

Podloge za mikro-topografsko i galvanotropsko aksonalno vođenje

Filipović, Karla

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:735890>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
FIZIČKI ODSJEK

Karla Filipović

PODLOGE ZA MIKRO-TOPOGRAFSKO I
GALVANOTROPSKO AKSONALNO VOĐENJE

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
FIZIČKI ODSJEK

INTEGRIRANI PREDDIPLOMSKI I DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
FIZIKA; SMJER ISTRAŽIVAČKI

Karla Filipović

Diplomski rad

**Podloge za mikro-topografsko i
galvanotropsko aksonalno vođenje**

Voditelj diplomskog rada: Doc.dr.sc. Vedran Đerek

Ocjena diplomskog rada: _____

Povjerenstvo: 1. _____

2. _____

3. _____

Datum polaganja: _____

Zagreb, 2024.

Zahvaljujem se mentoru doc. dr. sc. Vedranu Đereku i njegovom asistentu Aleksandru Opančaru na svojoj pomoći, savjetima i podršci pri izradi ovog rada. Zahvaljujem i dr. sc. Hrvoju Skenderoviću što mi je ustupio korištenje femtosekundnog lasera i optičkog profilometra te me uputio u rad s njima. Veliko hvala i dr. sc. Jordiu Sanchu Parramonu za mjerenja kontaktnim profilometrom i dr.sc. Idi Delač Marion i Anni Tvrdonovoj za mjerenja skenirajućim elektronskim mikroskopom bez kojih ovaj rad ne bi bio potpun. Želim zahvaliti i obitelji, Roku i prijateljima na potpori tijekom cijelog studija.

Sažetak

Tijekom razvoja mozga aksoni rastu prema svom cilju s visokim stupnjem preciznosti. Za točno usmjeravanje odgovorne su kemijske, topografske i galvanotropske naznake. Istraživanje djelovanja vanjskih naznaka na vođenje aksona bitno je za moguće kliničke primjene, kao što su ubrzavanje regeneracije živčanih puteva nakon traumatskih ozljeda, ali i za znanstvena istraživanja kao što su karakterizacije živih neuralnih mreža. U ovom radu izrađujemo podloge s različitim topografskim i galvanotropnim elementima koje se mogu koristiti za daljnje istraživanje aksonalnog vođenja. Za izradu topografskih naznaka koristimo nanosekundni i femtosekundni laser kojima mikrostrukturiramo površinu laserskom ablacijom. Podloge proizvodimo na komadima borosilikatnog stakla i silicija te promatramo efekte laserskih pulseva različite duljine i energije na dielektrični i poluvodički materijal. Za karakterizaciju uzoraka koristimo optički i kontaktni profilometar te pretražni elektronski mikroskop. Mjerimo ovisnosti volumena, promjera i dubine ablacijskog kratera o energiji pulsa te D^2 metodom računamo minimalnu ekspoziciju. Za galvanotropno vođenje koristimo organske elektrolitske fotokondenzatore (OEPC) koji su izrađene od organskih poluvodiča. OEPC su optoelektronički stimulatori koji se koriste za kapacitivnu neurostimulaciju. Koristeći nanosekundni i kontinuirani laser uklanjamo dizajnirani uzorak p-n dvosloja s površine fotokondenzatora čime stvaramo inverzne fotokondenzatore. Karakteriziramo inverzne fotokondenzatore mjerenjem tranzijentnog električnog potencijala.

Ključne riječi: aksonalno vođenje, nanosekundna ablacija, femtosekundna ablacija, laserska mikroobrada materijala, p-n dvosloj organskih poluvodiča, mjerenje tranzijentnog električnog potencijala

Substrates for microtopographic and galvanotropic axonal guidance

Abstract

During brain development axons grow towards their target with a high degree of accuracy. Chemical, topographical and galvanotropic cues are responsible for their guidance. Research of external cues for axonal guidance is vital for the possible clinical applications, such as accelerating nerve regeneration after traumatic injuries, as well as for scientific research (e.g. characterization of living neural networks). We designed and produced substrates with different topographical and galvanotropic elements which can be used for the investigation of axonal guidance. Microstructuring of the surface is done by using nanosecond and femtosecond laser ablation. Materials used for the substrates are borosilicate glass (dielectric) and silicon (semiconductor) on which the effects of different duration and energy of laser pulses are studied. Characterization was done using an optical profilometer, a contact profilometer and a scanning electron microscope. Dependence of the ablated volume, the diameter and the depth of ablation craters for different pulse energies is measured. The ablation threshold fluence is determined by the D^2 method. Organic electrolytic photocapacitors (OEPCs) were used for fabrication of the substrates with the galvanotropic cues. OEPCs are optoelectronic stimulators based on a p-n bilayer of organic semiconductors which are used for capacitive neurostimulation. Using a nanosecond and a continuous laser, a designed pattern of a p-n bilayer was removed from the surface of the photocapacitor, thus making an inverse photocapacitor. Characterization of said inverse photocapacitors is done by measuring the transient electric potential inside the physiological medium mimicking electrolyte.

Keywords: axonal guidance, nanosecond ablation, femtosecond ablation, laser micromachining, p-n bilayer of organic semiconductors, measuring transient electric potential

Sadržaj

1	Uvod	1
2	Aksonalno vođenje	1
2.1	Osnovni dijelovi neurona	1
2.2	Akcijski potencijal	2
2.3	Rast aksona	4
2.3.1	Kemijske naznake	4
2.3.2	Topografske naznake	6
2.3.3	Galvanotropske naznake	11
3	Laserska ablacija	13
3.1	Minimalna ekspozicija i energija	14
3.2	Duljina pulsa	15
3.2.1	Nanosekundni pulsevi	15
3.2.2	Femtosekundni pulsevi	17
3.3	Čuvanje sastava uzorka	19
3.4	Obrada materijala laserskom ablacijom	19
4	Supstrati	20
4.1	Borosilikatno staklo	21
4.2	Silicij	21
4.3	Indijev oksid dopiran kositrom	21
4.4	Organski elektrolitski fotokondenzatori	22
5	Eksperimentalni postav	23
5.1	Nd:YAG nanosekundni pulsni laser	23
5.2	Yb:KGW femtosekundni pulsni laser	25
5.3	Robotska ruka i kontinuirani laser	29
5.4	Pomično postolje	29
5.4.1	Thorlabs XY mikromanipulator	29
5.4.2	Newport integrirano XY linearno translacijsko postolje	30
5.4.3	Kontrola rada lasera i sinkronizacija s postoljem	31
5.5	Skenirajući elektronski mikroskop	32

5.6	Optički profilometar	32
5.7	Kontaktni profilometar	33
5.8	V_T skeniranje	35
5.8.1	Obrada podataka	36
6	Rezultati i rasprava	37
6.1	Topografske oznake napravljene nanosekundnim laserom	37
6.1.1	Analiza kratera nastalih nanosekundnom laserskom ablacijom .	37
6.1.2	Podloge na borosilikatnom staklu	44
6.1.3	Podloge na siliciju	45
6.1.4	Podloge na ITO-u	47
6.2	Topografske oznake napravljene femtosekundnim laserom	50
6.2.1	Podloge na borosilikatnom staklu	50
6.2.2	Podloge na siliciju	55
6.3	Galvanotropske oznake	62
6.3.1	Uzorci proizvedeni nanosekundnim laserom i Newport pomičnim postoljem	62
6.3.2	Uzorci proizvedeni kontinuiranim laserom i robotskom rukom .	65
6.3.3	Usporedba uzoraka proizvedenim kontinuiranim i pulsni- laserom	67
7	Zaključak	70
	Literatura	71

1 Uvod

Aksoni su citoplazmatski produžetci neurona koji vode signal (akcijski potencijal) te ga prenose drugim neuronima preko sinapsi. Tijekom embrionalnog razvoja aksoni rastu do svojih predodređenih ciljeva po dobro definiranim putanjama duž kojih ih navode različite naznake. Istraživanje aksonalnog rasta i vođenja bitno je za razumijevanje razvoja i dinamika živčanog sustava. Kako bismo u budućnosti mogli ubrzati regeneraciju živčanih puteva ili istraživati žive mreže neurona, moramo dobro razumjeti mehanizme aksonalnog vođenja te kako ih optimalno iskoristiti. Aksonalno vođenje se ostvaruje kemijskim, topografskim i galvanotropnim naznakama te ćemo se u ovom radu fokusirati na zadnje dvije vrste naznaka.

Topografske naznake različitih oblika i dimenzija obično se proizvode na supstratima različitim litografskim tehnikama. U ovom radu koristimo lasersku ablaciju za proizvodnju naznaka. Obrada materijala pulsni laserom je nova tehnika koja sve više dobiva na popularnosti zbog jednostavnosti i brzine izrade. U ovom radu koristimo nanosekundni i femtosekundni laser za strukturiranje materijala. Efekte laserskih pulseva različitih valnih duljina i trajanja promatramo na borosilikatnom staklu (dielektriku) i siliciju (poluvodiču).

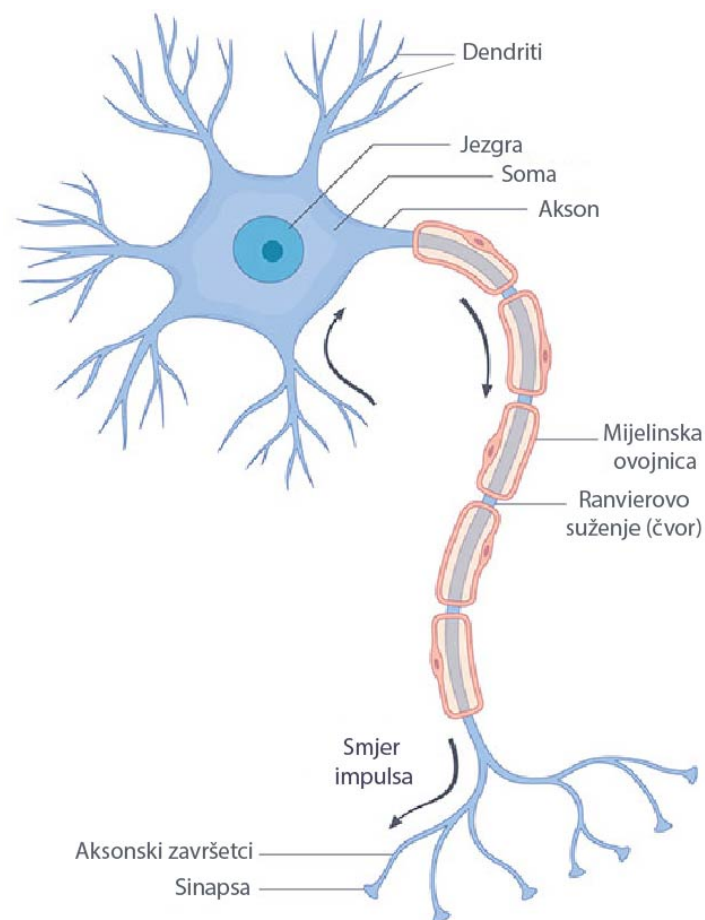
Za galvanotropno navođenje potrebno je proizvesti vanjsko električno polje dovoljne amplitude. Za stvaranje električnog polja koristimo organske elektrolitske fotokondenzatore koji su izrađeni od organskih poluvodiča te se koriste za kapacitivnu neurostimulaciju. Obrađujemo površinu fotokondenzatora kontinuiranim i pulsni laserom. Mjerimo tranzijentni električni potencijal te računamo električno polje koje dobivamo svjetlosnom pobudom proizvedenih inverznih fotokondenzatora.

2 Aksonalno vođenje

2.1 Osnovni dijelovi neurona

Osnovna jedinica živčanog sustava su živčane stanice ili neuroni koji ima oko 10^{10} u ljudskom živčanom sustavu. Neuroni se sastoje od some (staničnog tijela) promjera između $10\ \mu\text{m}$ i $50\ \mu\text{m}$ koja sadrži staničnu jezgru i organele te na kojoj se nalaze posebni citoplazmatski produžetci, dendriti i akson. Dendriti su ulazni dijelovi neurona koji se granaju iz some. Oni filtriraju i integriraju sinaptičku pobudu

i određuju treba li inicirati slanje signala duž neurona [1]. Akson je stanična ekstenzija promjera između $0.2 \mu\text{m}$ i $3 \mu\text{m}$ koja vodi električni signal od staničnog tijela do dendrita drugog neurona ili do mišićne stanice. Neki aksoni su pokriveni segmentiranom ovojnicom mijelinom koja služi kao izolator i ubrzava širenje akcijskog potencijala. Svaki segment mijelina je oko 2mm dugačak i odvojen je razmacima koje nazivamo Ranvierova suženja [2]. Na kraju aksona električni signal se pretvara u kemijski. Neurotransmiteri prenose signal u sinapsu, područje između kraja aksona i vrha dendrita, čime se kemijski signal ponovno pretvara u električni te signal podražaja putuje do drugih stanica [3].



Slika 2.1: Ilustracija neurona s označenim dijelovima. Na slici je prikazan akson s mijelinskom ovojnicom. Preuzeto s izvora [3] i prilagođeno.

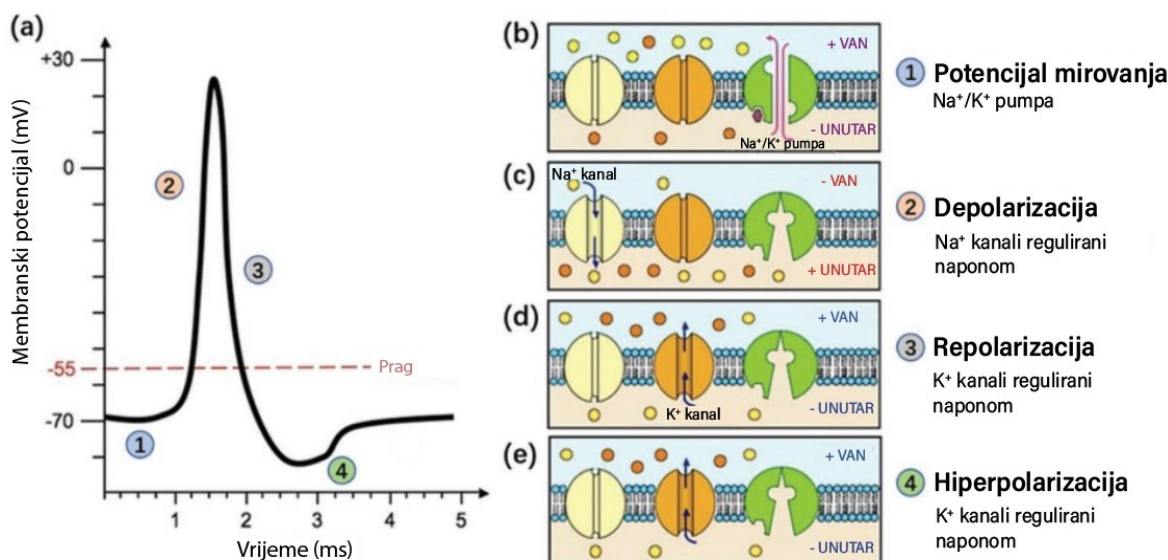
2.2 Akcijski potencijal

U vodenom okruženju tijela, soli i druge molekule disociraju na pozitivne i negativne ione zbog čega su tjelesne tekućine relativno dobri vodiči. Unutrašnjost aksona je ispunjena ionskom tekućinom koja je odvojena od ostatka tjelesnih tekućina tankom

dvoslojnom lipidnom membranom (debljine 50 – 100 Å). Električni otpor unutarnje i vanjske tekućine je gotovo isti, no imaju potpuno različit kemijski sastav. Vanjska tekućina sastoji se većinski od pozitivnih natrijevih iona i negativnih klorovih iona. Tekućina unutar aksona sastoji se od uglavnom kalijevih pozitivnih iona i negativno nabijenih iona organskih molekula. Kad je akson u stanju mirovanja, membrana je visoko propusna za kalijeve ione, nisko propusna za natrijeve ione i ne propušta velike organske ione. U stanju mirovanja natrij-kalijeva pumpa izbacuje Na^+ ione iz stanice i u stanicu propušta K^+ ione. Gradijent koncentracije tjera K^+ ione iz unutrašnjosti membrane, dok unutar ostaju negativni ioni organskih molekula. Dolazi do neravnoteže naboja i uspostavlja se membranski potencijal. Membranski potencijal suprotstavlja se protoku iona kalija, no naposljetku se postiže ravnoteža u kojoj je razlika električnog potencijala jednaka razlici kemijskog potencijala. Ravnotežni potencijal dan je Nernstovom jednadžbom:

$$\Delta V = \frac{RT}{zF} \ln\left(\frac{c_a}{c_b}\right) \quad (2.1)$$

gdje je R plinska konstanta, T temperatura, zF naboj po jednom molu iona kalija, c_a koncentracija iona kalija unutar membrane, a c_b koncentracija iona kalija izvan membrane [4]. Ravnotežni potencijal iznosi oko -70 mV u odnosu na vanjsku tekućinu. Živčani impuls nastaje ako je podražaj (kemijski, mehanički ili primijenjen napon) iznad praga okidanja. Impuls se širi duž aksona i nazivamo ga akcijski potencijal. Akcijski potencijal kao funkcija vremena prikazan je na slici 2.2.a. Kad se membranski potencijal poveća iznad praga, naponom kontrolirani Na^+ kanali se otvaraju i ioni natrija ulaze unutar membrane čime potencijal naglo raste do oko 30 mV . Ovaj proces se zove depolarizacija. Porastom membranskog potencijala aktiviraju se i naponom kontrolirani K^+ kanali. Kalijevi ioni izlaze iz aksona i iznos membranskog potencijala ponovno pada što zovemo repolarizacija. Membranski potencijal obično padne ispod potencijala mirovanja, do oko -90 mV , zbog izlaska velikog broja K^+ iona. Ovu pojavu nazivamo hiperpolarizacija. Ilustraciju aktivnosti ionskih kanala u svakoj fazi akcijskog potencijala možemo vidjeti na slikama 2.2.b-e. Nagli rast membranskog potencijala u jednom dijelu aksona uzrokuje povećanu propusnost u susjednom dijelu aksona čime se impuls propagira duž aksona. Nakon nekoliko milisekundi membranski potencijal se vraća u iznos stanja mirovanja i akson je spreman



Slika 2.2: Shema akcijskog potencijala. a) Ovisnost membranskog potencijala o vremenu za vrijeme trajanja akcijskog potencijala. b) Ionski kanali za vrijeme stanja mirovanja aksona gdje vidimo rad Na^+/K^+ pumpe. c) Rastom potencijala dolazi do depolarizacije stanice otvaranjem Na^+ naponom kontroliranih kanala. d) Aktiviraju se naponom kontrolirani K^+ kanali čime dolazi do repolarizacije, tj. pada potencijala. e) Membranski potencijal pada ispod potencijala mirovanja što zovemo hiperpolarizacija. Preuzeto s izvora [1] i prilagođeno.

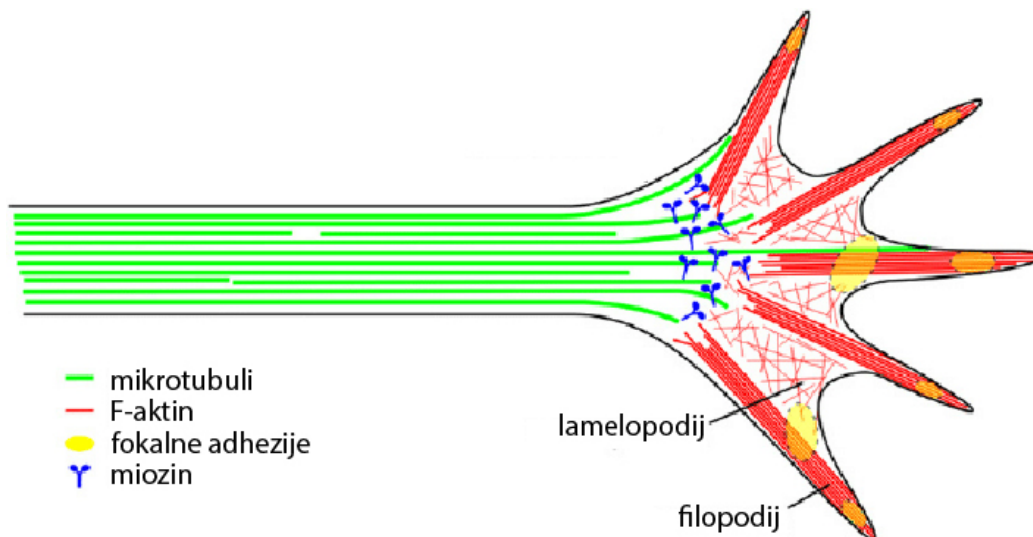
za sljedeći podražaj [1, 2].

2.3 Rast aksona

Neuronski završetci putuju prema svojim konačnim ciljevima s visokim stupnjem preciznosti. Na vrhu aksona nalazi se spljoštena struktura u obliku lepeze koja se sastoji od mnogo dugih i tankih šiljaka koji gledaju radijalno prema vani koju zovemo čunjićem rasta. Ilustraciju čunjića rasta možemo vidjeti na slici 2.3. Čunjić rasta aktivno istražuje okolinu te nailazi na vanjske naznake koje ga navode do finalnog odredišta. Naznake mogu biti kemijske, topografske ili galvanotropske.

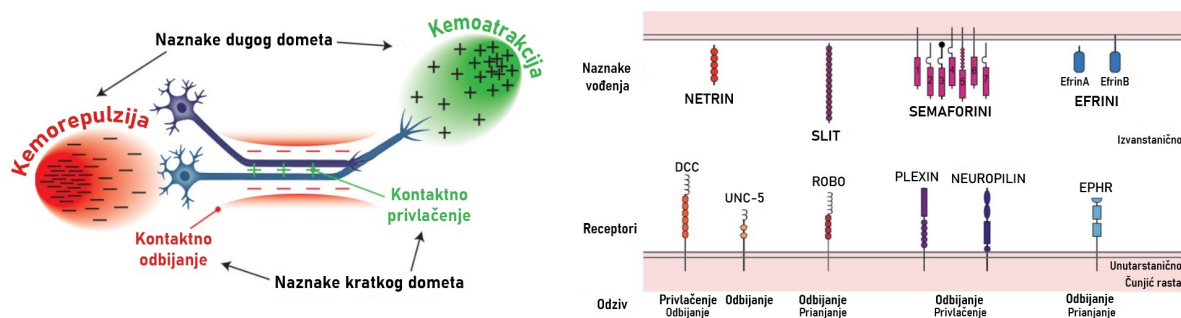
2.3.1 Kemijske naznake

Kemijske naznake mogu biti kemoatraktanti ili kemorepelenti ovisno o tome uzrokuju li privlačenje aksona u nakupine (živce ili svežnjeve) ili odbijanje što možemo vidjeti ilustrirano na lijevoj slici 2.4. Zadnji dvadeset godina korištene su različite eksperimentalne strategije kako bi se identificirale različite molekule i pripadni receptori odgovorni za aksonalno vođenje. Pronađene su četiri glavne skupine naznaka



Slika 2.3: Struktura čunjića rasta koji se nalazi na vrhu aksona te aktivno istražuje okolinu. Čunjić se sastoji od ravne regije lamelopodije i šiljastih izbočina filopodija unutar kojih možemo vidjeti dijelove citoskeleta. [5].

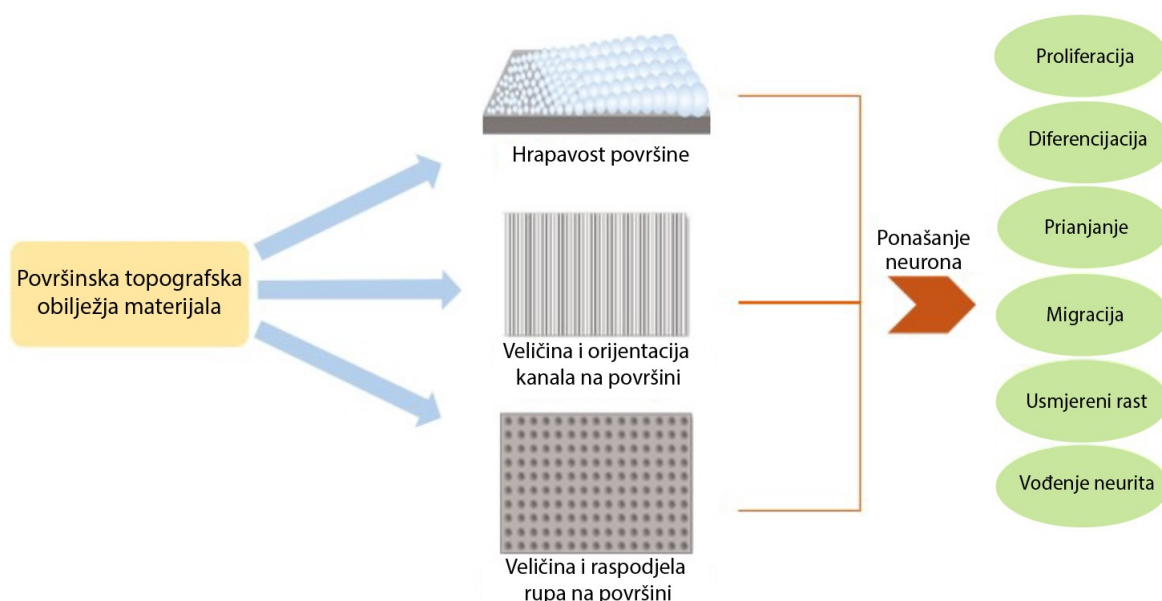
vođenja: netrini, slitovi, semaforini i efrini. Prikaz četiri glavne skupine, pripadnih receptora na čunjiću rasta i odziv na njih vidimo na desnoj slici 2.4. Detaljan opis svake od skupina i njihovog djelovanja je izvan opsega ovog rada i može se pronaći u priloženoj literaturi. Molekule stanične adhezije (CAM) su isto tako uključene u vođenje, kao i članovi obitelji imunoglobulina (Ig) i kadherina. Otkrića i karakterizacije ovih molekula dovela su do važnih otkrića oko mehanizama vođenja, uključujući postojanje naznaka za kratki i dugi domet vođenja i multifunkcionalnu prirodu nekih molekula [6, 7].



Slika 2.4: Lijevo: Kemijske naznake za aksonalno vođenje mogu imati bliži ili dalji domet i imati privlačno ili odbojno djelovanje. Preuzeto s izvora [6] i prilagođeno. Desno: Sažeti prikaz četiri glavne skupine naznaka za vođenje, njihovih receptora i rezultata njihovog djelovanja. Preuzeto s izvora [7] i prilagođeno.

2.3.2 Topografske naznake

Osim kemijskih naznaka koje su detaljno istražene, izvanstanična okolina pruža neuronima niz geometrijski dobro definiranih trodimenzionalnih naznaka na mikro i nano skalama koje utječu na razvoj, funkciju i regeneraciju živčanog sustava. Površinska topografija utječe na proliferaciju, diferencijaciju, prijanjanje, migraciju i usmjereni rast neurona te vođenje aksona (Slika 2.5). Posljednjih godina istraživači su testirali različita topografska obilježja, kao što su linije, kanali, stupovi i jame, čija veličina i oblik moduliraju ponašanje neurona [8].



Slika 2.5: Shematski dijagram utjecaja topografskih obilježja materijala na ponašanje neurona. Preuzeto s izvora [8] i prilagođeno.

Mehanizam topografskog vođenja zove se kontaktno vođenje. *In vivo* stanice su okružene izvanstaničnom matricom (eng. *extracellular matrix*, ECM) koja ima različita mikro i nano topološka obilježja s kojima neuroni interagiraju. U vođenju sudjeluju podstanične (filopodiji, stanična membrana i fokalne adhezije) i molekularne strukture (citoskeletna mreža). Na kraju aksona se nalazi čunjić rasta koji ima lamelipodijску regiju bogatu aktinom i izbočine filopodije kojima istražuje okolnu topografiju. Fokalne adhezije su skupine adhezijskih molekula koje mogu imati dimenzije topografskih obilježja te je pokazano da se orijentiraju u smjeru topografskog obilježja. Stanična membrana predstavlja granicu između stanice i ECM-a te je pokazano da se prilagođava vertikalnim topografskih obilježjima. Gore navedene podstanične strukture su kandidati za primarni senzor kontaktnog vođenja. Oblik stanice, orijentacija

i mobilnost su određene dinamikama citoskeletnih elemenata: aktina, mikrotubula i posrednih filamenata. Mehanizam kontaktnog vođenja i dalje nije u potpunosti objašnjen. Novija istraživanja se fokusiraju na transdukciju signala (skupina kemijskih procesa koji upravljaju staničnom funkcijom) gdje obećavajuće rezultate daje YAP-TAZ kombinacija proteina i transkripcijskog faktora [9].

Mikrouzorkovanje (eng. *micropatterning*) se koristi za obradu supstrata koji se koriste za formaciju neuralnih mreža, vođenje aksona, grananje i polarizaciju neurona. Najčešće metode mikro i nano obrade materijala su fotolitografija, meka litografija, dvofotonska litografija, elektropređenje, litografija ionskim snopom i litografija nanootiskom. U sljedećim odlomcima ćemo ukratko opisati navedene tehnike te ih usporediti s tehnikom korištenom u ovom radu (laserska mikro obrada).

Fotolitografija je relativno složena, no brza metoda kojom se mogu proizvesti kompleksni uzorci na površini supstrata čiji shematski prikaz možemo vidjeti na slici 2.6.a. Glavni princip ove metode je korištenje UV zračenja za polimerizaciju ili degradaciju fotorezista. Prvi korak je prekrivanje uzorka slojem fotorezista rotacijskim nanošenjem (eng. *spin coating*). Potom prekrivamo pločicu maskom koja ima otvore na područjima koja želimo ukloniti i ozračimo pločicu UV svjetlošću. Ozračeni fotorezist uklanjamo uranjanjem pločice u razvijач čime dobivamo željeni uzorak. Mane ove metode je potreba za savršeno ravnim supstratom i vrlo čistom okolinom, možemo se raditi samo na pogodnim materijalima i ograničeni smo valnom duljinom potrebne svjetlosti [10].

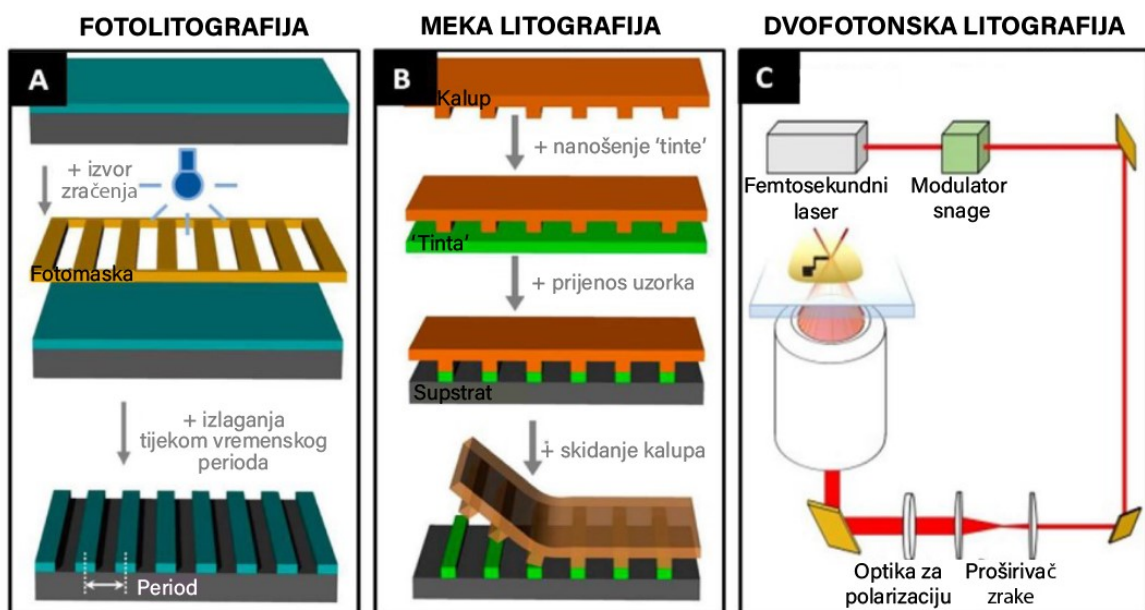
Meka litografija je proširenje metode fotolitografije čiji shematski prikaz možemo vidjeti na slici 2.6.b. Glavni princip je korištenje elastomernog materijala, kao što je silikonski polimer polidimetilsiloksan (PDMS), za kopiranje mikrostrukturiranog kalupa koji ima inverznu geometriju željene strukture. Prvi korak je priprema PDMS-a koji se prenosi na glavni silicijski kalup na kojem je definirana željena mikrostruktura. Nakon nekoliko sati PDMS se stvrdne nakon čega se može odlijepiti od kalupa i spreman je za korištenje. Ova tehnika je brza, jeftina i precizna te radi na ravnim i zakrivljenim površinama zbog fleksibilnosti PDMS-a. Međutim, može doći do promjena geometrije uzorka prilikom sušenja i očvršćivanja PDMS-a [10, 11].

Dvofotonska litografija je vrsta litografije kojoj je baza proces dvofotonske polimerizacije čiju ilustraciju možemo vidjeti na slici 2.5.c. Osnova dvofotonske polimerizacije je optički nelinearna apsorpcija svjetlosti (obično valne duljine u infracrve-

nom dijelu spektra čiji je izvor femtosekundni laser) koja inducira polimerizaciju ili umrežavanje (eng. *crosslinking*) materijala. Zraka femtosekundnog lasera se fokusira unutar materijala čime jedna molekula fotoinicijalizatora apsorbira dva fotona i dolazi do polimerizacije unutar volumena fokusa. Maksimalna rezolucija dobivenih struktura je ispod 100 nm što je bitno za promatranje efekata ECM-a na rast stanica. Nedostatci ove tehnike su ograničena ukupna veličina proizvedenih struktura, nedostatak biomaterijala koji su pogodni za dvofotonsku polimerizaciju i sporost procesa zbog koje ima niski proizvodni kapacitet [12].

Elektropredenje (eng. *electro-spinning*) je metoda koja se koristi za proizvodnju mikro i nano vlakana. Shematski prikaz elektropredenja s izvorom postavljenim okomito i vodoravno s obzirom na površinu možemo vidjeti na slici 2.7.a. Visoki napon se narine na otopinu polimera koja postaje električki nabijena i otapalo isparava prije nego što dođe do spremnika. Čvrsta vlakna se deponiraju u spremnik i koriste se za oponašanje ECM-a. Iako je metoda efikasna, zahtjevno je prilagoditi parametre elektropredenja, dolazi do problema s toksičnošću otopine i kontrolom veličine vlakana [10].

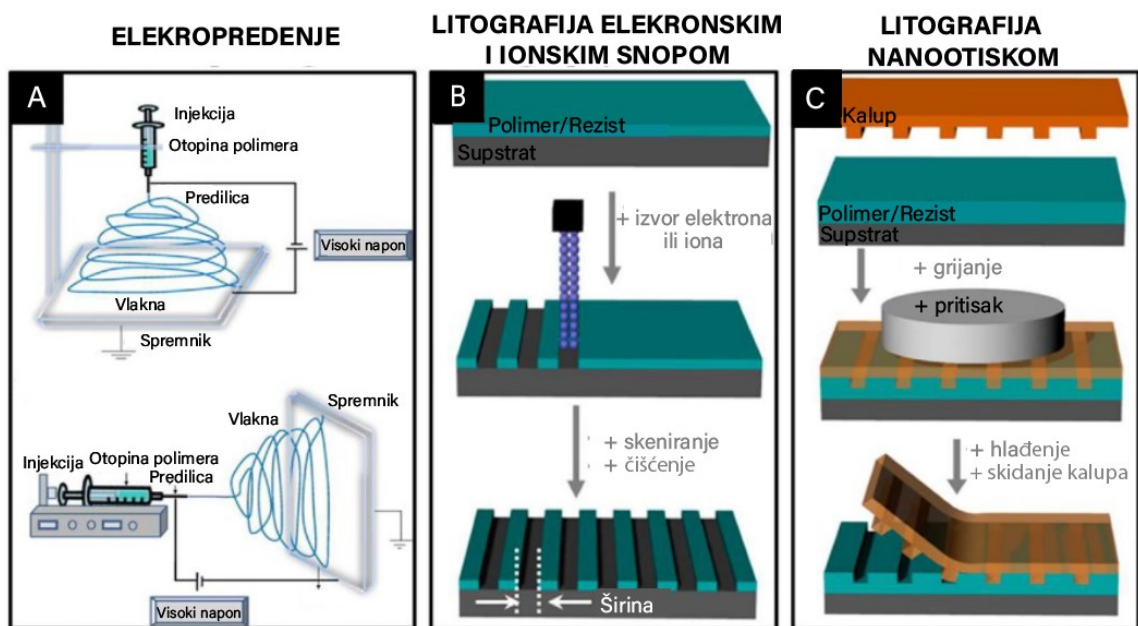
Litografija elektronskim snopom (EBL) je tehnika koja može stvoriti vrlo precizne strukture nanometarskih dimenzija koristeći fokusirani elektronski snop. Proces je



Slika 2.6: Shematski prikaz tehnika za mikro i nano obradu materijala za a) fotolitografiju, b) meku litografiju i c) dvofotonsku litografiju. Preuzeto s izvora [8] i prilagođeno.

sličan fotolitografiji, s razlikom da u fotolitografiji ozračimo cijeli uzorak UV svjetlošću odjednom, a u EBL-u koristimo seriju izlaganja. Obe metode koriste sloj rezista na supstratu, samo što je u slučaju EBL-a rezist osjetljiv na elektrone umjesto na UV svjetlost. Snop elektrona uzrokuje degradaciju ili umrežavanje rezista nakon čega se uzorak ispire razvijanjem. Za razliku od fotolitografije ne koriste se maske i imamo veću preciznost, no proces je skup i spor. Litografija ionskim snopom (IBL) koristi snop teških iona za izbijanje atoma s površine. Postiže se još bolja preciznost u usporedbi s EBL-om, no ima niski proizvodni kapacitet [10, 11]. Shematski prikaz litografije elektronskim i ionskim snopom možemo vidjeti na slici 2.7.b.

Litografija nanootiskom je metoda slična mekoj litografiji koja može proizvesti topološka obilježja nanometarskih dimenzija čiji shematski prikaz možemo vidjeti na slici 2.7.c. Nanostrukturirani kalup se utisne na površinu rezista čime se mehaničkom deformacijom prenosi uzorak. Metoda je ekstremno jednostavna, povećava izbor materijala u odnosu na druge metode i vrlo je pogodna za proizvodnju uzoraka na velikim skalama [10].

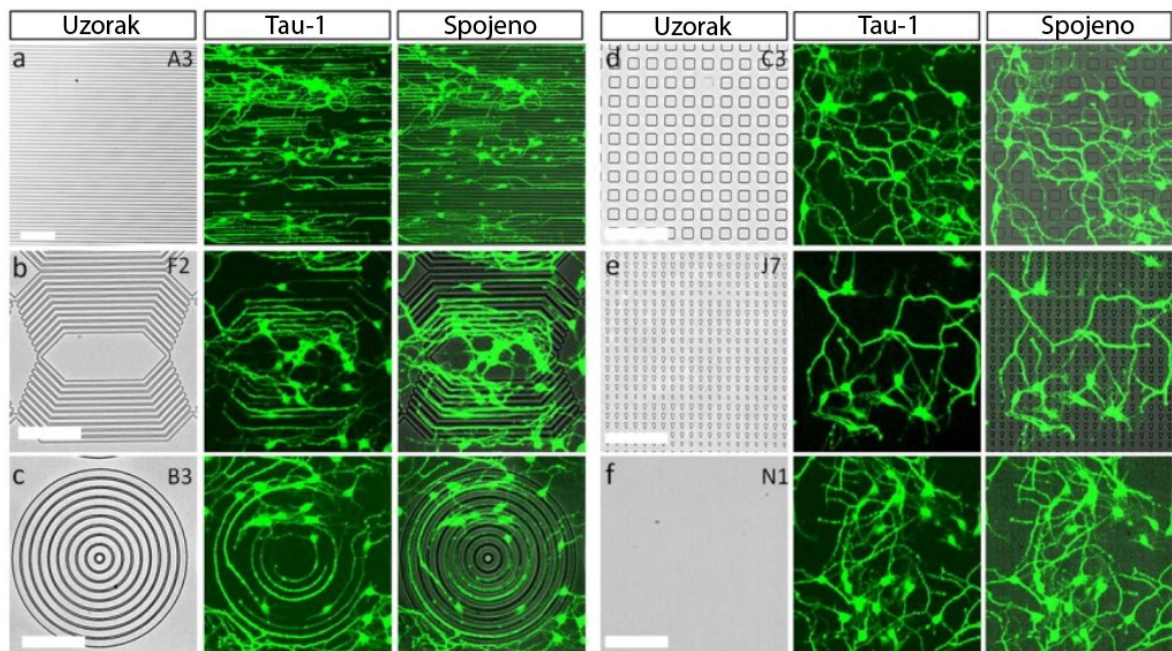


Slika 2.7: Shematski prikaz tehnika za mikro i nano obradu materijala za a)elektropredenje (okomito i vodoravno), b) litografiju elektronskim ili ionskim snopom i c)litografiju nanootiskom. Preuzeto s izvora [10] i prilagođeno.

Korištenje laserske ablacije kao metode obrade materijala ima određene prednosti u usporedbi s gore navedenim metodama. Za proizvodnje podloga različitim vrstama litografije potrebno je dosta specijalizirane opreme i resursa (rotacijski nanositelj,

čista soba, tamna soba s filtriranim osvjetljenjem, prikladni fotorezist, plazmeno ili kemijsko jetkanje površine, uklanjanje fotorezista koristeći drugo otapalo). Može doći do problema s reproducibilnosti zbog nejednolikog nanošenja i adhezije fotorezista na površinu. Beskontaktna metoda laserske ablacije može se koristiti na raznim materijalima, brza je, vrlo prilagodljiva, ima visoki stupanj preciznosti i izbjegava potrebu za fotorezistom i drugim kemikalijama. Njom je isto tako moguće modificirati postojeće elektrofiziološke podloge znatno lakše u usporedbi s ostalim tehnikama [13].

Detaljna analiza kako različita topografska obilježja utječu na aksonalni rast prikazana je u radu [14] čiji dio rezultata možemo vidjeti na slici 2.8. U radu su dizajnirali veliki broj uzoraka s obilježjima veličina između 2 i 15 μm koji su bili izotropni (točke, trokuti i kvadrati) i anizotropni (linearne, kružne i uglate rešetke). Obilježja su bila visoka 1 μm i napravljena mekom litografijom na PDMS-u. Na uzorke su postavili hipokampalne neurone koje su bili uzgajani 2 dana *in vitro* (2 DIV) i označeni posebnim aksonalnim markerima (Tau 1). Najslabije vođenje zapaženo je na spo-



Slika 2.8: Rast aksona (2 DIV) na različitim mikrostrukturiranim uzorcima. Prikazani uzorci su a) kanali 2 μm široki i 10 μm razmaknuti, b) kanali pod kutom 5 μm široki i razmaknuti, c) krugovi 5 μm široki i 10 μm razmaknuti, d) 10 \times 10 μm^2 kvadrati s 10 μm razmakom, e) trokuti 5 μm visoki i 10 μm široki i f) ravna površina sa skalom 100 μm . Preuzeto s izvora [14] i prilagođeno.

radičnim i izoliranim uzorcima, kao što su kvadrati i trokuti na slikama 2.8.d i 2.8.e. Vođenje je bilo najočitije na linearnim rešetkama i krugovima, što možemo vidjeti na slikama 2.8.a-c, gdje su aksoni pratili kanale (regije između uzdignutih dijelova). Računalnom analizom saznali su da je prosječna duljina aksona bila 60% veća u uzorcima s linijama i 48% veća na uzorcima s kružnicama u usporedbi s aksonima koji su rasli na ravnoj površini. Na isprekidanim uzorcima duljina je bila značajno kraća. Isto tako su pokazali da su aksoni bili manje razgranati kad su rasli na mikrostrukturiranoj površini u usporedbi s ravnom površinom.

Pokazan je različit rast aksona ovisno o dubini i periodu topografskih naznaka (razmak između minimuma kanala). Vođenje je jače za dublje kanale ($8 \mu m$ u usporedbi s $3 \mu m$) i za kanale s manjim periodom ($20 \mu m$ u usporedbi s $33 \mu m$ i $50 \mu m$) [15].

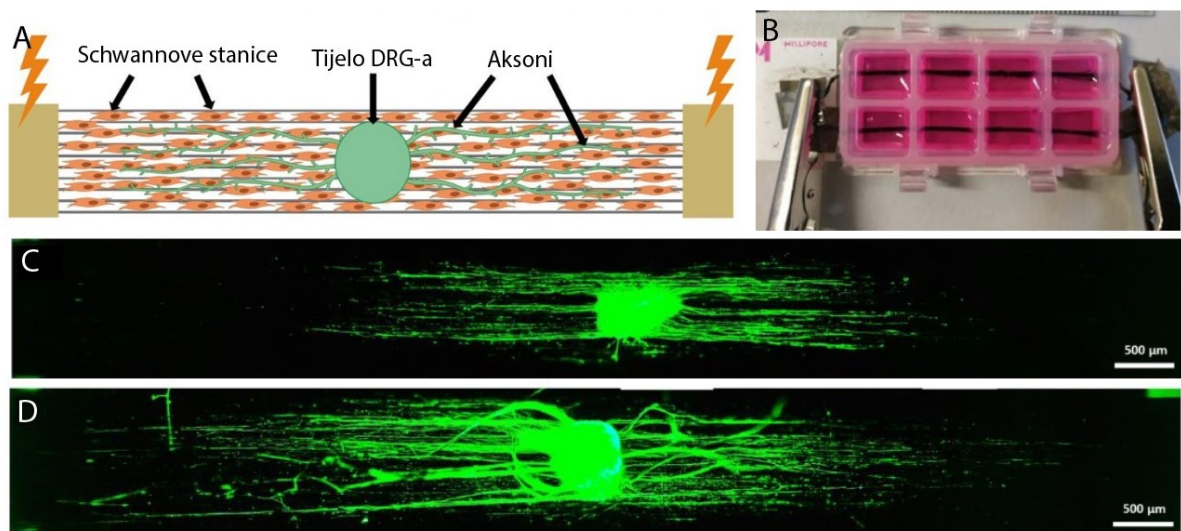
2.3.3 Galvanotropске naznake

Galvanotropizam je proces u kojem se rastući aksoni usmjeravaju pod utjecajem izvanstaničnog električnog polja. Pokazano je da zbog vanjskog električnog polja dolazi do zakretanja čunjića rasta tipično prema katodi (ovisno o tipu živčane stanice i supstratu, može doći i do odbijanja). Ovaj fenomen je izrazito snažan i često jači od kemijskog navođenja. Fiziološko električno polje fizički pomiče nabijene receptorske molekule koje se nalaze s vanjske strane lipidne dvoslojne membrane čime se stvara asimetrija receptora između strane membrane okrenutoj prema anodi i prema katodi. Tada se čunjić rasta okreće prema izvoru neurotransmitera, kao npr. acetilkolinu (*ACh*) u promatranim neuronima iz embrija žabe *Xenopus laevis*, i sam čunjić spontano otpušta *ACh* dok putuje prema ciljanom tkivu kako bi formirao sinapse. *ACh* stimulacija asimetrično raspoređenih *ACh* receptora aktivira kaskade signala prvenstveno na katodnoj strani zbog čega vidimo preferencijalni rast. Neurotransmiteri i električno polje s kojima se istovremeno susreće čunjić rasta međudjeluju čime se određuje koliko će se akson zakrenuti u smjeru katode.

Također, do nastanka izvanstaničnog električnog polja može doći zbog ponavljajućeg pulsirajućeg aktiviranja akcijskog potencijala ili zbog sinaptičke aktivnosti. Pokazano je da pulsno električno polje istosmjerne struje inducira katodno privlačenje kod embrionalnih neurona žabe *Xenopus laevis*. Pulsno električno polje može uzrokovati i sinkronizaciju i promjene u aktiviranju akcijskih potencijala u mrežama neurona što povratno može djelovati na naznake za vođenje čunjića rasta. Na promatra-

nim neuronima *Xenopus laevis* stimulacija je uzrokovala jače privlačno djelovanje netrina-1 i promijenila je odbojno djelovanje glikoproteina povezanog s mijelinom u privlačno [16].

Amplituda električnog polja potrebna za usmjeravanje testirana je na primjeru ganglijskih stanica retine. Amplitude dovoljne za usmjeravanje su u rasponu od $5 \cdot 10^{-4} \text{ mV/mm}$ do 10 mV/mm što obuhvaća četiri reda veličine. Nisu viđene značajne razlike u katodnoj orijentaciji aksona za različite iznose amplituda. U različitim radovima postoje velike razlike u iznosu minimalne amplitude električnog polja (od $5 \cdot 10^{-4} \text{ mV/mm}$ do 70 mV/mm) potrebnog za usmjeravanje aksona. Smatra se da je razlog tomu neujednačenost gustoće struje unutar medija, vrsta životinje i stadij razvoja korištenih neurona, način pripreme kulture stanica i korišteni supstrat [17]. Primjer kombinacije topografskog i galvanotropnog vođenja možemo vidjeti u članku [18]. Koristili su staničnu kulturu spinalnih ganglija (eng. *dorsal root ganglia*, DRG) i Schwannovih stanica koje održavaju mijelinsku ovojnici aksona i izlučuju različite neurotropne faktore koji stvaraju optimalno okruženje za rast aksona. Kao supstrat su koristili mikrovlakna polilaktične mliječne kiseline (PLA) proizvedene elektropredenjem koja su obložili elektrovodljivim polimerom polipirolom (PPy). Shemu



Slika 2.9: Prikaz eksperimentalnog postava i rezultata istraživanja topografskog i galvanotropnog vođenja aksona. a) Shema koja pokazuje mikrovlakna na kojima se nalazi stanični medij sa Schwannovim stanicama, tijelom DRG-a koje sadrži some i aksoni koji rastu u smjeru mikrovlakana. b) Korišteni uređaj gdje vidimo elektrode spojene na rubove mikrovlakana koje izbjegavaju kontakt s medijom kulture stanica. Na slici c) vidimo kontrolni, a na slici d) električno stimulirani uzorak. Možemo primijetiti povećanje duljine aksona i povećanje površine koje zauzimaju u usporedbi s kontrolnim uzorkom. Preuzeto s izvora [18] i prilagođeno.

eksperimentalnog postava možemo vidjeti na slici 2.9.a. Supstratu su dodali nekoliko zlatnih mikrovlakana kako bi povećali vodljivost. Potpuno izgrađen bioreaktor možemo vidjeti na slici 2.9.b gdje vidimo da se PLA-PPy-Au mikrovlakna nalaze ispod bunara (eng. *wells*) sa staničnim kulturama. Puštajući struju od 0.5 mA frekvencije 3 Hz postignuta je maksimalna duljina aksona i povećala se površina koju zauzimaju aksoni u usporedbi s kontrolnim uzorkom što možemo vidjeti na slikama 2.9.c i 2.9.d. Duljina se povećala za 19.2 %, a površina koju zauzimaju aksoni za 40 % [18].

3 Laserska ablacija

Laserska ablacija je termalan ili netermalan proces uklanjanja atoma ozračivanjem površine krutog materijala kontinuiranom ili pulsnom laserskom zrakom. Vrlo je važna tehnika kod obrade materijala koja se može koristiti za bušenje, graviranje ili rezanje materijala, proizvodnju nanočestica ili pripremu površine materijala na mikrometarskoj skali. U ovom radu koristimo femtosekundni i nanosekundni pulsni laser kao alat za mikroobradu materijala. Fokusiranjem laserskog snopa i preciznim pozicioniranjem uzorka laserskom ablacijom strojno obrađujemo materijal stvarajući ranije dizajnirane uzorke na površini različitih materijala. Karakteristike kratera i plazme koji nastaju ablacijom ovise o parametrima laserskog snopa (snazi, trajanju i valnoj duljini), o svojstvima materijala i o okruženju u kojem se materijal nalazi (vakuum, tekućina ili zrak).

Intenziteti lasera od nekoliko μJ do mJ po cm^2 mogu dovesti do desorpcije atoma i iona s površine bez vidljive štete na površini. S većim intenzitetima snopa različiti mehanizmi postaju mogući jer će laserski pulsevi dolaziti u kontakt s materijalom koji je rastopljen i/ili rekondenziran. Nadalje, dolazi do stvaranja ablacijskog kratera koji može imati povišene rubove, može doći do promjene površinske reflektivnosti ili do selektivne evaporacije. Neki od glavnih problema obrade materijala laserskom ablacijom o kojima ćemo detaljnije pričati u sljedećim odlomcima su određivanje minimalne ekspozicije za početak ablacije, velike razlike u procesima za pulseve različitog trajanja, određivanje stope ablacije materijala i sačuvanje sastava uzorka [19].

3.1 Minimalna ekspozicija i energija

Određivanje lokalne ekspozicije ili intenziteta je vrlo bitno kod rada s kratkim laser-
skim pulsevima jer nam ono govori o mogućim rizicima za izlaganje laserskom snopu
za čovjeka (moguća šteta na koži ili rožnici) ili za optičke materijale. Kako bi odredili
ekspoziciju moramo znati energiju snopa i prostorni profil. Najjednostavnija metoda
je takozvana Liuova metoda ili D^2 metoda. Mjerenjem veličine kratera na materijalu
pri različitim snagama ovom metodom možemo odrediti ekspoziciju praga ablacije
bez snimanja profila zrake. Ova metoda pretpostavlja Gausijanski profil zrake što
možemo zapisati kao:

$$F(r) = F_0 e^{-2r^2/w_0^2} \quad (3.1)$$

gdje je $F(r)$ lokalna ekspozicija na radijalnoj koordinati r , F_0 maksimalna ekspozicija,
a $2w_0$ promjer zrake na $1/e^2$ vrijednosti maksimuma. Definiramo ekspoziciju praga
ablacija F_{th} kao lokalnu ekspoziciju na rubu kratera radijusa R .

$$F_{th} = F_0 e^{-2R^2/w_0^2} \quad (3.2)$$

Prethodnu relaciju možemo zapisati kao:

$$R^2 = \frac{w_0^2}{2} \ln\left(\frac{F_0}{F_{th}}\right) \quad (3.3)$$

gdje vidimo linearnu ovisnost između kvadrata radijusa kratera i prirodnog logaritma
ekspozicije. Često je gornju jednadžbu zgodnije pisati preko energije snopa jer je
ona eksperimentalni parametar koji najčešće mjerimo. Energija je jednaka integralu
ekspozicije po površini:

$$E = \iint_S F dS \quad (3.4)$$

Računamo integral jednadžbe 3.1 u polarnim koordinatama $dS = r dr d\theta$ i izražavamo
ekspoziciju preko energije pulsa:

$$F_0 = \frac{2E}{\pi w_0^2} \quad (3.5)$$

Možemo prikazati ekspoziciju praga ablacije preko energije praga ablacije:

$$F_{th} = \frac{2E_{th}}{\pi w_0^2} \quad (3.6)$$

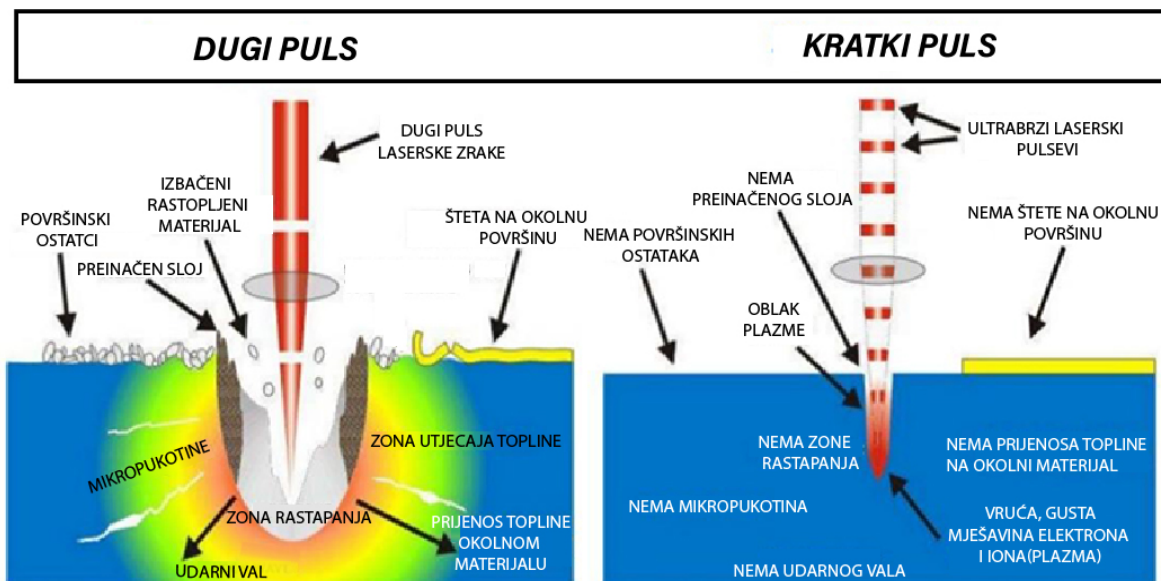
te dobiti ovisnost promjera kratera ($D = 2R$) o energiji pulsa:

$$D^2 = 2w_0^2 \ln\left(\frac{E}{E_{th}}\right) \quad (3.7)$$

Jednadžba 3.7 je ključna u D^2 metodi. Pomoću nje možemo prikazati ovisnost promjera kratera o prirodnom logaritmu energije pulsa. Iz linearne regresije možemo pronaći $2w_0$ iz koeficijenta smjera i E_{th} iz odsječka na x-osi [20].

3.2 Duljina pulsa

Teorijski modeli uklanjanja materijala ozračivanjem površine laserom uvelike ovise o duljini pulsa jer ona određuje apsorpciju i disipaciju energije unutar materijala. Za potrebe ovog rada korišteni su nanosekundni i femtosekundni laser te su interakcije tih lasera s materijalom detaljno je opisane u sljedećim poglavljima. Prikaz površinskih interakcija s materijalom za laserske pulseve različitih duljina možemo vidjeti na slici 3.1.



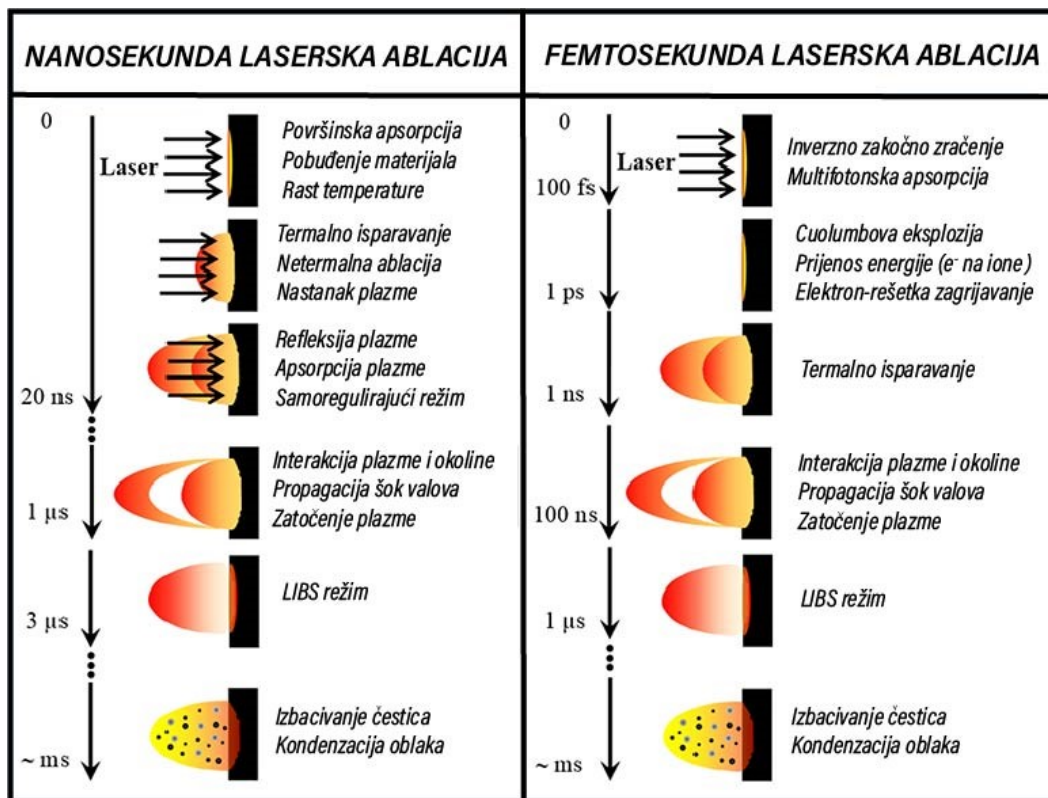
Slika 3.1: Usporedba interakcije dugog i kratkog laserskog pulsa s površinskim materijalom. Preuzeto s izvora [21] i prilagođeno.

3.2.1 Nanosekundni pulsevi

U interakciji laserskog pulsa i materijala, dio laserske energije se reflektira od površine, a dio se apsorbira unutar plitke dubine prodiranja u materijal. Za metale dva glavna

mehanizma apsorpcije energije su rezonantna apsorpcija i apsorpcija inverznim zakočnim zračenjem. Apсорpcija inverznim zakočnim zračenjem dominira u interakciji nanosekundnih pulseva i metala jer metali sadrže velik broj slobodnih elektrona koji apsorbiraju fotone iz laserske zrake. U dielektricima valentni elektroni apsorbiraju fotone i većinski se vraćaju u osnovno stanje reemitiranjem fotona zbog čega je prag ablacije tipično veći u usporedbi s metalima. Apсорbirana energija se prenosi drugim elektronima i rešetci sudarima. Ako je apсорbirana energija veća od Fermijeve energije, koja je aproksimativno suma energije vezanja i radne funkcije, elektroni mogu pobjeći iz materijala i formirati plazmu. Elektron fonon vrijeme relaksacije je reda veličine pikosekunde što je znatno kraće od trajanja pulsa, tako da se uspijeva ostvariti termalna ravnoteža između elektrona i rešetke [22], te se temperatura vrelišta se postigne dok zraka i dalje traje. Disipacija energije preko isparavanja je spora u usporedbi s trajanjem pulsa. Prije nego što površinski materijal stigne ispariti, materijal ispod njega će se već zagrijati do temperature vrelišta. Temperatura i tlak materijala ispod površine rastu iznad kritičnih iznosa i površina eksplodira. Povratni tlak na ozračenu površinu koji stvara evaporirani materijal može doseći 10^5 MPa (10^6 atmosfera) zbog čega dolazi do radijalnog izbacivanja čestica iz ozračene zone. Eksplozivna interakcija se klasificira kao netermalna interakcija i kao rezultat nje ne bi trebali vidjeti otopljeni materijal na rubovima kratera. Do uklanjanja čestica može doći i zbog hidromehaničkih nestabilnosti rastopljenog sloja materijala. Tijekom procesa eksplozije dolazi do stvaranja plazme čija temperatura prelazi 10^4 K. Vrijeme života plazme je nekoliko mikrosekundi, unutar kojih dolazi do plazma-materijal interakcija i prijenosa topline. Dolazi do daljnjeg uklanjanja materijala, no sada termalnim procesima [23].

Nastala plazma nalazi se na površini materijala u zoni interakcije lasera i materijala. Laser mora proći kroz plazmu kako bi došao do površine materijala. Tijekom prolaska, čestice unutar plazme apсорbiraju energiju inverznim zakočnim zračenjem i fotoionizacijom. Dok je plazma slabo ionizirana, dio laserske energije dolazi do površine, a dio je apсорbiran u plazmi ili u isparenom materijalu. Na visokim energijama, plazma postaje neprozirna za lasersku zraku i površina je zaštićena te dolazi do rasta plazme prema laseru. Ova pojava naziva se zaštita (eng. *shielding*) plazme te je odgovorna za smanjivanje dubine ablacije [22]. Prednost kraćih pulseva (pikosekundnih i femtosekundnih) je da apсорpcija i interakcija s površinom završe prije



Slika 3.2: Usporedba procesa interakcije nanosekundnog i femtosekundnog lasera i materijala s aproksimativnom vremenskom skalom u zraku. Preuzeto s izvora [24] i prilagođeno.

nego što se stvori plazma koja bi mogla apsorbirati dio energije. Prikaz različitih procesa i vremenskih skala u kojima se odvija nanosekundna ablacija možemo vidjeti na lijevim dijelovima slika 3.1 i 3.2.

3.2.2 Femtosekundni pulsevi

Interakcija femtosekundnog lasera i materijala je ultrabrzi nelinearan i neravnotežan proces. Interakcija snopa s metalima i nemetalima je različita zbog različitog broja slobodnih elektrona.

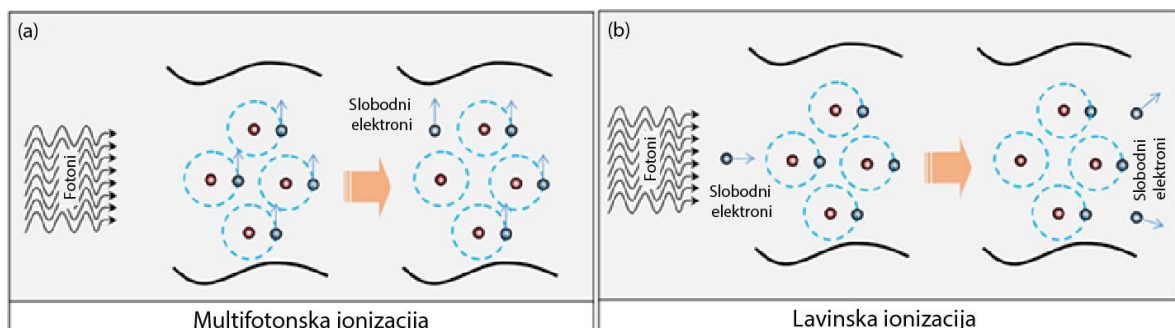
U metalima imamo veliki broj slobodnih elektrona. Kad femtosekundni laserski puls stigne do metala, slobodni elektroni apsorbiraju fotone te im raste energija. Sudaraju se s drugim elektronima čime međusobno prenose energiju. Broj elektrona s visokom kinetičkom energijom raste i dolazi do interakcije između elektrona i rešetke kojom se rešetka zagrije. Nakon prijensa energije rešetki, materijal će proći faznu promjenu u vremenskom okviru od nekoliko pikosekundi do desetaka nanosekundi. Rezultat promjene je plazma koja živi nekoliko mikro ili milisekundi ovisno o materijalu.

Nemetalni materijali nemaju slobodne elektrone koji započinju ionizaciju. Većina elektrona je vezana u valentnoj vrpci, zbog čega mehanizam ablacije nemetalnih materijala dijelimo u dva dijela.

Prvi dio je ionizacija koji uključuje fotoionizaciju i lavinsku ionizaciju. U fotoionizaciji ubrajamo procese tunelske ionizacije i multifotonsku ionizaciju. Multifotonska ionizacija je nelinearan proces koji postaje značajan pri korištenju pulseva intenziteta većih od 10^{13} W/cm^2 . Valentni elektron apsorbira nekoliko fotona ukupne energije veće od energije ionizacije i postaje slobodan. Ilustraciju multifotonske apsorpcije možemo vidjeti na slici 3.3.a. Tunelska ionizacija je uzrokovana jakim elektromagnetnim poljem koje nastaje interakcijom pulsa i materijala. EM polje uzrokuje smanjivanje Coulombove potencijale barijere valentnih elektrona koji onda mogu tunelirati u vodljivu vrpcu i postati vodljivi elektroni [25]. Fotoionizacijom dobivamo početne (eng. *seed*) elektrone, tj. slobodne elektrone unutar materijala koji započinju ionizaciju, koji su nam potrebni za daljnju lavinsku ionizaciju.

Slobodni elektron niske energije može apsorbirati više fotona i postati elektron s visokom kinetičkom energijom u vodljivoj vrpci. Takav elektron se može sudariti s vezanim elektronom i predati mu dovoljno energije da drugi elektron postane slobodan. Time dobivamo dva slobodna elektrona s niskom energijom. Ovakvu ionizaciju nazivamo sudarnom. Nastala dva slobodna elektrona apsorbiraju dodatne fotone te se proces može ponoviti. Seriju sudara u kojoj dobivamo sve više slobodnih elektrona nazivamo lavinskom ionizacijom [26]. Ilustraciju lavinske ionizacije možemo vidjeti na slici 3.3.b.

Drugi dio je promjena faze. Nakon ionizacije, imamo veliki broj slobodnih elektrona



Slika 3.3: Djelovanjem femtosekundnog lasera može doći do različitih procesa ionizacije. a) Pri visokim intenziteta vidimo nelinearni proces multifotonske ionizacije. b) Za pulseve nižeg intenziteta javlja se proces lavinske ionizacije. Preuzeto s izvora [24] i prilagođeno.

u materijalu te nemetalni materijal počne pokazivati metalne karakteristike. Mehanizam promjene faze ima termalnu i netermalnu fazu. Kad temperatura rešetke naraste iznad vrelišta unutar nekoliko pikosekundi, taljenje postaje glavni proces u faznom prijelazu te dolazi do termalnog isparavanja. U netermalnom faznom prijelazu glavni proces je Coulombova eksplozija. Coulombova eksplozija je proces u kojem se pobuđeni elektroni izbacuju iz materijala jer apsorpcija laserskog pulsa stvara električno polje zbog razdvajanja naboja (elektroni i ionizirani atomi). Nastalo električno polje vuče ione van materijala čime dolazi do uklanjanja prvih nekoliko monoslojeva (nekoliko nanometara) materijala [27]. Prikaz različitih procesa i vremenskih skala u kojima se odvija femtosekundna ablacija možemo vidjeti na desnim dijelovima slika 3.1 i 3.2.

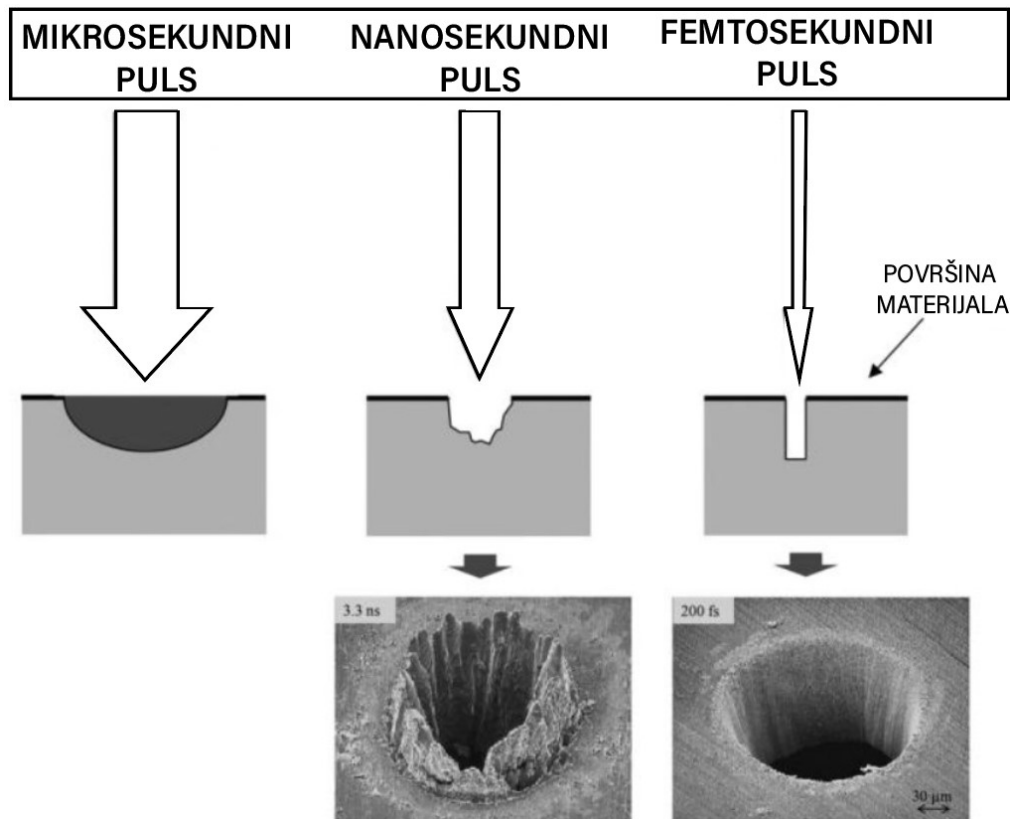
3.3 Čuvanje sastava uzorka

Materijal ablatiran u plazmu može imati oblik čestica, atoma i/ili molekula. Sastav plazme nije nužno isti kao i sastav uzorka zbog različitih svojstava elemenata i njihovih spojeva koji se nalaze unutar materijala. Za smanjivanje selektivnog isparavanja bitno je koristiti pulseve energije znatno veće od latentne topline isparavanja sastavnih elemenata uzorka jer time povećavamo vjerojatnost da će sve sastavnice uzorka biti potpuno uklonjene. Za duže mikrosekundne pulseve ili pulseve s niskim intenzitetima ($< 10^6 \text{ W/cm}^2$) termalna priroda procesa dopušta preferencijalno isparavanja. Za pulseve većeg intenziteta ($> 10^9 \text{ W/cm}^2$) i nanosekundne ili kraće pulseve, dolazi do ravnomjernijeg zagrijavanja i eksplozivnog izbacivanja materijala zbog kojeg izbačeni materijal ima sastav bliži originalnom uzorku [19].

3.4 Obrada materijala laserskom ablacijom

Za obradu materijala pulsnim laserom možemo koristiti lasere s dugom duljinom pulsa, kao što su mikro i nanosekundni, ili lasere s kratkom duljinom pulsa, kao što su piko i femtosekundni. Shematski prikaz interakcije laserskih pulseva različitih duljina s površinama krutina vidimo na slici 3.4. Za duže pulseve izbačeni rastopljeni materijal se ponovno stvrdne u okolini nastalog kratera te područje ablacije nije precizno i uniformno kao kod lasera s kraćim pulsevima. Širina zone utjecaja topline proporcionalna je korijenu duljine pulsa, što znači da je značajno veća za duže

pulseve. Korištenje kraćih pulseva omogućava visoko preciznu obradu materijala na mikro i nanometarskoj skali [24].



Slika 3.4: Shematski prikaz interakcije laserskih pulseva različite duljine s čvrstim površinama. Mikro i nanosekundni pulsevi interagiraju putem grijanja, taljenja i isparavanja. Pulsevi kraći od vremena potrebnog za nastanak plazme vode na direktno isparavanje i omogućuju obradu materijala s visokom preciznošću. Preuzeto s izvora [19] i prilagođeno.

4 Supstrati

Laserskom ablacijom obrađujemo komade borosilikatnog stakla, silicija, staklo s tankim slojem indijevog oksida dopiranog kositrom (ITO) i organske elektrolitske fotokondenzatore. Na mikrostrukturiranim uzorcima borosilikatnog stakla i silicija su će se tijekom budućih istraživanja promatrati utjecaj topoloških naznaka za rasta aksona. Mikrostrukturiranjem ITO-a i fotokondenzatora istražili smo kako ovi materijali interagiraju s laserskom svjetlošću što će nam pomoći kod izrade elemenata potrebnih za galvanotropske naznake za aksonalno vođenje.

4.1 Borosilikatno staklo

U ovom radu koristimo borosilikatno staklo koje se sastoji od silicijevog dioksida i borovog trioksida. Koristili smo stakla različitih debljina, prvo staklo debljine 1 mm koje smo rezali na kvadrate dimenzija $25.4\text{mm} \times 25.4\text{mm}$ i drugo okruglo staklo promjera 30 mm debljine 0.4 mm koje na jednoj strani ima sloj ITO-a debeo oko 200 nm. Mikrostrukturirano staklo se koristi u biomedicini, biokemiji, MEMS uređajima te kao mikroleće i optički valovodi koji su ključni za optičku komunikaciju. Česti problem koji se javlja u mikrostrukturiranju stakla su mikropukotine, koje možemo izbjeći koristeći vrlo kratke laserske pulseve (femtosekundne) ili dopiranjem stakla metalima, te kristalizacija koja uzrokuje smanjivanje transmisivnosti i promjenu indeksa loma [28].

4.2 Silicij

Silicij je prijelazni metal i poluvodič koji ima široku primjenu u poluvodičkoj industriji i često se koristi kao supstrat za elektroničke uređaje. Polikristalni i amorfni silicij koriste se u proizvodnji solarnih ćelija i raznih čipova. Mikrostrojna obrada silicija nano, piko i femtosekundnim pulsevima je dosta istraženo područje te je pokazano da koristeći pulseve kraće od 15 ns u UV području smanjujemo zonu utjecaja topline i taloženje rastopljenog materijala [28].

4.3 Indijev oksid dopiran kositrom

Indijev oksid dopiran kositrom (ITO) je n tip poluvodiča. ITO ima visoku električnu vodljivost ($< 10^5 \Omega\text{cm}$), proziran je ($> 85\%$) za vidljivu i blisko infracrvenu svjetlost i ima dobru adheziju na različite materijale zbog čega se koristi u brojne znanstvene i tehničke svrhe. Polikristalni tanki filmovi ITO-a se koriste kao transparentne vodljive elektrode za različite optoelektrične primjene, primjerice u zaslonima s tekućim kristalima (LCD), plazma zaslonima, solarnim ćelijama i organskim elektroluminiscentnim diodama [31, 32].

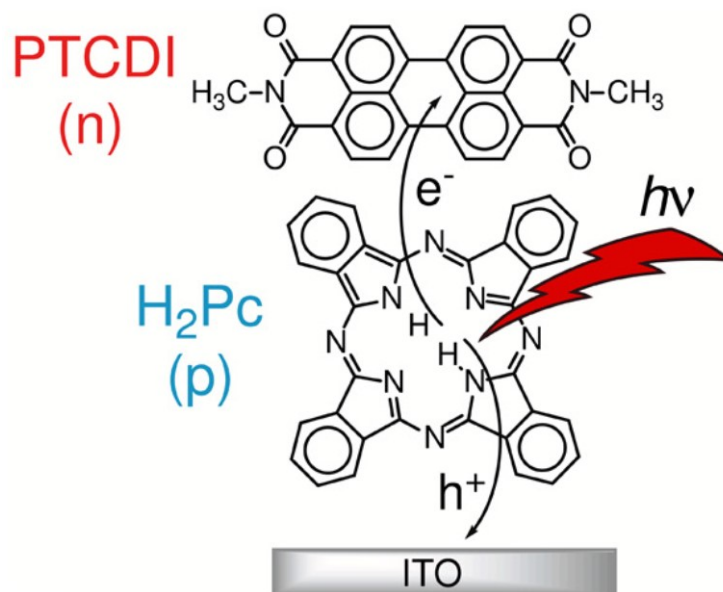
Neka od relevantnih svojstava gore navedenih materijala navedena su u tablici 4.1. Sloj ITO-a debeo oko 200 nm koji koristimo nalazi se na gore opisanim kružnim komadima borosilikatnog stakla.

Svojstvo	Silicij	Borosilikatno staklo	ITO
Gustoća [g cm^{-3}]	2.32	2.23	7.12
Talište [K]	1683	1500	2100
Toplinska vodljivost [$\text{W m}^{-1} \text{K}^{-1}$]	150	1.25	4
Toplinska difuzivnost [$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$]	8.5×10^{-5}	0.75×10^{-6}	2.24×10^{-6}
Specifična toplina [$\text{J kg}^{-1} \text{K}^{-1}$]	712	746	341

Tablica 4.1: Termofizikalna svojstva borosilikatnog stakla [29], silicija [30] i ITO-a [31, 32] pri $T=300 \text{ K}$.

4.4 Organski elektrolitski fotokondenzatori

Optoelektronički element koji se sastoji od prozirnog vodljivog sloja i p-n dvosloja izrađenog od organskih poluvodiča je organski elektrolitski fotokondenzator (OEPC) koji služi kao izvanstanična kapacitivna elektroda za stimulaciju stanica. P-n dvosloj koji koristimo sastoji se od 30 nm perilenskog tetrakarboksilnog diimida (PTCDI) koji je n sloj i 30 nm bezmetalnog ftalocijanina (H_2Pc) koji je p sloj. Kemijske strukture n i p sloja možemo vidjeti na slici 4.1.



Slika 4.1: Prikaz kemijskih struktura PTCDI-a (n-sloj) i H_2Pc -a (p-sloj). Osvjetljavanjem p-n dvosloja dolazi do prijenosa naboja. Sloj vodljivog ITO-a služi za skladištenje pozitivnog naboja i kao povratna elektroda. Preuzeto s izvora [33].

Dvosloj je evaporiran na komade stakla debljine 0.4 mm koji na sebi imaju sloj ITO-a debeo oko 200 nm . Osvjetljavanjem p-n sloja dolazi do razdvajanja naboja između p i n sloja. Vodljivi sloj ITO služi za skladištenje pozitivnog naboja i kao povratna elektroda u otopini [33]. Pokazano je da OEPC-ovi mogu stvoriti dovoljno električnog

naboja za moduliranje neuralnog tkiva *in vivo*. Fotokondenzatori kojima je stražnja elektroda bila zlato su bili postavljeni oko bedrenog živca štakora te su bili aktivirani crvenom svjetlošću [34]. U ovom radu koristili smo fotokondenzatore starije generacije kod kojih je prisutan problem brze degeneracije tijekom mjerenja tranzijentnog potencijala. Problem smo riješili rotacijskim nanošenjem tankog sloja vodljivog polimera poli(3,4-etilendioksitiofen):poli(stirensulfonat) (PEDOT:PSS) koji je unakrsno povezan epoksi-silanom (3-glicidoksi-propiltrimetoksisilan, GOPS) koji je poznat po velikom volumetrijskom elektrolitskom kapacitetu i koji smanjuje brzinu raspada uzoraka.

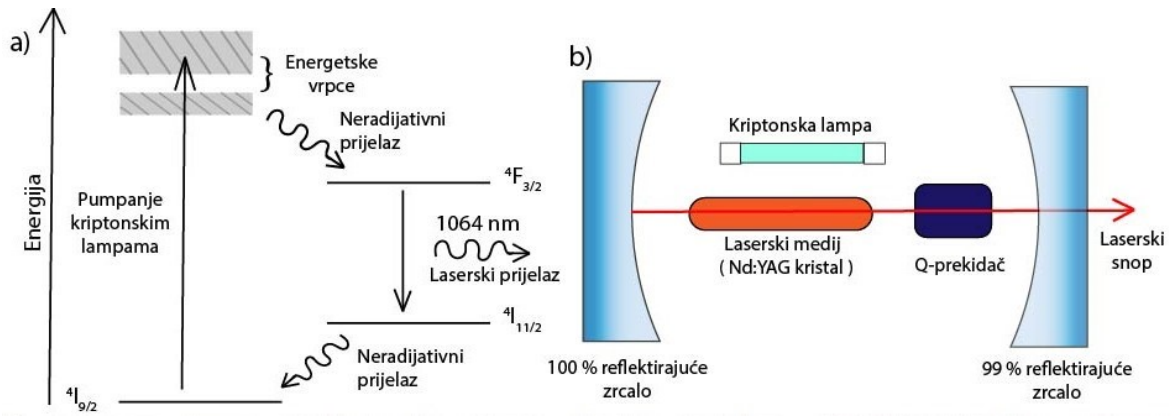
5 Eksperimentalni postav

U ovom poglavlju prvo ćemo opisati karakteristike i princip rada uređaja koji su bili potrebni za obradu uzoraka (nanosekundni i femtosekundni laser, postolja, robotska ruka i kontinuirani laser) nakon čega ćemo prijeći na uređaje korištene za karakterizaciju proizvedenih podloga (skenirajući elektronski mikroskop, optički i kontaktni profilometar i postav za mjerenje tranzijentnog električnog potencijala).

5.1 Nd:YAG nanosekundni pulsni laser

Kod Nd:YAG lasera laserski medij sastoji se od štapića itrij-aluminijevog granata ($Y_3Al_5O_{12}$) dopiranog ionima neodimija (Nd^{3+}). Neodimij je tehnološki vrlo važan lantanoid čiji ion Nd^{3+} ima konfiguraciju $[Xe] 4f^3$. Vjerojatnost da se 4f elektroni nalaze unutar popunjenih ljuski je velika, zbog čega su ovi ioni zaštićeni od polja kristala te ih možemo aproksimirati slobodnim ionima. Koristeći Hundovo pravilo, dobivamo osnovno stanje $^4I_{9/2}$. Sva druga moguća stanja angularnog momenta za $4f^3$ konfiguraciju su pobuđena stanja. Laserski prijelaz se odvija između $^4F_{3/2}$ i $^4I_{11/2}$ stanja prijelazom između kojih dobivamo fotone valne duljine 1064 nm. Nd:YAG laseri imaju četiri energetska nivoa koja su prikazana na lijevom slici 5.1. Pumpanje nivoa i inverzija naseljenosti se postiže kriptomskim lampama [35].

Za dobivanje pulseva se koristi Q-prekidač koji je u korištenom sustavu Pockelsova ćelija umetnuta u optički rezonator. Ćelija može promijeniti polarizaciju svjetlosti, čime sprječava laseriranje, ali dolazi do rasta broja pobuđenih atoma. Pri postizanju



Slika 5.1: a) Prikaz 4 levela odgovornih za laseriranje u Nd:YAG pulsnom laseru. b) Shema optičkog rezonatora Nd:YAG lasera s Q-prekidačem.

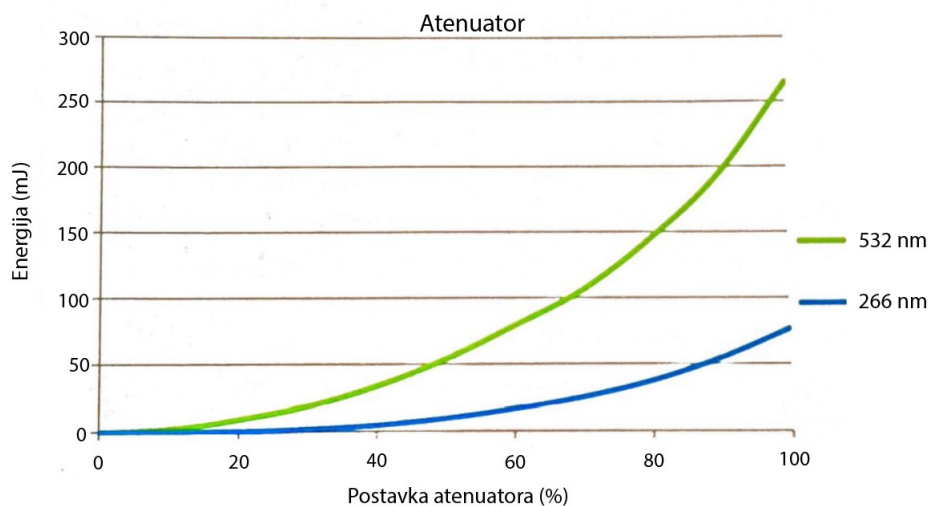
dovoljno visoke inverzije naseljenosti, ćelija će propustiti zraku bez promjene polarizacije. Rezultat su pulsevi velike snage duljine nekoliko nanosekundi. Ilustracija optičkog rezonatora lasera prikazana je na desnoj slici 5.1, a korišteni Litron TRLi G 450-10 laser s pulsevima duljine između 5 i 6 ns na slici 5.2.



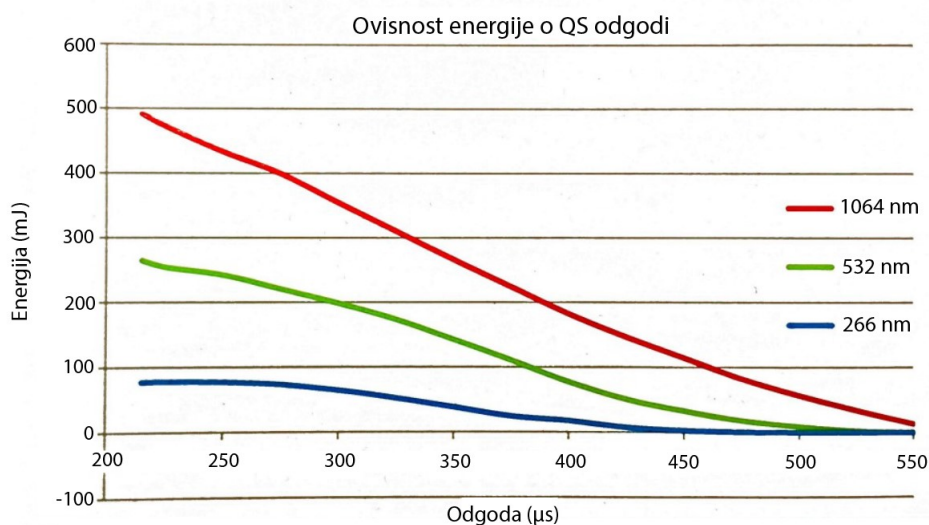
Slika 5.2: Korišteni Litron nanosekundni pulsni laser na koji su spojena dva harmonička modula.

Na laser su spojena dva harmonička modula s kojima možemo dobiti svjetlost valne duljine 532 nm ili 266 nm. Unutar modula za nastanak drugog harmonika se nalazi nelinearni kristal u kojem dva fotona iste frekvencije interagiraju s nelinearnim materijalom i dobivamo jedan foton duplo veće energije. Dobivamo četvrti harmonik spajanjem dva modula za dobivanje drugog harmonika. Laser ima izlaznu frekvenciju 10 Hz i maksimalnu energiju pulsa 450 mJ za 1064 nm, 220 mJ za 532 nm i 60 mJ za 266 nm. Unutar modula se također nalaze attenuatori s kojima kontroliramo energiju pulsa. Ovisnost energije pulsa o postavci attenuatora prikazana je na slici 5.3. Maksimalnu energiju pulsa dobivamo pri 100 % postavci attenuatora. Energija pulsa također ovisi o vremenu odgode Q-prekidača koje nam govori koliko dugo

nakon bljeska lampi dobivamo laserski puls. Vrijeme odgode za koje se postiže maksimalna energija je $220 \mu s$ te se povećavanjem odgode postižu niže energije pulseva. Graf ovisnosti energije o odgodi vidimo na slici 5.4.



Slika 5.3: Graf ovisnosti energije o postavci atenuatora za 532 nm i 266 nm za Litron laser. Preuzeto s izvora [36] i prilagođeno.



Slika 5.4: Graf ovisnosti energije o odgodi Q-prekidača za Litron laser. Preuzeto s izvora [36] i prilagođeno.

5.2 Yb:KGW femtosekundni pulsni laser

Koristimo Light Conversion Pharos PH2 femtosekundni laser maksimalne snage 15 W. Unutar njega se kao laserski medij koristi kristal kalij gadolinij volframata ($KGd(WO_4)_2$, KGW) dopiran ionima iterbija Yb^{3+} . Konfiguracija Yb^{3+} iona je $[Xe]4f^{13}$. Osnovno

stanje iona iterbija je $^4F_{7/2}$. Imamo samo jedno pobuđeno stanje $^2F_{5/2}$ jer nedostaje jedan elektron do pune $4f$ ljuske zbog čega se ova ljuska ponaša kao da ima šupljinu. Valna duljina prijelaza između pobuđenog i osnovnog stanja je 1030 nm . Energetski nivoi prikazani su na lijevoj slici 5.6. Za pumpanje nivoa se koriste laserske diode. U usporedbi s Nd:YAG laserima imaju širi pojas emisije što omogućava zaključavanje modova (eng. *mode-locking*) čime možemo dobiti pulseve kraće od pikosekunde [37]. Princip zaključavanja modova ćemo detaljnije objasniti u sljedećim odlomcima.

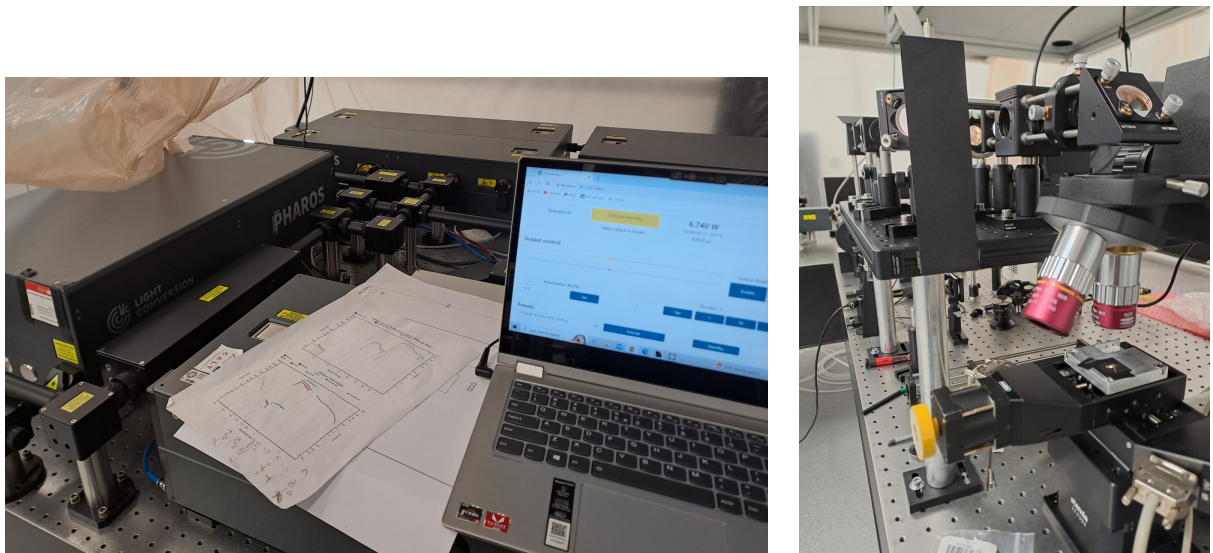
Val svjetlosti frekvencije $\omega_0 = 2\pi\nu_0$ i intenziteta $I = I_0 \cos^2(\omega_0 t)$ prolazi kroz optički modulator s frekvencijom modulacije $f = \Omega/2\pi$ i koeficijentom transmisije:

$$T = T_0(1 - a \cdot \sin^2(\Omega t/2)) \quad (5.1)$$

gdje je $a < 1$ stupanj modulacije. Transmitirani intenzitet onda postaje:

$$I_t = I \cdot T = I_0 T_0 [1 - a \cdot \sin^2(\Omega t/2)] \cdot \cos^2 \omega_0 t \quad (5.2)$$

Kad napravimo Fourierovu analizu modulirane svjetlosti dobivamo frekventni spektar koji se sastoji od središnje frekvencije ν_0 i bočnog pojasa (eng. *sideband*) frekvencija



Slika 5.5: Lijevo: Pharos femtosekundni laser i program za kontrolu na računalu. Desno: Laserske zrake se usmjerava i fokusira kroz optičke komponente od kojih je zadnja objektiv s povećanjem 5 puta i na kraju upada na uzorak koji se nalazi na pomičnom postolju. U pozicioniranju uzorka pomaže snop bijele svjetlosti i kamera kojima možemo pratiti ablaciju.

$\nu_0 \pm n \cdot f$ gdje su n prirodni brojevi. Razmak među frekvencijama iznosi :

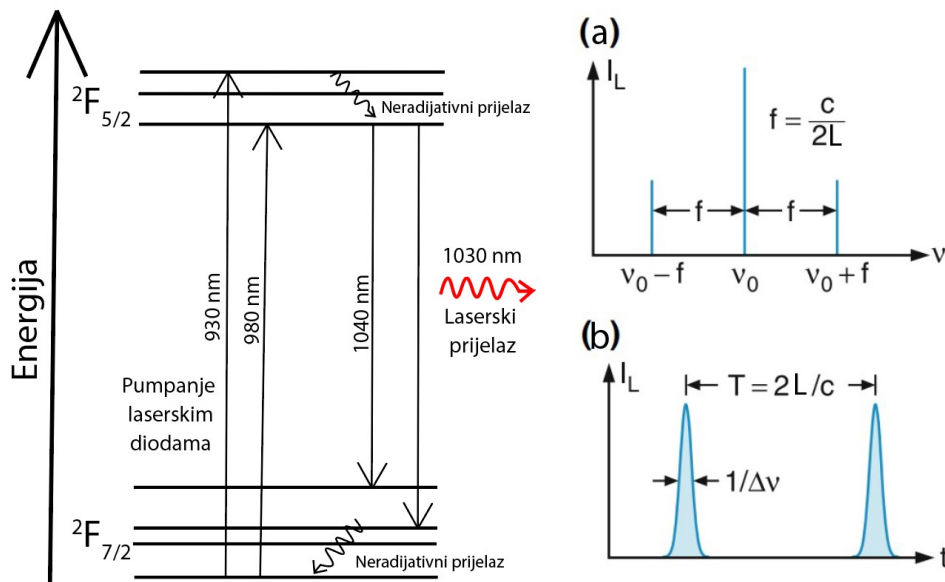
$$\Delta\nu = \frac{c}{2L} \quad (5.3)$$

gdje je c brzina svjetlosti, a L duljina rezonatora. Ako odaberemo da je frekvencija modulatora jednaka frekventnom razmaku longitudinalnih modova ($f = \Delta\nu$), svi modovi u bočnom pojasu postaju rezonantni s rezonantnim modom i time sudjeluju u laserskoj oscilaciji. Širina pulsa je jednaka

$$\Delta\tau = \frac{2\pi}{(2m+1)/\Omega} = \frac{2\pi}{N\Omega} = \frac{1}{\delta\nu} \quad (5.4)$$

gdje je $N = \delta\nu/\Delta\nu$ broj fazno zaključanih modova spektralne širine $\delta\nu$. Normalni multimodalni laser oscilira u isto vrijeme s više modova s nasumičnim fazama, dok modom zaključani laser oscilira s više modova među kojima je definirana razlika u fazi [38].

Metoda zaključavanja moda koja se koristi u PHAROS laseru je zaključavanje modova Kerrovom lećom. Za dovoljno visoke intenzitete, indeks loma se mijenja zbog nelinearne interakcije svjetlosti s medijem. Možemo napisati Taylorov razvoj indeks



Slika 5.6: Lijevo: Prikaz energetskega levela Yb:KGW lasera s označenim laserskim prijelazom. Desno: a) Prikaz frekventne domene kod zaključavanja modova. Prikazana je laserska frekvencija s dvije susjedne frekvencije razmaknute $c/2L$. b) Prikaz laserskih pulseva u vremenskoj domeni gdje je označena širina pulsa $1/\Delta\nu$ i vremenska udaljenost dvaju pulseva T . Preuzeto s izvora [38] i prilagođeno.

loma do linearnog člana:

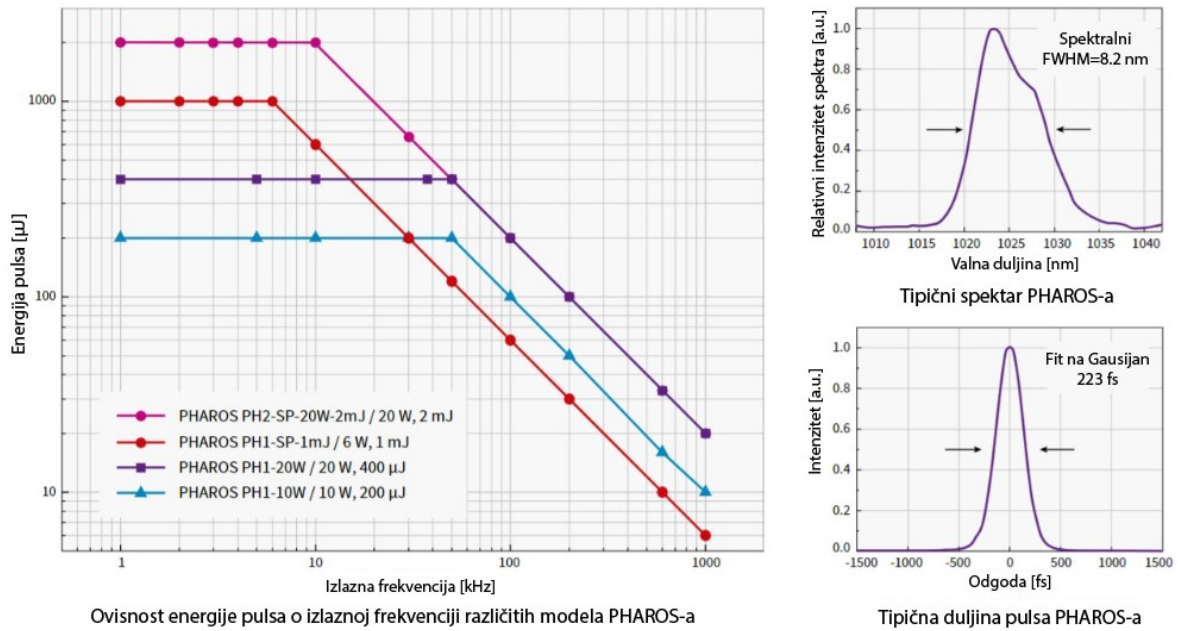
$$n(\omega, I) = n_0(\omega) + n_2(\omega)I \quad (5.5)$$

gdje je $n_0(\omega)$ normalni indeks loma, a $n_2(\omega) \ll n_0(\omega)$ nelinearni dio n . Promjena iznosa indeksa loma ovisi o intenzitetu svjetlosti. Kad laserska zraka Gausijanskog profila $I(r) = I_0 e^{-2(r/w)^2}$ prolazi kroz medij, po jednadžbi 5.5 promjena indeksa loma iznosi $\delta n = n_2 I$ i najveća je u centru zrake i smanjuje se prema rubovima. Dolazi do nelinearne polarizacije elektronskih ljusaka zbog električnog polja svjetlosti zbog čega se ovaj efekt zove optički Kerrov efekt. Nelinearna promjena u fazi koja nastaje dok laserska zraka putuje medijem duljine l može se zapisati kao:

$$\delta\phi = \frac{2\pi\delta n l}{\lambda} = \frac{2\pi n_2 I_0 l}{\lambda} e^{-2(r/w)^2} \simeq \frac{2\pi n_2 I_0 l}{\lambda} [1 - 2(r/w)^2] \quad (5.6)$$

Razlika u fazi je u prvom redu razvoja parabolička funkcija (r/w) što je ekvivalentno uvođenju sferične leće u medij zbog optičkog Kerrovog efekta. Fokus Kerrove leće ovisi o intenzitetu svjetlosti. Kad laserski puls s vremenskim profilom $I(t)$ prođe kroz medij, centar pulsa stvara najveći gradijent $n(r)$ i najkraći fokus f_{min} Kerrove leće. Ako postavimo aperturu na fokalnu udaljenost iza Kerrove leće, samo dio pulsa oko maksimuma se potpuno transmitira. Svi drugi dijelovi imaju duže fokuse i veći radijus (eng. *spot*) na aperturi pa se značajno atenuiraju. Ovaj proces se ponavlja za svaki prolazak rezonatorom i vodi na skraćivanje pulsa [37, 38].

Korišteni laser možemo vidjeti na lijevom dijelu slike 5.5. PHAROS laser ima maksimalnu energiju pulsa od 1.5 mJ , podesivo trajanje pulsa između 190 fs i 10 ps i maksimalnu izlaznu frekvenciju 1 MHz [39]. Energija pulsa ovisi o izlaznoj frekvenciji što možemo vidjeti na slici 5.7 za različite modele PHAROS lasera od kojih je korišteni najbliži modelu PHAROS PH2 SP-20W 2mJ. Koristili smo trajanje pulsa 190 fs i izlazne frekvencije 25 Hz , 50 Hz , 100 Hz i 10 kHz za koje je energija maksimalna (1.5 mJ). Laserska zraka se usmjerava i fokusira zrcalima i zatvaračima (eng. *shutter*) te dolazi do objektiva što vidimo na desnom dijelu slike 5.5. Prolazeći kroz optičke elemente puls gubi $2/3$ energije što uzimamo u obzir pri računanju minimalne ekspozicije. Za proizvodnju uzoraka u ovom radu koristili smo 5x povećanje na objektivu. Uzorak postavljamo na pomično postolje i fiksiramo. Rad postolja i lasera kontrolira računalni program u *LabView* programu.



Slika 5.7: Lijevo: Ovisnost energije pulsa o izlaznoj frekvenciji za različite modele PHAROS lasera. Desno gore: Prikaz tipičnog spektra PHAROS lasera. Desno dolje: Prikaz tipične duljine pulsa PHAROS lasera. Preuzeto s izvora [39] i prilagođeno.

5.3 Robotska ruka i kontinuirani laser

Obradu OEPC-eova testirali smo i s robotskom rukom na koju smo pričvrstili kontinuirani laser. Ova metoda je značajno brža i jednostavnija u usporedbi s korištenjem nanosekundnog lasera, no imamo mnogo manje slobode u biranju parametara. Robotska ruka koju koristimo je Rotrics DexArm s maksimalnom brzinom 550 mm/s i ponovljivošću 0.05 mm . Korišteni kontinuirani laser ima snagu 2.5 W i valnu duljinu 405 nm [40]. Pri radu smo naišli na problem s asimetričnošću rada motora što se može detaljnije vidjeti na proizvedenim uzorcima. Snaga kontinuiranog lasera je bila dovoljna za uklanjanje p-n dvosloja, no nedovoljna jaka za obradu ITO-a i drugih materijala koje smo koristili.

5.4 Pomično postolje

5.4.1 Thorlabs XY mikromanipulator

Za proizvodnju prvih uzoraka na staklu i siliciju koristili smo Thorlabs XY mikromanipulator. Na pomično postolje su postavljena dva koračna Thorlabs ZFS25B motora koja kontroliramo preko Thorlabs KST101 kontrolera koje možemo vidjeti na desnoj slici 5.9. Jedan mikrokorač motora prijeđe udaljenost od 0.46 nm s ponovljivošću



Slika 5.8: Korištena robotska ruka s pričvršćenim kontinuiranim laserom.

manjom od $5 \mu m$ i mrtvim hodom manjim od $15 \mu m$ [41]. Profil brzine motora je trapezoidalan što je bilo potrebno uzeti u obzir pri namještanju da motori za x i y smjer dođu istovremeno na zadanu lokaciju. Na kontrolerima je uključena opcija okidača (eng. *trigger*), tj. kontroleri daju signal od 5 V kad se motor prestane kretati što koristimo za sinkronizaciju rada lasera i pomicanja postolja.

5.4.2 Newport integrirano XY linearno translacijsko postolje

Za proizvodnju uzoraka s kompleksnijim geometrijama koristili smo Newport XY linearno translacijsko postolje koje vidimo na desnoj slici 5.9. Koristimo Newport ONE-XY100HA postolje s Newport XPS-RLD kontrolorom. Ovo postolje koristi integrirane XY linearne motore s prekrštenim valjkastim ležajevima za postizanje maksimalne brzine od 200 mm/s , ponovljivosti od $0.04 \mu m$ i minimalnim pojedinačnim korakom 50 nm . Kontroliramo rad uređaja Newportovim Laser Machining Softwareom (LMS-om), programom koju omogućuje unošenje i crtanje CAD datoteka s dizajnovima te istovremenu kontrolu postolja i lasera čime olakšava sinkronizaciju uređaja [42].



Slika 5.9: Lijevo: Thorlabs pomično postolje s koračnim motorima i mikrokontrolerima. Desno: Newport pomično postolje na koje smo postavili 3D isprintan pokrov kako bi mogli fiksirati uzorke i zaštititi postolje.

5.4.3 Kontrola rada lasera i sinkronizacija s postoljem

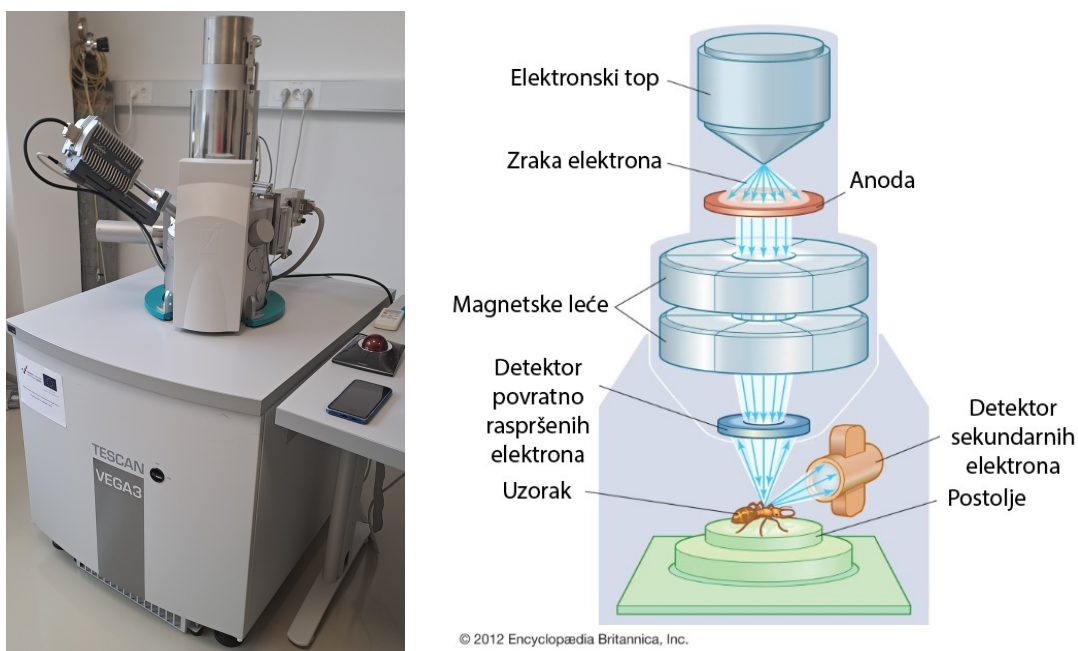
Za kontrolu nanosekundnog lasera i Thorlabs postolja koristimo signal generator Rigol DG1022Z kako bi kontrolirali Q-prekidač lasera i kriptonske lampe. Uređaj ima dva kanala koje namještamo da proizvode pulseve širine $20 \mu s$, frekvencije $10 Hz$ i snage $5 V$ s time da jedan kanal kasni za drugim $220 \mu s$. Kanal sa signalom bez kašnjenja spojen je direktno na kontroler lasera te kontrolira lampe, a drugi kanal je spojen na kutiju s mikrokontrolerom. Za sinkronizaciju koristimo Arduino Nano Every mikrokontroler. On kao ulazne signale uzima signal iz x i y kontrolera i signal sa signal generatora, a na izlaz je spojen Q-prekidač na kontroleru lasera. Kad oba motora stanu, Arduino omogućava laseriranje i kontrolira broj propuštenih pulseva preko Q-prekidača.

Za rad s Newport postoljem i dalje smo koristili iste postavke na signal generatoru, ali smo promijenili kod na Arduino mikrokontroleru. Na mikrokontroleru smo postavili ulazni pin na 'Input pull-up' postavku, koja u krug uvodi unutarnji otpornik kojim je pin automatski postavljen na $5 V$. Spojili smo ulazni pin mikrokontrolera na izlazni pin na kontroleru postolja koji pri izvršavanju trajektorije pali svoj izlazni pin koji spušta ulazni pin na Arduino na $0 V$. Promjena napona uzrokuje pokretanje funkcije koja omogućuje laseriranje preko Q-prekidača koji je spojen na izlazni pin

na Arduinu.

5.5 Skenirajući elektronski mikroskop

Skenirajući elektronski mikroskop (SEM) koristi fokusiranu zraku elektrona visokih energija za analizu površine uzorka. Iz interakcija elektrona s uzorkom možemo dobiti informacije o teksturi, kemijskom sastavu i kristalnoj strukturi. Shemu rada SEM-a i jedan od korištenih uređaja vidimo na slici 5.10. Elektroni izlaze iz elektronskog topa i ubrzavaju se prolazeći kroz uređaj na koji je postavljen naponu akceleracije (koristili smo napone od 10 i 20 kV). Snop se fokusira prolaskom kroz magnetske leće. Ubrzani elektroni nose veliku količinu kinetičke energije koja se može trošiti na različite načine dok se usporavaju u uzorku. Mogu nastajati sekundarni elektroni, elektroni raspršeni unazad, fotoni karakterističnog X-zračenja, vidljiva svjetlost i toplina. Sekundarni elektroni pružaju informacije o morfologiji i topologiji uzorka te ćemo koristiti podatke s detektora sekundarnih elektrona za dobivanje slika [44].

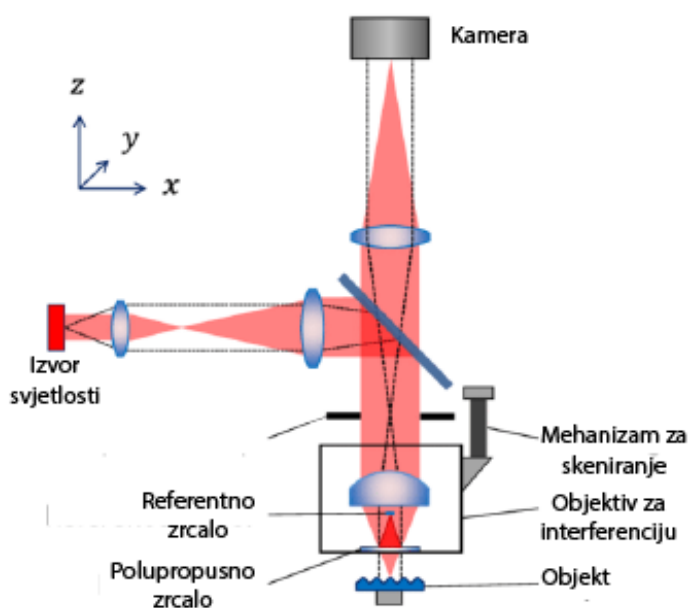


Slika 5.10: Lijevo: Tescan Vega3 SEM koji smo koristili. Desno: Shema pretražnog elektronskog mikroskopa. Preuzeto s izvora [43] i prilagođeno.

5.6 Optički profilometar

Optički profilometar je uređaj koji bez kontakta s površinom uzorka precizno mjeri površinski profil. Koristimo Filmetrics Profilm 3D profilometar s objektivima Nikon

10x i 50x DI koji vidimo lijevom dijelu slike 5.11. Profilometar radi na principu interferometra koristeći bijelu svjetlost. U optičkim profilometrima koriste se posebni interferometrijski objektiv, u korištenom uređaju to je Mirau objektiv, kako bi se odredila elevacija promatranog objekta. Između uzorka i ulazne optike nalazi se polupropusno zrcalo te iznad njega referentno zrcalo. Dio upadne svjetlosti putuje do uzorka, a dio do referentnog zrcala. Nakon refleksije zrake se rekombiniraju u polupropusnom zrcalu. Zbog velike širine frekvencijskog područja, dobivamo interferencijsku sliku samo kad su udaljenosti između polupropusnog zrcala i uzorka i polupropusnog zrcala i referentnog zrcala jednake. Shemu profilometra s Mirau objektivom vidimo na desnoj slici 5.11. Interferencijski uzorak se snima s elektroničkim senzorom te se procesira putem računalnog programa [46]. Za analizu podataka dobivenih s profilometra koristimo aplikaciju Profilm Online [47].

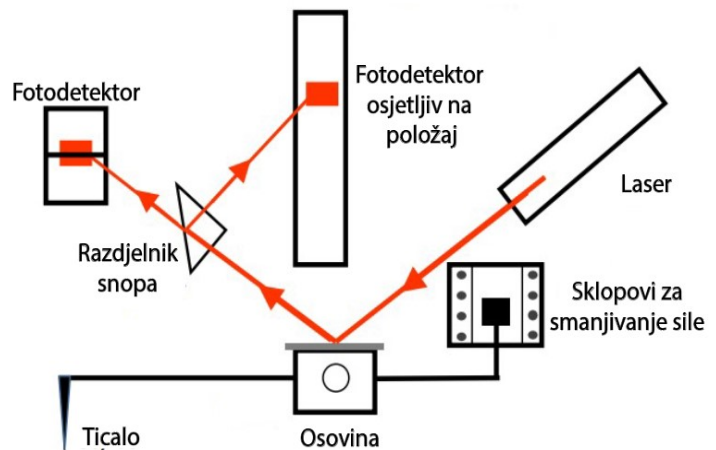
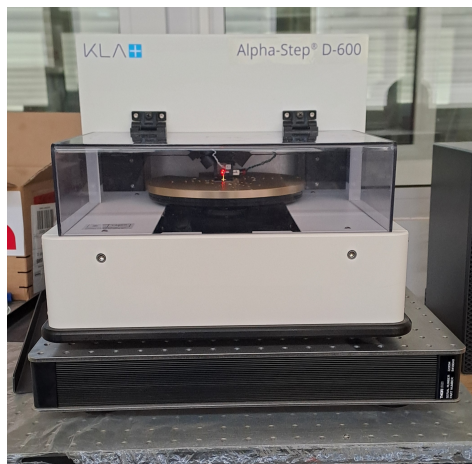


Slika 5.11: Lijevo: Filmetrics Profilm 3D profilometar koji smo koristili. Desno: Shema optičkog profilometra s Mirau objektivom. Preuzeto s izvora [45] i prilagođeno.

5.7 Kontaktni profilometar

Kontaktni profilometri su uređaji koji koriste ticalo (eng. *stylus*) za ocrtavanje kontura na površini uzorka kako bih odredili visinu i hrapavost površine. Koristimo KLA Alpha Step D-600 kontaktni profilometar koji možemo vidjeti na lijevoj slici 5.12. Uređaj se sastoji od mjerne glave na kojoj se nalazi ticalo i mehanizma skeniranja.

Vertikalni pokreti ticala se digitaliziraju i pretvaraju u topografsku sliku površine. Na desnoj slici 5.12 možemo vidjeti mjernu glavu s ticalom i različitim sensorima. Unutar uređaja se nalazi laser čija se zraka reflektira se od gornje površine osovine. Zraka potom dolazi do razdjelnika snopa i putuje na dva različita fotodetektora od kojih jedan mjeri male, a drugi veće pomake. Dok ticalo prolazi površinom, ono na uzorak djeluje silom čiji iznos možemo kontrolirati. Uzorak postavljamo na pomično postolje koje se nalazi na optički ravnoj podlozi.



Slika 5.12: Lijevo: KLA Alpha Step D-600 kontaktni profilometar koji smo koristili. Desno: Shema kontaktnog profilometra. Preuzeto s izvora [48] i prilagođeno.

Rezolucija uređaja ovisi i o obliku ticala jer ticalo ne može vidjeti nepravilnosti manje od njega samoga. Ticalo koje koristimo napravljeno je od dijamanta, ima polumjer $2 \mu m$ i središnji kut stošca 60° . Radijus i kut stošca mogu utjecati na očitane dubinu kanala. Maksimalnu dubinu kanala H_{MAX} možemo odrediti u dva slučaja:

$$1. \quad W \leq 2R \cos\left(\frac{\theta}{2}\right) \Rightarrow H_{MAX} = R \left\{ 1 - \cos \left[\arcsin \left(\frac{W}{2R} \right) \right] \right\} \quad (5.7)$$

$$2. \quad W > 2R \cos\left(\frac{\theta}{2}\right) \Rightarrow H_{MAX} = R \left[1 - \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \right] + \left[W - 2R \frac{\cos(\theta/2)}{\tan(\theta/2)} \right] \quad (5.8)$$

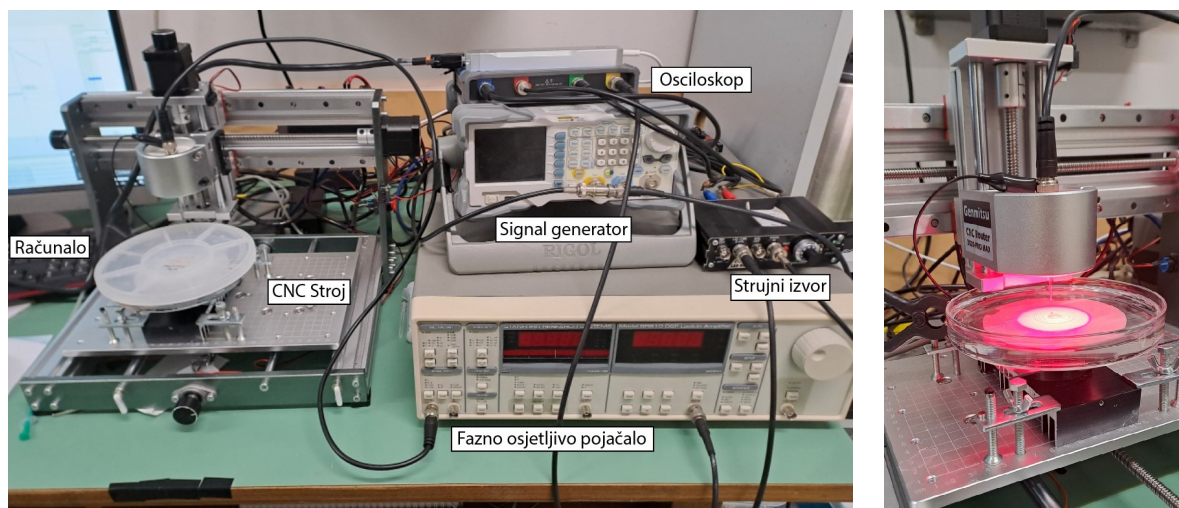
gdje je R radijus ticala, θ središnji kut stošca ticala, a W širina kanala [48]. Dodatno, kako bi precizno izmjerili dubinu kanala potrebno je uhvatiti barem 20 % površine dna. Za ticalo koje je pozicionirano točno normalno na površinu pod kutem od 90° kut maksimalno mjerljivog bočnog zida zadan je formulom:

$$\phi_{MAX} = 90^\circ - \frac{\theta}{2} \quad (5.9)$$

gdje je θ središnji kut stošca [49]. Za korišteno ticalo dobivamo maksimalni kut bočnih stijenki $\phi_{MAX} = 60^\circ$.

5.8 V_T skeniranje

V_T skeniranje koristimo za mjerenje tranzijentnog električnog potencijala u okolini fotokondenzatora. Postav možemo vidjeti na slici 5.13. Uzorke postavljamo u Petrijevu zdjelicu koja je napunjena s 0.1 molarnom otopinom kalijevog klorida. Ispod zdjelice se nalazi crvena LED-ica koju napaja Cyclops strujni izvor i koju kontroliramo putem Rigol signal generatora koji šalje sinusoidalni signal frekvencije 5 kHz. Unutar elektrolita se nalaze dvije elektrode između kojih mjerimo potencijal. Jedna od elektroda je $Ag/AgCl$ elektroda koja je uzemljena i nalazi se na rubu Petrijeve zdjelice. Druga elektroda je napravljena od tanke žice nikroma promjera 50 μm na koju je elektropolimeriziran PEDOT:PSS prije korištenja. Žica zbog vrlo malog poprečno presjeka ima velik iznos otpora (oko 600 $k\Omega$) koji želimo smanjiti. PEDOT:PSS ima veliki volumetrijski kapacitet te presvlačenje žice njime uzrokuje pad iznosa impedancije na oko 100 $k\Omega$. Potrebna nam je što manja impedancija kako bi uskladili impedanciju (eng. *impedance matching*), tj. smanjili refleksiju signala s elektrode, s fazno osjetljivim pojačalom koje ima impedanciju oko 10 $M\Omega$ i s osciloskopom koji ima impedanciju oko 1 $M\Omega$. Elektroda od nikroma pričvršćena je na CNC stroj koji kontroliramo računalnim programom i pomičemo samo s lijeve strane na desnu zbog asimetričnosti u radu motora. Pomična elektroda je spojena koaksijalnim kabelom na Stanford Research Systems fazno osjetljivo pojačalo. Koristimo fazno osjetljivo pojačalo jer trebamo izdvojiti željeni signal male amplitude iz šuma koji može imati do 10^6 puta veću amplitudu. Očitavamo potencijal u okolini uzorka i dobiveni signal šaljemo u fazno osjetljivo pojačalo zajedno sa signalom sa signal generatora koji kontrolira strujni izvor. Pomoću fazno osjetljivog pojačala dobivamo amplitudu i fazu (zapravo razliku u fazama između signala) potencijala u svakoj mjerenoj točki. Signal s pojačala očitava USB osciloskop koji je spojen na računalo. Računalnim programom u Pythonu kontroliramo rad CNC stroja, signal generatora i obrađujemo izmjerene podatke.



Slika 5.13: Lijevo: Postav za V_T skeniranje s označenim glavnim uređajima. Desno: Snimanje tranzijentnog potencijala proizvedenog inverznog fotokondenzatora.

5.8.1 Obrada podataka

Cilj VT skeniranja je dobivanje električnog polja koje možemo izračunati preko gradijenta tranzijentnog potencijala:

$$\vec{E} = -\nabla V_T \quad (5.10)$$

Tranzijentni potencijal možemo zapisati kao:

$$V_T(\vec{r}) = A(\vec{r})\cos(\omega t + \varphi(\vec{r})) \quad (5.11)$$

gdje je $A(\vec{r})$ amplituda mjenog potencijala, $\varphi(\vec{r})$ fazni pomak u odnosu na signal svjetlosti, a $\omega = 2\pi \times 5000\text{Hz}$. Na izlazu iz fazno osjetljivog pojačala dobivamo dva signala X i Y koji nastaju množenjem ulaznog signala, $V_u(t) = A_u\cos(\omega_u t + \varphi)$, s referentnim signalom, $V_r(t) = \sqrt{2}\cos(\omega_r t)$, i s referentnim signalom pomaknutim za 90° , $V_r'(t) = \sqrt{2}\cos(\omega_r t + 90^\circ)$, čime dobivamo :

$$X = V_u \times V_r = \frac{A_u}{\sqrt{2}}\cos(\varphi) \quad (5.12)$$

$$Y = V_u \times V_r' = \frac{A_u}{\sqrt{2}}\sin(\varphi) \quad (5.13)$$

Iz X i Y signala koristeći relacije:

$$A = A_u/\sqrt{2} = \sqrt{X^2 + Y^2} \quad (5.14)$$

$$\varphi = \arctan\left(\frac{2Y}{X}\right) \quad (5.15)$$

možemo dobiti efektivnu amplitudu A i fazu φ potencijala u svakoj mjerenoj točki iz kojih možemo izračunati električno polje [50].

6 Rezultati i rasprava

Ovo poglavlje podijelili smo na tri dijela, prvi koji govori o topografskim naznakama koje su proizvedene nanosekundnim laserom, drugi koji govori o topografskim naznakama proizvedenima femtosekundnim laserom i treći koji pokazuje proizvedene galvanotropske naznake.

U dijelovi poglavlja u kojima analiziramo topografske prvo ukratko opisujemo proces izrade i parametre postava, nakon čega analiziramo učinak jednog ili više laserskih pulseva na materijal koristeći optički profilometar i SEM. Promatramo ovisnosti ablatiranog volumena, dubine i promjera kratera o energiji pulsa koristeći Profilm Online aplikaciju. Iz dobivenih podataka radimo analizu D^2 metodom kojom određujemo minimalnu ekspoziciju. Nakon toga proizvodimo uzorke kompleksnijih geometrija (većinski uzorci linija) na različitim materijalima. Strukturirane supstrate promatramo pod mikroskopom, optičkim profilometrom, kontaktnim profilometrom i/ili SEM-om te ih dalje karakteriziramo.

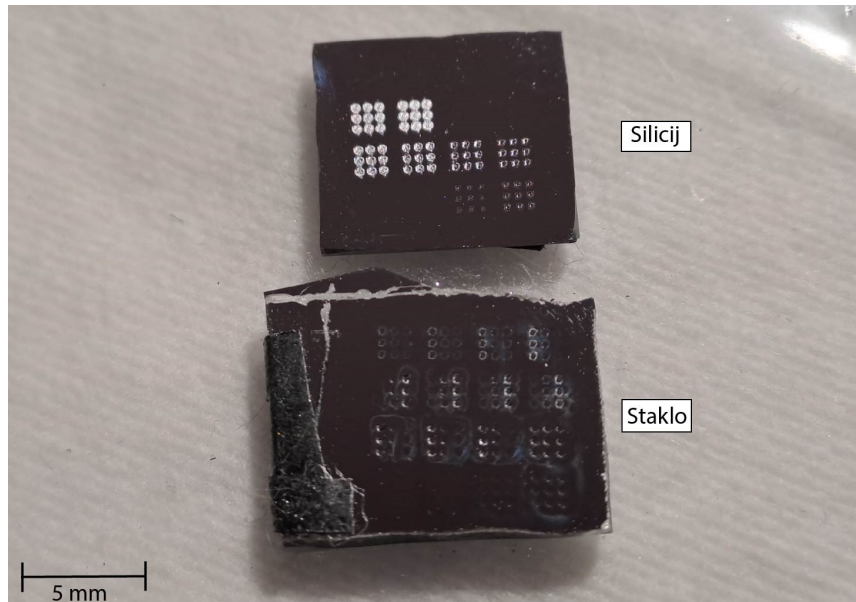
U dijelu poglavlja o galvanotropskim naznakama prvo ukratko opisujemo proces i parametre izrade, nakon čega pokazujemo dobiveni inverzni fotokondenzator i mjerenja tranzijentnog potencijala s izračunatim električnim poljem.

6.1 Topografske naznake napravljene nanosekundnim laserom

6.1.1 Analiza kratera nastalih nanosekundnom laserskom ablacijom

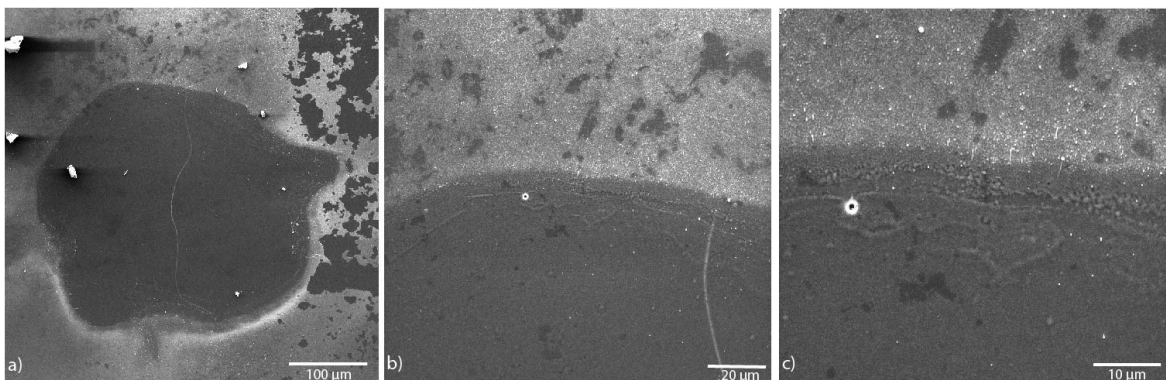
Prvo smo htjeli vidjeti i okarakterizirati učinak nanosekundnog laserskog pulsa na materijale. Koristili smo Thorlabs pomično postolje i nanosekundni laser. Uzorke smo napravili na komadima debljeg borosilikatnog stakla i silicija očišćenima izopro-

panolom. Nakon ablacije, uzorke smo očistili u ultrazvučnoj kadici Hellmanex III otopinom za čišćenje optičkih komponenti i deioniziranom vodom. Na njih smo evaporirali 40 nm aluminija kako bi dobili kvalitetnije slike na optičkom profilometru i SEM-u. Dobiveni uzorci prikazani su na slici 6.1.



Slika 6.1: Komadi silicija i borosilikatnog stakla na kojima smo nanosekundnom laserskom ablacijom proizveli kratere.

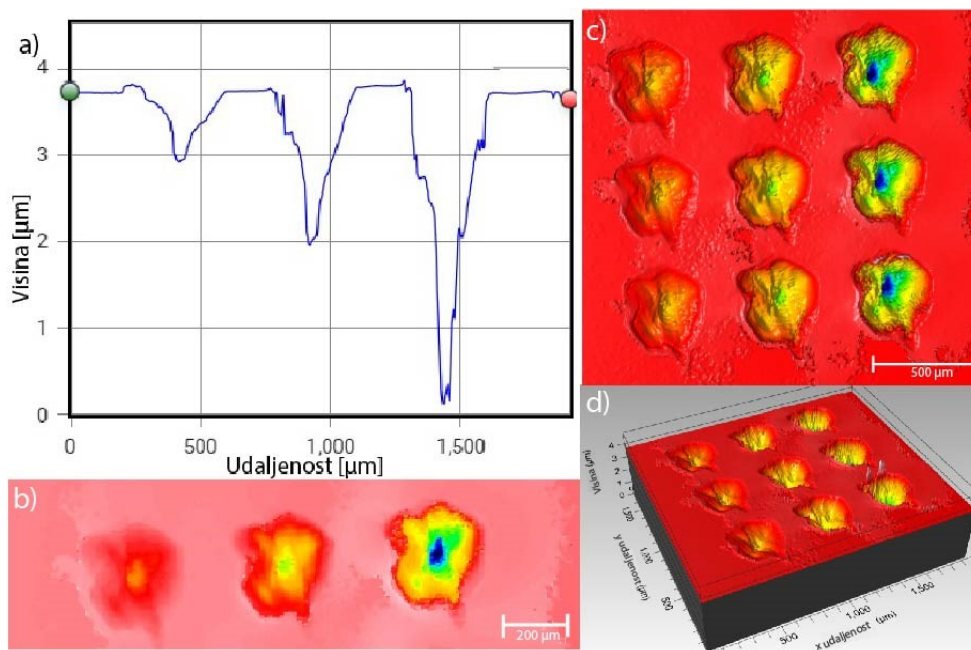
Na staklu se jedan puls sa 100% postavkom atenuatora vrlo slabo vidi golim okom, pa smo odlučili raditi uzorke s različitim brojem pulseva. Slika kratera napravljenog s 4 pulsa i 55% postavkom atenuatora slikana SEM-om prikazana je na slici 6.2. Možemo vidjeti da je staklo nakon ablacije vrlo glatko, čak i na slici s najvećim povećanjem. Linija koja se proteže duž kratera je najvjerojatnije mikropukotina. Nepravilan oblik kratera je posljedica termalnih procesa i promjene oblika zrake prolaskom kroz har-



Slika 6.2: SEM slika kratera proizvedenog s 4 pulsa na 55 % postavci atenuatora s povećanjem a) 417 puta b) 1540 puta c) 3530 puta.

moničke module.

Potom promatramo podatke dobivene optičkim profilometrom, primjer kojih možemo vidjeti na slici 6.3. Oko kratera na svim promatranim energijama pulsa možemo vidjeti sloj ablatiranog materijala čija debljina raste s energijom i brojem pulseva te je za 100% postavku atenuatora i 8 pulseva oko 150 nm.

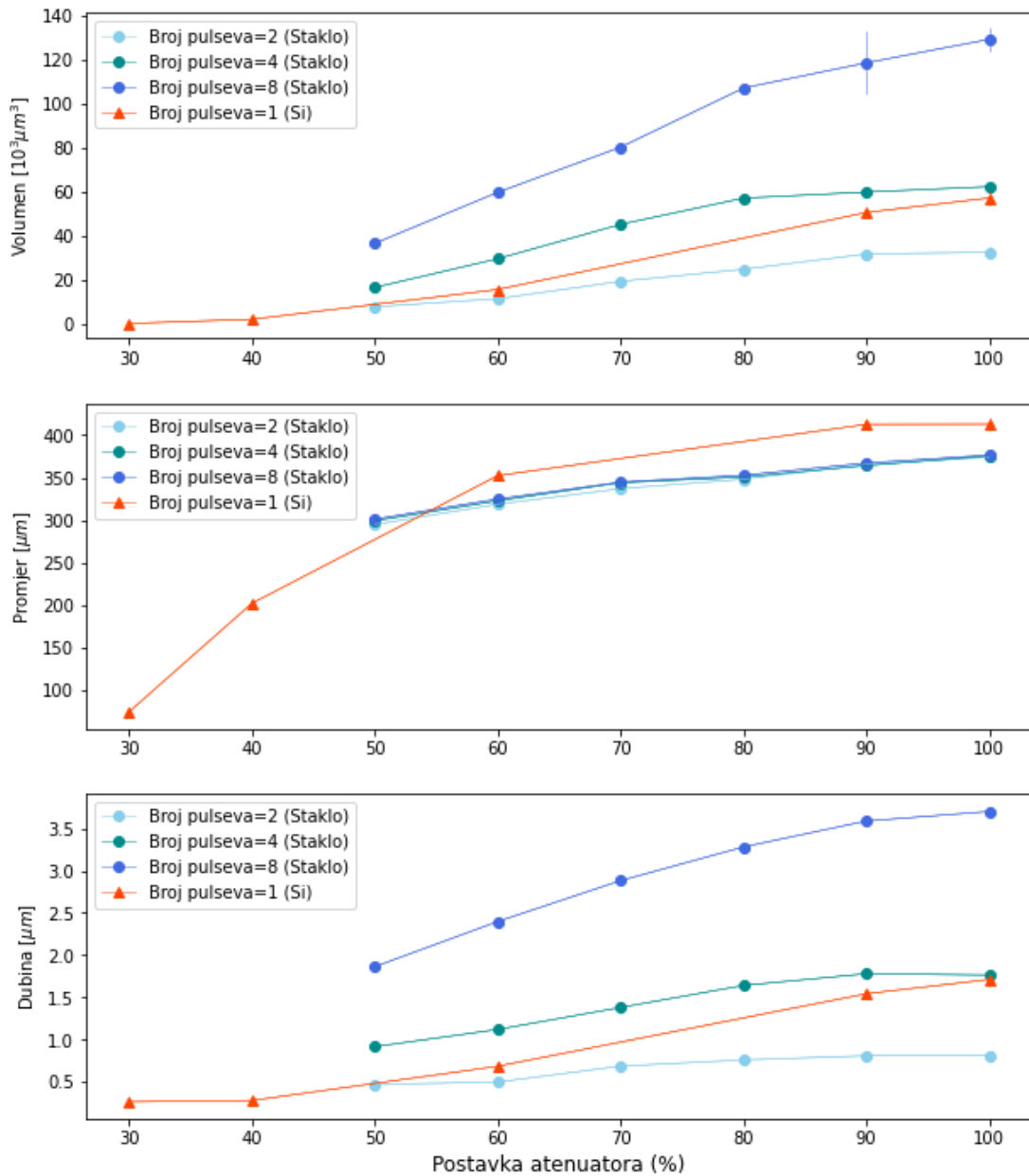


Slika 6.3: Prikaz podataka dobivenih optičkim profilometrom za staklo. a) Graf ovisnosti dubine o udaljenosti za uzorke proizvedene s 80% energije i 2, 4 i 8 pulseva. b) 2D prikaz kratera izmjenjenih na grafu. c) i d) 3D prikaz uzorka s 80% energije i 2, 4 i 8 pulseva.

Očitavamo iznose ablatiranog volumena, promjera i dubine kratera u Profilm Online aplikaciji. Ovisnost mjerenih veličina o postavci atenuatora za staklo i silicij možemo vidjeti na slici 6.4. Porastom energije pulsa dobivamo dublje kraterne s većim promjerom te je ablatirano više volumena. Možemo primijetiti da je iznos promjera vrlo blizak za istu postavku atenuacije i različit broj pulseva na staklu. Nismo napravili D^2 analizu zbog korištenja većeg broja pulseva.

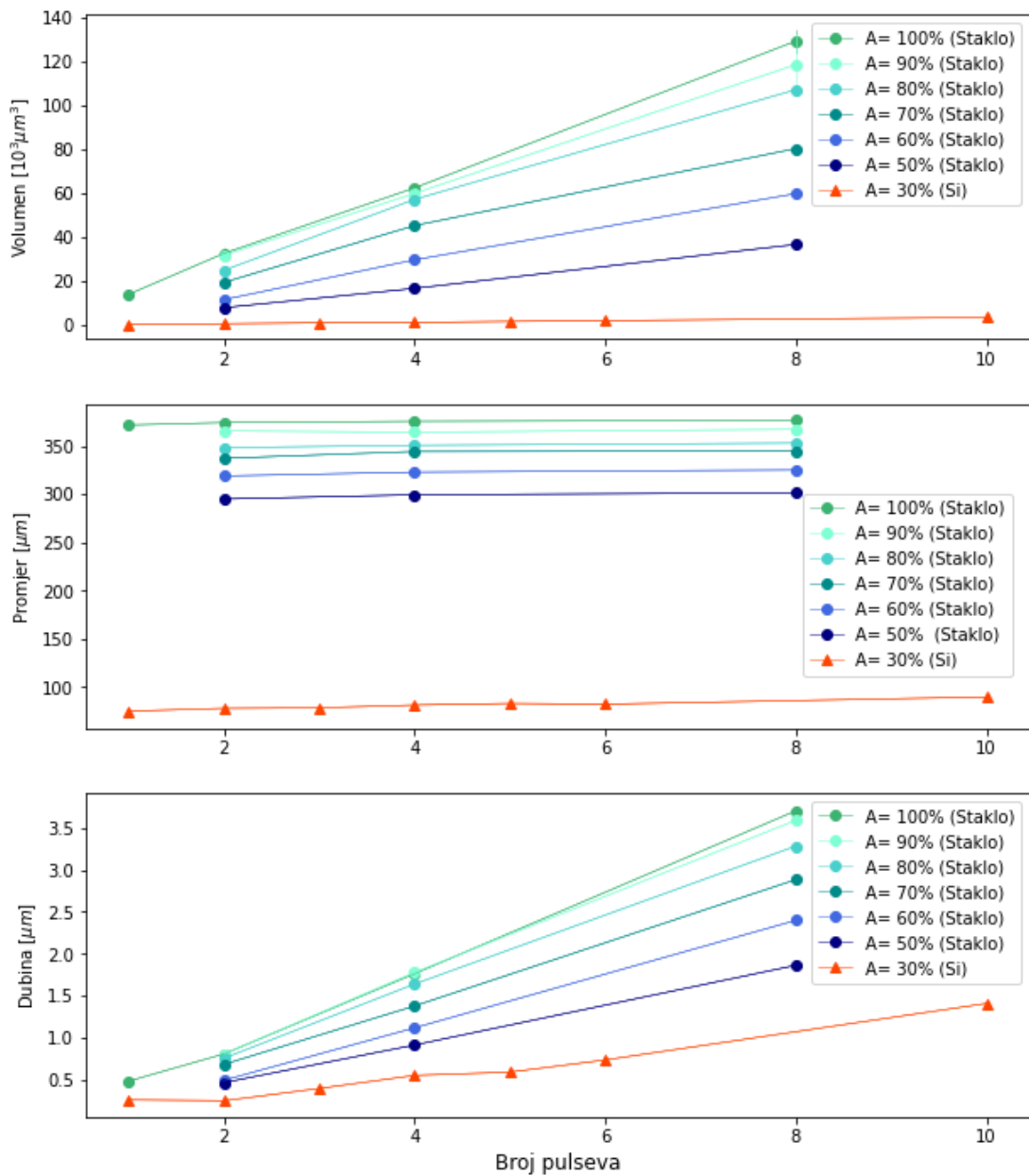
Ovisnost promjera i ostalih mjerenih veličina o broju pulseva možemo detaljnije promotriti na slici 6.5. Iznos ablatiranog volumena i dubina kratera na staklu jednoliko raste, dok se promjer vrlo malo poveća rastom broja pulseva.

Silicij ima visoku termalnu vodljivost te se već pri 30 % postavke atenuatora golim okom vidi proizvedeni krater zbog čega smo odabrali na siliciju raditi uzorke s jednim pulsom i različitim postotcima atenuacije. Kratere proizvedene sa 60 % i 100 % postavke atenuatora smo snimili SEM-om. Primijetili smo značajno veću hrapavost



Slika 6.4: Ovisnost ablatiranog volumena, promjera i dubine kratera o postavci atenuacije nanosekundnog lasera na borosilikatnom staklu i siliciju.

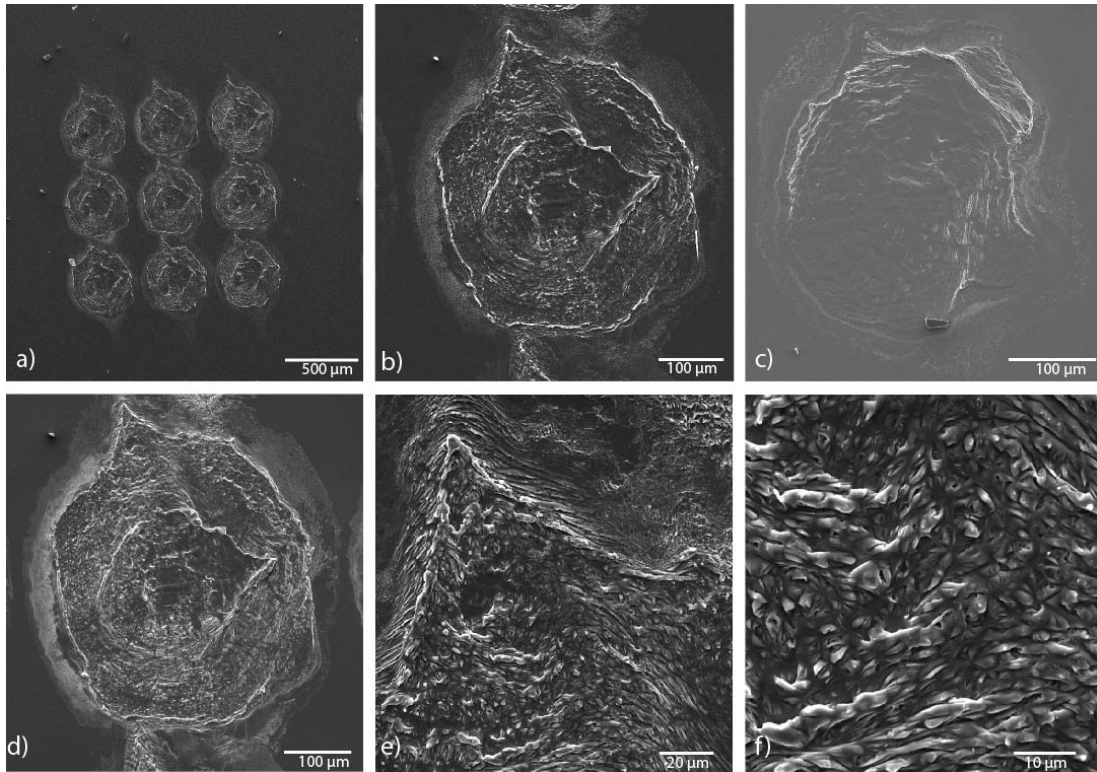
u usporedbi s kraterima na staklu. Krater dobiven pri 60 % postavci atenuatora koji vidimo na slici 6.6.c dijelu slike je značajno glađi od 100 % koji vidimo na slici 6.6.b. Nagnuli smo uzorak za 10° kako bi vidjeli detalje nepravilnosti površine. Nepravilnosti su malih dimenzija i možemo ih detaljnije promotriti na slikama 6.6.e-f. Hrapavost stvara probleme na optičkom profilometru koji zbog ograničene rezolucije ne može vidjeti nepravilnosti već dobivamo šiljke za koje smo potvrdili da ne postoje slikama sa SEM-a. Prikaz podataka s optičkog profilometra nalazi se na slici 6.7. Na slici 6.7.b vidimo krater proizveden s 1 pulsom i 30 % postavkom atenuatora.



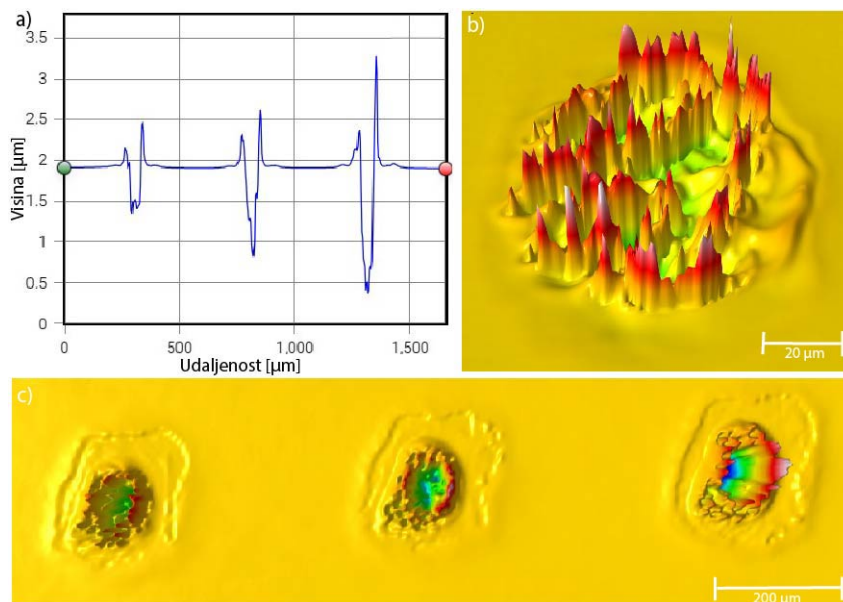
Slika 6.5: Ovisnost ablatiranog volumena, promjera i dubine kratera o broju pulseva nanosekundnog lasera na borosilikatnom staklu i siliciju.

U području oko kratera vidimo rastopljeni materijal te ne možemo vidjeti ablatirani materijal koji smo kod stakla mogli vidjeti na svakoj postavci atenuatora. Na 100 % postavke atenuatora imamo oko 30 nm ablatiranog materijala.

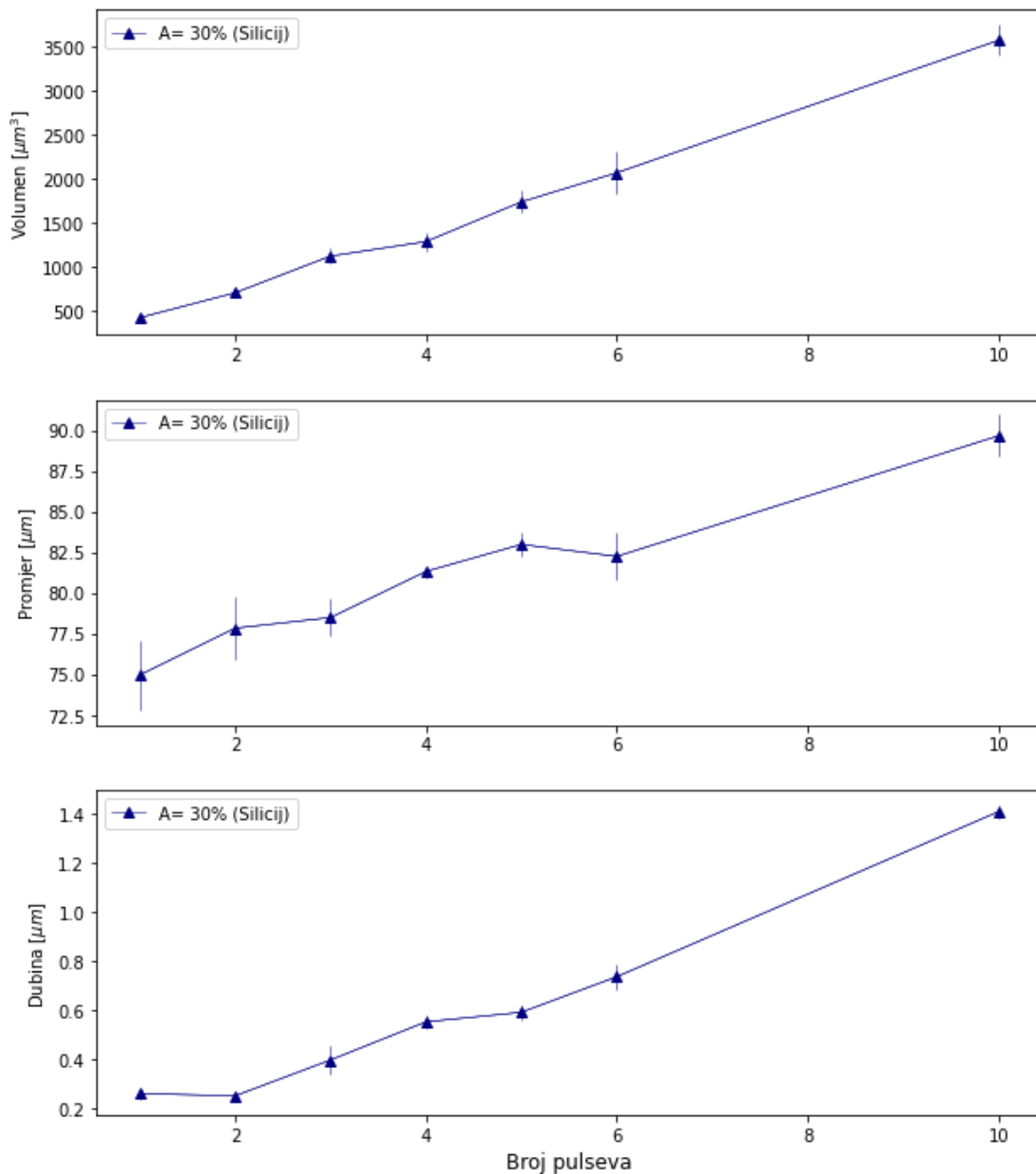
Ovisnost ablatiranog volumena, dubine i promjera kratera o postavci atenuatora na siliciju vidimo na slici 6.4. Jednim pulsom na siliciju sa 100% postavke atenuatora postižemo dubinu kao s 4 pulsa na staklu. Ovisnost dubine i ablatiranog volumena o postavci atenuatora izgleda vrlo slično kao kod stakla, dok ovisnost promjera kratera izgleda drugačije pri energijama blizu praga ablacije, ali na većim energijama iznosi



Slika 6.6: SEM slika kratera proizvedenih na siliciju s 1 pulsom za 100 % energije (a-b,d-f) s povećanjem a) 84 puta b) 354 puta d) 384 puta e) 1550 puta i f) 3550 puta. Slike d-f su pod kutem od 10°. c) Krater napravljen s 1 pulsom i 60% atenuacije s povećanjem 506 puta.



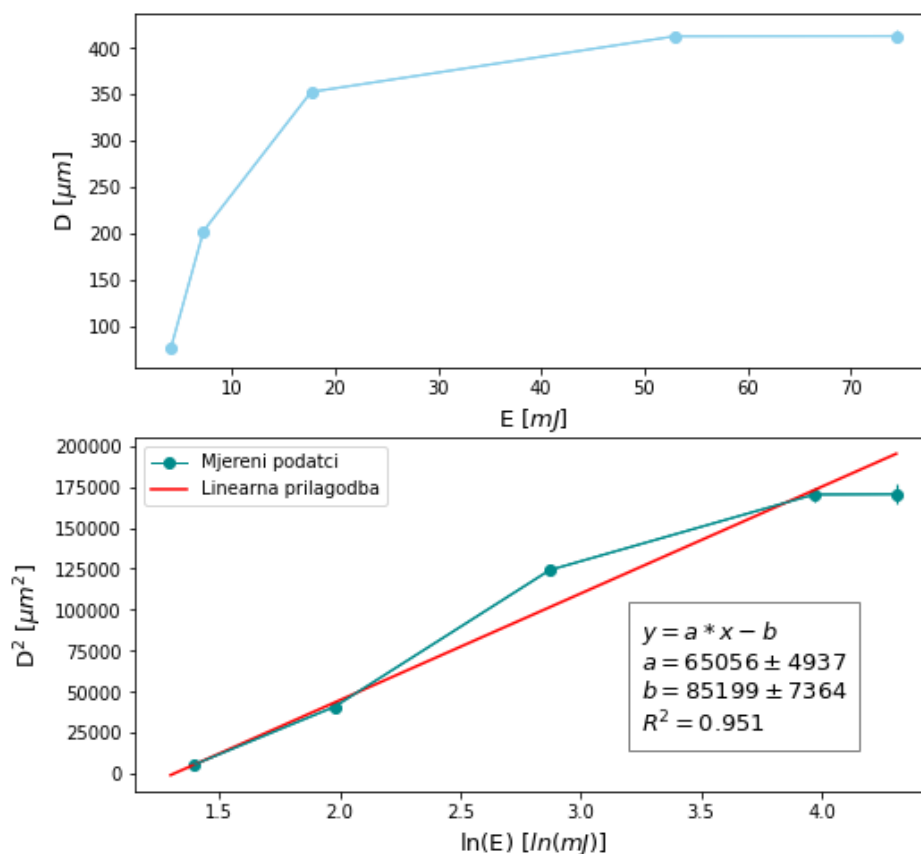
Slika 6.7: Prikaz podataka dobivenih profilometrom na siliciju. a) Graf ovisnosti dubine o udaljenosti za uzorke proizvedene s 30 % postavke atenuatora i 5, 6 i 10 pulseva. b) Uvećani prikaz kratera s 1 pulsom na 30 % atenuatora. c) 3D prikaz kratera izmjerenih na grafu.



Slika 6.8: Ovisnost ablatiranog volumena, promjera i dubine kratera o broju pulseva za atenuaciju namještenu na 30% na siliciju.

i ovisnost postaju sličniji.

Na siliciju smo napravili uzorak s minimalnim postotkom snage koji vidimo golim okom (30 %) s različitim brojem pulseva. Ovisnost mjerenih veličina o broju pulseva u usporedbi sa staklom možemo vidjeti na slici 6.5. Detaljniji prikaz samo silicija možemo vidjeti na slici 6.8. ablatirani volumen i dubina jednoliko rastu s povećanjem broja pulseva kao i na staklu, no dobivamo kratere manjeg promjera s dubinom usporedivom s dubinama dobivenim na staklu, ali s tri reda veličine manjim iznosom ablatiranog volumena. Iznos promjera raste s brojem pulseva. Imamo veće nepreciz-



Slika 6.9: Mjereni podatci ovisnosti promjera kratera o energiji pulsa i D^2 metoda u kojoj koristimo linearnu prilagodbu.

nosti kod ovih mjerenja zbog manjeg broja proizvedenih kratera.

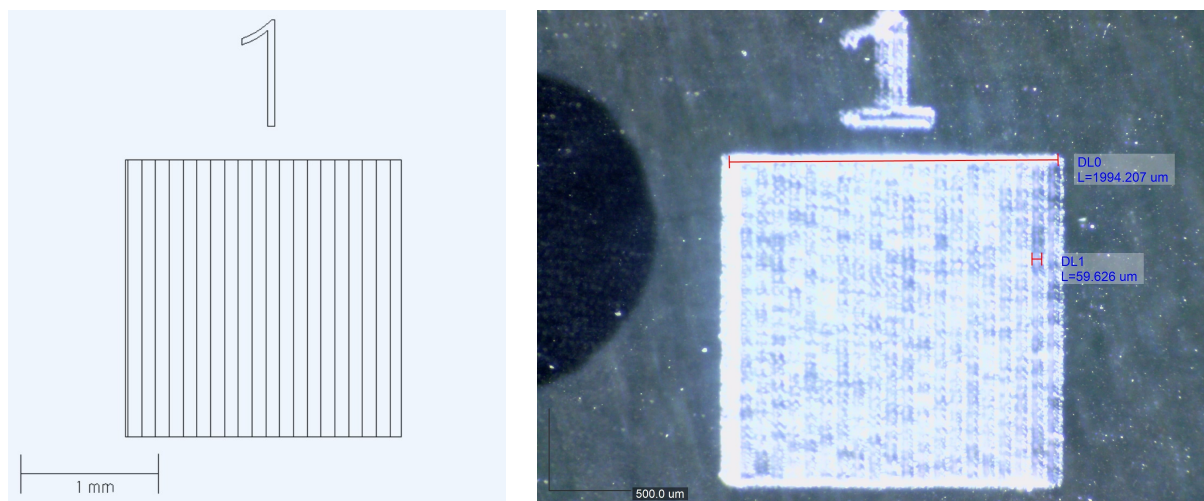
D^2 metodom određujemo minimalnu ekspoziciju iz linearne prilagodbe što možemo vidjeti na grafu na slici 6.9. Iz minimalne energije ablacije i promjera zrake na $1/e^2$ vrijednosti maksimuma koje dobijemo linearnom prilagodbom preko formule 3.6 dobivamo minimalnu ekspoziciju:

$$F_{th} = 7 \pm 1 \text{ J/cm}^2, R_{F_{th}} = 14.29\% \quad (6.1)$$

6.1.2 Podloge na borosilikatnom staklu

Nakon analize kratera, radimo uzorke s kompleksnijim geometrijama Newport pomičnim postoljem i LMS programom. Kao što smo vidjeli na slikama sa SEM-a i optičkog profilometra, oblik zrake nije savršeni krug, već je eliptičan zbog čega smo linije ispune radili s vertikalnom orijentacijom linija. Napravili smo nekoliko testova s Newport postoljem te se brzina 0.25 mm/s pokazala idealnom za postizanje spojenih linija, tj. ne vide se pojedinačni pulsevi.

Strukturirali smo ranije opisano tanko borosilikatno staklo kružnog oblika. Uzorke linija na staklu odabrali smo raditi na 95 % postavci atenuatora s kašnjenjem pulsa od $432.5 \mu s$. Ovakvom kombinacijom parametara dobili smo manje kraterne s dobrom reproducibilnosti. Razmacima između linija koje ispunjavaju kvadratiće su bili $100 \mu m$ i $200 \mu m$. Dizajn uzorka na staklu s razmakom $100 \mu m$ i podlogu dobivenu 1 prolaskom možemo vidjeti na lijevoj slici 6.10. Desnu sliku dobili smo promatranjem uzorka pod mikroskopom gdje smo vidjeli da je širina kanala oko $60 \mu m$, no postoji mogućnost da su se dijelovi pulseva preklapali. Proizveli smo podloge s istim dizajnom i postavkama lasera s 1, 2 i 4 prolaza.

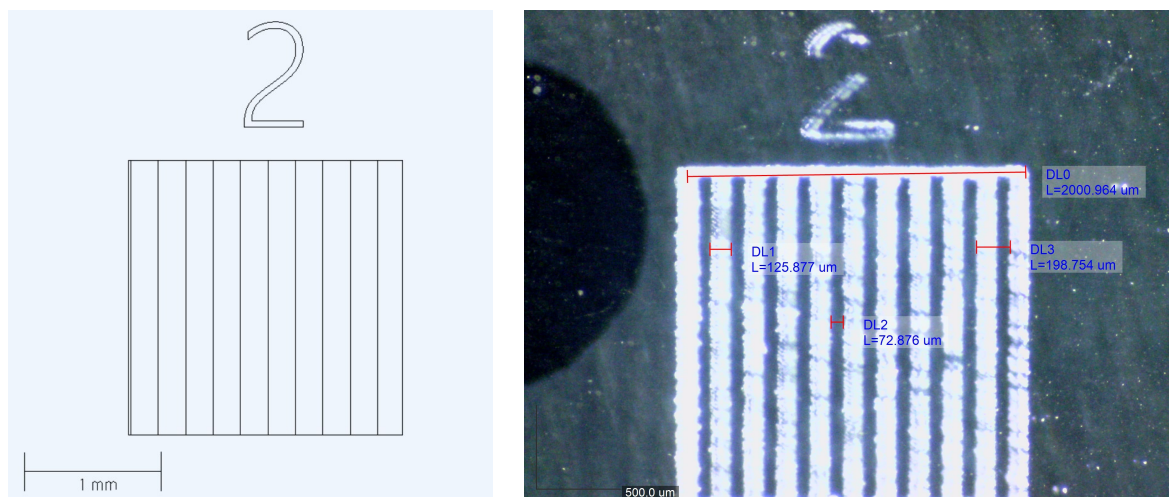


Slika 6.10: Lijevo: Dizajn podloge sa $100 \mu m$ razmaka između linijama na staklu iz LMS programa. Desno: Proizvedeni uzorak na staklu proizveden s jednim prolaskom.

Na slici 6.11 možemo vidjeti lijevo dizajn uzorka iz LMS programa i desno dobivenu podlogu napravljenu s 2 prolaska s razmakom među linijama $200 \mu m$. Izmjerali smo širinu linije od oko $120 \mu m$ s razmakom među linijama od oko $80 \mu m$. Proizveli smo uzorke s 1 i 2 prolaska.

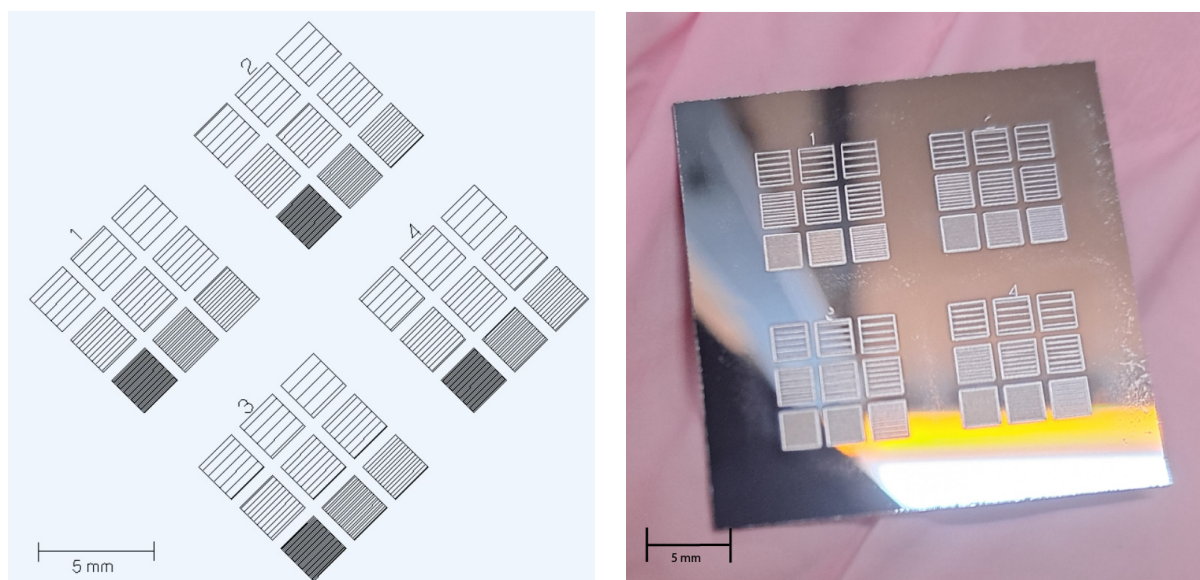
6.1.3 Podloge na siliciju

Na siliciju smo odlučili napraviti dvije podloge, jednu s različitim brojem prolazaka i jednu s različitim snagama. Korištena je ista brzina postolja kao za staklo. Za obje podloge korišten je isti dizajn prikazan na lijevoj slici 6.12. Napravljene su 4 skupine od 3×3 kvadratića duljine stranice $2 mm$. Najmanja udaljenost u linijama koje ispunjavaju kvadratiće je $50 \mu m$ za koju su linije spojene, u svakom sljedećem kvadratiću se povećava za $50 \mu m$ sve do $450 \mu m$. Na prvoj podlozi varirali smo broj



Slika 6.11: Lijevo: Dizajn podloge s $200 \mu m$ razmaka između linijama na staklu iz LMS programa. Desno: Proizvedeni uzorak na staklu s izmjerenom širinom linije oko $120 \mu m$.

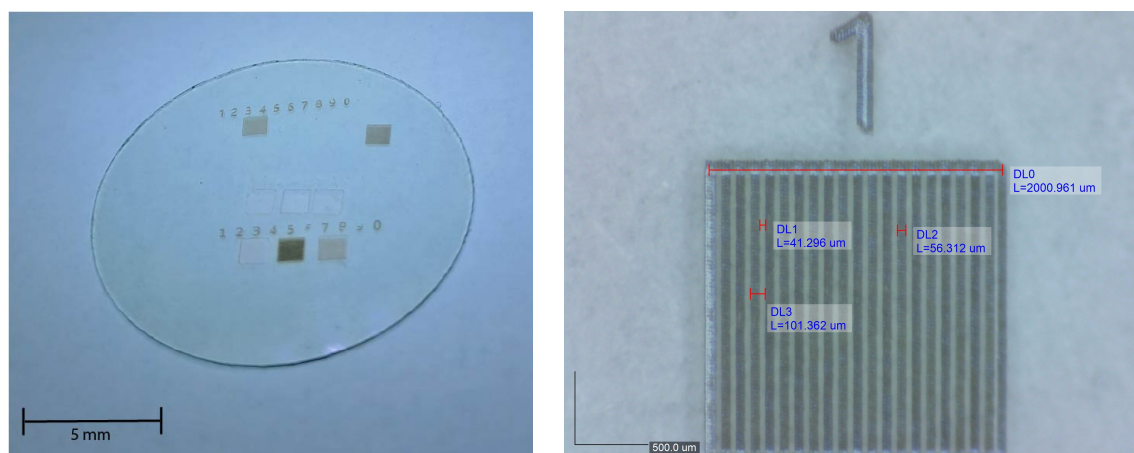
prolaza (1-4) pri 30 % postavci atenuatora. Podlogu vidimo na desnoj slici 6.12. Za drugu podlogu s različitim iznosima snage koristimo postavke atenuatora od 30 %, 40 %, 50 % i 60 %. Odabrali smo stati na 60 % jer pri većim snagama dolazi do zadebljanja i slabije definiranosti linija zbog veće energije i time povećane količine izbačenog materijala.



Slika 6.12: Lijevo: Dizajn uzorka s različitim brojem prolaza na siliciju iz LMS programa. Desno: Proizvedeni uzorak na siliciju prije čišćenja.

6.1.4 Podloge na ITO-u

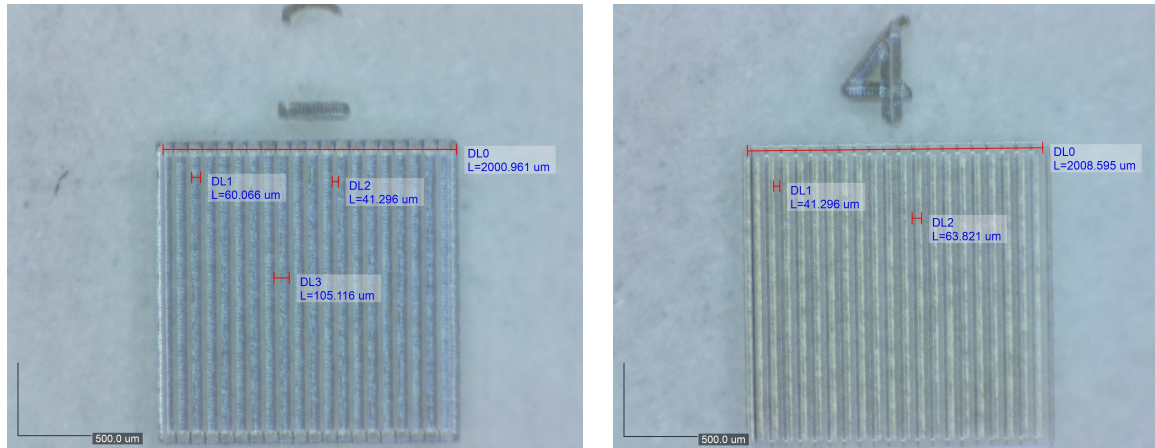
Strukturirali smo ITO kako bi proizveli topografske naznake, ali i odredili okvirne parametre koji su nam pomogli kod izrade galvanotropnih naznaka. Korišteni sloj ITO-a nalazio se na ranije opisanim komadima tankog stakla. Na lijevoj slici 6.13 možemo vidjeti probni uzorak na ITO-u s različitim postavkama atenuatora, od 40 % (srednji red) do 10 % (gornji red) u koracima od 5 %. Može se primijetiti da za veće snage dolazi do potpunog uklanjanja materijala te vidimo samo obrub kvadrata, dok za manje snage možemo vidjeti zatamnjeni sloj materijala. Nakon ablacije bi provjerili vodljivost unutar uklonjenog materijala. Pri većim snagama ablatirani dio materijala više ne bi bio vodljiv, što znači da smo potpuno uklonili ITO i došli do stakla. Postavke lasera koje smo koristili za strukturiranje su bile 15 % postavka atenuatora i $220 \mu s$ odgode pulsa s razmakom među ispunjavajućim linijama od $100 \mu m$. Dizajn uzorka koji smo koristili je bio isti kao i za staklo. Na desnoj slici 6.13 možemo vidjeti uzorak proizveden na ITO-u s jednim prolazom, dok na slici 6.14 možemo vidjeti uzorke napravljene s 2 i 4 prolaza.



Slika 6.13: Lijevo: Probni uzorak na ITO-u proizveden s različitim postavkama atenuatora. Desno: Proizvedeni uzorak na ITO-u napravljen s jednim prolazom i s izmjerenom širinom linije oko $60 \mu m$.

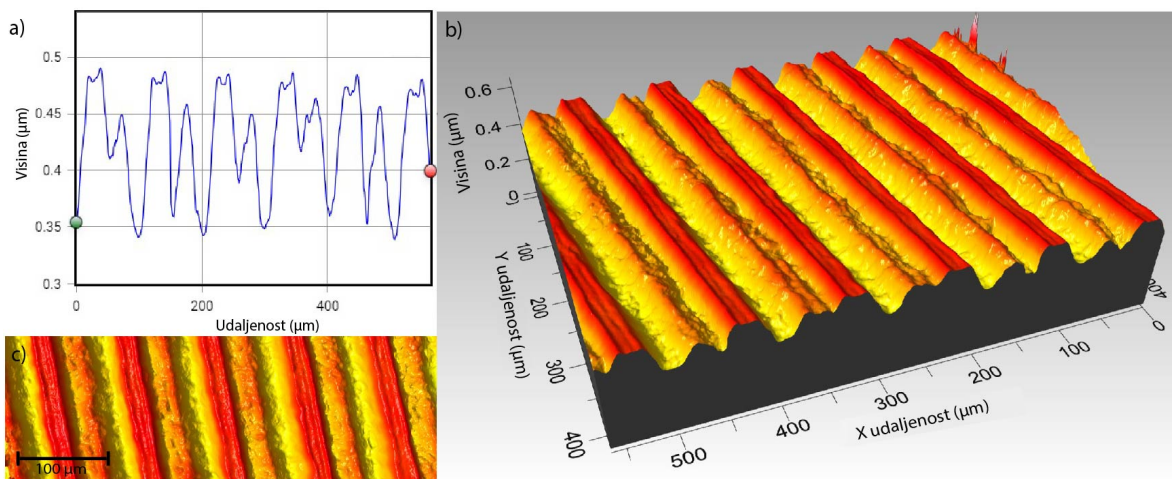
Možemo primijetiti da je uzorak s jednim prolazom najtamniji, a uzorak s 4 prolaza najsvjetliji zbog uklanjanja sve veće količine materijala. Isto tako možemo vidjeti da, kao što smo ranije vidjeli na debljem borosilikatnom staklu i siliciju, širina kanala gotovo konstantna i iznosi oko $60 \mu m$.

Uzorke s 2 i 4 prolaza očistili smo istom procedurom kao i uzorke na debljem staklu i siliciju nakon čega smo na njih evaporirali $30 nm$ aluminija. Uzorke smo odnijeli



Slika 6.14: Lijevo: Proizvedeni uzorak na ITO-u napravljen s dva prolaza i s izmjenom širinom linije oko $60 \mu m$. Desno: Proizvedeni uzorak na ITO-u napravljen s četiri prolaza i s izmjenom širinom linije oko $60 \mu m$.

na optički profilometar kako bi izmjerili dubinu kanala. Prikaz podataka dobivenih profilometrom za dva prolaza vidimo na slici 6.15, a za četiri prolaza na slici 6.16.



Slika 6.15: Prikaz podataka dobivenih profilometrom za 2 prolaska na ITO-u. a) Graf ovisnosti dubine o udaljenosti. b) 3D prikaz dobivenih kanala. c) Slika 3D prikaza odozgo.

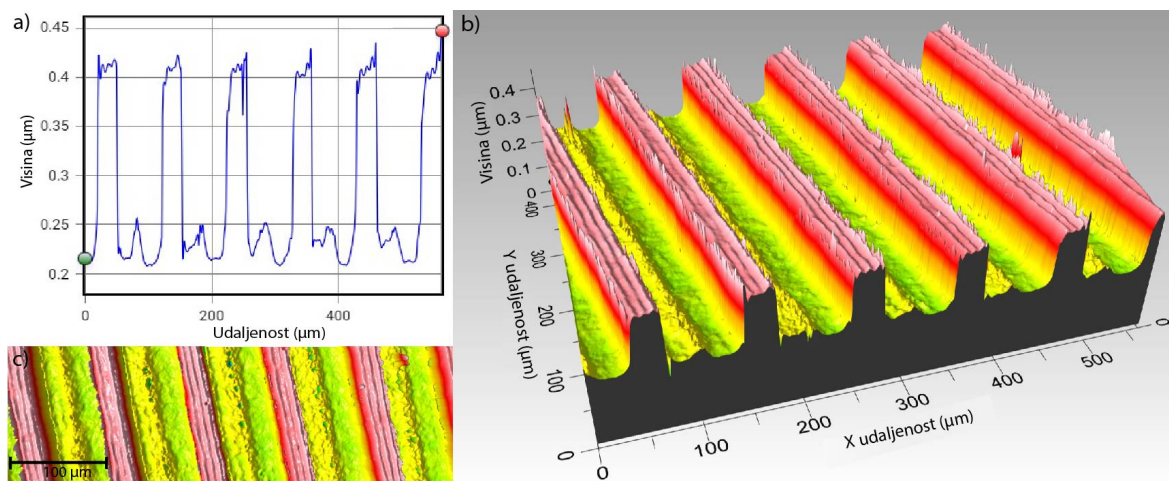
Pomoću aplikacije Profilm Online izmjerili smo širine kanala koje iznose:

$$d_2 = 72 \pm 2 \mu m, R_{d_2} = 2.78\% \quad (6.2)$$

$$d_4 = 73 \pm 1 \mu m, R_{d_2} = 1.37\% \quad (6.3)$$

i maksimalne dubine kanala:

$$h_2 = (162 \pm 3) nm, R_{h_2} = 1.85\% \quad (6.4)$$



Slika 6.16: Prikaz podataka dobivenih profilometrom za 4 prolaska na ITO-u. a) Graf ovisnosti dubine o udaljenosti. b) 3D prikaz dobivenih kanala. c) Slika 3D prikaza odozgo.

$$h_4 = (204 \pm 8) \text{ nm}, R_{h_4} = 3.92\% \quad (6.5)$$

Iznos širine kanala je gotovo isti za oba broja prolazaka, što se poklapa s ranijim mjerenjima promjera kratera za više pulseva na staklu. Na slikama s optičkog profilometra možemo primijetiti, pogotovo za 2 prolaska, kako imamo plići i dublji dio kanala. Do toga može doći zbog nepravilnog oblika zrake ili moguće nagnutosti pomičnog postolja. Smatramo da smo s 4 prolaska uklonili gotovo sav ITO jer nam kanali ne postaju dublji zbog činjenice da je ispod staklo kojemu je 15 % postavka attenuatora ispod praga ablacije.

Nanosekundnom ablacijom dobivamo kraterne i linije velikih promjera/širina i malih dubina (s najmanjom snagom na siliciju promjer kratera iznosi oko $75 \mu\text{m}$, a dubina oko 250 nm). Za aksonalno vođenje želimo imati linije širine manje od $10 \mu\text{m}$ i dubine veće od $10 \mu\text{m}$. Dodatnim prilagodbama postava (npr. boljim fokusiranjem ili promjenom leće) mogli bi postići nešto bolje rezultate, no smatramo da i dalje ne bismo bili blizu potrebnim dubinama i širinama linija. Maksimalna frekvencija lasera je 10 Hz što znači da za kompleksne i/ili veće uzorke strukturiranje dugo traje. U budućnosti nanosekundnu ablaciju bi mogli koristiti za stvaranje hrapavosti na površini (kao što smo vidjeli na primjeru silicija) ili strukturiranje obilježja većih dimenzija male dubine.

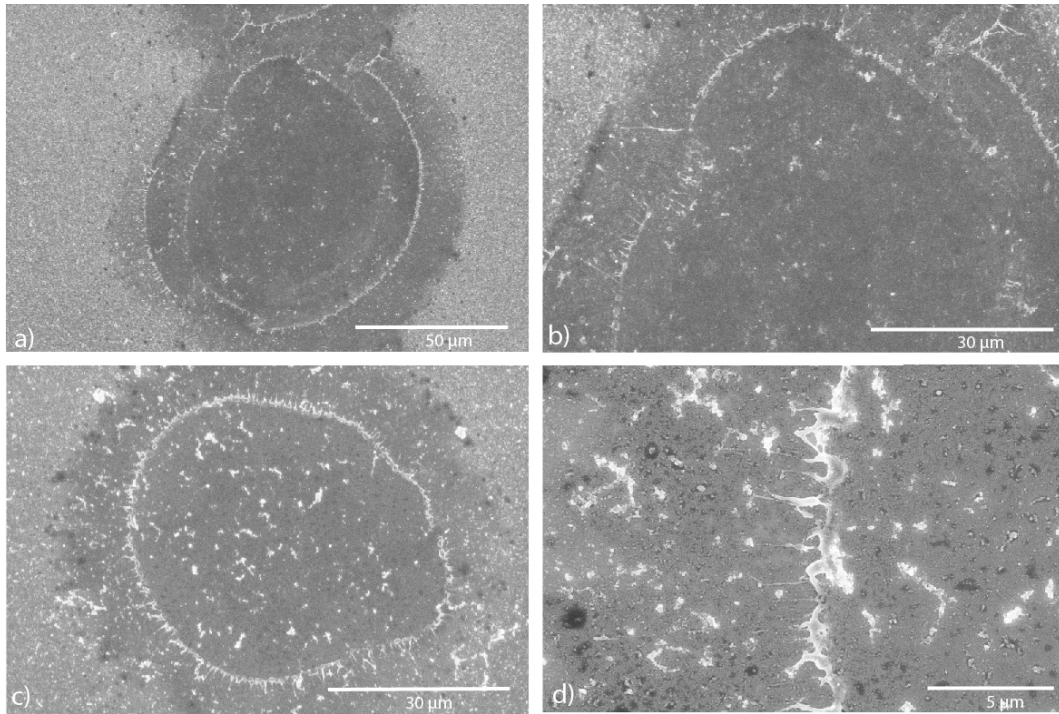
6.2 Topografske naznake napravljene femtosekundnim laserom

Topografske naznake proizveli smo femtosekundnim laserom na komadima borosilikatnog stakla i silicija. Ablaciju jednim pulsom dobili smo postavljanjem brzine kretanja postolja na 10 mm/s i smanjujući izlaznu frekvenciju lasera na 25 Hz , 50 Hz ili 100 Hz ovisno o veličini kratera (kad smo na kameri pričvršćenoj na postav vidjeli da se razmak među kraterima smanjuje, smanjili bi frekvenciju). Linije smo dobili smanjujući brzinu pokretnog postolja na 5 mm/s i postavljajući izlaznu frekvenciju na 10 kHz . Stali bismo s povećavanjem snage za proizvodnju linija kad smo vidjeli značajne negativne efekte na materijal o čemu ćemo detaljnije govoriti kod pojedinih materijala. Podloge strukturirane femtosekundnom ablacijom očistili smo prvo u ultrazvučnoj kadici u Hellmanex III otopinu i deioniziranoj vodi, nakon čega smo ih stavili u plazma čistač gdje smo ih 5 minuta čistili kisikovom plazmom. Potom smo na njih evaporirali 31 nm aluminija.

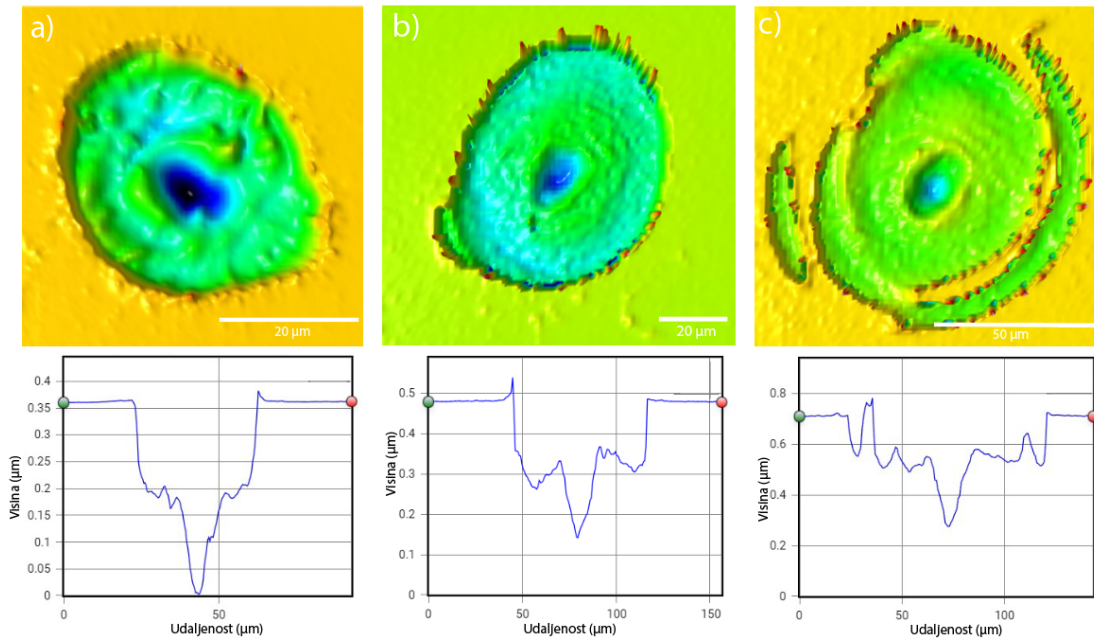
6.2.1 Podloge na borosilikatnom staklu

Za proizvodnju uzoraka koristili smo tanko borosilikatno staklo kružnog oblika debljine 0.4 mm . Izgled kratera proizvedenih s $425\text{ }\mu\text{J}$ i $75\text{ }\mu\text{J}$ energije pulsa možemo vidjeti na slici 6.17 sa SEM-a. Krateri su, kao i oni dobiveni nanosekundnim laserom, glatki u usporedbi sa silicijem. Povećavanjem energije javljaju se difrakcijski dijelovi zrake koji joj povećavaju promjer te se gubi primarni profil zrake što možemo vidjeti na mjerenjima sa SEM-a (slika 6.17) i s optičkog profilometra (slika 6.18). Na mjerenjima s profilometra možemo primijetiti da ne vidimo sloj rastaljenog materijala koji smo vidjeli u okolini kratera proizvedenih nanosekundnim laserom.

Očitavamo iznose ablatiranog volumena, promjera i dubine kratera u Profilm Online aplikaciji te dobivene ovisnosti izmjerene na staklu možemo vidjeti na grafu 6.19. U usporedbi s mjerenjima za nanosekundni laser, ablatirani volumen raste linearnije te je znatno (tri reda veličine) manji. Ovisnost promjera pokazuje ista svojstva koja ćemo koristiti za računanje minimalne ekspozicije za ablaciju. Dubina kratera blago raste u ovisnosti o energiji pulsa. Smatramo da smo već u režimu kao kod većih energija u nanosekundnoj ablaciji, gdje dolazimo do maksimalne dubine do koje jedan puls može doći. Isto tako potrebno je istaknuti da je nepreciznost optičkog profilometra 50 nm u z smjeru što nam može objasniti mali pad dubine porastom energije

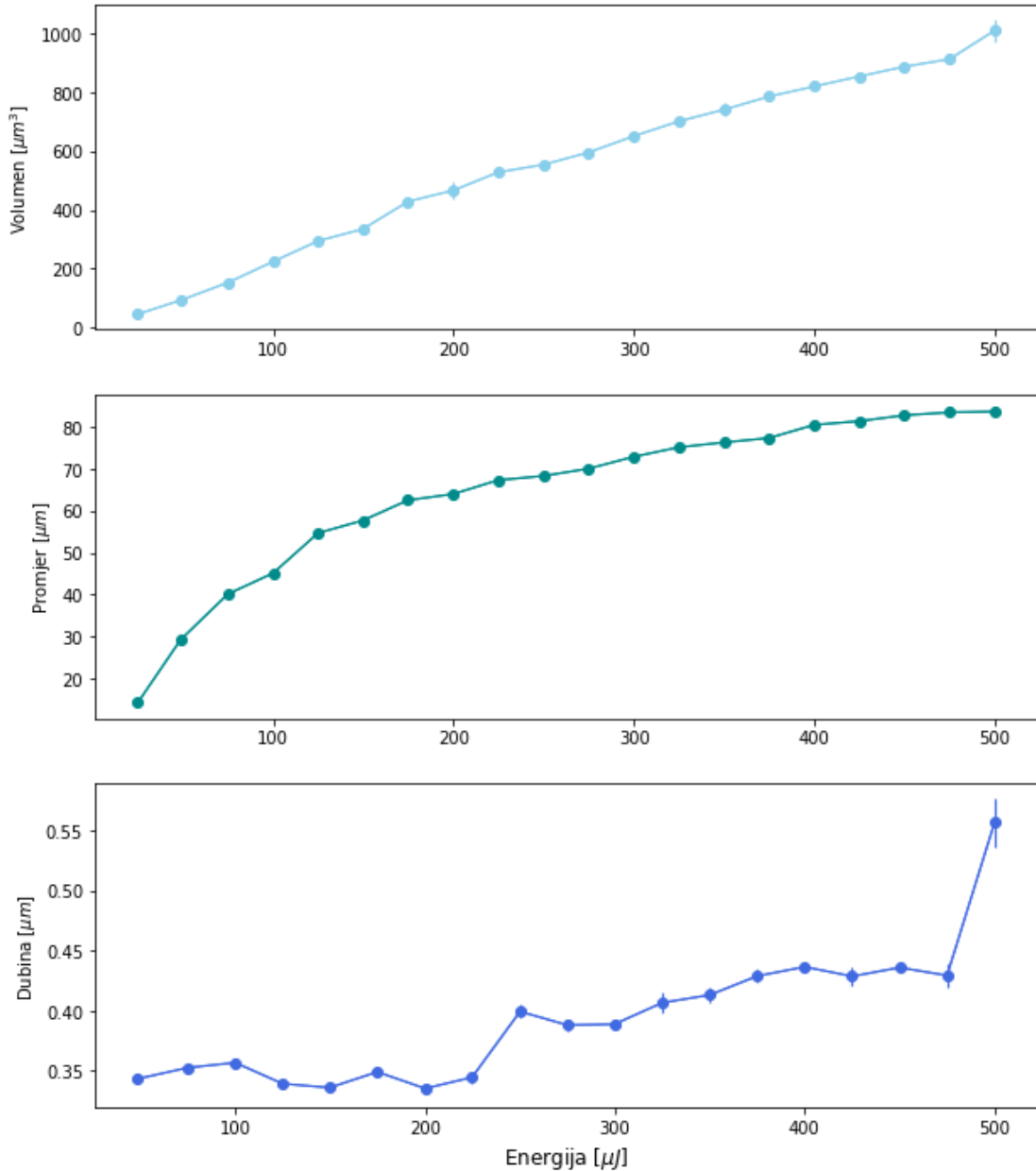


Slika 6.17: SEM slika kratera proizvedenih na staklu s 1 pulsom femtosekundnog lasera. a,b) Krater proizveden s $425 \mu J$ energije pulsa s povećanjem a) 1200 puta b) 2400 puta. c,d) Krater proizveden s $75 \mu J$ energije s povećanjem c) 2400 puta d) 10000 puta.



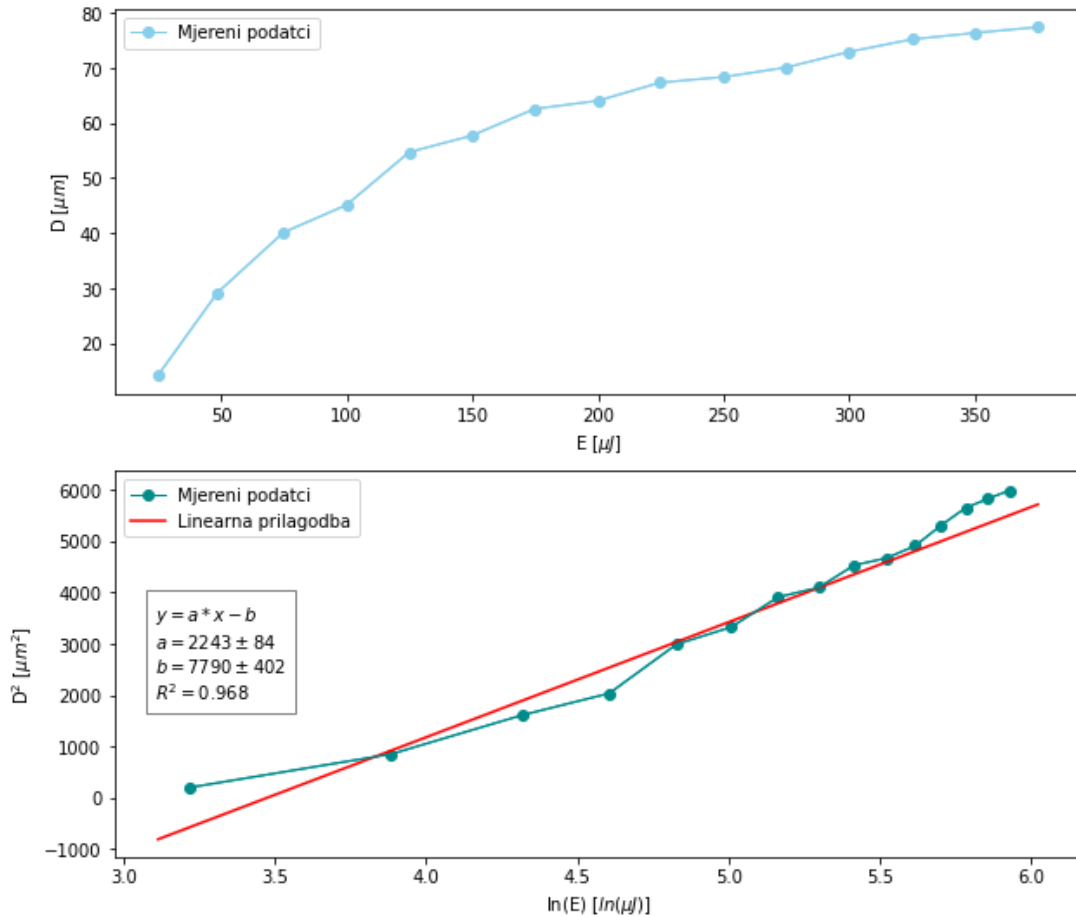
Slika 6.18: Prikaz kratera nastalih femtosekundnom ablacijom snimljenih optičkim profilometrom. a) Krater proizveden s $75 \mu J$ energije pulsa. b) Krater proizveden s $225 \mu J$ energije pulsa gdje počinjemo vidjeti difrakcijske efekte u donjem lijevom kutu kratera. c) Krater proizveden s $425 \mu J$ energije pulsa gdje vidimo difrakcijske dijelove zrake. Ispod slike svakog kratera se nalazi odgovarajući profil.

za neke mjerene kratere. Mjerenja dubine pokazuju vrh na energiji $500 \mu J$ koje je znatno veći od ostalih mjerenja. Potrebno je ponoviti mjerenje kako bi utvrdili da nije došlo do oscilacija u okolini tijekom mjerenja ili sličnih problema s postavom. Mogući problem je i nepotpuna poravnatost postava o kojoj ćemo detaljnije pričati kod uzoraka linija.



Slika 6.19: Ovisnost ablatiranog volumena, promjera i dubine kratera o energiji pulsa femtosekundnog lasera na borosilikatnom staklu.

Koristimo D^2 metodu kako bi odredili minimalnu ekspoziciju. Graf ovisnosti promjera o energiji i linearnu prilagodbu možemo vidjeti na slici 6.20. Iz linearne prilagodbe izračunamo minimalnu energije ablacije i promjer zrake na $1/e^2$ vrijednosti



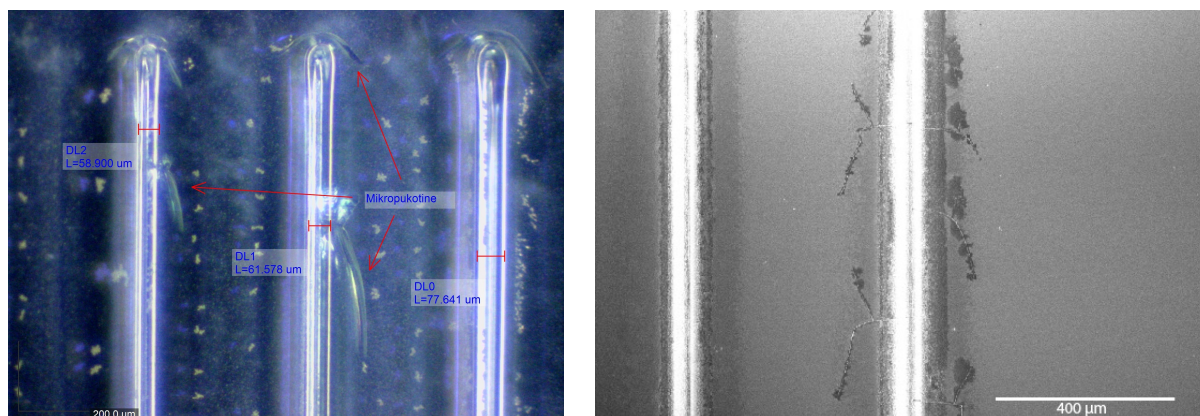
Slika 6.20: Mjereni podatci ovisnosti promjera kratera o energiji pulsa na borosilikatnom staklu i prikaz D^2 metode u kojoj koristimo linearnu prilagodbu.

maksimuma iz kojih preko formule 3.6 dobivamo minimalnu ekspoziciju:

$$F_{th} = 1.8 \pm 0.3 \text{ J/cm}^2, R_{F_{th}} = 16.67\% \quad (6.6)$$

Možemo primijetiti odstupanja od linearne prilagodbe. Smatramo da do njih dolazi zbog ranije opisane promjene oblika zrake pri većim energijama te ćemo u budućnosti pokušati ukloniti dijelove zrake nastale difrakcijom.

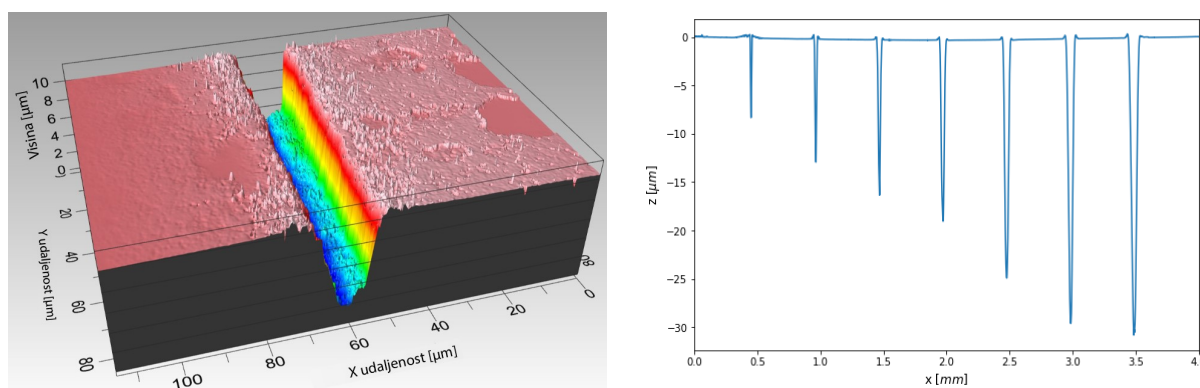
Nakon proizvodnje kratera, htjeli smo promotriti izgled linija (kanala) koje su nam jako bitne za aksonalno vođenje. Kanale na borosilikatnom staklu proizveli smo različitim energijama pulsa s razmacima među kanalima od 0.5 mm . Prestali smo povećavati snagu kad smo vidjeli nastajanje značajnih mikropukotina nakon prestanka trajanja pulsa. Iako femtosekundni pulsevi nemaju direktnu termalnu interakciju s materijalom, nastala plazma interagira termalno te tijekom hlađenja i ponovnog očvršćivanja materijala nastaju pukotine. Pukotine oko linija možemo vidjeti na



Slika 6.21: U okruženju kanala proizvedenih na većim energijama (desno vidimo $150 \mu J$, $200 \mu J$ i $250 \mu J$, lijevo $200 \mu J$ i $250 \mu J$) na borosilikatnom staklu možemo vidjeti nastale mikropukotine. Lijevo je prikazana slika slikana mikroskopom, a desno SEM-om s povećanjem 150 puta. Lijevo je podloga prikazana prije čišćenja i evaporacije aluminija.

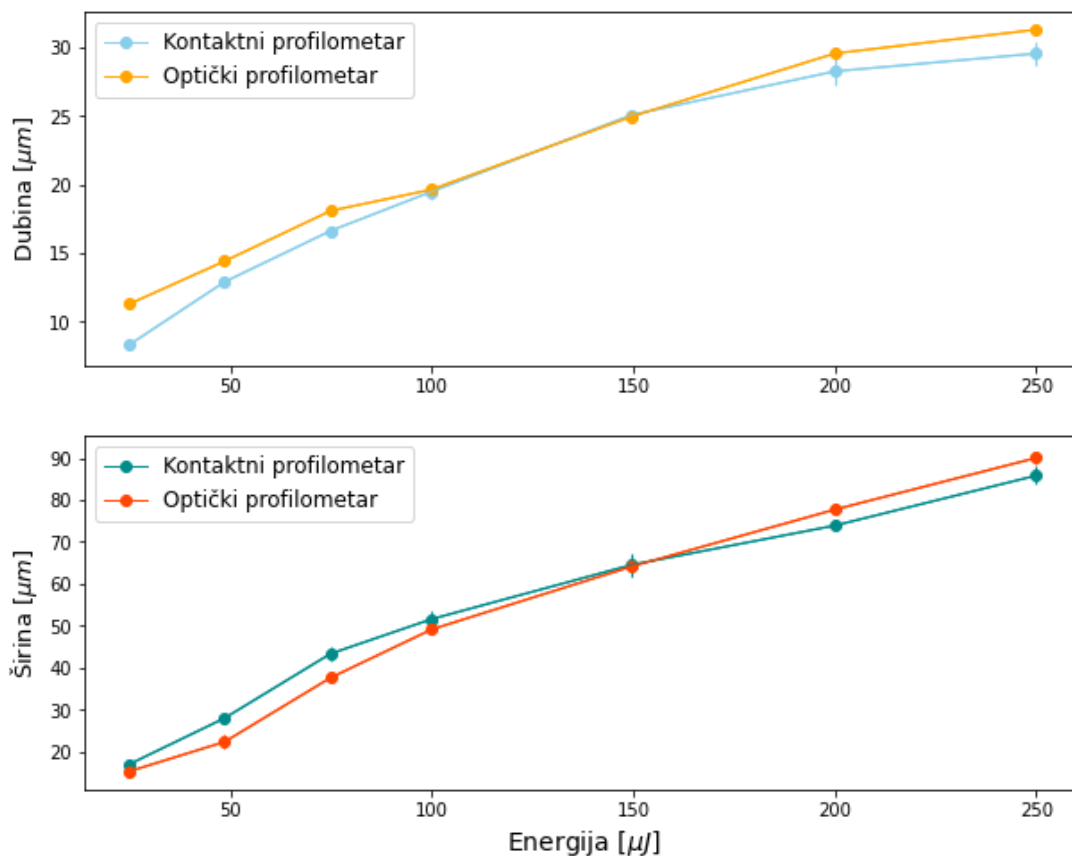
slikama 6.21 gdje su kanali slikani običnim mikroskopom i SEM-om.

Mjerali smo širinu i dubinu kanala optičkim i kontaktnim profilometrom. Izgled mjerenja optičkim profilometrom možemo vidjeti na lijevoj, a kontaktnim profilometrom na desnoj slici 6.22.



Slika 6.22: Lijevo: Primjer mjerenja kanala na staklu optičkim profilometrom. Kanal je napravljen energijom pulsa od $25 \mu J$ i frekvencijom lasera od $10 kHz$. Desno: Primjer mjerenja kanala na staklu kontaktnim profilometrom gdje vidimo sve proizvedene kanale.

Ovisnost dubine i širine kanala o energiji pulsa možemo vidjeti na slici 6.23. Možemo primijetiti dobro slaganje za mjerenja širine kanala s različitim profilometrima. Analizirali smo uvjete očitavanja maksimalne dubine kontaktnog profilometra (5.7, 5.8 i 5.9) te dobivamo uvjete daleko od mjerenih veličina, što smo i potvrdili poklapanjem s mjerenjima dubine optičkim profilometrom.

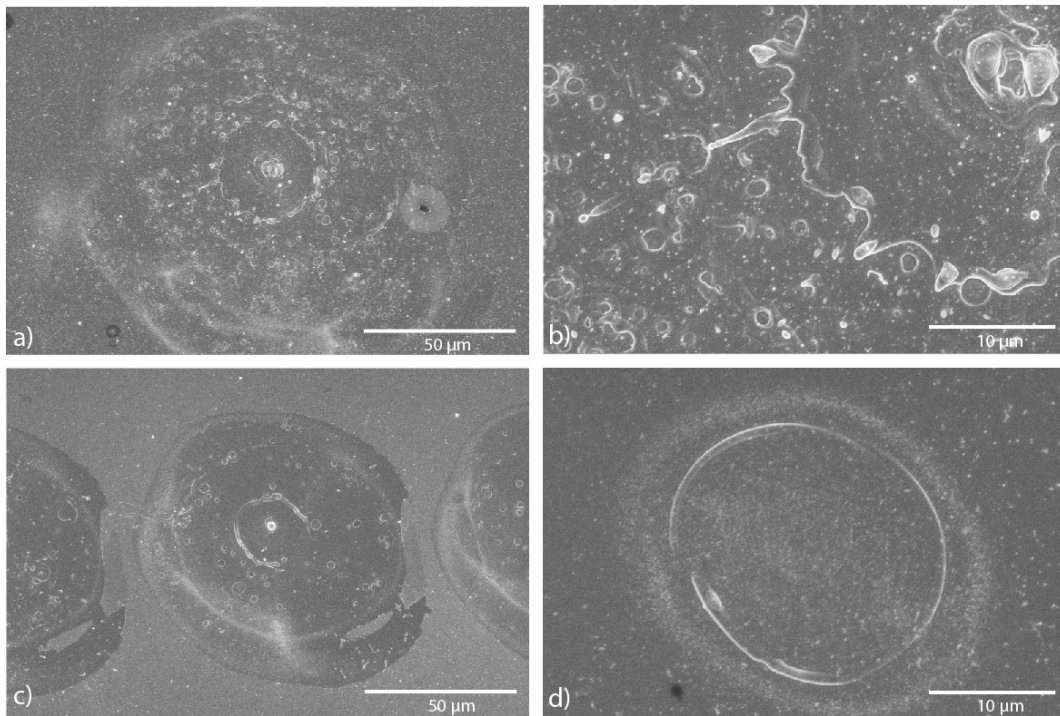


Slika 6.23: Ovisnost dubine i širine kanala na borosilikatnom staklu o energiji pulsa femtosekundnog lasera.

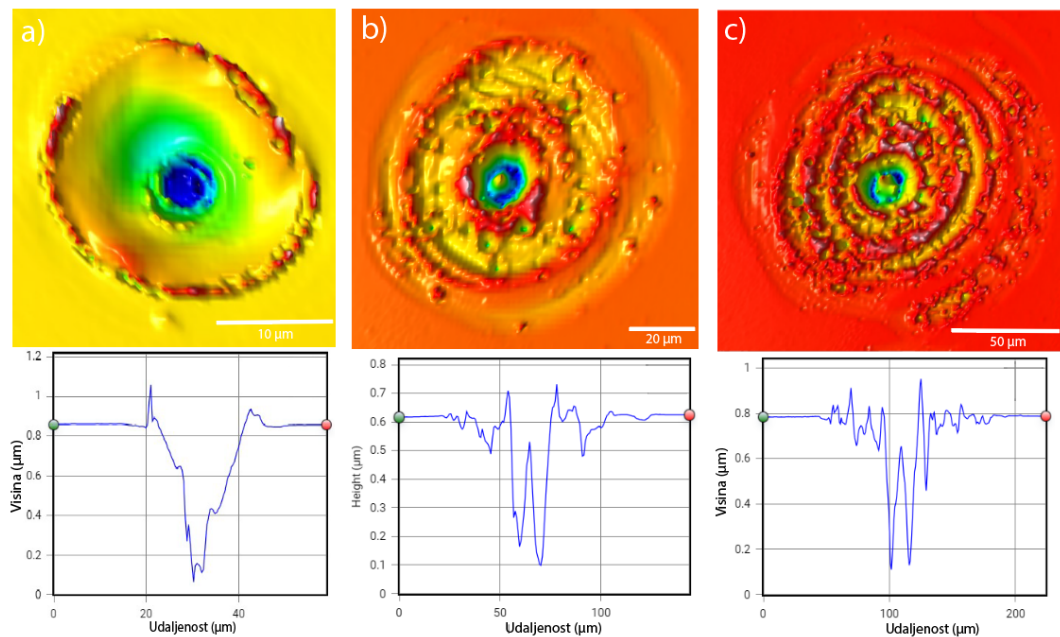
6.2.2 Podloge na siliciju

Počeli smo rad na komadima silicija praveći kratere na površini koristeći jedan puls femtosekundnog lasera kao i na borosilikatnom staklu. SEM slike dobivenih kratera pri različitim energijama pulsa možemo vidjeti na slici 6.24. Možemo zapaziti povećanje hrapavosti s porastom energije. Mjerenja napravljena optičkim profilometrom možemo vidjeti na slici 6.25. Na izmjerenim profilima vidimo šiljak u sredini kratera do kojeg dolazi zbog velike hrapavosti površine koju možemo detaljnije vidjeti na 6.24.b.

Očitavamo iznose ablatiranog volumena, promjera i dubine kratera u Profilm Online aplikaciji te dobivene ovisnosti možemo vidjeti na grafu 6.26. Kao i kod mjerenja kratera proizvedenih nanosekundnim laserom, nailazimo na probleme zbog hrapavosti koje vidimo kao šiljke zbog ograničene rezolucije profilometra. Ovisnosti volumena i promjera o energiji ponašaju se očekivano pri nižim energijama, dok pri višima vidimo veći rast zbog očekivanoga. Smatramo da je razlog rasta oblik zrake koji se, kao i

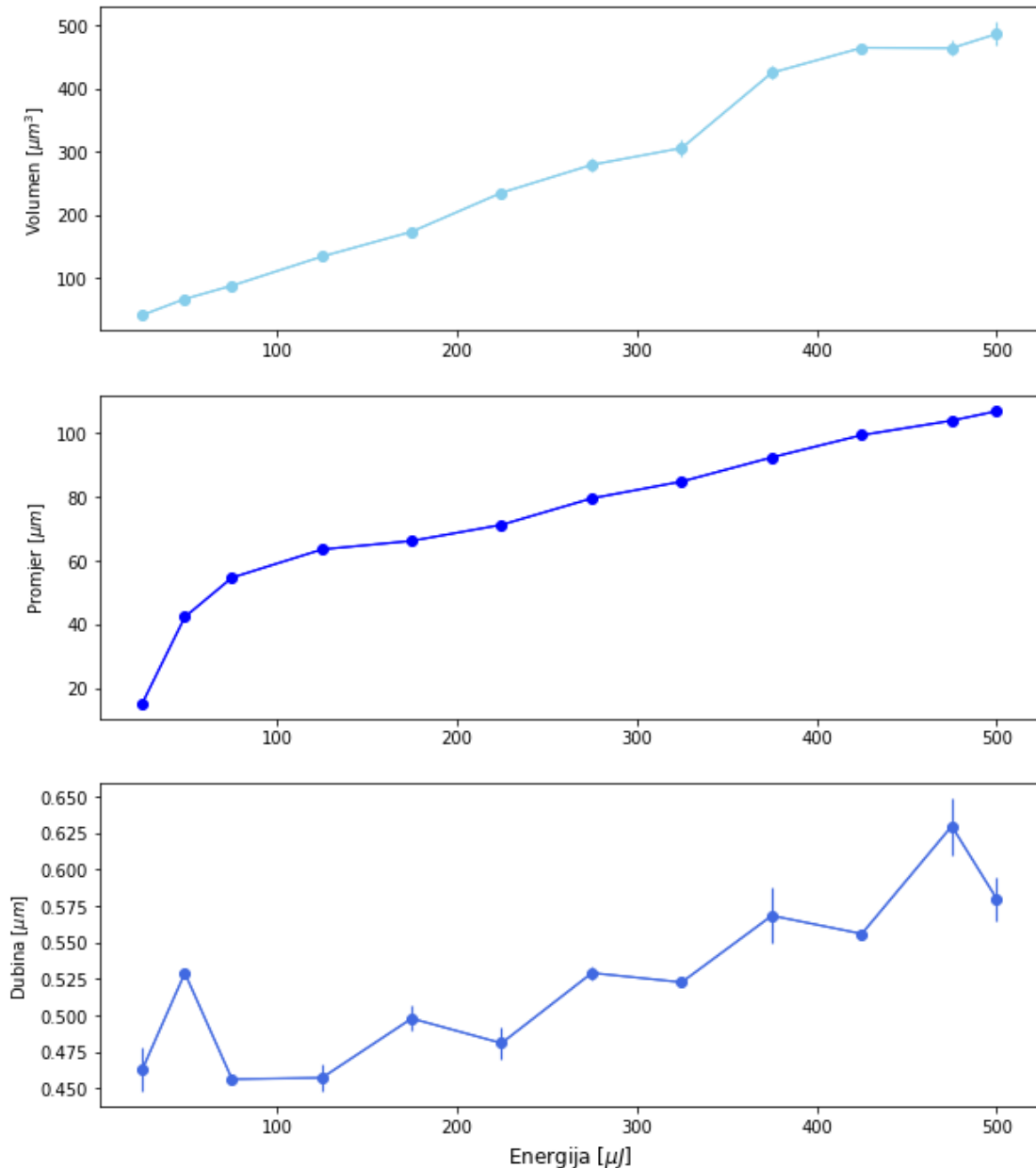


Slika 6.24: SEM slika kratera proizvedenih na siliciju s 1 pulsom femtosekundnim laserom. a-b) Krater proizveden s $475 \mu J$ energije pulsa s povećanjem a) 1200 puta b) 5000 puta. c) Krater proizveden s $225 \mu J$ energije s povećanjem 1200 puta. d) Krater proizveden s $25 \mu J$ energije s povećanjem 5000 puta.



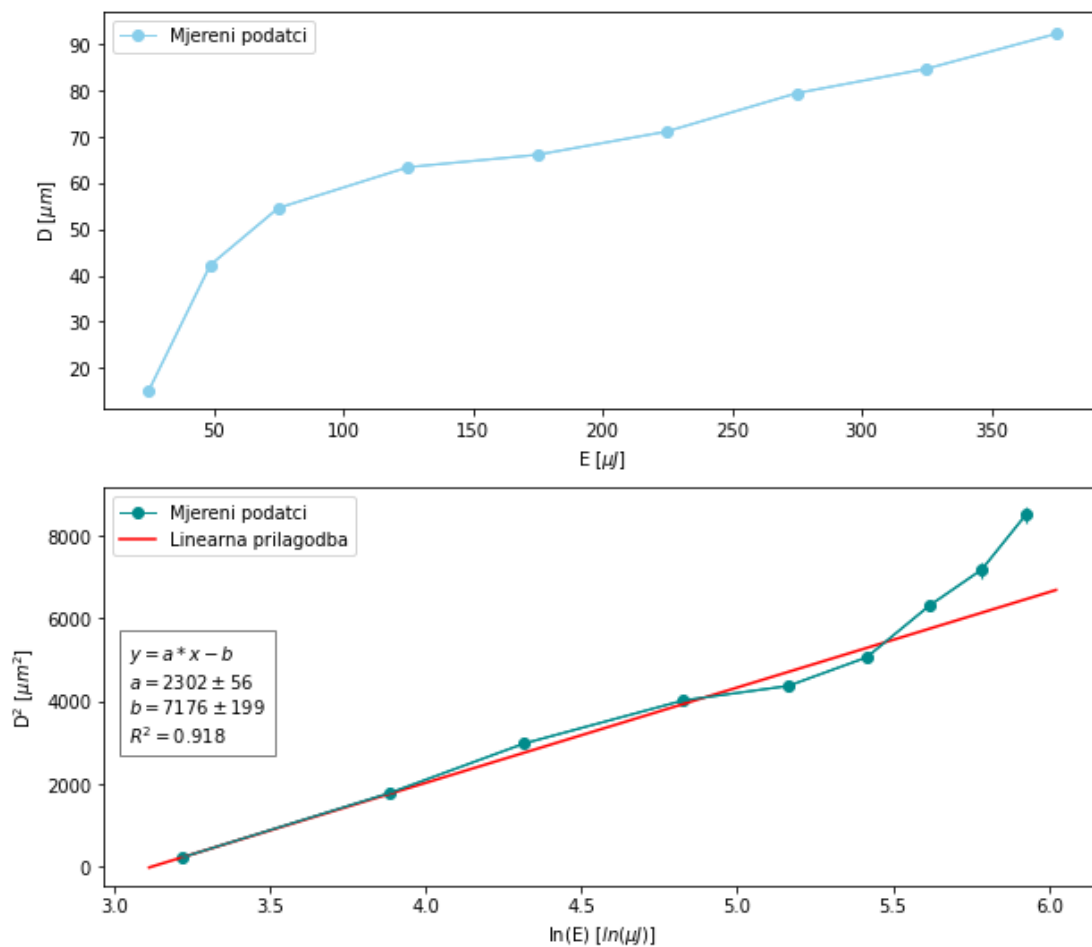
Slika 6.25: Prikaz kratera nastalih femtosekundnom ablacijom snimljenih optičkim profilometrom. a) Krater proizveden s $25 \mu J$ energije pulsa. b) Krater proizveden s $225 \mu J$ energije pulsa gdje vidimo veću hrapavost površine. c) Krater proizveden s $475 \mu J$ energije pulsa gdje vidimo difrakcijski uzorak i veću hrapavost u usporedbi s kraterima proizvedenim pulsevima nižih energija. Ispod svake slike kratera se nalazi odgovarajući profil.

kod stakla, mijenja s porastom energije. Ovisnost dubine dosta fluktuirá između 450 i 650 nm, no možemo primijetiti rast dubine s porastom energije. Šiljak koji dobivamo u sredini kratera zbog velike hrapavosti površine uvelike otežava određivanje najveće dubine. Nismo napravili mjerenje dubine jednog pulsa kontaktnim profilmetrom zbog male dubine i poteškoća u pronalaženju najdublje točke kratera.



Slika 6.26: Ovisnost ablatiranog volumena, promjera i dubine kratera o energiji pulsa femtosekundnog lasera na siliciju.

Koristimo D^2 metodu kako bi izračunali minimalnu ekspoziciju na siliciju. Koristili smo mjerene iznose promjera do 375 μJ energije pulsa jer za više energije vidimo veće difrakcijske dijelove zrake (što vidimo na slikama 6.24 i 6.25). Iz linearne pri-



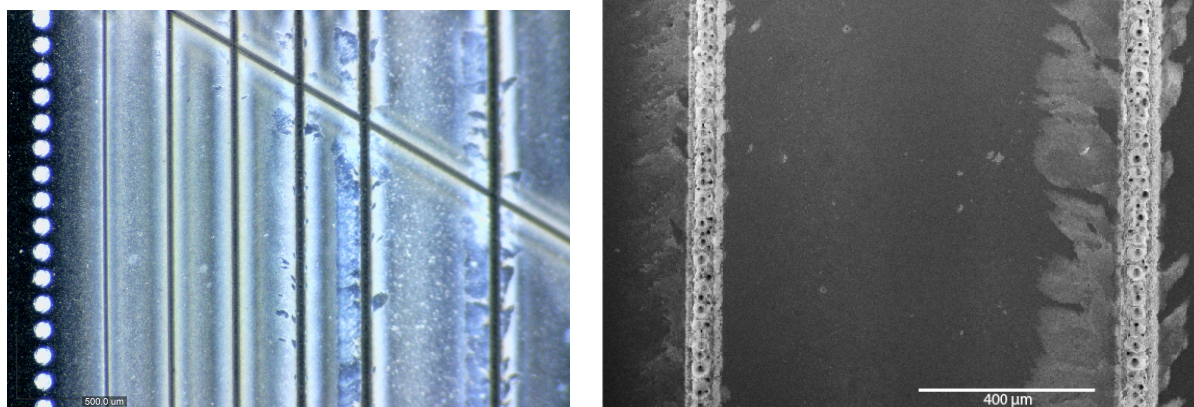
Slika 6.27: Mjereni podatci ovisnosti promjera kratera o energiji pulsa i D^2 metoda u kojoj koristimo linearnu prilagodbu.

lagodbe izračunamo minimalnu energije ablacije i promjer zrake na $1/e^2$ vrijednosti maksimuma iz kojih preko formule 3.6 dobivamo minimalnu ekspoziciju:

$$F_{th} = 1.3 \pm 0.2 \text{ J/cm}^2, R_{F_{th}} = 15.38\% \quad (6.7)$$

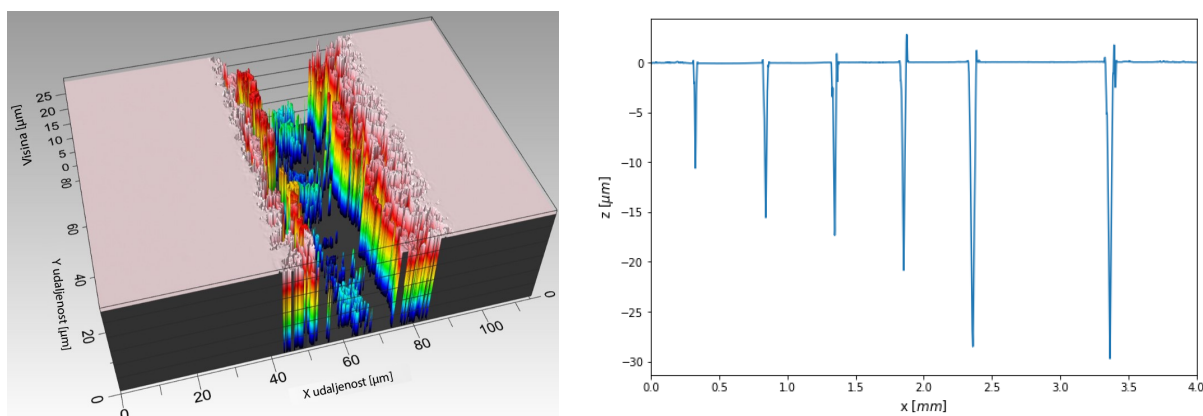
Kanale na siliciju radili smo s istim postavkama kao i za borosilikatno stakla. Pri većim snagama u blizini ablatiranih linija primijetili smo otkidanje gornjeg sloja materijala, što možemo detaljnije vidjeti na slikama 6.28 gdje su prikazana mjerenja SEM-om i mikroskopom. Odlučili stati pri $225 \mu\text{J}$ energije pulsa zbog značajnog oštećivanja površine. Na lijevoj slici 6.28 sa SEM-a možemo primijetiti veliku hrpavost na dnu kratera zbog koje smo očekivali probleme kod mjerenja s optičkim profilometrom.

Kanale proizvedene na siliciju prvo smo snimili optičkim profilometrom. Primjer jednog mjerenja možemo vidjeti na lijevoj slici 6.29. Ovom metodom izmjerili smo širine



Slika 6.28: U okruženju kanala proizvedenih na većim energijama (lijevo vidimo $125 \mu J$, $175 \mu J$ i $225 \mu J$, desno zadnja dva od tih kanala) na siliciju možemo vidjeti uklonjeni gornji sloj materijala. Lijevo slika je slikana mikroskopom, a desno SEM-om s povećanjem 150 puta. Lijevo je podloga prikazana prije čišćenja i evaporacije aluminija.

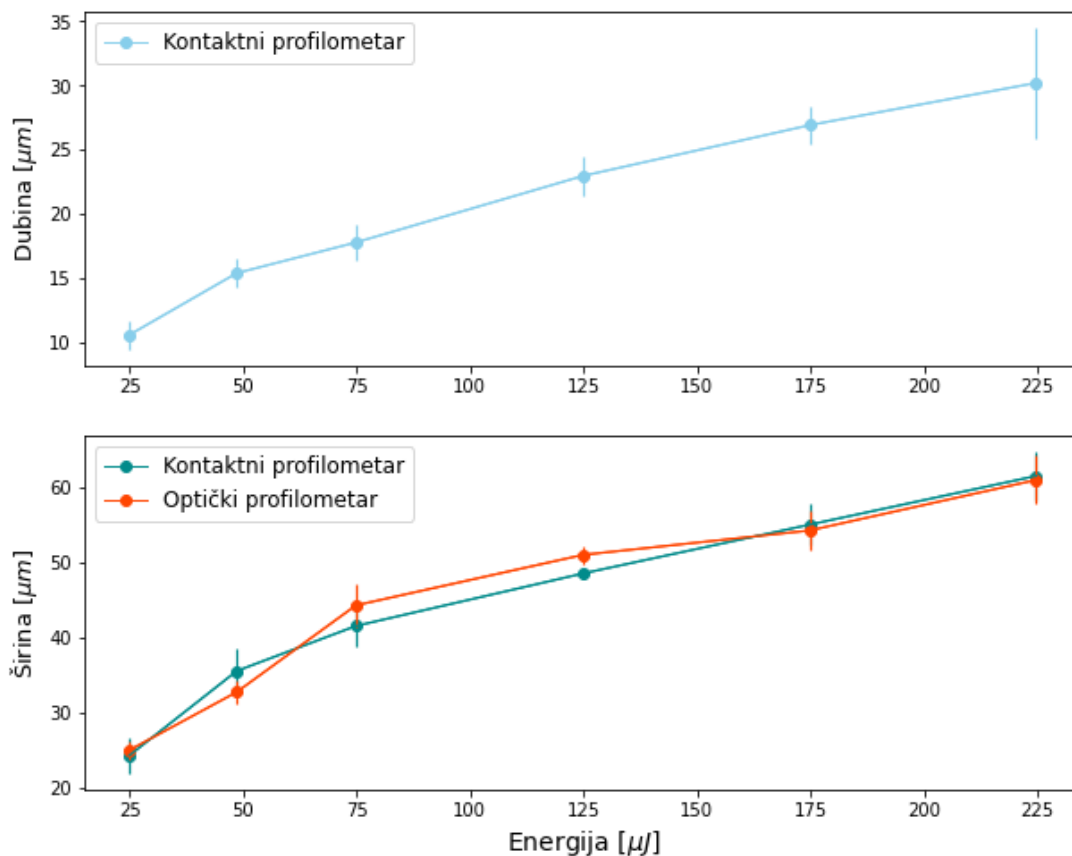
kanala, no nismo mogli vidjeti dno kanala tako da nismo mogli izmjeriti dubinu zbog ranije viđene hrapavosti.



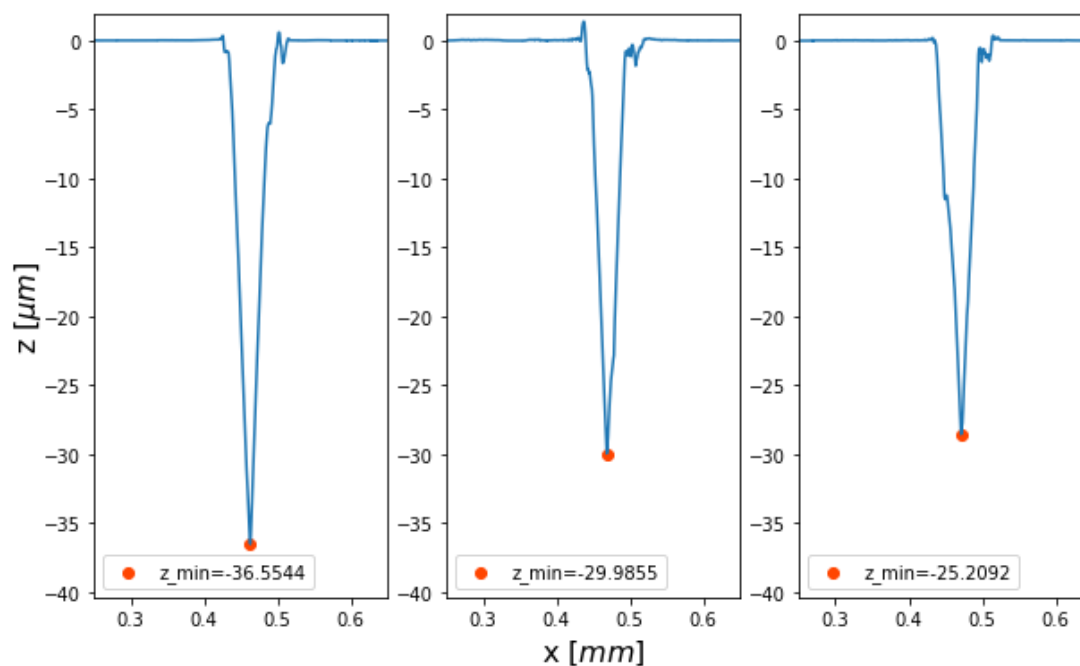
Slika 6.29: Lijevo: Primjer mjerenja kanala proizvedenog s femtosekundnim pulsevima energije $50 \mu J$ na siliciju optičkim profilometrom gdje ne vidimo dno kanala. Desno: Primjer mjerenja kanala na siliciju kontaktnim profilometrom.

Zbog ovoga smo odlučili odnijeti uzorke na kontaktni profilometar kojemu hrapavost površine ne predstavlja problem. Primjer mjerenja kontaktnim profilometrom možemo vidjeti na desnoj slici 6.29.

Rezultate mjerenja širine i dubine kanala s oba profilometra možemo vidjeti na grafu 6.30. Mjerenja širine kanala različitim profilometrima se dobro slažu. Pri mjerenjima kontaktnim profilometrom primijetili smo da dubina kanala proizvedenog s maksimalnom energijom pulsa ($225 \mu J$) dosta varira ovisno o dijelu kanala koji promatramo. Snimili smo profile tog kanala s lijeve na desnu stranu te su rezultati



Slika 6.30: Ovisnost dubine i širine kanala na siliciju o energiji pulsa femtosekundnog lasera.



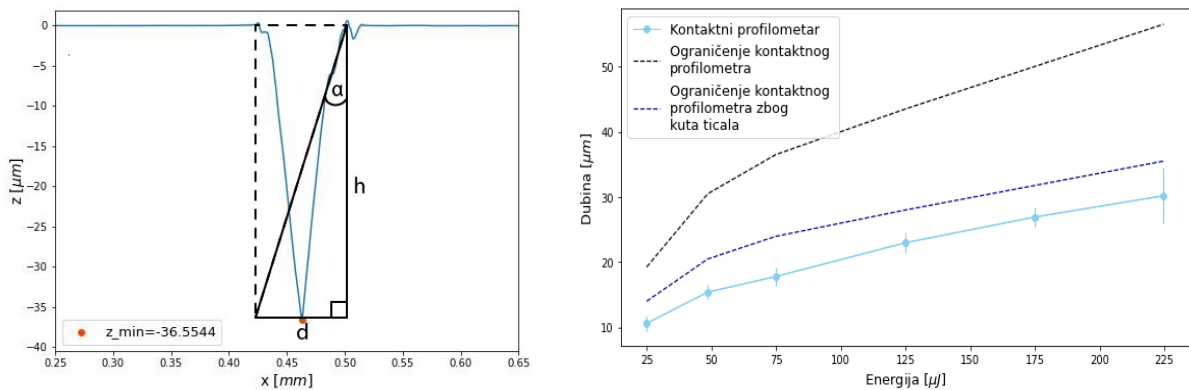
Slika 6.31: Mjerenja dubine kanala proizvedenog s $225 \mu J$ energije pulsa na siliciju kontaktnim profilometrom. Mjerenja su rađena s lijeva na desno.

mjerenja i pripadne maksimalne dubine prikazane na grafu 6.31.

Mogući uzroci različitih dubina su nagnutost postolja pri strukturiranju silicija femtosekundnim laserom ili nemogućnost kontaktnog profilometra da dođe do dna kanala. Koristeći jednačbe 5.7 i 5.8 izračunali smo maksimalnu visinu koju možemo dobiti kontaktnim profilometrom. Postoji i uvjet zadan jednačbom 5.9 koji nam govori da je maksimalna strmost kanala koju možemo vidjeti 60° . Koristeći taj kut možemo vidjeti s lijeve slike 6.32 da vrijedi jednačba za maksimalnu dubinu h :

$$h_{max} = d/\tan(\alpha) \quad (6.8)$$

gdje je d širina kanala. Dodali smo oba izračunata uvjeta na graf ovisnosti dubine o energiji pulsa što možemo vidjeti na desnoj slici 6.32. Možemo zaključiti da nemamo problema s prvim uvjetom jer su izračunate dubine značajno veće (na staklu dobivamo ovakvu ovisnost za oba uvjeta). Ograničenje zbog kuta ticala je znatno bliže mjerenim vrijednostima. U budućnosti uzorci se trebaju napraviti s više prolaza istom linijom i s malim energijama pulsa. Isti maksimumi i problemi s nejednakošću duž kanala bili bi jasna naznaka da je za mjerenja dubine kanala na siliciju potrebno koristiti ticalo drugačijeg središnjeg kuta ili potpuno drugu metodu.



Slika 6.32: Lijevo: Prikaz trokuta s pomoću kojeg smo računali ograničenje za uvjet 5.9. Desno: Mjereni iznosi dubine kanala na siliciju kontaktnim profilometrom i ograničenje maksimalne dubine kontaktnog profilometra iz jednačbi 5.8 i 5.9.

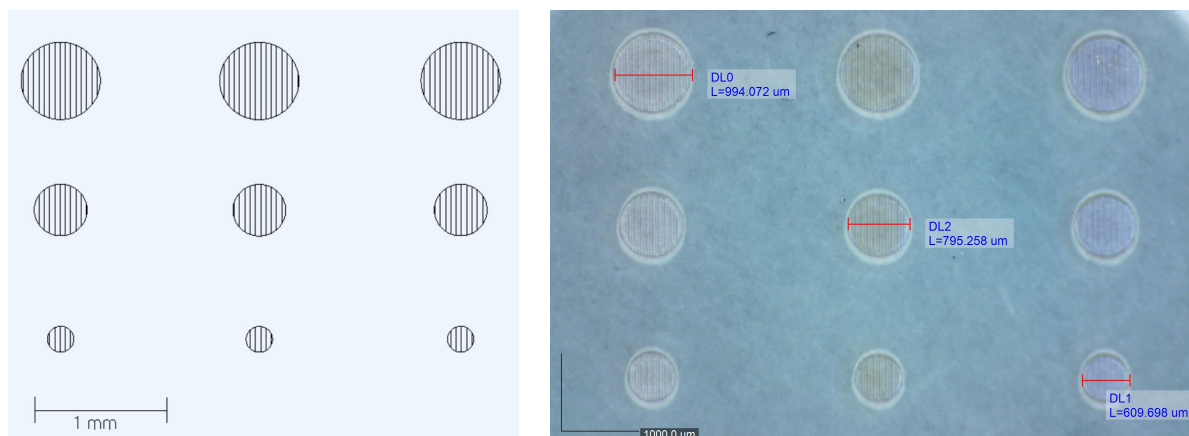
Femtosekundna ablacija se pokazala kao puno efikasnija metoda za strukturiranje površine materijala od nanosekundne ablacije. Minimalna širina linije koju smo postigli je oko $15 \mu m$, što još uvijek nije ispod $10 \mu m$, no znatno je bolje od širina dobivenih nanosekundnim laserom. Minimalna energija pulsa s kojom smo proizveli kanal

je 25 mJ što je minimalna energija samog lasera (uračunavajući gubitak 2/3 energije na vođenje snopa). U budućnosti planiramo postavu dodati optički element koji će dodatno atenuirati zraku kako bi smanjili energiju pulsa i došli bliže pragu ablacije, čime smanjujemo i širinu linije. Potrebno je provjeriti nagib postolja koji se u mjerenjima pokazao kao potencijalni problem (slika 6.31). Za strukturiranje koristili smo objektiv s povećanjem od 5 puta, no na raspolaganju su nam i objektivni s povećanjima 10 i 50 puta koje planiramo koristiti u budućnosti. Ovi objektivni će dodatno smanjiti snop, no za njihovo korištenje trebamo imati potpuno ravan postav kako ne bi ispali iz fokusa malim pomacima postolja. U budućnosti planiramo koristiti femtosekundnu lasersku ablaciju kao glavnu tehniku za proizvodnju mikro-topografskih naznaka za istraživanje aksonalnog vođenje.

6.3 Galvanotropske naznake

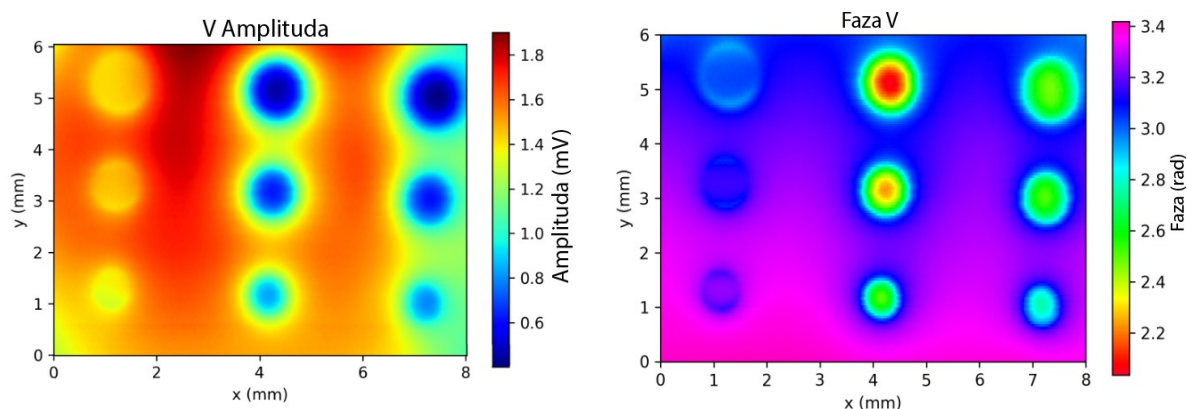
6.3.1 Uzorci proizvedeni nanosekundnim laserom i Newport pomičnim postoljem

Koristeći nanosekundni laser također je moguće strukturirati OEPC uređaje opisane ranije. Uklanjanjem p-n dvosloja stvaramo inverzne fotokondenzatore koje možemo koristiti za stvaranje galvanotropskih naznaka. Testirali smo različite snage lasera, te se od 6 % postavke atenuatora nadalje jasno vidi uklanjanje materijala. Linije su vrlo tanke tako da smo razmak za ispunjavajuće linije postavili na 40 μm . Napravili smo testni uzorak kvadrata s energijom laserskog pulsa od 7 % do 15 % te smo izmjerili tranzijentni potencijal gdje se pokazalo da s 15 % snage lasera postizemo najjače električno polje. Nakon toga smo napravili i uzorke s većim postavkama atenuatora, od 15 % do 24 %, no i dalje se 15 % činilo optimalnim. Kako bih pronašli optimalnu postavku atenuatora, napravili smo dizajn uzorka kružnica različitih dimenzija s vertikalnom ispunom u LMS programu koji možemo vidjeti na lijevoj slici 6.33. Potom smo napravili uzorak s 14, 15 i 16 % postavke atenuatora koji možemo vidjeti na desnoj slici 6.33. Možemo primijetiti da su uzorci s 14 % tamniji od onih napravljenih s 15 i 16%. Smatramo da je ovo rubna snaga pri kojoj uklonimo p-n dvosloj te samo zagrebemo površinski sloj ITO-a. Mjerenu amplitudu i fazu električnog potencijala možemo vidjeti na slici 6.34, a izračunatu amplitudu i fazu električnog polja možemo vidjeti na slici 6.35. Amplituda električnog polja je najveća za dio uzorka

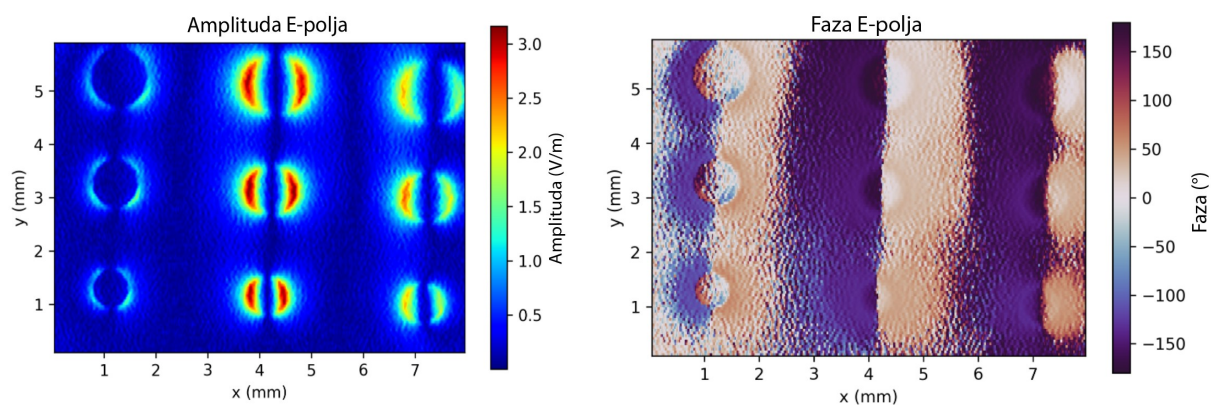


Slika 6.33: Lijevo: Dizajn uzorka za strukturiranje OEPC-a iz LMS programa. Desno: Proizvedeni uzorak na OEPC-u gdje su stupci proizvedeni s 16%, 14% i 15% postavkom atenuatora i možemo jasno vidjeti razlike u bojama donjeg sloja.

strukturiran s 14 % postavkom atenuatora i iznosi $3 V/m$ što je po literaturi dovoljno za usmjeravanje rasta aksona [17].

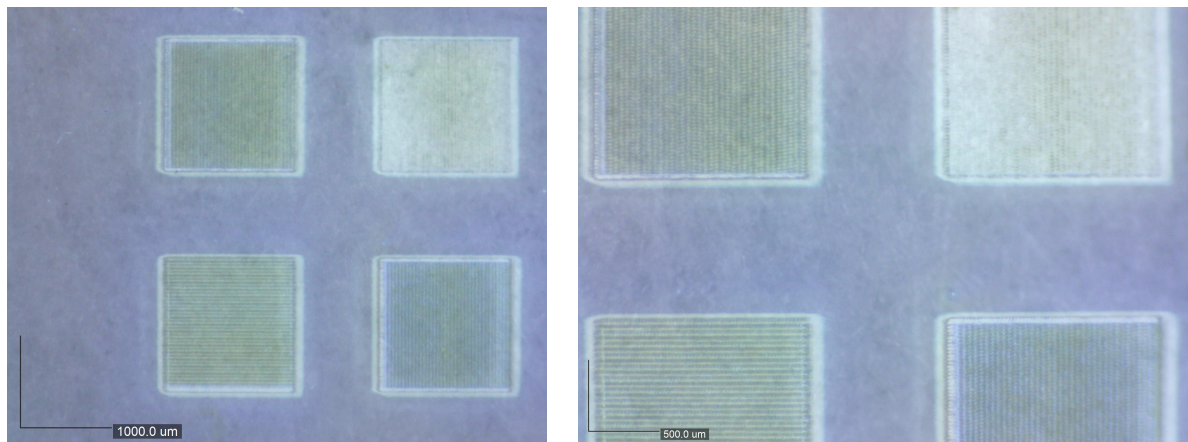


Slika 6.34: Lijevo vidimo izmjerenu amplitudu, a desno izmjerenu fazu električnog potencijala za uzorak s 9 krugova napravljen s 16 %, 14 % i 15 % postavkom atenuatora.



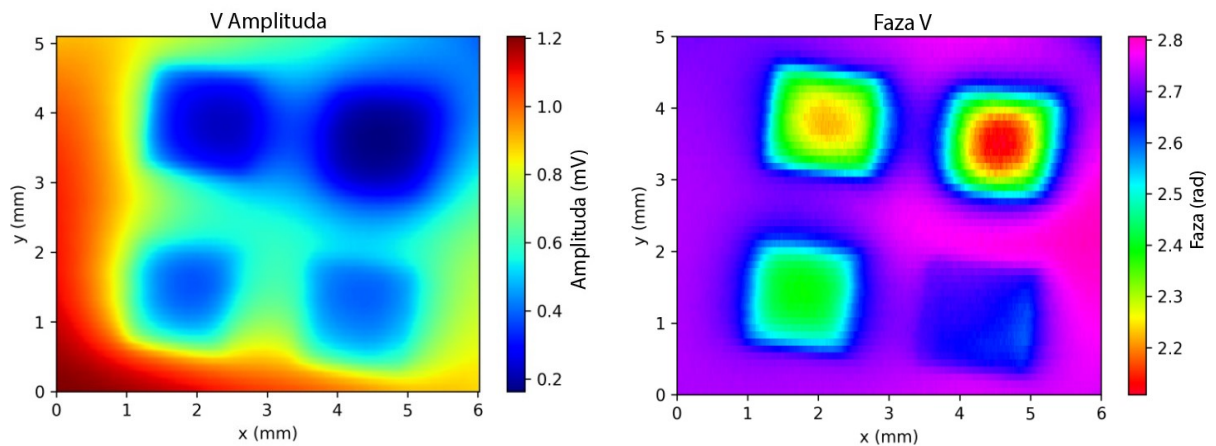
Slika 6.35: Lijevo vidimo izračunatu amplitudu, a desno izračunatu fazu električnog polja u x smjeru za uzorak s 9 krugova s 16 %, 14 % i 15 % postavkom atenuatora.

Potom smo napravili uzorke s 13, 14 i 15 % postavkom atenuatora kako bih potvrdili da je 14 % optimalna energija laserskog pulsa. Za ovaj uzorak koristili smo OEPC iz druge serije proizvodnje zbog čega možemo primijetiti promjenu u boji fotokondenzatora. Također smo varirali smjer ispunjavanja jer zbog eliptičnog oblika zrake horizontalno i vertikalno ispunjavanje daju različite rezultate. Mjerenja su nam pokazala da postizemo veće električno polje većom hrapavošću zbog čega smo odlučili testirati horizontalnu orijentaciju u kojoj ne dobijemo spojene linije, nego možemo vidjeti pojedinačne pulseve što pridonosi hrapavosti površine. Proizvedeni uzorak možemo vidjeti na slici 6.36.

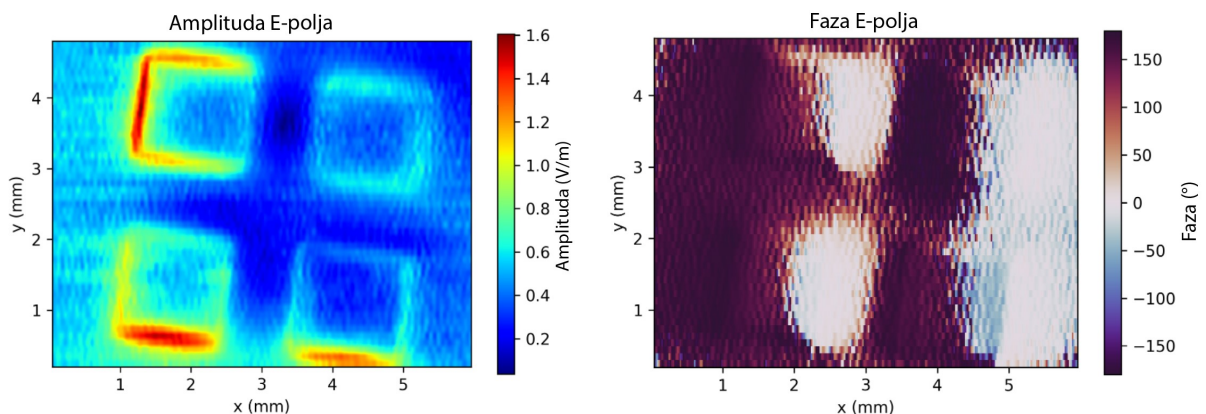


Slika 6.36: Lijevo: Proizvedena podloga s 4 kvadrata, gdje su u prvom stupcu kvadrati napravljeni s 14 % postavkom atenuatora, gornji s horizontalnom, a donji s vertikalnom ispunom. U drugom stupcu je gornji kvadrat napravljen s 13 %, a donji s 15 % postavkom atenuatora. Uzorak je zarotiran za 90° u odnosu na kako je bio postavljen pri proizvodnji zbog čega su horizontalna i vertikalna ispuna zamijenjene. Desno: Uvećani prikaz slike lijevo gdje bolje vidimo razliku između vertikalne i horizontalne ispune.

Uzorak je na slici 6.36 zarotiran za 90° u odnosu kako je proizveden. Mjereni električni potencijal i izračunato električno polje možemo vidjeti na slikama 6.37 i 6.38. Možemo primijetiti da uzorak s proizveden s 14 % i dalje pokazuje najjače električno polje te da horizontalnom orijentacijom ispune dobivamo veće električno polje što potvrđuje pretpostavku o doprinosu hrapavosti. Maksimalni iznos amplitude električnog polja za ovaj uzorak je bio 1.6 V/m . S ovim uzorkom smo imali problema s degradacijom uzorka, tj. amplituda potencijala se značajno smanjivala tijekom mjerenja.



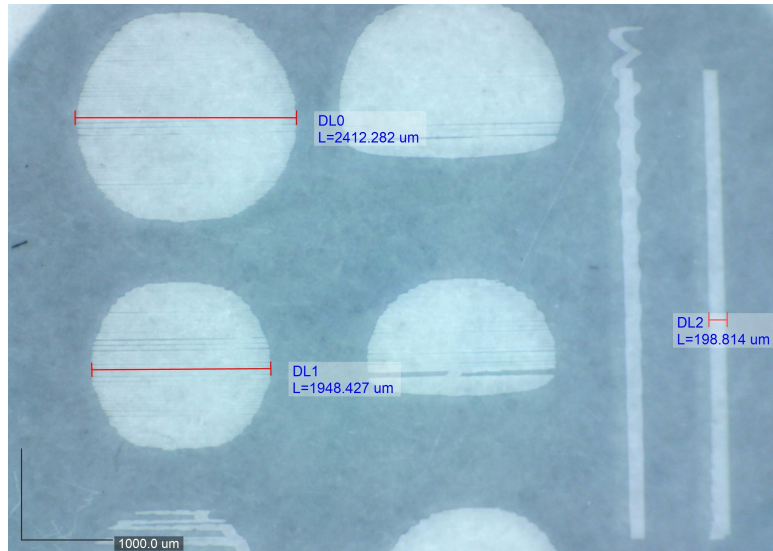
Slika 6.37: Lijevo vidimo izmjerenu amplitudu, a desno izmjerenu fazu električnog potencijala za uzorak s 4 kvadrata s 13 %, 14 % i 15 % postavkom atenuatora.



Slika 6.38: Lijevo vidimo izračunatu amplitudu, a desno izračunatu fazu električnog polja za uzorak s 4 kvadrata s 13 %, 14 % i 15 % postavkom atenuatora.

6.3.2 Uzorci proizvedeni kontinuiranim laserom i robotskom rukom

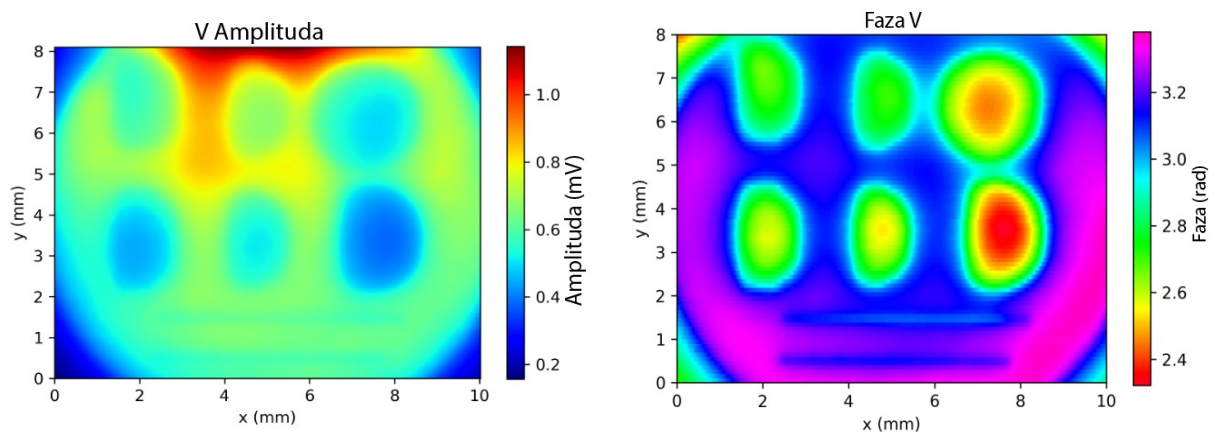
Uzorke na p-n dvosloju odlučili smo napraviti i koristeći robotske ruku na koju je pričvršćen kontinuirani diodni laser. Rad s robotskom rukom i kontinuiranim laserom omogućuje bržu proizvodnju koristeći slabiji laser s manje sigurnosnih rizika. Primjer uzoraka proizvedenih kontinuiranim laserom vidimo na slici 6.39. Na slici možemo primijetiti da proizvedeni krugovi nisu savršeni, već da imaju blago spljošteni gornji i donji dio. Ovaj problem asimetričnosti u radu motora robotske ruke nismo uspjeli riješiti, no ne bi trebao utjecati na rezultate. Razmak među linijama ispune je bio $10 \mu m$. Na ovom uzorku varirali smo brzine prolaska koje su po redovima krugova počevši od najvišeg bile 600 mm/min , 500 mm/min i 400 mm/min te je drugi stupac napravljen s 2 prolaska. Linije koje se nalaze pored krugova su napravljene s brzinom od 400 mm/min i 5 i 10 prolazaka.



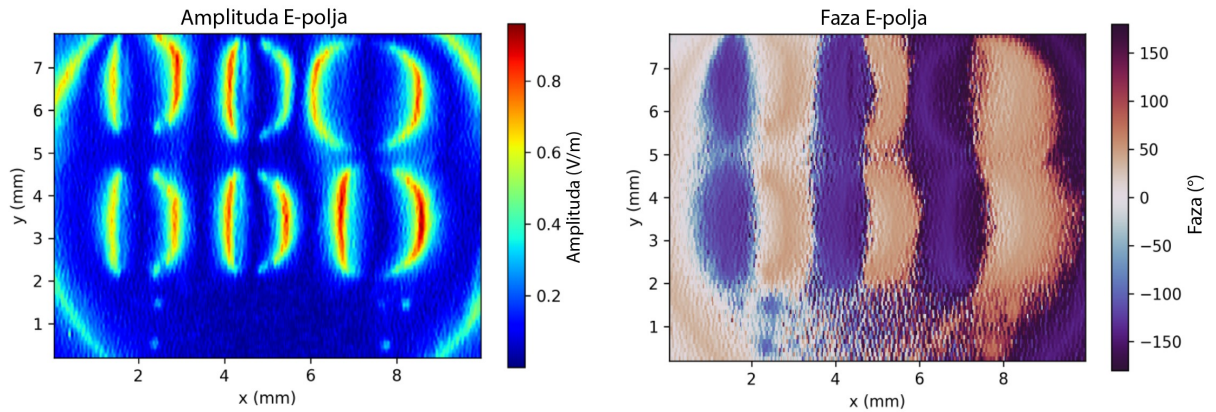
Slika 6.39: Uzorak napravljen kontinuiranim laserom koristeći različite brzine robotske ruke i brojeva prijelaza.

Na OEPC smo prije mjerenja rotacijskim nanošenjem nanijeli i unakrsno povezali tanak sloj PEDOT:PSS kako bih smanjili degradaciju uzorka. Izmjereni tranzijentni električni potencijal možemo vidjeti na slici 6.40. Izračunato električno polje je prikazano na slici 6.41. Maksimalna postignuta amplituda električnog polja iznosi oko 0.9 V/m . Uzorak smo okrenuli za 90° prilikom V_T skeniranja u odnosu na sliku 6.39.

Možemo primijetiti da ne postoje značajne razlike između krugova napravljenih s različitim brzinama i brojevima prolaska. Smatramo da je razlog tomu je što se pri prvom prolasku ukloni čitav p-n dvosloj, a laser nema dovoljno snage da uzrokuje ablaciju na ITO-u. Pokušali smo strukturirati ITO bez p-n dvosloja koristeći robotsku ruku i kontinuirani laser, no to nije bilo moguće koristeći navedeni kontinuirani laser.



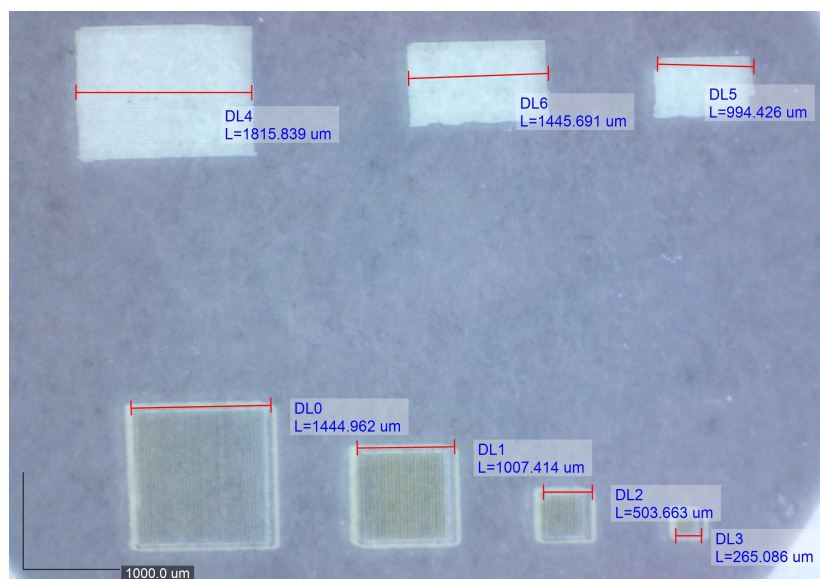
Slika 6.40: Lijevo vidimo izmjerenu amplitudu, a desno izmjerenu fazu električnog potencijala za uzorak krugova i linija proizveden kontinuiranim laserom i robotskom rukom.



Slika 6.41: Lijevo vidimo izračunatu amplitudu, a desno izračunatu fazu električnog polja u x smjeru za uzorak krugova i linija proizveden kontinuiranim laserom i robotskom rukom.

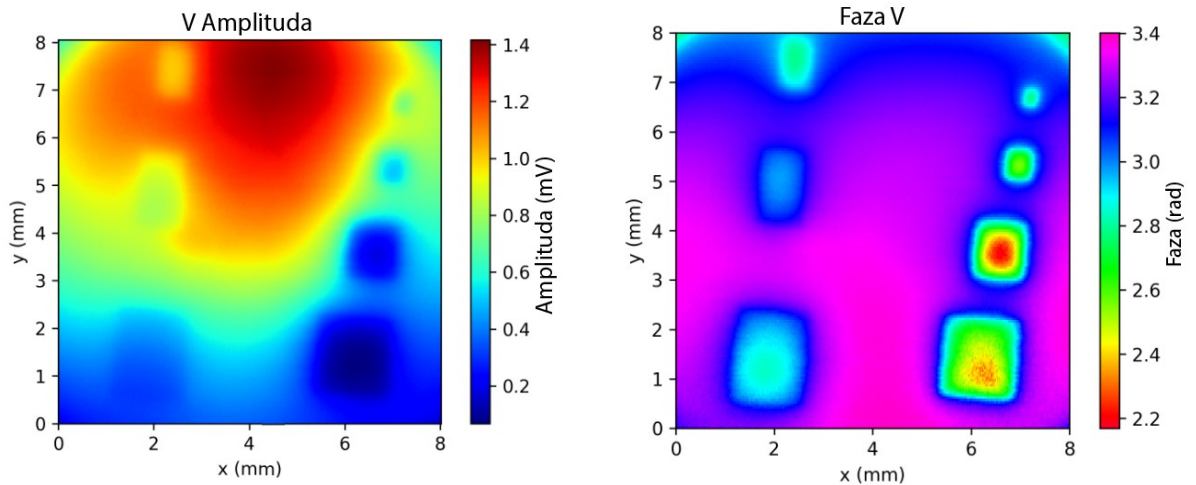
6.3.3 Usporedba uzoraka proizvedenim kontinuiranim i pulsним laserom

Htjeli smo usporediti električno polje koje možemo dobiti s kontinuiranim i pulsним laserom strukturirajući isti fotokondenzator. Napravili smo uzorak kvadrata smanjujućih dimenzija koji možemo vidjeti na slici 6.42 na uzorcima iz druge serije proizvodnje OEPC-ova. Jasno vidimo razliku u bojama graviranog područja. Uzorak proizveden nanosekundnim laserom napravljen je s 14 % postavke atenuatora i horizontalnim ispunjenjem. Uzorak proizveden kontinuiranim laserom napravljen je s brzinom $400 \text{ mm}/\text{min}$ te i dalje možemo vidjeti asimetričnost u radu motora zbog koje dobivamo pravokutnike umjesto kvadrata.

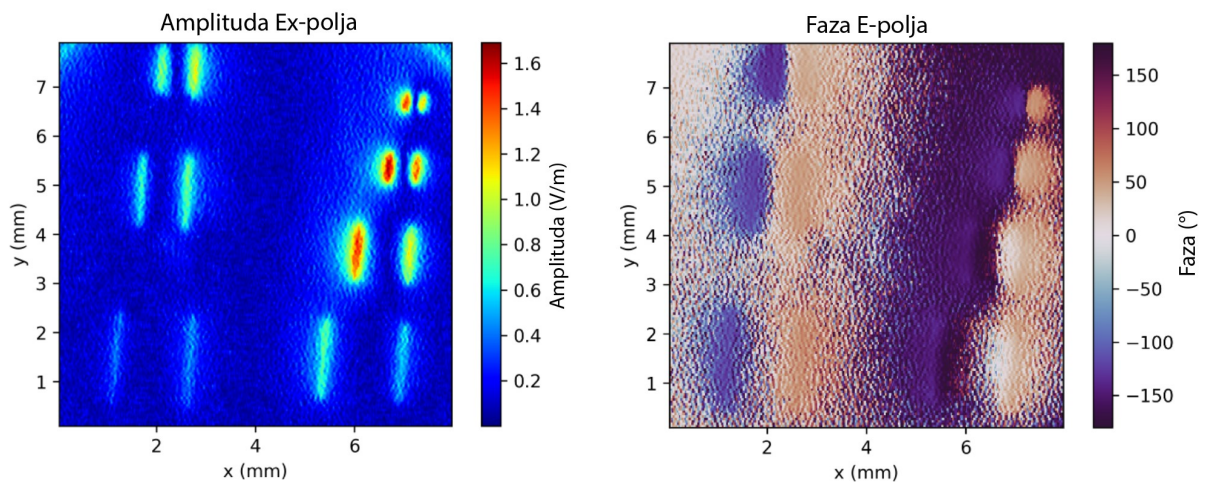


Slika 6.42: Uzorak napravljen kontinuiranim (gornji red) i nanosekundnim (donji red) laserom.

Izmjereni električni potencijal i izračunato električno polje možemo vidjeti na slikama 6.43 i 6.44. Strukturirani OEPC nismo prekrili PEDOT:PSS-om zbog čega možemo vidjeti opadanje iznosa amplitude električnog potencijala na lijevoj slici 6.43. Uzorci su na slici 6.42 okrenuti za 90° u odnosu na orijentaciju uzorka na V_T snimanju. Kvadrati proizvedeni nanosekundnim laserom i pomičnim postoljem postižu veće amplitude električnog polja (oko 1.6 V/m), no čak i s jednostavnom postavom kao što je kontinuirani laser na robotskoj ruci možemo dobiti usporedive rezultate (oko 0.8 V/m).



Slika 6.43: Lijevo vidimo izmjerenu amplitudu, a desno izmjerenu fazu električnog potencijala za uzorak kvadrata i pravokutnika proizveden kontinuiranim i nanosekundnim laserom.



Slika 6.44: Lijevo vidimo izračunatu amplitudu, a desno izračunatu fazu električnog polja u x smjeru za uzorak kvadrata i pravokutnika proizveden kontinuiranim i nanosekundnim laserom.

Za izradu uzoraka koristili smo uzorke iz dvije različite serije proizvodnje OEPC-ova te smo primijetili niže ukupne iznose električnog polja i brže raspadanje uzoraka iz

druge serije tijekom snimanja V_T -a. Za buduća mjerenja bi bilo potrebno svaki proizvedeni inverzni fotokondenzator prekriti slojem PEDOT:PSS-a koji se pokazao vrlo efektivnim u usporavanju degradacije.

Potrebno je napomenuti kako smo isključivo radili na p-n dvosloju na ITO-u. OEPC uređaji kao stražnju elektrodu također mogu koristiti sloj zlata i kroma (Cr/Au) što nismo testirali. Pretpostavljamo da bi koristeći nanosekundni laser oštetili zlatni sloj zbog vrlo niskog praga ablacije zlata (oko 3 puta niže od ITO-a).

Lasersko strukturiranje organskih elektrolitskih fotokondenzatora je brza i jednostavna metoda proizvodnje inverznih fotokondenzatora. Proizvedeni optoelektronički elementi mogu proizvesti električna polja amplituda reda veličine $1 V/m$. Nanosekundnim laserom postizemo veće amplitude električnog polja u usporedbi s kontinuiranim laserom zbog toga što strukturiramo i sloj ITO-a što ne možemo napraviti s kontinuiranim laserom zbog njegove niže snage. Oba lasera se mogu u budućnosti upotrebljavati za strukturiranje OEPC-ova, ovisno o potrebnim iznosima električnog polja. Planiramo isprobati obradu OEPC-ova s Cr/Au stražnjom elektrodom kontinuiranim laserom koji zbog manje snage ima manju vjerojatnost da ošteti zlatni sloj.

7 Zaključak

U ovom diplomskom radu koristili smo tehniku laserske mikroobrade za strukturiranje različitih materijala kako bih napravili supstrate koji će se koristiti za istraživanja aksonalnog vođenja.

Upoznali smo se s tri vrste naznaka za aksonalno vođenje, kemijske, topografske i galvanotropske, objasnili mehanizme vođenja i naveli primjere podloga koje su dovele do uspješnog usmjeravanja i poboljšavanja rasta aksona. Kao tehniku za mikrostrukturiranje materijala odabrali smo lasersku ablaciju. Detaljno smo objasnili mehanizme nanosekundne i femtosekundne ablacije.

Osposobili smo eksperimentalni postav za lasersku ablaciju nanosekundnim laserom koristeći pomično postolje, signal generator i mikrokontroler. Koristeći ovaj postav, proizveli smo uzorke kratera i linija na komadima borosilikatnog stakla i silicija. Dobile struktuirane uzorke smo analizirali i karakterizirali optičkim profilometrom i skenirajućim elektronskim mikroskopom.

Iste materijale smo strukturirali i femtosekundnim laserom te karakterizirali optičkim profilometrom, kontaktnim profilometrom i skenirajućim elektronskim mikroskopom. Femtosekundnim laserom dobivamo bolje definirane, dublje kratere/linije s manje vidljivom zonom utjecaja topline zbog čega je femtosekundna laserska ablacija bolja za precizno strukturiranje materijala u odnosu na nanosekundnu ablaciju.

Galvanotropske naznake konstruirali smo obrađujući organske elektrolitske fotokondenzatore nanosekundnim i kontinuiranim laserom. Time dobivamo inverzne fotokondenzatore koje karakteriziramo mjerenjem tranzijentnog električnog potencijala. Iz potencijala računamo električno polje čiji iznos je po literaturi [17] dovoljno velik za aksonalno usmjeravanje.

Kroz ovaj rad napravili smo početne korake za konstrukciju podloga za topografsko i galvanotropsko aksonalno vođenje. Tehnika laserske mikroobrade nudi mogućnost lake i brze prilagodbe dizajna i proizvodnje strukturiranih supstrata na materijalima različitih svojstava. U budućnosti je potrebno integrirati topografske i galvanotropске naznake te testirati rast neurona *in vitro* na strukturiranim podlogama kako bi vidjeli njihovu efikasnost u utjecanju na aksonalni rast.

Literatura

- [1] Tang, J. et al. Bridging biological and artificial neural networks with emerging neuromorphic devices: fundamentals, progress, and challenges. // *Advanced Materials*. Vol. 31, 49(2019), str. 1902761.
- [2] Davidovits, P. *Physics in biology and medicine*. 3rd ed. London: Elsevier/Academic Press, 2008.
- [3] What are the parts of the nervous system?, (01.10.2018.), National Institutes of health, <https://www.nichd.nih.gov/health/topics/neuro/conditioninfo/parts>, 15.05.2024.
- [4] Jackson, M. B. *Molecular and cellular biophysics*. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2006.
- [5] Franze, K.; Guck, J. The biophysics of neuronal growth. // *Reports on Progress in Physics*. Vol. 73, (2010), str. 94601
- [6] Kolodkin, A. L.; Tessier-Lavigne, M. Mechanisms and molecules of neuronal wiring: a primer. // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. Vol. 3, 6(2011), str. a001727.
- [7] Teixeira-Castro, A. et al. Learning the Biochemical Basis of Axonal Guidance: Using *Caenorhabditis elegans* as a Model. // *Biomedicines*. Vol. 11, 6(2023), str. 1731.
- [8] Liu, F. et al. The influence of the surface topographical cues of biomaterials on nerve cells in peripheral nerve regeneration: a review. // *Stem cells international*. Vol. 2021, 1(2021), str. 8124444.
- [9] Leclech, C.; Villard, C. Cellular and subcellular contact guidance on microfabricated substrates. // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. Vol. 8, (2020), str. 551505.
- [10] Patel, M.; Ahn, S.; Koh, W. G. Topographical pattern for neuronal tissue engineering. // *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. Vol. 114, (2022), str. 19-32.

- [11] Ermis, M.; Antmen, E.; Hasirci, V. Micro and Nanofabrication methods to control cell-substrate interactions and cell behavior: A review from the tissue engineering perspective. // *Bioactive materials*. Vol. 3, 3(2018), str. 355-369.
- [12] Jing, X. et al. Two-photon polymerization for 3D biomedical scaffolds: Overview and updates. // *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. Vol. 10, (2022), str. 994355.
- [13] Duncan, A. C. et al. Laser microfabricated model surfaces for controlled cell growth. // *Biosensors and Bioelectronics*. Vol. 17, 5(2002), str. 413-426.
- [14] Li, Wei et al. Large-scale topographical screen for investigation of physical neural-guidance cues. // *Scientific reports*. Vol. 5, 1(2015), str. 8644.
- [15] Leigh, B. L. et al. Tuning surface and topographical features to investigate competitive guidance of spiral ganglion neurons. // *ACS applied materials & interfaces*. Vol. 9, 37(2017), str. 31488-31496.
- [16] McCaig, C. D. et al. Controlling cell behavior electrically: current views and future potential. // *Physiological reviews*. Vol. 85, (2005), str. 943–978.
- [17] Yamashita, M. Weak electric fields serve as guidance cues that direct retinal ganglion cell axons in vitro. // *Biochemistry and Biophysics Reports*. Vol. 4, (2015), str. 83-88.
- [18] Gisbert Roca, F. et al. Electrical stimulation increases axonal growth from dorsal root ganglia co-cultured with Schwann cells in highly aligned PLA-PPy-Au microfiber substrates. // *International Journal of Molecular Sciences*. Vol. 23, 12(2022), str. 6362.
- [19] Cremers, D. A.; Radziemski, L. J. *Handbook of laser-induced breakdown spectroscopy*. 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2013.
- [20] Garcia-Lechuga, M.; Grojo, D. Simple and robust method for determination of laser fluence thresholds for material modifications: an extension of Liu's approach to imperfect beams. // *Open Research Europe*. Vol. 1, (2021).
- [21] Bado, P.; Clark, W.; Said, A. *Ultrafast laser micromachining handbook*. Dexter: Clark-MXR, 2007.

- [22] Li, X.; Guan, Y. Theoretical fundamentals of short pulse laser–metal interaction: A review. // *Nanotechnology and Precision Engineering (NPE)*. Vol. 3, 3(2020), str. 105-125.
- [23] Russo, R. E. et al. *Laser-induced breakdown spectroscopy: Laser ablation*. Elsevier, 2007., str. 41-70.
- [24] Hamad, A. H. *High Energy and Short Pulse Lasers: Effects of Different Laser Pulse Regimes (Nanosecond, Picosecond and Femtosecond) on the Ablation of Materials for Production of Nanoparticles in Liquid Solution*. InTech, 2016.
- [25] Guo, B. et al. *Femtosecond laser micro/nano-manufacturing: theories, measurements, methods, and applications*. // *Nanomanufacturing and Metrology*. Vol. 3, (2020), str. 26-67.
- [26] Lucas, L.; Zhang, J. *Femtosecond laser micromachining: A back-to-basics primer*. // *Industrial laser solutions*. Vol. 4, (2012), str. 1-22.
- [27] Harilal, S. S. et al. *Optical spectroscopy of laser-produced plasmas for standoff isotopic analysis*. // *Applied Physics Reviews*. Vol. 5, 2(2018).
- [28] Řiháková, L.; Chmelickova, H. *Laser Micromachining of Glass, Silicon, and Ceramics*. // *Advances in Materials Science and Engineering*. Vol. 2015, 1(2015), str. 584952.
- [29] Ben-Yakar, A. et al. *Thermal and fluid processes of a thin melt zone during femtosecond laser ablation of glass: the formation of rims by single laser pulses*. // *Journal of Physics D: Applied Physics*. Vol. 40, 5(2007), str. 1447.
- [30] Mills, K. C.; Courtney, L. *Thermophysical properties of silicon*. // *ISIJ international*. Vol. 40, Suppl(2000), str. S130-S138.
- [31] Farid, N. et al. *Improvement of electrical properties of ITO thin films by melt-free ultra-short laser crystallization*. // *Journal of Physics D: Applied Physics*. Vol. 54, 18(2021), str. 185103.
- [32] Ashida, T. et al. *Thermal transport properties of polycrystalline tin-doped indium oxide films*. // *Journal of applied physics*. Vol. 105, 7(2009).

- [33] Jakešova, M. et al. Optoelectronic control of single cells using organic photocapacitors. // Science Advances. Vol. 6, 4(2019).
- [34] Silverå Ejneby, M. et al. Chronic electrical stimulation of peripheral nerves via deep-red light transduced by an implanted organic photocapacitor. // Nature Biomedical Engineering. Vol. 6, 6(2022), str. 741-753.
- [35] Fox, M. A student's guide to atomic physics. 1st ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2018.
- [36] Henson, J. TRLi Series User Manual. Litron Lasers Ltd., 2018.
- [37] Svelto, O.; Hanna, D.C. Principles of lasers. 5th ed. New York: Springer, 2010.
- [38] Demtröder, W. Atoms, molecules and photons: An Introduction to Atomic, Molecular and Quantum Physics. 3rd ed. Berlin: Springer, 2017.
- [39] PHAROS - Modular-Design Femtosecond Lasers for Industry and Science, Light Conversion, <https://lightcon.com/product/pharos-femtosecond-lasers/>, 27.05.2024.
- [40] Rotrics DexArm Specs, (2022.), Rotrics, <https://rotrics.com/pages/dexarm-spec>, 16.05.2024.
- [41] Thorlabs 1" (25 mm) Travel Motorized Actuators, (2019.), Thorlabs, https://www.thorlabs.com/newgrouppage9.cfm?objectgroup_id=1883&pn=ZFS25B, 16.05.2024.
- [42] Integrated XY Linear Motor Stages - One XY Series, (2018.), Newport, <https://www.newport.com/p/ONE-XY100HA>, 16.05.2024.
- [43] Ford, B. J.; Joy, D. C.; Bradbury, S. Scanning electron microscope // Encyclopedia Britannica, (01.05.2024.), <https://www.britannica.com/technology/scanning-electron-microscope>, 01.06.2024.
- [44] Scanning Electron Microscopy. Nanoscience Instruments, <https://www.nanoscience.com/techniques/scanning-electron-microscopy/>, 01.06.2024.

- [45] De Groot, P. et al. Fourier optics modelling of coherence scanning interferometers // Applied Optical Metrology IV : SPIE Optical Engineering + Applications 2021 / edited by Novak, Trolinger and Wilcox. San Diego : SPIE, 2021. str. 2.
- [46] Paschotta, R. Optical Profilometers // RP Photonics Encyclopedia, (2019.), https://www.rp-photonics.com/optical_profilometers.html, 01.06.2024.
- [47] Profilm Online, <https://www.profilmonline.com/>, 16.06.2024.
- [48] General Information about Stylus-based Surface Profilers from KLA Instruments, KLA Instruments, (2022).
- [49] Stylus Product Line: Alpha-Step, Tencor P-Series and HRP-Series Profilers, KLA Instruments, Application Note, (2021).
- [50] Mioković, A. Geometrijska optimizacija elektroda za kapacitivnu neurostimulaciju. Diplomski rad. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet, 2022.