



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta mechatroniky, informatiky
a mezioborových studií ■

Optický vláknový senzor s nanovláknovým detekčním prvkem

Diplomová práce

Studijní program: N3942 – Nanotechnologie
Studijní obor: 3942T002 – Nanomateriály

Autor práce: **Bc. Tomáš Vaněk**
Vedoucí práce: doc. Ing. Stanislav Petřík, CSc.
Konzultant: doc. Mgr. Irena Lovětinská-Šlamborová, Ph.D.





TECHNICAL UNIVERSITY OF LIBEREC
Faculty of Mechatronics, Informatics
and Interdisciplinary Studies ■

Fiber Optic Sensor with Nanofiber Detection Element

Diploma thesis

Study programme: N3942 – Nanotechnology
Study branch: 3942T002 – Nanomaterials

Author: **Tomáš Vaněk**
Supervisor: doc. Ing. Stanislav Petřík, CSc.
Consultant: doc. Mgr. Irena Lovětinská-Šlamborová, Ph.D.



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Tomáš Vaněk**
Osobní číslo: **M15000220**
Studijní program: **N3942 Nanotechnologie**
Studijní obor: **Nanomateriály**
Název tématu: **Optický vláknový senzor s nanovláknovým detekčním prvkem**
Zadávací katedra: **Ústav nových technologií a aplikované informatiky**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Seznamte se se základními principy optických vláknových senzorů, vypracujte rešerši současného stavu jejich výzkumu a vývoje, zejména pro biomedicínské aplikace.
2. Navrhněte a realizujte experimentální zařízení pro ověření možnosti optické detekce aktivity vybraných organických biomolekul (primárně enzymů) imobilizovaných na povrchu nanovláken. Přenos optického signálu realizujte pomocí optických vláken.
3. Na základě studia odborné literatury a konzultací s vedoucím diplomové práce navrhněte vhodný nanovláknový materiál a připravte vzorky s imobilizovanými enzymy. Zaměřte se na možnost využití detekce esterázových aktivit pro diagnostiku monocytární leukemie.
4. Experimentálně ověřte funkčnost navrženého principu, vyhodnoťte citlivost a stabilitu senzoru.
5. Výsledky shrňte a diskutujte, identifikujte a navrhněte vylepšení a optimalizaci elektronického systému a optické konstrukce senzoru.

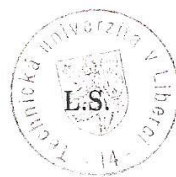
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Rozsah pracovní zprávy: **40 - 60 stran**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**
Seznam odborné literatury:

- [1] Turán, J. - Petřík, S.: Optické vláknové senzory. Alfa, Bratislava, 1990.
- [2] Eric Udd (Editor), William B. Spillman, Jr. (Editor): Fiber Optic Sensors: An Introduction for Engineers and Scientists, 2nd Edition. Wiley, 2011.
- [3] Zujie Fang, Ken Chin, Ronghui Qu, Haiwen Cai, Kai Chang (Series Editor): Fundamentals of Optical Fiber Sensors. Wiley, 2012.
- [4] Ramakrishna S et al, (2005), Electrospinning and Nanofibers, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.
- [5] Petřík S. (Editor) et al.: Nanofibers, Applications and Related Technologies - NART 2015, Conference Proceedings, August 31 - September 2, 2015, Technical University of Liberec, Czech Republic (2015). ISBN 978-80-7494-265-5
- [6] Osgrove F H, Williams R J H et al, (2001), Enzyme immobilization on nylon-optimization and the steps used to prevent enzyme leakage from the support, Enzyme and Microbial Technology, 28, 225-232.
- [7] Svec F, Gemeiner P, (1996), Engineering Aspects of Carriers for Immobilized Biocatalysts, Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 13:1, 217-236, [Online 6.8.2014]
- [8] Šlamborová, I., Zajícová, V., Exnar, P., Studničková, J.: Nanofiber structure with immobilized organic agents and the method of its preparation. ČR Patent, 303 911. 14.8.2012, 9.5.2013. WO 2014026656, 20.2.2014. EP2884968A1, 24.6.2015; US2015240411A1, 27.8.2015.
- [9] Lovětinská-Šlamborová, I., Exnar, P., Danilová, I., Veverková, I.: Medical and biochemical applicability of silica nanofibers. In: Nanofibers, Applications and Related Technologies - NART 2015, Conference Proceedings, August 31 - September 2, 2015, Technical University of Liberec, Czech Republic (2015), 263-269. ISBN 978-80-7494-265-5

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Stanislav Petřík, CSc.**
Ústav nových technologií a aplikované informatiky

Datum zadání diplomové práce: **20. října 2016**
Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2017**

prof. Ing. Zdeněk Pliva, Ph.D.
děkan



prof. Dr. Ing. Jiří Maryška, CSc.
vedoucí ústavu

V Liberci dne 20. října 2016

Prohlášení

Byl jsem seznámen s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Diplomovou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé diplomové práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum: 14. 5. 2017

Podpis: 

Poděkování

V první řadě bych rád poděkoval mému vedoucímu práce doc. Ing. Stanislavu Petříkovi, CSc za příležitost pracovat na této zajímavé práci, za jeho odborné rady a výpomoc při úpravě práce. Dále patří obrovské díky konzultantce doc. Mgr. Ireně Lovětinské– Šlamborové Ph.D. za pomoc při laboratorním výzkumu a celkovou pomoc při práci, stejně tak patří poděkováním i paním laborantkám, které byly nápomocny při práci v laboratoři. V neposlední řadě děkuji Bc. Janu Kredbovi za jeho obrovskou pomoc při návrhu a konstrukci elektronické části senzoru a všem ostatním, kteří se mnou při psaní této práce přežili.

Abstrakt

V této práci je představen senzorický systém založený na spojení jedinečných vlastností optických vláken a nanovláken. Funkcionalizačními reakcemi byly vytvořeny imobilizované nanovláknenné vrstvy aminokyselinami a enzymem Esterázou. Optická vlákna byla použita k přenosu optického signálu, který detekoval aktivitu imobilizovaných molekul, respektive jejich schopnost vychytávat organické látky z roztoku. Ověření výsledků detekce aktivity imobilizovaných molekul bylo prováděno pomocí UV/VIS spektroskopie, SEM a FTIR spektroskopie. Práce byla posléze zaměřena na využití těchto detekčních schopností pro diagnostiku monocytární leukemie. V průběhu této práce došlo také k návrhu a konstrukci hardwaru vylepšené elektronické části senzoru.

Klíčová slova: optické vláknové senzory, nanovláknena SiO₂, funkcionalizace nanovláken, histochemické reakce, monocytární leukemie.

Abstract

This thesis presents a sensory system based on the combination of a unique properties of optical fibers and nanofibers. Immobilized nanofiber layers by amino acids and Esterase enzyme were created by functionalization. Optical fibers were used to transfer an optical signal which detected the activity of the immobilized molecules, respectively their ability to pick up organic agents from solution. Result verification of detection activity of immobilized agents was performed by UV/VIS spektroskopy, SEM and FTIR spektroskopy. The research was further focused on using this detection ability for diagnostic of monocyte leukemia. During this work, the design and the hardware construction of the improved electronic part of the sensor was also carried out.

Key words: optical fiber senzors, SiO₂ nanofibers, functionalization of nanofibers, histochemical reactions, monocyte leukemia.

Obsah

Poděkování.....	6
Abstrakt	7
Abstract.....	8
Seznam obrázků.....	10
Seznam tabulek	12
Seznam grafů	12
1 Úvod	13
2 Optické vláknové senzory.....	14
2.1 Optická vlákna.....	16
2.2 Jednovidové optické vlákno.....	16
2.3 Mnohovidová optická vlákna	17
2.4 Šíření světla v optickém vláknu.....	17
2.5 Ztráty světelné energie v optických vláknech	20
2.5.1 Rozptylové ztráty	20
2.5.2 Disperzní ztráty	22
2.6 Příklady konstrukce optických vláknových senzorů a jejich současné využití v biomedicínských aplikacích.....	22
3 Senzorové pole optického vláknového senzoru	25
3.1 Křemičitá nanovlákna.....	25
3.1.1 Příprava křemičitých nanovláken	26
3.1.2 Funkcionalizace křemičitých nanovláken.....	28
3.1.3 Důkaz aminokyselin pomocí ninhydrinu	29
4 Enzymová analýza.....	31
4.1 Struktura enzymů	31
4.2 Mechanismus reakce enzymu se substrátem	32
4.3 Enzymová kinetika.....	34
5 Monocytární leukémie	36
6 Plán experimentu	38
7 Ověření funkčnosti optického vláknového senzoru	39
7.1 Použité laboratorní pomůcky a zařízení	39
7.2 Použité chemikálie.....	40

7.3	Měření intenzity detekovaného signálu v závislosti na sestavení sensorového pole.....	41
7.4	Funkcionalizace SiO ₂ nanovláken a měření jejího vlivu na intenzitu odraženého světla.....	43
7.4.1	Detekce aktivity enzymu Esterázy pomocí α - naftyl acetátu...	43
8	Detekční limit optického vláknového senzoru.....	49
9	Detekce aktivity enzymu esterázy v krevních nátěrech	55
9.1	Použité laboratorní pomůcky, zařízení a chemikálie	55
9.2	Příprava a analýza krevních nátěrů	56
10	Návrh a konstrukce zdokonalené elektronické části senzoru.....	61
11	Diskuze.....	64
	Závěr.....	67
	Použitá literatura	68
	Přílohy	70

Seznam obrázků

Obr. 2.1: Využití optických vláknových senzorů v průmyslu (GALLO 2013)	14
Obr. 2.2: Schéma optického vláknového senzoru (GALLO 2013)	15
Obr. 2.3: Stavba optického vlákna (Klega 2009)	16
Obr. 2.4: Schéma jednovidového optického vlákna (Petřík 2009).....	16
Obr. 2.5: Schéma mnohovidového optického vlákna se skokovou změnou indexu lomu (Petřík 2009).....	17
Obr. 2.6: Schéma mnohovidového optického vlákna s gradientní změnou indexu lomu (Petřík 2009).....	17
Obr. 2.7: Popis možných odrazů světelného paprsku v optickém vlákně (STRÍTESKÁ 2010)	18
Obr. 2.8: Porovnání Rayleighova a Mieova rozptylu (GALLO 2013).....	21
Obr. 2.9: Rozptyl na nečistotách (Maršálek 2006)	21
Obr. 2.10: Módová disperze (Maršálek 2006)	22
Obr. 2.11: Příklady konstrukcí intrinsických optovláknových senzorů. (Turán a Petřík 1991)	23
Obr. 2.12: Příklady konstrukcí extrinsických optických vláknových senzorů. (Turán a Petřík 1991)	24
Obr. 3.1: Povrch křemičitého nanovlákna (Exnar 2016).....	26
Obr. 3.2: (a) hydrolýza tetraalkoxysilanu, (b) polykondenzace (Exnar 2016)	27
Obr. 3.3: Elektrostatické zvlákňování ze struny (Elmarco s.r.o 2014).....	28
Obr. 3.4: Funkcionalizace povrchu nanovláken glutaraldehydem	29
Obr. 3.5: Imobilizace enzymu na funkcionalizovaná nanovlákna	29
Obr. 3.6: Reakce ninhydrinu s primární aminokyselinou.....	30
Obr. 3.7: Imobilizace křemičitých nanovláken argininem	30
Obr. 4.1: Mechanismus enzymatické reakce (a) „zámek a klíč“, (b) „ruka v rukavici“. (Vodrážka 1996).....	33
Obr. 4.2: Závislosti rychlosti enzymatické reakce na koncentraci substrátu nebo enzymu. (a) při konstantní koncentraci substrátu, (b) při konstantní koncentraci enzymu. (Vodrážka 1996).....	34
Obr. 5.1: Schéma histochemického prokázání Nespecifické esterázy. (Manchenko 2002)	37
Obr. 7.1: Obrázek optoelektronické části senzoru. (a) optické vlákno typu Y, (b) zdroj a zároveň detektor signálu.	39
Obr. 7.2: Snímek křemičité nanovláknové vrstvy.....	39
Obr. 7.3: Schéma sestavení sensorového pole.	41
Obr. 7.4: Nanovlákna s imobilizovanou esterázou, na kterou je navázán substrát s azobarvivem.....	44

Obr. 7.5: Porovnání vzorků před proběhnutím azokopulační reakce (Ref.) a po jejím proběhnutí pro dvě různá azobarviva (Fast blue B salt a Fast blue RR salt) o koncentracích substrátu 0,3 a 0,15g/l.....	47
Obr. 7.6: Důkaz aminokyselin pomocí ninyhydrinu. (a) referenční vzorky před zahřátím, (b) vzorky po zahřátí. (1) Leucin, (2) Arginin, (3) Tyrosin.	48
Obr. 8.1: Snímky ze SEM. Porovnání (a, b) funkcionalizovaných nanovláken po proběhnutí azokopulační reakce, s (c) vrstvou SiO ₂ nanovláken.....	49
Obr. 8.2: Snímek funkcionalizovaných nanovláčkových vzorků o různých koncentracích substrátů a barviva. (a) je referenční vzorek.....	50
Obr. 8.3: Snímek ze SEM. Fyzikálně adsorbované barvivo ve vrstvě funkcionalizovaných SiO ₂ nanovláken.	53
Obr. 9.1: Imerzní olej Lergille typ A (a), optický mikroskop Leica DM750 (b), Skleněné kyvety s mikroskopickými sklíčky (c).	55
Obr. 9.2: Porovnání krevních nátěrů při použití různých barvicích technik. (a) standardní krevní nátěr bez barvení. (b) Pappenheimovo barvení. (c) histochemické barvení pomocí Basic Red 9. (d) histochemické barvení pomocí Fast Blue B.....	58
Obr. 9.3: Snímky krevních nátěrů z optického mikroskopu. (a) histochemické barvení pomocí Fast Blue B. (b) histochemické barvení pomocí Basic Red 9. (c) Pappenheimovo barvení.	59
Obr. 9.4: Snímky krevních stěrů barvených histochemicky (Fast Blue B) při použití fosfátových pufrů o různých pH. (a) pH= 7,19, (b) pH= 5,9, (c) pH= 8,3.....	60
Obr. 10.1: Snímek základové desky původního měřicího přístroje.	62
Obr. 10.2: Návrh základové desky nového senzoru.....	63
Obr. 10.3: Snímek hardwaru nového senzoru.	63

Seznam tabulek

Tab. 7.1: Porovnání odrazivosti při různých uspořádání sensorového pole.	42
Tab. 7.2: Intenzita odraženého záření funkcionalizované SiO ₂ nanovlákněné vrstvy.....	45
Tab. 7.3: Odrazivost funkcionalizovaných nanovlákněných vrstev při použití různých azobarviv o různých koncentracích.	46
Tab. 7.4: Detekce odrazivosti funkcionalizovaných nanovlákněných vrstev aminokyselinami při reakci s ninhydrinem.	48
Tab. 8.1: Odrazivost vzorků při snižování koncentrace substrátu v porovnání s referenčním vzorkem.	50
Tab. 9.1: Naměřená odrazivost vzorků krevních stěrů při použití různých barviv.	60

Seznam grafů

Graf. 8.1: Porovnání odrazivosti vzorků při exponenciálním ředění vůči referenčnímu včetně chybových úseček.	51
Graf. 8.2: Měření UV/VIS spektrofotometrem. Vzorky s exponenciálním snižováním koncentrace substrátu.	52
Graf. 8.3: Pokles absorpance adsorbovaného barviva do vrstvy SiO ₂ nanovláken při snižování koncentrace substrátu (respektive barviva). Měřeno UV/VIS spektrometrem.	54

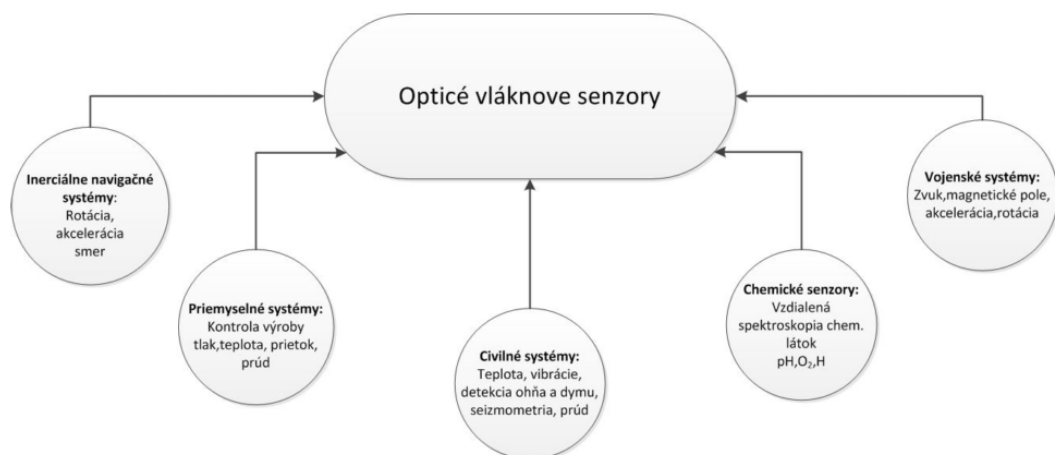
1 Úvod

Motivací pro vznik této práce byla myšlenka vytvořit optický vláknový senzor, který by dokázal využít přednosti nanovláken (zejména obrovský specifický měrný povrch a široká možnost funkcionalizace povrchu) pro detekci organických molekul (aminokyselin, aktivity enzymů).

Cílem této práce je (i) navrhnout a realizovat experimentální zařízení pro ověření možnosti detekce aktivity organických molekul imobilizovaných na nanovláknenné vrstvě. (ii) vyhodnotit citlivost a stabilitu senzoru. (iii) zaměřit se na využití detekce aktivity esterázových skupin pro diagnostiku monocytární leukemie a (iv) navrhnout optimalizaci elektronického systému a optické konstrukce senzoru.

2 Optické vláknové senzory

Vynález laseru v šedesátých letech minulého století odstartoval vědecký zájem na poli optických systémů, jakožto vhodná přenosová média pro komunikační zařízení. První optická vlákna však měla útlum signálu okolo 1000 dB/km. Průlom v této technologii nastal v roce 1972, kdy se podařilo vyvinout vlákno s útlumem už jen 4 dB/km. Zároveň vědci zjistili, že světelný paprsek procházející vláknem je možno modulovat fyzikálním působením, což otevřelo nové možnosti využití pro různé optické snímače a senzory. Důsledkem těchto poznatků je, že se dnes optické vláknové senzory používají v široké škále odvětví, jako jsou např.: průmysl, vojenství, navigace, civilní systémy, lékařství nebo právě chemické senzory, viz Obr. 2.1.



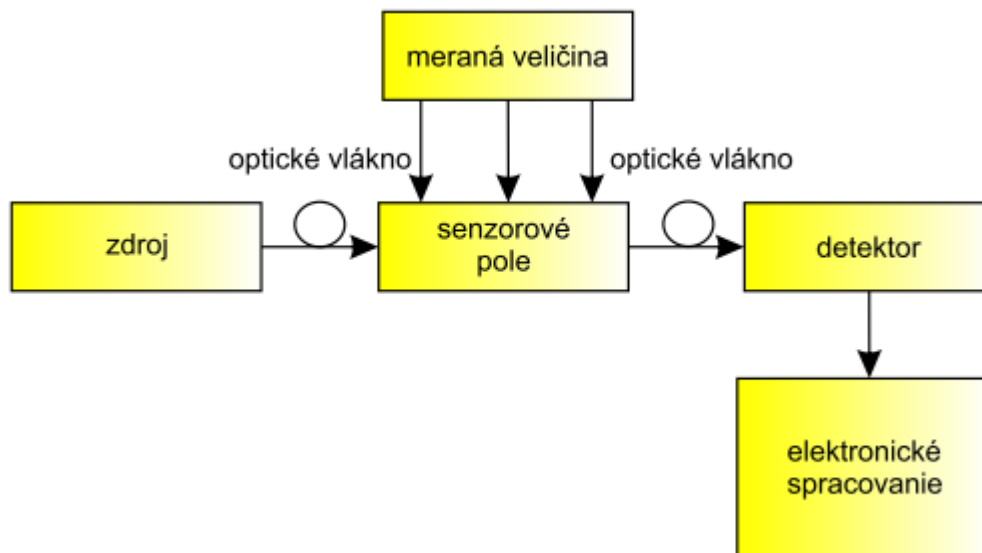
Obr. 2.1: Využití optických vláknových senzorů v průmyslu (GALLO 2013)

Takovéhoto průmyslového rozmachu dosáhly zejména díky tomu, že se po svém zdokonalení staly cenově dostupné, dokáží měřit široké spektrum fyzikální jevů (teplota, vlhkost, viskozita, elektrické pole atd.), a zároveň poskytují oproti konkurenčním elektronickým senzorům nesporné výhody, jako jsou:

- Elektrická nevodivost
- Odolnost vůči elektromagnetickému, elektrostatickému a radiovému rušení

- Vysoká citlivost
- Nízká hmotnost
- Jednoduchá integrace do široké palety struktur, přičemž tyto struktury vzhledem ke své malé velikosti a válcovému tvaru minimálně narušují
- Schopnost měřit více fyzikálních jevů najednou
- Měření na dlouhé vzdálenosti
- Měření těžko přístupných míst díky miniaturizaci a ohebnosti

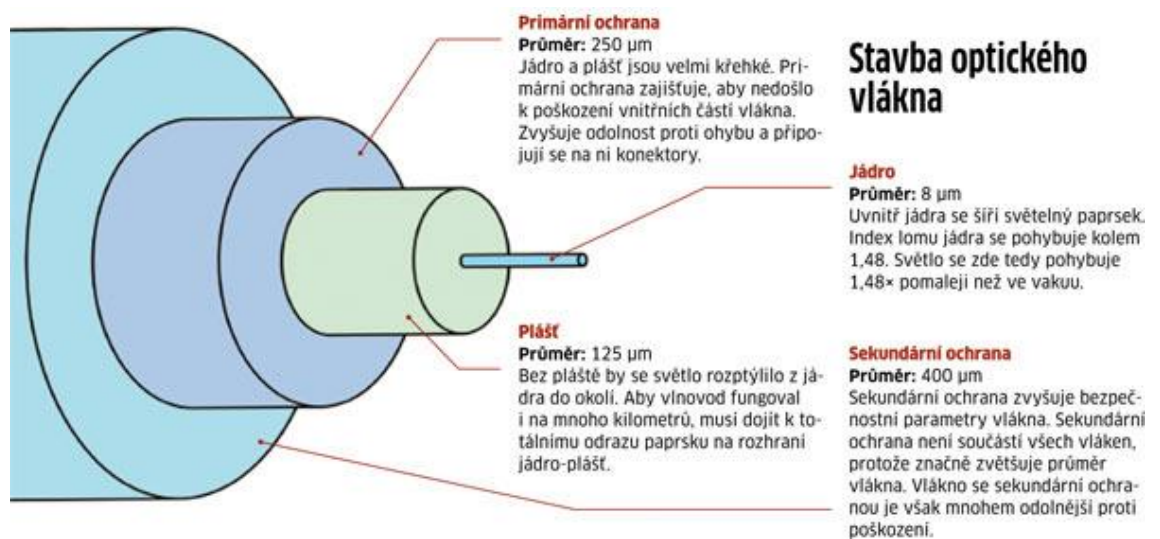
Základní schéma optického vláknového senzoru se skládá ze světelného zdroje, který posílá světelný paprsek optickým vláknem. Paprsek je přiveden do sensorového pole, neboli nějaké fyzikálně citlivé vrstvy. Zde se světlo absorbuje, odrazí nebo například vyvolá emisi fluorescenčního záření. Takto pozměněné světlo se vrací optickým vláknem (je možné i stejným optickým vláknem) na fotodiodový detektor. Na detektoru je optický signál převeden na elektrický signál a ten je posléze elektronicky zpracován. Schéma takového zařízení je na Obr. 2.2. (Bělohradský 2005; Fidanboyulu a Efendioglu 2009)



Obr. 2.2: Schéma optického vláknového senzoru (GALLO 2013)

2.1 Optická vlákna

Optické vlákno je dielektrický vlnovod, který je schopen přenášet elektromagnetické vlnění na dlouhé vzdálenosti podél optické osy vlákna. Obvykle je vyrobeno na křemičité bázi nebo jako kompozit plastů, přičemž se může skládat z několika vrstev od jádra, přes plášť až po ochranné vrstvy. To je znázorněno na obrázku 2.3. Optická vlákna mohou být dvojího typu, jednovidová nebo mnohovidová.



Obr. 2.3: Stavba optického vlákna (Klega 2009)

2.2 Jednovidové optické vlákno

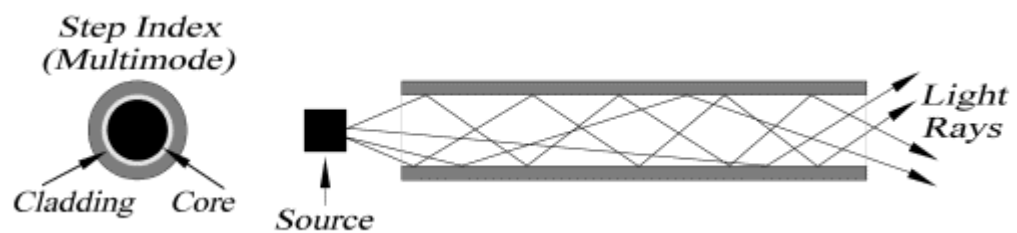
Jednovidové optické vlákno je optické vlákno, ve kterém se šíří jen jeden světelný paprsek, viz Obr. 2.4, díky čemuž zde nevzniká vidová disperze. Zároveň má menší průměr jádra (do 10 μm), což vede k většímu úhlu odrazu ve vlákne, a tedy menšímu prodloužení dráhy paprsku. Tyto vlastnosti vedou k menšímu útlumu signálu ve vlákne a používají se tedy pro přenosy na větší vzdálenost, až 100km bez opakovače.



Obr. 2.4: Schéma jednovidového optického vlákna (Petřík 2009)

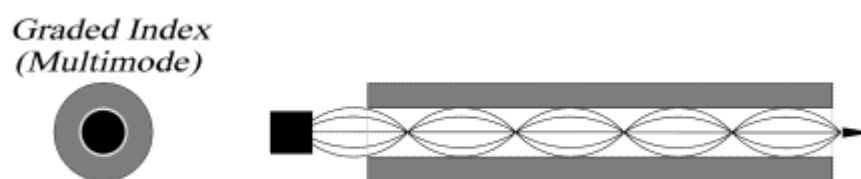
2.3 Mnohovidová optická vlákna

Vhledem k větší tloušťce jádra (50-100 μm) je možné, aby vstupující paprsek vstupoval do vlákna pod různými úhly, což zapříčiní různou rychlost šíření jednotlivých paprsků (vidů), a tím i zkreslení vstupního signálu na výstupu z vlákna. Tomuto zkreslení signálu se říká vidová disperze a uplatňuje se hlavně ve vláknech se skokovou změnou indexu lomu, což můžeme vidět na obrázku 2.5.



Obr. 2.5: Schéma mnohovidového optického vlákna se skokovou změnou indexu lomu (Petřík 2009)

Druhým typem mnohovidového vlákna je optické vlákno s gradientní změnou indexu lomu (obrázek 2.6), ve kterém se při přechodu z jádra do pláště mění index lomu plynule. Touto stavbou vlákna se do jisté míry podařilo omezit vidovou disperzi. (GALLO 2013; Sýkora 2004)



Obr. 2.6: Schéma mnohovidového optického vlákna s gradientní změnou indexu lomu (Petřík 2009)

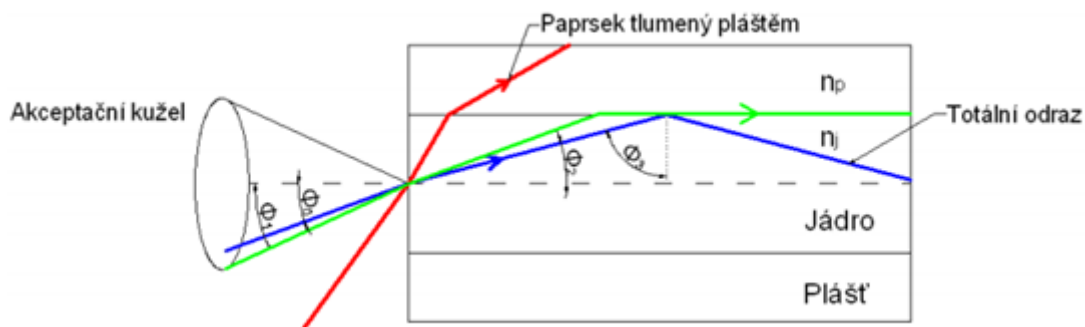
2.4 Šíření světla v optickém vláknu

Úkolem optického vlákna je vést paprsek světla s pokud možno co nejmenšími ztrátami. Z tohoto důvodu je velmi důležité, pod jakým úhlem paprsek do vlákna navedeme. Ze Snellova zákona víme, že:

$$\frac{\sin \phi_1}{\sin \phi_2} = \frac{n_2}{n_1} \quad (1)$$

n_2 , n_1 jsou indexy lomu prostředí, kam vstupuje paprsek, respektive ze kterého jde a ϕ_2 , ϕ_1 jsou úhly, které paprsek svírá s kolmicí k rovině lomu.

Paprsek dopadající na rozhraní dvou optických prostředí s různými indexy lomu se láme v závislosti na úhlu dopadu. Přičemž v optickém vlákně při přechodu paprsku z jádra do pláště mohou nastat tři případy. Pokud paprsek dopadá na rozhraní jádro – plášť pod úhlem menším než je mezní, tak se část paprsku odráží pod stejným úhlem zpět a část prochází do pláště pod úhlem menším než 90° , viz červený paprsek na obrázku 2.7. Pokud paprsek dopadá na rozhraní přesně pod mezním úhlem, tak se stejně jako v předchozím případě část odrazí pod mezním úhlem zpět a průchozí část paprsku se láme pod úhlem 90° . Ta se pak dále pohybuje na rozhraní jádra s pláštěm. Zbývá možnost, využívající se právě pro šíření světla v optickém vlákně, je pokud paprsek dopadá pod úhlem větším než je mezní, tu představuje modrý paprsek z obrázku 2.7. V tomto případě dochází k totálnímu odrazu a tím se zabraňuje nežádoucím energetickým ztrátám.



Obr. 2.7: Popis možných odrazů světelného paprsku v optickém vlákně (STRÍTESKÁ 2010)

Ze znalosti indexů lomu jádra a pláště lze pomocí Snellova zákona odvodit vztah pro výpočet intervalu úhlů, pod kterými je potřeba navést paprsek do vlákna, aby docházelo k totálnímu odrazu. Nejdříve si musíme uvědomit, ze kterého prostředí paprsek do vlákna vstupuje. Obvykle je to

vzduch s indexem lomu $n_v = 1$. Poté za použití Snellova zákona a popisků z Obr. 2.7 plyne pro mezní úhel na rozhraní jádro – plášť:

$$\frac{\sin \phi_3}{\sin 90^\circ} = \frac{n_p}{n_j} \wedge \sin \phi_3 \leq 1 \Rightarrow \sin \phi_3 = \frac{n_p}{n_j} \wedge \sin \phi_3 \leq 1 \quad (2)$$

$$\phi_3 = 90^\circ - \phi_2 \quad (3)$$

Stejný zákon plyne pro vstup do vlákna s rozhraním vzduch – jádro.

$$\sin \phi_1 = n_j * \sin \phi_2 \quad (4)$$

$$\sin \phi_1 = n_j * \sin(90^\circ - \phi_3) = n_j *$$

$$* \cos \phi_3 = n_j * \sqrt{1 - \sin^2 \phi_3} = n_j * \sqrt{1 - \frac{n_p^2}{n_j^2}} = \sqrt{n_j^2 - n_p^2} \quad (5)$$

$$\phi_1 < \arcsin \sqrt{n_j^2 - n_p^2} \quad (6)$$

$$\phi_1 \in \langle 0, 90 \rangle$$

Výsledná nerovnice (6) nám udává interval úhlů, pod kterými je možno navést do optického vlákna paprsek při současném zachování totálního odrazu ve vlákně na rozhraní jádro – plášť. Tento interval se také nazývá akceptační kužel.

Zatím bylo šíření světla rozebráno jen z částicového hlediska. Světlo má ale duální charakter a je tedy třeba přihlížet při popisu jeho šíření i na vlnový charakter. Ten nám ve stručnosti říká, že světlo se ve vlákně nemůže dlouhodobě šířit pod jakýmkoliv úhlem dopadu, který splňuje podmínku pro totální odraz, ale jen pod diskrétními úhly, které zároveň při odrazu na rozhraní jádro – plášť splňují podmínku konstruktivní interference. Při nesplnění této podmínky dojde po určitém počtu odrazů k vyrušení jednotlivých fázových příspěvků. Tato podmínka nám tedy definuje, že každé vlákno může mít jen určitý počet vidů, které se od sebe, vzhledem k různým úhlům dopadu, liší různou fázovou i grupovou rychlostí. (Čtyroký 2009; STRÍTESKÁ 2010)

2.5 Ztráty světelné energie v optických vláknech

Ztráty světelné energie jsou popsány následující rovnicí:

$$A = \frac{P_{out}}{P_{in}} \quad (7)$$

kde A je ztráta světelné energie a P_{out} , P_{in} jsou výkony na výstupu a vstupu.

Dají se rozdělit do několika kategorií:

- **Ohybové ztráty** – vznikají přílišným ohnutím vlákna, kde dojde k porušení podmínky totálního odrazu a světlo se vyváže, jak je popsáno v předchozí kapitole.
- **Rozptylové ztráty** – jsou dané převážně způsobem výroby, přičemž světlo se rozptyluje na nečistotách a fluktuacích krystalové mřížky.
- **Absorpční ztráty** – při nich se přeměňuje světelná energie na tepelnou.
- **Disperzní ztráty** – nedochází při nich ke ztrátám světelné energie, ale znehodnocují vlastnosti optického signálu.

Útlum optického vlákna

$$A[dB] = 10 * \log \frac{P_{out}}{P_{in}} \quad (8)$$

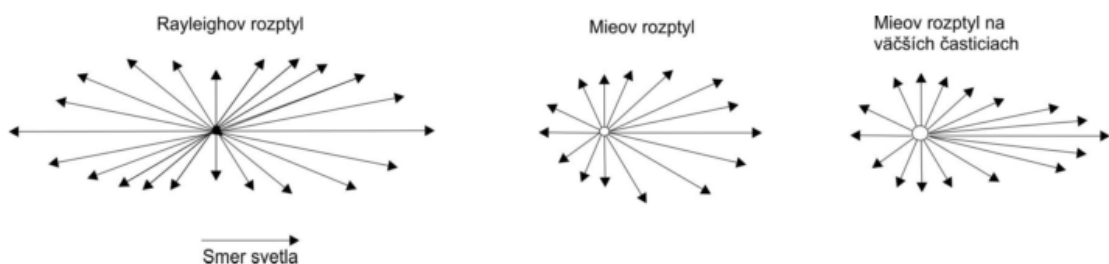
2.5.1 Rozptylové ztráty

Rayleigho rozptyl

Rayleigho rozptyl vzniká tepelnými kmity krystalové mřížky. Tento rozptyl se nedá odstranit, ani pokud by se optické vlákno zchladilo na hodnotu absolutní nuly, což by způsobilo zastavení tepelného kmitání mřížky, protože světlo se ohýbá kolem atomů v mřížce. Důležitou roli zde také hraje použitá vlnová délka záření, protože světlo o vyšší frekvenci se více láme. Lze ho tedy částečně eliminovat posunem frekvence záření do infračervené oblasti.

Mienův rozptyl

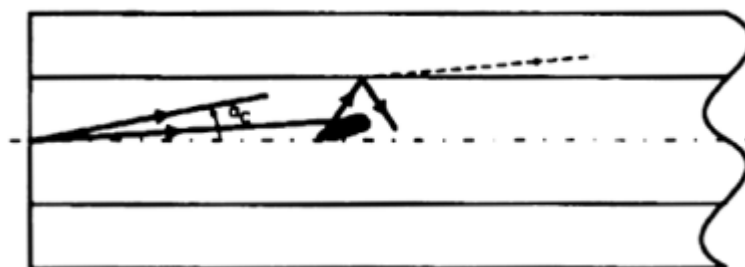
Mienův rozptyl je způsoben nehomogenitami optického vlákna, které jsou srovnatelné s vlnovou délkou procházejícího záření. Má velmi znatelnou závislost na úhlu dopadu. Na obrázku 2.8 je vidět, jak se tento jev v závislosti na úhlu dopadu paprsku na nehomogenitu liší od Rayleighova rozptylu. Příčiny tohoto rozptylu bývají způsobeny nedokonalostmi při výrobě vlákna, konkrétně například mikroskopickými trhlinkami ve vlákne, kolísáním průměru vlákna, nedokonalou cylindrickou strukturou vlnovodu, nečistoty ve vlákne atd.



Obr. 2.8: Porovnaní Rayleighova a Mieova rozptylu (GALLO 2013)

Rozptyl na nečistotách

Rozptyl na nečistotách je podobný Mieovu s tím rozdílem, že nehomogenity jsou větší než vlnová délka použitého světla, viz Obr. 2.9. Lze jej ovšem odstranit správným technologickým postupem při výrobě vlákna.

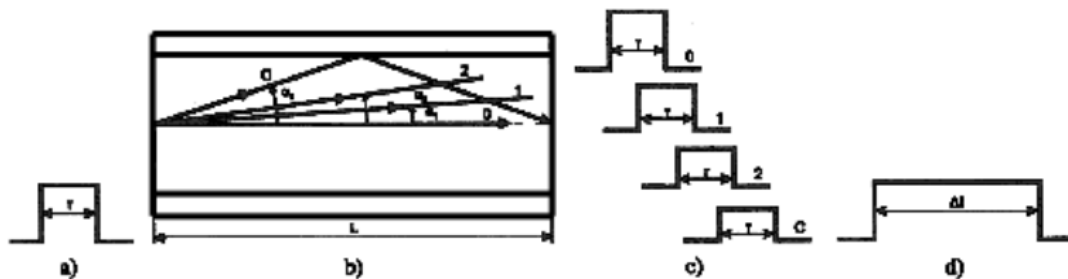


Obr. 2.9: Rozptyl na nečistotách (Maršálek 2006)

2.5.2 Disperzní ztráty

Módová disperze

Jednotlivé módy stejného signálu vstupují do optického vlákna pod různými úhly. Tím mají i různou délku dráhy uvnitř vlákna, což má za následek rozšíření pulsu na výstupu, jak je znázorněno na obr. 2.10.



Obr. 2.10: Módová disperze (Maršálek 2006)

Chromatická disperze

Je způsobena tím, že index lomu je závislý na frekvenci záření, neboli jednotlivé vlnové délky se vláknem šíří různou rychlostí. Tento jev je ale obvykle slabší než módová disperze. (Maršálek 2006; GALLO 2013)

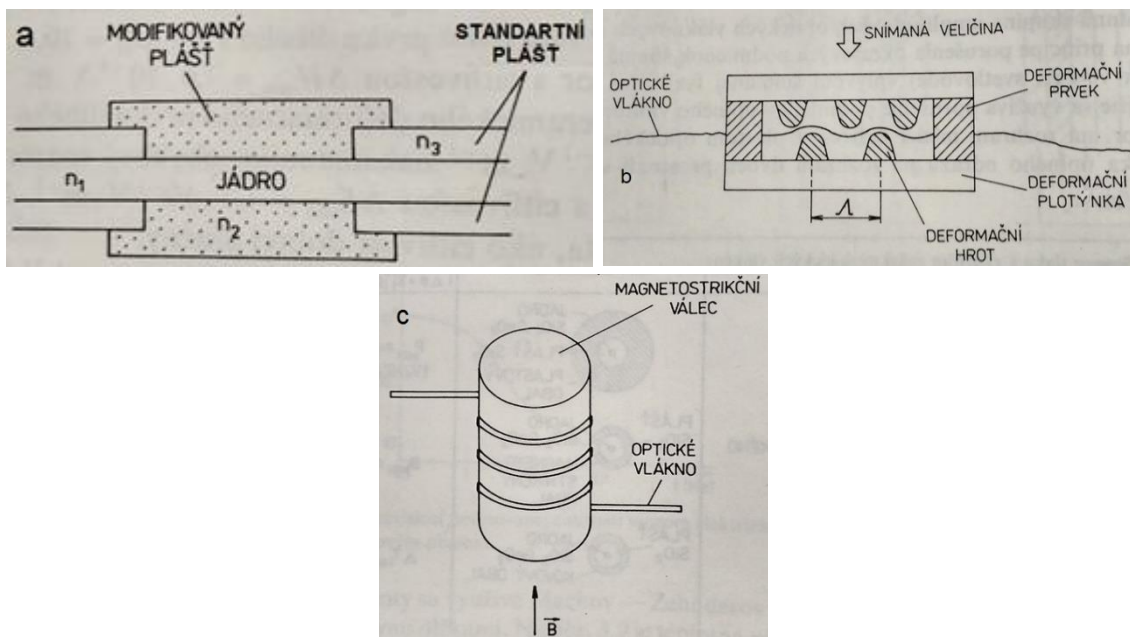
2.6 Příklady konstrukce optických vláknových senzorů a jejich současné využití v biomedicínských aplikacích

Konstrukce optických vláknových senzorů lze obecně rozdělit do dvou hlavních oblastí.

1) Intrinsické senzory

V nich se optické vlákno používá jako snímací prvek. Při měření se využívá vlivu snímané veličiny na přenosové vlastnosti optického vlákna, přičemž se může měnit intenzita přenášeného optického signálu, jeho fáze, frekvence nebo například polarizační stav. Příklady takovýchto konstrukcí můžeme vidět na obrázku 2.11. Konstrukce na obrázcích (a) a (b) jsou konkrétně příklady měření intenzity dopadajícího světla. V případě (a) je holé jádro optického vlákna ponořeno v kapalině o určitém indexu lomu. Pokud se na povrch jádra přichytí kapička oleje rozpuštěná v kapalině, dojde k porušení podmínek totálního odrazu a světlo se vyváže ven. Tímto způsobem je možno měřit koncentraci oleje v kapalině (v rozsahu 0 až

200ppm). Konstrukce (b) je tlakový senzor, který funguje na principu porušení podmínky totálního odrazu důsledkem mikro ohybů optického vlákna. Konstrukce (c) funguje na principu změny fáze světla procházejícího optickým vláknem. Optické vlákno je obmotáno okolo magnetostrikčního válce. Při působení magnetické indukce na válec se změní jeho poloměr, což způsobí protažení optického vlákna, a tím i změnu dráhy světla. Tento princip se používá i v zapojení, jako Mach-Zehnderův interferometr, což zvyšuje citlivost měření. (Turán a Petřík 1991)

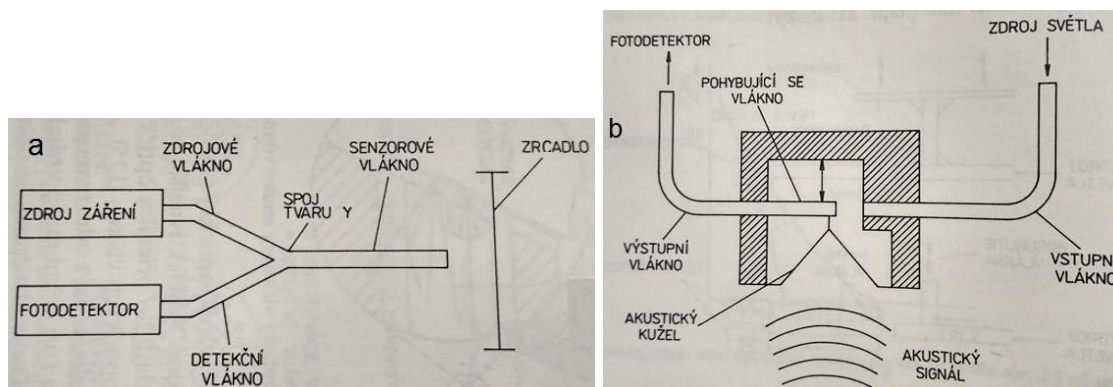


Obr. 2.11: Příklady konstrukcí intrinsických optovláknenných senzorů.
(Turán a Petřík 1991)

2) Extrinsické senzory

V extrinsických senzorech se optické vlákno používá jako prvek vstupu a výstupu optického signálu. Modulace optického signálu probíhá mimo optické vlákno, z tohoto důvodu je nutné, aby šíření světla bylo co nejméně závislé na okolních podmínkách. Tyto typy senzorů se využívají i v měřících přístrojích, jako jsou interferometry, Dopplerovy měřiče rychlosti atd. Jejich výhodou je, že mají nízkou hmotnost a dokáží měřit i na těžko přístupných místech. Příklady extrinsických optických senzorů jsou na obrázku 2.12. Senzor na obrázku (a) je tvořen optickým vláknem typu Y, které slouží jako vstup i výstup světelného signálu. Modulace signálu se provádí modulací

zrcadla nějakou fyzikální veličinou. V konstrukci (b) je jedno vlákno pevně usazené a druhé je připevněno na pohyblivou membránu. Modulace signálu zde probíhá rozkmitáním membrány akustickými vlnami. Toto je příklad optovláknenného akustického mikrofону. (Turán a Petřík 1991)



Obr. 2.12: Příklady konstrukcí extrinsických optických vláknových senzorů. (Turán a Petřík 1991)

Biomedicínské aplikace

Výroba optických vláknových senzorů pro biomedicínské aplikace začala již téměř před 20 lety. Důvodem jejich rozmachu v tomto oboru se stala jejich spolehlivost, biokompatibilita a relativní jednoduchost v sensor – fyzikální interakci. V průběhu let byly vyvinuty jak invazivní tak neinvazivní metody měření, které využívaly převážně křemičitá nebo plastová optická vlákna, jež byla použita různými způsoby měření např. transmisně, na odraz světla nebo třeba byla měřena fluorescence z určitého materiálu, který působil jako extrinsický senzor. (Keck 1996)

Současný výzkum a vývoj detekce za použití optických vláknových senzorů v oblasti biochemie je velmi pestrý a rozšířený. Zabývá se například od detekce reaktivních kyslíkových látek (ROS), konkrétně H_2O_2 vznikajících při „buněčném stresu“ (Koren et al. 2016), přes měření svalové tenze jednotlivých vláken (Go et al. 2017), termometrické měření v intra aortické sondě (Mendez 2016), až po enzymatickou detekci nepřeberného množství látek jakými mohou být: ethanolové výpary, glukóza, močovina, ATP, těžké kovy atd. (Wolfbeis 2004)

3 Senzorové pole optického vláknového senzoru

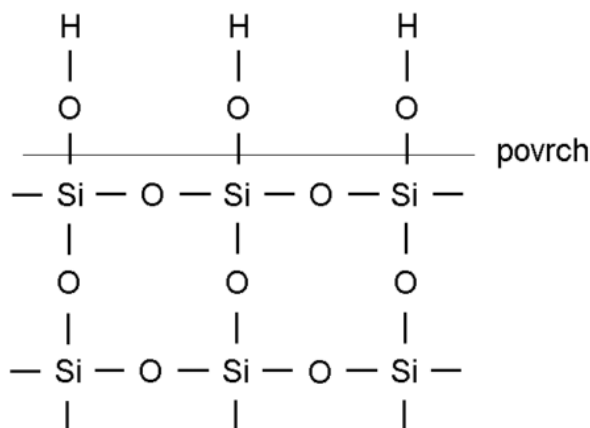
Zatím byla řeč jen o přivedení signálu k sensorovému poli a jeho odvedení do detektoru, kde se dále zpracuje. Aby byl senzor schopný detekce, musí mít speciálně navržené sensorové pole k detekci látky, kterou chceme detekovat. Zároveň musí mít aktivní prvek sensorového pole vysokou selektivitu vůči detekovaným molekulám, protože detekované molekuly mohou být jen minoritní složkou ve zkoumaném roztoku. Takovouto vlastností vynikají například enzymy, které mají při enzymatických reakcích velmi vysokou selektivitu vůči danému substrátu. Aby bylo možné tyto reakce detekovat optickým vláknem, je potřeba enzymy navázat na „manipulovatelné“ medium. V tomto případě byla zvolena funkcionalizovaná křemičitá nanovláknna, vzhledem k jejich dalším, níže popsaným výhodám.

3.1 Křemičitá nanovláknna

Z chemického hlediska by se dalo říci, že jsou tvořena molekulami SiO_2 , které jsou metodou elektrostatického zvlákňování zesíťované do nanovláknenné vrstvy. Z hlediska použití v senzorech poskytují řadu výhod. Zejména pro biologické aplikace, protože jsou biodegradabilní i biokompatibilní. Další výhodou je, že jako nanovláknna mají obrovský měrný specifický povrch, v řádech desítek m^2/g . To spolu s jejich povrchovou strukturou, znázorněnou na obrázku 3.1, která poskytuje velké množství vazebných míst, umožňuje imobilizovat na jejich povrch velké množství molekul. To by mělo mít pozitivní vliv na citlivost senzoru. Přesto, že jsou to nanovláknna, zachovávají si dostačující mechanické vlastnosti pro manipulaci s nimi na vzduchu i v kapalinách. (Šlamborová et al. 2012)

Dalším zajímavým jevem pozorovaným u struktur oxidu křemičitého je fotoluminiscence. K excitaci oxidu křemičitého je potřeba světlo alespoň blízké UV (např.:325nm), při kterém byla fotoluminiscence pozorovaná již pouhým okem. Zářivý přechod se u tohoto jevu uskutečňuje na povrchové vazbě Si– OH. Intenzitu fotoluminiscence lze ovlivňovat různými způsoby:

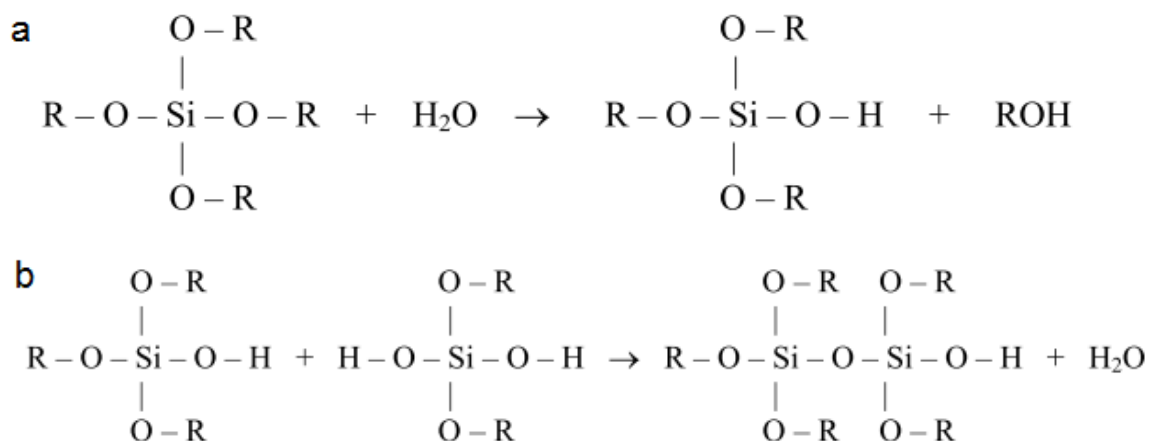
- **Změnou okolního media**– elektrofilní medium způsobuje zhášení luminiscence, nukleofilní ji až několiknásobně zvýší.
- **Funkcionalizací povrchu**– snížením počtu OH skupin dochází obecně k útlumu fotoluminiscence, ale navázání proteinu na imobilizovaný antigen také způsobuje změnu fotoluminiscence. Tohoto jevu může být využito v senzorických systémech. (Burýšková 2015)



Obr. 3.1: Povrch křemičitého nanovlákná (Exnar 2016)

3.1.1 Příprava křemičitých nanovláken

Jak již bylo zmíněno, připravují se metodou elektrostatického zvlákňování z roztoku křemičitého solú. Křemičitý sol se připraví kyselou katalýzou tetraalkoxysilanu v roztoku isopropyl alkoholu a vody, viz Obr. 3.2. Jako kyselina se používá kyselina chlorovodíková. V prvním kroku dojde k hydrolyze tetraalkoxysilanu, při níž se nahradí alkoxy skupina za hydroxylovou. V dalším kroku začnou jednotlivé, takto vytvořené, molekuly polykondenzovat. Kyselou katalýzou dochází k přednostnímu růstu makromolekul na konci řetězce, tudíž vznikají polymerní soly.



Obr. 3.2: (a) hydrolýza tetraalkoxysilanu, (b) polykondenzace (Exnar 2016)

Velmi důležitý je při výrobě solu správný molární poměr vody vůči alkoxydu, který udává bezrozměrné číslo k v rovnici (9). Může se pohybovat od 1,6 do 3 a jeho pokles koresponduje s poklesem viskozity zvláknovaného roztoku, a tím i snížením tloušťky vyrobených nanovláken.

$$k = \frac{[\text{H}_2\text{O}]}{[\text{Si}(\text{OR})_4]} \quad (9)$$

Obdobně je definovaný i molární poměr kyseliny chlorovodíkové vůči tetraalkoxysilanu, jako bezrozměrné číslo m , viz rovnice (10), nabývající hodnot od 0,001 do 1.

$$m = \frac{[\text{HCl}]}{[\text{Si}(\text{OR})_4]} \quad (10)$$

Předtím, než je možné takto připravený sol zvláknit, je nutné v něm zvýšit koncentraci polymeru odpařením rozpouštědla na přibližně 28 až 44%. Tím se zvýší viskozita roztoku. Roztok se obvykle elektrostaticky zvláknuje ze struny na zařízení Nanospider, jehož zvláknovací komoru můžeme vidět na obr. 3.3. Tloušťka výsledných vláken se pohybuje v rozmezí od 100 do 1000nm.

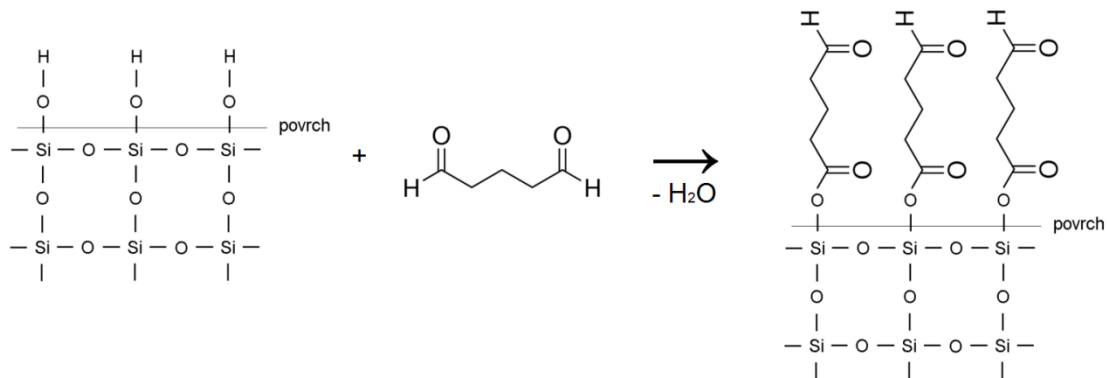


Obr. 3.3: Elektrostatické zvlákňování ze struny (Elmarco s.r.o 2014)

Výsledná nanovlákná jsou vzhledem k velkému množství Si – OH skupin na povrchu poměrně reaktivní a je potřeba je stabilizovat kvůli jejich rozpustnosti ve vodě. Stabilizace se provádí zahříváním nanovláknenné vrstvy. Morfologie vláken se při zahřívání do 850°C nemění, nad tuto teplotu se vrstva přetransformuje do formy křemičitého skla. Během zahřívání se postupně snižuje počet Si – OH skupin na povrchu vláken, čímž se snižuje jejich rozpustnost, ale zároveň také klesá počet vazebných míst. Například při zahřívání na 180°C po dobu 2 hodin je nanovláknenná vrstva schopna vydržet bez rozpuštění v roztoku simulujícíím plicní tekutinu i 7 dní.(Šlamborová et al. 2012; Exnar 2016)

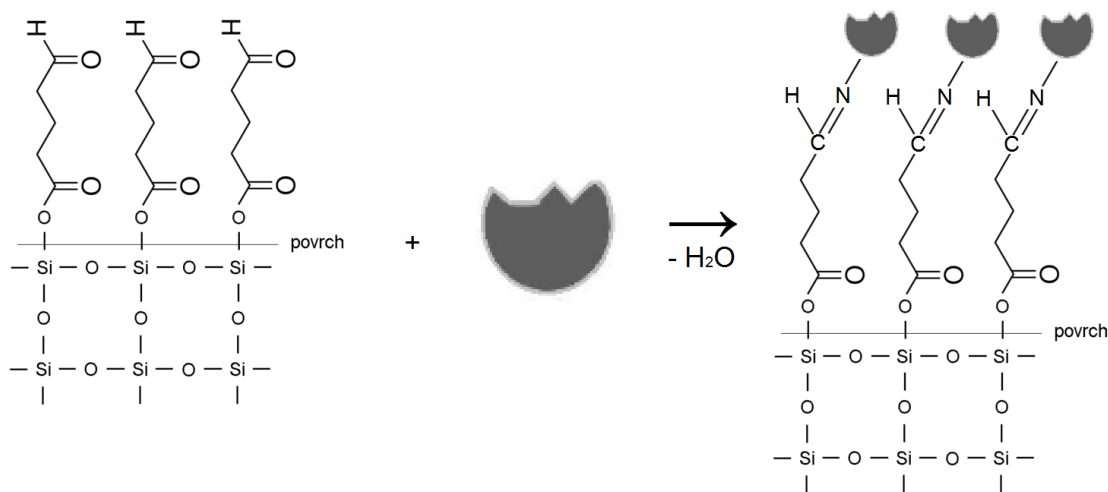
3.1.2 Funkcionalizace křemičitých nanovláken

K funkcionalizaci křemičitých nanovláken se využívá jejich, poměrně reaktivních, Si– OH skupin na povrchu. Při imobilizaci (pro histochemickou reakci) se enzym, z důvodu funkčnosti, připojuje přes linker. Tím může být například glutaraldehyd, který se k povrchu nanovláken váže etherickou vazbou, viz Obr. 3.4.



Obr. 3.4: Funkcionalizace povrchu nanovláken glutaraldehydem

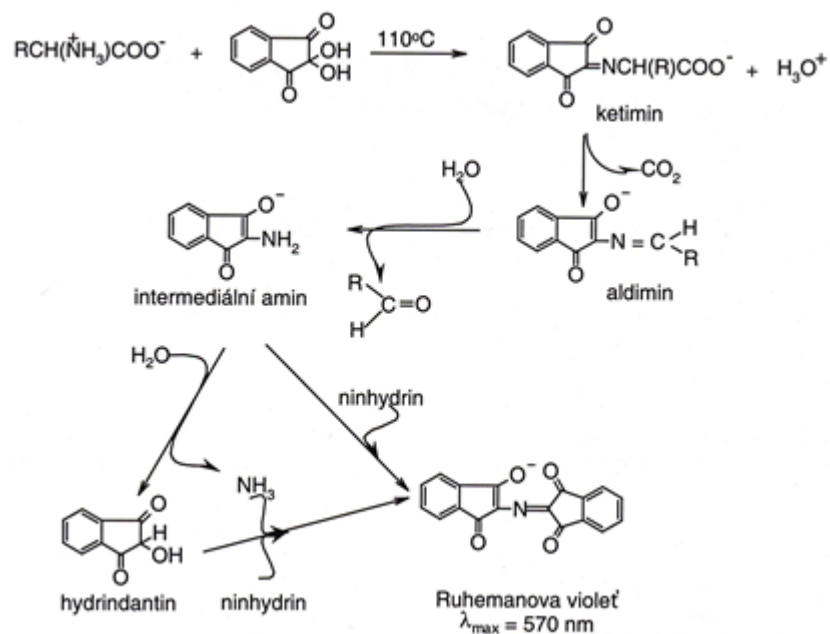
Makromolekula enzymů, konkrétně esterázy, obsahuje bílkovinou část. Tu tvoří polypeptidický řetězec, jehož základní stavební jednotkou jsou aminokyseliny. Reakcí primárního aminu aminokyseliny s aldehydem vzniká Schiffova báze, viz Obr. 3.5.



Obr. 3.5: Imobilizace enzymu na funkcionalizovaná nanovlákná

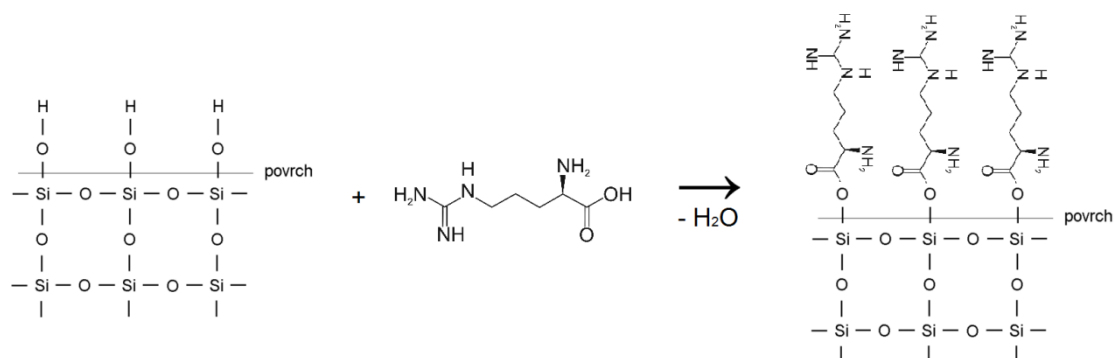
3.1.3 Důkaz aminokyselin pomocí ninhydrinu

Přítomnost aminokyselin v roztoku je možné prokázat reakcí dvou molekul ninhydrinu s primárním aminem aminokyseliny, za vzniku takzvaného Ruhemanova purpuru, který má absorpční maximum na vlnové délce 570nm. Přesné schéma této detekční reakce prošlo v průběhu let značným vývojem a v současnosti se zdá nejpravděpodobnější, že probíhá podle schématu na obrázku 3.6.



Obr. 3.6: Reakce ninhydrinu s primární aminokyselinou

K ověření funkčnosti senzoru je v tomto případě ještě nutné primární aminokyselinu imobilizovat na povrchu křemičitých nanovláken, což je možné reakcí karboxylové skupiny aminokyseliny (v tomto případě Argininem) s Si-OH skupinou na povrchu nanovláken, reakce je znázorněna na obr. 3.7.



Obr. 3.7: Imobilizace křemičitých nanovláken argininem

4 Enzymová analýza

Jak již bylo naznačeno, enzymy jsou vzhledem ke specifitě svých účinků mimořádně výhodná analytická činidla. Navíc analytické metody na nich založené, jsou velmi citlivé, rychlé a umožňují stanovit konkrétní látku v bohaté směsi dalších látek bez její předchozí úpravy nebo izolace. V medicíně jsou již neoddělitelnou součástí současných biochemických vyšetřovacích metod. V praxi mají dvojí uplatnění. Používají se jako analytická činidla pro stanovení široké palety diagnosticky významných látek, a zároveň se sledování hladiny jednotlivých enzymů používá k určení stavu lidského organismu. Například při určování diagnózy akutní monocytární leukemie se využívá detekce enzymu nespecifické esterázy v bílých krvinkách. Toho je v krvi vyšší množství v důsledku většího množství bílých krvinek. (Vodrážka 1996; Zdeněk et al. 2008)

4.1 Struktura enzymů

Enzymy jsou bílkovinné makromolekuly schopné katalytické činnosti. Jejich součástí může být (ale nemusí) nebílkovinná část zvaná kofaktor, který má funkci přenašeče atomů, skupin atomů nebo elektronů při biochemických reakcích, které enzymy katalyzují. Kofaktor může být pevně vázán přímo na makromolekulu enzymu, pak se mu říká prostetická skupina. Také může být vázán jen slabě, přičemž se může i oddělit, a v tom případě je nazýván koenzymem.

Konkrétní enzymatická reakce probíhá v relativně malé části makromolekuly, která se nazývá aktivní centrum. To je tvořeno přesně rozmístěnými funkčními skupinami, které jsou součástí postranních řetězců aminokyselinových zbytků z polypeptidového řetězce. Tyto skupiny mohou být od sebe v polypeptidovém řetězci i velmi vzdálené a jejich vzájemná „spolupráce“ je umožněna svinutím polypeptidového řetězce do speciální 3D struktury. V těchto aktivních centrech bývá několik typů skupin s různými funkcemi:

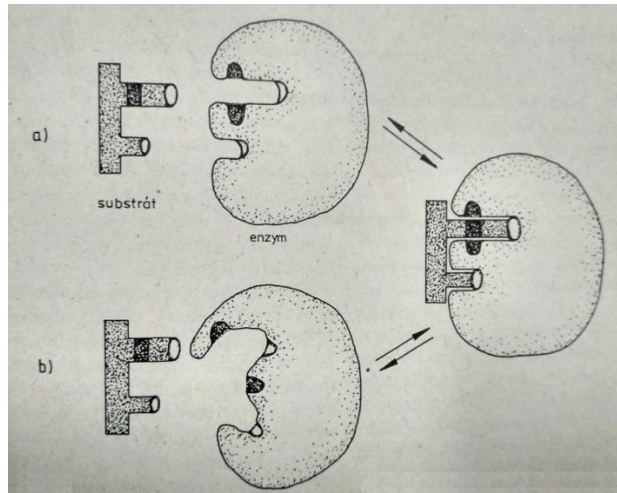
- **Katalyticky aktivní skupiny**– odpovědné za katalýzu reakce.

- **Vazebné skupiny**– jejich úkolem je navázat substrát.
- **Ostatní skupiny** – vytvářejí vhodné chemické prostředí v aktivním centru a jeho vhodnou prostorovou strukturu.

V neposlední řadě ještě enzymy obsahují další vazebná místa, kam se mohou navázat látky ovlivňující jejich aktivitu. Těmito látkami bývají například ionty kovů, které se u některých enzymů mohou podílet na stabilizaci struktury, nebo její změně podmiňující, popřípadě usnadňující, aktivitu enzymů. Tyto místa se poté nazývají stabilizační, respektive aktivační. (Vodrážka 1996)

4.2 Mechanismus reakce enzymu se substrátem

Pohled na přesný reakční mechanismus enzymu se substrátem se v průběhu let velice měnil a vyvíjel. První velmi významnou teorií byla teorie komplementarity, neboli teorie zámku a klíče, se kterou přišel významný organický chemik E. Fischer v roce 1894. Říkal, že aktivní centrum je tvořeno rigidní strukturou (zámek), do které přesně strukturně zapadá specifický substrát (klíč). Tato teorie by však nedokázala dostatečně vysvětlit obrovskou rychlost reakce (až 10^{14} krát vyšší než nekatalyzované), protože geometrické uspořádání „zámku“ a „klíče“ nutné pro reakci by bylo příliš pomalé. Průlom nastal s pomocí rentgenostrukturní analýzy, díky níž se zjistilo, že komplex enzym – substrát může mít jinou konformaci než samotný enzym. Tento objev dal podnět ke Koshlandově teorii „ruky v rukavici“, neboli indukovanému přizpůsobení konformace aktivního centra vůči přicházejícímu substrátu, viz Obr. 4.1. Bylo tedy zjištěno, že makromolekuly enzymů jsou tvořeny pevným strukturním jádrem s limitovanými konformačními stavy a poměrně dynamickým povrchem, což je předpokladem pro vysokou rychlost reakce.



Obr. 4.1: Mechanismus enzymatické reakce (a) „zámek a klíč“, (b) „ruka v rukavici“. (Vodrážka 1996)

Dynamický povrch by ovšem sám o sobě pro takovoto rychlosti reakce a efektivitu nestačil. Působí zde proto ještě několik důležitých efektů.

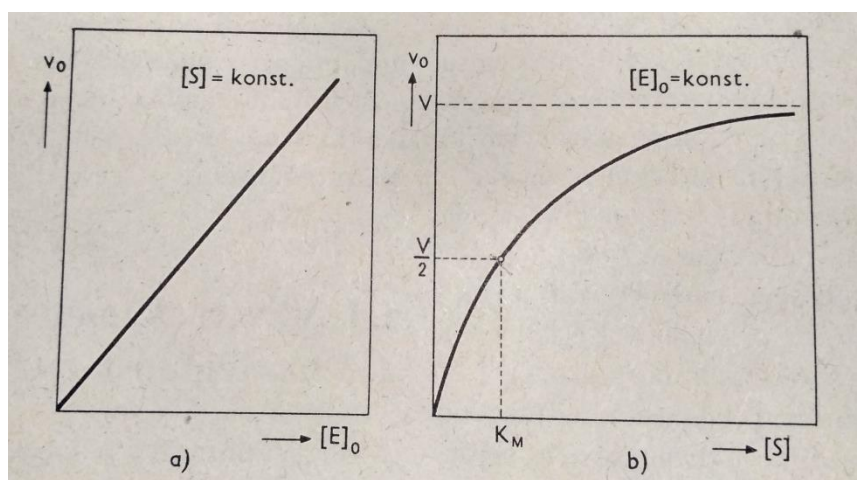
- **Efekt přiblížení** – vazby molekul substrátu jsou v aktivním centru obvykle nekovalentní (cca 0,3nm), čímž je způsobeno vytěsnění jakýchkoliv jiných molekul (např. H_2O), tím se vytvoří specifické „mikroprostředí“, které zvýší reaktivitu jednotlivých funkčních skupin aktivního centra i substrátu.
- **Koncentrační efekt** – vazbou v aktivním centru se substrát koncentruje, což způsobuje, že ho v reakčním prostoru může být až 10^5 krát vyšší koncentrace než v okolním roztoku → rychlost reakce je přímo úměrná koncentraci reaktantů.
- **Efekt orientace substrátu** – umožní, že molekuly substrátu jsou efektivně orientované, aby došlo k usnadnění reakce. Naproti tomu v klasickém roztoku je orientace reaktantů náhodná.
- **Způsob fixace substrátu** – energie uvolněná při vzniku vazeb vázající substrát se využije na překonání aktivační energie enzymatické reakce. Z tohoto důvodu je nižší rychlost reakce nesespecifických substrátů, které nemají potřebné funkční skupiny, jež by navázáním dodaly potřebnou energii pro aktivaci reakce. (Vodrážka 1996)

4.3 Enzymová kinetika

Rychlost průběhu enzymatických reakcí je ovlivňována několika faktory.

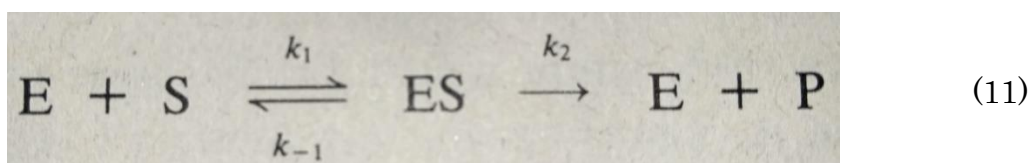
- Koncentrací substrátu
- Množstvím enzymu
- Fyzikálně chemickými vlastnostmi prostředí
- Přítomností efektorů (modifikátorů)

Při studiu závislosti různých koncentrací substrátu nebo enzymu v roztoku byly naměřeny následující závislosti, znázorněné na obrázku 4.2.



Obr. 4.2: Závislosti rychlosti enzymatické reakce na koncentraci substrátu nebo enzymu. (a) při konstantní koncentraci substrátu, (b) při konstantní koncentraci enzymu. (Vodrážka 1996)

Pro vysvětlení těchto závislostí navrhli Michaelis a Mentenová následující jednoduché obecné reakční schéma:



Kde E je enzym, S substrát, ES komplex enzym–substrát, P produkt a k_1 , k_{-1} , k_2 jsou rychlostní konstanty jednotlivých reakcí.

které vychází z představy, že při reakci jako meziprodukt vznikne komplex enzym – substrát. Při nízké koncentraci substrátu není všechen enzym vázán v komplexu $[E] > [ES]$, takže rychlost reakce (vzniku produktu) se

postupně zvyšuje s přibývajícím substrátem podle kinetiky prvního řádu. Ve chvíli, kdy je koncentrace substrátu dostatečně vysoká $[E] \ll [ES]$, tak dochází k nasycení enzymu substrátem a reakce získává trend kinetiky nultého řádu, proto se křivce z Obr. 4.2b říká saturační křivka. Při nasycení enzymu substrátem je dosažena mezní rychlost reakce $v = V$. Matematický popis závislosti z obrázku 4.2b vystihuje rovnice Michaelise a Mentenové pro závislost počáteční rychlosti jednosubstrátové reakce na koncentraci substrátu $[S]$:

$$v = \frac{V * [S]}{K_m + [S]} \quad (12)$$

Kde V je mezní rychlost a K_m je Michaelisova konstanta

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}; \quad V = k_2 * [E]_0 \quad (13)$$

$[E]_0$ je výchozí koncentrace enzymu.

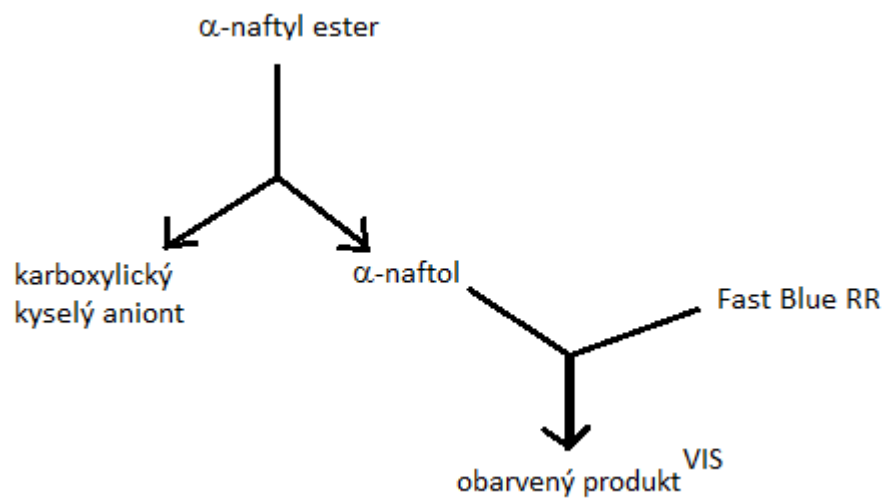
Z rovnice a grafu vyplývá, že Michaelisova konstanta je rovna polovině mezní rychlosti, a zároveň vypovídá o afinitě enzymu k danému substrátu. Čím je Michaelisova konstanta nižší, tím je vyšší afinita k substrátu, z čehož plyne, že u enzymů působících na více substrátů považujeme za hlavní ten, jehož K_m je nejnižší.

Dalšími vlivy ovlivňujícími rychlost enzymatické reakce jsou např. teplota, pH a látky ovlivňující činnost enzymů (modifikátory). Se vzrůstající teplotou rychlost reakce stoupá, až do bodu denaturace bílkovinné části enzymu, z čehož plyne, že každý enzym má své funkční teplotní optimum. Stejně tak u něj můžeme určit i optimální pracovní pH. Může být v řádu desetin i jednotek a je způsobeno protonyzací funkčních skupin v aktivním centru enzymu. (Vodrážka 1996)

5 Monocytární leukémie

Leukémie neboli rakovina krve obecně vzniká zhoubnou transformací kmenové (hemopoetické) buňky kostní dřeně. Při této transformaci kmenová buňka ztrácí schopnost diferenciací (přestává se dělit na funkcionalizované buňky odlišné od počátečních kmenových), a to obvykle na úrovni blastů (primitivních nezralých buněk, které se kromě jiného od zdravých leukocytů odlišují svou velikostí). Zároveň si zanechává schopnost proliferace (stále se dělí), která se vymyká autoregulačním pochodům. Tím dojde ke zvýšení množství leukemických buněk v kostní dřeni i v periferní krvi. V kostní dřeni je jich až více než 30% z počtu všech buněk a v periferní krvi více než 5%. Tyto buňky nejsou zcela funkční, a zároveň svým přemnožením „vytlačují“ zdravé funkční krevní buňky (červené krvinky, krevní destičky...), jejichž nedostatek způsobuje zhoršující se funkčnost organismu. Příznaky tedy může být ztráta tělesné výkonnosti, únava, krvácivost, malátnost, nebo velmi zhoršený průběh jindy banální nemoci, v důsledku nedostatku bílých krvinek.

Monocyty jsou konkrétně největší bílé krvinky v krvi, které se po vniknutí do tkání a orgánů mění na makrofágy, které jsou schopny fagocytózou odbourat nefunkční nebo mrtvé buňky a jiný korpuskulární materiál. Při monocytární leukémii se v krvi vyskytuje právě zvýšené množství nediferencujících monocytů a monoblastů (prekurzory monocytů). Buňky monocytů obsahují enzym nespecifickou esterázu, kterou je možné histochemicky prokázat. Nespecifická esteráza dokáže hydrolyzovat aromatické estery a předpokládá se, že je součástí detoxikačního aparátu buňky. Histochemický důkaz probíhá tak, že se na enzym naváže jeho specifický substrát (α -naftyl acetát), který je rozštěpen na acetátový aniont a α -naftol. Ten posléze reaguje v přítomnosti diazoniové soli za vzniku barevné nerozpustné sraženiny, viz Obr. 5.1. (Li et al. 1973; Manchenko 2002; Češka et al. 2015)



Obr. 5.1: Schéma histochemického prokázání Nespecifické esterázy.
(Manchenko 2002)

6 Plán experimentu

Experimentální část se zaměřuje na několik hlavních oblastí.

- Dokázat funkčnost optického vláknového senzoru a tím i aktivitu esterázových skupin immobilizovaných na povrchu křemičitých nanovláken.
- Vyhodnotit detekční limit a stabilitu takto navrženého experimentálního systému.
- Vyzkoušet pomocí senzoru detekovat aktivitu esterázových skupin v krevních nátěrech.
- Návrh a realizace vylepšené elektrické části senzoru.

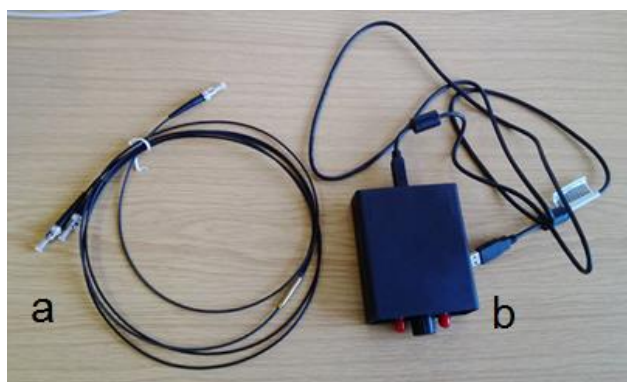
7 Ověření funkčnosti optického vláknového senzoru

7.1 Použité laboratorní pomůcky a zařízení

Veškeré pokusy a příprava vzorků byly prováděny v laboratořích Technické univerzity v Liberci.

Optoelektronický měřicí systém

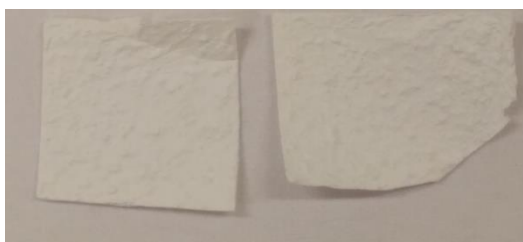
Zdrojem a zároveň detektorem signálu senzoru byl měřicí přístroj, který můžeme vidět na obrázku 7.1. Zdrojem světla v něm byla polovodičová LED dioda 520HR3C od firmy Hebei IT o vlnové délce 633nm a detektorem byla fotodioda BPX 65 od společnosti Siemens. Bylo použito multimodové plastové optické vlákno.



Obr. 7.1: Obrázek optoelektronické části senzoru. (a) optické vlákno typu Y, (b) zdroj a zároveň detektor signálu.

Nanovláknenné vrstvy

Pomocí laboratorního přístroje Nanospider byly jednotlivými výzkumnými skupina připraveny dva různé druhy nanovláknenných vrstev. Nanovláknenná vrstva z SiO_2 a z PAA/PVA



Obr. 7.2: Snímek křemičité nanovláknenné vrstvy.

Mikroskopická skla

Standardní skleněná laboratorní mikroskopická sklíčka. Podložní sklíčko s rozměry 76*26*1mm a krycí sklíčko s rozměry 24*24*0,17mm.

7.2 Použité chemikálie

Všechny použité chemikálie byly dodány od firmy Sigma-Aldrich.

Glutaraldehyd

Pro imobilizaci byl použit 25% roztok glutaraldehydu ve vodě s katalogovým označením G6257. CAS: 111-30-8. Molekulární hmotnost 100,12g/mol.

Esteráza

Enzym byl izolován z prasečích jater. Katalogové číslo enzymu na stránkách výrobce je E3019. CAS: 9016-18-6.

α -naftyl acetát

Molekulová hmotnost 186,21g/mol. CAS: 830-81-9. Katalogové číslo N8505 s čistotou nad 98%.

Aminokyseliny

L-Tyrosin – katalogové číslo T3754. CAS: 60-18-4. Molekulová hmotnost 181,19g/mol.

L-Arginin – katalogové číslo A5006. CAS: 74-79-3. Molekulová hmotnost 174,20g/mol.

L-Leucin – katalogové číslo L8000. CAS: 61-90-5. Molekulová hmotnost 131,17g/mol.

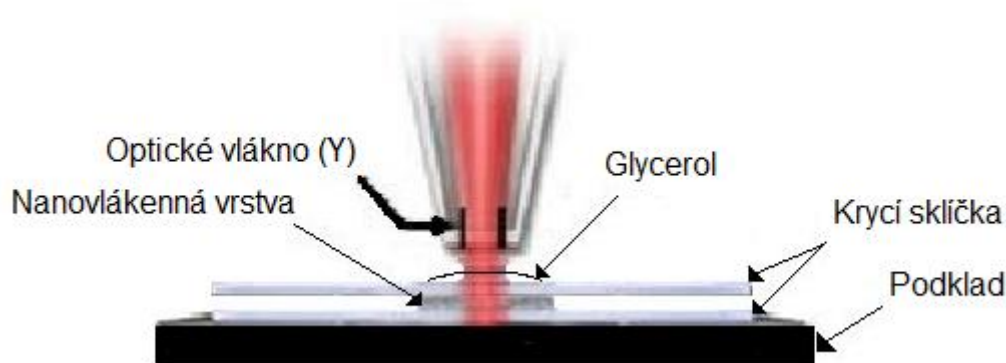
Azobarviva

Fast Blue RR Salt – katalogové číslo F0500. CAS: 14726-29-5. Molekulová hmotnost 387,89g/mol.

Fast Blue B Salt – katalogové číslo DS805. CAS: 14263-94-6. Molekulová hmotnost 475,47g/mol.

7.3 Měření intenzity detekovaného signálu v závislosti na sestavení sensorového pole

Pro počáteční vyzkoušení citlivosti senzoru a konkrétně vlivu sestavení sensorového pole na intenzitě detekovaného záření bylo uděláno několik pokusů s různým sestavením sensorového pole. Obecný design sensorového pole je naznačen na obrázku 7.3.

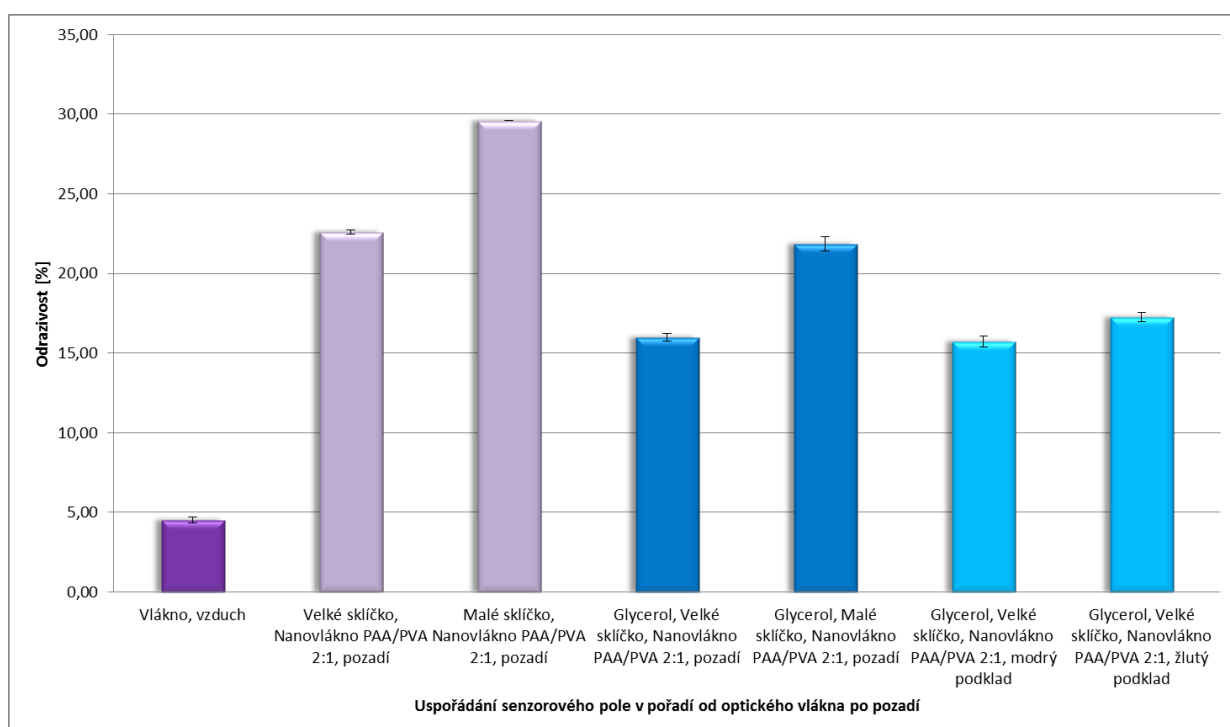


Obr. 7.3: Schéma sestavení sensorového pole.

Pro zjištění vlivu jednotlivých komponent na intenzitu odraženého světla se jednotlivé díly uvedené ve schématu, při měření, měnily nebo odebíraly. Výsledky těchto měření jsou znázorněny v tabulce 7.1. Změna uspořádání sensorového pole oproti tomu na obrázku 7.3 je myšlena v pořadí tak, jak světlo vychází z optického vlákna a postupně prochází skrz jednotlivé komponenty. V uspořádání je uvedeno i pozadí, což byl při těchto pokusech stůl, protože světlo z optického vlákna bylo schopné projít všemi předešlými vrstvami. Výsledná odrazivost neboli intenzita detekovaného světla je vztažena na procentuální hodnotu z intenzity vstupního záření. Přehledně jsou výsledky z tabulky 7.1 vyneseny v grafu 7.1.

Tab. 7.1: Porovnání odrazivosti při různých uspořádání sensorového pole.

Uspořádání sensorového pole	Odrazivost [%]	Odchylka [%]
Vlákno, vzduch	4,52	0,184
Velké sklíčko, Nanovláknno PAA/PVA 2:1, pozadí	22,59	0,153
Malé sklíčko, Nanovláknno PAA/PVA 2:1, pozadí	29,57	0,004
Glycerol, Velké sklíčko, Nanovláknno PAA/PVA 2:1, pozadí	15,98	0,235
Glycerol, Malé sklíčko, Nanovláknno PAA/PVA 2:1, pozadí	21,84	0,435
Glycerol, Velké sklíčko, Nanovláknno PAA/PVA 2:1, modrý podklad	15,73	0,349
Glycerol, Velké sklíčko, Nanovláknno PAA/PVA 2:1, žlutý podklad	17,25	0,310



Graf 7.1: Závislost změny detekované intenzity záření na sestavení sensorového pole.

Jak již bylo naznačeno, tak z výsledků je patrné, že vliv na odrazivost má i pozadí a především jeho absorpční spektrum. Modrý podklad absorbuje červené záření více než žlutý. Vliv pozadí je dán tím, že nanovláknenná

vrstva, která byla použita při tomto měření byla příliš tenká. Glycerol je pro měření použit, protože má vyšší index lomu než vzduch (1,473), takže je schopen vyvézt větší množství světla z optického vlákna do vzorku, čímž by se měla zvyšovat citlivost měření celé aparatury. Podobný vliv má i použití tenčího krycího sklíčka, protože se sníží dráha, kterou záření musí urazit z optického vlákna do nanovlákněné vrstvy, a tím i klesne množství záření, které se vyváže mimo sensorové pole.

7.4 Funkcionalizace SiO₂ nanovláken a měření jejího vlivu na intenzitu odraženého světla

Pro ověření detekčních schopností senzoru bylo navrženo několik různých pokusů, při kterých jsem funkcionalizoval křemičitou nanovlákněnou vrstvu takovými látkami, které jsou schopné s určitou selektivitou navázat konkrétní látky z roztoku. Tímto navázáním by mělo dojít ke změně v absorpčním spektru funkcionalizované nanovlákněné vrstvy, a tím i ke změně intenzity odraženého světla, které je detekováno detektorem. Sestavení sensorového pole bylo při těchto pokusech stejné jako na obrázku 8.3.

7.4.1 Detekce aktivity enzymu Esterázy pomocí α - naftyl acetátu

Důkazová reakce probíhá tak, že esteráza, imobilizovaná na povrchu nanovlákněné vrstvy z roztoku vychytá a rozštěpí substrát (α - naftyl acetát). Při této reakci se z molekuly α - naftyl acetátu odštěpí acetát a na zbylý α - naftol se naváže azobarvivo, které musí být také obsaženo v roztoku. Tato vzniklá sloučenina se k molekule esterázy váže kovalentně, takže v místě navázání způsobí zbarvení nanovlákněné vrstvy.

Pracovní postup

- Křemičitá nanovláknna se na 10 minut vloží do 2ml 2% roztoku glutaraldehydu.
- Promytí ve fosfátovém pufru pH= 7,2.
- Poté se připraví roztok 2mg esterázy v 20ml fosfátového pufru (pH= 7,2) a po dobu 10 minut se v něm nechají inkubovat funkcionalizovaná nanovláknna glutaraldehydem.
- Následuje promytí ve fosfátovém pufru pH= 7,2.
- Připraví se roztok 3mg substrátu (α -naftyl acetátu) s 9mg azobarviva (Fast Blue B nebo Fast Blue RR salt) ve fosfátovém pufru (pH=7,2), do kterého vložíme nanovláknna imobilizovaná esterázou. Inkubace probíhá 10 minut za laboratorní teploty.



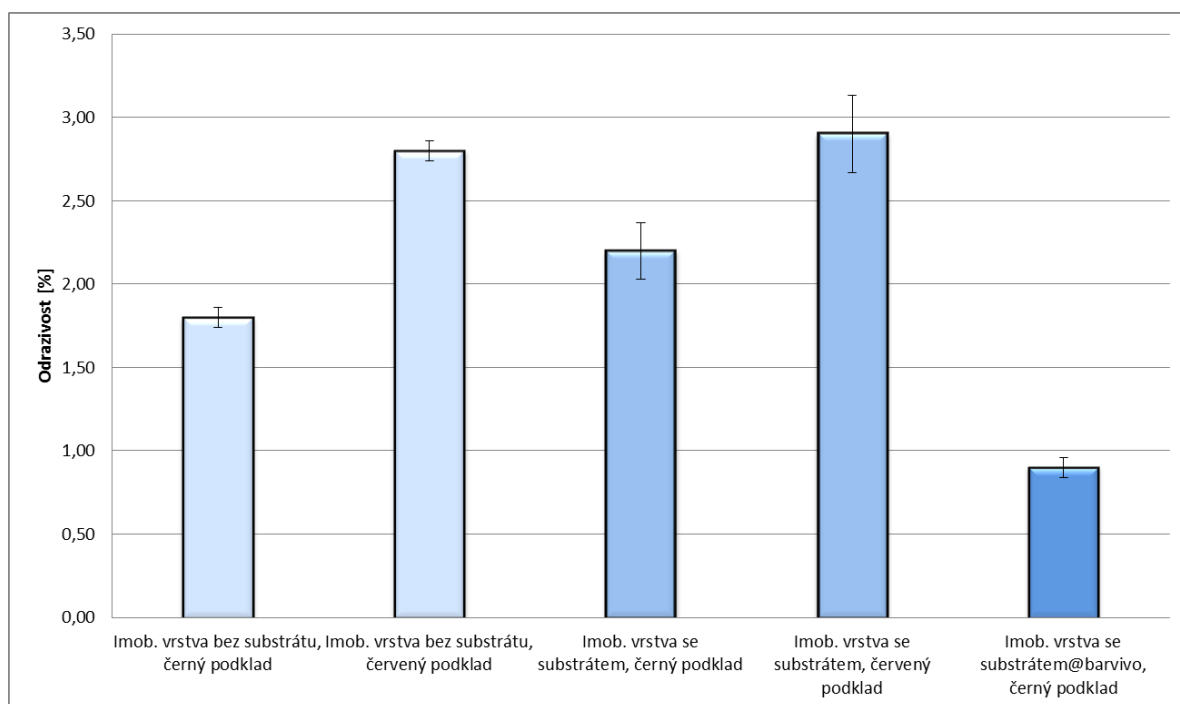
Obr. 7.4: Nanovláknna s imobilizovanou esterázou, na kterou je navázán substrát s azobarvivem.

Na obrázku 7.4 jsou vidět vzorky imobilizované nanovláknenné vrstvy, na které je navázán i substrát s azobarvivem. V tabulce 7.2 je pak porovnání změny odrazivosti, která byla měřena mezi jednotlivými kroky syntézy. Odrazivost při všech pokusech byla velmi malá, což by mělo být způsobeno tím, že vzorky byly při měření mokré a tím se většina záření, při průchodu sensorovým polem, odrazila mimo optické vlákno. Ze stejného důvodu je stále patrný vliv barvy pozadí, přestože nanovláknenná vrstva byla podstatně tlustší než v předchozích pokusech a v suchém stavu již záření plně absorbovala. Přesto je patrná mírná změna odrazivosti při navázání substrátu (v tomto kroku syntézy je vrstva „okometricky“ stále bílá jako původní křemičitá vrstva). Výrazný pokles odrazivosti byl naměřen až při

navázání azobarviva, to zapříčiní skokový nárůst absorpce v červené části spektra, který potvrzuje i změna barvy nanovlákněné vrstvy, viz Obr. 7.4. Výsledky z tabulky 7.2 jsou vyneseny do grafu 7.2.

Tab. 7.2: Intenzita odraženého záření funkcionalizované SiO₂ nanovlákněné vrstvy

Funkcionalizace nanovláken	Odrazivost [%]	Odchylka [%]
Imob. vrstva bez substrátu, černý podklad	1,80	0,06
Imob. vrstva bez substrátu, červený podklad	2,80	0,06
Imob. vrstva se substrátem, černý podklad	2,20	0,17
Imob. vrstva se substrátem, červený podklad	2,90	0,23
Imob. vrstva se substrátem@barvivo, černý podklad	0,90	0,06



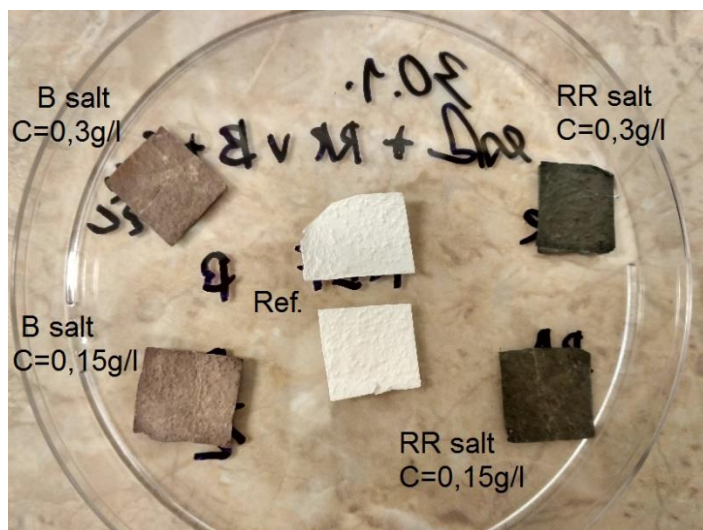
Graf 7.2: Závislost změny intenzity odraženého záření na funkcionalizaci nanovláken

Tím, že se velké množství záření, při snímání mokrých vzorků, odrazí mimo optické vlákno, dochází k velké ztrátě signálu, čímž se velice snižuje citlivost celého senzoru. Z tohoto důvodu se všechny další vzorky nechaly před testováním usušit. Usušením vzorků došlo při snímání k nárůstu intenzity odraženého světla, jak můžeme vidět v tabulce 7.3. V této tabulce je porovnána naměřená odrazivost vzorků vůči referenčnímu. Při funkcionalizaci vzorků byla k azokopulační reakci použita dvě různá azobarviva (Fast Blue B salt a Fast blue RR salt) o dvou různých koncentracích. Referenčním vzorkem byl vzorek imobilizovaný esterázou před proběhnutím azokopulační reakce, viz Obr. 7.5.

Tab. 7.3: Odrazivost funkcionalizovaných nanovláknenných vrstev při použití různých azobarviv o různých koncentracích.

Barvivo	Odrazivost [%]		Odchylka [%]
	0,3 [g/l]	0,15 [g/l]	
Koncentrace substrátu	0,3 [g/l]	0,15 [g/l]	
Fast Blue B salt	6,9	9,3	0,40
Fast blue RR salt	6,3	6,9	0,26
Reference	16,4		0,39

Z tabulky 7.3 je zároveň patrné, že detekční systém byl schopen zaznamenat změnu koncentrace substrátu. S nižší koncentrací substrátu se snížila absorpce záření vzorkem, čímž se zvýšila detekovaná odrazivost. Vliv pozadí v tomto případě již nebyl znát, protože suchá nanovláknenná vrstva byla dostatečně silná, aby se v ní záření plně absorbovalo nebo odrazilo. Zároveň je při porovnání dvou použitých barviv patrné, že barvivo Fast blue RR salt absorbuje použité záření více než Fast blue B salt.



Obr. 7.5: Porovnání vzorků před proběhnutím azokopulační reakce (Ref.) a po jejím proběhnutí pro dvě různá azobarviva (Fast blue B salt a Fast blue RR salt) o koncentracích substrátu 0,3 a 0,15g/l.

Detekce aminokyselin pomocí ninhydrinu

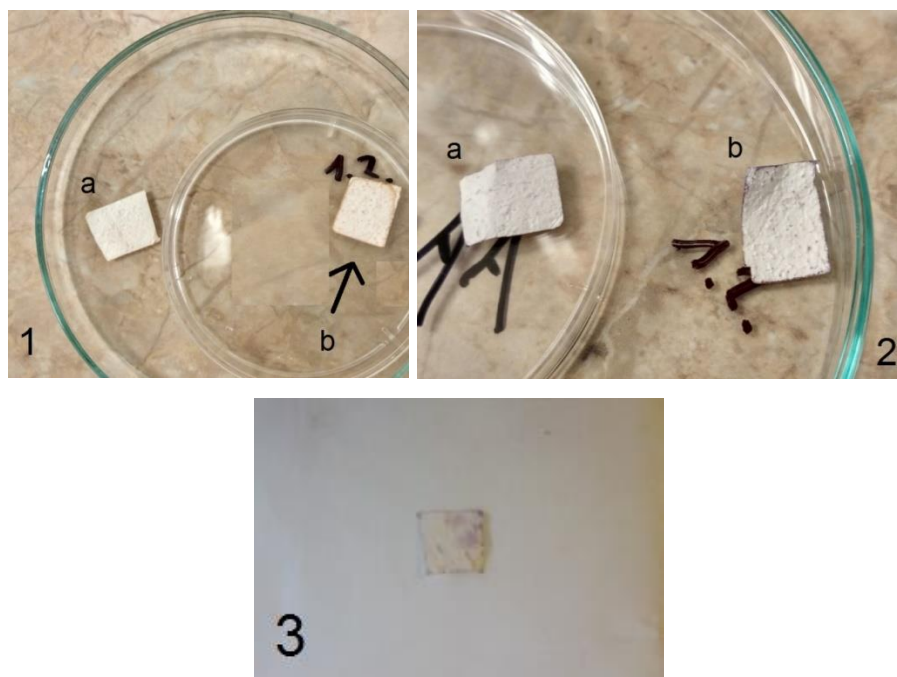
Teoretický rozbor důkazové reakce je popsán v kapitole 3.1.3. V těchto testech bylo úkolem dokázat detekovat přítomnost imobilizovaných aminokyselin na povrchu křemičité nanovlákně vrstvy. Pro pokusy byly imobilizovány tři různé aminokyseliny: Arginin, Leucin a Tyrosin.

Pracovní postup

- Křemičitá nanovláknina se na 10 minut vloží do 2ml 2% roztoku glutaraldehydu.
- Promytí ve fosfátovém pufru pH= 7,2.
- Ponoření do 1% roztoku Tyrosinu na 10 minut.
- Vysušení.
- Detekce pomocí 0,1% roztoku ninhydrinu v isopropylalkoholu.
- Zahřátí na 110°C– vyvolání barevné reakce.

Reakce alfa aminokyselin s ninhydrinem po zahřátí na 110°C způsobí zbarvení nanovlákně vrstvy, viz Obr. 7.6. Ze snímků je patrné, že reakce proběhla jen v určitých místech nanovlákně vrstvy, a to zejména na okrajích a v místech „zakřivení“ povrchu. To může být způsobeno migrací molekul ninhydrinu v kapalině (ve chvíli když je vrstva mokrá) do míst s vyšší potenciální energií, což jsou právě místa „zakřivení“ tak, aby se tato

energie snížila. Takto nehomogenní rozmístění je velmi složité na vyhodnocení a při použití senzoru s optickým vláknem, jehož světelný svazek je poměrně úzký může být výsledek velmi zavádějící. Řešením tohoto problému by mohlo být použití intrinsického designu sensorového pole a to konkrétně obalení jádra optického vlákna nanovláknennou vrstvou. V místech ninhydrinové reakce by docházelo k vyvázání nebo absorpci záření, což by mělo způsobit pokles intenzity záření na detektoru.



Obr. 7.6: Důkaz aminokyselin pomocí ninhydrinu. (a) referenční vzorky před zahřátím, (b) vzorky po zahřátí. (1) Leucin, (2) Arginin, (3) Tyrosin.

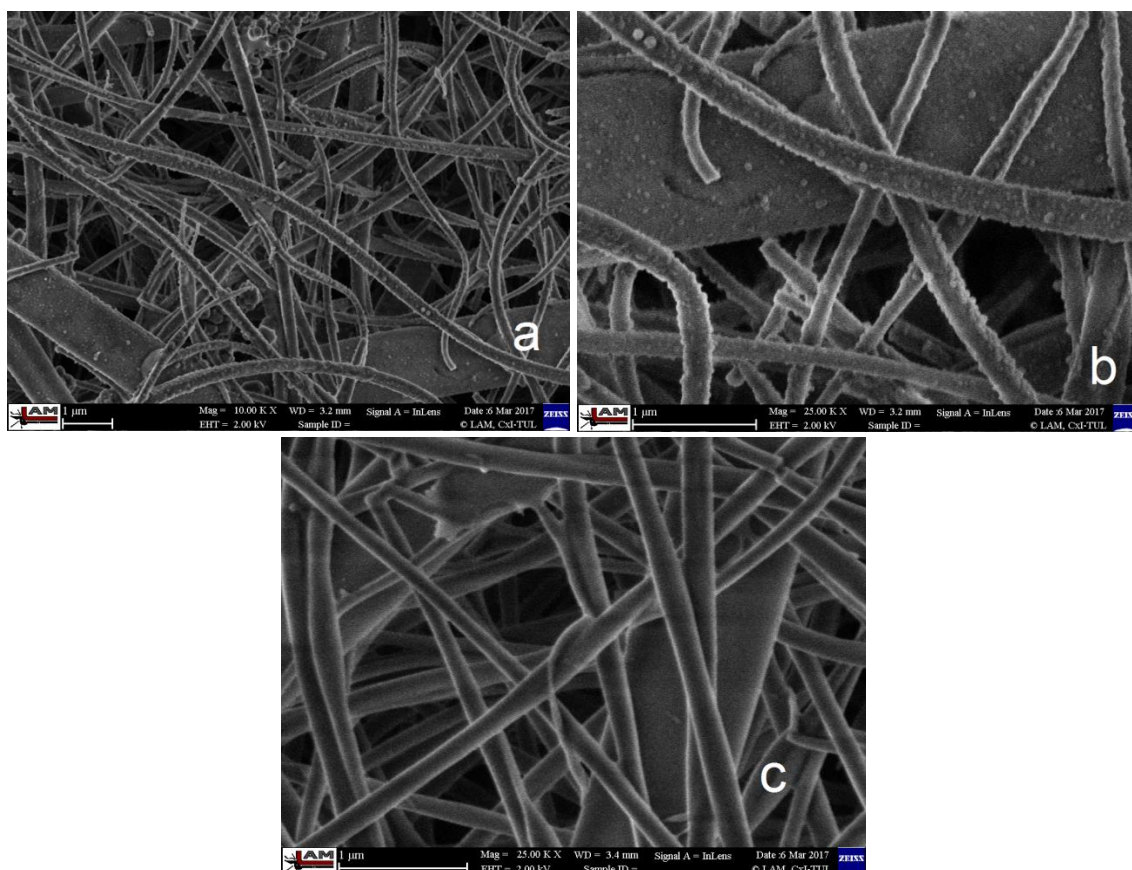
Přesto, pokud se nastaví aparatura správně do míst, kde reakce proběhla, tak je možné ve všech případech detekovat pokles odrazivosti a tím dokázat přítomnost imobilizovaných aminokyselin, viz Tab. 7.4.

Tab. 7.4: Detekce odrazivosti funkcionalizovaných nanovláknenných vrstev aminokyselinami při reakci s ninhydrinem.

Funkcionalizace nanovláken	Odrazivost [%]		Odchylka [%]
	po 110°C	před 110°C	
Arginin	20,1	22,1	0,87
Leucin	20,2	21,4	0,69
Tyrosin	14	17	0,5

8 Detekční limit optického vláknového senzoru

U každého senzoru je potřeba určit jeho detekční limit. Vzhledem k tomu, že pro měření je použito záření o vlnové délce 633nm a každá látka má své unikátní absorpční spektrum, tak nelze určit obecný detekční limit. Můžeme určit jen detekční limit pro každou jednotlivou chemickou reakci. Tato práce je zaměřená na detekci aktivity esterázových skupin. Z předešlých testů vyplynulo, že pro jeho detekci je vedle substrátu (α -naftyl acetátu) vhodné použít jako barvivo Fast blue RR salt, protože více absorbuje v červené části spektra. Azokopulační reakce zároveň probíhá v celé nanovláknenné vrstvě poměrně rovnoměrně, viz Obr. 7.5, což přispívá ke stabilitě měřicí metody. Tato poměrně rovnoměrná funkcionalizace povrchu je vidět i na snímcích z elektronového mikroskopu, které jsou na obrázku 8.1.



Obr. 8.1: Snímky ze SEM. Porovnání (a, b) funkcionalizovaných nanovláken po proběhnutí azokopulační reakce, s (c) vrstvou SiO₂ nanovláken.

Samotné měření detekčního limitu probíhalo tak, že se SiO₂ nanovlákná vrstva funkcionalizovala podle pracovního postupu uvedeného v kapitole 7.4.1 s tím rozdílem, že se pro jednotlivé vzorky exponenciálně snižovala koncentrace substrátu a barviva. Ředění vždy probíhalo v poměru 1:1, čímž se dosáhlo koncentrace až 1/128 vůči původní koncentraci. Na obrázku 8.2 je snímek vzorků o různých koncentracích substrátu a barviva v porovnání s referenčním vzorkem.



Obr. 8.2: Snímek funkcionalizovaných nanovlákných vzorků o různých koncentracích substrátů a barviva. (a) je referenční vzorek.

Ze snímku 8.2 je vidět, že poslední čtyři vzorky (od koncentrace 1/32 po 1/128 vůči počáteční koncentraci a referenční) jsou „okometricky“ těžko rozeznatelné. Hodnoty získané při měření těchto vzorků jsou v tabulce 8.1.

Tab. 8.1: Odrazivost vzorků při snižování koncentrace substrátu v porovnání s referenčním vzorkem.

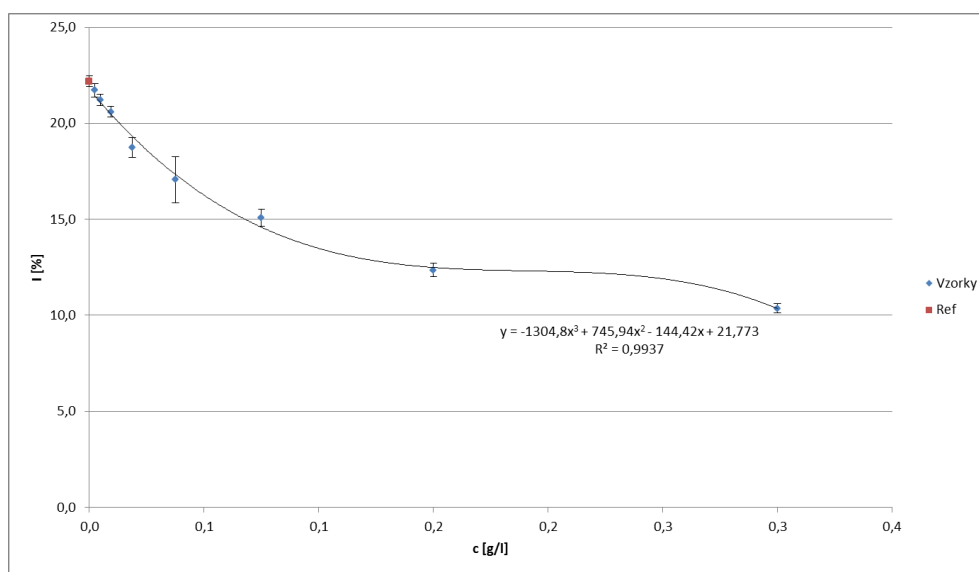
C _{substrátu} [g/l]	I _{záření} [%]	odchylka [%]
0,3	10,4	0,24
0,15	12,4	0,36
0,075	15,1	0,45
0,0375	17,1	1,19
0,01875	18,7	0,53
0,009375	20,6	0,28
0,0046875	21,2	0,30
0,00234375	21,7	0,35
Ref	22,2	0,28

Z tabulky je vidět, že až po koncentraci 4,6875 mg/l je rozdíl oproti referenčnímu vzorku stále vyšší než odchylka měření. Pokud uvažujeme, že v reakčním roztoku se nachází jen substrát, barvivo a fosfátový pufr, tak vzhledem k tomu, že $m_{\text{substrátu}} = 3\text{mg}$, $m_{\text{barviva}} = 9\text{mg}$, $V_{\text{pufru}} = 10\text{ml}$ a $\rho_{\text{pufru}} =$

1,012g/cm³, můžeme koncentraci detekovanou senzorem přepočítat na hodnotu ppm pomocí rovnice:

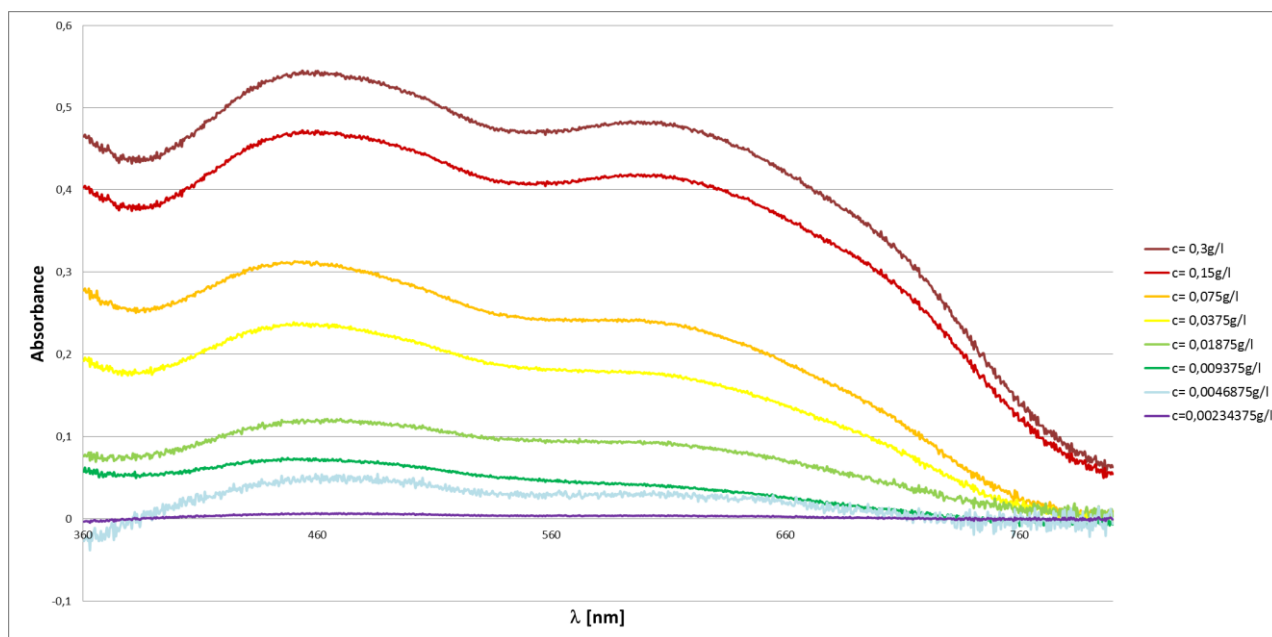
$$c_{\text{substrát}} = \frac{m_{\text{substrát}}}{\left(\rho_{\text{puf}} * V_{\text{puf}} + \frac{m_{\text{barvivo}}}{64}\right) * 64} = 4,63\text{ppm}$$

Tuto hodnotu ovšem nelze brát přesně jako detekční limit, protože z naměřených hodnot i odchylky lze vidět, že teoreticky by bylo možné snímat i nižší koncentraci při dalším „jemnějším“ ředění. Zjistit tuto hodnotu laboratorně by bylo velmi obtížné, ale teoreticky je možné ji extrapolací hodnot dopočítat. V grafu 8.1 jsou vyneseny hodnoty z tabulky 8.1 včetně chybových úseček jejich odchylek. Zároveň jsou tyto hodnoty proloženy regresní křivkou, která je polynomická 3. řádu, tak, abychom dostali, co největší hodnotu spolehlivosti za současného zachování „rozumného“ trendu z pohledu reálného chování systému. Průměrná odchylka měření u dat z tabulky 8.1 je 0,44, aby bylo měření jednoznačné, musí být rozdíl měřeného vzorku od referenčního větší než dvojnásobek této odchylky. Z toho plyne, že odrazivost musí být menší než 21,3%. Po dosazení této hodnoty do regresní rovnice vychází jediný reálný kořen, který má hodnotu koncentrace 3,33219mg/l. Teoretický detekční limit koncentrace substrátu, po zohlednění výše uvedených předpokladů a přepočítání, tedy vychází 3,29ppm.



Graf. 8.1: Porovnání odrazivosti vzorků při exponenciálním ředění vůči referenčnímu včetně chybových úseček.

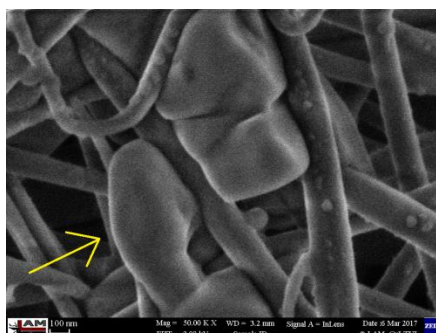
Pro ověření výsledků měření byly stejné vzorky měřeny pomocí UV/VIS spektrofotometru v odrazovém módu. Výsledná absorpční spektra vzorků s klesající koncentrací substrátu a barviva jsou vynesena v grafu 8.2. Z grafu je patrné, že s klesající koncentrací substrátu klesá absorbance vzorku, což odpovídá výsledkům naměřeným v tabulce 8.1. Dále je vidět, že vlnová délka světla použitého k měření (633nm) je v blízkosti jednoho ze dvou absorpčních maxim, které je přibližně na 594nm a měření UV/VIS spektrometrem potvrzuje, že použitým zářením je ještě možné koncentraci substrátu 4,69mg/l detekovat. U koncentrace substrátu 2,34mg/l, neboli zředění 1:128, už mizí absorpční pík v oblasti červeného světla. Mírný pík je ještě vidět pro modré světlo okolo 460nm, ale zde je již absorbance tak nízká, že hraničí s měřicí odchylkou spektrometru.



Graf. 8.2: Měření UV/VIS spektrofotometrem. Vzorky s exponenciálním snižováním koncentrace substrátu.

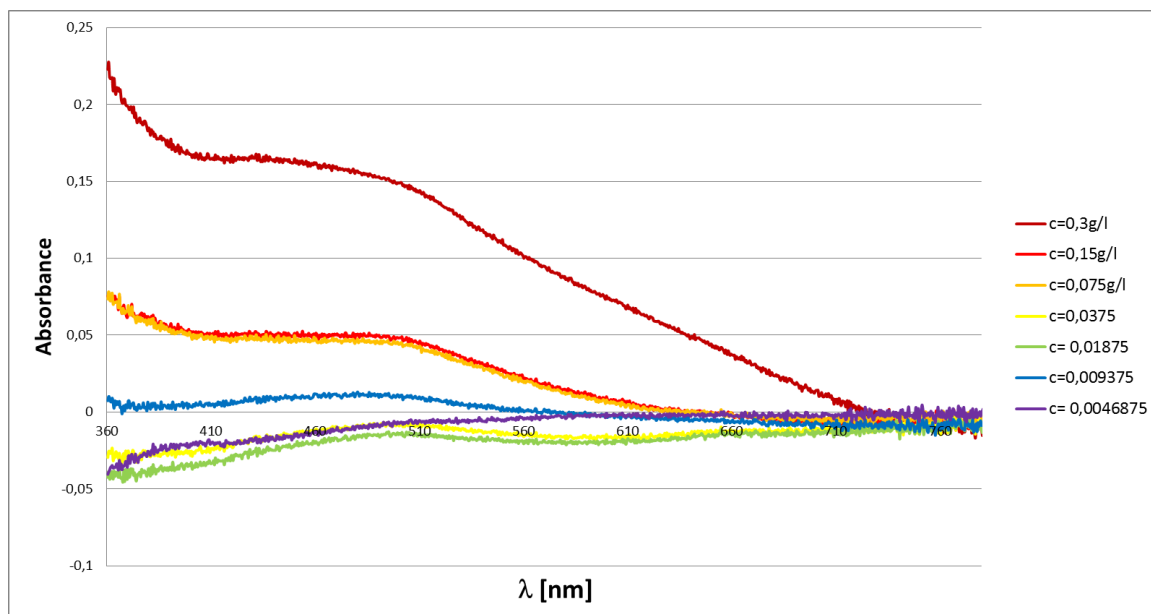
Při azokopulační reakci se barvivo váže kovalentně na odštěpený α -naftol, zároveň se ale může také fyzikálně adsorbovat přímo do nanovlákněné vrstvy, což by mohlo velmi zkreslit měření. Na snímku z elektronového mikroskopu (obrázek 8.3) jsou vyznačeny adsorbované částice barviva. Důkaz fyzikální adsorpce částic barviva můžeme vidět i na spektrografu z FTIR spektroskopie, který je v příloze A. Zde byly

porovnávají vzorky nefunkcionalizovaných SiO_2 nanovláken s funkcionalizovanými po proběhnutí azokopulační reakce. Koncentrace substrátu byla 0,3 a 0,15g/l. Na spektrografu je možné pozorovat změnu v absorbanci 2. amidického píku (1530cm^{-1}), která je způsobena valenční vibrací C=O a deformační vibrací N-H. To je důkazem organických sloučenin ve vzorcích. U SiO_2 vrstvy tento pík není vidět. Můžeme zde pozorovat i kvantitativní snížení intenzity tohoto píku u vzorku s poloviční koncentrací substrátu.



Obr. 8.3: Snímek ze SEM. Fyzikálně adsorbované barvivo ve vrstvě funkcionalizovaných SiO_2 nanovláken.

Z toho důvodu bylo měřeno, jak se mění množství adsorbovaného barviva nefunkcionalizované nanovláčkové vrstvy v závislosti na změně koncentrace substrátu a barviva v roztoku. Na grafu 8.3 je vidět, že se snižující se koncentrací barviva klesá i naměřená absorbance a při koncentraci 0,0375g/l již nanovláčková vrstva neobsahuje měřitelné množství. Z toho vyplývá, že při koncentracích v okolí detekčního limitu by tento jev již neměl ovlivňovat měření. Důvod, proč některé křivky jsou v záporných hodnotách je ten, že referenčním vzorkem byla funkcionalizovaná nanovláčková glutaraldehydem a esterázou. Tato funkcionalizace způsobuje naměřený pokles v absorpčním spektru.



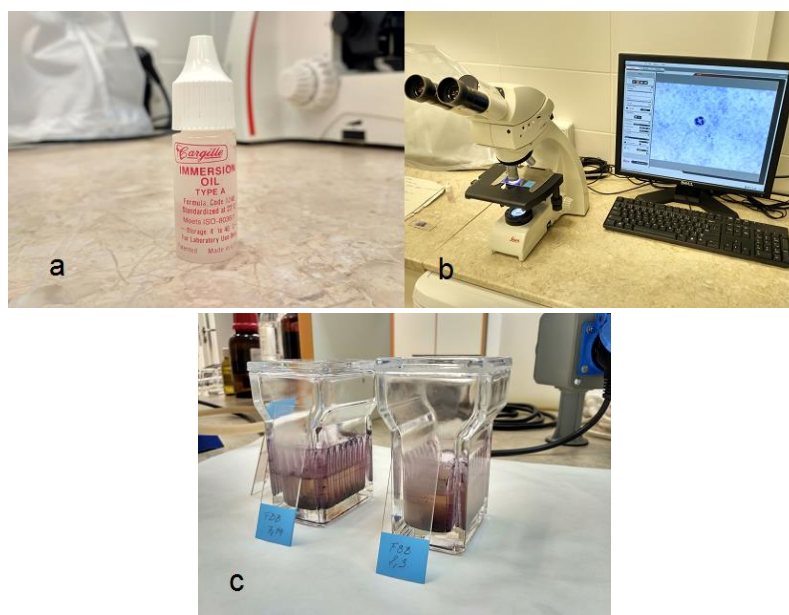
Graf. 8.3: Pokles absorbance adsorbovaného barviva do vrstvy SiO_2 nanovláken při snižování koncentrace substrátu (respektive barviva). Měřeno UV/VIS spektrometrem.

9 Detekce aktivity enzymu esterázy v krevních nátěrech

Jak již bylo řečeno v kapitole 5, enzym esteráza se nachází v leukocytech, jejichž zvýšené množství může signalizovat určitý typ leukémie. Na základě předchozích testů se připravily histochemicky barvené krevní nátěry s cílem pokusit se detekovat změnu v množství esterázy v leukocytech.

9.1 Použité laboratorní pomůcky, zařízení a chemikálie

- Optický vláknový měřicí systém (Obr. 7.1)
- Optický binokulární mikroskop Leica DM750 s imerzním objektivem a až 1000 násobným zvětšením. (Obr. 9.1 b)
- Imerzní olej Cargille typ A standardizovaný pro teplotu 23°C a podle normy ISO: 8036/1. (Obr. 9.1 a)
- Skleněné kyvety a mikroskopická sklíčka (Obr. 9.1 c)



Obr. 9.1: Imerzní olej Cargille typ A (a), optický mikroskop Leica DM750 (b), Skleněné kyvety s mikroskopickými sklíčky (c).

Chemikálie

- **α -naftyl acetát** – molekulová hmotnost 186,21g/mol. CAS: 830-81-9. Katalogové číslo N8505 s čistotou nad 98%, dodavatel Sigma–Aldrich.
- **Fast Blue B Salt** – dodavatel Sigma–Aldrich, katalogové číslo DS805. CAS: 14263-94-6. Molekulová hmotnost 475,47g/mol.
- **Basic Red 9**– dodavatel Sigma–Aldrich, katalogové číslo 55838. CAS: 569-61-9. Molekulová hmotnost 323,82g/mol.
- **Roztok May–Grünwald** – dodavatel Sigma–Aldrich, katalogové číslo 32856.
- **Roztok Giemsa–Romanowski**– dodavatel Sigma–Aldrich, katalogové číslo G4507. CAS: 51811-82-6. Molekulová hmotnost 291,8g/mol.

9.2 Příprava a analýza krevních nátěrů

Krevní stěry byly zhotoveny standardizovanou metodou (tedy z kapky periferní krve). Kapka periferní krve byla rozetřena po ploše vyčištěného podložního sklíčka.

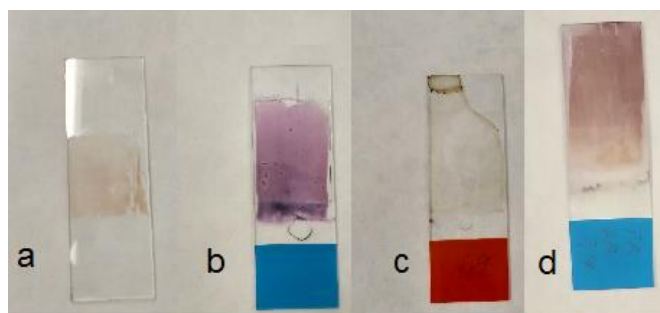
Pro histochemické barvení (tedy pro detekci esterázy v leukocytech) k substrátu α -naftyl acetátu byla použita dvě různá barviva (Fast Blue BB salt a Basic Red 9). Kromě toho (pro porovnání s histochemickým barvením) byly krevní nátěry paralelně obarveny i Pappenheimovou (panoptickou) metodou, která funguje na principu dvou barviv barvicích podle náboje molekuly. Barvivo azur B (roztok Giemse–Romanowského) barví modrošedě a váže aniontové části molekul, jako jsou nukleové kyseliny, nukleoproteiny, granule bazofilů... Barvivo eozin Y (roztok May – Grünwald) barví oranžovočerveně a váže kationtové části molekul, jako jsou hemoglobin a eozinofilní granula. (Lovětinská-Šlamborová 2013)

Postup práce

Histochemické barvení		Pappenheimova metoda
Příprava krevního nátěru na mikroskopické podložní sklíčko (fixace krevního nátěru 10 minut, u histochemického barvení byl nátěr fixován 10 minut ve formaldehydových parách)		
Příprava substrátového roztoku (A) 5mg α -naftyl acetátu v 0,5ml acetonu.		Vložení krevního nátěru do kyvety s roztokem May-Grünwalda, fixace 10 minut
Příprava roztoků barviv (B)		Opláchnutí (vymytí přebytečného braviva) v roztoku fosfátového pufru, pH= 6,7-6,8
Fast Blue BB Salt	Basic Red 9	Vložení do kyvety s roztokem Giemsa-Romanowski, fixace 10 minut
9mg FBB v 10ml vybraného fosfátového pufru (pH= 7,19; 5,9 a 8,3), smíchat roztoky A+B v poměru 1:1	Připravit 9mg R9 do 10ml fosfátového pufru, pH= 5,9	Opláchnutí v roztoku fosfátového pufru pH= 6,7-6,8, 2 krát
	Přidat 0,6ml roztoku s R9 do 23ml 0,1M roztoku Na_2PO_4 v pufru (tento roztok byl i ředěn 1:1 a 1:5 kvůli zintenzivnění barvení)	Opláchnutí pod proudem tekoucí vody a nechání zaschnout
Slití roztoků A a B a nechání 10 minut reagovat		Vytvoření trvalého preparátu zakápnutím kanadským balzámem a přikrytím krycím sklíčkem
Vlití roztoků do kyvety s krevními nátěry		
Nechat 40 minut inkubovat za laboratorní teploty		

Na obrázku 9.2 jsou výsledky (snímky) krevních nátěrů na mikroskopických sklíčkách. Můžeme zde vidět porovnání krevního nátěru bez barvení (a) s krevními stěry barvenými histochemicky (c, d) a Pappenheimovou metodou (b). Na těchto snímcích je vidět, že technika vytváření krevních nátěrů na mikroskopických sklíčkách neposkytuje homogenní vrstvu, což může být problém pro standardizované měření. Tento problém by mohl být vyřešen například správným designem sensorového pole, kde by funkcionalizovaná SiO_2 nanovláknenná vrstva byla připevněna na optické vlákno a při měření by se tato konstrukce namočila do kapky zkoumané krve. Zároveň by se pro jejich použití v sensorickém systému musel vyřešit problém, jakým způsobem na ně navázat krevní buňky

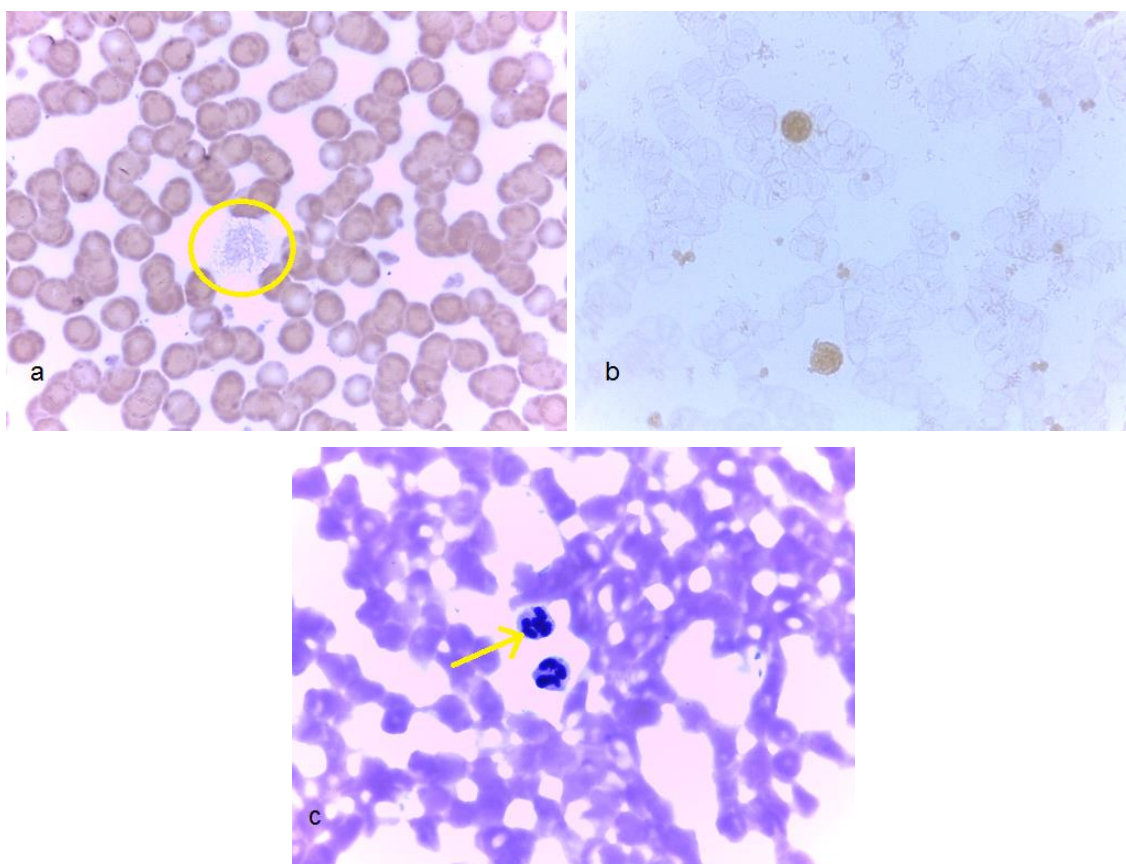
(zejména leukocyty), aby tato detekce mohla být uznána jako standardizovaná metoda. Řešením by mohlo být nenavazovat substrát s barvivem kovalentně, ale jen nasáknout nanovláknennou vrstvu jejich roztokem a samotná nanovláknna například plazmaticky upravit, aby měla kladný povrchový náboj, který by elektrostaticky přitahoval záporně nabitě buněčné membrány krevních buněk.



Obr. 9.2: Porovnání krevních nátěrů při použití různých barvicích technik. (a) standardní krevní nátěr bez barvení. (b) Pappenheimovo barvení. (c) histochemické barvení pomocí Basic Red 9. (d) histochemické barvení pomocí Fast Blue B.

Obrázek 9.3 ukazuje snímky z optického mikroskopu krevních nátěrů z obrázku 9.2. Na snímku (a) je histochemické barvení pomocí Fast Blue B. Ve žlutém kruhu je vyznačen leukocyt, u kterého je vidět jen mírně zbarvené jádro, tedy esterázová aktivita je minimální, oproti okolní bílé plazmě buňky. Tyto snímky jsou snímky nátěrů krve zdravého jedince. Pokud by krev byla leukemická, tak by jádro buňky bylo v důsledku vyšší aktivity enzymu více zbarvené, leukocyt by měl zhruba dvojnásobný objem. Okolní červené buňky jsou bezjaderné erythrocyty. Jejich zbarvení je primárně způsobeno elektrostatickým navázáním molekul barviva na povrch záporně nabitých buněčných membrán. Snímek (b) zachycuje histochemické barvení pomocí Basic Red 9 a je u něj patrné, že tato barvicí technika je mnohem více selektivní vůči leukemickým buňkám než v případě Fast Blue B. Kontrast mezi leukocyty a erythrocyty je u ní největší, což by mělo zvyšovat citlivost měření a to i přesto, že se jedná opět o krevní nátěr zdravého jedince. Pokud by se jednalo o nátěr leukemické krve, intenzita barevnosti by byla daleko větší (záleželo by i na typu leukemie).

Snímek (c) zachycuje standardní Pappenheimovo barvení. U něj je mnohem více výrazné zbarvení jader leukocytů (žlutá šipka na snímku), než v případě Fast Blue B, ale také způsobuje poměrně silné zbarvení, jak cytoplasmy leukocytů, tak okolních erytrocytů. Tento nepříliš vysoký kontrast (rozdíl v absorpci záření) bude pravděpodobně obtížně detekovatelný.



Obr. 9.3: Snímky krevních nátěrů z optického mikroskopu. (a) histochemické barvení pomocí Fast Blue B. (b) histochemické barvení pomocí Basic Red 9. (c) Pappenheimovo barvení.

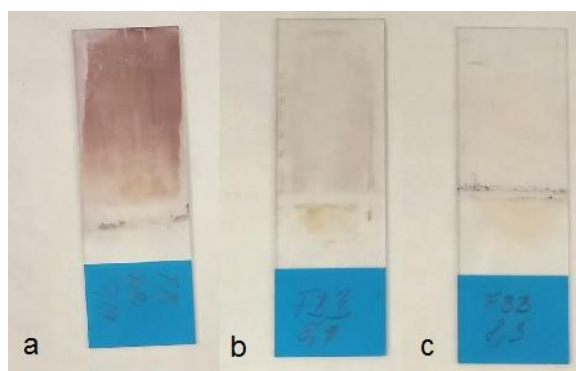
Měření intenzity odraženého záření těchto krevních nátěrů probíhalo s téměř stejnou konstrukcí sensorového pole, která je zobrazena na obrázku 7.3 s tím rozdílem, že při měření nebyla použita nanovláčková vrstva kvůli výše zmíněným důvodům. Naměřené odrazivosti pro jednotlivé druhy barvení jsou v tabulce 9.1. V tabulce je vidět, že všechny druhy barvení poskytly stejnou odrazivost. Tento výsledek může být způsoben vlnovou délkou použitého záření, respektive nízkou absorpcí vzorků v této části spektra. Jak již bylo popsáno výše, použité vzorky krevních nátěrů jsou

z krve zdravého jedince. Pro vyhodnocení účinnosti této metody je třeba porovnat tyto výsledky se vzorky leukemické krve. Problémem je, že leukemická krev je z medicínského hlediska brána jako infekční materiál a z důvodu předpisů je velmi obtížné ji získat. To se zatím nepodařilo, nicméně pokud bych já nebo kdokoliv jiný v tématu pokračoval, bude zahájeno jednání o spolupráci s pracovištěm, které by nátěry leukemické krve poskytlo.

Tab. 9.1: Naměřená odrazivost vzorků krevních stěrů při použití různých barviv.

Barvivo	Odrazivost [%]	Odchyłka [%]
Fast Blue B (pH= 7,19)	13,8	0,69
Basic Red 9 (pH= 5,9)	13,8	0,27
Pappenheimovo	13,8	0,42

Při histochemické (enzymatické) barvicí reakci je velmi důležitá hodnota pH prostředí, ve kterém reakce probíhá a je nutné ji optimalizovat. Na obrázku 9.4 můžeme vidět porovnání histochemické reakce (barvivo Fast Blue B) probíhající při pH= 7,19, 5,9 a 8,3. Podle zbarvení krevních nátěrů je vidět, že nejlépe reakce probíhala při pH= 7,19 (a).

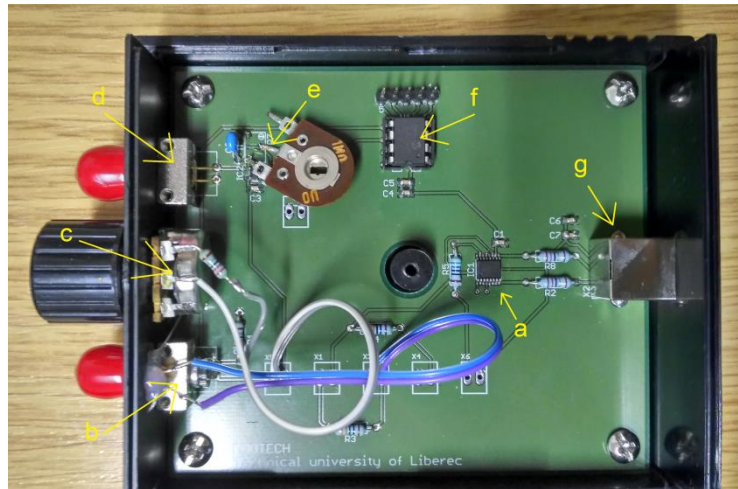


Obr. 9.4: Snímky krevních stěrů barvených histochemicky (Fast Blue B) při použití fosfátových pufrů o různých pH. (a) pH= 7,19, (b) pH= 5,9, (c) pH= 8,3.

10 Návrh a konstrukce zdokonalené elektronické části senzoru

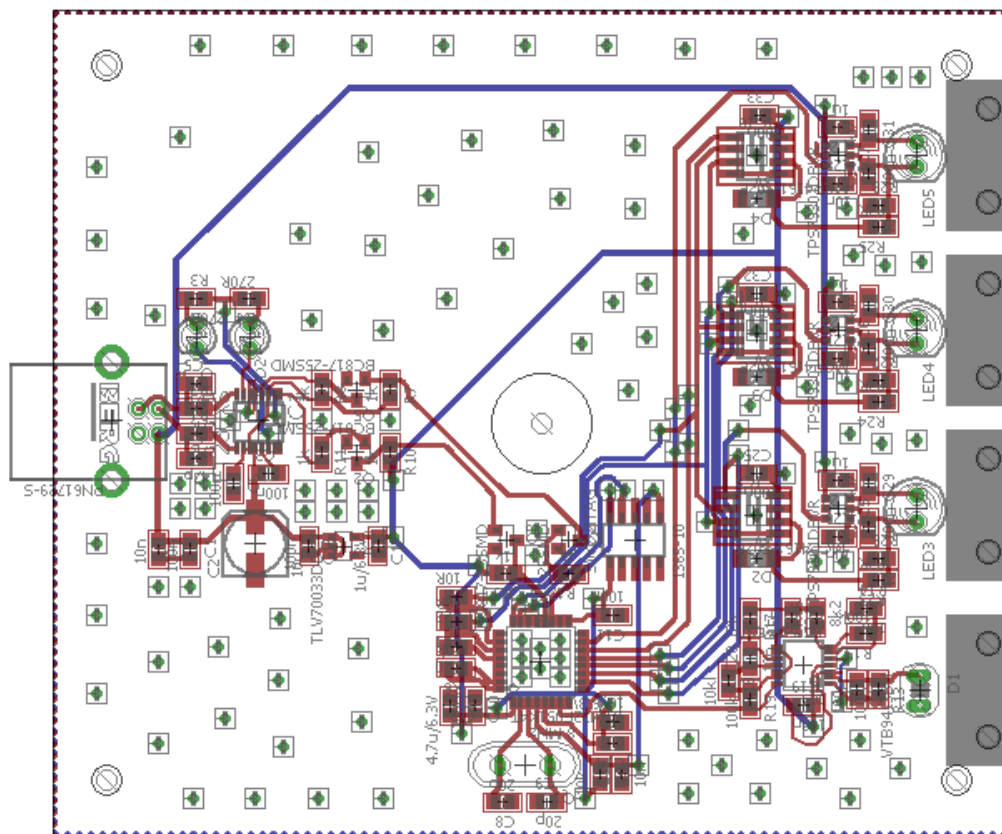
Elektronická část senzoru je jeho hlavním řídicím systémem, který má za úkol vyslat optický signál do optického vlákna a poté odražený signál detekovat. Určuje intenzitu signálu vyslaného do vlákna a zároveň zabezpečuje jeho převod z optického signálu na elektrický. Posléze je také odpovědná za komunikaci s řídicím softwarem v počítači. Snímek základové desky měřicího přístroje je na obrázku 10.1. Přestože dosavadní naměřené výsledky vykazují poměrně dobrou stabilitu a citlivost při měření, tak některé předchozí testy ukázaly omezené možnosti tohoto přístroje. Například použitá vlnová délka záření se ukázala nevhodná pro histochemické testy krevních nátěrů. Z tohoto důvodu byl navržen nový přístroj se třemi diodami z různých částí spekter (červená, zelená, fialová). To přináší úplně nové možnosti měření. Například využití jevu fotoluminiscence (pomocí fialové, možná i zelené diody), který byl u křemičitých nanovláken popsán v kapitole 3.1. Vyšší pokrytí spektra záření pro optický signál také může vyřešit problém s nízkou absorbcí pro použitou vlnovou délku. Zároveň by použití fialové diody mohlo zvýšit naměřený detekční limit pro azokopulační reakci s Fast Blue RR barvivem, protože na grafu 8.2 je vidět nejvyšší absorbance v této části spektra.

Kromě tohoto rozšíření testovacích možností je v elektronické části měřicího přístroje několik dalších částí, které je vhodné vylepšit. Z obrázku 10.1 je patrné, že signál z počítače se přivádí přes USB B konektor (g) do UART mikročipu (a), který slouží pro převod USB signálu do sériové komunikace a naopak. Samotné vysílání měřicího signálu je řízeno mikroprocesorem (f). Odtud jde signál do diody (b), přičemž jeho intenzita může být manuálně nastavena potenciometrem (c). Odražený signál se vrací do fotodiody (d), za níž je připojen obvod s operačním zesilovačem (e) pro zesílení příchozího signálu. Tato část obvodu je analogová, proto se v mikroprocesoru musí pomocí A/D převodníku převést signál na digitální a poté se posílá opět přes UART zpět do počítače.



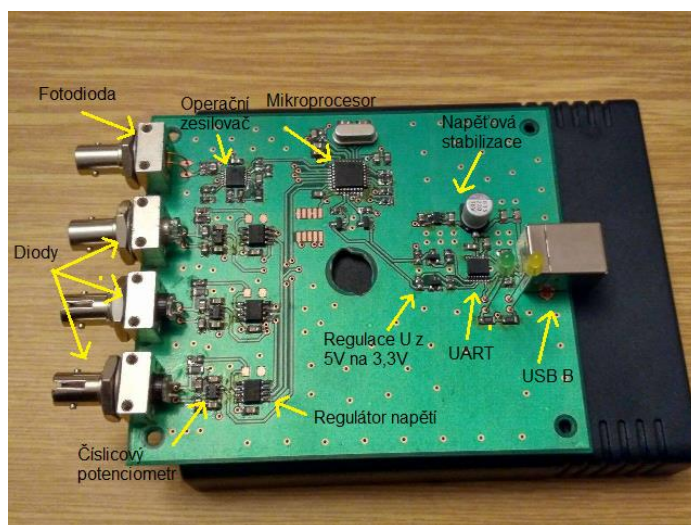
Obr. 10.1: Snímek základové desky původního měřicího přístroje.

Návrh základové desky nového měřicího přístroje můžeme vidět na obrázku 10.2 a schéma zapojení je znázorněno v příloze B. Signálový transfer s počítačem je řešen stejně jako u předchozího modelu z USB B přes UART. Signál z USB B je oproti předchozímu modelu pomocí řady kondenzátorů filtrován a je zde zařazena napěťová stabilizace. Mikroprocesorem je mnohem výkonnější 32 bitový ARM a je pro něj zregulováno napětí z 5V na jeho pracovních 3,3V. Velkým rozdílem oproti původnímu modelu jsou proudové stabilizace předřazené ke každé jednotlivé diodě a regulace proudu pro diodu programovatelným číslicovým potenciometrem. Toto zapojení umožní stabilní opakovatelné měření s možností definovaně řídit výstupní intenzitu záření. V případě manuálního potenciometru u předchozího modelu musel být potenciometr nastaven stále do polohy pro maximální intenzitu záření, protože v jiných případech by výsledky mezi sebou nebylo možno porovnávat. U analogové detekční části je za fotodiodu přiřazen operační zesilovač s postupným několikanásobným zesílením a zároveň filtrací signálu. To by oproti původnímu jednorázovému zesílení mělo poskytnout kvalitnější zpracování příchozího signálu, čímž by se mohla zvýšit citlivost přístroje.



Obr. 10.2: Návrh základové desky nového senzoru.

Na obrázku 10.3 je vyfocena hotová základová deska s naletovanými součástkami. Pro měření je třeba ještě naprogramovat software, což bude provedeno v nejbližší době. Bylo odzkoušeno, že deska komunikuje s počítačem a pomocí multimetru bylo otestováno, že na konektorech mikroprocesoru a diod je správné napětí, takže deska by měla být zcela funkční.



Obr. 10.3: Snímek hardwaru nového senzoru.

11 Diskuze

Pro počáteční ověření funkčnosti optického vláknového senzoru a optimalizaci designu sensorového pole z hlediska citlivosti měření bylo provedeno několik pokusů s různým designem sensorového pole. Změny v sestavení sensorového pole vycházely ze základního designu, který je na obrázku 8.3. Bylo ověřeno, že intenzita odraženého světla je závislá na barvě podkladu, což je způsobeno rozdílným absorpčním spektrem podkladového materiálu. Zároveň se zvyšuje intenzita odraženého světla při zmenšení vzdálenosti mezi nanovláknovým vzorkem a výstupem optického vlákna (použití tenčího mikroskopického sklíčka), což je dáno menším množstvím vyvázaného světla mimo aparaturu. V neposlední řadě použití glycerolu jako optického medium mezi optickým vláknem a mikroskopickým sklíčkem namísto vzduchu snižuje intenzitu detekovaného záření. Toto je však pravděpodobně způsobeno tím, že vyšší index lomu glycerolu způsobí vyvázání většího množství záření z optického vlákna do vzorku, což by mělo snížit „šum“ okolí a zvýšit citlivost měření.

Pro ověření možnosti detekce organických molekul (aminokyselin) a aktivity esterázových skupin bylo provedeno množství pokusů s různě funkcionalizovanými křemičitými nanovláknami. Z pokusů vyplynulo, že není vhodné používat k měření mokré vzorky SiO_2 nanovlákných vrstev, protože dochází k příliš velkým ztrátám optického signálu vyvázáním mimo optické vlákno. Naopak suché vzorky jsou již schopny absorbovat nebo odrazit veškeré záření, což maximalizuje detekční limit. Zároveň bylo prokázáno, že pomocí senzoru je možné detekovat proběhnutí azokopulační reakce (důkaz aktivity esterázových skupin), protože rozdíl naměřených intenzit odraženého záření před a po proběhnutí reakce byl mnohem větší, než chyba měření (Tab. 7.3). V téže tabulce je vidět i rozdíl v absorpci použitých barviv a také trend snižující se absorpce vzorku v závislosti na snižujícím se množství substrátu v roztoku.

V důsledku tohoto faktu byl měřen detekční limit optického vláknového senzoru. Vzhledem k tomu, že pro měření je používáno světlo o vlnové délce

633nm a každá molekula má odlišné absorpční spektrum, tak není možné stanovit obecný detekční limit, ale jen detekční limit pro konkrétní sensorickou reakci. Detekční limit byl měřen u reakce s barvivem Fast Blue RR, protože podle tabulky 7.3 vykazovala vyšší absorpci než s Fast blue B. Při měření byla exponenciálně snižována koncentrace substrátu a barviva v roztoku a experimentálně naměřený detekční limit byl 4,63ppm. Z tabulky 8.1 je však vidět, že teoretický detekční limit by mohl být ještě nižší (vzhledem k odchylce měření). Teoretický limit byl dopočítán pomocí extrapolace naměřených dat a vyšel 3,29ppm. Detekční limit pro tuto reakci byl ověřován pomocí odrazové UV/VIS spektroskopie a na grafu 9.2 můžeme vidět, že měření potvrzuje možnost detekce tohoto limitu. Zároveň ukazuje ještě vyšší absorpční pík v oblasti modrého světla.

K důkazu proběhlé reakce a zkoumání detekčního limitu byla také použita FTIR spektroskopie. Při ní však měřicí paprsek proniká do hloubky vzorku pár mikrometrů a FTIR je schopen detekovat jen strukturní změny přesahující 1 – 2% hmotnosti zkoumaného objemu vzorku. Hmotnost funkcionalizovaných skupin na povrchu SiO₂ nanovláken se však ukázala oproti samotným nanovláknům nižší než tento limit. Přesto rozbor spektrografu v příloze A poukazuje na přítomnost organických sloučenin (2. amidický pík, 1530cm⁻¹), která i podle obrázku 9.3, bude pravděpodobně způsobena fyzikální adsorpcí částic barviva. Tato adsorpce by mohla ovlivňovat měření detekčního limitu, avšak podle grafu 9.3 (měřeného UV/VIS spektrometrem) se tento vliv adsorpce vytrácí již při ředění 1:4.

Detekce aminokyselin (Leucin, Tyrosin, Arginin) byla vyzkoušena reakcí s ninhydrinem. Tabulka 8.4 ukazuje, že všechny aminokyseliny bylo možné takto detekovat, avšak jen při správném nastavení aparatury, což vylučuje standardizované měření. Problémem při této reakci je její nehomogenní průběh na povrchu funkcionalizované nanovláknenné vrstvy, což by mohlo být vyřešeno použitím jiného designu sensorového pole. Například použitím intrinsického designu senzoru s modifikovaným pláštěm (viz Obr. 2.11a), který by fungoval na principu vyvázání, respektive absorbování záření z jádra optického vlákna v důsledku proběhlé reakce.

U detekce esterázových aktivit v krevních nátěrech se zdá jako nejvhodnější pro detekční reakci použít k substrátu barvivo Basic Red 9. Z pokusů vyplynulo (obrázek 10.3), že poskytuje nejvyšší absorpční kontrast mezi leukocyty a zbylými krevními buňkami, což je pro měření stěžejní. Samotné měření poskytlo velmi podobné výsledky odrazivosti pro všechny tři použité metody barvení, což může být způsobeno nízkou absorbancí pro použité záření (633nm). Pro samotné vyhodnocení možnosti detekce touto metodou, je potřeba tyto výsledky vzorků krevních nátěrů zdravého jedince porovnat se vzorky krevních nátěrů leukemické krve. To by mohlo být předmětem další práce. Použití SiO_2 nanovláken v sensorovém poli přináší problém s vytvořením standardizovaného měření, přesto by tento problém, v důsledku správné modifikace nanovláken a sensorového pole, mohl mít řešení (kapitola 10.2). Poté by naopak SiO_2 nanovlákná vzhledem ke svému velkému měrnému povrchu byla ideálním materiálem pro tento sensorický systém.

V této práci byl zároveň navrhnout a konstruován i hardware měřicího přístroje, který k detekci může používat oproti původnímu (633nm) různé vlnové délky záření (410nm, 525nm, 630nm). To by mělo umožnit vybudit v SiO_2 nanovlákněch i fotoluminiscenci, což umožňuje zcela nové způsoby detekce proběhlých reakcí vzhledem k jejímu zhášení nebo zintenzivnění. Dalším zásadním vylepšením je softwarově řízená (proudově stabilizovaná) intenzita výstupního záření, což poskytuje například možnost volby hloubky prostupu nanovlákněné vrstvy paprskem nebo měření odrazivosti na vzrůstající intenzitě vstupního záření. Vylepšená byla i detekční část. Respektive zesílení fotodiodou detekovaného signálu, pomocí postupného několikanásobného zesílení signálu, což by mohlo poskytnout vyšší citlivost přístroje.

Závěr

Prvním cílem této práce bylo navrhnout a realizovat optický vláknový senzor pro ověření možnosti detekce aktivity organických molekul imobilizovaných na nanovláknenné vrstvě. V této práci byly na nanovláknennou vrstvu SiO₂ imobilizovány vybrané aminokyseliny (Leucin, Tyrosin, Arginin) a enzym Esteráza. Pomocí enzym – histochemické a nynhidrinové reakce bylo dokázáno, že optickým vláknovým senzorem je možné detekovat aktivitu takto imobilizovaných molekul.

Dalším cílem bylo vyhodnotit citlivost a stabilitu senzoru. Samotné měření v průběhu testů vykazovalo velmi dobrou stabilitu. Problém u některých měření je nehomogenní průběh chemické reakce v nanovláknenné vrstvě. Řešením může být intrinsická konstrukce senzoru, která byla v práci diskutována. Naměřený detekční limit pro molekuly substrátu v enzym – histochemické reakci esterázy s α - naftyl acetátem (barveným pomocí Fast Blue RR Salt) byl 4,63ppm. Teoretický detekční limit dopočítaný extrapolací naměřených dat byl až 3,29ppm.

Pro využití detekce aktivity esterázových skupin v diagnostice monocytární leukemie byly připraveny a analyzovány vzorky krevních nátěrů zdravého jedince. Z provedených důkazových reakcí se jako nejperspektivnější jevila histochemická reakce využívající barvivo Basic Red 9. K dokázání možnosti použití této metody v diagnostice je potřeba porovnat naměřené výsledky s výsledky krevních nátěrů leukemické krve, což může být předmětem dalšího výzkumu.

V neposlední řadě byl navržen a zkonstruován hardware elektronické části senzoru, který by měl poskytnout citlivější měření a otvírá zcela nové možnosti měření vzhledem k fyzikálním vlastnostem použité SiO₂ nanovláknenné vrstvy.

Dalším předmětem práce bude naprogramování softwaru pro nový senzor. Následné pokusy by se tedy mohly zabývat detekcí využívající fotoluminiscenci SiO₂ nanovláken. Zajímavé výsledky by také mohlo přinést porovnání různých designů aparatury z hlediska citlivosti měření.

Použitá literatura

BĚLOHRADSKÝ, Martin, 2005. *Supramolekulární chemie II*. Praha: Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky. ISBN 978-80-86241-27-2.

BURÝŠKOVÁ, Barbora, 2015. *Využití křemičitých struktur rozsivek a chrysomád v nanotechnologiích* [online]. B.m.: Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta. Dostupné z: https://botany.natur.cuni.cz/algo/soubory/diplomky/Barbora_Buryskova_BP.pdf

ČEŠKA, Richard, Tomáš ŠTULC, Vladimír TESARŽ a Milan LUKÁŠ, 2015. *Interna*. ISBN 978-80-7387-895-5.

ČTYROKÝ, Jiří, 2009. *Integrovaná fotonika* [online]. B.m.: Ústav radiotechniky a elektroniky Akademie věd ČR. Dostupné z: <http://www.physics.muni.cz/~jancely/Fotonika/Texty/IntegrovanaFotonika.pdf>

ELMARCO S.R.O, 2014. [vid. 2017-03-05]. Dostupné z: <http://www.elmarco.cz/fotogalerie/technologie-nanospider/>

EXNAR, Petr, 2016. *Chemie povrchů a příprava tenkých vrstev* [online]. 2016. Dostupné z: <https://nanoed.tul.cz/mod/resource/view.php?id=806>

FIDANBOYLU, K. A. a H. S. EFENDIOGLU, 2009. Fiber optic sensors and their applications. In: *5th International Advanced Technologies Symposium (IATS'09)* [online]. [vid. 2017-02-25]. Dostupné z: http://www.academia.edu/download/41626548/02_KeynoteAddress.pdf

GALLO, PRÁCE MARTIN, 2013. *Optické vláknové senzory* [online]. B.m.: Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií. Ústav telekomunikací [vid. 2017-02-25]. Dostupné z: https://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=69048

GO, Shanette A., Elisabeth R. JENSEN, Shawn M. O'CONNOR, Loribeth Q. EVERTZ, Duane A. MORROW, Samuel R. WARD, Richard L. LIEBER a Kenton R. KAUFMAN, 2017. Design Considerations of a Fiber Optic Pressure Sensor Protective Housing for Intramuscular Pressure Measurements. *Annals of Biomedical Engineering* [online]. 1. 3., 45(3), 739–746. ISSN 0090-6964, 1573-9686. Dostupné z: doi:10.1007/s10439-016-1703-6

KECK, Donald B., 1996. *Optical Sensor Technologies* [online] [vid. 2017-03-11]. Dostupné z: http://www.wtec.org/loyola/opto/c6_s3.htm

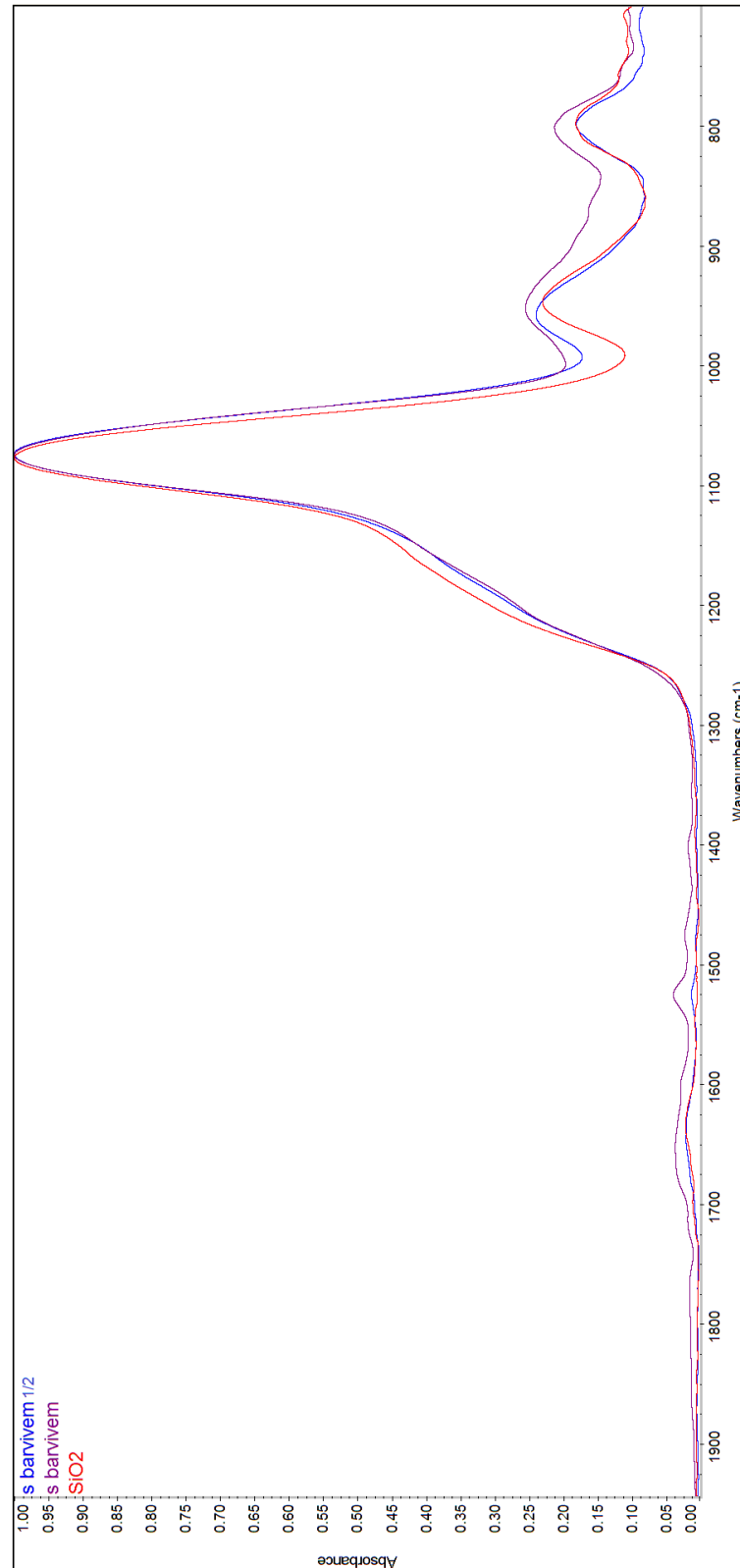
KLEGA, Vratislav, 2009. Optické sítě. *Chip.cz* [online] [vid. 2017-02-25]. Dostupné z: <http://www.chip.cz/novinky/trendy/opticke-site/>

KOREN, Klaus, Peter Ø. JENSEN a Michael KÜHL, 2016. Development of a rechargeable optical hydrogen peroxide sensor – sensor design and biological application. *Analyst* [online]. 141(14), 4332–4339. Dostupné z: doi:10.1039/C6AN00864J

- LI, CY, LT YAM a KW LAM, 1973. Esterases in human leukocytes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. **21**(1), 1–12. ISSN 0022-1554.
- LOVĚTINSKÁ-ŠLAMBOŘOVÁ, Irena, 2013. *Barvení krevních preparátů* [online] [vid. 2017-04-29]. Dostupné z: <http://www.kch.tul.cz/sites/default/files/texty/fp/mzt/barveni-krevnich-preparatu.pdf>
- MANCHENKO, Gennady P, 2002. *Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels*. B.m.: CRC press. ISBN 1-4200-4053-7.
- MARŠÁLEK, Leoš, 2006. *Optická vlákna* [online]. B.m.: Technická univerzita Ostrava, Fakulta elektrotechniky a informatiky, Katedra elektroniky a sdělovací techniky. 2.1.3. Dostupné z: <http://goro.czweb.org/download/interest/vlakna.pdf>
- MENDEZ, Alexis, 2016. Fiber Bragg grating sensors for biomedical applications. In: *Bragg Gratings, Photosensitivity, and Poling in Glass Waveguides: Photonics and Fiber Technology 2016 (ACOPT, BGPP, NP) (2016), paper BM4B.1* [online]. B.m.: Optical Society of America, s. BM4B.1 [vid. 2017-03-11]. Dostupné z: doi:10.1364/BGPP.2016.BM4B.1
- PETŘÍK, Milan, 2009. Optické kabely a solitony. *Lidovky.cz* [online] [vid. 2017-02-26]. Dostupné z: <http://petrik.bigblogger.lidovky.cz/c/110581/Opticke-kabely-a-solitony.html>
- STRÁTESKÁ, Renata, 2010. *Moderní metody měření teploty* [online]. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta [vid. 2017-02-27]. Dostupné z: http://is.muni.cz/th/175140/prif_m/
- SÝKORA, J., 2004. *Typy a vlastnosti optických vláken* [online] [vid. 2017-02-26]. Dostupné z: <http://access.feld.cvut.cz/view.php?cisloclanku=2004072802>
- ŠLAMBOŘOVÁ, Irena, Veronika ZAJÍCOVÁ, Petr EXNAR a Jarmila STUDNÍČKOVÁ, 2012. Nanofiber structure with immobilized organic substance and the method of its preparation [online]. US20150240411 A1. [vid. 2017-03-03]. 12. říjen 2012. Dostupné z: <http://www.google.com/patents/US20150240411>
- TURÁN, Ján a Stanislav PETRÍK, 1991. *Optické vláknové senzory*. Bratislava: Alfa. ISBN 978-80-05-00655-5.
- VODRÁŽKA, Zdeněk, 1996. *Biochemie*. Praha: Academia. ISBN 978-80-200-0600-4.
- WOLFBEIS, Otto S., 2004. Fiber-Optic Chemical Sensors and Biosensors. *Analytical Chemistry* [online]. 6., **76**(12), 3269–3284. ISSN 0003-2700, 1520-6882. Dostupné z: doi:10.1021/ac040049d
- ZDENĚK, Adam, Krejčí MARTA, Vorlíček JIŘÍ a a KOLEKTIV, 2008. *Hematologie - Přehled maligních hematologických nemocí: 2., doplněné a zcela přepracované vydání*. B.m.: Grada Publishing a.s. ISBN 978-80-247-6772-7.

Přílohy

Příloha A: Spektrograf z FTIR spektroskopie. Porovnání spekter SiO_2 nanovláčkové vrstvy s funkcionalizovanými vrstvami po proběhnutí azokopulační reakce ($c_{\text{substrátu}} = 0,3$ a $0,15 \text{ g/l}$) a fyzikální adsorpce barviva.



Příloha B: Schéma zapojení elektronické části nového senzoru

