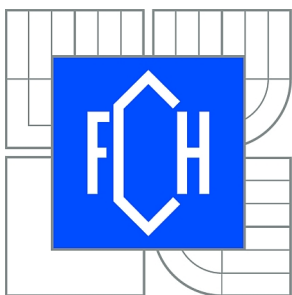


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

MIKROREOLOGIE POMOCÍ FLUORESCENČNÍ KORELAČNÍ SPEKTROSKOPIE

MICRORHEOLOGY WITH FLUORESCENCE CORRELATION SPECTROSCOPY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

PETRA KÁBRTOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. JAKUB MONDEK

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0932/2014** Akademický rok: **2014/2015**
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student(ka): **Petra Kábrtová**
Studijní program: Chemie a chemické technologie (B2801)
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)
Vedoucí práce: **Ing. Jakub Mondek**
Konzultanti: Ing. Zuzana Hnylučová

Název bakalářské práce:

Mikroreologie pomocí fluorescenční korelační spektroskopie

Zadání bakalářské práce:

1. Shromáždit literární poznatky o využití mikroreologie se zaměřením na fluorescenční korelační spektroskopii.
2. Seznámit se s různými metodami měření mikroreologie
3. Navrhnout a provést experimenty pro charakterizaci roztoků hyaluronanu pomocí mikroreologických technik.
4. Zhodnotit výsledky fluorescenční korelační spektroskopie ve vztahu k dalším metodám měření mikroreologie.

Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Petra Kábrtová
Student(ka)

Ing. Jakub Mondek
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Bylo provedeno srovnání tří pasivních mikrorheologických technik se zaměřením na FCS. K analýzám byly použity fluorescenčně značené a neznačené polystyrenové částice, pomocí kterých byly zjišťovány mikrorheologické vlastnosti roztoků glycerolu, Milli-Q vody a roztoků hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech. Pro metodu FCS byla navíc odvozena a ověřena jednodušší aproximovaná rovnice pro výpočet hodnot MSD.

Bylo zjištěno, že FCS překonává stávající mikrorheologické techniky DLS a video-mikrorheologii možností získat širší oblast dat. A to včetně té oblasti, ve které dosud nebylo možno mikrorheologické vlastnosti vzorku pomocí DLS nebo video-mikrorheologie spolehlivě popsat.

ABSTRACT

A comparison of three passive microrheological techniques was made with the emphasis on FCS. Fluorescently labelled and unlabelled polystyrene particles were used to probe a microrheological response of glycerol solutions, Milli-Q water and sodium hyaluronate solutions. In addition, for FCS technique an approximated equation for calculation of MSD values was derived and verified.

It was found that FCS outmatches current microrheological techniques of DLS and video-based particle tracking by its ability to gain a broader data range including the area in which, until now, it was impossible to describe a microrheological behaviour of samples reliably.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mikrorheologie, fluorescenční korelační spektroskopie, video-based particle tracking, dynamický rozptyl světla, hyaluronan, glycerol, polystyrenové nanočástice

KEY WORDS

Microrheology, fluorescence correlation spectroscopy, video-based particle tracking, dynamic light scattering, hyaluronate, glycerol, polystyrene nanoparticles

KÁBRTOVÁ, P. *Mikroreologie pomocí fluorescenční korelační spektroskopie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 43 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Jakub Mondek.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu bakalářské práce Ing. Jakubu Mondekovi a konzultantce Ing. Zuzaně Hnyluchové za obětavou spolupráci a podnětné připomínky. Taktéž děkuji své rodině a blízkým za podporu při studiu.

OBSAH

1. Úvod.....	7
2. Teoretická část.....	8
2.1. Biopolymery.....	8
2.1.1. Kyselina hyaluronová.....	8
2.2. Brownův pohyb.....	9
2.3. Reologie.....	10
2.4. Mikroreologie.....	11
2.4.1. Video-mikroreologie (Video-based particle tracking).....	11
2.4.2. Rozptyl světla: DWS a DLS.....	12
2.4.3. Dvoučásticová mikroreologie.....	13
2.5. Fluorescence.....	13
2.5.1. Princip fluorescence.....	13
2.5.2. Doba života a kvantový výtěžek fluorescence.....	15
2.6. Fluorescenční korelační spektroskopie.....	16
2.6.1. Princip FCS.....	16
2.6.2. Využití a omezení FCS.....	18
3. Současný stav řešené problematiky.....	19
4. Experimentální část.....	22
4.1. Materiály a příprava vzorků.....	22
4.1.1. Materiály.....	22
4.1.2. Příprava vzorků.....	23
4.2. Měření a vyhodnocování dat.....	23
4.2.1. Přístroje a programy.....	23
4.2.2. Měření a vyhodnocování dat z FCS.....	24
4.2.3. Měření a vyhodnocování dat z DLS.....	26
4.2.4. Měření a vyhodnocování dat z video-mikroreologie.....	26
5. Výsledky a diskuse.....	28
5.1. Roztoky glycerolu a Mili-Q voda.....	28
5.2. Roztoky hyaluronanu.....	29
5.2.1. Roztoky hyaluronanu o koncentraci 0,01 g/l.....	30
5.2.2. Roztoky hyaluronanu o koncentraci 1,0 g/l.....	32
6. Závěr.....	34

7. Seznam použitých zdrojů	35
8. Seznam použitých zkratek a symbolů	39
9. Seznam příloh.....	40
10. Přílohy	41

1. ÚVOD

Reologie je interdisciplinární obor zasahující do různých oblastí včetně chemického inženýrství, fyziky, materiálních věd a chemie. Pozoruhodnou ji dělá už to, že má široké spektrum použití v průmyslu. Ať už se jedná o velké množství technologií pro nátěrové hmoty, potraviny, těžbu ropy nebo zpracování plastů, vše úzce souvisí s porozuměním toku komplexních tekutin [1].

Reologii lze definovat jako metodu ke studiu viskoelasticity materiálů. Mikroreologie rozšiřuje tuto definici tak, že navíc zkoumá změny chování jednotlivých mikrostruktur materiálu v závislosti na použité technice [2].

Mikroreologie není termín označující jednu konkrétní techniku, ale spíše řadu postupů, které se snaží překonat některá omezení tradiční velkoobjemové reologie. Jedná se například o rozsah frekvence, počet parametrů, které mohou být zjištěny danou metodou, velikost a heterogenitu vzorku. Předložka „mikro-“ se v názvu vztahuje k velikosti napětí/deformace sondy, což je obvykle koloidní částice řádově o velikosti mikronů. Také ale poukazuje na to, že tento typ reologie lze aplikovat na velmi malé objemy, řádově v mikrolitrech (u fluorescenční korelační spektroskopie ve femtolitrech) [1].

Fluorescenční korelační spektroskopie (dále jen FCS) je součástí skupiny pasivních mikroreologických technik, která zahrnuje i dynamický rozptyl světla („dynamic light scattering“ – DLS) a jednočásticovou mikroreologii („single particle tracking“ – SPT). Touto skupinou metod lze získat informace o rychlostech difúze a aktivního transportu v rámci měření spontánních, tepelně poháněných mikroskopických fluktuací molekul ve vzorku nebo měřením jejich lokální koncentrace.

Ačkoliv byla metoda FCS představena před více než 25 lety, bylo obtížné ji aplikovat na nestálé systémy, jakými jsou například živé buňky. Nedávná technická vylepšení však zvýšila rychlost a citlivost metody natolik, že je možné provádět analýzy i biologických systémů [3].

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Biopolymery

Biomakromolekuly se dělí do několika tříd, z nichž pravděpodobně nejznámějšími a nejrozšířenějšími jsou proteiny a polysacharidy. Dále je třeba zmínit rozdělení na glykoproteiny, proteoglykany (proteiny s postranními sacharidovými řetězci s obsahem sacharidů a délkou postranních řetězců větší než u glykoproteinů) a stejně tak nukleové kyseliny DNA a RNA. Díky velké diverzitě je k dispozici pro studium široká škála struktur a jejich možných reakcí.

Doposud byly studovány převážně polysacharidy, a to z toho důvodu, že jsou hlavní surovinou pro mnoho z komoditních produktů. Jako příklad lze uvést bavlnu a papír (oba tyto produkty jsou vyráběny převážně z celulózy) nebo adheziva a nátěry na papír, pro které byl po mnoho let hlavní surovinou škrob. Konkrétně u zpracování celulózy však nastává problém v použití nevhodných rozpouštědel. Se zvyšujícími se požadavky na ekologičtější produkty lze očekávat nalezení dalšího využití těchto velkoobjemově vyráběných polymerů například jako biodegradabilní obaly nebo biopaliva [4].

Biopolymery však lze efektivně využít i v medicíně, a to konkrétně v tkáňovém inženýrství. Například hydrogely, které napodobují přirozenou extracelulární matrix, se používají v třídídimenzionálních buněčných kulturách, buněčné terapii a v tkáňovém inženýrství [5].

Polysacharidové hydrogely jsou totiž výbornými kandidáty pro kožní „scaffoldy“, a to díky jejich přirozené biokompatibilitě a schopnosti transportu vody a živin do buněk. Produkty jejich degradace mohou být bez problému vstřebány tělem. Některé polysacharidy mají také schopnost redukovat zánět a urychlovat hojení. Studium biokompatibilních polysacharidů je vedeno za účelem použití v různých medicínských a léčebných produktech [6].

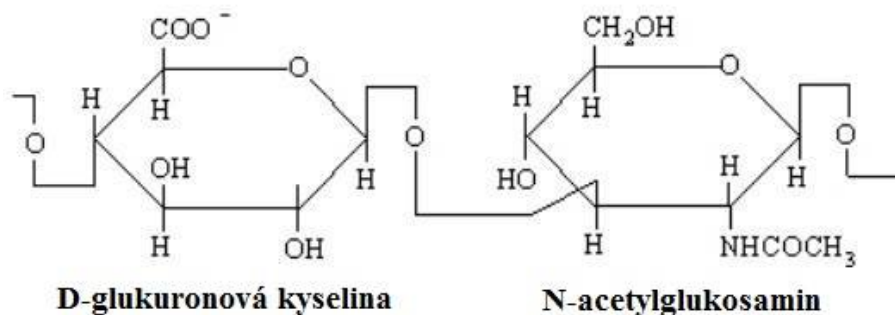
2.1.1. Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová (dále také HA) je vysokomolekulární biopolysacharid, který byl v roce 1934 objeven Karlem Meyerem a jeho asistentem Johnem Palmerem v očním sklivci skotu. Jedná se o přirozeně se vyskytující biopolymer s důležitými biologickými funkcemi, který lze nalézt u některých bakterií a u vyšších živočichů včetně člověka. Vyskytuje se ve většině pojivových tkání, ve větším množství pak v synoviální tekutině, očním sklivci, pupeční šňůře nebo v kohoutích hřebících. Přirozeně je kyselina hyaluronová syntetizována skupinou integrálních membránových proteinů, tzv. hyaluronan syntázy, a degradována řadou enzymů, tzv. hyaluronidázy [7].

2.1.1.1. Struktura HA

Hyaluronan je jeden z polysacharidů označovaných jako glykosaminoglykany, které se vyskytují typicky v pojivových tkáních obratlovců. Glukosaminy jsou nerozvětvené jednořetězové polymery složené z disacharidových jednotek *N*-acetylhexosaminu a hexosy. Hexosovou jednotkou je hexuronová kyselina nebo v případě keratan-sulfátu galaktosa [8].

Nativní kyselina hyaluronová je lineární polysacharid složený z disacharidových jednotek D-N-acetylglukosaminu a D-glukuronové kyseliny, které jsou spojeny střídavě β -1,4 a β -1,3 glykosidickými vazbami. V těle se kyselina hyaluronová vyskytuje nejčastěji ve formě sodné nebo draselné soli – hyaluronanu [7], [9].



Obrázek 1: Základní struktura kyseliny hyaluronové (hyaluronanu)[7]

2.1.1.2. Fyziologická funkce

Kyselina hyaluronová má celou řadu ochranných fyziologických funkcí, včetně *in vivo* chondroprotektivních účinků. Může také snížit četnost nervových impulsů nebo citlivost nervů vůči bolesti.

Podáním exogenní HA lze zvýšit množství chondrocytární HA a podpořit syntézu proteoglykanu. Dochází také ke snížení produkce a aktivity prozánětlivých mediátorů a matrixových metaloproteináz nebo k ovlivnění chování imunitních buněk. Tyto vlastnosti HA spočívají ve schopnosti vycytávat reaktivní volné radikály kyslíku, inhibovat migraci a agregaci leukocytů a makrofágů nebo regulovat proliferaci fibroblastů. Řada fyziologických efektů exogenní HA může záviset na její molekulové hmotnosti.

Hyaluronan má kromě funkce pasivní konstrukční molekuly i roli signální molekuly – interaguje s povrchovými buněčnými receptory a reguluje buněčnou proliferaci, migraci a diferenciaci. Díky svým hygroskopickým vlastnostem významně ovlivňuje hydrataci a fyzikální vlastnosti extracelulární matrix. Je také schopný interagovat s řadou receptorů, čímž může aktivovat signální kaskády, které kromě buněčné migrace a proliferace ovlivňují i genovou expresi [7].

2.2. Brownův pohyb

Brownův pohyb je neustálý náhodný pohyb částic rozptýlených v tekutině (kapalina nebo plyn). Poprvé byl systematicky pozorován Robertem Brownem v roce 1827. Einstein v roce 1905 popsál Brownův pohyb rozptýlených částic jako důsledek tepelného pohybu okolních molekul tekutiny. Dle Einsteinovy teorie platí:

$$\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle = \langle (x(t) - x(0))^2 \rangle = 2Dt, \quad (1)$$

kde $\langle [\Delta x(t)]^2 \rangle$ je střední čtverec posunu MSD („mean square displacement“) volné Brownovy částice v jedné dimenzi během času t , D je difúzní koeficient. Nicméně Einsteinova teorie Brownova pohybu je aplikovatelná pouze na dlouhé časové intervaly.

V krátkých časových intervalech není Brownův pohyb rozptýlených částic úplně náhodný, a to kvůli setrvačnosti částic a okolní tekutiny. Mimoto tepelná síla působící na částice rozptýlené v kapalině nepředstavuje jen bílý šum, ale je "zabarvená". Díky nedávnému experimentálnímu vývoji v oblasti optických pastí je možné tento nový režim Brownova pohybu blíže zkoumat.

Perzistence a náhodnost jsou považovány za dvě klíčové charakteristiky Brownova pohybu. Trajektorie Brownových částic jsou klasické příklady fraktálů (sobě podobných geometrických objektů, které mívají na první pohled velmi složitý tvar, ale jsou generovány opakovaným použitím jednoduchých pravidel). Obecným předpokladem je, že jsou nepřetržité, ale ne diferencovatelné. Rychlost Brownovy částice tak nelze definovat a vypočítává se jako průměrná hodnota měřená během určitého časového intervalu.

Schopnost měřit okamžitou rychlost Brownovy částice by mohla být neocenitelná zvláště při studiu nerovnovážné statistické mechaniky. Brownův pohyb rozptýlených částic může být taktéž využit pro mikroreologii ke zkoumání vlastností tekutin [10].

2.3. Reologie

Od prvopočátku se reologie zaměřovala především na strukturu materiálů, která ovlivňuje jejich makroskopické chování. Reálné materiály charakterizuje jejich mikrostruktura, která je určena prostorovým uspořádáním základních jednotek (makromolekul nebo částic) a jejich interakcemi mezi sebou. V rámci koncentrovaného polymerního nebo disperzního systému je mikrostruktura zpravidla velmi komplexní a díky pohybu nebo deformaci aplikované na systém může podléhat prostorovým modifikacím [11].

Reologická odezva komplexních tekutin může být lineární nebo nelineární. V obou případech je odezva funkcí aplikovaného napětí/deformace na tekutinu. Nelinearita je obvykle znakem strukturního přeskupování v systému, které je způsobeno aplikovaným napětím nebo deformací. Nelineární reologie má obrovský praktický význam, protože většina průmyslových procesů se odehrává právě v nelineárním režimu. Nicméně je velmi složité vytvořit obecné modely nelineárního chování, protože je ve své podstatě závislé na předchozích dějích v systému a specifických detailech toku.

Systémy v termodynamické rovnováze mají při dostatečně malém zatížení vždy lineární odezvu. Pro systémy, které nejsou v rovnováze, je však existence oblasti s lineární odezvou delikátnější záležitostí. Jedná se například o koloidní sklo, pasty nebo pěny. V každém případě je více pozornosti věnováno lineární reologii komplexní hmoty. A to nejen proto, že poskytuje větší šanci na získání přesných modelů, ale také proto, že v mnoha případech může lineární odezva systému úzce souviset se základní strukturou. Například fyzikální kvantify systému jako délková distribuce v polymerním roztoku mohou být měřeny za pomoci studia lineární dynamické odezvy [1].

Klasická reometrie nabízí omezené informace o mikrostruktuře studovaného materiálu vzhledem k relativně úzkému rozsahu frekvence, který je k dispozici. Měření je obvykle omezeno na měření nízkofrekvenčních mechanických vlastností. Zásadním krokem k získání informací o základních konstitutivních vláknech sítě je studium vysokofrekvenčního chování. Přestože v oblasti vývoje vysokofrekvenčních reometrů došlo k rozvoji a pokroku, stále je v této oblasti předčí mikroreologická měření [12].

2.4. Mikroreologie

Na rozdíl od reologie lze mikroreologií měřit heterogenitu fyzikálních vlastností vzorku s velmi vysokým rozlišením. Mikroreologie v podstatě umožňuje detailní charakterizaci viskozity a elasticity biologických tekutin, a to jak z příspěvku tekutiny tvořící disperzní prostředí polymerní sítě, tak z příspěvku samotné polymerní sítě [13].

Mikroreologie označuje skupinu metod, jejichž experimenty nejčastěji zahrnují video-mikroreologii a laserové nebo magnetické pinzety. Výjimkou není ani využití fluorescence a pokovování [1].

2.4.1. Video-mikroreologie (Video-based particle tracking)

V posledních letech vyvolalo velký zájem využití video-mikroskopie ke sledování pohybu jednotlivých mikročástic koloidů nebo individuálních molekul. Díky četným výhodám této techniky a velké flexibilitě se video-mikroskopie stala nejpoužívanější metodou v mnoha sledovacích experimentech, a to s řadou aplikací.

Standardní sestava pro video-mikroreologii zahrnuje CCD (charge-coupled device) připojené k mikroskopu, které získává obrazy fluoreskujících nebo i fluorescenčně neznačených kulovitých částic. Tento systém umožňuje přístup k širokému spektru časových měřítek od vysokorychlostního videa k neomezeně dlouhé časosběrné akvizici, která je zvláště vhodná pro studium biologických jevů [14].

Prostřednictvím video-mikroreologie lze sledovat mikroskopický pohyb biomolekul a fluorescenčních sond. Metodu lze použít například i ke studiu složitého prostředí buňky. Informace získané touto technikou umožňují extrahovat dynamické chování biomolekul a lokální mechanické vlastnosti uvnitř buňky ze středního čtverce posunu (MSD) sledované částice.

Z praktického pohledu je zřejmě nejobtížnější částí video-mikroreologického experimentu analýza získaného videa, tzn. popsání trajektorií několika částic. Videoanalýzy mají obvykle dvě části. V prvním kroku jsou analyzovány jednotlivé snímky, aby byly získány koordináty všech částic na snímku. Následně jsou v druhém kroku analyzovány trajektorie částic na základě změny jejich polohy na po sobě jdoucích snímcích.

Videoanalýzy trajektorií sledovaných částic mohou zahrnovat kompletní charakterizaci lineární viskoelasticity matrix. Známý Stokes-Einsteinův vztah

$$D(a) = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \quad (2)$$

popisuje vztah mezi difúzním koeficientem D k viskozitě η (parametr popisující Newtonovskou kapalinu) a koloidní rádius a . U jednoduchých Newtonovských viskózních kapalin bylo v případě koloidů pozorováno, že podléhají náhodnému pohybu. Střední čtverec posunu částice $\langle r^2(t) \rangle$ od času $t = 0$, který lze také označit jako MSD, se bude měnit v čase dle rovnice:

$$\langle r^2(t) \rangle = 4Dt, \quad (3)$$

kde r leží v dvoudimenzionální rovině jako u pozorování optickým mikroskopem.

Komplexní kapaliny vykazují jak viskózní, tak elastické chování. Mimoto materiál může vykazovat komplexní dynamiku, což může vést k závislosti viskózního a elastického modulu na frekvenci [1].

2.4.2. Rozptyl světla: DWS a DLS

Nejběžnější experimenty zahrnují dvě metody: dynamický rozptyl světla (DLS) a difúzní vlnovou spektroskopii (DWS). Pro účel analýzy jsou do vzorku přidávány měřicí částice. U DLS je pohyb částic určován analýzou časové změny rozptýleného světla. Jak částice ve vzorku difundují a přeskupují se, intenzita světla dopadajícího na detektor kolísá s časem. Intenzitní fluktuace rozptýleného světla v čase odhalují dynamiku média. DLS se obvykle používá pro zředěná transparentní média koloidních částic, aby bylo zamezeno vícenásobnému rozptylu.

Vícenásobného rozptylu naopak využívá difúzní vlnová spektroskopie (DWS), kterou lze použít pro neprůhledné a světlo vysoce rozptylující systémy jako jsou emulze, koloidní suspenze a gely [15].

Klíčovou nevýhodou DWS techniky je, že někdy vyžaduje vysokou koncentraci sledovaných částic, aby bylo dosaženo limitu vícenásobného rozptylu. To může výrazně omezit použitelnost techniky pro biologické vzorky jako např. proteiny, které mohou s částicemi tvořit agregáty. Dalším důvodem je také to, že vzorek je v květu měřen jako heterogenní celek a není možné zaměřit se na jeho jednotlivé části.

U DLS experimentů lze hodnoty MSD získat pomocí autokorelační funkce elektrického pole $g(t)$:

$$g(t) = g(0) \exp\left(-\frac{1}{6} q^2 \langle \Delta r^2(t) \rangle\right), \quad (4)$$

kde q je magnituda rozptylového vektoru:

$$q = \frac{4\pi \cdot n \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)}{\lambda}, \quad (5)$$

n je index lomu rozpouštědla, λ je vlnová délka světla, θ je úhel rozptylu, $g(0)$ je hodnota korelace v čase $t = 0$. Vztah mezi MSD a autokorelační funkcí rozptýleného světla je proto následující:

$$\langle \Delta r^2(t) \rangle = \frac{6}{q^2} [\ln(g(0)) - \ln(g(t))] \quad (6)$$

Komplexní modul pružnosti ve smyku $G'(s)$ lze získat z unilaterální Laplaceovy transformace MSD za použití Stokes-Einsteinova vztahu:

$$G'(s) = \frac{k_B T}{\pi a s \langle \Delta r^2(s) \rangle}, \quad (7)$$

kde k_B je Boltzmannova konstanta, T je termodynamická teplota, a je poloměr sondy.

Pomocí DLS lze za použití Stokes-Einsteinova vztahu zjistit i viskozitu média η :

$$\eta = \frac{k_B T}{3\pi D a}, \quad (8)$$

kde D je difúzní koeficient částic změřený pomocí DLS, a je poloměr částic [16].

2.4.3. Dvoučásticová mikrореologie

Mikrореologické techniky, zvláště pak sledování částic (particle tracking), jsou pravděpodobně nevhodnější techniky pro studium reologie v mnoha systémech jako například studium dynamiky uvnitř buněčných membrán nebo v oblasti monovrstev. Nicméně je zapotřebí opatrnosti při interpretaci výsledků získaných z jednočásticové mikrореologie a dostupných teorií. Když je to možné, doporučuje se použít korelující dvoučásticovou MSD [17].

Dvoučásticová mikrореologie je založena na vzájemné korelaci pohybu dvou částic za účelem zjištění reologických vlastností v jejich okolí. Pro homogenní materiály lze říci, že dvoučásticová mikrореologie vzhledem k velikosti částic poskytuje podobná data jako jednočásticová mikrореologie. Mezi daty získanými jednočásticovou a dvoučásticovou mikrореologií však často nastávají rozdíly. Důvodem rozdílu je přítomnost ochuzené vrstvy (izolovaná oblast v rámci polovodičového materiálu, ve které se nevyskytují volné nosiče náboje). V těchto případech se používá odvozený výpočetní vztah, který je schopný dát do souvislosti dva soubory dat s tloušťkou ochuzené vrstvy jako extrahovatelným parametrem [18].

Další studovanou oblastí jsou systémy, u kterých se předpokládá, že jsou lokálně nehomogenní. Metodologie pro jejich měření byla úspěšně testována na biopolymerních roztocích guaru. Dvoučásticová mikrореologie v tomto případě poskytla data o reologickém chování, která byla podobná datům získaných konvenčním reometrem popisujících makrореologické chování roztoku. Takové výsledky jednočásticová mikrореologie neposkytuje [19].

2.5. Fluorescence

V posledních 20 letech výrazně vzrostlo využití fluorescence při biologických analýzách. Fluorescence je aktuálně dominantní, široce používanou metodologií například v biotechnologiích, u průtokové cytometrie, v lékařské diagnostice, DNA sekvenování nebo i ve forenzních vědách.

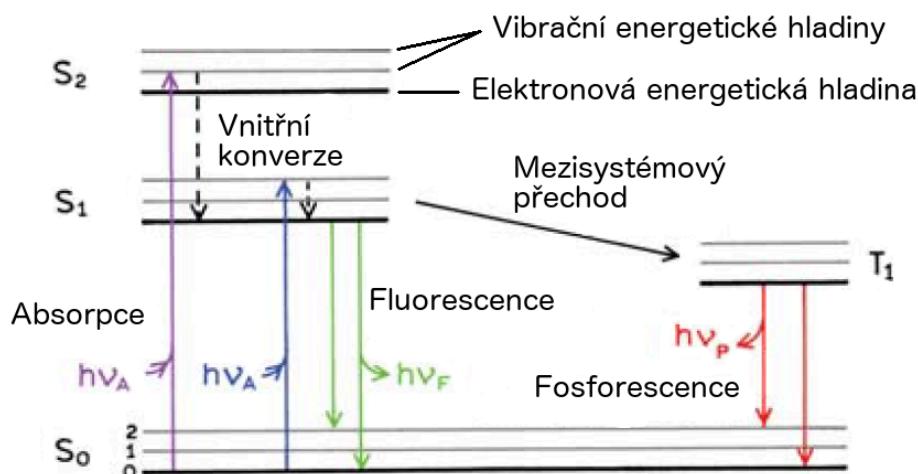
2.5.1. Princip fluorescence

Luminiscence je emise světla, které předchází elektronově excitovaný stav. Oficiálně lze luminiscenci na základě povahy excitovaného stavu rozdělit do dvou kategorií – fluorescence a fosforescence.

U fluorescence je elektron v excitovaném orbitalu v singletovém stavu spárován (opačným spinem) s druhým elektronem v orbitalu v základním stavu. Návrat do základního stavu je tak spinově dovolen a dochází k němu rychlou emisí fotonu. Rychlost emise je u fluorescence typicky 10^8 s^{-1} [20], takže typická doba života se pohybuje kolem cca 10 ns [20] (doba života fluoroforu je průměrná doba mezi jeho excitací a návratem do základního stavu, viz dále).

Naproti tomu fosforescence je emise záření z tripletového excitovaného stavu, ve kterém má elektron v excitovaném orbitalu stejnou spinovou orientaci jako elektron v základním stavu. Přechod na základní stav je tudíž zakázaný a rychlost emise je proto nízká (10^3 až 10^0 s^{-1} [20]). Doba života fosforescence je přibližně v milisekundách až sekundách.

Proces, ke kterému dochází mezi absorpcí a emisí světla, popisuje Jabloňského diagram. Jabloňského diagramy jsou v mnoha formách hojně používány k ilustraci různých molekulárních procesů, ke kterým může dojít v excitovaném stavu.



Obrázek 2: Jabloňského diagram [20]

Typický Jabloňského diagram uvedený na předchozím obrázku znázorňuje singletovou základní, první a druhou elektronovou energetickou hladinu, které jsou označeny jako S_0 , S_1 a S_2 . Na každé z těchto elektronových energetických hladin mohou fluorofory obsadit několik vibračních energetických hladin, které jsou na obrázku označeny čísly 0, 1, 2, atd. Přechody mezi jednotlivými stavy jsou kvůli okamžité absorpci světla zobrazeny jako vertikální čáry. Samotné přechody trvají cca 10^{-15} s , což je příliš krátká doba na významnější dislokaci jádra (Franck-Condonův princip).

Absorpce a emise probíhá u molekul nejčastěji z nejnižší vibrační hladiny. Fluorofor je většinou excitován na nějakou vyšší vibrační hladinu elektronové hladiny S_1 nebo S_2 . Ve většině případů molekuly z těchto vyšších vibračních stavů rychle relaxují na nejnižší vibrační hladinu daného stavu. Tento proces se také nazývá vnitřní (interní) konverze. Pokud je fluorescence nejúčinnějším prostředkem deexcitace, dojde při přechodu elektronu z nejnižší vibrační hladiny S_1 na S_0 k vyzáření fotonu.

Kvůli krátkému časovému rozpětí fluorescence je třeba k měření časově rozlišené emise záření vysoce sofistikovaná optika a elektronika. Navzdory komplikovanosti měření časově rozlišené fluorescence je tato metoda široce používána. Důvodem je, že na rozdíl od měření stacionární fluorescence lze z naměřených dat získat více informací.

Fluorescenci lze pozorovat zpravidla u aromatických molekul. Mezi typické fluorescentní sloučeniny (fluorofory) patří například chinin, fluorescein nebo rhodamin. Měřením fluorescence anthracenu nebo perylenu lze například sledovat i znečištění životního prostředí ropnými látkami.

Fluorescenční spektrální data jsou prezentována převážně pomocí excitačních či emisních spekter. Fluorescenční emisní spektrum je grafická závislost intenzity fluorescence na vlnové délce. Jednotlivá emisní spektra se od sebe značně liší a jejich tvar závisí jak na chemické struktuře fluoroforu, tak na rozpouštědle, ve kterém je fluorofor rozpuštěn.

2.5.2. Doba života a kvantový výtěžek fluorescence

Doba života a kvantový výtěžek fluorescence jsou možná nejdůležitějšími vlastnostmi fluoroforu. Kvantový výtěžek je počet emitovaných fotonů v poměru k počtu absorbovaných fotonů. Sloučeniny s největším kvantovým výtěžkem blíží se jedné, jako např. rhodaminy, poskytují nejjasnější emise. Doba života je taktéž důležitá, protože určuje dobu, po kterou fluorofor v excitovaném stavu interaguje se svým prostředím nebo do něj difunduje, a tím i informace získané z jeho emise.

Kvantový výtěžek fluorescence je poměr počtu fotonů emitovaných k počtu absorbovaných. Část fluoroforů podléhá nezářivým přechodům z excitovaného stavu do základního energetického stavu, proto je kvantový výtěžek fluorescence dán:

$$Q = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}}, \quad (9)$$

kde Γ je rychlost emise fluoroforu (zářivý přechod) a k_{nr} je rychlost nezářivého přechodu na základní energetickou hladinu.

Pro velký soubor identických molekul (nebo velké množství excitací té samé molekuly) lze časově rozlišený profil intenzity fluorescence následující ihned po excitaci popsat rovnicí:

$$I(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}} + c, \quad (10)$$

kde I_0 je intenzita fluorescence okamžitě po excitaci (v čase $t = 0$), τ je doba života excitovaného stavu a konstanta c vyjadřuje signál pozadí.

Doba života excitovaného stavu je dána průměrným časem, po který je molekula v excitovaném stavu před návratem do základního energetického stavu. Doba života τ je definována:

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \quad (11)$$

Emise fluorescence je náhodný proces a jen málo molekul emituje fotony v časech rovnajících se době života. Doba života τ je proto průměrnou hodnotou časů, po které je fluorofor v excitovaném stavu.

V případě absence nezářivého přechodu je doba života dána:

$$\tau_n = \frac{1}{\Gamma} \quad (12)$$

Doba života fluoroforu bez nezářivých přechodů se dá v podstatě vypočítat i z absorpčního spektra, extinkčního koeficientu a emisního spektra fluoroforu [20], [21].

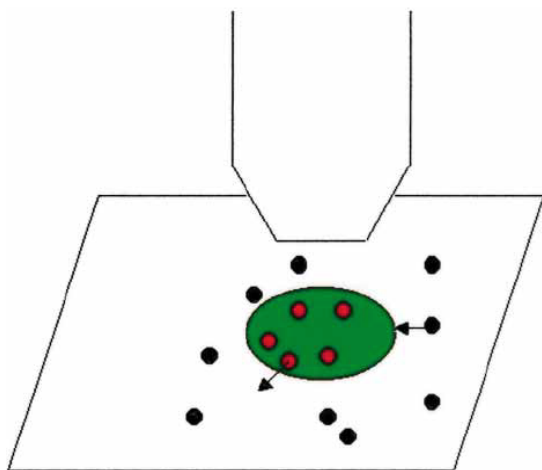
2.6. Fluorescenční korelační spektroskopie

V posledních dvou desetiletích byla technika fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) často používána pro analýzu koloidních systémů a procesů probíhajících na mezifázových rozhraních. Metoda se stala rutinním nástrojem pro měření hydrodynamických poloměrů malých fluorescentních molekul, makromolekul a nanočástic, ale také pro charakterizaci jejich interakcí a sledování jejich možné agregace. FCS byla také použita pro studium difúze v nehomogenních médiích jako např. taveniny, roztoky, gely nebo porózní struktury.

Metoda je založena na monitorování fluktuací intenzity fluorescence, která závisí na difúzi fluorescenčních sond (např. fluorescenčně značené nanočástice) přes velmi malý pozorovaný objem. Pomocí korelačních analýz těchto fluktuací lze získat informace o difúzních koeficientech sond, jejich koncentraci atd. [22].

2.6.1. Princip FCS

Fluorescenční optická mikroskopie je nejen v biologii výkonným nástrojem pro získávání informací o prostorovém a funkčním uspořádání endogenně autofluorescentních i exogenně označených molekul a dalších struktur. Pro tuto techniku se používají dva hlavní světelné zdroje – rtuťové či xenonové obloukové lampy s excitačním filtrem nebo lasery. Ve fluorescenčním mikroskopu pak záření o vysoké energii ozařuje a excituje fluorofory ve vzorku. Excitovaný fluorofor pak emituje fluorescenci o nižší energii než excitační záření. Pomocí filtrů je pak toto emitované záření izolováno a lze ho detekovat přímým pozorováním přes optiku v mikroskopu nebo příslušnými detektory. Fluorescenční mikroskopie je jediný druh mikroskopie, u které vzorek emituje vlastní záření.



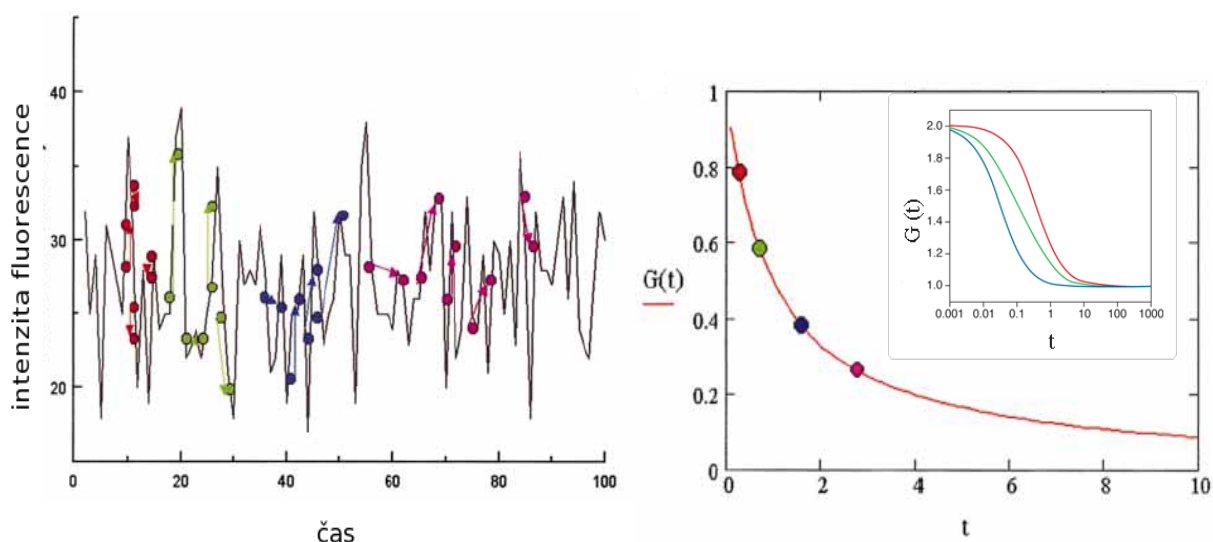
Obrázek 3: Fluktuace několika fluorescenčních molekul v konfokálním objemu. Mikroskopem zaměřený zelený paprsek laseru osvětluje malou oblast planárního systému (například membrány). Fluorescentní molekuly v osvětlovaném objemu emitují červené záření, které je mikroskopem převedeno na fotodetektor. Molekuly mimo tuto oblast neemitují žádné záření. Jak molekuly difundují do osvětleného objemu a mimo něj, intenzita detekované fluorescence se zvyšuje a snižuje [24].

Aby bylo možné analyzovat fluorescenční mikroskopii nějaký vzorek, musí fluoreskovat. Existuje několik způsobů, jak takový vzorek vytvořit. Ve většině technik se využívá fluorescentního značení vzorku, v biologii pak exprese fluorescentního proteinu. Kromě toho lze využít i vlastní fluorescence vzorku (t.j. autofluorescence) [23].

FCS se obvykle provádí s volně difundujícími molekulami. K excitaci se obvykle používá laser zaměřený na difrakčně omezené místo (konfokální objem). Pro odstínění nežádoucího signálu mimo požadovaný objem slouží konfokální „pinhole“. Za těchto optických podmínek je pozorovaný objem ve tvaru elipsoidu protaženého podél optické osy. Co se týče koncentrace fluoroforů, při tomto druhu analýzy musí být v takovém rozmezí, aby v pozorovaném objemu bylo přítomno jen několik molekul (cca 1 nM) [20].

Molekuly v konfokálním objemu emitují fluorescenční záření, které je přenášeno mikroskopem na fotodetektor (například fotonásobič nebo fotodiodové pole), který registruje určitou část fluorescence emitovaných fotonů. Jak molekuly difundují do konfokálního objemu a zase ven, počet fotonů se odpovídajícím způsobem zvyšuje a snižuje podle průměrné intenzity fluorescence, která je určena průměrným počtem molekul v konfokálním objemu. Rychlost difúze molekul a velikost konfokálního objemu určuje dobu fluorescenčních fluktuací. Měření velikosti konfokálního objemu a trvání fluktuací tedy poskytuje informace o difúzním koeficientu.

Zmíněné fluktuace jsou nicméně náhodné, takže měření jedné individuální fluktuace ať už sebezpřesnější neumožní přesně určit difúzní koeficient. Je proto nezbytné statisticky popsat větší množství fluktuací, a to výpočtem fluorescenční fluktuační autokorelační funkce $G(t)$, která popisuje zprůměrovanou rychlost fluktuačních změn z mnoha fluktuací. Funkce $G(t)$ je součet produktů dvojic fluktuujících amplitud rozdělených specifickými časovými intervaly [24].



Obrázek 4: (Vlevo) FCS analýza poskytuje záznam fluktuací intenzity fluorescence (nebo počtu fotonů) v čase. Graf výše ilustruje několik dvojic bodů oddělených jednou (červená), čtyřmi (zelená), osmi (modrá) a dvanácti (růžová) časovými jednotkami. (Vpravo) produkty těchto dvojic bodů jsou sečteny a po vhodné normalizaci jsou získány hodnoty $G(1)$, $G(4)$, $G(8)$ a $G(12)$. Průměrné hodnoty produktů bodů oddělených delšími časovými úseky jsou nižší, protože pozice každé částice uvnitř a vně konfokálního objemu s dřívější pozicí kvůli difúzi částic koreluje méně a méně [24]. (Vpravo v rámečku) tvar autokorelační funkce v závislosti na čase v logaritmickém měřítku [25].

Díky FCS lze tedy měřit autokorelační funkci dynamiky značených částic. Z těchto dat může být odvozena závislost efektivní difúze nebo častěji MSD na čase, což umožňuje získat detailnější informace o dynamice. Výhodou FCS oproti dalším pasivním mikrereologickým technikám je, že za pomoci FCS lze sledovat lokální reologické vlastnosti heterogenních vzorků při vlnových délkách rozměru, na který je pozorování zaměřeno. Mikrereologické techniky založené na rozptylu světla jako např. DLS a DWS nemají kvůli velkému osvětlenému objemu prostorovou rezoluci.

Vezmeme-li v potaz nízké koncentrace sond, malé objemy vzorků a skutečnost, že lze použít komerční FCS spektrometr, lze FCS spektroskopii shledat jako významný nástroj zejména pro biologické a medicínské aplikace, např. pro mikroeologické analýzy živých buněk [26].

2.6.2. Využití a omezení FCS

Fluorescenční mikroskopie se využívá ke zkoumání živých nebo fixovaných organismů, tkání, buněk a stejně tak organických a anorganických materiálů. Například imunofluorescence je běžně používanou technikou, při které se fluorescenčně značené protilátky naváží na příslušný antigen, čímž umožní lokalizovat molekuly v biologických vzorcích. Fluorescenční sondy mohou být také využity pro stanovení fyziologických koncentrací iontů a hodnot pH, které se v živých buňkách velmi rychle mění.

Fluorochromy umožňují identifikovat s vysokou specifitou buňky a buněčné komponenty v nefluoreskujícím materiálu. Díky fluorescenční mikroskopii může být navíc přítomnost fluoreskujícího materiálu detekována s detailní citlivostí. Použitím sady filtrů v této technice lze zredukovat pozadí a získat tak vysoce kvalitní snímky.

Přes veškeré své výhody i tato metoda má svá omezení. Jedním z nedostatků fluorescenční mikroskopie je, že fluorofory ztrácejí schopnost fluoreskovat kvůli efektu tzv. fotovybělování („photobleaching“) [23].

Fotovybělování nastává tehdy, když fluorofor permanentně ztrácí schopnost fluoreskovat kvůli fotonově indukovanému chemickému poškození a kovalentní modifikaci. Při přechodu z excitovaného singletového stavu na excitovaný tripletový stav mohou totiž fluorofory interagovat s dalšími molekulami za vzniku ireverzibilních kovalentních modifikací [27].

Dále je nutno zmínit, že ačkoliv použití fluorescenčních proteinů umožňuje analyzovat živé buňky, tak právě buňky jsou náchylné na fototoxicitu, zvláště pak na záření o nízké vlnové délce. Navíc fluorescentní molekuly mají tendenci vytvářet reaktivní chemické látky, které po ozáření zvyšují fototoxický efekt. Dalším omezením je, že lze detekovat pouze specifické struktury, které byly fluorescenčně označeny. Nicméně u mnoha biologických vzorků je problémem právě autofluorescence, kterou excitační/emisní filtry nejsou schopny zcela odfiltrout [23].

3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Měření hodnot MSD je zatíženo velkou statickou chybou v důsledku šumu, který se objevuje při získávání obrazu. Přítomnost šumu pak vede k nepřesnému určení pozice částice. Statická chyba může maskovat nepatrné odezvy z lokálního mikroprostředí mající vliv na MSD. Potenciálně tak mohou vznikat zavádějící závěry o biofyzikálních vlastnostech buněk.

Relativně nedávno však v této oblasti došlo k pokroku. *Pei-Hsun Wu a spol.* vyvinuli nový postup na přesnější kvantifikaci statické chyby. Pomocí metody „Monte Carlo“ získali přes statisticky dostatečné množství pokusů hodnotu směrodatné odchylky (prostorové rozlišení) sledovaných pozic statické částice v obrazu. Směrodatná odchylka byla poté použita ke kvantifikaci statické chyby. Tímto způsobem se individuálně kvantifikovala závislost statické chyby na intenzitě signálu částice, intenzitě pozadí, poloměru a centrální pozici v rámci pixelu.



Obrázek 5: Statická částice z experimentu (vlevo) a ze simulace (vpravo) [28]

Tato korekční technika není omezena pouze na částicové systémy, ale lze ji aplikovat i na jiné systémy sledování. Při přenesení na jiný systém je nutné znát korelaci signálu pixelu se šumem, a vhodně zvolit parametry sledování. Použitím této metodiky lze dosáhnout větší přehlednosti při interpretaci hodnot MSD získané z experimentů založených na sledování částic [28].

Pascale Winckler a spol. použili simulaci „Monte Carlo“ pro numerické vyjádření výsledků FCS experimentů heterogenních buněčných membrán. Tým monitoroval distribuci membránové fluidity u několika buněčných linií. Měření byla prováděna na úrovni jedné buňky, takže bylo možné získat detailní informace o mikroviskozitní distribuci v plazmatické membráně. Pomocí simulace Monte Carlo zjistili, že malé heterogenity plazmatické membrány představující viskozitní mikrodomény mohou mít významný vliv na podobu distribuce fluidity. Ačkoliv existují i další faktory ovlivňující fluiditu plazmatické membrány (např. adheze), došli vědci k závěru, že distribuce difúzních časů částečně nebo úplně souvisí s organizací plazmatické membrány.

Co se týče experimentálního provedení, měření plazmatické membrány bylo prováděno na styku se skleněným podkladem (v blízkosti rozhraní sklo-voda). Plazmatická membrána byla

následně přesně lokalizována přesunutím efektivního objemu. Mapování difúzních časů bylo prováděno opakovaným měřením po 4 sekundách podle mřížky 10×10 s krokem 500 nm [29].

Xianke Shi a spol. studovali pomocí FCS biologické procesy na buněčné úrovni u Dánia pruhovaného (*Danio rerio*) a embryí Octomilky (*Drosophila*). Nejdříve popsali jejich autofluorescenční model a následně určili penetrační hloubku pro FCS, což bylo zvláště u Dánia pruhovaného složité kvůli jeho tenké tkáni. Dále stanovili s vysokým prostorovým rozlišením rychlost průtoku krve a difúzní koeficienty proteinů značených zeleným fluorescenčním proteinem v cytosolu a v membráně různých typů buněk [30].

Kombinace FCS a FCCS (fluorescenční kros-korelační spektroskopie) představuje mimo jiné významný nástroj ke zjišťování subbuněčné farmakokinetiky a dynamiky nových testovaných léčiv v nanomolárních koncentracích. **Heike Glauner a spol.** zkoumali buněčný příjem a subbuněčnou distribuci reduktázového inhibitoru methotrexátu a kinázového inhibitoru PD173956 v lidských rakovinných buňkách. Navíc současně detekovali pomocí FCCS a FCS molekulární interakce uvnitř buňky s příslušnými cílovými proteiny a necílená navázání („off-target binding“) v nanomolárním měřítku.

Aby bylo zabráněno nežádoucímu efektu fotovybělování, vybrali vědci excitační lasery o takových intenzitách, které pokryly celý dynamický rozsah difúzních autokorelačních časů. Detekční objem pro FCCS analýzy byl zaměřen do cytosolu buňky v blízkosti jádra.

Objeví velké rozdíly mezi interakčními vlastnostmi výše uvedených inhibitorů. U methotrexátu byli schopni detekovat jeho cílovou distribuci a určit disociační konstanty. Naproti tomu u PD173956 se projeví silnější interakce s intracelulárními vysokomolekulárními strukturami než s cílovými rakovinnými buňkami [31].

Gernot Guigas a spol. využili FCS mikreologii pro stanovení anomálních difúzních vlastností fluorescenčně značených zlatých nanočástic v cytoplazmě a jádru živých buněk. Ze získaných hodnot MSD byli schopni určit komplexní modul pružnosti ve smyku G' pro obě buněčné kompartmenty. Díky této technice také zjistili rozdíly ve viskoelastické odezvě a anomální difúzi u buněk před a po vystavení osmotickému stresu [32].

Anne Bernheim-Groswasser a spol. použili techniku FCS ke studiu dynamiky semi-flexibilních polymerů. Pomocí výpočtu MSD polymerních segmentů sledovali dynamiku aktinových vláken ve dvou experimentálních provedeních: vlákna označená na různých místech a homogenně značená vlákna. Při porovnání výsledků poskytly oba postupy konzistentní výsledky, což umožnilo měřit časovou závislost MSD na čase (cca 40 μ s–2 s). Téměř přes celé časové měřítko se jimi naměřená data shodovala s vypočítanými teoretickými hodnotami podle hydrodynamických teorií [33].

U vodných roztoků vysokomolekulárního polyethylenglykolu porovnávali data z DWS, DLS, metod sledování částic („particle tracking methods“) a FCS **Silke Rathgeber a spol.** Byli schopni detekovat MSD v rozmezí cca 100–10⁶ nm². Výsledky mikreologických měření porovnávali také s konvenčními reologickými experimenty za použití mj. rotačního reometru.

Výsledkem jejich experimentů bylo také porovnání FCS mikreologie s dalšími mikreologickými technikami. FCS mikreologie se co se týče vysokého rozlišení nemůže rovnat mikreologickým metodám „laser particle tracking“ (dále jen LPT) nebo DWS, které překonává FCS mikreologii v lepším prostorovém rozlišení posunu sledované částice.

Na rozdíl od FCS nejsou ale tyto metody vhodné pro sledování dlouhodobé dynamiky. Z hlediska rozsahu MSD je FCS srovnatelná se standardními LPT metodami a DLS. Na rozdíl od standardních LPT metod umožňuje FCS také přístup k vyšším frekvencím [26].

Fluorescenční korelační spektroskopie nicméně nemusí být nástrojem pro měření pouze biologických vzorků. **T. Cherdhirankorn a spol.** využili FCS k měření difúzních koeficientů malých molekul chromoforů v PDMS (polydimethylsiloxan), PI (polyimid) a PVE (polyvinylether) homopolymerech s různými molekulovými hmotnostmi při teplotách vysoko nad teplotami skelných přechodů polymerů. Jedinečná citlivost FCS techniky umožňující použít nanomolární koncentrace sond zajistila, že sondy nijak neovlivnily vlastnosti polymerní matrix. U všech pozorovaných systémů pozorovali, že se rychlost difúze neřídí okolní viskozitou, která se extrémně zvyšuje s vysokou molekulovou hmotností polymerů. Naopak zjistili, že difúzní koeficient malých sond úzce koreluje se segmentovou dynamikou polymerů a současně si zachovává vlastnosti částic.

U vzorků ve vodném prostředí se provádí kalibrace efektivního objemu na základě přímého měření charakteristického difúzního času molekuly barviva se známým difúzním koeficientem, jako např. Rhodamin 6G. V případě použití organických rozpouštědel tento postup ale nelze použít, protože mnoho barviv má tendenci v organických rozpouštědlech agregovat a difúzní koeficienty barviv často nejsou na rozdíl od vodných systémů známy. V tomto případě spočívá řešení v nezávislém měření difúzních časů fluorescenčně značených polymerů metodou DLS. Cherdhirankornův tým rozšířil tento postup i pro polymerní taveniny, kdy pro kalibraci použili rozpouštědlo s podobným indexem lomu, jako má příslušný polymer. Pro kalibraci efektivního objemu například u PDMS taveniny použili tetrahydrofuran (THF). Difúzní koeficient perlylenem značených polystyrenových částic v roztoku THF byl stanoven metodou DLS a difúzní čas značených částic byl ve stejném roztoku měřen pomocí FCS [34].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Materiály a příprava vzorků

4.1.1. Materiály

Částice	Latex beads, sulfate-modified polystyrene, fluorescent orange Sigma-Aldrich L1528-1ML, LOT# MKBM7524 Aqueous suspension: 2,5 % solids 0,1 µm Microparticle size standard based on polystyrene monodisperse Fluka Analytical 90517-5ML-F, LOT# BCBL6505V Aqueous suspension: 2 % solids 0,1 µm Microparticle size standard based on polystyrene monodisperse Fluka Analytical 72938-5ML-F, LOT# BCBL7814V Aqueous suspension: 2 % solids 1,0 µm
Hyaluronan	Sodium hyaluronate, 90–130 kDa, Tech. grade Contipro Biotech s.r.o., Czech Republic Batch No.: 213-6547 Vlhkost 9,75 % Sodium hyaluronate, 500–750 kDa, Tech. grade Contipro Biotech s.r.o., Czech Republic Batch No.: 213-4245 Vlhkost 8,19 % Sodium hyaluronate, 1500–1750 kDa, Tech. grade Contipro Biotech s.r.o., Czech Republic Batch No.: 213-5226 Vlhkost 12,6 %
Glycerol	Glycerol ≥ 99,5 % Sigma-Aldrich G9012-1L, LOT# BCBK9967V
Rozpouštědlo	Mili-Q voda

4.1.2. Příprava vzorků

Byly připraveny roztoky 40% a 80% glycerolu. Pro další analýzy byly vzorky připraveny smísením následujícím množstvím složek, přičemž rozpouštědlo byl buď 40% glycerol, 80% glycerol nebo Mili-Q voda:

Tabulka 1: Složení vzorků

Metoda	FCS	DLS	Video-mikroreologie
Množství rozpouštědla [μ l]	998	1995	495
Množství částic [μ l]	2	5	5
Velikost částic [μ m]	0,1	0,1	1,0
Fluorescenčně značené částice	ano	ne	ne
Spotřeba vzorku na 1 analýzu	1 kapka (~10 μ l)	2 ml	100 μ l

Po smísení byly vzorky promíchány na vortexu. Pro DLS analýzy byl každý vzorek připraven třikrát. Před vlastním měřením byly připravené vzorky po dobu cca 30 minut odplyňovány v ultrazvukové lázni.

Dále byly připraveny roztoky hyaluronanu o molekulových hmotnostech $Mw_1 = 90\text{--}130$ kDa, $Mw_2 = 500\text{--}750$ kDa a $Mw_3 = 1500\text{--}1750$ kDa. Od každé molekulové hmotnosti byly připraveny roztoky o koncentraci $c_1 = 1$ g/l, $c_2 = 0,1$ g/l a $c_3 = 0,01$ g/l s ohledem na obsah vlhkosti v práškovém hyaluronanu. Vzorky byly následně připraveny obdobným způsobem jako u roztoků glycerolu (viz Tabulka 1) a promíchány na vortexu. V případě DLS (každý vzorek připraven třikrát) byly vzorky analyzovány ihned po jejich přípravě a promíchání na vortexu. Před FCS analýzami byly navíc vzorky probublány dusíkem pro odstranění kyslíku, který by mohl zhaset fluorescenci.

4.2. Měření a vyhodnocování dat

4.2.1. Přístroje a programy

FCS analýzy byly prováděny na přístroji *MicroTime 200* (Time-resolved Fluorescence Microscope) od společnosti PicoQuant za současného použití softwaru *SymPhoTime 64*. Pro excitaci byl vybrán laser 510 H IN MOU („horizontal in main optical units“) – excitační horizontálně polarizovaný laser o vlnové délce 510 nm. Pro konfokální detekci byl zvolen emisní pásmový filtr o vlnové délce 550/49 nm.

DLS analýzy byly prováděny na přístroji *Zetasizer Nano ZS* za použití stejnojmenného softwaru. Světelný zdroj přístroje byl červený laser o vlnové délce 633 nm.

K video-mikroreologickým experimentům byl použit mikroskop *NIKON Eclipse Ci* s kamerou *Canon EOS 550D* a dále programy *Eye Cockpit-UI 324 x CP* (nahrávání videí ve formátu AVI), *ImageJ* (převod formátu AVI na TIF), *CellSens Entry* (inverze barev, úprava kontrastu a jasu) a ke zpracování nahraných videí software *IDL* (Interactive data language).

4.2.2. Měření a vyhodnocování dat z FCS

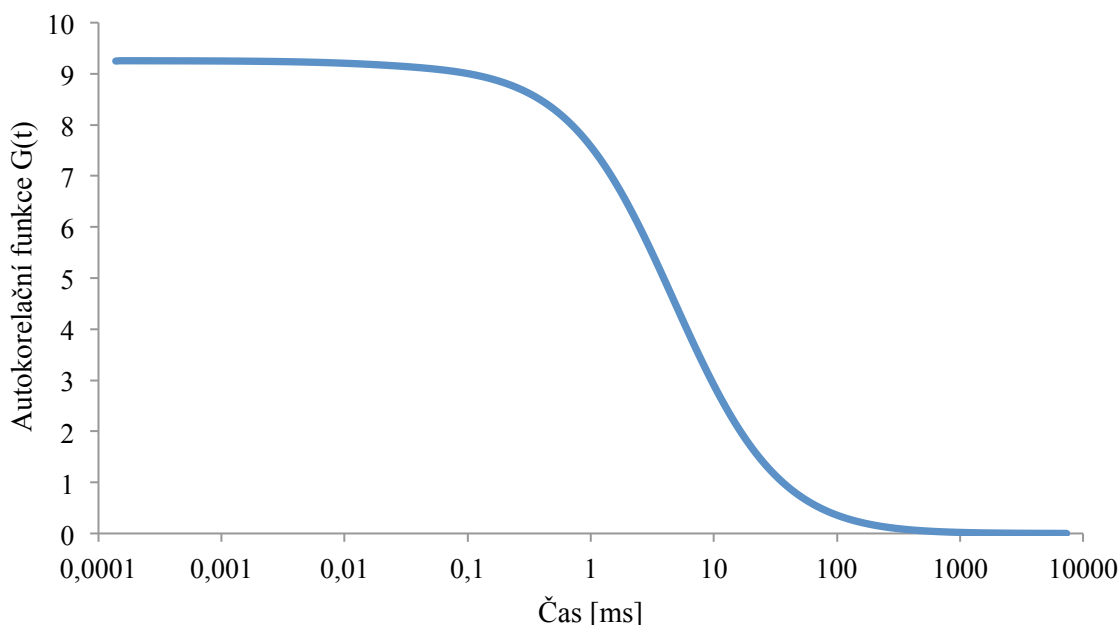
Před každou sérií měření byla vždy nastavena maximální odezva detektoru, a to manuální konfigurací pinhole, mikro-ostření mikroskopu a detektoru. U detektoru bylo nastaveno optimální rozlišení. Před měřením vzorků byl vždy nejprve nakalibrován efektivní objem analýzou Rhodaminu 6G o koncentraci 0,5 nM.

Výstupem FCS analýz byla křivka závislosti funkce $G(t)$ na čase. Získaná závislost byla následně proložena („fitována“) softwarově vypočítaným matematickým modelem pro difúzi s příspěvkem tripletového stavu a statisticky bylo rozhodnuto o počtu difúzních komponent v matematickém modelu. Tvar efektivního objemu je aproximován dle Gaussova profilu:

$$G(t) = \left[1 + T \left[\exp\left(-\frac{t}{\tau_{\text{Trip}}}\right) - 1 \right] \right] \sum_{i=0}^{n_{\text{Diff}}-1} \frac{\rho[i]}{\left[1 + \frac{t}{\tau_{\text{Diff}}[i]} \right] \left[1 + \frac{t}{\tau_{\text{Diff}}[i] \kappa^2} \right]^{0,5}}, \quad (13)$$

kde T je tripletová frakce molekul, t je čas, τ_{Trip} je doba života tripletového stavu, n_{Diff} je počet nezávisle difundujících částic, ρ je příspěvek i -té difundující částice, τ_{Diff} je difúzní čas i -té difundující částice a κ je poměr délky a průměru efektivního objemu.

Výsledkem „fitu“ byla autokorelační křivka:



Obrázek 6: Autokorelační křivka

Současně byly softwarově vypočítány následující parametry:

- Průměrné množství molekul v efektivním objemu N (vypočítáno z $G(0)$ z fitu autokorelační křivky)

$$N = \left[[1 - T] \sum_{i=0}^{n_{\text{Diff}}-1} \rho[i] \right], \quad (14)$$

- koncentrace molekul v efektivním objemu C (vypočítáno na základě V_{Eff})

$$C = \frac{N}{V_{\text{Eff}} \cdot N_A}, \quad (15)$$

- efektivní laterální fokální poloměr w_0 při intenzitě $1/e^2$ (vypočítáno na základě V_{Eff})

$$w_0 = \left[\frac{V_{\text{Eff}}}{\kappa} \right]^{\frac{1}{3}} \pi^{-0,5}, \quad (16)$$

- efektivní fokální poloměr z_0 rovnoběžný s optickou osou při intenzitě $1/e^2$ (vypočítáno na základě V_{Eff})

$$z_0 = \kappa \cdot w_0, \quad (17)$$

- difúzní koeficient k -té difundující částice D (vypočítáno na základě V_{Eff})

$$D[k] = \frac{w_0^2}{4 \cdot \tau_{\text{Diff}}[k]}, \quad (18)$$

kde V_{Eff} je efektivní excitační objem (stanovený kalibračním měřením Rhodaminu 6G) a N_A je Avogadrova konstanta.

Tabulka 2: Hodnoty některých parametrů získaných kalibrací na Rhodamin 6G

Parametr	Označení	Hodnota	Jednotka
Efektivní objem	V_{Eff}	0,800	fl
Efektivní laterální fokální poloměr	w_0	0,263	μm
Efektivní fokální poloměr rovnoběžný s optickou osou	z_0	2,077	μm
Poměr délky a průměru efektivního objemu	κ	7,897	–

Pro účel popisu mikoreologických vlastností vzorku byla autokorelační křivka výpočtem převedena na závislost MSD na čase. Popíšeme-li autokorelační funkci $G(t)$ jako:

$$G(t) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{2}{3w_0^2} \langle \Delta r^2(t) \rangle \right)^{-1} \left(1 + \frac{2}{3z_0^2} \langle \Delta r^2(t) \rangle \right)^{-1/2}, \quad (19)$$

lze MSD vyjádřit kubickou rovnicí:

$$\langle \Delta r^2(t) \rangle = x \Rightarrow \frac{2}{3w_0^4 z_0^2} x^3 + \left(\frac{2}{w_0^2 z_0^2} + \frac{4}{9w_0^4} \right) x^2 + \left(\frac{4}{3w_0^2} + \frac{3}{2z_0^2} \right) x + 1 - \frac{1}{N^2 G(t)^2} = 0. \quad (20)$$

Zanedbáme-li člen v odmocnině v rovnici (19), získáme její aproximovanou formu a MSD pak lze vyjádřit následujícím způsobem:

$$\langle \Delta r^2(t) \rangle = \frac{3}{2} \cdot w_0^2 \cdot \left(\frac{1}{N \cdot G(t)} - 1 \right). \quad (21)$$

Výpočet MSD podle aproximované rovnice (21) má však omezení. Tím je oblast, ve které experimentální hodnoty již nekorelují s teoretickými. Protože $w_0^2/z_0^2 \ll 1$, lze výraz

v odmocnině v rovnici (19) zanedbat pouze tehdy, je-li $\langle \Delta r^2(t) \rangle < 3z_0^2/2$. Tato oblast byla proto graficky oddělena závislostí $3z_0^2/2 = f(t)$, kde t je korelační čas.

Pro celkové porovnání výsledků byly vypočítány teoretické hodnoty MSD podle následujícího vzorce:

$$\text{MSD} = 6Dt; D = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot d_c} \Rightarrow \text{MSD}_{\text{teor.}} = \frac{k_B \cdot T}{\pi \cdot \eta \cdot d_c} \cdot t \cdot 10^{12} [\mu\text{m}^2] \quad (22)$$

kde D je difúzní koeficient, k_B je Boltzmannova konstanta, T je termodynamická teplota, η je dynamická viskozita disperzního prostředí, d_c je průměr sledovaných částic a t je korelační čas.

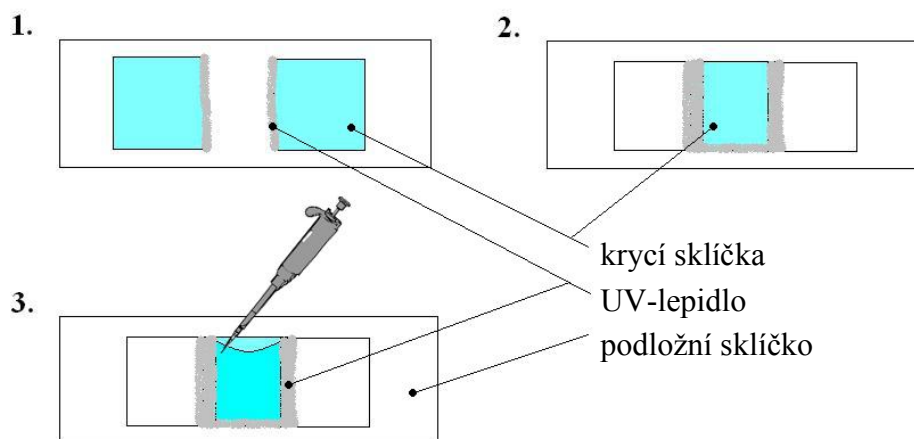
Kořeny kubické Rovnice (20) byly získány pomocí programu *MATLAB* (pro výpočet MSD byl použit pouze reálný kořen) a k vytvoření grafických závislostí a základním výpočtům byl použit *MS Excel*.

4.2.3. Měření a vyhodnocování dat z DLS

Každý vzorek určený k mikrореologické DLS analýze byl vždy připraven třikrát. Nejprve byl ve všech disperzních prostředích (Mili-Q voda, roztoky glycerolu a hyaluronanu) orientačně změřen hydrodynamický poloměr a zeta-potenciál (ζ -potenciál) polystyrenových částic, aby bylo zjištěno, zda jsou disperze stabilní a částice se v jednotlivých disperzních prostředích neshlukují. Na základě výsledků těchto analýz, které potvrdily stabilitu disperzí, bylo možné provést mikrореologická měření v plastových kyvetách, jejichž výsledkem byly softwarově vypočítané hodnoty mj. MSD a korelačního času. Pomocí *MS Excel* byly vytvořeny grafické závislosti.

4.2.4. Měření a vyhodnocování dat z video-mikrореologie

Pro každý vzorek určený k video-mikrореologickému experimentu bylo nutné vytvořit tzv. mikrореologickou kapsli, aby bylo zabráněno nežádoucímu pohybu kapalného vzorku mezi sklíčky a vysychání vzorku. To by mohlo významně zkreslit výsledky analýz. Každá kapsle byla vyrobena z jednoho podložního sklíčka a ze tří krycích sklíček pro mikroskopii:



Obrázek 7: Výroba kapslí pro video-mikrореologii

V prvním kroku byla k podložnímu sklíčku připevněna UV-lepidlem dvě krycí sklíčka. Ve druhém kroku bylo připevněno třetí sklíčko. Mezi jednotlivými kroky bylo UV-lepidlo vždy vytvrzeno pod UV-lampou. Ve třetím kroku byl pomocí mikropipety do vytvrzené kapsle nadávkován vzorek, který byl následně pozorován pod mikroskopem.

Po nahrání cca desetivteřinového videa ve formátu AVI bylo video převedeno v programu *ImageJ* na formát TIF. V programu *CellSens Entry* byla provedena inverze barev a upraven jas a kontrast tak, že výsledkem bylo video s bílými částicemi na černém pozadí.

Takto upravené video bylo dále zpracováno softwarem *IDL*, ve kterém byly pomocí filtru velikosti vybrány k dalšímu vyhodnocování stejně velké částice (vzhledem k poloze částice ve vzorku – částice vzdálenější se jevily menší – a vzhledem k případným nežádoucím aglomerátům částic). U takto vybraných částic byly následně sledovány jejich trajektorie pohybu na základě změny jejich polohy na po sobě jdoucích snímcích. Po zohlednění mj. rychlosti snímání videa, zvětšení mikroskopu (40×) a odstranění vlivu nežádoucího toku vzorku v mikrореologické kapsli byly pomocí softwaru vygenerovány hodnoty mj. MSD a času. U některých vzorků, především u roztoků glycerolu, Mili-Q vody a některých zředěnějších roztoků hyaluronanu, byl pomocí směrnice závislosti MSD na čase určen difúzní koeficient.

Protože nebylo možné pod optickým mikroskopem dobře pozorovat 0,1 μm částice, byly pro video-mikrореologické experimenty použity částice desetkrát větší – mikrometrové. Aby bylo možné porovnat výsledky všech tří technik – FCS, DLS a video-mikrореologie, byla získaná data z video-mikrореologie přepočítána pro 0,1 μm částice.

Nejdříve byla vypočítána viskozita vzorku η :

$$\eta = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot D_1 \cdot d_{C,1}}, \quad (23)$$

kde D_1 je experimentálně zjištěný difúzní koeficient a $d_{C,1}$ je průměr částic, se kterými byl experiment proveden.

Následně byl podle předchozího vzorce vypočten difúzní koeficient D_2 pro menší (teoretické) částice o průměru $d_{C,2}$:

$$D_2 = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot d_{C,2}}. \quad (24)$$

Hodnoty MSD pro menší částice (MSD_2) byly získány vynásobením hodnot MSD původních větších částic (MSD_1) a poměru difúzních koeficientů menších a větších částic:

$$MSD_2 = MSD_1 \cdot \frac{D_2}{D_1}. \quad (25)$$

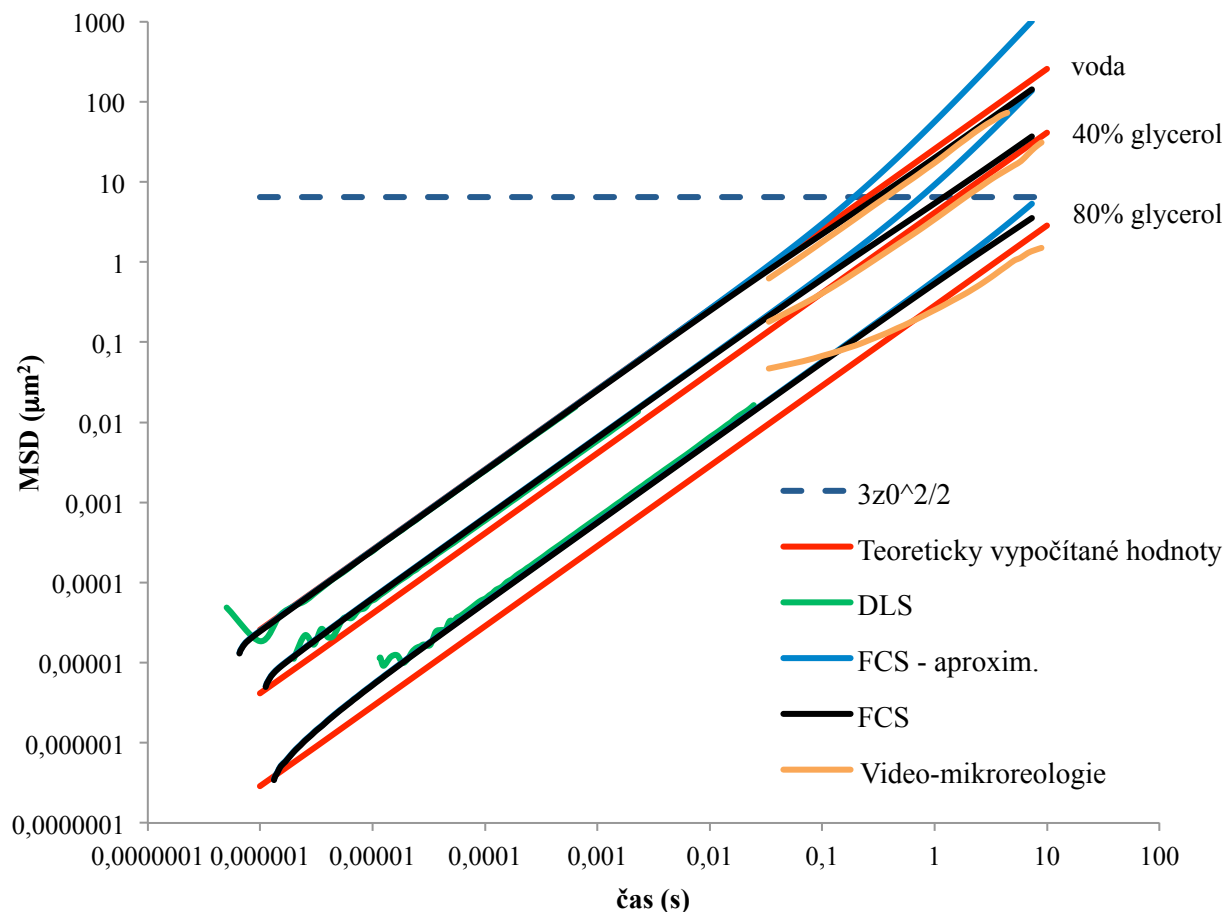
K vytvoření grafických závislostí a základním výpočtům byl použit *MS Excel*.

Všechny analýzy (pomocí FCS, DLS, video-mikrореologie) byly prováděny při stejné teplotě 23 °C.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1. Roztoky glycerolu a Mili-Q voda

Aby byla potvrzena správnost měření, byly nejprve analýzy provedeny všemi třemi metodami s newtonovskými roztoky glycerolu a Mili-Q vodou. U metody FCS bylo měření každého vzorku z časových důvodů provedeno jednou, u metod DLS a video-mikroreologie byl každý vzorek proměřen třikrát a výsledky byly zprůměrovány.



Obrázek 8: Závislost MSD na čase – roztoky glycerolu a Mili-Q voda

Z předchozího grafického porovnání mikroreologických metod vyplývá několik skutečností. Nejdůležitějším zjištěním je rozsah hodnot MSD a času u FCS mikroreologie. Jak je patrné z výše uvedeného grafu na Obrázku 8, metodou FCS lze získat mikroreologické informace ze širší oblasti hodnot, než u DLS nebo video-mikroreologie. Rozsah FCS je v podstatě dokonalejším spojením rozsahů těchto dvou technik. FCS navíc překonává konkurenční mikroreologické techniky i v oblasti krajních hodnot – např. u 80% glycerolu poskytuje DLS spolehlivé hodnoty až nad cca $7 \cdot 10^{-5}$ s a tomu odpovídajícího MSD $5 \cdot 10^{-5} \mu\text{m}^2$, zatímco u FCS je časový rozsah i rozsah MSD hodnot o téměř dva řády větší. Porovnáme-li v krajních hodnotách FCS a video-mikroreologii, lze je shledat jako téměř ekvivalentní.

Značný přínos má však FCS technika v oblasti středních časových a MSD hodnot. Máme-li jako příklad stále předchozí graf na Obrázku 8, pak v čase cca od $5 \cdot 10^{-4}$ s do cca $0,07$ – $0,7$ s

a MSD od 0,01 do 0,1–0,7 μm^2 vzniká oblast, ve které stávajícími technikami DLS a video-mikroreologií nejsme schopni spolehlivě popsat mikroreologické vlastnosti vzorku. Díky unikátním vlastnostem FCS techniky jsme však nyní schopni tuto oblast velmi dobře popsat, protože experimentální FCS hodnoty velmi dobře korelují s těmi teoretickými téměř v celém jejich rozsahu.

Co se týče video-mikroreologie, u roztoku 80% glycerolu lze pozorovat odklon video-mikroreologické závislosti od teoreticky vypočítaných hodnot. Ten může být způsoben mimo jiné i tím, že k analýze byly použity desetkrát větší částice a výsledky byly následně přepočítány pro částice menší. Takto vzniklá nepřesnost je zanedbatelná u vzorků s nízkou viskozitou, nicméně u vzorků s vyšší viskozitou (80% glycerol; HA: 1 g/l, 1500–1750 kDa) je její vliv na výsledky patrnější.

Analýzou newtonovských vzorků byla navíc ověřena i správnost aproximované rovnice pro výpočet MSD (modré křivky). Zohledníme-li i výše diskutovanou hranici pro MSD, kdy $\text{MSD} < 3z_0^2/2$, získáme spolehlivé hodnoty, které téměř v celém rozsahu velmi dobře korelují s hodnotami teoretickými. Můžeme tak relativně přesně popsat mikroreologické vlastnosti vzorků v širokém rozmezí času a MSD i pomocí aproximované (jednodušší) formy rovnice.

Z grafu na Obrázku 8 jsou nicméně patrné i odchylky experimentálních hodnot od teoretických ve smyslu posunu závislostí od sebe na základě jejich rozdílné směrnice. Tento posun je patrný zvláště u roztoků glycerolu analyzovaných pomocí FCS a DLS. Příčin posunu by mohlo být několik. Jedním z faktorů by mohlo být nesprávné pipetování glycerolu při přípravě roztoků, protože mikropipety jsou kalibrovány na kapaliny o nižší viskozitě (voda). Protože ale k tomuto posunu nedošlo u výsledků všech technik (i video-mikroreologie), chyba při pipetování zřejmě nebude mít na konečné výsledky tak markantní vliv a důvod posunu FCS a DLS závislostí bude jiný. U FCS by teoreticky mohla být příčinou deformace konfokálního objemu při analýze roztoků glycerolu způsobená změnou indexu lomu roztoku. Tuto skutečnost diskutuje ve svém článku *Suhling a spol.* [35]. Pokud by skutečně docházelo ke změně indexu lomu, docházelo by i ke zkreslení výsledků analýz glycerolu pomocí DLS (viz Rovnice 5).

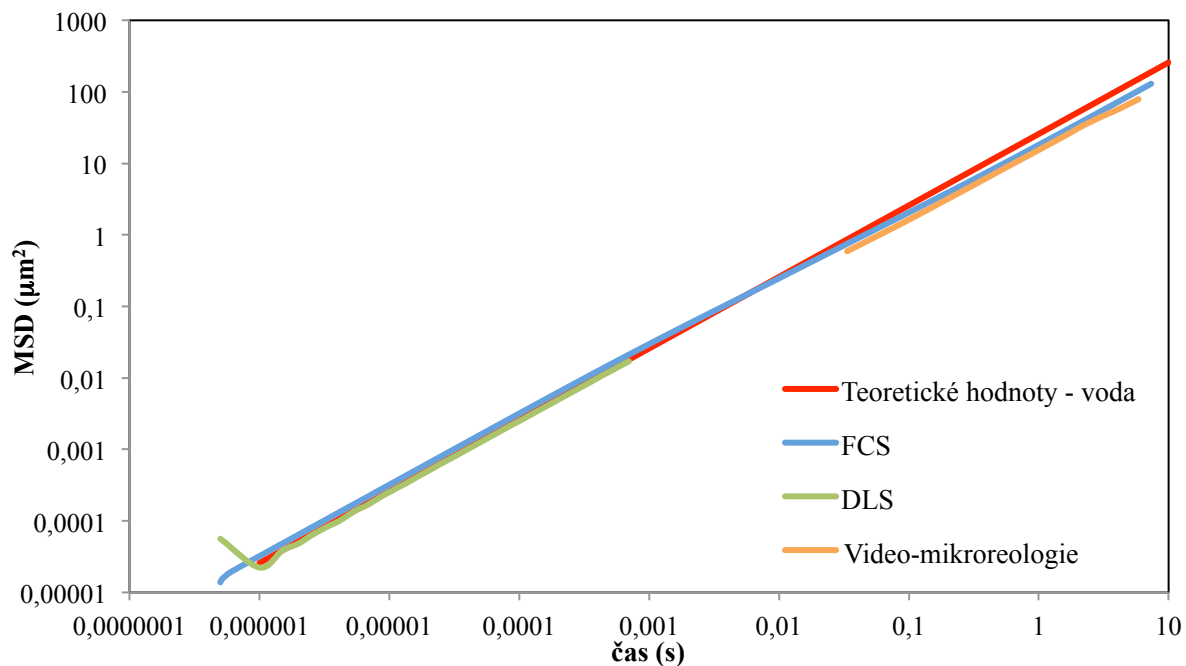
Naposledním faktem vyplývajícím z grafu na Obrázku 8 je určitý trend posunu závislostí MSD na čase k nižším hodnotám MSD v závislosti na vzrůstající viskozitě vzorku. V podstatě jde o logický důsledek toho, že ve viskóznějším médiu (roztoky glycerolu) jsou fluktuace pozorovaných částic menší než v méně viskózním médiu (Mili-Q voda). Z toho vyplývá i další neméně důležitá skutečnost, a to ta, že pro viskóznější vzorky, podobně jako v tomto případě 80% glycerol, nelze spolehlivě určit limitní hodnoty pro aproximovanou rovnici pro FCS (Rovnice 21). Pro viskóznější vzorky tak lze aproximovanou rovnici použít bez omezení.

5.2. Roztoky hyaluronanu

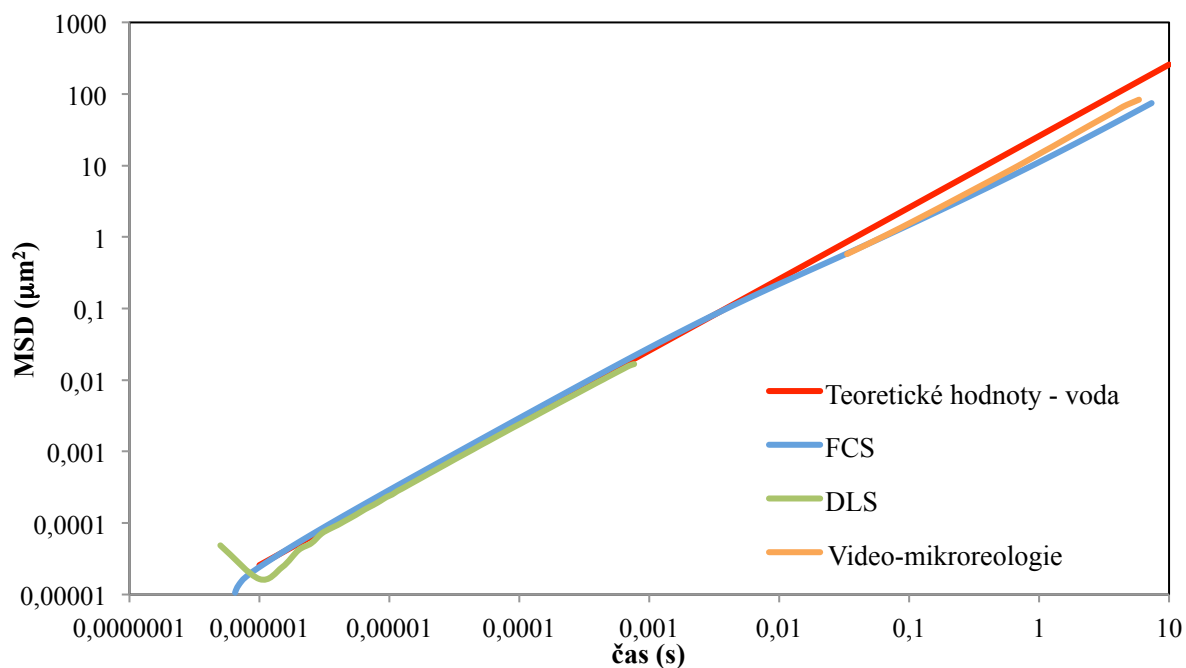
Po ověření správnosti všech tří mikroreologických technik bylo možné přistoupit k analýze newtonovských roztoků hyaluronanu. Roztoky hyaluronanu byly připraveny celkem ve třech koncentracích (0,01; 0,1 a 1,0 g/l), od každé koncentrace tři molekulové hmotnosti (90–130; 500–750; 1500–1750 kDa). U metody FCS bylo měření každého vzorku z časových důvodů stejně jako u roztoků glycerolu a Mili-Q vody provedeno pouze jednou, u metod DLS a video-mikroreologie byl každý vzorek proměřen třikrát a výsledky byly zprůměrovány.

Pro názorné porovnání jsou uvedeny výsledky pouze několika analýz – pro ředění 0,01 a 1,0 g/l a pro molekulové hmotnosti 90–130 a 1500–1750 kDa. Ostatní grafy jsou uvedeny v Přílohách. Srovnání experimentálně získaných dat bylo provedeno s teoretickými hodnotami pro vodu (rozpuštědlo).

5.2.1. Roztoky hyaluronanu o koncentraci 0,01 g/l



Obrázek 9: Závislost MSD na čase – HA: 0,01 g/l, 90–130 kDa



Obrázek 10: Závislost MSD na čase – HA: 0,01 g/l, 1500–1750 kDa

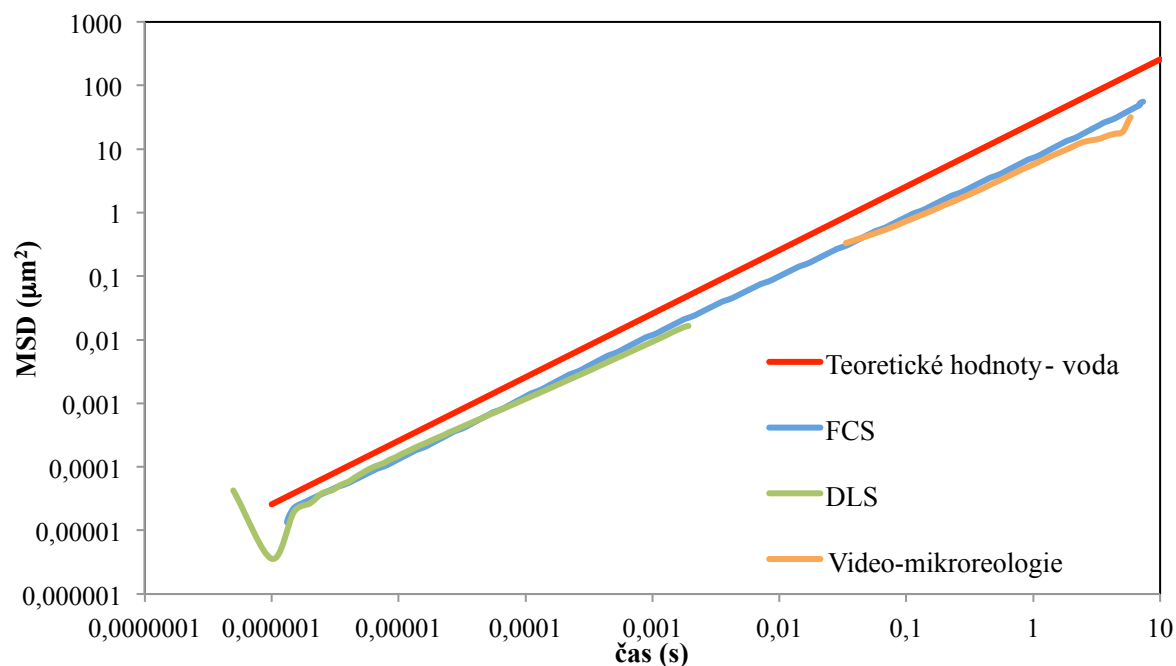
Srovnáme-li mezi sebou výsledky analýz dvou stejně koncentrovaných roztoků hyaluronanu lišících se pouze v molekulové hmotnosti, lze říci, že u obou vzorků dochází ještě stále k velmi dobré korelaci experimentálních dat s teoretickými hodnotami pro vodu (čisté rozpouštědlo). U roztoku hyaluronanu s vyšší molekulovou hmotností však již lze ve vyšších hodnotách MSD (cca nad $0,5 \mu\text{m}^2$) a času (cca nad $0,01 \text{ s}$) pozorovat určité odchýlení experimentálních závislostí od teoretické. Toto odchýlení lze sledovat u výsledků FCS a video-mikroreologie, DLS tuto časovou a MSD oblast nepokrývá.

Příčinou tohoto odchýlení je pro nenewtonovské kapaliny typické viskoelastické chování. Při porovnání výše uvedených grafických závislostí na Obrázcích 9 a 10 lze také pozorovat, že s rostoucí molekulovou hmotností polymeru se zmíněné viskoelastické vlastnosti roztoku projevují více.

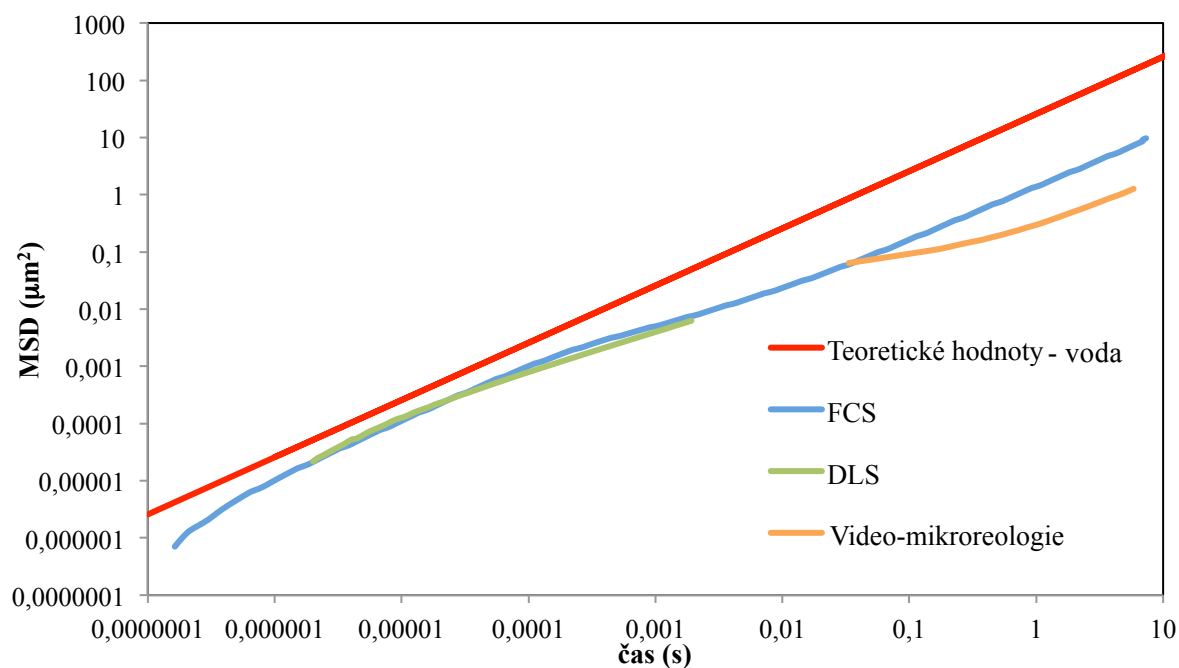
Výsledky DLS se u roztoku hyaluronanu s nižší molekulovou hmotností příliš nelišily od teoretických hodnot pro vodu a až na mírnou fluktuaci v nízkých krajních hodnotách se experimentální závislost se závislostí teoretickou téměř překrývala. To samé lze říci o výsledcích analýzy hyaluronanu o vyšší molekulové hmotnosti.

Významnější odlišnosti byly zaznamenány u koncentrovanějších roztoků hyaluronanu – viz. následující kapitola.

5.2.2. Roztoky hyaluronanu o koncentraci 1,0 g/l



Obrázek 11: Závislost MSD na čase – HA: 1,0 g/l, 90–130 kDa

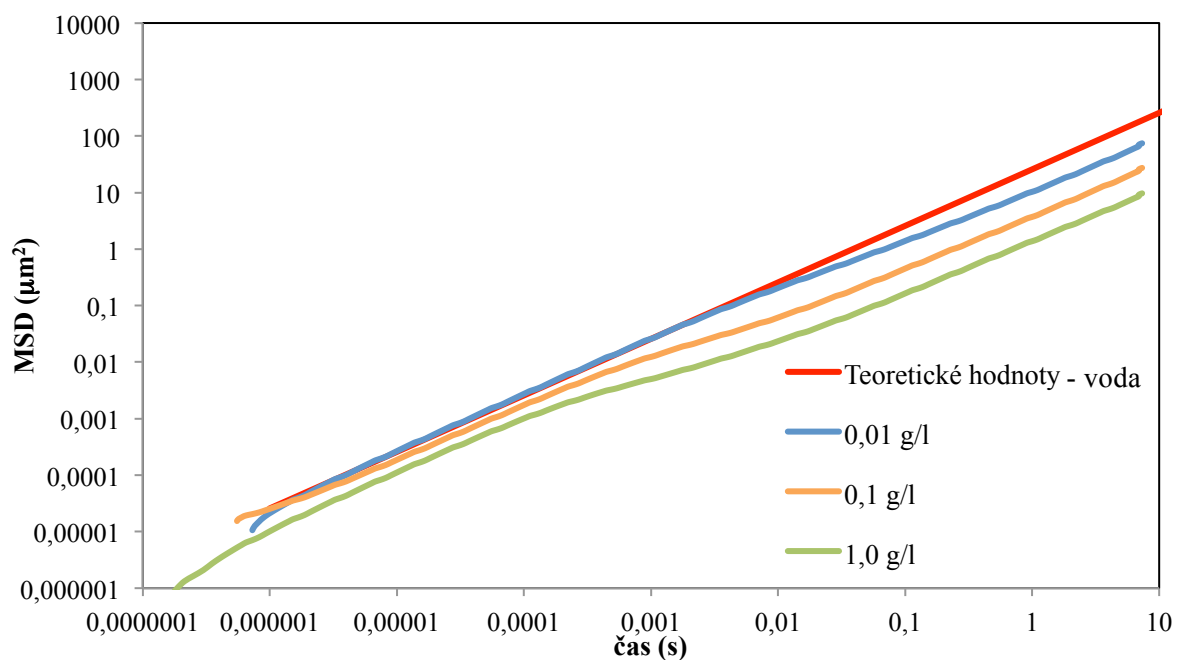


Obrázek 12: Závislost MSD na čase – HA: 1,0 g/l, 1500–1750 kDa

Na Obrázku 11 a 12 lze pozorovat, že u hyaluronanu s nižší molekulovou hmotností dochází k většinovému překryvu výsledků FCS s výsledky z DLS a video-mikroreologie. Naopak u hyaluronanu s vyšší molekulovou hmotností lze sledovat významné odchýlení výsledků video-mikroreologie, takže relativně nejlepší výsledky opět poskytuje FCS.

Odchýlení video-mikroreologické závislosti je pravděpodobně znovu způsobeno mimo jiné i použitím větších částic pro analýzu a následným přepočtem výsledků pro částice menší. Výsledky DLS prakticky kopírují závislost získanou pomocí FCS.

Ze závislosti MSD na čase pro roztoky hyaluronanu o koncentraci 1,0 g/l je současně patrný zvětšující se projev viskoelastických vlastností s rostoucí koncentrací roztoku, ale i s rostoucí molekulovou hmotností polymeru. Zvláště u vysokomolekulárního hyaluronanu lze mikroreologické vlastnosti jeho roztoků popsat esovitě prohnutou křivkou, u které se inflexní bod se zvyšující koncentrací roztoku a molekulovou hmotností polymeru přesouvá k nižším hodnotám času a MSD. Pro názornost je uvedeno následující grafické porovnání výsledků FCS analýz roztoků hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1500–1750 kDa o koncentraci 0,01; 0,1 a 1,0 g/l:



Obrázek 13: Závislost MSD na čase – HA: 1500–1750 kDa

6. ZÁVĚR

V této bakalářské práci bylo provedeno srovnání tří pasivních mikrореologických technik se zaměřením na FCS. K analýzám byly použity fluorescenčně značené a neznačené polystyrenové částice, pomocí kterých byly zjišťovány mikrореologické vlastnosti roztoků glycerolu, Mili-Q vody a roztoků hyaluronanu.

Z grafického srovnání výsledků všech tří mikrореologických technik vyplývá, že metodou FCS lze oproti DLS a video-mikrореologii získat širší rozsah hodnot MSD i času. Hlavním přínosem FCS je, že překonává konkurenční techniky pokrytím i té oblasti MSD a času, ve které výše zmíněnými stávajícími technikami nejsme schopni mikrореologické vlastnosti vzorku spolehlivě popsat. FCS těmto technikám navíc silně konkuruje i v oblasti krajních hodnot.

Pro jednodušší výpočet hodnot MSD byla pro FCS navíc odvozena aproximovaná rovnice, jejíž správnost byla ověřena analýzou newtonovských vzorků (Mili-Q voda a glycerol) a následným porovnáním s teoreticky vypočítanými hodnotami. Je-li zohledněna limitní platnost aproximované rovnice, lze i touto cestou získat velmi dobré výsledky.

Co se týče omezení FCS mikrореologie (potažmo i DLS), ukázalo se, že při analýze viskóznějších vzorků (80% glycerol) dochází zřejmě k deformaci konfokálního objemu na základě změny indexu lomu a následně ke zkreslení výsledků. V dalších experimentech by proto bylo vhodné tuto teorii ověřit a nalézt optimální řešení.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] CICUTA, Pietro a Athene M. DONALD. Microrheology: a review of the method and applications. *Soft Matter*[online]. 2007, vol. 3, issue 12, s. 1449- [cit. 2014-04-12]. DOI: 10.1039/b706004c. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b706004c>
- [2] WAIGH, T A. Microrheology of complex fluids. *Reports on Progress in Physics* [online]. 2005-03-01, vol. 68, issue 3, s. 685-742 [cit. 2014-04-12]. DOI: 10.1088/0034-4885/68/3/R04. Dostupné z: <http://stacks.iop.org/0034-4885/68/i=3/a=R04?key=crossref.13db41e971bf049d3528e867f566ccd9>
- [3] ELSON, Elliot L., Xiaoxiao MA, Yong Hwee FOO, Thorsten WOHLAND, Mark A. HINK a Aladdin PRAMANIK. Fluorescence Correlation Spectroscopy Measures Molecular Transport in Cells. *Traffic*. 2001, vol. 2, issue 11, s. 279-290. DOI: 10.1007/978-1-60761-244-5_18.
- [4] DONALD, Athene M. Why should polymer physicists study biopolymers?. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* [online]. 2007-12-15, vol. 45, issue 24, s. 3257-3262 [cit. 2014-04-24]. DOI: 10.1002/polb.21335. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/polb.21335>
- [5] VANDERHOOF, Janssen L., Mataz ALCOUTLABI, Jules J. MAGDA a Glenn D. PRESTWICH. Rheological Properties of Cross-Linked Hyaluronan-Gelatin Hydrogels for Tissue Engineering. *Macromolecular Bioscience* [online]. 2009-01-09, vol. 9, issue 1, s. 20-28 [cit. 2014-04-24]. DOI: 10.1002/mabi.200800141. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/mabi.200800141>
- [6] ALMEIDA, Nalinda, Anja MUELLER, Stanley HIRSCHI a Leela RAKESH. Rheological studies of polysaccharides for skin scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2014, vol. 102, issue 5, s. 1510-1517 [cit. 2014-04-25]. DOI: 10.1002/jbm.a.34805. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.34805>
- [7] NEČAS, J., L. BARTOŠÍKOVÁ, P. BRAUNER a J. KOLÁŘ. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinární medicína*. 2008, roč. 53, č. 8, s. 397-411. Dostupné z: <http://www.vri.cz/docs/vetmed/53-8-397.pdf>
- [8] FRASER, J. R. E., T. C. LAURENT, U. B. G. LAURENT, Marisa SHIINA. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*. 1997, vol. 242, issue 1, s. 255-275. DOI: 10.1016/b978-0-12-800092-2.00010-1. Dostupné z: http://www.crespinegel.no/pdf/ha_10.pdf
- [9] WIEST, Luitgard a Martina KERSCHER. Native hyaluronic acid in dermatology – results of an expert meeting. *JDDG*. 2008, vol. 6, issue 3, s. 176-180. DOI: 10.1111/j.1610-0387.2008.06639.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1610-0387.2008.06639.x>
- [10] LI, Tongcang a Mark G. RAIZEN. Brownian motion at short time scales. *Annalen der Physik*. 2013, vol. 525, issue 4, s. 281-295. DOI: 10.1002/andp.201200232. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/andp.201200232>
- [11] ROMANO LAPASIN, Sabrina Priel. *Rheology of Industrial Polysaccharides: Theory and Applications* [online]. Boston, MA: Springer US, 1995 [cit. 2014-04-26]. ISBN 978-146-1521-853. Dostupné z: <http://link.springer.com/book/10.1007%2F978-1-4615-2185-3>

- [12] VINCENT, Romaric R. a Martin A.K. WILLIAMS. Microrheological investigations give insights into the microstructure and functionality of pectin gels. *Carbohydrate Research* [online]. 2009, vol. 344, issue 14, s. 1863-1871 [cit. 2014-04-27]. DOI: 10.1016/j.carres.2008.11.021. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621508005600>
- [13] LAI, Samuel K., Ying-Ying WANG, Denis WIRTZ a Justin HANES. Micro- and macrorheology of mucus. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2009, vol. 61, issue 2, s. 86-100 [cit. 2014-04-26]. DOI: 10.1016/j.addr.2008.09.012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X08002603>
- [14] SAVIN, Thierry a Patrick S. DOYLE. Static and Dynamic Errors in Particle Tracking Microrheology. *Biophysical Journal* [online]. 2005, vol. 88, issue 1, s. 623-638 [cit. 2014-04-28]. DOI: 10.1529/biophysj.104.042457. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349505731362>
- [15] MOSCHAKIS, Thomas. Microrheology and particle tracking in food gels and emulsions. *Current Opinion in Colloid* [online]. 2013, vol. 18, issue 4, s. 311-323 [cit. 2014-04-26]. DOI: 10.1016/j.cocis.2013.04.011. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135902941300068X>
- [16] AMIN, Samiul, Carlos A. REGA a Hanna JANKEVICS. Detection of viscoelasticity in aggregating dilute protein solutions through dynamic light scattering-based optical microrheology. *Rheologica Acta* [online]. 2012, vol. 51, issue 4, s. 329-342 [cit. 2014-04-26]. DOI: 10.1007/s00397-011-0606-6. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00397-011-0606-6>
- [17] ORTEGA, Francisco, Hernán RITACCO a Ramón G. RUBIO. Interfacial microrheology: Particle tracking and related techniques. *Current Opinion in Colloid* [online]. 2010, vol. 15, issue 4, s. 237-245 [cit. 2014-04-28]. DOI: 10.1016/j.cocis.2010.03.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359029410000300>
- [18] WILLIAMS, M.A.K., R.R. VINCENT, D.N. PINDER a Y. HEMAR. Microrheological studies offer insights into polysaccharide gels. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics* [online]. 2008, vol. 149, 1-3, s. 63-70 [cit. 2014-04-28]. DOI: 10.1016/j.jnnfm.2007.05.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0377025707001413>
- [19] CROCKER, John, M. VALENTINE, Eric WEEKS, T. GISLER, P. KAPLAN, A. YODH a D. WEITZ. Two-Point Microrheology of Inhomogeneous Soft Materials. *Physical Review Letters* [online]. 2000, vol. 85, issue 4, s. 888-891 [cit. 2014-04-28]. DOI: 10.1103/PhysRevLett.85.888. Dostupné z: <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevLett.85.888>
- [20] LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, c2006, s. 1-10. ISBN 0387312781.
- [21] MARCU, Laura, Paul M FRENCH a Daniel S ELSON. *Fluorescence lifetime spectroscopy and imaging: principles and applications in biomedical diagnostics*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2014, 10,32-33. ISBN 9781439861677.
- [22] KOYNOV, Kaloian a Hans-Jürgen BUTT. Fluorescence correlation spectroscopy in colloid and interface science. *Current Opinion in Colloid*. 2012, vol. 17, issue 6, s.

- 377-387. DOI: 10.1016/j.cocis.2012.09.003. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359029412000994>
- [23] JENSEN, Ellen C., Yuling YAN, Gerard MARRIOTT, G.R. BRIGHT, G.W. FISHER, J. ROGOWSKA, D.L. TAYLOR, David A. AGARD, Yasushi HIRAOKA, Peter SHAW, John W. SEDAT, G.J. BRAKENHOFF, E.A. Van SPRONSEN, H.T.M. Van Der VOORT, N. NANNINGA, Donna J. ARNDT-JOVIN, Thomas M. JOVIN, Daniel AXELROD, Daniel AXELROD, Shinya INOUÉ, Daniel AXELROD, Edward H. HELLEN a David E. WOLF. Types of Imaging, Part 2: An Overview of Fluorescence Microscopy. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*. 2012, vol. 295, issue 10, s. 271-306. DOI: 10.1016/s0091-679x(08)60983-8.
- [24] ELSON, Elliot L., Xiaoxiao MA, Yong Hwee FOO, Thorsten WOHLAND, Mark A. HINK a Aladdin PRAMANIK. Fluorescence Correlation Spectroscopy Measures Molecular Transport in Cells. *Traffic*. 2001, vol. 2, issue 11, s. 279-290. DOI: 10.1007/978-1-60761-244-5_18.
- [25] Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS): Note 1.3. THERMO FISHER SCIENTIFIC INC. Life Technologies: A Thermo Fisher Scientific Brand [online]. 2015 [cit. 2015-03-24]. Dostupné z:
<https://www.lifetechnologies.com/cz/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/technical-notes-and-product-highlights/fluorescence-correlation-spectroscopy-fcs.html>
- [26] RATHGEBER, Silke, Hans-Josef BEAUVISAGE, Hubert CHEVREAU, Norbert WILLENBACHER a Claude OELSCHLAEGER. Microrheology with Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Langmuir*. 2009-06-02, vol. 25, issue 11, s. 6368-6376. DOI: 10.1021/la804170k. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la804170k>
- [27] Fluorophore Photobleaching Literature References. *Nikon MicroscopyU* [online]. 2000-2013 [cit. 2014-11-22]. Dostupné z:
<http://www.microscopyu.com/references/photobleaching.html>
- [28] WU, Pei-Hsun, Stephen H. ARCE, Patrick R. BURNEY a Yiider TSENG. A Novel Approach to High Accuracy of Video-Based Microrheology. *Biophysical Journal* [online]. 2009, vol. 96, issue 12, s. 5103-5111 [cit. 2014-04-28]. DOI: 10.1016/j.bpj.2009.03.029. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000634950900770X>
- [29] WINCKLER, Pascale, Aurélie CAILLER, Régis DETURCHE, Pierre JEANNESSON, Hamid MORJANI a Rodolphe JAFFIOL. Microfluidity mapping using fluorescence correlation spectroscopy: A new way to investigate plasma membrane microorganization of living cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2012, vol. 1818, issue 11, s. 2477-2485. DOI: 10.1016/j.bbamem.2012.05.018. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0005273612001769>
- [30] SHI, Xianke, Lin SHIN TEO, Xiaotao PAN, Shang-Wei CHONG, Rachel KRAUT, Vladimir KORZH a Thorsten WOHLAND. Probing events with single molecule sensitivity in zebrafish and Drosophila embryos by fluorescence correlation spectroscopy. *Developmental Dynamics*. 2009, vol. 238, issue 12, s. 3156-3167. DOI: 10.1002/dvdy.22140. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/dvdy.22140>

- [31] GLAUNER, Heike, Ivo R RUTTEKOLK, Kerrin HANSEN, Ben STEEMERS, Yi-Da CHUNG, Frank BECKER, Stefan HANNUS a Roland BROCK. Simultaneous detection of intracellular target and off-target binding of small molecule cancer drugs at nanomolar concentrations. *British Journal of Pharmacology*. 2010, vol. 160, issue 4, s. 958-970. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.00732.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1476-5381.2010.00732.x>
- [32] GUIGAS, Gernot, Claudia KALLA a Matthias WEISS. Probing the Nanoscale Viscoelasticity of Intracellular Fluids in Living Cells. *Biophysical Journal*. 2007, vol. 93, issue 1, s. 316-323. DOI: 10.1529/biophysj.106.099267. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349507712845>
- [33] BERNHEIM-GROSWASSER, Anne, Roman SHUSTERMAN a Oleg KRICHEVSKY. Fluorescence correlation spectroscopy analysis of segmental dynamics in actin filaments. *The Journal of Chemical Physics*. 2006, vol. 125, issue 8. DOI: 10.1063/1.2244550.
- [34] CHERDHIRANKORN, T., V. HARMANDARIS, A. JUHARI, P. VOUDOURIS, G. FYTAS, K. KREMER a K. KOYNOV. Fluorescence Correlation Spectroscopy Study of Molecular Probe Diffusion in Polymer Melts. *Macromolecules*. 2009-07-14, vol. 42, issue 13, s. 4858-4866. DOI: 10.1021/ma900605z. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma900605z>
- [35] SUHLING, Klaus, Paul M. W. FRENCH a David PHILLIPS. Time-resolved fluorescence microscopy. *Photochemical*. 2005, vol. 4, issue 1, s. 13-22. DOI:10.1039/b412924p. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b412924p>

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

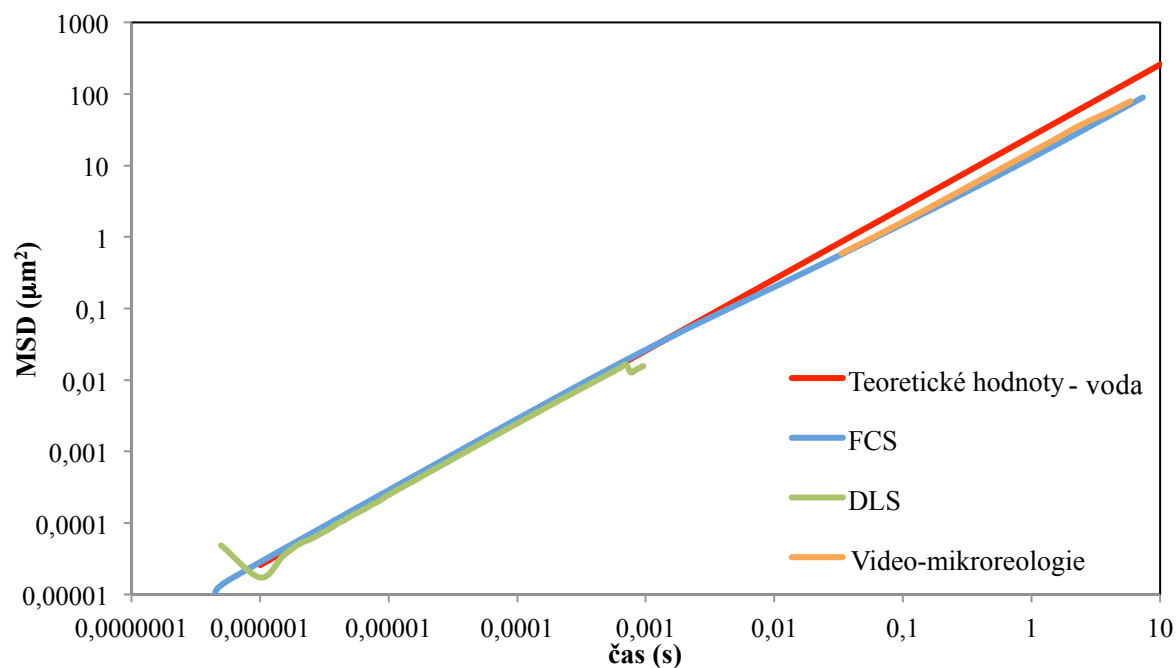
CCD	Charge-coupled device
DLS	Diffusing light spectroscopy (Dynamický rozptyl světla)
DWS	Diffusing wave spectroscopy (Difúzní vlnová spektroskopie)
FCCS	Fluorescence cross-correlation spectroscopy (Fluorescenční kros-korelační spektroskopie)
FCS	Fluorescence correlation spectroscopy (Fluorescenční korelační spektroskopie)
HA	Kyselina hyaluronová
H IN MOU	Horizontal in main optical units
IDL	Interactive data language
LPT	Laser particle tracking
MSD	Mean squared displacement (Střední čtverec posunu)
PDMS	Polydimethylsiloxan
PI	Polyimid
PVE	Polyvinylether
SPT	Single particle tracking (Jednočásticová mikrореologie)
THF	Tetrahydrofuran
c	Koncentrace
G(t)	Autokorelační funkce
M _w	Molekulová hmotnost

9. SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1	Závislost MSD na čase – HA: 0,01 g/l, 500–750 kDa
Příloha 2	Závislost MSD na čase – HA: 0,1 g/l, 500–750 kDa
Příloha 3	Závislost MSD na čase – HA: 1,0 g/l, 500–750 kDa
Příloha 4	Závislost MSD na čase – HA: 0,1 g/l, 90–130 kDa
Příloha 5	Závislost MSD na čase – HA: 0,1 g/l, 1500–1750 kDa

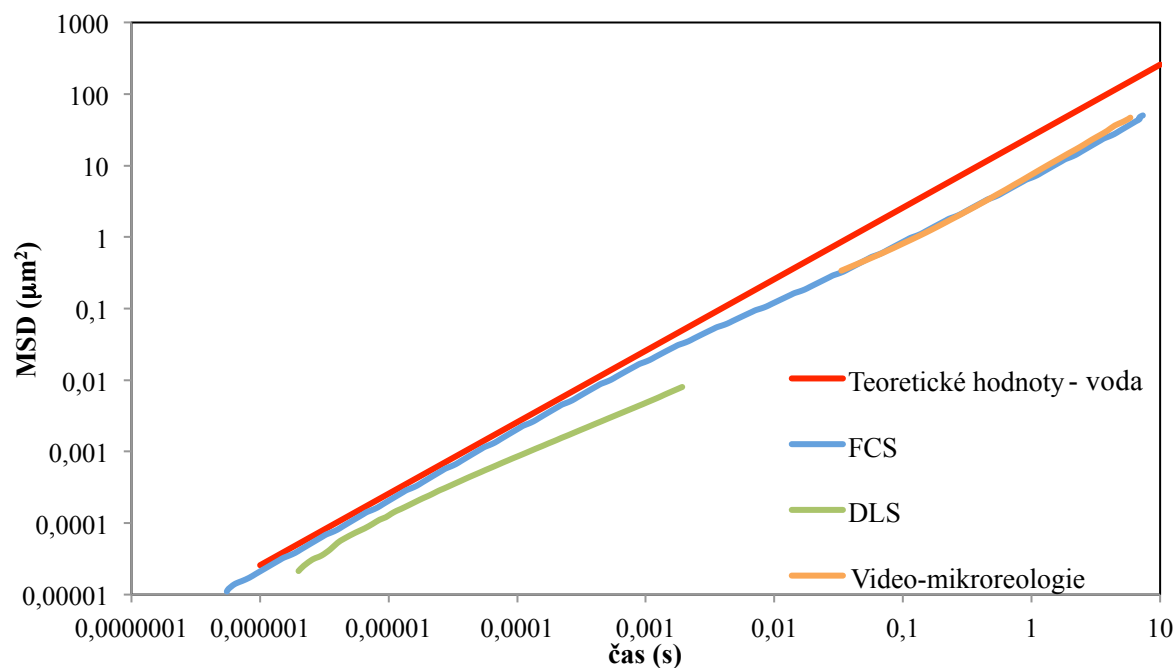
10. PŘÍLOHY

Příloha 1



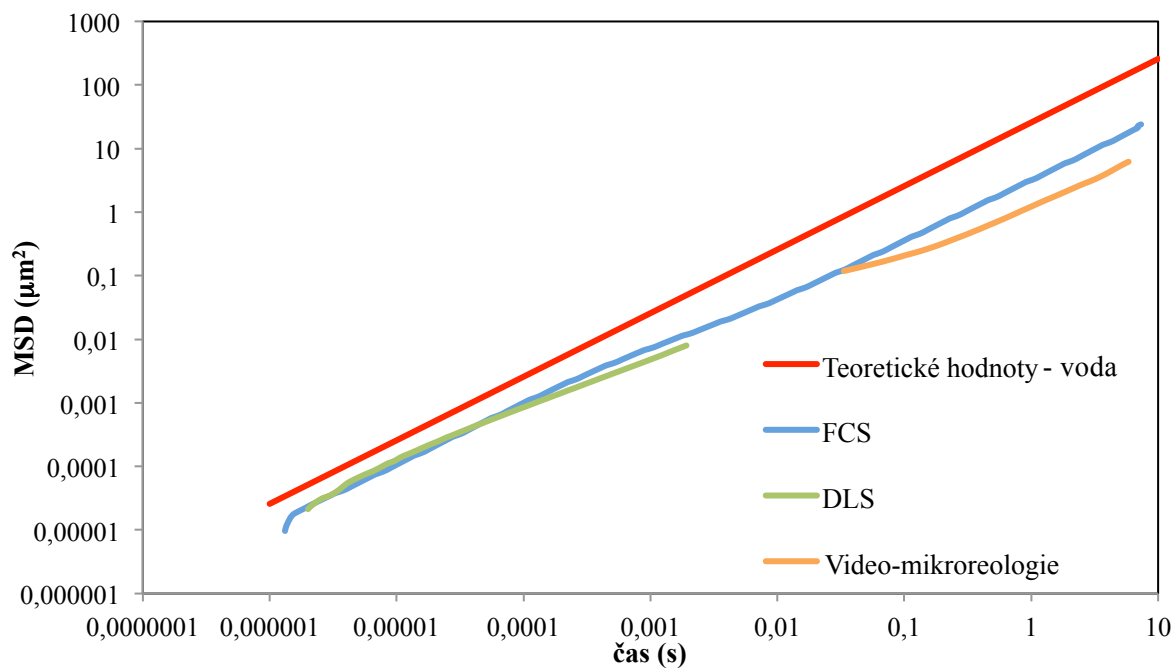
Obrázek 14: Závislost MSD na čase – HA: 0,01 g/l, 500–750 kDa

Příloha 2



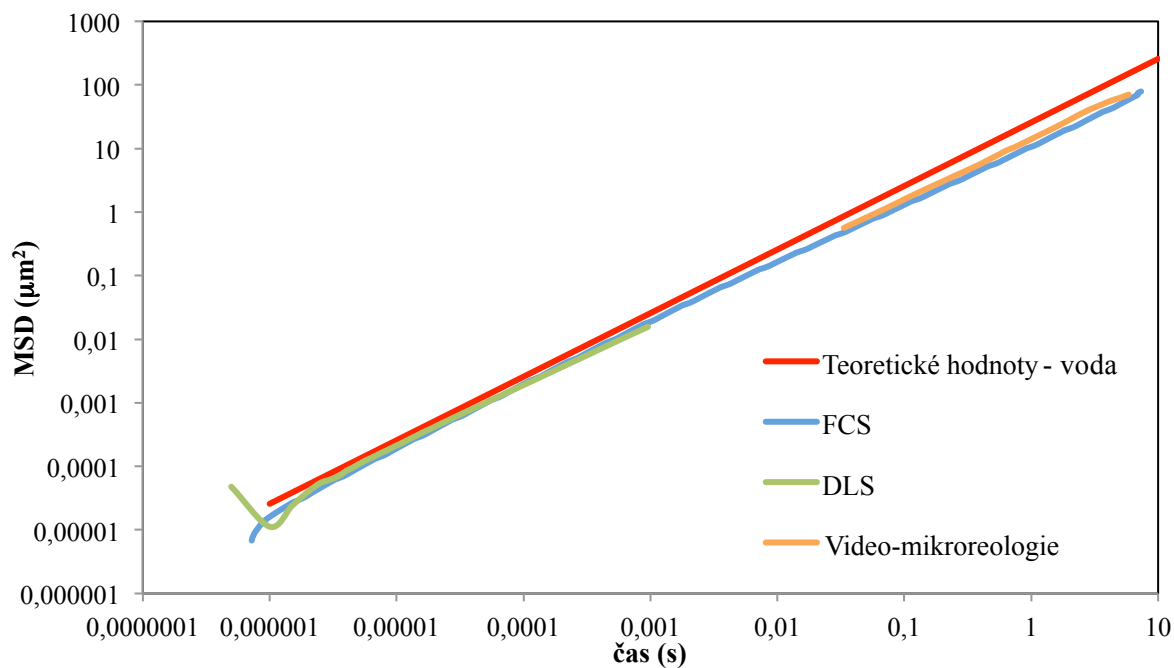
Obrázek 15: Závislost MSD na čase – HA: 0,1 g/l, 500–750 kDa

Příloha 3



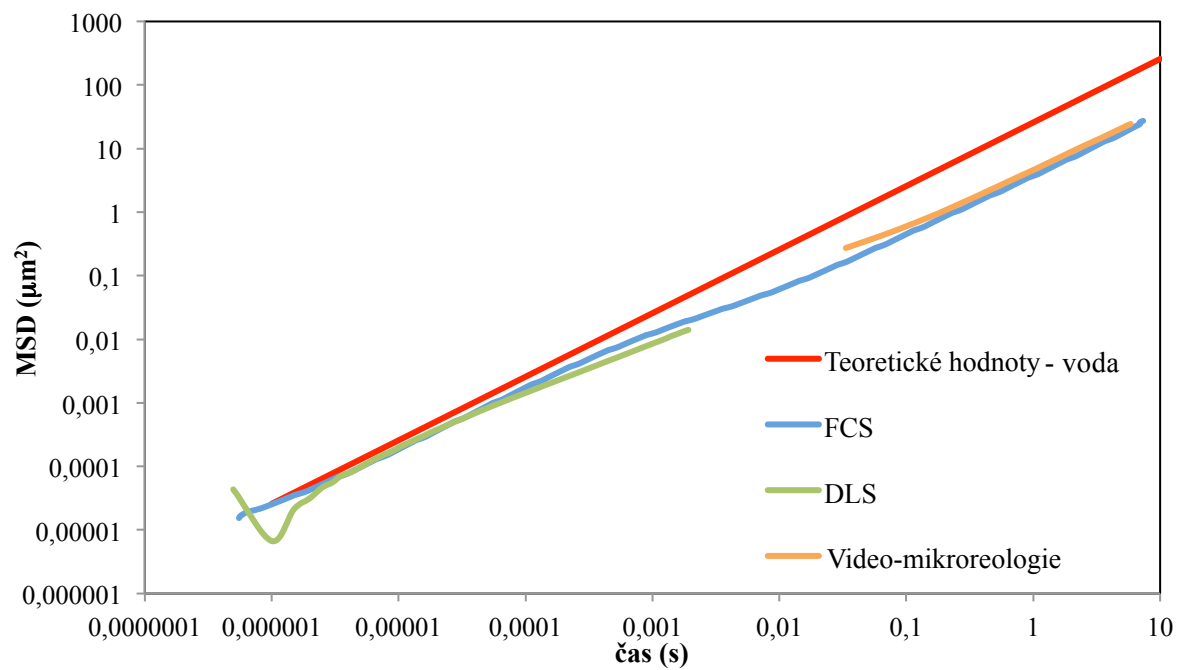
Obrázek 16: Závislost MSD na čase – HA: 1,0 g/l, 500–750 kDa

Příloha 4



Obrázek 17: Závislost MSD na čase – HA: 0,1 g/l, 90–130 kDa

Příloha 5



Obrázek 18: Závislost MSD na čase – HA: 0,1 g/l, 1500–1750 kDa