



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION

ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

TERAHERTZOVÁ SPEKTROSKOPIE V ČASOVÉ DOMÉNĚ A VIZUALIZACE BIOLOGICKÝCH OBJEKTŮ

TERAHERTZ TIME-DOMAIN SPECTROSCOPY AND VISUALIZATION OF BIOLOGICAL OBJECTS

DISERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Marie Nedvědová

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.

ŠKOLITEL - SPECIALISTA

CONSULTANT

doc. RNDr. Vojtěch Křesálek, CSc.

BRNO 2020

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá metodami terahertzové (THz) spektroskopie ke sledování kinetiky hemostatik, tj. biomedicínských materiálů používaných k podpoře přirozené hemostatické reakce těla. Teoretická část seznamuje s fyzikálními principy THz spektroskopie v časové doméně (THz TDS), zaměřuje se na výhody i omezení této metody a na související možnosti její aplikace v oblasti charakterizace biomedicínských materiálů. Dále jsou podrobně specifikována aktuální hemostatika, rozebrán princip jejich funkce a použití, včetně dostupných informací o interakci s živou tkání. Byly realizovány experimenty sledující kinetiku fyziologické reakce jednoduk tkáňového lepidla na bázi kyanoakrylátu a dále absorpčních hemostatik. Popis mechanismu reakce vychází z fyzikálně-chemických principů, na nichž je postaveno také odvození matematických modelů reakční kinetiky zkoumaných hemostatik. Modelováním jsou získány odhady hodnot parametrů charakterizující zkoumané vzorky. Z pohledu srovnání reakční rychlosti jednotlivých typů hemostatik je stěžejním parametrem časová konstanta, která je dále podrobněji vyhodnocena s využitím prostředků statistické analýzy. Výsledky experimentálního měření tkáňového lepidla získané THz TDS byly doplněny měřeními pomocí dalších spektroskopických a mikroskopických technik. Všechna data byla zpracována dle navržených algoritmů a následně analyzována matematickými metodami.

KLÍČOVÁ SLOVA

Terahertzová spektroskopie v časové doméně, hemostatika, polymerizace, kinetika síťování, kinetika sorpční reakce, matematické modelování kinetiky

ABSTRACT

This thesis deals with the methods of Terahertz (THz) spectroscopy to observe the kinetics of haemostatic materials used for supporting the native mechanism of haemostasis. The theoretical part follows the physical principles of THz time-domain spectroscopy (THz TDS), mentions the advantages and limitations of this method and its application possibilities for the characterization of biomedical materials. Further, there are specified properties of actual haemostats, described principles of their function and usage in practice, including their interaction with the living tissue. There were performed experiments monitoring the kinetics of physiologic reaction of the tissue adhesive based on the cyanoacrylates and absorbable haemostats. The mechanisms of monitored reactions were explained based on the physical-chemical principles that are used also for the kinetic models' derivation. Modelling of the measured data results in the estimation of the parameters characterizing the observed samples. The most interesting parameter is the time constant of the reaction because of the possibility to compare reaction rates of different types of haemostats. The detailed analysis of this parameter is performed using the means of statistical methods. Tissue adhesive samples were measured by other spectroscopic and microscopic methods to compare the findings with the experimental results of the THz TDS. Data were processed using algorithms designed especially for this experiment and analysed using mathematical methods.

KEYWORDS

Terahertz time-domain spectroscopy, haemostats, polymerization, networking kinetics, sorption reaction kinetics, mathematical modelling of kinetics

Nedvědová, M. *Terahertzová spektroskopie v časové doméně a vizualizace biologických objektů*. Brno: Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, Vysoké učení technické v Brně, 2020. 143 s., 11 příl. Vedoucí disertační práce: prof. Ing. Ivo Provazník, PhD.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou disertační práci na téma „Terahertzová spektroskopie v časové doméně a vizualizace biologických objektů“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího disertační práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autorka uvedené doktorské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této doktorské práce jsem neporušila autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhla nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědoma následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení § 152 trestního zákona č. 140/1961 Sb.

V Brně dne

.....

Ing. Marie Nedvěďová

PODĚKOVÁNÍ

V první řadě děkuji svému odbornému školiteli doc. RNDr. Vojtěchu Křesálkovi, CSc. za podnětné diskuze, cenné rady a vždy vstřícný a povzbudivý přístup. Děkuji také prof. Ing. Ivu Provazníkovi, Ph.D. za odborné vedení a konzultace mé disertační práce. Dále děkuji MUDr. Zdeňku Adamíkovi, Ph.D. za dlouhodobou spolupráci; plk. dr. hab. inž. Norbertu Paškovi, prof., za možnost samostatného měření na specializovaném pracovišti Institutu optoelektroniky Wojskowy Akademii Technicznej ve Varšavě; Ing. Jiřímu Pechovi, Ph.D. za poskytnutí FTIR spektrometru; všem dobrovolníkům darujících krev pro účely experimentu za jejich nadšení a důvěru. Největší dík však patří mé rodině, především rodičům za podporu po celou dobu studia a manželu Jiřímu za pochopení, shovívavost, ale také odbornou pomoc při zpracování dat.

V Brně dne

.....

podpis autorky

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
1.1	SOUČASNÝ STAV ZKOUMÁNÍ REAKCE HEMOSTATIK.....	8
1.2	CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	9
2	TERAHERTZOVÁ SPEKTROSKOPIE	11
2.1	TERAHERTZOVÉ ZÁŘENÍ A JEHO VLASTNOSTI	11
2.2	GENEROVÁNÍ A DETEKCE THZ ZÁŘENÍ.....	13
2.3	APLIKACE THZ ZÁŘENÍ	13
2.4	VZNIK THZ ZÁŘENÍ A JEHO INTERAKCE S HMOTOU.....	14
2.4.1	TEORIE VZNIKU THZ VLNY	14
2.4.2	TRANSMISE A ODRAZ	18
2.4.3	ABSORPCE A ROZPTYL	20
2.4.4	INTERAKCE THZ ZÁŘENÍ S HMOTOU NA MOLEKULÁRNÍ ÚROVNI.....	21
2.5	TERAHERTZOVÁ SPEKTROSKOPIE V ČASOVÉ DOMÉNĚ	23
2.5.1	OBECNÝ PRINCIP GENEROVÁNÍ A DETEKCE THZ IMPULSU (PUMP-PROBE)	23
2.5.2	ZDROJE IMPULSNÍHO THZ ZÁŘENÍ	24
2.5.3	DETEKTORY IMPULSNÍHO THZ ZÁŘENÍ.....	25
2.5.4	THZ IMPULS A JEHO SPEKTRUM	26
2.5.5	TRANSMISNÍ VS. REFLEXNÍ MĚŘENÍ	28
2.5.6	THZ SPEKTROSKOPIE BIOLOGICKÝCH OBJEKTŮ	31
3	HEMOSTATIKA.....	33
3.1	HEMOSTÁZA.....	33
3.2	ABSORPČNÍ HEMOSTATIKA	35
3.2.1	OXIDOVANÁ CELULÓZA.....	35
3.2.2	ŽELATINA	37
3.2.3	KOLAGEN	37
3.3	BIOLOGICKY AKTIVNÍ HEMOSTATIKA.....	38
3.4	SYNTETICKÁ TKÁŇOVÁ LEPIDLA.....	39
4	SPECIFIKACE POUŽITÝCH METOD A TECHNIKY	41
4.1	TERAHERTZOVÁ SPEKTROSKOPIE.....	41
4.1.1	TPS SPECTRA 3000.....	41
4.1.2	ATR MODUL	43
4.2	DIELEKTRICKÁ SPEKTROSKOPIE.....	44
4.2.1	PRINCIP METODY	45
4.2.2	LCR METR E4980A	48
4.3	INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE	48
4.3.1	PRINCIP METODY	49
4.3.2	FTIR SPEKTROSKOPIE.....	50
4.3.3	NICOLET™ IS™50	51

4.4	RAMANOVA SPEKTROSKOPIE.....	52
4.4.1	PRINCIP METODY	52
4.4.2	TECHNIKY MĚŘENÍ.....	53
4.4.3	INVIABASIS RAMAN MIKROSKOP	53
4.5	KLASICKÁ SVĚTELNÁ MIKROSKOPIE.....	54
4.5.1	ZÁKLADNÍ SPECIFIKA METODY	54
4.5.2	OPTICKÝ MIKROSKOP ZEISSAXIO SCOPE.A1	54
4.6	KONFOKÁLNÍ SKENOVACÍ MIKROSKOPIE	54
4.6.1	PRINCIP METODY	54
4.6.2	KONFOKÁLNÍ MIKROSKOP ZEISS LSM 700	55
5	STUDIUM VLASTNOSTÍ TKÁŇOVÝCH LEPIDEL	56
5.1	PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO MĚŘENÍ KINETIKY LEPIDLA	56
5.2	DIELEKTRICKÁ SPEKTROSKOPIE.....	56
5.2.1	METODIKA MĚŘENÍ.....	56
5.2.2	ZPRACOVÁNÍ DAT	58
5.2.3	CHARAKTERISTIKA DAT.....	59
5.3	TERAHERTZOVÁ SPEKTROSKOPIE.....	60
5.3.1	METODIKA MĚŘENÍ.....	60
5.3.2	ZPRACOVÁNÍ DAT	61
5.3.3	CHARAKTERISTIKA DAT.....	62
5.4	INFRAČERVENÁ SPEKTROSKOPIE	65
5.4.1	METODIKA MĚŘENÍ.....	65
5.4.2	CHARAKTERISTIKA NAMĚŘENÝCH DAT.....	65
5.4.3	ZPRACOVÁNÍ DAT	70
5.5	MODELOVÁNÍ SÍŤOVACÍ REAKCE TKÁŇOVÉHO LEPIDLA	73
5.5.1	KINETIKA SÍŤOVÁNÍ KYANOAKRYLÁTOVÉHO LEPIDLA	73
5.5.2	ODVOZENÍ MODELU SÍŤOVÁNÍ HISTOACRYLU A JEHO OLEJNATÝCH SMĚSÍ	75
5.5.3	ODVOZENÍ MODELU SÍŤOVÁNÍ HISTOACRYLU V PŘÍTOMNOSTI ŽIVOČIŠNÉ TKÁNĚ	76
5.5.4	MODELOVÁNÍ MĚŘENÝCH DAT	77
5.5.5	VÝSLEDKY MODELOVÁNÍ DAT	79
5.6	STATISTICKÁ ANALÝZA.....	83
5.6.1	HISTOACRYL A JEHO OLEJNATÉ SMĚSI	83
5.6.2	HISTOACRYL PŘI REAKCI S ŽIVOČIŠNOU TKÁNÍ.....	90
5.7	CHARAKTERIZACE STRUKTURY TKÁŇOVÉHO LEPIDLA.....	96
5.7.1	SVĚTELNÁ MIKROSKOPIE	96
5.7.2	RAMANOVA SPEKTROSKOPIE	97
5.7.3	KONFOKÁLNÍ MIKROSKOPIE	99
5.8	DISKUZE VÝSLEDKŮ.....	101
6	STUDIUM VLASTNOSTÍ HEMOSTATIK.....	104
6.1	PŘÍPRAVA VZORKŮ	104

6.2	METODIKA MĚŘENÍ.....	105
6.3	ZPRACOVÁNÍ DAT.....	107
6.4	CHARAKTERISTIKA DAT	107
6.5	MODELOVÁNÍ ABSORPČNÍ REAKCE HEMOSTATIK	109
6.5.1	PRINCIP INTERAKCE HYDROFILNÍHO POLYMERU A VODNÉHO PROSTŘEDÍ	109
6.5.2	MODELOVÁNÍ KINETIKY BOBTNÁNÍ HYDROGELŮ	109
6.5.3	ODVOZENÍ MODELU PSEUDOPRVNÍHO ŘÁDU	112
6.5.4	ODVOZENÍ WEIBULLOVA MODELU	114
6.5.5	MODELOVÁNÍ NAMĚŘENÝCH DAT.....	115
6.5.6	VÝSLEDKY MODELOVÁNÍ DAT A JEJICH POPISNÁ STATISTIKA	116
6.6	DISKUZE VÝSLEDKŮ.....	120
7	ZÁVĚR	122
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	125
	SEZNAM ZKRATEK.....	135
	SEZNAM POUŽITÝCH KONSTANT A VELIČIN	136
	SEZNAM OBRÁZKŮ	139
	SEZNAM TABULEK	142
	PŘÍLOHY	144

1 ÚVOD

Terahertzová (THz) spektroskopie se řadí k nejnovějším spektroskopickým metodám. Oblastí THz frekvencí elektromagnetického spektra se začalo hlouběji zabývat až koncem 20. století, jde tak zřejmě o nejméně probádanou část spektra. Paradoxně však výzkum v oblasti THz frekvencí významně přispěl k rozvoji fyziky už na počátku 19. století, kdy německý fyzik Heinrich Rubens provedl přesné měření záření absolutně černého tělesa ve frekvenční oblasti sahající až k 6 THz, čímž potvrdil platnost Planckova vzorce v celém rozsahu frekvencí a teplot [1]. Teprve v 70. letech minulého století získalo THz záření jedinečné uplatnění v astronomickém výzkumu, postupně byla postavena řada THz teleskopů a s nimi i úspěšné letecké a vesmírné observatoře. V oblasti experimentálního výzkumu se s THz spektroskopií setkáváme stále častěji, např. v zabezpečení letišť, širokopásmové komunikaci, nedestruktivní diagnostice. Největší potenciál pro biomedicínský výzkum představuje THz zobrazování, neboť umožňuje současně získat obrazovou i spektrální informaci. Měření biologických objektů na THz frekvencích skýtá řadu výhod, avšak naráží i na omezení, která mohou měřitelnost některých objektů zcela znemožnit. Po důkladné analýze lze však nežádoucí projevy (vysoký útlum měřeného signálu, Fabry-Pérotovy artefakty) více či méně potlačit zavedením vhodnějších postupů měření, přizpůsobením měřicí techniky dané medicínské aplikaci nebo také vývojem pokročilejších algoritmů zpracování dat.

Tato práce se zabývá právě možnostmi aplikace THz vln pro zkoumání biomedicínských materiálů se zaměřením na sledování dynamických jevů, jejich popis a následné modelování. Předmětem popisovaného výzkumu jsou hemostatika, speciálně navržené materiály používané v lékařství pro podporu fyziologického procesu zástavy krvácení (hemostázy). Tyto materiály mohou být různého původu a jejich použití se také liší s ohledem na konkrétní aplikaci. Jejich funkce je založena na odlišných principech, jimiž se hemostázy dosahuje. Zároveň je však dostupné jen malé množství informací o kinetice těchto reakcí, které by umožňovaly alespoň základní srovnání hemostatických materiálů z pohledu např. rychlosti a účinnosti zástavy krvácení za srovnatelných podmínek. Do experimentu popsaného v práci byly zařazeny materiály dvojího typu: hemostatická lepidla na bázi kyanoakrylátu a absorpční hemostatika na bázi oxidované celulózy, želatiny, kolagenu nebo kombinace fibrinogen-thrombinu.

1.1 Současný stav zkoumání reakce hemostatik

V dostupné literatuře lze nalézt jen nedostatečné prověření průběhu síťovací reakce (vzájemné spojování řetězců polymeru za vzniku prostorové sítě) kyanoakrylátových lepidel fyzikálními měřicími metodami. Objevují se okometrická pozorování chování lepidla v kapiláře, zvířecí studie *in vivo* [2],[3],[4] nebo základní reometrická měření [4]. Mechanismus síťovací reakce byl zkoumán několika technikami, např. nukleární magnetickou rezonanční spektroskopií [5], infračervenou spektroskopií [6],[7] nebo Ramanovou spektroskopií [8]. Výsledky těchto experimentů se však různí, a to zejména z pohledu rychlosti síťování. Doba do úplného zesíťování vzorků se u jednotlivých studií liší dokonce v několika řádech; od několika minut [6],[7] až po několik dnů [8]. Rozdílnost publikovaných hodnot pramení především z toho, že experimenty byly prováděny na různých typech kyanoakrylátů a také za různých laboratorních podmínek (např. vlhkost, rozdílná tloušťka vzorků atd.). V praxi reaguje tkáňové lepidlo s velmi komplexním systémem, jakým je krev. Aplikovat závěry *in vitro* experimentů na reálné situace je problematické, neboť se tkáňové lepidlo bude při styku s tělními tekutinami přirozeně chovat jinak než za laboratorních podmínek.

Velmi často se také používají směsi lepidel s olejnatou složkou se záměrem zpomalit průběh jinak velmi rychlé reakce a umožnit tak delší manipulaci s lepidlem. Toho se využívá například při cílené embolizaci cév, kdy se směs lepidla aplikuje pomocí katetru a je potřeba předejít zatuhnutí lepidla ještě před dopravením do cílového místa. Prokazatelný vliv oleje na zpomalení reakce byl zaznamenán v *in vitro* podmínkách, avšak při aplikaci *in vivo* došlo k podstatnému zkrácení doby síťování [9],[10]. V *in vivo* podmínkách se dokonce vytrácí přímý vliv množství oleje ve směsi na dobu síťování lepidla [4],[11]. Kinetika kyanoakrylátových lepidel byla zkoumána různými metodami za různých podmínek a výsledky jsou jasně schematicky formulovány. Jakým způsobem však do kinetiky síťovací reakce zasáhne přidaná olejová složka, zatím nebylo podrobněji zkoumáno. První náznaky se objevují v [12], kde se autor poprvé zabýval měřením fyzikálních vlastností těchto směsí (hustota, viskozita, mísitelnost, mezifázové napětí), ale hlavně zkoumáním jejich reakcí s iontovými a proteinovými roztoky složením podobnými krvi *in vitro*. Minimum informací je rovněž dostupné o chování tkáňových lepidel při styku s živočišnou tkání.

Podstatně méně informací lze nalézt o kinetice absorpčních hemostatik. Většina vědeckých prací se zabývá spíše jejich konkrétními medicínskými aplikacemi, kontraindikacemi či cytotoxicitou. Hemostatika byla studována metodami skenovací elektronové mikroskopie [13],[14],[15], transmisní elektronové mikroskopie [14], zobrazování magnetickou rezonancí [16], ale také spektroskopickými technikami; atomová emisní spektroskopii [17], ultrafialovo-viditelnou [18] a infračervenou spektroskopii [19]. Vedle základního měření pH vzorků oxidované celulózy [13] se prakticky neobjevují studie zabývající se měřením dalších fyzikálních či chemických parametrů v průběhu hemostatické reakce. Právě podobné experimenty by však mohly poskytnout objektivní srovnání různých typů hemostatik, např. z pohledu reakční rychlosti, a pomoci terapeutům s výběrem vhodného typu hemostatika pro konkrétní použití, což se doposud zakládá spíše na empirických zkušenostech aplikujícího lékaře.

U řady aplikací se upřednostňuje určitý typ hemostatika před ostatními z důvodu např. nižší cytotoxicity či zanedbatelné granulace ve tkáni. Stěžejním faktorem výběru hemostatika by měla být i jeho účinnost, která byla testována např. na zvířecích modelech [20],[21],[22]. Hemostatika jsou různého původu, proto i mechanismus účinku s krví a rychlost hemostázy se bude lišit a použití nemůže být zcela univerzální. Zatímco ve vaskulární chirurgii je prioritou velmi rychlá zástava krvácení za použití rychle polymerizujících hemostatik, u plastické chirurgie jsou na hemostatikum kladeny spíše opačné požadavky s ohledem na přesnost a preciznost [23]. Při rešerši však nebylo možné získat více informací v důsledku neexistence fyzikálních studií srovnávajících rychlost zástavy krvácení při použití různých typů hemostatik. Naskýtá se tak příležitost pro metody založené na sledování změn fyzikálních či chemických vlastností materiálů.

1.2 Cíle disertační práce

Z předchozího vyvstává řada otázek, na které se tato práce soustředí ve snaze vyplnit mezery v dané oblasti výzkumu. Práce je zaměřena na metody charakterizace kinetiky hemostatik pomocí THz spektroskopie v časové doméně s cílem popsat vlastnosti těchto materiálů. Pokud to povaha vzorku umožňuje, jsou výsledky doplněny měřeními dalšími technikami, konkrétně dielektrickou spektroskopii, infračervenou spektroskopii, Ramanovou spektroskopii, klasickou světelnou a/nebo konfokální skenovací mikroskopii. Kombinace měření různými metodami umožní hlubší náhled na vlastnosti zkoumaných materiálů, jejich srovnání a detailnější popis chování při

hemostatické reakci. Objasnění kinetiky hemostatické reakce poskytne také lepší porozumění mechanismům účinku. Získané informace mohou být využity k modelování zkoumaných systémů, určení charakteristických parametrů (časové konstanty) a srovnání hemostatik z pohledu reakčních rychlostí.

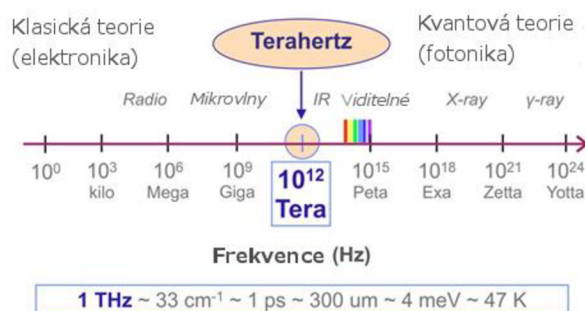
Cíle práce lze tedy shrnout do několika základních bodů:

1. Popis metodiky měření pomocí THz spektroskopie v časové doméně, včetně principů zpracování dat a jejich následné analýzy.
2. Podrobná specifikace použitých hemostatik, rozbor principu jejich funkce a použití, včetně dostupných informací o interakci s živou tkání.
3. Návrh a realizace experimentu pro sledování kinetiky fyziologické reakce hemostatika, zahrnující specifikaci použitého přístrojového vybavení, metodiku přípravy vzorků a postup měření.
4. Návrh algoritmů pro zpracování dat a jejich následnou analýzu pomocí vhodných matematických metod.
5. Vytvoření matematického modelu kinetiky hemostatické reakce zkoumaných materiálů a odhad hodnot parametrů modelu.
6. Srovnání modelových časových konstant s využitím prostředků statistické analýzy, hodnocení a formulování závěrů shrnujících výsledky práce.

2 TERAHERTZOVÁ SPEKTROSKOPIE

2.1 Terahertzové záření a jeho vlastnosti

Mluvíme-li o terahertzovém záření, jedná se o elektromagnetické vlnění vysílané na frekvencích THz pásma. THz část elektromagnetického spektra leží mezi mikrovlnným a infračerveným zářením, viz Obr. 2.1. Mezní frekvence oblasti nejsou pevně stanoveny, obecně se však míní rozpětí 100 GHz – 10 THz. Střední frekvence 1 THz odpovídá vlnové délce přibližně 300 μm ve vakuu [1],[24],[25].



Obr. 2.1 Terahertzová oblast elektromagnetického spektra (převzato z [26])

Označení *terahertz* se stal populárním teprve v průběhu 70. let minulého století. Do té doby se pro všechny vlnové délky přibližně od 20 μm po nejbližší milimetrovou oblast elektromagnetického spektra užíval termín vzdálené infračervené záření nebo submilimetrové. Pojem terahertzové záření se ujal až v souvislosti s terahertzovou spektroskopií v časové doméně (*THz time-domain spectroscopy*, zkr. THz TDS) a byl obecně přijat pro označení frekvenčního rozsahu 0,1 – 10 THz [1].

Jeden z historických názvů, tzv. *oblast THz mezery*, získala THz oblast díky technické a finanční náročnosti na realizaci THz systémů [1],[25],[27]. K velkému rozmachu však došlo postupně v 90. letech 20. století se vznikem THz TDS. Klíčovým faktorem byl vývoj optických femtosekundových laserů, jež tvoří základ většiny THz spektrometrů. Do té doby byly možnosti zdrojů a detektorů značně omezeny, jelikož není možné pokrýt THz oblast klasickou optickou spektroskopií (intenzita optických zdrojů záření klesá podobně jako záření absolutně černého tělesa), ani elektronickými zdroji (elektronické součástky nejsou schopny pracovat na tak vysokých frekvencích).

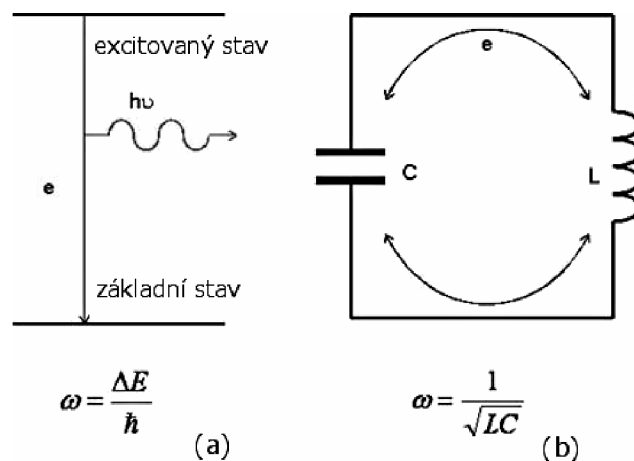
Princip THz vlnění je přirozeným propojením kvantově-mechanického a klasického popisu elektromagnetických vln a jejich interakcí s látkami [25]. Dříve byl výzkum elektromagnetického spektra jednoznačně rozdělen na oblast optických a elektrických vln, přičemž principy, metody i nástroje se pro každou oblast lišily, viz Tab. 2.1. Elektromagnetické vlny jsou obvykle generovány klasickými oscilacemi dipólů, zatímco optické vlnění je emitováno při kvantovém přechodu z energeticky vyššího stavu na nižší, viz Obr. 2.2 (s výjimkou záření černého tělesa, brzděného a synchrotronového záření). Na nižších frekvencích od THz vln je pomocí antény detekováno elektrické pole vlny, zatímco u vyšších frekvencí se hovoří o intenzitě nebo ozáření, které je úměrné toku fotonů. Další rozdíl spočívá v typu vlnovodů; mikrovlny jsou vedeny kovovými vlnovody, které u THz vln způsobují vysoké ztráty, zatímco vlnovody z dielektrika či optická vlákna nezpůsobují disperzi, ani velké ztráty [28].

THz záření má mimořádné postavení právě tím, že tvoří v elektromagnetickém spektru přirozený přechod mezi světem elektroniky (nízké frekvence) a optiky (vysoké

frekvence). Stejně jako každé elektromagnetické vlnění lze i vlastnosti a chování THz vln obecně popsat Maxwellovými rovnicemi, avšak vzhledem ke specifickému umístění ve spektru je jejich popis mnohem složitější. THz vlny zcela nezapadají ani do jedné kategorie a nemusí tedy ani nutně vyhovovat aproximace odvozené pro zmíněné oblasti.

Tab. 2.1 Srovnání vlastností optiky a elektroniky.

	Klasická elektromagnetická vlna	Optická vlna
Princip	Maxwellovy rovnice	Schrödingerovy rovnice
Emise	zrychlený pohyb nabitých částic, klasický dipól	kvantový přechod mezi energetickými hladinami
Měření	elektrické pole	intenzita
Instrumentace	elektrický obvod, anténa, kovové vlnovody	čočky, zrcadla, optická vlákna
Aproximace	uniformní pole	uniformní médium



Obr. 2.2 Princip kvantového přechodu s emisí fotonu (a) a klasického dipólu s emisí elektromagnetické vlny (b) [28].

(a) Optická vlna je výsledkem přechodu elektronu z excitovaného stavu do stavu základního. Uvolněné fotony záření mají energii rovnu násobku Planckovy konstanty h a frekvenci dopadajícího záření ν . Úhlová frekvence fotonu ω je dána podílem rozdílu energií ΔE mezi dvěma energetickými hladinami a redukované Planckovy konstanty \hbar ($\hbar = h/2\pi$).

(b) LC oscilátor generuje proud sinusového průběhu s úhlovou frekvencí ω nepřímo úměrnou odmocnině násobku indukčnosti L a kapacity C elektrického obvodu.

I přes obtíže spojené s technickou realizací zdrojů a detektorů má THz záření řadu výhodných vlastností, a to nejen z pohledu biomedicínských aplikací [28],[29]:

- Fotony THz záření mají *nízkou energii* a nemohou tak způsobovat ionizaci biologických tkání. THz vlny jsou tak považovány za bezpečné jak pro zkoumané vzorky, tak pro obsluhu. Obecně, s vyšším kmitočtem rychle rostou také expoziční limity hygienických norem neionizujícího záření až k hodnotě $100 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ na kmitočtu 300 GHz [30].
- Vzhledem k *vysoké absorpci* THz vlnění *molekulami vody* nemůže prostupovat lidským tělem (jako např. mikrovlny). Pokud by tedy záření

způsobovalo nějaké potenciální poškození (které dosud nebylo prokázáno), bude omezeno pouze na povrchovou vrstvu těla, tedy pokožku.

- c) THz vlny mají delší vlnové délky než viditelné a infračervené vlnění a jsou tak *méně postiženy Mieovým rozptylem*. Mohou procházet mnoha suchými dielektrickými materiály jako oblečení, papír, dřevo nebo plast. Vlnové délky jsou však zároveň dostatečně krátké, aby poskytovaly prostorové rozlišení na submilimetrové úrovni, což umožňuje např. čtení zavřených knih [31], zkoumání barevných vrstev v obraze i odhalení falzifikátů [32].
- d) Mnoho molekul vykazuje na THz frekvencích silnou absorpci a disperzi vzhledem k rotačním a vibračním přechodům dipólů. Tyto přechody jsou specifické pro každou molekulu a zanechávají jedinečný spektroskopický otisk (tzv. *fingerprint*).
- e) Koherentní THz signály mohou být detekovány v časové oblasti mapováním amplitudy a fáze přechodného elektrického pole, čímž se zpřístupňuje *absorpční a disperzní spektroskopie* zároveň.

2.2 Generování a detekce THz záření

Podle druhu generovaného THz vlnění rozlišujeme CW systémy (s kontinuální vlnou) a impulsní systémy. CW systémy pracují na jedné frekvenci, emitovaná vlna je spojitá nebo modulovaná na THz frekvencích. Jde o úzkopásmovou vlnu často s omezenou laditelností, ale s vysokým spektrálním rozlišením (~ 100 MHz). Obvykle se pracuje i s vyššími výkony. Rada z nich se vyvinula z klasické mikrovlnné techniky; THz vlnění je generováno násobením základní frekvence, tyto systémy pracují na frekvencích THz pásma do 0,8 THz. Pro generování vyšších frekvencí se používá fotoelektrické směšování (požadovanou frekvenci zázřejmě získáme superpozicí dvou laserů na různých kmitočtech) nebo oscilátor se zpětnou vlnou. CW detektory jsou nekoherentní, založené na měření intenzity (úzkopásmové Schottkyho diody a supravodivé struktury, širokopásmové bolometry, pyroelektrické detektory a Golayovy cely) [26].

Impulsní systémy (také nazývané *time-domain*) jsou založeny na generování a detekci velmi krátkého elektromagnetického přechodového jevu s trváním několika pikosekund. Krátký impuls je tvořen mnoha frekvencemi, které získáme Fourierovou transformací časového impulsu. Impulsní systémy jsou širokopásmové, emitovaná vlna není spojitá a jsou tak ideální pro spektroskopické aplikace a studium velmi rychlých procesů. Základ pochází z oblasti fotoniky; pro generování přechodových jevů se využívá velmi rychlý impulsní femtosekundový laser [26].

2.3 Aplikace THz záření

První THz aplikace se objevily v astronomii při zkoumání pozadí kosmického infračerveného záření a v diagnostice laserového plazmatu [28]. Praktické aplikace využívající THz záření jsou limitovány relativně krátkou vzdáleností (desítky až jednotky metrů či ještě méně) díky vysoké absorpci THz záření Zemskou atmosférou, za níž stojí především vibračně-rotační úrovně vodních par [1]. Představení THz TDS v 80. letech 20. století znamenala velký pokrok ve zdokonalení techniky, především zvýšení intenzity THz zdrojů a zlepšení citlivosti detektorů. Z podobnosti s mnoha aplikacemi jak optického, tak mikrovlnného záření vzešla i myšlenka využít THz vlny pro zobrazování. Zpočátku šlo o vidění v mlze a oparu, lokalizování skrytých předmětů a detekování vad v opticky neprůhledných materiálech, později se přidaly i

bezpečnostní aplikace kontroly zavazadel, kvality výrobků a spektroskopická charakterizace materiálů [25]. Postupně se rozšiřují možnosti uplatnění v oblasti komunikací, mikroelektroniky, environmentálního řízení, bezpečnosti a řízení kvality, forenzních věd, lékařské diagnostiky, chemických a biologických studií.

Pro biomedicínu představuje THz záření potenciál, neboť umožňuje doplnit klasické spektroskopické metody a získat informaci o vibracích molekul kapalin a plynů. Vibrační vlastnosti biomolekul, které leží v rozsahu vlnových délek mezi $3 \cdot 10^{-5}$ až $3 \cdot 10^{-3}$ m, přímo předurčují THz vlny k jejich začlenění mezi metody klinické diagnostiky [33]. THz záření dokáže zachytit změny na nejnižší molekulární úrovni, ale i celkové změny organizačně složitějších struktur a představuje tak revoluci v neinvazivních metodách medicíny.

2.4 Vznik THz záření a jeho interakce s hmotou

I přes specifické umístění ve spektru vychází popis THz vln ze základních principů elektromagnetického vlnění. Obecný popis interakce s makroskopicky uniformním médiem vychází z klasické teorie elektromagnetismu. Vysvětlení elementárních excitací na mikroskopické úrovni je pak založeno na základních principech kvantové teorie [34].

2.4.1 Teorie vzniku THz vlny

Obecný popis chování elektromagnetických vln v materiálovém prostředí se zakládá na Maxwellových rovnicích. Pro charakterizaci THz vln můžeme vycházet z diferenciálního tvaru Maxwellových rovnic (2.1) až (2.4) [34]:

$$\nabla \cdot \vec{D} = \rho_f \quad (\text{Gaussův zákon elektrostatického pole}) \quad (2.1)$$

$$\nabla \cdot \vec{B} = 0 \quad (\text{Gaussův zákon magnetostatického pole}) \quad (2.2)$$

$$\nabla \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \quad (\text{Faradayův zákon}) \quad (2.3)$$

$$\nabla \times \vec{H} = \vec{J}_f + \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} \quad (\text{Ampérův zákon}), \quad (2.4)$$

kde \vec{D} je vektor elektrické indukce [$\text{C} \cdot \text{m}^{-2}$], \vec{B} vektor magnetické indukce [T], ρ_f objemová hustota volných nábojů [$\text{C} \cdot \text{m}^{-3}$], \vec{E} vektor intenzity elektrického pole [$\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$], \vec{H} vektor intenzity magnetického pole [$\text{A} \cdot \text{m}^{-1}$], \vec{J}_f vektor hustoty elektrického proudu [$\text{A} \cdot \text{m}^{-2}$]. Obecně mohou být všechny veličiny navíc závislé i na poloze a čase.

Podle rovnice (2.1) je divergence vektoru elektrické indukce \vec{D} rovna objemové hustotě volného náboje ρ_f , neboli siločáry elektrické indukce začínají a končí tam, kde je přítomen elektrický náboj. Z (2.2) vyplývá, že neexistují magnetické monopóly, neboť divergence vektoru magnetické indukce \vec{B} je rovna nule. Podle (2.3) je rotace vektoru intenzity elektrického pole \vec{E} rovna záporně vzaté derivaci magnetické indukce \vec{B} . Z (2.4) vyplývá, že rotace intenzity magnetického pole \vec{H} je rovna hustotě vodivého proudu \vec{J}_f a hustotě posuvného proudu $\frac{\partial \vec{D}}{\partial t}$ [35].

Maxwellovy rovnice spolu s Lorentzovým zákonem síly tvoří teoretický základ klasické elektrodynamiky. Podle Lorentzovy rovnice (2.5) působí na částici s nábojem q , která se pohybuje rychlostí \vec{v} v elektromagnetickém poli o elektrické intenzitě \vec{E} a magnetické indukci \vec{B} , Lorentzova síla \vec{F} :

$$\vec{F} = q \cdot (\vec{E} + \vec{v} \times \vec{B}). \quad (2.5)$$

Řešení rovnic (2.1) až (2.5) vede v některých případech k úplnému popisu pohybu velkého množství nabitých částic. Na základě parciálních diferenciálních rovnic se však podaří vyřešit jen málo praktických úloh [35]. Pro praktické aplikace je vhodnější použít prostorové průměrování lokálních množství částic v atomárním měřítku [36]. Lokální odezvu nábojů (proud volných nábojů a dipólové polarizace vázaných nábojů) určují komplexní, frekvenčně závislé materiálové parametry – dielektrická permitivita ε a magnetická permeabilita μ , charakterizující elektromagnetické vlastnosti hmoty v makroskopickém měřítku – polarizaci \vec{P} [$\text{C}\cdot\text{m}^2$] a magnetizaci \vec{M} [$\text{A}\cdot\text{m}^{-1}$] média. Mezi dvojicemi vektorů \vec{D} a \vec{H} a poli \vec{E} a \vec{B} platí lineární vztahy (2.6) a (2.7), kde ε_0 je elektrická permitivita vakua (přibližně $8,854 \cdot 10^{-12} \text{ F}\cdot\text{m}^{-1}$) a μ_0 magnetická permeabilita vakua (přibližně $1,257 \cdot 10^{-6} \text{ H}\cdot\text{m}^{-1}$):

$$\vec{D}(\omega) = \varepsilon_0 \vec{E} + \vec{P} = \varepsilon(\omega) \cdot \vec{E}(\omega) \quad (2.6)$$

$$\vec{B}(\omega) = \mu_0 \cdot (\vec{H} + \vec{M}) = \mu(\omega) \cdot \vec{H}(\omega) \quad (2.7)$$

Platnost rovnic (2.6) a (2.7) se omezuje pouze na izotropní a lineární prostor. Magnetická odezva prostředí je obvykle velmi slabá ($|\mu - \mu_0| < 10^{-4} \mu_0$) a detekce i následná analýza je problematická ve srovnání s elektrickou odezvou. Hlavním důvodem je absence magnetických monopolů [34]. Elektrické a magnetické pole jsou navzájem provázané a vyskytují se současně. Navíc, vektory \vec{D} , \vec{B} , \vec{E} , \vec{H} tvoří spojitou funkci místa a času. Vlnové funkce pro elektrické a magnetické pole získáme aplikací rotace na rovnice (2.3) a (2.4) a s použitím lineárních vztahů (2.6) a (2.7). Vlnová funkce pro \vec{E} (2.8) je odvozena následovně:

$$\begin{aligned} \nabla \times (\nabla \times \vec{E}) &= -\nabla \times \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \\ \nabla \times (\nabla \times \vec{E}) &= -\mu \nabla \times \frac{\partial \vec{H}}{\partial t} \\ \nabla \times (\nabla \times \vec{E}) &= -\mu \left(\frac{\partial \vec{J}_f}{\partial t} + \frac{\partial^2 \vec{D}}{\partial t^2} \right) \\ \nabla \times (\nabla \times \vec{E}) &= -\mu \left(\frac{\partial \vec{J}_f}{\partial t} + \varepsilon \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} \right) \end{aligned} \quad (2.8)$$

Analogicky je odvozena i vlnová funkce pro \vec{H} (2.9):

$$\begin{aligned}\nabla \times (\nabla \times \vec{H}) &= \nabla \times \left(\vec{J}_f + \frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \right) \\ \nabla \times (\nabla \times \vec{H}) &= \nabla \times \left(\vec{J}_f + \varepsilon \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \right) \\ \nabla \times (\nabla \times \vec{H}) &= \nabla \times \vec{J}_f + \varepsilon \left(-\frac{\partial^2 \vec{B}}{\partial t^2} \right) \\ \nabla \times (\nabla \times \vec{H}) &= \nabla \times \vec{J}_f - \varepsilon \mu \left(\frac{\partial^2 \vec{H}}{\partial t^2} \right)\end{aligned}\tag{2.9}$$

Rovnice (2.8) a (2.9) jsou velmi obecné a levou stranu rovnic je možné upravit aplikací vektorové identity $\nabla \times (\nabla \times \vec{A}) = \nabla(\nabla \cdot \vec{A}) - \nabla^2 \vec{A}$. Dosazením materiálových vztahů (2.6) a (2.7) a aplikací rovnic (2.1) a (2.2) pak dostaneme vlnové rovnice v podobě (2.10) a (2.11), závislé především na hustotě elektrického proudu:

$$\nabla^2 \vec{E} - \varepsilon \mu \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} = \mu \frac{\partial \vec{J}_f}{\partial t} + \frac{1}{\varepsilon} \nabla \rho_f\tag{2.10}$$

$$\nabla^2 \vec{H} - \varepsilon \mu \frac{\partial^2 \vec{H}}{\partial t^2} = -\nabla \times \vec{J}_f\tag{2.11}$$

Předpokládá-li se, že \vec{J}_f je lineárně závislá na \vec{E} dle (2.12), kde σ je konduktivita [$\text{S}\cdot\text{m}^{-1}$], a zanedbá-li se zároveň fluktuace hustoty nábojů ($\nabla \rho_f = 0$), pak dojde ke zjednodušení vlnové rovnice pro \vec{E} (2.13) a podobně pro \vec{H} (2.14). Elektromagnetická vlna je dána spojením těchto dvou polí, popsáných rovnicemi (2.13) a (2.14):

$$\vec{J}_f = \sigma \vec{E},\tag{2.12}$$

$$\nabla^2 \vec{E} = \varepsilon \mu \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} + \sigma \mu \frac{\partial \vec{E}}{\partial t}\tag{2.13}$$

$$\nabla^2 \vec{H} = \varepsilon \mu \frac{\partial^2 \vec{H}}{\partial t^2} + \sigma \mu \frac{\partial \vec{H}}{\partial t}\tag{2.14}$$

Pokud je zkoumaným materiálem *dielektrikum* nebo *izolant* ($\sigma = 0$), vlnové rovnice mají podobu (2.15) a (2.16), kde v je rychlost elektromagnetické vlny v homogenním prostředí [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$] daná rychlostí světla ve vakuu c [$\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$] a indexem lomu prostředí n [-] dle (2.17). Za předpokladu $\mu = \mu_0$ platí $c = \frac{1}{\sqrt{\varepsilon_0 \mu_0}}$ a $n = \sqrt{\frac{\varepsilon}{\varepsilon_0}}$.

$$\nabla^2 \vec{E} = \varepsilon\mu \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} = \frac{1}{v^2} \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} \quad (2.15)$$

$$\nabla^2 \vec{H} = \varepsilon\mu \frac{\partial^2 \vec{H}}{\partial t^2} = \frac{1}{v^2} \frac{\partial^2 \vec{H}}{\partial t^2} \quad (2.16)$$

$$v = \frac{1}{\sqrt{\varepsilon\mu}} = \frac{c}{n} \quad (2.17)$$

Pokud je zkoumaný materiál *nemagnetický*, pak se Maxwellovy rovnice (2.1) a (2.4) změní a platí (2.18) a (2.19), neboť volné elektrické náboje v prostředí jsou zanedbatelné a nelze tedy hovořit o průchozím proudu:

$$\nabla \cdot \vec{D} = 0 \quad (2.18)$$

$$\nabla \times \vec{H} = \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} \quad (2.19)$$

Obecným řešením vlnových rovnic jsou lineárně polarizované monochromatické rovinné vlny dle (2.20) a (2.21), kde fáze ($\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t$) je funkcí času t a také polohy $\vec{r} = (x, y, z)$:

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \vec{E}_0 e^{i(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t)} \quad (2.20)$$

$$\vec{H}(\vec{r}, t) = \vec{H}_0 e^{i(\vec{k} \cdot \vec{r} - \omega t)} \quad (2.21)$$

Rovinná vlna se šíří prostorem v obecném směru daném vlnovým vektorem \vec{k} a platí, že fáze všech bodů plochy (roviny) kolmé na směr šíření vlny v prostoru je v určitém čase t konstantní: $\vec{k} \cdot \vec{r} = k_x x + k_y y + k_z z = konst.$ Elektrická a magnetická složka mají stejné vlnové vektory i frekvence a nejsou vůči sobě fázově posunuty. Vzhledem ke speciálním vlastnostem rovinné vlny můžeme z Maxwellových rovnic odvodit lineární algebraické rovnice pro vektorové amplitudy \vec{E}_0 a \vec{H}_0 v souvislosti s vlnovým vektorem \vec{k} a úhlovou frekvencí ω [rad·s⁻¹].

$$\nabla \cdot \vec{D} = 0 \quad \rightarrow \quad \vec{E}_0 \cdot \vec{k} = 0 \quad (2.22)$$

$$\nabla \cdot \vec{B} = 0 \quad \rightarrow \quad \vec{H}_0 \cdot \vec{k} = 0 \quad (2.23)$$

$$\nabla \times \vec{E} = -\frac{\partial \vec{B}}{\partial t} \quad \rightarrow \quad \vec{k} \times \vec{E}_0 = \mu\omega \vec{H}_0 \quad (2.24)$$

$$\nabla \times \vec{H} = \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} \quad \rightarrow \quad \vec{k} \times \vec{H}_0 = -\varepsilon\omega \vec{E}_0 \quad (2.25)$$

Z rovnic (2.22) – (2.25) vyplývá, že vektory \vec{E}_0 a \vec{H}_0 jsou kolmé k vlnovému vektoru (směru šíření vlny), tedy v izotropním prostředí je elektromagnetické vlnění příčné, a zároveň jsou vektory \vec{E}_0 a \vec{H}_0 navzájem kolmé. Úpravou rovnice (2.24) a následným sloučením s (2.25) pak získáme jednoduchý vztah pro disperzní relaci (2.26), popisující způsob šíření vlny daným materiálem s parametry ε a μ :

$$\begin{aligned}\vec{k} \times (\vec{k} \times \vec{E}_0) &= \mu\omega(\vec{H}_0 \times \vec{k}) \\ (\vec{k} \cdot \vec{E}_0) \cdot \vec{k} - (\vec{k} \cdot \vec{k}) \cdot \vec{E}_0 &= -\varepsilon\mu\omega^2\vec{E}_0 \\ k^2 &= \varepsilon\mu\omega^2\end{aligned}\tag{2.26}$$

Pro *nemagnetický materiál* platí mezi vlnočtem k [m^{-1}] a vlnovou délkou λ [m] vztah (2.27), kde k_0 je vlnové číslo ve vakuu ($k_0 = \frac{\omega}{c}$):

$$k = \frac{2\pi}{\lambda} = nk_0 = n\frac{\omega}{c}\tag{2.27}$$

Šíření vlny ve *vodiči* se od dielektrika liší. Vzhledem k vysoké konduktivitě vodiče ($\sigma \gg \omega\varepsilon$) vede vlnová rovnice k disperznímu vztahu (2.28) a amplituda vlnového vektoru \hat{k} je komplexní číslo (2.29) s reálnou k' a imaginární složkou k'' :

$$\hat{k}^2 \approx i\sigma\mu\omega.\tag{2.28}$$

$$\hat{k} = k' + ik'' \approx \sqrt{\frac{\omega\mu\sigma}{2}}(1 + i)\tag{2.29}$$

Běžné kovy se chovají jako ideální vodiče THz vln, proto je průnik elektromagnetické vlny do vodiče omezen jen na velmi malou hloubku v porovnání s jinými materiály. Například penetrační hloubka v mědi je přibližně 0,07 μm pro frekvenci 1 THz, což je zanedbatelné ve srovnání s vlnovou délkou 300 μm ve vakuu [34]. Penetrační hloubka je dána také frekvencí vlnění; nízké frekvence pronikají do vodiče lépe než vysoké.

2.4.2 Transmise a odraz

Při průchodu hmotným prostředím se THz vlny řídí klasickými zákony odrazu a lomu. Pouze v případě silně rozptylujících materiálů (např. póry ve strukturách) může dojít ke slabému nebo i relativně většímu rozptylu. Pro popis slabého rozptylu může být použit model na základě teorie Maxwell Garnetta nebo Bruggemana [36].

Uvažujeme-li rovinné rozhraní dvou dielektrik s indexy lomu n_1 a n_2 , na které dopadá z prvního prostředí rovinná elektromagnetická vlna, pak dochází k jejímu odrazu a lomu podle Snellova zákona $n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2$, kde n_1 a n_2 jsou indexy lomu 1. a 2. prostředí, θ_1 a θ_2 je úhel dopadu a lomu. Prvním prostředím se pak šíří

odražená vlna a druhým vlna lomená. Dle polarizace vlny dopadající na rozhraní (rovina xy) může vzniknout odražená vlna polarizovaná kolmo k rovině dopadu (s-polarizace) nebo polarizovaná v rovině dopadu (p-polarizace) [34]. Amplituda elektrického pole odražené vlny E_R , resp. prošlé vlny E_T , je úměrná amplitudě pole dopadající vlny E_I [36], kde r je amplitudový koeficient reflektivity (odrazivosti) a t amplitudový koeficient propustnosti:

$$E_R = rE_I \quad E_T = tE_I \quad (2.30)$$

Za dodržení hraničních podmínek (rovnost tangenciálních složek \vec{E} , resp. \vec{H} , na obou stranách rozhraní) je možné rozložení odraženého a prošlého vlnění popsat pomocí Fresnelových vztahů. Fresnelovy vzorce závisí na typu polarizace a vyjadřují poměr vektorových amplitud odražené a prošlé vlny k dopadající vlně [34].

Fresnelovy vztahy pro s-polarizaci:

$$r_s = \frac{E_{R,s}}{E_{I,s}} = \frac{n_1 \cos \theta_1 - n_2 \cos \theta_2}{n_1 \cos \theta_1 + n_2 \cos \theta_2} \quad (2.31)$$

$$t_s = \frac{E_{T,s}}{E_{I,s}} = \frac{2n_1 \cos \theta_1}{n_1 \cos \theta_1 + n_2 \cos \theta_2} \quad (2.32)$$

Fresnelovy vztahy pro p-polarizaci:

$$r_p = \frac{E_{R,p}}{E_{I,p}} = \frac{n_2 \cos \theta_1 - n_1 \cos \theta_2}{n_2 \cos \theta_1 + n_1 \cos \theta_2} \quad (2.33)$$

$$t_p = \frac{E_{T,p}}{E_{I,p}} = \frac{2n_1 \cos \theta_1}{n_2 \cos \theta_1 + n_1 \cos \theta_2} \quad (2.34)$$

Fresnelovy koeficienty nelze zjistit jednoduchým experimentálním měřením, neboť žádný detektor není schopen změřit přímo hodnotu \vec{E} . Fyzicky měřitelnou hodnotou je však výkon odražené a prošlé vlny. Proto se v praxi zjišťuje odrazivost (reflektance) R a propustnost (transmitance) T rozhraní jako poměr výkonů odražené (resp. prošlé) vlny P_R (resp. P_T) a dopadající vlny P_I [37], přičemž platí zákon zachování energie $R + T = 1$ (je-li absorpce zanedbatelná):

$$R \equiv \frac{P_R}{P_I} = \frac{E_R^2}{E_I^2} = r^2 \quad (2.35)$$

$$T \equiv \frac{P_T}{P_I} = \frac{n_2 \cos \theta_2 E_T^2}{n_1 \cos \theta_1 E_I^2} = \frac{n_2 \cos \theta_2}{n_1 \cos \theta_1} t^2 \quad (2.36)$$

Dopadá-li vlna kolmo na rozhraní, pak amplitudové koeficienty nezávisí na polarizaci ($\cos \theta_1 = \cos \theta_2 = 1$) a rovnice (2.35) a (2.36) se dále zjednoduší:

$$r = r_p = \frac{n_2 - n_1}{n_1 + n_2} = -r_s \quad (2.37)$$

$$t = t_p = \frac{2n_1}{n_1 + n_2} = t_s \quad (2.38)$$

$$R = r^2 = \left(\frac{n_2 - n_1}{n_1 + n_2} \right)^2 \quad (2.39)$$

$$T = \frac{n_2}{n_1} t^2 = \frac{4n_1 n_2}{(n_1 + n_2)^2} \quad (2.40)$$

2.4.3 Absorpce a rozptyl

Každý materiál do různé míry elektromagnetické vlnění absorbuje. Zanedbáme-li odraz, lze absorpci materiálu jednoduše popsat Lambert-Beerovým zákonem $I = I_0 e^{-\alpha d}$, kde I_0 je počáteční intenzita záření, I intenzita záření prošlého materiálem [$\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$], α lineární absorpční koeficient [cm^{-1}] a d tloušťka materiálu [cm]. Při obecném popisu chování elektromagnetické vlny však nemůžeme vycházet z měřené intenzity, jako je tomu v klasické optice, ale je potřeba zaměřit se na parametry elektrického a magnetického pole vlnění. Konkrétně jde o měření amplitudy a fáze elektrického pole, což dnes již umožňují moderní techniky elektrooptického vzorkování [1].

Disperze a absorpce popisují obecně reakci materiálu na působení vnějšího elektromagnetického pole. Částice hmoty jsou při interakci s poli obvykle donuceny k pohybu; jejich urychlený pohyb indukuje záření. V THz oblastí jsou účinky magnetických polí u běžných materiálů většinou zanedbatelné a pohyb elektronů je minimální. Elektromagnetické vlastnosti materiálu určují především elektrické dipóly indukované elektrickými poli [34]. Podle klasické teorie elektromagnetismu a za podmínky izotropního média je polarizace elektrických nábojů materiálu \vec{P} úměrná dopadajícímu elektrickému poli \vec{E} (2.41) [36], kde χ je elektrická susceptibilita [-]:

$$\vec{P} = \varepsilon_0 \chi \vec{E}, \quad (2.41)$$

Elektrická indukce \vec{D} je definována vztahem (2.6). Sloučením rovnic (2.6) a (2.41) lze odvodit vyjádření relativní permitivity (dielektrické konstanty) ε_r [-] (2.42), bezrozměrné veličiny charakterizující daný materiál:

$$\begin{aligned} \vec{D} &= \varepsilon_0 \vec{E} + \varepsilon_0 \chi \vec{E} \\ \varepsilon \vec{E} &= \varepsilon_0 \vec{E} (1 + \chi) \\ \frac{\varepsilon}{\varepsilon_0} &= 1 + \chi = \varepsilon_r \end{aligned} \quad (2.42)$$

Pro jednoduchost můžeme uvažovat případ vlny šířící se prostředím v kladném směru osy z s amplitudou E_0 a komplexní fází Φ , kde vlnové číslo \hat{k} má komplexní tvar a je spojením reálné části k' a absorpčního koeficientu α v imaginární části:

$$E = E_0 e^{i\Phi} = E_0 e^{i(\hat{k}z - \omega t)}, \quad (2.43)$$

$$\hat{k} = k' + i \frac{\alpha}{2} \quad (2.44)$$

Dle (2.27) je složka k' dána indexem lomu materiálu n , který však není konstantní. Index lomu se mění v závislosti na frekvenci (jev disperze) a v absorbujícím prostředí bude mít komplexní tvar \hat{n} , který získáme úpravou rovnice (2.44), kde $\kappa = \frac{\alpha}{2k_0}$ je extinkční koeficient, popisující míru útlumu amplitudy elektrického pole [36]. Komplexní index lomu může být popsán také zjednodušeným Maxwellovým vztahem (2.47), protože běžné optické materiály mají kladné ϵ_r i μ_r (typicky $\mu_r \approx 1$). Potom je \hat{n} dán odmocninou ϵ_r . Index lomu může nabývat i záporných hodnot (metamateriály).

$$\hat{k} = k_0 n + i \frac{\alpha}{2} = k_0 \left(n + i \frac{\alpha}{2k_0} \right) = k_0 \hat{n} \quad (2.45)$$

$$\hat{n} = n + i \frac{\alpha}{2k_0} = n + i\kappa, \quad (2.46)$$

$$\hat{n} = \sqrt{\epsilon_r \mu_r} \approx \sqrt{\epsilon_r}, \quad (2.47)$$

Souvislost disperze a absorpce popisují Kramers-Kronigovy disperzní relace, které umožňují výpočet \hat{n} z měřené absorpce. Vztahy spojují reálnou a imaginární část komplexní dielektrické funkce $\hat{\epsilon}$ [1]:

$$\hat{\epsilon} = \hat{n}^2 = (n + i\kappa)^2 = \epsilon' + i\epsilon'' \quad (2.48)$$

$$\epsilon' = n^2 - \kappa^2 \quad (2.49)$$

$$\epsilon'' = 2n\kappa \quad (2.50)$$

Komplexní povaha permitivity se projeví při matematickém popisu pohybu mikroskopických elektrických nábojů hnaných vnějším elektrickým polem, odvození indukovaného dipólového momentu a makroskopické polarizaci elektrických nábojů. Pro popis těchto elektromagnetických jevů existují dva základní modely – Lorentzův a Drudeho model popsané např. v [36].

2.4.4 Interakce THz záření s hmotou na molekulární úrovni

Při interakci THz vln s hmotou se objevují nízkoenergetické excitace na příslušných THz frekvencích. Může jít o Rydbergovy excitované stavy, přechody v příměsových polovodičích, přechody mezi pásmy v polovodičových nanostrukturách, interakce v silně korelovaných elektronových systémech, vibrace fononů v organických a

anorganických krystalech, rotačně-vibrační přechody v molekulách a hromadné pohyby biologických molekul [34].

THz záření lze použít k charakterizaci plynů, kapalin i pevných látek. U plynů můžeme nalézt typické ostré rezonance, odpovídající rotačním a vibračním stavům molekul, u kapalin a pevných látek pak širší absorpční maxima [38]. Molekulární krystaly, kapaliny a plyny vykazují v THz oblasti pohyby molekul, zejména mezimolekulární (vibrace, librace). Vibrační frekvence molekul jsou slabě ovlivněny zabudováním do krystalové mřížky, proto i posuvy absorpčních pásmů jsou poměrně malé ve srovnání s volnými molekulami [36]. Pevné látky vykazují v THz oblasti specifické interakce. Zatímco nepolární a nekovové materiály jsou v tomto pásmu téměř průhledné, např. dielektrika jako papír, plast, oblečení, dřevo a keramika [38], u dalších lze pozorovat nízkofrekvenční kmity krystalové mřížky. U amorfních látek je uspořádání atomů výrazně odlišné, proto i THz spektra amorfních a krystalických fází mohou být rozdílná i přes stejné chemické složení [39]. Specifické optické vlastnosti vykazují kovy [34], které z důvodu vysoké elektrické vodivosti silně odráží THz vlny.

Ve srovnání s mikrovlnným a infračerveným zářením vykazují THz vlny v atmosféře mimořádně vysoký útlum v důsledku přítomnosti vodních par. Interakce THz záření s molekulami vody výrazně ovlivňuje měřenou odezvu a z tvaru spektra lze dokonce určit její skupenství [40]. Voda v kapalném skupenství se projevuje širokou absorpcí a krystalová voda vyvolá změnu intenzity a posuny existujících čar. Vzdušná vlhkost je důležitým faktorem, který ovlivňuje každé měření a je potřeba jej zohlednit již při přípravě experimentu. V řadě případů lze vliv vodních par zanedbat. Pokud je však nutné okolní vlhkost eliminovat, celá dráha THz svazku se vzduchotěsně uzavře a v prostoru je vytvořena kontrolovaná atmosféra (vakuum, dusík). Pro měření vody v kapalném skupenství je potřeba použít speciální kyvetu, která je navržena tak, aby optická dráha procházela roztokem o optimální tloušťce kolem 100 μm [41]. Voda a dipolární kapaliny mohou být analyzovány na základě komplexní permitivity $\hat{\epsilon}$ nebo komplexního indexu lomu \hat{n} . Jednoduchými modely dielektrické relaxace pro permitivitu a vodivost lze popsat experimentálně určenou $\hat{\epsilon}$ vody a nižších alkoholů nejméně do 1 THz. Na vyšších frekvencích (> 6 THz) má odpověď vody rezonanční povahu. Objevují se periodické pohyby (např. librace), a absorpce, která není spojena s monotónním poklesem $\hat{\epsilon}$ při rostoucí frekvenci. Rezonance stojí za odchylkami od dielektrických relaxačních modelů a konkrétně voda vykazuje silné absorbující valenční vibrace [42].

Na velkých kontrastech látek je založena řada THz zobrazovacích aplikací. Jelikož obvykle používané obalové materiály jsou dielektrické, THz zobrazování umožňuje nedestructivní kontrolu balíků. Na silném odrazu kovových předmětů jsou založeny bezpečnostní aplikace pro detekci zbraní, exploziv a ilegálních drog ukrytých v běžných obalových materiálech. Silné absorpce vody může být využito zejména v řadě biologických aplikací, kdy mohou být odhaleny i velmi malé změny v hydrataci vzorků. Právě této vlastnosti lze využít i v pro zkoumání absorpční schopnosti hemostatik v předložené práci.

2.5 Terahertzová spektroskopie v časové doméně

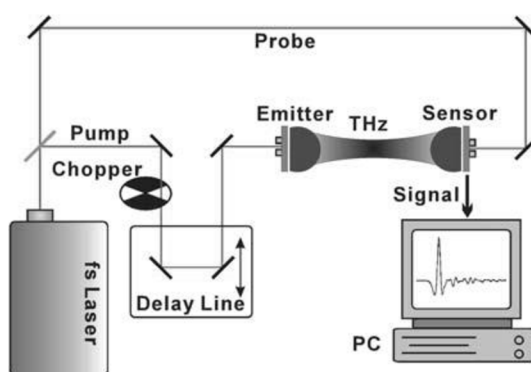
Terahertzová spektroskopie v časové doméně (THz TDS) umožňuje charakterizovat spektrální vlastnosti materiálů v THz oblasti, neboť řada z nich (zejména organických) zde vykazuje vibrační a rotační stavy, související se strukturou molekul a jejich dynamikou. Vibračně-rotačními stavy molekul se zabývá také Ramanova a infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR). Hlavní odlišnost však spočívá v tom, že obě zmíněné metody měří energii, zatímco THz TDS měří elektrické pole.

THz TDS je technikou *koherentní detekce*, kterou lze získat informaci jak o fázi, tak amplitudě signálu. Právě koherence umožňuje přímé měření reálné a imaginární složky permitivity materiálu [26]. THz impuls trvá řádově několik pikosekund, poskytuje tak vysoké *časové rozlišení* a umožňuje dynamickou spektroskopii. THz-TDS navíc používá pro vzorkování THz impulsů časové hradlování, tzv. „time-gating“ (detektor je zapnut jen po velmi krátkou dobu) [28], čímž lze efektivně potlačit šum na pozadí (poměr *SNR* až 100 000 [29]). Bohužel právě v biomedicínských zobrazovacích aplikacích je spousta faktorů, které *SNR* dramaticky snižují; jedná se např. o rychlost akvizice a vysokou absorpci biologickou tkání [29]. Vzhledem ke vzorkování THz impulsů v čase je měření poměrně zdlouhavé, nicméně postupným zdokonalováním měřicích systémů lze dosáhnout i vyšší rychlosti skenování se slušným poměrem *SNR*.

THz TDS však trpí *nizkým spektrálním rozlišením* vzhledem k omezenému skenovacímu rozsahu při reálném měření. Při měření spektra vzorku v kondenzovaném stavu, jehož spektrální vlastnosti mají často rozsah několika desítek THz, není omezené spektrální rozlišení takovým problémem jako třeba u plynů, u nichž je vhodnější použít zdroj kontinuálního THz vlnění s úzkou šířkou pásma [28].

2.5.1 Obecný princip generování a detekce THz impulsu (pump-probe)

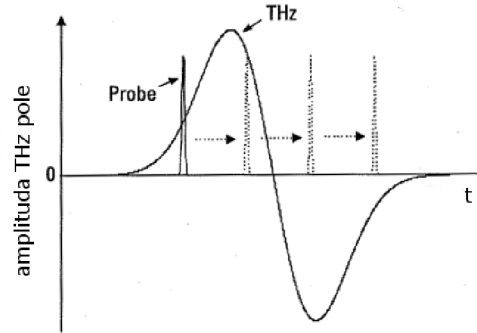
Na principu *pump-probe* pracuje prakticky většina impulsních THz systémů využívaných jak pro spektroskopii, tak zobrazovací aplikace. Tato technika se využívá k měření fyzikálních jevů s časovým rozlišením v rozsahu nanosekund až femtosekund. Obr. 2.3 uvádí schéma *pump-probe* experimentu.



Obr. 2.3 Princip pump-probe pro impulsní generování a detekci THz vlny (převzato z [28]).

Svazek záření z femtosekundového laseru je rozdělen na dva: *pump* a *probe*. K rozdělení laserového svazku slouží polarizátory a půlvlnné destičky. Předpokládáme-li lineární polarizaci svazku záření, pak vzniknou dva kolmé svazky záření. Půlvlnnou destičkou lze pak měnit polarizační úhel a řídit množství energie každého svazku. Oba impulsy jsou původem ze stejného optického svazku, mají tedy i stejnou šířku, obvykle v rozsahu 20 až 120 fs. Energie *pump* impulsu je však podstatně větší než energie *probe* impulsu, protože budí emitor k vygenerování THz vlny, která má mnohem delší trvání

(řádově několik ps). Mezi nejčastější emitory patří fotoelektricky vodivé antény a elektro-optické krystaly. THz impuls je poté opticky usměrněn a zaměřen na zkoumaný vzorek. U kolem *probe* impulsu je účastnit se detekce THz vlnění. Detektor registruje signál pouze za přítomnosti *probe* i THz impulsu současně. Protože je *probe* impuls mnohem kratší, jde o efektivní způsob vzorkování THz signálu s rozlišením daným šířkou femtosekundového impulsu. Obr. 2.4 znázorňuje záznam THz impulsu.



Obr. 2.4 Schéma principu THz TDS (převzato z [43]).

Postupným skenováním THz vlny *probe* impulsem v čase získáme informaci o amplitudě i fázi.

Změnou zpoždění mezi *pump* a *probe* impulsy může být zmapován celý průběh elektrického pole (amplituda a fáze) THz impulsu jako funkce času. Detekovaný signál $signal(t_0)$ je proporcionalní integrálu [43], kde $I_{probe}(t - t_0)$ je intenzita *probe* svazku, jehož maximum je v čase t_0 , a $E_{THZ}(t)$ je amplituda THz pole v čase t :

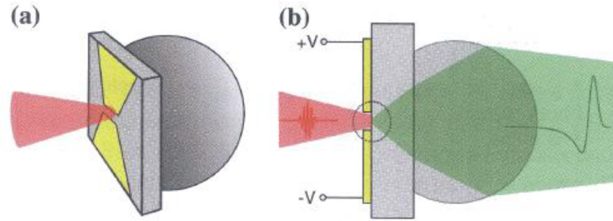
$$signal(t_0) \propto \int_{-\infty}^{\infty} I_{probe}(t - t_0) E_{THZ}(t) dt \quad (2.51)$$

Výsledkem detekce je křivka zachycující změnu amplitudy elektrického pole THz impulsu v závislosti na zpoždění (časový rozestup) mezi *probe* a *pump* impulsy. Toto zpoždění je řízeno pomocí *delay line* (zpožďovací linky) umístěné v dráze *pump* svazku. Vlastní mechanismus detekce se odvíjí od typu použitého detektoru. Obdobně jako pro generování THz záření mohou být i pro jeho detekci použity fotoelektricky vodivé antény nebo elektro-optické krystaly [36],[26].

2.5.2 Zdroje impulsního THz záření

Nejdůležitějším zdrojem pro generování impulsního THz záření je velmi rychlý laser. Pro získání krátkých *femtosekundových impulsů* je potřeba spínání laseru modulovat, aby se energie nashromážděná v době mezi impulsy vyzářila právě během impulsu. Využívá se techniky „*mode-locking*“, neboli módové synchronizace, při níž vznikají krátké, periodické impulsy s vysokým výkonem. Uvnitř dutiny laseru dochází k destruktivní a nedestruktivní interferenci vln a světlo se ustaluje v tzv. módech. Vzhledem k tomu, že módy nejsou generovány současně a se stejnou fází, lze pozorovat nepravidelné pulsace intenzity. Synchronizací jsou módy přinuceny k současnému generování s přibližně stejnými amplitudami. Pokud jsou synchronizovány i fáze, módy spolu interferují a výsledné záření má tvar krátkých impulsů. Běžně používané lasery pro buzení THz záření jsou na bázi titan-safíru, neodymového skla a optických vláken dopovaných neodymem, ytterbiem nebo erbiem [36].

Nejčastější komponentou THz systému pro generování impulsního THz záření je *fotoelektricky vodivá anténa*. Princip tohoto zařízení uvádí Obr. 2.5. Skládá se ze dvou kovových elektrod nanesených na polovodičovém substrátu. Při ozáření mezery mezi elektrodami ultrarychlým laserem se uvolňují fotoelektrické nosiče. Částice jsou urychlovány v elektrickém poli vytvořeném pomocí přiloženého napětí mezi elektrodami a usměrněným pohybem částic vzniká fotoelektrický proud.



Obr. 2.5 Fotoelektrická anténa s motýlkovou anténou (a) a její profil (b) (převzato z [36]). Femtosekundový laserový impuls přichází zleva (ozn. červeně) a THz záření je na výstupu vpravo (ozn.zeleně). Silikonová čočka soustředí záření uvolněné ze substrátu.

Obecně je pohyblivost děr ve srovnání s elektrony menší, proto může být zanedbána. Hustotu fotoelektrického proudu $J(t)$ lze popsat rovnicí (2.52), kde $N(t)$ je hustota nosičů, e elementární náboj, μ_e pohyblivost elektronu a E_b intenzita elektrického pole (předpětí). Hustota nosičů $N(t)$ je funkcí času a závisí na vlastnostech laserového impulsu. Následkem časově proměnlivého fotoelektrického proudu vzniká THz impuls s intenzitou elektrického pole popsanou rovnicí (2.53), kde A je oblast mezery ozářené laserovým paprskem, ϵ_0 permitivita vakua, c rychlost šíření světla ve vakuu, z vzdálenost bodu v poli od THz zdroje.:

$$J(t) = N(t)e\mu_e E_b, \quad (2.52)$$

$$E_{THz} = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \cdot \frac{A}{c^2 z} \cdot \frac{\partial J(t)}{\partial t} = \frac{A \cdot e}{4\pi\epsilon_0 c^2 z} \cdot \frac{\partial N(t)}{\partial t} \mu_e E_b \quad (2.53)$$

Dalším způsobem generování THz impulsů je *optická rektifikace* ultrarychlého optického impulsu dopadajícího na elektrooptický krystal, při níž dochází v důsledku nelineárních optických jevů k přechodné polarizaci a následné emisi THz impulsu. Tato schopnost generovat THz záření byla dosud objevena u těchto materiálů: GaAs, GaSe, ZnTe, CdTe a LiNbO₃ [33].

2.5.3 Detektory impulsního THz záření

Impulsní systémy využívají metody koherentní detekce, kterými lze přímo měřit amplitudu a fázi elektrického pole THz vlny. Princip koherentních detektorů je podobný mechanismu generování THz vlny v opačném pořadí. Stejně jako pro generování THz záření bývá i pro detekci často používána *fotoelektricky vodivá anténa*. Femtosekundový *probe* impuls aktivuje anténu k tvorbě fotoelektrických nosičů, které jsou v elektrickém poli dopadajícího THz impulsu urychlovány. Výsledný proud, generovaný v mezeře mezi elektrodami, je zesílen, převeden na napětí a obvykle detekován fázově citlivým detektorem. Mezi THz a laserovými impulsy zůstává stejný časový odstup a proud \bar{J} indukovaný THz polem je dán rovnicí (2.54), kde \bar{N} je průměrná hustota elektronů a τ časové zpoždění mezi *probe* a THz impulsem:

$$\bar{J} = \bar{N}e\mu E(\tau) \quad (2.54)$$

THz vlna je skenována jako funkce zpoždění τ [28]. Detekovaný signál je úměrný vektoru elektrického pole, nikoliv pouze intenzitě, což umožňuje fázově citlivé měření a přímé určení absorpčního koeficientu i indexu lomu.

Pro zvýšení citlivosti detekce a vyšší SNR bývá použit *lock-in zesilovač*, skládající se ze zdroje referenčního signálu pro modulaci měřeného signálu a fázově citlivého detektoru. Pro modulaci *pump* svazku bývá obvykle zařazen optický *chopper*, který moduluje odezvu systému na stejné frekvenci jako referenční signál. Vzhledem k rozdílné rychlosti odezvy dorazí oba signály do zesilovače v různých časech a jsou tedy fázově posunuté. Pro dosažení maximálního výstupu však musí být referenční signál a modulovaný vstupní signál ve fázi, což je hlavním úkolem *lock-in* zesilovače [36].

Pro detekci lze dále využít i *elektrooptický krystal* díky Pockelsově jevu. Přiložené statické elektrické pole indukuje v krystalu změnu polarizace záření, které jím prochází. Jde o opačný postup k optické rektifikaci [1], [33], [36].

2.5.4 THz impuls a jeho spektrum

Za účelem získání spektrální informace je časový průběh THz vlny $E(t)$ transformován do frekvenční oblasti pomocí Fourierovy transformace (FT) dle (2.55) [28]:

$$\hat{E}(\omega) = \text{FT}\{E(t)\} = \int_{-\infty}^{+\infty} E(t)e^{-i\omega t} dt = |E(\omega)|e^{-i\Phi(\omega)} \quad (2.55)$$

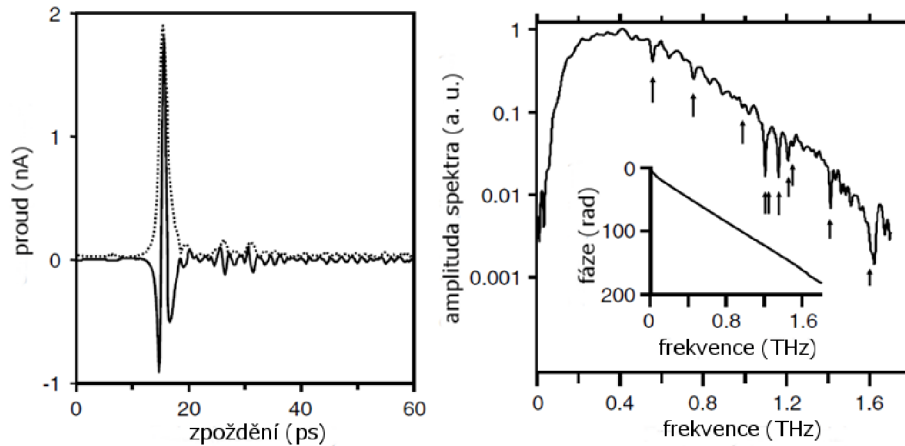
Spektrum $\hat{E}(\omega)$ má obecně komplexní tvar a je tvořeno amplitudovou $|E(\omega)|$ a fázovou složkou $\Phi(\omega)$. Díky koherenci může být reálná i imaginární část permitivity změřena přímo bez použití Kramers-Kronigových vzorců. Ve skutečnosti je měřen index lomu a útlum materiálu, který přímo souvisí s komplexní permitivitou [26], viz kap. 2.4.3. Obr. 2.6 uvádí obě složky spektra získané Fourierovou transformací THz vlny. Amplitudové spektrum je poměrně široké, přesahující několik řádů vlnové délky. Obsahuje řadu ostrých špiček v místech, kde se objevují rotační přechody vodních par (označeno šipkami), viz kap. 2.4.4. Vložený graf zaznamenává fázové spektrum v rozbaleném tvaru pro odstranění skoků na úhlové frekvenci 2π . Závislost fáze na frekvenci je přibližně lineární. Fázově citlivé měření je obvyklé spíše u mikrovlnných systémů, avšak fázová informace může být užitečná pro zobrazování, neboť fáze koreluje s tloušťkou vzorku a v mnoha případech i s jeho hustotou [25].

Ve skutečnosti je měřený THz signál časově omezený a diskrétní, nikoliv spojitý, proto nelze prakticky použít spojitou Fourierovu transformaci dle (2.55), ale její diskrétní podobu (DFT) podle (2.56) [44], kde \hat{E}_k je k -tý spektrální koeficient, N počet vzorků vstupní posloupnosti THz signálu E_n :

$$\hat{E}_k = \text{DFT}\{E_n\} = \sum_{n=0}^{N-1} E_n \cdot e^{-2\pi i \frac{k}{N} n} \quad (2.56)$$

Aby bylo možné výpočet DFT použít, je potřeba získat diskretní reprezentaci signálu vzorkováním, při němž vstupní signál $E(t)$ násobíme vzorkovacím oknem $v(t)$ délky T a vzorkovacím krokem Δt . Použitím konvolučního teorému (2.57) pak lze odvodit spektrum signálu $\hat{E}(\omega)$:

$$FT[E(t) \cdot v(t)] = FT[E(t)] * FT[v(t)] = \frac{1}{2\pi} \hat{E}(\omega) * \hat{V}(\omega) \quad (2.57)$$



Obr. 2.6 THz vlna a její amplitudové a fázové spektrum (převzato z [25]).

Vlevo je znázorněna typická THz vlna v časové oblasti měřená za normálních okolních podmínek na vzduchu. Oscilace, které následují po počátečním přechodovém jevu, způsobují vodní páry v dráze vlny. Přerušovaná křivka znázorňuje intenzitu jako obálku signálu vypočtenou z měřeného elektrického pole $E(t)$ použitím Hilbertovy transformace.

Vpravo je uveden graf amplitudové složky spektra $|E(\omega)|$ v logaritmickém měřítku. Šipky označují frekvence, na kterých se typicky vyskytují absorpční linie vodních par. Vložený graf znázorňuje fázi spektra odvozenou z $E(t)$.

Jelikož pracujeme s časovými signály s periodou vzorkování T , můžeme použít interpretaci DFT blízkou klasické FT jako funkci frekvence. Definiční vztah (2.56) lze popsat ekvivalentně jako (2.58) [44], kde koeficienty diskretního spektra přísluší určitým frekvencím $k\Omega$ a vzorky časového signálu časovým okamžikům nT :

$$\hat{E}(k\Omega) = \sum_{n=0}^{N-1} E(nT) \cdot e^{-ik\Omega nT} \quad (2.58)$$

Z povahy Fourierovy transformace vyplývá souvislost frekvenčního rozlišení Δf a frekvenčního rozsahu f_{max} s délkou vzorkovacího okna T a časovým rozlišením Δt , které jsou popsány následujícími vztahy (2.59) a (2.60) [28],[36],[44]:

$$\Delta f = \frac{1}{T} \quad (2.59)$$

$$\frac{1}{\Delta t} > 2f_{max} \quad (2.60)$$

Z předchozích vzorců vyplývají tři základní důsledky, ke kterým je nutné u THz impulsních systémů přihlídnout:

1. Δf je nepřímo úměrné délce vzorkovacího okna T . Tento faktor je důležitý zejména při spektroskopickém měření látek, jejichž spektrální otisky mohou mít různou šířku. Ve spektru plynů se objevují velmi úzká absorpční maxima a je tedy nutné zajistit vysoké frekvenční rozlišení (100 MHz – 1 GHz), které vyžaduje skenovací okno delší než 100 ps. Naopak absorpční maxima pevných látek jsou širší a pro jejich analýzu postačí nižší frekvenční rozlišení (~ 1 GHz), což odpovídá délce skenovacího okna kolem 10 ps [26].
2. Rovnice (2.60) vychází ze vzorkovacího teorému (2.61), který určuje velikost vzorkovacího kmitočtu f_{vz} nutného pro co nejlepší rekonstrukci původně spojitého signálu. f_{vz} musí být minimálně dvojnásobkem nejvyšší frekvence f_{max} vyskytující se v signálu [44]. THz systémy obvykle využívají pásmo do 5 THz, proto f_{vz} musí být nejméně 10 THz nebo T kolem 100 fs.

$$f_{vz} > 2f_{max}, \text{ kde } f_{vz} = \frac{N\Omega}{2\pi}. \quad (2.61)$$

3. Dosažitelné SNR souvisí s rychlostí akvizice. Ke snížení šumu v signálu může být použito průměrování, které však prodlužuje čas měření.

Při transformaci z časové oblasti do frekvenční může vzniknout v důsledku početních operací řada artefaktů, zejména aliasing, „rozmazání“ a etalonový efekt. Signál s konečnou dobou trvání má nekonečně široké spektrum, nicméně všechny energeticky důležité složky spektra leží obvykle pod kmitočtem f_{max} . Ideální vzorkování je doprovázeno periodizací spektra původního signálu. Pokud není splněna podmínka vzorkovacího teorému (rovnice (2.61)), dochází k aliasingu (zkreslení spektra), a ztrátě informace v důsledku překrytí spektrálních složek a jejich sčítání [44].

V důsledku časového omezení spojitého signálu po aplikaci skenovacího okna s konečnou délkou T dochází ve frekvenční oblasti ke konvoluci spekter signálu a okna. Každá čára v původním spektru se tak „rozmaže“ a dochází k prosakování hodnot na jiné kmitočty, což má negativní vliv na spektrální rozlišení. Řešením může být prodloužení okna, ale velký vliv má také výběr vhodného tvaru okna, který ovlivňuje tvar spektra. Existuje škála vzorkovacích oken s různými profily, které poskytují rozdílné spektrální rozlišení. Nejčastěji se používá obdélníkové okno, pro vyšší spektrální rozlišení pak Hannovo nebo Hammingovo [26].

U řady THz systémů můžeme na výstupu detekovat nejen THz impuls, ale také jeho ozvěny, způsobené jeho odrazy na rozhraní optických komponent (čočky, děliče svazku). Pokud je skenovací okno příliš dlouhé, pak se tato echa jeví jako malé repliky THz impulsu. Ve spektru signálu, který obsahuje THz impuls i jeho repliky, pak dojde k interferencím těchto složek, tzv. etalonovému efektu. Následkem toho mohou být překryty skutečné spektrální znaky, které při analýze spektra hledáme. Pro odstranění tohoto nežádoucího jevu je nutné omezit délku skenovacího okna tak, aby zachytilo pouze hlavní THz impuls, s čímž opět souvisí spektrální rozlišení [26].

2.5.5 Transmisní vs. reflexní měření

Systémy pro THz TDS lze uspořádat pro reflexní i transmisní měření. Na každém měření se do jisté míry promítnou vlastnosti jednotlivých komponent THz systému, což

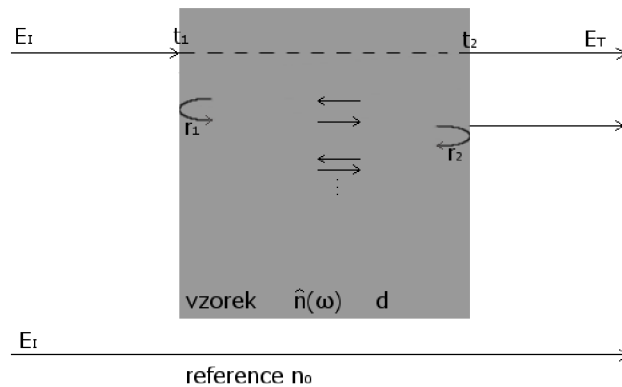
není žádoucí. Zahnutí optických parametrů a přenosových funkcí všech komponent do výpočtů by bylo velmi náročné, proto se k měření každého vzorku provádí i měření reference. V případě transmisního módu jde o volný prostor bez vzorku, v případě reflexního měření odraz od referenčního zrcadla. Měření vzorku je referenčním měřením normalizováno, čímž dojde k odstranění neznámých vlivů samotného systému. Pro systém s pevně danou geometrií je tedy změřena THz odezva vzorku a reference a pomocí Fourierovy transformace jsou získána jejich spektra. Spektrální vlastnosti zkoumaného vzorku $\hat{E}_{deconv}(\omega)$ pak získáme dekonvolucí poměru naměřeného spektra signálu vzorku \hat{E}_{vzorek} se spektrem referenčního signálu \hat{E}_{ref} [36]:

$$\hat{E}_{deconv}(\omega) = \frac{\hat{E}_{vzorek}(\omega)}{\hat{E}_{ref}(\omega)} \quad (2.62)$$

Obecně je preferováno transmisní měření před reflexním, neboť se při něm více projeví absorpční vlastnosti zkoumaného vzorku [36],[39]. Obr. 2.7 znázorňuje základní schéma propagace THz vlny skrz vzorek umístěný ve vakuu. Část vlnění vzorkem projde, ale zároveň uvnitř materiálu dochází k mnohačetným odrazům na rozhraních vzorku s okolní atmosférou, než dojde k úplnému průchodu. Celková transmise je pak dána superpozicí všech částí [34] dle (2.63), kde $FP(\omega)$ představuje Fabry-Pérotův efekt, následek mnohačetných odrazů uvnitř materiálu [43]:

$$E_T = \frac{E_I t_1 t_2 e^{i\phi}}{1 - r_1 r_2 e^{2i\phi}} = t_1 t_2 e^{-i\phi} FP(\omega) E_I, \quad (2.63)$$

$$FP(\omega) = \frac{1}{1 - r_1 r_2 e^{2i\phi}} \quad (2.64)$$



Obr. 2.7 Schéma základního modelu transmise elektromagnetické vlny E_I skrz jednu vrstvu materiálu o tloušťce d a s komplexním indexem lomu $\hat{n}(\omega)$.

Na rozhraní vrstvy a okolního prostředí s indexem lomu n_0 (např. vakuum) dochází nejen k průchodu vlny (charakterizované transmisními koeficienty t_1 a t_2), ale také k mnohačetným odrazům (reflexní koeficienty r_1 a r_2). Detektorem snímáme pouze vlnění E_T prošlé vzorkem a porovnáváme s referencí, která odpovídá ve vakuu E_I .

Následkem interakce THz vlny se vzorkem je zpoždění signálu oproti referenci a snížení jeho amplitudy. Uvažujeme-li kolmý dopad ($\theta_1 = 0$), pak můžeme transmisní

t_1 , t_2 a reflexní koeficienty r_1 , r_2 na rozhraní vyjádřit pomocí vztahů (2.37) a (2.38) a fázový posun $\phi(\omega)$ vlny šířící se materiálem odpovídá rovnici (2.65):

$$\phi(\omega) = \hat{n}(\omega)k_0d = \hat{n}(\omega)\frac{\omega}{c}d \quad (2.65)$$

Ve skutečnosti měříme komplexní transmisní koeficient $\hat{t}(\omega)$ s amplitudou $|t(\omega)|$ a fází $\phi(\omega)$ a můžeme jej vyjádřit jako poměr elektrických intenzit prošlého vlnění \hat{E}_T k dopadajícímu \hat{E}_I :

$$\begin{aligned} \hat{t}(\omega) &= |t(\omega)|e^{i\phi(\omega)} \\ &= \frac{\hat{E}_T(\omega)}{\hat{E}_I(\omega)} = \frac{4\hat{n}(\omega)e^{i\phi(\omega)}}{[\hat{n}(\omega) + 1]^2 - [\hat{n}(\omega) - 1]^2e^{2i\phi(\omega)}} \end{aligned} \quad (2.66)$$

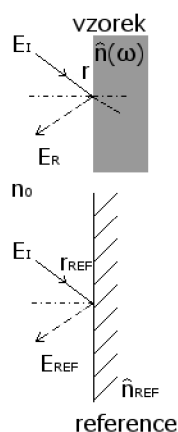
Odvození spektra komplexního indexu lomu $\hat{n}(\omega)$ z naměřeného spektra komplexní propustnosti $\hat{t}(\omega)$ se řeší numericky. Dle rovnice (2.66) je možné z naměřených $\hat{t}(\omega)$ a $\phi(\omega)$ určit $\hat{n}(\omega)$, popř. extinkční koeficient $\kappa(\omega)$ po aplikaci rovnice (2.46). Počáteční hodnota $\hat{n}(\omega)$ je zvolena odhadem a iteračními výpočty zpřesňována podle kritéria minimálního rozdílu mezi naměřenou a vypočtenou hodnotou [34],[39]. První analýza spočívá ve výpočtu indexu lomu ze zpoždění THz impulsu při průchodu vzorkem. Pokud známe tloušťku vzorku d , pak můžeme zjistit reálný index lomu n_{vzorek} z délky optické dráhy Δ podle $\Delta = n_{vzorek} \cdot d$. THz spektrometrem je měřeno zpoždění δt THz vlny po průchodu vzorkem a referencí a pro homogenní a izotropní vzorky platí [36]:

$$\delta t = \frac{d \cdot (n_{vzorek} - n_{REF})}{c}. \quad (2.67)$$

V případě vzduchu nebo dusíkové atmosféry je $n_{REF} = 1$. Absorpční koeficient homogenního vzorku lze určit pomocí Lambert-Beerova zákona [36],[40]:

$$\alpha(\omega) = \frac{2}{d} \cdot \ln \left(\frac{\hat{E}_I(\omega)}{\hat{E}_T(\omega)} \right). \quad (2.68)$$

Ne všechny vzorky je však možné měřit v transmisním módu. Především pro měření opticky tlustých vzorků je potřeba použít reflexní režim, kdy se materiálové parametry zjišťují z odrazu THz vlny od vzorku. Uspořádání experimentu pro reflexní měření znázorňuje Obr. 2.8. Obecné odvození indexu lomu z reflexního měření je možné na základě Fresnelových vztahů (2.31) a (2.33). Výpočet však komplikuje závislost úhlu lomu na indexu lomu materiálu podle Snellova zákona. Pokud je však uvažován kolmý dopad vlnění na měřený vzorek, situace se zjednoduší (viz kap. 2.4.2) [36].



Obr. 2.8 Schéma základního modelu pro reflexní měření elektromagnetické vlny E_I při odrazu od jedné vrstvy materiálu s komplexním indexem lomu $\hat{n}(\omega)$.

Na rozhraní vrstvy a okolního prostředí s indexem lomu n_0 (např. vakuum) dochází k odrazu vlny (charakterizováno reflexním koeficientem r). Detektorem snímáme odraženou vlnu E_R (reflexní koeficient r_{REF}) (nahore) a porovnááme s referenční vlnou E_{REF} , odraženou od referenčního zrcadla s indexem lomu $\hat{n}_{REF}(\omega)$ (dole).

Opět měříme komplexní reflexní koeficient vzorku $\hat{r}(\omega)$ a reference $\hat{r}_{REF}(\omega)$ s amplitudou $|r(\omega)|$ (resp. $|r_{REF}(\omega)|$) a fází $\Phi(\omega)$ (resp. $\Phi_{REF}(\omega)$). Poměr elektrických intenzit vlnění odraženého vzorkem $\hat{E}_R(\omega)$ a vlnění odraženého referenčním zrcadlem $\hat{E}_{REF}(\omega)$ odpovídá poměru jejich reflexních koeficientů [39]:

$$\frac{\hat{E}_R(\omega)}{\hat{E}_{REF}(\omega)} = \frac{\hat{r}(\omega)}{\hat{r}_{REF}(\omega)} = \frac{|r(\omega)|e^{i\Phi(\omega)}}{|r_{REF}(\omega)|e^{i\Phi_{REF}(\omega)}} = \frac{[\hat{n}(\omega)-1][\hat{n}_{REF}(\omega)+1]}{[\hat{n}(\omega)+1][\hat{n}_{REF}(\omega)-1]} \quad (2.69)$$

kde $\hat{n}_{REF}(\omega)$ je index lomu zrcadla. Platnost (2.69) je však omezena pouze na případ kolmého dopadu THz vlny na vzorek, kdy je zanedbán průnik vlny do vzorku, odrazy uvnitř něj a prostorové vychýlení referenční vlny a vlny odražené vzorkem [36],[39].

Reflexní měření může být mnohdy praktičtější, nicméně při nedodržení určitých opatření jsou výsledky zatíženy skrytými chybami. Klíčové je správné umístění emitoru THz vln, měřeného vzorku a detektoru tak, aby bylo možné odražený signál zachytit. Velkým problémem je posun referenčního zrcátka do jiné polohy než vzorek [36],[39]. I malá odchylka vnáší velkou chybu do výpočtu fáze. Pro věrohodné výsledky by nemělo dojít k vychýlení zrcátka od původní polohy vzorku o více než 1 μm [45]. Tento problém je prakticky vyřešen kombinací THz TDS a metody zeslabeného úplného odrazu ATR (Attenuated Total Reflection) nebo elipsometrií [39]. Použití reflexního módu může být však v řadě případech znemožněno; spousta materiálů má relativně nízký reflexní koeficient (cca 10 %), s čímž souvisí nízký SNR a ztížená identifikace spektrálních znaků. Proto je vhodné reflexní spektra využít spíše k porovnání s databází absorpčních spekter známých materiálů naměřených v transmisním režimu [36].

2.5.6 THz spektroskopie biologických objektů

Při popisu interakcí biologických tkání s THz zářením sehrává klíčovou roli elektrické pole. První možností je popsat odezvu pomocí klasické elektromagnetické vlny a charakterizovat zkoumané médium pomocí permitivity (schopnosti média polarizovat se) a vodivosti (schopnosti iontů pohybovat se médiem). Tyto parametry popisují reakci

shluků molekul, tedy celkové pohyby v makroskopickém měřítku. Důležitý je však i mikroskopický pohled, který absorpci záření spojuje s přesuny mezi energetickými hladinami molekul. Energie fotonů THz záření se zmíněnými přesuny úzce souvisí, neboť nabývá hodnot přibližně $2,0 \cdot 10^{-22}$ až $1,3 \cdot 10^{-20}$ J. Pro porozumění těmto interakcím je tak potřeba zohlednit i energetické úrovně molekul a kvantovou mechaniku [42].

THz vlnění je vhodné pro zkoumání biologických objektů ze dvou hlavních důvodů. Prvním z nich je bezpečnost použitého záření. Dle Planckova zákona $E = hf$ je energie fotonu na $f = 1 \text{ THz}$ rovna $6,6 \cdot 10^{-22}$ J nebo 4,1 meV. Energie způsobující ionizaci atomu je však až 1000krát vyšší. Výkon THz spektrometrů nepřesahuje 1 μW , což je milionkrát méně než přirozené THz záření emitované lidským tělem (až 1 W [36]). Z tohoto pohledu tedy nelze hovořit ani o termálních účincích [40]. Bezpečné úrovně ozáření byly aplikovány např. na keratinocyty a krevní leukocyty a nebyly pozorovány žádné změny [36]. Škodlivost THz záření podrobně zkoumal mezinárodní projekt THz-Bridge, který se zabýval spektroskopii proteinů, enzymů, biologických membrán a vybraných buněk, *in vitro* sledováním genotoxických účinků na lidské periferní leukocyty a lymfocyty a účinky na modely membrán a epitelu. Byl nalezen pouze jeden negativní výsledek při dlouhodobém vystavení (> 60 minut) lymfocytů kontinuálnímu THz záření na frekvenci 100 GHz s intenzitou 0,05 mW/cm², jinak nebyly zjištěny žádné genotoxické účinky na DNA nebo celkové negativní změny [46].

Dalším důvodem použití THz záření pro studium biologických vzorků je skutečnost, že existují mezimolekulární vibrace rezonující na THz frekvencích. Studium biologických vzorků je často založeno na specifické interakci THz záření s vodou, která je hojně obsažena ve tkáních. Díky vysokému obsahu vodíkových vazeb vykazuje na THz frekvencích silné absorpce, proto již malá změna obsahu vody ve tkáni je snadno detekovatelná, čehož lze využít např. v diagnostice nádorů, neboť přítomnost tumoru obvykle místně zvýší průtok krve, a tedy i obsah vody ve tkáni [36]. Do určité míry je THz záření schopné také interagovat s buněčnými strukturami, neboť rozměry mnoha buněk korespondují s vlnovou délkou THz záření.

U roztoků aminokyselin dominují při interakci s THz zářením změny rotačních a vibračních stavů, neboť jejich molekuly nejsou schopny reagovat na rychle se měnící THz elektrické pole celkovou rotací. Obdobně molekuly proteinů nejsou schopny reorientace otočením a přispívají k měřené permitivitě roztoků elektronickou a atomární polarizací a hromadnými vibračními stavy, které mohou poskytnout informaci o konformační změně [42]. Měřena byla i THz spektra nukleobází, nukleosidů, deoxynukleosidů a nukleotidů v krystalických stavech v rozsahu 0,4 – 5,8 THz, ve kterém vykazovaly odlišné charakteristické spektrální znaky [33].

Největší potenciál pro studium biologické tkáně představuje THz impulsní zobrazování, neboť dokáže rozlišit různé typy tkání i jejich funkční stav. Obrazy jsou založeny na jednoduchých parametrech v porovnání s detailní analýzou používanou ve spektroskopii. Hodnota každého pixelu je výsledkem analýzy tvaru THz vlny prošlé nebo odražené vzorkem. Výzkum v této oblasti se soustředí zejména na dvě aplikace: *in vivo* diagnostika povrchových tkání a studium vzorků vnitřních tkání *ex vivo* [42]. *In vivo* experimenty jsou limitovány silnou absorpcí vody, která omezuje hloubku průniku THz vlnění, proto je možné zobrazit pouze snadno přístupné části těla, např. pokožku a zuby (časná detekce zubních kazů [38], [42]). Citlivost THz vlnění na vodu však má i své výhody, neboť stupeň hydratace vypovídá o kondici tkáně, resp. stupni jejího poškození, čehož lze využít v diagnostice popálenin [25], hojení ran nebo charakterizaci tkání po biopsii [38].

3 HEMOSTATIKA

Hemostatika jsou materiály, které díky svým vlastnostem dokážou podpořit přirozenou hemostázu organismu, tedy zástavu krvácení. Díky specifické interakci s vodným prostředím, resp. krví, se řadí do skupiny polymerních gelů, tzv. hydrogelů. Před samotnou charakterizací hemostatik je vhodné objasnit princip hemostatické reakce těla.

3.1 Hemostáza

Krvácení je typickým projevem organismu prakticky na jakémkoliv zranění, při němž dojde k narušení cévní stěny. Přirozenou obranou je hemostáza, tedy proces zástavy krvácení jako základní mechanismus zachování integrity organismu [23]. Jde o složitý komplexní děj, který zahrnuje tři základní kroky – vazokonstrikci, adhezi a aktivaci krevních destiček a tvorbu fibrinu [47].

Při poranění cévy je obnažena subendoteliální extracelulární matrix, jež obsahuje několik adhezivních proteinů, zejména kolagen. Kolagenová vlákna se chovají jako ligandy pro povrchové receptory krevních destiček a za pomoci von Willebrandova faktoru destičky k vláknům přilnou. Adhezi se destičky zároveň aktivují a začnou uvolňovat látky podporující adhezi a aktivaci dalších destiček a látky s vazokonstrikčním účinkem (serotonin, PDGF faktor, tromboxan A₂). Následkem vazokonstrikce dojde k omezení průtoku krve skrz postiženou oblast cévy [48],[49]. Aktivací mění destičky svůj tvar; z okrouhlých buněk vznikají kuličky s pseudopodiemi¹, kterými se vzájemně proplétají. Agregace je podpořena trombinem a stabilizována glykoproteinovými receptory IIb/IIIa exponovanými na povrch destiček. Na receptory se váže fibrinogen, který spojuje destičky navzájem.

Hemokoagulace se účastní celá řada koagulačních faktorů, které jsou za normálních okolností v neaktivní podobě. Aktivace faktorů probíhá v kaskádě enzymatických reakcí, která může být zahájena endogenně² nebo exogenně³. Endogenní aktivace začíná v místě porušení cévy kontaktní aktivací faktoru XII, který způsobí aktivaci prekalikreinu na kalikrein, jenž zesiluje aktivaci faktoru XII. Následuje aktivace faktorů XI, IX, VIII a nakonec X. K faktoru X vede i exogenní hemokoagulace při větších poraněních, kdy do kontaktu s krví přichází tkáňová trombokináza (faktor III) a aktivuje faktor VII a X. Po aktivaci faktoru X (endogenně/exogenně) dochází k aktivaci faktoru V, který spolu s fosfolipidy a ionty Ca²⁺ vytváří protrombinázu. Tento komplex přemění protrombin (faktor II) na trombin, který aktivuje fibrinogen na fibrin, fibrin-stabilizující faktor XIII a faktory V, VIII a XI. Fibrinová vlákna polymerizují a vytváří rozpustný fibrin, který je stabilizován faktorem XIII na nerozpustný fibrin [50]. Přilnutím a zesíťováním fibrinových proteinů je vytvořena síť, která zachytává další destičky a červené krvinky za účelem vytvoření finální fibrinové zátky (trombu) [51],[52], která je po zahojení cévy postupně degradována řízenou fibrinolýzou [52].

V případě, že je rána relativně malá, je samotná hemostáza schopná zastavit krvácení bez významnější ztráty krve a bez vážných následků. Existují však i situace, kdy přirozená obranná reakce organismu na efektivní zástavu krvácení nestačí. Nejde pouze o zranění, ale typicky například o plánované chirurgické zákroky. Při těchto

¹ panožky

² uvnitř cévy

³ vně cévy

výkonech může být hemostáza podpořena kompresí⁴, ligací⁵, kauterizací⁶ nebo metodou „clipping“⁷ [23]. Nicméně v některých případech může být použití zmíněných konvenčních metod s ohledem na charakter krvácející tkáně vyloučeno. V těchto situacích je možné využít právě lokálně hemostaticky působící látky přírodního nebo syntetického původu [53], založené na chemické reakci podporující hemostázu [54].

Chemická hemostáza byla známa už ve starém Řecku, kdy Hippokrates použil pro zástavu krvácení žiraviny [54]. Moderní chemická hemostatika však byla objevena až na konci 18. století, kdy Paul Carnot představil želatinu. Později chirurg Victor Horsley zkoušel vymodelovaným voskem zastavit vnitřní lebeční krvácení u psa. V roce 1886 pak vytvořil směs včelího vosku, kyseliny salicylové a mandlového oleje, který představil jako antiseptický vosk vhodný pro použití v kraniální a spinální chirurgii [55]. Použití fibrinu jako hemostatika poprvé diskutoval S. Bergel už roku 1909 [56], ale teprve roku 1940 byl fibrinogen prakticky použit pro lepení povrchových nervů [57] a kombinace trombin-fibrinogen pak byla úspěšně použita při transplantaci kůže [58]. Podrobnější zkoumání mechanismu vlastní koagulace krve vedlo k vývoji oxidované celulózy (1942) [59] a následně i želatinové pěny (1945) [60]. Kyanoakrylátová lepidla byla objevena Harry Cooverem roku 1942, ale až roku 1959 publikoval možné využití pro lepení živých tkání [61]. Roku 1970 následoval objev mikrofibrilárního kolagenu z čištěné hovězí škáry [62] a hemostatické použití chitosanu pak poprvé publikoval William Malette roku 1983 [63].

Jednotné rozdělení hemostatických materiálů v literatuře neexistuje, nicméně je možné rozčlenit je do pěti hlavních skupin podle původu nebo mechanismu účinku [64]:

- a) mechanické,
- b) absorpční,
- c) biologicky aktivní,
- d) krycí,
- e) syntetické.

Mechanická hemostatika (kostní vosk, ostene) fungují na principu fyzikální bariéry, tj. mechanickou okluzí brání kostnímu krvácení. Absorpční hemostatika se nepřímo účastní hemokoagulace tím, že poskytují matici pro proces srážení krve (hemostatika na bázi želatiny a oxidované celulózy) nebo podporují usazování krevních destiček a jejich aktivaci (kolagen). Biologicky aktivní hemostatika jsou na bázi fibrinogenu a trombinu a účastní se tak hemokoagulační kaskády přímo. Hemostatické krytí (obvazy) jsou na bázi chitinu, chitosanu, zeolitového minerálu nebo v kombinaci s absorpčními a biologickými prostředky. Syntetická hemostatika fungují jako tkáňová lepidla; mechanismus účinku je založen buď na přirozené síťovací reakci lepidla při kontaktu s tkání (kyanoakryláty), nebo na smíchání specifických složek za účelem vytvoření hotového lepidla pro uzavření rány [64],[65].

Zmíněná hemostatika jsou dnes využívána v mnoha oblastech chirurgické praxe; především se jedná o aplikace v plastické [66] a gynekologické chirurgii [67], ale prakticky se uplatní při jakémkoliv chirurgickém výkonu [65]. Výběr vhodného hemostatika v dané aplikaci závisí na klinických zkušenostech operátora a jeho týmu

⁴ stlačení cévy

⁵ podvaz cévy

⁶ uzávěr cévy místním působením vysoké teploty

⁷ zasvorkování cévy

[68]. Volba ideálního hemostatika zahrnuje zohlednění několika důležitých faktorů [69]. Prvním z nich je *bezpečnost* přípravku, tzn. nesmí představovat žádné riziko pro pacienta. Nemělo by být antigenní, infekční, mutagenní nebo způsobovat jiné zdravotní komplikace. Další věcí je také *dostupnost* hemostatik, ať už se jedná o cenu či komerční dostupnost v konkrétní zemi. Jedním z faktorů je také nenáročná *manipulace* s materiálem, což zahrnuje jednoduchou a rychlou přípravu materiálu a snadný postup následné aplikace vhodným aplikátorem s ohledem na rozsah postižené oblasti. V následujících kapitolách jsou specifikována hemostatika, která byla použita v této studii, přičemž jejich výběr byl podmíněn třemi hlavními faktory:

- a) schválení použití příslušného hemostatika v ČR,
- b) komerční dostupnost volně prodejných hemostatik,
- c) aktuální dostupnost speciálních hemostatik na spolupracujícím pracovišti Krajské nemocnice Tomáše Bati ve Zlíně.

3.2 Absorpční hemostatika

Absorpční hemostatika se řadí do kategorie tzv. hydrogelů, což jsou polymery tvořené trojrozměrnou hydrofilní sítí schopnou pojmout velké množství vody. Tyto sítě se skládají z homopolymerů nebo kopolymerů zesíťovaných prostřednictvím chemických nebo fyzikálních vazeb, které zajišťují strukturu a fyzikální integritu celé polymerní sítě. Právě díky těmto vazbám jsou ve vodě nerozpustné [70]. Hydrogely jsou biokompatibilní, a dokonce schopny simulovat biologickou tkáň, proto také mají široké uplatnění v biomedicínských aplikacích a tkáňovém inženýrství. Často jsou využívány jako nosiče léků, které se z polymerní matrice uvolní v důsledku jejího nabobtnání [71]. Právě schopnost nabobtnat v přítomnosti termodynamicky kompatibilního roztoku je důležitou vlastností pro jejich hemostatické účely, viz podrobně kap. 6.5.1.

3.2.1 Oxidovaná celulóza

Celulóza je makromolekulární látka, nejrozšířenější polysacharid v rostlinné říši. Získává se z bavlny (téměř čistá celulóza) nebo ze dřeva (technická celulóza). Je složena z glukózových monomerních jednotek spojených lineárně 1,4- β -glykosidovou vazbou, základní stavební jednotkou je cellobiosa [72]. Oxidovaná regenerovaná celulóza se vyrábí rozložením buničiny ze dřeva a následnou obnovou ve formě celulózových vláken. Vlákná mají stejný průměr po celé délce, což je důležité pro jejich následnou rovnoměrnou a konzistentní oxidaci, jsou spletena do provázků, ze kterých je utkána textilie o různé hmotnosti. K oxidaci se používá oxid dusičitý (NO_2) nebo jeho dimer (dinitrogen tetroxide N_2O_4), kyselina dusičná HNO_3 , jodistá (H_5IO_6) nebo chlorná (HClO), na konci reakce se výsledné produkty různí. Oxidačním procesem získává tkanina antibakteriální vlastnosti a schopnost biodegradace [73]. Díky přítomnosti karboxylových skupin dochází při kontaktu oxycelulózy s tělními tekutinami ke snížení pH okolí. Pokusy *in vitro* a *in vivo* byla zjištěna antimikrobiální aktivita proti gram-pozitivním i gram-negativním organismům, včetně methicilin-rezistentního kmene *Staphylococcus aureus* [74],[75]. Baktericidní schopnost ovlivňuje koncentrace oxidačního činidla [76], struktura textilie i její tloušťka [77].

Suchá tkanina oxycelulózy se aplikuje přímo do rány, není doporučeno ji předem zvlhčovat. Výhodou je snadná manipulace; tvar tkaniny je možné vystřížením přesně přizpůsobit tvaru krvácející rány, neulpívá na chirurgických nástrojích a je možné ji v ráně přidržet, dokud nedojde k nastartování hemostázy. Nízké pH způsobuje rozpad

červených krvinek, což se projeví hnědým zbarvením tkaniny při kontaktu s krví. Uvolněný hemoglobin pak reaguje s kyselinou a vzniká kyselý hematin [64].

Hemostatické působení oxycelulózy začíná absorpcí vody. V důsledku lehkého nabobtnání materiál vytváří tamponádu, která fyzicky brání dalšímu krvácení. Vlákná celulózy zachycují nejen vodu, ale také proteiny, trombocyty a další krevní buňky, čímž se vytváří gelová matrice důležitá pro zformování pevné fibrinové zátky bránící venóznímu i kapilárnímu krvácení. Účinnost hemostatika významně ovlivňuje hustota vláken a vzor tkané textilie [21],[13]. Měřením času hemostázy různých typů oxycelulóz se zabývala studie [21]. Hemostatika byla aplikována na krvácející řeznou ránu ve slezině Yorkshirského prasete *in vivo*. Čas hemostázy se pohyboval v rozmezí 3,7 – 5,9 minut v závislosti na počtu vrstev. Oxycelulóza může být použita u různých typů otevřených i endoskopických operací, např. laparoskopické parciální nefrektomie⁸ [78], cholecystektomie⁹ [79], sternotomie¹⁰ [80], traumat jater a sleziny [81],[82], dále v ušní/nosní/krční chirurgii [83], operací porodnicko-gynekologických [84],[85], urologických a ortopedických [86], a v plastické chirurgii [87]. Bývá také vkládána mezi poškozené tkáně a brání tak srůstům během hojení [23]. Oxycelulóza je účinná také u pacientů s poruchami krevní koagulace [23].

Oxycelulóza je obvykle dobře snášena. Nízké pH však blokuje funkci dalších biologicky aktivních hemostatik, především trombinu. Kyselá povaha tohoto hemostatika může navíc způsobit zánět okolní tkáně a zpomalovat proces hojení [88]. Při pH krve se oxycelulóza přirozeně degraduje. Biodegradace oxycelulózy v těle je založena na fagocytóze makrofágy, které obsahují hydrolytické enzymy schopné štěpit oligomery. Na konci procesu štěpení zůstávají pouze degradační produkty, tj. glukóza a glukuronová kyselina, které se nehromadí v krvi ani v moči [73],[89],[90]. Oxycelulóza se v těle rozpadne z 80 % do 14-ti dnů [73],[90], nicméně histologické studie [91],[92] dokazují přítomnost celulózových vláken i několik let po operaci srdce. Celulózová vlákna v tkáni granulují a při radiologickém nebo MRI zobrazování mohou být zaměněna s tumory [93],[94]. Další možnou komplikaci řeší studie [95],[96], kdy se oxycelulóza použitá při operaci hrudníku dostala přes meziobratlový otvor a způsobila kompresi míchy. Nedoporučuje se také aplikovat tato hemostatika v infikované ráně.

Tato práce zkoumá vlastnosti dvou oxycelulóz: Surgicel NuKnit a Surgicel Fibrillar. Obě hemostatika mají stejného výrobce Johnson & Johnson, Ethicon, nicméně liší se strukturou textilie, plošnou hustotou i tloušťkou [21]. Surgicel NuKnit má podobu síťoviny s hustým a silným úpletem. Používá se zvláště při laparoskopickém řešení traumat, sternotomií a chirurgii pevných orgánů [65]. Látka může být smotána a vložena i do úzkého perforovaného prostoru, zároveň tvoří podporu při šití rány [77]. Surgicel Fibrillar je netkaná textilie, která se strukturou podobá klasické vatové buničině. Je indikován k zástavě žilního krvácení, krvácení po lobektomii¹¹ nebo resekci tumoru [97], dále pro kontrolu krvácení při kraniotomii¹², laminektomii¹³ a angioplastice koronárních arterií [65].

⁸ chirurgické odstranění ledviny

⁹ odstranění žlučníku

¹⁰ řez prsní kosti

¹¹ odstranění plicního laloku

¹² chirurgické otevření lebky

¹³ odstranění zadní části páteřního obratle

3.2.2 Želatina

Želatina je přírodní a vstřebatelný materiál získaný částečnou hydrolýzou kolagenu, který je základem pojivových a vazivových tkání. Získává se ze zvířecích kůží hovězího, vepřového nebo koňského původu a mohou mít formu prášku, tenkého filmu nebo porézní pěny [98]. Do rány se aplikuje suchá nebo namočená ve fyziologickém roztoku [23]. Mechanismus účinku není zcela známý, nicméně předpokládá se, že želatinová pěna vytváří v ráně fyzickou matici a podporuje tím srážení krve [54],[98]. Želatinová pěna je schopná pojmout tělní tekutiny do několikanásobku své hmotnosti [23]. Porézní struktura navíc aktivuje agregaci trombocytů [23]. Po ukončení koagulační kaskády může plazma přes želatinovou matici stále procházet [54].

Želatinová hemostatika nachází uplatnění v zástavě kapilárního, žilního i arteriálního krvácení při různých chirurgických výkonech [65]. Výjimečná absorpční schopnost však může představovat i jisté riziko. Hemostatikum dokáže dvojnásobně zvýšit svůj objem, což může způsobit utlačení některých orgánů či nervů [64]. Nedoporučuje se tak aplikace u očních výkonů [65] a použití v infikované ráně [54].

Želatina je zcela absorbována obvykle do 6 týdnů od aplikace [23],[64]. Stejně jako oxycelulóza však může zanechávat v těle léze, které lze zaznamenat zobrazovacími metodami [99]. Ačkoliv je zvířecího původu, není antigenní. Na rozdíl od oxidované celulózy je její pH neutrální, proto může být použita i v kombinaci s trombinem a zásahem přímo do hemokoagulační kaskády podpořit vlastní hemostatický účinek [54].

Studovaným želatinovým hemostatikem je přípravek Gelita-Spon (Gelita Medical, GmbH, SRN). Jedná se o sterilní absorbovatelnou želatinovou pěnu, vyrobenou z čištěné vepřové želatiny. Je nerozpustná ve vodě, avšak absorpcí krve dokáže zvýšit svou váhu více než 40krát. Pokud je hemostatikum aplikováno suché, je potřeba jej lehce stlačit, přiložit na krvácející oblast a přidržet na místě 1 až 2 minuty [100].

3.2.3 Kolagen

Mikrofibrilární kolagen je přírodní, nedenaturovaný a vstřebatelný materiál získaný z hovězích šlach a kůží [23], může vykazovat antigenní potenciál a způsobovat různé alergické reakce. Nemá žádné bakteriostatické vlastnosti a představuje tak i jisté riziko infekce [54]. Může mít formu prášku, plsti i porézní houby [64].

Základní stavební jednotkou kolagenu je tropokolagen, složený ze tří polypeptidových řetězců, z nichž každý je tvořen asi tisícem aminokyselinových zbytků. Tyto levotočivé helikální řetězce jsou stočeny do pravotočivé trojitě šroubovice stabilizované vodíkovými vazbami a tvoří tzv. superhelix [101]. Strukturální složitost kolagenu je zdrojem velkého množství nejrozličnějších antigenů. Konce superhelixu jsou tvořeny telopeptidy, které jsou nositeli s největší druhovou variabilitou antigenů, proto jejich odstraněním můžeme imunogenní riziko snížit. Produkt enzymatické úpravy kolagenu, při němž dojde k odštěpení telopeptidů, se nazývá atelokolagen [88].

Kolagen se pevně lepí na povrch krvácející rány a dochází téměř k okamžité hemostáze. Absorpcí krve nijak výrazně nezvětšuje objem, nedochází k nežádoucímu utlačování okolních tkání. Krev obvykle přes hemostatikum dále neprosakuje, a i po zástavě krvácení kolagen zůstává ke tkáni pevně přichycen. Princip hemostázy je založen na vytvoření záchytné sítě pro krevní destičky, které mohou okamžitě zahájit svou aktivaci a urychlí se tím vytvoření trombu [54],[64]. Hemostáza obvykle nastane během 2 až 5 minut [64]. Jelikož mechanismus účinku souvisí přímo s aktivací destiček,

je kolagen méně účinný u pacientů postižených trombocytopenií¹⁴. Naopak velmi dobrá účinnost je u heparinizovaných pacientů. Používá se pro kontrolu parenchymatózního¹⁵ krvácení a při laparoskopických operacích [54],[64],[65]. Vysoká přilnavost kolagenu k vlhkému povrchu je zároveň nevýhodou; jednak ztěžuje manipulaci před aplikací do cílového místa [54],[64] a nežádoucí je též adheze k okolním nervovým strukturám v místě aplikace, způsobující bolest až znečítlivění [54].

Do naší studie byla zařazena vstřebatelná atelokolagenová hemostatická plst Hypro-Sorb R (Hypro s. r. o., Komárov, CZE). Jedná se o 99,9% krystalický hovězí atelokolagen typu I. Jeho interakce spočívá ve specifické aktivitě k trombocytům – indukuje uvolňování koagulačních faktorů, které spolu s faktory krevní plazmy vytváří fibrinovou zátku. Je indikován pro zástavu kapilárního a parenchymatózního krvácení (nikoliv však tepenného), ale také k výplni tělních dutin v chirurgii, stomatologii a traumatologii. Nesmí být aplikován mezi okraje řezných ran, kde může komplikovat srůstání kůže s následkem široké jizvy. Hypro-Sorb R se pokládá přímo na krvácející ránu a jemně se přitlačí. K hemostáze by mělo dojít během 2 až 5 minut [102].

3.3 Biologicky aktivní hemostatika

Biologicky aktivní hemostatika se díky vlastnímu obsahu koagulačních faktorů přímo účastní hemokoagulační kaskády. Jedná se o fibrinová a trombinová lepidla. Trombin je důležitý faktor krevního srážení, neboť hraje roli v přeměně rozpustného fibrinogenu na nerozpustný fibrin, základ krevní sráženiny [69]. Hlavním zdrojem je hovězí plazma a představuje tak vysoké riziko imunitní reakce [103],[104], proto byl vyvinut trombin z lidské plazmy a rekombinantní lidský trombin. Oba typy lidského trombinu mají srovnatelnou účinnost s hovězím trombinem, vykazují podstatně nižší imunogenitu [105],[106], ovšem nejsou stoprocentně neantigenní. U trombinu vyrobeného z lidské plazmy existuje potenciální riziko přenosu infekčních látek a anafylaxe¹⁶ a u rekombinantního lidského trombinu je riziko alergické reakce u pacientů citlivých na zvířecí proteiny (had, křeček) [65]. Trombin je plně degradovatelný a netoxický. Samotný trombin může být použit k zástavě krvácení z drobných cév v neurochirurgii a v žilní, srdeční, míšní, břišní a ortopedické chirurgii [107]. Není doporučen k systémové aplikaci z důvodu možné trombózy [23]. Obvykle se nepoužívá samostatně, ale v kombinaci s želatinou nebo kolagenem.

Fibrinová hemostatika patří spíše do skupiny tkáňových adheziv používaných k lepení tkání [23]. Kombinují dvě složky – lidský trombin s chloridem vápenatým v jednom aplikátoru a fibrinogen (z lidské plazmy) s aprotininem hovězího původu v dalším odděleném aplikačním systému. Mechanismus účinku je založen na podpoře přirozené fyziologické reakce srážecích faktorů, které katalyzují přeměnu fibrinogenu na fibrin, aktivaci a agregaci destiček, čímž dojde k urychlení lokální hemokoagulace. K iniciaci reakce nevyžadují krvácení a fungují i nezávisle na vlastním fibrinogenu pacienta [65]. Při aplikaci hemostatika spolu obě složky reagují za vzniku fibrinových koagulů. Mechanická pevnost lepidla je dána obsahem fibrinogenu a rychlost vytvoření zátky a její pevnost pak souvisí s koncentrací trombinu [64]. V porovnání se syntetickými lepidly je však adheze ke tkáním velmi slabá [108].

¹⁴ snížené množství krevních destiček v krvi

¹⁵ funkční epitelová tkáň orgánů

¹⁶ celková akutní alergická reakce

Fibrinová lepidla jsou biokompatibilní, biodegradovatelná řádově ve dnech až týdnech a nezpůsobují zánět. Používají se k zástavě plošného krvácení v kardiovaskulární chirurgii, žilního krvácení retroperitonea a vnitřních orgánů, durálního krvácení, krvácení v plicích, urologické a plastické chirurgii [64],[65],[109]. Fibrinová hemostatika jsou vyrobena z lidské plazmy, proto nesou potenciální riziko přenosu infekčních chorob (viry a priony). Pro výrobu mohou být použity i hovězí bílkoviny, čímž můžeme snížit riziko infekce, ale naopak zvýšit riziko alergické či anafylaktické reakce organismu [23],[65]. Nevýhodou je zdlouhavá a komplikovaná příprava lepidla před vlastní aplikací [109]. Tekutá forma lepidla vyžaduje k vlastní reakci suchý povrch, následná polymerizace složek je velmi rychlá. Naopak pevná forma fibrinového hemostatika (v kombinaci např. s kolagenem) vyžaduje pro polymerizaci kontakt s tekutinou (voda, krev, mozkomíšní mok) [110].

Studovaným biologicky aktivním hemostatikem je produkt TachoSil (Takeda Pharmaceuticals International GmbH, CHE). Jde o kombinaci lidského fibrinogenu a lidského trombinu nanesených v tenké vrstvě na kolagenovou plst. Použitý kolagen je koňského původu a vzhledem k potenciálnímu riziku imunitní reakce je zbaven imunogenních epitopů [111]. Svým složením kombinuje vlastnosti absorpčního hemostatika a tkáňového lepidla. Výsledkem by měla být tedy i rychlejší hemostáza, což bylo potvrzeno ve studii [112], kdy k zástavě krvácení došlo během 3 minut u 75 % pacientů ve srovnání s 33 % pacientů, u nichž byla použita konvenční hemostatická plst bez koagulačních faktorů. Dojde-li ke kontaktu hemostatika s krví, biologicky aktivní vrstva se rozpustí a dojde k uvolnění koagulačních proteinů, které zahájí polymerizaci fibrinu. Hemostáza je dosažena v okamžiku, kdy vytvořená fibrinová vrstva přilepí kolagenovou plst k povrchu rány, čímž se vytvoří fyzická bariéra blokující další ztráty krve. Hemostatikum je účinně enzymaticky degradováno, nicméně zbytky mohou v tkáni přetrvávat i po 12 měsících [111]. TachoSil může být aplikován u popálenin, při rekonstrukci kostí, v zubní a ortopedické chirurgii, ale také v kardiochirurgii, neurochirurgii a chirurgii vnitřních orgánů [111],[113],[114].

3.4 Syntetická tkáňová lepidla

Tkáňová lepidla jsou vyráběna na bázi syntetických polymerů; nejčastěji jde o polykyanoakryláty, deriváty polyetylenglykolu, polyuretany a kopolymery kyseliny glykolové a kyseliny mléčné [115]. Pro naši studii bylo vybráno lepidlo ze skupiny kyanoakrylátů, které jsou dnes již komerčně dostupné. Adhezivní vlastnosti kyanoakrylátů byly objeveny už roku 1959. Dnes jsou známé především jako tzv. sekundová lepidla pro jednoduché a pohotové lepení v domácnosti, ale také pro náročnější aplikace v automobilovém a stavebním průmyslu. Pro lepení biologických tkání v medicíně bylo poprvé použito v 60. letech [115] a díky rychlosti polymerizační reakce se stalo oblíbenou alternativou klasického chirurgického šití. Kapalné monomery kyanoakrylátu jsou vysoce reaktivní a při pokojové teplotě velmi rychle polymerizují bez potřeby použití katalyzátoru, vyšší teploty nebo tlaku. Přírodním spouštěčem reakce je vzdušná vlhkost obsažená v okolním prostředí. Vzhledem k přítomnosti nitrilové skupiny $-C\equiv N$, která má tendenci odčerpávat elektrony, je akrylátová vazba polarizována, čímž se stane náchylnější k nukleofilnímu¹⁷ ataku slabými bázemi, jakými jsou voda nebo aminy. Po zahájení reakce monomery kyanoakrylátu velmi

¹⁷ molekuly nebo ionty s volnými páry elektronů, které poskytují elektrofilu v chemické reakci za vzniku chemické vazby

rychle podléhají aniontové polymerizaci, viz podrobně kap. 5.5.1. Reakce je exotermní a její rychlost je nepřímo úměrná délce alkylového řetězce [116].

Základní monomer kyanoakrylátu má formu kapaliny s velmi nízkou viskozitou. Při kontaktu s vlhkou tkání polymerizuje a vytváří pevný film pojící přiložené vrstvy. Vytvořená zátka je hydrofobní a díky své nepropustnosti plní i antimikrobiální funkci [64],[65]. Adheze lepidla ke tkáni je zprostředkována kovalentními vazbami mezi kyanoakrylátem a funkčními skupinami bílkovin obsažených ve tkáni (např. aminy lyzinu). Pevnost vazby souvisí s délkou alkylového řetězce; kratší řetězce např. butylkyanoakrylátu tvoří pevnější síť než delší řetězce oktylkyanoakrylátu. Naproti tomu delší řetězce vytváří flexibilnější spoje a existuje menší riziko jejich polámaní než u křehčích kyanoakrylátů s kratšími řetězci. Od délky řetězce se odvíjí také doba degradace polymeru ve tkáni, při níž dochází k hromadění toxických degradačních produktů, které mohou způsobit zánět zabraňující normálnímu hojení rány [64]. Polymery jsou degradovány hydrolýzou, kdy se uvolňuje alkylykyanoacetát a formaldehyd [116]. Kyanoakryláty s delším řetězcem degradují pomaleji a riziko cytotoxické reakce organismu významně snižují. Kvůli vysokému riziku cytotoxicity bylo zcela upuštěno od použití metyl- a etyl-kyanoakrylátů [115].

Hlavní a klinicky prověřenou aplikací kyanoakrylátů je lepení povrchových řezů, ran a trhlin kůže, kdy poskytují rychlé, bezbolestné a kosmeticky efektivní řešení. Některé typy kyanoakrylátů mohou být použity při rekonstrukci cév, např. arteriovenózní zkraty nebo bypassy, ale také pro embolizaci cévních malformací [116]. Postupně byly nalezeny i další aplikace v různých oblastech chirurgie, avšak tyto možnosti jsou omezeny vzhledem k cytotoxicitě a karcinogenitě lepidla a značnému riziku zánětu tkáně s hrozcí nekrózou.

Do studie bylo zařazeno tkáňové lepidlo Histoacryl® (B. Braun, SRN). Lepidlo je vyrobeno z enbukrylátu (n-butyl-kyanoakrylát) a pro snadnější kontrolu naneseného množství obsahuje modré barvivo D&C violet č. 2. Přípravek je indikován k lepení ran s malým napětím z chirurgických řezů a jednoduchých traumaticky indikovaných kožních ran, sklerotizaci širokých varixů v jícnu a žaludečním fundu a fixaci herniových sítěk [117].

4 SPECIFIKACE POUŽITÝCH METOD A TECHNIKY

Stěžejní metodou pro zkoumání hemostatik v této práci je THz spektroskopie. Vzhledem k její experimentální povaze je u vzorků, které to umožňují, doplněna měření dalšími metodami pro adekvátní porovnání výsledků. Jedná se o metody impedanční spektroskopie, infračervené spektroskopie, Ramanovy spektroskopie a mikroskopické techniky. V následujících kapitolách jsou shrnuty základní principy použitých metod a specifikace měřicích přístrojů. K oddělení desetinných míst v měřených datech je u všech zařízení primárně nastavena desetinná tečka, podobně také u programového softwaru (Matlab, Statistica) použitého ke zpracování dat. Pro jednotné srovnání výsledků je tedy desetinná tečka zachována i u všech grafů v následujících kapitolách.

4.1 Terahertzová spektroskopie

4.1.1 TPS Spectra 3000

Pro měření v oblasti THz vln elektromagnetického spektra je použito zařízení TPS Spectra 3000 (TeraView, Ltd., UK), impulsní systém založený na obecném *pump-probe* principu generování a detekce THz vlnění pomocí fotovodivostní antény (GaAs). Základem je erbiem dopovaný vláknový laser, emitující femtosekundové impulsy o vlnové délce 780 nm s opakovací frekvencí 100 MHz a průměrným výkonem > 65 mW. Spektrometr je kompaktní a všechny optické komponenty tvoří uzavřený systém pro maximální zachování mechanické stability. Pomocí modulů lze spektrometr přizpůsobit pro transmisní měření, analýzu ATR nebo zobrazování v reflexním režimu. K měření lze využít spektrálního rozsahu 0,06 – 4 THz (2 cm^{-1} – 120 cm^{-1}), přičemž spektrální rozlišení je dáno typem skenování. Při standardním použití rychlého skenování s rychlostí 30 snímků za sekundu je možné dosáhnout spektrálního rozlišení až 32 GHz ($1,2 \text{ cm}^{-1}$). Optické zpoždění je řízeno rychle se pohybujícími zrcadly. Rychlejší sběr dat (až 100 skenů za sekundu) má za následek snížení SNR [118].

Jelikož je měření založeno na jednopaprskové konfiguraci, je nutné získat nejdříve odezvu pozadí, tedy referenci. Obr. 4.1 (a) uvádí srovnání naměřených THz signálů reference a studovaného vzorku Histoacrylu. THz signál může nabývat i záporných hodnot, neboť je monitorováno THz elektrické pole, nikoliv intenzita signálu jako u klasické spektroskopie. Rychlou Fourierovou transformací (FFT) získáme frekvenční spektrum signálů, viz Obr. 4.1 (b). Při vložení vzorku do dráhy THz vlny dojde jednak ke snížení úrovně signálu v důsledku absorpce vzorkem, ale také k posunu pozice maxima vlny souvisejícího s indexem lomu vzorku. Odpovídající absorpenci a index lomu měřeného vzorku uvádí Obr. 4.1 (c), resp. (d).

Vlastnosti vzorku lze vyvodit podle elektromagnetické teorie (viz rovnice (2.66)) z poměru elektrických intenzit THz vlny prošlé vzorkem $E_T(\omega)$ a THz vlny reference $E_I(\omega)$. Odvození materiálových parametrů u TPS Spectry vychází z rovnice (4.1), kde $T(n)$ jsou Fresnelovy ztráty v důsledku odrazů na rozhraních:

$$\frac{E_T(\omega)}{E_I(\omega)} = T(n)e^{\left(-\frac{ad}{2} + \frac{i n \omega d}{c}\right)} \quad (4.1)$$

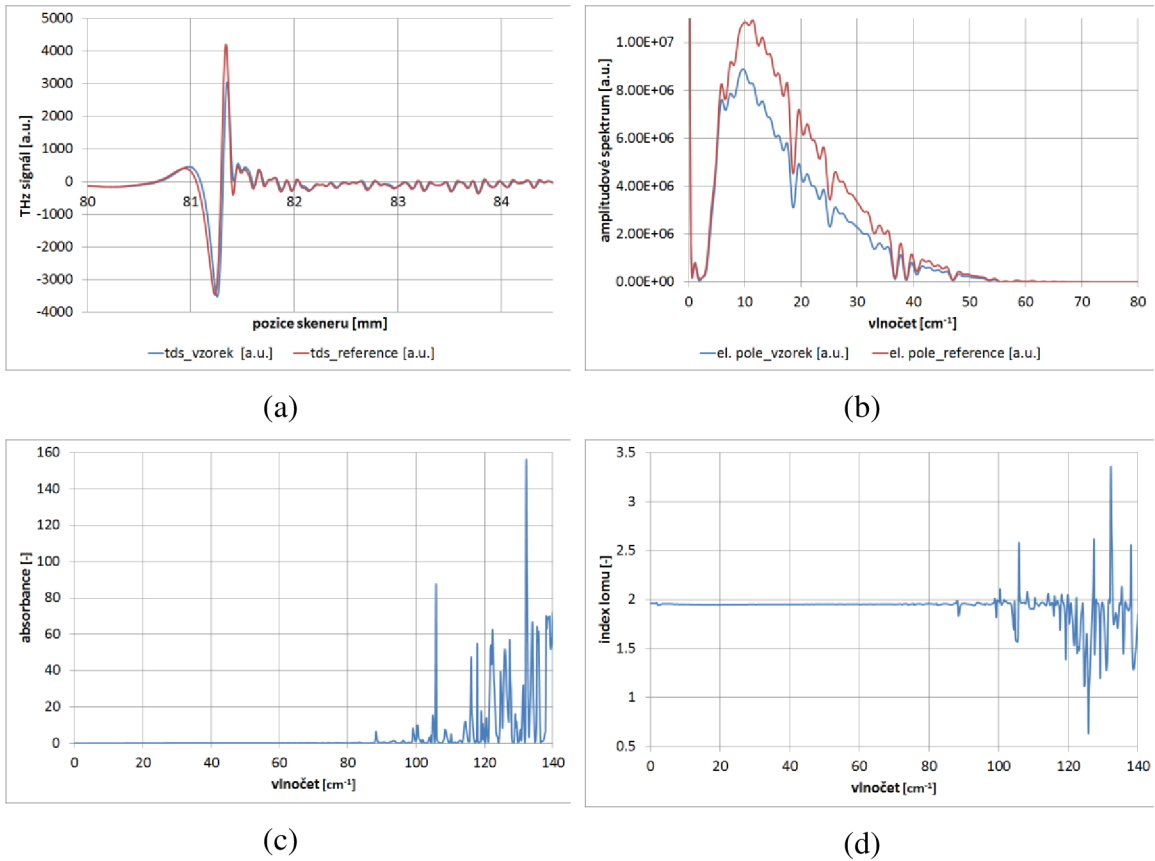
Uvažujeme-li $E_T(\omega)$ a $E_I(\omega)$ podle rovnic (4.2) a (4.3), kde A_S a A_{REF} jsou amplitudy elektrického pole THz vlny (reálná část FFT) a $\phi_S(\omega)$ a $\phi_{REF}(\omega)$ jsou fáze THz vlny (imaginární část FFT), pak lze určit absorpční koeficient α a index lomu n podle rovnic (4.4) a (4.5) [118]:

$$E_T(\omega) = A_S e^{i\phi_S(\omega)} \quad (4.2)$$

$$E_I(\omega) = A_{REF} e^{i\phi_{REF}(\omega)} \quad (4.3)$$

$$\alpha = -\frac{1}{d} 20 \log \left[\frac{A_S/A_{REF}}{T(n)} \right] \quad (4.4)$$

$$n = \frac{1}{d} \cdot \frac{c}{\omega} (\phi_S(\omega) - \phi_{REF}(\omega)) \quad (4.5)$$



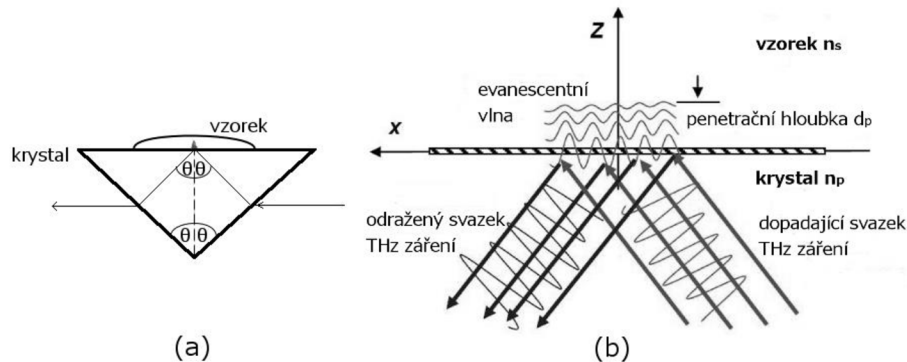
Obr. 4.1 THz signály reference, tj. ATR krystalu (ozn. červeně), a vzorku Histoacrylu po aplikaci na krystal (ozn. modře) (a) a z nich vypočtená spektra (b), absorbance (c) a index lomu vzorku (d).

Ve skutečnosti software TPS Spectry při hodnocení měřených dat s Fresnelovými ztrátami nepočítá [118]. Pokud má materiál relativně nízký index lomu, Fresnelovy ztráty mohou být zanedbány. Pro jednoduché srovnání: typické hodnoty n na THz frekvencích jsou např. u plastů v rozsahu $\langle 1,3; 2 \rangle$, u keramiky $\langle 2; 3 \rangle$ a u polovodičů kolem 3. U plastických hmot a keramiky α obvykle s frekvencí roste, a to díky rozptylu, neboť velikost zrněk a zachycených vzduchových kapes ($\sim 100 \mu\text{m}$) odpovídá přibližně vlnové délce vyšších THz frekvencí [26].

4.1.2 ATR modul

Pro účely našeho měření byla vybrána technika zeslabeného úplného odrazu ATR. Klasické transmisní měření nemohlo být realizováno hned z několika důvodů. Konfigurace dráhy svazku THz záření u TPS Spectry umožňuje transmisní měření pouze při vertikální poloze zkoumaného vzorku, což je pro měření kapalných vzorků nepraktické. Kapalným vzorkem je nutné umístit do kyvety nebo nanést na jiný podklad, čímž ale měníme původně jednovrstvý vzorek na vícevrstvý. Dráha THz vlnění prochází přes další rozhraní, což se více či méně (podle použitého podkladového materiálu) projeví na měřené odezvě a ztěžuje určení parametrů původně zkoumaného materiálu. Při použití podkladové vrstvy narážíme i na měnící se tloušťku vzorku v průběhu měření, stékání vzorku z podkladu atd. Těmto problémům se lze vyhnout použitím přídatného ATR modulu.

ATR umožňuje měření opticky tlustých vzorků s vyšším SNR než u transmisního měření; typicky se jedná o polární kapaliny [119]. Základem ATR modulu je krystal vyrobený z materiálu s vysokým indexem lomu, obvykle z křemíku nebo germania. V tomto případě je použit křemíkový krystal s indexem lomu 3,42 [118]. Křemík se používá pro své výjimečné vlastnosti; stálost, odolnost vůči chemickým sloučeninám, izotropii a výbornou propustnost THz záření s minimální disperzí vzhledem k vysokému měrnému odporu ($> 10 \text{ k}\Omega\cdot\text{cm}$) [120]. Měřený vzorek se nanáší horizontálně přímo na krystal. Díky malé měřicí plošce (kruh s průměrem 7 mm) stačí malé množství vzorku, který však musí být v těsném kontaktu s krystalem. Kapalně látky ke krystalu snadno přilnou, pevné látky je třeba zajistit dotažením šroubem [118].



Obr. 4.2 Optické schéma měření pomocí ATR metody (a) (převzato z [43]) a detail rozhraní krystal-vzorek se vznikem evanescentní vlny šířící se vzorkem (b) (převzato z [121]).

ATR vychází z principu úplného odrazu záření na fázovém rozhraní dvou látek s výrazně odlišnými indexy lomu. Měřený vzorek se nanáší přímo na měřicí krystal. Krystal má tvar lichoběžníkového hranolu (viz Obr. 4.2 (a)) a jeho důležitou specifikací je úhel dopadu na rozhraní, který odpovídá 35° [118]. Krystal je umístěn do dráhy THz svazku tak, aby na fázovém rozhraní krystal/vzorek došlo k jeho úplnému odrazu. Detekovaný svazek záření je kolineární se svazkem vstupujícím do krystalu; vložením krystalu tedy není nijak narušena dráha původního transmisního uspořádání [43].

Obdobně jako u transmisního a reflexního módu je změřena nejprve reference, poté vzorek. Měří-li se bez vzorku (rozhraní krystal/vzduch), dochází k úplnému odrazu za podmínky (4.6) [43], kde 2θ je vrcholový úhel krystalu a n_p jeho index lomu:

$$\sin \theta = n_p \sin \left(2\theta - \frac{\pi}{2} \right) \quad (4.6)$$

Pokud však na krystal aplikujeme zkoumaný vzorek, THz záření do vzorku částečně difunduje ve formě evanescentní vlny, viz Obr. 4.2 (b), a v důsledku absorpce na určitých frekvencích jsou pak tyto složky v detekovaném signále zeslabeny [36]. Evanescentní vlna pronikne vzorkem do určité penetrační hloubky d_p , která závisí na vlnové délce λ , indexech lomu vzorku n_s a krystalu n_p a úhlu dopadu na fázové rozhraní θ . Pro p-polarizovaný svazek platí (4.7) [122]:

$$d_p(\lambda) = \lambda \cdot \frac{n_p^2 n_s \cos \theta}{\pi(n_p^2 - n_s^2) \sqrt{(n_p^2 \sin^2 \theta - n_s^2)}} \quad (4.7)$$

Na rozdíl od transmisní techniky dráha průchodu vzorkem neodpovídá tloušťce vzorku, ale kopíruje exponenciální pokles intenzity elektrického pole [123]. Penetrační hloubka je obecně definována jako hloubka, při které poklesne intenzita elektromagnetické vlny šířící se materiálem na $\frac{1}{e}$ (37 %) původní hodnoty [124]. Na základě platnosti Lambert-Beerova zákona prakticky odpovídá $\frac{1}{\alpha}$, kde α je absorpční koeficient vzorku [122]. Evanescentní vlna pronikne do vzorku řádově pouze několik μm [124]. Pro p-polarizovaný svazek je hloubka vniku přibližně dvojnásobná ve srovnání s s-polarizovaným svazkem záření [122]. Hloubka vniku je závislá na frekvenci, resp. vlnočet; na nižších frekvencích dochází k hlubšímu průniku než na vyšších frekvencích, proto je absorpce na nižších frekvencích intenzivnější [124]. Následkem této frekvenční závislosti dochází k odchylce, která může být empiricky upravena korekcí $A_{corrected}(k) = \frac{ATR_{signal}(k)}{k_c}$ pro zachování korektnosti naměřených dat [122],[124], kde k_c je střední vlnočet pro normalizování absorpance $A(k)$.

Pro silně absorbující vzorky (typicky voda) však rovnice (4.7) přestává platit, protože dráha evanescentní vlny je srovnatelná s dráhou útlumu ve vzorku a detekovaný odražený signál není úměrný absorpčnímu koeficientu α [125]. Ovlivnit výsledky může také nedodržení minimální tloušťky vzorku, která musí být větší než penetrační hloubka evanescentní vlny [126].

Spektra z THz-ATR korespondují s výsledky transmisního měření, navíc však tato metoda skýtá i další výhody. Pro měření stačí i malé množství vzorku – u pevných látek 200 μg až několik mg, u kapalin okolo 1 ml [122]. Vzorky nevyžadují žádnou speciální přípravu, při měření nedochází k jejich degradaci a mohou být použity pro další analýzy. Některé pevné materiály, zejména práškové substance, se pro měření míchají s PE (polyetylen) nebo PTFE (polytetrafluoretylen) práškem a lisují do pelet [127]. Referencí je v takovém případě lisovaná tableta čistého PE nebo PTFE.

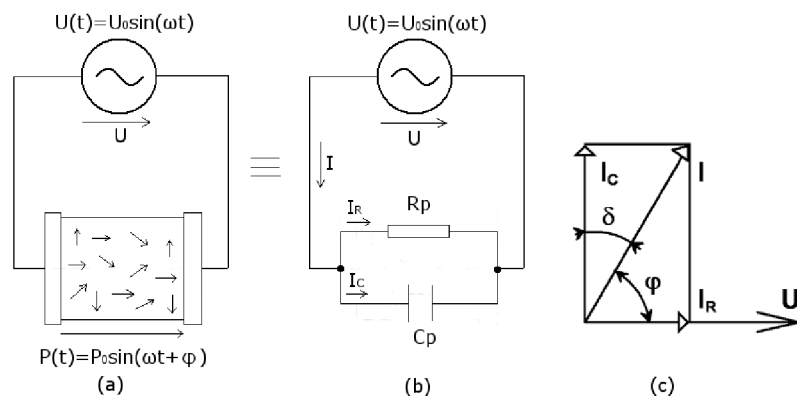
4.2 Dielektrická spektroskopie

Dielektrická spektroskopie (DS) je moderní nedestruktivní metodou umožňující charakterizaci elektrických i neelektrických vlastností materiálů souvisejících hlavně s jejich chemickým složením. DS tak stojí na pomezí elektrotechniky, fyziky, chemie i materiálového inženýrství, neboť aplikací vnějších elektrických podnětů zkoumá odezvu látky danou jejími vlastnostmi. Základní princip metody spočívá v nepřímém měření polarizace látky jako odezvy na změnu vnějšího elektrického pole. Zmíněné

polarizační vlastnosti lze měřit po aplikaci stejnosměrného i střídavého elektrického pole. Pomocí DS je možné zkoumat dynamiku vázaných i volných nábojů v materiálu (pevných látek i kapalin); může jít o ionty, polovodiče, smíšené elektron-iontové látky i dielektrika [128]. V tomto případě půjde o zkoumání dielektrik, což jsou ideálně látky, které obsahují pouze náboje vázané elektrostatickými silami. U reálných dielektrik se však vyskytují i náboje volné, způsobující nežádoucí vodivost. DS je zaměřena především na studium dielektrické polarizace, při níž jsou elektricky vázané náboje vychýleny ze svých rovnovážných poloh na krátké vzdálenosti působením vnějšího elektrického pole. U nepolárních dielektrik se indukují elektrické dipóly, u polárních dielektrik dojde k orientaci stávajících nábojů ve směru elektrického pole [128],[129].

4.2.1 Princip metody

DS spadá principiálně do oblasti impedanční spektroskopie, nicméně jejím zájmem není měření impedance látky, ale měření závislosti komplexní dielektrické permitivity materiálu na frekvenci nebo jiném parametru ovlivňujícím jeho vlastnosti (např. teplota, vlhkost, tlak). Dielektrická měření pro zjištění elektrochemického chování elektrolytů nebo vodičů jsou obvykle prováděna ve speciálně upravené cele, kde je vzorek vložen mezi dvě stejné elektrody. Pokud jsou však předmětem zkoumání chemické vzorky nebo živé buňky, není obvykle možné přesnou symetrii elektrod zachovat. Povaha experimentu může vyžadovat i přítomnost speciální atmosféry (vakuum, argon, kyslík). Měřicí aparaturu je tedy často nutné přizpůsobit specifickým požadavkům experimentu. Existují dva základní přístupy měření DS, a to v časové nebo frekvenční oblasti. Při DS v časové oblasti se na zkoumaný vzorek přivede elektrický stimul (skokové napětí, bílý šum, napěťový či proudový signál [128]) a sleduje se odezva časového průběhu proudu vzorkem. Naměřená data v časové oblasti lze převést pomocí Fourierovy transformace do frekvenční a naopak. Komplexní permitivita může být měřena v širokém rozsahu frekvencí 10^{-5} až 10^{11} Hz a umožňuje sledovat pomalé i rychlejší molekulární jevy [130], zároveň však vyžaduje různé měřicí techniky a odpovídající přístrojové vybavení. Základní zapojení paralelního obvodu pro měření permitivity materiálu uvádí Obr. 4.3.



Obr. 4.3 Schéma základního zapojení pro dielektrickou spektroskopii (a), ekvivalentní elektrický model charakterizující vlastnosti měřeného systému (b) [131] a fázový diagram (c) [129]. Schéma sestává ze zdroje střídavého napětí a dvou elektrod, které představují jednoduchý kapacitor. Střídavé napětí $U(t)$ způsobí polarizaci $P(t)$ vzorku dielektrika mezi elektrodami. Systém elektroda-materiál lze nahradit jednoduchým elektrickým modelem složeným z paralelního zapojení ideálního kapacitoru s kapacitou C_p a rezistoru s odporem R_p vyjadřujícím svodovou vodivost. Fázorový diagram zachycuje proudovou odezvu RC modelu při napájení harmonickým napětím. Ztrátový proud rezistorem I_R je ve fázi s přivedeným napětím U , což však neplatí pro nabíjecí proud kapacitorem I_C . Úhel φ představuje fázový posun napětí U a celkového proudu I , úhel δ je ztrátový a popisuje energetické ztráty na rezistoru.

Obvod je tvořen zdrojem střídavého napětí a elektrodami jednoduchého kondenzátoru, mezi nimiž je vložen vzorek dielektrika. Aplikujeme-li periodický napěťový signál $U(t) = U_0 \sin(\omega t)$, dochází k časově proměnné polarizaci vzorku $P(t)$. Existuje několik základních typů polarizace, které mohou být různě intenzivní, přičemž silnější jevy překrývají ty slabší. Podle druhu částice, která je uvedena do pohybu působením vnějšího pole, rozlišujeme obecně polarizaci elektronovou (vychýlení elektronů vůči jádru), atomovou (deformace atomu v molekule nebo mřížce) a orientační (molekuly polárních látek se chovají jako neuspořádané dipóly i bez přítomnosti elektrického pole, při jeho působení dojde k jejich orientaci) [132]. Molekuly dielektrika se snaží na oscilující pole co nejdříve reagovat. Odezva však nepřichází okamžitě a polarizace je vůči aplikovanému elektrickému poli fázově zpožděna o φ . Rychlost reakce se odvíjí od použité frekvence pole a také od složitosti a pevnosti struktury molekul, tj. uspořádání atomů (iontů) a vazbách mezi nimi. Polarizovatelnost prvku obecně roste s jeho atomovým číslem [133]. Logicky je polarizace elektronů rychlejší než atomová či orientační.

Podrobnější popis polarizace vychází z Maxwellových rovnic rozebraných v kap. 2.4.1. Lokální odezvu volných i vázaných nábojů popisují komplexní a frekvenčně závislé materiálové parametry; dielektrická permitivita $\hat{\varepsilon}$ a magnetická permeabilita $\hat{\mu}$ charakterizující elektromagnetické vlastnosti hmoty v makroskopickém měřítku, tedy polarizaci \vec{P} a magnetizaci \vec{M} média, viz rovnice (2.6) a (2.7). Dielektrická permitivita charakterizuje vlastnosti dielektrika při buzení harmonickým elektrickým polem. Matematicky představuje konstantu úměrnosti mezi fázory elektrické intenzity \vec{E} a indukce \vec{D} podle (4.8), její komplexní charakter popisuje rovnice (4.9), kde reálná složka ε' je relativní permitivita a imaginární složka ε'' ztrátové číslo:

$$\vec{D} = \hat{\varepsilon} \varepsilon_0 \vec{E} \quad (4.8)$$

$$\hat{\varepsilon}(\omega) = \varepsilon'(\omega) - i\varepsilon''(\omega) \quad (4.9)$$

Relativní permitivita charakterizuje schopnost dielektrika polarizovat se působením vnějšího stejnosměrného elektrického pole. Při působení střídavého pole zároveň dochází k energetickým ztrátám v důsledku absorpce energie materiálem. Orientace dipólů v materiálu je náhodná a dipólové momenty nestíhají reagovat na rychlé změny vnějšího elektrického pole. Imaginární složka tedy určuje míru ztrát v dielektriku vzniklých působením střídavého elektrického pole. Úroveň ztrátovosti materiálu můžeme popsat ztrátovým činitelem neboli disipačním (rozptylovým) faktorem D jako poměr energetických ztrát v dielektriku k celkové energii přenesené dielektrikem. Zároveň poměr odpovídá funkci tangens ztrátového úhlu δ podle (4.10):

$$D = \frac{\varepsilon''(\omega)}{\varepsilon'(\omega)} = \operatorname{tg} \delta \quad (4.10)$$

Z fázorového diagramu na Obr. 4.3 (c) lze odvodit, že $\operatorname{tg} \delta = \frac{I_R}{I_C}$, tedy $\operatorname{tg} \delta$ je roven poměru ztrátového proudu rezistorem I_R a nabíjecího proudu kapacitorem I_C

[131]. Pro proudové složky platí rovnice (4.11) a (4.12), kde R_p je odpor rezistoru [Ω], X_c je kapacitance kapacitoru [Ω] a C_p kapacita kapacitoru [F]:

$$I_R = \frac{U}{R_p} \quad (4.11)$$

$$I_C = \frac{U}{X_c} = \frac{U}{\frac{1}{\omega C_p}} = U\omega C_p, \quad (4.12)$$

Pomocí (4.11) a (4.12) lze odvodit další vyjádření D (4.13). Dosazením z (4.14) a (4.15) je možné dalšího zjednodušení D do tvaru (4.16) velmi výhodného pro praktické měření, neboť není závislý na geometrických parametrech vzorku, tj. vzdálenosti elektrod kondenzátoru d (tloušťka vzorku) [m] a ploše elektrod S [m²], ani vodivosti rezistoru G [S], ale závisí pouze na úhlové frekvenci, permitivitě ε [F.m⁻¹] a konduktivitě materiálu σ [S.m⁻¹]:

$$D = \frac{I_R}{I_C} = \frac{1}{\omega R_p C_p} \quad (4.13)$$

$$C_p = \varepsilon \frac{S}{d} \quad (4.14)$$

$$R_p = \frac{1}{G} = \frac{d}{\sigma S} \quad (4.15)$$

$$D = \frac{1}{\omega \frac{d}{\sigma S} \varepsilon \frac{S}{d}} = \frac{\sigma}{\omega \varepsilon} \quad (4.16)$$

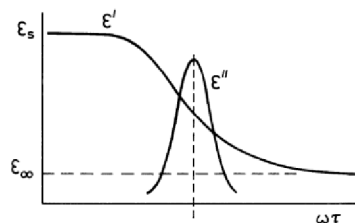
Dielektrická permitivita je časově (resp. frekvenčně) závislá vzhledem ke změnám uvnitř materiálu, tj. rezonanční jevy způsobené vibracemi atomů a molekul (elektronová a atomová polarizace) nebo relaxační jevy spojené s fluktuacemi dipólů (orientační polarizace). Díky setrvačnosti dipólů nepatří orientační polarizace mezi rezonanční jevy, ale jde o tzv. dielektrickou relaxaci. Relaxační děj lze charakterizovat relaxační časovou konstantou τ , která představuje dobu, za jakou dosáhne systém nového rovnovážného stavu po předchozím vybuzení a souvisí s relaxační frekvencí f_c [Hz] vztahem $\tau = \frac{1}{\omega_c} = \frac{1}{2\pi f_c}$. Tento proces je navíc teplotně závislý, neboť souvisí s viskozitou materiálu. S rostoucí teplotou se snižuje vnitřní tření v látce, což usnadňuje natáčení dipólů a roste polarizace dielektrika, tedy i ε .

Nejjednodušším modelem pro popis frekvenční závislosti permitivity pro jeden relaxační mechanismus spojený s reorientací dipólů je Debyeho model dle (4.17), kde ε_∞ a ε_s je permitivita vybuzeného a relaxovaného stavu:

$$\hat{\varepsilon}(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + i\omega\tau} \quad (4.17)$$

Obr. 4.4 znázorňuje obě složky $\hat{\epsilon}$ jako funkce kmitočtu $\omega\tau$ [134]. Na nízkých frekvencích mají dipóly dostatek času sledovat změny působícího elektrického pole a natáčet se do svých krajních poloh. Permittivita ϵ' dosahuje své maximální hodnoty ϵ_s , hustota náboje je maximální, energie je soustředěna v materiálu, polarizace se uplatňuje naplno a ztráty ϵ'' jsou úměrné frekvenci. Se vzrůstající frekvencí se však dipóly nejsou schopny vracet do původního stavu (relaxovat se) a polarizace se postupně zpomaluje. S dalším zvyšováním frekvence nestíhají dipóly reagovat na změny vnějšího pole a přestávají se podílet na celkové polarizaci. Pokles efektivní polarizace je charakteristický poklesem ϵ' a zároveň rychlým vzrůstem ztrátového čísla ϵ'' . Získaná energie je převáděna na teplo. Po dosažení relaxační frekvence již obě složky ϵ klesají, protože změny elektrického pole jsou příliš rychlé, orientační polarizace se utlumí. Pokles ϵ' začíná na úrovni ϵ_s , odpovídající součtu dipólové a vždy přítomné elektronové polarizace, a končí na úrovni ϵ_∞ , odpovídající jen elektronové polarizaci.

Debyeho model je jednoduchým teoretickým přiblížením pro základní pochopení jevu s jedním relaxačním časem. Reálné relaxační procesy je však složitější a zahrnují více relaxačních časů, proto vyžadují modifikaci modelu (např. Cole-Cole, Cole-Davidson, Havriliak-Negami) [43].



Obr. 4.4 Reálná ϵ' a imaginární část ϵ'' komplexní permittivity jako funkce kmitočtu $\omega\tau$ (převzato z [134]).

ϵ_s je nejvyšší úroveň (tzv. relaxovaná), které může dosáhnout ϵ' na nízkých frekvencích, kdy je polarizace maximální a dipóly dielektrika sledují změny vnějšího elektrického pole. Se zvyšující se frekvencí se však tato schopnost snižuje, až dosáhne úrovně nerelaxovaného stavu ϵ_∞ . Imaginární složka ϵ'' dosahuje při určité frekvenci svého maxima, jehož výška souvisí s intenzitou disperze [135].

4.2.2 LCR metr E4980A

Pro měření metodou DS byl použit automaticky vyvažovaný LCR můstek přístroje E4980A (Agilent Technologies, USA). Jedná se o precizní LCR metr, který umožňuje měření impedančních parametrů dvojpólových prvků v rozsahu frekvencí 20 Hz až 2 MHz [136]. Základní princip měření vychází z voltampérové metody, kdy se měří napětí i proud na svorkách vzorku a dále jejich fázový posun pro zjištění komplexní impedance.

4.3 Infračervená spektroskopie

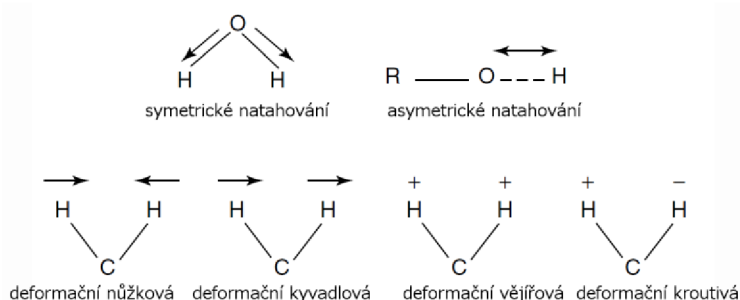
Infračervená (IR) spektroskopie je velmi užitečnou analytickou metodou umožňující studium téměř kteréhokoli vzorku v jakémkoli skupenství; s použitím vhodných technik a vybavení lze studovat kapalně roztoky, pasty, gely, prášky, tenké vrstvy, vlákna, plyny aj. [137]. Výhodami jsou možnost kvalitativní i kvantitativní analýzy a nedestruktivnost metody, neboť poskytuje informaci o složení vzorku, aniž by došlo k jeho poškození. Ačkoliv je IR spektroskopie používána ke zkoumání makroskopických vzorků, její podstata je založena na interakci molekul vzorku s IR zářením, které zaujímá v elektromagnetickém spektru rozsah vlnočtů přibližně od 14000

do 10 cm^{-1} (tj. $0,7\text{ }\mu\text{m} - 300\text{ }\mu\text{m}$), přičemž tuto oblast prakticky dělíme ještě na dalekou (FIR), střední (MIR) a blízkou (NIR). FIR oblast umožňuje sledovat vibrace slabých vazeb a vazeb těžkých atomů, v MIR oblasti se projevují základní vibrace a rotačně vibrační struktury malých molekul a v NIR oblasti dominují kombinační¹⁸ přechody a overtóny¹⁹ [138].

4.3.1 Princip metody

IR spektroskopie je založena na vibracích atomů při kontaktu IR záření s hmotou. Energie IR záření není dostatečná pro vyvolání excitačních přechodů elektronů, ale postačuje ke změnám rotačně vibračních energetických stavů molekuly. Celková energie molekuly E je tvořena 4 složkami: $E = E_{ele} + E_{vib} + E_{rot} + E_{trans}$, kde E_{ele} odpovídá energii přechodů elektronů v molekule, E_{vib} představuje vibrační energii molekuly získanou absorpcí záření, E_{rot} je rotační energie molekuly získaná absorpcí energie především v oblasti mikrovlnných frekvencí a E_{trans} je translační energie spojená s přeskupováním molekul v prostoru (tepelný pohyb částic) [139].

Z pohledu klasické fyziky můžeme vibrace popsat jako změny délek vazeb (natahování neboli *stretching*) nebo úhlů vazeb (ohýbání neboli *bending*). Změna délky vazeb může probíhat symetricky nebo asymetricky a lze je hromadně nazvat vibrace valenční. Při změně úhlů se jedná o vibrace deformační, které jsou podle způsobu prováděného vibračního pohybu dále členěny na rovinné (nůžkové neboli *scissoring*, kyvadlové) a mimorovinné (vějířové, kroutové), a to podle orientace vibrace vzhledem k rovině [137]. Uvedené typy vibrací znázorňuje Obr. 4.5.



Obr. 4.5 Typy vibrací vazeb molekul (převzato z [137]).

Směry deformačních vibrací jsou naznačeny ve vztahu k rovině dané rovinou papíru.

Vibrační energetické hladiny jsou kvantovány. Každý atom nebo molekula systému se v daném okamžiku nachází na jedné z těchto hladin. Ve větším shluku molekul budou jednotlivé atomy a molekuly rozloženy na různých energetických úrovních. Při každé interakci molekuly s IR zářením je kvantum energie buď emitováno, nebo absorbováno, a dochází ke změnám dipólového momentu molekuly. Pro většinu molekul odpovídají energetické rozdíly mezi kvantovými stavy oblasti MIR ($4000 - 400\text{ cm}^{-1}$), pro je nejčastěji využívanou oblastí pro spektroskopii nejrůznějších látek [139]. Obecně má každá molekula o N atomech $3N$ stupňů volnosti a může konat translační a rotační pohyb. Vibrace víceatomové molekuly už tedy představuje složitý kmitavý pohyb, který lze popsat součtem jednoduchých harmonických pohybů [138],[139].

¹⁸ současná excitace několika vibračních modů

¹⁹ excitace daného vibračního modu do vyšší excitované hladiny

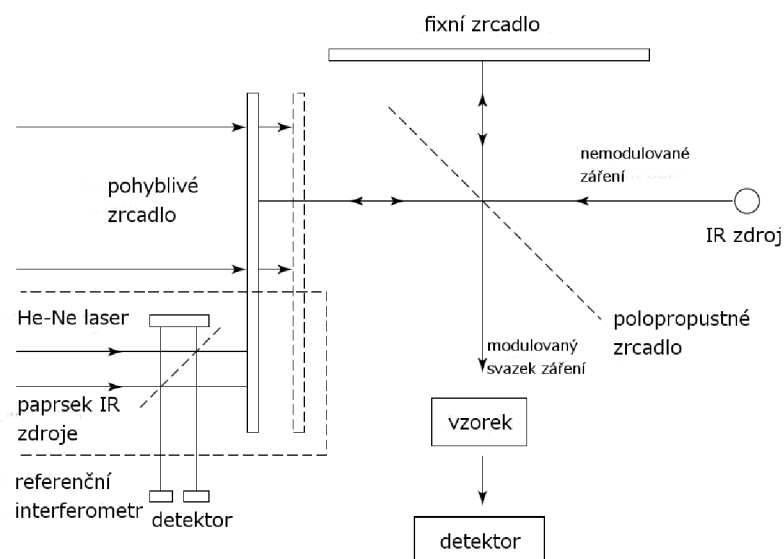
Při IR spektroskopickém měření jsou zjišťovány vlnočty, při kterých dochází k absorpci nebo emisi IR záření, a tím ke změně vibračního stavu molekul (vibrační přechod). Naměřené IR spektrum má podobu závislosti transmitance, absorpance nebo reflektance na vlnočtu či vlnové délce absorbovaného záření. Spektrum je tzv. pásové; jednotlivé absorpční pásy odpovídají různým vibračním přechodům. Vlnočtet absorbovaného záření odpovídá vlnočtu vibrace molekuly a absorbovaná energie se projeví zvýšením amplitudy vibrací.

MIR spektrum může být rozděleno na dvě hlavní části: oblast valenčních vibrací $4000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ a oblast deformačních vibrací (tzv. *fingerprint*) $1500 - 600 \text{ cm}^{-1}$. Oblast valenčních vibrací obsahuje charakteristické absorpční pásy funkčních skupin v molekule. V rozsahu $4000 - 2500 \text{ cm}^{-1}$ se nachází valenční vibrace vazeb vodíku (obecně X-H), u organických látek jde zejména o O-H, C-H a N-H. Volná vazba O-H obsažená hlavně v kapalných vzorcích se ve spektru projevuje jako široký pás kolem vlnočtu $3700 - 3600 \text{ cm}^{-1}$. N-H vazby se objevují v rozsahu $3700 - 3600 \text{ cm}^{-1}$ a mohou se s O-H vazbami vzájemně překrývat, jsou však ostřejší a bývají slabší. Do oblasti $3100 - 2850 \text{ cm}^{-1}$ se promítají C-H vazby. Mezi $2500 - 2000 \text{ cm}^{-1}$ můžeme pozorovat vibrace trojných vazeb $\text{C}\equiv\text{C}$, $\text{C}\equiv\text{N}$, avšak lze nalézt i absorpce skupin X-H, kde X představuje masivnější atom např. fosforu či křemíku. Oblast $2000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ obsahuje absorpční pásy dvojných vazeb $\text{C}=\text{C}$ a $\text{C}=\text{O}$. Vibrace karbonylových $\text{C}=\text{O}$ skupin jsou nejintenzivnější, zatímco $\text{C}=\text{C}$ vazby jsou slabší a nachází se v blízkosti 1650 cm^{-1} [137]. Analýza a interpretace absorpčních pásů v oblasti deformačních vibrací je složitější, neboť se nejedná o skupinové vibrace, ale vibrace ovlivněné přímo strukturou molekuly. I velmi malá změna ve struktuře molekuly se ve spektru silně projeví, nicméně soubor vlnočtů je pro každou sloučeninu velmi charakteristický. Vibrační spektrum molekuly je natolik unikátní pro daný typ molekuly, že umožňuje velmi dobrou identifikaci neznámé látky na základě srovnání jeho spektra s databází referenčních spekter [138].

4.3.2 FTIR spektroskopie

IR spektroskopie má počátky již ve 40. letech 20. století, kdy byly vyvinuty disperzní IR spektrometry [137]. Tyto systémy pracovaly na principu rozkladu (disperzi) světla pomocí monochromátoru a proces skenování celého rozsahu IR spektra byl velmi zdlouhavý. S rozvojem techniky v 80. letech byl tento problém překonán, neboť byly vyvinuty IR spektrometry s Fourierovou transformací (zkr. FTIR). FTIR spektroskopie je založena na interferenci záření mezi dvěma paprsky, jejímž výstupem je interferogram, tj. funkce měnící se délky dráhy mezi dvěma paprsky. Výsledné spektrum je získáno matematickou konverzí do frekvenční oblasti pomocí Fourierovy transformace [137]. Základní komponentou FTIR spektrometru je interferometr, měřící interferenci mezi dvěma paprsky. Schéma principu FTIR spektrometru s nejčastěji používaným Michelsonovým interferometrem je naznačen na Obr. 4.6. Světlo z IR zdroje dopadá na polopropustné zrcadlo. Zrcadlo polovinu záření odrazí a polovinu propustí. Paprsek odražený dopadá na další fixní zrcadlo, od kterého je odražen zpět k polopropustnému zrcadlu. Druhý paprsek (prošlý polopropustným zrcadlem) je zaměřen na pohyblivé zrcadlo, na kterém dojde také k odrazu zpět k polopropustnému zrcadlu. Pohyblivé zrcadlo způsobuje dráhový rozdíl mezi paprsky a díky tomu na polopropustném zrcadle dochází k jejich interferenci. Jsou-li vlny stejné vlnové délky ve fázi, tj. jejich dráhový rozdíl je celočíselný násobek vlnové délky, projevuje se konstruktivní interference a vlny se sčítají. Pokud není tato podmínka splněna, vlny jsou mimo fázi, dochází k destruktivní interferenci a vlny se odečítají. Rekombinovaný

paprsek je zaměřen na vzorek, se kterým interaguje a dopadá na detektor. Zrcadlo se pohybuje směrem k polopropustnému zrcadlu přes polohu nulového dráhového rozdílu a zpět, čímž vytváří výstupní vlnu interferogramu s proměnlivou amplitudou [140]. Poloha zrcadla je měřena pomocí referenčního laseru He-Ne, který určuje vzorkovací frekvenci signálu, neboť IR detektor snímá signál pouze v okamžiku, kdy sinusový referenční signál laseru prochází nulou.



Obr. 4.6 Schéma FTIR spektrometru (převzato z [137]).

Interferogram obsahuje kompletní spektrální informaci; zaznamenává signál, který je součtem všech konstruktivních i destruktivních interferencí na různých frekvencích, neboť na vstupu interferometru je polychromatické IR záření. V každé poloze pohyblivého zrcadla je získán jeden interferogram, který je Fourierovou transformací převeden na jednopaprskové spektrum, tedy závislost intenzity signálu na vlnočetu záření. Pohybem zrcadla jsou získány další interferogramy, které lze průměrovat a dosáhnout vyššího SNR. IR spektrum pak vznikne poměrem dvou jednopaprskových spekter, tj. podílem intenzity v každém bodě spektra vzorku a intenzity shodných bodů spektra pozadí.

4.3.3 Nicolet™ iS™50

Pro spektroskopickou analýzu vzorků v IR oblasti byl použit spektrometr Nicolet™ iS™50 (ThermoScientific, USA). Jde o klasický FTIR spektrometr, princip funkce odpovídá popisu v kap. 4.3.2. Spektrometr nabízí integraci modulů pro širokou škálu experimentů umožňující chemickou analýzu různých materiálů. Pro naše účely a adekvátní srovnání výsledků byl použit přídatný Smart iTR modul pro ATR měření.

Modul pro ATR je opět založen na principu totálního vnitřního odrazu, jak bylo vysvětleno v kap. 4.1.2. Zkoumaný vzorek se nanáší přímo na ATR krystal vyrobený z diamantu, který je dostatečně chemicky i mechanicky odolný. Zdrojem IR záření je Polaris™, polopropustné zrcátko je vyrobeno z KBr a pro detekci je použit DTGS KBr detektor. Vzorkování signálu zajišťuje He-Ne laser [141].

4.4 Ramanova spektroskopie

Stejně jako IR spektroskopie je i Ramanova spektroskopie užitečnou metodou pro analýzu vzorků v jakémkoli skupenství. Skýtá řadu výhod; jde o nedestruktivní metodu, která vyžaduje minimální nebo žádnou předchozí přípravu vzorku, měření jen minimálně ovlivňuje voda a nedochází k žádné interferenci s atmosférickým CO₂ a vodními parami. Technika je používána v mnoha aplikacích v oblasti chemie, biologie, geologie, farmakologie, analýzy materiálů a materiálových vad. Výsledky Ramanovy spektroskopie jsou často doplněny měřením v IR oblasti; zatímco IR spektrum odhaluje vibrace funkčních skupin a vysoce polárních vazeb, Ramanovo spektrum zachycuje vibrace páteřních struktur a symetrických vazeb [142].

4.4.1 Princip metody

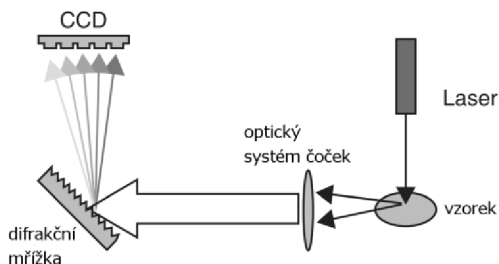
Ramanova spektroskopie je založena na tzv. Ramanově jevu nebo také Ramanově rozptylu, který byl poprvé experimentálně popsán indickým fyzikem C. V. Ramanem roku 1928. Pro jednoduché vysvětlení jevu uvažujeme monochromatickou vlnu jako tok fotonů, přičemž všechny mají stejnou energii danou $h \cdot f$. Při střetu fotonů monochromatického záření s molekulou látky může dojít obecně k absorpci, průchodu nebo rozptylu. Při rozptylu se velké množství fotonů odrazí do všech směrů bez ztráty energie, jde o tzv. elastický rozptyl, podrobně popsáný Rayleighem. Velmi malé množství fotonů však může interagovat s molekulou za výměny energie, dochází k tzv. neelastickému Ramanově rozptylu. Energie rozptýlených fotonů už není rovna $h \cdot f$ a vlnová délka rozptýlených fotonů bude vzhledem k excitační posunuta [143]. Pokud je frekvence rozptýleného záření menší než frekvence excitačního, pak se jedná o tzv. Stokesův rozptyl. Je-li frekvence rozptýleného záření vyšší, pak jde o anti-Stokesův rozptyl, který je obecně slabší než Stokesův [144]. Dle zákona zachování energie platí, že energetický rozdíl fotonů před a po srážce s molekulou musí odpovídat energetické změně molekuly, dochází tedy k přechodu mezi dvěma vibračními stavy [145].

V závislosti na typu molekuly můžeme v IR a Ramanově spektru pozorovat stejné, ale i odlišné vibrační přechody, obě techniky poskytují do jisté míry komplementární informaci. Vibrace související se změnou dipólového momentu molekuly se projeví v IR spektru, zatímco vibrace indukující změnu polarizovatelnosti molekuly zachycuje Ramanovo spektrum. V IR spektroskopii se vyjadřuje množství absorbovaného záření v jednotkách absorbance. Naopak intenzita rozptýleného záření je v Ramanově spektroskopii měřena jako množství rozptýlených fotonů detekovaných za sekundu. Jelikož tato hodnota závisí na mnoha vlastnostech měřicího zařízení, může být pro relevantní fyzikální interpretaci použito vyjádření pouze pomocí relativní intenzity v tzv. *arbitrary* jednotkách [a.u] nebo bývá měřítko zcela zanedbáno. Zatímco u IR spektroskopie koresponduje energie vibračního přechodu na určitém vlnočtu s frekvencí absorbovaného záření, v Ramanově spektroskopii odpovídá rozdílu frekvencí excitačního a rozptýleného záření (Ramanův posun) [145].

Intenzita rozptylu souvisí s výkonem excitačního laseru, polarizovatelností analyzované molekuly a excitační frekvencí laseru. Jelikož je rozptyl úměrný čtvrté mocnině excitační frekvence, obvykle se používají pro buzení zdroje UV záření [144], méně často i zdroje VIS či NIR záření [145]. V případě excitace pomocí UV záření se totiž v menší míře projevuje nežádoucí fluorescence než při použití VIS. Fluorescence vykazuje mnohem silnější aktivitu a dokáže slabší Ramanův rozptyl ve spektru zcela překrýt. Nevýhodou UV záření je však jeho absorpce řadou materiálů. Vysoká energie fotonů navíc představuje určité riziko degradace vzorku (až spálení) [144].

4.4.2 Techniky měření

Stejně jako u IR spektroskopie existují dvě možnosti uspořádání měřicí aparatury: disperzní spektrometr nebo spektrometr s Fourierovou transformací. Princip FT-Ramanova spektrometru je obdobný jako u FTIR (viz Obr. 4.6). Schéma disperzního Ramanova spektrometru je uveden na Obr. 4.7. Po excitaci zkoumaného vzorku laserem dochází k Ramanově rozptylu. Pro vytvoření Ramanova spektra je třeba rozložit naměřenou intenzitu Ramanova rozptylu na jednotlivé vlnové délky. Místo difrakční mřížky lze použít také sadu filtrů [144]. Rozptýlené záření se soustřeďuje soustavou optických čoček na difrakční mřížku, která jej rozloží na jednotlivé vlnové délky nebo vlnočty. Tato odezva je zaznamenána obvykle pomocí detektorů CCD [142].



Obr. 4.7 Schéma disperzního Ramanova spektrometru (převzato z [142]).

Moderní Ramanovy spektrometry jsou často kombinovány s mikroskopem a umožňují tak analýzu velmi malých vzorků nebo jejich částí. Pro excitaci vzorku se používají převážně lasery s kratší vlnovou délkou, jelikož prostorové rozlišení je omezeno difrakcí. V současnosti lze získat rozlišení $< 1 \mu\text{m}$ [144],[142]. Pro takové prostorové rozlišení je potřeba mít optický systém optimálně seřízen. Chceme-li zaměřit a analyzovat částici o velikosti $\sim 1 \mu\text{m}$, pak musí být optická dráha pro pozorování vzorku, excitační dráha laseru a dráha Ramanovsky rozptýleného svazku od vzorku směrem k detektoru zaměřeny do stejného bodu. Umístěním malé clonky před detektor do fokální roviny mikroskopu lze navíc využít výhod konfokální mikroskopie [144].

Systém pro Ramanovo zobrazování má většinou místo difrakční mřížky zakomponovány filtry pro výběr jednotlivých vlnových délek. Použitím filtru je vybráno a detekováno pouze záření v úzkém pásmu vlnových délek odpovídající významnému vibračnímu přechodu molekuly. Detektor zaznamenává obraz stejně jako při mikroskopickém snímání s tím rozdílem, že jsou sbírána data na vlnové délce odpovídající použitému filtru. Ramanův obraz je tedy snímkem dané oblasti vzorku pouze na konkrétní vlnové délce [144].

Při Ramanově mapování je s použitím pozičního zařízení vzorek postupně skenován a v každém bodě se měří Ramanovo spektrum. Pro zkoumanou vibraci můžeme zobrazit mapu měnící se intenzity Ramanova jevu ve vybrané oblasti vzorku [144]. Výhoda mapování spočívá ve změření celého spektra ve všech bodech, celý proces je v praxi velmi zdlouhavý. Metoda je užitečná hlavně při analýze heterogenních vzorků, např. při studiu rozložení účinné látky a přídavných látek v tabletě léčiva.

4.4.3 InViaBasis Raman mikroskop

Pro Ramanovu spektroskopickou analýzu byl použit systém InViaBasis Raman (Renishaw, plc., UK), který je kombinací Ramanova spektrometru inViaBasis a konfokálního mikroskopu Leica DM 2500 (Leica Microsystems, SRN). InViaBasis má funkční uspořádání typické pro disperzní spektrometr. Standardně je vybaven dvěma

excitačními zdroji: NIR diodovým laserem (785 nm, 300 mW) a argonovým iontovým laserem (514 nm, 20 mW). K odstranění excitačních vlnových délek laserů ze spekter jsou zařazeny filtry. Dle použitého typu excitačního zdroje je potřeba použít jinou difrakční mřížku: 1200 mm⁻¹ pro NIR oblast a 1800 mm⁻¹ pro VIS oblast. Výstupní signál zaznamenává CCD detektor [146].

4.5 Klasická světelná mikroskopie

4.5.1 Základní specifika metody

Klasická světelná mikroskopie je dnes natolik známá, že není třeba popisovat princip zobrazování. Mikroskopicky lze pozorovat tenké i opticky tlusté (neprůhledné) vzorky, a to přizpůsobením konstrukce mikroskopu na transmisní (průchod světla vzorkem) nebo reflexní (odraz světla od povrchu vzorku) režim snímání. Při tvorbě obrazu je bod v předmětové rovině zobrazen ideálně jako bod v obrazové rovině. Ve skutečnosti tomu tak není z důvodu přirozeně se vyskytujících vad optických prvků soustavy (hlavně objektivu) mikroskopu. Kvalita výstupního obrazu pak závisí na tom, jak dobře se podaří tyto nedokonalosti při výrobě nebo následném zpracování obrazu kompenzovat. Mikroskopická technika je v současnosti velmi vyspělá a umožňuje řadu modifikací pro speciální oblasti použití. Daří se tak pozorovat i předměty, u kterých bylo donedávna klasické zobrazení ve světelném poli problematické. Jedná se především o kontrastovací metody (tmavé pole, fázový kontrast, Hoffmanův modulační kontrast, polarizační a interferenční mikroskopie) a fluorescenční mikroskopii.

4.5.2 Optický mikroskop ZeissAxio Scope.A1

Pro základní transmisní zobrazení struktur vzorků byl použit mikroskop Axio Scope.A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, SRN). Mikroskop umožňuje nejen klasické pozorování ve světlém poli na průchod i odraz, ale také polarizační zobrazování vhodné pro zviditelnění dvojlomných vzorků. Mikroskop je vybaven objektivy pro zvětšení až 50x, polarizačními filtry a kamerou pro kontinuální snímání.

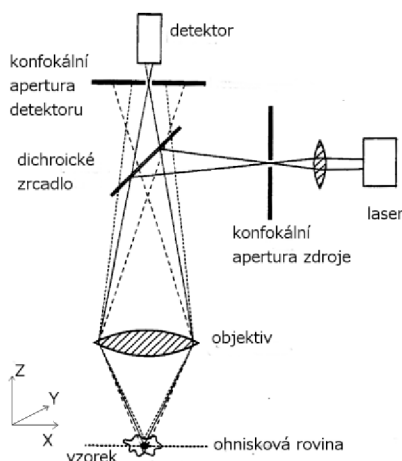
4.6 Konfokální skenovací mikroskopie

Konfokální mikroskopie dosahuje ve srovnání s ostatními metodami světelné mikroskopie mnohem vyššího kontrastu a rozlišení laterálního (až 0,25 μm) i axiálního (až 0,7 μm) [147] a umožňuje tak detailnější analýzu zkoumaných vzorků. Příčinou je odlišný princip expozice i sběru dat, který umožňuje snímat požadovanou oblast vzorku bodově a potlačit signál z oblastí mimo rovinu zaostření. Princip konfokálního zobrazování poprvé popsal Marvin Minsky roku 1955. Klíčovou myšlenkou konfokální optiky je projekce obrazu nasvíceného bodu ve vzorku na malou aperturu v konjugované ohniskové rovině. Světlo z osvětleného bodu projde konfokální aperturou a je detekováno, zatímco světlo z mimoohniskových struktur je zadrženo, čímž dojde ve výsledném obrazu ke zvýšení jak rozlišení, tak kontrastu [147].

4.6.1 Princip metody

Základní princip konfokálního mikroskopu v reflexním uspořádání je naznačen na Obr. 4.8. Excitačním zdrojem záření je obvykle laser, jehož výstup je upraven první

konfokální clonkou a úzký svazek záření je po dopadu na dichroické zrcadlo odkloněn na objektiv. Soustavou čoček objektivu je svazek zaměřen na požadovaný bod ve vybrané rovině vzorku. Průměr bodu odpovídá rozlišovací schopnosti objektivu (tzv. difrakční mez). Záření odražené z tohoto bodu se vrací přes čočky objektivu na dichroické zrcadlo, prochází přes druhou konfokální clonku a je detekováno citlivými fotonásobiči. Rozmítáním laseru ve směru os X a Y je bod po bodu a poté i řádek po řádku naskenován jeden řez vzorkem. Posunem vzorku ve směru osy Z jsou získány další 2D řezy vzorkem, což umožňuje následnou 3D rekonstrukci obrazu.



Obr. 4.8 Princip konfokálního mikroskopu v reflexním uspořádání (převzato z [148]).

Laserový svazek po průchodu konfokální aperturou tvoří téměř bodový zdroj záření, které je odraženo dichroickým zrcadlem a zaměřeno čočkou objektivu na zkoumaný vzorek. Záření odražené z fokusovaného bodu se vrací přes objektiv a dichroickým zrcadlem je propuštěno směrem k detektoru. Na detektor dopadne však jen záření, které projde konfokální clonou detektoru. Clony zdroje a detektoru jsou konfokální s fokusovaným bodem vzorku. Výsledný obraz 2D řezu vzorkem je vytvořen postupným skenováním bod po bodu v rovině XY.

Rozlišení u konfokálního mikroskopu lze popsat pomocí Rayleighova kritéria: obrazy dvou bodů jsou rozlišitelné, pokud centrální maximum Airyho disku prvního bodu leží v prvním minimu Airyho disku druhého bodu. Na rozlišení se však podílí i proces skenování a nastavení skenovacího zoomu, proto je důležité zohlednit také Nyquistův teorém [149]. Při Nyquistově vzorkování je optimální vzdálenost mezi sousedními pixely rovna polovině periody mezi dvěma rozlišitelnými detaily ve vzorku neboli pixel musí být alespoň dvakrát menší než nejmenší skenovaný detail ve vzorku. Pro každý objektiv existuje optimální nastavení clony, které je většinou možné softwarově zjistit a aplikovat.

4.6.2 Konfokální mikroskop Zeiss LSM 700

V této práci byl použit konfokální skenovací mikroskop typ LSM 700 (Zeiss, SRN). Základ tvoří mikroskop Axio Imager.Z2m, který je vybaven konfokálním skenovacím modulem LSM 700. Mikroskop Axio Imager.Z2m je klasický, světelný, plně motorizovaný mikroskop určený především pro materiálové aplikace. V kombinaci s konfokálním LSM 700 modulem umožňuje detailní 2D a 3D analýzu mikrostruktur různých povrchů. Pro fluorescenční měření je vybaven osvětlovacím LED systémem Colibri.2 (13 luminiscenčních diod kompletně pokrývá spektrum od ultrafialové po tmavě červenou oblast). Pro základní skenování vzorků byl použit laser s vlnovou délkou 405 nm.

5 STUDIUM VLASTNOSTÍ TKÁŇOVÝCH LEPIDEL

Předmětem tohoto experimentu je popis průběhu polymerizační reakce tkáňového lepidla na základě objektivního měření fyzikálními metodami, včetně charakterizace zesíťované struktury. Kinetika je sledována jednak v ryze laboratorních podmínkách, tj. bez přítomnosti biologických tekutin či tkání, a dále také v co nejpřirozenějších podmínkách běžného použití lepidla, tedy za přítomnosti živočišné tkáně. Mimo to bylo zkoumáno, zda má na chování lepidla vliv příměs olejové báze, jak bylo popsáno v několika literárních zdrojích. Ke sledování kinetiky polymerizace byly použity metody THz TDS, dielektrické a infračervené spektroskopie. Dynamická spektroskopická měření byla doplněna metodami klasické světelné mikroskopie, konfokální mikroskopie a Ramanovy spektroskopie k objasnění struktury lepidel a lepšimu porozumění průběhu reakce.

5.1 Příprava vzorků pro měření kinetiky lepidla

Pro experiment bylo vybráno tkáňové lepidlo Histoacryl, a to z několika důvodů: jako jedno z mála lepidel je na českém trhu povolené, je dostupné i bez lékařského předpisu a s jeho aplikací nejsou spojena žádná významnější rizika. Reakce lepidla s biologickou tkání je velmi rychlá, výrobce uvádí zatvrdnutí do 3 minut od aplikace [117]. V literatuře však existují informace o možnosti regulovat polymerizační čas reakce přidáním různých substancí jako oleje nebo kyseliny octové [3],[4]. V lékařské praxi se ke krátkodobému omezení tuhnutí Histoacrylu používá jeho smíchání s přípravkem Lipiodol (etyljodidovaný olej), kontrastní látka používaná v radiografii ke zvýšení kontrastu při zobrazení tkání a selektivnímu zvýraznění cév při zobrazování tumorů [150],[151]. Základem přípravku je čistý makový olej, do něhož je přidán jód jako hlavní kontrastní složka. Pro experimentální měření byla použita právě olejová složka Lipiodolu, tedy panenský makový olej. Byly připraveny nejen vzorky čistého lepidla, ale také směsi lepidla s makovým olejem (Solio) v poměru 3:1 (75 obj. % Histoacrylu a 25 obj. % oleje), 1:1 (50 obj. % Histoacrylu a 50 obj. % oleje) a 1:3 (25 obj. % Histoacrylu a 75 obj. % oleje). Podle obsahu složky lepidla jsou směsi pojmenovány mix75, mix50 a mix25. Míchání směsí probíhalo mikropipetou v mikrozkuhavce; lepidlo bylo opatrně vmícháno do oleje, aby byla omezena tvorba vzduchových bublin.

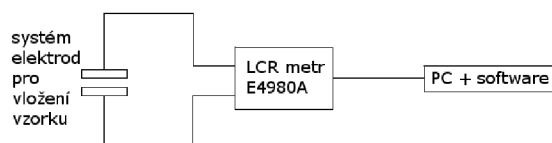
Pro experiment sledující reakci lepidla s biologickou tkání byly připraveny vzorky svalové tkáně prasete (plec) s rozměry přibližně 7x7 mm a tloušťkou 2 mm. Za účelem přiblížit se co nejvíce vlhkosti přirozeně prokrvené tkáně v laboratorních podmínkách byly vzorky tkáně uchovány ve fyziologickém roztoku při pokojové teplotě.

5.2 Dielektrická spektroskopie

Dielektrickou spektroskopií byla sledována pouze reakce samostatného lepidla a jeho směsi s olejovou složkou. Reakce s tkání není realizovatelná z důvodu vysoké vodivosti tkáně, která způsobí přemostění vlastní reakce lepidla.

5.2.1 Metodika měření

Blokové schéma použité aparatury pro dielektrická měření je uvedeno na Obr. 5.1. Zkoumaný vzorek byl nanesen mezi dvě elektrody, které jsou propojeny s LCR metrem. Měřená data jsou přes GPIB kabel posílána k online zpracování a záznamu do souboru pomocí programu vytvořeného v softwarovém prostředí Agilent VEE Pro, ver. 9.2.



Obr. 5.1 Blokové schéma použité měřicí aparatury pro dielektrickou spektroskopii.

Reálné zapojení měřicího pracoviště uvádí Obr. 5.2. Pro měření byly použity dvě válcové elektrody o stejném objemu, přičemž spodní elektroda má průměr kruhové podstavy 55 mm a výšku 28 mm a horní elektroda průměr 40 mm a výšku 53 mm. Na elektrody nejsou při měření kladeny žádné zvláštní nároky, proto nebyl k výrobě použit drahý kov, ale slitina železa, které je chemicky i fyzikálně dostatečně stálé a odolné. Robustní provedení elektrod zajišťuje dobrou tepelnou kapacitu a lépe tak udrží optimální teplotu i po delší dobu měření.

Před realizací finálního experimentu proběhla celá řada přípravných měření, neboť bylo nutné vzít v úvahu mnoho okolností. Z důvodu silných adhezivních vlastností měřeného vzorku a omezení znečištění elektrod byl nejprve vzorek nanášen mezi dvě vrstvy tenké hliníkové fólie vložené mezi elektrody. K zamezení přímého kontaktu vodivých ploch byly vrstvy vodivé fólie navzájem odděleny tenkou parafinovou vrstvou s malým okénkem pro vzorek. Z důvodu vložení dalších vrstev však samotné měření síťovací reakce ovlivňovaly nežádoucí parazitní jevy spojené s nerovnoměrným přilnutím vzorku k různým vrstvám, a tím nemožnost dodržet srovnatelné podmínky měření. S cílem zajistit rovnoměrné rozložení a tloušťku vzorku byla prověřena možnost aplikovat vzorek přímo na spodní elektrodu, která byla opatřena izolační vrstvou ve formě pevně přilnuté tenké vrstvy vosku s jednotně definovaným otvorem pro nanesení vzorku. V tomto případě se však objevil zásadní problém s blokováním přirozené síťovací reakce lepidla z důvodu nedostatečného přístupu okolního vzduchu (a tedy i vlhkosti) díky utěsnění vrstvou vosku.

Dalším kritériem, které bylo nutné vzít v úvahu pro co nejpřirozenější průběh síťování lepidla, byla také tloušťka vrstvy lepidla. Při běžném lepení tkání stačí malé množství lepidla, které je následně přitlačením spojovaných tkání rozprostřeno do velmi tenké vrstvy. Pokud by byla při měření vrstva příliš silná ($> 0,2$ mm [152]), síťování by probíhalo mnohem déle, řádově i desítky minut, což se neshoduje s popisem přirozených vlastností lepidla deklarovaným výrobcem.

Analýzou nedostatků předchozích přípravných měření byl stanoven postup výsledného experimentu, který se jevil jako nejvhodnější pro srovnání výsledků se závěry ostatních metod. Pro eliminaci parazitních vlastností rozhraní materiálů a nežádoucích jevů rušících měřený signál byly použity holé elektrody. Systém elektrod byl umístěn na nevodivé podložce a horní elektroda opatřena po obvodu nevodivým obalem z důvodu nežádoucího rušení při manipulaci s ní. K izolaci elektrod byla použita tenká lepicí polypropylenová fólie o tloušťce 40 μm . Pro zajištění dostatečného přístupu okolní vlhkosti byl vzorek nanesen blíže okraji elektrody s izolační vrstvou upevněnou na spodní elektrodě na druhé straně vzorku (viz detail na Obr. 5.2 (b)).

Samotné měření probíhalo za pomoci vytvořeného automatizovaného programu *DS_AgE4980A_1k_10k_100k.vee*. Vzhledem k tomu, že jde o měření v čase, je potřeba nepřetržitý zápis naměřených hodnot disipačního faktoru do souboru. Program obsahuje zvukovou signalizaci usnadňující provedení jednotlivých úkonů v definovaném čase. Po 5 sekundách od spuštění měření byl na spodní elektrodu nanesen vzorek lepidla o celkovém množství 2 μl a po dalších 5 sekundách přiklopen horní elektrodou.

Sledovaným parametrem byl disipační faktor, který je jednoduše interpretovatelný a pro měření velmi užitečný, neboť nezávisí na geometrických parametrech vzorku (u kapalného vzorku lze velmi obtížně podchytit), ale pouze na úhlové frekvenci, permitivitě a konduktivitě materiálu (viz kap. 4.2.1). Budícím vstupem byl sinusový signál s amplitudou 1 V a frekvencí 1 kHz, 10 kHz a 100 kHz.

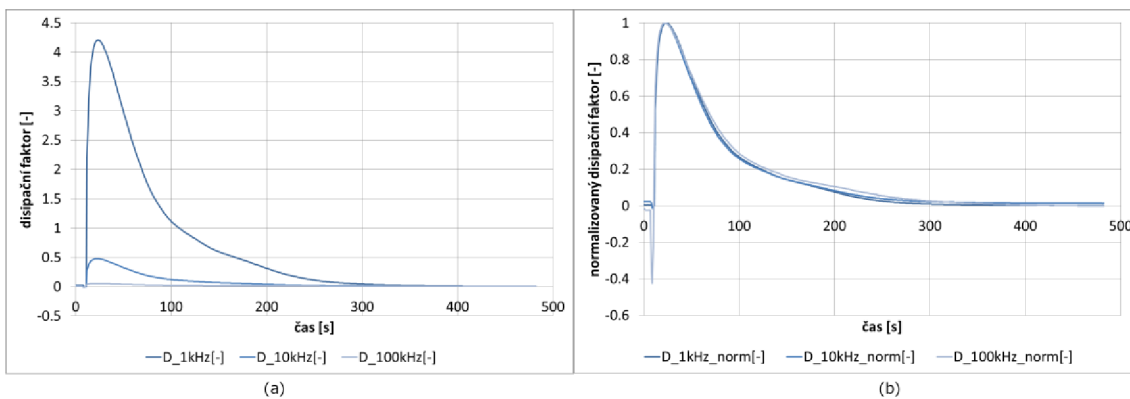


Obr. 5.2 Reálné zapojení měřicího pracoviště pro dielektrickou spektroskopii (a) a detail systému elektrod pro vložení vzorku (b).

5.2.2 Zpracování dat

Naměřená data byla programem automaticky zapisována do textového souboru *vzorek_xy.txt*, kde *xy* je číslo vzorku. Měřené frekvence (1 kHz, 10 kHz a 100 kHz) byly zvoleny z oblasti, kde se projevují rezonanční polarizace dielektrických materiálů. Naměřené křivky disipačního faktoru v čase $D(t)$ pro vzorek čistého Histoacrylu uvádí Obr. 5.3 (a) a stejné průběhy $D_{norm}(t)$ normalizované na interval 0 až 1 Obr. 5.3 (b) podle rovnice (5.1), kde D_{min} a D_{max} jsou minimální a maximální hodnoty D :

$$D_{norm}(t) = \frac{D(t) - D_{min}}{D_{max} - D_{min}} \quad (5.1)$$

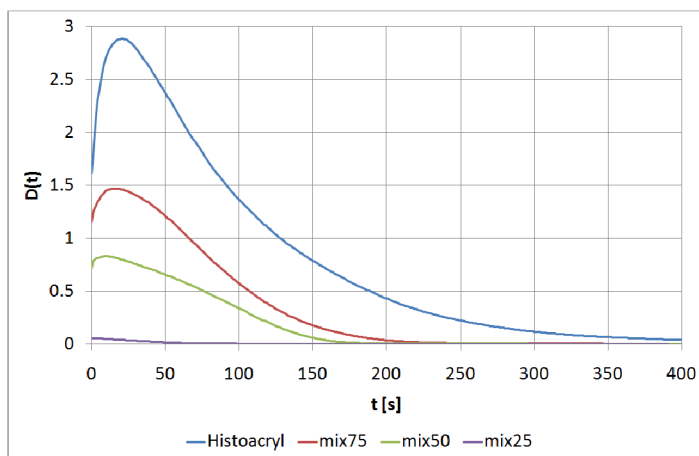


Obr. 5.3 Naměřené časové závislosti disipačního faktoru vzorku Histoacrylu (hist_1) na 3 různých frekvencích (a) a odpovídající normalizované průběhy v intervalu 0 až 1 (b). Překmit v grafu (b) není brán v úvahu, neboť jde o chybu měření způsobenou při aplikaci elektrody.

Pro všechny tři frekvence lze pozorovat téměř identické průběhy jen s drobnými odchylkami, proto pro další analýzu dat byla vybrána frekvence 1 kHz. Programem *ds_2017_07_20.m* byly naměřené $D(t)$ na frekvenci 1 kHz zpracovány do tabulky. Výsledkem je série souborů *vzorek_data.xls*, v nichž byl dále ručně proveden ořez dat od okamžiku přiklopení elektrody (záložka *tab*).

5.2.3 Charakteristika dat

První náhled chování jednotlivých vzorků ukazuje Obr. 5.4. Zobrazené průběhy jsou zprůměrovány z dat obsažených v souborech: hist_data1.xls, mix75_data.xls, mix50_data.xls a mix25_data.xls. Síťování kyanoakrylátu je silně exotermická reakce a ihned po aplikaci začne růst teplota vzorku [153]. Rostoucí teplota způsobí pokles rezistivity vzorku, resp. zvýšení jeho konduktivity [154], s čímž souvisí nárůst $D(t)$. Vyšší teplota sice urychluje počáteční fázi síťování, avšak po určité době dosáhne svého maxima. V důsledku mohutné polymerizace se zvyšuje viskozita vzorku, čímž dojde k poklesu konduktivity, a tím i $D(t)$, který předtím dosáhne svého maxima a poté klesá na konstantní úroveň signalizující ukončení síťovací reakce.



Obr. 5.4 Přehled zprůměrovaných naměřených časových závislostí disipačního faktoru $D(t)$ u vzorků Histoacrylu a jeho směsí.

U vzorků čistého Histoacrylu je zřejmý typický průběh síťovací reakce popsany výše, tj. počáteční exponenciální růst křivky $D(t)$, dosažení maxima a následný pokles na konečnou konstantní úroveň. S přibývajícím množstvím oleje ve vzorku však počáteční nárůst křivky postupně mizí. Jak popisuje rovnice (4.16), D souvisí s konduktivitou σ a permitivitou ϵ měřeného vzorku, tvořeného směsí dvou látek s různými charakteristikami. Zatímco ϵ makového oleje je 3,55 (na 1 kHz [155]) a je v rámci celého měření neměnná, ϵ kyanoakrylátových lepidel se pohybuje v rozsahu přibližně 1 až 3,5 (na 1 kHz, po vytvrzení [156],[157]). Na rozdíl od oleje není ϵ lepidla v průběhu měření konstantní a bude tedy významně ovlivňovat celkovou ϵ vzorku. Na začátku měření je lepidlo v tekutém stavu, hodnota ϵ je nejvyšší a síťováním se postupně blíží k výše uvedeným hodnotám pro úplné vytvrzení. Vzhledem k silné teplotní závislosti ϵ však dochází při zahřívání vzorku ještě k jejímu krátkodobému nárůstu obdobně jako u měřeného $D(t)$ [154].

Na celkové σ vzorku se budou rovněž podílet obě složky, i když přítomný olej má několikanásobně nižší rezistivitu ve srovnání s vytvrzeným kyanoakrylátem. Zatímco rezistivita olejů se pohybuje řádově v jednotkách $10^6 \Omega \cdot \text{cm}$ [158],[159], rezistivita kyanoakrylátů je mnohem vyšší, řádově 10^{12} až $10^{16} \Omega \cdot \text{cm}$ v zaschlém stavu [157],[160],[161]. Lze však předpokládat, že u tekutého vzorku, v němž je dostupné velké množství volných iontů, nabývá σ vysokých hodnot, které se mohou podstatně lišit od uvedených hodnot σ u zaschlého kyanoakrylátu. Z grafu na Obr. 5.4 je zřejmá také odlišnost výchozích hodnot D pro naměřené průběhy jednotlivých vzorků. U čistého lepidla dosahují počáteční hodnoty D v maximu 1,5 – 4,5, u směsí mix75 pak 0,8 – 2, pro mix50 0,3 – 1,3 a mix25 0,02 – 0,12. S větším množstvím oleje ve vzorku se významně snižuje i celkový rozsah hodnot D .

Z měření vyplývá, že olej významně blokuje zahřívání vzorku lepidla při síťování a jistým způsobem tak brání přirozenému průběhu reakce. Této skutečnosti se v praxi využívá například při výrobě kosmetických laků na nehty na bázi kyanoakrylátů, do kterých se přimíchává jojobový nebo avokádový olej s cílem zabránit podráždění pokožky vysokou teplotou [162].

Následné modelování bylo zaměřeno pouze na druhou část křivky, která je společná všem vzorkům a koresponduje s průběhem síťovací reakce. Větší množství oleje ve vzorku lepidla způsobuje postupné vymizení vzestupné hrany u měřených průběhů $D(t)$, která je spojena s nárůstem teploty při rychlé inicializaci síťovacího procesu (vazba OH^- na monomery), jak bylo popsáno výše.

5.3 Terahertzová spektroskopie

THz spektroskopie byla použita pro oba typy experimentů, tj. sledování vlastní reakce lepidla a jeho směsi a také reakce lepidla s živočišnou tkání. Část dat experimentální práce byla naměřena v rámci pobytu na Institutu optoelektroniky Wojskovej Akademie Technicznej ve Varšavě.

5.3.1 Metodika měření

Pro zkoumání kinetiky lepidel byl použit ATR modul s vestavěným křemíkovým krystalem. Měření probíhalo v rozsahu vlnočtů $2 \text{ cm}^{-1} - 120 \text{ cm}^{-1}$ ($0,06 - 4 \text{ THz}$). Měření probíhalo v klimatizované místnosti při teplotě (23 ± 1) °C a relativní vlhkosti (37 ± 2) %. Všechna měření probíhala za odčerpávání vodních par z komory spektrometru pomocí vakuové pumpy.

Před každým vzorkem bylo změřeno pozadí, tj. referenční signál bez přítomnosti vzorku. Poté byl na krystal nanesen vzorek lepidla nebo jeho směsi v množství $2 \mu\text{l}$ a přiklopen závažím pro vytvoření tenké vrstvy vzorku. Jako závaží byla použita horní elektroda z dielektrické spektroskopie a pro zajištění stejné tloušťky vzorku ($40 \mu\text{m}$) byla vložena tenká lepící polypropylenová fólie. Po měření byl krystal důkladně zbaven nečistot pomocí acetonu a dočištěn pomocí isopropylalkoholu. Pro zajištění dostatečného přístupu okolní vlhkosti byla elektroda umístěna tak, aby svou okrajovou částí překrývala krystal. Měření reakce probíhalo v čase zcela automatizovaně. Nastavení spektrometru bylo potřeba optimalizovat tak, aby skenování probíhalo přiměřeně rychle ovšem při zachování dobrého SNR. Kvůli vysoké početní náročnosti, která by značně prodlužovala čas měření, bylo upuštěno od výpočtů ATR parametrů (index lomu, ATR spektra aj.) a byla měřena pouze surová data ve formě THz signálu, která však obsahují veškeré důležité informace o měřeném objektu.

V případě sledování reakce lepidla s živočišnou tkání byl na vzorek lepidla aplikován vzorek tkáně a následovalo přiklopení elektrodou, která byla vyzdvižena polypropylenovou podložkou o tloušťce $2000 \mu\text{m}$, aby nedošlo k úplnému vytlačení vzorku lepidla z krystalu vlastní vahou elektrody. Tento experiment byl realizován také na pracovišti ve Varšavě. Ačkoliv bylo použito identické zařízení TPS Spectra 3000 stejného výrobce, přístroj nebyl schopen automatizovaného měření v čase s požadovanými parametry. Měření bylo spouštěno manuálně za současného sledování času. Po přiklopení elektrody bylo zahájeno měření síťovací reakce lepidla na krystalu. THz odezva byla změřena ihned po přiložení elektrody, dále po 15 sekundách do 2 minut od zahájení měření, následně každých 30 sekund do 5 minut od zahájení měření a

poté každých 60 sekund do ukončení měření. Nastavené parametry měření jsou uvedeny v Tab. 5.1.

Tab. 5.1 Nastavené parametry pro ATR měření kinetiky lepidla na přístroji TPS Spectra 3000.

Parametr měření	Hodnota
Počet skenů	30
Rozlišení (vlnčet)	1,2 cm ⁻¹
Frekvence skenování	30 s ⁻¹
Doba vytvoření 1 finálního skenu	1,44 s
Počet opakování	automatické měření / manuální spuštění měření v daných časových intervalech

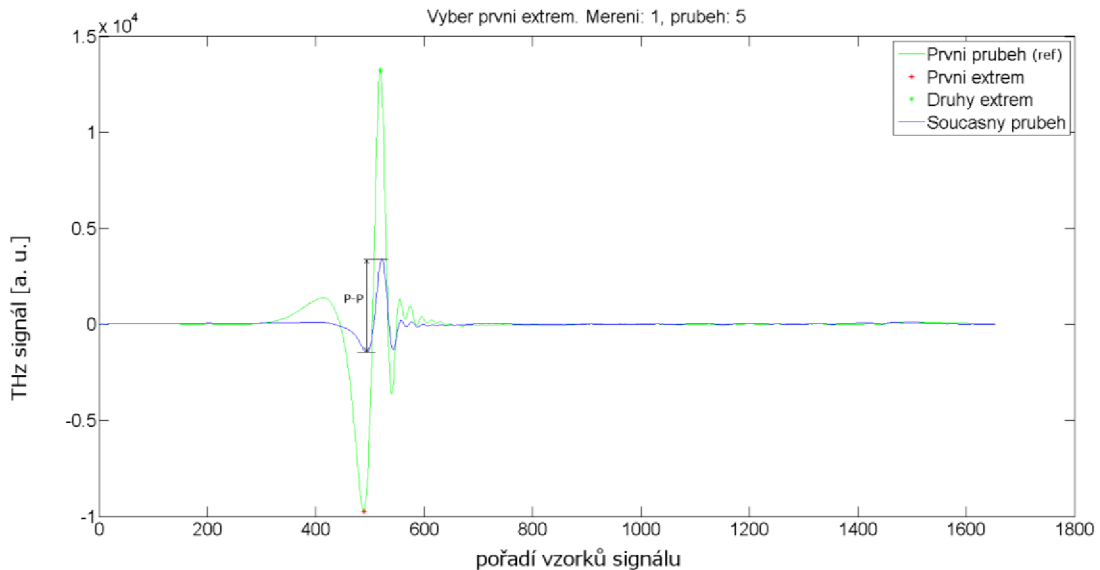
5.3.2 Zpracování dat

Jak již bylo řečeno, v experimentu byla měřena odezva materiálu v podobě surového THz signálu, který však obsahuje veškerou důležitou informaci o měřeném objektu a doplňující optické parametry lze v případě potřeby s pomocí dodaného softwaru zpětně spočítat. Pro účely této práce však nejsou stěžejní. Při hodnocení kinetiky reakce vycházíme ze změn měřeného THz signálu, ke kterým dochází v průběhu reakce v souvislosti se změnou struktury lepidla v důsledku síťování. Z měřeného THz signálu je možné zjistit jak reálnou (amplitudu), tak imaginární (fázi) složku permitivity měřeného vzorku. Na Obr. 4.1 je zřejmé, že fázový posuv mezi THz signálem reference (čistý krystal) a vzorku (nanesené lepidlo) je téměř zanedbatelný, což souvisí s velmi tenkou vrstvou naneseného vzorku. Naopak rozdíl amplitud obou signálů je výrazný a amplitudovou složku signálu lze využít k hodnocení. Konkrétně sledujeme změnu hodnoty peak-to-peak (špička-špička) THz signálu neboli rozkmit THz vlny. Princip metody je relativně jednoduchý a zároveň dostatečně robustní pro monitorování změn ve zkoumaném materiálu [163].

Surová data z měření na THz spektrometru se automaticky ukládají do .csv souboru, ve kterém jsou jednotlivé hodnoty odděleny čárkou. V prvním sloupci souboru jsou uloženy hodnoty osy x, tj. *Scanner position [mm]* nebo odpovídající *Optical delay [ps]* (volitelné v nastavení), další sloupce obsahují hodnoty osy y odpovídající naměřenému THz signálu v každém měřeném okamžiku, tj. *Terahertz signal [a.u.]*. Vzhledem k počtu opakovaných měření (250) a délce měřeného signálu (1655 vzorků) naplňují data matici o rozměru 1655 řádků x 250 sloupců. V tomto objemu by bylo již velmi problematické pracovat s daty ručně, a proto byl pro zpracování dat použit softwarový programovací nástroj MATLAB, ver. R2010a.

Surová data z .csv souborů byla jako první načtena a zpracována programem *ATR_TDS_AB_Polsko_2017_07_31.m*. Jednotlivá měření jsou v původním souboru zpřeházena, první krok tedy vedl k chronologickému uspořádání průběhů. V dalším kroku byly v každém průběhu nalezeny extrémní hodnoty THz vlny, tj. maximum a minimum, a stanoveny hodnoty rozkmitu vlny (zkr. P-P), včetně souřadnic osy x. V některých případech bylo nutné manuální určení extrémů pomocí okna s grafickým zobrazením prvního naměřeného THz impulsu (reference) a THz impulsu, u kterého došlo k dramatické změně tvaru, tj. po aplikaci tekutiny, viz Obr. 5.5. Bylo tak zamezeno chybné detekci extrémů softwarem a zároveň proběhla kontrola správného vyhodnocení P-P hodnoty. Zjištěné hodnoty byly uloženy do *tds_vzorekxy_extrem.xls*, kde xy udává číslo vzorku. U takto zpracovaných dat je pak provedena kontrola, zda

jsou data úplná, nedošlo v průběhu měření k chybám nebo významným odchylkám. Dále je stanoven začátek měření vlastní reakce hemostatika s kapalinou, data jsou v tomto bodě ručně ořezána a uložena do *vzorek.xls*, který obsahuje P-P hodnoty všech vzorků a je podkladem pro vytvoření modelu síťování Histoacrylu a jeho směsí.



Obr. 5.5 Okno pro výběr extrémů a definici hodnoty P-P (rozkmitu THz vlny).

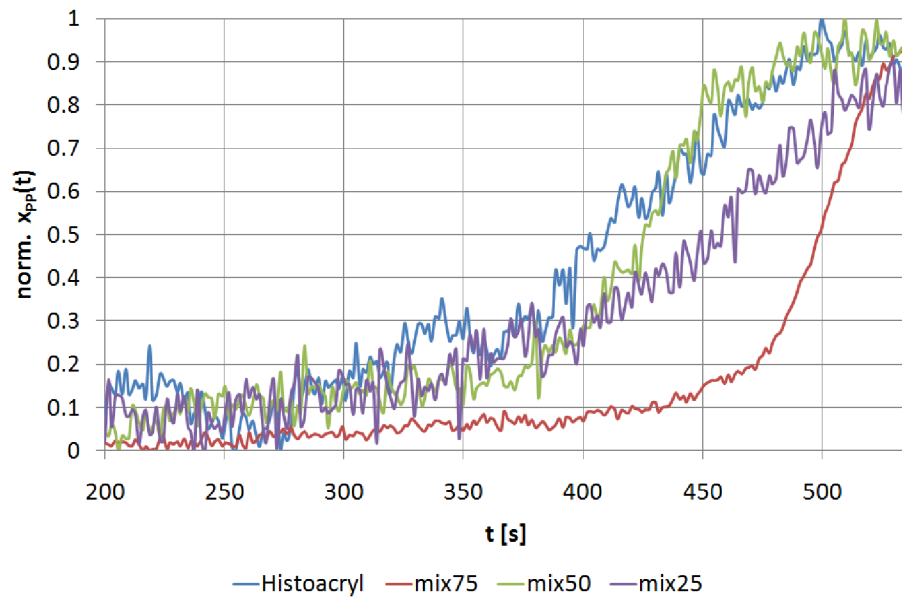
Zatímco na THz spektrometru na pracovišti UTB ve Zlíně bylo možné rychlé automatické zaznamenávání hodnot v čase, experiment na Univerzitě ve Varšavě probíhal s manuálním spouštěním každého měření za současného sledování času. Data z obou spektrometrů tedy mají odlišné vzorkování a pro počáteční zpracování bylo potřeba i rozdílných programů. V případě dat měřených na polském spektrometru byly soubory *tds_vzorek_xx.csv* (kde xx je pořadí vzorku) nejdříve zpracovány programem *thz_tds.m*. Výstupem jsou tabulky časových závislostí P-P hodnot jednotlivých vzorků uložených v souborech *tds_vzorek_extr.xls*, které jsou přímo vstupem pro následné modelování. Zpracování dat z měření reakce lepidla s živočišnou tkání proběhlo identickým způsobem popsaným výše.

5.3.3 Charakteristika dat

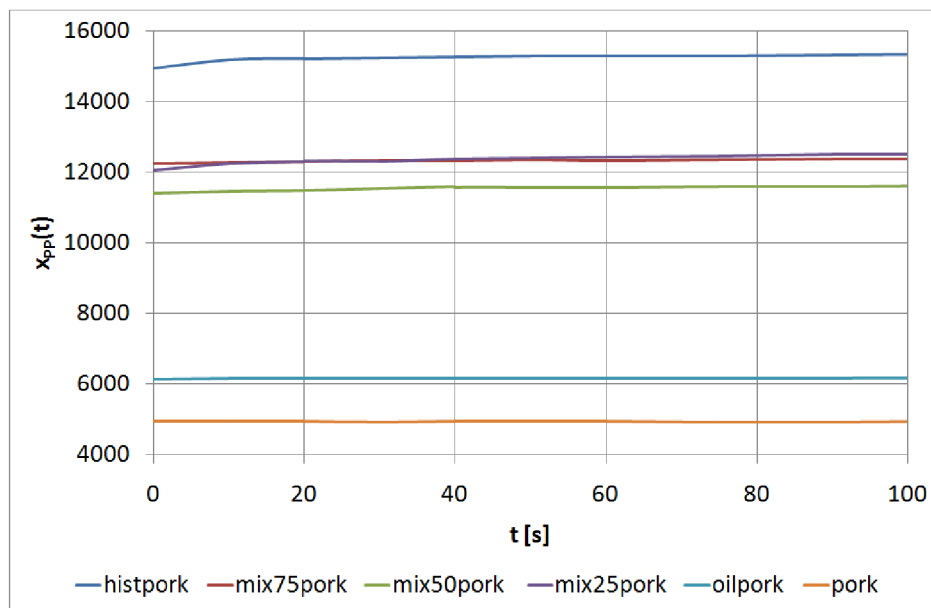
Obr. 5.6 zobrazuje hodnoty naměřené metodou THz spektroskopie zachycující síťování Histoacrylu a jeho směsí. Graf představuje normované průběhy P-P hodnot THz vlny $norm. x_{PP}(t)$ v čase t charakteristické pro jednotlivé vzorky. Data jsou zobrazena v čase 200 sekund od zahájení měření, neboť na začátku měření křivky lehce oscilují na konstantní hladině (kolem hodnoty 0 po normalizaci) nebo se také nepravidelně objevují rostoucí či klesající exponenciální tendence. K těmto změnám dochází ještě před samotným síťováním vzorku, které se projevuje až jako výrazný nárůst sigmoidního tvaru s ustálením na konečné konstantní úrovni (přibližně hodnota 1 po normalizaci).

Obr. 5.7 poskytuje první náhled na data naměřená v rámci druhého experimentu, kdy je sledován vliv přidané živočišné tkáně nasycené fyziologickým roztokem na síťování Histoacrylu a jeho olejnatých směsí. Jedná se původní, nijak neupravená data hodnot P-P THz vlny, tedy rozkmitu x_{PP} , v závislosti na čase t . Z grafu je zřejmé, že pro kontrolní vzorky samostatné prasečí tkáně (*pork*) a její reakci pouze s makovým olejem (*oilpork*) je měřená odezva mnohem slabší než u vzorků Histoacrylu a jeho směsí

s olejem. Velké rozdíly v rozsazích jednotlivých vzorků neumožňují detailní popis naměřených dat, proto byly originální data zarovnána do počátku v bodě [0, 0].



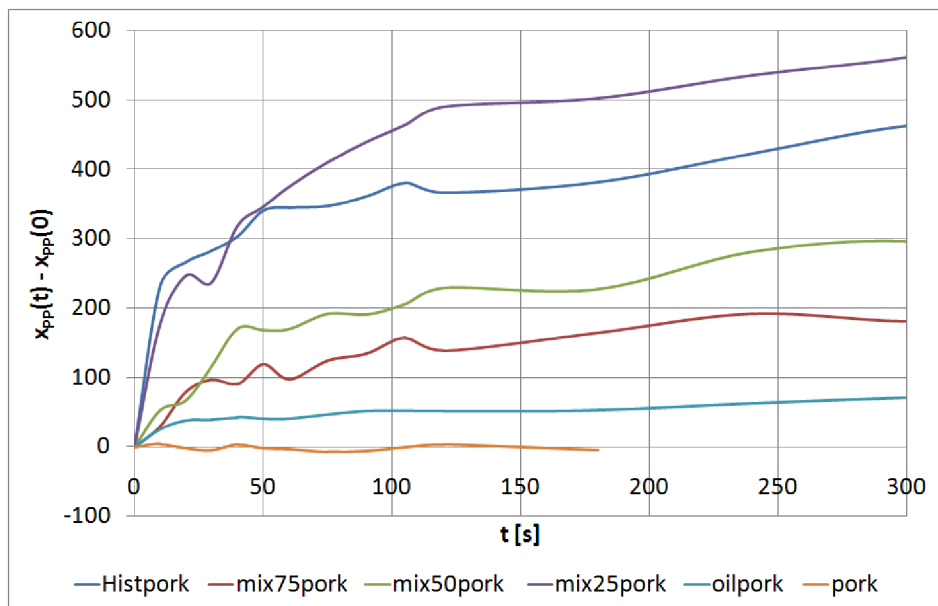
Obr. 5.6 Přehled časových závislostí normalizované P-P hodnoty THz vlny $norm. x_{pp}(t)$ měřených vzorků Histoacrylu a jeho olejnatých směsí.



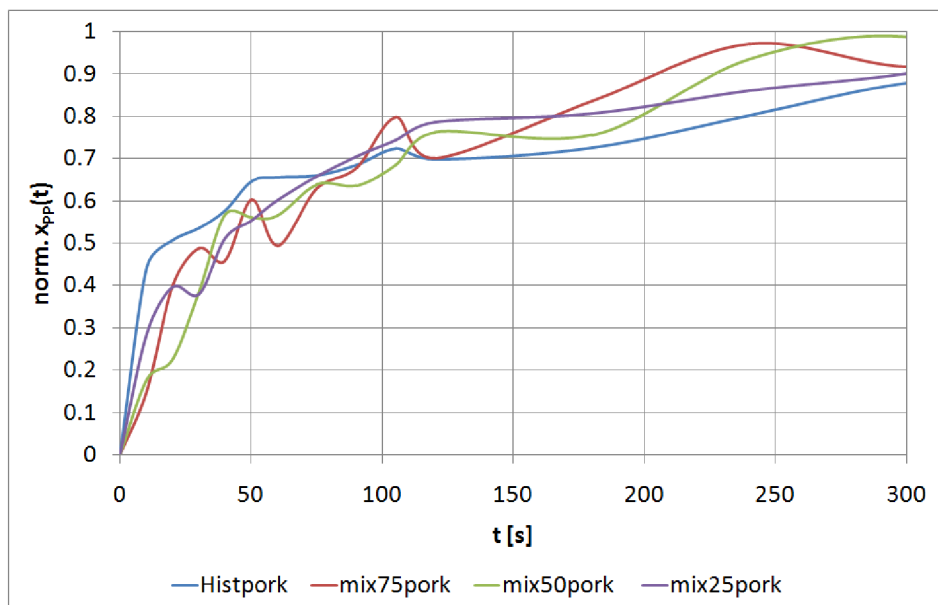
Obr. 5.7 Srovnání vybraných původních naměřených časových závislostí P-P hodnot THz vlny $x_{pp}(t)$ pro síťování vzorků Histoacrylu (*histpork*) a jeho směsí (*mix75pork*, *mix50pork*, *mix25pork*) za přítomnosti živočišné tkáně nasycené fyziologickým roztokem (*pork*).

Pro rozlišení reakce prasečí tkáně pouze s makovým olejem byl změřen i kontrolní vzorek *oilpork*.

Výsledkem předchozího je Obr. 5.8, který ukazuje slabší odezvu vzorků *pork* a *oilpork* a tedy jejich odlišnost od vzorků obsahujících Histoacryl. Tento fakt vede k významnému důkazu, že samotná síťovací reakce není překryta makovým olejem, ani aplikovanou svalovou tkání, resp. fyziologickým roztokem, ve kterém byla tkáň uchovávána před měřením. Pro detailní srovnání časových průběhů bylo v dalším kroku provedeno normování dat v intervalu $\langle 0, 1 \rangle$. Graf normovaných časových závislostí rozkmitu THz vlny uvádí Obr. 5.9.



Obr. 5.8 Naměřené časové závislosti rozkmitu THz vlny $x_{pp}(t)$ po jejich zarovnání do počátku $[0,0]$ pro lepší náhled na chování jednotlivých vzorků Histoacrylu (*histpork*) a jeho směsí v přítomnosti živočišné tkáně. Pro kontrolu byly zařazeny také vzorky tkáně (*pork*) a reakce tkáně pouze s olejem (*oilpork*).



Obr. 5.9 Normované časové závislosti rozkmitu THz vlny $norm.x_{pp}(t)$ pro detailní srovnání chování vzorků Histoacrylu a jeho směsí v přítomnosti živočišné tkáně.

Na Obr. 5.9 je již zřejmé, že po přidání vzorku prasečí tkáně se charakteristika šířování Histoacrylu zásadně mění. Výsledkem již není sigmoidní funkce, nýbrž rostoucí exponenciální průběh u všech měřených vzorků. Zároveň je patrná i jistá podobnost napříč vzorky ve srovnání s předchozím experimentem bez živočišné tkáně.

5.4 Infračervená spektroskopie

5.4.1 Metodika měření

Pro srovnání předchozích výsledků z THz spektroskopie byly vzorky lepidel měřeny rovněž technikou ATR. Základem ATR modulu Fourierova infračerveného spektrometru Nicolet iS50 je diamantový krystal kruhového tvaru, na který se přímo nanáší zkoumaný vzorek. Spektra byla měřena ve střední infračervené oblasti v rozsahu vlnočtů $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$. S ohledem na požadavky experimentu (rychlejší skenování, dobrý SNR) byl vytvořen v softwaru OMNIC měřicí protokol pro nastavení parametrů podle Tab. 5.2. V základním vybavení spektrometr neumožňuje automatizované měření v čase, proto bylo skenování spekter spouštěno manuálně a čas byl sledován stopkami.

Tab. 5.2 Nastavené parametry pro ATR měření na přístroji Nicolet iS50 FTIR.

Parametr měření	Hodnota
Počet skenů	7
Rozlišení (vlnočt)	$< 1 \text{ cm}^{-1}$
Měřený parametr	absorbance
Korekce	žádná
Doba vytvoření 1 finálního skenu	6 s

Měření probíhalo v klimatizované místnosti při teplotě $(23 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ a relativní vlhkosti $(40 \pm 1) \%$. Před každým vzorkem bylo změřeno pozadí, tj. spektrum čistého diamantového krystalu. Následovala aplikace vzorku v množství $2 \mu\text{l}$ přímo na krystal, jeho přiklopení horní elektrodou používanou pro DS a měření absorpčních spekter v čase. Měření každého typu vzorku bylo opakováno 10krát.

IR spektroskopie byla použita také pro sledování reakce lepidla s živočišnou tkání. Postup měření byl stejný jako u THz spektroskopie. Na vzorek lepidla na ATR krystalu byl aplikován vzorek tkáně a následovalo přiklopení elektrodou, která byla vyzdvižena polypropylenovou podložkou o tloušťce $2000 \mu\text{m}$, čímž bylo zajištěno optimální rozprostření lepidla mezi krystalem a tkání.

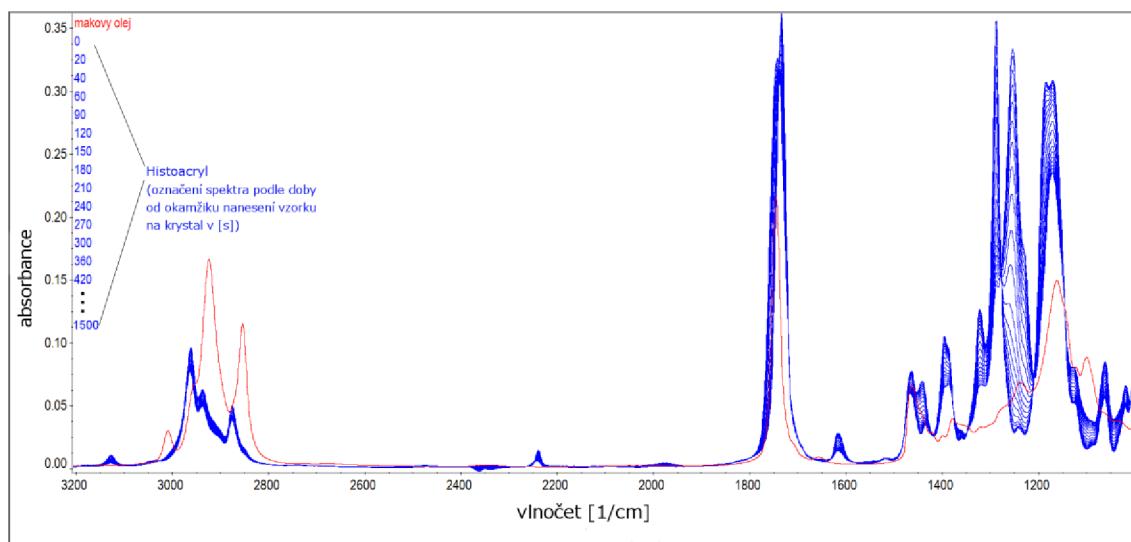
5.4.2 Charakteristika naměřených dat

A. Histoacryl a jeho směsi s olejem

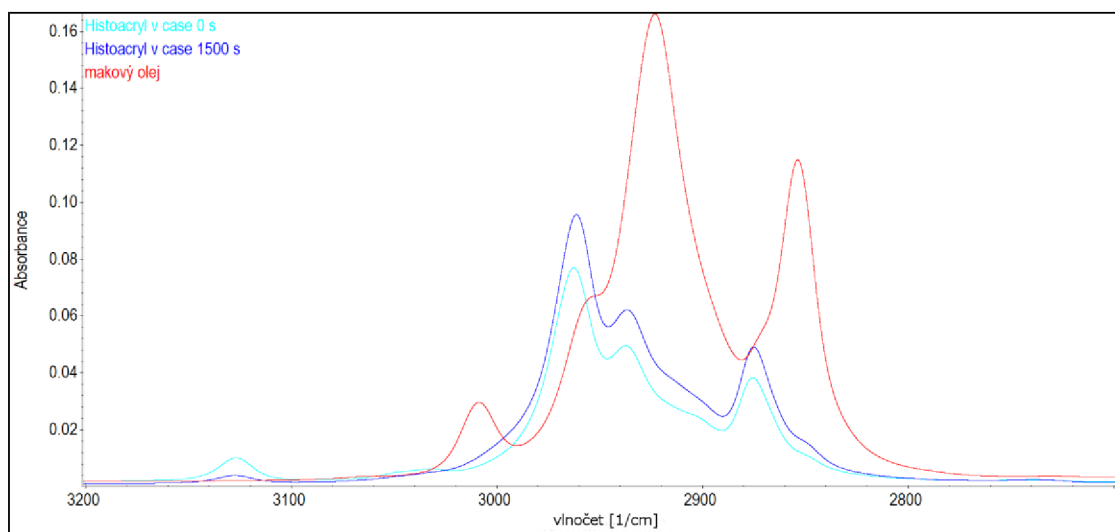
První jednoduchá přehledová analýza spekter proběhla pomocí měřicího softwaru OMNIC dodávaného výrobcem spektrometru. Měřená spektra mají podobu závislosti absorbance na vlnočtu. Ve spektru lze identifikovat oblasti charakteristické pro vibrace konkrétních funkčních skupin molekul. Tyto oblasti jsou typické přítomností absorpčních maxim s intenzitou měnící se v průběhu pozorované síťovací reakce. Obr. 5.10 srovnává IR spektra čistého Histoacrylu (ozn. modře) měřená v průběhu síťovací reakce a makového oleje (ozn. červeně) přidávaného do směsí. Spektra je možné rozdělit na tři hlavní oblasti se zajímavými absorpčními změnami v průběhu síťovací reakce: (A) $2700 - 3200 \text{ cm}^{-1}$, (B) $2200 - 2300 \text{ cm}^{-1}$ a (C) $1200 - 1900 \text{ cm}^{-1}$.

První oblast spektra (A) detailněji přibližuje Obr. 5.11. Dominuje zde pás absorpce v rozsahu vlnočtů $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$, kde se projevuje symetrické i

asymetrické natahování $-C-H$ vazeb methylových a methylenových skupin ($-CH_2-$, $-CH_3$) kyanoakrylátu [6]. Absorpční špičky (2961 , 2936 a 2874 cm^{-1}) se však překrývají se spektrem makového oleje. Absorpční špičky u oleje na 2922 a 2853 cm^{-1} představují symetrické a asymetrické natahování alifatických CH_2 skupin triglyceridů. Maximum kolem 3008 cm^{-1} je charakteristické pouze pro olej a odráží $C-H$ *stretching* cis-dvojných vazeb $=CH$ [164]. Další absorpční maximum kolem 3127 cm^{-1} se objevuje pouze u Histoacrylu a charakterizuje *stretching* dvojných vazeb $-C=C-$ vinylových struktur $=CH-$, $=CH_2$, které v průběhu reakce zanikají [6], což koresponduje s postupným zeslabováním absorpčního maxima.



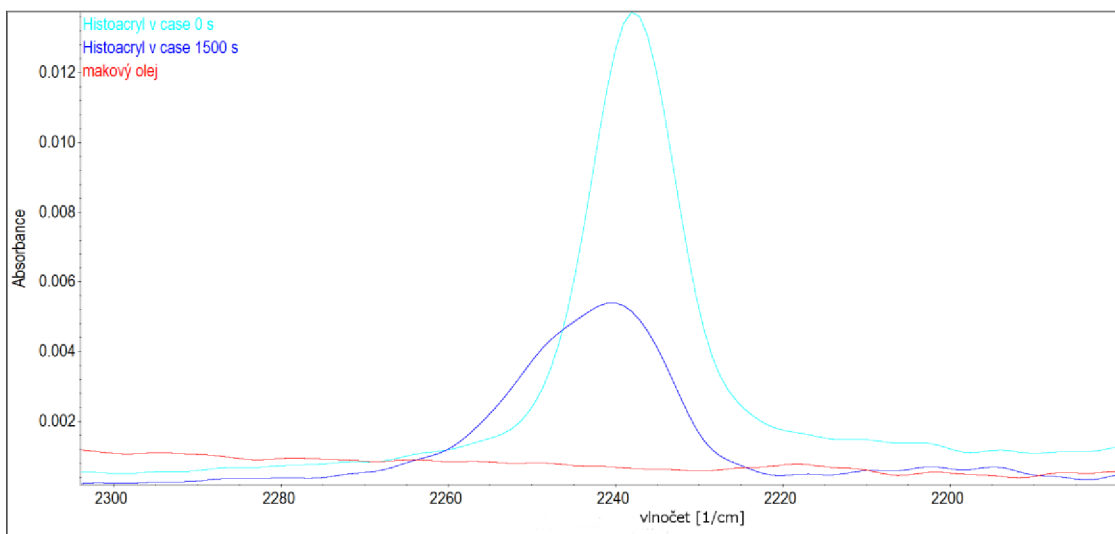
Obr. 5.10 IR absorpční spektra makového oleje (červené) a Histoacrylu při síťování (modré).



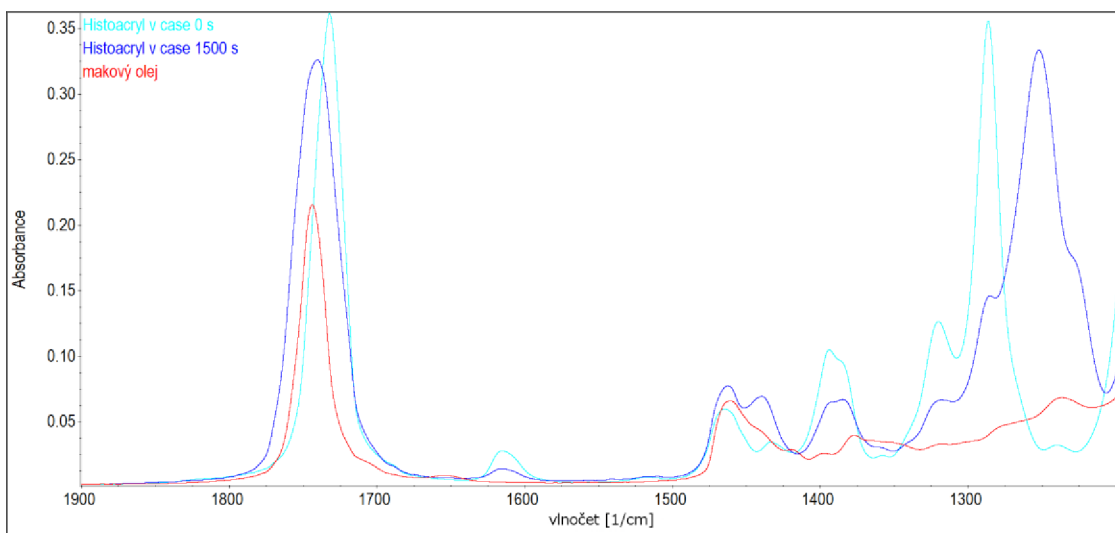
Obr. 5.11 Detail první části spektra (oblast A) makového oleje a Histoacrylu na začátku ($t = 0\text{ s}$) a konci síťovací reakce ($t = 1500\text{ s}$) v rozsahu vlnčetů $2700 - 3200\text{ cm}^{-1}$.

Detail druhé oblasti spektra (B) na Obr. 5.12 zachycuje absorpci Histoacrylu kolem vlnčtu 2240 cm^{-1} , na němž se projevuje protahování vazby $-C\equiv N$. V průběhu síťování dochází jednak k postupnému zeslabení intenzity absorpčního maxima, ale také k mírnému posunu doleva směrem k vyššímu vlnčtu. Přesný původ tohoto jevu zatím není zcela objasněn, ale může být vysvětlen několika hypotézami. První z nich dává posun do souvislosti se ztrátou původního propojení mezi skupinami $C\equiv N$, $C=C$ a $C=O$

a existenci $C\equiv N$ vazeb ve dvou odlišných konfiguracích ve sledovaném systému. Další možností je stabilizace aniontu na α -uhlíku (vzniklého po počátečním nukleofilním ataku) skupinami $-COOR$ a $-CN$ a přemístěním záporného náboje. Zároveň je však možné posun $-CN$ maxima přisoudit vodíkovým vazbám uvnitř i vně molekul [6].



Obr. 5.12 Detail druhé části spektra (oblast B) makového oleje a Histoacrylu na začátku ($t = 0$ s) a konci síťovací reakce ($t = 1500$ s) v rozsahu vlnočtů $2200 - 2300$ cm^{-1} .



Obr. 5.13 Detail třetí části spektra (oblast C) makového oleje a Histoacrylu na začátku ($t = 0$ s) a konci síťovací reakce ($t = 1500$ s) v rozsahu vlnočtů $1200 - 1900$ cm^{-1} .

Obr. 5.13 zachycuje poslední zajímavou oblast spektra, která částečně zasahuje do oblasti spektroskopického otisku (< 1500 cm^{-1}). Dominantní absorpce kolem 1740 cm^{-1} připadá protahování $-C=O$ vazeb a v průběhu reakce dochází k zeslabování intenzity a zároveň mírnému posunu absorpčního maxima. Podobnou vibraci však vykazuje i makový olej díky přítomnosti $-C=O$ vazeb cholesterol esteru [164]. Na 1615 cm^{-1} dochází k protahování $C=C$ vazeb, absorpce je silnější než na 3127 cm^{-1} a u makového oleje zcela chybí. Absorpční pás v oblasti $1500 - 1350$ cm^{-1} je charakteristický pro vazby typu *scissoring* a *bending* u CH_2 a CH_3 přítomných v lepidle. U oleje je patrná rovněž odezva kolem 1460 cm^{-1} spojená s ohýbáním CH_2 vazeb a spektra se lehce překrývají. Maximum na vlnočtu 1319 cm^{-1} je spojené s vibracemi $C-O$ vazeb [165]. Další silná absorpce se pak objevuje kolem vlnočtů 1284 a 1253 cm^{-1} . Jde o specifické

vibrace C-H skupin související jednak se zanikající dvojnou vazbou C=C (1284 cm⁻¹) a zároveň s nově vznikající vazbou C-C, konkrétně v řetězci CH₂-C-CH₂ (1253 cm⁻¹) [166]. Ve spektru lze tak pozorovat postupný pokles absorpčního maxima na 1284 cm⁻¹ a v protiváze růst maxima na 1253 cm⁻¹.

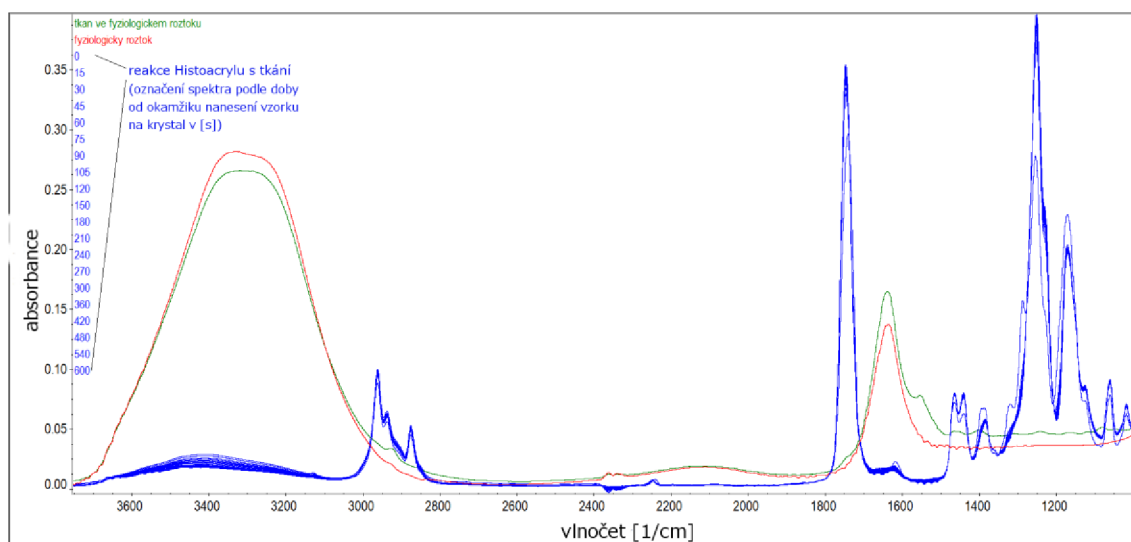
K podrobnější analýze kinetiky reakce lepidla mohly být použity pouze oblasti spektra, ve kterých absorpce lepidla převažovala nad absorpcí oleje. Popis jednotlivých oblastí a postup výběru je popsán v Tab. 5.3. Analýzou spekter Histoacrylu a makového oleje byly vybrány významné oblasti absorpčních maxim (označeny 1 až 16). Dle intenzity maxim bylo rozhodnuto o dominanci lepidla či oleje v dané oblasti. Ke sledování kinetiky lepidla připadají v úvahu maxima označená č. 1, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15 a 16 (ozn. x v Tab. 5.3).

Tab. 5.3 Přehled významných oblastí v naměřených IR spektrech Histoacrylu a makového oleje.

označení absorpčního maxima	vlnočet [cm ⁻¹]	vibrace funkčních skupin	přítomnost maxima ve spektru x... přítomen, -... nepřítomen		dominance H... Histoacryl, O... makový olej	možnost hodnocení x... ano, -... ne
			Histoacryl	makový olej		
1	3159,84 - 3100,06	-C=C- <i>stretching</i> vinylových skupin (=CH-, =CH ₂)	x	-	H	x
2	3006,06	C-H <i>stretching</i> cis- dvojných vazeb =CH	-	x	O	-
3	2990,14 - 2944,82	symetrický/asymetrický <i>stretching</i> -C-H vazeb	x (slabý)	x	překryv	-
4	2944,82 - 2918,78		x (slabý)	x	překryv	-
5	2887,93 - 2867,68		x (slabý)	x	překryv	-
6	2855,16		-	x	O	-
7	2265,99 - 2221,63	-C≡N <i>stretching</i>	x	-	H	x
8	1789,65 - 1699,97	-C=O <i>stretching</i>	x	x (slabý)	H	x
9	1640,19 - 1588,12	C=C <i>stretching</i>	x	-	H	x
10	1483,98 - 1452,16	CH ₂ a CH ₃ <i>scissoring</i> a <i>bending</i>	x	x	překryv	-
11	1449,27 - 1415,52		x	x	překryv	-
12	1394,05		x	-	H	x
13	1383,39		x	-	H	x
14	1319,21	C-O <i>stretching</i>	x	-	H	x
15	1300,77 - 1281,49	vibrace C-H skupin spojené se zánikem C=C vazby	x	-	H	x
16	1253,53	vibrace C-H skupin spojené se vznikem C-C vazby (CH ₂ -C-CH ₂)	x	-	H	x

B. Histoacryl při reakci s prasečí svalovou tkání

Dalším krokem byla rovněž analýza spekter vzorků Histpork a mix, tedy Histoacrylu a jeho olejnatých směsí při reakci s prasečí svalovou tkání. Obr. 5.14 uvádí IR spektra příslušející reakci Histoacrylu s tkání (ozn. modře), samotnému fyziologickému roztoku (ozn. červeně) a svalové tkáni v něm uchovávané (ozn. zeleně). Fyziologický roztok významně absorbuje IR záření a ve spektru se objevuje široký absorpční pás, který způsobí částečný nebo úplný překryv zájmových oblastí spektra na vlnočtech 2700 – 3200 cm^{-1} (A) a 2200 – 2300 cm^{-1} (B). Nejlépe zachovanou částí spektra zůstává oblast vlnočtů 1200 – 1900 cm^{-1} (C).



Obr. 5.14 IR absorpční spektra fyziologického roztoku (červené), živočišné svalové tkáně ve fyziologickém roztoku (zelené) a Histoacrylu při reakci s tkání (modré).

Podrobný popis zachycených změn dokumentuje Tab. 5.4. Díky vysoké absorpci IR záření vlhkou tkání, překryvu s olejem či slabému signálu Histpork se původní výběr oblastí vlnočtů zajímavých pro další analýzu zúžil na absorpční maxima označená č. 8, 13, 14, 15 a 16, viz podrobnější přehled v Tab. 5.4.

Tab. 5.4 Významné oblasti naměřených IR spekter Histoacrylu, jeho směsí s olejem (mix), použité prasečí svalové tkáně uložené ve fyziologickém roztoku (pork) a Histoacrylu při reakci s touto tkání (Histpork).

označení absorpčního maxima	vlnočť [cm^{-1}]		odezva látky ve spektru x... přítomen, -... nepřítomen		možnost hodnocení x... ano, -... ne
	<i>Histoacryl a mix</i>	<i>Histpork a mix</i>	<i>prasečí svalová tkáň ve fyziologickém roztoku</i>	<i>Histpork</i>	
1	3159,84 - 3100,06	3128,19	↑ absorpce	x (slabý)	-
2	3006,06	3008,31	↑ absorpce	-	-
3	2990,14 - 2944,82	2960,14	↑ absorpce	překryv s olejem	-
4	2944,82 - 2918,78	2944,82 - 2904,32	↑ absorpce	překryv s olejem	-
5	2887,93 - 2867,68	2873,11	-	překryv s olejem	-
6	2855,16	2855,16	-	-	-

označení absorpčního maxima	vlnočet [cm ⁻¹]		odezva látky ve spektru x... přítomen, -... nepřítomen		možnost hodnocení x... ano, -... ne
	<i>Histoacryl a mix</i>	<i>Histpork a mix</i>	<i>prasečí svalová tkáň ve fyziologickém roztoku</i>	<i>Histpork</i>	
7	2265,99 - 2221,63	2265,99 - 2221,63	-	x (slabý)	-
8	1789,65 - 1699,97	1789,65 - 1699,97	-	x	x
9	1640,19 - 1588,12	1618,46	↑ absorpce	x (slabý)	-
10	1483,98 - 1452,16	1483,98 - 1452,16	↑ absorpce	překryv s olejem	-
11	1449,27 - 1415,52	1441,21	-	překryv s olejem	-
12	1394,05	1394,05	-	-	-
13	1383,39	1383,39	-	x	x
14	1319,21	1319,21	-	x	x
15	1300,77 - 1281,49	1289,58	-	x	x
16	1253,53	1253,53	-	x	x

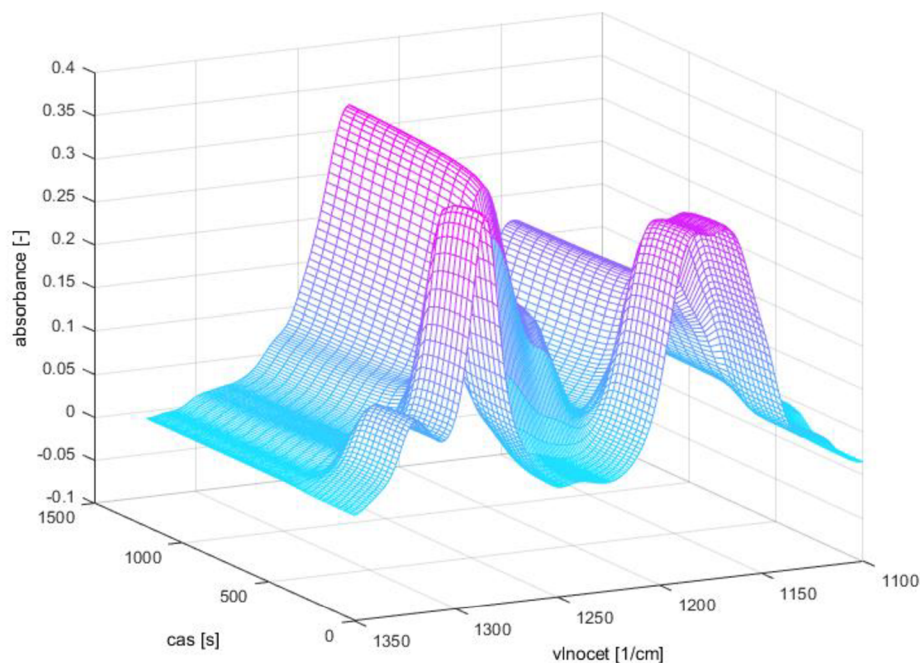
5.4.3 Zpracování dat

S využitím programu TQ Analyst byla provedena identifikace zájmových míst v IR spektru a extrakce hodnot maximální intenzity v těchto bodech v závislosti na čase. Polohy jednotlivých bodů byly označeny č. 1 až 17, včetně polohy reference REF na 3300 cm⁻¹ u Histoacrylu a jeho směsi a reference na 2500 cm⁻¹ u měření reakce s tkání (Histpork). Výběr absorpčních maxim odpovídá tabulkám Tab. 5.3 a Tab. 5.4. Podrobnou specifikaci poloh maxim pro vzorky Histoacrylu a jeho směsi uvádí protokol *diag_TQpeak_max_histoacryl+mix.xlsx* a pro měření reakce s tkání protokol *diag_TQpeak_max_histpork+mix.xlsx*. Výsledky analýzy jsou uloženy v souborech *max_vzorekxx.csv*, kde vzorek představuje hist, mix75, mix50 nebo mix25 a xx udává pořadí vzorku. Pro další analýzu bylo potřeba data upravit do tabulkové podoby vhodné pro další zpracování a analýzu. Veškerá úprava dat byla provedena pomocí vypracovaných skriptů v programovém prostředí Matlab. Programem *ftir_nacti_2017_10_13.m* byla ze souborů .csv extrahována časová osa a hodnoty jednotlivých maxim, proběhla normalizace na interval <0, 1> a zápis do tabulky *max_vzorek_data_norm.xls*. Přepis naměřených časových závislostí maxim všech vzorků umožnil program *ftir_pik_2017_10_13.m*. Výsledné soubory jsou uloženy pod názvem *max_vzorek_piky.xls* a jsou výchozími pro následné modelování.

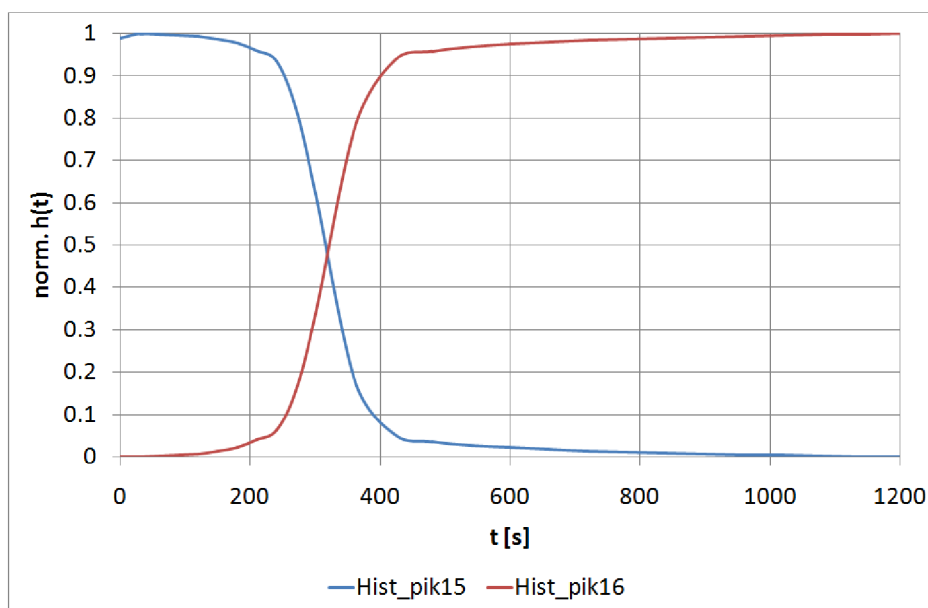
Nejvýraznější změnu při sledované reakci zaznamenávají maxima č. 15 a 16, tj. na vlnočtech cca 1284 cm⁻¹ a 1253 cm⁻¹, viz také 3D graf spektra Histoacrylu na Obr. 5.15 vytvořen pomocí programu v Matlabu. Tyto oblasti odpovídají vibračním C-H skupin spojených s přeměnou dvojnásobné vazby C=C na jednoduchou C-C vazbu prodlužujícího se polymerního vlákna. Časové průběhy maxim jsou identické s tím rozdílem, že maximum na 1284 cm⁻¹ klesá a na 1253 cm⁻¹ roste, viz Obr. 5.16. Pro další analýzu byl

vybrán vlnočít 1253 cm^{-1} , charakteristický vibrací vazby $\text{CH}_2\text{-C-CH}_2$ rostoucího polymerního řetězce.

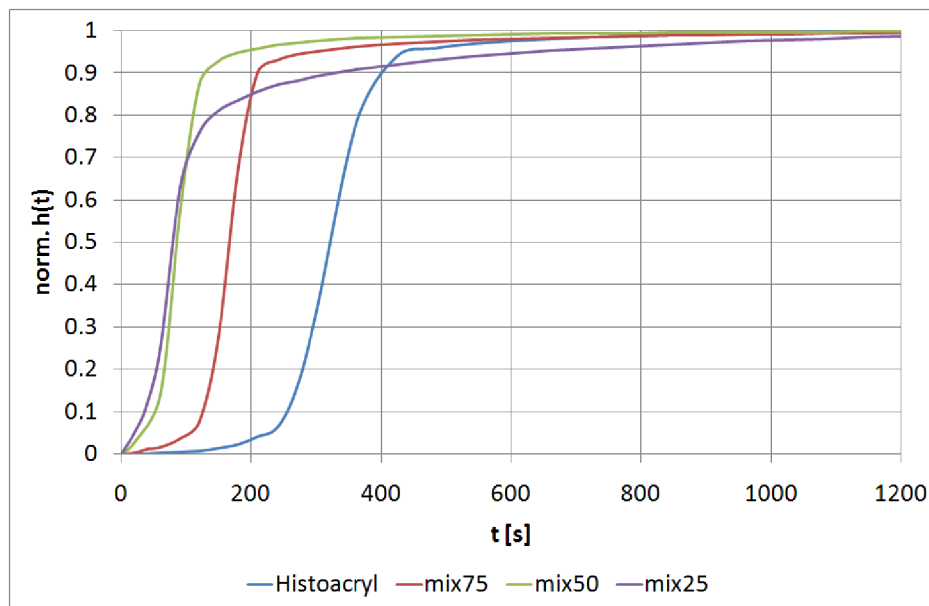
Obr. 5.17 uvádí přehled naměřených časových závislostí absorpčního maxima (č. 16) vzorků Histoacrylu a jeho směsí. Jedná se o normované hodnoty výšky maxim v průběhu síťování. U všech vzorků se s různým zpožděním objevuje sigmoidní křivka. Zpoždění se mění nezávisle na typu měřeného vzorku a jedná se o dobu, která uběhne, než dojde k nastartování sledované síťovací reakce. U vzorků Histoacrylu byla tato doba obvykle delší, což si vysvětlujeme omezeným přístupem vlhkosti k čistému lepidlu ve srovnání se vzorky směsí.



Obr. 5.15 3D graf IR spektra Histoacrylu (hist2) v rozsahu $1100 - 1350\text{ cm}^{-1}$.

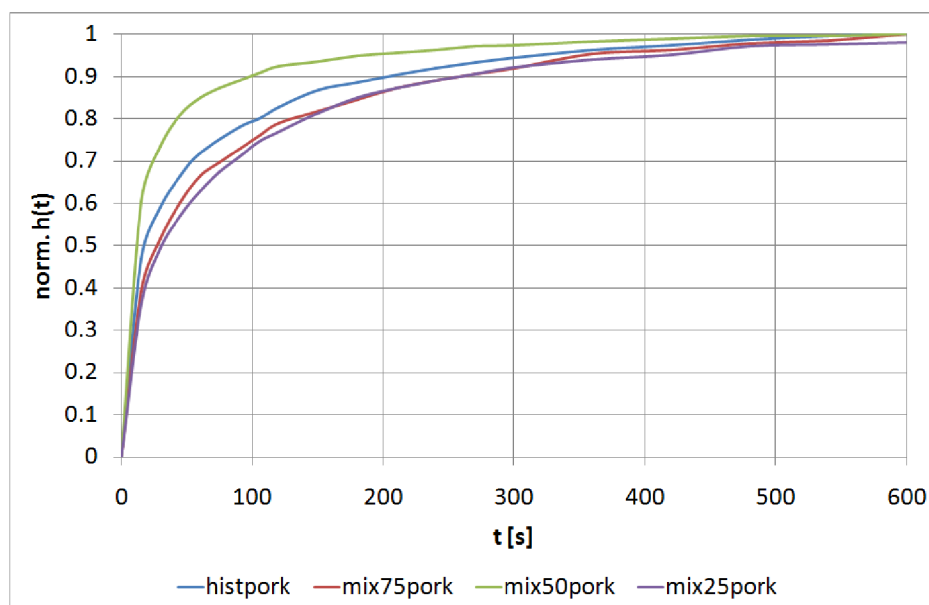


Obr. 5.16 Srovnání časových průběhů normalizované výšky absorpčních maxim na 1284 cm^{-1} (peak 15, modrý) a 1253 cm^{-1} (peak 16, červený) u vzorku Histoacrylu (hist2).



Obr. 5.17 Časové závislosti normalizované výšky absorpčního maxima 1253 cm^{-1} (peak 16) měřených vzorků Histoacrylu a jeho olejnatých směsí.

Stejně jako u předchozích vzorků Histoacrylu a jeho směsí bylo k sledování reakce Histoacrylu se svalovou tkání vybráno absorpční maximum na 1253 cm^{-1} (č. 16). Obr. 5.18 uvádí naměřené časové průběhy pro vzorky Histpork a jeho olejnaté směsi (mixpork) v reakci se svalovou tkání ve fyziologickém roztoku. Stejně jako u měření metodou THz spektroskopie pozorujeme změnu charakteru dat po přidání svalové tkáně ke vzorkům lepidla. Původně sigmoidní průběh je nahrazen exponenciální rostoucí funkcí, a to pro všechny typy vzorků.



Obr. 5.18 Časové závislosti normalizované výšky absorpčního maxima 1253 cm^{-1} (peak 16) měřených vzorků Histoacrylu (histpork) a jeho olejnaté směsi (mixpork) při reakci s živočišnou svalovou tkání ve fyziologickém roztoku.

5.5 Modelování síťovací reakce tkáňového lepidla

Ještě před modelováním naměřených dat je třeba podrobněji nahlédnout do chemické podstaty kinetiky síťování kyanoakrylátů. Odvození vycházející z chemických rovnic mohou být základním kamenem pro vytvoření matematického modelu.

5.5.1 Kinetika síťování kyanoakrylátového lepidla

Estery kyanoakrylátu mohou síťovat dvojím způsobem – radikálovou nebo aniontovou polymerizací [167]. V případě lepidel se přirozeně uplatňuje aniontová polymerizace vzhledem k jednoduchosti zahájení síťovací reakce díky snadno dostupným OH^- iontům přítomným ve vzdušné vlhkosti. Mechanismus polymerizace kyanoakrylátu popisuje Obr. 5.19. Prvním krokem je inicializace neboli zahájení reakce, ke které dochází spontánně během několika sekund po aplikaci lepidla na povrch. Volný hydroxylový iont OH^- se lehce váže na elektronakceptorní skupiny $-\text{COOR}$ a $-\text{CN}$, které přemístěním záporného náboje dokáží stabilizovat anion vzniklý na α -uhlíku a zabránit tak dalšímu nukleofilnímu ataku [6]. Dvojná vazba mezi uhlíky $\text{C}=\text{C}$ zaniká a je nahrazena jednoduchou vazbou $\text{C}-\text{C}$. Polymerizace se rychle šíří (tzv. propagace); dochází k postupnému navazování volných monomerů na záporně nabitý konec polymerního řetězce, vzniká živý („live“) polymer. Mechanismy přenosu (transferu) a ukončení (terminace) polymerizace nejsou dosud zcela objasněny, ale obecně se předpokládá, že molekula vody H_2O se váže na záporně nabitý konec živého polymeru za vzniku inertního polymerního řetězce („dead“ polymer) a OH^- , schopného zahájit nové polymerní vlákno [6]. Polymerizace končí vyčerpáním dostupných monomerů, rozpouštědla (H_2O) nebo po přidání neutralizujícího roztoku (např. kyseliny, H_3O^+) [168].

Každý krok aniontové polymerizace kyanoakrylátů lze popsat chemickými rovnicemi (5.2) až (5.6), které shrnuje Tab. 5.5. Do reakce vstupují tzv. reaktanty (levá strana rovnice) a výstupem jsou produkty (pravá strana rovnice). Šipka v rovnici naznačuje typ reakce; s výjimkou disociace vody jsou všechny reakce jednosměrné a nelze je tedy zvrátit. Pro každou reakci je specifická rychlostní konstanta označená k_x , kde x označuje příslušnou reakci.

Tab. 5.5 Chemické rovnice aniontové polymerizace kyanoakrylátů [169].

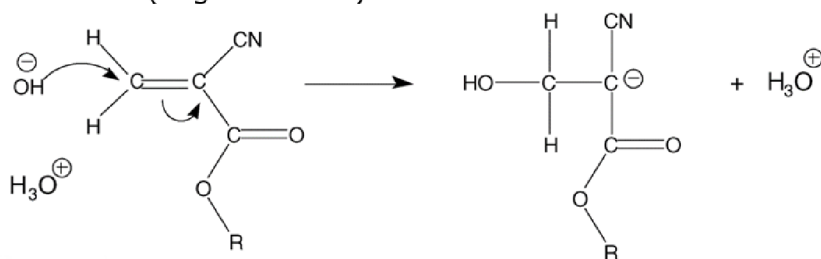
Vysvětlení zkratk: M – monomer, P – polymer, +/- označení polarity, K_w – rychlostní konstanta disociace vody, k_i – rychlostní konstanta inicializace, k_p – rychlostní konstanta propagace, k_{tr} – rychlostní konstanta přenosu, k_t – rychlostní konstanta ukončení reakce.

Disociace vody	$2\text{H}_2\text{O} \xrightleftharpoons{K_w} \text{H}_3\text{O}^+ + \text{OH}^-$	(5.2)
Inicializace síťování (Initiation)	$\text{OH}^- + \text{M} \xrightarrow{k_i} \text{P}_1^-$	(5.3)
Šíření polymerizace (Propagation)	$\text{P}_1^- + \text{M} \xrightarrow{k_p} \text{P}_2^-$ $\text{P}_n^- + \text{M} \xrightarrow{k_p} \text{P}_{n+1}^-$	(5.4)
Přenos (Transfer)	$\text{P}_{tr}^- + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{k_{tr}} \text{P}_{tr}\text{H} + \text{OH}^-$	(5.5)
Ukončení síťovací reakce (Termination)	$\text{P}_t^- + \text{H}_3\text{O}^+ \xrightarrow{k_t} \text{P}_t\text{H} + \text{H}_2\text{O}$	(5.6)

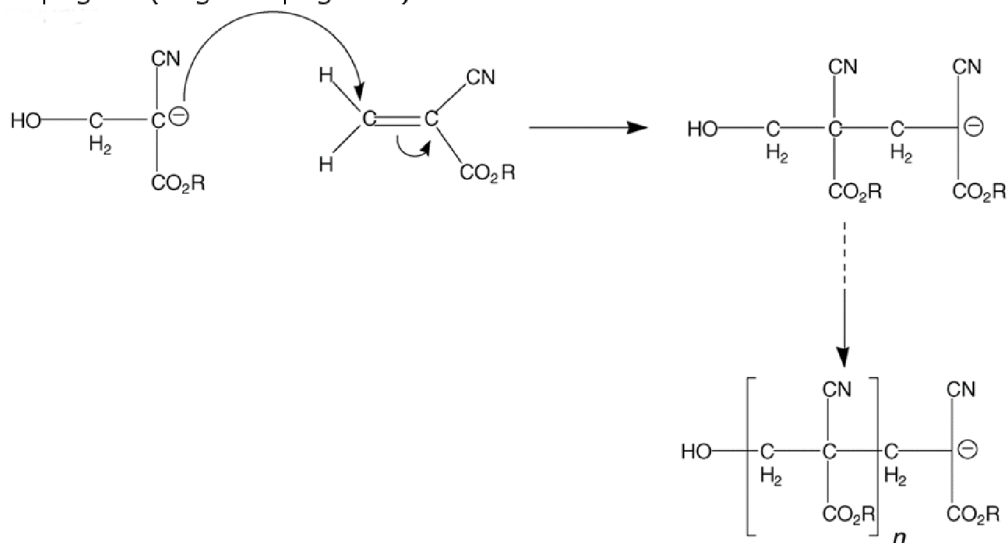
Disociace vody



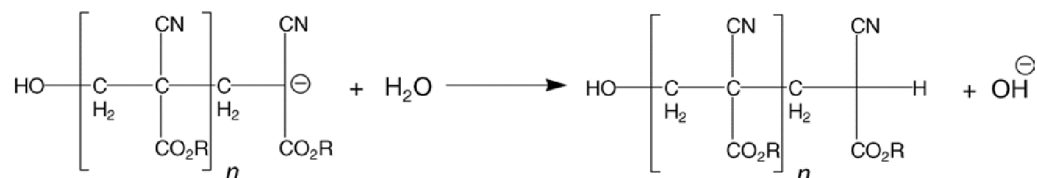
Inicializace (angl. Initiation)



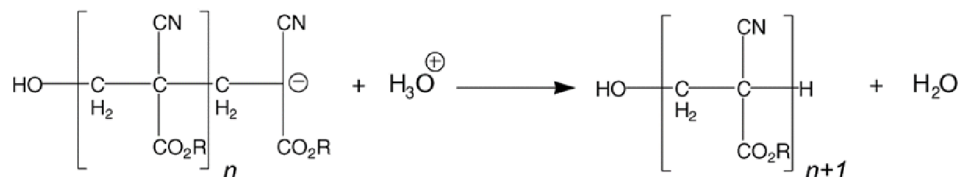
Propagace (angl. Propagation)



Transfer řetězce (angl. Transfer)



Terminace (angl. Termination)



Obr. 5.19 Aniontová polymerizace kyanoakrylátů iniciovaná slabými nukleofily (převzato z [6]).

Z chemických rovnic pak lze odvodit kinetické diferenciální rovnice, které jsou výchozím bodem pro následné modelování. Disociace vody je samovolný a zvrtný proces, který poskytuje dostatek volných iontů pro zahájení i nekomplikovaný průběh polymerizace lepidla. Množství OH^- aniontů vstupujících do reakce se odvíjí od aktuální vzdušné vlhkosti (příp. vlhkosti vázané na povrchu vzorku), která se pohybuje kolem 40 %. Samotné vlákno polymeru vzniká v okamžiku inicializace prvního monomeru OH^- iontem, jak popisuje rovnice (5.7). Řetězec polymeru se postupně prodlužuje navazováním dalších monomerů na volný konec vlákna („live“), viz rovnice (5.8). Ukončení reakce a vznik hotového polymeru („dead“) popisuje rovnice (5.9).

Každému procesu přísluší uvedená rychlostní konstanta k_x charakterizující rychlost probíhající reakce.

Tab. 5.6 Diferenciální rovnice vycházející z chemických rovnic v Tab. 5.5 popisující aniontovou polymerizaci kyanoakrylátu.

Inicializace polymeru	$\frac{\partial [P_n^-]}{\partial t} = k_i [OH^-][M]$	(5.7)
„Live“ polymer	$\frac{\partial [P_{n+1}^-]}{\partial t} = k_p [P_n^-][M]$	(5.8)
„Dead“ polymer	$\frac{\partial [PH]}{\partial t} = k_{tr} [P_n^-][H_2O] + k_t [P_n^-][H_3O^+]$	(5.9)

5.5.2 Odvození modelu síťování Histoacrylu a jeho olejnatých směsí

Obecně lze diferenciálními rovnicemi popsat soubor nejrůznějších chemických rovnic a vyjádřit tak rychlost přeměny reaktantů na produkty. Z podstaty experimentu je zřejmé, že při síťovací reakci kyanoakrylátu převládá propagace polymerního řetězce nad inicializací hydroxylovými ionty. Polymer rychle roste připojováním dalších a dalších monomerů, kdežto dostupnost míst, kde může být zahájeno nové vlákno, je s postupující polymerizací vzorku velmi omezená. Z toho důvodu se zaměříme na odvození modelu na základě šíření polymerizace. Vychází se z rovnice propagace polymerního řetězce (5.8), kterou lze zjednodušit do tvaru (5.10) zavedením zreagované α a nezreagované frakce $(1-\alpha)$ [170], tedy zesíťovaného polymeru $[P]$ a dosud nezesíťovaných volných monomerů $[M]$, viz (5.11):

$$\frac{d\alpha}{dt} = k_p \alpha (1 - \alpha), \quad (5.10)$$

$$\text{kde } [P] = \alpha \quad [M] = 1 - \alpha \quad (5.11)$$

Výsledkem úpravy rovnice (5.10) je výraz (5.12). Zavedením parciálních zlomků podle (5.13) lze získat rovnici (5.14), jejímž integrováním je konečné řešení ve tvaru sigmoidní funkce (5.15):

$$\frac{1}{\alpha(1-\alpha)} d\alpha = k_p dt \quad (5.12)$$

$$\frac{A}{\alpha} + \frac{B}{1-\alpha} = \frac{1}{\alpha(1-\alpha)} \quad (5.13)$$

$$\left(\frac{1}{\alpha} - \frac{-1}{1-\alpha} \right) d\alpha = k_p dt \quad (5.14)$$

$$\ln|\alpha| - \ln|1-\alpha| = k_p t + c_p$$

$$\ln \left| \frac{\alpha}{1-\alpha} \right| = k_p t + c_p$$

$$\alpha(t) = \frac{1}{1 + e^{-(k_p t + c_p)}} \quad (5.15)$$

Získaná sigmoidní funkce odvozená z propagace polymerního řetězce dobře kopíruje tvar křivek časových závislostí měřených parametrů v rámci všech použitých metod; tedy disipačního faktoru u dielektrické spektroskopie, rozkmitu THz vlny u THz spektroskopie a výšky absorpčního maxima na vlnočtu 1253 cm^{-1} u infračervené spektroskopie. Na základě toho byla sigmoida použita pro modelování dat Histoacrylu a jeho olejnatých směsí u všech tří metod.

5.5.3 Odvození modelu síťování Histoacrylu v přítomnosti živočišné tkáně

Při reakci Histoacrylu a jeho směsí se vzorkem prasečí svalové tkáně se zásadně mění charakter naměřených dat jak u THz spektroskopie, tak i u infračervené spektroskopie. Původně sigmoidní funkce je zcela nahrazena exponenciální. Tuto změnu však lze objasnit, vyjde-li se z podstaty experimentu.

Při měření samotného síťování tkáňového lepidla a jeho olejnatých směsí nebylo do reakce nijak výrazně zasahováno. Síťování probíhalo spontánně a záviselo pouze na dostupnosti OH^- aniontů v okolí, což bylo dáno především relativní vlhkostí vzduchu v laboratoři. Dále stlačení vzorku omezilo průnik vlhkosti dovnitř vzorku jen z okrajových částí. Přidáním tekutinou nasyceného vzorku tkáně k lepidlu však docílíme téměř 100%-ní vlhkosti a jejího neomezeného přístupu k lepidlu ze všech stran. Situace se mění a díky přebytku OH^- aniontů může být zahájeno více polymerních vláken v různých místech vzorku najednou. Inicializace síťování se začíná projevovat ve větší míře oproti původnímu experimentu, kdy zřejmě převažovala propagace polymeru.

S vyšším množstvím OH^- aniontů zároveň roste i množství H_3O^+ kationtů, které se naopak podílí na ukončení síťování, viz rovnice (5.6). Vzhledem k přímému kontaktu s vodou se v neposlední řadě začne uplatňovat také transfer řetězce polymeru, viz rovnice (5.5). Řešením diferenciálních rovnic popisujících jednotlivé reakce lze odvodit modelovou funkci. Pro zjednodušení lze množství polymeru $[P]$ a monomerů $[M]$ v reakci opět vyjádřit jako poměr zreagované α a nezreagované frakce $(1 - \alpha)$. Dále je uvažováno dostatečné množství vody $[\text{H}_2\text{O}]$, které nijak neomezuje rychlost reakce. Voda může vstoupit do reakce přímo v rámci transferu polymerního řetězce dle (5.18) nebo po disociaci na ionty $[\text{OH}^-]$ účastníci se inicializace polymerního vlákna dle (5.16) a $[\text{H}_3\text{O}^+]$ účastníci se terminace polymeru dle (5.20). Po zavedení konstant K_i , K_{tr} a K_t do rovnic (5.16), (5.18) a (5.20) je získáno řešení v podobě exponenciálních funkcí podle (5.17), (5.19) a (5.21). Na celkovém síťování Histoacrylu v přítomnosti živočišné tkáně se mohou různou měrou podílet všechny zmíněné reakce a můžeme z nich tedy vycházet při sestavení výsledného modelu.

$$\text{Inicializace} \quad \frac{\partial [P]}{\partial t} = k_i [\text{OH}^-] [M], \text{ kde } k_i [\text{OH}^-] = K_i \quad (5.16)$$

$$\frac{d\alpha}{dt} = K_i (1 - \alpha)$$

$$\alpha = 1 - e^{-(K_i t + c_i)} \quad (5.17)$$

$$\text{Transfer} \quad \frac{\partial [P]}{\partial t} = k_{tr} [P] [\text{H}_2\text{O}], \text{ kde } k_{tr} [\text{H}_2\text{O}] = K_{tr} \quad (5.18)$$

$$\frac{d\alpha}{dt} = K_{tr} \alpha$$

$$\alpha = e^{(K_{tr}t + c_{tr})} \quad (5.19)$$

Terminace

$$\frac{\partial[P]}{\partial t} = k_t[P][H_3O^+], \text{ kde } k_t[H_3O^+] = K_t \quad (5.20)$$

$$\frac{d\alpha}{dt} = K_t \alpha$$

$$\alpha = e^{(K_t t + c_t)} \quad (5.21)$$

5.5.4 Modelování měřených dat

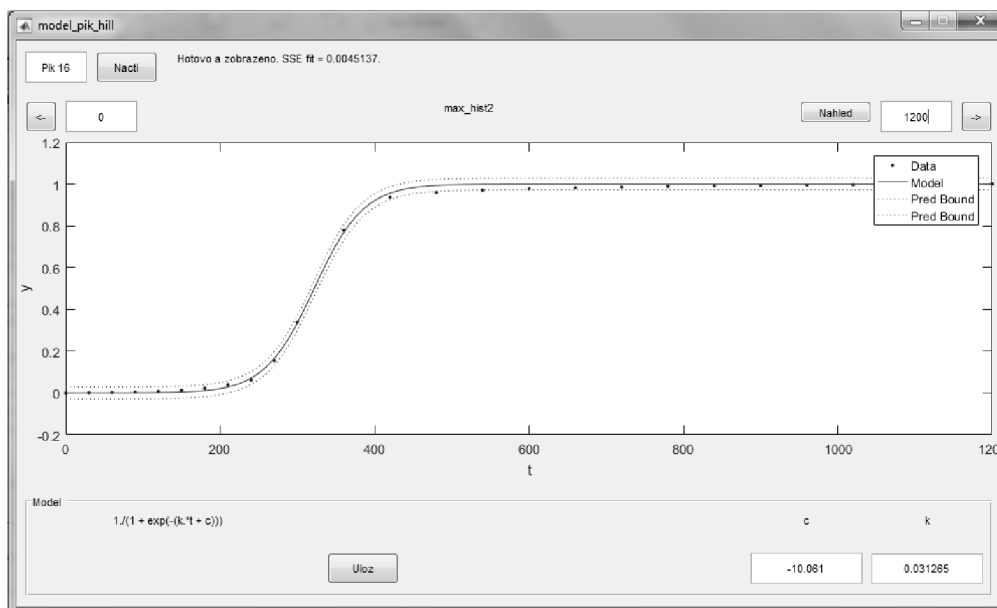
A. Histoacryl a jeho olejnaté směsi

Naměřené průběhy síťování Histoacrylu a jeho olejnatých směsí byly modelovány sigmoidní funkcí ve tvaru (5.22):

$$\alpha(t) = \frac{1}{1 + e^{-(kt+c)}} \quad (5.22)$$

V prostředí GUI Matlab byl pro každou z použitých metod vytvořen program umožňující načtení, zobrazení a modelování dat s uložením výstupů. V případě dat z THz spektroskopie a dielektrické spektroskopie jde o programy se shodným názvem *model_hill.m* a u IR spektroskopie *model_pik_hill.m* (označení *hill* je dáno podobností použité modelové funkce s Hillovou funkcí). Obr. 5.20 uvádí náhled grafického ovládacího okna programu pro modelování časových křivek naměřených IR spektroskopií. Nejdříve je vybráno absorpční maximum (ozn. *pik*), které se bude dále analyzovat, a tlačítkem *Nacti* se načtou příslušná data do grafického okna. V rozbalovací liště vlevo nahoře se zvolí soubor s daty, který má být otevřen k analýze. V grafickém okně se automaticky zobrazí průběh prvního měřeného vzorku. Celkový přehled chování všech vzorků je možné zobrazit tlačítkem *Nahled*. Zadáním konkrétních hodnot do vkládacích polí nad grafem vlevo a vpravo lze vymezit zobrazení dat v intervalu na časové ose t [s], po němž následuje normalizace hodnot v zájmové oblasti obecně označené osy y . Tlačítka se šípkami nad grafem vlevo a vpravo přepínáme mezi jednotlivými vzorky. Rovnice použitého modelu a jeho parametry zjištěné programem pro aktuálně analyzovaný průběh jsou uvedeny pod grafem. Tlačítkem *Uloz* jsou aktuálně zjištěné parametry vzorku uloženy do souboru *vzorek_vysl_modelu.xls*. V grafu jsou zobrazeny hranice 95%-ního intervalu spolehlivosti odhadu parametrů (Pred Bound). K modelování křivek byla použita nelineární regrese s odhadem parametrů metodou nejmenších čtverců, tzn. cílem je minimalizace sumy čtverců odchylek (SSE fit, z angl. Sum Squared Error), zvoleného nelineárního modelu $f(x_i)$ od původních dat y_i podle rovnice (5.23):

$$SSE = \min \left(\sum_{i=1}^n [y_i - f(x_i)] \right) \quad (5.23)$$



Obr. 5.20 Okno programu pro modelování křivek Histoacrylu a směsí měřených IR spektroskopii.

K řešení tohoto optimalizačního problému byl použit algoritmus „Trust-region“, který je založen na principu hledání nového extrému v tzv. důvěryhodné oblasti stanovené v okolí doposud nejlepšího nalezeného řešení. Nalezení správného řešení velmi závisí na volbě startovacích bodů.

B. Histoacryl při reakci s živočišnou tkání

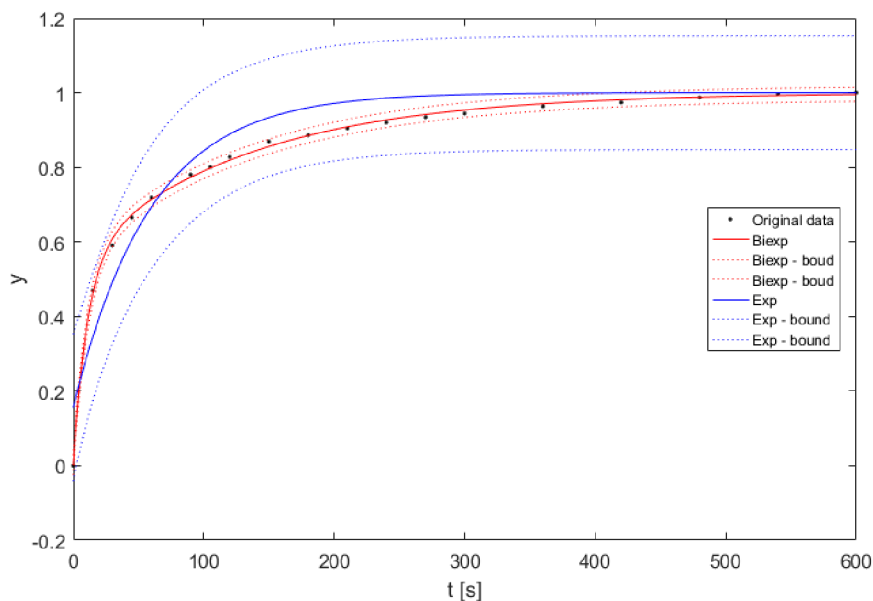
U naměřených průběhů síťování Histoacrylu a jeho olejnatých směsí v přítomnosti živočišné tkáně ve fyziologickém roztoku (tedy vzorky Histpork, resp. mixpork) byl identifikován exponenciální růst všech křivek měřených časových závislostí výšky absorpčního maxima u IR spektroskopie i rozkmitu THz vlny u THz spektroskopie. Rostoucí exponenciála je charakteristická pro inicializaci polymerizace, proto byla nejprve k modelování křivek použita rovnice (5.17). Aproximace křivek jednou exponenciálou však zcela neodpovídá vzhledem k jejich složitějšímu zakřivení. Dalším krokem bylo tedy rozšíření modelu o další exponenciálu podle (5.24)

$$\alpha(t) = 1 - e^{-(k_1 t + c_1)} - e^{(k_2 t + c_2)} \quad (5.24)$$

Obr. 5.21 poskytuje grafické srovnání výsledků aproximace jednou (exp) a dvěma exponenciálami (biexp). Jako kritérium optimality byla opět zvolena chyba SSE. Zatímco při použití jedné exponenciály je SSE 0,09, u biexponenciálního modelu je SSE 0,0012, tedy téměř o dva řády nižší. Pro modelování křivek Histpork a mixpork proto byla použita biexponenciální funkce dle (5.24), ať už se na výsledné polymerizaci podílí kterýkoliv z dějů – inicializace, transfer či terminace.

V prostředí GUI Matlab byly opět vytvořeny programy pro modelování naměřených dat biexponenciální funkcí. V případě dat z THz spektroskopie jde o program *model_biexp.m* a u IR spektroskopie *model_pik_biexp.m*. Také biexponenciální křivky jsou modelovány nelineární regrese s odhadem parametrů metodou nejmenších čtverců SSE za použití optimalizačního numerického algoritmu „Trust-region“.

Struktura uživatelského prostředí programu podobná jako u předchozího modelování sigmoidou.



Obr. 5.21 Srovnání exponenciálního (modrá) a biexponenciálního modelu (červená) pro naměřená data z IR spektroskopie (výška absorpčního maxima č. 16) u vzorku Histpork. Hranice 95%-ního intervalu spolehlivosti odhadu modelu jsou v grafu vyznačeny tečkovaně.

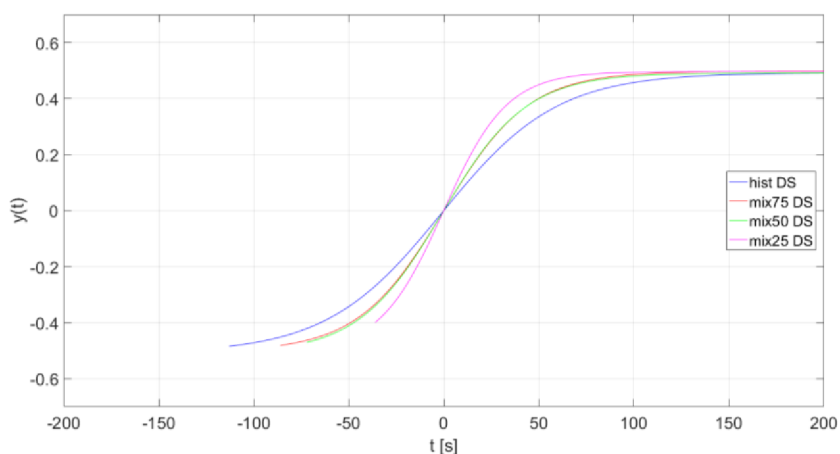
5.5.5 Výsledky modelování dat

Aproximací naměřených dat výše odvozenými modelovými křivkami byly získány obecně parametry c a k , jejichž hodnoty lze použít k vysvětlení chování zkoumaných vzorků. U Histoacrylu a jeho olejnatých směsí byly modelováním sigmoidní funkcí získány 2 parametry, ozn. c a k . Všechny časové závislosti měřených veličin mají podobné průběhy, avšak objevují se s různým zpožděním, což kopíruje hodnota parametru c . Délka tohoto zpoždění neboli posun křivky na časové ose může být ovlivněna různými faktory, nejvíce se však podílí doba, po kterou se vzorek rovnoměrně rozptýluje do tenké vrstvy, při které je teprve schopen síťování. Mnohem větší význam pro naše zkoumání síťování lepidla má parametr k , resp. jeho převrácená hodnota – časová konstanta $\tau = 1/k$. Časová konstanta charakterizuje rychlost sledované reakce, tzn. čím nižší je hodnota τ , tím rychleji reakce probíhá. Právě časovými konstantami lze srovnat rychlosti různých procesů.

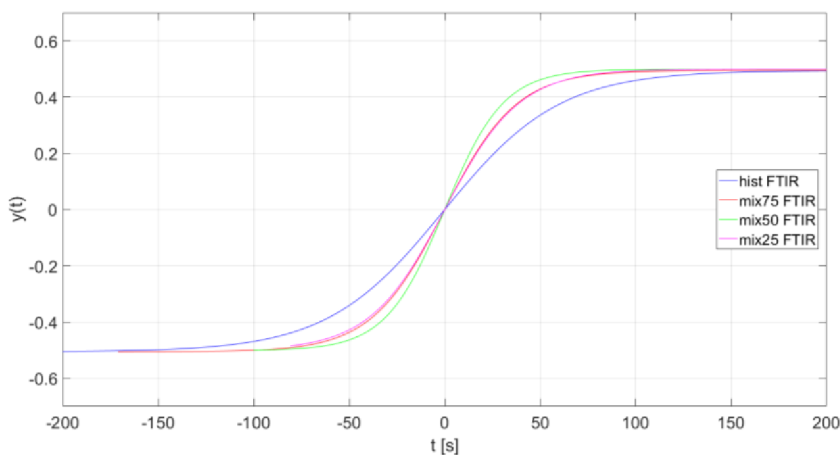
Tab. 5.7 uvádí střední hodnoty parametrů modelu c a τ získaných metodami DS, IR a THz spektroskopie pro jednotlivé vzorky. Konkrétně jde o hodnoty mediánů, což bude podrobně vysvětleno v následující kapitole. Uvedené parametry byly použity k vykreslení reprezentativních modelových průběhů na Obr. 5.22 až Obr. 5.25. Křivky byly vycentrovány podle inflexního bodu (program *sig_podle_inflex_bod.m*) do bodu $[0, 0]$, což umožňuje adekvátní srovnání sklonu jednotlivých sigmoidních průběhů, a tím i rychlostí probíhajících reakcí. Křivky dat z dielektrické spektroskopie mají ve srovnání s ostatními metodami sestupnou tendenci, proto byly překloupeny podle osy x , aby bylo možné křivky všech metod srovnat v jednom grafu. Na první pohled je zřejmé, že τ je nejdelší u vzorků samotného Histoacrylu, a to u všech tří metod. Zároveň však nepozorujeme přímou závislost mezi přidáním oleje ke vzorku lepidla a prodlužováním τ s výjimkou měření na THz spektroskopii (Obr. 5.24).

Tab. 5.7 Přehled parametrů τ a c sigmoidního modelu (medián \pm MAD) pro vzorky Histoacrylu a jeho olejnatých směsí u jednotlivých měřicích metod (DS, FTIR, THz).
U DS jsou klesající křivky otočeny dle osy x pro adekvátní srovnání s křivkami z ostatních metod.

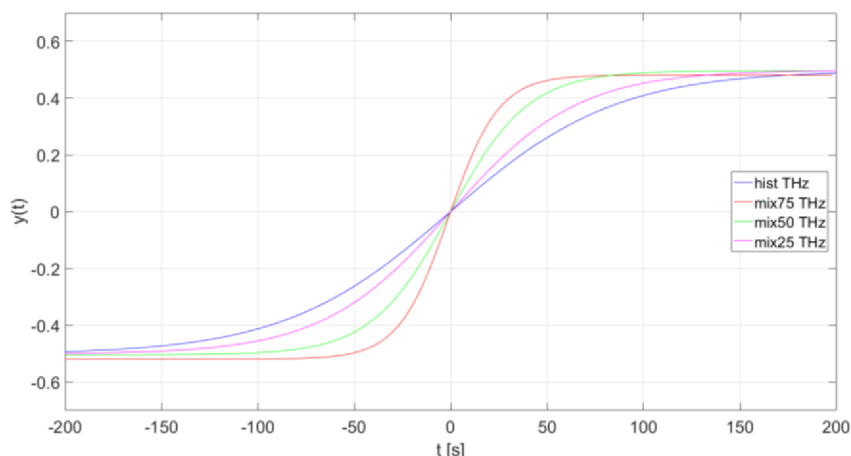
	Vzorek	τ [s]	c [-]
DS	Hist.	30 ± 13	$3,7 \pm 0,7$
	mix75	23 ± 6	$3,8 \pm 0,3$
	mix50	22 ± 4	$3,2 \pm 0,3$
	mix25	17 ± 2	$2,1 \pm 0,2$
FTIR	Hist.	30 ± 9	$-10,5 \pm 0,6$
	mix75	19 ± 4	$-9,0 \pm 3,0$
	mix50	15 ± 1	$-6,5 \pm 2,0$
	mix25	20 ± 3	$-4,1 \pm 0,4$
THz	Hist.	43 ± 10	-10 ± 7
	mix75	13 ± 5	-39 ± 20
	mix50	20 ± 5	-21 ± 7
	mix25	33 ± 7	-11 ± 9



Obr. 5.22 Modelové křivky síťování Histoacrylu a jeho olejnatých směsí měřených DS.

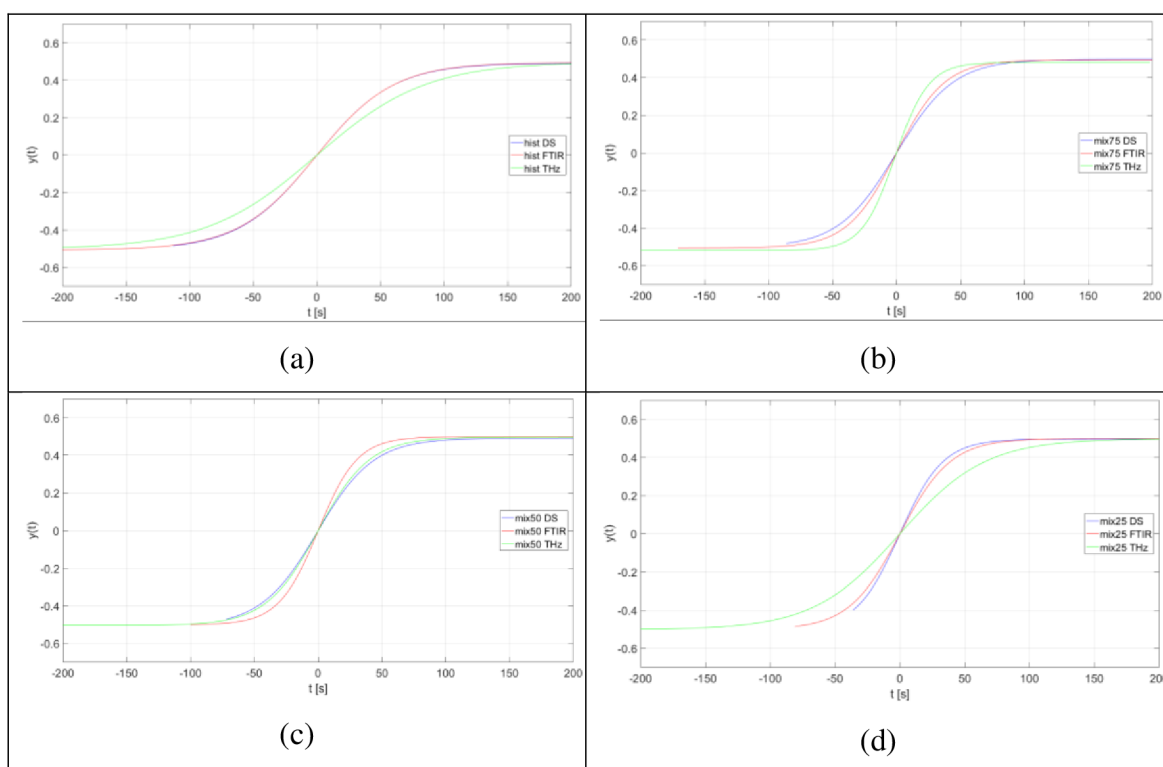


Obr. 5.23 Modelové křivky síťování Histoacrylu a jeho olejnatých směsí měřených IR spektroskopií.



Obr. 5.24 Modelové křivky sít'ování Histoacrylu a jeho olejnatých směsí měřených THz spektroskopii.

Obr. 5.25 uvádí grafické srovnání modelových křivek vzorků získaných jednotlivými metodami. U všech vzorků pozorujeme odchylky mezi metodami, nejčastěji se liší křivky modelu měření THz spektroskopii, nicméně křivky pro metody DS a IR spektroskopie poměrně dobře korelují.



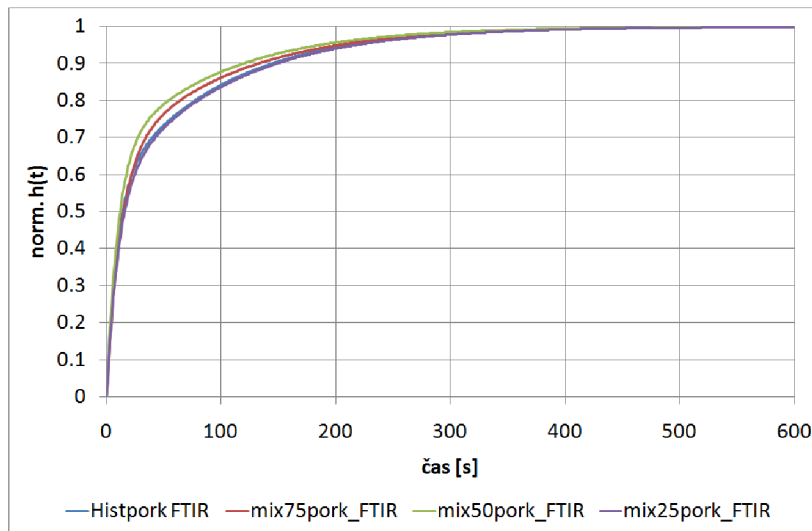
Obr. 5.25 Porovnání modelových křivek dat získaných měřením všemi spektroskopickými metodami (DS, FTIR, THz) vzorků Histoacrylu (a), mix75 (b), mix50 (c) a mix25 (d).

Při reakci vzorků Histoacrylu a jeho olejnatých směsí s živočišnou tkání byly časové závislosti měřených veličin modelovány biexponenciální funkcí a získány tak 4 parametry c_1 , c_2 a k_1 , k_2 charakterizující průběh reakce. Stejně jako u sigmoidní funkce jsou stěžejními časové konstanty $\tau_1 = 1/k_1$ a $\tau_2 = 1/k_2$, popisující zakřivení obou exponenciál. Parametry získané z biexponenciálního modelu jsou pro obě měřicí metody shrnuty v Tab. 5.8. Modelové křivky odpovídajících modelových parametrů jsou graficky zobrazeny na Obr. 5.26 pro IR spektroskopii a Obr. 5.27 pro THz spektroskopii. Zatímco křivky IR spektroskopie se mírně rozcházejí v intervalu 50 – 150

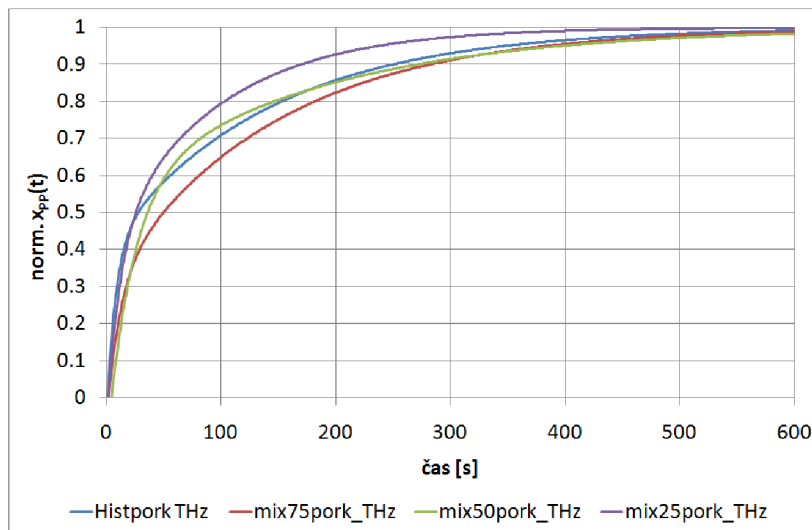
s, u THz spektroskopie jsou odchylky větší. Ani z těchto výsledků není zřejmá jakákoliv souvislost mezi množstvím oleje ve vzorku lepidla a rychlostí jeho síťování.

Tab. 5.8 Přehled parametrů τ_1 , τ_2 , c_1 , c_2 (medián \pm MAD) biexponenciálního modelu pro vzorky Histoacrylu a jeho olejnatých směsí měřených IR a THz spektroskopií

		τ_1 [s]	c_1 [-]	τ_2 [s]	c_2 [-]
FTIR	Histpork	9 ± 2	$0,6 \pm 0,2$	97 ± 12	$0,8 \pm 0,3$
	mix75pork	12 ± 2	$0,5 \pm 0,2$	101 ± 6	$1,0 \pm 0,3$
	mix50pork	10 ± 5	$0,4 \pm 0,1$	96 ± 15	$1,1 \pm 0,2$
	mix25pork	10 ± 6	$0,6 \pm 0,2$	99 ± 9	$0,9 \pm 0,3$
THz	Histpork	8 ± 3	$0,8 \pm 0,3$	140 ± 31	$0,5 \pm 0,3$
	mix75pork	11 ± 6	$1,0 \pm 0,3$	145 ± 40	$0,4 \pm 0,2$
	mix50pork	22 ± 16	$0,4 \pm 0,3$	181 ± 125	$0,8 \pm 0,4$
	mix25pork	12 ± 9	$0,7 \pm 0,6$	96 ± 27	$0,5 \pm 0,7$



Obr. 5.26 Modelové křivky síťování vzorků Histpork a mixpork z měření IR spektroskopii.



Obr. 5.27 Modelové křivky síťování vzorků Histpork a mixpork z měření THz spektroskopii.

5.6 Statistická analýza

Předchozí provedené experimenty naznačují, že zvolenými fyzikálními metodami lze sledovat kinetiku síťování tkáňového lepidla na bázi kyanoakrylátu. Z chemické podstaty kinetiky byly odvozeny modely časových závislostí měřených veličin a stanoveny parametry modelu, charakterizující sledovaný proces. Z experimentu vyvstává řada otázek, které můžeme shrnout a formulovat do několika základních:

- a) Jsou výsledky měření, reprezentující povahu kinetiky síťování tkáňového lepidla a jeho olejnatých směsí, srovnatelné napříč všemi měřicími metodami?
- b) Ovlivňuje přimíchání olejové složky do lepidla kinetiku síťovací reakce?
- c) Změní se kinetika síťování lepidla v přítomnosti živočišné svalové tkáně?

Některé otázky byly již částečně zodpovězeny, např. mění se povaha kinetiky lepidla po přidání živočišné tkáně. Pro hlubší pochopení struktury dat a vzájemných vztahů mezi měřenými vzorky se nabízí možnosti statistické analýzy. Ke statistickému zpracování dat byl použit software Statistica, verze 10.

5.6.1 Histoacryl a jeho olejnaté směsi

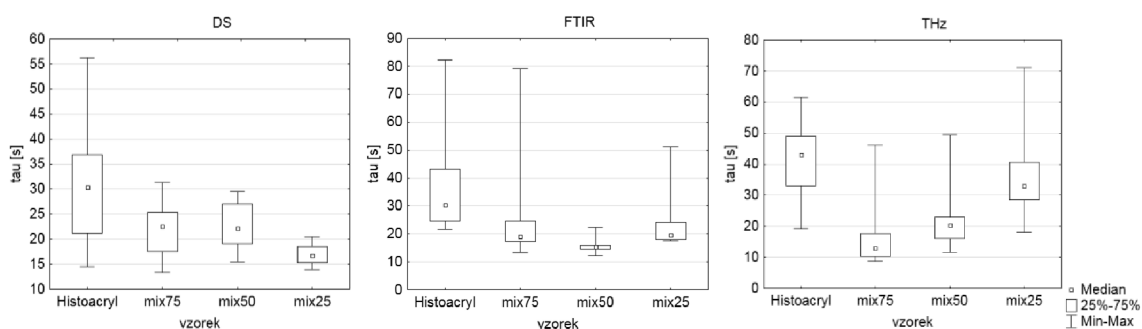
První informaci o povaze naměřených dat poskytuje popisná statistika ve formě výpočtů základních numerických charakteristik a grafické reprezentace dat. Velmi užitečným nástrojem pro získání počáteční představy o struktuře měřených parametrů je grafické znázornění rozložení dat pomocí histogramu a krabicového grafu; napoví mnohé nejen o struktuře dat, ale také jejich rozdělení, předpokladech dalšího testování, a usnadní i volbu charakteristiky popisující centrální tendenci dat (střední hodnotu).

Histogramy pro zjištěné hodnoty časové konstanty τ u vzorků Histoacrylu a jeho směsí v rámci jednotlivých měřicích metod uvádí příloha A. Histogram má podobu sloupcového grafu; jednotlivé sloupce představují četnosti hodnot zkoumané proměnné τ a červená křivka znázorňuje ideální normální rozdělení dat. Dle histogramů data normálně rozdělena nejsou, dokonce vykazují různé typy špičatosti a šikmosti a přítomnost odlehlých hodnot. Tento fakt potvrzují rovněž krabicové grafy hodnot na Obr. 5.28 a grafy normality s vypočtenými kritickými hodnotami Shapiro-Wilkova testu normality (SW-W), viz příloha B. Pro asymetricky rozdělená data je vhodné zvolit jako ukazatele centrální tendence medián, který není příliš citlivý k odlehlým hodnotám jako aritmetický průměr [171]. Vedle centrální tendence umožňuje krabicový graf posoudit rozptýlenost dat. Krabici tvoří 50 % dat, uvnitř je medián, dolní hrana krabice představuje první kvartil (Q_I , percentil 25 %), horní hrana třetí kvartil (Q_{III} , percentil 75 %), vousy grafu minimum a maximum nalezené v datech. S vyloučením průměru jako ukazatele středu dat je nutné zamítnout také použití rozptylu a směrodatné odchylky k popisu rozptýlenosti dat. Místo nich lze zvolit interkvartilové rozpětí, tedy rozdíl mezi třetím a prvním kvartilem ($Q_{III}-Q_I$) a mediánovou absolutní odchylku MAD. MAD se vypočítá jako medián z absolutních odchylek jednotlivých měření od mediánu dat a násobeným příslušným koeficientem podle rovnice (5.25) [171],[172]:

$$MAD = 1,4826 \cdot \text{median}\{|x_i - \text{median}(x)|\} \quad (5.25)$$

Všechny výše uvedené charakteristiky časové konstanty τ pro zkoumané vzorky v rámci všech tří měřicích metod jsou přehledně shrnuty v příloze C.1. V příloze C.2 je

obdobně shrnuta popisná statistika pro modelovou konstantu c . V prvním sloupci tabulky je uveden počet platných vzorků, tj. výběr reprezentativního souboru dat použitý pro statistickou analýzu. V dalších sloupcích je pak srovnání ukazatelů centrální tendence a rozptýlenosti dat, tj. medián a jeho absolutní odchylka MAD, průměr, nalezené minimum a maximum v datech, vypočtené hodnoty dolního (Q_I) a horního kvartilu (Q_{III}) a interkvartilové rozpětí ($Q_{III} - Q_I$).



Obr. 5.28 Krabicové grafy časové konstanty τ pro vzorky Histoacrylu a jeho olejnatých směsí zjištěných jednotlivými měřicími metodami.

Z výsledků popisné statistiky je zřejmé, že největší rozptyl vykazují vzorky čistého Histoacrylu, a to v rámci všech měřicích metod. S tím souvisí i větší odchylka mediánu, kdy MAD je většinou až 2x vyšší než u olejnatých směsí lepidla. Zároveň se ukazuje, že vzorky Histoacrylu vykazují celkově nejdelší časovou konstantu.

Další srovnání charakteristik vzorků a identifikování vztahů mezi nimi umožňuje statistické testování. S ohledem na validitu výsledků je důležitým krokem výběr vhodného statistického testu. Chceme-li srovnat více vzorků najednou, je potřeba volit test pro více než dva výběry, tedy z kategorie analýzy rozptylu. Nenormální rozdělení dat zavrhuje použití parametrických testů. Neparametrickou obdobou analýzy rozptylu je Kruskal-Wallisův test [173]. Za předpokladu nezávislosti pozorovaných hodnot lze testovat nulovou hypotézu H_0 , postavenou na shodě výběrových distribučních funkcí srovnávaných souborů podle (5.26). Alternativní hypotéza H_1 pak zní, že alespoň jedna distribuční funkce bude odlišná:

$$H_0: F_{Hist.}(x) = F_{mix75}(x) = F_{mix50}(x) = F_{mix25}(x) \quad (5.26)$$

$$H_1: \text{Alespoň jedna } F_i(x) \text{ se liší od ostatních} \quad (5.27)$$

Postup testu je následující: Základem je sdružený náhodný výběr, zahrnující hodnoty ze všech m skupin (celkem tedy n hodnot). Hodnoty se vzestupně uspořádají a každé z nich se přiřadí pořadí ve sdruženém výběru. V dalším kroku se vypočítají koeficienty T_i jako součty pořadí hodnot z i -té skupiny. Testovací statistika Kruskal-Wallisova testu H měří rozdílnost průměru pořadí ve skupinách podle rovnice (5.28):

$$H = \frac{12}{n(n+1)} \sum_i \frac{(T_i)^2}{n_i} - 3(n+1) \quad (5.28)$$

Nulová hypotéza H_0 je zamítnuta na hladině významnosti α v případě, že hodnota testovacího kritéria H je větší než kritická hodnota (kvantil) příslušné hladiny významnosti α . Pro velmi malé velikosti souboru (méně než 5 hodnot ve skupině) se kritické hodnoty testu uvádějí ve speciálních tabulkách, jinak lze distribuci H aproximovat Pearsonovým χ^2 rozdělením s $m-1$ stupni volnosti, viz (5.29):

$$h(\alpha, m - 1) \doteq \chi^2(\alpha, m - 1) \quad (5.29)$$

Test je možné vyhodnotit dvojím způsobem; srovnáním testovací statistiky s kritickou mezí nebo srovnáním p -hodnoty významnosti (po převedení do pravděpodobnostní škály). p -hodnota vyjadřuje pravděpodobnost, že by při platnosti H_0 testová statistika nabyla hodnoty, jaká vyšla z dat, nebo hodnoty ještě extrémnější. Tedy čím je p -hodnota testu menší než α , tím menší je pravděpodobnost platnosti H_0 , neboť má malou oporu v pozorovaných datech, a můžeme ji zamítnout.

Jestliže zamítneme H_0 , je potřeba rozhodnout, které dvojice skupin se významně liší. K tomu slouží test mnohonásobného porovnání průměrného pořadí pro všechny skupiny. Srovnávací test lze vyhodnotit dvojím způsobem; pomocí z' -skóre nebo p -hodnot. Výpočet z' hodnot pro srovnání dvou skupin u a v uvádí rovnice (5.30) [173], kde $t_i = \frac{T_i}{n_i}$ je průměr pořadí skupin a n_u, n_v počet hodnot ve srovnávaných skupinách:

$$z'_{u,v} = \frac{|t_u - t_v|}{\sqrt{\frac{1}{12} \left(\frac{1}{n_u} + \frac{1}{n_v} \right) n(n+1)}} \quad (5.30)$$

Vypočtené z' -skóre se srovná s hodnotou kvantilu normálního standardizovaného rozdělení pro vícenásobné porovnávání $z_\alpha(m)$, kterou lze vyhledat ve statistických tabulkách (např. [174]) nebo vypočítat pomocí statistického softwaru. Rozdíl hodnot u -té a v -té skupiny je významný, pokud $z'_{u,v} > z_\alpha(m)$. Z' -skóre můžeme také převést na p -hodnoty podle (5.31) a vyhodnotit test srovnáním hladin významnosti:

$$p = p(z')k(k-1), \quad (5.31)$$

$$\text{kde } p(z') = 2(1 - P(Z < z')) \quad (5.32)$$

Výsledky Kruskal-Wallisova testu uvádí tabulky Tab. 5.9 pro data z DS, Tab. 5.11 pro data z IR spektroskopie a Tab. 5.13 pro data z THz spektroskopie. Test byl vyhodnocen srovnáním hodnoty H s kritickou hodnotou $\chi^2(0,05; 3) = 7,8153$. U všech tří metod vyšel test významně ($p < 0,05$), zamítáme tedy H_0 , že všechny 4 skupiny vzorků pocházejí z rozdělení se stejnou distribuční funkcí, a lze říci, že se časové konstanty jednotlivých typů vzorků (Histoacryl a jeho směsi), vzájemně liší.

Závěr Kruskal-Wallisova testu je obecný a vztahy mezi každou dvojicí vzorků je možné dále analyzovat testem vícenásobného porovnání. Srovnání bylo provedeno jak pomocí z' -skóre, tak p -hodnot u všech měřených metod, nicméně pro snadnější

interpretaci výsledků jsou uvedeny pouze p -hodnoty testu v Tab. 5.10 pro data z DS, Tab. 5.12 pro data z IR spektroskopie a Tab. 5.14 pro data z THz spektroskopie. Tabulky z' -skóre jsou pak shrnuty v příloze D. Statisticky významné rozdíly mezi skupinami jsou v tabulkách zvýrazněny červeně. V případě z' -skóre jde o srovnání s hodnotou kvantilu $z_{0,05}(4) = 2,639$, u p -hodnot se stanovenou hladinou významnosti $\alpha = 0,05$, tzn. významně jsou označeny vztahy, pro něž platí $z' > 2,639$ a $p < 0,05$.

Tab. 5.9 Souhrn výsledků Kruskal-Wallisova testu pro modelová data z DS.

Kruskal-Wallis ANOVA založená na pořadí				
Závislá proměnná: tau [s], nezávislá proměnná: vzorek				
Kruskal-Wallisův test: $H(3, N=66) = 19,15926$ $p = 0,0003$				
	Kód	n platných	Součet pořadí T	Průměr pořadí t
Histoacryl	101	18	827	45,94444
mix75	102	19	603	31,73684
mix50	103	19	651	34,26316
mix25	104	10	130	13,00000

Tab. 5.10 Výsledky testu vícenásobného porovnání p -hodnot z Kruskal-Wallisova testu pro časovou konstantu τ z modelových dat DS.

p -hodnota	Histoacryl	mix75	mix50	mix25
Histoacryl		0,146631	0,385836	0,000081
mix75	0,146631		1,000000	0,074861
mix50	0,385836	1,000000		0,027476
mix25	0,000081	0,074861	0,027476	

Z výsledků vícenásobného porovnání skupin vzorků u DS je zřejmé, že nejvíce se od ostatních odlišuje vzorek mix25, tedy směs Histoacrylu s největším podílem oleje. Časová konstanta je nejkratší a jednoznačně se liší od Histoacrylu i vzorku mix50 s polovičním zastoupením obou složek. U vzorku mix75 test sice významně nevyšel, nicméně p -hodnoty mají k hranici zamítnutí H_0 velmi blízko.

Tab. 5.11 Souhrn výsledků Kruskal-Wallisova testu pro modelová data z IR spektroskopie.

Kruskal-Wallis ANOVA založená na pořadí				
Závislá proměnná: tau [s], nezávislá proměnná: vzorek				
Kruskal-Wallisův test: $H(3, N=38) = 20,47894$ $p = 0,0001$				
	Kód	n platných	Součet pořadí T	Průměr pořadí t
Histoacryl	101	7	221	31,57143
mix75	102	10	205	20,50000
mix50	103	11	90	8,18182
mix25	104	10	225	22,50000

Tab. 5.12 Výsledky testu vícenásobného porovnání p -hodnot z Kruskal-Wallisova testu pro časovou konstantu τ z modelových dat IR spektroskopie.

p -hodnota	Histoacryl	mix75	mix50	mix25
Histoacryl		0,259308	0,000081	0,585838
mix75	0,259308		0,067107	1,000000
mix50	0,000081	0,067107		0,019142
mix25	0,585838	1,000000	0,019142	

Tab. 5.13 Souhrn výsledků Kruskal-Wallisova testu pro modelová data z THz spektroskopie.

Kruskal-Wallis ANOVA založená na pořadí				
Závislá proměnná: tau [s], nezávislá proměnná: vzorek				
Kruskal-Wallisův test: $H(3, N=66) = 32,03690$ $p = 0,0000$				
	Kód	n platných	Součet pořadí T	Průměr pořadí t
Histoacryl	101	8	415	51,87500
mix75	102	15	252	16,80000
mix50	103	21	530	25,23810
mix25	104	22	1014	46,09091

Tab. 5.14 Výsledky testu vícenásobného porovnání p -hodnot z Kruskal-Wallisova testu pro časovou konstantu τ z modelových dat THz spektroskopie.

p -hodnota	Histoacryl	mix75	mix50	mix25
Histoacryl		0,000180	0,005030	1,000000
mix75	0,000180		1,000000	0,000031
mix50	0,005030	1,000000		0,002219
mix25	1,000000	0,000031	0,002219	

U IR spektroskopie test mnohonásobného porovnání poukazuje na největší odlišnost vzorku mix50. Nejvýznamnější je odchylka od samotného Histoacrylu a potvrzena je i u vzorku směsi mix25. Test srovnávající dvojici vzorků mix50 a mix75 významně nevyšel, ale p -hodnoty sahají velmi blízko k hranici zamítnutí H_0 . U THz spektroskopie zamítáme H_0 o podobnosti časových konstant téměř u všech vzorků s výjimkou dvojice Histoacrylu a mix25 a dvojice mix75 a mix50.

Další otázkou bylo, zda jsou časové konstanty konkrétních vzorků srovnatelné i mezi jednotlivými metodami. Záměrem je tedy srovnat časové konstanty zjištěné všemi metodami. Opětovně lze použít Kruskal-Wallisův test na stejná data naměřených časových konstant s tím rozdílem, že budou členěny podle měřicí metody jako nezávislé proměnné. Nulová hypotéza H_0 je postavena na shodě výběrových distribučních funkcí srovnávaných souborů podle (5.33), tedy časových konstant zjištěných použitými spektroskopickými metodami (DS, FTIR, THz). Alternativní hypotéza pak pracuje s variantou odlišnosti alespoň jedné distribuční funkce některé z měřících metod.

$$H_0: F_{DS}(x) = F_{FTIR}(x) = F_{THz}(x) \quad (5.33)$$

$$H_1: \text{Alespoň jedna } F_i(x) \text{ se liší od ostatních} \quad (5.34)$$

Výsledky testu shrnují tabulky Tab. 5.15 pro čistý Histoacryl, Tab. 5.16 pro směs mix75, Tab. 5.18 pro mix50 a Tab. 5.20 pro mix25. Při hodnocení testu byla použita tabelovaná kritická hodnota $h(0,05; 2) \doteq \chi^2(0,05; 2) = 5,9918$. U všech vzorků, s výjimkou čistého Histoacrylu, vyšel test významně ($p < 0,05$), tedy časová konstanta vzorku nemá stejné rozložení hodnot u všech měřených metod.

Pro podrobnější analýzu byl u vzorků směsi aplikován test vícenásobného porovnání, výsledky uvádí Tab. 5.17 pro mix75, Tab. 5.19 pro mix50 a Tab. 5.21 pro mix25. Pro snadnější interpretaci jsou opět uvedeny pouze tabulky p -hodnot, i když se vychází ze z' -skóre, které je následně přepočítáno do pravděpodobnostní škály, jak bylo

popsáno dříve. Nejčastěji se od ostatních odlišuje τ dat z THz spektroskopie (u mix75 a mix25), u vzorku mix50 naopak vyčnívá τ dat z IR spektroskopie.

Tab. 5.15 Kruskal-Wallisův test zjišťující rozdílnost τ síťování Histoacrylu pro všechny měřicí metody (DS, FTIR, THz).

Kruskal-Wallis ANOVA založená na pořadí				
Závislá proměnná: tau [s], nezávislá proměnná: metoda				
Kruskal-Wallisův test: H (2, N= 33) =3,681245 p =0,1587				
	Kód	n platných	Součet pořadí T	Průměr pořadí t
DS	101	18	261	14,50000
FTIR	102	7	121	17,28571
THz	103	8	179	22,37500

Tab. 5.16 Kruskal-Wallisův test zjišťující rozdílnost časových konstant τ síťování směsi mix75 pro všechny měřicí metody (DS, FTIR, THz).

Kruskal-Wallis ANOVA založená na pořadí				
Závislá proměnná: tau [s], nezávislá proměnná: metoda				
Kruskal-Wallisův test: H (2, N= 44) =8,968953 p =0,0113				
	Kód	n platných	Součet pořadí T	Průměr pořadí t
DS	101	19	515	27,10526
FTIR	102	10	258	25,80000
THz	103	15	217	14,46667

Tab. 5.17 Test vícenásobného porovnání p -hodnot z Kruskal-Wallisova testu pro časovou konstantu τ směsi mix75.

	DS	FTIR	THz
DS		1,000000	0,013171
FTIR	1,000000		0,092044
THz	0,013171	0,092044	

Tab. 5.18 Kruskal-Wallisův test zjišťující rozdílnost časových konstant τ síťování směsi mix50 pro všechny měřicí metody (DS, FTIR, THz).

Kruskal-Wallis ANOVA založená na pořadí				
Závislá proměnná: tau [s], nezávislá proměnná: metoda				
Kruskal-Wallisův test: H (2, N= 51) =14,45754 p =0,0007				
	Kód	n platných	Součet pořadí T	Průměr pořadí t
DS	101	19	636	33,47368
FTIR	102	11	133	12,09091
THz	103	21	557	26,52381

Tab. 5.19 Test vícenásobného porovnání p -hodnot z Kruskal-Wallisova testu pro časovou konstantu τ směsi mix50.

	DS	FTIR	THz
DS		0,000440	0,419419
FTIR	0,000440		0,027283
THz	0,419419	0,027283	

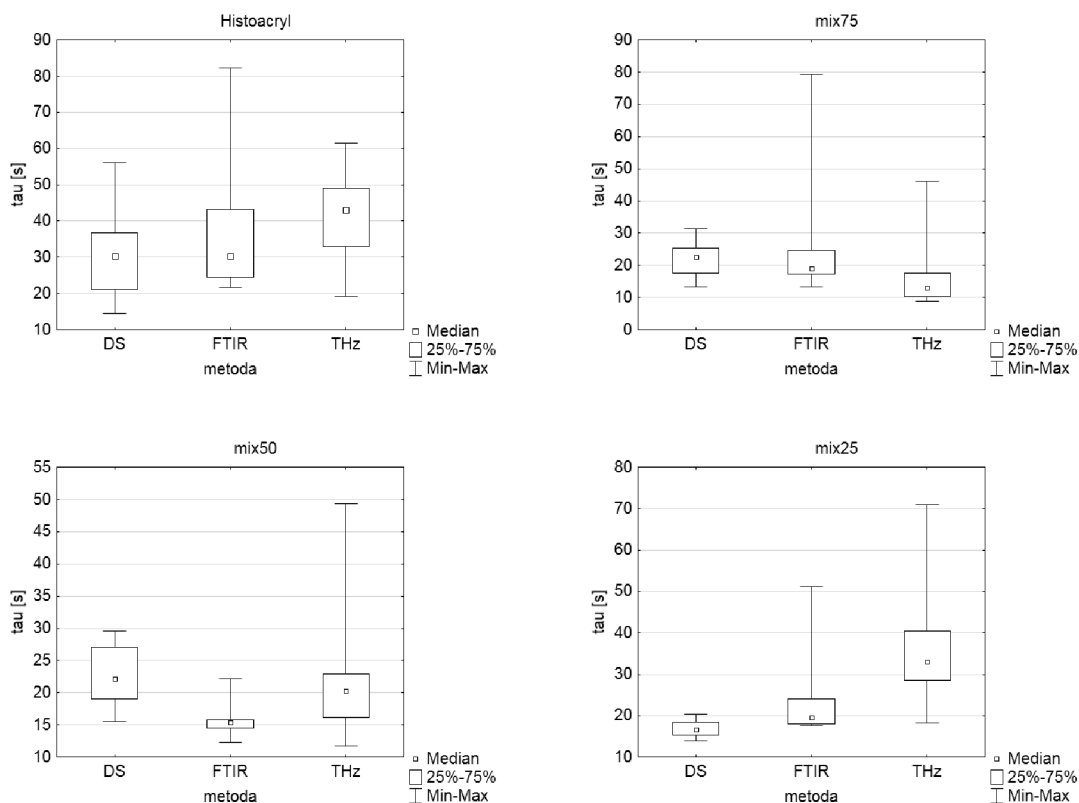
Tab. 5.20 Kruskal-Wallisův test zjišťující rozdílnost časových konstant τ síťování směsi mix25 pro všechny měřicí metody (DS, FTIR, THz).

Kruskal-Wallis ANOVA založená na pořadí				
Závislá proměnná: tau [s], nezávislá proměnná: metoda				
Kruskal-Wallisův test: $H(2, N=42) = 25,05249$ $p = 0,0000$				
	Kód	n platných	Součet pořadí T	Průměr pořadí t
DS	101	10	75	7,50000
FTIR	102	10	168	16,80000
THz	103	22	660	30,00000

Tab. 5.21 Test vícenásobného porovnání p -hodnot z Kruskal-Wallisova testu pro časovou konstantu τ směsi mix25.

	DS	FTIR	THz
DS		0,270160	0,000005
FTIR	0,270160		0,014351
THz	0,000005	0,014351	

Pro lepší představu podobnosti rozložení hodnot τ zjištěných měřicími metodami u jednotlivých vzorků slouží krabicové grafy, viz Obr. 5.29. Grafické zobrazení zvýrazňuje vzájemné odchylky rozložení téhož parametru měřeného různými metodami. Největší variabilita dat je zřejmá u čistého Histoacrylu, který má nejširší interkvartilové rozpětí pro τ , a to u všech metod.

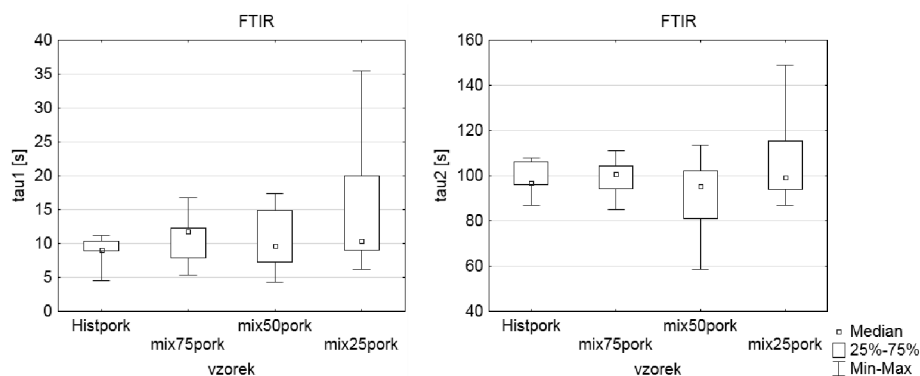


Obr. 5.29 Krabicové grafy časové konstanty τ zjištěné měřicími metodami pro každý typ vzorku.

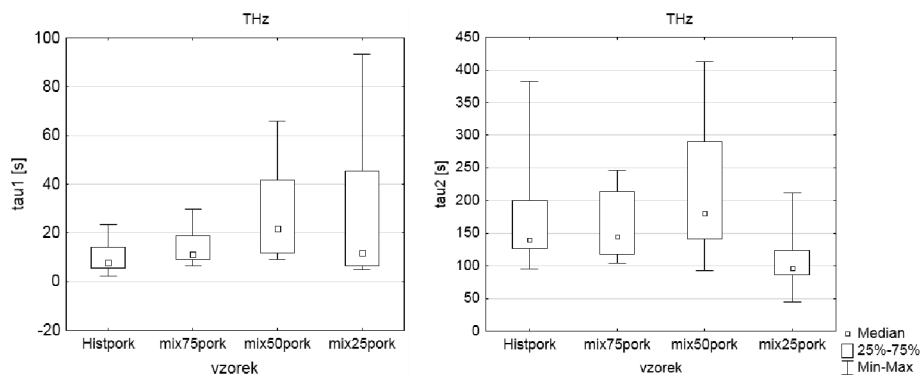
5.6.2 Histoacryl při reakci s živočišnou tkání

Kinetika sítování Histoacrylu (vč. jeho olejnatých směsí) při reakci s živočišnou tkání podstatně mění svůj charakter, jak bylo popsáno v kap. 5.5.3. Vzhledem k použití velmi dobře vodivé živočišné tkáně nasycené fyziologickým roztokem nemohla být do měření zařazena také metoda dielektrické spektroskopie jako u předchozího experimentu. Časové závislosti měřených parametrů získané IR spektroskopií a THz spektroskopií byly modelovány biexponenciální funkcí se 4 parametry c_1 , c_2 a k_1 , k_2 . Stejně jako u sigmoidní funkce zůstávají stěžejními parametry časové konstanty τ_1 a τ_2 , jejichž hodnoty se odrážejí v zakřivení obou exponenciál a vystihují rychlost sledované reakce.

První fází statistické analýzy je grafický náhled rozložení hodnot parametrů τ_1 a τ_2 . Histogramy četností a normální pravděpodobnostní grafy (vč. SW-W testu) pro hodnoty τ_1 a τ_2 u jednotlivých vzorků uvádí příloha A a B pro měření THz i IR spektroskopií. Z grafické analýzy je zřejmé, že data nemají normální rozdělení a jako ukazatele centrální tendence dat není vhodné použít průměr a další charakteristiky z něj vycházející. Střední hodnotu dat lépe reprezentuje medián a jako míry rozptýlenosti MAD a kvartily obdobně jako u dat čistého Histoacrylu a jeho olejnatých směsí. Parametry jsou graficky prezentovány v podobě krabicových grafů na Obr. 5.30 pro IR spektroskopii a Obr. 5.31 pro THz spektroskopii. Všechny numerické charakteristiky jsou shrnuty v příloze C.3 pro IR spektroskopii a C.5 pro THz spektroskopii. Popisná statistika parametrů c_1 , c_2 je pro obě měřicí metody uvedena v přílohách C.4 a C.6.



Obr. 5.30 Krabicové grafy časových konstant τ_1 a τ_2 z IR spektroskopie pro vzorky Histoacrylu (Histpork) a jeho olejnatých směsí (mixpork) při reakci s živočišnou tkání.



Obr. 5.31 Krabicové grafy časových konstant τ_1 a τ_2 z THz spektroskopie pro vzorky Histoacrylu (Histpork) a jeho olejnatých směsí (mixpork) při reakci s živočišnou tkání.

Ve srovnání s předchozím experimentem vykazují vzorky Histoacrylu (Histpork) mnohem menší rozptýlenost dat, a to i vůči ostatním vzorkům (mixpork) v rámci obou měřených metod. Zatímco mediány časových konstant u IR spektroskopie jsou si napříč všemi vzorky velmi podobné, u THz spektroskopie tomu tak již není a objevuje se rostoucí tendence časových konstant s přibývajícím množstvím oleje ve vzorku. Výjimkou je ovšem vzorek mix25pork, u něhož jsou časové konstanty srovnatelné se vzorkem Histpork nebo dokonce i kratší. Zda se hodnoty τ_1 a τ_2 jednotlivých vzorků skutečně liší, bylo posouzeno Kruskal-Wallisovým testem.

Tab. 5.22 a Tab. 5.23 uvádí výsledky Kruskal-Wallisova testu srovnávajícího časové konstanty τ_1 a τ_2 z modelu dat IR spektroskopie. Hodnota testu H je v obou případech menší než kritická hodnota $h(0,05; 3) = 7,8153$, zároveň $p > 0,05$, proto nemůžeme zamítnout H_0 , že všechny 4 skupiny vzorků pocházejí z rozdělení se stejnou distribuční funkcí. Rozdíly časových konstant v rámci jednotlivých vzorků nejsou nijak výrazné. Zdá se tedy, že po přidání živočišné tkáně ke vzorkům Histoacrylu i jeho směsí probíhá reakce podobnou rychlostí.

Tab. 5.22 Souhrn výsledků Kruskal-Wallisova testu pro časovou konstantu τ_1 získanou modelováním dat z IR spektroskopie.

Kruskal-Wallis ANOVA založená na pořadí				
Závislá proměnná: tau1 [s], nezávislá proměnná: vzorek				
Kruskal-Wallisův test: $H(3, N=39) = 3,849456$ $p = 0,2782$				
	Kód	n platných	Součet pořadí T	Průměr pořadí t
Histpork	101	9	135	15,00000
mix75pork	102	9	188	20,88889
mix50pork	103	10	185	18,50000
mix25pork	104	11	272	24,72727

Tab. 5.23 Souhrn výsledků Kruskal-Wallisova testu pro časovou konstantu τ_2 získanou modelováním dat z IR spektroskopie.

Kruskal-Wallis ANOVA založená na pořadí				
Závislá proměnná: tau2 [s], nezávislá proměnná: vzorek				
Kruskal-Wallisův test: $H(3, N=39) = 2,370482$ $p = 0,4992$				
	Kód	n platných	Součet pořadí T	Průměr pořadí t
Histpork	101	9	187	20,77778
mix75pork	102	9	180	20,00000
mix50pork	103	10	157	15,70000
mix25pork	104	11	256	23,27273

Kruskal-Wallisův test byl použit rovněž pro srovnání časových konstant biexponenciálního modelu dat z THz spektroskopie. Hodnota testu H je v případě τ_1 vyšší než kritická hodnota $h(0,05; 3) = 7,8153$ a lze tedy zamítnout H_0 , což potvrzuje i $p < 0,05$, viz Tab. 5.24. Následující test mnohonásobného porovnání hodnot Kruskal-Wallisova testu (z' -skóre v příloze D a p -hodnoty v Tab. 5.25) poukazuje na největší odchylku vzorku mix50pork od Histpork. V případě srovnání τ_2 je hodnota testu těsně pod kritickou hranicí, nicméně nejde o dostatečně silný důkaz k zamítnutí H_0 ($p > 0,05$). Rozdíl τ_2 napříč vzorky tedy není významný.

Tab. 5.24 Souhrn výsledků Kruskal-Wallisova testu pro časovou konstantu τ_1 získanou modelováním dat z THz spektroskopie.

Kruskal-Wallis ANOVA založená na pořadí				
Závislá proměnná: tau1 [s], nezávislá proměnná: vzorek				
Kruskal-Wallisův test: $H(3, N=42) = 11,83540$ $p = 0,0080$				
	Kód	n platných	Součet pořadí T	Průměr pořadí t
Histpork	101	15	204	13,60000
mix75pork	102	11	258	23,45455
mix50pork	103	10	304	30,40000
mix25pork	104	6	137	22,83333

Tab. 5.25 Výsledky testu vícenásobného porovnání p -hodnot z Kruskal-Wallisova testu pro τ_1 modelových dat THz spektroskopie.

p -hodnota	Histpork	mix75pork	mix50pork	mix25pork
Histoacryl		0,258071	0,004772	0,715224
mix75pork	0,258071		1,000000	1,000000
mix50pork	0,004772	1,000000		1,000000
mix25pork	0,715224	1,000000	1,000000	

Tab. 5.26 Souhrn výsledků Kruskal-Wallisova testu pro časovou konstantu τ_2 získanou modelováním dat z THz spektroskopie.

Kruskal-Wallis ANOVA založená na pořadí				
Závislá proměnná: tau2 [s], nezávislá proměnná: vzorek				
Kruskal-Wallisův test: $H(3, N=42) = 7,546907$ $p = 0,0564$				
	Kód	n platných	Součet pořadí T	Průměr pořadí t
Histpork	101	15	337	22,46667
mix75pork	102	11	231	21,00000
mix50pork	103	10	274	27,40000
mix25pork	104	6	61	10,16667

Další otázkou je, zda parametry τ_1 a τ_2 budou shodné, ať zvolíme k měření IR spektroskopii či THz spektroskopii. Zkoumáme tedy rozložení parametru ve dvou skupinách, ovšem nejedná se o párová data. Vzhledem k nenormálnímu rozdělení dat musíme opět volit neparametrický test pro 2 nezávislé výběry, nabízí se tedy Mann-Whitney U test, který je obdobou dvouvýběrového Wilcoxonova testu [171]. Obecně, Mann-Whitney U test porovnává každou hodnotu parametru z první skupiny x_i s každou hodnotou z druhé skupiny y_i . Konečný počet porovnaných dvojic je $n_x n_y$ [171]. Testuje se nulová hypotéza H_0 , že výběry pocházejí ze stejné populace a mají stejné střední hodnoty. Ačkoliv jde o neparametrický test, předpokladem použití je, že se tvar rozložení obou skupin výrazně neliší, což lze zkontrolovat např. na histogramech.

Počáteční kroky jsou stejné jako u Wilcoxonova testu. První je vytvoření sdruženého výběru, tedy vzestupné uspořádání všech hodnot z obou skupin do jednoho vektoru délky $n_x + n_y$, přitom označení skupin se volí tak, aby platilo $n_x \geq n_y$. Vypočteme součet pořadí hodnot v každé skupině, tj. T_x pro hodnoty x a T_y pro y . Mann-Whitney test vychází z tzv. U statistiky dle rovnic (5.35) a (5.36). Je stanovena hodnota $U = \min(U_x, U_y)$, která je porovnána s tabelovanou kritickou hodnotou pro Mann-Whitneyův test; je-li U menší nebo rovno kritické hodnotě, pak na stanovené hladině významnosti α zamítáme H_0 o totožnosti distribučních funkcí zkoumaných výběrů.

$$U_x = n_x n_y + \frac{n_x(n_x + 1)}{2} - T_x \quad (5.35)$$

$$U_y = n_x n_y + \frac{n_y(n_y + 1)}{2} - T_y \quad (5.36)$$

$$U_x + U_y = n_x n_y \quad (5.37)$$

Mann-Whitneyův test ve Statistice dále počítá také podrobnější z -statistiku. Pokud je počet vzorků dostatečně velký ($n_x n_y > 20$), pak může být použita aproximace normálním rozdělením $No(0,1)$, pro jehož střední hodnotu $E(U)$ a rozptyl $D(U)$ platí vztahy (5.38) a (5.39). Testovací z -statistiku pak lze obecně vypočíst ze vztahu (5.40). Software Statistica využívá při aproximaci $No(0,1)$ navíc korekci na nespojitost a z -statistika má tedy tvar rovnice (5.41), přičemž $\frac{1}{2}$ se přičítá, pokud $U - E(U) \leq \frac{n_y}{2}$, v opačném případě se $\frac{1}{2}$ odečte [175]. Pro lepší interpretaci výsledků lze rovněž zjistit příslušnou p -hodnotu převedením hodnoty z do pravděpodobnostní škály.

$$E(U) = \frac{1}{2} n_x n_y \quad (5.38)$$

$$D(U) = \frac{1}{12} n_x n_y (n_x + n_y + 1) \quad (5.39)$$

$$z = \frac{U - E(U)}{\sqrt{D(U)}} \quad (5.40)$$

$$z = \frac{U - E(U) \pm \frac{1}{2}}{\sqrt{D(U)}} \quad (5.41)$$

Shrnutí výsledků Mann-Whitneyho testu pro data Histpork uvádí Tab. 5.27. V tabulce jsou uvedeny výsledky pro obě časové konstanty zároveň. První dva sloupce uvádí součet pořadí u jednotlivých metod (T_x , T_y), dále hodnoty U a z -statistiky, odpovídající hodnotu p asymptotického testu (při aproximaci $No(0,1)$), počet platných měření pro každou metodu (n_x , n_y) a tzv. přesná p -hodnota vycházející z jednostranného testu. Pokud jsou obě uvedené p -hodnoty přibližně stejné, pak příslušná aproximace se jeví jako vhodná pro daná data. Přesná p -hodnota může být odhadnuta různým způsobem; někdy lze využít tabulky kritických hodnot pro příslušný test na dané hladině významnosti, mnohdy jsou však výpočty přesných hodnot natolik početně náročné, že jsou bez pomoci výpočetní techniky téměř neproveditelné [171].

Výsledky Mann-Whitneyho testu uvádí Tab. 5.28 pro data mix75pork, Tab. 5.29 pro mix50pork a Tab. 5.30 pro mix25pork. Významné výsledky testů jsou vyznačeny červeně ($p < 0,05$). V těchto případech lze zamítnout H_0 o shodě středních hodnot zkoumaných skupin. Při rozhodování se zaměřujeme především na hodnotu 2^*1 str. přesné p , které je věrohodnější u rozsahu výběrů menších než 30 [175]. Výsledky testování poukazují na to, že časová konstanta τ_l zjištěná z měření IR nebo THz spektroskopii je u většiny vzorků stejná s výjimkou vzorku mix50pork. Naopak časová

konstanta τ_2 zjištěná IR a THz spektroskopií se liší významně u všech vzorků s výjimkou mix25pork.

Tab. 5.27 Mann-Whitney U Test dat Histpork dle proměnné metoda ($p < 0,05$ ozn. červeně).

	Součet pořadí FTIR	Součet pořadí THz	U	Z	p-hodnota	n platných FTIR	n platných THz	2*1str. přesné p
τ_1 [s]	126	174	54	0,77517	0,438240	9	15	0,445986
τ_2 [s]	52	248	7	-3,57771	0,000347	9	15	0,000069

Tab. 5.28 Mann-Whitney U Test dat mix75pork dle proměnné metoda ($p < 0,05$ ozn. červeně).

	Součet pořadí FTIR	Součet pořadí THz	U	Z	p-hodnota	n platných FTIR	n platných THz	2*1str. přesné p
τ_1 [s]	84	126	39	-0,75974	0,447412	9	11	0,456097
τ_2 [s]	48	162	3	-3,49479	0,000474	9	11	0,000083

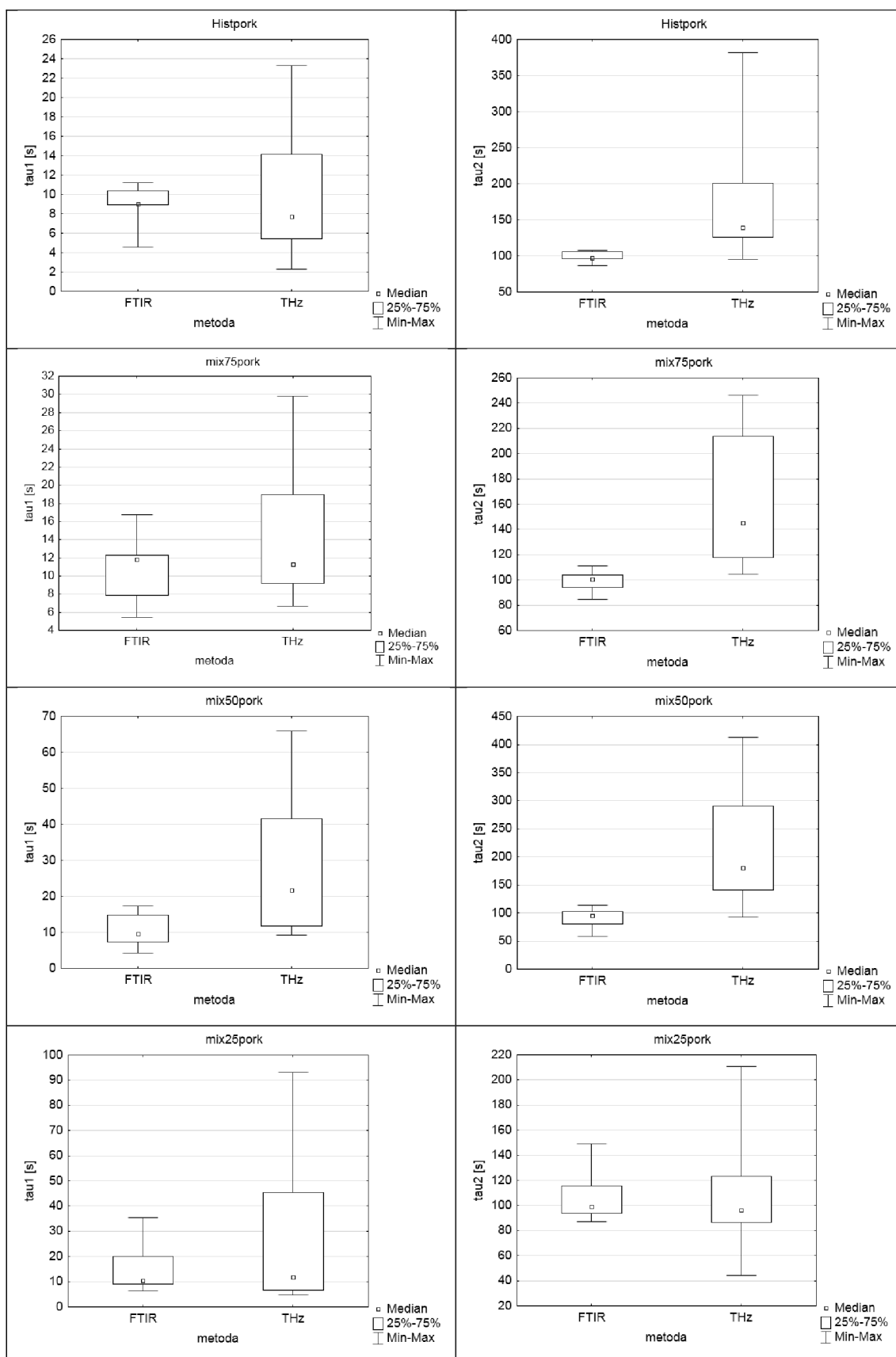
Tab. 5.29 Mann-Whitney U Test dat mix50pork dle proměnné metoda ($p < 0,05$ ozn. červeně).

	Součet pořadí FTIR	Součet pořadí THz	U	Z	p-hodnota	n platných FTIR	n platných THz	2*1str. přesné p
τ_1 [s]	74	136	19	-2,30558	0,021135	10	10	0,018543
τ_2 [s]	63	147	8	-3,13711	0,001706	10	10	0,000725

Tab. 5.30 Mann-Whitney U Test dat mix25pork dle proměnné metoda ($p < 0,05$ ozn. červeně).

	Součet pořadí FTIR	Součet pořadí THz	U	Z	p-hodnota	n platných FTIR	n platných THz	2*1str. přesné p
τ_1 [s]	101	52	31	0,150756	0,880169	11	6	0,883646
τ_2 [s]	104	49	28	0,452267	0,651077	11	6	0,660472

Výsledky Mann-Whitneyho testu lze ověřit vizuálně pomocí krabicových grafů (Obr. 5.32). Na první pohled je zřejmé, že časové konstanty získané z modelů dat měřených THz spektroskopií vykazují mnohem větší rozptýlenost ve srovnání s daty z IR spektroskopie. Mediány časové konstanty τ_1 jsou u obou metod relativně blízké, zatímco časová konstanta τ_2 měřená THz spektroskopií je ve většině případů delší než u IR spektroskopie.



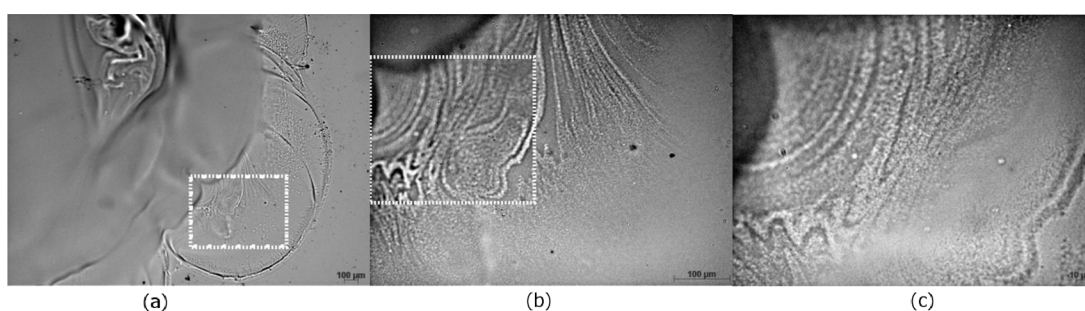
Obr. 5.32 Krabicové grafy srovnávající časové konstanty τ_1 a τ_2 zjištěné u jednotlivých vzorků metodami IR a THz spektroskopie.

5.7 Charakterizace struktury tkáňového lepidla

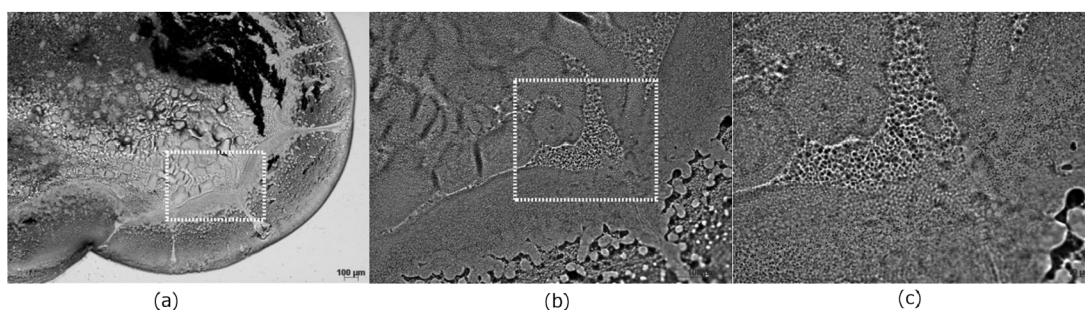
Předchozí kapitola se zabývala kinetikou tkáňového lepidla a srovnáním časových konstant získaných modelováním měřených průběhů pomocí statistické analýzy. Z výsledků však není zcela zřejmý vztah mezi množstvím oleje přidaného ke vzorku lepidla a rychlostí síťování. K lepšímu porozumění příčiny chování jednotlivých vzorků může přispět mikroskopická analýza jejich konečné zesíťované struktury.

5.7.1 Světelná mikroskopie

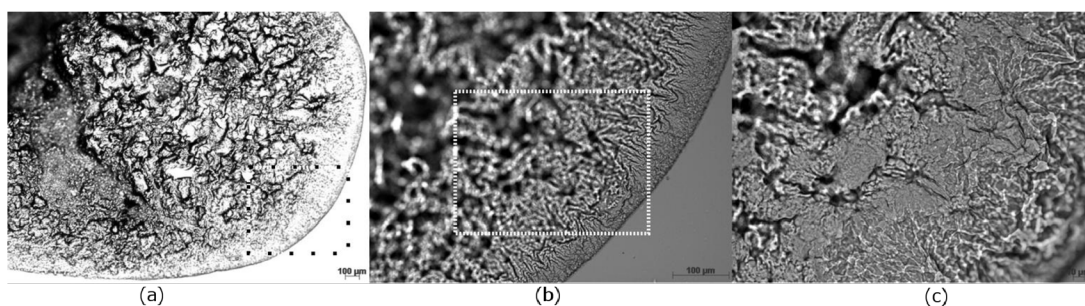
Pro pozorování struktury lepidla a jeho olejových směsí byly příslušné vzorky nanесeny na mikroskopická podložní sklíčka a ponechány cca 60 minut zcela vytvrdit. Zesíťované vzorky pak byly pozorovány mikroskopem Zeiss Axio Scope.A1 v transmissním režimu při zvětšení 5x, 20x a 40x. Snímky jednotlivých vzorků uvádí Obr. 5.33 (čistý Histoacryl), Obr. 5.34 (mix75), Obr. 5.35 (mix50) a Obr. 5.36 (mix25).



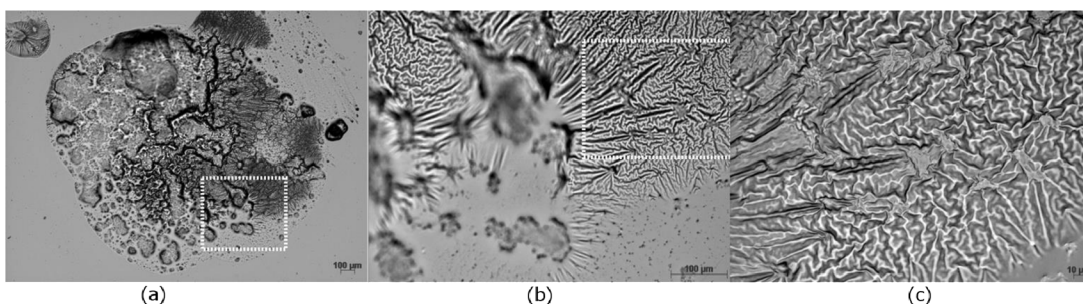
Obr. 5.33 Snímky čistého Histoacrylu získané světelným mikroskopem v transmissním režimu postupným zvětšováním vyznačené oblasti zájmu: 5x (a), 20x (b) a 40x (c).



Obr. 5.34 Snímky směsi MIX75 získané světelným mikroskopem v transmissním režimu postupným zvětšováním vyznačené oblasti zájmu: 5x (a), 20x (b) a 40x (c).



Obr. 5.35 Snímky směsi MIX50 získané světelným mikroskopem v transmissním režimu postupným zvětšováním vyznačené oblasti zájmu: 5x (a), 20x (b) a 40x (c).



Obr. 5.36 Snímky směsi MIX25 získané světelným mikroskopem v transmisním režimu postupným zvětšováním vyznačené oblasti zájmu: 5x (a), 20x (b) a 40x (c).

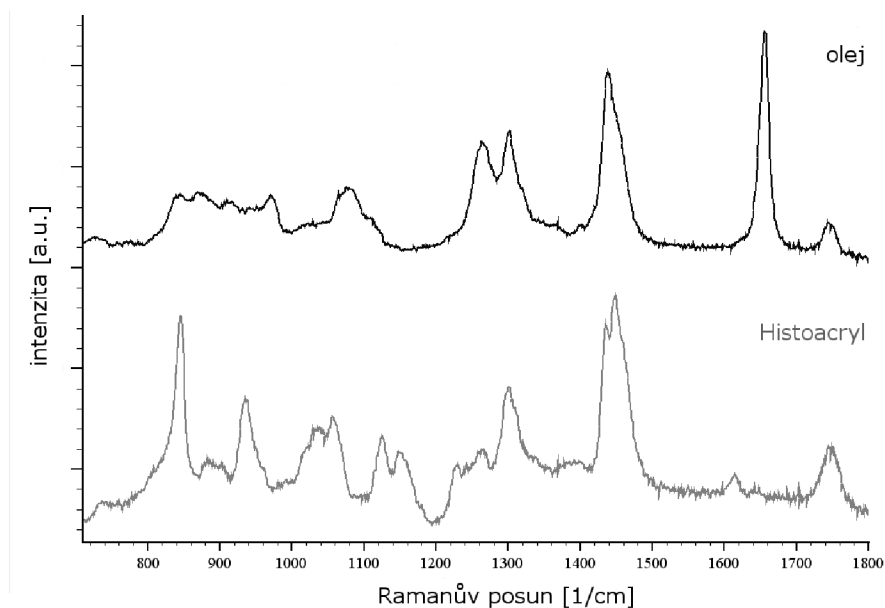
Kontrast snímků při těchto měřeních je dán absorpcí světla denzních struktur ve vzorku. U čistého lepidla byl kontrast nejhorší (viz Obr. 5.33) a i silnější vrstva lepidla byla ve světlém poli téměř transparentní, což ztěžovalo podrobnější zkoumání struktury. Naopak okraj vzorku, kde byla vrstva látky nejtenčí, poskytoval nejlepší obraz polymerních částic uspořádaných do husté sítě řetězových útvarů. Přírozně tenčí vrstva na okraji má lepší přístup k okolní vlhkosti a dokáže ji lépe absorbovat za vzniku husté polymerní sítě. U silnější vrstvy ve středu vzorku je další průnik vlhkosti blokován tenkou vrstvou zesíťovaného polymeru na povrchu, což celkově zpomaluje vytvrzování uvnitř vzorku. Ze snímků lze odhadovat velikost částic v řádech jednotek μm .

Přidáním olejové složky do lepidla se kontrast vzorku jednoznačně zvýšil a lze pozorovat strukturu vzorku již při nejmenším zvětšení. Nejlépe pozorovatelné jsou opět denzní struktury na okraji vzorku, kde je síť částic nejhustší. U všech směsí se objevují jasně ohraničené tmavé a světlé útvary, přičemž výskyt tmavých stop se zvyšuje s rostoucím přídatkem olejové složky ve vzorku. Ze snímků je zřejmá heterogenita směsí, ale není možné na základě mikroskopického zobrazení jednoznačně rozlišit olejovou složku od lepidla. Za účelem identifikace jednotlivých oblastí vzorku byla použita Ramanova spektroskopie a k podrobnějšímu zkoumání vnitřních struktur také konfokální mikroskopie.

5.7.2 Ramanova spektroskopie

Z mikroskopických pozorování je zřejmá heterogenita olejnatých směsí tkáňového lepidla, avšak nelze jednoznačně identifikovat jednotlivé složky, proto bylo použito mapování Ramanovou spektroskopií, které dokáže na základě spektrální analýzy určit zastoupení jednotlivých složek ve vzorku. Ramanova spektroskopická měření byla provedena na Ramanově mikroskopu inViaBasis s použitím budicího diodového laseru NIR na vlnové délce 785 nm a s maximálním výkonem 300 mW. Každý bod vzorku byl změřen objektivem se zvětšením 20x, v 5 akumulacích při expozičním čase CCD detektoru 2 sekundy a s rozlišením 1,5 μm v ose x a y. Nastavení systému bylo totožné pro všechny vzorky a skenování proběhlo v rozsahu vlnočtů 700 až 1800 cm^{-1} .

V prvním kroku bylo změřeno Ramanovo spektrum čistého makového oleje a Histoacrylu, viz Obr. 5.37. Spektra se od sebe podstatně liší a v každém lze nalézt oblasti s významnou intenzitou charakterizující danou látku. Přehled vibračních maxim ve spektrech obou látek uvádí Tab. 5.31. Pomineme-li oblasti překryvu vibračních maxim obou látek, Histoacryl může být charakterizován maximy na vlnočtech 845, 936, 1058, 1127, 1452 a 1750 cm^{-1} , zatímco u makového oleje dominují vlnočty 1080, 1265 a 1658 cm^{-1} . Právě zmíněné oblasti jsou klíčové pro identifikaci jednotlivých složek při následném Ramanově mapování směsí.



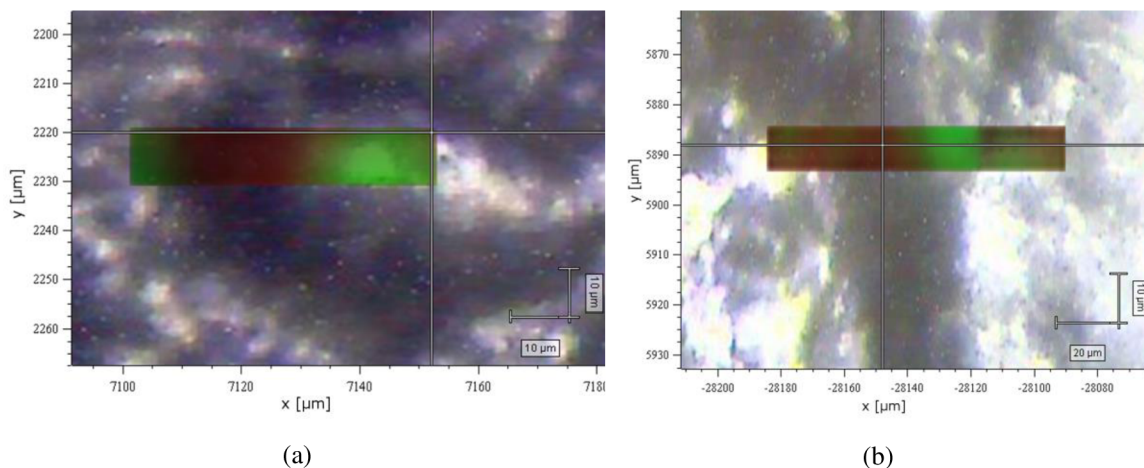
Obr. 5.37 Ramanovo spektrum Histoacrylu (dole) a makového oleje (nahore).

Tab. 5.31 Přehled dominantních vibračních maxim v Ramanových spektrech Histoacrylu (H) a makového oleje (O).

Typy vibrací byly určeny podle [176], [177], [178] a [179].

vlnočet Ramanova posunu [cm^{-1}]	typ vibrace	příslušnost vibračního maxima ve spektru (x přítomen, - nepřítomen)		dominance
		Histoacryl	makový olej	
840 - 845	C=C stretching	x	x (slabý)	H
936	C-O stretching	x	-	H
1058		x	-	H
1080	C-C stretching	-	x	O
1127	C-O stretching	x	-	H
1265	deformace CH vazeb cis-dialkyl etylenů (CH=CH)	-	x	O
1302	deformace CH_2 a CH_3 vazeb	x	x	překryv
1443		x	x	překryv
1452		x	-	H
1658	stretching cis-dialkyl C=C vazeb	-	x	O
1745 - 1750	C=O stretching	x	x (slabý)	H

Při Ramanově mapování je postupně procházena zvolená oblast zájmu ve vzorku, v každém bodě se změní intenzita spektra a porovnává se podobnost s již známými spektry jednotlivých složek. Na základě srovnání je bod přiřazen k příslušné látce. Ramanovu mapu pro směs mix75 a mix50 uvádí Obr. 5.38. Na základě podobnosti se známými spektry dvou hlavních komponent byly skenované body barevně rozlišeny, tedy červenou pro olej a zelenou pro lepidlo. Na získaných mapách lze pozorovat, že ve světlých oblastech mikroskopického obrazu vzorku převažuje právě Histoacryl, zatímco olej jednoznačně dominuje v tmavých oblastech.



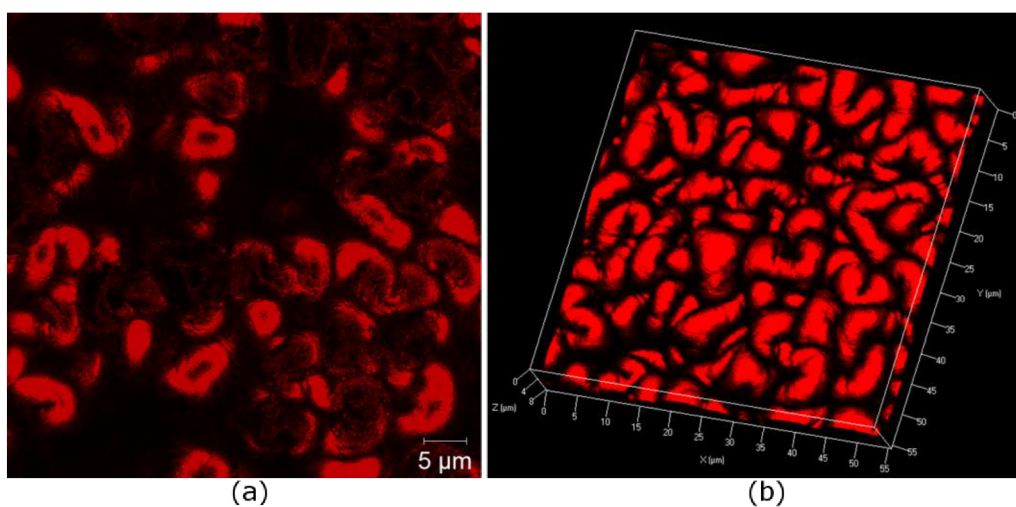
Obr. 5.38 Ramanova mapa pro směs mix75 (a) a mix50 (b). Skenovaná oblast zájmu je v černobílém mikroskopickém obrázku vyznačena barevně na základě shody spektra změřeného v daném bodě se spektrem oleje (červená) nebo Histoacrylu (zelená).

5.7.3 Konfokální mikroskopie

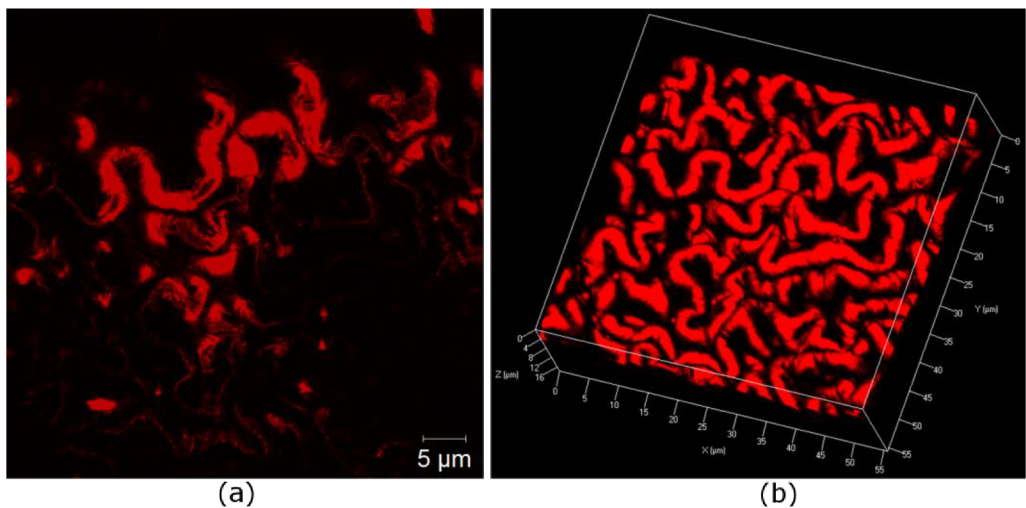
Podrobnější zobrazení struktury vzorků a vyšší rozlišení umožnil konfokální mikroskop Zeiss LSM 700. Vzorky byly analyzovány objektivem C Epiplan-Apochromat 50x/0.95 DIC M27, nastavené parametry skenování shrnuje Tab. 5.32. Výsledné 2D a 3D snímky vzorků uvádí Obr. 5.39 až Obr. 5.42.

Tab. 5.32 Nastavení parametrů skenování na konfokálním mikroskopu Zeiss LSM 700.

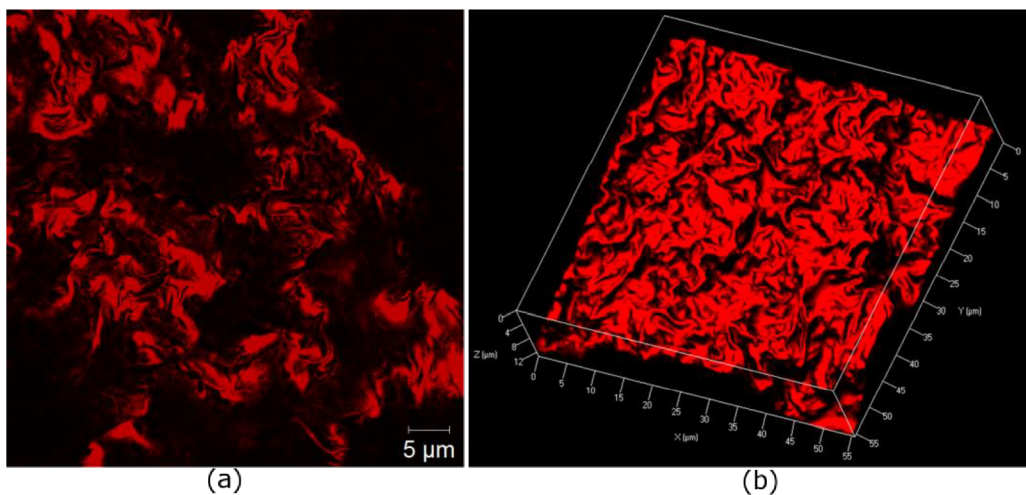
Parametr	Hodnota
Rozlišení osy x, y a z	x: 0,109 μm ; y: 0,109 μm ; z: 0,102 μm
Rozměry obrazu	x: 512 px, y: 512 px, z: individuální podle tloušťky skenované vrstvy
Zoom skenování	2,3
Velikost konfokální clony	12 μm
Zesílení detektoru	480 – 510
Digitální zesílení	1,16 – 1,24



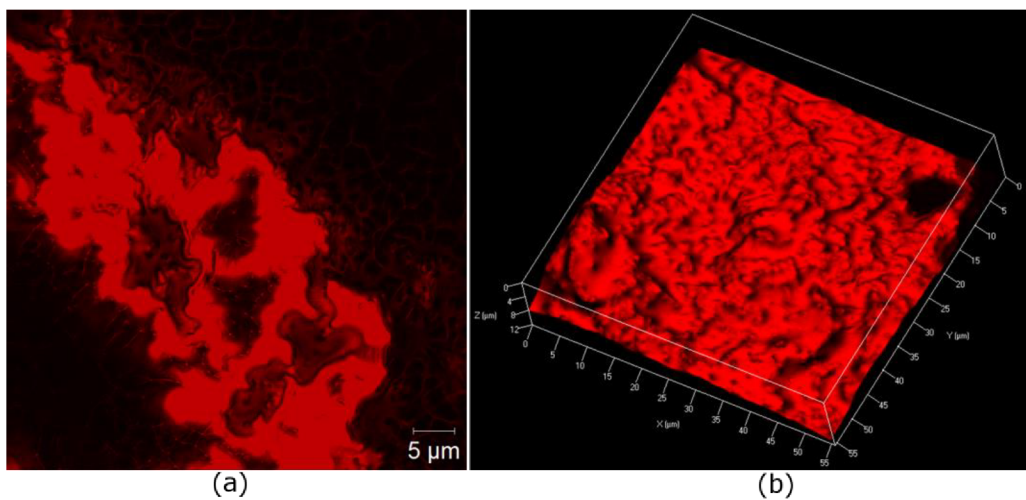
Obr. 5.39 2D obraz řezu tenčí vrstvou (9 μm) vzorku Histoacrylu (a) a jeho rekonstruovaný konfokální 3D snímek celé skenované vrstvy (b).



Obr. 5.40 2D obraz jednoho řezu vrstvou vzorku směsi mix75 (a) a rekonstruovaný konfokální 3D snímek celé skenované vrstvy o tloušťce 20 μm (b).



Obr. 5.41 2D obraz jednoho řezu vrstvou vzorku směsi mix50 (a) a rekonstruovaný konfokální 3D snímek celé skenované vrstvy o tloušťce 13 μm (b).



Obr. 5.42 2D obraz jednoho řezu vrstvou vzorku směsi mix25 (a) a rekonstruovaný konfokální 3D snímek celé skenované vrstvy o tloušťce 13 μm (b).

Obr. 5.39 uvádí 2D (a) a rekonstruovaný 3D obraz (b) vrstvou Histoacrylu tloušťky 9 μm . Na obrázcích je zřejmá řetězovitá formace polymeru a těsné přilnutí řetězců k sobě. Kompaktnost struktury se však postupně vytrácí s přidáním oleje, jak je zřejmé na snímcích vzorků směsí Histoacrylu s olejovou složkou, viz Obr. 5.40 (mix75), Obr. 5.41 (mix50) a Obr. 5.42 (mix25). Již u směsi mix75 lze pozorovat částečné rozvolnění řetězců díky přítomnému oleji, který prostupuje veškerý volný prostor mezi řetězci polymeru a vytváří na povrchu hladký film, ze kterého vystupují ostrůvky lepidla, viz Obr. 5.41 a Obr. 5.42. Olejový film na povrchu vzorku do jisté míry ztěžuje mapování a snižuje kvalitu získaných snímků.

5.8 Diskuze výsledků

Cílem tohoto experimentu bylo porozumět síťování tkáňového lepidla Histoacryl, a to objektivním měřením fyzikálních parametrů pomocí moderních spektroskopických metod – THz spektroskopie, IR a dielektrické spektroskopie při zachování identických postupů a manipulace se vzorky. Síťování polymeru totiž souvisí s časovou změnou sledovaných parametrů (útlum THz vlny, absorbance u IR a disipační faktor u DS).

Pro spektroskopická měření byly připraveny vzorky čistého Histoacrylu a jeho směsi s makovým olejem označené mix75, mix50, mix25 podle procentuálního podílu lepidla v konečném objemu vzorku. Vzhledem k velmi rychlému síťování lepidla vlivem vzdušné vlhkosti bylo nutné manipulovat se vzorky co nejkratší dobu. Jedině tak bylo možné zajistit, aby před samotným umístěním vzorku na měřicí krystal, resp. elektrodu u DS, nebyl promeškán nástup vlastní reakce. Korektní průběh reakce závisel velmi podstatně také na tloušťce vrstvy lepidla, což bylo ověřeno i vlastním měřením. Čím silnější byla vrstva lepidla, tím déle síťování trvalo a nebylo neobvyklé, že část vzorku v průběhu měření neztuhla vůbec, resp. tuhla v mnohem delším časovém horizontu řádově i několika hodin. Tato doba však není akceptovatelná pro měření z hlediska praktického použití lepidla. Síťování inicializují vodní páry a následná polymerizace je nejrychlejší na rozhraní lepidlo/povrch a lepidlo/vzduch, kde dochází k přímému kontaktu s vlhkostí. V těchto místech však zároveň vzniká nepropustná polymerní vrstva, která brání dalšímu vniku vody dovnitř vzorku, a tím i kompletnímu zesíťování uvnitř vzorku. V případě tloušťky vzorku bylo potřeba zvolit kompromis; pro úplné zesíťování by měl být vzorek co nejtenčí, ale zároveň aby i úzký prostor příliš neomezoval přístup vlhkosti. Dostupnými prostředky bylo cíleno na zachování jednotné tloušťky vzorku 40 μm , která se jevila optimální s ohledem na reálně měřitelnou dobu síťování. Vzorky s tloušťkou kolem 100 μm již síťují řádově desítky minut [6], tedy neúměrně dlouho vzhledem k potřebám tohoto experimentu. Měření mohla být zatížena také dalšími chybami, které i přes veškerou snahu nebylo snadné podchytit, např. přítomnost vzduchových bublin, nedostatečné rozmíchání složek směsí či další vlivy způsobující nestandardní chování vzorku (např. neúplné zesíťování).

I přes chyby měření byly získány časové průběhy síťovací reakce Histoacrylu a jeho olejnatých směsí, u nichž byl rozpoznán sigmoidní trend, a reakce stejných vzorků s živočišnou tkání, charakteristické biexponenciálním trendem. Modelové funkce byly odvozeny z kinetických rovnic aniontové polymerizace. Výsledkem modelování je souhrn parametrů, z nichž stěžejní jsou časové konstanty charakterizující rychlost reakce: τ u sigmoidy, τ_1 a τ_2 u biexponenciály. Získané hodnoty byly také předmětem zkoumání statistické analýzy.

V první řadě byla snaha ověřit, zda přidání olejové složky ke vzorku lepidla skutečně zpomaluje vlastní síťovací reakci. Samotná interakce lepidla s olejem není v literatuře podrobně popsána a schopnost zpomalení síťovací reakce není ani jednoznačně potvrzena. Mechanismus, jakým olej zasahuje do polymerizace lepidla, je diskutován především na základě změn fyzikálních vlastností lepidla v jejich směsi. Publikované výsledky [180],[181],[182] naznačují, že důležitou roli zde hraje viskozita. Za normální pokojové teploty 20 °C má Histoacryl nízkou viskozitu v rozmezí 2 – 3,5 cP [180], zatímco viskozita oleje je několikrát vyšší. Makový olej patří do skupiny olejů s vysokým obsahem nenasycené mastné kyseliny linoleové [181] a jeho dynamická viskozita se pohybuje kolem 60 cP při 20 °C [182]. Je tedy zřejmé, že viskozita směsi Histoacryl-olej vzroste. Ve studii [183] bylo zjištěno, že se zvyšující se viskozitou směsi se hustota lepidla snižuje, což by mohlo být i příčinou zpomalení polymerizace.

S využitím prostředků statistické analýzy byl na základě hodnot časové konstanty analyzován vztah mezi jednotlivými vzorky (Histoacryl a jeho směsi) měřenými každou z metod. Podle výsledků Kruskal-Wallisova testu (Tab. 5.9, Tab. 5.11, Tab. 5.13) a také krabicových grafů (Obr. 5.28) se vzorky čistého Histoacrylu odlišují od vzorků jeho směsí u všech použitých metod. Zároveň se hodnota τ jeví výrazně delší ve srovnání s olejnatými vzorky. Vyšší τ poukazuje však i na celkově delší dobu celého síťování, což se zcela neshoduje s původním očekáváním, že by mělo být síťování čistého lepidla bez olejové příměsi naopak nejrychlejší. Tento fakt je však s velkou pravděpodobností zapříčiněn právě ztíženým přístupem vzdušné vlhkosti ke vzorku, jak je zřejmé z designu experimentu (uzavření vzorku mezi dvě plochy při zachování konstantní vzdálenosti mezi nimi, resp. tloušťky vzorku). Přidáním oleje k lepidlu a následným promícháním se vzorek stává přístupnější ataku okolní vlhkosti vzhledem k tomu, že se na okrajích nevytváří příliš kompaktní polymerní struktura zabraňující přístupu vodních par dovnitř vzorku. Pro objasnění podstaty věci byla struktura čistého Histoacrylu a jeho směsí dále zkoumána světelnou a konfokální mikroskopií.

Na mikroskopických snímcích (Obr. 5.33 – Obr. 5.36) můžeme pozorovat heterogenní povahu všech směsí. Struktura vzorku se zřetelně mění v souvislosti se zvyšujícím se množstvím oleje. U vzorku čistého Histoacrylu (Obr. 5.33) bez přidané olejové složky vytváří lepidlo konzistentní síť menších částic, kdežto u směsí s olejem (Obr. 5.34, Obr. 5.35, Obr. 5.36) se objevuje velmi kontrastní obraz tmavých a světlých ohraničených ostrůvků. K identifikaci pozorovaných komponent byla použita Ramanova spektroskopie. Ramanova mapa mikroskopického snímku (Obr. 5.38) potvrdila heterogennost směsí a analýzou spekter v jednotlivých bodech obrazu byly identifikovány klastry částic lepidla (světlé oblasti) rozprostřené v oleji (tmavé oblasti).

Konfokálním mikroskopem byla u Histoacrylu pozorována pravidelná struktura řetězců polymeru, které k sobě těsně přiléhají a vyplňují celý prostor vzorku, přičemž tloušťka řetězců je cca 2 – 3 μm . U vzorků olejnatých směsí lze pozorovat obklopení hydrofilních částic lepidla hydrofobním olejem, který brání jejich shlukování do větších útvarů. Směs lepidlo-olej vytváří koloidní systém, kde jsou částice obou složek odděleny. Právě narušení struktury těsně přiléhajících polymerních řetězců u směsí pravděpodobně stojí za zpřístupněním vlhkosti do vzorku a kratším τ síťování. Srovnáním τ směsí nebyl zjištěn přímý vztah mezi dobou síťování a množstvím oleje. Jediný náznak se objevuje u THz spektroskopie, kdy se τ s přibývajícím množstvím oleje ve vzorku prodlužovala, což však zbylými metodami nebylo potvrzeno.

Změna sigmoidního trendu síťovací reakce lepidla po přidání vzorku živočišné tkáně na biexponenciální koresponduje se zásahem do kinetiky reakce. Sigmoidní

funkce odpovídá kinetické rovnici propagace polymeru, která převládá za normálních podmínek (pokojová teplota, vzdušná vlhkost). Po přidání vzorku živočišné tkáně uchovávané ve fyziologickém roztoku skokově vzroste množství vody a začnou se prosazovat jevy inicializace, transfer a terminace polymeru. Dle Kruskal-Wallisova testu srovnávajících τ_1 a τ_2 z IR spektroskopie není významný rozdíl v kinetice vzorků Histpork, mix75pork, mix50pork a mix25pork. U THz spektroskopie se po přidání oleje k lepidlu až do poměru 1:1 (mix50pork) objevuje růst τ_1 i τ_2 , u vzorku mix25pork dochází naopak k poklesu. Důvod může být různý, např. trojnásobné množství oleje může zastíňovat vlastní reakci lepidla, ale pro úplné objasnění by bylo potřeba analyzovat mnohem větší soubor dat.

Po přidání živočišné tkáně dochází k velkému zvratu u reakce čistého Histoacrylu. U samotného Histoacrylu byla τ (i celková doba síťování), zřetelně delší než u vzorků jeho olejnatých směsí, což lze vysvětlit omezením přístupu H_2O . Za přítomnosti živočišné tkáně, která bývá přirozeně bohatým zdrojem tekutin, se doba polymerizace podstatně zkrátí (dle τ_1). Např. u IR spektroskopie je střední hodnota τ u Histoacrylu 30 sekund, zatímco τ_1 u vzorku Histpork 9 sekund. Hodnota τ_2 odráží spíše pozvolné dozrívání reakce a nemá pro hodnocení velkou váhu.

Na závěr bylo zkoumáno, zda lze všemi metodami naměřit shodné hodnoty τ jednotlivých vzorků. U čistého Histoacrylu se zjištěné hodnoty τ výrazně neliší n rozdíl od olejnatých směsí (Obr. 5.29). Dle výsledku testu vícenásobného porovnání se nejčastěji od ostatních odlišují τ zjištěné THz spektroskopii, konkrétně u vzorků mix75 (nejkratší τ , Tab. 5.17) a mix25 (nejdelší τ , Tab. 5.21), naopak u vzorku mix50 (Tab. 5.19) vyčnívá τ zjištěné IR spektroskopii (nejkratší τ). Na krabicových grafech (Obr. 5.29) a podle odpovídajících výsledků Kruskal-Wallisova testu lze také zaznamenat, že s přibývajícím množstvím oleje ve vzorku se více rozcházejí hodnoty τ naměřené různými metodami. Tento fakt vzbuzuje dojem, že přidání oleje vnáší do měření také větší chybu.

Obdobně byla ověřena identita τ_1 , τ_2 zjištěných různými metodami u vzorků lepidla, jejichž síťovací reakce byla ovlivněna přidáním živočišné tkáně nasycené fyziologickým roztokem. Dle výsledků Mann-Whitneyho testu a krabicových grafů (Obr. 5.32) je zřejmé, že po přidání živočišné tkáně jsou rozdíly hodnot časových konstant mezi metodami u stejného vzorku menší. S výjimkou vzorku směsi mix50pork lze u všech ostatních vzorků konstatovat, že τ_1 zjištěné oběma metodami jsou podobné. Naopak, τ_2 měřená THz spektroskopii je u všech vzorků výrazně delší než u IR spektroskopie, s výjimkou vzorku mix25pork.

6 STUDIUM VLASTNOSTÍ HEMOSTATIK

Rychlost hemostatické reakce hemostatika by měla být dána jednak jeho absorpční schopností, tedy schopností pojmout co největší množství tekutiny v relativně krátkém čase, ale také schopností vytvořit bariéru bránící dalšímu průtoku krve. Předmětem následujících experimentů je sledování obou zmíněných vlastností hemostatik pomocí THz spektroskopie, kterou lze využít k objektivnímu srovnání vzorků na základě měření změn fyzikálních parametrů v průběhu reakce.

Studie byla rozdělena do dvou dílčích experimentů, které na sebe navazují. V praxi reaguje přirozeně hemostatikum přímo s krví, tedy velmi komplexním systémem z chemického i fyzikálního pohledu, což vnáší do měření jistou dávku variability a nejistoty. Pro prvotní testování je nutné zajistit nejen stálé laboratorní podmínky a opakovatelné postupy, ale obecně je také vhodné co nejvíce omezit vstup dalších proměnných, které lze stěží podchytit. Proto byl pro počáteční testování absorpční schopnosti hemostatik použit fyziologický roztok jako jednotné, stálé a lépe specifikovatelné médium jak po fyzikální, tak chemické stránce.

Na první experiment navazuje testování samotné hemostatické reakce přímo s lidskou krví. Snažíme se tedy o sledování kinetiky reakce za podmínek co nejvíce blízkých realitě. Vzhledem k tomu, že je v experimentu použit biologický materiál získaný přímo od lidských dobrovolníků, bylo nutné žádat o povolení etickou komisí, viz Příloha E. Na základě udělení oficiálního písemného souhlasu odborné etické komise Ústavu biomedicínského inženýrství (viz Příloha F) bylo možné zahájit plán vlastního experimentu. Cílem analýzy naměřených dat je pak vytvořit model kinetiky jednotlivých hemostatik a stanovit specifické časové konstanty procesu. Srovnání těchto dvou experimentů by mohlo přispět k lepšímu pochopení principu účinku jednotlivých typů hemostatik; zdali je mechanismus účinku dán převážně jejich absorpční schopností, či jsou podstatnější změny ve struktuře vzorku.

6.1 Příprava vzorků

Pro měření byly připraveny vzorky hemostatik, jejichž charakteristika byla uvedena v kap. 3.2 a 3.3. Celkem bylo použito 5 různých typů hemostatik: absorpční hemostatika z oxidované celulózy (Surgicel Nu-Knit, Surgicel Fibrillar), želatiny (Gelita-Spon) a kolagenu (Hypro-Sorb R) a biologicky aktivní hemostatikum (TachoSil). Snahou bylo zajistit pestrý výběr vzorků, aby byl zastoupen ideálně každý typ hemostatika. Zároveň byl však výběr vzorků podmíněn dostupností na spolupracujícím medicínském pracovišti a také celkovou dostupností v České republice, neboť ne všechny produkty se na český trh dodávají. Do měření byla zařazena také čistá celulóza (kosmetická vata) jako kontrolní vzorek bez jakýchkoliv známých hemostatických vlastností, a to pro srovnání především s oxycelulózovými hemostatiky. Pro měření byly z uvedených materiálů připraveny vzorky s takovými rozměry, aby byl zachován přibližně stejný objem a mohly být nasyceny aplikovanou kapalinou (20 μ l). V konečném důsledku však nejsou precizní rozměry vzorků příliš důležité, neboť penetrační hloubka THz vlny do vzorku je velmi omezená (max. desítky μ m) a neměříme materiál v celé tloušťce, ale pouze velmi tenké rozhraní v kontaktu s krystalem. Nejdůležitějším aspektem je tedy dodržet dobrý kontakt vzorku s krystalem a zajistit dostatečné nasycení této kontaktní vrstvy kapalinou. Tab. 6.1 uvádí rozměry připravených vzorků hemostatik.

Ve studii byly použity dva typy roztoků, pomocí nichž byla sledována absorpční a hemostatická reakce vybraných hemostatik. K měření absorpční schopnosti byl použit

fyziologický roztok výrobce Fresenius Kabi Italia S.r.l., 0,9 %ní roztok chloridu sodného běžně používaný pro přípravu infúzí. Pro zkoumání vlastní hemostatické reakce byla použita lidská krev poskytnutá dobrovolníky, kteří byli s průběhem celého experimentu a následným použitím dat seznámeni. Jejich dobrovolná účast v experimentu byla stvrzena a doložena formou informovaných souhlasů. Formulář informovaného souhlasu je uveden v příloze G. Pro měření bylo potřeba sice jen velmi malé množství krve (řádově μl), ale zároveň byl nutný její opakovaný odběr tak, aby byla pro každé měření čerstvá. Krev odebraná jednorázově ve větším množství se totiž rychle sráží a nelze ji použít opakovaně v průběhu několika minut k dalšímu měření. Vzhledem k předchozímu byl zvolen odběr kapky kapilární krve po vpichu do lůžka prstu ruky pomocí pera Accu-Chek[®] Fastclix. Jde o nejšetrnější způsob odběru krve, který běžně praktikují diabetičtí pacienti při pravidelné kontrole aktuální hladiny glukózy. Po vpichu je kapka kapilární krve z prstu nasáta pipetou a připravena k okamžité aplikaci.

Tab. 6.1 Rozměry vzorků hemostatik připravených pro měření.

Hemostatikum	Tloušťka [mm]	Rozměr [mm]
S. NuKnit	0,4	7 x 7,2
S. Fibrillar	0,6	7 x 5
HyproSorb	0,5	7 x 6
Gelita	0,6	7 x 5
TachoSil	0,6	7 x 5
Celulóza	0,6	7 x 5

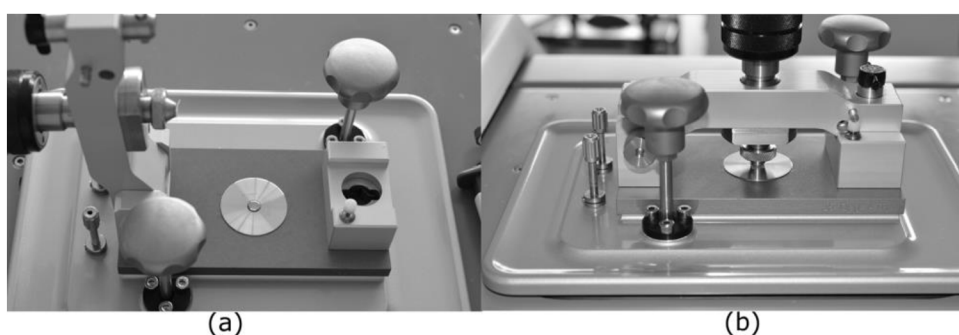
V průběhu přípravy experimentů byla řešena otázka náhrady krve jiným, nejlépe laboratorně připraveným roztokem, který by se svým složením krvi co nejvíce podobal a dokázal ji nahradit. Příkladem je Krebsův roztok používaný při experimentech prováděných na zvířecích srdcích. Náhrada čerstvé krve je však obtížným problémem. Předmětem studia je totiž vlastní hemostatická reakce, která je přímo podmíněna přítomností krevních elementů (erytrocytů, leukocytů a trombocytů) v krvi, jak bylo popsáno v kap. 3.1. Z toho důvodu je v zájmu experimentu dodržet všechny přirozené vlastnosti krve, včetně srážlivosti, aby byly co nejvíce zachovány přirozené podmínky pro účelové použití hemostatika. Laboratorní roztoky lze sice připravit ve složení odpovídající krvi, ale bez přítomnosti krevních elementů, které se na hemostáze významně podílí. Při použití takových roztoků by byla měřena pouze absorpční schopnost hemostatika, kterou lze snadněji zkoumat dostupným fyziologickým roztokem. Rovněž krevní konzervy se zvířecí nebo lidskou krví byly z experimentu vyloučeny, neboť tato krev je ošetřena protisrážlivými látkami (nejčastěji citronanem sodným), aby se předešlo přirozené hemokoagulaci a vzniku krevního koláče, který by krev znehodnotil pro další použití.

6.2 Metodika měření

Jak bylo teoreticky vysvětleno v kap. 2.4.4, THz spektroskopie je metoda velmi citlivá na obsah vody ve vzorku. Z toho důvodu se jeví jako vhodný způsob monitorování absorpční i hemostatické aktivity hemostatik za podmínky, že nedojde k úplnému útlumu signálu přítomností kapalného vzorku, což bylo ověřeno testovacími měřeními. Při zkoumání absorpční schopnosti dochází k nasáknutí vzorku fyziologickým

roztokem. Při sledování hemostatické aktivity je důležitá rychlost vytvoření pevné krevní zátky za účasti hemostatika, tedy přeměny kapalného skupenství krve na pevnou krevní sraženinu. Vzhledem k různému původu hemostatických materiálů se předpokládá i jejich rozdílnost v obou experimentech.

K měření kapalných vzorků je vhodnější metoda ATR. Postup aplikace je naznačen na Obr. 6.1. Na vyčištěný křemíkový krystal bylo pipetou naneseno nejdříve požadované množství 20 μl fyziologického roztoku, resp. krve. Vzápětí byla kapka roztoku přiklopena vzorkem hemostatika za dodržení konstantního tlaku pomocí přitlačného šroubu a byla sledována jejich reakce, resp. měřena časová závislost útlumu THz vlny ve vzorku související s probíhající reakcí. Měření na spektrometru bylo zahájeno ještě před okamžikem nanesení kapaliny na krystal, aby byly zachyceny všechny změny související s aplikací jednotlivých složek.



Obr. 6.1 Aplikace vzorku kapaliny (zde fyziologický roztok) na ATR krystal (a), následné přiklopení připraveným vzorkem hemostatika a jeho upevnění pomocí šroubu (b).

Nastavení spektrometru bylo optimalizováno pro dostatečně rychlé skenování a zachování dobrého SNR. Byla měřena pouze surová data, tj. THz signál bez dalších výpočtů ATR parametrů. Nastavené parametry skenování uvádí Tab. 6.2, přičemž jedno měření trvalo 1,44 s. U spektrometru ve Varšavě bohužel docházelo k výpadkům měření, pravděpodobně z důvodu náročnosti ukládání velkého objemu dat do paměti. Zápis dat byl po přerušení ihned obnoven, doba přerušení obvykle nepřesáhla 10 s.

Měření probíhalo v klimatizované místnosti při teplotě $(23 \pm 1) ^\circ\text{C}$ a relativní vlhkosti $(25 \pm 1) \%$. Z vnitřní optické komory spektrometru byl po celou dobu měření odsáván vzduch vakuovou pumpou za účelem minimalizovat přítomnost vodních par. Čistý ATR krystal byl měřen před každým vzorkem jako reference. Po měření vzorku byl krystal důkladně zbaven nečistot a ošetřen isopropylalkoholem. Měření bylo opakováno, aby bylo od každého hemostatika k dispozici alespoň 10 reprodukovatelných průběhů.

Tab. 6.2 Nastavené parametry pro ATR měření kinetiky hemostatik na přístroji TPS Spectra 3000

Parametr měření	Hodnota
Počet skenů	30
Rozlišení	1,5 cm^{-1}
Frekvence skenování	30 s^{-1}
Počet opakování (počet výsledných skenů)	249 - 599

6.3 Zpracování dat

Při hodnocení kinetiky reakce vycházíme ze změn měřeného THz signálu, ke kterým dochází v průběhu reakce v souvislosti s absorbováním tekutiny hemostatikem nebo změnou jeho struktury. Opět je tedy sledována změna rozkmitu THz vlny (P-P). THz signál poskytuje pro tuto analýzu veškerou důležitou informaci o měřeném objektu.

Surová data, tj. soubory ve formátu .csv, obsahují THz signály změřené v každém časovém okamžiku. Ke zpracování objemných dat byl opět použit programovací nástroj MATLAB. Po načtení dat programem *ATR_TDS_AB_Polsko_2017_07_31.m* bylo provedeno chronologické přerovnání jednotlivých průběhů a následně vyhledání extrémních hodnot THz vlny se zjištěním hodnoty P-P, včetně souřadnic na ose x. Zjištěné hodnoty byly uloženy do souboru *tds_vzorekxy_extrem.xls*, kde *xy* udává číslo vzorku. U takto zpracovaných dat byla provedena kontrola, zda jsou data úplná a zdali nedošlo v průběhu měření k chybám nebo významným odchylkám. Data jsou přenesena do souboru *vzorek.xls*, který obsahuje záznamy P-P hodnot pro všechny vzorky daného vzorku hemostatika v závislosti na čase (záložka *tab*).

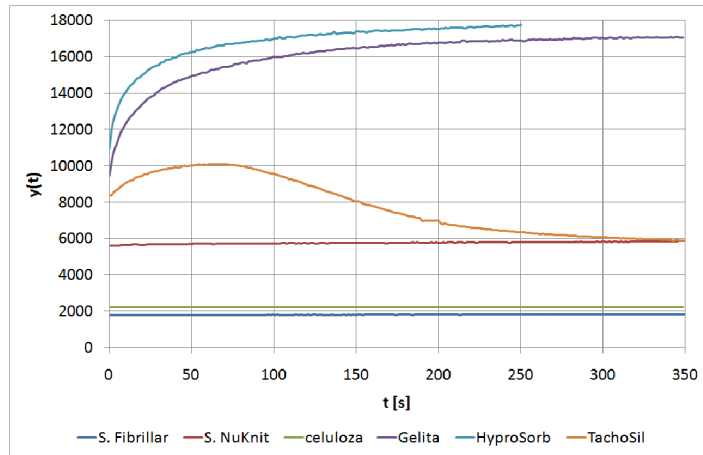
U některých průběhů měřených na spektrometru ve Varšavě se objevují výpadky hodnot, proto bylo v první řadě nutné odstranit vzniklé mezery v datech. Pro náhradu dat by bylo možné využít početně náročnějších operací, jako je interpolace lineárním či kubickým splinem. V případě těchto dat se však ukázalo plně dostačující provést náhradu chybějících hodnot zprůměrováním sousedních hodnot. Prodleva byla vzhledem k rozsahu měřených dat poměrně krátká (cca 10 sekund) a neměla podstatný vliv na následné modelování dat, pokud by se neobjevily výrazné extrémy.

6.4 Charakteristika dat

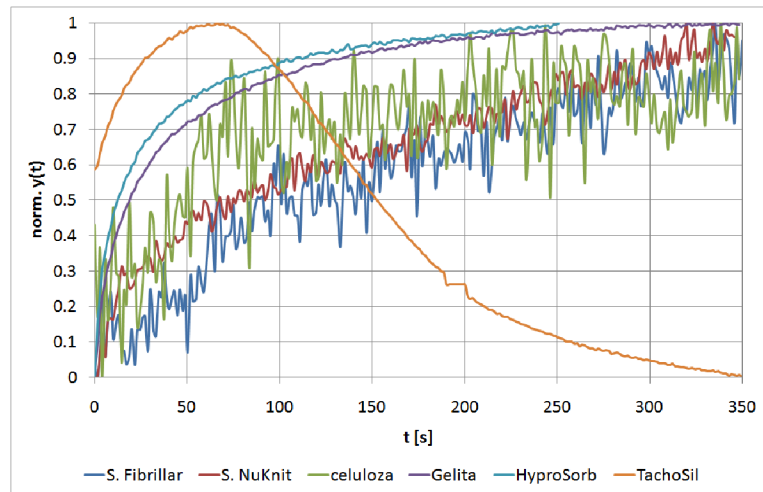
Obr. 6.2 poskytuje první náhled na chování jednotlivých typů hemostatik (originální průběhy bez jakékoliv předchozí úpravy) při reakci s fyziologickým roztokem. Odezva vzorků na bázi celulózy je podstatně slabší ve srovnání s ostatními hemostatiky a je zastíněna silnějšími reakcemi ostatních hemostatik, proto bylo provedeno sjednocení rozsahů měřených signálů normalizováním, což umožní i adekvátní srovnání všech vzorků. Při popisu dynamického jevu nejsou konkrétní hodnoty měřených parametrů tolik důležité jako jejich změna v čase. Naměřené časové signály byly normalizovány na interval $\langle 0, 1 \rangle$ dle rovnice (6.1), kde $norm\ y(t)$ je normalizovaná hodnota aktuální hodnoty signálu $y(t)$, y_{min} a y_{max} minimální, resp. maximální hodnota signálu:

$$norm\ y(t) = \frac{y(t) - y_{min}}{y_{max} - y_{min}} \quad (6.1)$$

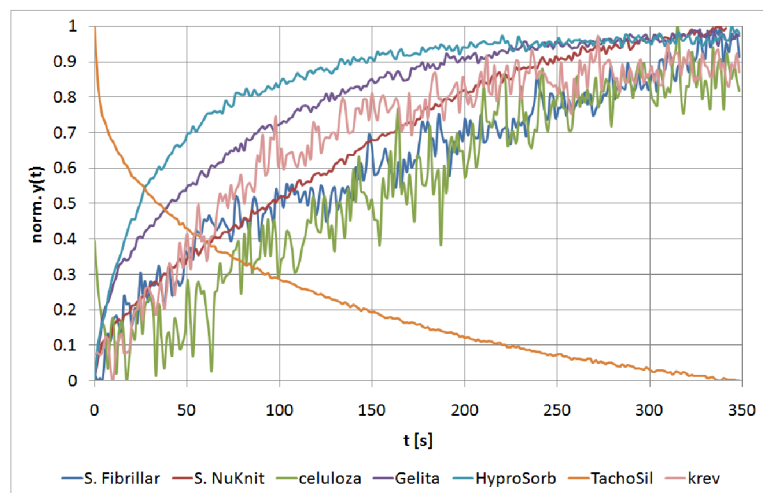
Obr. 6.3 uvádí přehled normovaných průběhů hemostatik. Nejnižší SNR ze všech vzorků vykazují celulózy; útlum souvisí s přítomností vody ve vrstvě těsně přiléhající ke krystalu. Oxidované celulózy (S. Fibrillar, S. NuKnit) však zároveň vykazují vyšší SNR ve srovnání s kontrolním vzorkem celulózy, tedy zřejmě jsou schopny pojmout větší množství roztoku. Hemostatika na bázi želatiny (Gelita) a kolagenu (HyproSorb) vykazují minimální zašuměním signálů a reakce s fyziologickým roztokem se zdá být efektivnější (silnější signál v důsledku lepší absorpce roztoku) i dynamičtější. Podobný charakter vykazuje i TachoSil, přičemž kombinace s fibrin-trombinovou vrstvou způsobuje variabilnější chování.



Obr. 6.2 Srovnání vybraných původních naměřených časových závislostí rozkmitu THz vlny $y(t)$ při reakci hemostatika s fyziologickým roztokem.



Obr. 6.3 Normované časové závislosti rozkmitu THz vlny $norm. y(t)$ pro detailní srovnání chování hemostatik reagujících s fyziologickým roztokem.



Obr. 6.4 Normované časové závislosti rozkmitu THz vlny $norm. y(t)$ vybraných vzorků hemostatik reagujících s krví.

Všem hemostatikům je společný počáteční růst křivek $norm y(t)$, tzn. zvětšuje se rozkmit THz vlny a sílí intenzita signálu. Toto chování koresponduje s pohlcováním fyziologického roztoku hemostatikem a úbytkem tekutiny z povrchu krystalu. U všech vzorků je pozorován exponenciální nárůst s výjimkou TachoSilu, u kterého je růst patrný jen na počátečním intervalu (do cca 50 sekund), po němž následuje pozvolný pokles hodnot až na konstantní úroveň.

Při reakci s krví mění změřené časové závislosti rozkmitu THz vlny u některých typů hemostatik svůj charakter, viz Obr. 6.4. U vzorku TachoSilu je tato změna nejvýraznější, neboť u většiny vzorků se objevuje pouze exponenciální pokles a počáteční rostoucí exponenciála je zachycena jen ojediněle. Naopak křivky vzorků Gelita a HyproSorb zůstávají zachovány. Křivky oxycelulóz vykazují vyšší SNR, tedy reakce s krví zřejmě bude efektivnější. Pro srovnání je uvedena také naměřená křivka pro vzorek samotné krve.

6.5 Modelování absorpční reakce hemostatik

6.5.1 Princip interakce hydrofilního polymeru a vodného prostředí

Při kontaktu hydrofilního polymeru s vodným prostředím dochází k absorpci tekutiny do struktury polymerní matrice, která začne bobtnat a zvětšovat svůj objem. Děje se tak prostřednictvím difúze, při níž dochází k náhodným pohybům částic po koncentračním spádu s cílem dosáhnout jejich rovnoměrného rozptýlení v prostoru. Difúze závisí na mnoha faktorech (např. teplota, tlak, velikost částic, vlastnosti prostředí) a velmi se tak liší její rychlost v různých prostředích (u plynů o několik řádů rychlejší než u kapalin a pevných látek) [184]. Difúze v polymerních materiálech je vzhledem ke složitosti struktury a fyzikálně-chemickým vlastnostem velmi komplexním dějem. Polymery jsou zesíťovány chemicky (kovalentními vazbami) nebo fyzicky (spletením či krystalizací), a bobtnání probíhá do nastolení rovnovážného stavu, tj. do vyrovnání elastických a osmotických sil [185]. Bobtnání zahrnuje tři kroky: difúze molekul vody do polymerní sítě, relaxace (hydratace polymerních řetězců) a expanze polymerní sítě do vodného prostředí. Průběh celé reakce se může lišit podle toho, který z kroků je dominantnější. Bobtnání se v různé míře objevuje u všech analyzovaných vzorků.

V závislosti na rychlosti difúze a expanze polymeru lze zaznamenat různé časové průběhy sorpční reakce, které lze vyjádřit jako $\frac{M(t)-M_0}{M_\infty-M_0}$, tedy poměr aktuální úrovně nabobtnaného polymeru v čase t $M(t) - M_0$ a stavu úplného nabobtnání korespondujícího s dosažením nového rovnovážného stavu $M_\infty - M_0$ [186]. Uvažujeme-li naprostou absenci vody ve vzorku polymeru na počátku reakce, pak lze $M_0 = 0$ a výraz se zjednoduší na $\frac{M(t)}{M_\infty}$.

6.5.2 Modelování kinetiky bobtnání hydrogelů

Pro modelování kinetiky bobtnání hydrogelů byla vytvořena řada modelů, které mohou být rozděleny do tří hlavních skupin: modely založené na Fickově difúzním zákonu, modely kolektivní difúze a modely nefickovské difúze [186],[187]. Modely založené na Fickově difúzním zákonu vychází z klasického matematického popisu formulovaného

rovnici (6.2), kde difúzní tok $J \left[\frac{kg}{m^2 \cdot s} \right]$ je přímo úměrný zápornému spádu koncentrace podél osy $z - \frac{\partial c}{\partial z} \left[\frac{kg}{m^4} \right]$, přičemž konstantou úměrnosti je difúzní koeficient $D_{dif} \left[\frac{m^2}{s} \right]$ charakterizující schopnost dané látky difundovat v určitém prostředí [184],[188]:

$$J = -D_{dif} \frac{\partial c}{\partial z} \quad (6.2)$$

Modely kolektivní difúze vysvětlují bobtnání polymeru jako rozpínání polymerní sítě, které je řízeno gradientem pnutí. Model je však použitelný pouze pro sledování změn v malých objemech. U větších objemů, kdy se často objevuje např. sigmoidní průběh, tento model selhává. Sigmoidní či dvoufázové absorpční křivky jsou charakteristické pro nefickovské chování sledovaného systému [186]. Difúzní proces penetrantů v polymerech se v řadě případů od typicky fickovského chování liší, což souvisí s fyzikálními vlastnostmi polymerní sítě a interakcemi mezi polymerem a penetrujícím roztokem. Nejznámější model bobtnání hydrogelu podle Alfreyho [189] popisuje reakci ve třech vrstvách: první vrstva v kontaktu s vodou se mění na gel, následuje tenká vrstva postupně hydratovaných a rozvolňovaných řetězců polymeru a poslední vrstva dosud nenabobtnaného suchého polymeru. Při bobtnání se snižuje teplota skelného přechodu T_g a polymer přechází z amorfni fáze do kaučukovité. Tento proces se již neřídí pouze Fickovým zákonem, kdy je rozvolňování řetězců rychlejší než difúze vody dovnitř polymeru. Začíná se projevovat nefickovská difúze, na které se podílí relaxační procesy molekul na rozhraní amorfni a kaučukovité fáze [190]. Toto chování se pojí s dlouhými relaxačními časy, pomalá reorientace molekul vede k mnoha nezvyklým jevům, zejména při teplotě nižší než T_g [187],[185]. Pomocí tzv. mocninné rovnice (6.3) lze určit, do jaké míry se proces chová podle Fickova zákona:

$$\frac{M(t)}{M_\infty} = k \cdot t^n, \quad (6.3)$$

kde $M(t)$ je množství roztoku absorbované v čase t , M_∞ celkové množství roztoku absorbované v čase $t = \infty$, k kinetická konstanta charakteristická pro daný systém [t^{-n}] a n difúzní exponent [-], podle jehož hodnoty lze odhadnout typ transportu. Difúzní exponent n mocninné rovnice je závislý na geometrickém uspořádání polymeru. Tab. 6.3 uvádí hodnoty n pro zarovnanou plochu vrstvy polymeru [188],[189],[190],[191]. Mocninná rovnice je spolehlivá pro průběh reakce $\frac{M(t)}{M_\infty} \leq 0,6$, tedy do nabobtnání přibližně 60 % polymeru [191].

Pro přesnější analýzu sorpčních procesů existují jak teoretické, tak empirické matematické modely. Teoretické modely jsou postaveny obvykle na Fickových zákonech a díky své složitosti jsou i početně náročné. Empirické modely většinou nemají zcela objasněný fyzikální základ, ale jsou častěji preferovány díky své jednoduchosti (malý počet parametrů) a velmi dobrým výsledkům aproximace. Přehled již použitých empirických i semi-empirických modelů lze nalézt např. v [184],[192],[193],[194].

Tab. 6.3 Členění mechanismů difúze podle hodnoty difúzního exponentu n z mocninné rovnice.

Difúzní exponent n	Typ difúzního transportu	Vztah mezi rychlostí difúze R_{diff} a relaxace R_{rel}	Vztah mezi teplotou experimentu T a teplotou skelného přechodu T_g
$n < 0,5$	pseudo-Fickovská difúze	$R_{diff} \ll R_{rel}$	$T > T_g$
$n = 0,5$	Case I difúze podle Fickova zákona	$R_{diff} < R_{rel}$	$T > T_g$
$0,5 < n < 1$	nefickovská (anomální) difúze	$R_{diff} \approx R_{rel}$	$T < T_g$
$n = 1$	Case II transport řízený relaxačními procesy	$R_{diff} > R_{rel}$	$T < T_g$
$n > 1$	super case II	$R_{diff} \gg R_{rel}$	$T < T_g$

Pro modelování absorpční reakce hemostatik byly vybrány empirické modely, které vedou k řešení v podobě exponenciálních funkcí. Absorpce je součástí sorpčního procesu, proto lze vycházet z obdobných sorpčních modelů. Nejblíže je model pseudoprvního řádu popsán diferenciální rovnicí (6.4) [195], z níž po integrování za okrajových podmínek $t_1 = 0$ až $t_2 = t$ a $M_1 = 0$ až $M_2 = M$ získáme výraz (6.5):

$$\frac{dM}{dt} = k \cdot (M_\infty - M) \quad (6.4)$$

$$M = M_\infty \cdot (1 - e^{-k \cdot t}) \quad (6.5)$$

Rovnicí (6.4) lze modelovat rehydrataci suchých vzorků [192],[196], opačného procesu k vysoušení vzorků za různých podmínek [197],[198], a je možné ji použít i na bobtnání hydrogelů [187],[190],[199]. Podrobné odvození modelu je vysvětleno v kap. 6.5.3. Model pseudoprvního řádu představuje jednoduchou rostoucí exponenciálu, kopírující postupný průnik roztoku do hydrogelu. Známe-li navíc hodnotu M_∞ , pak se počet parametrů ještě zredukuje; po normalizaci dat na intervalu $\langle 0, 1 \rangle$ je $M_\infty \approx 1$. Řada vzorků se však od klasického rostoucího exponenciálního průběhu liší, což nás nutí uvažovat o zařazení dalšího parametru. U komplexnějších reakcí bývá monoexponenciála nahrazena funkcí složenou z více komponent. Nejčastěji jde o součet dvou exponenciál, tzn. model je popsán jako dva paralelní procesy s kinetikou 1. řádu, přičemž první představuje rychlou reakci a druhý pomalou. Ne vždy však je tento přístup vhodný, touto problematikou se podrobněji zabývá [200] v souvislosti s popisem absorpční kinetiky celulózových materiálů.

K popisu komplexnějších reakcí byl použit model založený na tzv. „natažení“ exponenciály (Stretching Exponential). Model vychází z Weibullova rozdělení pravděpodobnosti, které bylo Weibullem navrženo jako zobecnění exponenciálního rozdělení pro popis odolnosti materiálů a později k popisu chování systémů s různým stupněm variability [192]. Z toho důvodu bývá model označován také jako Weibullův či Kohlrausch-Williams-Wattův při aplikacích v oblasti impedanční spektroskopie [128]. Obecná empirická rovnice modelu podle (6.6) je použitelná pro popis hydratačního

procesu a obsahuje 2 parametry; časovou konstantu procesu τ [s] a bezrozměrný parametr tvaru β [201],[202]:

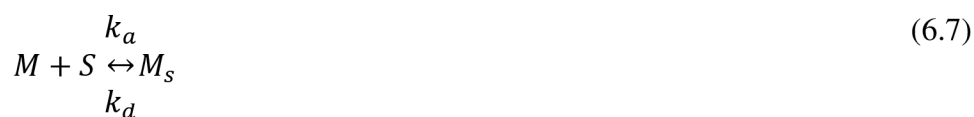
$$\frac{M - M_0}{M_\infty - M_0} = \left(1 - e^{-\left(\frac{t}{\tau}\right)^\beta}\right) \quad (6.6)$$

Časová konstanta τ určuje rychlost kinetiky sorpční reakce a představuje čas nutný k dosažení přibližně 63 % celého procesu. Hodnota parametru β ovlivňuje průběh funkce hustoty pravděpodobnosti a může tak aproximovat i jiná rozdělení. Je-li $\beta = 1$, Weibullovo rozdělení je identické s exponenciálním a výsledkem modelování je prostá exponenciála. Pro $\beta > 1$ je charakteristická rostoucí sigmoida a pro $\beta < 1$ parabolický průběh se strmým počátečním nárůstem [202]. Speciální případy pak nastávají pro $\beta = 2$, kdy je Weibullovo rozdělení blízké k Rayleighovu, při $\beta = 2,5$ aproximuje lognormální rozdělení a $\beta = 3,6$ normální rozdělení [203].

Weibullův model je model statistický a nemá pevnou oporu v teoretickém odvození, což je často kritizováno. Tento problém se však vztahuje prakticky na všechna rozdělení s ohledem na složitost reálných biologických dat [204]. Weibullův model je tedy obecně považován za empirický, avšak v [205] bylo demonstrováno jeho teoretické vysvětlení s pomocí fyzikálních zákonů. Model je velmi často používán k analýze rozpouštění a uvolňování léčiv z nosičů [204]. Podle hodnoty β je možné určit typ transportu léčiva, resp. rozpouštědla, v polymerní matrici: $\beta \leq 0,75$ pro difúzi podle Fickova zákona; $0,75 < \beta < 1$ pro kombinaci Fickovy difúze a bobtnání; $\beta > 1$ pro transport řízený složitějším komplexním mechanismem [206].

6.5.3 Odvození modelu pseudoprvního řádu

Model vychází ze základní představy absorpce vody do polymerní matrice. Tento jev je možné popsat jednoduchým kompartmentovým modelem [195], kdy je sorpce a desorpce vzorku M v roztoku S dána rovnicí (6.7), kde M_s představuje vzorek sycený roztokem, k_a a k_d představují rychlostní konstanty sorpce a desorpce:



Oba procesy lze popsat diferenciální rovnicí (6.8) a je-li navíc vzorek v roztokem nasáklém stavu M_s a suchém stavu M uvažován jako zreagovaná α a nezreagovaná frakce $(1 - \alpha)$ dle výrazu (6.9), pak lze rovnici ještě zjednodušit na (6.10):

$$\frac{dM_s}{dt} = k_a[S][M] - k_d[M_s] \quad (6.8)$$

$$M_s + M = 1 \quad \Rightarrow \quad \alpha + (1 - \alpha) = 1 \quad (6.9)$$

$$\frac{d\alpha}{dt} = k_a[S](1 - \alpha) - k_d\alpha \quad (6.10)$$

Před zahájením sorpční reakce je koncentrace roztoku $[S_0]$, v průběhu reakce dochází k postupnému úbytku roztoku S , který přechází do vzorku v podobě zreagované frakce α , což lze popsat rovnicí (6.11):

$$[S] = [S_0] - B \cdot \alpha, \quad \text{kde } B = \frac{[S_0] - [S_\infty]}{\alpha_\infty} \quad (6.11)$$

Po ukončení reakce, tzn. po úplném nasycení vzorku roztokem α_∞ , zůstává volný roztok v množství $[S_\infty]$. Po dosazení výrazu (6.11) do (6.10) získáme obecnou rovnici (6.12), která může být výchozím bodem pro odvození řady kinetických modelů sorpční reakce za různých podmínek:

$$\frac{d\alpha}{dt} = k_a([S_0] - B \cdot \alpha)(1 - \alpha) - k_d\alpha \quad (6.12)$$

Za normálních okolností je kompartmentální model (6.7) klasickou ukázkou kinetické reakce 2. řádu. Pokud je však jeden z reaktantů výrazně v převaze, je možné rovnici zjednodušit a použít kinetiku pseudoprvního řádu [207]. V tomto případě je výrazně v nadbytku použitý roztok podle (6.13) a množství $B \cdot \alpha$ je možné v rovnici zanedbat, resp. zahrnout do rychlostní konstanty k_a . Rovnice (6.12) se zjednoduší (6.14) a další úpravou lze získat podobu (6.15), která se po zavedení substituce (6.16) a (6.17) ještě zjednoduší na rovnici (6.18):

$$[S_0] \gg B \cdot \alpha \quad (6.13)$$

$$\frac{d\alpha}{dt} = k_a[S_0](1 - \alpha) - k_d\alpha \quad (6.14)$$

$$\frac{d\alpha}{dt} = k_a[S_0] - \alpha(k_a[S_0] + k_d) \quad (6.15)$$

$$C = k_a[S_0] \quad (6.16)$$

$$K = k_a[S_0] + k_d \quad (6.17)$$

$$\frac{d\alpha}{dt} = C - K \cdot \alpha \quad (6.18)$$

Integrovaním rovnice (6.18) je řešení (6.21):

$$\int_0^\alpha \frac{d\alpha}{C - K \cdot \alpha} = \int_0^t dt \quad (6.19)$$

$$\ln \left| \frac{K \cdot \alpha - C}{-C} \right| = -K \cdot t \quad (6.20)$$

$$\ln \left| 1 - \frac{K}{C} \alpha \right| = -K \cdot t \quad (6.21)$$

V okamžiku dosažení rovnovážného stavu, kdy se koncentrace reaktantů ustálí a nedochází k dalším přesunům, platí (6.22) a zároveň lze definovat rovnovážnou konstantu K_∞ podle (6.23), jejímž dosazením do (6.22) lze vyjádřit α_∞ podle (6.24):

$$\frac{d\alpha}{dt} = 0 = k_a[S_0] - \alpha_\infty(k_a[S_0] + k_d) \quad (6.22)$$

$$K_\infty = \frac{k_a}{k_d} \quad (6.23)$$

$$\alpha_\infty = \frac{K_\infty[S_0]}{K_\infty[S_0] + 1} = \frac{C}{K} \quad (6.24)$$

Nyní je možné dosadit (6.24) do (6.21) a po odlogaritmování získat konečné řešení v podobě (6.25):

$$\alpha(t) = \alpha_\infty \cdot (1 - e^{-K \cdot t + K_1}) \quad (6.25)$$

6.5.4 Odvození Weibullova modelu

Weibullův model využívající tzv. „natažení“ exponenciály je velmi dobře aplikovatelný na popis složitějších dějů, jakým je právě i relaxace polymerních řetězců. Jak je zřejmé z aproximace naměřených dat mocninou funkcí, žádný ze vzorků nevykazuje čistě fickovské chování a relaxační jevy se více či méně podílejí na transportním mechanismu roztoku do polymerní matrice.

Při odvození modelu se vychází z předchozího modelu kinetiky 1. řádu (6.4) s tím, že o původní konstantě k uvažujeme jako o funkci času podle (6.26) [204],[208]. Po jejím dosazení do diferenciální rovnice (6.4) získáme (6.27), kterou integrujeme (6.28) a výsledný výraz (6.29) je upraven substitucí konstantou $K_W = \frac{k_0}{\beta}$ na (6.30):

$$k(t) = k_0 \cdot t^{\beta-1} \quad (6.26)$$

$$\frac{dM}{dt} = k_0 \cdot t^{\beta-1} (M_\infty - M) \quad (6.27)$$

$$\int_0^M \frac{1}{M_\infty - M} dM = \int_0^t k_0 \cdot t^{\beta-1} dt \quad (6.28)$$

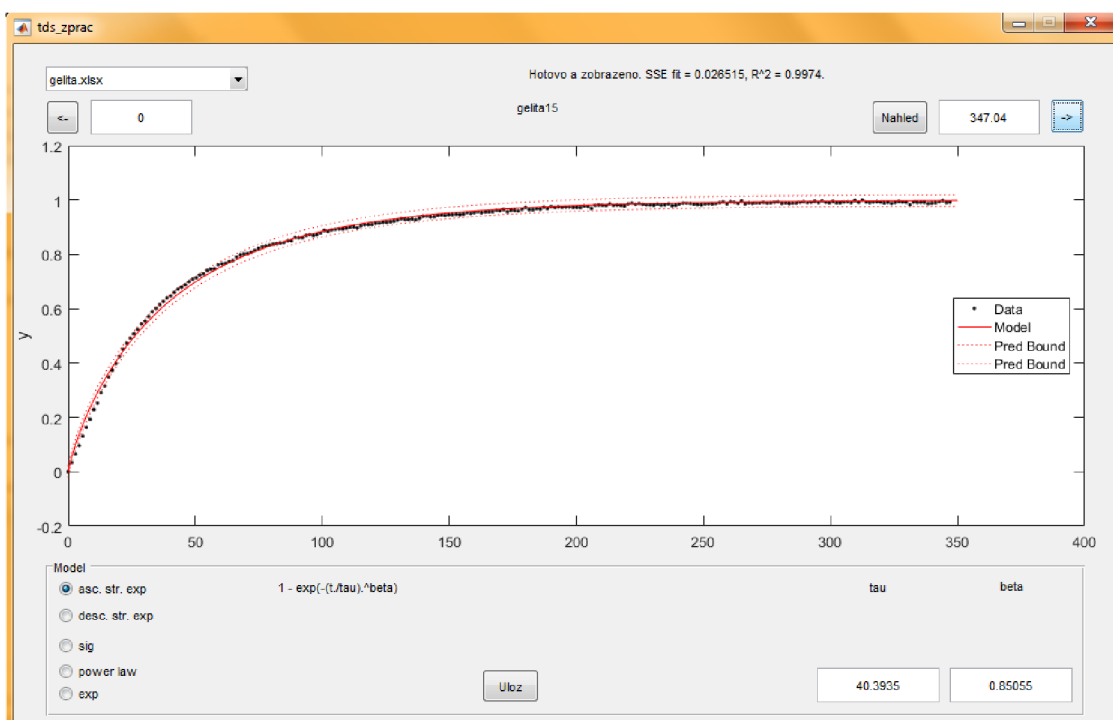
$$\frac{M_\infty - M}{M_\infty} = e^{\frac{-k_0}{\beta} t^\beta + K_2} \quad (6.29)$$

$$M(t) = M_\infty \cdot (1 - e^{-K_W \cdot t^\beta + K_2}) \quad (6.30)$$

6.5.5 Modelování naměřených dat

Po předchozích úpravách a ořezu naměřených hodnot mohla být data v souborech *vzorek.xls* podrobena další analýze a aproximaci matematickým modelem. Za tímto účelem byl v prostřední GUI Matlab vytvořen program *tds_zprac.m*, který představuje nástroj pro načtení zdrojových dat z listu *tab*, jejich zobrazení v grafickém okně, ale také následné modelování s uložením výstupů. Součástí programu je normalizace dat.

Struktura programu je až na několik detailů shodná s programem pro modelování kinetiky síťování tkáňového lepidla, viz kap. 5.5.4. Modelování křivek se opět zakládá na nelineární regresi, kdy je k řešení optimalizačního problému využit algoritmus „Trust-region“ a k odhadu parametrů aplikována metoda nejmenších čtverců (SSE) dle rovnice (5.23). Náhled grafického ovládacího okna programu pro modelování naměřených časových závislostí uvádí Obr. 6.5.



Obr. 6.5 Uživatelské okno programu pro modelování naměřených časových závislostí u hemostatik (zde vzorek Gelita při reakci s fyziologickým roztokem).

Pro přesnější odhad parametrů modelu je možný ořez dat na časové ose t [s] zadáním konkrétních hodnot do vkládacích polí nad grafem vlevo a vpravo, po němž následuje normalizace hodnot ve vybrané zájmové oblasti obecně označené osy y . Mezi jednotlivými vzorky přepínáme tlačítka se šipkami nahoře nad grafem vlevo a vpravo. V levé části pod oknem grafu lze vybrat ze seznamu modelových funkcí: rostoucí „natažená“ exponenciála (*asc. str. exp.*), klesající „natažená“ exponenciála (*desc. str. exp.*), sigmoida (*sig*), mocninná funkce (*power law*), monoexponenciála (*exp*). Po zvolení modelové funkce je vpravo uvedena příslušná rovnice a její parametry zjištěné programem pro aktuálně analyzovaný průběh. Zároveň je vypočtena chyba modelu pomocí kritéria SSE a také koeficient determinace R^2 , jehož hodnota říká, jaká část z celkové variability zkoumané proměnné může být daným modelem vysvětlena. Stiskem tlačítka *Uloz* jsou zjištěné parametry naměřených údajů pro příslušný vzorek uloženy do souboru *vzorek_vysl_modelu.xls*. Hranice 95%-ního intervalu spolehlivosti odhadu parametrů jsou v grafu naznačeny červeným tečkováním.

6.5.6 Výsledky modelování dat a jejich popisná statistika

U všech průběhů naměřených časových závislostí rozkmitu THz vlny při reakci hemostatik s fyziologickým roztokem i s krví je čitelný rostoucí trend, odrážející postupnou absorpci roztoku polymerními vlákny matrice hemostatika. Měřené křivky vzorků byly nejprve analyzovány mocninnou rovnicí, z jejíž parametrů lze určit, do jaké míry se reakce hemostatika s daným roztokem chová podle Fickova zákona difúze.

Výsledky aproximace mocninnou funkcí uvádí Tab. 6.4, shrnující střední hodnoty koeficientů k a n . U vzorků oxycelulóz, reagujících s fyziologickým roztokem, lze dle hodnot $n \approx 0,5$ usuzovat na chování blízké Fickově difúzi. Při reakci s krví již tomu tak není ($n > 0,5$). Kontrolní vzorek celulózy vykazuje značné rozdíly; při reakci s fyziologickým roztokem je $n < 0,5$, po přidání krve $n > 0,5$. U vzorků Gelita a HyproSorb zůstává $n < 0,5$ v případě obou médií. U TachoSilu byla analyzována pouze rostoucí část křivky; při reakci s oběma médii vykazuje anomální nefickovské chování s relaxačními jevy ($n > 0,5$).

Tab. 6.4 Střední hodnoty (průměry) koeficientů k a n mocninné funkce získané modelováním naměřených dat reakce hemostatik s fyziologickým roztokem a krví. Podrobná popisná statistika obou parametrů je uvedena v Příloze H.

Typ	Hem. + fyziologický roztok		Hem. + krev	
	$k [s^{-1}]$	$n [-]$	$k [s^{-1}]$	$n [-]$
celulóza	$0,12 \pm 0,08$	$0,38 \pm 0,20$	$0,05 \pm 0,09$	$0,70 \pm 0,30$
S. Fibrillar	$0,06 \pm 0,04$	$0,53 \pm 0,10$	$0,04 \pm 0,04$	$0,69 \pm 0,30$
S. NuKnit	$0,07 \pm 0,06$	$0,55 \pm 0,20$	$0,04 \pm 0,04$	$0,62 \pm 0,20$
Gelita	$0,22 \pm 0,06$	$0,30 \pm 0,07$	$0,20 \pm 0,11$	$0,30 \pm 0,10$
HyproSorb	$0,30 \pm 0,10$	$0,27 \pm 0,10$	$0,26 \pm 0,05$	$0,24 \pm 0,04$
TachoSil	$0,07 \pm 0,04$	$0,70 \pm 0,10$	$0,09 \pm 0,08$	$0,60 \pm 0,20$

Mocninná funkce sice poměrně dobře popisuje bobtnání polymerní matrice, ale začíná selhávat při hodnotách $\frac{M(t)}{M_\infty} > 0,6$. U řady hemostatik lze v této oblasti pozorovat odchýlení modelu od naměřených hodnot. Většina vzorků se od principů fickovské difúze výrazně liší a vykazují spíše nezvyklé chování, zahrnující všechny případy difúze, pro něž platí $n \neq 0,5$ [186]. Anomální chování se projevuje různými časovými závislostmi $\frac{M(t)}{M_\infty}$. U hemostatik dominuje především exponenciální charakter absorpčních křivek s různými tvarovými odchylkami, které lze vystihnout právě parametrem β modelu podle Weibulla.

Klasická exponenciální funkce je řešením kinetiky pseudoprvního řádu a velmi dobře aproximuje absorpční křivky celulózy a dále samotnou hemokoagulační reakci krve (v literatuře často popisována spíše jako sigmoidní funkce [209], [210]). Weibullův model je pak schopen aproximovat absorpční křivky ostatních hemostatik, a to díky tvarové přizpůsobivosti. Výsledné hodnoty parametrů modelování hemostatik pomocí uvedených funkcí shrnuje Tab. 6.5; jde již o průměrné hodnoty parametrů, přičemž jejich kompletní popisná statistika je uvedena v příloze J. Pro exponenciální model jde o parametry τ a c , u Weibullova modelu τ a β dle použitých rovnic (6.31) až (6.33):

exponenciální model
(exp., pseudoprvního řádu)
$$M(t) = 1 - c \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (6.31)$$

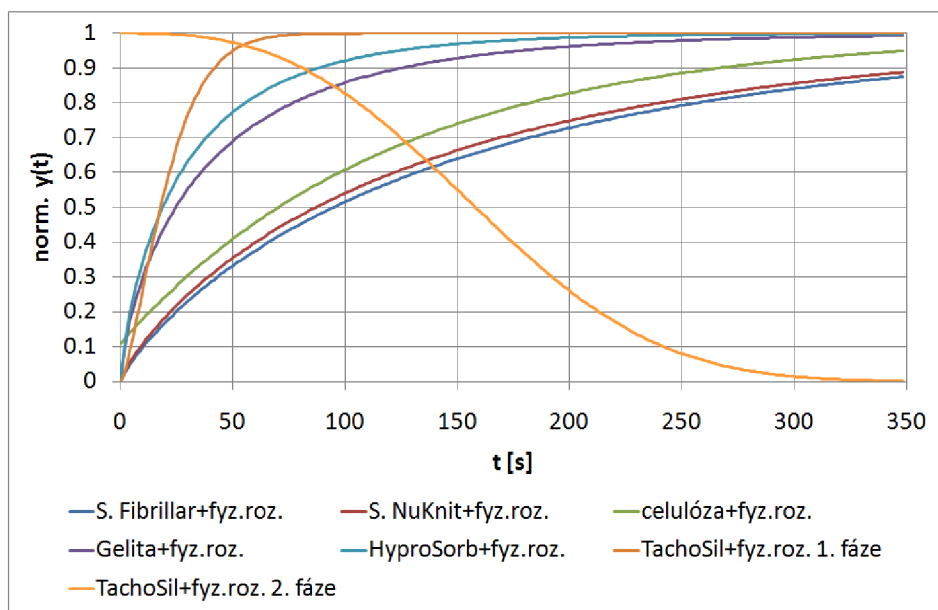
ascending (rostoucí) stretched exponential model
(asc. str. exp., Weibull)
$$M(t) = 1 - e^{-\left(\frac{t}{\tau}\right)^\beta} \quad (6.32)$$

descending (klesající) stretched exponential model
(desc. str. exp., Weibull)
$$M(t) = e^{-\left(\frac{t}{\tau}\right)^\beta} \quad (6.33)$$

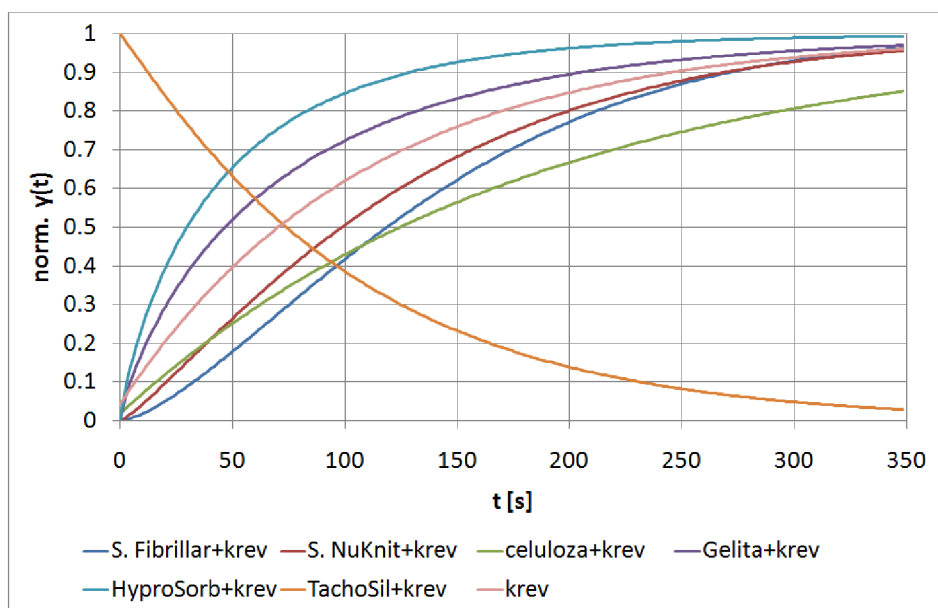
Tab. 6.5 Střední hodnoty (průměry) parametrů příslušných modelů získaných modelováním naměřených dat reakce hemostatik s fyziologickým roztokem a krví

Typ hem.	Typ modelu	Hem. + fyziologický roztok			Hem. + krev		
		τ [s]	β [-]	c [-]	τ [s]	β [-]	c [-]
celulóza	exp. (pseudo-1. řádu)	122 ± 35	-	0,89 ±0,13	184 ± 24	-	0,98 ± 0,07
S. Fibrillar	asc. str. exp. (Weibull)	146 ± 29	0,85 ± 0,14	-	152 ± 20	1,46 ± 0,39	-
S. NuKnit	asc. str. exp. (Weibull)	135 ± 32	0,83 ± 0,18	-	134 ± 15	1,20 ± 0,17	-
Gelita	asc. str. exp. (Weibull)	40 ± 8	0,74 ± 0,04	-	73 ± 15	0,81 ± 0,07	-
HyproSorb	asc. str. exp. (Weibull)	30 ± 10	0,78 ± 0,09	-	46,3 ± 4,7	0,82 ± 0,04	-
TachoSil	asc. str. exp. (Weibull)	23,0 ± 5,7	1,41 ± 0,13	-	20,3 ± 5,9	1,72 ± 0,94	-
TachoSil	desc. str. exp. (Weibull)	180 ± 19	2,83 ± 0,53	-	105 ± 35	1,05 ± 0,35	-
krev	exp. (pseudo-1. řádu)		-		108 ± 10		0,96 ± 0,05

Ukazatelem střední hodnoty dat byl zvolen průměr na základě ověření normálního rozdělení většiny dat pomocí normálního pravděpodobnostního grafu a Shapiro-Wilkova testu normality. Výsledky testování jsou uvedeny v příloze I. Ve většině případů p -hodnota testu vychází vyšší než kritická hladina 0,05, tzn. nelze zamítnout nulovou hypotézu o příslušnosti dat k normálnímu rozdělení. Výjimku tvoří časová konstanta $\tau_{asc.str.exp.}$ u reakce TachoSilu s fyziologickým roztokem, $\beta_{desc.str.exp.}$ u reakce TachoSilu s krví i fyziologickým roztokem, $\beta_{asc.str.exp.}$ u vzorku S. Fibrillar a také parametr c u samotné krve. Chyba výsledků parametrů $\delta(x)$ odpovídá $t_{n,P} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}$, kde $\frac{s}{\sqrt{n}}$ je výběrová směrodatná odchylka aritmetického průměru pro n hodnot a $t_{n,P}$ koeficient Studentova rozdělení (pro pravděpodobnost $P = 95\%$) [211]. Zjištěné parametry byly použity k výpočtům modelových křivek, které uvádí Obr. 6.6 pro reakce hemostatik s fyziologickým roztokem a Obr. 6.7 pro reakce s krví.



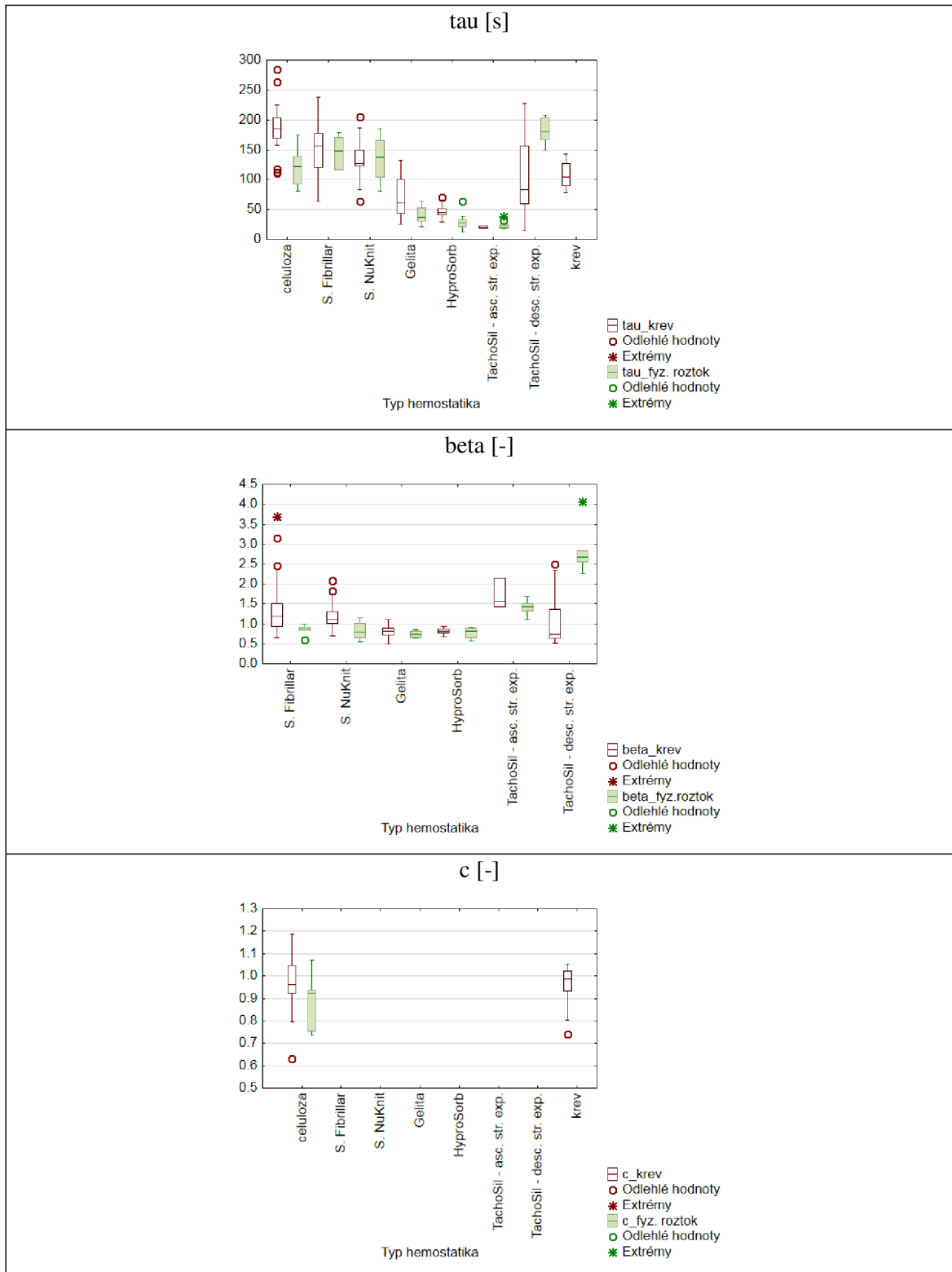
Obr. 6.6 Graf modelových křivek s parametry dle Tab. 6.5 pro reakci hemostatik s fyziologickým roztokem.



Obr. 6.7 Graf modelových křivek s parametry dle Tab. 6.5 pro reakci hemostatik s krví.

Pro získané parametry modelových funkcí byla provedena analýza rozdělení dat pomocí krabicového grafu. Výsledky uvádí Obr. 6.8 pro hodnoty časové konstanty τ (*exp.*, *str. exp.*), parametr β (*str. exp.*) a konstantu c (*exp.*). Krabicový graf prezentuje hodnoty příslušných parametrů pro obě použítá média, podle nichž jsou barevně rozlišena (krev – červeně, fyz. roztok – zeleně). Zároveň je graf kategorizován dle typu hemostatika. Krabicový graf prezentuje hodnoty příslušných parametrů pro obě použítá média, podle nichž jsou barevně rozlišena (krev – červeně, fyz. roztok – zeleně). Zároveň je graf kategorizován podle typu hemostatika. Krabicová část je tvořena prvním (Q_I) a třetím kvantilem (Q_{III}), mezi nimiž je linie odpovídající hodnotě mediánu. Vousy grafu vyznačují interval bez odlehlých hodnot. Jako odlehlá je klasifikována

hodnota větší než Q_{III} , resp. menší než Q_I , a to nejméně o 1,5násobek interkvartilového rozpětí.



Obr. 6.8 Krabicové grafy rozložení hodnot časové konstanty τ , parametru β a konstanty c kategorizovaných dle typu hemostatika.

6.6 Diskuze výsledků

Předložená práce byla zaměřena na zkoumání reakce hemostatik s cílem lépe porozumět jejímu mechanismu, a to s využitím experimentální metody THz spektroskopie. Vlastnosti hemostatik byly testovány dvojím způsobem – za použití fyziologického roztoku a krve. Při reakci s fyziologickým roztokem lze očekávat, že bude převažovat absorpce roztoku, ovšem při reakci s krví se již vedle absorpce mohou ve větší míře projevit další sorpční jevy (adsorpce, chemisorpce) či změny ve struktuře vlivem nasedání krevních elementů.

Dle míry útlumu THz vlny po průchodu vzorkem reagujícím s fyziologickým roztokem byla posouzena absorpční schopnost hemostatik (Obr. 6.2). Nejslabší absorpci vykazují oxycelulózy (S. Fibrillar, S. NuKnit); povrch krystalu je stále silně smáčen kapalinou i přes to, že ji vlákna celulózy v jisté míře vážou do sebe. Naopak odezva kolagenových hemostatik (HyproSorb, TachoSil) a želatiny (Gelita) je mnohem silnější a dynamičtější. Po normování časových průběhů $norm. y(t)$ (Obr. 6.3) lze u všech vzorků pozorovat nárůst signálu (zvětšující se rozkmit THz vlny) v čase s tím, jak hemostatikum pohlcuje tekutinu z povrchu krystalu. Nejnižší SNR je u kontrolního vzorku celulózy, což potvrzuje lepší absorpční účinnost oxycelulóz. Oxycelulózy si zachovávají svou strukturu, kolagenové a želatinové plsti typicky želírují a zvětšují svůj objem. Speciální chování vykazuje TachoSil, u něhož počáteční růst $norm. y(t)$ přechází v exponenciální pokles. Zřejmě se zde uplatňují dva různé mechanismy, což koresponduje se složením hemostatika, tedy kombinací kolagenu a fibrinogentrombinu. Na měřeném signále se podílí především vrstva koagulačních látek, která je v těsném kontaktu s krystalem. Počáteční růst signálu lze vysvětlit absorpcí tekutin jako u ostatních hemostatik. Po rozpuštění a uvolnění koagulačních látek ze suché vrstvy dochází k jejich aktivaci a postupnému vytvrzování fibrinové vrstvy, která propouští stále méně THz záření a způsobí útlum signálu.

Při reakci s krví dochází v kinetice hemostatik k několika změnám. Při reakci oxycelulóz s krví je průběh reakce zachován, ale s výrazně vyšším SNR, což pravděpodobně souvisí s přítomností krevních elementů, podílejících se na reakci. Krev tedy způsobuje slabší útlum THz vlny než fyziologický roztok. Reakce samotné krve má podobný exponenciální trend jako vzorky oxycelulóz. Dynamický charakter hemostatické reakce HyproSorbu a Gelity zůstává zachován, ovšem u většiny vzorků TachoSilu byla při reakci s krví zachycena pouze druhá fáze signálu (exponenciální pokles). Jelikož krev samotná obsahuje koagulační faktory, je počáteční aktivace faktorů přítomných v povrchové vrstvě TachoSilu rychlejší, neboť uvolněné látky mohou reagovat přímo s krevními faktory.

Naměřené časové průběhy byly nejdříve analyzovány pomocí mocninné rovnice. Na základě parametru n lze pak rozhodnout, jakým způsobem přistupovat k modelování naměřených dat. Fickovská difúze je obecně pozorována u nebobtnajících polymerů, jejichž relaxační čas je mnohem kratší ve srovnání s charakteristickým časem difúze, tedy transport je řízen hlavně koncentračním gradientem [212]. Podle hodnoty parametru n (viz Tab. 6.4) aplikované mocninné rovnice nevykazuje čistě fickovské chování ($n = 0,5$) žádné hemostatikum, nejbližší mají pouze oxycelulózy při reakci s fyziologickým roztokem, u nichž se bobtnání nijak výrazně neprojevuje. Pro vzorky Gelity a HyproSorbu je parametr $n < 0,5$, což poukazuje na pseudo-fickovské chování související s rychlou hydratací polymerních řetězců. Ačkoliv základ TachoSilu tvoří rovněž kolagenová matrice, je $n > 0,5$ při reakci s oběma kapalnými médii, tedy jde zřejmě o anomální nefickovské chování, při němž se vedle difúze uplatňují také

relaxační projevy, snižující rychlost reakce. Zároveň poukazují na dominantní projev aktivní fibrinogen-thrombinové složky u měřené odezvy.

Pro modelování reakcí s oběma kapalnými médii byly použity dva kinetické modely – model pseudoprvního řádu (oxycelulózy s oběma médii) a Weibullův model (ostatní hemostatika). Ačkoliv se jedná o semi-empirické modely, je uvedeno jejich fyzikální odvození s uvážením několika zjednodušení. Oba modely poskytují úspěšnou aproximaci křivek s koeficientem determinace $R^2 \approx 0,9$. Zjištěné parametry obou modelů shrnuje Tab. 6.5. Pro srovnání rychlosti kinetiky hemostatické reakce jsou stěžejním parametrem časové konstanty τ . U oxycelulóz je τ srovnatelné při reakci s oběma médii a zároveň se ani výrazně neliší τ mezi jednotlivými vzorky. Z toho lze usoudit, že na rychlost reakce nebudou mít příliš velký vliv rozdílné vlastnosti materiálů, tj. struktura textilie (tkaná vs. netkaná), plošná hustota či tloušťka materiálu. Značné odchylky lze pozorovat u vzorků kontrolní celulózy, které vykazují mnohem kratší dobu absorpce fyziologického roztoku (121 s, srovnatelná se vzorky oxycelulóz) ve srovnání s absorpcí krve (184 s), což potvrzuje hemostatickou účinnost oxycelulóz. U vzorků Gelity a HyproSorbu je rychlost reakce s fyziologickým roztokem vždy kratší než reakce s krví. U Gelity je tento rozdíl téměř dvojnásobný (u fyziologického roztoku 40 s, u krve 73 s). Reakce těchto hemostatik s krví se tak jeví mnohem komplexnější než pouhá difúze fyziologického roztoku. Zejména u HyproSorbu dochází vedle bobtnání i k silné adhezi krevních elementů, zejména destiček, které mají ke kolagenu přirozeně vyšší afinitu.

TachoSil vykazuje speciální chování reakce vzhledem k jejím dvěma fázím (vzestupná, sestupná). Časová konstanta první fáze je u reakcí s oběma použitými médii přibližně stejná – zřejmě jde tedy o dobu, kdy dochází k absorpci tekutiny a uvolnění koagulačních faktorů. U reakce s krví však byla první fáze zachycena jen ve velmi malém počtu případů. Druhá fáze se naopak objevuje u reakcí s oběma typy médií; τ druhé fáze je téměř poloviční (104 s) u krve ve srovnání s fyziologickým roztokem (180 s), což poukazuje na rychlou aktivaci koagulační kaskády. Tento fakt podtrhuje srovnatelná hodnota τ samotné krve (108 sekund), v jejímž případě se projevuje pouze přirozené srážení krve bez jakéhokoliv vnějšího zásahu. V případě srovnání modelových parametrů krve a druhé fáze TachoSilu však nejde jen o podobnost τ , ale také parametru $\beta \approx 1$, což odpovídá klasické monoexponenciále s $c \approx 1$.

Při podrobnější rozboru hodnot parametru tvaru β vzestupné exponenciály (*asc. str. exp.*) podle Weibulla, včetně jejich grafické prezentace krabicovým grafem, lze konstatovat, že při reakci s fyziologickým roztokem je β vždy nižší než při reakci s krví. Dle konkrétní hodnoty β zároveň můžeme určit charakter transportu. Při reakci vzorků Gelita a HyproSorb s fyziologickým roztokem je β velmi blízká hraniční hodnotě 0,75 a poukazuje tak na dominující difúzní mechanismus transportu, čímž zároveň potvrzuje i výsledek analýzy pomocí mocninné rovnice. Použitím krve se zvýší β na přibližně 0,81 a naznačuje tak kombinaci Fickovy difúze i bobtnání. Podobné hodnoty ($\beta \approx 0,8$) nalezneme u obou typů oxycelulóz při reakci s fyziologickým roztokem. Naopak při použití krve jsou hodnoty $\beta > 1$, které naznačují transport řízený komplexním mechanismem s relaxačními jevy. Podobná situace se týká také obou fází reakce u vzorků TachoSilu v případě fyziologického roztoku i krve.

7 ZÁVĚR

Hlavním cílem této práce bylo prozkoumat a lépe porozumět principům funkce hemostatických přípravků, a to s využitím nové metody – THz spektroskopie. Příprava vlastních experimentů vycházela z teoretického úvodu, v němž je vysvětlena podstata THz spektroskopie v časové oblasti, principy a omezení této metody v souvislosti s aplikacemi na biologické vzorky. S ohledem na dostupné informace byl přizpůsoben návrh experimentu tak, aby zkoumané jevy byly dobře měřitelné, i když si proces minimalizace nejistot u těchto měření vyžádal celou řadu kompromisů.

Praktická část disertace zahrnuje vlastní experimenty zabývající se kinetikou kyanoakrylátového tkáňového lepidla a kinetikou absorpčních hemostatik. Na základě analýzy naměřených údajů byly odvozeny modely kinetiky sledovaných vzorků, pomocí nichž lze popsat jejich chování a zejména pak odvodit charakteristiky související s rychlostí vlastní reakce, tj. síťování u tkáňových lepidel a hemostatické reakce u absorpčních hemostatik. K realizaci všech postupů zpracování a analýzy dat, včetně modelování, byla vytvořena celá řada programovacích skriptů v prostředí Matlab. K podrobnější analýze dat byly využity také prostředky statistické analýzy.

Z rozsáhlé výzkumné práce v této oblasti vyplývá řada nových poznatků. V následujících bodech jsou shrnuty výsledky experimentu s tkáňovým lepidlem:

- a) V experimentu nebyla jednoznačně potvrzena schopnost přidané olejové složky zpomalit síťování kyanoakrylátového lepidla. Naopak, doba síťování samotného lepidla v porovnání s olejnatými směsmi byla delší. Hlavní příčinou jsou pravděpodobně ztížené podmínky pro jeho přirozené síťování.
- b) Kyanoakrylátové lepidlo nereaguje s olejem přímo, ale vytváří koloidní systém, kde jsou částice obou složek velmi dobře odděleny. Díky narušenému kontaktu polymerních řetězců jsou olejnaté směsi lépe přístupné okolní vlhkosti, s čímž souvisí i kratší časové konstanty síťování.
- c) Při interakci kyanoakrylátového lepidla se vzorkem živočišné tkáně nasycené fyziologickým roztokem se mění sigmoidní průběh reakce na biexponenciální. Sigmoidní křivka koresponduje s fází propagace polymeru za běžných okolních podmínek. Po přidání vzorku živočišné tkáně začínají převažovat další jevy, tj. inicializace polymerního vlákna, transfer a terminace polymeru, jejichž kinetika má spíše exponenciální charakter.
- d) V přítomnosti živočišné tkáně se doba polymerizace kyanoakrylátového lepidla výrazně zkrátí (dle hodnoty časové konstanty τ_1).
- e) Statistickou analýzou bylo odhaleno nenormální rozložení naměřených dat, které vyžadovalo použití neparametrických testů. Kruskal-Wallisovým testem bylo ověřeno, že hodnota časové konstanty síťování čistého Histoacrylu zjištěná různými spektroskopickými metodami je přibližně stejná. V případě olejnatých směsí se však časové konstanty různí napříč metodami. Při reakci vzorků s živočišnou tkání se však tyto odchylky výrazně sniží.

Důležité poznatky experimentu zkoumajícího kinetiku absorpčních hemostatik jsou shrnuty následovně:

- a) Nejslabší absorpční schopnost ze všech měřených hemostatik vykazují vzorky oxycelulóz (S. Fibrillar, S. NuKnit), a to dle měřitelné míry útlumu THz vlny, která přímo souvisí s množstvím tekutiny na povrchu měřicího ATR krystalu.

Jako nejefektivnější se jeví hemostatika na bázi kolagenu (HyproSorb, TachoSil) a želatiny (Gelita), která vykazuje silnější měřitelný signál a také větší dynamiku reakce. Nejnižší SNR se vyskytuje u kontrolního vzorku obyčejné celulózy, což potvrzuje hemostatickou účinnost oxycelulóz.

- b) Charakter měřené hemostatické reakce samotné krve odpovídá jednoduché rostoucí exponenciální křivce, která je aproximována modelem pseudoprvního řádu stejně jako reakce obyčejné celulózy s fyziologickým roztokem i krví.
- c) Při interakci hemostatik s kapalnými médii se v různé míře projevuje bobtnání a relaxační procesy, tedy jevy, které se rozcházejí s principy Fickovy prosté difúze. Modely pro popis hemostatické reakce byly odvozeny na základě analogie s reabsorpčními procesy spíše než analogie s difúzí.
- d) Rostoucí exponenciální trend křivek měřené reakce hemostatik s fyziologickým roztokem i krví souvisí s absorpcí tekutiny do vnitřní struktury vzorku. K aproximaci kinetiky této reakce byl použit Weibullův model se dvěma parametry.
- e) Dle hodnot časové konstanty modelových funkcí je rychlost hemostatické reakce u obou typů oxycelulóz srovnatelná, nezávisí na rozdílných fyzikálních vlastnostech materiálů, ani na použitém médiu.
- f) Rychlost absorpční reakce kontrolního vzorku čisté celulózy s fyziologickým roztokem je srovnatelná s rychlostí reakce u vzorků oxycelulóz. Reakce celulózy s krví je však významně delší, což potvrzuje nulovou hemostatickou účinnost kontrolního vzorku ve srovnání s oxycelulózami.
- g) Hemostatické plsti Gelita a HyproSorb reagují s fyziologickým roztokem mnohem rychleji než s krví. Tato skutečnost poukazuje na větší složitost reakce s krví, kdy vedle pouhé difúze tekutiny do vzorku dochází i k dalším jevům ovlivňujícím průběh reakce (např. bobtnání, specifická adheze krevních destiček u HyproSorbu).
- h) Kinetika reakce TachoSilu vykazuje dvě fáze – počáteční exponenciální růst střídá exponenciální pokles. Na výsledné reakci se podílí dva různé procesy, které souvisí s komplexním složením TachoSilu (kolagen s vrstvou fibrinogenu a thrombinu). Po počáteční absorpci tekutiny vzorkem (vzestupná část měřené křivky) dochází k uvolnění a aktivaci koagulačních faktorů, jejichž cílem je vytvoření fibrinové bariéry (sestupná část měřené křivky). Při reakci TachoSilu s krví se první fáze vytrácí; koagulační faktory obsažené již v krvi zřejmě přímo aktivují faktory v povrchové vrstvě TachoSilu a primárně tedy měříme tvorbu fibrinové vrstvy. Tento fakt umocňuje shoda hodnoty časové konstanty druhé fáze reakce TachoSilu a časové konstanty hemostatické reakce samotné krve.

Dílní výsledky popsané experimentální práce byly prezentovány na konferenci SPIE (The International Society for Optics and Photonics), a dále byly zveřejněny ve vědeckých publikacích IEEE (Institute of Electrical and Electronics Engineers) a Springer. První výsledky měření vzorků Histoacrylu a jeho olejnatých směsí na THz spektroskopii byly prezentovány na konferenci SPIE [213]. Jednalo se o prvotní testovací měření, které se v několika ohledech od konečného designu experimentu odlišuje, což je i příčina rozdílných naměřených hodnot. Vyšší teplota okolí zřejmě ovlivnila rychlost síťovací reakce. Vyhodnocovaným parametrem zde byla minimální špičková hodnota THz vlny a k aproximaci časových závislostí byla použita jednoduchá

exponenciála. Další výsledky měření kinetiky reakce tkáňového lepidla THz spektroskopii byly publikovány v [214]. Naměřené časové závislosti rozkmitu THz vlny byly opět aproximovány jednoduchou exponenciálou. Výsledky měření byly doplněny mikroskopickými snímky zesíťovaných vzorků a jejich mapováním pomocí Ramanovy spektroskopie. Výsledky prvních měření kinetiky reakcí absorpčních hemostatik s fyziologickým roztokem byly publikovány v [215]. Měřeným parametrem byl index lomu (na 0,91 THz) a jeho časové závislosti byly aproximovány jednoduchou exponenciálou. Do článku byla také zahrnuta případová studie reakce hemostatik s krví jednoho dobrovolníka, která nastínila další možnosti tohoto typu měření.

Výsledky výše uvedených publikovaných prací se od výsledků předložené komplexní experimentální práce v několika ohledech liší. Důvodem jsou zejména odchylky v postupech měření a zpracování naměřených hodnot, které byly postupně v celém experimentu provedeny tak, aby vznikla optimální metodika charakterizace materiálů. S přibývajícím počtem měření totiž vyvstávaly nové skutečnosti, kterým bylo nutné přizpůsobit design experimentu. Největší míru variability do spektroskopických měření tkáňových lepidel vnášela teplota, při které měření probíhalo. Dále to byla aproximace jednoduchým exponenciálním modelem, která sice poskytovala základní představu o sledovaném ději, nicméně vykazovala jisté rezervy. Především šlo o model bez fyzikálního či chemického odvození a jednoduchá exponenciální aproximace pouze s jedním parametrem vyhovovala jen velmi omezenému úseku křivky naměřených údajů. Z toho důvodu byla práce cílena na podrobnější odvození takových modelů, které poskytují přesnější odhad chování hemostatik a tkáňových lepidel s využitím více modelových parametrů.

THz spektroskopie si svoje biomedicínské aplikace teprve hledá, nicméně provedené experimenty v této práci potvrdily, že metoda představuje jednu z možností, jak zkoumat rychle probíhající biologické děje s malou pravděpodobností poškození vzorku nebo jeho nežádoucího ovlivnění neionizujícím zářením.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BRÜNDERMANN, E., HÜBERS, H.-W., KIMMITT, M. F. *Terahertz Techniques*. Berlin: Springer-Verlag, 2012. 383 pages. ISBN 978-3-642-02591-4.
- [2] KAWAI, N. et al. Basic Study of a Mixture of N-butyl Cyanoacrylate, Ethanol, and Lipiodol as a New Embolic Material. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*. 2012, vol. 23, no. 11, pp. 1516 – 1521.
- [3] SPIEGEL, S. M. et al. Adjusting the Polymerization Time of Isobutyl-2 Cyanoacrylate. *American Society of Neuroradiology*. 1986, vol. 7, no. 1, pp. 109 – 112.
- [4] GOUNIS, M. J. et al. Effect of Glacial Acetic Acid and Ethiodized Oil Concentration on Embolization with N-Butyl 2-Cyanoacrylate: An in Vivo Investigation. *American Society of Neuroradiology*. 2002, vol. 23, no. 6, pp. 938 – 944.
- [5] KATTI, D., KRISHNAMURTI, N. Anionic polymerization of alkyl cyanoacrylates: In vitro model studies for in vivo applications. *Journal of Applied Polymer*. 1999, vol. 74, no. 2, pp. 336 – 344.
- [6] TOMLINSON, S. K. et al. The use of near-infrared spectroscopy for the cure monitoring of an ethyl cyanoacrylate adhesive. *Vibrational Spectroscopy*. 2006, vol. 40, no. 1, pp. 133 – 141.
- [7] Cambridge Polymer Group Inc. Determination of the kinetics of curing of cyanoacrylate-based adhesives with Fourier transform infrared spectroscopy. Application Note CPGAN #001, Boston, 2004.
- [8] EDWARDS, H. G. M., DAY, J. S. Fourier transform raman spectroscopic studies of the curing of cyanoacrylate glue. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2004, vol. 35, no. 7, pp. 555 – 560.
- [9] WIDLUS, D. M. et al. In vivo evaluation of iophendylate-cyanoacrylate mixtures. *Radiology*. 1992, vol. 185, no. 1, pp. 269 – 273.
- [10] STOESSLEIN, F., DITSCHERLEIN, G., ROMANIUK, P. A. Experimental studies on new liquid embolization mixtures (histoacryl-lipiodol, histoacryl-panthopaque). *Cardiovascular Interventional Radiology*. 1982, vol. 5, no. 5, pp. 264 – 267.
- [11] TAKASAWA, Ch. et al. Properties of N-butyl cyanoacrylate-iodized oil mixtures for arterial embolization: in vitro and in vivo experiments. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*. 2012, vol. 23, no. 9, pp. 1215 – 1221.
- [12] LI, Y. In vitro characterization of cyanoacrylate embolic glues used for vascular embolization. Sorbonne: Université de Technologie de Compiègne, 2017. 116 p. Ph.D. Thesis. Ph.D. supervisors: Anne-Virginie Salsac, Dominique Barthès-Biesel.
- [13] LEWIS, K. M. et al. Comparison of regenerated and non-regenerated oxidized cellulose hemostatic agents. *European Surgery*. 2013, vol. 45, no. 4, pp. 213–220.
- [14] FISCHER, T. H. Fischer et al. Comparison of structural and hemostatic properties of the poly-N-acetyl glucosamine syvek patch with products containing chitosan. *Microscopy Research and Technique*. 2004, vol. 63, no. 3, pp. 168 – 174.
- [15] RAHMANY, M. B., HANTGAN, R. R., VAN DYKE, M. A mechanistic investigation of the effect of keratin-based hemostatic agents on coagulation. *Biomaterials*. 2013, vol. 34, no. 10, pp. 2492 – 2500.
- [16] MIZUNO, K. et al. Evaluation of resorption and biocompatibility of collagen hemostats in the spinal epidural space. *Spine Journal*. 2014, vol. 14, no.9, pp. 2141 – 2149.
- [17] LI, J. et al. Zeolite-based hemostat QuikClot releases calcium into blood and promotes blood coagulation in vitro. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2013, vol. 34, no. 3, pp. 367 – 372.
- [18] LEE, B. P., DALVIN, J. L., MESSERSMITH, P. B. Synthesis and gelation of DOPA-modified poly(ethylene glycol) hydrogels. *Biomacromolecules*. 2002, vol. 3, no. 5, pp. 1038 – 1047.
- [19] KABIRI, M. et al. Preparation and characterization of absorbable hemostat crosslinked gelatin sponges for surgical applications. *Current Applied Physics*. 2011, vol. 11, no. 3, pp. 457 – 461.
- [20] LEWIS, K. M. et al. Comparison of two gelatin and thrombin combination hemostats in a porcine liver abrasion model. *Journal of Investigative Surgery*. 2013, vol. 26, no. 3, pp. 141 – 148.

- [21] HUTCHINSON, R. W. et al. Hemostatic efficacy and tissue reaction of oxidized regenerated cellulose hemostats. *Cellulose*. 2013, vol. 20, pp. 537 – 545.
- [22] KESHAVARZI, S. et al. Clinical experience with the surgical family of absorbable hemostats (oxidized regenerated cellulose) in neurosurgical applications: a review. *Wounds*. 2013, vol. 25, no. 6, pp. 160 – 167.
- [23] GAJDZIOK, J. Lokální hemostatika. *Remedia*. 2010, vol. 20, no. 3, pp. 185 – 190.
- [24] DOBROIU, A., OTANI, Ch., KAWASE, K. Terahertz-wave sources and imaging applications. *Measurement Science and Technology*. 2006, vol. 17, pp. R161 – R174. ISSN 0957-0233.
- [25] CHAN, W. L., DEIBEL, J., MITTELMAN, D. M. Imaging with terahertz radiation. *Reports on Progress in Physics*. 2007, vol. 70, no. 8, pp. 1325 – 1379. ISSN 0034-4885.
- [26] The Terahertz Wave eBook [online]. 2012, last revision 18th of December 2013 [cit. 2014-03-23]. Dostupné z: <http://dl.z-thz.com/eBook/zomega_ebook_pdf_1206_sr.pdf>
- [27] HUMPREYS, K. et al. Medical applications of Terahertz Imaging: a Review of Current Technology and Potential Applications in Biomedical Engineering. In *Proceedings of the 26th Annual International Conference of the IEEE EMBS*. San Francisco (California), 2004, 4 pages.
- [28] ZHANG, X.-C., XU, J. *Introduction to THz Wave Photonics*. New York: Springer-Verlag, 2010. 246 pages. ISBN 978-1-4419-0977-0.
- [29] ZHANG, X.-C. Terahertz wave imaging: horizons and hurdles. *Physics in Medicine and Biology*. 2002, vol. 47, pp. 3667 – 3677. ISSN 0031-9455.
- [30] VECCHIA, P. et al. *Exposure to high frequency electromagnetic fields, biological effects and health consequences (100 kHz – 300 GHz)*. Oberschleißheim: ICNIRP, 2009. ISBN 978-3-934994-10-2.
- [31] REDO-SANCHEZ, A. et al. Terahertz time-gated spectral imaging for content extraction through layered structures. *Nature Communications*. 2016, vol. 7, art. no. 12665.
- [32] ABRAHAM, E. et al. Non-invasive investigation of art paintings by terahertz imaging. *Applied Physics A*. 2014, vol. 100, no. 3, pp. 585 – 590.
- [33] YIN, X., W.-H. Ng, B., ABBOTT, D. *Terahertz Imaging for Biomedical Applications: Pattern Recognition and Tomographic Reconstruction*. New York: Springer-Verlag, 2012. 315 pages. ISBN 978-1-4614-1820-7.
- [34] LEE, Y.-S. *Principles of Terahertz Science and Technology*. New York: Springer-Verlag, 2009. 340 pages. ISBN 978-0-387-09539-4.
- [35] SZÁNTÓ, L. *Maxwellovy rovnice*. Praha: BEN, 2012. 124 stran. ISBN 978-80-7300-450-7.
- [36] PEIPONEN, K.-E., ZEITLER, J. A., KUWATA-GONOKAMI, M. *Terahertz Spectroscopy and Imaging*. Berlin: Springer-Verlag, 2013. 641 pages. ISBN 978-3-642-29563-8.
- [37] STECK, D.-A. Classical and Modern Optics. 2006, last revision 28th of June 2015 [cit. 2016-09-07]. Dostupné z: <<http://atomoptics-nas.uoregon.edu/~dsteck/teaching/optics/optics-notes.pdf>>
- [38] FITZGERALD, A. J. et al. An introduction to medical imaging with coherent terahertz frequency radiation. *Physics in Medicine and Biology*. 2002, vol. 47, R67 – R84. ISSN 0031-9155.
- [39] SAKAI, K. *Terahertz Optoelectronics*. Berlin: Springer-Verlag, 2005. 387 pages. ISBN 978-3-540-20013-0.
- [40] SON, J.-H. *Terahertz Biomedical Science & Technology*. Boca Raton: CRC Press, 2014. 377 pages. ISBN 978-1-466-57045-0.
- [41] WITHAYACHUMNANKUL, W., FISCHER, B. M., ABBOTT, D. Material thickness optimization for transmission-mode terahertz time-domain spectroscopy. *Optics Express*. 2008, vol. 16, no. 10, pp. 7382 – 7396. ISSN 1094-4087.
- [42] SMYE, S. W. et al. The interaction between Terahertz radiation and biological tissue. *Physics in Medicine and Biology*. 2001, vol. 46, pp. R101 – R112. ISSN 0031-9155.
- [43] NAFTALY, M. *Terahertz Metrology*. Boston: Artech House, 2015. 359 pages. ISBN 978-1-60807-776-2.

- [44] JAN, J. *Číslicová filtrace, analýza a restaurace signálů*. Brno: VUTUM, 2002. 427 stran. ISBN 978-8-021-42911-6.
- [45] NASHIMA, S., MORIKAWA, O., TAKATA, K., HANGYO, M. Measurement of optical properties of highly doped silicon by terahertz time domain reflection spectroscopy. *Applied Physics Letters*. 2001, vol. 79, no. 24, pp. 3923– 3925. ISSN 0003-6951.
- [46] GALLERANO, G. P. *Terahertz radiation in Biological Research, Investigations on Diagnostics and study on potential Genotoxic Effects*. Final Report of the THz-BRIDGE Project QLK4-CT-2000-00129. Frascati: UTS Tecnologie Fisiche Avanzate, 2004.
- [47] HILLER, E. *Basic principles of hemostasis*, Modern Hematology. Totowa: Humana, 2007, pp. 327 – 345. ISBN 978-1-58829-557-6.
- [48] BROOS, K. et al. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Reviews*. 2011, vol. 25, no. 4, pp. 155 – 167.
- [49] DE WITT, S. M. et al. Insights into platelet-based control of coagulation. *Thrombosis Research*. 2014, vol. 133, Suppl. 2, pp. S139–S148.
- [50] SILBERNAGL, S., DESPOPOULOS, A. *Atlas fyziologie člověka*. Praha: Grada Publishing, 2004. 448 stran. ISBN 978-8-02470-630-6.
- [51] GORBET, M. B., SEFTON, M. V. Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes. *Biomaterials*. 2004, vol. 25, no. 26, pp. 5681–5703.
- [52] CHAPIN, J. C., HAJJAR, K. A. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Reviews*. 2015, vol. 29, no. 1, pp. 17– 24.
- [53] MATULA, CH. W., STEIGER, CH. N. *Hemostasis and fleece-bound sealing in neurosurgery*. Stuttgart: Thieme, 2011, p. 94. ISBN 978-3-13132-041-4.
- [54] SCHONAUER, C. et al. The use of local agents: bone wax, gelatin, collagen, oxidized cellulose. *European Spine Journal*. 2004, vol. 13, suppl. 1, pp. S89 – S96.
- [55] TAN, T. C., BLACK, P. M. Sir Victor Horsley (1857-1916): pioneer of neurological surgery. *Neurosurgery*. 2002, vol. 50, no. 3, pp. 607 – 611, discussion 611 – 612.
- [56] BERGEL, S. Überwirkungen des fibrins. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 1909, vol. 35, no. 15, pp. 663 – 665.
- [57] YOUNG, J. Z., MEDAWAR, P. B. Fibrin suture of peripheral nerves. *Lancet*. 1940, vol. 236, no. 6101, pp. 126 – 128.
- [58] CRONKITE, E. P., LOZNER, E. L., DEEVER, J. M. Use of thrombin and fibrinogen in skin grafting. *JAMA*. 1944, vol. 124, no. 14, pp. 976 – 978.
- [59] FRANTZ, V. K. New methods of hemostasis. *Surgical Clinics of North America*. 1945, vol. 25, pp. 338 – 349.
- [60] LIGHT, R. U., PRENTICE, H. R. Surgical investigation of a new absorbable sponge derived from gelatin for use in hemostasis. *Journal of Neurosurgery*. 1945, vol. 2, no. 5, pp. 435 – 455.
- [61] COOVER, H. N., JOYNER, F. B., SHEARER, N. H. Chemistry and performance of cyanoacrylate adhesives. *SPE Journal*. 1959, vol. 15, pp. 413-417.
- [62] HAIT, M. R. Microcrystalline collagen, a new hemostatic agent. *American Journal of Surgery*. 1970, vol. 120, no. 3, p. 330.
- [63] MALETTE, W. G. et al. Chitosan: a new hemostatic. *The Annals of Thoracic Surgery*. 1983, vol. 36, no. 1, pp. 55 – 58.
- [64] ACHNECK, H. E. et al. A comprehensive review of topical hemostatic agents: efficacy and recommendations for use. *Annals of Surgery*. 2010, vol. 251, no. 2, pp. 217 – 228.
- [65] GABAY, M., BOUCHER, B. A. An essential primer for understanding the role of topical hemostats, surgical sealants, and adhesives for maintaining hemostasis. *Pharmacotherapy*. 2013, vol. 33, no. 9, pp. 935 – 955.
- [66] PALM, M. D., ALTMAN, J. S. Topical hemostatic agents: a review. *Dermatologic Surgery*. 2008, vol. 34, pp. 431 – 445.

- [67] WYSHAM, W. Z., ROQUE, D. R., SOPER, J. T. Use of topical hemostatic agents in gynecologic surgery. *Obstetrical & Gynecological Survey*. 2014, vol. 69, no. 9, pp. 557 – 563.
- [68] NEVELEFF, D. J. Optimizing hemostatic practices: matching the appropriate hemostat to the clinical situation. *AORN Journal*. 2012, vol. 96, no. 5, pp. S1 – S17.
- [69] SPOTNITZ, W. D., BURKS, S. G., PRABHU, R. *Fibrin-based adhesives and hemostatic agents*, Tissue Adhesives in Clinical Medicine, QUINN, J. V. (Ed.). New York: Decker, 2005. 183 pages. ISBN 978-155-00-9282-0.
- [70] YUI, N., MRSNY, R. J., PARK, K. *Reflexive Polymers and Hydrogels: Understanding and Designing Fast Responsive Polymeric Systems*. Boca Raton: CRC Press, 2004. 472 pages. ISBN 978-020-34-8535-4.
- [71] GANJI, F., VASHEGHANI-FARAHANI, E. Hydrogels in Controlled Drug Delivery Systems. *Iranian Polymer Journal*. 2009, vol. 18, no. 1., pp. 63 – 88.
- [72] DOSTÁL, J., PAULOVÁ, H. SLANINA, J., TÁBORSKÁ, E. *Biochemie pro bakaláře*. Brno: Masarykova univerzita v Brně, 2005. 174 stran. ISBN 80-210-3232-4.
- [73] STILLWELL, L., MARKS, M. G., SAFERTSEIN, L., WISEMAN, D. M. *Oxidized cellulose: chemistry, processing and medical applications*, Handbook of biodegradable polymers, DOMB, A. J., KOST, J., WISEMAN, D. M. (Ed.). Amsterdam: CRC Press, 1998. 544 pages. ISBN 978-142-00-4936-7.
- [74] Johnson and Johnson (2007), Prescribing information, SURGICEL® ORIGINAL, SURGICEL® NU-KNIT® and SURGICEL® FIBRILLAR™ Absorbable Hemostats (oxidized regenerated cellulose). Johnson and Johnson Wound Management, a Division of Ethicon, Inc., Somerville.
- [75] DINEEN, P. Antibacterial activity of oxidized regenerated cellulose. *Surgery, Gynecology and Obstetrics*. 1976, vol. 142, pp. 481 – 486.
- [76] ABAEV, Y., KAPUTSKY, V., ADARCHENKO, A., SOBESHCHUK, O. Mechanism of antibacterial effects of monocarboxycellulose and other ion-exchange derivatives of cellulose. *Antibiotiki I Meditsinskaia Biotekhnologiya*. 1986, vol. 31, no. 8, pp. 624 – 628.
- [77] SPANGLER, D. et al. In vitro antimicrobial activity of oxidized regenerated cellulose against antibiotic-resistant microorganisms. *Surgical Infections*. 2003, vol. 4, no. 3, pp. 255 – 262.
- [78] BREDA, A. et al. Use of haemostatic agents and glues during laparoscopic partial nephrectomy: a multi-institutional survey from the United States and Europe of 1347 cases. *European Urology*. 2007, vol. 52, no. 3, pp. 798 – 803.
- [79] RASTOGI, V., DY, V. Control of port-site bleeding from smaller incisions after laparoscopic cholecystectomy surgery: a new, innovative, and easier technique. *Surgical Laparoscopy, Endoscopy & Percutaneous Techniques*. 2002, vol. 12, no. 4, pp. 224 – 226.
- [80] MAIR, H. et al. Surgicel Nu-Knit hemostat for bleeding control of fragile sternum. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2005, vol. 130, no. 2, pp. 605 – 606.
- [81] THEUER, C. P., IMAGAWA, D. K. Use of knitted oxidized cellulose (Nu-knit) for the definitive packing of grade III liver fracture. *Injury*. 1999, vol. 30, no. 2, pp. 137 – 140.
- [82] TROOSKIN, S. Z., FLANCBAUM, L., BOYARSKY, A. H., GRECO, R. S. A simplified approach to techniques of splenic salvage. *Surgery, Gynecology & Obstetrics*. 1989, vol. 168, no. 6, pp. 546–548.
- [83] BHATNAGAR, R. K., BERRY, S. Selective Surgicel packing for the treatment of posterior epistaxis. *Ear, Nose & Throat Journal*. 2004, vol. 83, no. 9, pp. 633 – 634.
- [84] AWONUGA, A. O., MERHI, Z. O., KHULPATEEA, N. Abdominal packing for intractable obstetrical and gynecologic hemorrhage. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics*. 2006, vol. 93, no. 2, pp. 160 – 163.
- [85] SHARMA, J. B., MALHOTRA, M. Successful management of uterine incision hemorrhage in caesarean section with topical oxidized regenerated cellulose (Surgicel Nu Knit): a case report. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2006, vol. 274, no. 2, pp. 115 – 116.

- [86] SABEL, M., STUMMER, W. Haemostasis in spine surgery. The use of local agents: Surgicel and Surgifoam. *European Spine Journal*. 2004, vol. 13, suppl. 1, pp. S97 – S101.
- [87] BASSETTO, F. et al. Use of oxidized regenerated cellulose to stop bleeding after a facelift procedure. *Aesthetic Plastic Surgery*. 2008, vol. 32, no. 5, pp. 807 – 809.
- [88] TOMIZAWA, Y. Clinical benefits and risk analysis of topical hemostats: a review. *Journal of Artificial Organs*. 2005, vol. 6, pp. 137 – 142.
- [89] DIMITRIJEVICH, D., TATARKO, M., GRACY, R. W. Biodegradation of oxidized regenerated cellulose. *Carbohydrate Research*. 1990, vol. 195, no. 2, pp. 247 – 256.
- [90] DIMITRIJEVICH, D. et al. In vivo degradation of oxidized, regenerated cellulose. *Carbohydrate Research*. 1990, vol. 198, no. 2, pp. 331 – 341.
- [91] IBRAHIM, M. F., APS, C., YOUNG, C. P. A foreign body reaction to Surgicel mimicking an abscess following cardiac surgery. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2002, vol. 22, no. 3, pp. 489 – 490.
- [92] IGARI, T. et al. A case of foreign body granuloma after aortic valve replacement. *Kyobu Geka*. 1990, vol. 43, no. 7, pp. 550 – 552.
- [93] GAO, H. W. et al. Oxidized cellulose (Surgicel) granuloma mimicking a primary ovarian tumor. *International Journal of Gynecological Pathology*. 2002, vol. 21, no. 4, pp. 422 – 423.
- [94] AGARWAL, M. M. et al. Surgicel Granuloma: Unusual cause of “recurrent” mass lesion after laparoscopic nephron-sparing surgery for renal cell carcinoma. *Urology*. 2010, vol. 76, no. 2, pp. 334 – 335.
- [95] BANERJEE, T., GOLDSCHMIDT, K. ‘Surgiceloma’ manifested as cauda equina syndrome. *Southern Medical Journal*. 1998, vol. 91, no. 5, pp. 481 – 483.
- [96] BRODBELT, A. R. et al. Intraspinal oxidized cellulose (Surgicel) causing delayed paraplegia after thoracotomy – a report of three cases. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*. 2002, vol. 84, no. 2, pp. 97 – 99.
- [97] THAKUR, V. K. *Cellulose-based graft copolymers: Structure and Chemistry*. Boca Raton: CRC Press, 2015. 628 pages. ISBN 978-148-22-4248-5.
- [98] SZPALSKI, M., GUNZBURG, R., SZTERN, B. *An overview of blood-sparing techniques used in spine surgery during the perioperative period*, Haemostasis in Spine Surgery, SZPALSKI, M. et al. (Eds.). Berlin: Springer-Verlag, 2005. 117 pages. ISBN 3-540-24234-1.
- [99] RIBALTA, T. et al. Textiloma (Gossypiboma) mimicking recurrent intracranial tumor. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2004, vol. 128, no. 7, pp. 749 – 758.
- [100] Gelita Medical (2008), Instructions for Use, GELITA-SPON® Absorbable Gelatin Sponge. Gelita Medical, a Division of INVOTEC, Amsterdam.
- [101] MURRAY, R. K., GRANNER, D. K., MAYES, P. A., RODWELL, V. W. *Harperova biochemie*. Praha: H&H, 2002. 872 stran. ISBN 80-7319-013-3.
- [102] Hypro (2015), Návod k použití, Hypro-Sorb® R vstřebatelná atelokolagenová hemostatická plst. Hypro, Komárov.
- [103] LAWSON, J. H. et al. Antihuman factor V antibodies after use of relatively pure bovine thrombin. *Annals of Thoracic Surgery*. 2005, vol. 97, no. 3, pp. 1037 – 1038.
- [104] SCHOENECKER, J. G. et al. Exposure of mice to topical bovine thrombin induces systemic autoimmunity. *American Journal of Pathology*. 2001, vol. 159, no 5, pp. 1957 – 1969.
- [105] DORIA, C. et al. Phase 3, randomized, double-blind study of plasma-derived human thrombin versus bovine thrombin in achieving hemostasis in patients undergoing surgery. *Current Medical Research and Opinion*. 2008, vol. 24, no. 3, pp. 785 – 794.
- [106] CHAPMAN, W. C. et al. A phase 3, randomized, double-blind comparative study of the efficacy and safety of topical recombinant human thrombin and bovine thrombin in surgical hemostasis. *Journal of the American College of Surgeons*. 2007, vo. 205, no. 2, pp. 256 – 265.

- [107] KESSLER, C. M., ORTEL, T. L. Recent developments in topical thrombins. *Thrombosis and Haemostasis*. 2009, vol. 102, no. 1, pp. 15 – 24.
- [108] STRAUSBERG, R. L., LINK R. P. Protein-based medical adhesives. *Trends in Biotechnology*. 1990, vol. 8, no. 2, pp. 53 – 57.
- [109] REECE, T. B., MAXEY, T. S., KRON, I. L. A prospectus on tissue adhesives. *The American Journal of Surgery*. 2001, vol. 182, no. 2, suppl. 1, pp. S40 – S44.
- [110] NISTOR, R. F., CHIARI, F. M., MAIER, H., HEHL, K. The fixed combination of collagen with components of fibrin adhesive – a new hemostyptic agent in skull base procedures. *Skull Base Surgery*. 1997, vol. 7, no. 1, pp. 23 – 30.
- [111] Takeda (2017), Full Prescribing Information, TACHOSIL® Fibrin Sealant Patch. Takeda Austria, Linz.
- [112] MAISANO, F. et al. Tachosil surgical patch versus conventional haemostatic fleece material for control of bleeding in cardiovascular surgery: a randomized controlled trial. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2009, vol. 36, no. 4, pp. 708–714.
- [113] ERDOGAN, D., VAN GULIK, T. M. Evolution of fibrinogen-coated collagen patch for use as a topical hemostatic agent. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*. 2008, vol. 85, no. 1, pp. 272 – 278.
- [114] CHAPMAN, W. C. et al. A novel collagen-based composite offers effective hemostasis for multiple surgical indications: Results of a randomized controlled trial. *Surgery*. 2001, vol. 129, no. 4, pp. 445 – 450.
- [115] BOUTEN, P. J. M. et al. The chemistry of tissue adhesive materials. *Progress in Polymer Science*. 2013, vol. 39, no. 7, pp. 1375 – 1405.
- [116] BHATIA, S. K. *Biomaterials for clinical applications*. New York: Springer-Verlag, 2010. 283 pages. ISBN 978-1-4419-6920-0.
- [117] Histoacryl®, Návod k použití. B. Braun Surgical, Spain, 2011.
- [118] TPS Spectra 3000, Instrument General Information. TeraView, Cambridge, U. K., 2011.
- [119] HIRORI, H., YAMASHITA, K., NAGAI, M., TANAKA, K. Attenuated total reflection spectroscopy in time domain using terahertz coherent pulses. *Japanese Journal of Applied Physics*. 2004, vol. 43, no. 10A, p. L1287.
- [120] GRISCHKOWSKY, D., KEIDING, S., VAN EXTER, M., FATTINGER, C. Far-infrared time-domain spectroscopy with terahertz beam of dielectrics and semiconductors. *Journal of the Optical Society of America B*. 1990, vol. 7, no. 10, p. 2006.
- [121] CROMPTON, D., VICKERS, A. J. THz spectroscopic studies of biomolecules. In *Proceedings of the 13th Biennial Baltic Electronics Conference*. Tallinn (Estonia), 2012, pp. 13 – 20.
- [122] NEWNHAM, D. A., TADAY, P. F. Pulsed terahertz attenuated total reflection spectroscopy. *Applied Spectroscopy*. 2008, vol. 62, no. 4, pp. 394 – 398.
- [123] MILOSEVIC, M. *Internal reflection and ATR spectroscopy*. Hoboken: Wiley, 2012. 264 pages. ISBN 978-0-470-27832-1.
- [124] KHOSHHEB, Z. M. *Reflectance IR Spectroscopy*, Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology, THEOPHANIDES, T. (Ed.). Rijeka: InTech, 2012. 524 pages. ISBN: 978-9-53510-537-4.
- [125] EKGASIT, S. ATR spectral intensity: What is the upper limit of weak absorption? *Applied Spectroscopy*. 2000, vol. 54, no. 5, pp. 756 – 758.
- [126] SOLTANI, A. et al. Attenuated total reflection terahertz time-domain spectroscopy: Uncertainty analysis and reduction scheme. *IEEE Transactions on Terahertz Science and Technology*. 2016, vol. 6, no. 1, pp. 32 – 39.
- [127] ZEITLER, J. A. et al. Drug hydrate systems and dehydration processes studied by terahertz pulsed spectroscopy. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007, vol. 334, no. 1 – 2, pp. 78 – 84.

- [128] BARSOUKOV, E., MACDONALD, J. R. *Impedance Spectroscopy, Theory, Experiment, and Applications*. Hoboken: Wiley, 2005. 595 pages. ISBN 978-0-471-64749-2.
- [129] PALAI-DANY, T. *Dielektrická spektroskopie karboxymetylcelulózy v časové oblasti*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2009.
- [130] MIJOVIC, J., FITZ, B. D. *Dielectric Spectroscopy of Reactive Polymers*, Application Note Dielectrics 2. Novocontrol, Germany, 1998.
- [131] FRANCK, A. *Dielectric Characterization*, Application Note 032. TA Instruments, USA, 2012.
- [132] BLYTHE, A. R., BLOOR, D. *Electrical Properties of Polymers*. Cambridge: Cambridge University Press, 2005. 480 pages. ISBN 978-0-52155-219-6.
- [133] RAJU, G. G. *Dielectrics in Electric Fields*. New York: CRC Press, 2003. 592 pages. ISBN 978-0-82470-864-1.
- [134] BINNER, J. G. P. *Advanced Ceramic Processing and Technology*. New Jersey: William Andrew Publishing/Noyes, 1990. ISBN 978-0-81551-603-3.
- [135] MEISSNER, B., ZILVAR, V. *Fyzika polymerů: Struktura a vlastnosti polymerních materiálů*. Praha: SNTL, 1987. 306 stran.
- [136] Agilent E4980A Precision LCR Meter 20 Hz to 2 MHz. Agilent Technologies, U.S.A., 2013.
- [137] STUART, B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Chichester: Wiley, 2004. 203 pages. ISBN 978-0-47085-428-0.
- [138] THEOPHANIDES, T. *Introduction to Infrared Spectroscopy*, Infrared Spectroscopy – Materials Science, Engineering and Technology, THEOPHANIDES, T. (Ed.). Rijeka: InTech, 2012. 524 pages. ISBN 978-9-53510-537-4.
- [139] COATES, J. *Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach*, Encyclopedia of Analytical Chemistry, MEYERS, R. A. (Ed.). Chichester: Wiley, 2000. 2188 pages. ISBN 978-0-47097-3332.
- [140] SMITH, B. C. *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. Boca Raton: CRC Press, 2011. 207 pages. ISBN 978-1-42006-929-7.
- [141] Nicolet iS50 Spectrometer, User Guide. Thermo Fisher Scientific, U.S.A., 2013.
- [142] Introduction to Raman Spectroscopy. Thermo Fisher Scientific, U.S.A, 2008.
- [143] BROWN, J. M. *Molecular Spectroscopy*. Oxford: Oxford University Press, 1998. 86 pages. ISBN 978-0-19855-785-2.
- [144] SMITH, E., DENT, G. *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*. Chichester: Wiley, 2005. 210 pages. ISBN 978-0-471-49794-3.
- [145] SIEBERT, F., HILDEBRANDT, P. *Vibrational Spectroscopy in Life Science*. Weinheim: Wiley, 2008. 305 pages. ISBN 978-3-527-40506-0.
- [146] Renishaw inVia Raman Microscope. Renishaw, U.K., 2006.
- [147] PADDOCK, S. W., ELICEIRI, K. W. *Laser Scanning Confocal Microscopy: History, Applications, and Related Optical Sectioning Techniques*, Confocal Microscopy: Methods and Protocols, PADDOCK, S. W. (Ed.). New York: Springer-Verlag, 2014. 381 pages. ISBN 978-1-58829-351-0.
- [148] FINE, A. *Confocal Microscopy: Principles and Practice*, Imaging in Neuroscience and Development: A laboratory Manual, YUSTE, R., KONNERTH, A. (Eds.). New York: CSHL Press, 2005. 854 pages. ISBN 978-0-87969-692-4.
- [149] WILHELM, S. *Confocal Laser Scanning Microscopy*. Carl Zeiss, Jena, Germany, 2013. ISBN 978-3-94088-502-9.
- [150] SOVAK, M. *Radioccontrast Agents*. Berlin: Springer-Verlag, 1984. 612 pages. ISBN 978-3-642-69515-5.
- [151] KOLBECK, K. J. Lipiodol = Ethiodol. *Journal of Vascular and Interventional Radiology*. 2011, vol. 22, no. 3, pp. 419 – 420.

- [152] Cyanoacrylate Adhesives, Cyberbook [online]. 2019 [cit. 2. 10. 2019]. Dostupné z: <https://www.cyberbond.de/wp-content/uploads/cyberbook_kap04_ca_gb.pdf>
- [153] FINK, J. K. *Reactive Polymers Fundamentals and Applications: A Concise Guide to Industrial Polymers*. Norwich: William Andrew, 2013. 576 pages. ISBN 978-1-455-73158-9.
- [154] Application Note 2.17: Electrical Modeling of Polymers. Lambient Technologies, U.S.A., 2017.
- [155] KRISHNAMURTHY, S., IYENGAR, B. R. Y. Dielectric constants of commercial cashew shell oils. *Current Science*. 1949, vol. 18, no. 11, pp. 23 – 34.
- [156] Quantum 134, Technical Data Sheet. Herson, U.S.A., 2009.
- [157] Loctite 4903™, Technical Data Sheet. Henkel, U.S.A., 2014.
- [158] LAKRARI, K. et al. Study of electrical properties of vegetable oils for the purpose of an application in electrical engineering. *Global Journal of Food Science and Technology*. 2013, vol. 1, no. 1, pp. 82 – 85.
- [159] ISMAILI, S. A. et al. Study of the electrical resistivity of vegetable and essential oils. *Der Pharma Chemica*. 2015, vol. 7, no. 9, pp. 294 – 296.
- [160] Overview of materials for Cyanoacrylate Adhesive [online]. 2019 [cit. 17. 7. 2019]. Dostupné z: <<http://www.matweb.com/search/datasheet.aspx?matguid=d0d7dbec7666421caf8aa08724b634c5&n=1>>
- [161] Loctite 4850™, Technical Data Sheet. Henkel, U.S.A., 2008.
- [162] KISHITA, K., OHSAWA, N. Manicure Composition for Nail. *United States Patent* 6703003, assigned to Three Bond Co., Ltd., Tokyo, 2004.
- [163] PROBST, T. et al. Monitoring the Polymerization of Two-Component Epoxy Adhesives Using a Terahertz Time Domain Reflection System. *Journal of Infrared, Millimeter and Terahertz Waves*. 2015, vol. 36, no. 6, pp. 569 – 577.
- [164] SIDDIQUI, N., AHMAD, A. Infrared spectroscopic studies on edible and medicinal oils. *International Journal of Science, Environment and Technology*. 2013, vol. 2, no. 6, pp. 1297–1306.
- [165] DADMUN, M. D. *Developing Methods to Improve the Quality and Efficiency of Latent Fingerprint Development by Superglue Fuming*. Knoxville: University of Tennessee, 2014. 40 p. Final Project Report to the Department of Justice. Dostupné z WWW: <<https://www.ncjrs.gov/pdffiles1/nij/grants/248637.pdf>>
- [166] *Infrared Dynamic Imaging for the Examination of Chemical Reactions* (Ed.). Spectroscopy Online. 2013, vol. 28, no. s8. Dostupné z WWW: <<http://www.spectroscopyonline.com/infrared-dynamic-imaging-examination-chemical-reactions>>.
- [167] DUFFY, C., ZETTERLUND, P. B., ALDABBAGH, F. Radical polymerization of alkyl 2-cyanoacrylates. *Molecules*. 2018, vol. 23, no. 465, p. 21.
- [168] FOGLER, H. S. *Elements of Chemical Reaction Engineering*. New Jersey: Prentice-Hall PTR, 2006. 1080 pages. ISBN 978-0-130-47394-3.
- [169] EROMOSELE, I. C., PEPPER, D. C., RYAN, B. Water effects on the zwitterionic polymerization of cyanoacrylates. *Macromolecular Chemistry*. 1989, vol. 190, pp. 1613 – 1622.
- [170] BURNHAM, A. K. *Global Chemical Kinetics of Fossil Fuels*. Livermore: Springer-Verlag, 2017. 315 pages. ISBN 978-3-319-49634-2.
- [171] HENDL, J. *Přehled statistických metod zpracování dat: analýza a meta analýza dat*. Praha: Portál, 2006. 583 stran. ISBN 80-7367-123-9.
- [172] LEYS, CH. et al. Detecting outliers: Do not use standard deviation around the mean, use absolute deviation around the median. *Journal of Experimental Social Psychology*. 2013, vol. 49, no. 4, pp. 764 – 766.
- [173] BAŠTINEC, J. *Statistika, stochastické procesy, operační výzkum*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, 2014. 247 stran. Dostupné z: <http://matika.umat.feec.vutbr.cz/inovace/texty/DMA1/CZ/DMA1_plna_verze_CZ.pdf>

- [174] DUBJAKOVÁ, E. *Metody mnohonásobného porovnávání pro jednoduché třídění*. Brno: Masarykova univerzita, 2009. 57 s., 14 s. příloh. Diplomová práce. Vedoucí práce: RNDr. Marie Budíková, Dr.
- [175] LAJDOVÁ, D. *Neparametrické metody v systému STATISTICA*. Brno: Masarykova univerzita, 2009. 32 s., 8 s. příloh. Bakalářská práce. Vedoucí práce: RNDr. Marie Budíková, Dr.
- [176] CARLESI, S. *Optical spectroscopies: Application to the study of paint models*. Florencie: Università degli Studi, 2015. 220 p., 68 p. of Appendices. Ph.D. Thesis. Ph.D. supervisor: Prof. Piero Baglioni.
- [177] VANDENABEELE, P. et al. Analysis with micro-Raman spectroscopy of natural organic binding media and varnishes used in art. *Analytica Chimica Acta*. 2000, vol. 407, no. 1, pp. 261 – 274.
- [178] EDWARDS, H. G. M., DAY, J. S. Fourier transform Raman spectroscopic studies of the curing of cyanoacrylate glue. *Journal of Raman spectroscopy*. 2004, vol. 35, no. 7, pp. 555 – 560.
- [179] DAY, J. S. et al. The detection of drugs of abuse in fingerprints using Raman spectroscopy II: cyanoacrylate-fumed fingerprints. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2004, vol. 60, no. 8 – 9, pp. 1725 – 1730.
- [180] Histoacryl[®], Safety Data Sheet. AESCULAP AG&CO. KG, Germany, 2004.
- [181] SHAHIDI, F. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. New Jersey: Wiley, 2005. 3616 pages. ISBN 978-0-471-38460-1.
- [182] BOCKISCH, M. *Fats and Oils Handbook*. Illinois: AOCS Press, 1998. 838 pages. ISBN 978-0-935-31582-0.
- [183] TAKASAWA, C. et al. A fundamental examination of the effect of N-butyl-2-cyanoacrylate (NBCA)-iodized oil mixtures on arterial embolization. In the *European Congress of Radiology 2011*. Vídeň (Rakousko), 2001, 17 pages.
- [184] MASARO, L., ZHU, X. X. Physical models of diffusion for polymer solutions, gels and solids. *Progress in Polymer Science*. 1999, vol. 24, no. 5, pp. 731 – 775.
- [185] KYDONIEUS, A. F. *Treatise on Controlled Drug Delivery*. Livermore: Routledge, 2017. 568 pages. ISBN 978-1-351-40687-1.
- [186] SINGH, J. *Swelling of polymer gels*. Montreal: McGill University, 1993. 81 p., 13 p. of Appendices. Master Thesis.
- [187] GANJI, F., VASHEGHANI-FARAHANI, S., VASHEGHANI-FARAHANI, E. Theoretical description of hydrogel swelling: A review. *Iranian Polymer Journal*. 2010, vol. 19, no. 5, pp. 375–398.
- [188] WADSÖ, L. *A critical review on anomalous or non-fickian vapor sorption*. Lund: Lund University, 1992. 39 p. Internal report 7017.
- [189] ALFREY, T. Jr., GURNEE, E. F., LLOYD, W. G. Diffusion in glassy polymers. *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia*. 1966, vol. 12, pp. 246 – 261.
- [190] LEE, P. I. Kinetics of drug release from hydrogel matrices. *Journal of Controlled Release*. 1985, vol. 2, pp. 277 – 288.
- [191] PEPPAS, N. A., SAHLIN, J. J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *International Journal of Pharmaceutics*. 1989, vol. 57, pp. 169 – 172.
- [192] GÓRNICKI, K., et al. *Some remarks on modelling of mass transfer kinetics during rehydration of dried fruits and vegetables*, Mass Transfer – Advances in Sustainable Energy and Environment Oriented Numerical Modeling, NAKAJIMA, H. (Ed.). Rijeka: InTech, 2013. 524 pages. ISBN 978-953-51-6356-5.
- [193] THYBRING, E. E., GLASS, S. V., ZELINKA, S. L. Kinetics of water vapor sorption in wood cell walls: State of the art and research needs. *Forests*. 2019, vol. 10, no. 704, pp. 1 – 26.
- [194] MBOU, E. T. et al. Modelling of the water absorption kinetics and determination of the water diffusion coefficient in the pith of *Raffia vinifera* of Bandjoun, Cameroon. *Advances in Materials Science and Engineering*. 2017, vol. 2017, pp. 1 – 12.

- [195] AZIZIAN, S. Kinetic models of sorption: a theoretical analysis. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2004, vol. 276, no. 1, pp. 47 – 52.
- [196] KROKIDA, M. K., MARINOS-KOURIS, D. Rehydration kinetics of dehydrated products. *Journal of Food Engineering*. 2003, vol. 57, no. 1, pp. 1 – 7.
- [197] LEWIS, W. K. The rate of drying of solid materials. *The Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 1921, vol. 13, no. 5, pp. 427 – 432.
- [198] MUJUMDAR, A. S. *Handbook of Industrial Drying*. Boca Raton: CRC Press, 2015. 1301 pages. ISBN 978-1-4665-9665-8.
- [199] KIPCAK, A. S. et al. Modeling and investigation of the swelling kinetics of acrylamide-sodium acrylate hydrogel. *Journal of Chemistry*. 2014, vol. 2014, pp. 1 – 8.
- [200] THYBRING, E. E. et al. The parallel exponential kinetics model is unfit to characterize moisture sorption kinetics in cellulosic materials. *Cellulose*. 2019, vol. 26, pp. 723 – 735.
- [201] LANGENBUCHER, F. Letters to the Editor: Linearization of dissolution rate curves by the Weibull distribution. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 1972, vol. 24, no. 12, pp. 979–981.
- [202] COSTA, P., LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2001, vol. 13, no. 2, pp. 123 – 133.
- [203] LAI, C. D. *Weibull distributions and their applications*, Springer Handbook of Engineering Statistics, PHAM, H. (Ed.). Londýn: Springer-Verlag, 2006. 1120 pages. ISBN 978-1-85233-8060.
- [204] MIRCIOIU, C. et al. Mathematical modeling of release kinetics from supramolecular drug delivery systems. *Pharmaceutics*. 2019, vol. 11, no. 140, pp. 1 – 45.
- [205] BROWN, W. K., WOHLETZ, K. H. Derivation of the Weibull distribution based on physical principles and its connection to the Rosin-Rammler and lognormal distributions. *Journal of Applied Physics*. 1995, vol. 78, no. 4, pp. 2758 – 2763.
- [206] PAPAPOPOULOU, V. et al. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006, vol. 309, no. 1 – 2, pp. 44–50.
- [207] EL SEOUD, O. A., BAADER, W. J., BASTOS, E. L. *Practical chemical kinetics in solution, Encyclopedia of Physical Organic Chemistry*, WANG, Z. (Ed.). Hoboken: Wiley, 2017. 4464 pages. ISBN 978-1-118-47045-9.
- [208] HACINLIYAN, A. et al. Possible stretched exponential parametrization for humidity absorption in polymers. *European Physical Journal E*. 2009, vol. 28, no. 4, pp. 369 – 376.
- [209] VIKINGE, T. P. et al. Blood plasma coagulation studied by surface plasmon resonance. *Journal of Biomedical Optics*. 2000, vol. 5, no. 1, pp. 51 – 55.
- [210] XU, X., ZHU, J., CHEN, Z. Dynamic and quantitative assessment of blood coagulation using optical coherence elastography. *Scientific Reports*. 2016, vol. 6, pp. 1 – 7.
- [211] UHDEOVÁ, N. et al. *Fyzikální praktikum*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, 2006. 128 stran. ISBN 80-214-3234-9.
- [212] YUI, N., MRSNY, R. J., PARK, K. *Reflexive Polymers and Hydrogels: Understanding and Designing Fast Responsive Polymeric Systems*. Boca Raton: CRC Press, 2004. 472 pages. ISBN 978-0-203-48535-4.
- [213] TOBOLOVA-NEDVEDOVA, M. KRESALEK, V., ADAMIK, Z., PROVAZNIK, I. Terahertz time-domain spectroscopy for studying the kinetics of tissue adhesives. In *SPIE Proceedings vol. 9651, Millimetre Wave and Terahertz Sensors and Technology VIII*. Toulouse (France), 2015, 8 pages.
- [214] NEDVEDOVA, M., KRESALEK, V., VASKOVA, H., PROVAZNIK, I. Studying the kinetics of n-butyl-cyanoacrylate tissue adhesive and its oily mixtures. *Journal of Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves*. 2016, vol. 37, no. 10, pp. 1043 – 1054.
- [215] NEDVEDOVA, M., KRESALEK, V., ADAMIK, Z., PROVAZNIK, I. Terahertz time-domain spectroscopy for studying absorbable hemostats. *IEEE Transactions on Terahertz Science and Technology*. 2016, vol. 6, no. 3, pp. 420 – 426.

SEZNAM ZKRATEK

ATR	zeslabený úplný odraz, z angl. Attenuated Total Reflection
CCD	čip pro snímání obrazu, z angl. Charge-Coupled Device
CW	kontinuální vlna, z angl. Continuous Wave
DS	dielektrická spektroskopie, z angl. Dielectric Spectroscopy
FFT	rychlá Fourierova transformace, z angl. Fast Fourier Transform
FIR	vzdálení infračervené záření, z angl. Far Infrared Radiation
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací, z angl. Fourier Transform Infrared Spectroscopy
GPIO	rozhraní pro komunikaci měřicích a zkušebních přístrojů, z angl. General Purpose Interface Bus
GUI	grafické uživatelské rozhraní, z angl. Graphical User Interface
IR	infračervené záření, z angl. Infrared Radiation
MAD	absolutní odchylka mediánu, z angl. Median Absolute Deviation
MIR	záření ve střední infračervené oblasti, z angl. Mid-Infrared Radiation
MRI	zobrazování magnetickou rezonancí, z angl. Magnetic Resonance Imaging
NIR	záření v blízké infračervené oblasti, z angl. Nir-Infrared Radiation
PDGF	růstový faktor z krevních destiček, z angl. Platelet Derived Growth Factor
P-P	označení rozkmitu vlny špička-špička, z angl. Peak-to-Peak
Q _I	první kvartil (percentil 25 %)
Q _{III}	třetí kvartil (percentil 75 %)
SNR	poměr signál/šum, z angl. Signal to Noise Ratio
SSE	suma čtvercových odchylek, z angl. Sum of Squared Error
SW-W	Shapiro-Wilkův W test normality dat, z angl. Shapiro-Wilk W test
THz	terahertz
THz-TDS	terahertzová spektroskopie v časové doméně, z angl. Terahertz Time-Domain Spectroscopy

SEZNAM POUŽITÝCH KONSTANT A VELIČIN

A_{REF}	amplituda elektrického pole THz vlny reference [a. u.]
A_S	amplituda elektrického pole THz vlny vzorku [a. u.]
\vec{B}	vektor magnetické indukce [T]
c	rychlost světla ve vakuu ($c = 299\,792\,458\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$)
C_p	kapacita kondenzátoru [F]
d	tloušťka materiálu [m]
\vec{D}	vektor elektrické indukce [$\text{C}\cdot\text{m}^{-2}$]
D_{dif}	difúzní koeficient [$\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$]
D	ztrátový činitel, disipační (rozptylový) faktor [-]
d_p	penetrační hloubka [m]
e	elementární náboj ($1,602\,176\,634\cdot 10^{-19}\text{ C}$)
E	energie [J]
E_b	intenzita elektrického pole (předpětí) [$\text{N}\cdot\text{C}^{-1}$]
\vec{E}	vektor intenzity elektrického pole [$\text{V}\cdot\text{m}^{-1}$]
$\hat{E}(\omega)$	komplexní spektrum THz vlny složené z amplitudové $ E(\omega) $ a fázové složky $\Phi(\omega)$ závislé na ω
E_n	n -tý prvek posloupnosti vzorkované THz vlny
\vec{F}	Lorentzova síla [N]
f	frekvence [Hz]
f_c	relaxační frekvence [Hz]
f_{vz}	vzorkovací frekvence [Hz]
$FP(\omega)$	Fabry-Pérotův artefakt
G	vodivost [S]
\vec{H}	vektor intenzity magnetického pole [$\text{A}\cdot\text{m}^{-1}$]
h	Planckova konstanta ($h = 6,626\cdot 10^{-34}\text{ J}\cdot\text{s}$)
$h(t)$	výška absorpčního maxima IR spektra v čase t
I_0	počáteční intenzita dopadajícího záření [$\text{W}\cdot\text{m}^{-2}$]
I_C	nabíjecí proud kondenzátorem [A]
I_R	ztrátový proud rezistorem [A]
J	difúzní tok [$\text{kg}\cdot\text{m}^{-4}$]
\vec{J}_f	vektor hustoty elektrického proudu [$\text{A}\cdot\text{m}^{-2}$]

k	vlnočet [m^{-1}]
\vec{k}	vlnový vektor [m^{-1}]
k_0	vlnové číslo ve vakuu [m^{-1}]
k_a a k_d	rychlostní konstanty sorpce a desorpce vody [s^{-1}]
k_i	rychlostní konstanta inicializace polymeru [s^{-1}]
k_p	rychlostní konstanta propagace polymeru [s^{-1}]
k_t	rychlostní konstanta ukončení reakce polymerizace [s^{-1}]
k_{tr}	rychlostní konstanta přenosu při polymerizaci [s^{-1}]
\vec{M}	vektor magnetizace [$\text{A}\cdot\text{m}^{-1}$]
M_0	množství polymeru před zahájením bobtnání [-] (rovnovážný stav v $t = 0$)
M_∞	množství polymeru po úplném nabobtnání [-] (rovnovážný stav v $t \rightarrow \infty$)
M_s	množství polymeru nasyceného roztokem [-]
$M(t)$	aktuální množství nabobtnaného polymeru v čase t [-]
$\hat{n}(\omega)$	komplexní index lomu závislý na ω [-]
\vec{P}	vektor polarizace [$\text{C}\cdot\text{m}^{-2}$]
P_I	výkon dopadající elektromagnetické vlny [W]
P_R	výkon odražené elektromagnetické vlny [W]
P_T	výkon prošlé elektromagnetické vlny [W]
q	náboj částice [C]
$\hat{r}(\omega)$	komplexní reflexní koeficient [-]
r	amplitudový koeficient reflektivity (odrazivosti) [-]
R	odrazivost (reflektance) rozhraní [%]
R_p	odpor rezistoru [Ω]
S	plocha elektrod [m^2]
$\hat{t}(\omega)$	komplexní transmisní koeficient [-]
t	amplitudový koeficient propustnosti [-]
T	propustnost (transmitance) rozhraní [%]
T_g	teplota skelného přechodu [$^\circ\text{C}$]
$T(n)$	Fresnelovy ztráty v důsledku odrazů na rozhraních
$\hat{V}(\omega)$	spektrum vzorkovací funkce $v(t)$
X_c	kapacitance kondenzátoru [Ω]

$x_{PP}(t)$	hodnota rozkmitu THz vlny (Peak-to-Peak) v čase t [a. u.]
α	lineární absorpční koeficient Lambert-Beerova zákona [cm^{-1}]
β	bezrozměrný parametr tvaru Weibullový modelové funkce [-]
δ	ztrátový úhel [$^\circ$]
Δf	frekvenční rozlišení [Hz]
Δt	vzorkovací krok [s]
ε_0	permitivita vakua (přibližně $8,854 \cdot 10^{-12} \text{ F} \cdot \text{m}^{-1}$)
$\varepsilon_\infty, \varepsilon_s$	permitivita vybuzeného a relaxovaného stavu [$\text{F} \cdot \text{m}^{-1}$]
$\hat{\varepsilon}(\omega)$	komplexní permitivita [$\text{F} \cdot \text{m}^{-1}$]
ε_r	relativní permitivita (též dielektrická konstanta) [-]
θ_1, θ_2	úhel dopadu a lomu elektromagnetické vlny [$^\circ$]
$\phi_S(\omega), \phi_{REF}(\omega)$	fáze THz vlny vzorku a reference
κ	extinkční koeficient, imaginární složka $\hat{n}(\omega)$ [$\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
λ	vlnová délka [m]
μ_e	pohyblivost elektronu [$\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$]
μ	magnetická permeabilita [$\text{H} \cdot \text{m}^{-1}$]
μ_0	magnetická permeabilita vakua (přibližně $1,257 \cdot 10^{-6} \text{ H} \cdot \text{m}^{-1}$)
\vec{v}	vektor rychlosti [$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$]
$v(t)$	vzorkovací funkce (časové okno) délky T [s]
ρ_f	objemová hustota volných nábojů [$\text{C} \cdot \text{m}^{-3}$]
σ	konduktivita materiálu [$\text{S} \cdot \text{m}^{-1}$]
τ	časová konstanta procesu [s]
τ_d	časové zpoždění mezi <i>probe</i> impulsem a THz vlnou [s]
χ	elektrická susceptibilita [-]
ω_c	úhlová relaxační frekvence [$\text{rad} \cdot \text{s}^{-1}$]

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 2.1 Terahertzová oblast elektromagnetického spektra (převzato z [26])	11
Obr. 2.2 Princip kvantového přechodu s emisí fotonu (a) a klasického dipólu s emisí elektromagnetické vlny (b) [28].	12
Obr. 2.3 Princip pump-probe pro impulsní generování a detekci THz vlny (převzato z [28]).....	23
Obr. 2.4 Schéma principu THz TDS (převzato z [43]). Postupným skenováním THz vlny <i>probe</i> impulsem v čase získáme informaci o amplitudě i fázi.	24
Obr. 2.5 Fotoelektrická anténa s motýlkovou anténou (a) a její profil (b) (převzato z [36]).	25
Obr. 2.6 THz vlna a její amplitudové a fázové spektrum (převzato z [25]).....	27
Obr. 2.7 Schéma základního modelu transmise elektromagnetické vlny EI skrz jednu vrstvu materiálu o tloušťce d a s komplexním indexem lomu $n\omega$	29
Obr. 2.8 Schéma základního modelu pro reflexní měření elektromagnetické vlny EI při odrazu od jedné vrstvy materiálu s komplexním indexem lomu $n\omega$	31
Obr. 4.1 THz signály reference, tj. ATR krystalu (ozn. červeně), a vzorku Histoacrylu po aplikaci na krystal (ozn. modře) (a) a z nich vypočtená spektra (b), absorbance (c) a index lomu vzorku (d).	42
Obr. 4.2 Optické schéma měření pomocí ATR metody (a) (převzato z [43]) a detail rozhraní krystal-vzorek se vznikem evanescentní vlny šířící se vzorkem (b) (převzato z [124]).	43
Obr. 4.3 Schéma základního zapojení pro dielektrickou spektroskopii (a), ekvivalentní elektrický model charakterizující vlastnosti měřeného systému (b) [134] a fázový diagram (c) [132].	45
Obr. 4.4 Reálná ϵ' a imaginární část ϵ'' komplexní permitivity jako funkce kmitočtu $\omega\tau$ (převzato z [137]).	48
Obr. 4.5 Typy vibračních vazeb molekul (převzato z [140]).	49
Obr. 4.6 Schéma FTIR spektrometru (převzato z [140]).	51
Obr. 4.7 Schéma disperzního Ramanova spektrometru (převzato z [145]).....	53
Obr. 4.8 Princip konfokálního mikroskopu v reflexním uspořádání (převzato z [151]).	55
Obr. 5.1 Blokové schéma použité měřicí aparatury pro dielektrickou spektroskopii.	57
Obr. 5.2 Reálné zapojení měřicího pracoviště pro dielektrickou spektroskopii (a) a detail systému elektrod pro vložení vzorku (b).	58
Obr. 5.3 Naměřené časové závislosti disipačního faktoru vzorku Histoacrylu (<i>hist_1</i>) na 3 různých frekvencích (a) a odpovídající normalizované průběhy v intervalu 0 až 1 (b). Překmit v grafu (b) není brán v úvahu, neboť jde o chybu měření způsobenou při aplikaci elektrody.....	58
Obr. 5.4 Přehled zprůměrovaných naměřených časových závislostí disipačního faktoru $D(t)$ u vzorků Histoacrylu a jeho směsí.	59
Obr. 5.5 Okno pro výběr extrémů a definici hodnoty P-P (rozkmitu THz vlny).	62
Obr. 5.6 Přehled časových závislostí normalizované P-P hodnoty THz vlny <i>norm. x_{PP}(t)</i> měřených vzorků Histoacrylu a jeho olejnatých směsí.	63
Obr. 5.7 Srovnání vybraných původních naměřených časových závislostí P-P hodnot THz vlny <i>x_{PP}(t)</i> pro síťování vzorků Histoacrylu (<i>histpork</i>) a jeho směsí (<i>mix75pork</i> , <i>mix50pork</i> , <i>mix25pork</i>) za přítomnosti živočišné tkáně nasycené fyziologickým roztokem (<i>pork</i>).	63
Obr. 5.8 Naměřené časové závislosti rozkmitu THz vlny <i>x_{PP}(t)</i> po jejich zarovnání do počátku [0,0] pro lepší náhled na chování jednotlivých vzorků Histoacrylu (<i>histpork</i>) a jeho směsí v přítomnosti živočišné tkáně.....	64
Obr. 5.9 Normované časové závislosti rozkmitu THz vlny <i>norm.x_{PP}(t)</i> pro detailní srovnání chování vzorků Histoacrylu a jeho směsí v přítomnosti živočišné tkáně.	64
Obr. 5.10 IR absorpční spektra makového oleje (červeně) a Histoacrylu při síťování (modře).....	66

Obr. 5.11 Detail první části spektra (oblast A) makového oleje a Histoacrylu na začátku ($t = 0$ s) a konci síťovací reakce ($t = 1500$ s) v rozsahu vlnočtů $2700 - 3200 \text{ cm}^{-1}$.	66
Obr. 5.12 Detail druhé části spektra (oblast B) makového oleje a Histoacrylu na začátku ($t = 0$ s) a konci síťovací reakce ($t = 1500$ s) v rozsahu vlnočtů $2200 - 2300 \text{ cm}^{-1}$.	67
Obr. 5.13 Detail třetí části spektra (oblast C) makového oleje a Histoacrylu na začátku ($t = 0$ s) a konci síťovací reakce ($t = 1500$ s) v rozsahu vlnočtů $1200 - 1900 \text{ cm}^{-1}$.	67
Obr. 5.14 IR absorpční spektra fyziologického roztoku (červené), živočišné svalové tkáně ve fyziologickém roztoku (zelené) a Histoacrylu při reakci s tkání (modré).	69
Obr. 5.15 3D graf IR spektra Histoacrylu (hist2) v rozsahu $1100 - 1350 \text{ cm}^{-1}$.	71
Obr. 5.16 Srovnání časových průběhů normalizované výšky absorpčních maxim na 1284 cm^{-1} (peak 15, modrý) a 1253 cm^{-1} (peak 16, červený) u vzorku Histoacrylu (hist2).	71
Obr. 5.17 Časové závislosti normalizované výšky absorpčního maxima 1253 cm^{-1} (peak 16) měřených vzorků Histoacrylu a jeho olejnatých směsí.	72
Obr. 5.18 Časové závislosti normalizované výšky absorpčního maxima 1253 cm^{-1} (peak 16) měřených vzorků Histoacrylu (histpork) a jeho olejnaté směsi (mixpork) při reakci s živočišnou svalovou tkání ve fyziologickém roztoku.	72
Obr. 5.19 Aniontová polymerizace kyanoakrylátů iniciovaná slabými nukleofily (převzato z [6]).	74
Obr. 5.20 Okno programu pro modelování křivek Histoacrylu a směsí měřených IR spektroskopií.	78
Obr. 5.21 Srovnání exponenciálního (modrá) a biexponenciálního modelu (červená) pro naměřená data z IR spektroskopie (výška absorpčního maxima č. 16) u vzorku Histpork.	79
Obr. 5.22 Modelové křivky síťování Histoacrylu a jeho olejnatých směsí měřených DS.	80
Obr. 5.23 Modelové křivky síťování Histoacrylu a jeho olejnatých směsí měřených IR spektroskopií.	80
Obr. 5.24 Modelové křivky síťování Histoacrylu a jeho olejnatých směsí měřených THz spektroskopií.	81
Obr. 5.25 Porovnání modelových křivek dat získaných měřením všemi spektroskopickými metodami (DS, FTIR, THz) vzorků Histoacrylu (a), mix75 (b), mix50 (c) a mix25 (d).	81
Obr. 5.26 Modelové křivky síťování vzorků Histpork a mixpork z měření IR spektroskopií.	82
Obr. 5.27 Modelové křivky síťování vzorků Histpork a mixpork z měření THz spektroskopií.	82
Obr. 5.28 Krabicové grafy časové konstanty τ pro vzorky Histoacrylu a jeho olejnatých směsí zjištěných jednotlivými měřicími metodami.	84
Obr. 5.29 Krabicové grafy časové konstanty τ zjištěné měřicími metodami pro každý typ vzorku.	89
Obr. 5.30 Krabicové grafy časových konstant τ_1 a τ_2 z IR spektroskopie pro vzorky Histoacrylu (Histpork) a jeho olejnatých směsí (mixpork) při reakci s živočišnou tkání.	90
Obr. 5.31 Krabicové grafy časových konstant τ_1 a τ_2 z THz spektroskopie pro vzorky Histoacrylu (Histpork) a jeho olejnatých směsí (mixpork) při reakci s živočišnou tkání.	90
Obr. 5.32 Krabicové grafy srovnávající časové konstanty τ_1 a τ_2 zjištěné u jednotlivých vzorků metodami IR a THz spektroskopie.	95
Obr. 5.33 Snímky čistého Histoacrylu získané světelným mikroskopem v transmisním režimu postupným zvětšováním vyznačené oblasti zájmu: 5x (a), 20x (b) a 40x (c).	96
Obr. 5.34 Snímky směsi MIX75 získané světelným mikroskopem v transmisním režimu postupným zvětšováním vyznačené oblasti zájmu: 5x (a), 20x (b) a 40x (c).	96
Obr. 5.35 Snímky směsi MIX50 získané světelným mikroskopem v transmisním režimu postupným zvětšováním vyznačené oblasti zájmu: 5x (a), 20x (b) a 40x (c).	96
Obr. 5.36 Snímky směsi MIX25 získané světelným mikroskopem v transmisním režimu postupným zvětšováním vyznačené oblasti zájmu: 5x (a), 20x (b) a 40x (c).	97
Obr. 5.37 Ramanovo spektrum Histoacrylu (dole) a makového oleje (nahore).	98
Obr. 5.38 Ramanova mapa pro směs mix75 (a) a mix50 (b).	99

Obr. 5.39 2D obraz řezu tenčí vrstvou (9 μm) vzorku Histoacrylu (a) a jeho rekonstruovaný konfokální 3D snímek celé skenované vrstvy (b).	99
Obr. 5.40 2D obraz jednoho řezu vrstvou vzorku směsi mix75 (a) a rekonstruovaný konfokální 3D snímek celé skenované vrstvy o tloušťce 20 μm (b).	100
Obr. 5.41 2D obraz jednoho řezu vrstvou vzorku směsi mix50 (a) a rekonstruovaný konfokální 3D snímek celé skenované vrstvy o tloušťce 13 μm (b).	100
Obr. 5.42 2D obraz jednoho řezu vrstvou vzorku směsi mix25 (a) a rekonstruovaný konfokální 3D snímek celé skenované vrstvy o tloušťce 13 μm (b).	100
Obr. 6.1 Aplikace vzorku kapaliny (zde fyziologický roztok) na ATR krystal (a), následné přiklopení připraveným vzorkem hemostatika a jeho upevnění pomocí šroubu (b).	106
Obr. 6.2 Srovnání vybraných původních naměřených časových závislostí rozkmitu THz vlny $y(t)$ při reakci hemostatika s fyziologickým roztokem.	108
Obr. 6.3 Normované časové závislosti rozkmitu THz vlny <i>norm. $y(t)$</i> pro detailní srovnání chování hemostatik reagujících s fyziologickým roztokem.	108
Obr. 6.4 Normované časové závislosti rozkmitu THz vlny <i>norm. $y(t)$</i> vybraných vzorků hemostatik reagujících s krví.	108
Obr. 6.5 Uživatelské okno programu pro modelování naměřených časových závislostí u hemostatik (zde vzorek Gelita při reakci s fyziologickým roztokem).	115
Obr. 6.6 Graf modelových křivek s parametry dle Tab. 6.5 pro reakci hemostatik s fyziologickým roztokem.	118
Obr. 6.7 Graf modelových křivek s parametry dle Tab. 6.5 pro reakci hemostatik s krví.	118
Obr. 6.8 Krabicové grafy rozložení hodnot časové konstanty τ , parametru β a konstanty c kategorizovaných dle typu hemostatika.	119

SEZNAM TABULEK

Tab. 2.1 Srovnání vlastností optiky a elektroniky.....	12
Tab. 5.1 Nastavené parametry pro ATR měření kinetiky lepidla na přístroji TPS Spectra 3000.....	61
Tab. 5.2 Nastavené parametry pro ATR měření na přístroji Nicolet iS50 FTIR.....	65
Tab. 5.3 Přehled významných oblastí v naměřených IR spektrech Histoacrylu a makového oleje.	68
Tab. 5.4 Významné oblasti naměřených IR spekter Histoacrylu, jeho směsi s olejem (mix), použité prasečí svalové tkáně uložené ve fyziologickém roztoku (pork) a Histoacrylu při reakci s touto tkání (Histpork).....	69
Tab. 5.5 Chemické rovnice aniontové polymerizace kyanoakrylátů [172].	73
Tab. 5.6 Diferenciální rovnice vycházející z chemických rovnic v Tab. 5.5 popisující aniontovou polymerizaci kyanoakrylátu.	75
Tab. 5.7 Přehled parametrů τ a c sigmoidního modelu (medián \pm MAD) pro vzorky Histoacrylu a jeho olejnatých směsí u jednotlivých měřicích metod (DS, FTIR, THz).....	80
Tab. 5.8 Přehled parametrů τ_1 , τ_2 , c_1 , c_2 (medián \pm MAD) biexponenciálního modelu pro vzorky Histoacrylu a jeho olejnatých směsí měřených IR a THz spektroskopii.....	82
Tab. 5.9 Souhrn výsledků Kruskal-Wallisova testu pro modelová data z DS.....	86
Tab. 5.10 Výsledky testu vícenásobného porovnání p -hodnot z Kruskal-Wallisova pro časovou konstantu τ z modelových dat DS.	86
Tab. 5.11 Souhrn výsledků Kruskal-Wallisova testu pro modelová data z IR spektroskopie.....	86
Tab. 5.12 Výsledky testu vícenásobného porovnání p -hodnot z Kruskal-Wallisova testu pro časovou konstantu τ z modelových dat IR spektroskopie.	86
Tab. 5.13 Souhrn výsledků Kruskal-Wallisova testu pro modelová data z THz spektroskopie.....	87
Tab. 5.14 Výsledky testu vícenásobného porovnání p -hodnot z Kruskal-Wallisova testu pro časovou konstantu τ z modelových dat THz spektroskopie.	87
Tab. 5.15 Kruskal-Wallisův test zjišťující rozdílnost τ síťování Histoacrylu pro všechny měřicí metody (DS, FTIR, THz).....	88
Tab. 5.16 Kruskal-Wallisův test zjišťující rozdílnost časových konstant τ síťování směsi mix75 pro všechny měřicí metody (DS, FTIR, THz).....	88
Tab. 5.17 Test vícenásobného porovnání p -hodnot z Kruskal-Wallisova testu pro časovou konstantu τ směsi mix75.	88
Tab. 5.18 Kruskal-Wallisův test zjišťující rozdílnost časových konstant τ síťování směsi mix50 pro všechny měřicí metody (DS, FTIR, THz).....	88
Tab. 5.19 Test vícenásobného porovnání p -hodnot z Kruskal-Wallisova testu pro časovou konstantu τ směsi mix50.	88
Tab. 5.20 Kruskal-Wallisův test zjišťující rozdílnost časových konstant τ síťování směsi mix25 pro všechny měřicí metody (DS, FTIR, THz).....	89
Tab. 5.21 Test vícenásobného porovnání p -hodnot z Kruskal-Wallisova testu pro časovou konstantu τ směsi mix25.	89
Tab. 5.22 Souhrn výsledků Kruskal-Wallisova testu pro časovou konstantu τ_1 získanou modelováním dat z IR spektroskopie.	91
Tab. 5.23 Souhrn výsledků Kruskal-Wallisova testu pro časovou konstantu τ_2 získanou modelováním dat z IR spektroskopie.	91
Tab. 5.24 Souhrn výsledků Kruskal-Wallisova testu pro časovou konstantu τ_1 získanou modelováním dat z THz spektroskopie.	92
Tab. 5.25 Výsledky testu vícenásobného porovnání p -hodnot z Kruskal-Wallisova testu pro τ_1 modelových dat THz spektroskopie.....	92

Tab. 5.26 Souhrn výsledků Kruskal-Wallisova testu pro časovou konstantu τ_2 získanou modelováním dat z THz spektroskopie.	92
Tab. 5.27 Mann-Whitney U Test dat Histpork dle proměnné metoda ($p < 0,05$ ozn. červeně).....	94
Tab. 5.28 Mann-Whitney U Test dat mix75pork dle proměnné metoda ($p < 0,05$ ozn. červeně).	94
Tab. 5.29 Mann-Whitney U Test dat mix50pork dle proměnné metoda ($p < 0,05$ ozn. červeně).	94
Tab. 5.30 Mann-Whitney U Test dat mix25pork dle proměnné metoda ($p < 0,05$ ozn. červeně).	94
Tab. 5.31 Přehled dominantních vibračních maxim v Ramanových spektrech Histoacrylu (H) a makového oleje (O).	98
Tab. 5.32 Nastavení parametrů skenování na konfokálním mikroskopu Zeiss LSM 700.	99
Tab. 6.1 Rozměry vzorků hemostatik připravených pro měření.	105
Tab. 6.2 Nastavené parametry pro ATR měření kinetiky hemostatik na přístroji TPS Spectra 3000	106
Tab. 6.3 Členění mechanismů difúze podle hodnoty difúzního exponentu n z mocninné rovnice.	111
Tab. 6.4 Střední hodnoty (průměry) koeficientů k a n mocninné funkce získané modelováním naměřených dat reakce hemostatik s fyziologickým roztokem a krví.	116
Tab. 6.5 Střední hodnoty (průměry) parametrů příslušných modelů získaných modelováním naměřených dat reakce hemostatik s fyziologickým roztokem a krví.....	117

PŘÍLOHY

A. TKÁŇOVÁ LEPIDLA – HISTOGRAMY ČETNOSTÍ HODNOT ČASOVÝCH KONSTANT U POUŽITÝCH MĚŘICÍCH METOD	I
B. TKÁŇOVÁ LEPIDLA – NORMÁLNÍ PRAVDĚPODOBNOSTNÍ GRAFY A TESTY NORMALITY HODNOT MODELOVÝCH KONSTANT.	I
C. TKÁŇOVÁ LEPIDLA – POPISNÁ STATISTIKA PARAMETRŮ MODELU.....	II
D. TKÁŇOVÁ LEPIDLA – TEST VÍCENÁSOBNÉHO POROVNÁNÍ Z'-HODNOT KRUSKAL-WALLISOVA TESTU	IV
E. ŽÁDOST O VYJÁDŘENÍ ETICKÉ KOMISE	V
F. SOUHLAS ETICKÉ KOMISE S PROVEDENÍM EXPERIMENTŮ.....	VII
G. FORMULÁŘ INFORMOVANÉHO SOUHLASU S ODBĚREM KREVNÍHO VZORKU PRO ÚČELY EXPERIMENTU	VIII
H. ABSORPČNÍ HEMOSTATIKA – POPISNÁ STATISTIKA PARAMETRŮ MOCNINNÉ FUNKCE	IX
I. ABSORPČNÍ HEMOSTATIKA – NORMÁLNÍ PRAVDĚPODOBNOSTNÍ GRAFY A TESTY NORMALITY PARAMETRŮ MODELŮ.....	XI
J. ABSORPČNÍ HEMOSTATIKA – POPISNÁ STATISTIKA PARAMETRŮ MODELŮ.....	XII
K. STRUKTURA PŘILOŽENÉHO CD MÉDIA	XIV

A. TKÁŇOVÁ LEPIDLA – HISTOGRAMY ČETNOSTÍ HODNOT ČASOVÝCH KONSTANT U POUŽITÝCH MĚŘICÍCH METOD

Vzhledem k objemu dat je tato příloha součástí přiloženého CD.

B. TKÁŇOVÁ LEPIDLA – NORMÁLNÍ PRAVDĚPODOBNOSTNÍ GRAFY A TESTY NORMALITY HODNOT MODELOVÝCH KONSTANT.

Vzhledem k objemu dat je tato příloha součástí přiloženého CD.

C. TKÁŇOVÁ LEPIDLA – POPISNÁ STATISTIKA PARAMETRŮ MODELU

C.1 Numerické charakteristiky časové konstanty τ [s] sigmoidního modelu pro jednotlivé měřicí metody (DS, FTIR, THz).

	Vzorek	N	Medián	MAD	Průměr	Min	Max	Q _I	Q _{III}	Q _{III} -Q _I
DS	Hist.	18	30,281	13,313	30,493	14,454	56,230	21,111	36,838	15,727
	mix75	19	22,510	6,086	21,824	13,343	31,295	17,520	25,350	7,831
	mix50	19	22,131	4,570	22,383	15,485	29,580	19,048	27,045	7,997
	mix25	10	16,668	2,347	16,919	13,917	20,417	15,303	18,469	3,166
FTIR	Hist.	7	30,404	8,780	37,348	21,708	82,332	24,482	43,197	18,714
	mix75	10	19,037	4,215	26,375	13,256	79,346	17,226	24,485	7,259
	mix50	11	15,410	0,504	15,800	12,210	22,215	14,568	15,750	1,181
	mix25	10	19,634	2,739	23,340	17,599	51,224	17,967	24,052	6,085
THz	Hist.	8	43,017	10,435	41,365	19,216	61,489	33,049	49,040	15,992
	mix75	15	12,954	4,533	17,755	8,733	46,181	10,325	17,632	7,307
	mix50	21	20,338	4,934	20,985	11,715	49,400	16,124	22,956	6,832
	mix25	22	33,065	7,001	35,635	18,174	71,013	28,610	40,481	11,871

C.2 Numerické charakteristiky parametru c [-] sigmoidního modelu měřících metod (DS, FTIR, THz).

	Vzorek	N	Medián	MAD	Průměr	Min	Max	Q _I	Q _{III}	Q _{III} -Q _I
DS	Hist.	18	3,700	0,685	3,674	2,846	4,974	3,231	4,155	0,924
	mix75	19	3,811	0,348	3,887	3,020	4,832	3,601	4,126	0,524
	mix50	19	3,218	0,319	3,317	2,413	4,240	3,040	3,543	0,503
	mix25	10	2,146	0,193	2,147	1,758	2,416	2,047	2,315	0,268
FTIR	Hist.	7	-10,501	0,640	-9,010	-12,496	-3,902	-10,933	-4,338	6,595
	mix75	10	-8,960	2,594	-8,976	-11,881	-5,003	-11,267	-7,768	3,499
	mix50	11	-6,484	1,759	-6,936	-13,103	-4,689	-8,362	-5,298	3,064
	mix25	10	-4,122	0,359	-4,046	-4,520	-3,516	-4,269	-3,748	0,521
THz	Hist.	8	-10,358	6,664	-11,607	-20,390	-4,499	-16,580	-7,044	9,536
	mix75	15	-38,675	20,196	-33,035	-59,254	-3,758	-51,748	-9,798	41,951
	mix50	21	-20,979	7,098	-19,631	-34,905	-5,103	-25,160	-12,191	12,969
	mix25	22	-11,123	8,887	-10,745	-28,262	-3,161	-14,255	-4,618	9,637

C.3 Přehled základních numerických charakteristik časových konstant τ_1 a τ_2 biexponenciálního modelu dat z IR spektroskopie.

		N	Medián	MAD	Průměr	Min	Max	Q _I	Q _{III}	Q _{III} -Q _I
τ_1 [s]	Histpork	9	9,014	2,026	8,832	4,573	11,189	8,934	10,380	1,446
	mix75pork	9	11,840	2,364	10,862	5,424	16,756	7,857	12,249	4,392
	mix50pork	10	9,680	5,209	10,646	4,244	17,394	7,319	14,890	7,572
	mix25pork	11	10,334	6,039	15,375	6,261	35,530	9,105	20,011	10,906

		N	Medián	MAD	Průměr	Min	Max	Q_I	Q_{III}	Q_{III}-Q_I
τ_2 [s]	Histpork	9	96,890	11,987	99,839	86,994	108,039	96,246	106,130	9,884
	mix75pork	9	100,572	6,414	99,068	84,882	110,988	94,340	104,281	9,941
	mix50pork	10	95,555	15,456	92,235	58,744	113,522	81,070	102,284	21,214
	mix25pork	11	99,177	8,660	105,935	86,836	148,969	93,932	115,489	21,557

C.4 Přehled základních numerických charakteristik časových konstant c_1 a c_2 biexponenciálního modelu dat z IR spektroskopie.

		N	Medián	MAD	Průměr	Min	Max	Q_I	Q_{III}	Q_{III}-Q_I
c_1 [-]	Histpork	9	0,582	0,242	0,614	0,211	0,894	0,509	0,811	0,302
	mix75pork	9	0,461	0,202	0,538	0,322	0,761	0,450	0,628	0,178
	mix50pork	10	0,426	0,117	0,527	0,323	0,947	0,377	0,697	0,321
	mix25pork	11	0,590	0,195	0,646	0,306	1,191	0,459	0,930	0,471

c_2 [-]	Histpork	9	0,818	0,339	0,855	0,527	1,660	0,589	0,921	0,332
	mix75pork	9	0,990	0,284	0,912	0,631	1,292	0,763	1,017	0,255
	mix50pork	10	1,060	0,245	0,953	0,491	1,305	0,689	1,149	0,460
	mix25pork	11	0,809	0,285	0,810	0,362	1,256	0,501	1,001	0,501

C.5 Přehled základních numerických charakteristik časových konstant τ_1 a τ_2 biexponenciálního modelu dat z THz spektroskopie.

		N	Medián	MAD	Průměr	Min	Max	Q_I	Q_{III}	Q_{III}-Q_I
τ_1 [s]	Histpork	15	7,726	3,365	9,167	2,318	23,298	5,457	14,140	8,683
	mix75pork	11	11,321	6,311	14,868	6,667	29,799	9,189	18,924	9,736
	mix50pork	10	21,817	16,127	26,912	9,319	65,920	11,767	41,575	29,808
	mix25pork	6	11,794	8,991	28,938	4,791	93,266	6,668	45,317	38,649

τ_2 [s]	Histpork	15	139,866	30,872	167,225	95,602	381,723	125,743	200,888	75,144
	mix75pork	11	145,066	40,444	154,715	104,490	246,481	117,787	213,863	96,076
	mix50pork	10	180,846	$125,04_3$	219,493	93,032	412,439	140,764	290,723	149,959
	mix25pork	6	96,428	27,337	109,662	44,209	210,962	86,535	123,413	36,877

C.6 Přehled základních numerických charakteristik časových konstant c_1 a c_2 biexponenciálního modelu dat z THz spektroskopie.

		N	Medián	MAD	Průměr	Min	Max	Q_I	Q_{III}	Q_{III}-Q_I
c_1 [-]	Histpork	15	0,779	0,328	0,952	0,078	2,492	0,568	1,262	0,695
	mix75pork	11	1,009	0,321	1,003	2,083E-12	2,082	0,737	1,137	0,399
	mix50pork	10	0,374	0,334	0,448	2,262E-14	1,134	0,207	0,658	0,451
	mix25pork	6	0,724	0,630	0,869	4,035E-11	2,134	0,392	1,241	0,850

c_2 [-]	Histpork	15	0,522	0,345	0,543	0,054	0,963	0,317	0,852	0,535
	mix75pork	11	0,362	0,194	0,316	0,081	0,546	0,143	0,451	0,307
	mix50pork	10	0,809	0,409	0,838	0,050	1,442	0,609	1,273	0,664
	mix25pork	6	0,548	0,652	0,575	0,097	1,079	0,120	1,061	0,942

D. TKÁŇOVÁ LEPIDLA – TEST VÍCENÁSOBNÉHO POROVNÁNÍ Z'-HODNOT KRUSKAL-WALLISOVA TESTU

- D.1 Výsledky testu vícenásobného porovnání z' hodnot z Kruskal-Wallisova testu pro časovou konstantu τ z modelových dat DS.

z'-skóre	Histoacryl	mix75	mix50	mix25
Histoacryl		2,250164	1,850053	4,351317
mix75	2,250164		0,405631	2,498362
mix50	1,850053	0,405631		2,835220
mix25	4,351317	2,498362	2,835220	

- D.2 Výsledky testu vícenásobného porovnání z' hodnot z Kruskal-Wallisova testu pro časovou konstantu τ z modelových dat IR spektroskopie.

z'-skóre	Histoacryl	mix75	mix50	mix25
Histoacryl		2,021598	4,353100	1,656406
mix75	2,021598		2,536879	0,402422
mix50	4,353100	2,536879		2,948771
mix25	1,656406	0,402422	2,948771	

- D.3 Výsledky testu vícenásobného porovnání z' hodnot z Kruskal-Wallisova testu pro časovou konstantu τ z modelových dat THz spektroskopie.

z'-skóre	Histoacryl	mix75	mix50	mix25
Histoacryl		4,173550	3,339801	0,729814
mix75	4,173550		1,300259	4,556907
mix50	3,339801	1,300259		3,560678
mix25	0,729814	4,556907	3,560678	

- D.4 Výsledky testu vícenásobného porovnání z' hodnot z Kruskal-Wallisova testu pro τ_1 modelových dat THz spektroskopie.

z'-skóre	Hispork	mix75pork	mix50pork	mix25pork
Hispork		2,023595	3,354414	1,558123
mix75pork	2,023595		1,295744	0,099774
mix50pork	3,354414	1,295744		1,194406
mix25pork	1,558123	0,099774	1,194406	

E. ŽÁDOST O VYJÁDŘENÍ ETICKÉ KOMISE



Č.j. EK*:

Žádost o vyjádření Etické komise UBMI Fakulty elektrotechniky a komunikačních technologií Vysokého učení technického v Brně

k projektu výzkumné, habilitační, doktorské, diplomové (bakalářské) práce, zahrnující lidské účastníky

Název: Sledování kinetiky hemostatické reakce absorpčních hemostatik pomocí terahertzové spektroskopie v časové doméně

Forma projektu:

- aplikovaný výzkum v rámci doktorské práce

Autoři: MUDr. Zdeněk Adamík, Ph.D. (odpovědný vedoucí experimentu)
Ing. Marie Nedvědová (osoba pověřená prováděním experimentu)

Popis projektu:

1. Popis projektu:

Cílem tohoto výzkumu je sledovat kinetiku hemostatické reakce certifikovaných hemostatických přípravků při kontaktu s krví a porovnat jejich hemostatickou účinnost. Hemostatika jsou přípravky podporující zástavu krvácení při rozsáhlejším poranění či chirurgických výkonech. Pro správný průběh reakce je třeba získat vzorek čerstvě odebrané krve se zachováním všech jejích přirozených obranných mechanismů vedoucích k účinné zástavě krvácení. Vzorek krve subjektu je použit jako spouštěcí médium hemostatické reakce zkoumaných materiálů. Tato reakce je zkoumána pomocí terahertzové spektroskopie v časové doméně. Dobrovolná účast každého subjektu v experimentu bude doložena informovaným souhlasem.

2. Charakteristika souboru subjektů (počet, věk, pohlaví):

Do experimentu bude zařazeno alespoň 12 lidských subjektů, což je minimální počet vyhovující metodice statistického ověření hypotézy. Předpokládá se účast subjektů ve věkovém rozmezí od 18 do 60 let obou pohlaví, přičemž nebudou zahrnuty gravidní ženy.

3. Doba trvání celého projektu (od – do):

Provedení experimentu je plánováno na období 20. 11. 2017 – 19. 1. 2018.

4. Popis nakládání se subjekty:

V rámci experimentu bude subjektům z článku prstu horní končetiny opakovaně odebrána kapka kapilární krve, která bude použita pro studium různých typů hemostatičků. Pomocí odběrového pera bude šetrně a bezpečně proveden vpich sterilní jehlou do lůžka prstu a mikropipetou bude nasáta krev o množství 20 µl z vytvořené kapky na povrchu kůže.

5. Zajištění bezpečnosti:

Dodržování standardních hygienických postupů a laboratorních zásad v průběhu celého experimentu je nutným předpokladem pro zajištění bezpečnosti měřeného subjektu i osoby pověřené prováděním experimentu. Před samotným vpichem odběrovým perem si subjekt řádně umyje ruce mýdlem a tekoucí čistou vodou, případně použije dezinfekční prostředek. Pro vpich bude vždy použita nová sterilní jehla.

6. Informovaný souhlas účastníků (viz příloha).

7. Kdo ponese náklady na odškodnění v případě poškození subjektu hodnocení:

Z povahy experimentu a za předpokladu dodržení bezpečnosti práce nehrozí přímé riziko vedoucí k poškození subjektu hodnocení. Případné náklady na odškodnění vzniklé porušením výše popsaných postupů ponese osoba pověřená prováděním experimentu.

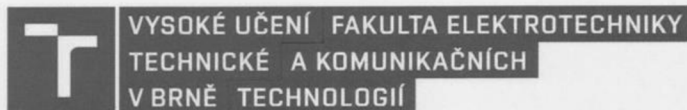
V Brně dne 9. 11. 2017

Podpis autora



*číslo jednací Etické komise doplní sekretariát UBMI

F. SOUHLAS ETICKÉ KOMISE S PROVEDENÍM EXPERIMENTŮ



Komu :

MUDr. Zdeněk Adamík, Ph.D., Ústav zdravotních věd, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Ing. Marie Nedvědová, UBMI FEKT VUT v Brně, Ústav elektroniky a měření, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Čj. : EK : 03b/2017

Vyjádření souhlasu Etické komise UBMI
Fakulty elektrotechniky a komunikačních technologií
Vysokého učení technického v Brně
(FEKT VUT)

Projekt Čj. : EK : 03/2017 :

Sledování kinetiky hemostatické reakce absorpčních hemostatik pomocí terahertzové spektroskopie v časové doméně

byl schválen Etickou komisí UBMI Fakulty elektrotechniky a komunikačních technologií Vysokého učení technického v Brně (FEKT VUT) :

dne : 20.11.2017

platný do : 31.1.2018

Etická komise UBMI Fakulty elektrotechniky a komunikačních technologií Vysokého učení technického v Brně ve složení:

doc. Ing. Jana Kolářová, Ph.D. – předseda (VUT FEKT)

prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D. – člen (VUT FEKT)

Ing. Martin Mézl, Ph.D. – člen (VUT FEKT)

prof. MUDr. Marie Nováková, Ph.D. – člen (MU Fyziologický ústav)

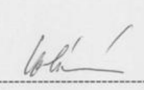
MUDr. Jaromír Gumulec, Ph.D. – člen (MU Ústav patologické fyziologie)

zhodnotila předložený projekt a neshledala žádné rozporny s platnými zásadami, předpisy a mezinárodními směnicemi pro provádění biomedicínského výzkumu zahrnující lidské účastníky.

řešitel projektu splnil podmínky nutné k získání souhlasu etické komise.

V Brně dne 20.11.2017




podpis předsedy EK

G. FORMULÁŘ INFORMOVANÉHO SOUHLASU S ODBĚREM KREVNÍHO VZORKU PRO ÚČELY EXPERIMENTU

Gynekologicko-porodnické oddělení
Krajská nemocnice T. Bati
Havlíčkovo nábřeží 600, 762 75 Zlín

Ústav elektroniky a měření
Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Nad Stráněmi 4511, 760 05 Zlín

Ústav biomedicínského inženýrství
Vysoké učení technické v Brně
Technická 12, 616 00 Brno

Informovaný souhlas s odběrem kapilární krve pro sledování kinetiky hemostatické reakce absorpčních hemostatik

Jméno a příjmení účastníka studie:

Datum a místo narození:

Účastník zařazen do studie pod identifikačním číslem:

Odpovědný vedoucí experimentu:

MUDr. Zdeněk Adamík, Ph.D.

Osoba pověřená prováděním experimentálního měření: Ing. Marie Nedvědová

Popis studie:

V rámci tohoto experimentu Vám bude z článku prstu horní končetiny opakovaně odebrána kapka kapilární krve, která bude použita pro studium různých typů hemostatik. Hemostatika jsou přípravky podporující zástavu krvácení při rozsáhlejších poranění či chirurgických výkonech. Cílem tohoto výzkumu je sledovat kinetiku hemostatické reakce jednotlivých hemostatických přípravků při kontaktu s krví a porovnat jejich hemostatickou účinnost. Pomocí odběrového pera bude šetrně a bezpečně proveden vpich sterilní jehlou do lůžka prstu a mikropipetou bude nasáta krev o množství 20 µl z vytvořené kapky na povrchu kůže.

Za předpokladu dodržení hygienických zásad (umytí rukou, použití dezinfekce) není známo žádné přímé riziko ohrožující zdraví účastníka. Vzorek krve bude okamžitě použit předepsaným způsobem za výše uvedeným účelem. Vzorek bude v laboratoři zpracován anonymně, bude použit pouze jednou a nebude uchováván za žádnými jinými účely.

Doba měření subjektu trvá cca 90 minut a od své účasti ve studii může subjekt kdykoliv bez postihu odstoupit. Subjektu nevznikají žádné výdaje spojené s jeho účastí ve studii. V celé studii se předpokládá účast cca 20 subjektů.

Prohlášení účastníka studie:

Já, níže podepsaný(á), souhlasím se svou dobrovolnou a bezúplatnou účastí v této studii a poskytnutím vzorku krve, který bude použit pro účely této studie. Byl(a) jsem podrobně informován(a) o cíli studie a jejích postupech. Pracovník pověřený prováděním experimentálního měření mi vysvětlil případné problémy, které by se mohly vyskytnout během účasti v této studii, a vysvětlil mi způsoby, jakými budou tyto problémy řešeny.

Při zařazení do studie budou moje osobní data uchována s plnou ochranou důvěrnosti dle platných zákonů České republiky. Do mé dokumentace budou moci na základě tohoto souhlasu nahlédnout za účelem ověření získaných údajů zástupci vedení experimentu, nezávislých etických komisí a místních nebo zahraničních kompetentních úřadů. Při vlastním provádění studie mohou být naměřená data poskytnuta jiným než výše uvedeným subjektům pouze bez identifikačních údajů, to znamená anonymní data označená číselným kódem. Rovněž pro výzkumné a vědecké účely mohou být naměřená data poskytnuta pouze bez identifikačních údajů (tedy anonymní data) nebo s mým výslovným souhlasem.

Porozuměl(a) jsem tomu, že mé jméno se nebude vyskytovat v referátech o této studii. Naopak souhlasím s uveřejněním a použitím výsledků této studie.

datum

podpis účastníka studie

podpis osoby pověřené prováděním experimentu

H. ABSORPČNÍ HEMOSTATIKA – POPISNÁ STATISTIKA PARAMETRŮ MOCNINNÉ FUNKCE

H.1 Popisná statistika parametrů k a n mocninné funkce pro reakci hemostatik s fyziologickým roztokem.

		N	Průměr	Medián	Min	Max	Q _I	Q _{III}	Q _{III} -Q _I	Rozptyl	Směrodatná odchylka
$k [s^{-1}]$	celulóza	8	0,1214	0,1252	0,0165	0,2050	0,0573	0,1924	0,1351	0,0059	0,0770
	S. Fibrillar	8	0,0568	0,0517	0,0125	0,1268	0,0364	0,0693	0,0329	0,0011	0,0344
	S. NuKnit	13	0,0709	0,0714	0,0039	0,1582	0,0180	0,1265	0,1085	0,0031	0,0561
	Gelita	17	0,2208	0,2145	0,1001	0,3102	0,1761	0,2731	0,0969	0,0041	0,0647
	HyproSorb	11	0,2820	0,2766	0,0920	0,4670	0,1692	0,3593	0,1900	0,0159	0,1261
	TachoSil	9	0,0742	0,0859	0,0236	0,1256	0,0397	0,0954	0,0556	0,0012	0,0347
$n [-]$	celulóza	8	0,3765	0,3176	0,2275	0,6936	0,2555	0,4723	0,2167	0,0282	0,1680
	S. Fibrillar	8	0,5284	0,5294	0,3308	0,7190	0,4589	0,6006	0,1416	0,0141	0,1191
	S. NuKnit	13	0,5538	0,4989	0,3091	0,9779	0,4008	0,6934	0,2926	0,0409	0,2023
	Gelita	17	0,2998	0,2899	0,2166	0,4941	0,2431	0,3237	0,0806	0,0051	0,0717
	HyproSorb	11	0,2697	0,2534	0,1285	0,4500	0,1889	0,3663	0,1774	0,0126	0,1126
	TachoSil	9	0,7040	0,6522	0,5270	0,8928	0,6307	0,8322	0,2015	0,0159	0,1261

H.2 Popisná statistika parametrů k a n mocninné funkce pro reakci hemostatik s krví.

		N	Průměr	Medián	Min	Max	Q_I	Q_{III}	Q_{III}-Q_I	Rozptyl	Směrodatná odchylka
$k [s^{-1}]$	celulóza	16	0,0488	0,0160	0,0008	0,2911	0,0043	0,0399	0,0356	0,0073	0,0857
	S. Fibrillar	21	0,0390	0,0315	0,0015	0,1531	0,0047	0,0507	0,0459	0,0017	0,0420
	S. NuKnit	20	0,0429	0,0327	0,0015	0,1670	0,0167	0,0509	0,0341	0,0016	0,0408
	Gelita	20	0,2641	0,2666	0,1592	0,3464	0,2351	0,2957	0,0605	0,0025	0,0504
	HyproSorb	20	0,2043	0,2123	0,0416	0,3845	0,0880	0,2790	0,1910	0,0124	0,1115
	TachoSil	5	0,0894	0,0616	0,0347	0,2219	0,0473	0,0815	0,0341	0,0057	0,0760
$n [-]$	celulóza	16	0,7056	0,6976	0,2032	1,2091	0,5389	0,9305	0,3916	0,0796	0,2822
	S. Fibrillar	21	0,6852	0,5903	0,3338	1,1421	0,5121	0,9060	0,3939	0,0649	0,2547
	S. NuKnit	20	0,6204	0,5959	0,3148	1,1109	0,5157	0,7081	0,1923	0,0333	0,1827
	Gelita	20	0,2368	0,2292	0,1872	0,3192	0,2110	0,2619	0,0509	0,0013	0,0366
	HyproSorb	20	0,3029	0,2680	0,1632	0,5384	0,2193	0,4074	0,1880	0,0128	0,1135
	TachoSil	5	0,5982	0,6585	0,2580	0,8075	0,5748	0,6920	0,1172	0,0431	0,2076

I. ABSORPČNÍ HEMOSTATIKA – NORMÁLNÍ PRAVDĚPODOBNOSTNÍ GRAFY A TESTY NORMALITY PARAMETRŮ MODELŮ

Vzhledem k objemu dat je tato příloha součástí přiloženého CD.

J. ABSORPČNÍ HEMOSTATIKA – POPISNÁ STATISTIKA PARAMETRŮ MODELŮ

J.1 Popisná statistika parametrů τ [s], c [-], β [-] modelových funkcí pro reakci hemostatik s fyziologickým roztokem.

Typ hemostatika	Typ modelu	Parametry modelu	N	Průměr	Medián	Min	Max	Q _I	Q _{III}	Q _{III} -Q _I	Rozptyl	Směrodatná odchylka
celulóza	exp.	c	6	0,8908	0,9229	0,7349	1,0723	0,7536	0,9379	0,1843	0,016	0,1270
		τ	6	121,6962	121,0765	81,3920	175,1458	93,2145	138,2718	45,0573	1134,283	33,6791
S. Fibrillar	asc. str. exp.	τ	6	146,1250	147,7483	116,2175	177,9286	116,2799	170,8273	54,5474	751,0508	27,4053
		β	6	0,8451	0,8746	0,5912	0,9921	0,8284	0,9096	0,0812	0,0187	0,1368
S. NuKnit	asc. str. exp.	τ	8	135,1837	137,6246	80,2129	185,3556	104,5223	165,8038	61,2814	1491,037	38,6139
		β	8	0,8293	0,7942	0,5523	1,1579	0,6641	1,0036	0,3395	0,046	0,2136
Gelita	asc. str. exp.	τ	14	40,3331	37,4479	21,8946	63,3361	30,4111	52,3950	21,9839	182,0418	13,4922
		β	14	0,7390	0,7338	0,6375	0,8505	0,6603	0,8128	0,1525	0,0056	0,0748
HyproSorb	asc. str. exp.	τ	10	30,0799	27,4565	11,5338	64,2134	21,6428	33,7460	12,1032	203,3866	14,2613
		β	10	0,7767	0,8160	0,5728	0,9096	0,6582	0,8890	0,2308	0,0156	0,1247
TachoSil	asc. str. exp.	τ	9	23,0397	19,5304	17,7439	38,9354	18,2147	23,2929	5,0782	54,9675	7,4140
		β	9	1,4114	1,4201	1,1031	1,6942	1,3310	1,5161	0,1851	0,0288	0,1698
	desc. str. exp.	τ	7	180,0097	180,1798	149,0115	208,2560	166,9649	204,3126	37,3477	442,0979	21,0261
		β	7	2,8251	2,6751	2,2531	4,0589	2,5659	2,8310	0,2651	0,3292	0,5737

J.2 Popisná statistika parametrů τ [s], c [-], β [-] modelových funkcí pro reakci hemostatik s krví.

Typ hemostatika	Typ modelu	Parametry modelu	N	Průměr	Medián	Min	Max	Q _I	Q _{III}	Q _{III} -Q _I	Rozptyl	Směrodatná odchylka
celuloza	exp.	c	17	0,9809	0,9610	0,6294	1,1873	0,9236	1,0456	0,1219	0,019	0,1365
		τ	17	184,2938	185,7985	111,6965	284,9249	169,4237	203,3705	33,9468	2219,118	47,1075
S. Fibrillar	asc. str. exp.	τ	20	152,4832	155,7377	63,8044	237,9358	120,2502	177,7962	57,5459	1907,707	43,6773
		β	20	1,4551	1,1840	0,6601	3,6896	0,9246	1,5107	0,5861	0,683	0,8267
S. NuKnit	asc. str. exp.	τ	20	133,5940	127,3244	62,9620	205,6079	122,6136	150,0687	27,4551	1077,030	32,8181
		β	20	1,1986	1,1200	0,7049	2,0814	1,0156	1,3121	0,2965	0,127	0,3560
Gelita	asc. str. exp.	τ	23	73,0397	60,4883	24,7710	132,7281	43,8698	101,1647	57,2949	1176,589	34,3014
		β	23	0,8104	0,8057	0,4885	1,1096	0,7129	0,8936	0,1806	0,028	0,1665
HyproSorb	asc. str. exp.	τ	20	46,2880	44,5117	29,1079	69,5823	40,5442	51,0422	10,4980	100,0853	10,0042
		β	20	0,8191	0,8195	0,6694	0,9422	0,7785	0,8839	0,1054	0,0061	0,0783
TachoSil	asc. str. exp.	τ	3	20,2810	19,6581	18,2657	22,9192	18,2657	22,9192	4,6535	5,7047	2,3884
		β	3	1,7174	1,5667	1,4372	2,1483	1,4372	2,1483	0,7111	0,1434	0,3787
	desc. str. exp.	τ	16	104,8302	83,2516	14,5111	226,9409	59,5948	156,3614	96,7666	4224,996	64,9999
		β	16	1,0537	0,7434	0,5123	2,5022	0,6412	1,3713	0,7299	0,428	0,6539
krev	exp.	c	18	0,9558	0,9871	0,7388	1,0530	0,9321	1,0230	0,0908	0,0085	0,0921
		τ	18	108,3383	104,1906	77,5435	143,4714	90,3169	127,5687	37,2518	423,7891	20,5861

K. STRUKTURA PŘILOŽENÉHO CD MÉDIA

Na CD jsou umístěny veškeré originální zdrojové kódy pro úpravu, analýzu i modelování dat. Vedle elektronické verze disertační práce ve formátu .pdf a souboru Příloha – Statistická analýza dat, obsahuje CD dvě hlavní složky, které jsou nazvány podle typu zkoumaných vzorků (Hemostats, Histoacryl), a jejich obsah je členěn dle následujícího schématu:

Hemostats:

Hemostats+blood

- 1_tds extrem – soubory nalezených extrémů pro všechna měření s krví
- 2_tds data zprac – soubory zpracovaných hodnot *vzorek+blood.xls* pro modelování
- 3_model – soubory *vzorek+blood_model.xls* s hodnotami modelových parametrů
- Matlab – obsahuje skripty vytvořené v Matlabu pro analýzu dat:
 - *ATR_TDS_AB_Polsko_2017_07_31.m* – skript pro zpracování surových dat z .csv souborů: chronologické přerovnání, hledání extrémních hodnot THz vlny, tedy rozkmitu P-P; vstup: *vzorek_xx.csv*, výstup: *tds_vzorek_xx_extrem.xls*
 - *tds_zprac.m* – GUI program pro modelování naměřených časových závislostí P-P hodnot THz vlny; vstup: *vzorek+blood.xls*, výstup: *vzorek+blood_model.xls*

Hemostats+NaCl (stejně členění jako Hemostats+blood)

Statistica – soubory statistických tabulek (.sta) a sešitů s aplikovanými metodami statistické analýzy (.stw) vytvořené v programu Statistica

Histoacryl:

Histoacryl

- DS:
 - DS_data:
 - 1_Po extrakci dat – soubory analyzovaných dat *vzorek_data.xls*
 - 2_Model – soubory s parametry modelu *vzorek_data_vysl_modelu.xls*
 - Matlab
 - *ds_2017_07_20.m* – skript pro zpracování souborů s originálními naměřenými daty, sbírá postupně všechny hodnoty ze souborů *vzorek_xy.txt* (vstup) pro daný typ vzorku a ukládá všechny časové závislosti disipačního faktoru do souboru *vzorek_data.xls* (výstup)
 - *model_hill.m* – GUI program pro aproximaci naměřených závislostí disipačního faktoru sigmoidní funkcí s výpočtem parametrů modelu; vstup: *vzorek_data.xls*, výstup: grafická prezentace křivky originálních dat a modelu, vypočtené parametry modelu uloženy do *vzorek_data_vysl_modelu.xls*
- FTIR:
 - 1_TQ methods – soubory nalezených poloh maxim, vč. jejich výšky, v IR spektrech
 - 2_3D grafy – 3D grafy naměřených IR spekter v čase vytvořených pomocí skriptu *graf3D_2017_05_31.m*
 - 3_FTIR_data:
 - 1_Nacteni csv souboru – data .csv a jejich zpracování do souborů *max_vzorek_data_norm.xls*
 - 2_Extrakce peaků – soubory s extrahovanými hodnotami maxim *max_vzorek_piky.xls* (výchozí pro modelování)
 - 3_Model – soubory s mod. parametry *max_vzorek_piky_vysl_modelu.xls*
 - Matlab:
 - *ftir_nacti_2017_10_13.m* – skript pro extrakci časové osy a hodnot všech maxim pro daný vzorek s pořadím *xx*, z *max_vzorekxx.csv* (vstup), následuje normalizace a zápis do tabulek výstupního souboru *max_vzorek_data_norm.xls* (jednotlivé listy označené jako *max_vzorekxx* obsahují výčet všech maxim měřených v čase)
 - *ftir_pik_2017_10_13.m* – skript pro přepis/přeskupení naměřených průběhů, aby mohlo být srovnáno chování vzorků v rámci jednoho maxima; vstup: *max_vzorek_data_norm.xls*, výstup: *max_vzorek_piky.xls* (každý list označen dle analyzovaného maxima pro všechny vzorky)
 - *model_pik_hill.m* – GUI program pro modelování jednotlivých časových průběhů měřených maxim sigmoidní funkcí; vstup: *max_vzorek_piky.xls*, výstup: *max_vzorek_piky_vysl_modelu.xls* (uložení parametrů modelu)
- THz:
 - tds 20170710 Polsko:
 - Data_zprac – tabulky extrémů THz vlny *tds_vzorek_extr.xls*
 - Matlab:
 - *thz_tds.m* – skript pro předzpracování dat z měření na polském spektrometru; postupné načtení surových dat pro daný vzorek, vyhledání max a min, výpočet maximálních rozdílů v signálu; vstup: *tds_vzorek_xx.csv*, výstup: *tds_vzorek_extr.xls*

- *model_hill.m* – GUI program pro modelování naměřených časových závislostí P-P sigmoidní funkcí; vstup: *tds_vzorek_xy_extr.xls*, výstup: *tds_vzorek_vysl_model.xls*
- Model – tabulky modelových parametrů *tds_vzorek_vysl_model.xls*
- tds 20171109-13-20 Zlin
 - *tds_extrem* – tabulky extrémů *tds_vzorekxy_extrem.xls*
 - Matlab:
 - *ATR_TDS_AB_Polsko_2017_07_31.m* – skript pro zpracování surových dat z .csv souborů: chronologické přerovnání, hledání extrémních hodnot THz vlny, tedy rozkmitu P-P; vstup: *vzorekxy.csv*, výstup: *tds_vzorekxy_extr.xls*
 - *model_hill.m* – GUI program pro modelování naměřených časových závislostí P-P sigmoidní funkcí; vstup: *tds_vzorekxy_extr.xls*; výstup: *tds_zprac_vysl_modelu_vzorek.xls*
 - Model – tabulky parametrů modelu *tds_zprac_vysl_modelu_vzorek.xls*
- *sig_podle_inflex_bod.m* – program pro vykreslení modelových sigmoidních průběhů slícovaných dle inflexního bodu křivek

Histoacryl+pork

- FTIR (obdobně jako u FTIR Histoacryl)
 - 1_Nacteni z csv
 - 2_Extrakce peaků
 - 3_Model
 - Matlab:
 - *ftir_nacti_2017_10_13.m*
 - *ftir_pik_2017_10_13.m*
 - *model_pik_biexp.m* – GUI program pro modelování jednotlivých časových průběhů měřených maxim biexponenciální funkcí; vstup: *max_vzorek_piky.xls*; výstup: *max_vzorek_piky_vysl_modelu.xls* (uložení parametrů modelu)
- THz (obdobně jako u THz Histoacryl)
 - tds 20170712 Varšava:
 - THz_data
 - model
 - tds 20171124 Zlin
 - THz_data
 - model
 - Matlab:
 - *thz_tds.m*
 - *ATR_TDS_AB_Polsko_2017_07_31.m*
 - *model_biexp.m* – GUI program pro modelování naměřených časových závislostí P-P biexponenciální funkcí; vstup: *tds_vzorek_xy_extr.xls*, výstup: *tds_vzorek_vysl_model.xls*