

# Charakterizace povrchů s použitím konfokální mikroskopie

Lucie Otépková

---

Bakalářská práce  
2021



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav výrobního inženýrství

Akademický rok: 2020/2021

## **ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE** (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Lucie Otépková**  
Osobní číslo: **T18212**  
Studijní program: **B3909 Procesní inženýrství**  
Studijní obor: **Technologická zařízení**  
Forma studia: **Prezenční**  
Téma práce: **Charakterizace povrchů s použitím konfokální mikroskopie**

### **Zásady pro vypracování**

- Vypracovat aktuální literární rešerši zaměřenou na použití mikroskopických metod a na charakterizaci morfologie povrchů.
- Charakterizace povrchů s použitím konfokální mikroskopie a AFM.
- Analýza, diskuze a srovnání získaných výsledků.

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

**Seznam doporučené literatury:**

- Paddock, Stephen W. (Ed.), *Confocal Microscopy*, ISBN 978-1-58829-351-0
- Pawley, James B., *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, ISBN 9780306448263
- Flys, O., Berglund, J., & Rosen, B.-G. (2020). Using confocal fusion for measurement of metal AM surface texture. *Surface Topography: Metrology and Properties*, 8(2).

Vedoucí bakalářské práce: **prof. RNDr. Petr Ponižil, Ph.D.**  
Ústav fyziky a mater. inženýrství

Datum zadání bakalářské práce: **5. ledna 2021**

Termín odevzdání bakalářské práce: **21. května 2021**

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

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

### **Prohlašuji,**

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## **ABSTRAKT**

Bakalářská práce je zaměřena na charakterizaci povrchů s využitím konfokální mikroskopie a technologie atomárních sil. Teoretická část je orientována na pochopení základů optiky a rovněž na vývoj a zdokonalování současných mikroskopických technik. V praktické části je popsán experiment, který zahrnuje přípravu povrchů pomocí 3D tisku a vyhodnocení jeho kvality. Výsledkem bakalářské práce je měření a následná diskuse o kvalitě stereolitografického tisku vzorků v závislosti na úhlu tisku s použitím konfokálního mikroskopu Olympus FV3000 a mikroskopu atomárních sil. Cílem bakalářské práce je mimo jiné i připravení anizotropních povrchů pro sledování růstu buněk, které budou dále zkoumány příslušnými odborníky na buněčné struktury.

Klíčová slova:

mikroskopické metody, konfokální mikroskopie, mikroskopie atomárních sil, topografie povrchu, stereolitografie

## **ABSTRACT**

The bachelor thesis focuses on the characterization of surfaces using confocal microscopy and atomic force technology. The theoretical part is focused on understanding the basics of optics and the development of current microscopic techniques. The practical part describes an experiment that includes the preparation of surfaces using 3D printing and evaluation of its quality. The results of the bachelor's thesis are the measurement and subsequent discussion of the quality of stereolithographic printing of samples depending on the printing angle using the Olympus FV3000 confocal microscope and the atomic force microscope. The aim of the bachelor's thesis is, among other things, to prepare anisotropic surfaces for monitoring cell growth, which will be further investigated by relevant experts in cell structures.

Keywords:

microscopic methods, confocal microscopy, atomic force microscopy, surface topography, stereolithography

Touto cestou bych chtěla poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce prof. RNDr. Petrovi Ponížilovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při tvorbě mé bakalářské práce.

Mé poděkování rovněž patří Ing. Karolíně Kocourkové, Ing. Markétě Kadlečkové a Ing. Kateřině Skopalové za pomoc při přípravě a realizaci experimentální části bakalářské práce.

V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu při studiu.

„Vědět málo je nebezpečné. Vědět mnoho, také.“

Albert Einstein

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

## OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 HISTORIE OPTICKÉ MIKROSKOPIE</b> .....	<b>12</b>
1.1 PRVNÍ MIKROSKOPY .....	12
1.2 ODSTRAŇOVÁNÍ VAD .....	14
1.3 PRVNÍ SÉRIOVÁ VÝROBA .....	15
1.4 POČÁTKY MODERNÍ MIKROSKOPIE .....	16
<b>2 ÚVOD DO OPTIKY</b> .....	<b>17</b>
2.1 SVĚTLO .....	17
2.2 CHOVÁNÍ SVĚTLA.....	18
2.2.1 Vlnový charakter .....	18
2.2.2 Částicový charakter .....	19
2.2.3 Částicově vlnový dualismus.....	23
<b>3 SVĚTELNÁ MIKROSKOPIE</b> .....	<b>24</b>
3.1 SVĚTELNÝ MIKROSKOP.....	24
3.1.1 Optická soustava .....	24
3.1.2 Vlastnosti objektivu .....	25
3.1.3 Osvětlovací soustava .....	30
3.1.4 Mechanické zařízení.....	30
3.2 MIKROSKOPICKÉ TECHNIKY VE SVĚTELNÉ MIKROSKOPII.....	30
3.2.1 Klasické techniky .....	31
3.2.2 Skenovací techniky .....	34
<b>4 ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE</b> .....	<b>35</b>
4.1 ELEKTRONOVÝ MIKROSKOP .....	36
4.2 TRANSMISNÍ ELEKTRONOVÝ MIKROSKOP .....	37
4.2.1 Zobrazovací soustava TEM.....	37
4.2.2 Osvětlovací soustava TEM .....	39
4.2.3 Vakuový systém .....	40
4.2.4 Interakce elektronového svazku s hmotou .....	41
4.2.5 Detekce a záznam obrazu.....	42
4.3 SKENOVACÍ ELEKTRONOVÝ MIKROSKOP .....	43
<b>5 FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE</b> .....	<b>45</b>
5.1 FLUORESCENCE .....	45
5.2 FLUORESCENČNÍ MIKROSKOP .....	46
5.2.1 Konfokální fluorescenční mikroskopie .....	47
<b>6 MIKROSKOPIE SKENOVACÍ SONDOU</b> .....	<b>51</b>
6.1 MIKROSKOPIE ATOMÁRNÍCH SIL.....	52

6.1.1	Kontaktní režim.....	52
6.1.2	Bezkontaktní režim .....	53
6.1.3	Pokleповý režim.....	53
6.1.4	Aplikace AFM.....	54
<b>7</b>	<b>TECHNOLOGIE 3D TISKU .....</b>	<b>55</b>
7.1	TYPY 3D TISKU .....	55
7.1.1	Technologie tisku FDM .....	55
7.1.2	Technologie tisku SLA .....	57
7.1.3	Volba materiálů pro 3D tisk.....	58
<b>8</b>	<b>SHRnutí TEORETICKÉ ČÁSTI.....</b>	<b>59</b>
<b>II</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST.....</b>	<b>60</b>
<b>9</b>	<b>STANOVENÍ CÍLŮ PRAKTICKÉ ČÁSTI.....</b>	<b>61</b>
<b>10</b>	<b>PŘÍPRAVA VZORKŮ POVRCHU .....</b>	<b>62</b>
10.1	PŘÍPRAVA VZORKŮ S JEMNOU POVRCHOVOU STRUKTUROU .....	62
10.2	PŘÍPRAVA VZORKŮ S HRUBŠÍ POVRCHOVOU STRUKTUROU.....	64
<b>11</b>	<b>SLA 3D TISK POVRCHŮ.....</b>	<b>67</b>
11.1	3D TISK VZORKŮ S JEMNOU POVRCHOVOU STRUKTUROU .....	67
11.1.1	Dokončovací operace .....	69
11.2	3D TISK VZORKŮ S HRUBŠÍ POVRCHOVOU STRUKTUROU .....	72
<b>12</b>	<b>MĚŘENÍ VZORKŮ S JEMNOU POVRCHOVOU STRUKTUROU VYTISKNUTÝCH POD ÚHLEM 0°, 45° A 90° .....</b>	<b>73</b>
12.1	ZKOUMÁNÍ VZORKŮ POD KONFOKÁLNÍM MIKROSKOPEM OLYMPUS FV3000 .....	73
12.1.1	Nastavení konfokálního mikroskopu Olympus FV3000.....	73
12.1.2	Měření povrchové struktury jemných proužků v závislosti na úhlu tisku .....	76
12.1.3	Měření povrchové struktury pravidelné sítě válečků v závislosti na úhlu tisku.....	79
12.1.4	Měření povrchové struktury prodlužujících se čárek v závislosti na úhlu tisku.....	83
12.2	ZKOUMÁNÍ VZORKŮ MIKROSKOPIÍ ATOMÁRNÍCH SIL .....	88
<b>13</b>	<b>MĚŘENÍ VZORKŮ S HRUBŠÍ POVRCHOVOU STRUKTUROU VYTISKNUTÝCH POUZE POD ÚHLEM 0° .....</b>	<b>94</b>
13.1	ZKOUMÁNÍ VZORKŮ S HRUBŠÍ POVRCHOVOU STRUKTUROU POD KONFOKÁLNÍM MIKROSKOPEM OLYMPUS FV3000.....	96
13.1.1	Měření povrchové struktury pravidelné sítě teček .....	96
13.1.2	Měření povrchové struktury krátkých čárek .....	98
13.1.3	Měření povrchové struktury dlouhých čárek .....	100
13.1.4	Zkoumání růstu buněčných linií na připravených površích.....	102
<b>14</b>	<b>CELKOVÉ ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ A JEJICH DISKUZE.....</b>	<b>106</b>
14.1	VYHODNOCENÍ TVARU JEMNÉ POVRCHOVÉ STRUKTURY V ZÁVISLOSTI NA POUŽITÉM NÁKLONU DESTIČKY PŘI 3D TISKU .....	106



14.2	VYHODNOCENÍ PŘEVÝŠENÍ NA KONKRÉTNÍM MÍSTĚ VZORKU V ZÁVISLOSTI NA POUŽITÉM NÁKLONU DESTIČKY PŘI 3D TISKU TECHNOLOGIÍ AFM .....	107
14.3	VYHODNOCENÍ HRUBŠÍ PRAVIDELNÉ ROZMĚROVÉ STRUKTURY VZORKŮ PŘI JEDINÉM ÚHLU TISKU $0^\circ$ .....	107
14.4	VYHODNOCENÍ RŮSTU BUNĚČNÝCH LINÍ NA PRAVIDELNÝCH POVRŠÍCH.....	107
<b>ZÁVĚR .....</b>		<b>109</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>		<b>110</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>		<b>115</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>		<b>118</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>		<b>122</b>

## ÚVOD

Trendem dnešní doby je nesporně neustálé zdokonalování a vývoj nových technologií. Jinak tomu není ani v oblasti optické mikroskopie. Tato fyzikální disciplína urazila od začátku svého vývoje již dlouhou cestu plnou zásadních objevů na poli vědy. Mikroskopy jsou dnes hojně rozšířené v mnoha odvětvích.

V teoretické části bakalářské práce je rozebrána historie optické mikroskopie od úplných začátků na konci 16. století až po zjištění omezenosti použití ve století 20. Dále se teoretická studie věnuje podrobnému popisu světelné, elektronové, fluorescenční mikroskopie a v neposlední řadě technologii atomárních sil. Teoretická část je zakončena kapitolou o 3D tisku, který je nutné zahrnout z důvodu aplikace v praktické části.

Cílem praktické části je použití konfokálního mikroskopu Olympus FV3000 pro vyhodnocení kvality 3D tisku povrchů vyrobených stereolitografickou 3D tiskárnou Form 3 od firmy Formlabs v závislosti na úhlu tisku. Dále bude konfokální mikroskop využit pro účely sledování směru růstu buněk na předtisknutém povrchu. Posledním úkolem je zkoumání objektů za využití mikroskopie atomárních sil a vyhodnocení jemné struktury vyrobených povrchů.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 HISTORIE OPTICKÉ MIKROSKOPIE

Optická mikroskopie má v současnosti široké využití v mnoha odvětvích lidské činnosti, příkladem mohou být: všeobecná medicína, molekulární biologie, mineralogie, chemie, výzkum nových i stávajících materiálů a mnoho dalších vědních oborů. V závislosti na druhu a vlastnostech zkoumaného vzorku je vybírán vhodný mikroskop a příslušná metoda pro pozorování daného vzorku. [7]

## 1.1 První mikroskopy

Historie optické mikroskopie sahá až do 16. století, kde v laboratoři geniálního holandského optika Zachariase Janssena vznikl první optický mikroskop. Tento objev byl zásadním krokem k budoucímu zdokonalování a vývoji mikroskopie. Do té doby se čočky používaly pouze jako lupa ke zvětšení pozorovaných objektů a následně našly využití rovněž ve výrobě brýlí. [13]

Zacharias Janssen a jeho otec Hans Janssen v roce 1590 sestrojili první složený mikroskop kombinací konvexních čoček v tubusu. Tento mikroskop lze vidět na *Obr. 1*. V přesnějším popise šlo o bikonvexní okulárovou a plan-konvexní objektivovou čočku. Pozorované předměty se zvětšovaly a zmenšovaly na základě změny délky trubice dalekohledu. [3,4,5]



*Obr.1 První složený mikroskop [39]*

- **Vývoj v 17. století**

Ve stejné době rovněž v Holandsku byl objeven i dalekohled. Na počátku 17. století italský fyzik Galileo Galilei oba tyto přístroje zdokonalil. V roce 1610 Galileo popsal optickou trubici, ta se sestávala z konvexního objektivu a konkávního okuláru. Podle Galileových slov mu takový mikroskop umožňoval vidět mouchy velké jako slepice, a pomocí dalekohledu docílil pozorování sluneční soustavy, které podporovalo Koperníkovu heliocentrickou koncepci. [2,3,6]

V roce 1624 Galileo Galilei vyvinul složený mikroskop ze dvou konvexních čoček pod názvem „Occhialino“ neboli „Malé oko“ vyobrazený na *Obr. 2*. S pojmenováním mikroskop poprvé přišel o rok později botanik Giovanni Faber, který zkombinoval řecká slova pro „malý“ a „vidět“. [3,4]



*Obr.2 Mikroskop Galilea Galileiho [38]*

Přestože mikroskopy 17. století měly vcelku uspokojující zvětšovací schopnosti (až 50x), disponovaly však hned několika nežádoucími vlastnostmi. Vzniklé obrazy byly nejasné a rozmazané, trpěly silnými sférickými aberacemi, protože reálná čočka s kulovitým povrchem nedovedla vytvořit ostrý obraz oproti ideální tenké čočce. Sférická aberace je pokles ostroty obrazu od středu směrem k okrajům. Příčinou této otvorové vady je, že paprsky rovnoběžné s optickou osou se lámou různě podle vzdálenosti od osy a nesbíhají se po průchodu soustavou čoček přesně v jednom ohnisku. [3,1]

Zdokonalování mikroskopů dále pokračovalo pod rukama Antonia van Leeuwenhoeka, tomu se podařilo vytvořit nejlepší jednočočkové mikroskopy tehdejší doby. Leeuwenhoek vyrobil stovky malých čoček vynikající kvality, jež měly ve srovnání s ostatními výraznější zvětšení (až 300x). Mikroskopy od tohoto nizozemského přírodovědce produkovaly mnohem méně aberací, než tomu bylo u většiny mikroskopů 17. století. Tajemství své technologie výroby však nikdy neprozradil. Až do 20. století nebyla jeho technika objasněna. V polovině 20. století byla provedena rekonstrukce Leeuwenhoekovy výroby čoček, z ní plyne, že výroba čoček pravděpodobně probíhala natavením skleněné tyčinky v plamenu za vzniku malé pravidelné skleněné kapky. [1,3,7,13]

Vývoj v podání anglického fyzika Roberta Hookea se ubíral jiným směrem. V roce 1660 se mu povedlo ve složeném mikroskopu správně použít hned tři čočky a dosáhl tak mnohem většího zvětšení, než bylo u dvoučočkových mikroskopů možné. Vzorky zkoumal v prostředí s vyšším indexem lomu, než má vzduch, a také vynalezl irisovou clonku (viz dále). Svá zkoumání a konstrukci mikroskopu s odděleným objektivem, okulárem a osvětlovacím zařízením podrobně popsal v knize *Micrographia* publikované už roku 1665. [1,3,7]

- **Skepse v 18. století**

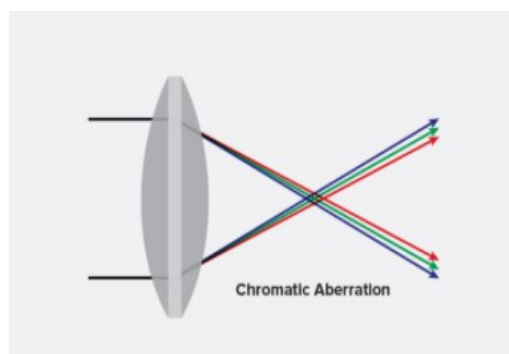
18. století by se ve spojitosti s mikroskopy a jejich vývojem dalo považovat za období skepse či pochybování o důležitosti přístroje. Ve společnosti panovalo všeobecné přesvědčení o tom, že mikroskopy slouží pouze pro zábavu zámožných lidí zajímajících se o krásy přírody, ale pro skutečnou vědu nejsou přínosem. Tento mýtus se podařilo vyvrátit hned v následujícím století v důsledku nových objevů a dalších vylepšení.

- **Vývoj v 19. století**

Hlavním problémem, který brzdil využití mikroskopie pro vědecké účely v 19. století, byly silné chromatické neboli barevné aberace, jež zkreslovaly a téměř znehodnocovaly výzkum.

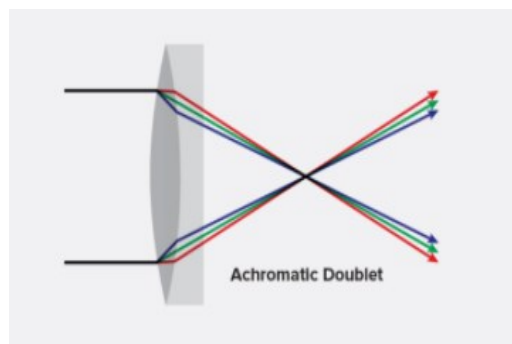
## 1.2 Odstraňování vad

Barevné vady vznikaly hlavně z toho, že se paprsky základních barev světelného spektra lámou odlišně a sférický povrch čočky nepřivádí světelné paprsky k zaostření k jednomu bodu, jak je vidět na *Obr. 3*. [8,9]



*Obr. 3 Chromatická vada objektivu [37]*

Významný krok se v tomto případě podařilo učinit Jacksonu Listerovi, když roku 1826 vypočítal zakřivení zvětšovací čočky tak, aby došlo ke snížení sférické i chromatické aberace v achromatickém objektivu. Odstranění těchto vad v achromatickém objektivu je uvedeno na *Obr. 4* skombinováním konvexní čočky vyrobené z korunového skla a konkávní čočky z flintového skla. Korunové (draselnovápenaté) sklo má nízký index lomu a nízkou disperzi, což je míra rozkladu světla materiálem. Opakem je potom pazourkové (křemenné) neboli flintové sklo. Spojení těchto čoček pomohlo k soustředění modrého a červeného světla do jednoho ohniska. [8,9]



*Obr. 4 Achromatický objektiv [37]*

### 1.3 První sériová výroba

V druhé polovině 19. století jsou s významným pokrokem v mikroskopii nejčastěji spojováni vědci Carl Zeiss, Ernst Abbé a na přelomu století rovněž August Köhler. Abbé a Köhler se stali zaměstnanci v Zeissově společnosti na výrobu mnoha typů kvalitních optických přístrojů založenou roku 1846. Zeiss začal konstrukcí jednoduchých mikroskopů, které v padesátých letech 19. století byly použity především na přípravné práce. [10]

Fyzik Ernst Abbé konstruoval mikroskopy s achromatickým objektivem, a také zdokonalil ponorné zařízení do oleje. [9] Objevil olej, jenž na vzduchu netvrdne a taktéž neničí objektiv ani čočku. [8] Dalším Abbéovým neméně důležitým vynálezem se stal Abbéův kondenzor. Světlo je zaostřováno více čočkami najednou, což vede k lepšímu osvětlení vzorku. Abbéův kondenzor byl však brzy nahrazen modernějším Köhlerovým přístrojem pro pozorování ve světlém poli. [11]

August Köhler, vedoucí projekčního oddělení v Carl Zeiss, upravoval optiku osvětlení, a dal vzniknout Köhlerovu princip osvětlení. Tento princip obsahuje dvě clony. První je plná clona zobrazená do roviny objektu a jako druhá nastupuje clonová clona, která reguluje

světelný tok, aby bylo osvětleno jenom zorné pole mikroskopu. Jako poslední je zaostřovací čočka pro docílení nejlepšího možného osvětlení a zároveň nejnižšího oslnění. V roce 1900 zformovala Köhlerova osvětlovací technika a Abbého optika základy dnešní techniky světelné mikroskopie pro pozorování ve světlém poli. [11]

August Köhler neuvažoval nad zlepšením jen v odvětví osvětlování vzorků, ale zajímala ho hlavně rozlišovací schopnost světelných mikroskopů a její zdokonalování.

#### 1.4 Počátky moderní mikroskopie

Jelikož je rozlišovací schopnost světelných mikroskopů omezena vlnovou délkou procházejícího světla, tak August Köhler použil místo viditelného světla UV světlo. Tím splnil požadavek použití světla s kratší vlnovou délkou a v roce 1904 projektoval první UV mikroskop, který se stal základním stavebním kamenem pro dnešní fluorescenční mikroskopy. [10]

Začátkem 20. století získal optický mikroskop téměř dnešní podobu, ale jeho vývoj rozhodně neskončil. Postupně bylo zjištěno, že optický mikroskop má své limity i teoretické hranice v pozorování objektů. Abychom mohli pozorovat drobné preparáty o velikosti několika nanometrů, bylo zapotřebí vyvinout mikroskop na jiném principu (viz dále). Místo viditelného světla použít jiný způsob osvětlení s kratší vlnovou délkou a zlepšit tak rozlišovací schopnost mikroskopu. [2,7]



## 2 ÚVOD DO OPTIKY

Pro pochopení vzniku obrazu v mikroskopu a ostatních dějů vznikajících při tvorbě výsledného obrazu je zapotřebí zmínit několik principů týkajících se šíření světla a jeho charakteristického chování. Následující poznatky budou v této kapitole podloženy příslušnými experimenty dokazující jejich pravdivost.

### 2.1 Světlo

Světlo je viditelné elektromagnetické záření o vlnové délce  $\lambda$  v rozmezí 390–760 nm. Vlnová délka viditelného světla leží mezi ultrafialovým a infračerveným zářením. [1]

Mezi základní vlastnosti světla patří kromě vlnové délky i rychlost šíření světla, frekvence, amplituda, intenzita světla a fáze.

Rychlost světla ve vakuu má stejnou velikost  $c$  ve všech směrech a inerciálních vztažných soustavách, nezávislou na rychlosti zdroje. To znamená, že rychlost světla emitovaného pohybujícím se zdrojem by měla být shodná s rychlostí světla emitovaného zdrojem v klidu vzhledem k dané soustavě souřadnic. [1]

$$c = \lambda f \left[ \frac{\text{m}}{\text{s}} \right] \quad (1)$$

kde:  $c$ ...rychlost světla ve vakuu [ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ]

$\lambda$ ...vlnová délka světla [m]

$f$ ...frekvence použitého světla [Hz]

V látkovém prostředí je rychlost světla  $c$  vždy nižší vlivem interakce s částicemi látky. Rychlost šíření světla závisí na indexu lomu daného prostředí. [1]

Narozdíl od rychlosti světla u frekvence nezáleží na prostředí, v němž se světlo šíří. Frekvence  $f$  viditelného světla se pohybuje v rozmezí  $3,9 \times 10^{14}$  Hz do  $7,7 \times 10^{14}$  Hz a udává počet kmitů za jednotku času. Určuje také barvu viditelného záření. Pro každou spektrální barvu je typická určitá vlnová délka. To, jakou barvu vidíme, přímo souvisí s povrchem sledovaného objektu. Předmět je viděn pouze v takové barvě, jakou vlnovou délku povrch odráží, ostatní vlnové délky jsou objektem pohlceny. [12]

Světlo je tedy vlněním elektromagnetického pole, které se sestává ze dvou kolmo na sebe oscilujících polí (elektrického a magnetického). Elektrické pole je důležité z hlediska účinků světla. Amplituda světla úzce souvisí s intenzitou. Amplituda  $A$  představuje největší možnou

výchylku sinusoidy měřenou od nulové hodnoty. Intenzita záření závisí na vzdálenosti od zdroje záření. Z bodového zdroje se světlo šíří ve všech směrech se stejnou intenzitou. [1]

## 2.2 Chování světla

Vysvětlení podstaty světla se ve fyzice pokládá za velký úspěch předchozího století, neboť odvodnit jeho chování je velmi složité.

### 2.2.1 Vlnový charakter

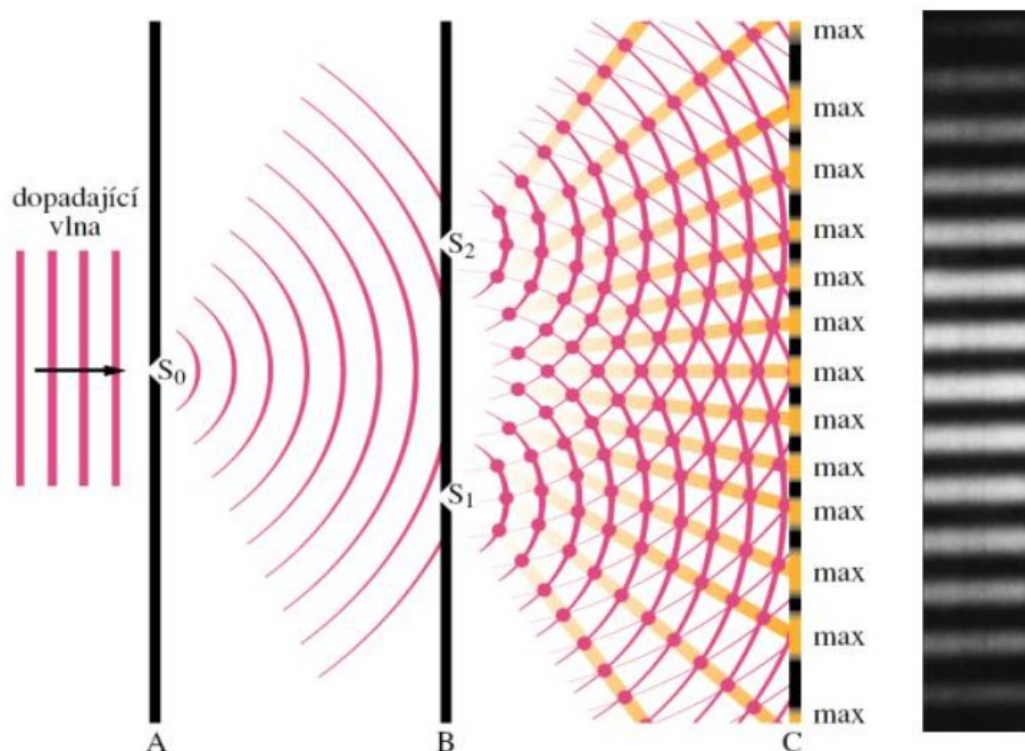
V 19. století jednomyslně fyzici přijali vlnovou teorii světla. První přesvědčivou vlnovou hypotézu pro přijetí vlnové teorie vyslovil holandský fyzik Christian Huygens roku 1678. Podle Huygensova principu každý bod vlnoplochy slouží jako nový bodový zdroj sekundárního vlnění, které se z něj v elementárních vlnoplochách šíří ve všech směrech. Za čas  $t$  se poloha vlnoplochy stane obálkou sekundárních vln. Díky tomuto principu je tedy možné nalézt polohu vlnoplochy za určitý čas, pokud je známa její současná poloha. [1]

- **Youngův pokus**

Vlnovou hypotézu o šíření světla bylo třeba experimentálně ověřit. Důkaz o tom, že světlo by opravdu mohlo být chápáno jako vlnění, podal na počátku 19. století ve svém pokusu anglický fyzik Thomas Young, jehož experiment byl příkladem interference (neboli skládání) světelných vln.

K pokusu, který je znázorněn na *Obr. 5*, byly použity stínítka s malými otvory blízko u sebe a zdroj elektromagnetického záření (vlnění kmitající pouze na jedné frekvenci). Dopadající monochromatické světlo je difraktováno (ohýbáno) na štěrbině  $S_0$  prvního stínítka A, jež lze považovat za bodový zdroj světla. Za štěrbinou  $S_0$  se světlo šíří podle Huygensova principu a osvětluje druhé stínítko B se dvěma štěrbinami  $S_1, S_2$ . Dopadající záření je opět ohýbáno na obou štěrbinách a vznikají tak dva bodové zdroje navzájem koherentního světla. Koherence je jednou z nutností pro vznik interference. Koherentního světla docílíme tím, že vycházející světlo ze štěrbin  $S_1, S_2$  bude mít stejnou amplitudu i fázi. V Youngově pokusu je tato podmínka vyřešena umístěním prvního otvoru  $S_0$  na stínítku A symetricky mezi otvory  $S_1, S_2$ . To znamená, že světlo vycházející z prvního otvoru dopadne na obě štěrbinu  $S_1, S_2$  ve fázi a světelné vlny vycházející ze štěrbin se překrývají a vzájemně interferují. Na posledním stínítku C vzniká interferenční obrazec, což je struktura pravidelných maxim a minim odpovídající světlým a tmavým proužkům na stínítku. Interferenční maximum

vznikne v místě, kde se sbíhá koherentní vlnění se stejnou fází a interferenční minimum naopak v místě s opačnou fází. [1,2]



Obr. 5 Youngův pokus [1]

Interference byla z historického hlediska považována za přímý důkaz vlnové vlastnosti světla. Pro její vznik je však nutné splnit následující podmínky:

1. Použití dvou a více vlněními.
2. Musí být splněna koherence použitého vlnění.
3. Mezi vlněními musí být časově neměnný fázový rozdíl.

Interference bude nejvýraznější, pokud použitá vlnění splňují podmínku stejné vlnové délky. [1]

### 2.2.2 Částicový charakter

Začátkem 20. století obohatil vědecký svět geniální teoretický fyzik Albert Einstein nejen o svou kvantovou hypotézu. Einsteinův génus dal vzniknout novým odvětvím fyziky, jakož jsou obecná a speciální teorie relativity a kvantová fyzika, právě v době, kdy už to vypadalo, že fyzika se stává vědou postrádající nové podněty k zamyšlení. Doposud byla fyzika prezentována jako vědní obor, který dokáže na základě znalosti počátečních podmínek popsat průběh určitého experimentálního problému v čase. Kvantová fyzika je však založena

na úplně odlišných principech. Podle kvantové teorie se může ze stejných počátečních podmínek vyvinout více situací se stejnou pravděpodobností. [1]

Na první pohled by se mohlo zdát, že je kvantová teorie nepředstavitelná, ale i ona se řídí jasně danými principy, důsledky, které z nich však plynou, jsou v jádru mnohdy extrémní. Jasným důkazem může být tunelový jev, který popírá klasickou mechaniku. Během tunelového jevu totiž částice mohou proniknout i do míst se zápornou kinetickou energií. Mohou se rovněž odrážet od překážek, které by bez potíží zdolaly. Dalo by se říci, že kvantová teorie ve spojení s teorií relativity tvoří dojem o nalezení „teorie všeho“. [1,2]

Einstein jako první začal uvažovat o elektromagnetickém záření jako o souboru částic světelných kvant a v roce 1905 vyslovil hypotézu, že světlo se šíří v kvantech, které nazýváme fotony. Fotony jsou druhem částic s nulovou klidovou hmotností a pohybují se rychlostí  $c$ . Energie fotonů se předává po kvantech, nikoliv spojitě (po libovolných částech). [1,14] Pro energii fotonu platí vztah:

$$E = hf = \frac{hc}{\lambda} [J] \quad (2)$$

kde:  $h$ ...Planckova konstanta rovna  $6,62607015 \cdot 10^{-34}$  [J·s]

$f$ ...frekvence použitého světla [Hz]

$c$ ...rychlost světla ve vakuu [ $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ]

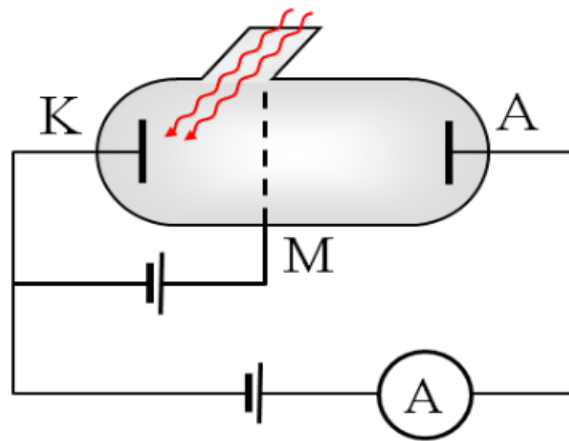
$\lambda$ ...vlnová délka světla [m]

U fotonů nedochází jen k přenosu energie, ale také k transferu hybnosti, jak je patrné z následujícího vztahu:

$$p = \frac{hf}{c} = \frac{h}{\lambda} \left[ \text{kg} \cdot \frac{\text{m}}{\text{s}} \right] \quad (3)$$

- **Fotoelektrický jev**

Kvantové vlastnosti záření se nejlépe demonstrují při fotoelektrickém jevu. Fotoelektrický jev můžeme pozorovat buď vnitřní u polovodičů, nebo vnější, a to u kovů. Fotoemise u polovodičů neprobíhá přímo, pouze se zvyšuje vodivost zkoumaného materiálu. Polovodičový fotoefekt byl objeven až po 2. světové válce, proto popisovaná fotoemise níže na *Obr. 6* je příkladem uvolňování elektronů z povrchu kovového materiálu.



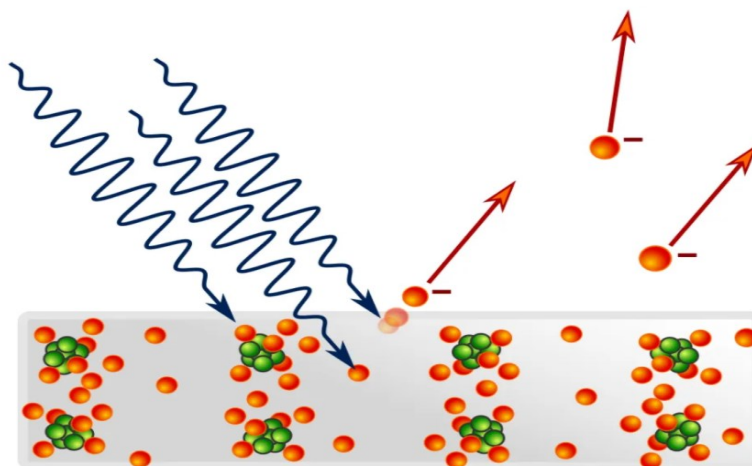
Obr. 6 Fotoefekt vnější [36]

Elektromagnetické záření dopadá na fotokatodu, z níž se uvolňují elektrony za vzniku proudu procházejícího přes mřížku směrem k anodě. Mřížka v tomto případě slouží jako bariéra pro elektrony s nízkou energií. Pokud je frekvence  $f$  elektronu menší než mezní frekvence kovu  $f_m$ , k fotoelektrickému jevu nedojde. Teorii fotoelektrického jevu nebylo možné vysvětlit pomocí metody, která předpokládala, že světlo se šíří jako vlna. Maximální kinetická energie, kterou může elektron získat, se nezmění. Může se měnit pouze počet fotonů, a to zvýšením intenzity použitého záření, ale energie jednotlivých fotonů zůstává stejná. [1,15]

Na Obr. 7 je jednoduché vysvětlení fotoelektrického jevu předložené roku 1905 Albertem Einsteinem. Při fotoefektu je jeden foton pohlcen právě jedním elektronem. Získanou energii  $E$  elektron využije na uvolnění se z kovu  $W_\nu$  a zbytková energie zůstane ve formě kinetické energie  $E_k$ . [1]

V roce 1922 dostal Albert Einstein Nobelovu cenu za objasnění a vyslovení zákona fotoelektrického jevu.

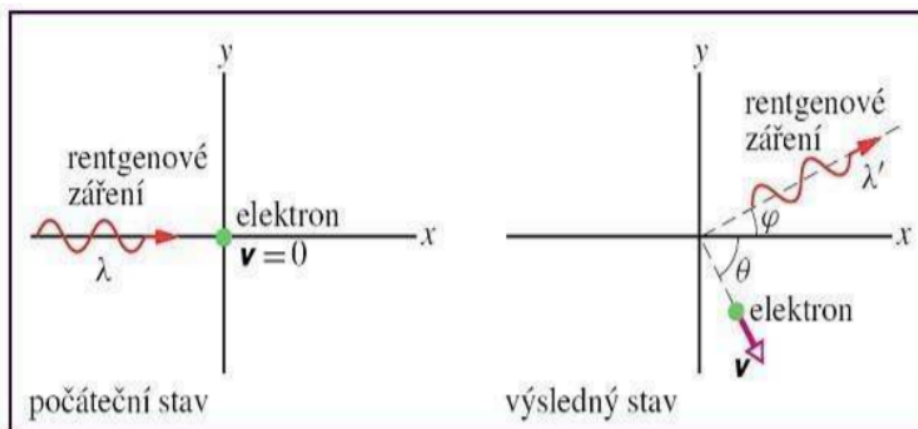
$$E = hf = W_\nu + E_k \quad (4)$$



Obr. 7 Fotoelektrický jev [35]

- **Comptonův jev**

Pomocí částicového chápání povahy světla byl tedy vysvětlen fotoelektrický jev a přesvědčivý důkaz o takto prezentované teorii světla provedl Arthur Holly Compton ve stejnojmenném experimentu znázorněném na Obr. 8. [1,14]



Obr.8 Comptonův jev [1]

Compton ve svém pokusu zkoumal dopadající svazek rentgenového záření o vlnové délce  $\lambda$  na uhlíkovou destičku. Následně vyhodnocoval, jak se rentgenové paprsky rozptylovaly na volných elektronech v materiálu. Vazebná energie elektronů v uhlíku byla zanedbatelná oproti energii, s níž disponoval svazek rentgenového záření, proto Compton považoval elektrony za volné částice. V uhlíkové desce docházelo k pružným srážkám volných elektronů s kvanty rentgenového záření, které mělo charakter částic. Při střetu fotonu s elektronem došlo ke snížení frekvence a záření se odrazilo pod určitým úhlem. Compton vyložil rozptyl paprsků na uhlíkovém terči podle zákonů o zachování energie a hybnosti.

Fotony dopadajícího záření přenáší energii a hybnost na volně vázané elektrony v uhlíkové desce. Přestože dopadající svazek fotonů obsahoval jen jednu vlnovou délku, rozptýlený svazek pojímal značný rozsah vlnových délek s nejčtetnější hodnotou  $\lambda'$ . Rozdíl těchto vlnových délek  $\Delta\lambda = \lambda' - \lambda$  a nazývá se Comptonův posuv. Ten se mění v závislosti na úhlu detekce rozptýleného záření. [1,14]

### 2.2.3 Částicově vlnový dualismus

Připustit, že záření má pouze vlnové vlastnosti, nebo tvrdit, že foton se chová pouze jako částice, se ukázalo být chybné. Přesto existují experimenty, jež jsou možné vysvětlit pouze jedním ze způsobů chápání povahy světla. Z toho důvodu je nutné uznat, že foton má částicový charakter, stejně jako vlnovou povahu. Foton je předmět z kvantové fyziky, u něhož není možné určit dráhu pohybu ani stanovit jeho polohu dopadu s přesností, ale s určitou pravděpodobností. Hodnotu pravděpodobnosti stanovuje Heisenbergův princip neurčitosti z Planckovy konstanty. Na základě aplikovaného experimentu projeví foton svůj částicový nebo vlnový charakter. Tato vlastnost záření byla přijata jako korpuskulárně vlnový dualismus.

### 3 SVĚTELNÁ MIKROSKOPIE

Světelná mikroskopie je technikou umožňující detailní zkoumání drobných objektů, které jsou pro oko příliš malé. [16]

Na sítnici lidského oka se nacházejí dva druhy tělísek, a to tyčinky a čípky. Tato tělíska vlivem nervového podráždění dopadajícího světla posílají informaci o přijímaném obrazu do mozku. Abychom od sebe rozeznali dva body, musí každý z paprsků dopadnout na jiná tělíska. Pokud by paprsky ze dvou bodů dopadly například na jeden čípek, oko nedovede od sebe tyto body rozlišit a splynuly by v jeden. [17]

#### 3.1 Světelný mikroskop

Světelný mikroskop slouží k pozorování předmětů, jež jsou pro lidské oko těžko rozlišitelné. Tento optický přístroj se skládá ze 3 základních částí: optická soustava, osvětlovací soustava a mechanické zařízení. Typický mikroskop je vyobrazený na *Obr.9*. [7]



*Obr. 9 Binokulární světelný mikroskop [34]*

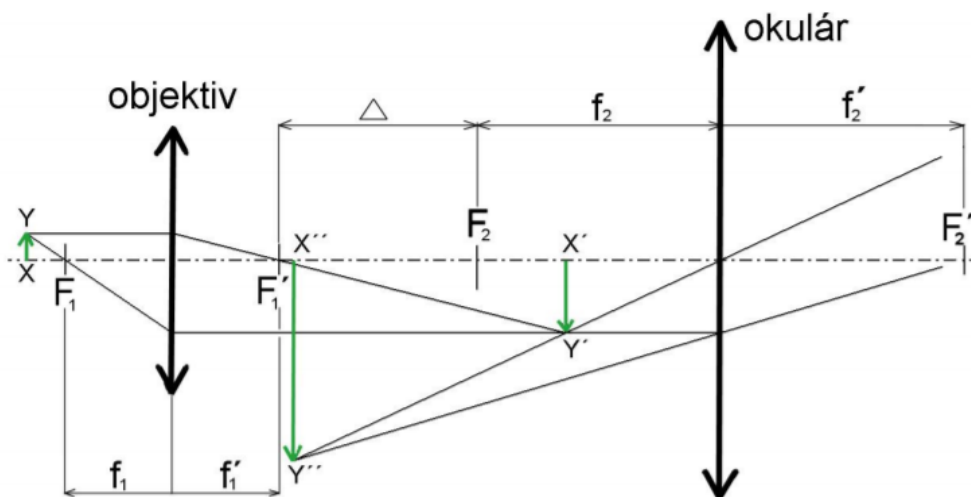
##### 3.1.1 Optická soustava

Celá optická neboli zobrazovací soustava se nachází v pohyblivém tubusu, který slouží k uložení objektivu a okuláru ve správné vzdálenosti a případně pro umístění dalších optických členů. Dvojitý tubus u binokulárního světelného mikroskopu na *Obr. 9* umožňuje



pozorování preparátu oběma očima. Děje se tak díky zabudovanému děliči paprsků uvnitř. [16]

Objektiv je soustava čoček (spojek) s krátkou ohniskovou vzdáleností umístěná blízko vzorku. Jak je patrné z *Obr. 10*, obraz  $X'Y'$  vytvořený objektivem je zvětšený převrácený a skutečný. Nachází se v předměťovém ohnisku okuláru a je tak pozorovaným předmětem pro okulár. [2] Vzdálenost mezi obrazovým ohniskem objektivu  $F_1'$  a předměťovým ohniskem okuláru  $F_2$  se nazývá optický interval  $\Delta$ . [17] Toto rozmezí představuje přiměřenou vzdálenost pro vznik obrazu z objektivu. Optický interval se při použití různých objektivů liší a určuje se z délky použitého tubusu. [18] Okulár zjednodušeně pracuje jako lupa a obraz z objektivu  $X'Y'$  jen zvětší, a tím vznikne zvětšený převrácený neskutečný obraz  $X''Y''$ . [2]



*Obr. 10 Princip vzniku obrazu ve světelném mikroskopu [17]*

Kromě vytváření obrazu zajišťuje objektiv s okulárem v určité míře také odstranění optických vad čoček. Objektivy se rozdělují podle toho, jak dovedou kompenzovat optické vady. Mezi nejpoužívanější typy patří achromatické a apochromatické objektivy. První typ se vyznačuje odstraněním chromatické vady pro paprsky zelené a žluté barvy, tedy pro vlnové délky od 520 do 590 nm. Apochromatické objektivy mají tuto kompenzaci rozšířenou ještě o paprsky modré a červené části spektra. [18]

### 3.1.2 Vlastnosti objektivu

Výběr vhodného objektivu je složitá záležitost, protože něco jako ideální objektiv neexistuje. Vždy záleží na tom, jaký je požadovaný výstup. Každá vlastnost objektivu má na výsledný obraz jiný vliv.

- **Ohnisková vzdálenost**

Ekvivalentní ohnisková vzdálenost vznikne spojením objektivu a okuláru v jedinou čočku s optickou mohutností náležící celému systému čoček. [18] Mikroskopické pozorování potom odpovídá zkoumání pouze pomocí lupy o ohniskové vzdálenosti  $f'$ . [17]

$$f' = \frac{f'_1 \cdot f'_2}{\Delta} [m] \quad (5)$$

kde:  $f'_1$ ...obrazová ohnisková vzdálenost objektivu

$f'_2$ ...obrazová ohnisková vzdálenost okuláru

$\Delta$ ...optický interval soustavy

- **Zvětšení mikroskopu**

Celkové zvětšení mikroskopu  $Z$  se určuje jako součin zvětšení objektivu  $Z_{ob}$  a okuláru  $Z_{ok}$ .

$$Z = Z_{ob} \cdot Z_{ok} = -\frac{\Delta \cdot d}{f_{ob} \cdot f_{ok}} [-] \quad (6)$$

Kde:  $d$ ...konvenční zraková vzdálenost ( $d=250$  mm)

$\Delta$ ...optický interval soustavy

$f_{ob}$ ...ohnisková vzdálenost objektivu

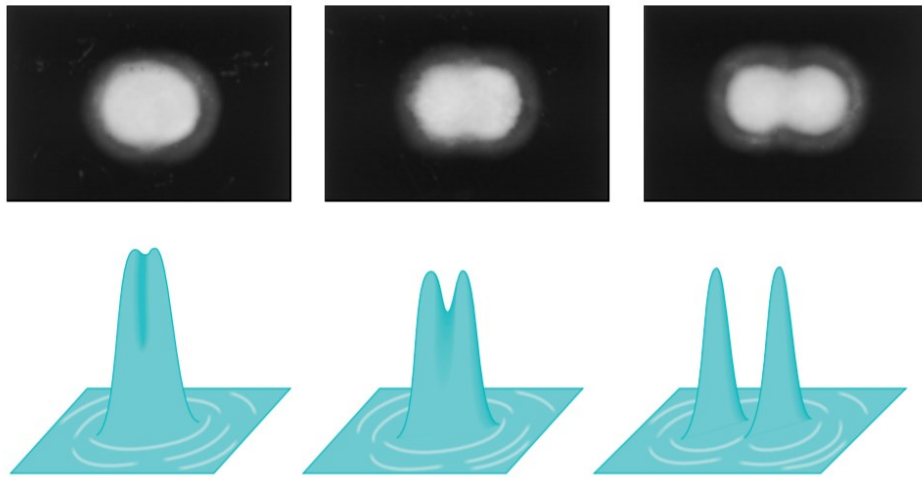
$f_{ok}$ ...ohnisková vzdálenost okuláru

Znaménko mínus ve vzorci značí, že výsledný obraz je převrácený.

- **Rozlišovací schopnost mikroskopu**

Mohlo by se zdát, že s pomocí vhodných čoček by mikroskop dosáhl neomezeného zvětšení. [7] Každý objektiv může zvyšovat celkové zvětšení mikroskopu jen do určité horní hranice i při použití nejlepších okulárů. Mez užitečného zvětšení představuje přibližně tisíci násobek numerické apertury (viz níže). Do této hranice je objektiv schopen zobrazit nové detaily zkoumaného předmětu. Jakákoliv další zvětšení jsou zcela bezcenná a jde jen o prázdná zvětšení. [18] Zvětšení je tedy omezeno rozlišovací schopností. [7] Rozlišovací schopnost je jedním z nejdůležitějších vlastností objektivu. Určuje vzdálenost dvou bodových zdrojů od sebe, aby jejich obrazy nesplynuly v jeden a daly se rozlišit. [13] Při odvozování rozlišovací schopnosti objektivu je světlo chápáno jako vlnění a s ním souvisí jevy jako difrakce a interference. Rozlišovací schopnost mikroskopu je omezena právě difrakcí světla. Aby byly obrazy dvou bodových zdrojů rozlišitelné, je zapotřebí stanovit rozlišovací schopnost neboli jejich vzájemnou vzdálenost, ta je definována jako polovina vlnové délky aplikovaného světla. Pod touto vzdáleností jsou bodové zdroje příliš blízko u sebe a dochází

ke sčítání jejich intenzit a následnému překrytí obrazů, jak je patrné z levé části *Obr. 11*. [16]



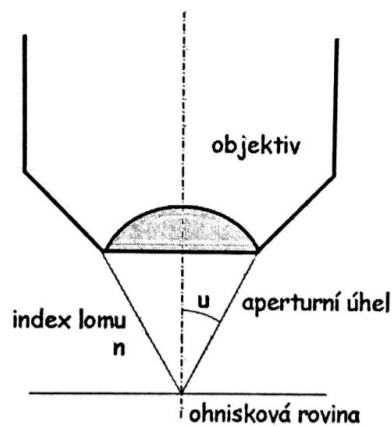
*Obr. 11 Rozlišovací schopnost dvou bodových zdrojů objektivem [1]*

Míru rozlišovací schopnosti pojmenoval už v 19. století Ernst Abbé jako numerickou aperturu  $NA$ . Tento vztah mezi otvorem objektivu a indexem lomu prostředí mezi vzorkem a objektivem  $n$  odpovídá rovnici (8) a vyjadřuje schopnost objektivu zachytit co nejvíce paprsků procházejících ze zkoumaného předmětu. Na *Obr. 12* je tento vztah vyjádřen graficky. [16]

$$NA = n \cdot \sin u \quad [-] \quad (7)$$

kde:  $u$ ...aperturní úhel (poloviční úhel dvou nejkrajnějších paprsků jdoucích do objektivu) [°]

$n$ ...index lomu prostředí mezi vzorkem a objektivem [-] (Lednický)

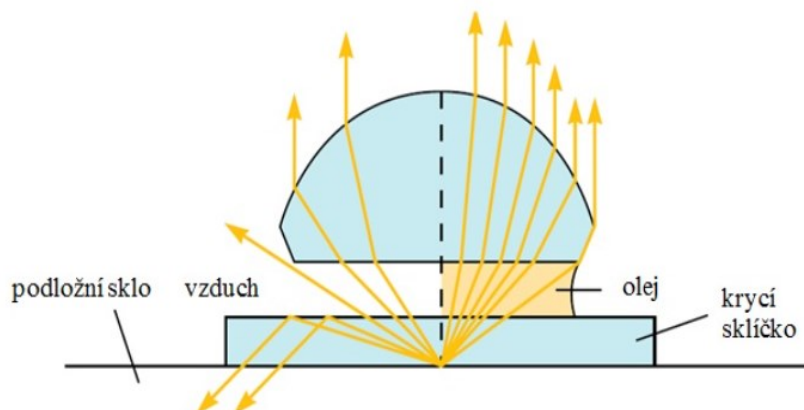


*Obr. 12 Definice numerické apertury [16]*

Numerická apertura je přímo úměrná rozlišovací schopnosti objektivu i výslednému zvětšení. Čím větší bude numerická apertura, tím vyššího zvětšení objektiv dosáhne a tím větší zvětšení získá. [18]

- **Světelnost objektivu**

Numerická apertura neovlivňuje jen rozlišovací schopnost a zvětšení, ale i světelnost objektivu a jeho hloubku ostrosti. Světelnost objektivu vyjadřuje míru zachycení maximálního počtu paprsků směřujících z předmětu do objektivu. O světelnosti rozhoduje nejen otvorový úhel objektivu, ale rovněž i index lomu prostředí, kterým paprsky procházejí, než se do objektivu dostanou. Paprsky, které vychází z preparátu procházejí krycím sklíčkem, kterým je preparát téměř vždy zajištěn. Po průchodu sklíčkem se paprsky dostanou na rozhraní mezi sklem a vzduchem. Jak je vidět na *Obr. 13*, paprsky se budou lámat od kolmice vlivem přechodu z prostředí s vyšším indexem lomu (sklo = 1,51) do prostředí s nižším indexem lomu (vzduch = 1). [18]

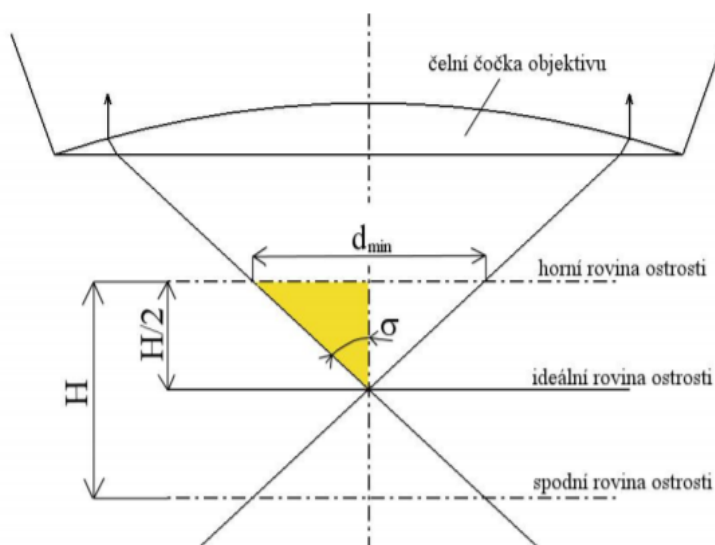


*Obr. 13 Rozdíl velikosti kužele paprsků u suchého a imerzního objektivu [33]*

Tento lom zapříčiní vznik širšího kužele paprsků, než byl v prostředí krycího sklíčka a do objektivu se nedostanou všechny paprsky prošlé preparátem. Tato skutečnost se dá částečně eliminovat, pokud mezi indexy lomu obou prostředí bude minimální rozdíl. Když na sklíčko kápneme imerzní olej s indexem lomu  $n = 1,5$  jak je tomu v pravé části již zmíněného obrázku, paprsky se při výstupu z krycího sklíčka budou lámat pod menším úhlem. Použití zředěného imerzního (cedrového) oleje je nejefektivnější metoda pro maximalizaci kužele paprsků vstupujícího do objektivu. Jedinou nevýhodou olejové imerze zůstává znečištění objektivu. Ponorné objektivy mohou používat i jiné, avšak méně účinné tekutiny pro minimalizaci rozdílu indexů lomu, a to destilovanou vodu či glycerol. [18]

- **Hloubka ostrosti objektivu**

Hloubka ostrosti je v obráceném poměru k numerické apertuře. Čím je numerická apertura menší, tím je hloubka ostrosti větší. [18] Je to schopnost objektivu ostře zobrazit určitou vrstvu preparátu ležící v předepsané vzdálenosti od objektivu. Na *Obr. 14* je znázorněna ideální rovina ostrosti jako rozdíl mezi horní a dolní rovinou ostrosti. Vyjadřuje tak jakýsi výškový profil, jež musí preparát dodržet, aby byl viděn ostře po celé své ploše. [17] Cokoliv mimo ideální rovinu ostrosti uvidíme rozostřeně.



*Obr. 14 Hloubka ostrosti objektivu [17]*

Hloubku ostrosti  $H$  můžeme změnit upravením aperturního úhlu  $\sigma$  nebo preparátu  $d_{min}$  v rovnici (9). [13]

$$H = \frac{d}{\operatorname{tg} \sigma} \quad (8)$$

- **Princip vzniku obrazu ve světelném mikroskopu**

Dopadající světlo na jednotlivé body preparátu se chová jako vlna a transformuje se (láme se nebo ohýbá). Takto podle Huygensova principu vznikají sekundární vlny, které spolu navzájem interferují a vstupují do objektivu. Paprsky procházejí ohniskovou rovinou objektivu. Jednotlivé ozářené body ohniskové roviny se stávají předmětem pro vznik výsledného obrazu. Čím více paprsků vytváří výsledný obraz, tím větších detailů docílíme. [13]

### 3.1.3 Osvětlovací soustava

Nemalý vliv na kvalitu výsledného obrazu má kromě optické soustavy i část osvětlovací. Osvětlovací soustava, která se skládá ze světelného zdroje, kondenzoru a různých typů vhodně použitých clonek, zaručuje dokonalé osvětlení preparátu, jež je pro kvalitní zkoumání nezbytné. Při zvětšení obrazu dochází k mnohonásobnému snížení jasu, který je zapotřebí kompenzovat osvětlením preparátu. [16] Zdrojem světla bývají nejčastěji LED diody, nebo wolframové halogenové žárovky opatřené ochranným krytem pro eliminaci vyzářeného světla do okolí.

Kondenzor se skládá z několika spojných čoček s krátkou ohniskovou vzdáleností. Jeho funkcí je koncentrování paprsků, aby bylo zorné pole dokonale osvětleno a aperturní úhel byl maximálně využit. Při rovnoměrném Köhlerově osvětlení se používá kondenzor se dvěma optickými soustavami, které stanovují pole osvětlení a sbíhavost svazku osvětlení. [16] Konstrukce Köhlerova osvětlení odstraňuje nežádoucí efekt při pozorování přidáním kolektoru. Vláčna žárovky se tak nezobrazují přímo do zaostřené roviny vzorku a osvětlení preparátu je rovnoměrné. [17]

Irisová clonka je nejčastěji používaná clonka pro regulaci množství světla přicházejícího do mikroskopu. Jas obrazu se reguluje změnou velikosti otvoru uprostřed jejím postupným natáčením. [18]

### 3.1.4 Mechanické zařízení

Mechanická část světelného mikroskopu se skládá ze stativu, který tvoří oporu mikroskopu a je spojen s nosičem tubusu, dále se zde nachází stolek a revolverová hlavička, která usnadňuje výměnu jednotlivých objektivů, jež jsou v ní uloženy. Posledními prvky na těle mikroskopu jsou makrometrický a mikrometrický šroub. Kombinace posuvů obou šroubů napomáhá k přesnému zaostření zkoumaného předmětu. [7]

## 3.2 Mikroskopické techniky ve světelné mikroskopii

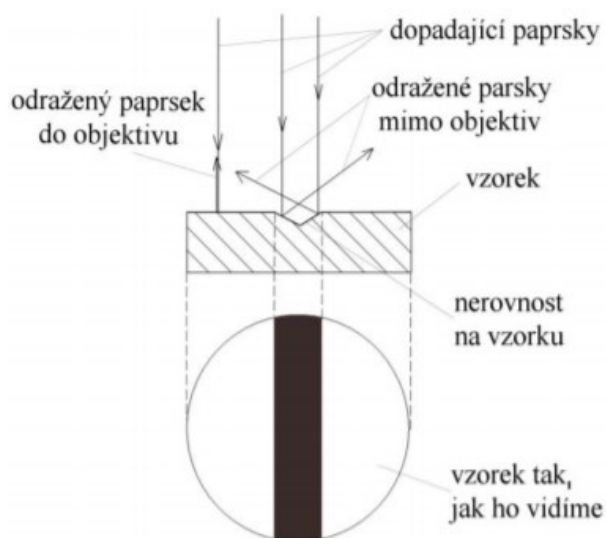
Technik pozorování ve světelné mikroskopii je hned několik. V porovnání mezi sebou nemají jasného favorita. Výběr vhodné metody vždy záleží na povaze zkoumaného preparátu, zdroji záření a v neposlední řadě hlavně na požadovaném výstupu. Pro snadnější orientaci můžeme mikroskopické techniky rozdělit do dvou kategorií.

### 3.2.1 Klasické techniky

Mezi klasické zobrazovací techniky patří pozorování ve světlém a tmavém poli, rovněž i fázový kontrast a polarizační mikroskopie. Od skenovacích technik se významně liší v tvorbě obrazu. Klasické techniky využívají k zobrazení vzorku čočky a výsledný obraz vzniká najednou. Tyto dvě metody nemusíme od sebe výlučně dělit, ale dají se i kombinovat (viz dále). [13]

- **Pozorování ve světlém poli**

Tato metoda patří mezi nejpoužívanější techniky světelné mikroskopie vůbec. Kombinuje v sobě použití procházejícího a odraženého světla. [13] Výsledný obraz bude záležet na nerovnostech preparátu. Z osvětlovací soustavy jsou vysílány paprsky rovnoběžné s optickou osou. Pokud tyto paprsky dopadnou na rovinnou část vzorku, odrazí se zpět pod stejným úhlem do objektivu a obraz uvidíme jako světlý, pokud však paprsky narazí na nerovnost v preparátu, nastane difrakce mimo objektiv a výsledná plocha bude tmavá. [17]



Obr. 15 Pozorování ve světlém poli [17]

- **Pozorování v tmavém poli**

Inverzní metodou pro pozorování ve světlém poli je tmavé pole. V tomto případě jsou všechny paprsky jdoucí z kondenzoru osvětlovací soustavy regulovány přidáním vhodné clony tak, aby dopadaly na povrch preparátu pod úhlem. [2] Další modifikací je potom vzhled výsledného obrazu vzorku. Paprsky, které dopadnou na rovinnou část vzorku se budou odrážet mimo objektiv. Naopak tomu bude u paprsků dopadajících na nerovný

povrch. V mikroskopu uvidíme nerovnosti světlé a rovinný povrch tmavý. [17] Metodou tmavého pole získáme obraz s větším kontrastem než při pozorování ve světlém poli. Tmavé pole se hojně využívá při zkoumání drobných částic, jimž více vyhovuje tmavé pozadí, na kterém nezaniknou. [16] Úpravou pozorování v tmavém poli získáme metodu šikmého osvětlení. Změnou v konstrukci je aperturní clonka vysunutá z optické osy. Paprsky dopadají pouze na část předmětu a výsledný obraz se zdá být plastický a tím i lépe viditelný. [17]



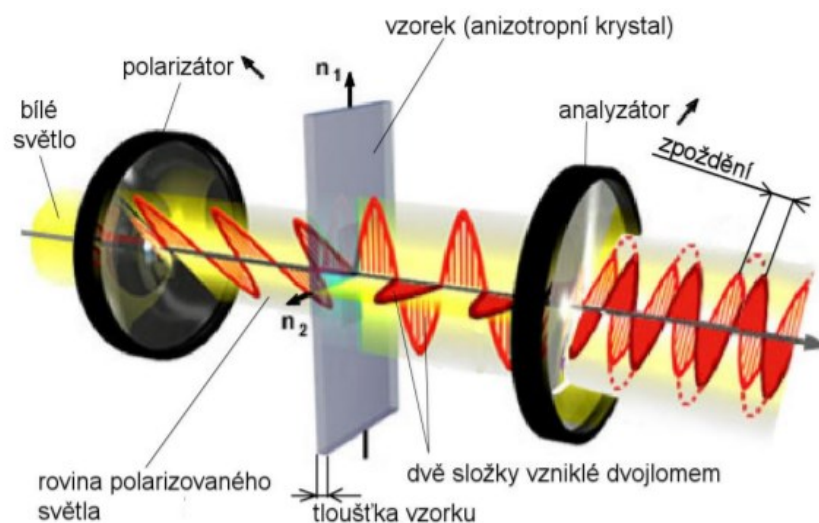
Obr. 16 Pozorování v tmavém poli [17]

- **Polarizační mikroskopie**

Již z názvu vyplývá, že základem polarizační mikroskopie je polarizované světlo. [17] Vlastností světla je, že jeho intenzita má v každém místě jiný směr neboli jde o nepolarizované světlo. Světlo můžeme polarizovat odrazem, lomem, nebo dvojlomem. V polarizační mikroskopii se používá dvojlom. Jak je vidět na Obr. 17, paprsek světla prochází dvojlomným tělesem, nejčastěji krystalem a dochází k jeho rozdělení na dva polarizované paprsky. První polarizovaný paprsek kmitá pouze v jedné rovině, která je kolmá na rovinu druhého polarizovaného paprsku. [18] Polarizační mikroskop má oproti klasickému navíc dva filtry. V osvětlovací soustavě je polarizátor, který zajišťuje vertikální polarizaci světla přiváděného na preparát. V optické soustavě se nachází analyzátor, jehož funkcí je horizontální polarizace. [17] Polarizátor a analyzátor jsou vůči sobě pootočený o 90°. [13] Pokud prvek, který pozorujeme v mikroskopu, má jednolomnou strukturu, tak zůstane zorné pole tmavé a zkoumání má nízkou vypovídající hodnotu. Jednolomná struktura značí, že vzorek nemá pravidelně uspořádané molekuly. Příkladem mohou být amorfnní látky. [18] Pro polarizační mikroskopii se nejčastěji využívá dvojlomných struktur



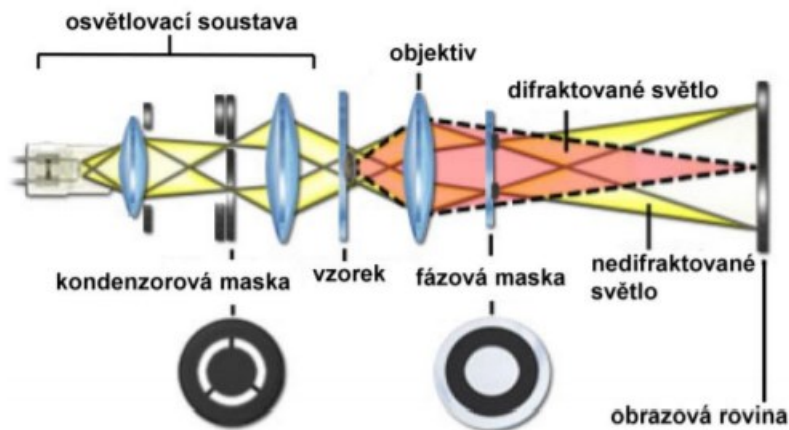
(pravidelně orientovaných). Nejčtenější zastoupení zde mají vzorky s prostředími s různým indexem lomu nebo s krystaly. [13] Pokud se na objektu vyskytují tyto aktivní prvky, bude jejich výsledný obraz světlý. [17] Polarizovaný paprsek, který vyjde z polarizátoru, se po vniknutí do dvojlomné struktury vzorku, štěpí na dva další paprsky s kolnými rovinami kmitu. Po průchodu paprsků analyzátozem, dojde k dalšímu štěpení obou paprsků. Z jednoho polarizovaného paprsku tak vzniknou 4 paprsky, z nichž okem pozorujeme ty, které mají rovinu kmitů kolnou k rovině polarizátoru. [18]



Obr. 17 Princip polarizační mikroskopie [17]

- **Fázový kontrast**

Lidské oko není schopno rozlišit fázové rozdíly vlnění, a proto se hojně využívalo barvení vzorků, protože pohlcují více, či méně intenzity záření a jeví se tak tmavší nebo světlejší. Metodu fázového kontrastu objevil holandský vědec Frits Zernike a dostal za ni Nobelovu cenu. Prvním výrobcem fázově kontrastního zařízení se stal ve 20. století Carl Zeiss. [18] Tato technika umožňuje u neobarvených biologických vzorků zlepšení kontrastu s vysokým rozlišením. [17] V osvětlovací soustavě je prstencovitá clona, která reguluje množství dopadajícího světla na vzorek svým mezikružím. V objektivu je umístěna fázová destička, na jejíž části se nachází vrstva kovu. [18] Tyto konstrukční změny mají za následek, že se u části paprsků změní jejich fáze o čtvrtinu vlnové délky. Ostatní difraktované paprsky projdou bez fázové změny. [17] Výsledný kontrast je vyvolán interferencí fázově posunutých světelných vln se světelnými vlnami, které prošly bez změny fáze. [17] Jelikož se fázového kontrastu využívá především u biologických vzorků, je velkou výhodou použití nebarvených struktur. Můžeme tak zkoumat živé pohyblivé buňky.



Obr. 18 Princip metody fázového kontrastu [17]

### 3.2.2 Skenovací techniky

Skenovací (rastrovací) techniky světelné mikroskopie vytvářejí výsledný obraz bod po bodu rastrováním zkoumaného vzorku. Složením jednotlivých signálů dohromady vznikne požadovaný obraz. [13] Techniky tvorby obrazu z této skupiny budou podrobněji popsány samostatně v následujících kapitolách, proto zde budou zmíněny jen pro uvedení příkladu. Mezi nejpoužívanější skenující techniky patří rastrovací elektronový mikroskop a technologie SPM (angl. scanning probe microscopy) neboli mikroskopie skenující sondou. [13] Jak už bylo v kapitole 3.2.1. zmíněno, klasické a rastrovací techniky spolu můžeme kombinovat. Příkladem takového spojení je konfokální světelná mikroskopie.

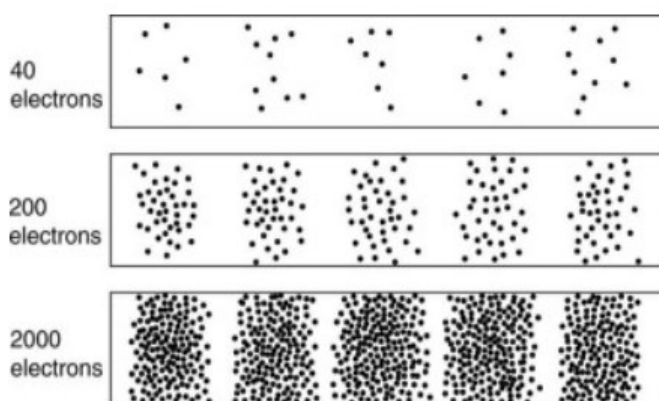
## 4 ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE

Z kapitoly 2.2 vyplývá, že svazek světla se může chovat jako vlna a zároveň předávat energii v kvantech. Nad touto symetrií uvažoval i francouzský fyzik Louis de Broglie a roku 1924 vyslovil odvážnou, svého času ničím nepodloženou hypotézu.

Pokud se vlnění může chovat jako svazek částic, proč by rovněž proud hmotných částic (elektronů) nemohl mít vlnovou povahu? De Broglie navrhoval každé volně se pohybující částici o energii  $E$  a hybnosti  $p$  přiřadit frekvenci  $f$  a vlnovou délku  $\lambda$ , nazývanou de Broglieho vlnová délka. [1]

Jestli má opravdu hmota vlnové vlastnosti bylo potřeba experimentálně ověřit. V roce 1927 de Broglieho hypotézu prokázali C.J.Davisson společně s L.H.Germerem z výzkumných laboratoří v USA a nezávisle na nich i G.P.Thomson z univerzity ve Skotsku. [1]

K experimentu byl použit svazek pohybujících se elektronů směrem na dvojštěrbinu. Elektrony dopadaly jednotlivě na stínítko a jejich světelným zábleskem byla zaznamenána poloha. *Obr. 19* ukazuje dopad nejdříve desítek až stovek elektronů, u nichž pravděpodobnost dopadu není zřejmá, ale po zaznamenání polohy několika tisíc elektronů, je na stínítku patrný interferenční obrazec maxim a minim. Z toho vyplývá, že se každý elektron chová jako de Broglieho vlna, která projde současně jednou i druhou štěrbinou zároveň a s určitou pravděpodobností dopadá na stínítko. [1]



*Obr. 19 Experimentální ověření existence de Broglieho vln [41]*

Tímto experimentem byl částicově vlnový dualismus prokázán i pro elektrony. Na tomto základě byly později zkonstruovány elektronové a iontové mikroskopy. [1]

#### 4.1 Elektronový mikroskop

Elektronové mikroskopy z vývojového hlediska nastupují jako dokonalejší přístroje po světelných mikroskopech. Mají několik technických i konstrukčních vylepšení. Osvětlovací soustava nepoužívá k osvětlení vzorku viditelné světlo, ale proud urychlených elektronů emitovaný ve vakuu. Elektronové vlny se odráží nebo projdou vzorkem a obraz je poté vytvořen na fluorescenčním stínítku. [19,39]

Rozlišovací schopnost světelné mikroskopie, stejně jako elektronové mikroskopie závisí na vlnové délce použitého záření. Elektronové mikroskopy se řídí de Broglieho vlnovou délkou elektronů, která je menší než vlnová délka viditelného světla, proto elektronová mikroskopie umožňuje rozlišit větší podrobnosti na vzorku než mikroskopie světelná. [19]

Velikost atomu je přibližně  $10^{-10}$  m. Vlnová délka urychlených elektronů 100 kV uvedená v rovnici (9) umožňuje vidět podrobnosti menší než velikost atomu.

$$\lambda = \frac{h}{p} = \frac{h}{\gamma m_e v} = \frac{h}{m_e v} \cdot \sqrt{1 - \frac{v^2}{c^2}} = \frac{6,626\,070\,150 \cdot 10^{-34}}{(9,109 \cdot 10^{-31}) \cdot 187\,557\,676,4} \cdot \sqrt{1 - \frac{187\,557\,676,4^2}{299\,792\,458^2}} =$$

$$\lambda = 3 \cdot 10^{-12} \text{ [m]} = 3 \cdot 10^{-3} \text{ [nm]} \quad (9)$$

Kde:  $\lambda$ ...vlnová délka urychlených elektronů [nm]

$h$ ...Planckova konstanta [J·s]

$p$ ...hybnost elektronů [ $\text{kg} \cdot \text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ]

$\gamma$ ...Lorentzův faktor

$m_e$ ...klidová hmotnost elektronů [kg]

$v$ ...rychlost elektronů [ $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ]

$c$ ...rychlost světla ve vakuu [ $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ]

$$v = \sqrt{\frac{2 \cdot e \cdot U}{m_e}} = \sqrt{\frac{2 \cdot (1,602\,176\,634 \cdot 10^{-19}) \cdot 100\,000}{9,109 \cdot 10^{-31}}} = 187\,557\,676,4 \left[ \frac{\text{m}}{\text{s}} \right] \quad (10)$$

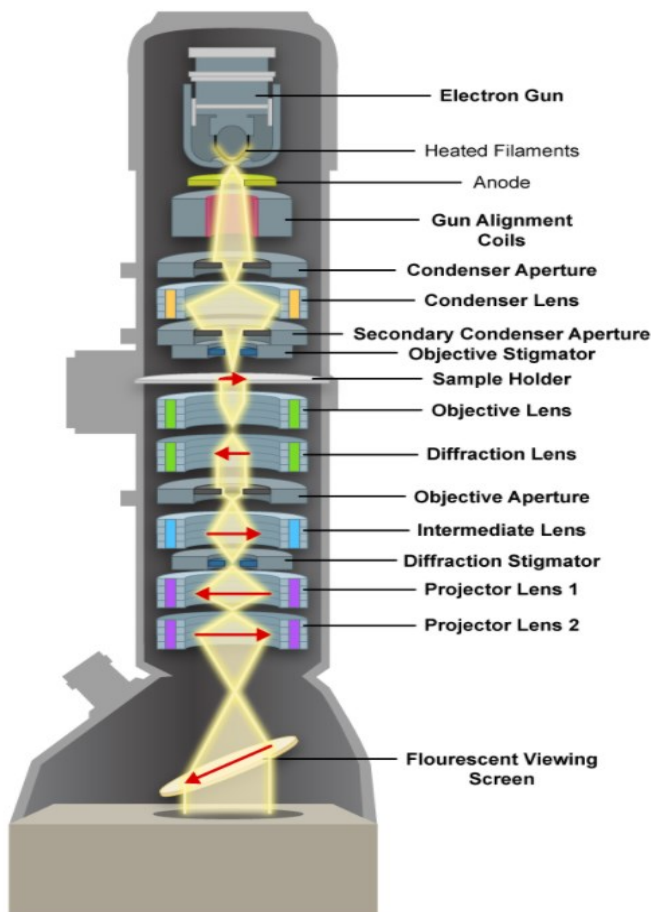
Kde:  $e$ ...elementární náboj [C]

$U$ ...urychlovací napětí [V]

Podle způsobu vzniku obrazu v elektronovém mikroskopu je rozdělujeme na Transmisní elektronový mikroskop a Skenovací elektronový mikroskop. [19]

## 4.2 Transmisní elektronový mikroskop

Princip vzniku obrazu u Transmisního elektronového mikroskopu (TEM) je shodný jako u světelného mikroskopu. Obraz pozorovaného vzorku vzniká najednou použitím čoček. Na Obr. 20 je znázorněn řez transmisním elektronovým mikroskopem.



Obr. 20 Schéma transmisního elektronového mikroskopu [28]

### 4.2.1 Zobrazovací soustava TEM

Zobrazovací soustava transmisního elektronového mikroskopu je složena z objektivu, jednoho, či dvou projekтивů a mezilehlých čoček. [20]

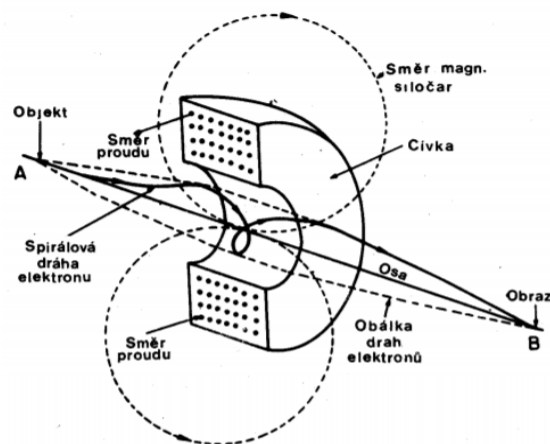
Nejdůležitější částí je bezpochyby objektiv, který přímo rozhoduje o kvalitě rozlišení mikroskopu a tím i o jeho finálním zvětšení. [20] O tom, že se elektronový mikroskop stal brzy po jeho objevení nepostradatelným nástrojem pro zkoumání nano a mikrosvěta, svědčí i fakt, že za objektiv elektronového mikroskopu byla Ernstu Ruskovi v roce 1986 udělena Nobelova cena. V současnosti s pomocí transmisního elektronového mikroskopu můžeme analyzovat povrch i vnitřní strukturu materiálů. Tloušťka vzorku musí být v řádu desítek

nanometrů, protože při analyzování vnitřní struktury materiálu detekujeme elektrony prošlé vzorkem. Nejlepší mikroskopy dosahují rozlišovací schopnosti až 0,19 nm. [19,39]

Jak upozorňuje literatura [20] komerční elektronové mikroskopy nejčastěji používají třístupňovou optickou soustavu, tedy objektiv, pomocný a hlavní projekтив. Funkce projekтивů spočívá v tom, zvětšit obraz vytvořený objektivem na požadovanou hodnotu. Oproti dvoustupňové optické soustavě třístupňová umožňuje při stejné délce tubusu dosáhnout většího zvětšení. [20]

- **Čočky a jejich zobrazovací vady**

K zaostření elektronů se v elektronových mikroskopech nejčastěji využívá elektromagnetických čoček. Elektromagnetické čočky jsou krátké cívky s kruhovými závitami vyrobené z měděného drátu. [19] Pro dosažení správných vlastností čočky jsou do ní vloženy pólové nástavce, které dokáží tvarovat magnetické pole. [16] Mezi pólovými nástavci vzniká silné magnetické pole, které fokusuje urychlené elektrony pohybující se blízko optické osy. [19] Schéma elektronové čočky znázorňuje *Obr. 21*.



*Obr. 21 Elektromagnetická čočka TEM [21]*

Elektromagnetické čočky se využívají z toho důvodu, že zakřívují dráhu elektronů. Pokud by bylo použito čoček skleněných, elektrony by čočkou buď prošly, nebo by byly čočkou pohlceny. U všech čoček, stejně tak u elektromagnetických se projevují jisté vady. Nejčastěji se setkáme s astigmatismem, sférickou a chromatickou aberací, může se objevit také asymetrická vada koma. [16]

Sférická vada je nejpodstatnější vada zatěžující objektiv. Na její velikosti také závisí celková rozlišovací schopnost optické soustavy. Jde o otvorovou vadu, jejímž působením jsou krajní elektrony více vychylovány než ostatní. K tomu abychom zvýšili rozlišovací schopnost je

zapotřebí buď snížit koeficient sférické aberace, nebo zvýšit urychlovací napětí elektronů. Pokud pomineme enormní provozní i výrobní náklady vysokonapěťových mikroskopů, postupným zvyšováním urychlovacího napětí až na hodnotu 3,15 MV se ukázalo, že takto urychlené elektrony radiačně poškozují zkoumaný vzorek. V 80. letech minulého století byly vyvinuty objektivy s malou hodnotou koeficientu sférické aberace ( $C_s = 0,5$ ). Důležitým milníkem pro zlepšení rozlišovací schopnosti bylo také vynalezení korektoru sférické aberace. Tyto korektory kompenzují otvorovou vadu nejen u objektivů ale rovněž u kondenzorů. [19,21]

Chromatická vada způsobuje, že obraz bodového vzorku nevidíme jako bod, ale jako rozptylový kroužek o určitém poloměru  $r_c$  uvedeného v rovnici (10). Tento poloměr závisí na velikosti divergence elektronového svazku  $\alpha$  a změně ohniskové vzdálenosti čočky  $\Delta f$ . Ohnisková vzdálenost čočky je přímo závislá na změně energie elektronů. Tato změna nastane, pokud je některý z elektronů rychlejší než ostatní a jeho dráha pohybu tolik nepodléhá magnetickému poli čočky. Změna energie elektronů je počáteční impulz pro vznik chromatické vady. Dalšími důvody jsou nestejnomyšlnost budícího napětí, nerovnoměrnost budícího proudu objektivu a ztráty energie elektronů po průchodu vzorkem z důvodu nepružného rozptylu. [16,19] V současnosti se používají velmi stabilní zdroje a změny v napětí či proudu jsou minimální.

#### 4.2.2 Osvětlovací soustava TEM

Osvětlovací soustava upravuje elektronový paprsek, který v sobě nese informaci o prosvětlovaném vzorku. [16] Dostatečná hustota elektronového svazku zabezpečí správný jas v konečném obrazu. Na výsledný obraz má vliv i úhlová apertura neboli poloviční úhel, pod kterým na preparát elektrony dopadají. [20]

Osvětlovací soustava se skládá z elektronové trysky, jednoho, nejlépe dvou kondenzorů a vhodně tvarované clony. Ta omezuje úhlovou aperturu osvětlení vzorku.

- **Elektronové trysky**

Elektronové trysky jsou přímým zdrojem elektronů. Obsahují katodu, která produkuje elektrony a anodu, do níž elektrony vstupují. Elektrony se v trysce také urychlují působením elektrického pole mezi katodou a anodou. Elektronové trysky můžeme rozdělit podle způsobu dodávání energie elektronům na termoemisní a autoemisní elektronové trysky. [20,21]

Termoemisioní elektronové trysky pracují na principu termoemise elektronů. K zahřátí katody dojde díky odporu k protékajícímu proudu. Následně elektrony dosáhnou potřebné energie k překonání katody a urychlují se na cestě k anodě. Důležitým prvkem je fokusační elektroda. Mezi ní a katodou vznikne napětí, a tím jsou elektrony svedeny do úzkého svazku. [21]

U autoemisioních elektronových trysek dochází k vysílání elektronů tunelovým jevem při silném působení elektrického pole. [19] Na hrotu katody je soustředěn záporný potenciál, ten je snížen intenzitou elektrického pole na takovou hodnotu, že se elektrony mohou vytrhnout z materiálu. Elektronům stojí v cestě dvě anody, jejichž elektrické pole mezi nimi elektrony urychlí. [21]

Elektronové trysky můžeme hodnotit hned z několika pohledů. Prvním parametrem je velikost zdroje. Ideálním případem by bylo, kdyby byl zdroj výhradně bodový. Tato vlastnost přímo souvisí s proudem vyzářených elektronů. Pro dokreslení: u termoemisioních trysek se proud emitovaných elektronů pohybuje okolo 100  $\mu\text{A}$ , ale u autoemisioních dosáhne maximálně 30  $\mu\text{A}$ . Ne všechny elektrony totiž projdou anodou právě proto, že zdroj není bodový a elektrony se z katody šíří ve všech směrech. Čím lepší bude prostorová soudržnost (koherence) elektronů, tím užší bude rozsah energie elektronů. Aby bylo záření elektronů koherentní, je zapotřebí aby měli použité elektrony stejnou vlnovou délku, a tedy i frekvenci. Dalším důležitým hlediskem je stabilita vyzařování elektronů v čase a jas katody. Ten vyjadřuje množství elektronů emitovaných za určitý čas z plochy katody. Posledním prvkem je životnost. U termoemisioních trysek je asi desetkrát nižší než u autoemisioním, kde činí nejméně 2000 hodin. Nízká životnost termoemisioních trysek spočívá ve vypařování wolframového vlákna katody při zahřívání. Tím dojde k zúžení průměru drátu natolik, že emise není možná. [21]

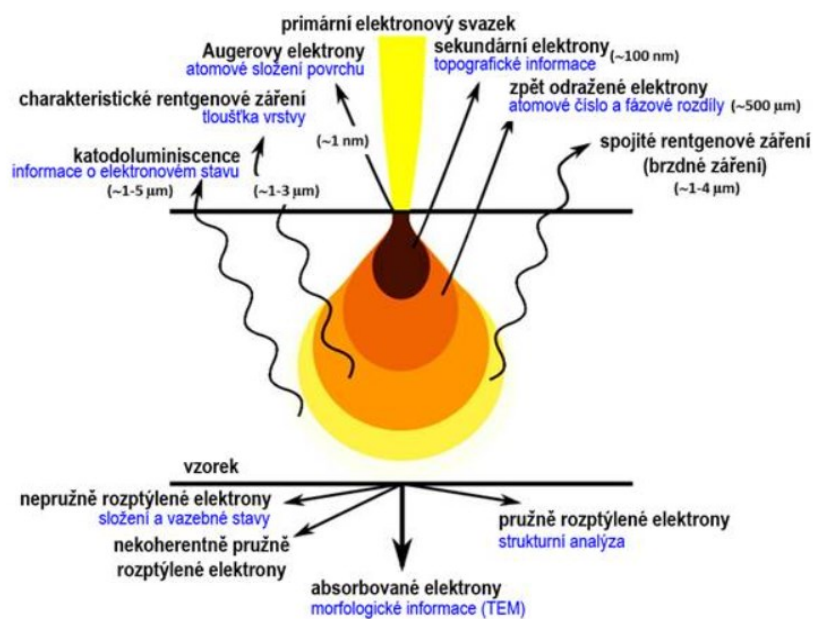
### 4.2.3 Vakuový systém

Každý elektronový mikroskop pracuje ve vakuu z toho důvodu, že elektrony jsou v atmosféře rozptylovány. Vzorek se do mikroskopu vkládá přes vakuovou propust i proto, aby kontaminace vzorku uhlovodíky byla minimální. [19] Vakuum zajišťuje minimální pravděpodobnost srážek elektronů se zbytkovým plynem. Vakuový systém je tvořen systémem vývěv, tak aby bylo zajištěno pracovní vakuum v celém rozsahu. [16]



#### 4.2.4 Interakce elektronového svazku s hmotou

V průběhu zkoumání působí na vzorek v mikroskopu několik okolních vlivů, které mohou významně ovlivnit kvalitu pozorování. Elektronová mikroskopie je založena na zpracování signálů vznikajících vzájemným působením vzorku a elektronového svazku v interakčním objemu. Získané podněty umožňují skvěle zmapovat složení i strukturu pozorovaného předmětu. *Obr. 22* ukazuje základní druhy interakcí. Pokud elektron projde vzorkem bez známky interakce, nedojde k přenosu energie a mluvíme tak o pružných srážkách. [16,20] Naopak k nepružným srážkám dochází, když elektron narušuje pevné vazby mezi atomy vzorku vlivem dodání energie při dopadu na jeho povrch. Tímto působení jsou tedy elektrony buď vzorkem absorbovány nebo odraženy. Při nepružných srážkách mohou vznikat sekundární nebo Augerovy elektrony, rentgenové záření, či fotony. Při pružném rozptylu vznikají zpětně odražené elektrony (rozptýlené pod úhlem větším než  $90^\circ$ ). Tohoto odražení se využívá k zobrazení orientace krystalové mřížky. Difrakcí zpětně odražených elektronů získáme informace o orientaci zrn materiálu i jeho struktuře. [20,21]



*Obr. 22 Interakce elektronového svazku s materiálem [40]*

- **Interakční objem**

Interakční objem je místo, v němž dochází k narušení molekulárních vazeb vzorku při dopadu urychleného svazku elektronů. V interakčním objemu mohou vznikat různé signály podle velikosti hustoty a atomového čísla materiálu. Hruškovitý tvar pronikání elektronů pod povrch vzorku patří nízkým hodnotám hustoty a atomového čísla. Jak ukazuje *Obr. 22*,

s rostoucí velikostí těchto charakteristických veličin materiálu elektrony pronikají hlouběji do vzorku a dochází ke srážkám urychlených elektronů s elektrony ve vzorku. Čím hlouběji elektrony prostupují, tím více ztrácejí svou energii a odchylojí se v dráze pohybu. Ztracená energie elektronů je absorbována preparátem. Částečně je pohlcená energie přeměněna na teplo, což je jeden z výše zmiňovaných okolních vlivů na preparát, a částečně dává vzniknout sekundárním procesům. [16,21]

- **Sekundární procesy**

Nejčastějším druhotným jevem při vzájemném působení elektronového svazku na vzorek je vznik sekundárních elektronů, ty jsou slabě vázané ve valenční oblasti a po interakci jsou vyhozeny ze vzorku. Atom má více energie a k vrácení do původního energetického stavu musí zaplnit volné místo po vyraženém elektronu elektronem z vnějšího orbitalu. Při tomto ději vznikají i Augerovy elektrony a charakteristické rentgenové záření, díky němuž můžeme provést prvkovou analýzu složení materiálu. Každý prvek vyzařuje jiné kvantum energie. [21]

#### 4.2.5 Detekce a záznam obrazu

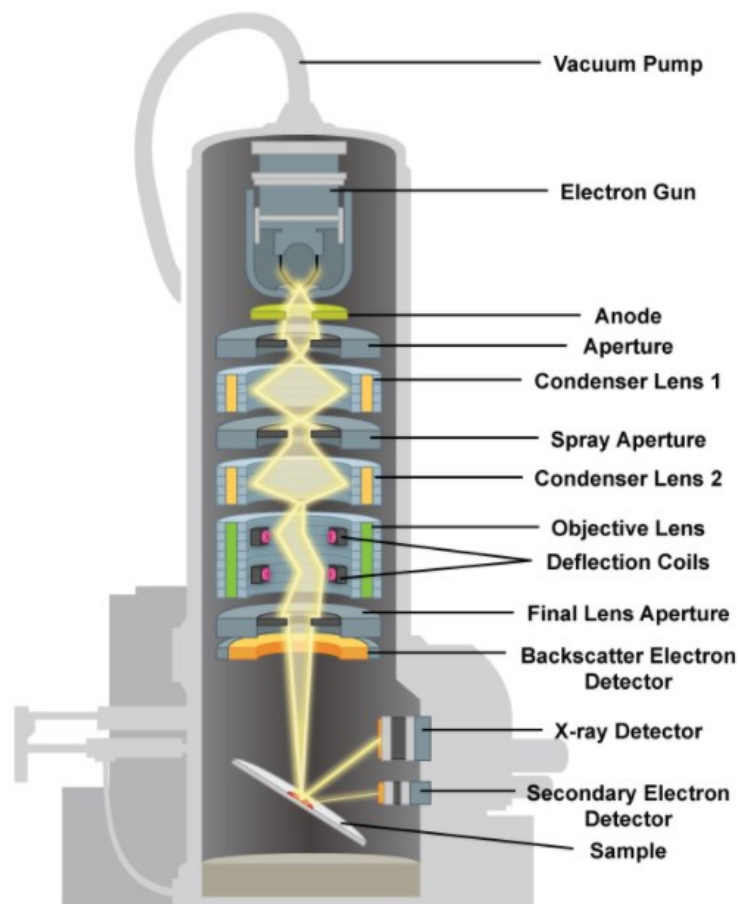
Jak už bylo zmíněno, urychlené elektrony emitované z katody elektronové trysky se pohybují ve vysokém vakuu. Aby byl obraz TEM viditelný, je zapotřebí do dráhy pohybu elektronovému svazku postavit vhodné médium, pro zajištění viditelnosti obrazu. Nejčastěji se používá světélkující prášek nanesený na kovovém stínítku. K zaznamenání obrazu se využívají moderní digitální kamery s externím cloněním, jehož příznivým účinkem je velká hloubka ostrosti pořízeného obrazu. Nejpoužívanější TEM technikou je pozorování ve světlem poli, stejně jako u světelné mikroskopie. Pokud při pozorování chceme dosáhnout informací o periodicitě atomárního uspořádání preparátu, bude nás zajímat difrakční obraz. Difrakce vznikne na vzorku po jeho vložení do proudu urychlených elektronů. Obraz se vytvoří v zadní ohniskové rovině objektivu a dále se zvětšuje mezilehlou čočkou a projektivem až na konečný obraz na kameře. [16] I když má transmisní elektronový mikroskop univerzální využití při zkoumání nano struktur materiálů se zvětšením až 1 500 000x, má i své nevýhody. Mezi ty nejmarkantnější patří určitě příprava vzorku. Preparát pro TEM musí mít dostatečně tenký, neboť by jinak mikroskop neposkytl žádné informace o povrchu materiálu. Dalším aspektem, který je třeba sledovat je možné poškození povrchu vzorku ionizujícím zářením pohybujících se elektronů. A v neposlední řadě může

dojít k chybné nebo nesprávné interpretace výsledného 2 D obrazu vzniklé z 3 D obrazu vzorku. [21]

### 4.3 Skenovací elektronový mikroskop

Rastrovací, nebo též skenovací elektronový mikroskop (SEM) vyobrazený na *Obr. 23* patří mezi techniky tvorby obrazu složením jednotlivých signálů, získaných ze vzorku rastrováním bod po bodu, řádek po řádku. [16]

Protože v předchozí kapitole 4.1.1. byly podrobně popsány části transmisního elektronového mikroskopu, nebude už tato kapitola důkladným popisem částí rastrovacího elektronového mikroskopu, neboť se SEM od TEM po konstrukční stránce příliš neliší. V této kapitole se budu spíše věnovat srovnání pozorovacích metod a dovedností SEM vůči TEM.



*Obr. 23 schéma SEM [28]*

Skenovací elektronový mikroskop používá pro interakci se vzorkem proud urychlených elektronů s nižším urychlovacím napětím (v rozmezí 10 až 40 kV), zatímco u TEM se interval použitých urychlovacích napětí pohybuje mezi 100 až 200 kV. Tento elektronový paprsek je zaostřen na vzorek a následně se posouvá bod po bodu. Aby mohl mikroskop skenovat po čárové trajektorii je nutné zařadit do elektronového sloupce systém pro

odklonění paprsků. Na konci řádku se elektronový paprsek posune na bod pod posledním bodem v řádku a pokračuje, dokud není naskenovaný celý obraz. [18,20]

Interakcí elektronů s povrchem vznikají srovnatelné signály jako u TEM. U tohoto typu mikroskopu se nejčastěji využívají sekundární a zpětně odražené elektrony, protože poskytnou lepší informace o rozdílné topografii povrchu materiálu než jiné signály vznikající díky nepružným srážkám. Mimo jiné se SEM používají rovněž ke zkoumání různorodých povrchů vzorku a na zjištění chemického složení. [20,21]

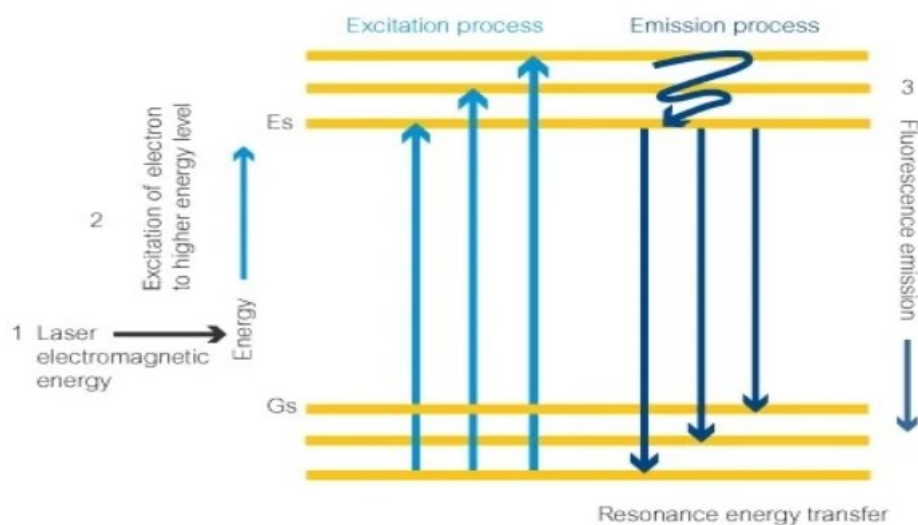
Mezi výhody rastrovacího elektronového mikroskopu určitě patří schopnost měření až do hloubky 10 000 atomových vrstev, což je pro představu několik mikrometrů. Maximální hloubka měření je dána ztracenou energií v důsledku nepružného rozptylu elektronů. SEM dosahují rozlišovací schopnosti až 2,5 nm, umí vytvořit 3D obraz vzorku. Ulehčují práci už na začátku mikroskopování a to proto, že nevyžadují takovou přípravu vzorku jako TEM, kromě oříznutí na správnou velikost podle držáku vzorku v mikroskopu. [21]

## 5 FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE

Tato mikroskopická metoda využívá rozložení fluorescenčního signálu v buňkách vzorku ke zkoumání jejich buněčné fyziologie. Jako každé vědní odvětví tak i fluorescenční mikroskopie prošla značným vývojem upevňující její postavení mezi nejpoužívanějšími mikroskopickými technikami 21. století. Na kvalitu dnešní fluorescenční mikroskopie měly vliv důležité milníky minulého století. Mezi nejzásadnější pokroky nepochybně patří syntetizace prvního umělého barviva a použití dichromatického zrcadla odrážející vlnové délky pouze z úzkého intervalu. V současné době je kladen důraz na zlepšení kontrastu, časového a prostorového rozlišení. [22]

### 5.1 Fluorescence

Pro pochopení principu fluorescenční mikroskopie je zapotřebí nejdříve objasnit pojem fluorescence. Při tomto ději znázorněném na *Obr. 24* dochází k emisi fotonu vlivem pohlcení záření o vlnové délce blízké se modrému světlu. Excitační foton modrého světla je absorbován vzorkem a vlivem dodání energie dochází k vybuzení elektronu fluoroforu a jeho přechodu do elektronové vrstvy o vyšší energetické úrovni  $E_s$ . Zpětný pohyb elektronu fluoroforu do původního energetického stupně  $G_s$  se děje za přítomnosti emisního fotonu s delší vlnovou délkou (zelené světlo). Fluorescence je viditelná jako záření pozorované látky při emisi velkého množství fotonů najednou, jelikož fluorescence trvá jen několik nanosekund. [23, 24]



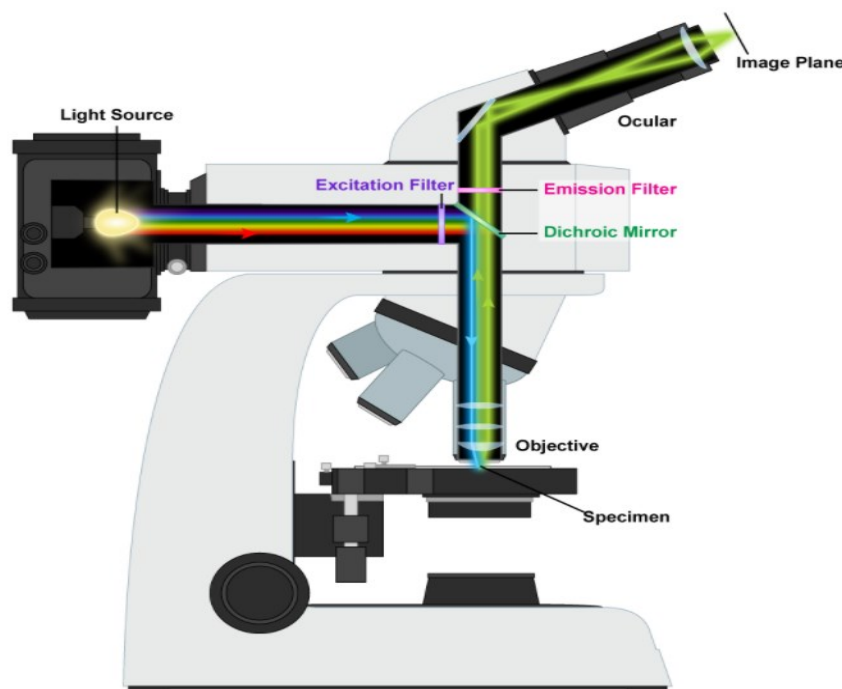
*Obr. 24 Vznik Fluorescence [42]*

Pokud bychom srovnali energie excitačních a emisních fotonů bude energie emisních fotonů nižší o ztracenou energii ve formě tepla v prvním excitovaném stavu. Jelikož fluorescence emitovaných elektronů nemá stejnou vlnovou délku jako excitační elektromagnetické záření, umísťují se před detektor fluorescenčního mikroskopu filtry, aby bylo rušivé záření odstraněno. [23, 24]

Excitace elektronů pomocí absorpce modrého světla není jedinou možností. Čím dál častěji se využívá i červeného světla. K pohlcení dvou fotonů dojde za vzniku pouze jednoho emitovaného fotonu o vyšší energii. Při použití zdroje světla o delší vlnové délce je získáno důležité výhody v podobě hlubšího průniku do materiálu. [24]

## 5.2 Fluorescenční mikroskop

Každý fluorescenční mikroskop je složen z několika neměnných částí jako je zdroj excitačního záření, objektiv, dichromatická zrcadla, zobrazovací zařízení a detektor emisního záření. Klasický fluorescenční mikroskop je zobrazen na *Obr. 25*.



*Obr. 25 Fluorescenční mikroskop [28]*

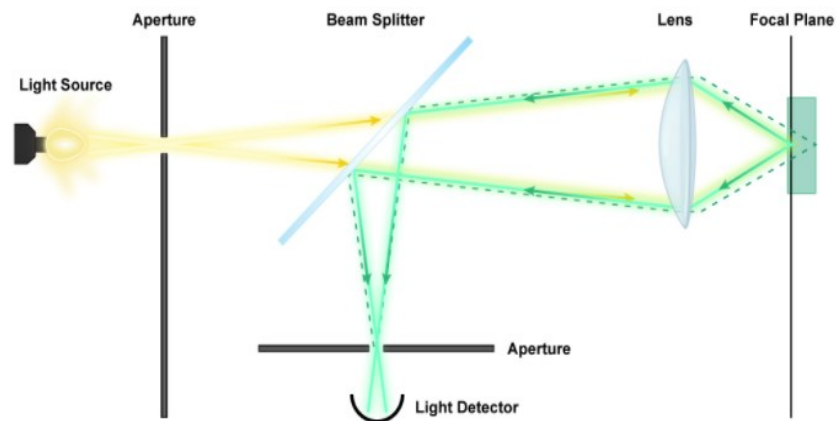
Paprsek ze zdroje dopadá na dichromatické zrcadlo pracující jako dělič paprsků, neboť odráží pouze úzký interval elektromagnetického záření o určité vlnové délce a zbytek spektra je propouštěn. Díky dichromatickému zrcadlu je rovněž docíleno zaostření paprsku na vzorek a průchodu vyzářeného paprsku do objektivu. Emisní záření je dichromatickým

zrcadlem propuštěno z důvodu delší vlnové délky než v případě excitačního záření. Emisní záření doputuje přes bariéru zabraňující excitačnímu záření dopadnout na detektory až ke 2. dichromatickému zrcátku, pomocí něhož jsou vyzářené fotony rozděleny podle vlnové délky budícího laseru. Digitálním zpracováním signálu v počítači je vytvořen záznam vzorku v reálném čase. [22,23]

### 5.2.1 Konfokální fluorescenční mikroskopie

Podle zobrazovaného pole vzorku může být fluorescenční mikroskopie rozdělena na dva druhy, a to mikroskopii širokého pole, ale pokud nebude fluorescenční signál snímán z celé plochy vzorku a omezí se jen na určitou oblast, jde o skenovací konfokální mikroskopii. Výsledný obraz pomocí této metody vznikne postupným rastrováním bod po bodu a následným složením získaných intenzit záření z jednotlivých bodů. [24] Konfokální mikroskopie je poměrně mladou metodou kombinující v sobě klasické i rastrovací techniky pro tvorbu výsledného 3 D obrazu vzorku.

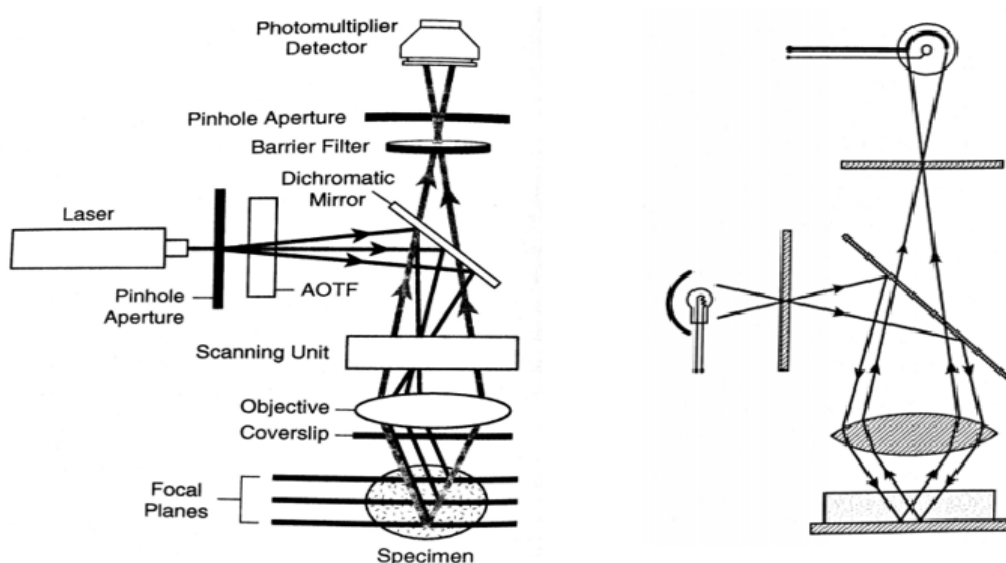
Autorem prvního konfokálního mikroskopu se stal americký vědec zabývající se umělou inteligencí Marvin Minsky. Roku 1961 mu byl uznán patent konfokálního mikroskopu, který později využíval pro zaznamenávání živých tkání nervových sítí v mozku. Konfokální mikroskop pracuje na principu dvou konfokálních bodových clonek zaostřených současně do shodné roviny ostrosti. K zachycení fluorescence dochází pouze z roviny ostrosti, a proto nenastane snížení obrazového kontrastu při pozorování vlivem rušivého rozostření z rovin nad a pod rovinou ostrosti. Jak je patrné z *Obr. 26*, první bodová clonka se nachází před zdrojem osvětlení vzorku a redukuje množství paprsků zaostřující vzorek na bodový zdroj světla. V praxi projde jen úzký svazek, který je odražen dichromatickým zrcadlem a objektivem zaostřen na konkrétní bod vzorku. Emisní paprsek ze zaostřené roviny v sobě nese přesnou informaci o konkrétním bodu vzorku a prochází přes dichromatické zrcadlo zpět. Paprsek je zaostřen na druhé bodové cloně umístěné před fotodetektorem. Druhá bodová clona brání světlu z nezaostřené roviny zasáhnout fotonásobič. Fluorescence z okolních rovin se tedy výsledného obrazu neúčastní. Jednotlivé body vzorku jsou viditelné s mnohem větší ostrostí, než by tomu bylo při aplikaci mikroskopie širokého pole, kde je pole zájmu vztaženo na celou plochu preparátu, nikoliv na bod. Při srovnání rozlišení širokouhlého světelného mikroskopu a mikroskopu konfokálního poskytuje konfokální mikroskop zvýšení maximálních bočních rozlišení v ose x a y ( $0,5 \mu\text{m}$  oproti  $0,25 \mu\text{m}$ ) a maximálního axiálního rozlišení v ose z ( $1,6 \mu\text{m}$  oproti  $0,7 \mu\text{m}$ ). [25, 26, 27, 50]



Obr. 26 Průchod paprsků vzorkem s konfokálními bodovými clonami [28]

Popularita konfokálního mikroskopu rostla spolu s počtem možných aplikací a dostupností technologie. Hlavním využitím se stalo pozorování živých biologických vzorků a jejich procesů v nich. Neinvazivní metoda tvorby obrazu pomocí optických řezů nenarušuje živé vzorky, neboť se nejedná o fyzickou metodu, ale o tvorbu optických řezů pomocí světla. Původní konfokální design v patentu Marvina Minského se dočkal několika technologických vylepšení, jež zahrnovaly stabilní laserový zdroj světla, přesnější filtry, efektivnější zrcadla, fotodetektory s nižším šumem a rychlé počítače s analýzou výsledných snímků. [26, 27]

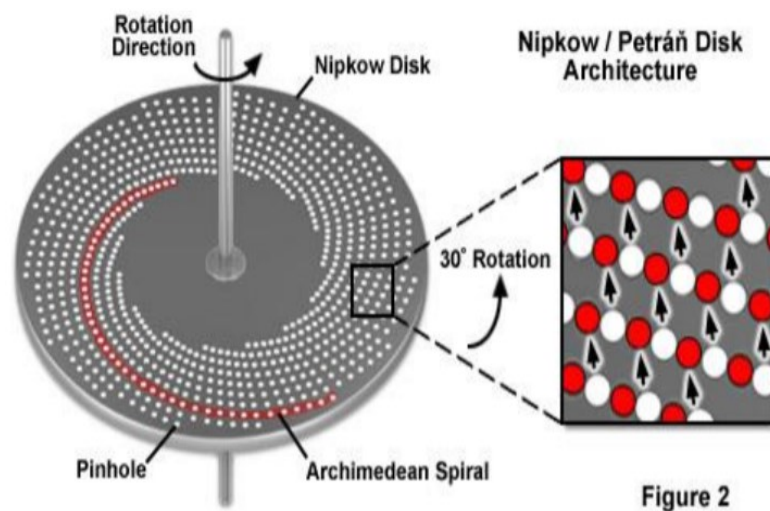
Obraz v konfokálním mikroskopu vzniká různými způsoby snímání vzorku. První z nich byl výše zmíněn jako Minskyho schéma. Grafické znázornění je vidět vpravo na Obr. 27. V tomto případě je rastrování zajištěno samotným vzorkem a všechny části mikroskopu jsou stacionární. V druhém případě dochází k pohybu objektivu. [22]



Obr. 27 LSCM konfigurace - (vlevo), schéma konfokálního mikroskopu podle Marvina Minského - (vpravo) [26]



V dnešní době nejpoužívanější konfokální mikroskop pracuje na principu pohybu laserového paprsku po části vzorku. V zásadě existují dva druhy skenování paprskem. Jde buď o skenování jednopaprskové (laserový skenovací konfokální mikroskop) nebo vícepaprskové na bázi Nipkowova disku. Výhodou vícepaprskového skenování je rychlost skenování, ta probíhá téměř v reálném čase, oproti jednopaprskovému LSCM, u něhož je omezena rychlost fluorescence z důvodu konečného množství světla z malého objemu fluoroforu v ohnisku skenovaného paprsku. Tuto vlastnost lze eliminovat použitím vícenásobného laserového buzení například s využitím rotujícího disku. Příkladem je Nipkowův disk na Obr. 28. [22, 25, 26, 50]



Obr. 28 Nipkowův kotouč [32]

Nipkowův disk se sestává z 200 000 otvorů uspořádaných do pravidelných spirál. Rychlost rotace disku dosahuje několika Hz a obraz je tvořen emisním zářením ze sousedních otvorů na disku. Ve srovnání s LSCM je snímkovací frekvence Nipkowova disku mnohonásobně větší a nedochází k tak značnému vysvícení vzorku, ale na druhou stranu LSCM je skvělou metodou pro zobrazení vnitřních struktur preparátů a též vyniká v axiálním rozlišení, protože neumožňuje detekci emisního záření z okolních bodů, jako v případě použití Nipkowova disku. [22, 25, 26]

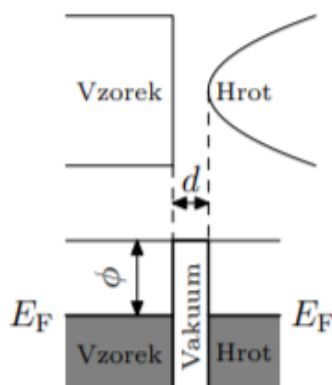
LSCM pracuje na principu počítačem řízených řádkovacích zrcadel, díky nimž se společně přenáší signál obrazu a poloha laseru. Ke složení výsledného obrazu dochází spojením jednotlivých pixelů podle detekovaných souřadnic. [22] Konfigurace LSCM je velmi podobná s konstrukcí mikroskopu sestrojeném Marvinem Minským. Pro srovnání byly obě tyto konstrukce vloženy do Obr. 27.

V moderních LSCM je jako zdroj použit jeden či více laserů. Paprsek prochází první konfokální clonou, dále se zde nachází AOTF filtry pro výběr správných vlnových délek buzení. Dichromatické zrcadlo odrazí excitační paprsek přes skenovací jednotku na objektiv. Objektivem je paprsek zaostřen na vzorek. Emisní paprsek prochází přes objektiv a zrcadlo přes bariérový filtr až k druhé konfokální cloně před fotodetektor. Signál na fotonásobičovém detektoru prochází do zobrazovacího systému v konfokálním mikroskopu. [26, 27]

## 6 MIKROSKOPIE SKENOVACÍ SONDOU

Mikroskopie skenovací sondou SPM (z anglických slov Scanning Probe Microscopy) zahrnuje několik rastrovacích mikroskopických technik, které ke studiu povrchu vzorků využívají pohybující se sondy ve tvaru ostrého hrotu. Na ostrosti hrotu potom závisí celkové rozlišení. Hrot se pohybuje v oblasti blízkého pole vzorku, což je definovaná vzdálenost do 100 nm od objektu. Souřadnice o aktuální poloze rastrovací sondy jsou zaznamenávány a skládány počítačem do výsledného trojrozměrného obrazu vzorku. Měření je sice časově náročnější než při použití jiných mikroskopických technik, ale tato technologie umožňuje zobrazit podrobnosti zkoumaného vzorku v intervalu od 100  $\mu\text{m}$  po 0,01 nm až 0,001 nm. [16,43,44]

První metoda ze skupiny SPM technik byla vyvinuta v roce 1981 ve výzkumném centru v Curychu pod názvem skenovací tunelová mikroskopie se značkou STM (z anglických slov Scanning Tunneling Microscopy). Jednalo se o první metodu mapující topografii povrchu vzorku na atomární úrovni. Technologie STM je založena na tunelovém jevu, jehož princip spočívá v zákonech kvantové fyziky. Technologii STM monitorujeme protékající proud mezi vodivým hrotem a vodivým vzorkem. Tunelová mikroskopie nedovoluje použití nevodivého materiálu ke zkoumání. Vodivý vzorek s vodivým hrotem není v přímém kontaktu, ale dělí je tenká vrstva vakua o vyšší energii, než je energie elektronů v kovovém hrotu. Tato vzniklá energetická bariéra zabraňuje přímému šíření proudu, pokud je však dodržena dostatečně tenká vrstva, označená na *Obr. 30* písmenem *d*, je možné detekovat procházející elektrony s určitou pravděpodobností díky tunelovému jevu, při němž se mohou částice šířit i do míst se zápornou energií. [43]



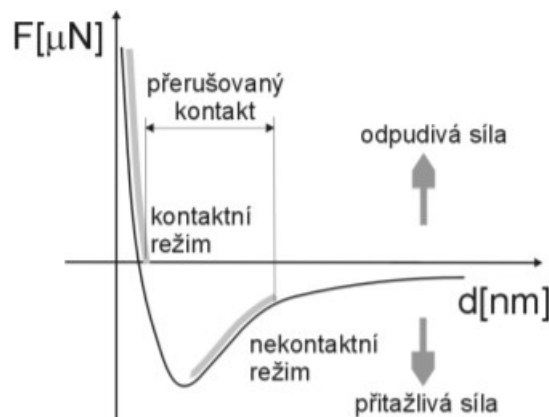
*Obr. 29 Tunelovací bariéra STM [43]*

Po zavedení této technologie následoval další vývoj, který dal vzniknout mnoha specializovaným metodám určených ke studiu nanotechnologie.

## 6.1 Mikroskopie atomárních sil

Jelikož skenovací tunelová mikroskopie není určena ke studiu nevodivých materiálů, byla pro oblast nevodivých vzorků, převážně polymerů, vyvinuta mikroskopie atomárních sil se zkratkou AFM (z anglických slov Atomic Force Microscopy), v dnešní době nejrozšířenější mikroskopická metoda skenujících sond stojící na základech tunelové mikroskopie. Tato technologie mapuje atomární síly na povrchu zkoumaného materiálu. Mikroskopickému zkoumání se podrobuje vždy jen malá část povrchu vzorku ( $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ ). AFM pracuje na podobném principu jako tunelová mikroskopie. Ostrý hrot kolmo upevněný na konci nosníku se pohybuje po povrchu zkoumaného materiálu. Mezi hrotem a povrchovou strukturou materiálu dochází k detekci interakčních sil, jež jsou způsobeny odpuzováním či přitahováním atomů hrotu vzorkem. Tyto síly zapříčiňují ohyb nosníku. Velikost ohybu závisí na míře interakce hrotu a vzorku. Nejčastěji se na ohybu nosníku podílejí přitažlivé van der Waalsovy síly, ale může se jednat také o třecí, odpudivé nebo adhezní síly. [16,43,44]

Jak je patrné z *Obr. 31* technologie AFM může pracovat ve dvou základních režimech, a to v kontaktním nebo bezkontaktním režimu. Účinky jednotlivých sil na ohyb hrotu jsou závislé na vzdálenosti rastrovací sondy od vzorku, označené písmenem  $d$  na následujícím obrázku. [44]

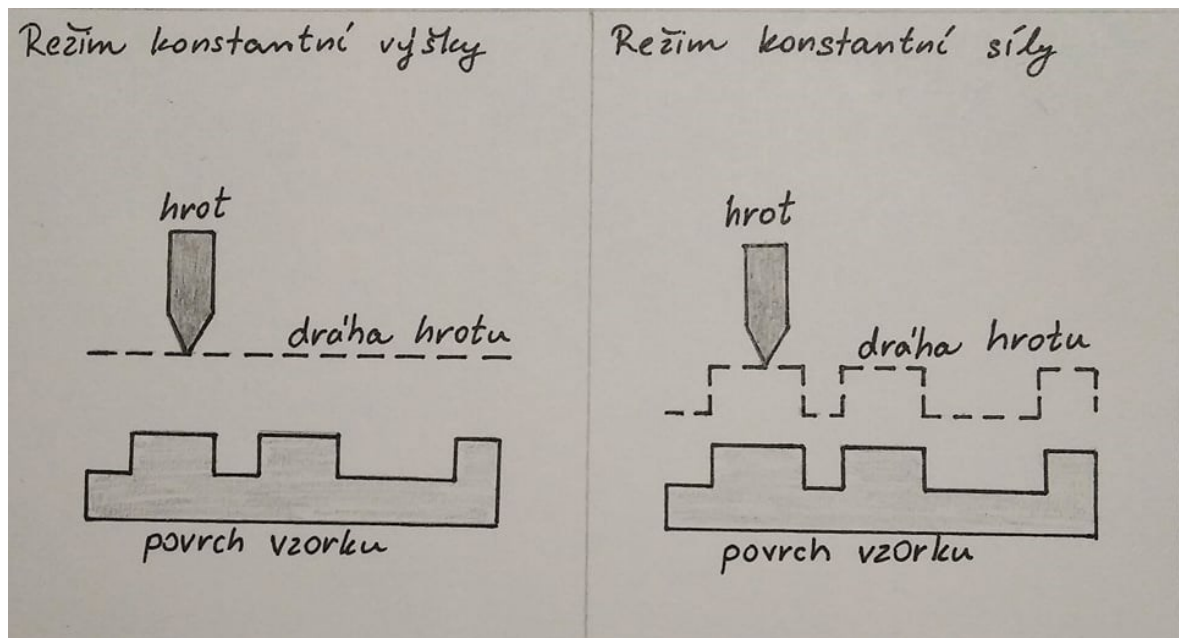


*Obr. 30* Výslednice působících sil na hrot sondy AFM [44]

### 6.1.1 Kontaktní režim

Kontaktní neboli dotykový režim nastává, když je vzdálenost mezi vzorkem a hrotem sondy dostatečně malá, aby na hrot působily odpudivé síly. V tomto případě lze provádět měření buď v režimu konstantní výšky nebo při režimu s konstantní silou. Při režimu s konstantní výškou je udržována stejná poloha nosníku  $z_0$  po celou dobu měření a výsledkem zkoumání

vzorku je počítačové vyhodnocení ohnutí nosníku. V opačném případě s využitím konstantní síly je ohyb nosníku po dobu měření neměnný a odečítá se výška základny nosníku. Kromě skenovacího pohybu vykonává hrot sondy ještě posuv v ose z. Oba případy jsou schematicky znázorněny na Obr. 32. [43]



Obr. 31 Režim s konstantní výškou / silou [Převzato z literatury 44]

### 6.1.2 Bezkontaktní režim

Bezkontaktní režim byl vyvinut hlavně z důvodu předejití poškození vzorku hrotem skenující sondy při dotykovém režimu. Při využití bezkontaktní metody se hrot sondy pohybuje v rozmezí od 1 do 10 nm od povrchu vzorku. V těchto místech působí na hrot přitažlivé van der Waalsovy síly. Velikost van der Waalsových sil se v této vzdálenosti pohybuje okolo  $10^{-12}$  N. Aby nedošlo k zachycení hrotu o povrch je nutné použít pružného a zároveň tuhého nosníku. Jelikož nedochází k mechanickému kontaktu mezi hrotem sondy a studovaným povrchem, je tato metoda vhodná pro zkoumání měkkých a elastických materiálů. [43,44]

### 6.1.3 Poklepový režim

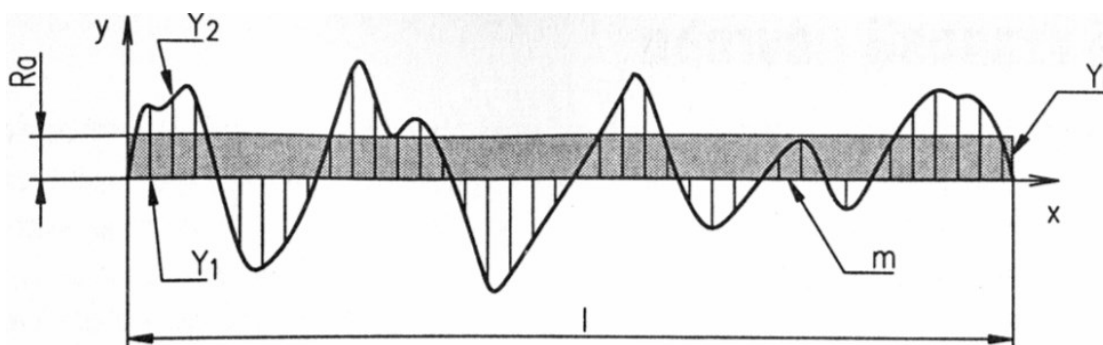
Poklepový režim kombinuje předchozí dva režimy dohromady. Tento způsob se používá za účelem dosažení vyššího rozlišení bez rizika poškození vzorku. Nosník s hrotem se rozkmitá až se hrot téměř dotýká povrchu. Povrch vzorku je vykreslen díky změnám v rezonanční frekvenci. [43]

### 6.1.4 Aplikace AFM

Mikroskopie atomárních sil je vhodnou metodou pro analýzu povrchových struktur vyrobených materiálů. V případě mé bakalářské práce byla tato technologie použita v experimentální části pro měření drsnosti povrchu ze zjištěného převýšení povrchové struktury s ohledem na použitý úhel tisku povrchů.

Drsnost povrchu neboli jeho zvlnění, je souhrnné označení pro nerovnosti vyskytující se na povrchu materiálu. Tyto nerovnosti mají mezi sebou minimální vzdálenost a mohou být způsobeny samotnou výrobou vzorku.

Existuje spousta parametrů popisující drsnost povrchu. Nejběžnější metodou pro určování drsnosti povrchu je parametr označený písmeny  $Ra$ , který představuje střední aritmetickou úchytku profilu. Na Obr. 33 je zobrazen parametr  $Ra$  i jeho statistický výpočet. Parametr  $Ra$  získáme jako součet všech absolutních hodnot výchylek v ose  $y$  od průměrné hodnoty. [48]



$$Ra = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |y_i| = \frac{|y_1| + |y_2| + |y_3| + \dots + |y_n|}{n}$$

Obr. 32 Parametr drsnosti povrchu a jeho statistický výpočet [48]

## 7 TECHNOLOGIE 3D TISKU

Poslední kapitolou teoretické části bakalářské práce je technologie 3D tisku. Tato kapitola je začleněna z toho důvodu, že v experimentální části byla použita SLA 3D tiskárna pro tisk předem naprogramovaných objektů vytvořených v CAD softwaru. Tyto povrchy byly dále zkoumány pod konfokálním mikroskopem a mikroskopií atomárních sil.

3D tisk je neodborné označení pro technologii aditivní výroby. Tento způsob výroby součástí se liší od konvenčních technologií, jako je například třískové obrábění. Hlavním rozdílem je tedy fakt, že nevzniká odpad ve formě třísky při odebrání materiálu, ale výsledná součást vzniká postupně vrstvením jednotlivých vrstev na sebe. Nejprve je nutné naprogramovat digitální 3D model požadovaného dílu v Computer Aided Design (CAD) softwaru. Následuje převedení modelu do formátu, který popisuje geometrii povrchu vytvořeného objektu a vygenerování G-Codu obsahující informace pro 3D tiskárnu. 3D model je rozdělen na jednotlivé tenké vrstvy, které jsou postupně nanášeny na sebe, dokud není předdefinovaný díl zcela vyroben. [45,46,47]

V dnešní době je aditivní výroba hojně rozšířený způsob výroby tvarově složitých součástí. Mezi další přednosti 3D tisku patří nízká pořizovací cena, hlavně z toho důvodu, že není nutné použití dalších nástrojů kromě samotné 3D tiskárny. 3D tisk je v mnoha ohledech flexibilní variantou výrobního procesu, ať už z pohledu možné změny tvaru nebo výběru materiálu, z něhož bude součást vyrobena. Výrobní metoda 3D tisku je vhodná pro kusovou a malosériovou výrobu. V sériové výrobě velkého objemu se jeví jako neekonomická volba z hlediska doby výroby. [45,46,50]

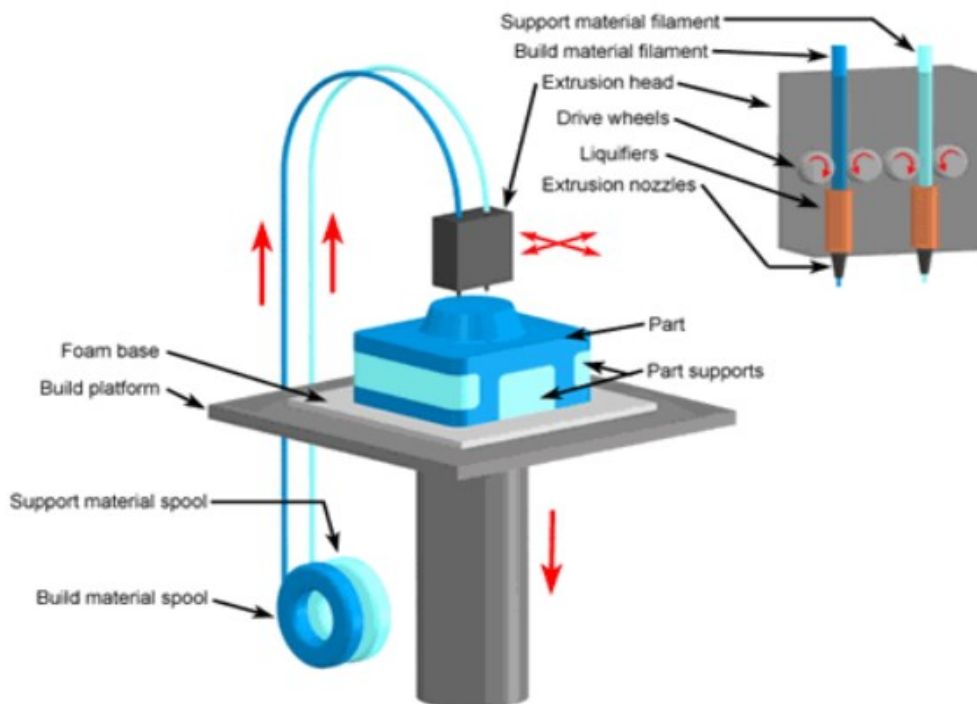
### 7.1 Typy 3D tisku

Tato mladá výrobní technologie, jež se zapsala do historie stereolitografickým patentem Charlese Hulla roku 1984, čítá v dnešní době několik specializovaných metod trojrozměrného tisku. V následujících kapitolách budou představeny některé z nich.

#### 7.1.1 Technologie tisku FDM

Nejnámější technologií spadající do skupiny aditivní výroby je bezpochyby metoda FDM (z anglických slov Fused Deposition Modeling), nazývána rovněž modelování fúzním ukládáním. *Obr. 34* znázorňuje postup této metody. Plastový materiál je dodáván nejčastěji

ve formě vlákna, které je podavačem směřováno z cívky do extruzní hlavy. V hlavě se nacházejí ohříváče, které zahřejí přiváděný materiál na teplotu těsně nad jeho bodem tání a následuje vytlačení materiálu na tiskovou podložku, kde se tvoří tenká vrstva. Tloušťka vrstvy je závislá na průměru extrudéru, ta se pohybuje v rozmezí od 0,3 mm do 0,1 mm. Vytlačený plast po natavení na podložku nebo předchozí vrstvu okamžitě tvrdne. Až je kompletně nanášena celá vrstva, podložka se posune o tloušťku této vrstvy níže a celý proces se opakuje do vytvoření poslední vrstvy výrobku. [30,47]



Obr. 33 FDM technologie aditivní výroby [47]

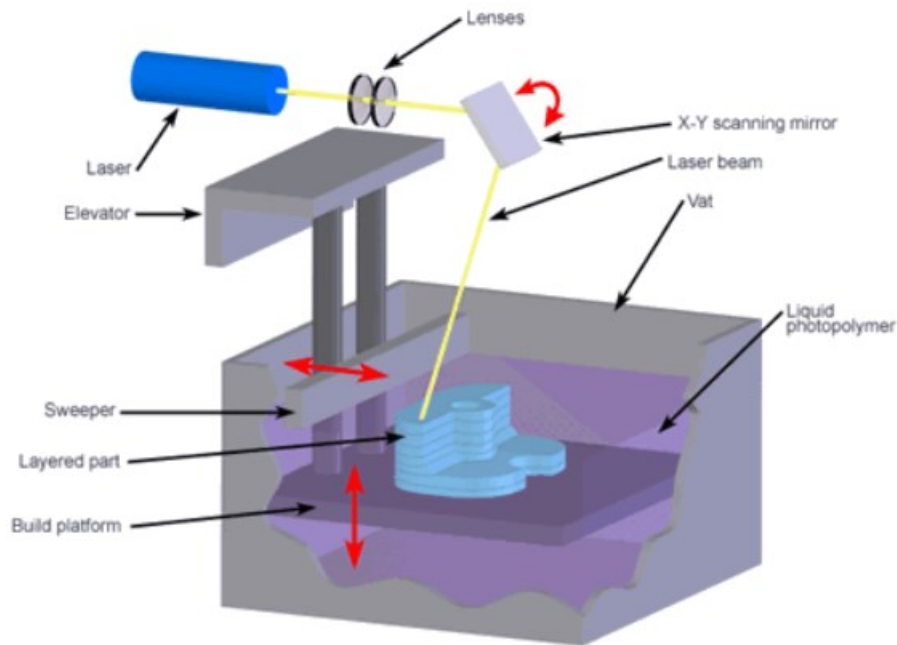
Technologie FDM používá k výrobě 3D součástí dvou materiálů současně. První materiál je modelovací a tiskne se jím samotný díl a druhý materiál slouží jako podpůrný. Z něj jsou vytvořeny podpěry. Po samotném 3D tisku je nutné odstranit pomocné podpěry, které slouží k tomu, aby se vyráběný díl při tisku nezhroutil. Po jejich odlomení mohou být na povrchu materiálu patrné otřepy a nečistoty. Výrobek se proto často brousí, či dále opracovává, barví nebo lakuje. [45]



### 7.1.2 Technologie tisku SLA

Stereolitografie, ve zkratce SLA, je nejstarší, ale stále využívanou metodou pro tvorbu 3D tisku. Princip této technologie spočívá v přesném prosvěcování a vytvrzování tekutého fotopolymery působením naprogramovaného laseru. [30,31]

Postup technologie znázorněné na *Obr. 35* je následující. Nejprve je nutné pečlivě promíchat připravený fotopolymer ve vaně pohybuje se stěračem, následuje příjezd tiskové podložky, laserem jsou nakresleny a vytvrzeny nosné konstrukce výrobku, poté se postupně vytvrzuje jedna vrstva světlocitlivé pryskyřice za druhou. Po vytvrzení jedné vrstvy pryskyřice se tisková podložka vysune o vzdálenost jedné vrstvy v ose z. Hotový výrobek je nutné pečlivě očistit od nevytvrzené pryskyřice. Nejčastěji se využívá jako rozpouštědlo izopropylalkohol. Po očištění jsou výrobky vytvrzovány UV zářením ve speciální peci. [31]



*Obr. 34 SLA technologie aditivní výroby [47]*

Na hotovém vytvrzeném výrobku je ještě nutné odstranit nosné podpory. Podpory jsou ve většině případů snadno odlomitelné i ručně nebo za použití kleštíček. Na nepohledové straně dílů jsou po nich patrné otřepy, ty se nejčastěji odstraňují broušením.

Výhody stereolitografie spočívají v rychlém a velice přesném tisku tvarově složitých součástí. Rozlišení v ose x, y se pohybuje okolo 100  $\mu\text{m}$  a v ose z dokonce až 25  $\mu\text{m}$  u nejlepších SLA 3D tiskáren. Díly vyrobené stereolitografickou cestou dosahují skvělé kvality povrchu s nejmenší drsností ze všech metod 3D tisku. SLA technologie je vhodná i

pro malosériovou výrobu, protože se fotopolymer vytvrzuje po celé ploše tiskové destičky za stejný čas, jen se spotřebuje více materiálu než při kusové výrobě. [30,46]

### 7.1.3 Volba materiálů pro 3D tisk

Materiál pro 3D tisk je nutné vybírat s ohledem na mechanické vlastnosti, očekávanou obrobiteľnosť, konečný vzhľad součásti a jeho cenu. Nejčastěji využívané materiály jsou termoplasty, elastomery, ale stále častěji je využíváno i kovů. Konkrétně při využití technologie SLA je možno využít materiálů na bázi termoplastů. Pružná a odolná pryskyřice napodobuje tuhý polypropylen, který se výborně hodí pro materiály s ostrými hranami, tenkými stěnami a drobnými detaily. [30,31]

Firmy zabývající se stereolitografickým 3D tiskem vyrábí z několika druhů materiálů s možností použití velké škály barev. Barvivo je smícháno s připravenou pryskyřicí před samotným tiskem.

SLA 3D tisk má z hlediska široké škály používaných materiálů rozsáhlé uplatnění v mnoha odvětvích. Konstrukční pryskyřice přináší kvalitní výrobky a snižují náklady a čas na výrobu. Pružné a elastické pryskyřice s přehledem nahradí silikonové materiály a hodí se všude, kde je nutné díl ohýbat, stlačovat apod. Pevné pryskyřice jsou vhodné pro prototypování tvrdých dílů, které odolají deformacím v čase. Materiály 3D tisku nejsou vhodné jen pro výrobní průmysl, ale uplatnění našly například i v lékařství. Lékařské a dentální pryskyřice umožňují výrobu sterilizovaných chirurgických nástrojů a implantátů. [31]

## 8 SHRNUÍ TEORETICKÉ ČÁSTI

První kapitola teoretické části mé bakalářské práce je zaměřena na historii optické mikroskopie počínaje prvními mikroskopy v 16. století, pokračuje vývojem v následujících stoletích, až po zjištění limitů optických mikroskopů začátkem 20. století. Další kapitola se zabývá optikou jako vědním oborem. V této části jsou čtenáři seznámeni s pojmy týkající se vlastností světla. Následovaly kapitoly světelné, elektronové, fluorescenční mikroskopie a mikroskopie atomárních sil. Tato posloupnost byla zvolena z důvodu historického vývoje. Součástí kapitoly o fluorescenční mikroskopii byl i popis a historie vzniku konfokálního mikroskopu.

Poslední část bakalářské práce je zaměřena na představení technologie 3D tisku, který je nutné znát pro další využití v praktické části bakalářské práce.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 9 STANOVENÍ CÍLŮ PRAKTICKÉ ČÁSTI

Jedním z cílů praktické části mé bakalářské práce je zhodnotit kvalitu 3D tisku předem naprogramovaných destiček v programu Catia pod konfokálním mikroskopem a mikroskopickou technikou atomárních sil. Pro 3D tisk jednotlivých povrchů byla použita stereolitografická tiskárna.

Dalším cílem je nachystat homogenní struktury povrchů pro růst buněčných linií a zkoumání tvaru a směru jejich růstu. Tyto povrchy budou dále použity pro zkoumání příslušnými odborníky na buněčné struktury pod vedením prof. Ing. Petra Humpolíčka, Ph.D.

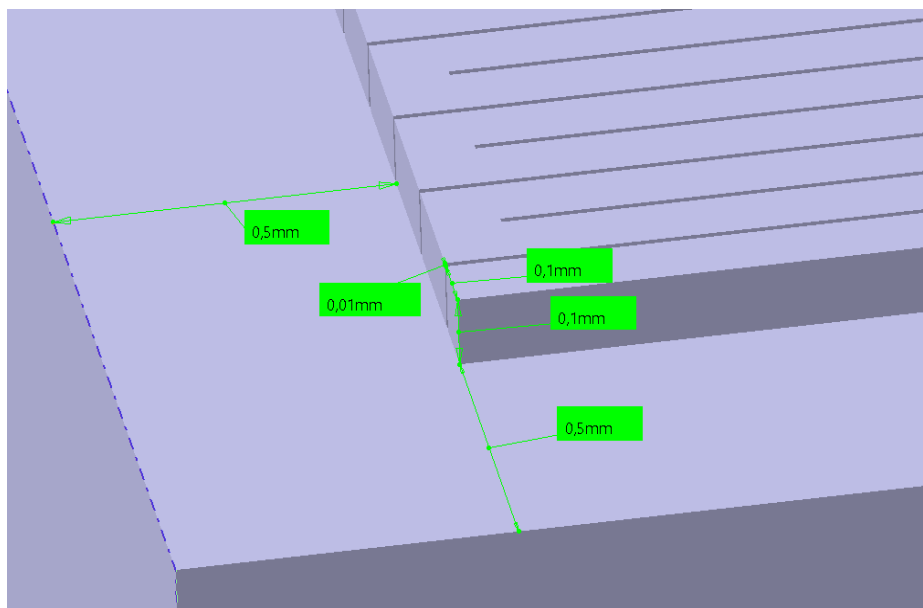
V obou případech byly struktury povrchů vytvořeny ve studentské verzi programu Catia V5-6R2020, 3D tisk byl realizován SLA 3D tiskárnou Form 3 od firmy Formlabs v budově U15. Zkoumání vyrobených povrchů proběhlo na konfokálním mikroskopu Olympus FV3000 v budově U11 a mikroskopickou technikou atomárních sil na přístroji NTEGRA Prima od firmy NT-MDT na v budově U15.

## 10 PŘÍPRAVA VZORKŮ POVRCHU

Jak již bylo řečeno při stanovování cílů praktické části bakalářské práce, modely pro 3D tisk byly naprogramovány ve studentské verzi programu Catia V5-6R2020 od firmy Dassault Systmes. Následovalo převedení objektů do formátu STL a import do předvýrobního programu 3D tiskárny.

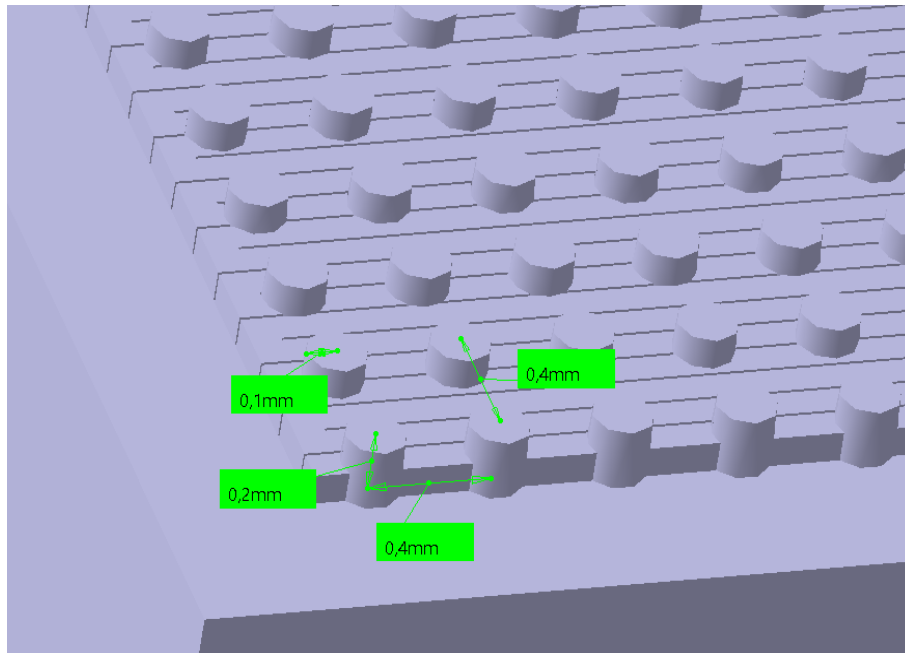
### 10.1 Příprava vzorků s jemnou povrchovou strukturou

Na *Obr. 35* je zobrazen první navržený vzorek. Nejprve byla vymodelována destička o rozměrech 20 x 20 mm s výškou 2 mm. Na ní byla nakreslena struktura pravidelných proužků s odsazením 0,5 mm od okraje destičky. Proužky měly po celé ploše vzorku konstantní rozměry, a to 0,1mm na výšku i na šířku. Mezera mezi proužky byla zvolena minimální s jistým předpokladem, že při samotném tisku se jednotlivé proužky nataví na sebe, mezera se slije a nebude patrná. Celá struktura byla namodelována tak, aby vznikl téměř hladký povrch.



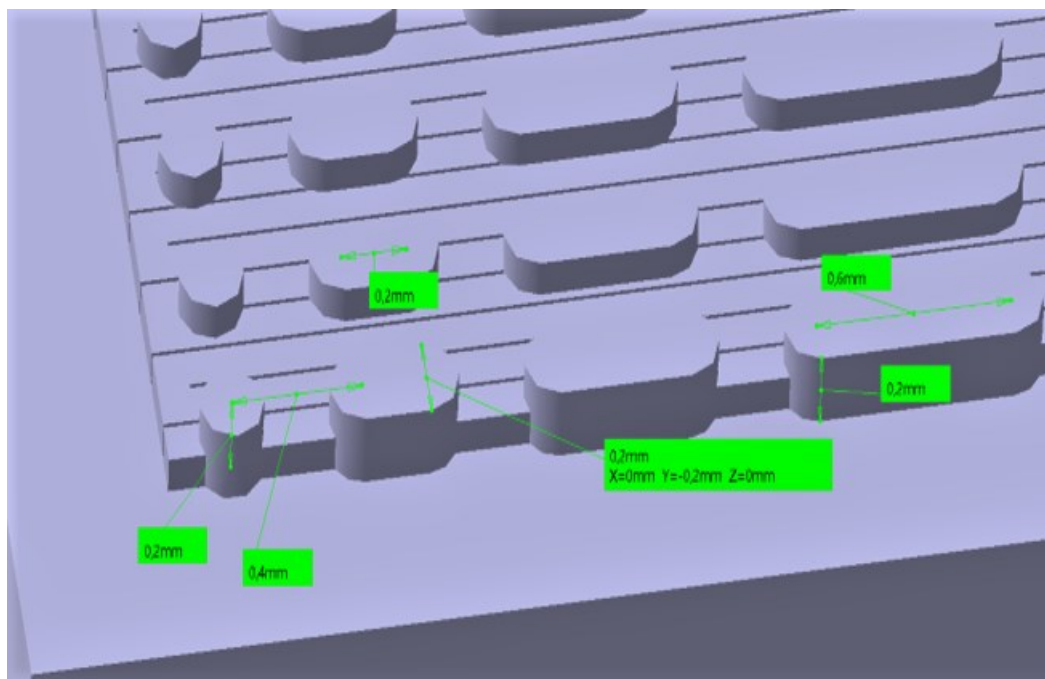
*Obr. 35 První vzorek tvořený jemnou strukturou pravidelných proužků*

Na *Obr. 36* je zobrazen druhý vzorek s pravidelnou strukturou válečků (teček) na předem definovaných prouzcích. Průměry a výšky jednotlivých válečků jsou 0,2 mm se vzdáleností středů 0,4 mm.



Obr. 36 Druhý vzorek tvořený pravidelnou sítí válečků o průměru 0,2 mm

Poslední povrch je zobrazen na Obr. 37. Tentokrát jde o nepravidelnou strukturu počínaje sloupcem teček jako v předchozím případě. Dále následují sloupce prodlužujících se čárek. Každá následující čárka je o 0,2 mm delší, což odpovídá průměru teček v prvním sloupci.

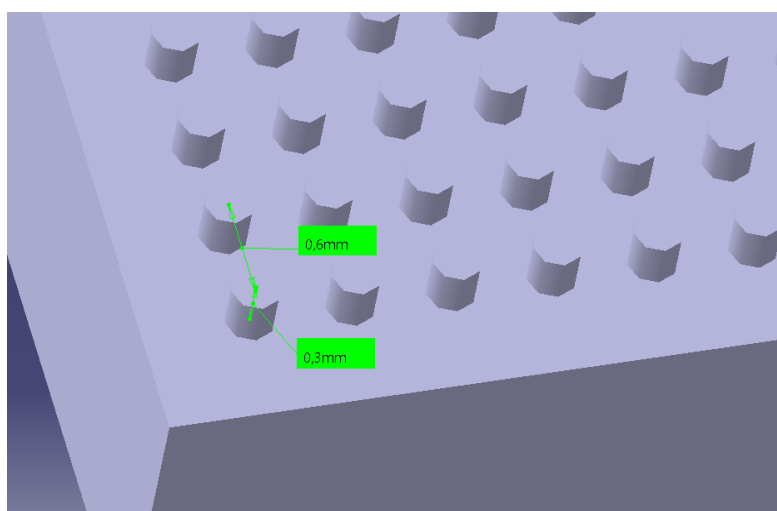


Obr. 37 Třetí vzorek tvořený prodlužujícími čárkami

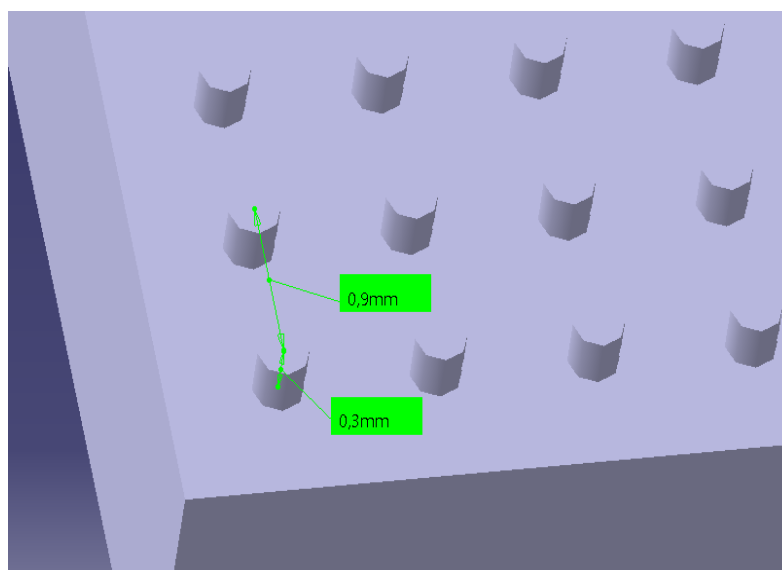
## 10.2 Příprava vzorků s hrubší povrchovou strukturou

Druhá sada vzorků byla rovněž vytvořena ve stejném programu jako předchozí vzorky. Tato sada obsahuje 3 dvojice vzorků s pravidelnou strukturou. Pravidelnost je důležitá z důvodu plánovaného použití jako podklad pro růst buněk a vyhodnocení jejich kvality a směru růstu.

Na *Obr. 38* a *Obr. 39* je vidět první dvojice z druhé sady vzorků. Tato dvojice vzorků má stejný základ tvořený pravidelnou strukturou válečků (teček) tentokrát o průměru 0,3 mm. Liší se však použitou mezerou. V první struktuře jsou válečky od sebe vzdáleny 0,3 mm a ve druhé struktuře 0,6 mm. Tyto vzdálenosti budou platit i pro další dvojice vzorků.



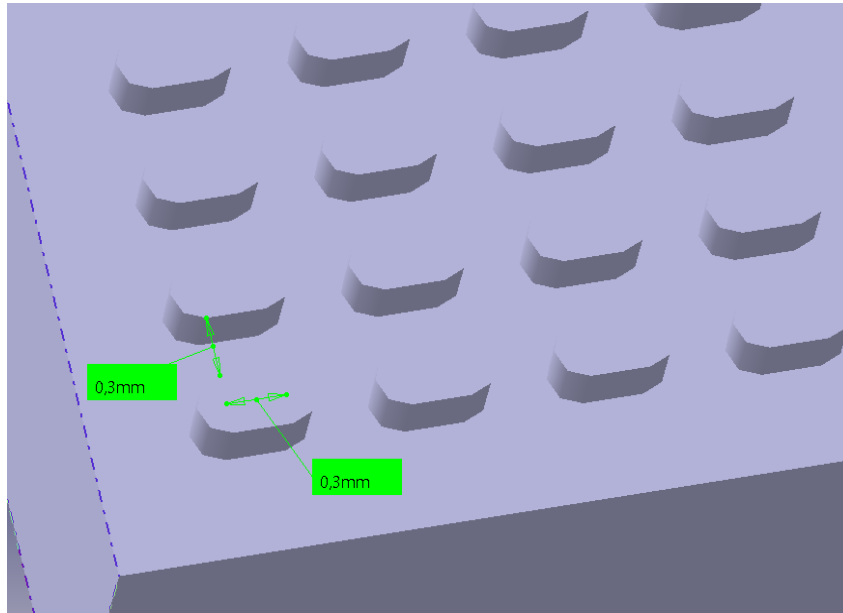
*Obr. 38* Povrch pravidelných teček o průměru 0,3 mm a mezeře 0,3 mm



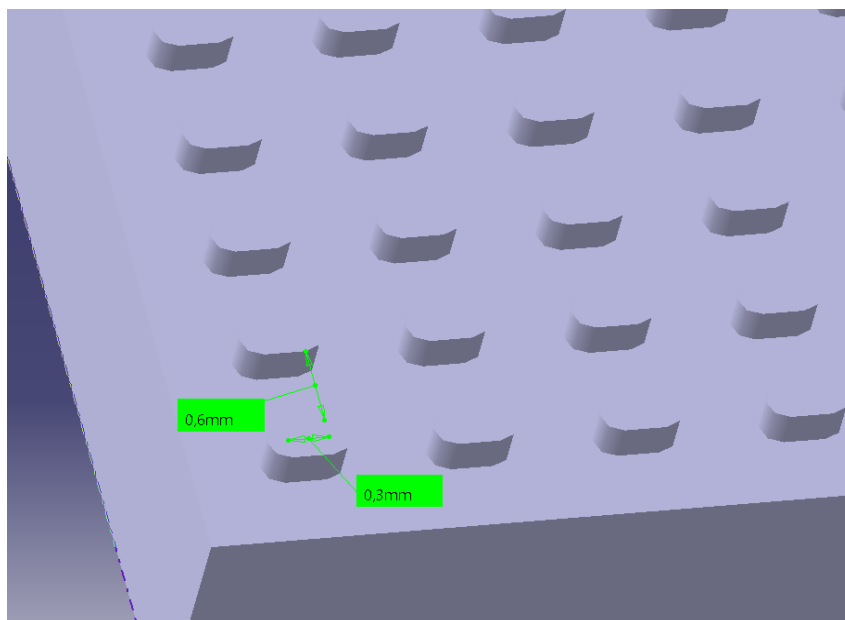
*Obr. 39* Povrch pravidelných teček o průměru 0,3 mm a mezeře 0,6 mm



Na *Obr. 40* a *Obr. 41* je zobrazena druhá dvojice vzorků obsahující krátké čárky. Krátká čárky byla vytvořena pomyslným spojením dvou teček dohromady. Délka čárek je tedy 0,6 mm. Struktury se opět liší pouze ve vzdálenosti jednotlivých čárek od sebe. V prvním vzorku je mezera mezi čárkami 0,3 mm a ve druhém 0,6 mm.

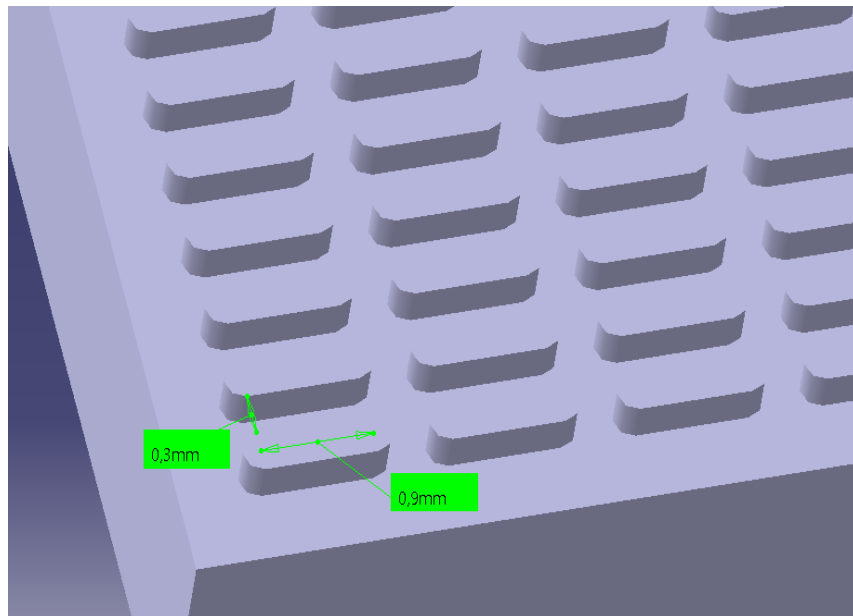


*Obr. 40* Povrch krátkých čárek o délce 0,6 mm a mezeře 0,3 mm

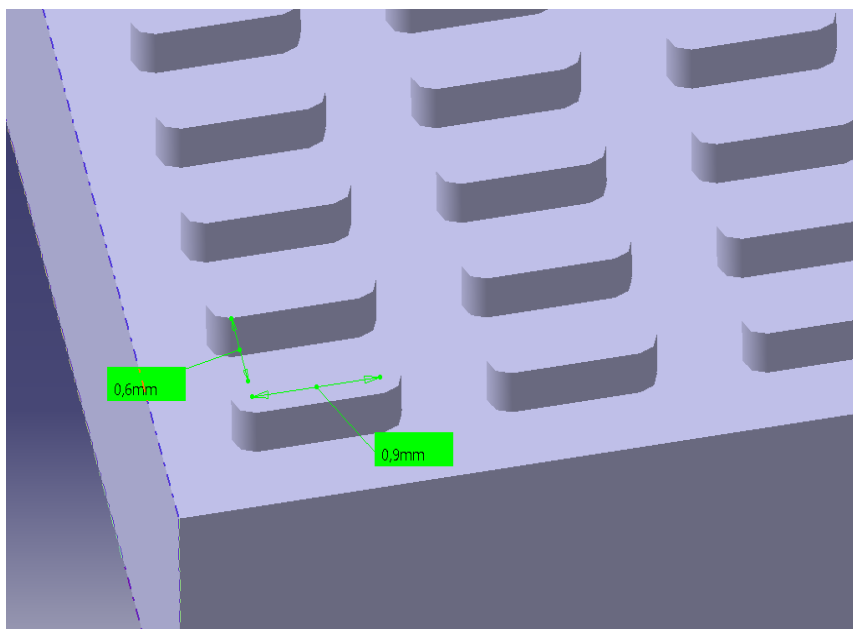


*Obr. 41* Povrch krátkých čárek o délce 0,6 mm a mezeře 0,6 mm

Poslední dvojice vzorků je zobrazena na *Obr. 42* a *Obr. 43*. Opět jde o pravidelnou strukturu čárek, tentokrát dlouhých. Jedna čárka je tvořena ze 4 teček, z toho vyplývá, že délka jedné čárky je 1,2 mm. Vzdálenosti dlouhých čárek od sebe (0,3 mm a 0,6 mm) je zde rovněž zachována jako ve dvou předchozích případech.



*Obr. 42* Povrch dlouhých čárek o délce 1,2 mm a mezeře 0,3 mm



*Obr. 43* Povrch dlouhých čárek o délce 1,2 mm a mezeře 0,6 mm

## 11 SLA 3D TISK POVRCHŮ

Po navržení jednotlivých vzorků v již zmíněném programu, následoval export do formátu STL a USB přenos dat do slicovacího programu PreForm stereolitografické tiskárny Formlabs Form 3.

### 11.1 3D tisk vzorků s jemnou povrchovou strukturou

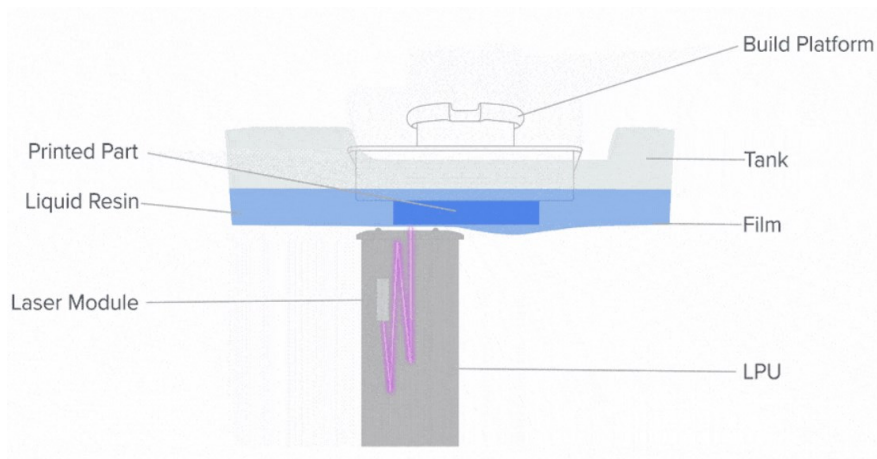
PreForm program slouží k vytvoření podrobného G-codu pro tiskárnu. G-code obsahuje přesné informační pokyny, podle nichž se bude tiskárna během samotného tisku řídit. Součástí tohoto slicovacího programu je automatické rozvržení tisku na tiskovou podložku s dostatečnými rozestupy jednotlivých výtisků od sebe, automatické vytvoření podpěr do míst, kde by mohlo během tisku dojít ke zhroucení materiálu, což by mohlo způsobit značně nežádoucí vliv na přesnost celého výrobku. V případě mého 3D tisku plnily podpěry hlavně tu funkci, aby byly vytisknuté destičky snadno oddělitelné od tiskové plochy.

Další důležitý parametr definovaný v prostředí PreForm byl úhel tisku. Do programu byly nahrány 3 vzorky z první sady, které již byly popsány v kapitole 10.1, a každý z nich byl vytisknut s náklonem 0°, 45° a 90°. Předvýrobním programem byly automaticky vygenerovány podpěry a vytvrzování pryskyřice probíhalo zároveň vertikálně, horizontálně a s náklonem 45°. Na *Obr. 46* jsou zobrazeny vytisknuté destičky i s podpěrami. V horní řadě jsou destičky vytisknuté pod úhlem 0°. V prostřední řadě jsou destičky vytisknuté s 45° náklonem a v poslední řadě s 90° náklonem. Tečky, které jsou na površích viditelné, jsou způsobeny právě zmiňovanými podpěrami. Předpokladem je, že úhel tisku ovlivní výslednou strukturu. Rozdíly v kvalitě tisku pod těmito úhly budou zkoumány pod konfokálním mikroskopem v následující kapitole.

Podpěry pro jednotlivé úhly tisku byly vygenerovány PreForm programem, stejně jako další nezbytné informace pro tiskárnu před začátkem tisku. Pomocí STL formátu byly modely nařezány na jednotlivé vytvrditelné vrstvy, naprogramován pohyb laseru a byla rovněž provedena bilance zásoby materiálu v zásobníku tiskárny.

Tisk připravených vzorků probíhal z Formlabs pryskyřice řady Clear. Tento materiál je biokompatibilní, vhodný pro výrobky s jemnými detaily, kde je zároveň požadován hladký povrch a průsvitnost výtisku. Tento materiál byl zvolen na základě právě těchto prezentovaných vlastností výrobcem, jelikož budou výrobky dále zkoumány pod konfokálním mikroskopem a průsvitnost je zde žádoucí.

Pro samotný tisk takto předdefinovaných destiček byla použita 3D tiskárna Formlabs Form 3, která pracuje na technologii Low Force Stereolitography (LFS). Na Obr. 44 je znázorněn princip této metody, která využívá parabolického zrcadla k polohování laseru vždy kolmo k rovině tisku. Parametry použité tiskárny uváděné výrobcem jsou shrnuty na následujícím Obr. 45.

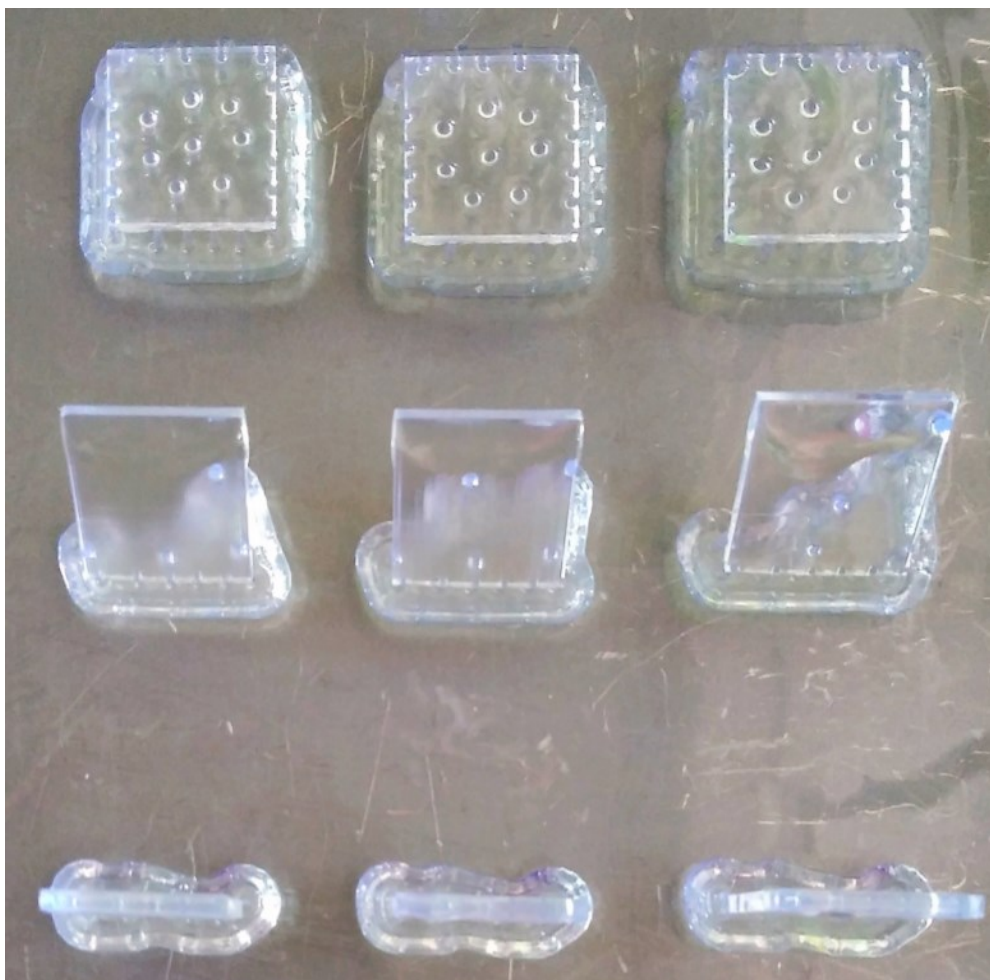


Obr. 44 Princip technologie Low Force Stereolitography [30]

3D tiskárna Formlabs	Form 3
Technologie	LFS (Low Force Stereolithography)
Tiskový objem	145 × 145 × 185 mm
Výška vrstvy	25–300 μm (také podle zvoleného materiálu)
Průměr vytvrzovacího bodu	85 μm
Laser (výkon)	1 × 250 mW
Laser (vlnová délka)	405 nm
Zásobník(y) pryskyřice	1 ×
Systém doplňování pryskyřice	automatický
Dočasné podpory	automaticky generované, velmi snadno odtrhnutelné
Ovládání	5,5" barevný dotykový displej (1280 × 750 px)
Přenos dat	WiFi (2,4/5 GHz), Ethernet (1000 Mbit), USB 2.0
Výstrahy	na displeji; SMS/e-mail přes Dashboard; 2 stavové LED; reproduktor
Software	PreForm (příprava 3D tisku, tisk na dálku), Dashboard (správa 3D tisku, tiskárna a týmů)
Podporované formáty dat	STL a OBJ (vstup), FORM (výstup)
Podporované platformy	Windows 7 (64bit.) a vyšší; Mac OS X 10.10 a vyšší; OpenGL 2.1; min. 4 GB RAM
Rozměry zařízení	405 × 375 × 530 mm
Minimální manipulační prostor	405 × 530 × 780 mm
Hmotnost zařízení	17,5 kg
Pracovní teplota	automatické vyhřívání do 35 °C
Řízení teploty	vzduchem vyhřívaná tisková komora
Požadavky na napájení	100–240 VAC; 2,5 A; 50/60 Hz; 220 W

Obr. 45 Parametry tiskárny Formlabs Form 3 [30]

Každý vzorek byl tedy vytisknut třikrát, pokaždé pod jiným úhlem. Před další manipulací s povrchy byly všechny řádně označeny číslem vzorku a úhlem tisku. Na *Obr. 46* jsou vidět vzorky i s podpěrami na tiskové ploše po vyjmutí z tiskárny. Na vytisknutých površích nejsou z uvedené fotky patrné vytisknuté struktury, protože šlo o jemnou strukturu.



*Obr. 46 Vytisknuté vzorky z první sady – úhel tisku 0° (první řádek), úhel tisku 45° (druhý řádek), úhel tisku 90° (třetí řádek)*

### 11.1.1 Dokončovací operace

Dokončovací operace v případě stereolitografického tisku obnášely nejprve vymývání vzorků od nevytvrzené pryskyřice v přístroji Form Wash. Tento přístroj je vyfocen na *Obr. 47*. Oplachování probíhalo v nádrži s izopropylalkoholem po dobu 10 minut. Následně byly povrchy vyjmuty, a ještě ručně otryskány směsí stlačeného vzduchu a isopropylalkoholu z důvodu očištění jemné struktury na vytisknutých vzorcích.

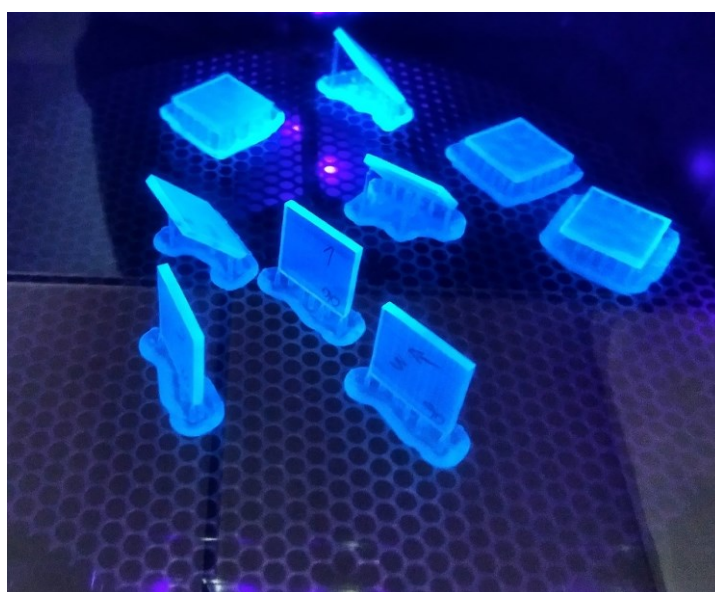


*Obr. 47 Příklad přístroje na oplachování nevytvrzené pryskyřice Form Wash*

Po očištění a vysušení povrchů směsí stlačeného vzduchu a isopropylalkoholu následovalo dodatečné vytvrzení v přístroji Form Cure, který je vyfocen na *Obr. 48*. Na otočný rošt ve vytvrzovací komoře byly položeny vzorky. Vytvrzovací komora se nahřála na 80 °C a vytvrzování probíhalo působením UV záření o vlnové délce 405 nm po dobu 120 minut. Detail vytvrzování UV zářením je vyobrazen na *Obr. 49*.



*Obr. 48 Příklad přístroje na dodatečné vytvrzení pryskyřice Form Cure*



*Obr. 49 Detail vytvrzovaných destiček ve Form Cure*

Poslední dokončovací operací bylo odtržení podpěr. U vzorků vytisknutých pod úhlem  $90^\circ$  byly podpěry odstraněny ručně a u ostatních vzorků za použití kleštíček. Následně byly všechny vzorky zbroušeny jemným brusným papírem Smirex, aby se zhladily otřepy po odtržených podpěrách.

## **11.2 3D tisk vzorků s hrubší povrchovou strukturou**

Jednotlivé dvojice vzorků s hrubší povrchovou strukturou byly popsány v kapitole 10.2 jako vzorky z druhé sady. Druhá sada vzorků byla tisknuta za stejných podmínek a při použití shodných strojů jako sada první. Jediným rozdílem byl zvolený úhel tisku. V tomto případě tisk probíhal pouze pod úhlem  $0^\circ$ . Povrchy z druhé sady byly navrhovány jako homogenní, aby plnily úlohu kvalitního podkladu pro růst buněk a jejich další zkoumání.



## 12 MĚŘENÍ VZORKŮ S JEMNOU POVRCHOVOU STRUKTUROU VYTISKNUTÝCH POD ÚHLEM 0°, 45° A 90°

Obě sady vytisknutých vzorků byly podrobeny dvojímu zkoumání pod mikroskopem. První sada vzorků byla zkoumána nejprve pod konfokálním mikroskopem Olympus FV3000 a poté technologií atomárních sil. Každý vzorek z první sady byl vytisknut pod úhlem 0°, 45° a 90°. Výsledkem zkoumání bude zhodnocení, jestli měl použitý úhel tisku vliv na kvalitu vytisknutého povrchu a také zhodnocení rozměrů natisknuté struktury ve srovnání s předdefinovanou strukturou v prostředí programu Catia.

Druhá sada vzorků byla rovněž zkoumána dvakrát, ale s tím rozdílem, že obě zkoumání proběhnou, pod již zmíněným konfokálním mikroskopem. Nejprve se zhodnotila kvalita tisku podle toho, jak se výsledná struktura rozměrově blíží navržené struktuře před vytisknutím. Následně byly vzorky využity jako homogenní podklad pro růst buněčných linií. Druhé zkoumání pod konfokálním mikroskopem mělo za úkol zmapovat, jak orientace povrchu ovlivňuje růst buněk. Druhá sada vzorků obsahuje 3 dvojice povrchových struktur modifikované tvarem nebo hustotou struktury. Předpokladem je, že upravovaný povrch bude ovlivňovat tvar a směr růstu buněk.

### 12.1 Zkoumání vzorků pod konfokálním mikroskopem Olympus FV3000

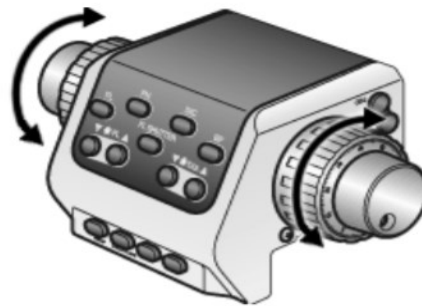
V této kapitole bude popsáno experimentální měření první sady vzorků pod konfokálním mikroskopem Olympus FV3000. Pro připomenutí první sada vzorků obsahuje 3 vzorky povrchových struktur vytisknuté pod úhly 0°, 45° a 90°. Z toho vyplývá, že prvního konfokálního zkoumání se účastnilo 9 vzorků.

#### 12.1.1 Nastavení konfokálního mikroskopu Olympus FV3000

Konfokální mikroskop Olympus Fluoview 3000 umožňuje pozorování ve 2 režimech. Nejdříve byl vždy použit pro vizuální pozorování mikroskopem okulár, kterým byl vzorek sledován v procházejícím světle. Výhodou při použití okuláru je, že lze snadno a rychle najít konkrétní místo na vzorku, které bude detailněji zkoumáno v LSM režimu. Každý vzorek byl zkoumán a následně vyfocen na několika místech, většinou na okraji a pro srovnání také uprostřed vzorku.

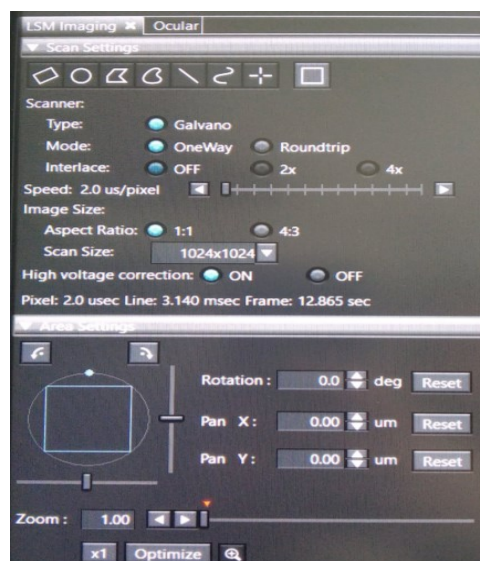
Před začátkem samotného měření bylo nutné nastavit několik důležitých parametrů konfokálního mikroskopu.

Nejprve byl vzorek položen natisknutou strukturou na krycí skličko a poté následoval výběr objektivu. Pro první měření byl zvolen objektiv s 4násobným zvětšením. Výhodou použitého konfokálního mikroskopu je, že je možné v průběhu měření zvolený objektiv měnit, aby bylo dosaženo požadovaného zvětšení, protože objektivy jsou automaticky vybírány z revolverové hlavy zabudované pod pohyblivým stolek se vzorkem. Tento pohyblivý stolek lze posouvat v osách x a y k nalezení konkrétního místa na zkoumaném vzorku. Po nalezení požadované oblasti na vzorku, určeného k dalšímu zkoumání byl zaostřen povrch vzorku otáčením zaostřovacího mechanismu, který je vyobrazen na *Obr. 50*. Zaostřovací mechanismus přibližuje nebo oddaluje objektiv od vzorku, dokud není povrch vzorku v ohniskové rovině. [49]



*Obr. 50* Zaostřovací mechanismus [49]

V další části bude jednotlivě popsáno softwarové okno pro pozorování v LSM režimu. Po přepnutí z vizuálního pozorování do LSM režimu, bylo nutné nastavit velikost skenování pro získání výsledného obrazu. V tomto případě byla zvolena velikost (1024 x 1024) px. Dodatečný zoom nebyl použit. Jak je patrné z *Obr. 51*.



*Obr. 51* Nastavení skenování v softwarovém okně LSM režimu

Dále je potřeba nastavit obrazové kanály. Jak je vidět na *Obr. 52*, bylo použito 5 obrazových kanálů (Violet, Blue, Yellow, Red a poslední kanál kombinuje všechny předchozí). Intenzita jednotlivých laserů a citlivost byla nastavována pro každý kanál zvlášť.



*Obr. 52* Nastavení obrazových kanálů

Pojmenování jednotlivých laserů se odvíjí od jejich excitační a emisní vlnové délky uvedené v *Tab.1*. Jak už bylo vysvětleno v kapitole 5.1 *Fluorescence*, emisní vlnová délka při pozorování fluorescence je vždy delší než excitační vlnová délka. Použité lasery v LSM režimu jsou tedy pojmenovány podle své excitační vlnové délky. Například laser Violet má excitační vlnovou délku 405 nm (v pásu fialového světla) a emisní vlnovou délku 430 nm (v pásu modrého světla).

*Tab. 1* Excitační a emisní vlnové délky použitých laserů

Pojmenování obrazových kanálů [-]	Excitační vlnová délka [nm]	Emisní vlnová délka [nm]
Violet	405	430
Blue	488	513
Yellow	561	586
Red	635	660

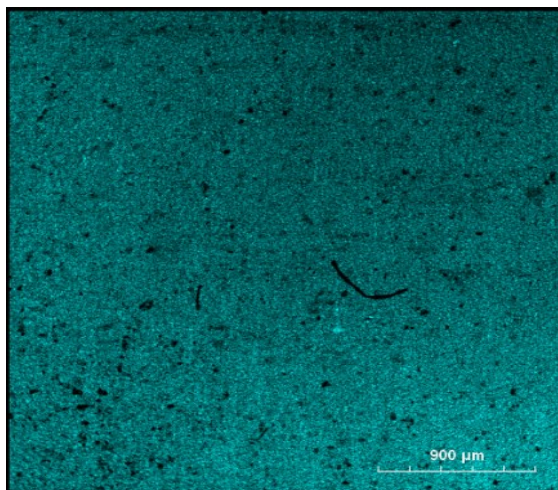
Když byly všechny důležité parametry nastaveny, přistoupilo se k samotnému LSM měření. V softwarovém okně bylo zvoleno opakované skenování vzorku a postupným nastavením intenzity, citlivosti a zaostřováním bylo dosaženo obrazu zaostřeného povrchu. Tlačítkem LSM Start bylo vyfoceno aktuální místo vzorku, podle předchozího nastavení. Získaný zdrojový kód dal vzniknout několika obrazům zkoumaného vzorku. Obraz složený ze všech použitých obrazových kanálů, ale také každý kanál zvlášť. Pro snadnou identifikaci a pozdější diskuzi bylo přidáno měřítko a zakótována struktura povrchu na snímcích.

### 12.1.2 Měření povrchové struktury jemných proužků v závislosti na úhlu tisku

Nejprve byl zkoumán první vzorek vytisknutý pod úhlem  $0^\circ$ . Jednalo se o strukturu pravidelných proužků o rozměrech uvedených v *Tab. 2*. Předpoklad byl takový, že mezera mezi jednotlivými proužky nebude patrná, protože se proužky nataví na sebe. Z *Obr. 53* je zřejmé, že výsledek dopadl jinak. Uprostřed vzorku není možné rozeznat jednotlivé pásy od sebe, natož jejich mezery. K tomuto měření byl použit objektiv se zvětšením 4x a okulár s pevným zvětšením 10x.

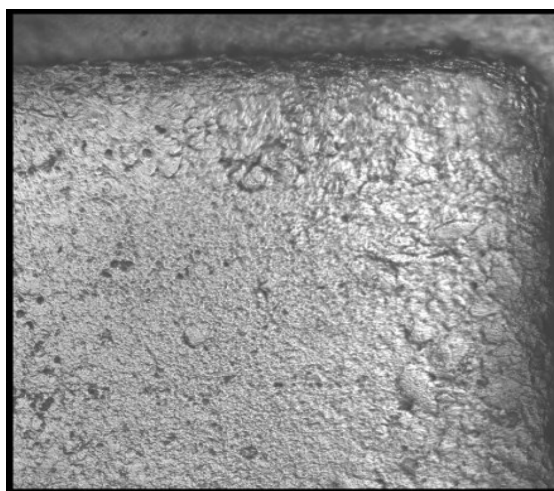
*Tab. 2* Rozměry prvního vzorku tvořeného jemnými proužky

Jednotlivé parametry 1. vzorku [-]	Referenční rozměr [ $\mu\text{m}$ ]
Podkladová destička (osa x)	$2 \cdot 10^4$
Podkladová destička (osa y)	$2 \cdot 10^4$
Podkladová destička (osa z)	$2 \cdot 10^3$
Odsazení z každé strany	500
Výška pásků	100
Šířka pásků	100
Mezera mezi pásy	10



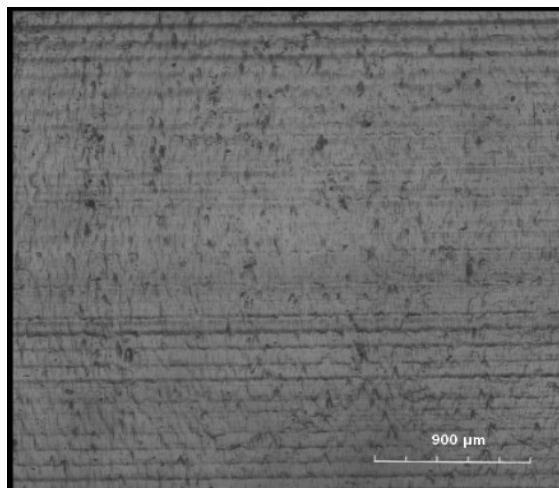
*Obr. 53 Struktura prvního vzorku tvořeného jemnými proužky, tisk 0°, zvětšeno 40x*

První vzorek byl ještě vyfocen na okraji na *Obr. 54* objektivem se zvětšením 10x, ale nebylo dosaženo uspokojivějších výsledků. I když při navrhování rozměrů struktury byly dodrženy minimální rozměry uváděné výrobcem 3D tiskárny, přesto výsledek nedopadl dle očekávání. Struktura pravidelných pásků neoddělitelně splynula. Důvodem by mohl být použitý materiál (pryskyřice pod obchodním označením Clear). Jelikož nebylo k 3D tisku vyzkoušeno více materiálů, není možné s jistotou říci, jestli pouze Clear pryskyřice nedosahuje předepsané přesnosti, nebo i ostatní materiály nabízené výrobcem.



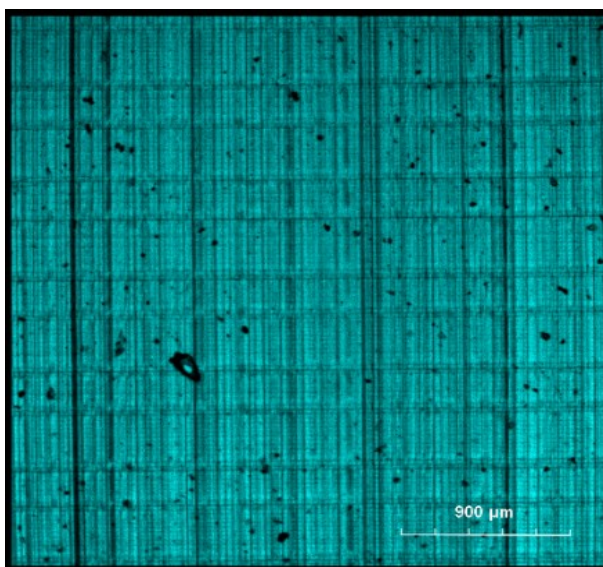
*Obr. 54 Okraj prvního vzorku tvořeného jemnými proužky, tisk 0°, zvětšeno 100x*

Následující vzorky stejné struktury vytisknuté pod úhlem 45° a 90° byly zkoumány z důvodu předpokládaného stečení pryskyřice při vytvrzování laserem. Při použitém úhlu tisku 45° jsou na *Obr. 55* ve struktuře patrné známky pravidelných proužků, z nichž se povrch skládá. Kromě struktury je vidět i stečení pryskyřice ve směru náklonu.



*Obr. 55 Struktura prvního vzorku tvořeného jemnými proužky, tisk 45°, zvětšeno 40x*

Při použitém úhlu tisku 90° není možné rozpoznat jednotlivé pásy ani směr náklonu vzorku ze stečené pryskyřice. Tento vzorek je uveden na *Obr. 56*.



*Obr. 56 Struktura prvního vzorku tvořeného jemnými proužky, tisk 90°, zvětšeno 40x*

K diskusi uvedených obrázků je možné říci, že struktura pravidelných pásků je patrná pouze při použitém úhlu tisku 45°, nevýhodou však je, že úhel tisku má nežádoucí účinek na kvalitu výsledného povrchu. Z detailního prozkoumání povrchu vytisknutého pod úhlem 45° vyplývá, že v rovině tisku vznikají shluky stečeného materiálu. Co se týče povrchové struktury vzorků vytisknutých pod úhlem 0° a 90°, není možné z pořízených snímků strukturu hodnotit.

### 12.1.3 Měření povrchové struktury pravidelné sítě válečků v závislosti na úhlu tisku

Následovalo měření druhého vzorku, jehož struktura je tvořena pravidelnou sítí válečků (teček) o rozměrech uvedených v *Tab. 3*.

*Tab. 3 Rozměry druhého vzorku tvořeného pravidelnou sítí teček*

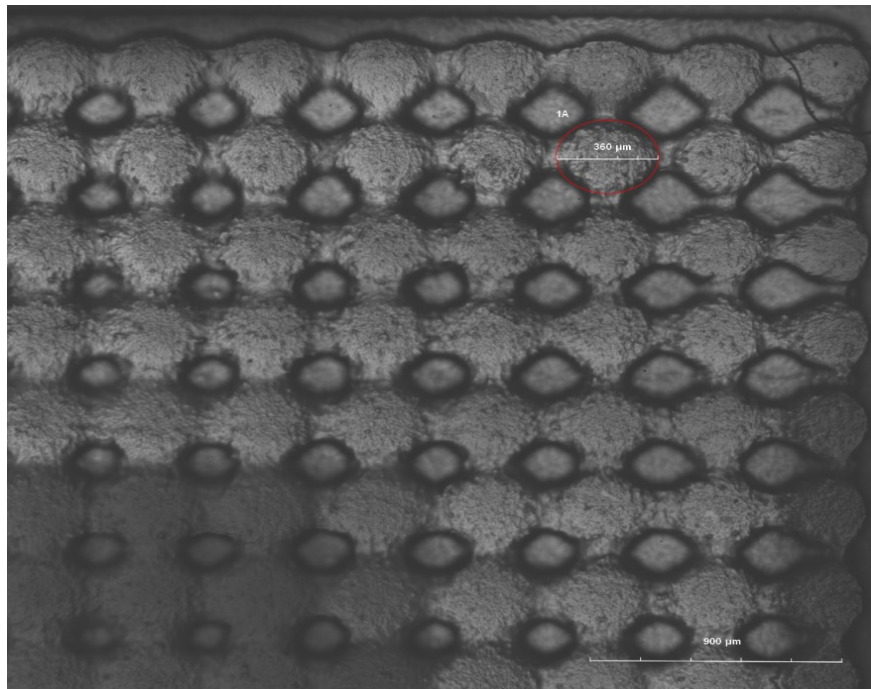
Jednotlivé parametry 2. vzorku [-]	Referenční rozměr [ $\mu\text{m}$ ]
Podkladová destička (osa x)	$2 \cdot 10^4$
Podkladová destička (osa y)	$2 \cdot 10^4$
Podkladová destička (osa z)	$2 \cdot 10^3$
Odsazení z každé strany	500
Výška válečků	200
Průměr válečků	200
Vzdálenost mezi středy válečků	400

Postup měření zůstal zachován jako v předchozím případě. Nejprve byl zkoumán vzorek vytisknutý pod úhlem  $0^\circ$ , poté následovaly další úhly. Na *Obr. 57* je zobrazena krajní struktura druhého vzorku a na *Obr. 58* prostředek zkoumaného vzorku. Z uvedených obrázků je patrný rozdíl ve velikosti struktury. Referenční průměr válečků byl zvolen  $200 \mu\text{m}$  a skutečný rozměr byl naměřen  $360 \mu\text{m}$  na okraji vzorku a  $380 \mu\text{m}$  uprostřed struktury.

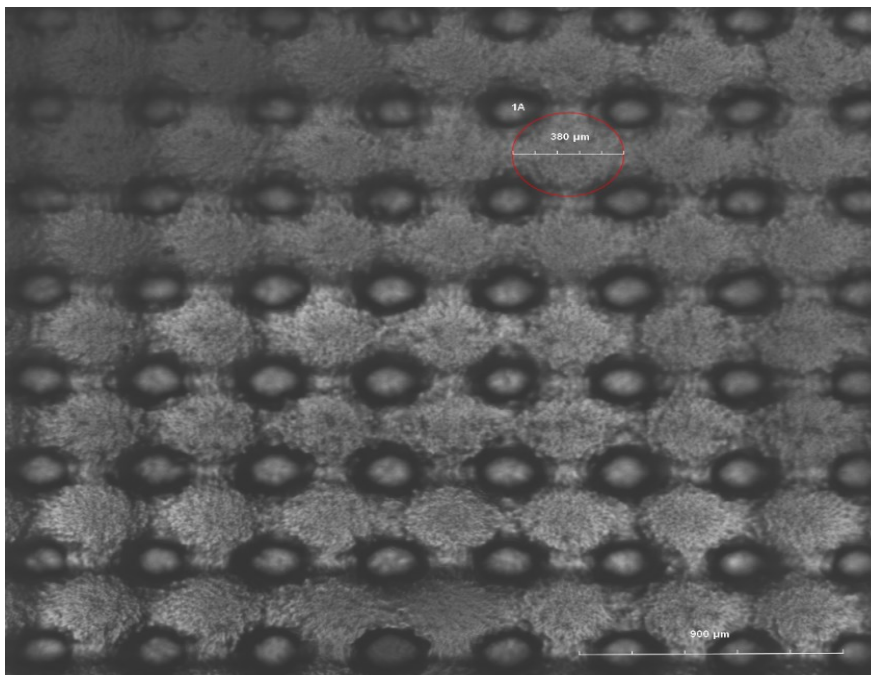
Na další dvojici obrázků *Obr. 59* a *Obr. 60* je znázorněna stejná struktura vytisknutá pod úhlem  $45^\circ$ . Na první pohled je z obou obrázků patrné jemné stečení pryskyřice v jednom směru. Referenční průměr válečků byl opět  $200 \mu\text{m}$  a skutečný průměr byl naměřen  $330 \mu\text{m}$  v krajní části vzorku a  $340 \mu\text{m}$  uprostřed zmíněné struktury. To, že se struktura vytisknutá pod úhlem  $45^\circ$  více blíží referenčnímu rozměru přisuzují vlivu použitého úhlu tisku.

V případě poslední dvojice obrázků *Obr. 61* a *Obr. 62* byl použit úhel tisku  $90^\circ$ . S jistotou mohu konstatovat, že použitý úhel tisku měl naprosto negativní vliv na vytvářenou strukturu. Původní síť válečků (teček) byla natolik změněna, že už se nejedná o válečky o určitém průměru, ale jejich rozměry se významně liší v příčném a podélném směru. Příčný směr označuje rovinu kolmou na směr tisku a podélný směr je shodný s rovinou tisku. V příčném směru není rozdíl, jestli se nacházíme na okraji nebo uprostřed vzorku, deformace struktury je shodná a to  $340 \mu\text{m}$  oproti původním  $200 \mu\text{m}$ . Rozdíl v deformaci struktury nastává v rovině tisku. V krajní části vzorku byla naměřena hodnota  $350 \mu\text{m}$  a uprostřed až  $390 \mu\text{m}$ .

Barevné provedení obrázků je rozdílné z toho důvodu, že snímky povrchu jsou tvořeny všemi obrazovými kanály. Jednotlivým nastavováním intenzity a citlivosti laseru každého obrazového kanálu získáme optimální podobu výsledných snímků z každého obrazového kanálu. Pro prezentaci výsledků v této práci byl vždy vybrán snímek s nejlepší vypovídající hodnotou.

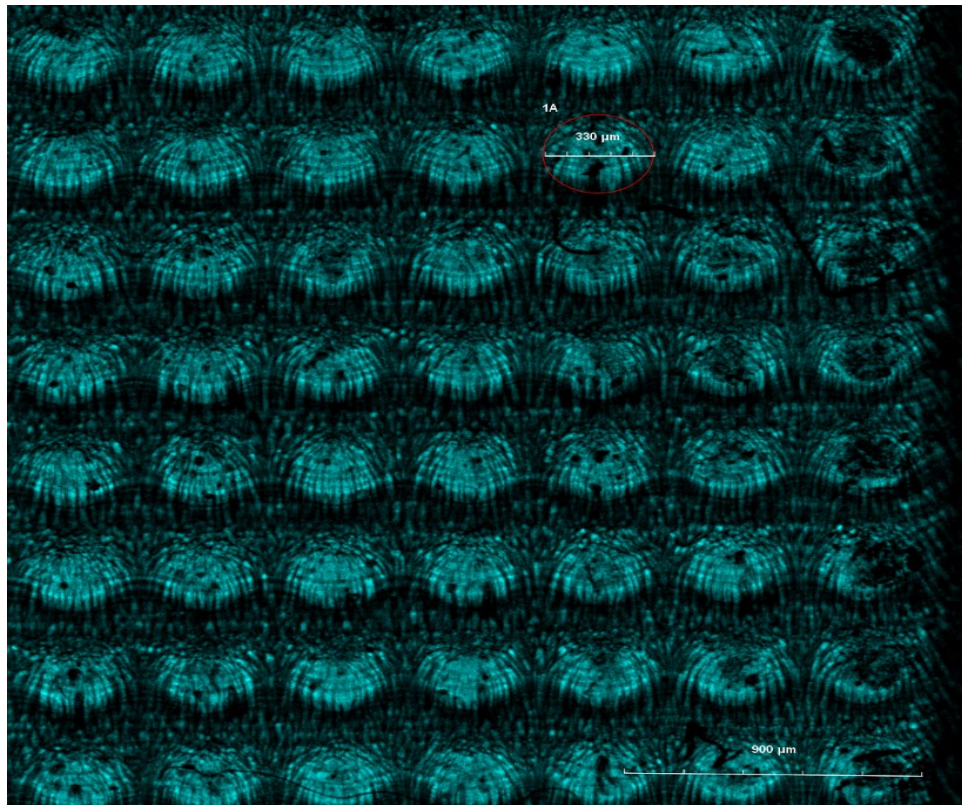


*Obr. 57 Okraj druhého vzorku tvořeného pravidelnou sítí teček, tisk 0°, zvětšeno 40x*

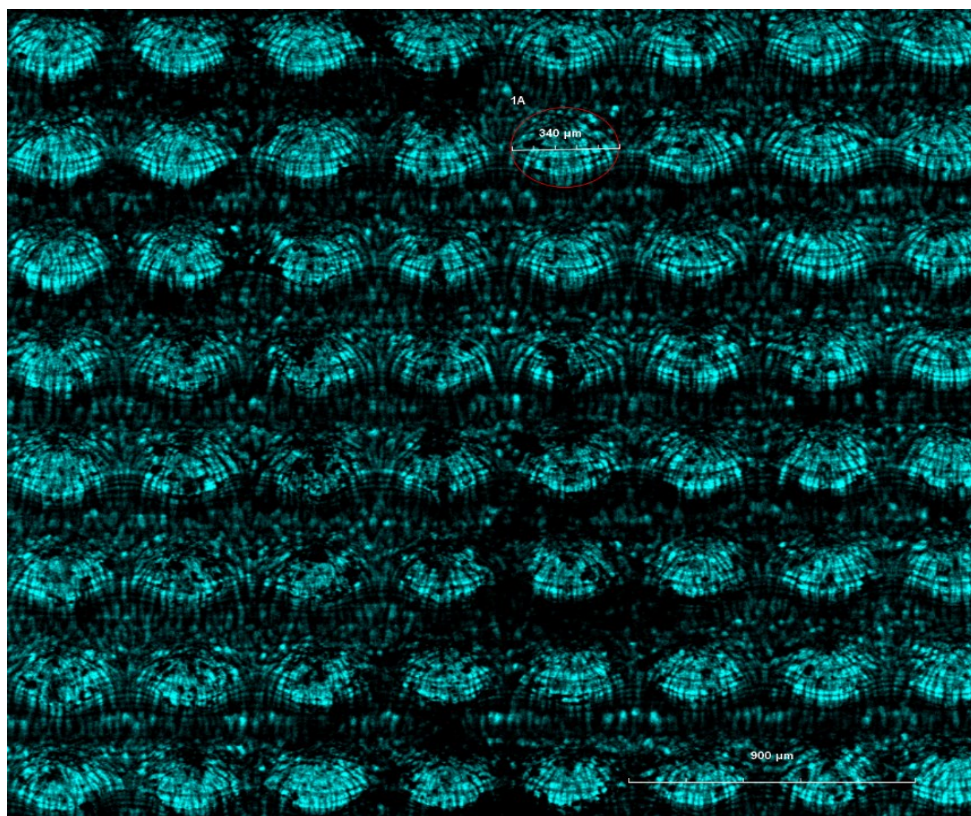


*Obr. 58 Prostředek druhého vzorku tvořeného pravidelnou sítí teček, tisk 0°, zvětšeno 40x*

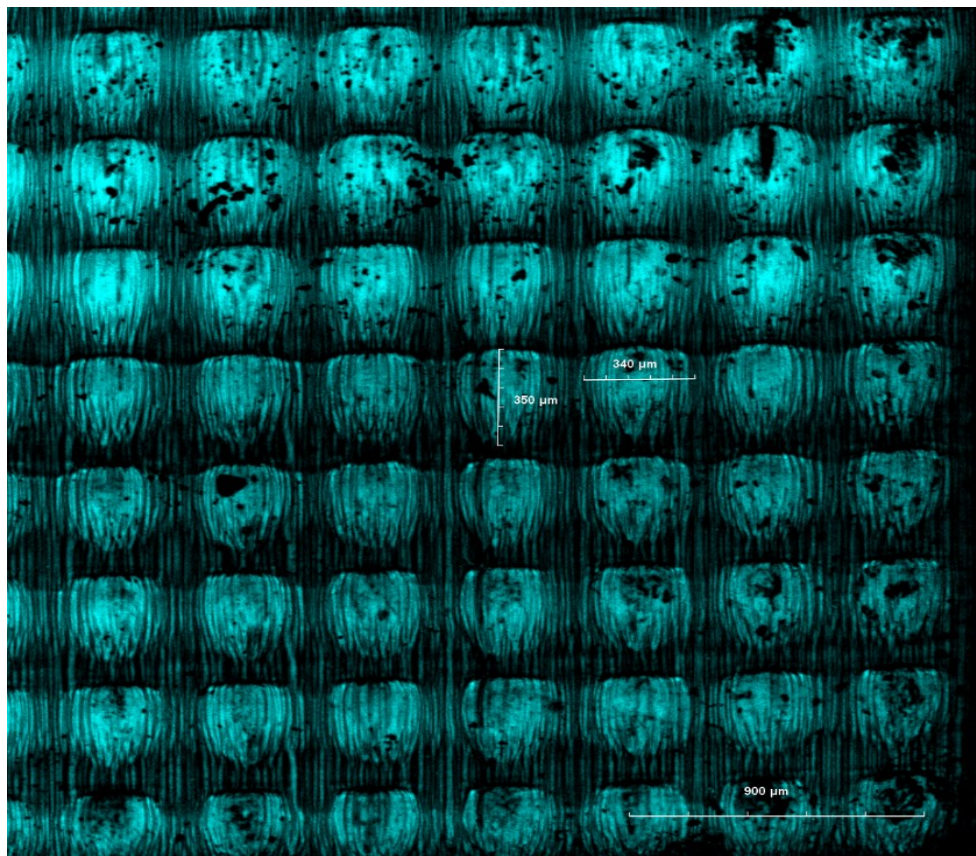




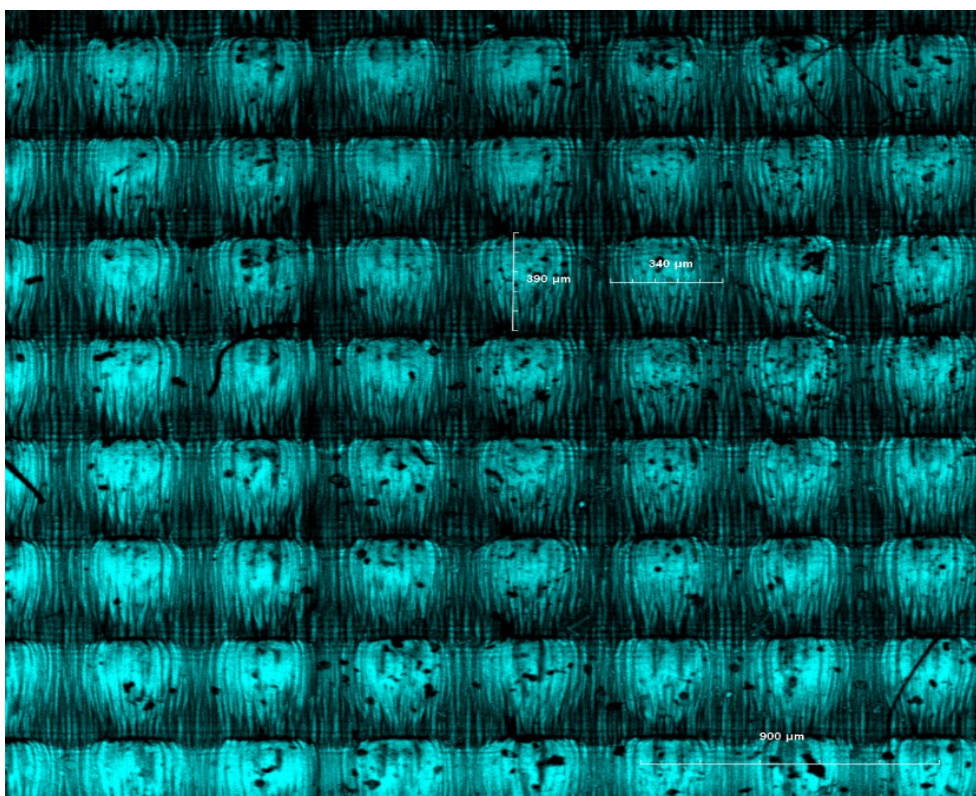
Obr. 59 Okraj druhého vzorku tvořeného pravidelnou sítí teček, tisk 45°, zvětšeno 40x



Obr. 60 Prostředek druhého vzorku tvořeného pravidelnou sítí teček, tisk 45°, zvětšeno 40x



Obr. 61 Okraj druhého vzorku tvořeného pravidelnou sítí teček, tisk 90°, zvětšeno 40x



Obr. 62 Prostředek druhého vzorku tvořeného pravidelnou sítí teček, tisk 90°, zvětšeno 40x

### 12.1.4 Měření povrchové struktury prodlužujících se čárek v závislosti na úhlu tisku

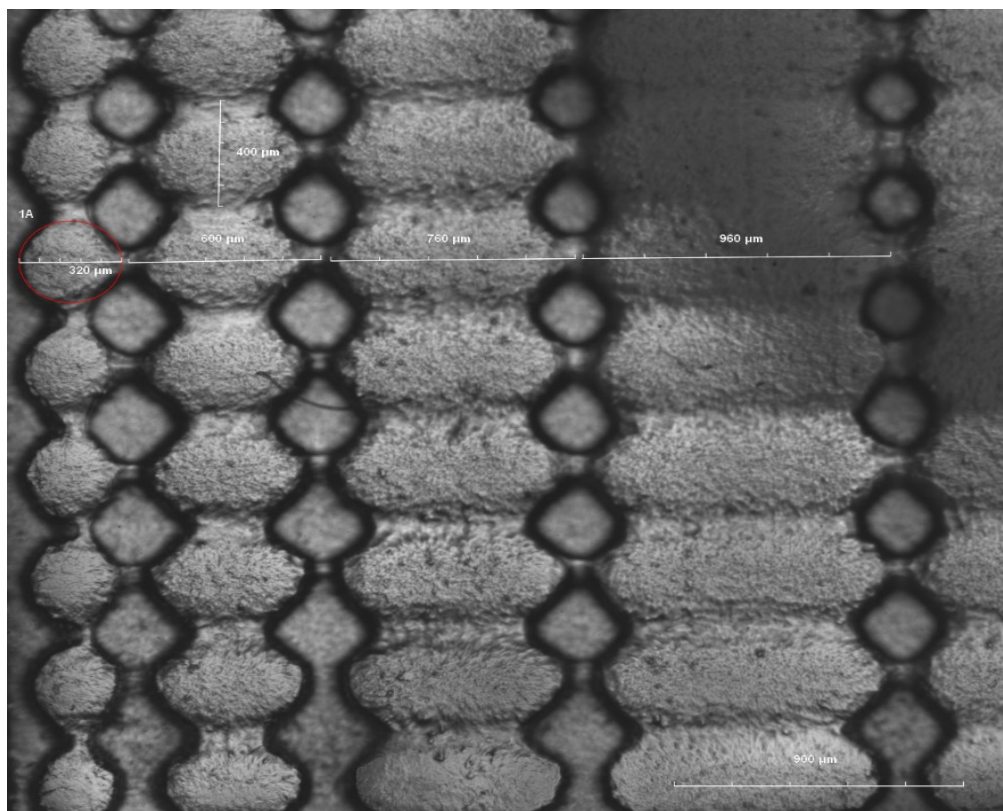
Měření první sady vzorků bylo zakončeno zkoumáním nepravidelné struktury třetího vzorku, kterou tvoří soustava počínaje sloupcem teček o shodném průměru jako v předchozím případě a pokračuje jednotlivými sloupci čárek, jejichž délka se prodlužuje vždy o 200  $\mu\text{m}$ . Rozměry třetího vzorku jsou pro názornost opět uvedeny v *Tab. 4*.

*Tab. 4 Rozměry třetího vzorku tvořeného prodlužujícími se čárkami*

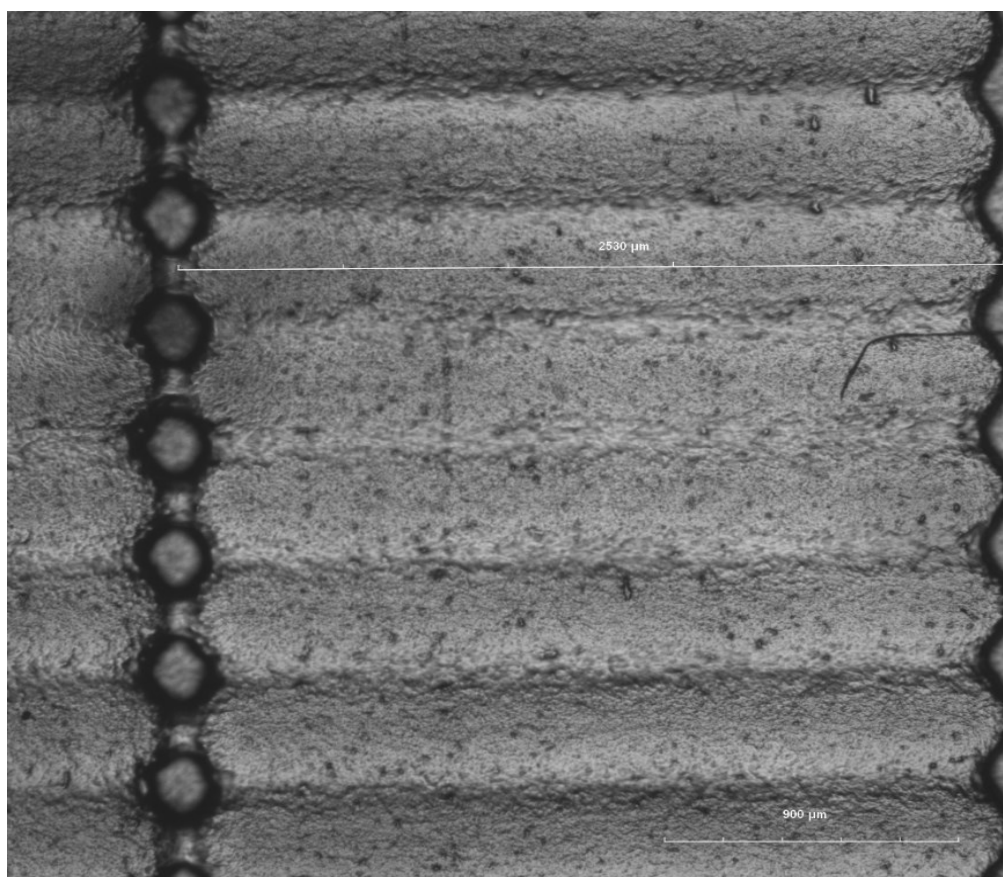
Jednotlivé parametry 3. vzorku [-]	Referenční rozměr [ $\mu\text{m}$ ]
Podkladová destička (osa x)	$2 \cdot 10^4$
Podkladová destička (osa y)	$2 \cdot 10^4$
Podkladová destička (osa z)	$2 \cdot 10^3$
Odsazení z každé strany	500
Výška teček / čárek	200
Průměr tečky	200
Délka 1. čárky	400
Délka 2. čárky	600
Délka 3. čárky	800
Délka poslední čárky	2400
Vzdálenost mezi tečkou a 1. čárkou	200
Vzdálenost mezi ostatními čárkami	200

Na následujících obrázcích *Obr. 63* až *Obr. 68* je vyfocen třetí vzorek opět ve třech použitých úhlech tisku a vždy je provedeno srovnání dvou krajních struktur. Z *Obr. 63* a *Obr. 64* je patrné roztečení celé struktury čárek. Toto splynutí struktury má za následek, že šířka čárek nebude rozměrově hodnocena v následujících tabulkách.

Referenční délky čárek uvedené v *Tab. 4*, se od naměřených rozměrů opět liší. Záleží na použitých úhlech tisku i rozměrech struktury. Konkrétní rozměrové hodnocení třetího vzorku vytisknutého pod jednotlivými úhly je provedeno v *Tab. 5*, *Tab. 6* a *Tab. 7*.



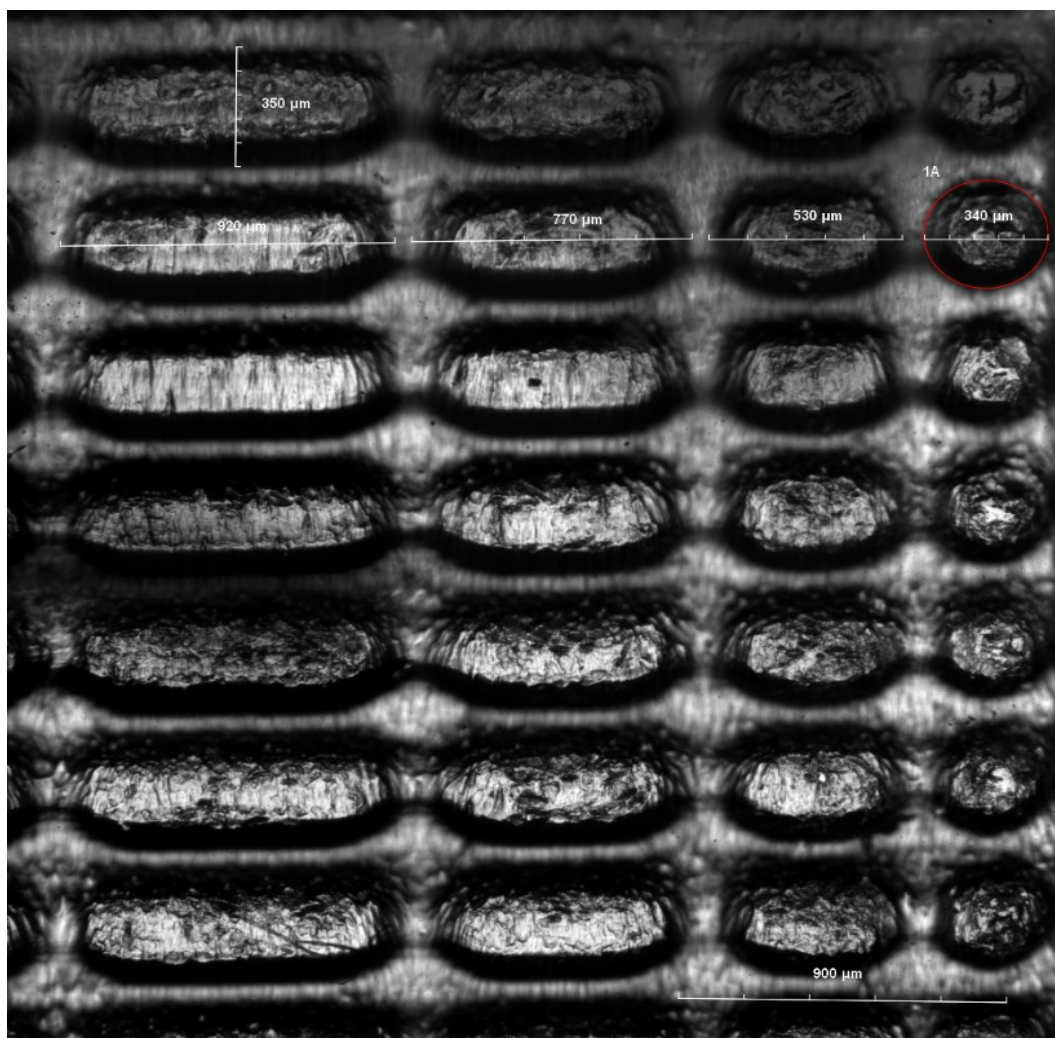
Obr. 63 Třetí vzorek tvořený prodlužujícími se čárkami, levý okraj, tisk 0°, zvětšeno 40x



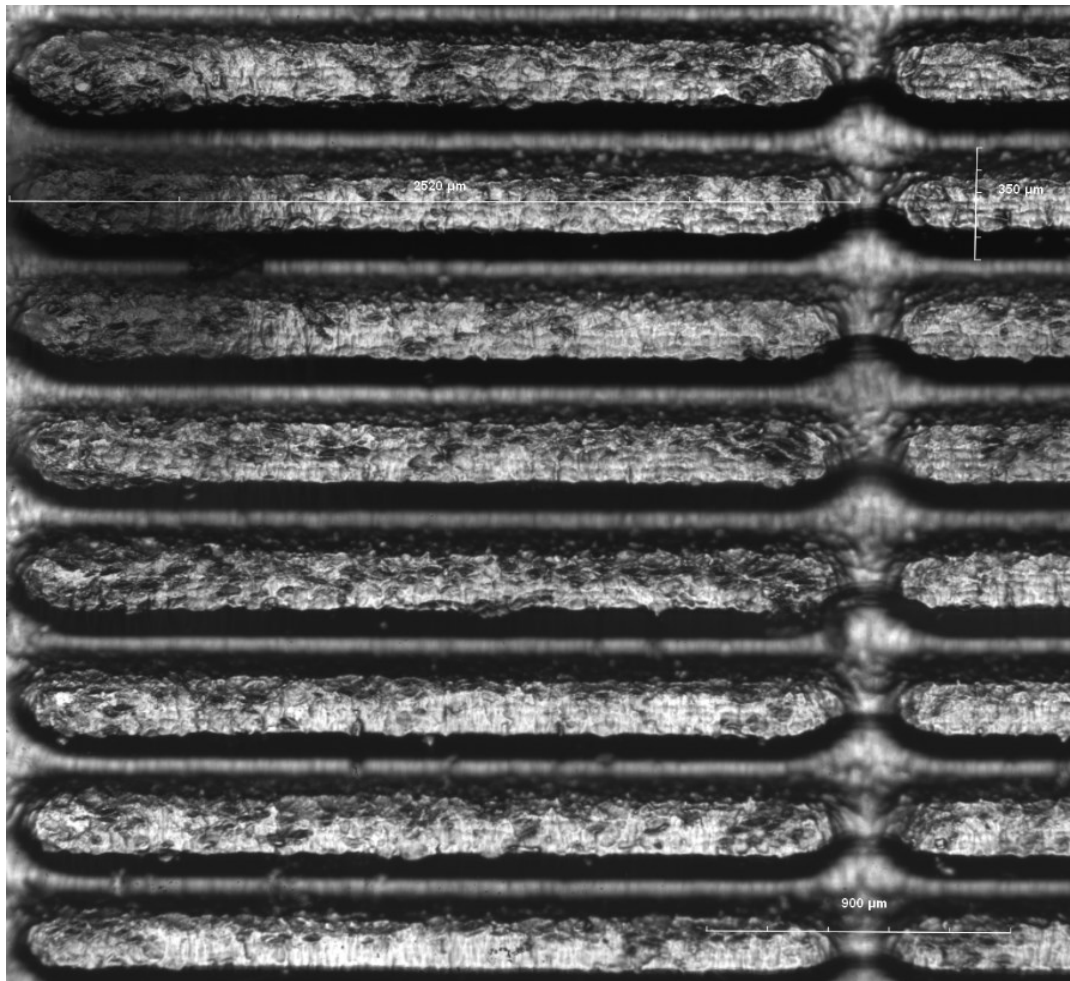
Obr. 64 Třetí vzorek tvořený prodlužujícími se čárkami, pravý okraj, tisk 0°, zvětšeno 40x

Tab. 5 Přehled rozměrů natisknuté struktury ve srovnání s navrženou strukturou třetího vzorku tvořeného prodlužujícími se čárkami, tisk 0°

Tvar zkoumané struktury	Navržený rozměr [μm]	Naměřený rozměr [μm]	Rozměrová deformace [μm]
Počáteční tečka	200	320	120
První čárka	400	600	200
Druhá čárka	600	760	160
Třetí čárka	800	960	160
Poslední čárka	2400	2530	130
Šířka čárek	200	400	200



Obr. 65 Třetí vzorek tvořený prodlužujícími se čárkami, pravý okraj, tisk 45°, zvětšeno 40x



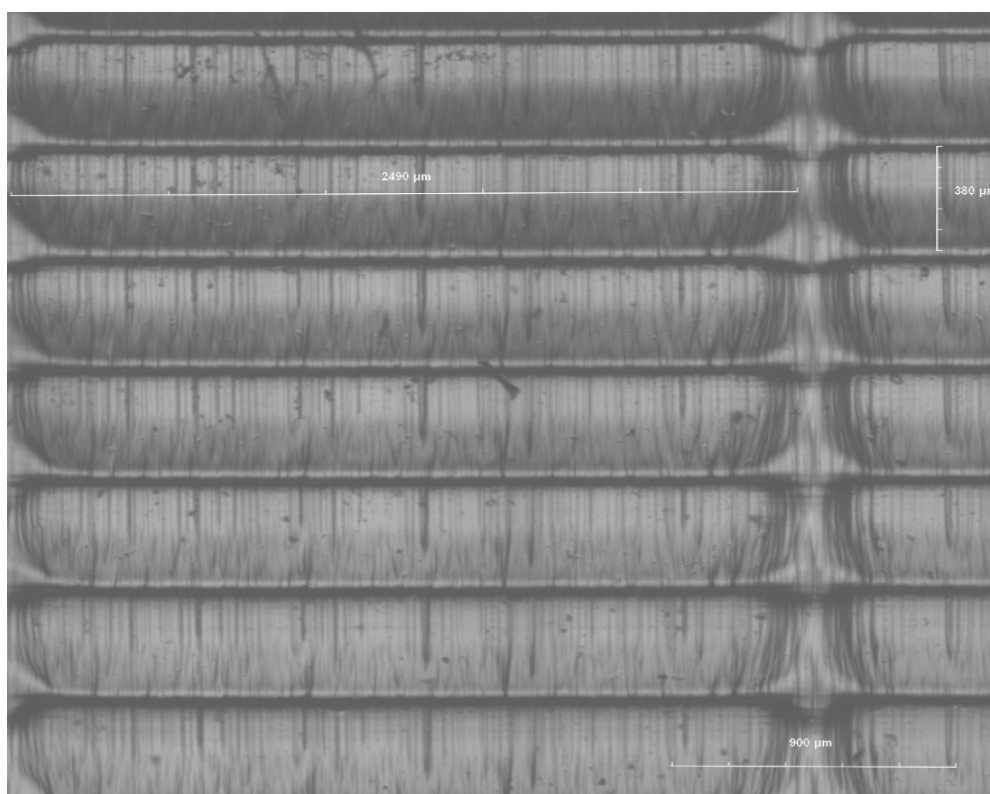
Obr. 66 Třetí vzorek tvořený prodlužujícími se čárkami, levý okraj, tisk 45°, zvětšeno 40x

Tab. 6 Přehled rozměrů natisknuté struktury ve srovnání s navrženou strukturou třetího vzorku tvořeného prodlužujícími se čárkami, tisk 45°

Tvar zkoumané struktury	Navržený rozměr [μm]	Naměřený rozměr [μm]	Rozměrová deformace [μm]
Počáteční tečka	200	340	140
První čárka	400	530	130
Druhá čárka	600	770	170
Třetí čárka	800	920	120
Poslední čárka	2400	2520	120
Šířka čárek	200	350	150



Obr. 67 Třetí vzorek tvořený prodlužujícími se čárkami, pravý okraj, tisk 90°, zvětšeno 40x



Obr. 68 Třetí vzorek tvořený prodlužujícími se čárkami, levý okraj, tisk 90°, zvětšeno 40x

Tab. 7 Přehled rozměrů natisknuté struktury ve srovnání s navrženou strukturou třetího vzorku tvořeného prodlužujícími se čárkami, tisk 90°

Tvar zkoumané struktury	Navržený rozměr [μm]	Naměřený rozměr [μm]	Rozměrová deformace [μm]
Počáteční tečka	200	370	170
První čárka	400	520	120
Druhá čárka	600	750	150
Třetí čárka	800	930	130
Poslední čárka	2400	2490	90
Šířka čárek	200	380	180

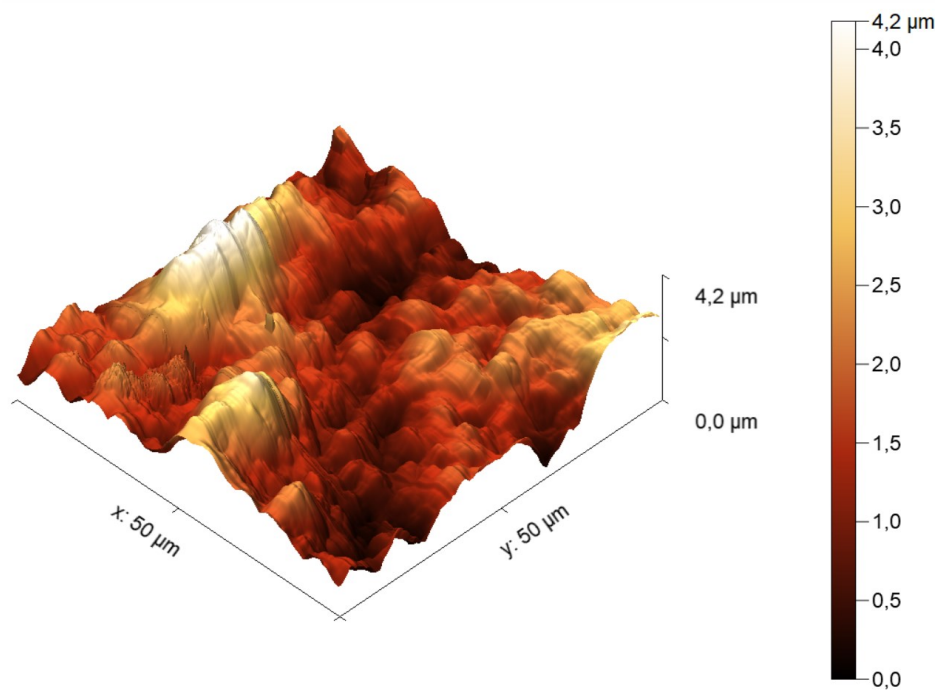
Cílem tohoto měření bylo zhodnotit, zda se budou stejné vzorky vytisknuté pod různými úhly rozměrově lišit. Ke zhodnocení právě uvedených snímků povrchu a tabulek s rozměry mohu říci, že úhel tisku ovlivňuje tvar a celkovou kvalitu vytisknutého povrchu. Bylo prokázáno, že při tisku pod různými úhly se struktury rozměrově liší, ale nejmarkantnější rozměrové odchylky byly způsobeny samotnou 3D tiskárnou a použitým materiálem. Z provedeného měření rovněž plyne, že povrchové struktury nejsou dokonale hladké. Při zaostření na povrch jednotlivých čárek tvořící strukturu, jsou na snímcích patrné tmavé skvrny. Tyto skvrny jsou důsledkem toho, že v daném místě na povrchu existuje převýšení.

## 12.2 Zkoumání vzorků mikroskopii atomárních sil

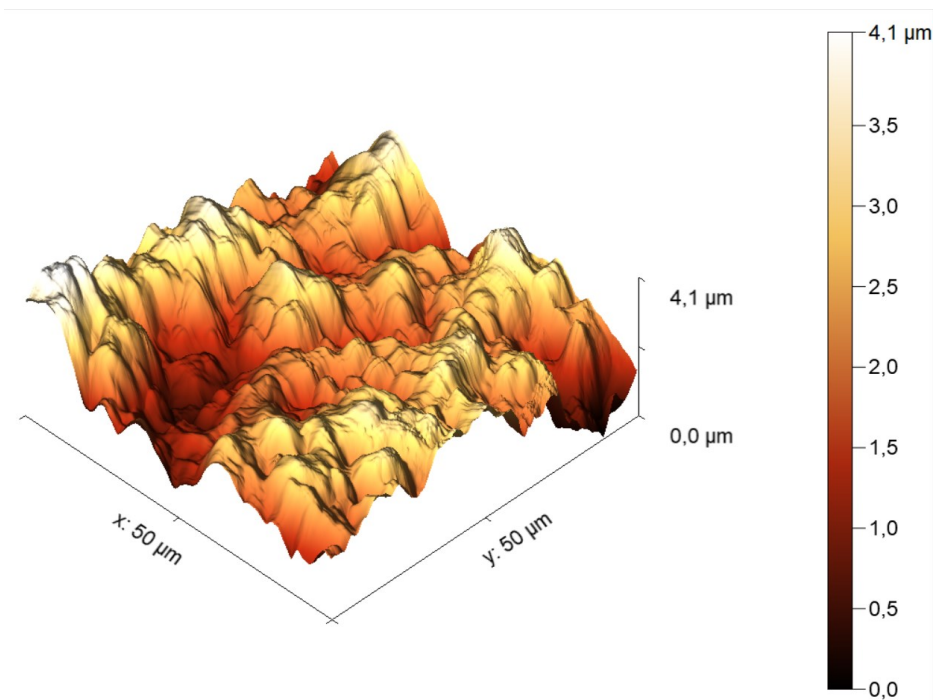
Mikroskopie atomárních sil byla začleněna do práce jako doplňková metoda z důvodu detailního zmapování vybrané části povrchu. Pro podrobné zkoumání byl vybrán třetí vzorek tvořený prodlužujícími se čárkami, hodnocený z hlediska naměřených rozměrů struktury v předchozí podkapitole. Konfokálním mikroskopem byl povrch jednotlivých vzorků zkoumán komplexně. Zajímaly nás rozměry jednotlivých teček, popřípadě čárek, a to, jak se liší od referenčního rozměru. Mikroskopie atomárních sil umožňuje pozorovat pouze malý výřez z povrchu vzorku, v tomto případě se jednalo o čtverec s rozměry 50 μm x 50 μm. Touto technologií byl zkoumán pouze povrch jedné čárky ve struktuře třetího vzorku. Dosud byla struktura hodnocena v osách x a y. Mikroskopii atomárních sil zhodnotíme převýšení povrchu v ose z jedné konkrétní čárky opět s ohledem na použitý úhel tisku.

Na následujících obrázcích Obr. 69 až Obr. 74 jsou uvedeny jednotlivá převýšení pro třetí vzorek povrchu vytisknutého pod úhly 0°, 45° a 90°.



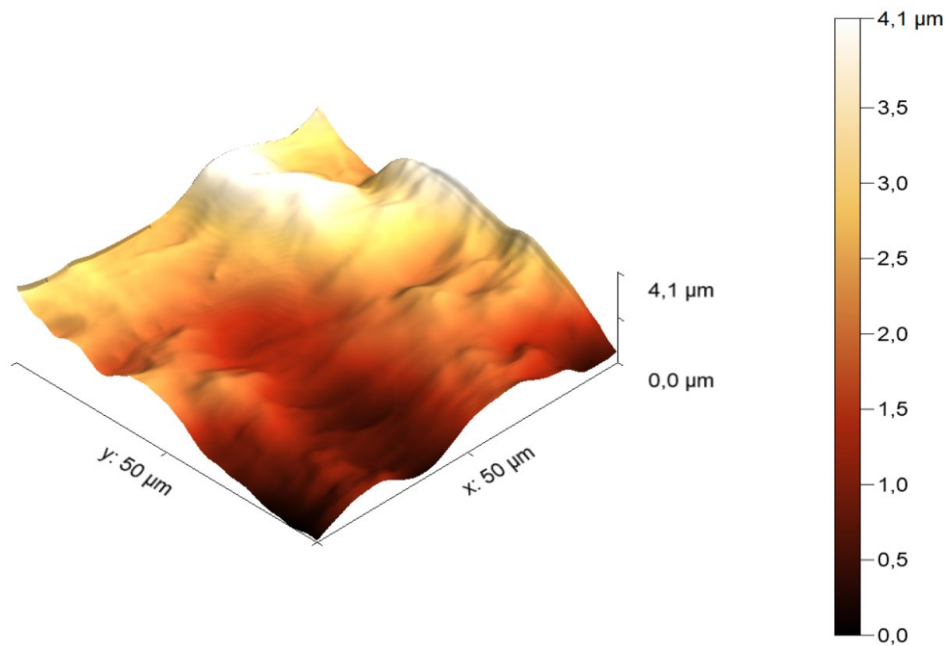


Obr. 69 Převýšení třetího vzorku při úhlu tisku 0°

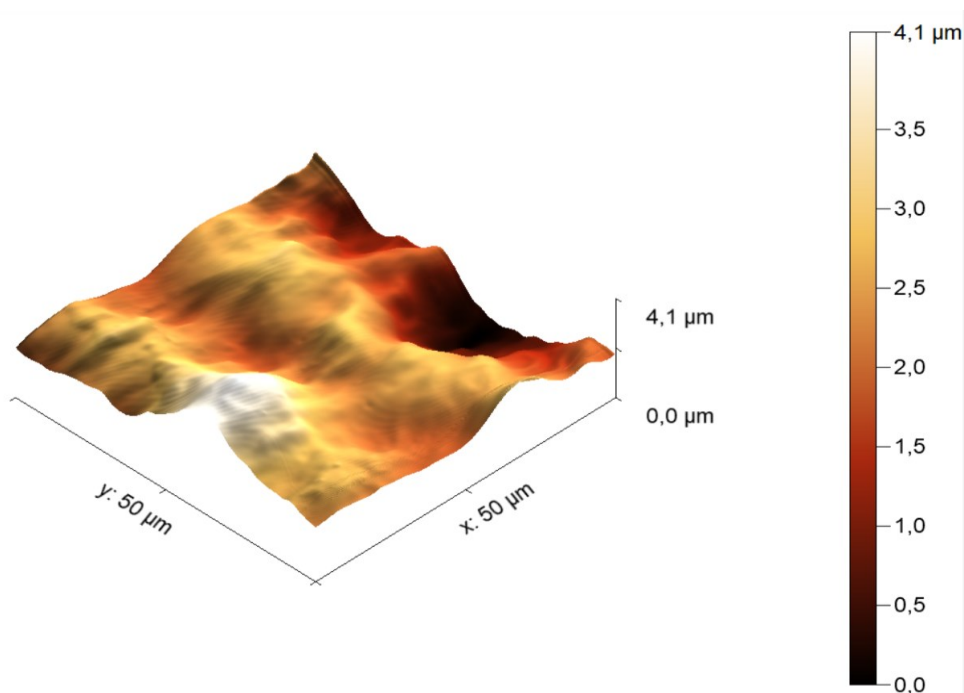


Obr. 70 Kontrolní převýšení třetího vzorku při úhlu tisku 0°

Z uvedených snímků vyplývá, že při úhlu tisku 0° jsou na povrchu mnohačetná převýšení s maximální hodnotou 4,2 μm. Pro upřesnění je nutno dodat, že zde pozorujeme obrázky s mnohonásobným zvětšením, protože jednotlivé elementy tvořící strukturu povrchu, jehož malou část pozorujeme jsou v řádu stovek μm a hodnocené převýšení v jednotkách μm.

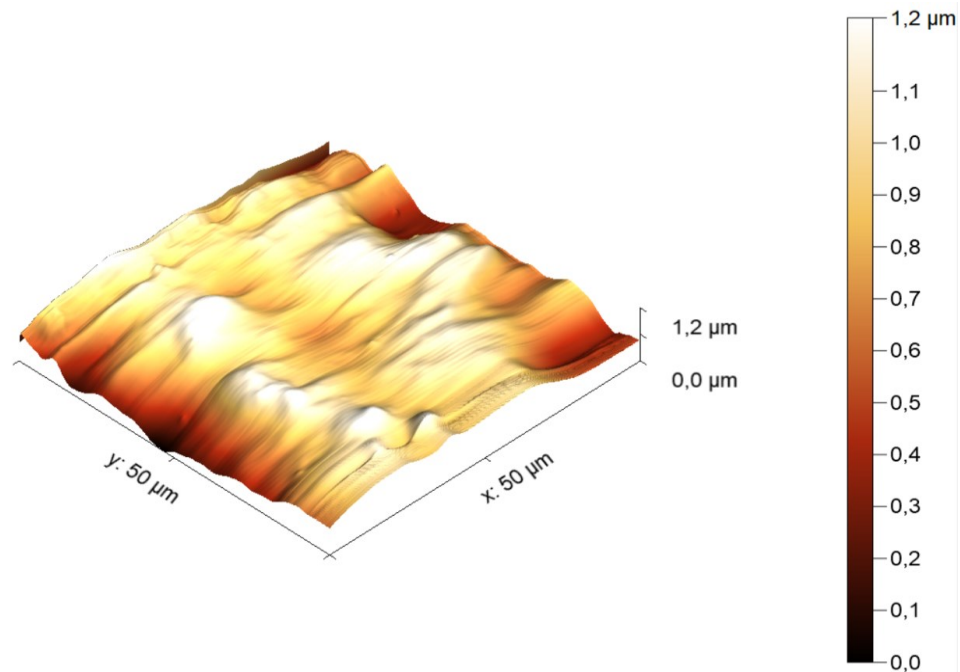


Obr. 71 Převýšení třetího vzorku při úhlu tisku 45°

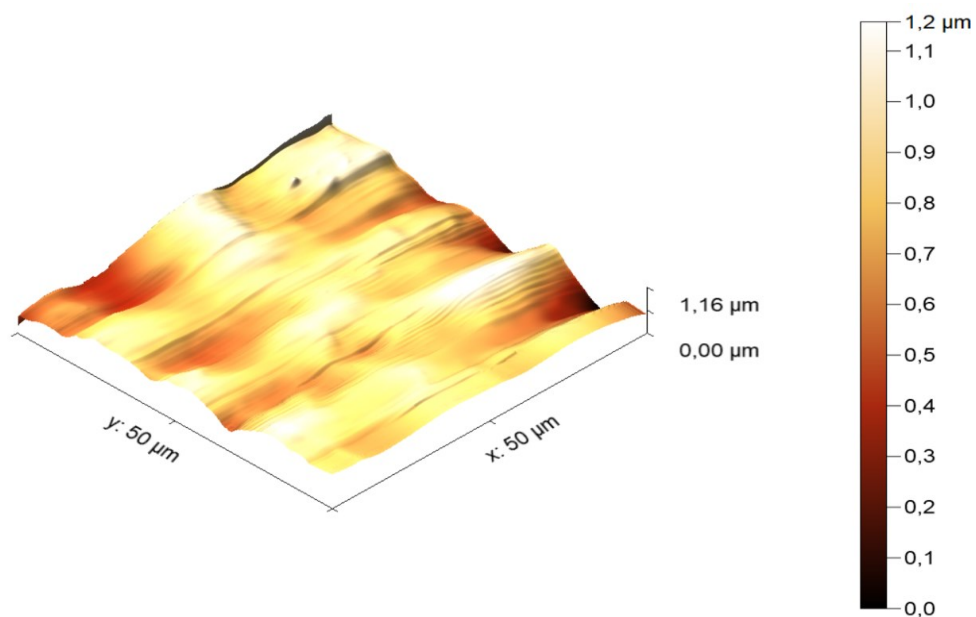


Obr. 72 Kontrolní převýšení třetího vzorku při úhlu tisku 45°

Při použití 45° náklonu povrch vykazuje převýšení se srovnatelnou maximální hodnotou 4,1 μm jako v předešlém případě. Hlavním rozdílem zůstává tvar povrchu. Použitím technologie AFM bylo prokázáno, že tisk pod úhlem vede k plynulejším přechodům ve výškovém profilu materiálu a převýšení nejsou tak ostrá jako při horizontálním tisku, protože na vytvrzovanou pryskyřici působí i použitý náklon.



Obr. 73 Převýšení třetího vzorku při úhlu tisku 90°



Obr. 74 Kontrolní převýšení třetího vzorku při úhlu tisku 90°

Jak je patrné z uvedených obrázků, při použití vertikálního tisku, bylo dosaženo povrchu s nejmenším převýšením a maximální hodnotou 1,2 μm. Z hlediska výškového profilu struktury dosahuje povrch vytisknutý s 90° náklonem nejplynulejších přechodů.

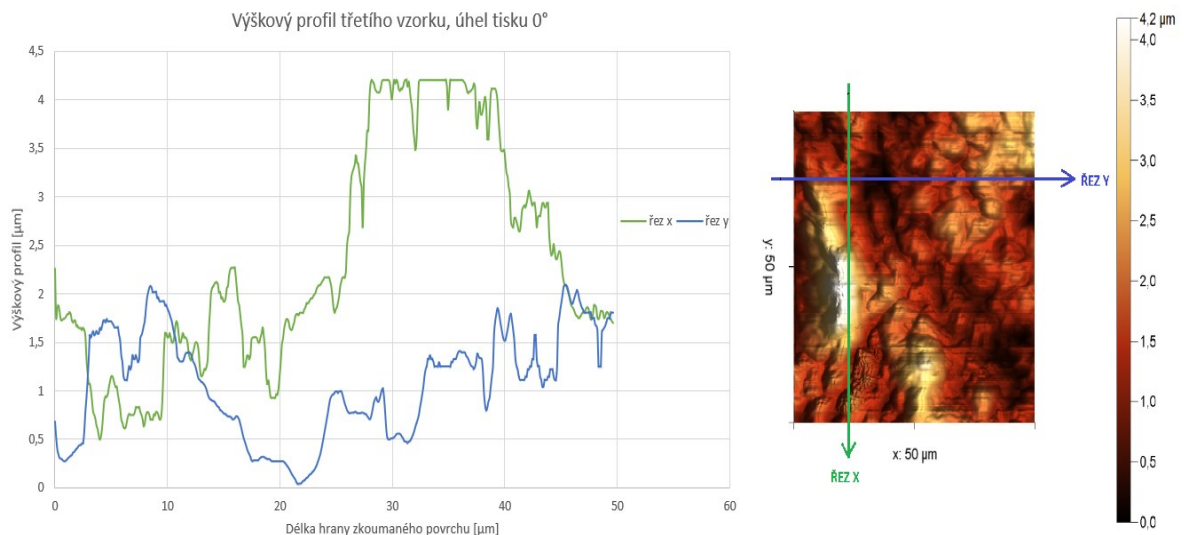
Pro každý úhel tisku byl povrch zmapován z hlediska barevného vykreslení existujícího převýšení a kontrolní měření bylo provedeno pro ověření správnosti získaných výsledků.

Mikroskopie atomárních sil mimo jiné umožňuje zjistit drsnost povrchu. Pro zjištění konkrétní drsnosti použitých vzorků s ohledem na úhel sklonu byl v této práci použit parametr  $R_a$ . Jednotlivé vypočtené hodnoty jsou uvedeny v *Tab. 8*.

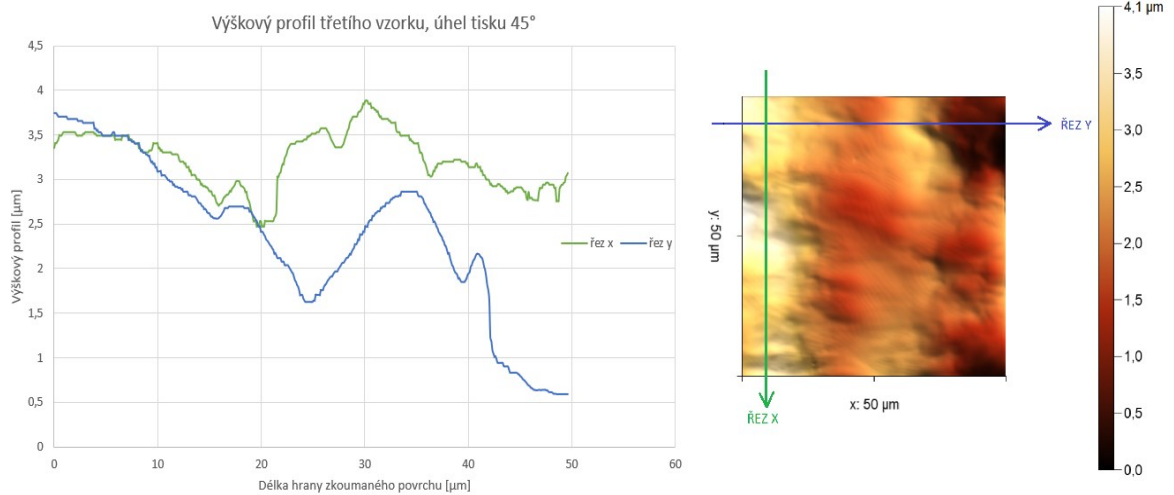
*Tab. 8 Vypočtené hodnoty jednotlivých parametrů  $R_a$  pro konkrétní povrchy s ohledem na použitý úhle tisku*

Náklon povrchu při 3D tisku [°]	Hodnoty parametru $R_a$ [μm]
0	0,59
45	0,53
90	0,15

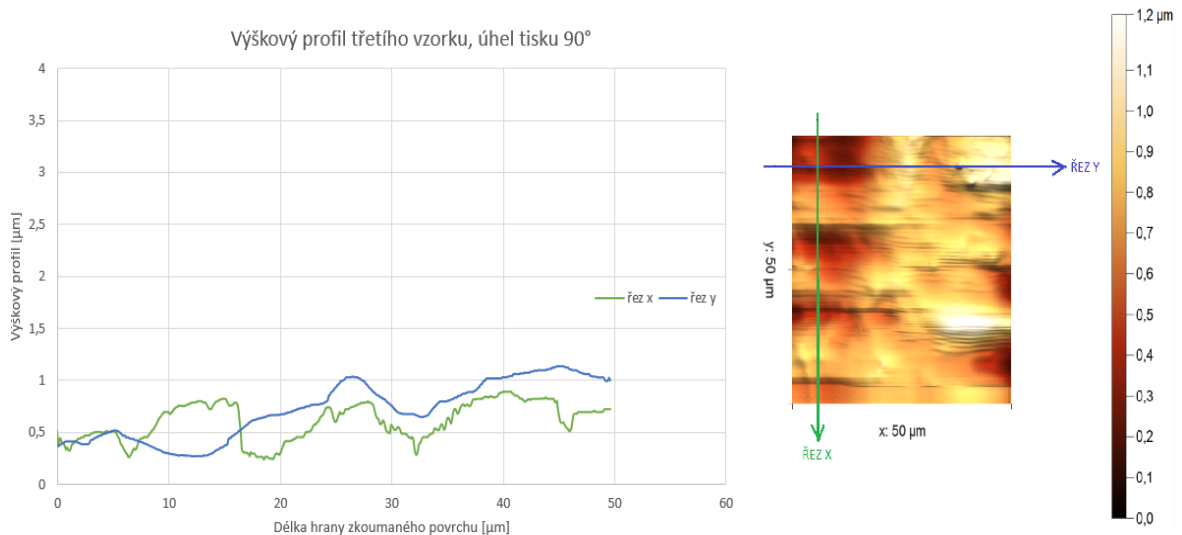
Z uvedené *Tab. 8* je patrné, že drsnost klesá se sklonem tisku, při úhlu tisku  $90^\circ$  je stékání velmi výrazné a drsnost je malá. Při úhlu tisku  $0^\circ$  a  $45^\circ$  jsou hodnoty  $R_a$  téměř srovnatelné, protože úhel tisku natolik neovlivňuje stečení povrchové struktury. Omezení vypovídající hodnoty drsnosti povrchu vidím v tom, že pro jednotlivé povrchy je pouze jeden výsledek. Tento výsledek nijak neobjasňuje zvlnění povrchu, či jeho náklon. Na následujících obrázcích (*Obr. 75*, *Obr. 76* a *Obr. 77*) je podrobně znázorněn výškový profil pro konkrétní úhel tisku třetího vzorku.



*Obr. 75 Výškový profil třetího vzorku, úhel tisku  $0^\circ$  (vlevo), konkrétní zkoumané místo řezu na vzorku, pohled shora (vpravo)*



Obr. 76 Výškový profil třetího vzorku, úhel tisku 45° (vlevo), konkrétní zkoumané místo řezu na vzorku, pohled shora (vpravo)



Obr. 77 Výškový profil třetího vzorku, úhel tisku 90° (vlevo), konkrétní zkoumané místo řezu na vzorku, pohled shora (vpravo)

Z uvedených obrázků vyplývá, že drsnost opravdu klesá s úhlem tisku a povrch má s rostoucím úhlem tisku plynulejší přechody ve výškovém profilu.

### 13 MĚŘENÍ VZORKŮ S HRUBŠÍ POVRCHOVOU STRUKTUROU VYTISKNUTÝCH POUZE POD ÚHLEM 0°

V předchozí kapitole byly podrobně změřeny jednotlivé vzorky vytisknuté pod třemi různými úhly a bylo zjištěno, že naměřené hodnoty povrchových struktur se významně liší od původních navržených rozměrů. Tvarové odchylky jsou z části způsobeny použitým úhlem tisku, ale hlavním důvodem délkových deformací byla zvolená velikost struktury.

I když byly zachovány minimální rozměry uváděné výrobcem 3D tiskárny, přesto byla kvalita struktury značně rozdílná. Tato chyba mohla být způsobena použitým materiálem v kombinaci se pracovním postupem 3D tiskárny. Po vytvrzení jedné vrstvy pryskyřice se tisková podložka vysune o jednu vrstvu nahoru, aby se mohla promíchat pryskyřice ve vaně. V této fázi mezi vytvrzováním jednotlivých vrstev odkapává z výtisku přebytečná nevytvrzená pryskyřice. Jelikož je pryskyřice hustá, stéká z krajů struktury doprostřed kde se může hromadit, protože navržená struktura byla dosti jemná.

Po předchozí zkušenosti s délkovou deformací natisknuté struktury, jsem se rozhodla zvětšit referenční rozměry i vzdálenosti mezi jednotlivými elementy. Druhá sada vzorků obsahuje tedy hrubší povrchovou strukturu a skládá se ze tří dvojic pravidelných struktur teček nebo čárek lišící se pouze vzdáleností od sebe, jak znázorňují poslední řádky následujících tabulek. Rozměry jednotlivých vzorků jsou tedy uvedeny v tabulkách (*Tab. 9, Tab. 10, Tab. 11*).

*Tab. 9 Navržená struktura pro první dvojici vzorků tvořená pravidelnou sítí teček, tisk 0°*

Tvar zkoumané struktury [-]	Navržený rozměr [μm]	Tvar zkoumané struktury [-]	Navržený rozměr [μm]
Podkladová destička (osa x)	$2 \cdot 10^4$	Podkladová destička (osa x)	$2 \cdot 10^4$
Podkladová destička (osa y)	$2 \cdot 10^4$	Podkladová destička (osa y)	$2 \cdot 10^4$
Podkladová destička (osa z)	$2 \cdot 10^3$	Podkladová destička (osa z)	$2 \cdot 10^3$
Odsazení z každé strany	500	Odsazení z každé strany	500
Výška teček	300	Výška teček	300
Průměr teček	300	Průměr teček	300
Mezera mezi tečkami	300	Mezera mezi tečkami	600

Tab. 10 Navržená struktura pro druhou dvojici vzorků tvořená pravidelnou sítí krátkých čárek, tisk  $0^\circ$

Tvar zkoumané Struktury [-]	Navržený rozměr [ $\mu\text{m}$ ]	Tvar zkoumané struktury [-]	Navržený rozměr [ $\mu\text{m}$ ]
Podkladová destička (osa x)	$2 \cdot 10^4$	Podkladová destička (osa x)	$2 \cdot 10^4$
Podkladová destička (osa y)	$2 \cdot 10^4$	Podkladová destička (osa y)	$2 \cdot 10^4$
Podkladová destička (osa z)	$2 \cdot 10^3$	Podkladová destička (osa z)	$2 \cdot 10^3$
Odsazení z každé strany	500	Odsazení z každé strany	500
Výška čárek	300	Výška čárek	300
Délka čárek	600	Délka čárek	600
Mezera mezi čárkami	300	Mezera mezi čárkami	600

Tab. 11 Navržená struktura pro třetí dvojici vzorků tvořená pravidelnou sítí dlouhých čárek, tisk  $0^\circ$

Tvar zkoumané struktury [-]	Navržený rozměr [ $\mu\text{m}$ ]	Tvar zkoumané struktury [-]	Navržený rozměr [ $\mu\text{m}$ ]
Podkladová destička (osa x)	$2 \cdot 10^4$	Podkladová destička (osa x)	$2 \cdot 10^4$
Podkladová destička (osa y)	$2 \cdot 10^4$	Podkladová destička (osa y)	$2 \cdot 10^4$
Podkladová destička (osa z)	$2 \cdot 10^3$	Podkladová destička (osa z)	$2 \cdot 10^3$
Odsazení z každé strany	500	Odsazení z každé strany	500
Výška čárek	300	Výška čárek	300
Délka čárek	1200	Délka čárek	1200
Mezera mezi čárkami	300	Mezera mezi čárkami	600

Jediný úhel tisku  $0^\circ$  byl použit z toho důvodu, že nejméně ovlivňuje tvarovou stálost natisknuté struktury. Při zkoumání druhého vzorku z první sady bylo zjištěno, že při použití náklonu  $45^\circ$  nebo  $90^\circ$  je natisknutá struktura tvarově deformována vlivem použitého úhlu. Pro připomenutí na Obr. 59 a Obr. 61 je jasné vidět, že z původních navržených teček se staly objekty s neměřitelným průměrem, neboť tečky získaly kapkovitý tvar.

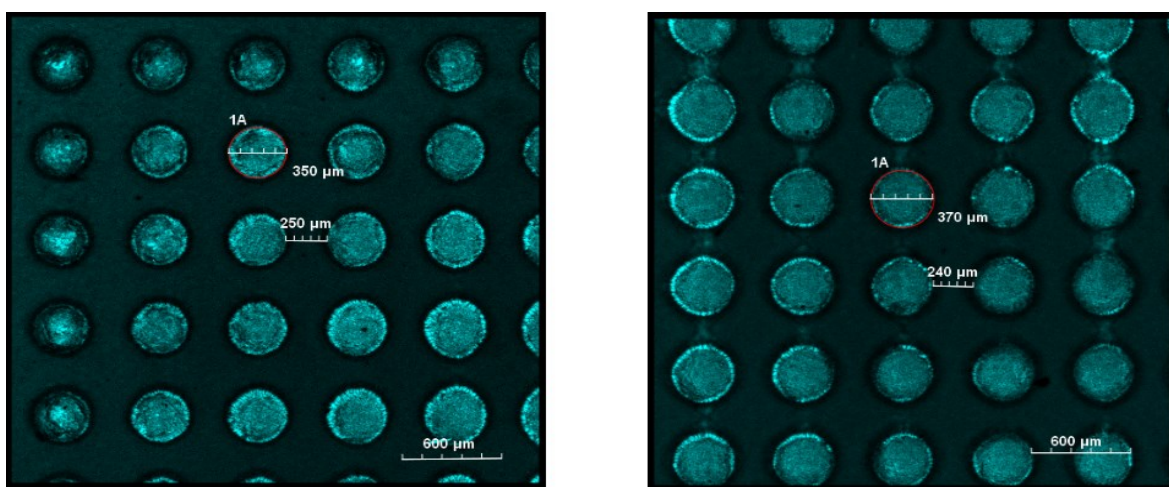
Z tohoto důvodu byl úhel  $0^\circ$  vyhodnocen jako nejméně škodlivý pro zachování tvaru natisknutých struktur. Pravidelnost struktury je nutné zachovat, protože tyto povrchy budou sloužit jako homogenní podklady pro růst buněčných linií a jejich další zkoumání.

### 13.1 Zkoumání vzorků s hrubší povrchovou strukturou pod konfokálním mikroskopem Olympus FV3000

Měření natisknuté struktury opět proběhlo pod konfokálním mikroskopem jako u první sady vzorků. Jednotlivé snímky pořízené během měření jsou uvedeny níže.

#### 13.1.1 Měření povrchové struktury pravidelné sítě teček

Na následujících obrázcích *Obr. 78* a *Obr. 79* je změřena výsledná struktura první dvojice povrchů složená z pravidelné sítě teček o průměru 300  $\mu\text{m}$  s mezerou 300  $\mu\text{m}$ .



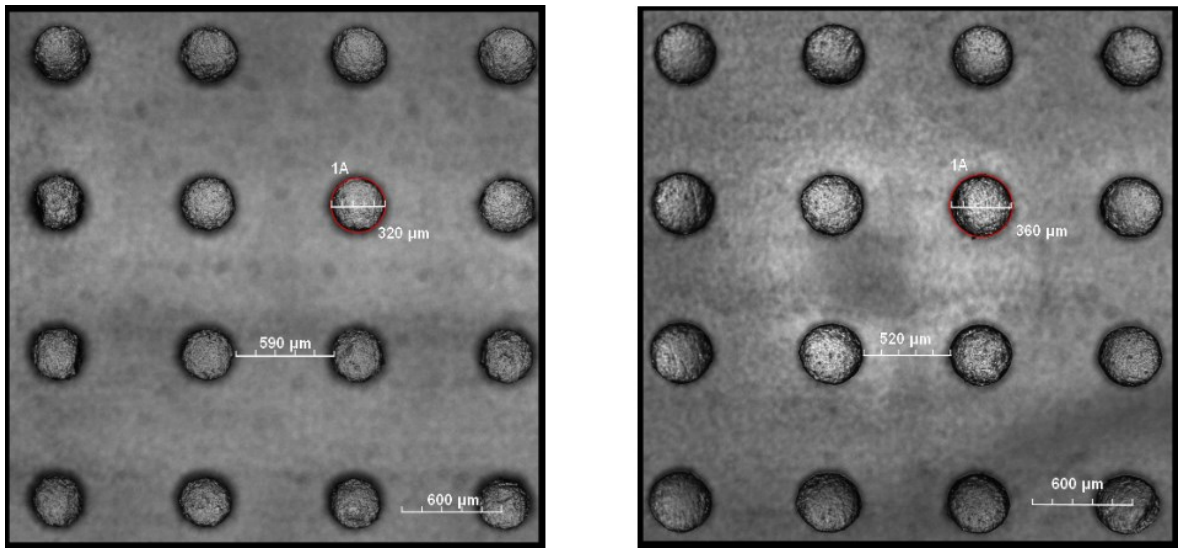
*Obr. 78* Struktura teček se vzdáleností 300  $\mu\text{m}$  – okraj (vlevo) a prostředek (vpravo)

V *Tab. 12* a *Tab. 13* je uvedeno konkrétní rozměrové hodnocení struktur první dvojice z druhé sady vzorků, která byla tisknuta pouze pod úhlem 0°.

*Tab. 12* Přehled rozměrů natisknuté struktury teček se vzdáleností 300  $\mu\text{m}$  ve srovnání s navrženou strukturou

Tvar zkoumané struktury na okraji [-]	Navržený rozměr [ $\mu\text{m}$ ]	Naměřený rozměr [ $\mu\text{m}$ ]	Defor mace délky [ $\mu\text{m}$ ]	Tvar zkoumané struktury uprostřed [-]	Navržený rozměr [ $\mu\text{m}$ ]	Naměřený rozměr [ $\mu\text{m}$ ]	Defor mace délky [ $\mu\text{m}$ ]
Průměr tečky	300	350	50	Průměr tečky	300	370	70
Mezera mezi tečkami	300	250	50	Mezera mezi tečkami	300	240	60





Obr. 79 Struktura teček se vzdáleností 600  $\mu\text{m}$  – okraj (vlevo) a prostředek (vpravo)

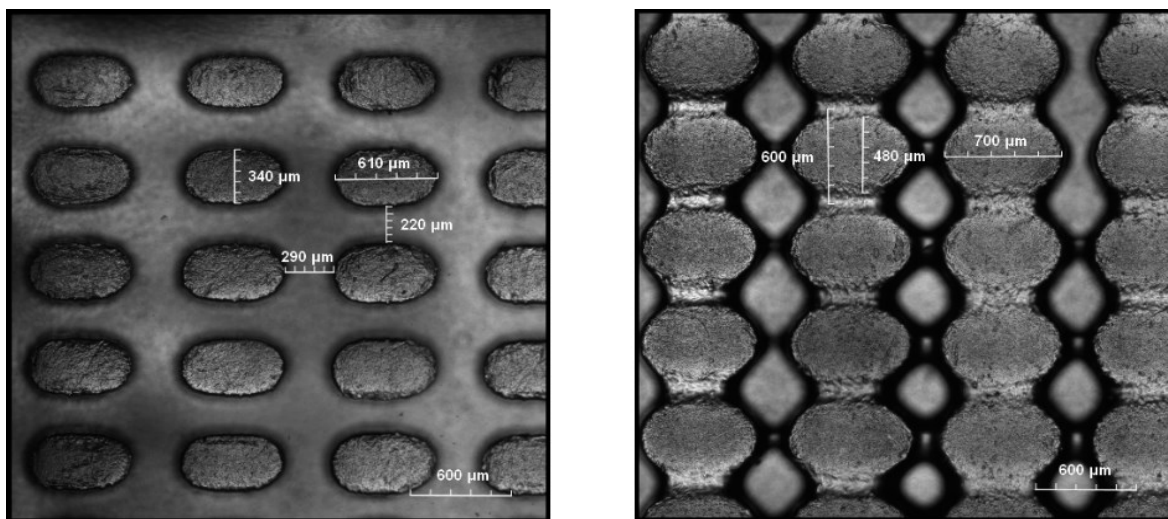
Tab. 13 Přehled rozměrů natisknuté struktury teček se vzdáleností 600  $\mu\text{m}$  ve srovnání s navrženou strukturou

Tvar zkoumané struktury na okraji [-]	Navržený rozměr [ $\mu\text{m}$ ]	Naměřený rozměr [ $\mu\text{m}$ ]	Defor mace Délky [ $\mu\text{m}$ ]	Tvar zkoumané struktury uprostřed [-]	Navržený rozměr [ $\mu\text{m}$ ]	Naměřený rozměr [ $\mu\text{m}$ ]	Defor mace délky [ $\mu\text{m}$ ]
Průměr tečky	300	320	20	Průměr tečky	300	360	60
Mezera mezi tečkami	600	590	10	Mezera mezi tečkami	600	520	80

Z Tab. 12 a Tab. 13 také plyne, že nepřesnost tisku je výraznější uprostřed vzorku. Tato skutečnost zůstává zachována i při dalším měření a mohla být způsobena nerovnoměrným odkapáváním nevytvrzené pryskyřice mezi fázemi vytvrzování jednotlivých vrstev, jak bylo zmíněno v kapitole 13.

### 13.1.2 Měření povrchové struktury krátkých čárek

Na *Obr. 80* a *Obr. 81* je znázorněna pravidelná struktura druhé dvojice vzorků tvořená krátkými čárkami o délce 600  $\mu\text{m}$  se vzdáleností 300  $\mu\text{m}$  a 600  $\mu\text{m}$ . V levé části obrázků se opět nachází snímek pořízený na okraji vzorku a v pravé části obrázků snímek pořízené uprostřed struktury.

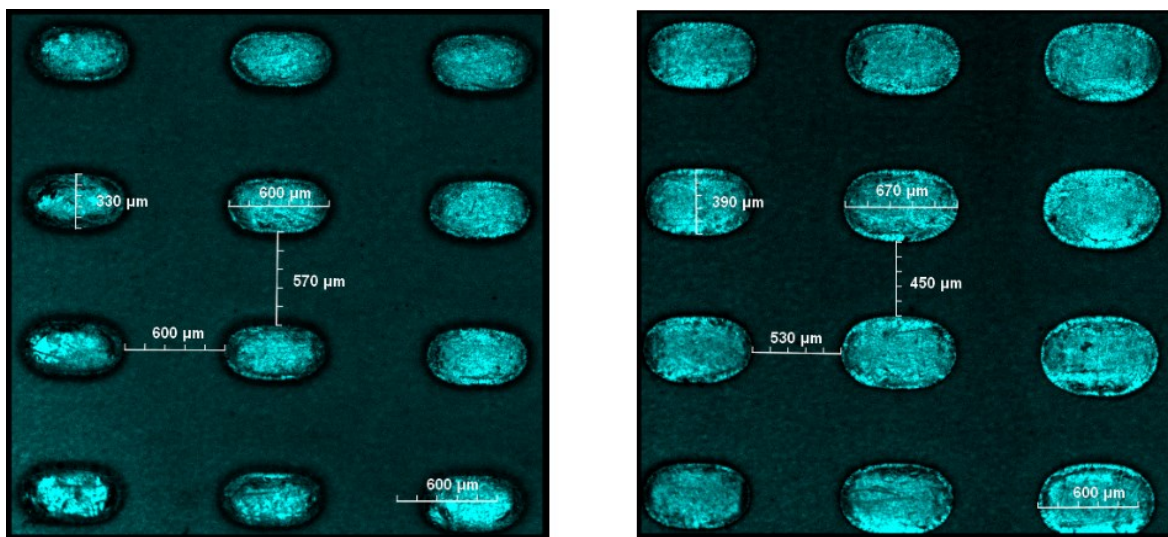


*Obr. 80* Struktura krátkých čárek o délce 600  $\mu\text{m}$  a vzdálenosti 300  $\mu\text{m}$  – okraj (vlevo) a prostředek (vpravo)

*Tab. 14* Přehled rozměrů natisknuté struktury čárek o délce 600  $\mu\text{m}$  se vzdáleností 300  $\mu\text{m}$  ve srovnání s navrženou strukturou

Tvar zkoumané struktury na okraji [-]	Navržený rozměr [ $\mu\text{m}$ ]	Naměřený rozměr [ $\mu\text{m}$ ]	Defor mace délky [ $\mu\text{m}$ ]	Tvar zkoumané struktury uprostřed [-]	Navržený rozměr [ $\mu\text{m}$ ]	Naměřený rozměr [ $\mu\text{m}$ ]	Defor mace délky [ $\mu\text{m}$ ]
Délka čárky	600	610	10	Délka čárky	600	700	100
Šířka čárky	300	240	60	Šířka čárky	300	480	180
Délka mezi čárkami	300	290	10	Délka mezi čárkami	300	-	-
Šířka mezi čárkami	300	220	80	Šířka mezi čárkami	300	-	-

Při pohledu na pravou část *Obr. 80* je zřejmé, že se rozměry jednotlivých čárek vyhodnotit nedají, z důvodu splynutí celé struktury, není proto možné jednotlivé čárky od sebe odlišit.



*Obr. 81* Struktura krátkých čárek o délce 600  $\mu\text{m}$  a vzdálenosti 600  $\mu\text{m}$  – okraj (vlevo) a prostředek (vpravo)

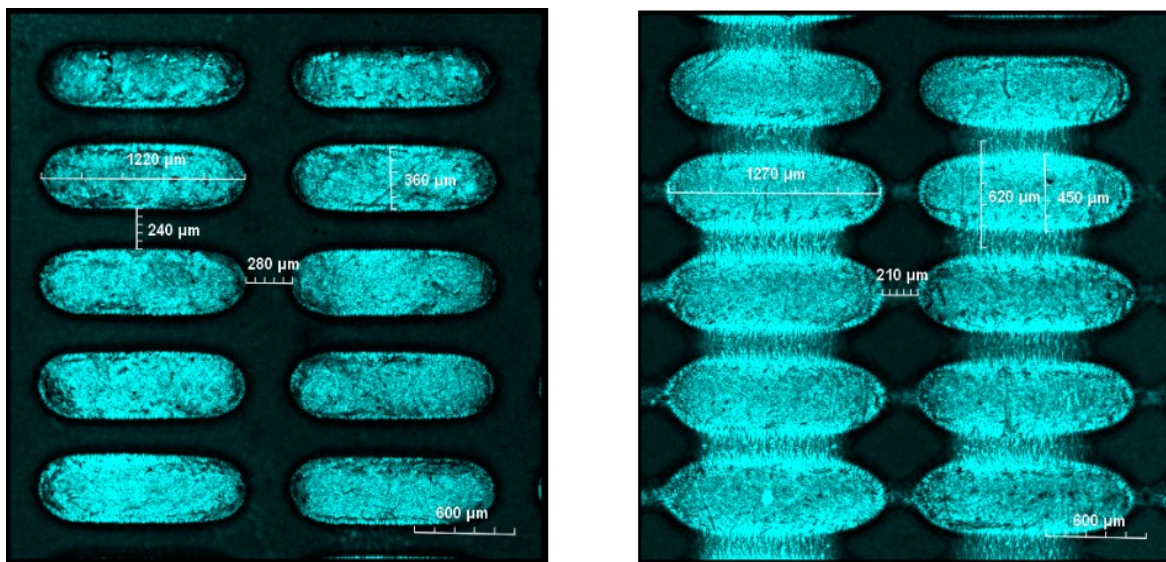
*Tab. 15* Přehled rozměrů natisknuté struktury čárek o délce 600  $\mu\text{m}$  se vzdáleností 600  $\mu\text{m}$  ve srovnání s navrženou strukturou

Tvar zkoumané struktury na kraji [-]	Navržený rozměr [ $\mu\text{m}$ ]	Naměřený rozměr [ $\mu\text{m}$ ]	Defor mace délky [ $\mu\text{m}$ ]	Tvar zkoumané struktury uprostřed [-]	Navržený rozměr [ $\mu\text{m}$ ]	Naměřený rozměr [ $\mu\text{m}$ ]	Defor mace délky [ $\mu\text{m}$ ]
Délka čárky	600	600	0	Délka čárky	600	670	70
Šířka čárky	300	330	30	Šířka čárky	300	390	90
Délka mezi čárkami	600	600	0	Délka mezi čárkami	600	530	70
Šířka mezi čárkami	600	570	30	Šířka mezi čárkami	600	450	150

Z *Tab. 15* plyne, že v případě zvolené délky čárky 600  $\mu\text{m}$  a mezery mezi čárkami 600  $\mu\text{m}$  nebyla na okraji vzorku zaznamenána žádná délková deformace natisknuté struktury.

### 13.1.3 Měření povrchové struktury dlouhých čárek

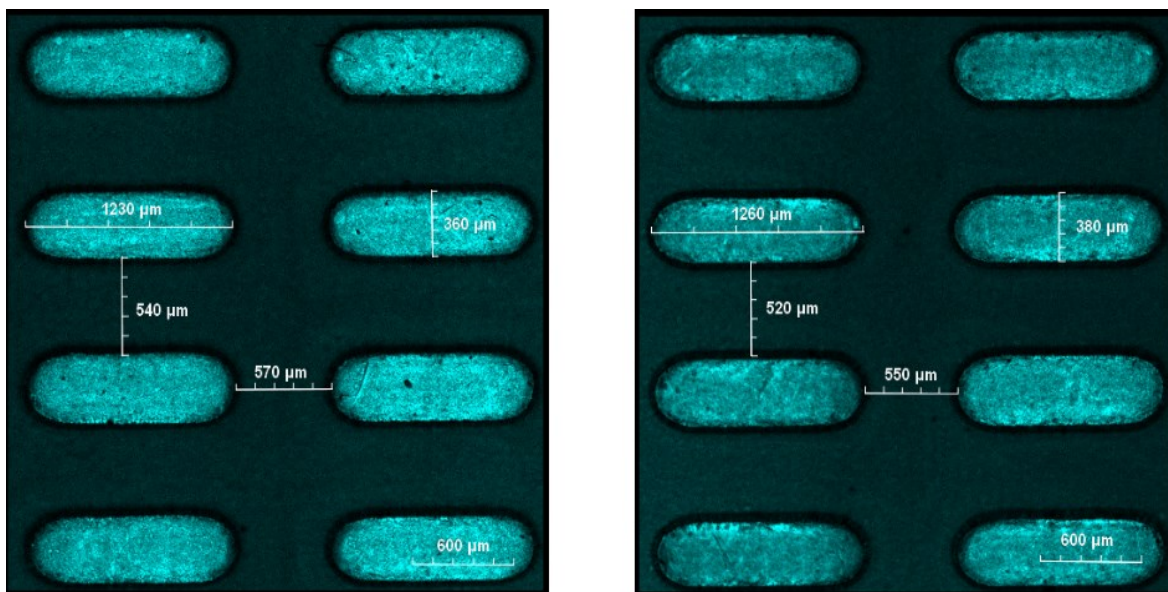
Struktura třetí dvojice vzorků je tvořena opět pravidelnými čárkami, tentokrát o délce 1200 $\mu\text{m}$  se vzdáleností 300  $\mu\text{m}$  a 600 $\mu\text{m}$ . Na *Obr. 82* a *Obr. 83* je provedeno měření jejich skutečných rozměrů a v *Tab. 16* a *Tab. 17* je rozměrové zhodnocení naměřené struktury.



*Obr. 82* Struktura dlouhých čárek o délce 1200  $\mu\text{m}$  a vzdálenosti 300  $\mu\text{m}$  – okraj (vlevo) a prostředek (vpravo)

*Tab. 16* Přehled rozměrů natisknuté struktury čárek o délce 1200  $\mu\text{m}$  se vzdáleností 300 $\mu\text{m}$  ve srovnání s navrženou strukturou

Tvar zkoumané struktury na okraji [-]	Navržený rozměr [ $\mu\text{m}$ ]	Naměřený rozměr [ $\mu\text{m}$ ]	Deformace Délky [ $\mu\text{m}$ ]	Tvar zkoumané struktury uprostřed [-]	Navržený rozměr [ $\mu\text{m}$ ]	Naměřený rozměr [ $\mu\text{m}$ ]	Deformace délky [ $\mu\text{m}$ ]
Délka čárky	1200	1220	20	Délka čárky	1200	1270	70
Šířka čárky	300	360	60	Šířka čárky	300	450	150
Délka mezi čárkami	300	280	20	Délka mezi čárkami	300	210	90
Šířka mezi čárkami	300	240	60	Šířka mezi čárkami	300	170	130



Obr. 83 Struktura dlouhých čárek o délce  $1200\ \mu\text{m}$  a vzdálenosti  $600\ \mu\text{m}$  – okraj (vlevo) a prostředek (vpravo)

Tab. 17 Přehled rozměrů natisknuté struktury čárek o délce  $1200\ \mu\text{m}$  se vzdáleností  $600\ \mu\text{m}$  ve srovnání s navrženou strukturou

Tvar zkoumané struktury na okraji [-]	Navržený rozměr [ $\mu\text{m}$ ]	Naměřený rozměr [ $\mu\text{m}$ ]	Deformace délky [ $\mu\text{m}$ ]	Tvar zkoumané struktury uprostřed [-]	Navržený rozměr [ $\mu\text{m}$ ]	Naměřený rozměr [ $\mu\text{m}$ ]	Deformace délky [ $\mu\text{m}$ ]
Délka čárky	1200	1230	30	Délka čárky	1200	1260	60
Šířka čárky	300	360	60	Šířka čárky	300	380	80
Délka mezi čárkami	600	570	30	Délka mezi čárkami	600	550	50
Šířka mezi čárkami	600	540	60	Šířka mezi čárkami	600	520	80

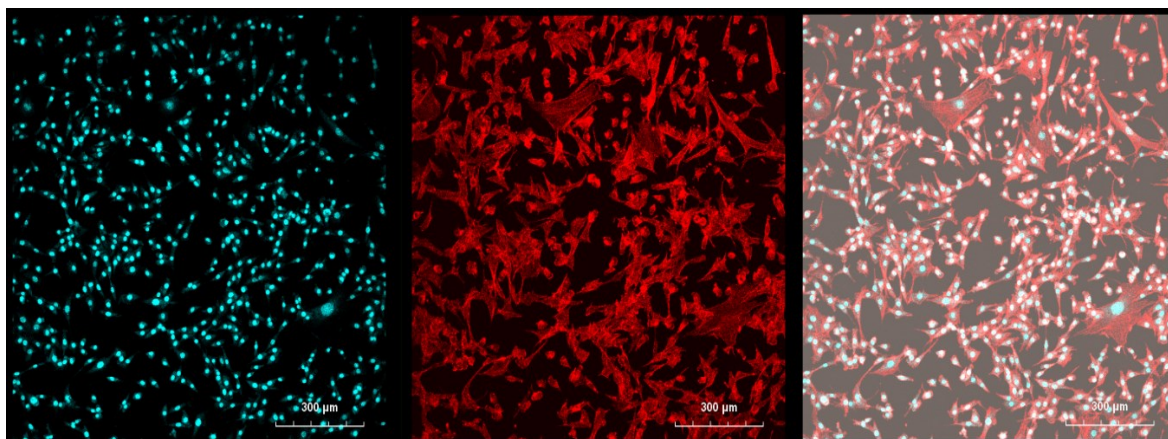
Uvedené tabulky Tab. 12 až Tab. 17 znázorňují délkovou deformaci natisknuté struktury. Tabulky nevykazují statistické znaky, protože byl zkoumaný povrch změřen vždy na jednom konkrétním místě a každý rozměr zaznamenán pouze jedenkrát. Úkolem bylo demonstrovat rozdíl v deformaci struktury podle toho, jestli je vzorek měřen na okraji nebo uprostřed zkoumané struktury.

### 13.1.4 Zkoumání růstu buněčných linií na připravených površích

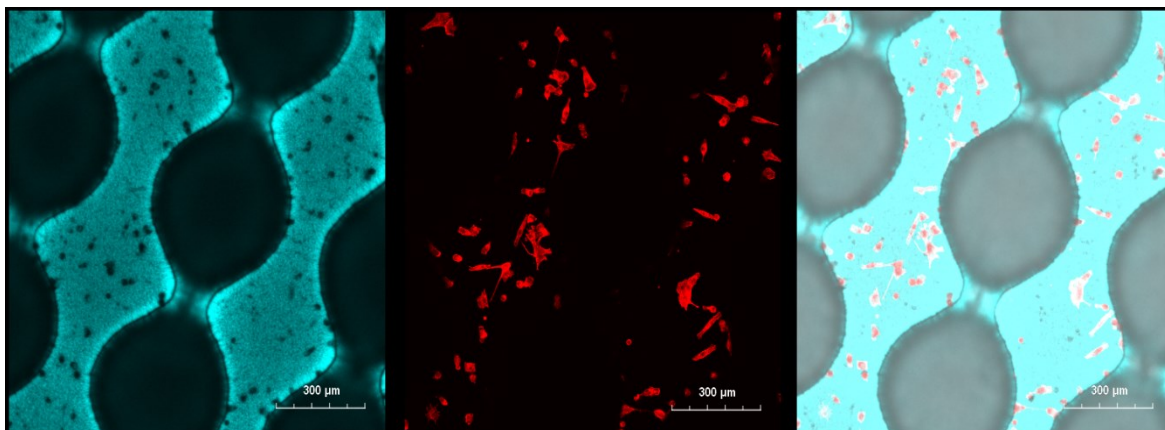
Primární účel výroby vzorků s pravidelnou strukturou byl takový, že povrchy budou sloužit jako homogenní podklady pro růst buněčných linií. Mým úkolem bylo tyto povrchy připravit a provést kontrolní měření morfologie růstu buněk. Připravené povrchy budou dále použity pro zkoumání příslušnými odborníky na buněčnou biologii.

V laboratořích buněčné biologie na Centru polymerních systémů byly provedeny prvotní testy proliferace na strukturovaných površích. Pro tyto účely byla použita linie myších embryonálních fibroblastů NIH/3T3. Vzorky byly před testováním sterilizovány UV zářením po dobu 30 min. Buňky byly na vzorky vysety v koncentraci  $10^5$  buněk/ml kultivačního média. Proliferace probíhala po dobu 4 dnů při teplotě  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  v inkubátoru s řízenou atmosférou ( $5\text{ }\%$   $\text{CO}_2$ ) za vysoké relativní vlhkosti. Po 4 dnech byly buňky zafixovány  $4\text{ }\%$  formaldehydem a nabarveny. Zvlášť byly barveny jádra buněk a zvlášť cytoskelet. Jádra buněk byla barvena barvivem Hoechst 33258. Barvivo prostupuje do jader buněk, kde se váže na DNA a emitující modrou fluorescenci. Cytoskelet byl nabarven barvivem ActinRed, které se váže na proteiny cytoskeletu buněk a emituje červenou fluorescenci.

Na následujících obrázcích jsou uvedeny povrchy, na nichž se růst buněčných skeletů zdařil (*Obr. 85 až Obr. 89*). Pro porovnání četnosti narostlých buněk a jejich tvaru je na *Obr. 84* uvedeno i srovnání růstu buněk na referenčním povrchu (polystyrenová Petriho miska). Na *Obr. 90* je zobrazen povrch tvořený pravidelnou sítí krátkých čárek o délce  $600\text{ }\mu\text{m}$  a vzdálenosti  $300\text{ }\mu\text{m}$ , na kterém se růst buněk nezdařil, a byl zachycen pouze šum.

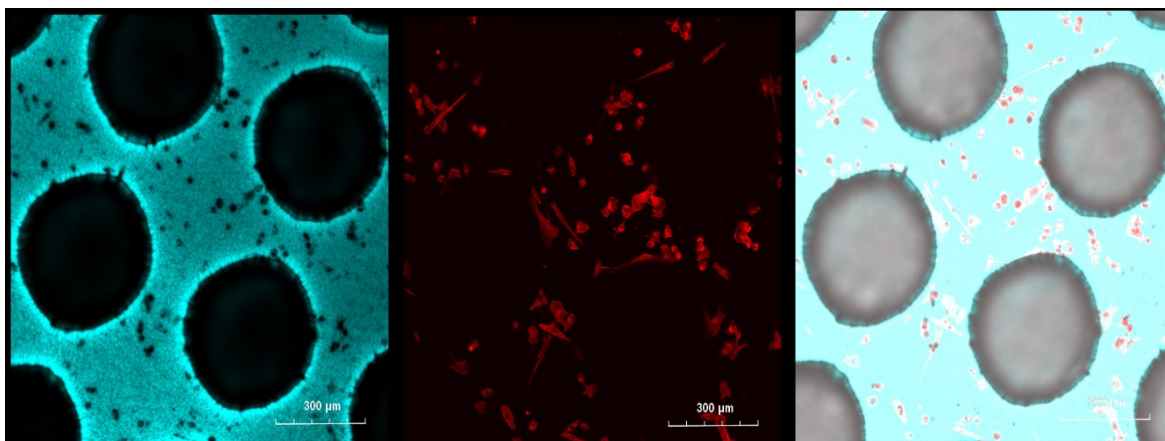


*Obr. 84 Četnost a tvar buněk na referenčním povrchu – jádra (vlevo), cytoskelet (uprostřed), dohromady (vpravo)*



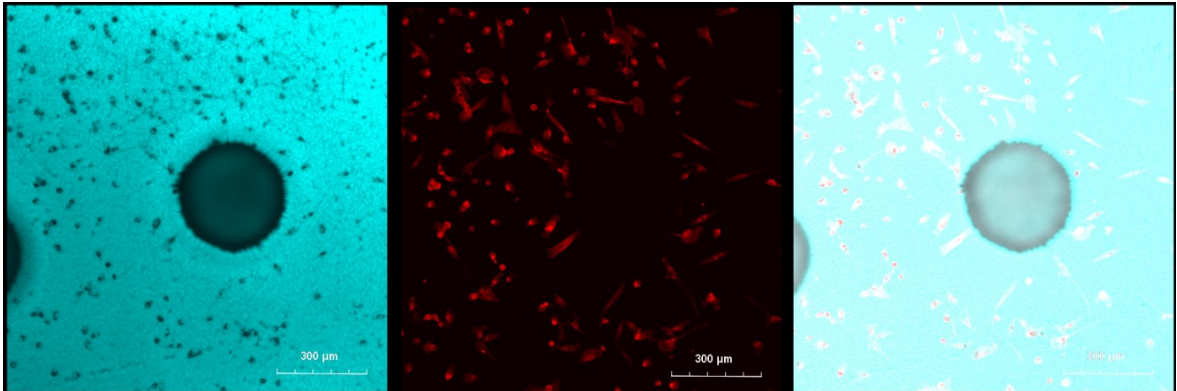
*Obr. 85 Růst buněk uprostřed pravidelné struktury teček o velikosti 300  $\mu\text{m}$  a vzdálenosti 300  $\mu\text{m}$  – jádra (vlevo), cytoskelet (uprostřed), dohromady (vpravo)*

Na *Obr. 85* je četnost buněk nižší a také jejich rozměry jsou menší než na referenčním povrchu, znázorněném na *Obr. 84*. Z toho vyplývá, že vytvořený povrch je méně vhodný pro růst buněk než referenční povrch. Při pohledu na levou část *Obr. 82* vyskytují se na ní tmavé skvrny. Tyto tmavé skvrny představují jádra buněk. Jsou zbarveny černě, protože byly nabarveny barvivem Hoechst 33258, které svítí pod stejnou vlnovou délkou  $\lambda=430$  nm jako vytisknutý povrch, který je autofluorescenční.



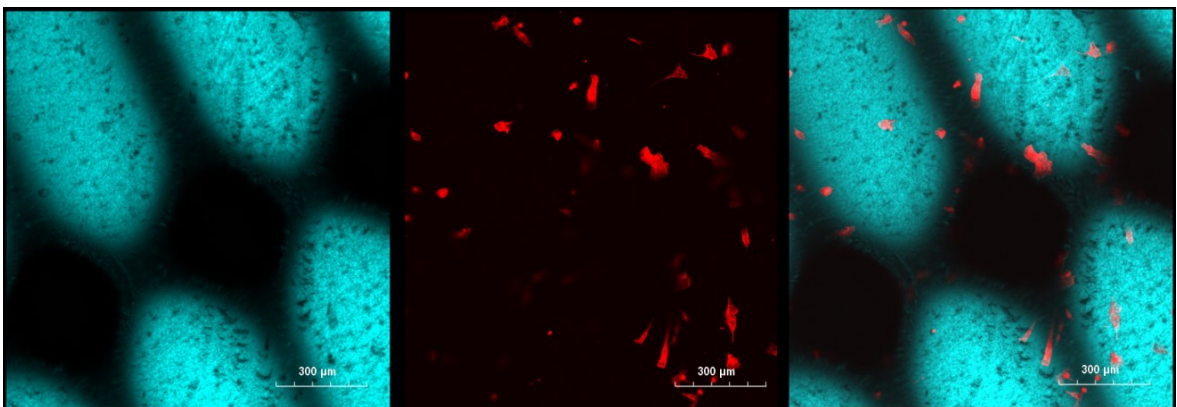
*Obr. 86 Růst buněk na okraji pravidelné struktury teček o velikosti 300  $\mu\text{m}$  a vzdálenosti 300  $\mu\text{m}$  – jádra (vlevo), cytoskelet (uprostřed), dohromady (vpravo)*

Z *Obr. 85* a *Obr. 86* vyplývá, že buňky lemují strukturu na povrchu materiálu. Při pohledu na prostřední část obou obrázků jsou patrné tmavé kruhy (negativy natisknuté struktury), kde buňky nerostou.

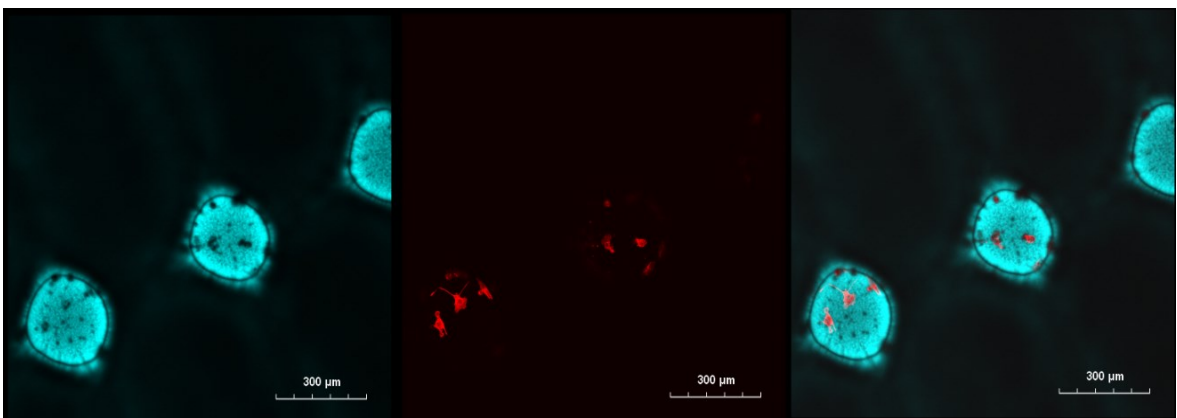


*Obr. 87 Růst buněk na pravidelné struktuře teček o velikosti 300  $\mu\text{m}$  a vzdálenosti 600  $\mu\text{m}$  – jádra (vlevo), cytoskelet (uprostřed), dohromady (vpravo)*

Při pohledu na střed *Obr. 87* by se zde dalo spekulovat, jestli směr růstu cytoskeletu je ovlivňován povrchovou strukturou materiálu či nikoliv. V těchto místech směřují buňky jakoby od tečky pryč po povrchu.



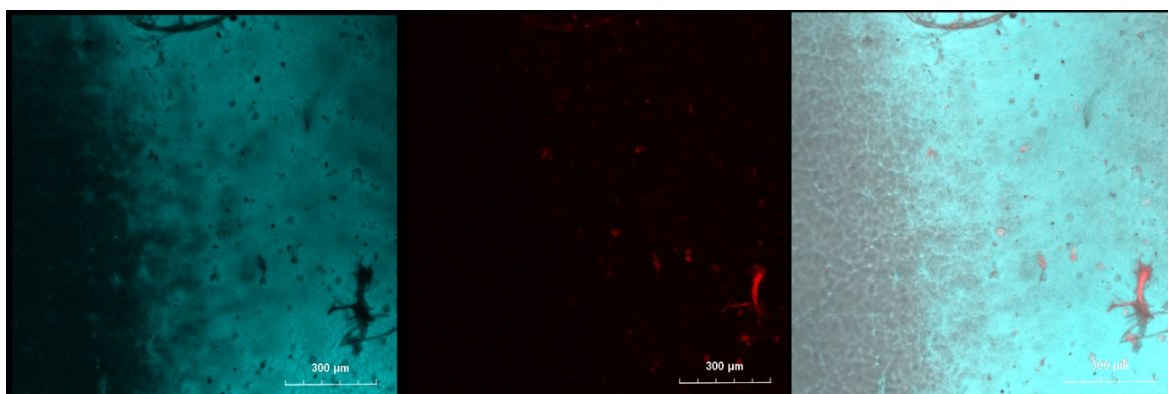
*Obr. 88 Růst buněk na pravidelné struktuře dlouhých čárek o délce 1200  $\mu\text{m}$  a vzdálenosti 300  $\mu\text{m}$  – jádra (vlevo), cytoskelet (uprostřed), dohromady (vpravo) – zaostřeno na čárky*



*Obr. 89 Růst buněk na pravidelné struktuře dlouhých čárek o délce 1200  $\mu\text{m}$  a vzdálenosti 300  $\mu\text{m}$  – jádra (vlevo), cytoskelet (uprostřed), dohromady (vpravo) – zaostřeno na povrch*



*Obr. 88* a *Obr. 89* mapuje shodné místo na povrchu vzorku tvořeného pravidelnou strukturou dlouhých čárek o délce 1200  $\mu\text{m}$ , ale pokaždé je zaostřena jiná rovina. *Obr. 88* je zaostřen na povrch čárek a *Obr. 89* je zaostřen na podklad povrchové struktury čárek neboli na mezery mezi čárkami. Zatímco na *Obr. 88* jsou buňky nahodile uspořádány, protože nejsou okolní strukturou nijak usměrněny, ale na *Obr. 89* je možné pozorovat, jak buňky přesně lemují kruhový tvar mezery. Rozdíl je také v četnosti, na *Obr. 89* je četnost buněk v malém prostoru mezery dále vyšší než na povrchu čárek na *Obr. 88*.



*Obr. 90* Růst buněk na pravidelné struktuře krátkých čárek o délce 600  $\mu\text{m}$  a vzdálenosti 300  $\mu\text{m}$  – jádra (vlevo), cytoskelet (uprostřed), dohromady (vpravo)

Měření růstu buněk na površích krátkých čárek o délce 600  $\mu\text{m}$  se vzdáleností 300  $\mu\text{m}$  a 600  $\mu\text{m}$  se nezdařil, stejně jako na povrchu dlouhých čárek o délce 1200  $\mu\text{m}$  se vzdáleností 600  $\mu\text{m}$ . *Obr. 90* uvádí příklad měření na jednom z těchto povrchů. Buňky zde nebyly zachyceny, uvedený snímek obsahuje pouze šum způsobený nastavením intenzity a citlivosti laserů při zaostřování. Skutečnost, že se na površích buňky nenachází by mohla být způsobena tím, že se buňky při růstu neujaly (nepřichytily k povrchu) a nebyly tudíž barveny a zafixovány.

Předpokladem bylo, že tvar vytisknutých povrchů ovlivní směr růstu buněk. Tato skutečnost se neprokázala s jistotou a povrchy s buňkami nebyly podrobeny další analýze na toto téma.

## 14 CELKOVÉ ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ A JEJICH DISKUZE

V této kapitole bude provedena diskuze získaných výsledků z experimentální části bakalářské práce. Hodnocení výsledků by se dalo pro přehlednost rozdělit do čtyř částí, podle toho, jaké výsledky jsem získala.

### 14.1 Vyhodnocení tvaru jemné povrchové struktury v závislosti na použitém náklonu destičky při 3D tisku

Nejprve byly vytisknuty jemné povrchové struktury pravidelných pásků o rozměrech 100  $\mu\text{m}$  na výšku i na šířku. Mezera mezi nimi byla zvolena minimální (10  $\mu\text{m}$ ). Zároveň byly tisknuty destičky, jejichž povrchová struktura byla tvořena pravidelnou sítí teček o průměru 200  $\mu\text{m}$  se stejnou mezerou a destičky s nepravidelnou povrchovou strukturou počínaje sloupcem teček a shodným rozměru jako u předchozí destičky a dále navazovaly sloupce pravidelně se prodlužujících čárek vždy o 200  $\mu\text{m}$ .

Při detailním zkoumání pod konfokálním mikroskopem Olympus fv3000 bylo zjištěno, že se navržené struktury při 3D tisku na stereolitografické tiskárně Form 3 významně zvětšily. Tiskárna nedodržela předepsanou strukturu, i když navržené rozměry nebyly v rozporu s doporučením výrobce. Struktura pravidelných pásků nebyla pod konfokálním mikroskopem vůbec rozlišitelná.

Na vytisknutých strukturách teček a čárek byl rovněž patrný vliv použitého náklonu při 3D tisku. *Obr. 61* ukazuje vliv 90° úhlu tisku na tvar pravidelné struktury teček. Tečky nejsou pravidelné a na povrchu je evidentní významné stečení pryskyřice. V případě tohoto i dalších měření platí, že struktura je méně roztečená na okrajích vzorku než uprostřed. Struktura prodlužujících se čárek na *Obr. 63* je rozměrově neoddělitelná a jednotlivé čárky jsou na sebe nataveny.

Byl zjištěn rozdíl v deformaci struktury vlivem úhlu tisku, markantnější vliv má ale navržený rozměr struktury, neboť zvolené rozměry nebyla 3D tiskárna schopna dodržet. Důvodem může být, že přesnost tisku není taková, jakou uvádí výrobce. Může také záležet na použitém materiálu. V mé práci byla použita pouze pryskyřice z řady Clear, jako jediný materiál, a proto není možné říci, jestli by povrchy z jiného materiálu byly méně zdeformované.

## 14.2 Vyhodnocení převýšení na konkrétním místě vzorku v závislosti na použitém náklonu destičky při 3D tisku technologií AFM

Další jev, který byl na všech površích pozorován, byly tmavé skvrny. Tyto barevné nedokonalosti byly způsobeny existujícím převýšením na povrchu, které vzniklo při vytvrzování pryskyřice při 3D tisku. Technologií AFM byl zkoumán malý výřez z povrchu prodlužujících se čárek (50  $\mu\text{m}$  x 50  $\mu\text{m}$ ). Z *Obr. 69* bylo zjištěno, že při horizontálním tisku se na povrchu vyskytují ostrá, mnohačetná převýšení s maximální hodnotou 4,2  $\mu\text{m}$ . Z ostatních obrázků bylo zjištěno, že čím větší je náklon při 3D tisku, tím plynulejších přechodů ve výškovém profilu bylo docíleno. Při 90° náklonu se mimo jiné snížila maximální hodnota převýšení na 1,2  $\mu\text{m}$ . Tuto skutečnost, vyobrazenou na *Obr. 67*, přisuzuji tomu, že použitý úhel tisku natolik ovlivnil strukturu, že vzniklé převýšení vertikálně steklo. Tuto hypotézu se podařilo prokázat na *Obr. 77*.

## 14.3 Vyhodnocení hrubší pravidelné rozměrové struktury vzorků při jediném úhlu tisku 0°

Po předchozí zkušenosti s přesností 3D tiskárny jsem se rozhodla zvětšit rozměr jednotlivých struktur a použít úhel tisku pouze 0°, aby náklon neovlivňoval pravidelnost struktury. Konkrétní rozměry vzorků jsou uvedeny v *Tab. 9*, *Tab. 10* a *Tab. 11*. V tomto případě byly tedy tisknuty dvojice vzorků, které se lišily pouze mezerou mezi jednotlivými referenčními elementy.

Opět platí, že čím je rozměr referenční struktury větší, tím přesnější 3D tisk je. Postupným měřením všech povrchů bylo v *Tab. 15* zjištěno, že při použití rozměrové struktury čárek o velikosti 600  $\mu\text{m}$ , bylo při měření na okraji vzorku dosaženo 0% chyby. Stále platí, že uprostřed vzorku je chyba povrchu vždy větší než na okraji. Domnívám se, že tento problém mohl být způsoben tím, že natisknuté struktury jsou příliš jemné a nemuselo dojít k dokonalému opláchnutí od nevytvrzené pryskyřice před dodatečným vytvrzováním. Na *Obr. 82* je v mezerách vidět přebytečná pryskyřice.

## 14.4 Vyhodnocení růstu buněčných linií na pravidelných površích

Nejprve byl pod konfokálním mikroskopem zkoumán referenční povrch, na němž byla zaznamenána velká četnost buněk. Dále byly zkoumány ostatní povrchy. Měření bylo úspěšné na třech površích. Jednalo se o struktury pravidelných teček o průměru 300  $\mu\text{m}$  se vzdáleností 300  $\mu\text{m}$  a 600  $\mu\text{m}$ , dále to byl povrch složený z pravidelných dlouhých čárek o

délce 1200  $\mu\text{m}$  a mezerou 300  $\mu\text{m}$ . Na ostatních površích buňky nenarostly a byl zachycen pouze šum, jak ukazuje *Obr. 90*. Předpokladem bylo, že navržená struktura bude ovlivňovat směr růstu buněk. Tato skutečnost se neprokázala, neboť buňky nevykazují pravidelnost v růstu. Měření s nejlepší vypovídající hodnotou mají *Obr. 88* a *Obr. 89*. Z těchto obrázků je možné konstatovat, že v obou případech bylo mapováno stejné místo na konkrétním vzorku, ale v *Obr. 88* bylo zaostřeno na povrch čárek a v *Obr. 89* bylo zaostřeno na mezery mezi čárkami. Na *Obr. 89* byla četnost buněk na tak malé ploše srovnatelná s referenčním povrchem a je zřejmé, že buňky přesně lemují kruhový tvar mezery. Z této skutečnosti by se dalo usoudit, že pokud by se mi povedlo vyrobit dostatečně jemnou strukturu s rozměry jednotlivých elementů srovnatelných s velikostí buněk, tak by tvar struktury mohl usměrňovat buňky v jejich růstu. Z tohoto důvodu se ukázala být stereolitografie jako technologie pro výrobu podkladů pro růst buněčných linií nepříliš vhodnou, protože použitím této metody nebylo možné vyrobit dostatečně jemnou strukturu podkladového materiálu pro usměrnění růstu buněk.

## ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývá mikroskopickými technikami a jejich vývojem od vynálezu prvního mikroskopu. Konkrétně je tato práce zaměřena na konfokální mikroskopii a mikroskopii atomárních sil. Tyto technologie byly využity v experimentální části k charakterizaci vyrobených povrchů. Součástí literární rešerše jsou kapitoly o světelné, elektronové, fluorescenční mikroskopii a mikroskopii skenovací sondou.

Kromě vývoje mikroskopie napříč stoletími je do teoretické části zakomponována kapitola o optice. V této kapitole je rozebráno světlo a jeho vlastnosti. Principy týkající se šíření světla a jeho charakteristického chování jsou podloženy příslušnými experimenty. Teoretická část je zakončena kapitolou zaměřující se na technologii 3D tisku. Tato technologie výroby byla v experimentální části použita pro výrobu povrchů s natisknutou strukturou.

Cílem experimentální části mé bakalářské práce bylo připravit povrchy určené k rozměrovému zhodnocení natisknuté struktury a usměrňování růstu buněčných linií. Tyto povrchy se povedlo připravit a bylo provedeno kontrolní měření růstu buněk. Z provedeného měření nebylo prokázáno, že modifikace tvaru natisknutých struktur na površích usměrňuje růst či tvar buněk. Buňky pouze v několika případech lemovaly tvar natisknuté struktury.

Rozměrové zhodnocení natisknuté struktury ve srovnání s navrženou prokázalo, že se povrchy více deformují uprostřed zkoumaných vzorků než na krajích. Tato skutečnost byla vysvětlena dříve.

Úkolem bylo také ověřit, zda je stereolitografický 3D tisk vhodnou metodou pro výrobu povrchů, které mají sloužit jako podkladové destičky pro růst buněčných linií. Tato technologie se ukázala být nepříliš vhodnou, protože použitá 3D tiskárna nedokázala vytvořit dostatečně jemnou strukturu vhodnou k modifikaci růstu buněčných linií.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. HOLLIDAY, David, Robert RESNICK a Jearl WALKER. *Fyzika*. 2. Brno: VUTIUM, 2013, 2019, 1200 s. ISBN 978-80-2144-123-1.
2. MALÝ, Petr. *Optika*. 2. Praha: Karolinum, 2013, 368 s. ISBN 9788024622460.
3. *Operating microscopes: past, present, and future* [online]. 2009 [cit. 2021-02-11]. Dostupné z: <https://thejns.org/focus/view/journals/neurosurg-focus/27/3/article-pE4.xml>
4. *Annals of Clinical & Laboratory Science* [online]. California, 2011 [cit. 2021-02-11]. Dostupné z: <http://www.annclinlabsci.org/content/41/2/201.short>
5. BAŠÍKOVÁ, Jana. *Historický nástin vývoje metod a forem histologického vyšetření*. Hradec Králové, 2015, 42 s. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze. Vedoucí práce Doc. PhDr. František Dohnal, CSc.
6. HADRAVA, Petr a Alena HADRAVOVÁ. Poselství Galileova dalekohledu. *Vesmír* [online]. 2009, 15.1.2009, **2009**(1), 3 [cit. 2021-02-11]. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/2009/cislo-1/poselstvi-galileova-dalekohledu.html>
7. RŮŽIČKOVÁ, Martina. *Mikroskopické snímky s vysokou hloubkou ostrosti*. Brno, 2012, 77 s. Diplomová práce. Vysoké Učení Technické v Brně. Vedoucí práce Ing. Vratislav Čmiel.
8. A history of the development of histology up to the end of the nineteenth century. *Research* [online]. 2015, **2015**(2) [cit. 2021-02-12]. Dostupné z: doi:<http://dx.doi.org/10.13070/rs.c.2.1283>
9. A Voyage to Beyond the Human Eye by Microscope, Leeuwenhoek's Invention. *Scientific Research* [online]. 2016, **2016**(1) [cit. 2021-02-12]. Dostupné z: doi:<http://dx.doi.org/10.4236/oalib.1102291>
10. WIMMER, Wolfgang. Carl Zeiss, Ernst Abbe a Advances in the Light Microscope. *Microscopy Today* [online]. 2017, **2017**(4) [cit. 2021-02-12]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1017/S155192951700058X>

11. From Animaculum to single molecules: 300 years of the light microscope. *THE ROYAL SOCIETY* [online]. **2015**(4) [cit. 2021-02-12]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1098/rsob.150019>
12. *WikiSkripta* [online]. [cit. 2021-02-12]. Dostupné z: [https://www.wikiskripta.eu/w/Viditeln%C3%A9\\_sv%C4%9Btlo](https://www.wikiskripta.eu/w/Viditeln%C3%A9_sv%C4%9Btlo)
13. RYZÍ, Adriana. *Současné trendy v hodnocení topografie povrchu pomocí světelné mikroskopie*. Zlín, 2016, 67 s. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
14. SMILEK, Petr. *Sbírka příkladů z atomové a jaderné fyziky*. Olomouc, 2013, 44 s. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Vedoucí práce RNDr. Renata Holubová, CSc.
15. KRÁLÍK, Jiří. O zavádění konceptu fotonu. *Letní škola matematiky a fyziky* [online]. 2018, **2018**(12), 18 [cit. 2021-02-12]. Dostupné z: <https://kma.ujep.cz/administrace/uploads/7252585.pdf>
16. LEDNICKÝ, František. *Mikroskopie a morfologie polymerů. Díl 1., Mikroskopie polymerů a preparační techniky*. Liberec: Technická univerzita, 2009, 71 s. ISBN 9788073724863.
17. POKORNÝ, Pavel. *SVĚTELNÁ MIKROSKOPIE A JEJÍ APLIKACE*. Brno, 2010, 54 s. Bakalářská práce. Vysoké Učení Technické v Brně. Vedoucí práce Ing. Martin Lošťák.
18. KNOZ, Jan a Věra OPRAVILOVÁ. *Základy mikroskopické techniky*. Brno: Masarykova univerzita, 1992, 195 s. ISBN 8021004738.
19. KARLÍK, Miroslav. *Úvod do transmisní elektronové mikroskopie*. Praha: České vysoké učení technické v Praze, 2011, 321 s. ISBN 9788001047293.
20. BARTL, P. *METODY elektronové mikroskopie*. Praha: NČSAV, 1964, 399 s.
21. LAMBOROVÁ, Leona. *TECHNIKY VYUŽÍVAJÍCÍ SVAZEK NABITÝCH ČÁSTIC K ZOBRAZENÍ A ANALÝZE MATERIÁLŮ*. Brno, 2019, 87 s. Bakalářská práce. VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ. Vedoucí práce Mgr. Jan Čupera.

22. CHMELOVÁ, Bc. Barbora. *Optimalizace mikroskopického zobrazování technikou TOCCSL*. Kladno, 2020, 66 s. Diplomová práce. České Vysoké Učení Technické v Praze. Vedoucí práce Doc. Ing. Martin Rožánek, Ph.D.
23. LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3. New York: Springer, 2006, 954 s. ISBN 0387312781 978-0-387-31278-1.
24. SANDERSON, Michael J., Ian SMITH, Ian PARKER a Martin D. BOOTMAN. Fluorescence Microscopy. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2014, **2014**(1), 25 [cit. 2021-03-01]. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.top071795
25. PAWLEY, James B. *Handbook of biological confocal microscopy*. 3. New York: Springer, 2006. ISBN 038725921X.
26. PADDOCK, Stephen W. *Confocal microscopy: methods and protocols*. 2. New York: Humana Press, 2014, 381 s. ISBN 9781588293510.
27. PRICE, Robert L. a W. Gray JEROME. *Basic confocal microscopy*. New York: Springer, 2011, 302 s. ISBN 9780387781747.
28. BRUSLIND, Linda. *General Microbiology* [online]. Oregon: Oregon State University [cit. 2021-04-08]. Dostupné z: <https://open.oregonstate.edu/generalmicrobiology/>
29. FOLDYNOVÁ, Kateřina. *Mechanické vlastnosti 3D tisku*. Ostrava, 2017. Bakalářská práce. Vysoká škola Báňská - technická univerzita Ostrava. Vedoucí práce Ing. Vladimír Zbožínek.
30. *3D WISER: member of Admasys international* [online]. [cit. 2021-04-11]. Dostupné z: <https://3dwiser.com/produkty/3d-tiskarny/pryskyrice/formlabs/formlabs-form-3/>
31. *PROTOLABS: Manufacturing. Accelerated* [online]. [cit. 2021-04-11]. Dostupné z: <https://www.protolabs.co.uk/materials/comparison-guide/>
32. *Výuka v mikroskopii a digitálním zobrazování. ZEISS* [online]. [cit. 2021-03-01]. Dostupné z: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/spinningdisk/introduction.html>
33. KOPECKÁ, PH.D., Mgr. Jana a Mgr. Gabriela ROTKOVÁ, PH.D. *Skripta ke cvičení z Obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií: Úvod pro práci s mikroskopem* [online]. [cit. 2021-03-01]. Dostupné z:



- [https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni\\_mikrobiologie/web/pages/prace\\_mikroskop.html](https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/prace_mikroskop.html)
34. *Mikroshop* [online]. [cit. 2021-03-01]. Dostupné z: <https://www.mikroshop.cz/cz/binokularni-mikroskop-levenhuk-med-10b>
35. *Ondas Particulas: Co to je fotoelektrický efekt?* [online]. [cit. 2021-03-01]. Dostupné z: <https://ondasyparticulas.com/2020/03/07/que-es-el-efecto-fotoelectrico/>
36. SKŘIVANOVÁ, Mgr. Lenka. *Kvantová fyzika* [online]. , 11 [cit. 2021-03-01]. Dostupné z: <https://adoc.pub/kvantova-fyzika-k-katoda-a-anoda-m-mika.html>
37. *Lacroix precision optics* [online]. [cit. 2021-03-01]. Dostupné z: <https://lacroixoptics.com/custom-optics/achromatic-lenses>
38. *Historie optické mikroskopie*. 13 s. Dostupné také z: <https://k123.fsv.cvut.cz/media/subjects/files/123MAI/cviceni-iii.pdf>
39. *Guachipedia: Mikroskop Hansa a Zacariase Janssen. 1590*. [online]. 9.8.2019 [cit. 2021-03-01]. Dostupné z: <https://www.guachipedia.com/archives/2-microscopio-de-hans-y-zacarias-janssen-1590>
40. REICHL, Jaroslav a Martin VŠETIČKA. *Encyklopedie fyziky* [online]. [cit. 2021-04-07]. Dostupné z: <http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/1675-skenovaci-elektronovy-mikroskop#>
41. *Lumenlearning* [online]. [cit. 2021-04-07]. Dostupné z: <https://courses.lumenlearning.com/physics/chapter/29-7-probability-the-heisenberg-uncertainty-principle/>
42. A Guide to Fluorescence. *News medicals life sciences* [online]. <https://www.news-medical.net/> [cit. 2021-04-07]. Dostupné z: <https://www.news-medical.net/whitepaper/20190408/A-Guide-to-Fluorescence.aspx>
43. VŮJTEK, Milan, Roman KUBÍNEK a Miroslav MAŠLÁNĚ. *Nanoskopie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2012. ISBN 978-80-244-3102-4. Dostupné také z: [https://fyzika.upol.cz/cs/system/files/download/vujtek/nanoskopie.pdf?fbclid=IwAR2-aVn12QRXGCdeNyfp1Lload\\_8zEzPppTdt2IJzuJHCnypNxJ\\_F2lx9ig](https://fyzika.upol.cz/cs/system/files/download/vujtek/nanoskopie.pdf?fbclid=IwAR2-aVn12QRXGCdeNyfp1Lload_8zEzPppTdt2IJzuJHCnypNxJ_F2lx9ig)

44. KUBÍNEK, Roman, Milan VŮJTEK a Renata HOLUBOVÁ. *Mikroskopie atomárních sil* [online]. In: . s. 8 [cit. 2021-4-26]. Dostupné z: <http://atmilab.upol.cz/texty/mfi.pdf?fbclid=IwAR03rnP8i3Di91FcFs3n22h-bhBzAUuGkhyF9bExia4lCvFi3aa4dszwDGQ>
45. NĚMEC, Radek. *3D tiskárna typu delta*. Brno, 2019. Diplomová práce. Vysoké Učení Technické v Brně. Vedoucí práce Ing. Petr Vyroubal, Ph.D.
46. *Encyklopedie 3D tisku* [online]. Vydavatelství Nová média, 2019 [cit. 2021-4-26]. Dostupné z: <https://www.3d-tisk.cz/encyklopedie-3d-tisku/>
47. *Custompart.net* [online]. Olney Laytonsville Road [cit. 2021-4-26]. Dostupné z: <https://www.custompartnet.com/>
48. ŠŇUPÁREK, Petr a Martin MAREK. *Technická dokumentace* [online]. In: . VŠB-TU Ostrava, Fakulta elektrotechniky a informatiky, s. 15 [cit. 2021-5-14]. Dostupné z: [http://fe1.vsb.cz/kat410/studium/studijni\\_materialy/td/01-textyVSB/005\\_Drsnost%20povrchu.pdf](http://fe1.vsb.cz/kat410/studium/studijni_materialy/td/01-textyVSB/005_Drsnost%20povrchu.pdf)
49. *User's Manual: Fluoview FV3000 Confocal Laser Scanning Microscope* [online]. In: . s. 292 [cit. 2021-5-15]. Dostupné z: <http://www.bu.edu/neurophotonics/files/2019/03/FV3000-Users-Manual.pdf>
50. FLYS, O., J. BERGLUND a B.G. ROSEN. *Using confocal fusion for measurement of metal AM surface texture* [online]. 2020, , 10 [cit. 2021-5-17]. Dostupné z: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/2051-672X/ab84c3/meta>

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

$3D$	Trojrozměrný
$c$	Rychlost světla ve vakuu
$\lambda$	Vlnová délka světla
$f$	Frekvence použitého světla
$S_0$	První štěrbina
$S_1$	Druhá štěrbina
$S_2$	Třetí štěrbina
$A$	První stínítko
$B$	Druhé stínítko
$C$	Třetí stínítko
$E$	Energie fotonů
$h$	Planckova konstanta
$f_m$	Mezní frekvence kovu
$p$	Hybnost fotonu
$W_v$	Práce elektronu potřebná k uvolnění z kovu
$E_k$	Kinetická energie
$\Delta\lambda$	Comptonův posuv
$\lambda'$	vlnová délka rozptýleného svazku fotonů rentgenového záření
$XY$	Předmět pro objektiv
$X'Y'$	Obraz vytvořený objektivem, předmět pro okulár
$F_l$	Předmětové ohnisko objektivu
$F_l'$	Obrazové ohnisko objektivu
$f_l$	ohnisková vzdálenost objektivu
$f_l'$	Předmětová vzdálenost objektivu
$X''Y''$	Obraz vytvořený okulárem

---

$F_2$	Předmětové ohnisko okuláru
$F_2'$	Obrazové ohnisko okuláru
$f_2$	ohnisková vzdálenost okuláru
$f_2'$	Předmětová vzdálenost okuláru
$\Delta$	Optický interval
$Z_{ob}$	Zvětšení objektivu
$Z_{ok}$	Zvětšení okuláru
$Z$	Celkové zvětšení mikroskopu
$d$	konvenční zraková vzdálenost
$NA$	Numerická apertura
$n$	Index lomu prostředí
$u$	Aperturní úhel
$H$	Hloubka ostrosti
$\sigma$	Změna aperturního úhlu
$d_{min}$	Průměr preparátu
<i>LED</i>	Light-Emitting Diode neboli elektroluminiscenční dioda
<i>SPM</i>	Scanning probe microscopy neboli mikroskopie skenující sondou
<i>TEM</i>	Transmisní elektronový mikroskop
$r_c$	Poloměr rozptylového kroužku
$\Delta f$	Změna ohniskové vzdálenosti čočky
$\alpha$	Divergence elektronového svazku
$2D$	Dvourozměrný
<i>SEM</i>	Skenovací elektronový mikroskop
<i>S1</i>	Elektronová vrstva o vyšší energetické úrovni
<i>S0</i>	Původní energetická hladina
<i>LSCM</i>	Laser scanning confocal microscopy neboli laser skenovací konfokální mikroskop

- AOTF* Filtr propouštějící světlo o určité vlnové délce
- SPM* Scanning Probe Microscopy neboli mikroskopie skenovací sondou
- STM* Scanning Tunneling Microscopy neboli skenovací tunelová mikroskopie
- AFM* Atomic Force Microscopy neboli mikroskopie atomárních sil
- Ra* střední aritmetická úchylka profilu
- CAD* Computer Aided Design neboli počítačem podporovaný design
- FDM* Fused Deposition Modeling neboli modelování fúzním ukládáním
- SLA* Stereolitografie
- Gcode* Informační pokyny pro 3D tisk
- LSM* Laser Scanning microscopy

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1 První složený mikroskop [39]</i> .....	12
<i>Obr. 2 Mikroskop Galilea Galileiho [38]</i> .....	13
<i>Obr. 3 Chromatická vada objektivu [37]</i> .....	14
<i>Obr. 4 Achromatický objektiv [37]</i> .....	15
<i>Obr. 5 Youngův pokus [1]</i> .....	19
<i>Obr. 6 Fotoefekt vnější [36]</i> .....	21
<i>Obr. 7 Fotoelektrický jev [35]</i> .....	22
<i>Obr. 8 Comptonův jev [1]</i> .....	22
<i>Obr. 9 Binokulární světelný mikroskop [34]</i> .....	24
<i>Obr. 10 Princip vzniku obrazu ve světelném mikroskopu [17]</i> .....	25
<i>Obr. 11 Rozlišovací schopnost dvou bodových zdrojů objektivem [1]</i> .....	27
<i>Obr. 12 Definice numerické apertury [16]</i> .....	27
<i>Obr. 13 Rozdíl velikosti kužele paprsků u suchého a imerzního objektivu [33]</i> .....	28
<i>Obr. 14 Hloubka ostrosti objektivu [17]</i> .....	29
<i>Obr. 15 Pozorování ve světlém poli [17]</i> .....	31
<i>Obr. 16 Pozorování v tmavém poli [17]</i> .....	32
<i>Obr. 17 Princip polarizační mikroskopie [17]</i> .....	33
<i>Obr. 18 Princip metody fázového kontrastu [17]</i> .....	34
<i>Obr. 19 Experimentální ověření existence de Broglieho vln [41]</i> .....	35
<i>Obr. 20 Schéma transmisního elektronového mikroskopu [28]</i> .....	37
<i>Obr. 21 Elektromagnetická čočka TEM [21]</i> .....	38
<i>Obr. 22 Interakce elektronového svazku s materiálem [40]</i> .....	41
<i>Obr. 23 Schéma SEM [28]</i> .....	43
<i>Obr. 24 Vznik Fluorescence [42]</i> .....	45
<i>Obr. 25 Fluorescenční mikroskop [28]</i> .....	46
<i>Obr. 26 Průchod paprsků vzorkem s konfokálními bodovými clonami [28]</i> .....	48
<i>Obr. 27 LSCM konfigurace – (vlevo), schéma konfokálního mikroskopu podle Marvina Minského – (vpravo) [26]</i> .....	48
<i>Obr. 28 Nipkowův kotouč [32]</i> .....	49
<i>Obr. 29 Tunelová bariéra STM [43]</i> .....	51
<i>Obr. 30 Výslednice působících sil na hrot AFM [44]</i> .....	52
<i>Obr. 31 Režim s konstantní výškou / silou [Převzato z literatury 44]</i> .....	53
<i>Obr. 32 Parametr drsnosti povrchu a jeho statistický výpočet [48]</i> .....	54
<i>Obr. 33 FDM technologie aditivní výroby [47]</i> .....	56

<i>Obr. 34 SLA technologie aditivní výroby [47].....</i>	<i>57</i>
<i>Obr. 35 První vzorek tvořený jemnou strukturou pravidelných proužků .....</i>	<i>62</i>
<i>Obr. 36 Druhý vzorek tvořený pravidelnou sítí válečků o průměru 0,2 mm .....</i>	<i>63</i>
<i>Obr. 37 Třetí vzorek tvořený prodlužujícími se čárkami.....</i>	<i>63</i>
<i>Obr. 38 Povrch pravidelných teček o průměru 0,3 mm a mezeře 0,3 mm.....</i>	<i>64</i>
<i>Obr. 39 Povrch pravidelných teček o průměru 0,3 mm a mezeře 0,6 mm.....</i>	<i>64</i>
<i>Obr. 40 Povrch krátkých čárek o délce 0,6 mm a mezeře 0,3 mm .....</i>	<i>65</i>
<i>Obr. 41 Povrch krátkých čárek o délce 0,6 mm a mezeře 0,6 mm .....</i>	<i>65</i>
<i>Obr. 42 Povrch dlouhých čárek o délce 1,2 mm a mezeře 0,3 mm.....</i>	<i>66</i>
<i>Obr. 43 Povrch dlouhých čárek o délce 1,2 mm a mezeře 0,6 mm.....</i>	<i>66</i>
<i>Obr. 44 Princip technologie Low Stereolitography [30].....</i>	<i>68</i>
<i>Obr. 45 Parametry tiskárny Formlabs Form 3 [30].....</i>	<i>68</i>
<i>Obr. 46 Vytisknuté vzorky z první sady – úhel tisku 0° (první řádek), úhel tisku 45° (druhý řádek), úhel tisku 90° (třetí řádek).....</i>	<i>69</i>
<i>Obr. 47 Přístroj na oplachování nevytvrzené pryskyřice Form Wash .....</i>	<i>70</i>
<i>Obr. 48 Přístroj na dodatečné vytvrzení pryskyřice Form Cure .....</i>	<i>71</i>
<i>Obr. 49 Detail vytvrzovaných destiček ve Form Cure.....</i>	<i>71</i>
<i>Obr. 50 Zaostřovací mechanismus [49].....</i>	<i>74</i>
<i>Obr. 51 Nastavení skenování v softwarovém okně LSM režimu.....</i>	<i>74</i>
<i>Obr. 52 Nastavení obrazových kanálů.....</i>	<i>75</i>
<i>Obr. 53 Struktura prvního vzorku tvořeného jemnými proužky, tisk 0°, zvětšeno 40x .....</i>	<i>77</i>
<i>Obr. 54 Okraj prvního vzorku tvořeného jemnými proužky, tisk 0°, zvětšeno 100x.....</i>	<i>77</i>
<i>Obr. 55 Struktura prvního vzorku tvořeného jemnými proužky, tisk 45°, zvětšeno 40x .....</i>	<i>78</i>
<i>Obr. 56 Struktura prvního vzorku tvořeného jemnými proužky, tisk 90°, zvětšeno 40x .....</i>	<i>78</i>
<i>Obr. 57 Okraj druhého vzorku tvořeného pravidelnou sítí teček, tisk 0°, zvětšeno 40x.....</i>	<i>80</i>
<i>Obr. 58 Prostředek druhého vzorku tvořeného pravidelnou sítí teček, tisk 0°, zvětšeno 40x .....</i>	<i>80</i>
<i>Obr. 59 Okraj druhého vzorku tvořeného pravidelnou sítí teček, tisk 45°, zvětšeno 40x....</i>	<i>81</i>
<i>Obr. 60 Prostředek druhého vzorku tvořeného pravidelnou sítí teček, tisk 45°, zvětšeno 40x .....</i>	<i>81</i>
<i>Obr. 61 Okraj druhého vzorku tvořeného pravidelnou sítí teček, tisk 90°, zvětšeno 40x.....</i>	<i>82</i>
<i>Obr. 62 Prostředek druhého vzorku tvořeného pravidelnou sítí teček, tisk 90°, zvětšeno 40x .....</i>	<i>82</i>
<i>Obr. 63 Třetí vzorek tvořený prodlužujícími se čárkami, levý okraj, tisk 0°, zvětšeno 40x.</i>	<i>84</i>
<i>Obr. 64 Třetí vzorek tvořený prodlužujícími se čárkami, pravý okraj, tisk 0°, zvětšeno 40x .....</i>	<i>84</i>

<i>Obr. 65 Třetí vzorek tvořený prodlužujícími se čárkami, pravý okraj, tisk 45°, zvětšeno 40x</i>	85
<i>Obr. 66 Třetí vzorek tvořený prodlužujícími se čárkami, levý okraj, tisk 45°, zvětšeno 40x...</i>	86
<i>Obr. 67 Třetí vzorek tvořený prodlužujícími se čárkami, pravý okraj, tisk 90°, zvětšeno 40x</i>	87
<i>Obr. 68 Třetí vzorek tvořený prodlužujícími se čárkami, levý okraj, tisk 90°, zvětšeno 40x...</i>	87
<i>Obr. 69 Převýšení třetího vzorku při úhlu tisku 0°</i>	89
<i>Obr. 70 Kontrolní převýšení třetího vzorku při úhlu tisku 0°</i>	89
<i>Obr. 71 Převýšení třetího vzorku při úhlu tisku 45°</i>	90
<i>Obr. 72 Kontrolní převýšení třetího vzorku při úhlu tisku 45°</i>	90
<i>Obr. 73 Převýšení třetího vzorku při úhlu tisku 90°</i>	91
<i>Obr. 74 Kontrolní převýšení třetího vzorku při úhlu tisku 90°</i>	91
<i>Obr. 75 Výškový profil třetího vzorku, úhel tisku 0° (vlevo), konkrétní zkoumané místo řezu na vzorku (vpravo)</i>	92
<i>Obr. 76 Výškový profil třetího vzorku, úhel tisku 45° (vlevo), konkrétní zkoumané místo řezu na vzorku (vpravo)</i>	93
<i>Obr. 77 Výškový profil třetího vzorku, úhel tisku 90° (vlevo), konkrétní zkoumané místo řezu na vzorku (vpravo)</i>	93
<i>Obr. 78 Struktura teček se vzdáleností 300 μm – okraj (vlevo) a prostředek (vpravo)</i>	96
<i>Obr. 79 Struktura teček se vzdáleností 600 μm – okraj (vlevo) a prostředek (vpravo)</i>	97
<i>Obr. 80 Struktura krátkých čárek o délce 600 μm a vzdáleností 300 μm – okraj (vlevo) a prostředek (vpravo)</i>	98
<i>Obr. 81 Struktura krátkých čárek o délce 600 μm a vzdáleností 600 μm – okraj (vlevo) a prostředek (vpravo)</i>	99
<i>Obr. 82 Struktura dlouhých čárek o délce 1200 μm a vzdáleností 300 μm – okraj (vlevo) a prostředek (vpravo)</i>	100
<i>Obr. 83 Struktura dlouhých čárek o délce 1200 μm a vzdáleností 600 μm – okraj (vlevo) a prostředek (vpravo)</i>	101
<i>Obr. 84 Četnost a tvar buněk na referenčním povrchu – jádra (vlevo), cytoskelet (uprostřed), dohromady (vpravo)</i>	102
<i>Obr. 85 Růst buněk uprostřed pravidelné struktury teček o velikosti 300 μm a vzdálenosti 300 μm – jádra (vlevo), cytoskelet (uprostřed), dohromady (vpravo)</i>	103
<i>Obr. 86 Růst buněk na kraji pravidelné struktury teček o velikosti 300 μm a vzdálenosti 300 μm – jádra (vlevo), cytoskelet (uprostřed), dohromady (vpravo)</i>	103
<i>Obr. 87 Růst buněk na pravidelné struktuře teček o velikosti 300 μm a vzdálenosti 600 μm – jádra (vlevo), cytoskelet (uprostřed), dohromady (vpravo)</i>	104



- Obr. 88 Růst buněk na pravidelné struktuře dlouhých čárek o délce 1200  $\mu\text{m}$  a vzdálenosti 300  $\mu\text{m}$  – jádra (vlevo), cytoskelet (uprostřed), dohromady (vpravo) – zaostřeno na čárky ..... 104*
- Obr. 89 Růst buněk na pravidelné struktuře dlouhých čárek o délce 1200  $\mu\text{m}$  a vzdálenosti 300  $\mu\text{m}$  – jádra (vlevo), cytoskelet (uprostřed), dohromady (vpravo) – zaostřeno na povrch ..... 104*
- Obr. 90 Růst buněk na pravidelné struktuře krátkých čárek o délce 600  $\mu\text{m}$  a vzdálenosti 300  $\mu\text{m}$  – jádra (vlevo), cytoskelet (uprostřed), dohromady (vpravo) ..... 105*

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tab. 1</i> Excitační a emisní vlnové délky použitých laserů .....	75
<i>Tab. 2</i> Rozměry prvního vzorku tvořeného jemnými proužky .....	76
<i>Tab. 3</i> Rozměry druhého vzorku tvořeného pravidelnou sítí teček.....	79
<i>Tab. 4</i> Rozměry třetího vzorku tvořeného prodlužujícími se čárkami .....	83
<i>Tab. 5</i> Přehled rozměrů natisknuté struktury ve srovnání s navrženou strukturou třetího vzorku tvořeného prodlužujícími se čárkami, tisk 0° .....	85
<i>Tab. 6</i> Přehled rozměrů natisknuté struktury ve srovnání s navrženou strukturou třetího vzorku tvořeného prodlužujícími se čárkami, tisk 45° .....	86
<i>Tab. 7</i> Přehled rozměrů natisknuté struktury ve srovnání s navrženou strukturou třetího vzorku tvořeného prodlužujícími se čárkami, tisk 90° .....	88
<i>Tab. 8</i> Vypočítané hodnoty jednotlivých parametrů Ra pro konkrétní povrchy s ohledem na použitý úhel tisku .....	92
<i>Tab. 9</i> Navržená struktura pro první dvojici vzorků tvořená pravidelnou sítí teček, tisk 0° .....	94
<i>Tab. 10</i> Navržená struktura pro druhou dvojici vzorků tvořená pravidelnou sítí krátkých čárek, tisk 0° .....	95
<i>Tab. 11</i> Navržená struktura pro třetí dvojici vzorků tvořená pravidelnou sítí dlouhých čárek, tisk 0° .....	95
<i>Tab. 12</i> Přehled rozměrů natisknuté struktury teček se vzdáleností 300 μm ve srovnání s navrženou strukturou.....	96
<i>Tab. 13</i> Přehled rozměrů natisknuté struktury teček se vzdáleností 600 μm ve srovnání s navrženou strukturou.....	97
<i>Tab. 14</i> Přehled rozměrů natisknuté struktury čárek o délce 600 μm se vzdáleností 300 μm ve srovnání s navrženou strukturou .....	98
<i>Tab. 15</i> Přehled rozměrů natisknuté struktury čárek o délce 600 μm se vzdáleností 600 μm ve srovnání s navrženou strukturou .....	99
<i>Tab. 16</i> Přehled rozměrů natisknuté struktury čárek o délce 1200 μm se vzdáleností 300 μm ve srovnání s navrženou strukturou .....	100
<i>Tab. 17</i> Přehled rozměrů natisknuté struktury čárek o délce 1200 μm se vzdáleností 600 μm ve srovnání s navrženou strukturou .....	101

