

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA STROJNÍ

Studijní program: N0715A270014 - Materiálové inženýrství
a výrobní technologie
Studijní specializace: Bez specializace

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Studium biokompatibilních slitin titanu metodou XPS

Autor: Bc. Petra ŠOTOVÁ
Vedoucí práce: prof. Dr. Ján MINÁR, Ph.D.

Akademický rok 2020/2021

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

Fakulta strojní

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Petra ŠOTOVÁ**
Osobní číslo: **S19N0133P**
Studijní program: **N0715A270014 Materiálové inženýrství a výrobní technologie**
Studijní obor: **Materiálové inženýrství a výrobní technologie**
Téma práce: **Studium biokompatibilních slitin titanu metodou XPS**
Zadávací katedra: **Katedra materiálu a strojírenské metalurgie**

Zásady pro vypracování

1. Základy fotoemise a využití XPS v materiálovém výzkumu
2. Algoritmy používané pro analýzu XPS spekter
3. Biokompatibilní materiály na bázi titanu a jeho slitin z pohledu XPS
4. Zaškolení v SARPES laboratoři a příprava sady vzorků poskytnutých LFP-UK
5. Provedení měření XPS s hlavním zaměřením na L2,3-stavy titanu, K-stavy kyslíku a uhlíku
6. Kvantitativní analýza naměřených spekter za pomoci fitovacího programu KolXPD
7. Závěr

Rozsah diplomové práce: **50-60 stran**
Rozsah grafických prací: **fotodokumentace, obrázky**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

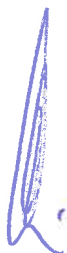
S. Hüfner, *Photoelectron Spectroscopy, Principles and Applications*, Springer; 3rd revised and enlarged ed.: Berlin, 2003.

J. F. Moulder, W. F. Stickle, P. E. Sobol, K. D. Bombem, *Handbook of X Ray Photoelectron Spectroscopy: A Reference Book of Standard Spectra for Identification and Interpretation of Xps Data*, Prkin-Elmer Corporation, Minnesota 1992.

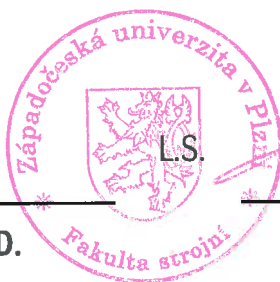
P. Kratochvíl, P. Lukáč, B. Sprušil: *Úvod do fyziky kovů*. SNTL/ALFA, Praha, 1984.

D.M. Brunette, P. Tengvall, M. Textor, P. Thomsen, *Titanium in Medicine*. Springer, Berlin, 2001

Vedoucí diplomové práce: **Prof. Dr. Ján Minár**
Nové technologie – výzkumné centrum
Konzultant diplomové práce: **Laurent Christophe Nicolai, Doktor**
Nové technologie – výzkumné centrum
Datum zadání diplomové práce: **6. října 2020**
Termín odevzdání diplomové práce: **28. května 2021**



Doc. Ing. Milan Edl, Ph.D.
děkan



Prof. Dr. Ing. Antonín Kříž, IWE
vedoucí katedry

Prohlášení o autorství

Předkládám tímto k posouzení a obhajobě diplomovou práci, zpracovanou na závěr studia na Fakultě strojní Západočeské univerzity v Plzni.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, s použitím odborné literatury a pramenů uvedených v seznamu, který je součástí této diplomové práce.

V Plzni dne: 28/5/2021



.....
podpis autora

Poděkování

Mé poděkování patří prof. Jánovi Minárovi za vedení práce a příležitost pracovat v prvotřídní laboratoři s prvotřídním týmem.

I would like to also thank to Dr. Laurent Nicolai for all his help, supervision and support.

Diplomová práce vznikla na základě řešení studentského projektu SGS-2021-030 "Vývoj nových materiálů, aplikace moderních metod jejich zpracování, ekologické výroby, svařování a testování".

ANOTAČNÍ LIST DIPLOMOVÉ PRÁCE

AUTOR	Příjmení Šotová	Jméno Petra	
STUDIJNÍ PROGRAM	N0715A270014 - Materiálové inženýrství a výrobní technologie		
VEDOUCÍ PRÁCE	Příjmení (včetně titulů) prof. Dr. Minár, Ph.D.	Jméno Ján	
PRACOVÍŠTĚ	ZČU - NTC		
DRUH PRÁCE	DIPLOMOVÁ	BAKALÁŘSKÁ	Nehodící se škrtněte
NÁZEV PRÁCE	Studium biokompatibilních slitin titanu metodou XPS		

FAKULTA	strojní	KATEDRA	KMM	ROK ODEVZD.	2020
----------------	---------	----------------	-----	--------------------	------

POČET STRAN (A4 a ekvivalentů A4)

CELKEM	60	TEXTOVÁ ČÁST	43	GRAFICKÁ ČÁST	0
---------------	----	---------------------	----	----------------------	---

STRUČNÝ POPIS ZAMĚŘENÍ, TÉMA, CÍL POZNATKY A PŘÍNOSY	Tato práce je zaměřena na studium povrchů titanových vzorků metodou XPS. Práce je rozdělena na teoretickou a experimentální část. V teoretické části je popsána metoda XPS, dále se autorka zabývá materiálovou biokompatibilitou titanu a chemickým složením povrchu titanových implantátů. V experimentu jsou zkoumány titanové a nanostrukturní titanové vzorky v následujících čtyřech modifikacích: vzorky kultivované v buněčném médiu s a bez buněk a vzorky kultivované v bakteriálním médiu s a bez bakterií. Data získaná metodou XPS byla vyhodnocena v programu KolXPD.
KLÍČOVÁ SLOVA	XPS, rentgenová fotoemisní spektroskopie, titan, nanostrukturní titan, biokompatibilita

SUMMARY OF DIPLOMA SHEET

AUTHOR	Surname Šotová	Name Petra	
STUDY PROGRAMME	N0715A270014 - Materials Science and Manufacturing Technology		
SUPERVISOR	Surname (Inclusive of Degrees) prof. Dr. Minár, Ph.D.	Name Ján	
INSTITUTION	ZČU - NTC		
TYPE OF WORK	DIPLOMA	BACHELOR	Delete when not applicable
TITLE OF THE WORK	Study of Biocompatible Titanium Alloys by Means of XPS Method		

FACULTY	Mechanical Engineering	DEPARTMENT	Material Science and Technology	SUBMITTED IN	2020
----------------	------------------------	-------------------	---------------------------------	---------------------	------

NUMBER OF PAGES (A4 and eq. A4)

TOTALLY	60	TEXT PART	43	GRAPHICAL PART	0
----------------	----	------------------	----	-----------------------	---

BRIEF DESCRIPTION TOPIC, GOAL, RESULTS AND CONTRIBUTIONS	This work is focused on a study of titanium sample surfaces by mean of XPS method. The work is divided into a theoretical and an experimental part. The description of XPS method, material biocompatibility and chemical composition of titanium surfaces are described in theoretical part of this work. The author studied titanium and nanostructured titanium samples which were differently treated as follows: samples cultivated in cell medium with and without human cells and samples cultivated in bacterial medium with and without bacteria. The acquired data were evaluated in KolXPD software.
KEY WORDS	XPS, X-ray photoemission spectroscopy, titanium, nanostructured titanium, biokompatibility

Obsah

Přehled použitých zkratk a symbolů.....	9
Seznam obrázků	10
Seznam tabulek	11
Úvod.....	12
1 Fotoemisní spektroskopie.....	13
1.1 Struktura fotoemisního spektra	15
1.2 Rentgenová fotoemisní spektroskopie	16
1.2.1 Zvýšení citlivosti povrchu metodou XPS.....	17
1.2.2 Hloubková analýza.....	18
1.3 Konstrukce spektrometru	18
1.4 Vyhodnocení dat	20
2 Materiálová biokompatibilita	21
2.1 Titan jako biomateriál	21
2.2 Slitiny titanu	22
2.2.1 Slitiny ($\alpha + \beta$) Ti.....	23
2.2.2 Slitiny β -Ti a pseudo β -Ti	23
2.3 Interakce titanu s bílkovinami a buňkami	24
3 Chemické složení povrchu implantátů	25
3.1 Oxidové filmy na implantátech před klinickým využitím	26
3.2 Filmy pěstované při pokojové teplotě na titanových vzorcích.....	27
3.2.1 Kvalitativní složení povrchu	27
3.2.2 Tloušťka oxidového filmu.....	29
3.2.3 Vliv oxidů, hydroxidů a vody	30
3.2.4 Kontaminace organickými sloučeninami	31

4 Výsledky a diskuze.....	32
4.1 Popis dodaného materiálu	32
4.1.1 Komerčně čistý titan.....	32
4.1.2 Nanostrukturní titan.....	33
4.1.3 Porovnání materiálových charakteristik dodaných vzorků	34
4.2 Popis a příprava vzorků.....	35
4.3 Vyhodnocení spekter.....	36
4.4 Porovnání spekter použitím Mg a Al zdrojů	38
4.5 Klasifikace vzorků.....	39
4.6 Průzkum základního materiálu	41
4.7 Charakterizace povrchu při emisi 60°	41
4.8 Hloubková analýza Ti 2p	46
4.9 Porovnání buněčného a bakteriálního média	48
4.10 Porovnání vzorků kultivovaných buňkami a bakteriemi.....	50
Závěr.....	52
Reference.....	54
Zdroje obrázků	58
Zdroje tabulek	60

Přehled použitých zkratk a symbolů

ASTM	American Society for Testing and Materials
BCC	Kubická prostorově uspořádaná krystalová mříž
BHI	Brain Heart Infusion, bakteriální médium použité v experimentu
ECAP	Equal Channel Angular Pressing
HCP	Hexagonální těsně uspořádaná krystalová mříž
IMFP	Inelastic Mean Free Path, neelastická střední volná dráha elektronu
MG-63	Lidské buňky použité v experimentu
PES	PhotoElectron/Emission Spectroscopy, fotoelektronová/emisní spektroskopie
RTG	Rentgenové záření
SARPES	Spin and Angle Resolved PhotoEmission Spectroscopy
UHV	Ultra High Vacuum, ultra vysoké vakuum
UK	Univerzita Karlova
XPS	X-Ray Photoemission Spectroscopy, rentgenová fotoemisní spektroskopie
ZČU	Západočeská univerzita v Plzni

E_b [eV]	Vazebná energie
E_k [eV]	Kinetická energie
E_{pass} [eV]	Energie elektronů, které budou detekovány
h [J·s]	Planckova konstanta, $h = 6,626 \cdot 10^{-34}$ J·s
ν [Hz]	Frekvence dopadajícího elektromagnetického záření
Φ [J]	Výstupní práce materiálu

Seznam obrázků

Obr. 1: Model fotoionizace (pro kovy) [1]	14
Obr. 2: Neelastická střední volná dráha (IMFP) elektronu [2]	14
Obr. 3: Ilustrační XPS spektrum pro Ti slitinu. Foto autor.	15
Obr. 4: Schéma Augerova procesu [3]	15
Obr. 5: Fotoemisní spektrum XPS vnitřní hladiny Ti 2p [4]	17
Obr. 6: Změna geometrického uspořádání XPS pro zvýšení citlivosti povrchu. Foto autor.	18
Obr. 7: Schématické znázornění konstrukce XPS aparatury [5]	19
Obr. 8: SARPES laboratoř, NTC. Foto autor.	19
Obr. 9: Model SARPES aparatury v laboratoři NTC [6]	20
Obr. 10: Rovnovážný fázový diagram slitiny Ti [7]	23
Obr. 11: Mikrostruktura Ti6Al4V [8]	24
Obr. 12: XPS spektra komerčních povrchů zubních implantátů [9]	28
Obr. 13: Průzkumová XPS spektra povrchů na komerčně čistém Ti [10]	29
Obr. 14: XPS spektrum Ti 2p [11]	31
Obr. 15: Schematický pohled na povrchový oxidový film na čistém titanu [12]	32
Obr. 16: Porovnání mikrostruktury vzorků Ti a nTi [13]	33
Obr. 17.: Model zápusky pro nanostrukturování vzorků. Foto autor.	35
Obr. 18: Příprava vzorku. Foto autor.	36
Obr. 19: Široké XPS spektrum Ti vzorku. Foto autor.	37
Obr. 20: Odečet pozadí XPS spektra. Foto autor.	38
Obr. 21: Porovnání Mg a Al anod jako zdrojů RTG záření. Foto autor.	39
Obr. 22: Porovnání Ti 2p spekter vzorků: Ti ref., Ti bakt. med., Ti bakterie. Foto autor.	40
Obr. 23: Porovnání Ti 2p spekter vzorků: Ti ref., Ti buň. med., Ti buňky. Foto autor.	41
Obr. 24: Průzkumné Ti 2p spektrum po 90 min. Ar odprašování. Foto autor.	42
Obr. 25: Geometrické uspořádání analytické komory při měření pod 0° a 60°. Foto autor.	43
Obr. 26: Porovnání nabitých XPS O 1s spekter. Foto autor.	43
Obr. 27: Ilustrační znázornění rozdílu povrchů vzorků Ti a nTi. Foto autor.	44
Obr. 28: Porovnání nabitých XPS C 1s spekter. Foto autor.	45
Obr. 29: Porovnání nabitých Ti 2p spekter při emisi při 0° a 60°. Foto autor.	46
Obr. 30: Hloubková analýza Ti 2p ref. vzorku pomocí Ar odprašování. Foto autor.	48
Obr. 31: Porovnání použitých médií dle O1s (vlevo) a C1s (vpravo). Foto autor.	49
Obr. 32: Porovnání médií dle Ti 2p. Foto autor.	50

Obr. 33: Porovnání spekter O 1s a C 1s pro Ti buňky a Ti bakterie. Foto autor.51
Obr. 34: Porovnání spekter Ti 2p pro Ti buňka a Ti bakterie. Foto autor.52

Seznam tabulek

Tab. 1: Obvyklé laboratorní zdroje RTG záření pro XPS. [1]16
Tab. 2: Legující prvky titanu. [2]23
Tab. 3: Experimentální vazebné energie povrchu Ti implantátů. [3]26
Tab. 4: Typické chemické složení oxidové vrstvy na Ti površích. [4]30
Tab. 5: Zastoupení intersticiálních prvků v komerčně čistém titanu. [5]33
Tab. 6: Materiálové charakteristiky titanu a jeho slitin. [6]36
Tab. 7: Technické parametry XPS měření.38
Tab. 8: Průměrné hodnoty E_b pro jednotlivé píky k obr. 26.44
Tab. 9: Průměrné hodnoty E_b pro jednotlivé píky k obr. 28.45
Tab. 10: Průměrné hodnoty E_b pro jednotlivé píky k obr. 29.47
Tab. 11: Technické parametry pro hloubkovou analýzu.47
Tab. 12: Průměrné hodnoty E_b pro jednotlivé píky k obr. 31.49
Tab. 13: Průměrné hodnoty E_b pro jednotlivé píky k obr. 32.50
Tab. 14: Průměrné hodnoty E_b pro jednotlivé píky k obr. 33.51
Tab. 15: Průměrné hodnoty E_b pro jednotlivé píky k obr. 34.52

Úvod

Moderní medicína nabízí nemalé množství aplikací, které by bez možnosti implantátů byly zcela nemyslitelné. Jednotlivé implantáty musí splňovat řadu různých požadavků zajišťující jejich dané využití. Jednu vlastnost mají však společnou, a tedy biokompatibilitu.

Jedním z hojně využívaných biokompatibilních materiálů je titan. Díky vrstvě oxidu titaničitého, která vzniká na jeho povrchu, dosahuje vynikající odolnosti proti korozi. Titan rovněž dosahuje dobrých mechanických vlastností a odolnosti proti únavě a opotřebení. Je netoxický a má silnou oseointegrační tendenci, tedy vývoj těsné apozice kosti k implantátu po krátké implantační době. [1, 2]

Právě buněčná odpověď lidského organismu na implantát je závislá na mnoha parametrech, jako je složení materiálu, nanogeometrie povrchu či použitý buněčný model. Klíčovou otázkou je, zda mají titanové povrchy aktivní roli při vyvolání takové diferenciaci buněk. Jednou z metod zkoumající buňky na povrchu titanu je rentgenová fotoemisní spektroskopie (XPS). Informační hloubka této metody je velmi malá, řádově v nanometrech, a proto je tato metoda vhodná ke zkoumání právě povrchu implantátů.

Tato diplomová práce vznikla na základě spolupráce výzkumného centra Nové technologie (ZČU) s Lékařskou fakultou v Plzni (UK). Cílem této práce je studium povrchů dodaných titanových a nanostrukturních titanových vzorků pomocí metody XPS. Budou zkoumány chemické vazby na povrchu vzorků různých buněčných a bakteriálních modifikací. Dalším záměrem této práce je vytvoření metodologie přípravy vzorků, osvojení práce s XPS aparaturou a následné vyhodnocení získaných dat.

Tato práce je rozdělena na čtyři základní úseky. První kapitola je věnována základům fotoemisní spektroskopie, je zde popsána obecná konstrukce spektrometru, struktura fotoemisního spektra a vybrané metody pro experimentální část. Druhá kapitola se zabývá materiálovou biokompatibilitou, kde jsou titan a jeho slitiny popsány jako biomateriály. V následující kapitole je popsáno chemické složení povrchů titanových implantátů, vliv oxidů, hydroxidů, vody a kontaminace organických sloučenin.

Experimentální část je věnována popisu dodaných vzorků, vlastnímu měření a vyhodnocování získaných dat. Je zde popsána metodologie přípravy vzorků pro uvedení do XPS aparatury, manipulace se vzorky uvnitř přístroje a použité parametry pro měření. Postup vyhodnocování analýz je navržen s ohledem na logickou návaznost mezi jednotlivými kroky.

1 Fotoemisní spektroskopie

Fotoelektronová neboli fotoemisní spektroskopie (Photoelectron or Photoemission Spectroscopy, PES) je experimentální metoda, která poskytuje kvalitativní a kvantitativní informaci o chemickém složení a elektronové struktuře měřených látek. PES se většinou používá na povrchy pevných látek, ačkoli svůj smysl má i u kapalin, například u kovových tavenin. U pevných povrchů metoda navíc k chemické informaci poskytuje náhled do povrchové atomární struktury a morfologie. [3]

Všechny fotoelektronové metody jsou založeny na fotoelektrickém efektu. Tento jev byl poprvé systematicky zkoumán Heinrichem Hertzem v roce 1887, kdy bylo zjištěno, že při osvětlení kovové destičky se za určitých okolností objeví elektrický proud, který bylo možné měřit [4]. Již o rok později bylo jasné, že tento tzv. fotoproud je způsoben částicemi se záporným nábojem. Tyto částice byly později ztotožněny s elektrony, které v roce 1897 objevil J. J. Thompson [4]. Následně byl fotoefekt popsán v roce 1905 Albertem Einsteinem, který za tento objev, po sléze v roce 1921, získal Nobelovu cenu za fyziku [5]. Další velký rozvoj spektroskopie nastal v 50. letech minulého století, kdy Kai Siegbahn vyvinul metody pro dosažení vysoce přesných měření energetických hladin v atomech jejich ozářením fotony a měřením energie elektronů emitovaných pomocí fotoelektrického jevu. Za tento přínos k vývoji elektronové spektroskopie získal Siegbahn v roce 1981 Nobelovu cenu za fyziku [6].

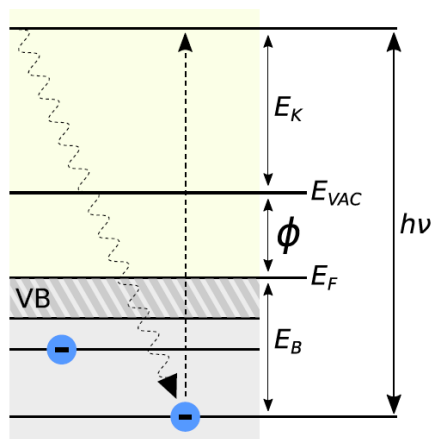
Princip fotoefektu spočívá v tom, že látky osvětlené elektromagnetickým zářením (fotony) emitují elektrony, pokud je energie přinesená fotony pro elektrony dostatečná k překonání povrchové výstupní práce. V prvním přiblížení je možné uvažovat o tomto efektu jako o jednočásticové excitaci, která opouští elektronovou strukturu a ponechává ji beze změny.

V takzvaném tříkrokovém modelu je jev rozdělen do tří oddělených fází. V prvním kroku je příchozí foton absorbován elektronem, který je takto excitován na vyšší energetickou hladinu. Ve druhé fázi se excitovaný elektron pohybuje látkou a s určitou pravděpodobností dosáhne povrchu látky bez neelastické srážky. Ve třetí fázi pak elektron překonává povrchovou výstupní práci a opouští látku do prostoru (vakua) mimo ni. [3]

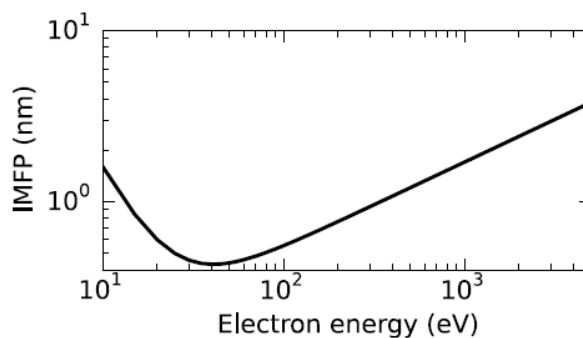
Elektron dále cestuje vakuem, je detekovaný a jeho kinetická energie je změřena příslušným analyzátozem. Emitované elektrony se označují jako fotoelektrony. Jejich kinetickou energii E_k lze určit jako:

$$E_k = h\nu - E_b - \Phi, \quad (1)$$

kde $h\nu$ je energie záření, konkrétně h značí Planckovu konstantu a ν frekvenci dopadajícího elektromagnetického záření, dále E_b představuje vazebnou energii elektronu, E_k kinetickou energii fotoelektronu a Φ výstupní práci materiálu. Tento proces je rovněž zaznamenán na obr. 1, kde VB značí valenční vrstvu, E_{VAC} úroveň vakua a E_F Fermiho hladinu.



Obr. 1: Model fotoionizace (pro kovy). [1]



Obr. 2: Neelastická střední volná dráha (IMFP) elektronu jako funkce jeho kinetické energie. [2]

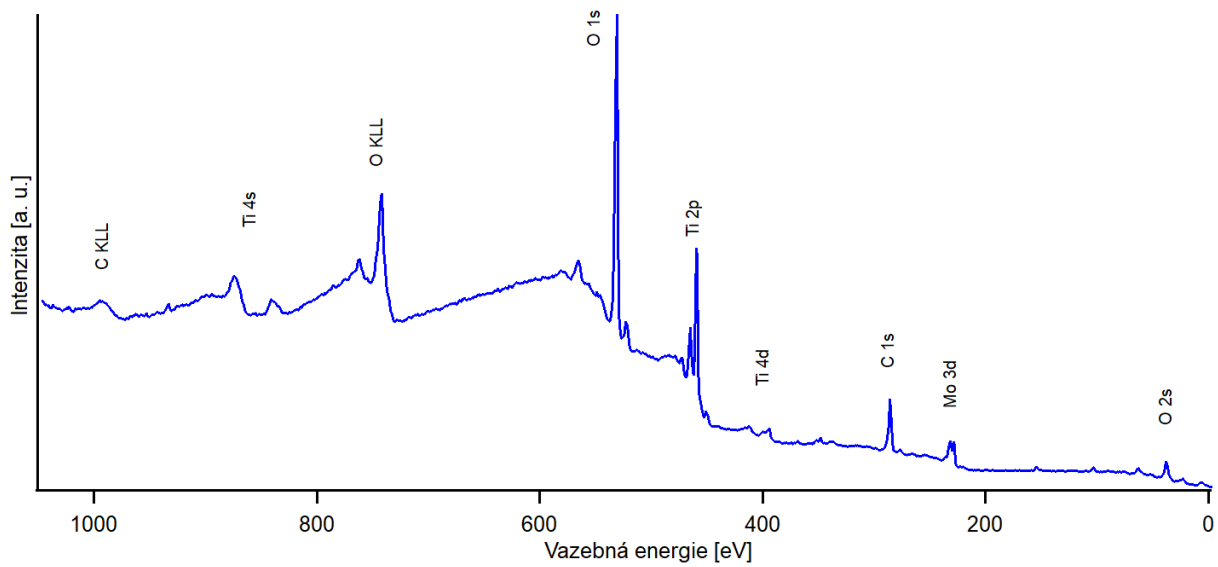
Tento vztah (1) platí pouze za předpokladu, že prostorové rozmístění a energie elektronů, které v atomu zůstanou po emisi, se v porovnání se stavem před emisí nezmění. Vazebná energie E_b nezávisí pouze na orbitální energii elektronu, ale i na korelační energii elektronů, relaxaci a relativistických procesech systému. Avšak tyto korelační efekty jsou při studiu Ti slitin zanedbatelné.

Signál je zaznamenán jako počet detekovaných elektronů, tedy množství jejich kinetické energie E_k . Na základě vzorce (1) lze získané spektrum přepočítat na intenzitu detekovaných elektronů závisících na vazebné energii E_b (obr. 3). V takovém spektru jsou vrcholy přítomny při vazebných energiích elektronů odpovídajících úrovním jádra v atomu, tedy 1s, 2s, 2p atd. [7]

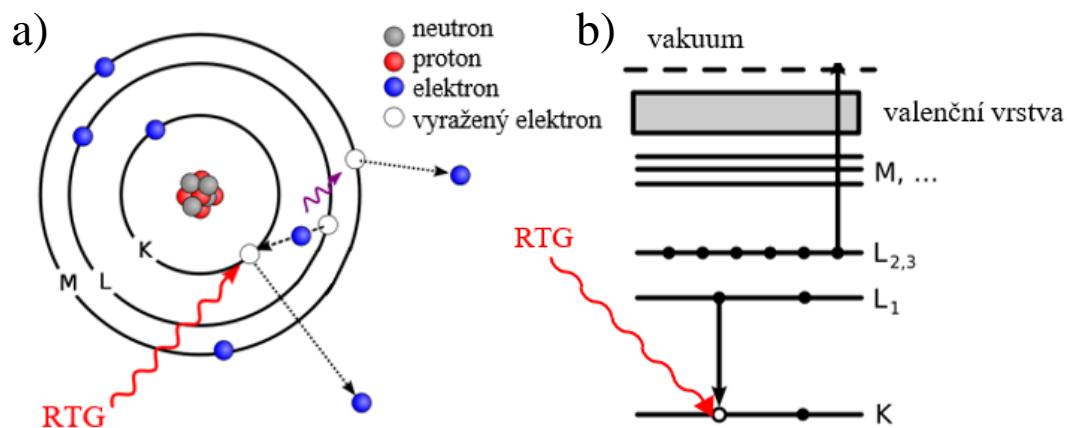
Další předností PES experimentu je povrchová citlivost. Jak již bylo uvedeno, k tomu, aby fotoelektron nesl informaci o chemickém složení, nesmí prodělat neelastickou srážku. Tyto srážky jsou popisovány tzv. neelastickou střední volnou dráhou (Inelastic Mean Free Path, IMFP) elektronu. Tato veličina závisí na kinetické energii elektronů, viz obr. 2. Pro fotoelektrony o energiích 50-1000 eV má velikost několika desetin nanometrů, což odpovídá tloušťce několika atomárních vrstev. Neelastická střední volná dráha způsobuje, že právě jen elektrony z povrchových vrstev mohou uniknout z atomu. Povrchová citlivost je dána právě tím, že nepružné srážky odstíní většinu fotoelektronů pocházejících z větších hloubek. [3, 7]

1.1 Struktura fotoemisního spektra

Hodnota vazebné energie E_b je charakteristická pro konkrétní chemický prvek. Jednotlivé píky v naměřených spektrech lze tedy jednoznačně přiřadit k určitým prvkům a stanovit tak chemické složení, jak je patrné z obr. 3. Intenzita každého píku závisí na koncentraci chemických prvků ve zkoumané oblasti (objemu blízko povrchu), pravděpodobnosti absorpce fotonů, experimentální geometrii a rozlišení spektrometru [7].



Obr. 3: Ilustrační XPS spektrum pro Ti slitinu; spektrum je tvořeno pozadím a píky, jednotlivé píky je možné na základě hodnoty vazebné energie přiřadit ke konkrétním chemickým prvkům. Foto autor.



Obr. 4: Schéma Augerova procesu: a) Dopadající vysokoenergetický elektron se srazí s elektronem jádra a zanechá po sobě prázdné místo, volné místo je vyplněno elektronem vyšší úrovně, uvolněná energie způsobí emisi Augerova elektronu. b) Energie Augerova elektronu je definována rozdílem mezi počátečním přechodem a původní úrovní energie Augerova elektronu před emisí. [3]

Ve fotoelektronovém spektru se kromě píků odpovídajícím vazebným energiím měřeného vzorku nacházejí i čáry odpovídající Augerovým elektronům. Jedná se o elektrony emitované v důsledku jejich excitace fotonem, který vznikl při zaplnění vakance na nižší energetické hladině elektronem z vyšší hladiny, viz obr. 4. Tyto píky lze poměrně snadno identifikovat, jelikož jejich pozice se při změně primární energie záření, tedy anody, nezmění. Pozadí naměřeného spektra tvoří elektrony, které před excitací prošly neelastickou srážkou.

1.2 Rentgenová fotoemisní spektroskopie

U rentgenové fotoemisní spektroskopie (X-Ray Photoemission Spectroscopy, XPS) se nejčastěji pro excitaci elektronů využívá měkkého rentgenového záření, zpravidla o energiích fotonů na čarách Mg K_{α} a Al K_{α} o energiích 1253,64 a 1486,61 eV. Hliníková anoda je využívána v případě, je-li požadována větší bulková senzitivita, naopak anoda hořčíková dosahuje, v porovnání s hliníkovou anodou, vyššího rozlišení. Kvalita rozlišení je závislá na hodnotě šířky čáry, čím je hodnota nižší, tím je rozlišení vyšší, jak je vidět v tab. 1.

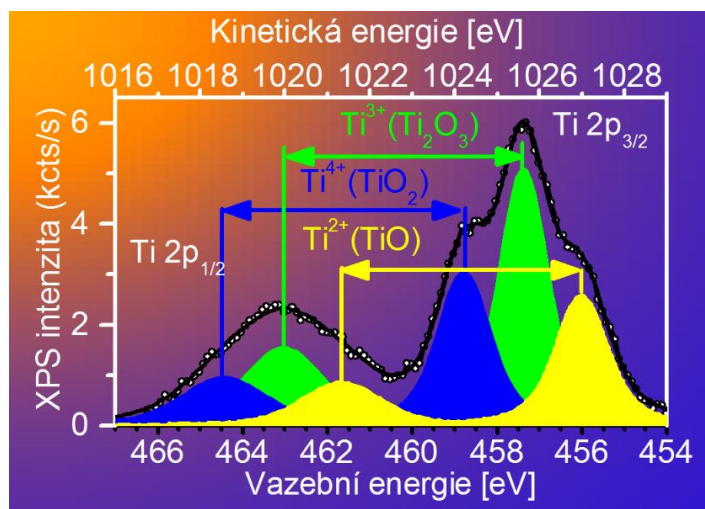
Tab. 1: Obvyklé laboratorní zdroje RTG záření pro XPS. [1]

Excitující zařízení	Energie [eV]	Šířka čáry [eV]
Mg $K_{\alpha 1,2}$	1253,64	0,68
Al $K_{\alpha 1,2}$	1486,61	0,85
Zr M_{ζ}	151,4	0,77
Zr K_{α}	8055	2,1
Cu L_{α}	931,6	-
Cr $K_{\alpha 1,2}$	5417	2,1
Zr L_{α}	2042,4	1,7
Ag L_{α}	2984,4	2,6

Přirozená šířka čáry je menší než 1 eV, což je dostatečná hodnota k určení vazebných energií na úrovni jádra v rozmezí 0,2 eV. Nízkoenergetické rentgenové excitační čáry (např. Zr M_{ζ}) jsou atraktivní na základě jejich energií 132 eV a 151 eV a jejich přirozených šířek čar 470 meV, respektive 770 meV, viz tab. 1. Jejich energie záření je mezi Al/Mg K_{α} a kvazi-monochromatickými UV excitacemi. [8]

Metoda XPS je vhodná i k měření spekter vnitřních energetických hladin. Typické energetické rozlišení analyzátorů umožňuje nejen chemickou identifikaci jednotlivých prvků,

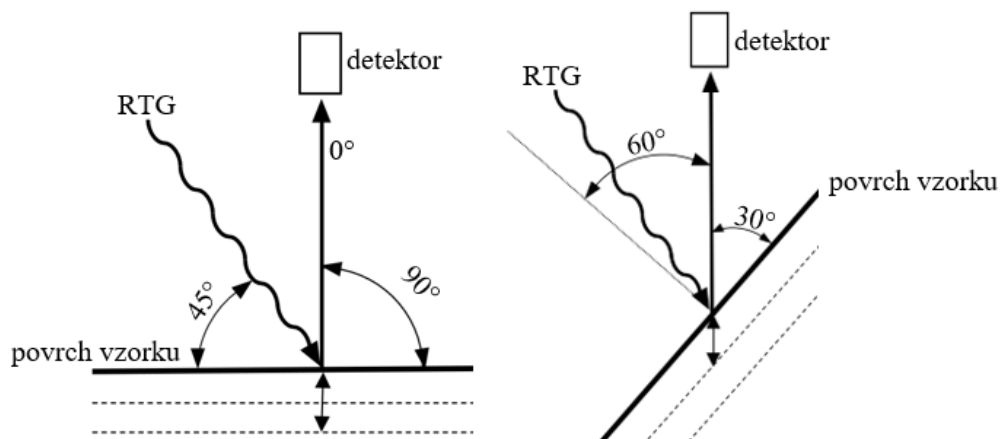
ale také hodnocení jejich chemického stavu (koordinace vazeb), jak lze vidět na obr. 5, spektrum Ti 2p se zde nachází současně ve stavu TiO, TiO₂ a Ti₂O₃.



Obr. 5: Fotoemisní spektrum XPS vnitřní hladiny Ti 2p; spektrum je tvořeno třemi různými doublety píků: TiO, TiO₂ a Ti₂O₃. [4]

1.2.1 Zvýšení citlivosti povrchu metodou XPS

Ačkoli rentgenové záření proniká do vzorku relativně hluboko, a to v řádech μm , informační hloubka je velmi malá, řádově nm. Povrchovost metody lze měnit také geometrickým uspořádáním, čehož bylo využito v experimentální části práce. Vzorky byly, ve srovnání s normální (0°) emisí, kdy kolmice k povrchu vzorku je totožná s paprskem elektronů dopadajícím do detektoru (obr. 6 vlevo), měřeny po úhlem 60° (obr. 6 vpravo), kdy kolmice k povrchu vzorku svírá s paprskem elektronů úhel 60°. Jestliže E_k elektronů získaná z RTG zdroje je stejná v obou případech, je dosaženo i stejné hodnoty IMFP, což znamená, že v případě emise 0° bude dosaženo větší hloubky, a tedy v případě 60° bude dosaženo vyšší citlivosti povrchu.



Obr. 6: Změna geometrického uspořádání XPS pro zvýšení citlivosti povrchu; obr. vlevo: emise pod 0°, obr. vpravo: 60°. Foto

1.2.2 Hloubková analýza

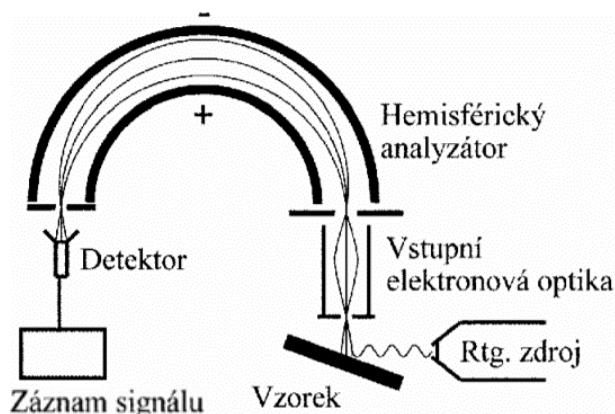
Pro průzkum změny chemického složení vzorku v závislosti na vzdálenosti od povrchu lze provést hloubkovou analýzu pomocí argonového odprašování. Princip odprašování spočívá v emisi elektronů z vlákna (katody), jejichž pohyb je urychlen do anodové klece. Katoda je udržována na potenciálu – 100 V vzhledem k anodě.

Sestava anoda-katoda je obklopena odpuzovačem, který má negativní potenciál vzhledem k anodě a katodě. Elektrony, které procházejí anodovou klecí bez ionizace atomu plynu (nebo molekuly), se odrážejí zpět do anodové klece. To zvyšuje ionizační účinnost zdroje. Jelikož celý proces funguje na základě čistě elektrostatických sil, není použití magnetů ve zdroji nutné.

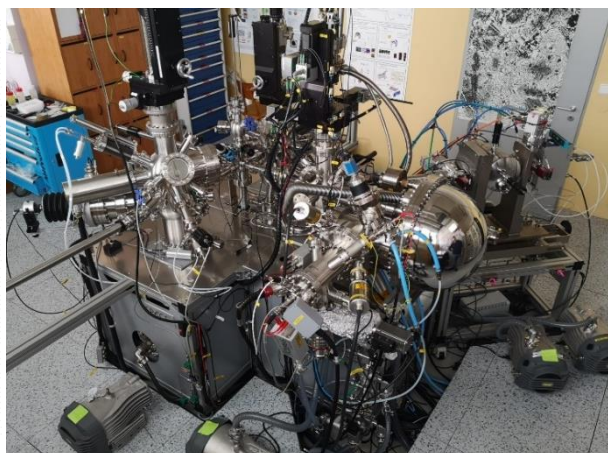
Otvor v odpuzovači umožňuje iontům uniknout. Potenciál mezi ionizační oblastí a vzorkem určuje energii paprsku. Tento otvor také vytváří tlakový rozdíl mezi vypouštěcí oblastí a zbytkem vakuové komory. Tlak uvnitř vypouštěcí oblasti je přibližně o 1 řád vyšší než v komoře.

1.3 Konstrukce spektrometru

Spektrometr je tvořen třemi hlavními částmi, a to elektronovým zdrojem (RTG lampou), hemisférickým analyzátozem a detektorem, viz obr. 7. RTG lampa jako zdroj rentgenového záření je v laboratořích využívána nejčastěji. Jedná se o vakuovou trubici obsahující anodu a katodu. Emise elektronů z nažhavené katody je způsobena potenciálním rozdílem několika kV mezi elektrodami. Emitované elektrony jsou v anodě následně rozptýleny z jader atomů. Elektrony rozptylem ztrácejí svoji energii ve formě RTG záření. [7]



Obr. 7: Schématické znázornění konstrukce XPS aparatury. [5]

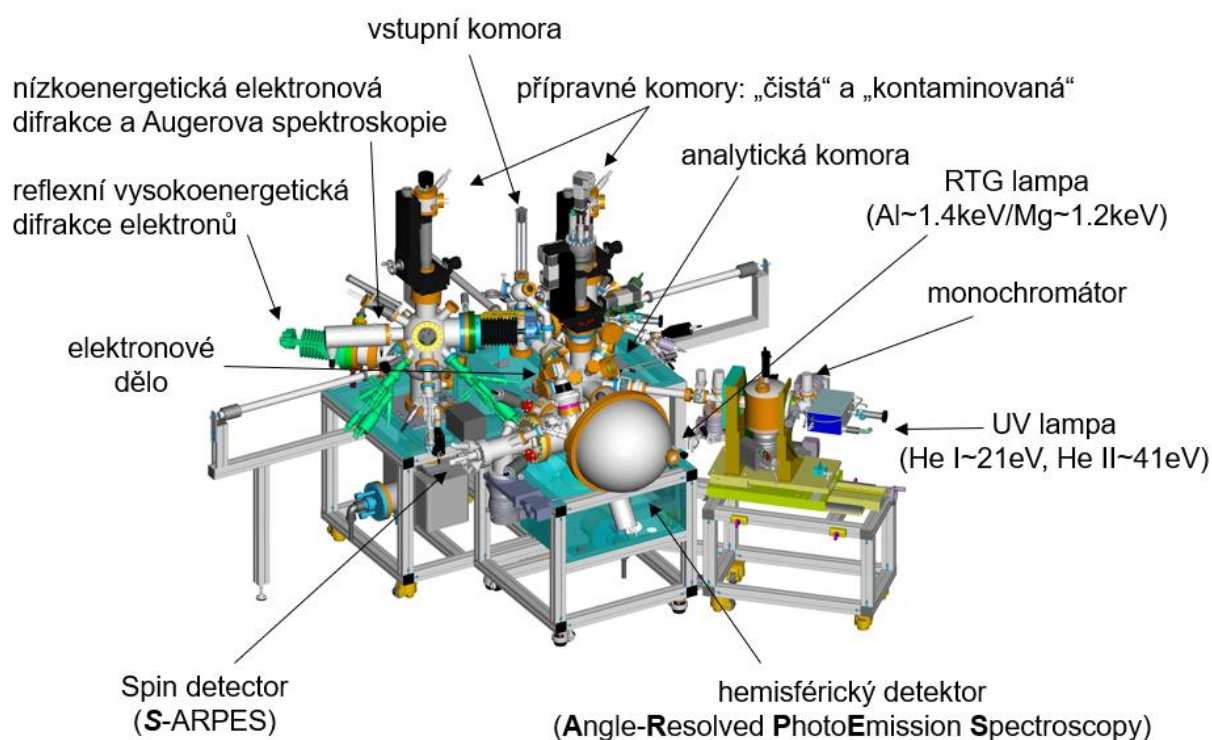


Obr. 8: SARPES laboratoř, NTC. Foto autor.

Mezi nejčastější typ analyzátoru patří elektrostatický hemisférický analyzátor. Je tvořen dvěma excentrickými polokoulemi (hemisférami) s odlišným potenciálem. Vnější hemisféra má negativní potenciál, což způsobuje změnu (ohyb) trajektorie elektronů. Naopak vnitřní hemisféra má kladný potenciál, přitahuje tak elektrony. Elektron procházející analyzátozem může tedy narazit do vnitřní či vnější hemisféry a nebo projde do detektoru. Kinetická energie, při které se elektron dostane do detektoru, je dána rozdílem potenciálů hemisfér. Signál vytvořený detektorem je dále zesilován, a poté převeden do digitální podoby. [7, 9]

Všechny části spektrometru vyžadují ultra vysoké vakuum, tedy tlak nižší než asi 10^{-7} Pa. Přítomnost vakua je důležitá pro emisi elektronů (jejich ionizace a následná ochrana proti zkratu), rentgenový přenos (snížení absorpce prostředí), přenos elektronů a čistotu povrchu zkoumaného vzorku. Adsorpce molekul plynu ze zbytkové atmosféry musí být tedy zanedbatelná, aby byl zachován čistý a stabilní povrch během celého procesu měření. [7]

Experiment bude měřen na zařízení SARPES (Spin and Ange Resolved PhotoEmission Spectroscopy) od společnosti SPECSTM, který je umístěn v laboratoři výzkumného centra Nové technologie při ZČU, viz obr. 8. Model aparatury s popisem konkrétních částí viz obr. 9.



Obr. 9: Model SARPES aparatury v laboratoři NTC. [6]

1.4 Vyhodnocení dat

Ke zpracování XPS spekter bude použit program KolXPD ve verzi 1.8.0. Fitování spekter bude realizováno pomocí odečtu Shirleyho a nebo Ranged-Shirleyho pozadí v závislosti na náročnosti morfologie pozadí a to vždy tak, aby byla odečtena celá plocha pozadí, která je tvořena, jak již bylo zmíněno, elektrony, které prošly neelastickou srážkou.

Podle Shirleyho je pozadí v každém bodě úměrné celkové ploše píku od tohoto bodu směrem k vyšším kinetickým energiím [10]. Opakovaným použitím lze tedy pozadí určit a ze spektra odečíst. Tímto postupem lze dosáhnout toho, že průběh pozadí na okrajích hladce navazuje na okraje píku, takže nastavení jeho hranic není pro určení pozadí (a tedy i plochy píku) tak kritické jako v případě pozadí lineárního. [10, 11] V případě použití Ranged-Shirleyho pozadí bude zadán jeho interval použití.

K nafitování píků je možné použít řadu možných liniových profilů. Mezi základní patří Gaussovy a Lorentzianovy funkce, které se využívají při nafitování symetrických píků, avšak ty jsou velmi zřídka adekvátní. Dále je možné využít profily na úrovni jádra při fitování asymetrických píků. V případě vzorků kovů se ukázalo, že z teoretických důvodů je třeba očekávat asymetrické profily [12]. Nicméně zaznamenaná spektra vykazují odchylky od idealizovaných profilů kvůli řadě instrumentálních a fyzikálních účinků, kterými jsou např.: funkce odezvy elektronového analyzátoru (která může být asymetrická), profil tvaru rentgenové čáry, vnitřní prodloužení životností stavu díry na úrovni jádra (obvykle se předpokládá, že má Lorentzianský charakter), rozšíření fononů a nebo diferenciální povrchové nabíjení vzorku [13]. Pro fitování symetrických píků uhlíku a kyslíku bude tedy použita Gaussova funkce a pro asymetrické píky kovů (titanu) bude použita konvoluce funkce Doniach-Šunjić [14], která zohledňuje asymetrii píku vzniklou excitací párů elektron-díra na Fermiho hladině a Gaussovy funkce. [11, 13, 15]

V důsledku nabíjení vzorku může docházet k posuvu spekter. V tomto případě bude jev korigován pomocí kalibrace na některý z píků o známé vazebné energii. Nejčastěji se jedná o pík C 1s v chemickém stavu C-C na energii 284,8 eV. [16]

Hlavním výsledkem fitování jsou získané hodnoty vazebné energie. Tyto hodnoty lze na základě porovnání s hodnotami z atlasů spekter [17-19], které obsahují data naměřených standardů, jednoznačně přiřadit k určitým prvkům a jejich chemické koordinaci.

2 Materiálová biokompatibilita

Lidské tělo vyvinulo několik mechanismů, které se aktivují při kontaktu cizího materiálu s živou tkání. Jinými slovy, dochází k zánětlivé reakci. Tato odezva lidského těla je složena z několika na sebe navazujících reakcí, které vedou k vláknitému zapouzdření implantátů [20]. Všechny tyto mechanismy byly původně vyvinuty jako ochrana těla, nebo alespoň k minimalizaci jeho poškození. V případě bioimplantátů jsou tyto reakce nežádoucí a způsobují komplikace během procesu implantace či během hojení. Právě z tohoto důvodu nelze použít jakýkoli materiál jako „biokompatibilní“, tedy materiál snášenlivý v biologickém prostředí.

Následující biomateriály patří mezi nejrozšířenější. Titan a jeho slitiny či slitiny kobaltu a chromu se využívají pro výrobu zubních protéz, srdečních chlopní, kloubních náhrad či kostních dlah. Mezi nekovové biomateriály patří polytetrafluorethylen a polyethylentereftalát, využívají se například pro výrobu cévních štěpů. [7]

2.1 Titan jako biomateriál

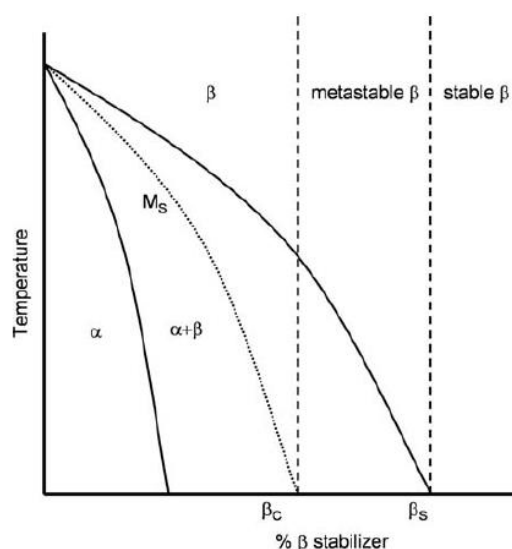
Titan a jeho slitiny se začaly využívat jako biomateriály pro implantáty koncem 60. let minulého století [21]. Jednalo se především o výrobu ortopedických implantátů, například kloubních náhrad a nebo pro fixaci zlomeniny. Zvyšující se použití kovů na bázi Ti je, kromě jejich dobré únavové odolnosti, přičítáno jejich vynikající odolnosti proti korozi *in vivo*, což je vlastnost související se stabilní vrstvou oxidu TiO_2 (tloušťka cca 4 nm) [1].

Přestože je odolnost vůči korozi Ti v neproteinových roztocích podobná vysoce kvalitní nerezové oceli S316 (dle EN X5CrNiMo17-12-2), nerezová ocel vždy vykazuje vyšší reaktivitu v buněčné kultuře. To může být způsobené tím, že proteinové roztoky urychlují korozi nerezové oceli ve srovnání s ekvivalentními solnými roztoky. Titan, na druhou stranu, nevykazuje zvýšenou rychlost koroze v biologických médiích. Napětí a opotřebení mohou nicméně urychlit rychlost koroze titanu. [1]

Další předností titanu jako biomateriálu je nižší modul pružnosti v porovnání s jinými kovovými biomateriály, konkrétně 100-110 GPa v porovnání s hodnotou 200-220 GPa [1]. Titanový bioimplantát má také silnou oseointegrační tendenci (tj. vývoj těsné apozice kosti k implantátu po krátké implantační době), tato vlastnost představuje podstatnou výhodu pro trvalé implantáty s kostními rozhraními [21].

2.2 Slitiny titanu

Titan, jakožto alotropický prvek, se může vyskytovat ve dvou různých strukturních modifikacích: jako hexagonální těsně uspořádaná (HCP), či kubická prostorově uspořádaná (BCC) krystalová mříž. První z nich je označována jako α a druhá jako β -fáze. Pod transformační teplotou 883 °C (některá literatura uvádí 882,5 °C), se titan vyskytuje jako α -fáze a nad 883 °C (882,5 °C) tedy jako β -fáze [1, 22]. S rostoucím množstvím β -stabilizačních prvků se vyvíjí ($\alpha + \beta$) struktura, nad β_c je možná metastabilní β -fáze a nad β_s vede pouze stabilní β -fáze. Čára M_s představuje teploty, pod nimiž se může martenzit tvořit v závislosti na použité rychlosti ochlazování, viz fázový diagram (obr. 10). [21]



Obr. 10: Rovnovážný fázový diagram slitiny Ti. [7]

Slitiny titanu se dělí na čtyři hlavní kategorie: α , ($\alpha + \beta$), pseudo- β a β -fáze [21]. Struktura se odvíjí na základně legujících prvků (legujícího prvku) a jejich (jeho) koncentraci. Na základě této klasifikace lze rozdělit legující prvky do tří skupin: α -stabilizátory, β -stabilizátory a neutrální prvky, viz tab. 2. Zvýrazněné prvky v tabulce jsou prvky s vysoce dobrou biokompatibilitou.

Tab. 2: Legující prvky titanu. [2]

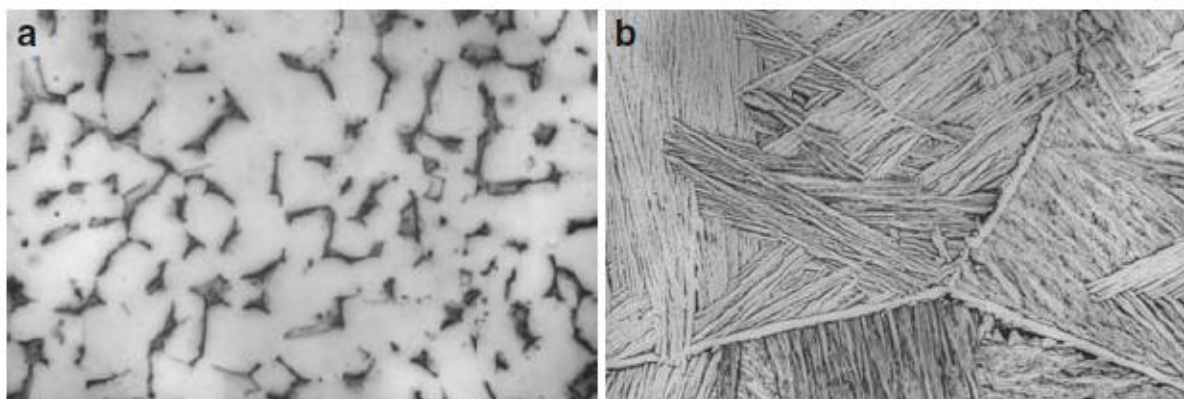
α -stabilizátory	Al	O	N	C									
β -stabilizátory	Nb	Ta	Mo	V	Fe	W	Cr	Si	Co	Mn	Ni	Cu	H
neutrální	Zr	Sn											

Stabilizátory typu α zvyšují teplotu přechodu, naopak β -stabilizující prvky teplotu snižují. Tato skutečnost může vést ke stavu, ve kterém jsou α a β -fáze přítomny společně, nebo dochází pouze k β -fázi. Tyto materiály se nazývají β -stabilní slitiny. [7]

2.2.1 Slitiny ($\alpha + \beta$) Ti

Dvoufázové ($\alpha + \beta$) Ti slitiny kombinují do jisté míry vlastnosti obou fází. Tyto vlastnosti se avšak neprojevují tak výrazně jako u jednotlivých fází. Slitina Ti6Al4V společně s jejími novějšími alternativami Ti6Al7Nb a Ti5Al2,5Fe patří mezi nejpoužívanější [21, 22]. Všechny tyto slitiny se jako biomateriály chovají podobně příznivě. V kombinaci s jejich vynikající korozivzdorností vykazují implantáty ve srovnání s jinými kovovými biomateriály i vynikající vlastnosti proti korozní únavě. Mechanické vlastnosti jsou závislé na poměrném složení jednotlivých fází.

Tyto slitiny se zpracovávají tzv. mletím za tepla, vznikají tak malá α zrna, která jsou obklopena β částicemi, viz. obr. 11a. Takto vzniklá struktura má výbornou odolnost vůči iniciaci únavové trhliny a vynikající únavovou pevnost při vysoko-cyklová únavě. Lamelární struktura Ti6Al4V, obr. 11b, zobrazuje opět světlejší plochy jako α -lamely, které jsou odděleny tmavými lamelami β -fáze. [21, 22]



Obr. 11 Mikrostruktura Ti6Al4V: a) světlé oblasti – α -Ti, tmavé oblasti – β -Ti, b) lamelární struktura. [8]

2.2.2 Slitiny β -Ti a pseudo β -Ti

Tyto slitiny mají vyšší množství β -stabilizujících prvků, přičemž molybden vykazuje největší vliv [21]. Mají vynikající korozivzdornost a nízký Youngův modul pružnosti (44-51 GPa pro za studena kalenou pseudo- β slitinu Ti13Nb13Zr) [21]. Kromě toho jsou tyto materiály tvárné a vykazují zlepšenou odolnost proti opotřebení a únavě [23].

Vzhledem k tomu, že se výzkumníci zaměřují na materiály s větší tuhostí (s nižším Youngovým modulem pružnosti), jsou nedávno vyvinuté materiály pro bioimplantáty téměř výhradně β strukturami. Kromě toho je mezi β -stabilizátory více biokompatibilních prvků. Bylo prokázáno, že titanové slitiny jsou chemicky stabilní a současně mají efektivní mechanickou pevnost. [7]

2.3 Interakce titanu s bílkovinami a buňkami

Titan snadno adsorbuje proteiny z biologických tekutin. Mezi specifické proteiny patří například albumin, laminin V, glykosaminoglykany, kolagenáza, fibronectin, komplementové proteiny a fibrinogen [1]. Neexistují avšak žádné obecně přijímané závěry o důležitosti proteinového filmu pro biologickou reakci na titan.

Ti povrchy mohou také podporovat růst a diferenciaci (vývojové rozrůznění) buněk. Stejně jako u všech ostatních bioimplantátů jsou na biomateriálu nejprve zaznamenány neutrofilie a makrofágy. Velké buňky se dále tvoří z aktivovaných makrofágů. Je známo, že oseoprogenitorové buňky migrují do místa implantátu a diferencují se na osteoblasty, které tvoří kost.

Bylo publikováno nemalé množství článků o interakcích buněk s povrchy titanu. Vzhledem k tomu, že nikdy nebyla prokázána korelace mezi adhezí buněk *in vitro* a hojením *in vivo*, je hodnota těchto studií pro predikci účinnosti kostních implantátů sporná [1]. Z tohoto důvodu byly vzorky pro experimentální část připraveny v roztoku simulující lidské tělo na Lékařské fakultě v Plzni, čímž by mělo dojít ke snížení tohoto nechtěného jevu. Klíčovou otázkou je, zda mají povrchy Ti aktivní roli při vyvolání takové diferenciaci buněk [1].

3 Chemické složení povrchu implantátů

XPS se obzvláště osvědčila jako metoda pro zkoumání složení titanových (implantátových) povrchů. Je to dáno kombinací následujících vlastností. Informační hloubka je 5-10 nm, což je velice příznivé vzhledem k tomu, že vrstva oxidu je nejdůležitější z hlediska biokompatibility. Naměřená spektra jsou relativně snadno vyhodnotitelná. Proveditelnost extrakce kvantitativních nebo semikvantitativních koncentrací prvků a citlivost měřených energií vazeb elektronů na místní chemické prostředí (oxidační stav a informace o funkční skupině) [1, 24].

Typické vazebné energie experimentálně naměřené XPS metodou pro povrchy titanu a jejich odpovídající přiřazení k chemickým stavům jsou uvedeny v tab. 3. Hodnoty z tabulky, především pro titan, kyslík a uhlík, budou dále použity v experimentální části této práce.

Tab. 3: Experimentální vazebné energie prvků často zaznamenaných na povrchu Ti implantátů a jejich přiřazení ke konkrétním chemickým stavům. [3]

Chemický prvek/orbital	XPS vazebná energie [eV]*	Poznámka
Ti 2p _{3/2}	458,8-459,2	TiO ₂ , oxidační stav +IV, nejstabilnější a nejhojnější oxid, v přírodních a anodických oxidových filmech
	457,2-457,6	Ti ₂ O ₃ , oxidační stav +III, přítomný na rozhraní oxid/kov
	455,1-455,7	TiO, oxidační stav +II, přítomný na rozhraní kov/oxid
	453,6-454,2	Ti, oxidační stav 0
Al 2p	74,4-74,8	Al ₂ O ₃ , nejstabilnější stav oxidace +III
Nb 3d _{5/2}	207,5-207,8	Nb ₂ O ₅ , nejstabilnější stav oxidace +V
V 2p _{3/2}	≈ 516,4	V rozsahu stechiometrie od V ₂ O ₅ do V ₂ O ₃
O 1s	530,2-530,6	O ^{-II} (oxid, TiO ₂)
	531,3-532,2	OH (hydroxid)
		C=O (organické adsorbáty, kontaminanty)
	532,5-533,4	OH ₂ (chemisorbovaná voda)
C 1s	281-282	Karbidy (např. TiC)
	285,0	C-C, C-H (uhlovodíkové kontaminanty)
	286,4-286,7	C-O (organické adsorbáty, např. alkohol nebo alkoholáty)
	287,8-288,0	C=O (organické adsorbáty, např. ketony)

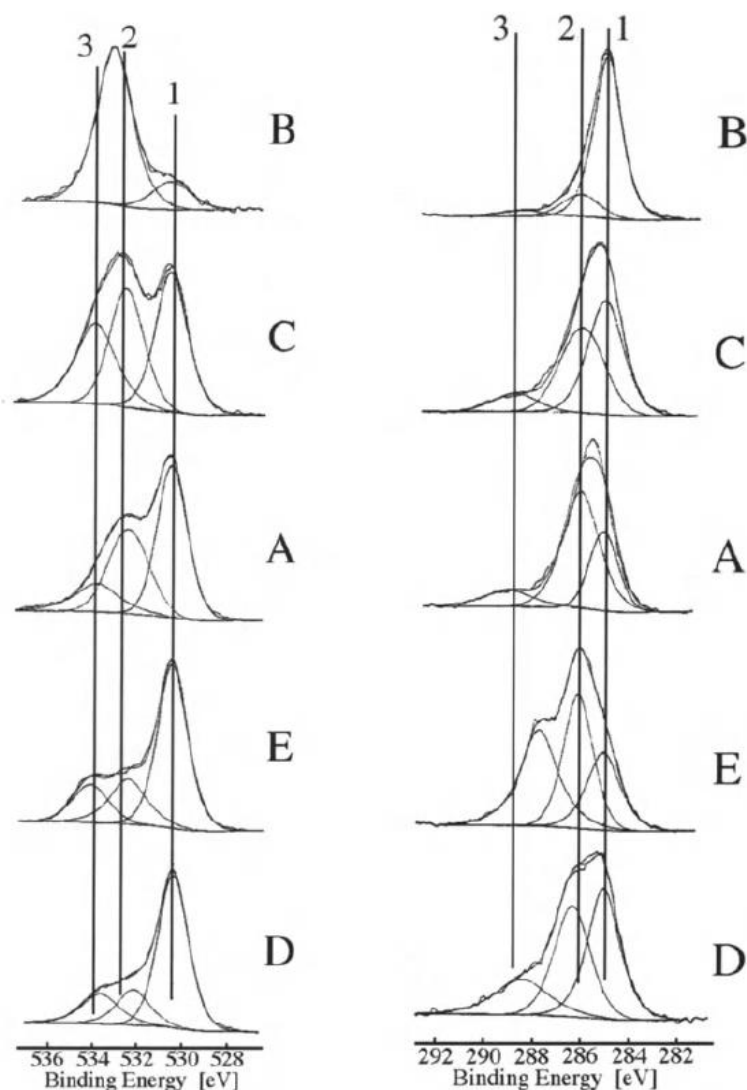
	288,5-289,3	COO (organické adsorbáty, např. karboxylová kyselina, karboxyláty nebo estery) CO ₃ ^{-II} (uhličitan)
Ca 2p	≈ 347	Ca ^{+II} adsorbované ionty nebo fosforečnan vápenatý
P 2p	132,4-132,6	PO ₄ ^{-III} (adsorbovaný fosfát)
	133,1-133,4	HPO ₄ ^{-II} (adsorbovaný hydrogenfosforečnan)
	134,2-134,6	H ₂ PO ₄ (adsorbovaný dihydrogenfosfát)
N 1s	396,2-397,0	Nitridy (např. TiN)
	≈ 399-402	NH ^{+IV} (amoniak), organické aminy
	≈ 407-408	Dusičnan (NO ₃ ⁻)
Si 2p	≈ 102-103	Křemičitan
	≈ 101-102	Siloxany (časté kontaminanty)

*Vazebné energie obecně odkazované na C1s při 285,0 eV.

Tato technika je nejenom velmi užitečná pro zkoumání základních vlastností povrchů titanu, ale i pro studium a optimalizaci povrchových vlastností implantátů v praxi. Lze tak sledovat kontaminaci konkrétních výrobních a čistících procesů, dále měřit tloušťky oxidového povlaku a monitorovat účinek povrchových modifikací, jako je silanizace, fosfátování vápníku či anodizace.

3.1 Oxidové filmy na implantátech před klinickým využitím

Na obr. 12 vlevo lze vidět vazebné energie vazby O 1s. Poloha 1 je typická pro TiO₂, zatímco polohy 2 a 3 jsou reprezentativní pro povrchový hydroxid, vodu, organické funkční skupiny obsahující kyslík a další oxidy, jako je SiO_x. Na obr. 12 vpravo lze vidět vazebné energie vazby C 1s. Poloha 1 je typická pro kontaminaci uhlovodíky a organokřemíky (křivka B), zatímco polohy 2 a 3 jsou charakteristické pro různé organické a karbonátové druhy obsahující kyslík. [1]



Obr. 12: XPS spektra komerčních povrchů zubních implantátů. [9]

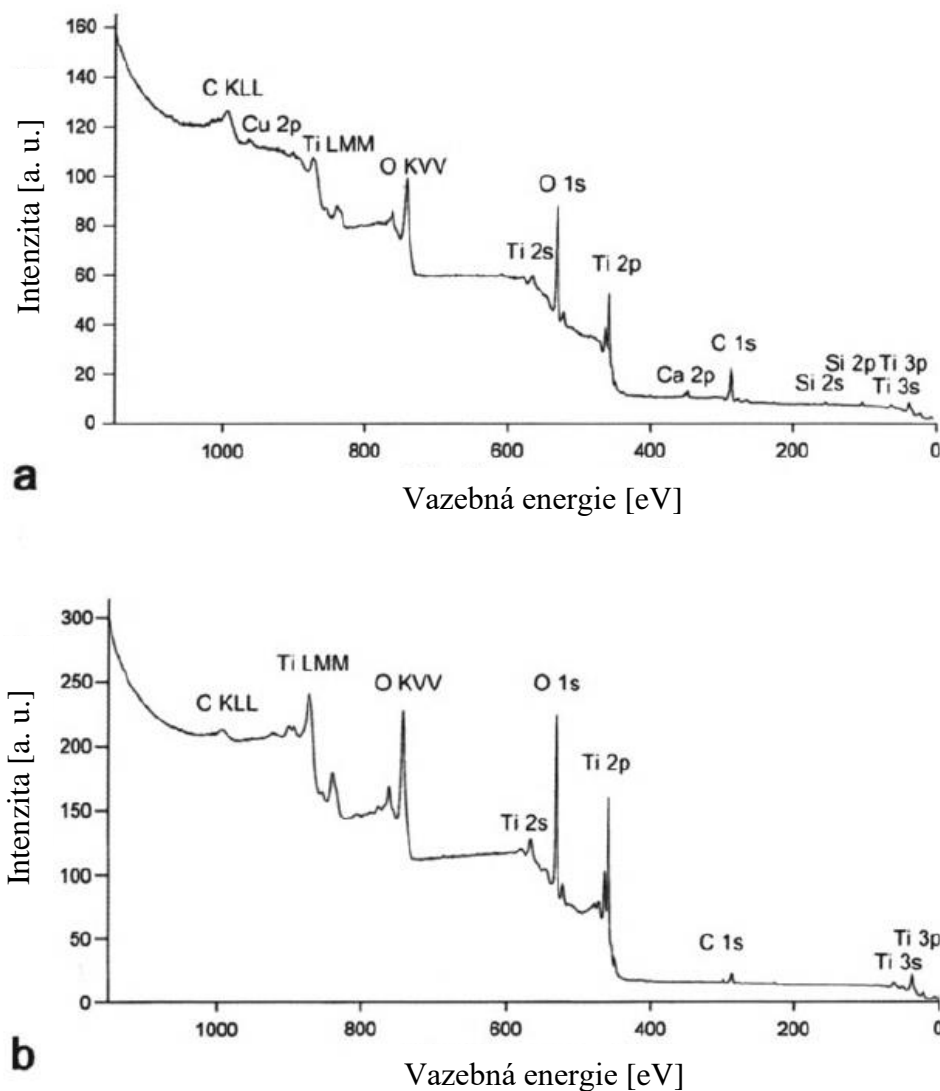
3.2 Filmy pěstované při pokojové teplotě na titanových vzorcích

Na růst filmu oxidu titaničitého má vliv řada různých aspektů, např. chemické složení, struktura či tloušťka vzorku. Právě tyto vlastnosti jsou relevantní pro biologickou účinnost titanových implantátů a dalších biomedicínských zařízení. Jednotlivé aspekty budou popsány v následujících odstavcích. [1]

3.2.1 Kvalitativní složení povrchu

Bylo dokázáno, že i na titanových površích, u kterých byl kladen důraz na čistotu výroby a přípravy, se vyskytuje film TiO_2 . Tento film má tloušťku několik nanometrů, kryje a chrání podkladový kov. Spektra na obr. 13 demonstrují chemické složení povrchů komerčně čistých titanových vzorků, které byly mechanicky leštěny. Obr. 13a zachycuje povrch před odmaštěním

a 13b po odmaštění v organických rozpouštědlech, pasivaci v kyselině dusičné a konečném čištění plazmou v kyslíkové atmosféře. Tento proces je právě určený k odstranění jak anorganických, tak i organických kontaminantů obecně přítomných na mechanicky leštěných a jinak vyrobených kovových površích. [25]



Obr. 13: Průzkumová XPS spektra povrchů na komerčně čistém Ti s oxidovým filmem pěstovaným při pokojové teplotě: a) mechanicky leštěný vzorek, b) mechanicky leštěný a vyčištěný vzorek. [10]

Spektra z obr. 13 byla pořízena metodou XPS pomocí Al K_{α} záření pod úhlem 0° emise elektronů vzhledem k povrchu vzorků. Ve spektru, které zachycuje povrch po odmaštění (13b), dominují píky, které patří titanu, kyslíku a uhlíku. Jedná se právě o kontaminaci uhlovodíky,

ke které dochází vystavením vzorků okolí atmosféře. Této kontaminaci nelze zabránit. Chemické složení viz následující tabulka č. 4. [1]

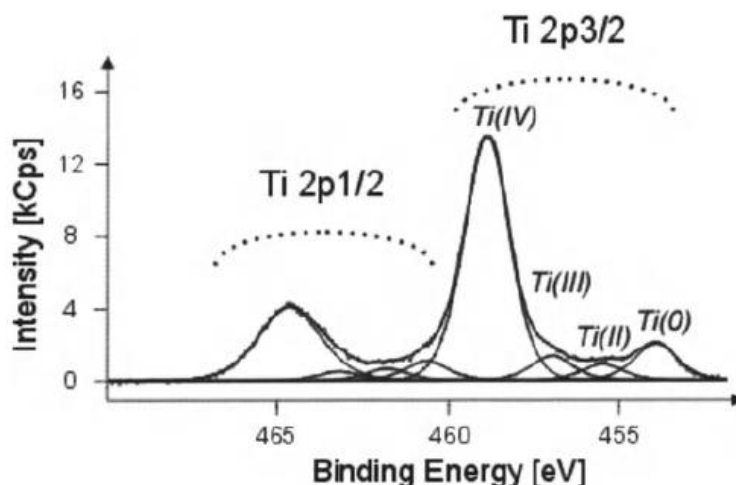
Tab. 4: Typické chemické složení oxidové vrstvy na Ti površích. [4]

Chemický prvek	Leštěný povrch [%]	Leštěný a odmaštěný povrch [%]
Ti	14,8±1,6	27,8±0,8
O	46,8±1,9	58,8±1,5
C	30,9±2,1	12,8±1,8
N	0,6±0,2	0,6±0,2
Si	1,0±0,4	nezjištěno
Ca	0,9±0,3	nezjištěno
Pb	0,3±0,2	nezjištěno
Zn	0,7±0,6	nezjištěno
Cu	0,4±0,1	nezjištěno
Tloušťka vrstvy [nm]	4,3±0,2	5,1±0,1

Koncentrace uhlíku 20-30 %, zjištěné pomocí XPS, se zdají vysoké, jedná se ale o typické hodnoty vzorků, které byly po určitou dobu vystaveny působení atmosféry. Po odmaštění je dosahováno hodnot 5-15 % (viz tab. 4). Pokud by byl vzorek opět vystaven působení vzduchu, tato hodnota opět vzroste. Hodnota tloušťky oxidové vrstvy referenčního vzorku po čištění plazmou v kyslíkové atmosféře vzrostla cca o 0,8 nm.

3.2.2 Tloušťka oxidového filmu

Spektrum XPS Ti 2p na obr. 14 pochází z typické hloubky vzorkování od 0 do cca 6 nm (toto platí pro úhel vyzařování elektronů 0° vzhledem k povrchové rovině vzorku). Signál Ti 2p poskytuje jasný důkaz, že chemické složení (oxidační stav, stechiometrie) není výlučně výsledkem TiO₂, ale jsou zde přítomny další druhy oxidů, i když v nižších koncentracích, pro které je přítomen Ti ve stavu nižší oxidace odpovídajícím nižším vazebným energiím XPS. Polohy píku lze přiřadit oxidačnímu stavu + IV pro TiO₂, + III (Ti₂O₃), +II (TiO) a 0 (Ti kov). Tohoto faktu bude využito při fitování XPS spekter v experimentální části. [1]



Obr. 14: XPS spektrum Ti 2p. Složení oxidového filmu ukazuje podíly od Ti v oxidačních stavech + IV (TiO_2), + III (Ti_2O_3), + II (TiO) a 0 (Ti kov). [11]

3.2.3 Vliv oxidů, hydroxidů a vody

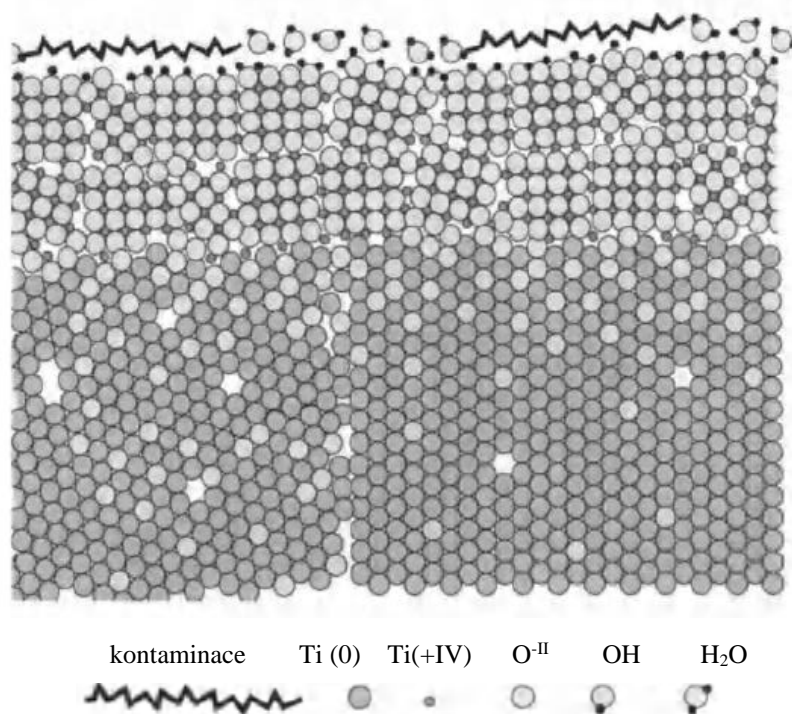
Pro materiály, které jsou v přímém kontaktu s biologickým prostředím, je rozhodující, kromě chemického složení a tloušťky oxidové vrstvy, chemická povaha kyslíku. Tento prvek může být přítomen ve vrstvě v následujících modifikacích:

- oxid (O^{II}): tvoří hlavní část oxidového filmu,
- hydroxid (OH): údajně je přítomen v nejbližší povrchové vrstvě,
- voda (H_2O): uvádí se, že je chemisorbována (koordinovaně vázána na povrchové titanové kationty) a fyzorbována (tj. méně silně adsorbována) na povrchu oxid/hydroxid, kombinovaný účinek tvorby hydroxidu a adsorpce vody na oxidové povrchy se často označuje jako „hydratace“,
- organické sloučeniny obsahující kyslík – obecně náhodně adsorbované produkty kontaminace a reakce organických molekul s povrchem oxidu titaničitého: takové sloučeniny se snadno adsorbují nebo se reaktivně tvoří na povrchu titanu (oxidu) v důsledku vysoké adsorpční síly čistých filmů oxidu titaničitého a jejich vysoké reaktivity vůči organickým druhům tvořící povrchové komplexy,
- anorganické druhy obsahující kyslík, jako je dusičnan (NO_3), fosforečnan (PO_4^{III}),
- křemičitan (SiO_4^{IV}) nebo síran (SO_4^{II}), často přítomné jako stopy. [1]

3.2.4 Kontaminace organickými sloučeninami

Oxidový film na povrchu titanového vzorku je považován za velice stabilní, je přesto reaktivní vůči kontaminantům, a to včetně organických molekul. Charakteristika povrchové vrstvy je vyobrazena na obr. 15 a souhrnně popsána následovně.

- Oxidový film je buďto amorfní, nebo nanokrystalické povahy a obvykle o tloušťce 3 až 7 nm, sestávající hlavně z nejstabilnějšího oxidu TiO_2 .
- Rozhraní Ti/TiO_2 je charakterizované poměrem $\text{O}:\text{Ti}$ měnícím se postupně od 2:1 k menšímu poměru (ale ne k nule) ve vrstvě TiO_2 .
- Hydroxid a chemisorbovaná voda jsou silně vázané na kationty Ti na nejvzdálenějším povrchu s vlastnostmi závislými na podmínkách výroby povrchu a historii vzorku.
- Nejvzdálenější povrchová vrstva, která se skládá (alespoň částečně) z organických látek buď adsorbovaných (jako jsou uhlovodíky), nebo z kovově-organických druhů, jako jsou alkoxidy nebo karboxyláty titanu, jejichž koncentrace závisí nejen na tom, jak úspěšně byl povrch původně připraven (očištěn), ale také na době expozice okolní a na kvalitě atmosféry během skladování.

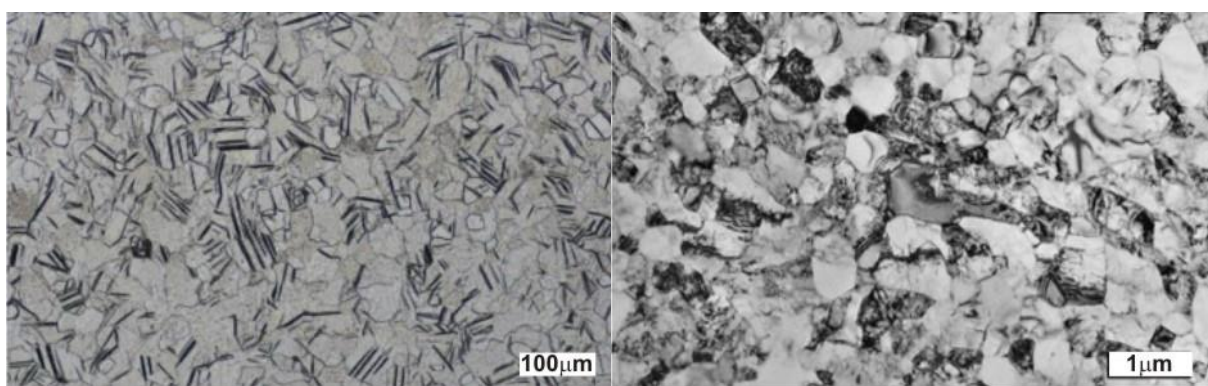


Obr. 15: Schematický pohled na povrchový oxidový film na čistém titanu. [12]

4 Výsledky a diskuze

4.1 Popis dodaného materiálu

Vzorky pro experiment byly dodány Lékařskou fakultou v Plzni (UK). Jedná se o komerčně čisté titanové vzorky (Ti) a nanostrukturální titanové vzorky (nTi), které se svým chemickým složením od Ti neliší, avšak dochází k poklesu velikosti zrn, viz. obr. 16, což zaručuje zvýšení materiálových pevnostních charakteristik. Z obr. 16 je patrný rozdíl mikrostruktury Ti (vlevo) a nTi (vpravo), na daných snímcích dosahují zrna střední velikosti cca 45 μm pro Ti a 50 nm pro nTi. Tyto vzorky byly dodány ve stavu referenčním (čisté, bez kultivace) a modifikovaným.



Obr. 16: Porovnání mikrostruktury vzorků Ti a nTi; střední velikost zrna Ti vzorku před nanostrukturování (vlevo) dosahuje vel. cca 45 μm , po nanostrukturování (vpravo) cca 50 nm. [13]

4.1.1 Komerčně čistý titan

Komerčně čistý titan je hojně využívaným materiálem právě v oblasti implantátů. Jedná se o cenově výhodnější variantu chemicky čistého titanu, který je spíše využíván pro laboratorní účely. Chemické složení komerčně čistého titanu se liší přítomností dalších prvků, které pozměňují jeho mechanické vlastnosti. Dle množství těchto aditivních prvků lze dle ASTM (American Society for Testing and Materials) rozdělit do 4 stupňů. Rozdělení včetně chemického složení je patrné z tab. 5. [5]

Tab. 5: Zastoupení intersticiálních prvků v komerčně čistém titanu podle standardů ASTM. [5]

ASTM stupeň	Ti [%]	Fe [%]	O _{max} [%]	H _{max} [%]	C _{max} [%]	N _{max} [%]
Stupeň 1	99,5	0,20	0,18	0,015	0,08	0,03
Stupeň 2	99,2	0,30	0,25	0,015	0,08	0,03
Stupeň 3	99,1	0,30	0,35	0,015	0,08	0,05
Stupeň 4	99,0	0,50	0,40	0,015	0,08	0,05

Komerčně čistý titan 1. stupně dle ASTM dosahuje v porovnání s ostatními stupni čistoty nejvyšší hodnoty 99,5 % obsahu titanu, jinými slovy, obsah intersticiálních prvků je nejnižší, a právě proto tento materiál dosahuje nejnižší mechanické pevnosti a naopak nejvyšší tvrdosti. Vykazuje houževnaté chování i při poměrně nízkých teplotách. Jako většina těchto titanových slitin dosahuje výborné korozní odolnosti a má dobrou snášenlivost i ve vysoce oxidačním prostředí. Hlavní využití nachází v prostředí, kde je vyžadována odolnost vůči korozi za požadavků sníženého obsahu železa a dalších nečistot. Z uvedených stupňů dosahuje nejvyšší obrobiteľnosti, čehož je společně s broušením a leštěním využíváno právě při přípravě finálního tvaru implantátu. [2]

Komerčně čistý titan 2. stupně dle ASTM dosahuje obdobných obecných vlastností jako komerčně čistý titan 1. stupně. Významným rozdílem jsou mechanické vlastnosti, na úkor snížení obsahu titanu o 0,3 % a zvýšení obsahu železa o 0,1 % a kyslíku o 0,07 % dochází k výraznému navýšení meze kluzu a pevnosti, v obou případech přibližně o 105 MPa. Naopak přítomností intersticiálních prvků dochází k poklesu tažnosti materiálu o 4 %. Slitina komerčně čistého titanu 2. stupně dosahuje taktéž velmi dobré obrobiteľnosti. [2]

U komerčně čistého titanu 3. stupně ale ASTM dochází, jako v předešlém případě, na základě přítomnosti intersticiálních prvků k nárůstu pevnostních vlastností a poklesu tažnosti. Ve srovnání s komerčně čistým titanem 2. stupně nedochází ke změně obsahu železa, obsah dusíku vzrostl o 0,02 % a taktéž obsah kyslíku o 0,10 %. Mez kluzu dosahuje hodnoty 377 MPa, mez pevnosti 440 MPa a tažnost 18 %. Komerčně čistý titan 3. stupně má dobrou obrobiteľnost a dosahuje výborné korozivzdornosti v prostředích vysoce oxidačních až středně redukčních, včetně chloridů. [2]

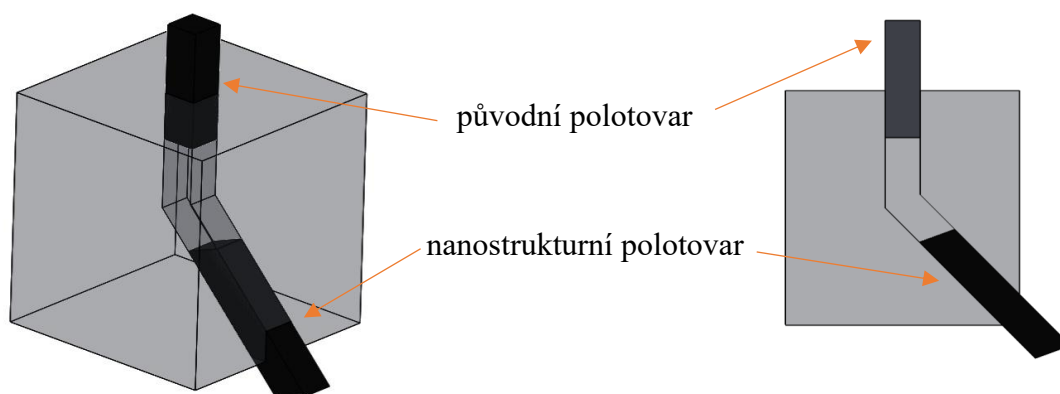
Pro experiment byl zvolen komerčně čistý titan 4. stupně ale ASTM. Obsahuje v porovnání s ostatními uvedenými stupni nejvyšší množství intersticiálních prvků. Obsah železa dosahuje 0,5 %, kyslík až 0,4 %. Komerčně čistý titan 4. stupně dosahuje vysokých hodnot pevnostních vlastností. Mez kluzu dosahuje minimální hodnoty 480 MPa, mez pevnosti min. hodnoty 550 MPa. Je vhodná k obrábění a odolnost proti korozní únavě v solných lázních dosahuje opět vysokých hodnot. [2]

4.1.2 Nanostrukturní titan

Nanostrukturní titan jako obdoba komerčně čistého Ti vzbuzuje v oblasti implantologie čím dál tím větší zájem. Jedná se o titanovou slitinu se specifickým procesem výroby, během které dochází k velké plastické deformaci. Metoda úhlového protlačování kanálem stejného průřezu s následným válcováním (Equal Channel Angular Pressing, ECAP) probíhá za teplot

450 °C a velmi vysokých tlaků. Metoda ECAP je vhodná právě pro zpracování tyčových titanových polotovarů, které mohou být následně obrobeny do finálního tvaru implantátu. Zařízení pro ECAP, viz. model na obr. 17, tvoří zápusťka (blok materiálu) s protlačovacím kanálem lomeným pod úhlem Φ , který je obvykle 90 – 135°.

Vzorek je vtažen do zápusťky pístem lisovacího stroje. Využitím několikanásobného opakování deformačního procesu je dosaženo značného smykového přetvoření struktury materiálu, dochází tedy ke změně mikrostruktury krystalů. Během tohoto procesu dochází k výrazné deformaci bez změny geometrie polotovaru, výsledná struktura dosahuje velikosti zrn v řádu nanometrů. [2]



Obr. 17: Model zápusťky pro nanostrukturování vzorků; tyčový (původní) polotovar je vtažen do zápusťky pístem lisovacího stroje za vysokých teplot a tlaků, během protlačování lomeným kanálem dochází k poklesu velikosti zrn daného polotovaru. Foto autor.

Takto upravený materiál dosahuje vyšších materiálových pevnostních charakteristik, dochází například k poklesu Youngova modulu pružnosti, viz tab. 6. Nanostrukturní titan se svým chemickým složením od komerčně čistého Ti neliší a lze opět rozdělit dle ASTM do 4 stupňů, viz tab. 5. Pro experiment byl opět zvolen stupeň 4 dle ASTM pro nTi vzorky.

4.1.3 Porovnání materiálových charakteristik dodaných vzorků

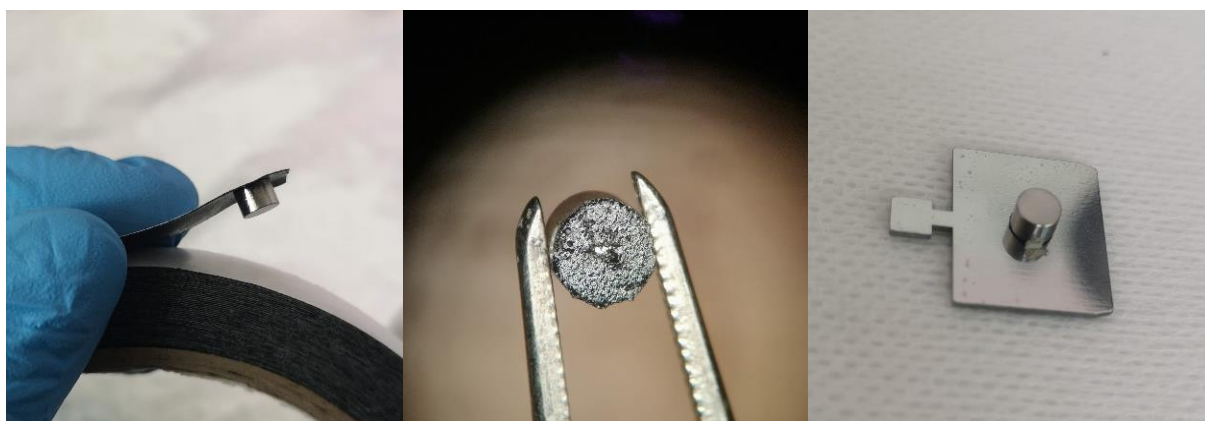
V tab. 6 jsou shrnuty materiálové charakteristiky pro titan a jeho slitiny. Pro porovnání byly vyznačeny hodnoty pro Ti 4 a nTi 4. Nanostrukturalizací bylo dosaženo výrazně vyšší hodnoty meze pevnosti i kluzu. Také došlo ke snížení hodnoty modulu pružnosti, avšak stále nedosahuje hodnot lidských kostí, které jsou například 17-28 GPa pro kortikální kost, či 0,5-3 GPa pro kost trabekulární [2]. Do tabulky byly zařazeny také hodnoty pro slitinu Ti-6Al-4V, která patří mezi běžně používané slitiny v implantologii, přestože modul pružnosti dosahuje hodnoty 114 GPa.

Tab. 6: Materiálové charakteristiky titanu a jeho slitin. [6]

Materiál	Mez pevnosti [MPa]	Mez kluzu [MPa]	Tažnost [%]	Modul pružnosti [GPa]
Titan	220	140	54	116
Ti 1	240	170	24	105
Ti 2	344	275	20	105
Ti 3	440	377	18	105
Ti 4	550	480	15	105
nTi 2	1030	548	12	96
nTi 4	1235	1085	12,5	100
Ti-6Al-4V	895	825	10	114

4.2 Popis a příprava vzorků

Pro uvedení vzorků do přístroje bylo nutné připevnit vzorky na molybdenovou podložku. Na spodní část vzorku byla přilepena oboustranná lepicí uhlíková páska lemující podstavu vzorku. Do středu lepicí pásky (na podstavě vzorku) byl vyříznut skalpelem otvor pro stříbrnou pastu pro zajištění vodivosti mezi vzorkem a molybdenovou podložkou, viz obr. 18. Zaručení vodivosti bylo ověřeno multimetrem. Naměřené hodnoty se vždy pohybovaly v rozmezí 10-20 Ω . Nežádoucím nabíjením vzorků při měření by docházelo k modifikaci kinetické energie elektronů, které jsou vybuzeny ze vzorku. Veškerá manipulace probíhala v rukavicích a s použitím ultrazvukově vyčištěných pomůcek pro maximální snížení nechtěné kontaminace vzorků.



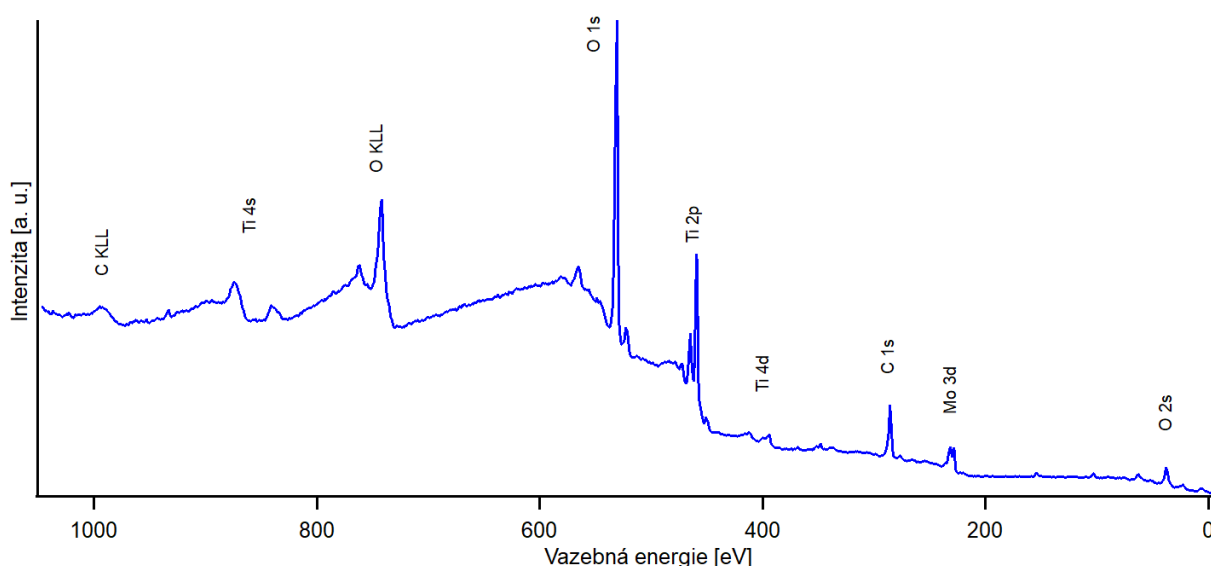
Obr. 18: Příprava vzorku: vzorek je nutné upevnit na Mo podložku pomocí uhlíkové lepicí pásky (obr. vlevo), dále je vyříznut otvor do uhlíkové pásky (obr. uprostřed) a nanesena Ag pasta pro zajištění vodivosti mezi vzorkem a Mo podložkou, poté je vzorek připevněn na manipulační Mo podložku (obr. vpravo). Foto autor.

Takto připravený vzorek byl vložen do zařízení SARPES. Vstupní komora (tzv. „LoadLock“) byla zavzdušněna a vzorek byl uveden dovnitř přístroje pomocí aktivních, či pasivních (dle typu uchycení) magnetických manipulátorů. Následovala vakuace na 10^{-8} mbar. V případě odprašování byl vzorek dále přemístěn do přípravné komory, která je vakuována na hodnotu 10^{-11} mbar. Vlastní měření probíhalo v UHV (Ultra High Vacuum) komoře, která dosahuje hodnoty vakuua 10^{-10} mbar.

Pro experiment byly poskytnuty vzorky modifikované, jak bude popsáno v následujících odstavcích, tak i vzorky referenční, a to vždy ve stavu Ti a nTi. Tyto referenční vzorky nebyly nikterak ošetřeny, pouze jejich povrch byl zbroušen/vyleštěn na hodnotu střední velikosti zrna menší než $0,1 \mu\text{m}$. Právě drsnost povrchu vzorku (implantátu) hraje jednu z klíčových rolí při uchycení buněk na povrch vzorku (implantátu). Tyto nemodifikované vzorky budou použity jako vzorky referenční (standards).

4.3 Vyhodnocení spekter

Měřením byla získána následující spektra. Na obr. 19 lze vidět široké spektrum povrchu neošetřeného titanového vzorku, který byl použit jako vzorek referenční. Osa y znázorňuje intenzitu signálu (píků), tato bezrozměrná hodnota je úměrná množství atomů v analyzovaném objemu. Na ose x je zanesena vazebná energie. Ke každé hodnotě vazebné energie přísluší konkrétní chemický prvek. Samotný graf je tvořen pozadím a píky.



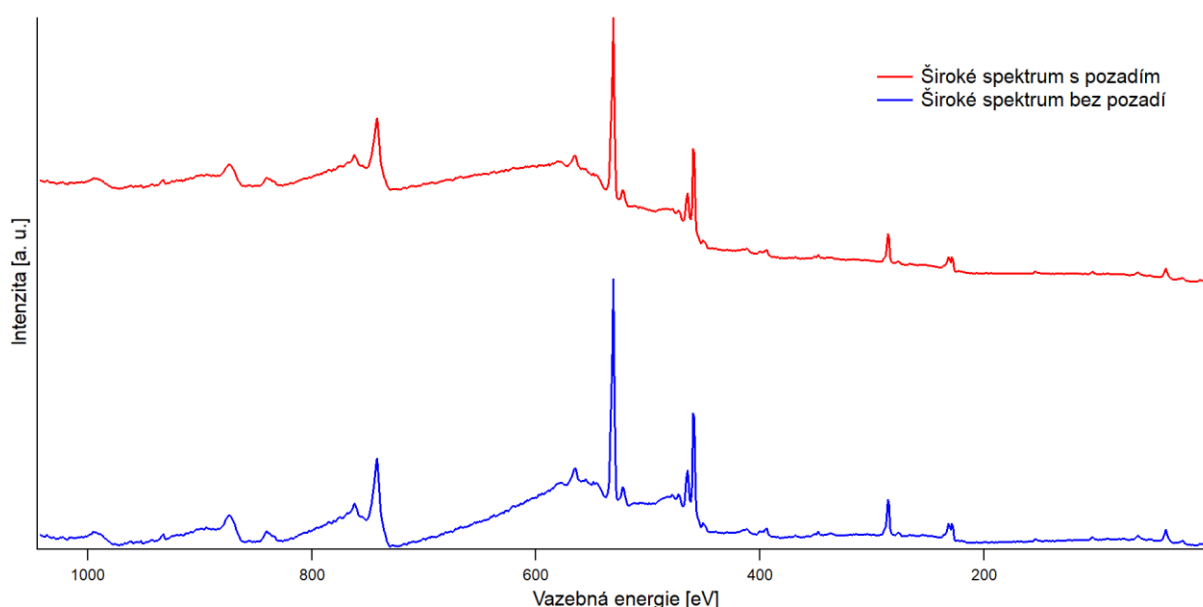
Obr. 19: Široké XPS spektrum Ti vzorku; spektrum je tvořeno píky a pozadím, jednotlivé píky a jejich hodnotu vazebné energie je možné přiřadit ke konkrétním chemickým prvkům. Tech. parametry: $E_{\text{pass}} = 15 \text{ eV}$, SA, slit 3. Foto autor.

Široké spektrum (na obr. 19) obsahuje Ti 4s, O 1s, Ti 2p, Ti 4d, C 1s, Mo 3d a O 2s píky, dále se zde nachází i píky příslušející Augerovu přechodu C KLL a O KLL. Nepatrná přítomnost Mo je způsobena použitím molybdenové podložky, na které byly vzorky připevněny a měřeny.

Tab. 7: Technické parametry XPS měření.

	Široké spektrum	Přesné spektrum
E_{pass} [eV]	50	15
Číslo slitu	3	3
Mód analyzátoru	SA	SA/MA

Pro jednotlivá měření byly zvoleny následující technické parametry, viz tab. 7, kde E_{pass} značí energii elektronů, která je pomocí elektrostatického pole v hemisférickém analyzátoru vybrána tak, aby pouze tyto elektrony dosáhly na štěrbinu detektoru a na samotné detektory. Pro všechna měření byl vybrán slit č. 3, tzn. o průměru 3 mm a délce 20 mm. Jako mód analyzátoru byl zvolen SA (small area) mód o průměru 0,1 mm, tento mód dosahuje nej přesnějších výsledků. V případě spektra průzkumu základního materiálu (obr. 24) byl zvolen MA (middle area) mód s průměrem 2 mm.



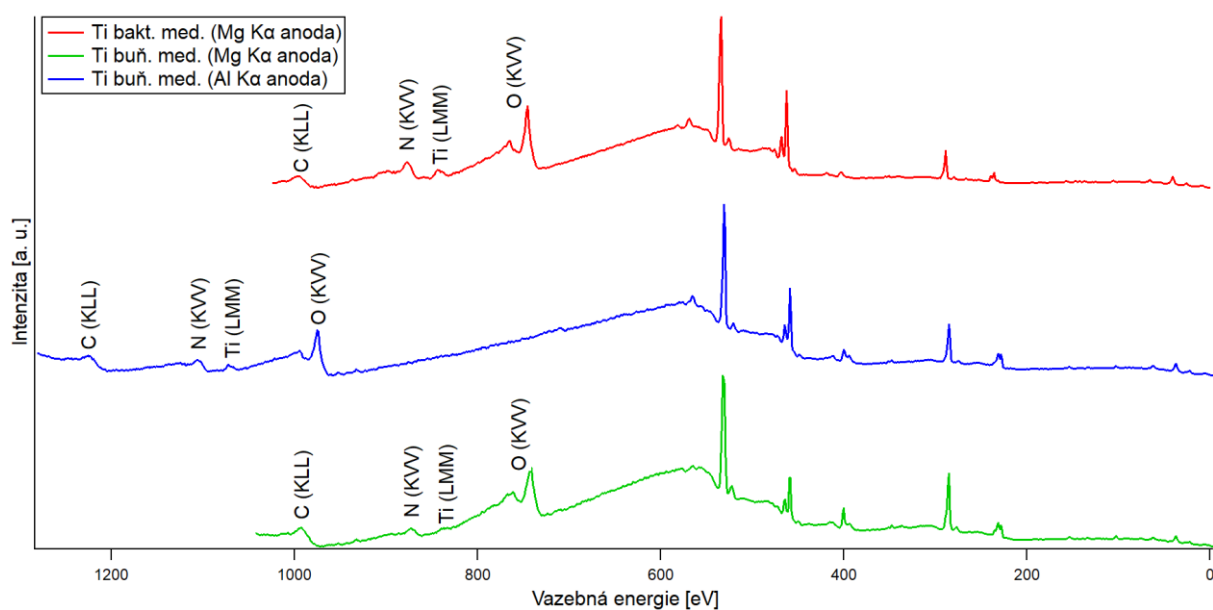
Obr. 20: Odečet pozadí XPS spektra ($Mg K_{\alpha}$); před vyhodnocováním je nutné odečíst pozadí ze spektra, které vzniklo neelastickými procesy při měření; červeně je znázorněno XPS spektrum s pozadím, modře s odečteným pozadím. Tech. parametry: $E_{\text{pass}} = 50 \text{ eV}$, SA, slit 3. Foto autor.

Obr. 20 vykresluje rozdíl mezi XPS širokého spektrem s pozadím (červeně) a bez pozadí (modře). Pokud fotoelektron při transportu k povrchu ztrácí svoji kinetickou energii neelastickými procesy, přispívá k pozadí spektra. K odečtu pozadí byla použita Ranged-Shirley funkce, jak bylo popsáno teoretické části práce. Během procesu vyhodnocování spekter bylo dokázáno, že přesnějších výsledků je získáno v případě, kdy je pozadí definováno společně s píky a následně odečteno, oproti případům, kdy bylo nejdříve odečteno pozadí, a pak až nafitovány píky.

Všechna vyhodnocená spektra byla normována na hodnotu 1, tedy vydělena hodnotou jejich nejvyšší intenzity. Z tohoto důvodu je možné hodnotit poměr množství daných píků pouze v rozsahu jednoho konkrétního spektra. Data byla vyhodnocena pomocí Gaussovo funkce pro symetrické píky (C 1s, O 1s) a pomocí konvoluce funkce Doniach-Šunjić [14] pro Ti 2p. Pro detailnější výzkum a potenciální publikaci bude v budoucnu použita Voightovo funkce, která zohledňuje asymetrii píků. Následné analýzy budou věnovány převážně Ti vzorkům, jak bude dále uvedeno, vzorky nTi jsou více náchylné ke kontaminaci a zároveň s tím spojeným nižším signálem.

4.4 Porovnání spekter použitím Mg a Al zdrojů

Jak již bylo uvedeno v teoretické části této práce, mezi nejčastěji používané anodové materiály patří Mg a Al, které produkují radiální vedení $K_{\alpha 1,2}$ o energiích 1253,6 a 1486,6 eV.



Obr. 21: Porovnání Mg a Al anod jako zdrojů RTG záření; pozice Augerových píků je různá pro vazebnou energii, v případě energie kinetické by hodnoty pozic byly stejné. Tech. parametry: $E_{pass} = 50$ eV, SA, slit 3. Foto autor.

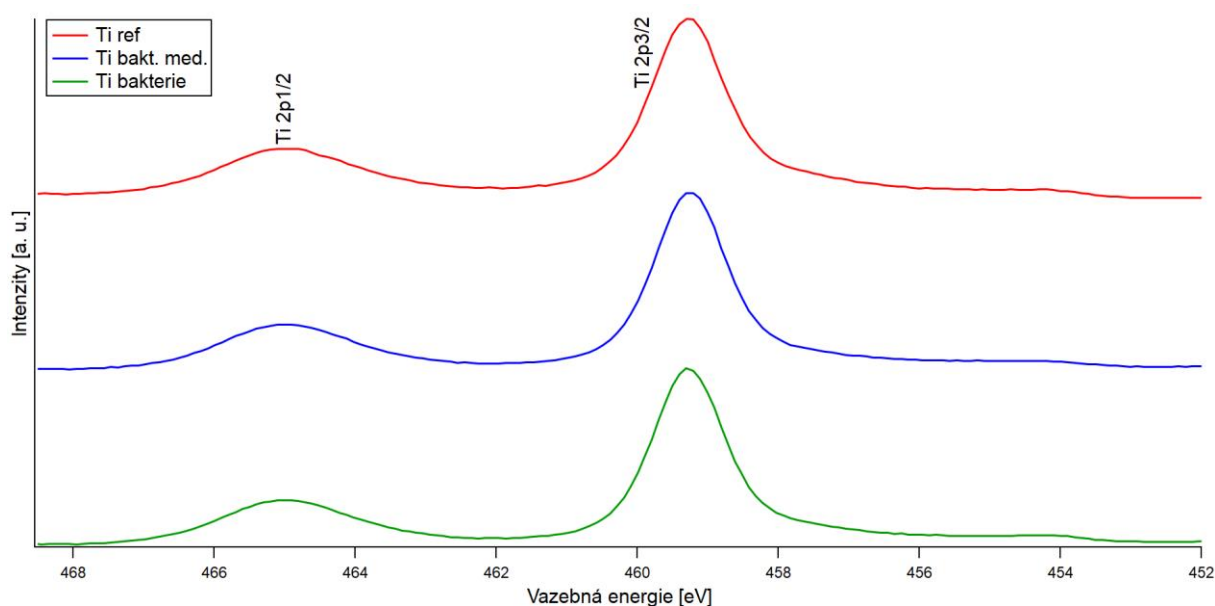
Obr. 21 zobrazuje porovnání širokých spekter získaných právě Mg a Al anodami, červeně je zobrazeno široké spektrum pro vzorek Ti bakt. med. (Mg anoda), modře vzorek Ti buň. med. (Mg anoda) a zeleně vzorek Ti buň. med. (Al anoda). Energie elektronu Augerova píku vždy opustí vzorek se stejnou kinetickou energií (což nezávisí na zdrojové fotonové energii), proto lze na obr. 21 vidět různé hodnoty vazebné energie. V případě použití kinetické energie místo vazebné by tyto hodnoty byly stejné.

4.5 Klasifikace vzorků

K titanovým referenčním vzorkům byly dále dodány vzorky ve čtyřech různých modifikacích, jedná se o vzorky kultivované:

- bakteriemi a bakteriálním médiem (dále jen jako „bakterie“),
- pouze bakteriálním médiem bez bakterií („bakt. med.“),
- lidskými buňkami s buněčným médiem („buňky“) a
- pouze buněčným médiem bez buněk („bun. med.“).

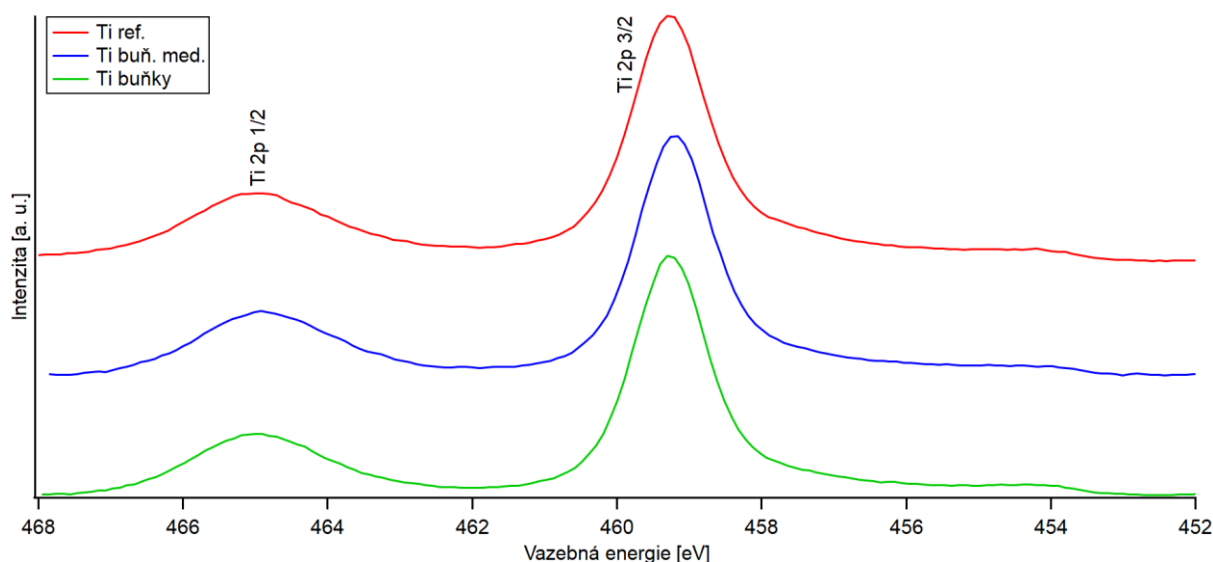
Doba kultivace byla v každém případě sedm dní. Po uplynutí této doby byly buňky a bakterie ze vzorků šetrně sejmuty jednořadým kartáčkem, následovalo omytí destilovanou vodou a osušení vzorků.



Obr. 22: Porovnání Ti 2p spekter vzorků: Ti referenční (Ti ref.), Ti vzorek kultivovaný bakteriálním médiem (Ti bakt. med.) a Ti vzorek kultivovaný bakteriemi a bakt. médiem (Ti bakterie). Tech. parametry: $E_{pass} = 15$ eV, SA, slit 3. Foto autor.

Na obr. 22 lze vidět srovnání Ti 2p spekter pro Ti vzorky, jedná se o vzorek referenční (červeně), vzorek kultivovaný jen bakteriálním médiem (modře) a vzorek kultivovaný bakteriemi i bakteriálním médiem (zeleně). Na první pohled nejsou zřejmé žádné zásadní rozdíly, z grafu lze odečíst doublety píků Ti 2p_{1/2} a Ti 2p_{3/2}, tyto doublety mají přibližně stejné hodnoty vazebné energie a nedochází zde k jejich posuvu. Pro získání více informací je nutné získaná spektra nafitovat a vyhodnotit.

Pro experiment byly vybrány bakterie *Streptococcus oralis*. Tyto bakterie byly kultivovány na destičkách s krevním agarem a uloženy v chladničce. Pro přípravu bakteriální suspenze bylo odebráno několik bakteriálních kolonií se stejným vzhledem. Jako bakteriální médium byla použita infuze mozkové a srdeční tkáně (Brain Heart Infusion, BHI). Jedná se o tekuté médium bohaté na živiny, které je vhodné ke všeobecnému použití pro růst široké škály mikroorganismů.



Obr. 23: Porovnání Ti 2p spekter vzorků: Ti referenční (Ti ref.), Ti vzorek kultivovaný buněčným médiem (Ti buň. med.) a Ti vzorek kultivovaný buňkami a buň. médiem (Ti buňky). Tech. parametry: $E_{\text{pass}} = 15 \text{ eV}$, SA, slit 3. Foto autor.

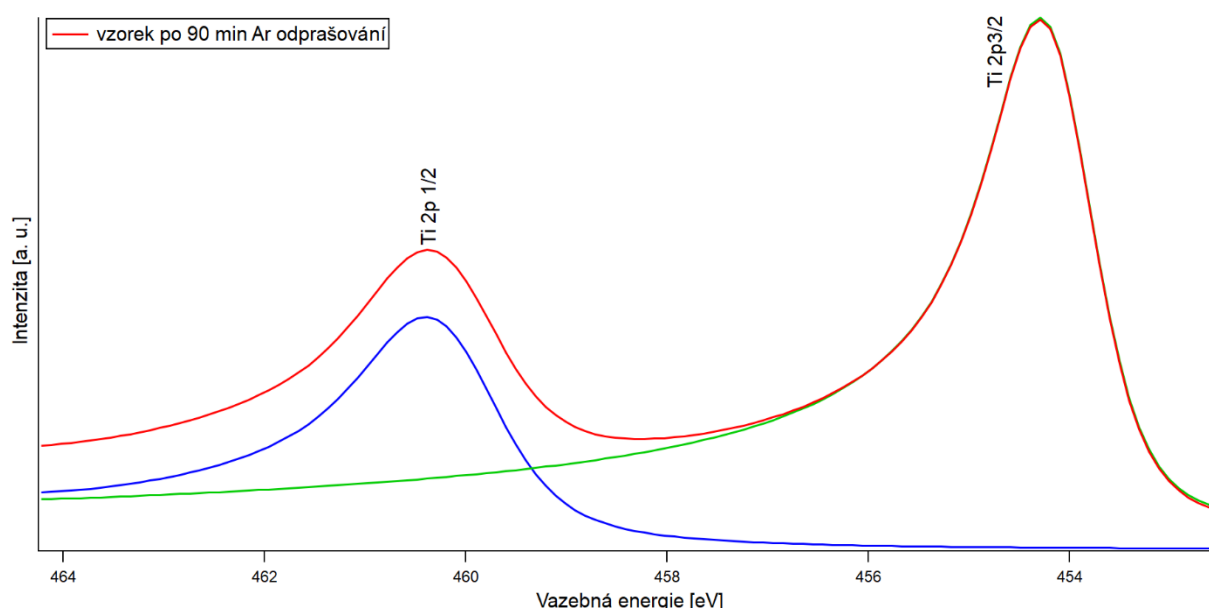
Obr. 23 znázorňuje srovnání Ti 2p spekter, jedná opět o Ti vzorek referenční (červeně), poté vzorek modifikovaný buněčným médiem bez buněk (modře) a vzorek modifikovaný buňkami i buněčným médiem (zeleně). Dle pozice doubletů píků lze opět konstatovat, že se jedná o píky Ti 2p_{1/2} a Ti 2p_{3/2}, pro více informací je opět nutné píky nafitovat.

Jako buněčné (růstové) médium byl použit roztok DMEM + 10 % FSB + 1 % ATB + 2 nM glutamin (pozn. DMEM – médium; FSB – sérum; ATB – antibiotika – penicilin a streptomycin; glutamin – aminokyselina). Dále byla použita buněčná linie lidských buněk MG 63 (ATCC[®] CRL-1427[™]). Jedná se o buňky z vazivové tkáně (fibroblasty), které byly

odebrány ze zhoubného nádoru kostní tkáně 14letého chlapce kavkazské populace [15]. Fibroblasty bývají velice často voleny při výběru vhodných buněk pro výzkum z důvodu jejich snadné kultivace v laboratorním prostředí [2, 29].

4.6 Průzkum základního materiálu

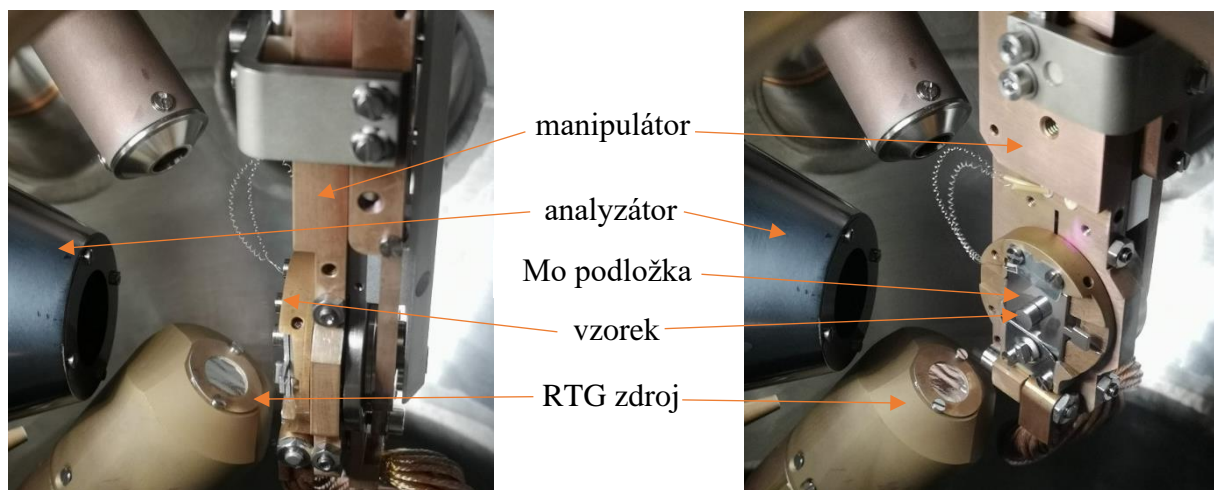
Pro získání referenčních vzorků vyšší kvality a pro průzkum bulkového materiálu bylo provedeno iontové odprašování argonem (o čistotě 99,9999 %) po dobu 90 min, viz obr. 24. Princip odprašování spočívá v emisi elektronů z vlákna (katody), jejichž pohyb je urychlen do anodové klece, jak již bylo popsáno v teoretické části. Po následném vyhodnocení byla potvrzena hypotéza, že v případě spektra Ti 2p se jedná pouze o čistý titan (Ti^0), na obr. 24 lze vidět doublet píků odpovídající tomuto kovu, dalším důkazem je asymetričnost píků, pokud by se jednalo o nejčastější Ti vazbu oxid titaničitý (TiO_2), píky by byly symetrické. Pro fitování byla použita Voightova funkce, která je právě vhodná pro asymetrické píky.



Obr. 24: Průzkumné Ti 2p spektrum po 90 min. Ar iontové odprašování. Tech. parametry: $E_{pass} = 15$ eV, MA, slit 3. Foto autor.

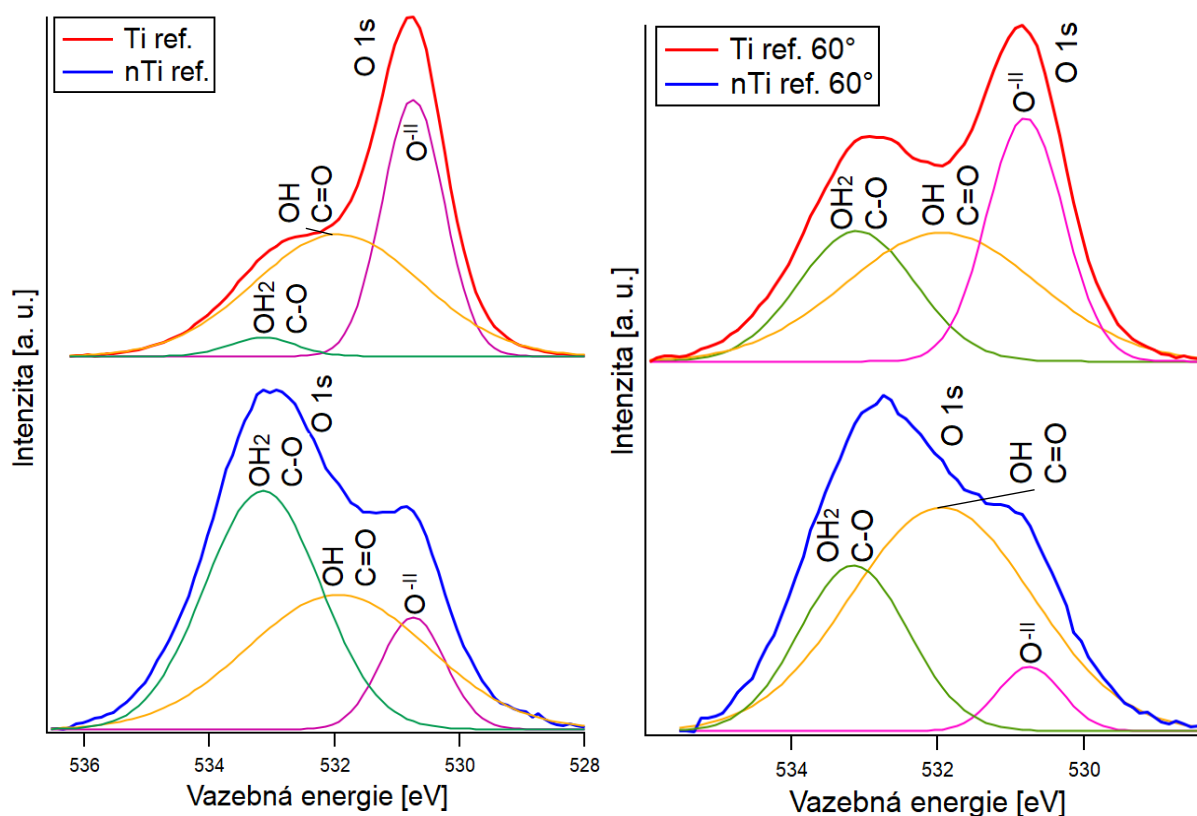
4.7 Charakterizace povrchu při emisi 60°

Pro získání vyšší povrchové citlivosti byly vzorky měřeny taktéž pod úhlem 60° , viz obr. 25, kde je patrný rozdíl v geometrickém uspořádání, resp. natočení vzorku vůči detektoru. Obr. 25 zachycuje vnitřní uspořádání analytické komory, na obr. vlevo probíhá (běžné) měření pod úhlem 0° , vpravo pod 60° .



Obr. 25: Geometrické uspořádání analytické komory při měření pod úhlem 0° (vlevo) a 60° (vpravo). Měřením pod emisí 60° bylo dosaženo vyšší povrchové citlivosti. Foto autor.

Při porovnávání Ti ref. a nTi ref. při normální emisii byl zpozorován rozdíl v podílu O^{II} (TiO_2) a kontaminace (OH_2 , C-O, OH, C=O). Vzorek nTi obsahuje menší množství O^{II} oproti množství jeho kontaminace, především OH_2 a C-O, které se běžně nacházejí v atmosféře jako chemisorbovaná voda a oxid uhelnatý.



Obr. 26: Porovnání nafitovaných O 1s spekter pro Ti a nTi při emisii při 0° a 60° . Tech. parametry: $E_{pass} = 15$ eV, SA, slit 3. Foto autor.

Naopak u Ti vzorku převažuje množství O^{II} oproti kontaminaci. Tato skutečnost je dána rozdílnou morfologií, kdy při stejných objemech zkoumaného povrchu je zkoumána větší plocha v případě nTi, což je vysvětleno na obr. 27. Dochází tak k vyšší absorpci kyslíku a tedy k vyšší kontaminaci povrchu vzorku. Množství O^{II} mezi Ti a nTi nelze porovnat, jelikož spektra jsou normována na hodnotu 1. Avšak lze říci, že Ti obsahuje větší množství O^{II} , jelikož během měření bylo nutné navýšit počet skenů pro Ti pro získání srovnatelně kvalitního (hladkého) spektra.



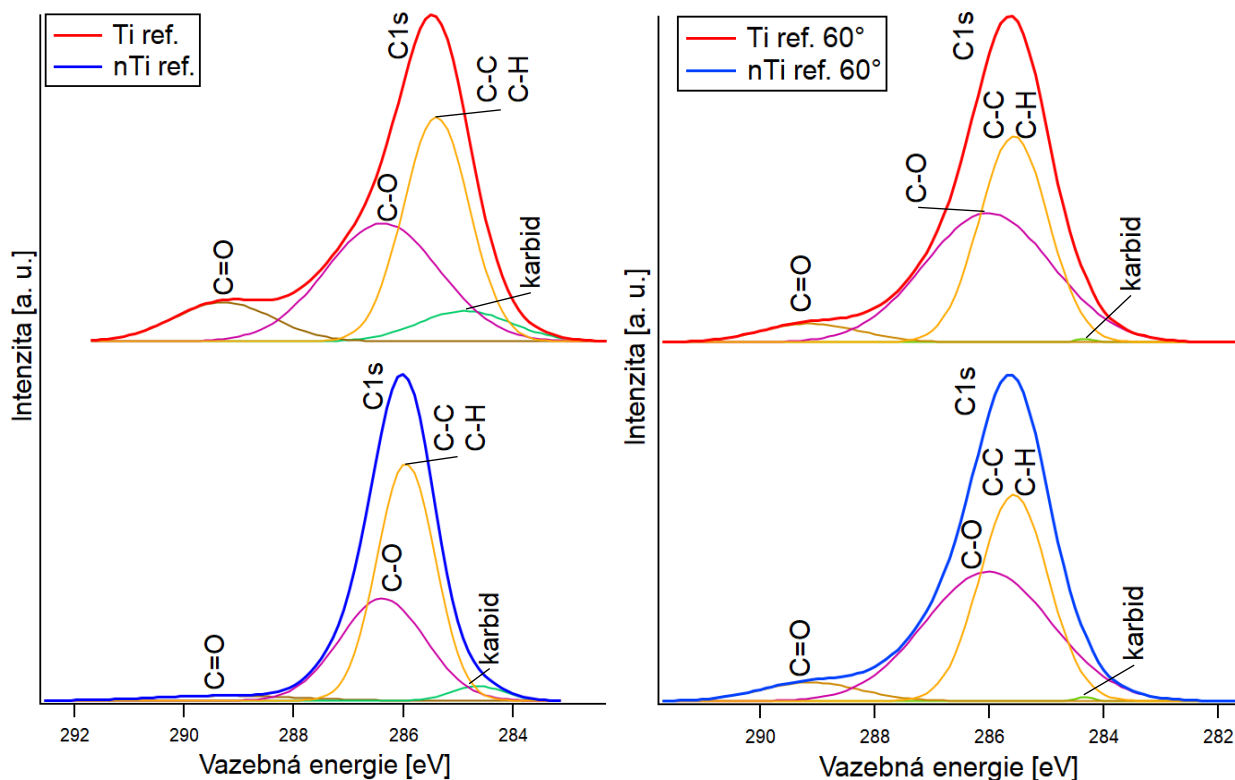
Obr. 27: Ilustrační znázornění rozdílu povrchů vzorků Ti a nTi; při stejném objemu vzorků je povrch pro nTi větší, dochází tedy k větší kontaminaci povrchu. Foto autor.

Při porovnání spekter O 1s pro Ti vzorky při 0° a 60° dochází při 60° emisi k redukcí signálu z objemu vzorku, a tedy ke zvýšení povrchové citlivosti vzorku. Relativně řečeno, při emisi 60° dochází ke snížení množství O^{II} (tedy TiO_2) a zároveň ke zvýšení obsahu kontaminace.

Pro spektra Ti 0° a 60° je dominantním píkem O^{II} , kontaminace OH_2 a C-O je pro spektrum Ti ref. 0° minimální. V obou případech spekter nTi převažuje množství kontaminace nad O^{II} , u nTi ref. 0° emise dominuje pík OH_2 a C-O, u nTi ref. 60° to je OH, C=O. Fitování O 1s spekter proběhlo na základě Gaussovo funkce a získané hodnoty byly porovnány s hodnotami z [30] a hodnotami z tabulky č. 3 [1]. Průměrné hodnoty vazebných energií byly zaneseny do tab. 8.

Tab. 8: Průměrné hodnoty E_b pro jednotlivé píky k obr. 26.

	O^{II}	OH, C=O	OH_2 , C-O
E_b [eV]	530,6	531,9	533,2



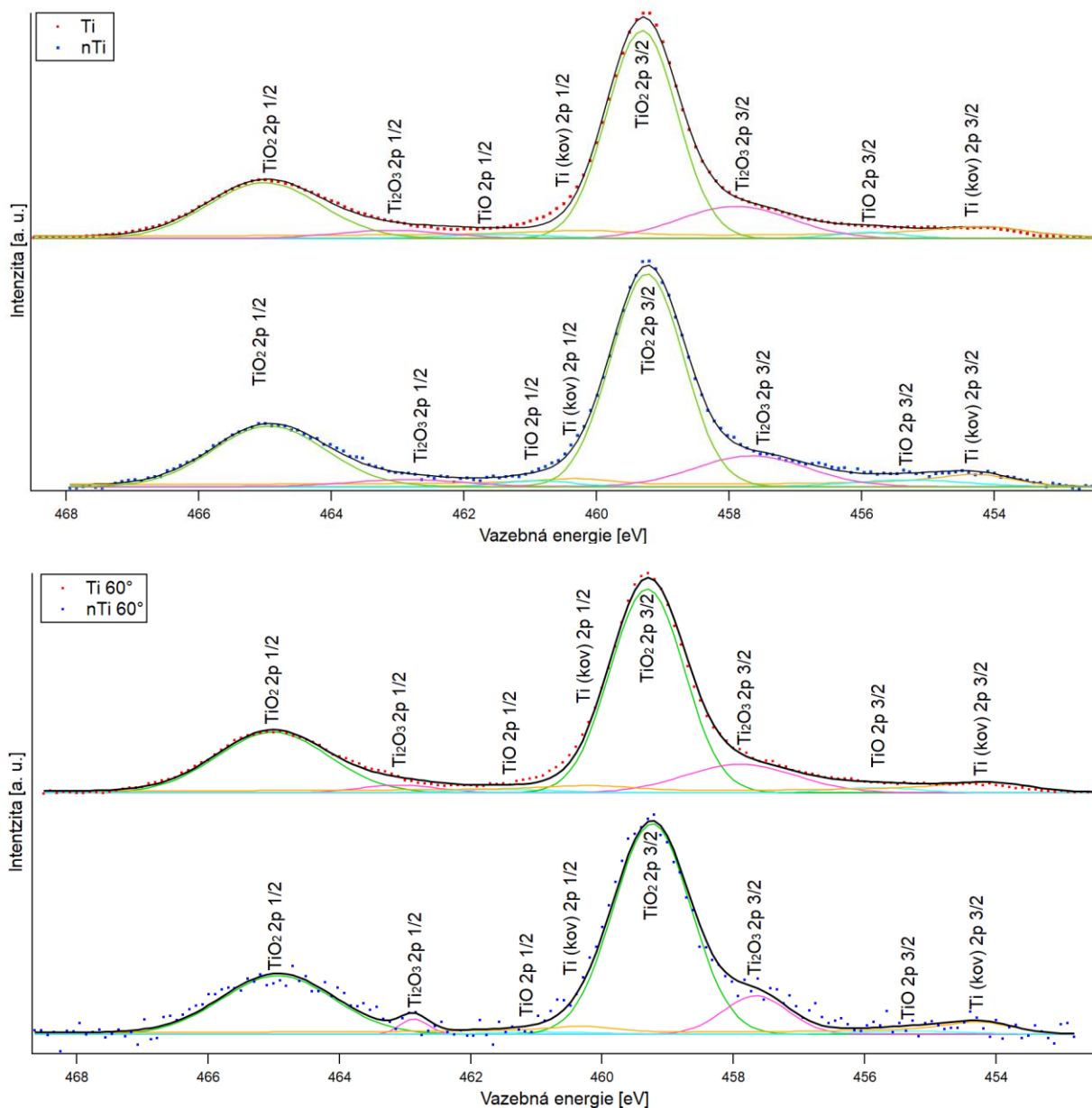
Obr. 28: Porovnání nafitovaných C 1s spekter pro Ti a nTi při emisi při 0° a 60°. Tech. parametry: $E_{pass} = 15 \text{ eV}$, SA, slit 3. Foto autor.

Při vyhodnocování C 1s spekter pro Ti ref. a nTi ref. při normální emisi byl zpozorován dominantní rozdíl v obsahu C=O (CO_2), viz obr. 28 vlevo. V případě nTi ref. je tato vazba zanedbatelná. V obou případech normální emise jsou dominantními vazbami C-C a C-H, u tohoto píku dochází k zanedbatelnému posuvu vazebné energie, pozice pro Ti ref. je 285,2 eV, pro nTi ref. 286 eV. Na základě tab. č. 3 se zde nachází i vazba COO (organické absorbáty), avšak při fitování Gaussovo funkcí tyto píky nebyly rozeznány a došlo pravděpodobně ke spojení píků s C=O. Přesnější vyhodnocení bude v budoucnu realizováno pomocí Voightovo funkce.

Ve všech případech C 1s je dominantní pík C-C a C-H, poté C-O, dále, až na případ normální emise pro nTi ref., C=O a nakonec pík karbidu, což může být například TiC. Hodnoty pozic jsou u všech případů téměř stejné. Fitování C 1s spekter proběhlo na základě Gaussovo funkce a průměrné hodnoty pozic píků jsou zaznamenány v tab. 9.

Tab. 9: Průměrné hodnoty E_b pro jednotlivé píky k obr. 28.

	karbid	C-C, C-H	C-O	C=O
E_b [eV]	284,4	285,6	286,1	289,4



Obr. 29: Porovnání nafitovaných Ti 2p spekter pro Ti a nTi při emisi při 0° a 60°. Tech. parametry: $E_{pass} = 15$ eV, SA, slit 3. Foto autor.

Z obr. 29 jsou patrná Ti 2p spektra pro normální i 60° emisi, vždy pro Ti i nTi vzorky. Data získaná měřením XPS jsou zaznamenána jako tečky, červené pro Ti, modré pro nTi. Jednotlivé Ti 2p píky jsou rozděleny dle oxidačního stavu daného prvku. Oxidační stav -IV náleží pro TiO_2 , dle tab. 3 se jedná o hlavní oxidační stav v oxidových vrstvách, stav +III náleží Ti_2O_3 , který se nachází na rozhraní oxid-kov, dále je zobrazen oxidační stav +II pro TiO, který se nachází opět na rozhraní oxid-kov, oxidační stav 0 přísluší titanu jako takovému (kovu). Píky jednotlivých vazeb jsou zobrazeny ve formě doubletů píků, tento fakt je způsoben spin-orbitálním štěpením. Doublety lze charakterizovat opět pozicí (tedy hodnotou vazebné energie) a hodnotou splitu (vzdálenost mezi jednotlivými píky).

Při měření Ti vzorků bylo dosaženo vyšší jemnosti spektra, pro normální emisi nTi vzorku byl navýšen počet skenů (z 30 na 90), bylo tak dosaženo vyšší jemnosti spektra. U 60° emise nTi vzorku byla hodnota skenů navýšena na hodnotu 60, rozdíl rozlišení je znatelný. U tohoto spektra dochází ke vzniku určitého artefaktu (falešného signálu) v případě Ti₂O₃ 2p_{1/2}, kdy byly na spektrum aplikovány stejné fitovací parametry jako u normální emise a program se tak snažil nafitovat dané spektrum. V budoucnu budou tyto píky přefitovány pomocí Voightovy funkce pro získání přesnějších výsledků pro budoucí publikaci. Mezi nejdominantnější píky patří ve všech případech píky TiO₂ a dále Ti₂O₃ a Ti píky jako kov. Vazba TiO je minimální. Průměrné hodnoty vazebné energie a hodnota splitu (hodnota E_b pro určení vzdálenosti mezi doublety píků) viz tab. 10.

Tab. 10: Průměrné hodnoty E_b pro jednotlivé píky k obr. 29.

	Ti (kov) 2p _{3/2}	TiO 2p _{3/2}	Ti ₂ O ₃ 2p _{3/2}	TiO ₂ 2p _{3/2}
E _b [eV]	454,1	455,9	457,7	459,3
Split [eV]	6,04	5,6	5,2	5,7

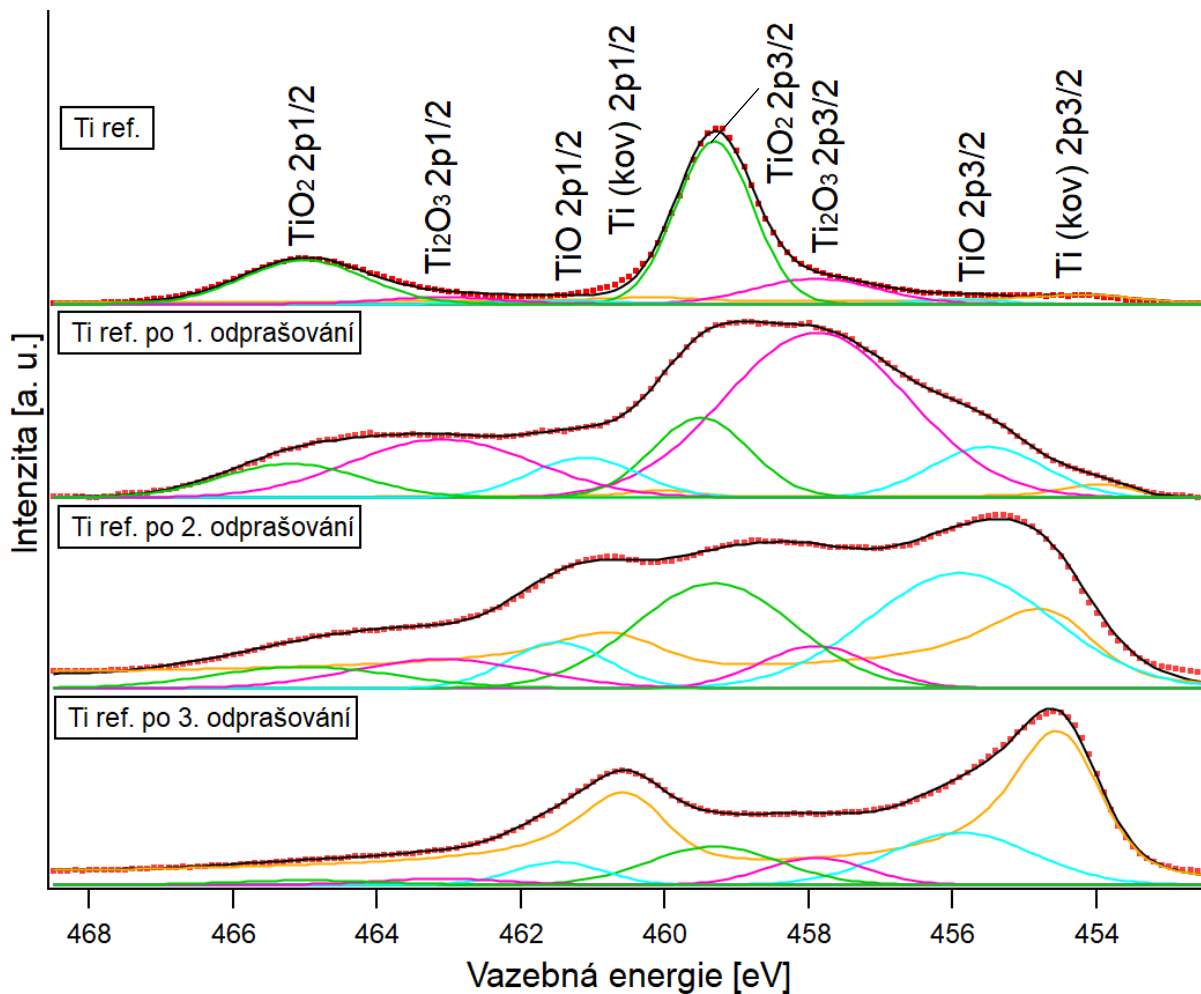
4.8 Hloubková analýza Ti 2p

Pro hloubkovou analýzu vzorků bylo provedeno Ar odprašování, tentokrát po dobu 3x10 min, kdy bylo při každém odprašování odebráno několik atomárních vrstev z povrchu vzorku. Původní povrch i nově vzniklé povrchy byly vždy přeměřeny, a proto je možné na obr. 30 sledovat vývoj kompozice jeho povrchu v závislosti na hloubce od původního povrchu. Technické parametry pro hloubkovou analýzu jsou shrnuty v tab. č. 11.

Pomocí emise bylo modulováno množství emitovaných elektronů. Pro hloubkovou analýzu byla zvolena nejvyšší možná hodnota emise 10 mA. Tab. 11 dále obsahuje zvolené hodnoty energie a typické hodnoty úrovně vakua pro odprašování u tohoto přístroje. Data získaná měřením povrchu referenčního vzorku před a mezi jednotlivými odprašováními viz obr. 30.

Tab. 11: Technické parametry pro hloubkovou analýzu.

Odprašování	Energie [keV]	Emise [mA]	Tlak [mbar]
1. 10 min	0,6	10	5,6-6·10 ⁻⁶
2. 10 min	0,8	10	5,6-6·10 ⁻⁶
3. 10 min	1,0	10	5,6-6·10 ⁻⁶

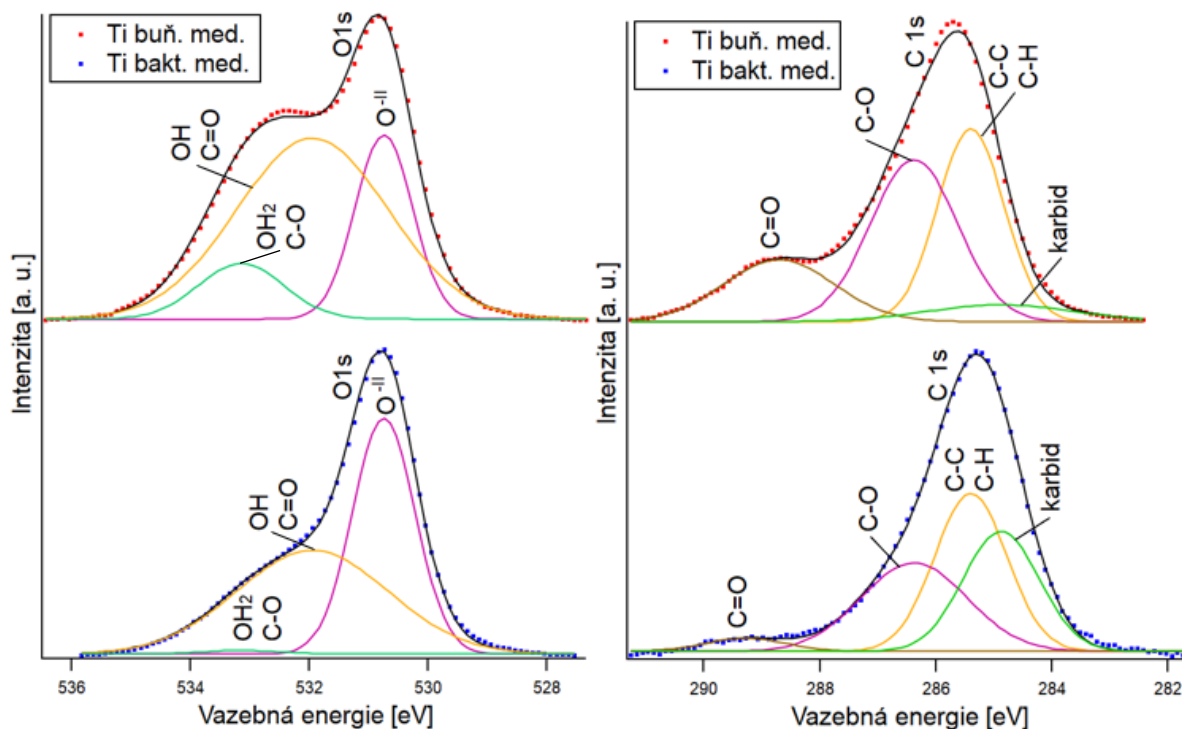


Obr. 30: Hloubková analýza Ti 2p ref. vzorku pomocí Ar odprašování. Tech. parametry: $E_{pass} = 15 \text{ eV}$, SA, slit 3. Foto autor.

Pro povrch neodprašeného vzorku je nejdominantnější vazbou TiO_2 , jak lze vidět na obr. 30 nahoře, další výraznou vazbou je Ti_2O_3 . Poměrová převaha se pro TiO_2 v závislosti na hloubce od původního povrchu snižuje. Pík Ti_2O_3 2p_{3/2} se po prvním odprašování jeví jako převládající, dochází zde avšak k vyčerpání limitu Gaussovy funkce. Pro nejpřesnější nařizování byla nepatrně upravena pozice píku Ti (kov) 2p_{3/2} u spektra po 2. odprašování, což vedlo k vykreslení nižší intenzity píku Ti_2O_3 2p_{3/2}. Použitím Gaussovy a Doniach-Šunjić funkcí bylo sice dosaženo preciznějšího nařizování, ale pro budoucí analýzu oblastí bude potřeba Voightovy funkce. Vývoj kompozice povrchu směřuje k navýšení množství Ti jako kovu, důkazem je opět asymetrie dominantních píků, viz Ti ref. po 3. odprašování. U spektra po 1. odprašování lze pozorovat stejnou intenzitu píků pro TiO, z fyzikálního hlediska je tato možnost nesmyslná. Poměr mezi doublety píků by měl pro kovy dosazovat hodnoty 2.

4.9 Porovnání buněčného a bakteriálního média

Pro porovnání použitých médií byly zvoleny spektra O 1s, C 1s a Ti 2p. Již na první pohled jsou patrné jisté rozdíly, viz obr. 31-32. Jelikož vzorky nTi vykazují vyšší kontaminaci na úkor nižší hodnoty signálu, jak již bylo zmíněno dříve, byly vybrány pro tuto analýzu vzorky Ti.

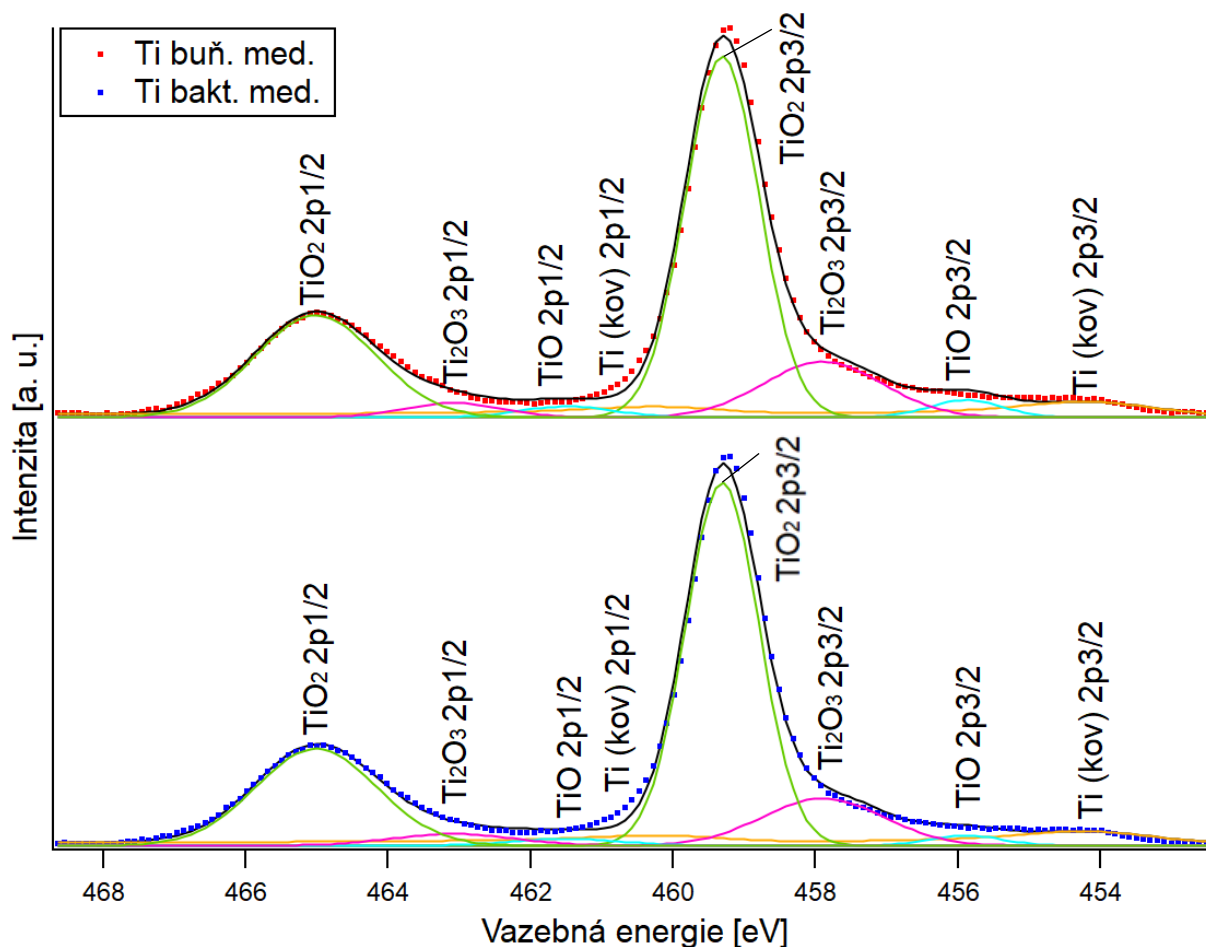


Obr. 31: Porovnání použitých médií dle O1s (vlevo) a C1s (vpravo). Tech. parametry: $E_{pass} = 15 \text{ eV}$, SA, slit 3. Foto autor.

U O1s spektra, obr. 31 vlevo, dochází k vysokému výskytu kontaminace (OH, C=O) pro buněčné médium, intenzita je srovnatelná s píkem O^{-II}. Dále zde bylo zaznamenáno určité množství chemisorbované vody (OH₂) a CO, množství těchto kontaminantů je nepatrné u bakteriálního média. V obou případech C 1s spekter převládají uhlovodíkové kontaminanty C-C a C-H. Média se liší v množství karbidu a C-O, kdy u Ti bakt. med. převládá nad C-O a u Ti bun. med. naopak. Zastoupení C=O u Ti bakt. med. je nepatrné. Průměrné hodnoty vazebných energií viz tabulka 12.

Tab. 12: Průměrné hodnoty E_b pro jednotlivé píky k obr. 31.

O 1s	O ^{-II}	OH, C=O	OH ₂ , C-O	
E_b [eV]	530,4	532,0	533,1	
C 1s	karbid	C-C, C-H	C-O	C=O
E_b [eV]	284,7	285,4	286,3	288,5



Obr. 32: Porovnání médií dle Ti 2p. Tech. parametry: $E_{pass} = 15 \text{ eV}$, SA, slit 3. Foto autor.

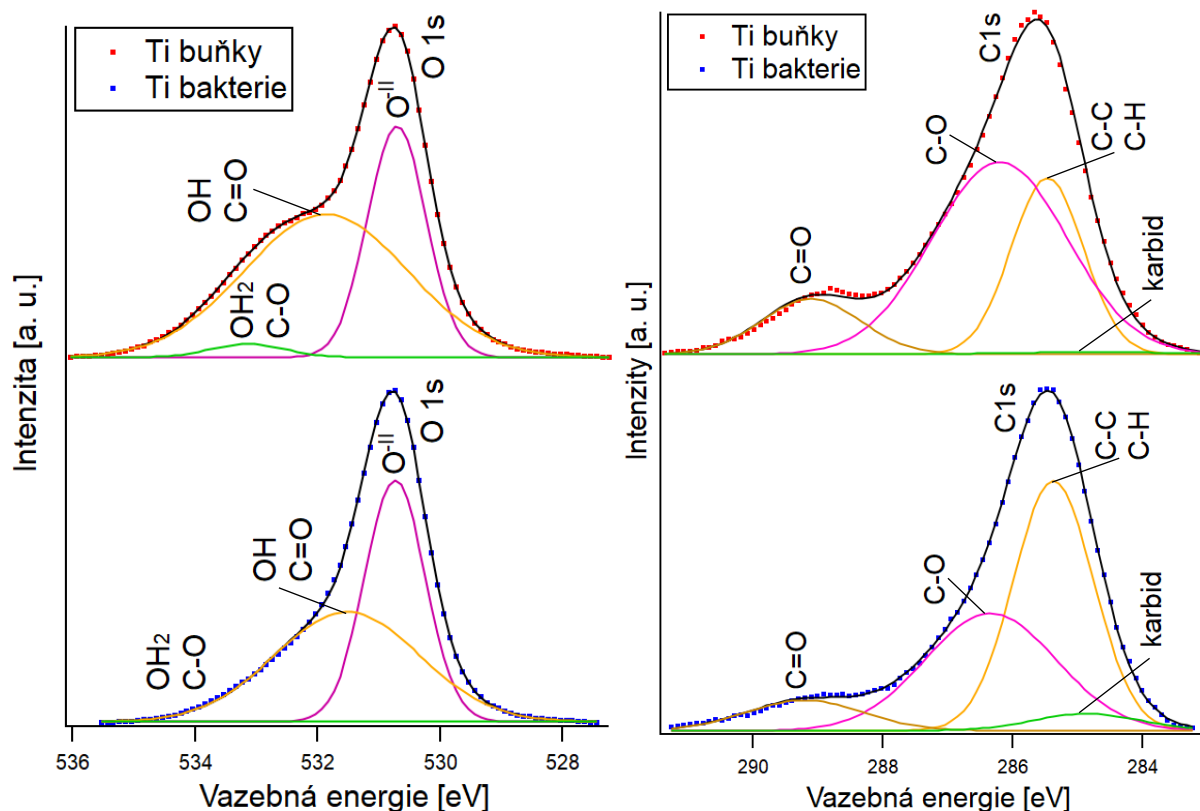
Oproti O 1s a C 1s daná média nejeví žádný rozdíl při porovnání spekter Ti 2p, obr. 32. Nejvýznamnější zastoupení patří TiO_2 , poté Ti_2O_3 . Zastoupení Ti (kov) a TiO se jeví shodné pro obě spektra. Pro detailnější vyhodnocení bude opět použita Voightova funkce, která nabízí nafitování více chemických komponentů, je tedy možné nastavit parametry tak, aby vazba TiO_2 existovala současně jako anatas TiO_2 a rutil TiO_2 . [33, 34] Vazebné energie a hodnoty splitu viz tab. 13.

Tab. 13: Průměrné hodnoty E_b pro jednotlivé píky k obr. 32.

	Ti (kov) $2p_{3/2}$	TiO $2p_{3/2}$	Ti_2O_3 $2p_{3/2}$	TiO_2 $2p_{3/2}$
E_b [eV]	454,3	455,9	457,9	459,3
Split [eV]	6,04	5,6	5,2	5,7

4.10 Porovnání vzorků kultivovaných buňkami a bakteriemi

Pro porovnání vzorků, které byly kultivovány buňkami MG-63 a bakteriemi *Streptococcus oralis*, byly opět vybrány Ti vzorky, viz obr. 33. Průměrné vazebné energie byly opět naneseny do tabulky (tab. 14).



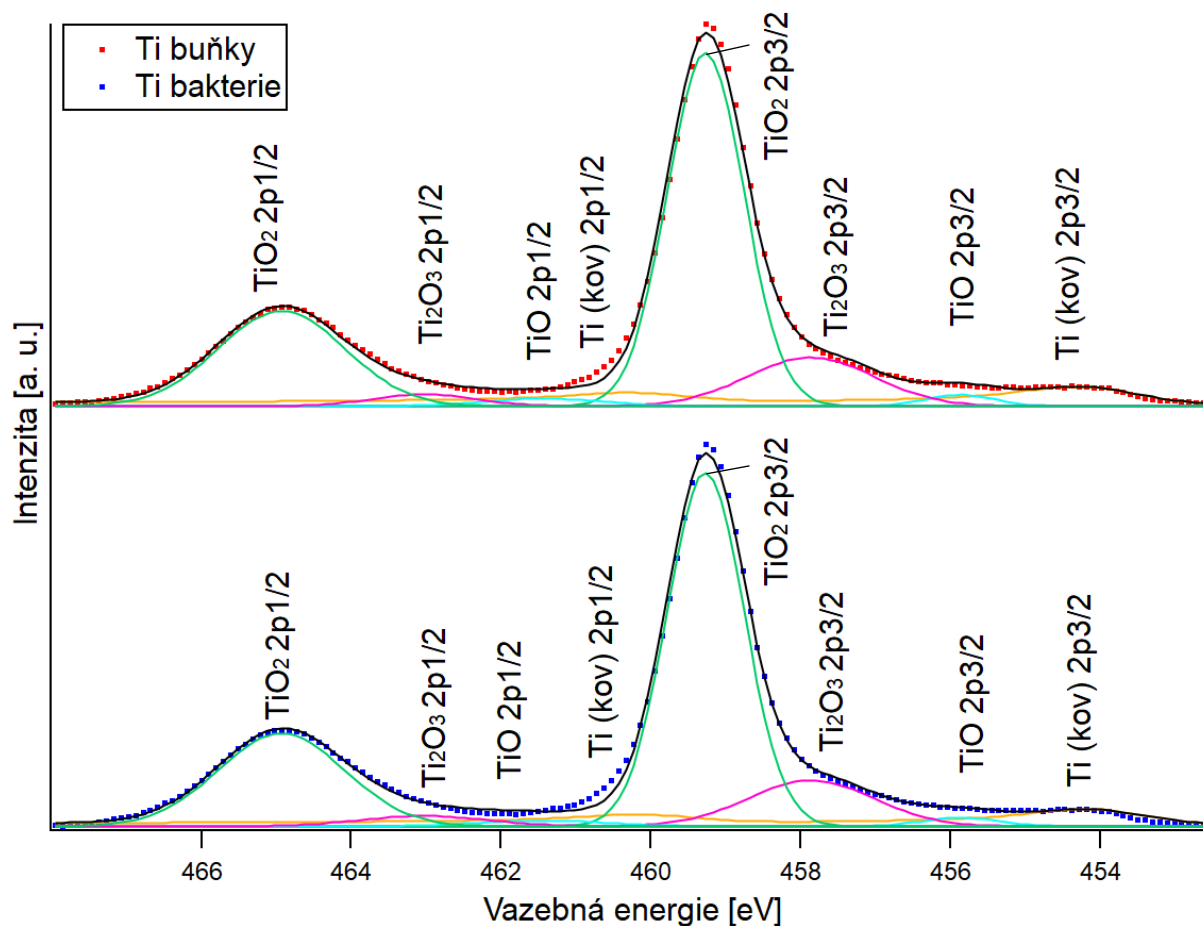
Obr. 33: Porovnání spekter O 1s a C 1s pro Ti buňky a Ti bakterie. Tech. parametry: $E_{pass} = 15$ eV, SA, slit 3. Foto autor.

Pro O 1s vzorek Ti bakterie nebyla detekována kontaminace ve formě OH₂ a C-O, až na tento fakt se spektra příliš neliší, viz. obr. 33 vlevo. Největší podíl tvoří v obou případech O^{II}, dále OH a C=O.

U C 1s je méně kontaminace u vzorku s bakteriemi. Stejně jako u vzorku Ti bun. med. je pozorována srovnatelný podíl kontaminace a C-C, C-H. Pro vzorky Ti bakt. med a Ti bakterie platí, že nejvyšší zastoupení má C-C, C-H a menší C-O.

Tab. 14: Průměrné hodnoty E_b pro jednotlivé píky k obr. 33.

O 1s	O ^{II}	OH, C=O	OH ₂ , C-O	
E E_b [eV]	530,3	531,7	533,2	
C 1s	karbid	C-C, C-H	C-O	C=O
E_b [eV]	284,9	285,2	286,3	289,1



Obr. 34: Porovnání spekter Ti 2p pro Ti buňka a Ti bakterie. Tech. parametry: $E_{pass} = 15 \text{ eV}$, SA, slit 3. Foto autor.

Na obr. 34 lze opět hodnotit jen kvalitativně, pro kvantitativní hodnocení bude opět zvolena Voightova funkce. Nejvyšší zastoupení má TiO_2 , dále Ti_2O_3 . Ostatní vazby jsou minimální. Vazebné energie a hodnoty splitu viz tab. 15.

Tab. 15: Průměrné hodnoty E_b pro jednotlivé píky k obr. 34.

	Ti (kov) 2p _{3/2}	TiO 2p _{3/2}	Ti ₂ O ₃ 2p _{3/2}	TiO ₂ 2p _{3/2}
E_b [eV]	454,3	455,9	457,9	459,3
Split [eV]	6,04	5,6	5,2	5,7

Závěr

XPS metoda se prokázala jako vhodná pro zkoumání povrchu titanových vzorků. Pro experiment byly poskytnuty Ti a nTi vzorky Lékařskou fakultou v Plzni, které byly dodány ve stavu referenčním, tedy bez kultivace, a dále ve stavu modifikovaném čtyřmi různými způsoby: bakteriálním médiem, bakteriemi *Streptococcus oralis* a médiem, jen buněčným médiem a dále lidskými buňkami MG-63 a médiem. Chemické složení Ti a nTi vzorků se neliší, jedná se pouze o specifickou úpravu střední velikosti zrn. Pro experiment byly použity vzorky stupně 4 dle ASTM.

Cílem této práce bylo studium povrchů biokompatibilních Ti slitin včetně vypracování metodologie, jak s danými vzorky zacházet. Byl popsán postup přípravy vzorků, jejich uchycení na molybdenovou podložku, jejich vakuace a následná manipulace uvnitř přístroje včetně samotné XPS analýzy. Rovněž byl charakterizován postup čištění ionty argonu (tzv. odprašování). Dále byla rovněž popsána metoda vyhodnocování dat pomocí programu KolXPD.

Během prvotních měření byly zkoumány vzorky referenční pro Ti a nTi. Přestože se tato data na první pohled nezdála příliš odlišná, po vyhodnocení bylo zjištěno, že vzorky nTi obsahují větší množství kontaminace. Tento jev byl následně objasněn odlišnou morfologií daných vzorků, kdy při stejně velkém objemu zkoumaných vzorků je v případě nTi zkoumána větší plocha, což následně přispívá k vyšší kontaminaci. V případě XPS metody přítomnost kontaminace vede k nižšímu signálu, což znamená, že získaná data jsou hůře čitelná. Tento jev lze korigovat zvýšením počtů skenů během měření. Bylo předpokládáno, že kontaminace vzorků je pro budoucí biokompatibilní implantáty nechtěná, proto následující analýzy byly převážně zaměřeny na Ti vzorky.

Vzorky byly měřeny tzv. normální emisí, tedy pod úhlem 0° (což je úhel mezi kolmicí od povrchu vzorku a paprskem elektronů dopadajících do detektoru), dále byly vzorky také měřeny pod úhlem 60° . Pro Ti vzorky dochází, oproti normální emisi, ke zdatelnému nárůstu množství kontaminace (OH_2 , C-O) v případě 60° emise, nejdominantnější zastoupení má O^{II} . U nTi vzorků se při 60° emisi stává dominantním pík OH, C=O, podíl O^{II} je nejmenší jak pro normální, tak i pro 60° emisi. Ve všech případech spekter C 1s je nejdominantnějšími vazbami C-C a C-H. Při měření pod 60° přítomnost karbidu byla téměř nedetekovatelná. Spektra C 1s a O 1s byla fitována pomocí Gaussovy funkce, popř. funkcí Doniach-Šunjić. Ti 2p spektra nevykazují žádné zásadní rozdíly. Pro fitování Ti 2p spekter byla pro další analýzy doporučena Voightova funkce, která zohledňuje asymetričnost kovových píků.

Dále byla provedena hloubková analýza referenčního Ti vzorku. Vzorek byl tedy změřen v původním stavu a dále po každém odprašování, byla tak získána data charakterizující vývoj zastoupení jednotlivých vazeb v závislosti na vzdálenosti od původního povrchu vzorku. Vzorek před odprašováním vykazoval dominantní zastoupení vazby TiO_2 , se vzrůstajícím počtem odprašování toto zastoupení klesá a naopak vzrůstá množství Ti jako kovu.

Při zkoumání vzorků kultivovaných bakteriálním a buněčným médiem byly zpozorovány značné rozdíly, bylo tedy potvrzeno, že se jedná o odlišná média. Bakteriální médium u C 1s obsahovalo vyšší množství karbidu než u buněčného média a naopak u O1s přítomnost OH_2 a C-O byla téměř nedetekovatelná.

Na závěr byly porovnány vzorky s bakteriemi a buňkami. Dominantním píkem u O 1s spekter pro tyto vzorky je O^{II} , dále se zde vyskytuje dané množství kontaminace OH a C=O, u vzorku s buňkami je nepatrné množství kontaminace OH_2 , C-O, u vzorku s bakteriemi nebyla tato kontaminace detekována. Pro C 1s u vzorku s buňkami převažuje kontaminace C-O, její intenzita je srovnatelná s píkem C-C, C-H, naopak u vzorku s bakteriemi je intenzita C-O znatelně nižší. Obsah karbidu je u buněk nedetekovatelný, u bakterií téměř zanedbatelný. U Ti 2p spekter nebyl sledován žádný zásadní rozdíl, opět bylo navrženo pro další výzkum použití Voightovy funkce.

Tato diplomová práce poskytuje prvotní analýzy chemického složení povrchů dodaných vzorků, které budou sloužit pro další výzkum přichycení buněk a bakterií k titanovým implantátům. Analýzy provedené v této práci budou sloužit jako základ pro další výzkum ve spolupráci s Lékařskou fakultou v Plzni.

Reference

- [1] BRUNETTE, D. M., TENGVALL, P., TEXTOR, M., THOMSEN, P. (ed.). *Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications*. New York: Springer, 2001. ISBN 978-3-642-63119-1.
- [2] BABUŠKA, V. *Biokompatibilita a oseointegrace dentálních implantátů z nanostrukturního titanu*. Plzeň, 2019. Habilitační práce. Univerzita Karlova. Lékařská fakulta v Plzni. Ústav lékařské chemie a biochemie.
- [3] Skupina fyziky povrchů. *XPS na STM – TPD – XPS – LEED* [online]. [Cit. 30. 10. 2020]. Dostupné z: <https://physics.mff.cuni.cz/kfpp/povrchy/metoda/xps-my>
- [4] LUSTIG, F., SCHAUER, F., OŽVOLDOVÁ, M. *Vnější fotoefekt* [online]. [Cit. 16. 4. 2021]. Dostupné z: <https://www.ises.info/index.php/cs/laboratory/experiment/photoelectric-effect-VA/introduction>
- [5] The Nobel Prize Foundation. *The Nobel Prize in Physics 1921* [online]. [Cit. 1. 11. 2020]. Dostupné z: <https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1921/summary>
- [6] The Nobel Prize Foundation. *Kai M. Siegbahn Facts* [online]. [Cit. 25. 3. 2021]. Dostupné z: <https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1981/siegbahn/facts/>
- [7] RAFAJ, Z. *Biocompatibility of Transition Metal Alloys: Physical-Chemical Background*. Praha, 2017. Diplomová práce. Karlova univerzita. Matematicko-fyzikální fakulta. Vedoucí práce Václav Nehasil.
- [8] SPECS™. *XR 50/XR 50 NAP, X-Ray Source*. Berlín, 2018. SPECS User Manual, Version 3.2. SPECS reference: 2100002828.
- [9] RAFAJ, Z. *Surface Oxide on the TiNb Alloys Optical Study of Adsorption Properties*. Praha, 2015. Bakalářské práce. Karlova univerzita. Matematicko-fyzikální fakulta. Vedoucí práce Václav Nehasil.

- [10] BLUMENTRIT, P. *Nedestruktivní hloubkové profilování velmi tenkých kovových vrstev elektronově-spektroskopickými metodami*. Praha, 2006. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Matematicko-fyzikální fakulta. Vedoucí práce Jiří Pavluch.
- [11] SALVI, A. M., CASTLE, J. E., WATTS, J. F., DESIMONI, E. *Peak Fitting of the Chromium 2p XPS Spectrum*. Applied Surface Science. 1995, **90**, 333-341. ISSN 0169-4332.
- [12] ECKERTO VÁ, L. *Metody analýzy povrchů – elektronová spektroskopie*. Praha: Akademia, 1990. ISBN 80-200-0261-8.
- [13] CasaXPS. *Line Shapes* [online]. [Cit. 10. 5. 2021]. Dostupné z: http://www.casaxps.com/help_manual/line_shapes.htm
- [14] DONIACH, S., SUNJIC, M. *Many-Electron Singularity in X-Ray Photoemission and X-Ray Line Spectra from Metals*. Journal of Physics: Solid State Physics. 1970, **3**, 285.
- [15] HÜFNER, S., WERTHEIM, G. K., WERNICK, J. H. *XPS Core Line Asymmetries in Metals*. Solid State Communications. 1975, **17**, 417-422. ISSN 0038-1098.
- [16] SCHUSSER, J. *Elektronické a strukturní vlastnosti vrstev CeOx/SrTiO3(100)*. Praha, 2017. Diplomová práce. Karlova univerzita. Matematicko-fyzikální fakulta. Vedoucí práce Kateřina Veltruská.
- [17] WAGNER, C. D. *Handbook of X-Ray Photoelectron Spectroscopy: A Reference Book of Standard Data for Use in X-Ray Photoelectron Spectroscopy*. Eden Prairie, Minnesota: Perkin-Elmer, 1979. ISBN 978-0964812413.
- [18] CHRIST, B. V. *Handbook of Monochromatic XPS Spectra: The Elements of Native Oxides*. New York: John Wiley & Sons, 2000. ISBN 978-0-471-49265-8.
- [19] MOULDER, J. F., CHASTAIN, J. *Handbook of X-Ray Photoelectron Spectroscopy: A Reference Book of Standard Spectra for Identification and Interpretation of XPS Data*. Eden Prairie, Minn, Physical Electronics Division, Perkin-Elmer Corp. 1992. ISSN: 096481241X 9780964812413.

- [20] MORAIS, J. M., PAPADIMITRAKOPOULOS, F. a BURGESS, D. J. *Biomaterials/Tissue Interactions: Possible Solutions to Overcome Foreign Body Response* [online]. The AAPS Journal. 2010, **12**, 188-196 [cit. 16. 11. 2020]. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1208%2Fs12248-010-9175-3>
- [21] NARAYAN, R. *Biomedical Materials*. New York: Springer, 2009. ISBN 978-0-387-84871-6.
- [22] DUCHEK, P. *Kovové biomateriály* [přednáška]. Plzeň, KMM, předmět Biomateriály.
- [23] NIINOMI, M. *Recent Research and Development in Titanium Alloys for Biomedical Applications and Healthcare Goods*. Science and Technology of Advanced Materials. 2003, **4**(5), 445.
- [24] KRATOCHVÍL, P., LUKÁČ, P., SPRUŠIL, B. *Úvod do fyziky kovů I*. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, 1984. DT 546.3:53(075.8)
- [25] SITTIG, C., TEXTOR, M., SPENCER, N. D., WIELAND, M. a VALLOTTON, P. H. *Surface Characterization of Implant Materials c. p. Ti, Ti-6Al-7Nb and Ti-6Al-4V with Different Pretreatments* [online]. [Cit. 20. 11. 2020]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/8365364_Surface_characterization_of_implant_materials_cp_Ti_Ti-6Al-7Nb_and_Ti-6Al-4V_with_different_pretreatments
- [26] VANZILLOTA, P., SOARES, G. A., BASTOS, I. N., SIMÃO, R. A., KUROMOTO, N. K. *Potentialities of Some Surface Characterization Techniques for the Development of Titanium Biomedical Alloys*. *Materials Research*. 2004, **7** (3), 437-444.
- [27] WENNERBERG, A., ALBREKTSSON, T., JOHANSSON, C., ANDERSSON, B. *Experimental Study of Turned and Grit-Blasted Screw-Shaped Implants with Special Emphasis on Effects of Blasting Material and Turface Topography*. *Biomaterials*. 1996, **17**(1), 15-22.
- [28] ALLA, R. K., GINJUPALLI, K., UPADHYA, N., SHAMMAS, M., KRISHNARAVI, R., SEKHAR, R. *Surface Roughness of Implants: A Review*. *Trends Biomat. Artif. Organs*. 2011, **25**(3), 112-118.

[29] ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J. *Molecular Biology of The Cell*. New York: Garland Science, 2002. ISBN-10 0-8153-3218-1.

[30] XING, J., XIA, Z., HU, J., ZHANG, Y., ZHONG, L. *Growth and Crystallization of Titanium Oxide Films at Different Anodization Modes*. Journal of the Electrochemical Society. 2013, **160**(6), 239-246.

[31] BABUŠKA, V., PALAN, J., KOLAJA DOBRÁ, J., KULDA, V., DUCHEK, M., ČERNÝ, J., HRUŠÁK, D. *Proliferation of Osteoblasts on Laser-Modified Nanostructured Titanium Surfaces*. Materials (Basel). 2018, **11**(10), 1827.

[32] BABUŠKA, V., KOLAJA DOBRÁ, J., DLUHOŠ, L., DVOŘÁKOVÁ, J., MOZTARZADEH, J., HRUŠÁK, D., KULDA, V. *Repeated Exposure of Nanostructured Titanium to Osteoblasts with Respect to Peri-Implantitis*. Materials (Basel). 2020, **13**, 697.

[33] BIESINGER, M. C., LAU, L. W. M., GERSON, A. R., SMART, R. ST.C. *Resolving surface chemical states in XPS analysis of first row transition metals, oxides and hydroxides: Sc, Ti, V, Cu and Zn*. Applied Surface Science. 2010, **257**(3), 887-898. ISSN 0169-4332.

[34] JIA, J., YAMAMOTO, H., OKAJIMA, T., SHIGESATO, Y. *On the Crystal Structural Control of Sputtered TiO₂ Thin Films*. Nanoscale Research Letters. 2016, **11**, 324.

Zdroje obrázků

- [1] RAFAJ, Z. Model fotoionizace (pro kovy) [obrázek]. In: *Biocompatibility of Transition Metal Alloys: Physical-chemical Background* [online]. [Cit. 5. 12. 2020]. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/85704>
- [2] Wikipedia. Neelastická střední volná dráha (IMFP) elektronu jako funkce jeho kinetické energie [obrázek]. In: *Inelastic mean free path* [online]. [Cit. 5. 12. 2020]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Inelastic_mean_free_path#/media/File:E-IMFP_universal-en.svg
- [3] Wikipedia. Schéma Augerova procesu energie [obrázek]. In: *Auger-Effekt* [online]. [Cit. 5. 5. 2021]. Dostupné z: <https://de.wikipedia.org/wiki/Auger-Effekt>
- [4] Skupina fyziky povrchů. Fotoemisní spektrum XPS vnitřní hladiny Ti 2p, spektrum je tvořeno třemi různými doublety píků: TiO, TiO₂, Ti₂O₃ [obrázek]. In: *Princip fotoemisní spektroskopie (PES)* [online]. [Cit. 30. 11. 2020]. Dostupné z: <https://physics.mff.cuni.cz/kfpp/povrchy/metoda/xps-my>
- [5] Skupina fyziky povrchů. Schématické znázornění konstrukce XPS aparatury [obrázek]. In: *Princip fotoemisní spektroskopie (PES)* [online]. [Cit. 1. 12. 2020]. Dostupné z: <https://physics.mff.cuni.cz/kfpp/povrchy/metoda/xps-my>
- [6] SPECSTM. SARPES aparatura (model) v laboratoři NTC aparatury [obrázek]. In: *XR 50/XR 50 NAP, X-Ray Source*. Berlín, 2018. SPECS User Manual, Version 3.2. SPECS reference: 2100002828.
- [7] NARAYAN, R., ed. Rovnovážný fázový diagram slitiny Ti [obrázek]. In: *Biomedical Materials*. New York: Springer, 2009. ISBN 978-0-387-84871-6.
- [8] NARAYAN, R., ed. Mikrostruktura Ti6Al4V: a) světlé oblasti – α -Ti, tmavé oblasti – β -Ti, b) lamelární struktura [obrázek]. In: *Biomedical Materials*. New York: Springer, 2009. ISBN 978-0-387-84871-6.

[9] BRUNETTE, D. M., TENGVALL, P., TEXTOR, M., THOMSEN, P. (ed.). XPS spektra komerčních povrchů zubních implantátů [obrázek]. In: *Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications*. New York: Springer, 2001. ISBN 978-3-642-63119-1.

[10] BRUNETTE, D. M., TENGVALL, P., TEXTOR, M., THOMSEN, P. (ed.). Průzkumová XPS spektra povrchů na komerčně čistém Ti s oxidovým filmem pěstovaným při pokojové teplotě: a) mechanicky leštěný vzorek, b) mechanicky leštěný a vyčištěný vzorek [obrázek]. In: *Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications*. New York: Springer, 2001. ISBN 978-3-642-63119-1.

[11] BRUNETTE, D. M., TENGVALL, P., TEXTOR, M., THOMSEN, P. (ed.). XPS spektrum Ti (2p). Složení oxidového filmu ukazuje podíly od Ti v oxidačních stavech + IV (TiO_2), + III (Ti_2O_3), + II (TiO) a 0 (Ti kov) [obrázek]. In: *Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications*. New York: Springer, 2001. ISBN 978-3-642-63119-1.

[12] BRUNETTE, D. M., TENGVALL, P., TEXTOR, M., THOMSEN, P. (ed.). Schematický pohled na povrchový oxidový film na čistém titanu [obrázek]. In: *Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications*. New York: Springer, 2001. ISBN 978-3-642-63119-1.

[13] BABUŠKA, V., PALAN, J., KOLAJA DOBRÁ, J., KULDA, V., DUCHEK, M., ČERNÝ, J., HRUŠÁK, D. Porovnání mikrostruktury vzorků Ti a nTi [obrázek]. In: *Proliferation of Osteoblasts on Laser-Modified Nanostructured Titanium Surfaces*. Materials (Basel). 2018, **11**(10), 1827.

Zdroje tabulek

- [1] SPECS™. Laboratorní zdroje RTG záření pro XPS [tabulka]. In: *XR 50/XR 50 NAP, X-Ray Source*. Berlín, 2018. SPECS User Manual, Version 3.2. SPECS reference: 2100002828.
- [2] RAFAJ, Z. Legující prvky titanu [tabulka]. In: *Biocompatibility of Transition Metal Alloys: Physical-Chemical Background* [online]. [Cit. 30. 11. 2020] Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/85704>
- [3] BRUNETTE, D. M., TENGVALL, P., TEXTOR, M., THOMSEN, P. (ed.). Experimentální vazebné energie prvků často zaznamenávaných na povrchu Ti implantátů a jejich přiřazení ke konkrétním chemickým stavům [tabulka]. In: *Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications*. New York: Springer, 2001. ISBN 978-3-642-63119-1.
- [4] BRUNETTE, D. M., TENGVALL, P., TEXTOR, M., THOMSEN, P. (ed.). Typické chemické složení oxidové vrstvy na Ti površích [tabulka]. In: *Titanium in Medicine: Material Science, Surface Science, Engineering, Biological Responses and Medical Applications*. New York: Springer, 2001. ISBN 978-3-642-63119-1.
- [5] BABUŠKA, V. Zastoupení intersticiálních prvků v komerčně čistém titanu podle standardů ASTM [tabulka]. In: *Biokompatibilita a oseointegrace dentálních implantátů z nanostrukturního titanu*. Plzeň, 2019. Habilitační práce. Univerzita Karlova. Lékařská fakulta v Plzni. Ústav lékařské chemie a biochemie.
- [6] BABUŠKA, V. Materiálové charakteristiky titanu a jeho slitin [tabulka]. In: *Biokompatibilita a oseointegrace dentálních implantátů z nanostrukturního titanu*. Plzeň, 2019. Habilitační práce. Univerzita Karlova. Lékařská fakulta v Plzni. Ústav lékařské chemie a biochemie.