



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

FLUORESCENČNÍ KORELAČNÍ SPEKTROSKOPIE VE STUDIU VLASTNOSTÍ KOLOIDNÍCH SYSTÉMŮ

FLUORESCENCE CORRELATION SPECTROSCOPY IN THE STUDY OF THE PROPERTIES OF COLLOIDAL
SYSTEMS

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Kateřina Marková

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

BRNO 2024

Zadání dizertační práce

Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie Akademický rok: 2023/24
Studentka: **Ing. Kateřina Marková**
Studijní program: Fyzikální chemie
Studijní obor: Fyzikální chemie
Vedoucí práce: **prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.**

Název dizertační práce:

Fluorescenční korelační spektroskopie ve studiu vlastností koloidních systémů

Zadání dizertační práce:

Prostudovat transportní vlastnosti vybraných hydrogelů/biopolymerů metodou fluorescenční korelační spektroskopie, zkoumat jejich vztah ke struktuře a reologii prostředí, v němž se transport odehrává včetně vlivu velikosti difundujících částic.

Termín odevzdání dizertační práce: 30.4.2024:

Ing. Kateřina Marková
studentka

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.9.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Hydrogely jsou pro své vlastnosti vyhledávanou maticí pro medicínské účely. Často jsou tyto vlastnosti podmíněné jejich strukturou, proto je kladen důraz na přesně definovanou polymerní síť. V rámci předložené dizertační práce byly různé typy hydrogelů zkoumány pomocí fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) ve spojení s mikreologií.

Spojení těchto metod se při zjišťování vlastností hydrogelů využívá minimálně, proto byla potřeba standardizace a optimalizace metody. Pro tyto účely byly vybrány fluorescenčně značené silikátové nanočástice s neutrálním povrchovým nábojem. V rámci optimalizace metody byly zjištěny limity přístroje, kdy se naměřené difúzní koeficienty ještě daly považovat za validní. Dále byly určeny parametry, které ovlivňují MSD křivku, tedy mají vliv také na správnost samotných naměřených dat.

Jako modelový koloidní systém byl vybrán vodný roztok agarózy, který se v závislosti na koncentraci pohybuje v rozmezí viskoelastické kapaliny, až po tuhý hydrogel. Na něm byly testovány difúzní vlastnosti použitých nanočástic, ale také strukturní vlastnosti samotného systému. Byly zjištěny limitní koncentrace, kdy difúzní koeficient přestal být vybranou technikou detekovatelný. Tento limit se podařilo částečně posunout úpravou korelačního času, kdy ovšem rozptyl hodnot difúzního koeficientu byl velmi vysoký. Takto naměřené hodnoty byly srovnány s bezkalibrační metodou dvouohnskové fluorescenční korelační spektroskopie (2f-FCS).

Dále byly zjišťovány změny v difúzním koeficientu v závislosti na typu přípravy vzorků. Současně s těmito experimenty byla provedena i obrazová analýza, která ve spojení s FCS přinesla zajímavé výsledky. Posledním experimentem, který přinesl informace o vlastnostech jak vložených nanočástic, tak polymerním systému, bylo vymývání částic ze struktury hydrogelu.

Jako poslední a nejpokročilejší analýza polymerní sítě, která definovala systém novým, alternativním, způsobem, byla vybrána metoda maximální entropie a analýza pomocí log-normální distribuce difúzních koeficientů. Hodnoty získané těmito pokročilými analýzami byly podobné jako data vypočítaná matematickým modelem anomální difúze.

Novým přístupem byl popis vlastností pomocí reologických modulů. Ty se získaly řadou přepočtů z naměřené autokorelační křivky. Výstupem byl tedy reologický modul získaný z mikreologických dat. Tvar křivky je srovnatelný s klasickou (makro)reologií, nicméně číselné hodnoty jsou řádově nižší. Nejmenší částice se v celé koncentrační řadě chovaly jako v čistě viskózním prostředí, největší částice definovaly chování systému v závislosti na koncentraci od velmi viskózního po viskoelastické.

Posledním typem měření bylo studium hyaluronanu pomocí vybraných nanočástic a dále pomocí jeho fluorescenčně značeného analogu. Veškeré metody, které byly použity ve studiu agarózového hydrogelu se aplikovaly na viskoelastický systém hyaluronanu, kdy se zjišťovala použitelnost vybraných metod pro nový koloidní systém.

Klíčová slova: fluorescenční korelační spektroskopie, 2f-FCS, FLIM, MEM, log-normální distribuce, mikreologie

ABSTRACT

Because of their properties, hydrogels are a highly sought-after matrix for medical purposes. These properties are often conditioned by the structure, therefore the emphasis is put on a precisely defined polymer network. In the presented dissertation, different types of hydrogels were researched using fluorescence correlation spectroscopy (FCS) in conjunction with microrheology.

The combination of aforementioned methods is rarely used when determining the properties of hydrogels, and therefore, the method had to be standardized and optimized. For these purposes, fluorescently labeled silicate nanoparticles with a neutral surface charge were selected. In the course of the method optimization, the limits of the device were discovered within which the measured diffusion coefficients could still be considered valid. Furthermore, we have determined the parameters that affect the MSD curve and thus also the correctness of the actual measured data.

An aqueous solution of agarose was chosen as a model colloidal system, as it ranges from a viscoelastic liquid to a solid hydrogel depending on the concentration. On this colloidal system, the diffusion properties of the nanoparticles used were tested as well as the structural properties of the system itself. Limit concentrations were found when the diffusion coefficient could no longer be detected using the selected method. The limit was successfully partially extended by adjusting the correlation time, however, the dispersion of the diffusion coefficient values was very high in such case. The values measured in this way were compared with the calibration-free method of bifocal fluorescence correlation spectroscopy (2f-FCS).

Furthermore, changes in the diffusion coefficient were determined depending on the type of sample preparation. Alongside these experiments, image analysis was also performed, which provided interesting results in conjunction with FCS. The last experiment, which provided information about the properties of both the embedded nanoparticles and the polymer system, consisted of washing out of the particles from the hydrogel structure.

The maximum entropy method with an analysis using log-normal distribution of diffusion coefficients was selected as the last and the most advanced polymer network analysis of the, which defined the system in a new and an alternative way. The results obtained using these advanced analyses were similar to the data calculated using the mathematical model of anomalous diffusion.

The description of properties using rheological modules was a completely new approach. The properties were obtained using a series of conversions from the measured autocorrelation curve. Therefore, a rheological module obtained from microrheological data was the output of the approach. The shape of the curve is comparable to classical (macro)rheology, but the numerical values are lower by an entire order of magnitude. The smallest particles in the entire concentration range behaved as if they were in a purely viscous environment while the largest particles defined the behavior of the system depending on the concentration from very viscous to viscoelastic.

The last type of measurement was the study of hyaluronan using selected nanoparticles and its fluorescently labeled analogue. All the methods that were used in the study of agarose hydrogel were applied to the viscoelastic system of hyaluronan when the applicability of the selected methods to the new colloidal system was being determined.

Keywords: fluorescence correlation spectroscopy, 2f-FCS, fluorescence lifetime imaging microscopy, maximum entropy method, log-normal distribution, microrheology

MARKOVÁ, Kateřina. *Fluorescenční korelační spektroskopie ve studiu vlastností koloidních systémů*. Brno, 2024. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/160938>. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Miloslav Pekař.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

Ing. Kateřina Marková

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému školiteli, prof. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc., za cenné připomínky, čas a především vstřícnost, kterou mi věnoval během mého doktorského studia. Stejně velký dík patří mému školiteli specialistovi, doc. Ing. Filipu Mravcovi, Ph.D., který strávil dlouhé hodiny konzultacemi a diskuzemi nad mými daty. Dále bych ráda poděkovala kolegům Ing. Martinu Kadlecovi a Ing. Monice Trudičové za pomoc při některých typech experimentů a analýz.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým dětem a jejich otci, že byli se mnou velmi trpěliví, přizpůsobili se nepravidelnému časovému plánu a umožnili mi dokončení studia.

OBSAH

1	Úvod.....	11
2	Cíle práce	12
3	Teoretická část	13
3.1	Fluorescence	13
3.2	Fluorescenční zobrazovací mikroskopie.....	14
3.3	Fluorescenční korelační spektroskopie.....	16
3.3.1	Matematická analýza dat – SymPhoTime64	16
3.3.2	Modely zahrnující neuniformnost systému	19
3.3.3	Časově rozlišená FCS	21
3.3.4	Dvouohnisková fluorescenční korelační spektroskopie	23
3.4	Time-correlated single photon counting.....	24
3.4.1	Instrumentace pro TCSPC analýzu.....	25
3.4.2	Funkce odezvy přístroje.....	25
3.5	Difúze	26
3.5.1	Termodynamika.....	26
3.5.2	Difúzní rovnice a druhý Fickův zákon	28
3.6	Mikroreologie	29
3.6.1	Základní princip mikroreologie	29
3.6.2	Aktivní mikroreologie	29
3.6.3	Pasivní mikroreologie.....	29
3.7	Reologické moduly.....	31
3.8	Hydrogely	31
3.8.1	Agarózový hydrogel	32
3.8.2	Hyaluronát sodný.....	33
3.9	Fluorescenční sondy vyžívané pro FCS	33
3.9.1	Sférické nanočástice	34
3.9.2	Fluorescenčně značené biopolymery	34
4	Současný stav řešené problematiky	36
4.1	Použití FCS a jejích modifikací ke studiu daného systému.....	36
4.2	Studium hydrogelů pomocí fluorescenční mikroskopie	38
4.3	Experimenty zahrnující měření MSD křivek.....	40
4.4	Současný stav řešené problematiky na Fakultě chemické VUT v Brně.....	41
5	Experimentální část.....	43

5.1	Použité chemikálie.....	43
5.2	Použité přístroje	43
5.3	Příprava kalibračních roztoků.....	43
5.4	Příprava vzorků.....	44
5.4.1	Fluorescenčně značené nanočástice ve vodě	44
5.4.2	Fluorescenčně značené nanočástice v glycerolu.....	44
5.4.3	Fluorescenčně značené nanočástice agarózovém hydrogelu	44
5.4.4	Fluorescenčně značené nanočástice v hyaluronanovém gelu	45
5.5	Příprava mikroskopu na měření	45
5.6	Matematické přepočty	46
5.6.1	Přepočet autokorelační křivky na MSD křivku	46
5.6.2	Přepočet MSD křivky na reologické moduly	46
5.7	Ověření velikosti částic.....	46
6	Výsledky a diskuze	47
6.1	Test robustnosti metody.....	47
6.2	Porovnání velikosti částic pomocí metody DLS a FCS.....	47
6.3	Parametry, které ovlivňují výslednou křivku MSD.....	48
6.3.1	Šířka konfokálního objemu v horizontální rovině	48
6.3.2	Šířka konfokálního objemu ve vertikální rovině	49
6.3.3	Počet částic v objemu	49
6.3.4	Autokorelační funkce.....	50
6.4	Limitní viskozita pro měření částic	51
6.5	Agarózový hydrogel	52
6.5.1	Měření difúzního koeficientu metodou jednoohniskové FCS	52
6.5.2	Měření difúzního koeficientu metodou dvouohniskové FCS.....	57
6.5.3	Porovnání jednoohniskové a dvouohniskové FCS	60
6.5.4	Alternativní metody vyhodnocení	60
6.5.5	Přepočet MSD křivek na reologické moduly.....	64
6.5.6	FLIM agarózového hydrogelu	67
6.5.7	Analýza pomocí programu ImageJ	71
6.5.8	Další způsoby přípravy hydrogelu s nanočásticemi	72
6.5.9	Uvolňování částic z hydrogelu do roztoku	82
6.6	Difúze v roztoku hyaluronanu	85
6.6.1	Porovnání fluorescenčně značených nanočástic a fluorescenčně značeného hyaluronátu sodného	86

6.6.2 Log-normální distribuční model	88
7 Závěr	91
8 Podíl doktoranda a význam výsledků	95
9 Použitá literatura	96
10 Seznam použitých zkratk.....	108
11 Seznam použitých symbolů.....	109
12 Přílohy	110
Příloha 1 – Nastavení fluorescenčního mikroskopu pro měření a následné analýzy	110
Příprava fluorescenčního mikroskopu.....	110
Kalibrace konfokálního mikroskopu pomocí dvou detektorů.....	116
Měření FCS (korelační křivky)	118
Měření TCSPC	120
Měření FLIM obrázků.....	124
FLIM – z-scan	129
2f-FCS	130
Příloha 2 – Analýza dat	132
FCS v případě výpočtu jedné korelační křivky změřené pomocí dvou detektorů .	132
FCS v případě skupinového měření	134
FLCS	134
TCSPC.....	135
FLIM	137
2f-FCS	138
Příloha 3 – Získání kubické rovnice z obecných rovnic	141
Příloha 4 – Přepočet autokorelační křivky na MSD.....	143
13 Přehled publikací a aktivit.....	146
13.1 Články v impaktovaném časopise	146
13.2 Abstrakty.....	146
13.3 Přednášky na mezinárodní konferenci.....	146
13.4 Postery na mezinárodní konferenci	147

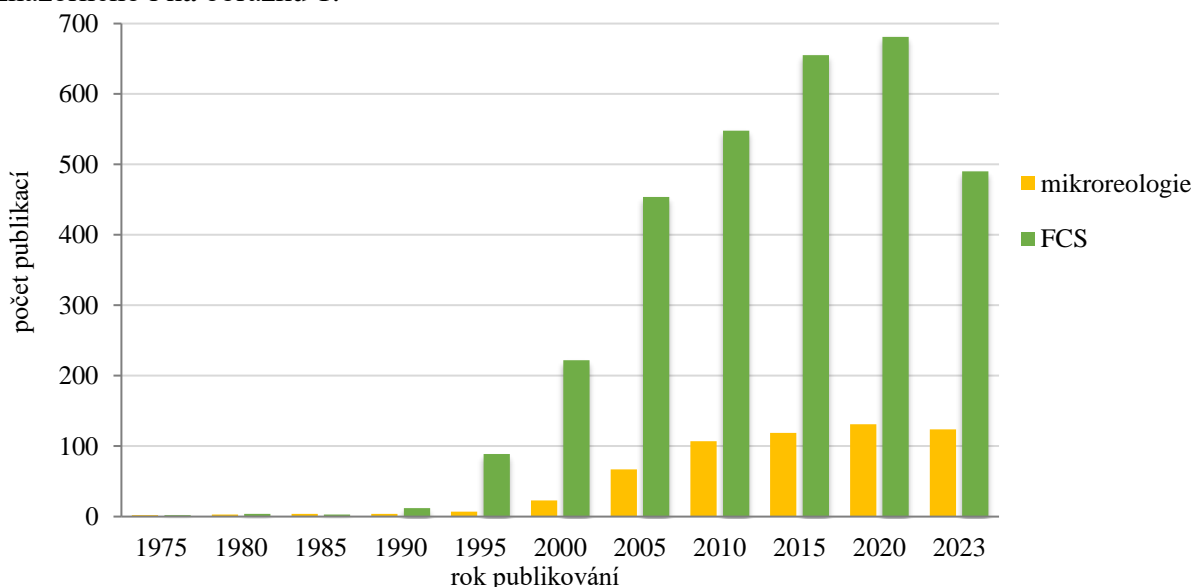
1 ÚVOD

Díky narůstajícímu zájmu o využívání hydrogelů v různých odvětvích se zvyšují i nároky na vlastnosti těchto materiálů. V současné době je velmi žádaná příprava hydrogelů, které mají přesně definovanou vnitřní strukturu. Způsobem výroby lze docílit požadavků, které jsou na výsledný gel kladeny, ovšem postup by měl zahrnovat i možné způsoby ověření struktury.

Jednou z možností pro popis hydrogelů je reologické měření, které je ale vhodné pouze pro vzorky dostupné v dostatečném množství. Proto byla vyvinuta metoda mikrereologie, která oproti klasické reologii vyžaduje řádově menší objem vzorku a je schopna měřit mimo jiné i nehomogenní materiály. Navíc díky téměř nulovému mechanickému poškození při samotné analýze je tato metoda vhodná i pro biologické vzorky.

Velmi používaná metoda pro zjišťování vnitřní struktury je pasivní difúze, kdy je v reálném čase sledováno chování jedné částice v určitém prostředí. Z této závislosti pak lze stanovit, o jaký materiál se v konkrétním bodě jedná. Pro sledování částic v reálném čase je velmi vhodná metoda fluorescenční korelační spektroskopie, která v průběhu času zaznamenává změnu intenzity fluorescence ve velmi malém objemu, řádově ve femtolitrech. Spojením pasivní difúze s fluorescenční korelační spektroskopií získáme velmi funkční způsob pro zjištění chování částice v komplexním systému, na základě čehož jsme schopni určit vlastnosti a strukturu zkoumaného systému.

Problematika mikrereologie byla poprvé aplikována a publikována v roce 1968 při zjišťování vlastností suspenze krevních buněk [1] a popisu disperzních systémů a polymerů [2]. Oproti tomu fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) byla zcela poprvé zmíněna až v roce 1971 v publikaci, která se zabývala čistě fyzikální chemií [3]. Ačkoli jsou obě techniky dlouhodobě známé, větší pozornost získaly až na přelomu tisíciletí, což je znázorněno i na obrázku 1.



Obrázek 1: Vývoj publikační činnosti od roku 1975 do současnosti v oblasti mikrereologie a fluorescenční korelační spektroskopie. Extrahováno z databáze Web of Science [4].

Je zajímavé, že fluorescenční korelační spektroskopie je v současnosti velmi využívanou technikou, ale její spojení s mikrereologií je minimální. V oblasti využití FCS pro studium hydrogelů bylo dosud publikováno přibližně 60 článků, ovšem pouze necelá třetina z nich byla ve spojení s mikrereologií [4]. Z uvedené statistiky vyplývá, že se spojení těchto dvou metod dosud nevyužívá i přes fakt, že poskytují značné výhody a umožňují zkoumat nejen fyzikálně chemické chování materiálů, ale i optimalizaci příprav těchto vzorků a detekci případných chyb.

2 CÍLE PRÁCE

Prvním krokem je vypracování rešerše na téma mikroreologie měřená metodou fluorescenční korelační spektroskopie. Na základě rešerše je nutné vybrat vhodné koncentrace vybraných koloidních systémů pro studium této techniky a verifikaci následných analýz.

Na vybraném koloidním systému se provede optimalizace metodiky měření a vyhodnocování difúzního chování fluorescenčně značených částic o různé velikosti. Zjištěné informace by měly být dále použity pro popis komplexních koloidních systémů pomocí fluorescenční mikroskopie a různých variant metody fluorescenční korelační spektroskopie společně s převodem dat na hodnoty středního čtverce posunu (MSD).

Na vybraném gelovém systému se prokážou možnosti použitých metod pro popis difúzního chování modelových fluorescenčních sond z hlediska charakterizace síťové struktury gelu. V rámci těchto experimentů je nutné připravit koloidní systém s obsahem fluorescenčních sond takovým způsobem, aby byly zachovány vlastnosti a struktura systému, ale zároveň aby navržený způsob byl aplikovatelný i pro ostatní gelové systémy a vhodný pro měření FCS.

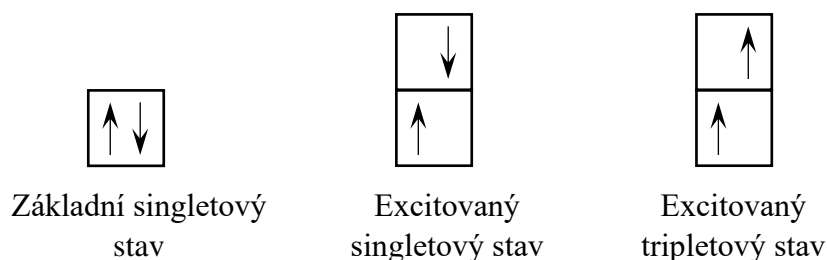
Po ověření aplikovatelnosti metody na vybraný koloidní systém by bylo vhodné vyzkoušet i další metody a analýzy. Mezi související vhodné metody se řadí především dvouhniková fluorescenční korelační spektroskopie. Kromě aktuálního softwaru umožňujícího následnou analýzu dat najít další způsoby interpretace naměřených dat. Posledním krokem při testování agarózového systému je navržení metody přepočtu získaných autokorelačních křivek na reologické moduly.

Po verifikaci všech zvolených metod a analýz se tyto znalosti přenesou na nový koloidní systém, kdy se ověří všeobecná platnost těchto hypotéz. Vybranými metodami a způsoby interpretace se charakterizují koloidní systémy hyaluronanu z pohledu difúzního chování částic v tomto prostředí a fluorescenčně značeného hyaluronanu jako alternativní sondy.

3 TEORETICKÁ ČÁST

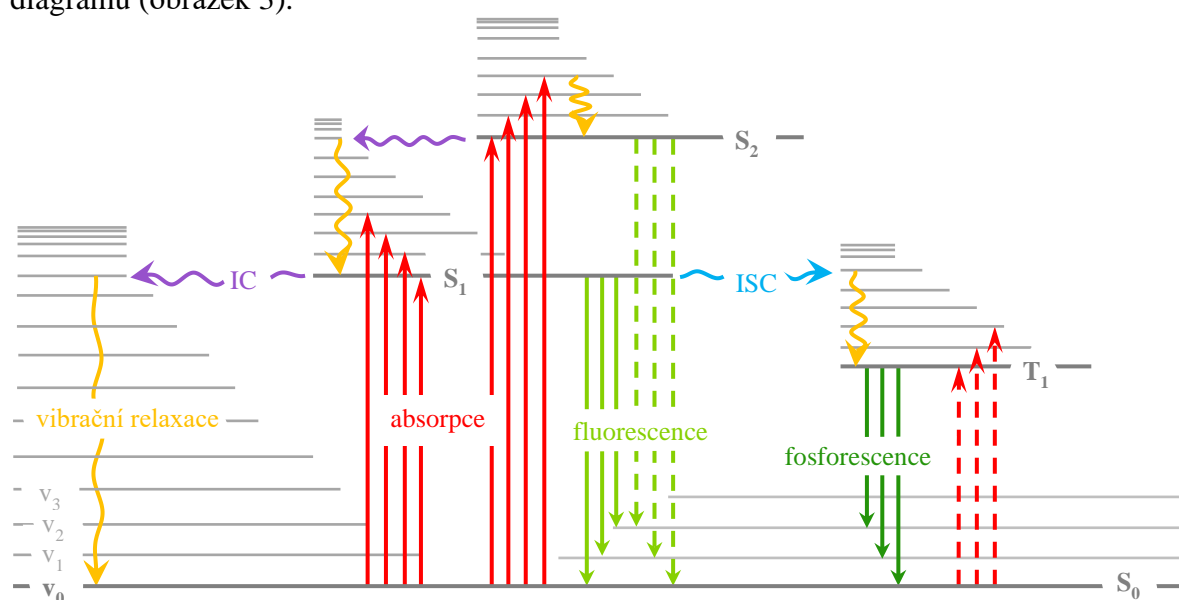
3.1 Fluorescence

Pokud molekula absorbuje záření o specifické vlnové délce, pak může dojít k přechodu ze základní na vyšší (excitovanou) elektronovou hladinu. Obecně lze tyto excitované stavy rozdělit na singletové a tripletové, které se liší orientací spinu, viz obrázek 2. To, kterou vyšší excitovanou hladinu elektron obsadí, závisí na pravděpodobnosti přechodu a excitační vlnové délce.



Obrázek 2: Základní a excitované stavy molekuly [5].

Molekula v excitovaném stavu má několik možností, jak využít dodanou energii. Kromě fotoluminiscence se může mimo jiné jednat o změnu konformace, přenos elektronu nebo fotodisociaci. Elektron se může do základní neexcitované hladiny vrátit pouze z nejnižší vibrační hladiny odpovídajícího excitovaného stavu. Molekula ve většině případů absorbuje do některé z vyšších vibračních hladin, proto zákonitě musí v dalším kroku dojít k *vibrační relaxaci*, tedy nezářivé ztrátě energie, a s tím spojeným poklesem energie na vyšší základní excitovanou hladinu. Dalším nezářivým přechodem je *vnitřní konverze*, kdy se elektron z vyšší základní excitované hladiny dostane do nižšího excitovaného stavu, ovšem vyšší vibrační hladinu tohoto stavu. Posledním nezářivým přechodem je *mezisystémový přechod*, který se vyznačuje změnou spinového stavu. Zmiňované procesy jsou zobrazeny na Perrin–Jabłoňského diagramu (obrázek 3).

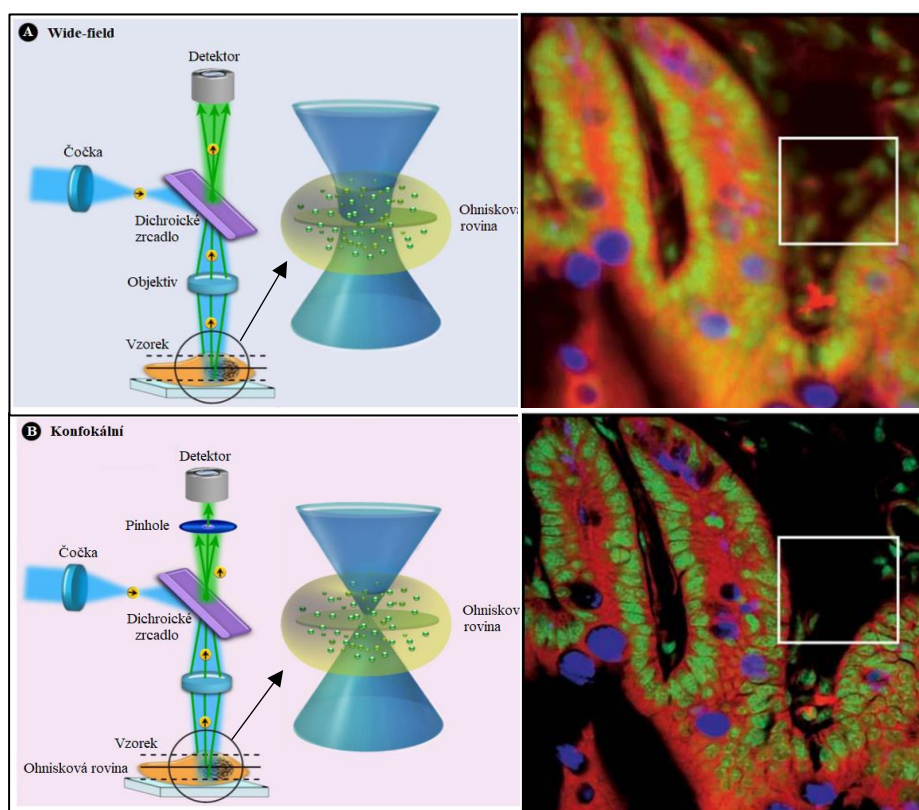


Obrázek 3: Perrin–Jabłoňského diagram. IC = vnitřní konverze, ISC = mezisystémový přechod (intersystem crossing), S_x = singletová hladina, T_x = tripletová hladina [5].

Při zářivém přechodu může dojít ke dvěma situacím. V prvním případě se elektron vrací do základní singletové hladiny z vyššího excitovaného singletového stavu, tím pádem se jedná o fluorescenci, jejíž doba života se pohybuje řádově v nanosekundách. Ve druhém případě dochází k mezisystémovému přechodu ze singletu na triplet a elektron se pak vrací z tripletové hladiny přes kvantově zakázaný stav, což způsobuje fosforescenci. Zde se současně s vyzářením fotonu musí změnit orientace spinu, proto celý proces trvá déle – mikrosekundy až sekundy. Kvůli prvotní proběhlé vibrační relaxaci ztrácí tripletový stav nezanedbatelnou část dodané energie, proto je získaná vlnová délka vyšší, než by měla fluorescence při stejné excitační energii. Kromě fosforescence může z tripletové hladiny dojít i ke zpožděné fluorescenci v případě, že je možné díky zahřívání zvýšit vibrační stav. Z tohoto stavu mezisystémovým přechodem přejde zpět do vyšší excitované singletové hladiny, ze které následně může vyzářit foton ve formě fluorescence. Obecně lze říct, že fotoluminiscenci lze podpořit zvýšením množství budícího záření, naopak při vyšších teplotách se zvyšuje pravděpodobnost nezářivých přechodů [6].

3.2 Fluorescenční zobrazovací mikroskopie

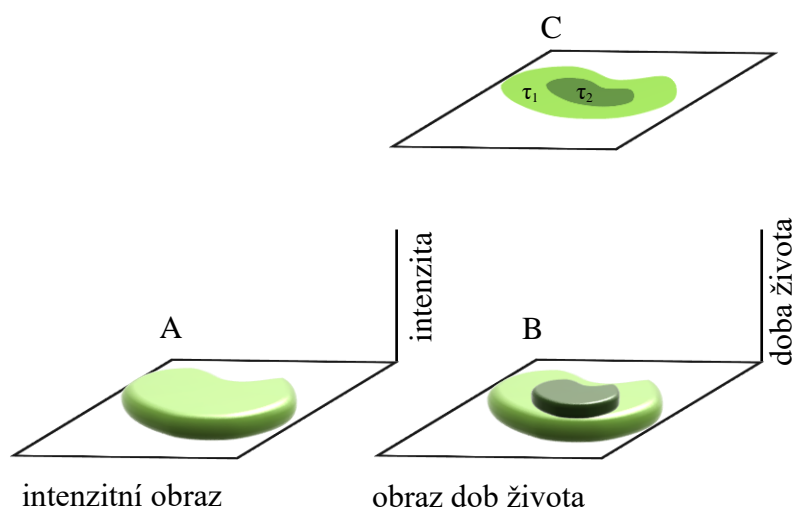
Pro získání fluorescenčního obrazu existují dvě metody. *Wide-field metoda*, která je méně přesná, snímá v ohniskové rovině širokou oblast vzorku. Pro tuto metodu se současně používá detektor pro zobrazení časově rozlišené fluorescence (time-resolved imaging detector). Mnohem přesnější metodou je *laserová skenovací mikroskopie* (LSM). Citlivost je zde dána použitím tzv. pinhole, která slouží k odfiltrování záření pocházejícího z jiné než ohniskové roviny a k přesnějšímu zaostření laseru. Obraz se vytváří tím, že v každém skenovacím bodě se měří doba života fluorescence [7].



Obrázek 4: Srovnání wide-field metody (A) a konfokální LSM (B) [7].

Metoda fluorescenční mikroskopie zobrazující dobu života (FLIM) je technika, která umožňuje zaznamenávat doby života fluoroforu a zároveň jeho umístění v prostoru. Na základě kombinace intenzitního profilu vzorku a získané doby života se vytvoří finální obraz, na kterém lze rozlišit různé doby života a jejich relativní zastoupení ve vzorku [8].

Pokud se měří vzorek s rovnoměrnou koncentrací fluoroforu, samotná intenzitní mapa by neposkytovala všechny dostupné informace. Oproti tomu doba života fluorescence není závislá na koncentraci, ale reaguje na změnu okolního prostředí, jako je například viskozita, polarita rozpouštědla nebo koncentrace iontů [8]. Kromě koncentrace je intenzita fluorescence ještě závislá na čase. To se jeví jako jedna z nevýhod klasického fluorescenčního mikroskopu. Rozdíl těchto dvou fluorescenčních metod je zobrazen na obrázku 5, kde zkoumaný vzorek má dvě oblasti se shodnou intenzitou fluorescence, které jsou proto pro klasický fluorescenční mikroskop vzájemně nerozlišitelné. Na druhém obrázku je stejný vzorek pozorovaný pomocí FLIM. Zde jsou rozlišeny dvě oblasti, které se od sebe liší dobou dosvitu fluorescence. Z fyzikálního hlediska se jedná buď o dva různé fluorofory, nebo o jeden fluorofor ve dvou různých prostředích (přítomnost iontů, jiná viskozita, pH...). Pro následnou analýzu je potřeba znát alespoň přibližné vlastnosti daného systému pro správné určení typu fluoroforu [8].



Obrázek 5: Srovnání klasické fluorescenční mikroskopie (A) a laserové skenovací mikroskopie (B). Na obrázku B jsou rozlišeny doby života, ačkoli koncentrace obou fluoroforů je stejná, kdy výsledek skenu je zobrazen na obrázku C. U klasické fluorescenční mikroskopie není možné tyto dvě oblasti rozdělit, protože fluorescence je na koncentraci závislá [6].

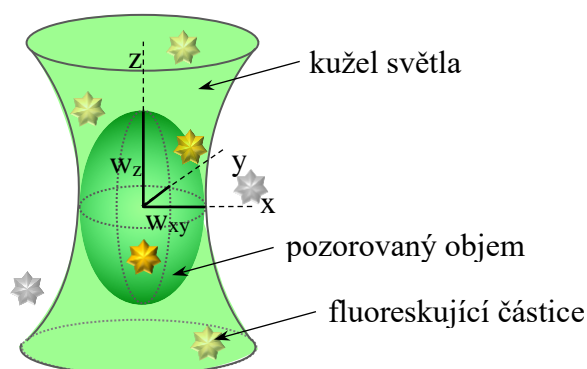
Kromě nezávislosti na koncentraci fluoroforu má laserová fluorescenční skenovací mikroskopie několik dalších výhod. Patří mezi ně například oddělení fluorescenčního světla od šumu pozadí pomocí časového filtru, který lze mimo jiné využít i jako upřesňující parametr pro další analytická měření. Také je možné snížit celkový počet potřebných detektorů, protože jeden detektor dokáže pracovat s více dobami života zároveň [10].

Díky kombinaci fluorescence a mikroskopie je tato metoda vhodná i pro zkoumání jednotlivých buněk, případně určité struktury měřeného vzorku. Při použití správného nastavení fluorescenčního mikroskopu je možné efektivně zkoumat dynamiku fluorescence až na úroveň jedné molekuly [11, 12].

3.3 Fluorescenční korelační spektroskopie

Tato metoda, která se označuje zkratkou FCS, je založena na získávání dynamických a strukturních informací na základě fluktuace intenzity fluorescence v čase. Fluorescence je emitována jednou nebo více molekulami fluoroforu, kdy se změna intenzitního profilu získává z velmi malého objemu, který je vytvořený laserovým paprskem. Tato změna je vyvolána pohybem pozorovaných fluorescenčních molekul skrz daný konfokální objem. Při zjišťování periodičnosti pozorovaného děje je potřeba zvolit odpovídající časové měřítko v závislosti na zkoumaném materiálu a fluoroforu [13].

Pohyb částic je daný translační difúzí nebo tokem. Díky velikosti konfokálního objemu (standardně okolo jednoho femtolitru) se do něj vejde omezené množství částic – v ideálním případě se jedná o jednu molekulu v pozorovaném objemu, což odpovídá řádově koncentraci fluoroforu $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Tím je možné sledovat přítomnost nebo absenci fluorescenčních částic v objemu a zaznamenávat změnu intenzity v závislosti na době setrvání fluoroforu v dráze excitačního paprsku [14].



Obrázek 6: Znárodnění konfokálního objemu s fluoreskujícími částicemi

Pokud se jedná o translační difúzi, tak difúzní čas a z něj odvozený difúzní koeficient závisí na velikosti konfokálního objemu. Ten ovlivňuje řada faktorů, mezi které patří například typ objektivu, intenzita laseru, jeho vlnová délka a další. Dále je potřeba alespoň rámcově znát rychlost, se kterou dané děje probíhají. Pro přesné měření je nutné kalibrace objemu a rychlosti průchodu fluoroforu o známém difúzním koeficientu v závislosti na okolní teplotě. Samotná translační difúze trvá řádově ve stovkách mikrosekund až jednotkách sekund, oproti tomu fotochemické děje jsou až o řád rychlejší [15].

3.3.1 Matematická analýza dat – SymPhoTime64

Všechny uvedené rovnice byly převzaty z vyhodnocovacího systému SymPhoTime64, případně z manuálu od firmy PicoQuant [16].

Pro správné vyhodnocení dat je nutné znát velikost efektivního a konfokálního objemu. Pokud jsou objemy aproximovány 3D Gaussovou křivkou, pak efektivní objem je větší oproti konfokálnímu o faktor $2^{\frac{3}{2}}$. Zatímco termín konfokální objem popisuje objem v šířce poloviny maxima funkce ve všech osách, tak efektivní objem se používá k popisu objemu, ve kterém je pravděpodobnost detekce molekuly vyšší než $\frac{1}{e^2}$ hustoty. Vztah mezi těmito objemy je dán rovnicí:

$$V_{conf} = \left(\frac{\pi}{2}\right)^{\frac{3}{2}} w_{xy}^2 w_z = \left(\frac{1}{2}\right)^{\frac{3}{2}} V_{eff}, \quad (1)$$

kde w_{xy} je laterální a w_z axiální $\frac{1}{e^2}$ -poloměr konfokálního objemu. Rozměr w_z je často vyjadřován jako $w_z = \kappa \cdot w_{xy}$, kde κ představuje excentricitu konfokálního objemu.

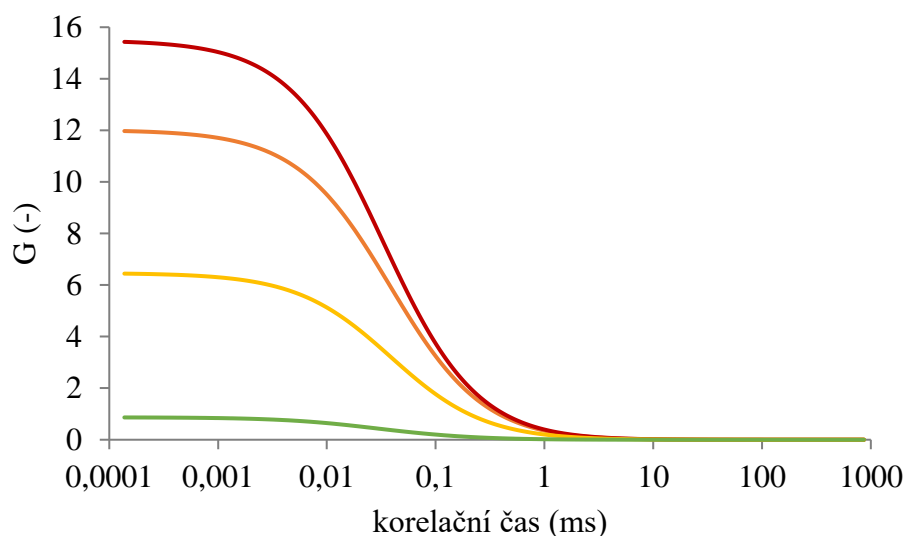
Zaznamenaná změna intenzity je analyzována pomocí matematických modelů v závislosti na typu získaných dat, zkoumaném vzorku a zkušenosti operátora. Autokorelační funkce popisuje stupeň korelace mezi dvěma určitými hodnotami intenzity fluorescence v daném časovém intervalu. Vyjadřuje tedy, s jakou pravděpodobností se bude stejná molekula vyskytovat v pozorovaném objemu v čase $t + \tau$ za předpokladu, že se zde nacházela v čase t .

Křížově korelační funkce (cross-correlation function) udává, jestli a jak moc je daná charakteristika společná pro dva systémy. Z toho důvodu se šum detektoru projeví v autokorelaci, ale v křížové korelaci už ne z důvodu, že žádné dva detektory nemají úplně stejný šum, ovšem fluorescence je u obou detektorů shodná.

Korelační funkci lze vypočítat ze zaznamenaných fluktuací intenzity fluorescence $I(t)$ podle rovnice

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t) \cdot I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}. \quad (2)$$

Z hodnoty korelační funkce G v čase $\tau = 0$ pak můžeme získat informaci o rozsahu fluktuací detekovaného fluorescenčního signálu. Je nepřímo úměrná počtu molekul v konfokálním objemu, tedy při zvyšování koncentrace molekul se hodnota autokorelační funkce snižuje.



Obrázek 7: Závislost funkce G na koncentraci fluoroforu. Zelená křivka zobrazuje nejméně koncentrovaný roztok (a správný, kdy se nachází v objemu pouze jedna molekula fluoroforu), červená nejméně koncentrovaný.

Za předpokladu, že konfokální objem může být aproximován 3D Gaussovou křivkou, tak autokorelační funkci lze vypočítat jako

$$G(\tau) = G_0 \cdot \left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)^{-1} \cdot \left(1 + \frac{\tau}{\kappa^2 \tau_D}\right)^{-\frac{1}{2}}, \quad (3)$$

kde τ_D představuje dobu, kdy korelace klesne na polovinu původního maxima. Tento čas lze obecně interpretovat jako dobu, kterou molekula potřebuje, aby se dostala ven z konfokálního objemu pomocí translační difúze. Jinou formulací lze říct, že je to statistický údaj, kdy je 50 %

pozorovaných fluoroforů v detekčním objemu a 50 % už je pryč. Je tedy přímo spojený s difúzním koeficientem, což dokládá rovnice

$$w_{xy}^2 = 4D\tau_D. \quad (4)$$

Pro proložení FCS dat ve formě jednoduchých autokorelačních křivek se nejčastěji využívají následující základní matematické modely:

$$\text{Pure Diffusion} \quad G(\tau) = \sum_{i=0}^{n_{Diff}-1} \frac{\rho[i]}{\left[1 + \frac{\tau}{\tau_D[i]}\right] \cdot \left[1 + \frac{\tau}{\tau_D[i] \cdot \kappa^2}\right]^{\frac{1}{2}}} \quad (5)$$

$$\text{Triplet} \quad G(\tau) = \left[1 + T \left[\exp\left(-\frac{\tau}{\tau_T}\right) - 1\right]\right] \cdot \sum_{i=0}^{n_{Diff}-1} \frac{\rho[i]}{\left[1 + \frac{\tau}{\tau_D[i]}\right] \cdot \left[1 + \frac{\tau}{\tau_D[i] \cdot \kappa^2}\right]^{\frac{1}{2}}} \quad (6)$$

Triplet Extended 3D

$$G(\tau) = \left[1 + \sum_{j=0}^{n_{Triplet}-1} T(j) \left[\exp\left(-\frac{\tau}{\tau_T(j)}\right) - 1\right]\right] \cdot \sum_{i=0}^{n_{Diff}-1} \frac{\rho[i]}{\left[1 + \left(\frac{\tau}{\tau_D[i]}\right)^{\alpha[i]}\right] \cdot \left[1 + \frac{\left(\frac{\tau}{\tau_D[i]}\right)^{\alpha[i]}}{\kappa^2}\right]^{\frac{1}{2}}} + G_{inf} \quad (7)$$

Matematický model *Pure Diffusion* se využívá pro analýzu difúze fluoroforu v daném prostředí. Předpokládá se, že fluorofor nevykazuje žádný mezisystémový přechod, tedy se nemění fotofyzikální vlastnosti. Matematický model *Triplet* se používá pro analýzu, kdy fluorofor přechází do tripletového stavu nebo stavu s jemu podobnou fotofyzikou (tzv. „dark state“). Pro rozšíření této funkce byl následně navržen model *Triplet Extended 3D*. Tato funkce se používá, kdy průměrná rychlost není zcela stabilní, případně fluorofor difunduje ve všech třech směrech v prostředí typu buňka nebo polymer [17].

Komplikace nastávají v případě polydisperzních vzorků, které mohou mít například různou velikost (molekulovou hmotnost), případně zdánlivou velikost, kdy částice může procházet anizotropním prostředím (například gelem). S tímto problémem souvisí i případ, kdy je měřena směs s různou hodnotou jasu přítomných molekul.

V programu SymPhoTime64, který se standardně používá pro analýzy FCS křivek, nelze dostatečně podrobně rozlišit jednotlivé doby života, dochází zde ke zkreslování výsledků a široké distribuci difúzních časů. V tomto případě se používal model s více difúzními časy označený jako *Pure Diffusion* (rovnice 5), kde se jedná o lineární kombinaci. Zde se sleduje číslo, které musí být co nejblíže jedné a zároveň reziduální analýza, kdy odchylky od střední hodnoty musí být náhodné a rovnoměrné bez velkých extrémů. Protože se jedná pouze o matematickou analýzu, která nezohledňuje povahu vzorku, lze tímto způsobem proložit data korelační křivkou se čtyřmi proměnnými (difúzními časy), kdy fit bude sice matematicky správně, ovšem informační hodnota bude v některých případech nulová.

Další možností je vyhodnocení s „parametrem alfa“. Jedná se o úpravu modelu *Pure Diffusion*, kdy člen rovnice obsahující difúzní čas (tedy jedinou neznámou, kterou ze vzorce potřebujeme vypočítat) je umocněn na parametr alfa (rovnice 8).

$$G(t) = \frac{1}{\langle N \rangle} \cdot \frac{1}{1 + \left(\frac{t}{\tau_D}\right)^\alpha} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\left(\frac{t}{\tau_D}\right)^\alpha}{\kappa^2}}} \quad (8)$$

V tomto případě je opět fit matematicky v pořádku, tedy data jsou správně proložena a reziduální analýza vychází rovnoměrně. Pokud se nejedná o velmi komplikovaný systém, pak výsledkem je jedna hodnota parametru alfa a jedna hodnota difúzního času. Matematicky tento parametr upraví křivku tak, aby byla namodelovaná správně pro daná data, bohužel v literatuře stále chybí fyzikální vysvětlení tohoto parametru. Jednou z možností je brát tento parametr jako ukazatel anomality difúze, tedy pokud je alfa rovna jedné, jedná se o volnou difúzi, ale čím více se od této hodnoty liší (zpravidla je menší), tak je těžší difúzi částic definovat jednoduchým způsobem. Sledováním změny tohoto parametru je možné získat informace o homogenitě systému [18].

3.3.2 Modely zahrnující neuniformnost systému

Standardní model 3D difúze (rovnice (5)) je vhodný pro studium difúzních vlastností monodisperzních fluoroforů v izotropním prostředí (např. jednoduchý organický fluorofor ve vodě). Pro systémy, které jsou polydisperzní anebo se se pohybují v anizotropním prostředí je potřeba použít složitější modely, které polydisperzitu anebo anizotropii prostředí zahrnují. Zvláště je třeba přihlídnout k faktu, že výše zmíněné vlastnosti se mohou měnit spojitě a není tak vhodné je popisovat systémem diskretních hodnot, protože standardní model 3D difúze nabízí lineární kombinaci maximálně čtyř komponent. Model Anomální 3D difúze (rovnice (7)) toto kritérium splňuje, nicméně v literatuře chybí význam číselné hodnoty koeficientu anomální difúze, jak bylo zmíněno výše. Proto je potřeba přistoupit k použití modelů, které v sobě nesou předpoklad rozložení daných veličin. Jako příklad je možné uvést (log-)normální (Gaussovské), Poissonovo nebo Schulz-Zimmovo rozdělení [19, 20]. Jako další možnosti analýzy, která překonává problémy algoritmu metody nejmenších čtverců a poskytuje distribuci sledovaných hodnot, je takzvaná metoda maximální entropie (Maximum Entropy Method, MEM).

K příspěvku neuniformity je třeba zařadit i člen, který reflektuje různý molekulární jas (brightness, molecular brightness) studovaných fluoroforů. Je třeba zmínit, že pokud se jedná např. o značený polymer, lze distribuci jeho stupně polymerizace spojit s hustotou značení fluoroforu [21]. Pokud vynecháme příspěvek nefluorescentních stavů (tripletu apod.), lze obecně model autokorelační funkce napsat v níže uvedeném stavu

$$G(t) = \frac{1}{\langle N \rangle} \cdot \frac{\int_0^\infty P(\tau_D) M(t, \tau_D) \varepsilon^2(\tau_D) d\tau_D}{(P(\tau_D) \varepsilon(\tau_D) d\tau_D)^2}, \quad (9)$$

kde výraz $P(\tau_D)$ vyjadřuje distribuci difúzních časů, $M(t, \tau_D)$ vyjadřuje standardní translační difúzi a výraz $\varepsilon(\tau_D)$ je distribuce jasu v závislosti na difúzním čase (a tím i velikosti molekuly). K poslednímu parametru je potřeba připomenout, že samotná autokorelační je bilancí intenzit fluorescence a je tedy velmi citlivá na přítomnost fluoroforů s různým molekulárním jasnem, jak je uvedené v rovnici (2).

3.3.2.1 Log-normální model distribuce difúzních časů

Log-normální model vyjadřuje rozdělení pravděpodobnosti náhodné veličiny, jejíž logaritmus je rozdělen normálně. Tento model je charakterizován vztahem

$$P(\tau_D) = \frac{1}{\sqrt{2 \cdot \pi \cdot b^2(\tau_D)} \cdot \tau_D} e^{-\frac{1}{2} \frac{(\ln(\tau_D) - \ln(\tau_{D, \text{střed}}))^2}{b^2(\tau_D)}}, \quad (10)$$

kde τ_D je nezávisle proměnná, $\tau_{D, \text{střed}}$ je medián závislosti a parametr b odpovídá směrodatné odchylce přirozeného logaritmu proměnné.

Tento model je velmi často využíván v analýze velikosti částic v koloidních systémech nebo v systémech s distribucí molekulové hmotnosti [22, 23].

3.3.2.2 Schulz-Zimmova distribuce

Jedná se o funkci, která popisuje kontinuální distribuci molekulových hmotností polymeru, což se promítne do distribuce velikostí polymeru a tím pádem, v případě fluorescenčně značených polymerů, i do distribuce difúzních časů. Distribuce může mít různou podobu vyjádření, jako například:

$$P(X) = \frac{\xi^{\xi+1}}{\Gamma(\xi + 1)} \frac{X^{\xi+1}}{\langle X \rangle^\xi} \exp\left(-\xi \frac{X}{\langle X \rangle}\right), \quad (11)$$

kde X je stupeň polymerizace, $\langle X \rangle$ je střední hodnota stupně polymerizace, ξ je definováno jako $\xi = \frac{1}{\text{index polydispersity} - 1}$ a Γ je gamma funkce. V tomto případě autoři převedli distribuci difúzních časů právě na stupeň polymerizace X a hledali parametry $\langle X \rangle$ a ξ , které porovnávali s hodnotami zjištěnými pomocí konvenčních metod [21].

3.3.2.3 Metoda maximální entropie

Analýza metodou maximální entropie (MEM) je založená na algoritmu navrženém Skillingem a Bryanem [24]. Tato metoda byla již dříve úspěšně použita k získání distribuce dob života fluorescence a difúzních koeficientů a v poslední době je tato metoda implementována jako MEMFCS k analýze FCS dat [20]. MEMFCS analýza korelačních dat hledá nejlepší rozdělení $P(\tau_D)$, kde je nejenom hodnota χ^2 minimální, ale také entropie (H) je maximální. Princip maximální entropie říká, že nejvhodnějším rozdělením pro modelování daného souboru dat je rozdělení s nejvyšší entropií ze všech, která splňují omezení našich předchozích znalostí. Méně pravděpodobný výsledek přináší více informací než pravděpodobnější. Entropii je možné tedy vyjádřit jako míru neurčitosti. Pokud by bylo cílem nalézt rozdělení $P(x)$, o kterém toho víme co nejméně, pak by v souladu s touto hypotézou měla být entropie maximální.

Pokud je předpoklad, že distribuce difúzních časů bude kontinuální, lze závislost autokorelační funkce na difúzním čase vyjádřit jako:

$$G(t) = \sum_i^n \alpha_i \left(\frac{1}{1 + \frac{t}{\tau_D}} \right) \left(\frac{1}{1 + \kappa^2 \frac{t}{\tau_D}} \right)^{1/2}, \quad (12)$$

kde amplituda α_i musí splňovat podmínku, že experimentální data $G(\tau)$ jsou správně matematicky i fyzikálně proložena. Často je možné, že kritérium dobré shody (χ^2) je splněno pro mnoho různých rozdělení α_i , zejména pokud jsou data zašuměná. Taková rozdělení mohou

také zahrnovat řešení pro specifické modely, například jednu nebo více pevných hodnot pro τ_D . Experimentální data pak odpovídají kterémukoli z těchto rozdělení, a proto je přijatelný jakýkoli model, který takové rozdělení předpovídá [25].

Pro aplikaci v FCS technikách je důležité, že metoda maximální entropie odhaluje příspěvky vícenásobných difúzních módů bez předchozího předpokladu jejich počtu. MEM je navržena tak, aby vytvořila co nejširší rozdělení difúzních časů (τ_D) a poskytla kvantitativní měření jejich středních difúzních koeficientů. Entropie je v tomto smyslu pak definována jako:

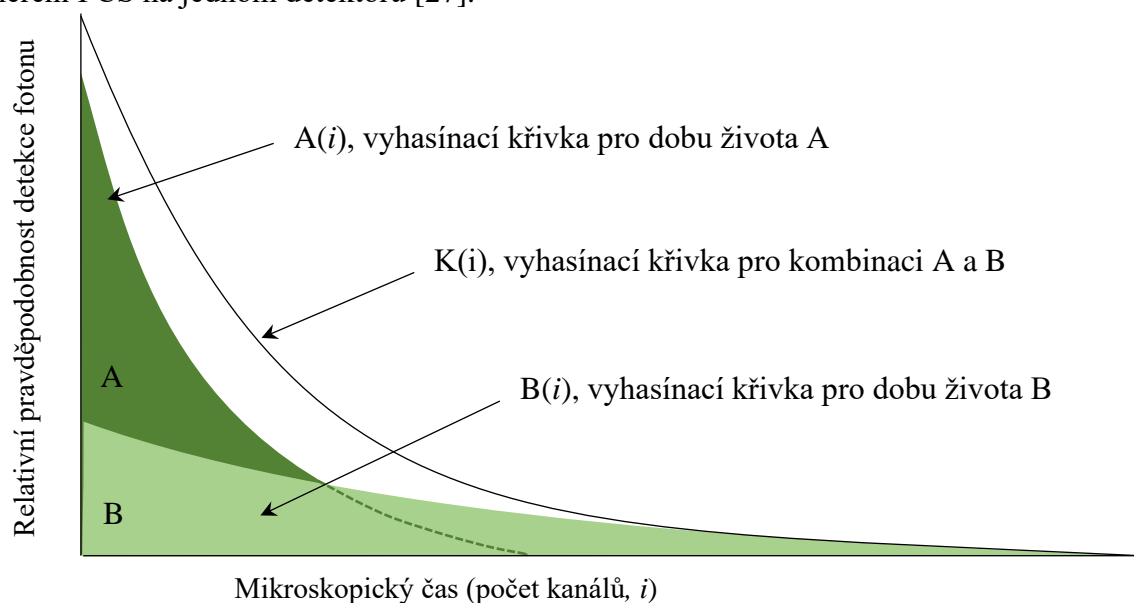
$$H = - \sum_x p(x) \ln p(x), \quad (13)$$

kde $p(x) = \frac{\alpha_i}{\sum_i \alpha_i}$. Účelem algoritmů je pak hledat takové rozdělení, pro které je hodnota entropie H maximální.

3.3.3 Časově rozlišená FCS

Další možností měření je využití dob života fluorescence získaných z TCSPC analýzy. Tento způsob analýzy (FLCS – Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy) vypočítává autokorelační křivky pro každou dobu života fluorescence zvlášť. Základními požadavky pro FLCS je nanosekundová pulzní excitace a schopnost současně měřit čas příchodu fluorescenčního fotonu ve dvou různých časových škálách. První měřený čas je makroskopický, který zaznamenává dobu příchodu fotonu od počátku experimentu s přesností nanosekund a lze z něj zjistit informace například o difúzním čase. Druhý čas je mikroskopický, je vztažený k excitačnímu pulzu a má rozlišení v pikosekundách. Tento čas nese informaci o tom, jak který foton přispívá do jednotlivých autokorelačních funkcí [26].

Na základě těchto dat je možné zjistit, jestli všechny doby života nesou informační hodnotu (tedy jestli náleží konkrétnímu typu fluoroforu), nebo se jedná pouze o artefakt měření. Touto metodou je možné redukovat šum detektoru, případně jeho tzv. afterpulsing v případě měření FCS na jednom detektoru [27].



Obrázek 8: Relativní pravděpodobnost původu fotonu se mění v průběhu vyhasínání a může být vyhodnocena pro jednotlivé fotony [28].

FLCS je založena na skutečnosti, že s pulzní excitací se pravděpodobnost, ze kterého fluoroforu pochází detekovaný foton, mění v čase díky různé době života fluorescence, jak je zobrazené na obrázku 8. Mikroskopický čas fotonu (počet kanálů, i) umožňuje statistické vyhodnocení jeho původu. Pokud je tento čas dlouhý, pak pravděpodobně pochází z delší doby života fluorescence (A), ačkoli existuje konečná pravděpodobnost, že pochází z kratší doby života fluorescence (B) [28, 29].

Následující rovnice jsou převzaty ze softwaru SymPhoTime64 [16]. Pokud se normalizují histogramy $A(i)$ a $B(i)$ na jednotkovou oblast, pak platí, že:

$$a(i) = \frac{A(i)}{\sum A(i)} \quad (\text{pro } b(i) \text{ platí to stejné}), \quad (14)$$

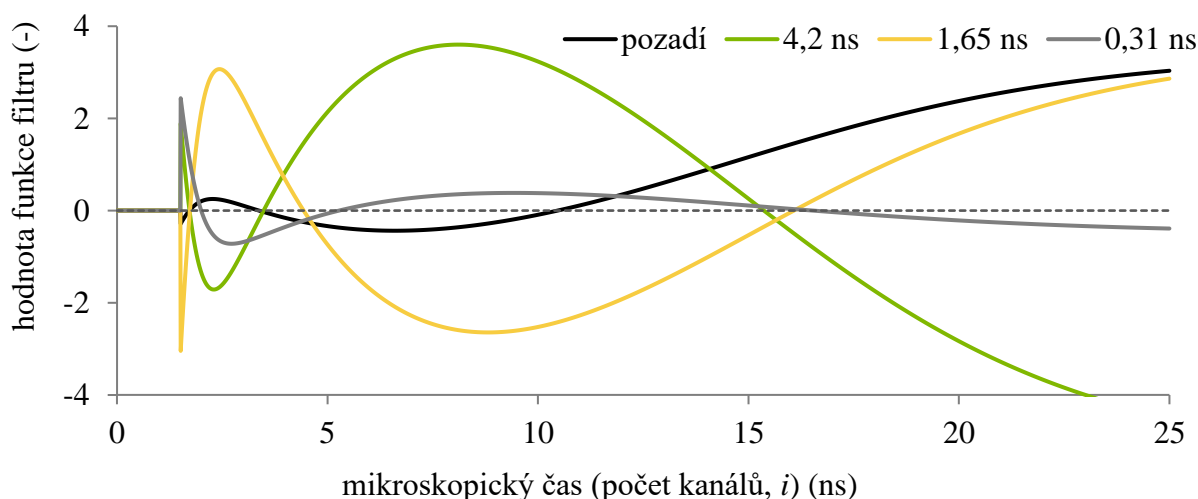
což znamená, že $\sum a(i) = \sum b(i) = 1$. Tyto normalizované vyhasínací křivky se používají jako modelové. Vyhasínací křivka $K(i)$ pro kombinaci A a B je vyjádřena jako lineární kombinace, tedy:

$$K(i) = w_a \cdot a(i) + w_b \cdot b(i), \quad (15)$$

kde w_a a w_b jsou amplitudy jednotlivých příspěvků fotonu z fluoroforu A nebo B vyjádřené v počtech fotonů. Na základě těchto příspěvků lze definovat funkce $f_a(i)$ a $f_b(i)$ jako

$$\begin{aligned} \langle f_a(i) \cdot K(i) \rangle &= w_a \\ \langle f_b(i) \cdot K(i) \rangle &= w_b. \end{aligned} \quad (16)$$

Lomené závorky označují průměr z nekonečného počtu měření. Z rovnic vyplývá, že uvedené funkce $f_a(i)$ a $f_b(i)$ slouží jako statistické filtry aplikované na každý histogramový kanál TCSPC. Tyto funkce jsou počítány z vyhasínací křivky $K(i)$ a modelových vyhasínacích křivek (tedy z rovnic 8 a 9). Dalším požadavkem na tyto funkce je ten, že současně musí minimalizovat relativní chyby. Díky $f_a(i)$ a $f_b(i)$ je možné statisticky oddělit příspěvky jednotlivých fotonů. Znaménko a velikost příspěvků jednotlivých fotonů mohou být určeny z celkového počtu kanálů (mikroskopickému času) díky odpovídající funkci filtru $f_a(i)$ a $f_b(i)$. Na obrázku 9 jsou zobrazeny funkce pro tři doby života a pozadí [28, 30].



Obrázek 9: FLCS filtry pro pozadí a 3 doby života [16].

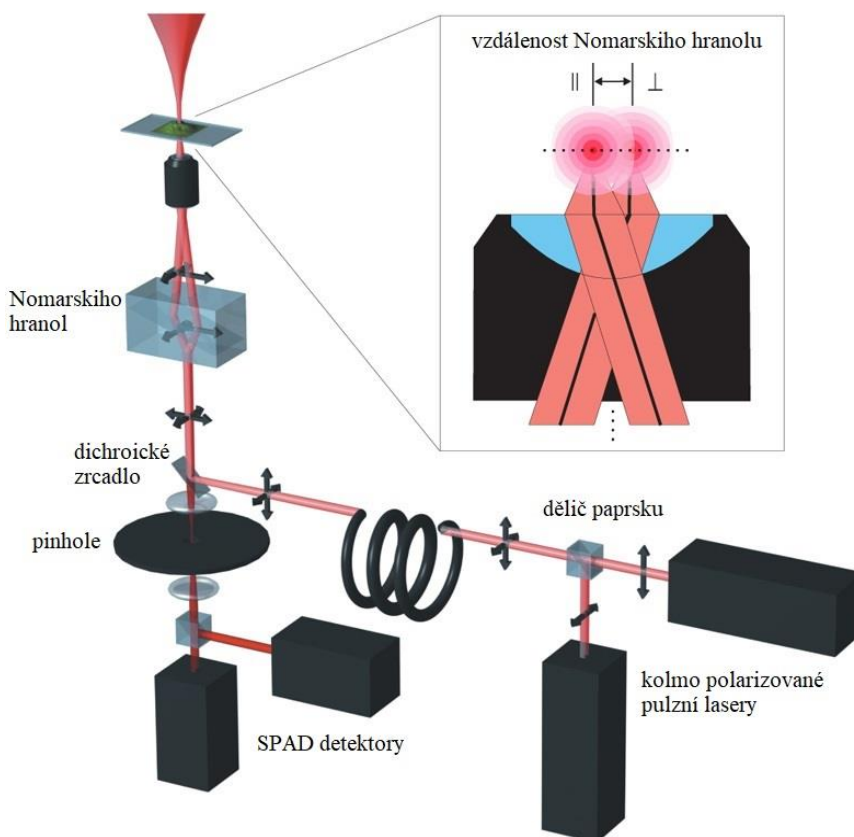
Součet všech hodnot filtru v daném čase je vždy přesně 1. Použitím filtru $f_a(i)$ při korelaci všech fotonových záznamů získáme autokorelační funkci pro dobu života A, stejně tak pro další doby života [31].

3.3.4 Dvouohnisková fluorescenční korelační spektroskopie

Samotná FCS metoda je ovlivněna řadou fotofyzikálních a optických faktorů, stejně tak jako hardwarovým nastavením přístroje. Mezi tyto faktory patří například index lomu (kompenzace různými typy objektivů založených na rozdílných imerzích), optická saturace (vliv intenzity excitačního paprsku na difúzní koeficient) nebo astigmatismu laserového paprsku. Kvůli těmto vlivům je třeba kalibrovat i několikrát během experimentu konfokální objem, což při měření určitých typů vzorků může být z časového hlediska náročné [32, 33].

Kvůli zmiňovaným problémům byla vyvinuta metoda dvouohniskové FCS (dual-focus FCS, 2f-FCS), která by se měla těmto omezení vyhýbat. Díky této metodě, která je nezávislá na výše uvedených faktorech, je možné získat absolutní hodnotu difúzního koeficientu s vysokou přesností, a to bez nutnosti kalibrace konfokálního objemu. Poprvé tuto metodu zmiňuje ve své práci Thomas Dertinger v roce 2007 (respektive skupina okolo profesora Jörga Enderleina, který je také autorem přepočítávacího algoritmu v softwaru MATLAB) [34]. Oproti klasické FCS se jedná o spolehlivější metodu, která má sice podobné přístrojové nastavení (obrázek 10), časově méně náročné a přesnější měření, ale komplikovanější analýzu.

Rozdíl oproti klasické FCS je v použití dvou střídavě pulzujících laserů o shodné vlnové délce, ale rozdílnou polarizací, které se synchronizují pomocí pulsně prokládané excitace (pulsed interleaved excitation, PIE). Tyto laserové paprsky jsou v dělicí kostce spojeny do jednoho sekvenčního paprsku, který je veden přes dichroické zrcadlo na Nomarskiho hranol (Nomarski prism). Pomocí něj je paprsek vychýlen podle polarizace do dvou různých směrů a směřován do objektivu, kde se generují dvě překrývající se excitační ohniska o daném vzájemném posunu. Emisní záření je snímáno stejně jako při měření pomocí klasické FCS. Při následné analýze je díky pikosekundovému rozlišení detektorů možné přiřadit jednotlivé fotony ke konkrétní polarizaci [35].



Obrázek 10: Přístrojové uspořádání 2f-FCS [35].

Pro správnou analýzu je potřeba znát vzdálenost mezi ohnisky a obecný tvar detekčních objemů. Ten je kvantitativně definován molekulovou detekční funkcí (molecule detection function, MDF). Vzdálenost mezi ohnisky je dána vlastnostmi Nomarskiho hranolu. Samotný výpočet a proložení korelačních křivek probíhá pomocí softwarového skriptu (např. v programu MATLAB), kdy lze výpočtem následně získat absolutní hodnotu difúzního koeficientu [33, 35].

Vzdálenost mezi ohnisky lze stanovit třemi různými způsoby. První metodou je provedení srovnávacího měření difúze fluorescenčních nanočástic a získaný difúzní koeficient porovnat s výsledky z dynamického rozptylu světla. Další způsob je z -sken, kdy se určí difúzní čas v detekovaném objemu podél osy z . Poslední možností je použít sondu se známým difúzním koeficientem jako při standardní kalibraci u jednoohniskové fluorescenční korelační spektroskopie [34].

3.4 Time-correlated single photon counting

Existují dva typy měření parametrů fluorescence. *Ustálenou fluorescenci* (steady-state fluorescence), která je měřena při kontinuálním excitačním záření, je možné měřit polarizaci nebo střední hodnotu intenzity fluorescence [8]. Jako zdroj záření se zde využívá lampa, nejčastěji xenonová, emitující konstantní množství fotonů za jednotku času. Ve výsledku pak zůstává koncentrace excitovaných molekul fluoroforu konstantní [36]. Druhým typem měření je *časově rozlišená fluorescence* (time-resolved fluorescence). Zde je výsledkem časová závislost měřených parametrů fluorescence. Časově rozlišená fluorescence se používá často pro získání informací o dynamice excitovaného stavu, což je důležitý parametr pro interpretaci fotobiologických i fotofyzikálních procesů [8]. Dále je možné získat intenzitní a anizotropní křivky [36].

Do časově rozlišené fluorescence patří i pulzní fluorimetrie, kdy po excitaci vzorku dojde v časovém měřítku k poklesu fluorescence. Tento pokles tvoří v ideálním případě, tedy v přítomnosti pouze jedné doby života excitovaného stavu, monoexponenciální křivku. V reálném vzorku je ovšem pokles většinou víceexponenciální [37]. Skutečná křivka je pak tvořena samotnými naměřenými daty ze všech přítomných dob života fluorescence a funkcí odezvy přístroje (instrument response function, IRF – viz kapitola 3.4.2)

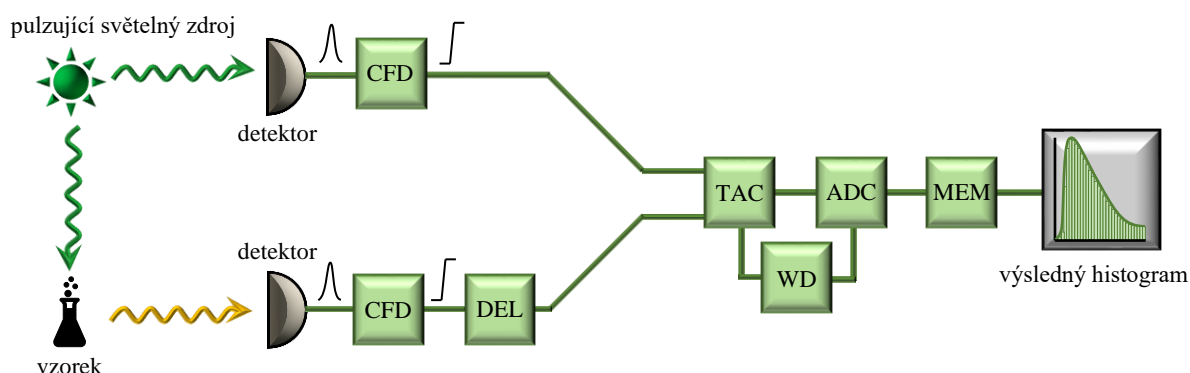
Metoda časově korelovaného sčítání jednotlivých fotonů (time-correlated single photon counting, TCSPC) patří do skupiny časově rozlišené fluorescence. Je založena na sčítání fotonů postupně dopadajících na detektor od začátku světelného impulzu. Principem metody je to, že pravděpodobnost detekce jediného fotonu v čase t po excitačním pulzu je úměrná intenzitě fluorescence v konkrétním čase [38]. TCSPC metoda má dobrý dynamický rozsah a linearitu, vysokou citlivost a definovanou statistiku (Poissonova distribuce), která umožňuje správnou matematickou operaci pro každý bod v analýze dat [6].

Aby bylo možné získat analyzovatelná data, je nutné mít v kanálu s nejvyšším počtem fotonů alespoň 10^4 fotonů. Toto číslo bylo stanoveno na základě experimentálních měření [39]. Z tohoto důvodu je potřeba měření několikrát opakovat, aby bylo tohoto čísla dosaženo, protože detekční rychlost bývá přibližně jeden foton na sto excitačních pulzů [6]. Výsledkem TCSPC analýzy je histogram, kde na ose x je časový interval mezi jednotlivými excitačními pulzy a na ose y se zobrazuje intenzita fluorescence (počet fotonů detekovaných s daným časovým rozdílem) [38]. Důležitým prvkem, který ovlivňuje přesnost této metody, je tzv. mrtvý čas, který má jak detektor, tak i příslušná elektronika. Po úspěšné detekci (detektor) nebo časování (elektronika) fotonu se musí detektor i elektronika obnovit a vrátit se do aktivního stavu, než bude možné zaznamenat další foton. Tyto obnovy trvají několik desítek nanosekund,

a proto je nelze zanedbat kvůli pikosekundové frekvenci laseru a nanosekundové době života fluorescence (ve vztahu k těmto veličinám se jedná o velmi dlouhou dobu). Pokud fotony dopadají příliš rychle za sebou, může dojít k procentuální ztrátě detekovatelných fotonů, a tím pádem i ke zkreslení konečné vyhasinací křivky [39].

3.4.1 Instrumentace pro TCSPC analýzu

Zdrojem budícího záření je záblesková lampička nebo laser, který excituje fluorofor ve vzorku a současně vyšle impulz do elektroniky. Ten je nasměrován do diskriminátoru (constant fraction discriminator, CFD), který upraví jeho intenzitu a zároveň zaznamená čas příchodu pulzu. V detekční jednotce se vygeneruje „START“ signál, čímž se spustí ukládání lineárního napětí na kondenzátor (time-to-amplitude convertor, TAC). Současně je vzorek v emisním kanálu excitován optickým pulzem, což následně emituje fotoluminiscenční záření [39].



Obrázek 11: Schematické znázornění instrumentace pro TCSPC analýzu [40].

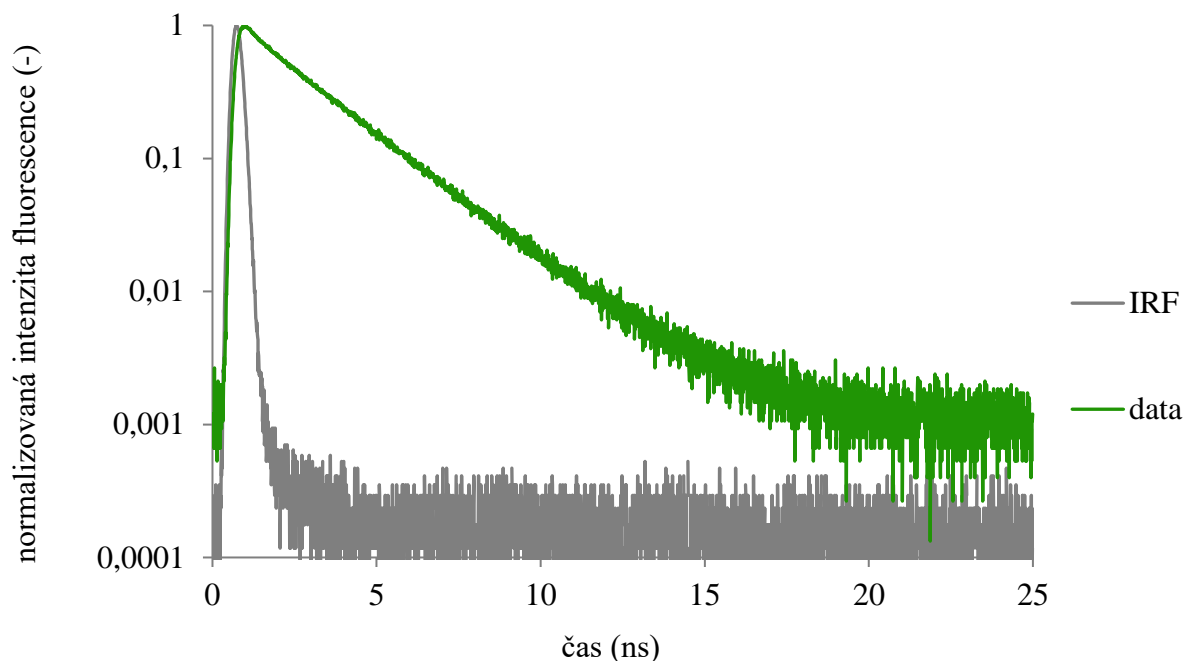
Přístroj musí být nastaven tak, aby na detektor (fotonásobič) nedopadlo více než jeden foton za jeden excitační pulz. Po dopadu fotonu na detektor se vyšle „STOP“ signál do detekční elektroniky (TAC), kde se mezitím generoval schodek napětí. To odpovídá napětí rostoucímu lineárně s časem. Po obdržení „STOP“ signálu se zastaví zvyšování napětí a převede se na elektrický pulz, který odpovídá rozdílu mezi „START“ a „STOP“ signálem. Pokud napětí není v předem daném rozsahu, je pro minimalizaci chyb naměřená událost potlačena v diskriminátoru (window discriminator, WD). Pro získání numerické hodnoty je výsledný signál veden do převodníku (analog to digital converter, ADC). Data pro jednotlivé fotony jsou průběžně ukládána do digitální paměti (MEM), ze kterých je získán výsledný histogram [40].

3.4.2 Funkce odezvy přístroje

Funkce odezvy přístroje (IRF) v časově rozlišených měřeních fluorescence se obvykle získává zaznamenáním časového profilu excitačního světla. Zpětný odraz nebo elastický rozptyl poskytuje silný a snadno získatelný signál, ale pozorovatelný pouze na vlnových délkách kratších než emise fluorescence.

Konvenční fotonásobiče (PMT) a lavinové fotodiody (APD) používané v časově rozlišené spektroskopii a mikroskopii trpí tzv. barevným efektem (colour effect) – jejich časová odpověď závisí na energii detekovaného fotonu. Tato odezva detektoru závislá na vlnové délce může vážně zkreslit výsledky časově rozlišených měření. Stává se to závažným problémem, pokud je doba fluorescence srovnatelná s dobou odezvy detektoru. Typickým příkladem analýzy dat v časové doméně je iterativní rekonvoluce. Zde se předpokládá, že časová odezva přístroje je stejná pro excitační impulzy a fluorescenční fotony, ale kvůli výše uvedenému barevnému efektu detektorů tento předpoklad neplatí. Rychlé mikrokanálové PMT jsou prakticky

bez barevných efektů, ale jejich pořizovací cena je vysoká a kvantový výtěžek nízký, proto se volí detektory typu APD s vyšším kvantovým výtěžkem [41].



Obrázek 12: Funkce odezvy detektoru (IRF, šedě) a vyhasínací křivka fluoroforu získaná z naměřených dat (zeleně) [16].

Samotná křivka je složena z profilu excitačního pulzu, odezvy elektroniky a optiky. V ideálním případě má křivka velmi úzký budící impuls. Pokud dojde v rámci nastavení přístroje k jakékoli odchylce, výsledný profil píku bude o poznání širší a jeho intenzita nebude ve většině případů tak vysoká [42].

3.5 Difúze

Při teplotách vyšších, než je absolutní nula, je možné díky srážkám molekul rozpouštědla s disperzními částicemi pozorovat tepelný pohyb. Tento pohyb je náhodný, probíhá v různých směrech s různou rychlostí. S rostoucí hmotností a poloměrem částice se zvyšuje pravděpodobnost kompenzace nárazů – z toho důvodu je u částic s efektivním poloměrem vyšším než 4 μm pozorovatelný pouze vibrační pohyb, nikoli tepelný [43]. V makroskopickém pohybu se tepelný pohyb projevuje jako difúze. K tomuto jevu dochází v soustavách, kde je přítomný koncentrační gradient [44].

3.5.1 Termodynamika

Maximální neobjemová práce je rovna $dw = d\mu$ a odpovídá přenosu jednoho molu látky z místa o chemickém potenciálu μ do místa s potenciálem $\mu + d\mu$. Pokud chemický potenciál závisí na poloze x , tak platí [44]:

$$dw = d\mu = \left(\frac{\partial\mu}{\partial x}\right)_{p,T} dx. \quad (17)$$

Práci lze obecně vyjádřit pomocí síly jako $dw = -Fdx$. Porovnáním těchto dvou rovnic dostaneme:

$$F_{\text{termodynamická}} = -\left(\frac{\partial\mu}{\partial x}\right)_{p,T}. \quad (18)$$

3.5.1.1 První Fickův zákon

V homogenním roztoku o aktivitě a je chemický potenciál vyjádřen jako

$$\mu = \mu^0 + RT \ln a. \quad (19)$$

V případě nehomogenního roztoku je aktivita závislá na poloze, a tak je síla rovna:

$$F = -RT \left(\frac{\partial \ln a}{\partial x} \right)_{p,T}. \quad (20)$$

Pro nízké koncentrace je možné jimi nahradit aktivitu, takže rovnice bude mít tvar $F = -RT \left(\frac{\partial \ln c}{\partial x} \right)_{p,T}$, a protože platí $\frac{dc}{dx} = -\frac{c}{\lambda}$, tak rovnice pro sílu bude mít tvar:

$$F = -\frac{RT}{\lambda}. \quad (21)$$

Podle prvního Fickova zákona je tok částic přímo úměrný koncentračnímu gradientu $J_m = -D \frac{dN}{dz}$ (pro plyny). Tento vztah lze odvodit i pro difúzi části v kondenzované fázi. Částice dosáhnou rovnovážné rychlosti v , pokud se termodynamická síla vyrovná třecí síle ($v \propto F_{term.}$). Tok částic J je úměrný rychlosti pohybu částic a termodynamická síla je úměrná koncentračnímu gradientu $\frac{dc}{dx}$. Porovnáním rovnic dostaneme vztah pro Fickův zákon [45]:

$$J \propto \frac{dc}{dx}. \quad (22)$$

3.5.1.2 Einsteinův vztah

Pokud rovnici $J_m = -D \frac{dN}{dz}$ vydělíme Avogradovou konstantou, čímž se převede počet molekul na látkové množství, tak se dostane Fickův zákon ve tvaru:

$$J = -D \frac{dc}{dx}. \quad (23)$$

Tok souvisí s rychlostí pohybu částic podle vztahu $J = sc$. Určíme počet částic, které jsou v objemu $s\Delta tA$, které mohou v daném čase projít plochou A . Počet částic se rovná $s\Delta tAc$. Porovnáním obou rovnic pro tok dostaneme $sc = -D \frac{dc}{dx}$. Vyjádřením termodynamické síly z prvního Fickova zákona ($F = -RT \left(\frac{\partial \ln c}{\partial x} \right)_{p,T}$) a dosazením dostaneme:

$$s = -\frac{D}{c} \frac{dc}{dx} = \frac{DF}{RT}. \quad (24)$$

Z toho vyplývá, že pokud známe efektivní sílu a difúzní koeficient, můžeme vypočítat rychlost částic, aniž by síla musela pocházet z elektrického pole. Iont, na který působí elektrické pole o intenzitě E , se pohybuje rychlostí $s = uE$ a působí na něj síla ezE ($F = N_A ezE = zFE$). Dosazením dostaneme rovnici:

$$uE = \frac{DzFE}{RT} \Rightarrow u = \frac{zFD}{RT}. \quad (25)$$

Vyjádřením difúzního koeficientu získáme Einsteinův vztah pro difúzní koeficient v závislosti na pohyblivosti iontu u [45]:

$$D = \frac{uRT}{zFD}. \quad (26)$$

Typická hodnota difúzního koeficientu pro iont ve vodě je řádově $10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ (pro pohyblivost daného iontu $u = 5 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2\text{s}^{-1}\text{V}^{-1}$) [46].

3.5.1.3 Stokes-Einsteinova rovnice

Kombinací vztahů $u = \frac{ze}{f}$ a $u = \frac{zFD}{RT}$ dostaneme rovnici:

$$D = \frac{zRT}{f} = \frac{k_B T}{f}. \quad (27)$$

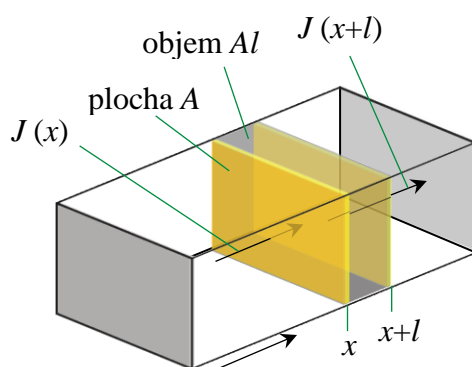
Dosažením frikční síly dostaneme Stokes-Einsteinovu rovnici, která definuje vztah mezi difúzním koeficientem a viskozitou prostředí:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}. \quad (28)$$

Díky tomu, že v rovnici nevystupuje náboj iontu, tak lze rovnici využít i pro hodnotu nulového náboje, tzn. lze určit D pomocí viskozity i pro neutrální částice. Toto vychází z předpokladu, že třecí síla je přímo úměrná rychlosti pohybu [47].

3.5.2 Difúzní rovnice a druhý Fickův zákon

Difúze je charakterizována změnou gradientu. Koncentrace difundované látky proto nezávisí jen na prostorové souřadnici (první Fickův zákon), ale i na čase. Z toho důvodu se k prvnímu Fickovu zákonu musí přidat druhý Fickův zákon (= difúzní rovnice). Ten charakterizuje změny koncentrace v čase.



Obrázek 13: Druhý Fickův zákon [31].

V bodě x je v čase t koncentrace c . Mezi body x a $x + l$ je vrstva Al , do které během malého časového intervalu dt v důsledku koncentračního gradientu vstoupí látkové množství $JAdt$. Rychlost nárůstu koncentrace v dané vrstvě je v důsledku toku částic zleva

$$\frac{\partial c^+}{\partial t} = \frac{JAdt}{Al dt} = \frac{J}{l}. \quad (29)$$

Z pravé strany vrstvy zase částice odchází do míst s ještě menší koncentrací, proto tok bude J' , ale rovnice bude stejná:

$$\frac{\partial c^-}{\partial t} = \frac{J'Adt}{Al dt} = \frac{J'}{l}. \quad (30)$$

Celková změna koncentrace částic ve vrstvě je $\frac{\partial c}{\partial t} = \frac{J-J'}{l}$. Použitím Fickova prvního zákona dostaneme:

$$J - J' = -D \frac{\partial c}{\partial x} + D \frac{\partial c'}{\partial x} = \dots = Dl \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}. \quad (31)$$

Druhý Fickův zákon má tedy tvar:

$$\frac{\partial c}{\partial x} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}. \quad (32)$$

Rychlost změny koncentrace je přímo úměrná druhé derivaci koncentrace podle prostorové souřadnice. Pokud je systém nehomogenní, jsou místa s různou koncentrací vyrovnávána [47].

3.6 Mikroreologie

3.6.1 Základní princip mikroreologie

Jako doplněk klasické reologie byla vyvinuta technika mikroreologie. Mezi největší výhody patří potřeba velmi malého množství vzorku, což je výhodné například u biologických materiálů, nebo při měření drahých nebo vzácných vzorků. Navíc klasická reologie neumožňuje lokální měření v nehomogenním prostředí [48]. Díky mikroreologii je možné velmi detailně charakterizovat vzorek s poměrně vysokým rozlišením. Viskoelastické vlastnosti mohou být zjištěny jak z chování disperzního prostředí, tak i z polymerní sítě (případně jiné dispergované látky) [49].

Obecně se v mikroreologii využívají mechanické sondy velmi malých rozměrů, které deformují okolní prostředí. Ideální sondou jsou kulovité inertní částice, které mají velikost odpovídající typu měření (nejčastěji desítky nanometrů až desítky mikrometrů). Díky sledování chování této částice je možné předpovídat vlastnosti systému v mikroskopickém měřítku. Mikroreologii lze rozdělit podle způsobu manipulace sledovanou sondou na aktivní (kapitola 3.6.2), kdy je částice aktivně ovlivňována a na pasivní (kapitola 3.6.3), kdy se částice pohybuje pouze díky tepelnému pohybu [50].

3.6.2 Aktivní mikroreologie

Díky aktivní mikroreologii lze měřit tvrdší vzorky, případně vzorky s nelineární reologickou odpovědí. Využívá se zde působení elektrického a magnetického pole, optické pinzety nebo mikroskopu atomárních sil [51].

Princip aktivní mikroreologie je srovnatelný s klasickou reologií, kdy se na vzorek působí vnější silou a měří se výsledná deformace. Rozdíl mezi těmito metodami je ve stupni deformace, kdy se u aktivní mikroreologie pomocí částic měří pouze lokální viskoelastická odezva [52].

3.6.3 Pasivní mikroreologie

Po měření měkkých materiálů je výhodnější zvolit pasivní mikroreologii, která není oproti aktivní mikroreologii tak přístrojově náročná, ale při měření je možné využít velké množství nástrojů. Pro samotné vyhodnocení je tato technika mnohem jednodušší, protože se zde nepočítá s vnější silou, ale pouze s tepelným pohybem definovaným jako $k_B T$. Z tohoto důvodu musí být vzorek velmi měkký, aby byl pohyb částic způsobený tepelným pohybem vůbec detekovatelný [51].

Nejčastější metodou je videomikroreologie, která mapuje trajektorii částice v čase. Do této kategorie lze ještě zařadit jednočásticovou [52] a dvoučásticovou mikroreologii [53]. Použitím technik jako například DLS nebo FCS je možné získat další informace o vlastnostech měřeného systému. Kvůli specifickým požadavkům na získané informace existuje řada mikroreologických metod, kdy každá z nich má své klady i zápory, proto je vhodná pro jiný typ měření.

3.6.3.1 MSD křivky

Brownův pohyb sondy v homogenním elastickém prostředí závisí na lokálním mikroprostředí. Porovnáním energie, která je potřebná k tepelnému pohybu sondy s energií potřebnou k deformaci materiálu je možné dostat rovnici

$$\frac{k_B T}{a^3} = \frac{G' L^2}{a^2}, \quad (33)$$

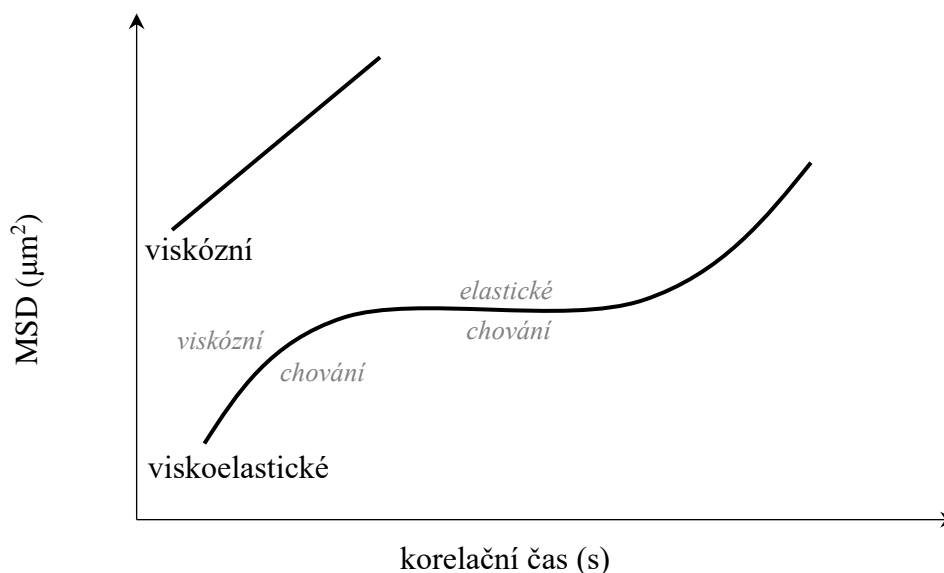
kde k_B je Boltzmannova konstanta, T je termodynamická teplota, a je poloměr sondy, G' je elastická složka modulu pružnosti a L je délka posunu [48]. Protože pro většinu vzorků není možné měnit v průběhu experimentu současně i teplotu, pak horní měřitelná hranice elastické složky G' závisí na průměru sledované sondy a rozlišení použité metody pro sledování délky posunu L .

Obecně se střední kvadratický posun (MSD, mean square displacement) používá jako měřítko odchylky polohy částice vzhledem k referenční poloze v průběhu času. Jedná se o nejčastěji využívanou metodu pro sledování náhodného pohybu sondy, která poměrně přesně dokáže lokálně analyzovat dané prostředí [54]. Tuto funkci lze zapsat rovnicí

$$MSD = \langle [\vec{x}(t + \tau) - \vec{x}(t)]^2 + [\vec{y}(t + \tau) - \vec{y}(t)]^2 + [\vec{z}(t + \tau) - \vec{z}(t)]^2 \rangle, \quad (34)$$

kde x , y a z značí polohu částice, τ je uplynulý čas a t je časový interval [55].

Výsledný tvar MSD křivky v závislosti na čase vypovídá o vlastnostech daného systému. Pokud se jedná o čistě elastický materiál, hodnota MSD se v čase nezvyšuje. Pro viskózní látky je typická lineární závislost, která má v grafickém znázornění sklon jedna. Viskoelastické materiály vykazují chování obou těchto látek, kdy se jejich sklon mění o nuly (elastické) po jedna (viskózní). Často dochází v průběhu experimentu ke změně sklonu křivky v závislosti na lokálních vlastnostech daného prostředí [55]. Tyto závislosti jsou zobrazeny na obrázku 14.



Obrázek 14: Tvar MSD křivky v závislosti na čase pro jednotlivé typy systémů [55].

Korelační funkce G fluorescenční sondy difundující skrz přesně definovaný objem je přímo spojená s MSD křivkou podle rovnice

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

kde člen $\langle \Delta r^2(t) \rangle$ reprezentuje právě střední hodnotu posunu. Pokud se celá rovnice položí rovna nule, vyjde výsledná kubická rovnice

$$\text{MSD} = \frac{8}{27w_{xy}^4 w_z^2} x^3 + \left(\frac{8}{9w_{xy}^2 w_z^2} + \frac{4}{9w_{xy}^4} \right) x^2 + \left(\frac{4}{3w_{xy}^2} + \frac{2}{3w_z^2} \right) x + 1 - \frac{1}{N^2 G(t)^2}. \quad (36)$$

Výsledkem této rovnice jsou vždy dva komplexně sdružené kořeny a jeden kladný reálný kořen. Postup získání rovnic (35) a (36) je uvedený v příloze 3.

3.7 Reologické moduly

Pro charakterizaci chování viskoelastických látek se v klasické (makro)reologii využívají oscilační testy. Zde se využívá teoretického modelu dvou desek, mezi které se umístí vzorek. Jeden ze senzorů osciluje se sinusoidní závislostí, a to buď s mírou deformace, nebo předem nastaveným napětím a na stacionární desce se sleduje odezva druhé proměnné. Z této časové odezvy (míra deformace, případně napětí) je pak možné určit viskoelastický charakter látky [56, 57].

Komplexní modul G^* je definován jako podíl působícího napětí a míry deformace. Skládá se ze dvou složek. První, reálná složka je paměťový modul G' , která charakterizuje elastické chování viskoelastické látky. Druhá složka je imaginární, označuje se jako ztrátový modul s a reprezentuje viskózní chování této látky.

Vzhledem k nutnému propojení mikrereologické části práce (MSD křivky) a reologických modulů, bylo třeba najít společnou proměnnou, přes kterou by bylo možné získané MSD křivky přepočítat. Touto proměnnou je poddajnost, což je v reologii poměr naměřené míry deformace a aplikovaného napětí. Přepočet poddajnosti na komplexní modul G^* popisuje rovnice (37).

$$J = \frac{\gamma}{\tau} = \frac{1}{G^*}, \quad (37)$$

kde γ popisuje míru deformace a τ tečné napětí. Z mikrereologického hlediska je možné získat z jejího vztahu k MSD následující rovnici [58]

$$J(t) = \frac{3\pi a}{DkT} \text{MSD}. \quad (38)$$

3.8 Hydrogely

Hydrogely jsou speciální skupinou lyogelů, kdy je disperzním prostředím voda. Řetězce jsou vzájemně propojené do trojrozměrné sítě, která vyplňuje celé disperzní prostředí. Výhodnou vlastností je, že se hydrogely ve vodě nerozpouští díky zesílení polymeru. Naopak při kontaktu s ní dokážou velké množství absorbovat, tím dojde ke zvětšení objemu = bobtnají. Tato schopnost je podmíněna strukturou polymerního řetězce, kdy funkční skupiny musí mít hydrofilní charakter [59].

V okolí hydrogelu se nachází *volná voda*, která se osmotickou silou dostane do polymerní sítě. Při absorpci vody dojde nejdříve k hydratování polárních částí řetězce, čímž vznikne *primárně vázaná voda*, která je ze systému jen těžko odstranitelná. Na základě toho dochází ke zvětšení objemu sítě a vystavení hydrofobních skupin. Ty také interagují s molekulami vody,

kdy vzniká *sekundárně vázaná voda*. Voda uvnitř hydrogelu pak umožňuje difúzi v ní rozpuštěných látek [60, 61].

Hydrogely se dělí do několika kategorií podle vlastností a typu přípravy. Prvním z rozdělení je na přírodní a syntetické. *Přírodní hydrogely* jsou tvořeny například kolagenem, kyselinou hyaluronovou nebo deriváty přírodních polymerů. Kvůli jejich přírodnímu původu ale může pokaždé jiné složení, které následně může ovlivňovat výslednou strukturu a vlastnosti hydrogelu. Z tohoto důvodu je těžké při stejné přípravě reprodukovat shodné finální vlastnosti a mikrostrukturu. *Syntetické hydrogely*, které obsahují například PVAI, jsou snáze reprodukovatelné, protože podmínky polymerizace jsou téměř shodné. Výhodou je, že tyto polymery mohou být přizpůsobené požadovaným vlastnostem pro danou aplikaci [62].

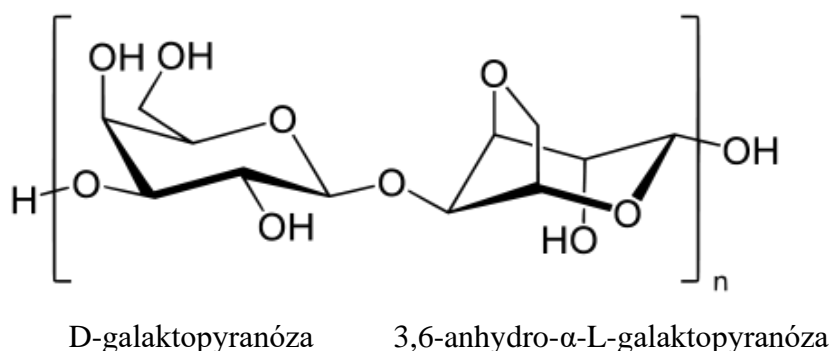
Podle typu síťování je možné hydrogely rozdělit na chemicky a fyzikálně síťované gely. Díky zesíťování mají hydrogely mechanické vlastnosti, které se podobají tuhým látkám. *Chemicky síťované hydrogely* obsahují kovalentní vazby, které vznikají v důsledku aktivace reakčních míst na polymerním řetězci. K tomuto jevu dochází díky působení síťovacího činidla, změnou teploty nebo pH. Takto připravené gely jsou také známé jako trvalé hydrogely, protože nejsou rozpustné v žádném typu rozpouštědla. Oproti tomu *fyzikálně síťované hydrogely* obsahují pouze slabé vazebné interakce. Z tohoto důvodu jsou gely slabší, ale patří mezi dočasné gely, tedy změnou podmínek je možné trojrozměrnou síť narušit [63, 64].

V osmdesátých letech minulého století byly vyvinuty tzv. inteligentní (smart) hydrogely, kdy se vycházelo z předpokladu (článek Dušek a Patterson [65]), že náhlou změnou vnějších podmínek je možné docílit změn v botnavosti gelu, polymerizaci materiálu, případně je možné uvolnit aktivní látku inkorporovanou do polymerní sítě [66].

3.8.1 Agarózový hydrogel

Jednou z forem agaru, který se izoluje z červených mořských řas, je agaróza. Dlouhou dobu byla považována za neutrální molekulu, ale její neutralita nebyla zatím žádnou analytickou metodou potvrzena. V současné době je agaróza brána jako směs agarových molekul s nejnižším možným obsahem náboje. Může ovšem obsahovat zbytky karboxylových, sulfátových nebo pyruvátových skupin. Konkrétní složení závisí na druhu použitých rhodophyt, období jejich sběru a podmínkách extrakce polymeru [67].

Tvoří ji lineární řetězec střídajících se podjednotek β -D-galaktopyranózy spojených $\alpha(1,3)$ -glykosidickou vazbou a zbytků 3,6-anhydro- α -L-galaktopyranózy vzájemně provázaných $\beta(1,4)$ -glykosidickou vazbou [68].



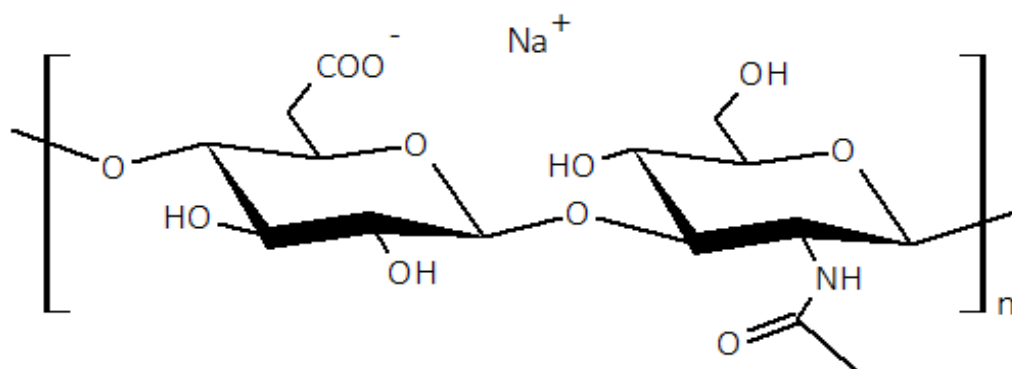
Obrázek 15: Struktura agarózy

3.8.2 Hyaluronát sodný

Hyaluronan (hyaluronát sodný, sodná sůl kyseliny hyaluronové) je přirozeně se vyskytující lineární polysacharid, patřící do třídy nesulfátovaných glykosaminoglykanů, s opakujícími se jednotkami sodné soli kyseliny D-glukuronové a *N*-acetyl-D-glukosaminu a střídajícími se β -(1 \rightarrow 3), β -(1 \rightarrow 4) glykosidickými vazbami. V tomto polysacharidu je rotace kolem glykosidických vazeb omezena, protože oba monosacharidy jsou v energeticky stabilní konfiguraci β , v níž jsou objemné funkční skupiny (karboxyl, acetamidová, hydroxylová a anomerní uhlík) ve stericky výhodné ekvatoriální poloze [69].

Počet opakujících se disacharidů v dokončené molekule HA může dosáhnout 10000 nebo více s molekulovou hmotností okolo $4 \cdot 10^6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Při pH 7 jsou karboxylové skupiny převážně ionizované. Ve fyziologickém roztoku je kostra molekuly HA vyztužena kombinací chemické struktury disacharidu, vnitřních vodíkových vazeb a interakcí s rozpouštědlem. Kromě toho se preferovaný tvar ve vodě vyznačuje hydrofobními oblastmi (axiální vodíkové atomy) na střídajících se stranách ploché, páskové sekundární struktury. Obě strany jsou identické, takže molekuly HA jsou ambidextrózní, což jim umožňuje agregovat prostřednictvím specifických interakcí ve vodě a vytvářet sítě, a to i při nízkých koncentracích. V důsledku toho zaujímá molekula HA ve fyziologických roztocích strukturu rozšířeného náhodného klubka s hmotnostní koncentrací polysacharidu okolo 0,1 % nebo méně, pokud je makromolekula přítomna ve velmi zředěné koncentraci ve fyziologickém roztoku. To znamená, že domény jednotlivých molekul by se měly vzájemně překrývat při koncentracích $1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ a více. Doménová struktura HA má zajímavé a důležité důsledky. Malé molekuly, jako je voda, elektrolyty a živiny, mohou volně difundovat rozpouštědlem uvnitř domény. Velké molekuly, jako jsou proteiny, však budou z domény částečně vyloučeny kvůli svým hydrodynamickým rozměrům v roztoku [70].

Vysokomolekulární HA a fragmenty různých velikostí mohou ovlivňovat řadu biologických procesů prostřednictvím interakcí s receptory, jako je například CD44, receptor pro hyaluronanem zprostředkovanou pohyblivost (RHAMM, HMMR) a receptor pro hyaluronan endotelu lymfatických cév 1 (LYVE1) [71].

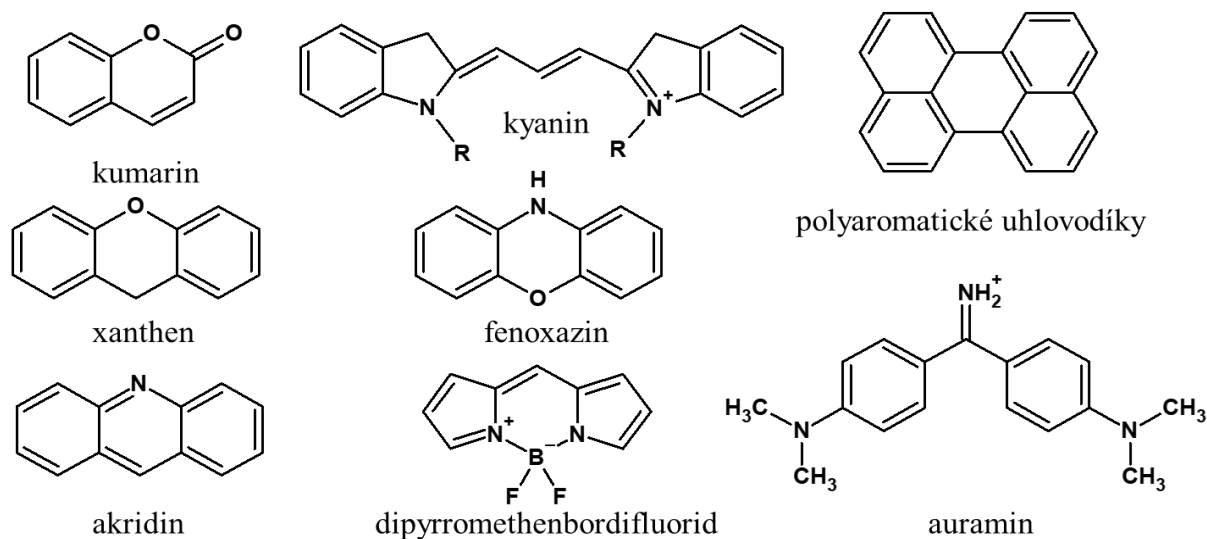


Obrázek 16: Struktura hyaluronanu sodného

3.9 Fluorescenční sondy využívané pro FCS

Fluorescenční sondy využívané v metodě FCS lze podle jejich velikosti rozdělit na molekulární a makromolekulární. Mezi molekulární sondy patří především kumaríny, kyaniny, rhodamin

a jeho deriváty, fluorescein a jeho deriváty, polyaromatické uhlovodíky nebo dipyrromethenbordifluoridy (BODIPY) [72].



Obrázek 17: Struktura základních molekulárních sond.

Mezi nejčastěji využívané makromolekulární sondy můžeme zařadit různé druhy fluorescenčních nebo fluorescenčně značených polysacharidů, protilátek, proteinů, případně olichosacharidy. V současné době se začaly využívat i sférické nanočástice, které jsou pro měření ideální díky svým neprůtočným vlastnostem, často jsou vysoce stabilní a monodisperzní [73].

3.9.1 Sférické nanočástice

Pro tuto práci jsou stěžejní právě fluorescenčně značené nanočástice s pevným základem (křemíkové, polystyrenové, latexové...) a fluorescenční značkou navázanou na povrchu. Pro možnost variability měření je vhodné, aby částice měly stejný základ, ale lišily se funkční skupinou – NH_2 , COOH , neutrální, případně dalšími vlastnostmi, jako je například afinita k různým typům molekul, hydrofobicita a hydrofilita.

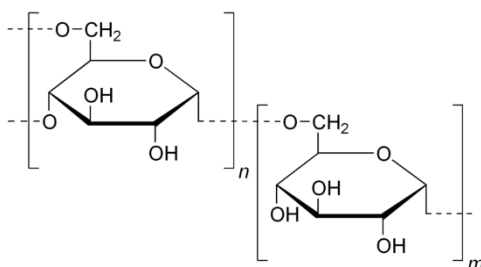
V příloze 1 jsou uvedeny některé společnosti, které distribuují nanočástice o daných vlastnostech. Kromě těchto nanočástic se využívají i například kvantové tečky nebo stříbrné a zlaté nanočástice [74, 75]. Fluorescenčně značené částice se využívají především pro studium vlastností daného prostředí.

3.9.2 Fluorescenčně značené biopolymery

Mezi nejčastěji fluorescenčně značené biopolymery patří poly- nebo oligosacharidy [76], proteiny [77] a protilátky [78]. Na rozdíl od sférických částic, biopolymery se využívají především pro studium různých biologických reakcí a procesů, často týkajících se jich samých.

Nejznámějším biopolymerem je zelený fluorescenční protein (GFP), který se používá často i jako fluorescenční značka. Pomocí FCS byly například testovány jeho vlastnosti po změně pH [79] nebo závislost dynamiky konformačních fluktuací jeho mutantní verze [80].

Dalším využívaným biopolymerem jsou fluorescenčně značené dextransy. Patří mezi nejvyužívanější polymery vůbec, a to od testování samotné FCS přes studium koloidních prostředí až po živé systémy [76, 81, 82]. Značené dextransy jsou, podobně jako nanočástice, velmi prodávaným artiklem. V různých velikostech (MW tisíce až miliony daltonů) s různými fluorescenčními značkami (modrá až červená) a s povrchovou úpravou (náboj, fixovatelnost) je má v nabídce například společnost Thermo Fisher Scientific v cenové kategorii do 3000 Kč za 1 mg [83].



Obrázek 18: Struktura dextranu

Nevýhodou biopolymerů jako fluorescenčně značených sond ohebnost jejich řetězce, tedy pro některá měření, jako například zjišťování velikosti pórů hydrogelů, jsou méně vhodné než tuhé sférické nanočástice.

4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

4.1 Použití FCS a jejích modifikací ke studiu daného systému

Jak už bylo řečeno v úvodu, samotná metoda FCS i mikrореologie jsou poměrně známé metody, ovšem spojení není příliš časté. Jedním z důvodů může být finanční náročnost FCS techniky a složité následné analýzy.

Jednou z nejvýznamnějších prací, která se zabývá spojením FCS s mikrореologií je publikace výzkumné skupiny pod vedením **S. Rathgeber** [84]. Jejich experimenty se týkaly měření vodných roztoků vysokomolekulárního PEG, kdy porovnávali výsledky získané z DLS s výsledky z FCS mikrореologie a videomikrореologie. Mikrореologická měření byla také srovnána s klasickou reologií, kdy byl použit rotační reometr. Bylo zjištěno, že kombinace metody FCS s mikrореologií je stejně přesná jako standardní laserové metody i DLS. Navíc oproti ostatním mikrореologickým metodám má FCS mnohem větší frekvenční rozsah. Další výhodou je použití fluorescenčních částic, kdy se snímá pouze fluktuace intenzity oproti například DLS, kdy je přesnost měření závislá i na kvalitě vzorku kvůli rozptylu světla. V této práci je popsán kromě měření a vyhodnocení dat i převod na MSD křivky a jejich interpretaci.

Další publikací, která stojí za zmínku, je článek z roku 2016 od **J. Hansinga**, který se zabývá matematickými simulacemi různých typů prostředí i použitých částic a jejich srovnáním s experimentálními daty [85]. Jako modelové prostředí byl použit dextran v nabitě i neutrální formě a fluorescenční sondy od molekulární velikosti (negativně nabitá Alexa488®) po částice ve stovkách nanometrů. Byly vyvinuty matematické modely například pro vliv elektrostatických interakcí na difúzi částic. Přitažlivé elektrostatické interakce výrazně snižovaly mobilitu nabitých fluorescenčních sond, zatímco odpuzivé interakce měly mnohem slabší účinek. Dále model vykazoval lineární závislost difúzivity na koncentraci polymeru pro čistě sterické interakce. To je v kontrastu s experimentálními zjištěními, která obvykle vykazují určitou exponenciální závislost. Ta může nastat v případě, pokud jsou do modelu zahrnuty i hydrodynamické interakce.

Několik vědeckých skupin zkoumalo vliv velikosti částic na rychlost difúze. Například skupina okolo **Q. Xu** se zabývala difúzí fluorescenčně značených povrchově modifikovaných polystyrenových nanočástic do hovězího sklivce [86]. Sklovitý gel je složen z více než 98 % vody, přičemž kolagen a hyaluronan představují dvě hlavní pevné složky. Kolagenové fibrily se prolínají s hyaluronanovými molekulami, které dohromady vytvářejí rozsáhlou a jemnou polymerní síť. Částice byly potaženy vrstvou PEG nebo modifikovány funkční skupinou COOH nebo NH₂ a jejich velikosti se pohybovala v rozmezí 100–1000 nm. Byly pozorovány rozdíly v difúzi molekul stejných velikostí, ale různé povrchové úpravy. PS-COOH částice se pohybovaly mnohem pomaleji než stejně velké částice PS-PEG. Navíc rozdíl rychlosti difúze ve vodě a gelu se od sebe také mnohonásobně lišil. Bylo také potvrzeno, že menší částice difundují rychleji než částice s větším poloměrem. Opačný výsledek ale získal **S. Lai**, který měřil rychlost difúze PS částic potažených PEG o velikosti 100–500 nm v cervikálním hlenu [87]. Experimentálně prokázali, že relativní rychlost difúze 500nm částic byla vyšší než u 100 a 200nm.

Dalším, kdo se zabýval vlivem velikosti částic na difúzní procesy, byl v roce 2004 **N. Fatin-Rouge** [88]. Testovali vlastnosti agaróзовého gelu pomocí částic v rozmezí 1–140 nm. V této práci je velmi dobře popsána příprava jak samotného hydrogelu, tak i fluorescenčních částic. Jako fluorescenční barvivo byly použity především různé varianty rhodaminu. Na rozdíl od ostatních prací se zde nepočítá s klasickým difúzním koeficientem,

ale s tzv. redukováným, který je poměrem difúzního koeficientu látky A v gelu a ve vodě. Jeho hodnota je menší nebo rovna jedné a je snižována stericnými, chemickými a elektrickými interakcemi s polymerními řetězci. U agarózových gelů bylo pozorováno, že zatímco korelační délka pórů polymeru, je do značné míry nezávislá na iontové síle, tak ale částečně závisí na rychlosti ochlazování během procesu gelace. Distribuce velikosti pórů se řídí Weibullovou distribuční funkcí druhého řádu, která závisí pouze na průměrném poloměru pórů. Použité částice byly rozděleny do dvou skupin – ty, které nereagovaly vůbec nebo málo s polymerním řetězcem (organická barviva, latexové částice, proteiny) a ty, které vykazovaly hydrofilní charakter a afinitu k agarózové síti (SiO_2 , COOH , NH_2 ...). Experimenty byly mimo jiné vyhodnocovány i podle parametru α , kdy pro volnou difúzi v roztoku je její hodnota rovna jedné. Bylo zjištěno, že v reálných heterogenních porézních médiích dochází k anomální difúzi částic kvůli specifické struktuře gelu. Dále bylo zjištěno, že největší hydrodynamický poloměr zachycených částic, které vykazovali lokální pohyb, byl cca 70 nm pro 1,5% agarózový gel.

Iontová síla může a nemusí mít vliv na difúzi částic v závislosti na typu gelu. Bylo prokázáno, že na agarózové gely nemá iontová síla vliv [89]. Oproti tomu velký vliv má na difúzi v alginátovém hydrogelu. Této tématice se věnuje **M. Golmohamadi** [90]. Bylo zjištěno, že difúzní toky jsou způsobeny hlavně zvýšenými koncentracemi kationtů spojenými s významným negativním nábojem na alginátovém gelu (což vede ke zvýšenému koncentračnímu gradientu). Ovšem měření difúze je záležitost pouze tepelného pohybu, proto výsledky velmi silně záleží na fyzikálně-chemické struktuře gelu. Ukázalo se, že difúzní koeficienty se lišily až o 30 %, ale tato variabilita byla způsobena spíše změnami v gelové struktuře (botnání, komprese) než účinkem náboje. Největší vliv na gelovou strukturu, a tím i na difúzi, měly Ca^{2+} ionty, zatímco použití H^+ a Na^+ ionty vedly pouze k relativně malým účinkům na difúzi. Další experiment prokázal, že rostoucí záporný náboj sondy vede k významnému, ale menšímu (přibližně 10%) snížení difúzního koeficientu.

Protože jsou hydrogely využívány v medicínských aplikacích, často se využívá modelových prostředí. **N. Reitan** používala jako modelový systém pro extracelulární matrix 5% želatinový gel a multicelulární sferoidy [91]. Ve své práci srovnává metodu jednofotonové FCS s metodou dvoufotonové FRAP. Jejich výsledky jsou srovnatelné, ale FCS odhaluje anomální nebo vícesložkovou difúzi v gelu a sféroidech, které nejsou rozlišitelné pomocí FRAP, ačkoli jsou měřeny na stejném mikroskopu. Tato studie ukazuje, že jednofotonovou FCS lze použít ke studiu extracelulárního transportu makromolekul v modelovém vzorku a že FCS poskytuje více informací o difúzních vlastnostech ve srovnání s FRAP. Jako fluorescenčně značené sondy zde byly použity dextransy (155 kDa a 2 MDa) a IgG (150kDa).

Velkou kapitolou jsou tzv. „stimuli-responsive“ hydrogely, tedy hydrogely reagující na vnější podněty od pH, přes teplotu až po magnetické pole. V současné době se zvyšují možnosti jejich využití v medicíně, až už se jedná o různé biosenzory, cílenou distribuci léčiv nebo umělou rekonstrukci svalů [92]. Kvůli poptávce na tyto typy hydrogelů rostou i nároky na vlastnosti matric. **A. Vagias** je jedním z lidí zabývajících se tímto typem hydrogelů. V jednom z publikovaných článků testoval difúzi různě nabitých fluorescenčních sond [93]. Jako fluorescenční sondy zde byly vybrány neutrální Alexa 647, slabě interagující negativně nabitá sonda Alexa 488 a silně interagující pozitivně nabitý Rhodamin 6G. Na rozdíl od Alexa 647 se mobilita dvou interagujících sond odchylovala od klasické Fickovy difúze kvůli interakci sonda–polymer. Přestože dynamika sondy a botnání hydrogelu jsou vzájemně závislé vlastnosti, jejich vztah je velmi komplikovaný a neumožňuje předpovědět dynamiku sondy na základě strukturální informace polymeru.

V dalším publikovaném článku **A. Vagias** používal jako fluorescenční sondu značený protein IgG [94]. Byl zjišťován vliv proteinových interakcí s polymerní sítí, řízené ionizace proteinu pomocí pH a hydrofobní interakce na difúzi IgG. Kombinovaná analýza profilů intenzity fluorescence a dynamiky monitorované FCS umožňuje kvantifikovat termodynamicky řízené dělení IgG a zpomalení jeho difúze. Bylo zjištěno, že zpomalení difúze je univerzální funkcí objemové frakce polymeru, která je vzhledem ke změnám teploty nebo pH poměrně robustní.

Hydrogely mohou sloužit i jako testovací náhrada za biologický materiál. **U. Pramanik** použila ve své práci blokový kopolymer poloxamer (F127) jako simulaci komplexního prostředí uvnitř buňky [95]. V tomto prostředí zjišťovala vlastnosti IDP (Intrinsically Disordered Protein) beta-kaseinu značeného fluorescenčním barvivem Alexa488. Ačkoli tento článek popisuje dva konformační stavy zmíněného polymeru, způsob měření je velmi užitečný pro naše účely díky použití stejného vybavení, jaké máme k dispozici. Mimo jiné zde byla sledována rotační dynamika pomocí fluorescenční anisotropie a translační dynamika pomocí fluorescenční korelační spektroskopie. Porovnával se zde difúzní koeficient získaný v hydrogelu a ve fosfátovém pufru. Na základě tohoto byla určována lokální translační a rotační viskozita v F127-hydrogelu.

4.2 Studium hydrogelů pomocí fluorescenční mikroskopie

Porézní materiály, jako je například buněčný cytosol, hydrogely a blokové kopolymery, mají v nanoměřítku takové rysy, které ovlivňují vlastnosti v makroměřítku. Charakterizace struktury nanopórů je v současné době obtížná kvůli zobrazování, přípravě vzorků a různým matematickým operacím.

Skupina okolo **L. Kisley** [96] studovala vlastnosti různých porézních materiálů, především na agarózových hydrogelech a vodných lyotropních gelů na bázi tekutých krystalů, pomocí tzv. fcsSOFI (fluorescence correlation spectroscopy super-resolution optical fluctuation imaging). Bylo zjištěno, že strukturální a difúzní vlastnosti lze přesně získat při rozlišení s omezenou difrakcí. Difúzní koeficienty byly přesně získány kombinací metody fcsSOFI s difrakčně omezeným fluorescenčním zobrazováním (diffraction-limited fluorescence imaging) a sledováním jednotlivých částic (single-particle tracking). Ve svých experimentech používali COOH modifikované polystyrenové nanočástice o velikosti 100 nm s Ex/Em 540/560 nm a agarózový gel o koncentracích 1 a 2 hm. %. Bylo předpokládáno, že aniontová COOH skupina bude mít minimální interakci se záporně nabitou agarózou. Pro zobrazování byl použit wide-field TIRF mikroskop s olejovou imerzí.

Dalším typem měření je kombinace FCS s konfokální mikroskopií, kterým se zabýval **F. Ingremeau** se svým týmem v experimentu týkajícím se souvislosti difúze a objemové frakce gelu [97]. Ve své práci dokázali, že doba difúze souvisí s mechanickým stavem gelu, tedy s botnáním nebo kompresí. V experimentu sledovali pomocí FCS fluorescenční nanočástice, které difundovaly skrz strukturu polyakrylamidového gelu. Tyto výsledky byly kombinovány s konfokální mikroskopií, kdy byl proveden optický řez v ose z . Série obrázků z konfokálního mikroskopu byla prováděna vždy na povrchu sklíčka ($z = 0 \mu\text{m}$), uprostřed a téměř na povrchu vzorku. Experimentálně bylo dokázáno, že difúze malých fluorescenčních sond v mechanicky stlačovaných PAA gelech závisí na objemové frakci gelu. Práce také ukazuje, že přímé optické odečítání založené na měření difúze pomáhá při odhadu absolutní hodnoty tlaku v systému bez potřeby jakékoli analýzy obrazu nebo rekonstrukce.

Pouze optické metody bez kombinace s FCS pro charakterizaci hydrogelů využila skupina okolo **G. Tummaly**, kdy zkoumali PVAI hydrogely využívané pro výrobu kontaktních

čoček [98]. Pro charakterizaci struktury byly použity techniky optické mikroskopie, fluorescenční mikroskopie a mikroskopie atomových sil (AFM). Dále byla provedena měření rozptylu světla ve viditelném spektrálním rozsahu pomocí senzoru BTDF (bidirectional transmittance distribution function) pro kvantifikaci rozptýleného světla.

Kromě fluorescenční konfokální mikroskopie existuje ještě širokopásmová (widefield) fluorescenční mikroskopie. Ta se na rozdíl od konfokální nezaměřuje pouze na jednu rovinu, tedy výsledný obraz není tak ostrý, zato ale lze získat více fotonů nesoucích požadovaná data. Tuto metodu používali ve své práci **M. N. Egorikhina** a kolektiv, kdy ji využívali v preklinických studiích různých biologických materiálů [99]. Právě díky fluorescenční mikroskopii byli schopni studovat interakce buněk s materiály bez dalšího zpracování nebo poškození vzorků. Jako studovaný scaffold zde byly využity dva typy kyseliny polymléčné, derivát dimethyl akrylátu a dalších biokompatibilních látek (kolagen, hydroxyapatit a další). Pomocí této metody bylo možné zobrazit jak povrch, tak i vnitřní strukturu vybraného scaffoldu, ovšem až po osazení buňkami a jejich nárůstu.

Živé buňky použila k charakterizaci hydrogelového systému skupina okolo **J. Vandaeleho** [100]. Ti dávali do souvislosti vnitřní strukturu hydrogelu a rychlost proliferace HeLa buněk zapouzdřených v daném hydrogelu. Jako modelový systém zde zkoumali novou třídu hydrogelu připravenou z polyisokyanidů. Pro přesnější charakterizaci gelu provedli i reologická měření. Na rozdíl od jiných měření byl v tomto případě fluorescenčně označený už samotný polymer, a to samovolným navázáním derivátu rhodaminu s kovalentně navázaných DBCO linkerem na řetězec. Pro vizualizaci byly použity dva různé softwary, pro analýzu polymerní sítě byl využitý program MATLAB (součástí článku jsou i odkazy přímo na stažení skriptu pro tyto analýzy). Dále se v článku zabývají možnostmi zobrazení struktury gelu ve 3D společně s postupem, jak na to. Diskutují se zde vlivy na výslednou strukturu hydrogelu, jako je koncentrace polymeru a délka polymeru.

Koen J. A. Martens a spol. se zabývali studiem struktury κ -karagenanového hydrogelu a chováním částic uvnitř něj [101]. Hlavní zobrazovací metodou byla sptFM (single particle tracking fluorescence microscopy), kdy se sledovaly injektované 28nm fluorescenční částice. Difúze sond dokázala poměrně přesně určit průměr karagenanového vlákna. V oblasti hustšího zesílení byl difúzní koeficient samozřejmě nižší, navíc bylo také možné zjistit průměr těchto oblastí. Bylo zjištěno, že i po úplném zgelovatění κ -karagenanu dochází uvnitř hydrogelu k reorganizaci vláken. Porovnáním získaných dat s daty naměřenými jinými (invazivními) technikami dospěli k závěru, že se jedná o velmi přesnou metodu, která má výhodu rychlého a přesného změření vzorku bez nutnosti fyzického zásahu. Tím pádem je možné tuto metodu využít pro medicínské účely, například pro posouzení difúzního chování rozpuštěných látek v komplexním hydrogelovém systému.

Dalším zobrazováním struktury hydrogelu se zabýval **L. Jiang** spolu s S. Granickem [102]. V jejich studii bylo hlavním tématem sledování posunu fluorescenčních sond – nanočástic. Díky Brownovu pohybu dokázali určit tvar a rozmístění pórů a přibližně definovat heterogenitu systému. Jako fluorescenční sondy byly použity latexové nanočástice, které byly pro zminimalizování adsorpce potaženy albuminem. Částice byly zamíchány přímo do horkého gely a celý vzorek se nechal ztuhnout. Následně se testovaly i různé vlastnosti hydrogelu, především reakce na vnější podněty. Jedním z nich byl vliv teploty na velikost pórů, kdy bylo zjištěno, že při laboratorní teplotě vytváří gely převážně síť s přibližně stejně velkými póry, při zahřívání se distribuce pórů mění ve prospěch větších. Při ochlazení gelu k výrazné změně distribuce pórů nedocházelo. Dále byly gely podstoupeny mechanickému namáhání, kdy bylo

zjištěno, že nejdříve zanikají větší póry. V článku je také stručně vysvětleno, jak z MSD křivek, respektive trajektorie nanočástic, lze získat informaci o velikosti pórů.

Hydrogely jsou pro své vlastnosti velmi často využívány v medicíně. Mezi klíčové informace popisující konkrétní hydrogel patří rychlost a způsob degradace. Tuto vlastnost zkoumali **M. Zhang** a spol., kteří sledovali zbytkovou morfologii a stupeň degradace v reálném čase [103]. Jako fluorescenční sonda byl využit tetrafenylethen vázaného na povrch mezoporézních dopaminových nanočástic. Tyto částice pak byly injektovány do hydrogelů síťovaným působením UV záření. Díky použití kvantitativního stanovení fluorescence a fotoakustického zobrazování bylo možné zjišťovat samotnou degradaci hydrogelu v reálném čase a neinvazivním způsobem.

Pojem „nanoskopické pravítko“ ve spojení s fluorescencí a mikroskopií jedné molekuly použil ve své práci **J. Seelig** [104]. Používali zlaté nanočástice s navázaným fluorescenčním barvivem typu Alexa dohromady spojených prostřednictvím DNA různých délek. Naměřená doba života fluorescence byla brána jako funkce délky řetězce pro částice 5–40 nm. Doba života fluorescence a kvantová účinnost jsou ale ovlivňovány plasmonovým spektrem zlatých nanočástic, proto je nutné před měřením provést optimalizaci a kalibraci systému. Z jejich naměřených dat je patrné, že rozsah používané metody je vyšší, pokud se emisní vlnová délka kryje s plasmonovou rezonancí. Nejsilnějším rysem jejich měření bylo zhašení celkového signálu fluorescence, které bylo funkcí délky řetězce. Také zmiňují, že jedna z dalších možností měření větších vzdáleností, je metoda FRET.

4.3 Experimenty zahrnující měření MSD křivek

Mikroreologie umožňuje získat určitou odezvu viskoelastických kapalin a gelů z pohybu částic do ní ponořených. Tento přístup demonstroval ve své práci **L. G. Rizzi**, který popisoval chemicky zesíťovaný polyakrylamid prostřednictvím jeho přechodu sol–gel [105]. Prostřednictvím non-Markov-Langevinovy rovnice získal obecný výraz pro MSD křivku a časově závislý difúzní koeficient, díky kterým dokázal odhadnout komplexní smykový modul a komplexní viskozitu materiálu. Mimo to popisoval gely i pomocí koeficientů n a α , které souvisí s dynamikou a strukturou gelu. S tím souvisí i pozorování, co se děje s koeficientem α v průběhu gelace.

Karagenan patří mezi často využívané hydrogely díky své biokompabilitě a vcelku jednoduché přípravě. Dalším, kdo se zabýval experimenty související s jeho strukturou, byl **L. Geonzon** [106]. Chování hydrogelu bylo pozorováno jak dynamickou reologií, tak mikroreologií, tedy sledováním fluorescenčních částic a analyzováním MSD křivek. Mikroreologií bylo určováno viskoelastické chování v průběhu tuhnutí gelu. Dalším testovaným vzorkem byl jeden den skladovaný hydrogel. Zkoumaný hydrogel obsahoval dva typy karagenanu – kappa a lambda. V závislosti na jejich poměru se při stejných podmínkách poměrně výrazně měnily vlastnosti směsi, a to jak v průběhu chladnutí, tak i po jednom dni. Díky tomuto poměru také vznikla kontinuální a nekontinuální fáze, kdy kontinuální fázi tvořil koncentrovanější karagenan. Při středních směšovacích poměrech mohlo docházet k fázové inverzi, kdy oba karagenany mohly tvořit dvojistou souvislou strukturu.

Kromě uměle vyrobených hydrogelů simulujících biologický materiál se často využívá mukus, především lidský. Díky znalostem o reologických vlastnostech by bylo možné efektivněji léčit například dysfonii. Přímo laryngeální mukus z oblasti hlasivek odebírali pro charakterizaci jeho vlastností vědci pod vedením **G. Peterse** [107]. Část vzorků byla testována oscilační smykovou reologií, druhá část byla sledována pomocí PTM (particle

tracking microscopy). Z reologického měření byl získáván absolutní G' a G'' , z mikreologického pak MSD a MSAD křivky. Jako fluorescenční sondy byly použity FluoSpheres se záporným povrchovým nábojem s navázaným oranžovým fluoroforem o průměru 1 μm . Aby nedocházelo k adhezi nanočástic na povrch vzorku, byly částice potaženy polyetylglykolem. V závislosti na hydrataci vzorku se poměrně značně měnilo i viskoelastické chování biologického materiálu od viskoelastické kapaliny po pevnou látku připomínající tuhý gel.

Pomocí metody MSD je možné nejen charakterizovat hydrogely a jim podobné vzorky, ale také samotné nanočástice. Tomuto tématu se věnuje článek **B. Ilhan**, která měřila translační a rotační difúzi nově vzniklých agregátů sférických nanočástic ve 3D prostoru [108]. Samotné měření translační dynamiky není nijakou novinkou, ani použití fluorescenční anisotropie pro studium rotace částic. V jejich práci je uveden vcelku nový přístup k měření rotační a translační dynamiky zároveň pomocí fluorescenční anisotropie. Jako zkoumané částice byly použity speciálně syntetizované sférické částice typu „malina“, tedy jedna kladně nabitá částice s nasorbovanými záporně nabitými nanočásticemi s vrstvou oxidu křemičitého. Povrch částice byl charakterizován mikroskopem atomárních sil. Translační pohyb byl sledován pomocí konfokální mikroskopie. Pokud se na povrch zkoumané částice naváže i fluorescenční sonda, pak je možné definovat umístění částice a její natočení.

4.4 Současný stav řešené problematiky na Fakultě chemické VUT v Brně

Poprvé se spojení mikreologie a fluorescenční korelační spektroskopie objevilo v roce 2015 v bakalářské práci **P. Kábrtové** [109]. Porovnávala tři pasivní mikreologické metody – videomikreologii, DLS a FCS mikreologii. Metody byly testovány na různých koncentrovaných roztocích glycerolu, hyaluronanu a srovnávány s deionizovanou vodou. Jako mikreologické sondy byly použity fluorescenčně značené a neznačené latexové a polystyrenové nanočástice. Bylo zjištěno, že díky FCS mikreologii lze získat přesnější výsledky než ze zbylých dvou mikreologických metod. Pro tuto metodu byla také odvozena rovnice pro výpočet MSD křivek, která byla následně ověřena analýzou newtonovských kapalin.

Výše zmíněná práce se svým tématem prolíná s dizertační prací **Z. Hnyluchové**, která se zaměřuje studium pasivních mikreologických technik [110]. Hlavní výhodou, která byla zjištěna u FCS mikreologie oproti ostatním metodám byla možnost dlouhého časového intervalu pro sledování nanočástic. Získaná data byla převedena na MSD křivku. Ta byla porovnáвана s modelem získaným z deionizované vody. V závislosti na koncentraci hydrogelu se odchyloval tvar křivky od tohoto modelu a zvyšoval se podíl elastické složky. Křivka získaná z metody DLS kopírovala tvar křivky z FCS mikreologie. Součástí práce je také skript v programu MATLAB pro určení viskozity vzorku z malého objemu.

P. Kábrtová navázala na svoji bakalářskou práci a na dizertační práci Z. Hnyluchové v roce 2017, kdy používala pro mikreologickou charakterizaci hyaluronový hydrogel s příměsí CTAB [111]. Jako fluorescenční sondu použila opět latexové a polystyrenové nanočástice, kdy součástí práce bylo zpřesnění použitelnosti částic různé velikosti pro daná měření. Také se věnovala některým faktorům, které by mohly ovlivnit výslednou MSD křivku. Experimentálně bylo zjištěno, že index lomu nemá na MSD křivku takřka žádný vliv. Naproti tomu měla výrazný vliv koncentrace hydrogelu a molekulová hmotnost polymeru, kdy se zvyšující se hodnotou narůstá i podíl elastické složky.

Ve stejném roce byla publikována bakalářská práce **A. Dušenkové**, která se zabývala optimalizací přípravy vzorků pro FCS mikreologii a následně inkorporací polyelektrolytu do modelového hydrogelu, v tomto případě agarózového [112]. Fluorescenční sondy byly s latexovým jádrem potažené fluoroforem s emisní vlnovou délkou ve žluto-zelené oblasti. Byl konstatovaný vliv způsobu inkorporace částic do hydrogelu, stejně tak vliv přidaného PSS na výsledný tvar MSD křivky.

Stejný typ měření, pouze s jiným typem hydrogelu, dělala ve své bakalářské práci **H. Papežiková** [113]. Ta používala polyhydroxyethyl methakrylát síťovaný termoiniciací, později fotoiniciací. Stejně jako v předchozím případě, tak i zde se do modelového hydrogelu přidalo určité množství PSS.

Na tyto práce navázala opět **A. Dušenková** ve své diplomové práci [114]. Původní agarózu vyměnila za alginát sodný a k polyelektrolytu PSS přidala ještě polyglutamát sodný.

Velká část dizertační práce **J. Mondeka** je věnovaná fluorescenční časově rozlišené korelační spektroskopii [115]. Ve své práci porovnával dvě mikreologické techniky – FCS a videomikreologii. Dále se pokusil částečně optimalizovat metodu FCS mikreologie pro studium hydrogelových systémů. Součástí práce je základní skript pro převod autokorelační křivky na MSD. Při porovnání výsledků získaných FCS a DLS bylo zjištěno výrazné odchytky způsobené rozptylem světla na řetězcích polymeru. Z tohoto důvodu je pro charakterizaci hydrogelových systémů vhodnější použít FCS mikreologii.

Bohužel k řádné optimalizaci metody a zjištění vlivů na samotné měření nedošlo, proto se tímto tématem zabývala **S. Pavlíková** [116]. Zobrazuje, jaký vliv mají jednotlivé parametry získané ze softwaru, pokud jsou už při kalibraci špatně nastavené. Dále byla zjišťována limitní viskozita vzorku a použitelné velikosti částic pro danou koncentraci hydrogelu. Velmi přínosnou částí je zdokonalení skriptu v softwaru MATLAB pro převod autokorelační křivky na MSD.

Poslední prací, kterou je vhodné zmínit, je diplomová práce **R. Chovancové** [117]. Ta je zaměřena na dvouhnikovou fluorescenční korelační spektroskopii. Součástí práce je podrobný návod na nastavení a kalibraci přístroje. Pomocí této metody byl studován hydrogel fluorescenčně značeného hyaluronanu. Byly zjišťovány různé vlivy na difúzní koeficienty, z nichž nejvýznamnější byla iontová síla a koncentrace neznačeného polymeru. Používaná metoda má velký potenciál být využívána pro studium hydrodynamického chování polymeru jak ve vodě, tak i ve fyziologickém roztoku.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité chemikálie

Fluorescenční nanočástice:	Sicastar®-RedF 10 nm	micromod GmbH
	-	-
	Sicastar®-GreenF 30 nm	micromod GmbH
	-	-
	Sicastar®-GreenF 50 nm	micromod GmbH
	-	-
	Sicastar®-GreenF 70 nm	micromod GmbH
	-	-
	Sicastar®-GreenF 100 nm	micromod GmbH
-	-	
DiagNano™	DiagNano™ 10 nm	CD Bioparticles
	-	-
	DiagNano™ 50 nm	CD Bioparticles
-	-	-
DiagNano™	DiagNano™ 100 nm	CD Bioparticles
	-	-
	-	-
Fluorescenčně značený hyaluronan:	FITC-HA-Se 274 kDa	TdB Labs
	-	-
	FITC-HA-Se 710 kDa	TdB Labs
-	-	-
Prostředí:	Glycerol bezvodý p.a.	lach:ner 56-81-5
	Agaróza	Sigma Aldrich 9012-36-6
	Hyaluronát sodný	Contipro Group 9067-32-7
Kalibrační roztoky:	Rhodamin 6G	Sigma Aldrich 989-38-8
	-	-
	Atto 488	Sigma Aldrich 41051-1MG-F

5.2 Použité přístroje

Konfokální mikroskop	MicroTime200	PicoQuant GmbH	Německo
DLS	Zetasizer Nano Zs	Malvern Instrument	Spojené království
Elektronový mikroskop	EVO LS 10	Zeiss	Německo

5.3 Příprava kalibračních roztoků

Pro přesnou kalibraci konfokálního mikroskopu je nutné velmi precizně připravit i kalibrační roztoky fluorescenčních sond v řádu nanomolů. Pro zjištění přesné koncentrace připravených roztoků byla použita UV-VIS spektrofotometrie, kdy pomocí Lambert-Beerova zákona byla z naměřené absorbance zjištěna přesná koncentrace roztoku.

Pro kalibraci zelených nanočástic byla použita sonda Atto488®. Přesné množství této sondy rozpuštěné v DMSO bylo napipetováno do odměrné baňky a doplněno deionizovanou

vodou po rysku. Nejnižší koncentrace, kterou je možné tímto způsobem připravit, je v řádu $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Následným ředěním byla koncentrace upravena na požadovanou nanomolární koncentraci.

Pro kalibraci 10nm nanočástic byl použitý Rhodamin6G®. Na analytických vahách bylo odměřeno přesné množství prášku fluorescenční sondy a kvantitativně převedeno do odměrné baňky. Několikanásobným zředěním deionizovanou vodou byla výsledná koncentrace v řádu jednotek nanomolů.

5.4 Příprava vzorků

5.4.1 Fluorescenčně značené nanočástice ve vodě

Do vialek bylo napipetováno přesné množství roztoku fluorescenčních částic. Pro potřeby metody FCS, která vyžaduje jednu molekulu v jednom femtolitru, byl deionizovanou vodou doplněn objem tak, aby výsledná koncentrace byla v jednotkách nanomolů.

5.4.2 Fluorescenčně značené nanočástice v glycerolu

Do vialek bylo napipetováno dané množství glycerolu. Na požadovanou koncentraci byl pak naředěn vypočítaným množstvím deionizované vody. Takto připravené roztoky byly následně vortexovány 5 minut kvůli homogenizaci vzorku. Do roztoku glycerolu byl napipetován objem nanočástic tak, aby se opět dosáhlo nanomolární koncentrace. Pro všechny velikosti částic byly shodné koncentrace 50, 60 a 70 hm. %. Zbylé koncentrace se upravily přímo pro konkrétní velikost podle chování nanočástic v koncentrační řadě.

5.4.3 Fluorescenčně značené nanočástice agarózovém hydrogelu

Pro přípravu vzorku fluorescenčních částic v agarózovém hydrogelu existuje několik způsobů, které lze rozdělit podle typu difúze a podle objemu výsledného vzorku. Příprava agarózového gelu je vždy stejná.

Do vialek se navázilo přesné množství agarózy a na požadovanou koncentraci bylo doplněno deionizovanou vodou. Pracovalo se s koncentracemi od 0,1 hm. % do 2 hm. %. Směs byla za stálého míchání zahřívána na teplotu 85 °C, kdy při této teplotě byl hydrogel udržován až do úplného zprůhlednění bez známek bílého zákalu. Z takto připraveného gelu bylo napipetováno určité množství do držáku vzorku, kde se hydrogel nechal 60 minut ztuhnout při laboratorní teplotě. Zde je důležité vzorek zakrýt parafilmem, případně překrýt olejovou vrstvou, aby nedocházelo k odpařování vzorku. V této práci se upřednostnilo překrytí parafilmem.

Prvním způsobem je difúze z povrchu vzorku. Tento způsob je nejjednodušší, protože se připravil hydrogel výše uvedeným způsobem a po zatuhnutí se na povrch napipetovalo vypočítané množství fluorescenčních nanočástic. Vzorek se opět překryl parafilmem a nechal se další hodinu stát, aby došlo k prodifundování částic do gelu.

Druhým způsobem, který byl především používán v této práci, je zamíchání fluorescenčních nanočástic přímo do tekutého hydrogelu. Ještě před zahříváním směsi se k agaróze do deionizované vody napipetovalo přesné množství disperze nanočástic o dané koncentraci. Poté se postupovalo opět podle postupu výše. U částic byla měřením prokázána vysoká termostabilita, kdy se difúzní koeficient neměnil ani po dosažení bodu varu a následném zchladnutí.

Tyto postupy ovšem platí pouze pro vzorky, kdy je možné do držáku sklička napipetovat standardní 2 ml gelu. Pokud je potřeba měřit mnohem menší objemy gelu, nebo teplotně nestabilní částice, je nutné způsob přípravy upravit. Měřeními bylo zjištěno, že způsob difúze

z povrchu gelu v malém (mikrolitrovém) množství vzorku není možný. Lze tedy připravovat gely pouze s částicemi zamíchanými už při přípravě.

Byl připraven agarózový gel dvojnásobné koncentrace, než byla výsledná koncentrace. Tento gel byl smíchán v poměru 1:1 z fluorescenčními částicemi, případně se směsí částic. Míchání bylo nutné provést až přímo na krycím sklíčku, tedy bylo potřeba pracovat velmi rychle, neboť gel rychle tuhne a při pomalejší práci by nedošlo k homogennímu rozmíchání částic. Proto je vhodné nejprve na krycí sklíčko nanést dané množství nanočástic a na něj pak napipetovat stejné množství hydrogelu a ihned začít míchat. Takto připravená směs byla zaparafilmována a po 10 minutách byla připravena na měření. Po celou dobu měření se parafilm nechal na držáku sklíčka kvůli minimalizaci vysychání hydrogelu.

5.4.4 Fluorescenčně značené nanočástice v hyaluronanovém gelu

Požadované množství hyaluronanu se smíchalo s vypočítaným množstvím vody, kdy se roztok polysacharidu nechal míchat na magnetické míchačce při teplotě okolo 30 °C do úplného rozpuštění. Tímto stylem se vytvořila koncentrační řada hyaluronanu od 0,05 g·l⁻¹ až do 2 g·l⁻¹. Byl připraven roztok fluorescenčně značeného hyaluronanu, který se v požadovaném množství přikápl k již připravenému roztoku hyaluronanu ve vodě. Takto připravený vzorek se nechal stát 10 minut při laboratorní teplotě, aby došlo k homogenní distribuci fluorescenčně značeného hyaluronanu. Po této době se 1 ml gelu přenesl na krycí sklíčko, kde byl následně měřen.

Obdobný postup byl i pro měření s fluorescenčními nanočásticemi, kdy byly částice zamíchané přímo do roztoku hyaluronanu jako jiný typ fluorescenční sondy.

5.5 Příprava mikroskopu na měření

Samotné hardwarové i softwarové nastavení přístroje je velmi komplexní a dlouhá záležitost. Podrobný návod pro různé druhy měření je uveden v příloze 1. Pro jednotlivé částice bylo zvoleno vhodné dichroické zrcadlo. Stejně tak musely být před každým detektorem různé emisní filtry. Konkrétní nastavení pro dané nanočástice je uvedeno v tabulce 1. Pro měření každé velikosti nanočástic zvlášť se frekvence laseru a doba setrvání skeneru v konkrétním místě (dwell time) nastavily dle potřeby měření (standardně 40 MHz a 1 ms), pro měření všech velikostí najednou byla použita pulzní prokládaná excitace (PIE), frekvence 40 MHz a dwell time 3 ms pro nasbírání dostatečného množství fotonů v každém kanálu detekce.

Tabulka 1: Nastavení mikroskopu pro jednotlivé typy částic

Výrobce	Velikost částic	Laser	Dichroické zrcadlo	Emisní filtr
micromod	10 nm	514 nm	514	550/49
	30 nm	467 nm	470/635	520/35
	50 nm	467 nm	470/635	520/35
	70 nm	467 nm	470/635	520/35
	100 nm	467 nm	470/635	520/35
CD Bioparticles	10 nm	467 nm	470/635	520/35
	50 nm	467 nm	470/635	590/21
	100 nm	635 nm	470/635	670/90

5.6 Matematické přepočty

5.6.1 Přepočet autokorelační křivky na MSD křivku

Jako standardní výstup měření FCS se považuje autokorelační křivka, která ovšem sama o sobě nepopisuje viskoelastické vlastnosti zkoumaného prostředí. Tyto vlastnosti jdou zjistit z MSD křivky, kterou lze namodelovat matematickými operacemi z kubické rovnice (36).

Pro potřeby výpočtu je nutné zjistit ze softwaru SymPhoTime64 šířku konfokálního objemu v axiální a horizontální rovině (w_{xy} a w_z). Dále je důležitým parametrem počet částic (N) a samotná hodnota autokorelační funkce ($G(t)$).

Původní skript v softwaru MATLAB byl poprvé použitý v práci **P. Kábrtové** [111], později v dizertační práci **J. Mondeka** [115]. Kód s mírnými modifikacemi vytvořila **S. Pavlíková** ve své diplomové práci [116]. Ta nakombinovala kódy z předchozích prací a upravila je tak, aby byly funkčnější a jednodušeji zapsané. V kódu se ale vyskytovala numerická chyba, která byla opravena. Nový kód s dalšími úpravami i s vysvětlením jednotlivých částí je v příloze 4.

5.6.2 Přepočet MSD křivky na reologické moduly

Pro rychlejší a přesnější výpočet jediného reálného kořene rovnice (36) byl vytvořený skript v softwaru MATLAB. Z něj byly vyexportovány MSD křivky ve formě .csv tabulky. Díky jednoduchému přepočtu byla tato data přepočítána na poddajnost pomocí rovnice (38), což je

$$J(t) = \frac{3\pi a}{DkT} \text{MSD}.$$

Tato data, která je potřeba mít v excelu, se následně zpracovala v softwaru Rheology Advantage Data Analysis (TA instruments, US). Zde bylo nejprve vypočítáno retardační spektrum, kde byla získána viskozita při nulovém smyku (Pa·s) a okamžitá poddajnost (Pa⁻¹). Z těchto dat se pak získalo relaxační spektrum a z něj samotné reologické moduly.

5.7 Ověření velikosti částic

Byly připraveny vzorky pro měření FCS a DLS. Pro DLS měření nebylo možné použít 10nm částice od firmy Micromod kvůli jejich vlnové délce. Z metody DLS se dostala přímo velikost testovaných částic. Z FCS se velikost částic musela teprve vypočítat z rovnice (22), tedy přepočtem difúzního koeficientu na velikost pomocí Stokes-Einsteinovy rovnice.

Měření DLS bylo provedené na přístroji ZetaSizerNano ZS společnosti Malvern Instruments. Každý vzorek byl proměřen pětkrát. Nastavení přístroje bylo následující:

Rozpouštědlo	voda (index lomu 1,33)
Teplota	25 °C (cela temperována 120 s)
Režim měření	173° backscatter

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Test robustnosti metody

Výsledkem kalibrace fluorescenčního mikroskopu jsou vždy dvě hodnoty – objem konfokálního objemu V_{konf} a jeho excentricita κ . Z následující rovnice je možné vypočítat i šířku konfokálního objemu v horizontální a vertikální rovině, které se objevují v kubické rovnici pro průběh MSD křivky.

$$w_z = \kappa \cdot w_{xy} \quad (39)$$

Pokud se jeden z těchto parametrů, případně oba, změní, dojde i k výrazné změně u získaných výsledků. Neovlivní se ovšem tvar korelační křivky, tedy zde není možné posoudit správnost měření, ale ovlivní se difúzní koeficient a tvar MSD křivky. Jak ukazuje tabulka 2, když se zachová poměr objemu a excentricity, pak zmiňovaná odchylka není tak velká. Pro modelaci odchylky byly zvolené hodnoty, které se od experimentálně naměřené lišily o 50 %. Taková odchylka je ovšem při správném měření a správné kalibraci téměř vyloučená.

Tabulka 2: Ukázka ovlivnění difúzního koeficientu ($\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) při zadání správných a nesprávných parametrů.

	Menší objem	Správný objem	Vyšší objem
Menší hodnota κ	9,7	16,0	22,3
Správná hodnota κ	6,9	11,0	15,2
Vyšší hodnota κ	5,4	8,9	12,1

6.2 Porovnání velikosti částic pomocí metody DLS a FCS

Aby bylo jisté, že hodnoty difúzního koeficientu, které se získají z FCS, jsou opravdu správné, vzaly se částice různých velikostí a změřily se paralelně i dynamickým rozptylem světla (DLS). Pomocí Stokes-Einsteinovy rovnice byl vypočítán poloměr částice získaný z difúzního koeficientu (FCS) a porovnaný se změřeným (DLS).

Metodou DLS nebylo možné změřit částice o průměru 10 nm, protože jejich excitační vlnová délka odpovídala vlnové délce laseru přístroje ZetaSizer. Z tohoto důvodu docházelo kromě žádaného rozptylu záření také k fluorescenci, která zkreslovala výsledky.

Jak je vidět z následující tabulky, naměřená velikost částic se téměř nelišila od sebe, ani od výrobcem uváděných hodnot.

Tabulka 3: Porovnání hodnot difúzního koeficientu a průměru částice získaného metodami DLS a FCS.

Tabelovaný průměr (nm)	DLS		FCS	
	Průměr (nm)	Difúzní koeficient ($\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	Průměr (nm)	Difúzní koeficient ($\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)
10	-	-	11,43	41,75
30	33,62	14,20	34,94	13,66
50	54,18	8,81	53,50	8,92
70	72,55	6,58	73,99	6,45
100	99,74	4,78	101,76	4,69

6.3 Parametry, které ovlivňují výslednou křivku MSD

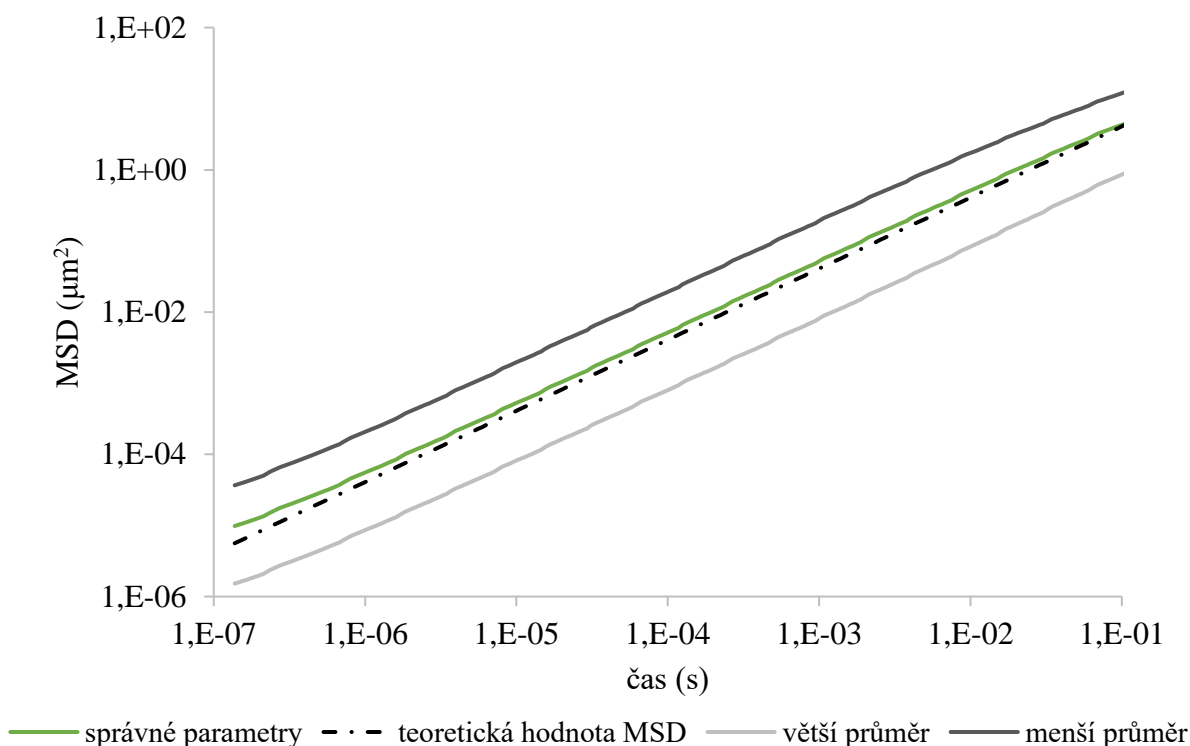
V kapitole 5.6 je uvedena kubická rovnice, ze které lze vypočítat MSD křivku. Mezi parametry, které ovlivňují její řešení, patří šířka konfokálního objemu v horizontální a vertikální rovině, počet částic a samotná hodnota autokorelační funkce. Autokorelační funkce a počet částic se zjišťuje přímo z naměřených dat, zatímco rozměry konfokálního objemu jsou parametry kalibrace.

Při analýze vzorku lze ovlivnit MSD křivku použitím složitějšího matematického modelu, případně jeho nesprávným použitím. Zde je také potřeba hlídat průběh reziduí – nelze použít jednodušší matematický model, aby MSD křivka odpovídala teoretickému modelu, pokud se jedná o složitější fotofyziku (například je přítomných víc difúzních časů, případně tripletní stav fluoroforu).

Pokud je kalibrace naměřena správně, pak se průběh korelační a MSD křivky dá manuálně ovlivnit pouze matematickým modelem. Software může ještě průběh MSD křivky (nikoli autokorelační) změnit špatným výpočtem počtu částic. Manuálně nejde tuto skutečnost ale jednoduše opravit. Následující modely zobrazují správně nastavené parametry, tedy difúzní koeficient odpovídá realitě a takto vypočítaný model kopíruje teoreticky vypočítaný model. Chybné parametry se liší vždy o $\pm 50\%$.

6.3.1 Šířka konfokálního objemu v horizontální rovině

Šířka konfokálního objemu v horizontální rovině (tj. průměr objemu) se v kubické rovnici objevuje v podobě druhé a čtvrté mocniny oproti délce, která je zde jen jako druhá mocnina. Bylo zjištěno, že tento parametr neovlivňuje samotný tvar MSD křivky, pouze mění její hodnotu ve směru osy y.

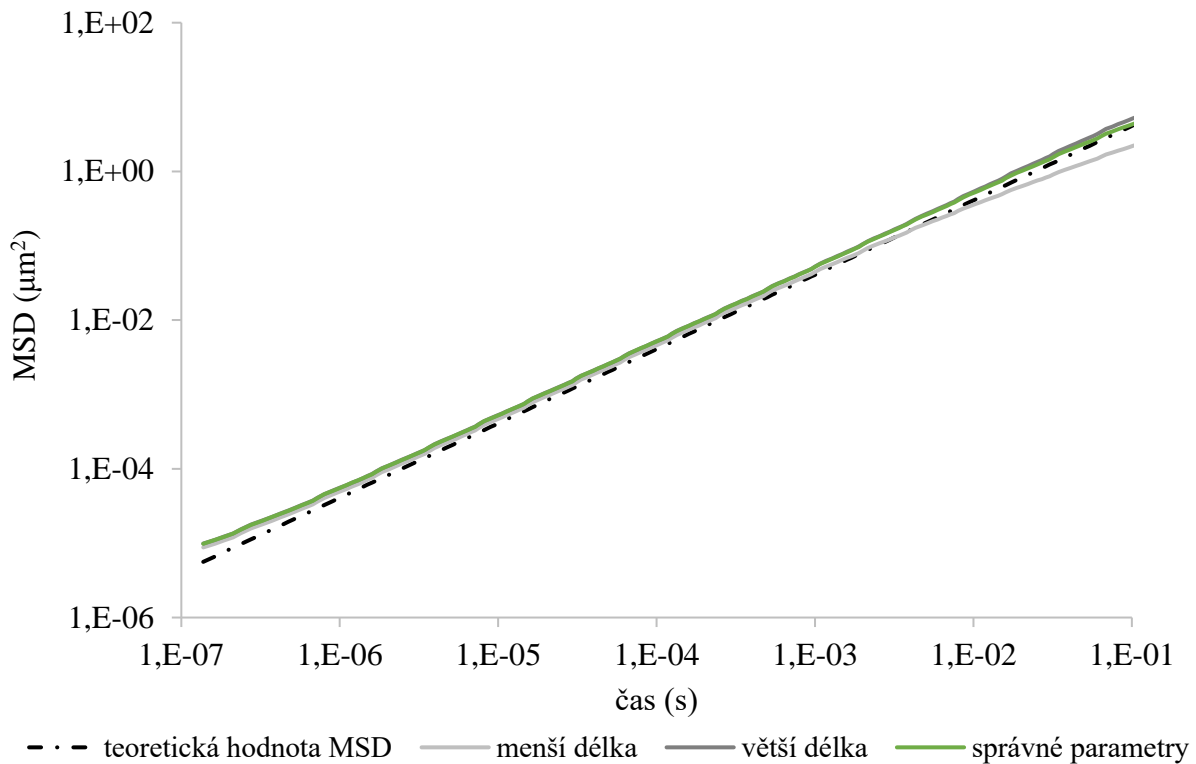


Obrázek 19: Výsledné MSD křivky při zadání všech správných parametrů (zelená) a správných parametrů kromě hodnoty horizontálního průměru konfokálního objemu (obě šedé) a jejich porovnání s teoretickým modelem (čerchovaná).

6.3.2 Šířka konfokálního objemu ve vertikální rovině

Z kalibrace je také možné zjistit šířku konfokálního objemu ve vertikální rovině (w_z). Ta ovlivňuje kromě objemu konfokálního objemu i parametr κ . V kubické rovnici se vyskytuje pouze s druhou mocninou.

Z grafu je patrné, že tato šířka konfokálního objemu nemá na průběh MSD křivky téměř žádný vliv a kopíruje tvar experimentálně naměřených dat. Menší odklon od průběhu je možné pozorovat v delším čase pro větší hodnoty w_z .

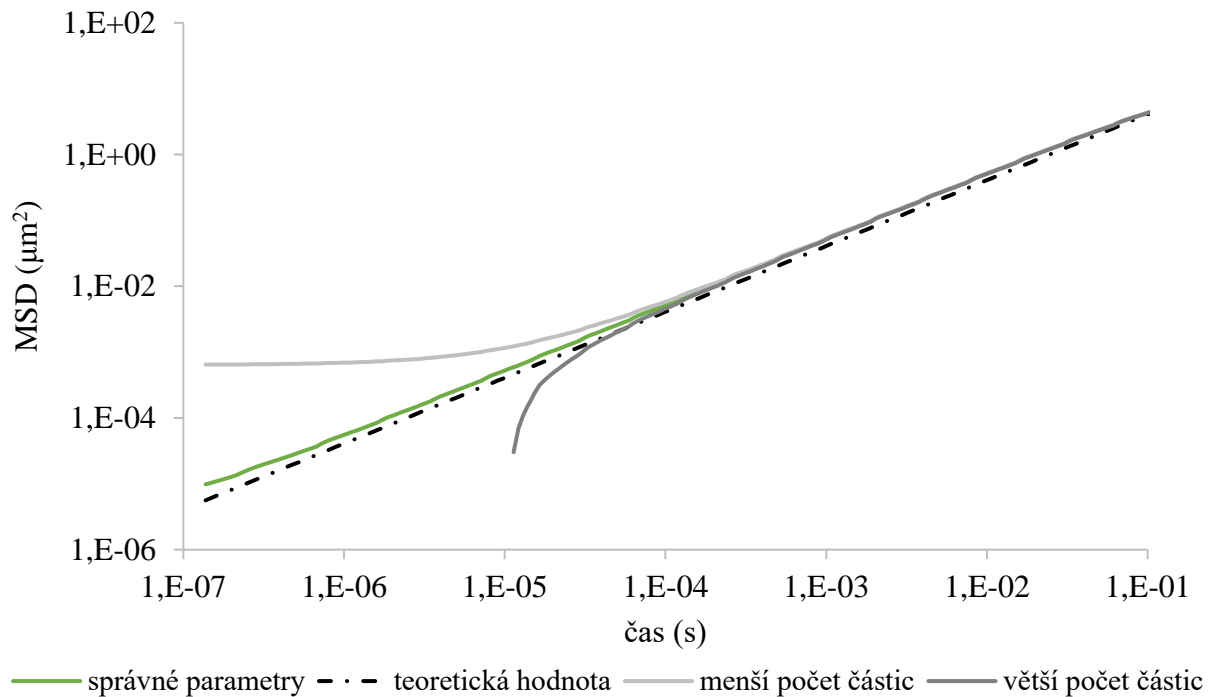


Obrázek 20: Výsledné MSD křivky při zadání všech správných parametrů (zelená) a správných parametrů kromě hodnoty šířky (délky) konfokálního objemu ve vertikální rovině (obě šedé) a jejich porovnání s teoretickým modelem (čerchovaná).

6.3.3 Počet částic v objemu

Dalším parametrem, který ovlivňuje hodnotu kubické rovnice, je počet částic. Jak bylo zmíněno výše, software tuto hodnotu vypočítá a manuálně ji nelze změnit. Problém nastává v případě, že software vyhodnotí počet částic jako hodnotu s určitou chybou.

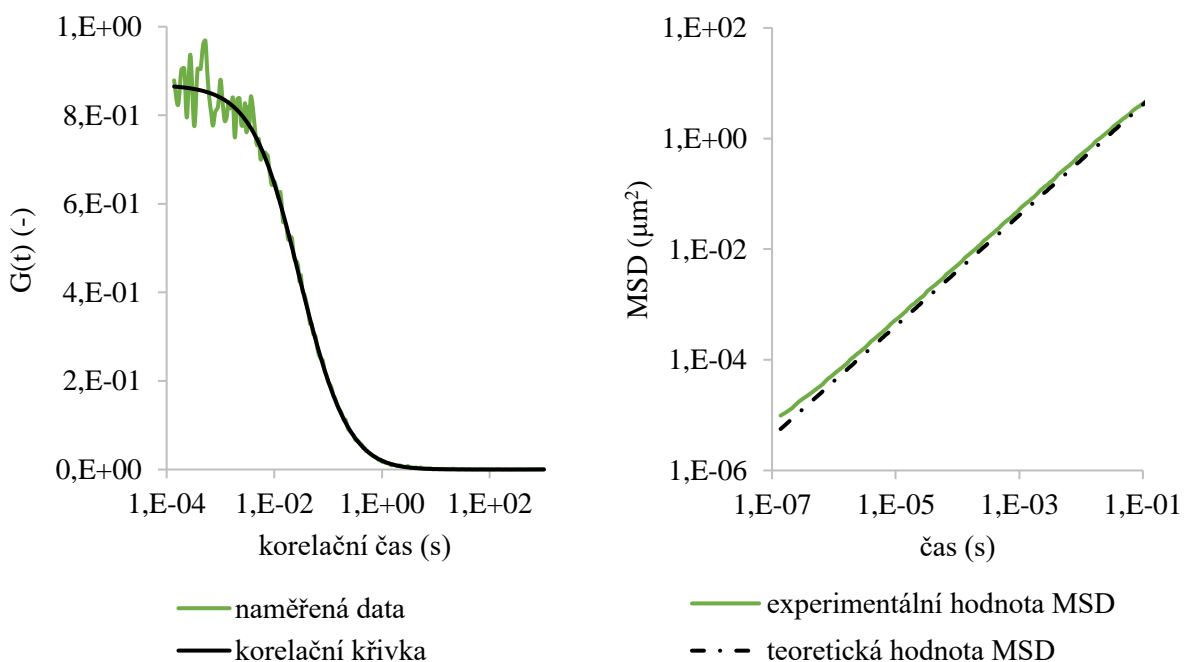
Pokud se vezme libovolné číslo z tohoto intervalu, změní se radikálně tvar MSD křivky, především na začátku v nízkých časech. Pokud se dosadí špatná hodnota, tvar se začne čím dál více odlišovat od teoretické hodnoty. V tomto případě se nejedná o modelové hodnoty jako v předchozích případech, ale jedná se o skutečnou chybu udanou softwarem, tedy cca 0,25 % od střední hodnoty.



Obrázek 21: Porovnání teoretického modelu průběhu MSD křivky a různého počtu částic.

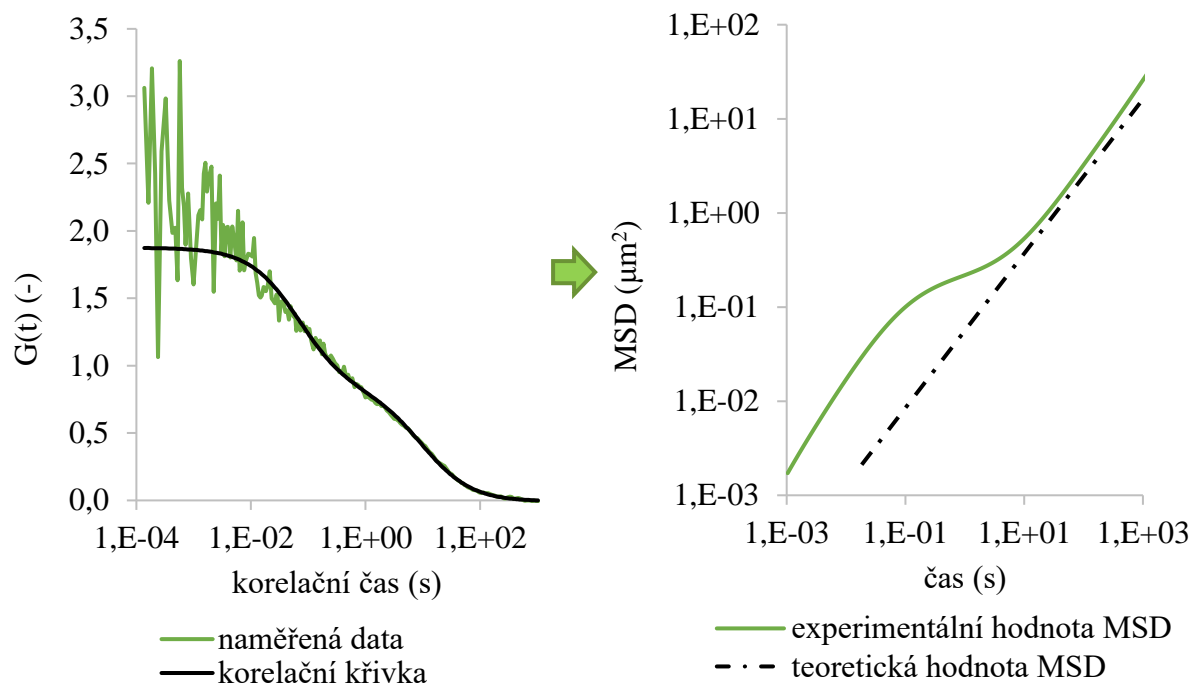
6.3.4 Autokorelační funkce

Posledním parametrem, který může ovlivnit průběh MSD křivky, je autokorelační funkce G . Pokud je vzorek i kalibrace naměřený správně a fyzikální chování je možné vyjádřit pouze jedním difúzním koeficientem, pak tvar MSD křivky odpovídá průběhu teoretické hodnoty MSD.



Obrázek 22: Převod autokorelační křivky s jedním difúzním koeficientem na MSD křivku.

Pro jednoduchou difúzi je vhodné použít model *Pure Diffusion*, při kterém získaný tvar MSD křivky odpovídá teoretickému průběhu MSD. Někdy ovšem tento model nelze použít, například kvůli složitější fotofyzice.



Obrázek 23: Převod autokorelační křivky se dvěma difúzními koeficienty na MSD křivku.

Někdy se ale může stát, že data nejsou ideálně naměřená, proto časová fluktuace intenzity přesně nekopíruje tvar korelační křivky. V tomto případě, aby data odpovídala některému z modelů, a tedy data korespondovala s korelační křivkou, se použije špatně složitější model. Tím pádem časová fluktuace fluorescence zdánlivě vypadá správně na úkor validity dat. Z toho vyplývá, že ačkoli je systém viskózní, použitím špatného matematického modelu můžeme dostat výsledky odpovídající viskoelastickému prostředí.

6.4 Limitní viskozita pro měření částic

Pro stanovení viskozitních limitů FCS byl použit roztok glycerolu o různých koncentracích. Jako limitní viskozita byla brána taková hodnota, kdy naměřená data pro částice dané velikosti v roztoku glycerolu nešla vyhodnotit, respektive získané výsledky nebyly smysluplné (často byly difúzní koeficienty příliš vysoké, nebo absolutní zastoupení difúzního času mělo zápornou hodnotu). Hodnota autokorelační křivky se spolu se vzrůstající koncentrací glycerolu a průměrem částic klesala, až dosáhla takové hodnoty, kdy chyba měření byla příliš velká, nebo s daty nekoreloval žádný z dostupných matematických modelů. Všechna měření probíhala při teplotě $23,0 \pm 0,2$ °C.

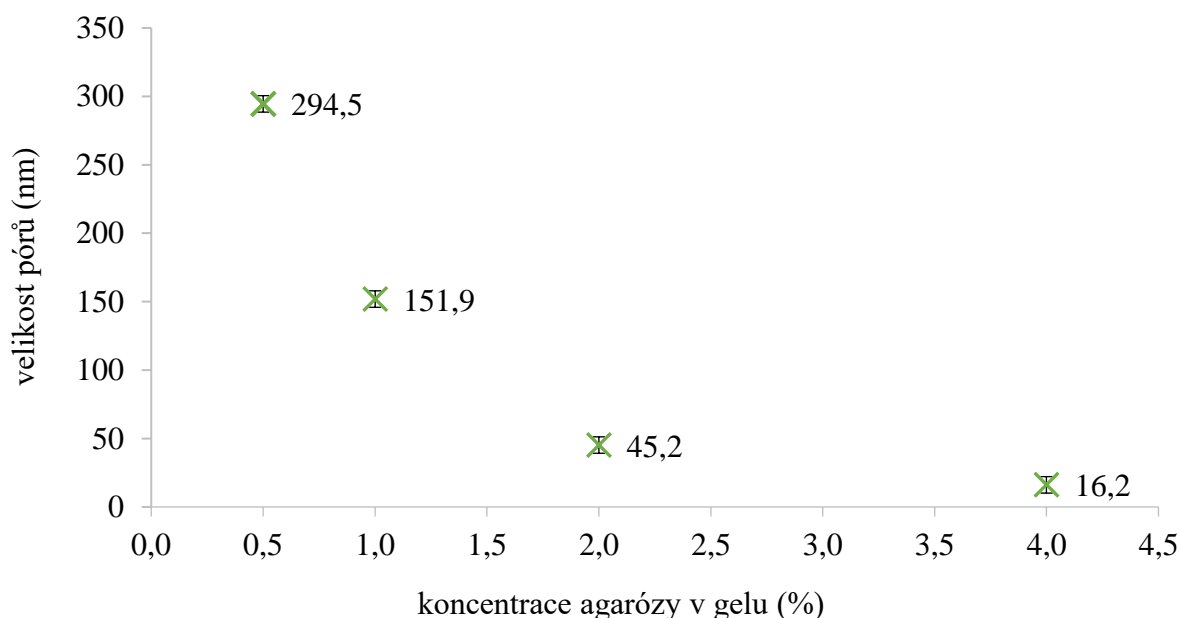
Ačkoli podle Stokes-Einsteinovy rovnice částice ještě při limitní viskozitě měly vykazovat tepelný pohyb, citlivost metody dosáhla svého maxima a další difúzní koeficienty se nepodařilo změřit. Dalo by se říct, že minimální difúzní koeficient, který je možné spolehlivě změřit, se pohybuje v okolo $0,1 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Naměřené výsledky zobrazuje tabulka 4.

Tabulka 4: Limitní viskozita a difúzní koeficient pro částice různé velikosti

Glycerol (hm. %)	Viskozita (mPa·s)	Difúzní koeficient ($\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$)	Limitní viskozita pro
-	-	$0,052 \pm 0,003$	10 nm
93	$328,6 \pm 13,3$	$0,183 \pm 0,021$	30 nm
90	$222,2 \pm 8,4$	$0,104 \pm 0,016$	50 nm
84	$150,3 \pm 4,7$	$0,049 \pm 0,011$	70 nm
75	$41,2 \pm 0,5$	$0,062 \pm 0,006$	100 nm

6.5 Agarózový hydrogel

Pro měření gelů bylo potřeba zjistit přibližnou velikost pórů agarózy, aby byly použity odpovídající částice. Jako metoda byla zvolena turbidimetrie, kdy se získaly průměrné velikosti. Výsledné průměrné velikosti jsou zobrazeny na obrázku 24.



Obrázek 24: Závislost velikosti pórů na koncentraci agarózy v gelu.

6.5.1 Měření difúzního koeficientu metodou jednoohniskové FCS

Protože se jedná o fyzikálně připravený gel, velikost pórů pro jednu koncentraci bude charakterizována spíše distribucí velikostí než pouze jednou konkrétní hodnotou. Z toho důvodu není možné považovat výsledky získané z turbidimetrie za zcela přesné. Proto, i když byla zjištěna určitá velikost pórů, odpovídající částice jimi nemusely vždy dokázat prodifundovat. Limitní koncentrace agarózy, kdy translační pohyb částic o dané velikosti nebyl dále používaným přístrojem a postupem detekovatelný, jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Difúzní koeficient různě velikých částic v závislosti na koncentraci agarózového gelu.

	0 %	0,1 %	0,3 %	0,5 %	1,0 %	1,5 %	2,0 %
10 nm	41,8 ± 0,4	13,3 ± 3,6	13,5 ± 3,3	13,0 ± 3,2	6,3 ± 1,2	5,6 ± 1,6	3,9 ± 1,3
30 nm	13,7 ± 0,5	6,7 ± 0,8	6,4 ± 1,3	3,7 ± 0,4	3,0 ± 0,9	2,5 ± 0,8	2,1 ± 0,7
50 nm	8,9 ± 0,2	4,7 ± 0,6	2,3 ± 0,9	1,4 ± 0,6	1,0 ± 0,4	-	-
70 nm	6,5 ± 0,3	3,7 ± 0,6	2,4 ± 0,7	0,9 ± 0,4	-	-	-
100 nm	4,7 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,6 ± 0,2	-	-	-	-

Bylo provedeno několik měření, na jejichž základě byl stanovený difúzní koeficient pro danou velikost částice v určitém gelu. Z výsledků ovšem nešel stanovit jediný difúzní koeficient kvůli heterogenní povaze vzorku. V tabulce 5 je proto uvedena střední hodnota difúzního koeficientu (medián) a hodnota intervalu, ve kterém se tento koeficient pohybuje. Nejedná se tedy o chybu měření, ale o fyzikální popis měřeného systému, kdy uvedený interval je spojený s šířkou distribuce difúzních koeficientů.

Z tabulky 5 je patrné, že malé částice mají v nízkých koncentracích takřka stejný difúzní koeficient i odchylku měření. Je tedy možné říct, že do určité koncentrace nejsou tyto částice výrazně ovlivňovány okolním prostředím. Pokud se na tabulku 5 podíváme z pohledu procentuálního poměru difúzního koeficientu naměřeného v gelu a ve vodě, dostaneme hodnoty uvedené v tabulce 6.

Tabulka 6: Procentuální změna difúzního koeficientu nanočástic v různě koncentrovaném agarózovém hydrogelu oproti difúznímu koeficientu ve vodě

	0 %	0,1 %	0,3 %	0,5 %	1,0 %	1,5 %	2,0 %
10 nm	100	31,9	32,3	31,1	15,1	13,4	9,3
30 nm	100	49,0	46,9	27,1	22,0	18,3	15,4
50 nm	100	52,7	25,8	15,7	11,2	-	-
70 nm	100	57,4	29,5	14,0	-	-	-
100 nm	100	21,3	12,8	-	-	-	-

Nejmenším částicím téměř okamžitě klesl difúzní koeficient na třetinu, kde byl pro nižší koncentrace agarózového gelu téměř neměnný. U ostatních velikostí se počáteční difúzní koeficient pohyboval okolo poloviční hodnoty. U všech částic se difúzní koeficient zastavil na přibližně desetinové rychlosti pohybu oproti hodnotám ve vodě.

Samotná odchylka měření dokáže dát informace o struktuře hydrogelu. Čím je odchylka vyšší, tím víc difúzních koeficientů zde může být, a tedy je systém více heterogenní. Data jsou uvedena v tabulce 7.

Tabulka 7: Procentuální hodnoty vypočítaného poměru odchylky měření vůči naměřenému difúznímu koeficientu pro různé velikosti částic v různě koncentrovaném agarózovém hydrogelu

	0 %	0,1 %	0,3 %	0,5 %	1,0 %	1,5 %	2,0 %
10 nm	1,0	27,1	24,4	24,6	25,4	28,6	33,3
30 nm	3,7	11,9	17,2	24,3	30,0	32,0	33,3
50 nm	2,2	12,8	30,4	35,7	40,0	-	-
70 nm	4,7	16,2	36,8	44,4	-	-	-
100 nm	2,1	20,0	33,3	-	-	-	-

Procentuální odchylka by teoreticky mohla být výstupním parametrem měření. Pro částice difundující ve vodě je odchylka, tedy přesněji řečeno interval naměřených hodnot, v jednotkách procent, tedy částice nejsou nijak ovlivněny vnějším prostředím a jedná se opravdu jen o chybu měření. S narůstající koncentrací roste i šířka intervalu. Pouze u nejmenších částic zůstává interval téměř stejný – s klesajícím difúzním koeficientem úměrně klesá i interval hodnot difúzního koeficientu. Pohyb je pravděpodobně ovlivněn hustotou sítě, ale samotný interval zůstává stejný. Dalo by se říct, že z pohledu 10nm částic je gel „homogenní“, tedy že většina porů je pro průchod částic stejně vhodná.

Čím větší jsou částice, tím klesá pravděpodobnost, že částice najde vhodný pór „na první pokus“, tedy dojde k poklesu difúzního koeficientu a nárůstu intervalu hodnot. Zjednodušeně by se dalo říct, že je gel čím dál víc nehomogenní. Jen u 100nm částic se odchylka zastavila u 33 %, což neodpovídá trendu vzestupu procentuální hodnoty distribuce difúzního koeficientu. Je možné, že tato nepřesnost je dána samotným měřením – při této koncentraci už mohlo dojít ke zkreslení výsledků kvůli detekčním limitům přístroje. Zde dochází k detekci hraniční hodnoty difúzního času, tedy odchylka měření může být už vyšší než u ostatních měření. U největších částic je stejná přesnost zaručena pouze u nejnižší koncentrace agarózového gelu, u další měřené koncentrace je hodnota už nepřesná, spíše orientační, tím pádem ani velikost intervalu nemusí odpovídat realitě. Veškerá tato měření byla analyzována pouze do korelačního času 1000 ms, který je defaultně nastavený a probíhají podle něj veškerá měření.

6.5.1.1 Vliv prodloužení korelačního času na difúzní koeficient

Bylo zjištěno, že metoda, u které jsme byli přesvědčeni, že je pro naše účely velmi limitovaná, je naopak přesná a použitelná i při nízkých difúzních koeficientech. Stačilo poupravit hardwarové a softwarové nastavení měření (intenzita laseru, délka měření a při analýze celkový korelační čas) a najednou se rozsah metody zvětšil a získala se validní data i z oblasti dlouhých difúzních časů.

Další nevýhodou krátkého korelačního času bylo, že při zapnutí FLCS korekci často nedocházelo ke korelaci mezi jednotlivými detektory. Po prodloužení korelačního času se křivka vyhladila a jednotlivé naměřené křivky mezi sebou už korelovaly.

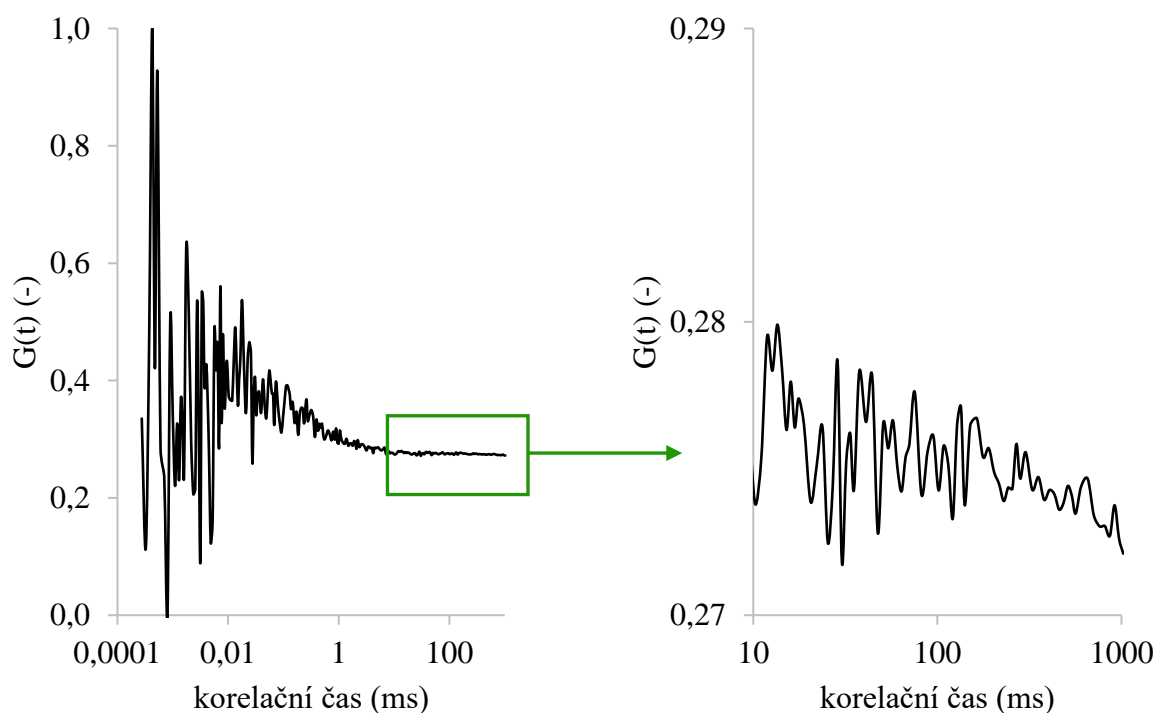
Zde ovšem není pravidlem, že nejpřesnější bude nejdelší korelační čas. Musí se brát v potaz i povaha měřeného vzorku – tedy pro částice s malým poloměrem stačí krátká korelace. Při zvyšování korelačního času buď nedocházelo k výraznějším změnám, nebo se zde začal

objevovat velmi krátký difúzní koeficient, který ovlivňoval správnost výsledku, protože byl často průměrován s difúzí sledovaných částic.

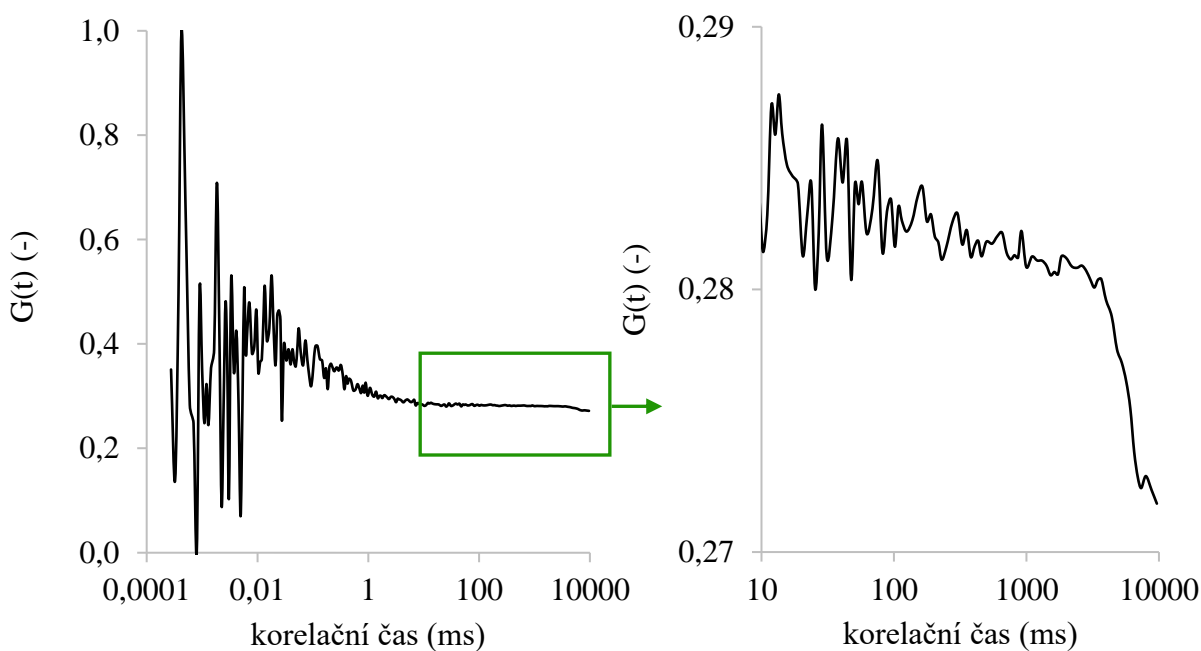
Tabulka 8: Výběr kratšího difúzního koeficientu v závislosti na volbě délky celkové korelace

Průměr částic (nm)	Koncentrace agarózového hydrogelu (hm. %)	Difúzní koeficient pro různé korelační časy ($\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$)			
		1000 ms	2000 ms	5000 ms	10000 ms
10	0,1 %	$15,0 \pm 1,3$	$14,0 \pm 1,4$	$14,0 \pm 1,6$	$14,0 \pm 1,1$
	2,0 %	$2,2 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,1$
70	0,1 %	$3,2 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,1$	$2,3 \pm 0,1$
	2,0 %	-	-	-	$0,6 \pm 0,3$

U větších částic pak použití vyššího korelačního času dávalo smysl už jen z toho důvodu, že inflexní bod korelační křivky odpovídal až vyššímu času, tedy někdy nemusel být vůbec zobrazen. Toto je ukázáno na obrázcích 25 a 26.



Obrázek 25: Korelační čas pouze do 1000 ms. Inflexní bod odpovídající difúznímu času částic není zobrazen.



Obrázek 26: Korelační čas až do 10 000 ms, kde je patrný další inflexní bod, který odpovídá pohybu velkých částic ve vysoce koncentrované agaróze.

V následující tabulce 9 je zobrazena závislost difúzního koeficientu na velikosti částic, které difundují v různě koncentrovaném agarózovém hydrogelu. V závislosti na povaze vzorku byl zvolena různě dlouhá doba korelace. Obecně lze říct, že pro vzorky s difúzním koeficientem pro $2 \mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ a nižší je vhodné prodloužit dobu korelace. Pro vzorky, kde se difúzní koeficient pohybuje okolo $1 \mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ bylo potřeba zvolit maximální dobu korelace, tedy 10 sekund.

Pro všechny vzorky byl použitý jednotný matematický model Pure Diffusion, aby se předešlo chybám a odchýlkám kvůli jiným matematickým operacím. Po zvolení správné délky korelace tento model odpovídal datům.

Tabulka 9: Závislost difúzního koeficientu ($\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) na velikosti částic a hmotnostní koncentraci agarózového hydrogelu

	0 hm. %	0,1 hm. %	0,2 hm. %	0,5 hm. %	1,0 hm. %	1,5 hm. %	2,0 hm. %
10 nm	$43,0 \pm 1,4$	$13,5 \pm 2,6$	$13,0 \pm 2,2$	$11,5 \pm 1,8$	$5,5 \pm 0,4$	$3,1 \pm 0,5$	$1,7 \pm 0,6$
30 nm	$11,0 \pm 0,4$	$8,7 \pm 0,2$	$6,9 \pm 0,3$	$3,9 \pm 0,7$	$2,8 \pm 0,4$	$1,7 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,5$
50 nm	$7,4 \pm 0,2$	$5,4 \pm 1,1$	$4,9 \pm 1,0$	$3,8 \pm 0,7$	$2,1 \pm 0,5$	$0,6 \pm 0,2$	$0,10 \pm 0,22$
70 nm	$5,4 \pm 0,2$	$3,6 \pm 1,2$	$2,4 \pm 0,8$	$1,4 \pm 0,5$	$0,21 \pm 0,12$	$0,11 \pm 0,06$	$0,06 \pm 0,13$
100 nm	$3,5 \pm 0,3$	$1,8 \pm 0,6$	$0,7 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,2$	$0,10 \pm 0,09$	$0,06 \pm 0,05$	$0,02 \pm 0,04$

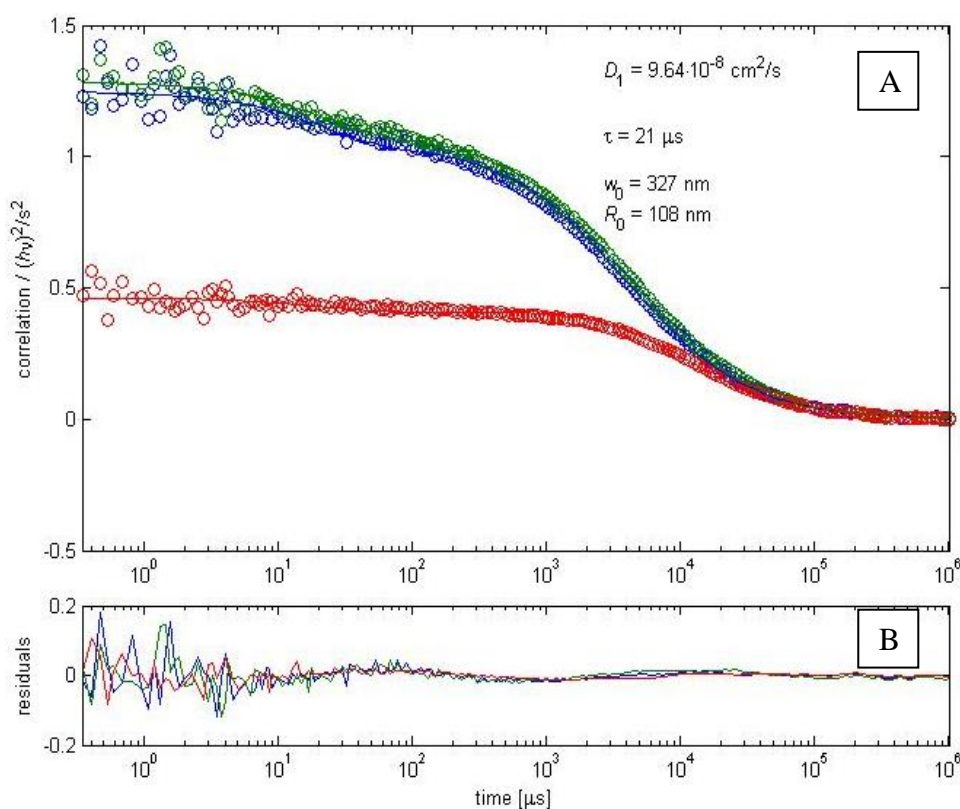
Z tabulky 9 je patrné, že díky delšímu korelačnímu času lze získat difúzní koeficient také pro velmi koncentrované hydrogely s velkými fluorescenčními nanočásticemi. Nicméně použití jiného matematického modelu výsledky příliš neovlivnilo, průměrný difúzní koeficient zůstal přibližně stejný.

Nezměnila se příliš ani průměrná směrodatná odchylka. Stále platí, že s narůstající koncentrací agarózového hydrogelu se odchylka zvyšuje – tedy můžeme říct, že prostředí je nehomogennější a volný pohyb částic je zpomalován hydrogelovou sítí. V případě velkých částic a velmi koncentrovaných hydrogelů je odchylka i větší než samotná hodnota difúzního koeficientu.

6.5.2 Měření difúzního koeficientu metodou dvouhnikové FCS

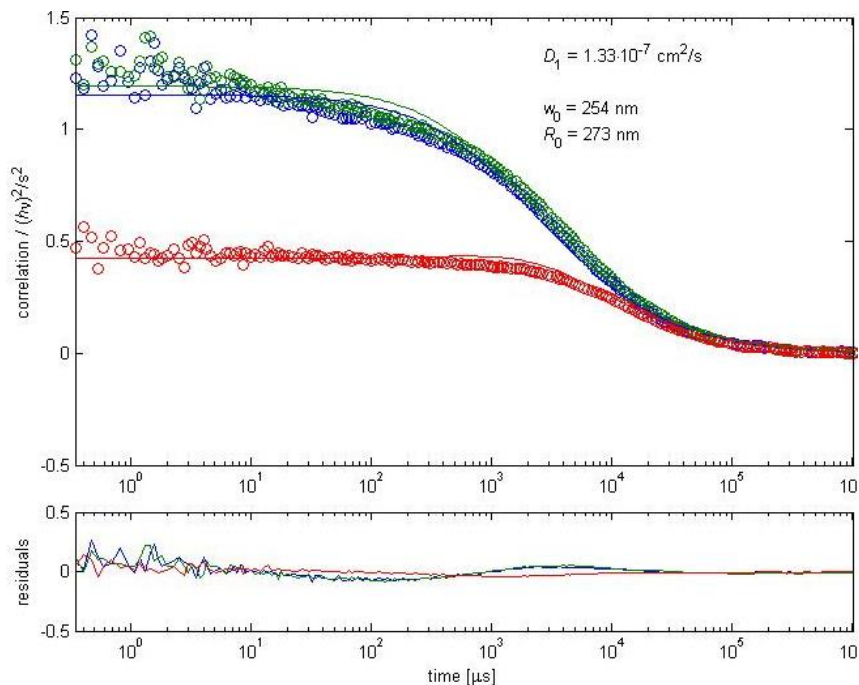
Byl předpoklad, že dvouhniková FCS (2f-FCS) bude přesnější a spolehlivější metodou pro měření korelačních křivek. Obecně se s touto myšlenkou dá souhlasit už jen z důvodu, že se nemusí při každé změně teploty kalibrovat konfokální objem, tedy se eliminuje chyba vzniklá při měření kalibrace.

Problém nastává při měření vyšších koncentrací agarózového hydrogelu ve spojení s většími nanočásticemi. Protože se jedná o pouze softwarové vyhodnocení, aniž by operátor mohl do výsledku zasáhnout, vše záleží pouze na algoritmu daného skriptu, jaká data vyhodnotí jako relevantní a jaká ne. Zde je možné nastavit pouze dvě hodnoty difúzního koeficientu a dvě hodnoty tripletu, ale není možné do skriptu nějak výrazně zasahovat. Matematicky je možné získat data z čehokoli, správnost výsledku je pak na posouzení uživatele. Následující obrázky 27 a 28 zobrazují změnu proložení křivek pouze přidáním jednoho parametru.



Obrázek 27: Korelační křivky s jedním difúzním koeficientem a jedním tripletem. Na grafu A jsou zobrazeny autokorelační a křížově korelační křivky, na grafu B rozložení residuí.

V případě obrázku 27 je pak ještě nutné rozhodnout, jestli se jedná opravdu o tripletní stav fluoroforu, nebo jestli vlivem prostředí dochází k fotovybělení částice. Ve druhém případě se zde také vyskytuje velmi krátký difúzní čas, protože částice je detekována v objemu, ale kvůli velmi pomalé difúzi se dříve fotovybělí, než prodifunduje skrz celý objem. To se projeví jako „zhasnutí částice“, tedy se částice dále nedetekuje a dochází ke zkreslení výsledku.



Obrázek 28: Korelační křivky s jedním difúzním koeficientem. Na grafu A jsou zobrazeny autokorelační a křížově korelační křivky, na grafu B rozložení reziduí.

Na obrázku 28 je vidět, že krátký difúzní čas je zde opravdu přítomný a že odebrání nefluorescenční komponenty (triplet) posunulo celé proložení korelačních křivek. Vlivem toho došlo k výrazné změně difúzního koeficientu z $9,6 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ na $13,3 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

Při nízkých koncentracích, případně pro malé částice, je tato metoda mnohem přesnější a rychlejší, zatímco při velmi pomalém difúzním koeficientu nedává 2f-FCS spolehlivé případně žádné, výsledky. Na druhou stranu, ačkoli nízký difúzní koeficient nebyla tato metoda schopna zjistit, vypočítané (vysoké) difúzní koeficienty byly zatížené pořád velmi malou relativní chybou měření. V následující tabulce jsou uvedeny difúzní koeficienty v závislosti na koncentraci agarózy v hydrogelu a velikosti použitých částic.

Tabulka 10: Závislost difúzního koeficientu ($\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) na velikosti částic a hmotnostní koncentraci agarózového hydrogelu pro 2f-FCS.

	0 hm. %	0,1 hm. %	0,2 hm. %	0,5 hm. %	1,0 hm. %	1,5 hm. %	2,0 hm. %
10 nm	$45,5 \pm 0,01$	$14,3 \pm 3,8$	$11,8 \pm 1,5$	$9,9 \pm 2,6$	$7,2 \pm 1,2$	$5,1 \pm 0,6$	$3,8 \pm 0,4$
30 nm	$16,5 \pm 0,02$	$10,7 \pm 1,0$	$10,4 \pm 2,2$	$8,9 \pm 1,0$	$4,7 \pm 0,7$	$1,9 \pm 0,5$	$1,1 \pm 0,4$
50 nm	$8,7 \pm 0,01$	$5,5 \pm 0,5$	$4,8 \pm 0,6$	$3,2 \pm 1,1$	$2,4 \pm 1,0$	$1,0 \pm 0,6$	$0,5 \pm 0,4$
70 nm	$6,0 \pm 0,01$	$4,7 \pm 0,4$	$2,9 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,4$	-	-	-
100 nm	$3,9 \pm 0,05$	$2,1 \pm 0,5$	$0,9 \pm 0,3$	$0,5 \pm 0,3$	-	-	-

Opět zde platí, že při zvyšující se koncentraci agarózového hydrogelu roste i směrodatná odchylka, která zobrazuje nehomogenitu prostředí. Jak je vidět z tabulky 10, i zde se dosáhlo limitní koncentrace agarózového hydrogelu pro difúzi částic při standardním nastavení. Malý rozdíl je vidět pro 50nm částice, kdy matematický skript byl schopný se dostat k číselnému výsledku i přes nízký difúzní koeficient a výsledná hodnota byla, i v porovnání s 1f-FCS, relevantní.

Pro zobrazení velmi nízkých difúzních koeficientů na hranici detekovatelnosti bylo nutné opětovně prodloužit dobu korelace až na 10 000 ms. Zde ovšem nastal problém oproti vyhodnocování v programu SymPhoTime64. Zatímco v softwaru SymPhoTime64 je možné ručně volit interval hodnot vypočítané korelační křivky, ve kterých bude probíhat analýza a výpočet difúzních koeficientů, případně zde jdou ručně zvolit meze, ve kterých se daný difúzní koeficient má hledat, v MATLAB skriptu toto možné není. Často se proto stávalo, že velmi nízký difúzní koeficient nebyl brán jako validní a skript ho nevypočítal jako jeden z možných výsledků daných matic.

Z tohoto důvodu muselo být přistoupeno k radikálnějšímu řešení, aby byl nízký difúzní koeficient jediným možným výsledkem. Tím bylo oříznutí začátku korelační křivky – jak moc, to záleželo na povaze vzorku, respektive na velikosti předpokládaného difúzního koeficientu. Čím nižší byl difúzní koeficient, tím hůře detekovatelný byl pro přístroj, respektive pak i pro skript. Počátek nové korelační křivky se tedy pohyboval od 0,001 ms pro „vyšší“ difúzní koeficient až po 0,01 ms pro nejnižší možné hodnoty difúzního koeficientu.

Tabulka 11: Posunutí mezi detekce pomocí úpravy celkového korelačního času a jeho začátku. Nově získané hodnoty jsou označeny zeleně.

	0 hm. %	0,1 hm. %	0,2 hm. %	0,5 hm. %	1,0 hm. %	1,5 hm. %	2,0 hm. %
10 nm	45,5 ± 0,01	14,3 ± 3,8	11,8 ± 1,5	9,9 ± 2,6	7,2 ± 1,2	5,1 ± 0,6	3,8 ± 0,4
30 nm	16,5 ± 0,02	10,7 ± 1,0	10,4 ± 2,2	8,9 ± 1,0	4,7 ± 0,7	1,9 ± 0,5	1,1 ± 0,4
50 nm	8,7 ± 0,01	5,5 ± 0,5	4,8 ± 0,6	3,2 ± 1,1	2,4 ± 1,0	1,0 ± 0,6	0,5 ± 0,4
70 nm	6,0 ± 0,01	4,7 ± 0,4	2,9 ± 0,3	1,4 ± 0,4	0,43 ± 0,22	0,11 ± 0,06	-
100 nm	3,9 ± 0,05	2,1 ± 0,5	0,9 ± 0,3	0,5 ± 0,3	0,17 ± 0,12	0,09 ± 0,07	-

Z tabulky je zřejmé, že úprava hodnot korelační funkce pomohla částečně zpřesnit měření ve vyšších koncentracích agarózového hydrogelu pro větší částice. Nicméně ani tato úprava nebyla schopna zajistit získání dat z nejkonzentrovanejších vzorků. Zde skript neproběhl správně, respektive naměřená data se nepodařilo proložit. U předchozí koncentrace (1,5 hm.%) byly hodnoty pro 70nm a 100nm částice (v tabulce 11 kurzívou) nepřesné z toho důvodu, že se několikrát musela upravovat datová korelační křivka, aby byl skript schopný data proložit. Proto bych se přikláníla k tomu v tomto případě metodu 2f-FCS nepoužívat, protože obdržené výsledky jsou na hranici validity.

6.5.3 Porovnání jednoohniskové a dvouohniskové FCS

Model Triplet z programu SymPhoTime64, stejně jako 2f-FCS skript v MATLABu se zahrnutým tripletem se ukazují jako velmi vhodné modely pro analýzu získaných dat. Pokud není výslovně výrobcem uvedeno, že sonda je tzv. „beztripletní“, je nutné a správné zahrnout triplet do prokládaného modelu. Dalším vodítkem pak jsou průběhy obou funkcí (autokorelačních, stejně jako křížově korelačních), které vykazují v nízkých korelačních časech charakteristický průběh.

Aby se získala představa, jak jsou na tom jednotlivé metody s přesností vůči sobě, byl změřen jeden vzorek oběma metodami. Konkrétně se jednalo o 50nm částice, abychom se vyhnuli příliš neměnnému difúznímu koeficientu (menší částice), nebo aby nedošlo k jejich přílišnému zpomalení (větší částice). V tabulce 12 je uveden průměrný difúzní koeficient a jeho směrodatná odchylka.

Tabulka 12: Porovnání jedno- a dvouohniskové FCS. Uvedeny jsou hodnoty pro 50nm částice.

mód	0 hm. %	0,1 hm. %	0,2 hm. %	0,5 hm. %	1,0 hm. %	1,5 hm. %	2,0 hm. %
1f	9,2 ± 0,5	5,3 ± 1,0	4,8 ± 1,2	3,0 ± 1,5	2,1 ± 0,7	0,7 ± 0,4	0,4 ± 0,3
2f	8,97 ± 0,02	5,6 ± 0,5	5,2 ± 0,6	3,3 ± 1,3	2,4 ± 1,0	0,9 ± 0,5	0,5 ± 0,4

Hned z měření částic ve vodě je jasně vidět, že dvouohnisková FCS je mnohem přesnější pro vyšší difúzní koeficienty. Obecně se zde relativní chyba jednoho bodu pohybovala okolo 1 % a méně. Stejně tak i směrodatná odchylka je nižší. To může být dáno velikostí konfokálního objemu, který je pro 2f-FCS mnohem větší než u 1f-FCS. V praxi by to znamenalo, že částice může svoji rychlost změnit několikrát a v průměru se nebude lišit tolik, jako by to bylo u průchodu menším objemem.

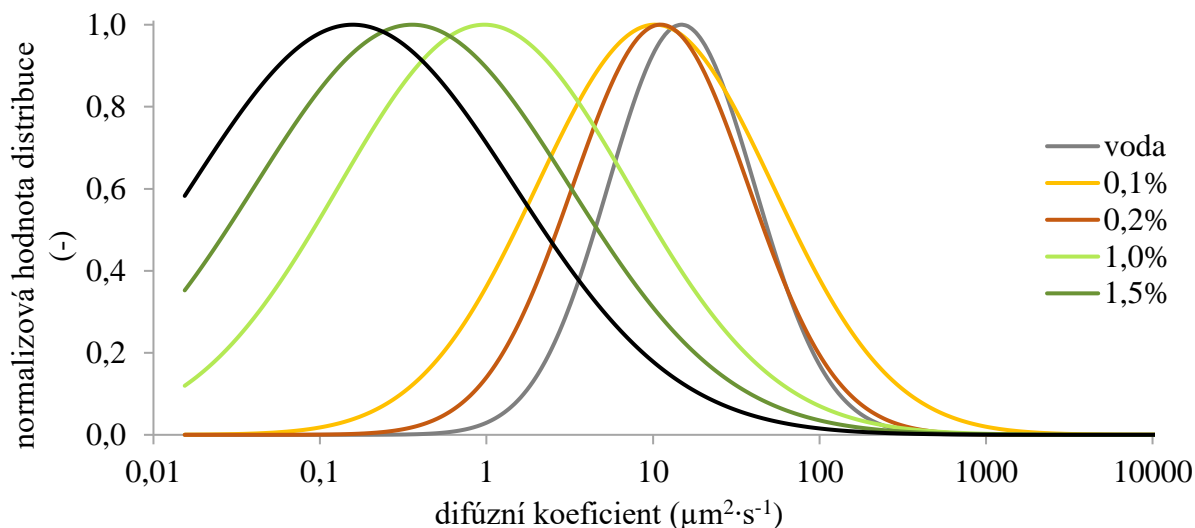
Výsledkem měření je, že pokud je difúzní koeficient větší nebo roven $1 \mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$, pak je vhodné použít dvouohniskovou FCS díky její nízké relativní chybě a přesnosti výsledků. Pro nižší difúzní koeficienty by bylo lepší používat jednoohniskovou FCS, protože zde je operátor schopný ovlivnit výsledek měření různými následnými úpravami při analýze, volbou matematického modelu a lze se touto metodou dostat i nižším hodnotám difúzního koeficientu.

6.5.4 Alternativní metody vyhodnocení

Jako alternativní metody vyhodnocení dat získaných pomocí FCS byly využívány dva rozdílné distribuční přístupy. Prvním z nich je proložení získaných autokorelačních funkcí pomocí log-normálního distribučního modelu, který je součástí modelu autokorelační funkce. Dalším přístupem je tzv. metoda maximální entropie, která neposkytuje přímo parametry proložení, ale výstupem je distribuce pravděpodobnosti difúzních koeficientů. Pro získání konkrétních parametrů byly získané distribuce z MEM analýzy proloženy v programu OriginPro log-normálním modelem, protože tento model je považován za vhodný k popisu distribuční závislosti velikosti částic, a tedy i difúzních koeficientů.

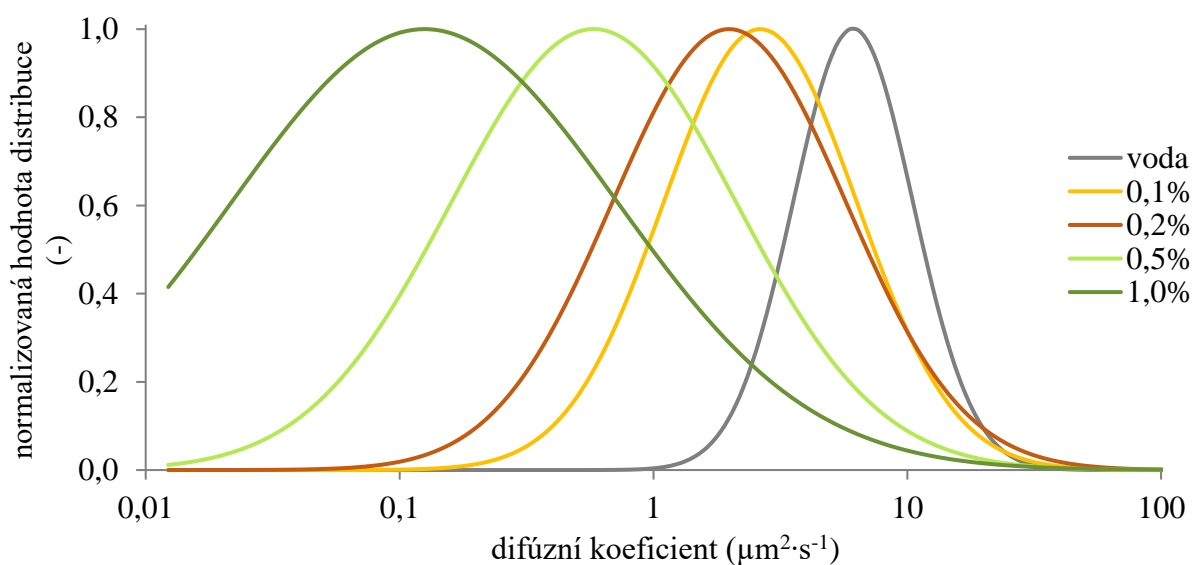
6.5.4.1 Log-normální distribuce difúzních koeficientů

V programu QuickFit 3.0 byly proloženy získané autokorelační funkce pomocí modelu normální difúze (rovnice (5)), která zahrnovala i log-normální distribuční model. Následující grafy (obrázky 29 až 31) shrnují normalizované průběhy hodnot distribuční funkce na difúzním koeficientu. Výstupem toho modelu je pak například medián závislosti vyjadřující střední hodnotu koeficientu distribuce.



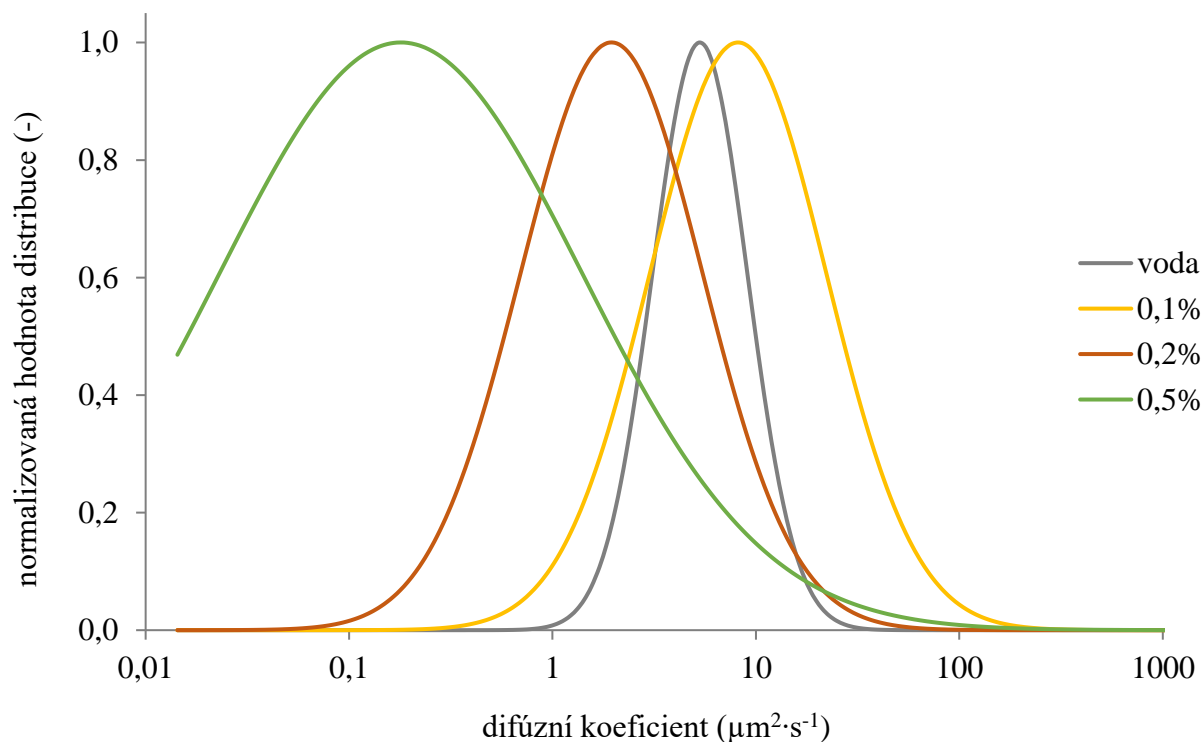
Obrázek 29: Normalizovaná log-normální distribuce pro 10nm částice v různě koncentrovaném agarózovém systému.

Jak lze vidět ze získaných křivek distribucí pro 10nm částice, s rostoucí koncentrací se medián závislosti posouvá k nižším difúzním koeficientům a šířka distribuce se zvětšuje. Využití tohoto modelu je do jisté míry závislé na vstupních datech, kdy u některých u některých koncentrací agarózy (konkrétně 0,5 hm. %) nebylo možné získat smysluplnou distribuci difúzních koeficientů ani po vynechání například začátku křivky. Velmi obtížně se vyhodnocují i data, kde je dominantní zastoupení tripletního stavu. V tomto případě standardní vyhodnocení (Pure diffusion model) poskytuje robustnější, fyzikálně smysluplnější výsledky, i když se ztrácí potenciální informace o šířce distribuce.



Obrázek 30: Normalizovaná log-normální distribuce pro 50nm částice v různě koncentrovaném agarózovém systému.

Obrázek 30 ukazuje distribuce difúzních koeficientů pro 50nm částice, kdy vyhodnocení bylo možné provést jen do koncentrace agarózy 1 hm. %. Nad touto hranicí nebyl již skript schopný vyhodnocení případně vykazoval distribuci ve fyzikálně nerelevantní oblasti, zejména umisťoval medián distribuční funkce do časové oblasti tripletních/nefluorescentních procesů. V oblasti 0–1 hm. % posun mediánu distribuce a postupný nárůst její šířky poskytuje obdobný pohled na chování systému jako u části o velikosti 10 nm.

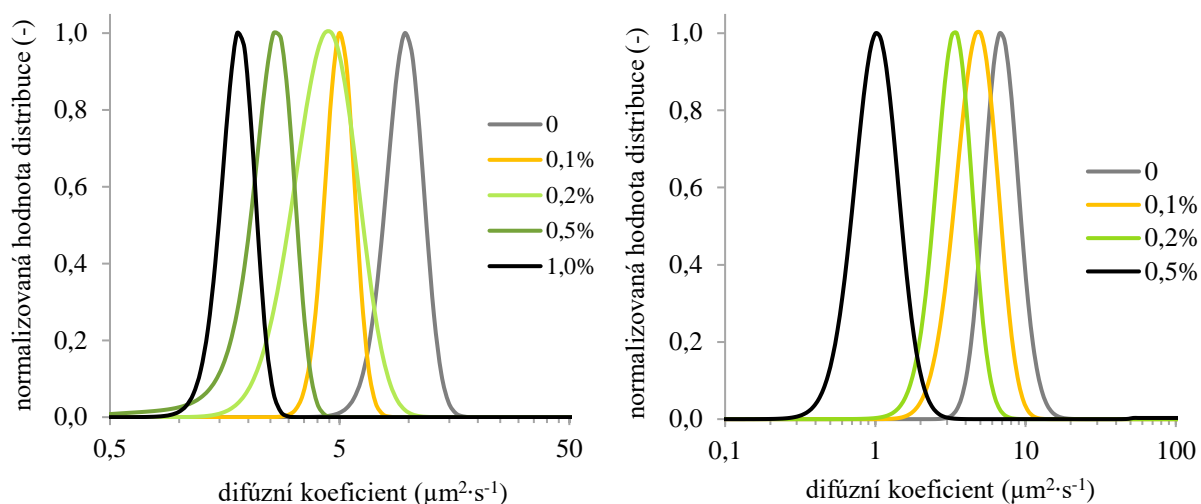


Obrázek 31: Normalizovaná log-normální distribuce pro 70nm částice v různě koncentrovaném agarózovém systému.

U částic o velikosti 70 nm pak bylo možné získat distribuce difúzních koeficientů jen do celkové koncentrace 0,5 hm. %, kdy výsledné závislosti shrnuje obrázek 31. I zde se vyskytl problém, že distribuce byla algoritmem umisťována do oblasti velmi krátkých časů, případně selhal celý proces prokládání. Celkové selhání algoritmu prokládání bylo zejména patrné, pokud hodnota $G(0)$ byla velmi nízká, typicky menší než 0,05 a byla zatížena velkou chybou. Nicméně u proložitelných vzorků lze opět konstatovat, že změna tvaru distribuce odpovídá závislostem ukázaných pro částice o velikosti 10 a 50 nm.

6.5.4.2 MEM distribuce difúzních koeficientů

Opět v programu QuickFit 3.0 byly proloženy získané autokorelační funkce, pomocí metody maximální entropie (MEM). Následně získané závislosti byly proloženy v programu OriginPro klasickým log-normálním distribučním modelem, protože lze předpokládat, že pro lokální populaci difúzních koeficientů tento model poskytuje realistický obraz. Následující grafy zobrazené na obrázku 32 shrnují normalizované průběhy hodnot distribuční funkce z MEM metody na difúzním koeficientu. Z průběhů lze opět vidět, ve srovnání s předchozím typem analýzy, že se distribuce posunuje s rostoucí koncentrací k nižším difúzním koeficientům a závislosti vykazují širší charakter.



Obrázek 32: Distribuce difúzních koeficientů získaných Metodou maximální entropie pro částice o velikosti 50 nm (vlevo) a 70 nm (vpravo) pro různé koncentrace agarózy.

V tabulce 13 je ukázáno srovnání vyhodnocení standardním postupem jednoohniskové FCS a metodou MEM. Jak lze vidět, metoda MEM poskytuje podobné výsledky difúzních koeficientů (medián proložených závislostí) jako jednoohniskový přístup. Větší odchylky lze nalézt u vyšší koncentrace agarózy, kdy je standardní model vyhodnocení zatížen větší relativní chybou. Nízké odchylky u proložení MEM distribuce ukazují, že zvolený přístup vyhodnocení je vhodný a difúzní koeficienty v těchto lokálních populacích opravdu vykazují log-normální rozdělení.

Tabulka 13: Porovnání závislosti hodnoty stanoveného difúzního koeficientu ($\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) pro částice o velikosti 50 nm na hmotnostní koncentraci agarózového hydrogelu pro standardní vyhodnocení jednoohniskové FCS a pro metodu maximální entropie.

mód	0 hm. %	0,1 hm. %	0,2 hm. %	0,5 hm. %	1,0 hm. %
1f	$9,2 \pm 0,5$	$5,3 \pm 1,0$	$4,8 \pm 1,2$	$3,0 \pm 1,5$	$2,1 \pm 0,7$
MEM	$9,93 \pm 0,01$	$5,11 \pm 0,01$	$4,8 \pm 0,02$	$2,68 \pm 0,01$	$1,19 \pm 0,01$

Výhodou MEM analýzy je i získání příslušné distribuce difúzních koeficientů. U získaných dat byl díky tomu spočítán i index polydispersity, a to jako druhá mocnina poměru odlogaritmovaného „w“ (logaritmická šířka distribuce) a mediánu distribuce. Na této hodnotě lze demonstrovat postupné rozšiřování distribuce difúzních koeficientů s rostoucí koncentrací agarózy (Tabulka 14).

Tabulka 14: Porovnání stanoveného difúzního koeficientu ($\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) pro částice o velikosti 50 nm a 70 nm na hmotnostní koncentraci agarózového hydrogelu získané metodou maximální entropie.

částice	koncentrace agarózy (hm. %)	medián ($\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$)	w ($\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$)	PDI
50 nm	0	$9,93 \pm 0,02$	$0,186 \pm 0,002$	0,024
	0,1	$5,11 \pm 0,01$	$0,147 \pm 0,001$	0,075
	0,2	$4,80 \pm 0,02$	$0,315 \pm 0,003$	0,185
	0,5	$2,68 \pm 0,01$	$0,206 \pm 0,002$	0,360
	1,0	$1,19 \pm 0,01$	$0,165 \pm 0,002$	1,532
70 nm	0	$7,39 \pm 0,01$	$0,262 \pm 0,001$	0,061
	0,1	$5,23 \pm 0,02$	$0,319 \pm 0,030$	0,159
	0,2	$3,58 \pm 0,01$	$0,278 \pm 0,002$	0,281
	0,5	$1,13 \pm 0,01$	$0,337 \pm 0,002$	3,697

Pokud srovnáme výše uvedené způsoby vyhodnocení, lze v tomto případě jednoznačně určit metodu maximální entropie jako vhodnější ve srovnání s modelem difúze, který předpokládá log-normální distribuci difúzních koeficientů. MEM analýza poskytuje reálnější obraz distribuce difúzních koeficientů, protože výsledkem může být i multimodální distribuce, která ukazuje na různé „difúzní populace“, které mohou být například tvořeny skupinami různě difundujících částic.

Tato metoda je nicméně velmi citlivá na vstupní parametry, kterými jsou kappa faktor (excentricita) konfokálního objemu, hodnota $G(t \rightarrow \infty)$ případně dobu života tripletního stavu a jeho relativní zastoupení. Tyto parametry musí být získány pomocí konvenční analýzy, protože například $G(t \rightarrow \infty)$ je nemožné z průběhu distribuce odhadnout. Pokud jsou tyto parametry správně zadány, MEM analýza prokáže jednotlivé populace difúzních koeficientů a šířku jejich distribuce. To je největší přínos ve srovnání s konvenční analýzou, kde jsou data testována na přítomnost jednotlivých populací (difúzních koeficientů) a je na operátorovi, aby rozhodl, kolik difúzních koeficientů má algoritmus hledat (se zahrnutím případných tripletních a ostatních nefluorescentních stavů).

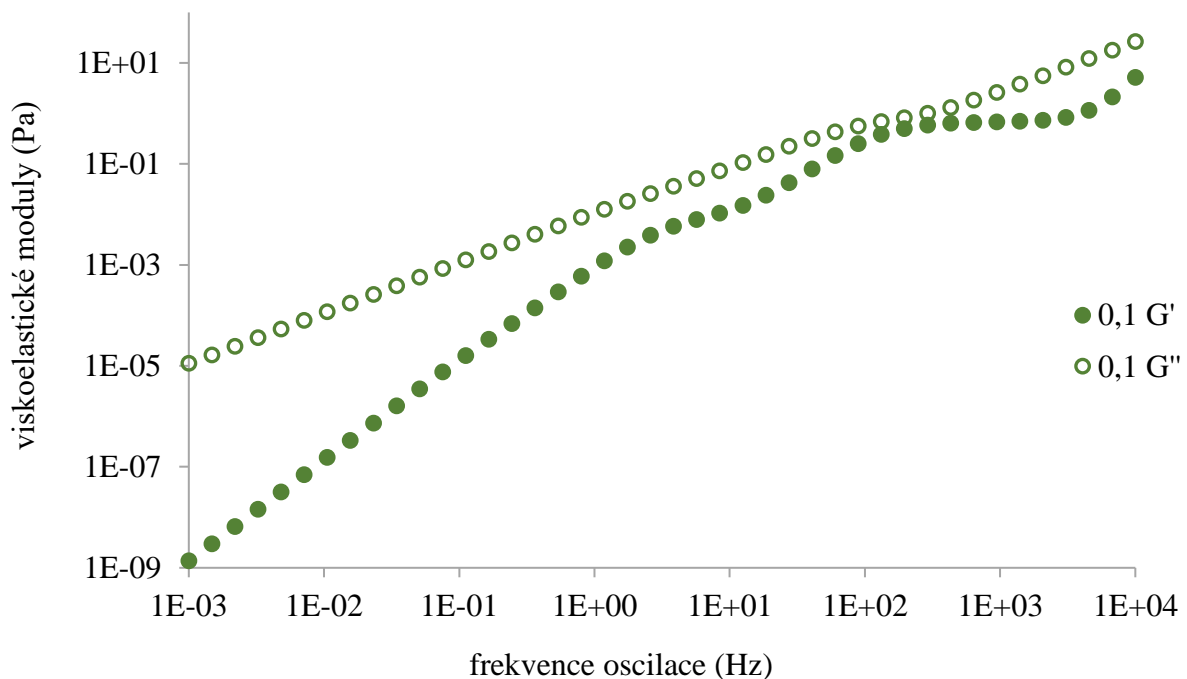
Model předpokládající log-normální distribuci pak poskytuje pouze unimodální distribuci a je tak vhodný pro vzorky s nízkou polydisperzitou, respektive obsahuje pouze jednu populaci difúzních časů/difúzních koeficientů/velikostí. V literatuře lze nalézt, že byl tento model verifikován právě pomocí MEM analýzy, a to například u studia emulzí [20], kdy byly srovnávány průběhy distribucí získané oběma metodami.

6.5.5 Přepočítání MSD křivek na reologické moduly

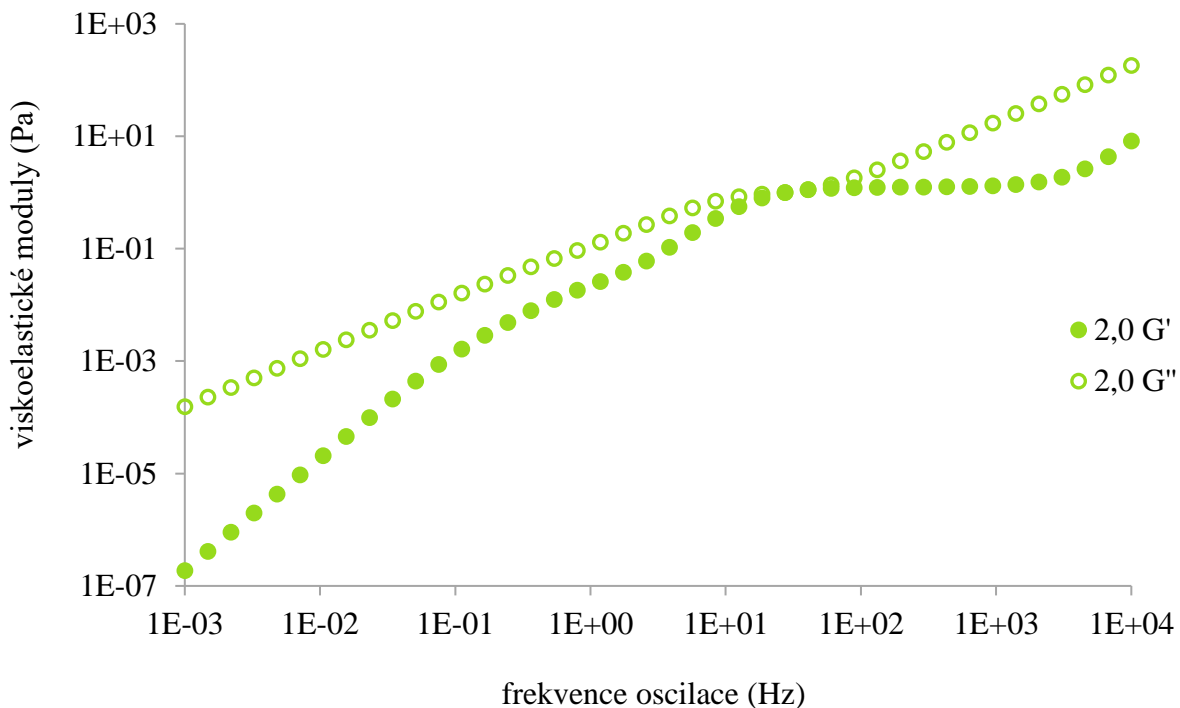
Další informace, které je možné z naměřených dat získat, jsou reologické moduly, čímž tato technika spadá do oblasti (pasivní) mikrereologie. Oproti klasické reologii je tato metoda

použitelná pro velmi malé množství vzorku, případně tam, kde je měřené prostředí těžko dostupné a jeho separací by došlo k částečné nebo úplné degradaci vzorku (velmi často biologické vzorky, kdy je takto možné měření uvnitř cytoplasmy). Konvenční reometry aplikují relativně vyšší napětí na velkou plochu a mají za následek makroskopickou deformaci, což vede k průměrné objemové odezvě, ale chybí některé strukturální detaily pro ty prostorově heterogenní nebo vícefázové systémy. Některé systémy jsou navíc křehké, takže vložené vyšší napětí nevyhnutelně narušuje měřený systém a vede ke zkresleným informacím. Další výhodou mikroreologie je i vyšší rozsah frekvencí, kdy u konvenční reologie se dosahuje maximálně desítek hertzů, oproti mikroreologii, kde je možný rozsah frekvencí (10^{-3} - 10^5 Hz) [118]. Je tak možno získat široké viskoelastické spektrum, které u konvenční reologie je získáváno pomocí tzv. časově-teplotní superpozice [119].

Cílem těchto přepočtů bylo prokázat, jestli je průběh mikroreologických dat porovnatelný s makroreologickými experimenty. Původní naměřená autokorelační křivka byla převedena algoritmem na MSD křivky (rovnice (36)), který je na Fakultě chemické VUT v Brně používán delší dobu a několikrát byla ověřena jeho validita. Z těchto dat se jednoduchým přepočtem získala poddajnost J (rovnice (38)), která se následně pomocí softwaru Rheology Advantage Data Analysis (kapitola 5.6.2) a v něm daného postupu převedla na reologické moduly, které jsou zobrazeny na následujících obrázcích 33 až 36.

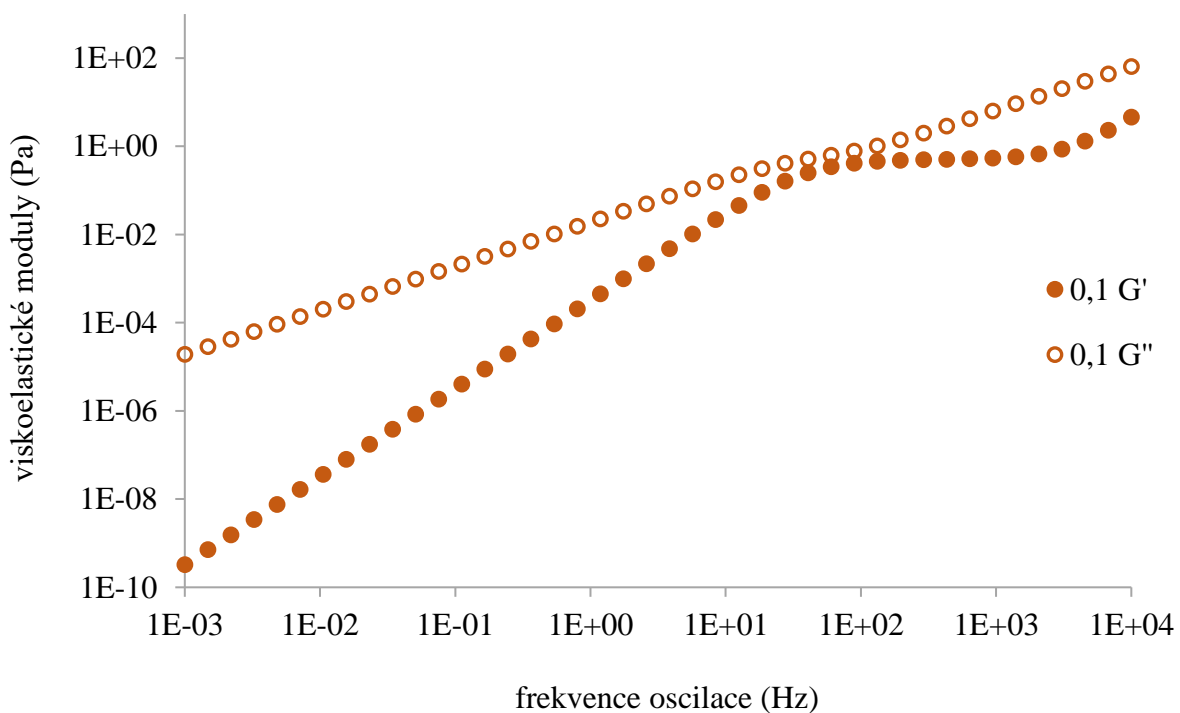


Obrázek 33: Viskoelastické moduly pro 10nm částice v 0,1% agarózovém hydrogelu.

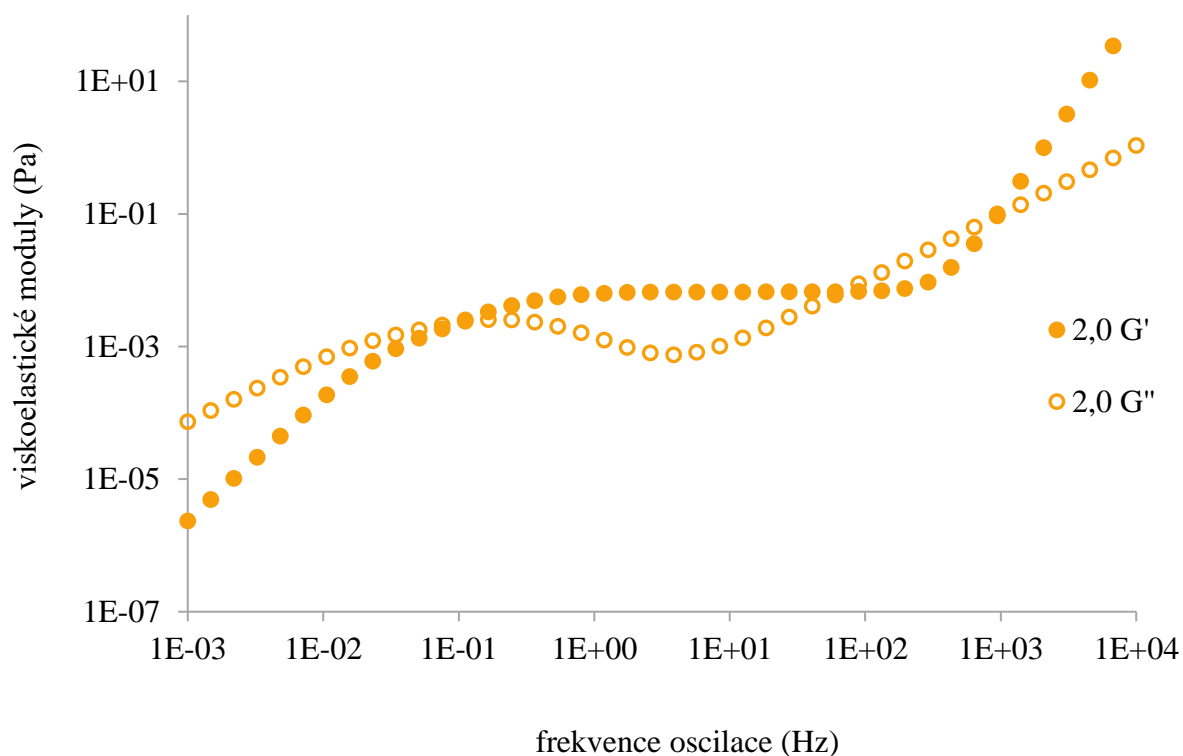


Obrázek 34: Viskoelastické moduly pro 10nm částice v 2% agarózovém hydrogelu.

Když se porovnají oba grafy uvedené na obrázcích 33 a 34, je jasně patrné, že nejmenší částice vnímají gel v celém rozsahu koncentrací jako převážně viskózní kapalinu. Ani v jednom případě zde nedošlo k situaci, kdy by paměťový modul G' byl větší než ztrátový modul G'' , ačkoli v nejvyšší koncentraci dochází k potkání obou křivek.



Obrázek 35: Viskoelastické moduly pro 100nm částice v 0,1% agarózovém hydrogelu.



Obrázek 36: Viskoelastické moduly pro 10nm částice v 2% agarózovém hydrogelu.

Obrázky 35 a 36 zobrazují obě krajní koncentrace popisované největšími v této práci používanými fluorescenčními nanočásticemi. V případě nejnižší koncentrace se okolní prostředí chová stále jako viskózní látka, kdy ztrátový modul je v celém spektru nad úrovní paměťového modulu. V oblasti nejvyšších koncentrací (zde je uvedena pouze nejvyšší měřená koncentrace, což jsou 2 hm. %) dochází k postupnému zakřivení obou křivek, což odpovídá klasickému viskoelastickému chování. Je zde velmi dobře patrná oblast elastického chování gelu (plateau zone), kdy G' je vyšší než G'' .

Tato data byla srovnávána i s daty z konvenčního reometru. Bylo zjištěno, že průběh křivek vzájemně odpovídá, ale samotné hodnoty modulů získaných z mikroeologických experimentů jsou o několik řádů nižší oproti datům, která poskytuje klasická (makro) reologie [120, 121].

6.5.6 FLIM agarózového hydrogelu

Fluorescenční mikroskopie je vhodným nástrojem pro zobrazení struktury zkoumaného vzorku. Pro hydrogely se zde nabízí dva typy měření – buď se připraví hydrogel vždy s jedním typem částic, nebo se připraví směs částic, která se smíchá s hydrogelem. Oba typy měření mají své výhody a nevýhody. Výhodou prvního je homogenita získaných výsledků, kdy díky absenci jiných fluoroforů nemůže dojít ke kontaminaci výsledků emisí jiného fluoroforu. Velkou nevýhodou je fakt, že se měří pokaždé jiný vzorek, tedy struktura hydrogelu je sice podobná, ale nikdy ne naprosto stejná.

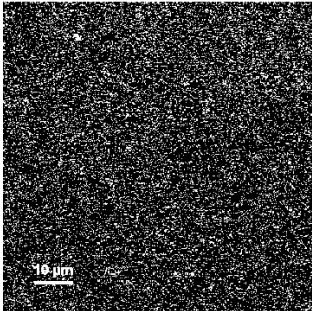
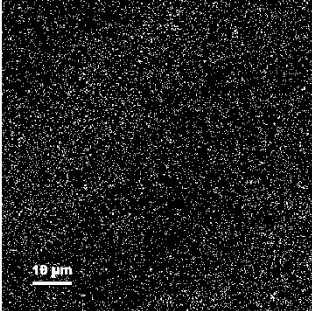
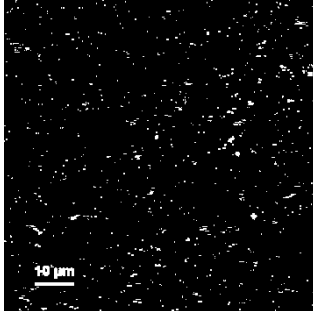
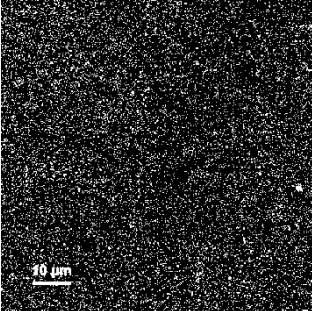
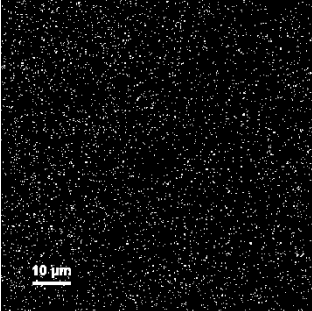
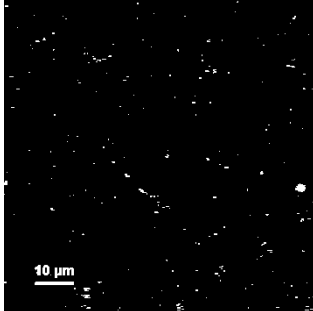
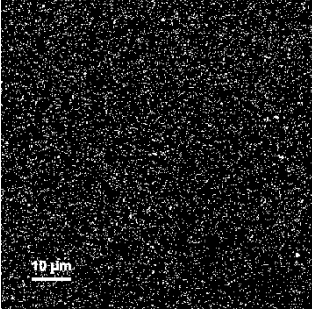
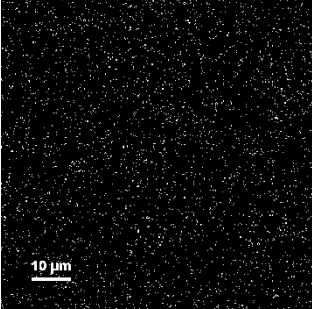
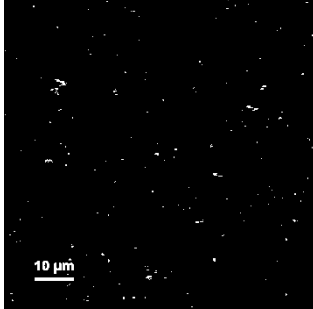
Pro zobrazení struktury v jednom vzorku je tedy vhodnější použít směs nanočástic o různých velikostech. Hlavní nevýhodou této možnosti je, že kvůli přítomnosti více fluoroforů může dojít ke zkreslení výsledků emisí pocházející z jiného fluoroforu. Aby se co nejvíce eliminovala tato možnost, byly vybrány fluorofory buď s jinou vlnovou délkou excitace a emise, nebo byla excitační a emisní vlnová délka stejná, ale částice se od sebe lišily dobou

života fluorescence. Pro toto měření bylo nutné měřit na více detektorech, tedy další chyba mohla vzniknout i kvůli různé citlivosti a nastavení detektoru.

6.5.6.1 Měření velikostí jednotlivě

Jak bylo zmíněno výše, při měření pouze jedné velikosti částic ve vzorku, bylo možné použít pouze jeden detektor a výsledky pak mezi sebou alespoň porovnat.

Tabulka 15: Zobrazení distribuce nanočástic pro různé velikosti a v různě koncentrovaných hydrogelech

Koncentrace agarózového gelu (hm. %)	10nm částice	50nm částice	100nm částice
0,25			
0,5			
1,0			

Jak je poměrně zřetelně vidět, s narůstající koncentrací i velikostí částic se mění distribuce ve vzorku. Pokud výsledky budou hodnoceny z pohledu získání informace o struktuře gelu, tak 10 nm částice neposkytují žádné relevantní informace, protože jsou prodlifundované téměř homogenně skrz celý hydrogel. Větší částice už jsou situovány pouze v místech s vhodnou velikostí póru. Na základě tohoto můžeme říct, že většina vzniklých pórů je větších než 10 nm,

kdy tyto částice mohly bez většího omezení difundovat skrz celý hydrogel. Díky větším částicím je pak možné následně určovat, kde jsou póry prostupné pro jednotlivé velikosti.

6.5.6.2 Měření všech velikostí zároveň

Pro experimenty je samozřejmě vhodnější, když se sníží množství možných vlivů způsobujících odchylku měření na minimum. Z toho důvodu se připravila směs nanočástic o různých velikostech, která byla smíchána s hydrogelem. Díky tomu je možné sledovat strukturu jednoho vzorku ve stejném místě, tedy výsledky jsou vzájemně porovnatelné.

Tabulka 16: Ověření tabelovaných dob života fluorescence barviva AlexaFluor® v různých koncentrovaných hydrogelech

Průměr částic	Tabelované hodnoty fluoroforu AlexaFluor®		Doba života fluorescence (ns)			
	Doba života (ns)	Kvantový výtěžek (-)	0,25 % gel	0,5% gel	1,0% gel	1,5% gel
10 nm	4,1	0,92	4,10 ± 0,10	4,07 ± 0,10	3,91 ± 0,04	4,00 ± 0,10
50 nm	2,5	0,61	2,41 ± 0,09	2,38 ± 0,02	2,48 ± 0,01	2,48 ± 0,01
100 nm	1,2	0,36	1,18 ± 0,07	1,34 ± 0,06	1,25 ± 0,07	1,92 ± 0,01

Pro 10nm nanočástice byla pozorována ještě druhá doba života okolo 1 ns. Tato doba života by mohla odpovídat rezonančnímu přenosu energie, ovšem je ještě nutná verifikace. U ostatních fluoroforů byla zjištěna pouze jedna doba života. U 100nm nanočástic je nápadný prudký nárůst doby života v koncentrovanějším hydrogelu. V nižších koncentracích se doba života pohybuje okolo 1,25 ns, což je lehce nad tabelovanou hodnotou, ovšem stále v rámci chyby přístroje.

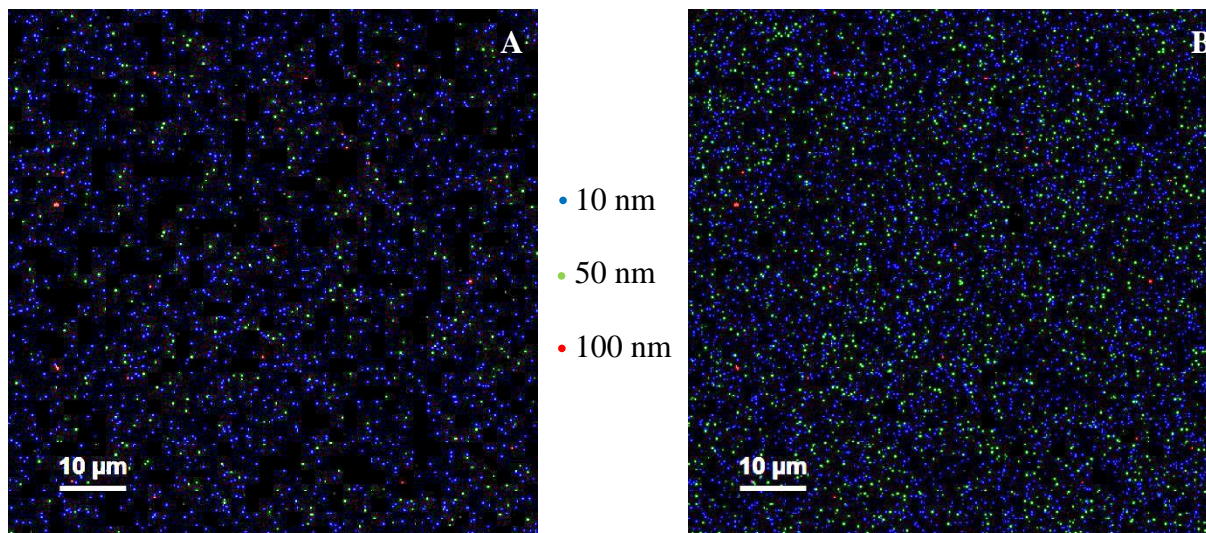
Díky rozdílné době života při stejné excitační vlnové délce 10nm a 50nm nanočástic bylo možné měření a analýza jejich směsi v rámci jednoho FLIM obrázku. Nicméně matematická analýza zpočátku nerozeznala krátkou komponentu patřící 10nm částicím od doby života fluorescence 50nm částic. Z tohoto důvodu bylo potřeba zadat hodnotu pro 50nm částice ručně, kdy se dopočítaly zbylé dvě.

Tabulka 17: Doby života fluorescence pro 10nm nanočástice

Koncentrace gelu (hm. %)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_3 (ns)
0,5	4,28 ± 0,05	2,3	0,94 ± 0,05
1,0	4,26 ± 0,04	2,3	0,98 ± 0,09
1,5	4,35 ± 0,05	2,3	0,88 ± 0,01

Měřit a analyzovat směs částic v hydrogelu je také možné více způsoby. Nejpřesnějším je snímat na každém detektoru jeden typ částic, vyhodnotit každý zvlášť a až ve finální analýze obrázky sloučit do jednoho (obrázek 37A).

Druhým typem je měření opět na dvou detektorech, ale při skenování se data ukládají do společného obrázku (obrázek 37B). Poté pomocí TCSPC analýzy se matematicky od sebe oddělí doby života, které se pak zobrazí na RGB, kdy pro každou dobu života je jiná barva. Nevýhodou je, že takto lze snímat maximálně tři typy částic zároveň. Navíc zde může dojít k nesprávné, respektive méně přesné matematické analýze a oddělení dat.



Obrázek 37: Porovnání dvou typů vyhodnocení stejného vzorku měřeného ve stejném místě. Na obrázku vlevo (A) jsou tři FLIM obrázky zkombinované do jednoho. Zde se vyhodnotila každá velikost částic TCSPC analýzou zvlášť, tedy by měla být přesnější. Na obrázku vpravo (B) je kombinace 10nm a 50nm částic snímaných dvěma detektory, ale uložených jako jeden FLIM obraz. Matematickou analýzou pak byly od sebe tyto doby života odděleny.

Ačkoli se při vyhodnocení vyskytly i další doby života, pro daný experiment spíše balastní, je dobré vědět, že sice jejich relativní zastoupení je stejné nebo vyšší než zastoupení doby života pocházející přímo z fluoroforu, ale jejich intenzita je ve většině případů mnohem nižší. Bez těchto dob života ale fit nebyl zcela přesný, proto bylo nutné s nimi v analýze pracovat. Viz příklad v následující tabulce pro 50nm částice v 1,5% agarózovém gelu.

Tabulka 18: Příklad dvou dob života fluorescence jednoho fluoroforu, jejich relativní zastoupení a intenzita

Doba života (ns)	Relativní zastoupení (kCnts)	Intenzita fluorescence (kCnts)
$2,500 \pm 0,002$	$0,370 \pm 0,005$	$116,0 \pm 1,7$
$0,018 \pm 0,005$	$13,0 \pm 1,9$	$29,0 \pm 3,6$

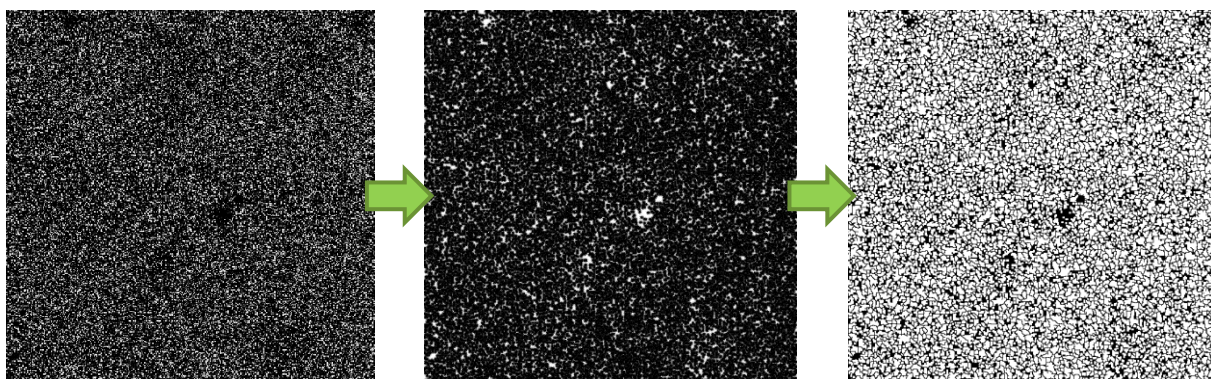
Je také zajímavé, že někde se vyskytují pouze 10nm částice. Zde se nabízí otázka, jestli je možné, aby danou část gelu vyplnily pouze 10nm částice a ostatní částice jiných velikostí musely z důvodu zaplnění póru difundovat skrz polymerní síť dále. Také je možné, že se v daném místě vyskytují oba, případně všechny tři fluorofory, ale pouze jeden má dostatečně silnou intenzitu fluorescence.

6.5.7 Analýza pomocí programu ImageJ

Díky fluorescenční mikroskopii je možné získat podstatné informace o struktuře vzorku. Samotný software propojený s mikroskopem ale už kromě obrazu další informace není schopný dodat.

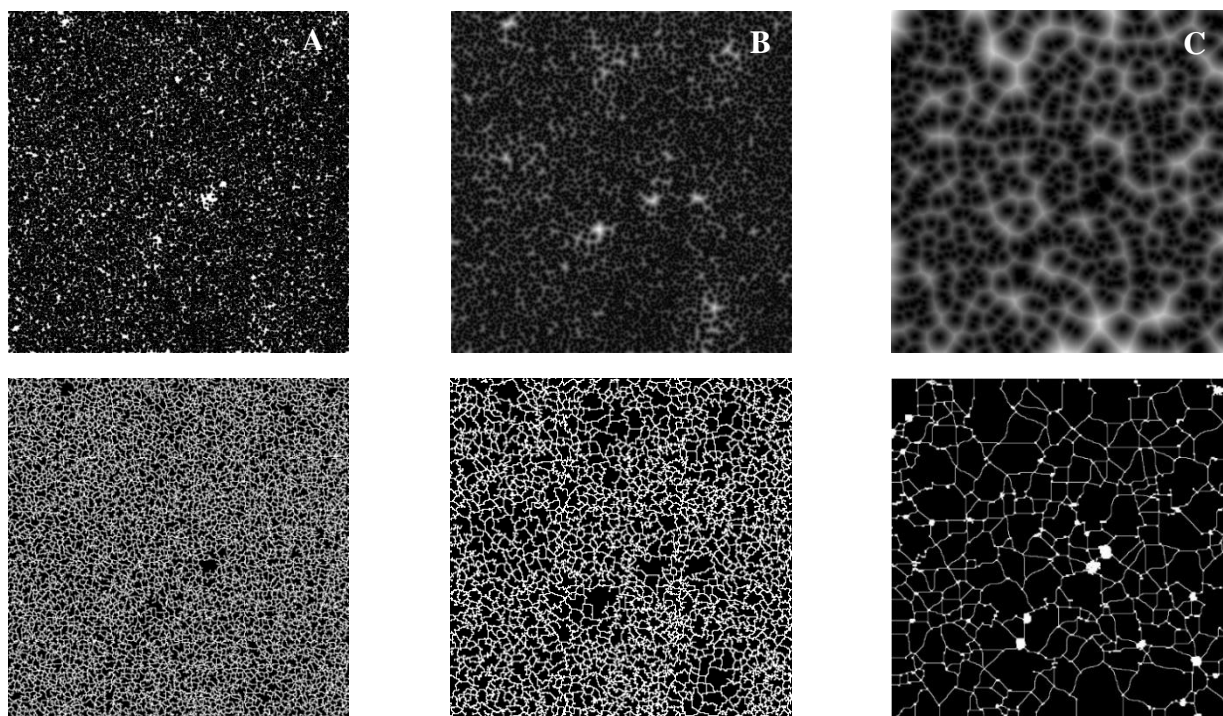
Pro pokročilou obrazovou analýzu byl použitý software ImageJ, který umožnil z naměřených dat vypočítat pravděpodobnou vzdálenost mezi jednotlivými body, díky čemuž je možné alespoň přibližně určit velikost pórů v daném hydrogelu.

Pro potřeby softwaru není vhodné měřit všechny velikosti zároveň, protože se zde pracuje pouze v černobílé variantě, tedy s pozadím a jedním typem částic. Na obrázku 38 je znázorněný převod FLIM obrazu na mapu pomocí eukleidovské metriky.



Obrázek 38: Postup analýzy z FLIM obrázku (vlevo) po mapu rozložení částic (EDM) v programu ImageJ (vpravo) pro částice o průměru 10 nm v 1% agarózovém hydrogelu.

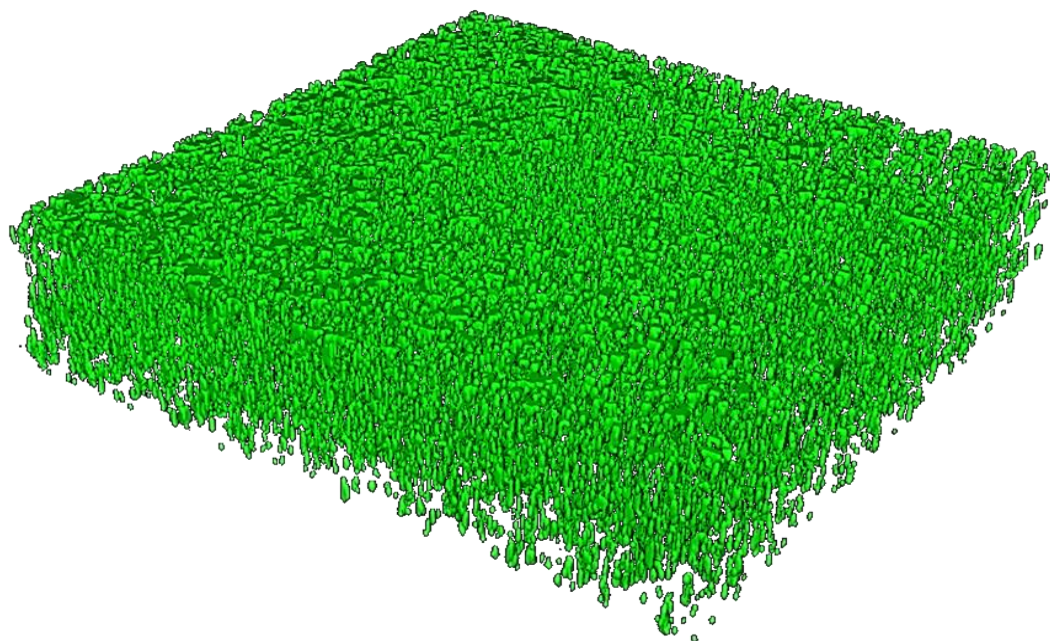
Stejná matematická analýza byla provedena i pro ostatní typy částic. Na následujícím obrázku jsou zobrazeny všechny měřené částice v 1% agarózovém hydrogelu.



Obrázek 39: Rozložení částic v 1% agarózovém hydrogelu. Zleva 10nm částice (A), 50nm částice (B) a 100nm částice (C).

Horní řada zobrazuje pouze pravděpodobnost rozložení částic, zatímco ve druhé řadě je mapa rozložení částic (EDM). Na základě takovéto obrazové analýzy lze zjistit pravděpodobné rozložení částic, tedy se dá předpovědět přibližná velikost pórů v daném místě. Při zobrazení velkých částic už je zformovaná jakási struktura hydrogelové sítě. Při použití menších částic jsou tyto částice rozmístěny přibližně rovnoměrně v rámci celého vzorku. Další možností je použít méně koncentrovaný roztok částic pro obarvení zkoumaného hydrogelu. Tím pádem by póry nebyly tolik přeplněné, proto by mohla více vyniknout struktura gelu.

Další možností obrazové analýzy je převod řezů získaných metodou FLIM na 3D obraz. Tím lze docílit reálné představy toho, jak vypadá rozložení pórů uvnitř hydrogelu. Zde je potřeba zvážit, jaká koncentrace fluorescenčních částí bude pro obarvení vzorku vhodná, aby nedošlo k ovlivnění struktury sítě vlivem velikosti částic. Také je potřeba vzít v úvahu, že se jedná o časové měření, kdy veškerý pohyb částic je nežádoucí. Proto byla zvolena kombinace velikosti částic a koncentrace agarózového hydrogelu, aby difúzní koeficient byl co nejnižší. Nejprve bylo změřeno několik ploch hydrogelu nad sebou (pomocí funkce z-sken), které byly následně extrapolací převedeny na 3D obraz.



Obrázek 40: 3D obraz agarózového hydrogelu (50nm částice v 1,5% gelu) poskládaný z FLIM obrazů získaných pomocí z-skenů. Rozměry skenované plochy jsou 80 x 80 μm , výška je 20 μm .

6.5.8 Další způsoby přípravy hydrogelu s nanočásticemi

Ne všechny částice jsou termostabilní, aby bylo možné použít způsob přípravy popsany v kapitole 5.4.3. Z toho důvodu byly testovány jiné způsoby přípravy agarózového gelu s fluorescenčními nanočásticemi.

6.5.8.1 Difúze nanočástic z povrchu hydrogelu

Hydrogely díky jejich specifickým vlastnostem zastávají nezanedbatelnou roli v medicínských aplikacích, kdy fungují jako ochrana inkorporovaných látek a jako dávkovací systém. Jedním z mnoha využití hydrogelů je uvolňování látky z polymerní sítě. Aby se látky mohly uvolnit, musí se v první řadě do hydrogelu nějakým způsobem dostat. Ne vždy je možné připravit přímo hydrogel s biologicky aktivní látkou, existují případy, kdy se látka začlení do struktury až

po vytvoření polymerní sítě. Jednou z možností je průnik částic přímo z povrchu hydrogelu dovnitř struktury.

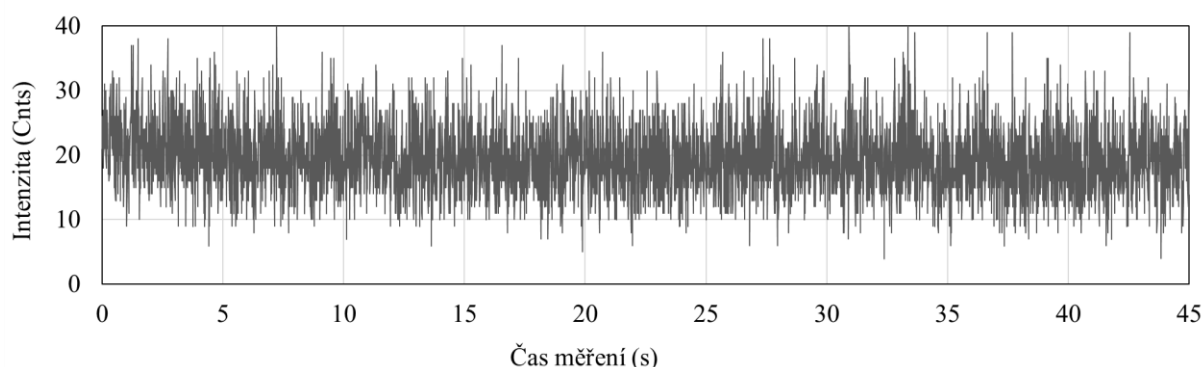
V našem případě byly jako model biologicky aktivní látky použité fluorescenční částice s neutrálním povrchovým nábojem, které byly napipetovány na povrch hydrogelu. Bylo nutné minimalizovat kontakt se vzduchem, aby nedošlo k vysychání hydrogelu, pokud by se částice nechaly difundovat delší dobu. Z tohoto důvodu byly všechny držáky se vzorkem po dobu experimentu překryty parafilmem. Koncentrace částic, výsledný objem fluorescenční směsi a objem hydrogelu byl zvolen tak, aby se zamezilo naředění gelu roztokem částic, aby byla zaručena pravděpodobnost průchodu částic do gelu (velikost částic vs. velikost pórů) a aby celý povrch hydrogelu byl zalitý roztokem (zamezení oschnutí povrchu).

Celková doba difúze byla 48 hodin. Tento čas byl zvolen na základě výpočtu, kdy částice s nejnižším validně měřitelným difúzním koeficientem ($D = 0,1 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) by měly prodifundovat skrz hydrogel s výškou jeden centimetr během 28 hodin.

Tabulka 19: Difúzní koeficienty po difúzi částic do hydrogelu z povrchu hydrogelu.

Čas difúze (hod)	Velikost částic (nm)	Koncentrace hydrogelu (hm. %)	Difúzní koeficient ($\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	cpm ($\text{cnts} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{molecule}^{-1}$)
6	30	0,1	0,82 ± 0,68	3723 ± 72
		0,2	0,96 ± 0,73	2562 ± 81
		0,5	384 ± 219	2508 ± 63
		1,0	500 ± 380	2381 ± 57
	50	0,1	365 ± 198	4414 ± 112
		0,2	476 ± 121	3876 ± 97
		0,5	514 ± 394	3384 ± 79
		1,0	573 ± 351	2897 ± 81
	100	0,1	381 ± 279	3891 ± 66
		0,2	416 ± 313	3465 ± 76
		0,5	525 ± 364	3018 ± 79
		1,0	601 ± 426	2934 ± 48
48	30	0,1	8,7 ± 0,4	1046 ± 95
		0,2	7,8 ± 0,3	1562 ± 91
		0,5	421 ± 20	15,3 ± 6,4
		1,0	606 ± 31	6,1 ± 2,7
	50	0,1	467 ± 233	21,8 ± 3,2
		0,2	491 ± 386	13,6 ± 2,9
		0,5	614 ± 425	7,4 ± 1,1
		1,0	622 ± 483	3,1 ± 0,7
	100	0,1	558 ± 413	9,7 ± 2,6
		0,2	604 ± 422	8,1 ± 1,4
		0,5	659 ± 487	1,3 ± 0,4
		1,0	648 ± 442	1,1 ± 0,2

Na první pohled je patrné, že je měření zatíženo obrovskou chybou a naměřené difúzní koeficienty neodpovídají difundujícím nanočásticím. Ačkoli vyhodnocení by mohlo být interpretováno způsobem, kdy velmi rychlé difúzní koeficienty budou považované za fotovybělování, případně nějakou další velmi rychlý fotofyzikální proces, při pohledu na záznam intenzity fluorescence se jako pravděpodobnější jeví jiné vysvětlení. Z naměřené fluktuace intenzity (Time Trace) bylo patrné, že pro jiné, než 30nm částice v nejnižší koncentraci se nejedná o fluorescenční signál pocházející z použitých nanočástic, ale jedná se o molekulární difúzi.

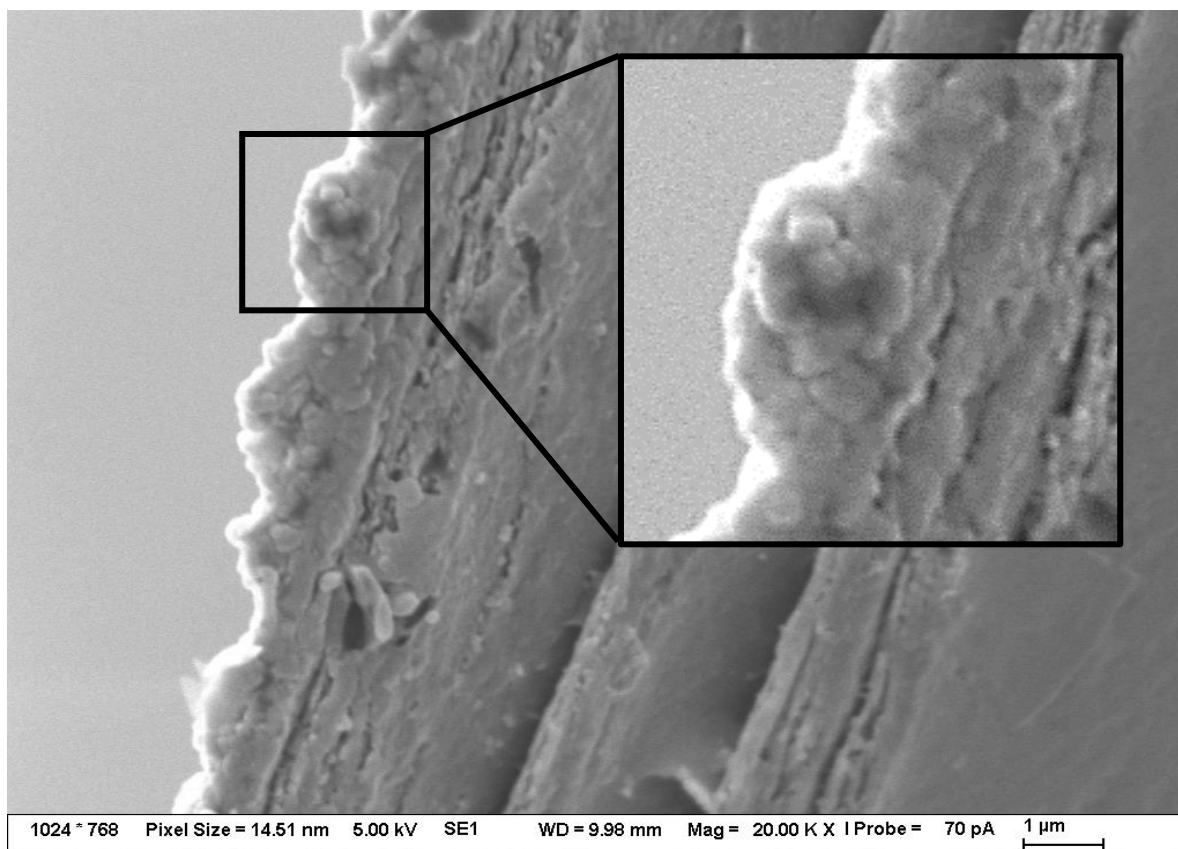


Obrázek 41: Záznam intenzity fluorescence pro 100nm částice v 0,1% agarózovém hydrogelu po 48 hodinách difúze. Nejsou zde vidět žádné píky, které by značily přítomnost větších částic, jedná se pouze o molekulární difúzi (viz srovnání se záznamy fluktuace intenzity fluorescence uvedenými v Příloze 3)

Pro větší částice a vyšší koncentrace agarózového gelu zůstával celkový jas přibližně stejný po celou dobu měření, zatímco samotný molekulární se rapidně snížil. To znamená, že se v konfokálním objemu vyskytovalo velké množství fluoroforu kvůli vyšší koncentraci původní fluorescenční směsi, nicméně tento signál nepocházel z větších částic. Původní vysoká cpm může znamenat, že ještě nedošlo k difúzi veškerých fluoroforů, tedy molekul v objemu bylo adekvátní množství.

Aby bylo prokázáno, že se částice drží pouze na povrchu hydrogelu a difúze dovnitř struktury neprobíhá, byly kompetentní osobou pořízeny snímky z elektronového mikroskopu. Vzhledem ke vlastnostem vzorku a rozlišovací schopnosti mikroskopu byly vybrány pouze 100nm částice, které byly pro rastrovací elektronový mikroskop měřitelné.

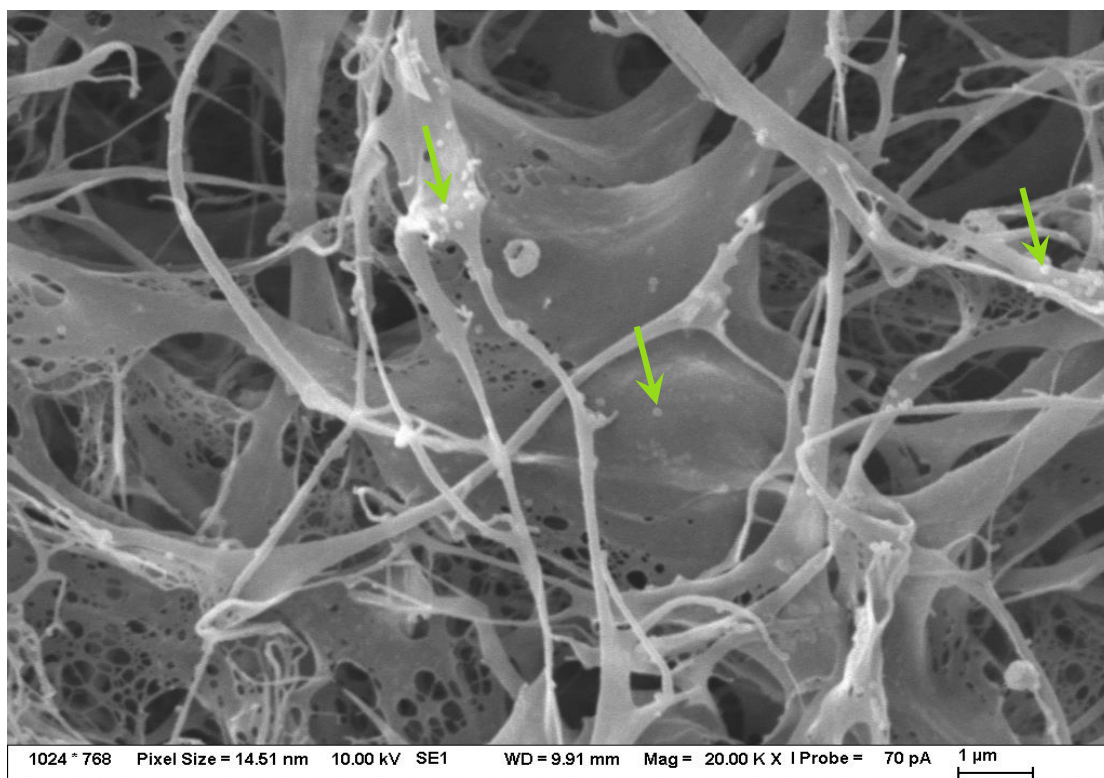
Byly vyzkoušeny dva způsoby měření hydrogelu. V obou případech byl vybrán hydrogel s nejnižší koncentrací agarózy, tedy 0,1 hm.%, kdy se částice nechaly difundovat 48 hodin pod parafilmem. V prvním případě byl následně parafilm odebrán a vzorek s byl ponechán na vzduchu, aby vyschnul. Po týdnu schnutí na krycí skličku byl xerogel odebrán a měřen na zlomu, aby bylo vidět, jestli jsou částice pouze u povrchu nebo i ve struktuře.



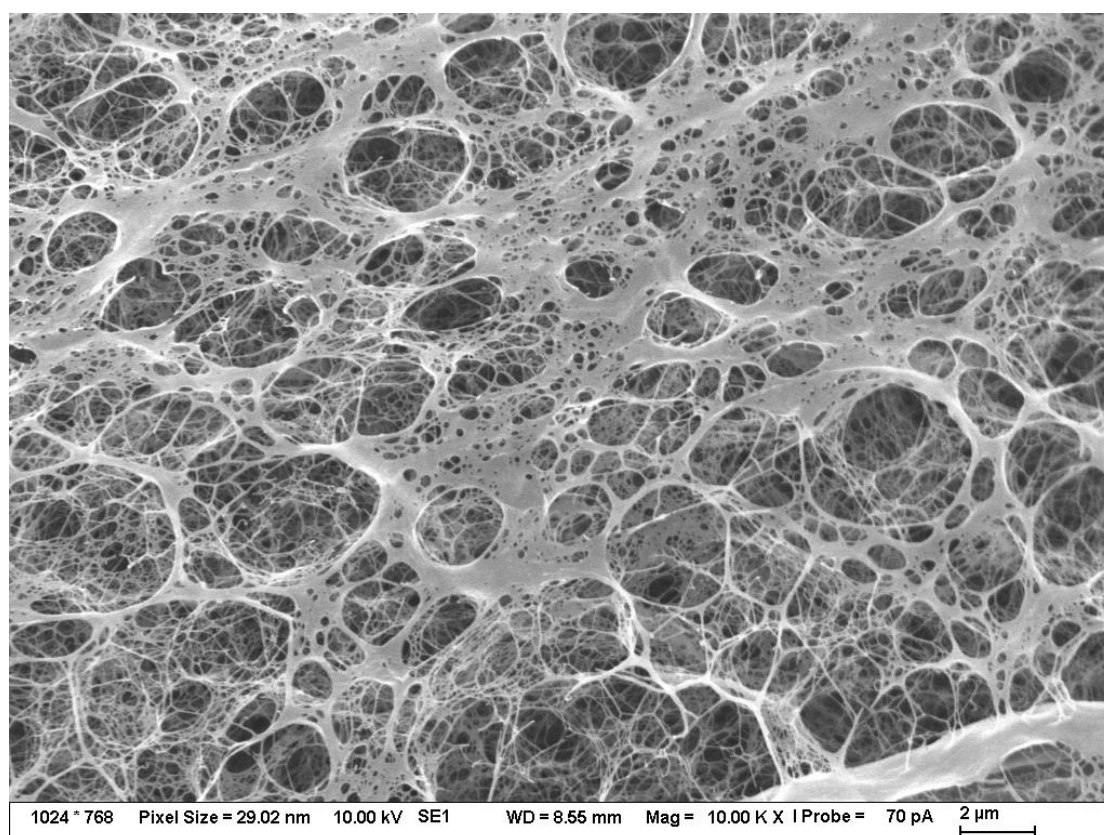
Obrázek 42: Snímek z SEM pro 0,1% agarózový hydrogel s přidavkem 100nm částic. Metoda vyschnutí gelu na vzduchu. Ve zvětšeném výřezu jsou vidět velké agregáty částic. Na levé části je povrch gelu, směrem doprava jsou pak hlubší části gelu.

Z obrázku 42 je vidět, že částice zůstaly pouze na povrchu hydrogelu, ačkoli ten měl velmi nízkou koncentraci. Pravděpodobně ihned se zde vytvořily agregáty, které zamezily difúzi částic do vzorku. Jak je vidět, dále ve struktuře se žádné částice nenachází. Vzhledem k podobným vlastnostem ostatních typů částic (stejný – neutrální – náboj, shodné jádro i fluorofor) se dá přepokládat, že k agregaci částic na povrchu gelu dochází ve všech případech.

Dalším způsobem byla lyofilizace hydrogelu. Zde se koncentrace částic shodovala s koncentrací v prvním případě, jen délka difúze byla týden. Důvodem byla příprava hydrogelu do plastové kyvety kvůli zmrazení, tedy tloušťka gelu byla vyšší než v předchozím případě. Díky lyofilizaci zůstala přibližná struktura sítě, tedy ze snímku povrchu není možné říct, kolik částic prodifundovalo dovnitř. Tuto informaci bychom měli získat ze snímku z hlubších vrstev agarózového hydrogelu. Bohužel kvůli původní nízké koncentraci gelu bylo obtížné ho vyjmout z kyvety neporušený, tedy už i ta nejsvrchnější vrstva polymerní sítě byla značně poškozena (Obrázek 43). Jako druhá vrstva bylo vybráno místo ze středu hydrogelu, kdy byl proveden řez sítí a snímek byl pořízen na řezu (Obrázek 44).



Obrázek 43: Hydrogel – lyofilizace. Snímek je z povrchu hydrogelu, opět tu jsou vidět velké shluky částic zachycených na vláknech polymerní sítě.



Obrázek 44: hydrogel – lyofilizace. Snímek je pořízen z řezu uprostřed polymerní sítě. V této části nebyly nalezeny žádné částice, které by potvrdily difúzi fluorescenčních částic do struktury hydrogelu.

Díky snímku z vnitřní části polymerní sítě se potvrdilo předchozí měření, a to, že částice se drží pouze na povrchu hydrogelu a do struktury se žádným způsobem nedostanou. Difúze z povrchu je tedy možná pouze pro molekulární fluorofory, případně velmi malé částice, a to za předpokladu, že porozita prostředí bude vysoká, aby nemohlo dojít k agregaci fluoroforu na povrchu.

6.5.8.2 Difúze nanočástic z jejich vodného roztoku do hydrogelu

Další možností inkorporace biologicky aktivních látek do struktury hydrogelu je samovolné prodifundování látky z jejího roztoku do připraveného hydrogelu. Zde bylo podmínkou, aby nedocházelo k výraznému bobtnání hydrogelu, tedy hydrogel musel být mechanicky stabilní delší dobu ve vodném prostředí. Dále musela být zaručena vzájemná inertnost částic a polymerní sítě, aby se difundující látka nenávázala na povrch vloženého hydrogelu a nebránila tak průchodu dalších částic.

Stejně jako v předchozím případě byly jako model supramolekulárních komplexů biologicky aktivních látek použity fluorescenčně značené sférické křemíkové nanočástice s neutrálním povrchovým nábojem. Nejprve byla vyzkoušena stabilita hydrogelu v samotné vodě, aby bylo dokázáno, že hydrogel výrazně nebobtná, tím pádem se nezvětšuje velikost pórů. Poté byl různě koncentrovaný hydrogel ponořen na určitou dobu do roztoku fluorescenčních nanočástic. Koncentrace částic byla záměrně zvolena vyšší, než by ve skutečnosti potřebovala být, aby byla vyšší pravděpodobnost, že alespoň určitá frakce prodifunduje dovnitř struktury. Zároveň u všech velikostí byla dodržena jednotná koncentrace částic, respektive počet částic v objemu, aby získané výsledky byly vzájemně porovnatelné.

Difúze z roztoku do hydrogelu trvala pokaždé 15 minut, poté byl hydrogel opatrně přemístěn na krycí sklíčko do držáku vzorku. Nejprve bylo otestováno, jak se chovají částice ihned po difúzi do hydrogelu. Toto měření bylo ovšem možné provést pouze u nejméně koncentrovaného hydrogelu, protože u vyšších koncentrací probíhá difúze znatelně pomaleji. Toto brzké měření bylo zvažováno především z důvodu, jestli a jak moc se bude lišit difúze na okraji a uprostřed hydrogelu a po určité době následné difúze. Všechny vzorky byly ponechány na sklíčku pod parafilmem 48 hodin, aby se dosáhlo homogenní difúze skrz celý hydrogel. Pokud byl hydrogel dostatečně pevný, uprostřed vzorku se provedl řez a měřilo se na nově vzniklém povrchu. V ostatních případech byl gel alespoň částečně otočen, případně lehce promíchán, aby se měřilo v jiném místě než původně.

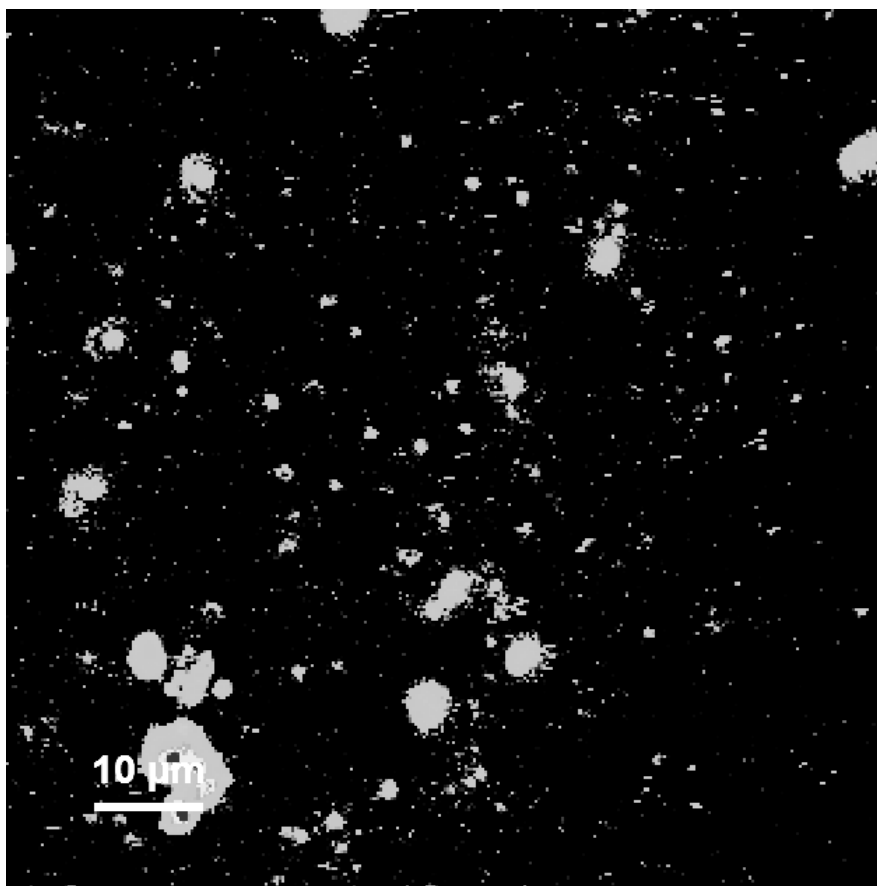
Všechna měření jasně ukázala jeden krátký difúzní čas a jeden triplet. Většina měření měla i dlouhou komponentu, kterou lze přiřadit samotné difúzi fluorescenčních nanočástic. Tabulka 20 zobrazuje vypočítané hodnoty pro 100nm částice v různě koncentrovaných agarózových hydrogelech.

Tabulka 20: Ukázka výsledků pro některé koncentrace pro 100nm částice po 48 hodinách

c_{gel} (hm. %)	D_1 ($\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$)	ρ_1 (-)	D_2 ($\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$)	ρ_2 (-)	zastoupení nižšího D (%)	τ_{trip} (μs)	cpm (cnts·s ⁻¹ ·molecule ⁻¹)
0,2	331 ± 24	0,155 ± 0,004	1,20 ± 0,11	0,032 ± 0,003	20,6	7,3 ± 2,0	9380 ± 675
1,0	327 ± 11	0,075 ± 0,005	0,68 ± 0,13	0,0051 ± 0,0004	6,8	8,6 ± 1,3	8337 ± 142
2,0	222 ± 7	0,046 ± 0,001	-	-	0	11,0 ± 2,9	339 ± 1,8

Jak je vidět z výše uvedené tabulky, se zvyšující se koncentrací gelu se snižuje poměrně rapidně molekulární jas. Když se porovnájí oba difúzní koeficienty, pak vysoký molekulární jas je pouze v případě, kde je přítomný krátký difúzní koeficient. Z tohoto můžeme usoudit, že vyšší difúzní koeficient nesouvisí přímo s difúzí částic, může to být artefakt měření, vyhasnutí částice před opuštěním měřeného objemu a podobně. Proto v dalších tabulkách bude uvedený pouze nízký difúzní koeficient, který by měl odpovídat translační difúzi fluorescenčních nanočástic.

Pro potvrzení, že se jedná opravdu o fotofyzikální proces, a ne o uvolněné fluorescenční barvivo, byl pořízen intenzitní obraz (Obrázek 45). Pokud by se opravdu jednalo o uvolněný fluorofor z nanočástice, pak by v místech, kde není na první pohled patrná intenzita, musela být měřitelná korelace. Z FCS měření ale vyplynulo, že se v tmavých místech nenachází žádné částice, protože nedocházelo k validnímu naměření autokorelačních křivek, ani ve FLIM analýze zde nebyla patrná žádná intenzita fluorescence, která by nasvědčovala přítomnosti volného fluoroforu.



Obrázek 45: Intenzitní obraz 100nm částic na okraji 2% agarózového hydrogelu po 48 hodinách difúze.

Aby se zjistilo, co se děje s difúzním koeficientem v čase na povrchu hydrogelu, respektive na styčné ploše hydrogelu s roztokem nanočástic, bylo provedeno měření po 15 minutách difúze v roztoku, kdy se následně gel opatrně přemístil na krycí sklíčko. Hydrogel byl měřen dvakrát – ihned po vyjmutí z roztoku, podruhé po 48 hodinách. Pro druhé měření byl gel nechán v držáku vzorku, pouze se překryl parafilmem a byl na potřebnou dobu umístěn do uzavřené nádoby. Ve druhém případě se zjišťovalo, jestli a případně jaký bude rozdíl difúzních

koeficientů oproti difúznímu koeficientu z ihned změřeného vzorku. Byl předpoklad, že difúzní koeficient pro vzorek měřený ihned by měl být nižší kvůli vyššímu počtu částic, kdy částice ještě nestihly prodifundovat do objemu hydrogelu, tedy povrch hydrogelu by měl být více koncentrovaný. Porovnání je uvedeno v následující tabulce.

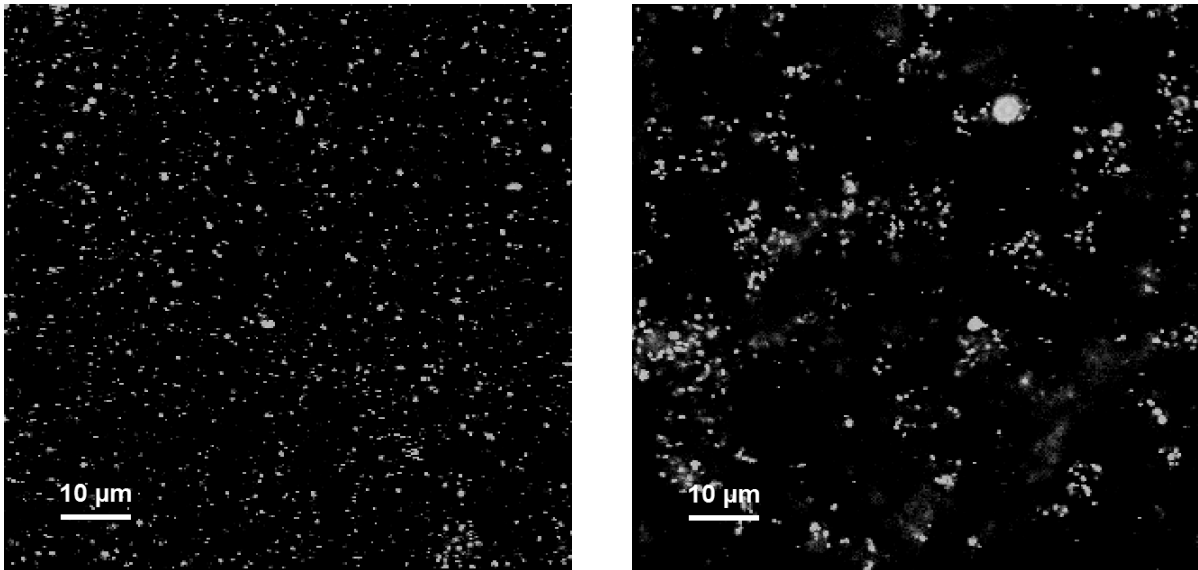
Tabulka 21: Porovnání počtu částic a difúzního koeficientu pro 0,2% agarózový hydrogel

Průměr částic (nm)	Měřeno ihned		Měřeno po 48 hodinách	
	$D (\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	$N (-)$	$D (\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	$N (-)$
30	$2,9 \pm 0,5$	$10,8 \pm 0,04$	$1,9 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,03$
50	$1,4 \pm 0,3$	$14,6 \pm 0,06$	$1,6 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,02$
70	$0,8 \pm 0,3$	$15,0 \pm 0,07$	$1,3 \pm 0,2$	$5,2 \pm 0,04$
100	$0,5 \pm 0,2$	$15,6 \pm 0,06$	$0,9 \pm 0,2$	$6,4 \pm 0,05$

V tabulce 21 je ukázka rozdílu difúzního koeficientu a počtu částic. Jednoznačně z toho vyplývá, že po 48 hodinách difúze jsou částice na povrchu vzorku už mnohem méně koncentrované, tedy difúze probíhá i v případě největších částic. Sestupný trend difúzního koeficientu je patrný v obou případech, kdy nejnižší difúzní koeficient vykazovaly největší částice. Zajímavý je vývoj difúzního koeficientu v obou případech měření. Pokud se vzorek měřil ihned po ukončení difúze v roztoku, byl povrch částečně nasycen fluorescenčními nanočásticemi, viz obrázek 46 vlevo. To znamená, že jejich difúzní koeficient byl závislý od toho, jakou měly částice možnost difundovat do volnějších prostor, případně jak moc byly bráněné ostatními částicemi. Tomuto odpovídá i vyšší interval rozptylu.

V případě měření po dvou dnech byly částice na povrchu gelu už pevně dané v pórech, kam prodifundovaly a dál jejich pohyb již nepokračoval. V těchto místech byly částice v podobě shluků, proto jejich pohyb byl velmi pomalý.

V tabulce 21 je vidět, že i rozptyl hodnot difúzního koeficientu není tak velký, protože částice jsou rozmístěny pravděpodobně ve finální podobě a všechny se pohybují přibližně stejně rychle. Ačkoli je počet částic v objemu nižší než u měření „ihned“, difúzní koeficient je pro všechny typy částic mnohem více podobný. To by mohlo vypovídat o tom, že veškeré vhodné póry pro jednotlivé velikosti částic jsou obsazeny danými částicemi, které mají zde přibližně stejnou možnost pohybu.



Obrázek 46: Porovnání 100nm částic v 0,2% agarózovém hydrogelu. Vlevo je měření ihned po skončení difúze v roztoku, vpravo je měření po 48 hodinách.

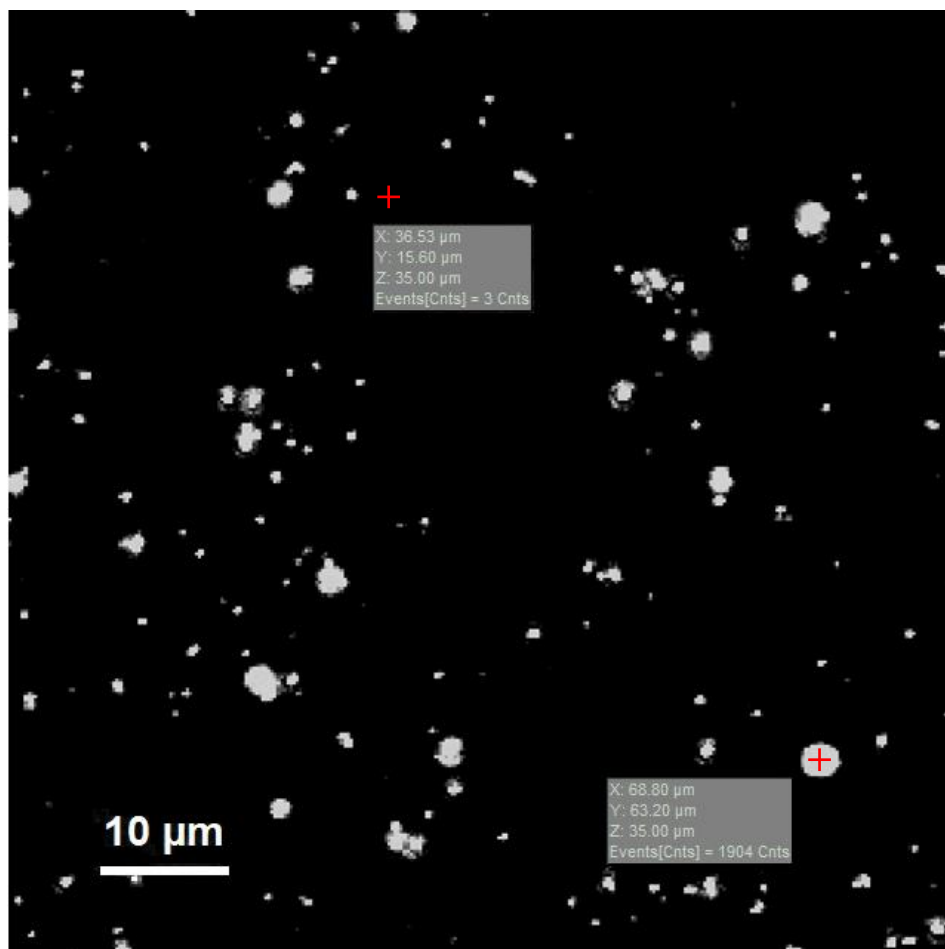
Z obrázku 46 je patrné, že částice, které se mohly pohybovat, tak z povrchu gelu zmizely. Zůstaly zde pravděpodobně ty částice, které byly uzavřeny v pórech na povrchu hydrogelu, případně k nim prodifundovaly další, ale dále se už nepohnuly.

Jako poslední, co se dalo z gelu zjistit, byla informace o tom, jestli a jak probíhá difúze uvnitř hydrogelu, případně kolik částic se z okraje dostane doprostřed vzorku. Vzorky byly měřeny opět po 48 hodinách difúze, kdy samotná difúze v roztoku trvala 15 minut. Nejméně koncentrované hydrogely nebyly tímto způsobem měřitelné, protože nedržely dostatečně pevný tvar na to, aby mohly být rozkrojeny. V následující tabulce je porovnání difúze a počtu částic na povrchu a uprostřed gelu.

Tabulka 22: Porovnání difúzního koeficientu a počtu částic na okraji a uvnitř 1% agarózového hydrogelu

Částice (nm)	Měřeno na okraji hydrogelu		Měřeno v řezu uprostřed hydrogelu	
	$D (\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	$N (-)$	$D (\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1})$	$N (-)$
30	$0,53 \pm 0,11$	$7,0 \pm 0,1$	$1,10 \pm 0,14$	$2,5 \pm 0,1$
50	$0,17 \pm 0,06$	$11,0 \pm 0,1$	$0,70 \pm 0,21$	$6,2 \pm 0,1$
70	$0,09 \pm 0,03$	$12,0 \pm 0,1$	$0,30 \pm 0,13$	$9,0 \pm 0,1$
100	$0,05 \pm 0,04$	$28,0 \pm 0,1$	-	$15,0 \pm 0,1$

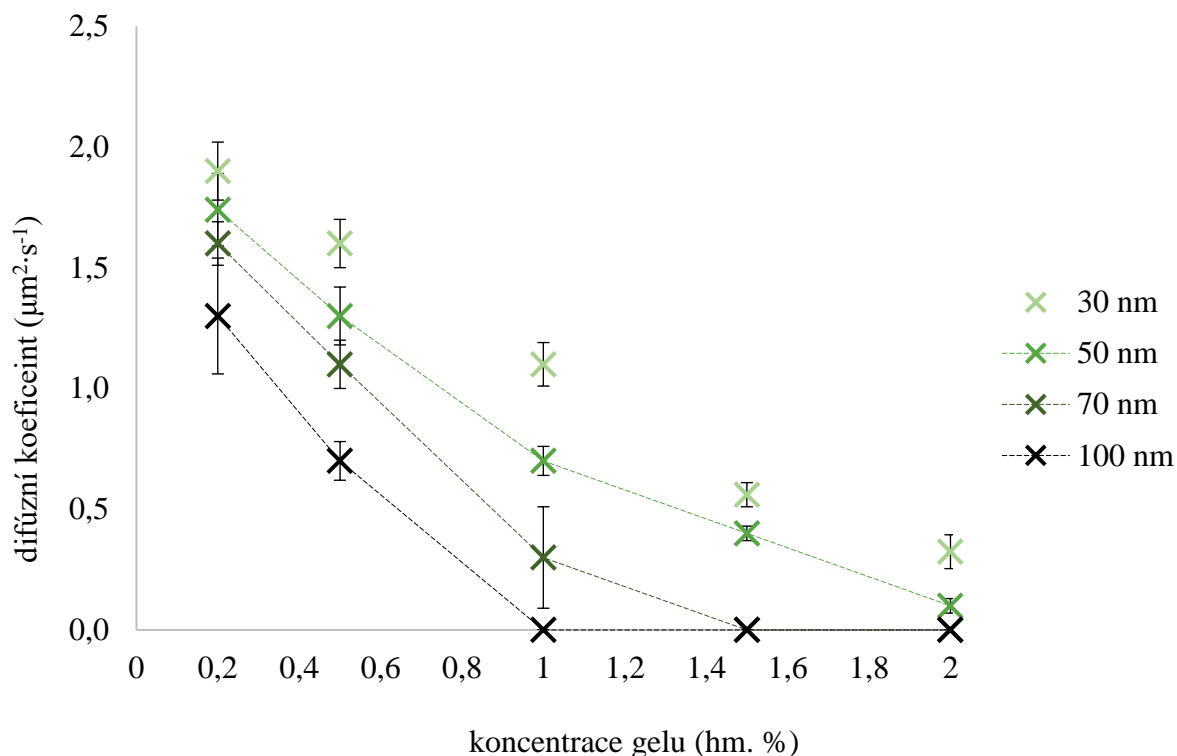
Jak je vidět, výsledky se od sebe poměrně dost liší. Největší počet částic zůstává stále v pórech na okraji hydrogelu, ale měření potvrdilo, že difúze probíhá i v celém objemu vzorku. Vyrůstající počet částic u měření uprostřed hydrogelu by šlo vysvětlit tím, že částice nemají mnoho možností, kam mohou difundovat, tedy se pohybují po stejných cestách a zakoncentrovávají se. Největší částice neměly na řezu měřitelný difúzní koeficient, což ale neznamenalo, že zde nebyly přítomné, jak je vidět z počtu částic. Vyskytoval se zde pouze vysoký difúzní koeficient, který je připisovaný jinému fotofyzikálnímu jevu, než je translační difúze, proto nebyl považován za relevantní a v tabulce nebyl uveden. Obrázek 47 tuto teorii potvrzuje.



Obrázek 47: Intenzitní obraz 100nm částic na řezu 2% agarózového hydrogelu. Jsou zde vyznačeny dvě místa, kdy je zřejmé, že v tmavém bodě není téměř žádná intenzita (3 Cnts), zatímco ve druhém bodě, kde je shluk částic, je tato intenzita vysoká (1904 Cnts)

Z dosažených výsledků je možné vyvodit následující závěr – libovolně velké částice jsou schopny prodifundovat i skrz nejkoncentrovanější hydrogel. Data odpovídají faktu, že částice se pohybuje pouze po nejideálnější cestě, nedokáže se dostat do pórů, pokud okolní síť není dostatečně porézní na průchod částice. Původní premisa, že okolní síť se přizpůsobuje difundující částici, která okolní polymer při průchodu částečně deformuje, se nejeví jako příliš reálná. Pokud by byl tento fakt pravdivý, pak by částice nebyly pouze v určitých shlucích, ale homogenněji roz distribuované skrz celý objem hydrogelu.

Následující graf zobrazuje celkový přehled difúzních koeficientů fluorescenčních nanočástic v závislosti na koncentraci okolního agarózového hydrogelu.



Obrázek 48: Závislost difúzního koeficientu na velikosti částic a koncentraci agarózového hydrogelu.

V porovnání s měřením hydrogelu a přípravou částic uvedenou v kapitole 6.5.1 jsou data získaná touto metodou velmi odlišná. Díky metodě zamíchání částic do gelu už při přípravě dostaneme informace o okamžité difúzi v gelu, protože částice nejsou zpočátku zakoncentrované na jednom místě, jak je tomu zde. V prvním způsobu je ovšem problém v tom, že se částice dostanou i do míst, kam by se standardně nedostaly – musí se zde zvážit i možnost, že by gel neměl takové procento pórů dané velikosti, že se hydrogel částečně nanočásticím při tuhnutí přizpůsobil.

Ve druhém způsobu přípravy je možné sledovat cestu nanočástic od okraje gelu až do jeho středu. Díky této metodě se potvrdilo, že částice jsou schopny difundovat skrz hydrogel a zůstávají v místech, odkud už nemůžou difundovat dál. Bohužel se zde nelze příliš spolehnout na naměřená FCS data, co se týká vypovídající hodnoty – částice ve většině případů nevykazují přílišný translační pohyb. Tato metoda ale dokáže poměrně spolehlivě označit póry s požadovanou velikostí, proto je velmi vhodná na zobrazování a mapování hydrogelu. Zde by možná bylo do budoucna vhodné měřit více velikostí částic zároveň, kdy při jednom měření dojde k vybarvení celého vzorku a půjde okamžitě rozlišit, jak jsou zde póry procentuálně rozloženy. Tato metoda má díky svému využití vysoký aplikační potenciál, co se týká gelového pravitka a obrazového popisu vzorku.

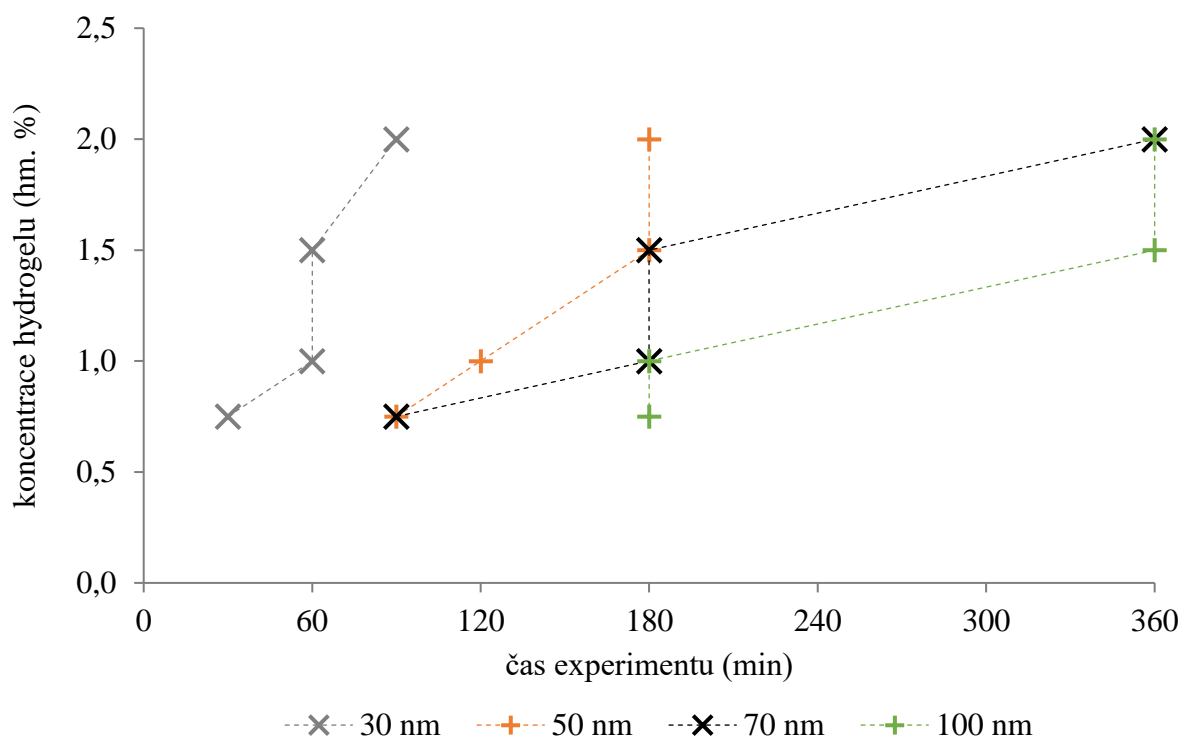
6.5.9 Uvolňování částic z hydrogelu do roztoku

Jedním z možných aplikačních potenciálů hydrogelů v medicínské oblasti je postupné uvolňování biologicky aktivních látek a jejich komplexů z jejich vnitřní struktury. Biologicky aktivní látky mohou být velikostně od úrovně malých molekul (jednotky nanometrů)

po supramolekulární komplexy, jako jsou dendrimery nebo liposomy (stovky nanometrů). Vzhledem k široké velikostní škále uvažovaných terapeutických systémů, je vhodné pro základní orientaci využít modelové systémy, jako jsou právě nanočástice. Popis časového uvolňování částic z hydrogelu do roztoku pak může sloužit jako vhodný model pasivně difundujících systémů.

Různě koncentrovaný agarózový hydrogel obsahující fluorescenčně značené částice byl ponořen do deionizované vody, aby se sledovala pasivní difúze fluorescenčních nanočástic, případně jejich fyzikální změna. Byl zde předpoklad, že částice mohou v hydrogelu kvůli jejich nulovému povrchovému náboji agregovat, tedy by se částečně mohla vysvětlit změna difúzního koeficientu uvnitř hydrogelu. Dále bylo potřeba ověřit, že i částice vykazující velmi nízký, téměř nulový difúzní koeficient, jsou schopné v hydrogelu a potažmo i ven z něj volně difundovat.

Hydrogel byl ponořen po dobu 40 hodin, kdy agaróza vykazovala vysokou stabilitu, tedy gel neztratil vnitřní integritu. Po stanovené době byl odpipetováno 100 μ l roztoku, ve kterém byla změřena autokorelační křivka pomocí FCS pro zjištění difúzního koeficientu. Následující graf zobrazuje čas, kdy se difúzní koeficient dané částice ustálil na hodnotě, která odpovídá difúznímu koeficientu částice ve vodě.



Obrázek 49: Závislost korespondujícího času, kdy difúzní koeficient uvolněné fluorescenční částice odpovídá difúznímu koeficientu ve vodě pro difúzi z různě koncentrovaných hydrogelů.

Následující tabulka 23 zobrazuje difúzní koeficienty, které byly naměřeny pro různý čas průběhu experimentu v různě koncentrovaném agarózovém hydrogelu. Zeleně zbarvené buňky ukazují difúzní koeficient, který odpovídá difúzi ve vodě pro konkrétní částici. Žluté buňky mapují situaci, kdy difúzní koeficient ještě neodpovídal samotným částicím, ale už ani se nejednalo o molekulární difúzi. V tomto případě je systém stále dost heterogenní na to, aby se jednalo o ustálenou difúzi. V červených časech ještě nedošlo k vymytí částice z hydrogelu.

Tabulka 23: Zobrazení difúzního koeficientu pro vymývání částic z agarózového hydrogelu v různých časech. Barevná pole rozlišují difúzní koeficient získaný z roztoku ve srovnání s difúzí stejných částic ve vodě (zelená = korespondující difúzní koeficient, žlutá = změny v systému, červená = nedochází k vymývání částic)

30 min	0,75 %	1,00 %	1,50 %	2,00 %
30 nm	11,0 ± 0,4	7,3 ± 2,1	359 ± 16	498 ± 23
50 nm	3,9 ± 0,2	355 ± 42	307 ± 16	567 ± 22
70 nm	366 ± 5	447 ± 37	395 ± 29	334 ± 16
100 nm	481 ± 25	444 ± 24	365 ± 32	457 ± 19
60 min	0,75 %	1,00 %	1,50 %	2,00 %
30 nm	15,8 ± 0,4	15,1 ± 0,2	11,0 ± 0,5	3,8 ± 0,1
50 nm	9,3 ± 0,6	12 ± 1,4	3,7 ± 1,6	423 ± 21
70 nm	2,1 ± 0,2	407 ± 29	481 ± 32	325 ± 18
100 nm	513 ± 48	500 ± 20	452 ± 17	453 ± 33
90 min	0,75 %	1,00 %	1,50 %	2,00 %
30 nm	12,0 ± 0,5	12,5 ± 0,6	12,1 ± 0,3	13,6 ± 0,6
50 nm	7,9 ± 0,3	13,0 ± 1,7	21,0 ± 4,9	466 ± 29
70 nm	5,4 ± 0,4	3,4 ± 0,5	345 ± 18	445 ± 17
100 nm	486 ± 0,6	420 ± 14	482 ± 18	398 ± 25
120 min	0,75 %	1,00 %	1,50 %	2,00 %
30 nm	11,0 ± 0,4	11,8 ± 0,9	12,3 ± 0,1	12,4 ± 0,4
50 nm	8,5 ± 0,7	8,9 ± 0,1	4,2 ± 0,1	5,8 ± 0,7
70 nm	4,2 ± 0,3	2,4 ± 0,1	489 ± 41	428 ± 13
100 nm	2,3 ± 0,1	496 ± 12	555 ± 24	515 ± 27
180 min	0,75 %	1,00 %	1,50 %	2,00 %
30 nm	13,1 ± 0,4	13,0 ± 0,5	12,1 ± 0,8	11 ± 0,7
50 nm	9,1 ± 0,3	6,1 ± 0,2	6,8 ± 0,3	7,3 ± 0,3
70 nm	5,5 ± 0,2	5,4 ± 0,3	6,5 ± 0,3	426 ± 28
100 nm	3,7 ± 0,2	4,4 ± 0,5	419 ± 33	534 ± 19
360 min	0,75 %	1,00 %	1,50 %	2,00 %
30 nm	13,1 ± 0,2	12,8 ± 0,4	13,6 ± 0,6	12 ± 0,5
50 nm	8,9 ± 0,3	9,3 ± 0,3	8,7 ± 0,5	7,8 ± 0,2
70 nm	5,8 ± 0,1	6,1 ± 0,4	5,9 ± 0,2	6,0 ± 0,8
100 nm	3,3 ± 0,1	3,1 ± 0,2	3,4 ± 0,2	2,9 ± 0,3

2400 min	0,75 %	1,00 %	1,50 %	2,00 %
30 nm	12,0 ± 0,7	13,2 ± 0,4	12,0 ± 0,3	14,1 ± 0,9
50 nm	8,4 ± 0,3	9,2 ± 0,3	8,6 ± 0,4	9,9 ± 0,3
70 nm	5,9 ± 0,4	5,5 ± 0,2	6,0 ± 0,1	6,7 ± 0,2
100 nm	3,7 ± 0,2	3,5 ± 0,1	4,2 ± 0,3	3,2 ± 0,3

Jak je z tabulek vidět, logicky dochází k uvolňování nejdříve malých částic z nejméně koncentrovanějšího hydrogelu. Vysoké difúzní koeficienty mohly znamenat buď uvolněné fluorescenční barvivo z částice ve vodě, část agarózového řetězce, případně velmi velkou částici (například agregát částic, uvolněný kus gelu s uzavřenými částicemi uvnitř apod.), která se v průběhu difúze fotovybělila, případně zde došlo k nefluorescentnímu procesu (přechod do tripletního stavu). Krátký difúzní čas nevymizel ale ani po ustálení difúze, tedy v případě, kdy byl dominantní krátký difúzní koeficient. Jeho intenzita i relativní zastoupení byla stále významná, jak je vidět z tabulky 24. Pro ověření neměnné hodnoty difúzního koeficientu byl roztok uvolněných částic změřen po 40 hodinách, kdy nedošlo k žádné výrazné změně oproti difúzi po šesti hodinách.

Tabulka 24: Ukázka obou difúzních koeficientů pro 50nm částice měřené po 90 minutách.

koncentrace gelu (hm. %)	D_1 ($\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$)	ρ_1 (-)	D_2 ($\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$)	ρ_2 (-)	N (-)	cpm (cnts·s ⁻¹)
0,75	7,9 ± 0,3	0,12 ± 0,004	336 ± 21	0,60 ± 0,01	1,39 ± 0,02	5393 ± 93
1,0	13 ± 1,7	0,11 ± 0,01	399 ± 28	0,57 ± 0,01	1,47 ± 0,03	5074 ± 91
1,5	21 ± 4,9	0,14 ± 0,02	599 ± 59	1,84 ± 0,03	0,5 ± 0,01	4515 ± 61
2,0	-		466 ± 29	6,7 ± 0,3	0,15 ± 0,01	4176 ± 40

Pokud byl ve vzorku přítomen i nízký difúzní koeficient, tedy částice prodifundovaly z hydrogelu do vodného prostředí, celkový jas jedné molekuly/částice (cpm) i celkový počet částic výrazně vzrostl. Když byl přítomen pouze vysoký difúzní koeficient, případně se částice teprve začínají vymývat a jejich zastoupení není příliš významné, počet částic se pohyboval pod hodnotou jednoho fluoroforu v konfokálním objemu. Z tohoto lze usoudit, že se opravdu jedná spíše o agregát částic, který se vlivem velkého výkonu laseru fotovybělil ještě během přechodu skrz konfokální objem než o uvolněné fluorofory z částice.

6.6 Difúze v roztoku hyaluronanu

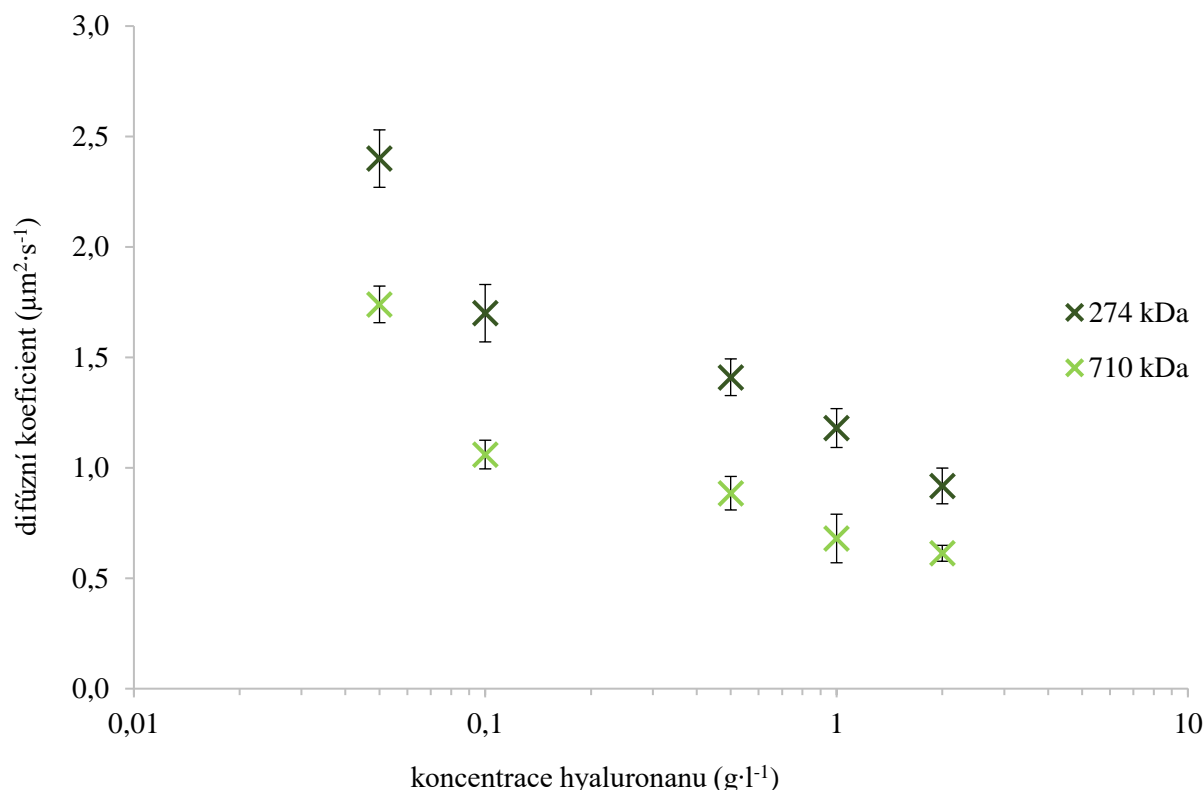
Hyaluronan patří k velmi významným nesulfátovaným polysacharidům. Je to humektant, organizátor extracelulární matrix, součást synoviální kapaliny i očního sklivce. Hyaluronan v roztoku je stabilizovaný vodíkovými můstky. Meziřetězcové interakce jsou poté zprostředkovány přes tzv. hydrofobní oblasti (angl. hydrophobic patches) a vodíkové můstky. Silně solvatovaná hyaluronová doména je schopná propustit látky jakékoli velikosti, kde jde jen o čas průchodu skrz doménu. Jako obecně uznávanou hranici přechodu mezi zředěným a polozředěným režimem je hranice 1 g·l⁻¹ [70].

Jsou možné dva přístupy studia daného systému. Je možné využít inertní fluorescenční sondu nebo fluorescenčně značenou variantu studovaného polymeru. Každý z těchto přístupů

má své využití. První přístup odpovídá interakci s např. s inkorporovaným supramolekulárním nosičovým komplexem biologicky aktivních látek v hyaluronanové doméně, druhý poskytuje informace o agregaci a formování samotné hyaluronanové domény.

6.6.1 Porovnání fluorescenčně značených nanočástic a fluorescenčně značeného hyaluronátu sodného

Jak je uvedeno v úvodu kapitoly, částice reprezentují působení externí přidané látky nebo mohou sloužit jako sonda pro studium chování a konformace hyaluronanu v roztoku. V případě značené varianty polymeru pak lze studovat i meziřetězcové interakce (neelastické interakce) a studovat formování domény polymeru z pohledu její součásti.



Obrázek 50: Pokles difúzního koeficientu pro obě molekulové hmotnosti hyaluronanu.

Experiment zahrnoval měření fluorescenčně značeného hyaluronanu v roztoku nativního hyaluronanu. Závislost difúzního koeficientu fluorescenčně značeného hyaluronanu na koncentraci roztoku hyaluronanu zobrazuje obrázek 50. Ačkoli průběh poklesu difúzního koeficientu vypadá strmější u kratšího polymeru, v obou případech došlo k poklesu hodnot na třetinu, tedy v tomto případě délka řetězce nemá žádný vliv na chování polymeru v prostředí.

Ze získaných difúzních koeficientů hyaluronanových řetězců ve vodě byl vypočítán teoretický hydrodynamický poloměr. 274kDa řetězec odpovídá průměru přibližně 74 nm, pro 710kDa řetězec to je zhruba 110 nm. Na základě těchto výpočtů (rovnice (28)) byly zvoleny modelové sférické částice s odpovídajícím poloměrem. Následující tabulka 25 shrnuje porovnání sférických fluorescenčních nanočástic a polysacharidového řetězce.

Tabulka 25: Porovnání difúzních koeficientů ($\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) hyaluronanového řetězce a odpovídajících nanočástic.

Koncentrace hyaluronanu ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	274 kDa	70 nm	710 kDa	100 nm
0,00	$5,9 \pm 0,5$	$6,9 \pm 1,1$	$4,01 \pm 0,32$	$4,31 \pm 0,40$
0,05	$2,4 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,2$	$1,74 \pm 0,08$	$1,13 \pm 0,05$
0,10	$1,7 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,2$	$1,06 \pm 0,07$	$1,21 \pm 0,04$
0,50	$1,41 \pm 0,08$	$2,3 \pm 0,1$	$0,89 \pm 0,08$	$1,08 \pm 0,08$
1,00	$1,18 \pm 0,09$	$2,0 \pm 0,3$	$0,74 \pm 0,06$	$0,99 \pm 0,03$
2,00	$0,92 \pm 0,08$	$1,6 \pm 0,1$	$0,61 \pm 0,04$	$0,71 \pm 0,07$

Z tabulky vyplývá, že řetězec s vyšší molekulovou hmotností se pohybuje v roztoku podobně jako sférická částice. Při vzrůstající viskozitě okolního prostředí se difúzní koeficient řetězce mění podobně jako difúzní koeficient částice. Pokud se ale molekulová hmotnost řetězce sníží, začne být více ovlivňován okolním prostředím (například meziřetězcové interakce). Při vzrůstající koncentraci hyaluronanu se řetězec zpomaluje výrazně více než sférická částice, což by mohlo být vysvětleno natažením řetězce v roztoku, případně jeho interakcemi s okolními řetězci.

Tabulka 26: Srovnání výsledných difúzních koeficientů získaných pomocí modelů normální a anomální difúze

	normální difúze (Pure Diffusion, rovnice (5))				anomální difúze (Triplet Extended 3D, rovnice (7))	
	C_{Hya} ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	D_1 ($\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$)	D_2 ($\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$)	D_1/D_2	D_1 ($\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$)	α (-)
274 kDa	0,00	$6,4 \pm 0,6$	60 ± 40	3,4	$9,3 \pm 0,3$	$0,98 \pm 0,01$
	0,05	$1,9 \pm 0,2$	13 ± 4	1,7	$3,8 \pm 0,1$	$0,84 \pm 0,01$
	0,10	$1,5 \pm 0,3$	11 ± 5	1,5	$3,5 \pm 0,2$	$0,83 \pm 0,01$
	0,50	$1,4 \pm 0,2$	11 ± 6	1,7	$2,7 \pm 0,1$	$0,80 \pm 0,01$
	1,0	$1,1 \pm 0,2$	12 ± 8	1,7	$2,6 \pm 0,1$	$0,76 \pm 0,01$
	2,0	$0,9 \pm 0,1$	8 ± 2	1,5	$2,1 \pm 0,1$	$0,75 \pm 0,01$
710 kDa	0,00	$3,33 \pm 0,32$	27 ± 8	2,3	$5,84 \pm 0,13$	$0,95 \pm 0,01$
	0,05	$0,82 \pm 0,09$	8 ± 4	2,0	$1,64 \pm 0,07$	$0,75 \pm 0,01$
	0,10	$0,60 \pm 0,06$	6 ± 2	2,4	$1,24 \pm 0,04$	$0,78 \pm 0,01$
	0,50	$0,56 \pm 0,06$	7 ± 2	2,0	$1,09 \pm 0,05$	$0,72 \pm 0,01$
	1,0	$0,47 \pm 0,05$	5 ± 2	2,2	$0,95 \pm 0,04$	$0,77 \pm 0,01$
	2,0	$0,41 \pm 0,07$	5 ± 2	2,4	$0,83 \pm 0,03$	$0,72 \pm 0,01$

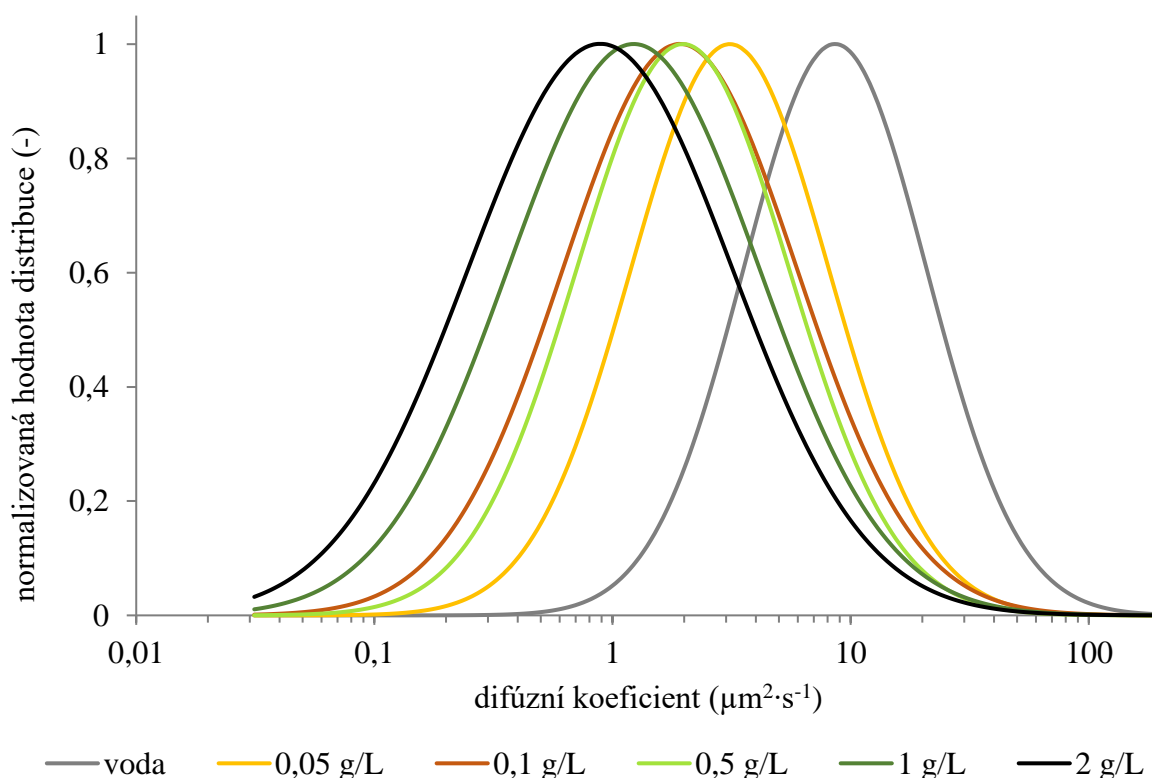
Zde bylo na výběr ze dvou možných přístupů vyhodnocení. První, který je uvedený v tabulce 26, je model Pure diffusion, kdy byly nutné pro správné vyhodnocení dva difúzní koeficienty. Druhou možností bylo vyhodnotit data jako anomální difúzi, tedy použít složitější model Triplet Extended 3D, kdy ale nebylo nutné počítat s tripletem, pouze s parametrem anomální difúze α .

Pokud bychom se nezaměřili na čísla, ale pouze na poměry vůči sobě, tak lze tvrdit, že obě metody dávají logicky konzistentní výsledky. Difúzní koeficient v nejkonzentrovanejším roztoku je přibližně o polovinu nižší než v nejzředěnějším roztoku, a to ve všech případech. V případě dvou difúzních koeficientů je zajímavé zjištění, kdy pro nižší molekulovou hmotnost se poměr kratšího a delšího difúzního koeficientu klesl z hodnoty 3,4 ve vodném prostředí na hodnotu 1,7 v hyaluronovém gelu, zatímco v případě 710kDa řetězce poměr difúzních koeficientů zůstal po celou dobu měření přibližně stejný. V průběhu měření v gelu se pak už poměr v obou případech výrazně neměnil.

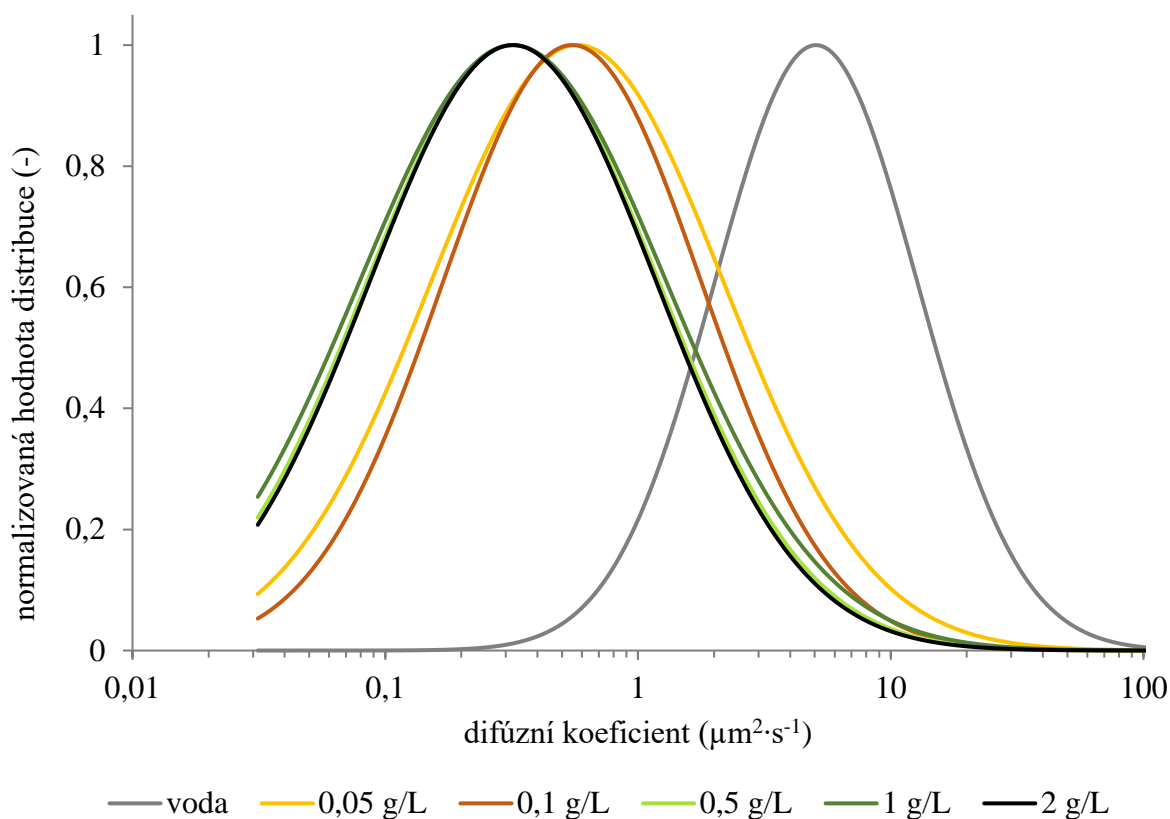
Ve druhém přístupu, tedy vyhodnocení pomocí anomální difúze, se sledovala především změna koeficientu alfa (viz kapitola 3.3.1 a rovnice (8)). Jak je vidět, ve vodném prostředí se hodnota blíží jedné, tedy se jedná o volnou difúzi. V případě 274kDa řetězce se hodnota v průběhu měření snižovala až na hodnotu 0,75. Hodnota alfa pro řetězec s vyšší molekulovou hmotností klesla už při prvním přidavku polymeru, ale zůstala na stejné hodnotě po celou dobu měření.

6.6.2 Log-normální distribuční model

Pro popis chování značeného polymeru v prostředí rostoucí koncentrace nezačleně varianty byl použit distribuční log-normální model. Jak již bylo uvedeno výše, distribuční modely poskytují vyjádření šířky distribuce difundující populace a samozřejmě střed distribuce vyjádřený jako medián.



Obrázek 51: Log-normální distribuční model pro molekulovou hmotnost hyaluronanu 274 kDa.



Obrázek 52: Log-normální distribuční model pro molekulovou hmotnost hyaluronanu 710 kDa.

Pokud srovnáme grafickou distribuci, lze vidět u obou molekulových hmotností rozdíly, kdy nižší molekulová hmotnost vykazuje kontinuální pokles s rostoucí koncentrací přidaného hyaluronanu. U vyšší molekulové hmotnosti pak lze vidět, že se přídavky rozdělily do dvou skupin s podobnou distribucí. To ukazuje na rozdílné chování obou molekulových hmotností tak, jak bylo popsáno již modelem anomální difúze.

Výše uvedené výsledky poukazují na komplexnost roztoku hyaluronanu jako koloidního prostředí a zároveň potvrzují vhodnost použité metody pro tento popis. Použití značeného hyaluronanu jako fluorescenční sondy vykazuje vyšší procentuální odchylky stanovených difúzních koeficientů než v případě charakterizace systému pomocí značených částic. Toto se projevuje i v relativně široké distribuci získané za použití interpretace FCS dat log-normálním modelem. Tento jev lze připsat pravděpodobně nejen faktu, že se doména značeného hyaluronanu bude při prostupu mezi dalšími řetězci deformovat, ale zároveň lze očekávat i různé meziřetězcové interakce. Jako intenzivnější se jeví u použitých systémů meziřetězcová interakce u vyšší molekulové hmotnosti, která vykazuje při srovnatelné změně koncentrace vůči nižší molekulové hmotnosti výraznější pokles hodnot a distribucí difúzního koeficientu.

V neposlední řadě je potřeba vzít do úvahy i pravděpodobně silně nehomogenní distribuci fluorescenčních značek na kostře značeného biopolymeru, která bude přispívat k širší distribuci stanovených difúzních koeficientů, jak je zobrazuje log-normální distribuční model. Polymer s vyšší hustotou značení bude vykazovat vyšší parametr molekulárního jasů, který ovlivňuje hodnotu autokorelační funkce čtvercem své hodnoty, což vyplývá už z rovnice (9). Tento fakt bohužel vychází ze samotného průběhu syntézy a není možné ho připravit tak, aby distribuce fluorescenčních značek na polymeru byla vždy homogenní. Lze předpokládat, že rozmístění značek bude v přímé spojitosti s distribucí molekulové hmotnosti, a tedy hodnotou

polydispersity [21]. Možným řešením by bylo použití preparativní separační techniky se záchytem frakcí, jako je například velikostně vylučovací chromatografie (Size-Exclusion Chromatography, SEC).

Velmi zajímavé srovnání poskytuje tabulka 27, kde je srovnání mediánu log-normální distribuce D_c a difúzního koeficientu získaného modelem anomální difúze. Výsledky ukazují shodu pro nižší molekulovou hmotnost až do koncentrace $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, kdy se znatelně sníží parametr anomality α a pro poslední dvě hodnoty zůstává stejný. Pokud zůstaneme u myšlenky, že tento parametr definuje nehomogenitu systému, můžeme tímto způsobem interpretovat i data získaná pro hyaluronan s vyšší molekulovou hmotností. V tomto případě je z modelu anomální difúze patrné, že parametr anomality α se snížil na relativně nízkou hodnotu okolo 0,75. Dále se v průběhu měření takřka neměnil, zatímco difúzní koeficient v případě použití tohoto modelu klesal kontinuálně až na téměř pětínovou hodnotu (a na polovinu v porovnání s prvním přídatkem hyaluronanu, stejně jako v případě nižší molekulové hmotnosti).

V případě log-normálního modelu difúzní koeficient klesl a dále po celou dobu měření klesal pouze pozvolna, kdy konečná hodnota dosáhla 63 % ve srovnání s prvním přídatkem hyaluronanu, a dokonce 7 % proti hodnotě ve vodě, oproti hodnotám z modelu anomální difúze, kdy byla hodnota po přídatku hyaluronanu poloviční, ve srovnání s vodou 14%. Vzhledem k tomu, že v případě anomální difúze se jedná o průměrnou hodnotu, kde heterogenitu systému určuje pouze zmiňovaný parametr α , nejsou obě metody mezi sebou porovnatelné. Při použití log-normálního modelu je stanovený difúzní koeficient medián výsledné distribuce, kdy samotnou neuniformitu systému určuje šířka distribuce.

Tabulka 27: Srovnání mediánu log-normálního distribučního modelu a vyhodnocení difúzního koeficientu modelem anomální difúze.

	$c_{\text{Hya}} (\text{g}\cdot\text{l}^{-1})$	$D_c (\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	$D_1 (\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1})$	$\alpha (-)$
274 kDa	0,00	$9,4 \pm 0,1$	$9,3 \pm 0,3$	$0,98 \pm 0,01$
	0,05	$3,9 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,1$	$0,84 \pm 0,01$
	0,10	$3,5 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,2$	$0,83 \pm 0,01$
	0,50	$2,8 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,1$	$0,80 \pm 0,01$
	1,00	$1,7 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,1$	$0,76 \pm 0,01$
	2,00	$1,0 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,1$	$0,75 \pm 0,01$
710 kDa	0,00	$5,97 \pm 0,32$	$5,84 \pm 0,13$	$0,95 \pm 0,01$
	0,05	$0,67 \pm 0,05$	$1,64 \pm 0,07$	$0,75 \pm 0,01$
	0,10	$0,62 \pm 0,04$	$1,24 \pm 0,04$	$0,78 \pm 0,01$
	0,50	$0,56 \pm 0,02$	$1,09 \pm 0,05$	$0,72 \pm 0,01$
	1,00	$0,43 \pm 0,03$	$0,95 \pm 0,04$	$0,77 \pm 0,01$
	2,00	$0,42 \pm 0,03$	$0,83 \pm 0,03$	$0,72 \pm 0,01$

7 ZÁVĚR

Tato práce se zaměřuje na využití pokročilých fluorescenčních technik, jako je fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) a mikroskopie zobrazující dobu života fluorescence (FLIM), ve studiu koloidních systémů, a to zejména hydrogelů a roztoků polysacharidů. V této práci je diskutováno využití pokročilých metod analýzy dat z metody FCS, využití fluorescenčních částic ve stanovení tzv. „gelového prahového“, převody závislosti autokorelační funkce na reologické moduly přepočtem přes MSD křivky a v neposlední řadě i využití značených polymerů jako fluorescenčních sond s jejich nativními analogy ve studiu konformačních procesů v roztoku. Výsledky z techniky FLIM jsou pak interpretovány metodami obrazové analýzy, převážně pak pomocí programu ImageJ.

V první části práce je diskutována problematika optimalizace systému a vliv jednotlivých parametrů na samotné měření a vyhodnocení dat. Tento proces je nutný z hlediska výzkumu složitých systémů, kdy se chyba měření může snadno zaměnit s vlastností studovaného vzorku. Tato část práce se tedy věnuje postižení všech možných experimentálních aspektů, které ovlivňují získaná data a jejich následnou interpretaci. Nejprve byl proveden test robustnosti metody, kdy se ovlivnily dva parametry získané při kalibraci konfokálního objemu, s hodnotami z metody dynamického rozptylu světla (DLS) a nalezené difúzní koeficienty byly shodné.

Pro následnou interpretaci dat jakožto viskoelastického systému bylo nutné optimalizovat přepočet na MSD křivku a s tím i experimentálně ověřit vliv proměnných z kubické rovnice na samotnou MSD křivku. Největší vliv na tvar křivky má samotný použitý matematický model, a s ním spojená hodnota autokorelační funkce G , kdy se mění kompletně celý průběh v závislosti na zvoleném modelu. Další velkou změnu lze pozorovat u špatně vypočítaném počtu částic a délka a šířka konfokálního objemu. Při špatně zvolené délce w_z (z_0) dojde k zakřivení MSD křivky v nejdelších časech měření. V případě nesprávné šířky konfokálního objemu w_{xy} dochází k posunu křivky ve směru osy y , ale průběh zůstává nezměněn. Z tohoto lze předpokládat, že pokud je nesprávně proložena MSD křivka, pak není v pořádku ani původní výpočet proložení autokorelační křivky (fit), protože vypočítaná data jsou posunuta k jiným hodnotám.

Pro potřeby navržených experimentů bylo nutné zjistit měřicí limity konfigurace přístroje, tedy jak nízký difúzní koeficient částic bude mít ještě vypovídající hodnotu. Limitní viskozita pro 100nm (největší používané) částice byla $41 \text{ mPa}\cdot\text{s}^{-1}$, kdy částice dále nevykazovaly tepelný pohyb, který by byl při laboratorní teplotě měřitelný. U všech typů částic se difúzní koeficient s platnou směrodatnou odchylkou pohyboval okolo hodnoty $0,1 \mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$. Při delších difúzních časech už chyba měření byla příliš vysoká na to, aby se dala považovat za vlastnost prostředí, které bylo homogenní.

Dalším krokem bylo otestování správnosti nastavení parametrů měření, různých typů samotného měření a konečných analýz. Pro tyto účely byl zvolen vodný roztok agarózy, který dle své koncentrace vytváří širokou škálu koloidních systémů od viskoelastických kapalin po fyzikálně síťované hydrogely. Tento systém byl zvolen mimo jiné proto, že jeho vlastnosti jsou v literatuře dobře popsány a bylo tedy možné přímé srovnání navrhovaných metod s již dříve publikovanými výsledky. V literatuře je agarózový hydrogel popisován často jako systém s jednou velikostí pórů pro konkrétní koncentraci. Pro jednoduchý popis systému je tato průměrná hodnota dostačující, v této práci byly turbidimetricky stanoveny velikosti pórů až do koncentrace agarózového hydrogelu 4 hm. %. Získané hodnoty korespondovaly s velikostmi uváděnými v člancích (například [122]). Tento popis ale není dostačující, pokud

je nutné zjistit přesnou vnitřní strukturu, kdy je potřeba skrz gel difundovat částice dané velikosti. Z tohoto důvodu jsou následující experimenty vcelku inovativní, kdy se pohyb fluorescenčně značených nanočástic spojuje přímo s jejich velikostí, a tím jsou schopny definovat efektivní velikost oka. Zároveň je možné získat informaci o tom, jak se potenciální nosič pohybuje v síti v reálném čase.

Pro otestování metody byl měřen různě koncentrovaný agarózový koloidní systém, kdy byl stanoven difúzní koeficient fluorescenčně značených silikátových nanočástic různých velikostí. Velmi zajímavý výsledek ukázaly částice s nejmenším poloměrem v nízkých koncentracích. Ukázalo se, že při difúzi v nízkých koncentracích se částice zpomalily, ale difúzní koeficient zůstal po určité době neměnný, dokud prostředí nezačalo částice více ovlivňovat. Pro větší částice tento trend nebyl patrný, zde byly částice ovlivňovány už i v nejméně husté polymerní síti. Jak se očekávalo, čím byly větší částice, tím nižší koncentrace byla potřeba pro „zastavení“, tedy jejich difúzní pohyb nebyl pomocí FCS detekovatelný. Zde byla polymerní síť natolik hustá, že neumožňovala translační pohyb částic, tedy se dá předpokládat, že při této koncentraci jsou oka sítě menší než průměr částice, pokud se nebude předpokládat ovlivnění sítě hmotností částice. Při měření docházelo s narůstající koncentrací agarózy v hydrogelu k většímu rozptylu hodnot difúzního koeficientu částic. Tento fakt by se mohl vysvětlit tím, že zde dochází k postupnému nárůstu hustoty polymerní sítě, kdy oka sítě jsou mnohem méně homogenní, a i menší odchylky ve velikostech se projeví na difúzním chování částice. Z tohoto důvodu zde byl tento rozptyl považován za ukazatel nehomogenity, nikoli za artefakt či chybu měření. Jedinou výjimku tvořily 10nm částice, kdy se odchylka pohybovala celou dobu okolo 30 %. Je tedy možné tvrdit, že tyto částice se v různě koncentrovaném hydrogelu chovaly tak, jako kdyby ke změně koncentrace v tomto případě takřka nedocházelo.

Díky tomu, že v softwaru SymPhoTime64 je možný manuální zásah do matematických výpočtů, a tedy ovlivnění výsledků i tvaru křivky, byl testován vliv prodloužení korelačního času na difúzní čas částic. Kdy z posunu horní hranice 1000 ms na 10000 ms bylo možné pozorovat difúzní koeficient i v limitních koncentracích agarózového hydrogelu. V těchto případech byl ale naměřený difúzní koeficient tak krátký, že rozptyl jeho hodnot dosahoval 200 % proti mediánu hodnot.

Další vyzkoušenou metodou byla modifikace klasické jednoohniskové fluorescenční korelační spektroskopie, a to její dvouohnisková varianta (2f-FCS). Nevýhodou vyhodnocení této metody je nemožnost zásahu do běžícího skriptu a získání pouze jedné hodnoty difúzního koeficientu bez směrodatné odchylky. Po zjištění, že měření lze ovlivnit prodloužením korelačního času, byl tento postup aplikován i zde. Prodloužení času pomohlo částečně, navíc s velkým rozptylem hodnot, tedy se vyhodnotilo, že skript není schopný počítat velmi nízké difúzní koeficienty. Pokud se ale srovnaly hodnoty, kde byl nižší rozptyl naměřených hodnot, pak byly obě varianty FCS podobně spolehlivé. Z tohoto důvodu je z mého pohledu vhodnější používat jednoohniskovou fluorescenční korelační spektroskopii, kdy se v rámci jednoho měření možné naměřit data pro TCSPC analýzu, F(L)CS analýzu i obrazovou analýzu (FLIM), což v případě dvouohniskového přístupu není možné, případně je velmi komplikované na vyhodnocení.

Většina dat vykazovala známky anomální difúze, což znamená, že difúze byla nějakým způsobem bráněná, nerovnoměrná a že se částice pohybovala v nehomogenním prostředí. Jedním způsobem bylo použití modelu anomální difúze přímo v softwaru SymPhoTime64, který do specifické analýzy zahrnuje i parametr anomální difúze α . Druhou možností byla analýza dat softwarem QuickFit, který umožňuje různé typy analýz a modelů, včetně metody

maximální entropie a rozšíření standardního modelu o parametry log-normální distribuce. Takto získaná data byla opět porovnána s daty získané v používaném softwaru SymPhoTime64. Výsledek ukázal, že data získaná modelem anomální difúze jsou srovnatelná s mediánem z pokročilejších analýz (log-normální model, MEM analýza). Data zahrnující volnou difúzi a více difúzních koeficientů se od hodnot získaných z anomálních analýz lišila. Z tohoto důvodu je nutné znát povahu vzorku, kdy opticky správné proložení dat, rozložení reziduí i zdánlivě logické výsledné hodnoty nemusí znamenat správné výsledky.

Posledním způsobem získání informací o struktuře gelu je obrazová analýza. Tady je nejvyšší předpoklad detailního popisu velikosti ok sítě, kdy je možné velmi dobře zobrazit oka, kam se jaké částice dostaly a kde je přítomna polymerní síť. Pomocí metody FLIM je možné mapovat, kde se jaký typ fluorescenčních částic v rámci struktury gelu nachází, a to buď víc velikostí dohromady, nebo měřené separátně. Pro fluorescenční měření je výhodné měřit více velikostí zároveň, kdy je na první pohled patrné, kde se jaká velikost nachází, a tím přesněji určit rozložení v hydrogelu. Měření částic o různých velikostech je výhodné pro následnou obrazovou analýzu, zde se použil software ImageJ. Na základě matematického výpočtu (EDM) je možné přesnější zobrazení, kde je největší pravděpodobnost výskytu částice v hydrogelu a kde se tato pravděpodobnost blíží nule, tedy je zde přítomný polymerní řetězec. Na základě těchto propočtů by mohlo být možné stanovit alespoň poměr „obsazené“ a „neobsazené“ plochy částicemi, kdy by bylo možné stanovit, kolik procent gelu zabírají částice (a tedy i póry) o různých velikostech. Tato poslední navržená analýza není součástí předložené práce, jedná se o doporučení následných experimentů.

Po optimalizaci metod ověřených na funkčním systému se testovala příprava agarózového hydrogelu různými způsoby. Ve všech případech se připravil čistý agarózový hydrogel o různých koncentracích. V prvním způsobu se roztok fluorescenčních částic napipetoval na povrch hydrogelu. Ani po dostatečně dlouhé době probíhání experimentu se nepotvrdila difúze do struktury hydrogelu. Tento fakt byl potvrzen pomocí transmisního elektronového mikroskopu. Při dalším způsobu byl agarózový hydrogel ponořen do vodného roztoku fluorescenčně značených částic. Zde oproti předchozímu způsobu docházelo k difúzi částic do struktury hydrogelu. Byl zde pozorován vliv doby difúze nanočástic skrz hydrogel, kdy ihned po vyjmutí hydrogelu z roztoku bylo pozorováno rovnoměrné rozmístění částic. Po 48 hodinách difúze částic v hydrogelu mimo roztok došlo ke kumulaci částic v odpovídajících pórech, kdy částice menší, než oka polymerní sítě difundovaly skrz gel dál, větší svůj pohyb pravděpodobně zastavily.

Dalším způsobem ověření vlastností systému bylo uvolňování částic do roztoku. Zde byl opět vnímán výrazně vliv doby experimentu, kdy v závislosti na koncentraci agarózového hydrogelu a velikosti částic docházelo k postupnému vymývání částic do vodného roztoku. V souladu s předpokladem se nejrychleji vymývaly nejmenší částice z nejméně koncentrovaného gelu, nejpomaleji největší částice.

Jedním z posledních způsobů interpretace vlastností koloidního systému je převedení autokorelačních křivek na reologické moduly G' a G'' . V našem případě bylo nutné autokorelační křivku převést na MSD křivku, tu přepočítat na poddajnost a z té teprve pomocí softwaru Rheology Advantage Data Analysis vypočítat reologické moduly. Těmi se potvrdil předpoklad, že v celé vybrané koncentrační řadě se 10nm částice chovají jako ve viskózním prostředí, zatímco 100nm částice prostředí vnímají od viskózního po viskoelastické. Je zde možné i srovnání tvarů mikrereologických modulů s moduly z reologie, kdy je tvar velmi

podobný, ale řádově vychází hodnoty jinak. Zdůvodnění a ověření tohoto faktu je předmětem dalších experimentů.

Poslední část předložené práce se věnuje ověření výše zmiňovaných experimentů na jiném koloidním systému. Pro naše účely byl vybrán vodný roztok hyaluronanu studovaný pomocí jeho fluorescenčně značeného analogu. Získané výsledky potvrzují, že je vhodnější pro popis chování polydisperzní fluorescenční sondy (značeného polymeru) v prostředí koloidního systému použít metody, které poskytují distribuce difúzních koeficientů.

8 PODÍL DOKTORANDA A VÝZNAM VÝSLEDKŮ

Na základě vnitřního předpisu VUT – Studijní a zkušební řád VUT, článku 42 a směrnice č. 2/2017 – Pravidla pro organizaci studia na FCH včetně dodatků 1 a 2, je na tomto místě vymezen podíl doktoranda na dosažených výsledcích uvedených v dizertační práci a zhodnocen jejich přínos.

Všechny experimenty v dizertační práci byly po konzultacích se školitelem a školitelem specialistou navrženy a prováděny zcela samostatně, stejně jako vyhodnocení jejich výsledků. Některé experimenty a analýzy přesahující rámec mých znalostí byly prováděny pod dohledem kompetentní osoby (Ing. Monika Trudičová – turbidimetrie a SEM, Ing. Martin Kadlec – vyhodnocení reologických modulů, doc. Filip Mravec – analýzy v softwaru QuickFit). Experimenty zahrnující vliv parametrů na změnu MSD křivek byly součástí diplomové práce Ing. et Ing. Stely Valovič, kterou jsem konzultovala. Publikační výstup byl připravován ve vzájemné spolupráci se školitelem specialistou s využitím externí jazykové revize.

Dizertační práce pojednává o využití mikroskopických fluorescenčních technik ve studiu komplexních koloidních systémů, kdy k jejich charakterizaci byla využita technika FLIM a různé varianty metody FCS. Jednotlivé přístupy buď dosud nebyly ve světové vědecké literatuře popsány nebo nebyly aplikovány na daný studovaný systém. Dizertace tak představuje originální příspěvek k porozumění studovaných systémů. Přínos výsledků je shrnutý v kapitole Závěr.

9 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] GOLDSMITH, Harry L. Microrheology of red blood cell suspensions. In: *Journal of General Physiology*. New York: Rockefeller University Press, 1968, **52**, s. 5. ISSN 0022-1295.
- [2] POKROVSKII, Vladimir N. Microrheology of dispersed systems and polymers. Stress tensor for a suspension of rigid ellipsoids. In: *Colloid Journal - USSR*. New York: Consultants Bureau/Springer, 1968, **30**(6), s. 664.
- [3] MAGDE, Douglas, Elliot ELSON a W. W. WEBB. Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System—Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy. In: *Physical Review Letters*. College Park: American Physical Society, 1972, **29**(11), s. 705-708. [cit. 2020-12-07]. DOI: 10.1103/PhysRevLett.29.705. ISSN 0031-9007. Dostupné také z: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.29.705>
- [4] *Web of Science* [online]. Toronto: Thomson Reuters, 1997 [cit. 2020-12-28]. Dostupné z: www.webofknowledge.com
- [5] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-863-6907-2.
- [6] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006. ISBN 0387312781.
- [7] ISHIKAWA-ANKERHOLD, Hellen C. a kol. Advanced Fluorescence Microscopy Techniques—FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules* [online]. 2012, 17(12), 4047-4132 [cit. 2020-12-07]. DOI: 10.3390/molecules17044047. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/17/4/4047/>
- [8] VALEUR, Bernard. *Molecular fluorescence: principles and applications*. New York: Wiley-VCH, 2002. ISBN 35-272-9919-X.
- [9] CHEN, Leng-Chun a kol. Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy for Quantitative Biological Imaging. *Digital Microscopy* [online]. Elsevier, 2013, 2013, 457-488 [cit. 2020-12-28]. Methods in Cell Biology. DOI: 10.1016/B978-0-12-407761-4.00020-8. ISBN 9780124077614. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124077614000208>
- [10] KRAEMER, Benedict a kol. Time-resolved laser scanning microscopy with FLIM and advanced FCS capability. *Proceedings of the SPIE* [online]. San Jose, 2005, **5700**, 138-143 [cit. 2020-12-29]. DOI: 10.1117/12.590500. Dostupné z: <http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?doi=10.1117/12.590500>
- [11] WAHL, M. a kol. Time-Resolved Confocal Fluorescence Imaging and Spectroscopy System with Single Molecule Sensitivity and Sub-Micrometer Resolution. *Current Pharmaceutical Biotechnology* [online]. 2004, **5**(3), 299-308 [cit. 2020-12-29]. DOI: 10.2174/1389201043376841. ISSN 13892010. Dostupné z: <http://www.eurekaselect.com/62829/article>

- [12] RÜTTINGER, Steffen a kol. Fluorescence performance standards for confocal microscopy. *Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences X* [online]. San Francisco: SPIE BiOS, 2010, **7569**, 75692I [cit. 2020-12-29]. DOI: 10.1117/12.840501. Dostupné z: <http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?doi=10.1117/12.840501>
- [13] BACIA, K., E. HAUSTEIN a P. SCHWILLE. Fluorescence Correlation Spectroscopy: Principles and Applications. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2014, **2014**(7) [cit. 2020-12-29]. DOI: 10.1101/pdb.top081802. ISSN 1559-6095. Dostupné z: <http://www.cshprotocols.org/cgi/doi/10.1101/pdb.top081802>
- [14] SCHWILLE, Petra a Elke HAUSTEIN. *Fluorescence Correlation Spectroscopy: An Introduction to its Concepts and Applications* [online]. 2001, 1-33 [cit. 2020-12-29]. Dostupné z: <https://pages.jh.edu/~iic/resources/ewExternalFiles/FCSSchwille.pdf>
- [15] BERANOVÁ, Lenka, Jana HUMPOLÍČKOVÁ a Martin HOF. *Fluorescenční korelační spektroskopie*. Chemické Listy [online]. 2009, **103**(2), 125-129 [cit. 2020-12-29]. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2009_02_125-129.pdf
- [16] SymPhoTime64. *PicoQuant: Software* [online]. Berlin [cit. 2020-12-29]. Dostupné z: <https://www.picoquant.com/products/category/software/symphotime-64-fluorescence-lifetime-imaging-and-correlation-software>
- [17] MACHÁŇ, Radek a Martin HOF. Fluorescence Correlation Spectroscopy. In: *PicoQuant* [online]. Berlin [cit. 2020-12-29]. Dostupné z: https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/17319/5_fcs.pdf
- [18] GMACHOWSKI, Lech. Fractal model of anomalous diffusion. *European Biophysics Journal* [online]. 2015, **44**(8), 613-621 [cit. 2024-01-17]. ISSN 0175-7571. Dostupné z: doi:10.1007/s00249-015-1054-5
- [19] KALWARCZYK, Tomasz a spol. Apparent Anomalous Diffusion in the Cytoplasm of Human Cells: The Effect of Probes' Polydispersity. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2017, 2017-10-26, **121**(42), 9831-9837 [cit. 2024-01-17]. ISSN 1520-6106. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jpcc.7b07158
- [20] PAL, Nibedita a spol. Fluorescence Correlation Spectroscopy: An Efficient Tool for Measuring Size, Size-Distribution and Polydispersity of Microemulsion Droplets in Solution. *Analytical Chemistry* [online]. 2011, 2011-10-15, **83**(20), 7736-7744 [cit. 2024-01-17]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac2012637
- [21] SCHAEFFEL, David a spol. Fluorescence Correlation Spectroscopy in Dilute Polymer Solutions: Effects of Molar Mass Dispersity and the Type of Fluorescent Labeling. *ACS Macro Letters* [online]. 2015, 2015-02-17, **4**(2), 171-176 [cit. 2024-01-17]. ISSN 2161-1653. Dostupné z: doi:10.1021/mz500638e
- [22] THOMAS, John C. The determination of log normal particle size distributions by dynamic light scattering. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 1987, **117**(1), 187-192 [cit. 2024-01-17]. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1016/0021-9797(87)90182-2

- [23] MONTEIRO, Michael J. Fitting molecular weight distributions using a log-normal distribution model. *European Polymer Journal* [online]. 2015, **65**, 197-201 [cit. 2024-01-17]. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2015.01.009
- [24] SKILLING, J. a R. K. BRYAN. Maximum entropy image reconstruction: general algorithm. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society* [online]. 1984, 1984-11-01, **211**(1), 111-124 [cit. 2024-01-17]. ISSN 0035-8711. Dostupné z: doi:10.1093/mnras/211.1.111
- [25] SENGUPTA, Parijat a spol. Measuring Size Distribution in Highly Heterogeneous Systems with Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Biophysical Journal* [online]. 2003, **84**(3), 1977-1984 [cit. 2024-01-17]. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(03)75006-1
- [26] MASTERS, Barry R. Fluorescence Lifetime Spectroscopy and Imaging: Principles and Applications in Biomedical Diagnostics. *Journal of Biomedical Optics* [online]. 2014, **19**(10) [cit. 2020-12-29]. DOI: 10.1117/1.JBO.19.10.109901. ISSN 1083-3668. Dostupné z: <http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?doi=10.1117/1.JBO.19.10.109901>
- [27] MARCU, Laura, Paul M. W. FRENCH a Daniel S. ELSON, ed. *Fluorescence Lifetime Spectroscopy and Imaging* [online]. 2014-7-17 [cit. 2020-12-29]. DOI: 10.1201/b17018.
- [28] KAPUSTA, Peter, Jörg ENDERLEIN a Martin HOF. FLCS - Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy. In: *PicoQuant: Application Note* [online]. Berlin, 2006 [cit. 2020-12-29]. Dostupné z: https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/7272/appnote_flcs.pdf
- [29] HUMPOLICKOVÁ, Jana a kol. Fluorescence lifetime correlation spectroscopy. In: *Photon Counting Applications, Quantum Optics, and Quantum Cryptography*. 6583. Proc. of SPIE, 2007, 2007-5-4. DOI: 10.1117/12.736637. ISBN 978-0819467119. Dostupné také z: <http://proceedings.spiedigitallibrary.org/proceeding.aspx?doi=10.1117/12.736637>
- [30] MACHÁŇ, Radek, Peter KAPUSTA a Martin HOF. Statistical filtering in fluorescence microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2014, **406**(20), 4797-4813 [cit. 2020-12-29]. DOI: 10.1007/s00216-014-7892-7. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-014-7892-7>
- [31] HUMPOLÍČKOVÁ, Jana a kol. Equilibrium Dynamics of Spermine-Induced Plasmid DNA Condensation Revealed by Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy. *Biophysical Journal* [online]. 2008, **94**(3), L17-L19 [cit. 2020-12-29]. DOI: 10.1529/biophysj.107.122408. ISSN 00063495. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349508706714>
- [32] ENDERLEIN, Jörg. Fluorescence correlation spectroscopy (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* [online]. 2013, **85**(5), 999-1016 [cit. 2020-12-29]. DOI: 10.1351/PAC-REP-11-11-17. ISSN 1365-3075. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/pac.2013.85.issue-5/pac-rep-11-11-17/pac-rep-11-11-17.xml>

- [33] ARBOUR, Tyler J. a Jörg ENDERLEIN. Application of dual-focus fluorescence correlation spectroscopy to microfluidic flow-velocity measurement. *Lab on a Chip* [online]. 2010, **10**(10), 1286-1292 [cit. 2020-12-29]. DOI: 10.1039/b924594d. ISSN 1473-0197. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b924594d>
- [34] DERTINGER, Thomas a kol. Two-Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy: A New Tool for Accurate and Absolute Diffusion Measurements. *ChemPhysChem* [online]. 2007, **8**(3), 433-443 [cit. 2020-12-29]. DOI: 10.1002/cphc.200600638. ISSN 14394235. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cphc.200600638>
- [35] DERTINGER, Thomas a kol. Dual-Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy. In: *PicoQuant: Application Note* [online]. Berlin: PicoQuant, 2011 [cit. 2020-12-29]. Dostupné z: https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/7352/appnote_2ffcs.pdf
- [36] FIŠAR, Zdeněk. Fluorescenční spektroskopie v neurovědách. In: *1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy* [online]. Praha, 2006 [cit. 2020-12-29]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>
- [37] LIVESEY, A.K. a J.C. BROCHON. Analyzing the Distribution of Decay Constants in Pulse-Fluorimetry Using the Maximum Entropy Method. *Biophysical Journal* [online]. 1987, **52**(5), 693-706 [cit. 2020-12-29]. DOI: 10.1016/S0006-3495(87)83264-2. ISSN 00063495. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349587832642>
- [38] BECKER, W. a kol. Fluorescence lifetime imaging by time-correlated single-photon counting. *Microscopy Research and Technique* [online]. 2004, **63**(1), 58-66 [cit. 2020-12-29]. DOI: 10.1002/jemt.10421. ISSN 1059910x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jemt.10421>
- [39] WAHL, Michael. PICOQUANT. Time-Correlated Single Photon Counting [online]. In: Berlin: PicoQuant, 2014 [cit. 2020-12-29]. Dostupné také z: https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/7253/technote_tcspc.pdf
- [40] ISBANER, Sebastian, Narain KAREDLA a Jörg ENDERLEIN. Dead-time correction of fluorescence lifetime measurements and fluorescence lifetime imaging. *Optics Express*. 2016, **24**(9). DOI: 10.1364/OE.24.009429. ISSN 1094-4087. Dostupné také z: <https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=oe-24-9-9429>
- [41] CHEN, Ruiyun a kol. Electron Transfer-Based Single Molecule Fluorescence as a Probe for Nano-Environment Dynamics. *Sensors* [online]. 2014, **14**(2), 2449-2467 [cit. 2020-12-29]. DOI: 10.3390/s140202449. ISSN 1424-8220. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1424-8220/14/2/2449/>
- [42] LUCHOWSKI, Rafal. Instrument response standard in time-resolved fluorescence. *Review of Scientific Instruments* [online]. 2009, **80**(3) [cit. 2020-12-29]. DOI: 10.1063/1.3095677. ISSN 0034-6748. Dostupné z: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.3095677>
- [43] GREGERSEN, Erik. Brownian motion. *Encyclopædia Britannica* [online]. Encyclopædia Britannica, inc., b.r. [cit. 2021-01-03]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/Brownian-motion>

- [44] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0579-X.
- [45] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 3. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2008. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [46] Table of Diffusion Coefficients. *Aquion* [online]. Radebeul: Aquion, 2012, 2015 [cit. 2021-01-03]. Dostupné z: <https://www.aqion.de/site/194>
- [47] ATKINS, Peter a Julio DE PAULA. *Fyzikální chemie*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2013. ISBN 978-80-7080-830-6.
- [48] GARDEL, M.L., M.T. VALENTINE a D.A. WEITZ. Microrheology. *Microscale Diagnostic Techniques* [online]. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005, 1-49 [cit. 2021-01-27]. DOI: 10.1007/3-540-26449-3_1. ISBN 3-540-23099-8. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/3-540-26449-3_1
- [49] LAI, Samuel K. a kol. Micro- and macrorheology of mucus. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2009, **61**(2), 86-100 [cit. 2021-01-27]. DOI: 10.1016/j.addr.2008.09.012. ISSN 0169409X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X08002603>
- [50] MACKINTOSH, F.C. a C.F. SCHMIDT. Microrheology. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* [online]. Elsevier Science, 1999, **4**(4), 300-307 [cit. 2021-01-27]. DOI: 10.1016/S1359-0294(99)90010-9. ISSN 13590294. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359029499900109>
- [51] CHEN, Daniel T.N. a kol. Rheology of Soft Materials. *Annual Review of Condensed Matter Physics* [online]. 2010, **1**(1), 301-322 [cit. 2021-01-27]. DOI: 10.1146/annurev-conmatphys-070909-104120. ISSN 1947-5454. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781119220510.ch9>
- [52] MASON, T. G. a kol. Particle Tracking Microrheology of Complex Fluids. *Physical Review Letters* [online]. 1997, **79**(17), 3282-3285 [cit. 2021-01-27]. DOI: 10.1103/PhysRevLett.79.3282. ISSN 0031-9007. Dostupné z: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.79.3282>
- [53] ORTEGA, Francisco, Hernán RITACCO a Ramón G. RUBIO. Interfacial microrheology: Particle tracking and related techniques. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* [online]. 2010, **15**(4), 237-245 [cit. 2021-01-27]. DOI: 10.1016/j.cocis.2010.03.001. ISSN 13590294. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359029410000300>
- [54] TARANTINO, Nadine a kol. TNF and IL-1 exhibit distinct ubiquitin requirements for inducing NEMO–IKK supramolecular structures. *The Journal of Cell Biology* [online]. 2014, **204**(2), 231-245 [cit. 2021-01-28]. DOI: 10.1083/jcb.201307172. ISSN 1540-8140. Dostupné z: <https://rupress.org/jcb/article/204/2/231/37431/TNF-and-IL1-exhibit-distinct-ubiquitin>
- [55] MANSEL, Bradley. A Practical Review of Microrheological Techniques. *Rheology - New Concepts, Applications and Methods* [online]. InTech, 2013, 2013-02-13 [cit. 2021-01-28]. DOI: 10.5772/53639. ISBN 978-953-51-0953-2. Dostupné z:

- <http://www.intechopen.com/books/rheology-new-concepts-applications-and-methods/a-practical-review-of-microrheological-techniques>
- [56] A Basic Introduction to Rheology. *Malvern Panalytical Ltd* [online]. [cit. 2024-01-17]. Dostupné z: <https://cdn.technologynetworks.com/TN/Resources/PDF/WP160620BasicIntroRheology.pdf>
- [57] WEIN, Ondřej. *Úvod do reologie*. Brno: Malé Centrum, 1996. ISBN 80-238-0928-8.
- [58] FURST, Eric a Todd M. SQUIRES. Microrheology [online]. Oxford University Press, 2017 [cit. 2024-01-17]. ISBN 978-0-19-965520-5. Dostupné z: <https://academic.oup.com/book/26241>
- [59] AHMED, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. *Journal of Advanced Research* [online]. 2015, **6**(2), 105-121 [cit. 2021-02-01]. DOI: 10.1016/j.jare.2013.07.006. ISSN 20901232. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2090123213000969>
- [60] GULREZ, Syed K. H., Saphwan AL-ASSAF a Glyn O. PHILLIPS. Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications* [online]. InTech, 2011, 2011-08-01 [cit. 2021-02-01]. DOI: 10.5772/24553. ISBN 978-953-307-268-5. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/progress-in-molecular-and-environmental-bioengineering-from-analysis-and-modeling-to-technology-applications/hydrogels-methods-of-preparation-characterisation-and-applications>
- [61] TSOU, Yung-Hao a kol. Hydrogel as a bioactive material to regulate stem cell fate. *Bioactive Materials* [online]. 2016, **1**(1), 39-55 [cit. 2021-02-01]. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2016.05.001. ISSN 2452199X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2452199X1630010X>
- [62] YAHIA, L. Hocine. History and Applications of Hydrogels. *Journal of Biomedical Sciences* [online]. 2015, **04**(02) [cit. 2021-02-01]. DOI: 10.4172/2254-609X.100013. ISSN 2254609X. Dostupné z: <http://www.jbiomed.com/biomedical-sciences/history-and-applications-of-hydrogels.php?aid=7218>
- [63] PARHI, Rabinarayan. Cross-Linked Hydrogel for Pharmaceutical Applications: A Review. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* [online]. 2017, **7**(4), 515-530 [cit. 2021-02-01]. DOI: 10.15171/apb.2017.064. ISSN 2228-5881. Dostupné z: http://apb.tbzmed.ac.ir/Abstract/APB_19295_20170413093617
- [64] PATEL, Alpesh a Kibret MEQUANINT. Hydrogel Biomaterials. *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges* [online]. InTech, 2011, 2011-08-01 [cit. 2021-02-01]. DOI: 10.5772/24856. ISBN 978-953-307-309-5. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/biomedical-engineering-frontiers-and-challenges/hydrogel-biomaterials>
- [65] DUŠEK, K. a D. PATTERSON. Transition in swollen polymer networks induced by intramolecular condensation. *Journal of Polymer Science Part A-2: Polymer Physics* [online]. 1968, **6**(7), 1209-1216 [cit. 2021-02-01]. DOI:

- 10.1002/pol.1968.160060701. ISSN 04492978. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pol.1968.160060701>
- [66] BUWALDA, Sytze J. a kol. Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials. *Journal of Controlled Release* [online]. 2014, **190**, 254-273 [cit. 2021-02-01]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.03.052. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365914002181>
- [67] ARMISÉN, Rafael. Agar and agarose biotechnological applications. *Hydrobiologia* [online]. 1991, **221**(1), 157-166 [cit. 2021-02-01]. DOI: 10.1007/BF00028372. ISSN 0018-8158. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00028372>
- [68] RINAUDO, Marguerite. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International* [online]. 2008, **57**(3), 397-430 [cit. 2021-02-01]. DOI: 10.1002/pi.2378. ISSN 09598103. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pi.2378>
- [69] SNETKOV, Petr a spol. Hyaluronic Acid: The Influence of Molecular Weight on Structural, Physical, Physico-Chemical, and Degradable Properties of Biopolymer. *Polymers* [online]. 2020, **12**(8) [cit. 2024-01-17]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: [doi:10.3390/polym12081800](https://doi.org/10.3390/polym12081800)
- [70] HASCALL, Vincent C. a Torvard C. LAURENT. Hyaluronan: Structure and Physical Properties. *Glycoforum* [online]. 1997 [cit. 2024-01-17]. Dostupné z: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [71] PETERS, Alec a Larry S. SHERMAN. Diverse Roles for Hyaluronan and Hyaluronan Receptors in the Developing and Adult Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(17) [cit. 2024-01-17]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: [doi:10.3390/ijms21175988](https://doi.org/10.3390/ijms21175988)
- [72] Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS): Note 1.3. *Thermo Fisher Scientific* [online]. Waltham [cit. 2021-01-03]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/technical-notes-and-product-highlights/fluorescence-correlation-spectroscopy-fcs.html>
- [73] DAUTY, Emmanuel a A. S. VERKMAN. Molecular crowding reduces to a similar extent the diffusion of small solutes and macromolecules: measurement by fluorescence correlation spectroscopy. *Journal of Molecular Recognition* [online]. 2004, **17**(5), 441-447 [cit. 2021-01-04]. DOI: 10.1002/jmr.709. ISSN 0952-3499. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jmr.709>
- [74] RAY, Krishanu, Jian ZHANG a Joseph R. LAKOWICZ. Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopic Study of Fluorophore-Labeled Silver Nanoparticles. *Analytical Chemistry* [online]. 2008, **80**(19), 7313-7318 [cit. 2021-01-04]. DOI: 10.1021/ac8009356. ISSN 0003-2700. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac8009356>
- [75] BALAJI, Sri a kol. Fluorescence Correlation Spectroscopy of Gold Nanoparticles. *Spectroscopy Letters* [online]. 2012, **45**(1), 22-28 [cit. 2021-01-04]. DOI:

- 10.1080/00387010.2011.588645. ISSN 0038-7010. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00387010.2011.588645>
- [76] AL-BARADI, Ateyyah M., Matthew MEARS, Richard A. L. JONES a Mark GEOGHEGAN. Diffusion of dextran within poly(methacrylic acid) hydrogels. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* [online]. 2012, **50**(18), 1286-1292 [cit. 2021-01-04]. DOI: 10.1002/polb.23120. ISSN 08876266. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/polb.23120>
- [77] STEVENS, Andrew P., Vladimir HLADY a Randal O. DULL. Fluorescence correlation spectroscopy can probe albumin dynamics inside lung endothelial glycocalyx. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* [online]. 2007, **293**(2), L328-L335 [cit. 2021-01-04]. DOI: 10.1152/ajplung.00390.2006. ISSN 1040-0605. Dostupné z: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajplung.00390.2006>
- [78] VAGIAS, A., K. a kol. Diffusion and Permeation of Labeled IgG in Grafted Hydrogels. *Macromolecules* [online]. 2017, **50**(12), 4770-4779 [cit. 2021-01-04]. DOI: 10.1021/acs.macromol.7b00514. ISSN 0024-9297. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.macromol.7b00514>
- [79] TERRY, B.R., E.K. MATTHEWS a J. HASELOFF. Molecular Characterization of Recombinant Green Fluorescent Protein by Fluorescence Correlation Microscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 1995, **217**(1), 21-27 [cit. 2021-01-04]. DOI: 10.1006/bbrc.1995.2740. ISSN 0006291X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X85727404>
- [80] HAUPTS, U., S. MAITI a P. SCHWILLE. Dynamics of fluorescence fluctuations in green fluorescent protein observed by fluorescence correlation spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1998, **95**(23), 13573-13578 [cit. 2021-01-04]. DOI: 10.1073/pnas.95.23.13573. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.95.23.13573>
- [81] VISSER, Nina V., Mark A. HINK a Arie VAN HOEK. Comparison Between Fluorescence Correlation Spectroscopy and Time-Resolved Fluorescence Anisotropy as Illustrated with a Fluorescent Dextran Conjugate. *Journal of Fluorescence* [online]. 1999, **9**(3), 251-255 [cit. 2021-01-04]. DOI: 10.1023/A:1022515902867. ISSN 10530509. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1022515902867>
- [82] GENNERICH, Arne a Detlev SCHILD. Anisotropic Diffusion in Mitral Cell Dendrites Revealed by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Biophysical Journal* [online]. 2002, **83**(1), 510-522 [cit. 2021-01-04]. DOI: 10.1016/S0006-3495(02)75187-4. ISSN 00063495. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349502751874>
- [83] *Thermo Fisher Scientific* [online]. Waltham, 2006 [cit. 2021-02-01]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home.html>
- [84] RATHGEBER, Silke a kol. Microrheology with Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Langmuir* [online]. 2009, **25**(11), 6368-6376 [cit. 2021-02-02]. DOI: 10.1021/la804170k. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la804170k>

- [85] HANSING, Johann a kol. Nanoparticle filtering in charged hydrogels: Effects of particle size, charge asymmetry and salt concentration. *The European Physical Journal E* [online]. 2016, **39**(5) [cit. 2021-02-04]. DOI: 10.1140/epje/i2016-16053-2. ISSN 1292-8941. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1140/epje/i2016-16053-2>
- [86] XU, Qingguo a kol. Nanoparticle diffusion in, and microrheology of, the bovine vitreous ex vivo. *Journal of Controlled Release* [online]. 2013, **167**(1), 76-84 [cit. 2021-02-04]. DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.01.018. ISSN 01683659. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016836591300045X?via%3Dihub>
- [87] LAI, S. K a kol. Rapid transport of large polymeric nanoparticles in fresh undiluted human mucus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2007, **104**(5), 1482-1487 [cit. 2021-02-04]. DOI: 10.1073/pnas.0608611104. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0608611104>
- [88] 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. 2021-02-04]. DOI: 10.1016/S0006-3495(04)74325-8. ISSN 00063495. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349504743258>
- [89] VEGA, A. L., H. YAO a W. Y. (2003). Effect of ionic strength and porosity on ion diffusion in agarose gels. *Summer Bioengineering Conference*. (ed.). Key Biscayne, Florida.
- [90] GOLMOHAMADI, Mahmood a Kevin J. WILKINSON. Diffusion of ions in a calcium alginate hydrogel-structure is the primary factor controlling diffusion. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2013, **94**(1), 82-87 [cit. 2021-02-04]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.01.046. ISSN 01448617. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861713000635>
- [91] REITAN, Nina Kristine, Aphirak JUTHAJAN, Tore LINDMO a Catharina DE LANGE DAVIES. Macromolecular diffusion in the extracellular matrix measured by fluorescence correlation spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics* [online]. 2008, **13**(5) [cit. 2021-02-04]. DOI: 10.1117/1.2982530. ISSN 10833668. Dostupné z: <http://biomedicaloptics.spiedigitallibrary.org/article.aspx?doi=10.1117/1.2982530>
- [92] SHI, Qiang a kol. Bioactuators based on stimulus-responsive hydrogels and their emerging biomedical applications. *NPG Asia Materials* [online]. 2019, **11**(1) [cit. 2021-02-04]. DOI: 10.1038/s41427-019-0165-3. ISSN 1884-4049. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41427-019-0165-3>
- [93] VAGIAS, Apostolos a kol. Dynamics in Stimuli-Responsive Poly(N - isopropylacrylamide) Hydrogel Layers As Revealed by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Macromolecules* [online]. 2014, **47**(15), 5303-5312 [cit. 2021-02-04]. DOI: 10.1021/ma500928p. ISSN 0024-9297. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ma500928p>
- [94] VAGIAS, A. a kol. Diffusion and Permeation of Labeled IgG in Grafted Hydrogels. *Macromolecules* [online]. 2017, **50**(12), 4770-4779 [cit. 2021-02-04]. DOI: 10.1021/acs.macromol.7b00514. ISSN 0024-9297. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.macromol.7b00514>

- [95] PRAMANIK, Ushasi a spol. An intrinsically disordered protein in F127 hydrogel: Fluorescence correlation spectroscopy and structural diversity of beta casein. *Chemical Physics Letters* [online]. 2021, **762** [cit. 2024-01-17]. ISSN 00092614. Dostupné z: doi:10.1016/j.cplett.2020.138105
- [96] KISLEY, Lydia a kol. Characterization of Porous Materials by Fluorescence Correlation Spectroscopy Super-resolution Optical Fluctuation Imaging. *ACS Nano* [online]. 2015, **9**(9), 9158-9166 [cit. 2021-02-02]. DOI: 10.1021/acsnano.5b03430. ISSN 1936-0851. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.5b03430> N
- [97] INGREMEAU, F. a kol. Optical sensing of mechanical pressure based on diffusion measurement in polyacrylamide cell-like barometers. *Soft Matter* [online]. 2017, **13**(23), 4210-4213 [cit. 2021-02-02]. DOI: 10.1039/C6SM02887J. ISSN 1744-683X. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6SM02887J>
- [98] TUMMALA, Gopi Krishna a kol. Light scattering in poly(vinyl alcohol) hydrogels reinforced with nanocellulose for ophthalmic use. *Optical Materials Express* [online]. 2017, **7**(8), 2824-2837 [cit. 2021-02-02]. DOI: 10.1364/OME.7.002824. ISSN 2159-3930. Dostupné z: <https://www.osapublishing.org/abstract.cfm?URI=ome-7-8-2824>
- [99] EGORIKHINA, M. N. a spol. Widefield Fluorescence Microscopy in Preclinical Studies of Biomedical Materials, Scaffolds, and Biomedical Cell Products. *Technical Physics* [online]. 2020, **65**(9), 1524-1529 [cit. 2024-01-17]. ISSN 1063-7842. Dostupné z: doi:10.1134/S1063784220090133
- [100] VANDAELE, Johannes a spol. Structural characterization of fibrous synthetic hydrogels using fluorescence microscopy. *Soft Matter* [online]. 2020, 2020-05-6, **16**(17), 4210-4219 [cit. 2024-01-17]. ISSN 1744-683X. Dostupné z: doi:10.1039/C9SM01828J
- [101] MARTENS, Koen J. A., John VAN DUYNHOVEN a Johannes HOHLBEIN. Spatiotemporal Heterogeneity of κ -Carrageenan Gels Investigated via Single-Particle-Tracking Fluorescence Microscopy. *Langmuir* [online]. 2020, 2020-05-26, **36**(20), 5502-5509 [cit. 2024-01-17]. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/acs.langmuir.0c00393
- [102] JIANG, Lingxiang a Steve GRANICK. Real-Space, in Situ Maps of Hydrogel Pores. *ACS Nano* [online]. 2017, 2017-01-24, **11**(1), 204-212 [cit. 2024-01-17]. ISSN 1936-0851. Dostupné z: doi:10.1021/acsnano.6b04468
- [103] ZHANG, Mengdi a spol. Real-time and noninvasive tracking of injectable hydrogel degradation using functionalized AIE nanoparticles. *Nanophotonics* [online]. 2020, 2020-07-04, **9**(7), 2063-2075 [cit. 2024-01-17]. ISSN 2192-8614. Dostupné z: doi:10.1515/nanoph-2020-0087
- [104] SEELIG, J. a spol. Nanoparticle-Induced Fluorescence Lifetime Modification as Nanoscopic Ruler: Demonstration at the Single Molecule Level. *Nano Letters* [online]. 2007, 2007-03-01, **7**(3), 685-689 [cit. 2024-01-17]. ISSN 1530-6984. Dostupné z: doi:10.1021/nl0627590
- [105] RIZZI, L. G. Microrheological approach for the viscoelastic response of gels. *Journal of Rheology* [online]. 2020, **64**(4), 969-979 [cit. 2024-01-17]. ISSN 0148-6055. Dostupné z: doi:10.1122/8.0000034

- [106] GEONZON, Lester C. a spol. Gelation mechanism and network structure of mixed kappa carrageenan/lambda carrageenan gels studied by macroscopic and microscopic observation methods. *Food Hydrocolloids* [online]. 2020, **105** [cit. 2024-01-17]. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2020.105759
- [107] PETERS, Gregor a spol. Human Laryngeal Mucus from the Vocal Folds: Rheological Characterization by Particle Tracking Microrheology and Oscillatory Shear Rheology. *Applied Sciences* [online]. 2021, **11**(7) [cit. 2024-01-17]. ISSN 2076-3417. Dostupné z: doi:10.3390/app11073011
- [108] ILHAN, Beybin a spol. Spherical probes for simultaneous measurement of rotational and translational diffusion in 3 dimensions. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2020, **576**, 322-329 [cit. 2024-01-17]. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1016/j.jcis.2020.05.026
- [109] KÁBRTOVÁ, P. *Mikroreologie pomocí fluorescenční korelační spektroskopie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 43 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Jakub Mondek
- [110] HNYLUCHOVÁ, Z. *Mikroreologie biokoloidních systémů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 137 s. (přílohy 17 s.). Vedoucí dizertační práce: prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc
- [111] KÁBRTOVÁ, P. *Pokročilé mikroreologické techniky ve výzkumu hydrogelů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 63 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D..
- [112] DUŠENKOVÁ, A. *Optimalizace mikroreologických technik pro charakterizaci biopolymerních gelů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 38 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D
- [113] PAPEŽÍKOVÁ, H. *Příprava, charakterizace a aplikační potenciál hydrogelů na bázi (semi)interpenetrovaných polymerních sítí*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. 47 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D..
- [114] DUŠENKOVÁ, Alica. *Inkorporace polyelektrolytových aktivních složek do hydrogelových matic – vliv na mechanické a transportní vlastnosti*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113442>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Petr Sedláček.
- [115] MONDEK, J. *Časově rozlišená fluorescence ve výzkumu interakcí hyaluronanu a koloidních systémů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 162 s. Vedoucí dizertační práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc
- [116] PAVLÍKOVÁ, Stela. *Vliv velikosti částic na mikroreologické experimenty pomocí fluorescenční korelační spektroskopie*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113579>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec.
- [117] CHOVANCOVÁ, R. *Dual-focus FCS in Colloidal Research*. Brno: Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, 2015. 76 p. Supervisor Ing. Filip Mravec, Ph.D.

- [118] LIU, Wei a Chi WU. Rheological Study of Soft Matters: A Review of Microrheology and Microrheometers. *Macromolecular Chemistry and Physics* [online]. 2018, **219**(3) [cit. 2024-01-17]. ISSN 1022-1352. Dostupné z: doi:10.1002/macp.201700307
- [119] RAMLI, Hairunnisa a spol. Basic principle and good practices of rheology for polymers for teachers and beginners. *Chemistry Teacher International* [online]. 2022, 2022-12-30, **4**(4), 307-326 [cit. 2024-01-17]. ISSN 2569-3263. Dostupné z: doi:10.1515/cti-2022-0010
- [120] ALAM, Khurshid a spol. Rheological Characterization of Biological Hydrogels in Aqueous State. *Journal of Applied Biotechnology Reports* [online]. 2020, **7**(3), 171-175 [cit. 2024-01-17]. Dostupné z: doi:10.30491/JABR.2020.109994
- [121] BARRANGOU, Lisa M., Christopher R. DAUBERT a E. ALLEN FOEGEDING. Textural properties of agarose gels. I. Rheological and fracture properties. *Food Hydrocolloids* [online]. 2006, **20**(2-3), 184-195 [cit. 2024-01-17]. ISSN 0268005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodhyd.2005.02.019
- [122] NARAYANAN, Jaaky, Jun-Ying XIONG a Xiang-Yang LIU. Determination of agarose gel pore size: Absorbance measurements vis a vis other techniques. *Journal of Physics: Conference Series* [online]. 2006, 2006-01-01, **28**, 83-86 [cit. 2024-02-14]. ISSN 1742-6588. Dostupné z: doi:10.1088/1742-6596/28/1/017

10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Zkratka	Význam zkratky
ADC	analog to digital converter
APD	lavinová fotodioda
CFD	constant fraction discriminator
DLS	dynamický rozptyl světla
DMSO	dimethylsulfoxid
EDM	mapa rozložení částic (Euclidean distance map)
FCS	fluorescenční korelační spektroskopie
1f-, 2f-FCS	jednoohnisková a dvouohnisková FCS
FITC-HA	fluorescenčně značená kyselina hyaluronová
FLCS	časově rozlišená FCS
FLIM	fluorescenční mikroskopie zobrazující dobu života
FRAP	obnovení fluorescence po fotovybělení
HA	kyselina hyaluronová
IC	vnitřní konverze
IRF	funkce odezvy přístroje
ISC	mezisystémový přechod
LSM	laserová skenovací mikroskopie
MEM	metoda maximální entropie
MDF	molekulová detekční funkce
PEG	polyethylenglykol
PGA	programmable gain amplifier
PIE	pulzně prokládaná excitace (pulsed interleaved excitation)
PS	polystyren
PMT	fotonásobič
PVAI	polyvinylalkohol
S_x	singletová hladina
T_x	tripletová hladina
TAC	time-to-amplitude convertor
TIRF	fluorescence s totálním vnitřním odrazem
TCSPC	časově korelované sčítání jednotlivých fotonů
v_x	vibrační hladina
WD	window discriminator

11 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ

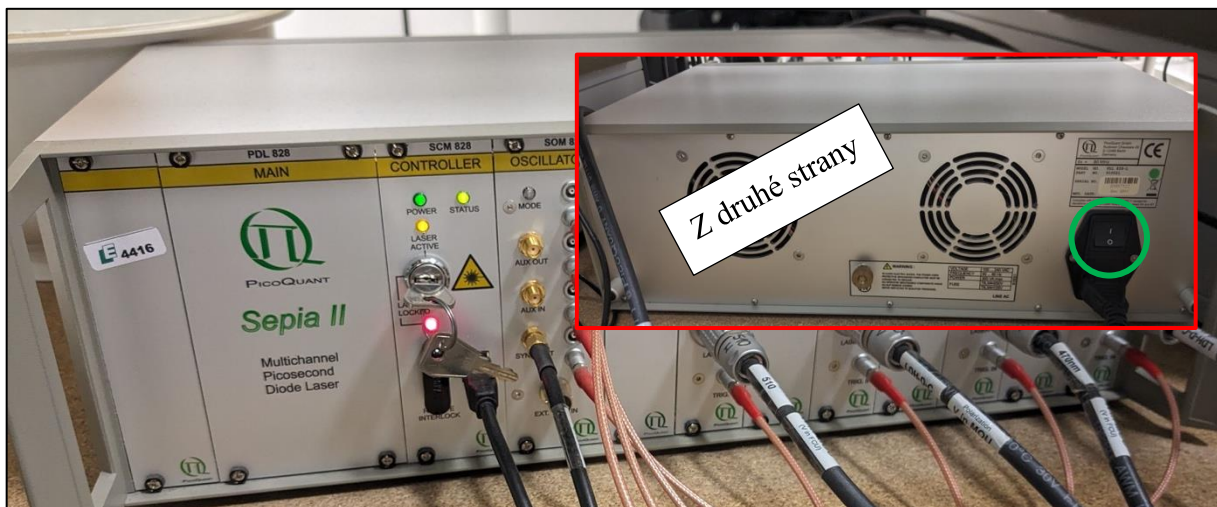
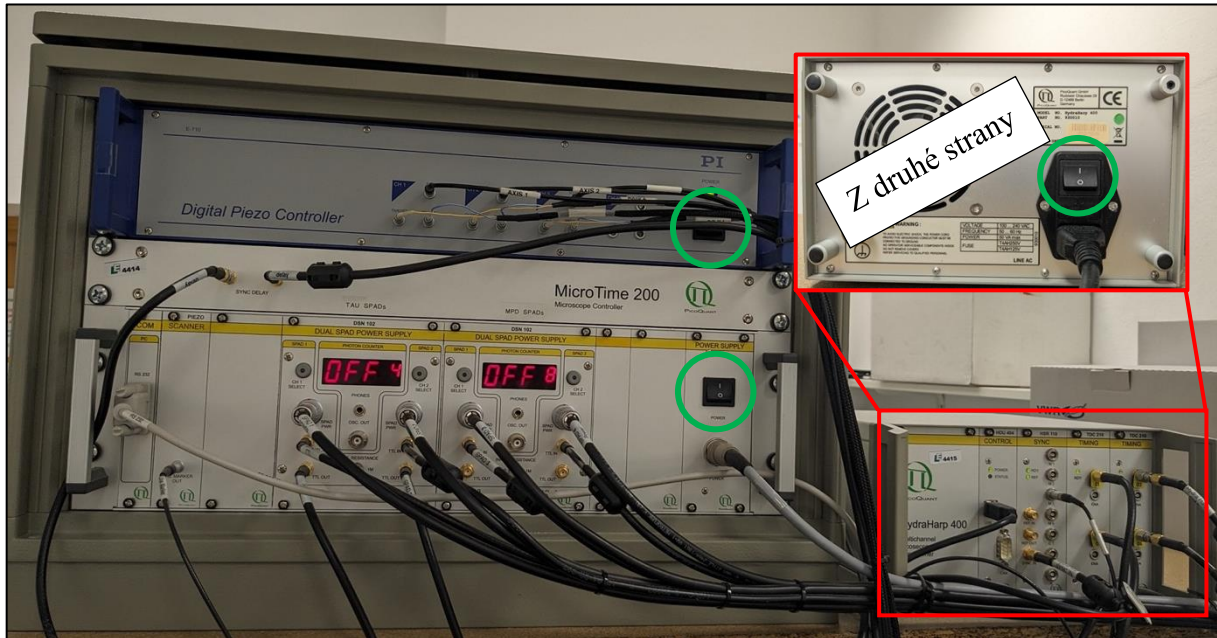
Symbol	Význam symbolu	Jednotka
D_x	difúzní koeficient	$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
$G(t)$	korelační funkce	-
G^*, G', G''	komplexní modul, elastický modul, ztrátový modul	Pa
MSD	střední kvadratický posun	m^2
I	intenzita fluorescence	Cnts
cpm	molekulární jas	$\text{Cnts} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{molekula}^{-1}$
$J(t)$	poddajnost	Pa^{-1}
$\tau_{\text{Diff, Trip}}$	difúzní čas, čas nefluorescenční komponenty	s
τ_x	doba života fluorescence	s
t	čas	s
ρ_x	relativní zastoupení	-
α	koeficient anomální difúze	-
N	počet částic	-
$V_{\text{conf, eff}}$	konfokální objem, efektivní objem	l
$w_{xy, z} (w_0, z_0)$	šířka konfokálního objemu v horizontální a vertikální rovině	m
κ	kappa	-
c	koncentrace	$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}, \text{g} \cdot \text{l}^{-1}$

12 PŘÍLOHY

Příloha 1 – Nastavení fluorescenčního mikroskopu pro měření a následné analýzy

Příprava fluorescenčního mikroskopu

- 1) Zapnout centrální vypínač – červená kolébka na rozdvojce



- 2) Zkontrolovat, jestli jsou zapnuté ostatní komponenty
- 3) Zapnout požadované detektory (dle požadovaného spektrálního rozsahu). Po zapnutí svítí tlačítko nepřerušovaně červeně a na displeji se zobrazuje signál daného detektoru (tlačítko u druhého detektoru bliká). Stlačením nepřerušovaně svítícího tlačítka se detektor vypne.

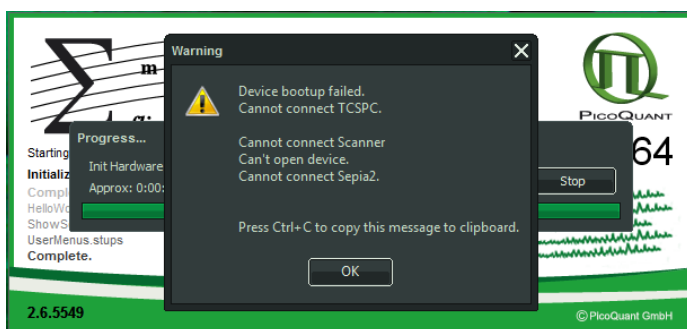


- 4) Odemknout lasery otočením klíčku do svislé polohy (zamčené lasery svítí všechny žlutooranžově). Zůstane svítit červeně jen vybraná pozice laseru (z předchozího nastavení mikroskopu). Zkontrolovat, jestli je ve výběru zasunutých laserů ten požadovaný.

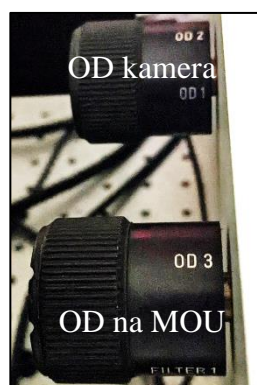
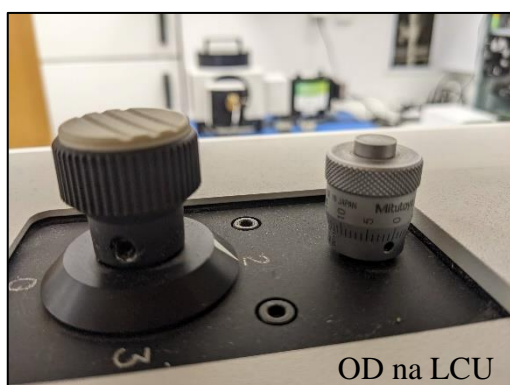


- 5) Zapnout počítač, pokud ještě není. Pustit software SymPhoTime64.

DŮLEŽITÉ!!! Vždy pustit dřív mikroskop než software – jinak nedojde ke komunikaci komponent mikroskopu se softwarem a software se stejně musí restartovat



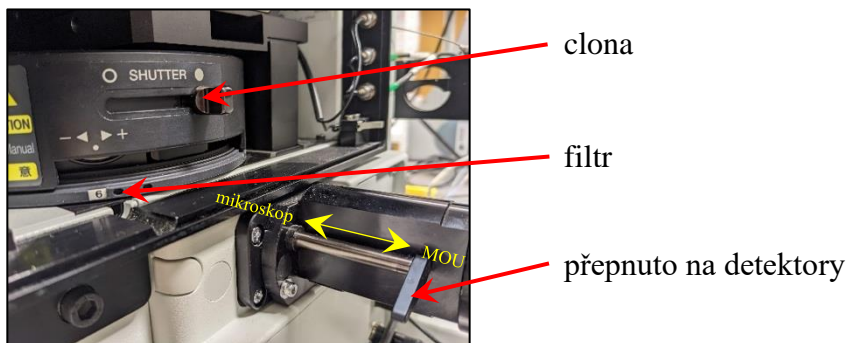
- 6) Kontrola spektrálního typu dichroického zrcadla (výměna držáku s dichroickým zrcadlem pomocí otáčení šroubu ve směru šipky), velikosti pinhole (standardně 50 μm), fluorescenčních filtrů (výběr nejen podle Ex/Em, ale i kvůli odfiltrování Ramanovského píku vody u Fluorescenční korelační spektroskopie), nastavení Optical density na LCU (Laser Combining Unit, výběr OD0–3, tedy ztlumení 10^0 – 10^3), úprava intenzity laseru hardwarově (jak moc je zašroubovaný stříbrný šroub) i softwarově (zvolit %). Začíná se na OD2 na LCU a OD3 na MOU. Detektory se samy vypnou při překročení hodnoty okolo milionu, proto je na začátku potřeba mít velké zeslabení a postupně pak přidávat.



- 7) Napustit stůl vzduchem – pozor, hadice má tendenci při přetlaku vylétnout z přívodu vzduchu

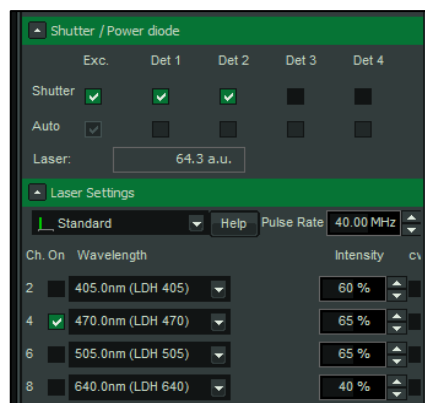
Pozn. Nepěkně hlasitý zvuk, posazuje to věci okolo a člověk se lekne, je lepší hadici přidržet na přívodu

- 8) Zkontrolovat, jestli je filtr na mikroskopu v poloze 6 (tedy prázdné, bez barevného filtru), páčka na tubusu musí být vpravo (přepínač, kam půjde emise – jestli na detektor = blíž k MOU, nebo do okulárů = blíž k mikroskopu)

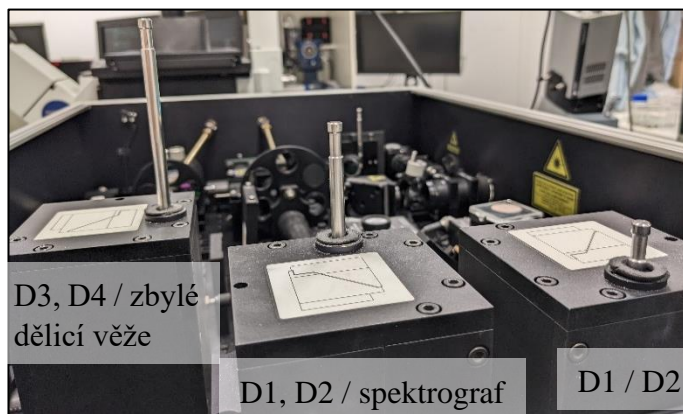


- 9) Zhasnout, nechat rozsvícený jen nejnütnější zdroj světla, například nejvíc zeslabenou lampičku u fluorologu, přiklopit černý kryt nad objektiv (minimalizace světelného šumu)

- 10) Zapnout excitační záření a požadované detektory – lze buď na krabičce s Manual control (zde zapnout i tlačítko Manual Control), případně v softwaru zakliknout požadované detektory. Laser se volí podle skutečné pozice v jednotce Sepia (sloty 2, 4, 6 a 8; tedy pokud je laser na druhém místě, v softwaru zaškrtnu políčko 4 a vyberu příslušný laser)



- 11) Pomocí dělicích věží nasměrovat světelný paprsek na požadované detektory (D1–4)

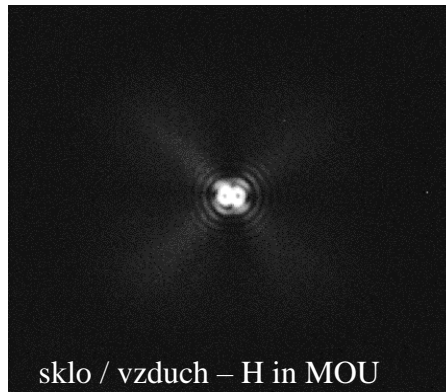


12) Dát do držáku vzorku krycí sklíčko, kápnout kapku deionizované vody na objektiv (s vodní imerzí, na olejový imerzní olej, na suchý nic), položit na to držák

Pozn.: Pokud se mění dodavatel krycího sklíčka, je vhodné zkontrolovat korekční kroužek, aby odpovídal pro danou tloušťku sklíčka. Je to sice malá změna, ale poměrně dost se zvýší přesnost měření

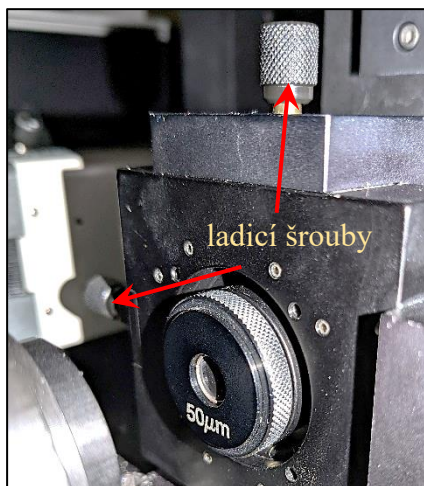


13) Najít mezifázové rozhraní sklíčko/vzduch (kříž, orientace dle polarizace laseru) pomocí pohybu šroubu v ose z. Mezifázové rozhraní sklíčko/imerzní voda je o 1,5 otáčky malým přibližovacím šroubem níž (tvar několika kruhů). Poté udělat co nejmenší světlý bod na černobílé kameře. Pokud je obraz moc intenzivní, tak se bod ladí špatně – je potřeba ztlumit intenzitu na vzdálenějším šroubu na MOU (Main Optical Unit), třeba až na OD3. Někdy je možné zachytit i nepravý odraz z rozhraní. Je potřeba najít to rozhraní, které je nejintenzivnější (je poslední směrem dolů, další pak už je rozhraní sklíčko/voda)



- 14) V softwaru být v záložce Test, vpravo nahoře vybrat TimeTrace a zvolit správné detektory, zapnout oranžovým tlačítkem Start. Pokud je zaškrtnuté logaritmické měřítko, tak ho odškrtnout, ať jsou vidět intenzitní změny lineárně
- 15) Dvěma šrouby na držáku bodové clonky (pinhole) dosáhnout co nejvyšší intenzity dopadajícího záření (tzv. backscattering signal). To stejné udělat s pomocí vychylovačů paprsků před jednotlivými detektory

Pozn.: Dá se dá hýbat i s vychylovačem paprsku, aby obraz rozhraní byl co nejsymetričtější – jak do stran, tak kroužkem. Dá se pohnout i s dichroickým zrcadlem, ale to bez dozoru zkušenější osoby nedoporučuji.



sem je potřeba se trefit laserovým paprskem

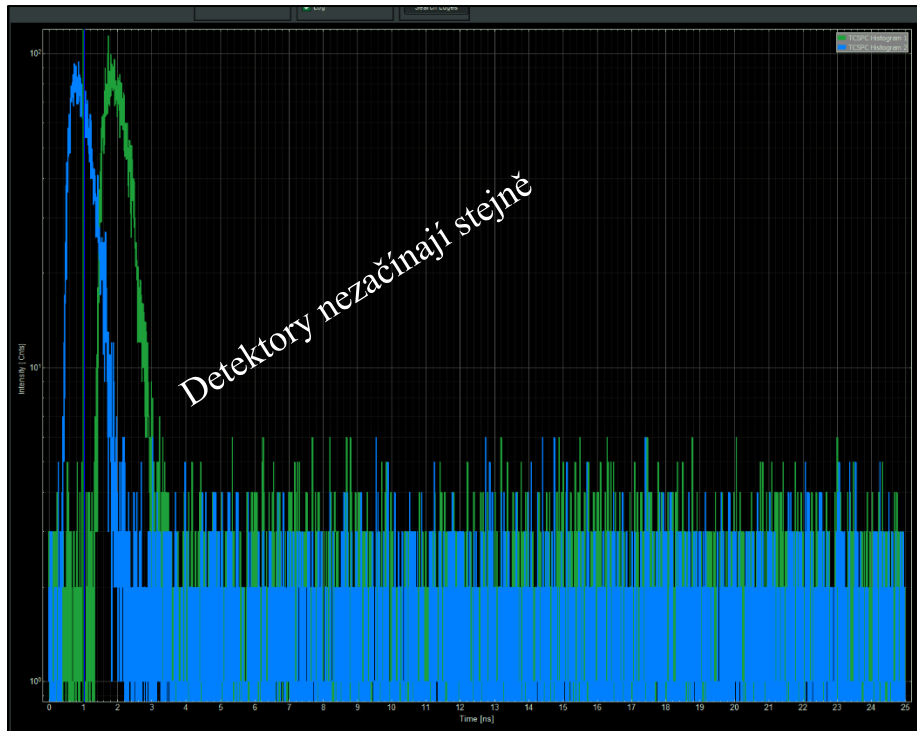


Pomocí šroubů na clonce (2 ks) a zaostřovacím šroubem na mikroskopu (taky 2 ks, vlevo a vpravo na těle mikroskopu, ale dělají to stejně) přejet přes **intenzitní maximum**. Pokud se oba detektory chovají stejně, pak je dosaženo globálního maxima.

- 16) Zajištění konfokality systému pomocí ladění společných optických prvků (pozice ohniska, vychylovač paprsku pro vstup do mikroskopu, dichroický prvek, konfokální štěrбина, vychylovače paprsku před detektory) je iterativní záležitost a je potřeba se při změně jednoho prvku vrátit k doladění všech předešlých. Ladění by mělo být skončeno právě

tehdy, když už mírný posun v nastavení optických prvků nezpůsobuje výrazné změny v intenzitě nebo časovém profilu signálu

- 17) Po dosažení nejvyšší intenzity se přepnout do módu TCSPC. Zde je potřeba zkontrolovat náběh všech detektorů. Začátek by měl být okolo 1 ns (není potřeba tam mít víc balastního času, zas u kratšího času je riziko, že tam nebude celý pulz)



- 18) Pomocí tlačítka Search Edges zjistit začátek obou TCSPC histogramů. Na základě toho upravit Offset pro každý Channel (detektor 1 = channel 1 atp.). Offset se zadává v ps. Je potřeba pouze doladit už tam zadanou hodnotu (tedy když je offset -30000 ps a je potřeba upravit hodnotu o 0,1 ns, tak se zadá -30100 ps, nikdy se to neresetuje celé). Náběhy nebývají úplně přesně stejné, mírná odchylka je běžná (okolo 10 ps)

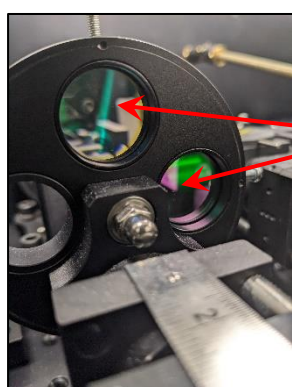
Z rozbalovací nabídky vybrat správný detektor, upravit začátek náběhu podle Search Edges

- 19) Pokud znám dobu života fluorescence používaného fluoroforu, je vhodné doladit k tomu i frekvenci blikání laseru (Pulse Rate, standardně je nastavena na 40 MHz, což je vhodné pro fluorofory o době života fluorescence okolo 4 ns)
- 20) Po skončení měření – dělicí věže dát do nejnižší polohy, zakrýt zpátky MOU, vrátit dělicí věže zpět do původní polohy

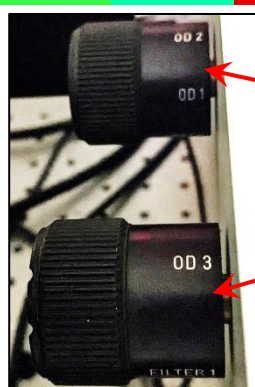
Kalibrace konfokálního mikroskopu pomocí dvou detektorů

- 1) Zapnout a připravit mikroskop viz výše, závěrky před detektory vypnuté (stačí jen vysunuté dělicí věže)
- 2) Na filter carouselu nastavit správný filtr. Pokud není vložený, tak vyndat z držáku a vložit do carouselu. Emisní filtr se vyměňuje v rukavicích a pomocí šroubováku. Pro filtr jsou vyhrazeny dvě polohy. Pokud je na šroubu nastavené Filter 1, tento filtr se nachází dole v optické dráze. Je potřeba ho dostat nahoru, by se dal vyměnit, tedy o dvě pozice otočit (na šroubu bude buď OD3 nebo Open, zaleží, který filtr se mění). Sledovat šipku na hraně filtru a podle typu filtru (výrobce) ho vložit správně (liší se Chroma® a Semrock®, dávají se opačný směrem šipky)

Výrobce	Směr šipky	Označení filtrů					
Chroma	Detektor → vzorek	437/25	440/40	690/70	405/LP	430/LP	460/LP
Semrock	Vzorek → detektor	520/35	550/49	519/LP	750/SP	488R	



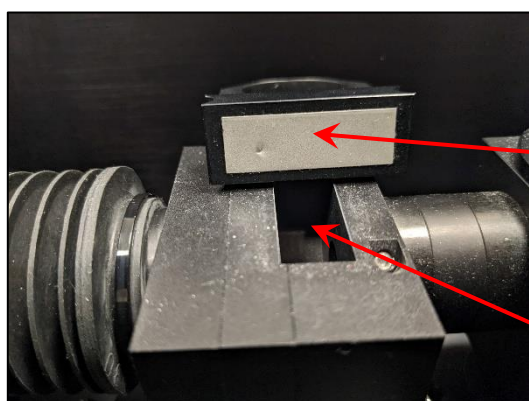
místa pro vložení emisního filtru



Šroub ovládající černobílou kameru

Šroub pro filter carousel – v tomto případě je možné vyměnit Filter 2 (fyzicky je teď nahore)

- 3) Další možností je vložení filtru přímo před detektor – v případě, že na každý detektor je potřeba jiný filtr. V carouselu je filtr společný pro celou MOU.

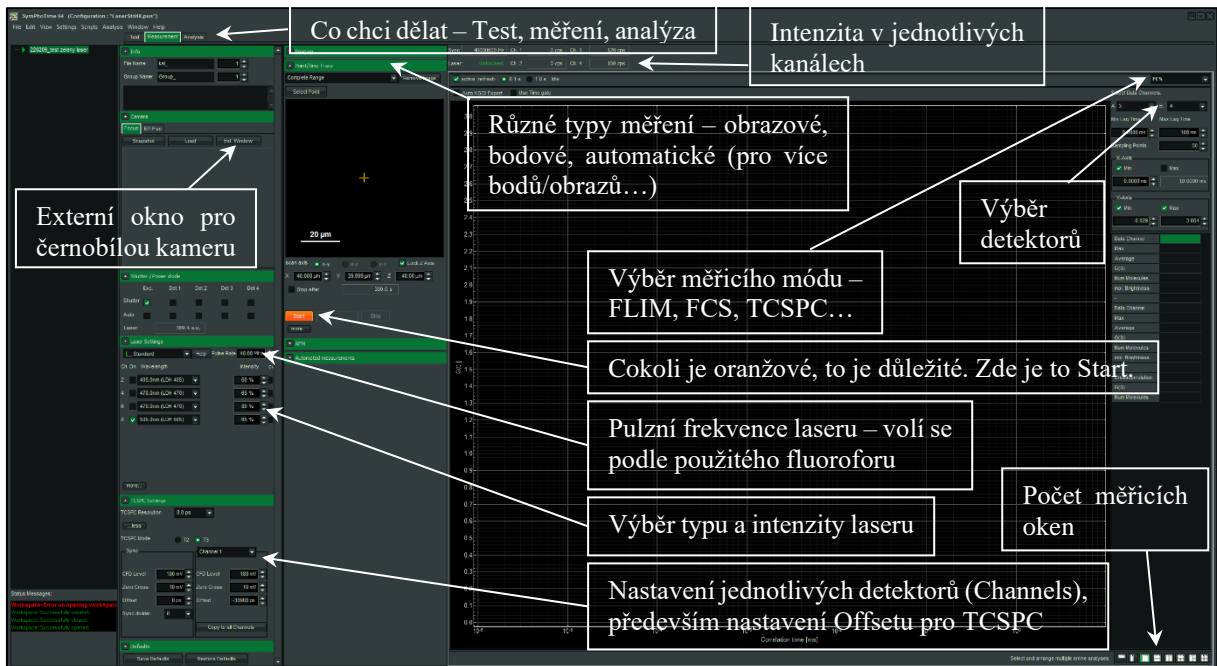


Držák pro emisní filtr. Některé jsou už přímo popsané, co za typ filtru tam patří. Po vyndání filtru z držáku kvůli vložení filtru do carouselu je nutné, aby se držák položil na místo na stole s nápisem daného filtru (Filter 1/ Filter 2) pro lepší orientaci, který filtr je kde.

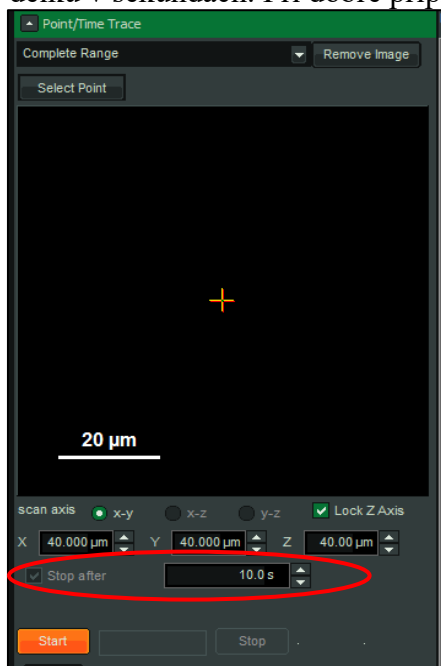
Místo pro zasunutí držáku s emisním filtrem

- 4) Vytvořit novou složku – často to nebere interpunkci, tak název bez ní. Speciální znaky jsou v pořádku

- 5) Přepnout se do záložky Measurement, vpravo nahoře vybrat z rozbalovací nabídky možnost měření FCS a vybrat správné detektory

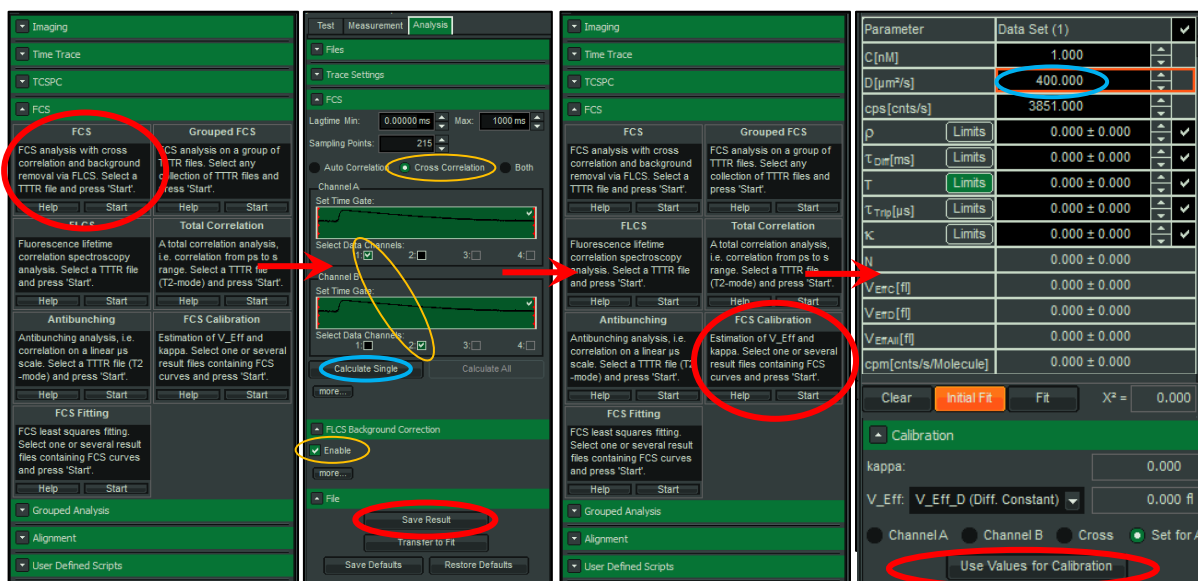


- 6) Na krycí sklíčko kápnout kalibrační roztok (stačí kapka, ne moc, aby se to nerozteklo po sklíčku, přesně na laserový paprsek), zaostřovacím šroubem vyjet kousek výš do vzorku – orientace podle mezifázového rozhraní a číselné hodnoty intenzity fluorescence na DPC nebo v softwaru
- 7) Je možné zadat čas měření – záložka Point Measurement, zaškrtnout Stop after – nastavit délku v sekundách. Při dobře připraveném roztoku je délka okolo 5 minut dostatečující



- 8) Zapnout závěrku detektorů a měření oranžovým tlačítkem Start

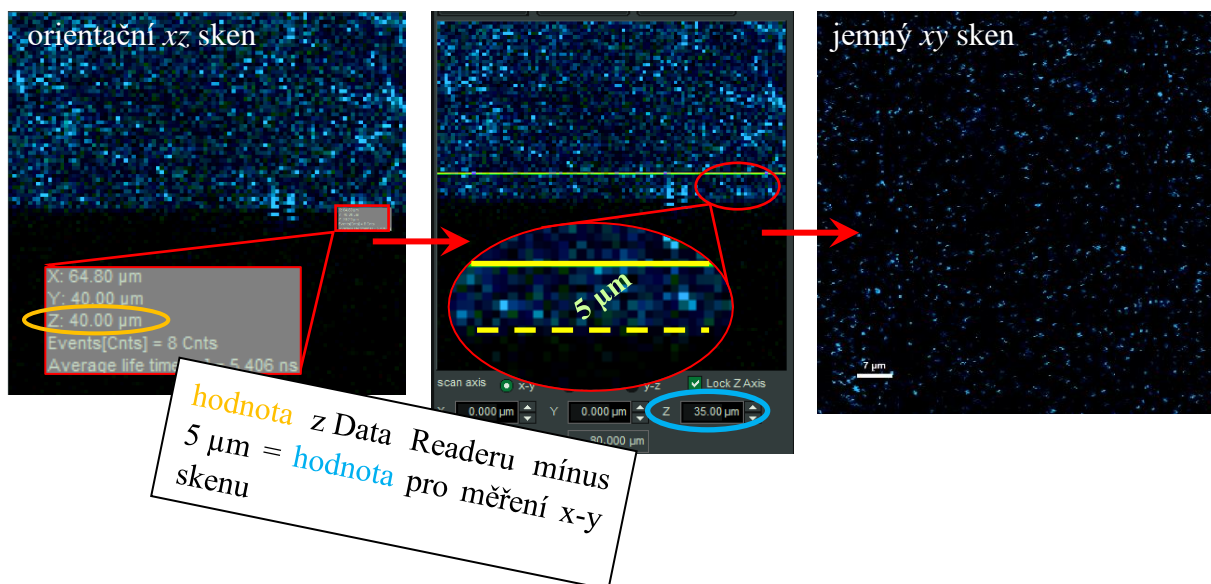
- 9) Po skončení měření se uloží vlevo dva soubory – označit ten hlavní (horní) a přepnout se do módu Analysis
- 10) Vybrat záložku FCS a dát start → Crosscorrelation → vybrat používané detektory → zaškrtnout FLCS Background – Enable → Calculate Single → Save Result
- 11) Vybrat uložená data v předchozím kroku a spustit FCS Calibration
- 12) Do kolonky D (difúzní koeficient) napsat skutečný (vypočítaný) difúzní koeficient podle aktuální teploty podle tabelovaného pro kalibrační fluorofor → Initial Fit → Use values from calibration → Save result



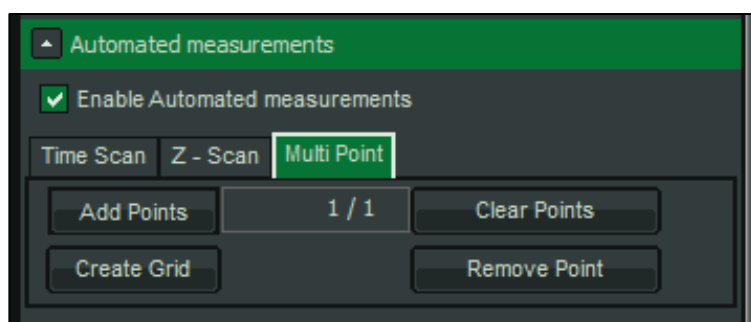
Pozn.: Z matematického hlediska není korelace detektorů komutativní a může záležet, jestli je korelován detektor 1 s detektorem 2 nebo naopak. Kvůli chybě je dobré dodržovat pro celé měření stejnou křížovou korelaci (minimálně by to mělo sedět s používanou kalibrací).

Měření FCS (korelační křivky)

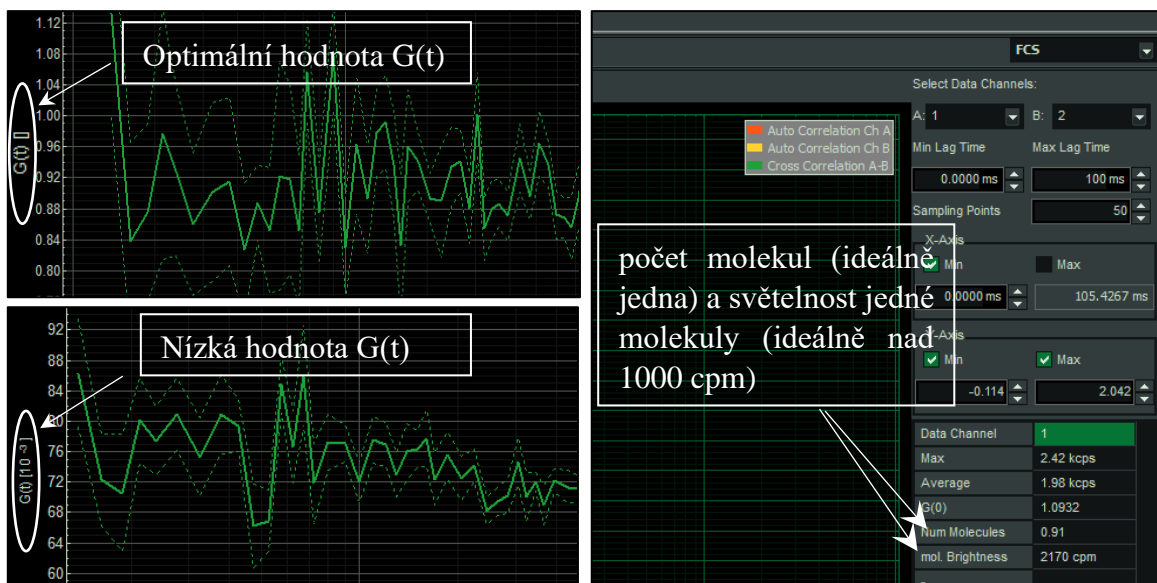
- 1) Zkontrolovat stav objektivu, jestli je na něm dostatečné množství imerzního prostředí
- 2) Položit držák se vzorkem, najít opět mezifázové rozhraní sklíčko/vzorek (pokud je rozhraní „divné“, je potřeba se orientovat podle rozhraní sklíčko/voda, které je pořád stejné. Hledané rozhraní je to o 1,5 otáčky nad ním, tedy hned to následující)
- 3) V případě roztoku stačí vyjet do vzorku (půl otáčky nahoru) a měřit tam
- 4) V případě jiných vzorků (hydrogely, membrány, buňky, cokoli, co neteče) je vhodné udělat xz a následně xy sken 5 µm nad sklíčkem, aby se vědělo, ve kterém místě se přesně měří (postup viz Měření FLIM). Pro finální xy sken je lepší, když je větší rozlišení, aby byla lépe vidět případná nehomogenita



- 5) Přepnout se do záložky Point/Time Trace, hodnoty všech os jsou standardně na 40 µm. V případě potřeby je možné s každým bodem pohnout jinak
- 6) Pokud se měří pouze jeden vzorek, stačí dát Start (může se zvolit ještě doba měření) a měřit
- 7) Při měření více bodů naráz je vhodné se přepnout do záložky Automated Measurements → Multipoint → Clear Points → Add Points. Tady už je nutné zadat dobu měření jednoho bodu – vše záleží na fluoroforu a typu vzorku. Většinou 5–15 minut na jeden bod stačí

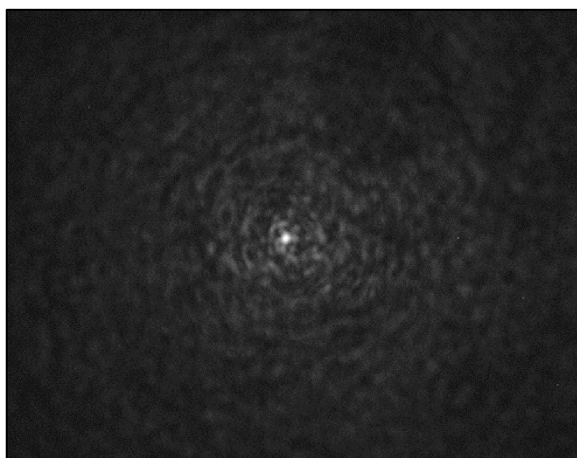


- 8) Kontrola hodnoty korelační funkce G – měla by být okolo 1 (tedy jedna molekula v objemu, jedná se o převrácenou funkci počtu částic). Mezní hodnota pro správné vyhodnocení je okolo $G = 0,2$ (na ose při měření se to zobrazuje jako 200, kdy se ale hodnota v popisu osy změní na 10^{-3})
- 9) Kontrola Molecular Brightness – pokud vzorek svítí málo, je možné přidat na intenzitě excitace. Není možné (fyzicky ano, pro správnost vyhodnocení ne) přidat intenzitu během měření a v měření pokračovat, vždycky je potřeba vypnout měření a začít znovu s novou intenzitou. Pokud se zvolí vyšší intenzita, je potřeba znovu změřit kalibraci – se zvyšující se intenzitou laseru se zvětšuje i síla (tloušťka) laseru, tím pádem i velikost konfokálního objemu. Pokud se Molecular Brightness nezmění ani po přidání výkonu laseru, případně je v záporných číslech, je něco špatně se vzorkem. Příliš vysoká intenzita ale není vhodná kvůli možné fotodestrukci vzorku. Hodnota MB se nezmění po přidání dalšího fluoroforu – je to teoretická hodnota intenzity fluorescence pocházející z jedné molekuly fluoroforu



Poznámka pro měření hydrogelů:

- Celou dobu od přípravy mít vzorek překrytý shora parafilmem kvůli vysychání vzorku
- Kvůli nehomogenitě prostředí je obraz na černobílé kameře „flekátý“. Občas se zde objeví odraz z rozhraní. Samotné rozhraní má tvar něco mezi křížem a kolečkem, spíš kolečko (vzorek je z velké části voda, tak je tomu podobné i rozhraní).



Obraz z černobílé kamery těsně nad rozhraním

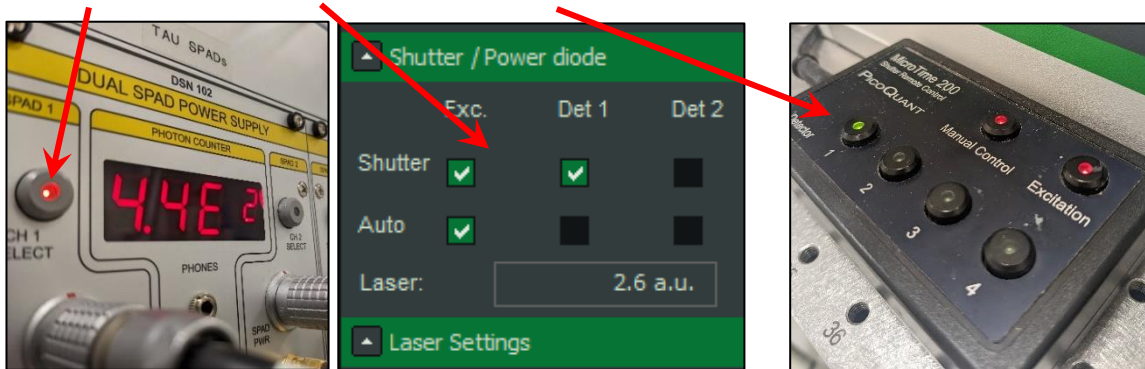
- Je potřeba udělat xz sken $\rightarrow xy$ sken se dělá $5 \mu\text{m}$ nad sklíčkem (pravým tlačítkem Show Data Reader, zjistit hodnotu, kde začíná sklíčko, manuálně zadat vypočítanou hodnotu do pozice pro osu z) \rightarrow Start \rightarrow vybrat body pro měření – vyhnout se výrazným nehomogenitám, pokud to není účel měření (vzduchové bubliny, intenzivní shluky čehosi...)

Měření TCSPC

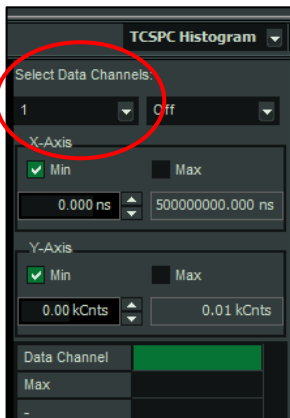
- 1) Přepnout se na měření TCSPC histogramu
- 2) Naměřit IRF (Instrument Response Function)

Pozn.: Tohle je nutné pro správnou analýzu pomocí módu Reconvolution (viz dále). Pro mód Tailfit to není nutné, ale i tak je vhodné to mít naměřené

a. Hardwarově i softwarově (nebo Manual Control) nechat zapnutý pouze jeden detektor



b. Vybrat v Select Data Channels pouze ten zapnutý



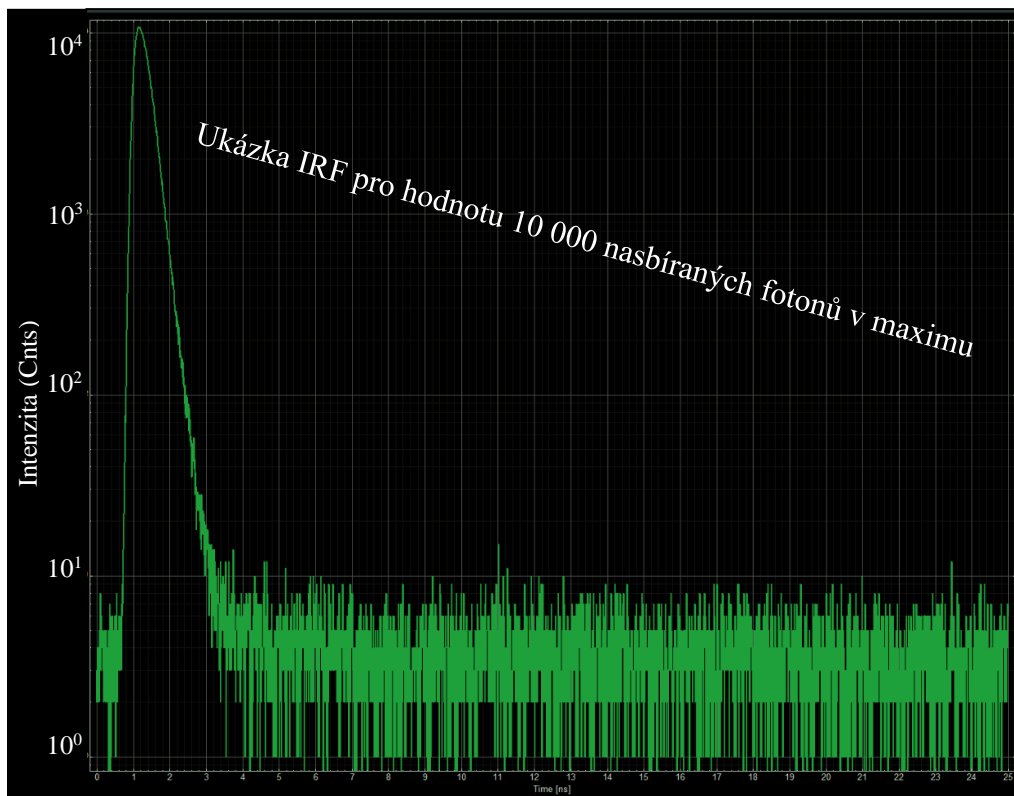
c. Měřit na rozhraní sklíčko/vzduch

d. Pokud vím, že měřím velmi intenzivní odezvu a malé množství fotonů, je vhodné nechat software, ať se zastaví sám pomocí zaškrtnutí Stop after

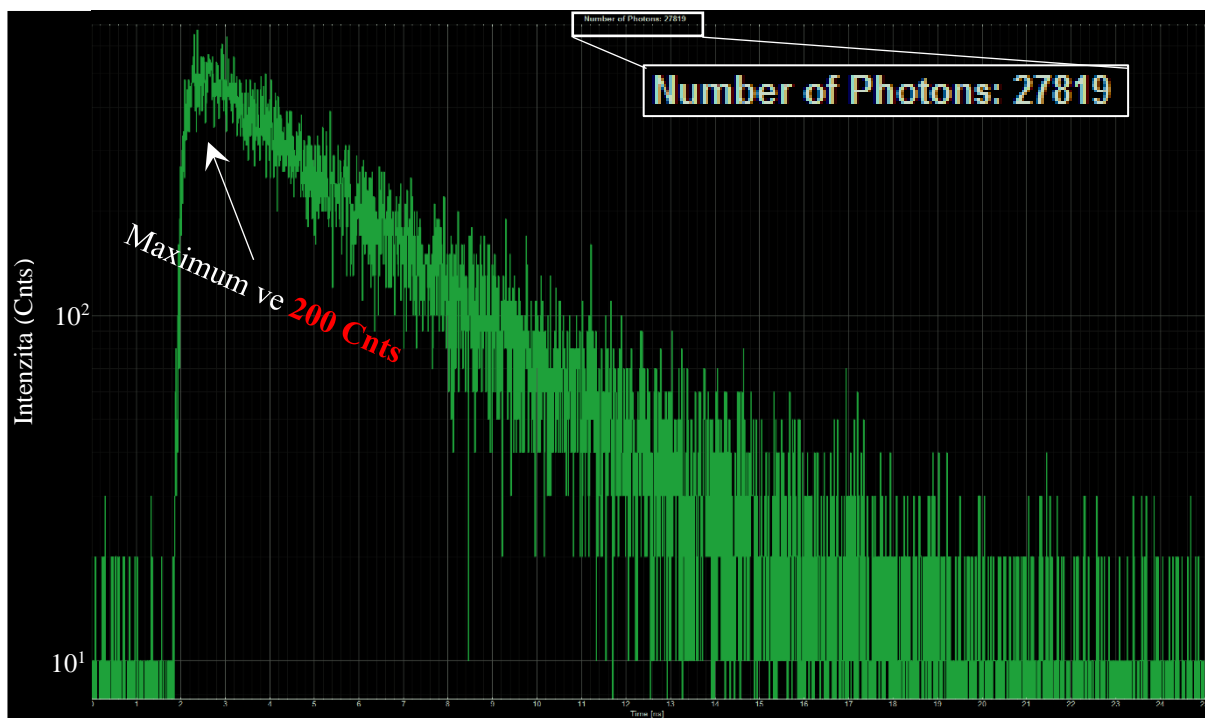
e. Udělat si několik histogramů podle maximálního počtu fotonů podle toho, co očekávám od vzorku. Když nevím, tak je standard 1000, 5000, 10000, 25000.

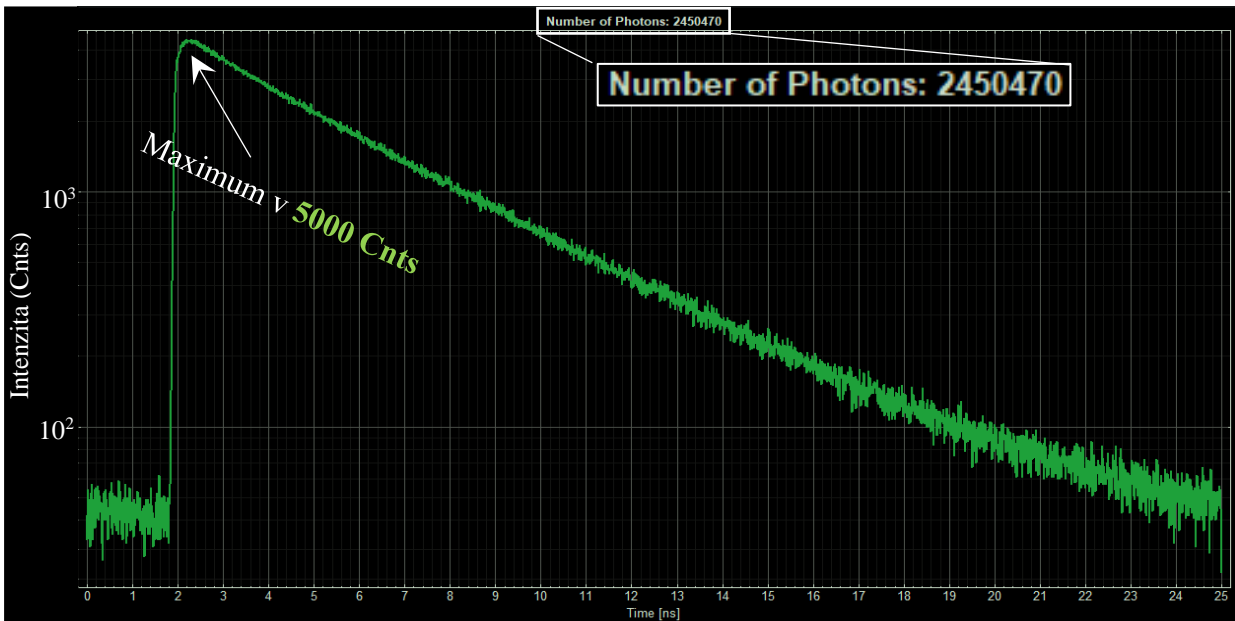
f. Je možné naměřit IRF až po doměření vzorků, aby bylo známé maximum fotonů vzorku, nicméně se pak během doby měření nemůže vyhodnocovat, když není naměřené IRF

Pozn.: Je možné nechat zapnuté všechny detektory a signál rozdělit až při analýze dat, ale je to zbytečná práce navíc



- 3) Vložit vzorek, najít požadované místo na měření, zapnout měření
- 4) Doba měření je závislá na vzorku, pořád platí pravidlo 10 000 nasbíraných fotonů v maximu. Pokud se ale vzorek měří už půl hodiny a pořád jsme na 3 000 fotonech, asi nemá smysl měřit dál, neboť vzorek je velmi pravděpodobně už fotovybělený, lokálně přehřátý, a tedy nepoužitelný

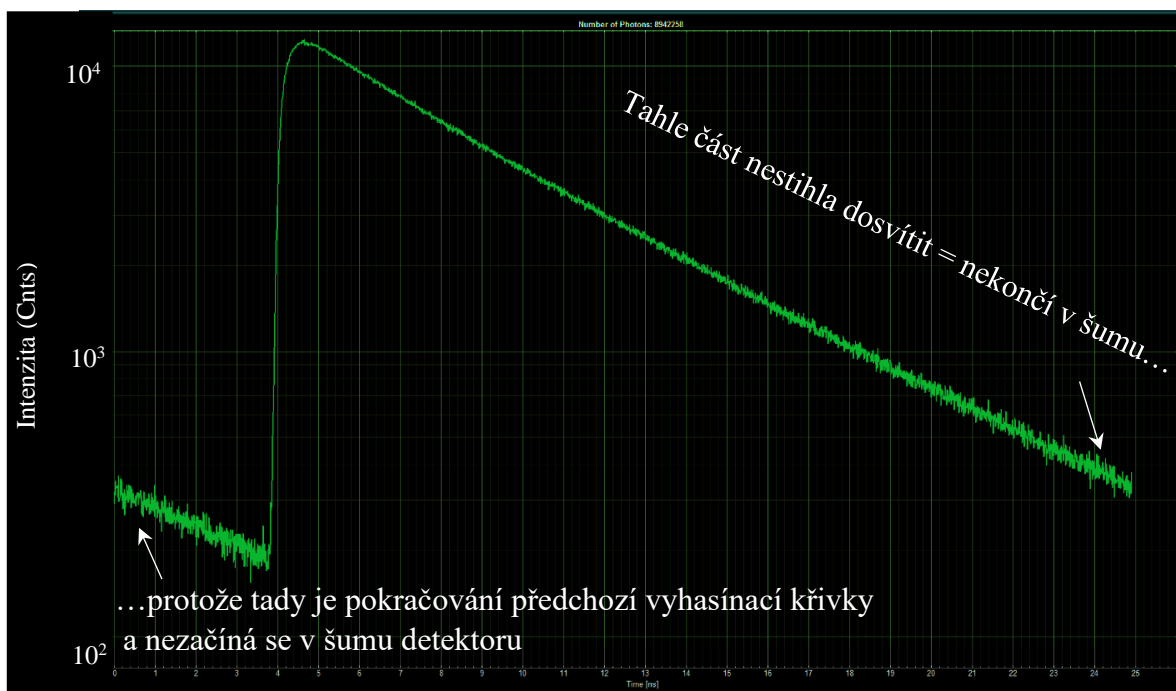




Pozn.: Když se k měření měří zároveň i TimeTrace (dvě okna – jedno pro TSCSPC a druhé pro TimeTrace), tak je na intenzitě vidět, jestli se se vzorkem něco děje ve smyslu degradace, nebo naopak generace nových svítících částic, nebo jestli vzorek nezmizel (ve smyslu, že nedošlo k posunu měřeného objektu, neprasklo sklíčko – nejčastější případ, ...).

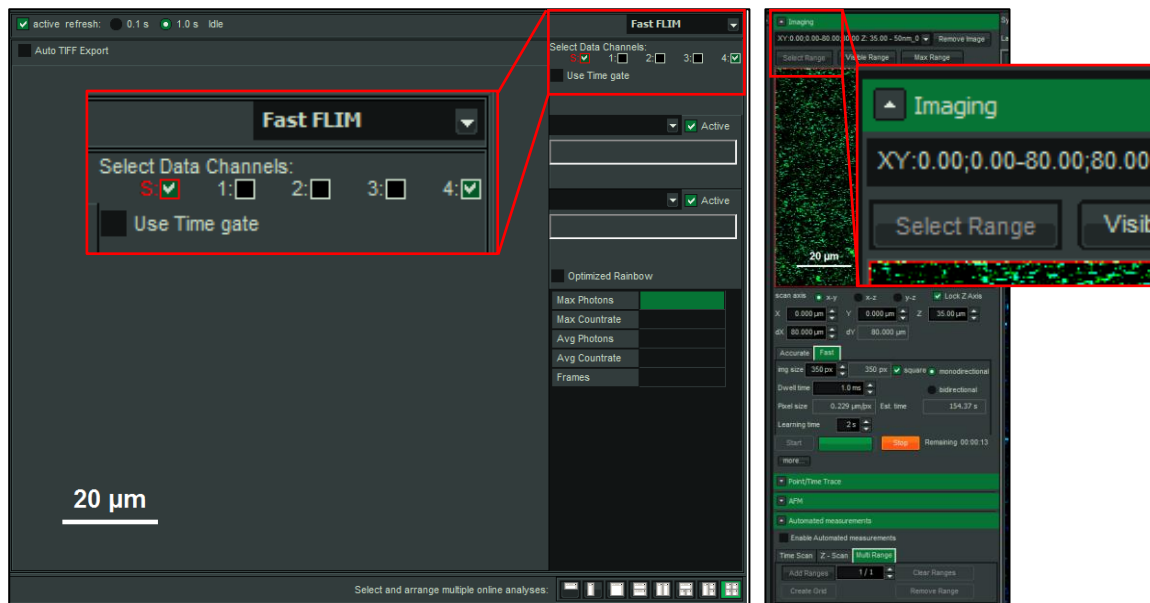


- 5) Je potřeba pohlídat, jestli interval laserového pulzu není moc krátký, tedy jestli fluorofor stihne dosvítit. Pokud ne, je potřeba snížit frekvenci blikání laseru (prodloužit dobu mezi pulzy) a naměřit znova i IRF



Měření FLIM obrázků

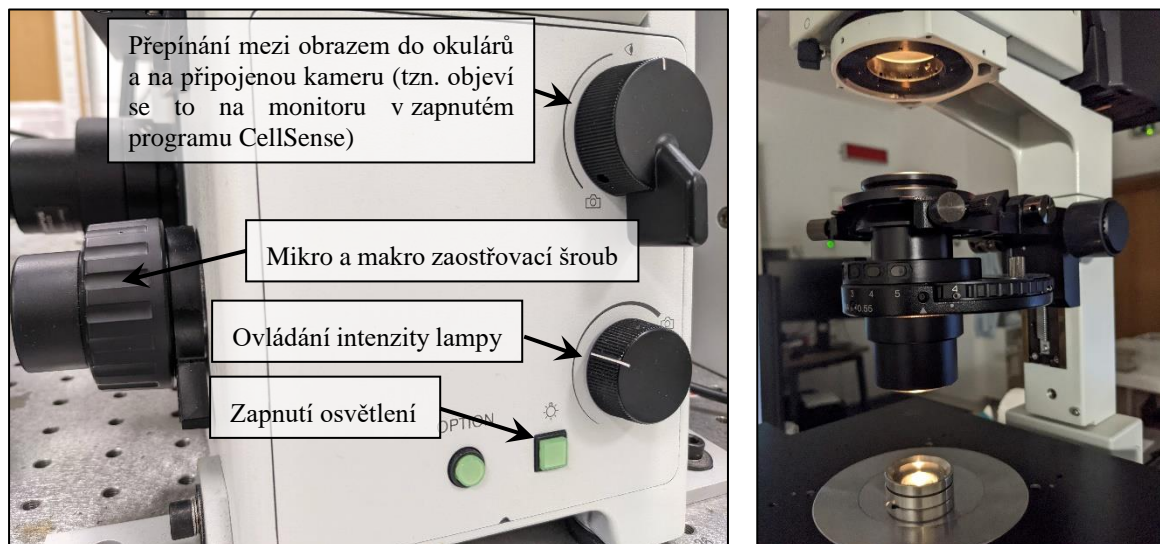
- 1) Z rozbalovací nabídky vpravo nahoře vybrat Fast FLIM, veškerá měření probíhají v záložce Imaging



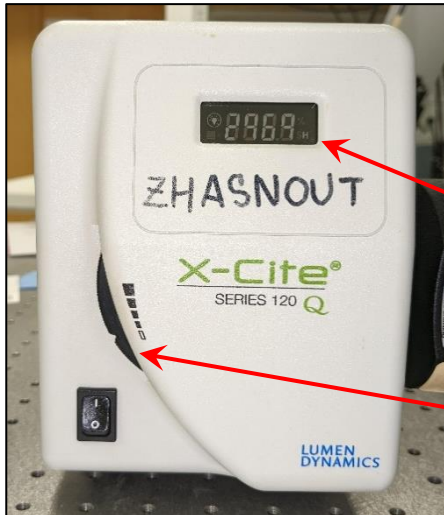
- 2) Vložit držák se vzorkem na objektiv, najít mezifázové rozhraní sklíčko/vzorek, prozatím nedávat light protection cover (velká černá papírová krytka přes vzorek)

Následující body se týkají především měření živých vzorků, případně vzorků, kde očekáváme zobrazení struktury „pouhým okem“ (velké nanočástice, membrány...)

- 3) Páčku na tubusu posunout směrem k mikroskopu, přiklopit horní část mikroskopu tak, aby byla svisle



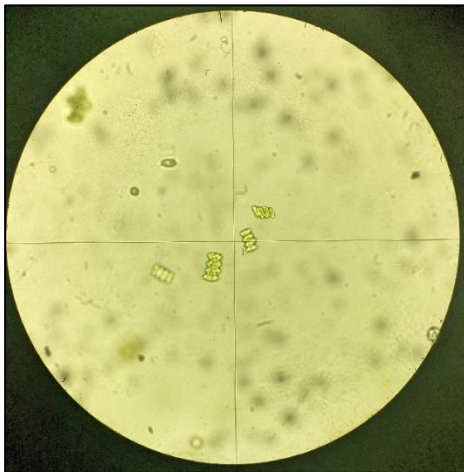
- 4) Zapnout lampu X-Cite po levé straně mikroskopu. Chvilí trvá, než se nahřeje (typicky 90 sekund), připravená je, až symbol žárovky přestane blikat



Počet hodin, které byla lampa v provozu od výměny světelného zdroje (speciální 120W rtuťová výbojka, garantovaná životnost přes 2000 hodin, typicky 2500 hodin)

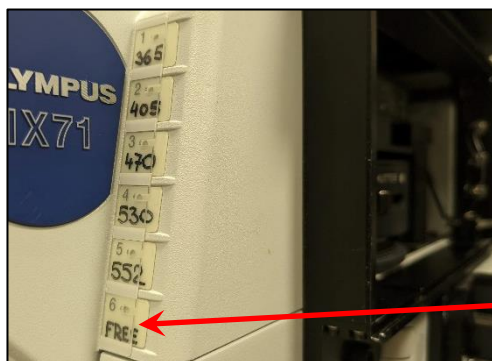
Regulace intenzity záření

- 5) Na těle mikroskopu zapnout zdroj žlutého světla. Takto přes optický mikroskop najít vrstvu, kde přibližně bude probíhat měření.



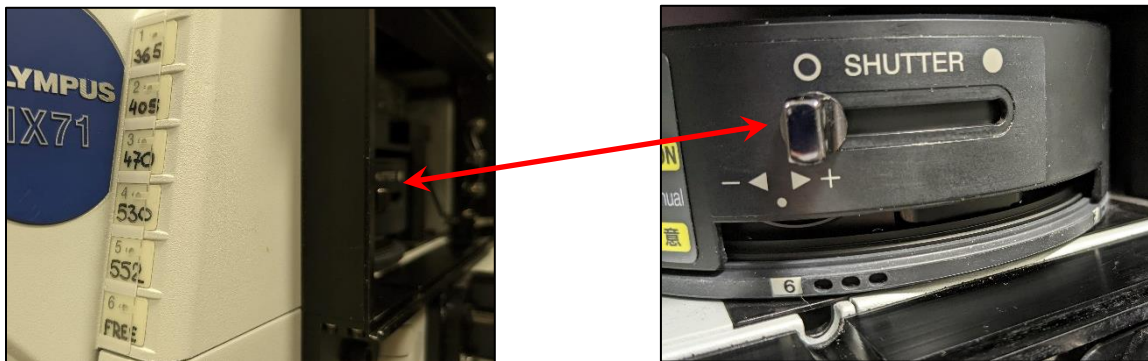
Pohled do okuláru mikroskopu – jeden z okulárů obsahuje i zaměřovací kříž. Pro lepší orientaci je dobré, když se kříž nachází v této pozici. Skener skenuje oblast okolo středu.

- 6) Zaostřovacím šroubem najít vrstvu, ve které bude probíhat měření.
 7) Na těle mikroskopu je seznam dostupných filtrů (označení na 1–6). Vybrat vhodný pro měřený vzorek a nastavit ho vpravo v mikroskopu na filter wheel. Musí to zacvaknout, občas to má tendenci zůstat v poloze těsně před zapadnutím

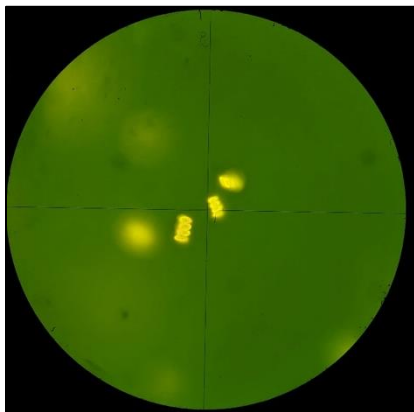


- 8) Zakrýt vzorek

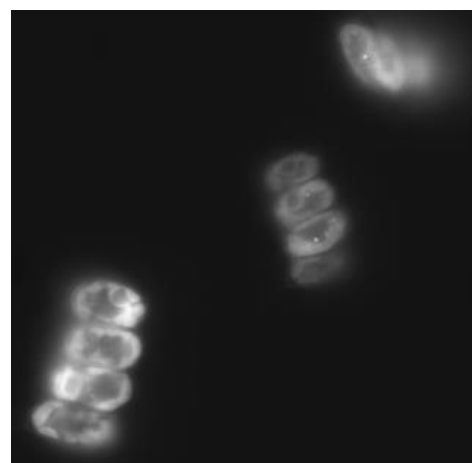
- 9) Na lampě X-Cite přidat intenzitu záření a najít si přes fluorescenční mikroskop místo, kde chci měřit. Pokud není vidět obraz, zkontrolovat otevření clony (Shutter) vpravo na těle mikroskopu



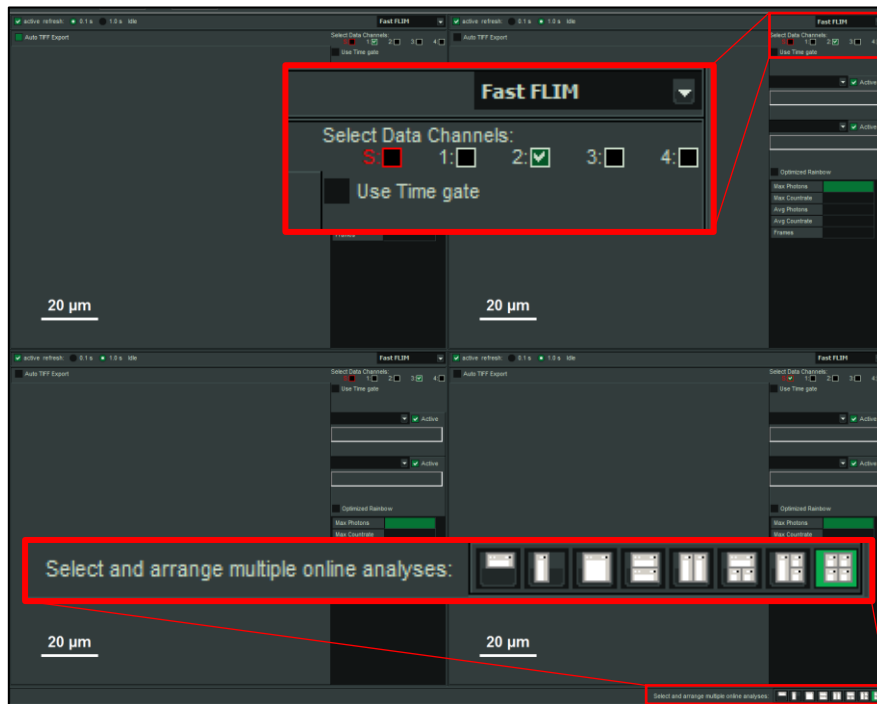
- a) **DŮLEŽITÉ:** V softwaru v záložce Point/Time Trace zadat do všech souřadnic 40 μm , i když tam je nastavená. Někdy mikroskop neví, že to tam je nastavené a měří jinde. Stačí kliknout do každého okénka a dát enter, pak se podívat, co to udělalo se vzorkem



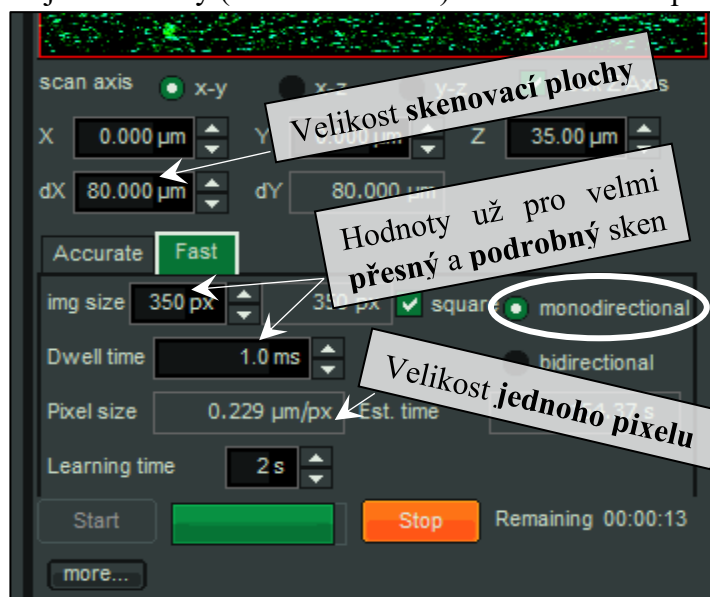
- 10) Pokud potřebuji přenést obraz na obrazovku, pak je postup následující
- Zapnout program CellSens Entry
 - Přepnout zobrazení obrazu ze symbolu oka na symbol kamery na těle mikroskopu
 - Zmáčknout tlačítko Live, pro pořízení snímku stisknout Snap. Lze i nahrávat video (vhodné například pro sledování buněk, videomikroreologii...)



- d) Je možné nastavit i barevné pozadí, defaultně je obraz černobílý. Stejně tak si lze vybrat i světelnost celého objektu (přepnout Exposure z Automatic na Manual a vybrat si hodnotu)
- 11) Nastavit na filter wheel zpět číslo 6, posunout páčku směrem k MOU → všechen signál jde do detektorů
 - 12) Pokud je potřeba měřit víc obrázků stejného místa, ale s jinými parametry (nejčastěji před každým detektorem je jiný emisní filtr), pak je možné vybrat si vpravo dole počet oken, tedy počet různých obrázků. Pro každý z nich je možné vybrat zdroj dat, v tomto případě detektor/kombinaci detektorů. Písmeno S znamená průměr dat ze všech zapnutých a používaných detektorů

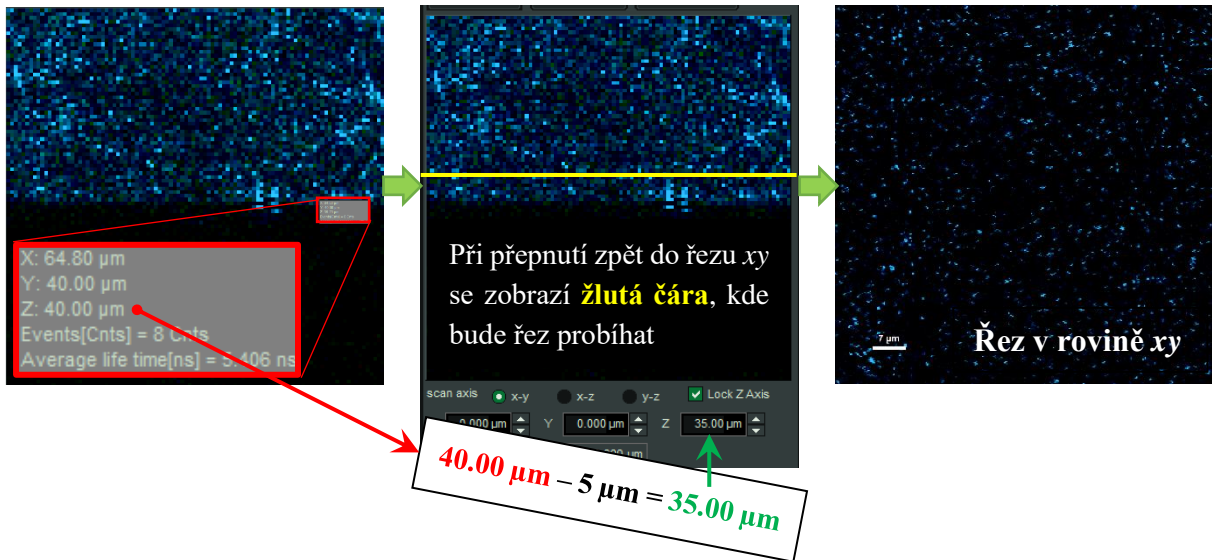


- 13) Pro zaměřovací sken stačí nízká hodnota pixelů (standardně 100–150 px) a Max Range. Dwell Time se nastaví na nejnižší možnou hodnotu – 0,8 ms. Pohyb laseru nastavit na jednosměrný (monodirectional). Je to o malinko pomalejší, ale přesnější.



14) Měření hydrogelů

- Spustit měření v ose xz nebo yz (je to jedno)
- Pravým tlačítkem zvolit Show Data Reader → zjistit hodnotu, kde začíná sklíčko
- Přepnout se do osy xy → zadat hodnotu mínus cca $5\ \mu\text{m}$
- Dwell Time $1\ \text{ms}$, Img size $350\ \text{px}$ a zaškrtnutý výběr square
- Zapnout měření

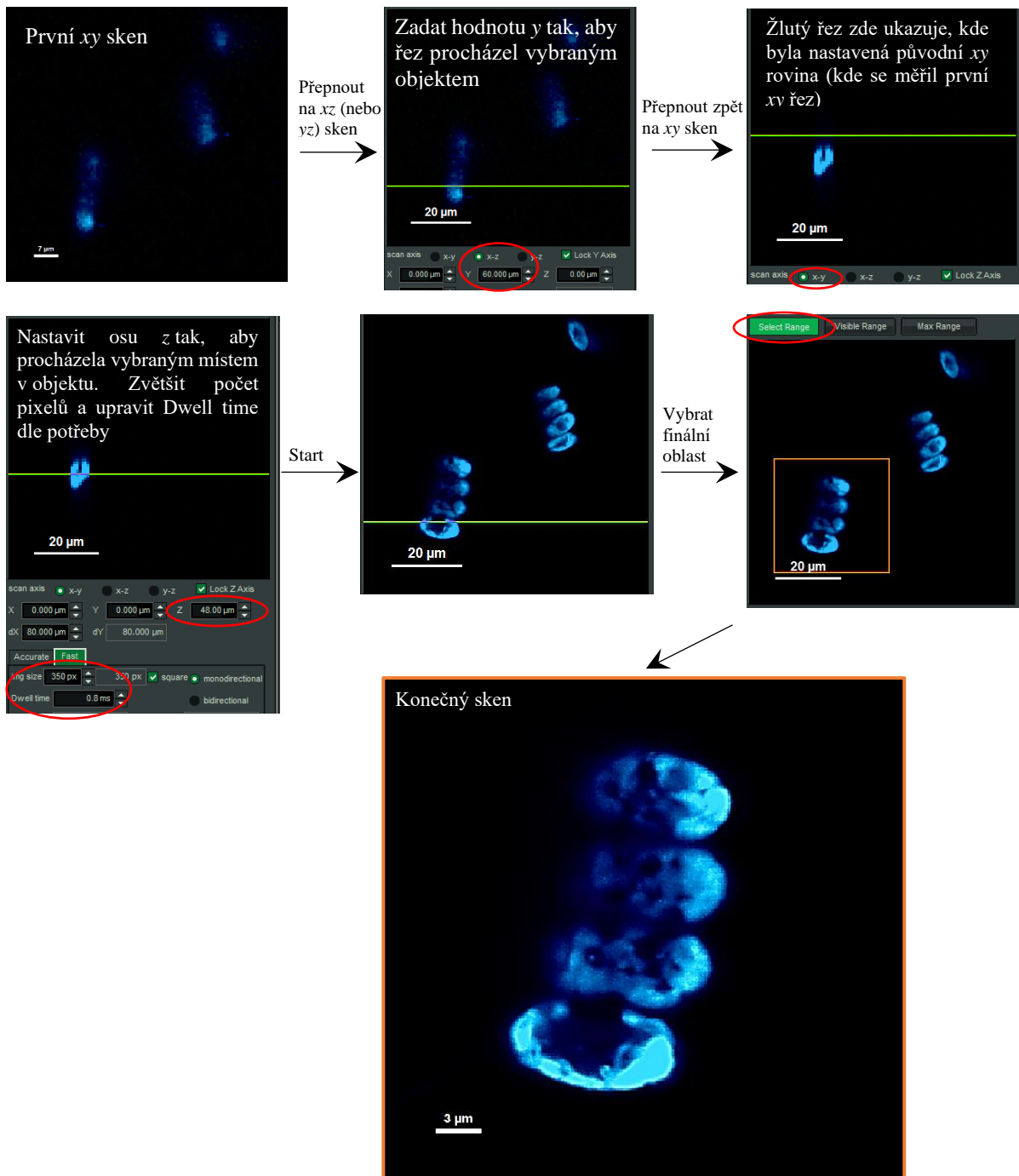


15) Měření ostatních vzorků (převážně biologických)

- Rychlý sken (nízký Dwell Time i pixely) v ose xy
- Vybrat oblast, kterou chci měřit nahoře v okně (buď přes Select Range, nebo si oblastí prohlédnout víc přiblížením a pak tu finální vybrat pomocí Visible Range). V prvním případě je vidět celá oblast a je možné posouvat a upravovat velikost výběru
- Rychlý sken vybrané oblasti
- Přesnější zaměření, kde se ve vzorku nachází ohnisko paprsku, se dělá pomocí rychlého skenu v ose z . Při měření např. bakterií se vybere buď xz nebo yz podle natočení bakterií, nebo ve kterém směru jich je víc. Poloha skenu (žlutá čára) se volí změnou hodnoty zbývající osy (tedy při měření xz měním osu y)
- Vybrat místo, kudy bude procházet osa xy (nejčastěji uprostřed vzorku), podle toho upravit polohu osy z
- Finální snímek se měří s velkým rozlišením. Parametry se vybírají s ohledem na povahu vzorku (Dwell Time nebude $30\ \text{sekund}$ pro bakterie, které by se tou dobou už přepálily atd.)

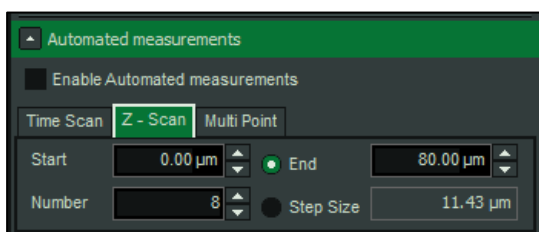
16) Vypnout lampu

Pozn.: Rozlišení obrázku, tedy počet mikrometrů na pixel, je limitovaná šířkou konfokálního objemu. Skeny se sice překrývají, ale skenovací plocha by měla být i tak větší nebo stejná, než je šířka konfokálního objemu. Pokud je sken příliš jemný, software si okolí dopočítává a může to vést k mírnému zkreslení hodnot. Pokud je sken příliš jemný a zároveň rychlý, projeví se to jako krátké vodorovné čárky ve výsledném FLIMu. Velmi podobně vypadá, pokud se živý vzorek pod mikroskopem hýbe. To dochází ale k rozmazání pouze měřeného objektu, nikoli všech bodů včetně pozadí.



FLIM – z-scan

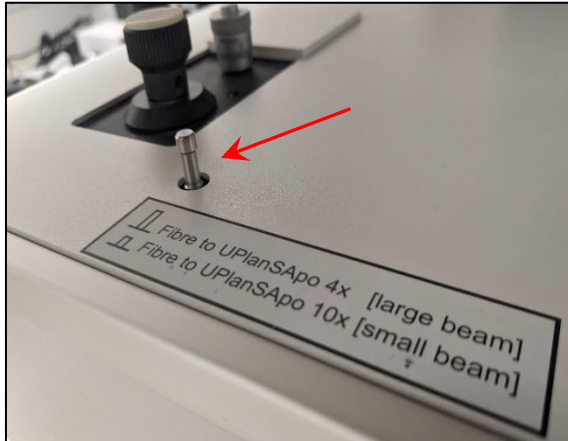
- 1) Záložka Imaging – nastavit jako pro klasické měření FLIM
- 2) Přepnout se do Automated measurement → Enable → Z-Scan
- 3) Zvolit, kolik FLIM obrazů se bude měřit a začátek a konec měření (poloha skeneru v ose z)
- 4) Zapsat velikost kroku (přepočítává se podle počtu kroků a celkové délce skenu)



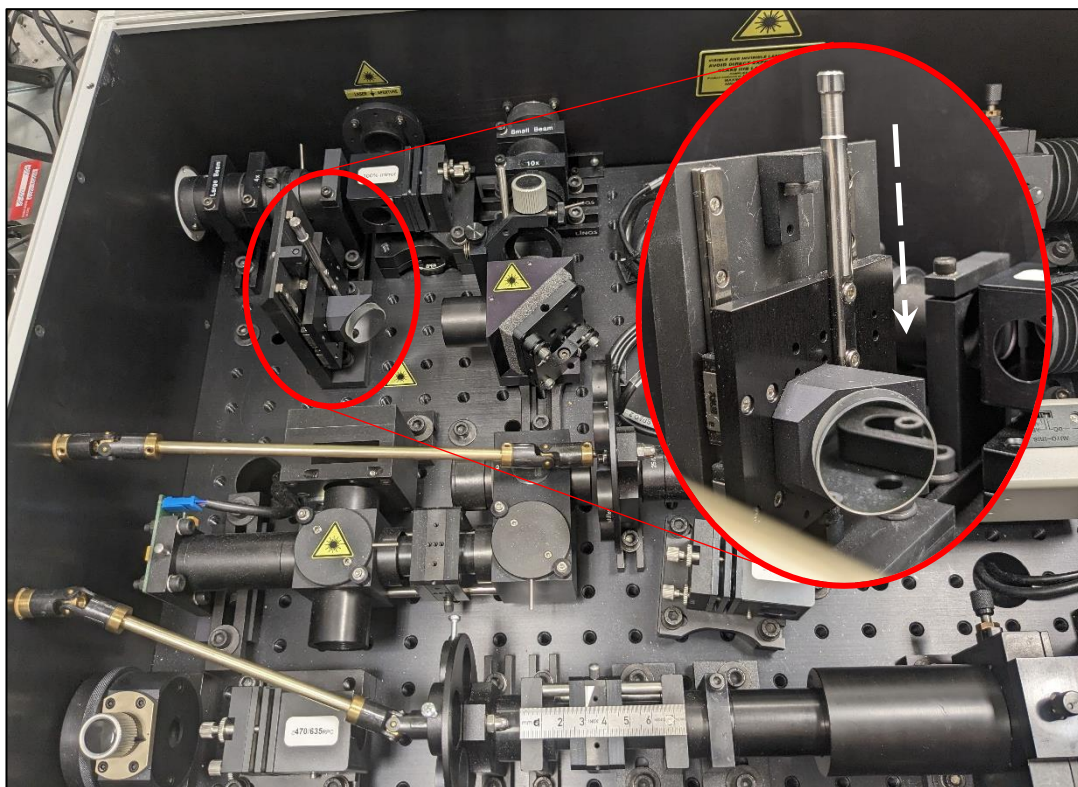
Pozn.: Snažit se nemít moc jemný sken, závisí na rozlišení a povaze vzorku, aby nedocházelo k jeho fotovybělení. Pro hydrogely je ideální krok okolo 400 nm, 50 skenů. Čím jemnější rozlišení, tím lepší obraz, brát v potaz celkovou velikost obrazu. Pro ideální výsledek je dobré mít z-sken jako krychli (vypadá to lépe), tedy celková délka z-skenu odpovídá délce os x a y

2f-FCS

- 1) Jako zdroj záření se používají dva lasery o stejné vlnové délce, ale opačné polarizaci. Je tedy nutné zjistit, jestli se pro vybraný fluorofor vyskytují i požadované lasery
- 2) Velikost pinhole je 150 μm , objektiv s vodní imerzí a 60násobným zvětšením
- 3) Nastavit na LCU režim Small Beam (zasunout páčku dolů)

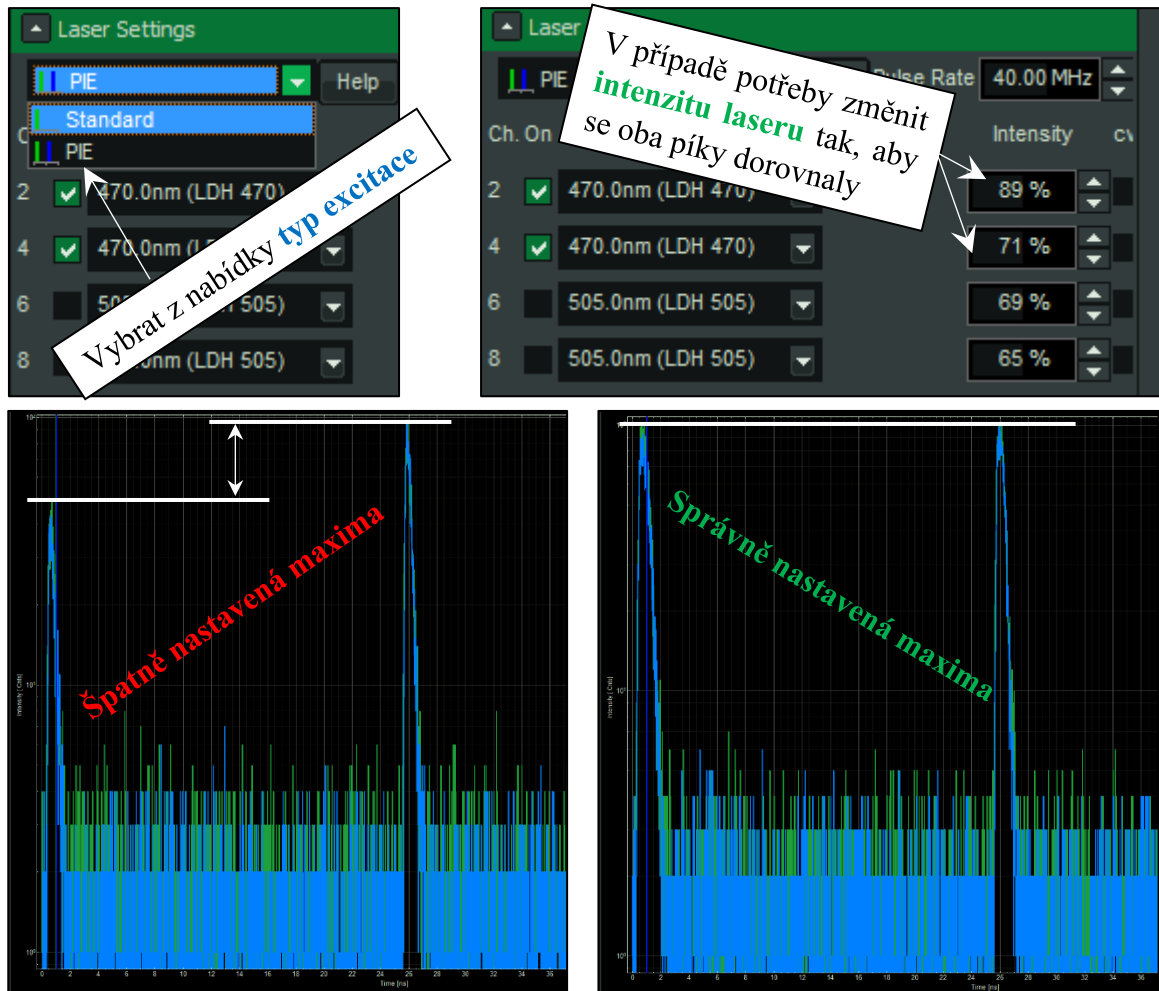


- 4) Zasunout dolů i první zrcadlo v optické dráze paprsku v MOU



- 5) Kápnout vodu na objektiv, položit držák se sklíčkem, najít mezifázové rozhraní sklíčko/vzduch
- 6) Najít nejvyšší intenzitu laseru v módu Test \rightarrow Time Trace, dokud je jen jeden zapnutý laser. Pak přidat i druhý a doladit to na maximum
- 7) Zapnout TCSPC mód a doladit píky na co nejužší pomocí šroubů na vychylovači paprsku před detektory

- 8) Přepnout typ excitace na pulzně prokládanou excitaci (PIE). Podívat se na TCSPC křivky, jestli jsou obě stejně intenzivní (stejné maximum fotonů). Pokud ne, je potřeba ručně tyto hodnoty doladit (u výběru laserů změnit % u jednoho z nich)



- 9) Vložení Nomarského prismsy do těla mikroskopu (z pravé strany nad filter wheel)

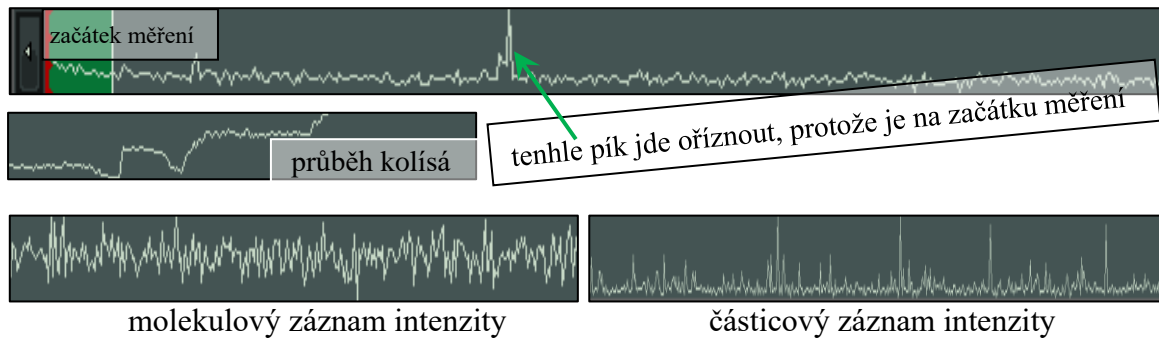


- 10) Přepnout se do módu Measurement, vybrat měření FCS
 11) Změřit kalibrační vzorek, na základě toho se pak počítá vzdálenost ohnisek
 12) Pokud nedojde ke změně vlnové délky, nemusí se už znovu kalibrační vzorek měřit (rozdíl oproti klasické FCS, kde se musí znovu kalibrovat při změně teploty)

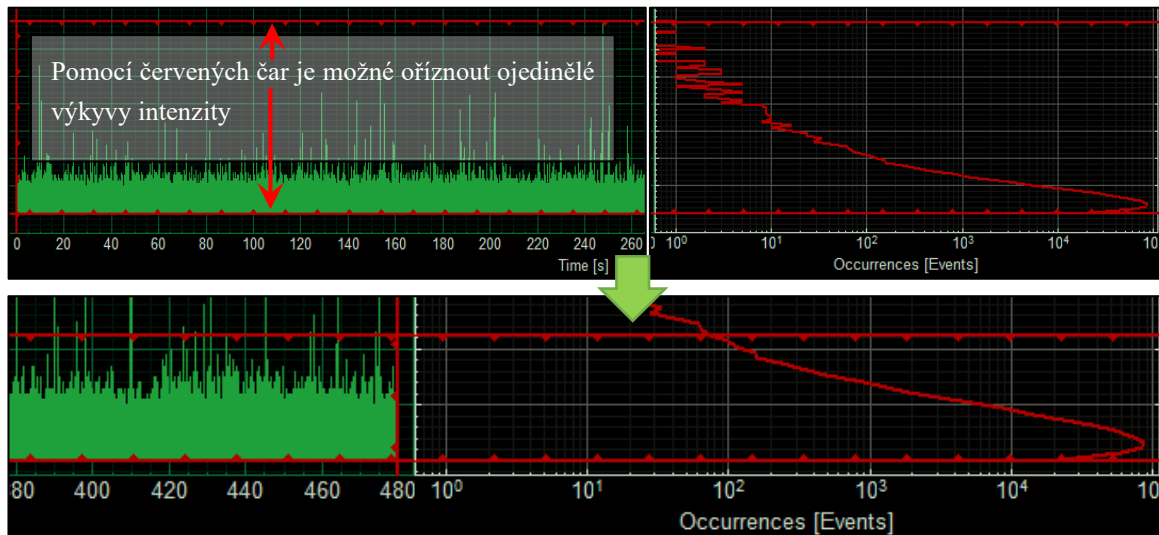
Příloha 2 – Analýza dat

FCS v případě výpočtu jedné korelační křivky změřené pomocí dvou detektorů

- 1) Vybrat hlavní složku dat → Záložka Analysis → FCS → Start
- 2) Vybrat Crosscorrelation → zkontrolovat, jestli jsou vybrané správné detektory → zaškrtnout FLCS Background correction – Enable
- 3) Podívat se, jestli nahoře v časovém záznamu intenzity fluorescence nejsou příliš velké odchylky/shluky (velké píky, když ve vzorku nemají co dělat), jestli je záznam konstantní (jestli časem intenzita nevzrůstá, neklesá, pokud to není povaha měření)



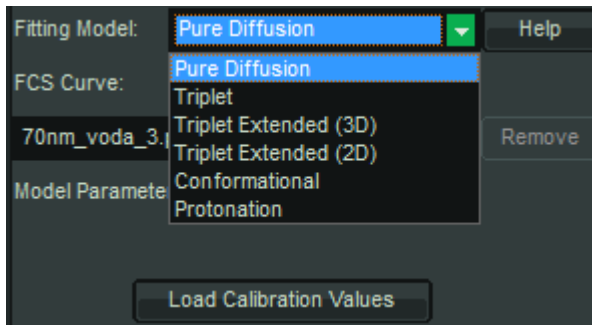
- 4) Pokud je chyba na začátku nebo na konci měření a měření bylo dostatečně dlouhé, lze to z jedné strany oříznout. Chyba z prostředku měření „vyříznout“ nejde.
- 5) Další možností je oříznout signál shora červenou čarou. Aby byla data oříznuta adekvátně (ne moc, ne málo), lze se orientovat vedle Time Trace červeným histogramem, který zobrazuje četnost výskytu dané hodnoty. V horní části se sem tam vyskytne nějaká hodnota, ty je možné oříznout až ke skutečnému začátku histogramu. Pokud se jedná o měření velkých částic, které standardně tvoří shluky a histogram není ideální, nic se neořezává.



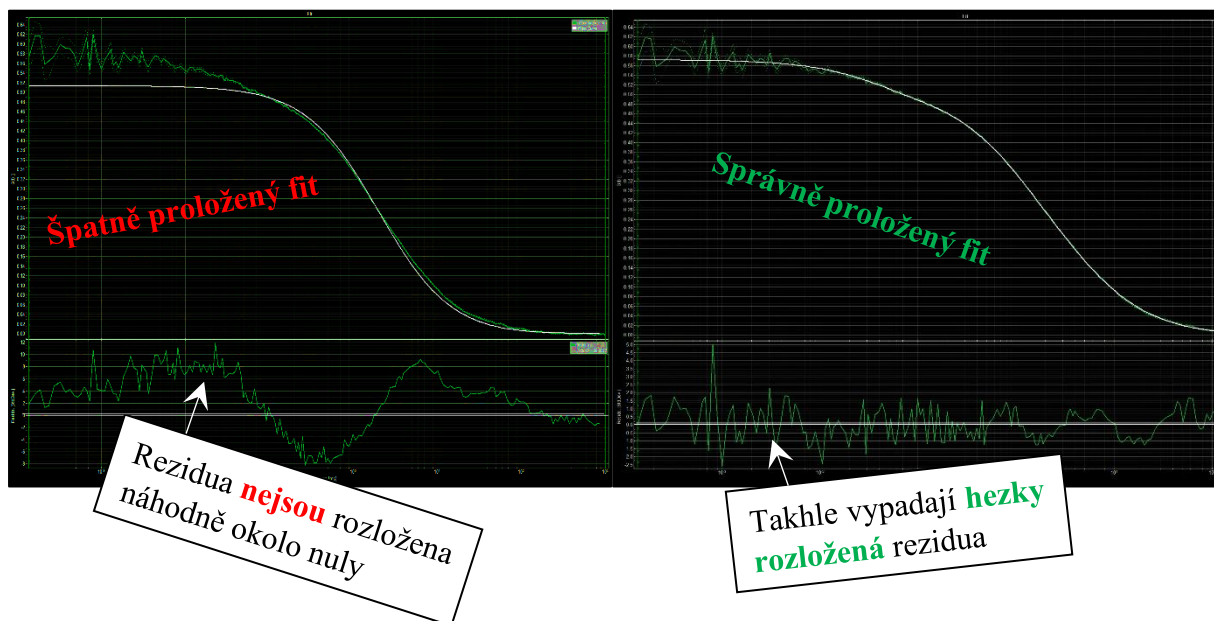
Pozn.: Oříznutím se velmi často poměrně zásadně změní i hodnota difúzního koeficientu. Je potřeba brát v úvahu povahu vzorku a jak moc je vhodné odstraňovat odchylky intenzity

- 6) Calculate Single (vygeneruje se FCS křivka) → Transfer to Fit
- 7) Zkontrolovat, jestli jsou kappa a konfokální objem správně naimportované (jestli se zobrazovaná hodnota shoduje s vypočítanou při kalibraci)

- 8) Vybrat požadovaný matematický model (nejčastěji se začíná na Pure Diffusion, při velmi vysoké hodnotě D pak vybrat Triplet). Hodnoty Triplet Extended jsou velmi specifické, mají více parametrů a pro spoustu standardních měření nejsou nutné → Initial Fit



- 9) Logicky vyhodnotit, jestli vypočítaný difúzní koeficient dává smysl a jestli jsou rezidua rozložená kolem nuly. Pokud ne, je třeba přidat další parametr, případně změnit matematický model. Toto opakovat, dokud výsledek nebude smysluplný. Zde je riziko přidání moc parametrů, kdy sice rezidua budou hezky proložená, ale výsledek nebude dávat smysl (například záporná hodnota ρ , nesmyslně vysoký triplet, chyba vyšší než vypočítaná hodnota atd.)



- 10) Pokud to typ měření dovolí, je možné křivku oříznout na začátku i na konci. Na konci bývají fragmenty ovlivňující velmi pomalý difúzní koeficient (velké agregáty čehosi ve vzorku), takže většinou je možné s touto částí nepočítat
- 11) V případě používání modelu Triplet Extended je zde parametr α (ovlivnění difúze – $\alpha < 1 \Rightarrow$ bráněná difúze, $\alpha = 1 \Rightarrow$ volná difúze, $\alpha > 1 \Rightarrow$ vnější vliv na zrychlení difúze). Ten je automaticky nastavený na hodnotu 1. Odškrtnutím tlačítka vedle hodnoty se tento parametr začne dopočítávat také spolu s ostatními (zvýšení parametrů vede ke zvýšení možné chyby při analýze, ale někdy je přidání dalšího parametru nutné)

- 12) Save result

13) Tabulka se kopíruje přes pravé tlačítko. Pokud dobíhá výpočet, tak software nereaguje na kliknutí pravým tlačítkem, musí se kliknout vícekrát (nebo pár sekund počkat)

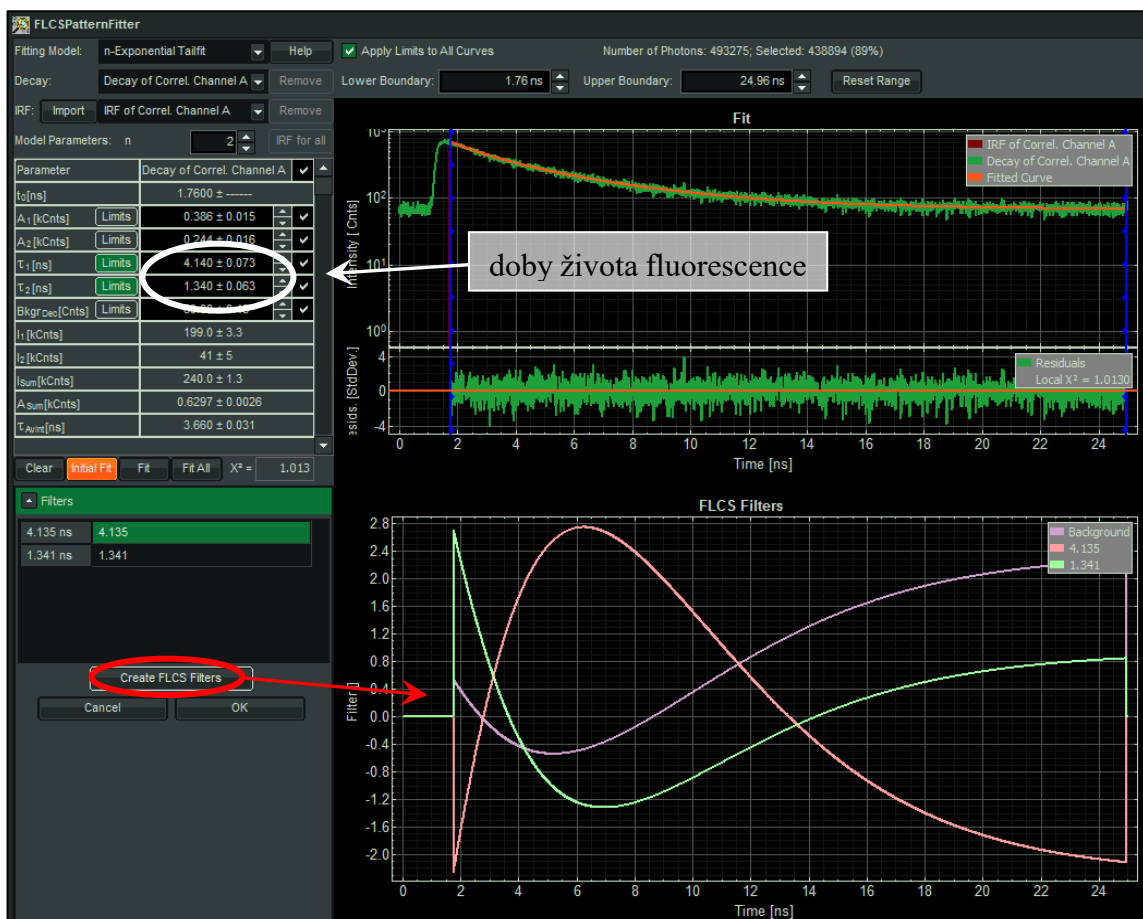
Pozn.: Analýzové okno nejde zavřít standardně, pokud je zároveň spuštěné měření. Musí se přepnout do Measurement, pak zpět do Analysis. Tím se analýzové okno zmenší, pak ho jde křížkem zavřít. Po skončení měření jde okno zavřít normálně i z maximalizace.

FCS v případě skupinového měření

- 1) Analysis → Gruped FCS → Start → Crosscorrelation → FLCS Background Correction – Enable
- 2) Je lepší zkontrolovat každý Time Trace zvlášť, viz body 3–5 pro samotnou křivku. Tím se ale změni počet vykreslených bodů, z původních 215 klesne hodnota na 100. Je potřeba zadat zpět původní hodnotu, nebo víc (100 bodů je opravdu málo)
- 3) Calculate All → Transfer to Fit
- 4) Postup vyhodnocení viz postup pro jednu křivku
- 5) Po nalezení (vybrání) správného modelu a nafitování jedné křivky stisknout Fit All
- 6) Proklikat se všemi křivkami a zkontrolovat, jestli se všechny proložily správně (občas je potřeba stisknout Fit, aby se křivka proložila, někdy matematický model nesedne úplně přesně, proto výpočet neproběhne a rezidua mají tvar podobný Gaussově křivce)
- 7) Save result → zkopírovat data přes pravé tlačítko

FLCS

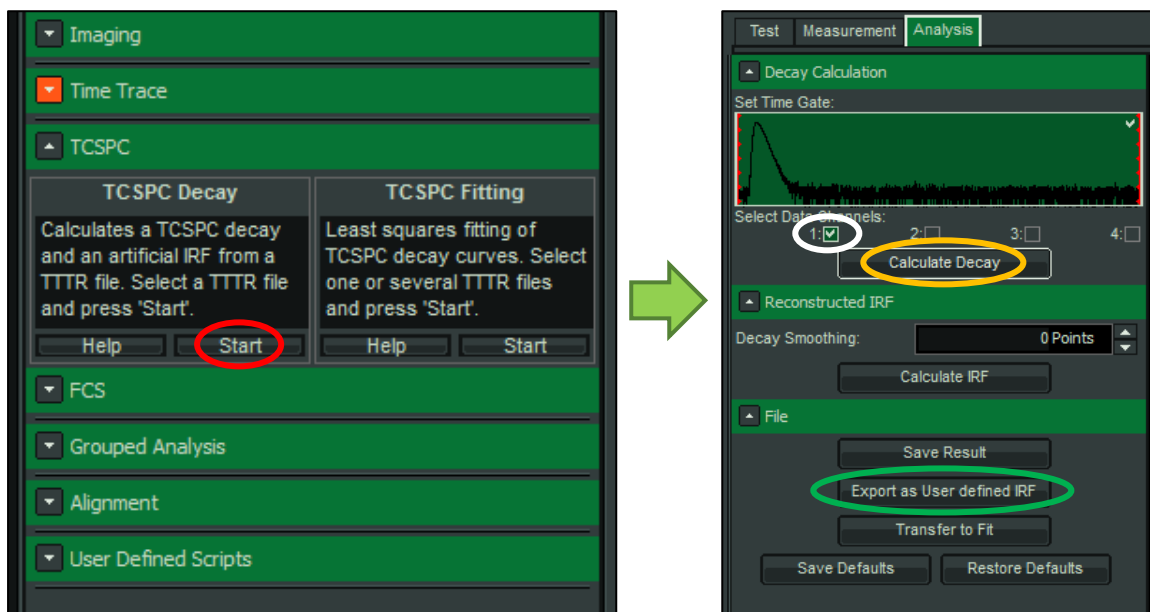
- 1) Záložka FCS → FLCS → Start
- 2) Vybrat Crosscorrelation
- 3) Create Filters: zvolit možnost LT-Fitting → otevře se okno s TCSPC histogramem



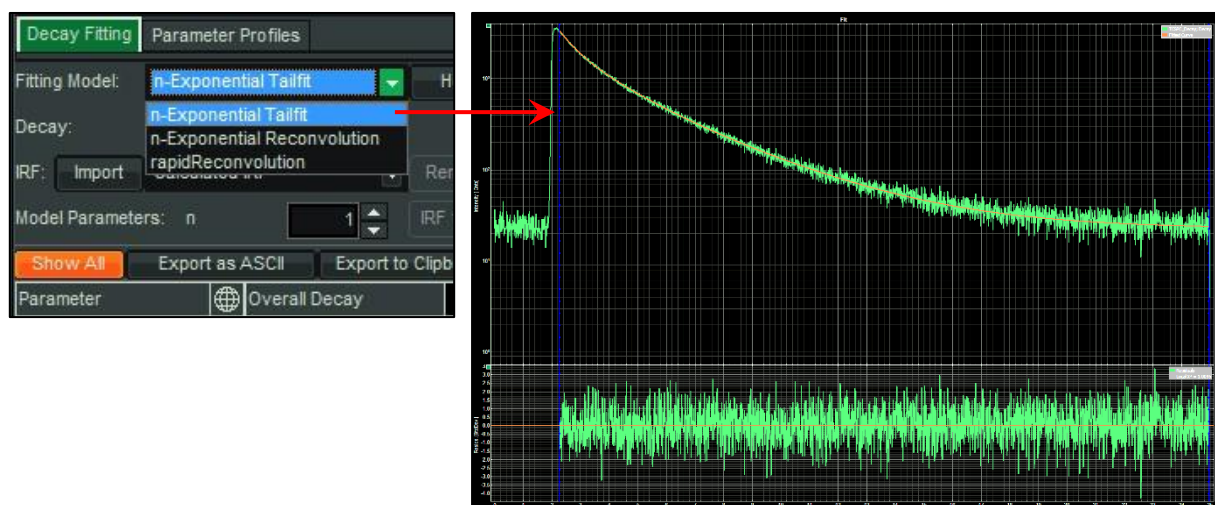
- 4) Vyhodnotit podle TCSPC vyhodnocení (pokud není naměřené IRF, tak buď pracovat s Tailfitem, nebo IRF doměřit, uložit a použít)
- 5) Uložit data s vypočítanými dobami života (filtr se generuje i pro pozadí/šum)
- 6) Pro Channel A i B vybrat dobu života, která odpovídá měřenému fluoroforu
- 7) Calculate → Transfer to Fit
- 8) Vyhodnocení stejné jako u klasické FCS
- 9) V případě potřeby opakovat i pro zbývající doby života

TCSPC

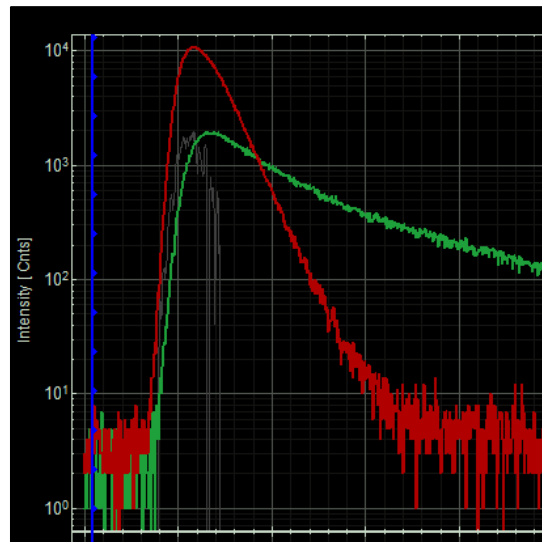
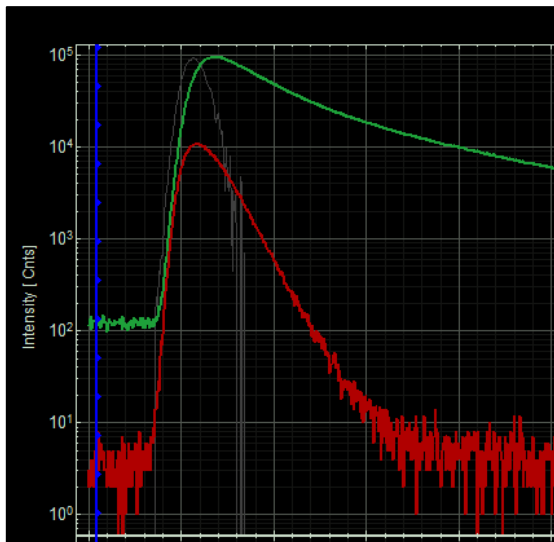
- 1) Vybrat data pro IRF → TCSPC Decay → pokud bylo zapnutých více detektorů, vybrat pouze jeden → Calculate Decay → Export as IRF



- 2) Vybrat data pro analýzu → TCSPC Decay → vybrat detektor (vždy musí odpovídat detektor pro data detektoru pro IRF) → Transfer to Fit
- 3) Vybrat, jestli se bude počítat Rekonvoluce, nebo Tailfit (rekonvoluce je mnohem přesnější, ale v některých případech je lepší použít Tailfit – například špatné IRF...)

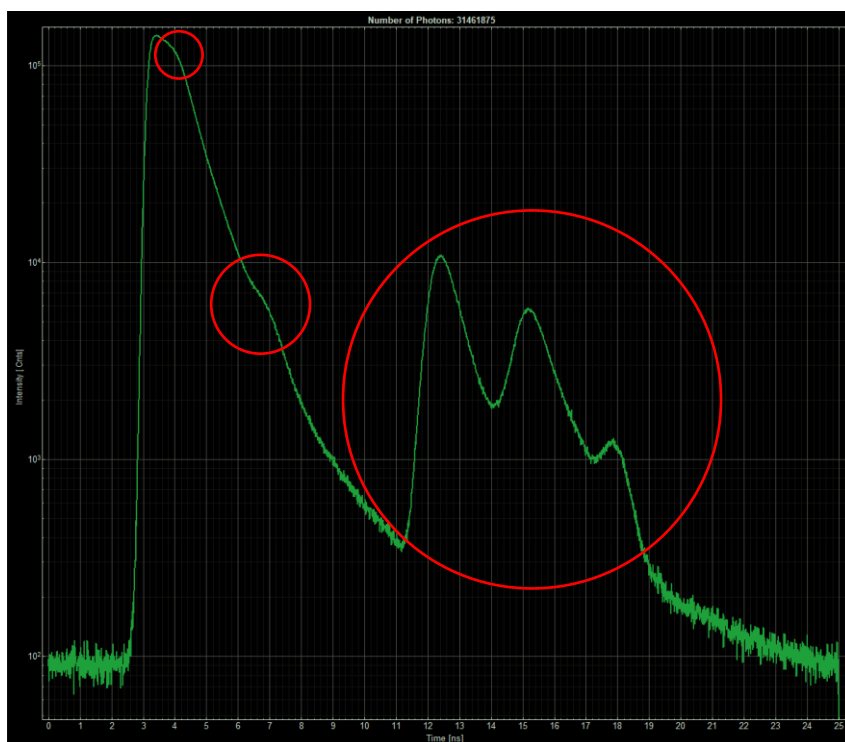


- 4) Pro Tailfit vybrat začátek prokládání a dát Initial Fit → přidávat parametry (dobu života fluorescence), dokud rezidua nejsou náhodně kolem nuly
- 5) Pro rekonvoluci (n-exponential reconvolution) se musí nahrát IRF, které se uložilo dříve. Zde je potřeba se orientovat podle maxima vyhasínací křivky – IRF může být vyšší, nesmí být nižší, než je maximum histogramu



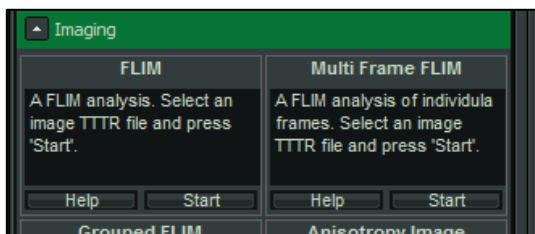
- 6) Initial Fit → přidat parametry podle potřeby → Save Result

Pozn.: Smysl dávají max. 3 doby života, pokud ve vzorku není více fluoroforů. Musí se hlídat, jestli jedna z amplitud není záporná (je to možné pouze v případě, že dochází k interakcím v excitovaném stavu, jinak se jedná o chybu analýzy). Dále brát v potaz nejen rozložení reziduí, ale i jestli data dávají smysl – jestli se jedna z dob života pouze nerozdělí na dvě kratší se stejným zastoupením, zatímco rozložení reziduí se změní jen velmi mírně. Také je vhodné sledovat parametr X, který by se měl pohybovat v rozmezí 0,8–1,2.

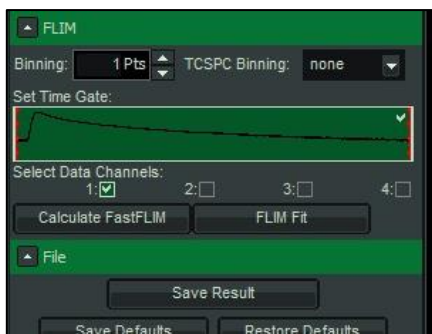


FLIM

- 1) Vybrat hlavní soubor FLIMu → Imaging → FLIM → Start



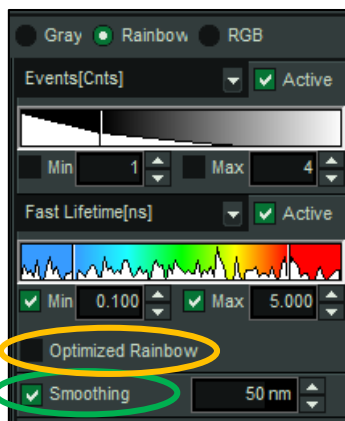
- 2) Vybrat, ze kterého detektoru se mají brát dat → Calculate FastFLIM



- 3) Vybrat mezi Tailfit a rekonvolucí → v případě rekonvoluce nahrát IRF podle maxima vyhasínací křivky
- 4) Přidat parametry podle potřeby → Initial Fit → FLIM Fit
- 5) Po skončení výpočtu je možné vybrat ze tří možností vpravo nahoře: Gray, Rainbow, RGB
 - a) *Gray* zobrazí vybraný parametr ve stupních šedé



- b) *Rainbow* má možnost barevného škálování parametru, a navíc ještě zesílení/ztlumení jasu vybraného parametru (černobílá stupnice). Zobrazí se zde například distribuce doby života fluorescence. Režim **Optimized Rainbow** bere v potaz zastoupení jednotlivých dob života fluorescence a přizpůsobí tomu škálu. Režim **Smoothing** vezme sousedící pixely a udělá z nich průměr – tady se musí opatrně, hodně závisí na velikosti a rozlišení výsledného FLIMu, aby nedošlo k výraznému zkreslení dat



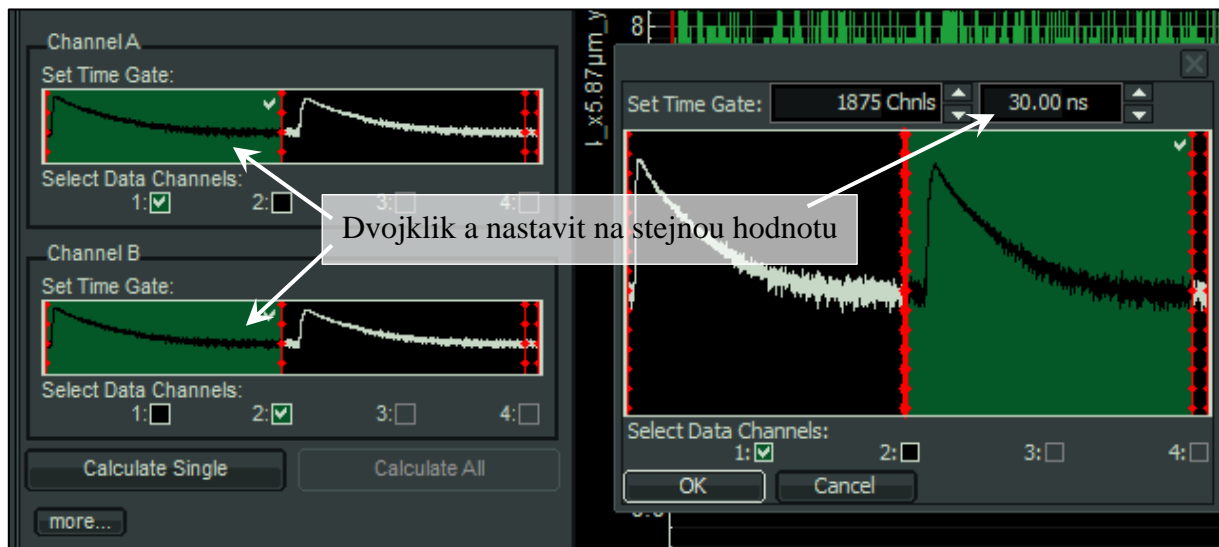
- c) *RGB* je výhodné například pro více dob života, kdy každá barva může odpovídat jedné době života, takže je možné zobrazit rozložení každé zvlášť a odfiltrout tím přebytečný šum. Je nutné dávat pozor na škálování, kdy velmi často škála začíná v záporných číslech, takže dojde k nežádoucímu zesílení intenzity vybraného parametru



- 6) Obrázek se exportuje přes pravé tlačítko – Bitmap with Colorscale (bez barevné škály je to jen barevný obrázek bez informační hodnoty)

2f-FCS

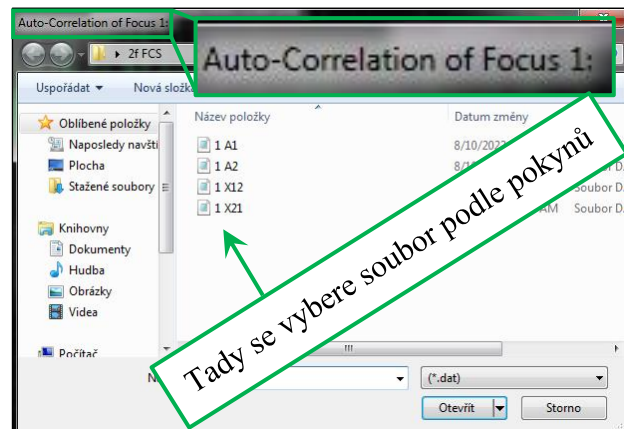
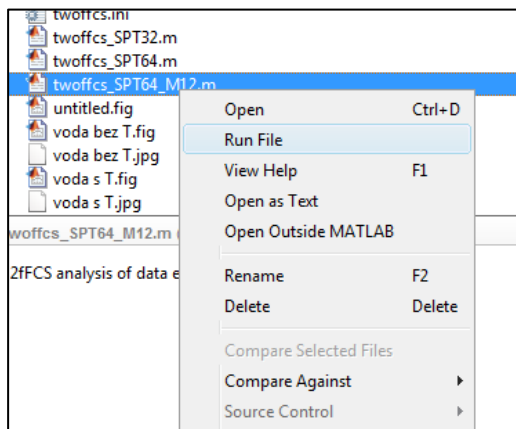
- 1) Tady není možné použít Grouped Measurement, musí se vyhodnotit každá křivka zvlášť
- 2) FLCS Background Correction – Enable
- 3) Pohlídat, aby Time Gate bylo pro oba stejné (první končí tam, kde začíná druhý, pro druhý detektor stejná hodnota)



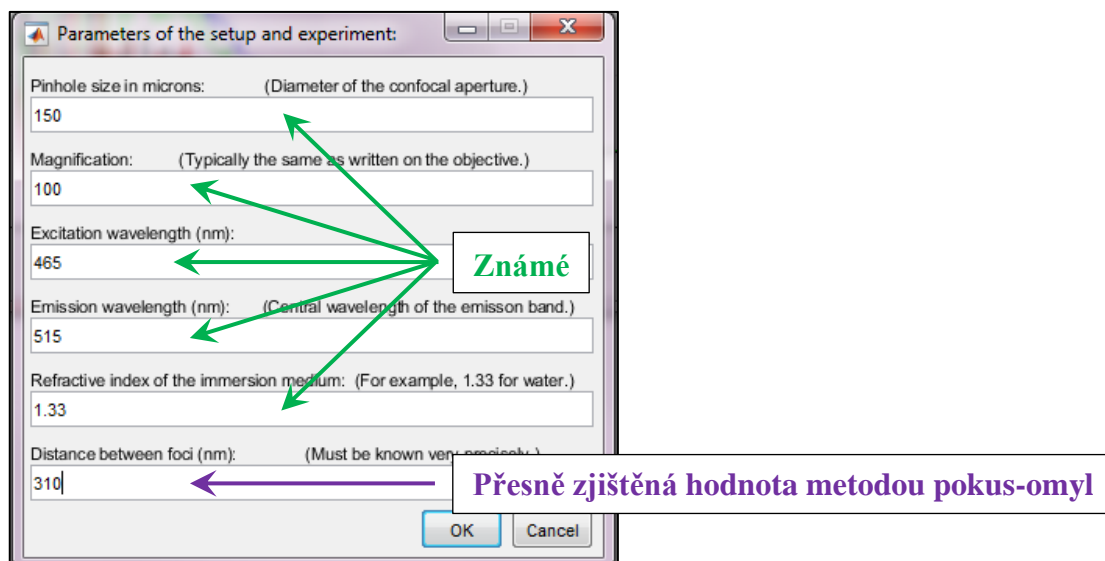
- 4) Vypočítat čtyři křížově korelační křivky pro obě ohniska (tedy první vyhasínací křivka pro Channel A s první vyhasínací křivkou pro Channel B → uložit jako A1 → stejně pro A2 → křížová korelace první a druhé X12 → stejně pro X21)



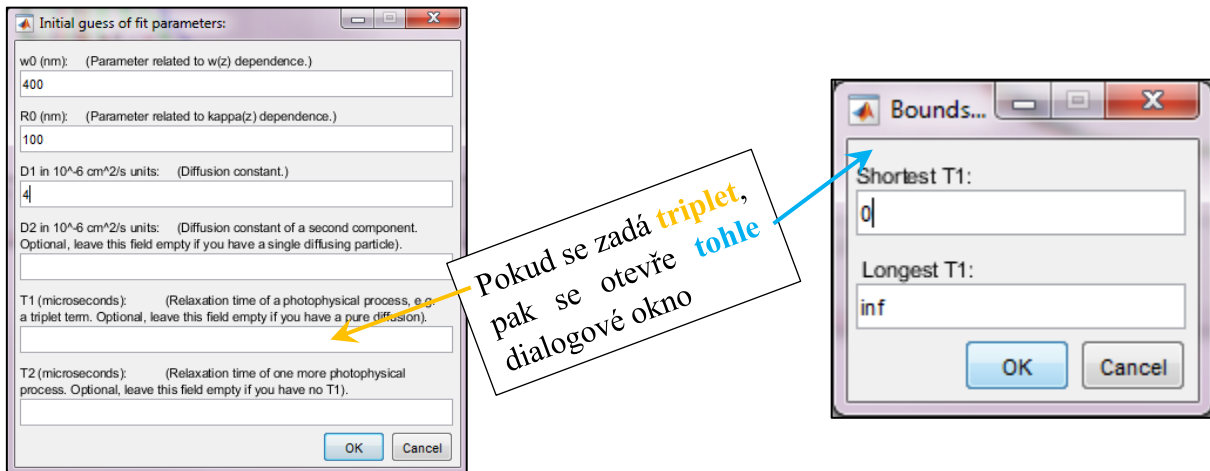
- 5) Data se exportují kliknutím pravým tlačítkem na vypočítanou křivku → Export data (All Cells)
- 6) Nedávat Transfer to Fit (je to zbytečné, difúzní koeficient se počítá v MATLABu), pouze Save result
- 7) Pustit software MATLAB
- 8) Najít soubor se skriptem → pravým tlačítkem Run the file → okamžitě bez jakéhokoli přičinění se zobrazí okno, aby se vybral soubor s první korelací (A1) → pokračovat podle toho, co píše skript (focus1 → focus2 = X12)



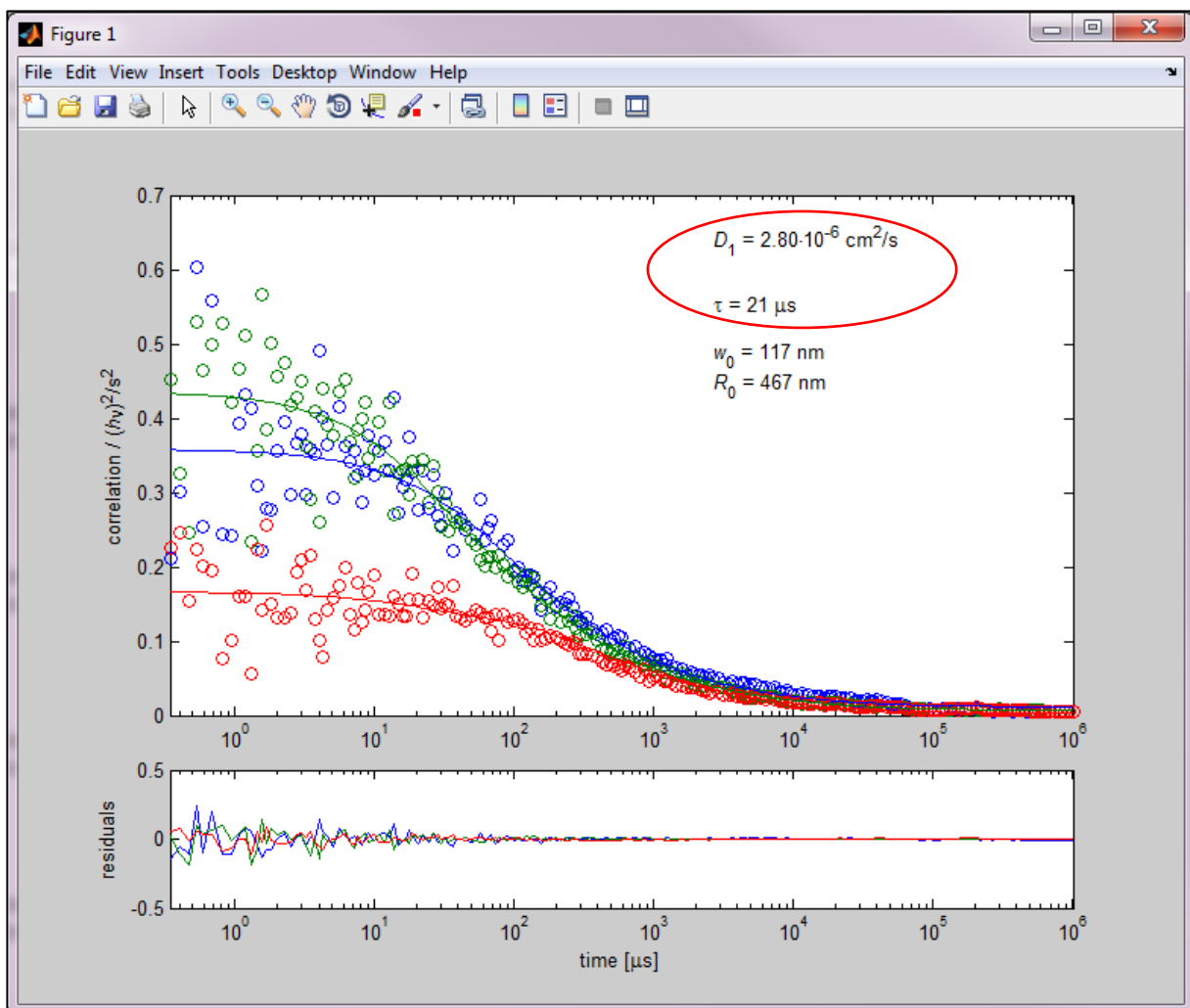
- 9) Při kalibraci není známá hodnota vzdálenosti ohnisek – musí se nějaká zadat a podle vypočítaného difúzního koeficientu tuto hodnotu opravit



- 10) Do pop-up oken se pro hodnoty D a T píše vždy jen orientační hodnota, program si to spočítá sám. Po zadání hodnoty tripletu (desítky, většinou se dává hodnota 10) do prvního okna vyskočí další pro zadání limitních hodnot tripletu (většinou od 0 do 100)



- 11) Program vypočítá hodnoty D a T, musí se opsat ručně, zkopírovat nejdou. Hodnoty jsou absolutní, tedy bez směrodatné odchylky



Příloha 3 – Získání kubické rovnice z obecných rovnic

Translační pohyb fluoroforu ve 3D prostoru je definovaný rovnicí Pure Diffusion

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{\left[1 + \frac{\tau}{\tau_D [i]}\right] \cdot \left[1 + \frac{\tau}{\tau_D [i] \cdot \kappa^2}\right]^{\frac{1}{2}}} \quad (1)$$

Koeficient kappa (excentricita konfokálního objemu) z výše uvedené rovnice lze definovat jako

$$\kappa = \frac{z_0}{w_0} \quad (2)$$

Pokud intenzitní profil konfokálního objemu odpovídá Gaussovu rozložení, pak je difúzní koeficient D definován jako

$$D = \frac{w_0^2}{4\tau_D} \quad (3)$$

Z této rovnice lze vyjádřit difúzní čas τ_D jako

$$\tau_D = \frac{w_0^2}{4D} \quad (4)$$

Zmíněné koeficienty:

koeficient	název	jednotky
$G(\tau)$	korelační funkce pro daný čas	-
N	počet částic	-
τ	korelační čas	s
τ_D	difúzní čas	s
κ	kappa (excentricita)	-
D	difúzní koeficient	$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
w_0	šířka konfokálního objemu v horizontální rovině	m
z_0	šířka konfokálního objemu ve vertikální rovině	m

Vztah difúzního koeficientu D a střední hodnoty čtverce posunu (MSD) ve 3D prostoru je dán vztahem

$$\text{MSD} = 6D\tau \quad (5)$$

Z této rovnice vychází difúzní koeficient D jako

$$D = \frac{\text{MSD}}{6\tau} \quad (6)$$

Dosažením rovnice 6 do rovnice 4 dostaneme vztah difúzního času jako funkci MSD

$$\tau_D = \frac{w_0^2 6\tau}{4\text{MSD}} = \frac{3}{2} \cdot \frac{w_0^2 \tau}{\text{MSD}}. \quad (7)$$

V rovnici 1 se vyskytuje člen $\frac{\tau}{\tau_D}$. Ten se získá vynásobením převrácené hodnoty rovnice 7 korelačním časem τ .

$$\frac{\tau}{\tau_D} = \frac{2}{3} \cdot \frac{\tau}{w_0^2 \tau} \text{MSD} = \frac{2}{3} \cdot \frac{1}{w_0^2} \text{MSD} = \frac{2}{3w_0^2} \text{MSD}. \quad (8)$$

Dosažením vztahu z rovnice 8 do rovnice 1 se zahrnutím rovnice 2 vznikne přímý vztah korelační funkce $G(t)$ a MSD – rovnice 9.

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{\left[\left[1 + \frac{2}{3w_0^2} \text{MSD} \right] \cdot \left[1 + \frac{2}{3w_0^2 \frac{z_0^2}{w_0^2}} \text{MSD} \right] \right]^{\frac{1}{2}}}. \quad (9)$$

Po vykrácení zbyde výsledný vztah, který odpovídá i vztahu uvedeným ve článku Silke Rathgeber [84]:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \cdot \frac{1}{\left[1 + \frac{2}{3w_0^2} \text{MSD} \right] \cdot \left[1 + \frac{2}{3z_0^2} \text{MSD} \right]^{\frac{1}{2}}}. \quad (10)$$

Matematickou úpravou rovnice 10, konkrétně jejím roznásobením a umocněním na druhou, aby jmenovatel nebyl pod odmocninou, se získá výraz (kdy MSD se nahradilo písmenem x):

$$G^2(\tau)N^2 = \frac{1}{x^3 \frac{8}{27w_0^4 z_0^2} + x^2 \left(\frac{4}{9w_0^4} + \frac{8}{9w_0^2 z_0^2} \right) + x \left(\frac{4}{3w_0^2} + \frac{2}{3z_0^2} \right) + 1}. \quad (11)$$

Pokud se vypočítaná kubická rovnice položí rovno nule, získá se řešení (tři kořeny) MSD. Následně pro každý konkrétní korelační čas τ je možné získat konkrétní hodnotu MSD. Výsledná kubická rovnice zahrnující kubický, kvadratický, lineární i absolutní člen vypadá následovně:

$$x^3 \frac{8}{27w_0^4 z_0^2} + x^2 \left(\frac{4}{9w_0^4} + \frac{8}{9w_0^2 z_0^2} \right) + x \left(\frac{4}{3w_0^2} + \frac{2}{3z_0^2} \right) + 1 - \frac{1}{G^2(\tau)N^2} = 0. \quad (12)$$

Příloha 4 – Přepočítání autokorelační křivky na MSD

- 1) Po výpočtu FCS křivky → kliknout pravým tlačítkem → Export data (All Cells)
- 2) Pro výpočet MSD je potřeba mít data ve formě .csv (ze SymPhoTimu se to uloží jako .dat → musí se to otevřít v Excelu a uložit jako CSV – Textový soubor s oddělovači)
- 3) Smazat řádky, kde není číselná hodnota (ted' se nemyslí hlavička, ale na konci sloupců je NaN, případně --- → tak tohle se musí smazat, hlavičku klidně nechat)
- 4) Jako oddělovač nastavit středník, s tabulátorem si MATLAB (asi) neporadí
- 5) Pro jistotu si to zkontrolujte, když se to otevře jako Poznámkový blok, a ne jako Excel, jestli je to jeden velký a nepřehledný chumel dat, který je mezi sebou oddělený středníky

Popis skriptu

- 1) Používat desetinné tečky místo čárek při výpočtu, v názvu je to samozřejmě jedno

```
csv = dlmread('/Users/***/namerena_data.csv', ';', 2, 0);
```

- 2) První člen označuje cestu, kde je uložený zdrojový soubor
- 3) Druhý člen říká, co se používá k oddělení sloupců – v tomto případě středník (tabulátor nejde zadat, středník je nejlepší volba, ale je možné vcelku cokoli, co nebude software mást – čárka asi není nejvhodnější volba)
- 4) Třetí a čtvrtý člen, tedy 2 a 0, tedy znamená, kolik se vynechá řádků (hlavička) a kolik sloupců (takže tedy se vynechají 2 řádky a žádný sloupec, bere to hned od začátku, tedy od sloupce A). První řádek je ten, kde začínají data.
- 5) Na tohle nesahat:

```
cas = csv(:, 1);  
Gt = csv(:, 2);  
n = length(Gt);
```

- 6) Následující řádky doplnit z výpočtu ze SymPhoTime64 – tohle je jediné, co se upravuje – nejčastěji pouze počet částic. Občas je potřeba s tím pohnout, pokud křivka vypadá blbě (začátek je zahnutý), většinou je to otázka třetího a čtvrtého desetinného místa.

```
wxy = 0.251*ones(n, 1);  
wz = 2.050*ones(n, 1);  
N = 2.74507;
```

- 7) Výpočet tří kořenů kubické rovnice – na to nesahat

```
a = 8./ (27.* (wxy.^4) .* (wz.^2));  
b = (8./ (9.* (wxy.^2) .* (wz.^2))) + (4./ (9.* (wxy.^4)));  
c = (4./ (3.* (wxy.^2))) + (2./ (3.* (wz.^2)));  
d = 1 - (1./ ((N.^2) * (Gt.^2)));  
  
r = zeros(n, 3);  
for i = 1:n  
    p = roots([a(i), b(i), c(i), d(i)]);  
    r(i, :) = p';  
end
```

- 8) Vykreslení grafů ve třech různých oknech pro všechny kořeny kubické rovnice – jsou dva komplexně sdružené (mají imaginární složka, liší se jen znaménkem. V tomto případě jsou komplexní kořeny nejprve pouze reálné bez imaginární složky, jakmile se objeví

i imaginární složka, pak mají kořeny stejnou hodnotu a liší se znaménkem před imaginární částí komplexního čísla) a jeden reálný. MATLAB řadí kořeny vzestupně, tedy jediný vhodný (tedy ten reálný) bude vždy na třetím místě.

Pro zobrazení pouze reálného kořene je možné nechat ve skriptu pouze figure (3), nicméně jak jsou to tři samostatná okna, pak není nic jednoduššího než zbylé dvě zavřít. Je to jen pro kontrolu (dvojitou, další je v excelu).

```
figure(1)
loglog(time, r(:,1), 'b');
xlabel('correlation time (ms)');
ylabel('MSD (um2)');
```

```
figure(2)
loglog(time, r(:,2), 'r');
xlabel('correlation time (ms)');
ylabel('MSD (um2)');
```

```
figure(3)
loglog(time, r(:,3), 'g');
xlabel('correlation time (ms)');
ylabel('MSD (um2)');
```

- 9) Vytvoření tabulky, kde v prvním sloupci je korelační čas (aby se pak v excelu dal vytvořit vlastní graf), další tři sloupce obsahují kořeny kubické rovnice. Komplexní kořeny se vyexportují i s imaginární složkou, pro účely vytvoření MSD se používá třetí, reálný, kořen.

```
Y = [time, r(:,1) , r(:,2) , r(:,3)];
T = array2table(Y)
```

- 10) Pojmenování sloupců, tedy vytvoření hlavičky. Čísla v závorce označují, na které sloupce se příkaz vztahuje (dvojtečka nahrazuje pomlčku, je to tedy „od do“, zde první až čtvrtý sloupec)

```
T.Properties.VariableNames(1:4) = {'correlation time (ms)',
'1st root', '2nd root', '3rd root'}
```

- 11) Následující řádek uloží data pod názvem, který zvolíme – je schopný přepsat původní soubor, je potřeba to pojmenovat jinak než původně vkládaná data. Tady to „msd“ v závorce je jen pojmenování sloupce.

```
writetable(T, '/Users/strudl/Documents/MATLAB/test.csv')
```

Skript pro zkopírování do MATLABu:

```
% napsat cestu k souboru a zvolit, kolik řádků a sloupců se bude vynechávat
csv = dlmread('C:\***\0,5.csv', ';', 2, 0);
cas = csv(:, 1);
Gt = csv(:, 2);
n = length(Gt);

% následující řádky doplnit z výpočtu ze SymPhoTime64
wxy = 0.251*ones(n,1);
wz = 2.050*ones(n,1);
N = 2.74507;

% neměnit
a = 8./(27.*(wxy.^4).*(wz.^2));
b = (8./(9.*(wxy.^2).*(wz.^2)))+(4./(9.*(wxy.^4)));
c = (4./(3.*(wxy.^2)))+(2./(3.*(wz.^2)));
d = 1-(1./((N.^2)*(Gt.^2)));

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

% vykreslení všech grafů (potřeba je jen ten poslední, tj. figure 3)
figure(1)
loglog(time, r(:,1), 'b');
xlabel('correlation time (ms)');
ylabel('MSD (um2)');

figure(2)
loglog(time, r(:,2), 'r');
xlabel('correlation time (ms)');
ylabel('MSD (um2)');

figure(3)
loglog(time, r(:,3), 'g');
xlabel('correlation time (ms)');
ylabel('MSD (um2)');

% vytvoření tabulky pro všechny kořeny kubické rovnice
Y = [time, r(:,1), r(:,2), r(:,3)];
T = array2table(Y)

% pojmenování sloupců v tabulce – bere to pořadí z vytvořené tabulky Y
T.Properties.VariableNames(1:4) = {'correlation time (ms)',
'1st root', '2nd root', '3rd root'}

% export tabulky – musí se pojmenovat jinak, než se jmenuje původní soubor, přepisuje se to
writetable(T, '/Users/***/nova_tabulka.csv')
```

13 PŘEHLED PUBLIKACÍ A AKTIVIT

13.1 Články v impaktovaném časopise

MARKOVÁ, Kateřina a Filip MRAVEC. Fluorescence correlation spectroscopy in the study of the interaction between hyaluronan and positively charged surfactants. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2024 [cit. 2024-03-08]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2024.130627

PAVELICOVA, Kristyna, Tomas RYPAR, Katerina MARKOVA, Filip MRAVEC, Vojtech ADAM, Marketa VACULOVICOVA a Lukas NEJDL. UV-responsive fluorescent behavior of pharmaceuticals assessed by UV-induced fingerprint spectroscopy (UV-IFS). *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2022, **628** [cit. 2024-03-08]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2022.122289

MÜLLEROVÁ, Lucie, Kateřina MARKOVÁ, Stanislav OBRUČA a Filip MRAVEC. Use of Flavin-Related Cellular Autofluorescence to Monitor Processes in Microbial Biotechnology. *Microorganisms* [online]. 2022, **10**(6) [cit. 2024-03-08]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms10061179

13.2 Abstrakty

MARKOVÁ, K.; MRAVEC, F.; OBRUČA, S. *Influence of stress factors on the intrinsic fluorescence of Cupriavidus necator*. Methods and Applications in Fluorescence – Book of abstracts. Gothenburg: Sweden MEETX AB, 2022. p. 26.

MARKOVÁ, K.; PEKAŘ, M. *Dual-focus fluorescence correlation spectroscopy in the study of hydrogel properties*. Studentská odborná konference Chemie je život 2021. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2021. p. 88. ISBN: 978-80-214-6002-7.

MARKOVÁ, K.; PEKAŘ, M. *Hydrogel structure determined by fluorescent nanoparticles*. Nanocon 2021 – Abstracts. Ostrava: Tanger Ltd., 2021. ISBN: 978-80-88365-00-6.

MARKOVÁ, K. *Visualization of a Gel Structure Using Fluorescent Nanoparticles*. Studentská odborná konference Chemie je život 2020. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2020. p. 104-105. ISBN: 978-80-214-5920-0.

MARKOVÁ, K. *Diffusion of Nanoparticles in Complex Colloidal System – A Fluorescence Correlation Spectroscopy Study*. Studentská odborná konference Chemie je život 2019. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2019. p. 55. ISBN: 978-80-214-5807-9.

MARKOVÁ, K.; PAVLÍKOVÁ, S.; PEKAŘ, M. *Optimization of data retrieval from fluorescence correlation spectroscopy for microreological experiments*. NANOCON 2019 - Abstracts. 1st. Ostrava: Tanger Ltd, 2019. p. 152. ISBN: 978-80-87294-94-9.

13.3 Přednášky na mezinárodní konferenci

Studentská odborná konference Chemie je život 2019 (Brno, Česká republika)

Studentská odborná konference Chemie je život 2020 (Brno, Česká republika)

Studentská odborná konference Chemie je život 2021 (Brno, Česká republika)

13.4 Postery na mezinárodní konferenci

17th Conference on Methods and Applications in Fluorescence (Gothenburg, Sweden)

13th International Conference on Nanomaterials – Research & Application (Brno, Česká republika)

11th International Conference on Nanomaterials – Research & Application (Brno, Česká republika)



Fluorescence correlation spectroscopy in the study of the interaction between hyaluronan and positively charged surfactants

Kateřina Marková, Filip Mravec*

Materials Research Centre, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:

Hyaluronan
Cetyltrimethylammonium bromide
Septonex®
Fluorescence correlation spectroscopy
Maximum entropy method

ABSTRACT

The interaction between fluorescently labeled hyaluronan and cationic surfactants was studied using Fluorescence Correlation Spectroscopy. The hyaluronan was selected at two different molecular weights – specifically, 274 kDa and 710 kDa. Cetyltrimethylammonium bromide and Septonex® were chosen as cationic surfactants to interact with the negatively charged biopolymer. The study focused on changes in the diffusive behavior of a biopolymer that interacts with surfactant molecules in an aqueous environment. Various methods were applied to evaluate the obtained data, these including, among others, the Maximum Entropy Method, which provides the distributional dependences of diffusion coefficients. Without the surfactant, the studied biopolymers showed diffusion behavior comparable to that found in previously published studies. In the presence of surfactants, more intense interaction was observed between Cetyltrimethylammonium bromide and Septonex®. Comparing the molecular weights, the retention of intermolecular aggregates after the precipitation region for the lower weight and the disintegration of these aggregates for the higher weight were observed; moreover, they showed diffusion behavior comparable to the samples without the presence of the surfactant.

1. Introduction

In this article, we present another way of studying the interaction between positively charged surfactants based on tetraalkylammonium salts and negatively charged polysaccharide, the sodium salt of hyaluronic acid, also known as hyaluronan. Hyaluronan is a naturally occurring glycosaminoglycan, which is one of the linear polysaccharides with high molecular weight. It is composed of repeating disaccharide units, each of these units containing the sodium salt of D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine [1].

As we have shown in previous articles, there is a large variability in surfactant-polymer interactions, which vary according to the total concentrations of the individual components [2] or the presence of low molecular weight electrolytes [3]. Experiments on hyaluronan-surfactant interactions can be found in the literature, mainly focused on the description of phase behavior [4–7]. The influence of the molecular weight of hyaluronan and the presence of an electrolyte are mentioned. Comparative experiments involving hyaluronan and other polyelectrolytes of a similar charge density have also been performed, in which it was found that surfactants' bonds to hyaluronan are significantly weaker than to the other polyelectrolytes [8]. This was explained

by the different stiffnesses of the polymers studied. Previously published studies show that changing the ionic strength of the solution influences the conformation of the hyaluronic chain; however, this effect is more prominent from an ionic strength of 0.1 M.

The initial motivation of the work was to create a stable aggregate where a so-called pearl necklace structure would be formed. There is an imaginary cord which is formed by a linear polysaccharide. At its negatively charged carboxyl groups, it carries a certain type of micelles, aggregates of surfactants capable of carrying hydrophobic substances. This model was intended to show the possibilities of the physical modification of the native polysaccharide. As shown previously [9,10], the presence of hyaluronan reduces the negative impact of surfactants on human cells. There is a certain possibility that the use of some biocompatible surfactants could lead to a fully biocompatible drug delivery system for hydrophobic biologically-active substances.

Three different methods have been proposed to describe the mode of interaction between surfactant and hyaluronan. In the first method, hyaluronan is physically labeled with dimers (or oligomers) of acridine orange, a positively charged fluorescent probe that exhibits a hypsochromic shift in the absorption spectrum in the form of dimers and oligomers, and the fluorescence is disabled. An increase in fluorescence

* Corresponding author.

E-mail address: mravec@fch.vut.cz (F. Mravec).

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130627>

Received 26 October 2023; Received in revised form 16 February 2024; Accepted 3 March 2024

Available online 7 March 2024

0141-8130/© 2024 Elsevier B.V. All rights reserved.

was observed even at very low additions of the surfactant, well below its critical micellar and aggregation concentrations [11]. The second method involves evaluating the size of aggregates and their zeta-potential [12]. The third method is focused on the intramolecular Förster resonance energy transfer between the hydrophobic probe perylene, located in the micellar core, and negatively charged fluorescein, condensed on the positively-charged micellar surface [13]. The study of the change in energy transfer efficiency, as a function of the change in distance within the micelle, is used to describe the interaction and to design the shape of the aggregate during the interaction of the polymer and the micellar form of the surfactant. In such studies, the aggregation process of the surfactant CTAB as well as Septonex® was determined in an aqueous solution in the presence of hyaluronan of different concentrations and molecular weights. The critical aggregation and critical micellar concentrations (CAC and CMC, respectively) of individual surfactants were determined for the respective variants of the hyaluronan solution. It was found that for very low concentrations of the polymer, the determined CAC and CMC do not depend on its molecular weight. The determined values are then: $CAC_{CTAB} = 0.007 \pm 0.001$ mM, $CAC_{Septonex®} = 0.022 \pm 0.001$ mM, $CMC_{CTAB} = 0.79 \pm 0.02$ mM, and $CMC_{Septonex®} = 0.90 \pm 0.03$ mM [13]. The description of surfactant aggregation in the presence of a polymer from the point of view of (i) the formation of a non-polar domain or (ii) the interaction of the surfactant with a fluorescent probe bound to the carboxyl group of the polymer can typically be divided into 4 areas: 1) under CAC - the surfactant binds as a monomer to the polymer chain and does not form detectable non-polar domains; 2) between the CAC and the area of phase separation - induced aggregates are forming on the polymer chain, which is often referred to as the pearl-necklace structure; 3) the area of phase separation - a precipitate forms and a minimal amount of surfactant is present in the solution, which would form hydrophobic domains; 4) beyond the phase separation region - the formation of free micelles (CMC) occurs at values that correspond to the system without polymer and the system is without precipitates. The whole of this description focuses on the formation of the non-polar domain of the aggregating surfactant on the polymer. To complete the overall picture, it is necessary to look at the given experiments from the point of view of the behavior of the polymer, because in any carrier system of non-polar substances, the non-polar domain will be anchored to the polymer chain.

In this work, we used a covalently-labeled fluorescent derivative of hyaluronan and thus describe the behavior of the complex from the point of view of the polymer part. On the basis of our previous studies with native hyaluronan [11–13], we selected two commercially-available molecular weights of the fluorescently labeled variant – specifically 274 kDa and 710 kDa. The diffusion behavior of fluorescently-labeled hyaluronan was studied, for example, using the technique of confocal fluorescence recovery after photobleaching, where a polymer with two molecular weights of 500 and 830 kDa was studied at different concentrations [17]. Using this technique, the free self-diffusion coefficient defined at the limit of zero concentration was determined to be 7.9 and 5.6 $\mu\text{m}^2/\text{s}$. In our case, we decided to use the Fluorescence Correlation Spectroscopy method. The use of the FCS method in colloidal systems is extensive, and can be found elsewhere (e.g. [18]). By studying the temporal fluctuation of the emitted signal, on a scale from hundreds of nanoseconds to seconds, and the subsequent autocorrelation of such a course, it is possible to determine, for example, the diffusion coefficient of the translational movement of colloidal particles, the concentration of fluorophores, and the kinetic parameters of reactions during which the changes in the emitted signal occur. The course of the signal fluctuation from a single fluorophore with constant brightness in an isotropic medium will be different from the passage of a labeled polymer, which is expected to have a molecular weight distribution that is closely related to the brightness of such a structure [19]. The use of standard simple models for fitting experimental data therefore leads to inaccuracies or to misleading information, because statistically good fits with diffusion coefficients that do not correspond to physical reality can be obtained,

or they can be very difficult to interpret. One of the possible solutions is to use models that contain power parameters, models that consider the lognormal distribution of diffusion coefficients, and the so-called Maximum Entropy Method, which does not interpret the data with any mathematical model [20,21]. At this point, it is also necessary to mention the influence of the particle size ratio and the homogeneity of the coloring compared to the size of the observed volume. This ratio has a significant effect on the determined diffusion coefficients [22]. In this article, a polymer with a very low degree of labeling is used, and, at the same time, we assume that there are also dynamic changes in the conformation of the polymer chain. The uniformity of substitution is not known for these polymers, and, therefore, we do not assume that the determined diffusion parameters need to be corrected.

In this paper, we attempt to subject the obtained data to these advanced analyses and to discuss the data in terms of physical relevance by comparing them with previously gained results.

2. Experimental

2.1. Materials

The cationic surfactant Carboxypendecinium bromide (Septonex®, Czech Pharmacopoeia quality) was purchased from GBNchem, Czechia, and Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB, purity ≥ 99.0 %) from Sigma-Aldrich, Czechia. Fluorescently-labeled hyaluronan with Fluorescein isothiocyanate was purchased from TdB Labs (Sweden) in two versions: A) Mw = 274 kDa, degree of substitution 0.008, and B) Mw = 710 kDa, degree of substitution 0.009. Sodium chloride (Penta, Czechia) was chosen for investigations into the influence of ionic strength. Deionized water was used throughout the study (PURELAB Option R7/15; ELGA, Great Britain).

2.2. Sample preparation

Stock solutions of the polymer and the corresponding surfactant were prepared in deionized water. The stock solution of the labeled polymer was always freshly prepared to avoid possible hydrolysis or release of the fluorescent label. The final concentration of the polymer was the same in all samples for both variants, specifically 3 mg/L. From the stock solution of the surfactant, a concentration series was prepared: 0 M, 3.3 μM , 6.7 μM , 10.0 μM , 33.3 μM , 66.7 μM , 100.0 μM , 333.0 μM , 667.0 μM , 1.0 mM, 3.3 mM, 6.7 mM and 10.0 mM.

The samples for the ionic strength influence measurement were prepared in deionized water. The exact amount of NaCl was added to a fluorescently labeled hyaluronan aqueous solution. Concentration of hyaluronan was the same for all of the NaCl concentrations. The final concentrations of the salt solution were 1.0 mM, 2.5 mM, 5.0 mM, 7.5 mM and 10.0 mM.

2.3. Methods

The basic principle of Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) is to analyze time correlations in fluorescence fluctuations emitted when fluorescently labeled molecules (particles, polymers, etc.) diffuse in and out of a small observation volume (typically $<10^{-15}$ L). From the time-correlation of the fluorescence fluctuations induced by fluorophores diffusing through a focused beam of light, FCS can quantitatively evaluate the concentration, diffusion coefficient, and interaction of the molecules in vitro or in vivo. In the context of Fluorescence Correlation Spectroscopy, a confocal system is used to focus a laser beam onto a small observation volume. The fluorescent light emitted from fluorescently labeled molecules in the observation volume is collected by the same objective and propagates along the opposite direction to that of the excitation/depletion light. The confocal system is used to ensure that only the fluorescence from the focal plane is detected, thus reducing the background noise and increasing the signal-to-noise ratio. In this

particular case, we observed the effect of the added positively-charged surfactant on the diffusion behavior of the hyaluronan biopolymer labeled with FITC in an aqueous solution.

FCS measurements were performed on a MicroTime 200 system (Picoquant GmbH, DE) connected to an Olympus IX71 microscope (Olympus, JP). Samples were visualized and quantified using the 60× objective with water immersion (numerical aperture 1.2). The excitation source was a diode laser emitting a wavelength of 470 nm; the signal was detected by a SPCM-AQRH detector (Excelitas, USA) through a 520/35 emission filter (Chroma, USA). An aqueous solution of the probe ATTO 488 (ATTO-TEC GmbH, DE) with a concentration of ~1 nM was used as a calibration solution for determining the parameters of the observed volume. For the time-trace acquisition and generating the autocorrelation curve, SymPhoTime64 software (PicoQuant GmbH, DE) was used. Fitting of the autocorrelation function was performed according to the selected diffusion model using SymPhoTime64 as well as QuickFit 3.0 software [23]. All samples were measured at least five times.

2.4. FCS evaluation

Due to the assumed polydispersity of the sample, the following models were considered – the multicomponent standard diffusion model (Eq. (1)), the anomalous diffusion model (Eq. (2)), and the model including the Log-normal distribution of diffusion times (Eq. (4)); the Maximum Entropy Method was also used. Depending on the sample, a term involving fast non-fluorescent processes such as intersystem crossing to non-fluorescent triplet states or excited-state reactions was also considered for all models.

2.4.1. Multicomponent standard diffusion model

In the most general case, when fluorescent particles of one type freely diffuse in all three dimensions, the dependence of the value of the autocorrelation function G on time is expressed as:

$$G(t) = nf \cdot \frac{1}{\langle N \rangle} \cdot \sum_i \frac{f_i}{1 + \frac{t}{\tau_{D,i}} \cdot \sqrt{1 + \frac{t}{\kappa^2 \cdot \tau_{D,i}}}} \quad (1)$$

where nf stands for non-fluorescent processes (e.g. triplet decay), $\langle N \rangle$ is the average number of fluorophores inside the focal volume, f_i is the fraction of the i -th diffusing component, $\tau_{D,i}$ is the diffusion time of the i -th diffusing component, and κ is the aspect ratio of the gaussian used to approximate the focus.

This model includes the eventual transitions of the fluorophores to the non-fluorescent triplet state and a finite number of discrete diffusive populations or processes.

2.4.2. Anomalous diffusion model

This model extends the previous model (Eq. (1)) by introducing an additional parameter α (anomaly exponent) and thus includes a deviation from ideal free Brownian diffusion, which assumes a linear dependence of the mean square displacement over time. If the particle interacts with a heterogeneous environment, the diffusion coefficient decreases and the course changes from a linear to a power-law dependence. If the value of α is between 0 and 1, the result is so-called subdiffusion; if α is equal to 1, then the behavior of the particle corresponds to free diffusion.

$$G(t) = nf \cdot \frac{1}{\langle N \rangle} \cdot \frac{1}{1 + \left(\frac{t}{\tau_D}\right)^\alpha} \cdot \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\left(\frac{t}{\tau_D}\right)^\alpha}{\kappa^2}}} \quad (2)$$

2.4.3. Log-normal distribution model

A model involving Log-normal distribution was confirmed [24] as a suitable model for describing polydisperse samples exhibiting free

Brownian diffusion. The obtained distribution better expresses the distribution of diffusion coefficients in real systems than the standard diffusion model (Eq. (1)).

The following equation expresses the implementation of the distribution model into the standard diffusion model:

$$G(t) = \frac{1}{\langle N \rangle} \frac{\int_{\tau_{min}}^{\tau_{max}} P(\tau_D) \cdot \left(1 + \frac{t}{\tau_D}\right)^{-1} \cdot \left(1 + \frac{t}{\tau_D \cdot \kappa^2}\right)^{-1/2} d\tau_D}{\int_{\tau_{min}}^{\tau_{max}} P(\tau_D) d\tau_D}, \quad (3)$$

where the Log-normal distribution model $P(\tau_D)$ is defined by:

$$P(\tau_D) = \frac{1}{\sqrt{2 \cdot \pi \cdot b(\tau_D) \cdot \tau_D}} \cdot e^{-\frac{1}{2} \cdot \frac{(\log(\tau_D) - \log(\tau_{D,c}))^2}{b^2(\tau_D)}}, \quad (4)$$

where τ_D is the independent variable, $\tau_{D,c}$ is the median of the dependence, and the parameter $b(\tau_D)$ corresponds to the logarithm of the standard deviation of the variable.

2.4.4. Maximum entropy method

Maximum entropy analysis is based on the algorithm suggested by Skilling and Bryan [25]. This method has previously been used successfully to obtain fluorescence lifetime distributions and diffusion coefficients, and, more recently, has been implemented as MEMFCS to analyze FCS data [20].

The analysis of correlation data searches for the best distribution $p(\tau_D)$, where not only is the χ^2 value a minimum, but the entropy (H) is also a maximum. The maximum entropy principle states that the best distribution to model a given data set is the one with the highest entropy among those that satisfy the constraints of our prior knowledge. A less likely outcome provides more information than a more likely one. The entropy can therefore be expressed as a measure of uncertainty. The goal is to find a distribution $p(x)$ that has the highest uncertainty as possible, then the result should be that entropy H is at a maximum.

If the distribution of diffusion times is assumed to be continuous, the dependence of the autocorrelation function on the diffusion time can be expressed as:

$$G(t) = \sum_i^n \alpha_i \left(\frac{1}{1 + \frac{t}{\tau_D}} \right) \left(\frac{1}{1 + \frac{t}{\kappa^2 \tau_D}} \right)^{1/2} \quad (5)$$

where the amplitude α_i must fulfill the condition that the experimental data $G(\tau)$ are correctly fitted. It is often possible for the goodness-of-fit criterion (χ^2) to be fulfilled for many different distributions of α_i , especially when the data are noisy. Such distributions may also include the solutions for particular models, such as one or more fixed values of τ_D . The experimental data will then fit one of these distributions; therefore, any model that predicts such a distribution is acceptable [26]. Importantly for its application to FCS techniques, the Maximum Entropy Method reveals the contributions of multiple diffusion modes without any prior assumption about their number. MEM is designed to produce the broadest possible distribution of diffusion times (τ_D) and provide a quantitative measure of their mean diffusion coefficients.

The entropy in this context is defined as:

$$H = - \sum_x p(x) \ln p(x) \quad (6)$$

where $p(x) = \frac{\alpha_i}{\sum_i \alpha_i}$. The purpose of the algorithms is to search for a distribution for which the value of H is maximal. Since the script does not provide any values directly, the obtained MEM distributions need to be fitted to a model to help determine the center of the distribution and other parameters for the comparison with other models. It should be mentioned that the Log-normal model was found to be the most appropriate model and was further used to evaluate the MEM data.

3. Results and discussion

This chapter considers the different studied systems and the different evaluation methods applied to each one (Fig. 1).

3.1. Hyaluronan in an aqueous environment

To optimize the measurement conditions, different concentrations of fluorescently-labeled hyaluronan were prepared from the aqueous stock solution to obtain an autocorrelation function value $G(t)$ close to 1 for time $t = 0$. Fig. 2 shows a typical dependence, without normalization, of the value of the autocorrelation function $G(t)$ on the diffusion time for both hyaluronan molecular weights used in this study. The higher molecular weight shows a clearly distinct shift of the function towards higher correlation times and thus exhibits a lower value for the translational diffusion coefficient.

To demonstrate the different approaches to FCS data evaluation, 710 kDa hyaluronan in aqueous medium was selected (Fig. 3). The Multicomponent Standard Diffusion Model was used as the first one. In this case, the best fit for 710 kDa hyaluronan ($\chi^2 = 1.174$) was a two-component model with $D_1 = 4.74 \pm 0.43$ (80 % fraction) and $D_2 = 45.7 \pm 18.5 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (20 % fraction). Next, we fitted experimental data with the anomalous diffusion model ($\chi^2 = 1.214$), where a diffusion coefficient of $6.79 \pm 0.14 \mu\text{m}^2/\text{s}$ and a coefficient of anomaly α of 0.864 ± 0.016 were found. The results using the Log-normal model ($\chi^2 = 1.234$) show that the center of the distribution (the median) corresponds to a diffusion coefficient of $3.26 \pm 0.36 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Finally, MEM analysis was applied ($\chi^2 = 1.003$). In this case, the distribution showed two separate populations, with the first median D_1 of $5.03 \pm 0.01 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (90 % fraction) and the second median D_2 of $43.59 \pm 0.02 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (10 % fraction). On the basis of the above data, it can be said that the analysis of diffusion coefficients corresponds rather to two processes, where the dominant process shows a diffusion coefficient D_1 of about $5 \mu\text{m}^2/\text{s}$, which corresponds to the range of values found earlier with a different method (830 kDa $\approx 5.6 \mu\text{m}^2/\text{s}$ [17]). The faster component, D_2 , with a diffusion coefficient of around $45 \mu\text{m}^2/\text{s}$, may correspond to the smaller fraction of the chains or it may be a second periodic process associated with the movement of a relatively large chain through the observed volume. This is most likely not a free fluorescent label, as a free probe would show a diffusion coefficient close to $400 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (under the given measurement conditions). The possible appearance of a component with a diffusion coefficient corresponding to the free diffusion of the hydrolyzed label was taken as one of the indicators of the stability of the polymer stock solution. If this component appeared in the analysis, a fresh stock solution was prepared.

For 274 kDa hyaluronan, MEM analysis revealed only one

distribution peak, as can be seen in Fig. 4. The distribution obtained using the Log-normal model was added to the MEM distribution for comparison. The obtained diffusion coefficients, which correspond to the median of the distribution, were $9.83 \pm 0.01 \mu\text{m}^2/\text{s}$ for the MEM and $9.38 \pm 0.17 \mu\text{m}^2/\text{s}$ for the Log-normal model. The Multicomponent Standard Diffusion Model showed the best agreement for a single diffusion coefficient of $11.32 \pm 0.01 \mu\text{m}^2/\text{s}$ and a roughly 5 % fraction of the non-fluorescent signal (typical time about 86 μs). The anomalous diffusion model then showed a value of $11.0 \pm 0.2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (with a roughly 7 % fraction of the non-fluorescent signal; typical time, 100 μs), with an α coefficient of 1.01. Thus, in this case, the model did not provide any new information.

In conclusion, this chapter shows that hyaluronan with lower molecular weight exhibits a homogeneous distribution of diffusion times, unlike hyaluronan with higher molecular weight, where an additional process is present, probably related to the segmental movement of the long chain when passing through the observed volume. With our chosen hyaluronan concentration of 3 mg/L, we can neglect the interchain interaction in the analysis, because the critical concentration for domain overlap values are at least two orders of magnitude higher [18]. It is very important for the study of polymer-surfactant interaction to use MEM analysis in order to describe different processes, especially in this complex system.

3.2. Hyaluronan of molecular weight 274 kDa in the CTAB and Septonex® aqueous solution

Fig. 5 shows the diffusion coefficient values obtained by fitting the experimental data with the Anomalous Diffusion model. For comparison with the diffusion coefficient in the absence of surfactant, the experimental data were related to the value of $D_w = 12.10 \pm 0.26 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (with anomalous coefficient $\alpha = 0.94$) and plotted as the D/D_w ratio. The corresponding anomalous coefficients are assigned in the form of text boxes at each point of the plot. On the basis of previously published data [12], vertical colour lines are plotted in the graph to show the important concentrations in terms of surfactant aggregation – the critical micellar concentration (CMC, red), the critical aggregation concentration (CAC, yellow), and the theoretical concentration when the polyion/surfactant charge ratio is equal to one ($c_s = c_{\text{mon}}$, green). The concentration of the surfactant was obtained by determining the molar concentration of the monomer from the weight of hyaluronan using the molecular weight of the hyaluronan monomer of 403.31 g/mol; it corresponds to the concentration of the carboxyl groups of hyaluronan. At the same time, the regions marked A-D are defined in the graph. These regions correspond to: A) the region of the binding of the molecular form of surfactant; B) the region of “pearl necklace” formation; C) the region of phase

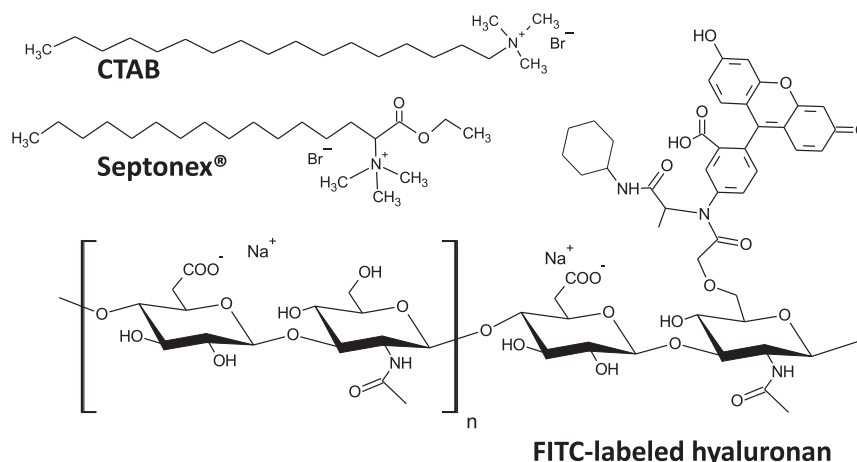


Fig. 1. Chemical structure of all used chemicals.

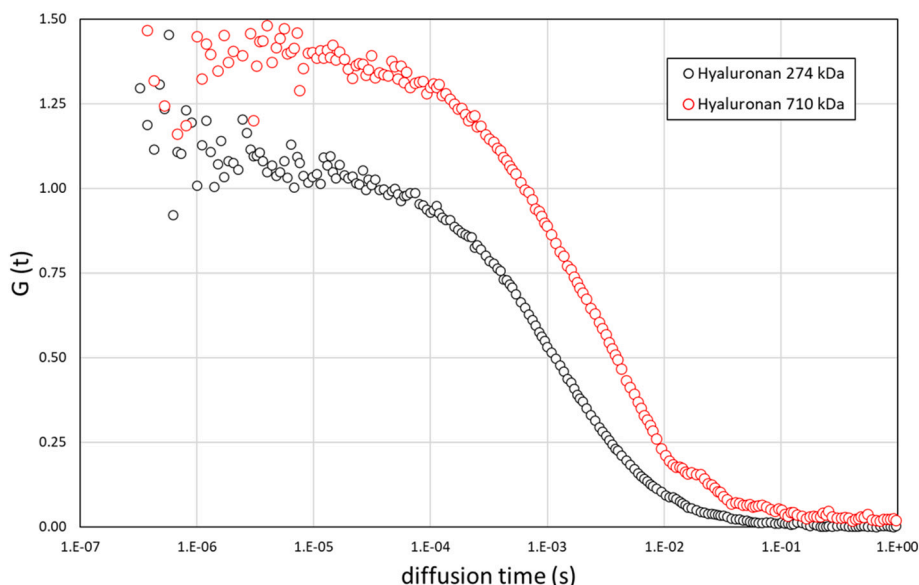


Fig. 2. Selected autocorrelation function dependencies for two hyaluronan chains with different molecular weights used in the experiments. The final concentration for both polymers is 3 mg/L.

separation; and D) the region of the mixed binding of surfactant to the polymer in molecular and micellar form.

In terms of the anomalous diffusion model, which yields the value of the average diffusion coefficient, there is a slight decrease in the diffusion coefficient in region A compared to the purely aqueous environment, but the minimal additions do not imply any change within the error bars for either surfactant. For CTAB, the theoretical limit of charge equilibration and the observed critical aggregation concentration overlap. There is a monotonic decrease in the average diffusion coefficient up to the precipitation region. In the case of Septonex®, if the error bars are taken into account, the “pearl necklace” formation region is characterized by similar diffusion coefficient values for all measured surfactant additions, which are lower than in region A. For both surfactants, further additions mean the destabilization and precipitation of the system, where no measurable signal or autocorrelation curve can be obtained for the evaluation. This means that in this case the hyaluronan is wholly a part of the precipitate. For studied surfactants, the range of the precipitation region was found to vary, with a 333 μM concentration of CTAB showing no measurable signal; for Septonex®, however, a sufficient signal was obtained to plot an autocorrelation curve and analyze it. As the surfactant concentration increases, the diffusion coefficients increase again, where the change is more significant with CTAB compared to Septonex®. The final concentration of 10 mM leads to aggregates with a similar mean size (mean diffusion coefficient) as that obtained using the Anomalous Diffusion model.

Other useful parameters to describe the behavior of the chain may be the average number of molecules in the observed volume and the molecular brightness expressed as the number of photons collected per second relative to the average number of particles (cpm, counts per molecule). For a better comparison with the initial values, both parameters are given for the hyaluronan solution without the presence of surfactant. A first look at the two dependencies shown in Fig. 6 for both surfactants shows that the number of particles before the phase region for CTAB remains approximately the same, and decreases for both Septonex® and CTAB up to a concentration of 33 μM . There is a big difference at this concentration, where CTAB shows an order of magnitude decrease, but Septonex® remains within the measurement error at approximately the same value. This trend is similar for the change in diffusion coefficient (Fig. 5). Within the measurement error, we can say that the molecular brightness is identical in the region up to 33 μM . Above the phase-separation region, the average fluorescence

intensity remained roughly constant during the measurements. It can be suggested that the observed two-order increase in cpm value is related to the two-order decrease in the average number of particles. In this case, the determination of molecular brightness values is burdened with a large error and it is worth looking at the global change in the trend rather than the magnitude of a particular value. The changes in the average number of molecules and molecular brightness should be compared by analysing the lifetime (τ_i) of the excited state of the fluorophore. Table S1 in Supplementary Information lists the lifetimes that correspond to the biexponential nature of the fluorescence decay and are supplemented with the relative amplitudes (a_i). This trend was observed for all samples and the biexponential model were the best fitting model. The mean value of the fluorescence lifetime showed a decreasing character, even if the value of the molecular brightness increased by an order of magnitude. In the case of the 274 kDa polymer, this shows that the formation of stable aggregates of surfactant and polymer chains occurs beyond the phase separation region. This trend did not change until the final surfactant concentration.

As mentioned earlier, average values can serve as a basic guide to the evolution of the diffusion behavior of the system under study. However, the values of the average number of particles in the observed volume and molecular brightness, obtained from this analysis, can bring useful information, that MEM analysis cannot provide. MEM analysis was applied to the experimental data to provide the distributions of the individual diffusion processes. Hyaluronan with a molecular weight of 274 kDa showed a unimodal distribution of diffusion times/coefficients, as shown in Fig. 4. The addition of surfactants, especially at low concentrations, was likely to lead to multimodal distributions of diffusion coefficients. The results for each addition are summarized in Fig. 7.

Comparing the median of the dominant distribution in the first region (Fig. 7, CTAB A and Septonex® A), we obtain a similar dependence, where the value shifts to lower diffusion coefficients with increasing concentration for CTAB and remains at a similar value for Septonex®. The dependencies here, with some exceptions, show a bimodal character, with the median minority peak being found at higher diffusion coefficients. For CTAB, no trend is shown, whereas for Septonex® the distribution decreases with higher surfactant addition and the peaks shift towards higher values of diffusion coefficients. Due to the complexity of the system, higher diffusion coefficients can be considered either as indicating a population of tightly packed polymer-surfactant complexes or as another, most likely segmental, movement of the

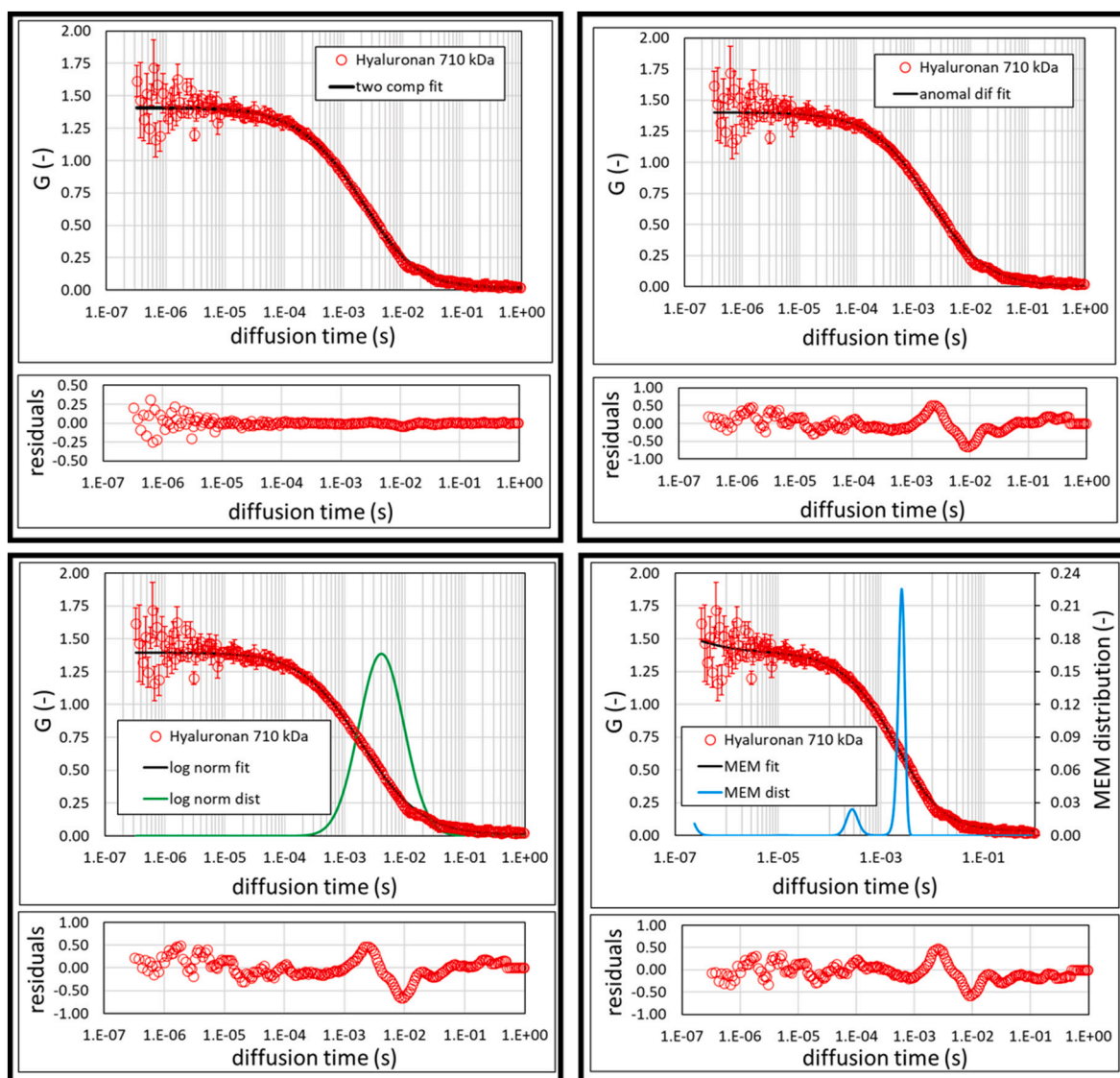


Fig. 3. Data, fit, and residual analysis of FCS data of 710 kDa hyaluronan. A) two-component standard diffusion model; B) anomalous diffusion model; C) Log-normal model; D) Maximum Entropy Method.

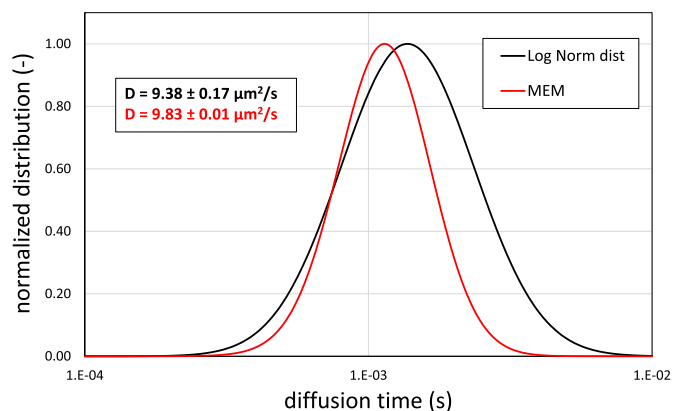


Fig. 4. Distribution of diffusion times of 274 kDa hyaluronan obtained from Log-normal (black) and MEM models (red). The distribution curves are normalized and in the inset box contains the calculated corresponding diffusion coefficients from median of the distribution.

chain through the observed volume. The median distribution, the logarithm of standard deviation, and corresponding values of the polydispersity index (PDI) are shown in Table S2 in the Supplementary Information.

Beyond the phase separation region (for CTAB, 667 μM ; for Septonex®, 333 μM), MEM analysis shows a very narrow distribution of diffusion coefficients, which are shifted to the lowest values determined within the measurement. The complexes in this part acquire the largest size, which is supported by comparison with the previous analysis of the relative number of particles and the relative molecular brightness. The smallest average number of particles and the highest values of molecular brightness can be found in this region. It should be mentioned that in this region, near the concentrations where the phase separation occurs, the decrease in the average number of particles can be attributed to the fact that only the non-precipitated fraction is observed, although the presence of a precipitate could not be directly observed in prepared samples. At the same time, the samples show comparable fluorescence intensity, which confirms no or only minimal precipitation of the complex.

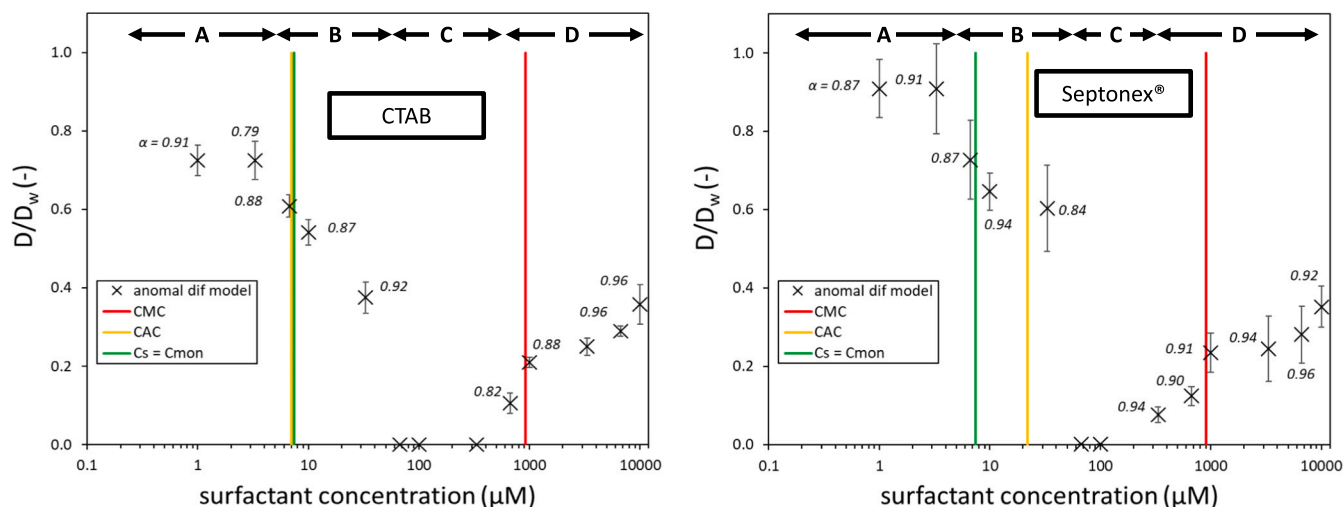


Fig. 5. Dependence of the diffusion coefficient ratio of the 274 kDa hyaluronan in the presence and the absence of CTAB and Septonex® as a function of its concentration. The text boxes at each point indicate the values of the anomaly coefficient. The vertical lines characterize, based on previously published data [12], the values of the critical micellar concentration of CTAB and Septonex® (red), its critical aggregation concentration (yellow), and the values where a theoretical charge equilibration between surfactant and polymer occurs (green). Regions A-D correspond to: A) the region of binding of the molecular form of surfactant; B) the region of the “pearl necklace” formation; C) the region of a phase separation; D) the region of mixed binding of surfactant to the polymer in a molecular and micellar form.

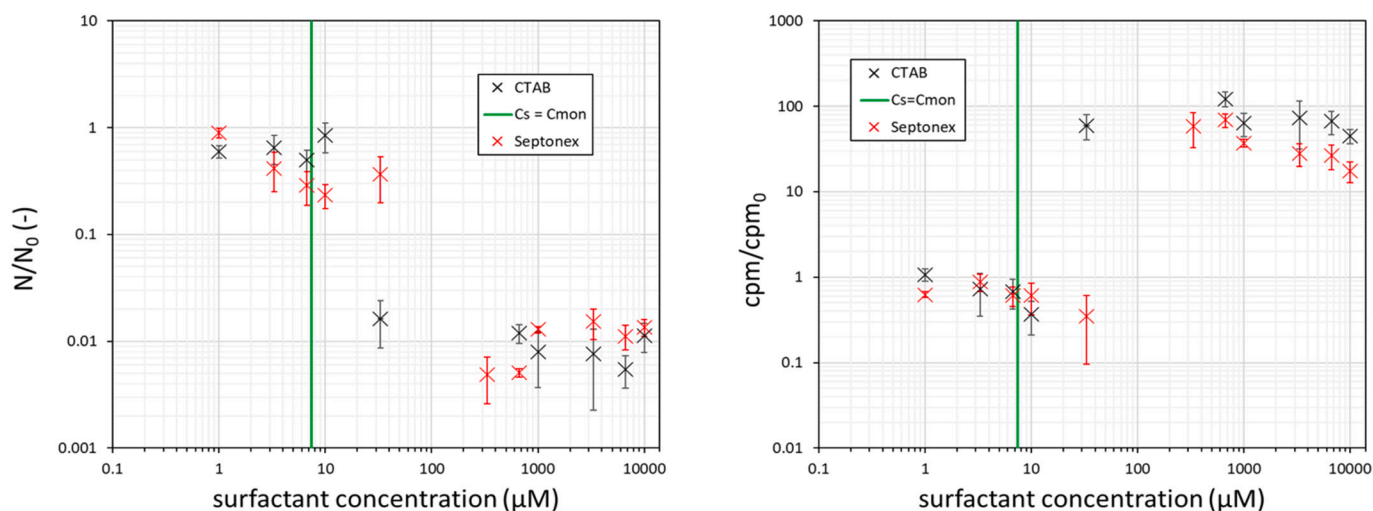


Fig. 6. Dependence of the relative number of molecules N/N_0 and the relative molecular brightness cpm/cpm_0 on the surfactant concentration for 274 kDa hyaluronan. Green line indicates the region of the theoretical charge equilibration.

3.3. Hyaluronan of molecular weight 710 kDa in aqueous solution of CTAB and Septonex®

In discussing the interaction of surfactants and hyaluronan with higher molecular weight, we should first recall that the anomalous diffusion model showed a median diffusion coefficient of $6.79 \mu\text{m}^2/\text{s}$ and that the MEM analysis showed a median dominant peak at $5.03 \mu\text{m}^2/\text{s}$. As shown in Fig. 8 and the corresponding Table S3 (Supplementary Information), a low addition of surfactant leads to an increase in the determined diffusion coefficient of the surfactant-polymer complex for both types of used surfactants. In the case of CTAB, the increase in the observed parameter is more pronounced and up to a concentration of $33 \mu\text{M}$ the diffusion coefficient is higher or comparable. The positions of the medians of the distribution curves from the MEM analysis correspond to this trend. Overall, the distribution curves of diffusion coefficients in the given concentration range can be considered broad and reflect the higher molecular weight of the observed chain.

The limit concentration ($33 \mu\text{M}$) before the precipitation area shows a multimodal character with narrower distributions. The samples containing 67 , 100 , and $333 \mu\text{M}$ surfactant showed precipitation for both monitored substances and thus cannot be evaluated. Higher concentrations showed an increasing mean diffusion coefficient along with a shift in the median of the MEM distribution. At higher surfactant concentrations, both CTAB and Septonex® showed an increase of up to 110% and 80% of the initial value in water, respectively, which is practically double when compared to lower molecular weight hyaluronan. Comparison with MEM analysis shows that the two highest concentrations (6.7 and 10 mM) exhibit a broad and bimodal distribution, which is likely responsible for the significant shift in the mean value of the diffusion coefficient for the Anomalous Diffusion model.

There is a significant increase in the diffusion coefficient at concentrations above $667 \mu\text{M}$. An increase in the diffusion coefficient, which may mean a decrease in the size of the diffusing aggregate, corresponds to a gradual increase in the number of particles and a decrease

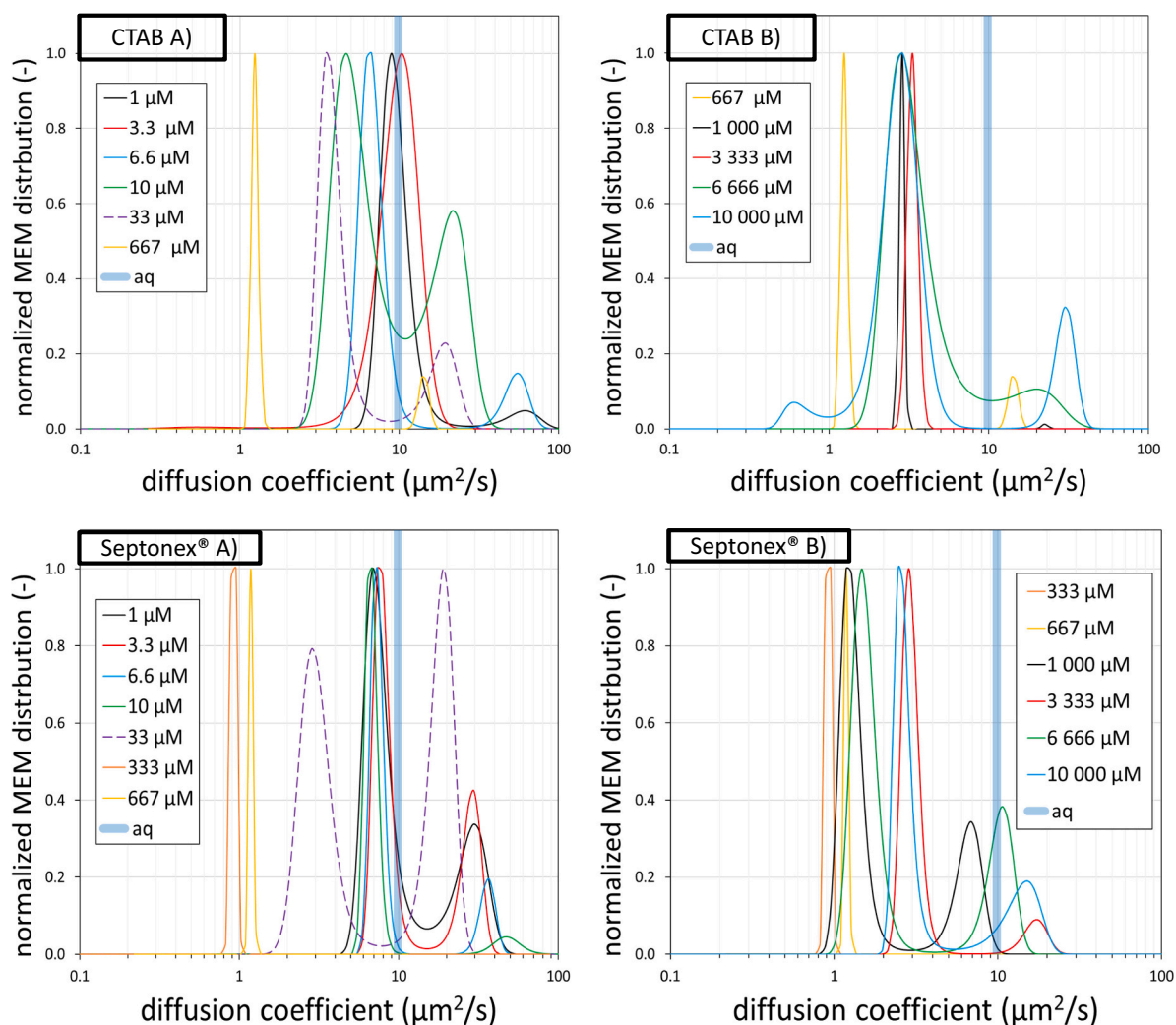


Fig. 7. Normalized dependence of MEM distribution on diffusion coefficient of 274 kDa fluorescently labeled hyaluronan for individual surfactant concentrations. For clarity, the individual surfactants are separated by the region with the addition of one valid analysis from the following and preceding region, respectively. The beginning of precipitation around the value of 33 μM is plotted by the purple dashed line. The dependencies are supplemented with the median obtained from MEM analysis of the aqueous hyaluronan solution (aq).

in the relative cpm value (Fig. 9). If we include these three pieces of information, we can say that as the concentration of the surfactant increases, the aggregated chains are disrupted, and the aggregates exhibit a similar diffusion behavior as individual chains. Here again, the situation is significantly different with hyaluronan of lower molecular weight, which remains probably only in an aggregated form up to 10 mM (Fig. 10).

3.4. Effect of ionic strength on the diffusion behavior of hyaluronan

Due to the ionic nature of the used surfactants, one can assume that the presence of surfactant can change the ionic strength of the system and influence the diffusion behavior of negatively charged hyaluronan. We decided to demonstrate the effect of changing the ionic strength on the diffusion behavior of hyaluronan by adding NaCl to its aqueous solution. MEM analysis and the resulting median of the distribution of diffusion coefficients were chosen. For clarity, the change in diffusion coefficient is shown relative to the value without salt addition. As shown in Fig. 11 below, with the increasing addition of low molecular weight electrolyte, the diffusion coefficient increases for both molecular weights. The Anomalous Diffusion Model as well as the Log-normal model show similar results. For lower molecular weight hyaluronan, the overall change within the selected salt concentrations is lower than

for higher molecular weight hyaluronan.

If we compare the trend with Figs. 5 and 8, we see that a change only in the ionic strength of the solution cannot be responsible for the observed changes in the diffusion behavior of the polymer with added surfactant. The diffusion coefficient of a polymer of lower molecular weight with low additions decreases, and its increase only occurs beyond the CMC of the given surfactant. In the case of higher molecular weight hyaluronan, the increase in the diffusion coefficient occurs in the area of low surfactant additions. However, this increase is too high to correspond to any increase caused by ionic strength.

Considering the measured data and the behavior of the surfactant with values below the CAC or CMC, it is possible to consider the influence of the change in ionic strength as minor but not negligible because of the ionic nature of the used surfactant.

4. Conclusion

In this work, we presented a different perspective from previously published works regarding the interaction of hyaluronan and the positively charged surfactants Cetyltrimethylammonium bromide and Septonex®. Our study focused on the behavior of the polymer chain, contrary to earlier works, which looked at the system primarily from the perspective of the micellar environment. In this work, the main method

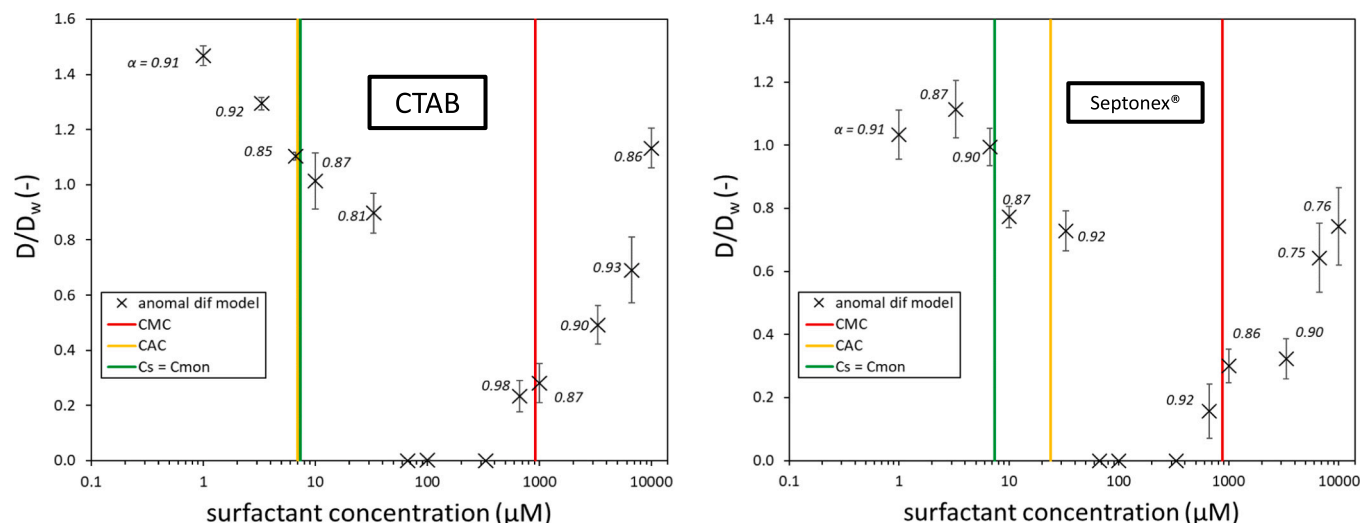


Fig. 8. Dependence of the diffusion coefficient ratio of 710 kDa fluorescently labeled hyaluronan in the presence and the absence of CTAB and Septonex® as a function of its concentration. The text boxes at each point indicate the values of the anomaly coefficient. The vertical lines then characterize, based on previously published data [12], the values of the critical micellar concentration of CTAB and Septonex® (red), its critical aggregation concentration (yellow), and the values where the theoretical charge equilibration between a surfactant and a polymer occurs (green).

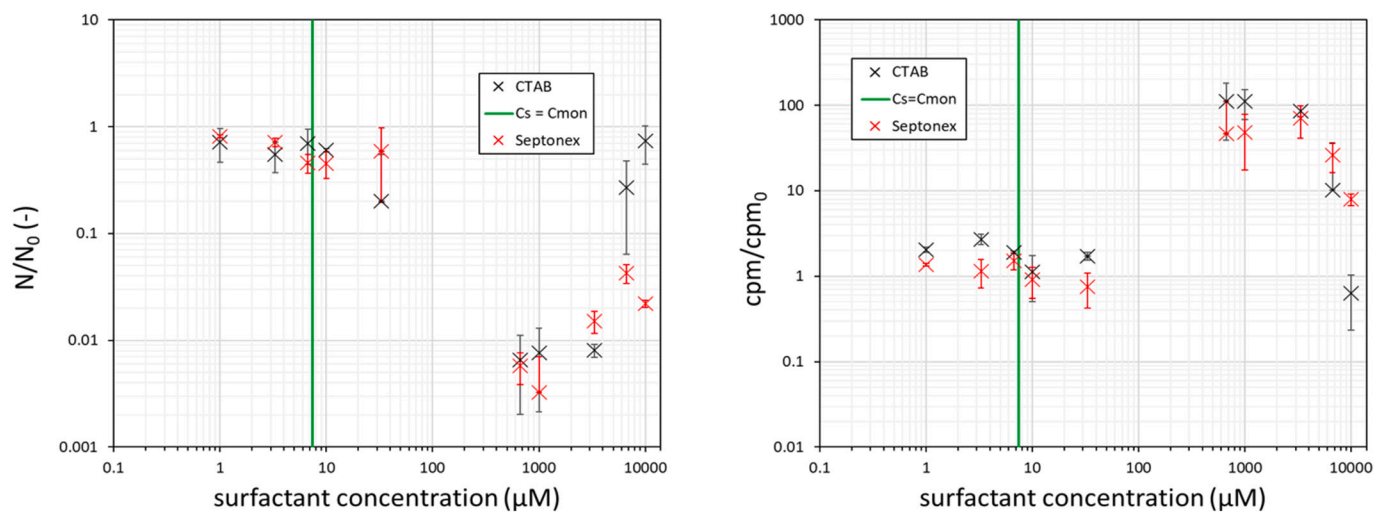


Fig. 9. Dependence of the relative number of molecules N/N_0 and the relative molecular brightness cpm/cpm_0 on the surfactant concentration for 710 kDa hyaluronan. The green line indicates the region of theoretical charge equilibration.

applied was Fluorescence Correlation Spectroscopy, which was used to study FITC-labeled hyaluronan with two molecular weights, 274 and 710 kDa. At the same time, we compared different evaluation methods, supplementing the relatively widely-used Anomalous Diffusion model with the Maximum Entropy Method. As a result, we determined the distribution of diffusion coefficients, instead of parameters of probability. The analysis was supplemented by the determination of the molecular brightness and the lifetimes of the excited state of the fluorophore.

We confirmed some results published earlier, such as precipitation in the region between 33 and 333 μM of added surfactant. Another confirmed fact was that Septonex® interacts with more moderate changes than CTAB due to its bulkier hydrophilic head. This was reflected both in the parameters of the Anomalous Diffusion model as well as in the distribution dependencies obtained by the Maximum Entropy Method.

The main finding achieved in this work was the different behavior of the biopolymer according to its molecular weight. The lower molecular weight showed only a slight decrease in the diffusion coefficient at the

lowest concentrations, then a more significant decrease in the area around the CAC up to the area of precipitation. The area of precipitation is followed by an area that slightly overlaps with the area of critical micellar concentration and there is an increase in the mean diffusion coefficient. For CTAB, the increase is continuous. In the case of Septonex®, the area with the highest additions of surfactant can be described as constant within the error bars. However, the diffusion coefficients remain at about 40 % of the value for a polymer of a given molecular weight, and it can thus be said that there are still polymer-surfactant intermolecular aggregates in the given area. The correctness of this statement is also proven by the fact that the average number of molecules and the molecular brightness values remain almost unchanged.

At the lowest additions of the surfactant, hyaluronan with a higher molecular weight exhibits an increase in the diffusion coefficient according to both the Anomalous Diffusion model and the MEM distribution dependencies, which should mean the presence of chain contraction. Again, there is a decline in the area of precipitation. Beyond this area, the diffusion coefficient increases to the values for the chain itself, the most likely explanation of which is the dissolution of polymer-

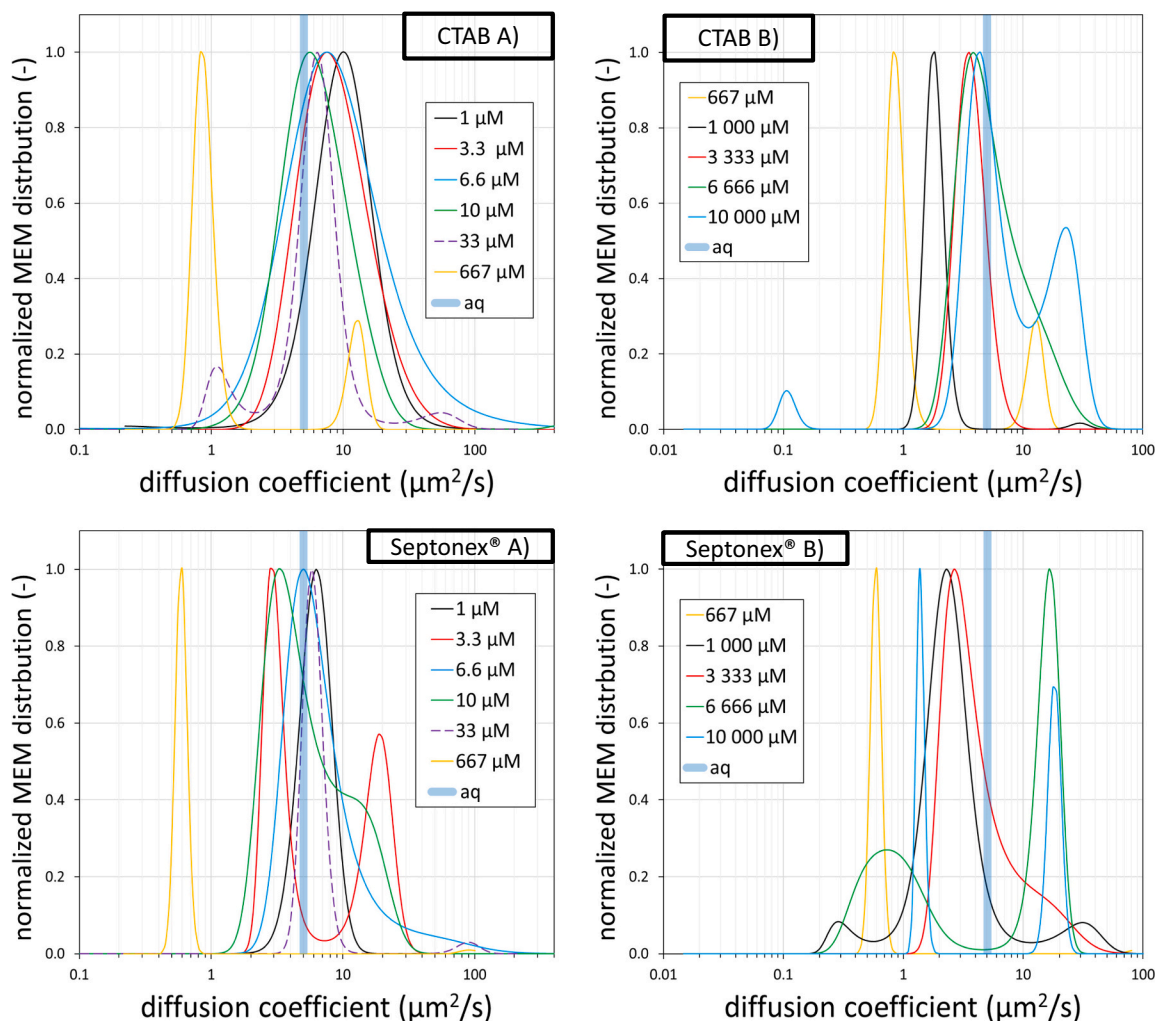


Fig. 10. Normalized dependence of the MEM distribution on the diffusion coefficient of 710 kDa fluorescently labeled hyaluronan for the individual surfactant concentrations. For clarity, the individual surfactants are separated by the region with the addition of one valid analysis from the following and preceding region. The beginning of the precipitation around the value of 33 μM is plotted by the purple dashed line. The dependencies are supplemented with the median obtained from the MEM analysis of the aqueous hyaluronan solution (aq).

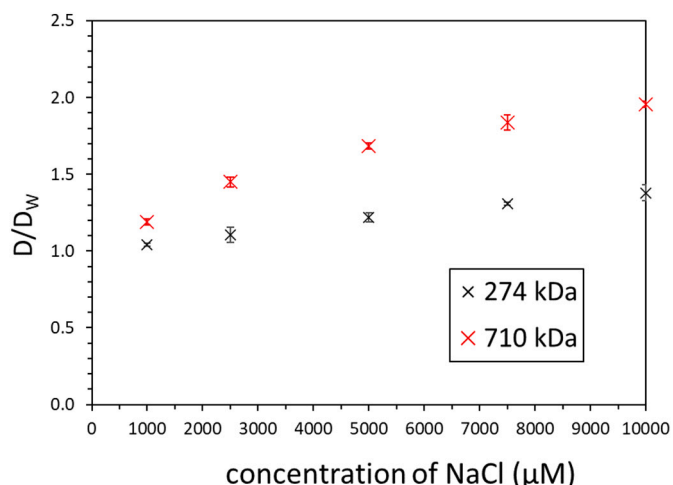


Fig. 11. Influence of the NaCl concentration on the diffusion coefficient of 274 and 710 kDa hyaluronan. Diffusion coefficients were obtained as the median of the MEM distribution and are shown relative to the value of the diffusion coefficient obtained for the solution without added salt.

surfactant aggregates. This statement is also supported by the increase in the mean numbers of molecules up to the original values (especially for CTAB) and the associated decrease in molecular brightness values.

Cationic surfactants in micelle form have the ability to carry inside their core some hydrophobic substances, but, unfortunately, they aren't biocompatible. Hyaluronan is one of the most biocompatible substances with a highly hydrophilic nature. Because of this hydrophilic feature, it cannot be used as a carrier of hydrophobic substances, e.g., in drug delivery systems. One important property of hyaluronan is its ability to suppress the negative effect of cationic surfactants on human cells. From this point of view, aggregates composed of hyaluronan and cationic surfactant are highly symbiotic, because biocompatibility with the ability to carry a hydrophilic substance is achieved. The study of these interactions has already been published in previous articles [9–13], which discuss changes in surfactant aggregation behavior in dependence on the presence of hyaluronan. In contrast, this work focused mainly on changes in the diffusion properties of the polymer chain in dependence on the addition of surfactant.

CRediT authorship contribution statement

Kateřina Marková: Data curation, Investigation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Filip Mravec:** Conceptualization,

Formal analysis, Methodology, Supervision, Writing – original draft, Writing – review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgement

This work was supported by the Czech Science Foundation, project No. 19-14024J (GACR).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130627>.

References

- [1] A. Fallacara, E. Baldini, S. Manfredini, S. Vertuani, Hyaluronic acid in the third millennium, *Polymers* (Basel) (2018), <https://doi.org/10.3390/polym10070701>.
- [2] M. Klučáková, M. Havlíková, F. Mravec, M. Pekař, Diffusion of dyes in polyelectrolyte-surfactant hydrogels, *RSC Adv.* (2022), <https://doi.org/10.1039/d2ra02379b>.
- [3] T. Halasová, J. Krouská, F. Mravec, M. Pekař, Hyaluronan-surfactant interactions in physiological solution studied by tensiometry and fluorescence probe techniques, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 391 (2011), <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.05.035>.
- [4] K. Thalberg, B. Lindman, Interaction between hyaluronan and cationic surfactants, *J. Phys. Chem.* (1989), <https://doi.org/10.1021/j100341a058>.
- [5] K. Thalberg, B. Lindman, G. Karlström, Phase diagram of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: tetradecyltrimethylammonium bromide-hyaluronan-water, *J. Phys. Chem.* (1990), <https://doi.org/10.1021/j100373a075>.
- [6] K. Thalberg, B. Lindman, G. Karlström, Phase behavior of a system of cationic surfactant and anionic polyelectrolyte: the effect of salt, *J. Phys. Chem.* (1991), <https://doi.org/10.1021/j100168a053>.
- [7] K. Thalberg, J. Van Stam, C. Lindblad, M. Almgren, B. Lindman, Time-resolved fluorescence and self-diffusion studies in systems of a cationic surfactant and an anionic polyelectrolyte, *J. Phys. Chem.* (1991), <https://doi.org/10.1021/j100175a101>.
- [8] A.B. Kayitmazer, E. Seyrek, P.L. Dubin, B.A. Staggemeier, Influence of chain stiffness on the interaction of polyelectrolytes with oppositely charged micelles and proteins, *Journal of Physical Chemistry B* (2003), <https://doi.org/10.1021/jp034065a>.
- [9] M. Kalbáčová, M. Verdánová, F. Mravec, T. Halasová, M. Pekař, Effect of CTAB and CTAB in the presence of hyaluronan on selected human cell types, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 460 (2014), <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.12.048>.
- [10] P. Sauerová, M. Verdánová, F. Mravec, T. Pilgrová, T. Venerová, M. Hubálek Kalbáčová, M. Pekař, Hyaluronic acid as a modulator of the cytotoxic effects of cationic surfactants, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* (2015), <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.06.058>.
- [11] J. Mondek, F. Mravec, T. Halasová, Z. Hnylučová, M. Pekař, Formation and dissociation of the acridine orange dimer as a tool for studying polyelectrolyte-surfactant interactions, *Langmuir* (2014), <https://doi.org/10.1021/la502011s>.
- [12] T. Pilgrová, T. Venerová, F. Mravec, M. Pekař, Interactions of hyaluronan with oppositely charged surfactants in very diluted solutions in water, *Int. J. Biol. Macromol.* 112 (2018), <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.176>.
- [13] P. Holínková, F. Mravec, T. Venerová, C.H. Chang, M. Pekař, Hyaluronan interactions with cationic surfactants – insights from fluorescence resonance energy transfer and anisotropy techniques, *Int. J. Biol. Macromol.* (2022), <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.05.067>.
- [17] P. Gribbon, B.C. Heng, T.E. Hardingham, The molecular basis of the solution properties of hyaluronan investigated by confocal fluorescence recovery after photobleaching, *Biophys. J.* (1999), [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77061-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77061-X).
- [18] K. Koynov, H.J. Butt, Fluorescence correlation spectroscopy in colloid and interface science, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* (2012), <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2012.09.003>.
- [19] T. Kalwarczyk, K. Kwapiszewska, K. Szczepanski, K. Sozanski, J. Szymanski, B. Michalska, P. Patalas-Krawczyk, J. Duszynski, R. Holyst, Apparent anomalous diffusion in the cytoplasm of human cells: the effect of Probes' polydispersity, *J. Phys. Chem. B* (2017), <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.7b07158>.
- [20] N. Pal, S.D. Verma, M.K. Singh, S. Sen, Fluorescence correlation spectroscopy: an efficient tool for measuring size, size-distribution and polydispersity of microemulsion droplets in solution, *Anal. Chem.* (2011), <https://doi.org/10.1021/ac2012637>.
- [21] L. Xue, S. Jin, S. Nagasaka, D.A. Higgins, T. Ito, Investigation of molecular diffusion at block copolymer thin films using maximum entropy method-based fluorescence correlation spectroscopy and single molecule tracking, *J. Fluoresc.* (2022), <https://doi.org/10.1007/s10895-022-02975-6>.
- [22] J. Gapinski, M. Jarzębski, J. Buitenhuis, T. Deptula, J. Mazuryk, A. Patkowski, Structure and dimensions of Core-Shell nanoparticles comparable to the confocal volume studied by means of fluorescence correlation spectroscopy, *Langmuir* (2016), <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b04605>.
- [23] J.W. Krieger, J. Langowski, QuickFit 3.0. <https://bii.eu/quickfit-3>. (Accessed 1 September 2023).
- [24] F. Schneider, D. Waithe, B.C. Lagerholm, D. Shrestha, E. Sezgin, C. Eggeling, M. Fritzsche, Statistical analysis of scanning fluorescence correlation spectroscopy data differentiates free from hindered diffusion, *ACS Nano* 12 (2018) 8540–8546, <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b04080>.
- [25] J. Skilling, R.K. Bryan, Maximum entropy image reconstruction: general algorithm, *Mon. Not. R. Astron. Soc.* (1984), <https://doi.org/10.1093/mnras/211.1.111>.
- [26] P. Sengupta, K. Garai, J. Balaji, N. Periasamy, S. Maiti, Measuring size distribution in highly heterogeneous systems with fluorescence correlation spectroscopy, *Biophys. J.* (2003), [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)75006-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)75006-1).