



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

FLUORESCENČNÍ KORELAČNÍ SPEKTROSKOPIE VE STUDIU VLASTNOSTÍ KOLOIDNÍCH SYSTÉMŮ

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

AUTOREFERÁT DIZERTAČNÍ PRÁCE

SUMMARY OF DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Kateřina Marková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

ŠKOLITEL SPECIALISTA

CONSULTANT

doc. Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2024

ABSTRAKT

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

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

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

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

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

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

OBSAH

1	Úvod.....	6
2	Cíle práce	7
3	Teoretická část	8
3.1	Fluorescenční zobrazovací mikroskopie.....	8
3.2	Fluorescenční korelační spektroskopie.....	8
3.2.1	Matematická analýza dat – SymPhoTime64.....	8
3.2.2	Modely zahrnující neuniformnost systému	11
3.3	Time-correlated single photon counting	13
3.4	Difúze	14
3.5	Hydrogely	14
3.5.1	Agaróza	14
3.5.2	Hyaluronát sodný	15
4	Experimentální část.....	16
4.1	Použité chemikálie.....	16
4.2	Použité přístroje	16
4.3	Příprava vzorků.....	16
4.3.1	Fluorescenčně značené nanočástice ve vodě.....	16
4.3.2	Fluorescenčně značené nanočástice v glycerolu	16
4.3.3	Fluorescenčně značené nanočástice agarózovém hydrogelu	16
4.3.4	Fluorescenčně značené nanočástice v hyaluronanovém gelu	17
4.4	Matematické přepočty	17
4.4.1	Přepočet autokorelační křivky na MSD křivku.....	17
4.5	Ověření velikosti částic.....	18
5	Významné výsledky a diskuze	19
5.1	Porovnání velikosti částic pomocí metody DLS a FCS.....	19
5.2	Limitní viskozita pro měření částic	19
5.3	Agarózový hydrogel	20
5.3.1	Měření difúzního koeficientu metodou jednoohniskové FCS.....	20
5.3.2	Měření difúzního koeficientu metodou dvouohniskové FCS	21
5.3.3	Porovnání jednoohniskové a dvouohniskové FCS.....	24
5.3.4	Alternativní vyhodnocení pomocí MEM	25
5.3.5	FLIM agarózového hydrogelu.....	27
5.3.6	Analýza pomocí programu ImageJ	31
5.4	Difúze v roztoku hyaluronanu	32

6	Závěr	36
7	Použitá literatura	40
8	Životopis	43
9	Přehled publikací a aktivit.....	44
9.1	Články v impaktovaném časopise	44
9.2	Abstrakty.....	44
9.3	Přednášky na mezinárodní konferenci.....	44
9.4	Postery na mezinárodní konferenci	45

1 ÚVOD

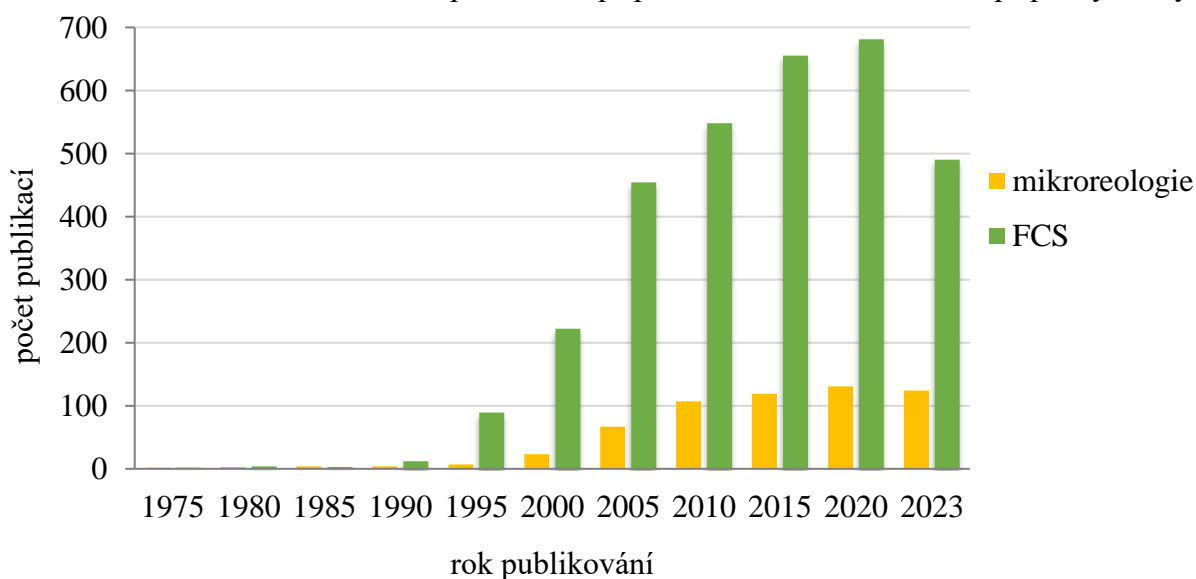
Díky narůstajícímu zájmu o využívání hydrogelů v různých odvětvích se zvyšují i nároky na vlastnosti těchto materiálů. V současné době je velmi žádaná příprava hydrogelů, které mají přesně definovanou vnitřní strukturu. Způsobem výroby lze docílit požadavků, které jsou na výsledný gel kladeny, ovšem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

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

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

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

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



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

2 CÍLE PRÁCE

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

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

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

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

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

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Fluorescenční zobrazovací mikroskopie

Pro získání fluorescenčního obrazu existují dvě metody. *Wide-field metoda*, která je méně přesná, snímá v ohniskové rovině širokou oblast vzorku. Pro tuto metodu se současně používá detektor pro zobrazení časově rozlišené fluorescence (time-resolved imaging detector). Mnohem přesnější metodou je *laserová skenovací mikroskopie* (LSM). Citlivost je zde dána použitím tzv. pinhole, která slouží k odfiltrování záření pocházejícího z jiné než ohniskové roviny. Obraz se vytváří způsobem, kdy se v každém skenovacím bodě se měří doba života fluorescence [5].

Metoda fluorescenční mikroskopie zobrazující dobu života (FLIM) je technika, která umožňuje zaznamenávat doby života fluoroforu a zároveň jeho umístění v prostoru. Na základě kombinace intenzitního profilu vzorku a získané doby života se vytvoří finální obraz, na kterém lze rozlišit různé doby života a jejich relativní zastoupení ve vzorku [6].

3.2 Fluorescenční korelační spektroskopie

Tato metoda, která se označuje zkratkou FCS, je založena na získávání dynamických a strukturních informací na základě fluktuace intenzity fluorescence v čase. Fluorescence je emitována jednou nebo více molekulami fluoroforu, kdy se změna intenzitního profilu získává z velmi malého objemu, který je vytvořený laserovým paprskem. Tato změna je vyvolána pohybem pozorovaných fluorescenčních molekul skrz daný konfokální objem. Při zjišťování periodičnosti pozorovaného děje je potřeba zvolit odpovídající časové měřítko v závislosti na zkoumaném materiálu a fluoroforu [7].

Pohyb částic je daný translační difúzí nebo tokem. Díky velikosti konfokálního objemu (standardně okolo jednoho femtolitru) se do něj vejde omezené množství částic – v ideálním případě se jedná o jednu molekulu v pozorovaném objemu, což odpovídá řádově koncentraci fluoroforu $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Tím je možné sledovat přítomnost nebo absenci fluorescenčních částic v objemu a zaznamenávat změnu intenzity v závislosti na době setrvání fluoroforu v dráze excitačního paprsku [8].

Pokud se jedná o translační difúzi, tak difúzní čas a z něj odvozený difúzní koeficient závisí na velikosti konfokálního objemu. Ten ovlivňuje řada faktorů, mezi které patří například typ objektivu, intenzita laseru, jeho vlnová délka a další. Dále je potřeba alespoň rámcově znát rychlost, se kterou dané děje probíhají. Pro přesné měření je nutné kalibrace objemu a rychlosti průchodu fluoroforu o známém difúzním koeficientu v závislosti na okolní teplotě. Samotná translační difúze trvá řádově ve stovkách mikrosekund až jednotkách sekund, oproti tomu fotochemické děje jsou až o řád rychlejší [9].

3.2.1 Matematická analýza dat – SymPhoTime64

Všechny uvedené rovnice byly převzaty z vyhodnocovacího systému SymPhoTime64, případně z manuálu od firmy PicoQuant [10].

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

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

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

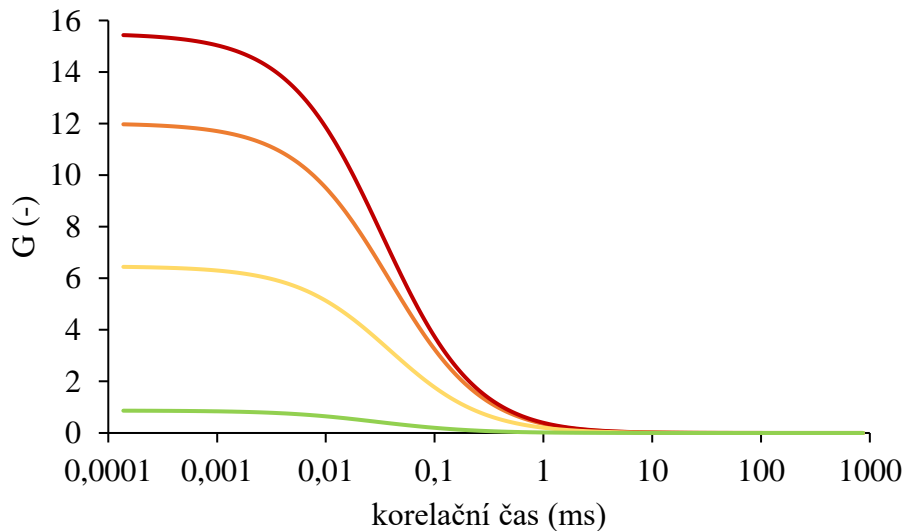
Zaznamenaná změna intenzity je analyzována pomocí matematických modelů v závislosti na typu získaných dat, zkoumaném vzorku a zkušenosti operátora. Autokorelační funkce popisuje stupeň korelace mezi dvěma určitými hodnotami intenzity fluorescence v daném časovém intervalu. Vyjadřuje tedy, s jakou pravděpodobností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

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

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

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

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



Obrázek 2: Závislost funkce G na koncentraci fluoroforu. Zelená křivka zobrazuje nejvíce koncentrovaný roztok (a správný, kdy se nachází v objemu pouze jedna molekula fluoroforu), červená nejméně koncentrovaný.

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

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

kde τ_D představuje dobu, kdy korelace klesne na polovinu původního maxima. Tento čas lze interpretovat jako dobu, kterou molekula potřebuje, aby se dostala z konfokálního objemu pomocí difuze. Jinou formulací lze říct, že je to statistický údaj, kdy je 50 % pozorovaných fluoroforů v detekčním objemu a 50 % už je pryč. Je tedy přímo spojený s difuzním koeficientem, což dokládá rovnice

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

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

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

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

Triplet Extended 3D

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

Matematický model *Pure Diffusion* se využívá pro analýzu difúze fluoroforu v daném prostředí. Předpokládá se, že fluorofor nevykazuje žádný mezisystémový přechod, tedy se nemění fotofyzikální vlastnosti. Matematický model *Triplet* se používá pro analýzu, kdy fluorofor přechází do tripletového stavu nebo stavu s jemu podobnou fotofyzikou (tzv. „dark state“). Pro rozšíření této funkce byl následně navržen model *Triplet Extended 3D*. Tato funkce se používá, kdy průměrná rychlost není zcela stabilní, případně fluorofor difunduje ve všech třech směrech v prostředí typu buňka nebo polymer [11].

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

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

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

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

V tomto případě je opět fit matematicky v pořádku, tedy data jsou správně proložena a reziduální analýza vychází rovnoměrně. Pokud se nejedná o velmi komplikovaný systém, pak výsledkem je jedna hodnota parametru alfa a jedna hodnota difúzního času. Matematicky tento parametr upraví křivku tak, aby byla namodelovaná správně pro daná data, bohužel v literatuře stále chybí fyzikální vysvětlení tohoto parametru. Jednou z možností je brát tento parametr jako ukazatel anomality difúze, tedy pokud je alfa rovna jedné, jedná se o volnou difúzi, ale čím více se od této hodnoty liší (zpravidla je menší), tak je těžší difúzi částic definovat jednoduchým způsobem. Sledováním změny tohoto parametru je možné získat informace o homogenitě systému [12].

3.2.2 Modely zahrnující neuniformnost systému

Standardní model 3D difúze (rovnice (5)) je vhodný pro studium difúzních vlastností monodisperzních fluoroforů v izotropním prostředí (např. jednoduchý organický fluorofor ve vodě). Pro systémy, které jsou polydisperzní anebo se se pohybují v anizotropním prostředí je potřeba použít složitější modely, které polydisperzitu anebo anizotropii prostředí zahrnují. Zvláště je třeba přihlídnout k faktu, že výše zmíněné vlastnosti se mohou měnit spojitě a není tak vhodné je popisovat systémem diskrétních hodnot, protože standardní model 3D difúze nabízí lineární kombinaci maximálně čtyř komponent. Model Anomální 3D difúze (rovnice (7)) toto kritérium splňuje, nicméně v literatuře chybí význam číselné hodnoty koeficientu anomální difúze, jak bylo zmíněno výše. Proto je potřeba přistoupit k použití modelů, které v sobě nesou předpoklad rozložení daných veličin. Jako příklad je možné uvést (log-)normální (Gaussovské), Poissonovo nebo Schulz-Zimmovo rozdělení [13, 14]. Jako další možností analýzy, která překonává problémy algoritmu metody nejmenších čtverců a poskytuje distribuci sledovaných hodnot, je takzvaná metoda maximální entropie (Maximum Entropy Method, MEM).

K příspěvku neuniformity je třeba zařadit i člen, který reflektuje různý molekulární jas (brightness, molecular brightness) studovaných fluoroforů. Je třeba zmínit, že pokud se jedná např. o značený polymer, lze distribuci jeho stupně polymerizace spojit s hustotou značení fluoroforu [15]. Pokud vynecháme příspěvek nefluorescentních stavů (tripletu apod.), lze obecně model autokorelační funkce napsat v níže uvedeném stavu

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

kde výraz $P(\tau_D)$ vyjadřuje distribuci difúzních časů, $M(t, \tau_D)$ vyjadřuje standardní translační difúzi a výraz $\varepsilon(\tau_D)$ je distribuce jasu v závislosti na difúzním čase (a tím i velikosti molekuly). K poslednímu parametru je potřeba připomenout, že samotná autokorelační je bilancí intenzit

fluorescence a je tedy velmi citlivá na přítomnost fluoroforů s různým molekulárním jasnem, jak je uvedené v rovnici (2).

3.2.2.1 Log-normální model distribuce difúzních časů

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

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

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

Tento model je velmi často využíván v analýze velikosti částic v koloidních systémech nebo v systémech s distribucí molekulové hmotnosti [16, 17].

3.2.2.2 Metoda maximální entropie

Analýza metodou maximální entropie (MEM) je založená na algoritmu navrženém Skillingem a Bryanem [18]. Tato metoda byla již dříve úspěšně použita k získání distribuce dob života fluorescence a difúzních koeficientů a v poslední době je tato metoda implementována jako MEMFCS k analýze FCS dat [18]. MEMFCS analýza korelačních dat hledá nejlepší rozdělení $P(\tau_D)$, kde je nejenom hodnota χ^2 minimální, ale také entropie (H) je maximální. Princip maximální entropie říká, že nejvhodnějším rozdělením pro modelování daného souboru dat je rozdělení s nejvyšší entropií ze všech, která splňují omezení našich předchozích znalostí. Méně pravděpodobný výsledek přináší více informací než pravděpodobnější. Entropii je možné tedy vyjádřit jako míru neurčitosti. Pokud by bylo cílem nalézt rozdělení $P(x)$, o kterém toho víme co nejméně, pak by v souladu s touto hypotézou měla být entropie maximální.

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

$$G(t) = \sum_i^n \alpha_i \left(\frac{1}{1 + \frac{t}{\tau_D}} \right) \left(\frac{1}{1 + \kappa^2 \frac{t}{\tau_D}} \right)^{1/2}, \quad (11)$$

kde amplituda α_i musí splňovat podmínku, že experimentální data $G(\tau)$ jsou správně matematicky i fyzikálně proložena. Často je možné, že kritérium dobré shody (χ^2) je splněno pro mnoho různých rozdělení α_i , zejména pokud jsou data zašuměná. Taková rozdělení mohou také zahrnovat řešení pro specifické modely, například jednu nebo více pevných hodnot pro τ_D . Experimentální data pak odpovídají kterémukoli z těchto rozdělení, a proto je přijatelný jakýkoli model, který takové rozdělení předpovídá [19].

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

$$H = - \sum_x p(x) \ln p(x), \quad (12)$$

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

3.2.2.3 Dvouohnisková FCS

Samotná FCS metoda je ovlivněna řadou fotofyzikálních a optických faktorů, stejně tak jako hardwarovým nastavením přístroje. Mezi tyto faktory patří například index lomu (kompenzace různými typy objektivů založených na rozdílných imerzích), optická saturace (vliv intenzity excitačního paprsku na difúzní koeficient) nebo astigmatismu laserového paprsku. Kvůli těmto vlivům je třeba kalibrovat i několikrát během experimentu konfokální objem, což při měření určitých typů vzorků může být z časového hlediska náročné [20, 21].

Kvůli zmiňovaným problémům byla vyvinuta metoda dvouohniskové FCS (dual-focus FCS, 2f-FCS), která by se měla těmto omezení vyhýbat. Díky této metodě, která je nezávislá na výše uvedených faktorech, je možné získat absolutní hodnotu difúzního koeficientu s vysokou přesností, a to bez nutnosti kalibrace konfokálního objemu. Poprvé tuto metodu zmiňuje ve své práci Thomas Dertinger v roce 2007 (respektive skupina okolo profesora Jörga Enderleina, který je také autorem přepočítávacího algoritmu v softwaru MATLAB) [22]. Oproti klasické FCS se jedná o spolehlivější metodu, která má sice podobné přístrojové nastavení, časově méně náročné a přesnější měření, ale komplikovanější analýzu.

Rozdíl oproti klasické FCS je v použití dvou střídavě pulzujících laserů o shodné vlnové délce, ale rozdílnou polarizací, které se synchronizují pomocí pulsně prokládané excitace (pulsed interleaved excitation, PIE). Tyto laserové paprsky jsou v dělicí kostce spojeny do jednoho sekvenčního paprsku, který je veden přes dichroické zrcadlo na Nomarskiho hranol (Nomarski prism). Pomocí něj je paprsek vychýlen podle polarizace do dvou různých směrů a směřován do objektivu, kde se generují dvě překrývající se excitační ohniska o daném vzájemném posunu. Emisní záření je snímáno stejně jako při měření pomocí klasické FCS. Při následné analýze je díky pikosekundovému rozlišení detektorů možné přiřadit jednotlivé fotony ke konkrétní polarizaci [23].

Pro správnou analýzu je potřeba znát vzdálenost mezi ohnisky a obecný tvar detekčních objemů. Ten je kvantitativně definován molekulovou detekční funkcí (molecule detection function, MDF). Vzdálenost mezi ohnisky je dána vlastnostmi Nomarskiho hranolu. Samotný výpočet a proložení korelačních křivek probíhá pomocí softwarového skriptu (např. v programu MATLAB), kdy lze výpočtem následně získat absolutní hodnotu difúzního koeficientu [21, 23].

Vzdálenost mezi ohnisky lze stanovit třemi různými způsoby. První metodou je provedení srovnávacího měření difúze fluorescenčních nanočástic a získaný difúzní koeficient porovnat s výsledky z dynamického rozptylu světla. Další způsob je z -sken, kdy se určí difúzní čas v detekovaném objemu podél osy z . Poslední možností je použít sondu se známým difúzním koeficientem jako při standardní kalibraci u jednoohniskové fluorescenční korelační spektroskopie [22].

3.3 Time-correlated single photon counting

Existují dva typy měření parametrů fluorescence. *Ustálenou fluorescenci* (steady-state fluorescence), která je měřena při kontinuálním excitačním záření, je možné měřit polarizaci nebo střední hodnotu intenzity fluorescence [6]. Jako zdroj záření se zde využívá lampa, nejčastěji xenonová, emitující konstantní množství fotonů za jednotku času. Ve výsledku pak zůstává koncentrace excitovaných molekul fluoroforu konstantní [24]. Druhým typem měření

je *časově rozlišená fluorescence* (time-resolved fluorescence). Zde je výsledkem časová závislost měřených parametrů fluorescence. Časově rozlišená fluorescence se používá často pro získání informací o dynamice excitovaného stavu, což je důležitý parametr pro interpretaci fotobiologických i fotofyzikálních procesů [6]. Dále je možné získat intenzitní a anizotropní křivky [24].

Do časově rozlišené fluorescence patří i pulzní fluorimetrie, kdy po excitaci vzorku dojde v časovém měřítku k poklesu fluorescence. Tento pokles tvoří v ideálním případě, tedy v přítomnosti pouze jedné doby života excitovaného stavu, monoexponenciální křivku. V reálném vzorku je ovšem pokles většinou víceexponenciální [25]. Skutečná křivka je pak tvořena samotnými naměřenými daty ze všech přítomných dob života fluorescence a funkcí odezvy přístroje (instrument response function, IRF).

Metoda časově korelovaného sčítání jednotlivých fotonů (time-correlated single photon counting, TCSPC) patří do skupiny časově rozlišené fluorescence. Je založena na sčítání fotonů postupně dopadajících na detektor od začátku světelného impulzu. Principem metody je to, že pravděpodobnost detekce jediného fotonu v čase t po excitačním pulzu je úměrná intenzitě fluorescence v konkrétním čase [26]. TCSPC metoda má dobrý dynamický rozsah a linearitu, vysokou citlivost a definovanou statistiku (Poissonova distribuce), která umožňuje správnou matematickou operaci pro každý bod v analýze dat.

3.4 Difúze

Při teplotách vyšších, než je absolutní nula, je možné díky srážkám molekul rozpouštědla s disperzními částicemi pozorovat tepelný pohyb. Tento pohyb je náhodný, probíhá v různých směrech s různou rychlostí. S rostoucí hmotností a poloměrem částice se zvyšuje pravděpodobnost kompenzace nárazů – z toho důvodu je u částic s efektivním poloměrem vyšším než 4 μm pozorovatelný pouze vibrační pohyb, nikoli tepelný [27]. V makroskopickém pohybu se tepelný pohyb projevuje jako difúze. K tomuto jevu dochází v soustavách, kde je přítomný koncentrační gradient [28].

3.5 Hydrogely

Hydrogely jsou speciální skupinou lyogelů, kdy je disperzním prostředím voda. Řetězce jsou vzájemně propojené do trojrozměrné sítě, která vyplňuje celé disperzní prostředí. Výhodnou vlastností je, že se hydrogely ve vodě nerozpouští díky zesílení polymeru. Naopak při kontaktu s ní dokážou velké množství absorbovat, tím dojde ke zvětšení objemu = bobtnají. Tato schopnost je podmíněna strukturou polymerního řetězce, kdy funkční skupiny musí mít hydrofilní charakter [29].

3.5.1 Agaróza

Jednou z forem agaru, který se izoluje z červených mořských řas, je agaróza. Dlouhou dobu byla považována za neutrální molekulu, ale její neutralita nebyla zatím žádnou analytickou metodou potvrzena. V současné době je agaróza brána jako směs agarových molekul s nejnižším možným obsahem náboje. Může ovšem obsahovat zbytky karboxylových, sulfátových nebo pyruvátových skupin. Konkrétní složení závisí na druhu použitých rhodophyt, období jejich sběru a podmínkách extrakce polymeru [30].

Tvoří ji lineární řetězec střídajících se podjednotek β -D-galaktopyranózy spojených $\alpha(1,3)$ -glykosidickou vazbou a zbytků 3,6-anhydro- α -L-galaktopyranózy vzájemně provázaných $\beta(1,4)$ -glykosidickou vazbou [31].

3.5.2 Hyaluronát sodný

Hyaluronan (hyaluronát sodný, sodná sůl kyseliny hyaluronové) je přirozeně se vyskytující lineární polysacharid, patřící do třídy nesulfátovaných glykosaminoglykanů, s opakujícími se jednotkami sodné soli kyseliny D-glukuronové a *N*-acetyl-D-glukosaminu a střídajícími se β -(1→3), β -(1→4) glykosidickými vazbami. V tomto polysacharidu je rotace kolem glykosidických vazeb omezena, protože oba monosacharidy jsou v energeticky stabilní konfiguraci β , v níž jsou objemné funkční skupiny (karboxyl, acetamidová, hydroxylová a anomerní uhlík) ve stericky výhodné ekvatoriální poloze [32].

Vysokomolekulární HA a fragmenty různých velikostí mohou ovlivňovat řadu biologických procesů prostřednictvím interakcí s receptory, jako je například CD44, receptor pro hyaluronanem zprostředkovanou pohyblivost (RHAMM, HMMR) a receptor pro hyaluronan endotelu lymfatických cév 1 (LYVE1) [33].

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

Fluorescenční nanočástice Sicastar® (micromod GmbH) – 10 nm (RedF), 30 nm (GreenF), 50 nm (GreenF), 70 nm (GreenF), 100 nm (GreenF). Fluorescenční částice DiagNano™ 10 nm, 50 nm, 100 nm. Fluorescenčně značený hyaluronan FITC-HA-Se 274 kDa a 710 kDa (TdB Labs). Glycerol bezvodý p.a. (lach:ner), agaróza (Sigma Aldrich), hyaluronát sodný (Contipro Group). Rhodamin 6G (Sigma Aldrich), Atto 488 (Sigma Aldrich),

4.2 Použité přístroje

Konfokální mikroskop MicroTime200 (PicoQuant GmbH, DE), Zetasizer Nano Zs (Malvern Instrument, UK), Elektronový mikroskop EVO LS 10 (Zeiss, DE).

4.3 Příprava vzorků

4.3.1 Fluorescenčně značené nanočástice ve vodě

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

4.3.2 Fluorescenčně značené nanočástice v glycerolu

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

4.3.3 Fluorescenčně značené nanočástice agarózovém hydrogelu

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

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

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

Druhým způsobem, který byl především používán v této práci, je zamíchání fluorescenčních nanočástic přímo do tekutého hydrogelu. Ještě před zahříváním směsi se k agaróze do deionizované vody napipetovalo přesné množství disperze nanočástic o dané koncentraci. Poté se postupovalo opět podle postupu výše. U částic byla měřením prokázána

vysoká termostabilita, kdy se difúzní koeficient neměnil ani po dosažení bodu varu a následném zchladnutí.

Tyto postupy ovšem platí pouze pro vzorky, kdy je možné do držáku sklička napipetovat standardní 2 ml gelu. Pokud je potřeba měřit mnohem menší objemy gelu, nebo teplotně nestabilní částice, je nutné způsob přípravy upravit. Měřeními bylo zjištěno, že způsob difúze z povrchu gelu v malém (mikrolitrovém) množství vzorku není možný. Lze tedy připravovat gely pouze s částicemi zamíchanými už při přípravě.

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

4.3.4 Fluorescenčně značené nanočástice v hyaluronanovém gelu

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

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

4.4 Matematické přepočty

4.4.1 Přepočet autokorelační křivky na MSD křivku

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

$$\text{MSD} = \frac{8}{27w_{xy}^4w_z^2}x^3 + \left(\frac{8}{9w_{xy}^2w_z^2} + \frac{4}{9w_{xy}^4}\right)x^2 + \left(\frac{4}{3w_{xy}^2} + \frac{2}{3w_z^2}\right)x + 1 - \frac{1}{N^2G(t)^2}. \quad (13)$$

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

Původní skript v softwaru MATLAB byl poprvé použitý v práci **P. Kábrtové** [34], později v dizertační práci **J. Mondeka** [35]. Kód s mírnými modifikacemi vytvořila **S. Pavlíková** ve své diplomové práci [36]. Ta nakombinovala kódy z předchozích prací a upravila je tak, aby byly jednodušejší zapsané. V kódu ale byla numerická chyba, která se opravila. Nový kód s dalšími úpravami i s vysvětlením jednotlivých částí je v příloze 3.

Pro rychlejší a přesnější výpočet jediného reálného kořene rovnice (13) byl vytvořený skript v softwaru MATLAB. Z něj byly vyexportovány MSD křivky ve formě .csv tabulky. Díky jednoduchému přepočtu byla tato data přepočítána na poddajnost pomocí rovnice (14):

$$J(t) = \frac{3\pi a}{DkT} \text{MSD}. \quad (14)$$

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

4.5 Ověření velikosti částic

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

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

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

5 VÝZNAMNÉ VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Porovnání velikosti částic pomocí metody DLS a FCS

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

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

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

Tabulka 1: Porovnání hodnot difúzního koeficientu a průměru částice získaného metodami DLS a FCS.

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

5.2 Limitní viskozita pro měření částic

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

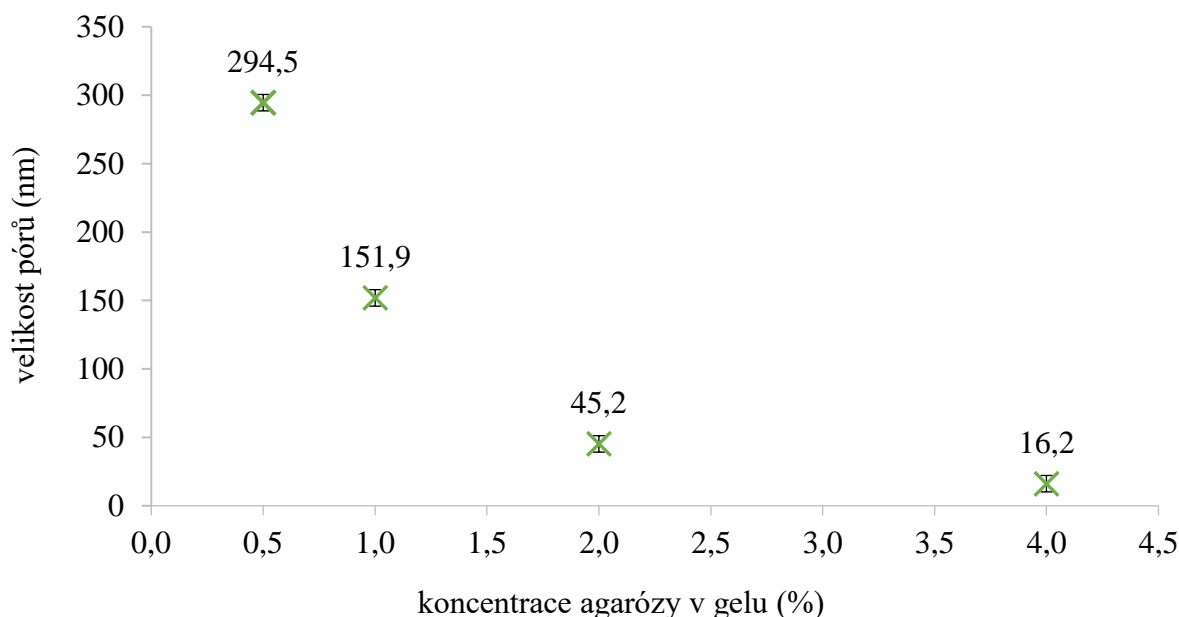
Tabulka 2: Limitní viskozita a difúzní koeficient pro částice různé velikosti

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

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

5.3 Agarózový hydrogel

Pro měření gelů bylo potřeba zjistit přibližnou velikost pórů agarózy, aby byly použity odpovídající částice. Jako metoda byla zvolena turbidimetrie, kdy se získaly průměrné velikosti. Výsledné průměrné velikosti jsou zobrazeny na obrázku 3.



Obrázek 3: Závislost velikosti pórů na koncentraci agarózy v gelu.

5.3.1 Měření difúzního koeficientu metodou jednoohniskové FCS

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

Tabulka 3: Difúzní koeficient různě velkých částic v závislosti na koncentraci agarózového gelu.

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

Bylo provedeno několik měření, na jejichž základě byl stanovený difúzní koeficient pro danou velikost částice v určitém gelu. Z výsledků ovšem nešel stanovit jediný difúzní koeficient kvůli heterogenní povaze vzorku. V tabulce 3 je proto uvedena střední hodnota difúzního koeficientu (medián) a hodnota intervalu, ve kterém se tento koeficient pohybuje. Nejedná se tedy o chybu měření, ale o fyzikální popis měřeného systému, kdy uvedený interval je spojený s šířkou distribuce difúzních koeficientů.

Samotná odchylka měření dokáže dát informace o struktuře hydrogelu. Čím je odchylka vyšší, tím víc difúzních koeficientů zde může být, a tedy je systém více heterogenní. Data jsou uvedena v tabulce 4.

Tabulka 4: Procentuální hodnoty vypočítaného poměru odchylky měření vůči naměřenému difúznímu koeficientu pro různé velikosti částic v různě koncentrovaném agarózovém hydrogelu

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

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

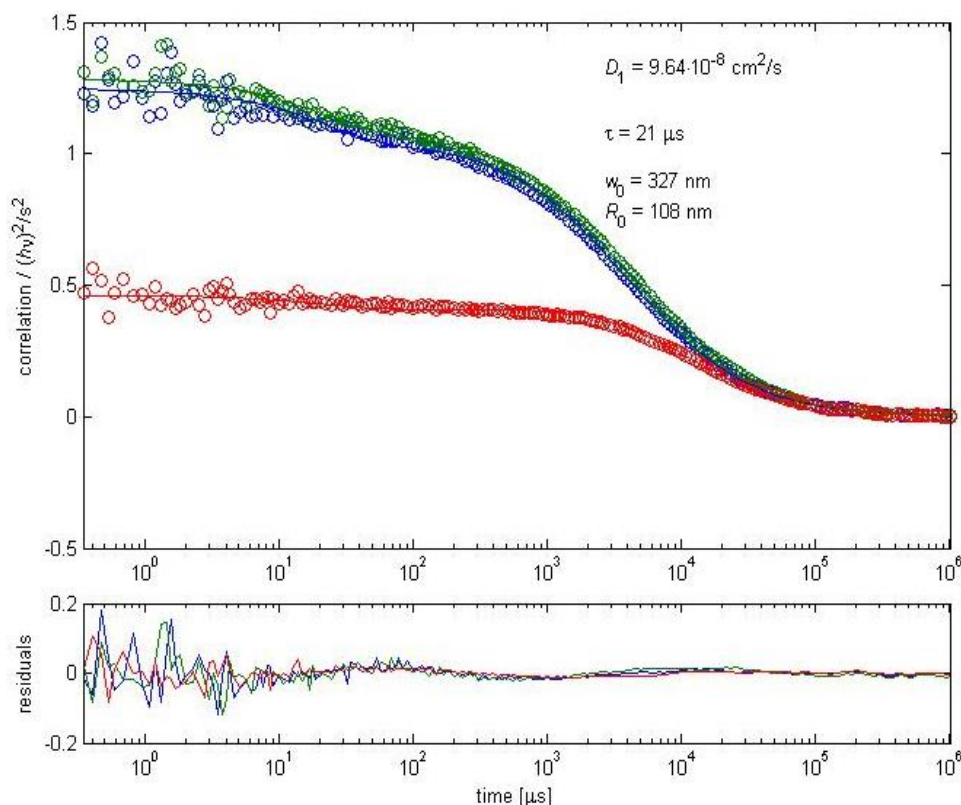
Čím větší jsou částice, tím klesá pravděpodobnost, že částice najde vhodný pór „na první pokus“, tedy dojde k poklesu difúzního koeficientu a nárůstu intervalu hodnot. Zjednodušeně by se dalo říct, že je gel čím dál víc nehomogenní. Jen u 100nm částic se odchylka zastavila u 33 %, což neodpovídá trendu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

5.3.2 Měření difúzního koeficientu metodou dvouhnikové FCS

Byl předpoklad, že dvouhniková FCS (2f-FCS) bude přesnější a spolehlivější metodou pro měření korelačních křivek. Obecně se s touto myšlenkou dá souhlasit už jen z důvodu, že se

nemusí při každé změně teploty kalibrovat konfokální objem, tedy se eliminuje chyba vzniklá při měření kalibrace.

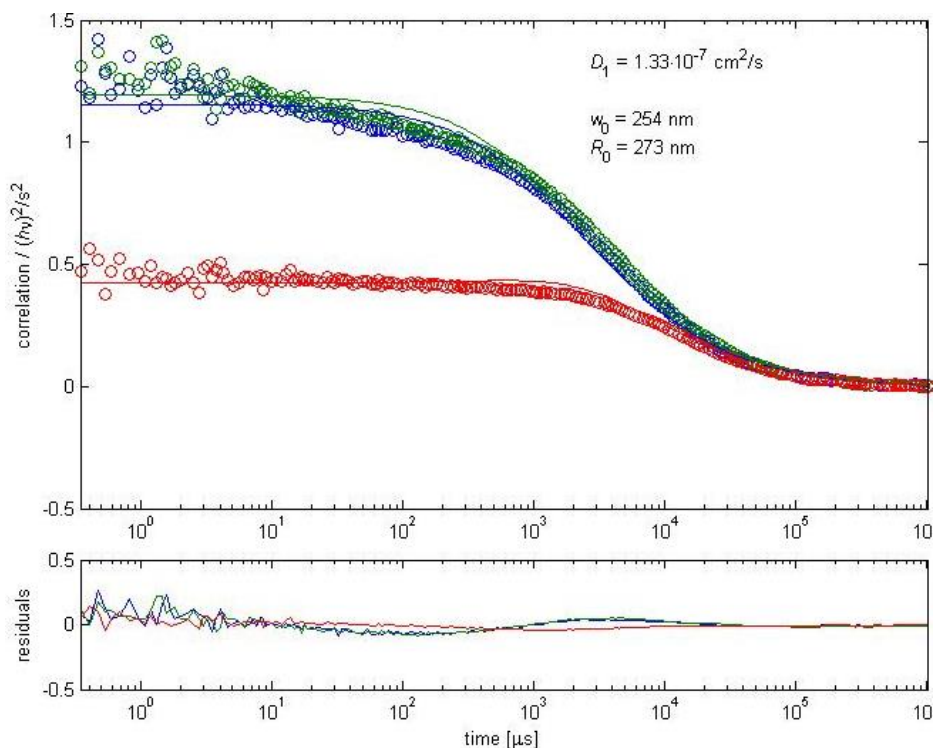
Problém nastává při měření vyšších koncentrací agarózového hydrogelu ve spojení s většími nanočásticemi. Protože se jedná o pouze softwarové vyhodnocení, aniž by operátor mohl do výsledku zasáhnout, vše záleží pouze na algoritmu daného skriptu, jaká data vyhodnotí jako relevantní a jaká ne. Zde je možné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



Obrázek 4: Korelační křivky s jedním difúzním koeficientem a jedním tripletem.

V případě obrázku 4 je pak ještě nutné rozhodnout, jestli se jedná opravdu o tripletní stav fluoroforu, nebo jestli vlivem prostředí dochází k fotovybělení částice. Ve druhém případě se zde také vyskytuje velmi krátký difúzní čas, protože částice je detektována v objemu, ale kvůli velmi pomalé difúzi se dříve fotovybělí, než prodifunduje skrz celý objem. To se projeví jako „zhasnutí částice“, tedy se částice dále nedetekuje a dochází ke zkreslení výsledku.

Na obrázku 5 je vidět, že krátký difúzní čas je zde opravdu přítomný a že odebrání nefluorescenční komponenty (triplet) posunulo celé proložení korelačních křivek. Vlivem toho došlo k výrazné změně difúzního koeficientu z $9,6 \mu m^2 \cdot s^{-1}$ na $13,3 \mu m^2 \cdot s^{-1}$.



Obrázek 5: Korelační křivky s jedním difúzním koeficientem

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

Tabulka 5: Závislost difúzního koeficientu ($\mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) na velikosti částic a hmotnostní koncentraci agarózového hydrogelu pro 2f-FCS.

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

Opět zde platí, že při zvyšující se koncentraci agarózového hydrogelu roste i směrodatná odchylka, která zobrazuje nehomogenitu prostředí. Jak je vidět z tabulky 5, i zde se dosáhlo limitní koncentrace agarózového hydrogelu pro difúzi částic při standardním nastavení. Malý rozdíl je vidět pro 50nm částice, kdy matematický skript byl schopný se dostat

k číselnému výsledku i přes nízký difúzní koeficient a výsledná hodnota byla, i v porovnání s 1f-FCS, relevantní.

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

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

Tabulka 6: Posunutí mezi detekce pomocí úpravy celkového korelačního času a jeho začátku

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

Z tabulky je zřejmé, že úprava hodnot korelační funkce pomohla částečně zpřesnit měření ve vyšších koncentracích agarózového hydrogelu pro větší částice. Nicméně ani tato úprava nebyla schopna zajistit získání dat z nejkonzentrovanejších vzorků. Zde skript neproběhl správně, respektive naměřená data se nepodařilo proložit. U předchozí koncentrace (1,5 hm.%) byly hodnoty pro 70nm a 100nm částice (v tabulce 6 kurzívou) nepřesné z toho důvodu, že se několikrát musela upravovat datová korelační křivka, aby byl skript schopný data proložit. Proto bych se přikláněla k tomu v tomto případě metodu 2f-FCS nepoužívat, protože obdržené výsledky jsou na hranici validity.

5.3.3 Porovnání jednohnikové a dvouhnikové FCS

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

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

Tabulka 7: Porovnání jedno a dvouohniskové FCS. Zobrazeny jsou hodnoty pro 50nm částice.

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

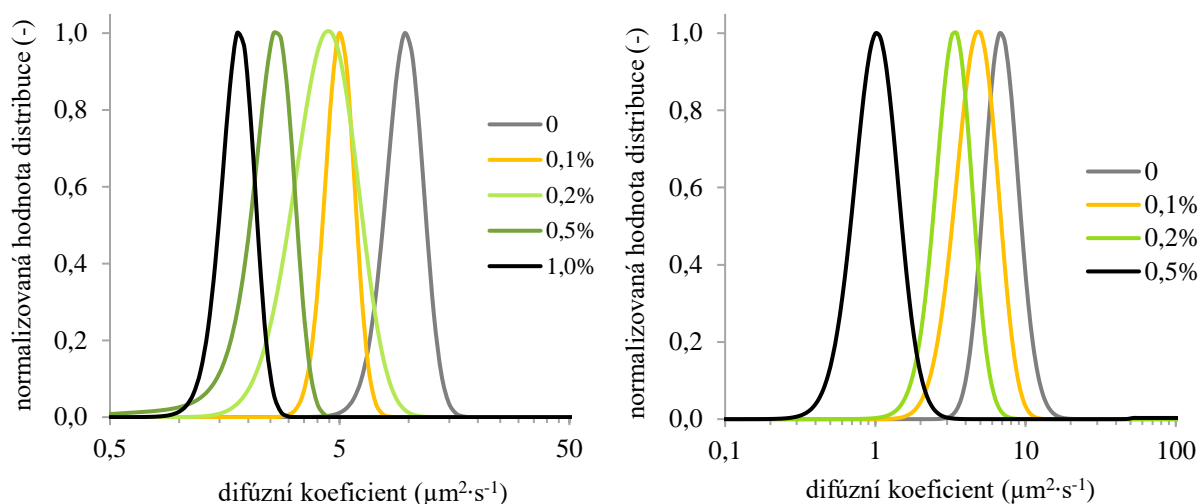
Hned z měření částic ve vodě je jasně vidět, že dvouohnisková FCS je mnohem přesnější pro vyšší difúzní koeficienty. Obecně se zde relativní chyba jednoho bodu pohybovala okolo 1 % a méně. Stejně tak i směrodatná odchylka je nižší. To může být dáno velikostí konfokálního objemu, který je pro 2f-FCS mnohem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

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

5.3.4 Alternativní vyhodnocení pomocí MEM

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

V programu QuickFit 3.0 byly proloženy získané autokorelační funkce, pomocí metody maximální entropie (MEM). Následně získané závislosti byly proloženy v programu OriginPro klasickým log-normálním distribučním modelem, protože lze předpokládat, že pro lokální populaci difúzních koeficientů tento model poskytuje realistický obraz. Grafy zobrazené na obrázku 6 shrnují normalizované průběhy hodnot distribuční funkce z MEM metody na difúzním koeficientu. Z průběhů lze opět vidět, ve srovnání s předchozím typem analýzy, že se distribuce posunuje s rostoucí koncentrací k nižším difúzním koeficientům a závislosti vykazují širší charakter.



Obrázek 6: Distribuce difúzních koeficientů pro fluorescenčně značené částice o velikostech 50 nm (vlevo) a 70 nm (vpravo) získaných Metodou maximální entropie pro různé hmotnostní koncentrace agarózy.

V tabulce 8 je ukázáno srovnání vyhodnocení standardním postupem jednoohniskové FCS a metodou MEM. Jak lze vidět, metoda MEM poskytuje podobné výsledky difúzních koeficientů (medián proložených závislostí) jako jednoohniskový přístup. Větší odchylky lze nalézt u vyšší koncentrace agarózy, kdy je standardní model vyhodnocení zatížen větší relativní chybou. Nízké odchylky u proložení MEM distribuce ukazují, že zvolený přístup vyhodnocení je vhodný a difúzní koeficienty v těchto lokálních populacích opravdu vykazují log-normální rozdělení.

Tabulka 8: Porovnání závislosti hodnoty stanoveného difúzního koeficientu ($\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) pro částice o velikosti 50 nm na hmotnostní koncentraci agarózového hydrogelu pro standardní vyhodnocení jednoohniskové FCS a pro metodu maximální entropie.

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

Výhodou MEM analýzy je získání příslušné distribuce difúzních koeficientů. U získaných dat byl díky tomu spočítán i index polydispersity, a to jako druhá mocnina poměru odlogaritmovaného „w“ (logaritmická šířka distribuce) a mediánu distribuce. Na této hodnotě lze demonstrovat postupné rozšiřování distribuce difúzních koeficientů s rostoucí koncentrací agarózy (Tabulka 9).

Tabulka 9: Porovnání stanoveného difúzního koeficientu ($\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) pro částice o velikosti 50 nm a 70 nm na hmotnostní koncentraci agarózového hydrogelu získané metodou maximální entropie.

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

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

5.3.5 FLIM agarózového hydrogelu

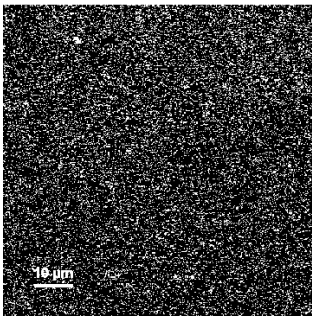
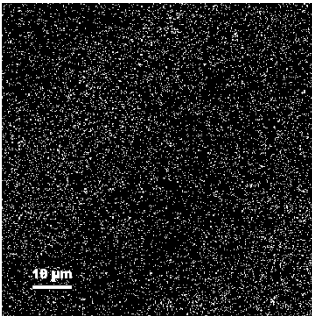
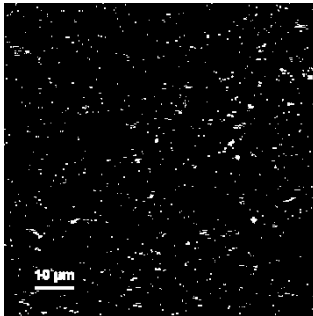
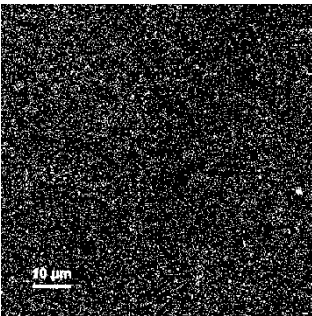
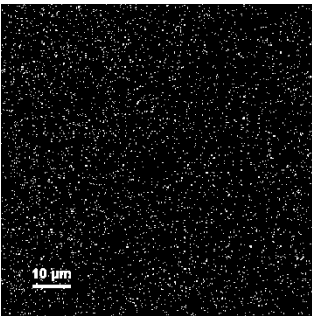
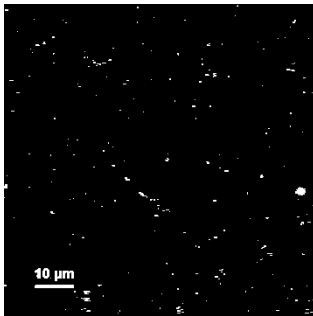
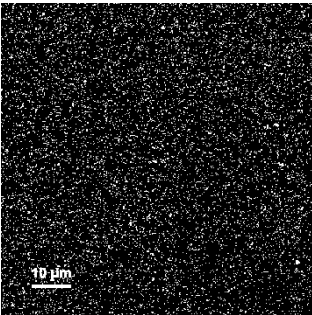
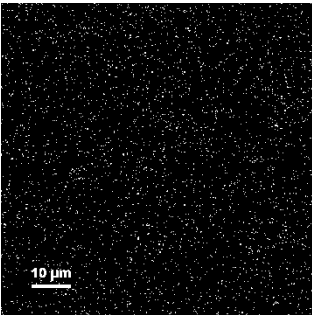
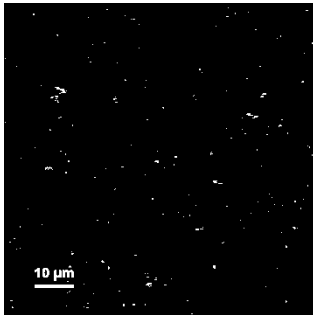
Fluorescenční mikroskopie je vhodným nástrojem pro zobrazení struktury zkoumaného vzorku. Pro hydrogely se zde nabízí dva typy měření – buď se připraví hydrogel vždy s jedním typem částic, nebo se připraví směs částic, která se smíchá s hydrogelem. Oba typy měření mají své výhody a nevýhody. Výhodou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

Pro zobrazení struktury v jednom vzorku je tedy vhodnější použít směs nanočástic o různých velikostech. Hlavní nevýhodou této možnosti je, že kvůli přítomnosti více fluoroforů může dojít ke zkreslení výsledků emisí pocházející z jiného fluoroforu. Aby se co nejvíce eliminovala tato možnost, byly vybrány fluorofory buď s jinou vlnovou délkou excitace a emise, nebo byla excitační a emisní vlnová délka stejná, ale částice se od sebe lišily dobou života fluorescence. Pro toto měření bylo nutné měřit na více detektorech, tedy další chyba mohla vzniknout i kvůli různé citlivosti a nastavení detektoru.

5.3.5.1 Měření velikostí jednotlivě

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

Tabulka 10: Zobrazení distribuce nanočástic pro různé velikosti a v různě koncentrovaných hydrogelech

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

Jak je poměrně zřetelně vidět, s narůstající koncentrací i velikostí částic se mění distribuce ve vzorku. Pokud výsledky budou hodnoceny z pohledu získání informace o struktuře gelu, tak 10 nm částice neposkytují žádné relevantní informace, protože jsou prodifundované téměř homogenně skrz celý hydrogel. Větší částice už jsou situovány pouze v místech s vhodnou velikostí póru. Na základě tohoto můžeme říct, že většina vzniklých pórů je větších než 10 nm, kdy tyto částice mohly bez většího omezení difundovat skrz celý hydrogel. Díky větším částicím je pak možné následně určovat, kde jsou póry prostupné pro jednotlivé velikosti.

5.3.5.2 Měření všech velikostí zároveň

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

Tabulka 11: Ověření tabelovaných dob života fluorescence barviva AlexaFluor® v různých koncentrovaných hydrogelech

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

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

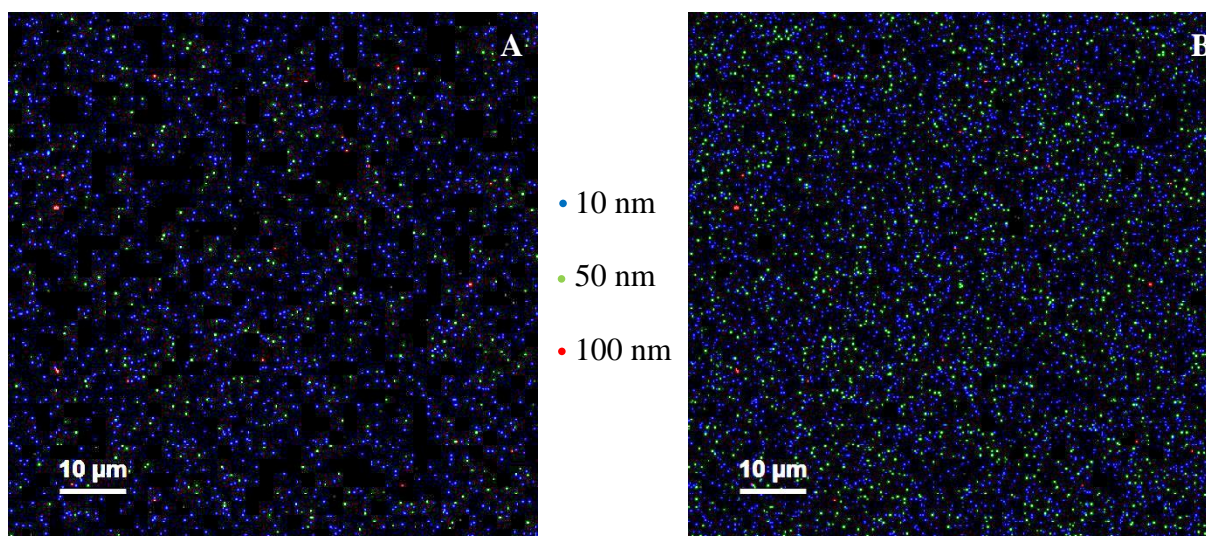
Díky rozdílné době života při stejné excitační vlnové délce 10nm a 50nm nanočástic bylo možné měření a analýza jejich směsi v rámci jednoho FLIM obrázku. Nicméně matematická analýza zpočátku nerozeznala krátkou komponentu patřící 10nm částicím od doby života fluorescence 50nm částic. Z tohoto důvodu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

Tabulka 12: Doby života fluorescence pro 10nm nanočástice

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

Měřit a analyzovat směs částic v hydrogelu je také možné více způsoby. Nejpřesnějším je snímat na každém detektoru jeden typ částic, vyhodnotit každý zvlášť a až ve finální analýze obrázky sloučit do jednoho (obrázek 7A).

Druhým typem je měření opět na dvou detektorech, ale při skenování se data ukládají do společného obrázku (obrázek 7B). Poté pomocí TCSPC analýzy se matematicky od sebe oddělí doby života, které se pak zobrazí na RGB, kdy pro každou dobu života je jiná barva. Nevýhodou je, že takto lze snímat maximálně tři typy částic zároveň. Navíc zde může dojít k nesprávné, respektive méně přesné matematické analýze a oddělení dat.



Obrázek 7: Porovnání dvou typů vyhodnocení stejného vzorku měřeného ve stejném místě. Na obrázku vlevo (A) jsou tři FILM obrázky zkombinované do jednoho. Zde se vyhodnotila každá velikost částic TCSPC analýzou zvlášť, tedy by měla být přesnější. Na obrázku vpravo (B) je kombinace 10nm a 50nm částic snímaných dvěma detektory, ale uložených jako jeden FLIM obraz. Matematickou analýzou pak byly od sebe tyto doby života odděleny.

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

Tabulka 13: Příklad dvou dob života fluorescence jednoho fluoroforu, jejich relativní zastoupení a intenzita

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

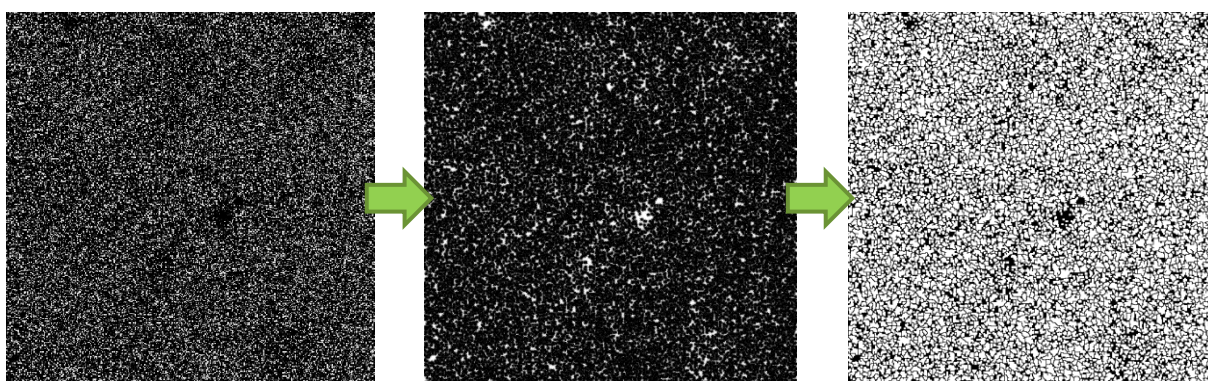
Je také zajímavé, že někde se vyskytují pouze 10nm částice. Zde se nabízí otázka, jestli je možné, aby danou část gelu vyplnily pouze 10nm částice a ostatní částice jiných velikostí musely z důvodu zaplnění póru difundovat skrz polymerní síť dále. Také je možné, že se v daném místě vyskytují oba, případně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

5.3.6 Analýza pomocí programu ImageJ

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

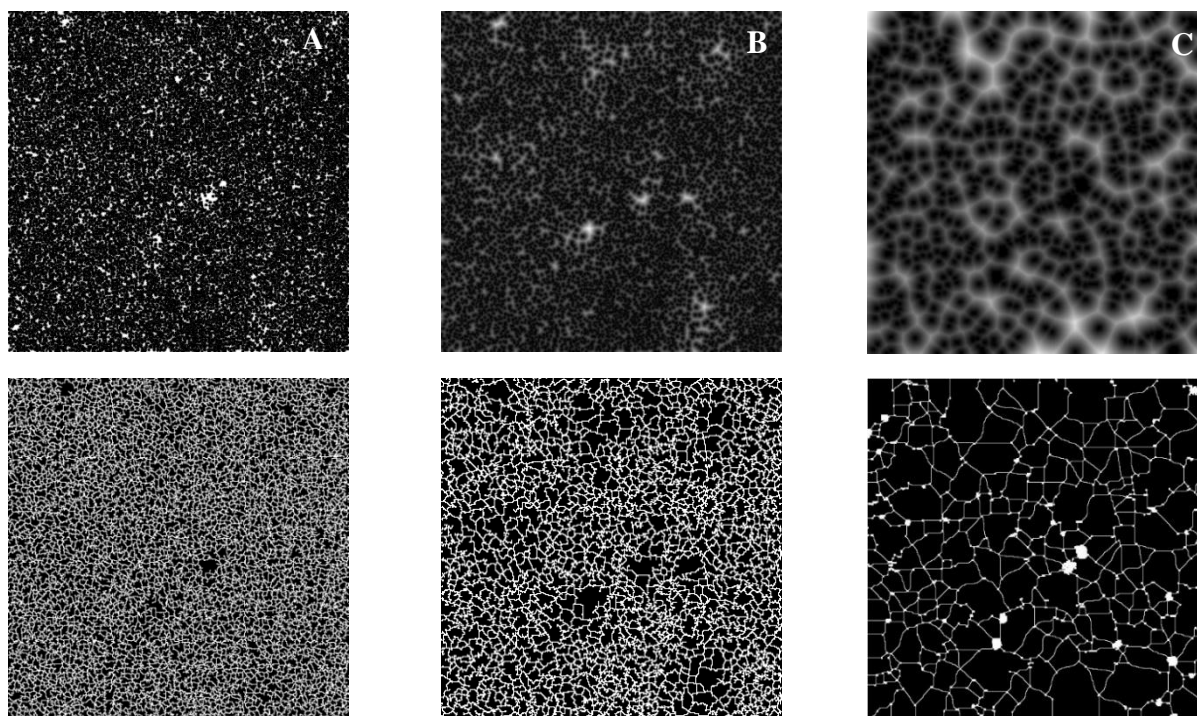
Pro pokročilou obrazovou analýzu byl použitý software ImageJ, který umožnil z naměřených dat vypočítat pravděpodobnou vzdálenost mezi jednotlivými body, díky čemuž je možné alespoň přibližně určit velikost pórů v daném hydrogelu.

Pro potřeby softwaru není vhodné měřit všechny velikosti zároveň, protože se zde pracuje pouze v černobílé variantě, tedy s pozadím a jedním typem částic. Na obrázku 8 je znázorněný převod FLIM obrazu na mapu pomocí eukleidovské metriky.



Obrázek 8: Postup analýzy z FLIM obrázku (vlevo) po mapu rozložení částic (EDM) v programu ImageJ (vpravo) pro částice o průměru 10 nm v 1% agarózovém hydrogelu.

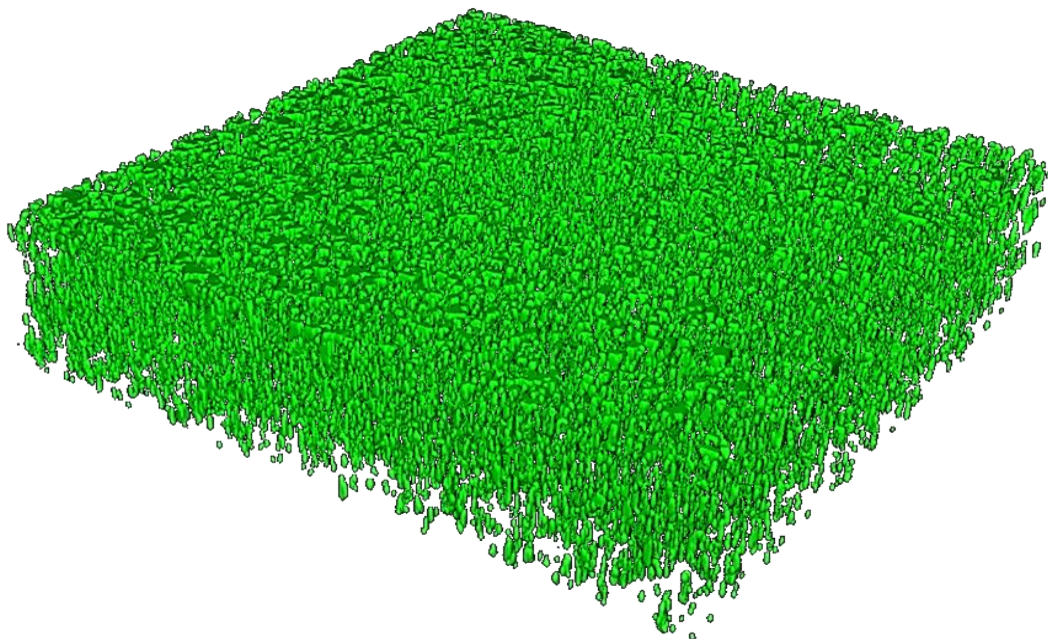
Stejná matematická analýza byla provedena i pro ostatní typy částic. Na následujícím obrázku jsou zobrazeny všechny měřené částice v 1% agarózovém hydrogelu.



Obrázek 9: Rozložení částic v 1% agarózovém hydrogelu. Zleva 10nm částice (A), 50nm částice (B) a 100nm částice (C).

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

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

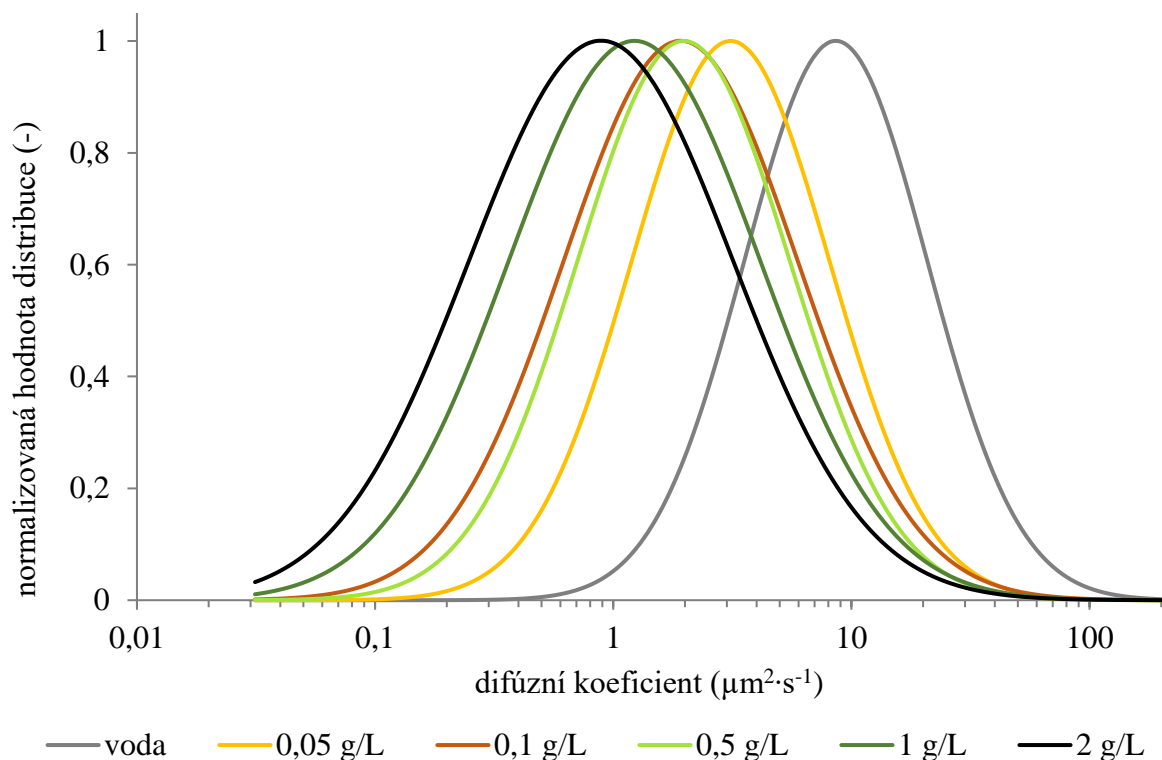


Obrázek 10: 3D obraz agarózového hydrogelu (50nm částice v 1,5% gelu) poskládaný z FLIM obrazů získaných pomocí z-skenu. Rozměry skenované plochy jsou 80 x 80 μm , výška je 20 μm .

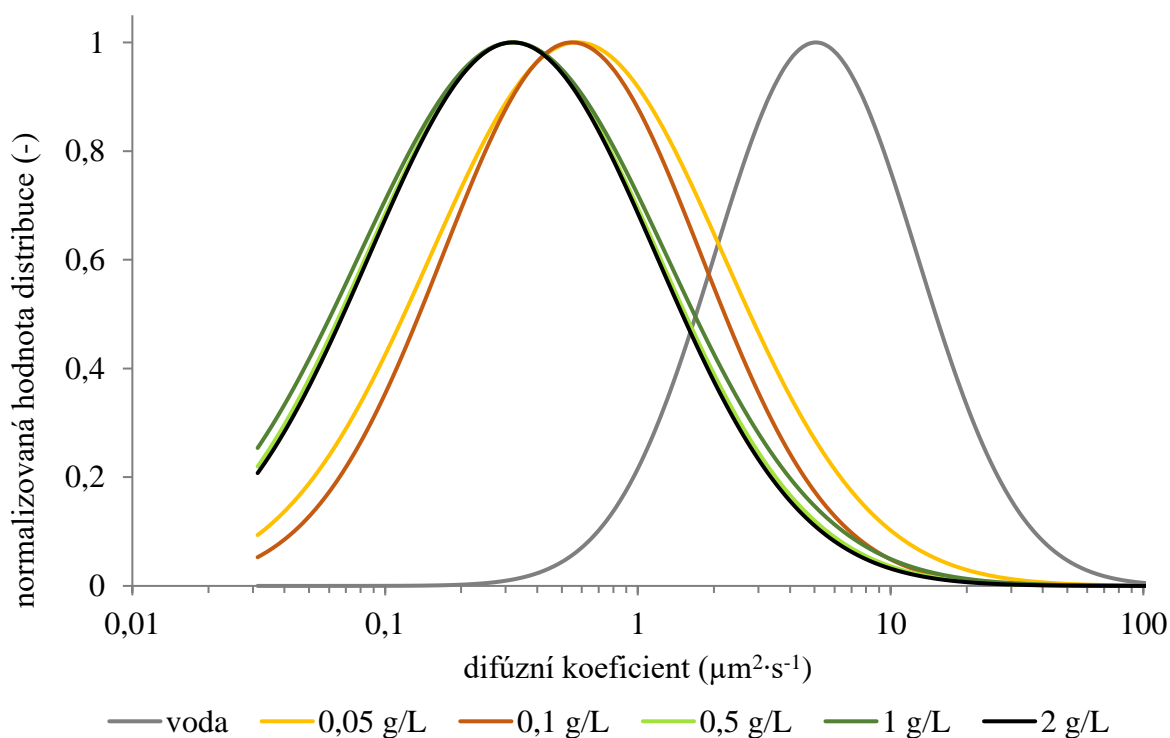
5.4 Difúze v roztoku hyaluronanu

Hyaluronan patří k velmi významným nesulfátovaným polysacharidům. Je to humektant, organizátor extracelulární matrix, součást synoviální kapaliny i očního sklivce. Hyaluronan v roztoku je stabilizovaný vodíkovými můstky. Meziřetězcové interakce jsou poté zprostředkovány přes tzv. hydrofobní oblasti (angl. hydrophobic patches) a vodíkové můstky. Silně solvatovaná hyaluronová doména je schopná propustit látky jakékoli velikosti, kde jde jen o čas průchodu skrz doménu. Jako obecně uznávanou hranicí přechodu mezi zředěným a polozředěným režimem je hranice $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ [32].

Jsou možné dva přístupy studia daného systému. Je možné využít inertní fluorescenční sondu nebo fluorescenčně značenou variantu studovaného polymeru. Každý z těchto přístupů má své využití. První přístup odpovídá interakci s např. s inkorporovaným supramolekulárním nosičovým komplexem biologicky aktivních látek v hyaluronanové doméně, druhý poskytuje informace o agregaci a formování samotné hyaluronanové domény.



Obrázek 11: Log-normální distribuční model pro molekulovou hmotnost hyaluronanu 274 kDa.



Obrázek 12: Log-normální distribuční model pro molekulovou hmotnost hyaluronanu 710 kDa.

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

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

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

V neposlední řadě je potřeba vzít do úvahy i pravděpodobně silně nehomogenní distribuci fluorescenčních značek na kostře značeného biopolymeru, která bude přispívat k širší distribuci stanovených difúzních koeficientů, jak je zobrazuje log-normální distribuční model. Polymer s vyšší hustotou značení bude vykazovat vyšší parametr molekulárního jasu, který ovlivňuje hodnotu autokorelační funkce čtvercem své hodnoty, což vyplývá už z rovnice (9). Tento fakt bohužel vychází ze samotného průběhu syntézy a není možné ho připravit tak, aby distribuce fluorescenčních značek na polymeru byla vždy homogenní. Lze předpokládat, že rozmístění značek bude v přímé spojitosti s distribucí molekulové hmotnosti, a tedy hodnotou polydispersity [15]. Možným řešením by bylo použití preparativní separační techniky se záchytem frakcí, jako je například velikostně vylučovací chromatografie (Size-Exclusion Chromatography, SEC).

Velmi zajímavé srovnání poskytuje tabulka 14, kde je srovnání mediánu log-normální distribuce Dc a difúzního koeficientu získaného modelem anomální difúze. Výsledky ukazují shodu pro nižší molekulovou hmotnost až do koncentrace $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, kdy se znatelně sníží parametr anomality α a pro poslední dvě hodnoty zůstává stejný. Pokud zůstaneme u myšlenky, že tento parametr definuje nehomogenitu systému, můžeme tímto způsobem interpretovat i data získaná pro hyaluronan s vyšší molekulovou hmotností. V tomto případě je z modelu anomální difúze patrné, že parametr anomality α se snížil na relativně nízkou hodnotu okolo 0,75. Dále se v průběhu měření takřka neměnil, zatímco difúzní koeficient v případě použití tohoto modelu klesal kontinuálně až na téměř pětínovou hodnotu (a na polovinu v porovnání s prvním přídavkem hyaluronanu, stejně jako v případě nižší molekulové hmotnosti).

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

porovnatelné. Při použití log-normálního modelu je stanovený difúzní koeficient medián výsledné distribuce, kdy samotnou neuniformitu systému určuje šířka distribuce.

Tabulka 14: Srovnání mediánu log-normálního distribučního modelu a vyhodnocení difúzního koeficientu modelem anomální difúze.

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

6 ZÁVĚR

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

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

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

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

Dalším krokem bylo otestování správnosti nastavení parametrů měření, různých typů samotného měření a konečných analýz. Pro tyto účely byl zvolen vodný roztok agarózy, který dle své koncentrace vytváří širokou škálu koloidních systémů od viskoelastických kapalin po fyzikálně síťované hydrogely. Tento systém byl zvolen mimo jiné proto, že jeho vlastnosti jsou v literatuře dobře popsány a bylo tedy možné přímé srovnání navrhovaných metod s již dříve publikovanými výsledky. V literatuře je agarózový hydrogel popisován často jako systém s jednou velikostí pórů pro konkrétní koncentraci. Pro jednoduchý popis systému je tato průměrná hodnota dostačující, v této práci byly turbidimetricky stanoveny velikosti pórů až do koncentrace agarózového hydrogelu 4 hm. %. Získané hodnoty korespondovaly s velikostmi uváděnými v člancích (například [37]). Tento popis ale není dostačující, pokud je

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

7 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] GOLDSMITH, Harry L. Microrheology of red blood cell suspensions. In: *Journal of General Physiology*. New York: Rockefeller University Press, 1968, **52**, s. 5. ISSN 0022-1295.
- [2] POKROVSKII, Vladimir N. Microrheology of dispersed systems and polymers. Stress tensor for a suspension of rigid ellipsoids. In: *Colloid Journal - USSR*. New York: Consultants Bureau/Springer, 1968, **30**(6), s. 664.
- [3] MAGDE, Douglas, Elliot ELSON a W. W. WEBB. Thermodynamic Fluctuations in a Reacting System—Measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy. In: *Physical Review Letters*. College Park: American Physical Society, 1972, **29**(11), s. 705-708. [cit. 2020-12-07]. DOI: 10.1103/PhysRevLett.29.705. ISSN 0031-9007. Dostupné také z: <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.29.705>
- [4] *Web of Science* [online]. Toronto: Thomson Reuters, 1997 [cit. 2020-12-28]. Dostupné z: www.webofknowledge.com
- [5] ISHIKAWA-ANKERHOLD, Hellen C. a kol. Advanced Fluorescence Microscopy Techniques—FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules* [online]. 2012, 17(12), 4047-4132 [cit. 2020-12-07]. DOI: 10.3390/molecules17044047. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1420-3049/17/4/4047/>
- [6] VALEUR, Bernard. *Molecular fluorescence: principles and applications*. New York: Wiley-VCH, 2002. ISBN 35-272-9919-X.
- [7] BACIA, K., E. HAUSTEIN a P. SCHWILLE. Fluorescence Correlation Spectroscopy: Principles and Applications. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2014, **2014**(7) [cit. 2020-12-29]. DOI: 10.1101/pdb.top081802. ISSN 1559-6095. Dostupné z: <http://www.cshprotocols.org/cgi/doi/10.1101/pdb.top081802>
- [8] SCHWILLE, Petra a Elke HAUSTEIN. *Fluorescence Correlation Spectroscopy: An Introduction to its Concepts and Applications* [online]. 2001, 1-33 [cit. 2020-12-29]. Dostupné z: <https://pages.jh.edu/~iic/resources/ewExternalFiles/FCSSchwille.pdf>
- [9] BERANOVÁ, Lenka, Jana HUMPOLÍČKOVÁ a Martin HOF. *Fluorescenční korelační spektroskopie*. Chemické Listy [online]. 2009, **103**(2), 125-129 [cit. 2020-12-29]. Dostupné z: http://chemicke-listy.cz/docs/full/2009_02_125-129.pdf
- [10] SymPhoTime64. *PicoQuant: Software* [online]. Berlin [cit. 2020-12-29]. Dostupné z: <https://www.picoquant.com/products/category/software/symphotime-64-fluorescence-lifetime-imaging-and-correlation-software>
- [11] MACHÁŇ, Radek a Martin HOF. Fluorescence Correlation Spectroscopy. In: *PicoQuant* [online]. Berlin [cit. 2020-12-29]. Dostupné z: https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/17319/5_fcs.pdf
- [12] GMACHOWSKI, Lech. Fractal model of anomalous diffusion. *European Biophysics Journal* [online]. 2015, **44**(8), 613-621 [cit. 2024-01-17]. ISSN 0175-7571. Dostupné z: doi:10.1007/s00249-015-1054-5
- [13] KALWARCZYK, Tomasz a spol. Apparent Anomalous Diffusion in the Cytoplasm of Human Cells: The Effect of Probes' Polydispersity. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2017, 2017-10-26, **121**(42), 9831-9837 [cit. 2024-01-17]. ISSN 1520-6106. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jpcc.7b07158
- [14] PAL, Nibedita a spol. Fluorescence Correlation Spectroscopy: An Efficient Tool for Measuring Size, Size-Distribution and Polydispersity of Microemulsion Droplets in Solution. *Analytical Chemistry* [online]. 2011, 2011-10-15, **83**(20), 7736-7744 [cit. 2024-01-17]. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac2012637
- [15] SCHAEFFEL, David a spol. Fluorescence Correlation Spectroscopy in Dilute Polymer Solutions: Effects of Molar Mass Dispersity and the Type of Fluorescent Labeling. *ACS Macro Letters* [online]. 2015, 2015-02-17, **4**(2), 171-176 [cit. 2024-01-17]. ISSN 2161-1653. Dostupné z: doi:10.1021/mz500638e

- [16] THOMAS, John C. The determination of log normal particle size distributions by dynamic light scattering. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 1987, **117**(1), 187-192 [cit. 2024-01-17]. ISSN 00219797. Dostupné z: doi:10.1016/0021-9797(87)90182-2
- [17] MONTEIRO, Michael J. Fitting molecular weight distributions using a log-normal distribution model. *European Polymer Journal* [online]. 2015, **65**, 197-201 [cit. 2024-01-17]. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2015.01.009
- [18] SKILLING, J. a R. K. BRYAN. Maximum entropy image reconstruction: general algorithm. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society* [online]. 1984, 1984-11-01, **211**(1), 111-124 [cit. 2024-01-17]. ISSN 0035-8711. Dostupné z: doi:10.1093/mnras/211.1.111
- [19] SENGUPTA, Parijat a spol. Measuring Size Distribution in Highly Heterogeneous Systems with Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Biophysical Journal* [online]. 2003, **84**(3), 1977-1984 [cit. 2024-01-17]. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/S0006-3495(03)75006-1
- [20] ENDERLEIN, Jörg. Fluorescence correlation spectroscopy (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* [online]. 2013, **85**(5), 999-1016 [cit. 2020-12-29]. DOI: 10.1351/PAC-REP-11-11-17. ISSN 1365-3075. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/pac.2013.85.issue-5/pac-rep-11-11-17/pac-rep-11-11-17.xml>
- [21] ARBOUR, Tyler J. a Jörg ENDERLEIN. Application of dual-focus fluorescence correlation spectroscopy to microfluidic flow-velocity measurement. *Lab on a Chip* [online]. 2010, **10**(10), 1286-1292 [cit. 2020-12-29]. DOI: 10.1039/b924594d. ISSN 1473-0197. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b924594d>
- [22] DERTINGER, Thomas a kol. Two-Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy: A New Tool for Accurate and Absolute Diffusion Measurements. *ChemPhysChem* [online]. 2007, **8**(3), 433-443 [cit. 2020-12-29]. DOI: 10.1002/cphc.200600638. ISSN 14394235. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cphc.200600638>
- [23] DERTINGER, Thomas a kol. Dual-Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy. In: *PicoQuant: Application Note* [online]. Berlin: PicoQuant, 2011 [cit. 2020-12-29]. Dostupné z: https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/7352/appnote_2ffcs.pdf
- [24] FIŠAR, Zdeněk. Fluorescenční spektroskopie v neurověděch. In: *1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy* [online]. Praha, 2006 [cit. 2020-12-29]. Dostupné z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>
- [25] LIVESEY, A.K. a J.C. BROCHON. Analyzing the Distribution of Decay Constants in Pulse-Fluorimetry Using the Maximum Entropy Method. *Biophysical Journal* [online]. 1987, **52**(5), 693-706 [cit. 2020-12-29]. DOI: 10.1016/S0006-3495(87)83264-2. ISSN 00063495. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349587832642>
- [26] BECKER, W. a kol. Fluorescence lifetime imaging by time-correlated single-photon counting. *Microscopy Research and Technique* [online]. 2004, **63**(1), 58-66 [cit. 2020-12-29]. DOI: 10.1002/jemt.10421. ISSN 1059910x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jemt.10421>
- [27] GREGERSEN, Erik. Brownian motion. *Encyclopædia Britannica* [online]. Encyclopædia Britannica, inc., b.r. [cit. 2021-01-03]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/Brownian-motion>
- [28] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 5., přepřac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0579-X.
- [29] AHMED, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. *Journal of Advanced Research* [online]. 2015, **6**(2), 105-121 [cit. 2021-02-01]. DOI: 10.1016/j.jare.2013.07.006. ISSN 20901232. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2090123213000969>
- [30] ARMISÉN, Rafael. Agar and agarose biotechnological applications. *Hydrobiologia* [online]. 1991, **221**(1), 157-166 [cit. 2021-02-01]. DOI: 10.1007/BF00028372. ISSN 0018-8158. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00028372>

- [31] RINAUDO, Marguerite. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International* [online]. 2008, **57**(3), 397-430 [cit. 2021-02-01]. DOI: 10.1002/pi.2378. ISSN 09598103. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pi.2378>
- [32] SNETKOV, Petr a spol. Hyaluronic Acid: The Influence of Molecular Weight on Structural, Physical, Physico-Chemical, and Degradable Properties of Biopolymer. *Polymers* [online]. 2020, **12**(8) [cit. 2024-01-17]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: [doi:10.3390/polym12081800](https://doi.org/10.3390/polym12081800)
- [33] PETERS, Alec a Larry S. SHERMAN. Diverse Roles for Hyaluronan and Hyaluronan Receptors in the Developing and Adult Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(17) [cit. 2024-01-17]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: [doi:10.3390/ijms21175988](https://doi.org/10.3390/ijms21175988)
- [34] KÁBRTOVÁ, P. *Pokročilé mikrореologické techniky ve výzkumu hydrogelů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 63 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.
- [35] MONDEK, J. *Časově rozlišená fluorescence ve výzkumu interakcí hyaluronanu a koloidních systémů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2018. 162 s. Vedoucí dizertační práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
- [36] PAVLÍKOVÁ, Stela. *Vliv velikosti částic na mikrореologické experimenty pomocí fluorescenční korelační spektroskopie*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113579>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Filip Mravec.
- [37] NARAYANAN, Jaaky, Jun-Ying XIONG a Xiang-Yang LIU. Determination of agarose gel pore size: Absorbance measurements vis a vis other techniques. *Journal of Physics: Conference Series* [online]. 2006, 2006-01-01, **28**, 83-86 [cit. 2024-02-14]. ISSN 1742-6588. Dostupné z: [doi:10.1088/1742-6596/28/1/017](https://doi.org/10.1088/1742-6596/28/1/017)

8 ŽIVOTOPIS

Jméno, příjmení: Kateřina Marková
Datum narození: 12. 8. 1994
Adresa: Dornych 306/118, 617 00 Brno
E-mail: Katerina.Markova@vut.cz
Telefon: +420 732 825 483

Vzdělání

2018 – 2024 Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně
Studijní obor: Fyzikální chemie – doktorské studium
Téma práce: Fluorescenční korelační spektroskopie ve studiu vlastností koloidních systémů

2016 – 2018 Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace – magisterské studium
Závěrečná práce: Vnitřní fluorescence bakterií *Cupriavidus necator*

2013 – 2016 Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace – bakalářské studium
Závěrečná práce: pH citlivé fluorescenční sondy

2009 – 2013 Gymnázium Jihlava

Pracovní stáže a zkušenosti

2016 – 2023 Centrum materiálového výzkumu na Fakultě chemické, VUT v Brně – příprava a analýza hydrogelů, operátor fluorescenčního konfokálního mikroskopu

2015 Genetická laboratoř CKTCH – Izolace, analýza a sekvenace bakteriální a houbové DNA a virové RNA

Dovednosti

Anglický jazyk B2
Německý jazyk B1

9 PŘEHLED PUBLIKACÍ A AKTIVIT

9.1 Články v impaktovaném časopise

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

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

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

9.2 Abstrakty

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

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

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

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

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

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

9.3 Přednášky na mezinárodní konferenci

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

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

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

9.4 Postery na mezinárodní konferenci

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

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

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