



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE**

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**POKROČILÉ MIKROREOLOGICKÉ TECHNIKY VE  
VÝZKUMU HYDROGELŮ**

ADVANCED MICRORHEOLOGICAL TECHNIQUES IN THE RESEARCH OF HYDROGELS

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. Petra Kábrtová**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**Ing. Filip Mravec, Ph.D.**

**BRNO 2017**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1110/2016  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Petra Kábrtová**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Filip Mravec, Ph.D.**  
Akademický rok: 2016/17

### Název diplomové práce:

Pokročilé mikrereologické techniky ve výzkumu hydrogelů

### Zadání diplomové práce zadání:

1. Rešerše na pasivně mikrereologické techniky ve studiu koloidních soustav s přihlédnutím k technice fluorescenční korelační spektroskopie a hydrogelům.
2. Na základě rešerše vybrat vhodný postup pro využití FCS v mikrereologické studii fázově separovaného hydrogelu v systému hyaluronan-cetyltrimethylamonium bromid.
3. Porovnat mikrereologické vlastnosti připraveného gelu s roztokem biopolymeru a stanovit vliv molekulové hmotnosti.
4. Na základě výsledků diskutovat použitelnost a omezení této specifické techniky pasivní mikrereologie.

### Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Petra Kábrtová  
student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.  
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce se zabývá využitím techniky fluorescenční korelační spektroskopie pro mikrореologickou charakterizaci hydrogelu v systému hyaluronan-cetyltrimethylamonium bromid. Pro mikrореologické FCS analýzy byly použity fluorescenčně značené částice. V rámci optimalizace metody byla nejdříve na základě analýzy newtonských roztoků glycerolu vybrána nejvhodnější velikost těchto částic. Diskuse byla rovněž zaměřena na vliv změny indexu lomu měřeného roztoku na výsledky analýz. Na základě měření roztoků hyaluronanu bylo následně možné zhodnotit vliv koncentrace a molekulové hmotnosti tohoto biopolymeru na výsledky FCS mikrореologie a porovnat je s výsledky analýz modelových hydrogelů hyaluronanu a CTAB. Na závěr byla diskutována použitelnost a omezení FCS mikrореologie.

## **ABSTRACT**

This diploma thesis deals with the use of fluorescence correlation spectroscopy technique for microrheological characterization of hydrogel in a system of hyaluronate-cetyltrimethylammonium bromide. Fluorescently labelled particles were used for microrheological FCS analysis. To optimize the method the most appropriate size of particles was chosen on the basis of Newtonian glycerol solutions analysis. Among other things, the discussion was focused on the influence of refractive index change of analysed solutions on analysis results. After hyaluronate solutions analysis it was possible to assess the biopolymer concentration and molecular weight impact on the FCS microrheology results, which could then be compared with analysis results of model hydrogels of hyaluronate and CTAB. Finally, usability and limitations of FCS microrheology have been discussed.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

mikrореologie, hydrogely, fluorescenční korelační spektroskopie, hyaluronan, cetyltrimethylamonium bromid

## **KEY WORDS**

microrheology, hydrogels, fluorescence correlation spectroscopy, hyaluronate, cetyltrimethylammonium bromide

KÁBRTOVÁ, P. *Pokročilé mikrореologické techniky ve výzkumu hydrogelů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 63 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D..

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

### *Poděkování:*

*Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D. a konzultantovi Ing. Jakubu Mondekovi za obětavou spolupráci a podnětné připomínky. Taktéž děkuji své rodině a blízkým přátelům za podporu nejen při studiu, ale i v životě.*

## OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část .....	8
2.1	Hydrogely .....	8
2.1.1	Využití hydrogelů v medicíně .....	8
2.1.1.1	Syntetické hydrogely .....	8
2.1.1.2	Biohydrogely .....	9
2.2	Hyaluronan.....	9
2.2.1	Fyziologické funkce a vlastnosti hyaluronanu .....	10
2.2.2	Hyaluronanové hydrogely .....	11
2.2.2.1	Hydrogely vzniklé chemickým zesítním .....	11
2.2.2.2	Hydrogely vzniklé fyzikálním zesítním .....	11
2.3	Reologie .....	13
2.3.1	Reologie newtonských kapalin.....	13
2.3.2	Viskozita.....	14
2.3.3	Komplexní reologie neneutronských kapalin .....	15
2.3.4	Viskoelasticita .....	16
2.3.5	Reologie roztoků polymerů a surfaktantů .....	17
2.4	Mikroreologie .....	18
2.4.1	Brownův pohyb .....	18
2.4.2	Mikroreologické experimenty a techniky .....	19
2.4.2.1	Dynamický rozptyl světla (DLS) .....	20
2.4.2.2	Difúzní vlnová spektroskopie (DWS) .....	21
2.4.2.3	Optické pinzety .....	22
2.4.2.4	Video-mikroreologie (částicová mikroreologie).....	22
2.4.3	Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS).....	23
2.4.3.1	Princip fluorescence .....	23
2.4.3.2	Franck–Condonův princip.....	25
2.4.3.3	Doba života a kvantový výtěžek fluorescence .....	26
2.4.3.4	Princip FCS .....	27
2.4.3.5	Limitace FCS techniky .....	29
2.4.3.6	FCS mikroreologie .....	29
3	Současný stav řešené problematiky .....	31

3.1	Video-mikroreologie koloidních soustav .....	31
3.2	DLS a DWS mikroreologie koloidních soustav .....	32
3.3	FCS mikroreologie koloidních soustav .....	32
4	Koncept práce .....	34
5	Experimentální část .....	35
5.1	Materiály .....	35
5.2	Příprava vzorků .....	36
5.2.1	Roztoky glycerolu a deionizované vody .....	36
5.2.2	Roztoky hyaluronanu sodného .....	36
5.2.3	Hydrogely hyaluronanu sodného a CTAB .....	37
5.3	Měření a vyhodnocování dat .....	37
5.3.1	Přístroje a programy .....	37
5.3.2	Měření a vyhodnocování FCS dat .....	37
6	Výsledky a diskuse .....	40
6.1	Výběr vhodné velikosti fluorescenčních částic .....	40
6.2	Vliv změny indexu lomu roztoku na výsledek mikroreologické FCS analýzy .....	43
6.3	Vliv koncentrace a molekulové hmotnosti HA na mikroreologii roztoku .....	44
6.4	Vliv molekulové hmotnosti HA na mikroreologii hydrogelu .....	46
7	Závěr .....	49
8	Seznam použitých zdrojů .....	51
9	Seznam použitých symbolů a zkratk .....	58
10	Seznam příloh .....	60
11	Přílohy .....	61

# 1 ÚVOD

Hydrogelové systémy patří v současnosti mezi nejčastější témata výzkumu s cílem vyvinout nové biokompatibilní a biodegradabilní nosiče léčiv či scaffoldy. I když se prvotní výzkum zaměřoval ryze na syntetické hydrogely a jejich deriváty, uplatnily se v tomto směru i hydrogely přírodního původu. Mezi jejich nejvýznamnější zástupce patří například alginát, chitosan nebo hyaluronan. Protože je pro účely použití hydrogelu ve farmacii (např. jako výše zmíněný nosič léčiv) nezbytné prozkoumat a popsat daný hydrogel co nejdetailněji, vyvstává potřeba nalézt takovou analytickou techniku, kterou by bylo možné pro tak detailní charakterizaci použít.

Jednou z technik splňující takové požadavky by mohla být právě fluorescenční korelační spektroskopie (FCS). Ta patří spolu s dynamickým rozptylem světla (DLS), difúzní vlnovou spektroskopií (DWS) a řadou metod částicové video-mikroreologie mezi tzv. pasivní mikroreologické techniky. Tyto techniky jsou schopné poskytnout informace charakterizující dané prostředí. Mezi tyto informace se řadí například rychlost difúze nebo aktivního transportu. K tomu potřebná data jsou získávána prostřednictvím analýz tepelně indukovaných fluktuací ve vzorku umístěných sond.

Fluorescenční korelační spektroskopie byla již použita ke studiu procesů probíhajících na mezifázovém rozhraní i k měření koloidních systémů. Unikum této techniky spočívá v její citlivosti na signály jednotlivých sond umístěných v měřeném vzorku a v miniaturních rozměrech sledovaného objemu vzorku. Právě díky tomu lze s vysokou přesností a citlivostí charakterizovat různé heterogenity vyskytující se ve vzorku a jejich lokální dynamiku.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Hydrogely

Hydrogely jsou ve vodném prostředí nabobtnalé polymery, které udržují zřetelnou třídídimenzionální strukturu. Jejich klasifikace [1] může být založena na:

- *původu polymeru*: přírodní, syntetické nebo hybridní hydrogely (složené ze syntetických a přírodních molekul),
- *povaze zesíťení*: kovalentní nebo fyzikální gely,
- *povaze sítě*: homopolymer, kopolymer, prostupující hydrogely nebo hydrogely s dvojitým zesíťením,
- *fyzikální struktura*: homogenní (opticky transparentní), mikroporózní a makroporózní hydrogely,
- *jejich osudu v organismu*: degradabilní a nedegradabilní hydrogely.

Díky vysokému obsahu vody je většina hydrogelových struktur vysoce biokompatibilní. Množství vody v rovnovážném stavu nabobtnání představuje rovnováhu mezi termodynamickou směšovací silou (hydratace) a stahovací silou třídídimenzionální sítě. Směšovací síla závisí hlavně na hydrofilnosti polymerního skeletu (charakterizována interakčním parametrem  $\chi$ ) a na stahovací síle působící na množství příčných vazeb spojujících polymerní řetězce do třídídimenzionální sítě [2]. Proto existuje široká škála možností designu přípravy hydrogelů rozdílných struktur a vlastností.

Tradiční metody syntézy hydrogelů byly omezené v možnosti kontroly detailní hydrogelové struktury. Nicméně nové přístupy založené na genetickém inženýrství a hybridních hydrogelech celý tento výzkum výrazně posunuly. Tyto techniky umožňují například vložení biorozpoznávacích skupin do struktury makromolekul, což ovlivňuje samouspořádávání do precizně definovaných třídídimenzionálních struktur. Výsledkem je, že se aplikační potenciál hydrogelů rozšířil z tradičních oblastí (biomateriály a nosičové systémy) i do dalších odvětví, jako je mikrofluidika a nanotechnologie [3].

#### 2.1.1 Využití hydrogelů v medicíně

##### 2.1.1.1 Syntetické hydrogely

Výzkum designu hydrogelů vhodných pro bezpočet medicínských aplikací byl započat ve stejné době jako práce na měkkých kontaktních čočkách [3]. Bylo studováno použití hydrogelů v oftalmologii jako mikrokapilární dreny při glaukomu [4], výplně pro obnovení odchlípnuté sítnice [5] nebo výplně po enukleaci (extrakce očního bulbu) [6]. Nejen tyto aplikace byly hnací silou pro detailní studium vztahu mezi fyzikální a chemickou strukturou zesíťených hydrofilních polymerů a jejich biokompatibilitou. Výsledky tohoto studia byly převedeny do klinické praxe – úspěšným příkladem je použití hydrogelů založených na HEMA (2-hydroxyethylmethakrylátu) v rhinoplastice. HEMA-hydrogely vykazují dlouhodobou biokompatibilitu a poskytují výborné kosmetické výsledky [7].

Brzo po objevu hydrogelů byla zkoumána možnost jejich použití také jako nosičové systémy pro antibiotika nebo léčiva na rakovinu [8]. Počáteční studie se zaměřovaly na polymery HEMA (2-hydroxyethylmethakrylát), pozdější studie pak na HEMA kopolymery, polyakrylamidy nebo polyvinylalkohol. Na míru fyziologickým potřebám

byly připraveny i další typy hydrogelů. Například hydrogely na bázi kopolymerů N-(2-hydroxypropyl)methakrylamidu (HPMA) byly použity jako nosičové systémy pro léky na rakovinu [9], [3].

### 2.1.1.2 Biohydrogely

V poslední době je čím dál větší pozornost věnována i hydrogelům z biopolymerů. Hydrogely přírodního původu jsou většinou biokompatibilní a podporují aktivitu buněk. I přes nižší mechanickou odolnost, možnost vyvolání imunitní odpovědi nebo obtížně proveditelné modifikace struktur zůstávají nadále biomateriály velmi slibnou komponentou hydrogelů, a to především díky jejich bioaktivitě a přirozenému výskytu v lidském těle [10].

Mezi často řešenou problematiku patří například léčba diabetických vředů na nohou. Pro krytí těchto ran se používají i obvazy na bázi alginátu s vysokou absorpční schopností. Alginát je v tomto případě často ve formě vápenaté soli a mnohdy je kombinován s kolagenem. Při kontaktu s povrchem rány tvoří alginát gel, který může být následně odstraněn spolu s obvazem nebo může být z rány vypláchnut pomocí sterilního fyziologického roztoku. Kombinací s druhotným viskózním polštářkem dochází ke zvýšení absorpční schopnosti [11].

V biomedicínských aplikacích mají důležitou roli také materiály založené na chitosanu, a to díky jejich netoxické povaze, biokompatibilitě a biodegradabilitě. Zkoumány byly například injektovatelné chitosanové hydrogely s disodnou solí glycerolfosfátu. Tyto hydrogely byly dokonce shledány jako ideální třída polymerních materiálů pro použití v biomedicínských aplikacích. Například tým *Dang a spol.* připravili hydrogel rozpouštěním chitosanu v kyselině mléčné. Tento hydrogel vykazoval nižší teplotu gelace (oproti jiným rozpouštědlům), což umožňovalo vytvořit umělý výstupek kůže v místě vpichu po injekci do podkoží u myši [12].

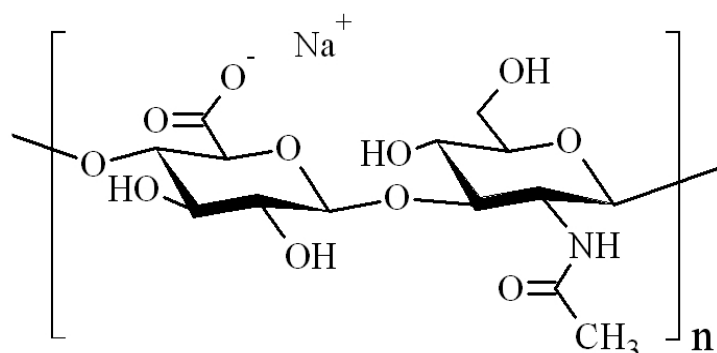
Možnost použití hyaluronanových hydrogelů pro redukci srůstů šlach flexorů po poranění u králíků zkoumal tým *Liu a spol.* Zjistili, že film ze zesíťného derivátu hyaluronanu napomohl zhojení šlach bez tvorby fibrózy v průběhu tří týdnů po operaci [13]. Makromer methakrylátu kyseliny hyaluronové zesíťné tetramethylethylendiaminem (TEMED) a peroxodisíranem amonným byl aplikován na model infarktu myokardu za účelem ligace sestupné a diagonální koronární artérie. Výsledkem bylo výrazné omezení šíření infarktu a zlepšení funkce srdce [10], [14].

## 2.2 Hyaluronan

Hyaluronan (sůl kyseliny hyaluronové) je biokompatibilní, lineární, nerozvětvený mukopolysacharid, který se obecně vyskytuje ve všech pojivových tkáních těla. Jedná se o přirozenou součást extracelulární matrix, očního sklivce a kloubní synoviální tekutiny [15].

Hyaluronan (HA) je hydrofilní nesulfátovaný glykosaminoglykan složený z opakujících se disacharidových jednotek D–glukuronové kyseliny a N–acetyl–D–glukosaminu střídavě vázaných přes  $\beta$ –(1→3) a  $\beta$ –(1→4) glykosidické vazby (viz **Obrázek 1**). Je syntetizován třemi membránově vázanými HA–syntázami v plazmatické membráně. Bezpočet biologických funkcí hyaluronanu vyplývá z univerzální povahy jeho biosyntézy a organizace. Ta je pružně regulována třemi isoformami HA–syntáz, které se od sebe liší svými

enzymatickými vlastnostmi, mírou schopnosti elongace HA řetězce, rychlostí biosyntézy a expresními předlohami [16].



*Obrázek 1* Struktura hyaluronanu sodného

### 2.2.1 Fyziologické funkce a vlastnosti hyaluronanu

Hyaluronan je v přirozené formě vysokomolekulární (1–2 miliony Da) viskoelastická sloučenina. Biologická aktivita hyaluronanu se liší v závislosti na jeho molekulové hmotnosti. Nízkomolekulární hyaluronan má vyšší angiogenní aktivitu než vysokomolekulární. Na základě toho by teoreticky bylo možné regulovat biologické funkce při regeneraci tkání *in vivo* použitím hyaluronanu s různou molekulovou hmotností jako stavebního materiálu pro scaffoldy [17].

Jak už bylo řečeno, hyaluronan má několik biologických funkcí, které jsou nezbytné například pro embryogenezi, diferenciaci, migraci, proliferaci nebo intercelulární komunikaci mezi různými typy buněk. Poslední dobou se také hromadí důkazy o tom, že má hyaluronan důležitou roli v mnoha aspektech biologie kmenových buněk. Zvýšená syntéza hyaluronanu během diferenciaci embryonálních kmenových buněk je totiž spojena s epitel–mezenchymálním přechodem. Ukázalo se také, že syntéza hyaluronanu a jeho uspořádání do pericelulárního obalu slouží u mezenchymálních kmenových buněk jako ochrana pro udržení kmenové povahy buněk. Této vlastnosti se využívá například při vývoji hydrogelových scaffoldů založených na hyaluronanu pro využití v tkáňovém inženýrství a při vaskulární regeneraci [16].

Interakce hyaluronanu s buněčnými HA–vazebnými proteiny jsou důležité nejen pro buněčnou adhezi, migraci, proliferaci a léčení ran, ale stejně tak mají velký význam u zánětlivých procesů a rakovinných metastáz. Hyaluronan neobsahuje proteiny specifické pro daný organismus, proto po implantaci nespouští imunitní odpověď. I díky absenci imunogenicity se proto z hyaluronanu stává atraktivní stavební jednotka pro návrhy nových biomateriálů.

Další vlastností, která z hyaluronanu dělá perspektivního kandidáta pro inženýrství nových biomateriálů, je jeho lubricita a neadhezivní povaha. Ví se, že hyaluronan pokrývá a odděluje většinu povrchu tkání, které se vzájemně stýkají (nachází se ve vysoké koncentraci v synoviální tekutině). Studie o využití hyaluronanu a jeho hydrogelů při břišních, gynekologických, srdečních a muskuloskeletálních chirurgických procedurách prokázaly, že

hyaluronan redukuje postoperační adheze [18]. Také u materiálů, na kterých byl nanesen povlak hyaluronanu, byla pozorována snížená buněčná adheze k intraokulárním čočkám a rovněž došlo ke snížení růstu bakteriálního biofilmu [19], [20].

## 2.2.2 Hyaluronanové hydrogely

### 2.2.2.1 Hydrogely vzniklé chemickým zesítním

I přes excelentní mechanické a biochemické vlastnosti polymerů hyaluronanu v přirozeném stavu byly zkoumány také jeho možné chemické modifikace. Pro dosažení požadovaných vlastností výsledného biomateriálu bylo zkoumáno chemické zesítnění HA polymerů přes inter- nebo intra-funkční skupiny jejich bočních řetězců, jako jsou hydroxylové a karboxylové skupiny. Těmito vlastnostmi může být např. zvýšená odolnost vůči biodegradaci nebo potřeba vyrobit medicínské zařízení v požadované formě, jakou je např. hydrogel [21].

Chemicky modifikovaný hyaluronan může být transformován do mnoha fyzikálních forem: viskoelastické roztoky, měkké nebo tuhé hydrogely, elektricky spřádaná nanovlákna, netkané síťoviny, makroporózní a vláknité houby, pružné listy nebo nanočásticové tekutiny. Mnoho těchto forem vzniká na základě chemického zesítnění přes volné reaktivní skupiny, a to adicí, kondenzací nebo radikálovou polymerizací. Tyto modifikace často cílí na tři funkční skupiny: karboxylová skupina glukuronové kyseliny, primární a sekundární hydroxylové skupiny a *N*-acetyl. U karboxylátů dochází nejčastěji k reakci s karboimidem, k esterifikaci nebo amidaci. Hydroxyly podléhají etherifikaci, esterifikaci a zesítnění prostřednictvím divinylsulfonu nebo bis-epoxidu.

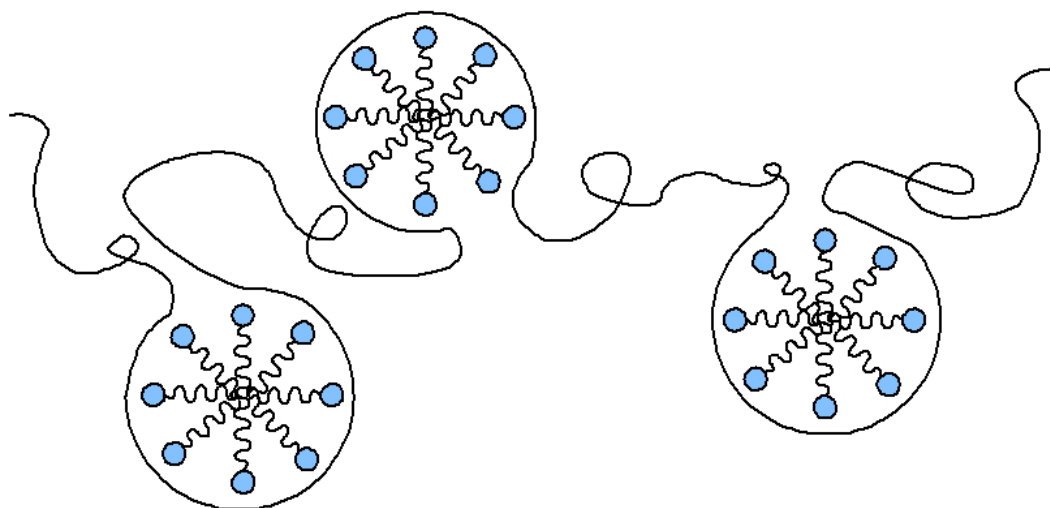
Klinické produkty pro buněčnou terapii a regenerativní medicínu vyžadují takovou povahu zesítnění, která je kompatibilní s enkapsulací buněk nebo injekční aplikací do tkání. Injektovatelné klinické biomateriály musí splňovat různá marketingová, regulační a finanční omezení, aby vznikl produkt, který může být schválen, uveden na trh a používán lékaři. Mnoho hydrogelů založených na hyaluronanu tato kritéria splňuje a je schopno být nosičovým systémem pro buňky a terapeutické látky pro léčbu a regeneraci tkání [22].

### 2.2.2.2 Hydrogely vzniklé fyzikálním zesítním

V posledních letech se čím dál víc využívá směsí obsahujících surfaktant a polymer, a to především kvůli jejich významu v různých průmyslových aplikacích v oblasti kosmetiky, potravinářství, farmacie, detergentů atd. Obecně se polymery do systémů přidávají pro kontrolu reologie, stability systému nebo pro úpravu povrchové adsorpce. Interakce ve směsi vycházejí z hydrofobních, dipólových a elektrostatických sil. Přitažlivé elektrostatické síly jsou v tomto systému opačně nabitého polymeru a surfaktantu velmi důležité.

Surfaktanty v přítomnosti opačně nabitého polyelektrolytu začínají tvořit agregáty (viz **Obrázek 2**) s daným polyelektrolytem v okamžiku, kdy koncentrace surfaktantu překročí svou kritickou agregační koncentraci. Agregace polyelektrolytu a opačně nabitého surfaktantu závisí především na vlastnostech surfaktantu a polyelektrolytu. Vytvoření komplexu polyelektrolyt–surfaktant vychází z působení elektrostatických interakcí a současné stabilizace pomocí hydrofobních interakcí nepolárních částí molekul surfaktantu. V tomto procesu je protiion polyelektrolytu nahrazen iontem surfaktantu. Vazebné místo polyelektrolytu a surfaktantu tak v konečném důsledku tvoří neutrální iontový pár. Velká

elektrostatická přitažlivost v tomto asociačním procesu vytváří energeticky velmi výhodnou vazbu závislou mimo jiné na hustotě iontového náboje. K této vazbě proto dochází v systémech s velmi nízkou koncentrací volného surfaktantu.



**Obrázek 2** Zjednodušené schéma systému polymer–surfaktant v konformaci tzv. perlového náhrdelníku; záporně nabitě polymerní vlákno (reprezentující hyaluronan) se prostřednictvím elektrostatických interakcí váže s kladně nabitými micelami kationického surfaktantu

Konformační vlastnosti a dynamické chování polyelektrolytových řetězců jsou dány stupněm ionizace, koncentrací a distribucí protiiontu. Ve vodném roztoku jsou důležité rovněž solvatační vlastnosti a hydrofobní interakce, protože silně ovlivňují konformační vlastnosti polymeru. Protiionty mohou být solvatovány různými způsoby, a proto ovlivňují solvataci polymeru.

Kvůli přítomnosti silných elektrostatických interakcí v opačně nabitém systému polyelektrolytu dochází ke vzniku nepravidelné distribuce protiiontů v roztoku. Koncentrace protiiontů se v blízkosti polyelektrolytu výrazně zvyšuje a se vzdáleností naopak rapidně klesá. Nepravidelná distribuce protiiontů rovněž působí na monomerní protiionty surfaktantu přítomné v polyelektrolytovém roztoku. Hlavním důvodem vazby molekul surfaktantu na opačně nabitý polyelektrolyt je elektrostatická stabilizace micel surfaktantu [23].

Surfaktanty jsou často využívány při formulaci přípravků pro zlepšení rozpustnosti a biologické dostupnosti aktivních látek. Příkladem využití může být kombinace kyseliny hyaluronové (hyaluronanu), která je silně hydrofilní, a některých cytotoxických látek, které jsou naopak hydrofobní. Interakce mezi anionickým polysacharidem hyaluronanem sodným a kationickými surfaktanty byly již studovány pomocí NMR spektroskopie [24], měření viskozity [25], povrchového napětí a vodivostních metod [26]. Tyto studie mimo jiné shledaly, že asociaci ovlivňuje mnoho faktorů, a to včetně délky řetězce surfaktantu, molekulové hmotnosti polymeru nebo koncentrace elektrolytu [27].

Interakce mezi hyaluronanem a kationickými surfaktanty mají ve sféře medicínských aplikací obrovský význam nejen jako potenciální hydrogelové nosiče léčiv. Například **Taeusch a spol.** zkoumali interakce hyaluronanu s plicními surfaktanty. Při akutním zranění

plic totiž mohou inaktivující látky narušovat přenos (adsorpci) plicních surfaktantů na mezifázové rozhraní vzduchu a vodní vrstvy, která tvoří vnitřní povlak plicních sklípků. Tým mimo jiné zjistil, že hyaluronan výrazně zvýšil rychlost a míru adsorpce surfaktantu na mezifázové rozhraní. Hyaluronan byl v tomto případě efektivní již při nízkých koncentracích a navíc nezvyšoval agregaci plicního surfaktantu [28].

Nejen z uvedených příkladů vyplývá, že systémy polymer–surfaktant zastoupené hyaluronanem a kationickým surfaktantem vytváří velmi zajímavé možnosti využití v medicínských aplikacích, a proto by bylo vhodné vlastnosti a chování těchto systémů dále zkoumat.

## 2.3 Reologie

Reologie se zabývá studiem toku a deformace materiálu, na který je aplikována síla. Reologická měření se provádí pomocí reometrů a lze je použít pro všechny druhy materiálů – tekutiny (např. zředěné roztoky polymerů a surfaktantů), polotuhé látky (pasty a krémy), polymerní taveniny i pevné polymery (asfalt). Reologické vlastnosti lze v makroměřítku změřit pomocí mechanického reometru z deformace vzorku, v mikroměřítku pak pomocí mikrokapilárního viskozimetru nebo optických metod (mikroreologie).

Mnoho běžně užívaných materiálů vykazuje komplexní reologické vlastnosti. Jejich viskozita a viskoelastičita se může lišit v závislosti na aplikovaných vnějších podmínkách, jakými jsou například stres, napětí, časový horizont nebo teplota. Vnitřní proměnné vzorku, jako např. koncentrace proteinu a jeho stabilita nebo formulace biofarmaceutik, jsou rovněž klíčovými faktory určujícími reologické vlastnosti.

Reologické vlastnosti mají dopad na všechny fáze využití materiálu skrze několik průmyslových odvětví – od vývoje formulace a stability materiálu přes jeho zpracování až po uvedení výrobku na trh. Volba vhodného reometru pro měření těchto vlastností často závisí na příslušných deformačních rychlostech, časových měřítkách a nelze opomenout velikost vzorku a jeho viskozitu [29].

### 2.3.1 Reologie newtonských kapalin

Různé systémy reagují na smykovou deformaci rozdílně, například u tekutiny (kapalina nebo plyn) dojde k viskóznímu toku, u pevného tělesa může dojít k jeho elastické deformaci. V případě tekutiny se jedná o nevratnou deformaci, zatímco u pevného tělesa je deformace vratná. Uvažujeme-li laminární tok a nejjednodušší, tzv. **newtonské** chování, lze s ohledem na **Obrázek 3** definovat následující:

- smykové napětí  $\tau$ , které je dáno podílem smykové síly  $F$  a plochy  $A$ :

$$\tau = \frac{F}{A} [\text{Pa}] \quad (1)$$

- smyková deformace  $\gamma$ :

$$\gamma = \frac{dx}{dy} \quad (2)$$

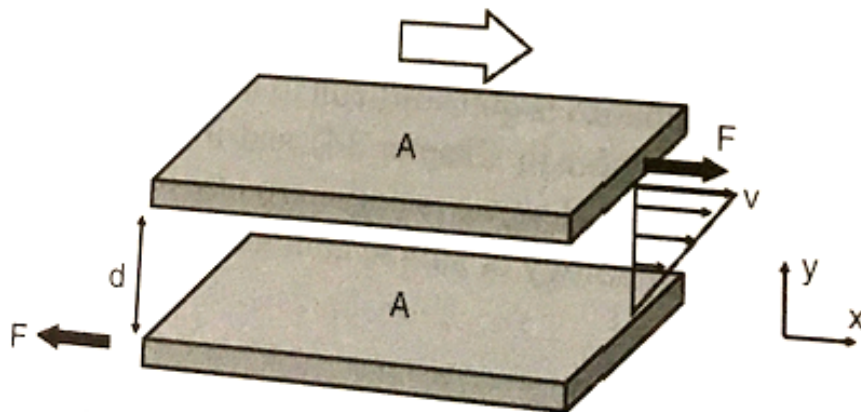
- průtoková rychlost  $v$ :

$$v = \frac{dx}{dt} \quad (3)$$

- deformační rychlost  $D$ :

$$D = \frac{dv}{dy} = \frac{d}{dt} \left( \frac{dx}{dy} \right) [\text{s}^{-1}] \quad (4)$$

Pro dvě paralelní desky, jejichž vzájemná vzdálenost  $d$  je konstantní, se průtoková rychlost  $v$  ve směru  $y$  lineárně mění. Deformační rychlost  $D$  zůstává stejná ve všech vrstvách.



**Obrázek 3** Dvě paralelní desky o ploše  $A$  jsou umístěny na  $y = 0$  a  $y = d$ . Prostor mezi deskami je vyplněn tekutinou, na kterou působí smyková deformace. Horní deska se vůči dolní desce pohybuje rychlostí  $v$ . Délky šipek mezi deskami jsou úměrné lokální rychlosti  $v$  tekutině [30].

Pro nejjednodušší případ, tzv. **newtonskou** kapalinu, je smykové napětí  $\tau$  přímo úměrné deformační rychlosti  $D$ . Konstantou úměrnosti je v tomto případě dynamická viskozita  $\eta$ :

$$\frac{F}{A} = \eta \frac{dv}{dy} \approx \tau = \eta D \quad (5)$$

Jednoduché kapaliny jsou většinou newtonské, zatímco koloidní systémy, disperze nebo roztoky mohou ale nemusí být newtonské. Reologická povaha se může také měnit s koncentrací a deformační rychlostí [30].

### 2.3.2 Viskozita

Viskozita, která je definována jako odpor tekutiny vůči deformaci, se může v rámci různých materiálů významně lišit. Čím je viskozita vyšší, tím větší je třeba smykové napětí pro určitý smykový tok.

Viskozitu lze měřit prostřednictvím několika experimentů, které jsou vhodné pro různé systémy a účely. Pomocí kapilárního (Ostwaldova) viskozimetru lze stanovit viskozitu na základě naměřených hodnot času průtoku kapaliny. Čas průtoku  $t$  závisí na viskozitě  $\eta$

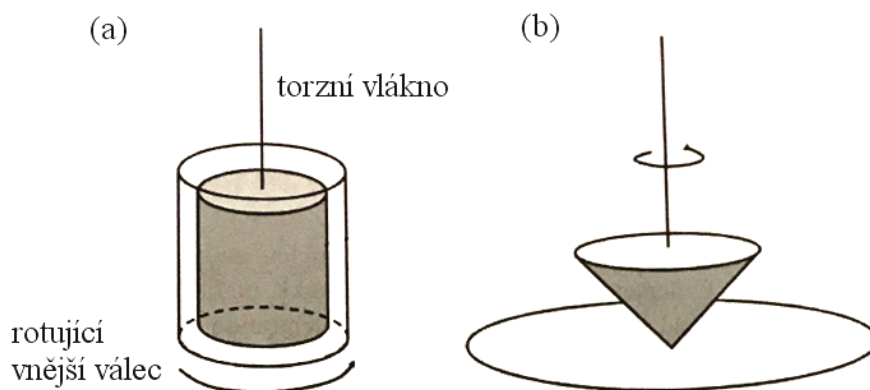
a stejně tak na hustotě kapaliny  $\rho$ . Přístroj je obecně kalibrován měřením kapaliny o známé viskozitě. Následující vztah se uplatňuje pro dvě kapaliny – 1 a 2:

$$\frac{\eta_1}{\eta_2} = \frac{\rho_1 t_1}{\rho_2 t_2} \quad (6)$$

U zředěných roztoků nebo disperzí se hustota roztoku a čistého rozpouštědla neliší, proto platí:

$$\frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t}{t_0} \quad (7)$$

V koncentrických válcových a rotačních viskozimetrech v uspořádání kužel–deska je viskózní tekutina uzavřena v prostoru mezi dvěma povrchy (viz **Obrázek 4**). Jak se jeden z nich pohybuje, například rotací vnějšího válce u koncentrického válcového viskozimetru, viskózní odpor se přenáší tekutinou a vytváří na stacionárním povrchu točivý moment, který souvisí s viskozitou. Změnou šířky prostoru nebo velikosti úhlové rychlosti lze měnit deformační rychlost [30].



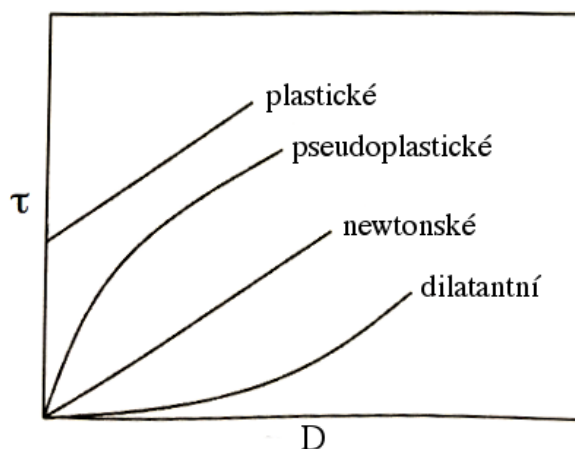
**Obrázek 4** Schematické znázornění (a) koncentrického válcového viskozimetru a (b) viskozimetru kužel–deska [30]

### 2.3.3 Komplexní reologie neneutonských kapalin

Jak už bylo uvedeno výše, u **newtonských** kapalin je smykové napětí  $\tau$  přímo úměrné deformační rychlosti  $D$ . Pro koloidní systémy však tato jednoduchá úměra neplatí, proto zde hovoříme o tzv. **neneutonských** kapalinách. Můžeme však stanovit zdánlivou viskozitu  $\eta_{app}$ :

$$\tau = \eta_{app} D \quad (8)$$

Zdánlivá viskozita se obecně mění s časem, při dané deformační rychlosti (nebo smykovém napětí). Proto zdánlivá viskozita závisí na historii roztoku. Závislost smykového napětí na deformační rychlosti je pro různé systémy rozdílná (viz **Obrázek 5**).



**Obrázek 5** Viskozita u newtonských a nenewtonských systémů [30]

Pro **pseudoplastické** systémy zdánlivá viskozita klesá se vzrůstající deformační rychlostí. U **plastických** systémů je nutné vynaložit určité smykové napětí předtím, než kapalina začne téct. **Dilatantní** systémy charakterizuje zvyšující se zdánlivá viskozita se zvyšující se deformační rychlostí.

Nenewtonské chování může být projevem několika mechanismů. U zředěných systémů se může objevit jev zvaný shear thinning, který může nastat v důsledku orientace částic nebo změn v konformaci polymerních molekul přítomných v roztoku. Proto když je deformační rychlost větší než rychlost termální reorientace částic, jsou částice orientovány ve směru proudění. Koncentrované systémy vykazují shear thinning tehdy, když je deformační rychlost větší než rychlost ustanovení rovnovážných suprapartikulárních struktur. U polymerních roztoků shear thinning silně závisí na koncentraci [30], [31].

#### 2.3.4 Viskoelasticita

V případě jednoduchých newtonských kapalin je smykové napětí přímo úměrné deformační rychlosti. Podrobíme-li pevné těleso napětí, dojde spíše k jeho deformaci, než aby začalo téct. Smykové napětí je tedy přímo úměrné spíše smykové deformaci než deformační rychlosti:

$$\tau = G^* \frac{dx}{dy} \quad (9)$$

kde  $G^*$  [Pa] je tzv. storage modulus (komplexní modul). Pro řadu systémů polymer–surfaktant je charakteristické, že současně poskytují oba typy odezev – jsou viskózní i elastické, tedy viskoelastické.

Viskoelasticitu lze zkoumat pomocí oscilačních měření. Vnější válec (nebo deska) sinusoidně osciluje a točivý moment zaznamenaný vnitřním válcem se měří jako funkce času. V případě elastických těles je smykové napětí nejvyšší při maximální deformaci, tzn. v krajních bodech oscilace. Pokud na elastické těleso žádná deformace nepůsobí,

smykové napětí je rovno nule. S deformací se smykové napětí fázově mění, a to ve chvíli, kdy je fázový úhel  $\delta$  nulový. U viskózních kapalin je smykové napětí nejvyšší v maximu deformační rychlosti. Proto k tomuto dochází při nulové deformaci. V maximu deformace jsou smykové napětí a deformační rychlost nulové. Smykové napětí je proto vzhledem k deformaci mimo fázi a fázový úhel je  $90^\circ$ .

U viskoelastických kapalin má fázový úhel střední hodnotu  $0^\circ < \delta < 90^\circ$ . Je charakterizován fázovou a mimofázovou částí modulu:

- shear storage modulus (akumulovaný modul) – elastická část:

$$G' = G^* \cos \delta \quad (10)$$

- shear loss modulus (ztrátový modul) – viskózní část:

$$G'' = G^* \sin \delta \quad (11)$$

Viskoelastické systémy jsou taktéž charakterizovány těmito parametry:

- dynamický smykový modul (dynamic shear modulus)  $G$ :

$$G = \left[ (G')^2 + (G'')^2 \right]^{1/2} \quad (12)$$

- dynamická viskozita  $\eta$ :

$$\eta = \frac{G}{\omega} = \frac{\left[ (G')^2 + (G'')^2 \right]^{1/2}}{\omega} \quad (13)$$

Limitujícím typem chování je elastický gel a newtonská kapalina. U elastického gelu dominuje elastická složka, proto je  $G' \gg G''$  a  $G'$  je nezávislý na frekvenci  $\omega$ . Dynamická viskozita  $\eta$  se blíží  $G'/\omega$ , což je nepřímo úměrné frekvenci. U newtonských systémů dominuje viskózní složka a (dynamická) viskozita je na frekvenci nezávislá [30].

### 2.3.5 Reologie roztoků polymerů a surfaktantů

Viskozita polymerních roztoků závisí na několika faktorech – molekulární hmotnost, koncentrace, podmínky rozpouštění nebo extenze molekul polymeru. U polyelektrolytů je extenze polymerních molekul dána entropií protiiontu. Proto má na extenzi velký vliv jak přítomnost solí, tak koncentrace polymeru. Podle elektrostatického screeningu polyionty zaujímají v přítomnosti solí nebo při vyšší koncentraci polyiontu kompaktnější konformaci, což vysvětluje pokles redukované viskozity roztoku [30].

Samospořádávání surfaktantu do sférických agregátů ovlivňuje viskozitu roztoku jen velmi slabě. Na druhé straně tvorba válcových nebo vláknitých agregátů je doprovázena vysokými nárůsty viskozity. V případě sférických agregátů se při nízké koncentraci surfaktantu viskozita roztoku řídí Einsteinovou rovnicí. U vyšších koncentrací se používají modely, které berou na zřetel shlukování a další mezičásticové interakce. Dramatický nárůst viskozity s koncentrací je pak způsoben kombinací tvorby micel a jejich vzájemnými interakcemi. Takovéto roztoky jsou typicky viskoelastické.

Reologické chování směsných roztoků polymer–surfaktant je stejně jako u polymerních roztoků obecně silně závislé na koncentraci polymeru. Nicméně u těchto systémů lze

pozorovat mnohem razantnější změny. Směsné roztoky polymeru a surfaktantu jsou typicky viskoelastické. U některých systémů může při zvyšování teploty dojít ke změně dominantního efektu z viskózního na elastický. Tento jev je typický pro neiontové polymery, u kterých se vzrůstající teplotou klesá jejich polarita [30], [32]. U neiontových polymerů asociujících s iontovým surfaktantem se redukovaná viskozita zvyšuje s molekulovou hmotností polymeru a zvláště pak s vazbou surfaktantu. Jak se iontový surfaktant navazuje, je polymer efektivně přeměňován na polyelektrolyt s více rozbalenou konformací [33].

## 2.4 Mikrореologie

### 2.4.1 Brownův pohyb

Brownův pohyb je podle všeho neustálý a náhodný pohyb částic suspendovaných v tekutině (v kapalině nebo v plynu), který byl poprvé systematicky sledován Robertem Brownem v roce 1827. Einstein jako první vysvětlil v roce 1905 Brownův pohyb suspendované částice jako následek termálního pohybu molekul okolní tekutiny. Einsteinova teorie Brownova pohybu udává:

$$\langle \Delta r^2(t) \rangle = \langle (r(t) - r(0))^2 \rangle = 2Dt \quad (14)$$

kde  $\langle \Delta r^2(t) \rangle$  je střední čtverec posunu (mean-square displacement = MSD) volné brownovské částice v jedné dimenzi během času  $t$  a  $D$  je difúzní koeficient. Difúzní koeficient je dán Stokes-Einsteinovou rovnicí:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \quad (15)$$

kde  $k_B$  je Boltzmannova konstanta,  $T$  je teplota,  $\eta$  je viskozita tekutiny a  $R$  je poloměr částice. Experimentálně byla Einsteinova rovnice (14) potvrzena experimenty Jeana Perrina, kterému byla roku 1926 udělena Nobelova cena za fyziku.

Perzistence a náhodnost jsou obecně uznávány jako dvě klíčové charakteristiky Brownova pohybu. Trajektorie brownovských částic jsou klasické příklady fraktálů. Obecně se předpokládá, že jsou všude kontinuální ale nikde diferenciovatelné. Pokud trajektorie není diferenciovatelná, není rychlost brownovské částice definována. Střední rychlost částice  $\bar{v}$  měřená v časovém intervalu  $t$  je:

$$\bar{v} \equiv \frac{\sqrt{\langle \Delta r^2(t) \rangle}}{t} = \frac{\sqrt{2D}}{\sqrt{t}} \quad (16)$$

Tuto rovnici ale nelze použít, pokud se  $t$  blíží nule, a proto s ní nelze popsat skutečnou rychlost částice.

V roce 1900 F. M. Exner uskutečnil první kvantitativní studii Brownova pohybu, a to měřením rychlosti brownovských částic suspendovaných ve vodě. Zjistil, že se měřená rychlost snižovala se zvětšující se velikostí částice a zvyšovala s rostoucí teplotou vody. Einstein později zveřejnil svou práci, která se zabývala okamžitou rychlostí brownovské částice. Tvrdil, že změřením této proměnné by bylo možné prokázat, že „kinetická energie

pohybu těžiště částice je nezávislá na velikosti a povaze částice a na povaze okolního prostředí“, což představuje jeden ze základních principů statistické mechaniky – tzv. ekvipartiční teorém. Einstein nicméně shledal, že kvůli velmi rychlé randomizaci pohybu by bylo v praxi nemožné okamžitou rychlost brownovské částice změřit.

Nedifúzní Brownův pohyb koloidních suspenzí o vysokých koncentracích v rámci kratších časových intervalů je v současné době studován pomocí měření autokorelačních funkcí několikanásobně rozptýleného, transmitovaného světla. Nedávný vývoj v oblasti optických pinzet a detekčních systémů s nevídaným rozlišením umožnil studovat Brownův pohyb na úrovni jedné částice ve velmi krátkých časových intervalech. Například *Huang a spol.* sledovali v kapalině přechod z balistického Brownova pohybu na difúzní Brownův pohyb [34].

Kromě Brownova pohybu v krátkých časových intervalech jsou v současné době středem pozornosti i studie anizotropického Brownova pohybu a Brownova pohybu v nerovnovážných systémech. Brownův pohyb v nerovnovážných systémech přitahuje pozornost už proto, že přímo souvisí s transportem molekul a buněk v biologických systémech [35].

#### 2.4.2 Mikroreologické experimenty a techniky

Základním předpokladem mikroreologických experimentů je, že Brownův pohyb částic o velikosti mikronů dispergovaných v tekutině je ovlivněn mechanickými vlastnostmi okolního média. Typickými výstupy těchto experimentů jsou hodnoty MSD v závislosti na čase. Naměřené hodnoty MSD mohou být analyzovány mimo jiné pomocí generalizované Stokes–Einsteinovy rovnice rozšířené o viskozitu závislou na frekvenci, která odpovídá elasticitě:

$$\tilde{D}(s) = \frac{k_B T}{6\pi\tilde{\eta}_s R s} \quad (17)$$

kde  $R$  je poloměr částice,  $\tilde{\eta}_s$  je viskozita závislá na frekvenci, která byla podrobena Laplaceově transformaci,  $\tilde{D}(s)$  je difúzní koeficient závislý na frekvenci, která byla podrobena Laplaceově transformaci a  $s$  je transformovaná frekvence. Tato metoda analýzy dat se obecně používá častěji, protože umožňuje přímé porovnání komplexního modulu  $G^*$  mezi mikroreologickým měřením a měřením pomocí mechanického reometru.

Střední čtverec posunu částice lze změřit dvěma způsoby. Buď nepřímo z autokorelační funkce několikanásobně rozptýleného světla prostřednictvím souboru částic (sond) například technikou difúzní vlnové spektroskopie (DWS) nebo přímo sledováním časově zprůměrovaného pohybu jedné izolované částice použitím např. laserových metod [36].

Většina mikroreologických technik spočívá v působení napětí/síly na danou tekutinu prostřednictvím v tekutině přítomných částic (sond) a následné odezvě tekutiny na toto napětí způsobené pohybem částic. Pohyb částic je způsoben buď termálním (Brownovým) pohybem, kdy hovoříme o tzv. pasivní mikroreologii, nebo vhodnou externí silou působící na částice – tzv. aktivní mikroreologie. Aplikace externí síly, jakou je například magnetické pole, na částice může vyvolat nelineární odpověď tekutiny, protože může dojít ke značné výsledné deformaci tekutiny. Naopak deformace tekutiny vyvolaná teplotně excitovanými částicemi je mnohem menší, a to v mnoha případech zajišťuje lineární odpověď. Navíc pomocí aktivních

mikroreologických technik lze obecně získat data o výrazně nižší frekvenci než pomocí technik pasivní mikroreologie.

Hodnoty MSD lze získat prostřednictvím metod pasivní mikroreologie, a to například sledováním částic, video-mikroreologií nebo pomocí rozptylu světla. Metody založené na zaznamenávání trajektorie individuální částice obvykle vyžadují menší objemy vzorků než technika dynamického rozptylu světla (DLS) nebo difúzní vlnové spektroskopie (DWS). Na druhou stranu mají DLS techniky tu výhodu, že poskytují data z inherentního průměru celého souboru částic, zatímco například metody jednočásticové mikroreologie vyžadují více měření dostatečně obsáhlých pro získání spolehlivých průměrných hodnot. Mikroreologická měření lze provést i prostřednictvím termálních fluktuací nebo oscilací ohebného nosníku (cantileveru) mikroskopu atomárních sil (Atomic force microscope, AFM). Nicméně získání viskoelastického modulu z AFM měření je kvůli relativně velkým rozměrům cantileveru a možnému přidání vibračních módů cantileveru poměrně obtížné, ne-li nemožné [37].

#### 2.4.2.1 Dynamický rozptyl světla (DLS)

Technika dynamického rozptylu světla spočívá v analýze fluktuací intenzity rozptýleného světla, které přímo souvisí s dynamikou média. Nejjednodušší aplikací DLS je měření difúzního koeficientu koloidních částic. Bylo prokázáno, že toto stanovení nikterak nenarušují mezičásticové interakce, takže difúzní koeficient je nepřímě úměrný velikosti částic, což dělá z DLS hojně využívaný nástroj právě pro stanovení velikosti částic. Nicméně dynamika systémů komplexních tekutin je mnohem komplikovanější [38].

Pomocí DLS experimentů může být měřena i časová závislost hodnot MSD částic suspendovaných v polymerním roztoku. Dvěma limitními případy pro DLS jsou čistě viskózní tekutina a kompletně elastické médium. Pokud je materiál čistě viskózní, částice skrz něj difundují a hodnoty MSD stoupají lineárně s časem. Rovnice popisující pohyb částice v třídimenzionálním prostoru má tvar:

$$\langle \Delta r^2(t) \rangle = 6Dt \quad (18)$$

Stanovením difúzního koeficientu  $D$  lze vypočítat viskozitu materiálu (viz Rovnice 15). Naopak pohyb částic v elastickém médiu bude omezený a MSD dosáhne průměrné hodnoty, která je dána elastickým modulem materiálu [39].

Tradiční metoda DLS je limitována na převážně transparentní vzorky, protože vyžaduje transmissi více než 90 % nerozptýleného světla, aby bylo zabráněno komplikacím způsobených několikanásobným rozptylem. Tato skutečnost představovala vážné omezení ve studiu komplexních tekutin do doby, než se došlo k názoru, že v opačném limitu několikanásobného rozptylu může časově korelovaná funkce rozptýlené intenzity poskytnout další užitečné informace (DWS) [40].

V typickém DLS měření laserový paprsek dopadá na vzorek a je rozptýlen částicemi. Rozptýlené záření je detekováno detektorem umístěným pod úhlem  $\theta$  vůči přicházejícímu paprsku. Jak částice ve vzorku difundují a přeskupují se, intenzita světla dopadajícího na detektor kolísá v čase. V nejjednodušším případě každý foton podlehe rozptylu pouze jednou a poté putuje přímo do detektoru. Fluktuace intenzity jsou zaznamenávány jako funkce času  $I(t)$  a normalizovaná intenzitní korelační funkce  $g_2(t)$  se následně vypočítá dle rovnice:

$$g_2(t) = \frac{\langle I(t_0)I(t_0+t) \rangle}{\langle I(t_0) \rangle^2} \quad (19)$$

Měřená funkce  $g_2$  může být vztažena k vypočítané korelační funkci elektrického pole  $g_1$ :

$$g_1(t) = \frac{\langle E(t)E(t_0+t) \rangle}{\langle |E(t)| \rangle^2} \quad (20)$$

kde  $E$  je rozptýlené elektrické pole. Pokud jsou všechny částice statisticky nezávislé a pohybují se náhodně pouze vlivem termálních impulsů, platí:

$$g_1(t) = \exp\left[-\frac{q^2 \langle \Delta r^2(t) \rangle}{6}\right] \quad (21)$$

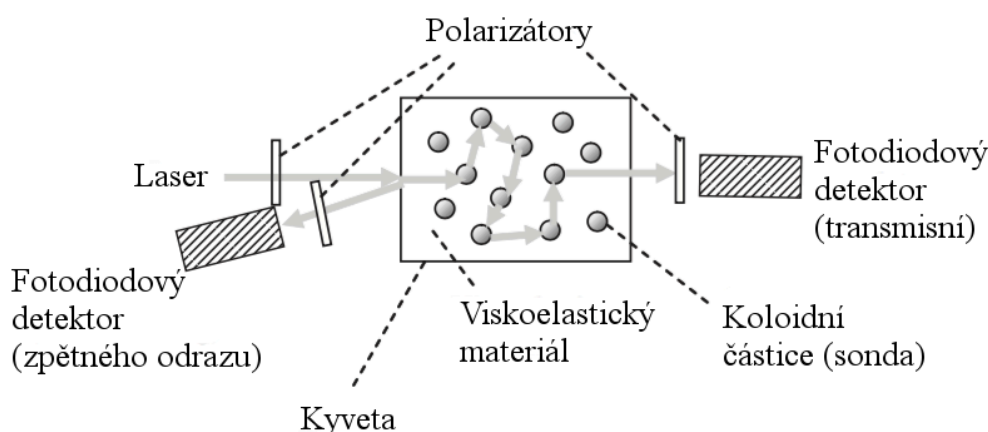
kde  $\langle \Delta r^2(t) \rangle$  je zprůměrovaná 3-D hodnota MSD a  $q$  je magnituda rozptylového vektoru:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (22)$$

kde  $n$  je index lomu vzorku a  $\lambda$  je vlnová délka laseru ve vakuu. Technika DLS je typicky citlivá na frekvence v rozmezí 0,01–10 Hz podobně jako konvenční makroskopické reometry [41].

#### 2.4.2.2 Difúzní vlnová spektroskopie (DWS)

Difúzní vlnová spektroskopie umožňuje měření média s několikanásobným rozptylem a rozšiřuje tak oblast frekvence směrem k vyšším hodnotám. Nastavení experimentu je podobné jako u DLS, nicméně v tomto případě laserový paprsek dopadá na opaleskující vzorek a světlo je před vstupem do detektoru několikanásobně rozptýleno (viz **Obrázek 6**).



**Obrázek 6** Schéma experimentu difúzní vlnové spektroskopie [42]

Rovnice difúze se používá pro popis propagace světla skrz vzorek. Jak se fotony odráží ve všech možných úhlech, dochází ke ztrátě všech informací závislých na  $q$ . Výsledkem jsou pouze dvě experimentální geometrie – transmise nebo zpětný odraz. Stejně jako u DLS je

detekována fluktuace intenzity světla dopadajícího na detektor, která přímo souvisí s dynamikou média a lze tak získat i hodnoty MSD částic. Korelační funkce elektrického pole  $g_1$  je pak dána:

$$g_1(t) \propto \int_0^\infty P(s_l) \exp\left[-\frac{k_0^2 s_l \langle \Delta r^2(t) \rangle}{3l^*}\right] ds_l \quad (23)$$

kde  $P(s_l)$  je pravděpodobnost, že světlo urazí vzdálenost  $s_l$ ,  $k_0 = 2\pi n/\lambda$  kde  $n$  je index lomu rozpouštědla,  $\lambda$  je vlnová délka světla ve vakuu a  $l^*$  je střední volná dráha transportu definovaná jako vzdálenost, kterou musí světlo urazit, než je jeho směr změněn na kompletně náhodný.

Technika DWS je citlivá na pohyby na mnohem menších vlnových délkách a při rychlejších časových intervalech než DLS. Hodnoty MSD se získávají přepočtem z  $g_1(t)$ . Typický rozsah frekvence DWS měření je  $10-10^5$  Hz, což umožňuje přímá měření vysokofrekvenčních odpovědí polymerních roztoků a dalších materiálů, které nelze měřit pomocí tradičních mechanických experimentů [41].

### 2.4.2.3 Optické pinzety

Princip systémů optických pinzet spočívá ve vytváření místního intenzitního gradientu světla pomocí úzce zaměřeného laserového paprsku. Částice vstupující do tohoto gradientu je vystavena síle, která ji posouvá do ohniska paprsku, kde je intenzita největší a distribuce rotačně symetrická. V ohnisku je čistá síla nulová a částice je tak stabilizována ve třech dimenzích. Když je na částici aplikována externí síla (Brownovy interakce mezi částicí a molekulami okolní tekutiny), je z centra pasti vypuzena. Optická past se chová jako mechanická pružina a gradientní silou přitahuje částici zpátky do centra pasti. Pro malé posuny je tato síla přímo úměrná posunu částice (harmonický potenciál). Pomocí optických pinzet lze provádět měření viskozity, elasticity a pasivní/aktivní viskoelastická měření [43].

Nicméně použití optických pinzet pro mikrereologická měření poněkud komplikuje analýzu mikrereologických dat, protože jak síla zachycení tak stochastické kolize s viskoelastickým vzorkem ovlivňují dynamiku částic (sond). Pro analýzu fluktuací zachycených částic je nutné použít Langevinovu rovnici, která je pro newtonskou kapalinu s nízkým Reynoldsovým číslem:

$$-C \frac{dx}{dt} + \kappa_{el} x = F_t(t) \quad (24)$$

kde  $F_t(t)$  je stochastická termální síla,  $\kappa_{el}$  je elastická konstanta a  $C$  je součinitel odporu.

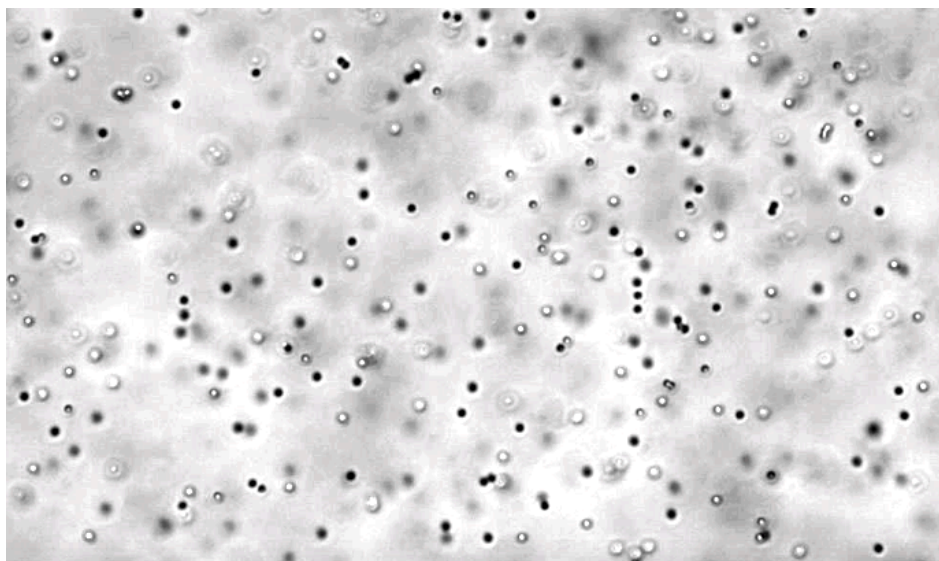
Optické pinzety často vyžadují kalibraci síly laserových pastí. Z analýzy Brownova pohybu zachycené koloidní částice lze stanovit sílu pasti, a to s méně než 1% chybou při současném použití statistické analýzy Langevinovy rovnice a fotonásobiče [42].

### 2.4.2.4 Video-mikrereologie (částicová mikrereologie)

Prostřednictvím této techniky je možné zobrazit částice (sondy) v roztoku přímo pomocí mikroskopu. Techniky zpracování obrazu byly vyvinuty za účelem zautomatizování procesu sledování stovek částic současně v rámci jediného obrazu z mikroskopu, a to se

submikronovou přesností. I přes to, že je video-mikroreologie limitována frekvencemi dostupnými pro kameru, jedná se o velmi důležitou techniku schopnou získat statisticky dobrá data souboru částic.

V typickém experimentu video-mikroreologie jsou snímky z mikroskopu získávány pomocí CCD kamery (charge-coupled device). Takto získaná videa (**Obrázek 7**) jsou pak zpracována počítačovým softwarem. Pro tato zpracování byly vyvinuty algoritmy pro automatické procesy nalezení středu částic umístěných v sekvenci snímků z videa. Pozice částic na každém snímku je pak porovnávána s pozicemi na dalších snímcích a z těchto údajů jsou následně vytvořeny trajektorie částic.



**Obrázek 7** Snímek pořízený pomocí video-mikroreologie (polystyrenové částice o velikosti 1  $\mu\text{m}$  v prostředí vody)

Soubor částic je možné zobrazit pomocí konvenčního světelného mikroskopu buď prostřednictvím fluorescence nebo metody světlého pole (bright field microscopy). Při použití metody světlého pole mohou být pozorovány částice větší než stovky nanometrů, ale difrakcí omezená rozlišovací schopnost mikroskopu vylučuje analýzu menších částic. Prostřednictvím fluorescenčního značení lze sledovat i menší částice, které se v tomto případě chovají jako bodové zdroje světla. Je zde i možnost provedení kolokalizačních studií s různými fluorescenčními barvivy. Fluorescenčně značené koloidní částice jsou komerčně dostupné v rozměrech od 20 nm až po několik mikronů [41].

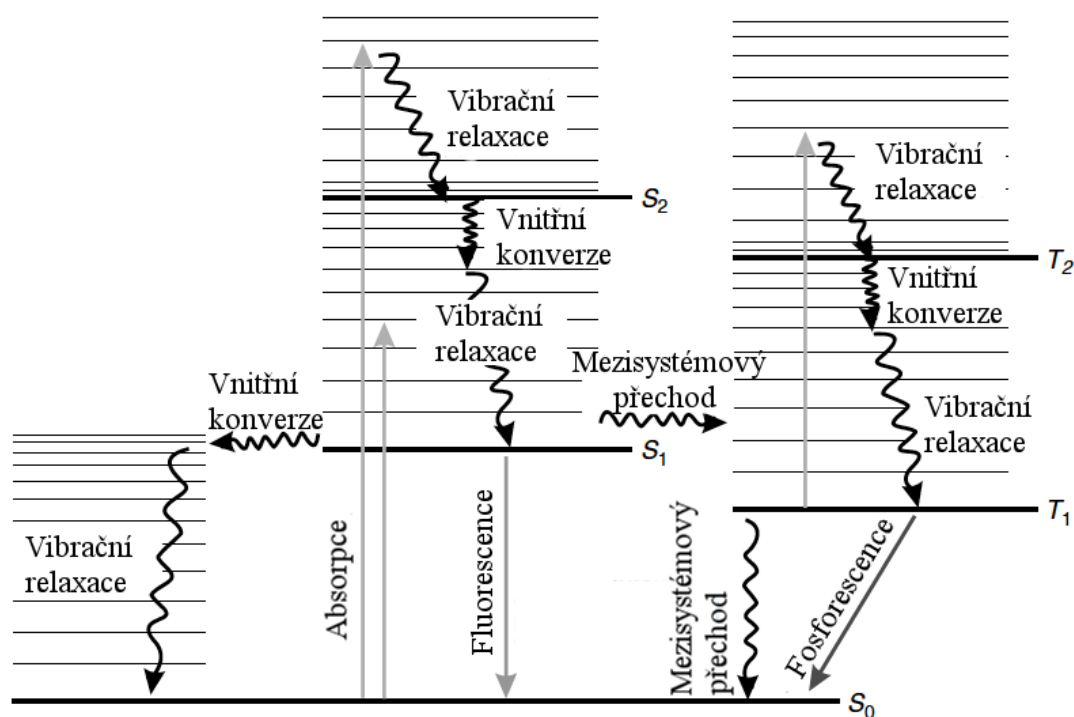
### 2.4.3 Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS)

#### 2.4.3.1 Princip fluorescence

Fluorofor je molekula, která absorbuje energii o určité vlnové délce a poté vyzáří energii o rozdílné, ale stejně specifické vlnové délce. Množství a vlnová délka emitované energie závisí jak na fluoroforu, tak na chemickém prostředí, ve kterém se nachází. Fluorofory jsou někdy označovány také jako chromofory – z historického hlediska část molekuly odpovědná za zbarvení. Označení chromofor navíc znamená molekulu absorbující světlo, kdežto fluorofor značí molekulu schopnou světlo i emitovat.

Elektronové stavy většiny organických molekul lze rozdělit na stavy singletové, u kterých jsou všechny elektrony v molekule spinově spárovány, a na tripletové, u kterých elektronový pár spinově spárován není. Po excitaci fluoroforu pomocí světla o vhodné vlnové délce se fluorofor obvykle nachází v jednom z mnoha vibračních stavů excitovaného singletového stavu (viz **Obrázek 8**). Pravděpodobnost výskytu molekuly v jednom z možných excitovaných singletových stavů  $S_n$  závisí na možnostech přechodu a excitační vlnové délce. Obsazení singletového stavu je řízeno interakcí excitovaného elektronu s elektrickým polem excitačního světla.

Po excitaci do vyšších excitovaných singletových stavů podléhají molekuly relaxaci prostřednictvím vnitřní konverze nejprve na vyšší vibrační hladiny prvního excitovaného singletového stavu  $S_1$ , a to během  $10^{-11}$ – $10^{-14}$  s [44]. Molekuly setrvávající na těchto vyšších vibračních hladinách se prostřednictvím vibrační relaxace rychle ( $10^{-10}$ – $10^{-12}$  s) [44] vracejí na nejnižší vibrační hladinu tohoto stavu, přičemž kvůli kolizím s ostatními molekulami dochází ke ztrátám energie. Z nejnižší vibrační hladiny prvního excitovaného singletového stavu může molekula ztratit svou energii prostřednictvím nezářivé vnitřní konverze následované vibrační relaxací, vyzářením fluorescence nebo prostřednictvím mezisystémového přechodu a následné fosforescence. Molekula může být excitována na vyšší singletové stavy také prostřednictvím absorpce sekundárního fotonu. Absorpce z hladiny  $S_1$  na hladinu  $S_n$  a následná ionizace molekuly představuje možnou cestu pro fotovybělování (photobleaching).



**Obrázek 8** Jabloňského diagram popisující elektronové hladiny běžných organických molekul a možné přechody mezi různými singletovými a tripletovými stavy [44]

Spin excitovaného elektronu se může obrátit i během mezisystémového přechodu, po kterém molekula obvykle sestává v prvním excitovaném tripletovém stavu  $T_1$ . U většiny

organických barviv je mezisystémový přechod poměrně neefektivní a navíc spinově zakázaný proces, a to i přes to, že tripletový stav má nižší hladinu energie než excitovaný singletový stav. Pravděpodobnost mezisystémového přechodu vzrůstá, pokud se vibrační hladiny dvou stavů překrývají. Efektivita mezisystémového přechodu celkově silně závisí na povaze fluoroforu a možnostech přechodu a obecně ji nelze předpovědět.

Molekula excitovaná na vysokou vibrační hladinu tripletového stavu může ztratit energii prostřednictvím kolizí s molekulami rozpouštědla (vibrační relaxace), čímž se molekula dostane na nejnižší vibrační hladinu tripletového stavu. Následně může znovu podlehnout mezisystémovému přechodu na vyšší vibrační hladinu základního singletového stavu, odkud se vrací vibrační relaxací na nejnižší vibrační hladinu. Stejně jako u singletových stavů i tripletové stavy mohou být excitovány absorpcí sekundárního fotonu na vyšší hladiny  $T_n$ . Protože je přechod mezi singletem a tripletem také spinově zakázaný, může doba života tripletového stavu trvat až 100 s [44], přičemž průměrná doba života excitovaného singletového stavu je  $10^{-7}$ – $10^{-9}$  s [44]. Protože často dochází k interní konverzi a dalším nežářivým přechodům, lze fosforescenci pozorovat obvykle při nízkých teplotách nebo u médií s vysokou viskozitou.

Emise fluorescence ze základní vibrační hladiny prvního excitovaného singletového stavu tvoří spontánní proces obsahující informace o prostředí fluoroforu a jeho interakcích. Například fluorescenční emisní spektrum a jeho maximum poskytuje informace o polaritě rozpouštědla. Naopak doba života a kvantový výtěžek fluorescence přímo odráží přechodné zhášecí interakce fluoroforu s jinými molekulami [44].

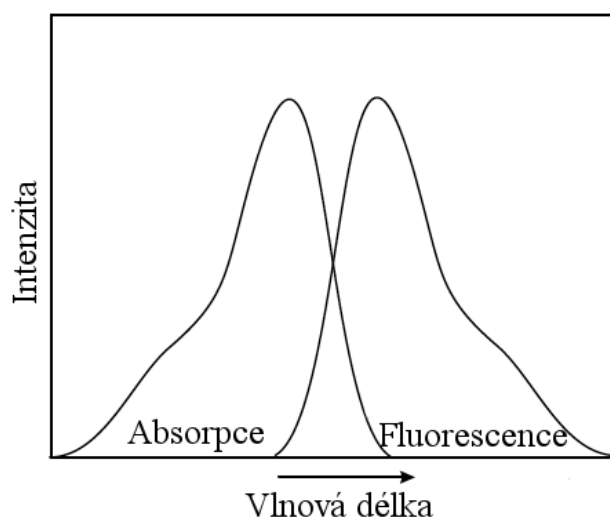
#### 2.4.3.2 Franck–Condonův princip

U relativně velkých fluoroforů obsahujících více než 30 atomů je mnoho normálních vibrací o různých frekvencích spojeno do elektronového přechodu. Kolize a elektrostatické interakce s okolními molekulami rozpouštědla navíc rozšiřují linie vibračních přechodů. Výsledkem je kvazikontinuum stavů rozložených na každé elektronové hladině.

Franck–Condonův princip říká, že k elektronovému přechodu dojde s nejvyšší pravděpodobností bez změny pozice jádra molekulární jednotky a jeho okolí. Kvantová mechanika formuluje tento princip tak, že intenzita vibračního přechodu je přímo úměrná druhé mocnině překryvového integrálu mezi vibračními vlnovými funkcemi dvou stavů, které jsou součástí přechodu. Jinými slovy jsou elektronové přechody v podstatě okamžité porovnávány s pohyby jádra v čase. Proto když se má molekula během elektronového přechodu přesunout na novou vibrační hladinu, musí být tato nová vibrační hladina okamžitě kompatibilní s pozicí jádra a hybností vibrační hladiny molekuly v původním elektronovém stavu.

Protože se elektronová konfigurace molekuly po excitaci mění, musí se jádro reorganizovat do nové elektronové konfigurace, což vyvolá okamžitou molekulární vibraci. Právě to je důvod, proč k elektronovým přechodům nemůže dojít bez vibrační dynamiky. Z excitovaného stavu podléhají molekuly rychlé relaxaci na nejnižší vibrační hladinu (Kashovo pravidlo). V závislosti na kvantovém výtěžku fluorescence se poté molekuly vracejí do základního elektronového stavu za současné emise fotonu. Franck–Condonův princip lze aplikovat jak na absorpci, tak na fluorescenci. Kashovo pravidlo říká, že k emisi vždy

dojde z nejnižšího excitovaného singletového stavu  $S_{1,v=0}$ . A právě aplikovatelnost Franck–Condonova principu v absorpci i emisi v kombinaci s Kashovým pravidlem vede k zrcadlové symetrii absorpčního a fluorescenčního (emisního) spektra typických molekul organických barviv. Vzhledem ke ztrátě vibrační excitační energie během excitačního/emisního cyklu dochází k emisi fluorescence při nižší energii (Stokesův posun) [44] – viz **Obrázek 9**.



**Obrázek 9** Absorpční a emisní fluorescenční spektrum typické molekuly organického barviva [44]

### 2.4.3.3 Doba života a kvantový výtěžek fluorescence

V oblasti fluorescenční spektroskopie patří kvantový výtěžek a doba života fluorescence mezi důležitá kritéria výběru fluoroforů. Kvantový výtěžek fluorescence  $\Phi_f$  daného fluoroforu je dán poměrem emitovaných fluorescenčních fotonů a fotonů absorbovaných. Dle rovnice

$$\Phi_f = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad (25)$$

může být kvantový výtěžek popsán dvěma rychlostními konstantami – rychlostní konstantou pro zářivé přechody  $k_r$  a rychlostní konstantou pro nezářivé přechody  $k_{nr}$ , která zahrnuje všechny relaxační procesy (interní konverze, mezisystémový přechod a další intra-/intermolekulární zhášecí procesy). I když je kompletní predikce kvantového výtěžku fluorescence u určitého fluoroforu nemožná, lze formulovat alespoň některé požadavky pro zvýšení kvantového výtěžku:

- fluorofor by měl vykazovat rigidní strukturu, aby se minimalizovaly nezářivé přechody způsobené rotací nebo vibrací postranních skupin fluoroforu;
- k zajištění nízké rychlostní konstanty mezisystémového přechodu je doporučeno vyhnout se silné spin-orbitální vazbě (například u těžkých atomů);
- přechody založené na přenosu náboje kvůli konjugovaným elektron-donorovým a akceptorovým skupinám často vykazují jasnou fluorescenci.

Nicméně existují i další nezárivé procesy, které mohou zdárně konkurovat emisi světla a snižovat tak kvantový výtěžek fluorescence.

Průměrná doba, kterou molekula stráví v excitovaném stavu  $S_1$  před spontánní emisí, se označuje jako doba života fluorescence  $\tau_f$ :

$$\tau_f = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (26)$$

Dobu života fluoroforu lze popsat jako časový pokles počtu excitovaných fluoroforů  $[F(t)^*]$  po optické excitaci nepatrně krátkým světelným pulsem.

$$\frac{d[F(t)^*]}{dt} = -(k_r + k_{nr})[F(t)^*] \quad (27)$$

Protože je počet excitovaných fluoroforů  $[F(t)^*]$  přímo úměrný intenzitě fluorescence  $I(t)$ , lze integrací od  $t = 0$  do  $t$  získat jednoduchou exponenciální funkci podobnou radioaktivnímu rozpadu.

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_f}\right) \quad (28)$$

U heterogenních vzorků nebo směsí fluoroforů se časový průběh fluorescence popisuje pomocí multiexponenciálního modelu:

$$I(t) = \sum_i a_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_{i,f}}\right); \quad \sum_i a_i = 1 \quad (29)$$

Na základě toho časově rozlišená fluorescenční spektroskopie umožňuje kvantitativní vyhodnocení relativního příspěvku  $a_i$   $i$ -té komponenty vzorku s charakteristickou dobou života fluorescence  $\tau_{i,f}$  [44].

#### 2.4.3.4 Princip FCS

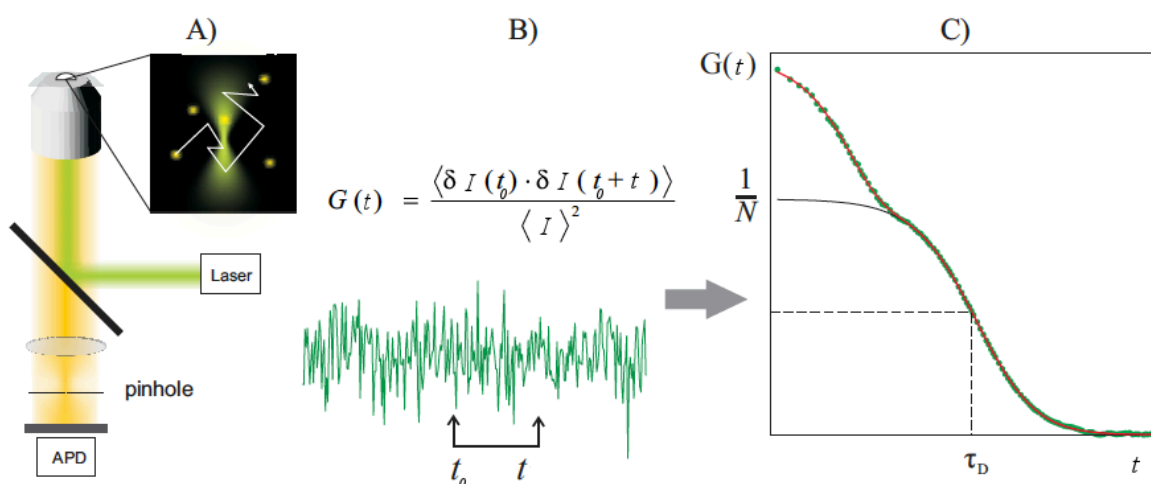
Mezi vybavení FCS běžně patří konfokální mikroskop. Ten se používá pro detekci fluorescence, kterou emitují fluorescenčně značené molekuly procházející malým, subfemtolitrovým detekčním konfokálním objemem. Tento konfokální objem vzniká zaměřením laseru na difrakčně limitované místo a omezením detekce emise v axiálním směru pomocí pinhole. Pro detekci se využívají vysoce citlivé, tzv. lavinové fotodiody (avalanche photodiode, APD), které detekují fluorescenci jako proud jednotlivých dopadajících fotonů – primární surová data ve FCS. I když tato data již obsahují informace o dynamice jednotlivých molekul, musí být v rámci několika kroků zpracována, aby z nich bylo možné extrahovat požadované informace jako koncentrace nebo difúzní koeficienty.

V prvním kroku se využívají data o dopadu jednotlivých fotonů v čase pro výpočet fluktuace intenzity  $I(t)$ . Následně může být vypočítána autokorelační funkce  $G(t)$ :

$$G(t) = \frac{\langle \delta I(t_0) \cdot \delta I(t_0 + t) \rangle}{\langle I(t_0) \rangle^2} \quad (30)$$

$I(t)$  je intenzita fluorescence v čase  $t$ ,  $\langle I(t) \rangle = (1/T) \int_0^T I(t) dt$  značí průměrný čas signálu,  $\delta I(t) = I(t) - \langle I(t) \rangle$  jsou fluktuace kolem střední hodnoty  $I(t)$  a  $t$  je korelační čas. Autokorelační funkce měří soběpodobnost signálu a zohledňuje možnost, že signál v různých časech patří stále té samé molekulární události. Proto je difúzní čas  $\tau_D$  autokorelační křivky vztažen k času, který molekuly stráví v detekčním objemu. Amplituda je nepřímo úměrná průměrnému počtu pozorovaných molekul  $N$  v detekčním objemu  $V_{ef}$  a koncentraci  $c$  fluorescenčních částic v roztoku:

$$G(0) = \frac{1}{N} = \frac{1}{V_{ef} \cdot c} \quad (31)$$



**Obrázek 10** Princip FCS. **A:** Fluoreskující molekuly difundují detekčním objemem konfokálního mikroskopu a dochází k intenzitním fluktuacím (**B**). **C:** Korelační křivka je výsledkem autokorelace intenzitních fluktuací a zohledňuje soběpodobnost signálu [45].

Difúze v detekčním objemu není obecně jediným jevem způsobujícím fluktuace intenzity fluorescence. Mezi tyto jevy patří také vnitřní dynamika, rotace fluoroforu spojená s měnicími se možnostmi excitace nebo fotofyzikální fluktuace např. kvůli výskytu tripletového stavu.

Korelační funkce závisí na parametrech zájmu (fitovací parametry), které se mění během procesu fitování, aby se minimalizoval rozdíl mezi experimentální korelační křivkou a modelem. Konkrétní podoba vzorce korelační funkce používané pro analýzu dat závisí nejen na tvaru detekčního objemu, ale i na povaze fluorescenčních molekul. Dobrá aproximace pro molekuly podléhající volné difúzi v rámci konfokálního detekčního objemu je třídídimenzionální Gaussovský profil:

$$G(t) = \frac{1}{N} \left( 1 + \frac{t}{\tau_D} \right)^{-1} \left( 1 + \frac{t}{\tau_D \kappa^2} \right)^{-1/2} \quad (32)$$

$N = V_{ef} c$  je průměrný počet částic v efektivním detekčním objemu  $V_{ef} = \pi^{3/2} w_0^3 \kappa$ ,  $\kappa$  je poměr  $z_0$  a  $w_0$ , kde  $z_0$  je efektivní fokální poloměr rovnoběžný s optickou osou a  $w_0$  je

efektivní laterální fokální poloměr (při intenzitě  $1/e^2$ ). Difúzní čas  $\tau_D = w_0^2/4D$  může být použit pro výpočet difúzního koeficientu  $D$ . Nicméně ke stanovení koncentrací a difúzních koeficientů z hodnot  $N$  a  $\tau_D$  je nezbytné znát parametry popisující geometrii detekčního objemu  $w_0$  a  $\kappa$ . Tyto parametry jsou obvykle stanoveny pomocí kalibračního měření barviva se známým difúzním koeficientem [45].

#### 2.4.3.5 Limitace FCS techniky

Díky vzrůstající výkonnosti komerčních zařízení pro FCS je v současné době velmi snadné naměřit korelační křivky. Nicméně interpretace těchto křivek je občas kvůli některým technickým artefaktům velmi obtížná. Korelační křivka představuje spíš abstraktní soubor dat, který není dobře rozpoznatelný ani zkušeným analytikem. Důvodem je, že i nepatrná změna sklonu či zakřivení křivky může mít obrovský vliv na výstup fitování. Dokonce i výběr vhodného fitovacího modelu vyžaduje dobrou znalost měřeného systému, a proto má vyhodnocování naměřených dat obecně interaktivní charakter.

Kvantitativní FCS měření je založeno na kalibraci velikosti detekčního objemu. Naneštěstí tato velikost nezávisí pouze na nastavení, ale je ovlivněna hned několika parametry. Optické odchylky způsobené nesprávnou tloušťkou krycího sklíčka, nesouladem indexů lomu nebo astigmatismem mohou snadno vést až k 50% chybě v difúzi a k ještě větším chybám v koncentračních měřeních. Optická saturace tripletového stavu navíc vede ke zvětšení detekčního objemu v závislosti na excitační síle laseru. Problém kalibrace detekčního objemu lze vyřešit pomocí pokročilých FCS technik, u kterých nemusí být detekční objem znám dopředu, ale lze jej stanovit na základě samotného experimentu.

Z korelační křivky také není zřejmý nekorelovaný signál pozadí, což způsobuje redukcii amplitudy korelační křivky a v důsledku toho i chybné stanovení koncentrací. Fotovybělování, nevratný zánik fluoroforu, je běžným problémem zvláště v případě pomalu difundujících molekul a laserů o vysokém výkonu. Ovlivňuje nejen amplitudu, ale i tvar korelační křivky. Vyčerpání fluoroforů navíc může vést k rozpadu intenzity v čase a silně zkresleným křivkám. Stejným způsobem mohou zkreslit korelační křivky např. i agregáty nebo excitační nestability a následné fitování pomocí standardních modelových funkcí je pak téměř nemožné. Běžně se proto naměří několik krátkých souborů dat místo jednoho dlouhého a následně se manuálně nebo automaticky vyřadí zkreslené korelační křivky [45].

#### 2.4.3.6 FCS mikrorologie

V poslední době nachází FCS využití i v tradiční makromolekulární a koloidní oblasti. Jak už bylo uvedeno podrobněji výše v kapitole 2.4.3.4, v typickém FCS experimentu je subfemtolitrový objem vzorku ozařován excitačním laserem. Když fluorofor difunduje do konfokálního objemu a z něj, způsobuje fluktuace intenzity fluorescence. Výstupem FCS měření je autokorelační funkce intenzitních fluktuací  $G(t)$ , do které lze na základě Rovnice (18) a Rovnice (32) dosadit MSD:

$$G(t) = \frac{1}{N} \left( 1 + \frac{2}{3w_0^2} \langle \Delta r^2(t) \rangle \right)^{-1} \left( 1 + \frac{2}{3z_0^2} \langle \Delta r^2(t) \rangle \right)^{-1/2} \quad (33)$$

Tohoto přístupu poprvé využili *Shusterman a spol.* pro měření MSD fluorescenčně značené DNA [46]. Od té doby mnoho výzkumných skupin využívá tohoto přístupu ke zkoumání difúze různých fluorescenčně značených specií/částic. Časovou závislost MSD získanou z autokorelační funkce lze použít rovněž pro identifikaci difúzních anomálií, kterými jsou subdifúzní a superdifúzní procesy [47].

Pomocí FCS lze studovat mobilitu malých molekul, makromolekul nebo koloidů v komplexních nebo heterogenních prostředích, jakými jsou například nanoporózní materiály, roztoky polymerů a gely. Významnou výhodou FCS oproti jiným pasivním mikroreologickým technikám je schopnost analyzovat lokální reologické vlastnosti heterogenních vzorků. V porovnání s částicovou mikroreologií lze u FCS použít daleko menší částice (až 20nm), což umožňuje zjistit reologickou odpověď odpovídající tomuto rozměru. Naproti tomu mikroreologické techniky rozptylu světla (DLS, DWS) kvůli velkému osvětlovanému objemu vzorku jeho heterogenitu nezohledňují. FCS má navíc tu výhodu, že sleduje pouze fluorescenčně značené částice, a proto není měření ovlivněno interferencí pozadí. Mikroreologické FCS analýzy navíc vyžadují nižší koncentrace sond/částic a malé objemy vzorků [48], [49].

### 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

#### 3.1 Video-mikroreologie koloidních soustav

Video-mikroreologie (částicová mikroreologie) patří v současné době mezi nejpoužívanější techniky pasivní mikroreologie využívané pro reologickou charakterizaci koloidních soustav. Tým *Aufderhorst-Roberts a spol.* použil tuto techniku pro měření reologických a strukturních vlastností samouspořádávajícího peptidového derivátu Fmoc-tyrosinu. Ke spuštění gelace použili glukono- $\delta$ -laktón, čímž došlo během několika hodin k postupnému snižování pH. Počátek samouspořádávání v systému pak tým identifikoval na základě prudkého poklesu MSD hodnot částic vložených do roztoku. Analýzou dynamiky těchto částic následně byli schopni kvantifikovat heterogenitu vzorku [50].

Pro měření modulu a reverzního perkolačního přechodu degradujícího hydrogelu, který představuje klíčový faktor pro kontrolu buněčné migrace, degradaci implantátu nebo regeneraci tkání, použil techniku částicové mikroreologie *Schultz a spol.* Zjistili, že modul gelu se během skoro třiceti dnů změnil o téměř pět řádů. Navíc se ukázalo, že během konečné degradace docházelo v reverzním procesu perkolačního přechodu ke kritickému rozměrovému chování [51].

*Raghu a spol.* sledovali pomocí video-mikroreologie reologické vlastnosti roztoku regenerovaného silk fibroinu. Pryskyřic zbavené hedvábí bylo rozpuštěno ve směsi tetrahydrátu dusičnanu vápenatého a methanolu. K analýze byly použity mikronové polystyrenové částice. K transportu a umístění částic do zamýšleného regionu vzorku byla použita optická pinzeta. Výsledky měření ukázaly, že různě koncentrované roztoky regenerovaného silk fibroinu vykazují viskoelastické vlastnosti. V mikronovém měřítku byli také schopni kvantitativně stanovit strukturní heterogenitu tohoto roztoku [52].

Pro reologickou charakteristiku gastrointestinálních mucinů použili techniku video-mikroreologie i *Georgiades a spol.* Pro analýzu použili dobře charakterizované prasečí muciny označené jako MUC5AC a MUC2, které představovaly modely lidských mucinů. Viskoelasticitu tým stanovoval jako funkci koncentrace mucinů a pH. Protože použili redukující a chaotropní činidla, mohli zkoumat i mezoskopické síly, které určují integritu polymerní sítě. Zjistili tak, že intestinální i žaludeční mucin tvoří gely, které v závislosti na pH mění svou konformaci (ke gelaci dochází při nízkých hodnotách pH). Při snížení pH současně dojde ke stonásobnému zvýšení elastického smykového modulu. Přídavek redukujícího a chaotropního činidla způsobuje denaturaci mucinových struktur a dochází k velkému poklesu jejich smykového modulu [53].

V nedávné době došlo v oblasti částicové (video-) mikroreologie na několik vylepšení. *Wong a spol.* zkoumali mikroreologické vlastnosti heterogenních biopolymerních hydrogelů pomocí kovalentně vázaných mikročástic. Konvenční techniky částicové (video-) mikroreologie vyžadují znalost velikosti ok polymerní sítě, aby bylo možné vybrat sondy o vhodné velikosti. Tým přišel na to, že použitím kovalentně vázaných sond lze tomuto omezení předejít. Jejich experimenty ukázaly, že v dobře definovaném systému, jakým je například polyakrylamidový gel, umožnily povrchově modifikované částice (oproti standardním karboxylovaným částicím) spolehlivější měření mechanických vlastností polymerní sítě. Dále také zjistili, že díky vhodné povrchové modifikaci mikročástic nebylo nadále nutné použít sondy větší než oka polymerní sítě [54].

### 3.2 DLS a DWS mikrereologie koloidních soustav

I přes řadu výhod se techniky dynamického rozptylu světla (DLS) a difúzní vlnové spektroskopie (DWS) využívají k mikrereologické charakterizaci znatelně méně, než výše uvedená video-mikrereologie. Data získaná prostřednictvím DLS nebo DWS jsou často porovnávána s výstupy dalších pasivních mikrereologických technik. Například tým *Di Cola a spol.* využil techniku DLS spolu s video-mikrereologií a reologií pro zkoumání struktury a dynamiky několika kopolymerů maleátu sodného a mírně hydrofobních komonomerů ve vodném prostředí. Cílem práce bylo také studium závislosti specifické viskozity na koncentraci polyelektrolytu, a to s přídavkem a bez přídavku soli. Tým rovněž zkoumal chování amplitudy naměřené pomocí DLS, které v rychlém režimu odpovídalo předpokladům, ale v pomalém režimu nikoliv. Přišli tak na to, že hydrofobicita komonomeru pravděpodobně ovlivňuje agregační proces a mění asociační uspořádání v otevřené, uzavřené nebo žádné [55].

*Shibayama a Norisuye* použili metodu časově rozlišeného dynamického rozptylu světla pro stanovení bodu gelace, sledování kritické dynamiky gelu blízko bodu gelace, mechanismu gelace a architektury gelového klastru. Bod gelace stanovovali mimo jiné na základě výskytu koherenční zrnitosti intenzity rozptylu světla nebo znatelného potlačení počáteční amplitudy korelační funkce intenzity v čase. Tým také zkoumal použití těchto konceptů a jejich validitu pro různé typy gelů – chemické gely, termoreverzibilní fyzikální gely a biologické gely [56].

Techniku difúzní vlnové spektroskopie (DWS) využil pro mikrereologická měření vláknité sítě aktinu tým *Palmer a spol.* U elastického modulu pozorovali malou magnitudu, nezávislost na namáhání a slabou závislost na koncentraci. Došli proto k závěru, že samotný vláknitý aktin nestačí pro vytvoření elastického modulu nezbytného pro udržení strukturní rigidity většiny buněk nebo pro podporu nových buněčných výčnělků. Měření mimo jiné prokázala, že mechanické vlastnosti vláknitého aktinu jsou vysoce závislé na frekvenci deformace. Prostřednictvím naměřených hodnot MSD byl tým schopen také pozorovat lokální fluktuace jednotlivých aktinových vláken [57].

*Dasgupta a spol.* měřili prostřednictvím DWS mikrereologii polyethylenoxidu. Pro analýzu použili polystyrenové mikročástice různých velikostí a s různými povrchovými úpravami. Výstupem jejich měření byl mimo jiné elastický a viskózní modul vzorku. Aby tým získal data s větším rozsahem frekvence, použil pro stanovení dynamiky částic v roztoku i techniku dynamického rozptylu světla (DLS) [39].

### 3.3 FCS mikrereologie koloidních soustav

V poslední době si své místo mezi pasivními mikrereologickými technikami získává i fluorescenční korelační spektroskopie. Pravděpodobně nejčastější aplikací této techniky je v současnosti charakterizace difúze nebo stanovení difúzního koeficientu. Pro popsání reologických vlastností matrix pomocí FCS techniky je rovněž nezbytné měření difúze koloidních částic, na základě kterého je následně prostřednictvím hodnot MSD získán smykový modul prostředí. Jako první použili FCS pro takováto mikrereologická měření *Guigas a spol.* Monitorovali difúzi fluorescenčně značených zlatých nanočástic v cytoplasmě a jádře živých buněk a stanovovali komplexní modul pro obě kompartmenty [48], [58].

Porovnáváním mikro- a makroviskozity v dispergovaných lamelárních fázích (gelech) pomocí techniky FCS se zabývali *Szymański a spol.* K měření mikroviskozity použili

mikroskopické sondy o různých velikostech – fluorescenční barvivo rhodamin (0,85 nm), lysozym (2 nm) a kvantové tečky (12,5 nm). Zjistili, že viskozita kontinuální fáze byla přibližně dvakrát vyšší než u vody. Hodnoty naměřené viskozity byly navíc stejné pro všechny tři druhy sond, což značí, že v pozorovaném mikroskopickém měřítku je systém poměrně jednotný. Tým předpokládá, že makroviskozitu lze naměřit až pomocí sond, které jsou o mnoho větší než 25 nm. Do budoucna chce proto tým použít pro svá měření i větší sondy a stanovit tak měřítko, při kterém se začíná mikrostruktura projevovat v makroreologických vlastnostech [59].

Pomocí kombinace FCS a DLS techniky zkoumali **Zettl a spol.** prostou a facilitovanou difúzi ve zředěných polymerních roztocích. K analýze použili fluorescenčně značené polystyrenové řetězce. Z výsledků analýz roztoků o stejných koncentracích a molekulových hmotnostech zjistili, že výstupem FCS je prostý difúzní koeficient, zatímco DLS poskytuje facilitovaný difúzní koeficient. Tým následně porovnáním FCS a DLS dat zjistil, že prostřednictvím FCS lze v různých režimech pozorovat jak difúzi prostou, tak facilitovanou [60].

**Liang a spol.** prostřednictvím FCS stanovovali nukleoplazmickou viskozitu. Neinvazivní a spolehlivá kvantifikace reologických vlastností buněčného jádra je totiž extrémně užitečná pro fundamentální výzkum a praktické aplikace v medicíně a biologii. Mimo jiné také zjistili, že nukleoplazmická viskozita HeLa buněk i buněk adenokarcinomu plic byla vyšší než viskozita jejich cytoplazmy [61].

Pro svá měření si techniku FCS zvolili i **Kihara a spol.** Ti stanovovali difúzní koeficienty biomolekul různých velikostí (1–10 nm) ve smrštěném kolagenovém gelu (účinkem fibroblastů). Difúzní koeficienty biomolekul v kontrolním kolagenovém gelu bez buněk se podobně jako v roztoku snižovaly postupně. Nicméně ve smrštěném gelu za přítomnosti buněk docházelo k prudkému snížení difúzních koeficientů. Po získání difúzních koeficientů biomolekul mohl tým vypočítat poměr kondenzace kolagenového vlákna fibroblasty. Přišli tak na to, že v přítomnosti buněk je biomolekulární difúze z důvodu vysoce kondenzovaných kolagenových vláken omezená [62].

**Fatin-Rouge a spol.** využili FCS ke studii difúze nanočástic o velikosti 1–140 nm v agarósových gelech, které se často používají jako modelové systémy představující mikrobiální biofilmy nebo buněčnou cytoplasmu. Výsledky měření odhalily anomální difúzi částic v agarósových gelech, ke které dochází tehdy, dojde-li k zachycení velkých částic v pórech gelu [48], [63].

Kontrolovaná difúze a uvolnění rozpustných molekul je jedním z klíčových problematik při vývoji třidimenzionálních scaffoldů pro tkáňové inženýrství a nosiče léčiv. **Zustiak a spol.** použili FCS metodu pro přímá měření translační difúze solutů, a to prostřednictvím charakterizace difúze modelových proteinů v 3D zesítěném polyethylenglykolovém (PEG) hydrogelovém scaffoldu. Zkoumali jak dynamiku hydrogelové struktury, tak velikost proteinu a jejich efekt na difuzivitu proteinu. Výsledky z FCS pro proteinovou difuzivitu následně validovali porovnáním se standardním velkoobjemovým stanovením difúze [64].

## 4 KONCEPT PRÁCE

Jedním z cílů a také přínosů této práce bylo provést rešerši na pasivně mikrereologické techniky ve studiu koloidních soustav s přihlédnutím k technice fluorescenční korelační spektroskopie a hydrogelům. Na základě provedené rešerše byl následně vybrán postup pro využití FCS v mikrereologické studii fázově separovaného hydrogelu v systému hyaluronan-cetyltrimethylamonium bromid (dále jen CTAB). Pro tento účel byl na základě FCS analýz nejprve uskutečněn výběr nejvhodnější velikosti fluorescenčně značených částic (i s ohledem na závěry práce týmu *Szymański a spol.* [59]) Byly proto porovnávány výsledky z měření 30, 100 a 300nm fluorescenčně značených částic rozptýlených v prostředí glycerolu a vody. Pro účel tohoto srovnání byly použity výsledky i pro 100nm částice z mé předchozí (bakalářské) práce [65]. Měření v prostředí newtonské kapaliny (voda, glycerol) bylo navíc ověřeno správné nastavení FCS metody.

Dalším cílem této práce bylo ověřit hypotézu uvedenou v mé bakalářské práci [65], a to, že změna indexu lomu analyzovaného roztoku může způsobit deformaci konfokálního objemu, čímž dojde ke vzniku nepřesností výsledků měření. Pro tento účel byl změřen index lomu všech použitých roztoků a gelů, následně bylo provedeno srovnání těchto hodnot a diskuse jejich vlivu na výsledky analýz.

Po výběru vhodných fluorescenčně značených částic a ověření vlivu indexu lomu na výsledky FCS měření byly provedeny mikrereologické analýzy nejprve u různě koncentrovaných roztoků biopolymeru. Na základě toho mohl být zhodnocen vliv koncentrace i molekulové hmotnosti biopolymeru na mikrereologické chování roztoků a byly tak získány podklady pro srovnání s mikrereologickým chováním hydrogelu. U připravených gelů byl následně zhodnocen i vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu na mikrereologické chování.

Spolu s výsledky byla průběžně diskutována a na závěr shrnuta použitelnost a omezení FCS techniky pro pasivní mikrereologii. V tomto kroku byla zohledňována koncentrace a molekulová hmotnost polymeru, změny indexu lomu prostředí a velikost částic.

## 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 Materiály

Částice	Latex beads, carboxylate-modified polystyrene, fluorescent yellow-green Sigma-Aldrich L5155-1ML, LOT# 012K1566V Aqueous suspension: 2,5 % solids 0,03 $\mu\text{m}$  Micro particles GmbH PS-FluoRed-Fi207 Aqueous suspension: 2,5 % solids 0,288 $\mu\text{m}$ , PDI = 0,07 abs/em = 530/607 nm
Hyaluronan	Sodium hyaluronate, 90–130 kDa, Tech. grade Contipro Biotech s.r.o., Czech Republic Batch No.: 214-8707 Vlhkost 9,18 %  Sodium hyaluronate, 500–750 kDa, Tech. grade Contipro Biotech s.r.o., Czech Republic Batch No.: 213-4245 Vlhkost 8,18 %  Sodium hyaluronate, 1500–1750 kDa, Tech. grade Contipro Biotech s.r.o., Czech Republic Batch No.: 213-5226 Vlhkost 10,27 %
Glycerol	Glycerol $\geq$ 99,5 % Sigma-Aldrich G9012-1L LOT# BCBK9967V
NaCl	Chlorid sodný p.a. (PENTA) CAS: 7647-14-5 č. šarže: 1903200314
CTAB	Hexadecyltrimethylammonium bromide $\geq$ 99 % Sigma-Aldrich H6269 – 500 G LOT# SLBJ9504V
Rozpouštědlo	deionizovaná voda

## 5.2 Příprava vzorků

### 5.2.1 Roztoky glycerolu a deionizované vody

Roztoky glycerolu a deionizované vody byly připraveny dle **Tabulky 1**. Po smísení glycerolu, deionizované vody a fluorescenčně značených 30nm částic byly vzniklé roztoky zamíchány na vortexu. Pomocí probublání dusíkem byl z roztoku odstraněn kyslík, který by mohl zhaset fluorescenci. Dle obdobného postupu byly připraveny i roztoky 40% a 80% glycerolu s deionizovanou vodou, ve kterých byly rozptýleny 300nm fluorescenčně značené částice.

*Tabulka 1 Složení roztoků glycerolu a vody*

Vzorek	Objem glycerolu [ml]	Objem deionizované vody [ml]	Objem 30nm částic [ $\mu$ l]
Deionizovaná voda	0	1,0	2
20% glycerol	0,2	0,8	2
40% glycerol	0,4	0,6	2
60% glycerol	0,6	0,4	2
80% glycerol	0,8	0,2	2

Stejným způsobem byly připraveny roztoky pro měření indexu lomu. Pro tento účel však nebylo třeba do těchto roztoků přidávat fluorescenčně značené částice a odstraňovat rozpuštěný kyslík.

### 5.2.2 Roztoky hyaluronanu sodného

Pro přípravu roztoků hyaluronanu byl pro každou koncentraci použit hyaluronan o třech molekulových hmotnostech:

- $M_S$ : 90–130 kDa
- $M_M$ : 500–750 kDa
- $M_L$ : 1500–1750 kDa

S ohledem na vlhkost práškového hyaluronanu byly připraveny roztoky o několika koncentracích uvedených v **Tabulce 2**, ke kterým byly přidány buď 30nm nebo 300nm částice.

*Tabulka 2 Přehled analyzovaných roztoků hyaluronanu*

Koncentrace HA [g/l]	0,01	0,1	1	3	5	7	15
Velikost použitých částic [nm]	300	300	300				
		30	30	30	30	30	30

Příprava těchto roztoků spočívala v navázení příslušného množství hyaluronanu a následném rozpuštění v deionizované vodě. Do druhého dne byl roztok vždy ponechán k rozmíchání na magnetické míchače. Po této době bylo možné přidat do roztoku fluorescenčně značené částice, a to vždy 2  $\mu$ l částic k 1 ml roztoku. Takto připravený vzorek byl probublán dusíkem pro odstranění rozpuštěného kyslíku a následně mohl být podroben FCS analýze.

Stejně jako u roztoků glycerolu byly i roztoky biopolymeru pro měření indexu lomu připraveny bez přídavku fluorescenčně značených částic a bez následného probublání dusíkem.

### 5.2.3 Hydrogely hyaluronanu sodného a CTAB

Pro přípravu modelového hydrogelu byl vybrán hyaluronan o koncentraci 10 g/l, který byl rozpuštěn v 0,15M roztoku NaCl. Přidáním 200mM roztoku CTAB, který byl rovněž rozpuštěn v 0,15M NaCl, vznikl fázově separovaný gel.

Stejně jako u roztoků hyaluronanu bylo nejprve navázeno příslušné množství práškového biopolymeru. Navážka byla následně rozpuštěna v roztoku 0,15M NaCl a takto vzniklý roztok byl do druhého dne ponechán k rozmíchání na magnetické míchače. Druhý den byly ke 3 ml tohoto roztoku přidány 3  $\mu$ l 30nm fluorescenčně značených částic a směs byla promíchána na vortexu. Následně byl k této směsi přidán roztok 200mM CTAB v poměru k HA 1:1. Smísením těchto roztoků vznikl fázově separovaný gel, který byl ponechán do druhého dne sedimentovat. Takto sedimentovaný gel měl totiž lepší optické vlastnosti, než gel oddělený od supernatantu pomocí odstředivky – na základě vizuálního porovnání těchto hydrogelů bylo zjištěno, že samovolně sedimentovaný hydrogel byl více čirý než gel centrifugovaný. Po oddělení supernatantu byl hydrogel podroben měření na FCS.

Stejným způsobem byly připraveny vzorky hydrogelů pro měření indexu lomu. Jediným rozdílem byla absence fluorescenčně značených částic.

## 5.3 Měření a vyhodnocování dat

### 5.3.1 Přístroje a programy

Pro účely FCS měření byl využíván přístroj společnosti PicoQuant, a to *MicroTime 200, Time-resolved Fluorescence Microscope*. Měření byla elektronicky zaznamenávána a zpracovávána prostřednictvím softwaru *SymPhoTime 64*. Pro 30nm (300nm) fluorescenčně značené částice byl zvolen excitační horizontálně polarizovaný laser s vlnovou délkou 470 nm (510 nm) a pro konfokální detekci byl vybrán emisní pásmový filtr s vlnovou délkou 520/35 nm (550/49 nm).

Pro následné zpracování FCS dat za účelem získání hodnot MSD byl použit software *Microsoft Excel* a *MATLAB*.

### 5.3.2 Měření a vyhodnocování FCS dat

Prvním krokem FCS měření bylo vždy nastavení přístroje. To zahrnovalo nastavení maximální odezvy detektoru prostřednictvím manuální konfigurace pinhole a mikroostření mikroskopu a detektoru, u kterého bylo nastaveno i optimální rozlišení. Před měřením vzorků

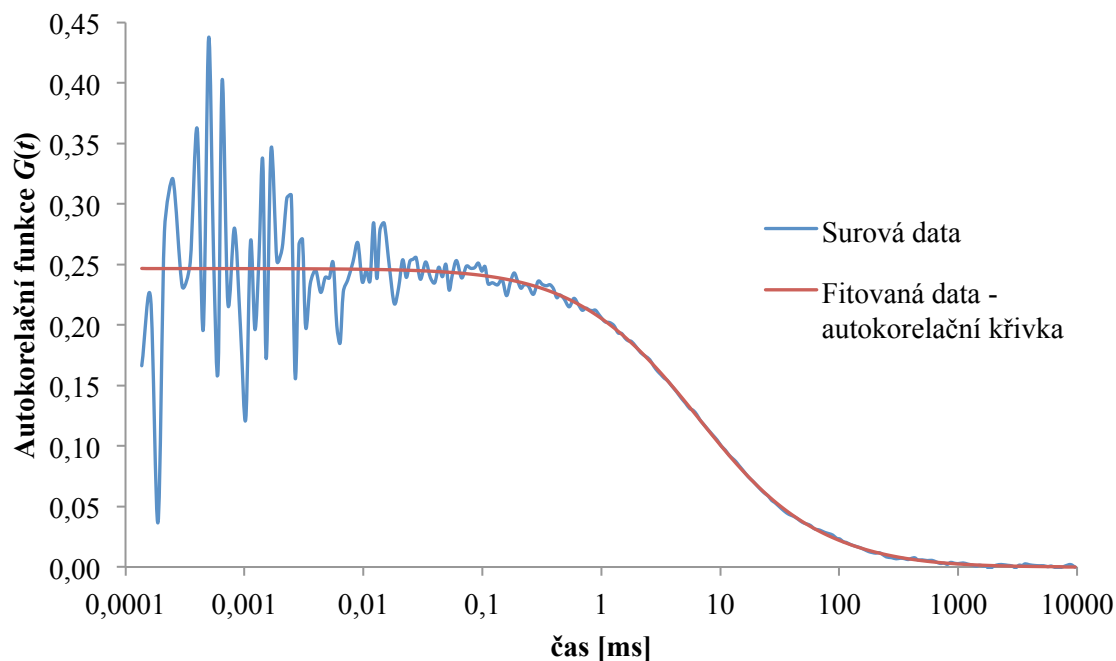
byla dále provedena kalibrace efektivního konfokálního objemu, a to prostřednictvím analýzy roztoku fluorescenční sondy Atto 488 o koncentraci 2 nM (pro 30nm částice) nebo Rhodaminu 6G o koncentraci 0,5 nM (pro 300nm částice). Důležitým výstupem kalibrace byly hodnoty charakterizující konfokální objem – mj. hodnota  $\kappa$  a  $V_{ef}$ .

Na základě provedené kalibrace bylo dále možné měřit vzorky samotné. Výstupem FCS měření byla křivka časové závislosti autokorelační funkce  $G(t)$ . Tato surová data byla následně softwarem fitována pomocí matematického modelu pro čistou difúzi (Rovnice (32)) a na základě statistiky byl stanoven počet difúzních komponent matematického modelu. S přihlédnutím k Rovnici (32) pak čistou difúzi popisuje rovnice:

$$G(t) = \sum_{i=0}^{n_{dif}-1} \frac{\rho[i]}{\left[1 + \frac{t}{\tau_D[i]}\right] \left[1 + \frac{t}{\tau_D[i]\kappa^2}\right]^{1/2}} \quad N = \left[ \sum_{i=0}^{n_{dif}-1} \rho[i] \right]^{-1} \quad (34)$$

kde  $n_{dif}$  je počet nezávisle difundujících částic,  $\tau_D$  je difúzní čas  $i$ -té difundující částice,  $t$  je čas,  $\rho[i]$  je příspěvek  $i$ -té difundující částice,  $\kappa$  je poměr délky a průměru konfokálního objemu a  $N$  je průměrný počet molekul v konfokálním objemu vypočítaný z  $G(0)$ .

Výsledkem fitování matematickým modelem byla autokorelační křivka (viz **Obrázek 11**).



**Obrázek 11** Ukázka fitování naměřených FCS dat

Získaná data z autokorelační křivky bylo dále nutné přepočítat na parametr popisující mikoreologické vlastnosti daného prostředí, a to MSD. Jak už bylo uvedeno v teoretické části v kapitole 2.4.3.6, lze do rovnice popisující autokorelační funkci  $G(t)$  parametr MSD dosadit:

$$G(t) = \frac{1}{N} \left( 1 + \frac{2}{3w_0^2} \langle \Delta r^2(t) \rangle \right)^{-1} \left( 1 + \frac{2}{3z_0^2} \langle \Delta r^2(t) \rangle \right)^{-1/2} \quad (35)$$

Pro další výpočty bylo nutné vyjádřit parametr MSD z předchozí rovnice, a to ve formě kubické rovnice:

$$\langle \Delta r^2(t) \rangle = x \Rightarrow \frac{2}{3w_0^4 z_0^2} x^3 + \left( \frac{2}{w_0^2 z_0^2} + \frac{4}{9w_0^4} \right) x^2 + \left( \frac{4}{3w_0^2} + \frac{3}{2z_0^2} \right) x + 1 - \frac{1}{N^2 (G(t))^2} = 0 \quad (36)$$

Vzhledem k objemu dat a složitosti výpočtů byl k vyjádření hodnot MSD z předchozí rovnice použit program *MATLAB*. Pro tento účel byl použit následující m-soubor:

V prvním kroku bylo nutné zadat tyto naměřené a vypočítané parametry z FCS (uvedené hodnoty jsou ilustrační):

<code>n = 220;</code>	počet řádků dat z autokorelační křivky
<code>wxy = 0.320^2*ones(n,1);</code>	průměr konfokálního objemu [ $\mu\text{m}$ ]
<code>wz = 1.599^2*ones(n,1);</code>	délka konfokálního objemu [ $\mu\text{m}$ ]
<code>N = 0.015908*ones;</code>	počet částic v konfokálním objemu

Druhý krok zahrnoval samotný výpočet kořenů kubické rovnice:

```

a = 1./(3.*(wxy.^2).*wz);
b = (8./(9.*wxy.*wz))+(4./(9.*(wxy.*wxy)));
c = (4./(3.*wxy))+(2./(3.*wz));
d = 1-(1./(N*Gt).^2);

r = zeros(n,3);
for i = 1:n
p = roots([a(i), b(i), c(i), d(i)]);
r(i,:) = p;
end

```

Tímto způsobem byly vyjádřeny experimentálně získané hodnoty MSD závislé na čase.

Aby bylo možné experimentálně získané hodnoty MSD porovnat s teoretickými hodnotami, vycházelo se z těchto rovnic:

$$\text{MSD} = 6Dt; D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \quad (37)$$

kde  $D$  je difúzní koeficient,  $k_B$  je Boltzmannova konstanta,  $T$  je teplota,  $\eta$  je viskozita tekutiny (tabelovaná hodnota),  $t$  je čas a  $R$  je poloměr částice. Teoretické hodnoty MSD pak lze na základě toho vyjádřit:

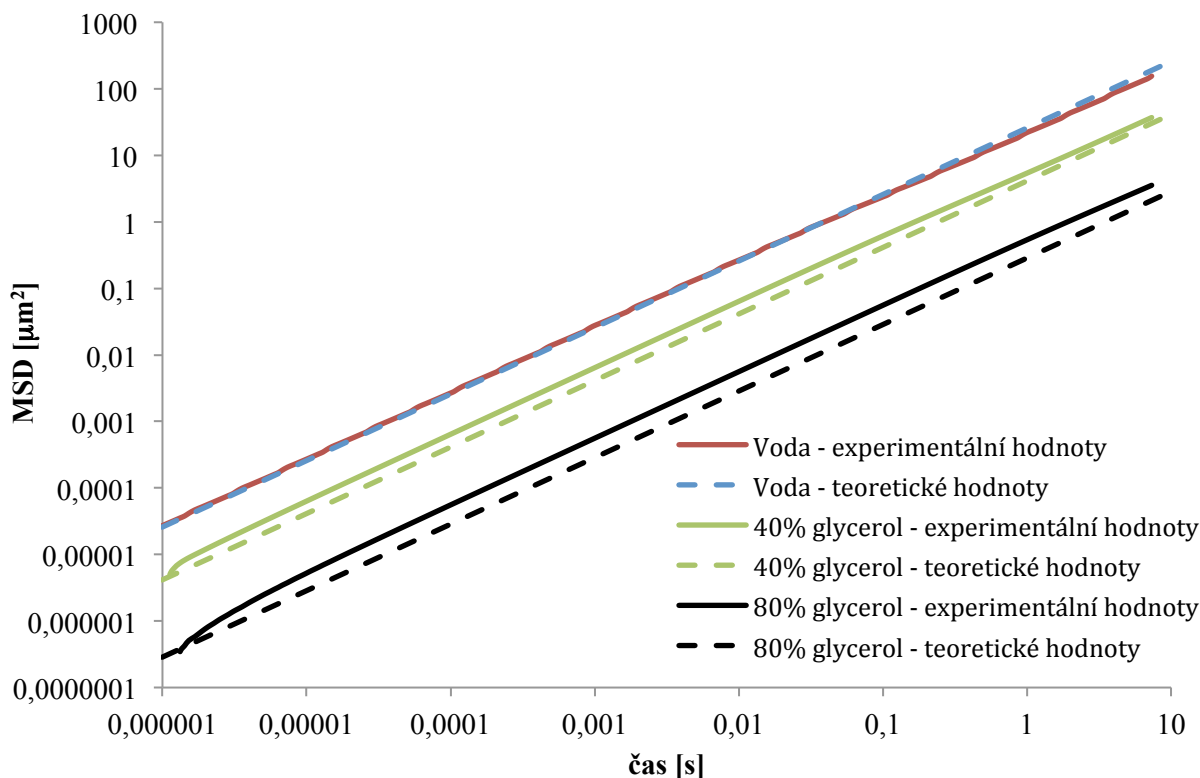
$$\text{MSD}_{\text{teor.}} = \frac{k_B T t}{\pi\eta R} \cdot 10^{12} [\mu\text{m}^2] \quad (38)$$

Výpočet teoretických hodnot MSD a jejich následné porovnání s experimentálními daty bylo použito pouze u newtonských roztoků (glycerol a voda). U finálních časových MSD závislostí roztoků hyaluronanu a hydrogelů byly pro účel porovnání chování newtonské a neneutronské kapaliny použity teoretické hodnoty MSD pro prostředí vody.

## 6 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 6.1 Výběr vhodné velikosti fluorescenčních částic

Jak už bylo uvedeno výše, tato práce navazuje na mou předešlou (bakalářskou) práci, ve které byly pro FCS měření použity 100nm fluorescenčně značené částice. Ty byly mimo jiné použity i pro analýzu newtonských roztoků glycerolu a vody (**Obrázek 12**).

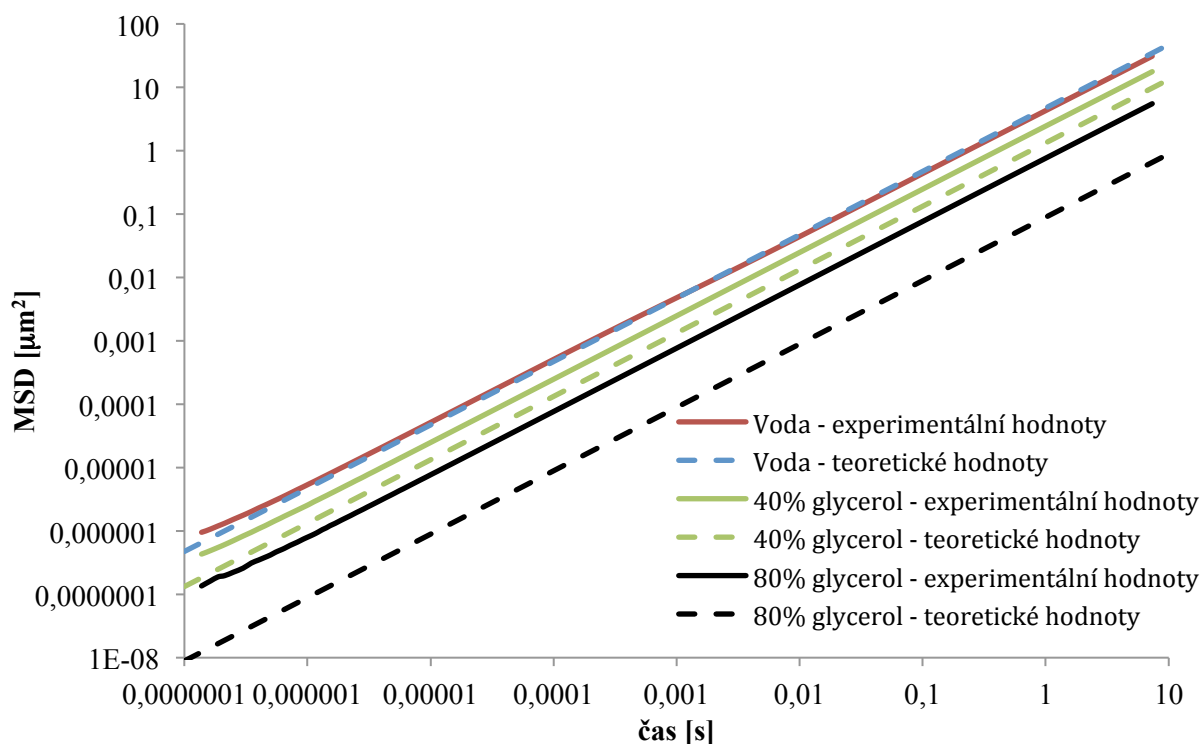


**Obrázek 12** Výsledky FCS analýz 100nm částic v prostředí glycerolu a vody

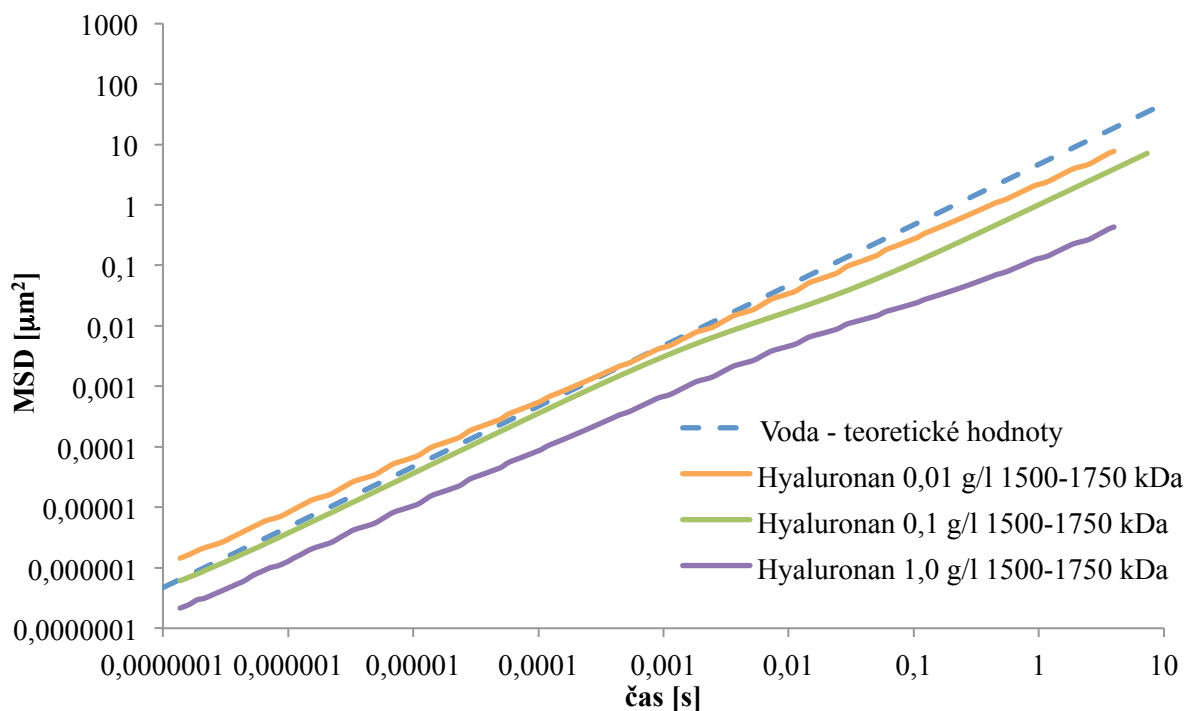
Z analýz **100nm částic** v prostředí vody, 40% a 80% glycerolu je patrné, že se zvyšující se viskozitou (koncentrací glycerolu) dochází k čím dál většímu posunu křivky experimentálně získaných dat od křivky vypočítaných teoretických dat. Při použití 100nm částic při FCS analýzách by tudíž za těchto podmínek bylo možné objektivně měřit pouze vzorky s nízkou viskozitou, tzn. zředěné vodné roztoky. Nejprve se na základě práce *Suhlinga a spol.* [66] předpokládalo, že ke zmíněnému posunu křivek dochází v důsledku deformace konfokálního objemu v závislosti na změně indexu lomu prostředí. Tato hypotéza však byla na základě dalších experimentů (viz dále) vyvrácena.

Mezi tyto experimenty patří i analýzy, ve kterých byly použity fluorescenčně značené **300nm částice**, a to opět k měření mikroreologických vlastností vody a glycerolu. Na výsledných grafických závislostech hodnot MSD na čase (**Obrázek 13**) je možné znovu pozorovat zvětšující se posun experimentálních hodnot od teoretických, a to dokonce v ještě větší míře než u 100nm částic. Na základě toho je proto na místě zařadit mezi hlavní faktory ovlivňující zmíněný posun experimentálních hodnot především velikost použitých fluorescenčně značených částic. Podobně jako u 100nm částic by se i 300nm částice daly teoreticky použít na relativně objektivní měření roztoků o nízké viskozitě (blížíci se vodě), ale

oproti 100nm částicím určitě v menší míře. Nicméně i vzhledem k výsledkům dalších níže uvedených experimentů realizovaných v prostředí hyaluronanu (**Obrázek 14**) lze použití 300nm částic pro účely FCS mikroeologie klasifikovat jako nevhodné.



**Obrázek 13** Výsledky FCS analýz 300nm částic v prostředí glycerolu a vody

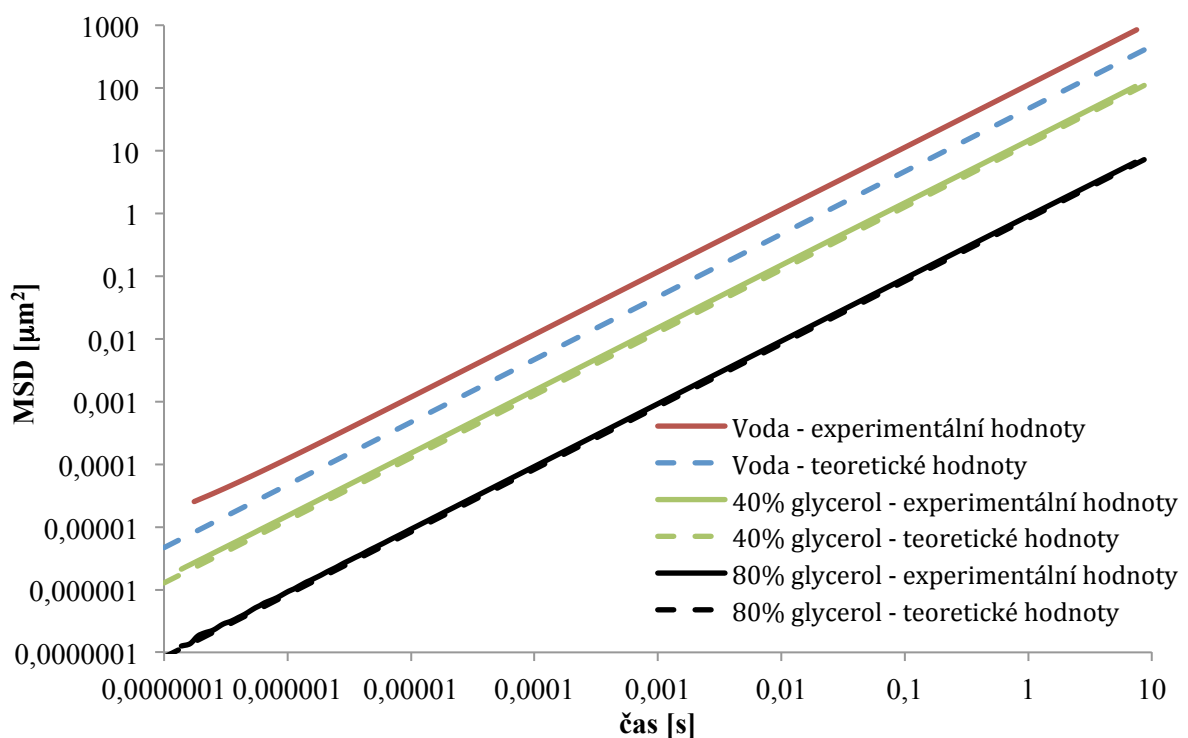


**Obrázek 14** Výsledky FCS analýz 300nm částic v prostředí hyaluronanu ( $M = 1500\text{--}1750$  kDa)

Z výsledků měření 300nm částic v prostředí vysokomolekulárního hyaluronanu (**Obrázek 14**) je patrné, že již při nízké koncentraci biopolymeru se na křivce časové závislosti MSD začíná pomalu objevovat šum, který způsobuje „roztřesení“ křivky. Tento šum by se pravděpodobně s dalším zvyšováním koncentrace projevoval stále víc, na základě čehož by docházelo ke zkreslování a výsledné křivky by nepopisovaly skutečné mikoreologické chování daného prostředí. A protože cílem těchto experimentů je výběr nejvhodnějších částic pro měření hydrogelů, u kterých je koncentrace hyaluronanu 10 g/l, je na místě 300nm částice z tohoto výběru vyloučit. Kvůli podobnému rozměru částic a konfokálního objemu navíc vznikají velké nepřesnosti, a proto je i zpracování naměřených dat a následný přepočítání na MSD obtížnější než u menších částic.

Protože použití fluorescenčně značených částic větších než 100 nm bylo posouzeno jako nevhodné, byly k dalšímu měření použity menší **30nm částice**. Na **Obrázku 15** jsou znázorněny časové závislosti hodnot MSD pro 30nm částice, a to opět v prostředí glycerolu a vody. Na první pohled je patrné, že oproti větším částicím lze pomocí těchto 30nm získat spolehlivá experimentální data (odpovídající těm teoreticky vypočítaným) především pro viskóznější (koncentrovanější) vzorky, což perfektně vyhovuje účelu této práce.

Co se týče výsledků analýz těchto částic v prostředí vody, je zde opět pozorován již výše zmíněný posun experimentálních hodnot od teoretických. Z uvedených grafických závislostí by bylo možné vyvodit souvislost mezi velikostí částic, viskozitou měřeného roztoku a právě tímto posunem. Pro měření vzorků o viskozitě podobné vodnému prostředí by proto do budoucna bylo zajímavé vyzkoušet FCS měření s ještě menšími (např. 20nm) částicemi.



**Obrázek 15** Výsledky FCS analýz 30nm částic v prostředí 40% a 80% glycerolu a vody

## 6.2 Vliv změny indexu lomu roztoku na výsledek mikreologické FCS analýzy

V předchozí kapitole byla diskutována hypotéza, že změna indexu lomu měřených roztoků (oproti vodnému roztoku fluorescenční sondy Atto 488 použitému při kalibraci konfokálního objemu) způsobuje změnu směrnice (posun) křivky časové závislosti experimentálně zjištěných MSD hodnot vůči teoretickým hodnotám. Na základě porovnání grafických závislostí MSD na čase však bylo zjištěno, že hlavními faktory ovlivňující zmíněný posun jsou viskozita měřeného roztoku a velikost použitých částic.

I přes to však bylo na místě ověřit vliv změny indexu lomu měřeného roztoku na finální výsledky mikreologické FCS analýzy. Pro tento účel byl proto u všech roztoků použitých pro mikreologické analýzy změřen index lomu. K největšímu nárůstu indexu lomu docházelo u roztoků glycerolu a vody – viz **Tabulka 3**.

*Tabulka 3 Naměřené hodnoty indexu lomu pro roztoky glycerolu a vody*

Vzorek	Voda	20% glycerol	40% glycerol	60% glycerol	80% glycerol
<b>Index lomu</b>	1,3309	1,3601	1,3883	1,4156	1,4444

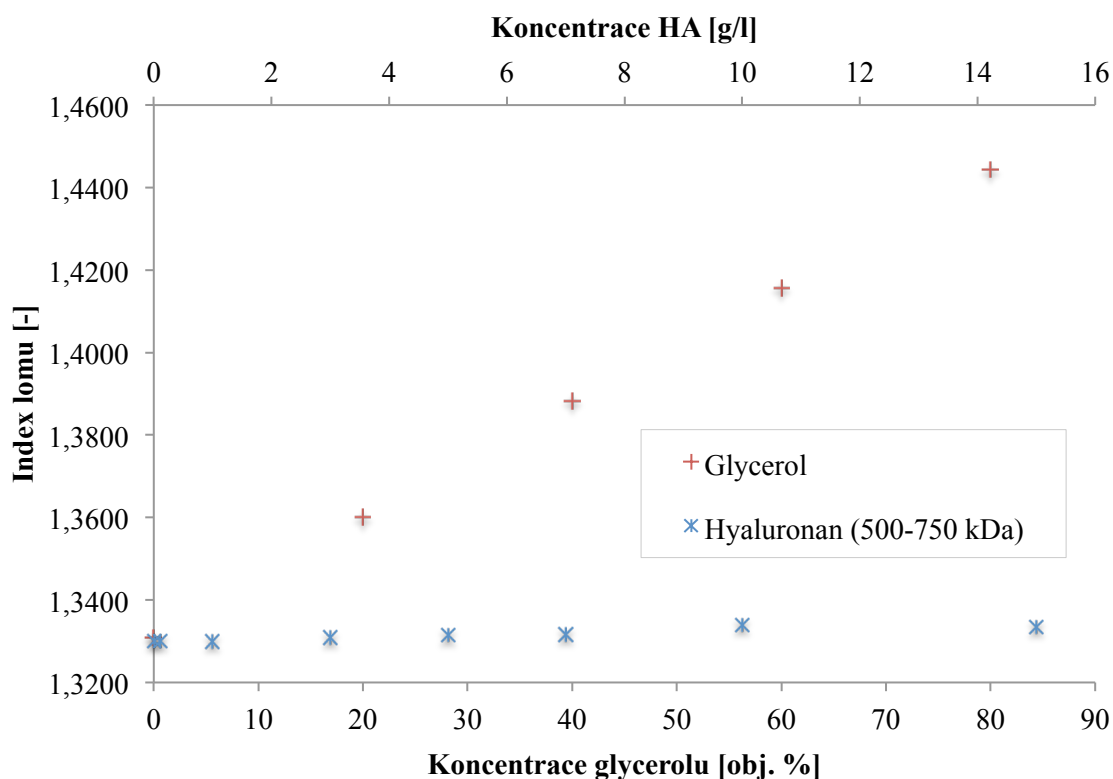
U měřených roztoků hyaluronanu k tak velkému nárůstu indexu lomu nedocházelo, a to dokonce ani v případě hydrogelů hyaluronanu s CTAB (**Tabulka 4**).

*Tabulka 4 Naměřené hodnoty indexu lomu pro roztoky hyaluronanu a pro hydrogely HA s CTAB*

	Index lomu		
Molekulová hmotnost HA	90–130 kDa	500–750 kDa	1500–1750 kDa
Koncentrace HA [g/l]			
0,01	1,3301	1,3301	1,3301
0,1	1,3301	1,3301	1,3300
1,0	1,3300	1,3300	1,3300
3,0	1,3309	1,3309	1,3309
5,0	1,3315	1,3315	1,3315
7,0	1,3317	1,3317	1,3319
10,0	1,3343	1,3339	1,3340
15,0	1,3335	1,3335	1,3335
<b>Hydrogely HA (10 g/l) + CTAB</b>	1,3628	1,3632	1,3645

Z naměřených hodnot je patrné, že se index lomu roztoků hyaluronanu zvyšoval spolu s koncentrací biopolymeru. Molekulová hmotnost hyaluronanu zřejmě nebude mít na změnu indexu lomu takový vliv, protože v rámci jednotlivých koncentrací polymerního roztoku

došlo vždy jen k minimální změně. Zřetelnější změnu hodnot indexu lomu lze pozorovat u stejně koncentrovaných hydrogelů, u kterých je patrný velmi pozvolný nárůst indexu lomu se zvyšující se molekulovou hmotností hyaluronanu.



**Obrázek 16** Grafické znázornění nárůstu hodnot indexu lomu v závislosti na koncentraci roztoků

Pro lepší zhodnocení byla rovněž vynesena grafická závislost indexu lomu na koncentraci roztoků glycerolu a hyaluronanu (**Obrázek 16**). Protože se index lomu v závislosti na molekulové hmotnosti hyaluronanu významně neměnil, byly pro grafické znázornění použity výsledky pro hyaluronan o molekulové hmotnosti 500–750 kDa. Jak z uvedených tabulek tak z grafu je patrné, že se index lomu mnohem více zvyšuje u roztoků glycerolu než u použitých roztoků hyaluronanu.

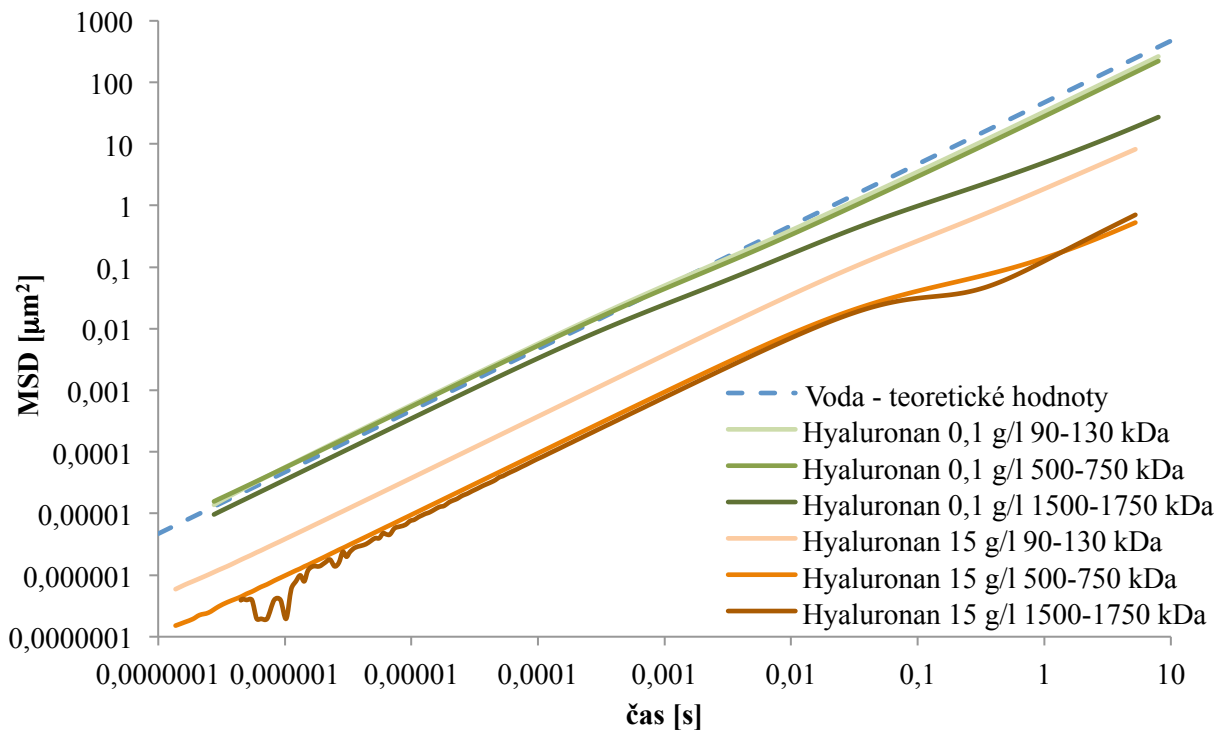
Již dříve bylo uvedeno (**Obrázek 15**), že i v prostředí 80% glycerolu, který má nejvyšší naměřený index lomu, korelují experimentální FCS data pro 30nm částice velmi dobře s teoreticky vypočítanými daty (především co se týče směrnice křivky). Proto lze **pro případ zde použitých roztoků a hydrogelů** hyaluronanu dojít k závěru, že změna indexu lomu nemá zjevný vliv na vznik posunu křivky experimentálních dat vůči těm teoreticky vypočítaným.

### 6.3 Vliv koncentrace a molekulové hmotnosti HA na mikrereologii roztoku

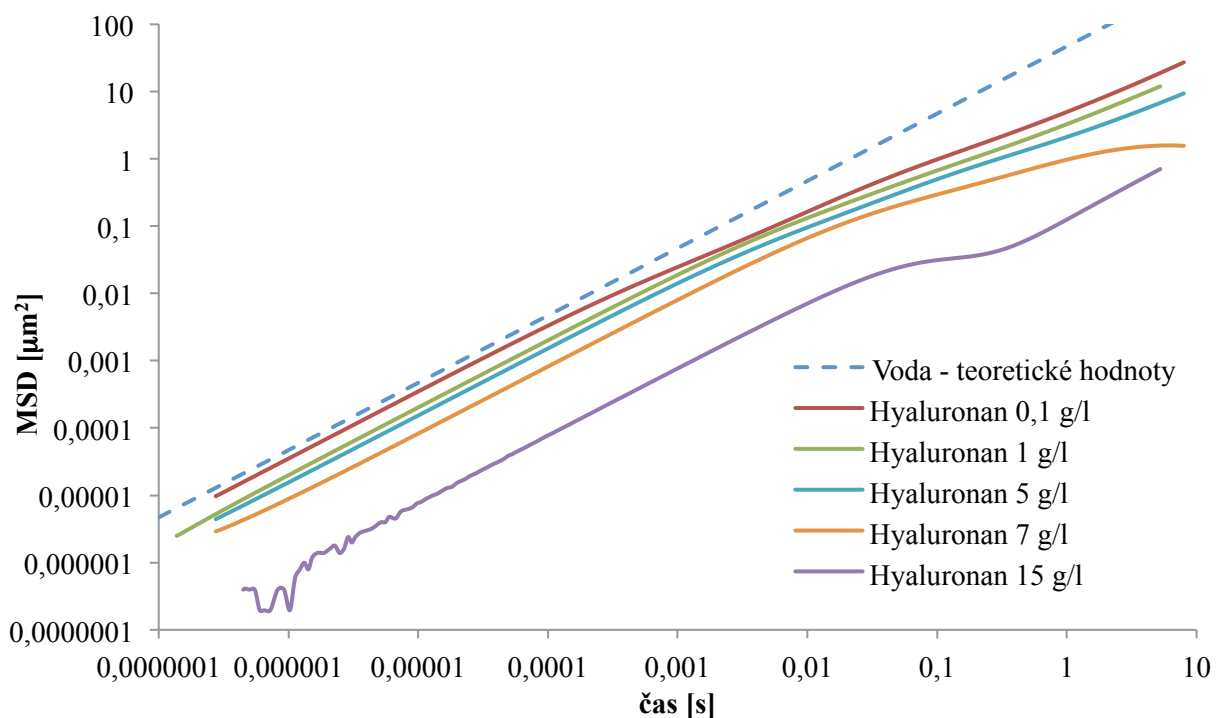
Za účelem posouzení vlivu molekulové hmotnosti a koncentrace hyaluronanu na mikrereologické chování roztoku byly připraveny roztoky HA o koncentracích 0,1; 1; 3; 5; 7 a 15 g/l. Pro každou koncentraci byly připraveny tři roztoky o různých molekulových hmotnostech: 90–130 kDa, 500–750 kDa a 1500–1750 kDa.

Pro vizuální porovnání a ověření správnosti výpočtů je v následujících grafických závislostech uvedena i křivka teoreticky vypočítaných hodnot pro vodu. Dalším důvodem pro

uvedení teoretických hodnot pro vodu bylo i potvrzení předpokladu, že rovnice pro výpočet hodnot MSD z autokorelační funkce platí jak pro newtonské kapaliny, tak pro neneutonské.



**Obrázek 17** Výsledky FCS analýz pro 30nm částice v prostředí roztoků hyaluronanu o koncentracích 0,1 g/l a 15 g/l s molekulovou hmotností 90–130 kDa, 500–750 kDa a 1500–1750 kDa



**Obrázek 18** Výsledky FCS analýz pro 30nm částice v prostředí různě koncentrovaného hyaluronanu s molekulovou hmotností 1500–1750 kDa

Na **Obrázku 17** jsou zobrazeny grafické závislosti MSD na čase pro nejzřednější (0,1 g/l) a nejkonzentrovější (15 g/l) roztoky hyaluronanu o molekulových hmotnostech 90–130 kDa, 500–750 kDa a 1500–1750 kDa. Z grafu je patrné, že hyaluronan o koncentraci 0,1 g/l vykazuje podobné chování jako voda, a to až do střední molekulové hmotnosti (500–750 kDa). Nicméně již u těchto vzorků lze sledovat počínající viskoelastické chování. Při vysoké molekulové hmotnosti hyaluronanu (1500–1750 kDa) již lze na základě rostoucího podílu elastické složky pozorovat zřetelné odchýlení až esovité prohnutí křivky. Tento jev je nejvýraznější u nejkonzentrovějšího roztoku s vysokou molekulovou hmotností. U tohoto roztoku jsou však při nižších hodnotách MSD a času patrné počínající fluktuace křivky, což představuje pomyslnou hranici pro roztoky, které lze ještě pomocí FCS mikrореologie charakterizovat. Vzhledem k tomu, že se tyto fluktuace objevily až u vysoké molekulové hmotnosti hyaluronanu o koncentraci 15 g/l, je pravděpodobné, že by FCS analýzy koncentrovanějších roztoků s nižší molekulovou hmotností stále mohly poskytovat relevantní výsledky.

Další věc, kterou lze na **Obrázku 17** pozorovat, je posun křivek v rámci osy  $y$  k nižším hodnotám MSD, a to s rostoucí koncentrací roztoku a nepatrně i s rostoucí molekulovou hmotností. Tento posun je logický důsledek toho, že v koncentrovanějším prostředí se pozorovaná částice pohybuje v menší míře než například ve vodném prostředí. Na **Obrázku 18** je tato závislost posunu křivky na koncentraci roztoku demonstrována na koncentrační řadě roztoků hyaluronanu o vysoké molekulové hmotnosti 1500–1750 kDa. Pro přehlednost grafu byly v tomto případě vynechány výsledky pro koncentraci 3 g/l, jsou však uvedeny v přílohách. U všech uvedených křivek lze opět pozorovat odchýlení až esovitý tvar křivky, což vypovídá o viskoelastickém chování roztoků a postupném nárůstu elastické složky.

Výsledkem tedy je, že koncentrace hyaluronanu ovlivňuje výstupy FCS mikrореologie v tom smyslu, že způsobuje postupný nárůst elastické složky a posun křivek ve směru osy  $y$  k nižším hodnotám MSD. Molekulová hmotnost hyaluronanu k tomuto posunu také přispívá, nicméně oproti koncentraci biopolymeru v daleko menší míře, a ovlivňuje především odchýlení křivky a její tvar (esovité prohnutí, fluktuace při nižších hodnotách MSD i času). K největšímu odchýlení křivky dochází zpravidla u roztoků vysokomolekulárního hyaluronanu.

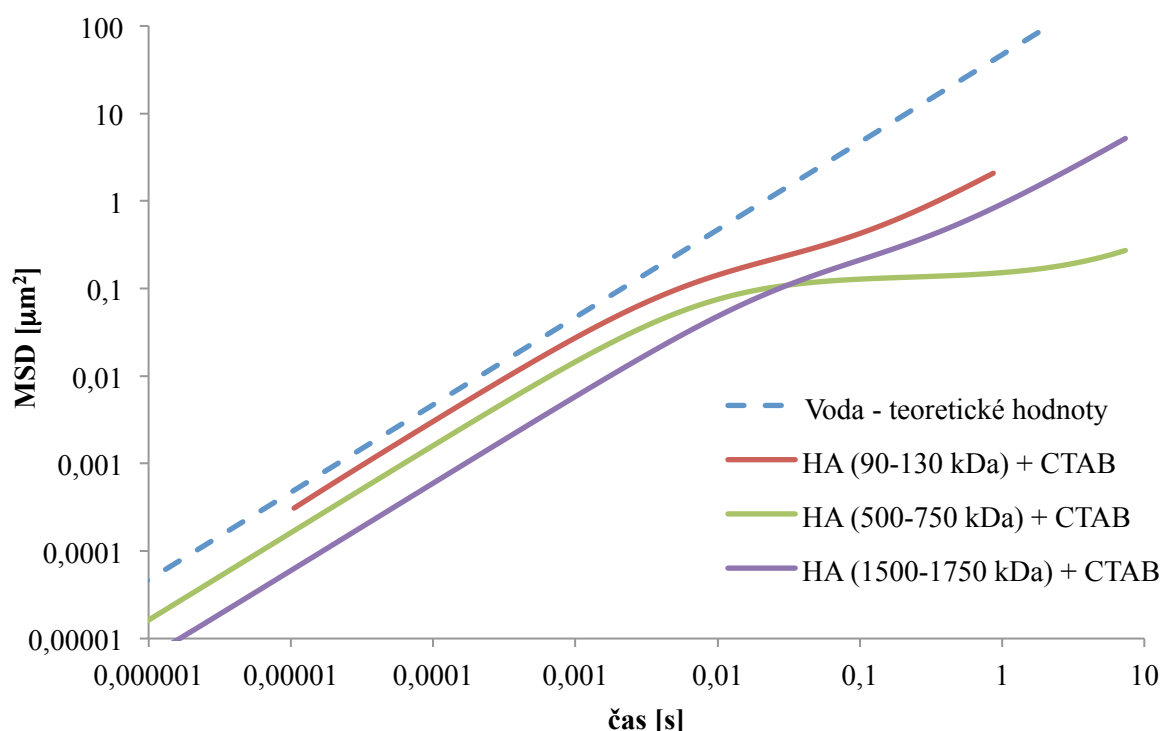
#### **6.4 Vliv molekulové hmotnosti HA na mikrореologii hydrogelu**

Na základě zhodnocení mikrореologického chování roztoků hyaluronanu mohlo být následně provedeno srovnání s připravenými hydrogely. Na **Obrázku 19** jsou znázorněny časové závislosti MSD pro tři hydrogely, které byly připraveny z hyaluronanu o koncentraci 10 g/l, z toho každý s rozdílnou molekulovou hmotností.

Stejně jako u roztoků hyaluronanu i zde je možné v závislosti na rostoucí molekulové hmotnosti pozorovat postupný posun křivek po ose  $y$  k nižším hodnotám MSD. V tomto ohledu je rovněž nutné zohlednit rozdílnou konzistenci gelů. Nízkomolekulární gel připomínal vysoce viskózní roztok podobný medu, gel z hyaluronanu o střední molekulové hmotnosti již svou konzistencí připomínal spíše gel než vysoce viskózní roztok a vysokomolekulární gel měl již podobu konzistentního gelu. Z toho je patrné, že molekulová

hmotnost hyaluronanu neovlivňuje pouze mikroreologické vlastnosti, ale i makroskopickou podobu daného gelu.

U všech uvedených křivek pro gely je opět možné ve vyšších hodnotách MSD a času pozorovat jejich esovité prohnutí, které vypovídá o viskoelastické odezvě prostředí a nárůstu elastické složky. U prvních dvou gelů lze stejně jako u roztoků hyaluronanu pozorovat zvětšující se odchýlení křivky v závislosti na rostoucí molekulové hmotnosti hyaluronanu. Tomuto trendu se lehce vzdaluje gel s vysokomolekulárním hyaluronanem. Příčinou mohla být například přítomnost mikrokrystallů vysráženého CTAB ve vzorku hydrogelu nebo jednoduše skutečnost, že pozorovaný konfokální objem byl zaměřen na místo, které mělo oproti předešlým vzorkům jiné uspořádání (vzhledem k hustotě sítě apod.).



**Obrázek 19** Výsledky FCS analýz pro 30nm částice v prostředí hydrogelu: HA (10 g/l) + 200mM CTAB

Z grafu je rovněž patrné, že i v případě měření hydrogelů poskytuje technika FCS mikroreologie data v širokém rozmezí hodnot MSD ( $10^{-5}$ – $10 \mu\text{m}^2$ ) i času ( $10^{-6}$ – $10$  s). Výjimku v tomto ohledu představuje hydrogel z nízkomolekulárního hyaluronanu, u kterého je však kratší rozsah získaných dat s největší pravděpodobností způsoben směřodatnou odchylkou při výpočtu počtu molekul v konfokálním objemu.

V celkovém porovnání s roztoky biopolymeru jsou analýzy hydrogelů i následné vyhodnocení dat složitější. U roztoku hyaluronanu je za běžných podmínek dostatečné, aby jednotlivé FCS měření probíhalo po dobu cca 10–15 minut. Taková měření v naprosté většině případů poskytnou dobré a spolehlivé výsledky. Oproti tomu analýzy hydrogelů vyžadují délku jednoho měření alespoň 30 minut, přičemž před samotnou analýzou je nutné ponechat gel umístěný na krycí skličku po dobu cca 10 minut, aby se tvarově ustálil a nedocházelo tak ke zkreslování měření. Vzhledem k obrovskému objemu dat je náročnější i následné softwarové zpracování získaných dat.

Navzdory těmto úskalím je však FCS mikoreologie významnou pokročilou technikou s obrovským potenciálem jak pro analýzu koloidních roztoků, tak hydrogelů. Přestože je vývoj této mikoreologické techniky teprve na počátku, je možné již nyní získat velmi zajímavé informace o mikroprostředí daného vzorku hydrogelu, a to v rámci poměrně širokého rozmezí MSD i času.

Přednost, kterou je nutno zdůraznit, je citlivost této techniky. Jak již bylo uvedeno, výsledky mikoreologického měření závisí i na volbě místa (v rámci hydrogelu), na které je zaměřen konfokální objem. Oblasti s rozdílnou hustotou gelové sítě tak budou poskytovat rozdílnou mikoreologickou odezvu. Pokud by se tedy provedlo několik měření téhož hydrogelu, ale se zaměřením na různá místa, bylo by na základě statistického zpracování získaných dat možné popsat mikoreologické chování různých heterogenních regionů hydrogelu. Takto detailně charakterizovaný hydrogel by pak mohl být použit například jako nosič léčiv nebo scaffold, protože by umožňoval jednodušší predikci chování molekul léčiva nebo buněk umístěných v gelu.

## 7 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo provést rešerši na pasivně mikrореologické techniky ve studiu koloidních soustav s přihlédnutím k technice fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) a hydrogelům. Na základě provedené rešerše byl poté vybrán postup pro využití FCS v mikrореologické studii fázově separovaného hydrogelu v systému hyaluronan-cetyltrimethylamonium bromid (CTAB). Průběžně byla rovněž diskutována použitelnost a omezení této techniky pro mikrореologická měření.

Prostřednictvím techniky FCS je možné s ohledem na velikost použitých fluorescenčně značených částic stanovit mikrореologické vlastnosti newtonských roztoků, a to s vysokou přesností. Volba vhodné velikosti částic je velmi důležitá pro eliminaci významné odchylky experimentálně zjištěných dat od těch teoretických, tzn. pro zvýšení spolehlivosti získaných výsledků. V rámci této práce byly použity dvě velikosti částic, 30nm a 300nm, a pro srovnání byly uvedeny výsledky z předešlé práce pro 100nm částice. Protože byl u 300nm částic pozorován poměrně velký posun experimentálních dat od teoretických a velikost těchto částic byla velmi podobná rozměru konfokálního objemu, byly tyto částice z výběru pro charakterizaci hydrogelu vyloučeny. Částice o průměru 100 nm byly z tohoto výběru také vyloučeny, protože sice poskytovaly dobré výsledky, ale spolehlivě pouze pro vzorky s nízkou viskozitou podobné vodě. I proto byly pro charakterizaci neneutronských hydrogelů vybrány 30nm částice, které se na základě analýz viskóznějších newtonských roztoků glycerolu ukázaly jako nejvhodnější.

Součástí této práce bylo i zhodnocení vlivu změny indexu lomu měřeného roztoku oproti kalibračnímu na výsledky mikrореologické analýzy. Na základě porovnání naměřených hodnot indexu lomu a výsledků FCS analýz bylo shledáno, že pro zde použité roztoky a hydrogely hyaluronanu nemá změna indexu lomu vliv na výsledky mikrореologického měření. Na základě analýz newtonských roztoků je hlavní role v tomto ohledu připisována především viskozitě roztoku a velikosti použitých fluorescenčně značených částic, protože právě tyto parametry s největší pravděpodobností ovlivňují odchylky experimentálních hodnot od teoretických.

Dalšími zkoumanými faktory ovlivňujícími mikrореologickou FCS analýzu biopolymerních roztoků byla koncentrace a molekulová hmotnost hyaluronanu. Bylo zjištěno, že koncentrace hyaluronanu způsobuje postupný nárůst elastické složky a posun křivek směrem k nižším hodnotám MSD. Molekulová hmotnost hyaluronanu k tomuto posunu také přispívá, nicméně oproti koncentraci biopolymeru v daleko menší míře, a ovlivňuje především odchýlení křivky a její tvar. K největšímu odchýlení křivky dochází zpravidla u nejkonzentrovanejších roztoků vysokomolekulárního hyaluronanu.

U připravených hydrogelů byl zkoumán vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu na výsledky FCS mikrореologie. Stejně jako u roztoků hyaluronanu i zde bylo možné v závislosti na rostoucí molekulové hmotnosti pozorovat postupný posun křivek směrem k nižším hodnotám MSD. S rostoucí molekulovou hmotností se rovněž měnila konzistence hydrogelu, a to postupně z vysoce viskózního roztoku na celistvý hydrogel.

I přes veškerá úskalí spojená s analýzou a následným zpracováním a vyhodnocením dat z FCS analýzy hydrogelů je tato mikrореologická technika významná především pokrytím širokého rozmezí času ( $10^{-6}$ – $10$  s) i MSD hodnot ( $10^{-5}$ – $10 \mu\text{m}^2$ ) a také svou citlivostí. Protože

výsledky mikroreologického měření závisí i na volbě pozorovaného místa v hydrogelu, bylo by na základě několika měření fokusovaných na různé regiony téhož hydrogelu a následného statistického zpracování získaných dat teoreticky možné popsat mikroreologické chování různých heterogenních regionů hydrogelu. Tato detailní charakteristika hydrogelu by pak mohla být využita například pro predikci chování molekul léčiva nebo buněk umístěných v daném hydrogelu.

Celkově je technika FCS mikroreologie použitelná pro studium jak newtonských roztoků, tak neneutronských roztoků a hydrogelů. Vždy je však nutné zvolit vhodnou velikost použitých fluorescenčně značených částic. V této práci byl za pomyslnou hranici použitelnosti FCS techniky považován vzorek roztoku vysokomolekulárního (1500–1750 kDa) hyaluronanu o koncentraci 15 g/l. Teoreticky by bylo možné prostřednictvím této techniky spolehlivě měřit i koncentrovanější roztoky hyaluronanu, ale o nižší molekulové hmotnosti. Horní hranice pro koncentraci hyaluronanu stanovena nebyla.

U výsledků FCS analýz hydrogelových vzorků hyaluronanu a CTAB žádné fluktuace výsledných časových MSD závislostí pozorovány nebyly. Proto by s největší pravděpodobností bylo možné použít FCS techniku i pro měření hydrogelů s vyšší koncentrací a/nebo molekulovou hmotností hyaluronanu a dalších bio- nebo syntetických polymerů.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] KOPEČEK, Jindřich a Jiyuan YANG. Hydrogels as smart biomaterials. *Polymer International* [online]. 2007, 56(9), 1078-1098 [cit. 2017-02-15]. DOI: 10.1002/pi.2253. ISSN 09598103. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pi.2253>
- [2] Structure and elasticity of non-crystalline polymer networks. DUŠEK, K a W PRINS. *Fortschritte der Hochpolymeren-Forschung* [online]. 6/1. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1969, s. 1-102 [cit. 2017-02-15]. ISBN 9783540359432. Dostupné z: <http://link.springer.com/chapter/10.1007/BFb0051042>
- [3] KOPEČEK, Jindřich. Hydrogels: From soft contact lenses and implants to self-assembled nanomaterials. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* [online]. 2009, 47(22), 5929-5946 [cit. 2017-02-16]. DOI: 10.1002/pola.23607. ISSN 0887624x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pola.23607>
- [4] KREJČÍ, Lubomír. Hydroxyethyl Methacrylate Capillary Strip. *Archives of Ophthalmology* [online]. 1970, 84(1), 76- [cit. 2017-02-16]. DOI: 10.1001/archophth.1970.00990040078019. ISSN 0003-9950. Dostupné z: <http://archophth.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archophth.1970.00990040078019>
- [5] KŘÍSTEK, A., B. KÖNIG a O. WICHTERLE. [A contribution to the surgical treatment of retinal detachment. (Experience with the use of polyglycolmethacrylate as material for implants in the Custodis operation)]. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*. 1966, 149(2), 219-227.
- [6] DREIFUS, M., T. HERBEN, D. LÍM a O. WICHTERLE. Tolerance of orbital implants made of hydrocolloid acrylate. *Sborník lékařský*. 1960, 62, 212-218.
- [7] VOLDŘICH, Z., Z. TOMÁNEK, J. VACÍK a J. KOPEČEK. Long-term experience with poly(glycol monomethacrylate) gel in plastic operations of the nose. *Journal of Biomedical Materials Research* [online]. 1975, 9(6), 675-685 [cit. 2017-02-16]. DOI: 10.1002/jbm.820090612. ISSN 00219304. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.820090612>
- [8] ZATHURECKÝ, L., H. RASKOVÁ, M. ROCHOVÁ, V. KRUPA, O. WICHTERLE, R. CHROMEČEK a I. GAVRILOVÁ. Liberation and resorption of drugs from macromolecular ethyleneglycolmonomethacrylate gel. *Arzneimittelforschung*. 1969, 19(6), 951-954.
- [9] SUBR, V., R. DUNCAN a J. KOPEČEK. Release of macromolecules and daunomycin from hydrophilic gels containing enzymatically degradable bonds. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* [online]. 1989, 1(4), 261-278 [cit. 2017-02-16]. DOI: 10.1163/156856289X00145. ISSN 0920-5063. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1163/156856289X00145>
- [10] HASAN, Anwarul, Ahmad KHATTAB, Mohammad Ariful ISLAM, et al. Injectable Hydrogels for Cardiac Tissue Repair after Myocardial Infarction. *Advanced Science* [online]. 2015, 2(11), 1500122- [cit. 2017-02-23]. DOI: 10.1002/advs.201500122. ISSN 21983844. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/advs.201500122>

- [11] DUMVILLE, Jo C, Susan O'MEARA, Sohan DESHPANDE a Katharine SPEAK. Hydrogel dressings for healing diabetic foot ulcers. Cochrane Database of Systematic Reviews [online]. Chichester, UK: John Wiley, 1996 [cit. 2017-02-23]. DOI: 10.1002/14651858.CD009101.pub3. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD009101.pub3>
- [12] DANG, Qi Feng, Shu Hua ZOU, Xi Guang CHEN, Cheng Sheng LIU, Jing Jing LI, Xuan ZHOU, Ya LIU a Xiao Jie CHENG. Characterizations of chitosan-based highly porous hydrogel-The effects of the solvent. Journal of Applied Polymer Science [online]. 2012, 125(S2), E88-E98 [cit. 2017-02-25]. DOI: 10.1002/app.36681. ISSN 00218995. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/app.36681>
- [13] LIU, Yanchun, Aleksander SKARDAL, Xiao Zheng SHU a Glenn D. PRESTWICH. Prevention of peritendinous adhesions using a hyaluronan-derived hydrogel film following partial-thickness flexor tendon injury. Journal of Orthopaedic Research [online]. 2008, 26(4), 562-569 [cit. 2017-02-23]. DOI: 10.1002/jor.20499. ISSN 07360266. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jor.20499>
- [14] YOON, So Jeong, Yong Hu FANG, Choon Hak LIM, Bum Shik KIM, Ho Sung SON, Yongdoo PARK a Kyung SUN. Regeneration of ischemic heart using hyaluronic acid-based injectable hydrogel. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials [online]. 2009, 91B(1), 163-171 [cit. 2017-02-23]. DOI: 10.1002/jbm.b.31386. ISSN 15524973. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.b.31386>
- [15] BRUNELLI, G, C LONGINOTTI, C BERTAZZO, A PAVESIO a D PRESSATO. Adhesion reduction after knee surgery in a rabbit model by Hyaloglide, a hyaluronan derivative gel. Journal of Orthopaedic Research [online]. 2005, 23(6), 1377-1382 [cit. 2017-02-21]. DOI: 10.1016/j.orthres.2005.05.001. ISSN 07360266. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0736026605001361>
- [16] SIMPSON, Russell M.L., Xuechong HONG, Mei Mei WONG, et al. Hyaluronan Is Crucial for Stem Cell Differentiation into Smooth Muscle Lineage. STEM CELLS [online]. 2016, 34(5), 1225-1238 [cit. 2017-02-21]. DOI: 10.1002/stem.2328. ISSN 10665099. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/stem.2328>
- [17] KIM, Jungju, Yongdoo PARK, Giyoong TAE, et al. Characterization of low-molecular-weight hyaluronic acid-based hydrogel and differential stem cell responses in the hydrogel microenvironments. Journal of Biomedical Materials Research Part A [online]. 2009, 88A(4), 967-975 [cit. 2017-02-21]. DOI: 10.1002/jbm.a.31947. ISSN 15493296. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.31947>
- [18] HAMILTON, Raymond, Ellen M. FOX, Raksha A. ACHARYA a Alan E. WALTS. Water insoluble derivatives of hyaluronic acid. US4937270 A. Uděleno 26. červen 1990.
- [19] MORRA, M. a C. CASSINELLI. Wettability and surface structure of hyaluronic acid and hyaluronic acid ester fouling-resistant coatings. ACS polymeric materials science and engineering. San Francisco, 1997, 13, 566-567.
- [20] PITT, William G., Robert N. MORRIS, Mitchell L. MASON, Matthew W. HALL, Yi LUO a Glenn D. PRESTWICH. Attachment of hyaluronan to metallic surfaces. Journal of Biomedical Materials Research [online]. 2004, 68A(1), 95-106 [cit. 2017-02-21]. DOI: 10.1002/jbm.a.10170. ISSN 0021-9304. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.10170>

- [21] CHOI, Sung Chul, Mi Ae YOO, Su Yeon LEE, Hyun Ji LEE, Dong Hoon SON, Jessica JUNG, Insup NOH a Chan-Wha KIM. Modulation of biomechanical properties of hyaluronic acid hydrogels by crosslinking agents. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2015, 103(9), 3072-3080 [cit. 2017-02-21]. DOI: 10.1002/jbm.a.35437. ISSN 15493296. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.35437>
- [22] BURDICK, Jason A. a Glenn D. PRESTWICH. Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications. *Advanced Materials* [online]. 2011, 23(12), H41-H56 [cit. 2017-02-22]. DOI: 10.1002/adma.201003963. ISSN 09359648. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/adma.201003963>
- [23] ANSARI, Anis A., M. KAMIL a Kabir-ud DIN. Interaction of Oppositely Charged Polymer– Surfactant System Based on Surface Tension Measurements. *Journal of Petroleum Science Research* [online]. 2013, 2(1), 35-40 [cit. 2017-02-26]. Dostupné z: <https://archive.org/details/JPSR10013>
- [24] BJOERLING, Mikael, Asa HERSLOEF-BJOERLING a Peter STILBS. An NMR self-diffusion study of the interaction between sodium hyaluronate and tetradecyltrimethylammonium bromide. *Macromolecules* [online]. 1995, 28(20), 6970-6975 [cit. 2017-02-28]. DOI: 10.1021/ma00124a038. ISSN 0024-9297. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma00124a038>
- [25] FUKADA, Kazuhiro, Emi SUZUKI a Tsutomu SEIMIYA. Rheological Properties of Sodium Hyaluronate in Decyltrimethylammonium Bromide Aqueous Solutions 1. *Langmuir* [online]. 1999, 15(12), 4217-4221 [cit. 2017-02-28]. DOI: 10.1021/la9811822. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la9811822>
- [26] THALBERG, Kyrre a Bjoern LINDMAN. Interaction between hyaluronan and cationic surfactants. *The Journal of Physical Chemistry* [online]. 1989, 93(4), 1478-1483 [cit. 2017-02-28]. DOI: 10.1021/j100341a058. ISSN 0022-3654. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/j100341a058>
- [27] YIN, Dian-shu, Wan-yun YANG, Zhi-qiang GE a Ying-jin YUAN. A fluorescence study of sodium hyaluronate/surfactant interactions in aqueous media. *Carbohydrate Research* [online]. 2005, 340(6), 1201-1206 [cit. 2017-02-28]. DOI: 10.1016/j.carres.2005.01.017. ISSN 00086215. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621505000479>
- [28] TAEUSCH, H. William, Eric DYBBRO a Karen W. LU. Pulmonary surfactant adsorption is increased by hyaluronan or polyethylene glycol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2008, 62(2), 243-249 [cit. 2017-03-02]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2007.10.009. ISSN 09277765. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776507004031>
- [29] *Rheology and Viscosity*. Malvern [online]. England: Malvern Instruments Limited, 2017 [cit. 2017-02-15]. Dostupné z: <http://www.malvern.com/en/products/measurement-type/rheology-viscosity/>
- [30] KRONBERG, Bengt, Krister HOLMBERG a Björn LINDMAN. *Surface chemistry of surfactants and polymers*. Chichester: Wiley, 2014. ISBN 978-1-119-96124-6.

- [31] MORRIS, E.R., A.N. CUTLER, S.B. ROSS-MURPHY, D.A. REES a J. PRICE. Concentration and shear rate dependence of viscosity in random coil polysaccharide solutions. *Carbohydrate Polymers* [online]. 1981, 1(1), 5-21 [cit. 2017-02-13]. DOI: 10.1016/0144-8617(81)90011-4. ISSN 01448617. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0144861781900114>
- [32] CARLSSON, Anders, Gunnar KARLSTRÖM a Björn LINDMAN. Thermal gelation of nonionic cellulose ethers and ionic surfactants in water. *Colloids and Surfaces* [online]. 1990, 47, 147-165 [cit. 2017-02-13]. DOI: 10.1016/0166-6622(90)80069-G. ISSN 01666622. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016666229080069G>
- [33] FRANCOIS, J., J. DAYANTIS a J. SABBADIN. Hydrodynamical behaviour of the poly(ethylene oxide)-sodium dodecylsulphate complex. *European Polymer Journal* [online]. 1985, 21(2), 165-174 [cit. 2017-02-13]. DOI: 10.1016/0014-3057(85)90049-7. ISSN 00143057. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0014305785900497>
- [34] HUANG, Rongxin, Isaac CHAVEZ, Katja M. TAUTE, Branimir LUKIĆ, Sylvia JENEY, Mark G. RAIZEN a Ernst-Ludwig FLORIN. Direct observation of the full transition from ballistic to diffusive Brownian motion in a liquid. *Nature Physics* [online]. 2011-3-27, 7(7), 576-580 [cit. 2017-03-02]. DOI: 10.1038/nphys1953. ISSN 1745-2473. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nphys1953>
- [35] LI, Tongcang a Mark G. RAIZEN. Brownian motion at short time scales. *Annalen der Physik* [online]. 2013, 525(4), 281-295 [cit. 2017-03-02]. DOI: 10.1002/andp.201200232. ISSN 00033804. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/andp.201200232>
- [36] MUKHOPADHYAY, Ashis a Steve GRANICK. Micro- and nanorheology. *Current Opinion in Colloid* [online]. 2001, 6(5-6), 423-429 [cit. 2017-03-03]. DOI: 10.1016/S1359-0294(01)00119-4. ISSN 13590294. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359029401001194>
- [37] SOHN, I.S, R RAJAGOPALAN a A.C DOGARIU. Spatially resolved microrheology through a liquid/liquid interface. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2004, 269(2), 503-513 [cit. 2017-03-03]. DOI: 10.1016/S0021-9797(03)00728-8. ISSN 00219797. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021979703007288>
- [38] MASON, T.G., Hu GANG a D.A. WEITZ. Rheology of complex fluids measured by dynamic light scattering. *Journal of Molecular Structure* [online]. 1996, 383(1-3), 81-90 [cit. 2017-03-03]. DOI: 10.1016/S0022-2860(96)09272-1. ISSN 00222860. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022286096092721>
- [39] DASGUPTA, Bivash R., Shang-You TEE, John C. CROCKER, B. J. FRISKEN a D. A. WEITZ. Microrheology of polyethylene oxide using diffusing wave spectroscopy and single scattering. *Physical Review E* [online]. 2002, 65(5), - [cit. 2017-03-03]. DOI: 10.1103/PhysRevE.65.051505. ISSN 1063-651x. Dostupné z: <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.65.051505>
- [40] CICUTA, Pietro a Athene M. DONALD. Microrheology: a review of the method and applications. *Soft Matter* [online]. 2007, 3(12), 1449- [cit. 2017-03-03]. DOI: 10.1039/b706004c. ISSN 1744-683x. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b706004c>

- [41] Microrheology. GARDEL, M. L., M. T. VALENTINE a D. A. WEITZ. *Microscale Diagnostic Techniques* [online]. Springer Berlin Heidelberg, 2005, s. 1-49 [cit. 2017-03-03]. ISBN 978-3-540-26449-1. Dostupné z: [http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F3-540-26449-3\\_1](http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F3-540-26449-3_1)
- [42] WAIGH, T A. *Microrheology of complex fluids. Reports on Progress in Physics* [online]. 2005, **68**(3), 685-742 [cit. 2017-03-04]. DOI: 10.1088/0034-4885/68/3/R04. ISSN 0034-4885. Dostupné z: <http://stacks.iop.org/0034-4885/68/i=3/a=R04?key=crossref.13db41e971bf049d3528e867f566ccd9>
- [43] *Micro-Rheology Measurement with the NanoTracker: Technical Note*. In: JPK Instruments: Nanotechnology for Life Science [online]. JPK Instruments, c2017 [cit. 2017-03-04]. Dostupné z: <http://www.jpk.com/index.download.9900bdd5a1cb296747759ffdac5472d1>
- [44] *Basic Principles of Fluorescence Spectroscopy*. SAUER, Markus, Johan HOFKENS a Jörg ENDERLEIN. *Handbook of fluorescence spectroscopy and imaging: from single molecules to ensembles* [online]. Weinheim: Wiley-VCH, c2011, s. 1-30 [cit. 2017-03-15]. ISBN 978-3-527-31669-4. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9783527633500>
- [45] RIES, Jonas a Petra SCHWILLE. *Fluorescence correlation spectroscopy*. *BioEssays* [online]. 2012, 34(5), 361-368 [cit. 2017-03-05]. DOI: 10.1002/bies.201100111. ISSN 02659247. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bies.201100111>
- [46] SHUSTERMAN, Roman, Sergey ALON, Tatyana GAVRINYOV a Oleg KRICHEVSKY. *Monomer Dynamics in Double- and Single-Stranded DNA Polymers*. *Physical Review Letters* [online]. 2004, 92(4), - [cit. 2017-03-19]. DOI: 10.1103/PhysRevLett.92.048303. ISSN 0031-9007. Dostupné z: <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.92.048303>
- [47] KUBEČKA, Jakub, Filip UHLÍK a Peter KOŠOVAN. *Mean squared displacement from fluorescence correlation spectroscopy*. *Soft Matter* [online]. 2016, 12(16), 3760-3769 [cit. 2017-03-19]. DOI: 10.1039/C6SM00296J. ISSN 1744-683x. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6SM00296J>
- [48] KOYNOV, Kaloian a Hans-Jürgen BUTT. *Fluorescence correlation spectroscopy in colloid and interface science*. *Current Opinion in Colloid* [online]. 2012, 17(6), 377-387 [cit. 2017-03-19]. DOI: 10.1016/j.cocis.2012.09.003. ISSN 13590294. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359029412000994>
- [49] RATHGEBER, Silke, Hans-Josef BEAUVISAGE, Hubert CHEVREAU, Norbert WILLENBACHER a Claude OELSCHLAEGER. *Microrheology with Fluorescence Correlation Spectroscopy*. *Langmuir* [online]. 2009, 25(11), 6368-6376 [cit. 2017-03-20]. DOI: 10.1021/la804170k. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la804170k>
- [50] AUFDERHORST-ROBERTS, Anders, William J. FRITH a Athene M. DONALD. *A microrheological study of hydrogel kinetics and micro-heterogeneity*. *The European Physical Journal E* [online]. 2014, 37(5), - [cit. 2017-03-20]. DOI: 10.1140/epje/i2014-14044-y. ISSN 1292-8941. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1140/epje/i2014-14044-y>

- [51] SCHULTZ, Kelly M., Aaron D. BALDWIN, Kristi L. KIICK a Eric M. FURST. Measuring the Modulus and Reverse Percolation Transition of a Degrading Hydrogel. *ACS Macro Letters* [online]. 2012, 1(6), 706-708 [cit. 2017-03-21]. DOI: 10.1021/mz300106y. ISSN 2161-1653. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/mz300106y>
- [52] A., Raghu, Somashekar R. a Sharath ANANTHAMURTHY. Microrheological studies of regenerated silk fibroin solution by video microscopy. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* [online]. 2007, 45(18), 2555-2562 [cit. 2017-03-21]. DOI: 10.1002/polb.21252. ISSN 08876266. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/polb.21252>
- [53] GEORGIADES, Pantelis, Paul D. A. PUDNEY, David J. THORNTON, Thomas A. WAIGH a Stephen BLACKLOW. Particle tracking microrheology of purified gastrointestinal mucins. *Biopolymers* [online]. 2014, 101(4), 366-377 [cit. 2017-03-23]. DOI: 10.1002/bip.22372. ISSN 00063525. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bip.22372>
- [54] WONG, Long Hui, Nicholas A. KURNIAWAN, Heng-Phon TOO a Raj RAJAGOPALAN. Spatially resolved microrheology of heterogeneous biopolymer hydrogels using covalently bound microspheres. *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* [online]. 2014, 13(4), 839-849 [cit. 2017-03-21]. DOI: 10.1007/s10237-013-0538-4. ISSN 1617-7959. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10237-013-0538-4>
- [55] DI COLA, Emanuela, Thomas A. WAIGH a Ralph H. COLBY. Dynamic light scattering and rheology studies of aqueous solutions of amphiphilic sodium maleate containing copolymers. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* [online]. 2007, 45(7), 774-785 [cit. 2017-03-24]. DOI: 10.1002/polb.21079. ISSN 08876266. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/polb.21079>
- [56] SHIBAYAMA, Mitsuhiro a Tomohisa NORISUYE. Gel Formation Analyses by Dynamic Light Scattering. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* [online]. 2002, 75(4), 641-659 [cit. 2017-03-24]. DOI: 10.1246/bcsj.75.641. ISSN 0009-2673. Dostupné z: <http://www.journal.csj.jp/doi/10.1246/bcsj.75.641>
- [57] PALMER, Andre, Thomas G. MASON, Jingyuan XU, Scot C. KUO a Denis WIRTZ. Diffusing Wave Spectroscopy Microrheology of Actin Filament Networks. *Biophysical Journal* [online]. 1999, 76(2), 1063-1071 [cit. 2017-03-24]. DOI: 10.1016/S0006-3495(99)77271-1. ISSN 00063495. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349599772711>
- [58] GUIGAS, Gernot, Claudia KALLA a Matthias WEISS. Probing the Nanoscale Viscoelasticity of Intracellular Fluids in Living Cells. *Biophysical Journal* [online]. 2007, 93(1), 316-323 [cit. 2017-03-24]. DOI: 10.1529/biophysj.106.099267. ISSN 00063495. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349507712845>
- [59] SZYMAŃSKI, Jędrzej, Agnieszka WILK, Robert HOŁYST, Geraint ROBERTS, Kirsty SINCLAIR a Adam KOWALSKI. Micro- and macro-shear viscosity in dispersed lamellar phases. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics* [online]. 2008, 148(1-3), 134-140 [cit. 2017-03-25]. DOI: 10.1016/j.jnnfm.2007.04.008. ISSN 03770257. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0377025707001024>

- [60] ZETTL, Ute, Sebastian T. HOFFMANN, Felix KOBERLING, Georg KRAUSCH, Jörg ENDERLEIN, Ludger HARNAU a Matthias BALLAUFF. Self-Diffusion and Cooperative Diffusion in Semidilute Polymer Solutions As Measured by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Macromolecules* [online]. 2009, 42(24), 9537-9547 [cit. 2017-03-25]. DOI: 10.1021/ma901404g. ISSN 0024-9297. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma901404g>
- [61] LIANG, Lifang, Xichao WANG, Da XING, Tongsheng CHEN a Wei R. CHEN. Noninvasive determination of cell nucleoplasmic viscosity by fluorescence correlation spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics* [online]. 2009, 14(2), 024013 [cit. 2017-03-25]. DOI: 10.1117/1.3088141. ISSN 10833668. Dostupné z: <http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?doi=10.1117/1.3088141>
- [62] KIHARA, Takanori, Junri ITO, Jun MIYAKE a Michiya MATSUSAKI. Measurement of Biomolecular Diffusion in Extracellular Matrix Condensed by Fibroblasts Using Fluorescence Correlation Spectroscopy. *PLoS ONE* [online]. 2013, 8(11), e82382- [cit. 2017-03-25]. DOI: 10.1371/journal.pone.0082382. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0082382>
- [63] FATIN-ROUGE, Nicolas, Konstantin STARCHEV a Jacques BUFFLE. Size Effects on Diffusion Processes within Agarose Gels. *Biophysical Journal* [online]. 2004, 86(5), 2710-2719 [cit. 2017-03-24]. DOI: 10.1016/S0006-3495(04)74325-8. ISSN 00063495. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349504743258>
- [64] ZUSTIAK, Silviya P., Hacene BOUKARI a Jennie B. LEACH. Solute diffusion and interactions in cross-linked poly(ethylene glycol) hydrogels studied by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Soft Matter* [online]. 2010, 6(15), 3609- [cit. 2017-03-25]. DOI: 10.1039/c0sm00111b. ISSN 1744-683x. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c0sm00111b>
- [65] KÁBRTOVÁ, P. Mikroreologie pomocí fluorescenční korelační spektroskopie. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 43 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Jakub Mondek.
- [66] SUHLING, Klaus, Paul M. W. FRENCH a David PHILLIPS. Time-resolved fluorescence microscopy. *Photochemical* [online]. 2005, 4(1), 13- [cit. 2017-04-23]. DOI: 10.1039/b412924p. ISSN 1474-905x. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b412924p>

## 9 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

<b>Symbol/zkratka</b>	<b>Význam</b>
$a_i$	relativní příspěvek $i$ -té komponenty
$A$	plocha
$c$	koncentrace
$C$	součinitel odporu
$D$	deformační rychlost (kapitola 2.3)
$D$	difúzní koeficient (kapitola 2.4 a následující)
$\tilde{D}(s)$	difúzní koeficient závislý na frekvenci, která byla podrobena Laplaceově transformaci
$E$	rozptýlené elektrické pole
$F$	smyková síla (kapitola 2.3)
$[F(t)^*]$	počet excitovaných fluoroforů (kapitola 2.4.3.3)
$F_t(t)$	stochastická termální síla (kapitola 2.4.2.3)
$g_1(t)$	korelační funkce elektrického pole
$g_2(t)$	normalizovaná intenzitní korelační funkce
$G$	dynamický smykový modul (dynamic shear modulus) – kapitola 2.3.4
$G'$	akumulovaný modul (shear storage modulus) – kapitola 2.3.4
$G''$	ztrátový modul (shear loss modulus) – kapitola 2.3.4
$G^*$	komplexní modul (storage modulus) – kapitola 2.3.4
$G(t)$	autokorelační funkce (kapitola 2.4.3.4 a následující)
$I(t)$	fluktuační intenzity světla v čase
$k_B$	Boltzmannova konstanta
$k_{nr}$	rychlostní konstanta pro nezářivé přechody
$k_r$	rychlostní konstanta pro zářivé přechody
$l^*$	střední volná dráha transportu
$M$	molekulová hmotnost
$n$	index lomu
$n_{dif}$	počet nezávisle difundujících částic (kapitola 5.3.2)
$N$	počet molekul
$P(s_l)$	pravděpodobnost, že světlo urazí vzdálenost $s_l$
$q$	magnituda rozptylového vektoru
$\langle \Delta r^2(t) \rangle$	střední čtverec posunu částice, MSD
$R$	poloměr částice
$s$	transformovaná frekvence
$s_l$	vzdálenost
$S_n$	excitovaný singletový stav
$t$	čas
$T$	teplota
$T_n$	excitovaný tripletový stav
$v$	průtoková rychlost
$\bar{v}$	střední rychlost částice (kapitola 2.4.1)

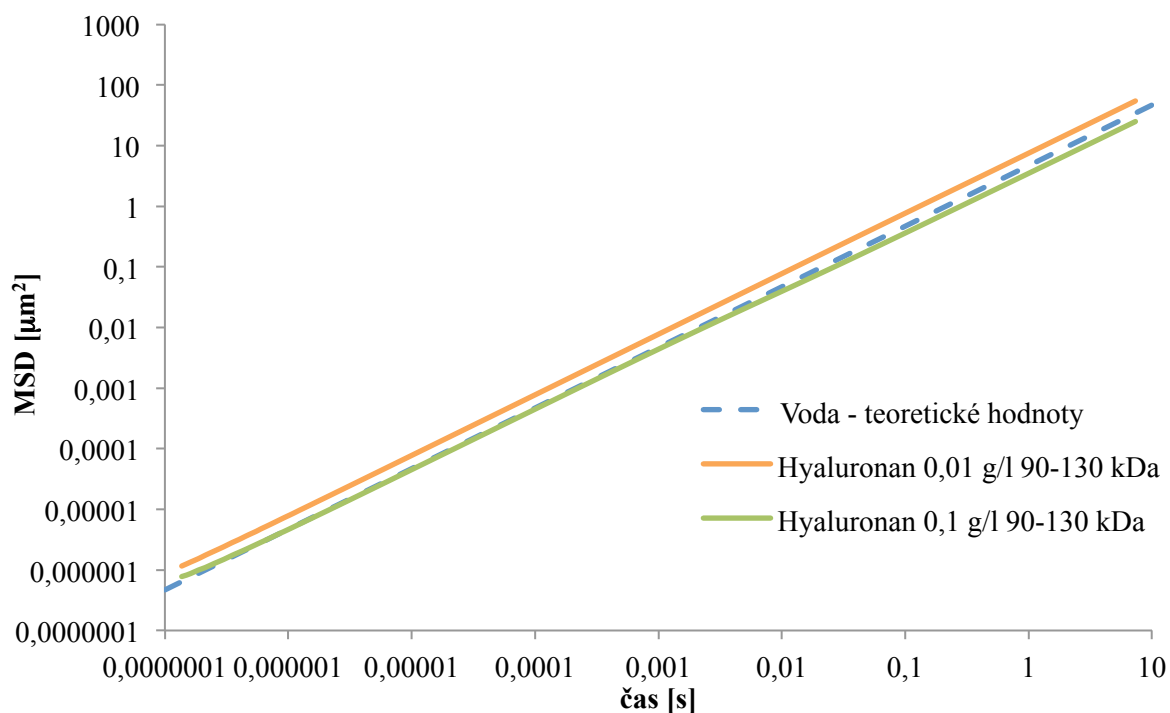
$V_{ef}$	efektivní objem
$w_0$	efektivní laterální fokální poloměr
$x, y, r$	souřadnice
$z_0$	efektivní fokální poloměr rovnoběžný s optickou osou
$\gamma$	smyková deformace
$\delta$	fázový úhel
$\eta$	dynamická viskozita
$\eta_0$	dynamická viskozita čistého rozpouštědla
$\eta_{app}$	zdánlivá viskozita
$\tilde{\eta}_s$	viskozita závislá na frekvenci, která byla podrobena Laplaceově transformaci
$\theta$	úhel umístění detektoru (kapitola 2.4.2.1)
$\kappa$	poměr délky $z_0$ a průměru $w_0$ detekčního objemu
$\kappa_{el}$	elastická konstanta
$\lambda$	vlnová délka
$\rho$	hustota
$\rho[i]$	příspěvek $i$ -té difundující částice (kapitola 5.3.2)
$\tau$	smykové napětí
$\tau_D$	difúzní čas
$\tau_f$	doba života fluorescence
$\Phi_f$	kvantový výtěžek fluorescence
$\chi$	interakční parametr
$\omega$	frekvence
AFM	atomic force microscopy (mikroskopie atomárních sil)
APD	avalanche photodiode (lavinová fotodioda)
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
DLS	dynamic light scattering (dynamický rozptyl světla)
DWS	diffusion wave spectroscopy (difúzní vlnová spektroskopie)
FCS	fluorescence correlation spectroscopy (fluorescenční korelační spektroskopie)
Fmoc	9-fluorenylmethoxykarbonyl
HA	hyaluronan
HEMA	2-hydroxyethylmethakrylát
HPMA	<i>N</i> -(2-hydroxypropyl)methakrylamid
MSD	mean-square displacement (střední čtverec posunu částice)
NMR	nukleární magnetická resonance
PEG	polyethylenglykol
TEMED	tetramethylethylendiamin

## 10 SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha 1 Výsledky FCS analýz 300nm částic v prostředí hyaluronanu (M = 90–130 kDa)
- Příloha 2 Výsledky FCS analýz 300nm částic v prostředí hyaluronanu (M = 500–750 kDa)
- Příloha 3 Výsledky FCS analýz 30nm částic v prostředí 20% a 60% glycerolu a vody
- Příloha 4 Výsledky FCS analýz 30nm částic v prostředí hyaluronanu (3 g/l)
- Příloha 5 Výsledky FCS analýz pro 30nm částice v prostředí různě koncentrovaného hyaluronanu s molekulovou hmotností 90–130 kDa
- Příloha 6 Výsledky FCS analýz pro 30nm částice v prostředí různě koncentrovaného hyaluronanu s molekulovou hmotností 500–750 kDa

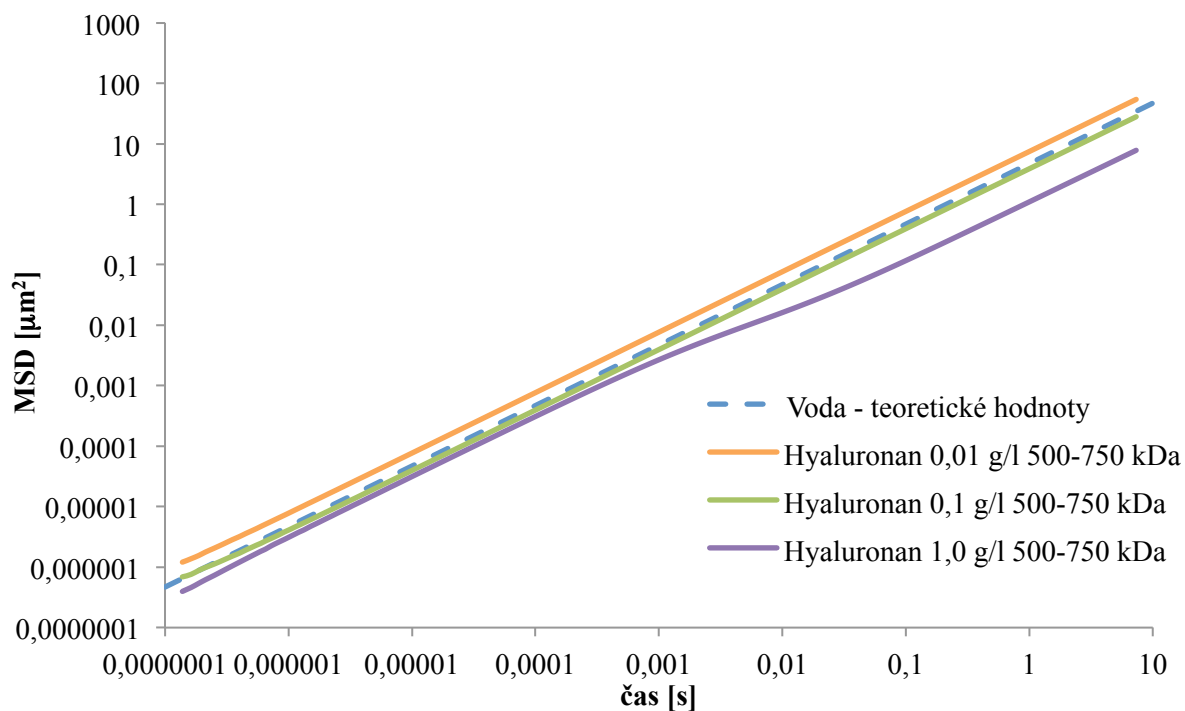
# 11 PŘÍLOHY

## Příloha 1



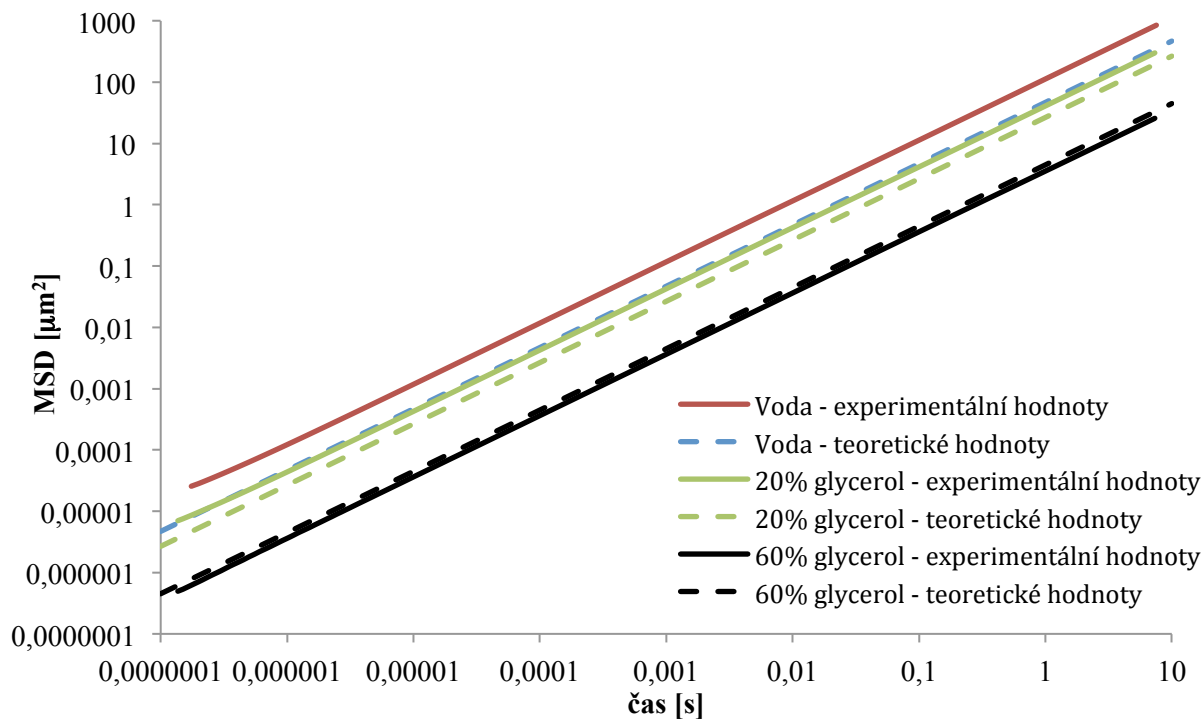
**Obrázek 20** Výsledky FCS analýz 300nm částic v prostředí hyaluronanu ( $M = 90\text{--}130$  kDa)

## Příloha 2



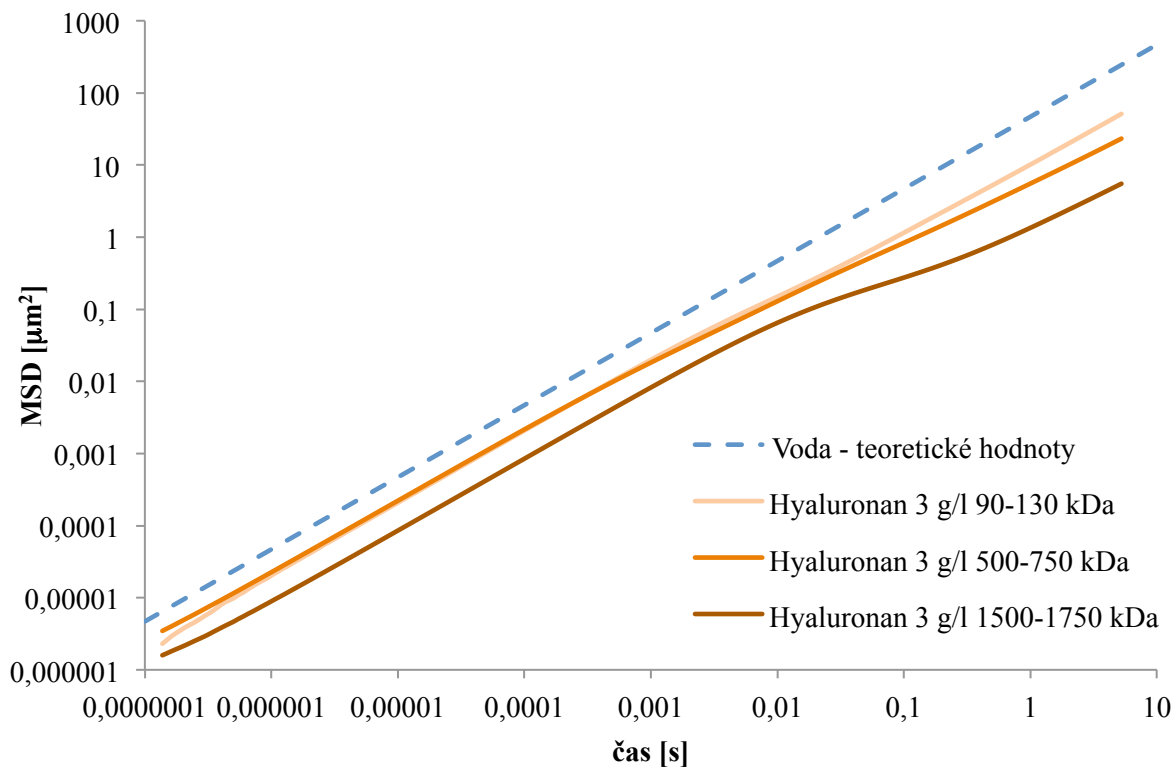
**Obrázek 21** Výsledky FCS analýz 300nm částic v prostředí hyaluronanu ( $M = 500\text{--}750$  kDa)

Příloha 3



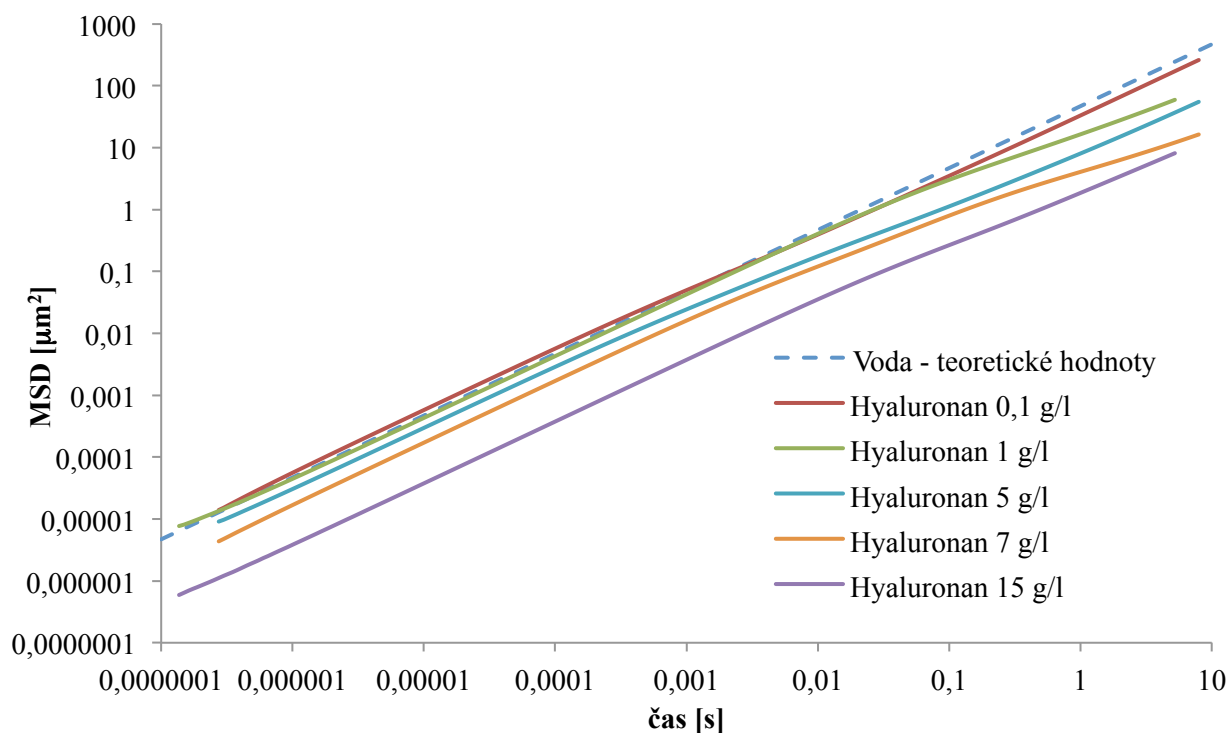
**Obrázek 22** Výsledky FCS analýz 30nm částic v prostředí 20% a 60% glycerolu a vody

Příloha 4



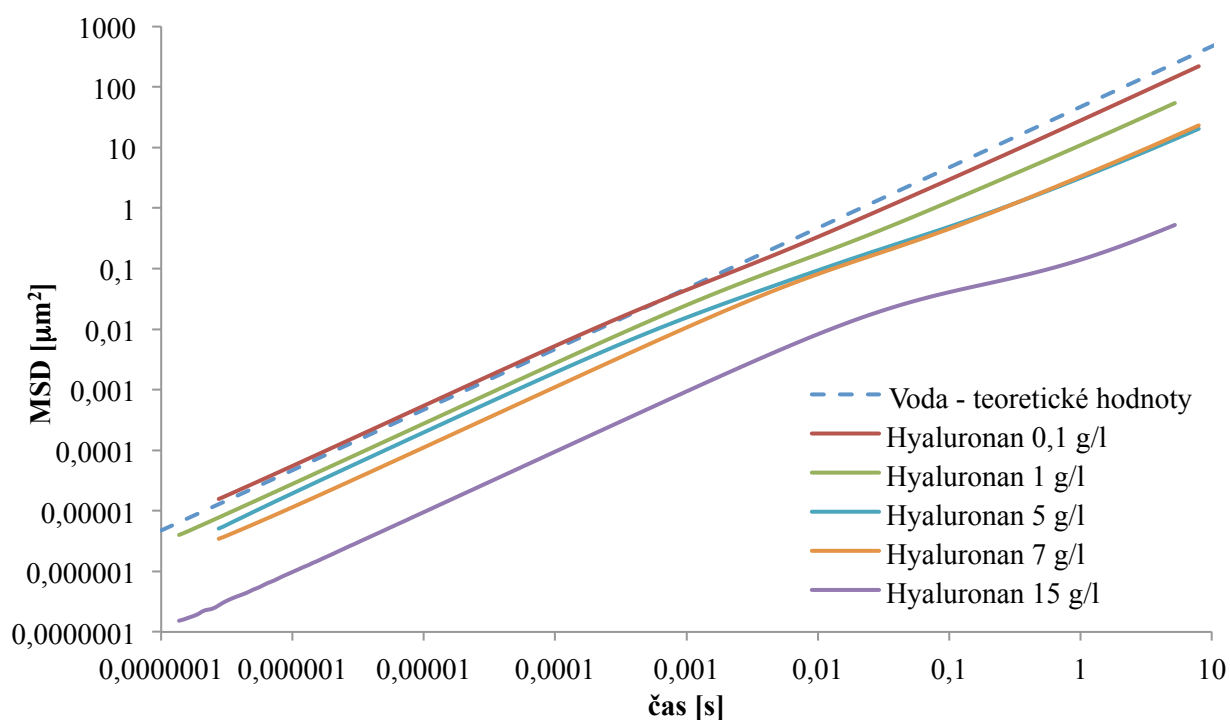
**Obrázek 23** Výsledky FCS analýz 30nm částic v prostředí hyaluronanu (3 g/l)

Příloha 5



**Obrázek 24** Výsledky FCS analýz pro 30nm částice v prostředí různě koncentrovaného hyaluronanu s molekulovou hmotností 90–130 kDa

Příloha 6



**Obrázek 25** Výsledky FCS analýz pro 30nm částice v prostředí různě koncentrovaného hyaluronanu s molekulovou hmotností 500–750 kDa