



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

Studentská vědecká a odborná činnost 2017

Mechatronika

29. květen 2017

**Technická univerzita v Liberci
Univerzitní náměstí 1410/1
budova G,
461 17 Liberec**



Recenzent: Klára Antlová

Editor: Tereza Semerádová

© Technická univerzita v Liberci – 2017

ISBN 978-80-7494-337-9

Obsah

MECHATRONIKA – bakalářský studijní program

Marcel HAVRDA

Příprava monosubstituovaných cyklodextrinů selektivní deacetylací 6

Ondřej SEIBERT

Příprava nanočástic oxidů těžkých kovů 16

Hana ŠINKOROVÁ

Biokompatibilní povrchové modifikace polyethylentereftalátu zaměřené na biomedicínské aplikace 26

MECHATRONIKA – navazující a doktorský studijní program

Micheal KALÁT

Nanočásticové senzorové systémy 38

Krčmář LUKÁŠ

Pokročilé řízení pohonů pro mobilní robotickou platformu a jejich laboratorní testování 48

Petr NAIMAN

Bionická ruka 51

David SALAČ

Distribuovaná aplikace pro kryptoanalýzu asymetrických kryptosystémů 54

Jakub Štoček

Konstrukce optického zobrazovače pro trojrozměrné zobrazování 62



MECHATRONIKA

bakalářský studijní program

PŘÍPRAVA MONOSUBSTITUOVANÝCH CYKLODEXTRINŮ SELEKTIVNÍ DEACETYLACÍ

Havrda Marcel

Sekce - MECHATRONIKA,
Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií, 3. ročník
Bakalářský studijní program – NANOTECHNOLOGIE

Abstrakt: Tato práce se zabývá syntézou monosubstituovaných derivátů cyklodextrinů (CD) pomocí regioselektivní deacetylce. Pro optimalizování přípravy derivátů byly nejprve provedeny pilotní studie, kde byly výtěžky sledovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Vybraná činidla byla použita pro deacetylaci per-O-acetyl- β -CD ve větším měřítku, a takto byly získány dva monosubstituované deriváty. Jedná se o per-O-acetyl-2^A-hydroxy- β -CD a per-O-acetyl-6^A-hydroxy- β -CD. Výsledné produkty byly charakterizovány pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) a hmotnostní spektrometrie (MS). Příprava prvně jmenovaného derivátu nebyla doposud publikována. První část literární rešerše je zaměřen na stručný úvod do problematiky cyklodextrinů. Druhá část se věnuje monosubstituovaným derivátům CD a teorii selektivní deacetylce.

Klíčová slova: cyklodextriny, monosubstituovaný derivát, selektivní deacetylce

1 Úvod

Od objevení cyklodextrinů (*Szejtli* [1]) uplynula již řada let, ale přesto jsou určitá odvětví těchto cyklických oligosacharidů pro vědce stále velkou neznámou. Důvodem bádání a získávání nových poznatků, může být široké využití těchto látek v praxi. Díky svým unikátním fyzikálně-chemickým vlastnostem, schopnostem tvořit inkluzní komplexy a velmi nízké toxicitě, našly cyklodextriny i jejich deriváty široké využití v nejrozličnějších odvětvích, jako například v potravinářském (*Szente & Szejtli* [2]), kosmetickém (*Buschmann & Schollmeyer* [3]), farmaceutickém (*Buschmann & Schollmeyer* [4]), zemědělském (*del Valle* [5]) nebo textilním průmyslu (*Buschmann a kol.* [6]).

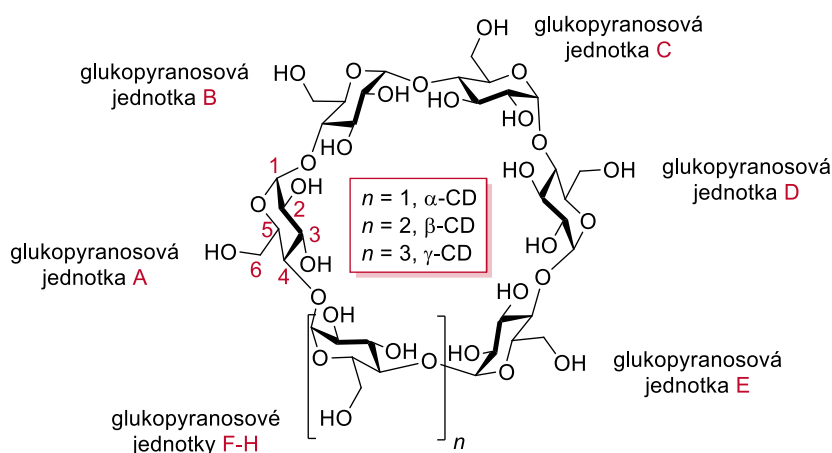
Tato práce si klade za cíl prozkoumání nové metodologie přípravy derivátů cyklodextrinů pomocí regioselektivní deacetylce. Motivací pro optimalizování této metody je ve výsledku snadná, časově a finančně nenáročná cesta, která vede k přípravě vhodných derivátů, díky nimž bychom mohli v blízké době modifikovat celou řadu nanomateriálů. Využití by takto připravené deriváty našly i jako velmi užitečné prekurzory pro další chemické syntézy.

2 Cyklodextriny

Cyklodextriny (CD), dříve známé též pod názvem cykloamylosy nebo cyklomaltodextriny, jsou cyklické oligosacharidy, jejichž základní stavební jednotkou jsou α -D-glukopyranosové jednotky v židličkové konformaci ⁴C₁, které jsou do prstence vzájemně propojeny $\alpha(1\rightarrow4)$ glykosidickými vazbami. Ke vzniku této vazby dochází při enzymatické degradaci amylosy za působení enzymů cyklomaltodextrin glykosyltransferáz – CGTáz, které jsou bakteriálního původu (*Larsen* [7]).

Podle počtu glukopyranosových jednotek, jež jsou propojeny v kruhu, dělíme CD na α -CD (6 jednotek), β -CD (7 jednotek) a γ -CD (8 jednotek), jak můžeme vidět na obrázku 1. Tyto tři typy patří k nejčastěji využívaným, protože mají prostorově výhodnou konformaci, která jim

zajišťuje dobré komplexační vlastnosti. Kromě těchto tří typů byl již vyroben pre- α -CD, jehož struktura je tvořena pěti glukopyranosovými jednotkami. Zároveň jsou známy typy obsahující větší počet jednotek: δ -CD (9 jednotek), ϵ -CD (10 jednotek) a některé z nich mohou být tvořeny až sto jednotkami (Frank [8]).



Obrázek 1: Struktura cyklodextrinů.

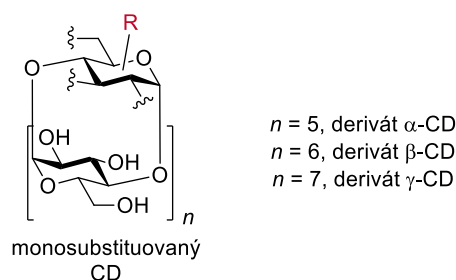
3 Monosubstituované deriváty cyklodextrinů

Tam, kde přestávají CD stačit, se na řadu dostávají jejich deriváty, čímž se ještě zvyšuje využitelnost (Szejtli [1]). Základní typy CD obsahují 18 (α -CD), 21 (β -CD) a 24 (γ -CD) hydroxylových skupin, které lze libovolně modifikovat, a tak dostáváme široké spektrum nových derivátů rozličných vlastností. Počet známých derivátů CD je obrovský: při vyhledávání v databázi SciFinder[®] se dozvídáme o existenci více než 2000 známých derivátů α -CD, téměř 8000 derivátů β -CD, a také více než 1000 derivátů γ -CD. Většina dosud syntetizovaných derivátů však nenašla své uplatnění, protože zahrnují složité kroky syntéz, což má za následek nízké výtěžky a vysokou cenu. Aby bylo možné deriváty CD využít v praxi, musí být zachována jejich zdravotní nezávadnost a komplexační vlastnosti.

Reakcí CD s reaktantem dochází k modifikaci hydroxylových skupin, a tím vzniká směs izomerů s různým stupněm substituce: mono-, di-, tri- i více substituované deriváty. Jednotlivé izomery se liší polohou substituentu/ů v rámci jedné glukopyranosové jednotky, ale i umístěním glukopyranosové jednotky v celém CD. Proto rozlišujeme různé druhy derivátů CD: persubstituované CD, náhodně substituované CD, persubstituované CD ve zvolené pozici, selektivně substituované CD a monosubstituované CD.

Vzniklé směsi jednotlivých izomerů je po syntéze nutné separovat, což může být velmi obtížné. Pro monosubstituované deriváty je možný vznik tří různých izomerů, pro disubstituované deriváty je možný vznik desítek izomerů a pro tri- a více substituované deriváty toto číslo ještě více roste. Z tohoto důvodu je výhodná příprava především persubstituovaných a monosubstituovaných derivátů.

Monosubstituované deriváty (obrázek 2) se připravují derivatizací vodíku na hydroxylové skupině. Velké množství hydroxylových skupin v polohách 2, 3 a 6, které si navzájem konkurují, však znesnadňuje substituci na cílené OH skupině. Možností, jak docílit regioselektivní modifikace CD je využít odlišných vlastností hydroxylových skupin v různých polohách (Rezanka [9]).

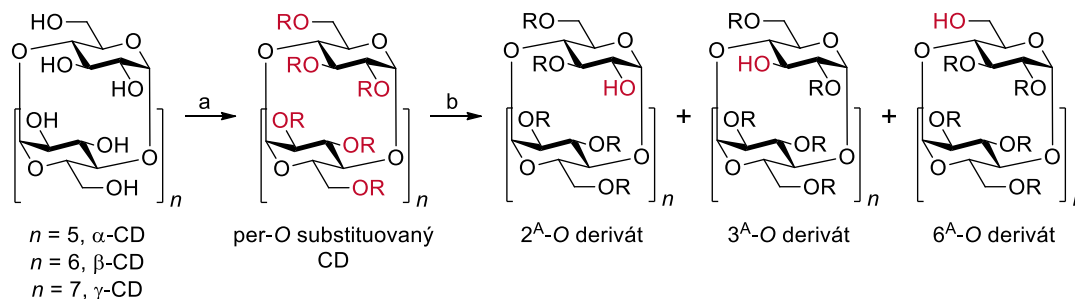


Obrázek 2: Monosubstituované deriváty CD.

Metody pro vznik selektivních monosubstituovaných derivátů můžeme rozdělit do dvou kategorií: metody přímé a nepřímé (Rezanka [9]).

Ve své práci jsem se vydal cestou nepřímých metod přípravy monosubstituovaných derivátů CD. Nechal jsem se inspirovat odbornými články, ve kterých již byly popsány některé postupy selektivního ochraňování persubstituovaných CD.

Principem nepřímých metod je nejprve ochránění všech hydroxylových skupin (obrázek 3a). Per-O substituovaný CD lze připravit obvykle jednoduchými chemickými reakcemi s výtěžky blízcími se ke 100 %. Dalším krokem je selektivní ochránění chránicí skupiny (např. metylové) na příslušné pozici (obrázek 3b). Výhodou nepřímých metod je variabilnější použití, protože dále reagovat může pouze jedna specifická OH skupina, která může být dále upravena standardními reakcemi na téměř jakýkoli požadovaný monosubstituovaný derivát CD. Za nevýhody lze považovat více reakčních kroků. Je důležité upozornit na to, že v této práci se monosubstituovanými deriváty rozumí i deriváty, které mají pouze jednu OH skupinu a všechny ostatní OH skupiny jsou ochráněny (např. acetylovány, benzylovány, metylovány apod.).



Obrázek 3: Princip nepřímé metody vzniku monosubstituovaného derivátu CD.

Jednou z již zmíněných nepřímých metod je selektivní demethylace, ta využívá k selektivnímu ochránění permethylovaného CD diisobutylaluminium hydridu (DIBAL) (du Roizel a kol. [10]). Díky této metodě lze syntetizovat permethylované 2^A -O, 3^A -O nebo 6^A -O deriváty. Další metoda, která využívá DIBAL je selektivní de-O-benzylace perbenzylovaných α -, β - nebo γ -CD (Pearce & Sinay [11]). Výsledkem selektivní de-O-benzylace je především vznik 6^A -O derivátu. Poslední dobře zmapovanou ochraňovací reakcí je de-O-benzoylace (Sakairi a kol. [12]). Čtenář by se neměl nechat zmást tím, že se název selektivní debenzoylace liší od selektivní debenzylace pouze jedním písmenem. Odlišná není pouze benzoylová chránicí skupina, kterou tvoří ester, ale také je při této metodě použit jiný reaktant hydrazin. Dalším rozdílem této metody je vznik 2^A -O derivátu.

3.1 Selektivní deacetylace

Selektivní deacetylace by v budoucnu mohla být další metodou, pomocí které bychom mohli být schopni připravit monosubstituované deriváty v přijatelných výtěžcích. Do této doby však nebyl publikován žádný postup zabývající se selektivním odchraňováním peracetylovaných CD. V literatuře (Kaya a kol. [13]) byly popsány pouze reakce, které vedly k odstranění acetylové skupiny z derivátů glukosy, monosacharidů, disacharidů atd., nikoliv však z cyklodextrinů.

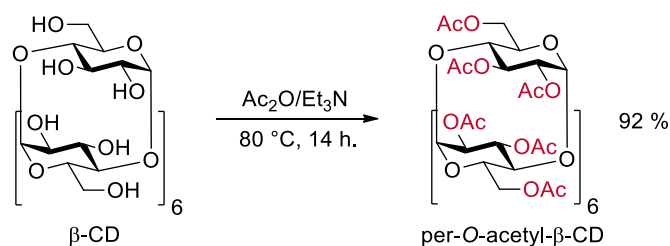
Vrátíme-li se zpět k monosubstituovaným derivátům CD, je důležité uvést, že per-O-acetyl-6^A-hydroxy-β-CD již byl (na rozdíl od izomerů v polohách 2 a 3) syntetizován. Nejednalo se však o selektivní deacetylaci, ale o složitý proces zahrnující několik chránících a odchraňovacích reakčních kroků.

Od regioselektivní deacetylace se očekává, že usnadní přípravu a zvýší výtěžky acetylovaných derivátů CD. Výhodou může být již příprava peracetylovaného CD, která je velmi jednoduchá, finančně nenáročná a s výtěžky blížící se ke 100 %. Další nespornou výhodou je přesné a jednoduché určení polohy substituentu monosubstituovaného CD pouze pomocí ¹H NMR spektra (běžně je nutné použít 2D NMR). Metodu pro zjištění polohy pomocí ¹H NMR navrhli vědci Michal Řezanka a Jindřich Jindřich (Rezanka & Jindrich [14]) a je založena na specifickém posunu signálu atomu vodíku v různých polohách. Lze takto tedy rozlišit všechny tři typy peracetylovaných mono-O-substituovaných derivátů α-, β- i γ-CD.

Díky těmto výhodám popisované regioselektivní odchraňovací reakce lze předpokládat perspektivní využití této metody i do budoucna. Z tohoto důvodu jsem se ve své bakalářské práci zabýval právě přípravou monosubstituovaných derivátů CD selektivní deacetylací.

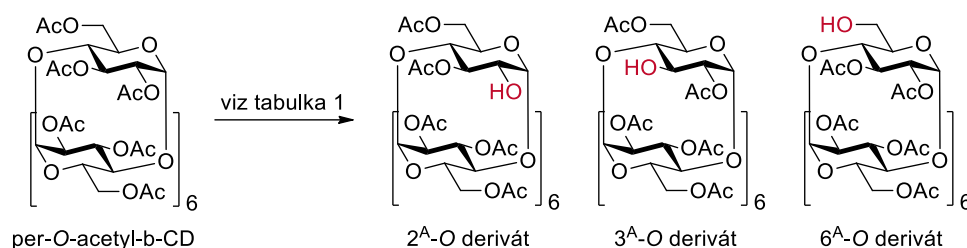
4 Výsledky a diskuze

Aby bylo možné syntetizovat monosubstituované deriváty CD pomocí selektivní deacetylace, bylo nejprve nutné připravit výchozí látku – per-O-acetylovaný β-CD (obrázek 4). Jako výchozí látka pro tuto reakci byl zakoupen komerčně dostupný β-CD, k němuž byl do reakce v přebytku přidán anhydrid kyseliny octové a triethylamin. Vzniklý peracetylovaný-β-CD byl bez problémů přečištěn pomocí sloupcové chromatografie.



Obrázek 4: Příprava per-O-acetyl-β-cyklodextrinu.

Po připravení výchozí látky pro selektivní deacetylaci byly provedeny pilotní odchraňovací studie s nižší navázkou (obrázek 5). Per-O-acetylovaný-β-CD byl vždy rozpuštěn v příslušném rozpouštědle, dále bylo do reakce přidáno odchraňovací činidlo a reakční směs byla míchána po určitou dobu za konstantní teploty (viz tabulka 1). Průběh reakce byl zprvu kontrolován pomocí TLC a hmotnostní spektrometrie. Po zjištění retenčních faktorů monosubstituovaných derivátů na TLC byla ke sledování průběhu reakce používána primárně metoda TLC.



Obrázek 5: Schéma selektivní deacetylace.

Tabulka 1: Testované odchraňovací reakce.

reaktant*	teplota	čas	rozpuštědlo
H ₂ NNH ₂ .H ₂ O	r.t.	22 h.	ACN
H ₂ NNH ₂ .H ₂ O	r.t.	30 h.	THF
H ₂ NNH ₂ .H ₂ O	r.t.	45 h.	pyridin
H ₂ NNH ₂ .H ₂ O	r.t.	48 h.	THF
H ₂ NNH ₂ .H ₂ O	r.t.	68 h.	DMF
H ₂ NNH ₂ .H ₂ O	r.t.	68 h.	MeOH
H ₂ NNH ₂ .H ₂ O	r.t.	6 d.	pyridin
H ₂ NNH ₂ .H ₂ O	50 °C	23 h.	MeOH
H ₂ NNH ₂ .H ₂ O	70 °C	72 h.	DMSO
H ₂ NNH ₂ .H ₂ O	70 °C	96 h.	ACN
H ₂ NNH ₂ .H ₂ O	70 °C	96 h.	DMSO
H ₂ NNH ₂ .H ₂ O (2 ekv.)	r.t.	21 h.	DMF
H ₂ NNH ₂ .H ₂ O (2 ekv.)	r.t.	21 h.	MeOH
H ₂ NNH ₂ .H ₂ O (2 ekv.)	50 °C	20 h.	MeOH
hydrazin + kys. octová	r.t.	22 h.	pyridin
H ₂ NNH ₂ .HCl	50 °C	96 h.	MeOH
H ₂ NNH ₂ .HCl	70 °C	96 h.	DMSO
H ₂ NNH ₂ .HCl	70 °C	6 d.	DMSO
fenylhydrazin	50 °C	20 h.	MeOH
fenylhydrazin	70 °C	13 d.	DMSO
fenylhydrazin (6 ekv.)	r.t.	45 h.	THF
fenylhydrazin (6 ekv.)	r.t.	45 h.	pyridin
fenylhydrazin (62 ekv.)	70 °C	5 d.	DMSO
tosylhydrazin	50 °C	96 h.	MeOH
tosylhydrazin	70 °C	96 h.	DMSO
DIBAL	r.t.	3 h.	toluen
DIBAL	0 °C	1 h.	toluen

DIBAL	-80 °C	1 h.	toluen
DIBAL (10 ekv.)	r.t.	1 h.	toluen
DIBAL (10 ekv.)	r.t.	3 h.	toluen
DIBAL (10 ekv.)	0 °C	1 h.	toluen
DIBAL (10 ekv.)	-80 °C	1 h.	toluen
FeCl ₃ .6H ₂ O	r.t.	96 h.	ACN
FeCl ₃ .6H ₂ O	r.t.	5 d.	ACN
FeCl ₃ .6H ₂ O	r.t.	6 d.	ACN
FeCl ₃ .6H ₂ O	r.t.	7 d.	ACN
FeCl ₃ .6H ₂ O	r.t.	8 d.	ACN
FeCl ₃ .6H ₂ O	50 °C	24 h.	ACN
FeCl ₃ .6H ₂ O	70 °C	6 d.	ACN
<i>N,N</i> -diisopropylethylamin	r.t.	48 h.	THF
<i>N,N</i> -diisopropylethylamin	r.t.	72 h.	ACN
<i>N,N</i> -diisopropylethylamin (2 ekv.)	r.t.	72 h.	ACN + H ₂ O
<i>N,N</i> -diisopropylethylamin (50 ekv.)	r.t.	72 h.	ACN + H ₂ O
K ₂ CO ₃	r.t.	5 d.	ACN + H ₂ O
K ₂ CO ₃	r.t.	6 d.	ACN + H ₂ O
K ₂ CO ₃ (10 ekv.)	r.t.	48 h.	ACN + H ₂ O
imidazol	40 °C	20 h.	MeOH
imidazol	40 °C	7 d.	MeOH
NH ₃ 25%	r.t.	48 h.	ACN
NH ₃ 25%	r.t.	5 d.	THF + MeOH
trifenyfosfin	r.t.	72 h.	ACN
trifenyfosfin	r.t.	72 h.	THF
Cs ₂ CO ₃	r.t.	2 d.	ACN + H ₂ O
<i>tecr</i> -butoxid draselný	r.t.	20 h.	THF

*není-li uvedeno jinak množství reaktantu bylo stanoveno na 1 ekvivalent

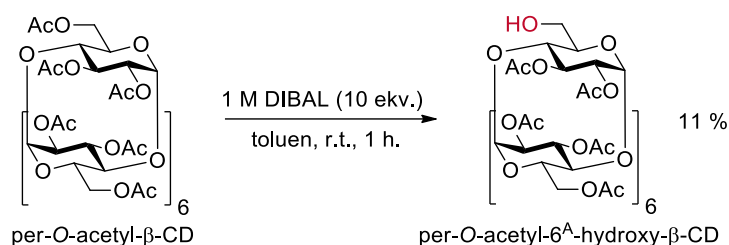
Zprvu bylo cíleno převážně na 2^A-O monosubstituovaný derivát, protože tento derivát dosud nebyl syntetizován. Inspirací byl článek (*Sakairi a kol.* [12]) ve kterém autoři využili k selektivnímu odchránění benzoxylové skupiny na 2 uhlíku hydrazin. Reakce peracetylovaného β-CD s H₂NNH₂.H₂O za použití rozpouštědla pyridinu však nepřinesla kýžený výsledek. Proto bylo přistoupeno k testování řady dostupných rozpouštědel místo pyridinu a současně využito i komplexačních vlastností výchozí látky – pro selektivní odchránění byl vyzkoušen různě modifikovaný hydrazin (např. fenyhydrazin, tosylhydrazin, viz tabulka 1). U některých reakcí bylo s vidinou lepšího výtěžku též přidáno více odchránovacího činidla nebo byla měněna teplota či reakční doba. Po porovnání pilotních reakcí byla opakována reakce s H₂NNH₂.H₂O v DMSO při teplotě 70 °C a s reakční dobou 72 hodin s vyšší navázkou 100 mg peracetylovaného-β-CD. Vzniklý produkt byl směsí několika derivátů, které bylo nutné od sebe odseparovat. Proto proběhla nejprve sloupcová chromatografie na silikagelu, a takto se podařilo

oddělit směs 2^A- a 6^A-O derivátů. Následovala chromatografie na 10 g reverzního silikagelu, která byla provedena dvakrát po sobě. Ačkoliv byly obě chromatografie na reverzním silikagelu časově náročné, nepodařilo se získat čistý per-O-acetyl-2^A-hydroxy-β-CD.

Neúspěch přípravy 2^A-O derivátu však nezavdal příčinu ke chmurám a bylo přistoupeno k přípravě 6^A-O derivátu. V tomto případě bylo využito znalostí z vědeckých publikací, (*du Roizel a kol.* [10]), (*Pearce & Sinay* [11]), (*Xiao a kol.* [15]), které popisují selektivní ochrání menthylové a benzylové skupiny za pomoci DIBAL. Reakce probíhaly pod inertním plynem argonem. Jako ochraňovací látka byl použit 1 M roztok DIBAL v toluenu a z tohoto důvodu byl jako rozpouštědlo použit také toluen. Pilotní studie ukázala, že se s velkou pravděpodobností jedná o selektivní reakci, protože na TLC byl vidět z monosubstituovaných derivátů pouze 6^A-O derivát. Vznikalo však velké množství více deacetylovaných derivátů. Pro zvýšení selektivity reakce směrem k monosubstituovanému derivátu bylo přistoupeno ke snížení reakční teploty na 0 °C či dokonce na -80 °C. Ukázalo se však, že reakční teplota nemá na vznik monosubstituovaných derivátů významnější vliv.

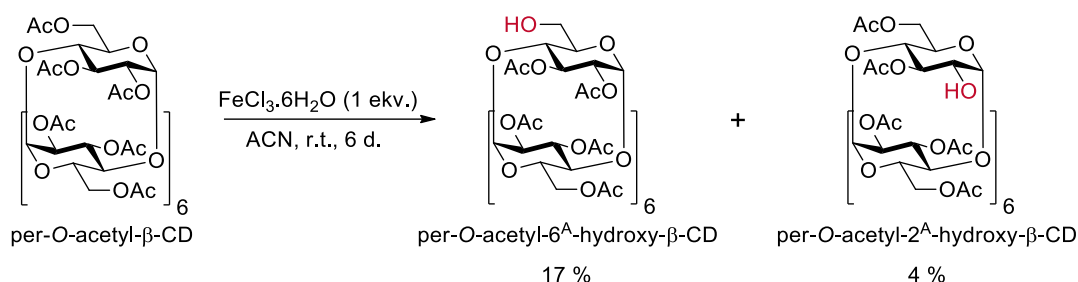
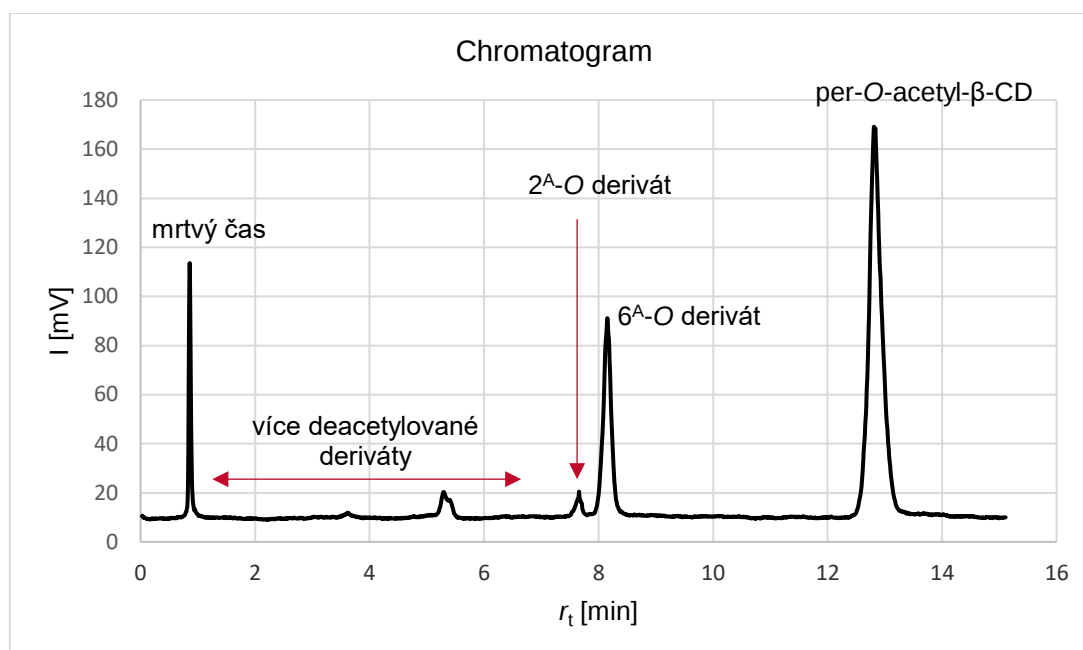
To ovšem nelze říci o množství DIBAL v reakci. Reakce s 10 ekvivalenty měly dle TLC lepší předpoklad na vyšší výtěžek požadovaného derivátu. Selektivitu reakce nám potvrdil i graf získaný prostřednictvím HPLC. Bohužel se nepodařilo HPLC správně nakalibrovat a proto z grafu nebylo možné vyčíst reálné množství vzniku 6^A-O derivátu, ale pouze poměr výchozí látky a konečného produktu. Přestože byl tento poměr 5:1 v neprospěch požadované látky, výhodou této metody zůstala selektivnost. Bylo tedy přistoupeno ke zopakování syntézy s 1g množstvím peracetylovaného β-CD, (obrázek 6). Po přečištění produktu pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu bylo výsledkem bezproblémové separování 110 mg per-O-acetyl-6^A-hydroxy-β-CD. Výtěžek reakce činil 11 %. Výtěžek patří sice k těm nižším, avšak výhodou je jednoduchá separace, jelikož nevznikají žádné další monosubstituované produkty.

Produkt byl charakterizován pomocí MS a NMR (včetně 2D) a spektroskopická data se shodovala s literaturou (*Diakur a kol.* [16]).



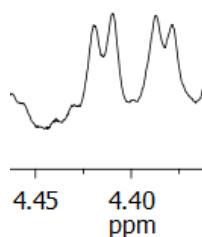
Obrázek 6: Schéma selektivní deacetylace působením DIBAL

Pro další ochraňovací reakce posloužily informace z literatury (*Kaya a kol.* [13]), (*Wei a kol.* [17]), která se zabývala selektivní deacetylací glukosy, monosacharidů, disacharidů atd. Výsledkem bylo velké množství reakcí, při kterých byla použita řada různých ochraňovacích činidel, ale i rozpouštědel – viz tabulka 1. V závislosti na průběhu reakce byla upravována teplota i reakční doba. Většina vyzkoušených reakcí však nebyla podle TLC vhodná pro selektivní ochrání peracetylovaného β-CD. Některé reakce neposkytovaly kýžené monosubstituované deriváty, jiné jen ve velmi nízkém výtěžku. V úvahu přicházela pouze reakce, při které byl jako ochraňovací činidlo použit FeCl₃·6H₂O. Z TLC bylo zjištěno, že vznikají 2 monosubstituované deriváty a z toho jeden v nadbytku. Toto podezření potvrdil chromatogram z HPLC, na kterém je vidět přítomnost dvou monosubstituovaných derivátů (graf 1). Pro zjištění izolovatelných výtěžků byla tato reakce zopakována s navážkou 1 g výchozí látky, která byla rozpuštěna v ACN (obrázek 7). Do reakce byl přidán 1 ekvivalent FeCl₃·6H₂O a reakce probíhala za laboratorní teploty 6 dnů.

Obrázek 7: Schéma selektivní deacetylace působením $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.Graf 1: Chromatogram selektivní de-O-acetylace působením $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Vzniklé monosubstituované deriváty bylo nutné odseparovat a zároveň odstranit výchozí látku a více deacetylované produkty. Z tohoto důvodu byla provedena sloupcová chromatografie na silikagelu, během které se podařilo získat směs 2^A- a 6^A-O derivátů. Směs bylo třeba dále rozdělit na jednotlivé izomery, proto bylo přistoupeno k další chromatografii na 30 g silikagelu. Po odpaření frakcí vykazovaly izolované deriváty stále známky nečistot. Z tohoto důvodu byl 6^A-O derivát přečištěn na silikagelu a 2^A-O derivát na reverzním silikagelu. Výsledkem reakce bylo připravení 172 mg per-O-acetyl-6^A-hydroxy- β -CD (17 %) a 39 mg per-O-acetyl-2^A-hydroxy- β -CD (4 %). Výtěžek 6^A-O derivátu při této reakci je vyšší, než u reakce s použitím DIBAL, avšak nevýhodou tohoto postupu je nutnost separovat 2^A- a 6^A-O deriváty, které lze rozdělit jen velmi obtížně.

Poloha substituentů byla určena pomocí metody, kterou navrhli vědci Michal Řezanka a Jindřich Jindřich (Rezanka [9]). Touto metodou lze určit polohu substituentu na peracetylovaném mono-O-substituovaném derivátu CD pouze pomocí ^1H NMR spektra měřeného v CDCl_3 . 2-O derivát se podařilo určit pomocí specifického signálu dd ($J = 12,4$ a $3,9$ Hz), který je posunut přibližně na hodnotu 4.40 ppm (obrázek 8). Zároveň se následkem posunu tohoto signálu snížila integrální intenzita ostatních H-2 vodíků, což je opět charakteristickým znakem pro peracetylované CD monosubstituované v poloze 2.



Obrázek 8: Charakteristický NMR signál 2^A-O derivátu.

5 Závěr

Tato práce je zaměřena na optimalizaci regioselektivní deacetylce. Nejprve byly provedeny pilotní studie, během kterých byla vyzkoušena řada různých experimentálních podmínek. Po zjištění vhodných reakcí byly tyto reakce opakovány s vyšší navázkou. Výsledkem je příprava dvou monosubstituovaných derivátů cyklodextrinů: per-*O*-acetyl-2^A-hydroxy-β-CD a per-*O*-acetyl-6^A-hydroxy-β-CD. První z uvedených derivátů zatím nikdo neizoloval ani necharakterizoval. Druhý z derivátů je známý z literatury, avšak zde byl připraven novou reakční cestou. Připravené deriváty byly charakterizovány pomocí ¹H NMR, ¹³C NMR, COSY, HSQC, HMBC a MS.

Připravené monosubstituované deriváty budou dále využity k reakci s pyrrolovým derivátem. Takto substituovaný CD bude sloužit k modifikaci vláken a pomocí komplexačních vlastností budou k CD navázány vhodné biomolekuly. Výsledkem by mělo být vytvoření nosičů pro tkáňové inženýrství.

Literatura

- [1] SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry, *Chemical Reviews*, 1998, Vol. 98, 1743–1753.
- [2] SZENTE, L., SZEJTLI, J. Cyclodextrins as food ingredients, *Trends in Food Science & Technology*, 2004, Vol. 15, 137–142.
- [3] BUSCHMANN, H. J., SCHOLLMAYER, E. J. Applications of cyclodextrins in cosmetic products, *Journal of Cosmetic Science*, 2002, Vol. 53, 185–191.
- [4] HASHIMOTO, H. Present status of industrial application of cyclodextrins in Japan, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2002, Vol. 44, 57–62.
- [5] DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses, *Process Biochemistry*, 2004, Vol. 39, 1033–1046.
- [6] BUSCHMANN, H. J., KNITTEL, D., SCHOLLMAYER, E. New textile applications of cyclodextrins, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2001, Vol. 40, 169–172.
- [7] LARSEN, K. L. Large cyclodextrins, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2002, Vol. 43, 1–13.
- [8] FRANK, H. H. *Crystalline Molecular Complexes and Compounds: Structures and Principles*, 1st edition, Oxford University Press, 2005.
- [9] REZANKA, M. Monosubstituted cyclodextrins as precursors for further use, *European Journal of Organic Chemistry*, 2016, Vol. 2016, 5322–5334.
- [10] DU ROIZEL, B., BALTAZE, J. P., SINAY, P. Diisobutylaluminum-promoted secondary rim selective de-*O*-methylation of permethylated cyclodextrins, *Tetrahedron Letters*, 2002, Vol. 43, 2371–2373.

- [11] PEARCE, A. J., SINAY, P. Diisobutylaluminum-promoted regioselective de-o-benzylation of perbenzylated cyclodextrins, *Angewandte Chemie-International Edition*, 2000, Vol. 39, 3610–3612.
- [12] SAKAIRI, N., KUZUHARA, H., OKAMOTO, T., YAJIMA, M. Synthesis and biological evaluation of 2-amino-2-deoxy- and 6-amino-6-deoxy-cyclomaltoheptaose polysulfates as synergists for angiogenesis inhibition, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1996, Vol. 4, 2187–2192.
- [13] KAYA, E., SONMEZ, F., KUCUKISLAMOGLU, M., NEBIOGLU, M. Selective anomeric deacetylation using zinc acetate as catalyst, *Chemical Papers*, 2012, Vol. 66, 312–315.
- [14] REZANKA, M., JINDRICH, J. Complete sets of monosubstituted cyclomaltohexaoses (alpha-cyclodextrins) as precursors for further synthesis, *Carbohydrate Research*, 2011, Vol. 346, 2374–2379.
- [15] XIAO, S., YANG, M., SINAY, P., BLERIOT, Y., SOLLOGOUB, M., ZHANG, Y. Diisobutylaluminium hydride (DIBAL-H) promoted secondary rim regioselective demethylations of permethylated beta-cyclodextrin, *European Journal of Organic Chemistry*, 2010, Vol. 2010, 1510–1516.
- [16] DIAKUR, J., ZUO, Z., WIEBE, L. I. Synthesis and drug complexation studies with β -cyclodextrins fluorinated on the primary face, *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 1999, Vol. 18, 209–223.
- [17] WEI, G., ZHANG, L., CAI, C., CHENG, S., DU, Y. Selective cleavage of sugar anomeric O-acyl groups using $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, *Tetrahedron Letters*, 2008, Vol. 49, 5488–5491.

PŘÍPRAVA NANOČÁSTIC OXIDŮ TĚŽKÝCH KOVŮ

Ondřej Seibert

Sekce – MECHATRONIKA

Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií, 3 ročník

Bakalářský studijní program – NANOMATERIÁLY

Abstrakt: Práce se zabývá porovnáním metod přípravy nanočástic oxidů těžkých kovů se zaměřením na řadu lanthanoidů. Lanthanoidy mají již dnes široké použití například v elektronice, v různých senzorech, jako extrémně účinné katalyzátory či některé vykazují i fotochemické vlastnosti. Metody byly porovnány dle různých kritérií. První kritérium bylo posoudit proveditelnost metody v laboratořích KCH FP TUL. Dalším důležitým kritériem výběru metod byla schopnost tvořit nanočástice s rozměrem pod 100 nm. Při tomto rozměru částic se již markantně mění vlastnosti materiálu jako je izolace, vodivost, magnetické vlastnosti a mnoho dalších. Homogenita výsledných částic je také důležitá, protože není cílem vytvořit částice o širokém spektru velikostí. Vzorky je nutné charakterizovat rastrovací elektronovou mikroskopií, aby mohla být posouzena úspěšnost experimentu.

Klíčová slova: nanočástice, oxidy těžkých kovů, oxidy lanthanoidů, lanthanoidy

1 Metody výroby nanočástic oxidů těžkých kovů

1.1 Metoda sol – gel

První metodou, která prošla výše zmíněnými kritérii a byla experimentálně zkoušena v laboratoři byla metoda sol – gel. Pro přípravu gelu byl použit 1 gram nonahydrátu dusičnanu železitého, který byl rozpuštěn v ethanolu. Do roztoku byl přilít etylenglykol a bylo nutné roztok řádně promíchat. Stejným způsobem byl připraven roztok s hexahydrátem dusičnanu ceritého. Oba roztoky byly sušeny v sušárně. Po více jak dnu sušení vytvořil etylenglykol s dusičnanem železitým gel. Roztok s dusičnanem ceritým nevytvořil žádnou gelovitou strukturu, pouze vzrostla viskozita roztoku a začal se zbarvovat do žluta. Po úplném vysušení roztoků na prášek byly roztoky vypáleny v peci až při teplotě 650 °C. Při této teplotě jsou veškeré organické sloučeniny spáleny na plyny a zbydou pouze příslušné oxidy kovů.

1.2 Syntéza v zeleném čaji

Extrakt byl vytvořen delším vařením čínského zeleného čaje v destilované vodě. Bylo nutné extrakt přefiltrovat od nečistot. Navážka 1 g hexahydrátu dusičnanu ceritého a 1 g nonahydrátu dusičnanu železitého byla rozpuštěna v kádince v destilované vodě, každý dusičnan zvlášť. Do obou roztoků byl přilít extrakt z čaje. U dusičnanu železitého došlo ihned ke změně barvy ze zelené do černé. Roztoky byly sušeny na plotýnce. Vzorek s dusičnanem

ceritým vytvořil gel medovité konzistence a zelenozlaté barvy, vzorek s dusičnanem železitým se vysušil na černý prášek. Oxidy vznikly pálením vzorků až na teplotu 650 °C.

1.3 Syntéza v mandarinkovém extraktu

Extrakt z mandarinkové kůry byl vytvořen dlouhým vařením čerstvé, pečlivě omyté kůry v destilované vodě. Je nutné roztok zfiltrvat, aby se odstranily nečistoty. Navážka 1 gramu hexahydrátu dusičnanu ceritého byla rozpuštěna v destilované vodě a přilít byl extrakt z mandarinkové kůry. Další přídáním chemikálií byl 25 % amoniak až do pH 10. Při tomto pH došlo k vysrážení produktu a výraznému ztmavnutí roztoku. Stejný postup byl opakován pro nonahydrát dusičnanu železitého. Ten se ovšem ihned při slítí roztoku dusičnanu a mandarinkového extraktu zbarvil do černa. Vzorky byly vysušeny v sušárně a páleny byly v peci při 650 °C.

1.4 Syntéza v cibulovém extraktu

Cibulový extrakt byl vytvořen dlouhým vařením slupek z červené cibule. Roztok z destilované vody a nonahydrátu dusičnanu železitého a destilované vody byl přilít do cibulového roztoku. Roztok změnil barvu do temně fialové až černé. Roztok s hexahydrátem dusičnanu ceritého s cibulovým extraktem naopak zesvětlal. Po vysušení vznikla houbovitá struktura, u dusičnanu ceritého měla výslednou fialovozlatavou barvu. Oba vysušené meziprodukty byly spáleny v peci až při 650 °C.

1.5 Syntéza se škrobem

Škrob byl rozpuštěn v destilované vodě a zahřát tak, aby vznikl čirý roztok. Ten byl přilít do vodných roztoků dusičnanu ceritého a železitého. Po homogenizaci roztoků byly oba vysušeny v sušárně. Vzorek se železem vytvořil po sušení přibližně tvar a velikost mince v hodnotě 5 Kč. Následně byly oba vzorky páleny v peci až na 650 °C.

1.6 Syntéza ve vaječném bílku

Pro tento experiment bylo nutné oddělit bílek od žloutku ze 2 středně velkých vajec. Bílek byl vmíchán do vodných roztoků dusičnanu ceritého a dusičnanu železitého.

1.7 Self combustion metoda (metoda samovznícení)

Tato metoda je založena na reakci paliva a dusičnanu kovu. Pro tento experiment byl použit dusičnan ceritý a dusičnan železitý. Jako paliva byla použita kyselina citronová, glycin a močovina. Nejdříve bylo potřeba rozpustit dusičnan a jedno z paliv ve vodě a následně roztok vysušit v sušárně. Poté byly vzorky páleny až při teplotě 650 °C. K samovznícení unikajících plynů z paliv dochází kolem teploty 300 °C.

1.8 Elektrospinning

Metodou elektrospinningu byla vytvořena polymerní vlákna. Vlákna byla nejdříve zkoušena z poly(vinylalkoholu) (PVA) a poté z poly(vinylbutyralu). Byly připraveny 4 polymerní roztoky z PVA. První byl s přídavkem glycinu a dusičnanu ceritého, druhý

s přídavkem močoviny a dusičnanu ceritého, třetí byl s přídavkem glycinu a dusičnanu železitého a poslední byl vytvořen přidáním extraktu ze zeleného čaje a dusičnanu ceritého. Bylo nutné zjistit, zda tyto roztoky s anorganickou složkou můžou efektivně tvořit nanovlákná. Nejprve byl zkoušen elektrospinning na tyčce se stejnosměrným napětím. Pouze vzorek s čajem byl schopen efektivnější tvorby nanovláken, a proto zbytek roztoku byl zvlákněn na nanospideru pro vytvoření většího množství nanovláken. Zbylé 3 roztoky tedy byly experimentálně zvlákněny elektrospinningem střídavým napětím. Tato metoda se jevila jako mnohem efektivnější. Dalším polymerním roztokem byl roztok PVB a dusičnanu ceritého. Nejdříve byl zkoušen elektrospinning stejnosměrným napětím. Již zde byla vidět podstatně efektivnější tvorba nanovláken, než u roztoků z PVA. Tento roztok byl tedy ve větším množství také zvlákněn na nanospideru. U elektrospinningu střídavým napětím, byla efektivita ještě výrazně větší. Bylo tedy rozhodnuto touto metodou zvláknit větší množství vzorku. Všechny 3 vzorky, kterých bylo děláno více, byly spáleny v peci.

1.9 Pálení polymerních roztoků.

Po experimentech se zvláknováním roztoků PVA bylo rozhodnuto zbylé roztoky vysušit a spálit. Jednalo se o oba roztoky s močovinou a roztok s glycinem. Po vysušení zbyla tvrdá polymerní vrstva na dně kádinky. Suché vzorky byly vypáleny v peci. Vznikly 2 nažloutlé oxidy ceričité a jeden rezavočervený oxid železitý.

1.10 Použití úspěšného experimentu pro řadu lanthanoidů.

Dle předchozích výsledků charakterizace rastrovací elektronové mikroskopie byl vybrán experiment s glycinem. Nejdříve bylo nutné vyrobit dusičnany lanthanu, ceru, praseodymu, neodymu a gadolinia. Ty byly připraveny rozpouštěním oxidů v koncentrované kyselině dusičné a následně vysušeny na prášek. Opakována byla metoda samovznícení s glycinem, jejíž popis je zmíněn v odstavci 1.7.

2 Charakterizace výsledků experimentů

Veškeré vzorky byly charakterizovány rastrovacím elektronovým mikroskopem, za což děkuji Ing. Pavlu Kejzlarovi Ph.D.

2.1 Metoda sol – gel

Výsledné částice měly velikost 30 – 50 nm jak pro vzorek oxidu ceričitého, tak pro vzorek oxidu železitého. Tyto nanočástice byly aglomerovány, bylo ovšem zcela patrné, že dochází k rozpadu velkých částic na stále menší a menší. Je zřejmé, že jednotlivé nanočástice u sebe nedrží velkými silami, a proto dochází k rozpadu částic. Oxid ceričitý měl nažloutlou barvu, oxid železitý červenorezavou.

2.2 Syntéza v zeleném čaji

Oxid ceričitý vytvořil aglomerovanou strukturu z jemných, poměrně dost homogenních nanočástic o velikosti přibližně 20 nm. Oxid železitý vytvořil také

aglomerované struktury, ovšem již nebyly složeny pouze z jednoho druhu částic. Zde se jednalo hned o druhy 3. Prvním druhem byly tyčinky s rozměry ve stovkách nanometrů, druhým druhem byly nanočástice kolem 30 nm a posledním druhem byly extrémně jemné nanočástice pod 10 nm, které zřejmě tvořily aglomeráty a na nich ležely výše popsané větší částice. Oxid ceričitý měl béžově světlou barvu, oxid železitý odstín rezavý.

2.3 Syntéza v mandarinkovém extraktu

Oxid ceričitý vytvořil extrémně porézní strukturu. Velikosti jednotlivých pórů se pohybovaly i kolem 10 nm. Opět byly nalezeny aglomeráty, které na sobě měly jakousi spečenou krustu. Ovšem na lomu byla velmi porézní struktura. Oxid železitý vytvořil také poměrně porézní strukturu, ovšem póry měly velikost spíše v řádech mikrometrů. Jednotlivé částice, ze kterých byly tvořeny stěny pórů, měly velikost přibližně 75 - 150 nm. Ve vzorku byly nalezeny i částice s rozměrem pod 10 nm. Oxid ceričitý měl světlý odstín žluté, oxid železitý opět rezavý.

2.4 Syntéza v cibulovém extraktu

Oxid ceričitý vytvořil strukturu, ve které se různě prolíná pórovitá fáze s aglomerovanými částicemi. Zajímavější strukturu vytvořil oxid železitý. Jednalo se o aglomeráty s průměrnou velikostí částic okolo 100 nm, aglomeráty byly poměrně výrazně homogenní. Oxid ceričitý měl nažloutlou barvu, oxid železitý kovově tmavou až černou.

2.5 Syntéza se škrobem

Oxid ceričitý vytvořil nanočástice o přibližné velikosti 20 – 70 nm. Tyto částice opět byly velmi aglomerovány. Ovšem jednotlivá zrna byla velmi dobře rozeznatelná. Oxid železitý vytvořil aglomeráty ze dvou druhů částic. První byly částice s velikostí přibližně 150 nm. Druhé částice byly o poznání jemnější, s velikostí přibližně 15 – 20 nm. Výsledná barva oxidu ceričitého byla světlounce žlutá, barva oxidu železitého byla rezavohnědá.

2.6 Syntéza ve vaječném bílku

Oxid ceričitý vytvořil aglomeráty z velmi homogenních částic o přibližné velikosti 20 nm. Oxid železitý vytvořil jednak jehličky o délce stovek a šířce desítek nanometrů, jednak větší částice s velikostí stovek nanometrů a také jemné částice s velikostí cca 12 – 70 nm. Zajímavostí byly krystalické, hexagonální částice, na kterých byly krásně vidět úhly 120°.

2.7 Self – combustion metoda (metoda samovznícení)

Aglomeráty oxidu ceričitého byly zpozorovány i u pálení prekurzoru s kyselinou citronovou. Ty byly tvořeny poměrně homogenními částicemi o velikosti kolem 20 nm. Na povrchu částic byla pozorována spečená krusta. Na lomu vzorku se ovšem vždy nacházely homogenní částice. Oxid železitý, připravený stejným způsobem, vytvořil nanočástice, které svým tvarem připomínají mořské korály. Ty byly také aglomerovány do shluků. Byla také pozorována povrchová krusta.

Oxid ceričitý vzniklý pálením dusičnanu s glycinem vytvořil porézní strukturu s povrchovou spečenou krustou, ale na lomu částic byla vždy pozorována porézní struktura. Stěny mezi póry měly velikost i kolem 20 nm. I oxid železitý vytvořil porézní strukturu, která už ovšem nebyla tak jemná, stěny i póry byly znatelně větší. Ve strukturách je možné pozorovat krystalickou hexagonální strukturu.

Pálením s močovinou vytvořil oxid ceričitý částice s velikostí okolo 100 nm. Ty jsou ještě navíc pokryty velmi jemnými částicemi s rozměrem okolo 10 nm. Část vzorků měla na povrchu spečenou krustu. Oxid železitý vytvořil aglomeráty bez povrchové krusty. Částice měly rozměr 65 – 170 nm a byly velmi dobře rozeznatelné.

2.8 Elektrosinning

Pálením vzorku z nanospideru s čajem a dusičnanem ceritým v PVA vznikly částice s velikostí 15 – 30 nm. Tyto částice tvořily strukturu vláken. Můžeme tedy říci, že pálením polymerních vláken s přídavkem anorganické složky vzniknou vlákna anorganická. Tímto způsobem je tedy možné ovlivnit velikost výsledné struktury.

Vzorek z nanospideru s PVB a dusičnanem ceritým zachoval po spálení také vláknennou strukturu. Tato vlákna byla i různě spečena. To platí i pro vlákna vytvořená střídavým napětím.

2.9 Pálení polymerních roztoků

Po pálení PVA s glycinem a dusičnanem ceritým vznikly aglomeráty z nanočástic o rozměru přibližně 20 – 50 nm. Zajímavostí byly jehličky, rozesté po celém vzorku. Po pálení PVA s močovinou a dusičnanem ceritým vznikly částice s velikostí přibližně 40 nm. Zvláštností jsou pŕŕkulaté struktury na povrchu částic, tvořené také částicemi okolo 40 nm. Pálením PVA s močovinou a dusičnanem železitým vznikly 3 zajímavé druhy částic. Prvním druhem byly částice s rozměrem lehce pod 100 nm rozptýlené po celém povrchu vzorku. Druhým druhem částic byly mikrometrové jehličky s šířkou v řádu stovek nanometrů. Posledním pozorovaným druhem částic byly přibližně 500 nm hexagonální částice. Povrch, na kterém ležely jemnější částice, byl tvořen právě jehličkami a hexagonálními částicemi.

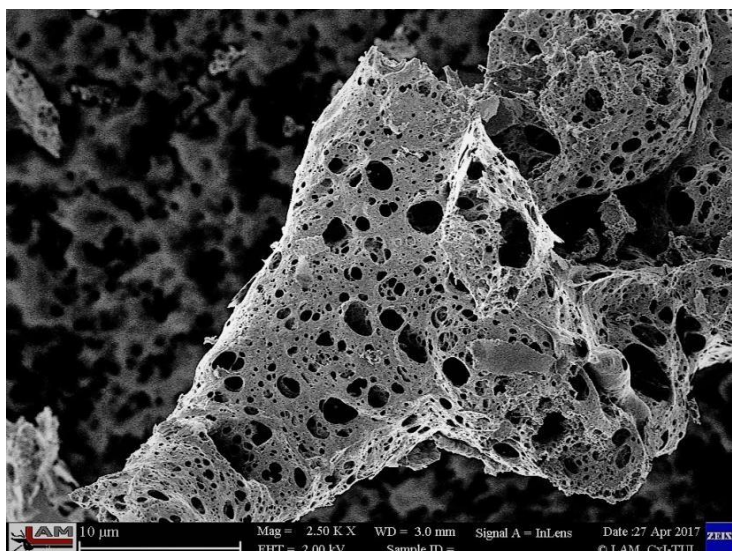
2.10 Použití úspěšného experimentu pro řadu lanthanoidů.

Oxid lanthanitý vytvořil, dle očekávání, pórovitou strukturu. Póry měly různorodou velikost od mikronových po jemné póry s velikostí kolem 10 nm. Oxid ceričitý vytvořil také porézní strukturu, ovšem oproti původnímu experimentu značně robustnější. Oxid praseodymito-praseodymitý se odlišoval velkým počtem malých pŕŕů, přibližně s velikostí okolo 10 nm. Celkově byl poréznější než oxid lanthanitý. Oxid neodymitý měl vŕbec nejvíc malých pŕŕů a lze říci, že byl nejvyvedenějším z pětice vzorků. Oxid gadolinitý vytvořil pouze slabě porézní strukturu, částice byly velmi spečené. Z pěti opakovaných experimentů byl nejméně vydařený.

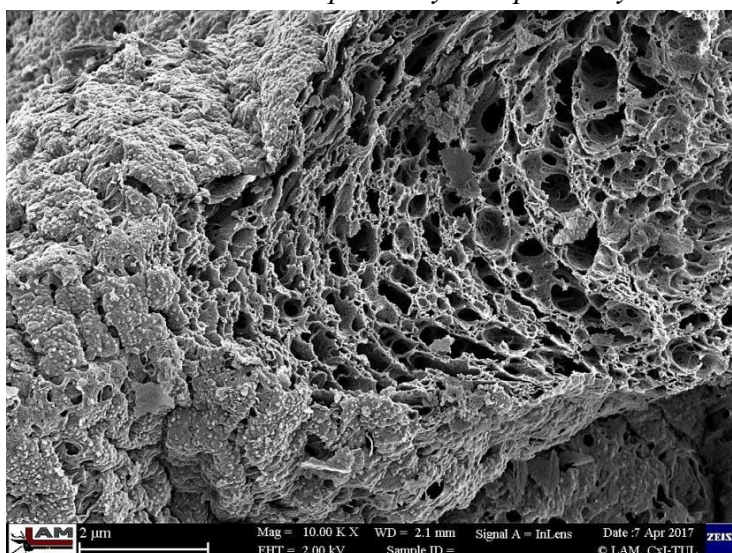
3 Závěr

Experimentálně bylo ověřeno, že prakticky všechny metody vedou k uspokojivým výsledkům. Nevýhodou metody samovznícení i metody zelených syntéz je zatím neschopnost přesně řídit výslednou velikost částic. Zde se tak otevírá další možnost výzkumu, kdy se může zkoumat vliv různých poměrů paliv či extraktů a prekursorů kovů. Dalším významným faktorem je doba pálení v peci. Je zde potenciál zkoumat vliv různých časů pálení a různých teplot na výsledné částice. Velkou výhodou je u spalovacích metod výtěžnost. Ta dosahuje hodnot i přes 90 %, protože ztráty vznikají jen při manipulaci se vzorky. Metoda elektrospinningu má výhodu v možnosti regulace průměru vláken. To je dáno schopností různých polymerů tvořit různé průměry vláken. Další výhodou je možnost použití přímo vzniklých textilií pro různé účely, např. výrobu různých ochranných obleků proti ionizujícímu záření. Naopak nevýhodou je větší časová náročnost metody a také menší účinnost. Vzniklé oxidické prášky mají velký potenciál pro využití v dalším výzkumu na TUL. Je ovšem nutné je nejdříve pomlít na nanomlýnku, aby se rozrušily veškeré aglomerované struktury. Cíl práce byl splněn, metody vykazují dobrou schopnost tvořit nanočástice, často homogenní. Ověřena byla také proveditelnost v laboratořích KCH FP TUL .

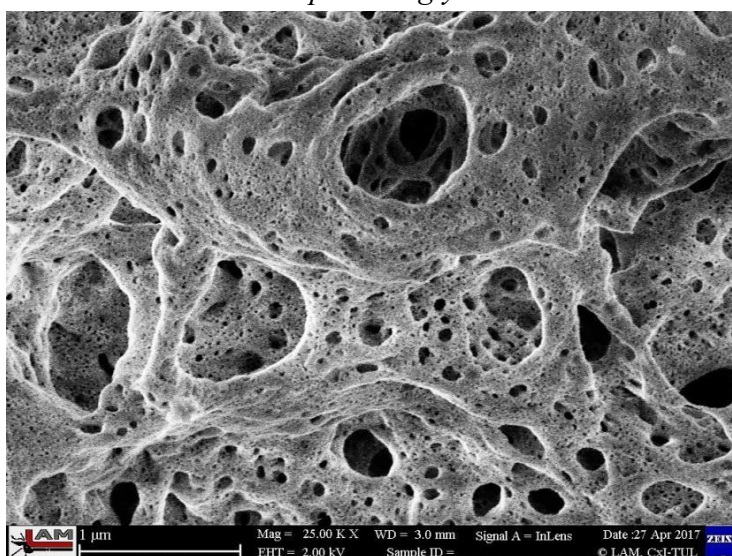
Na následujících snímcích z rastrovací elektronové mikroskopie je možné vidět výše popsané částice oxidů těžkých kovů.



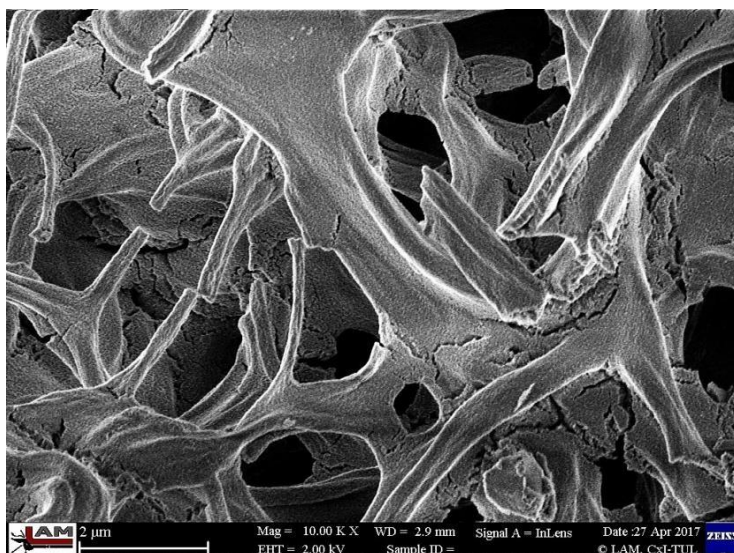
Obrázek 1: Částice oxidu praseodymito-praseodymického



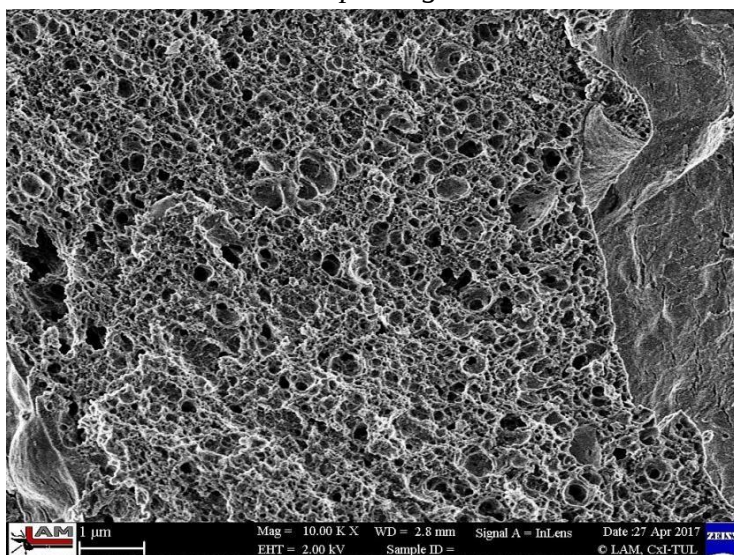
*Obrázek 2: Porezní struktura oxidu cerického.
Metoda pálení s glycinem*



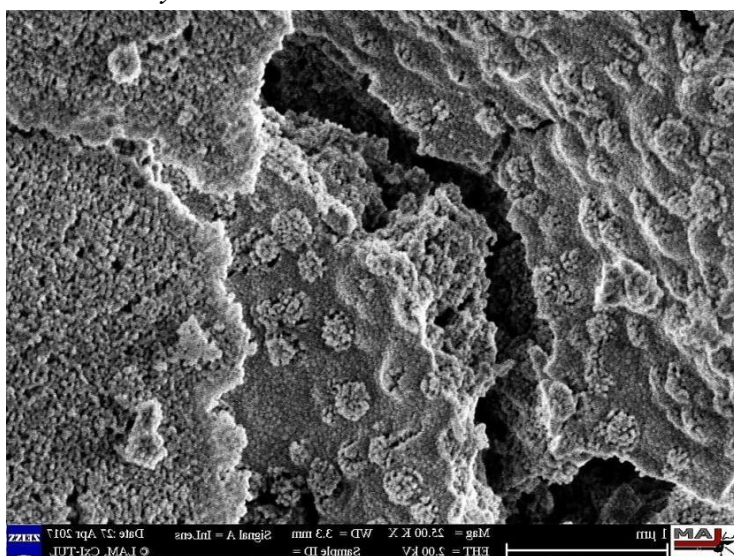
Obrázek 3: Porezní struktura oxidu neodymického



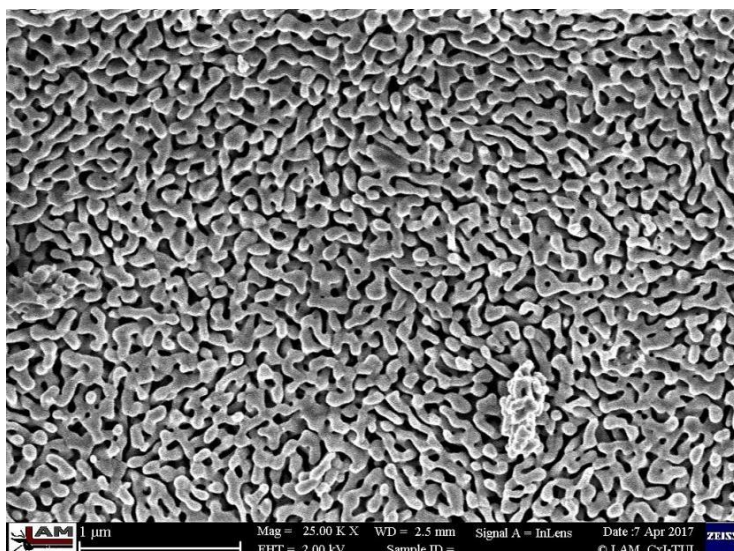
*Obrázek 4: Vlakna oxidu ceričitého.
Elektrospinning PVB*



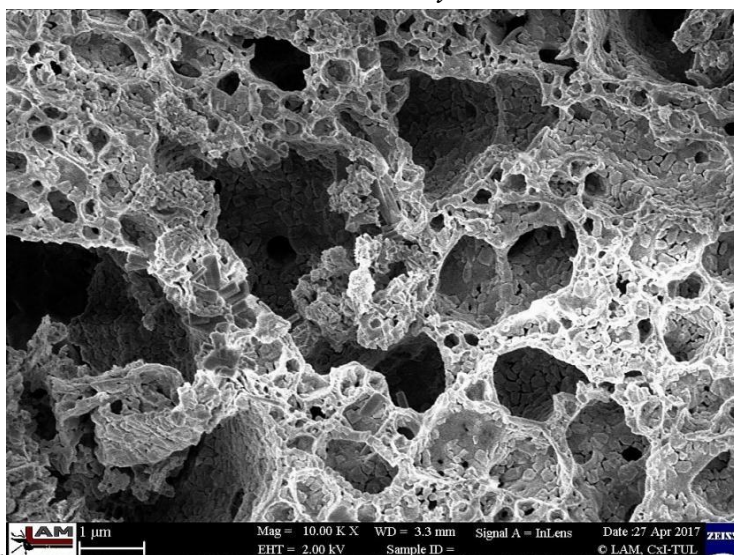
*Obrázek 5: Velmi porezní struktura oxidu ceričitého.
Syntéza v mandarinkovém extraktu*



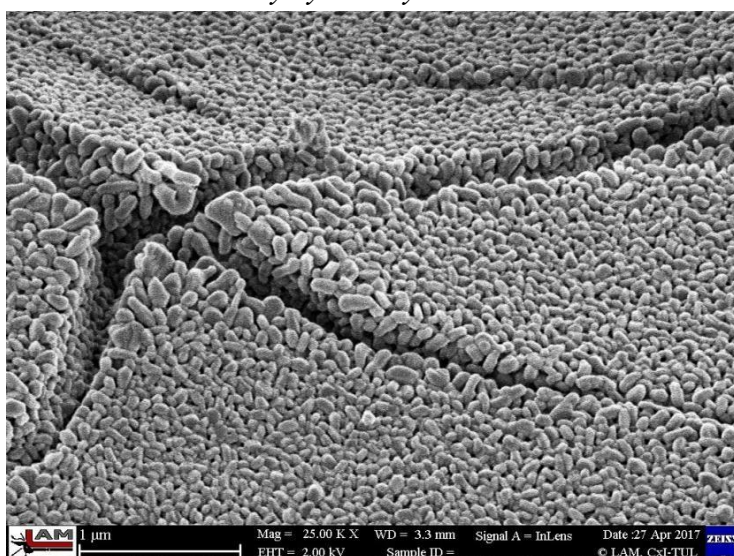
*Obrázek 6: Zajímavá struktura oxidu ceričitého.
Metoda pálení zbylého PVA s močovinou a dusičnanem ceritým*



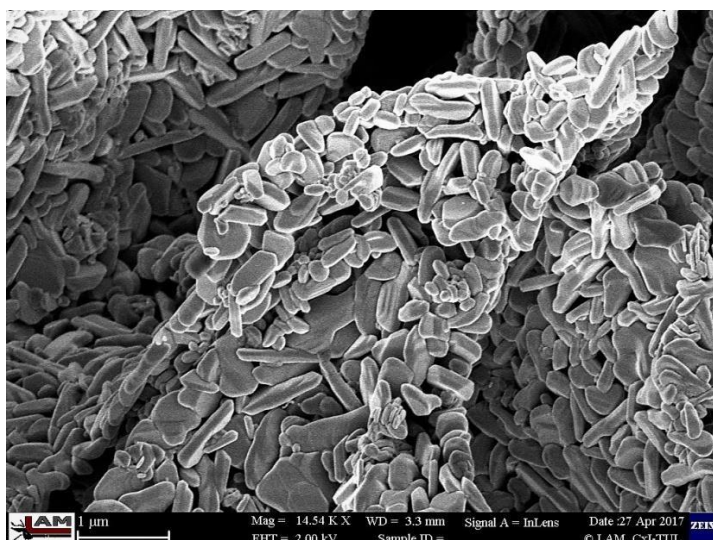
*Obrázek 1: Koralovité nanočástice oxidu železitého.
Metoda samovznícení s kys. citronovou*



Obrázek 8: Oxid železitý vytvořený v mandarinkovém extraktu



*Obrázek 9: Homogenní částice oxidu železitého.
Vytvořeny v cibulovém extraktu*



Obrázek 10: Rozmanité částice oxidu železitého.
Pálení zbylého polymerního roztoku PVA,
močoviny a dusičnanu železitého.

Použitá literatura:

- [1] EHRAMPOUSH, Mohammad Hassan, Mohammad MIRIA, Mohammad Hossien SALMANI a Amir Hossein MAHVI, 2015. Cadmium removal from aqueous solution by green synthesis iron oxide nanoparticles with tangerine peel extract. *Journal of Environmental Health Science and Engineering* [online]. 16. 12., 13, 84. ISSN 2052-336X. Dostupné z: doi:10.1186/s40201-015-0237-4
- [2] DARROUDI, Majid, Mina SARANI, Reza KAZEMI OSKUEE, Ali KHORSAND ZAK, Hasan Ali HOSSEINI a Leila GHOLAMI, 2014. Green synthesis and evaluation of metabolic activity of starch mediated nanoceria. *Ceramics International* [online]. 1., 40(1), 2041–2045. ISSN 02728842. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceramint.2013.07.116
- [3] DHANANJAYA, N., H. NAGABHUSHANA, B.M. NAGABHUSHANA, B. RUDRASWAMY, S.C. SHARMA, D.V. SUNITHA, C. SHIVAKUMARA a R.P.S. CHAKRADHAR, 2012. Effect of different fuels on structural, thermo and photoluminescent properties of Gd₂O₃ nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [online]. 10., 96, 532–540. ISSN 13861425. Dostupné z: doi:10.1016/j.saa.2012.04.067
- [4] UNNITHAN, Afeesh Rajan, Arathyram Ramachandra Kurup SASIKALA, Yesupatham SATHISHKUMAR, Yang Soo LEE, Chan Hee PARK a Cheol Sang KIM, 2014. Nanoceria doped electrospun antibacterial composite mats for potential biomedical applications. *Ceramics International* [online]. 9., 40(8), 12003–12012. ISSN 0272-8842. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceramint.2014.04.038

BIOKOMPATIBILNÍ POVRCHOVÉ MODIFIKACE POLYETHYLENTEREFTALÁTU ZAMĚŘENÉ NA BIOMEDICÍNSKÉ APLIKACE

Šinkorová Hana

Sekce - MECHATRONIKA,
Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií, 3. ročník
Bakalářský studijní program – NANOTECHNOLOGIE

Abstrakt: Tato práce je zaměřena na povrchovou modifikaci polyethylentereftalátových (PET) fólií, snižující, případně zabraňující adhezi bakterií k povrchu a následné tvorbě biofilmu. K modifikaci byla použita Grignardova činidla o různě dlouhém alkylovém řetězci (CH_3MgBr , $\text{C}_4\text{H}_9\text{MgCl}$, $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{MgCl}$, $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{MgCl}$ a $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{MgBr}$). Modifikované povrchy byly podrobeny testování kontaktního úhlu vody (WCA) a volné povrchové energie (FSE), které vypovídají o hydrofobicitě modifikovaných vzorků. Dále byly připravené vzorky testovány pomocí infračervené spektroskopie (FTIR), rastrovací elektronové mikroskopie (SEM) a mikroskopie atomárních sil (AFM). Při zkoumání adheze bakterií k modifikovaným povrchům byly použity tři patogenní bakteriální kmeny, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Kromě testování adheze bakterií k modifikovaným povrchům, byla testována i adheze buněk a jejich následná proliferace.

Klíčová slova: polyethylentereftalát, povrchová modifikace, Grignardova činidla, biofilm, biokompatibilita

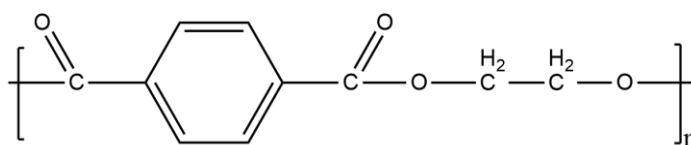
1 Úvod

V současné době se zvyšuje užívání umělých, polymerních tělních implantátů, s tím souvisí také větší míra infekcí týkajících se vzniku biofilmu na implantátech. Ve světě kontinuálně narůstá snaha o snížení výskytu biofilmu, případně zabránění jeho vzniku. Vlivem neustále narůstající rezistence bakterií (v biofilmu jsou navíc až 1000 resistantnější), je léčba infekcí způsobených vznikem biofilmu velice problematická. Adheze bakterií může být z velké části ovlivněna povrchovou úpravou polymerních materiálů. Hlavním cílem této práce je eliminace adheze mikroorganismů k povrchu polyethylentereftalátu pomocí povrchové chemické modifikace Grignardovými činidly. Při zachování mechanických vlastností materiálů a zisku potřebných chemických a biologických vlastností modifikovaného povrchu.

2 Polyethylentereftalát

Polyethylentereftalát bývá nejčastěji označován zkratkou PET, poměrně časté bývá i použití zkratky PETE nebo PETP popř. PET-P.

O objev polyethylentereftalátu se na počátku 30. let minulého století zasloužila americká společnost E. I. du Pont de Nemours and Company známější spíše pod názvem DuPont. První patent na jeho výrobu byl podán pracovníky britské firmy Calcio Printer Johna Rexe Whitfielda a Jamese Tennanta Dicksona již roku 1949. (viz *Whitfield & Dickson* [1])



Obrázek 1: Strukturní vzorec polyethylentereftalátu.

PET je nejznámějším a nejvýznamnějším polymerem ze zástupců termických polyesterů. Charakteristickým znakem polyesterů je přítomnost esterových funkčních skupin v hlavním makromolekulárním řetězci. Za polyestery jsou tedy označovány polymery s obecným vzorcem $[-R^1-CO-O-R^2-]_n-$.

2.1 PET ve zdravotnictví

V poslední době je polyethylentereftalát (PET) jedním z nejvyužívanějších polymerů v medicíně. Nejčastější podoba PET užívaného ve zdravotnictví je biokompatibilní a chemicky inertní vlákno s technickým názvem Dacron. (viz *Roll et al.* [2]) Především se používá na výrobu textilií využívaných ve zdravotnictví, ale z dacronové stříže se dají plést, případně tkát také umělé cévy. Spolu s různými povlaky je často využíván na chirurgické síťky, ale také na srdeční chlopně, cévní štěpy, krevní a močové katétry a mnoho dalších. (viz *Galatík* [3]) Cévní štěpy z PET bývají potaženy kolagenem, o močových katétrech je k dispozici minimální množství informací. PET v kombinaci s polyakrylamidem, nebo se sodnou solí kyseliny polyakrylové vyvolávají protizánětlivou reakci v makrofágách. V jiném případě, pokud je PET zkombinován s polyethylenglykolem (PEG) nebo s oligoethylenglykolem, může být vyroben antitrombotický materiál. (viz *Lam & Vu* [4], *Banerjee et al.* [5], *Barrett & Yousaf* [6])

2.2 Modifikace PET

V posledních letech se nejen u polymerů často hovoří o povrchových úpravách pomocí nanovrstev. Nanesením nanovrstvy na povrch materiálu můžeme docílit například zlepšení odolnosti vůči korozi a mechanickým otěrům, nebo požadovaných třecích vlastností. Nanášení vrstev probíhá také z estetických důvodů.

Povrchová modifikace PET, za účelem změny drsnosti, hydrofobicity, barevnosti a mnoha dalších vlastností, představuje důležitý pokrok v oblasti biomateriálů, moderních textilií nebo filtrací. Dosažení povrchové modifikace PET použitím různých roztoků se obecně považuje za velmi složité. Vhodnými metodami jak dosáhnout efektivní modifikace, jsou hydrolyza, která zapříčiní vznik hydroxylových a karboxylových funkčních skupin a aminolýza, která způsobí vznik aminových skupin. (viz *Favaro et al.* [7] *Zhu et al.* [8])

3 Biofilm

Biofilm je pro bakterie výhodnější forma života. Oproti planktonickým buňkám poskytuje biofilm buňkám ochranu a usnadňuje adhezi dalším mikroorganismům. Bakterie žijící v biofilmu mají lepší odolnost vůči mechanickému poškození, toxickým látkám, bakteriofágům i UV záření. Při výskytu v tělech živočichů jsou tyto bakterie navíc odolnější vůči imunitnímu systému a antibiotikům. U bakterií nacházejících se ve společenství, byla pozorována zvýšená metabolická aktivita, čehož se plně využívá v průmyslu.

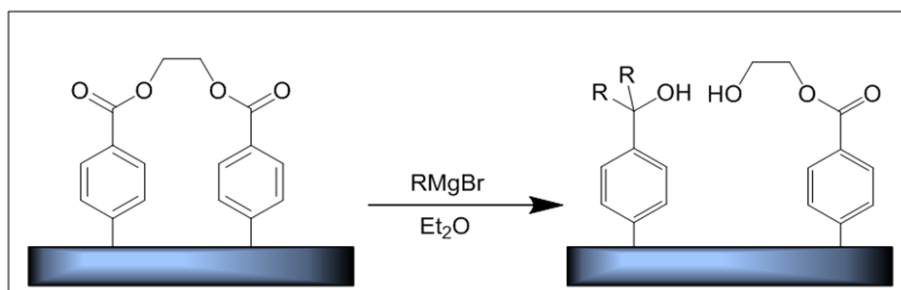
3.1 Biofilm ve zdravotnictví

Každoročně se zvyšující užívání polymerních materiálů, zejména pak umělých implantátů a katétrů je hlavní příčinou snahy o eliminaci biofilmu adherovat k povrchu. Působení bakterií v biofilmu, poskytuje těmto mikroorganismům patřičnou rezistenci. Proti desinfekčním přípravkům, antibiotikům i imunitnímu systému jsou infekce způsobené biofilmem velice

obtížně léčitelné. Riziko vzniku infekce je ovlivněno způsobem zavedení polymerního materiálu, péčí o něj, dobou, po kterou je zaveden do těla, typem polymeru, ze kterého je vyroben a jeho případnou povrchovou úpravou. Polymerní materiály traumatizují tkáň ve svém okolí, což vede k rozvoji zánětlivé reakce společně s reakcí imunitního systému na cizorodý předmět. Může tedy docházet ke vzniku infekce katétrů, umělých implantátů, cévních protéz, umělých chlopní, nitroděložních tělísek a dalších. Biofilm zapříčiňuje v našem těle mnoho druhů infekcí. S biofilmem se často spojují infekční onemocnění typu periodontida-záněty týkající se dásní a zubů, pseudomonádové pneumonie infekce dýchacího ústrojí při cystické fibróze, osteomyelitida-záněty kostí popřípadě kostní dřeně, otitis media zánět středního ucha. (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aureginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, aj), prostatitida (*Escherichia coli*) a další. (viz Costerton et al. [9]) Infekce chlopenních náhrad (způsobené kmeny *S. aureus*) patří mezi nejzávažnější, úmrtnost spojená s touto infekcí se pohybuje okolo 25 %. (viz Rulík & fakulta [10], Macela [11])

4 Výsledky a diskuze

4.1 Funkcionalizace PET fólií



Obrázek 2: Modifikace PET fólií pomocí Grignardových činidel.

Ve dvou- případně tříhrdlé baňce s PET fólií byla pomocí vakuově-inertní linky zajištěna inertní atmosféra. Následně bylo přidáno 50 ml 0,1 M Grignardova činidla rozpuštěného v diethyletheru (DEE), přesný popis objemů Grignardova činidla a DEE tvořící 0,1 M roztok popisuje tabulka 1. Reakce probíhala za stálého míchání po dobu 30 min, 1 hod, 2 hod a 3 hod. Poté byly PET fólie z roztoků vytaženy a následně byl proveden oplach. Fólie byly přendány do 250ml Erlenmayerovy baňky a k nim bylo přidáno 50 ml DEE, následně baňka byla vložena na 1 min do sonikační lázně. Opakováno se stejným množstvím CH_3OH , 0,01 M HCl a 3x s destilovanou vodou. Po finálním čištění byly fólie sušeny ve vakuu v exsikátoru.

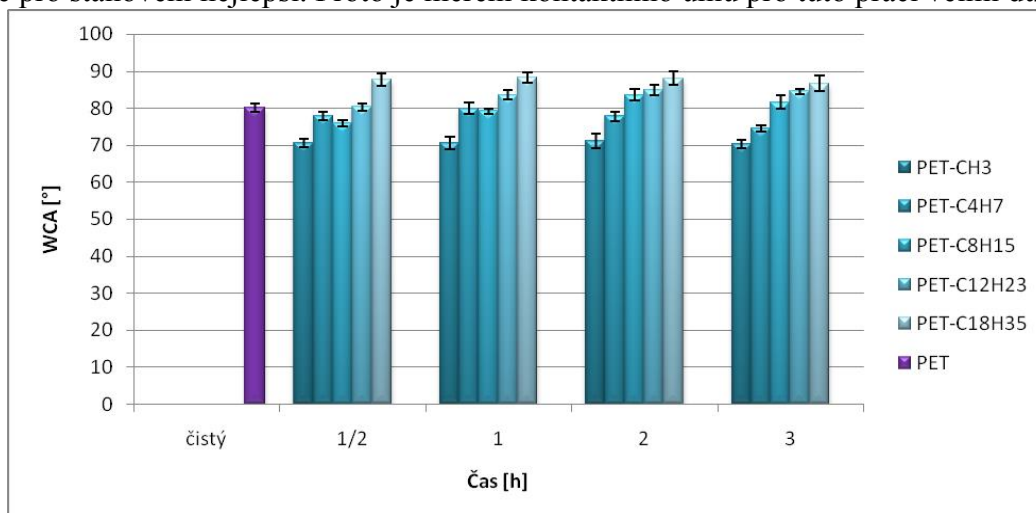
Všechna Grignardova činidla byla přidána do reakce bez nutných úprav ve stavu dodání, ale diethylether bylo potřeba před použitím vysušit. Destilace byla prováděna pod inertní atmosférou argonu.

Tabulka 1: Přesný popis přípravy 50 ml 0,1 M roztoku testovaných Grignardových činidel.

Příprava 50 ml 0,1 M roztoku Grignardova činidla		Grignardovo činidlo [ml]	Diethylether [ml]
3 M	CH_3MgBr	1,7	48,3
2 M	$\text{C}_4\text{H}_9\text{MgCl}$	2,5	47,5
2 M	$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{MgBr}$	2,5	47,5
1 M	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{MgBr}$	5	45
0,5 M	$\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{MgCl}$	10	40

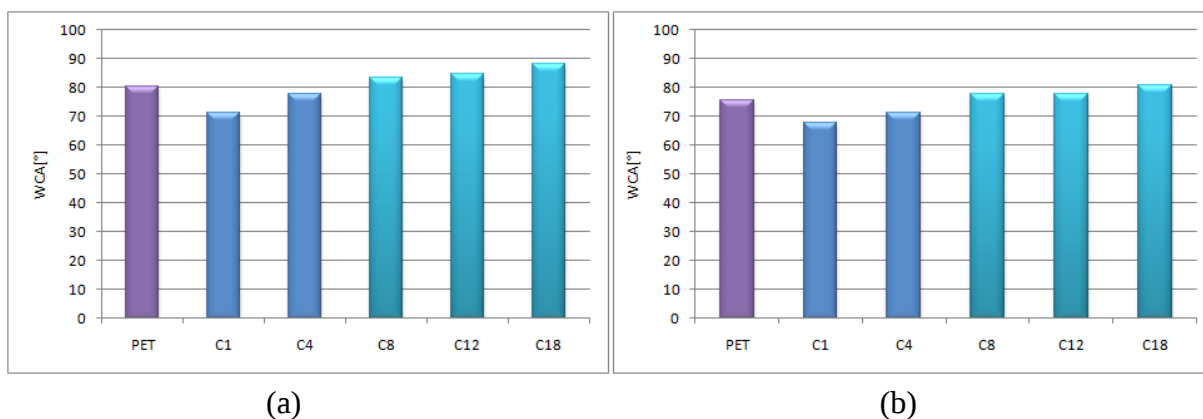
4.2 Měření kontaktního úhlu vody

Hlavní fyzikální veličinou, na základě které se hodnotí adheze mikroorganismů k povrchům je hydrofobicita. Určení hydrofobicity lze provést více metodami avšak měření kontaktního úhlu je pro stanovení nejlepší. Proto je měření kontaktního úhlu pro tuto práci velmi důležité.



Obrázek 3: Grafické zpracování výsledků měření kontaktního úhlu vody (WCA) všech modifikovaných vzorků ve stanovených reakčních časech v porovnání s nemodifikovanou PET fólií.

První měření WCA se prováděla na všech typech modifikovaných vzorků a pro všechny reakční časy. Z výsledků těchto měření bylo zjištěno, že nejvyšších kontaktních úhlů dosahují PET fólie, které byly v reakci 2 hodiny. Díky tomuto zjištění byly pro následující testy použity modifikované PET fólie o délce reakčního času 2 hodiny.

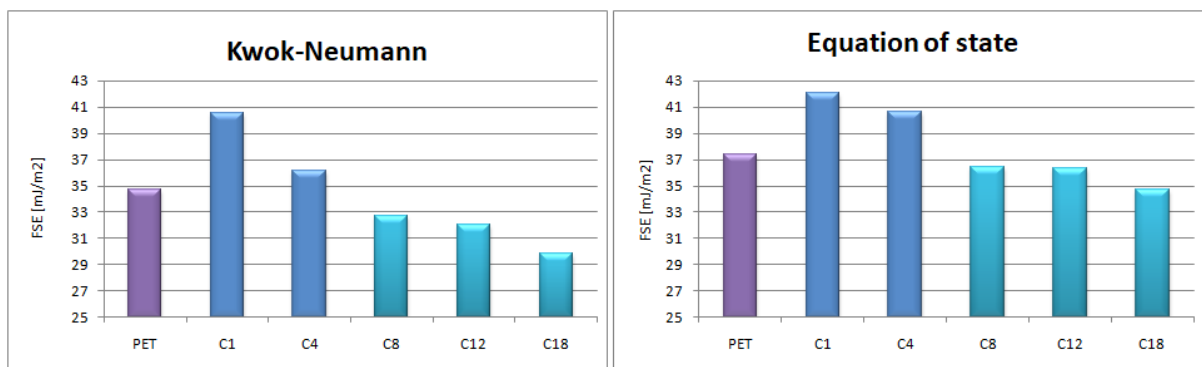


Obrázek 4: (a) Výsledky měření kontaktního úhlu vody metodou $\theta/2$, za předpokladu, že kapka zaujímá tvar koule, (b) výsledky měření metodou měření úhlu smáčení na přisedlé kapce.

Pokud porovnáme výsledné hodnoty měření kontaktního úhlu, všimneme si, že trend zvyšujícího se kontaktního úhlu s rostoucí délkou alkylového řetězce se zachoval. Také modifikované vzorky PET-CH₃ a PET-C₄H₉ mají nižší kontaktní úhel než nemodifikovaný vzorek. Hodnoty WCA získané metodou měření úhlu smáčení na přisedlé kapce však vycházejí o 5° až 8° nižší než hodnoty získané metodou $\theta/2$.

4.3 Stanovení volné povrchové energie

Pokud porovnáme výsledné hodnoty měření kontaktního úhlu, všimneme si, že trend zvyšujícího se kontaktního úhlu s rostoucí délkou alkylového řetězce se zachoval. Také modifikované vzorky PET-CH₃ a PET-C₄H₉ mají nižší kontaktní úhel než nemodifikovaný vzorek. Hodnoty WCA získané metodou měření úhlu smáčení na přisedlé kapce však vycházejí o 5° až 8° nižší než hodnoty získané metodou $\theta/2$.



Obrázek 5: (a) Výsledky volné povrchové energie vypočtené Kwok-Neumann metodou, (b) Výsledky volné povrchové energie vypočteny metodou Equation of state (EOS).

Pro výpočet volné povrchové energie byly v obou případech použity nepřímé metody, které vycházejí ze znalosti kontaktního úhlu. Pomocí výsledků kontaktního úhlu získaných metodou $\theta/2$ byly vypočteny hodnoty FSE pomocí Kwok-Neumann metody. FSE pro nemodifikovanou PET fólii dosahovala hodnot 34,7 mJ/m². Nejvyšší vypočtenou hodnotu FSE 40,6 mJ/m² jsme získali pro modifikovaný vzorek PET-CH₃ nejnižší 29,9 mJ/m² pro modifikace PET-C₁₈H₃₇.

Z hodnot kontaktního úhlu, získaných metodou měření úhlu smáčení na přisedlé kapce byly získány výsledné hodnoty FSE vypočtené metodou Equation of state (EOS). U hodnot získaných metodou EOS, pozorujeme stejný růstový trend jako u předchozích metod. Hodnoty FSE měřené touto metodou vycházejí o 3 až 5 mJ/m² vyšší než hodnoty vypočteny Kwok-Neumann metodou.

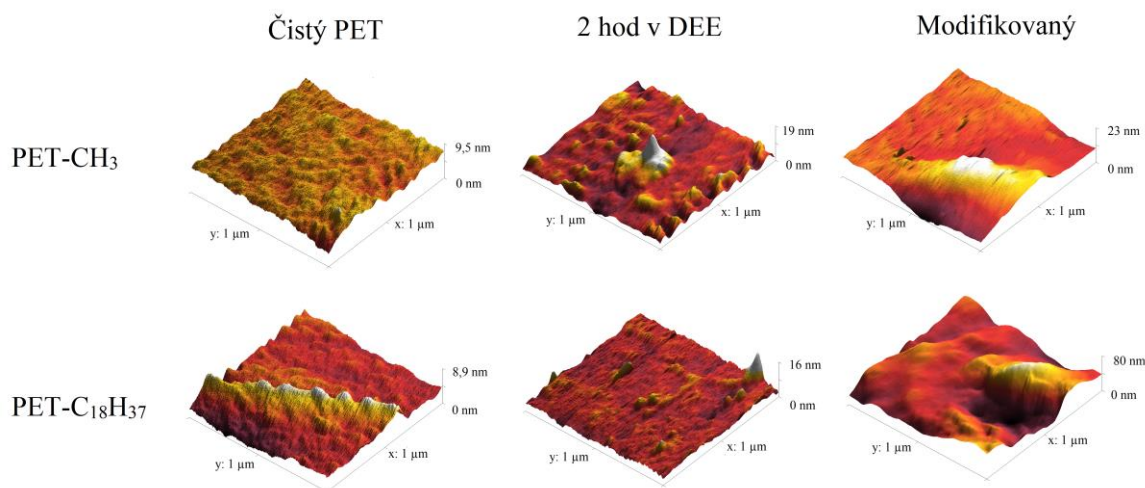
Vliv FSE na adhezi bakterií byl již v předchozích letech studován. Publikace uvádějí nejnižší adhezi bakterií kmene *E. coli* mezi hodnotami 21 a 29 mJ/m². (viz Zhang *et al.* [12]) Hodnotě 29 mJ/m² jsme se velice přiblížili s modifikovaným vzorkem PET-C₁₈H₃₇, u kterého byla vypočtena hodnota 29,9 mJ/m² (34,6 mJ/m² pro metodu EOS). Nejnižší adheze bakteriálního kmene *P. aeruginosa* byla uvedena mezi 20 a 24 mJ/m². (viz Zhang *et al.* [12]) K této hodnotě se nám nepodařilo přiblížit ani jednou modifikací. Námi získané výsledky adheze bakterií k povrchu jsou popsány v kapitole 4.5.

4.4 Pozorování změn drsnosti povrchu modifikovaných vzorků

Pomocí AFM mikroskopie jsme pozorovali změny drsnosti (Ra) PET fólií jak číselně, tak graficky při rozměru 1x1 μ m a 10x10 μ m. Nejprve byly měřeny čisté PET fólie, následně bylo provedeno měření těch samých fólií po 2 h v DEE, abychom mohli pozorovat, jak ovlivní topografii povrchu samotné rozpouštědlo (bobtnání fólie). Nakonec byly pozorovány již modifikované vzorky. Byla vyvinuta snaha o pozorování tohoto průběhu změn hrubosti ve stejném místě připravovaného vzorku.

Tabulka 2: Změna drsnosti (Ra)^a u všech modifikovaných PET fólií pro rozměr 1x1 μm .

Změny drsnosti povrchu pro rozměr 1x1 μm					
Druh modifikace:	PET-CH ₃	PET-C ₄ H ₉	PET-C ₈ H ₁₇	PET-C ₁₂ H ₂₅	PET-C ₁₈ H ₃₇
Čistý PET	456	224	487	1170	423
2 hod v DEE	1085	525	805	1530	616
Modifikovaný	2111	813	991	2270	10290
Hodnoty v tabulce uvedeny v pm, (Ra) ^a označuje střední aritmetickou odchylku povrchu v řezu.					

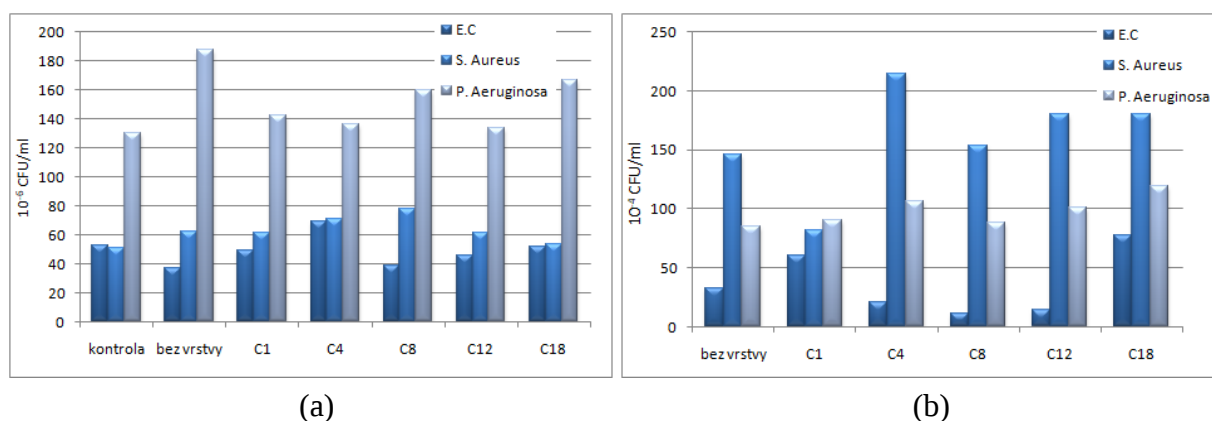
Obrázek 6: Grafické znázornění změn drsnosti povrchu PET fólií pro modifikaci PET-CH₃ a PET-C₁₈H₃₇ pro rozměr 1x1 μm .

Můžeme si všimnout, že topografie u modifikace PET-CH₃ se oproti čistému vzorku změnila. Povrch byl pokryt povlakem. U modifikace PET-C₁₈H₃₇ je změna topografie o mnoho výraznější, pokrytí však není zcela rovnoměrné.

4.5 Analýza výsledků testů biofilmu

Pro tyto testy byly vybrány 3 patogenní bakteriální kmeny, z toho dva zástupci gramnegativních bakterií *Escherichia coli* (CCM 3954) a *Pseudomonas aeruginosa* (CCM 3955) a jeden zástupce grampozitivních bakterií *Staphylococcus aureus* (CCM 3953). Počáteční koncentrace všech bakteriálních kmenů byla 10⁸ CFU/ml.

První z testů KTJ-CFU (kolonii tvořící jednotka) byly provedeny z roztoku, ve kterém byly ponechány bakterie společně s PET-foliemi k 24 hodinové inkubaci viz obrázek 7 (a). Lze tedy usoudit, že bakteriím *P. aeruginosa* se dařilo lépe, jinými slovy množily se rychleji než zbylé dva bakteriální kmeny. Oproti kontrolnímu testu došlo u bakteriálních kmenů *S. Aureus* a *P. aeruginosa* k nárůstu bakterií, kdežto u *E. coli* jsou hodnoty v některých případech vyšší a v některých zase naopak nižší. Z publikací týkajících se adheze *E.coli* k různým povrchům je zřejmé, že špatně adheruje na rovné, hladké povrchy, tím by mohl být tento jev způsoben. (viz Ong et al. [13], Absolom et al. [14])



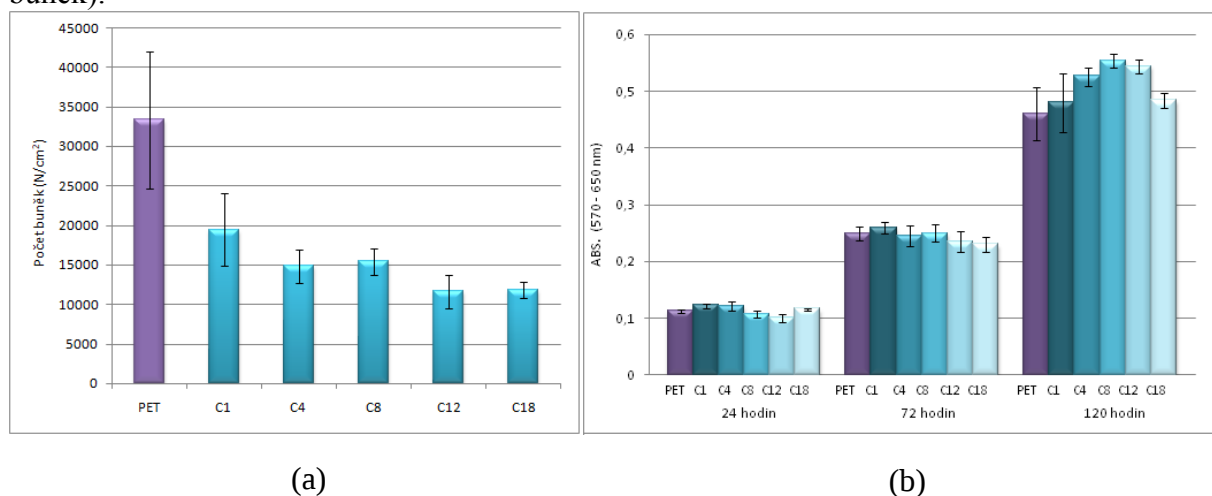
Obrázek 7: (a) Grafické zpracování výsledků testů KTJ suspenze, ve které byly vzorky ponechány 24 hodin, (b) výsledky testů KTJ z roztoku, do kterého byly vzorky 1 hodinu vytřepávány.

Druhé testy KTJ byly provedeny z roztoků do kterých byly po dobu jedné hodiny vzorky vytřepávány viz obrázek 7 (b). Přestože se *P. aeruginosa* množila nejvíce do roztoku po třepání se uvolnil větší počet bakterií *S. aureus*, což může souviset s jejich morfologií (koky bez bičíků), složením buněčné membrány, metabolismem a dalšími faktory.

Pro lepší charakterizaci chování bakterií na připravených PET-fóliích bylo navrženo testování kritické koncentrace (hraniční koncentrace, při které nedochází k množení bakterií). Avšak tyto testy nebyly dosud provedeny, ale jsou aktuálně plánovány.

4.6 Cytotoxicita a biokompatibilita připravených vzorků

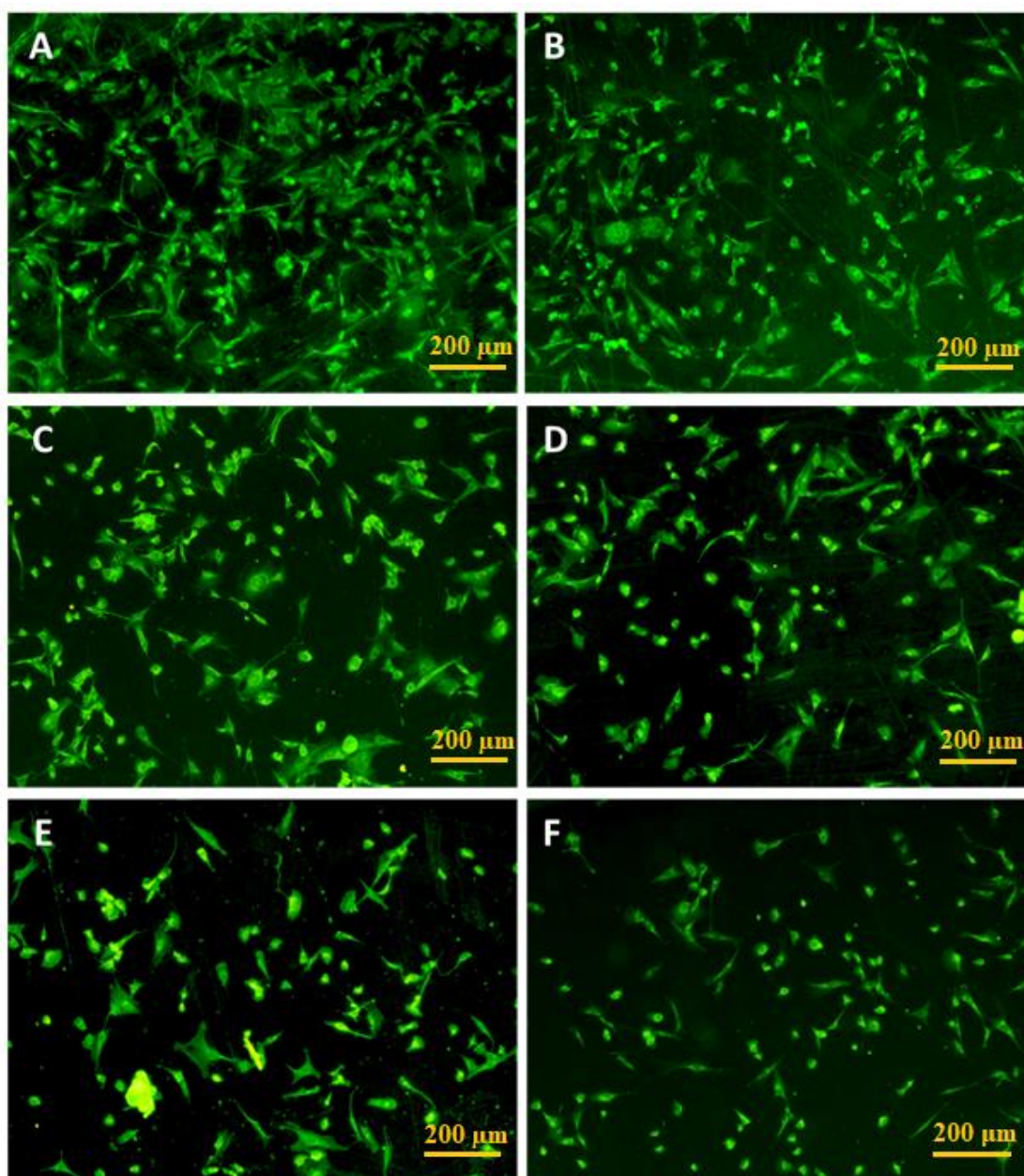
Na modifikovaných PET-fóliích byly prováděny testy adheze buněk k povrchu a proliferace buněk, které by měli ověřit cytotoxicitu a biokompatibilitu připravených vzorků. Testy probíhaly na modelové buněčné linii myších fibroblastů 3T3 (klon A3). Testování adheze buněk k povrchu bylo vyhodnocováno mikroskopicky 12 hodin po ukončení kultivace. Testování proliferace buněk na námi modifikovaných PET fóliích probíhalo in vitro a bylo vyhodnocováno pro tři časové intervaly. Námi zvolené časové intervaly byly 24 hodin, 72 hodin a 120 hodin. Měření bylo provedeno metodou MTT (test metabolické aktivity buněk).



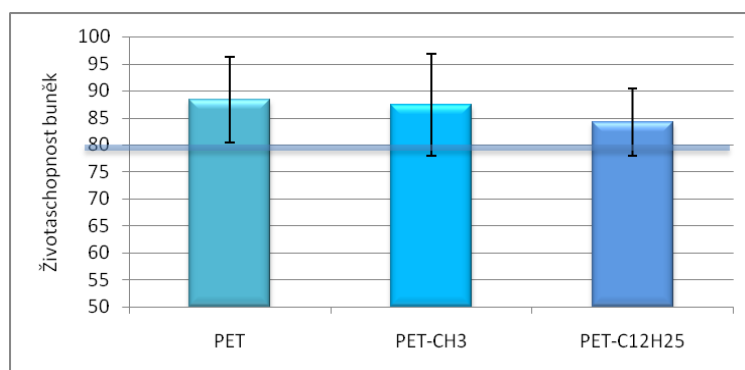
Obrázek 8: (a) Testování adheze buněk na povrch PET fólií po 12 hodinách, (b) Výsledky proliferace 3T3 fibroblastů na povrchu upravených PET fólií v porovnání s nemodifikovaným vzorkem pro různé časové intervaly.

U výsledků testů adheze buněk viz obrázek 8 (a), je viditelný pokles adheze k PET fóliím o delším alkylovém řetězci. Oproti nemodifikované PET fólii je vidět značný pokles adheze i pro modifikaci PET-CH₃, kdy jsme dostaly méně než 60 % hodnoty dosažené pro čistou PET fólii. U modifikací PET-C₄H₉ a PET-C₈H₁₇ byla adheze buněk méně než poloviční. Pro modifikace s nejdelšími alkylovými řetězci PET-C₁₂H₂₅ a PET-C₁₈H₃₇ jsme docílily pouhé 35 % adheze buněk k povrchu. Tento pokles adheze buněk k povrchu je viditelný i na obrázku 9. Při focení snímků na obrázku 9 byl použit objektiv pro 10x zvětšení.

Z výsledků proliferace buněk viz obrázek 8 (b) lze vypožorovat, že po 24 hodinách a po 72 hodinách s délkou uhlíkatého řetězce proliferace mírně klesá. U měření po 120 hodinách tento trend již není patrný díky velkému množství buněk. Uvedená metoda není příliš vhodná pro hodnocení testovaného typu materiálů.



Obrázek 9: Snímky z fluorescenční mikroskopie fibroblastů 3T3 adherovaných na povrch (A) neupravené PET fólie a (B) PET-CH₃, (C) PET-C₄H₉, (D) PET-C₈H₁₇, (E) PET-C₁₂H₂₅ a (F) PET-C₁₈H₃₇.



Obrázek 10: Výsledek testu cytotoxicity ve srovnání s kontrolou buněk. Hranice 80 % představujeme minimální limit, kdy je materiál považován za biokompatibilní. (viz Swar *et al.* [15])

Testování toxicity námi připravených povrchů již bylo provedeno a publikováno pro modifikace PET-CH₃ a PET-C₁₂H₂₅, nebyly tudíž opakovány a hodnoty potřebné pro sestrojení obrázku 10 byly převzaty z publikovaného článku. (viz Swar *et al.* [15])

5 Závěr

Úspěšně se podařilo modifikovat PET fólie pěti Grignardovými činidly o různě dlouhém alkylovém řetězci (C₁, C₄, C₈, C₁₂ a C₁₈), které by měly v závislosti na délce alkylového řetězce eliminovat vznik biofilmu na jejich povrchu.

Za pomoci měření kontaktního úhlu vody se podařilo potvrdit změnu hydrofobicity v závislosti na délce alkylového řetězce. S prodlužujícím se řetězcem se zvyšuje kontaktní úhel (klesá volná povrchová energie), tudíž roste hydrofobicita připravených vzorků.

Z testů tří patogenních biofilm aktivních bakteriálních kmenů bylo potvrzeno, že *E.coli* k rovným, hladkým povrchům nemá tendenci adherovat a tvořit biofilm. Naopak *P.aeruginosa* námi připravené vzorky nijak zvlášť nevadily, docházelo k její výrazné proliferaci a vzniku biofilmové vrstvy, která však byla výrazně tenčí v porovnání s nemodifikovanými vzorky. Proliferace *S. aureus* byla jen o trochu vyšší než *E.coli*, ale při vytřepávání PET folií se uvolňoval nejvíce.

Z testů cytotoxicity je patrné že s rostoucím alkylovým řetězcem se snižuje adheze buněk k povrchu vzorků, nicméně všechny připravené vzorky jsou pro buňky netoxické. Viabilita buněk byla ve všech případech vyšší než 80 %, tudíž je můžeme označit za biokompatibilní.

Literatura

- [1] WHINFIELD, J.R., DICKSON, J.T. Polymeric linear terephthalic esters, US 2465319 A
- [2] ROLL, S., MÜLLER-NORDHORN, J., KEIL, T., SCHOLZ, H., EIDT, D., GREINER, W., WILLICH, S. N. Dacron vs. PTFE as bypass materials in peripheral vascular surgery, *BMC Surg.*, Dec. 2008, Vol. 8, 22.
- [3] GALATÍK, L. Kde nalezneme plasty v medicíně?, *MM Průmyslové spektrum.*, Feb. 2002, Vol. 1, 44
- [4] LAM, M. T., WU, J. C. Biomaterial applications in cardiovascular tissue repair and regeneration, *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.*, Aug. 2012, Vol. 10, No. 8, 1039-1049.
- [5] BANERJEE, I., PANGULE, R. C., KANE, R. S. Antifouling coatings: recent developments in the design of surfaces that prevent fouling by proteins, bacteria, and marine organisms, *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla.*, Feb. 2011, Vol. 23, No. 6, 690-718.
- [6] BARRETT, D. G., YOUSAF, M. N. Design and applications of biodegradable polyester tissue scaffolds based on endogenous monomers found in human metabolism, *Basel Switz.*, Oct.

- 2009, Vol. 14, No. 10, 4022-4050.
- [7] FAVARO, S. L., RUBIRA, A. F., MUNIZ, E. C., RADOVANOVIC, E. Surface modification of HDPE, PP, and PET films with KMnO₄/HCl solutions, *Polym. Degrad. Stab.*, Jul. 2007, Vol. 92, No. 7, 1219–1226.
- [8] ZHU, Y., MAO, Z., GAO, C. A Multivariate Change-Point Model for Statistical Process Control, *Rsc Adv.*, 2013, Vol. 3, No. 8, 2509–2519.
- [9] COSTERTON, J., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D., KORBER, D., LAPPINSCOTT, H. A Microbial Biofilms, *Annu. Rev. Microbiol.*, 1995, Vol. 49, 711–745.
- [10] RULÍK, M., FAKULTA, U. P. P. *Mikrobiální biofilmy*, 1st edition, Univerzita Palackého v Olomouci, 2011.
- [11] MACELA, A. *Infekční choroby a intracelulární parazitismus bakterií*, 1st edition, Grada Publishing a.s., 2006.
- [12] ZHANG, X., WANG, L., LEVÄNEN, E. Superhydrophobic surfaces for reduction of bacterial adhesion, *RSC Adv*, Nov. 2006, Vol. 3, No. 30, 18.
- [13] ONG, Y.-L., RAZATOS, A., GEORGIOU, G., SHARMA, M. M. Adhesion Forces between E. coli Bacteria and Biomaterial Surfaces, *Langmuir*, Apr. 1999, Vol. 15, No. 8, 2719–2725.
- [14] ABSOLOM, D. R., LAMBERTI, F. V., POLICOVA, Z., ZINGG, W., OSS, C. J. VAN, NEUMANN, A. W. Surface thermodynamics of bacterial adhesion., *Appl. Environ. Microbiol.*, Jan. 1983, Vol. 46, No. 1, 90–97.
- [15] SWAR, S., ZAJÍCOVÁ, V., RYSOVÁ, M., LOVĚTINSKÁ-ŠLAMBOŘOVÁ, I., VOLESKÝ, L., STIBOR, I. Biocompatible surface modification of poly(ethylene terephthalate) focused on pathogenic bacteria: Promising prospects in biomedical applications, *Appl. Polym. Sci.*, Jul. 2017, Vol. 134, No. 26, 29.

MECHATRONIKA

navazující a doktorský studijní program

NANOČÁSTICOVÉ SENZOROVÉ SYSTÉMY

Michael Kalát

Sekce – MECHATRONIKA,
Fakulta mechatroniky, 2. ročník navazujícího studia
Magisterský studijní program – Nanomateriály

Abstrakt: V rámci této práce byla testována odezva senzorů založených na zlatých a stříbrných nanočásticích (NČ) funkcionalizovaných β -cyklodextrinem (β -CD) na 13 biologicky aktivních látkách a třech bakteriálních druzích. Za tímto účelem byl připraven vhodný derivát β -CD a ten byl dále navázán na zmíněné nanočástice.

Teoretická část práce je věnována nanočásticím a cyklodextrinům (CD), konkrétně jejich vlastnostem a možnostem využití v bionanotechnologických aplikacích. Následně je pojednáno o senzorových systémech, zejména těch založených právě na nanočásticích funkcionalizovaných cyklodextriny.

Klíčová slova: nanočástice, cyklodextriny, detekce biologicky aktivních látek

1 Úvod

Detekování chemických látek je v dnešní době, kdy hrají důležitou roli ochrana životního prostředí a péče o lidské zdraví, ústředním tématem mnoha laboratorních pracovišť po celém světě (Chen et al., 2017). Elektrochemické, elektroforetické, spektroskopické, chromatografické a další metody, které jsou k těmto účelům používány, často vyžadují nákladné technické vybavení, relativně zdlouhavou přípravu vzorků a neumožňují testování in-situ. Technologické zjednodušení a překonání zmíněných nesnází přináší detekční systémy založené na barevných (Wen et al., 2016) a jiných fyzikálně-chemických změnách (García-Berrios et al., 2010).

Velká pozornost je v tomto ohledu věnována kovovým nanočásticím, především zlatým a stříbrným (Wang et al., 2010; Yeh et al., 2012; Yue et al., 2016). Jejich vlastnosti (zejména optické) závisí na tvaru, velikosti a stavu částic, proto se s výhodou využívají jako senzory přítomnosti různých sloučenin, obvykle ve vodném prostředí. Nanočástice je možné aplikovat přímo v místě zájmu, jejich odezva je patrná často okamžitě a lze ji pozorovat pouhým okem.

V teoretické části práce jsou popsány chemické senzorové systémy, které jsou založeny právě na nanočásticích drahých kovů. Ty mohou díky svým vlastnostem fungovat jako senzory sami o sobě (Lee et al., 2008), ale daleko častěji se funkcionalizují za účelem zvýšení selektivity a senzitivity vůči zvoleným chemickým sloučeninám (Wang et al., 2010; Yue et al., 2016). Blíže je věnována pozornost senzorům připraveným navázáním cyklodextrinů na nanočástice zlata a stříbra. Cyklodextriny se pro svou schopnost vytvářet inkluzní komplexy s řadou lipofilních látek používají v mnoha biotechnologických aplikacích (Crini, 2014). V práci jsou diskutovány vlastnosti, syntéza a praktická využití zmíněných detekčních systémů.

2 Teoretická část

2.1 Nanočástice

Nanočástice jsou tzv. 0D nanomateriály, tzn. materiály, jejichž všechny tři rozměry spadají podle definice do rozmezí od 1 do 100 nm. Mají nejčastěji kulovitý nebo tyčinkovitý tvar a v závislosti na fyzikálně-chemických vlastnostech prostředí se vyskytují v izolované nebo agregované, resp. aglomerované formě. Vlivem malých rozměrů u NČ často pozorujeme

kvantové a další jevy odlišné od těch, které lze pozorovat u makroskopického materiálu. Velký měrný povrch částic může znamenat jejich vyšší reaktivitu, schopnost pronikat buněčnými membránami anebo vyšší biochemickou aktivitu. (Dubchak et al., 2010).

NČ se přirozeně vyskytují snad ve všech zemských sférách. Typickými příklady jsou sopečný dým, koloidy v hydrosféře, organismy využívající, příp. produkující NČ (např. magnetotaktické bakterie) aj. Díky pokroku ve výzkumu a znalosti analytických metod je možné připravovat a pozorovat NČ různé velikosti, tvaru a chemického složení. To přináší na jedné straně obrovskou škálu potenciálních aplikací těchto materiálů, na druhou stranu nevyhnutelný dopad na životní prostředí. Vzhledem k unikátním vlastnostem nanostruktur se jejich toxicita stanovuje nesnadno a často je potřeba testovat každou látku zvlášť. I proto je k dispozici stále nedostatek ucelených informací o vlivu antropogenních NČ na životní prostředí a lidské zdraví (Kamali et al., 2016).

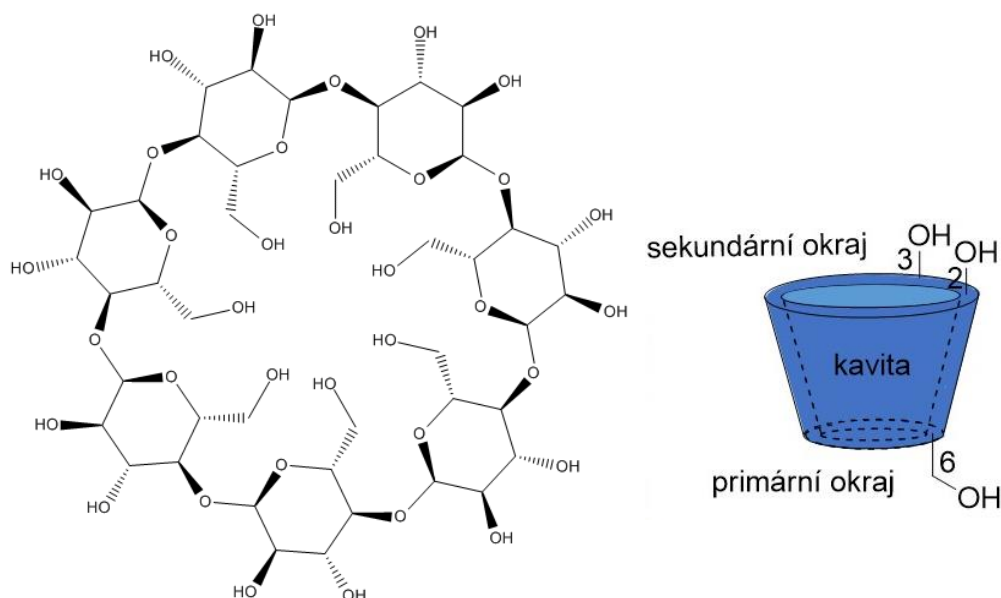
Kovové NČ jsou díky svým jedinečným optickým, elektronickým, magnetickým a katalytickým vlastnostem hojně testovány a využívány v odpovídajících oblastech průmyslu (Oyama, 2010). Jednu z klíčových rolí hrají optické vlastnosti NČ ušlechtilých kovů (zlata, stříbra aj.), díky kterým mohou být využívány mj. jako senzory chemických látek. Při interakci světla a kovové NČ dochází k lokalizované povrchové plazmonové rezonanci. Plazmony jsou koherentní oscilace elektronů vodivostního pásu dané látky, které mají schopnost silně absorbovat a rozptylovat světlo (mají vysoký koeficient extinkce), a tím způsobují velké lokální zvětšení elektromagnetického pole. Toho se využívá například ve spektroskopických a mikroskopických metodách ke zvýšení síly signálu a rozlišení, nebo k manipulaci s optickým signálem (Pelton et al., 2008).

Zlaté nanočástice představují důležitou součást teranostiky (vědy, spojující terapii a diagnostiku) a dalších biomedicínských a bionanotechnologických aplikací. Kupříkladu splňují novodobé předpoklady pro senzory chemických látek, neboť kromě výše uvedených důvodů lze relativně levně a jednoduše připravit ve stabilizované a biokompatibilní formě (funkcionalizací vhodnými ligandy). Hned několik detekčních metod využívá specifických optických vlastností Au-NČ, které jsou závislé na jejich velikosti. Jedná se například o absorpci světla ve viditelné oblasti, schopnost povrchového zvýšení Ramanova rozptylu či vysoce účinné zhášení fluorescence. Díky velkému měrnému povrchu mohou zlaté NČ imobilizovat mnoho látek, které jsou následně využívány při interakcích s různými analyty, a vykazovat tak vysokou senzitivitu. Toho se s výhodou využívá například v imunologii při tvorbě komplexu protilátky a antigenu imobilizovaného na povrchu nanočástic (Yue et al., 2016; Fang et al., 2017).

2.2 Cyklodextriny

Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy tvořené pěti a více jednotkami α -D-glukopyranosy spojených vzájemně $\alpha(1\rightarrow4)$ glykosidickými vazbami. S rostoucím počtem těchto jednotek se nazývají po řadě pre- α -CD (pouze syntetický), α -CD, β -CD atd. (obr. 1, vlevo). Sloučeninu později nazvanou cyklodextrin se poprvé podařilo izolovat na konci 19. století jako produkt degradace škrobu vlivem mikroorganismů (Villiers, 1891). Ve dvacátém století se pak jejich studiem zabýval Schardinger (1905) a další skupiny vědců, kteří postupně odkrývali fyzikálně-chemické vlastnosti cyklodextrinů a jejich schopnost tvořit inkluzní komplexy (Szejtli, 1998).

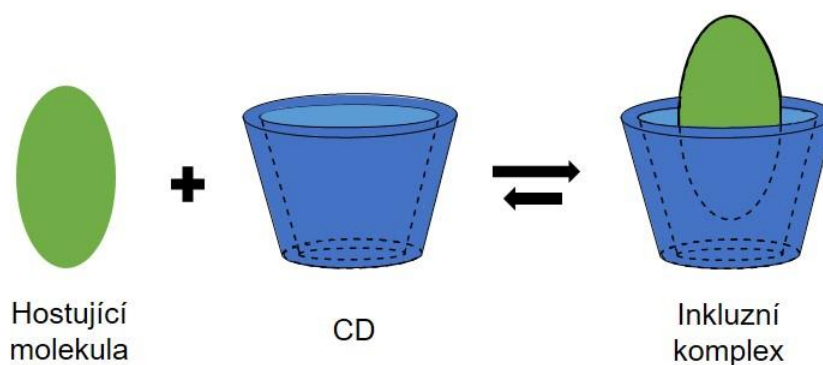
Cyklodextriny jsou stále bílé krystalické látky, jejichž chemická struktura připomíná tvar dutého komolého kužele (obr. 1, vpravo). Jeho užší okraj je tvořen primárními OH skupinami (na uhlících C-6), jeho širší okraj je tvořen sekundárními OH skupinami (na uhlících C-2,



Obrázek 1: Struktura (vlevo) a tvar (vpravo) β -cyklodextrinu.

C-3). Velké množství hydroxylových skupin zajišťuje značnou afinitu CD k vodě, ale zároveň umožňuje tvorbu vodíkových můstků a znesnadňuje tak v případě β -CD jeho rozpustnost. Naopak kavita CD je vlivem přítomných vodíkových atomů a kyslíkových můstků lipofilní. Její velikost je u nejběžnějšího homologu, β -CD, který má 7 glukózových jednotek, 6 Å na primárním, resp. 6,4 Å na sekundární okraji (Easton and Lincoln, 1999).

Zmíněné vlastnosti předurčují CD ke komplexaci hydrofobních látek (viz obr. 2), čímž zpravidla dochází ke zvýšení stability a rozpustnosti těchto látek ve vodě. Hlavními faktory ovlivňujícími vznik a sílu komplexu charakterizovanou komplexační konstantou jsou sterická shoda dané látky s kavitou CD a dostupnost vzájemných nevazebných interakcí (Szejtli, 1998; Kurkov and Loftsson, 2013). Cyklodextriny nacházejí praktické uplatnění v mnoha oblastech lidské činnosti, přispívá k tomu kromě jejich jedinečných vlastností také relativně snadná a levná příprava. Novinky za světa CD jsou každé dva roky prezentovány na konferenci Evropské cyklodextrinové společnosti, ta příští se koná již letos v říjnu v Lisabonu (<https://www.eurocd2017.lisbonph-events.pt>).



Obrázek 2: Schéma tvorby inkluzního komplexu.

2.3 Senzorové systémy

Detekování chemických látek hraje důležitou roli v biomedicině, mnoha odvětvích průmyslu, vojenství a dalších oblastech. Využívají se senzory založené na specifických interakcích, fyzisorpci, chemisorpci aj., které signalizují přítomnost určitého analytu na základě změny

optických, elektrochemických, imunologických a dalších vlastností. Jsou popsány systémy založené na nanostrukturách, jako jsou uhlíkové trubičky, grafen, fulereny, nanočástice, kvantové tečky ad. Rozsáhlé studie o senzorových systémech lze najít v literatuře (Dickert et al., 2003; Shtykov and Rusanova, 2008; Vlasov et al., 2010). Zde bude věnována pozornost pouze senzorům založených na nanočásticích chemicky modifikovaných cyklodextriny.

2.3.1 Senzory založené na nanočásticích funkcionalizovaných CD

Detekční systémy založené na nanočásticích funkcionalizovaných cyklodextriny zpravidla fungují jako kolorimetrické senzory. Jejich hlavní výhodou je technická, finanční i časová nenáročnost a selektivita vůči analytům. Princip detekce spočívá obvykle ve vytvoření inkluzního komplexu mezi analyty a CD, ale nemusí tomu tak být vždy (Ma et al., 2016). Odezvu senzoru je možné pozorovat pouhým okem, příp. jednoduchým UV/VIS spektrometrem. Konkrétní příklady použití senzorů tohoto typu lze najít v literatuře (např. Wen et al., 2016, Chen et al., 2010).

3 Experimentální část

Výchozí látky a rozpouštědla byly zakoupeny od běžných dodavatelů. Při filtracích byla použita frita S4, s velikostí pórů 5-15 μm a membránová vývěva.

^1H NMR spektra byla měřena na přístroji Varian Gemini 300 HC při pracovní frekvenci 300 MHz a vzorky jednotlivých produktů byly pro měření rozpuštěny v deuterovaných rozpouštědlech. Snímky nanočástic a jejich EDX charakterizace byla provedena na přístroji UHR FE-SEM Carl Zeiss ULTRA Plus při 10 kV.

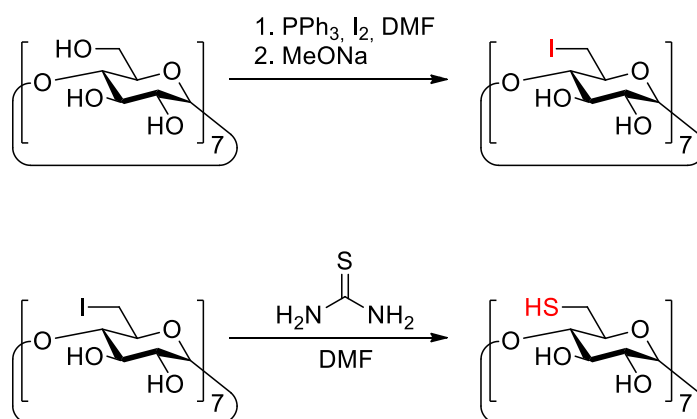
Podle postupů dostupných v literatuře (Ashton, 1996, Chen et al., 2010) byly syntetizovány per-6-deoxy-per-6-iodo- a per-6-deoxy-per-6-thio- deriváty nejběžnějších homologů CD – α , β , γ . Dále byly na základě vybraných postupů (Turkievich et al., 1951, Hutter a Fendler, 2002) syntetizovány zlaté a stříbrné nanočástice. V obou případech byl k redukci výchozí látky ($\text{K}[\text{AuCl}_4]$, resp. AgNO_3) použit citrát sodný, Ag-NČ byly navíc syntetizovány pomocí chelatonu III.

Senzory byly připraveny funkcionalizací NČ pomocí per-6-deoxy-per-6-thio- β -CD (Řezanka et al., 2011). Jejich odezva byla testována přidáním vybraných biologicky aktivních látek (N-(3,5-dinitrobenzoyl)-D- α -fenylglycin (1), ($\pm$)-baklofen (2), mefloquin hydrochlorid (3), vínan metoprololia (4), disopyramid (5), chlorochin difosfát (6), Z-D,L-Leucin (7), oxyfenonium bromid (8), 1-(4-chlor- α -fenylbenzyl)hexahydro-4-methyl-1H-1,4-diazepin (9), primaquin bisfosfát (10), paraquat dichlorid (hydrát) (11), N-(3,5-Dinitrobenzoyl)-L- α -fenylglycin (12), diperodon hydrochlorid (13)), resp. bakteriálních kmenů (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Streptococcus aureus*) k roztokům připravených funkcionalizovaných nanočástic. Směsi byly homogenizovány třepáním a ponechány 24 h při laboratorní teplotě. Během této doby docházelo u některých vzorků k postupné sedimentaci částic, a tím k odbarvení roztoků.

4 Výsledky a diskuze

Za účelem navázání cyklodextrinů na kovové nanočástice byly syntetizovány tři typy per 6-deoxy-per-6-thio-CD umožňující navázání na nanočástice dativní vazbou síra-kov. Tyto deriváty CD byly připraveny přes meziprodukt per-6-deoxy-per-6-iodo-CD. Oproti postupu uvedenému v literatuře (Chen et al., 2010) byla pro separaci látky v posledním kroku syntézy namísto filtrace na fritě použita centrifugace. Bylo ověřeno, že tímto způsobem lze získat čistší produkt a téměř v kvantitativním výtěžku.

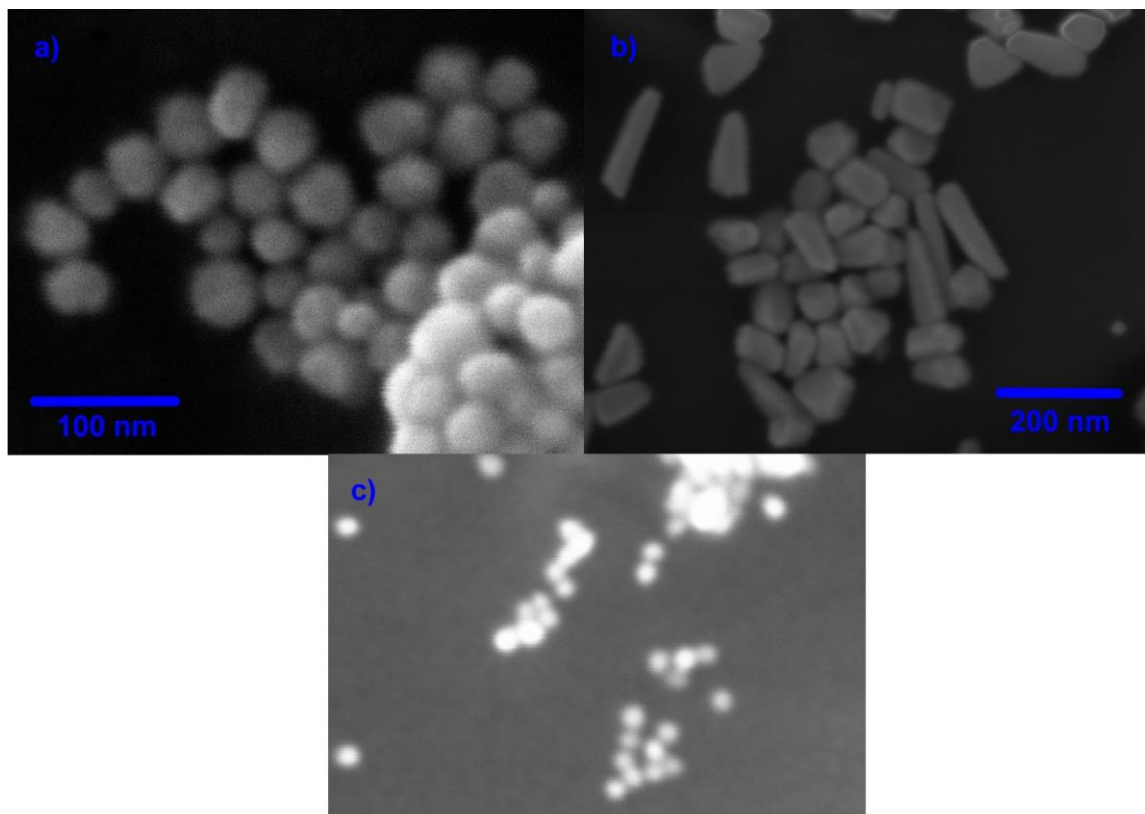
Pro syntézu byly použity tři základní typy CD (α , β , γ) a ve všech případech bylo postupováno stejně jako je uvedeno v experimentální části pro β -CD (viz obr. 3). Zopakování stejného postupu u všech zmíněných CD umožňuje přítomnost stejného počtu substituovaných hydroxylových skupin na hmotnostní jednotku CD. Naměřená ^1H NMR data výsledných produktů se však i přes opakovanou syntézu pouze pro β -CD shodují s literaturou (Benkhaleh et al., 2008). Možných příčin je hned několik, například nedostatečně vysušený CD před úvodním krokem syntézy nebo nedodržení inertních podmínek v některém ze syntetických kroků. V dalších experimentech byl proto použit pouze per 6-deoxy-per 6 thio β -CD.



Obrázek 3: Schéma reakce pro přípravu per 6-deoxy-per-6-iodo-, resp. per 6-deoxy-per-6-thio- β -CD.

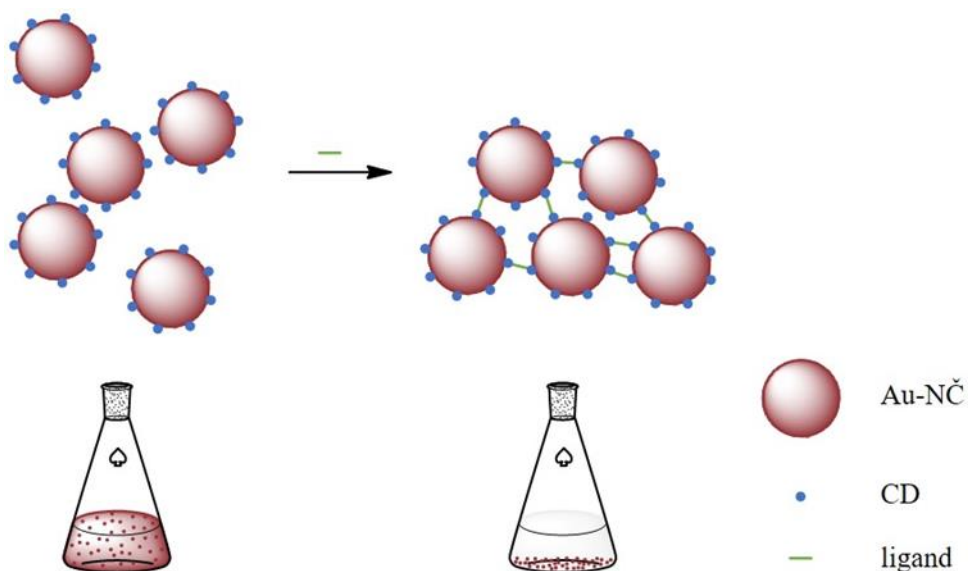
Nanočástice byly připraveny s využitím postupů známých z literatury (Turkevich et al., 1951; Hutter and Fendler, 2002) a během praktické části této práce byly syntetizovány hned několikrát ať již z důvodu spotřeby anebo jejich relativně rychlé degradace (stále jsou přibližně 1-2 měsíce při 7°C). Při přípravě stříbrných nanočástic byly využity dva postupy – výchozí dusičnan stříbrný byl redukován v jednom případě citrátem sodným a v druhém případě chelatonem III. Pravidelnější tvar s užší distribucí velikostí NČ byl získán postupem s redukcí chelatonem III. V případě zlata byly získány nanočástice o průměru přibližně 15 nm, u stříbrných NČ byla pozorována širší distribuce velikostí v intervalu 30-80 nm při redukci chelatonem a v intervalu 50-200 nm při redukci citrátem. Připravené nanočástice byly pozorovány na SEM (viz obr. 4). Před každou přípravou nanočástic byla aparatura z důvodu odstranění veškerých zbytkových kovových částic, které by mohly narušit syntézu, promyta lučavkou královskou (3:1 HCl/HNO_3) a destilovanou vodou.

Funkcionalizace nanočástic byla provedena pouhým smícháním roztoků per-6-deoxy-per-6 thio- β -CD a nanočástic a následnou homogenizací směsi v ultrazvukové lázni. Za účelem získání roztoku obsahujícího pouze funkcionalizované nanočástice byly nanočástice separovány centrifugací, dispergovány ve vodě s pomocí ultrazvukové lázně a tento postup byl dvakrát zopakován. První separace proběhla kvantitativně, při dalších byly patrné zbytkové NČ v roztoku. Po funkcionalizaci bylo možné pozorovat barevnou změnu (ztmavnutí) roztoku nanočástic. Ukázalo se, že stříbrné nanočástice po funkcionalizaci rychle sedimentují (v řádu několika hodin), tím pádem nejsou vhodné k použití jako senzory biologicky aktivních látek. Proto byly pro následné testování použity pouze funkcionalizované zlaté nanočástice. Navázání per-6-deoxy-per-6-thio- β -CD na nanočástice bylo ověřeno pomocí chemické analýzy EDX. Pomocí Ramanovy ani infračervené spektroskopie se z důvodu nestability látky v laserovém paprsku, resp. malé koncentrace CD nepodařilo navázání prokázat.



Obrázek 4: Snímky ze SEM: a) Ag-NČ redukováné chelatonem III, b) Ag-NČ redukováné citrátem, c) Au-NČ redukováné citrátem.

Senzory použité v této práci jsou založeny především na vzniku inkluzního komplexu mezi lipofilní kavitou cyklodextrinu a vhodných funkčních skupin biologicky aktivních látek. Tím může dojít k propojení jednotlivých funkcionalizovaných nanočástic (agregaci) a odezvě senzoru v podobě sedimentace nanočástic (viz obr. 5).

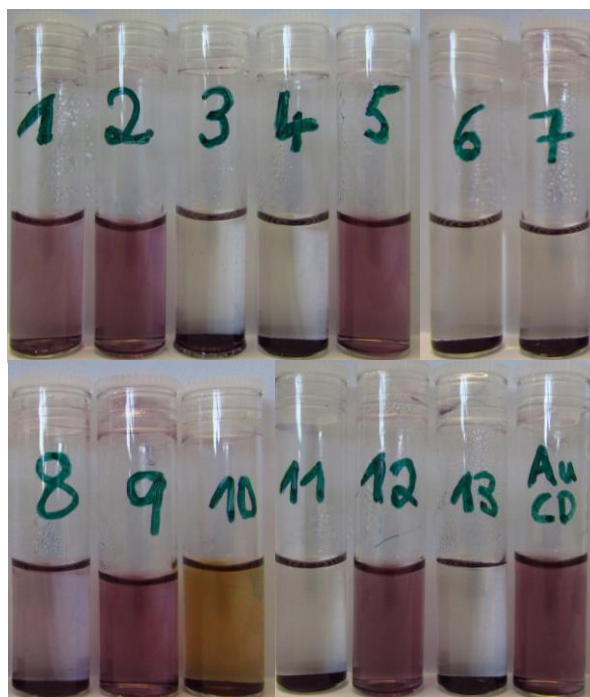


Obrázek 5: Schéma principu sensorového systému založeného na CD funkcionalizovaných NČ.

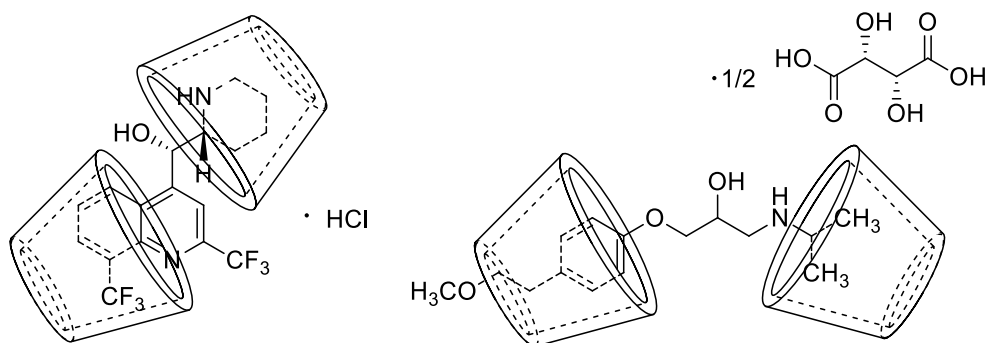
Testování odezvy senzorů bylo zahájeno pipetováním vodných roztoků biologicky aktivních látek k roztoku funkcionalizovaných nanočástic a jejich pozorováním po dobu 24 hodin. U látek, které v připravené koncentraci nebyly rozpustné ve vodě, byly odpipetovány nasycené roztoky nad nerozpuštěným, centrifugací separovaným, sedimentem. Na rozdíl od samotných zlatých nanočástic, které reagují na změnu iontové síly roztoku (např. na přidání chloridu

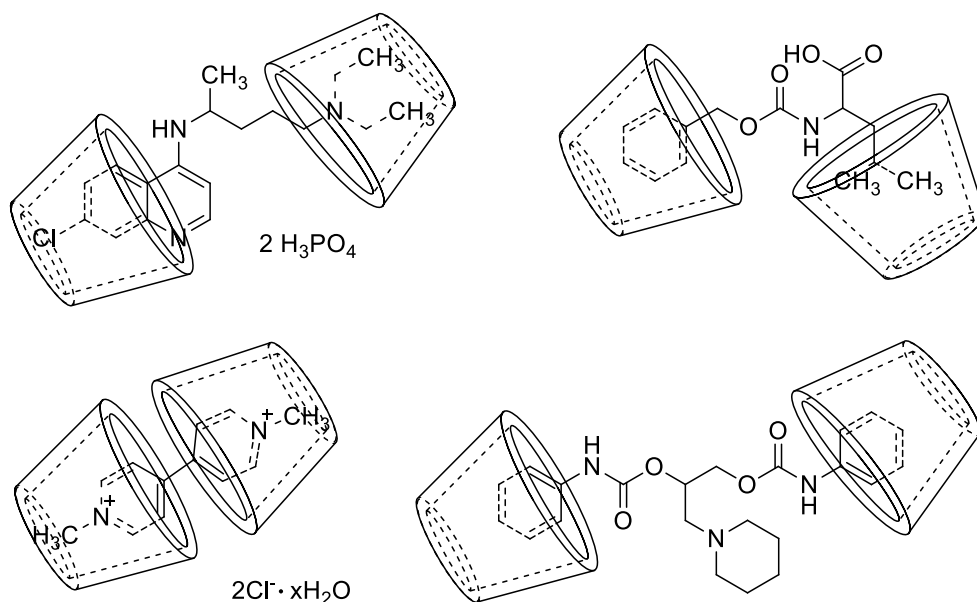
sodného) změnou barvy do modré, nebo až téměř úplným odbarvením, na funkcionalizované nanočástice nemá změna iontové síly roztoku pozorovatelný vliv. To bylo ověřeno pomocí UV/VIS spektroskopie. Absorbance všech připravených roztoků funkcionalizovaných NČ s biologicky aktivními látkami byla shodná. Uvedený fakt výrazně rozšiřuje aplikační možnosti těchto senzorů. Reálné roztoky v přírodě mají různou iontovou sílu, avšak jejich analytické stanovení pomocí nanočástic funkcionalizovaných CD to nijak neovlivní.

Po 24 hodinách došlo u některých roztoků k sedimentaci funkcionalizovaných nanočástic (viz obr. 6). Důvod sedimentace je připisován především interakci lipofilní kavity CD a lipofilní části dané biologicky aktivní látky přítomné v roztoku. K sedimentaci docházelo pouze v případě přítomnosti a sterické dostupnosti dvou a více takovýchto lipofilních částí na jedné sloučenině. Jen v tom případě mohlo dojít k vytvoření síťovité struktury a sedimentaci částic (viz obr. 7 a 8). Určitý vliv mohla mít také interakce látek s kovovými nanočásticemi. U látek způsobujících sedimentaci funkcionalizovaných nanočástic byla otestována rovněž odezva pro jejich desetinnou, setinovou, resp. tisícinovou koncentraci. Nejlepší citlivosti bylo dosaženo u Dipiperodonu, u kterého byla detekována koncentrace přibližně 0,8 mM

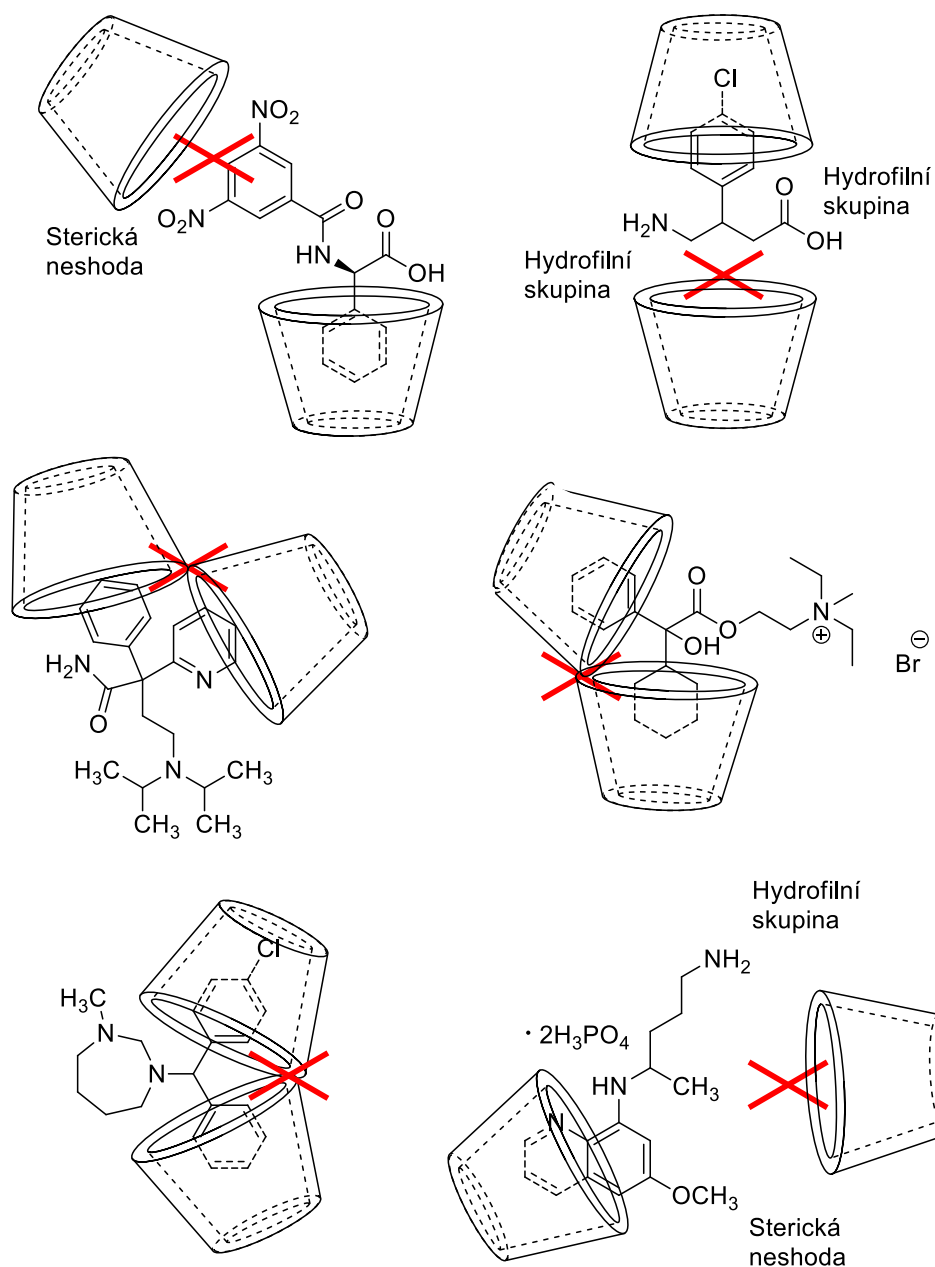


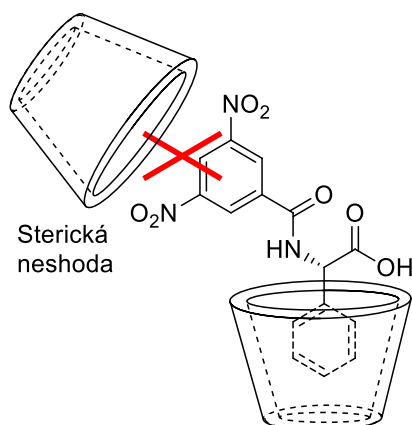
Obrázek 6: Odezva Au-NČ na biologicky aktivní látky.





Obrázek 7: Látky způsobující sedimentaci funkcionalizovaných nanočástic, znázornění vzniklých inkluzních komplexů.





Obrázek 8: Látky, které nezpůsobují sedimentaci funkcionalizovaných nanočástic, znázornění příčiny.

Dále byla testována odezva připravených senzorů na vybrané bakterie s obsahem 10^7 , resp. 10^6 kolonií. Konkrétně se jednalo o druhy *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Streptococcus aureus*. Po 24 hodinách došlo k sedimentaci senzorů při použití vyšší koncentrace prvních dvou zmíněných bakteriálních kmenů. Ty mají od streptokoka odlišné složení buněčné stěny (jsou tzv. gramnegativní) a mají tyčinkovitý tvar (streptokok má tvar kulovitý), takže umožňují vznik obdobné síťovité struktury jako v případě některých biologicky aktivních látek.

Byla testována také odezva senzorů na vybrané hormony obsažené v komerčně dostupných antikoncepcích (Artizia, Verezana). Pravděpodobně vlivem nízké koncentrace hormonů, a naopak velkého množství doprovodného materiálu nebyla pozorována žádná reakce.

5 Závěr

Teoretická část této práce se zabývá nanočásticemi především ušlechtilých kovů, jejich vlastnostmi a využitím v biotechnologických aplikacích. Dále je zaměřena na cyklodextriny a jejich význam ve vědě i běžném životě. Pozornost je věnována i senzorovým systémům, zejména pak těm, které jsou založeny na nanočásticích zlata a stříbra funkcionalizovaných cyklodextriny.

Při vypracování praktické části práce byly syntetizovány dva vybrané persubstituované deriváty pro každý z nejběžnějších homologů CD – α , β , γ . Při syntéze se podařilo získat úpravou publikovaného postupu derivát CD s vyšší čistotou a ve vyšším výtěžku než udává literatura. Dále byly připraveny roztoky nanočástic zlata a stříbra s využitím redukčních činidel citrátu a chelatonu III. Per-6-deoxy-per-6-thio- β -CD byl použit na funkcionalizaci uvedených nanočástic a tento senzorový systém byl otestován k detekci 13 vybraných biologicky aktivních látek, třech druhů bakterií a některých hormonů. Byla předložena teorie dokládající selektivitu cyklodextrinem modifikovaných NČ vůči některým těmto látkám a mikroorganismům.

V současné době je výzkum v oblasti senzorových systémů založených na nanočásticích funkcionalizovaných cyklodextriny i nadále důležitým tématem mnoha laboratoří po celém světě. Snaha je především o zvýšení selektivity a senzitivity senzorů vhodnou modifikací cyklodextrinů a v případě medicínských aplikací přiblížení se klinické praxi. Věřím, že tato práce posunula bádání v této oblasti opět o kus vpřed.

Literatura

- A. Villiers.** Sur La Fermentation de La Fécule Par L'action Du Ferment Butyrique. C. r. Académie Sci. 1891, No. 112, 536–538.
- Ashton.** Amino Acid Derivatives of β -Cyclodextrin. J. Org. Chem. 1996, 61 (3), 903–908.
- Benkhalel, A.;** Cheradame, H.; Fichet, O.; Teyssié, D.; Buchmann, W.; Guégan, P. Synthesis and Characterization of Amphiphilic per-(6-Thio-2,3-Trimethylsilyl)cyclodextrin: Application to Langmuir Film Formation. Carbohydr. Polym. 2008, 73 (3), 482–489.
- Chen, X.;** Parker, S. G.; Zou, G.; Su, W.; Zhang, Q. β -Cyclodextrin-Functionalized Silver Nanoparticles for the Naked Eye Detection of Aromatic Isomers. ACS Nano 2010, 4 (11), 6387–6394.
- Chen, Y.;** Xianyu, Y.; Jiang, X. Surface Modification of Gold Nanoparticles with Small Molecules for Biochemical Analysis. Acc. Chem. Res. 2017, 50 (2), 310–319.
- Crini, G.** Review: A History of Cyclodextrins. Chem. Rev. 2014, 114 (21), 10940–10975.
- Daniel, M.-C.; Astruc, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. Chem. Rev. 2004, 104 (1), 293–346.
- Dickert, F. L.;** Lieberzeit, P.; Hayden, O. Sensor Strategies for Microorganism Detection - from Physical Principles to Imprinting Procedures. Anal. Bioanal. Chem. 2003, 377 (3), 540–549.
- Dubchak, S.;** Ogar, A.; Mieltski, J. W.; Turnau, K. Influence of Silver and Titanium Nanoparticles on Arbuscular Mycorrhiza Colonization and Accumulation of Radiocaesium in Helianthus Annuus. Span. J. Agric. Res. 2010, 8 (S1), 103.
- Easton, C. J.;** Lincoln, S. F. Modified Cyclodextrins: Scaffolds and Templates for Supramolecular Chemistry; Imperial College Press, 1999.
- Fang, C.;** Dharmanarajan, R.; Megharaj, M.; Naidu, R. Gold Nanoparticle-Based Optical Sensors for Selected Anionic Contaminants. Trends Anal. Chem. 2017, 86, 143–154.
- García-Berrios, E.;** Gao, T.; Woodka, M. D.; Maldonado, S.; Brunschwig, B. S.; Ellsworth, M. W.; Lewis, N. S. Response versus Chain Length of Alkanethiol-Capped Au Nanoparticle Chemiresistive Chemical Vapor Sensors. J. Phys. Chem. C 2010, 114 (50), 21914–21920.
- Hutter, E.;** Fendler, J. H. Size Quantized Formation and Self-Assembly of Gold Encased Silver Nanoparticles. Chem. Commun. Camb. Engl. 2002, No. 4, 378–379.
- Kamali et al.** Review on Recent Advances in Environmental Remediation and Related Toxicity of Engineered Nanoparticles. Environ. Engineering Manag. J. 2016, 15 (4), 923–934.
- Kurkov, S. V.;** Loftsson, T. Cyclodextrins. Int. J. Pharm. 2013, 453 (1), 167–180.
- Lee, J. H.;** Wang, Z.; Liu, J.; Lu, Y. Highly Sensitive and Selective Colorimetric Sensors for Uranyl (UO₂²⁺): Development and Comparison of Labeled and Label-Free DNAzyme-Gold Nanoparticle Systems. J. Am. Chem. Soc. 2008, 130 (43), 14217–14226.
- Oyama, M.** Recent Nanoarchitectures in Metal Nanoparticle-Modified Electrodes for Electroanalysis. Anal. Sci. 2010, 26 (1), 1–12.
- Pelton, M.;** Aizpurua, J.; Bryant, G. Metal-Nanoparticle Plasmonics. Laser Photonics Rev. 2008, 2 (3), 136–159.
- Řezanka, P.; Navrátilová, K.; Žvátora, P.; Sýkora, D.; Matějka, P.; Mikšík, I.; Kašička, V.; Král, V. Cyclodextrin Modified Gold Nanoparticles-Based Open-Tubular Capillary Electrochromatographic Separations of Polyaromatic Hydrocarbons. J. Nanoparticle Res. 2011, 13 (11), 5947–5957.
- Shtykov, S. N.;** Rusanova, T. Y. Nanomaterials and Nanotechnologies in Chemical and Biochemical Sensors: Capabilities and Applications. Russ. J. Gen. Chem. 2008, 78 (12), 2521–2531.
- Szejtli, J.** Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. Chem. Rev. 1998, 98 (5), 1743–1754.
- Turkevich, J.;** Stevenson, P. C.; Hillier, J. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. Discuss. Faraday Soc. 1951, 11 (0), 55–75.
- Vlasov, Y. G.;** Ermolenko, Y. E.; Legin, A. V.; Rudnitskaya, A. M.; Kolodnikov, V. V. Chemical Sensors and Their Systems. J. Anal. Chem. 2010, 65 (9), 880–898.
- Wang, C.;** Luconi, M.; Masi, A.; Fernandez, L. Silver Nanoparticles as Optical Sensors. In Silver Nanoparticles; Pozo, D., Ed.; InTech, 2010.
- Wen, D.;** Liu, W.; Herrmann, A.-K.; Haubold, D.; Holzschuh, M.; Simon, F.; Eychmüller, A. Simple and Sensitive Colorimetric Detection of Dopamine Based on Assembly of Cyclodextrin-Modified Au Nanoparticles. Small 2016, 12 (18), 2439–2442.
- Yeh, Y.-C.;** Creran, B.; Rotello, V. M. Gold Nanoparticles: Preparation, Properties, and Applications in Bionanotechnology. Nanoscale 2012, 4 (6), 1871–1880.
- Yue, G.;** Su, S.; Li, N.; Shuai, M.; Lai, X.; Astruc, D.; Zhao, P. Gold Nanoparticles as Sensors in the Colorimetric and Fluorescence Detection of Chemical Warfare Agents. Coord. Chem. Rev. 2016, 311, 75–84.

POKROČILÉ ŘÍZENÍ POHONŮ PRO MOBILNÍ ROBOTICKOU PLATFORMU A JEJICH LABORATORNÍ TESTOVÁNÍ

Bc. Krčmář Lukáš

Sekce - MECHATRONIKA

Fakulta Mechatroniky, informatiky a mezioborových studií, 2. ročník

Magisterský studijní program – AUTOMATICKÉ ŘÍZENÍ

Abstrakt: Tato práce se zabývá pokročilým řízením pohonů pro mobilní robotickou platformu a jejím laboratorním testováním. Náplní této práce je návrh konkrétního pohonu a trakční baterie, především pak tvorba samotného programu, který již řídí samotné servomotory a vytváří řídicí systém převádějící požadovaná data o směru a rychlosti mobilní platformy na jednotlivé signály pro servomotory. Tento servopohon musí mít dostatečný výkon pro transport požadovaného materiálu požadované hmotnosti. Trakční baterie taktéž musí mít dostatečné parametry s ohledem na dobu provozu na jedno nabití. Řízení mobilní platformy je prozatím za účelem laboratorního testování řešeno ovládáním modelářskou vysílačkou. Řídicí systém mobilní platformy je uzpůsoben pro komunikaci s nadřazeným autonomním řízením.

Klíčová slova: Autonomní mobilní platforma, řídicí systém, měření se záznamem dat, trakční baterie, elektrický pohon

Experiment a metody

Základním úkolem experimentu bylo zapojení obou pohonů ovládaných obdélníkovým signálem. Ovládání bylo připojeno přes dva vstupy servopohonů ovládající směr a rychlost otáčení.

Další fází bylo připojení napájení z trakční baterie. K tomu bylo zapotřebí oživit jednotku BMS. Dle pokynů výrobce musel být dodržen specifický postup, aby nedošlo k poškození vstupů mikroprocesoru jednotky.

Následně mohl být již tvořen samotný program mobilní platformy. Nejprve byl vytvořen generátor obdélníkového signálu, nezávislého na běhu hlavního programu, pro test funkčnosti celého zapojení. Následně bylo zapotřebí číst data od přijímače vysílačky a následně je převést do vhodné číselné podoby. Spojením těchto dvou základních programů a jeho následující nadstavbou uživatelsky přívětivějšího ovládání vznikl řídicí systém ovládání pohonů mobilní platformy. Tento systém je uzpůsoben pro záměnu ovládání vysílačkou vyšším systémem ovládání, jako například autonomní řízení.

Během tvorby programu mobilní platformy a ladění toho programu se vyskytli závažné problémy s regulací pohonů. Přednastavené hodnoty PID regulátorů motorů od výrobce nebyly použitelné v kombinaci s mobilní platformou. Motory jsou pevně spojeny s převodovkou a následně přes drážkový řemen jsou spojeny s koly platformy. Veškeré vůle, především na drážkovém řemenu vychylovaly celý systém pohonu za mez stability regulace. Tím vznikaly rostoucí kmity pohonů při zastavení.

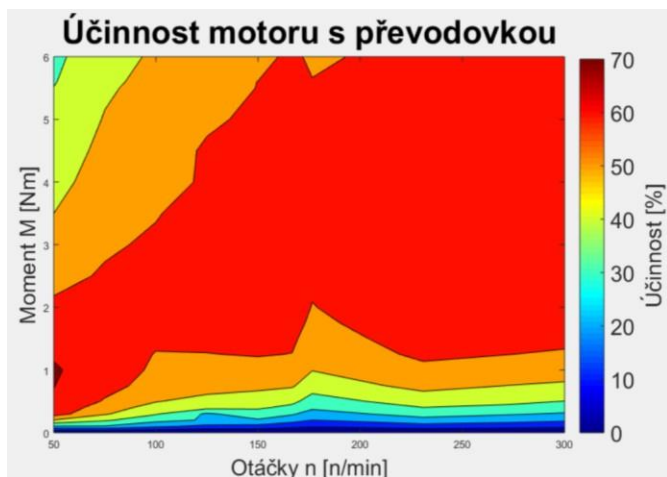
Výsledky a diskuze

Vzhledem k tomu, že vypočtený potřebný krouticí moment na kolech mobilní platformy je roven hodnotě $M_{kolo} = 4,94 \text{ Nm}$, po rozsáhlém průzkumu trhu a uvážení, bylo rozhodnuto o kombinaci BLDC motoru společně s převodovkou.

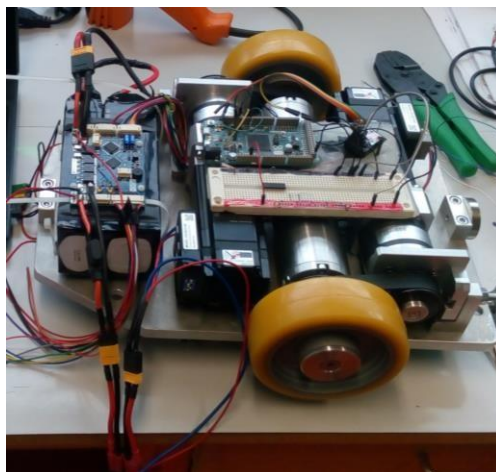
Za účelem zjištění reálných hodnot účinností převodovky a samotného motoru bylo provedeno měření na dynamometru Dynofit ASD 6,3K-4. Při pokusu měření samotného motoru na tomto dynamometru byl zjištěn fakt, že dynamometr má značně velký moment setrvačnosti, který není schopen motor překonat, i díky tomu, že nelze vyřadit PID regulátor

motoru. Měření samotného motoru bylo provedeno na experimentálním dynamometru, který navrhl doc. Ing. Josef Černohorský, Ph.D. a také pomohl s měřením těchto motorů. Měření motorů i s převodovkami bylo provedeno na dynamometru Dynofit, jelikož s převodovým poměrem 10:1 již motor měl dostatečný krouticí moment pro překonání setrvačných sil dynamometru.

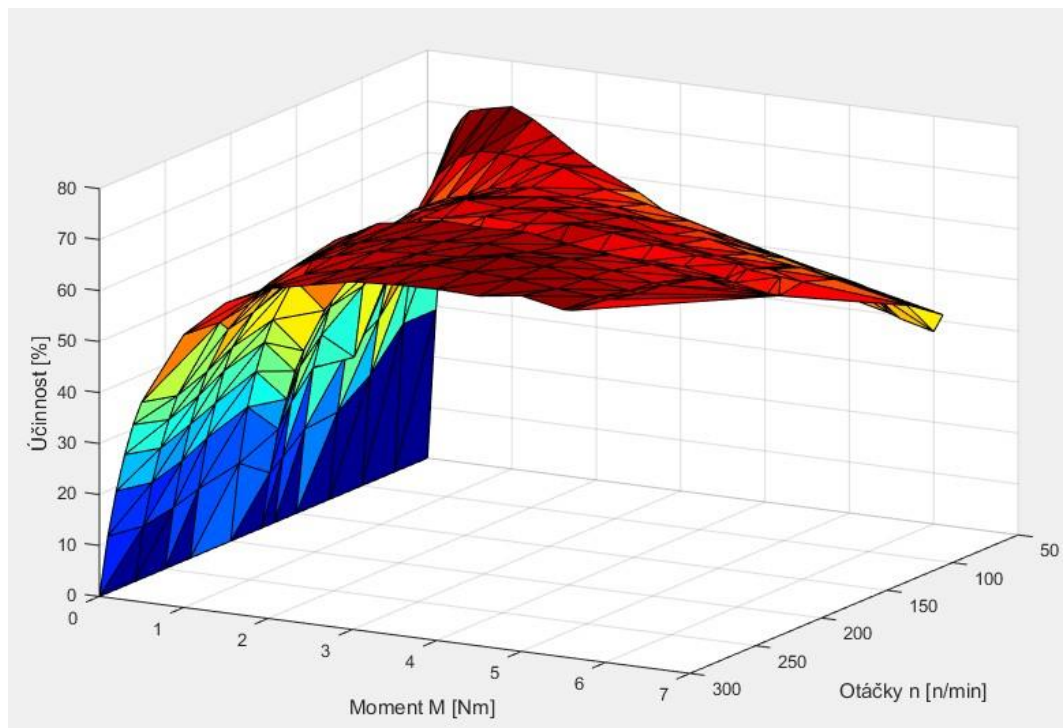
Samotná mobilní platforma byla testována na laboratorní dráze odpovídající prostředí a náročnosti, ke které je určena. Střední hodnota výkonu na testovací dráze je rovna $E=33$ W. Jmenovitá kapacita trakční baterie činí 184 W. Lze tedy jednoduchým výpočtem předpokládat nepřetržitý provoz mobilní platformy z trakční baterie více než 5,6 h.



Obrázek 1. 2D graf účinnosti motoru s převodovkou



Obrázek 2. Mobilní platforma



Obrázek 3. 3D graf účinnosti motoru s převodovkou

Závěr

Náplní této diplomové práce bylo navrhnout a vybrat vhodný pohon a trakční baterii celé mobilní robotické platformy. Vzhledem ke vlastnostem jednotlivých typů platforem byla vybrána diferenciální platforma, která ke svému běhu využívá dva nezávisle hnané pohony. Po výpočtu jízdních odporů mobilní robotické platformy byly vybrány motory společně s převodovkami.

Během realizace mobilní robotické platformy se vyskytlo několik problémů. Za největší problém lze považovat regulátory motorů, které není možné jakýmkoliv způsobem vyřadit. Tím pádem není možné spolehlivě identifikovat přenosovou funkci systému mobilní robotické platformy. Jako nejlepší řešení bylo vybráno a odzkoušeno postupné nastavování hodnot jednotlivých složek PID regulátorů a sledování průběhů otáčení hřídelí motorů.

Po instalaci pohonů mohl být postupně tvořen řídicí systém těchto pohonů. I přes dlouho řešené potíže byl řídicí systém navržen do podoby vhodné i pro spolupráci s nadřazeným systémem autonomního řízení.

Při vývoji řízení mobilní robotické platformy byly vyřešeny i některé mechanické části platformy, konkrétně změna třetího, tzv. opěrného bodu platformy. Původní návrh byl navržen s kulovým ložiskem. To se ale během testování jeví jako nevhodné až nefunkční. Kulové ložisko bylo nahrazeno systémem kolečka, který využívají nákupní vozíky.

Během laboratorního testování na dynamometru a testovací dráze byly zjištěny skvělé výsledky účinností pohonů, převodovek i spotřeby. Doba provozu mobilní robotické platformy byla ustanovena nejméně 5,6 hodiny.

Literatura

- [1] KHATEEB, Siddique A, Mohammed M FARID, J.Robert SELMAN a Said AL-HALLAJ. Design and simulation of a lithium-ion battery with a phase change material thermal management system for an electric scooter.
- [2] AFFANNI, A., A. BELLINI, G. FRANCESCHINI, P. GUGLIELMI a C. TASSONI. Battery Choice and Management for New-Generation Electric Vehicles. IEEE Transactions on Industrial Electronics [online].
- [3] SHEU, Kuen-Bao. Simulation for the analysis of a hybrid electric scooter powertrain. Applied Energy [online]. 2008, 85(7), 589-606

BIONICKÁ RUKA

Bc. Najman Petr

Sekce - MECHATRONIKA,
Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií, 2. ročník
Magisterský studijní program – MECHATRONIKA

Abstrakt: Tato diplomová práce se zabývá problematikou levných bionických náhrad lidské horní končetiny. Práce obsahuje teoretický úvod do problematiky protetických náhrad horní končetiny. Jako technický vzorek posloužil prototyp, který je sestaven podle japonského projektu HACKberry. Prototyp je vyrobený pomocí 3D tisku a doplněn o snadno dostupnou elektroniku a řídicí jednotku Arduino Micro. V rámci práce je vytvořeno spektrum snímačů, pro neinvazivní snímání signálů z předloktí nebo paže uživatele. Všechny vytvořené snímače se podrobily testování a ověření jejich funkčnosti na ovládání bionické náhrady. Vznikl také další prototyp bionické ruky HACKberry, který se upravil pro použití s komerčním předloktím.

Klíčová slova: bionické náhrady, HACKberry, Arduino, 3D tisk, neinvazivní snímání

1 Úvod

Teoretická část diplomové práce se zabývá poznatky, které jsou důležité pro pochopení celé problematiky týkající se horní končetiny a protetiky pro ní určenou. Mezi tyto poznatky patří historie a vznik vědního oboru s názvem bionika. Na tuto vědní disciplínu navazuje rozprava o anatomii a fyziologii lidské horní končetiny. To zahrnuje popis kostí, svalů, pohybů končetinou a úchopů. Následuje rozbor příčin, typy amputací a rozbor dostupné protetiky. Dále jsou vysvětleny technologie 3D tisku a materiály pro ně používané. Nachází se zde základní popis elektromyografie a popis horní končetiny z pohledu kinematiky.

K prototypu bionické ruky HACKberry [1], který byl plně dokončen, se sestrojily různé snímače pro neinvazivní snímání signálů ze svalů předloktí a paže uživatele. Jako základní vznikl snímač inspirovaný přímo projektem HACKberry. K tomuto snímači následně vznikly další čtyři návrhy snímačů, využívající jiných principů snímání. Tyto snímače využívají infračervené snímání vzdálenosti, snímání EMG signálů, snímání síly, zrychlení a ohybu. K těmto snímačům se vytvořila pouzdra umožňující připnutí na uživatele a tato pouzdra se vyrobila pomocí 3D tisku. Tyto senzorické jednotky se otestovaly a proběhlo vyhodnocení jejich funkčnosti. Vznikla také hybridní verze ruky HACKberry použitelná se zapůjčeným komerčním předloktím.

1. Metody

V první řadě se dokončil prototyp bionické ruky HACKberry, jehož základ byl sestaven v rámci semestrálního projektu [2]. Tento prototyp se doplnil o vlastní akumulátor a měničem stejnosměrného napětí, který reguluje napájecí napětí pro servomotory. Servomotory mají maximální napájecí napětí 6 V, kdežto jmenovité napětí baterií je 7,4 V. Prototyp byl vybaven kabeláží a jednoduchým konektorem pro připojení senzorů. V rámci zlepšení úchopových vlastností, se nahradil servomotor zprostředkávající pohyb ukazováčku za téměř 3× silnější model.

V rámci diplomové práce se navrhlo pět různých snímačů pro neinvazivní snímání. Jeden inspirovaný projektem HACKberry a čtyři nové konstrukce, kdy každý využívá jiného principu snímání. První snímač pracovní nazvaný MARK 1 využívá infračerveného světla

k měření vzdálenosti. Uchycený do pouzdra měří vzdálenost mezi samotným IR snímačem a kontaktním místem s uživatelem. Při kontrakci svalu dojde ke zmenšení této vzdálenosti a tím k ovládní bionické náhrady. Snímač MARK 2 využívá snímání potenciálního napětí ve svalu uživatele pomocí elektromyografie. MARK 3 využívá senzor zrychlení pro odhalení kontrakce svalu. Snímač MARK 4 využívá změny síly působící na pouzdro připnuté na uživatele. Při kontrakci svalu se zvýší síla působící na FSR (Force Sensitive Resistor), ten sníží svůj vnitřní odpor a umožňuje s touto změnou pracovat. Poslední snímač MARK 5 funguje podobně jako předchozí snímač, jen využívá svého vlastního ohybu.

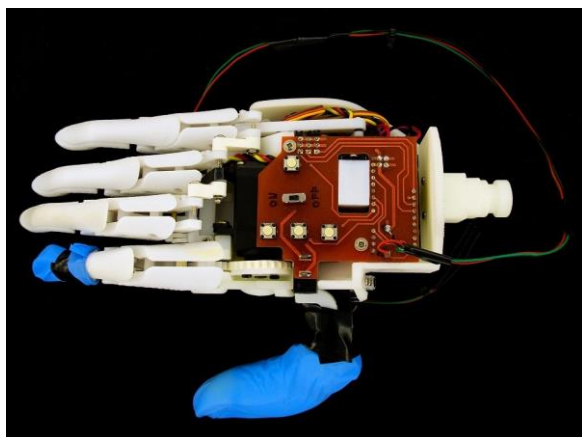
K těmto senzorům byla navržena vlastní pouzdra, která se následně vyrobila technologií 3D tisku v Laboratoři prototypových technologií a procesů Technické univerzity v Liberci. Tato pouzdra se osadila popruhy a otestovala se jejich funkčnost. Zjistilo senzor MARK 3 se pro účely snímání kontrakce svalů na předloktí nebo paži uživatele nehodí. Pro senzor MARK 5 se nepodařilo vytvořit vhodné pouzdro umožňující uchycení na uživatele. Testované spektrum snímačů se skládalo ze dvou typů senzoru MARK 1, jednoho senzoru MARK 2 a dvou verzí senzorů MARK 4.

Celé toto spektrum snímačů bylo testováno pomocí vytvořeného měřicího algoritmu na třech uživateli (autor práce, vedoucí práce a pan uživatel po amputaci horní končetiny). Testovací algoritmus byl navržen tak, aby byly ověřeny vlastnosti všech snímačů. Jednotlivé měření trvalo 30 s a se všemi uživateli byla provedena tři měření pro každý senzor.

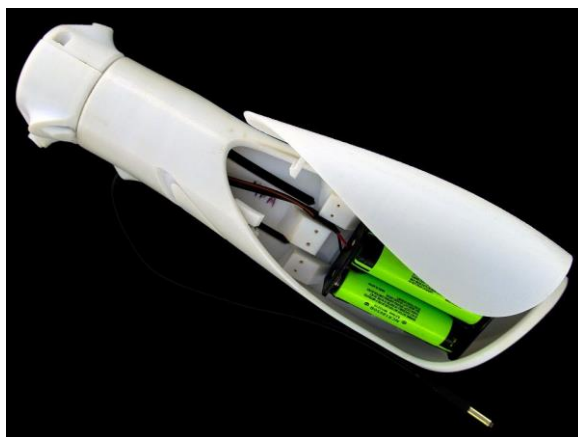
Uživatelem po amputaci byla zapůjčena komerční myoelektrická protéza, která se podrobila analýze zpracování. Ke komerčnímu zápěstí se vytvořila hybridní patice, pro připojení bionické ruky HACKberry. Tato idea byla převzata z podobného projektu, který proběhl v berlínském Fab Labu [3]. Zde však bylo využito originálního zámku dodávaného výrobcem protetických náhrad. V rámci této diplomové práce ovšem vznikla vlastní jednodušší patice pro popojení předloktí a ruky, která je vyrobitelná technologií 3D tisku.

1.1 Výsledky a diskuze

Analýzováním všech naměřených dat pro všech pět senzorických jednotek se zjistilo, že pro ovládní bionické náhrady HACKberry se nejlépe hodí vytvořený senzor MARK 4. Ovládací algoritmus využívá hodnoty při klidové hodnotě svalu a hodnoty při kontrakci svalu. Hlavním parametrem je pak co největší rozdíl těchto hodnot. Díky tomu je pak zaručena dobrá citlivost při ovládní. Největší rozdíl se podařilo změřit u senzoru MARK 2, ten však zprostředkovává informaci pouze o tom zda se změnilo potenciální napětí ve svalu, ale ne jestli je zatnutý nebo uvolněný. V neposlední řadě se dbalo i na aspekt udržet cenu na co nejnížší mezi. Cena na stavbu (případné vylepšení a opravy) prototypu a senzorických jednotek nepřesáhla 20000 Kč.



(a)



(b)

Obrázek 1: (a) Kompletní prototyp bionické ruky, (b) předloktí vybavené bateriemi.

2 Závěr

Všechny cíle diplomové práce se podařilo splnit. Podařilo se plně dokončit prototyp bionické náhrady HACKberry, a v rámci předávání zkušeností dalším studentům byl sestaven i druhý prototyp. Spektrum několika vytvořených snímačů se zvládlo sestavit a řádně otestovat i s uživatelem, který prodělal amputaci horní končetiny. Po diskuzi s tímto uživatelem bylo ověřeno, že tato koncepce bionické náhrady a vytvořených snímačů je reálně použitelná, i přes svá slabá místa. V úplném závěru práce se naznačily další směry, kterými se může tato práce posouvat.

Literatura

- [1] HACKberry © 2016 exiii [online]. [cit. 2017-05-09]. <http://exiii-hackberry.com/>
- [2] NAJMAN, Petr. Bionická ruka. Liberec 2016. Semestrální projekt. Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií Technické univerzity v Liberci. Vedoucí semestrálního projektu Jan Koprnický.
- [3] Myoelectric Exiii hand. My Human Kit. Tutorial. [online]. [cit. 2017-05-09]. <http://myhumankit.org/en/tutorials/myoelectric-exiii-hand/>

DISTRIBUOVANÁ APLIKACE PRO KRYPTOANALÝZU ASYMETRICKÝCH KRYPTOSYSTÉMŮ

Bc. David Salač

Sekce – MECHATRONIKA

Fakulta mechatroniky, informatiky a mezioborových studií, 2. ročník
Navazující magisterský program – INFORMAČNÍ TECHNOLOGIE

Abstrakt: Práce je zaměřena na prozkoumání potenciálu distribuované aplikace při procesu kryptoanalýzy systémů s veřejným klíčem. V rámci práce jsou představeny problémy faktorizace celých čísel a řešení diskretního logaritmu v souvislosti se šiframi a protokoly s veřejným klíčem. Důležitou součástí práce je představení důležitých numerických metod pro řešení těchto tříd problémů. Jako praktická část následuje vytvoření distribuované aplikace, která předmětné šifry implementuje v rámci distribuovaného systému. Aplikace je rozdělena na část webové aplikace a terminálové aplikace. Webová aplikace slouží především pro vkládání problémů a jejich správu a představuje hlavní uzel v síti. Terminálová aplikace implementuje numerické metody pro výpočet problémů a představuje podružný uzel v rámci sítě. V závěru následuje analýza použitelnosti aplikace v reálných situacích pomocí pokročilých metod odhadu.

Klíčová slova: Kryptoanalýza kryptosystémů s veřejným klíčem, Distribuovaná aplikace, Problém faktorizace čísel, Problém diskretního logaritmu, Numerické metody

Úvod

Práce pojednává o vztahu kryptosystémů s veřejným klíčem s řešením problému diskretního logaritmu a faktorizace celých čísel. V rámci práce jsou představeny pouze vybrané efektivní metody používané v současnosti. V případě faktorizace celých čísel jsou to především Pollardova rho metoda, Dixonova metoda a kvadratické síto. V rámci řešení problému diskretního logaritmu se jedná zejména o metody Baby step giant step, Pohlig–Hellmanův algoritmus a Index calculus. V případě každé numerické metody je diskutována možnost její implementace v rámci distribuované aplikace. Koncepce distribuované aplikace je vybrána tak, že existuje jeden řídicí uzel, který je reprezentován webovou aplikací. V té je možné vkládat a editovat jednotlivé kryptografické problémy, zejména kryptoanalýzu šifer RSA, ElGamal či Diffie-Hellmanova protokolu pro výměnu klíčů. Další úloha webové aplikace je distribuce problémů mezi jednotlivé uzly v systému. Podřízený uzel v systému je reprezentován terminálovou aplikací. Ta se skládá z implementovaných numerických metod pro řešení problému faktorizace celých čísel, případně diskretního logaritmu. Terminálová aplikace také zajišťuje přenos dat mezi webovým serverem. V závěru následuje analýza potenciálu distribuovaného systému v reálných situacích.

1 Numerické metody

V této sekci jsou popsány vybrané metody používané pro faktorizaci celých čísel a řešení diskrétního logaritmu. Komplexnost těchto metod se pohybuje na různé úrovni, lepších výsledků je dosaženo při řešení problému faktorizace celých čísel. Prozatím nebyla objevena žádná metoda, která by byla schopna pracovat s polynomiální komplexností (vyjma případu Shorovy metody pro kvantové počítače). Popsané metody představují pouze základní výšeč v problematice. Existuje řada dalších metod, případně vylepšení popsanych metod.

V případě problému faktorizace celých čísel hledáme rozklad přirozeného čísla n tvaru:

$$n = \prod_{\forall i} p_i^{\alpha_i} \quad (1)$$

kde p_i je prvočíslo a α_i je přirozené číslo.

Diskrétní logaritmus lze prezentovat jako hledání přirozeného čísla x v kongruenci:

$$g^x \equiv a \pmod{p} \quad (2)$$

pro pevně zvolená přirozená čísla g , a a p .

1.1 Dixonova faktorizační metoda náhodných čtverců

Dixonova faktorizační metoda byla poprvé posána Johnem D. Dixonem v roce 1981. Představovala první použitelný způsob hledání čísel ve tvaru Legendery kongruence (formátu pro čísla $x, y : x^2 \equiv y^2 \pmod{n} \wedge x \not\equiv y \pmod{n}$), který je později použitelný pro faktorizaci).

Algoritmus se skládá z následujících kroků:

1. Nalezení faktorové základny F (v podstatě uspořádaná množina prvočísel). Většinou se jedná o k prvních prvočísel v číselné řadě.
2. Nalezení alespoň $|F| + 1$ ($|F|$ je kardinalita množiny F) čísel $x_i \in (\sqrt{n}, n) \cap \mathbb{N}$ takových, že $(x_i^2 \pmod{n})$ je hladké na F .
3. Sestrojení matice $\tilde{E}$ reprezentující exponenty z rozkladu $(x_i^2 \pmod{n})$ na prvočísla z F . Matici zapisujeme tak, že sloupec reprezentuje exponenty z rozkladu. Matice má minimálně o jeden sloupec více, nežli má řádků, tedy nulový prostor matice není prázdná množina.

$$\tilde{E} = \begin{array}{ccccc|c} x_1 & x_2 & \cdots & x_{|F|} & x_{|F|+1} & \\ \hline 7 & 2 & \cdots & 0 & 1 & p_1 \\ 0 & 3 & \cdots & 0 & 2 & p_2 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ 0 & 1 & \cdots & 2 & 1 & p_{|F|-1} \\ 1 & 0 & \cdots & 0 & 3 & p_{|F|} \end{array}$$

Protože nás zajímá pouze parita exponentů, pracujeme s maticí $E = \tilde{E} \pmod{2}$.

4. Pokud nalezneme nulový prostor matice E (pracujeme nad polem $\mathbb{Z}_2$), sestavíme Legendrovu kongruenci následujícím způsobem:

$$n = (\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_{|F|+1})^T \in \text{nullspace}(E), \quad \beta_i \in \{0, 1\}, i \in [1, |F| + 1] \cap \mathbb{N}$$

$$x = \prod_{i=1}^{|F|+1} x_i^{\beta_i}$$

$$y = \prod_{i=1}^{|F|} p_i^{\left(\sum_{j=1}^{|F|+1} \alpha_j \cdot \beta_j\right) \cdot 0.5}$$

Takovouto kongruenci můžeme využít při rozkladu na prvočísla.

5. Vypočteme $\text{GCD}(x \pm y, n)$ a pokud je výsledek netriviální dělitel n , algoritmus skončí (pravděpodobnost této varianty je $\frac{2}{3}$). Jinak je $\text{GCD}(x \pm y, n)$ rovno 1 nebo n , pak se algoritmus vrací na krok 2 (pravděpodobnost této varianty je $\frac{1}{3}$).

Časová složitost tohoto problému (v daném případě odhad počtu kroků algoritmu pro konkrétní hodnotu n) je heuristicky odhadnuta jako:

$$\mathcal{O}\left(\exp\left(\alpha \cdot (\ln n \cdot \ln(\ln n))^{\frac{1}{2}}\right)\right), \alpha \geq 2\sqrt{2}$$

Dixonův algoritmus je výchozím bodem pro všechny ostatní pokročilé metody. Přímým rozšířením metody je algoritmus kvadratického síta, který představuje nejefektivnější metodu pro faktorizaci čísel do velikosti cca. 2^{100} .

V rámci implementace algoritmu je možné pomýšlet na paralelizaci téměř výhradně v procesu cezení (takto je označen bod 2 algoritmu).

1.2 Algoritmus baby–step giant–step

Tato metoda pro řešení diskretního logaritmu byla poprvé popsána v roce 1968. Algoritmus předpokládá, že následující kongruence:

$$g^k \equiv a \pmod{n} \tag{3}$$

pro přirozená čísla $g, a, n, k \in \mathbb{N}$ má alespoň jedno řešení.

Algoritmus se skládá z následujících kroků:

1. Vypočte se číslo $s = \lfloor n \rfloor$.
2. Vypočítá se dvojice:

$$S = \{(ag^i, i), \quad i \in [0, s) \cap \mathbb{Z}\}$$

a uloží se do seznamu. Tento krok je označován jako baby–step.

3. Vypočte se další sekvence T následujících dvojic:

$$T = \{(g^{is}, i), \quad i \in [1, s] \cap \mathbb{Z}\}$$

a uloží se do seznamu. Tento krok se označuje jako giant-step.

4. Prohledá se seznam S a T na shodu $ag^r = g^{ts}$ kde ag^r je v S a g^{ts} je v T . Pokud algoritmus tato čísla nalezne, pak $k = ts - r$ řeší kongruenci (3).

Tento algoritmus se také někdy nazývá Shankova baby-step giant step metoda. Časová náročnost tohoto algoritmu je:

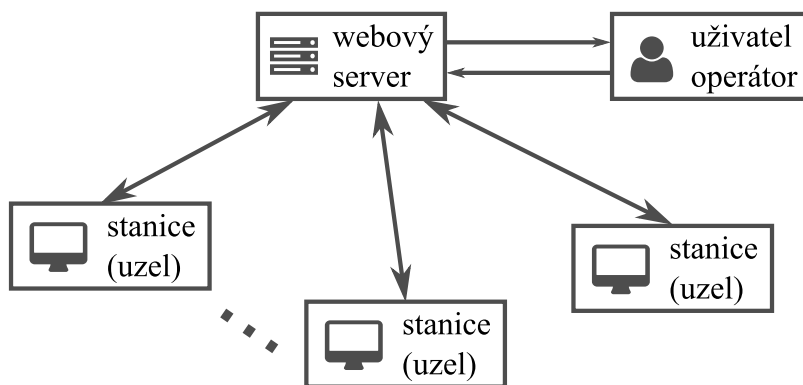
$$\mathcal{O}(\exp(\sqrt{n} \log n))$$

Esenciální nevýhoda tohoto algoritmu je nutnost ukládat v datové struktuře alespoň $\sqrt{n}$ hodnot. To je realizovatelné pouze pro relativně malé hodnoty n .

Existuje řada vylepšení tohoto algoritmu. Mezi základní patří Pohlig–Hellmanův algoritmus, který může najít využití v případě chybné implementace některých kryptosystémů.

2 Distribuovaná aplikace

Distribuovaná aplikace je tvořena dvěma typy uzlů, prvním uzlem je uzel řídicí, který je prezentován webovou aplikací, druhým typem je uzel podružný, který je prezentován terminálovou aplikací.



Ilustrace 1: Koncepce distribuované aplikace

2.1 Webová aplikace

Hlavním účelem webové aplikace je ukládání seznamu úloh a poskytování rozhraní pro standardní operace s těmito daty (jako je jejich vkládání, aktualizace a mazání). Aplikace také zobrazuje výsledky vyřešených úloh spolu s dalšími informacemi o výpočetním procesu. Aplikace také poskytuje rozhraní pro jednotlivé uzly v systému.

Základní rysy návrhu webové aplikace jsou v následujícím seznamu:

1. Správa uživatelů systému. Každý uživatel má svoji úroveň oprávnění. Administrátoři mohou vytvářet nové uživatele a editovat stávající.
2. Správa úloh v systému, tyto budou dále distribuovány mezi jednotlivé uzly systému. Úloha v systému je později konvertována na problém řešení diskretního logaritmu nebo faktorizace celých čísel.

V systému lze řešit následující typy úloh:

- kryptoanalýzu šifry RSA (hledá zprávu m a privátní klíč d z hodnot c, e a n),
 - kryptoanalýzu šifry ElGamal (hledáme m a klíč x pomocí c_1, c_2, p, g a h)
 - kryptoanalýzu Diffie-Hellmanova protokolu (hledá klíč z hodnot p, g, g^a a g^b).
3. Správa stanic v systému. Stanice je zde míněna jako podružný uzel v rámci distribuovaného systému. Představuje jeden počítač (nebo jejich skupinu). Webová aplikace uchovává hodnotu ID stanice, poslední aktivitu a naposledy přiřazenou úlohu.
 4. Aplikace poskytuje detailní informace o každé úloze a stanici a zobrazuje také výstupy výpočtu.
 5. V neposlední řadě je součástí webové aplikace také stránka s manuálem.

DIPLOMA THESIS APPLICATION

Welcome to application designed for cryptanalysis of public key cryptosystem.
Author: David Salač

Insert new task

List of all tasks in system

Task ID	Task type	Task priority	Inserted	Last activity	Detail	Remove
120	ElGamal	SOLVED	2017-04-30 09:11:02	2017-04-30 09:13:36		

Ilustrace 2: Ukázka rozhraní webové aplikace

Technicky byla aplikace vyřešena pomocí PHP verze 7.0 a MySQL verze 5.5 využívající InnoDB engine. Technické prostředky pro řešení webové aplikace byly zvoleny s ohledem na portabilitu výstupu a cenovou dostupnost řešení.

2.2 Terminálová aplikace

Terminálová aplikace slouží k vyřešení konkrétní přidělené kryptoanalytické úlohy. Základní funkce aplikace je převedení úlohy na řešení problému diskretního logaritmu, popřípadě faktorizace celých čísel. K následnému vyřešení je využita vybraná numerická metoda, která je v

rámci aplikace implementovaná. Následně dojde ke zpětnému přenosu vyřešené úlohy zpátky na server. Aplikace je psána v jazyce Java SE.

V rámci implementace numerických metod jsou v aplikaci následující relevantní třídy:

PollardRho implementuje Pollardovu Rho metodu pro faktorizaci celých čísel. Tato metoda přijímá jako jediný svůj parametr maximální počet iterací (z důvodu potenciálního výskytu nekonečné smyčky). Tato metoda je využívána pro faktorizaci menších čísel.

Dixon implementuje Dixonovu metodu náhodných čtverců pro faktorizaci celých čísel. Jediným parametrem této metody je faktorová základna. Její velikost je určena empiricky.

QuadraticSieve implementuje kvadratické síto pro faktorizaci celých čísel. Metoda pracuje s fixně zvoleným polynomem $Q(x) = (x + \lceil n \rceil)^2 - n$. Jedná se o výchozí polynom kvadratického síta. Hodnoty parametrů metody, v daném případě interval x a velikost faktorové základny jsou určeny empiricky. Tato metoda je využívána pro faktorizaci čísel větších než 2^{40} až cca. 2^{70} .

NumberFieldSieve obsahuje funkcionalitu nezbytnou pro implementaci metody číselného síta.

PollardsRhoDL reprezentuje Pollardovu rho metodu pro diskrétní logaritmus. Její koncepce je podobná jako u faktorizace čísel. Jedná se o metodu vhodnou spíše pro předzpracování problému.

BabyStepGiantStep implementuje metodu baby step giant step pro diskrétní logaritmus. Metoda přijímá jako svůj jediný parametr maximální velikost datové struktury vyskytující se v kroku zvaném baby-step (popsáno výše).

SilverPohligHellman představuje implementaci Silver–Pohlig–Hellmanova algoritmu pro diskrétní logaritmus. V rámci implementace využívá tento algoritmus také baby-step giant-step metodu. K nezbytné faktorizaci na začátku metody se využívá hrubá síla.

IndexCalculus představuje implementaci metody index calculus pro diskrétní logaritmus. Jedná se o metodu se subexponenciální časovou náročností. Na druhou stranu vyžaduje řadu doprovodné funkcionality. Jediným parametrem této metody je velikost faktorové základny. V rámci samotného výpočtu se však tato třída, s ohledem na nestabilitu metody, nevyužívá.

V praktické části je také implementována řada doprovodné funkcionality, která je nezbytná pro fungování jednotlivých metod. Mimořádně důležitá je efektivní práce s maticemi nad polem $\mathbb{Z}_2$, která se využívá v případě metod číselné faktorizace. Podobně je například implementována i obecná funkcionalita pro práci s maticemi nad okruhem $\mathbb{Z}_n$ pro nějaké složené přirozené číslo n .

3 Analýza použitelnosti aplikace v reálných situacích

Reálné situace se od modelových liší především ve velikosti používaných čísel (parametrů kryptografických systémů). Protože je časová náročnost přibližně exponenciálně závislá na

délce vstupu, je i nárůst času potřebného k úspěšnému vyřešení úloh enormní. Na této skutečnosti je postavená bezpečnost všech zmíněných kryptosystémů. Čas, který je nezbytný pro vyřešení praktických úloh, je odhadnut za využití exponenciální regrese naměřených hodnot.

Při měření závislosti času na velikosti vstupu potřebného k odhadu času nezbytného pro vyřešení praktických úloh byly využity tři stolní počítače v přibližně následující konfiguraci:

Informace o CPU: Intel(R) Core(TM) i7-5557U CPU @ 3.10GHz

Dostupná RAM: 8 GB

Operační systém: Linux 4.4.0-72-generic #93-Ubuntu x86_64 GNU/Linux

V případě faktorizace čísel v rámci metody RSA jsou v rámci práce zmíněny pouze základní velikosti modulů používaných v praxi. Odhady času, který je nezbytný pro výpočet dané úlohy v případě použití tří stanic, tj. $S = 3$, jsou v tabulce 1. Zde t značí čas v příslušných jednotkách a N velikost vstupu v bitech.

Tabulka 1: Odhad času pro řešení N bitové RSA úlohy

N [bit]	t [s]	t [rok]	S
1024	$1.37 \cdot 10^{19}$	$4.36 \cdot 10^{11}$	3
2048	$6.12 \cdot 10^{41}$	$1.94 \cdot 10^{34}$	3
4096	$1.21 \cdot 10^{87}$	$3.84 \cdot 10^{79}$	3
8192	$4.76 \cdot 10^{177}$	$1.51 \cdot 10^{170}$	3

V případě řešení problému diskretního logaritmu je situace srovnatelná. Vypočtená data jsou zobrazena v tabulce 2 níže. Zde t značí čas v příslušných jednotkách, N velikost vstupu v bitech a S počet stanic v systému.

Tabulka 2: Odhad času nezbytného pro řešení N bitové úlohy diskretního logaritmu

N [bit]	t [s]	t [rok]	S
512	$9.29 \cdot 10^{78}$	$2.95 \cdot 10^{71}$	3
1024	$9.75 \cdot 10^{163}$	$3.09 \cdot 10^{156}$	3
2048	$1.07 \cdot 10^{334}$	$3.41 \cdot 10^{326}$	3
4096	$1.30 \cdot 10^{674}$	$4.13 \cdot 10^{666}$	3

Ze srovnání je zřejmé, že metody používané pro řešení diskretního logaritmu jsou podstatně méně efektivní nežli metody používané pro řešení problému faktorizace celých čísel.

Závěr

V rámci práce byly představeny základní asymetrické kryptosystémy, které spoléhají na problém řešení diskretního logaritmu či faktorizace čísel. Kryptoanalýza těchto systémů je značně náročná, neboť neexistují efektivní algoritmy pro řešení těchto problémů. V rámci faktorizace čísel jsou nejefektivnější metody kvadratického síta a obecného číselného síta. Obě vycházejí z Dixonovy metody náhodných čtverců, která je výše představena. Při řešení problému diskretního logaritmu neexistují metody se srovnatelnou komplexností jako v případě faktorizace čísel. Nejefektivnější metoda je index calculus. V rámci práce je představena metoda baby-step giant-step.

Distribuovaná aplikace je koncipována tak, že existuje jeden řídicí uzel, který je prezentován webovou aplikací a dále libovolný počet podružných uzlů prezentovaných terminálovou aplikací. Hlavní úloha webové aplikace je poskytnutí grafického rozhraní pro uživatele pro vkládání a správu kryptografických problémů. Úloha desktopové (terminálové) aplikace spočívá v řešení jednotlivých problémů. K tomu jsou využity popsání numerické metody, jakož i některé další.

V rámci odhadu použitelnosti aplikace v reálných situacích se prokázalo, že pokud neudělá vývojář v rámci implementace kryptografických systémů chybu, je úspěšná kryptoanalýza v představitelném čase téměř nemožná.

Literatura

- [1] DELFS, Hans a Helmut KNEBL, 2015. *Introduction to Cryptography: Principles and Applications*. Third edition. Berlin: Springer.
- [2] Y. YAN, Song, Moti YUNG a John RIEF, 2013. *COMPUTATIONAL NUMBER THEORY AND MODERN CRYPTOGRAPHY*. Higher Education Press: Singapore. ISBN 9781118188583.
- [3] YAN, Song Y. *Number theory for computing*. 2nd ed. New York: Springer, 2002. ISBN 35-404-3072-5.

KONSTRUKCE OPTICKÉHO ZOBRAZOVAČE PRO TROJROZMĚRNÉ ZOBRAZOVÁNÍ

Bc. Jakub Štoček

Sekce - MECHATRONIKA,
Fakulta zdravotních studií, 2. ročník
Navazující magisterský studijní program – BIOMEDICÍNSKÉ INŽENÝRSTVÍ

Abstrakt: Práce pojednává o vývoji zařízení pro snímání bioluminiscenčního optického signálu v trojrozměrném prostoru. Dále se zabývá testováním vytvářených kamer a konstrukce pro snímání pod různými úhly ve více variantách s modely vytvořenými v programu Autodesk Inventor. V programovacím jazyku Matlab je vyvinut rekonstrukční algoritmus, který z naměřených dat vytváří tomografické řezy zobrazující pozici signálu v prostoru.
Klíčová slova: trojrozměrný, zobrazovač, bioluminiscence, konstrukce, Radonova transformace

1 Zmapování současného stavu

V následující kapitole je analyzován současný stav na pracovišti IKEM v době započetí diplomové práce.

1.1 Pozorování probíhajících experimentů

Pro účely diplomové práce proběhlo sledování experimentů na pracovišti IKEM za účelem zjištění podrobností a kritických bodů pro návrh konstrukce nového přístroje.

V době sledování probíhaly experimenty na výzkum substituce výroby inzulinu u diabetických jedinců za pomoci tkáňového implantátu Langerhansových ostrůvků ze zdravých dárců uložené do „komůrek“, podobných implantačním plastovým shantům. Tyto komůrky byly implantovány *sub cutálně* laboratorním potkanům v oblasti abdomen (dolní část trupu) po dvou kusech. Do jednoho kusu byl vložen implantát z dárce – „celosvítícího“ potkana a druhá komůrka zůstala prázdná jako referenční. Dárce je potkan, který je geneticky modifikován (GMO), tak že všechny jeho buňky při podání luciferinu začnou generovat fotony pomocí tzv. bioluminiscence, viz kapitola 1.1.1 diplomové práce.

1.2 IVIS Lumina XR

Zařízení IVIS Lumina XR od výrobce Caliper Life Sciences, Inc. (USA), který je dnes součástí PerkinElmer, Inc. (USA), je užívána na pracovišti IKEM k testování buněčné aktivity *in vivo* pomocí bioluminiscenční a fluorescenční metody. Tento model umožňuje i snímání vestavěným dvourozměrným rentgenovým zařízením. Zařízení je primárně určeno pro myši, potkany a *in vitro* vzorky v průhledném stabilním obalu.

Zařízení se skládá z následujících částí: Snímací temné komory s ovládací elektronikou a vertikálně posuvnou pracovní deskou uvnitř komory, jejíž součástí je otočná scintilační destička pro RTG. V horní části komory je umístěna chlazená CCD kamera a optická soustava, filtry a výstupy zdroje světla a pracovní LED osvětlení komory. V dolní části pod komorou je uložen zdroj rentgenového záření. Části s kamerou i s RTG zdrojem jsou nepřístupné bez demontáže zařízení. Komora je uzavřena světlotěsnými dveřmi s dvojitým jištěním proti nechtěnému otevření – mechanické a elektromagnetické a bezpečnostním vypínačem napájení RTG zdroje.

Další součástí zařízení je monitor a ovládací počítač s operačním softwarem z rodiny Windows, akvizičním a ovládacím software pro kameru, snímací komoru a RTG zařízení. Fluorescenční

modul skládající se ze zdroje světla a excitačních filtrů, který je se snímací komorou propojen optickými vlákny.

1.3 Dostupné 3D řešení pro bioluminiscenci a fluorescenci

V současné době jsou známy 3 metody pro získání 3D informací o umístění a intenzitě zdroje bioluminiscenčního nebo fluorescenčního signálu.

1.3.1 Kamera s laserovou triangulací

Tato metoda vychází z průmyslové laserové triangulace, jelikož je aplikovaný stejný princip získání prostorového modelu za použití laserového paprsku, jehož deformace na povrchu objektu (potkan nebo myš) je snímána kamerou a následně přepočítána do povrchového modelu. Navíc tato metoda užívá 2D nasnímaná luminiscenční data jako v případě přístroje popsaného v kapitole 4.2 diplomové práce. Ty však pomocí získaného povrchového modelu přepočítá z povrchu modelu do jeho vnitřku, za pomoci vyzkoumané distribuce fluorescenčního nebo bioluminiscenčního záření uvnitř živého organismu.

1.3.2 Kamera a MicroCT

Další metoda pro získání trojrozměrných bioluminiscenčních dat využívá MicroCT neboli rentgenový počítačový tomograf malých rozměrů a s nízkou dávkou záření. Tento typ zařízení má pracovní desku s možností kontinuálního rotačního pohybu sledovaného objektu (myš) mezi zdrojem rentgenového záření a deskovým scintilačním detektorem. Z metody MicroCT se získají kompletní anatomická trojrozměrná data včetně přesného topografického povrchu sledovaného objektu. Následně probíhá expozice CCD kamery bioluminiscenčním nebo fluorescenčním signálem ze sledovaného objektu.

Pozice sledovaného objektu se v průběhu měření nemění a proto je nutné následně v rámci této metody nasnímaná 2D data přepočítat z povrchového topografického modelu za pomoci distribuční funkce pro bioluminiscenční nebo fluorescenční signál v živém organismu. Výstupem této metody jsou trojrozměrná anatomická a topografická data z rentgenové počítačové tomografie a trojrozměrná vypočtená bioluminiscenční nebo fluorescenční data. Příkladem této metody je přístroj IVIS SpetrumCT.

1.3.3 FMT – *Fluorescence transillumination tomography*

Metoda FMT neboli volně přeloženo fluorescenční prosvěcovací tomografie je založena na principu, že excitační záření v podobě laserů osvětluje objekt z jedné strany a z druhé strany je pozorován CCD kamerou. Osvětlování je řízeno přes XY rastrovou matici, která určuje směr jednotlivých excitačních záblesků pod objektem. Sledovaný objekt (potkan, myš, laboratorní vzorek) je imobilizován a zajištěn v kazetě, kde musí být stlačen. Kazeta je poté zasunuta do přístroje.

Tomografická fluorescenční data jsou vypočtena z kompozice koordinátů XY zdrojového excitačního záření a s ním souvisejícím detekovaným emisním zářením. Poté je vypočten zdroj fluorescenčního signálu ve sledovaném objektu. Tento výpočet je podmíněn kalibrací před měřením, která určí prostorový útlum fluorescenčního signálu. Příkladem této metody jsou přístroje FMT 1000, FMT 2000 a FMT 4000, jež se liší v počtu excitačních zdrojů (laserů) v počtu 1, 2 a 4. Více zdrojové varianty umožňují detekci více typů fluorescenční agens najednou.

2 Programování

Kapitola se zabývá postupem vývoje 3D rekonstrukčního algoritmu sestaveného v programovacím prostředí MATLAB, jeho jednotlivé fáze vývoje až po výsledný funkční algoritmus. Po vzoru rentgenové počítačové tomografie, známé pod zkratkou CT byl zvolen postup výpočtu Radonovy transformace, která je popsána v kapitole 2.2.3 diplomové práce.

2.1 Dekonstrukce a princip algoritmu

V první fázi vývoje jsem se soustředil na pochopení principu interpretace Radonovy transformace v programovacím prostředí MATLAB, která je zastoupena funkcemi $R = \text{radon}(I, \theta)$, kde R je proměnná ukládající výstup Radonovy transformace, I je vstupní matice (obrázek), kterou vkládáme do transformace a θ je úhel nebo sada úhlů, pod kterými chceme transformaci uvést. Pokud není uvedeno jinak implicitně se provádí Radonova transformace pro $\theta = 0:180$ neboli pro úhly 0° až 180° .

Pro převod matice z Radonova prostoru zpět je v programovací prostředí definována funkce $I = \text{iradon}(R, d\theta)$, kde I je proměnná ukládající výsledek inverzní Radonovy transformace, R je vstupní matice projekcí v Radonově prostoru a θ jsou úhly projekce, který musí mít shodný počet s projekčními maticemi a musí mít konstantní rozdíl. Pokud tyto úhly nejsou přesně definované je možné dosadit za θ proměnnou $d\theta$, která definuje úhlový rozdíl mezi projekcemi.

Pro první osvojení manipulace s obrazem byly v rámci skriptu vytvořeny tři testovací obrazy, jejichž generování je popsáno v úryvku ze souboru *prog1.m*. Obrázky jsou vytvářeny do 2D matice o rozměrech proměnné *matice* a do ní je následně matematicky vepsán objekt. Matematický rozsah v obrázku je 0 až 1, objekty jsou v hodnotách 1, 0,8 a 0,3, pozadí v hodnotě 0, tento matematický rozsah matice je jinak označován jako *double*.

Na řádcích 10 až 12 jsou vytvořeny matice pro testovací obrázky, které jsou naplněny definovanými obrazci na řádcích 14-22 pro obrázek P1, 24-35 pro obrázek P2 a 39-47 pro obrázek P3, všechny generované obrázky jsou k vidění níže. Ty jsou užity v souborech *prog1.m*, *prog2.m*, *prog3.m*, *prog5.m*.

Tyto obrázky byly užity v souboru *prog1.m* k testování dekonstrukce Radonovou transformací a poté zobrazení jednotlivých projekcí v rozsahu 0° - 170° s 10° krokem. Účelem tohoto programu bylo zjistit pojetí jednotlivé projekce z pohledu funkce *radon*, výstup jedné projekce odpovídá vstupu projekce do dané funkce pro daný úhel. Ačkoliv se jedná o řádkovou informaci, kterou lze vyjádřit jako křivkový graf, funkce *radon* a *iradon* jej vyžadují v čtvercové matici, kde je daný řádkový vektor replikován po celé výši matice.

Výstup z části zdrojového kódu výše byl zpracován do ilustrace popisující fungování algoritmu Radonovy transformace, bylo vybráno pro ilustraci 5 projekcí z 17 vypočtených a uprostřed byl usazen rekonstruovaný obraz.

2.2 Testování s umělými daty a reálnou předlohou

Další fáze vývoje byla zaměřena na kvalitu rekonstrukce při použití definovaného počtu projekcí a závislost jejich pozice (úhlu), to se vztahuje na soubory *prog2.m*, *prog3.m*, *prog5.m* a *prog6.m*. Na obrázcích dole je zřejmé, že s klesajícím počtem projekcí velmi rapidně klesá kvalita a hlavně přesnost rekonstrukce výsledného obrazu. U 3 projekcí a 5 projekcí dokonce vzniká falešný zdroj signálu v pravém horním rohu. Zřejmé je, že nejméně náchylné na klesající kvalitu rekonstrukce je signál ve formě kruhu (plošného bodu).

Následně byla využita data z přístroje IVIS Lumina XR z probíhajících experimentů na pracovišti IKEM (viz kapitola 4 diplomové práce) a vytvořena data blíže odpovídající reálnému signálu. Stejně jako u generovaných dat byl rozložen 2D obraz Radonovou transformací a dám jako předloha výsledného tomografického řezu. Bodový kruhový zdroj s rozdílnou intenzitou směrem k okraji je považován za předlohu bodového signálu zářícího v homogenním prostředí.

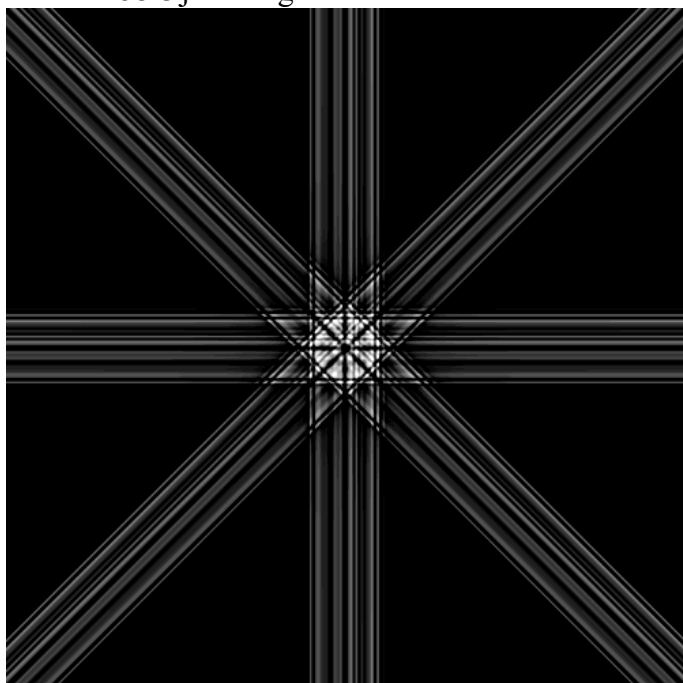
Na obrázcích dole je vidět výstup při použití stejného algoritmu jako u generovaných dat s použitím reálné předlohy, jelikož jsou data vysoce kontrastní s pozadím a téměř centralizovaná, je možné získat informaci o zdroji signálu ze všech rekonstrukcí, jeho přesnost tvaru však s klesajícím počtem projekcí klesá stejně jako u testování na generovaných datech.

2.3 Testování s reálnou předlohou v prostoru

Poslední fáze programování byla zaměřena na uzpůsobení algoritmu pro zdrojová data, která budou získána z kamery, tedy 2D obrazy – matice se společnou osou rotace ve středu rekonstruovaného prostoru. V této době ještě nebyla k dispozici naměřená data a pro testování algoritmu byla užita opět předloha na základě reálných dat ze zařízení IVIS Lumina XR, avšak tentokrát byly užity jako zdrojové obrazy z teoretických kamer s různými úhly.

Každý obraz zastupoval jednu kameru a rekonstrukce zájmového prostoru probíhala vodorovně, tedy společná osa rotace obrazů byla horizontální, jeden sloupec každého obrazu vyznačoval jednu řádkovou projekci pro inverzní Radonově transformaci. Výsledný počet vrstev odpovídal pixelové šíři obrazu a velikost rekonstruovaných obrazů odpovídala výšce zdrojového obrazu.

Výstupem tohoto algoritmu je trojrozměrná matice, jejíž první dva rozměry (X,Y) jsou 2D tomografické rekonstrukce, které jsou výstupem inverzní Radonovy transformace a třetí rozměr (Z) je pořadí těchto 2D matic za sebou. V případě tohoto testování se jednalo o matici o rozměru 500 x 500 x 500, přičemž výpočet rekonstrukce proběhl pouze u vrstev (Z) 201 až 300. Na obrázku dole je tomografická rekonstruovaná vrstva s pořadovým číslem 250.



Obrázek 1- rekonstruovaný tomografický řez, vrstva 250

2.4 Aplikace algoritmu na naměřená data

Pro finální fázi programování jsou zapotřebí reálná data, která budou získána během testování a případně dle nich lze rekonstrukční algoritmus modifikovat. Tato aplikace a případná adaptace proběhne až následně po testování uvedeném níže.

3 Návrh konstrukce

Zásadním společným parametrem všech návrhů jsou technické vlastnosti setu kamery a optické soustavy (objektivu), které jsou pro každou sestavu unikátní. Z nich nejvýznamnější je parametr pracovní vzdálenosti optické soustavy, která je popsána v kapitole 3.3.2 diplomové práce. Vzdálenost objektivu a sledovaného předmětu totiž určuje minimální poloměr oblouku rotace kamery kolem předmětu v jakékoliv variantě a s tím i minimální rozměry snímací komory, aby se do ní takovýto oblouk vešel i s příslušenstvím a pracovním prostorem okolo (např. pro příslušenství, datové a napájecí kabely apod.).

3.1 Konstrukce testovacího držáku

Pro účely testování kamery, která prošla výběrem a byla u ní prokázána funkční schopnost snímání bioluminiscenčního signálu, byl vytvořen držák. Z důvodu nutnosti umístění do současného přístroje, užívaného pro porovnání, byly rozměry držáku limitovány vnitřními rozměry snímací komory přístroje IVIS Lumina XR. Držák byl konstrukčně definován na kameru G2-3200 s užitím rozměrů vypočtených v kapitole 7 diplomové práce a následně otestovaných. S pomocí tohoto držáku má být ověřena funkčnost rekonstrukčního algoritmu popsaného v kapitole 6 diplomové práce.

Počet úhlů a rozsah snímání byl omezen vnitřními rozměry snímací komory přístroje IVIS Lumina, které jsou uvedeny v technickém listu jako *Imaging Chamber Interior Dimension* s rozměry 43 x 38 x 43 cm (W x D x H), neboli šířka x hloubka x výška. Rozměr základní desky držáku byl tedy určen na 40 x 40 cm z důvodu manipulační rezervy. Zdvojená podstava kolmá k základní desce byla se stejného důvodu stanovena na spodní hraně na 35 cm. Na ilustraci nahoře je vyznačený díl černě. Červeně jsou vyznačeny úhly snímání -24°, -12°, 12°, 24° a zeleně úhly -20°, -15°, -10°, -5°, 5°, 10°, 15°, 20° a modře je vyznačena společná výchozí pozice 0°. Žlutě je uveden obrys kamery v odpovídajících rozměrech ve výchozích a krajních pozicích. Zároveň ilustrace vysvětluje maximální rozsah -24° až 24°, jelikož v těchto pozicích je kamera na hraně vymezeného prostoru limitovaného vnitřními rozměry snímací komory.

3.2 Konstrukce snímací komory

Na základě testování bylo odpozorováno, že je potřeba konstrukce samostatné komory nebo jinak *black boxu*, jelikož je nutné zajistit světlotěsnost při snímání bioluminiscenčního signálu. Tato komora bude shodná pro všechny následující návrhy a lišit se může pouze v rozměrech. Základní konstrukci zajistí montované hliníkové profily čtyřhranné s drážkou, které se konvenčně užívají při výrobě jednoúčelových laboratorních přístrojů. Konstrukce z tohoto materiálu je pevná, dá se snadno smontovat a do vzniklých drážek se dá zasunout výplňový materiál dle volby. Zároveň už se pro tyto účely vyrábí i standardizované příslušenství – madla, šroubovací nohy, panty, zavírací systémy, úpony.

Samotná komora by mohla být realizovaná jako zařízení na stůl nebo samostatně stojící zařízení s tím, že by hliníková konstrukce bez výplně byla prodloužena pod snímací komoru a osazena šroubovými nohami. Šroubem nastavitelné nohy slouží k vyrovnání komory do vodorovné pozice v obou směrech při instalaci v prostoru. Výška této konstrukce by se odvíjela podle určení, zda u ní bude pracováno v sedě nebo ve stoje, tak aby byla podlaha snímací komory v komfortní výšce (přibližně jako výška pracovního stolu).

3.3 Varianta více kamer pod různými úhly

Za účelem získání obrazových dat z více úhlů se nabízí možnost užití více kamer, pevně konstrukčně vázané ve svých pozicích vůči společné ose rotace. Tato varianta by byla ze své podstaty nejpřesnější, jelikož by nedocházelo k žádné mechanické změně, kamery stejného typu řízené jedním počítačem by snímaly signál současně se stejným nastavením.

Tato varianta by vyžadovala zapojení kamer umožňující propojení kamer s počítačem, což by při použití USB bylo velmi náročné a maximální počet kamer by byl limitován počtem USB portů na řídicím PC, zároveň bylo by nutné extra vést elektrické napájení kamer. Možnou modifikací je propojení kamer s řídicím počítačem přes ethernet kabely umožňující zároveň napájení POE, toto zapojení zahrnuje speciální router s technologií POE, do kterého jsou kamery zapojeny a z něj už pouze jedním datovým kabelem je zapojený řídicí počítač. Jelikož v současné době tato technika operuje na rozhraní GigE (Gigabyte ethernet), jsou datové přenosové rychlosti celé soustavy dostatečně vysoké, aby zajistila hladký průběh měření. Zásadním bodem proti této variantě je finanční náročnost celé soustavy, která ji eliminuje z řešení. Z vývoje algoritmu (viz kapitola 6 diplomové práce) vyšlo najevo, že pro získání použitelných dat by bylo zapotřebí 5 úhlů snímání, což by znamenalo cenu 5 kamer a 5 objektivů.

3.4 Varianta jedné kamery pod různými úhly

Pro vytvoření funkční varianty, která by kombinovala výše zmíněný princip a byla konstrukčně a finančně dostupná je řešením použití jedné kamery, která by měnila svoji polohu, jako to bylo u návrhu konstrukce testovacího držáku. Ten měl však zásadní nedostatek s časovými prodlevami při přendávání kamery z pozice na pozici.

V tomto řešení by byla kamera umístěna na rameni, které by rotovalo podle mechanické osy shodné s osou zobrazovací. Upevnění kamery na tomto rameni by garantovalo konstantní pracovní vzdálenost od sledovaného objektu umístěného v ose rotace a oproti testovacímu návrh by odpadlo korigování středu obrazu po každém přendání. Rameno by se otáčelo před deskou, kterou pracovní můžeme nazvat jako úhelník, jelikož na něm budou vyznačeny úhly snímání, vůči kterému bude rameno s kamerou zaaretováno. Aretace by probíhala spojovacím kolíkem, který by pevně spojil rameno kamery v jejím geometrickém středu a úhelník v otvoru vymezující předem nastavený úhel snímání.

3.4.1 Modifikace s elektrickým posunem

Pro získání lepší kvality měření a více dat z více sérií sledování by bylo potřeba ponechat po celou dobu měření uzavřenou komoru a zefektivnit přesun mezi pozicemi bez časových pauz. Toho lze dosáhnout motorizovaným posunem kamery mezi pozicemi, který by garantoval změnu pozice rychlejší než manuální přenastavení a dostatečnou přesnost pro rekonstrukční algoritmus.

Zůstane tedy zachována stejná konstrukce, jak je popsána v kapitole 7.4 diplomové práce, kdy je kamera umístěna na ramenu a rotuje kolem společné osy mechanické i zobrazovací. Do osy otáčení je vložen krokový motor s redukční převodovkou pro dosažení dostatečného kroutícího momentu, aby otáčení bylo plynulé a hmotnost kamery a ramene neovlivňovala přesnost polohování. Krokový motor má definovaný počet pulsů na otáčku. Otočení osy motoru o 180° je tedy definováno určitým počtem pulsů, pokud se použije redukční převodovka s poměrem 1:4, je počet pulsů na otočení celé osy o 180° čtyřnásobek.

4 Experiment

Pro potřeby diplomové práce bylo nutné ověřit získané teoretické poznatky v praktickém měření. Vytypované kamery bylo nutné otestovat přímo v laboratoři IKEM, kde jsou k dispozici žijící subjekty schopné generovat bioluminiscenční optický signál. Kamery na testování od výrobce Balsler byly zapůjčeny firmou ATEsystem, s.r.o a kamera G2-3200 byla zapůjčena firmou Moravské přístroje a.s., obě zápůjčky byly finančně garantovány firmou Experientio, s.r.o.

Popis měření

Okolní podmínky: Laboratorní místnost bez oken s aktivní ventilací udržující teplotu místnosti pod 24°C, v místnosti se nachází optické zobrazovací zařízení s anesteziologickým přístrojem s otevřeným inhalačním okruhem (anestetický plyn je vydechován do prostoru), kamera byla umístěna do temného boxu, zdrojem světla pro manipulaci bylo konvenční osvětlení místnosti, které bylo v průběhu testování vypnuto a kamera byla ovládána mimo místnost

Subjekt: celosvitící laboratorní potkan (*Rattus norvegicus*) reagující na luciferin – samička

Agens: 0,2 ml luciferin, koncentrace 6 mg / ml, intraperitoneální injekční aplikace nebo intramuskulární injekční aplikace pánevní končetina dexter

Sestava 1

Kamera: BASLER acA2000 – 50gmNIR, ID: 106159 - 18, S/N: 21961203, GigE (UTP kabel)

Čip: CMOSIS CMV2000 NIR - enhanced, Rozlišení: 2048 × 1088, Velikost pixelu: 5,5 × 5,5 μm, Plocha snímáče: 2/3"

Objektiv: Computar 12 mm, M1214-MP2, f12mm, C-mount, 2/3", M30.5x0.5

Sestava 2

Kamera: BASLER acA2440 - 20gm, ID: 107212 – 03 P, S/N: 22021768, GigE (UTP kabel)

Čip: Sony IMX264, Rozlišení: 2448 x 2048, Velikost pixelu: 3,45 × 3,45 μm, Plocha snímáče: 2/3"

Objektiv: VS25-25085/C, f25 mm, C-mount, S/N: Z15045318

Sestava 3

Kamera: G2-3200, Moravské přístroje (Moravia instrument), ID: 2787, S/N: G2FK3200-002787, USB 2.0

Čip: KAF-3200ME, Rozlišení: 2184 × 1472, Velikost pixelu: 6,8 × 6,8 μm, Plocha snímáče: 14,9 × 10 mm

Objektiv: Canon EFS 18-55 mm, Ø 58 mm, ID: 3960508113

Referenční porovnání: IVIS Lumina XR

60 s expozice, ihned po aplikaci injekce

Pro účely testování bylo při každém měření ověřena přítomnost bioluminiscenčního signálu na začátku a na konci současně užívaným přístrojem IVIS Lumina XR.

4.1 Závěr testování I

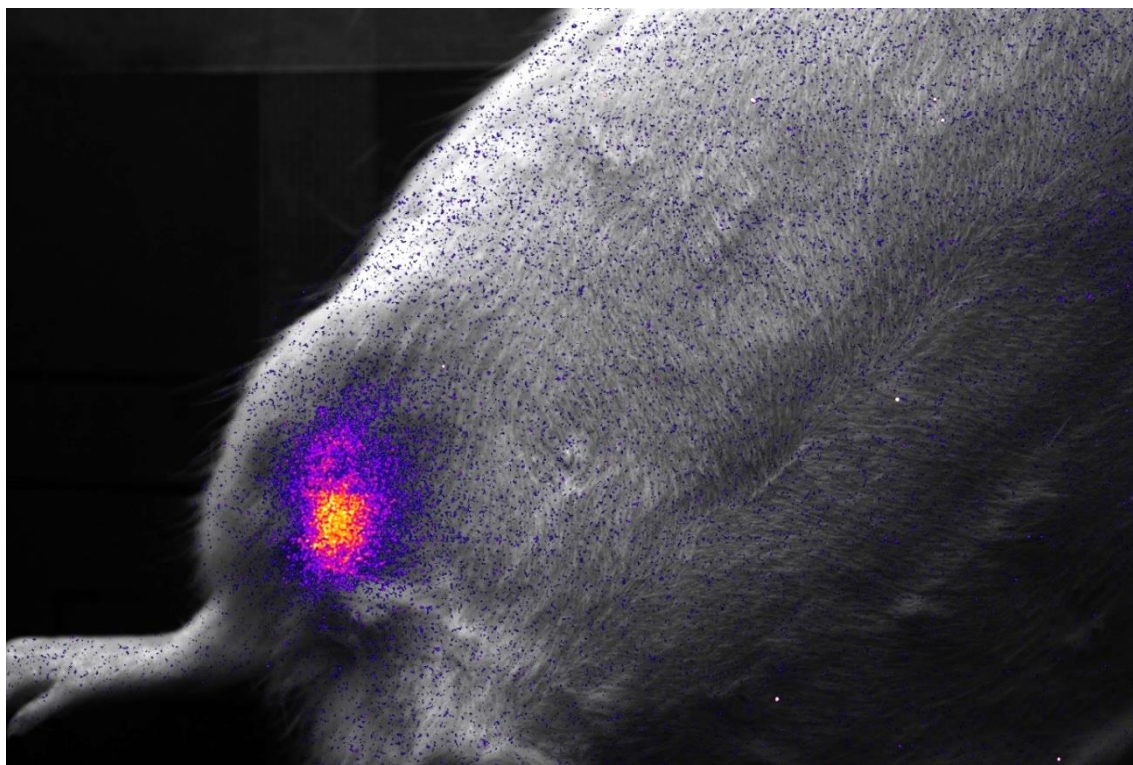
Testování I prokázalo, že kamera BASLER acA2000 – 50gmNIR v této konfiguraci není schopna zachytit bioluminiscenční signál. Zarážející je však chování kamery při samotném měření, kdy se 90 % rozsahu nastavení expozičního času stalo nepoužitelné v důsledku saturace obrazu. Toto shledání bylo konzultováno s českým dodavatelem i německým výrobcem.

4.2 Závěr testování II

Testování II prověřovalo schopnost detekce Sestavy 1 modifikovanou, Sestavy 2 a Sestavy 3. Bylo úspěšně prokázáno, že kamera G2-3200 (Sestava 3) je jako jediná z vtypovaných schopna detekovat a zaznamenat bioluminiscenční signál.

4.3 Testování III

Pro druhé snímání byl aplikován na míru vyrobený držák s vymezením snímacích úhlů, aby bylo možné získat data pro testování rekonstrukčního 3D algoritmu. Byly použity úhly 0°, - 24°, 24°, 12° a - 12°, ale pro poslední dvě polohy nebyl získán odpovídající signál, jelikož bylo už více jak 1 hodinu a 5 minut po injekci luciferinu a došlo k poklesu bioluminiscenčního signálu, tak že její kamera již nedetekovala, ale závěrečné ověření její ještě prokázalo.



Obrázek 2 - kombinace obrazů G2-3200 pod úhlem 0° expozice 1s + expozice 40s dark korekce, lookup fire, průměrovací filtr

4.4 Sumarizace

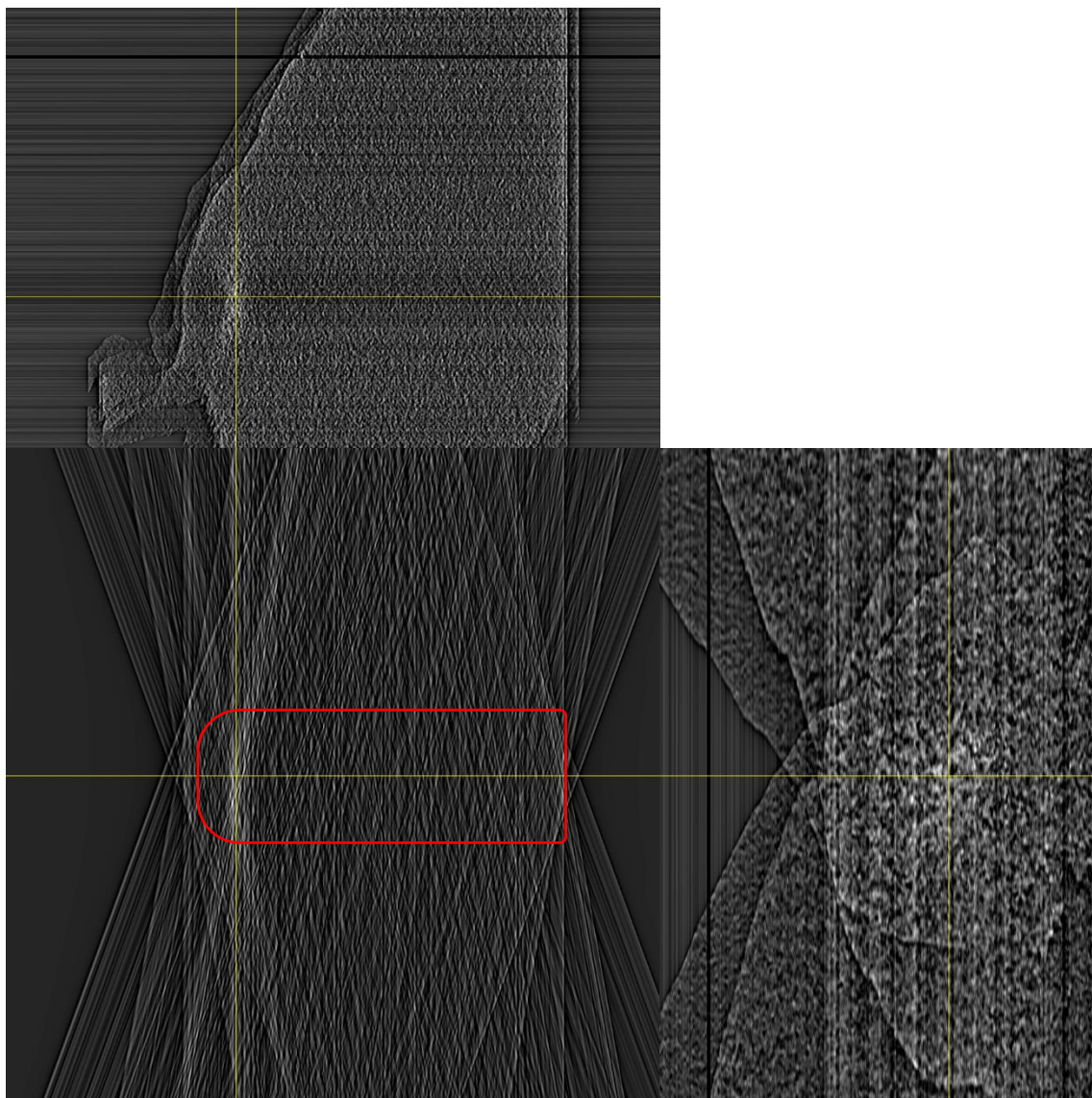
Počet testování i jejich délka byl limitován samotným principem této metody, jelikož jak už bylo řečeno pro vytvoření bioluminiscenčního signálu je zapotřebí živý organismus a jiným způsobem nebylo možné testování kamer provést. Délka měření kromě samotného biologického poklesu exprese luciferinu byla limitována maximální bezpečnou délkou anestezie jedince (subjektu). Při anestezii delší než 1,5 hodiny stoupá riziko úhynu jedince.

5 Rekonstrukční algoritmus

S prvními naměřenými reálnými daty bylo teprve možné směřovat vývoj algoritmu do finální fáze. Oproti testovacím variantám bylo nutné definovat přesně vstupní data, která byla před použitím modifikována a nahrát je odděleně. Dále po dobu testování s reálnou předlohou byla vstupní data do rekonstrukce shodná ze všech směrů. Tento vstup do algoritmu byl upraven, aby vstupní reálná data odpovídala jejich skutečné pozici.

5.1 Projekce výstupu z algoritmu

Výstupem rekonstrukčního algoritmu je *stack* rekonstrukcí uložené ve formátu TIFF. Ten však lze prohlížet v programu Matlab pouze po jednotlivé vrstvě. Otevřením *stacku* TIFF v programu ImageJ umožňuje volné a rychlé listování v jednotlivých vrstvách. Taktéž je možné si *stack* zobrazit v ortogonální projekci, která zobrazí *stack* ze 3 stran: ze předu (XY) tak jak jsou řezy, ze shora (XZ) a boční pohled (YZ). Horní pohled (XZ) odpovídá zobrazovacímu úhlu 0°. Při posunu po vertikální ose je vidět vzájemný posun projekcí z horního pohledu. Zároveň je možné se v rámci jednotlivých projekcí pohybovat a sledovat svoji pozici pomocí žlutého navigačního kříže.



Obrázek 3 - tomografický řez 5 projekční rekonstrukcí s ortogonálními projekcemi

6 Možnosti dalšího využití

Tato metoda má zřejmé nedostatky, už jak bylo popsáno v diplomové práci při vývoji konstrukce a rekonstrukčního algoritmu, a je zde velký prostor pro další vývoj, který se může zaměřit na zkvalitnění akvizice dat, jejich lepší filtraci a následného výpočtu rekonstrukce. Dále by bylo potřeba k vyrobenému samotnému přístroji, tak jak byl popsán v kapitole 7.3 diplomové práce, vybudovat komplexní software, který by zkombinoval všechny funkce v jednom programu: tedy akvizici a úpravu dat, rekonstrukci a projekci (kterou nyní zastupovaly 3 různé programy). V rámci diplomové práce byly definovány konstrukční prvky ke stavbě přístroje, jejíž základním kamenem je kamera konstrukce CCD dostatečně citlivá pro detekci bioluminiscenčního signálu (viz kapitola 8.3 diplomové práce). Ta musí být umístěna do světlotěsné komory vyrobené na míru podle vlastností celé optické soustavy (kamera + objektiv), tak aby se do ní vešel oblouk pro snímání s minimálním poloměrem pracovní vzdálenosti (WD), tak jak je popsáno v kapitole 7 diplomové práce. Jak se ukázalo v průběhu zpracování diplomové práce, není k dispozici vhodný software pro rekonstrukci bioluminiscenčních dat v 3D prostoru. Z toho důvodu byl v programovacím prostředí Matlab vyvinut vlastní rekonstrukční algoritmu, jehož popis se nachází v kapitole 6 a 9.2 diplomové práce.

7 Závěr

V rámci této diplomové práce byly analyzovány možnosti konstrukce zařízení pro trojrozměrné zobrazení optického signálu aplikovatelného ve specifických podmínkách bioluminiscenčního měření. Byl zdokumentován vývoj vlastní konstrukce přístroje, který by takový způsob zobrazování umožňoval. Proto bylo nejprve nutné vytypovat a následně otestovat kamery schopné snímat optický bioluminiscenční signál. Tato problematika se ukázala jako nejsložitější a nejzásadnější pro celou diplomovou práci, protože každou z vytipovaných kamer bylo nutné otestovat na pracovišti IKEM na živých subjektech pro schopnost detekce bioluminiscenčního signálu. Možné kamery byly vytipovány na základě parametrů bioluminiscence a předpokládané citlivosti čipu, aby ji kamery mohly detekovat. Přestože žádná komerčně dostupná kamera není primárně určena k detekování bioluminiscence, podařilo se jednu kameru sestavit na základě průběžného testování.

Při absenci dostupného software pro rekonstrukci optického signálu v trojrozměrném prostoru byl vyvinut vlastní algoritmus v programovacím prostředí Matlab na principu Radonovy transformace. Ten byl v průběhu vývoje testován na umělých datech, poté na datech z reálné předlohy a ve výsledku na reálných datech naměřených kamerou a za pomoci zařízení vlastní konstrukce.

Komplexní řešení diplomové práce umožnilo koncipovat funkční experimentální přístroj schopný detekce a záznamu bioluminiscenčního signálu v trojrozměrném prostoru a jeho matematickou rekonstrukci do tomografických obrazů. Samotná konstrukce přístroje je v diplomové práci prezentována úspěšně aplikovaným testovacím držákem pro možnosti snímání pod různými úhly a 3D modely návrhů laboratorního přístroje vytvořených na základě získaných poznatků při zpracování problematiky. Přínosem diplomové práce je též vytvořený matematický algoritmus, potřebný k rekonstrukci dat v trojrozměrném prostoru a jehož funkčnost byla ověřena.

Na závěry této diplomové práce je možné navázat v dalším výzkumu, který by zpracované poznatky dále rozvinul. Na základě představených 3D modelů z Autodesk Inventor by bylo možné vyrobit experimentální zařízení, ke kterému pak bude s využitím vyvinutého algoritmu a získaných poznatků vytvořeno komplexní programové prostředí zahrnující všechny potřebné softwarové funkce (akvizice, rekonstrukce, projekce) do jednoho programu s grafickým rozhraním.

Literatura

- [1] ŠTOČEK, Jakub. *Konstrukce optického zobrazovače pro trojrozměrné zobrazování*. Liberec, 2017. Diplomová práce. Technická univerzita v Liberci. Vedoucí práce doc. Ing. Daniel Jiráček, Ph.D.

Název	Studentská vědecká a odborná činnost 2017 - Mechatronika
Autor	kolektiv autorů
Vydavatel	Technická univerzita v Liberci
Určeno pro	studenty
Schváleno	čj.RE 15/17, schváleno rektorátem TUL dne 22.5.2017
Vyšlo	v květnu 2017
Vydání	1.
Počet stran	71
Tiskárna	Vysokoškolský podnik Liberec, spol. s r.o., Studentská 1402/2, Liberec
Číslo publikace	55-015-17

ISBN 978-80-7494-337-9



ISBN 978-80-7494-336-2