

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

## 29 864

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

*C12M 3/00* (2006.01)  
*C12M 3/04* (2006.01)  
*C12N 5/071* (2010.01)  
*B82Y 5/00* (2011.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2016-32491**  
(22) Přihlášeno: **17.06.2016**  
(47) Zapsáno: **11.10.2016**

(73) Majitel:  
Fyzikální ústav AV ČR, v.v.i., Praha 8, CZ  
Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i., Praha 4, CZ  
Ústav pro nanomateriály, pokročilé technologie a  
inovace, TUL, Liberec 1, CZ

(72) Původce:  
Ing. Alexander Kromka, Ph.D., Praha, CZ  
Ing. Štěpán Potocký, Ph.D., Praha, CZ  
Ing. Mária Domonkos, Praha, CZ  
doc. Ing. Lenka Martinová, CSc., Liberec 1, CZ  
Ing. Miroslava Rysová, Liberec 1, CZ  
doc. MUDr. Lucie Bačáková, CSc., Praha 4, CZ  
Ing. Roman Matějka, Praha 4, CZ  
Mgr. Elena Filová, Ph.D., Praha 4, CZ

(74) Zástupce:  
Karel Bauer, CITT, FZÚ AV, v.v.i., Za Radnici  
835, 252 41 Dolní Břežany

(54) Název užitného vzoru:  
**Multifunkční samonosná diamantová  
porézní podložka pro kultivaci buněk**

**CZ 29864 U1**

## Multifunkční samonosná diamantová porézní podložka pro kultivaci buněk

### Oblast techniky

Uvedené technické řešení se týká multifunkční diamantové porézní podložky pro kultivaci buněk spadající do oblasti materiálového inženýrství, kompozitních materiálů, nanomateriálů a biotechnologií. Technické řešení rozšiřuje možnosti experimentálních metod v oblasti regenerativní medicíny, tkáňového inženýrství, mikrofluidních kultivačních systémů, farmakologie, ochrany životního prostředí, bio-senzoriky apod.

### Dosavadní stav techniky

Diamantové tenké vrstvy reprezentují unikátní materiál vykazující výjimečnou kombinaci intrinsecích vlastností, jako jsou vysoká tvrdost, chemická stabilita, odolnost vůči záření, optická propustnost, polovodivý charakter (izolant vs. vodič), laditelná fotoluminiscence, biokompatibilita, případně i antibakteriálnost.

Mnohé aplikace vyžadují specifický charakter vrstev, jako jsou povrchová drsnost, velikost zrn, kompaktnost a celistvost vrstvy. V posledních letech do popředí vstupuje požadavek laditelnosti jejich vlastností. Jedná se o specifickou chemickou terminaci povrchů diamantu atomy/(bio-) molekulami s funkcí převodníku nebo katalyzátoru mezi biochemickými reakcemi, řízenému průběhu (elektro-) chemických procesů, selektivnímu rozpoznání okolních molekul nebo stimulanému usměrnění biologických procesů.

Dalším důležitým aspektem je tvorba vrstev požadované morfologie s cílem zvýšení kontaktní plochy jako jsou např. nanosloupky, nanojehly, nanodutinky anebo porézní struktura. Stávající způsoby přípravy vrstev s řízenou morfologií zahrnují techniky shora-dolů, zdola-nahoru a depozice podle vzoru.

Metoda přístupu shora-dolů spočívá v přípravě objemové vrstvy, která je následně řízeně odleptávána podle předem daného vzoru, čímž dochází k tvorbě trojdimenzionální struktury. Jednotlivé přístupy se liší způsobem tvorby vzoru (litografie, nahodilá struktury a samouspořádání) a následného leptacího procesu (suché či mokré leptání). Proces reaktivního leptání diamantu ve směsi  $CF_4/O_2$  je popsán v dokumentu H. Shiomi, Reactive Ion Etching of Diamond in  $O_2$  and  $CF_4$  Plasma, and Fabrication of Porous Diamond for Field Emitter Cathodes, Jpn. J. Appl. Phys. 36 (1997) 7745-7748. doi: 10.1143/JJAP.36.7745. Následně byla tato metoda aplikována na leptání diamantu. Jako masky byly využity různé druhy materiálů (Al, Ni, Au, diamantové nanočástice, anodický aluminium oxid). V dokumentu O. Babchenko, A. Kromka, K. Hruska, M. Michalka, J. Potmesil, M. Vanecek, Nanostructuring of diamond films using self-assembled nanoparticles. Cent. Eur. J. Phys. 7 (2009) 310-314. doi:10.2478/s11534-009-0026-8 bylo využito samouspořádání zlatých, niklových a diamantových nanočástic. Tímto způsobem lze připravit diamantové sloupečky, drátky, šestiúhelníkové struktury či neuspořádané nanostruktury. V dokumentu A. Kriele, O. A. Williams, M. Wolfer, J. J. Hees, W. Smirnov, C. E. Nebel, Formation of nanopores in nano-crystalline diamond films, Chem. Phys. Lett. 507 (2011) 253-259. doi: 10.1016/j.cplett.2011.03.089 je využito procesu mokrého leptání bez litografie, zejména odlišné chemické odolnosti diamantové a grafitické ( $sp^2$ ) fáze, která je preferenčně lokalizována na hranicích zrn, žlhaním diamantové membrány ve vzduchu. Diamantová membrána byla cíleně připravena se zvýšeným podílem  $sp^2$  fáze ( $\geq 7\%$ ).

Metoda přístupu zdola-nahoru využívá principu selektivní tvorby či odleptání zárodečné (nukleární) vrstvy, která je základem dalšího růstu diamantu. V dokumentu M. Varga, O. Babchenko, P. Bauerova, K. Hruska, V. Jurka, A. Kromka, et al., Fabrication of 3D diamond membranes for microfluidic systems, in: NANOCON 2014 6th Int., TANGER LTD, Kltickova 62, Ostrava 710 00, Czech Republic, 2015: pp. 556-562. je k vytvoření vzoru použit standardní litografický proces, kde zárodečná vrstva byla řízeně odstraněna chemickou cestou. V dokumentu M. Domonkos, T. Ižák, L. Štolcová, J. Proška, P. Demo, A. Kromka, Structuring of diamond films using microsphere lithography, Acta Polytech. 54 (2014) 320-324, doi:10.14311/AP.2014, 54.0320. se vyu-

živá samo-organizující vrstvy polystyrenových kuliček, které sloužily jako maska pro plazmatické reaktivní leptání zárodečné vrstvy.

V poslední době se studuje příprava strukturovaných diamantových vrstev, zejména porézních, dle předdefinované struktury substrátu. V dokumentu M. Marton, M. Vojs, M. Kotlár, P. Michniak, L. Vančo, M. Veselý, et al., Deposition of boron doped diamond and carbon nanomaterials on graphite foam electrodes, Appl. Surf. Sci. 312 (2014) 139-144. doi: 10.1016/j.apsusc.2014.05.199 byl jako vzor porézní struktury využit materiál tvořený uhlíkovou pěnou. V dokumentu C. Hébert, E. Scorsone, M. Mermoux, P. Bergonzo, Porous diamond with high electrochemical performance, Carbon. 90 (2015) 102-109. doi: 10.1016/j.carbon.2015.04.016. byly použity skleněná vlákna nukleovaná vodivým polymerem. Použití samo-uspořádané struktury tvořené SiO<sub>2</sub> kuličkami bylo použito v dokumentu F. Gao, C. E. Nebel, Diamond-Based Supercapacitors: Realization and Properties, ACS Appl. Mater. Interfaces. (2015). doi: 10.1021/acsami.5b07027.

Obecnou nevýhodou metod shora-dolů a zdola-nahoru je technologická náročnost přípravy porézní podložky s definovanou pórovitostí. Pro porézní podložky se jeví nejschůdnější cesta růstu dle předdefinované struktury substrátu. Zde jsou hlavními problémy mechanická a teplotní stabilita porézního substrátu, tj. křehkost uhlíkové pěny a teplotní nestabilita zejména u polymerních vláken. V případě skleněných vláken je to nukleační proces, kdy je třeba zajistit homogenní distribuci diamantových nanočástic s co nejvyšší hustotou. Využívá se elektrostatických sil mezi diamantovými nanočásticemi a vodivým polymerem, který se nanese na skleněná vlákna. U samo-uspořádaných struktur je problémem difúzní limit růstových částic z plazmatu. Řešení tohoto omezení bylo nalezeno v metodě postupného přerůstání a opakování samo-uspořádávajícího vzoru, který má však pro svojí náročnost limitované využití.

#### Podstata technického řešení

Předkládané technické řešení řeší problémy degradace anorganických nanovláken (SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub>, WO<sub>3</sub>, CeO<sub>2</sub>, a jiné) nanovláken chemickým působením prostředí, zvýšení biokompatibility nanovláken a definované a časově stabilní povrchové terminace.

Degradace nanovláken se projevuje snížením mechanické pevnosti a pružnosti, a samonosné kompaktnosti vedoucí až k jejich rozpadnutí.

Degradace nanovláken se dále může projevovat v nedefinované bio-odezvě kultivovaných buněk. Povrch vodíkově terminovaných nanovláken je časově nestabilní.

Uvedené problémy jsou řešeny pomocí samonosné porézní podložky a homogenní distribuce nanočástic diamantu na jejím povrchu, přičemž samonosná porézní nanotkanina obsahuje anorganické nanovláčka.

Ke zvýšení chemické stability anorganických oxidových nanovláken (SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, TiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub>, WO<sub>3</sub>, CeO<sub>2</sub>, a jiné) dále jejich biokompatibility, dále jejich definované chemicky-stabilní povrchové terminace se v tomto technickém řešení používá diamantová tenká vrstva. Pro zlepšení efektivnosti procesu se pro nanášení diamantu na nanotkaninu používá metoda chemické depozice z par plynů v mikrovlnném plazmatu.

Ve výhodném provedení je porézní nanotkanina homogenně pokryta nanočásticemi diamantu ve vodní disperzi roztoku obsahujícím nanočástice diamantu, které tvoří nukleační centra.

V dalším výhodném provedení probíhá chemická depozice z par plynů v mikrovlnném reaktoru na nukleačních nanodiamantových centrech. Výsledkem depozice je homogenní a hermetické pokrytí nanovláken tenkou diamantovou vrstvou, tj. samonosná diamantová porézní podložka.

Velikost pórů lze regulovat primární maticí nanovláken a tloušťkou diamantové vrstvy, tj. jejím dorůstáním se zmenšuje velikost pórů.

Uvedené technické řešení vede k zlepšení parametrů nanovláken a následně k významnému zlepšení chemické odolnosti nanovláken, regulovatelné smáčivosti povrchu nanovláken, kontrolované elektrické vodivosti nanovláken, zvýšení biokompatibility nanovláken, zachování porézní mor-

fologie podložky, snížení ekonomické a ekologické náročnosti výroby samonosné porézní diamantové podložky v důsledku snížení počtu technologických kroků a kratšího času depozice diamantových vrstev.

5 Technické řešení bude dále objasněno pomocí výkresů a příkladů provedení, které nesmí být interpretovány jako omezení nárokovaného rozsahu.

#### Objasnění výkresů

Obr. 1 představuje fotku SiO<sub>2</sub> nanovláknenné vrstvy po depozici diamantové vrstvy (velikost vzorku 1 x 2,5 cm<sup>2</sup>), tj. samonosné diamantové porézní podložky.

10 Obr. 2 představuje morfologii originální SiO<sub>2</sub> nanovláknenné vrstvy (bez úprav) zobrazenou pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu.

Obr. 3 představuje snímek z rastrovacího elektronového mikroskopu zobrazující morfologii diamantové porézní podložky. Jako substrát byla použita nukleovaná SiO<sub>2</sub> nanovláknenná vrstva.

Obr. 4 představuje Ramanovo spektrum samonosné diamantové porézní podložky.

15 Obr. 5 představuje fluorescenční snímky endotelových HSVEC buněk na povrchu porézní, kyslíkově terminované (smáčivý povrch), diamantové podložce. Rozdílné intenzity buněk a ostrost jsou způsobeny morfologií povrchu a tím pádem i rozdílnou rovinou polohy buněk ve vzorku.

Obr. 6 představuje fluorescenční snímky endotelových HSVEC buněk na povrchu porézní, vodíkově terminované (nesmáčivý povrch) diamantové podložce.

#### Příklady uskutečnění technického řešení

##### 20 Příklad 1

Pro technické řešení popsané v tomto příkladu jsou použity p-dopované křemíkové substráty Si (100), které byly očištěny v izopropylalkoholu a v ultrazvukové vaně po dobu 15 minut. Jako vzor pro porézní strukturu byla použita nanovláknenná vrstva tvořená SiO<sub>2</sub> nanovláknny připravená 25 metodou elektrostatického zvlákňování. SiO<sub>2</sub> nanovláknenná vrstva byla nukleována vodní disperzí diamantového nanoprášku velikosti 5 nm. Diamantová porézní podložka (viz Obr. 1) byla připravena metodou chemické depozice z plynné fáze v mikrovlnném plazmatickém reaktoru. Depozice probíhala v systému s fokusovanou plazmou s následujícími parametry: MW výkon 3 kW, tlak 5 kPa, pracovní směs 1,5 % CH<sub>4</sub> v H<sub>2</sub> (300 sccm), teplota tkaniny cca 700 °C, délka depozice: 1 a 2 h.

30 Na Obr. 2 jsou zobrazeny referenční snímky z rastrovacího elektronového mikroskopu SiO<sub>2</sub> nanovláknenné vrstvy (bez úprav), ze kterých byla určena průměrná velikost vláken 220 až 230 nm. Poměr délky jednotlivých vláken k jejich průměru je min. řádově 1/1000.

35 Na Obr. 3 je vidět struktura nanovláknenné vrstvy po depozici diamantu, tj. samonosné diamantové porézní podložky. Tenká vrstva diamantu kopíruje primární morfologii SiO<sub>2</sub> vláken. Obrázek 3a ukazuje, že byla zachována primární struktura nanovláknenné vrstvy. Detail jednotlivých vláken pokrytých diamantovou vrstvou je vidět na Obr. 3b. Jednotlivá vlákna v celém zobrazeném objemu jsou rovnoměrně pokryta diamantovou vrstvou. Z toho lze usuzovat na rovnoměrné rozložení diamantových částic s vysokou nukleační hustotou.

40 Obrázek 4 ukazuje Ramanovo spektrum porézní podložky (viz Obr. 1 anebo Obr. 3). Ostré maximum na pozici 1332 cm<sup>-1</sup> prokazuje diamantový charakter připravené porézní podložky.

##### Příklad 2

Biokompatibilita samonosné diamantové porézní podložky byla prokázána kultivací endotelových buněk.

45 Pro kultivaci buněk byly použity vzorky samonosné diamantové porézní podložky, tj. porézní SiO<sub>2</sub> nanotkanina pokrytá tenkou diamantovou vrstvou. Samonosná diamantová porézní podložka byla terminována buď vodíkem anebo kyslíkem (Obr. 3). Jako referenční vzorky byly pou-

žity diamantové tenké vrstvy, jedna terminovaná vodíkem a druhá terminovaná kyslíkem. Kyslíková terminace uvedených vzorků byla realizována v kyslíkové plazmě s následujícími parametry: RF výkon 45 W, tlak 500 Pa, průtok O<sub>2</sub> 13 sccm, délka procesu 60 s.

Vzhledem k povaze vzorků byla použita sterilizace UV zářením po dobu 30 minut z obou stran. Na vzorky byly nasazeny endotelové buňky HSVEC v hustotě 27 tis./kultivační jamku, rozměr kultivační jamky 1,7 cm<sup>2</sup>. Kultivační médium EGM-2 (Endothelial Cell Growth Medium), které je optimalizované pro růst endotelových buněk. Kultivace buněk probíhala staticky ve dvou časových intervalech, 24 hodin a 72 hodin. Kratší interval 24 hodin byl zvolen pro ověření adheze buněk na podložky. Delší 72 hodinový interval poskytuje informaci o proliferaci buněk a o cytotoxicitě vzorků a o možném použití pro dlouhodobou buněčnou kultivaci.

Po kultivaci byly vzorky s buňkami opláchnuty PBS a nabarveny pomocí kitu Live/Dead cytotoxicity/viability assay, který živé buňky obarví zeleně a mrtvé buňky červeně. Následná viabilita buněk je vyhodnocena jako procento živých buněk.

Obrázek 5 zobrazuje fluorescenční snímky endotelových HSVEC buněk kultivovaných na povrchu porézní diamantové podložky terminované kyslíkem (smáčivý povrch). Statická kultivace byla prováděna po dobu 24 hodin. Rozdílné intenzity fluorescence a ostroty buněk jsou způsobeny morfologií povrchu a v důsledku toho i rozdílnou rovinou polohy buněk ve vzorku. Na Obr. 6 jsou zobrazeny fluorescenční snímky endotelových HSVEC buněk kultivovaných na povrchu porézní vodíkové terminované (nesmáčivý povrch) diamantové podložky.

Z Obr. 5 a 6 je zřejmé, že endotelové buňky HSVEC lépe adherují a proliferují na kyslíkově terminovaném povrchu samonosné porézní diamantové podložky. Hydrofilní charakter kyslíkové terminace poskytuje lepší podmínky pro adhezi buněk z buněčné suspenze. Statická kultivace po dobu 24 hodin na vzorku terminovaném vodíkem vykazovala výrazně nižší schopnost buněk adheze a následné proliferace.

Uvedený výsledek demonstruje nejen vhodnost porézní samonosné diamantové podložky pro kultivaci buněk, ale i kontrolovanou atomární a chemickou terminaci povrchu potvrzující její multifunkčnost.

#### Průmyslová využitelnost

Technické řešení samonosných porézních podložek mohou být využity pro kultivaci buněk.

30

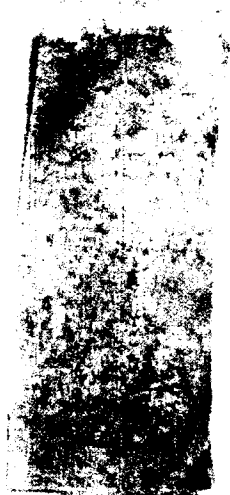
## N Á R O K Y   N A   O C H R A N U

1. Multifunkční porézní nanovlákná podložka, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že povrch je pokryt nanočásticemi uhlíku.
2. Multifunkční porézní nanovlákná podložka podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že nanočástice uhlíku jsou ve formě izolovaných diamantových nanočástic.
- 35 3. Multifunkční porézní nanovlákná podložka podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že nanočástice uhlíku jsou ve formě kompaktní diamantové tenké vrstvy.
4. Multifunkční porézní nanovlákná podložka podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že nanočástice uhlíku jsou ve formě izolovaných diamantových nanočástic a kompaktní diamantové tenké vrstvy.
- 40 5. Multifunkční porézní nanovlákná podložka podle nároku 1 nebo 2 nebo 3 nebo 4, **v y z n a ě u j í c í s e**, kombinací více vrstev nanovláken.
6. Multifunkční porézní nanovlákná podložka podle nároku 5, **v y z n a ě u j í c í s e**, kombinací různých typů materiálů nanovláken.

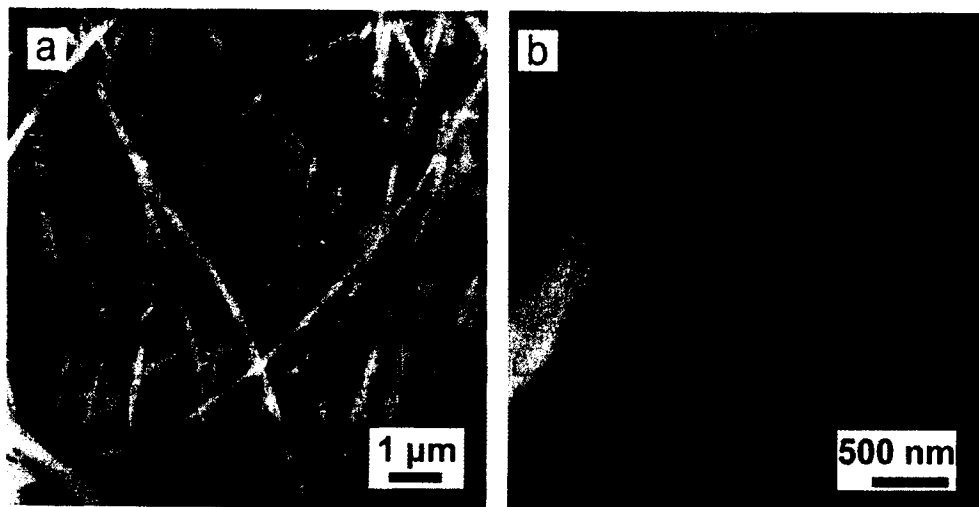
4 výkresy

45

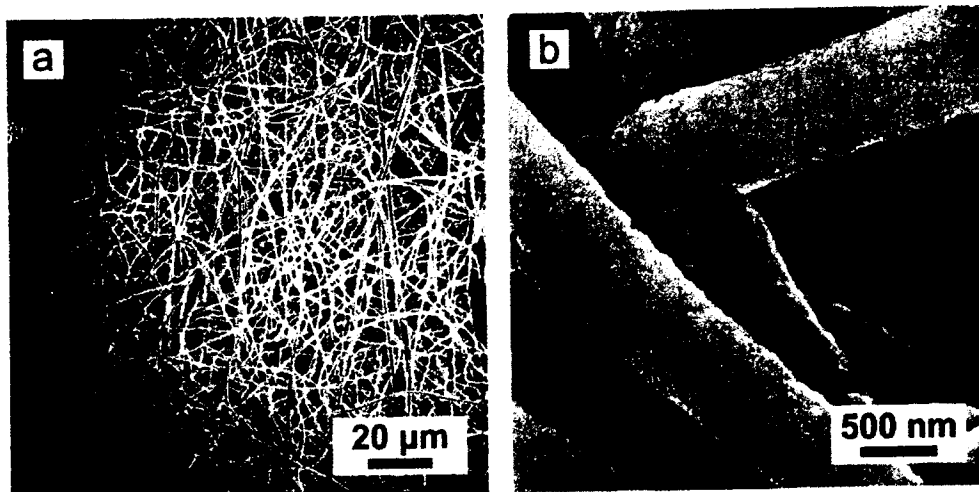
Výkresy:



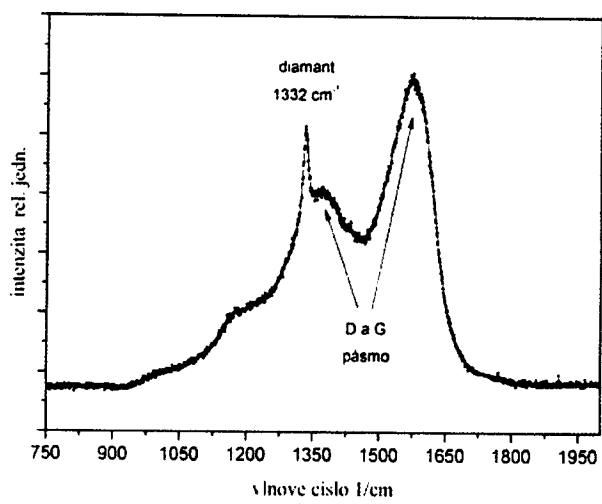
Obr. 1



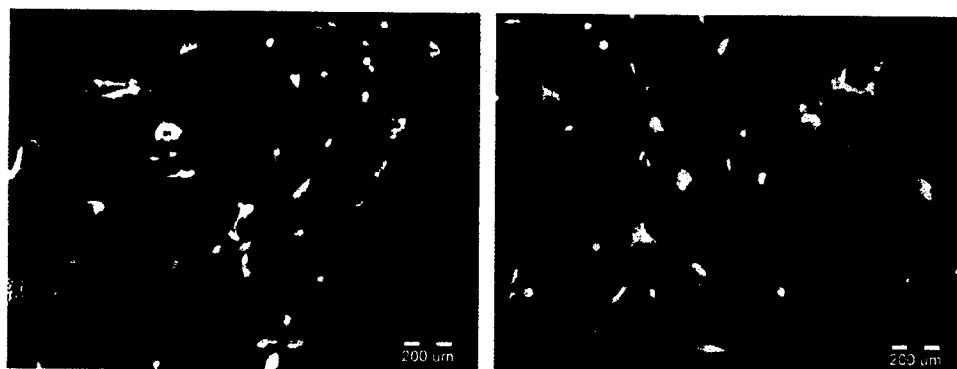
Obr. 2



Obr. 3.

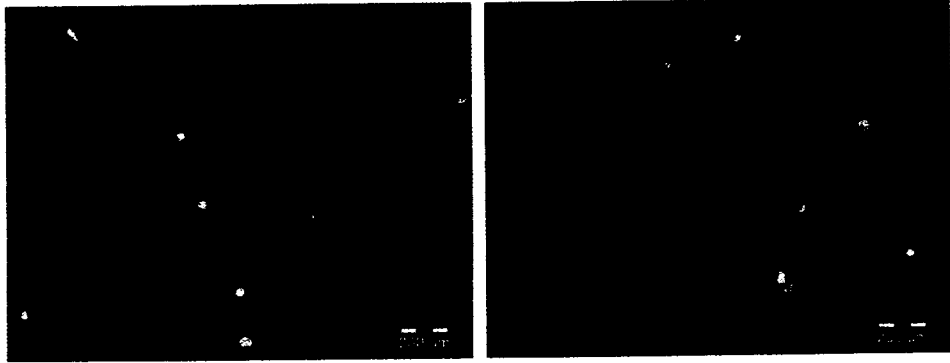


Obr. 4.



Obr. 5.





Obr. 6.

Konec dokumentu