě štípané) slídy lze HA efektivně imobilizovat pouze z vodného roztoku.

Pomocí semikontakního módu AFM byly na povrchu slídy pozorovány rozdílné povrchové reliéfy imobilizované HA v závislosti na koncentraci použitého roztoku, přítomnosti soli, času depozice a zejména molekulové hmotnosti. Ve většině případů nebyly pozorovány izolované makromolekulární klubka, respektive polymerní řetězce, ale jejich shluky což bylo dáno zejména vyšší koncentrací polymeru v roztoku, což koresponduje s výsledky prezentovanými v literatuře. [11]

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] C. D. Frisbie, *Scanning Probe Microscopy*. 2004, pp. 469–484.
- [2] R. Kubínek and M. Vůjtek, “Mikroskopie skenující sondou.”
- [3] R. J. Lewis, *Atomic Force Microscopy in process engineering*. 2007.
- [4] V. V. Tsukruk and S. Singamaneni, *Scanning Probe Microscopy of Soft Matter*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011.
- [5] K. Dobranská and K. Kubíček, “Studium mechanických vlastností materiálů pomocí AFM,” 2009.
- [6] P. Wagner, “Immobilization strategies for biological scanning probe microscopy.”
- [7] P. P. Nosi, S. B.- Logick, and C. H. Materi, “Metody přípravy povrchu nosičů při studiu biologických materiálů s využitím metody,” pp. 1–13.
- [8] M. D. Hari G. Garg, Ph.D., D.Sc, and Charles A. Hales, *Chemistry and Biology of Hyaluronan*. .
- [9] M. K. Cowman, M. Li, and E. a Balazs, “Tapping mode atomic force microscopy of hyaluronan: extended and intramolecularly interacting chains.,” *Biophysical journal*, vol. 75, no. 4, pp. 2030–7, Oct. 1998.
- [10] S. Al-Assaf, G. O. Phillips, a. P. Gunning, and V. J. Morris, “Molecular interaction studies of the hyaluronan derivative, hylan A using atomic force microscopy,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 47, no. 4, pp. 341–345, Mar. 2002.
- [11] M. K. Cowman, C. Spagnoli, D. Kudasheva, M. Li, A. Dyal, S. Kanai, and E. a Balazs, “Extended, relaxed, and condensed conformations of hyaluronan observed by atomic force microscopy.,” *Biophysical journal*, vol. 88, no. 1, pp. 590–602, Jan. 2005.
- [12] C. Spagnoli, A. Korniaikov, A. Ulman, E. a Balazs, Y. L. Lyubchenko, and M. K. Cowman, “Hyaluronan conformations on surfaces: effect of surface charge and hydrophobicity.,” *Carbohydrate research*, vol. 340, no. 5, pp. 929–41, Apr. 2005.
- [13] M. . Cowman, M. Li, a Dyal, and E. . Balazs, “Tapping mode atomic force microscopy of the hyaluronan derivative, hylan A,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 41, no. 3, pp. 229–235, Mar. 2000.
- [14] [online]. [cit. 2013-05-24]. Dostupné z: <http://www.ieap.uni-kiel.de/surface/ag-kipp/stm/stm.htm>
- [15] [online].[cit.2013-05-23].Dostupné_z: <http://mrsec.wisc.edu/Edetc/Slideshow/slides/contents/piezoelectricity.html>

- [16] GARG, Hari G. a Charles A. HALES. Chemistry and biology of hyaluronan. Elsevier, 2004. ISBN 978-0-08-044382-9.
- [17] Steinbüchel, A., Vandamme, E. J., Baets, S. De: *Biopolymers: Polysaccharides I, Polysaccharides from Prokaryotes*. Vol. 5, Wiley-VCH, 2002. 532 p. ISBN 3-527-30226-3
- [18] [online].[cit.2013-05-24]. Dostupné z:
<http://www.soils.wisc.edu/courses/SS325/primary.htm>
- [19] MIRONOV, V.L. Fundamentals of scanning probe microscopy, 2004,
DOI: 10.1134/S106378501304010X.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

SPM	Mikroskopie skenující sondou
AFM	Mikroskopie atomárních sil
STM	Rastrovací tunelovací mikroskopie
MFM	Mikroskopie magnetických sil
FMM	Mikroskopie modulovaných sil
LFM	Mikroskopie laterálních sil
EFM	Mikroskopie elektrostatických sil
SCM	Rastrovací kapacitní mikroskopie
SThM	Rastrovací termická mikroskopie
HA	Hyaluronová kyselina
MW	Molekulární hmotnost [Da]
U_T	Tunelovací napětí [V]
I_T	Tunelovací proud [A]
R_H	Hydrodynamický poloměr [m]
Φ	Energetická výška bariéry
d	Vzdálenost hrotu od povrchu vzorku

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: <i>Princip STM</i> [19]	14
Obrázek 2: <i>Princip funkce detekčního zařízení AFM.</i>	15
Obrázek 3: <i>Graf závislosti celkové síly na vzdálenosti hrotu od povrchu v kontaktním a bezkontaktním režimu.</i>	16
Obrázek 4: <i>Rozdělení AFM módů na statické a dynamické</i> [4]	18
Obrázek 5: <i>Spodní pevná část přístroje AFM na němž je polohovací zařízení v podobě piezokeramického skeneru nesoucí měřený vzorek (vyfoceno v laboratoři na UFMI, FT, UTB ve Zlíně).</i>	19
Obrázek 6: <i>Princip funkce piezoelektrik.</i> [19]	21
Obrázek 7: <i>Sonda pro SPM složená z hrotu na obdélníkovém (vlevo) nebo trojúhelníkovém (vpravo) raménku.</i> [19].....	22
Obrázek 8: <i>Horní odnímatelná část přístroje AFM nesoucí nosník s hrotem.</i>	22
Obrázek 9: <i>Způsoby imobilizace polymerního řetězce</i> [3].....	24
Obrázek 10: <i>Závislost stavu polymerního řetězce na rozpouštědle</i> [3].....	25
Obrázek 11: <i>Závislost stavu polymerního kartáčku na rozpouštědle</i> [3].....	25
Obrázek 12: <i>Struktura slídy</i> [18].....	27
Obrázek 13: <i>Chemický strukturní vzorec kyseliny hyaluronové.</i> [16].....	30
Obrázek 14: <i>Model polymerního klubka hyaluronanu ve zředěném (nahore) a koncentrovaném roztoku (dole)</i> [16]	31
Obrázek 15: <i>Porovnání hydrodynamických poloměrů</i>	31
Obrázek 16: <i>Třepačka LT2 používaná pro rozpouštění vzorků HA.</i>	35
Obrázek 17: <i>Vzorky slídy používané pro imobilizaci HA.</i>	36
Obrázek 18: <i>Schéma přípravy vzorků pro imobilizaci na povrchu slídy.</i>	37
Obrázek 19: <i>SPM- NTEGRA-Prima, od společnosti NT-MDT v laboratoři UFMI, FT, UTB ve Zlíně.</i>	38
Obrázek 20: <i>Topografie povrchu čerstvě štípané slídy.</i>	39
Obrázek 21: <i>Topografie povrchu HA na slídě, imobilizované z 0,01 hm. %</i>	40
Obrázek 22: <i>Topografie povrchu HA na kladně nabitě slídě, imobilizované z 0,0 1 hm. % roztoku HA o MW = 0,66 MDa s dobou depozice 150 s.</i>	41
Obrázek 23: <i>Mechanismus vazby polyanionu na kladně nabitý povrch</i> [16].....	42

Obrázek 24: 3D zobrazení topografie povrchu HA na kladně nabitě slídě, imobilizované z 0,01 hm. % roztoku HA o MW = 0,66 MDa, ředěného 0,15M NaCl, s dobou depozice 150 s.	43
Obrázek 25: 2D zobrazení topografie a profilů pro výsledky	44
Obrázek 26: Topografie povrchu HA na slídě, imobilizované z 0,01 hm. % roztok u HA o MW = 2,36 MDa s dobou depozice 240 s.	45
Obrázek 27: Výsledky obrazové analýzy pro nízkomolekulovou HA imobilizovanou z vodného roztoku na neupravený povrch slídy (výsledky korespondují s daty uvedenými na obrázku 21).	46
Obrázek 28: Výsledky obrazové analýzy vysokomolekulovou HA imobilizovanou z vodného roztoku na neupravený povrch slídy (výsledky korespondují s daty uvedenými na obrázku 26).	47
Obrázek 29: Topografie povrchu HA na kladně nabitě slídě, imobilizované z 0,0 1 hm. % roztoku HA o MW = 2,36 MDa s dobou depozice 150 s.	48
Obrázek 30: Topografie povrchu HA na kladně nabitě slídě, imobilizované z 0,005 hm. % roztoku HA o MW = 2,36 MDa s dobou depozice 150 s.	49
Obrázek 31: Topografie povrchu HA na kladně nabitě slídě, imobilizované z 0,001 hm. % roztoku HA o MW = 2,36 MDa s dobou depozice 150 s.	49
Obrázek 32: Topografie povrchu HA na kladně nabitě slídě, imobilizované z 0,01 hm. % roztoku HA o MW = 2,36 MDa, ředěného 0,15M NaCl, s dobou depozice 150 s.	51