

ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

Katedra přírodovědných oborů



Strukturní změny diamantové elektrody v in vitro podmínkách

Structural changes of diamond electrode under in vitro conditions

Diplomová práce

Studijní program: Biomedicínská a klinická technika

Studijní obor: Přístroje a metody pro biomedicínu

Vedoucí práce: Ing. Vladimíra Petráková, Ph.D.

Bc. Hana Vratislavská

Kladno, květen 2017

Katedra přírodovědných oborů

Akademický rok: 2016/2017

Z a d á n í d i p l o m o v é p r á c e

Student: **Bc. Hana Vratislavská**
Studijní obor: Přístroje a metody pro biomedicínu
Téma: **Strukturní změny diamantové elektrody v in vitro podmínkách**
Téma anglicky: Structural changes of diamond electrode under in vitro conditions

Zásady pro vypracování:

Nanokrystalický diamant (NCD) je díky svým vlastnostem využíván jako elektroda pro řadu aplikací v analytické chemii nebo elektrochemii. Jednou z dalších možných aplikací diamantu jsou buněčné elektrody. Cílem práce je prozkoumat strukturní změny diamantových elektrod v in vitro podmínkách a nalézt vhodný postup pro přípravu NCD vrstev, které jsou nejvhodnější pro použití v in vitro podmínkách.


- 1) Připravte NCD vrstvy na substrátech vhodných pro kultivaci buněk (sklo, křemen). Vzorčky připravte za použití různých metod nukleace substrátu (čištění, seeding) a různých parametrů při růstu vrstvy (např. tlak, teplota).
- 2) Charakterizujte morfologii vzorků pomocí optického mikroskopu, mikroskopu atomárních sil (AFM) a skenovacího elektronového mikroskopu (SEM).
- 3) Zjistěte vliv sterilizačních metod na strukturní změny připravených NCD vrstev.
- 4) Zjistěte vliv opakovaných kultivací buněk na strukturní změny NCD vrstev.

Seznam odborné literatury:

- [1] L. Kavan, Z. Vlckova Zivcova, V. Petrak et al., Boron-doped Diamond Electrodes: Electrochemical, Atomic Force Microscopy and Raman Study towards Corrosion-modifications at Nanoscale, *Electrochimica Acta*, ročník In press, číslo -, 2015
- [2] A Taylor, F Fendrych, L Fekete et al., Novel high frequency pulsed MW-linear antenna plasma-chemistry: Routes towards large area, low pressure nanodiamond growth, *Diamond and Related Materials*, ročník 20, číslo 4, 2011
- [3] P. May, Diamond thin films: a 21st-century material, *Philos. Trans. R. Soc., Ser. A*, ročník 358, číslo -, 2000

Vedoucí: Ing. Vladimíra Petráková, Ph.D.
Konzultant: Andrew James Taylor, Mgr. Jana Turňová

Zadání platné do: 20.08.2018


.....
vedoucí katedry / pracoviště


.....
děkan

V Kladně dne 06.03.2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem Strukturní změny diamantové elektrody v in vitro podmínkách 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).

V dne

.....

podpis

Poděkování

Mé poděkování patří vedoucí diplomové práce Ing. Vladimíře Petrákové, PhD. za odborné vedení a cenné rady. Dále bych ráda poděkovala paní Mgr. Janě Turňové za trpělivost a ochotu při realizaci našeho experimentu a celému týmu na Fyzikálním ústavu Akademie věd České republiky. Jmenovitě děkuji pánům Andrewovi Jamesovi Taylorovi, RNDr. Ladislavovi Feketemu, Ph.D. a Ing. Ladislavovi Klimšovi za vstřícnost a čas věnovaný charakterizaci našich vzorků.

Abstrakt

Diamant je ve formě tenkých vrstev používáný pro tvorbu rozhraní mezi materiálem (např. elektrodou nebo implantátem) a tkání díky jeho tvrdosti, mechanické odolnosti a biokompatibilitě. Náš experiment dokazuje jeho odolnost vůči opakovaným sterilizacím a kultivacím. Ve spolupráci s Akademií věd České republiky byly vytvořeny dva typy nanodiamantové elektrody. Vzorke každého typu byly rozděleny do triplikátů, které prošly jedním až čtyřmi cykly sterilizace a kultivace. Pro kultivaci byly použity myší fibroblasty CT26. Charakterizace nanodiamantové vrstvy byla provedena pomocí diferenciální interferenční kontrastní mikroskopie (DIC), rastrovacího elektronového mikroskopu (SEM), mikroskopie atomárních sil (AFM) a Ramanovy spektroskopie. Odolnost diamantových elektrod byla porovnána se zlatými vrstvami – vzorovým materiálem používaným standardně pro tvorbu elektrod ve formě naprášené 10nm vrstvy titanu a 100nm vrstvy zlata na sklo. Tyto vzorky prošly stejnými cykly sterilizace a kultivace. Z porovnání výsledků charakterizace vyplývá zachování, celistvost a minimální poškození nanodiamantové vrstvy. Oproti tomu zlaté vzorky vykazují relativně velké mechanické poškození. Diamantová vrstva tedy může zvýšit životnost elektrod či mikroelektrodových polí (MEA) oproti běžně používaným materiálům.

Klíčová slova

Nanodiamanty, tenká vrstva, strukturní změny, mikroelektrodová pole.

Abstract

Diamond is used to form the interface between the material (e.g. electrode or implant) and the tissue in the form of thin layers due to its hardness, mechanical resistance and biocompatibility. Our experiment proves its resistance to repeated sterilization and cultivation of cells. In cooperation with the Czech Academy of Sciences, two types of nanodiamond electrodes were developed and prepared. Samples of each type were divided into triplets that underwent one to four cycles of sterilization and cultivation. CT26 mouse fibroblasts were used for culturing. Characterization of the nanodiamond layer was performed by differential interference contrast microscopy (DIC), scanning electron microscope (SEM), atomic force microscopy (AFM) and Raman spectroscopy. The resistance of diamond electrodes has been compared to gold thin layers – a standard material used to form electrodes in the form of a sputtered 10 nm titanium layer and a 100 nm gold layer. These samples have undergone the same cycles of sterilization and cultivation. The results of the characterization indicate the preservation, integrity and minimal damage of the nanodiamond layer. On the other hand, gold samples show relatively large mechanical damage. Thus, diamond layer can increase the lifetime of the electrodes or microelectrode arrays versus commonly used materials.

Key words

Nanodiamond, thin layer, structural changes, microelectrode array.

Obsah

Seznam zkratk	9
Seznam obrázků	11
Seznam tabulek	12
1 Úvod	13
1.1 Cíl práce.....	13
1.2 Struktura práce.....	14
2 Teoretická část	15
2.1 Diamanty jako jedna z forem uhlíku	15
2.1.1 Diamanty v historii lidstva.....	16
2.2 Nanodiamanty.....	17
2.2.1 Historie syntézy nanodiamantů.....	18
2.2.2 Příprava nanodiamantů	18
2.2.2.1 Syntéza detonací	18
2.2.2.2 Metoda CVD.....	19
2.2.2.3 MW-LA-PECVD	23
2.2.3 Dopování.....	23
2.3 Metody charakterizace.....	24
2.3.1 Mikroskopie metodou DIC	24
2.3.2 SEM	25
2.3.3 AFM.....	26
2.3.4 Ramanova spektroskopie	27
3 Praktická část	28
3.1 Výroba vzorků.....	28
3.2 Nanodiamantové tenké vrstvy	30

3.2.1 Schéma experimentu.....	30
3.2.1.1 Sterilizace.....	31
3.2.1.2 Chemická úprava	31
3.2.1.3 Kultivace buněk	32
3.2.1.4 Enzymatické čištění	33
3.2.1.5 Oplach destilovanou vodou.....	33
3.3 Zlaté tenké vrstvy	33
3.4 Čištění diamantových elektrod	34
3.5 Charakterizace	34
3.5.1 Optický mikroskop	35
3.5.2 SEM	35
3.5.3 AFM.....	35
3.5.4 Ramanova spektroskopie	36
4 Výsledky	37
4.1 Kultivace buněk.....	37
4.2 Optický mikroskop	39
4.3 SEM.....	43
4.4 AFM	49
4.5 Ramanova spektroskopie.....	53
5 Diskuze	55
5.1 Kultivace buněk.....	55
5.2 Optická mikroskopie	55
5.3 SEM.....	56
5.4 AFM	57
5.5 Ramanova spektroskopie.....	58
6 Závěr.....	59
Seznam použité literatury	60

Seznam zkratek

MEA	MicroElectrode Array	mikroelektrodové pole
HPHT	High-Pressure High-Temperature	syntéza diamantů za vysokého tlaku a teploty
LPLT	Low-Pressure Low-Temperature	syntéza diamantů za nízkého tlaku a nízké teploty
MEMS	MicroElectroMechanical Systems	MikroElektroMechanické Systémy
CVD	Chemical Vapor Deposition	chemická depozice z plynné fáze
PECVD	Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition	depozice z plynné fáze podpořená plazmatem
RF	radiofrekvenční zdroj	
HF	Hot Filament	žhavicí vlákno
DC	Dirrect Current	stejnsměrný proud
MW	MicroWave	mikrovlny
MW-LA-PECVD	Microwave Linear Antenna Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition	chemická depozice z plynné fáze podpořená mikrovlnným plazmatem
NCD	NanoCrystalline Diamond	nanokrystalický diamant
B-NCD	Boron – dopped NanoCrystalline Diamond	borem dopovaný nanorystalický diamant
C0	nulý pracovní cyklus označení referenčních vzorků	
C1	1. pracovní cyklus	
C2	2. pracovní cyklus	
C3	3. pracovní cyklus	
C4	4. pracovní cyklus	
PEI	polyethylenimin	

TNT	trinitrotoluen	
DIC	Differential Interference Contrast microscopy	mikroskopická metoda diferenciálního interferenčního kontrastu
NIC	Nomarski Interference Contrast	Nomarského interferenční kontrast
SEM	Scanning Electron Microscopy	rastrovací/skenovací elektronový mikroskop
TEM	Transmission Electron Microscopy	transmisní elektronový mikroskop
AFM	Atomic Force Microscopy	mikroskopie atomárních sil
E-T detektor	Everhart-Thornley	
RMS	Root Mean Square	střední kvadratický průměr výškových odchylek
TPA	trans-polyacetylen	

Seznam obrázků

Obr. 1: Schéma chemických reakcí v průběhu depozice z plynné fáze (CVD).....	20
Obr. 2: Bachmanův trojúhelníkový diagram možností růstu diamantu.....	22
Obr. 3: Ilustrační obrázek diamantových elektrod.....	28
Obr. 4: Fotografie všech vzorků, které se zúčastnily experimentu s opakovanými sterilizacemi a kultivacemi.	29
Obr. 5: Schéma experimentu s opakovanými sterilizacemi a kultivacemi.....	30
Obr. 6: Snímky z optického mikroskopu pořízené po 40 minutách kultivace.....	37
Obr. 7: Snímky z optického mikroskopu pořízené po 24 hodinách kultivace.....	38
Obr. 8: Snímky z optického mikroskopu pořízené po 48 hodinách kultivace.....	38
Obr. 9: DIC snímky povrchu elektrod L16028 při různém zvětšení.....	40
Obr. 10: DIC snímky povrchu elektrod L16029.....	41
Obr. 11: DIC snímky povrchu zlatých elektrod.....	42
Obr. 12: SEM snímky elektrod L16028.....	44
Obr. 13: SEM snímky elektrod L16029.....	45
Obr. 14: SEM snímky zlatých elektrod.....	46
Obr. 15: Srovnání povrchů elektrod L16028 vyčištěných různými metodami.....	47
Obr. 16: Srovnání povrchů elektrod L16029 vyčištěných různými metodami.....	48
Obr. 17: AFM snímky povrchu elektrod L16028.....	50
Obr. 18: AFM snímky povrchu elektrod L16029.....	51
Obr. 19: AFM snímky povrchu zlatých elektrod.....	52
Obr. 20: Ramanovo spektrum pro diamantové elektrody L16028.....	53
Obr. 21: Ramanovo spektrum pro diamantové elektrody L16029.....	54

Seznam tabulek

Tab. 1: Přehled typů vzorků použitých během experimentu.	28
---	----

1 Úvod

Nanodiamanty představují třídu materiálů s velkým potenciálním využitím v oblasti biologie a medicíny. Výsledky mnoha studií ukázaly na možnost využití diamantů v různých lékařských aplikacích, např. zařízení na podávání léků, kardiovaskulární zařízení nebo lékařských diagnostických aplikacích [1]. Avšak je důležité vyvinout zdokonalené metody pro konjugaci farmakologických činidel a biologických molekul s diamanty, aby tyto pokročilé aplikace byly uvedeny do praxe [2]. V posledních letech již byla diamantová vrstva aplikována na kloubní náhrady, umělé srdeční chlopně a mikroelektromechanické systémy za účelem prodloužení životnosti [3].

Hojně využívanou aplikací diamantového zařízení v lékařství je diamantový nůž, který je vyráběn v mnoha velikostech a různé kvalitě dle konkrétních aplikacích. Tyto nože musí být odborně ošetřovány a ostřeny, protože dochází k jejich otupování [4]. Diamantové nože jsou používány při operacích očí, konkrétně v refrakční chirurgii. Zejména jsou hlavním nástrojem pro radiální keratotomii¹ pro korekci krátkozrakosti a pro asymetrickou radiální keratotomii pro korekci astigmatismu a léčbu prvního a druhého stupně keratokonu² [6].

Přestože mechanické parametry diamantových tenkých vrstev jsou známy, dosud neproběhla systematická studie, která by stanovila míru opotřebení diamantových tenkých vrstev při biologických experimentech, sterilizaci, mechanickému nebo enzymatickému odmyváání buněk a čištění. Případně vliv sterilizace a opakovaného používání na růst buněk na diamantovém substrátu.

1.1 Cíl práce

Tato práce uvádí set cyklů opakované sterilizace a kultivace buněk na diamantové podložce, kde v každém kroku je hodnocena míra opotřebení pomocí mikroskopických metod. Diamantové vrstvy jsou na dvou různých podložkách – na skle a na titanu, aby demonstrovaly podmínky, které jsou u výsledných mikroelektrodoových polí – kombinace vodivých částí (titan) s izolačními (sklo). Výsledky jsou porovnané s opotřebením

¹ Keratotomie - chirurgické naříznutí rohovky [5].

² Keratokonus - onemocnění rohovky, při němž se rohovka kuželovitě vyklenuje a ztenčuje [5].

zlatých tenkých vrstev, jako materiálu, který se běžně používá k výrobě mikroelektrodových polí.

Cílem této práce je prozkoumat strukturní změny nanodiamantového povrchu v důsledku opakovaných sterilizací a kultivací buněk. Dle naší hypotézy by vzniklé poškození, nebo změna struktury vrstvy, mělo být nižší oproti kontrolnímu vzorku (tenká vrstva zlata na titanu) díky mechanickým vlastnostem diamantu. Tuto hypotézu chceme dokázat experimentem se dvěma typy nanodiamantových tenkých vrstev (elektrod). Vzorky podstoupí jednu až čtyři sterilizace a následné kultivace buněk. Charakterizace povrchu elektrod byla provedena ve spolupráci s Fyzikálním ústavem Akademie věd České republiky mikroskopickými metodami – optická mikroskopie, elektronová mikroskopie a mikroskopie atomárních sil.

1.2 Struktura práce

Práce je členěna do pěti hlavních kapitol – teoretická část, praktická část, výsledky, diskuze, závěr. Teoretická část diplomové práce je věnována obecnému úvodu do diamantových vrstev. Kapitola začíná stručnou historií syntézy diamantů, pokračuje přes nejčastější metody syntézy a úpravy diamantů a končí úvodem do použitých charakterizačních metod. Praktická část je věnována podrobnému popisu provedeného experimentu, jehož výsledky jsou uvedeny v kapitole Výsledky a rozebrány v kapitole Diskuze.

2 Teoretická část

2.1 Diamanty jako jedna z forem uhlíku

Uhlíkové vrstvy obecně, jsou perspektivní pro použití v mnoha odvětvích vědy a techniky. Jako příklad uveďme optoelektroniku, medicínu, kvantovou elektroniku a počítačové inženýrství. Velký zájem o tenké vrstvy pochází z faktu, že v nich mohou být realizovány amorfnní stavy, které jsou odpovědné za řadu užitečných vlastností např. korozní odolnost, dobrá vodivost, vysoká tvrdost, optická transparentnost a mnoho dalších [7].

Tenké vrstvy diamantu a amorfnního uhlíku představují třídu materiálů, které kombinují vlastnosti diamantu, grafitu a polymeru. Amorfnní uhlík se může nacházet v několika hybridizovaných stavech, na rozdíl např. od amorfnního křemíku a germania, které se mohou nacházet pouze v sp^3 hybridizaci, a tedy jejich atomové orbitály zaujímají v prostoru tvar čtyřstěnu. Amorfnní uhlík se může nalézat nejenom v sp^3 hybridizaci jako křemík a germanium, ale i v sp^2 (rovnostranný trojúhelník) a sp^1 (lineární) hybridizaci vazeb. Poměr těchto hybridizovaných vazeb je zodpovědný za vlastnosti uhlíkových tenkých vrstev [8].

Diamanty jsou tvořeny atomy uhlíku, které jsou uspořádány do kubické plošně centrované mřížky (fcc). Ve skutečnosti jde o dvojnásobnou kubickou plošně centrovanou mřížku, která vznikla translací. Elementární buňka diamantu tedy obsahuje 8 atomů uhlíku v sp^3 hybridizaci. Jedná se tedy o krystalickou formu uhlíku [9]. Pokud si představíme atomy uhlíku jako pevné částice kulového tvaru, pak zaujímají 34% prostoru mřížky [10].

Diamantový krystal vykazuje nejvyšší atomovou hustotu ($1,76 \times 10^{23} \text{ cm}^{-3}$) ze všech pevných látek v důsledku malé vzdálenosti mezi jednotlivými atomy uhlíku (1,54 Å). Velmi vysoká vazebná energie mezi dvěma atomy uhlíku (83kcal/mol) a směrovost tetraedrických vazeb jsou příčinou vysoké pevnosti diamantu. Dále vykazuje nejvyšší tvrdost podle Vickerse (10000 kg/mm^2) ze všech známých materiálů. Diamant je rovněž odolný vůči korozi s výjimkou kyslíkové atmosféry při teplotách nad 800 °C. Jeho tepelná vodivost je také největší ze všech materiálů ($20 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ při pokojové teplotě) [11].

2.1.1 Diamanty v historii lidstva

Diamanty byly poprvé objeveny v Indii v roce 800 př. n. l. Dřívější doly byly nánosovým štěrkem v březích nebo na dně aktivních koryt řek, ve kterých se diamanty usadily ještě s jinými tvrdými a těžkými krystaly vlivem záplavových vod. Nejslavnější indický důl byl v Kolluru, kde bylo nalezeno několik historických diamantů, mezi nimi i velmi slavný Koh-i-Noor. Ačkoli většina diamantových dolů byla do 18. století vytěžena, tak některé jsou stále funkční, a dokonce budou některé oblasti otevřeny pro komerční využití. S úpadkem indických dolů byly objeveny ložiska v Brazílii, po jejich vytěžení byly obrovské zásoby nalezeny v Africe. Dnes je africký kontinent hlavním dodavatelem přírodního diamantu na světě. Většina diamantů pro výrobu šperků pochází z pobřežních ložisek v jihozápadní Africe, zatímco průmyslově kvalitní diamanty produkuje Angola. Velká ložiska byla objevena v 50. letech minulého století na Sibiři, v 70. letech v severozápadní Austrálii a v 90. letech v severní části USA [12].

Nejprve byly diamanty považovány pouze za drahokamy, které se používaly k výrobě šperků nebo k finančním transakcím. Existují historické důkazy z 16. století naznačující použití diamantového prášku nebo zrn pro leštění drahokamů a pro řezání a gravírování na sklo. Dnes však je diamant považován za materiál s velkým potenciálem a je používán nejenom k dekorativním účelům, ale používá se na příklad i jako brusný nástroj a velké uplatnění má ve vědě a průmyslu. Navzdory jeho velké užitečnosti není využíván v průmyslu ve velké míře kvůli jeho vzácnosti. I s moderními těžebními metodami musí být vytěženo a zpracováno průměrně 250 tun horniny, aby byl vyroben jeden karát diamantu. Proto od pradávna existuje snaha o výrobu syntetického diamantu [12].

Na konci 18. století britský chemik Smithson Tennant dokázal, že je diamant složen pouze z uhlíku a tím započala snaha o jeho syntézu. Úspěšné syntézy bylo dosaženo v polovině 20. století dvěma metodami. První bylo využití vysokého tlaku a vysoké teploty (HPHT, High-Pressure High-Temperature), což vedlo ke tvorbě diamantové drtě. Druhá metoda využívala nízkou teplotu, nízký tlak (LPLT, Low-Pressure Low-Temperature) a vedla k syntéze polykrystalické vrstvy na nediamantových substrátech [12].

2.2 Nanodiamanty

Díky předchozím výzkumům bylo zjištěno, že nanodiamanty vynikají vysokou biokompatibilitou, která je mnohem vyšší než u jiných uhlíkových nanomateriálů [13]. Kombinace vlastností jako je necytotoxicita, stabilní fotoluminiscence, a jednoduchost funkcionalizace biomolekulami, dělají z nanodiamantů velmi atraktivní materiál pro využití jak v in vitro, tak v in vivo biomedicíně [13]. Nejčastěji jsou nanodiamanty využívány pro pokrytí ortopedických implantátů [14], transport léčiv [15], zásobník léčiv [16], fluorescenční barvivo [17].

Dále nanodiamanty nacházejí uplatnění jako povrchový materiál elektrod pro analytickou chemii a elektrochemii z důvodu velmi širokého potenciálního okna ve vodném roztoku, odolnosti proti znečištění, chemické stálosti v agresivním prostředí, transparentnosti a relativní snadnosti funkcionalizace. Vzájemný vztah mezi povrchovou vodivostí a chemickým prostředím poskytuje další prostředek pro studium diamantu a může sloužit jako základ pro senzory [18].

Jednou z dalších velmi významných vlastností nanodiamantů je jejich antibakteriální působení. Bakteriální infekční onemocnění, jako je chronický zánět, představují velmi vážnou hrozbu pro lidské zdraví. Trvalý nárůst infekcí způsobených bakteriemi odolnými vůči více léčivům přispívá k současným problémům, jimž moderní zdravotní péče čelí. Léčba bakteriálních infekcí s multirezistentními bakteriemi je velmi obtížná, neboť vývoj nových antimikrobiálních léků nedosahuje rychlosti, s jakou se vyvíjí rezistentní patogeny. Tato skutečnost vyvolala zájem o vývoj alternativ k antibiotikům. Slibnou strategií je využití nanomateriálů s antibakteriálním charakterem a nanostruktur vykazujících antiadhezivní aktivitu proti biofilmům. Nanodiamanty, které jsou modifikované glykany³, se ukázaly být velmi užitečné pro boj s mikrobiálními infekcemi. Jako příklad uveďme manózou modifikované nanodiamantové částice, které mají vysoký potenciál v boji proti bakterii *Escherichia coli*. Budoucnost v takto upravených částicích je velmi slibná, ale nutně vyžaduje pečlivý výzkum in vivo [19].

³ Glykany jsou oligosacharidy nebo polysacharidy, které se hydrolyticky rozkládají na monosacharidy [5]. Často je tento pojem využíván pro označení sacharidové části glykoproteinů.

2.2.1 Historie syntézy nanodiamantů

První zmínka o syntéze nanodiamantů pochází z července 1963, kdy byla objevena syntéza pomocí detonace. Období mezi lety 1963 až 2003 můžeme rozdělit do třech období. Mezi lety 1963-1982 se všechny studie soustředí na výrobu nanodiamantů. V období 1982-1993 překročil výrobní potenciál rozsah aplikací, intenzivní studie a výroba nanodiamantů je prováděna současně na několika výzkumných centrech v Sovětském svazu. Mezi lety 1993-2003 vede nerentabilní výroba k uzavření řady výzkumných center a ukončení výroby [20].

2.2.2 Příprava nanodiamantů

Vlastnosti a struktura nanodiamantů závisí na jejich přípravě. Obvykle jsou připravovány metodou HPHT, kdy vznikají růstem za vysoké teploty a tlaku ze zárodečného centra a následným drcením. Tento proces simuluje tvorbu diamantů v přírodě. Dalšími metody představuje detonace směsi výbušnin, nebo CVD (Chemical Vapor Deposition, Chemická depozice z plynné fáze) [21].

2.2.2.1 Syntéza detonací

Při této metodě je nejprve výbušnina, či směs výbušnin, vystavena vysokému tlaku a teplotě a k explozi dochází v uzavřené odpalovací komoře ve vodním nebo suchém prostředí. Jako výbušnina je nejčastěji používán trinitrotoluen (TNT), dále hexogen, oktogen a jejich směsi. Mezi produkty detonace najdeme mimo jiné volný uhlík. Kombinace tlaku, teploty a detonační vlny umožňují zachování diamantu a zabraňují jeho grafitizaci. V druhém kroku syntézy dochází k ochlazení atomů diamantů na teplotu, která není dostatečná pro grafitizaci. Velikost vzniklých nanodiamantů je závislá na kapacitě chladicího média v komoře. Posledním krokem je zbavení nanodiamantů povrchové vrstvy, která je tvořena grafitem a amorfním uhlíkem. Tento krok se odehrává opět za vysokého tlaku a teploty, ale tentokrát v autoklávu, za působení kyselin [22].

Nový mechanismus tvorby částic nanodiamantu během detonační syntézy zahrnuje následující kroky. Nejprve jsou molekuly TNT rozloženy na základní radikály – C_2 a CO_3 . V případě hexogenu jsou vytvořeny pouze dimery C_2 . V dalším kroku je z radikálů C_2 vytvořen cyklohexan nebo rovnou molekula adamantanu⁴. Dále dochází

⁴ Adamantan je krystalický cykloalkan.

k interakci diamantového jádra (adamantanu) s methylovými a dalšími monokarbonovými zbytky, což má za následek růst nanodiamantu [23].

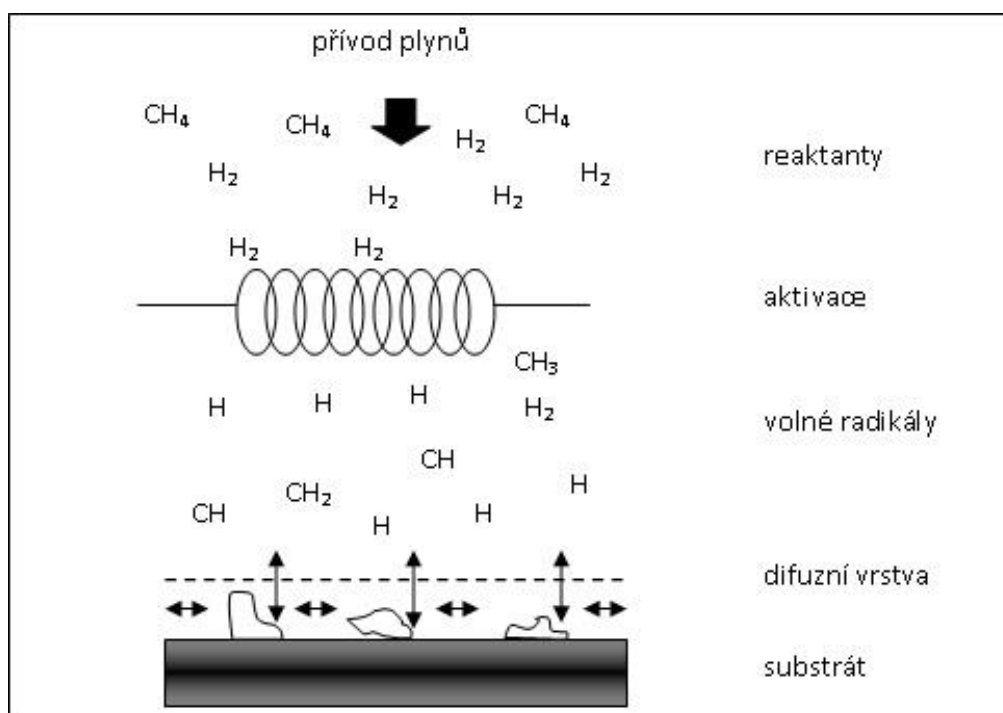
Výroba a růst detonačních nanodiamantů je s největší pravděpodobností pouze chemickým procesem. Obecně je předpokládána univerzální povaha detonační syntézy. Bez ohledu na to, zda je použita výbušná látka obsahující vodík (např. TNT nebo hexogen) nebo bez obsahu vodíku, je pro tuto reakci typický vznik radikálového dimeru C_2 . Tento dimer pravděpodobně vytváří nanodiamantové nukleační centrum, které je velmi podobné adamantanu. Toto centrum se zdá se být jedinou stabilní uhlíkovou strukturou v chemické reakční zóně. Zdá se, že nanodiamantové krystaly rostou difúzním mechanismem reakcí, kdy je C_2 dimer přidáván na molekuly adamantanu a pak na volné vazby povrchu diamantových částic. Ukončení růstu nastává v důsledku akumulace strukturálních defektů a dokončení přechodu sp^2 hybridizovaného uhlíku na sp^3 hybridizovaný „diamantový“ uhlík a vyčerpáním uhlíkových radikálů v důsledku jejich rekombinace [23].

2.2.2.2 Metoda CVD

K objevu této metody vedla myšlenka, že diamant se může vytvářet přidáním uhlíkových atomů podle šablony tak, aby atomy zaujímaly tetrahedrální uspořádání. Pokud by se tohoto uspořádání podařilo dosáhnout z plynné fáze a za nízkého tlaku, znamenalo by to velkou úsporu energií a prostředků na pořízení velmi nákladné aparatury simulující přírodní podmínky vzniku diamantu. Tato myšlenka vedla k experimentům s tepelným rozkladem uhlík obsahujících plynů za sníženého tlaku. Tyto experimenty byly provedeny na začátku 60. let minulého století a vedly k vypěstování diamantů na povrchu krystalů přírodních diamantů zahřátých na 900 °C. Avšak v těchto velmi raných experimentech docházelo zároveň i k depozici grafitu, což vedlo k dalším experimentům, při kterých bylo mimo jiné zjištěno, že depozice z plynné fáze může být použita i pro růst diamantu na nediamantovém substrátu. Všechny tyto znalosti zkombinoval Národní institut pro výzkum materiálů v Japonsku, kde v roce 1982 zkonstruovali „reaktor se žhavicím vláknem“. V této aparatuře bylo dosaženo velmi rychlého růstu (1 $\mu\text{m}/\text{hod}$) kvalitních diamantů na nediamantových substrátech. O rok později uvedla stejná skupina vědců do provozu aparaturu využívající mikrovlnné plazma. Obecně tato aktivita a série objevů podnítila celosvětový zájem o metodu CVD, která v akademické i průmyslové sféře pokračuje až do současnosti [24].

Technika CVD umožňuje depozici čtyř různých druhů uhlíku: amorfni uhlík s sp^2 nebo sp^3 hybridizovanými orbitaly a polykrystalické nebo monokrystalické diamanty [25].

Hlavní myšlenkou metody chemické depozice z plynné fáze je vystavení pevnolátkového substrátu účinkům plynných prekurzorů, které obsahují molekuly uhlíku. Nad substrátem probíhá chemická reakce, jejímž důsledkem je depozice tenkého filmu na povrch substrátu. Existuje několik CVD technik pro přípravu nanodiamantové vrstvy, avšak hlavní principy jsou pro všechny techniky stejné [24]. Chemické reakce se vyskytují na povrchu vyhřívaného substrátu a v jejich blízkosti, což vede k usazování tenkého filmu na povrchu. To je doprovázeno produkcí chemických vedlejších produktů, které jsou vyčerpány z komory spolu s nezreagovanými prekurzory plynů [12]. Obvykle má substrát vyšší teplotu než $700\text{ }^\circ\text{C}$, aby bylo zajištěno co nejpravděpodobnější vytvoření diamantu spíše než amorfniho uhlíku [24].



Obr. 1: Schéma chemických reakcí v průběhu depozice z plynné fáze (CVD). Inspirováno [24].

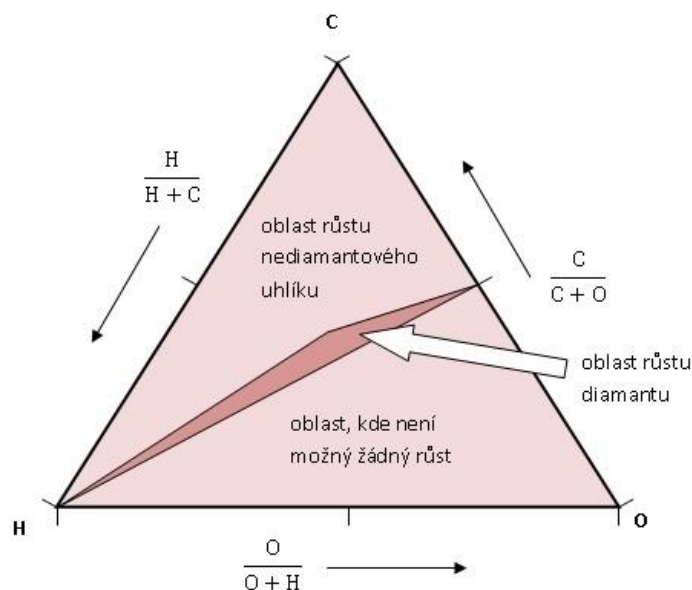
V prvním kroku jsou v komoře smíchány reaktivní plyny, nejčastěji CH_4 a H_2 . Tato pracovní směs projde aktivací energetickým zdrojem v závislosti na typu metody. Může se jednat o aktivaci např. radiofrekvenčním zdrojem (RF), žhavicím vláknem (HF),

stejným proudem (DC) atd. Aktivace způsobí rozpad molekul na atomy a volné radikály, vytvoření iontů a elektronů, zahřátí plynu na pár tisíc kelvinů. Před dopadem na povrch substrátu se tyto reaktivní částice míchají a podstupují celou řadu chemických reakcí [24]. Jako substrát je nyní nejčastěji používán molybden, nitrid křemičitý a karbid wolframu [26].

Růst diamantu začíná ve chvíli, kdy se jednotlivé atomy uhlíku, které vznikly rozpadem CH_4 , usazují na povrch takovým způsobem, aby iniciovaly vznik sp^3 tetraedrické mřížky. Při použití přírodních diamantových substrátů je šablona pro požadovanou mřížku již přítomna a mřížka je pouze postupně rozšířena novými atomy. U nediamantových substrátů žádná šablona neexistuje, a tak jsou atomy uhlíku, deponované jinak než do diamantové formy, leptány zpět do plynné fáze reakcí s atomárním vodíkem. To vede k velmi dlouhé době, po které začne diamant růst – řádově to jsou hodiny až dny. Proto je povrch substrátu upraven, aby se tato doba snížila a zvýšila se hustota nukleačních míst. Nejjednodušší je upravení povrchu mechanickým obroušením pomocí diamantového písku s rozměry zrn od 10 nm do 10 μm . Předpokládá se, že toto obroušení pomáhá nukleaci třemi možnými způsoby. Buď vytvořením vhodně tvarovaných škrábanců, které slouží jako předloha růstu, nebo zarytí nanometrových fragmentů diamantu působí jako zárodečné krystaly. Poslední možností je kombinace obou předchozích [24].

Jakmile jednotlivé krystaly na substrátu rostou, dojde k jejich splynutí, protože rostou ve všech třech směrech. V tomto okamžiku vytvářejí spojitý film a mohou růst pouze do výšky. S rostoucí výškou se velikost krystalu zvětšuje a počet defektů se snižuje. To znamená, že vnější vrstvy silnějších fólií jsou často mnohem kvalitnější než počáteční nukleační vrstvy. Z toho důvodu u aplikací, u kterých je velmi důležitá kvalita a malá velikost krystalů, je vrstva oddělena od substrátu a spodních 50-100 μm je obroušeno [24].

Dle Bachmannova trojúhelníkového diagramu může diamant růst pouze při daném poměru uhlíku, vodíku a kyslíku v plynné fázi. Růst není závislý na použité metodě depozice ani na použité směsi plynů [27].



Obr. 2: Bachmanův trojúhelníkový diagram možnosti růstu diamantu. Inspirováno [24].

Nyní je všeobecně známo, že atomy vodíku jsou ve směsi plynů velmi důležité a vlastně řídí všechny chemické procesy. Atomy vodíku jsou produkovány buď termálním rozpadem H_2 na horkém povrchu žhavicího vlákna (metoda HF CVD), nebo po interakci H_2 a elektronu v plazmových systémech (metoda MW PECVD, Microwave Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition, Depozice z plynné fáze podpořená mikrovlnným plazmatem). Právě vysoká koncentrace atomárního vodíku je klíčová pro správný průběh chemických procesů. Vodík je využíván pro zaplnění volných kovalentních vazeb, které se nacházejí na povrchu vznikajícího diamantu, který jinak obsahuje sp^3 vazby. Navázáním vodíku je tedy udržena stabilní krystalická mřížka. Chceme-li vodík nahradit dalším uhlíkem, necháme diamant s vodíkem na povrchu reagovat s atomárním vodíkem. Vznikne H_2 a kovalentní vazba je uvolněna pro navázání uhlovodíku (methyly). Necháme-li povrch diamantu dále reagovat s atomárním vodíkem, vznikne radikál CH_2 . Tento radikál je navázán na sousední methylovou skupinu a ve výsledku dojde k uzavření dvou atomů uhlíku do krystalické mřížky diamantu. Tímto procesem je zabráněno grafitizaci povrchu. Vodík zabraňuje tvorbě polymerů nebo dlouhých uhlovodíkových řetězců [24].

Jedním z prvních příkladů aplikace CVD ve velkém měřítku byl karbonylový proces pro rafinaci niklu, který byl vyvinut v roce 1890 [28]. Mnoho z prvních aplikací zahrnovalo rafinaci nebo čištění kovů. Jiné počáteční aplikace zahrnují nanášení povlaků

pro zvýšení odolnosti proti opotřebení, proti korozi, výrobu konstrukčních prvků a součástí. Mnohé z výše jmenovaných aplikací jsou stále velmi ekonomicky významné, avšak většina nedávných výzkumů je zaměřena na depozici tenkých vrstev. Velká část výzkumu a vývoje v posledních desetiletích se soustřeďuje na polovodičovou revoluci. CVD je technologie, která umožňuje výrobu mikroelektroniky na bázi křemíku. V závislosti na zařízení se používají postupy CVD pro ukládání tenkých vrstev aktivního polovodičového materiálu, vodivých spojů nebo izolačních dielektrik. Další zajímavou aplikací využívající depozici z plynné fáze je výroba mikroelektromechanickým struktur tzv. MEMS (MicroElectroMechanical Systems, MikroElektroMechanické Systémy). Většina technologie MEMS je odvozena z technologie křemíkové mikroelektroniky, většina těchto zařízení je vyrobena z polykrystalických křemíkových filmů deponovaných na křemíkových destičkách a s mezivrstvami oxidu křemičitého, které jsou později odstraněny chemickým leptáním. Jak polykrystalický křemík, tak oxid křemičitý jsou deponovány za použití CVD nebo PECVD. Postupy a sled reakcí při CVD definují strukturu zařízení kolmo na křemíkový substrát, litografické postupy a leptání definují strukturu v dalších dvou rozměrech [28].

2.2.2.3 MW-LA-PECVD

Pro depozici B-NCD vrstev při nízkých teplotách a na velké plochy byla vyvinuta nová metoda depozice z plynné fáze mikrovlnnou plazmou MW-LA-PECVD. Při této metodě je povrchová vlna udržována lineárně podél antén, a proto velikost mikrovlnného výboje není omezena vlnovou délkou vstupního mikrovlnného výkonu. Růst s dobrou homogenitou na velkých plochách a za nízkých teplot (<400 °C) je umožněn díky difuzním vlastnostem plazmatu. Tyto vlastnosti získává v důsledku kombinace nízkého pracovního tlaku, nízké energie elektronů (1,5 eV) s vysokou hustotou plazmatu ($>10^{11}/\text{cm}^3$), což umožňuje vysokou koncentraci atomárního vodíku i při nízkých hustotách výkonu [29].

2.2.3 Dopování

Pro umocnění elektronických vlastností nanokrystalických diamantových (NCD) vrstev je možné diamant dopovat jinými atomárními prvky a vytvořit tak polovodič n-typu nebo p-typu. Velmi časté je dopování borem, tak vzniknou centra s pozitivním nábojem a diamant tak získává unikátní vlastnosti polovodiče p-typu, které jsou velmi

důležité pro další elektrochemické aplikace [29]. Vzhledem k jejich vysoké vodivosti se využívají např. při úpravách vody nebo jako elektrochemické senzory [30].

Elektrochemické vlastnosti borem dopovaného diamantu jsou ovlivněny různými faktory jako je úroveň dopování, krystalografická orientace, morfologie nebo také přítomnost atomů nečistot na povrchu. Na povrchu diamantu se přirozeně vyskytují heteroatomy⁵, např. vodík nebo kyslík. Dipóly C-H ve vodíkem terminovaných diamantech (HT) způsobují negativní elektronovou afinitu. Naopak C-O dipóly v kyslíkem terminovaných diamantech (OT) způsobují pozitivní afinitu. Ve vodných roztocích elektrolytů je však možné přeměnit HT diamant na OT elektrochemickou oxidací. Významným důsledkem terminace diamantu vodíkem je p-typ vodivosti i pro nedopovaný diamant. Na druhou stranu diamant s kyslíkovým heteroatomem je vždy izolant. Cílené chemické modifikace, jako např. dopování borem, byly uskutečněny pro elektrochemické, fotoelektrochemické a jiné konkrétní aplikace [32].

Borem dopované nanokrystalické diamantové vrstvy (B-NCD) jsou nejčastěji produkovány ve směsi H₂ a CH₄ ke kterým je přidán bor ve formě trimethylboranu B(CH₃)₃, diboranu B₂H₆ nebo ve formě trimethylboritanu B(OCH₃)₃, za použití metod HF CVD [33, 34] nebo MW PECVD [30].

Pro zvýšení průmyslového využití B-NCD vrstev je nezbytná depozice nanodiamantů na velké plochy substrátu za nižších teplot (menších než 400 °C), které jsou kompatibilní se substrátem. Při obou výše zmíněných metodách (HF CVD a MW PECVD) dosahuje teplota až k 1000°C [29].

2.3 Metody charakterizace

2.3.1 Mikroskopie metodou DIC

Optická mikroskopie pomocí metody diferenciálního interferenčního kontrastu (DIC), která je rovněž známá jako Nomarského mikroskopie nebo metoda Nomarského interferenčního kontrastu (NIC) je používána ke zvýšení kontrastu v neprůhledných vzorcích a byla vyvinuta v padesátých letech 20. století polským fyzikem Georgesem

⁵ Heteroatomy jsou atomy jiných prvků než uhlíku, vyskytující se v heterocyklických sloučeninách. Podle druhu heteroatomu lze sloučeniny dále dělit [31].

Nomarskim. Metoda funguje na principu interference vlnových polí. První pole interaguje s vyšetřovaným vzorkem, druhé pole je referenční [35].

Mikroskop využívá dvojsvazkové interference, tedy lokální přechody v optické dráze paprsku jsou transformovány do oblastí různého kontrastu v obraze objektu. Jak je obecně známo z teorie difrakce, délka optické dráhy je součinem indexu lomu a vzdálenosti – tloušťce mezi dvěma body na optické dráze a přímo souvisí s dobou průchodu a počtem cyklů vibrací způsobené fotonem cestujícím mezi těmito dvěma body. V DIC mikroskopii je vzorek snímán dvojicí koherentních paprsků, které vznikly difrakcí paprsku na difrakčním prvku v rozdělovači. Pokud paprsky procházejí fázovým objektem v oblasti, kde je gradient v indexu lomu nebo tloušťce, budou mít rozdílnou optickou dráhu. Rozdíl v optické dráze je poté převeden na změnu amplitudy obrazu, a protože tento rozdíl odpovídá fázovému rozdílu mezi dvěma paprsky, je potvrzena přítomnost fázových gradientů ve vzorku. Vzhledem k tomu, že je délka optické dráhy produktem indexu lomu a tloušťky, nelze ze samotného obrazu zjistit, zda je fázový rozdíl způsoben díky rozdílům v indexu lomu, ve tloušťce nebo v obou možnostech. Přesněji řečeno by rozdíly v amplitudě obrazu měly být označovány jako rozdíl optické dráhy, nikoliv jako rozdíly v indexu lomu nebo rozdíly ve fyzické tloušťce, pokud neznáme bližší informace o zkoumaném objektu [36].

DIC mikroskop je složen z polarizátoru, difrakčního prvku, kondenzoru, objektivu a analyzátoru. Úloha polarizátoru je zřejmá, vytváří lineárně polarizované světlo, které prochází difrakčním prvkem. Difrakčním prvkem je zde Wollastonův hranol, který rozdělí paprsek na řádný a mimořádný šířící se stejným směrem, avšak rozdílnou rychlostí. Kondenzátor je spojná čočka nebo soustava čoček sloužící k soustředění světelných paprsků do jednoho místa na vzorku. Po průchodu vzorkem, nebo odrazu na něm, jsou oba paprsky v objektivu rekombinovány [36].

2.3.2 SEM

Skenovací, nebo též rastrovací, elektronová mikroskopie (Scanning Electron Microscopy, SEM) je, zjednodušeně řečeno, obdobou optické mikroskopie, avšak s použitím proudu elektronů namísto fotonů. Základními součástmi mikroskopu je zdroj elektronů, kondenzační čočky a vakuový systém. Tato metoda je primárně využívána ke studiu povrchové struktury vzorků. Zdrojem elektronů je obvykle wolframové vlákno.

Elektrony jsou zrychleny na energii 1–30 kV. Pokud bychom srovnali metodu SEM s metodou transmisní elektronové mikroskopie (Transmission Electron Microscopy, TEM), tak právě u zrychlení elektronů je největší rozdíl. Při TEM jsou elektrony urychleny na vyšší energii, 100–300 kV. Elektronový paprsek je směřován kondenzátorovými čočkami na vzorek, kde má při dopadu průměr pouze 2–10 nm. Elektrony interagují s atomy ve vzorku, které jsou vybuzeny na vyšší energetickou hladinu a emitují sekundární elektrony. Tyto sekundární elektrony jsou detekovány a jejich množství závisí mimo jiné na topografii povrchu [37].

První mikroskop využívající elektronový svazek byl vynalezen roku 1937 Manfredem von Ardennem. V roce 1965 byl uveden na trh první komerční přístroj s názvem Stereoscan za pomoci Cambridge Scientific Instrument Company [38].

2.3.3 AFM

Mikroskopie atomárních sil (Atomic Force Microscopy, AFM) je mikroskopická technika, která je používána k trojrozměrnému zobrazování povrchů. Tuto metodu přivedli na svět v roce 1986 pánové Gerd Binnig, Cal Quate a Christoph Gerber [39].

Hlavními komponentami mikroskopu je hrot umístěný na ohebném nosníku, tzn. cantileveru⁶, optický detekční systém, piezoelektrické skenery ve směru x–y–z a zdroj laserového záření [40]. Hlavní princip spočívá v přiblížení hrotu ke vzorku na vzdálenost jednotek, maximálně desítek nanometrů. Na hrot tak působí množství atomárních sil, např. van der Waalsovy síly, kapilární, elektrostatické, magnetické síly a mnoho dalších, které ovlivňují prohnutí nosníku. Detektor zaznamenává výchylku a pohyb nosníku s hrotem pomocí odrazu laserového paprsku. Mikroskopie může být provozována v kontaktním, bezkontaktním a poklepovém režimu. V kontaktním režimu se hrot fyzicky dotýká povrchu vzorku. V poklepovém režimu osciluje nosník se známou frekvencí, amplituda kmitů se obvykle pohybuje od několika nanometrů do přibližně 200 nm. Při přiblížení hrotu k povrchu způsobí atomární síly snížení amplitudy oscilací. V bezkontaktním režimu vůbec nedochází k fyzickému kontaktu hrotu a vzorku. Nosník osciluje s amplitudou menší než 10 nm a van der Waalsovy síly, které jsou nejsilnější

⁶ Výraz cantilever je běžně užíván i v českém jazyce.

v rozmezí 1-10 nm nad povrchem, způsobí snížení rezonanční frekvence nosníku. Volba režimu vždy závisí na zkoumaném typu vzorku [41].

Nosníky jsou dnes vyráběny z křemíku nebo nitridu křemičitého. Velikost a materiál nosníku volíme v závislosti na zkoumaném materiálu, můžeme tak vybrat tužší nebo pružnější nosník. Obecně jsou nosníky vyráběny v obdélníkovém nebo trojúhelníkovém tvaru, ale vyskytují se i hybridní tvary přizpůsobené konkrétním požadavkům. Hrot je umístěn na konci ohebného nosníku a může mít mnoho tvarů a být různě ostrý, ostřejší hrot může např. často zlepšit boční rozlišení AFM [40].

2.3.4 Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie je metoda hojně využívaná v analytické chemii. Nepružný rozptyl světla, na kterém je tato metoda založena, byl předpovězen již v roce 1923 Adolfem Smekalem. První pozorování nepružného rozptylu proběhlo až v roce 1928 za účasti Sira Chandrasekhara Venkata Ramana po kterém je pojmenován důsledek nepružného rozptylu, Ramanův efekt [42].

Jako zdroj záření je obvykle používán laser z viditelné nebo infračervené oblasti. Světlo interaguje s molekulárními vibracemi (a rotacemi) v důsledku čehož je rozptýleno. Fotony rozptýleného záření mají jinou frekvenci, fázi, polarizaci a obsahují informaci o rozptylovém centru, na příklad o jeho energii a prostorové orientaci chemické vazby. Je-li vlnová délka rozptýlených fotonů nižší než vlnová délka excitačního záření, pak mluvíme o Stokesově posunu. Naopak pokud je rozptýlená vlnová délka vyšší, mluvíme o anti-Stokesově posunu. Při ozáření vzorku rovněž dochází k pružnému Rayleighově rozptylu, avšak takto rozptýlené světlo je snadno odfiltrováno, protože vlnová délka rozptýlených fotonů je totožná s vlnovou délkou excitačního laserového záření [42].

3 Praktická část

Nanokrystalický diamant je díky svým vlastnostem využíván jako elektroda pro řadu aplikací a v neposlední řadě jako buněčná elektroda. Cílem našeho experimentu je dokázat opakovanou sterilizací a kultivací buněk mechanickou odolnost diamantové vrstvy nanesené na sklo.

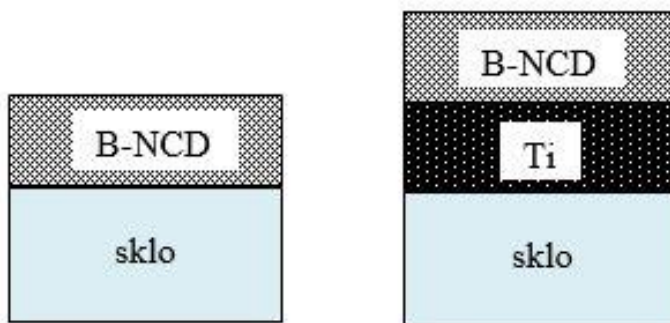
V následující tabulce je uveden přehled všech vzorků – typ podložky, typ tenké vrstvy a používané označení.

Tab. 1: Přehled typů vzorků použitých během experimentu.

podložka	tenká vrstva	označení
sklo	B-NCD	L16028
titan	B-NCD	L16029
sklo	titan-zlato	zlato

3.1 Výroba vzorků

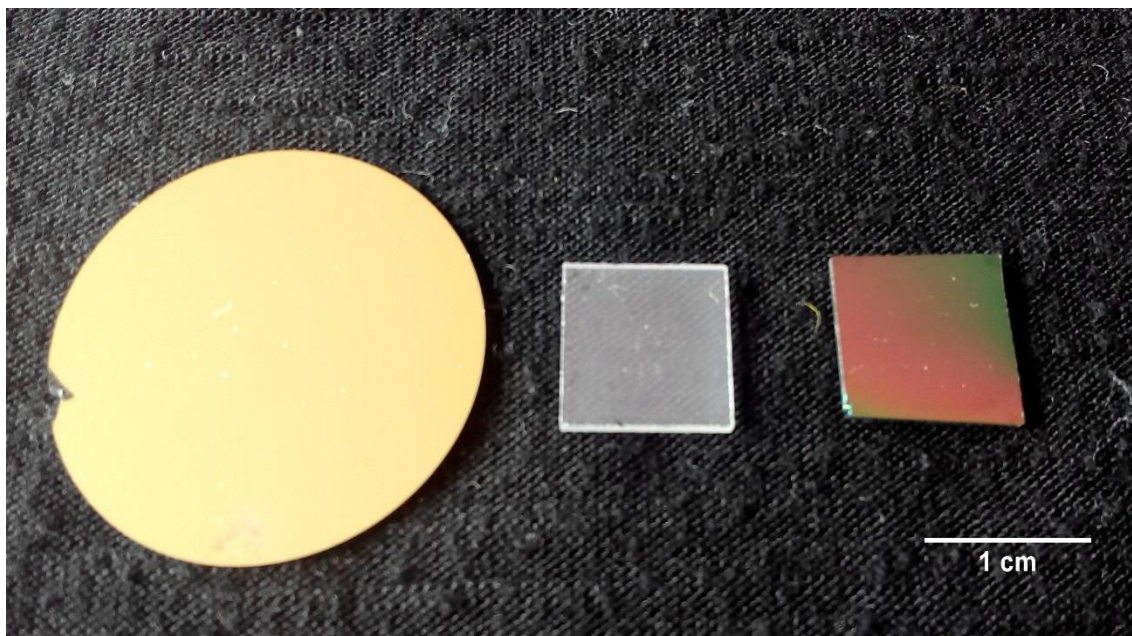
Vzorky s označením L16028 a L16029 byly připraveny ve Fyzikálním Ústavu Akademie věd České republiky. U obou typů vzorků byla nanodiamantová vrstva vytvořena na skleněném podkladu, čtverec o obsahu 1 cm², ale u L16029 byla navíc nanesená na sklo tenká vrstva titanu.



Obr. 3: Ilustrační obrázek diamantových elektrod. Vzorek vlevo bez mezivrstvy titanu byl označen jako L16028, vzorek vpravo s mezivrstvou titanu jako L16029.

Borem dopované nanodiamanty byly dle [29] vytvořeny v MW-LA-PECVD aparatuře chemickou depozicí z plynné fáze podporované plazmatem. Tato aparatura umožňuje depozici i na velké plochy až do rozměrů 50x30 cm. Byla použita plynná směs $H_2/CH_4/CO_2$ při pracovním tlaku menším než 1 mbar, mikrovlnný výkon 3 kW a pro dopování byl zvolen trimethylboran. Poměr boru k uhlíku byl nastaven na 15000 ppm a poměr CO_2/CH_4 byl nastaven mezi 0-0,6. Teplota substrátu byla sledována infračerveným průmyslovým pyrometrem a pohybovala se od 600 °C do 650 °C. Skleněný substrát byl pokryt nanodiamantovým práškem s názvem NanoAmando®B z japonského institutu NanoCarbon Research Institute Ltd. Průměrná velikost krystalů v použitém prášku byla změřena po sonikaci dynamickým rozptylem světla (DLS) jako 4-6 nm. Následně byly už pokryté vzorky odstředěny, aby došlo k odstranění nežádoucích velkých částic. Tento proces vedl k homogennímu pokrytí substrátů s hustotou nukleace přibližně 10^{10} cm^{-2} . Tloušťka nanodiamantové vrstvy byla změřena pomocí elipsometrie jako 1407 nm. Rychlost růstu diamantů činila 39 nm/hod.

Zlaté vzorky byly vyrobeny ve Fyzikálním ústavu. Vzorky sloužily pro porovnání strukturálních změn v důsledku stejného postupu sterilizace a kultivace jako na diamantových vzorcích. Na kruhové sklo byla nanasena vrstva titanu o tloušťce 10 nm a poté naprášena vrstva zlata o tloušťce 100 nm.



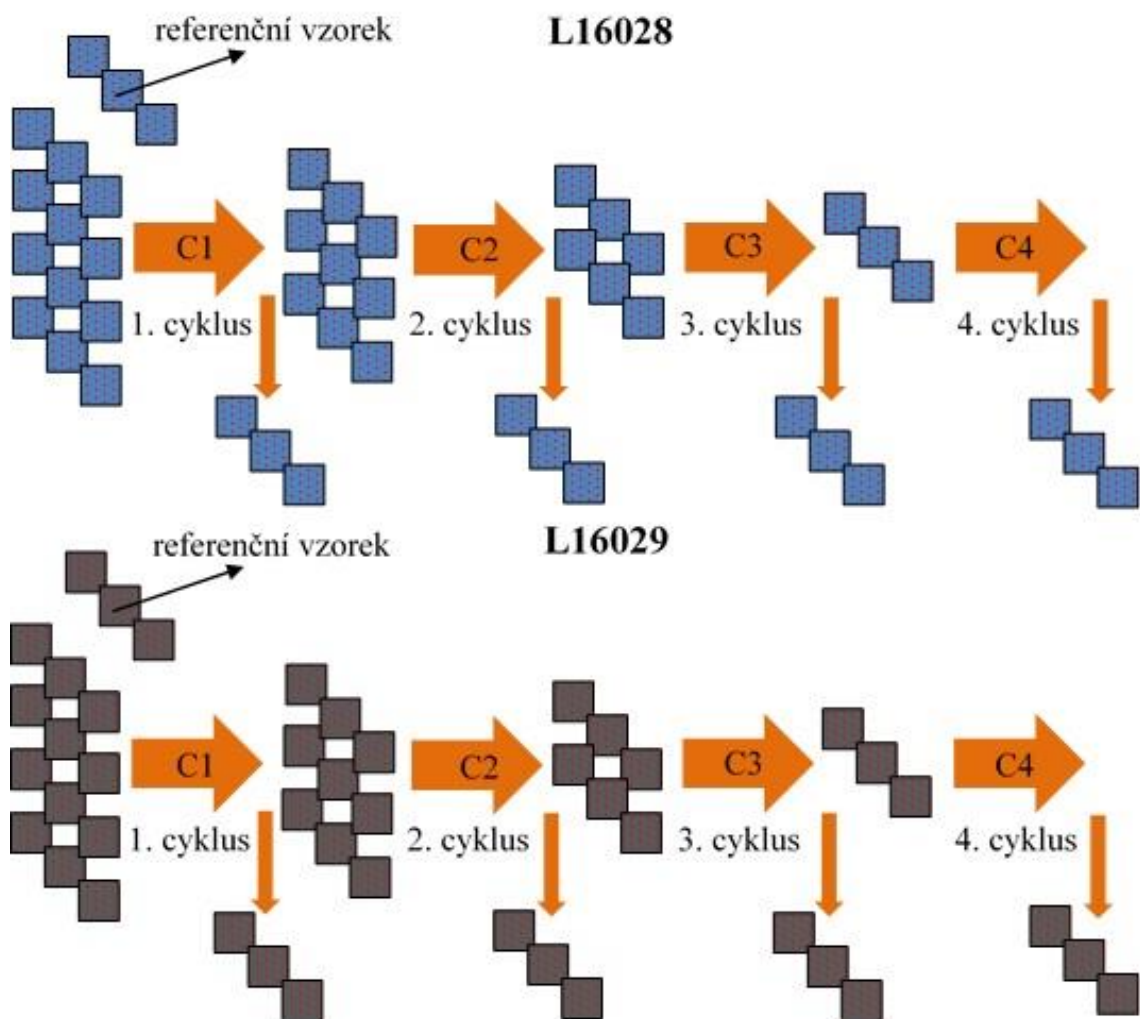
Obr. 4: Fotografie všech vzorků, které se zúčastnily experimentu s opakovanými sterilizacemi a kultivacemi. Zleva: zlatá elektroda, diamantový vzorek L16028 vzorek L16029.

3.2 Nanodiamantové tenké vrstvy

3.2.1 Schéma experimentu

Celkem bylo vyrobeno 15 vzorků B-NCD na skle (L16028) a 15 vzorků s titanovou mezivrstvou (L16029), tedy B-NCD + Ti na skle. Pro náš experiment byly vzorky každého typu náhodně rozděleny do triplikátů, dále jsme tedy pracovali s pěti skupinami po třech vzorcích od každého typu.

Pro zjištění vlivu sterilizačních metod a opakovaných kultivací na diamantové elektrody jsme vytvořili pracovní cyklus, který byl jednou až čtyřkrát opakován. Jeden pracovní cyklus zahrnuje sterilizaci, chemickou úpravu povrchu, kultivaci buněk, enzymatické čištění a finální oplach destilovanou vodou.



Obr. 5: Schéma experimentu s opakovanými sterilizacemi a kultivacemi.

Před začátkem prvního pracovního cyklu byl vybrán referenční triplikát od obou typů vzorků, tyto dva triplikáty neprošly žádnou sterilizací, kultivací, ani čištěním. Do prvního cyklu tedy postoupilo osm skupin triplikátů – čtyři od každého typu. Po ukončení prvního cyklu byla odebrána a odložena pro pozdější charakterizaci jedna skupina triplikátů od obou typů vzorků. Takto jsme postupovali po ukončení každého cyklu. Do druhého cyklu tedy postoupilo šest skupin triplikátů, do třetího cyklu čtyři skupiny a do posledního čtvrtého cyklu pouze dvě skupiny triplikátů – od obou typů vzorků po jednom triplikátu.

3.2.1.1 Sterilizace

Sterilizace všech vzorků probíhala v autoklávu s následujícími parametry. Teplota 121 °C, tlak kolísal v rozmezí 1,2 - 1,4 bar, doba sterilizace 15 minut.

Před zahájením samotné sterilizace bylo nutné zkontrolovat hladinu destilované vody v autoklávu, případně ji doplnit. Každý vzorek byl zvlášť zabalen do aluminiové fólie, aby byly ochráněny před působením vlhka. Všechny zabalené vzorky jsme umístili do skleněné Petriho misky a zahájili sterilizaci.

Po ukončení sterilizace a otevření autoklávu byla Petriho miska se vzorky přenesena do laminárního boxu, kde byly rozbaleny a každý triplikát byl umístěn zvlášť do sterilní umělohmotné Petriho misky.

3.2.1.2 Chemická úprava

PEI (polyethylenimin) je obecně v biologii používán před kultivací buněk pro potažení povrchu substrátu. Toto potažení je prováděno pro zlepšení přilnutí buněk k povrchu [43].

Před prvním pracovním cyklem bylo nutné PEI namíchat a pro použití v dalších cyklech byl skladován v lednici při 4 °C. Odvážíme 0,775 g kyseliny borité (H_3BO_3), 1,1875 g boraxu (tetraboritan sodný), vsypeme je do 250 ml destilované vody, zahřejeme na teplotu 70 °C a stále mícháme. Po úplném rozpuštění roztok zchladíme na pokojovou teplotu a změříme pH, které by se mělo pohybovat kolem 8. Námi změřená hodnota pH byla 8,4. Protože je PEI dle [43] pro buňky toxické, používají se velmi ředěné roztoky, nejčastěji 0,05 - 0,1%. Roztok o požadované koncentraci byl připraven přidáním 150 μ l námi připraveného PEI do 100 ml destilované vody. Protože jsme nepracovali v laminárním boxu, byla nádoba s ředěným roztokem vysterilizována v autoklávu při teplotě 121 °C, tlaku 1,4 bar po dobu 30 minut.

Samotné potažení všech vzorků bylo provedeno v laminárním boxu. Na každý vzorek bylo nanášeno 50 µl námi namíchaného PEI. Vzorky byly následně po jedné hodině omyty sterilní destilovanou vodou, přibližně 200 µl na každý vzorek. Omytí bylo opakováno desetkrát a po omytí byly vzorky 60 minut ozařovány germicidní lampou.

3.2.1.3 Kultivace buněk

Pro kultivační část experimentu byly zvoleny buňky CT26. Jedná se o myší fibroblasty karcinomu tlustého střeva. Jako medium bylo použito RPMI-1640 ++⁷.

Vyjmeme kryozkumavku s buňkami z mrazáku a vložíme ji do teplé vody. Medium vyjmeme z lednice a necháme jej ohřát na pokojovou teplotu. Po rozmrazení buněk přelijeme celý obsah kryozkumavky do sterilní 15ml zkumavky a doplníme přibližně do 10ml mediem. Zkumavku vložíme do centrifugy, vyvážíme zkumavkou s vodou a zapneme program CELL, který má následující předdefinované parametry: teplota 30 °C, doba centrifugace 5 minut, 1100 otáček za minutu.

Po skončení centrifugace pracujeme v laminárním boxu. Opatrně vylijeme obsah zkumavky tak, aby nedošlo k poškození peletu a opět doplníme mediem do 2 ml. Pipetou rozrušíme pelet a promícháme. Odebereme 8 µl do eppendorfky, přidáme 8 µl trypanové modře a promícháme. Z eppendorfky přeneseme 8 µl zbarveného séra do jedné části Bürkerovy komůrky, pod mikroskopem se zvětšením 10× spočteme přeživší buňky. Trypanová modř obarví pouze mrtvé buňky, protože z živých buněk je aktivně transportována přes buněčnou membránu. Ve všech pracovních cyklech nanášíme na elektrody suspenzi s koncentrací živých buněk v rozmezí 0,8 - 1 milion buněk/ml. Pokud je koncentrace příliš vysoká, naředíme suspenzi mediem v požadovaném poměru a opět spočteme buňky v Bürkerově komůrce.

Po přepočtení živých buněk a získání požadované koncentrace nanese na každý vzorek 50 µl suspenze a umístíme na 40 minut do laboratorního inkubátoru (termostatu), který udržuje stálou teplotu 37 °C. Po uplynutí této doby přidáme do každé Petriho misky, tedy ke každému triplikátu, 2 ml media a opět všechny vzorky přemístíme do termostatu a necháme kultivovat po dobu 48 hodin.

⁷ Medium obsahuje dva suplementy, proto označení ++. Prvním suplementem je fetální bovinní sérum, druhým jsou antibiotika.

Růst buněk byl kontrolován v každém cyklu optickým mikroskopem dostupným v laboratoři. Buňky byly vždy zkontrolovány po vytažení po 40 minutách z termostatu a přidání media. Dále byly zkontrolovány po 24 hodinách kultivace a naposled po 48 hodinách před enzymatickým čištěním. Neprůsvitné vzorky (L16029 a později zlato) byly kontrolovány pouze na okrajích, kde nebyla nanášena vrstva povrchového materiálu.

3.2.1.4 Enzymatické čištění

Po uplynutí potřebné inkubační doby vyjmeme Petriho misky z termostatu a plastovou jednorázovou pipetou odstraníme medium. Každý vzorek opláchneme pod proudem destilované vody a umístíme zpět do Petriho misek.

Připravíme si 1% roztok Tergazymu⁸, což je dle informací uvedených na webových stránkách firmy aniontový detergent s proteázovým enzymem pro manuální a ultrazvukové čištění. Rozpustíme 0,5 g Tergazymu v 50ml destilované vody za stálého míchání. Roztok zahříváme na teplotu 55 °C a poté jej nalijeme do Petriho misek se vzorky v takovém množství, aby byly všechny vzorky ponořeny. Necháme působit přes noc, tedy alespoň 8 hodin.

3.2.1.5 Oplach destilovanou vodou

Po uplynutí potřebné doby k enzymatickému čištění opláchneme každý vzorek pod proudem destilované vody a umístíme každé zvlášť do čisté Petriho misky. Následuje tzv. bazénový oplach, kdy do každé misky nalijeme destilovanou vodu a přibližně po dvou minutách ji vyměníme. Toto opakujeme desetkrát. Po posledním oplachu náhodně vybereme jeden triplikát od obou typů nanodiamantových vzorků, které nebudou pokračovat do dalšího cyklu a umístíme je do dvou označených krabiček. Všechny tři vzorky v krabičce proložíme perlanem nebo papírem, aby se nedotýkaly.

3.3 Zlaté tenké vrstvy

Pracovní cyklus pro dodatečně vyrobené zlaté vzorky byl stejný jako pro nanodiamantové vzorky. Dva vzorky byly uloženy pro případné další použití. Experiment byl proveden na pěti vzorcích, z toho jeden referenční. Nebyl tak proveden v triplikátech.

⁸ Používali jsme Tergazyme od firmy ALCONOX.

Při sterilizaci nebyl žádný rozdíl mezi zlatými a nanodiamantovými vzorky, byl použit naprosto identický postup se stejnými fyzikálními podmínkami.

Při potažení vzorků použijeme místo 50 μ l PEI větší množství. Jako optimální se jeví 200 μ l, protože zlaté vzorky mají přibližně čtyřikrát větší plochu. Pro omytí bylo použito přibližně 0,9 - 1,1 ml destilované vody na každý vzorek. Doba působení PEI před omytím a doba působení germicidní lampy zůstala zachována, tedy vždy jedna hodina.

Jedinou odlišností při kultivaci bylo množství nanosené suspenze. Místo původních 50 μ l bylo nyní použito 200 μ l. Koncentrace buněk, typ buněk i doba kultivace byla zachována.

Při enzymatickém čištění a oplachu destilovanou vodou byl postup naprosto identický.

3.4 Čištění diamantových elektrod

Při charakterizaci skenovacím elektronovým mikroskopem byl zjištěn nános nečistot, či plaku, na vzorcích, které prošly alespoň jedním cyklem. Proto bylo zvoleno agresivnější čištění v kyselině pro vzorky, které prošly čtyřmi cykly. Toto čištění proběhlo ve spolupráci s Fyziologickým ústavem Akademie věd České republiky.

Od obou typů diamantových vzorků byl vybrán jeden pro čištění v kyselině chlorovodíkové a jeden pro čištění v kyselině dusičné. Pro pár čištěný v HCl byl zvolen 1M roztok HCl do kterého byly vzorky ponořeny a umístěny na laboratorní míchací houpačku po dobu 12 hodin. Druhý pár byl ponořen do 65% roztoku HNO₃ a míchán po stejnou dobu. Poté byly všechny vzorky opláchnuty destilovanou vodou a osušeny filtračním papírem.

3.5 Charakterizace

Charakterizace povrchu všech vzorků byla provedena ve spolupráci s Fyzikálním ústavem Akademie věd České republiky s využitím tamějších přístrojů.

3.5.1 Optický mikroskop

Všechny vzorky byly před charakterizací prohlédnuty a zbaveny viditelných nečistot a prachu ofouknutím stlačeným vzduchem, případně byly lehce manuálně očištěny acetonem pomocí vatového tamponu.

Charakterizace byla provedena s využitím mikroskopu Axio Scope.A1 od firmy Zeiss s příslušným softwarem. Mikroskop je založen na Nomarského metodě diferenciálního interferenčního kontrastu. Fotografie povrchu byly pořízeny vždy se zvětšením 5×, 10×, 20×, 50×. Byly charakterizovány všechny vzorky v každém triplikátu.

3.5.2 SEM

Dle výsledků optické mikroskopie byl pro charakterizaci pomocí skenovací elektronové mikroskopie zvolen jeden vzorek z každého triplikátu. Všechny vybrané vzorky byly vyčištěny v ultrazvukové lázni s acetonem a přilepeny na nosič vzorků vodivým stříbrným lepidlem. Lepidlo bylo potřeba nechat vyschnout po dobu přibližně 30 minut. Charakterizace probíhala za následujících podmínek – pracovní vzdálenost 5,5 nm, proud přes vzorek <1 pA, urychlující napětí 5 kV, tlak v oblasti katody $1,2 \cdot 10^{-7}$ Pa, tlak v komoře a v tubusu $1 \cdot 10^{-2}$ - $1,7 \cdot 10^{-4}$ Pa. Pro detekci sekundárních elektronů byl použit komorový detektor typu Everhart-Thornley (E-T detektor).

3.5.3 AFM

Pro dodatečnou charakterizaci na AFM byl vybrán jeden vzorek z referenčního triplikátu a jeden vzorek z triplikátu po čtyřech cyklech. Tyto vzorky již prošly charakterizací pomocí SEM, tedy byly vyčištěny v ultrazvukové lázni.

Mikroskop Dimension Icon od firmy Bruker pracoval v poklepovém módu s následujícími parametry. Frekvence kmitů 4 kHz, amplituda kmitů 150 nm. Skenovanou plochou byl čtverec o straně 5 μ m, který byl nejprve vybrán pomocí optického mikroskopu.

3.5.4 Ramanova spektroskopie

Pro Ramanovu spektroskopii byl použit modrý excitační laser na vlnové délce 488 nm. Nejprve bylo vytvořeno referenční spektrum křemíku, kde se objevuje jeden charakteristický pík s Ramanovým posunem 520 cm^{-1} .

Elektrody byly charakterizovány s následujícím nastavením. Expozice 1 s, počet akumulací na jedno spektrum 60, výkon laseru 100 %. Pozadí ve spektru bylo odečteno pomocí tzv. korekcí na základní linie (baseline correction).

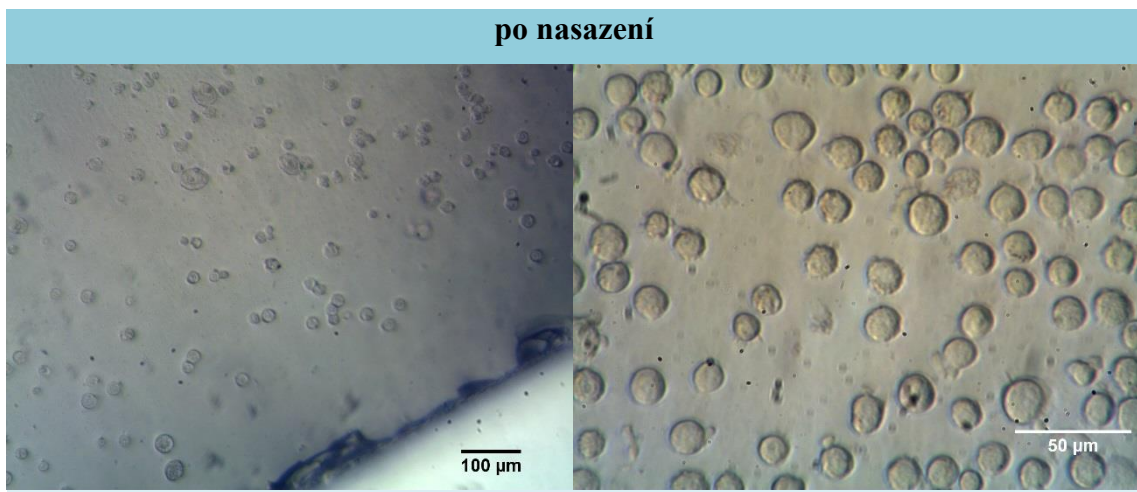
4 Výsledky

4.1 Kultivace buněk

Růst buněk CT26 byl kontrolován v každém cyklu optickým mikroskopem dostupným v laboratoři. Neprůsvitné vzorky (L16029 a později zlato) byly kontrolovány pouze na okrajích, kde nebyla nanesena vrstva povrchového materiálu. U většiny zlatých vzorků nebyla vrstva titanu a zlata nanesena na okrajích, kde bylo sklo fixováno v aparatuře při naprašování. U vzorků s celistvou neprůsvitnou vrstvou, převážně L16029, byla tato vrstva na okraji mechanicky porušena diamantovým nožem. Průsvitné vzorky L16028 byly kontrolovány v celé ploše elektrody.

Koncentrace živých buněk v nanášené suspenzi se v každém cyklu pohybovala v rozmezí 0,8 - 1 milion buněk/ml.

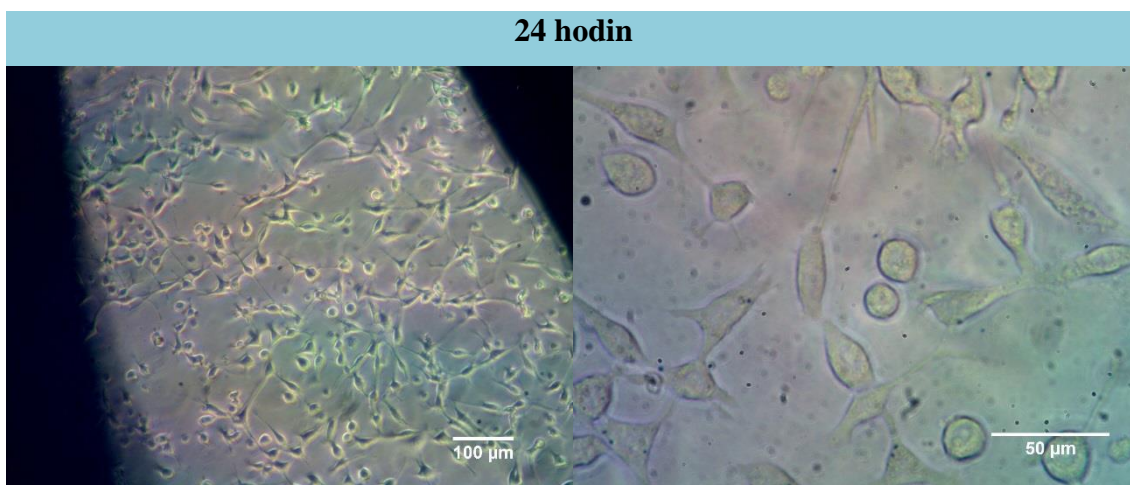
Obr. 6 vlevo ukazuje okraj průsvitného vzorku L16028 s buňkami po nasazení, vpravo je snímek ze středu téhož vzorku. Snímky byly pořízeny po 40 minutách kultivace v termostatu. Obrázek ukazuje, přilnuté buňky k nanodiamantové vrstvě.



Obr. 6: Snímky z optického mikroskopu pořízené po 40 minutách kultivace v termostatu od nasazení buněk CT26 na vzorku L16028. Vlevo je snímek z okraje elektrody, vpravo snímek ze středové části vzorku.

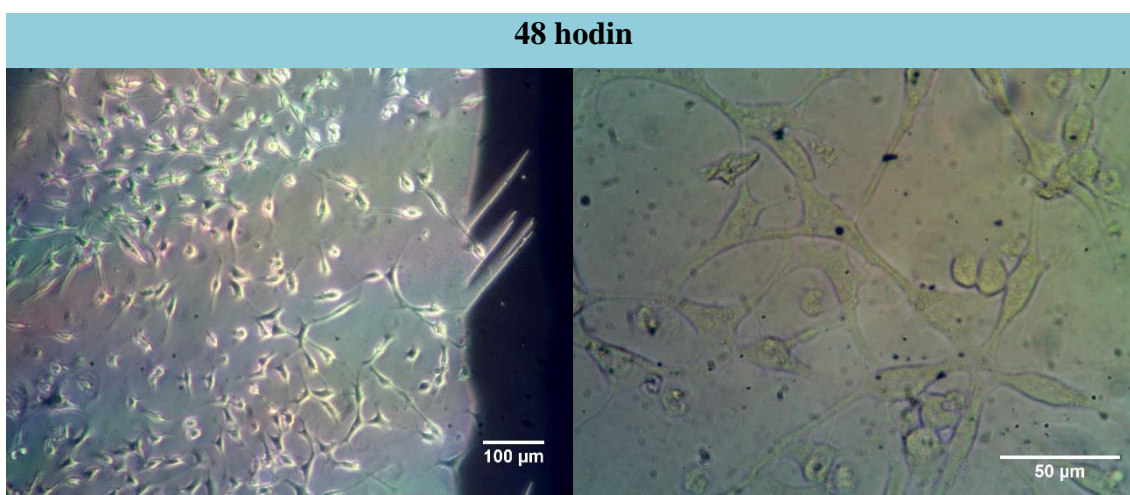
Na obr. 7 vidíme vzorek titanu a zlata měřené optickým mikroskopem. Světlé části, kde jsou viditelné buňky, znázorňují místa, kde vrstva není (jinde není vzorek průhledný a není možné buňky zobrazovat v tomto uspořádání). Tvar nepokryté oblasti přesně

odpovídá geometrii uchycení vzorku v aparatuře při naprašování. Snímky byly pořízeny po 24 hodinách kultivace.



Obr. 7: Snímky z optického mikroskopu pořízené po 24 hodinách kultivace buněk CT26. Jedná se o zlaté vzorky, vlevo vidíme chybějící vrstvu titanu a zlata vzniklou díky uchycení podložky při naprašování. Díky tomu bylo možné monitorovat stav buněk.

Na obr. 8 vidíme vzorek L16029. Nanodiamantová vrstva a titanová podložka byla mechanicky na okraji poškozena diamantovým nožem, aby byla umožněna kontrola růstu buněk. Na jiných místech bylo pozorování znemožněno díky přítomnosti neprůsvitné vrstvy titanu. Tyto snímky byly pořízeny po 48 hodinách kultivace před enzymatickým čištěním.



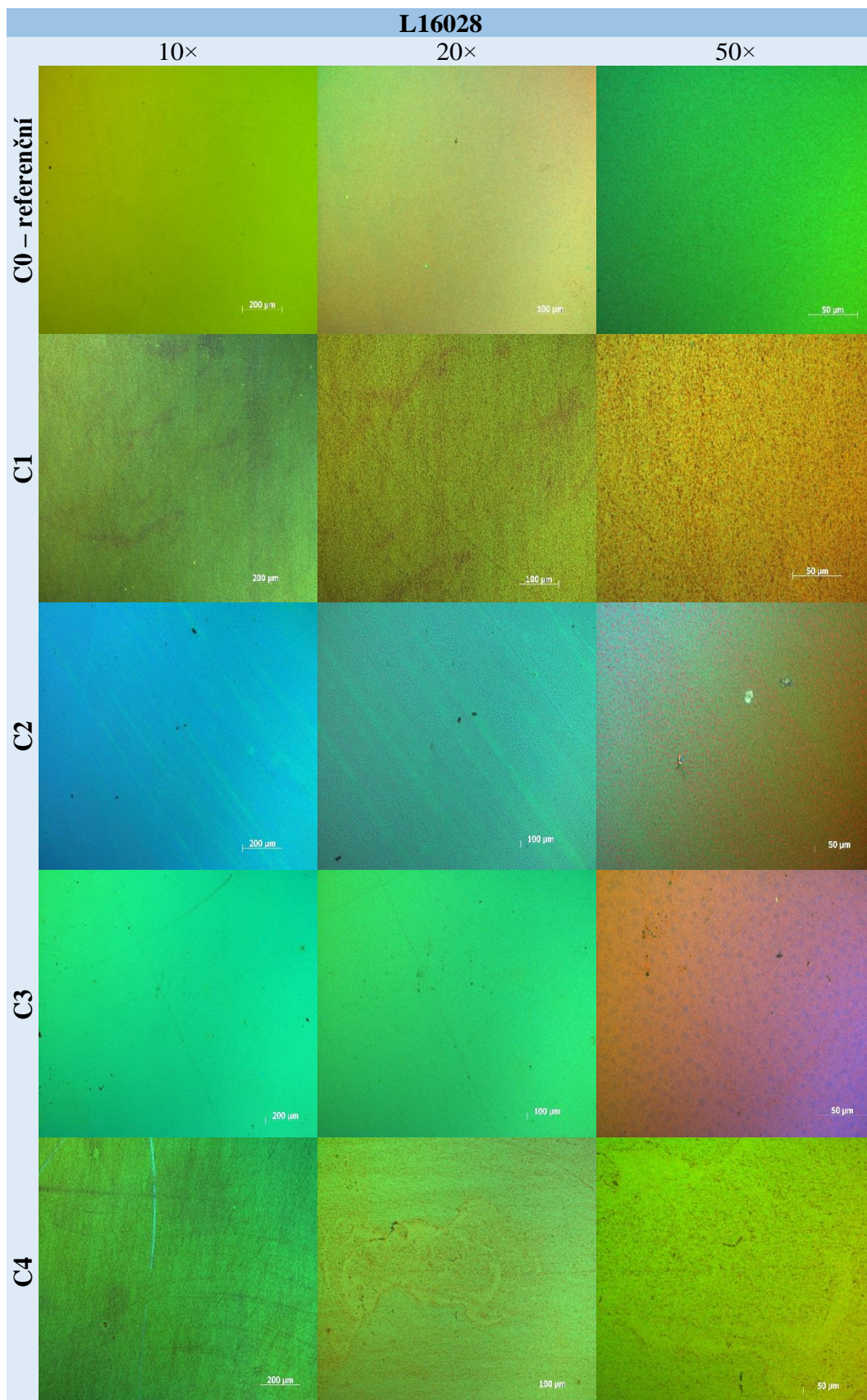
Obr. 8: Snímky z optického mikroskopu pořízené po 48 hodinách kultivace buněk CT26 na elektrodě L16029. Vlevo vidíme mechanické poškození nanodiamantové a titanové vrstvy diamantovým nožem, díky kterému bylo možné kontrolovat růst buněk.

4.2 Optický mikroskop

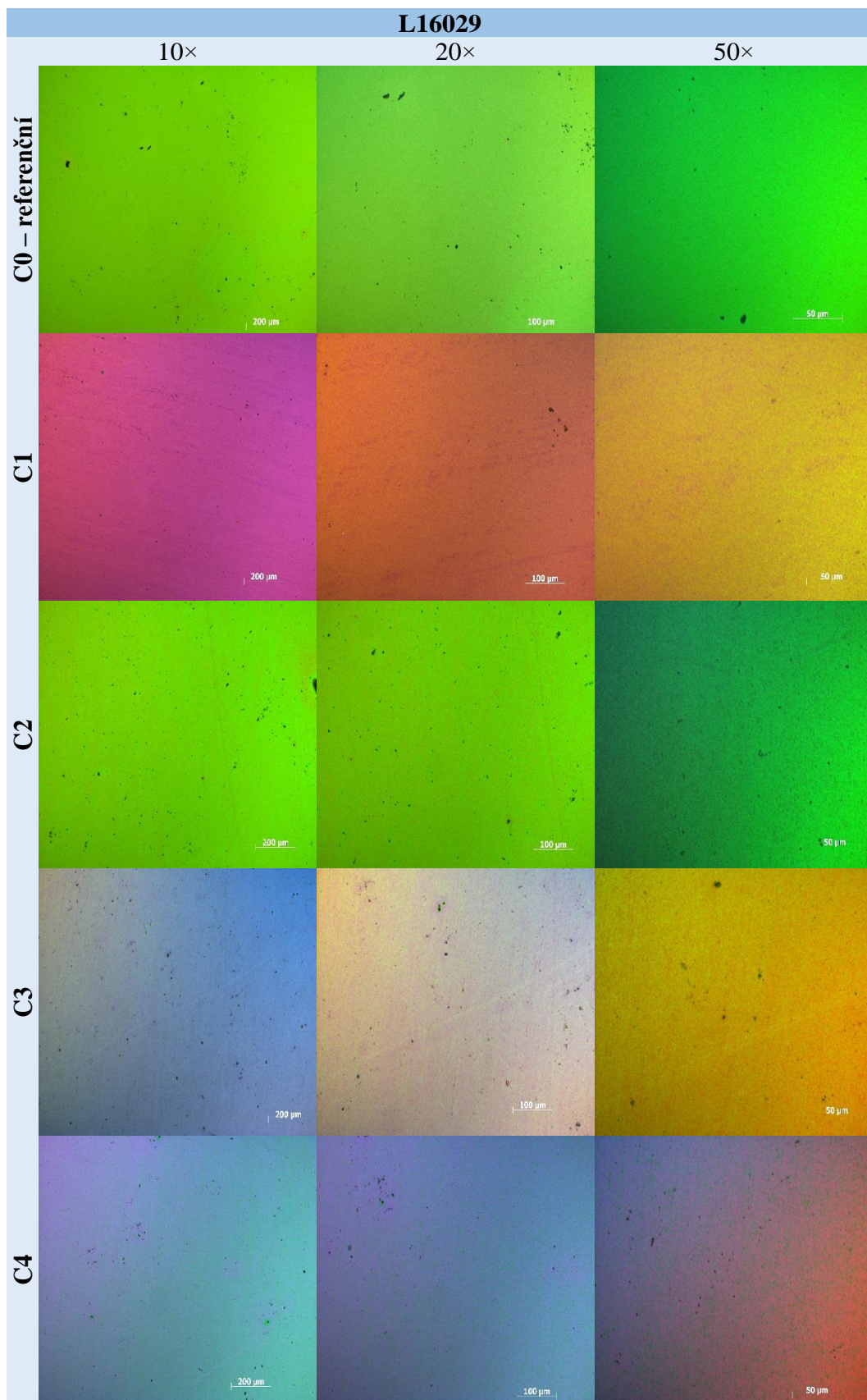
Na následujících obrázcích uvidíme snímky z optického mikroskopu při různém zvětšení získané Nomarského metodou diferenciálního interferenčního kontrastu. Různé barvy představují fázový rozdíl, který je způsoben díky rozdílům v indexu lomu, ve tloušťce nebo v obou možnostech. Jednotlivé barevné odstíny byly voleny tak, aby fázový rozdíl co nejlépe vynikl.

Na obr. 9 vidíme snímky povrchu elektrody L16028, na obr. 10 snímky povrchu elektrody L16029. V obou případech je vyobrazen povrch pouze jednoho vzorku z každého triplikátu, přestože byly zkontrolovány všechny vzorky. Vidíme, že ani v jednom případě nedošlo k výraznému poškození diamantové tenké vrstvy

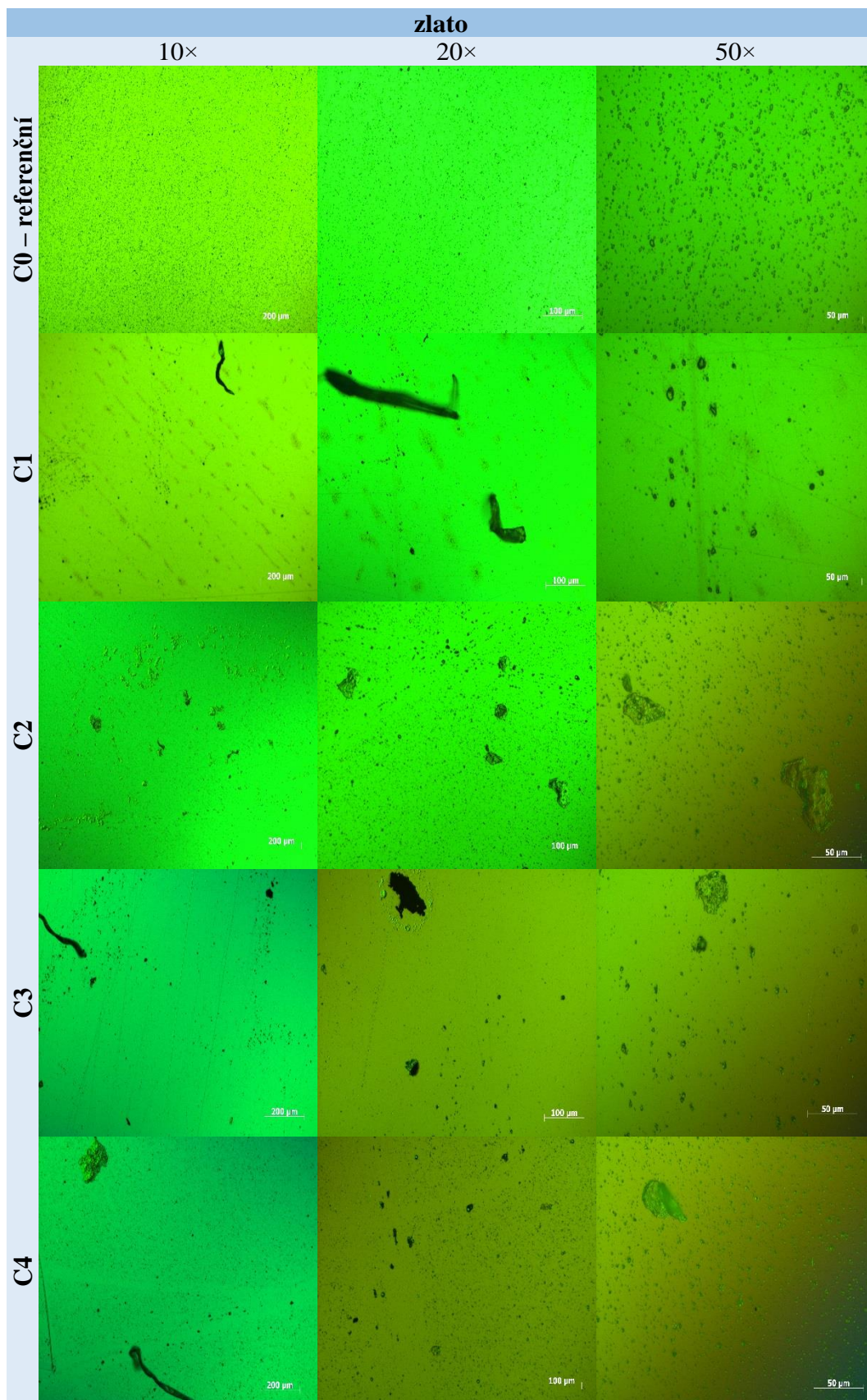
Na obr. 11 vidíme snímky povrchu zlatých elektrod. U zlatých vzorků nebyly vytvořeny triplikáty, vidíme tedy povrchy všech vzorků. Kromě referenčního vzorku pozorujeme u všech mechanické poškození zlaté vrstvy, které již bylo viditelné pouhým okem.



Obr. 9: DIC snímky povrchu elektrod L16028 při různém zvětšení. Z kapacitních důvodů je vyobrazen povrch jednoho vzorku z každého triplikátu. Jednotlivé barevné odstíny byly voleny tak, aby nejlépe vynikl fázový rozdíl.



Obr. 10: DIC snímky povrchu elektrod L16029. Z kapacitních důvodů je vyobrazen povrch jednoho vzorku z každého triplikátu. Jednotlivé barevné odstíny byly voleny tak, aby nejlépe vynikl fázový rozdíl.



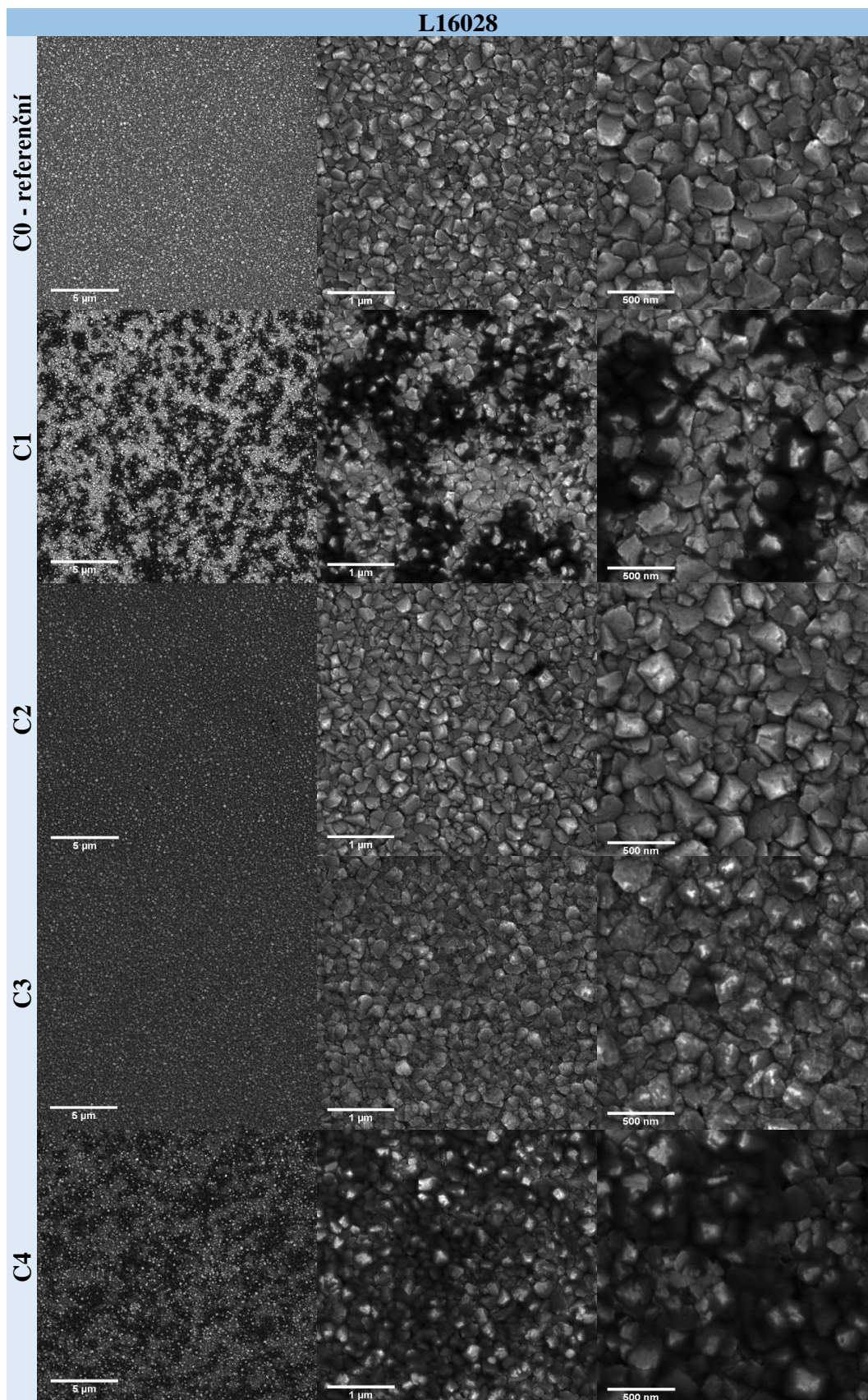
Obr. 11: DIC snímky povrchu zlatých elektrod. Kromě referenčního vzorku vidíme mechanická poškození zlaté tenké vrstvy ve formě hlubokých vrypů, či škrábanců.

4.3 SEM

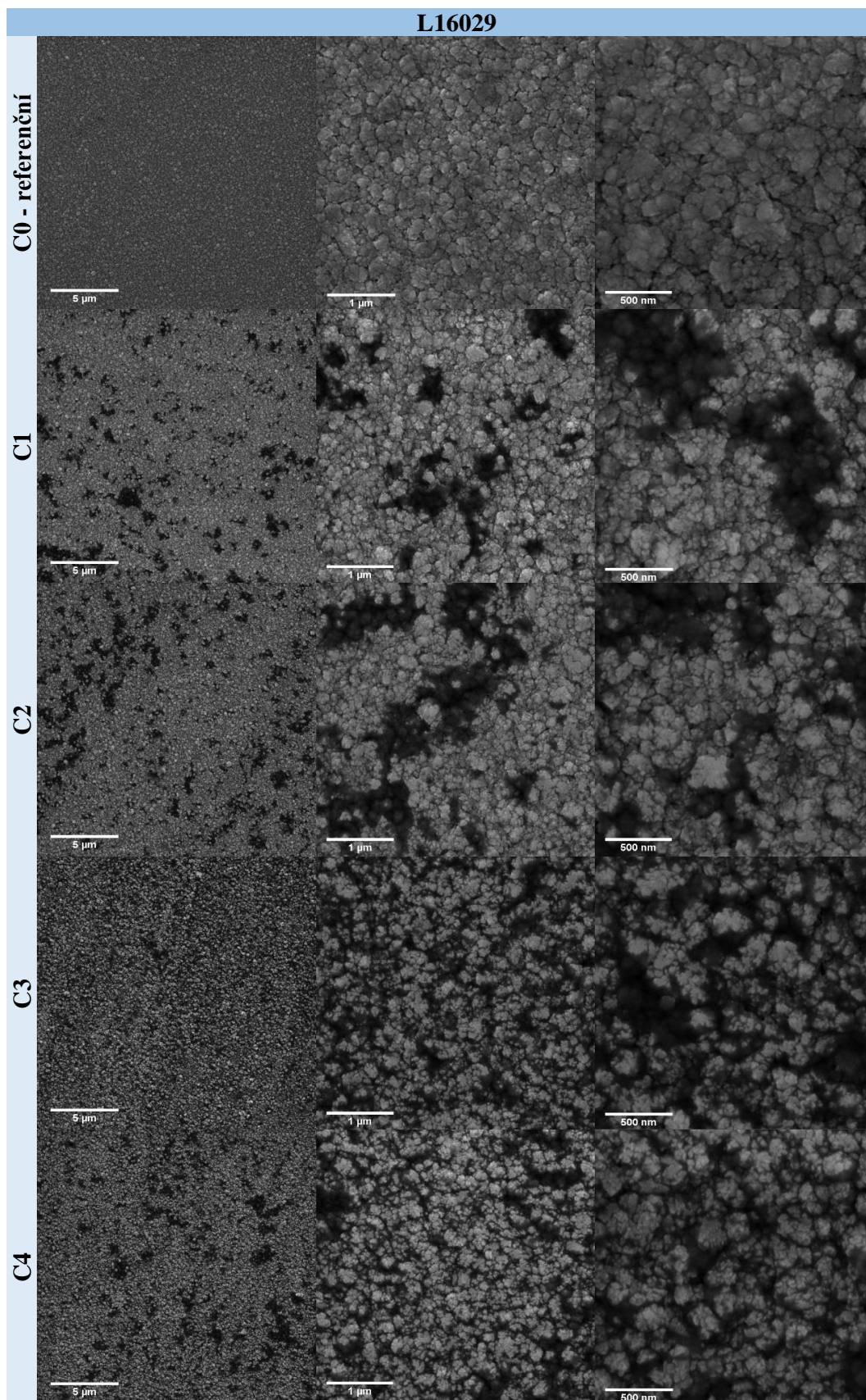
Elektrody L16028 a L16029 byly pro charakterizaci skenovacím elektronovým mikroskopem vybrány na základě výsledků optické mikroskopie. Vzorky byly vybrány tak, aby dostatečně doplnily výsledky z optického mikroskopu a odhalily případné jemné strukturální změny. Z každého triplikátu byl vybrán jeden reprezentativní vzorek.

Výsledky charakterizace diamantových elektrod jsou uvedeny na obrázcích 12 a 13 na následujících stranách. Ze snímků vyplývá pokrytí diamantové vrstvy povlakem pravděpodobně organických nečistot. Výsledky pro zlaté vzorky jsou uvedeny na obr. 14, zde není povlak pozorován. Pozorujeme však u všech vzorků, včetně referenčního, malá kruhová místa, kde zcela chybí zlatá vrstva.

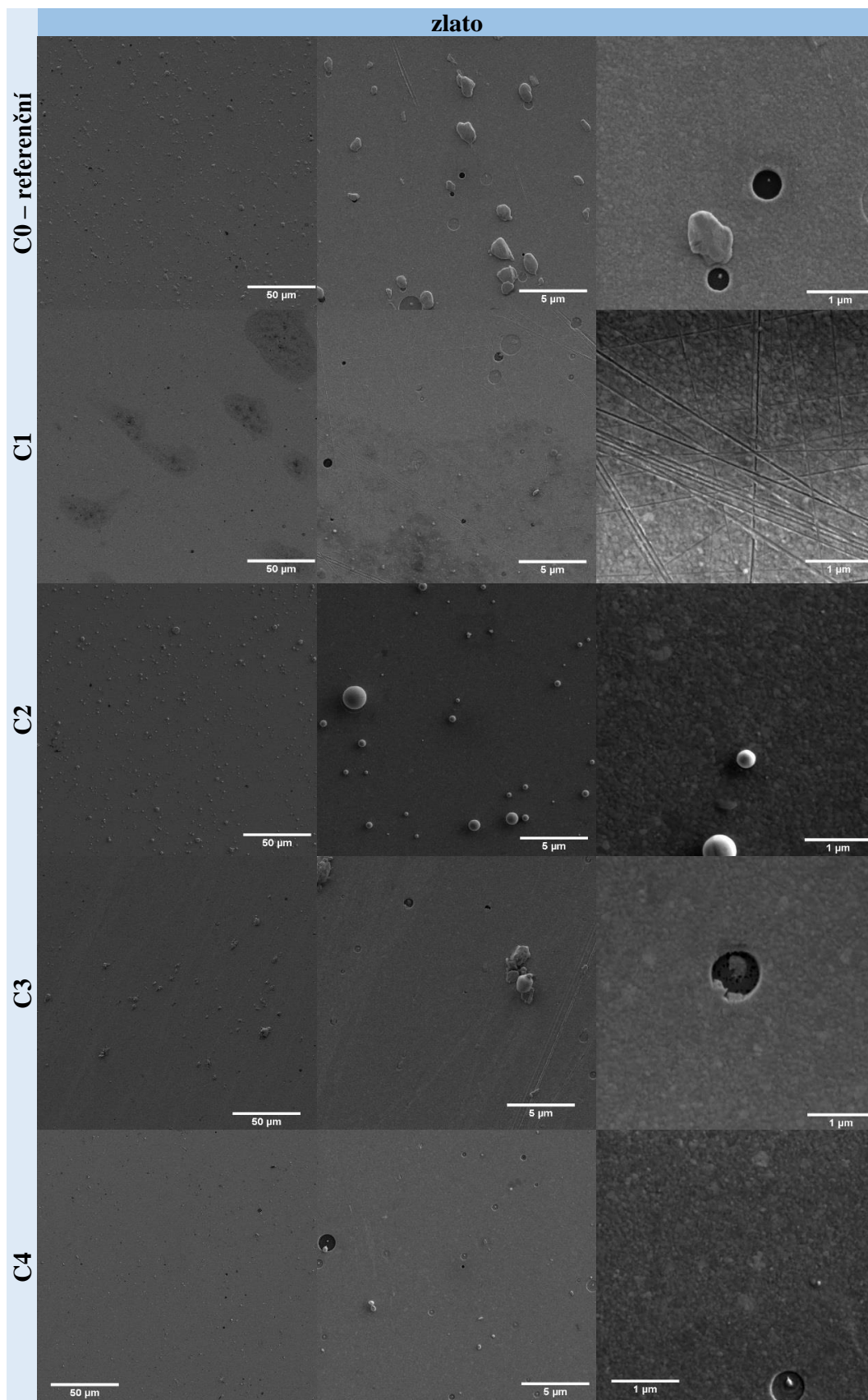
Diamantové elektrody byly následně po provedení analýzy čištěny dvěma způsoby – kyselinou chlorovodíkovou a kyselinou dusičnou. Cílem bylo zjistit metodu čištění, která dostatečně odstraní zbytky organických nečistot. Výsledky čištění v obou kyselinách, v porovnání s čištěním pomocí Tergazymu, jsou uvedeny na obr. 15 a 16. Jak u typu L16028, tak u L16029, vidíme dobře vyčištěný povrch po použití kyseliny dusičné.



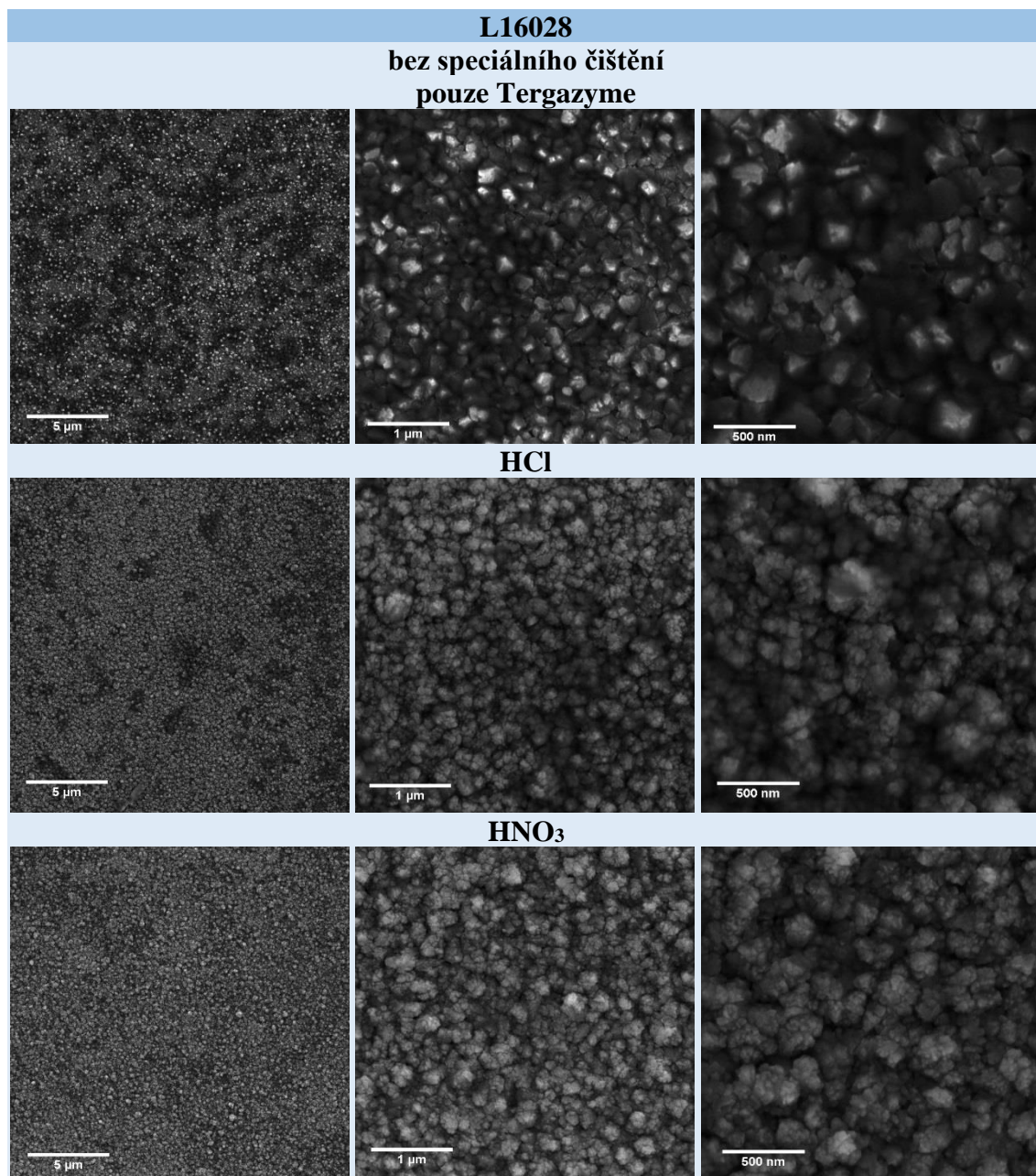
Obr. 12: SEM snímky elektrod L16028. Z každého triplikátu byl vybrán jeden reprezentativní vzorek. U všech vzorků, kromě referenčního, vidíme pokrytí nanodiamantové tenké vrstvy vrstvou organických nečistot.



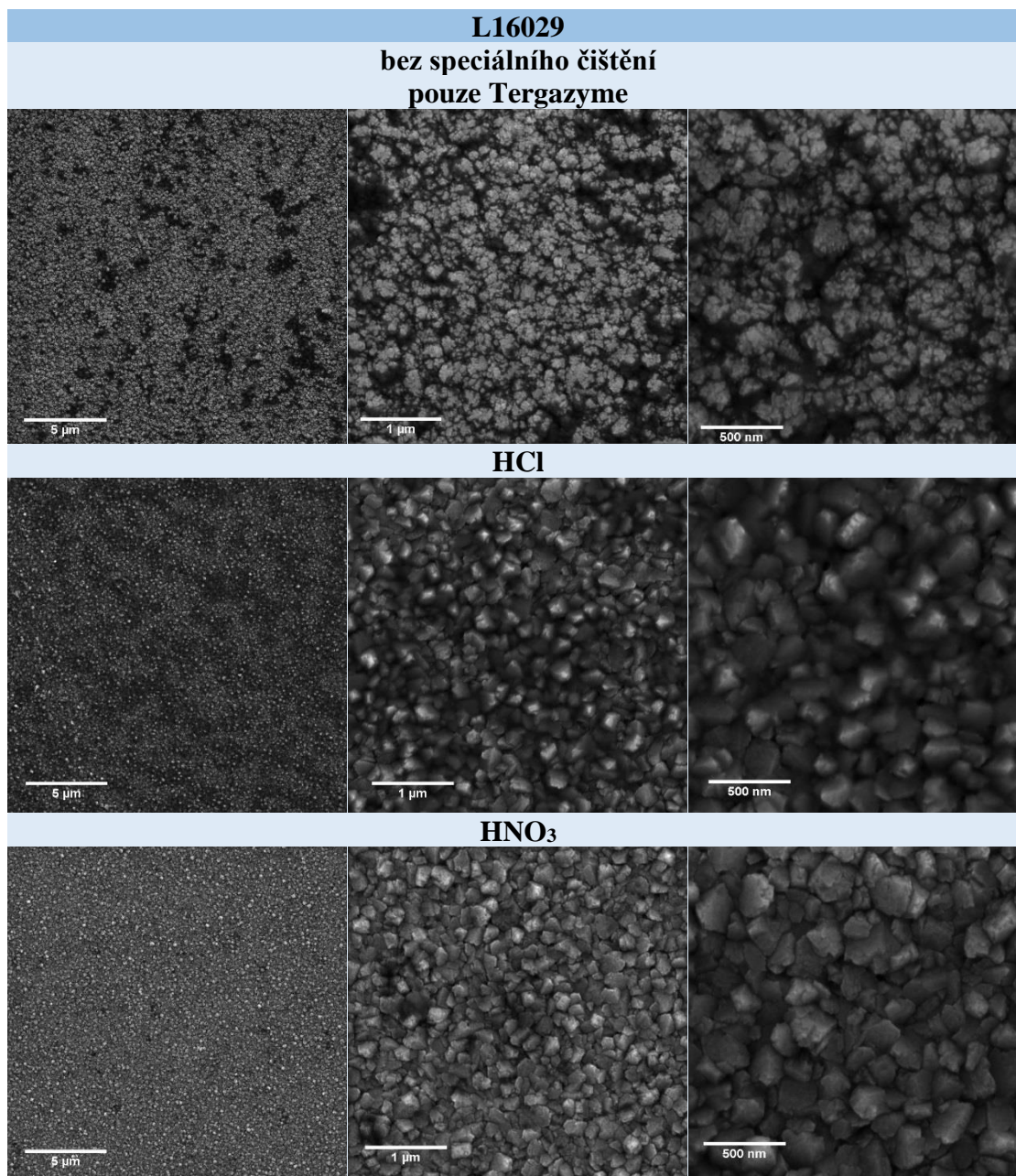
Obr. 13: SEM snímky elektrod L16029. Z každého triplikátu byl vybrán jeden reprezentativní vzorek. U všech vzorků, kromě referenčního, vidíme pokrytí nanodiamantové tenké vrstvy vrstvou organických nečistot.



Obr. 14: SEM snímky zlatých elektrod. U všech vzorků, včetně referenčního, pozorujeme malá kruhová místa, kde zcela chybí zlatá vrstva.



Obr. 15: Srovnání povrchů elektrod L16028 vyčištěných různými metodami. Vidíme redukci nečistot překrývajících nanodiamantovou vrstvu po vyčištění v kyselině dusičné.



Obr. 16: Srovnání povrchů elektrod L16029 vyčištěných různými metodami. Vidíme redukci nečistot překrývajících nanodiamantovou vrstvu po vyčištění v kyselině dusičné.

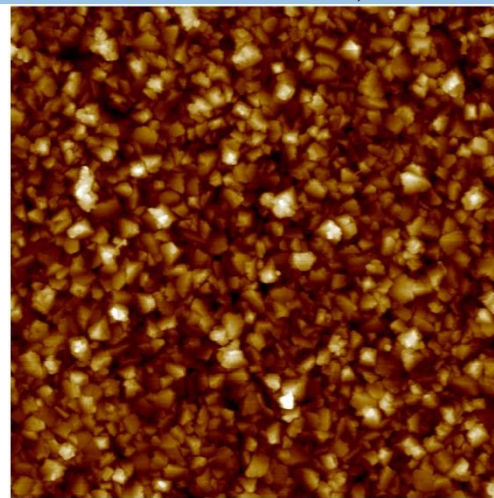
4.4 AFM

Z důvodu časové náročnosti měření byl charakterizován vždy pouze referenční vzorek od každého typu elektrody a jeden vzorek po čtyřech cyklech.

Topografické mapy povrchu diamantových elektrod jsou vyobrazeny na obr. 17 a 18. Pro každou elektrodu byl změřen výškový profil řezu vzorku a spočten příslušný střední kvadratický průměr výškových odchylek (RMS, Root Mean Square) pomocí programu Gwyddion. U obou typů vzorků vidíme po čtyřech cyklech povlak nečistot překrývající krystaly diamantů, avšak vypočtená hodnota RMS se od hodnoty referenčních vzorků příliš nezměnila.

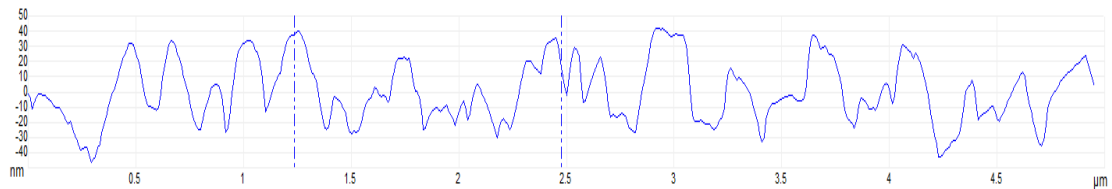
Výsledky zlatých vzorků jsou uvedeny na obr. 19. U těchto elektrod bylo možné změřit výškový profil pouze pro referenční vzorek. Na vzorku se nacházely hluboká místa s chybějící zlatou vrstvou. Takové místo vidíme na snímku z měření profilu referenčního vzorku na obr. 19. Zde se nachází 56 nm hluboká prohlubeň. Profil vzorku po čtyřech cyklech nebylo možné změřit kvůli mechanickému poškození vzorku.

L16028
C0 – referenční
RMS=23,3 nm

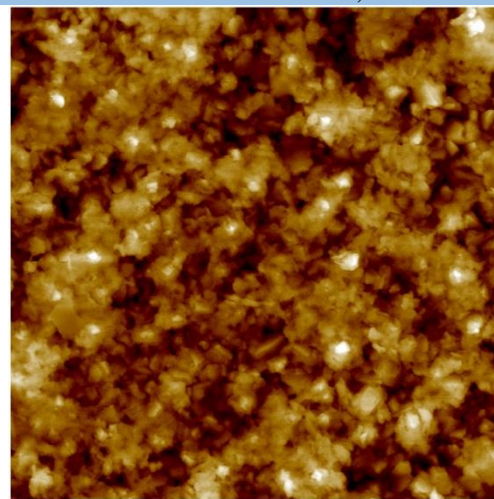


Height Sensor 1.0 μm

výškový profil

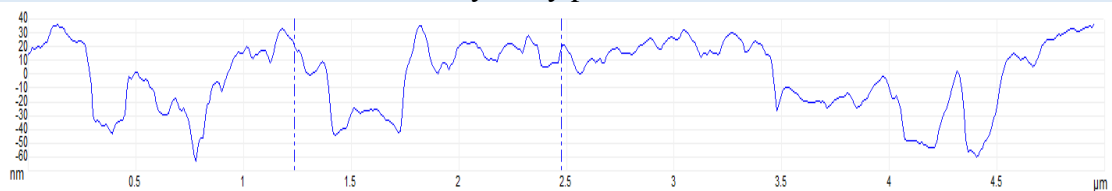


C4
RMS=21,9 nm



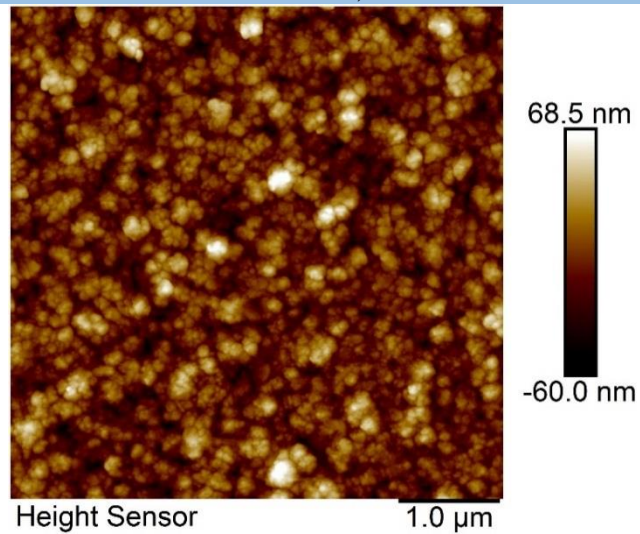
Height Sensor 1.0 μm

výškový profil

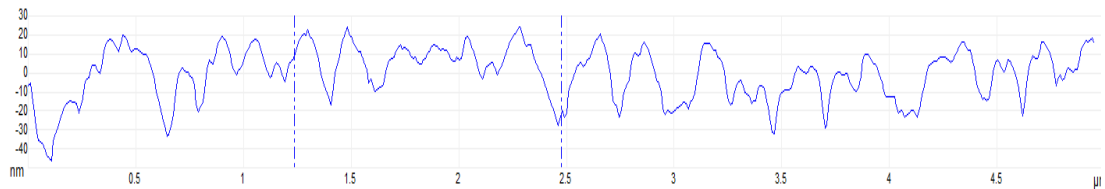


Obr. 17: AFM snímky povrchu elektrod L16028. Na elektrodě po čtyřech cyklech je viditelný povlak nečistot překrývající nanodiamantovou tenkou vrstvou. Pro obě elektrody byl změřen výškový profil řezu vzorku a spočten střední kvadratický průměr výškových odchylek (RMS). Z hodnoty RMS usuzujeme, že drsnost povrchu se významně nezměnila.

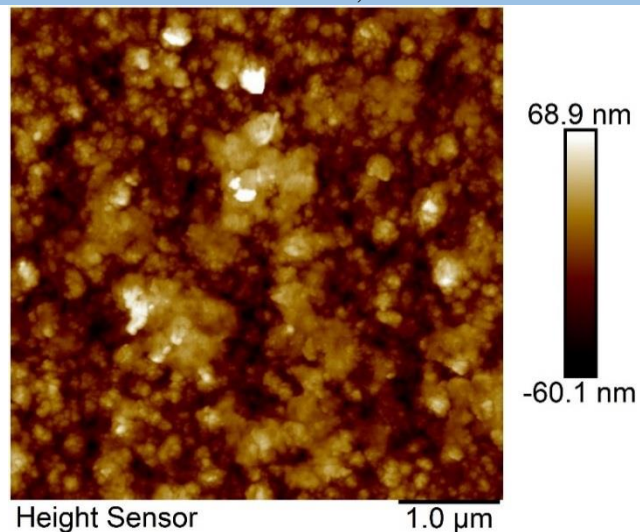
L16029
C0 – referenční
RMS=18,3 nm



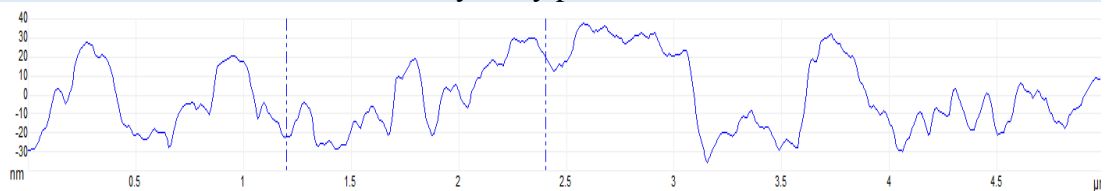
výškový profil



C4
RMS=18,8 nm

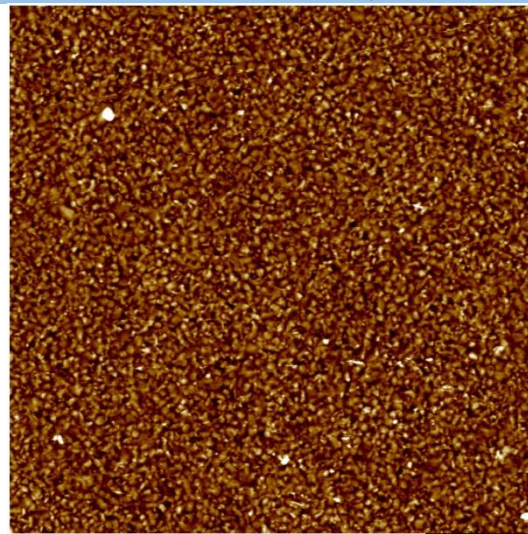


výškový profil



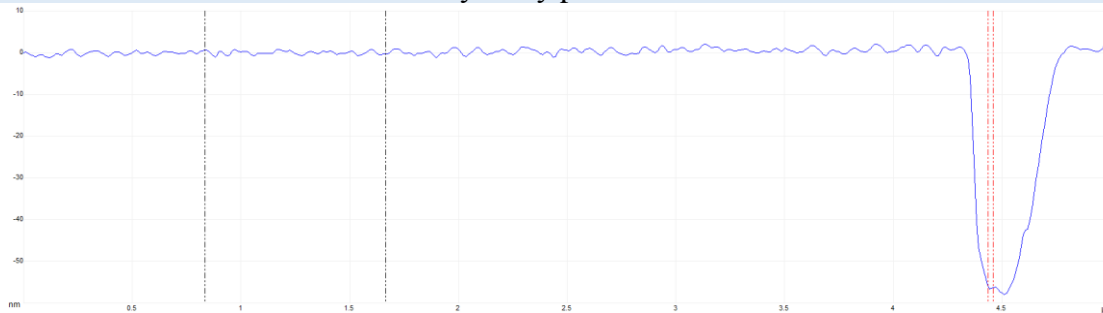
Obr. 18: AFM snímky povrchu elektrod L16029. Na elektrodě po čtyřech cyklech je viditelný povlak nečistot překrývající nanodiamantovou tenkou vrstvou. Pro obě elektrody byl změřen výškový profil řezu vzorku a spočten střední kvadratický průměr výškových odchylek (RMS). Z hodnoty RMS usuzujeme, že drsnost povrchu se významně nezměnila.

C0 – referenční
RMS=1,3 nm

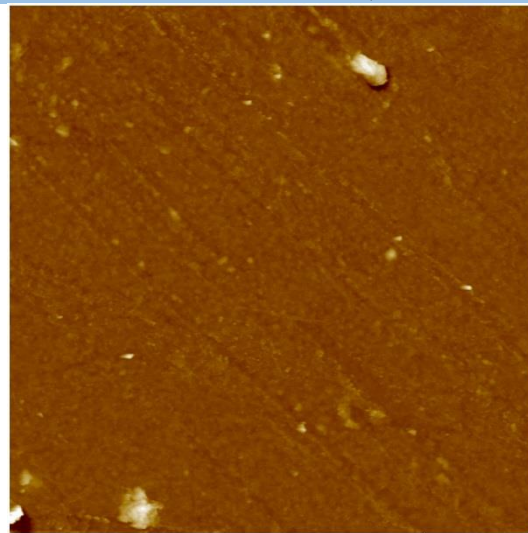


Height Sensor 1.0 μm

výškový profil



C4
RMS=2,7 nm



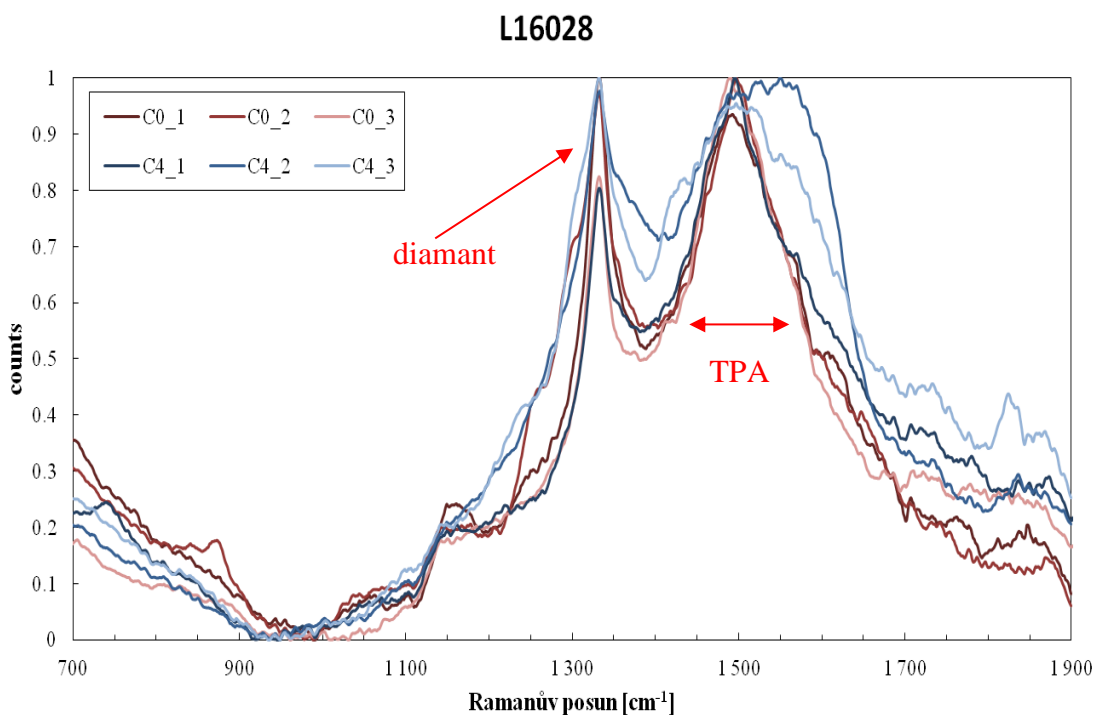
Height Sensor 1.0 μm

Obr. 19: AFM snímky povrchu zlatých elektrod. Z důvodu mechanického poškození bylo možné změřit výškový profil pouze u referenčního vzorku, kde vidíme 56 nm hlubokou prohlubeň ve vrstvě zlata.

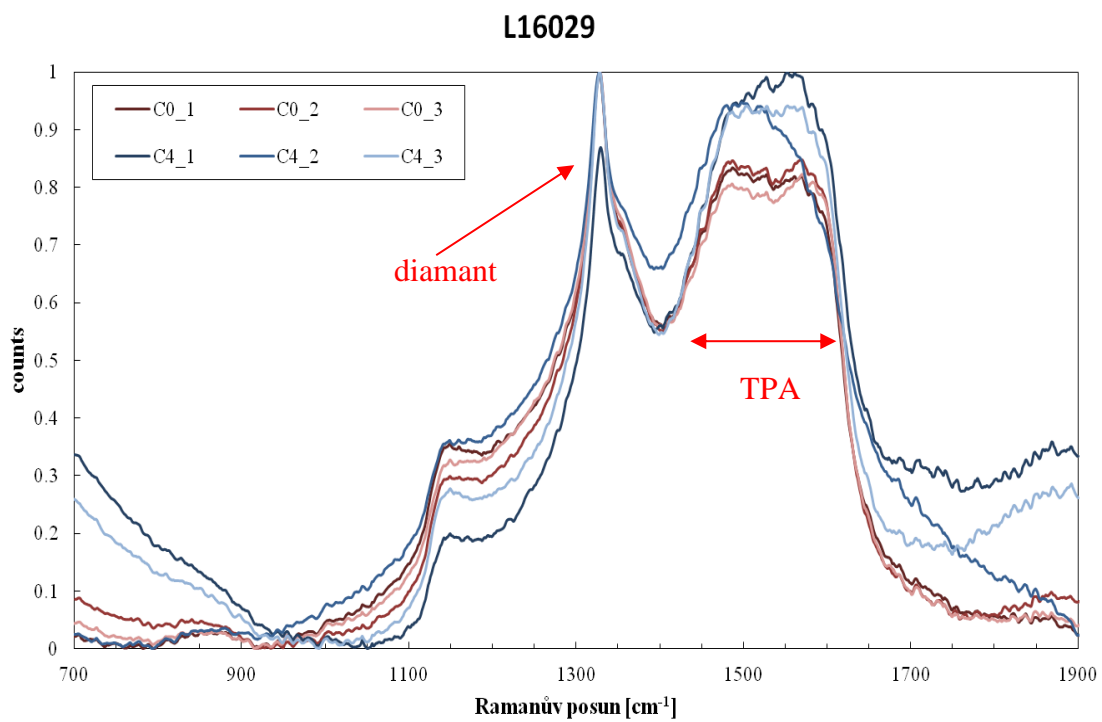
4.5 Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie byla provedena pouze pro diamantové elektrody – pro referenční vzorky a pro vzorky po čtyřech cyklech. Na rozdíl od charakterizace pomocí SEM a AFM, bylo vytvořeno Ramanovo spektrum pro všechny vzorky v daném triplikátu. Všechna spektra jednoho typu elektrody byla vynesena do jednoho grafu. Spektra byla pro snazší porovnání normalizována na nejvyšší intenzitu diamantového píku, absolutní hodnota signálu byla převedena na relativní.

Grafy uvedené na obr. 20 a 21 představují normalizovaná Ramanova spektra. U obou elektrod pozorujeme diamantový pík v rozmezí od 1319 do 1332 cm^{-1} . Rovněž je zřetelný menší pík kolem 1150 cm^{-1} a výrazný pík v okolí 1500 cm^{-1} . Tyto dva píky pocházejí ze segmentů trans-polyacetyleny (TPA), což je obecně přijímaná skutečnost a objevují se ve všech Ramanových spektrech nanokrystalických diamantů [44].



Obr. 20: Ramanovo spektrum pro diamantové elektrody L16028. V rozmezí od 1319 do 1332 cm^{-1} pozorujeme diamantový pík. Menší pík v okolí 1150 cm^{-1} a výrazný pík v okolí 1500 cm^{-1} pocházejí ze segmentů trans-polyacetyleny.



Obr. 21: Ramanovo spektrum pro diamantové elektrody L16029. V rozmezí od 1319 do 1332 cm^{-1} pozorujeme diamantový pík. Menší pík v okolí 1150 cm^{-1} a výrazný pík v okolí 1500 cm^{-1} pocházejí ze segmentů trans-polyacetylenů.

5 Diskuze

5.1 Kultivace buněk

Díky kontrole buněk optickým mikroskopem v každém pracovním cyklu po 40 minutách, 24 a 48 hodinách kultivace v termostatu víme, že se buňky vyvíjely a rostly bez zjevných problémů. V tempu růstu a vzhledu buněk nebyl, dle předpokladu, shledán žádný rozdíl v závislosti na počtu provedených pracovních cyklů. Chemikálie používané v průběhu cyklu, konkrétně polyethylenimin a Tergazyme, byly voleny dle standardních postupů s experimenty na komerčních mikroelektrodových polích a ukázaly se být velmi vhodné z hlediska necytotoxicity.

Přilnavost buněk můžeme hodnotit pouze u průsvitného vzorku L16028, kde byla většina buněk CT26 přilnuta již po 40 minutách od nasazení. Neprůsvitné vzorky jsme pozorovali díky předchozímu mechanickému poškození titanové a zlaté vrstvy. Mohli jsme tedy pozorovat pouze buňky přilnuté na skle, ne na svrchní tenké vrstvě. Vzhledem k tomu, že na obr. 6 vidíme buňky přilnuté k diamantovému povrchu elektrody L16028, můžeme říci, že i na elektrodě L16029 dochází k dobré přilnavosti. K tomuto nás vede fakt, že na obou zmíněných elektrodách byla nanosena stejná tenká vrstva nanodiamantů. Přilnavost na zlaté tenké vrstvě by neměla být odlišná od přilnavosti na skle z důvodu podobné struktury povrchu.

Přestože jsou na obr. 7 a 8 snímky pořízené pouze na okraji neprůsvitných vzorků, můžeme říci, že hustota buněčné kultury je stejná na okraji i uprostřed vzorku. K tomuto faktu nás vedou snímky na obr. 6, kde je s ohledem na měřítko hustota rostoucích buněk stejná na okraji i uprostřed elektrody. Dbali jsme jak na dodržení přibližně stejné hustoty nasazených živých buněk v každém pracovním cyklu, tak i na roztažení suspenze s buňkami po celé ploše vzorku.

5.2 Optická mikroskopie

Charakterizace pomocí optického mikroskopu byla provedena u všech vzorků ve všech triplikátech. Ani na jednom typu diamantové elektrody nebyla shledána velká mechanická poškození nanodiamantové vrstvy. Na obr. 9 a 10 můžeme vidět celistvý povrch, občas s výskytem prachových částic. Vzorky nebyly před charakterizací

optickým mikroskopem speciálně čištěny. Pouze vzorky, na jejichž povrchu byly pozorovány příliš velké prachové částice a jiné nečistoty, byly vyčištěny pomocí acetonu, vatové tyčinky a ofoukány stlačeným vzduchem. Vzhledem k tomu, že mikroskopie probíhala za normálních prašných podmínek v nelaboratorní místnosti, nebylo možné zabránit usazení nových prachových částic na povrch vzorků. Srovnáme-li vzhled povrchů elektrod bez titanové vrstvy (L16028) a s titanovou vrstvou (L16029), nevidíme žádný rozdíl v množství usazených nečistot.

Na druhou stranu snímky povrchů zlatých elektrod ukazují relativně velká mechanická poškození u vzorků, které prošly jedním a více cykly. Na snímcích referenční elektrody vidíme pouze prachové částice. U ostatních elektrod se po celém povrchu náhodně vyskytují škrábance, které jsou způsobeny jednoznačně působením mechanické síly. Tyto škrábance byly viditelné již při bližším pohledu pouhým okem a objevily se po prvním cyklu. Jedná se většinou o škrábance způsobené neopatrností manipulace s pipetou převážně při snaze o roztažení suspenze buněk po celém povrchu vzorku. Dalším zdrojem mechanického poškození zlatých vzorků mohla být manipulace s pinzetou. Je však důležité zmínit, že stejný postup byl použit i u diamantových vzorků, u kterých však žádné poškození povrchu nebylo pozorováno. Diamantová vrstva je oproti zlaté velmi mechanicky odolná.

5.3 SEM

Jak již bylo zmíněno, charakterizace skenovacím elektronovým mikroskopem byla provedena vždy pouze pro jeden vzorek z každého triplikátu. Dle snímků z optického mikroskopu byl vybrán nejméně zaprášený vzorek. U triplikátů, kde nebylo možné rozhodnout, který ze vzorků je nejvhodnější, byla elektroda pro charakterizaci vybrána náhodně. Zlaté elektrody byly charakterizovány všechny.

Na obr. 12 a 13 vidíme u referenčních vzorků čistou a celistvou vrstvu krystalů nanodiamantů. U ostatních vzorků vidíme černý povlak překrývající na některých místech nanodiamantovou vrstvu. Zde je důležité připomenout, že různé odstíny šedi neudávají výškové rozlišení jako u AFM, ale ukazují na změnu vodivosti povrchu. Nejvíce je tento povlak vidět na snímcích elektrody L16028 po jednom cyklu. Povlak vytváří mapy, které jsou náhodně rozmístěny po celém povrchu všech vzorků. Domníváme se, že by povlak mohl být zbytkem polyethyleniminu, který byl použit

v každém cyklu pro potažení povrchu před kultivací buněk. Další možnou variantou je, že se jedná o zbytky kultivovaných buněk. Tato hypotéza se však zdá být méně pravděpodobná, protože Tergazym velmi účinně odstraňuje proteiny a je běžně používán v laboratořích, které se zabývají studiem elektrické aktivity buněk, tedy je běžně používán na čištění komerčních elektrod. Pokud by došlo k nedostatečnému odmytí PEI, tak je velmi pravděpodobné, že se v průběhu další sterilizace v autoklávu, v rámci dalšího cyklu, jeho molekuly mohou dostat do diamantové vrstvy a působením tepla se mohou trvale přichytit k diamantovým krystalům. V dalších experimentech by bylo vhodné vyzkoušet i jiné chemické úpravy povrchu, např. Poly-D-Lysine.

Na obr. 14 vidíme snímky zlatých elektrod. U všech vzorků vidíme malá místa, kde chybí vrchní zlatá vrstva. Vzhledem k tomu, že se tato místa vyskytují i na referenčním vzorku, tak můžeme říci, že tato poškození nevznikla v průběhu našeho experimentu. Rovněž vidíme, že se na povrchu nevyskytuje povlak pozorovaný na diamantových elektrodách. Tato skutečnost je dána rozdílnou morfologií zlatých a diamantových vzorků. Diamanty tvoří krystaly, tedy výsledný povrch je hrubý s relativně velkými výškovými rozdíly, které jsou způsobeny rozměry a orientací krystalů. Zlatou vrstvu tvoří atomy zlata, je tedy hladká a souvislá.

Na základě snímků, kde je zřetelný povlak na diamantové vrstvě, jsme se rozhodli pro agresivnější metody čištění vzorků. Využili jsme standardní protokol čištění v HNO_3 používaný ve Fyziologickém ústavu Akademie věd pro čištění elektrod používaných pro kultivaci neuronů. Navíc jsme zkusili i čištění v HCl pro porovnání výsledků. Snímky po čištění v obou kyselinách jsou srovnány na obr. 15 a 16. Elektrody čištěné v HCl jsou stále na náhodných místech pokryty povlakem nečistot, i když se povlak zdá být zredukovaný. Vzorky čištěné v HNO_3 jsou prokazatelně čistější. V dalších experimentech bych navrhovala vyzkoušet delší čištění v HNO_3 , oplach v ethanolu a následnou sterilizaci v autoklávu.

5.4 AFM

Výsledky mikroskopie atomárních sil nám dávají informace o výškovém rozložení povrchu.

Vypočtená drsnost povrchu RMS diamantových elektrod se u referenčního vzorku a vzorku, který prošel čtyřmi cykly, příliš neliší. U vzorku L16028 je rozdíl 6 %, u vzorku

L16029 rozdíl činí pouhá 3 %. Z tohoto zjištění vyplývá, že přítomnost povlaku nemá vliv na drsnost. Opět se nabízí vysvětlení pomocí morfologie povrchu. Jak již bylo zmíněno, krystaly diamantu tvoří vrcholy a jakási údolí. Plak pokrývá rovnoměrně jak vrcholy, tak údolí mezi krystaly. Tím není drsnost povrchu výrazně změněna.

U zlatého vzorku po čtyřech cyklech se drsnost velmi měnila v závislosti na místě měření od 1,3 nm po 7,7 nm. Toto je způsobeno nerovnoměrně naprášenou vrstvou zlata. Hluboké škrábance způsobily zlomení tří skenovacích hrotů.

5.5 Ramanova spektroskopie

Grafy uvedené na obr. 20 a 21 představují normalizovaná Ramanova spektra na nejvyšší intenzitu. Stejně jako v [29] pozorujeme diamantový pík a dva píky pocházejí ze segmentů trans-polyacetyleny, což je obecně přijímaná skutečnost. Píky příslušející trans-polyacetyleny se objevují ve všech Ramanových spektrech nanokrystalických diamantů [44].

Na obr. 20 (vzorky L16028) vidíme u vzorku označeného C4_2 (druhý vzorek z triplikátu, který prošel čtyřmi cykly) rozšíření diamantového píku, které je nejčastěji způsobeno přítomností grafitu. V našem případě jsme ale možnost přítomnosti grafitu vyloučili. Vzhledem k tomu, že se toto výrazné rozšíření u ostatních vzorků neobjevuje, je možné, že to byla pouze lokální vlastnost vrstvy v jednom konkrétním bodu. Vzorky byly měřeny mikro-Ramanovou spektroskopií a je možné, že homogenita vzorku není v rámci celého povrchu zachovaná. Z toho jsme usoudili, že není možné udělat závěr, že by na vzorku došlo ke grafítizaci, která by v tomto případě byla velmi neočekávaná a domníváme se, že pozorované změny jsou dané pouze podmínkami měření a případnou nehomogenitou vzorku.

Na obr. 21 (vzorky L16029) vidíme v píku v okolí 1360 cm^{-1} a 1580 cm^{-1} raménka, která pravděpodobně pocházejí z grafenu, který mohl vzniknout v průběhu růstu nanodiamantové vrstvy.

6 Závěr

Byly vyrobeny dva typy diamantových elektrod v souladu s materiály, které jsou používány pro výrobu komerčních elektrod a mikroelektrodových polí. Prvním typem bylo sklo s diamantovou vrstvou, u druhého typu byla nanodiamantová vrstva deponována na titan. Diamantová vrstva byla vytvořena pomocí speciálního typu depozice z plynné fáze podpořené mikrovlnným plazmatem na Fyzikálním ústavu Akademie věd České republiky a jedná se o borem dopované nanokrystalické diamanty.

Provedli jsme experiment s opakovanými sterilizacemi a kultivacemi buněk z buněčné linie CT26. Jeden pracovní cyklus se skládal ze sterilizace v autoklávu, potažení polyethyleniminem, kultivace buněk, čištění Tergazymem a oplachu destilovanou vodou. Elektrody prošly jedním až čtyřmi cykly.

Povrch diamantových elektrod byl charakterizován pomocí optické mikroskopie s využitím diferenciálního interferenčního kontrastu, skenovací elektronové mikroskopie, mikroskopie atomárních sil a Ramanovy spektroskopie.

Nebylo zjištěno žádné mechanické poškození diamantového povrchu. Z Ramanovy spektroskopie víme, že nedošlo ani ke změně diamantového píku v důsledku opakovaných sterilizací, kultivací a působení chemikálií v průběhu experimentu. Diamantová vrstva tedy může zvýšit životnost komerčně vyráběných elektrod.

Na snímcích z elektronového mikroskopu je viditelný povlak nečistot překrývající diamantovou vrstvou, který má původ pravděpodobně ve špatném odmytí polyethyleniminu. Tento povlak však neměl vliv na další kultivace buněk. Ve spolupráci s Fyziologickým ústavem Akademie věd České republiky byly elektrody vyčištěny dvěma různými kyselinami. Kyselina chlorovodíková povlak pouze místy zredukovala, zatímco kyselina dusičná povlak téměř odstranila.

Pro srovnání byly vytvořeny elektrody naprášením zlata na vrstvu titanu, které prošly stejnými cykly sterilizace a kultivace a byly charakterizovány stejnými metodami. V porovnání s diamantovými elektrodami jsou náchylnější k mechanickému poškození (např. pinzetou, či pipetou).

Seznam použité literatury

- [1] NARAYAN, Roger, ed. *Diamond-based materials for biomedical applications*. Oxford: Woodhead Publishing, 2013. Woodhead publishing series in biomaterials, number 55. ISBN 978-0-85709-340-0.
- [2] LAM, Robert a Dean HO. Nanodiamonds as vehicles for systemic and localized drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* [online]. 2009, **6**(9), 883–895. ISSN 1742-5247, 1744-7593. Dostupné z: doi:10.1517/17425240903156382
- [3] FRIES, Marc D a Yogesh K VOHRA. Nanostructured diamond film deposition on curved surfaces of metallic temporomandibular joint implant. *Journal of Physics D: Applied Physics* [online]. 2002, **35**(20), L105–L107. ISSN 0022-3727. Dostupné z: doi:10.1088/0022-3727/35/20/104
- [4] DYKSTRA, Michael J. *A manual of applied techniques for biological electron microscopy*. New York: Plenum, 1993. ISBN 978-0-306-44449-4.
- [5] VOKURKA, Martin a Jan HUGO. *Velký lékařský slovník*. 2015. ISBN 978-80-7345-456-2.
- [6] LOMBARDI, M. a M. ABBONDANZA. Asymmetric radial keratotomy for the correction of keratoconus. *Journal of Refractive Surgery (Thorofare, N.J.: 1995)*. 1997, **13**(3), 302–307. ISSN 1081-597X.
- [7] NOVIKOV, N.V, S.I KHANDOZHKO, V.M PEREVERTAILO, L.Yu OSTROVSKAYA, A.G GONTAR a O.B LOGINOVA. The wettability of a-C:H films by solution of different physicochemical compositions. *Diamond and Related Materials* [online]. 1998, **7**(9), 1263–1266. ISSN 09259635. Dostupné z: doi:10.1016/S0925-9635(98)00171-X
- [8] OSTROVSKAYA, L.Yu. Studies of diamond and diamond-like film surfaces using XAES, AFM and wetting. *Vacuum* [online]. 2002, **68**(3), 219–238. ISSN 0042207X. Dostupné z: doi:10.1016/S0042-207X(02)00460-8
- [9] NAZARÉ, Maria Helena, A. J. NEVES a INSTITUTION OF ELECTRICAL ENGINEERS, ed. *Properties, growth and applications of diamond*. London: INSPEC, 2001. EMIS datareviews series, 26. ISBN 978-0-85296-785-0.
- [10] PIERSON, Hugh O. *Handbook of carbon, graphite, diamond, and fullerenes: properties, processing, and applications*. Park Ridge, N.J., U.S.A: Noyes Publications, 1993. ISBN 978-0-8155-1339-1.
- [11] NARAYAN, Roger J, Ryan D. BOEHM a Anirudha V. SUMANT. Medical applications of diamond particles & surfaces. *Materials Today* [online]. 2011, **14**(4), 154–163. ISSN 13697021. Dostupné z: doi:10.1016/S1369-7021(11)70087-6
- [12] PARK, Jong-Hee a T. S SUDARSHAN. *Chemical vapor deposition* [online]. Materials Park, Ohio: ASM International, 2001 [vid. 2017-04-26]. ISBN 978-1-61503-224-2. Dostupné z: <http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=3002420>

- [13] XING, Yun a Liming DAI. Nanodiamonds for nanomedicine. *Nanomedicine* [online]. 2009, **4**(2), 207–218. ISSN 1743-5889, 1748-6963. Dostupné z: doi:10.2217/17435889.4.2.207
- [14] MANSOORIANFAR, Mojtaba, Mohammad Ali SHOKRGOZAR, Morteza MEHRJOO, Elnaz TAMJID a Arash SIMCHI. Nanodiamonds for surface engineering of orthopedic implants: Enhanced biocompatibility in human osteosarcoma cell culture. *Diamond and Related Materials* [online]. 2013, **40**, 107–114. ISSN 09259635. Dostupné z: doi:10.1016/j.diamond.2013.10.012
- [15] VAJAYANTHIMALA, V, Dong Keun LEE, Sue V KIM, Albert YEN, Nathaniel TSAI, Dean HO, Huan-Cheng CHANG a Olga SHENDEROVA. Nanodiamond-mediated drug delivery and imaging: challenges and opportunities. *Expert Opinion on Drug Delivery* [online]. 2015, **12**(5), 735–749. ISSN 1742-5247, 1744-7593. Dostupné z: doi:10.1517/17425247.2015.992412
- [16] CHEN, Mark, Erik D. PIERSTORFF, Robert LAM, Shu-You LI, Houjin HUANG, Eiji OSAWA a Dean HO. Nanodiamond-Mediated Delivery of Water-Insoluble Therapeutics. *ACS Nano* [online]. 2009, **3**(7), 2016–2022. ISSN 1936-0851, 1936-086X. Dostupné z: doi:10.1021/nn900480m
- [17] SCHRAND, Amanda M., Jonathan B. LIN, Suzanne Ciftan HENS a Saber M. HUSSAIN. Temporal and mechanistic tracking of cellular uptake dynamics with novel surface fluorophore-bound nanodiamonds. *Nanoscale* [online]. 2011, **3**(2), 435–445. ISSN 2040-3364, 2040-3372. Dostupné z: doi:10.1039/C0NR00408A
- [18] FUJISHIMA, Akira a Yasuaki EINAGA, ed. *Diamond electrochemistry*. Tokyo: BKC, 2005. ISBN 978-0-444-51908-5.
- [19] SZUNERITS, Sabine, Alexandre BARRAS a Rabah BOUKHERROUB. Antibacterial Applications of Nanodiamonds. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2016, **13**(4), 413. ISSN 1660-4601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph13040413
- [20] DANILENKO, V. V. On the history of the discovery of nanodiamond synthesis. *Physics of the Solid State* [online]. 2004, **46**(4), 595–599. ISSN 1063-7834, 1090-6460. Dostupné z: doi:10.1134/1.1711431
- [21] SCHRAND, Amanda, Suzanne A. Ciftan HENS a Olga SHENDEROVA. Nanodiamond Particles: Properties and Perspectives for Bioapplications. *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences* [online]. 2009, **34**(1), 18–74. ISSN 1040-8436. Dostupné z: doi:10.1080/10408430902831987
- [22] *Carbon nanoparticles and nanostructures*. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2016. ISBN 978-3-319-28780-5.
- [23] DOLMATOV, V. Yu., V. MYLLYMÄKI a A. VEHANEN. A possible mechanism of nanodiamond formation during detonation synthesis. *Journal of Superhard Materials* [online]. 2013, **35**(3), 143–150. ISSN 1063-4576, 1934-9408. Dostupné z: doi:10.3103/S1063457613030039
- [24] MAY, P. W. Diamond thin films: a 21st-century material. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*

[online]. 2000, **358**(1766), 473–495. ISSN 1364-503X, 1471-2962. Dostupné z: doi:10.1098/rsta.2000.0542

[25] ANDO, Yasutaka, Shogo TOBE, Takashi SAITO, Jun-ichi SAKURAI, Hirokazu TAHARA a Takao YOSHIKAWA. Enlargement of the diamond deposition area in combustion flame method by traversing substrate. *Thin Solid Films* [online]. 2004, **457**(1), 217–223. ISSN 00406090. Dostupné z: doi:10.1016/j.tsf.2003.12.042

[26] SCHWANDER, Michael a Knut PARTES. A review of diamond synthesis by CVD processes. *Diamond and Related Materials* [online]. 2011, **20**(9), 1287–1301. ISSN 09259635. Dostupné z: doi:10.1016/j.diamond.2011.08.005

[27] BACHMANN, Peter K., Dieter LEERS a Hans LYDTIN. Towards a general concept of diamond chemical vapour deposition. *Diamond and Related Materials* [online]. 1991, **1**(1), 1–12. ISSN 09259635. Dostupné z: doi:10.1016/0925-9635(91)90005-U

[28] MOND, Ludwig, Carl LANGER a Friedrich QUINCKE. L.—Action of carbon monoxide on nickel. *J. Chem. Soc., Trans.* [online]. 1890, **57**(0), 749–753. ISSN 0368-1645. Dostupné z: doi:10.1039/CT8905700749

[29] TAYLOR, Andrew, Ladislav FEKETE, Pavel HUBÍK, Aleš JÄGER, Petr JANÍČEK, Vincent MORTET, Jan MISTRÍK a Jiří VACÍK. Large area deposition of boron doped nano-crystalline diamond films at low temperatures using microwave plasma enhanced chemical vapour deposition with linear antenna delivery. *Diamond and Related Materials* [online]. 2014, **47**, 27–34. ISSN 09259635. Dostupné z: doi:10.1016/j.diamond.2014.05.002

[30] NESLÁDEK, Miloš, Dominique TROMSON, Christine MER, Philippe BERGONZO, Pavel HUBIK a Jiri J. MARES. Superconductive B-doped nanocrystalline diamond thin films: Electrical transport and Raman spectra. *Applied Physics Letters* [online]. 2006, **88**(23), 232111. ISSN 0003-6951, 1077-3118. Dostupné z: doi:10.1063/1.2211055

[31] SENDA, Yasuhisa. Role of the heteroatom on stereoselectivity in the complex metal hydride reduction of six-membered cyclic ketones. *Chirality* [online]. 2002, **14**(2–3), 110–120. ISSN 0899-0042, 1520-636X. Dostupné z: doi:10.1002/chir.10051

[32] KAVAN, Ladislav, Zuzana VLCKOVA ZIVCOVA, Vaclav PETRAK, Otakar FRANK, Pavel JANDA, Hana TARABKOVA, Milos NESLADEK a Vincent MORTET. Boron-doped Diamond Electrodes: Electrochemical, Atomic Force Microscopy and Raman Study towards Corrosion-modifications at Nanoscale. *Electrochimica Acta* [online]. 2015, **179**, 626–636. ISSN 00134686. Dostupné z: doi:10.1016/j.electacta.2015.04.124

[33] ZHANG, Jun, Jing LI a Hua PENG. Low-Complexity Iterative Coherent Detection for Differentially Encoded MPSK. In: [online]. B.m.: IEEE, 2008, s. 23–28 [vid. 2017-04-06]. ISBN 978-0-7695-3119-9. Dostupné z: doi:10.1109/CISP.2008.528

[34] WANG, Z.L., Q. LUO, L.W. LIU, C.Y. LI, H.X. YANG, H.F. YANG, J.J. LI, X.Y. LU, Z.S. JIN, L. LU a C.Z. GU. The superconductivity in boron-doped

polycrystalline diamond thick films. *Diamond and Related Materials* [online]. 2006, **15**(4–8), 659–663. ISSN 09259635. Dostupné z: doi:10.1016/j.diamond.2005.12.035

[35] PLUTA, Maksymilian. Nomarski's DIC microscopy: a review. In: Maksymilian PLUTA a Mariusz SZYJER, ed. [online]. 1994, s. 10–25 [vid. 2017-04-23]. Dostupné z: doi:10.1117/12.171873

[36] MURPHY, Douglas B. *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*. New York: Wiley-Liss, 2001. ISBN 978-0-471-25391-4.

[37] GOODHEW, Peter J, R BEANLAND a F. J HUMPHREYS. *Electron microscopy and analysis* [online]. London: Taylor & Francis, 2001 [vid. 2017-04-27]. ISBN 978-0-7484-0968-6. Dostupné z: <http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=168520>

[38] GOLDSTEIN, Joseph, Dale E NEWBURY, Patrick ECHLIN, David C JOY, A. D ROMIG, Charles E LYMAN, Charles FIORI a Eric LIFSHIN. *Scanning electron microscopy and x-ray microanalysis: a text for biologists, materials scientists, and geologists*. New York: Plenum Press, 1992. ISBN 978-1-4613-0491-3.

[39] BINNIG, G., C. F. QUATE a Ch. GERBER. Atomic Force Microscope. *Physical Review Letters* [online]. 1986, **56**(9), 930–933. ISSN 0031-9007. Dostupné z: doi:10.1103/PhysRevLett.56.930

[40] YABLON, Dalia G. *Scanning probe microscopy for industrial applications: nanomechanical characterization*. 2014. ISBN 978-1-118-28823-8.

[41] MORRIS, V. J, A. R KIRBY a A. P GUNNING. *Atomic force microscopy for biologists* [online]. London: Imperial College Press, 2010 [vid. 2017-04-27]. ISBN 978-1-84816-467-3. Dostupné z: <http://www.ebrary.com>

[42] GARDINER, D. J., P. R. GRAVES a H. J. BOWLEY, ed. *Practical Raman spectroscopy*. Berlin ; New York: Springer-Verlag, 1989. ISBN 978-0-387-50254-0.

[43] HUNTER, A. Molecular hurdles in polyfectin design and mechanistic background to polycation induced cytotoxicity☆. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2006, **58**(14), 1523–1531. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2006.09.008

[44] FERRARI, A. C. a J. ROBERTSON. Origin of the 1150 – cm – 1 Raman mode in nanocrystalline diamond. *Physical Review B* [online]. 2001, **63**(12) [vid. 2017-05-09]. ISSN 0163-1829, 1095-3795. Dostupné z: doi:10.1103/PhysRevB.63.121405