



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**  

---

**FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ**  
**Katedra přírodovědných oborů**

**Zlepšení vlastností DLC pokrytí implantátů  
při užití hybridní laserové technologie a  
dopace germaniem**

**Improvement of DLC implant coating using  
hybrid laser technology and germanium  
dopation**

Diplomová práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika  
Studijní obor: Přístroje a metody pro biomedicínu

Autor diplomové práce: Bc. Jana Kondratievdvá  
Vedoucí diplomové práce: Prof. Ing. Miroslav Jelínek, DrSc.  
Konzultant: Ing. Tomáš Kocourek, Ph.D.

---

**Kladno 2019**

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem „Zlepšení vlastností DLC pokrytí implantátů při užití hybridní laserové technologie a dopace germaniem“ vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k diplomové práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 Zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně 16. 5. 2019

.....

Bc. Jana Kondratievdv

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu prof. Ing. Miroslavu Jelínkovi, DrSc. za vedení práce a spolupráci, ale také za trpělivost, cenné rady a připomínky k mé diplomové práci. Dále bych poděkovala Ing. Tomášovi Kocourkovi, Ph.D. za konzultaci, výpomoc a spolupráci v laboratoři při experimentech, a Ing. Janu Remsovi, Ph.D. za užitečné komentáře a připomínky. Také bych chtěla poděkovat paní Mgr. Mariia Lunové, Ph.D. za poskytnutí biologických testů. V neposlední řadě bych poděkovala CTU Grant Agency za jejich podporu grantem SGS18/157/OHK4/2T/17.

## **ABSTRAKT**

### **Zlepšení vlastností DLC pokrytí implantátů při užití laserové technologie a dopace germaniem**

Diamantu podobné uhlíkové vrstvy (DLC) dopované germaniem jsou schopné zlepšit biokompatibilitu perspektivních biomedicínských aplikací, včetně krytí implantátů. V této práci jsou shrnuty a diskutovány výhody, současný stav techniky a zkušenosti s vrstvami GeDLC. Tyto vrstvy jsou připravovány metodou duální pulzní laserové depozice (PLD). Je prezentováno uspořádání a podmínky depozice germania pomocí PLD s využitím KrF laseru z germaniového terče. Připravili jsme 5 vzorků. Vrstvy germania byly nanášeny na křemíkové (Si) podložky. Povrchy a morfologie 5 vzorků byly analyzovány mechanickým profilometrem (Alphastep IQ – KLA-Tencor) a mikroskopií atomárních sil (AFM) (Solver NEXT – NT-MDT) v kombinaci s optickým mikroskopem. Dále byly deponovány vrstvy GeDLC na taveném křemenu o různých koncentracích germania metodou duální PLD s použitím dvou terčů (uhlíkový a germaniový). Vrstvy byly charakterizovány metodami rastrovací elektronové mikroskopie (SEM), vlnově disperzní spektroskopie (WDS), tloušťka a drsnost povrchu mechanickým profilometrem (Alphastep IQ – KLA-Tencor). Na závěr byl proveden test in-vitro biokompatibility.

### **Klíčová slova**

Germanium, Diamantu podobný uhlík, duální PLD

## **ABSTRACT**

### **Improvement of DLC implant coating using hybrid laser technology and germanium dopation**

GeDLC layers are capable of improving the biocompatibility of biomedical applications, including implant coverage. Advantages and present state of art and experiences with GeDLC layers are summarized and discussed. These layers were prepared by the dual PLD method. PLD deposition and deposition conditions using KrF laser and one target (germanium) are presented. Five samples were prepared. The germanium layers were deposited on silicon substrates. Surfaces and morphology of 5 samples were analyzed by a mechanical profilometer (Alphastep IQ – KLA-Tencor) and atomic force microscopy (AFM) in combination with an optical microscope. Furthermore, layers of GeDLC were deposited on Si and FS substrates of different concentrations of germanium by dual PLD with two targets (graphite and germanium). The layers were characterized by SEM, WDS, thickness and surface roughness by mechanical profilometer (Alphastep IQ – KLA-Tencor). Finally, an in-vitro biocompatibility test was performed.

### **Keywords**

Germanium, Diamond-like carbon, dual PLD

# Obsah

<b>Seznam symbolů a zkratk</b> .....	<b>9</b>
<b>Seznam obrázků</b> .....	<b>10</b>
<b>Seznam tabulek</b> .....	<b>11</b>
<b>1 Úvod</b> .....	<b>12</b>
1.1 Přehled současného stavu.....	13
1.1.1 Diamantu podobný uhlík.....	13
1.1.2 Germanium jako dopant.....	14
1.1.3 Germanium a zdraví.....	14
1.1.4 Germanium + DLC.....	15
1.2 Cíle práce.....	16
<b>2 Metody</b> .....	<b>17</b>
2.1 Metody přípravy vrstev.....	17
2.1.1 Pulzní laserová depozice.....	17
2.1.2 Experimentální komponenty PLD.....	17
2.1.3 Mechanismus PLD.....	18
2.1.4 Duální pulzní laserová depozice PLD.....	19
2.2 Charakterizační metody.....	19
2.2.1 Rastrovací elektronový mikroskop.....	19
2.2.2 Vlnová disperzní spektroskopie.....	21
2.2.3 Mikroskopie atomárních sil.....	25
<b>3 Experimenty</b> .....	<b>27</b>
3.1 Experiment 1 – Depozice vrstev germania metodou PLD.....	27
3.1.1 Depozice.....	27
3.1.2 Morfologie, topologie.....	28
3.2 Výpočet parametrů potřebných pro depozici GeDLC vrstev.....	28
3.3 Experiment 2 – Depozice GeDLC vrstev metodou duální PLD.....	30
3.3.1 Depozice.....	30
3.3.2 Měření povrchu vrstev, tloušťky a drsnosti.....	32
3.3.3 Morfologie, složení.....	32
3.3.4 Příprava buněčné kultury.....	32

3.3.5	Test životaschopnosti buněk.....	32
<b>4</b>	<b>Výsledky.....</b>	<b>34</b>
4.1	Experiment 1 – Stanovení růstu germania .....	34
4.1.1	Tloušťka, drsnost a morfologie .....	34
4.1.2	Homogenita .....	36
4.1.3	Topologie.....	38
4.2	Výsledky výpočtu parametrů potřebných pro depozici GeDLC vrstev .....	39
4.2.1	Výpočet rychlosti růstu vrstev germania.....	39
4.2.2	Výpočet počtu pulzů a opakovacích frekvencí pro různé koncentrace germania .....	39
4.3	Experiment 2 – Stanovení koncentrace, cytotoxicity.....	42
4.3.1	Depoziční podmínky + WDS a drsnost.....	43
4.3.2	Rychlost růstu, drsnost a morfologie.....	43
4.3.3	Složení .....	44
4.3.4	In vitro biokompatibilita.....	44
<b>5</b>	<b>Diskuse.....</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>49</b>
	<b>Seznam použité literatury .....</b>	<b>51</b>

# Seznam symbolů a zkratk

## Seznam symbolů

Symbol	Jednotka	Význam
Z		Protonové číslo
H		Vodík
Li		Lithium
Be		Beryllium
Si		Křemík
FS (SiO <sub>2</sub> )		Oxid křemičitý
FBS		Fetal Bovine serum
PI		Propidium jodid
Ra	mm	Střední aritmetická úchylka profilu

## Seznam zkratk

Zkratka	Význam
DLC	Diamantu podobný uhlík (Diamond-like carbon)
Ge	Germanium
GeDLC	Diamantu podobný uhlík dopovaný germaniem
PVD	Physical Vapor Deposition
CVD	Chemical Vapor Deposition
PLD	Pulzní laserová depozice (Pulsed laser deposition)
RF-PECVD	Plasma-enhanced chemical vapor deposition
KrF	Krypton-Fluor
XPS	Rentgenová fotoelektron. spektroskopie (X-ray photoelectron spectroscopy)
AFM	Mikroskopie atomárních sil (Atomic Force microscopy)
SPM	(Scanning probe microscopy)
SEM	Rastrovací elektronový mikroskop (Scanning Electron microscopy)
WDS	Vlnová disperzní spektroskopie (Wavelength dispersive spectroscopy)
WDX	Vlnová disperzní rentgenovská spektroskopie (Wavelength dispersive X-ray spectroscopy)
EDX	Energetický disperzní rentgenovský spektrometr (Energy Dispersive X-ray Analysis)
EMPA	Electron Probe X-ray Microanalysis
at. %	Atomární procento
ppb	Parts per billion
ppm	Parts per milion
IR	Infračervený
UV	Ultrafialový
ROS	Reactive Oxygen Species



## Seznam obrázků

Označení	Název	Strana
1.1.1.1	Modifikované schéma dopantů pro DLC	13
2.1.2.1	Schéma PLD	18
2.1.4.1	Schéma duální PLD	19
2.2.1.1	Schéma interakcí elektronu s tenkým vzorkem	20
2.2.2.1	Braggův zákon	23
2.2.2.2	Schéma WDS	25
2.2.3.1	Působení cantileveru na povrch vzorku	26
3.1.1.1	Pohled do vakuové komory – nastavení pro metodu PLD (vlevo), germaniový terč (vpravo)	27
3.3.1.1	Dva lasery využité pro duální PLD (vlevo), vakuová komora (vpravo)	31
3.3.1.2	Pohled do vakuové komory – nastavení pro metodu duální PLD (uchycené dva terče)	31
4.1.1.1	Profil tloušťky vzorku Ge 1 (3 J/cm <sup>2</sup> )	35
4.1.1.2	Profil tloušťky vzorku Ge 2 (2 J/cm <sup>2</sup> )	35
4.1.1.3	Profil tloušťky vzorku Ge 5 (1 J/cm <sup>2</sup> )	36
4.1.2.1	Optický mikroskop – vrstva germania (Ge 1 – 3 J/cm <sup>2</sup> )	36
4.1.2.2	Optický mikroskop – vrstva germania (Ge 2 – 2 J/cm <sup>2</sup> )	37
4.1.2.3	Optický mikroskop přiblížení – vrstva germania (Ge 2 – 2 J/cm <sup>2</sup> )	37
4.1.3.1	AFM, oblast 50×50 μm (Ge 5 – 1 J/cm <sup>2</sup> )	38
4.1.3.2	AFM, oblast 50×50 μm (Ge 5 – 1 J/cm <sup>2</sup> ), 3D zobrazení	38
4.3.2.1	SEM fotografie DLC vrstev dopovaných germaniem, zvětšeno 400x. <b>a)</b> 0 at. % <b>b)</b> 1 at. % <b>c)</b> 2,5 at. % <b>d)</b> 5 at. % <b>e)</b> 9 at. % <b>f)</b> 12 at. % Ge v DLC	43
4.3.4.1	Životaschopnost buněk Huh7 na různých substrátech Ge po 5 dnech kultivace. <b>(A)</b> Buňky byly obarveny propidium jodidem (PI, červený) pro stanovení životaschopnosti buněk. Jádra byla kontrastně zbarvena Hoechstovou modří. Buňky byly zobrazeny pomocí epifluorescenčního mikroskopu IM-2FL (Optika Italy). Zobrazeny jsou reprezentativní snímky. Jako pozitivní kontrola byly buňky ošetřeny 20% ethanolem po dobu 60 minut	44

# Seznam tabulek

Označení	Název	Strana
3.1.1.1	Depoziční parametry pro PLD	27
3.3.1.1	Depoziční parametry pro duální PLD	30
4.1.1.1	Výsledné hodnoty (tloušťka, drsnost)	34
4.2.1.1	Výsledné vypočítané hodnoty rychlosti růstu vrstev germania	39
4.2.2.1	Výsledné hodnoty počtu pulzů a opakovací frekvence pro konečnou tloušťku 100 nm o koncentracích 1 a 3 at.% Ge v DLC, O.F. – Opakovací frekvence, žluté označení = optimální hustota energie vzhledem k morfologii a rychlosti růstu vrstvy	41
4.2.2.2	Výsledné vypočítané hodnoty počtu pulzů a opakovací frekvence pro konečnou tloušťku 100 nm o koncentracích 5 a 7 at.% Ge v DLC, O.F. – Opakovací frekvence, žluté označení = optimální hustota energie vzhledem k morfologii a rychlosti růstu vrstvy	41
4.2.2.3	Výsledné vypočítané hodnoty počtu pulzů a opakovací frekvence pro konečnou tloušťku 100 nm o koncentracích 10 a 12 at.% Ge v DLC, O.F. – Opakovací frekvence, žluté označení = optimální hustota energie vzhledem k morfologii a rychlosti růstu vrstvy	42
4.2.2.4	Výsledné vypočítané hodnoty počtu pulzů a opakovací frekvence pro konečnou tloušťku 100 nm o koncentracích 20 at.% Ge v DLC, O.F. – Opakovací frekvence, žluté označení = optimální hustota energie vzhledem k morfologii a rychlosti růstu vrstvy	42
4.3.1.1	Depoziční podmínky: Koncentrace germania obsaženého v DLC, drsnost GeDLC vrstev připravených metodou PLD. Tloušťka vrstev cca 160 nm. Laser 1 – hustota energie 8 J/cm <sup>2</sup> , velikost spotu 2 x 1 mm <sup>2</sup> . Laser 2 – hustota energie 1.5 J/cm <sup>2</sup> , velikost spotu 4 x 1.5 mm <sup>2</sup>	43

# 1 Úvod

Obor nanotechnologie je v posledních letech velmi zkoumán a tato vědní oblast tvoří obrovskou část pokroku. Jedním z mnoha typů úspěchu je využití oboru nanotechnologie v implantologii. Využití nano vrstev v pokrývání implantátů, které slouží jako náhrady původních kloubů, zubů či jako cévní náhrady v organismu, nese obrovský potenciál v biomedicině. Implantáty pokryté nano vrstvou či souborem nano vrstev představují velký úspěch v přijetí a snášenlivosti těchto náhrad.

Jedním z materiálů, který se v této oblasti používá, je diamantu podobný uhlík (DLC, neboli diamond-like carbon). DLC má skvělé kvality a vlastnosti v pokrývání implantátů. Jednou z jeho kvalit je jeho vysoká biokompatibilita s prostředím v lidském těle.

Ovšem i tyto vlastnosti mohou být vylepšeny pomocí přísad tzv. dopantů. Do dnešní doby bylo vyzkoušeno mnoho dopantů. Jedním, který se zda být nadějný, je germanium, proto se v této studii zaměříme na vytvoření nano vrstev DLC dopovaných germaniem pomocí metodou pulzní laserové depozice (PLD). Dále budou tyto nano vrstvy charakterizovány. Jednou z hlavních charakteristik je vždy v tomto oboru implantologie zkouška biokompatibility a toxicity.

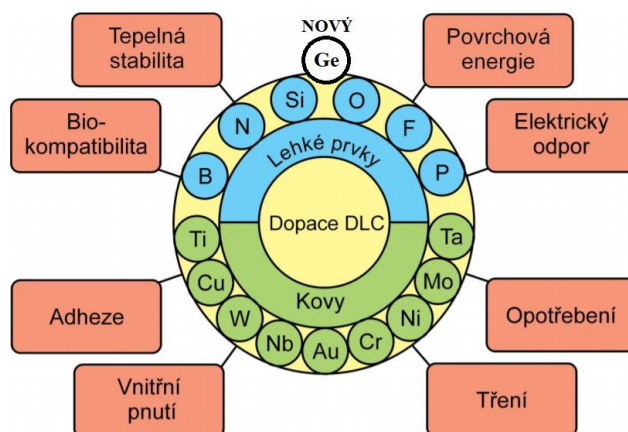
V této práci se tedy zabýváme studiem vlastností germania s následným vytvořením vrstev germania. Dalším bodem je již výše zmíněná dopace germaniem vrstev DLC. V konečné části práce jsou tyto vrstvy podrobeny zkouškám in vitro biokompatibility, kde se ukáže, zda germanium zlepšuje vlastnosti diamantu podobného uhlíku a jestli je možné tento prvek jakožto dopant používat v pokrývání implantátů.

## 1.1 Přehled současného stavu

### 1.1.1 Diamantu podobný uhlík

Vrstvy DLC, které jsou metastabilní amorfni uhlíkové vrstvy disponující mnoha vynikajícími vlastnostmi pro využití v mnoha oblastech. DLC se intenzivně používá pro potahování implantátů. DLC vrstvy mají potenciální využití v kardiovaskulárních oblastech pro pokrytí a zlepšení hemokompatibility protetických ventilů, stentů, umělých přístrojů pro srdce a plíce, v ortopedických oblastech pro implantaci bederních a kolenních implantátů, v očních oblastech pro zlepšení funkce čoček a pro konformní obal lékařských a chirurgických nástrojů.

Dopanty (přidavné prvky) ve vrstvách DLC způsobují změny tvrdosti, součinitele tření, drsnosti povrchu, adhezi a dokonce i ovlivňují biokompatibilitu. Vlastnosti mnoha navrhovaných prvků, využitě jako dopanty byly úspěšně testovány a charakterizovány [1]. Prvky jsou znázorněny na obrázku níže.



Obr. 1.1.1.1: Modifikované schéma dopantů pro DLC [2]

Čisté tenké vrstvy DLC nebo dopované vrstvy diamantu podobné uhlíku mohou být připraveny mnoha způsoby. Můžeme je připravit modifikací povrchu materiálu např. (teplem, oxidací) nebo je můžeme nanášet tzv. deponovat. Depoziční metody máme fyzikální (Physical Vapor Deposition – PVD) nebo chemické (Chemical Vapor Deposition – CVD). Jedním typem z fyzikálních metod je metoda pulzní laserová depozice PLD, kde je veden laserový svazek do vakuové komory, kde je připevněn terč s daným materiálem, který chceme deponovat na podložku, která je upevněna kolmo na terč v určité vzdálenosti. Pokud ovšem chceme deponovat vrstvy DLC s přidavným

dopantem, je nutné užít metodu duální pulzní laserové depozice. Zde jsou do vakuové komory vedeny dva svazky dvou laserů, kdy jeden svazek dopadá na terč DLC a druhý na terč s dopantem. Plazma vzniklé po překročení ablačního prahu obou materiálů dopadá na jednu podložku. Zde pak roste tenká vrstva DLC s příměsí dopantu [1].

### 1.1.2 Germanium jako dopant

Čisté germanium je polovodič s podobným vzhledem jako elementární křemík. Stejně jako křemík, germanium přirozeně reaguje a vytváří v přírodě komplexy s kyslíkem. Na rozdíl od křemíku je příliš reaktivní a nachází se přirozeně na Zemi ve volném (elementárním) stavu [3]. Teplota tání je 1211,40 K (938,25 °C). Až do třicátých let se považovalo germanium za špatně vodivý kov [4].

Za standardních podmínek je germanium křehkým, stříbřitě bílým polokovovým prvkem [5].

### 1.1.3 Germanium a zdraví

Germanium není považováno za důležitý prvek pro živý organismus. Některé složité organické sloučeniny germania jsou zkoumány jako možné léčivé přípravky, ačkoli se zatím žádný z nich ještě neprokázal jako úspěšný. Podobně jako křemík a hliník, přírodní sloučeniny germania mají tendenci být nerozpustné ve vodě a mají proto malou orální toxicitu. Syntetické rozpustné germaniové soli jsou však nefrotoxické a syntetické chemicky reaktivní sloučeniny germania s halogeny a vodíkem jsou dráždivé látky a toxiny [6]. Germanium se vyskytuje v lidském těle o koncentraci 71,4 ppb. Biologická role germania není známa, i když stimuluje metabolismus. V roce 1980 bylo tvrzeno, že germanium hraje určitou roli na našem zdraví, ale tvrzení nebylo prokázáno. Germanium může interferovat s enzymy, jako je laktát a alkohol dehydrogenáza. Organické sloučeniny germania jsou více toxické než anorganické sloučeniny germania. Závažná otrava germaniem může způsobit smrt, způsobenou respirační paralýzou [7].

Na druhou stranu se ukazuje, že i přes závažné obavy o naše zdraví se germanium používá ke zlepšení srdečních a cévních stavů, včetně vysokého krevního tlaku, vysokého cholesterolu a srdečních chorob, pro zlepšení očních onemocnění, včetně glaukomu a katarakty, zlepšení jaterních chorob, včetně hepatitidy a jaterní cirhózy. Někteří lékaři předepisují germanium při osteoartróze, revmatoidní artritidě, bolesti, osteoporóze, a také při onemocnění AIDS. Germanium se také používá ke zvýšení oběhu krve do mozku, podporuje imunitní systém a také se užívá jako antioxidant. Germanium může také působit protizánětlivým účinkem [4]. Ačkoliv bylo germanium dosud relativně málo zkoumané, nebyla zatím pozorována významná cytotoxicita [8]. Bylo však prokázáno, že produkty germania mohou představovat potenciální riziko pro lidské

zdraví [9]. Proto byly provedeny důkladné testy biokompatibility vyráběných materiálů. Studie se prováděly na úrovni buněk za použití odlišných buněčných linií. Navíc byly sledovány parametry krátkodobé buněčné smrti. GeDLC vrstvy byly připraveny mnoha způsoby, většinou pomocí RF-PECVD [10]. V našem případě se použije duální PLD.

#### **1.1.4 Germanium + DLC**

Nové výsledky ukazují, že vrstvy GeDLC mají lepší mechanické vlastnosti (vysokou tvrdost, vysokou trvanlivost, nízké napětí, nízkou absorpci, širokopásmovou IR průhlednost, variabilní refrakční index od 1,7 do 4) a dobrou přilnavost [8]. GeDLC vrstvy byly vyrobeny pomocí dvou KrF excimer laserů v metanové atmosféře při pokojové teplotě [9]. Vlastnosti vrstev byly měřeny rentgenovou fotoelektronovou spektroskopií (XPS) a metodou mikroskopie atomárních sil (AFM). Výsledky ukazují, že uhlíkové atomy jsou začleněny do germaniové mřížky a vytváří GeDLC slitinu pro koncentrace pod 10 at%, kde jsou atomy germania rovnoměrně rozloženy [10]. Vícevrstvé filmy GeDLC byly také připraveny na substrátu germania ultrafialovým laserem [11]. Vrstvy byly charakterizovány metodami pro zjištění tloušťky a tvrdosti vrstev, XPS a SEM. Tvrdost vrstev GeDLC byla vyšší než 48,1 GPa, což je téměř stejné jako u čistého filmu DLC. Mezitím ve srovnání s čistým filmem DLC se kritické zatížení filmu GeDLC na substrátu germania zvyšuje ze 71,6 mN na 143,8 mN. Navíc film GeDLC se po zkouškách stálosti nezměnil. Stejná skupina také připravila vrstvy GeDLC s různými koncentracemi germania za použití PLD [12].

Ze studia literatury vidíme, že GeDLC filmy mohou být slibný materiál pro širokou škálu aplikací, včetně biomedicíny. Nýbrž studie vlastností u vyšších koncentrací germania nebyly provedeny. Proto budeme provádět fyzikální a biokompatibilní studie vrstev GeDLC. Tyto vrstvy budou pak studovány několika metodami (studium rychlosti růstu, drsnosti, morfologie, složení, přesnosti a biologických vlastností (cytotoxicity, adheze) vrstev o koncentraci germania od 0 at. % do 12 at. %.

## 1.2 Cíle práce

Cílem této práce bude prostudovat vlastnosti germania, zejména to jak tento prvek může působit na organismus. Prvním krokem bude vytvořit vrstvy germania metodou PLD při různých hodnotách hustoty energie laserového svazku charakterizovat je. Na základě těchto charakteristik bude proveden výpočet optimálních depozičních parametrů pro přípravu dopovaného DLC germaniem o koncentraci od nuly až cca 20 at. %. Druhým bodem této práce bude vytvořit vrstvy DLC dopované germaniem metodou duální PLD o různých koncentracích germania. Tyto GeDLC vrstvy budou studovány pomocí charakterizačních metod. Získané výsledky budou zhodnoceny a prodiskutovány.

## 2 Metody

### 2.1 Metody přípravy vrstev

#### 2.1.1 Pulzní laserová depozice

Pulzní laserová depozice je depoziční technika, která používá vysokoenergetický UV excimerový laser, jehož svazek je fokusován na terč a díky tomu dochází k ablaci (odpařování) látky obsažené v terči. Odpařovaný materiál se kvůli vysoké hustotě energie záření převede do tzv. plasmového obláčku, který putuje směrem k podložce, která je umístěna v dané vzdálenosti od terče. Na podložce dochází k následné kondenzaci. Rychlost růstu vrstvy je ovlivněna vlastnostmi laserového svazku.

Pulzní laser, kterého tato metoda využívá, je takový laser, který nevydává záření v kontinuálním režimu, nýbrž ve formě krátkých optických impulzů [13].

U metody PLD se nejvíce využívá, již výše zmíněný, excimerový laser. Tento laser využívá excitované dimery, jež jsou nestabilní molekuly, které vznikají pouze na přechodnou dobu na základě vzájemného působení excitovaného atomu (molekuly) s atomem (molekulou) v základním stavu. Tento dimer nemůže vzniknout, pokud jsou oba dva atomy (molekuly) v základním stavu [13].

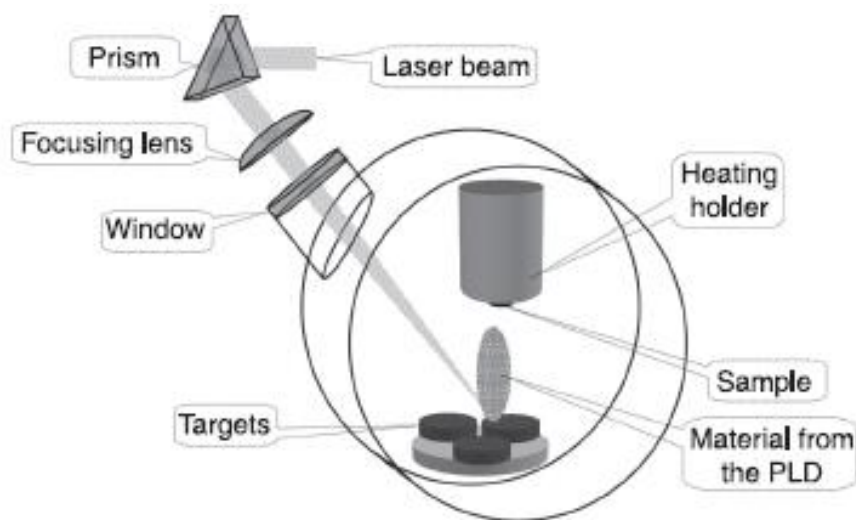
Postup přípravy vrstev metodou PLD je možné rozdělit do tří fází. První děj, který nastává, je absorpce fotonu laserového svazku terčem a následné odpařování povrchové vrstvy terče. Interakce typu laser-terč-podložka je složitý jev, kde teoretický popis kombinuje rovnovážné i nerovnovážné procesy děje. Interakce fokusovaného laserového svazku s terčem přivodí vznik odpařovaného materiálu o vysokém tlaku v blízké vzdálenosti terče. Odpařený zahřátý materiál představuje rychle rozpínající se plyn malého objemu s vysokým tlakem. Přechod plynu materiálu terče nastává v okamžiku odpařování materiálu. Vzniklý tzv. obláček terčového materiálu expanduje k povrchu terče a dále adiabaticky expanduje směrem do prostoru k podložce. Druhým dějem je přechod ablovaných částic materiálu terče. Tyto částice tvarují plazmový obláček kolmo k povrchu terče směrem k podložce. Při putování materiálu směrem k podložce dochází k rozdělení rychlostí a energií částic, které zásadně ovlivňují strukturu, stechiometrii a tloušťku vrstvy. Třetí fází procesu přípravy vrstev metodou PLD je kondenzace ablovaných částic na povrchu podložky a následný růst vrstvy [14].

#### 2.1.2 Experimentální komponenty PLD

Mezi základní komponenty experimentu metodou pulzní laserové depozice patří vakuová komora, fokusační optika, držáky terče a podložek umístěné v komoře, materiál terče a laser. Laserový svazek vedený přes fokusační optiku je směřován do vakuové komory na terč. Zde se díky vysoké hustotě energie (překonán ablační práh) materiál terče



převede do formy plazmového obláčku a poté kondenzuje na podložce, která je umístěna v dané vzdálenosti od terče [14,15].



Obr. 2.1.2.1: Schéma PLD [1]

### 2.1.3 Mechanismus PLD

Mechanismus, který vede k ablaci materiálu, závisí na parametrech laseru, optických, termodynamických a topologických vlastnostech terče. Na povrchu terče se absorbuje laserové záření, které zapříčiňuje elektronovou excitaci a poté ji převádí do tepelné, chemické a mechanické energie, která způsobí ablaci. Částice obsažené v plazmovém obláčku tvoří směsi atomů, molekul, iontů, elektronů, klastrů a pevných částic. Plazmový obláček pak dále expanduje směrem od terče k podložce [14].

Další charakteristikou pulzní laserové depozice je, že odpařený materiál dopadá na substrát (podložku) během několika mikrosekund po každém nanosekundovém impulzu laseru, přičemž frekvence laseru je obvykle mezi 1 až 10 Hz [16].

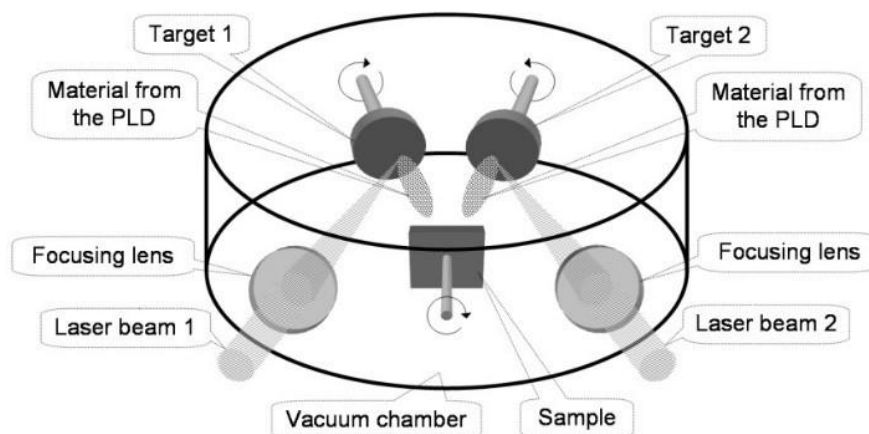
Jak bude vrstva vypadat, resp. její tloušťka a plocha, ovlivňují mnohé parametry a interakce, jako jsou parametry laseru (vlnová délka, opakovací frekvence, délka impulzu), hustota energie svazku, materiálové vlastnosti terče, druh a tlak plynu využit během depozice, vzdálenost terč-podložka a vlastnosti podložky (teplota a tepelná vodivost podložky, mřížkové parametry) [14].

**Výhody:** Stechiometrické depozice vícesložkových materiálů, vysoká rychlost depozice (1 nm/s), jednoduchost, nízká spotřeba materiálu terče, nízké teploty, možnost vytváření vícevrstevných struktur a čistý lokální ohřev povrchu terče (snižuje zanesení vrstev)

**Nevýhody:** Špatné homogenní pokrytí větších ploch 5 až 10 cm, deponovaný povrch vrstvy může obsahovat tzv. kuličky

### 2.1.4 Duální pulzní laserová depozice PLD

Duální PLD se od klasické pulzní laserové depozice liší tím, že využívá dva laserové svazky vedené do vakuové komory. Zatímco u metody PLD jsme nanášeli vrstvu odevzdanou z jednoho terče, u duální PLD nanášíme dva různé materiály na jednu podložku. Dva laserové svazky, vycházející ze dvou laserových zařízení, jsou fokusovány na příslušné terče, kdy z jednoho terče je vypařovaný materiál transportován na podložku a z druhého terče (materiálově odlišný od prvního terče) je vypařovaný materiál také přenášen na tu samou podložku. Zde oba dva materiály kondenzují a vytvářejí vrstvu. Parametry vrstvy jsou ovlivněny stejnými vlastnostmi jako u jednoduché pulzní laserové depozice [1].



Obr. 2.1.4.1: Schéma duální PLD [1]

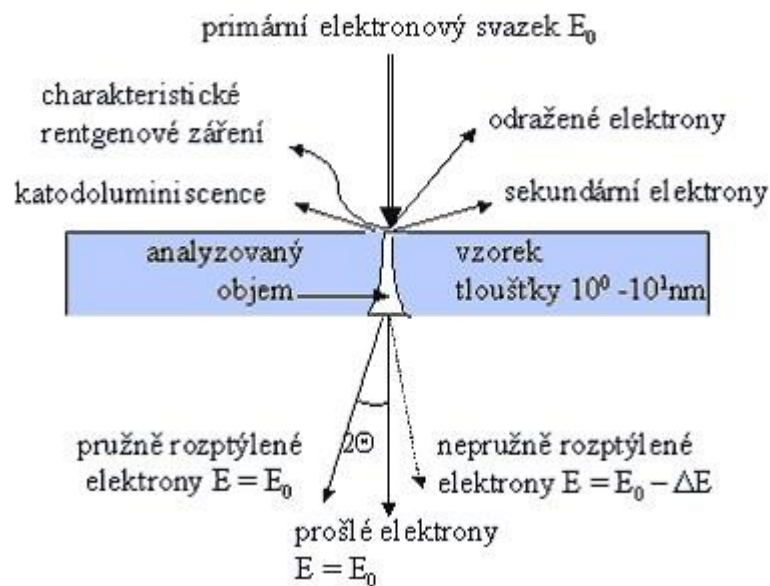
## 2.2 Charakterizační metody

Po vytvoření daných tenkých vrstev GeDLC o různých koncentracích je nutné určit jejich vlastnosti určující jejich vhodnost pro praktické využití. Pro kvantitativní a kvalitativní analýzu jsme využili metod mikroskopických, a to rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM) a mikroskopu atomárních sil (AFM). Jako součást SEM jsme využili metody WDS ke stanovení složení a rozložení prvků ve vzorku, tedy v našich připravených vrstvách.

### 2.2.1 Rastrovací elektronový mikroskop

Rastrovací elektronový mikroskop SEM (z angl. Scanning electron microscopy) je jedním z nejuniverzálnějších přístrojů pro sledování a analýzu mikrostrukturálních charakteristik pevných látek a jejich povrchů. Jde o charakterizační analytickou metodu,

kteřá používá urychlené elektrony dopadající na zkoumaný vzorek, které s látkou vzorku interagují. Elektronový svazek, který na vzorek dopadá, se může odrazet, absorbovat nebo procházet. U SEM využíváme odražených a sekundárních elektronů, které mají energii až desítky eV, charakteristického rentgenového záření a prošlých elektronů. Při průchodu hmotou se elektrony nejen rozptylují, ale také ztrácejí při srážkách s atomy část své energie. Po průchodu svazku vzorkem se mohou elektrony pružně a nepružně rozptýlovat, kde se u prošlých a pružně rozptýlených elektronů energie svazku nemění. U nepružně rozptýlených elektronů se část energie předá atomu a kinetická energie klesá. Řada zdrojů informací v SEM (jako např. Rentgenové záření a Augerovy elektrony), poskytnou důležité údaje o složení vzorku nejenom v jeho objemu, ale zejména v blízkosti povrchu. U energií elektronů užívaných při mikroanalýze (5 až 50 keV) dosahují elektrony rychlostí, které se blíží rychlosti světla. Elektrony urychlené vysokým napětím emitované tryskou jsou soustřeďovány do úzkého svazku pomocí elektronových čoček, vychylované cívkami a pak svazek paprsků skenuje povrch vzorku, řádek po řádku. Obraz se tedy vytváří, bod po bodu [17,18].



**Obr. 2.2.1.1:** Schéma interakcí elektronu s tenkým vzorkem [14]

SEM tedy využívá sekundárních elektronů, které jsou emitované z povrchu. Intenzita a úhel emise závisí na morfologii povrchu a na materiálu. Zesílení SEM je asi max.  $250\,000\times$ . Má dobré příčné a vertikální rozlišení ( $3 - 6 \text{ nm}$ ). Elektronový mikroanalýzátor, který využívá detekce a spektroskopie charakteristického rentgenového záření jako zdroj informace, je výkonným přístrojem pro elementární analýzu malých objemů. Vzorek je analyzován většinou nedestruktivně a přístroj umožňuje studovat i rozložení koncentrace prvků po ploše. Přesnost stanovení chemického složení činí obvykle 1% až 2% z celkového obsahu stanoveného prvku. SEM slouží i k zobrazování

trojrozměrných preparátů s vysokým rozlišením a s velkou hloubkou ostrosti. Zvětšení u SEM je dáno poměrem délek stran obrazovky a rastrovacího obdélníku na vzorku. Pohybuje se v rozmezí 20 až 200 000. Rastrovaný obdélník na vzorku má stranu cca jeden mikrometr [17,18].

V rastrovacím elektronovém mikroskopu volíme jako odezvu na excitaci primárními elektrony buď pomalé sekundární elektrony, nebo rychlé elektrony pružně odražené. Po jejich detekci vhodným detektorem je vzniklým elektrickým signálem modulován jas elektronového paprsku dopadajícího na obrazovku. Emise sekundárních elektronů je citlivá na povrchovou topografii, lokální elektrické a magnetické pole a na chemickém složení. Pružně odražených elektronů je možné využít například ke sledování povrchových nerovností.

Čím je úhel dopadu primárního svazku vzhledem k normále pozorované plošky menší, tím je emise sekundárních elektronů silnější a ploška na obrazovce se jeví světlejší [19].

## 2.2.2 Vlnová disperzní spektroskopie

Vlnová disperzní spektroskopie WDS (z angl. Wavelength dispersive spectroscopy) je analytická nedestruktivní metoda, využívaná v oblasti rentgenové mikroanalýzy, která je široce používána v elektronové mikroskopii pro stanovení složení a rozložení prvků ve vzorku. Při tzv. „bombardování“ elektronů v atomu, dochází ke změně stavu elektronů, za současného vyzáření charakteristického rentgenového záření, kde tyto paprsky jsou charakteristické pro dané prvky ve vzorku. Jednou z těchto metod je právě metoda WDS, která rozděluje rentgenové paprsky pomocí difrakce, vzniklé krystalem, výběrem jedné vlnové délky. WDS má výborné rozlišení a citlivost pro detail ve sledování stopových prvků, také tato metoda umožňuje provádění kvantitativních a kvalitativních analýz. Při kvalitativní analýze je možno identifikovat prvky, vypsát chemické značky prvku a vypsát energie a vlnové délky jednotlivých charakteristických rentgenových čar.

Přínos metody WDS je především ve vědě o materiálech, ve studiích o mikrostrukturách slitin nebo je vhodná také ke zkoumání distribuce iontů v buňkách a tkáních. Nástroj pro užití rentgenové disperzní spektroskopie je často součástí SEM, kde se pak používá k získání přesných chemických analýz zkoumaného prvku. Abychom mohli použít emitované rentgenové záření jako nástroj mikroanalýzy, musíme ho rozložit na spektrum. Tento rozklad se nejčastěji provádí podle vlnových délek WDX (Wavelength Dispersive X-ray Analysis) nebo energií vybuzeného rentgenového záření EDX. Nejlepší analýzy jsou na rovných površích. Citlivost u WDX je 100 ppm a 1000 ppm pro energetickou disperzní analýzu (EDX). Podélné nebo hloubkové rozlišení je asi 1 mikrometr. Technika má malou citlivost pro lehké prvky zabudované v těžkých maticích. Tyto dvě metody spadají do analýzy EMPA (Electron Probe X-ray

Microanalysis), která užívá elektrony k excitaci rentgenového záření, které je poté právě analyzováno v závislosti buď na energii EDX, nebo na vlnové délce WDX [18,20,21].

Elektronový mikroskop je obdobou optického mikroskopu s tím rozdílem, že optické čočky jsou nahrazeny elektromagnetickými čočkami a místo fotonů jsou ke zkoumání objektu použity elektrony. U rozlišovací schopnosti optického mikroskopu platí, že nejmenší vzdálenost dvou objektů, kterou lze pod mikroskopem ještě rozpoznat, je polovina vlnové délky použitého světelného záření. Mez rozlišovací schopnosti optického mikroskopu je téměř 200 nm. Vlnové délky urychlených elektronů jsou o mnoho řádů menší než vlnové délky fotonů viditelného světla, proto má elektronový mikroskop mnohem vyšší rozlišovací schopnost. Jedním z typů elektronových mikroskopů je SEM. Zde jsou elektrony emitovány wolframovou katodou, urychlovány kladným napětím 5 – 50 kV a elektronovou optikou jsou fokusovány do úzkého svazku dopadajícího na vzorek. Vychylovací čočky řádkovacího systému svazek elektronů rozmítají po pozorované oblasti povrchu, kde svazek přejíždí oblast bod po bodu a řádek po řádku. U tohoto typu volíme jako odezvu na excitaci primárními elektrony buď pomalé sekundární elektrony, nebo rychlé elektrony pružně odražené [19].

SEM má rozlišovací schopnost až 20 – 25 nm a hloubkovou ostrost i 300× větší než optické mikroskopy. Hloubkové rozlišení závisí na počtu detekovaných částic. Nejbližše k povrchu vznikají sekundární elektrony, pružně rozptýlené elektrony přinášejí informaci z hloubek řádu  $10^2$  nm. Emise sekundárních elektronů je citlivá na povrchovou topografii, lokální elektrické a magnetické pole a na chemickém složení. Pružně odražených elektronů lze využít ke sledování povrchových nerovností. S tímto elektronovým mikroskopem je metoda WDS používána [19].

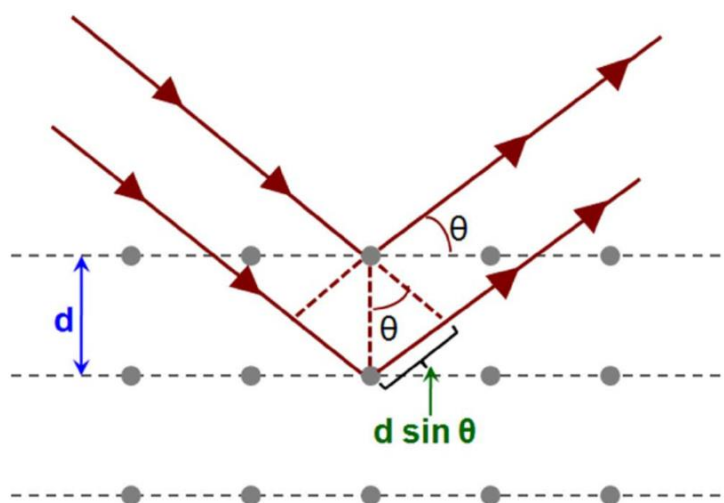
Z historického hlediska můžeme považovat, za vznik a možnost uskutečnit tuto metodu, objevení rentgenového záření v roce 1895 německým fyzikem W. C. Röntgenem (1845 – 1923), když studoval výboje v plynech. Zjistil, že při dopadu katodového záření (urychlené elektrony pomocí elektrického pole) na kovovou anodu, kde vzniká záření, které proniká předměty. Röntgen provedl mnoho pokusů, kde jeden z nich provedl údajně na své ženě, kdy vytvořil první rentgenový snímek její ruky. Za tento objev dostal v roce 1901 první Nobelovu cenu za fyziku. Díky tomuto objevu bylo možno vyvinout mnoho přístrojů fungujících na principu rentgenového záření [22].

Samotná analýza WDS ve spojení se SEM zahrnuje 4 kroky, které musí být dodrženy pro získání optimálních výsledků. V prvním kroku je svazek elektronů urychlován v elektronovém sloupci SEM na dostatečnou energii pro generaci charakteristického rentgenového záření při dopadu na vzorek. V druhém kroku jakmile je rentgenové záření generováno ze vzorku a dopadající pod specifickým úhlem  $\theta$  na specifický krystal (používají se různé vzdálenosti krystalických mřížek). U vlnově disperzní analýzy nelze jedním typem difrakčního krystalu pokrýt celý vlnový rozsah cca  $10^{-1}$  až  $10^1$  nm. Proto bývají mikroskopy vybaveny až čtyřmi spektrometry a krystaly LiF (lithiumfluorid),

PET (pentearythrit), RAP (rubidiumftqalát) a PbSt (steatit olova), pokrývajícími vlnový rozsah od 0,08 nm do 9 nm. Dále se lomí pouze část rentgenových paprsků splňujících Braggovu difrakční podmínku a na detektor dopadá záření o jedné vlnové délce. Braggův zákon je vyjádřen takto

$$n \cdot \lambda = 2d \cdot \sin(\theta) \quad (2.2.2.1)$$

kde  $n$  je řád interference,  $\lambda$  je vlnová délka,  $d$  je vzdálenost meziatomových rovin a  $\theta$  je difrakční úhel [18,21].



Obr. 2.2.2.1: Braggův zákon [23]

Ve třetím kroku, kdy rentgenové paprsky specifických vlnových délek dopadají na detektor, musí být dodržena geometrie umístění tří hlavních komponentů. Vzorek, krystal a detektor musí být situovány do tzv. Rowlandova kruhu, podstatným pro efektivní zaostření rentgenového záření. Vzhledem k tomu, že vzorek je fixně upevněn, tudíž i úhel vzniklého rentgenového záření je neměnný, tak analytický krystal a detektor se musí vůči sobě pohybovat. Kromě toho se krystal také otáčí. Detektory používané pro spektroskopii jsou nejčastěji plynoměrové proporční typy, kde rentgenové paprsky vstupují do detektoru přes kolimátor a tenké okno, následně jsou absorbovány atomy plynu a potom je vyražen fotoelektron každým atomem absorbující foton. V posledním kroku jsou porovnávány intenzity dopadajícího záření na detektor podle známých hodnot požadovaných prvků. Také musí být intenzity rentgenového záření korigovány pro maticové účinky spojené s atomovým číslem ( $Z$ ), absorpcí ( $A$ ) a fluorescencí ( $F$ ).

Pomocí této metody se tedy detekují atomy s vyšším atomovým číslem větší než 5 a umožňuje kvantitativní (realizovatelné pro prvky s atomovými čísly většími než 11) i kvalitativní analýzu vzorku. Kvantitativní analýzu určuje poloha spektrálních čar

charakteristického rentgenového záření, která je charakteristická pro určitý prvek, nezávisí však na tom, zda emitující prvek je ve volném stavu, nebo je vázán v nějaké sloučenině. Podle polohy příslušné rentgenové čáry můžeme tedy určit typ emitujícího atomu. Citlivost této metody je 100 ppm [18,21].

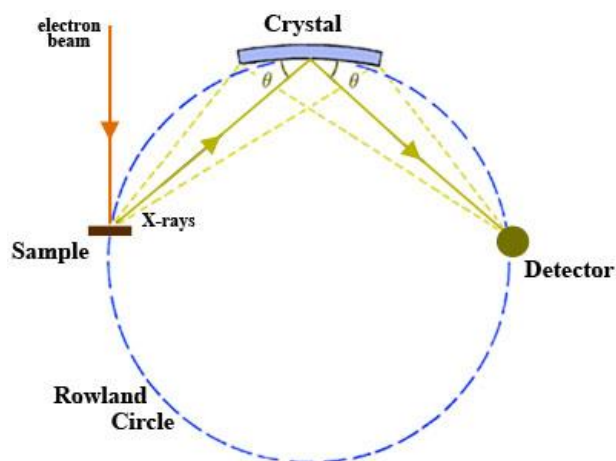
Porovnáme-li metodu WDS s metodou EDX, liší se především dobou snímání, dobou vyhodnocení, detekovatelností a studiem prvků. Energeticky disperzní analýza EDX je méně časově náročná a celé energetické spektrum obsáhne v relativně krátkém čase, a je možné studovat prvky o protonovém čísle větším nebo rovno 11. Zatímco vlnově disperzní spektroskopie WDS je časově náročnější, umožňuje detekovat prvky o protonovém čísle větším nebo rovno 4. Tudíž je tato metoda citlivější a obsáhne i prvky s protonovým číslem menším než 11, a také pořízené spektrum pomocí WDS už nepotřebuje další zpracování, nýbrž už takto poskytuje kvalitní analýzu. Proč můžeme pomocí těchto metod studovat právě prvky s těmito protonovými čísly, je dáno vlastním detektorem rentgenového záření. Tento detektor může pracovat ve dvou režimech. Jedním režimem je tzv. „s okénkem“, kdy je detektor oddělen od prostoru komory a umožňuje detekovat prvky s  $Z \geq 11$ . U druhého režimu „bez okna“ (spojen s komorou), je možnost detekovat prvky rozšířena o dusík, kyslík a uhlík, tedy detekuje prvky s  $Z \geq 6$  [18].

Oblast, ve které se generuje rentgenové záření, připomíná svým tvarem „hrušku“, přičemž intenzita emitovaného záření je soustředěna do blízkosti středu tohoto tvaru. Množství vzniklých rentgenových kvant je dáno účinným průřezem  $\sigma$ , kde pro nejdůležitější hladinu K přibližně platí číselný vztah

$$\sigma = 7,9 \times 10^{-14} \times \ln\left(\frac{W_o/W_{kr}}{W_o \times W_{kr}}\right) \quad (2.2.2.2)$$

kde  $W_o$  je energie primárního svazku (proniká přibližně do hloubky 1 mikrometru,  $W_{kr}$  je energie potřebná na ionizaci K hladiny a  $\sigma$  je účinný průřez [18].

Jak už bylo řečeno, tato metoda poskytuje kvantitativní a kvalitativní analýzu. Tato metoda může také sloužit pro tak zvané „mapování“ neboli ke kvantitativní plošné analýze. Pomocí rentgenového mikro analyzátoru můžeme získat také informaci o plošném rozložení jednotlivých prvků sledovaného objektu. Tohoto zobrazení dosáhneme tak, že při nastavení spektrometru na požadovaný prvek, snímá paprsek sondy po řádcích vybranou plochu a výstupní signál detektoru moduluje intenzitu katodového paprsku obrazovky, synchronizovaného s pohybem elektronového svazku sondy. Místa s vysokou koncentrací prvku budou při zobrazení nejsvětlejší, šedá místa budou odpovídat koncentraci nižší a černá pak místům, kde požadovaný prvek není [18].



Obr. 2.2.2.2: Schéma WDS [21]

### Výhody WDS

- 1) nedestruktivní kvantitativní analýza bodů vzorku krátkých vzdáleností (několik mikrometrů)
- 2) pracuje velmi dobře s přírodními i pevnými syntetickými materiály jako jsou minerály, sklo, polovodiče nebo kovy
- 3) vysoké prostorové rozlišení a vysoká citlivost na stopové prvky [20,21]
- 4) vzniklé spektrum pořízené pomocí WDS je velmi kvalitní, pro analytické účely už nevyžaduje další zpracování [23]

### Nevýhody WDS

- 1) nedokáže kvantifikovat prvky s atomovým číslem menším než 5 (H, Li, Be)
- 2) nelze získat informaci o hmotnosti prvku (= využití hmotnostní spektrometrie) [21]

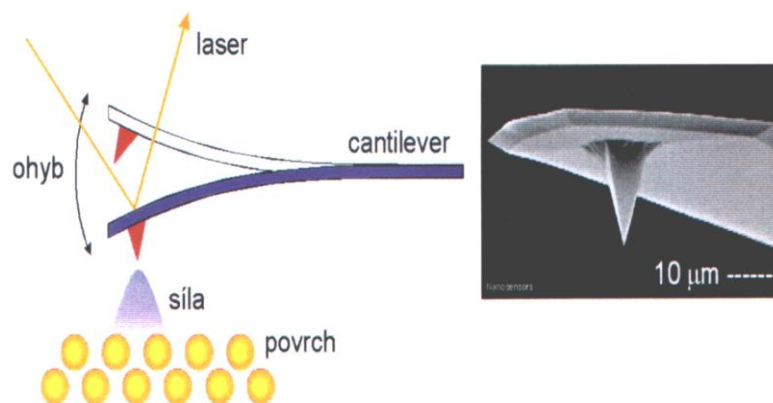
## 2.2.3 Mikroskopie atomárních sil

Mikroskopie atomárních sil AFM (z angl. Atomic force microscopy) se zabývá především studiem povrchu. Některé SPM (Scanning probe microscopy) techniky se zabývají i mechanickými vlastnostmi. Jde o takové vlastnosti, které určitým způsobem ovlivňují praktické využití daného vzorku a co se týče aplikace nanotechnologií, tak zde jsou klíčové [24].

AFM metoda je nejrozšířenější technikou ze skupiny mikroskopů s rastrující sondou SPM. Je založena na snímání polohy malé sondy, která je udržována v těsné blízkosti povrchu, pohybující se v pravidelném rastru po povrchu. Mechanismy detekce se ovšem u různých SPM technik liší. V případě AFM jde o detekci síly působící mezi sondou a povrchem. Pro pohyb sondy se využívá piezoelektrických převodníků, které poskytují



sub-nanometrové rozlišení. Nejčastěji se detekuje síla mezi hrotem a povrchem při využití deformace pružného držáku hrotu, zvaným „cantilever“, a detekce této deformace je pomocí laserového svazku. Pro citlivost této metody je ovšem podstatné, aby tuhost cantileveru byla co nejmenší v rozmezí 0,1 až 100 N/m. Cantilever je zhotoven z křemíku nebo nitridu křemíku, a jeho délka je obvykle  $1,5 \times 10^{-4}$  m a šířka od  $0,5$  až  $5 \times 10^{-6}$  m.



**Obr. 2.2.3.1:** Působení cantileveru na povrch vzorku [14]

Při měření pomocí mikroskopie atomárních sil rozeznáváme několik módů rastrování povrchu v závislosti na tom, jestli se systém hrot-povrch nalézá na odpudivé nebo na přitažlivé části silové závislosti. U AFM vzorek nemusí mít vodivý povrch a na hrot nemusí být vodivý, tudíž lze zobrazovat jak vodiče i izolanty. Klíčovou částí AFM je cantilever s hrotem. Ta musí snímat síly řádu  $10^{-9}$  –  $10^{-8}$  N. Pružina musí přesně sledovat povrch vzorku v průběhu posunu hrotu. Jelikož hrot kmitá při snímání povrchu obvykle s frekvencí několika kHz, měla by být rezonanční frekvence cantileveru vyšší než 10 kHz. V současné době nejrozšířenější systém detekce využívá odrazu laserového svazku od vrchní části cantileveru pokryté zrcadlovou vrstvou a následné analýzy rozložení odraženého záření citlivým detektorem. Měření s AFM může být prováděno ve dvou základních módech. Prvním z nich je kontaktní mód, ve kterém na hrot působí odpudivé síly velmi krátkého dosahu a druhým je nekontaktní mód, ve kterém jsou detekovány přitažlivé síly krátkého, resp. dlouhého dosahu. Bezkontaktní režim měření neumožňuje dosažení tak vysokého rozlišení, jako režim kontaktní. Ačkoli je velmi vhodný pro studium měkkých povrchů a proto je často aplikován pro studium povrchů tenkých organických vrstev (polymerů, LB filmů) a biologických preparátů [25,26].

Hloubkové rozlišení metody AFM je 1 až 2 nm. Atomární rozlišení řádu 0,1 až 0,2 nm lze docílit na hladkých vzorcích. Přístroj je obvykle provozován na vzduchu, ale také může být hrot a vzorek v kapalině. Provoz ve vakuu je možný, ale nebývá běžný.

Po měření pomocí AFM se musí získaná data dále zpracovat a analyzovat. To umožňuje dostupný program Gwyddion [25].

## 3 Experimenty

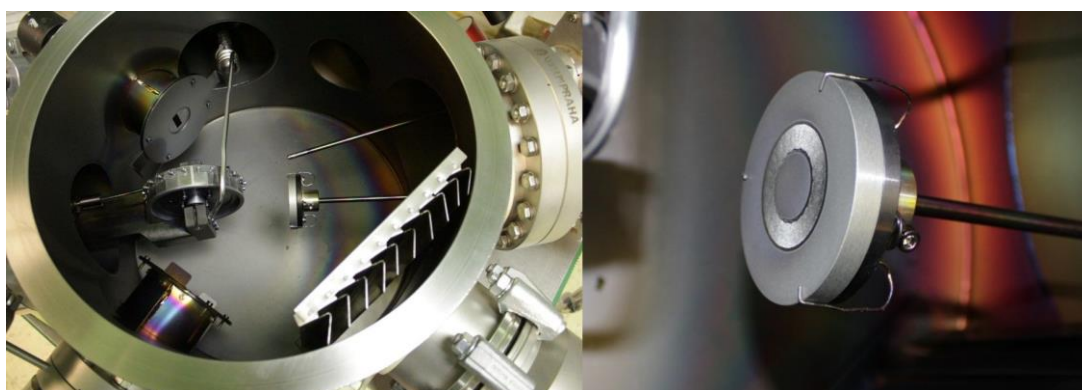
### 3.1 Experiment 1 – Depozice vrstev germania metodou PLD

#### 3.1.1 Depozice

Pomocí metody pulzní laserové depozice se ve vakuové komoře vytvořily germaniové nanovrstvy, zachycené na křemíkových podložkách (čistota 99,99%). Laserový fokusovaný svazek byl veden na germaniový terč, uchycený na rotačním držáku. Využilo se excimerového laseru KrF s vlnovou délkou 248 nm. Křemíkové podložky byly důkladně očištěny v ultrazvukové čističce, acetonem a etalonem. Následně jsem je vysušila. Celkem bylo připraveno 5 podložek, které se postupně vkládaly do vakuové komory (5 depozic). Všechny podložky byly umístěny od terče ve vzdálenosti 45 mm na pevný držák. Samotná depozice byla provedena za pokojové teploty o tlaku vakua  $5 \times 10^{-4}$  Pa v přítomnosti argonu o tlaku 0,25 Pa. Hustota energie laseru se pohybovala v rozmezí od 3 do 1 J/cm<sup>2</sup>. Opakovací frekvence byla nastavena na 10 Hz. Depoziční parametry jsou shrnuty v tabulce níže.

**Tabulka 3.1.1.1:** Depoziční parametry pro PLD

Vzorek	Počet pulzů	Hustota energie (J/cm <sup>2</sup> )	Frekvence (Hz)	Vzdálenost terč-podložka (mm)
Ge 1	7000	3	10	45
Ge 2	10000	2	10	45
Ge 3	10000	1,5	10	45
Ge 4	20000	1,3	10	45
Ge 5	10000	1	10	45



**Obr. 3.1.1.1:** Pohled do vakuové komory – nastavení pro metodu PLD (vlevo), germaniový terč (vpravo). Fotografie: vlastní

### 3.1.2 Morfologie, topologie

Všech 5 vrstev germania bylo nejprve zkoumáno pod optickým mikroskopem s ohledem na jejich homogenitu.

Další metodou, kterou byly dané povrchy germania zkoumány, byla analýza povrchu mechanickým profilometrem (Alphastep IQ - KLA/Tencor). Mechanický profilometr skenoval povrch vrstvy diamantovým hrotem o průměru 5  $\mu\text{m}$  v úhlu 60° se silou hrotu 8,59 mg. Morfologie povrchu byla charakterizována mikroskopií atomárních sil AFM. Toto měření bylo provedeno v dynamickém režimu pomocí špičky HA\_NC na zařízení Solver NEXT (NT-MDT). Byly provedeny skeny o rozměru 50×50  $\mu\text{m}$ , které byly dále zpracovány v softwaru (Gwyddion 2.39).

### 3.2 Výpočet parametrů potřebných pro depozici GeDLC vrstev

Na základě vytvořených vrstev germania o dané tloušťce je potřebné pro další krok experimentu provést několik výpočtů. Nejprve byly určeny hodnoty koncentrací germania obsažených v DLC, které chceme získat (1, 3, 5, 7, 10, 12 a 20 at. % Ge v DLC). Prvním krokem je výpočet rychlosti růstu vrstev. Dále je nutné zjistit hustotu atomu (atom density) a hmotnost jednoho atomu (atomic weight) germania a uhlíku. Podle těchto výpočtů je nyní možné určit hodnotu tloušťky germania a uhlíku v konečné tloušťce 100 nm, počty pulzů a opakovací frekvence pro dané koncentrace. Jednotlivé zkratky počítaných hodnot byly použity pro jednoduchost zápisu.

Výpočet rychlosti růstu (GR):

$$GR = \frac{\text{Tloušťka vrstvy}}{\text{Počet pulzů}} = [\text{nm/pulz}] \quad (3.2.1)$$

Výpočet hmotnosti jednoho atomu uhlíku AWC:

$$AWC = \frac{Ar(C) \times \text{Atomová hmotnostní konstanta}}{10^{-3} [\text{kg}]} = [g] \quad (3.2.2)$$

kde  $Ar(C)$  je relativní atomová hmotnost uhlíku.

Výpočet hmotnosti jednoho atomu germania AWGe:

$$AWGe = \frac{Ar(Ge) \times \text{Atomová hmotnostní konstanta}}{10^{-3} [\text{kg}]} = [g] \quad (3.2.3)$$

kde  $Ar(Ge)$  je relativní atomová hmotnost germania.

Výpočet hustoty atomu uhlíku:

$$\text{Hustota atomu } C = \frac{\text{Hustota } C \text{ [g/cm}^3\text{]}}{AWC} = [\text{cm}^3] \quad (3.2.4)$$

kde  $AWC$  je hmotnost jednoho atomu uhlíku.

Výpočet hustoty atomu germania:

$$\text{Hustota atomu } Ge = \frac{\text{Hustota } Ge \text{ [g/cm}^3\text{]}}{AWGe} = [\text{cm}^3] \quad (3.2.5)$$

kde  $AWGe$  je hmotnost jednoho atomu germania.

Výpočet tloušťky uhlíku pro 100 nm konečné tloušťky vrstvy X:

$$X = \frac{100}{at\% C \times \left( \frac{\text{Hustota atomu } Ge}{\text{Hustota atomu } C} \right) + at\% Ge} \times \left( at\% C \times \frac{\text{Hustota atomu } Ge}{\text{Hustota atomu } C} \right) \quad (3.2.6)$$

kde  $at\% C$  je atomová koncentrace uhlíku,  $at\% Ge$  je atomová koncentrace germania. Výsledek je v jednotkách [nm].

Výpočet tloušťky germania pro 100 nm konečné tloušťky vrstvy Y:

$$Y = 100 - X = [nm] \quad (3.2.7)$$

Výpočet počtu pulzů pro uhlík a germanium pro dané koncentrace:

$$\text{Počet pulzů pro } C = \frac{X}{GR \text{ uhlíku}} \quad (3.2.8)$$

$$\text{Počet pulzů pro } Ge = \frac{Y}{GR \text{ germania}} \quad (3.2.9)$$

Výpočet opakovací frekvence  $f$ :

$$f(Ge) = f(C) \times \frac{\text{Počet pulzů pro } Ge}{\text{Počet pulzů pro } C} = [Hz] \quad (3.2.10)$$

### 3.3 Experiment 2 – Depozice GeDLC vrstev metodou duální PLD

#### 3.3.1 Depozice

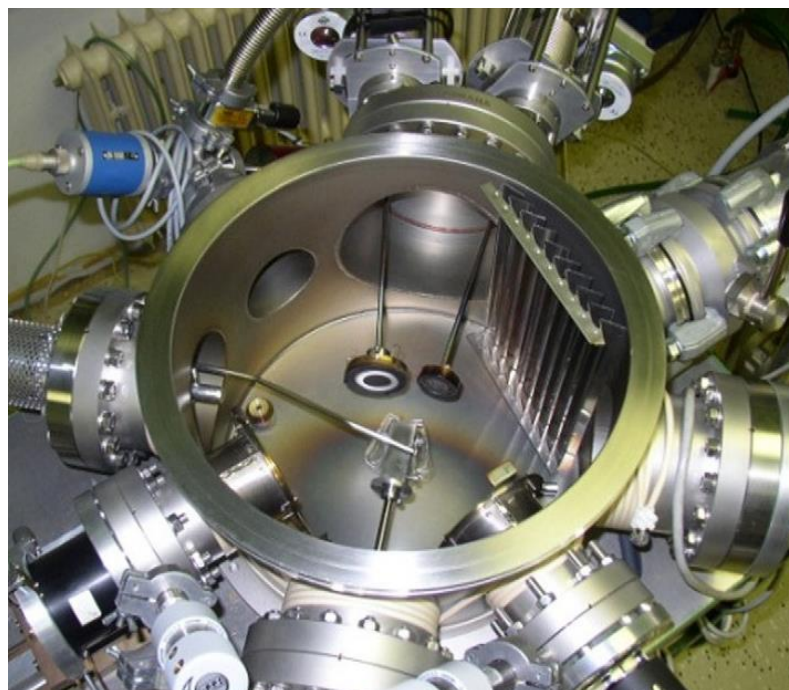
V této části experimentu jsme užili metodu duální PLD k vytvoření nano vrstev GeDLC. Tyto vrstvy byly připraveny užitím dvou excimerových KrF laserů ( $\lambda = 248$  nm,  $\tau = 20$  ns). Toky dvou cílových materiálů byly směřovány na rotující substrát (podložku). Zařízení, které jsme využily, umožňuje jednoduchým způsobem připravit dopované vrstvy s velkou koncentrací dopantu změnou laserové fluence na terče a laserovou opakovací frekvencí. První laserový paprsek (Coherent, Compex Pro) byl fokusován na vysoce čistý uhlíkový terč s hustotou energie  $8 \text{ J/cm}^2$ . Opakovací frekvence byla nastavena v rozmezí 18-26 Hz. Druhý laserový paprsek (Lumonics PM-800) byl fokusován na germaniový terč s hustotou energie  $1,5 \text{ J/cm}^2$  a opakovací frekvenci 1 až 23 Hz. Počet pulsů byl nastaven tak, aby se dosáhlo přibližně stejné tloušťky vrstev. Vzdálenost mezi terči a substrátem je 40 mm. Terče byly rotovány s frekvencí 0,5 Hz. Podložky jsme použili křemíkové Si (99,99%) a z taveného křemene FS ( $\text{SiO}_2$ ). Abychom zvýšili přilnavost vrstev, podložky byly očištěny radiofrekvenčním výbojem před nanášením po dobu 2 min při výkonu 100 W a při tlaku 5 Pa, za užití plynu argonu. Křemíkové substráty byly použity pro studium morfologie a kompozic a tavený křemen byl užit pro biologické testy. Vakuová komora pracovala pod tlakem  $5 \times 10^{-4}$  Pa. Vrstvy byly deponovány v argonové atmosféře (0,25 Pa) za pokojové teploty. Depoziční parametry jsou shrnuty v tabulce 3.2.1.

**Tabulka 3.3.1.1:** Depoziční parametry pro duální PLD

Vzorky	Laser 1 Compex (grafitový terč)			Laser 2 Lumonics (germanium)			Předpokládaná koncentrace Ge v DLC [at. %]
	Hustota energie [ $\text{J/cm}^2$ ]	Počet pulzů	Frekvence [Hz]	Hustota energie [ $\text{J/cm}^2$ ]	Počet pulzů	Frekvence [Hz]	
GeDLC 5 (Si+7×FS)	8	21685	14	1,5	29429	19	20
GeDLC 6 (Si+7×FS)	8	29083	30	1,5	17450	18	10
GeDLC 7 (Si+7×FS)	8	31891	27	1,5	12992	11	7
GeDLC 8 (Si+7×FS)	8	36216	30	1,5	6036	5	3
GeDLC 9 (Si+7×FS)	8	38680	37	1,5	2091	2	1
GeDLC 10 (Si+7×FS)	8	40000	30	1,5	-	-	0



**Obr. 3.3.1.1:** Dva lasery využívané pro duální PLD (vlevo), vakuová komora (vpravo). Fotografie: vlastní



**Obr. 3.3.1.2:** Pohled do vakuové komory – nastavení pro metodu duální PLD (uchycené dva terče) [1]

### 3.3.2 Měření povrchu vrstev, tloušťky a drsnosti

Povrch připravených vrstev byl analyzován mechanickým profilometrem (Alphastep IQ – KLA Tencor) a SEM (JEOL JXA 733). Sken profilometru byl dlouhý 2 mm s rychlostí 50  $\mu\text{m/s}$ . Vzorkovací frekvence byla 50 Hz, rozsah snímače byl 13  $\mu\text{m}$  a stylus síly působil 4,5 mg. Pro výpočet parametrů drsnosti byla využita mezní hodnota 250  $\mu\text{m}$ . Byl použit stylus s poloměrem špičky 5  $\mu\text{m}$  a úhlem 60°. Byly provedeny dva skeny ve dvou kolmých směrech.

### 3.3.3 Morfologie, složení

Morfologie a složení tenkých vrstev GeDLC bylo zjištěno pomocí elektronové mikroskopie SEM (JEOL JXA 733) spolu s využitím vlnové disperzní spektroskopie WDS. Energie primárních elektronů byla držena na 3 keV, aby se minimalizovala jejich penetrační hloubka a absorpce emitovaných rentgenových paprsků. Pro tuto energii bylo odhadnuto, že průměr elektronového bodu je v rozmezí 1 až 2  $\mu\text{m}$  a hloubka asi 0,2  $\mu\text{m}$ , takže příspěvek substrátu může být zanedbán. Přesnost měření Ge a C byla lepší než 5 %.

### 3.3.4 Příprava buněčné kultury

Lidská buněčná linie hepatocelulárního karcinomu (Huh7) získaná z japonské sbírky výzkumných bioreaktorů (JCRB) byla kultivována v médiu EMEM (ATCC) doplněném 10% fetálním bovinním sérem (FBS, Thermo Fisher Scientific) a 0,1 % (v/v) penicilin/streptomycin (Sigma, St. Louis, MO) podle doporučení dodavatele. Kultury byly uchovávány ve zvlhčené atmosféře 5 %  $\text{CO}_2$  při 37 °C a médium bylo měněno jednou týdně [27].

### 3.3.5 Test životaschopnosti buněk

Cytotoxická aktivita sloučenin byla stanovena kvantitativně fluorimetrickým testem s použitím propidiumjodidu (PI) [28].

Biokompatibilita samotných materiálů je klíčovým krokem ve výzkumu materiálů pro biomedicínské aplikace. Nejprve bylo studováno, jak substráty o různých koncentracích germania ovlivňují celkovou rychlost růstu buněk. Náš výzkum byl zaměřen na speciální typ buněk – hepatocyty. Tyto buňky jsou polarizované a specifické, čímž se stávají jedinečně citlivé na infekce [29]. Pro studii byly tedy použity buňky Huh7. Tento typ buněk Huh7 je jedním z nejrozšířenějších modelových systémů in vitro pro studium lidských hepatocytů [30].

Před naočkováním buněk byly všechny experimentální substráty na bázi germania sterilizovány 70% etanolem po dobu 20 minut a následnou ultrafialovou (UV) expozicí po dobu jedné hodiny. Pro všechny buněčné experimenty v této studii byly buňky na sterilizovaných substrátech naočkovány při počáteční hustotě 25000 buněk/ $\text{cm}^2$

a udržovány za standardních podmínek buněčné kultury (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Buňky byly ponechány růstu na substrátech založených na bázi germania po dobu 5 dnů za standardních podmínek buněčné kultury [27]. Když byly buňky v exponenciální růstové fázi, byla mono vrstva jednou promyta fyziologickým roztokem pufovaným fosfátem (PBS) a pak obarvena přidáním 1 ml PI (50 µg/mL) rozdělených do misek po dobu pěti minut ve tmě při pokojové teplotě. Jádra byla kontrastována s Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific). Fluorescenční snímky byly zaznamenány pomocí epifluorescenčním mikroskopem IM-2FL (Optika Microscopes, Ponteranica, Italy).



## 4 Výsledky

### 4.1 Experiment 1 – Stanovení růstu germania

V této části experimentu bylo celkem vytvořeno 5 vrstev germania o různých hodnotách hustoty energie Ge 1 – Ge 5. Tyto vrstvy byly podrobeny testům na zjištění tloušťky, drsnosti a morfologie.

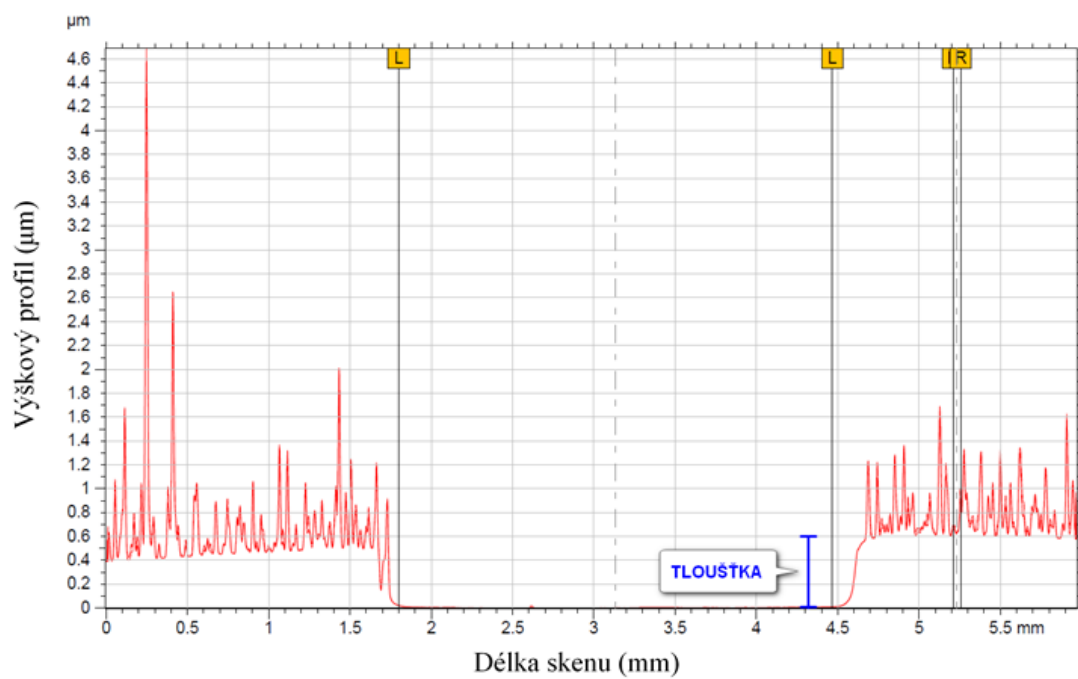
#### 4.1.1 Tloušťka, drsnost a morfologie

Povrchy (tloušťky, drsnosti) všech pěti vzorků byly analyzovány mechanickým profilometrem (Alphastep IQ – KLA-Tencor) s diamantovým hrotem (o poloměru 5  $\mu\text{m}$  pod úhlem 60°) a se silou hrotu 8,59 mg. Morfologie vrstev byla charakterizována mikroskopií atomárních sil (AFM - Solver NEXT – NT-MDT) v dynamickém režimu s hrotem HA\_NC kombinovaná s optickým mikroskopem. Snímky z AFM byly vyhodnoceny pomocí softwaru Gwyddion. Výsledné hodnoty tloušťky a drsnosti jsou zapsány v tab. 4.1.1.1.

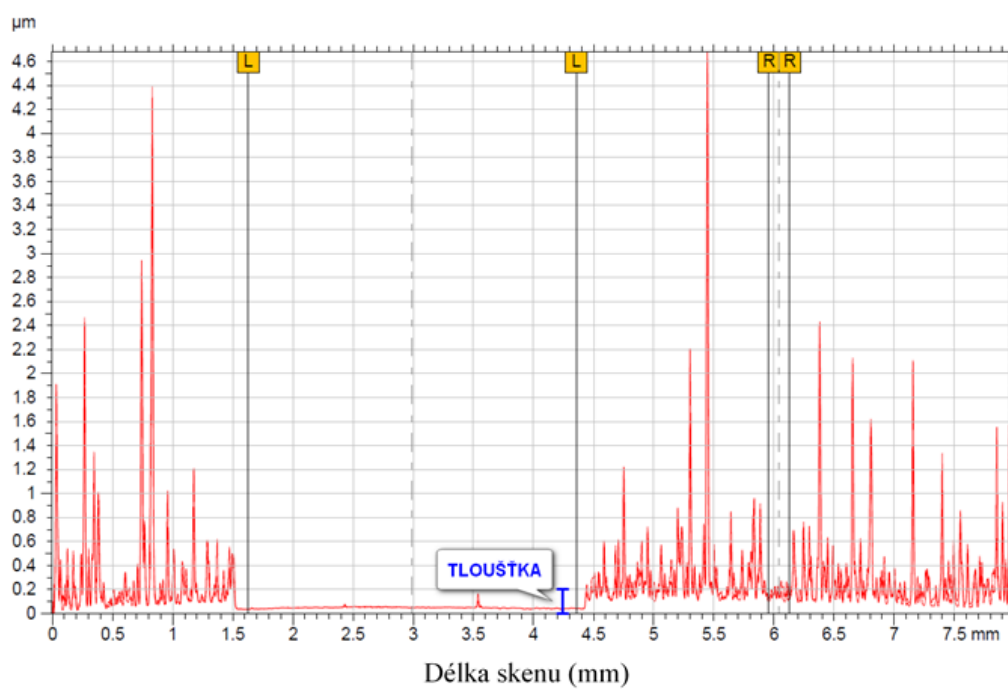
**Tabulka 4.1.1.1:** Výsledné hodnoty (tloušťka, drsnost)

Vzorek	Počet pulzů	Hustota energie [J/cm <sup>2</sup> ]	Tloušťka [nm]	Drsnost Ra [ $\mu\text{m}$ ]
Ge 1	7000	3	694	0,18
Ge 2	10000	2	117	0,251
Ge 3	10000	1,5	35	0,0199
Ge 4	20000	1,3	20	0,0141
Ge 5	10000	1	26	0,0172

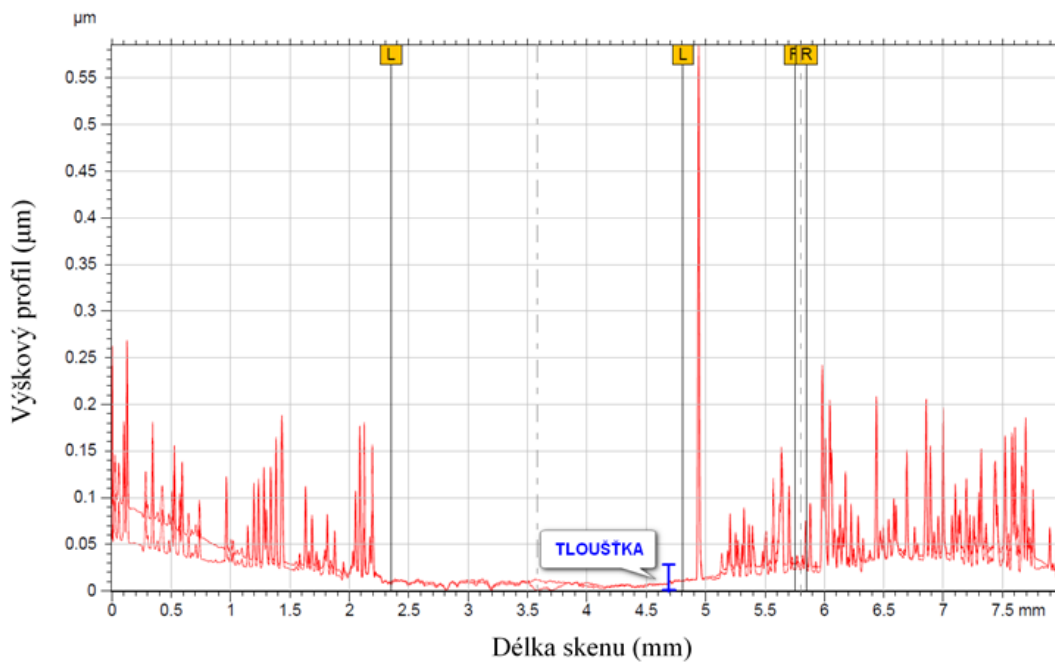
Na obrázcích (grafech) 4.1.1.1 až 4.1.1.3 jsou zobrazeny profily tloušťky vrstev vzorků Ge 1, Ge 2 a Ge 5. Na obrázcích poukazují, kde je v tomto grafu vidět tloušťka vrstvy. Kvůli malé tloušťce vzorků Ge 3 a Ge 4 byla tyto spektra nepovedená a bohužel se mi to nepodařilo vylepšit ani změnou polohy (dráhy) hrotu. Vzorky byly hrbolaté, a proto je obtížné na těchto grafech určit, kde končí křemíková podložka a kde začíná vrstva germania.



**Obr. 4.1.1.1:** Profil tloušťky vzorku Ge 1 (3 J/cm<sup>2</sup>)



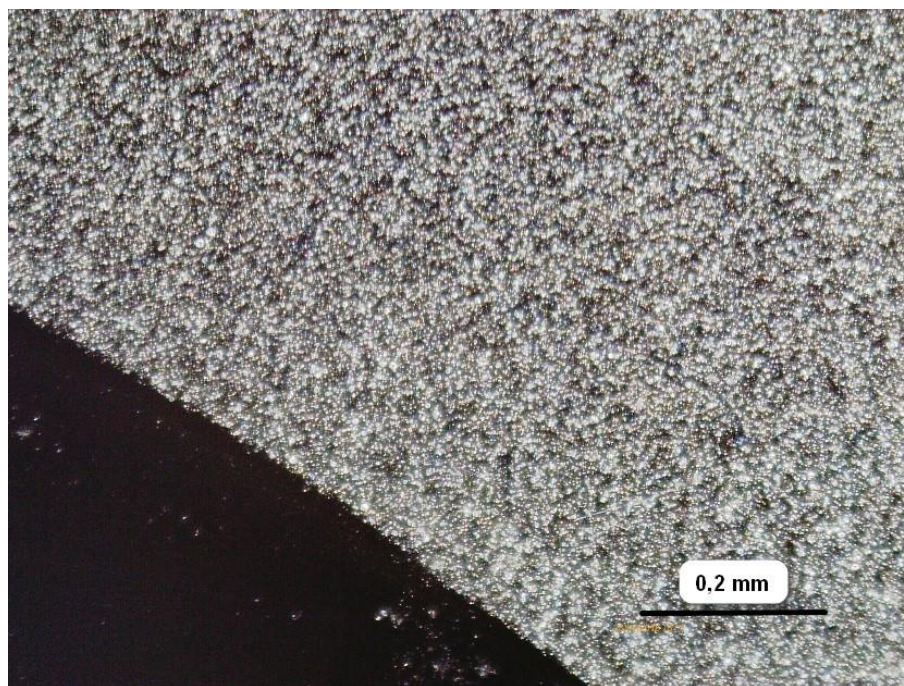
**Obr. 4.1.1.2:** Profil tloušťky vzorku Ge 2 (2 J/cm<sup>2</sup>)



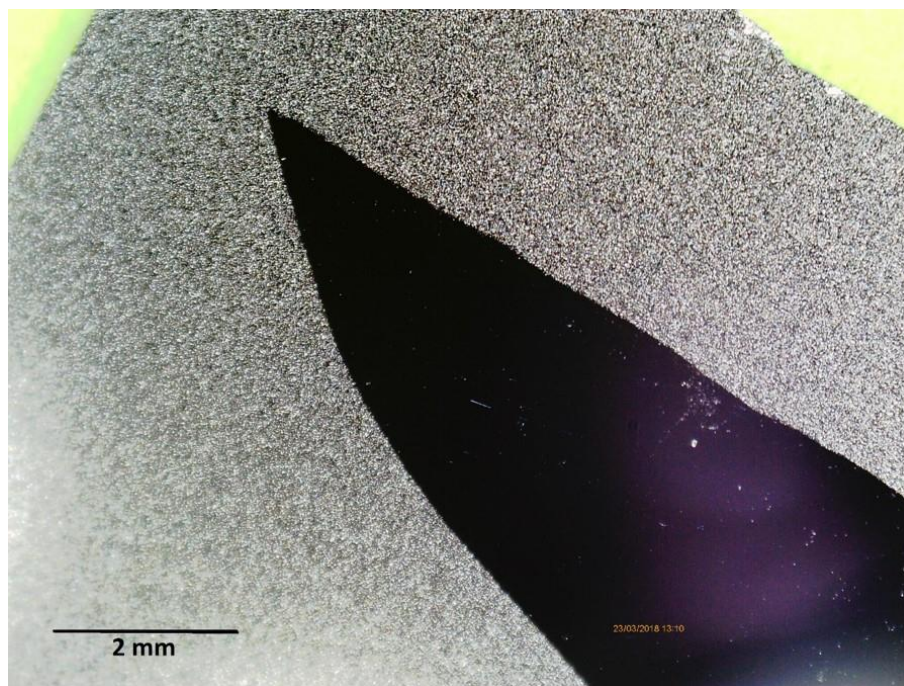
**Obr. 4.1.1.3:** Profil tloušťky vzorku Ge 5 (1 J/cm<sup>2</sup>)

## 4.1.2 Homogenita

Na fotkách 4.1.2.1 až 4.1.2.3 je zobrazen povrch vzorků Ge 1 a Ge 2. Fotky byly pořízeny optickým mikroskopem. Je zde vidět co je Si podložka (tmavé pole) a jak je strukturovaná vrstva germania (stříbrné pole). Bohužel u vzorků Ge 3,4 a 5 se nepodařilo dostatečně zaostřit povrch.



**Obr. 4.1.2.1:** Optický mikroskop – vrstva germania (Ge 1 – 3 J/cm<sup>2</sup>)



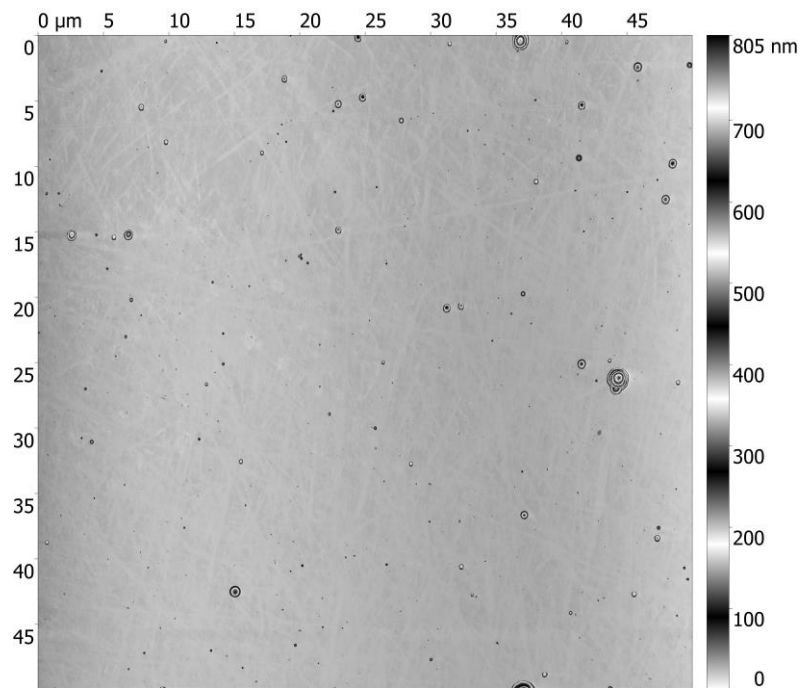
**Obr. 4.1.2.2:** Optický mikroskop – vrstva germania ( $\text{Ge } 2 - 2 \text{ J/cm}^2$ )



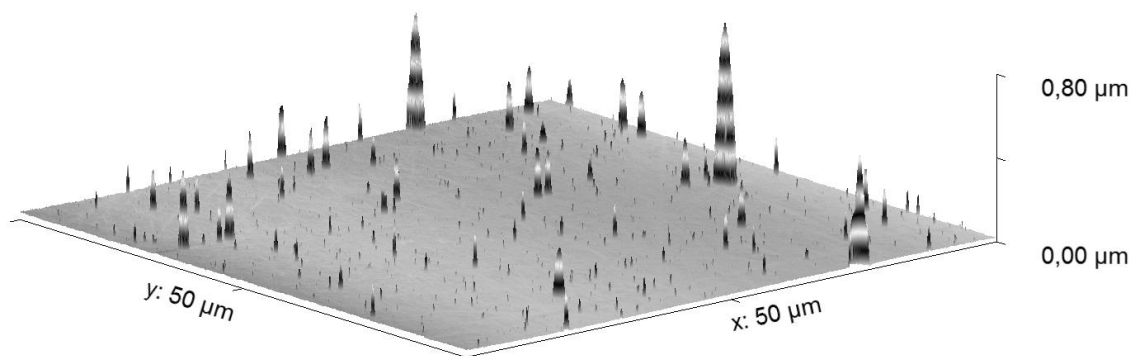
**Obr. 4.1.2.3:** Optický mikroskop přiblížení – vrstva germania ( $\text{Ge } 2 - 2 \text{ J/cm}^2$ )

### 4.1.3 Topologie

Na následujících obrázcích je vyobrazena topologie vzorku Ge 5 pomocí mikroskopie atomárních sil AFM. Pro tuto charakteristiku byl právě vybrán tento vzorek, protože vzorky Ge 1 a Ge 2 vykazují velmi hrbokatý povrch s velkou příměsí „kapiček“. Vzorek Ge 5 byl zvolen pro tuto metodu právě kvůli tomu, že povrch je více hladký než u vzorků Ge 1 a Ge 2 a je zde méně takzvaných „kapiček“.



**Obr. 4.1.3.1:** AFM, oblast 50×50 μm (Ge 5 – 1 J/cm<sup>2</sup>)



**Obr. 4.1.3.2:** AFM, oblast 50×50 μm (Ge 5 – 1 J/cm<sup>2</sup>), 3D zobrazení

## 4.2 Výsledky výpočtu parametrů potřebných pro depozici GeDLC vrstev

### 4.2.1 Výpočet rychlosti růstu vrstev germania

Výpočet rychlosti růstu (GR) podle vzorce (3.2.1):

$$GR = \frac{\text{Tloušťka vrstvy pro Ge 1}}{\text{Počet pulzů pro Ge 1}} = \frac{694}{7000} = 0,0991 \text{ nm/pulz}$$

Dopočítané hodnoty rychlostí růstu jsou uvedeny v tabulce níže.

**Tab. 4.2.1.1:** Výsledné vypočítané hodnoty rychlosti růstu vrstev germania

Vzorek	Hustota energie [J/cm <sup>2</sup> ]	Počet pulzů	Tloušťka [nm]	Rychlost růstu [nm/pulz]
Ge 1	3	7000	694	0,0991
Ge 2	2	10000	117	0,0117
Ge 3	1,5	10000	35	0,0035
Ge 4	1,3	20000	20	0,001
Ge 5	1	10000	26	0,0026

Pro následný výpočet bylo také potřeba vypočítat rychlost růstu uhlíku. Na základě zkušeností růstu vrstvy uhlíku z předchozích experimentů byla převzata hodnota 0,031 nm/pulz. Tyto hodnoty byly určeny pro konečnou tloušťku vrstvy 100 nm.

### 4.2.2 Výpočet počtu pulzů a opakovacích frekvencí pro různé koncentrace germania

Pro tento výpočet bylo nutné vypočítat mezikroky, které jsou uvedeny v podkapitole 3.2, a také pro tento výpočet bylo potřeba dohledat fyzikální vlastnosti germania a uhlíku, které jsou dostupné v tabulkách.

Výpočet hmotnosti jednoho atomu uhlíku  $A_{WC}$  a germania  $A_{WGe}$  podle vzorce (3.2.2 a 3.2.3):

Relativní atomová hmotnost ( $A_r$ ) germania = 72,64

Relativní atomová hmotnost ( $A_r$ ) uhlíku = 12,01

Atomová hmotnostní konstanta =  $1,661 \times 10^{-27}$  kg

$$A_{WC} = \frac{A_r(C) \times \text{Atomová hmotnostní konstanta}}{10^{-3}[kg]} = \frac{12,01 \times 1,661 \times 10^{-27}}{10^{-3}}$$

$$A_{WC} = 1,99 \times 10^{-23} \text{ g}$$

$$AW_{Ge} = \frac{Ar(Ge) \times \text{Atomová hmotnostní konstanta}}{10^{-3} [kg]} = \frac{72,64 \times 1,661 \times 10^{-27}}{10^{-3}}$$

$$AW_{Ge} = 1,2 \times 10^{-23} \text{ g}$$

Výpočet hustoty atomu uhlíku a germania podle vzorce (3.2.4 a 3.2.5):

$$\text{Hustota germania} = 5,323 \text{ g/cm}^3$$

$$\text{Hustota uhlíku} = 3 \text{ g/cm}^3$$

$$\text{Hustota atomu C} = \frac{\text{Hustota C [g/cm}^3]}{AW_C} = \frac{3}{1,99 \times 10^{-23}} = 1,5 \times 10^{23} \text{ cm}^3$$

$$\text{Hustota atomu Ge} = \frac{\text{Hustota Ge [g/cm}^3]}{AW_{Ge}} = \frac{5,323}{1,2 \times 10^{-22}} = 4,44 \times 10^{22} \text{ cm}^3$$

Výpočet tloušťky uhlíku pro 100 nm konečné tloušťky vrstvy X pro poměr koncentrací C:Ge = 99:1 at.% podle vzorce (3.2.6):

$$X = \frac{100}{\text{at\% C} \times \left( \frac{\text{Hustota atomu Ge}}{\text{Hustota atomu C}} \right) + \text{at\% Ge}} \times \left( \text{at\% C} \times \frac{\text{Hustota atomu Ge}}{\text{Hustota atomu C}} \right)$$

$$X = \frac{100}{99 \times \left( \frac{4,44 \times 10^{22}}{1,5 \times 10^{23}} \right) + 1} \times \left( 99 \times \frac{4,44 \times 10^{22}}{1,5 \times 10^{23}} \right)$$

$$X = 96,7 \text{ nm}$$

Výpočet tloušťky germania pro 100 nm konečné tloušťky vrstvy Y podle vzorce (3.2.7):

$$Y = 100 - X = 100 - 96,7 = 3,3 \text{ nm}$$

Výpočet počtu pulzů pro uhlík a germanium, například pro poměr koncentrací C:Ge = 99:1 at. %, vzorek GeDLC 1 podle vzorce (3.2.8 a 3.2.9):

$$\text{Rychlost růstu (GR) uhlíku} = 0,031 \text{ nm/pulz}$$

Rychlost růstu (GR) germania pro vzorek Ge 1 (hustota energie 3 J/cm<sup>2</sup>, tloušťka vrstvy 694 nm, 7000 pulzů) = 0,0991 nm/pulz

$$\text{Počet pulzů pro C} = \frac{X}{GR \text{ uhlíku}} = \frac{96,7}{0,031} = 3118 \text{ pulzů}$$

$$\text{Počet pulzů pro Ge} = \frac{Y}{GR_{\text{germania}}} = \frac{3,3}{0,0991} = 33 \text{ pulzů}$$

Výpočet opakovacích frekvencí  $f$  pro uhlík a germanium, například pro poměr koncentrací C:Ge = 99:1 at. %, vzorek GeDLC 1 podle vzorce (3.2.10):

$$f(\text{Ge}) = f(\text{C}) \times \frac{\text{Počet pulzů pro Ge}}{\text{Počet pulzů pro C}} = 47 \times \frac{33}{3118} = 0,5 \text{ Hz}$$

V následujících tabulkách jsou vypočteny hodnoty počtů pulzů a opakovacích frekvencí pro různé koncentrace germania v diamantu podobném uhlíku.

**Tab. 4.2.2.1:** Výsledné vypočítané hodnoty počtu pulzů a opakovací frekvence pro konečnou tloušťku 100 nm o koncentracích 1 a 3 at. % Ge v DLC, O.F. – Opakovací frekvence, žluté označení = optimální hustota energie vzhledem k morfologii a rychlosti růstu vrstvy

Vzorek	Hustota energie [J/cm <sup>2</sup> ]	1 at% Ge v DLC				3 at% Ge v DLC			
		Ge		DLC		Ge		DLC	
		Počet pulzů	O.F. [Hz]	Počet pulzů	O.F. [Hz]	Počet pulzů	O.F. [Hz]	Počet pulzů	O.F. [Hz]
GeDLC 1	3	33	0,5	3118	47	95	0,5	2920	15
GeDLC 2	2	282	2	3118	22	808	2	2920	7
<b>GeDLC 3</b>	<b>1,5</b>	<b>942</b>	<b>3</b>	<b>3118</b>	<b>10</b>	<b>2702</b>	<b>2</b>	<b>2920</b>	<b>2</b>
GeDLC 4	1,3	3299	16	3118	15	9459	9	2920	3
GeDLC 5	1	1269	3	3118	7	3637	9	2920	7

**Tab. 4.2.2.2:** Výsledné vypočítané hodnoty počtu pulzů a opakovací frekvence pro konečnou tloušťku 100 nm o koncentracích 5 a 7 at. % Ge v DLC, O.F. – Opakovací frekvence, žluté označení = optimální hustota energie vzhledem k morfologii a rychlosti růstu vrstvy

Vzorek	Hustota energie [J/cm <sup>2</sup> ]	5 at% Ge v DLC				7 at% Ge v DLC			
		Ge		DLC		Ge		DLC	
		Počet pulzů	O.F. [Hz]	Počet pulzů	O.F. [Hz]	Počet pulzů	O.F. [Hz]	Počet pulzů	O.F. [Hz]
GeDLC 1	3	152	0,5	2738	9	204	0,5	2572	6
GeDLC 2	2	1290	3	2738	6	1733	4	2572	6
<b>GeDLC 3</b>	<b>1,5</b>	<b>4313</b>	<b>8</b>	<b>2738</b>	<b>5</b>	<b>5792</b>	<b>4</b>	<b>2572</b>	<b>2</b>
GeDLC 4	1,3	15095	9	2738	2	20272	8	2572	1
GeDLC 5	1	5806	9	2738	4	7797	3	2572	1



**Tab. 4.2.2.3:** Výsledné vypočítané hodnoty počtu pulzů a opakovací frekvence pro konečnou tloušťku 100 nm o koncentracích 10 a 12 at. % Ge v DLC, O.F. – Opakovací frekvence, žluté označení = optimální hustota energie vzhledem k morfologii a rychlosti růstu vrstvy

Vzorek	Hustota energie [J/cm <sup>2</sup> ]	10 at% Ge v DLC				12 at% Ge v DLC			
		Ge		DLC		Ge		DLC	
		Počet pulzů	O.F. [Hz]	Počet pulzů	O.F. [Hz]	Počet pulzů	O.F. [Hz]	Počet pulzů	O.F. [Hz]
GeDLC 1	3	276	0,5	2345	4	318	1	2208	7
GeDLC 2	2	2332	4	2345	4	2695	5	2208	4
<b>GeDLC 3</b>	<b>1,5</b>	<b>7797</b>	<b>3</b>	<b>2345</b>	<b>1</b>	<b>9010</b>	<b>5</b>	<b>2208</b>	<b>1</b>
GeDLC 4	1,3	27290	13	2345	1	31536	16	2208	1
GeDLC 5	1	10496	9	2345	2	12129	10	2208	2

**Tab. 4.2.2.4:** Výsledné vypočítané hodnoty počtu pulzů a opakovací frekvence pro konečnou tloušťku 100 nm o koncentraci 20 at. % Ge v DLC, O.F. – Opakovací frekvence, žluté označení = optimální hustota energie vzhledem k morfologii a rychlosti růstu vrstvy

Vzorek	Hustota energie [J/cm <sup>2</sup> ]	20 at% Ge v DLC			
		Ge		DLC	
		Počet pulzů	O.F. [Hz]	Počet pulzů	O.F. [Hz]
GeDLC 1	3	462	1	1748	4
GeDLC 2	2	3912	4	1748	2
<b>GeDLC 3</b>	<b>1,5</b>	<b>13080</b>	<b>8</b>	<b>1748</b>	<b>1</b>
GeDLC 4	1,3	45780	30	1748	1
GeDLC 5	1	17607	10	1748	1

### 4.3 Experiment 2 – Stanovení koncentrace, cytotoxicity

V této druhé části experimentu byly vytvořeny vrstvy DLC dopované germaniem (GeDLC) o různých koncentracích. Zde byla určena hodnota tloušťky, která by měla být pro každou vrstvu o různé koncentraci stejná. Další depoziční podmínky jsou zobrazeny v tabulce níže.

### 4.3.1 Depoziční podmínky + WDS a drsnost

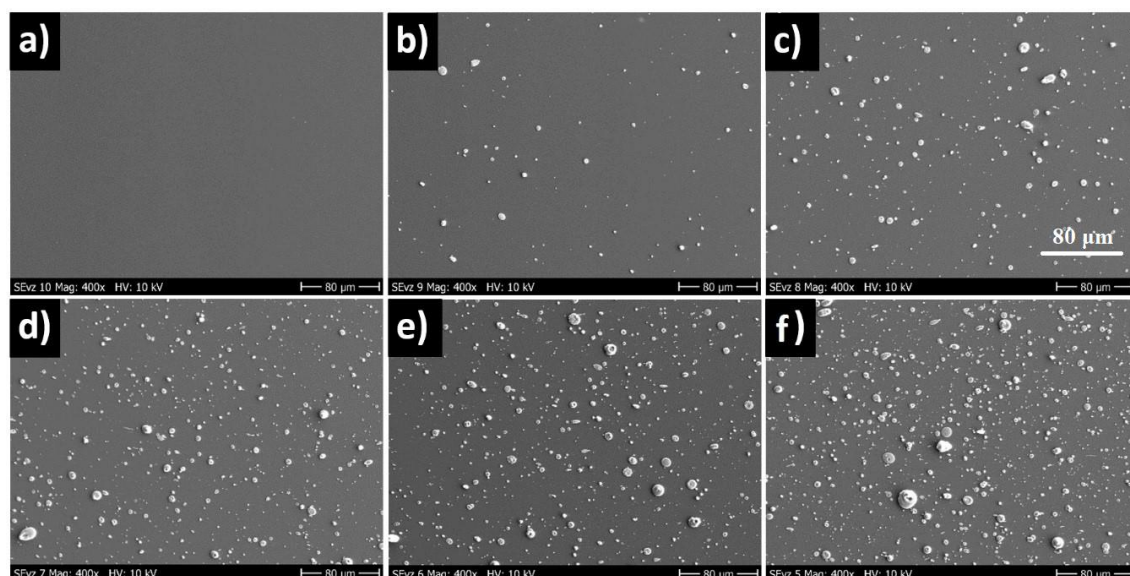
**Tab. 4.3.1.1:** Depoziční podmínky: Koncentrace germania obsaženého v DLC, drsnost GeDLC vrstev připravených metodou PLD. Tloušťka vrstev cca 160 nm. Laser 1 – hustota energie 8 J/cm<sup>2</sup>, velikost spotu 2 x 1 mm<sup>2</sup>. Laser 2 – hustota energie 1.5 J/cm<sup>2</sup>, velikost spotu 4 x 1.5 mm<sup>2</sup>

Vzorek	LASER 1 – COMPEX (uhlíkový terč)		LASER 2 – LUMONICS (germaniový terč)		Koncentrace:	
	Počet pulzů	Opakovací frekvence [Hz]	Počet pulzů	Opakovací frekvence [Hz]	Ge v DLC (WDS) [at. %]	Drsnost Ra [nm]
GeDLC5	21 685	14	29 429	19	12	120.1
GeDLC6	29 083	30	17 450	18	9	83.6
GeDLC7	31 891	27	12 992	11	5	63.6
GeDLC8	36 216	30	6 036	5	2.5	61.7
GeDLC9	38 680	37	2 091	2	1	14.4
GeDLC10	40 000	30	-	-	0	2.8

### 4.3.2 Rychlost růstu, drsnost a morfologie

Z měření pomocí profilometru byla vypočítána rychlost růstu. Se změnou dopace (koncentrace) germania z 12 at. % na 0 at. % se rychlost růstu pohybovala z  $7,4 \times 10^{-3}$  nm/pulz na  $4,0 \times 10^{-3}$  nm/pulz.

Měření drsnosti ukazuje, že Ra se mění z přibližně 3 nm na 120 nm. Z fotografií níže, které byly získány přístrojem SEM je vidět, že vrstva se skládá z malých zrnkovitých kapiček o velikosti několika mikrometrů.



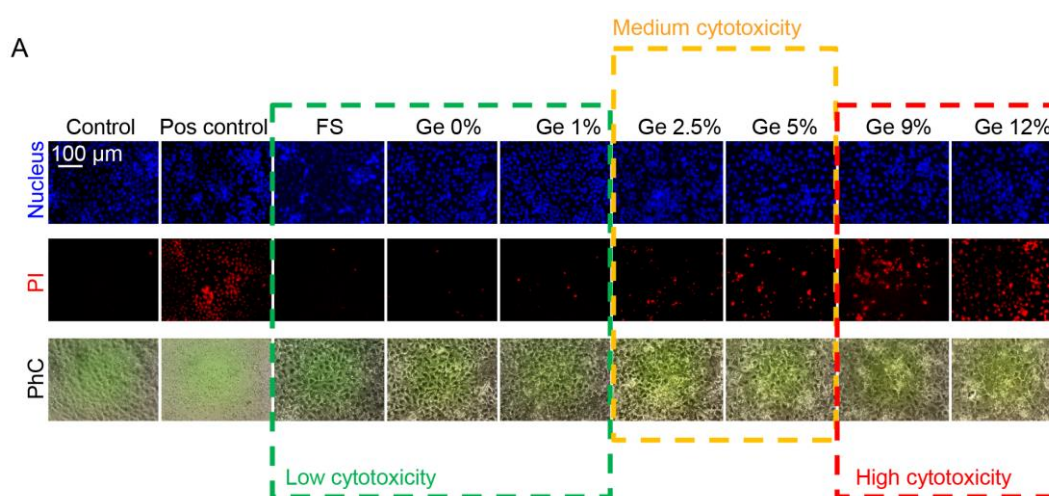
**Obr. 4.3.2.1:** SEM fotografie DLC vrstev dopovaných germaniem, zvětšeno 400x. a) 0 at. %, b) 1 at. %, c) 2,5 at. %, d) 5 at. %, e) 9 at. % a f) 12 at. % Ge v DLC

### 4.3.3 Složení

Toto měření bylo provedeno metodou WDS. Naměřené koncentrace germania vztažené s depozičními podmínkami se pohybovaly od 0 at. % do 12 at. % - viz tabulka 4.3.1.1.

### 4.3.4 In vitro biokompatibilita

Obrázek (A) ukazuje cytotoxické chování buněk pěstovaných na různých substrátech germania, jak bylo pozorováno pomocí mikroskopie fázového kontrastu (PhC) a mrtvého testu fluorescenčním zobrazení. U všech vzorků se většina buněk Huh7 pevně připojila k povrchu materiálů a účinně se šířila během kultivačního období.



**Obr. 4.3.4.1:** Životaschopnost buněk Huh7 na různých substrátech Ge po 5 dnech kultivace. (A) Buňky byly obarveny propidium jodidem (PI, červený) pro stanovení životaschopnosti buněk. Jádra byla kontrastně zbarvena Hoechstovou modří. Buňky byly zobrazeny pomocí epifluorescenčního mikroskopu IM-2FL (Optika Italy). Zobrazeny jsou reprezentativní snímky. Jako pozitivní kontrola byly buňky ošetřeny 20% ethanolem po dobu 60 minut

## 5 Diskuse

V kapitole „Přehled současného stavu“ stručně popisují materiál používaný v pokrývání implantátů již spousty let, je velmi plně prostudován a jeho vlastnosti a kvality jsou zcela známé. Tímto materiálem je tzv. diamond like carbon neboli DLC. Více se zaměřuji na popis dopantu, kterým by mohly být ještě více zlepšeny kvality materiálu DLC. Jedná se o germanium, které podle dostupné literatury vykazuje dobré mechanické a optické vlastnosti. Co se týče účinků germania na organismus, existují dva odlišné názory, i když dosud bylo germanium málo zkoumané. Jeden poukazuje na to, že germanium (sloučeniny germania) bývá pro lidský organismus přítěží a působí toxicky. Druhý poukazuje na to, že germanium může být používáno pro zlepšení stavu při různých onemocněních.

**Experiment 1:** Na tomto základě získaných informací byly nejprve vytvořeny metodou pulzní laserové depozice vrstvy germania za účelem zjištění vlastností germania, především rychlosti růstu této vrstvy. Celkem bylo vytvořeno 5 vrstev germania na křemíkových podložkách (99,99%) o různé hustotě energie použitého laseru (KrF laser,  $\lambda=248$  nm) a počtu pulzů. Hustota energie se pohybovala od 3 do 1 J/cm<sup>2</sup>. U vrstev byla zkoumána tloušťka, drsnost, homogenita a morfologie.

U hustoty energie 3 J/cm<sup>2</sup> se **tloušťka** vrstvy pohybovala kolem cca 700 nm a u hustot energií 1, 1,3 a 1,5 J/cm<sup>2</sup> byly vrstvy velmi tenké, hodnota se pohybovala kolem 30 nm. To jak vrstva rychle roste a jaké tloušťky dosahuje, určuje právě použitá hustota energie a také použitý počet pulzů. Z výsledků je tedy patrné, že čím větší hustota energie, tím je vrstva silnější a roste rychleji. **Drsnost** se zvyšovala s rostoucí tloušťkou vrstvy a hustotou energie laseru.

Pomocí **optického mikroskopu** a metodou **AFM** (mikroskopie atomárních sil) se prokázalo, že vrstvy germania tvoří drsný povrch, neboli vznikají zde tzv. kapičky. Tyto kapičky v našem případě dosahovaly vyšších hodnot. Metodou AFM byla zkoumána vrstva germania o hustotě energie 1 J/cm<sup>2</sup>, která ze snímků optického mikroskopu vykazovala nejmenší počet a výšku těchto kapiček. Z obrázku, který byl získán metodou AFM a následně zpracován v softwaru Gwyddion, je přesně vidět, že germanium tvoří sice hladký povrch, ale jsou zde tyto kapičky o výšce až 800 nm.

**Experiment 2:** Avšak hlavním cílem bylo vytvořit vrstvy DLC dopovaným germaniem, a tak na základě těchto výsledků bylo zapotřebí zjistit hodnoty počtu pulzů a opakovacích frekvencí, které budou užity na vytvoření těchto vrstev. Výpočet byl vztažen pro konečnou tloušťku vrstev 100 nm a pro hodnoty koncentrace germania v DLC.

Nicméně tento výpočet byl následně upraven, protože je chtěné dosáhnout co možné největší tloušťky vrstev. Byla stanovena konstantní hustota energie laserového svazku dopadajícího na uhlíkový terč (Laser 1 – 8 J/cm<sup>2</sup>) a hustota energie druhého laserového svazku dopadajícího na germaniový terč (Laser 2 – 1,5 J/cm<sup>2</sup>) jako optimální hustota energie vzhledem k morfologii a rychlosti růstu vrstev (tab. 4.2.2.1 až 4.2.2.4 – žlutě zvýrazněno). Předpokládané hodnoty koncentrace zůstaly stejné.

Dále se tedy experimentálně vyzkoušelo nanést na křemíkovou podložku, upevněnou na rotujícím držáku, zvláště germaniovou vrstvu a uhlíkovou vrstvu, která zůstane stabilní a o takové tloušťce, která bude dostatečně velká. Bylo dosaženo tloušťky 160 nm vrstvy DLC při 40000 pulzech, kdy vrstva zůstala stabilní (tím je myšleno, že při vyšší tloušťce vrstva nevydržela – popraskala) a tloušťky 100 nm vrstvy germania také při 40000 pulzech. Tímto vyšel poznatek, že při stejném počtu pulzů vrstva DLC roste rychleji než vrstva germania. Za konečnou vrstvu tloušťky GeDLC byla tedy zvolena hodnota 160 nm a hodnoty počtu pulzů a opakovacích frekvencí se zvýšily právě na základě rychlosti růstu vrstvy. Tudíž se výpočet upravil na hodnoty počtu pulzů a frekvencí, které jsou uvedeny v tabulce 4.3.1.1.

Počet počtu pulzů a hodnoty opakovacích frekvencí jsou také ovlivněny tím, že při této depozici GeDLC vrstev, byl použit rotující držák podložek, zatímco u experimentu č. 1, kdy se deponovaly jen vrstvy germania, byl užit pevný držák podložek. Čím je větší plocha pro dopad plasmy, vycházejí od terčů, tím je zapotřebí zvýšit počet pulzů. Další, co může mít vliv na výsledek, jsou vlastnosti laseru (intenzita, rozložení energie) a stav povrchu terče (postupem na terči vznikají nerovnosti).

V této tabulce 4.3.1.1 jsou také uvedeny výsledky **složení**, respektive skutečné hodnoty koncentrace germania ve vzorku metodou WDS. Koncentrace se lehce liší od předpokládaných hodnot, ale v tomto případě je odchylka malá. Pokud se zaměříme na 5 at. % koncentraci germania, kterou jsme získali i po přepočtu pro 160 nm tloušťky vrstvy, je zde vidět, že hodnoty počtu pulzů a frekvence pro uhlík jsou poměrně vyšší než u předpokládané 5 % koncentrace germania pro 100 nm tloušťky vrstvy (tab. 4.2.2.2). To stejné můžeme pozorovat i u 12% koncentrace germania. Zde jsou také hodnoty počtu pulzů a frekvencí jak u germania tak uhlíku mnohem vyšší než u předpokládaného výpočtu.

Vše se odvíjí od požadované tloušťky vrstvy a také záleží, v jaké oblasti vzorku bylo měření prováděno. Koncentrace se mohou lišit na základě přítomných tzv. kapiček, které nám vytváří germanium. Pokud v dané vybrané oblasti měření je přítomno mnoho těchto kapiček germania, tím se zvyšuje výsledná průměrná hodnota koncentrace. Předpokládané hodnoty koncentrace byly určeny pro homogenní rozložení germania na podložce, nýbrž tyto hodnoty sloužily pro odhad reálných hodnot.

Z měření **rychlosti růstu** pro skutečné koncentrace germania vyplývá, že z 12 at. % na 0 at. % se rychlost růstu pohybovala z  $7,4 \times 10^{-3}$  nm/pulz na  $4,0 \times 10^{-3}$  nm/pulz.

Z analýzy pomocí WDS také vyplývá, že obsah germania v „zrnech“ byl přibližně desetkrát vyšší ve srovnání s hladkými částmi vrstvy.

Na přítomnost těchto zrn (kapiček) působí mnoho faktorů. Výskyt těchto zrn může být ovlivněn hustotou energie laseru, délkou pulzu (čím kratší délka pulzu, tím vznikne méně kapiček) nebo i například vlnovou délkou laseru. U excimerových laserů, které byly pro tento experiment využity (KrF,  $\lambda=248$  nm) změna trvání pulzu nebývá možná, většina z nich má nastavenou hodnotu délky pulzu. Pokud máme vlnovou délku laseru, která se silně absorbuje v terči, tak tím se mění rozložení iontů v plazmě, která dopadá na podložku a vzniká homogennější vrstva.

**Morfologie a topologie** povrchu GeDLC vrstev byla zkoumána SEM. Výsledky ukazují (viz obr. 4.3.2.1), že se zvyšující se koncentrací germania je povrch drsnější a je zde větší obsazenost tzv. kapiček či zrn. Při nulové koncentraci germania, tedy u čistého DLC žádné nerovnosti nevznikají a povrch je hladký. Je tedy patrné, že tyto hrbolky způsobuje germanium.

Pozoruhodné je, že po určitou dobu byly sloučeniny germania a germania považovány za bezpečné a používané ve výživových doplncích [31]. Mnohé zprávy ukázaly, že doplňky germania představují vysoké riziko pro člověka při vysokých dávkách [7]. Doposud jsou však stále k dispozici zdravotnické výrobky s obsahem germania [32].

Tato skutečnost vytvořila dojem, že implantáty na bázi germania mají vysokou biokompatibilitu a jsou lidským tělem dobře snášeny [32,33,34]. Proto nebyla hlášena žádná systémová toxicita germaniových implantátů u lidí. Chybí důkladná analýza geotoxické cytotoxicity na relevantních buněčných modelech. Podrobné studie v posledních dvou desetiletích ukázaly, že redoxní reakce aktivních kovů a metaloidů (jako Ge) podléhají redoxním cyklickým reakcím a mají schopnost produkovat reaktivní druhy kyslíku [7,35,36]. Zvýšená tvorba ROS (Reactive Oxygen Species) brání buněčné antioxidační ochraně a následně indukuje poškození DNA, peroxidaci lipidů a smrt buněk [35].

Bylo dokázáno, že mezi široce používanými jaterními buněčnými liniemi jsou Huh7 nejcitlivější k redoxní nerovnováze a oxidačnímu poškození [37,38,39]. Pro posouzení akutní toxicity substrátů na bázi germania jsme tedy v našich experimentech použili buněčnou linii Huh7.

**Stanovení cytotoxicity:** Buňky Huh7 byly kultivovány na substrátech s různými procenty koncentrace germania po dobu 5 dnů. Po 5 dnech kultivace byla stanovena životaschopnost buněk s použitím značení propidium jodidem. Propidium jodid (PI) je dobře známé membránové nepropustné barvivo, které je obecně odlučováno z životaschopných buněk. Navazuje se na dvouvláknovou DNA interkalací mezi páry bází. Zvýšení buněk značených PI tedy odráží cytotoxickou odpověď. Na daném povrchu

všech vzorků o různé koncentraci germania se tyto Huh7 buňky pevně přichytily a kultivace probíhala v pořádku.

Obecně jsou systémové studie toxicity germania stále poměrně omezené. Řada studií ukázala, že doplňky germania představují vysoké riziko pro člověka při vysokých dávkách. Sloučeniny germania jsou relativně méně toxické ve srovnání s jinými metaloidy a kovy. Relativně vysoké dávky oxidu germaničitého a jiných anorganických sloučenin germania však mohou způsobit závažnou otravu, včetně smrti. V této studii jsme identifikovali práh koncentrace germania v substrátu buněčné kultury, aby se zabránilo těžké toxické reakci. Zjistili jsme, že koncentrace germania vyšší než 2,5 % indukuje známky buněčné smrti v jaterních buňkách. Je zajímavé, že materiály na bázi germania materiálů s koncentrací až 1,5 % již prokázaly cytotoxické účinky [32,33,34]. V tomto ohledu náš Ge 1% materiál vykazoval nižší toxicitu ve srovnání s 1,5% Ge popsaným v [32].

## 6 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo vytvořit vrstvy germania o různé tloušťce za odlišných hustot energií a počtů pulzů za použití KrF laseru metodou Pulzní laserová depozice. Hustota energie se pohybovala od 3 do 1 J/cm<sup>2</sup>. U těchto vrstev byla zkoumána tloušťka, drsnost, morfologie a topologie. Důležitým faktorem, který jsme získali pomocí měření a následného výpočtu, byla rychlost růstu vrstvy germania.

Důležitým mezikrokem bylo vypočítat počet pulzů a opakovací frekvence, které byly nastaveny pro depozici GeDLC vrstev od různých koncentrací germania. Nejdříve byly určeny hodnoty koncentrací pohybující se v rozmezí od 1 at. % - 20 at. %. Pro tyto koncentrace byly dopočítány hodnoty počtu pulzů a frekvencí, a byla zvolena optimální hustota energie laseru (1,5 J/cm<sup>2</sup>), která byla použita pro nastavení laseru, kde jeho paprsek dopadal na germaniový terč. Druhý laser (uhlíkový terč) měl nastavenou hustotu energie 8 J/cm<sup>2</sup>.

Následně byly vytvořeny vrstvy DLC dopované germaniem (GeDLC) o koncentraci germania rostoucí od 0 % do 12 %, připravené metodou duální pulzní laserová depozice, za užití dvou laserů KrF, kdy jeden laserový paprsek dopadal na germaniový terč a druhý na uhlíkový. Vlastnosti vrstev, jako jsou rychlost růstu, drsnost, SEM morfologie, složení (metoda WDS) a biologické vlastnosti byly studovány ve vztahu s koncentrací dopantu. Rychlost růstu vrstev byla nízká (od  $4 \times 10^{-3}$  do  $7,4 \times 10^{-3}$  nm/pulz). Drsnost vzrůstala s rostoucí koncentrací germania, vznikaly tzv. kapičky.

Předpokládané hodnoty koncentrací sloužily pro odhad reálných koncentrací germania. Výsledné koncentrace liší od předpokládaných na základě přítomnosti tzv. kapiček. Při měření záleží na vybrané oblasti. Pokud v oblasti měření byla velké obsazenost kapiček (zrn), tak to způsobilo změnu koncentrace. Přítomnost kapiček byla také ovlivněna vlastnostmi laseru (hustota energie, délka pulzu, vlnová délka) a povrchem terče. Výsledné hodnoty počtu pulzů a frekvencí se také liší od vypočítaných hodnot pro předpokládané koncentrace. Odchylna byla způsobena kvůli zvolené vyšší konečné tloušťce vrstev GeDLC (160 nm), než pro kterou to bylo počítáno (100 nm). Z experimentů se ukázalo, že rychlost růstu vrstvy germania je nižší než rychlost růstu uhlíku, proto musel být výpočet upraven.

Nakonec byly vrstvy GeDLC charakterizovány pomocí biologických testů, kdy se zkoumala cytotoxicita. Cytotoxicita byla zkoumána na jaterních buňkách, hepatocytech typu Huh7. Z výsledků se ukázalo, že se zvyšující se koncentrací germania se zvyšuje cytotoxicita. Z analýzy vzorků vyplývá, že vrstvy o nízké koncentraci germania (1 at. % - max. 1,5 at. %), nevykazují toxicitu a jsou biokompatibilní.



Tedy nanovrstvy DLC dopované nízkou koncentrací germania mohou být užity v biomedicíně určené pro pokrývání implantátů.

Nicméně pro klinickou praxi by proto měla být pečlivě zvážena cytotoxicita germania. Naše výsledky naznačují, že cytotoxické účinky germaniových substrátů vyžadují intenzivnější studium a že mohou být zařazeny do biomedicínských aplikací.

## Seznam použité literatury

- [1] JELÍNEK, Miroslav, Josef ZEMEK, Jan REMSA, et al. Hybrid laser technology and doped biomaterials. *Applied Surface Science*. 2017, **417**, 73-83. DOI: 10.1016/j.apsusc.2017.03.103. ISSN 01694332. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169433217307547>
- [2] SÁNCHEZ-LÓPEZ, J. C., A. FERNÁNDEZ, Jan REMSA, et al. Doping and Alloying Effects on DLC Coatings. *Tribology of Diamond-Like Carbon Films*. Boston, MA: Springer US, 2008, **417**, 311-338. DOI: 10.1007/978-0-387-49891-1\_12. ISBN 978-0-387-30264-5. ISSN 01694332. Dostupné také z: [http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-49891-1\\_12](http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-49891-1_12)
- [3] Germanium. Wikipedia (2018). Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Germanium>
- [4] HALLER, E.E. Germanium: From its discovery to SiGe devices. *Materials Science in Semiconductor Processing* [online]. 2006, **9**(4-5), 408-422 [cit. 2019-04-18]. DOI: 10.1016/j.mssp.2006.08.063. ISSN 13698001. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369800106001326>
- [5] EMSLEY, John. *Nature's building blocks: an A-Z guide to the elements*. New York: Oxford University Press, 2001. ISBN 0-19-850341-5.
- [6] W.K., Germanium for Electronic Devices. NY Times (1953). Dostupné z: <https://www.nytimes.com/1953/05/10/archives/germanium-for-electronic-devices.html>
- [7] TAO, Shyy-Hwa a P.Michael BOLGER. Hazard Assessment of Germanium Supplements. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*[online]. 1997, **25**(3), 211-219 [cit. 2019-04-18]. DOI: 10.1006/rtph.1997.1098. ISSN 02732300. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0273230097910989>
- [8] SOUSANI, F., H. JAMALI, R. MOZAFARINIA a A. ESHAGHI. Thermal stability of germanium-carbon coatings prepared by a RF plasma enhanced chemical vapor deposition method. *Infrared Physics & Technology* [online]. 2018, **93**, 255-259 [cit. 2019-04-18]. DOI: 10.1016/j.infrared.2018.08.006. ISSN 13504495. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350449518303505>
- [9] SHAFI, H.Z., A. MAHMOOD, Z. ALI a M. MEHMOOD. Optical and Structural Analysis of GeC Thin Films Deposited by Reactive Pulsed Laser Ablation Technique. *Key Engineering Materials* [online]. 2010, **442**, 178-186 [cit. 2019-04-18]. DOI: 10.4028/www.scientific.net/KEM.442.178. ISSN 1662-9795. Dostupné z: <https://www.scientific.net/KEM.442.178>

- [10] MAHMOOD, Arshad, A. SHAH, F.F. CASTILLON, L. Cota ARAIZA, J. HEIRAS, M. Yasin AKHTAR RAJA a M. KHIZAR. Surface analysis of GeC prepared by reactive pulsed laser deposition technique. *Current Applied Physics* [online]. 2011, **11**(3), 547-550 [cit. 2019-04-18]. DOI: 10.1016/j.cap.2010.09.011. ISSN 15671739. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567173910003135>
- [11] CHENG, Y., Y. M. LU, Y. L. GUO, G. J. HUANG, S. Y. WANG a F. T. TIAN. MULTILAYERS DIAMOND-LIKE CARBON FILM WITH GERMANIUM BUFFER LAYERS BY PULSED LASER DEPOSITION. *Surface Review and Letters* [online]. 2017, **24**(02) [cit. 2019-04-18]. DOI: 10.1142/S0218625X17500147. ISSN 0218-625X. Dostupné z: <http://www.worldscientific.com/doi/abs/10.1142/S0218625X17500147>
- [12] Cheng Y., et al.; private communication February 2017
- [13] VRBOVÁ, Miroslava, Helena JELÍNKOVÁ a Petr GAVRILOV. *Úvod do laserové techniky*. Dot. 1. vyd. Praha: České vysoké učení technické, 1998. ISBN 80-01-01108-9
- [14] JELÍNEK, Miroslav – přednášky z předmětu Nanotechnologie
- [15] Pulsed Laser Deposition - Andor Learning Centre. *Leading provider of high technology tools and systems for research and industry - Andor - Oxford Instruments* [online]. Copyright © Oxford Instruments 2019 [cit. 25.04.2019]. Dostupné z: <https://andor.oxinst.com/learning/view/article/pulsed-laser-deposition>
- [16] Pulsed Laser Deposition | NFFA.eu. *Home | NFFA.eu* [online]. Dostupné z: <https://www.nffa.eu/offer/growth-synthesis/installation-2/pld/>
- [17] HULÍNSKÝ, Václav a Karel JUREK. *Zkoumání látek elektronovým paprskem*. Praha: SNTL, 1982. Moderní metody v chemické laboratoři.
- [18] GRICOVÁ, Marie. *Metody analýzy materiálů*. Praha: České vysoké učení technické, 1988.
- [19] KRAUS, Ivo a Jaroslav FIALA. *Elementární fyzika pevných látek*. 2. přepracované vydání. Praha: České vysoké učení technické v Praze, 2016. ISBN 978-80-01-05942-5.
- [20] *LABOREXPORT Kft. - Laboratórium berendezések és műszerek* [online]. Copyright © [cit.25.04.2019]. Dostupné z: [http://www.laborexport.hu/\\_data/VFS\\_be564080af6d6a2942db1be5b9743e39.PDF](http://www.laborexport.hu/_data/VFS_be564080af6d6a2942db1be5b9743e39.PDF)
- [21] Wavelength-dispersive spectroscopy (WDS). [online]. Dostupné z: [https://serc.carleton.edu/research\\_education/geochemsheets/wds.html](https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/wds.html)

- [22] Rentgenové záření :: MEF. *Fyzika :: MEF* [online]. Copyright © 2006 [cit. 25.04.2019]. Dostupné z: <http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/540-rentgenove-zareni>
- [23] Bragg's law. A two-dimensional crystal lattice and a set of imaginary... | Download Scientific Diagram. *ResearchGate / Share and discover research* [online]. Copyright © ResearchGate [cit. 25.04.2019]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/figure/Braggs-law-A-two-dimensional-crystal-lattice-and-a-set-of-imaginary-planes-is\\_fig10\\_47418334](https://www.researchgate.net/figure/Braggs-law-A-two-dimensional-crystal-lattice-and-a-set-of-imaginary-planes-is_fig10_47418334)
- [24] Nanometrologie.cz. *Nanometrologie.cz* [online]. Dostupné z: [http://nanometrologie.cz/cz/props\\_mechanical.php](http://nanometrologie.cz/cz/props_mechanical.php)
- [25] Nanometrologie.cz. *Nanometrologie.cz* [online]. Dostupné z: [http://nanometrologie.cz/cz/techs\\_afm.php](http://nanometrologie.cz/cz/techs_afm.php)
- [26] KALVODA, Ladislav a Anatolij Sergejevič PARŠIN. *Vybraná témata z fyziky povrchů: vícevrstevné systémy a tenké organické filmy*. Praha: České vysoké učení technické, 2000. ISBN 80-01-02217-X.
- [27] LUNOVA, Mariia, Vitalii ZABLOTSKII, Nora M. DEMPSEY, et al. Modulation of collective cell behaviour by geometrical constraints. *Integrative Biology* [online]. 2016, **8**(11), 1099-1110 [cit. 2019-04-18]. DOI: 10.1039/C6IB00125D. ISSN 1757-9694. Dostupné z: <https://academic.oup.com/ib/article/8/11/1099-1110/5163504>
- [28] WROBEL, Kazimierz, Estefanía CLAUDIO, Fernando SEGADE, Sofia RAMOS a Pedro S. LAZO. Measurement of cytotoxicity by propidium iodide staining of target cell DNA. *Journal of Immunological Methods* [online]. 1996, **189**(2), 243-249 [cit. 2019-04-18]. DOI: 10.1016/0022-1759(95)00253-7. ISSN 00221759. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022175995002537>
- [29] MARCH, Sandra, Vyas RAMANAN, Kartik TREHAN, et al. Micropatterned coculture of primary human hepatocytes and supportive cells for the study of hepatotropic pathogens. *Nature Protocols* [online]. 2015, **10**(12), 2027-2053 [cit. 2019-04-18]. DOI: 10.1038/nprot.2015.128. ISSN 1754-2189. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nprot.2015.128>
- [30] TERJUNG, Ronald, ed. *Comprehensive Physiology* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2013 [cit. 2019-04-18]. ISBN 9780470650714.
- [31] SCHAUSS, Alexander G. Nephrotoxicity and neurotoxicity in humans from organogermanium compounds and germanium dioxide. *Biological Trace Element Research* [online]. 1991, **29**(3), 267-280 [cit. 2019-04-25]. DOI: 10.1007/BF03032683. ISSN 0163-4984. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF03032683>

- [32] BIAN, Dong, Weirui ZHOU, Jiuxu DENG, et al. Development of magnesium-based biodegradable metals with dietary trace element germanium as orthopaedic implant applications. *Acta Biomaterialia*[online]. 2017, **64**, 421-436 [cit. 2019-04-25]. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.10.004. ISSN 17427061. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706117306207>
- [33] HWANG, Suk-Won, Gayoung PARK, Chris EDWARDS, et al. Dissolution Chemistry and Biocompatibility of Single-Crystalline Silicon Nanomembranes and Associated Materials for Transient Electronics. *ACS Nano* [online]. 2014, **8**(6), 5843-5851 [cit. 2019-04-25]. DOI: 10.1021/nn500847g. ISSN 1936-0851. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/nn500847g>
- [34] KANG, Seung-Kyun, Gayoung PARK, Kyungmin KIM, et al. Dissolution Chemistry and Biocompatibility of Silicon- and Germanium-Based Semiconductors for Transient Electronics. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. 2015, **7**(17), 9297-9305 [cit. 2019-04-25]. DOI: 10.1021/acsami.5b02526. ISSN 1944-8244. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsami.5b02526>
- [35] JOMOVA, Klaudia a Marian VALKO. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* [online]. 2011, **283**(2-3), 65-87 [cit. 2019-04-25]. DOI: 10.1016/j.tox.2011.03.001. ISSN 0300483X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X11000886>
- [36] TCHOUNWOU, Paul B., Clement G. YEDJOU, Anita K. PATLOLLA a Dwayne J. SUTTON. Heavy Metal Toxicity and the Environment. LUCH, Andreas, ed. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*[online]. Basel: Springer Basel, 2012, 2012-4-24, s. 133-164 [cit. 2019-04-25]. *Experientia Supplementum*. DOI: 10.1007/978-3-7643-8340-4\_6. ISBN 978-3-7643-8339-8. Dostupné z: [http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-7643-8340-4\\_6](http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-7643-8340-4_6)
- [37] LUNOVA, Mariia, Barbora SMOLKOVÁ, Anna LYNNYK, Mariia UZHYTCHAK, Milan JIRSA, Šárka KUBINOVÁ, Alexandr DEJNEKA a Oleg LUNOV. Targeting the mTOR Signaling Pathway Utilizing Nanoparticles: A Critical Overview. *Cancers* [online]. 2019, **11**(1) [cit. 2019-04-25]. DOI: 10.3390/cancers11010082. ISSN 2072-6694. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6694/11/1/82>
- [38] Non-Thermal Plasma, as a New Physicochemical Source, to Induce Redox Imbalance and Subsequent Cell Death in Liver Cancer Cell Lines. *Cellular Physiology and Biochemistry* [online]. 2019, **52**(1), 119-140 [cit. 2019-04-25]. DOI: 10.33594/000000009. ISSN 10158987. Dostupné z: <https://articles.cellphysiolbiochem.com/Articles/000009/>
- [39] LUNOVA, Mariia, Andrey PROKHOROV, Milan JIRSA, et al. Nanoparticle core stability and surface functionalization drive the mTOR signaling pathway in

hepatocellular cell lines. *Scientific Reports* [online]. 2017, **7**(1) [cit. 2019-04-25].  
DOI: 10.1038/s41598-017-16447-6. ISSN 2045-2322. Dostupné z:  
<http://www.nature.com/articles/s41598-017-16447-6>

