

DIFUZE KURKUMINU NA POVRCHU POLYAMIDU 6, ŘÍZENÁ INTENZITOU DOPADAJÍCÍHO SVĚTLA.

Zinenko Kateryna

Sekce – PŘÍRODNÍ, HUMANITNÍ A SPOLEČENSKÉ VĚDY

Fakulta přírodovědně-humanitní a pedagogická, 3. ročník

Bakalářský studijní program – BIOINŽENÝRSTVÍ

Abstrakt: Tato práce je věnována stanovení difuzního koeficientu kurkuminu na povrchu materiálů vyrobených z polyamidu 6. Ke studiu byly použity jak polymerní fólie, tak i nanovláknenné vrstvy připravené z roztoku s malým přídavkem kurkuminu. Proces fotovybělení a pořizování obrazů probíhal pomocí laserového skenovacího mikroskopu. Další část práce se zaměřuje na studium difuzního koeficientu na kompozitních polyamidových nitích vyrobených střídavým zvlákňováním. Pro fotovybělení a snímání byl použit mikroskop pracující v širokém poli (widefield). Tyto nítě byly rovněž využity ke zkoumání závislosti difuzního koeficientu na intenzitě bílého světla dopadajícího na vzorek. Výsledky měření ukázaly, že difuzní koeficient je silně závislý na intenzitě světla působícího na vzorek.

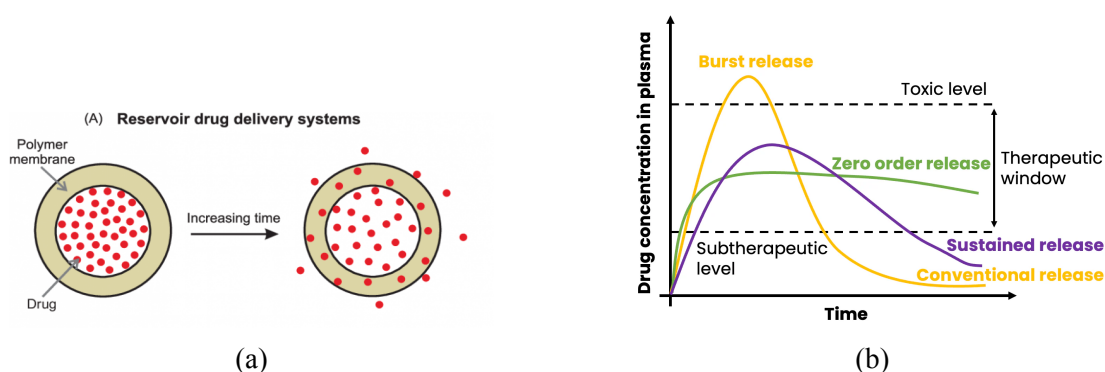
Klíčová slova: difúze závislá na světle, povrchová difúze, difúze kurkuminu, povrchová difúze na polymerních materiálech, aplikace FRAP na polymerních materiálech, difúze kurkuminu na povrchu polyamidu 6, aplikace FRAP ve widefield mikroskopii

1 Úvod do problematiky

V posledních letech se intenzivně zkoumá využití polymerních materiálů při výrobě systémů pro dodávání léčiv (drug delivery systems, DDS). Některé z těchto systémů jsou již komerčně dostupné na trhu ve formě kapslí, tablet, náplastí a vaginálních kroužků. Mezi hlavní výhody systémů DDS patří možnost lokální aplikace léčiva a jeho řízené uvolňování, což umožňuje dosáhnout vyšší účinnosti podávané látky díky stabilizaci její koncentrace v místě účinku na maximální možnou efektivní úroveň. Tím zároveň dochází ke snížení zátěže pro organismus a minimalizaci rizika komplikací během léčby pacienta.

Plánovaný profil uvolňování léčiva se však může měnit v závislosti na době a podmínkách skladování materiálu. Vlivem difuzního pohybu může molekula léčivé látky dosáhnout vnější strany systému, a po kontaktu s vodním prostředím lidského těla se tak uvolní větší množství účinné látky, než bylo původně zamýšleno – tento jev je znám jako „burst release efekt“. Tento efekt je řízen difuzním koeficientem dané látky a může vést jak ke zkrácení doby účinné léčby po podání přípravku, tak i ke zvýšení koncentrace účinné látky na toxickou úroveň. Burst release efekt je již dobře popsán u zásobníkových systémů, v nichž je účinná látka ohraničena polymerní membránou. Příklad takového systému je uveden na obrázku níže (viz Obrázek 1).

Tato práce se zabývá touto problematikou a je zaměřena na stanovení difuzního koeficientu kurkuminu, který má řadu léčivých vlastností, na povrchu kompozitních nití vyrobených střídavým zvlákňováním z polyamidu 6. Vzhledem k tomu, že zkoumaná léčivá látka je přírodním fluoroforem, byla k detekci jejího přemísťování použita fluorescenční mikroskopie v širokém poli. Jako nejvhodnější metoda pro vytvoření koncentračního gradientu difundující látky se ukázala metoda FRAP, která byla původně vyvinuta pro stanovení difuzních koeficientů molekul v kapalném prostředí buněčného cytosolu.



Obrázek 1: 1a zobrazení systému DDS, ve kterém je léčivá látka ohraničena polymerní membránou (převzato z gpatindia.com), 1b závislost koncentrace léčiva v plasmě při různých typech uvolňování v čase; v DDS systémech se snažíme dosáhnout farmakokinetického profilu zobrazeného na grafu zeleně (převzato z nanocomposix.com).

2 Teoretický základ

2.1 Obnovení fluorescence po fotovybělení

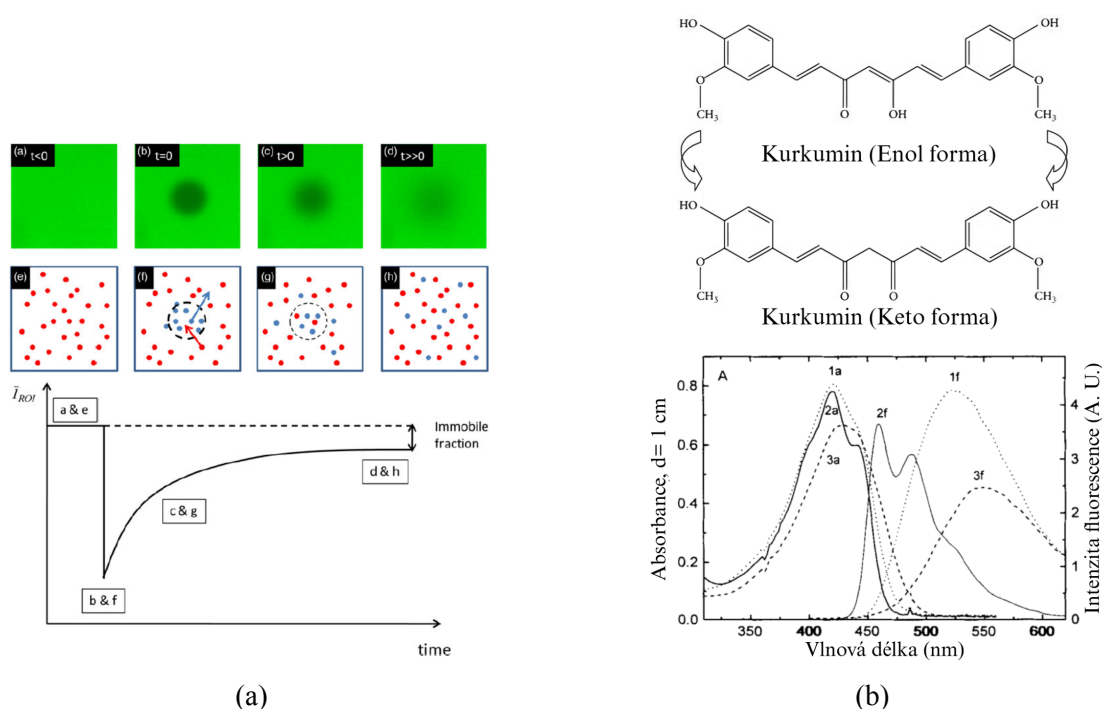
Obnovení fluorescence po fotovybělení (Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP) je technika sloužící k určení difuzního koeficientu fluoreskujících nebo fluorescenčně označených molekul. Při provádění této metody je nejprve na vzorek aplikován intenzivní světelný paprsek, po jehož dopadu dojde v daném místě k degradaci nebo chemické přeměně fluoroforu na látku, která již není fluorescenčně aktivní. Tím vzniká gradient koncentrace difundující látky. Ihned poté je sledován difuzní pohyb pomocí světelného paprsku s výrazně nižší intenzitou (Lorén et al., 2015).

Průběh obnovy fluorescence po fotovybělení při standardních experimentech v kapalném prostředí, prováděných pomocí laserového skenovacího mikroskopu, je znázorněn na obrázku 2a. K matematickému popisu tohoto jevu se často používá buď střední hodnota intenzity pixelů v místě fotovybělení (viz obrázek 2a kruhová tmavá oblast), nebo integrál z intenzity detekované fluorescence v tomto místě. Křivka znázorňující průběh difuze fluorescenčně aktivních molekul do místa fotovybělení je zobrazena obrázku 2a dole. Je patrné, že návrat fluorescence může být neúplný, což je způsobeno částečnou imobilizací fotovybělených částic (Lorén et al., 2015).

Při aplikaci metody FRAP se objevuje řada úskalí, jejichž identifikace a eliminace tvořily významnou součást této studie. Mezi klíčové faktory ovlivňující přesnost a interpretaci výsledků patří zejména: předpoklad lineární závislosti fluorescence difundující látky na její koncentraci, nežádoucí fotovybělení během pořizování snímků, částečné obnovení fluorescence způsobené návratem fluorescenčních vlastností dříve fotovybělených molekul, u polymerních materiálů vzniká riziko difuze nefotovybělených molekul z hlubších vrstev k povrchu vzorku, což má přímý vliv na optimální volbu času a intenzity fotovybělení.

2.2 Interakce kurkuminu se světlem

Kurkumin, jehož strukturní vzorec je uveden na obrázku 2b, patří do skupiny diarylheptanoidů a v závislosti na prostředí se může vyskytovat v keto a enol formě. Tento jev má přímý vliv na interakci kurkuminu se světlem, což se projevuje v jeho absorpčních a fluorescenčních spektrech (viz Obrázek 2b). Je vidět, že ve vybraných rozpouštědlech se maxima absorpčního spektra nacházejí v rozmezí 400–450 nm (Chignell et al., 1994).



Obrázek 2: 2a Průběh obnovy fluorescence po fotovybělení (převzato z Lorén et al., 2015), 2b Strukturní vzorec kurkuminu; absorpční a fluorescenční spektra kurkuminu v různých rozpouštědlech. Absorpční spektra v acetonitrilu, toluenu a ethanolu jsou označena čarami 1a–3a, fluorescenční spektra v těchto prostředích pak čarami 1f–3f. Fluorescenční spektra jsou korigovaná a normalizovaná. Koncentrace kurkuminu je 15 μM , optická dráha 1 cm, excitační vlnová délka $\lambda_{\text{exc}} = 375 \text{ nm}$. Upraveno podle (Chignell et al., 1994) pomocí BioRender.com.

Další důležitou vlastností kurkuminu pro tuto práci je jeho schopnost degradace účinkem světla. Světlem indukovaná degradace probíhá štěpením heptadienového řetězce. Produkty této degradace zahrnují: vanilin, ferulovou kyselinu, ferulový aldehyd a feroilmetan (Arora et al., 2022).

2.3 Povrchová difuze

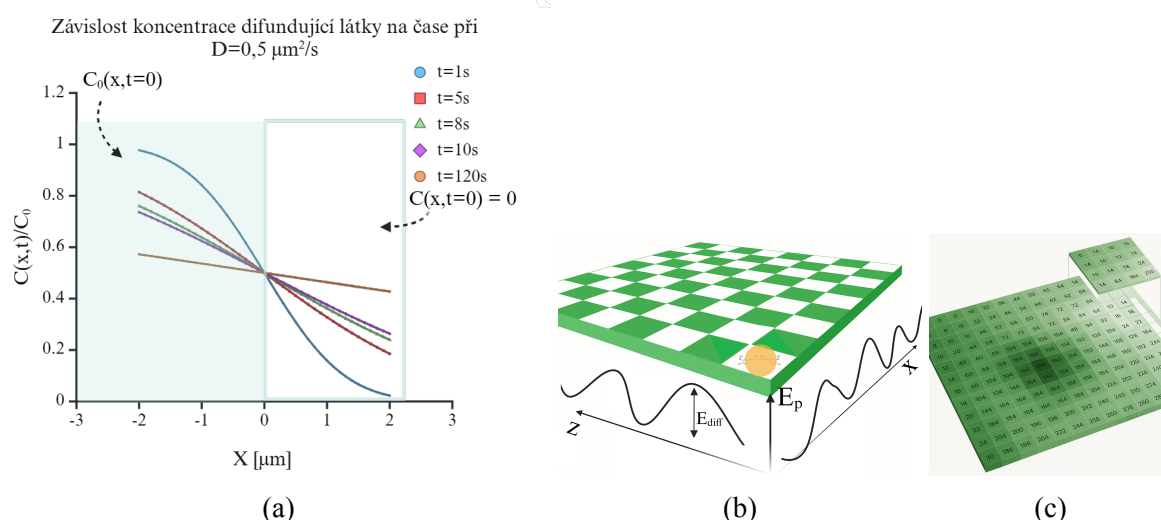
Obecně je pod pojmem difuze definován jev, při kterém je pozorován náhodný pohyb částic směrem z oblasti s vyšší koncentrací do oblasti s nižší koncentrací. Matematicky je tento jev popsán prvním a druhým Fickovým zákonem (1), jehož zápis pro konstantní difuzní koeficient D a difuzi probíhající v jednorozměrném prostoru je uveden níže. Proměnná t zde označuje čas a C koncentraci difundující látky (Crank, 1979).

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (1)$$

Z druhého Fickova zákona jsou následně odvozovány rovnice popisující průběh difuze za přesně definovaných okrajových podmínek. Při zpracování této práce byl použit matematický model využívající chybovou doplňkovou funkci (2). Zde C opět označuje koncentraci difundující látky, t čas, D difuzní koeficient a x vzdálenost sledovaného místa od rozhraní mezi dvěma prostředími (Oura et al., 2004). Tento případ lze matematicky popsat jako Heavisideův skok funkce $C(x, t)$ v čase $t = 0 \text{ s}$. Pro přehlednost je graf funkce 2 uveden níže (viz Obrázek 3a).

$$C(x, t) = \frac{C_0}{2} \operatorname{erfc} \left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}} \right) \quad (2)$$

Na mikroskopické úrovni při popisu pohybu adsorbované částice na povrchu ideálního materiálu uvažujeme, že povrch obsahuje periodické pole adsorpčních míst s minimální potenciální energií (viz Obrázek 3b). Pohyb částic poté můžeme představit jako náhodné skoky mezi jednotlivými adsorpčními místy. Odchyly od ideálního předpokladu pak tvoří možná interakce částic mezi sebou při jejich vyšší koncentraci a přítomnost defektních míst na povrchu materiálu, což může způsobit zachycování částice na pevném místě s minimální potenciální energií (Oura et al., 2004).



Obrázek 3: 3a Graf zobrazující změnu rozložení koncentrace difundující látky v čase za podmínek platných pro použití modelu využívajícího chybovou doplňkovou funkci. 3b Schematický náčrtek periodického pole adsorpčních míst s minimální potenciální energií (zobrazených bílou barvou), mezi nimiž difundující částice (zobrazená žlutě) vykonává skákový pohyb. 3c Schematické zobrazení pixelů jako čtverců, kterým ve skutečnosti odpovídá zadané číslo, a kterým je následně přiřazena barva.

2.4 Fluorescenční mikroskopie a obrazová analýza

Fluorescence je definována jako jev, při kterém po absorpci elektromagnetického záření (v ultrafialové a viditelné oblasti spektra) dochází k vyzařování fotonů o nižší energii, tedy o delší vlnové délce. Vyzařované fotony jsou následně ve fluorescenčním mikroskopu zachyceny objektivem a nasměrovány optickou soustavou na detektor, který je tvořen křemíkovou fotodiodou (Bankhead, 2014).

Po dopadu fotonů na detektor dochází k fotoelektrickému jevu, při němž se z povrchu detektoru uvolňují elektrony. Množství uvolněných elektronů je následně převedeno do formy elektrického signálu, který slouží k vytvoření obrazového snímku (Bankhead, 2014).

Povrch detektoru je rozdělen na menší čtverce, přičemž signály z těchto částí tvoří přímý podklad pro přiřazení hodnot jednotlivým pixelům digitálního obrazu. Pixely (z angl. picture element, prvek obrazu) jsou nejmenší jednotky, ze kterých se obraz skládá (viz Obrázek 3c). Z pohledu počítače se pixel jeví pouze jako číslo v definovaném rozsahu hodnot, které je násled-

ně převedeno na čtverec s určitou barvou a jejím odstínem podle zvoleného způsobu vizualizace (Bankhead, 2014).

Při kvantitativní analýze obrazu je proto nezbytné ponořit se do skutečných číselných dat a při zpracování snímků dbát na to, aby tato data nebyla nijak neúmyslně pozměněna, což by mohlo vést k chybným závěrům (Bankhead, 2014). Při zpracování snímků v této práci byla použita makra. Jedno z použitých maker je uvedeno níže. Výstupem tohoto příkazu je graf a zároveň tabulka obsahující informace o prostorovém rozložení střední hodnoty pixelů podél niti. Pixelům odpovídajícím pozadí byla pomocí příkazu „Threshold...” přiřazena hodnota NaN, a tímto způsobem nebyly zahrnuty do výpočtu průměru.

```
1 run("Set_Scale...", "distance=2.9_known=1_unit=um");
2 run("32-bit");
3 setAutoThreshold("Default_dark_no-reset");
4 //run("Threshold...");
5 setThreshold(1027.50, 1e33);
6 run("NaN_Background");
7 makeRectangle(0, 0, 2464, 2056);
8 run("Plot_Profile");
```

Listing 1: Makro použité při zpracování snímku polyamidových nití.

3 Experimentální část

Cílem mojí bakalářské práce, zaměřené na využití metody kvantitativní fluorescenční mikroskopie FRAP, převzaté z analýzy buněčných vzorků v molekulární biologii, byla její aplikace a úprava pro polymerní materiály. Pro jednoznačné posouzení rozsahu pozorovaného difuzního jevu však bylo nezbytné provést dodatečné analýzy sloužící k popisu chování fluoroforu za konkrétních experimentálních podmínek. Kromě odhadu difuzního koeficientu kurkuminu v kompozitních polymerních nitích z polyamidu 6, vyrobených střídavým elektrickým zvlákňováním, je výstupem mojí práce také rozpracovaný postup pro použití metody FRAP na polymerních materiálech pomocí fluorescenční mikroskopie v širokém poli.

Prvním krokem by vždy mělo být studium závislosti detekované fluorescence z povrchu vzorku na koncentraci fluoroforu v něm. Ke kvantitativnímu posouzení rychlosti probíhající difuze by měl být použit vzorek s maximální možnou koncentrací v rámci lineární závislosti. Dále je nutné zohlednit, že použitá látka má především léčivé účinky a není určena pro fluorescenční mikroskopii, a proto může vykazovat nižší stabilitu vůči působení světla než běžné komerční syntetické fluorofory. Z tohoto důvodu je nutné studovat také jev tzv. fotovybělení, ke kterému dochází v průběhu pořizování snímků.

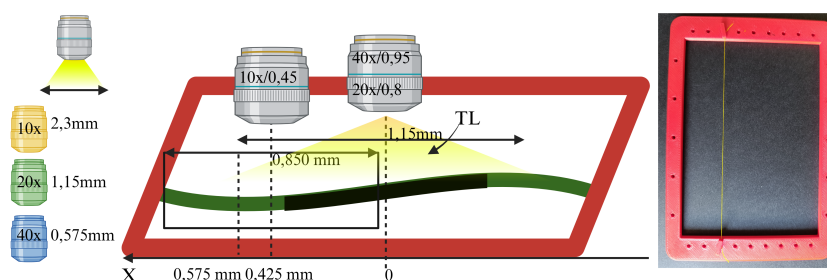
Dalším problémem, který může nastat při provádění metody FRAP na pevném polymerním nosiči, je možné tavení polymeru. Tento problém se sice přímo netýká polyamidu 6, jenž byl v této práci použit, avšak může nastat u méně termicky stabilních makromolekul. Tavení polymeru znemožňuje použití vyšší intenzity světla, což prodlužuje dobu potřebnou pro fotovybělení. Otázka hloubky vrstvy fotovybělených molekul zůstává rovněž otevřená.

Na volbu délky fotovybělení má vliv také další faktor, a to obnova fluorescence po fotovybělení. Ta však nemusí být způsobena pouze difuzí fluoreskující molekuly v rovině materiálu, ale může být podmíněna buď difuzí z jeho hloubky, nebo opětovným nabytím schopnosti fluoreskovat u již fotovybělených molekul – jak je tomu například u zeleného fluorescenčního proteinu.

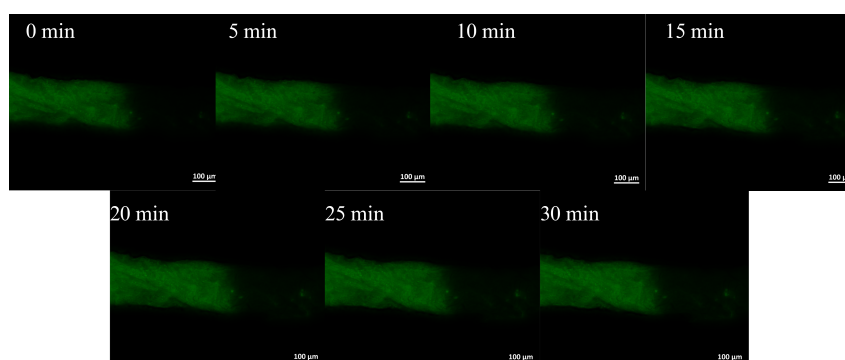
Provedené experimenty potvrzují existenci odchylek, způsobených výše popsanými faktory. Tyto odchylky však nejsou natolik významné, aby kriticky ovlivnily další analýzu výsledků.

3.1 Stanovení difuzního koeficientu kurkuminu na kompozitních polyamidových nitích

Výše popsané analýzy a úvahy vedly k následujícímu nastavení při provádění experimentu: nejprve byla niť umístěna na držák vytištěný pomocí 3D tiskárny (viz Obrázek 4), poté byl držák se zavěšenou nití vložen do mikroskopu. Fotovybělení probíhalo s použitím objektivu $40\times/0,95$ a světla o vlnové délce 475 nm s intenzitou 1,7 %. Doba fotovybělení byla vždy 20 minut; po jejím uplynutí byla niť posunuta o 0,425 mm ve směru osy X, kde následně probíhalo snímání. K pořizování obrazu byl použit objektiv $10\times/0,45$ a světlo o vlnové délce 475 nm s intenzitou 1,7 %, přičemž expoziční čas činil 20 ms. Během snímání bylo vždy pořízeno 20 řezů (tzv. *z-stack*), aby byla niť vystavena excitačnímu světlu po dobu celkem 400 ms. Snímky pořízené v průběhu sledování obnovy fluorescence po fotovybělení na niti vyrobené z roztoku s obsahem kurkuminu 0,25 hm. % jsou uvedeny níže (viz Obrázek 5). Po pořízení snímků byla niť opět posunuta do polohy $x = 0$, kde na ni – v závislosti na typu prováděného experimentu – bylo ponecháno působit TL (bílé) světlo, přičemž byl použit objektiv $20\times/0,8$ (viz Obrázek 4). Popis provedených experimentů spolu s jejich označením, používaným dále v práci, je uveden v následující tabulce (viz Tabulka 1).



Obrázek 4: Grafické znázornění postupu použitého při provedení experimentů (vlevo) a snímek použitého držáku (vpravo).



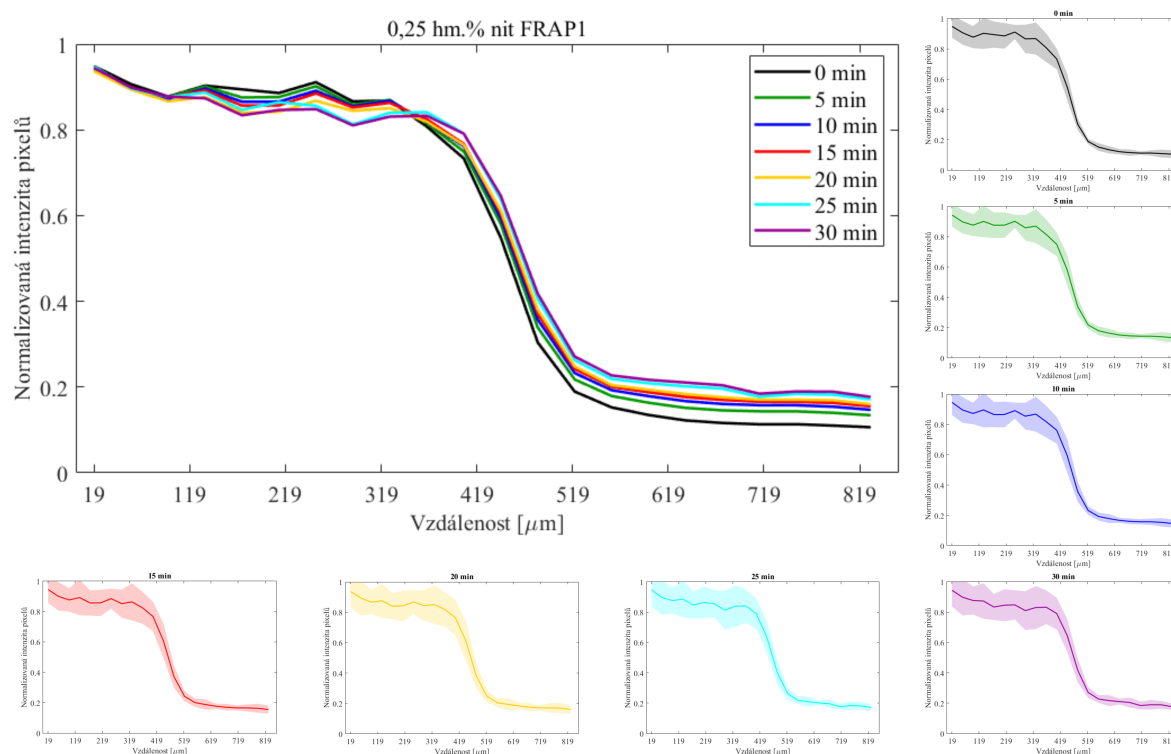
Obrázek 5: Snímky pořízené v průběhu pozorování obnovy fluorescence po fotovybělení na niti vyrobené z roztoku s obsahem kurkuminu 0,25 hm. %. V mezech byl vzorek osvětlen TL světlem o intenzitě 7,6 %. Měřitko: $100\mu\text{m}$.

Po získání snímků následovala jejich obrazová a matematická analýza. Pomocí makra, popsaného v podkapitole 2.4, byl v softwaru Fiji z každého snímku získán profil průměrné intenzity

Tabulka 1: Změny v popsaném nastavení při provádění FRAP experimentu na nitích.

Název experimentu	Použitá nit byla vyrobena z	Počet opakování	Pořizování snímků	Intenzita TL
0,25kurkFRAP0	0,25 hm.% roztoku	3	sedmkrát	0 %
0,25kurkFRAP02	0,25 hm.% roztoku	3	dvakrát	0 %
0,25kurkFRAP1	0,25 hm.% roztoku	6	sedmkrát	7,6 %
0,25kurkFRAP2	0,25 hm.% roztoku	6	sedmkrát	8,1 %
0,75kurkFRAP3	0,75 hm.% roztoku	3	sedmkrát	7,2 %

pixelů napříč celým obrazem. Výsledky byly následně normalizovány vzhledem k maximální průměrné hodnotě v oblasti neovlivněné fotovybelením na počátku experimentu, což umožnilo lepší srovnatelnost a interpretaci dat. Graf na Obrázku 6 znázorňuje prostorové rozložení průměrné intenzity fluorescence ze série šesti experimentů. Hlavní část grafu zachycuje průběh průměrných hodnot, zatímco menší doprovodné grafy zobrazují směrodatné odchylky pro jednotlivé časové body.



Obrázek 6: Průběh obnovy fluorescence po fotovybelení na niti při použití nastavení odpovídajícího experimentu 025kurkFRAP1. Centrální graf zobrazuje průměrné normované hodnoty v každém časovém bodě. Boční grafy ukazují rozložení zprůměrované normované intenzity v jednotlivých časech (shora dolů: 0 min, 5 min, 10 min, 30 min; zleva doprava: 15 min, 20 min, 25 min, 30 min) se směrodatnými odchylkami.

Pro další analýzu bylo nezbytné původní data znovu normalizovat do formy vhodné pro použití ve zvoleném matematickém modelu. Ve výsledném vzorci 3 označuje $\bar{F}(x, t)$ průměrnou intenzitu pixelů v bodě x a čase t . Symbol $\bar{F}_{\min}(0)$ představuje minimální průměrnou hodnotu intenzity pixelů v čase $t = 0$ min, zatímco $\bar{F}_{\max}(0)$ odpovídá maximální průměrné hodnotě ve stejném časovém bodě.

$$\frac{\overline{F}(x, t) - \overline{F}_{\min}(, 0)}{\overline{F}_{\max}(0) - \overline{F}_{\min}(0)} \quad (3)$$

Volba matematického modelu vycházela z faktu, že jediné možné nastavení experimentu na zařízení dostupném v prostorách univerzity neumožňovalo získat výsledky ani okrajové podmínky typické pro klasické FRAP experimenty. Stejně tak i materiál, který byl v rámci této práce použit ke studiu, nebyl dosud pro FRAP analýzu běžně využíván. Z tohoto důvodu bylo nezbytné zaměřit se na matematické modely, které sice dosud nebyly ve FRAP metodě běžně aplikovány, ale jež jsou potenciálně vhodné pro studium povrchové difuze. Pro odhad difuzního koeficientu byl dříve zmíněný model 2 rozšířen o regresní parametry a a T . Zavedení parametru a má za cíl eliminovat chybu způsobenou nepřesným určením bodu považovaného za $x = 0$, který by dle okrajové podmínky původního modelu měl odpovídat ostré hranici mezi dvěma prostředními v čase $t = 0$. Přidání dalšího parametru T pak umožňuje kompenzovat chybu vzniklou tím, že z fyzikální povahy světla a omezení použitého zařízení nelze tuto ostrou hranici ve skutečnosti přesně realizovat. Parametr T lze interpretovat tak, že ostrá hranice na počátku skutečně existovala, ale samotné snímání započalo až s jistým zpožděním. Výsledná rovnice, použitá pro nelineární regresi v programu R, měla následující tvar:

$$\frac{\overline{F}(x, t) - \overline{F}_{\min}(, 0)}{\overline{F}_{\max}(0) - \overline{F}_{\min}(0)} = \frac{1}{2} \operatorname{erfc}\left(\frac{x + a}{2\sqrt{D}\sqrt{t + T}}\right) \quad (4)$$

Odhadnute programem R hodnoty parametru jsou uvedeny v následující tabulce (viz Tabulka 2). Ze získaných parametru lze konstatovat, že při pořizování snímků pouze dvakrát — v časech 0 a 30 minut — byl difuzní koeficient stanoven jako $4,3 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$. Při pořizování snímků každých 5 minut v časovém rozmezí 0–30 minut byl stanoven jako $1,7 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$. Tento pokles v odhadnuté hodnotě difuzního koeficientu může být způsoben fotovybělením částic, které difundovaly do již poškozené oblasti. Pokud však na vzorek mezi pořizováním snímků působilo TL světlo o intenzitě 7,6 %, byl pozorován významný nárůst difuzního koeficientu na $4,9 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$. Zvýšení intenzity TL světla na 8,2 % vedlo k nárůstu difuzního koeficientu o jeden řád, na $1,68 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$. Na závěr lze konstatovat, že difuze kurkuminu na polyamidových vláknech je závislá na intenzitě světla dopadajícího na vzorek. Grafy reziduí pořízené ve stejném softwaru poukazují na vznik systematické chyby, pravděpodobně vznikající v oblastech s nadměrnou koncentrací fluoroforu a v částech nítě, kde dochází k obnově fluorescence nepodmíněně podélnou difuzí částic.

Tabulka 2: Parametry odhadnuté z nelineární regresní analýzy pro jednotlivé série FRAP experimentů.

Název experimentu	Odhad a [m]	Odhad $\sqrt{D}$ [$\sqrt{\text{m}^2/\text{s}}$]	Odhad T [s]
0,25kurkFRAP0	$1,717 \cdot 10^{-5} \pm 1,701 \cdot 10^{-6}$	$4,141 \cdot 10^{-7} \pm 3,102 \cdot 10^{-7}$	11090 ± 11090
0,25kurkFRAP02	$3,735 \cdot 10^{-6} \pm 3,927 \cdot 10^{-6}$	$6,562 \cdot 10^{-7} \pm 3,151 \cdot 10^{-7}$	4194 ± 4740
0,25kurkFRAP1	$2,235 \cdot 10^{-5} \pm 2,098 \cdot 10^{-6}$	$7,009 \cdot 10^{-7} \pm 2,292 \cdot 10^{-7}$	3452 ± 2791
0,25kurkFRAP2	$5,979 \cdot 10^{-6} \pm 3,010 \cdot 10^{-6}$	$1,295 \cdot 10^{-6} \pm 2,465 \cdot 10^{-7}$	1611 ± 898
0,75kurkFRAP3	$5,154 \cdot 10^{-5} \pm 5,017 \cdot 10^{-6}$	$1,641 \cdot 10^{-6} \pm 3,896 \cdot 10^{-7}$	1375 ± 1000

3.2 FRAP experimenty provedené pomocí LSCM na Ústavu experimentální medicíny v Praze

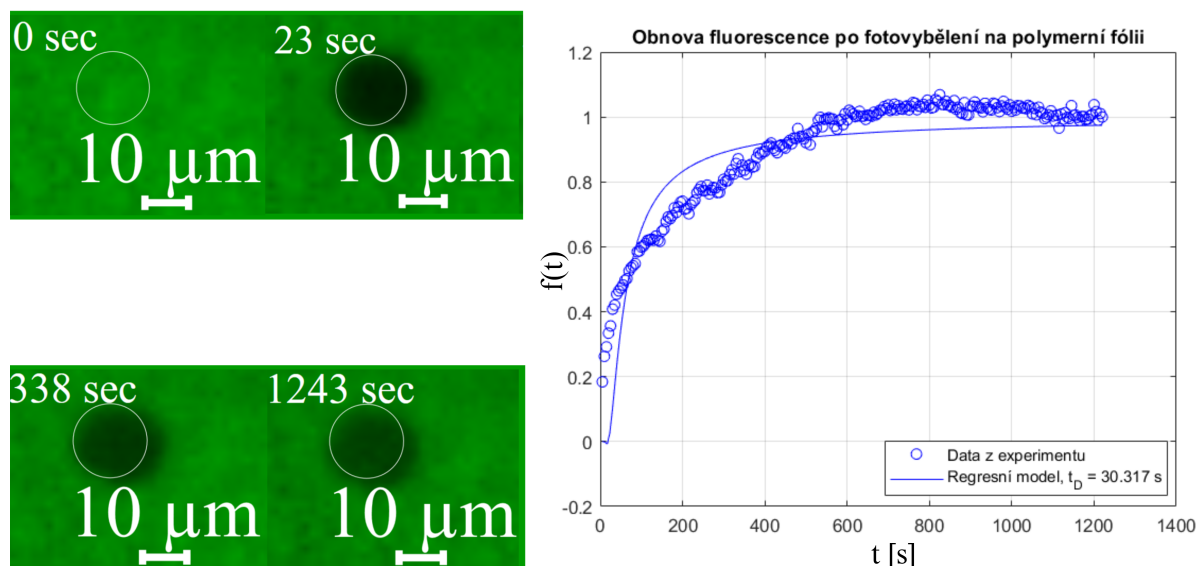
Pro další analýzu FRAP na laserovém skenovacím mikroskopu, který je pro provádění této metody běžnější, byly připraveny planární vzorky dvou typů. Prvním z nich byla polyamidová fólie, vzniklá uschnutím roztoku polyamidu 6 a kurkuminu v kyselinách mravenčí a octové v petriho misce. Tímto způsobem byla připravena řada vzorků s různou koncentrací kurkuminu; k další analýze byl zvolen vzorek z rozsahu koncentrací, ve kterém se projevovala lineární závislost detekované fluorescence na koncentraci fluoroforu, jak bylo uvedeno na počátku kapitoly 3. Na základě výsledků analýzy polyamidových fólií byla zvolena koncentrace kurkuminu v roztoku použitého k výrobě nanovlákněné vrstvy. Zvláknění probíhalo při konstantním napětí, z jehly na rotující kolektor. Takto vyrobené vzorky byly zavěšené ve vzduchu před objektivem mikroskopu pomocí nástavce vytištěného na 3D tiskárně.

Pořizování snímků probíhalo na mikroskopu Zeiss AxioObserver LSM 880 pomocí objektivu Plan Apochromat 10x/0,45 M27. Při snímání bylo použito excitační světlo o vlnové délce 488 nm a intenzitě 2 %. Doba, po kterou se laserový paprsek nacházel v místě odpovídajícím jednomu pixelu (pixel time), činila 1,54 μ s. K fotovybělení byly použity dvě vlnové délky 405 nm a 408 nm obě nastavené na 100 % intenzitu. Pixel dwell time při fotovybělení byl zvětšen na 131,07 μ s. Při použití nanovlákněného materiálu probíhalo fotovybělení pomaleji a bylo nutné uvedený postup zopakovat desetkrát (počet iterací při fotovybělení byl roven deseti). Průběh FRAP na polyamidové fólii je uveden na obrázku 7. Další analýza probíhala dvěma způsoby, kdy nejprve byl odhadnut difuzní koeficient s využitím následujícího empirického vztahu $D = \gamma \left(\frac{w^2}{4t_{\frac{1}{2}}} \right)$, kde D značí difuzní koeficient, γ je parametr závislý na tvaru a profilu skvrny fotovybívání (ve výpočtu byla použita hodnota 0,88), w je poloměr skvrny fotovybívání a $t_{\frac{1}{2}}$ je poločas obnovy fluorescence (Lorén et al., 2015). Při výpočtu byly použity hodnoty z regresního modelu poskytnuté programem ZEN Pro ihned po provedení experimentu. Spočítané hodnoty byly vloženy do tabulky 3. Dalším způsobem stanovení difuzního koeficientu byl model dle Soumpasis (Soumpasis, 1983) a Saxtona (viz rovnice 5) (Saxton, 2001), ve kterém τ_D značí charakteristický difuzní čas, t je symbolem pro čas, J_0 a J_1 jsou Besselovy funkce prvního druhu, $F(t)$ je střední intenzita pixelů ve fotovyběleném místě v čase t , $F(0)$ je střední intenzita pixelů ve fotovyběleném místě ihned po fotovybělení, $F(\infty)$ je střední intenzita pixelů ve fotovyběleném místě po ustálení rovnováhy (ukončení difuze) a r_b je značka pro poloměr skvrny fotovybívání. Graf zobrazující regresní křivku získanou aplikací tohoto modelu na experimentální data je uveden na obrázku 7. Vypočtené hodnoty difuzních koeficientů byly zaneseny do tabulky 3.

$$f(t) = \exp\left(-\frac{2\tau_D}{t}\right) \left[J_0\left(\frac{2\tau_D}{t}\right) + J_1\left(\frac{2\tau_D}{t}\right) \right], \quad f(t) = \frac{F(t) - F(0)}{F(\infty) - F(0)}, \quad \tau_D = \frac{r_b^2}{4D} \quad (5)$$

Tabulka 3: Difuzní koeficienty kurkuminu stanovené pro planární vzorky polyamidu 6.

<i>Materiál</i>	<i>Polymerní folie</i>		<i>Nanovlákněná vrstva</i>	<i>Nanovlákněná vrstva</i>
Regresní model	Zen pro	Saxton and Soumpasis	Zen pro	Saxton and Soumpasis
<i>Difuzní koeficient</i> [m ² /s]	1.5×10^{-13}	5.8×10^{-13}	2.7×10^{-13}	2.0×10^{-12}



Obrázek 7: Zleva je zobrazen průběh FRAP experimentu na polyamidové fólii. Zprava je uveden graf získaný aplikací regresního modelu (viz rovnice 5) na data pořízená v průběhu tohoto experimentu.

4 Závěr

Tato práce uvádí rozpracovaný postup nastavení a úpravy FRAP experimentů prováděných na polymerních materiálech, což je zatím málo řešené téma v odborné literatuře (Sustr et al., 2017).

Stanovené difuzní koeficienty kurkuminu na polymerní fólii z polyamidu 6 se pohybují řádově kolem $D \approx 10^{-13} \frac{\text{m}^2}{\text{s}}$. V případě nanovláknenného materiálu se stanovený difuzní koeficient nachází v rozmezí $10^{-12} \frac{\text{m}^2}{\text{s}}$ až $10^{-13} \frac{\text{m}^2}{\text{s}}$. Získaná data řádově odpovídají difuzním koeficientům stanoveným pro kurkumin na povrchu PLGA pomocí počítačové simulace (Giorgi et al., 2024).

Experimenty prováděné na kompozitních polyamidových nitích vyrobených střídavým zvlákněním ukazují na silnou závislost difuzního koeficientu na intenzitě bílého světla dopadajícího na vzorek. Jev světlem řízené povrchové difuze je rovněž v odborné literatuře zatím málo zkoumán. Studie, ve které bylo zkoumáno chování atomů cesia na povrchu safíru, uvádí, že při světlem řízené difuzi je část energie z absorbovaných fotonů spotřebována na desorpci difundující částice z povrchu, po kterém se pohybuje. Právě procesy adsorpce (navázání částice na povrch pomocí ne vazebných interakcí) a desorpce (uvolnění z povrchu) hrají pro rychlost difuze klíčovou roli. Zároveň se uvádí, že při nehomogenním osvětlení vzorku dochází k efektu shodnému se Soretovým jevem, při kterém nehomogenní ohřev tělesa vyvolává nerovnoměrné rozložení molekul v jeho objemu (Vartanyan et al., 2011).

Literatura

ARORA, Aditi; KUMAR, Sumit; KUMAR, Sandeep; KUMAR, Rajesh; PRASAD, Ashok, 2022. Chemical Features and Therapeutic Applications of Curcumin (A Review). *Russian Journal of General Chemistry*. Roč. 92, s. 1785–1805. Dostupné z DOI: 10.1134/S1070363222090201.

BANKHEAD, Peter, 2014. *Analyzing fluorescence microscopy images with ImageJ*.

- CRANK, J., 1979. *The Mathematics of Diffusion*. Clarendon Press. Oxford science publications. ISBN 9780198534112. Dostupné také z: <https://books.google.cz/books?id=eHANhZwVouYC>.
- GIORGI, Alessandro; BELLUSSI, Francesco; PARLANI, Stefano; LUCISANO, Andrea; SILVESTRI, Emanuele; ARYAL, Susmita; PARK, Sanghyo; KEY, Jaehong; FASANO, Matteo, 2024. Diffusion of curcumin in PLGA-based carriers for drug delivery: a molecular dynamics study. *Journal of molecular modeling*. Roč. 30, s. 219. Dostupné z DOI: 10.1007/s00894-024-06023-x.
- CHIGNELL, C. F.; BILSKI, P.; RESZKA, K. J.; MOTTEN, A. G.; SIK, R. H.; DAHL, T. A., 1994. Spectral and photochemical properties of curcumin. *Photochemistry and Photobiology*. Roč. 59, č. 3, s. 295–302. Dostupné z DOI: 10.1111/j.1751-1097.1994.tb05037.x.
- LORÉN, Niklas; HAGMAN, Joel; JONASSON, Jenny; DESCHOUT, Hendrik; BERNIN, Diana; CELLA ZANACCHI, Francesca; DIASPRO, Alberto; MCNALLY, James; AMELOOT, Marcel; SMISDOM, Nick; NYDEN, Magnus; HERMANSSON, Anne-Marie; RUDEMO, Mats; BRAECKMANS, Kevin, 2015. Fluorescence recovery after photobleaching in material and life sciences: Putting theory into practice. *Quarterly Reviews of Biophysics*. Roč. 48, s. 323–387. Dostupné z DOI: 10.1017/S0033583515000013.
- OURA, K.; LIFSHITS, V.; SARANIN, Alexander; ZOTOV, A.; KATAYAMA, Mitsuhiro; YATES, John, 2004. Surface Science: An Introduction. *Physics Today*. Roč. 57, s. 79–80. Dostupné z DOI: 10.1063/1.1825276.
- SAXTON, Michael, 2001. Anomalous Subdiffusion in Fluorescence Photobleaching Recovery: A Monte Carlo Study. *Biophysical journal*. Roč. 81, s. 2226–40. Dostupné z DOI: 10.1016/S0006-3495(01)75870-5.
- SOUMPASIS, Dikeos, 1983. Theoretical analysis of fluorescence photobleaching recovery. *Biophysical journal*. Roč. 41, s. 95–7. Dostupné z DOI: 10.1016/S0006-3495(83)84410-5.
- SUSTR, David; HLAVACEK, Antonin; DUSCHL, Claus; VOLODKIN, Dmitry, 2017. Multi-Fractional Analysis of Molecular Diffusion in Polymer Multilayers by FRAP. A New Simulation-Based Approach. *The Journal of Physical Chemistry B*. Roč. 122. Dostupné z DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b11051.
- VARTANYAN, T.; PRZHIBEL'SKII, Sergey; KHROMOV, Valerii; LEONOV, N., 2011. Light-Induced Surface Diffusion. In: ISBN 978-953-307-636-2. Dostupné z DOI: 10.5772/21117.