



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

**VLIV VELIKOSTI ČÁSTIC NA MIKROREOLOGICKÉ
EXPERIMENTY POMOCÍ FLUORESCENČNÍ
KORELAČNÍ SPEKTROSKOPIE**

INFLUENCE OF PARTICLE SIZE ON MICROREOLOGY EXPERIMENTS USING FLUORESCENCE
CORRELATION SPECTROSCOPY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Stela Pavlíková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1279/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Stela Pavlíková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Filip Mravec, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Vliv velikosti částic na mikrореologické experimenty pomocí fluorescenční korelační spektroskopie

Zadání diplomové práce:

- 1) Provést literární rešerši na techniku mikrореologie realizované pomocí fluorescenční korelační spektroskopie.
- 2) Na základě rešerše vybrat vhodná modelová prostředí a velikosti částic společně se spektrálními charakteristikami.
- 3) Provést experimenty s různými částicemi v prostředí o různé viskozitě.
- 4) Na základě výsledků stanovit omezení pro jednotlivé velikosti částic ve vybraných prostředích.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019:

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

Bc. Stela Pavlíková
student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

V tejto diplomovej práci je diskutovaná mikrореológia pomocou metódy fluorescenčnej korelačnej spektroskopie. Ako mikrореologické sondy boli využité fluorescenčne značené častice 5 veľkostí v rozmedzí 10-100 nm v prostredí rôzne koncentrovaných roztokov glycerolu a v agarózových géloch rôznej koncentrácie. Pomocou FCS bol zistený difúzny koeficient jednotlivých častíc v jednotlivých prostrediach, na základe ktorého bola určená viskozita glycerolu, v ktorej dôjde k zastaveniu daných častíc. Častice o veľkosti 10 nm sa nezastavili ani v 100 hm.% glycerole. V agarózových géloch dochádzalo pri kombinácii vyššej koncentrácie agarózy a väčších častíc k nárastu difúzneho koeficientu na nepravdepodobne vysokú hodnotu. Pravdepodobne sa jednalo o autofluorescenciu agarózy a táto hodnota indukuje zastavenie daných častíc v daných agarózovom géle. Ďalej boli dáta z FCS merania prevedené pomocou software MATLAB na MSD krivky. V práci je diskutovaný vplyv jednotlivých experimentálne zistených parametrov na tvar tejto krivky, kedy bolo zistené, že najzásadnejší vplyv má počet častíc a autokorelačná funkcia.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with microrheology measured via the fluorescence correlation spectroscopy. As microrheological probes, fluorescently marked nanoparticles of 5 sizes in the range of 10-100 nm, were used. The particles had been immersed in a variety of concentrated glycerol solutions and agarose gels of different concentrations, and the FCS measurement revealed a diffusion coefficient of individual particles in each environment. Based on the coefficient, the viscosity of the glycerol needed to stop the particles could be determined. Particles of 10 nm size were not stopped even by the 100 wt% glycerol. In the case of the agarose gels, a combination of higher agarose concentration and larger particles resulted in an increase in the diffusion coefficient to an unlikely high value. This was caused probably by an agarose autofluorescence and the value indicates stopping of the particles in the given agarose gel. Later, the data acquired by the FCS measurement were converted to MSD curves using MATLAB software. The thesis discusses the influence of the experimental parameters on the shape of the MSD curve. The results showed that the number of particles and autocorrelation function have the most significant effect.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mikrореológia, FCS, viskoelasticita, MATLAB, MSD, glycerol, agaróza

KEYWORDS

Microrheology, FCS, viscoelasticity, MATLAB, MSD, glycerol, agarose

PAVLÍKOVÁ, Stela. *Vliv velikosti částic na mikroeologické 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.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

Pod'akovanie

Chcela by som poďakovať vedúcemu mojej diplomovej práce, Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D., a konzultantke, Ing. Kateřine Bílkovej, za ich trpezlivosť, čas a ochotu. Ďalej by som rada poďakovala kolegom z laboratória za ich pomoc s jednotlivými metódami a v neposlednom rade mojej rodine a kamarátom za ich podporu a povzbudzujúce slová vždy, keď boli potrebné.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČASŤ	8
2.1	Reológia	8
2.1.1	Newtonovské a nenevtonovské kvapaliny	9
2.1.2	Viskoelastické vlastnosti.....	10
2.2	Brownov pohyb.....	13
2.2.1	Difúzia	14
2.3	Mikroreológia	16
2.3.1	Aktívna mikroreológia	16
2.3.2	Pasívna mikroreológia	16
2.4	Fluorescencia	18
2.4.1	Fluorescenčná korelačná spektroskopia.....	19
2.5	Dynamický rozptyl svetla	20
2.5.1	DLS mikroreológia	22
2.6	Gély.....	22
2.6.1	Hydrogély	23
2.6.2	Agaróza	24
3	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	25
3.1	Súčasný stav riešenej problematiky vo svete.....	25
3.2	Súčasný stav riešenej problematiky na Fakulte chemickej, VUT v Brně.....	26
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	29
4.1	Použité chemikálie	29
4.2	Použité prístroje	29
4.3	Príprava kalibračných roztokov fluorescenčných sond	29
4.4	Príprava vzoriek na meranie	30
4.4.1	Vzorky vo vode.....	30
4.4.2	Vzorky v glycerole.....	30
4.4.3	Vzorky v agaróze	30
4.5	Spektrálna charakterizácia častíc	30
4.6	Overenie veľkosti častíc pomocou DLS	31
4.7	Overenie veľkosti častíc pomocou FCS.....	31
4.8	Meranie FCS	31

4.9	Vyhodnotenie FCS.....	32
4.10	Reologické meranie viskozity určených roztokov glycerolu.....	35
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	36
5.1	Spektrálna charakteristika vybraných častíc.....	36
5.2	Overenie veľkosti častíc.....	37
5.3	Vplyv parametrov, ktoré ovplyvňujú riešenie kubickej rovnice.....	39
5.4	Mikroreologické vlastnosti glycerolu.....	43
5.5	Mikroreologické vlastnosti agarózy.....	49
6	ZÁVER.....	52
7	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV.....	53
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV.....	58
9	PRÍLOHY.....	60

1 ÚVOD

V súčasnej dobe ľudstvo zažíva najväčší rozmach nových materiálov za celú svoju históriu. Využitie nachádzajú nielen v priemysle a strojárstve, ale aj v oblasti, ktorá sa nás bytostne dotýka – a to vo farmácii a medicíne. Medzi takéto materiály patria napríklad hydrogély, ktoré sa využívajú ako scaffoldy či nosiče liečiv. Aby boli tieto materiály bezpečné a fungovali tak, ako je od nich vyžadované, je nesmierne dôležité tieto materiály detailne popísať a preskúmať.

Popis materiálu je možný pomocou reológie, ktorá študuje deformáciu a tok materiálu. Pre túto techniku je nutný objem vzorku v mililitroch, čo môže byť problémom pri charakterizácii materiálov, ktoré je náročné získať vo väčších množstvách. Tento problém rieši technika zvaná mikroreológia. Pojem mikroreológia neoznačuje jednu metódu, ale zahrňuje viacero techník.

Medzi jednu z takýchto techník patrí mikroreológia pomocou fluorescenčnej korelačnej spektroskopie. Táto metóda má svoje základy vybudované už viac ako 12 rokov, kedy **Guigas a spol.** pomocou tejto metódy zisťovali difúzne vlastnosti fluorescenčne značených nanočastíc v živých bunkách [1]. Experimentálny popis tejto metódy priniesol o rok neskôr vo svojej práci **Rathgeber a spol.** [2]. No napriek tomu, že táto metóda už teda nie je najnovšia, patrí medzi málo používané techniky a o jej meraní a vyhodnotení vyšlo len veľmi málo publikácií. Pre ilustráciu, vedecká databáza *Web of Knowledge* na tému kľúčových slov „FCS microrheology“ momentálne eviduje 5 vedeckých publikácií.

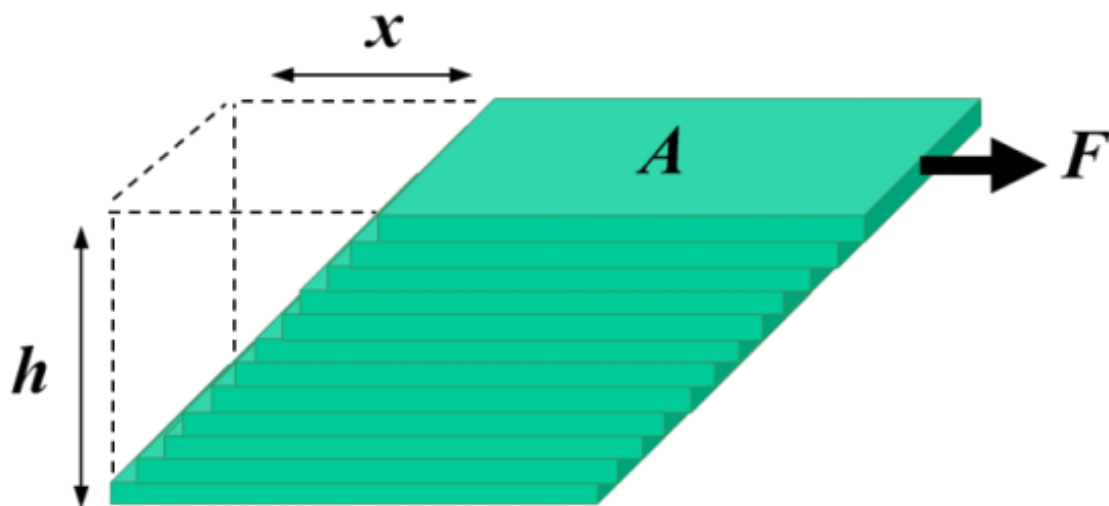
To je približne rovnaký počet, ako počet záverečných prací, ktoré za posledných pár rokov vznikli na túto tému na Fakulte chemickej, VUT v Brně. Prvou prácou bola práca **Petry Kábrtovej**, ktorá porovnávala techniku FCS mikroreológie s DLS mikroreológiou a video-mikroreológiou [3]. Toto porovnanie v rámci svojej práce robil aj **Jakub Mondek** [4] a **Zuzana Hnyluchová** [5]. Všetky tieto práce sa zhodujú v tom, že výhoda FCS mikroreológie voči ostatným dvom metódam je zisk širšieho rozsahu MSD a času a možnosť získať dáta aj v tých oblastiach, v ktorých DLS mikroreológia a video-mikroreológia neposkytujú spoľahlivé výsledky.

Táto práca nadväzuje na predchádzajúce experimenty prebiehajúce na Fakulte chemickej. Vzhľadom k tomu, že v predchádzajúcich experimentoch boli klady FCS mikroreológie už preskúmané, práca sa zameriava na limitácie danej techniky. Sú hľadané obmedzenia pre jednotlivé veľkosti častíc, za ktorými už táto technika nie je použiteľná a zároveň sú v práci diskutované parametre, ktoré majú vplyv na vyhodnotenie dát.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Reológia

Pojem reológia je odvodený od gréckeho slova „rhei“, čo v preklade znamená „tiecť“. Toto označenie bolo pre štúdium deformácie a toku materiálu zavedené v dvadsiatych rokoch minulého storočia americkým fyzikom Eugene Binghamom. História tohto vedného odboru siaha však oveľa ďalej do minulosti. Dala by sa datovať do roku 1678 kedy Robert Hook sformuloval základy klasickej teórie elasticity [6]. V tom istom storočí Isaac Newton venoval svoju pozornosť kvapalinám a vyslovil predpoklad, že odpor, ktorý kladú dve susedné vrstvy kvapaliny vzájomnému pohybu z nedostatku klzkosti je priamoúmerný rýchlosti, s akou sú časti kvapaliny od seba vzájomne oddelené [7]. Nedostatok klzkosti popísaný Newtonom sa v súčasnosti označuje ako viskozita. Predpoklad, ktorý vyslovil, je dnes známy ako Newtonov zákon a znázorňuje ho paralelný doskový model na obrázku 1 [6].



Obrázok 1: Paralelný doskový model [8]

Tento model popisuje rýchlostný tok v kvapaline medzi nepohybujúcou sa (spodnou) a pohybujúcou sa (vrchnou) doskou. Každá vrstva v kvapaline sa pohybuje rýchlejšie ako vrstva pod ňou. Vzďialenosť medzi doskami je h , vrchná doska má plochu A a do pohybu je uvedená silou F . Aby dochádzalo k laminárnemu šmykovému prúdeniu, na kvapalinu musí pôsobiť vonkajšia šmyková sila, ktorá má formu šmykového napätia σ . Definuje ho rovnica (1)

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (1)$$

kde σ je šmykové napätie, F je sila a A je plocha vrchnej dosky.

V reakcii na túto silu sa horná vrstva posunie o vzdialenosť x , zatiaľ čo spodná vrstva ostane na mieste. Gradient tohto posuvu je relatívna deformácia pri namáhaní v šmyku γ (u tuhých látok sa nazýva skos γ), vyjadruje ho rovnica (2)

$$\gamma = \frac{x}{h} \quad (2)$$

kde γ je relatívna deformácia pri namáhaní v šmyku, x je vzdialenosť, o ktorú sa posunie vrchná doska a h je vzdialenosť medzi spodnou a vrchnou doskou.

U tuhých látok bude táto deformácia konečná, ale u tekutín, kde sa zložky môžu pohybovať voči sebe navzájom, sa bude relatívna deformácia zvyšovať s časom. To vytvorí gradient rýchlosti nazývaný rýchlosť šmyku alebo rýchlosť deformácie $\dot{\gamma}$ (3)

$$\dot{\gamma} = \frac{d\gamma}{dt} \quad (3)$$

kde $\dot{\gamma}$ je rýchlosť deformácie a $d\gamma$ podľa dt označuje zmenu relatívnej deformácie v čase.

Koeficient proporcionality medzi šmykovým napätím σ a rýchlosťou deformácie $\dot{\gamma}$ je definovaný ako dynamická viskozita η , ktorá je kvantitatívnym meraním vnútorného trenia kvapaliny a súvisí so stratou kinetickej energie v systéme. Vyjadruje ju rovnica (4)

$$\eta = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}} \quad (4)$$

kde η je dynamická viskozita, σ je šmykové napätie a $\dot{\gamma}$ je rýchlosť deformácie [8].

2.1.1 Newtonovské a neneutronovské kvapaliny

Model znázornený na obrázku 1 platí v prípade newtonovských kvapalín, ktoré sú ideálne viskózne a viskozita je závislá len na teplote. Ich šmykové napätie je definované Newtonovým zákonom viskozity, ktorý popisuje rovnica (5)

$$\tau = \eta \dot{\gamma} \quad (5)$$

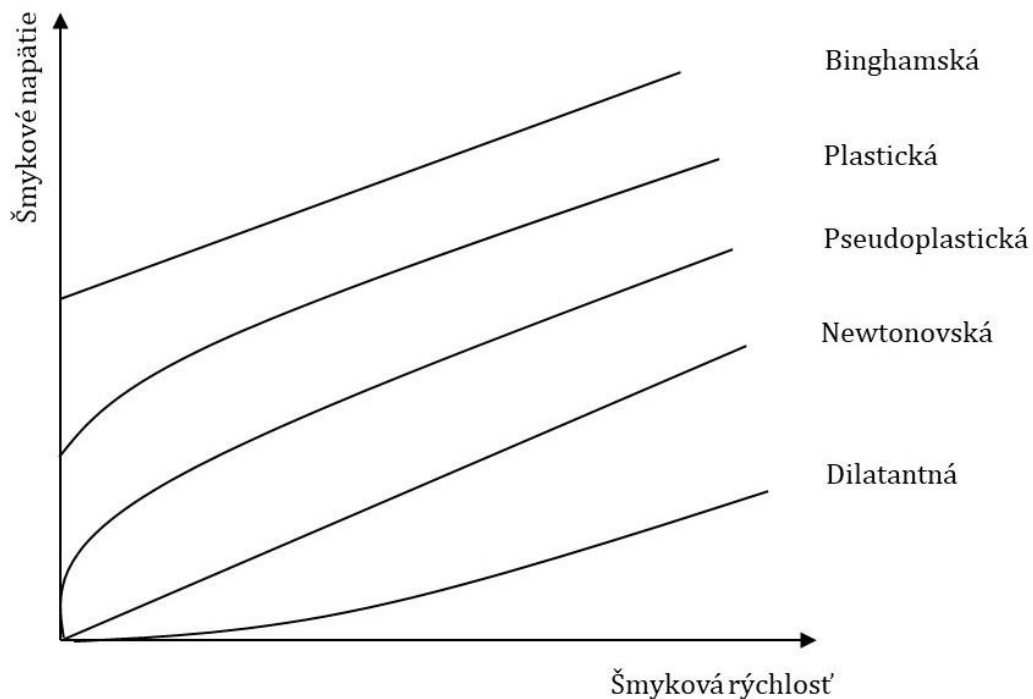
kde súčiniteľ τ je dotyčnicové napätie, η je dynamická viskozita a $\dot{\gamma}$ je rýchlosť deformácie [9].

Kvapaliny, pre ktoré klasický Newtonov zákon viskozity neplatí a ich rýchlosť deformácie nie je priamo úmerná napätiu sa nazývajú neneutronovské kvapaliny. Ich viskozita závisí na aplikovanom strese alebo sile a môže sa meniť s časom. V závislosti na svojich vlastnostiach sa delia na dve hlavné skupiny – na viskoelastické neneutronovské kvapaliny, a na neelastické neneutronovské kvapaliny, ktoré je možné rozdeliť na kvapaliny časovo závislé a časovo nezávislé. U časovo nezávislých neneutronovských kvapalín viskozita na čase nezávisí a nelineárny vzťah medzi šmykovým napätím τ a šmykovou rýchlosťou a $\dot{\gamma}$ sa zapisuje podľa rovnice (6).

$$\tau = f(\dot{\gamma}) \quad (6)$$

Podľa funkčnej závislosti v rovnici (6) sa časovo nezávislé neneutronovské kvapaliny rozlišujú na pseudoplastické kvapaliny, u ktorých viskozita klesá s rýchlosťou deformácie, dilatantné kvapaliny, u ktorých viskozita rastie s rýchlosťou deformácie a Binghamské kvapaliny, ktoré tečú až od určitého napätia.

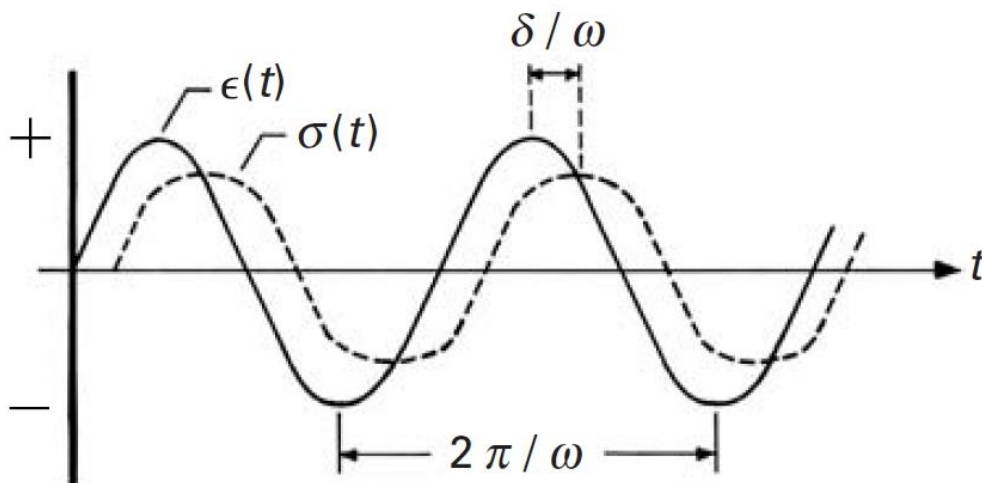
V prípade časovo závislých kvapalín sú vlastnosti kvapaliny závislé na dobe pôsobenia napätia. U tixotropných kvapalín s dobou pôsobenia napätia viskozita klesá, zatiaľ čo u reopexných kvapalín s dobou pôsobenia napätia viskozita rastie [10]. Ilustruje to obrázok 2.



Obrázok 2: Rozdelenie kvapalín na základe závislosti šmykového napätia τ na šmykovej rýchlosti $\dot{\gamma}$

2.1.2 Viskoelastické vlastnosti

Reológia sa zaoberá aj deformáciou tuhých materiálov, aj tokom tekutín, no najmä sa zaoberá správaním komplexných viskoelastických materiálov, ktoré sa po odstránení napätia čiastočne vrátia do pôvodného tvaru. Tie nie sú ani ideálne pevné látky, ani ideálne tekutiny. Patrí medzi ne veľké množstvo reálnych materiálov, najmä materiály s vnútornou štruktúrou tvorenou koloidnými časticami, vláknitými polymérmi či inými supra-molekulovými usporiadaniami. V dôsledku zložitej vnútornej štruktúry sa u týchto materiálov vzťah medzi napätím a deformáciou nedá jednoducho definovať elasticitnými a viskozitnými konštantami. Je funkciou času, smeru a rozsahu deformácie [11].



Obrázok 3: Časová závislosť napätia σ a deformácie ϵ u viskoelastických materiálov [12]

Vzťah medzi napätím a deformáciou sa u viskoelastických látok dá ilustrovať pomocou obrázku 3. Pre ideálne elastický materiál (ideálna pevná látka) je zmena napätia a deformácie harmonická s rovnakou frekvenciou a je vo fáze, čiže fázový posun je $\delta = 0$. Ideálne viskózne materiál (ideálna kvapalná látka) má fázový posun $\delta = 90^\circ$. Z obrázku 3 je možné vyčítať, že fázový posun pre viskoelastický materiál leží v intervale $\delta \in (0, \pi/2)$ [13], pričom 45° predstavuje hranicu medzi vlastnosťami podobnými pevnej a kvapalnej formy. Táto hodnota môže indukovať v géloch bod, v ktorom dochádza k tvorbe siete. Pri práci s polymérnymi systémami je fázový posun často vyjadrený ako stratová tangenta ($\tan \delta$) [8].

Z obrázku 3 je ďalej zrejmé, že deformáciu ε je možné vyjadriť nasledujúcim spôsobom podľa rovnice (7).

$$\varepsilon = \varepsilon_0 \sin \omega t \quad (7)$$

A napätie σ podľa rovnice (8)

$$\sigma = \sigma_0 \sin(\omega t + \delta) \quad (8)$$

kde v oboch rovniciach je ω uhlová frekvencia, t je čas, δ je fázový posun, ε_0 je počiatočná deformácia a σ_0 je počiatočné napätie.

Časť mechanickej energie, ktorá je vložená pri namáhaní do viskoelastických materiálov sa uloží a využije sa pri následnom odľahčení, čo je elastická časť reprezentovaná elastickým modulom E' v komplexnom module pružnosti E^* (resp. G' v komplexnom šmykovom module G^*) a časť sa v nevratnom procese premení v tepelnú energiu, čo charakterizuje stratový modul E'' v komplexnom module pružnosti E^* (resp. G'' v komplexnom šmykovom module G^*) reprezentujúci viskózne vlastnosti materiálu [12] [13].

Elastický modul je možné vyjadriť nasledovne (9),

$$E' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \cos \delta \quad (9)$$

stratový modul obdobne (10)

$$E'' = \frac{\sigma_0}{\varepsilon_0} \sin \delta \quad (10)$$

a nakoniec, komplexný modul pružnosti E^* ma tvar rovnice (11)

$$E^* = E' + iE'' \quad (11)$$

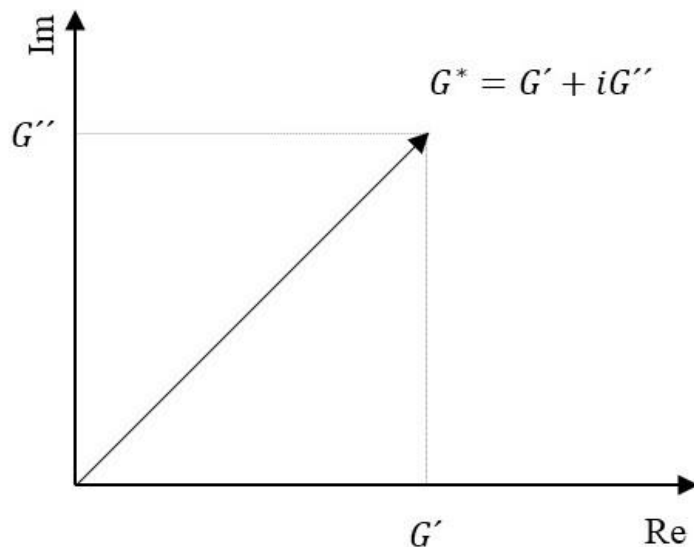
kde i je imaginárna jednotka.

Obdobným spôsobom môže byť odvodený aj komplexný šmykový modul G^* a jeho zložky. Komplexný šmykový modul má potom tvar podľa rovnice (12)

$$G^* = G' + iG'' \quad (12)$$

kde G' je elastický modul, ktoré reprezentuje reálnu časť komplexného šmykového modulu a stratový modul je G'' , ktorý reprezentuje imaginárnu časť tohto modulu [13].

Tento vzťah je možné zobrazit' na Argandovom diagrame (obrázok 4), ktorý umožňuje grafické znázornenie komplexných čísel. Osa x predstavuje reálne čísla a osa y čísla imaginárne, čo umožňuje aby komplexné čísla boli vynesené ako body v rovine definovanej dvoma osami [14].



Obrázok 4: Argandov diagram znázorňujúci vzťah medzi komplexným šmykovým modulom a jeho reálnou a imaginárnou zložkou [8]

S použitím trigonometrie je možné vektorovo znázorniť viskózne a elastické príspevky ako je zobrazené na obrázku 5, z ktorého je možné vyvodit' nasledujúce goniometrické vzťahy. Elastický modul G' je možné vyjadriť pomocou rovnice (13),

$$G' = G^* \cos \delta \quad (13)$$

pre stratový modul G'' platí rovnica (14),

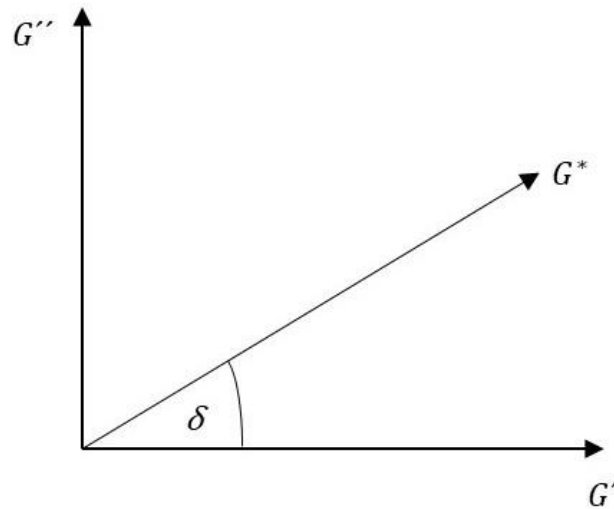
$$G'' = G^* \sin \delta \quad (14)$$

a komplexný šmykový modul G^* je možné za pomoci elastického a stratového modulu vyjadriť nasledovným spôsobom podľa rovnice (15).

$$G^* = \sqrt{(G'^2 + G''^2)} \quad (15)$$

A nakoniec, pre stratovú tangentu $\tan \delta$ platí vzťah (16).

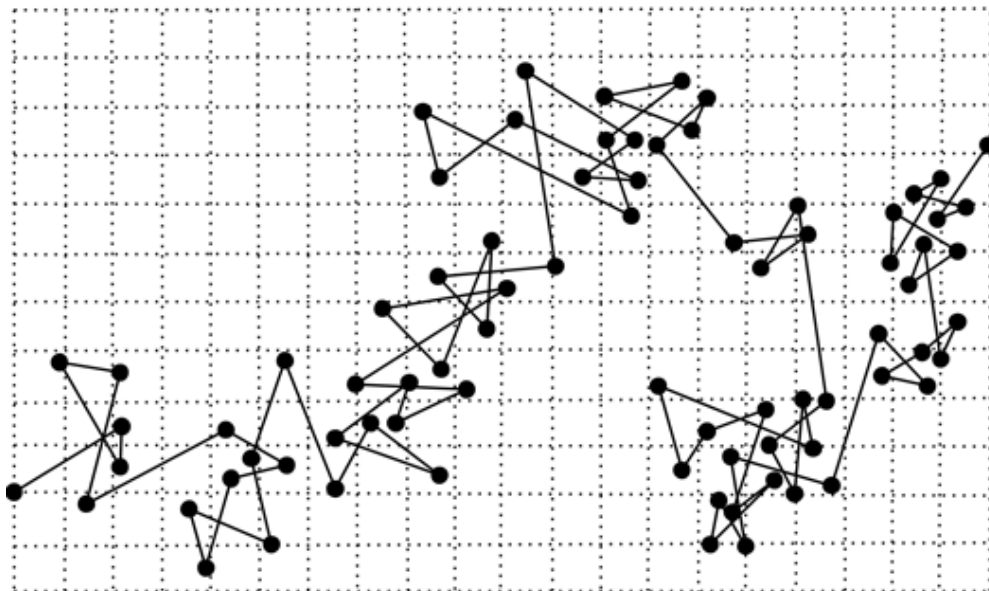
$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad (16)$$



Obrázok 5: Geometrické vzťahy medzi G^* a jej zložkami G' a G''

2.2 Brownov pohyb

Neustálený a neusporiadaný pohyb veľmi malých častíc bol po prvý raz pozorovaný v roku 1827 anglickým botanikom Robertom Brownom, ktorý pod mikroskopom skúmal malé peľové zrnká [15]. Na jeho počesť tento pohyb častíc v mikroheterogénnych a koloidných systémoch dostal názov Brownov pohyb. Tento chaotický termický pohyb, ktorý je prebieha v rôznom smere a rôznou rýchlosťou po zložitej dráhe, je vykonávaný v dôsledku zrážok disperznej častice s veľkým počtom molekúl disperzného prostredia. S rastúcou veľkosťou a hmotnosťou častice sa zvyšuje pravdepodobnosť kompenzácie nárazov, preto častice s väčším efektívnym polomerom ako $4\ \mu\text{m}$ vykonávajú len vibračný pohyb a tepelný pohyb už nie je pozorovateľný [16].



Obrázok 6: Hrubé priblíženie pohybu častíc pri Brownovom pohybe, strana štvorca predstavuje dĺžku $3\ \mu\text{m}$, pričom každá zo zakreslených úsečiek predstavuje približne 10^{23} nepozorovateľných posunutí jednej častice. Navyše sa Brownov pohyb deje v priestore a obrázok zachycuje priemet do roviny zorného pola mikroskopu [17].

Chaotický pohyb častíc neumožňuje stanoviť ich okamžitú rýchlosť, preto je nutné naň použiť štatistický pohľad. Týmto pohľadom sa na Brownov pohyb nezávisle na sebe pozreli v roku 1906 Marian Smoluchowski [18] a chvíľu pred ním, v roku 1905, Albert Einstein vo svojej práci *O pohybe malých častíc suspendovaných v nehybné kvapaline, predpokladanom molekulárne-kinetickej teórii tepla* [19]. Intenzita nepravidelného pohybu s kľukatou trasou je charakterizovaná pomocou zaznamenávania zmeny súradnice častice vo zvolenom smere (posun častice x) v pravidelných časových intervaloch t . Na základe kinetickej teórie je možné vypočítať pravdepodobnosť P pohybu častíc v akomkoľvek smere počas určitého časového intervalu t v médiu, ktorého difúzny koeficient je známy. Pravdepodobnosť je potom určená nasledovne (17)

$$P = \frac{e^{-\frac{x^2}{4Kt}}}{2\sqrt{\pi Kt}} \quad (17)$$

kde P je pravdepodobnosť pohybu častíc v akomkoľvek smere, x je posun častice, t je časový interval a K je konštanta, ktorá má polovičnú hodnotu difúzneho koeficientu prostredia. V grafickom znázornení je možné vyniesť pravdepodobnosť P voči posunu x , vďaka čomu dostaneme Gaussovú krivku, ktorá je typická pre náhodné premenné, ktoré sú súčtom iných nezávislých štatisticky identických náhodných premenných [20].

Matematickými úpravami rovnice (17), ktoré zahrňujú integráciu, je možné dostať nasledujúcu veličinu rozmeru dĺžky, ktorá sa nazýva stredný posun $\langle x^2 \rangle$. Táto veličina je štatistickou charakterizáciou intenzity tepelného pohybu (18),

$$\langle x^2 \rangle^{1/2} = (Kt)^{1/2} \quad (18)$$

kde K je konštanta, ktorá má polovičnú hodnotu difúzneho koeficientu prostredia a t je časový interval [21].

2.2.1 Difúzia

V makroskopickkej mierke sa tepelný pohyb prejavuje ako difúzia. K tomu javu dochádza v dôsledku translačného pohybu častíc v sústavách s koncentračným gradientom. Rýchlosť difúzie je v stacionárnom prostredí vyjadrená difúznym tokom J_i , ktorý je definovaný ako látkové množstvo difundujúcej zložky, ktoré za jednotku času prejde jednotkovou plochou kolmou k smeru difúzie [16].

Ak rovinné koncentračné rozhranie oddeľuje systém o vyššej koncentrácii c_1 na ľavej strane od roztoku o nižšej koncentrácii c_2 na pravej strane, vďaka tepelnému pohybu je v celkovej bilancii zaznamenaný difúzny tok zľava doprava, úmerný rozdielu koncentrácií $c_1 - c_2$. Vzťah medzi intenzitou difúzneho toku a koncentračným spádom vystihuje I. Fickov zákon (19)

$$J_i = -D_i \left(\frac{\delta c}{\delta x} \right) \quad (19)$$

kde x je priestorová súradnica v smere koncentračného spádu, D_i je difúzny koeficient a J_i je difúzny tok [21].

I. Fickov zákon platí v prípade jednorozmernej stacionárnej difúzie. V prípade nestacionárnej difúzie sa koncentračný gradient mení s časom a difúzny tok sa mení s polohou. Popisuje ju II. Fickov zákon, ktorý znázorňuje rovnica (20) [16].

$$D_i \left(\frac{\delta^2 c}{\delta x^2} \right)_t = \left(\frac{\delta c}{\delta t} \right)_x \quad (20)$$

Ako bolo naznačené v kapitole 2.2, medzi difúznym koeficientom, ktorý je mierou rýchlosti difúzie a stredným posunom, ktorý je charakteristikou intenzity tepelného pohybu, je vzájomný vzťah. Matematickými úvahami a následnými úpravami porovnania rovníc (17) a (20) je možné dospieť k jednoduchému vzťahu (21)

$$D_i = \frac{\langle x^2 \rangle}{2t} \quad (21)$$

kde D_i je difúzny koeficient, $\langle x^2 \rangle$ je stredný kvadratický posun a t je časový interval [21].

Ak je možné zanedbať vplyv vonkajších síl a je uvažovaná len difúzia, pôsobí na disperzné častice hybná sila difúzie, čo je gradient chemického potenciálu. Proti nej pôsobí brzdná sila prostredia - trecia sila, ktorá je úmerná rýchlosti pohybu častice. Akonáhle sa tieto sily vyrovnajú, nastáva ustálený stav. Z rovnosti týchto dvoch síl v ustálenom stave dostaneme Einsteinovu rovnicu pre difúzny koeficient (22)

$$D_i = \frac{k_B T}{f_i} \quad (22)$$

kde k_B je Boltzmanova konštanta, ktorá ma hodnotu $1,381 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$, T je termodynamická teplota a f_i je frikčný koeficient, ktorý závisí na teplote, rozmeroch a tvare častíc a na vlastnostiach disperzného prostredia. V systéme s izometrickými časticami je ho možné vyjadriť Stokesovou rovnicou (23)

$$f_i = 6\pi\eta_0 r_i \quad (23)$$

kde r_i je polomer častice a η_0 je viskozita disperzného prostredia [16].

Spojením rovnice (22) a (23) je možné dostať známu Stokes-Einsteinová rovnicu (24)

$$D_i = \frac{k_B T}{6\pi\eta_0 r_i} \quad (24)$$

kde k_B je Boltzmanova konštanta, T je termodynamická teplota, r_i je polomer častice a η_0 je viskozita disperzného prostredia [16].

Rastúca závislosť difúzneho koeficientu na teplote je spôsobená dvoma dôvodmi. Prvým dôvodom je, že difúzia je dôsledkom tepelného pohybu a jej hybná sila je rovná súčinu $k_B T$. Druhým dôvodom je klesajúci trend viskozity kvapalného disperzného prostredia v závislosti na teplote. Vzhľadom k rovnici (21) je tieto závery možné aplikovať aj na stredný posuv [21].

Na základe jednouchého vzťahu v rovnici (21) je možné následne dospieť k Einstein-Smoluchowského rovnici (25), ktorú nezávisle na sebe objavili Einstein (1905) a Smoluchowski (1906)

$$\langle x^2 \rangle = \sqrt{\frac{k_B T t}{3\pi\eta_0 r_i}} \quad (25)$$

kde k_B je Boltzmanova konštanta, T je termodynamická teplota, t je časový interval, r_i je polomer častice a η_0 je viskozita disperzného prostredia [16].

2.3 Mikroreológia

Reologické merania síce poskytujú radu dôležitých informácií o materiáli, no nie sú vhodné pre všetky systémy. Pre tieto merania je potrebný objem vzorku v mililitroch, čo môže byť problém pri meraní vzácnych materiálov a biologických vzoriek, ktoré je ťažké získať vo väčších množstvách. Okrem toho, konvenčné reometre neumožňujú lokálne meranie v nehomogénnych systémoch. Na riešenie týchto problémov vznikla nová trieda technik - mikroreológia [22].

Všeobecným princípom mikroreológie je využitie mechanickej sondy čo najmenších rozmerov, ktorá deformuje médium. Typicky sa ako sondy používajú chemicky inertné sférické častice s priemerom od stotín mikrometra až do niekoľkých mikrometrov. Tieto sondy v spojení s mikroskopickými technikami s vysokým rozlíšením umožňujú meranie reologických vlastností v mikrometrickej mierke. Mikroreologické techniky je možné rozdeliť na metódy, ktoré zahŕňajú aktívnu manipuláciu sondou vo vzorku (aktívna mikroreologia) a metódy, ktoré využívajú Brownov pohyb sond vo vzorke (pasívna mikroreologia) [23].

2.3.1 Aktívna mikroreológia

Aktívne mikroreologické metódy vyžadujú zložitejšie prístrojové vybavenie ako pasívne metódy, ale sú univerzálnejšie. Umožňujú meranie tvrdších vzoriek a vzoriek s nelineárnou reologickou odozvou [11]. Časticami sondy je aktívne manipulované prostredníctvom magnetických polí, elektrických polí alebo mikromechanických síl. Princíp merania je obdobný ako pri klasickej reológii – na vzorku pôsobí vonkajšie napätie a zmeria sa výsledná deformácia. Rozdiel je v tom, že sonda deformuje materiál len lokálne a získa sa lokálna viskoelastická odozva [22]. Namerané dáta je potom možné previesť na komplexný šmykový modul pomocou integrálnych transformácií [11].

História tejto techniky siaha do dvadsiatyh rokov minulého storočia, kedy Freundlich a Seifriz študovali vlastnosti želatíny za použitia malých magnetických častíc [24]. Medzi prvými metódami, ktoré boli využívané patrila mikropipetová aspirácia, ktorá bola neskôr rozvinutá tak, aby zahŕňala aj časovo závislé efekty. Ďalej sa v tejto oblasti využíva kvantitatívna metóda tečenia a magnetická krútiaca cytometria. Využívajú sa aj optické pinzety a mikroskopia atomárnych síl [11].

2.3.2 Pasívna mikroreológia

Pasívne metódy sú v porovnaní s aktívnymi metódami vhodnejšie pre mäkkšie materiály, sú ľahko kalibrovateľné a dá sa pri ich meraní využiť veľké množstvo nástrojov [11]. Na rozdiel od aktívnych mikroreologických techník, ktoré merajú odozvu na externú hnaciu silu, pasívne merania využívajú na meranie reologických vlastností iba tepelnú energiu vložených častíc, ktorá je určená $k_B T$. Materiály pre toto meranie musia byť preto dostatočne mäkké, aby bol pohyb vnorených častíc detekovateľný len s ich energiou $k_B T$ [22].

Tepelný pohyb sondy závisí v homogénnom elastickom médiu od tuhosti lokálneho mikroprostredia. Rovnosťou tepelnej energie sondy o polomere a s elastickou energiou, ktorá je potrebná na deformáciu materiálu s elastickým modulom G' je možné dostať nasledujúcou rovnicu (26)

$$\frac{k_B T}{a^3} = \frac{G' L^2}{a^2} \quad (26)$$

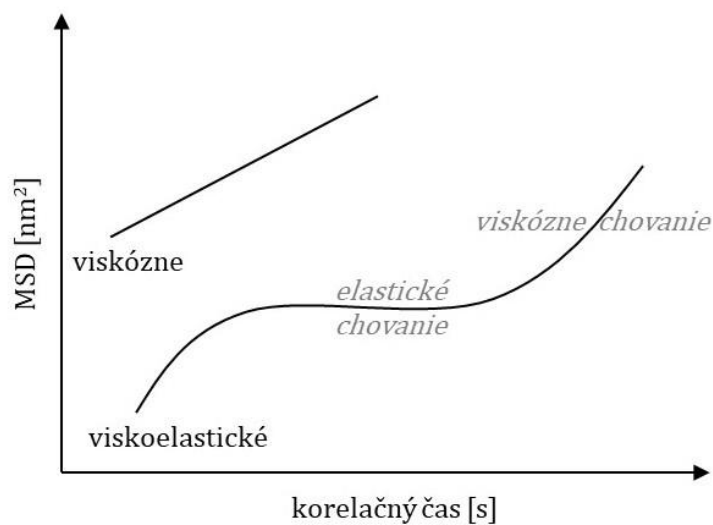
kde k_B je Boltzmanova konštanta, T je termodynamická teplota, a je polomer sondy, G' je elastická zložka modulu pružnosti a L značí dĺžku posunu. Vzhľadom k tomu, že pre väčšinu materiálov používaných na tieto merania, nie je možné výrazne meniť teplotu, vrchná hranica elastického modulu G' , ktorú je možné merať, závisí od veľkosti vlozenej sondy a od rozlišovacej schopnosti konkrétnej metódy rozlišovať dĺžku posunu jednotlivých častíc L . Väčšina používaných metód dokáže rozlíšiť posun v rozsahu 1 Å až 10 nm, čo umožňuje na meranie využiť častice o veľkosti mikrónov a s modulom pružnosti 10 až 500 Pa [22].

Pohyb jednotlivých častíc v čase popisuje korelačná funkcia, ktorá nesie názov stredná hodnota štvorca posunu MSD. Táto funkcia je definovaná pomocou rovnice (27)

$$MSD = \langle [\vec{x}(t + \tau) - \vec{x}(t)]^2 + [\vec{y}(t + \tau) - \vec{y}(t)]^2 + [\vec{z}(t + \tau) - \vec{z}(t)]^2 \rangle \quad (27)$$

kde τ je oneskorenie, t je časový interval a \vec{x}, \vec{y} a \vec{z} reprezentujú polohu častice [25].

Závislosť MSD častíc na čase závisí od povahy materiálu. Ak je materiál čisto viskóznym, závislosť MSD na čase je lineárne rastúca so sklonom jedna v grafickom znázornení. Na rozdiel od toho, v elastických materiáloch MSD s časom nevykazuje žiadne zvýšenie a len kolíše okolo určitej rovnovážnej polohy. Viskoelastické materiály sa pohybujú medzi týmito dvoma prípadmi a ich sklon v grafickom vyjadrení je v rozmedzí nula až jedna. Tieto materiály často vykazujú odlišné viskoelastické vlastnosti v rôznych časových intervaloch, takže sklon takéhoto grafu sa môže meniť v celom experimentálne pozorovanom rozsahu [25]. Graficky to znázorňuje obrázok 7.



Obrázok 7: Ukážka príkladu MSD pre viskóznym a viskoelastickým materiál

Častice vložené do čisto viskózneho prostredia majú MSD definované nasledovne (28)

$$MSD = 2dD_i\tau \quad (28)$$

kde d je dimenzia, D_i je difúzny koeficient a τ je časová odchýlka. Difúzny koeficient je možné vyjadriť podľa Stokes-Einsteinovej rovnice (24), ktorá je popísaná v kapitole 2.2.1 [25].

MSD častíc vložených do viskoelastického média má voči difúznemu koeficientu zložitejší vzťah. Na vyjadrenie môže byť použitá zovšeobecnená Stokes-Einsteinova rovnica (29), ktorá zohľadňuje viskoelasticitu takéhoto materiálu ako viskozitu závislú na frekvencii

$$\tilde{G}(s) = \frac{k_B T}{\pi a s \langle \Delta \vec{x}^2(s) \rangle} \quad (29)$$

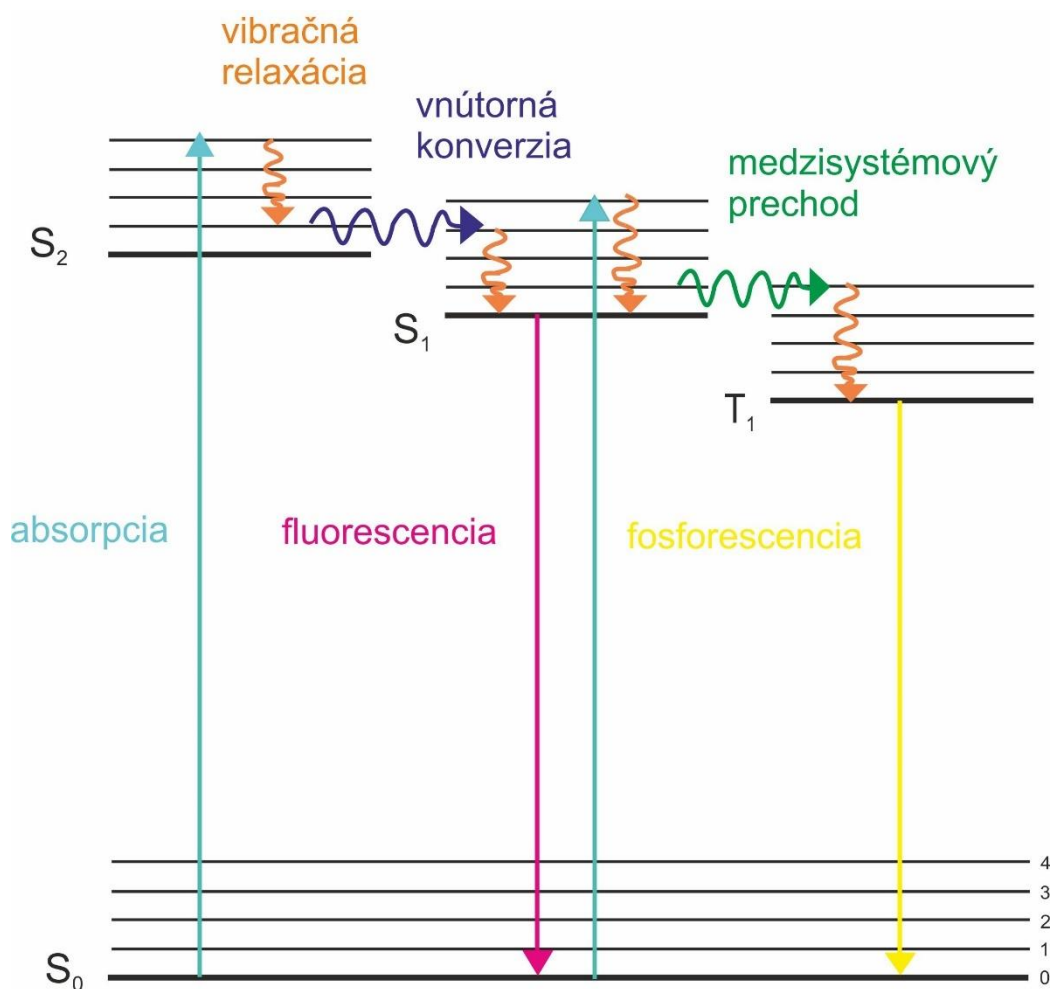
kde $\langle \Delta \vec{x}^2(s) \rangle$ je Laplaceová transformácia MSD, $\tilde{G}(s)$ je viskoelastické spektrum, s je Laplaceová frekvencia, T je termodynamická teplota a k_B je Boltzmanova konštanta [25].

2.4 Fluorescencia

Fluorescencia je typ luminiscencie, ktorý je spôsobený absorpciou elektromagnetického žiarenia molekulou v základnom singletovom stave S_0 . Po absorpcii fotónov sa zmení energetický stav molekuly. Molekula prejde do excitovaného singletového stavu S_1 , v ktorom je elektrón v excitovanom orbitály spárovaný s druhým elektrónom nadchádzajúcim sa v orbitály základného stavu. Nedochádza teda ku zmene spinu elektrónov. Tieto prechody sú z kvantovo-mechanického hľadiska dovolené, v dôsledku čoho je návrat do základného stavu rýchly. Dochádza k nemu emisiou fotónu o nižšej energii, ako mal fotón prijatý pri absorpcii [26].

Pri prechode do vyššieho energetického stavu môže dôjsť ku zmene multiplicity spinov. V tom prípade reč už nie je o fluorescencii, ale o fosforescencii. Molekula sa nachádza v excitovanom tripletovom stave T_1 , v ktorom majú elektróny rovnaký spin a prechod na základnú hladinu S_0 je z hľadiska kvantovej mechaniky nedovolený. Molekula preto môže zostať v excitovanom stave po dlhšiu dobu a fosforescencia má tak dlhší dosvit [27].

Okrem fosforescencie a fluorescencie, pri absorpcii fotónov môže dochádzať aj k nežiarivým deaktiváčnym procesom. Molekula fluoroforu sa po excitácii svetlom vhodnej vlnovej dĺžky nachádza v jednej z mnohých vibračných hladín v niektorom možnom excitovanom singletovom stave S_n . To, ktorý excitovaný singletovaný stav elektrón obsadí, závisí od pravdepodobnosti prechodu a excitačnej vlnovej dĺžky. Po excitácii na vyšší excitovaný stav S_n molekuly relaxujú prostredníctvom vnútornej konverzie na vyšší vibračný stav prvého excitovaného singletového stavu S_1 . Potom nastáva vibračná relaxácia, čo je prechod elektrónu na najnižšiu vibračnú hladinu, pri ktorom molekula vyžiari energiu vo forme tepla. V závislosti od molekulárnej štruktúry môže následne dôjsť k spontánnej emisii fluorescenčného fotónu a k prechodu elektrónu na základnú singletovú hladinu S_0 . Alebo môže dôjsť k medzisystémovému prechodu, pri ktorom dôjde k prechodu elektrónu z excitovaného singletového stavu S_1 do excitovaného tripletového stavu T_1 , ktorý ma nižšiu energiu. Pri tomto prechode dochádza ku zmene spinu elektrónu a návrat na základnú singletovú hladinu S_0 je buď prostredníctvom fosforescencie alebo oneskorenej fluorescencie, kedy sa elektrón z tripletového stavu vráti do excitovaného singletového stavu a odtiaľ na základnú singletovú hladinu [28]. Tieto popísané procesy sú znázornené na Jablonskiho diagrame na obrázku 8.



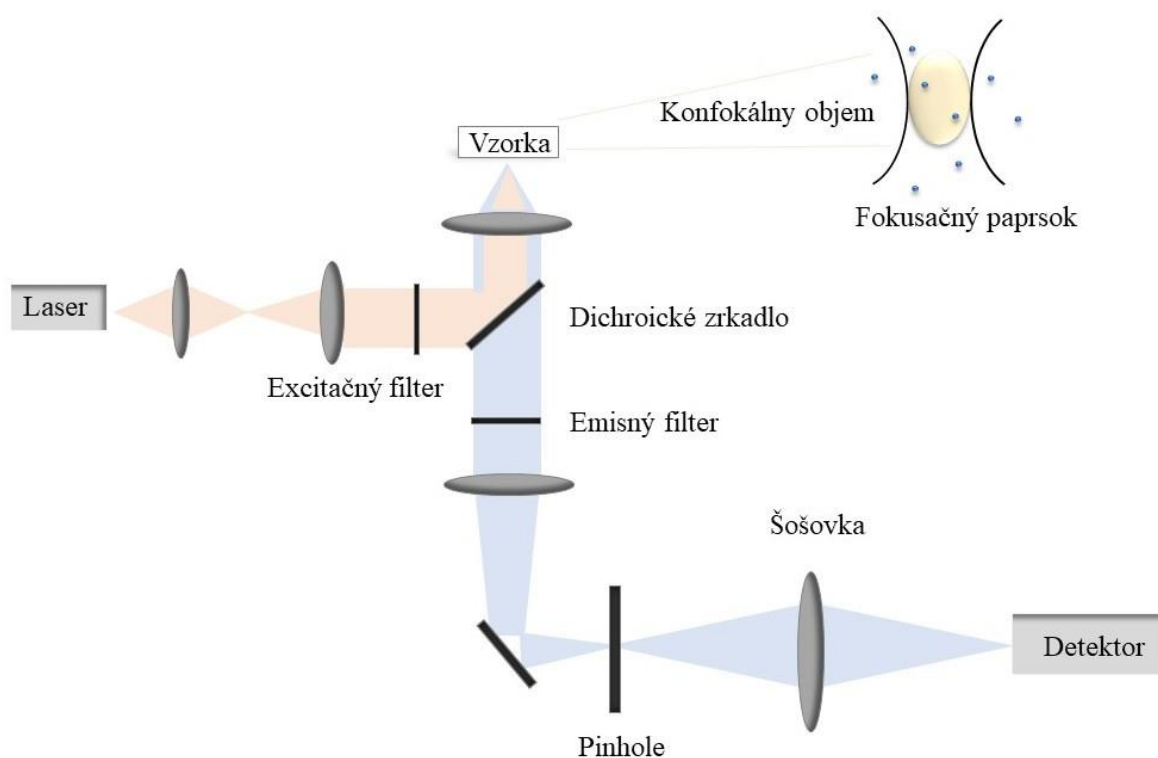
Obrázok 8: Jablonskiho diagram schematicky zobrazuje energetické stavy v molekule a procesy, ktorými molekula prechádza jednotlivými stavmi. S_0 označuje základný singletový stav, S_1 a S_2 sú excitované singletové stavy a T_1 je excitovaný tripletový stav.

2.4.1 Fluorescenčná korelačná spektroskopia

Fluorescenčná korelačná spektroskopia (FCS) je technika založená na zaznamenávaní a analyzovaní časovej fluktuácie intenzity fluorescence emitovanej fluoroforom. Zo získaných dát je možné stanoviť fyzikálne a chemické parametre, ako napríklad translačný difúzny koeficient, prietokovú rýchlosť, chemické rýchlostné konštanty, rotačný difúzny koeficient či molekulové hmotnosti [29].

Pri meraní FCS sa sníma signál z malej ohniskovej oblasti – konfokálneho objemu, ktorý je približne 1 femtoliter. Vzhľadom k tomu, že na toto meranie sa využívajú vzorky s rádovo nanomolárnou koncentráciou, v tomto objeme sa priemerne nachádza jedna fluoreskujúca molekula. Vďaka tomu sa na fluktuácii signálu výrazne prejaví to, ako molekuly termálnym pohybom prejdú cez konfokálny objem. Tento signál je potom podrobený štatistickej analýze, z ktorej je možné určiť napríklad priemernú dobu, ktorú molekula strávila v konfokálnom objeme, difúzny koeficient a koncentráciu danej látky [30].

Na meranie FCS sa využíva konfokálny mikroskop. Jeho schéma je znázornená na obrázku 9. Ako zdroj excitačného žiarenia sa používa laser o vhodnej vlnovej dĺžke. Toto excitačné žiarenie je pomocou dichroického zrkadla nasmerované do objektívu. Vzhľadom k tomu, že väčšinou sa používajú vzorky vo vodnom prostredí, objektív sa zvyčajne používa s vodnou imerziou a s vysokou numerickou aparatúrou, vďaka čomu je žiarenie zaostrené na difrakčne obmedzený bod. Emitované žiarenie je zberané tým istým objektívom a prechádza opäť cez dichroické zrkadlo a emisný filter. Následne prechádza cez pinhole, ktorá efektívne blokuje akýkoľvek fluorescenčný signál, ktorý pochádza mimo ohniskovú oblasť, čím obmedzuje konfokálny objem aj v axiálnom smere. Emitované žiarenie je potom nasmerované na detektor, ktorý sníma signál [31].



Obrázok 9: Znázornenie konfokálneho objemu a schematické znázornenie konfokálneho mikroskopu, kedy oranžovou je znázornené excitačné žiarenie, modrou emisné

2.5 Dynamický rozptyl svetla

Dynamický rozptyl svetla (DLS) alebo tiež nazývaný kvázielastický rozptyl svetla (QELS) je neinvazívna technika vhodná pre meranie veľkosti častíc v submikrónovej oblasti. Princípom je meranie fluktuácie intenzity rozptýleného svetla z laserového zdroja okolo priemernej hodnoty daného vzorku [32]. Monochromatické dopadajúce svetlo bude podliehať javu zvanému Dopplerovo rozšírenie, pretože častice sa neustále pohybujú termálnym Brownovým pohybom. V dôsledku toho je rozptýlené žiarenie v interferencii – buď je v deštruktívnej fáze a navzájom sa vyruší alebo v konštruktívnej fáze a vytvorí detekovateľný signál [33]. Čím rýchlejšie sa častice pohybujú, tým je zmena intenzity rozptylného svetla rýchlejšia. Rýchlosť týchto zmien je teda priamo závislá na pohybe molekuly [32].

Z fluktuácie intenzity rozptýleného svetla je možné získať autokorelačnú funkciu, z ktorej je následne možné dostať difúzny koeficient a z neho prostredníctvom Stokes-Einsteinovej rovnice informáciou o veľkosti. Dolný limit veľkosti je niekoľko nanometrov a závisí na šume v signály, horný limit je niekoľko mikrometrov a je určený sedimentáciou častíc [34].

Korelačná funkcia opisuje pohyb skúmaných molekúl a môže byť vyjadrená nasledovne (30)

$$g_2(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (30)$$

kde $g_2(\tau)$ označuje korelačnú funkciu, I značí intenzitu, t značí dobu trvania a τ označuje časovú odchýlku. Zátvorky označujú priemerovanie vlastnosti počas doby trvania experimentu t [33]. Pri veľkej časovej odchýlke τ sú $I(t)$ a $I(t + \tau)$ na sebe nezávislé, zatiaľ čo pri veľmi krátkom časovom oneskorení τ závislé sú [35].

V typickom DLS experimente však nie je možné presne rozoznať pohyb jednotlivých častíc v roztoku, preto sa pohyb častíc voči sebe koreluje pomocou funkcie korelácie elektrického poľa $g_1(\tau)$. Táto korelačná funkcia môže byť pomocou Siegertovho vzťahu prepojená s rovnicou (30) na základe aproximácie, že fotodetektor sníma len rozptýlené žiarenie a že počítanie fotónov je náhodným Gaussovým procesom. Rovnica (31) má tvar

$$g_1(\tau) = B + \beta |g_1(\tau)|^2 \quad (31)$$

kde B je baseline, β je koherenčný faktor, ktorý závisí na vlastnostiach detektora a skúmaných molekúl, a $g_1(\tau)$ je funkcia korelácie elektrického poľa [33].

V prípade guľovitých častíc rovnakej veľkosti je možné korelačnú funkciu vyjadriť v exponenciálnom tvare (32)

$$g(\tau) = \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_c}\right) \quad (32)$$

kde parameter $g(\tau)$ je korelačná funkcia, τ je časová odchylka a τ_c je parameter úmerný difúznemu koeficientu D_i častíc, ktorý je možné vyjadriť nasledovne (33)

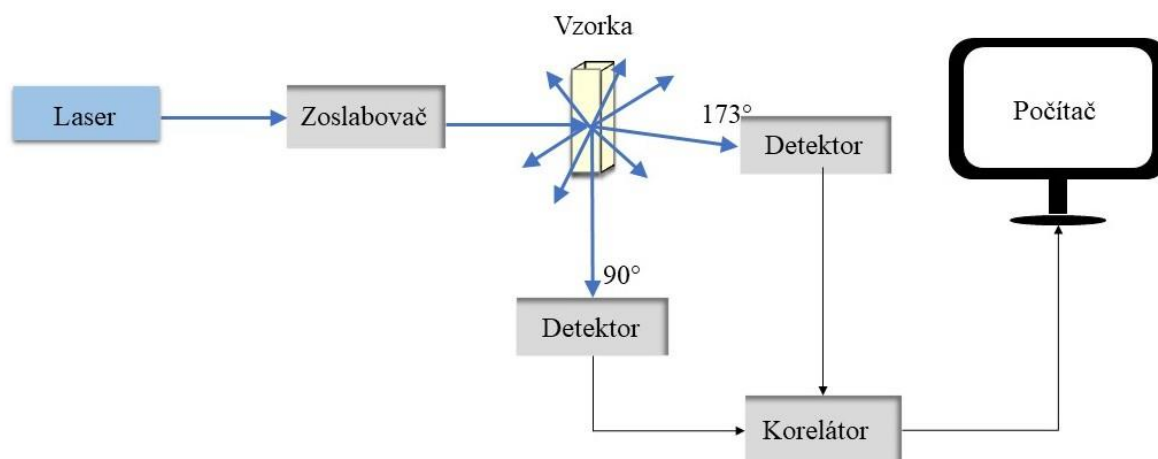
$$\tau_c = \frac{1}{2} D_i Q \quad (33)$$

kde D_i je difúzny koeficient a Q je vlnový vektor. Grafickým vynesением $\ln g(\tau)$ proti τ je možné získať τ_c . Následne je možné dostať za použitia Stokes-Einsteinovej rovnice hydrodynamický polomer častíc R (34)

$$R = \frac{k_B T}{6\pi\eta} Q^2 \tau_c \quad (34)$$

kde R je hydrodynamický polomer, k_B je Boltzmanova konštanta, T je termodynamická teplota, η je viskozita prostredia, Q je vlnový vektor a τ_c je parameter úmerný difúznemu koeficientu.

Pri meraní DLS sa meria τ_c pri rôznych uhloch rozptylu (rôzne hodnoty Q) a vynáša sa $1/\tau_c$ proti Q^2 , odkiaľ je možné získať difúzny koeficient a následne hydrodynamický polomer [35]. Experimentálne usporiadanie pre metódu DLS je zobrazené na obrázku 10.



Obrázok 10: Experimentálne usporiadanie pre meranie DLS

2.5.1 DLS mikroreológia

DLS je predchodcom dnešnej mikroreológie. Veľká časť teoretických aj praktických základov mikroreológie je odvodená od techniky rozptylu svetla. Meranie rozptýleného svetla je možné využiť na získanie dát o viskozite aj elastickej module daného viskoelastického materiálu [36].

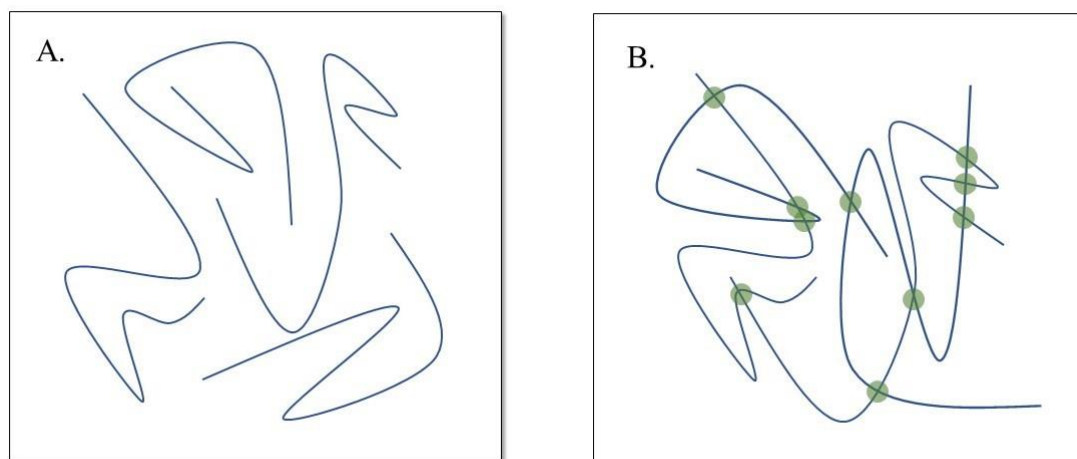
Patrí medzi pasívne techniky, kedy častice koloidnej sondy podliehajú tepelným výkyvom v systéme pri termodynamickej rovnováhe. DLS sleduje MSD sondy v čase, vďaka čomu je možné získať lineárne viskoelastické parametre. Táto metóda je vhodná pre látky s nízkou viskozitou, či pre materiály so slabou vnútornou štruktúrou. Meranie mikroreológie pomocou DLS je použiteľné pre transparentné až jemne zakalené vzorky, kedy je zachovaný rozptyl svetla z dispergovaných častíc. Meranie nepriehľadných vzoriek je možné za pomoci difúznej vlnovej spektroskopie (DWS), ktorá je možná aj pri viacnásobnom rozptyle svetla [37].

Na to, aby meranie DLS mikroreológie bolo správne, je potrebné minimalizovať niektoré javy, ku ktorým môže počas experimentu dochádzať. Patrí k nim interakcia medzi časticami a prostredím, ktorá môže ovplyvniť difúziu častíc alebo môže lokálne zmeniť materiálové prostredie. Veľmi dôležité je aj vybrať vhodnú veľkosť častíc, aby nedochádzalo k sedimentácii častíc. V meraní materiály by nemali dochádzať k zmenám v štruktúre a nie je ani ideálne merať DLS mikroreológiu v okolí bodu zgelovania, nakoľko je táto technika citlivá na určité tohto bodu [37].

2.6 Gély

Gélom sa nazýva trojrozmerná makromolekulárna sieť, ktorá vytvára súvislú štruktúru, ktorá prestupuje celým disperzným prostredím. Spojité je nielen disperzné prostredie, ale aj disperzný podiel. Sieť vzniká ak sa medzi makromolekulami lineárneho polyméru vytvorí dostatočný počet spojov. Tieto spoje, nazývané aj uzly siete, môžu vzniknúť dvoma spôsobmi a podľa toho

sa delia aj na dve kategórie. Fyzikálne sieťované gély vznikajú pôsobením fyzikálnych síl (polárne sily, vodíkové väzby, apod.). Úseky polymérnych reťazcov sa spájajú do uzlových oblastí, ktoré sa nevytvárajú na koncoch reťazcov, ale medzi ľubovoľnými úsekmi, vďaka čomu jedna makromolekula môže byť zapojená do niekoľkých uzlových oblastí. Druhou možnosťou vzniku sú chemické reakcie. Gély, ktoré takto vznikajú sa nazývajú kovalentne sieťované gély. Môžu vznikáť nelineárnou kondenzačnou alebo adičnou polymeráciou monoméru alebo z lineárnych polymérov zosieťovaním za prítomnosti vhodného sieťovacieho činidla. Štruktúra takéhoto gélu je veľmi pevná [16] [21].



Obrázok 11: A. nezosieťované polymérne reťazce B. trojrozmerná sieť, v ktorej došlo k vytvoreniu uzlov (zelenou) fyzikálnym sieťovaním

2.6.1 Hydrogély

Podľa povahy disperzného prostredia je možné rozlíšiť rôzne typy gélov. Systém s kvapalným prostredím sa nazýva lyogél, jeho vysušením vzniká xerogél. Podľa typu kvapalného prostredia je možné lyogély rozdeliť na organogély a hydrogély [16]. Hydrogélom sa nazýva hydrofilný gél, ktorý obsahuje sieť polymérnych reťazcov, ktorých disperzným prostredím je voda. Má schopnosť napučať a zadržať významnú časť vody vo svojej štruktúre, no pritom sa vo vode nerozpúšťa. Vďaka vysokému obsahu vody je podobne flexibilný ako tkanivo, čo vedie k značnému záujmu o tento materiál [38]. Schopnosť hydrogélom absorbovať vodu je podmienená prítomnosťou hydrofilných funkčných skupín (napríklad alkoholy, karboxylové kyseliny či amíny), pripojených k polymérnej kostre. Odolnosť voči vode vzniká krížovými väzbami medzi sieťovými reťazcami [39].

Hydrogély môžu byť rozdelené do dvoch kategórii – prírodné a syntetické. Prírodné hydrogély zahŕňajú kolagén, fibrín, kyselinu hyalurónovú a deriváty prírodných materiálov ako napríklad chitosan a alginát. Nevýhodou prírodných hydrogélom je ťažká reprodukovateľnosť ich konečných mikroštruktúr a vlastností. To je spôsobené tým, že ich mechanické vlastnosti veľmi závisia na podmienkach polymerizácie a vzhľadom k ich prírodnému pôvodu, ich zloženie sa môže líšiť dávku od dávky. Syntetické polyméry, ktoré vo svojej štruktúre obsahujú napríklad polyetylén glykol, polyakrylamid či polyvinylalkohol sú ľahšie reprodukovateľné, aj keď ich konečná štruktúra tiež závisí od podmienok polymerizácie. Syntetické hydrogély majú

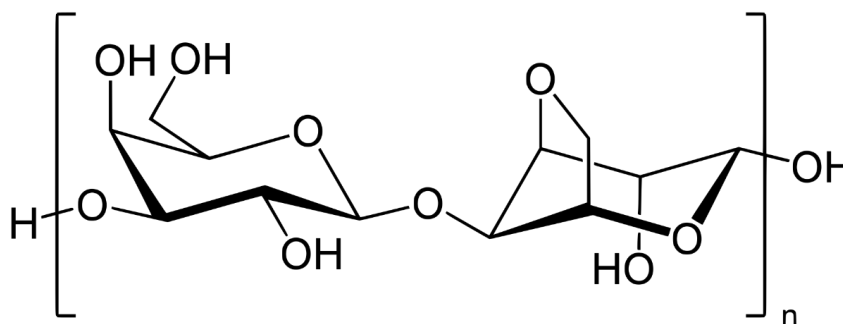
oproti prírodným ešte ďalšiu výhodu a tou je to, že je jednoduchšie prispôbiť ich vlastnosti podľa požadovaných aplikácií – dá sa meniť koncentrácia či molekulová hmotnosť polyméru [40].

Či už sú polyméry prírodného alebo syntetického pôvodu, mali spĺňať určité fyzikálno-chemické predpoklady, ktoré ich predurčujú k širokému využitiu v rôznych priemyselných odvetviach ako napríklad oblasti čistenia vody, vývoji senzorov, odstraňovaní znečisťujúcich látok, poľnohospodárstve, potravinárstve, farmácii či biomedicíne. Medzi vlastnosti, ktoré by mali tieto molekuly spĺňať patrí hydrofilnosť, mechanická pevnosť, želatínovanie, pórovitosť a v prípade biologických aplikácií aj biokompatibilita a biologická odbúrateľnosť [39].

2.6.2 Agaróza

Polysacharidy izolované z rias vďaka svojim jedinečným vlastnostiam hrajú čím ďalej, tým dôležitejšiu rolu v rôznych oblastiach biotechnológie. Medzi významné polysacharidy izolované z rias patrí agaróza, ktorá má celú radu výnimočných vlastností. Je možné ju pripravovať opakovane s rovnakými vlastnosťami, je teoreticky chemicky neutrálna a už pri nízkych koncentráciách vytvára hydrogély. Najvýznamnejším komerčným zdrojom agarózy sú v súčasnosti červené riasy Rhodophyta [41].

Agarózu tvorí lineárny reťazec striedajúcich sa podjednotiek β -D-galaktopyranózy spojených prostredníctvom $\alpha(1,3)$ -glykozidickej väzby a zvyškov 3,6-anhydro- α -L-galaktopyranózy naviazaných $\beta(1,4)$ -glykozidickou väzbou [42]. Hoci bola agaróza dlho považovaná za neutrálnu molekulu, ani najlepšie analytické metódy nepotvrdili jej chemickú neutralitu. Preto sa v súčasnej dobe ako agaróza rozumie zmes agarových molekúl, ktorá má najnižší možný obsah náboja a teda najväčšiu schopnosť tvorby gélu, frakcionovaná z komplexu molekúl nazývaných agar [43]. Vo svojej štruktúre môže obsahovať metoxylové či sulfátové skupiny alebo zvyšok kyseliny pyrohroznovej. Konkrétne zloženie závisí od druhu červených rias, obdobia zberu a podmienok extrakcie [42].



Obrázok 12: Štruktúra agarózy

Agaróza môže mať jednoduchú alebo dvojité helikálnu konformáciu v tuhom stave. Gelácia nastáva agregáciou dvojšróbovnic pri teplote, ktorá závisí od obsahu metoxyly a sulfátu. Vzniká tak termoreverzibilný fyzikálne sieťovaný gél, ktorý je stabilizovaný vodíkovými väzbami [42]. V agarózovom géle sú parametre koncentrácie gélu, veľkosti pórov a mechanických vlastností prepojené a môžu byť optimalizované pre jednotlivé aplikácie. Veľkosť pórov agarózy je nepriamo úmerná koncentrácii hydrogélu. To zároveň ovplyvňuje aj difúziu v agarózových hydrogélach – čím je vyššia koncentrácia agarózy, gél je hustejší a tým menšia je priemerná veľkosť pórov a nižšia difuzivita [44].

3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

Fluorescenčná korelačná spektroskopia bola na mikrereologické meranie po prvý raz využitá v roku 2007 skupinou *Guigas a spol.* [1]. No napriek, tomu, že táto technika je známa už 12 rokov, ako vo svojej dizertačnej práci z roku 2018 konštatuje *Jakub Mondek*, o FCS mikroleógii vyšlo veľmi málo publikácii, čo môže byť spôsobené finančnou náročnosťou prístrojového vybavenia alebo malým množstvom informácií o tom, ako FCS mikrereológiu merať a vyhodnocovať [4].

Z toho dôvodu je tento prehľad súčasného stavu rozdelený na dve časti. V prvej časti je zhrnutý stav riešenej problematiky vo svete, ktorý je hlavne zameraný na výpočet MSD z dát získaných prostredníctvom FCS. V druhej časti je súčasný stav riešený na Fakulte chemickej, VUT v Brně kde bolo vykonaných už niekoľko experimentov na mikrereológiu pomocou FCS.

3.1 Súčasný stav riešenej problematiky vo svete

Fluorescenčnú korelačnú spektroskopiu na určenie šmykového modulu po prvý raz použil v roku 2007 *Guigas a spol.* Pomocou FCS zisťovali difúzne vlastnosti fluorescenčne značených zlatých nanočastíc v cytoplazme a jadre živých buniek. Použili častice o veľkosti 5 nm ktoré boli označené fluorescenčným farbivom AlexaFluor488. Matematickými operáciami previedli zistené difúzne vlastnosti na MSD a z toho určili komplexný šmykový modul. Vďaka tomu popísali viskoelastické správanie cytoplazmy a nukleoplazmy. Ďalej boli schopní pomocou tejto metódy skúmať vplyv osmotického stresu na difúziu a viskoelastickú odpoveď daných buniek [1].

O rok neskôr, v roku 2008, skupina vedcov *Rathgeber a spol.* priamo dokázala, že FCS je vhodná na pasívne mikrereologické experimenty. Pre svoje experimenty využili vodný roztok polyetylénoxidu s vysokou molekulovou hmotnosťou. Ako sondu použili polystyrénové častice modifikované karboxylovou skupinou FluoSpheres™. Veľkosť častíc bola 100 nm. Tieto vzorky boli vybrané pre možnosť porovnania s dátami získanými z dynamického rozptylu svetla a video-mikrereológie. Výsledky získané z mikrereologických experimentov boli taktiež porovnané s výsledkami získanými z konvenčných reologických metód. Získané hodnoty boli porovnateľné a bola medzi nimi dobrá zhoda v celom frekvenčnom rozsahu. Práca obsahuje kompletne odvodenie prevedenia autokorelačnej funkcie na MSD. V závere sa dostáva k vzorcu (35) pomocou ktorého je možné MSD vypočítať,

$$MSD = \frac{3}{2} w_{xy}^2 \left(\frac{1}{NG(t)} - 1 \right) \quad (35)$$

kde w_{xy} je priemer konfokálneho objemu, N je počet častíc a $G(t)$ sú hodnoty autokorelačnej funkcie. Túto rovnicu je možné dostať úvahou $MSD \ll \frac{3w_z^2}{2}$, kde w_z je dĺžka konfokálneho objemu. Rovnica (35) však nie je obecné platná a platí len do bodu, v ktorom sa v úvahe pravá strana vyrovná ľavej. Od toho bodu je možné pozorovať vychýlenie teoretických a experimentálne zistených bodov. V závere svojej práce odporúčajú túto metódu ako účinný nástroj pre biologické a medicínske aplikácie hlavne vzhľadom k nízkym koncentráciám a malému množstvu vzorku, ktoré metóda FCS potrebuje [2].

Piskorz a Ochab-Marcinek v roku 2014 využili výpočet MSD z dát získaných pomocou FCS na štúdium bránenej difúzie, čo je veličina, pomocou ktorej je možné určiť veľkosť štruktúr brániacich Brownovmu pohybu molekúl. V práci porovnávali tri známe typy bránenej difúzie, ktoré vykazujú celú škálu správania - od čisto Gaussovho správania až po správanie, ktoré sa ostro vymyká Gaussovému. Porovnaním teoretických a nasimulovaných dát zistili, že všetky tri typy bránenej difúzie vykazujú približne rovnaké MSD. Vďaka tomu určili, že na interpretáciu údajov z FCS je možné využiť jeden model bez ohľadu na mechanizmus bránenej difúzie. Ďalej zistili, že jeden špecifický typ bránenej difúzie je možné odhadnúť na základe tvaru autokorelačných funkcií. V závere konštatujú, že obmedzenie FCS spočíva v tom, že meria iba časovú koreláciu difúzneho pohybu. Preto považujú za vhodné dáta z tejto techniky doplniť inou mikrореologickou technikou, ktorá sleduje jednotlivé častice, napríklad video-mikrореológia sa javí ako užitočná komplementárna technika, ktorá môže poskytnúť informácie o tom, čo obmedzuje pohyb častíc [45].

V roku 2015 kolektív autorov **Nepal a spol.** využili na určenie štruktúry a dynamiky viskoelastických materiálov modifikáciu FCS – skenovacíu fluorescenčnú korelačnú spektroskopiu (SFCS). Pri tejto metóde sa spájajú časové a priestorové informácie. Vzorka alebo laserové žiarenie sa pohybuje po malej kruhovej trajektórii vysokou rýchlosťou. Výsledne oscilácie sa v korelačnej funkcii môžu analyzovať a tak je možné získať difúzne koeficienty fluorescenčných molekúl. Vo svojom experimente študovali dlhé molekuly DNA na konci označené fluorescenčným farbivom Rhodamin-6-G. Z výsledkov dostali MSD skúmaného systému, no okrem toho zistili aj informácie o štruktúre skúmaného vzorku, napríklad distribúciu vzdialeností medzi koncovými bodmi DNA [46].

Senanayake a spol. v roku 2019 študovali pomocou metódy FCS difúziu nanočastíc vo vodných roztokoch a géloch polyvinylalkoholu s vysokou molekulovou hmotnosťou. Ako sonda boli použité zlaté nanočastice s veľkosťou 5 až 30 nm. Roztoky a gély polyvinylalkoholu boli premerané aj na klasickom reometri, vďaka čomu bol získaný ich komplexný šmykový modul a jeho elastická aj stratová časť. Toto meranie nepreukázalo výrazný modul pružnosti, kvôli čomu nebolo možné presne vypočítať veľkosť pórov v géloch a v polymérnej sieti. To viedlo k sťaženiu vyhodnotenia dát a k neistote spojenej s výsledkami. Vo svojej práci zistili, že súčasné hydrodynamické modely pre popis závislosti veľkosti difúzneho koeficientu častíc sú neadekvátne. Navrhli preto exponenciálnu závislosť difúzneho koeficientu na veľkosti častíc a vlastnostiach polyvinylalkoholu. Táto nimi navrhnutá závislosť v súlade nelineárnou Langevinovou teóriou [47].

3.2 Súčasný stav riešenej problematiky na Fakulte chemickej, VUT v Brně

Pilotnou prácou, ktorá sa mikrореológiou pomocou FCS na FCH zaoberala bola bakalárska práca **Petry Kábrtovej** z roku 2015, ktorá vo svojej práci porovnávala tri pasívne mikrореologické metódy – DLS mikrореológiu, FCS mikrореológiu a video-mikrореológiu. Tieto metódy testovala na vzorkách 40% a 80% vodných roztokoch glycerolu a roztokoch hyaluronanu o troch molekulových hmotnostiach a troch koncentráciách. Ako mikrореologické sondy použila fluorescenčne značené latexové nanočastice o veľkosti 0,1 μm a polystyrénové nanočastice s veľkosťou 0,1 μm a 1 μm .

Z porovnania troch pasívnych metód, ktoré využívala vyplynulo, že metódou FCS je možné získať širší rozsah hodnôt MSD aj času. Najviac je touto metódou možné získať aj tie hodnoty MSD a času, v ktorých zvyšné dve metódy neposkytujú spoľahlivé výsledky. Vo svojej práci použila aj aproximovanú rovnicu na výpočet MSD z dát získaných prostredníctvom FCS a úspešne túto rovnicu potvrdila analýzou newtonovských kvapalín [3].

Na túto prácu **Petra Kábrtová** nadväzovala aj vo svojej diplomovej práci, kedy metódu FCS využila pre mikrereologickú charakterizáciu hydrogélů vytvorených z hyaluronanu a CTAB. V tejto práci najskôr pomocou FCS mikrereologie v prostredí vodných roztoků glycerolu vyberala vhodnú veľkosť častíc. Na svoje experimenty využívala latexové a polystyrénové častice s veľkosťou 30 nm, 100 nm a 300 nm. Častice s väčšou veľkosťou ako 100 nm sa ukázali ako nevhodné, preto na ďalšie experimenty využila častice s veľkosťou 30 nm. Ďalej v svojej práci skúmala vplyv zmeny indexu lomu na výsledok mikrereologickej analýzy, pretože už vo svojej bakalárskej práci načrtla hypotézu, že rozdielny index lomu meraných roztoků glycerolu a kalibračného roztoku môže spôsobovať posun krivky časovej závislosti experimentálne zisteného MSD voči teoretickým hodnotám. Experimentálne však overila, že zmena indexu lomu nemá výrazný vplyv na vznik posunu krivky. Ďalej v práci diskutuje vplyv koncentrácie a molekulovej hmotnosti na mikrereológiu hydrogélů. Zvyšujúca sa koncentrácia a molekulová hmotnosť hyaluronanu spôsobuje nárast elastickej zložky a posun kriviek smerom k nižším hodnotám MSD [48].

Zuzana Hnyluchová v roku 2016 vo svojej dizertačnej práci overovala možnosti FCS mikrereologie na vzorkách glycerolu vo vode a roztokoch hyaluronanu s koncentráciou $0,01 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Na meranie použila polystyrénové častice Microparticles s veľkosťou 100 nm. Roztoky s glycerolom premerala aj pomocou DLS mikrereologie aj pomocou video-mikrereologie a tieto výsledky porovnala. U video-mikrereologie použila z dôvodu predĺženia intervalu, počas ktorého by bolo možné častice pozorovať, väčšiu veľkosť častíc. Získanú MSD následne previedla viacerými matematickými operáciami na MSD, ktoré by platili pre prípad 100 nm častíc. V porovnaní týchto metód opäť potvrdzuje výhodu FCS mikrereologie, ktorou je možnosť vykazovať MSD v dlhých časových intervaloch. Roztok hyaluronanu o koncentrácii $0,01 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ vykazoval len mierny odklon krivky MSD od hodnoty MSD demineralizovanej vody. Tento odklon značil istú mieru viskoelasticity daného roztoku. Pre hyaluronan o koncentrácii $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ boli zistené značné rozdiely v krivke MSD oproti menej koncentrovanému roztoku. Krivka mala vplyvom elastickej zložky esovitý tvar. DLS krivka kopírovala krivku získanú FCS mikrereologickým meraním [5].

V roku 2017 bola publikovaná bakalárska práca od **Alici Dušenkovej**, ktorá v tejto práci mala za cieľ optimalizovať mikrereologické techniky pre charakterizáciu biopolymérnych hydrogélů. Ako modelové prostredie bola vybraná agaróza a ako mikrereologické sondy použila 30 nm latexové častice s fluorescenciou v žlto-zelenej oblasti. Vo svojej práci študovala dva typy vzoriek – vzorky, v ktorých boli častice inkorporované do gélov pri príprave roztoků, alebo vzorky, kedy boli častice do gélov inkorporované difúziou. Do agarózových gélov pridávala polystyrénsulfonát. V závere práce konštatuje úspešnú optimalizáciu tejto metódy, no zároveň upozorňuje na autofluorescenciu agarózy, ktorá sa pri tomto meraní vyskytla. Z nameraných dát zostrojila MSD krivky pomocou ktorých overila predpoklad, že pridávaný polystyrénsulfonát má vplyv na viskoelatické vlastnosti agarózového gélu [49].

Poslednou prácou, ktorá na túto tému na FCH vyšla, patrí už spomínaná dizertačná práca od **Jakuba Mondeka** z roku 2018. V práci sa venoval metóde fluorescenčnej časovo-rozlišenej korelačnej spektroskopii. Porovnával FCS mikrereológou s metódou video-mikrereológie a DLS mikrereológie a optimalizoval metódu FCS mikrereológie na využitie tejto metódy pre štúdium hydrogélových systémov. Súčasťou jeho práce bolo aj vytvorenie skriptu v software MATLAB, vďaka ktorému je možné previesť získané korelačné funkcie na MSD fluorescenčných častíc. Ako vzorky používal 40% a 80% vodný roztok glycerolu a roztoky hyaluronanu s rôznou koncentráciou a s rôznou molekulovou hmotnosťou. Do pripravených vzoriek boli ako sondy použité 30 nm a 100 nm fluorescenčne značené častice. V závere práce konštatuje lineárnu zmenu MSD na čase pre newtonovské kvapaliny (roztokov glycerolu), ktorú potvrdil pre obe veľkosti častíc. Metóda FCS aj DLS vykazovala obdobné výsledky. U nenewtonovských kvapalin (roztokov hyaluronanu) pozoroval prejav viskoelastických vlastností. Čím bola vyššia molekulová hmotnosť a vyššia koncentrácia, tým boli tieto vlastnosti viac pozorovateľné. Pri porovnaní DLS a FCS metódy našiel výrazné odchýlky medzi týmito technikami, ktoré bol spôsobený rozptylom svetla na reťazcoch polyméru, z čoho plynie, že vhodnejšia metóda pre mikrereologické meranie koncentrovaných roztokov polyméru alebo gélu je mikrereológia prostredníctvom FCS [4].

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1 Použité chemikálie

Častice:	Sicastar®-redF 10 nm	micromod 1401840-01
	Sicastar®-greenF 30 nm	micromod 1211742-02
	Sicastar®-greenF 50 nm	micromod 0711842-01
	Sicastar®-greenF 70 nm	micromod 1021442-02
	Sicastar®-greenF 100 nm	micromod 1331742-02
	Kalibračné roztoky:	Atto 488
Rhodamin 6G		Sigma Aldrich 989-38-8
Prostredie:	Glycerol bezvodý P.A.	lach:ner 56-81-5
	Agaróza	Sigma Aldrich 9012-36-6

4.2 Použité prístroje

Konfokálny mikroskop	MicroTime 200	PicoQuant GmbH
DLS	Zetasizer Nano Zs	Malvern Instrument
Fluorimeter	Spectrofluorometer FS5	Edinburg Instrument
Reometer	AR-G2 Rheometer	TA Instruments

4.3 Príprava kalibračných roztokov fluorescenčných sond

Na analytických váhach bolo navážené potrebné množstvo fluorescenčnej sondy Rhodamin 6G. To bolo prevedené do odmernej banky, ktorá bola po rysku doplnená vodou. Takto bol pripravený zásobný roztok o koncentrácií $1,56 \cdot 10^{-6}$ M. Tento roztok bol následne zriedený na koncentráciu $1,56 \cdot 10^{-9}$ M, ktorú je vhodné použiť pre meranie na konfokálnom fluorescenčnom mikroskope MicroTime 200.

Kalibračný roztok sondy Atto 488 bol vytvorený obdobným spôsobom. Bolo napipetované vypočítané množstvo sondy v DMSO do odmernej banky, následne bolo DMSO odparené a banka bola doplnená vodou. Koncentrácia zásobného roztoku bola $1,24 \cdot 10^{-6}$ M, na meranie na MicroTime 200 bola zriedená na koncentráciu $1,24 \cdot 10^{-9}$ M. Obidva zásobné roztoky boli premerané na UV-VIS spektrofotometri, kedy bola zistená ich absorbancia, z ktorej bola pomocou Lambert-Beerovho zákona zistená presná koncentrácia.

4.4 Príprava vzoriek na meranie

4.4.1 Vzorky vo vode

Do čistých, suchých a označených vialiek bolo napipetované vypočítané množstvo roztoku častíc, ktoré bolo na koncentráciu $4 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ zriedené vypočítaným množstvom deionizovanej vody. Táto koncentrácia častíc bola zvolená kvôli meraniu na MicroTime 200, kedy je ideálne aby v konfokálnom objeme bola práve jedna častica.

4.4.2 Vzorky v glycerole

Do čistých, suchých a označených vialiek bolo navážené vypočítané množstvo glycerolu, ktorý bol na požadované hmotnostné percentá doplnený deionizovanou vodou. Pripravené roztoky boli následne vortexované 10 sekúnd a bolo do nich napipetované vypočítané množstvo častíc tak, aby koncentrácia častíc vo výslednom roztoku bola $4 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Pre všetky častice boli pripravené roztoky o koncentráciách 50 hm.%, 60 hm.% a 70 hm.%. Zvyšné koncentrácie boli pripravené individuálne pre každú veľkosť častíc podľa správania, ktoré dané častice v pripravených koncentračných radách vykazovali.

4.4.3 Vzorky v agaróze

Do čistých, suchých a označených vialiek bolo navážené vypočítané množstvo agarózy, ktorá bola doplnená na požadovaný objem vodou. Agaróza bola pripravená o koncentracii 0,5 hm.%, 1 hm.%, 1,5 hm.% a 2 hm.%. Do pripravených roztokov bolo napipetované vypočítané množstvo častíc tak, aby koncentrácia častíc vo výslednom roztoku bola $4 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Roztok bol následne zahrievaný na teplotu 85°C , ktorá bola kontrolovaná teplomerom. Následne bol roztok za neustálej kontroly teploty varený tak dlho, až kým nedošlo k úplnému rozpusteniu agarózy a vytvoreniu číreho roztoku. Ten bol následne preliaty do držiaku s podložným sklíčkom a ponechaný na stuhnutie.

4.5 Spektrálna charakterizácia častíc

Excitačné a emisné spektrá častíc v prostredí deionizovanej vody boli zmerané pomocou fluorimetru Spectrofluorometer FS5. Prístroj bol ovládaný pomocou programu Fluoracle a následne boli dáta vyhodnotené v programe MS Excel. Všetky merania boli vykonané za laboratórnej teploty. Pre excitačné spektrum častíc o veľkosti 10 nm bolo nastavené rozmedzie vlnovej dĺžky na 400–650 nm s krokom 1 nm, emisia bola nastavená na 585 nm a šírka emisnej aj excitačnej štrbiny na 2 nm. Emisné spektrum bolo snímané pri rovnakom kroku a rovnakej šírke štrbín, rozmedzie bolo nastavené na 530–600 nm a excitačná vlnová dĺžka na 510 nm. Častice o veľkosti 30, 50, 70 a 100 nm boli taktiež skenované s krokom 1 nm a šírkou oboch štrbín 2 nm pre excitačné aj emisné spektrum. Rozmedzie excitačného spektra bolo nastavené na 400–510 nm s emisou pri 520 nm a emisné spektrum bolo premerané v rozmedzí 480–570 nm s excitačnou vlnovou dĺžkou 467 nm.

4.6 Overenie veľkosti častíc pomocou DLS

Veľkosť častíc bola overená pomocou metódy DLS na prístroji Zetasizer nano Zs. Na meranie boli použité roztoky častíc v deiónizovanej vode. Roztoky boli premerané ihneď po príprave vzorku, a keďže nevykazovali disperzitu udávanú výrobcom, bol na ne vyskúšaný aj ultrazvuk, kedy tesne pred meraním boli 5 minút ultrazvukované a následne premerané. Vzorky boli merané v sklenených kyvetách pri uhle 173° a pri teplote 25°C . Ako zdroj svetla bol použitý hélium-neónový laser, ako rozpúšťadlo bola nastavená voda s refrakčným indexom 1,330 a viskozitou 0,8872 cP. Refrakčný index materiálu bol nastavený na 1,46 a absorbanca materiálu na 0,010.

4.7 Overenie veľkosti častíc pomocou FCS

Fluorescenčná korelačná spektroskopia bola meraná na fluorescenčnom konfokálnom mikroskope MicroTime 200 od spoločnosti PicoQuant. Tento prístroj sa skladá z inverzného mikroskopu Olympus s objektívom s vodnou imerziou, excitačnej jednotky a detekčného systému. Ovládanie prístroja je pomocou integrovaného software SymPhoTime 64. Overenie difúzneho koeficientu spočívalo v nameraní dát FCS z ktorých bol vyhodnotený difúzny koeficient. Ten bol následne prepočítaný pomocou Stokes-Einsteinovej rovnice (24) na veľkosť častíc. Bližšie nastavenie prístroja je opísané v nasledujúcej kapitole.

4.8 Meranie FCS

Pre meranie FCS je veľmi dôležitým krokom správne nastavenie prístroja. To zahŕňa výber vhodnej vlnovej dĺžky excitačného zdroja a k tomu výber odpovedajúceho dichroického zrkadla a emisného filtra. Tieto spomenuté atribúty sa volia podľa spektrálnych charakteristík použitého vzorku. Pre vzorky obsahujúce 10 nm častice bol vybraný ako excitačný zdroj laser o vlnovej dĺžke 510 nm, dichroické zrkadlo 514 a emisný filter bol použitý filter typu band-pass 550/49. Vzorky s ostatnými veľkosťami častíc boli excitované laserom s vlnovou dĺžkou 467 nm za použitia dichroického zrkadla 470/635 a emisný filter bol zvolený band-pass filter 520/35.

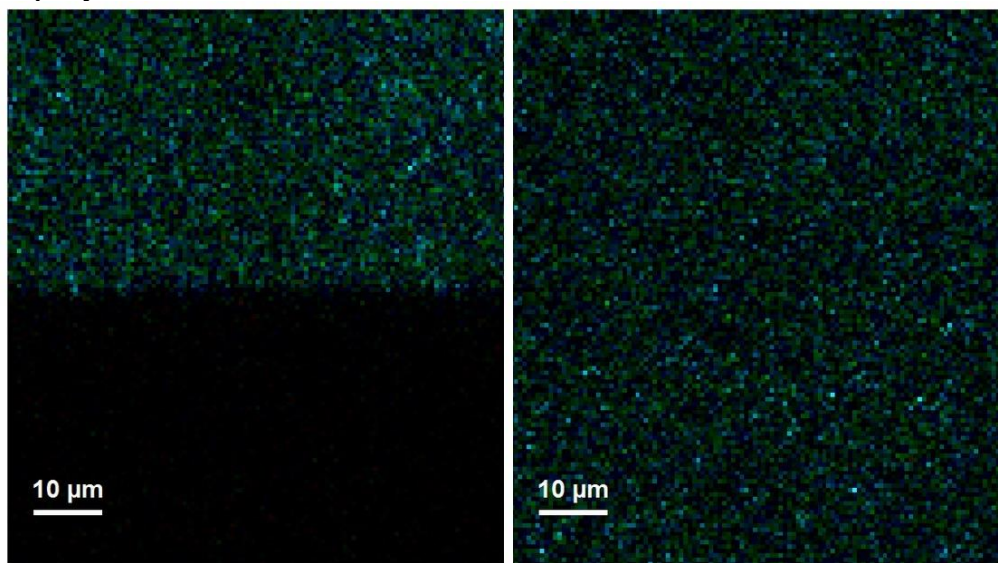
Po nastavení správneho laseru a výmene dichroického zrkadla a filtrov nasleduje manuálne ostrenie pinhole, vďaka ktorej je pri správnom nastavení odfiltrované žiarenie pochádzajúce mimo ohniskovú rovinu. Následne je nutná kalibrácia konfokálneho objemu, po ktorej prichádza na radu samotné meranie. Na meranie je potrebné malé množstvo vzorku, ktoré je kvapnuté na krycie sklíčko držiaku. Výnimkou boli vzorky v agaróze, ktoré už v držiaku boli pripravené. Vzorka je potom excitovaná zvoleným laserom a fluorescenčný signál prechádza cez objektív, dichroické zrkadlo, emisný filter, pinhole až do deliacich veží, kde sa signál delí medzi dva detektory.

Už spomínaná kalibrácia konfokálneho objemu je samostatnou kapitolou, ktorá sa pri mikroeologickom vyhodnocovaní dát nameraných pomocou FCS ukázala ako veľmi dôležitá. Kalibráciu je možné vykonať viacerými spôsobmi, v tejto práci bola zvolená kalibrácia konfokálneho objemu pomocou fluoroforu so známym difúznym koeficientom. Pre každý zdroj excitačného žiarenia bolo nutné použiť iný fluorofor. Meranie s časticami o veľkosti 10 nm bolo kalibrované na fluorescenčnú sondu Rhodamin 6G, ktorá má pri teplote 25°C známy difúzny koeficient $(4,14 \pm 0,05) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [50]. Keďže difúzny koeficient je veličina závislá

na teplote, vždy bol prepočítaný na aktuálnu teplotu merania a vypočítaná hodnota bola zadaná do módu *FCS Calibration* v programe SymPhoTime 64. Program následne dopočítal hodnotu efektívneho objemu V_{eff} a jeho rozmer voči kolmému smeru laseru w_{xy} , čo vlastne označuje priemer konfokálneho objemu a rozmer v smere rovnobežnom w_z , čiže dĺžku konfokálneho objemu. Ďalej program určil hodnotu parametru κ , ktorý určuje excentricitu objemu.

Kalibrácia konfokálneho objemu v prípade merania s laserom o vlnovej dĺžke 467 nm prebehla na fluorescencnú sondu Atto 488, ktorá má pri teplote 25°C známy difúzny koeficient $(4,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [50]. Efektívny objem a zvyšné dopočítané parametre sa pre každú sondu a každé meranie značne líšili a ich správne určenie je dôležité pre následné vyhodnocovanie v programe MATLAB.

Pred každým samotným meraním vzorku bol najskôr naskenovaný obraz daného vzorku. Ten bol vytvorený pomocou metódy FLIM (Fluorescence lifetime imaging microscopy), ktorá obraz vytvára tak, že v každom bode obrázku meria dobu života fluorescencie. Pri tomto meraní bolo najskôr vždy nájdené rozhranie vzorka/sklíčko a následne bol vykonaný sken v rovine xz . Ak sken preukázal, že vzorka je homogénna a neobsahuje vzduchové bubliny, agregáty či iné nehomogenity, nasledoval sken v rovine xy približne 5 μm nad rozhraním sklíčko/vzorka. Ak aj tento sken preukázal homogenitu, v danom vzorku boli vybrané tri body, v ktorých boli zbierané dáta pre FCS. Doba merania závisela na intenzite fluorescencie. Čím intenzívnejšie vzorka fluoreskovala, tým boli dáta namerané rýchlejšie a doba merania mohla byť kratšia. Meranie sa pohybovalo v intervale 5-15 minút.



Obrázok 13: Obraz vytvorený pomocou metódy FLIM, na ľavej strane sken v rovine xz , na pravej strane sken v rovine xy

4.9 Vyhodnotenie FCS

Výstupom FCS analýzy je autokorelačná krivka, ktorá znázorňuje závislosť autokorelačnej funkcie G na čase t . Vzhľadom na to, že meranie prebiehalo na dvoch detektoroch, boli získané dve autokorelačné krivky, ktoré boli korelované medzi sebou, vďaka čomu dochádza k minimalizácii šumu. Takto získaná kroskorelačná krivka je následne analyzovaná v móde *FCS Analyses*. Tento mód obsahuje viacero matematických modelov, ktorými je možné namerané dáta fitovať.

Pre túto prácu boli vyskúšané model *Pure Diffusion* aj model *Triplet Extended 3D*. Pomocou fitu boli získané dáta, ktoré opisujú chovanie sondy v danom prostredí, ako napríklad difúzny koeficient, počet častíc v konfokálnom objeme, či difúzny čas. Vzhľadom na to, že meranie v jednom vzorku prebiehalo v troch miestach, tieto hodnoty boli spriemerované a vyhodnotené pomocou MS Excel.

Pomocou fitu však nie je možné získať parameter popisujúci mikroeologické vlastnosti daného prostredia. Na to je nutné tieto získané dáta prepočítať matematickými operáciami na parameter MSD. MSD je možné z autokorelačnej funkcie vyjadriť vo forme kubickej rovnice (36)

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

kde w_{xy} je priemer konfokálneho objemu, w_z je dĺžka konfokálneho objemu, N je počet častíc v konfokálnom objeme a $G(t)$ je hodnota autokorelačnej funkcie.

Riešenie kubickej rovnice nie je úplne triviálna záležitosť, obecné je to možné pomocou Cardanovho vzorca či Harriotovou metódou prevodu na kvadratickú a lineárnu rovnicu. Vzhľadom k prácnosti výpočtu, bol pre výpočet koreňov kubickej rovnice zvolený výpočet pomocou software MATLAB. V tomto programe bol vytvorený skript podľa práce **Petry Kábrtovej** [3] a **Jakuba Mondeka** [4]. M-súbor bol pre jednoduchšie a intuitívnejšie používanie upravený a pozmenený a jeho prvá časť vyzerá nasledovne.

```
csv = dlmread('100nm.csv', ';', 1, 0);
cas = csv(:, 1);
Gt = csv(:, 2);
n = length(Gt);
wxy = 0.255*ones(n,1);
wz = 1.79*ones(n,1);
N = 1.5819*ones(n,1);
```

V tomto kóde v prvom riadku sú do premennej *csv* pomocou metódy *dlmread* načítané namerané dáta. Za metódou *dlmread* nasledujú parametre danej metódy - cesta k súboru uloženému v počítači, ktorý pre spracovanie dát v MATLAB musí byť vo formáte *.csv* a potom nasleduje znak, ktorým sú oddelené jednotlivé stĺpce v zdrojovom súbore.

V ďalšom riadku je do premennej *cas* uložený vektor hodnôt zo súboru *csv*, ktoré sa nachádza v prvom stĺpci, do premennej *Gt* je uložený vektor hodnôt z druhého stĺpca. V tomto prípade bol načítavaný súbor, kedy v exportovaných dátach boli v prvom stĺpci hodnoty času v sekundách a v druhom stĺpci hodnoty autokorelačnej funkcie tiež v základných jednotkách. V štvrtom riadku kódu sa nachádza premenná *n*, do ktorej sa pomocou metódy *length* uloží počet riadkov matice *Gt*, čo je vlastne počet riadkov z autokorelačnej funkcie.

Ďalej je tento kód zhodný s kódom, ktorý vo svojej práci použila **Petra Kábrtová** [3]. Do premennej *wxy* je zadaná hodnota priemeru konfokálneho objemu, ktorá bola zistená kalibráciou, v tomto konkrétnom prípade to bolo 0,255. Priemer konfokálneho objemu je ďalej v tomto riadku prevedený na maticu a to pomocou metódy *ones(n,1)*. Využitím tejto metódy bola táto zadaná hodnota priemeru konfokálneho objemu vynásobená maticou jednotiek s počtom riadkov *n* (počet riadkov autokorelačnej funkcie) a s jedným stĺpcom.

Do premennej wz je zadaná dĺžka konfokálneho objemu (v tomto prípade 1,79), ktorá je taktiež pomocou metódou `ones(n,1)` prevedená na maticu s n riadkami a jedným stĺpcom. Do premennej N je zadaný počet častíc v konfokálnom objeme.

Druhá časť kódu obsahuje matematický zápis koeficientov kubickej rovnice a , b , c , d do programovacieho jazyka MATLAB. V tejto časti si je možné povšimnúť, že miesto klasického delenia a násobenia sa používa maticové násobenie a delenie, ktoré sa v MATLAB značí „*“

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

Nasleduje časť, v ktorej je samotná kubická rovnica riešená. V tejto časti taktiež nedošlo k žiadnej zmene. Premenná r je definovaná ako matica o veľkosti n riadkov a 3 stĺpcov, v ktorej sú samé nuly. Nasleduje cyklus, v ktorom i značí iterátor a počas ktorého sa kubická rovnica rieši n -krát (počet riadkov v autokorelačnej funkcii). Výsledky každej iterácie sú zapísané na i -tý riadok matice r .

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

Následne bola pridaná posledná časť kódu, ktorá opäť trochu uľahčuje prácu s dátami a umožňuje okamžitý export výsledkov a vyobrazenie grafu časovej závislosti MSD.

```
msd=r(:,3);
loglog(cas, msd, 'r')
csvwrite('\100nmMSD.csv', msd)
```

Do premennej msd je uložený tretí stĺpec z premennej r – to je tretí koreň kubickej rovnice a zároveň sú to vypočítané hodnoty MSD (zvyšné dva korene nepatria do oboru reálnych čísel). Pomocou metódy `loglog(cas, msd, 'r')` je vykreslený ihneď v prostredí MATLAB graf závislosti MSD na čase s oboma osami v logaritmickom mierke (r v danej metóde značí, že graf sa vykreslí červenou farbou). A nakoniec, pomocou metódy `csvwrite` sú do súboru formátu `.csv` zapísané vypočítané hodnoty MSD, kde parametre metódy sú opäť cesta k súboru, kam sa súbor uloží a následne hodnota, ktorá sa tam má zapísať.

Takto vyexportované dáta boli následne spracované v programe MS Excel, kde boli porovnané experimentálne získané hodnoty MSD s teoretickými hodnotami. Teoretická hodnota MSD bola vypočítaná pomocou rovnice (28). Teoretickú hodnotu MSD je možné po dosadení Stokes- Einsteinovej rovnice (24) vyjadriť nasledovne (37)

$$MSD = \frac{k_B T t}{\pi \eta R} \quad (37)$$

kde k_B je Boltzmanova konštanta, T je termodynamická teplota, η je viskozita, t je čas a R je polomer častice.

4.10 Reologické meranie viskozity určených roztokov glycerolu

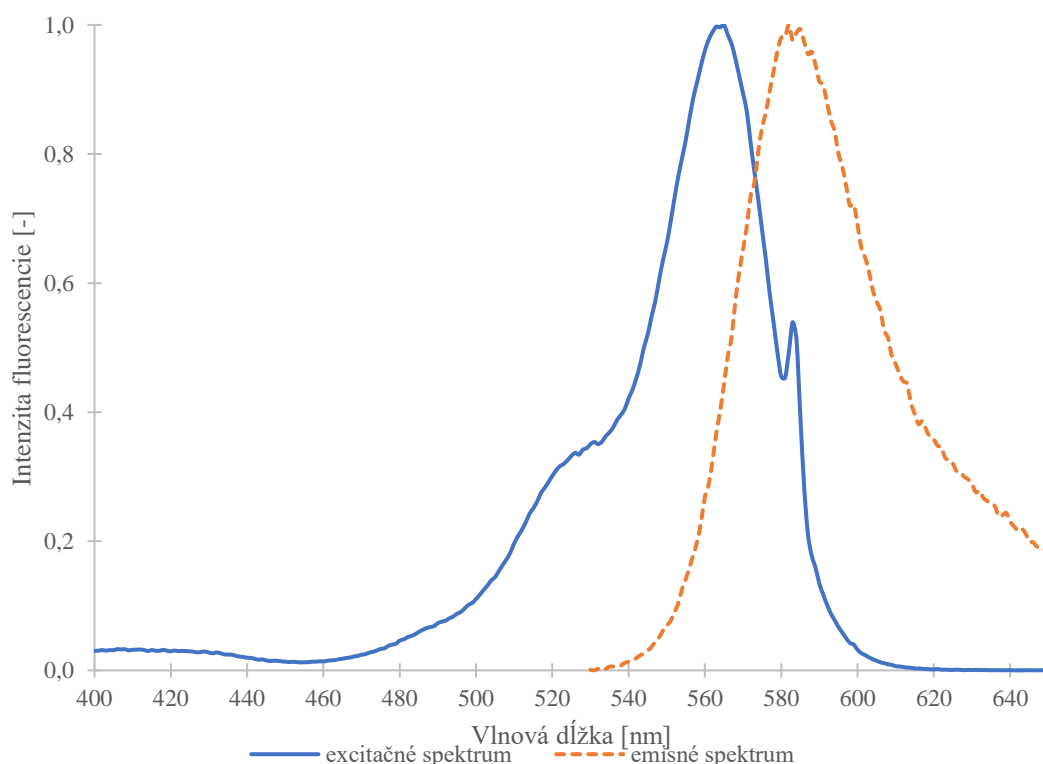
Na základe vyhodnotenia FCS merania boli vybrané 4 hmotnostné koncentrácie glycerolu, u ktorých bolo vyhodnotené, že pri nich došlo k zastaveniu jednotlivých častíc. Konkrétne to boli roztoky s koncentráciou 93 hm.%, 90 hm.%, 87 hm.% a 75 hm.%. U týchto roztokov bolo nutné určiť viskozitu, tá bola zmeraná pomocou reometra typu AR G2. Na meranie bola použitá geometria typu double-gap. Objem vzorku na meranie bol približne 9 ml, tak aby spodná nádoba bola naplnená až po okraj. Meranie prebehlo pri teplote 23°C a boli premerané tokové krivky. Tie boli vyhodnotené v programe MS Excel, v ktorom bola do grafu vynášaná závislosť viskozity na šmykovej rýchlosti. Pre každú koncentráciu glycerolu boli vykonané tri merania, ktoré boli následne spriemerované a z nich bola určená hodnota viskozity odpovedajúca danej hmotnostnej koncentrácií glycerolu.

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 Spektrálna charakteristika vybraných častíc

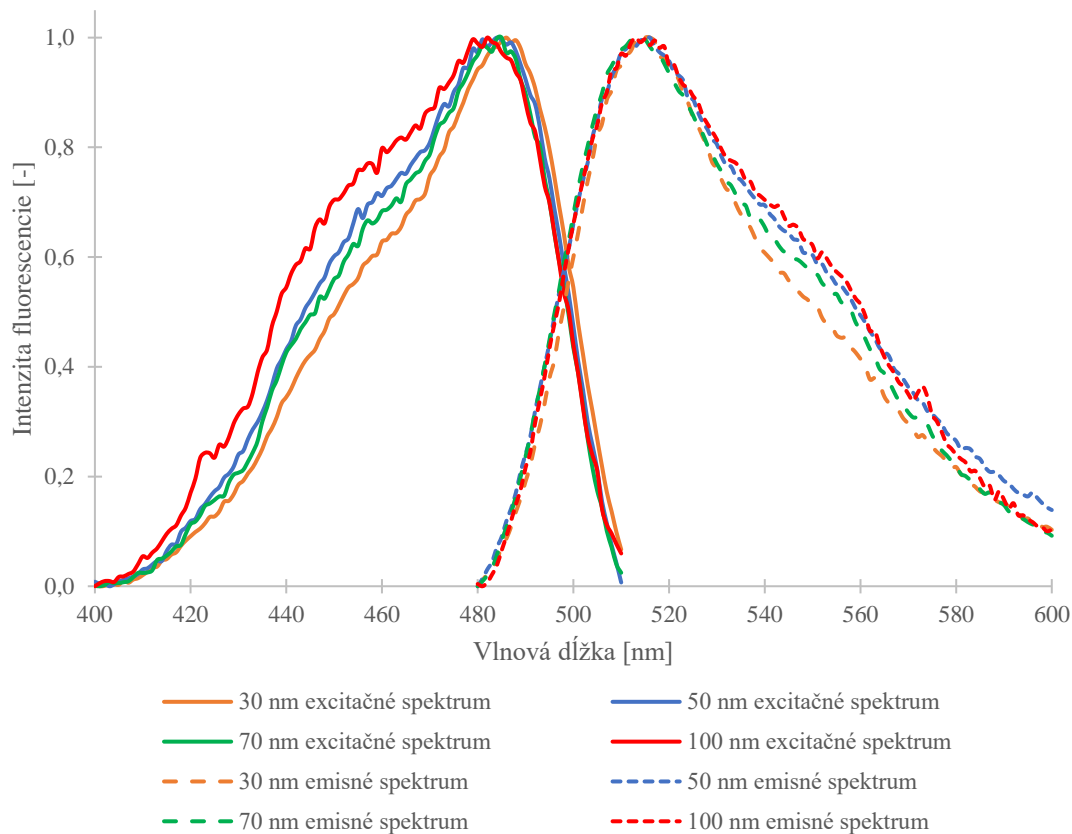
Ako mikroreologické sondy boli vybrané častice Sicastar® v 5 veľkostiach – 10 nm, 30 nm, 50 nm, 70 nm a 100 nm. Tieto častice sú na kremíkovej báze, sú chemicky rovnaké a bez náboja a vybrané boli kvôli predpokladu, že vďaka týmto vlastnostiam nebudú nijak interagovať s prostredím do ktorého budú umiestnené. Ďalším kritériom pri výbere bolo finančné a časové hľadisko, aby boli dodané v relatívne rýchlom časovom intervale. Zároveň z týchto častíc existuje široké spektrum veľkostí a sú dostupné aj so záporným a kladným nábojom, čo umožňuje aby boli v budúcnosti táto práca rozšírená o ďalšie experimenty.

Tieto vybrané častice boli dvoch typov – 10 nm častice, ktoré majú fluorescenciu v žltej oblasti, zatiaľ čo všetky ostatné vybrané veľkosti emitujú žiarenie v zelenej oblasti. Excitačná vlnová dĺžka pre častice so žltou fluorescenciou bola výrobcom uvádzaná na 569 nm, zatiaľ čo maximum emisnej vlnovej dĺžky bolo uvedené na 585 nm. Excitačné a emisné spektrum pre tieto častice je vyobrazené na obrázku 14 a ako je možné z týchto spektier vyčítať, emisné a excitačné maximum sa naozaj zhoduje s tým čo uvádza výrobca. Preto pre tieto častice bola zvolená ako ideálna vlnová dĺžka z laserov, ktoré sú k dispozícii vlnová dĺžka 510 nm a emisný filter bol vybraný 550/49.



Obrázok 14: Excitačné (modré) a emisné (oranžové) spektrum pre častice o veľkosti 10 nm, v excitačnom spektre pri vlnovej dĺžke 585 nm je vidieť elastický rozptyl z lampy

Častice s fluorescenciou v zelenej oblasti majú výrobcom udávané excitačné maximum 485 nm a emisné maximum 510 nm. Spektrálna charakteristika týchto častíc je uvedená na obrázku 15. Opäť je možné pozorovať zhodu s informáciami, ktoré uvádza výrobca. Ako vhodný excitačný zdroj bol preto vybraný laser o vlnovej dĺžke 470 nm a emisný filter 520/35.

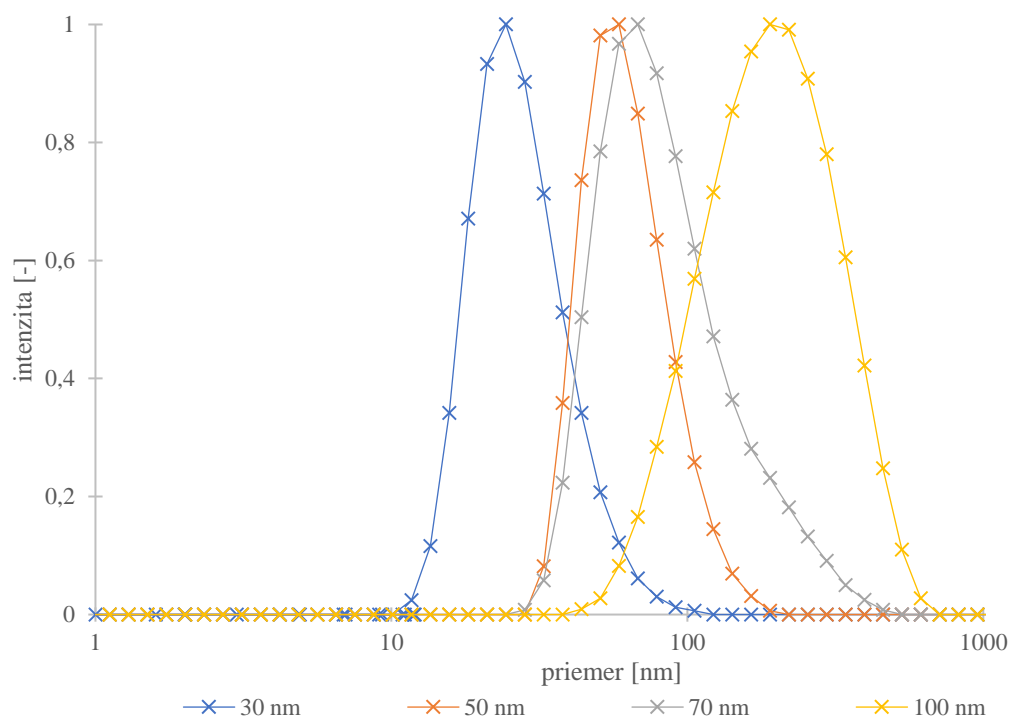


Obrázok 15: Excitačné (plnou čiarou) a emisné (prerušovanou čiarou) spektrá pre častice o veľkosti 30, 50, 70 a 100 nm

5.2 Overenie veľkosti častíc

Zatiaľ čo spektrálne charakteristiky zodpovedali tomu, čo uvádzal výrobca, u veľkosti častíc výsledky tak pozitívne neboli. Na overenie veľkosti častíc boli využité dve metódy – metóda dynamického rozptylu svetla a metóda fluorescenčnej korelačnej spektroskopie. Hodnoty zistené experimentálne pomocou týchto dvoch metód boli porovnané s teoretickými hodnotami, ktoré udáva výrobca častíc.

Pomocou metódy DLS bola zistená priemerná veľkosť častíc a distribúcia veľkosti jednotlivých častíc, tá je znázornená na obrázku 16. Touto metódou nebolo možné zmerať častice o veľkosti 10 nm, nakoľko použitá vlnová dĺžka laseru v tejto metóde odpovedala excitačnej vlnovej dĺžke daných častíc a okrem rozptylu svetla u nich dochádzalo k emitovaniu žiarenia, čo skresľovalo výsledky a znemožňovalo vyhodnotenie dát. Zo zistenej priemernej veľkosti častíc bol pomocou Stokes-Einsteinovej rovnice vypočítaný difúzny koeficient.



Obrázok 16: Veľkosť častíc zistená pomocou metódy DLS

Vypočítaný difúzny koeficient a experimentálne zistená veľkosť častíc pomocou DLS bola následne porovnaná s dátami zistenými z FCS. Pomocou FCS bol zistený difúzny koeficient, ktorý bol pomocou Stokes-Einsteinovej rovnice prepočítaný na veľkosť častíc. Všetky tieto výsledky spolu s teoretickou hodnotou priemeru častíc a z toho určeného koeficientu sú zhrnuté v tabuľke 1.

Tabuľka 1: Teoretické a experimentálne zistené hodnoty veľkosti častíc a ich difúzneho koeficientu vo vode

Teoretická hodnota		DLS		FCS	
Priemer [nm]	Difúzny koeficient [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	Priemer [nm]	Difúzny koeficient [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	Priemer [nm]	Difúzny koeficient [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]
10,00	47,77	-	-	16,47	29,00
30,00	15,92	41,60	11,48	43,43	11,00
50,00	9,55	82,26	5,81	68,25	7,00
70,00	6,82	110,20	4,34	108,08	4,42
100,00	4,78	168,60	2,83	145,20	3,29

Ako je možné vyčítať z tabuľky 1, hodnoty difúzneho koeficientu a veľkosti častíc zistené pomocou metód FCS a DLS sú približne zhodné. Tieto experimentálne zistené hodnoty sa však líšia od hodnoty udávanej výrobcom, a to v niektorých prípadoch (napríklad pre 100 nm častice) o viac ako 60 %. Takisto je možné z obrázku 16, vyčítať, že napriek udávanej monodisperzite, výsledky z DLS monodisperzitu nepotvrdili, práve naopak.

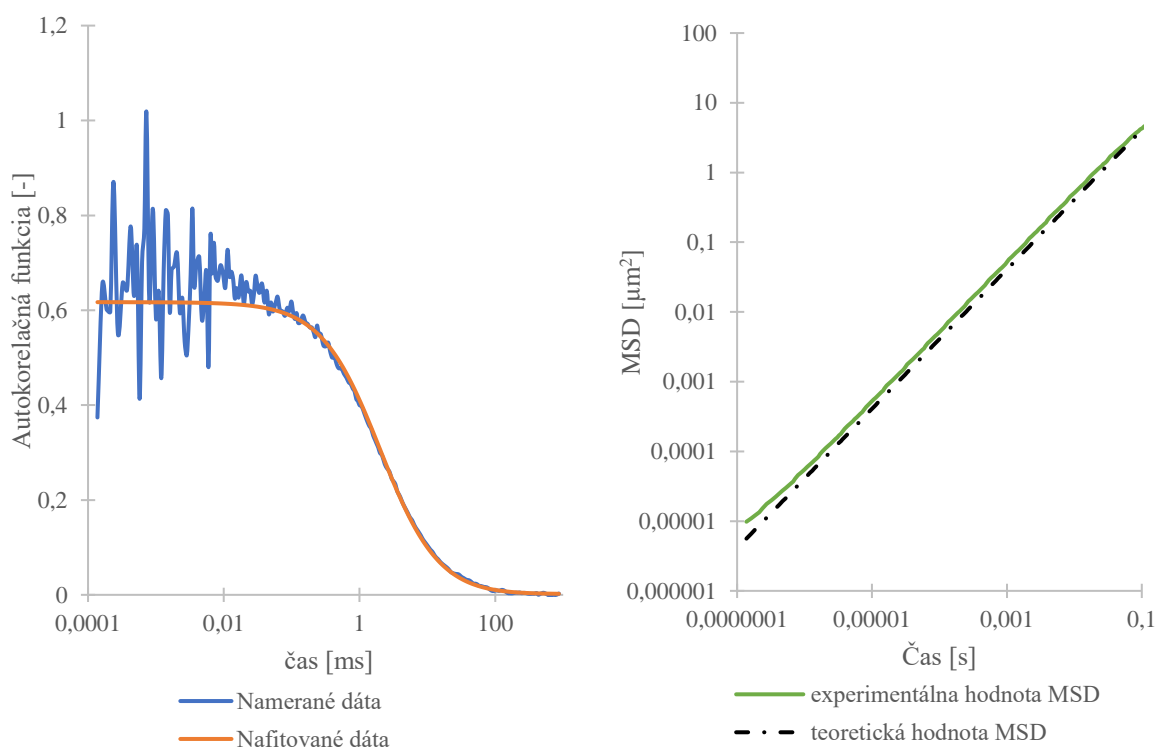
Meranie pomocou DLS bolo opakované niekoľkokrát, na roztoky bol vyskúšaný pred meraním aj ultrazvuk, no výsledky z DLS vychádzali stále rovnako. Vzhľadom na opakovaný veľký počet experimentov, ktorý udával stále rovnaký výsledok a potvrdenie veľkosti častíc dvoma na sebe nezávislými metódami, bol s touto skutočnosťou konfrontovaný aj výrobca

častíc, ktorý však neposkytol žiadne relevantné stanovisko a tvrdil, že dané častice by mali vykazovať udávanú veľkosť a monodisperzitu. Preto vo všetkých ďalších výpočtoch boli použité hodnoty veľkosti častíc, ktoré boli experimentálne overené, avšak, v texte aj grafoch naďalej častice ostávajú označované veľkosťou, ktorú udával výrobca. Pri vyhodnocovaní dát nameraných pomocou FCS metódy bola použitá veľkosť častíc, ktoré boli zistené touto metódou.

5.3 Vplyv parametrov, ktoré ovplyvňujú riešenie kubickej rovnice

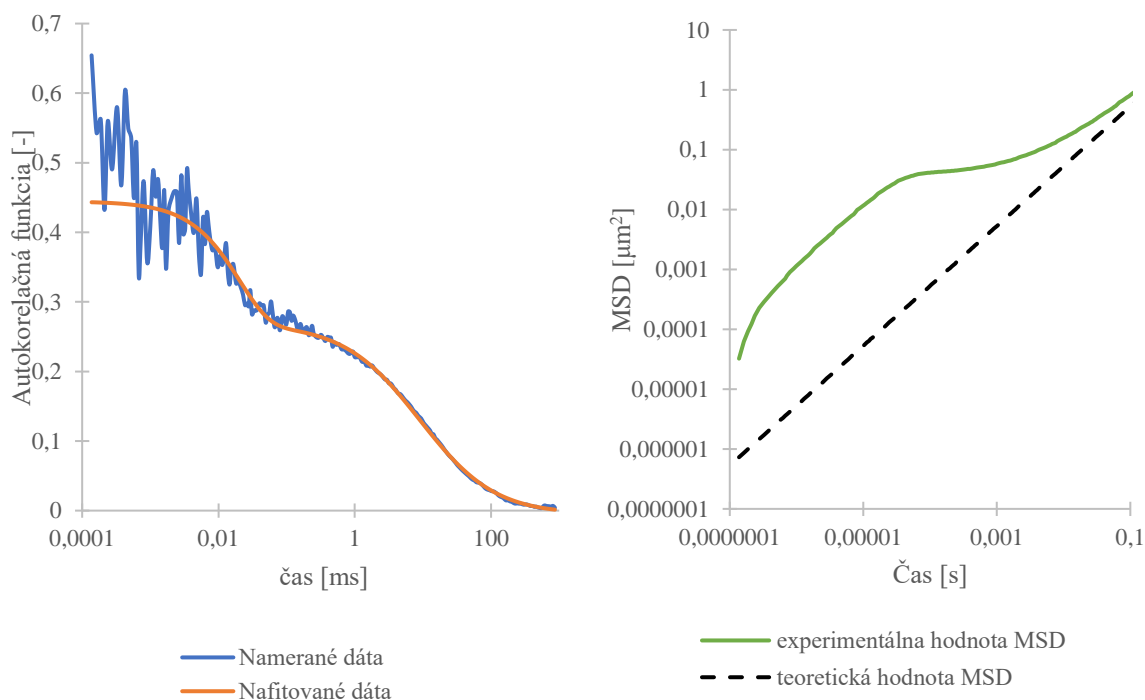
Ako bolo spomenuté v kapitole 4.9, MSD je možné z autokorelačnej funkcie dostať pomocou kubickej rovnice (36). V tejto rovnici vystupujú 4 experimentálne zistené parametre, ktoré môžu mať vplyv na jej riešenie. Medzi tieto parametre patrí autokorelačná funkcia $G(t)$, ktorá je zistená pomocou fitu dát. Fitom nameraných dát je zistený aj počet častíc N . Ďalšími parametrami, ktoré majú na toto riešenie vplyv sú rozmery konfokálneho objemu, ktoré sú zistené jeho kalibráciou – jeho priemer w_{xy} a dĺžka w_z .

Zisk autokorelačnej funkcie $G(t)$ z nameraných surových dát je popísaný v kapitole 4.9. V tejto práci bol zistený výrazný vplyv výberu matematického modelu pri fitovaní dát na tvar MSD krivky. Ak je použitý matematický model *Pure Diffusion*, fitom dát je možné získať typickú autokorelačnú krivku, ktorá ma tvar obrátenej sigmoidy. Tento tvar nameraných dát sa na riešení kubickej rovnice prejaví lineárne, ako je zobrazené na obrázku 17.



Obrázok 17: Graf vľavo ukazuje autokorelačnú funkciu získanú fitovaním surových dát matematickým modelom *Pure Diffusion*, graf vpravo znázorňuje riešenie odpovedajúcej kubickej rovnice vynesené do grafu pri zadaní správnych rozmerov konfokálneho objemu a správnom počte častíc

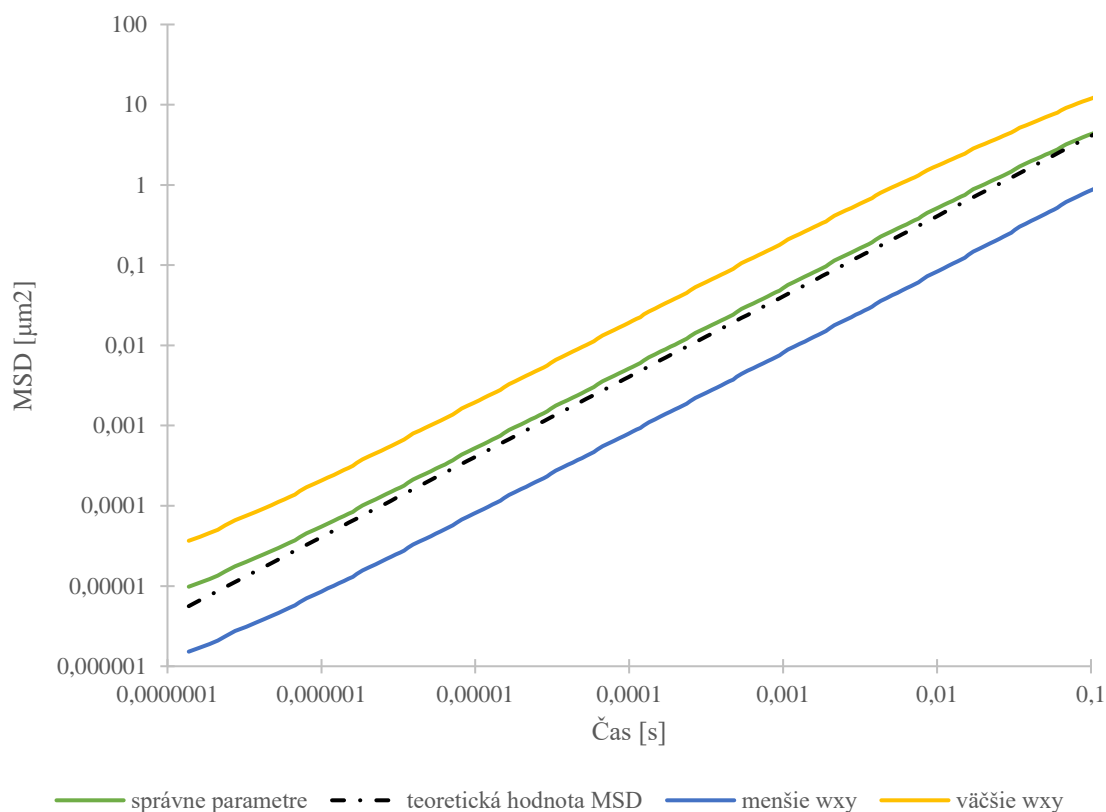
Avšak, tento model nie je vždy možné použiť na namerané dáta. Občas je fotofyzika daného vzorku zložitejšia a surové dáta nie je možné týmto modelom nafitovať, pretože sa jednoducho tento model nechytí. Preto je niekedy nutné použiť napríklad model *Triplet Extended 3D*, kedy je možné v tomto modeli zohľadniť viac difúzných koeficientov či viac tripletov. Obrázok 18 znázorňuje fit takýchto dát a je možné si všimnúť, že táto nafitovaná krivka naozaj odpovedá surovým dátam. Na tomto obrázku je ďalej možné si všimnúť, ako sa tento tvar nafitovaných dát prejaví na grafickom znázornení riešenia kubickéj rovnice – závislosť MSD na čase nevykazuje lineárny trend.



Obrázok 18: Graf vľavo ukazuje autokorelačnú funkciu získanú fitovaním surových dát matematickým modelom *Triplet Extended 3D*, graf vpravo znázorňuje riešenie odpovedajúcej kubickéj rovnice vynesené do grafu pri zadaní správnych rozmerov konfokálneho objemu a správnom počte častíc

Nelineárna závislosť MSD na čase indukuje viskoelastické správanie a je možné, aby takáto závislosť vyšla aj pri vyhodnocovaní dát pomocou modelu *Pure Diffusion*. Avšak, v tejto práci bol odsledovaný vplyv použitého modelu na tvar krivky aj u vzoriek, ktoré by viskoelastické správanie vykazovať nemali. Preto je voľba vhodného matematického modelu veľmi dôležitá.

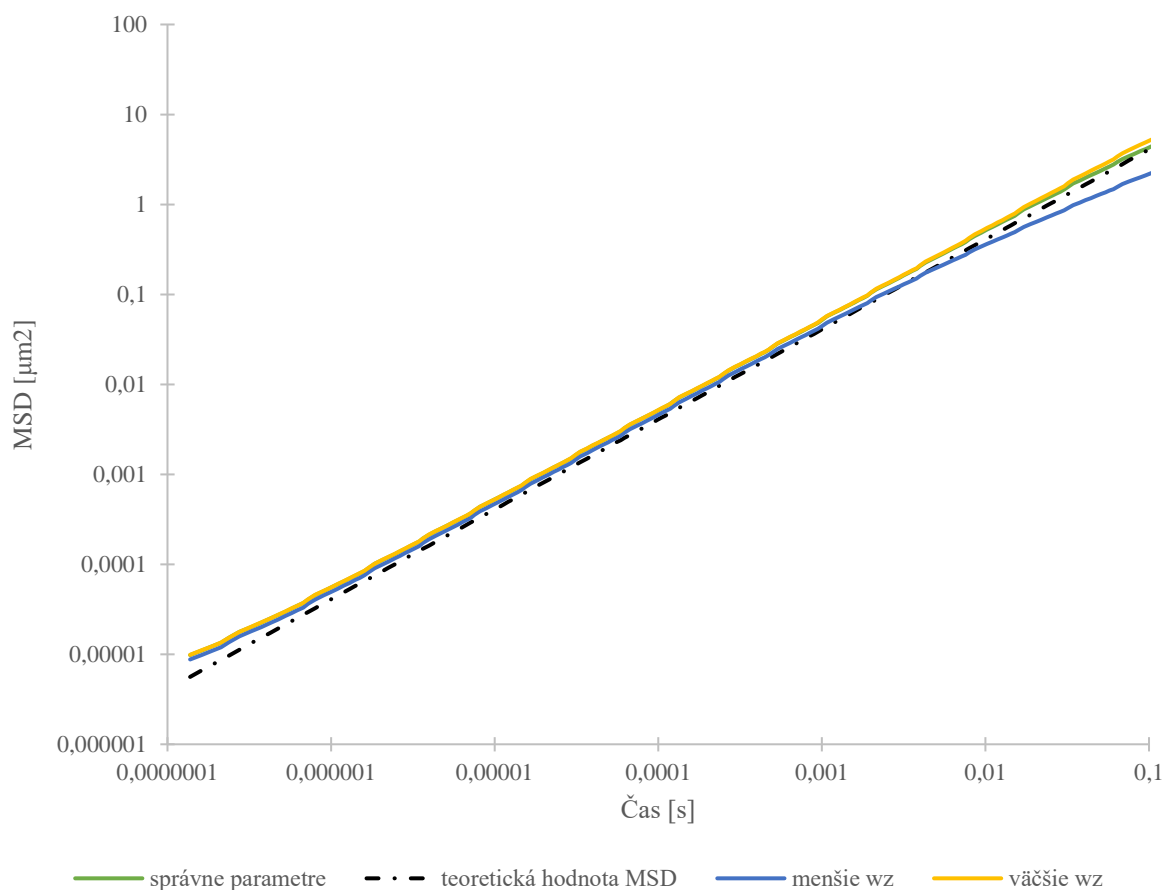
Ďalšími parametrami ovplyvňujúcim riešenie kubickéj rovnice sú rozmery konfokálneho objemu. Priemer konfokálneho objemu sa v danej kubickéj rovnici vyskytuje s druhou a štvrtou mocninou, zatiaľ čo jeho dĺžka sa vyskytuje s druhou mocninou. Ako bolo v tejto práci zistené, tieto parametre nemajú tvar časovej závislosti MSD, ale posúvajú danú krivku v smere osy y .



Obrázok 19: Graf znázorňujúci závislosť MSD na čase pri zadaní správnej dĺžky konfokálneho objemu, správnom počte častíc a autokorelačnej funkcie získanej modelom Pure Diffusion pri správom určení priemeru konfokálneho objemu (zelená), menšom priemere konfokálneho objemu oproti skutočnosti (modrá) a väčšom priemere oproti skutočnosti (žltá)

Ako je možné vidieť na obrázku 19, priemer konfokálneho objemu má naozaj výrazný vplyv na posun tejto krivky od teoretickej hodnoty. Hodnoty väčšieho a menšieho konfokálneho objemu voči skutočnosti boli zvolené približne o 50 % rozdielne voči priemeru zistenému kalibráciou. Tieto hodnoty boli zvolené ako modelový príklad, takéto široké rozpätie priemeru konfokálneho objemu je, pri reálnom meraní a správnej kalibrácii, takmer vylúčené. Tento obrázok však názorne ilustruje, prečo je pri meraní mikroeologických vlastností pomocou metódy FCS veľmi dôležitá správna kalibrácia konfokálneho objemu.

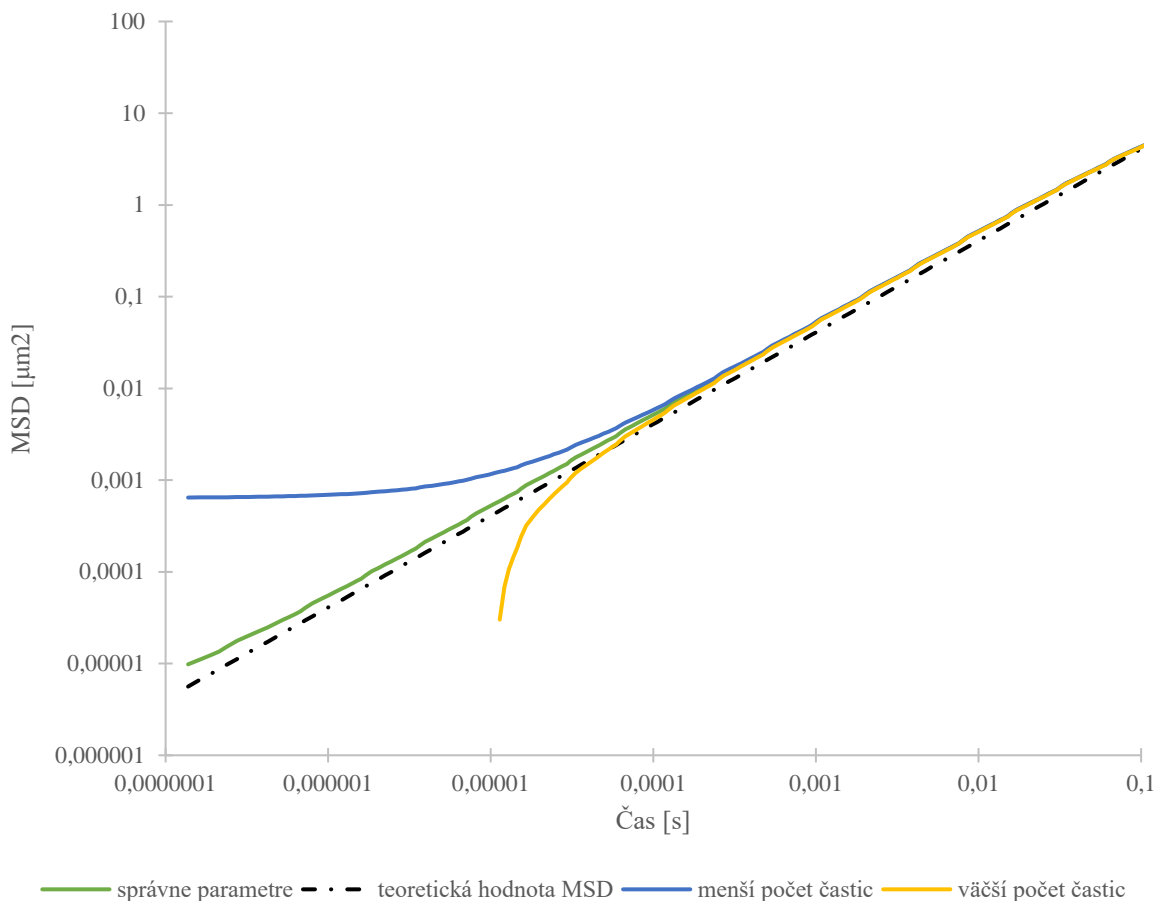
Ako už bolo v úvode tejto kapitoly spomínané, druhým rozmerom konfokálneho objemu, ktorý vstupuje do riešenia kubického rovnice, je dĺžka konfokálneho objemu. Tento parameter sa v danej rovnici, na rozdiel od priemeru konfokálneho objemu, vyskytuje len s druhou mocninou. Jeho vplyv na závislosť MSD na čase je znázornený na obrázku 20. Opäť, takisto ako v prípade priemeru konfokálneho objemu, boli zvolené modelové hodnoty, ktoré sa líšili od experimentálne zistenej hodnoty taktiež približne o 50 %. Tu je možné pozorovať, že zmena dĺžky konfokálneho objemu nemá na časovú závislosť MSD žiadny výrazný vplyv. Na obrázku 20 je možné pozorovať malý posun kriviek a v prípade určenia menšej dĺžky konfokálneho objemu voči skutočnosti dochádza k miernemu odkloneniu MSD krivky od teoretických hodnôt.



Obrázok 20: Graf znázorňujúci závislosť MSD na čase pri zadaní správneho priemeru konfokálneho objemu, správnom počte častíc a autokorelačnej funkcie získanej modelom Pure Diffusion pri správnom určení dĺžky konfokálneho objemu (zelená), menšej dĺžke konfokálneho objemu oproti skutočnosti (modrá) a väčšej dĺžke oproti skutočnosti (žltá)

Posledným parametrom, ktorý do kubickvej rovnice vstupuje, je počet častíc. Ako sa ukázalo, tento parameter má najväčší vplyv na tvar MSD krivky. Nevýhodou tohto parametra je, že ho z výsledkov fitu FCS nie je možné dostať jednoznačne určený. Je získaný ako určitá hodnota \pm určitá chyba. Dosadením rôznych hodnôt z tohto intervalu do kubickvej rovnice je možné dostať MSD krivky, ktoré znázorňuje obrázok 21. Ako je možné si všimnúť, pri zadaní nesprávnych hodnôt dochádza v nízkych časoch k výraznému odchýleniu hodnoty MSD od teoretickej hodnoty. Treba podotknúť, že v tomto prípade sú, na rozdiel od predchádzajúcich obrázkov, kde bol porovnávaný vplyv rozmerov konfokálneho objemu, krivky vytvorené reálnymi experimentálne zistenými dátami a skutočná hodnota častíc sa od väčšej hodnoty a menšej hodnoty líši približne o 0,5 %.

Momentálne jedinou možnosťou, ako zistiť skutočný počet častíc v konfokálnom objeme a získať tak MSD krivku, ktorá bude zmysluplná, je metóda pokus-omyl. Z intervalu počtu častíc zisteným fitom je potrebné dosádzať hodnoty počtu častíc až kým nie je získaná krivka, ktorá je na svojom začiatku vyrovnaná. Ak je počet častíc, ktorý je zadaný do výpočtu väčší než skutočný počet častíc, hodnoty MSD vyjdú v nízkych časoch záporné, čo samozrejme nedáva zmysel. Pokiaľ je naopak počet častíc menší, hodnoty MSD naopak vyjdú príliš vysoké.



Obrázok 21: Graf znázorňujúci závislosť MSD na čase pri zadaní autokorelačnej funkcie získanej modelom Pure Diffusion, správneho priemeru a dĺžky konfokálneho objemu a pri správnom určení počtu častíc (zelená), menšom počte častíc oproti skutočnosti (modrá) a väčšom počte častíc oproti skutočnosti (žltá)

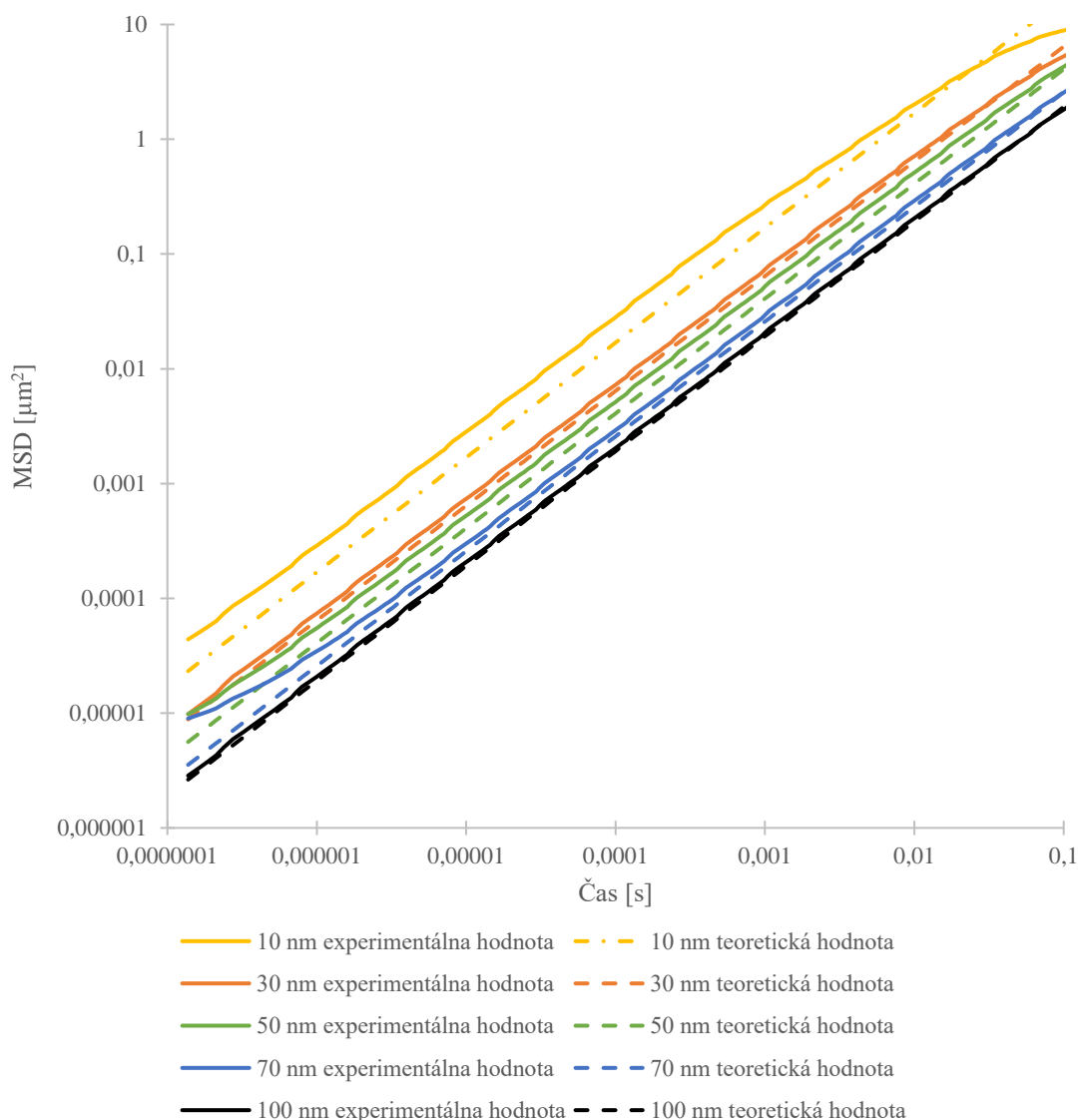
5.4 Mikroreologické vlastnosti glycerolu

Správanie častíc v daných prostrediach bolo v tejto práci sledované dvoma spôsobmi. Prvým z nich sú spomínané závislosti MSD na čase, ktoré boli vyhodnocované prostredníctvom software MATLAB, druhým spôsobom bolo sledovanie difúzneho koeficientu jednotlivých častíc v danom prostredí.

Vďaka newtonovskej povahe roztokov glycerolu bola predikcia tvaru závislosti MSD na čase lineárna. Táto lineárna závislosť bola potvrdená v práci **Jakuba Mondeka** [4] aj **Petry Kábrtovej** [3]. Výsledky získané v tejto práci sa odlišujú od ich výsledkov. MSD krivky experimentálne zistené v tejto práci vykazujú lineárne chovanie len vo vode a v 50 % glycerole, vo všetkých vyšších koncentráciách má časová závislosť MSD nelineárny trend.

Ako však bolo diskutované v kapitole 5.3, výrazný vplyv na tvar MSD krivky má použitý fitovací matematický model. **Petra Kábrtová** [48] použila vo svojej práci na získanie fitu model *Pure Diffusion* pre roztoky vody aj glycerolu. V tejto práci bolo možné použiť tento model len na vzorky častíc v prostredí deionizovanej vody. Získané MSD krivky pre vodné prostredie sú vyobrazené na obrázku 22, na ktorom je možné pozorovať, že získané hodnoty sa naozaj blížia teoretickým hodnotám.

U 70 nm častíc je vidieť na začiatku krivky odchýlenie od teoretickej hodnoty. Ako bolo diskutované v kapitole 5.3, toto odchýlenie je spôsobené pravdepodobne určením nesprávneho (menšieho) počtu častíc v konfokálnom objeme.

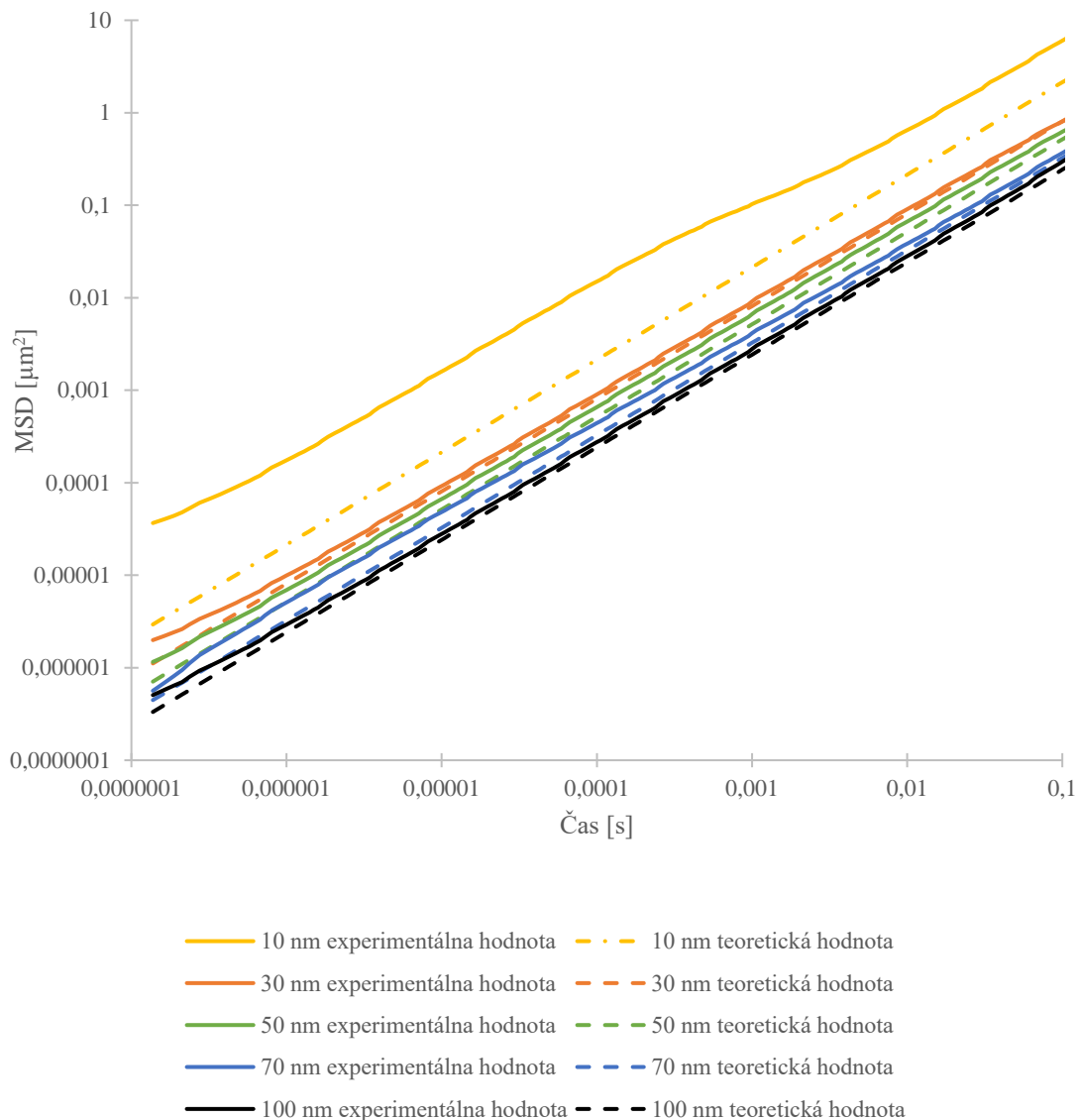


Obrázok 22: Časová závislosť MSD pre rôzne veľkosti častíc v prostredí deionizovanej vody

Avšak, pre vodné roztoky glycerolu nebolo možné model *Pure Diffusion* použiť. Fotofyzika použitých častíc v danom prostredí tomuto modelu neodpovedala a model sa odmietal chytiť. Preto bolo nutné použiť model *Triplet Extended 3D*. Ako ilustruje obrázok 23 na ktorom je vyobrazená časová závislosť MSD pre rôzne veľkosti častíc v 50 % glycerole, napriek použitiu zložitejšieho modelu vychádzajú v tomto prípade experimentálne hodnoty veľmi blízko teoretickým hodnotám. U častíc o veľkosti 70 nm dochádza opäť na začiatku krivky k odchýleniu, čo môže byť spôsobené nesprávnym odhadom počtu častíc.

Ďalej je možné si na tomto obrázku všimnúť značné odchýlenie krivky pre 10 nm od teoretickej hodnoty, čo môže byť spôsobené nesprávnou kalibráciou konfokálneho objemu. Navyše táto krivka v stredných časoch začína vykazovať nelineárne chovanie. Tu sa pravdepodobne začína prejavovať vplyv komplikovanejšieho fitovacieho modelu, pretože tieto

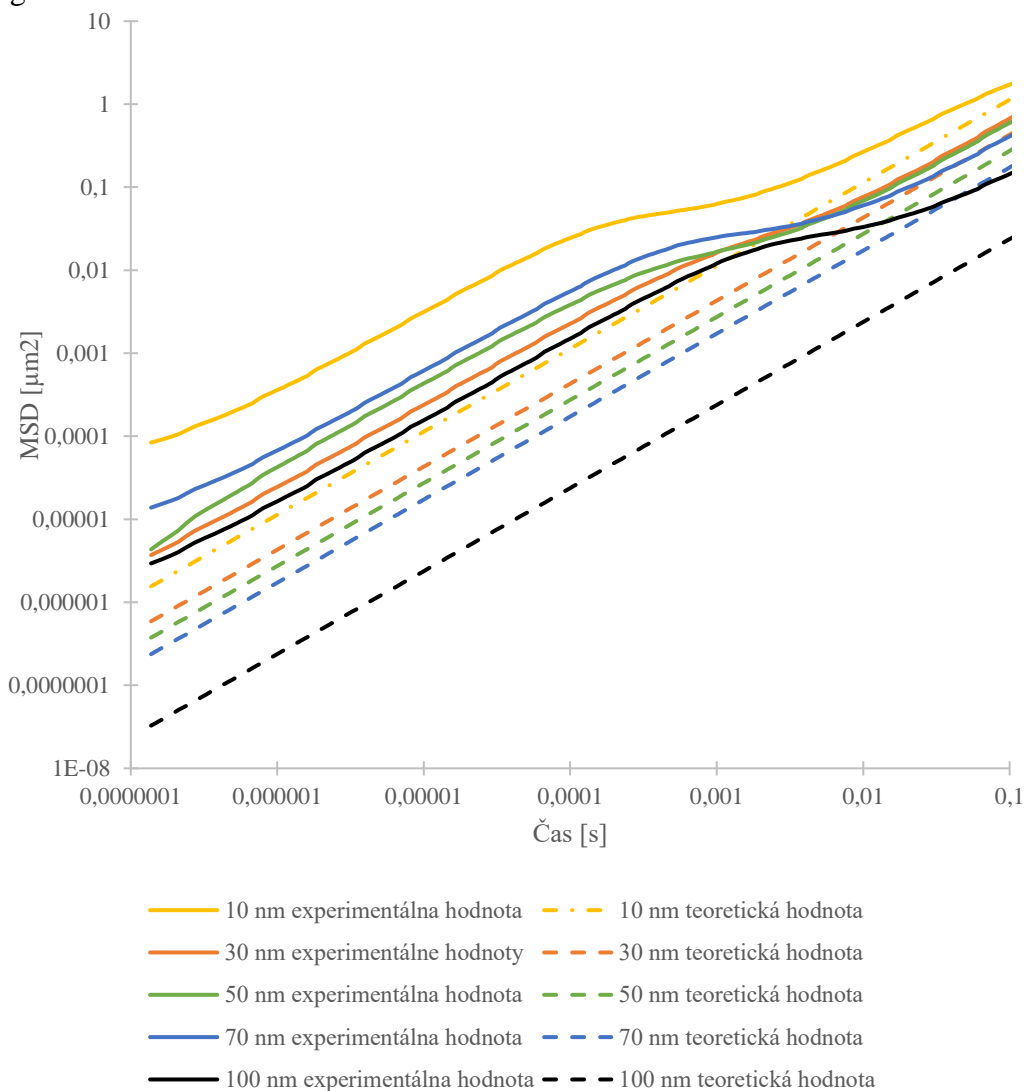
jediné častice mali inú fluorescenciu ako ostatné a pri vyhodnocovaní bolo nutné aby fit čo najlepšie odpovedal, ich vyhodnotiť na dva difúzne koeficienty. Nafitovaná autokorelačná krivka pre 10 nm častice sa teda blížila svojim tvarom krivke vyobrazenej na obrázok 18, zatiaľ čo všetky ostatné krivky napriek komplikovanejšiemu použitému modelu, sa stále blíži typickému tvaru obrátenej sigmoidy.



Obrázok 23: Časová závislosť MSD pre rôzne veľkosti častíc v prostredí 50 hm. % glycerolu

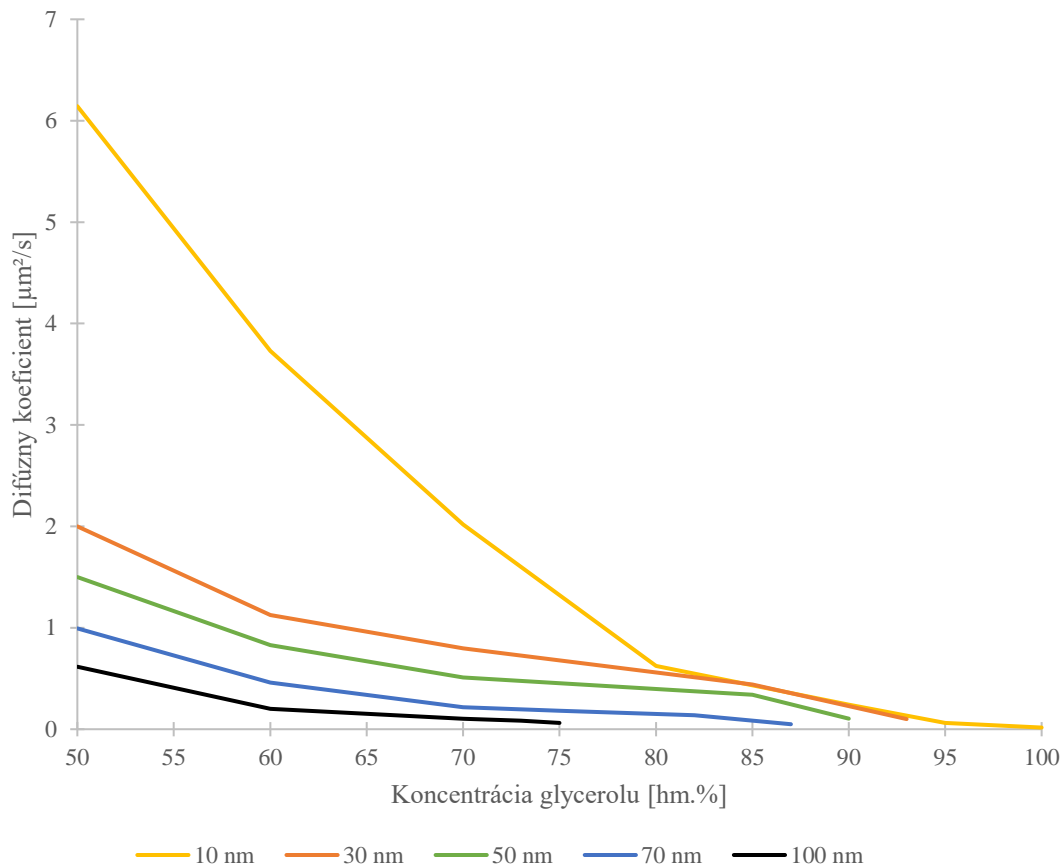
Diametrálne odlišné výsledky boli získané pre všetky vyššie koncentrácie glycerolu. Na obrázku 24 je možné vidieť MSD krivky v 60 hm.% glycerole. Na vyhodnotenie týchto dát v programe SymPhoTime 64 bol opäť použitý model *Triplet Extended 3D*. Napriek tomu, že nebolo nutné použiť do modelu viac difúzných koeficientov či tripletov ako tomu bolo u 50 % glycerolu a 10 nm častíc, tieto MSD krivky už nevykazujú lineárne chovanie napriek predpokladu, že vodné roztoky glycerolu sú newtonovská kvapalina a nemali by vykazovať viskoelastické vlastnosti. Tu je možné predpokladať, že vplyv na finálny tvar kriviek MSD má naozaj použitie komplikovanejšieho matematického modelu a na vyhodnotenie dát by bolo vhodnejšie použiť model *Pure Diffusion*, keby je to možné.

Na tomto grafe je ale opäť možné v nízkych časoch sledovať vplyv nesprávneho určenia počtu častíc v konfokálnom objeme – a to konkrétne pre veľkosť 50 nm, kedy bol pravdepodobne počet častíc v objeme určený o málo viac, než bol skutočný. Ako už bolo diskutované v kapitole 5.3, počet častíc je hodnota, ktorá je zistená s určitou neistotou, ktorá vo výpočte nie je zohľadnená a musela by byť otestovaná pre všetky hodnoty v tomto intervale. Ďalej tento nevhodne určený počet častíc môže byť spôsobený aj koncentračnými nehomogenitami.



Obrázok 24: Časová závislosť MSD pre rôzne veľkosti častíc v prostredí 60 hm. % glycerolu

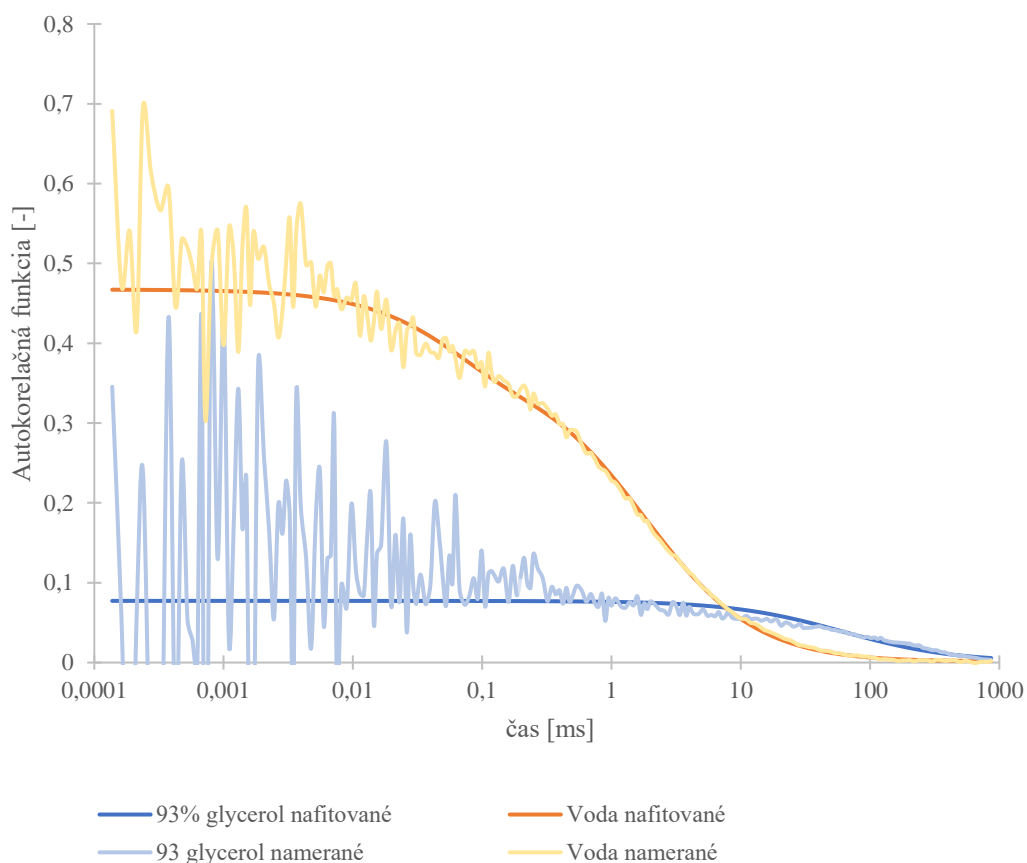
Okrem pohľadu cez MSD krivky bolo na správanie častíc v prostredí o rôznej viskozite ešte nahliadané druhým spôsobom a to pomocou difúzneho koeficientu. Ten bol získaný z nameraných FCS dát pomocou fitu. Bolo predpokladané, že so zvyšujúcou sa koncentráciou glycerolu bude pozorované znižovanie difúzneho koeficientu. Tento predpoklad bol úspešne overený a trend bol takmer lineárny, čo taktiež odpovedá predikcii, nakoľko so zvyšujúcou sa koncentráciou by sa mala zvyšovať viskozita roztoku a tá by mala vstupovať nepriamoúmerne do Stokes-Einsteinovej rovnice. Jej prejavom by teda malo byť spomalenie častíc a zmenšenie ich difúzneho koeficientu. Toto ilustruje obrázok 25, kde je ďalej možné tiež sledovať ďalší predpokladaný trend a to, že so zväčšujúcim sa veľkosťou častíc bude klesať difúzny koeficient.



Obrázok 25: Závislosť difúzneho koeficientu na koncentrácii glycerolu pre častice o rôznych veľkostiach

Na obrázku 25 je možné si ďalej všimnúť, že všetky krivky, okrem krivky pre 10 nm, sa končia skôr ako v 100 hm.% glycerolu. V týchto miestach sa krivky už limitne blížia nule. Tieto koncentrácie glycerolu, pri ktorých sa difúzny koeficient blíži nule, boli určené ako koncentrácie, v ktorých častice už takmer nedifundujú a je možné povedať, že častice sa vo viskozite prostredia odpovedajúcej danej hmotnostnej koncentrácii glycerolu zastavili. Experimentálne bola táto koncentrácia určená ako tá, pri ktorej vyhodnocovaní nameraných dát z FCS, už autokorelačné funkcie nekorelovali a chyba merania bola príliš veľká. Porovnanie nekorelujúcich a korelujúcich dát je znázornené na obrázku 26.

Vo všeobecnosti, pri meraní bolo možné pozorovať istý trend - so znižujúcou sa hodnotou difúzneho koeficientu autokorelačná funkcia vykazovala stále menej a menej typický charakter. Surové dáta bolo čím ďalej, tým ťažšie nafitovateľné daným matematickým modelom, zvyšovala sa chyba a nepresnosť merania. Toto mohlo byť spôsobené aj zmenou indexu lomu, kedy bol použitý objektív s vodnou imerziou, a index lomu vody je značne odlišný od indexu lomu koncentrovanejších roztokov glycerolu. Preto by bolo vhodné premerať tieto roztoky pomocou objektívu s olejovou imerziou, alebo by bolo vhodné použiť dvojohniskovú FCS, ktorá by tiež mala viesť k menším chybám v meraní. Z časových dôvodov nebola ani jedna z týchto metód vyskúšaná.



Obrázok 26: Autokorelačná funkcia pre 30 nm vo vode (oranžová) a autokorelačná funkcia pre 30 nm častice v 93 hm.% glycerole (modrá)

Z obrázku 25 je možné si ešte povšimnúť, že napriek tomu, že krivka pre 10 nm častice sa taktiež blíži nule, ako jediná pokračuje až do 100 hm.% glycerolu. Je to preto, lebo aj napriek nízkemu difúznemu koeficientu, stále vykazovala peknú autokorelačnú funkciu, ktorá sa dala vyhodnotiť. Preto pre túto jedinú veľkosť nebola určená viskozita, v ktorej by došlo k zastaveniu častíc. Výsledky pre ostatné veľkosti častíc sú zhrnuté v tabuľke 2. Pre koncentrácie glycerolu, v ktorých došlo k zastaveniu danej veľkosti častíc bola pomocou konvenčnej reologie zistená viskozita daného roztoku. Tá je taktiež uvedená v tabuľke 2.

Tabuľka 2: Koncentrácie glycerolu, v ktorých sa jednotlivé častice zastavili a odpovedajúca viskozita zistená reologickým meraním

Veľkosť častíc [nm]	Koncentrácia glycerolu [hm.%]	Viskozita [mPa·s]
30	93	328,63
50	90	222,25
70	87	150,28
100	75	41,23

5.5 Mikreoreologické vlastnosti agarózy

Tak isto, ako v prípade glycerolu, aj na mikreoreologické vlastnosti agarózy boli pozerané z dvoch uhľov. Výsledky uhľa pohľadu skrz difúzne koeficienty sú zobrazené v tabuľke 3.

Tabuľka 3: Difúzne koeficienty [$\mu\text{m}^2/\text{s}$] jednotlivých veľkostí častíc v rôznych prostrediach

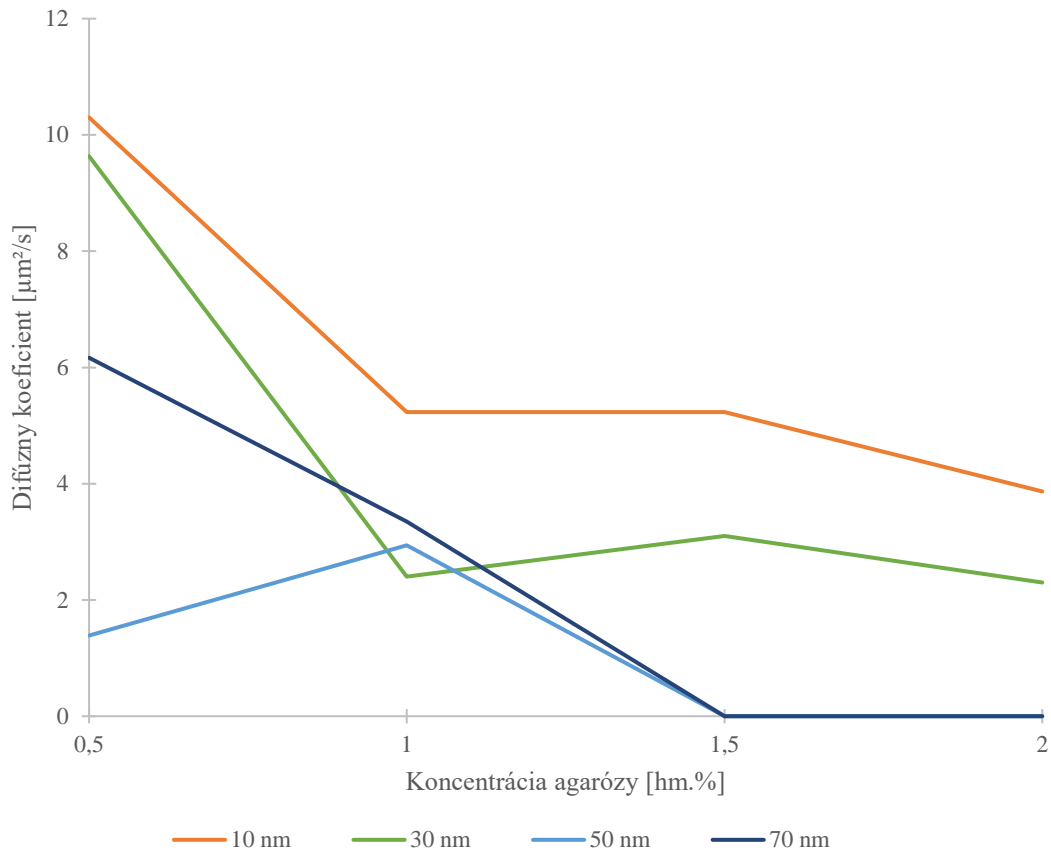
Veľkosť častíc [nm]	Koncentrácia agarózy [hm.%]			
	0,5	1	1,5	2
10	10,30	5,23	5,23	3,87
30	9,63	2,40	3,10	2,30
50	1,39	2,94	Autofluorescencia agarózy	Autofluorescencia agarózy
70	6,17	3,35	Autofluorescencia agarózy	-
100	Autofluorescencia agarózy	-	-	-

Pri meraní vyšlo niekoľko zaujímavých hodnôt, ktoré sa rádovo líšili od ostatných hodnôt. Bola to napríklad hodnota difúzneho koeficientu $188 \mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ pre častice o veľkosti 50 nm v 2 hm.% agarózy. Táto hodnota sa významne líši od hodnoty experimentálne zisteného difúzneho koeficientu týchto častíc v prostredí vody, ktorá sa pohybuje okolo $7 \mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$. Nie je pravdepodobné, aby v agarózovom géle, kde sa častice pohybujú v póroch, ktoré sú vyplnené vodou, sa častice pohybovali približne 26-krát rýchlejšie ako vo vodnom prostredí. Ako vo svojej práci diskutovala *Alica Dušenková* [49], pri takýchto vysokých hodnotách difúzneho koeficientu pravdepodobne nepôjde o fluorescenčný signál z častíc ale zo samotnej agarózy.

V tabuľke 3 je možné si všimnúť určitý trend – so zvyšujúcou sa koncentráciou agarózy dochádza k vykazovaniu autofluorescencie agarózy u čoraz menších častíc. Na základe tohto trendu by sa dalo predpokladať, že v týchto koncentráciách dochádza k zastaveniu častíc, častice sa už nepohybujú a získaný signál je autofluorescencia agarózy. Preto neboli niektoré kombinácie koncentrácie agarózy a veľkostí častíc ďalej merané.

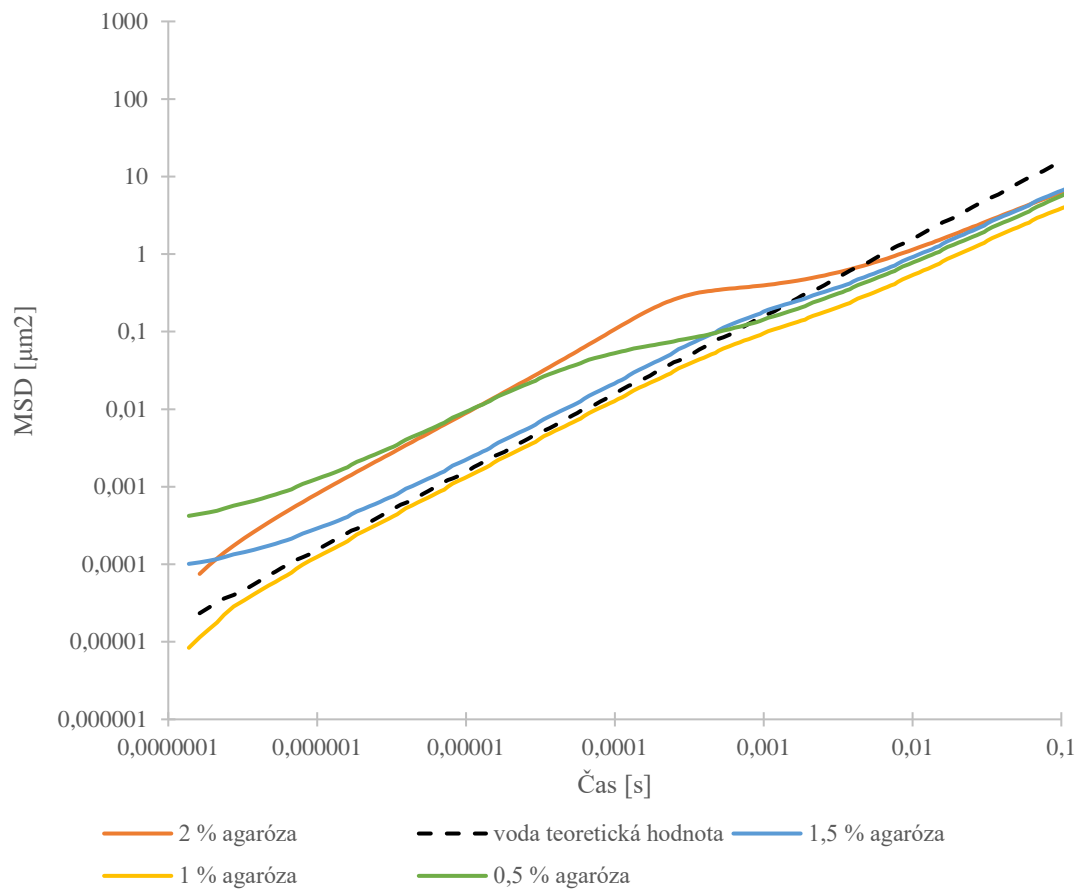
Ďalej je možné z tabuľky vyčítať, že na rozdiel od prostredia glycerolu, prostredie agarózy nevykazuje žiadnu závislosť medzi koncentráciou použitej agarózy a difúznymi koeficientom daných častíc. Graficky to znázorňuje obrázok 27.

Difúzne koeficienty sa rádovo približujú experimentálne zisteným koeficientom v prostredí vody, ktoré sú uvedené v tabuľke 1. Pri meraní v rôznych častiach hydrogélu boli zistené rozdiely v difúznymi koeficientoch v jednotlivých častiach gélu. Toto môže byť spôsobené tým, že agaróza je fyzikálny gél, v ktorom nie je možné nijakým spôsobom ovplyvniť vnútorné usporiadanie a póry v štruktúre sú rôzne veľké, čo spôsobuje, že častice sú v niektorých miestach rýchlejšie, inde sa zastavia a niekde sú pomalšie.



Obrázok 27: Závislosť difúzneho koeficientu daných častíc na koncentrácii použitej agarózy

Ďalej bolo na mikroreologické vlastnosti pozerané aj pomocou závislosti MSD na čase. Pre porovnanie dát bola zvolená ako teoretická hodnota hodnota MSD danej veľkosti častíc vo vode. Pre častice o veľkosti 10 nm sú dané krivky v rôzne koncentrovaných agarózach znázornené na obrázku 28. Tu je možné pozorovať značné odchýlenie a zmenu daných kriviek oproti teoretickej hodnote. Agarózové hydrogély sú viskoelastické materiály, u ktorých tvar MSD kriviek závisí na obsahu viskózneho a elastickej zložky. V nízkych časoch je možné pozorovať odchýlenie MSD od teoretickej hodnoty – ako už bolo v predchádzajúcich kapitolách diskutované, na toto odchýlenie má vplyv presné určenie počtu častíc. V stredných časových intervaloch je možné pozorovať zmenu tvaru krivky. Táto zmena je pravdepodobne spôsobená prevahou elastickej zložky nad viskóznou. Posun tejto hodnoty k nižším hodnotám MSD indikuje väčší podiel zložky elastickej. To značí zadržiavanie častíc štruktúrou hydrogélu. V dlhších časoch možno opäť pozorovať lineárny trend závislosti MSD na čase, kde už pravdepodobne nedochádza k zadržiavaniu častíc štruktúrou, a častice tak môžu difundovať ďalej.



Obrázok 28: Závislosť MSD na čase pre 10 nm častice a rôzne koncentrácie agarózy

6 ZÁVER

Cieľom tejto diplomovej práce bolo vykonať experimenty s rôznymi veľkosťami častíc v prostredí o rôznej viskozite a určiť viskozitu, v ktorej dôjde k zastaveniu jednotlivých častíc. Na splnenie tohto zadania bola vybraná technika mikrereológie, ktorá bola meraná prostredníctvom fluorescenčnej korelačnej spektroskopie. Táto metóda pre mikrereológiu nie je vo svete príliš používaná najmä pre náročné a pracné vyhodnocovanie dát.

Časť tejto práce bola preto sústredená hlavne na optimalizáciu vyhodnocovania dát, kedy bol upravený už existujúci skript pre programovací jazyk MATLAB tak, aby bolo vyhodnocovanie čo najviac intuitívne a obsahovalo čo najmenej manuálnych krokov. Prostredníctvom tohto skriptu sú získané hodnoty MSD. Z nich je možné vytvoriť graf závislosti MSD na čase. V ďalšej časti práce bol detailne rozobraný vplyv jednotlivých experimentálne zisťovaných parametrov na tvar MSD krivky. Bolo zistené, že výrazný vplyv na tvar krivky má počet častíc v konfokálnom objeme. Tento parameter je zároveň najnáročnejšie určiť presne, vzhľadom k tomu, že z nameraných dát je extrahovaný v intervale rozpätí a môže byť ovplyvnený nehomogenitou vzorku.

Najzásadnejším parametrom, ktorý môže viesť k nesprávnej interpretácii dát, je autokorelačná funkcia. Tú je možné z nameraných dát získať nafiťovaním matematickým modelom v prostredí programu SymPhoTime 64. Ako najvhodnejší sa ukazuje byť model *Pure Diffusion*. Iné modely môžu viesť na nelineárnu závislosť MSD na čase aj v prípade newtonovských kvapalín, ktoré by mali vykazovať lineárnu závislosť.

Vplyv rozmerov konfokálneho objemu na tvar časovej závislosti MSD nebol oproti predchádzajúcim dvom parametrom nijak významný. Priemer konfokálneho objemu túto závislosť posúva v smere osy y oproti teoretickým hodnotám. Dĺžka posúva taktiež ale v oveľa menšej miere ako priemer. Tomuto posunu sa dá zabrániť správnou kalibráciou konfokálneho objemu.

Ako modelové prostredie pre experimenty boli v tejto práci vybrané rôzne koncentrácie vodných roztokov glycerolu a rôzne koncentrované agarózové gély. Do týchto prostredí boli inkorporované fluorescenčné nanočastice piatich veľkostí, kedy najmenšie častice mali 10 nm a najväčšie 100 nm. Najskôr bola vykonaná spektrálna a veľkostná charakterizácia daných častíc, kedy bolo zistené, že veľkosť častíc neodpovedá veľkosti uvádzanej výrobcom. Následne boli pripravené roztoky glycerolu a agarózové gély premerané pomocou FCS. Dáta z týchto merania boli pomocou programu MATLAB a MS Excel prevedené na MSD krivky.

Prostredníctvom difúzneho koeficientu a korelačných funkcií boli určené koncentrácie glycerolových roztokov, v ktorých dôjde k zastaveniu jednotlivých častíc. Pomocou reológie bola určená viskozita daných roztokov. 10 nm častice sa nezastavili ani v 100 % glycerole.

Častice v agarózových géloch nevykazovali, na rozdiel od glycerolových roztokov, lineárnu závislosť difúzneho koeficientu na koncentrácii. To je spôsobené tým, že tieto gély sú fyzikálne sieťované a rôznych miestach majú rôzne vlastnosti. Bolo však u nich možné pozorovať zaujímavú charakteristiku – od určitej kombinácie koncentrácie agarózy a veľkosti častíc, častice vykazovali nepravdepodobne vysoký difúzny koeficient. Pravdepodobne šlo o autofluorescenciu agarózy a výskyt tohto vysokého difúzneho koeficientu by mohol indikovať zastavenie častíc v danom prostredí.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] GUIGAS, Gernot, Claudia KALLA a Matthias WEISS. Probing the Nanoscale Viscoelasticity of Intracellular Fluids in Living Cells. *Biophysical Journal* [online]. 2007, **93**(1), 316-323 [cit. 2019-04-10]. DOI: 10.1529/biophysj.106.099267. ISSN 00063495. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349507712845>
- [2] RATHGEBER, Silke, Hans-Josef BEAUVISAGE, Hubert CHEVREAU, Norbert WILLENBACHER a Claude OELSCHLAEGER. Microrheology with Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Langmuir* [online]. 2009, **25**(11), 6368-6376 [cit. 2019-04-10]. DOI: 10.1021/la804170k. ISSN 0743-7463. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la804170k>
- [3] KÁBRTOVÁ, Petra. *Mikroreologie pomocí fluorescenční korelační spektroskopie*. Brno, 2015. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Ing. Jakub Mondek.
- [4] MONDEK, Jakub. *Časově rozlišená fluorescence ve výzkumu interakcí hyaluronanu a koloidních systémů*. Brno, 2018. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
- [5] HNYLUCHOVÁ, Zuzana. *Mikroreologie biokoloidních systémů*. Brno, 2016. Dizertační práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
- [6] BARNES, Howard, J. HUTTON a Kenneth WALTERS. *An introduction to rheology*. New York: Distributors for the U.S. and Canada, Elsevier Science Pub. Co., 1989. Rheology series, 3. ISBN 0444871403.
- [7] NEWTON, Isaac. *Philosophiae naturalis principia mathematica*. Glasguae, 1822.
- [8] A Basic Introduction to Rheology. In: *Malvern Panalytical* [online]. Worcestershire: Malvern Instruments Worldwide, 2016 [cit. 2019-03-18]. Dostupné z: <http://cdn.technologynetworks.com/TN/Resources/PDF/WP160620BasicIntroRheology.pdf>
- [9] HOLUBOVÁ, Renata. *Základy reologie a reometrie kapalin*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-4178-8.
- [10] BARMAN, Purna, Rishi KAIRI, Ashoke DAS a Rabiul ISLAM. An Overview of Non-Newtonian Fluid. *International Journal of Applied Science and Engineering* [online]. 2016, **4**(2) [cit. 2019-03-10]. DOI: 10.5958/2322-0465.2016.00011.3. ISSN 2321-0745. Dostupné z: <http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:ijase&volume=4&issue=2&article=006>
- [11] CHEN, Daniel, Qi WEN, Paul JANMEY, John CROCKER a Arjun YODH. Rheology of Soft Materials. *Annual Review of Condensed Matter Physics* [online].

- 2010, **1**(1), 301-322 [cit. 2019-03-16]. DOI: 10.1146/annurev-conmatphys-070909-104120. ISSN 1947-5454. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-conmatphys-070909-104120>
- [12] VAŠINA, Martin. *Studium tlumicích vlastností materiálů: Study of damping properties of materials : zkrácená verze habilitační práce*. Brno: VUTIUM, 2009. ISBN 978-80-214-3848-4.
- [13] MEYERS, Marc a Krishan CHAWLA. *Mechanical behavior of materials*. 2nd ed. New York: Cambridge University Press, 2009. ISBN 978-0-521-86675-0.
- [14] Argand diagram. *Encyclopædia Britannica* [online]. Encyclopædia Britannica, inc., 2006 [cit. 2019-03-19]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/Argand-diagram>
- [15] BROWN, Robert. Mikroskopische Beobachtungen über die im Pollen der Pflanzen enthaltenen Partikeln, und über das allgemeine Vorkommen activer Molecüle in organischen und unorganischen Körpern. *Annalen der Physik und Chemie* [online]. 1828, **90**(10), 294-313 [cit. 2019-03-14]. DOI: 10.1002/andp.18280901016. ISSN 00033804. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/andp.18280901016>
- [16] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 6., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2010. ISBN 978-80-7080-745-3.
- [17] KRÁLOVÁ, Magda. BROWNŮV POHYB. *Techmania Science Center: Eduportal* [online]. Plzeň: © Techmania Science Center, o.p.s., b.r. [cit. 2019-03-14]. Dostupné z: <https://edu.techmania.cz/cs/encyklopedie/fyzika/strukturalatek/kineticka-teorie-latek/brownuv-pohyb>
- [18] VON SMOLUCHOWSKI, M. Zur kinetischen Theorie der Brownschen Molekularbewegung und der Suspensionen. *Annalen der Physik* [online]. 1906, **326**(14), 756-780 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1002/andp.19063261405. ISSN 00033804. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/andp.19063261405>
- [19] EINSTEIN, A. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen. *Annalen der Physik* [online]. 1905, **322**(8), 549-560 [cit. 2019-03-15]. DOI: 10.1002/andp.19053220806. ISSN 00033804. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/andp.19053220806>
- [20] GREGERSEN, Erik. Brownian motion. *Encyclopædia Britannica* [online]. Encyclopædia Britannica, inc., b.r. [cit. 2019-03-15]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/Brownian-motion>
- [21] POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [22] GARDEL, M.L, M.T. VALENTINE a D.A WEITZ. *Microrheology. Microscale diagnostic techniques*. New York: Springer, 2005, s. 1-55. ISBN 3540230998.
- [23] MACKINTOSH, F.C. a C.F. SCHMIDT. *Microrheology. Current Opinion in Colloid & Interface Science* [online]. 1999, **4**(4), 300-307 [cit. 2019-04-04]. DOI:

- 10.1016/S1359-0294(99)90010-9. ISSN 13590294. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359029499900109>
- [24] FREUNDLICH, Herbert a William SEIFRIZ. Über die Elastizität von Solen und Gelen. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* [online]. 1923, **104**(1) [cit. 2019-04-04]. DOI: 10.1515/zpch-1923-10415. ISSN 2196-7156. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/zpch.1923.104.issue-1/zpch-1923-10415/zpch-1923-10415.xml>
- [25] W., Bradley, Stephen KEEN, Philipus J., Yacine HEMAR a Martin A.K. A Practical Review of Microrheological Techniques. DURAIRAJ, Rajkumar, ed. *Rheology - New Concepts, Applications and Methods* [online]. InTech, 2013 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.5772/53639. ISBN 978-953-51-0953-2. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/rheology-new-concepts-applications-and-methods/a-practical-review-of-microrheological-techniques>
- [26] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006. ISBN 0387312781.
- [27] ZÁRUBA, Kamil. *Analytická chemie*. Vydání první. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2016. ISBN 978-80-7080-951-8.
- [28] Basic Principles of Fluorescence Spectroscopy. SAUER, Markus, Johan HOFKENS a Jörg ENDERLEIN. *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2011, s. 1-30 [cit. 2019-04-04]. DOI: 10.1002/9783527633500.ch1. ISBN 9783527633500. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9783527633500.ch1>
- [29] VALEUR, Bernard a M. N. BERBERAN-SANTOS. *Molecular fluorescence: principles and applications*. Second edition. Chichester, England: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2012.
- [30] BERANOVÁ, Lenka, Jana HUMPOLÍČKOVÁ a Martin HOF. Fluorescenční korelační spektroskopie. *Chemické Listy* [online]. b.r., **2009**(103), 125-129 [cit. 13.3.2019]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_02_125-129.pdf
- [31] SCHWILLE, Petra a Elke HAUSTEIN. *Fluorescence Correlation Spectroscopy: An Introduction to its Concepts and Applications* [online]. b.r., , 1-33 [cit. 2019-03-17]. Dostupné z: <https://pages.jh.edu/~iic/resources/ewExternalFiles/FCS-Schwille.pdf>
- [32] ŠEVČÍKOVÁ, Petra, Věra KAŠPÁRKOVÁ, Jiří KREJČÍ a Pavlína VLTAVSKÁ. Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. *Chemické Listy* [online]. 2014, **108**(5), 479-482 [cit. 2019-04-10]. ISSN 1213-7103. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2014_05_479-482.pdf
- [33] STETEFELD, Jörg, Sean A. MCKENNA a Trushar R. PATEL. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews* [online]. 2016, **8**(4), 409-427 [cit. 2019-04-21]. DOI: 10.1007/s12551-016-0218-6. ISSN 1867-2450. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12551-016-0218-6>

- [34] PABST, W. a E. GREGOROVÁ. *Charakterizace částic a částicových soustav*. Praha: VŠCHT, 2007.
- [35] KVÍTEK, Libor. Metody studia koloidních soustav. *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis* [online]. Olomouc, Czech Republic, b.r. [cit. 2019-04-07]. Dostupné z: <http://chemikalie.upol.cz/skripta/msk/msk.pdf>
- [36] CICUTA, Pietro a Athene M. DONALD. Microrheology: a review of the method and applications. *Soft Matter* [online]. 2007, **3**(12) [cit. 2019-04-22]. DOI: 10.1039/b706004c. ISSN 1744-683X. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b706004c>
- [37] An Introduction to DLS Microrheology. In: *Malvern Panalytical* [online]. Worcestershire: Malvern Instruments Worldwide, 2015 [cit. 2019-04-02]. Dostupné z: <https://cdn.technologynetworks.com/TN/Resources/PDF/WP120917IntroDLSMicro.pdf>
- [38] AHMED, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications. *Journal of Advanced Research* [online]. 2015, **6**(2), 105-121 [cit. 2019-03-27]. DOI: 10.1016/j.jare.2013.07.006. ISSN 20901232. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2090123213000969>
- [39] MAJEE, Sutapa Biswas. Introductory Chapter: An Overview of Hydrogels. MAJEE, Sutapa Biswas, ed. *Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels* [online]. InTech, 2016 [cit. 2019-03-28]. DOI: 10.5772/64302. ISBN 978-953-51-2509-9. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/emerging-concepts-in-analysis-and-applications-of-hydrogels/introductory-chapter-an-overview-of-hydrogels>
- [40] YAHIA, LHocine. History and Applications of Hydrogels. *Journal of Biomedical Sciences* [online]. 2015, **04**(02) [cit. 2019-03-28]. DOI: 10.4172/2254-609X.100013. ISSN 2254609X. Dostupné z: <http://www.jbiomed.com/biomedical-sciences/history-and-applications-of-hydrogels.php?aid=7218>
- [41] RENN, Donald W. Agar and agarose: indispensable partners in biotechnology. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development* [online]. 1984, **23**(1), 17-21 [cit. 2019-03-29]. DOI: 10.1021/i300013a004. ISSN 0196-4321. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/i300013a004>
- [42] RINAUDO, Marguerite. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International* [online]. 2008, **57**(3), 397-430 [cit. 2019-03-29]. DOI: 10.1002/pi.2378. ISSN 09598103. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/pi.2378>
- [43] ARMISN, Rafael. Agar and agarose biotechnological applications. *Hydrobiologia* [online]. 1991, **221**(1), 157-166 [cit. 2019-03-29]. DOI: 10.1007/BF00028372. ISSN 0018-8158. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00028372>
- [44] ROACH, Brendan L., Adam B. NOVER, Gerard A. ATESHIAN a Clark T. HUNG. Agarose Hydrogel Characterization for Regenerative Medicine Applications:

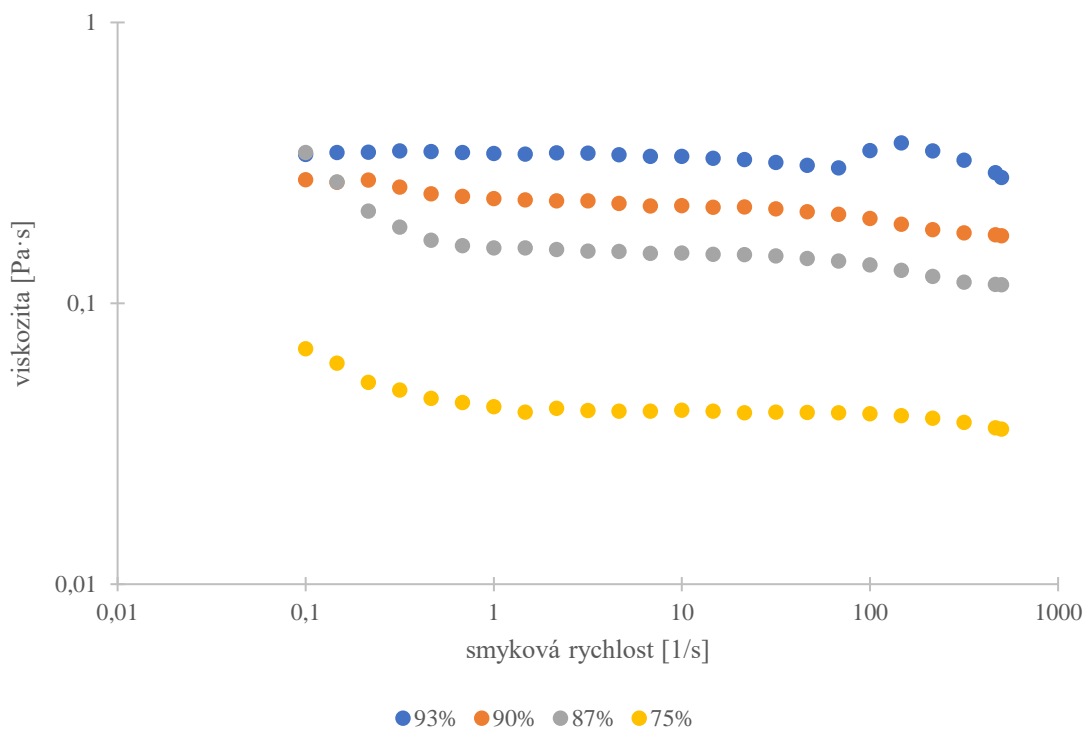
- Focus on Engineering Cartilage. NEVES, Nuno M., ed. a Rui L. REIS, ed. *Biomaterials from Nature for Advanced Devices and Therapies* [online]. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2016, s. 258-273 [cit. 2019-03-29]. DOI: 10.1002/9781119126218.ch16. ISBN 9781119126218. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781119126218.ch16>
- [45] PISKORZ, Tomasz K. a Anna OCHAB-MARCINEK. A Universal Model of Restricted Diffusion for Fluorescence Correlation Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2014, **118**(18), 4906-4912 [cit. 2019-04-10]. DOI: 10.1021/jp502467u. ISSN 1520-6106. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp502467u>
- [46] NEPAL, Manish, Alon OYLER-YANIV a Oleg KRICHEVSKY. Scanning fluorescence correlation spectroscopy as a versatile tool to measure static and dynamic properties of soft matter systems. *Soft Matter* [online]. 2015, **11**(46), 8939-8947 [cit. 2019-04-12]. DOI: 10.1039/C5SM01582K. ISSN 1744-683X. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C5SM01582K>
- [47] NANAYAKE, Kavindya K., Ehsan Akbari FAKHRABADI, Matthew W. LIBERATORE a Ashis MUKHOPADHYAY. Diffusion of Nanoparticles in Entangled Poly(vinyl alcohol) Solutions and Gels. *Macromolecules* [online]. 2019, **52**(3), 787-795 [cit. 2019-04-11]. DOI: 10.1021/acs.macromol.8b01917. ISSN 0024-9297. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.macromol.8b01917>
- [48] KÁBRTOVÁ, Petra. *Pokročilé mikrореologické techniky ve výzkumu hydrogelů*. Brno, 2017. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. Vedoucí práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.
- [49] DUŠENKOVÁ, Alica. *Optimalizace mikrореologických technik pro charakterizaci biopolymerních gelů*. Brno, 2017. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. Vedoucí práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
- [50] KAPUSTA, Peter. Absolute Diffusion Coefficients: Compilation of Reference Data for FCS Calibration. In: *PicoQuant* [online]. Berlin, b.r. [cit. 2019-04-14]. Dostupné z: https://www.picoquant.com/images/uploads/page/files/7353/appnote_diffusioncoefficients.pdf

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

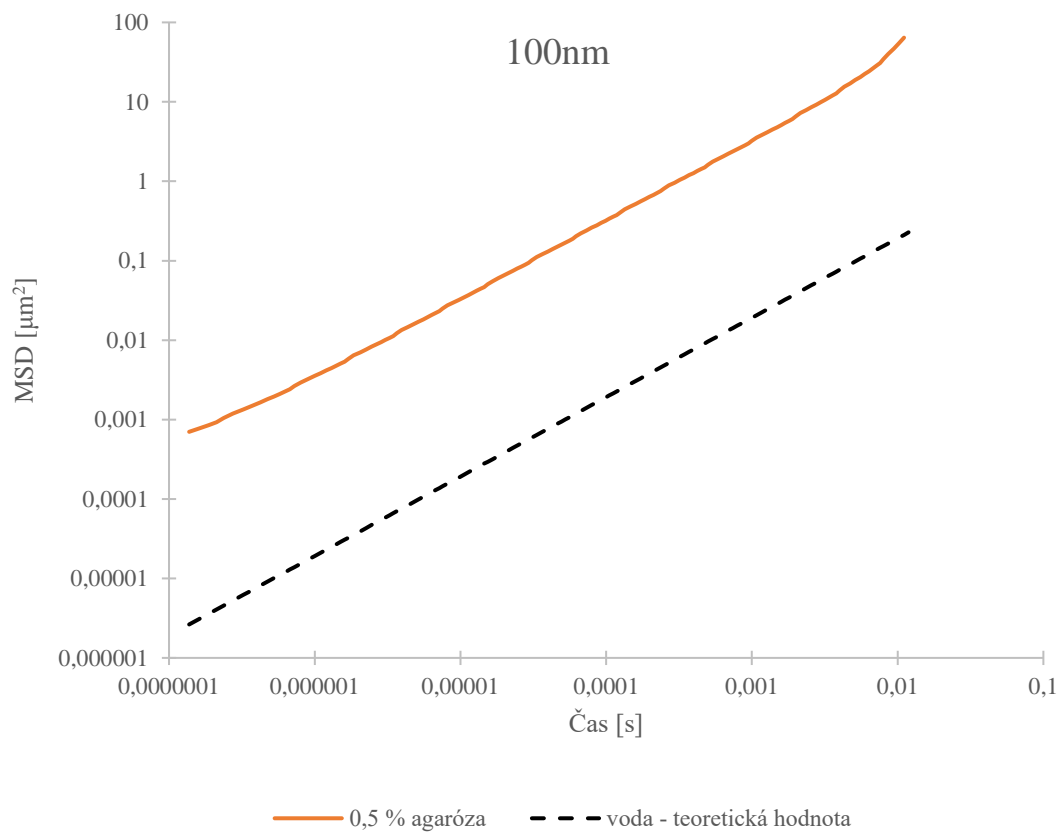
FCS	fluorescenčná korelačná spektroskopia
DLS	dynamický rozptyl svetla
QELS	kvázielastický rozptyl svetla
DWS	difúzna vlnová spektroskopia
MSD	stredná hodnota štvorca posunu
CTAB	cetyltrimethylamónium bromid
SFCS	skenovacia fluorescenčná korelačná spektroskopia
FLIM	fluorescence lifetime imaging microscopy
DMSO	dimethyl sulfoxid
σ	šmykové napätie
F	sila
A	plocha dosky v paralelnom doskovom modele
γ	relatívna deformácia pri namáhaní v šmyku
x'	vzdialenosť, o ktorú sa posunie vrchná doska v paralelnom doskovom modeli
h	vzdialenosť medzi spodnou a vrchnou doskou v paralelnom doskovom modeli
$\dot{\gamma}$	rýchlosť deformácie
t	časový interval
η	dynamická viskozita
τ	dotyčnicové napätie
ε	deformácia
δ	fázový posun
ω	uhlová frekvencia
ε_0	počiatočná deformácia
σ_0	je počiatočné napätie.
E^*	komplexný modul pružnosti
E'	elastická časť modulu pružnosti
E''	stratová časť modulu pružnosti
i	imaginárna jednotka
G^*	komplexný šmykový modul
G'	elastická časť šmykového modulu
G''	stratový modul šmykového modulu
$\tan \delta$	stratová tangenta
P'	pravdepodobnosť pohybu častíc
x'	posun častice
K	konštanta, ktorá ma polovičnú hodnotu ako difúzny koeficient
$\langle x^2 \rangle$	stredný posun
D_i	difúzny koeficient
J_i	difúzny tok
c	koncentrácia
k_B	Boltzmanova konštanta
f_i	frikčný koeficient

r_i	polomer častice
η_0	viskozita disperzného prostredia
T	termodynamická teplota
a	polomer častice
L	dĺžka posunu
d	dimenzia
$\langle \Delta \vec{x}^2(s) \rangle$	Laplaceová transformácia MSD
$\tilde{G}(s)$	viskoelastické spektrum
s	Laplaceová frekvencia
S_0	základný singletový stav
S_n	excitovaný singletový stav
T_1	excitovaný tripletový stav
$g_2(\tau)$	korelačná funkcia pre DLS
I	intenzita
B	baseline
β	koherenčný faktor
$g_1(\tau)$	korelačná funkcia elektrického poľa
τ_c	parameter úmerný difúznemu koeficientu
Q	vlnový vektor
R	hydrodynamický polomer
$G(t)$	autokorelačná funkcia
N	počet častíc
V_{eff}	efektívny objem
κ	faktor, určujúci excentricitu okonfokálneho objemu
w_{xy}	priemer konfokálneho objemu
w_z	dĺžka konfokálneho objemu

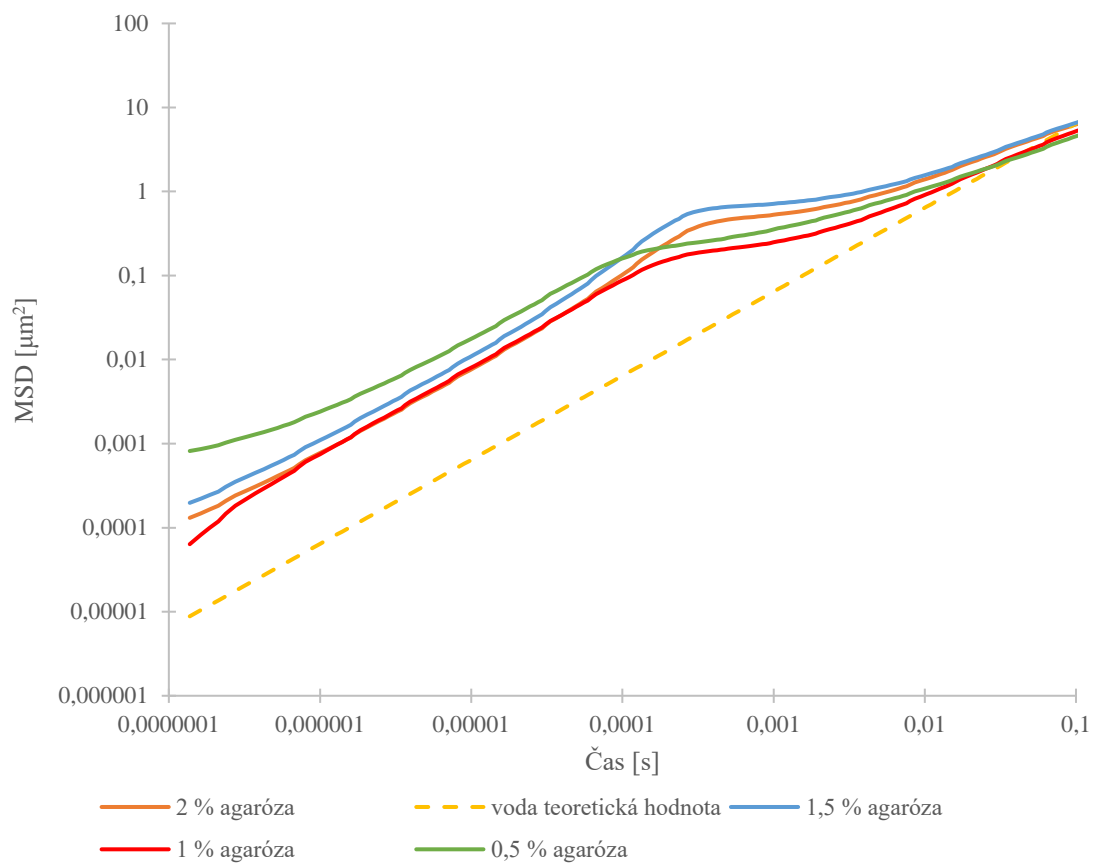
9 PRÍLOHY



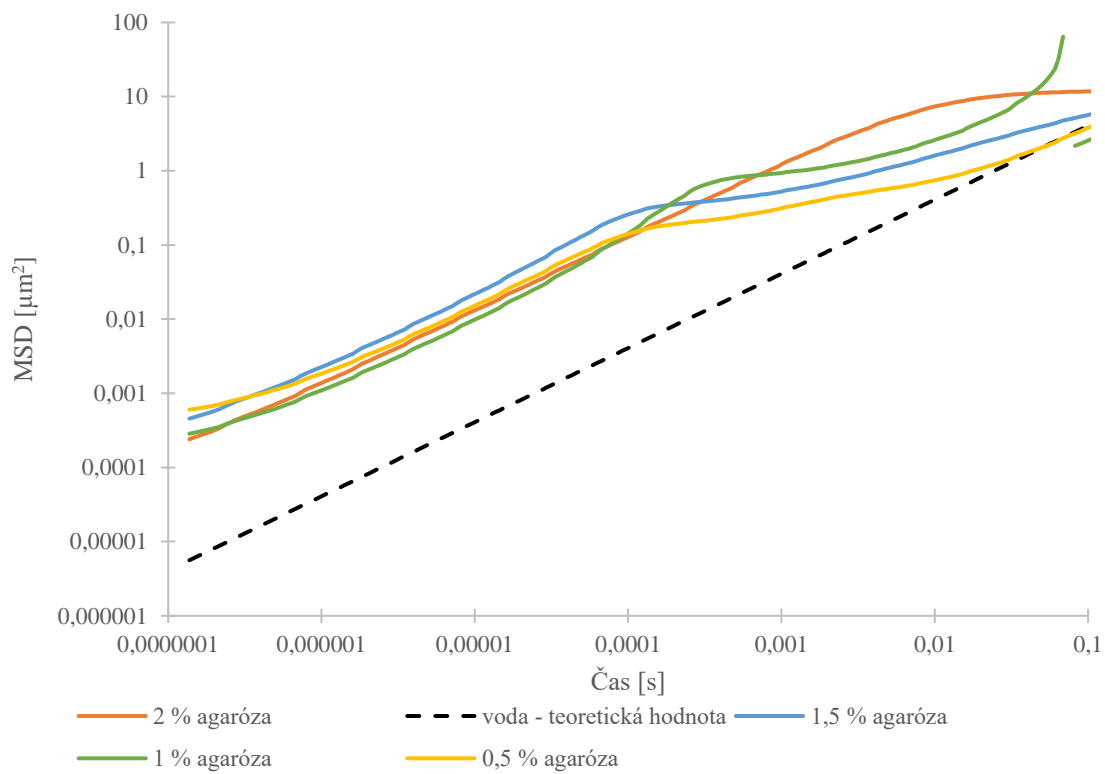
Obrázok 29: Závislosť viskozity na šmykovej rýchlosti pre určené hmotnostné koncentrácie glycerolu



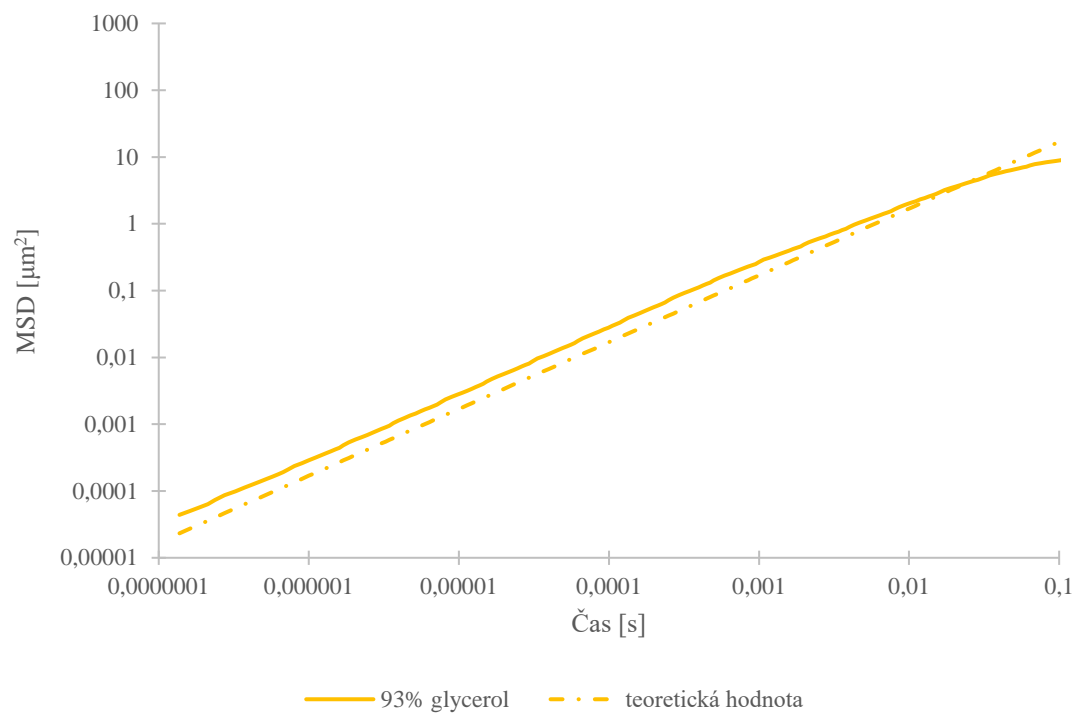
Obrázok 30: MSD krivka pre 100 nm častice v prostredí 0,5% agarózy



Obrázok 31: MSD krivky pre 30 nm častice v prostredí rôzne koncentrovaného agarózového gélu



Obrázok 32: MSD krivky pre 50 nm častice v prostredí rôzne koncentrovaného agarózového gélu



Obrázok 33: MSD krivka pre 30 nm častice v 93% glycerole, ktorý bol určený ako hmotnostná koncentrácia, pri ktorej dôjde k zastaveniu častíc