



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

MIKRORELOGIE V KOLOIDNÍCH SYSTÉMECH
MICRORHEOLOGY IN COLLOID SYSTEMS

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. Lucie Hradecká

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. Filip Mravec, Ph.D.

BRNO 2016



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0991/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Bc. Lucie Hradecká	
Studijní program:	Chemie pro medicínské aplikace (N2846)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808T031)	
Vedoucí práce	Ing. Filip Mravec, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Zuzana Hnylučová	

Název diplomové práce:

Mikroreologie v koloidních systémech

Zadání diplomové práce:

1. Rešerše na téma metody pasivní mikroreologie v koloidních systémech a vliv povrchového náboje částic pro mikroreologii.
2. Na základě rešerše zvolit dvě vhodné metody pro studium interakce mezi nabitými částicemi a polyelektroly.
3. Stanovit mikroreologické parametry v systémech s kladně a záporně nabitým biopolymerem pomocí shodně nabitých a opačně nabitých částic a porovnat výsledky s neutrálními částicemi.
4. Diskutovat vliv náboje na výsledky stanovené zvolenými metodami.

Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

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

Bc. Lucie Hradecká
Student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

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

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na zhodnocení vlivu povrchových vlastností částic na výsledky mikrореologických měření roztoků biopolymerů. Hyaluronan byl zvolen jako záporně nabitý polymer, chitosan jako kladně nabitý polymer a jako modelový homogenní systém byl použit glycerol a jeho roztoky o různých koncentracích. Z pasivních mikrореologických metod byly vybrány metody dynamického rozptylu světla (*dynamic light scattering*) a jednočásticové mikrореologie (*video particle tracking*). Jako sondy pro tyto metody byly použity částice s různě modifikovaným povrchem (neutrální, s kladným povrchovým nábojem a se záporným povrchovým nábojem). Výsledky mikrореologických metod pak byly porovnány s klasickou reologií a v případě glycerolu i s tabelovanými hodnotami.

ABSTRACT

This master thesis is focused on the evaluation of the influence of particle surface properties on the results of microrheological measurements with biopolymer solutions. Hyaluronan has been chosen as negatively charged polymer, chitosan as positively charged polymer and glycerol and its solutions of various concentrations were used as homogenous model systems. Dynamic light scattering and single particle tracking microrheology were chosen from passive microrheological techniques. Particles with various surface modifications (neutral, positive surface charge and negative surface charge) were used for the experiments. The results of microrheological techniques were then compared with classic rheology and moreover the glycerol results were compared with tabulated values.

KLÍČOVÁ SLOVA

pasivní mikrореologie, dynamický rozptyl světla, reologie, viskozita, kyselina hyaluronová, chitosan

KEY WORDS

passive microrheology, dynamic light scattering, rheology, viscosity, hyaluronic acid, chitosan

HRADECKÁ, L. *Mikroreologie v koloidních systémech*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 59 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu své diplomové práce panu Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. za odborný dohled a také své konzultantce Ing. Zuzaně Hnyluchové za velmi ochotnou spolupráci a odborné rady.

Obsah

1	Úvod	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Kyselina hyaluronová	8
2.1.1	Struktura	8
2.1.2	Výskyt, vlastnosti a funkce	9
2.2	Chitosan	10
2.2.1	Struktura	10
2.2.2	Výskyt, vlastnosti a funkce	11
2.3	Reologie	11
2.3.1	Smykové napětí	12
2.3.2	Viskoelastické vlastnosti	12
2.3.3	Elastický a viskozitní modul	13
2.3.4	Newtonovské a nenevtonovské kapaliny	14
2.4	Brownův pohyb	16
2.5	Mikroreologie	17
2.5.1	Jednočásticová mikroreologie	18
2.5.2	Dynamický rozptyl světla.....	19
2.5.3	Difuzní vlnová spektrometrie	21
2.5.4	Dvoučásticová mikroreologie	22
3	Současný stav řešené problematiky.....	24
4	Materiály a metody.....	28
4.1	Materiály	28
4.2	Vybavení.....	28
4.3	Příprava vzorků.....	29
5	Měření a vyhodnocení dat	30
5.1	Měření metodou dynamického rozptylu světla	30
5.2	Měření metodou jednočásticové mikroreologie	31
5.3	Měření metodou klasické reologie	33
6	Výsledky a diskuze.....	34
6.1	Glycerolová řada.....	34
6.2	Hyaluronová řada	39
6.3	Chitosanová řada	46

7	Závěr.....	51
8	Seznam použitých zdrojů	53
9	Seznam použitých zkratek.....	56
10	Seznam příloh.....	57
11	Přílohy	58

1 Úvod

Charakteristika materiálů z hlediska jejich viskoelastických vlastností je důležitá pro mnoho odvětví z oblasti chemie, fyziky nebo materiálového inženýrství. V současnosti je možné pro tyto účely použít kromě klasické reologie i některou z mikrореologických metod. Mikrореologie stejně jako reologie umožňuje studovat viskoelastické vlastnosti materiálů, ale navíc umí překonat některá omezení klasického reometru. Velkým přínosem je možnost zkoumat nehomogenní vzorky a zaměřovat se na lokální mikroprostředí zatímco reologie poskytuje informaci o vzorku jako celku. Další často zmiňovanou výhodou je velmi malé množství vzorku potřebného pro experimentální účely, protože se požadovaný objem pohybuje v řádech mikrolitrů. Toho se často využívá v oblasti biologie a medicíny, kde dostupné množství vzorků bývá omezené. Mikrореologie zahrnuje řadu metod, které lze rozdělit na aktivní a pasivní. Aktivní metody zahrnují aktivní manipulaci se sondami (částicemi) vloženými do vzorku, naproti tomu pasivní metody jsou založeny na sledování tepelného pohybu sond.

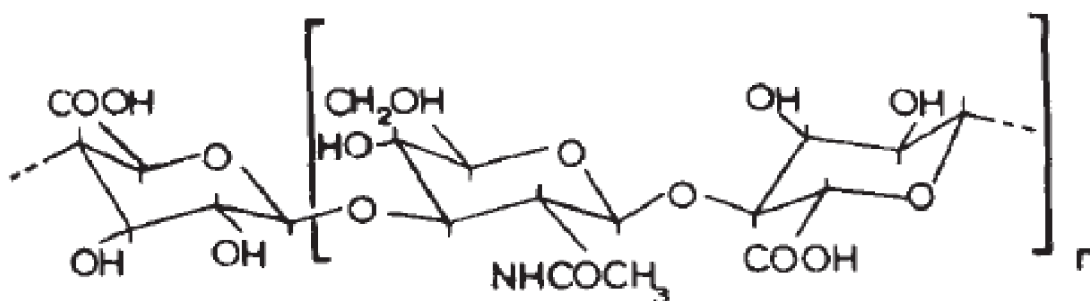
2 Teoretická část

2.1 Kyselina hyaluronová

Kyselina hyaluronová byla poprvé izolována z hovězího sklivce v roce 1934 panem Karlem Meyerem. V 50. letech pan Meyer a jeho kolegové zjistili, že se jedná o lineární polysacharid složený z opakující se disacharidové strukturní jednotky. Různé názvy této látky (kyselina hyaluronová, hyaluronan, hyaluronát) odráží její vlastnosti v různém prostředí. Když byla poprvé izolována, chovala se jako mírná kyselina, odtud název kyselina hyaluronová. Za fyziologických podmínek se obvykle vyskytuje jako sodná sůl tedy hyaluronan sodný. Později se začal používat název hyaluronát pro soli kyseliny hyaluronové a pojem hyluronan nyní zahrnuje všechny formy [1]. Hyaluronan se nachází v extracelulární matrix tkáně všech obratlovců, ale liší se koncentrací. V krevním séru se koncentrace kyseliny hyaluronové pohybuje v rozsahu 0,01 – 0,1 $\mu\text{g/g}$, v synoviální tekutině 1400 – 3600 $\mu\text{g/g}$ a v pojivové tkáni 8,5 – 18 $\mu\text{g/g}$. Hyaluronan je přírodní polymer a má široké uplatnění v medicíně, veterinární medicíně ale i v průmyslu například v kosmetických přípravcích proti vráskám [2].

2.1.1 Struktura

Hyaluronan patří do skupiny polysacharidů pojivové tkáně, jinak také nazývané mukopolysacharidy nebo glykosaminoglykany, kam patří mimo jiné i chondroitin sulfát, dermatan sulfát nebo heparin [3]. Oproti ostatním sloučeninám z této skupiny má unikátní vlastnost, že není kovalentně vázán na polypeptid. Nemá rozvětvený řetězec a neobsahuje sulfátové skupiny. Má relativně jednoduchou strukturu, v polymerním řetězci se opakují disacharidové jednotky složené z D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu, které jsou střídavě propojeny β -1,4 a β -1,3 glykosidickými vazbami (viz *Obrázek 1*). Struktura disacharidové jednotky je energeticky velmi stabilní, protože objemné skupiny zaujímají polohu ve stericky výhodné ekvatoriální rovině, zatímco všechny malé vodíkové atomy jsou ve stericky méně výhodné axiální rovině [4]. Hyaluronan je negativně nabitý biopolymer kvůli přítomnosti karboxylové skupiny na glukuronové jednotce. Molekulární hmotnost hyaluronanu v extracelulární matrix je většinou několik milionů daltonů [5].



Obrázek 1: Základní strukturní jednotka molekuly kyseliny hyaluronové [7]

2.1.2 Výskyt, vlastnosti a funkce

Hyaluronan je látka nacházející se v extracelulárním prostředí všech obratlovců, v nejvyšších koncentracích se pak vyskytuje v pojivové tkáni, jako jsou chrupavky, kosti, kůže atd. Dále se vyskytuje např. v synoviální tekutině, v krevním séru, v pupeční šňůře a v očním sklivci. V lidském těle se téměř polovina celkového množství kyseliny hyaluronové vyskytuje v kůži, kde má několik důležitých funkcí. Může imobilizovat vodu v tkáni, a tak změnit stlačitelnost a objem [2]. Hyaluronan se však nachází i v intracelulárním prostředí, kde má pravděpodobně důležitou úlohu při zánětu [1].

Hyaluronan se dříve získával extrakcí z kohoutích hřebínků, kdy ale po následné purifikaci stále zůstávalo 0,5 % nečistot a výtěžky nebyly nijak vysoké. Změna nastala, když se začaly využívat bakterie *Streptococcus equi* a *Streptococcus zooepidemicus* k produkci hyaluronanu. Hyaluronan tak bylo možné začít získávat v mnohem větším množství než by tomu bylo jakoukoliv extrakční metodou [3].

Hyaluronan má důležitou strukturní roli, protože v extracelulární matrix tvoří vysokomolekulární komplex s agrekanem, což je proteoglykan tvořící hlavní nekolagenní složku mezibuněčné hmoty chrupavky [6]. Hyaluronan však plní i další funkce kromě těch strukturních a fyziologických v tkáních, také ovlivňuje chování buněk při morfogenezi, remodelaci tkání a svou úlohu má i při zánětech nebo onemocněních. Má unikátní biofyzikální vlastnosti a přímo se podílí na udržování tkáňové homeostázy. Hyaluronan interaguje s proteoglykany a spojovacími proteiny, a tak organizuje a zachovává strukturu extracelulární a pericelulární matrix. Chová se také jako signální molekula, protože komunikuje s mnoha povrchovými receptory [1].

Hyaluronan je klinicky využíván pro své jedinečné reologické vlastnosti. Je to hydrofilní látka a viskózní roztoky vysokomolekulární kyseliny hyaluronové a jejích solí jsou používány v intraartikulárních injekcích při léčbě artropatií, při hojení ran různých tkání a v oční i ušní chirurgii [5].

Snahou mnoha vědců je příprava takových derivátů kyseliny hyaluronové, které by měly unikátní vlastnosti pro konkrétní biomedicínské aplikace. Biologové se snaží odhalit komplexní biologickou funkci hyaluronanu a jeho receptory v různých signálních procesech. Lidé zaměřeni na biomedicínské inženýrství připravují hydrogely na bázi hyaluronanu pro účely hojení ran. Mnoho současných studií se také zaměřuje na možnosti využití hyaluronanu jako nosiče v oblasti cílené distribuce léčiv [1].

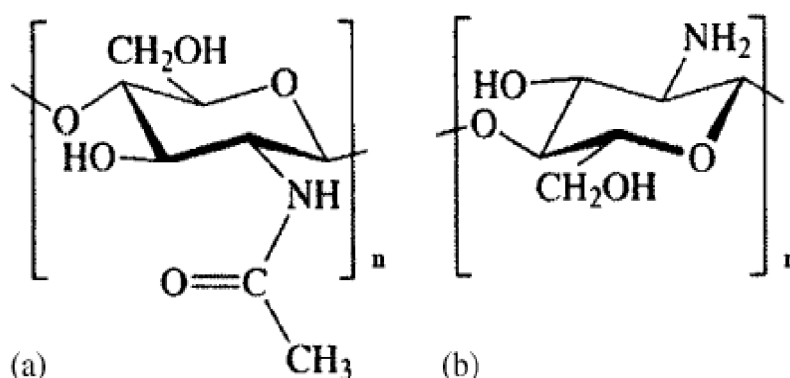
2.2 Chitosan

Chitosan je odvozený od chitinu, což je druhý nejrozšířenější polysacharid po celulóze, a připravuje se jeho deacetylací. Jakmile stupeň deacetylace chitinu dosáhne 50 %, je získán chitosan. Chitin je v přírodě organizován do krystalických mikrofibril, které tvoří strukturální elementy exoskeletu členovců nebo buněčných stěn hub a kvasinek. Chitin je tedy součástí schránek korýšů, hmyzu, kroužkovic, měkkýšů a dalších organismů [8].

Chitosan má široké využití při přípravě různých materiálů hlavně v biomedicíně, protože není toxický, je biokompatibilní a biodegradabilní. Využívá se však i v jiných oborech např. v kosmetice (péče o vlasy), agrochemii, fyzikální chemii, při konzervaci potravin, čištění vody nebo jako potravní doplněk [9].

2.2.1 Struktura

Chitin je poly(β -1,4-N-acetyl-D-glukosamin) a chitosan (viz *Obrázek 2*) je připraven jeho alkalickou deacetylací, varem s 50% hydroxidem sodným (po několik hodin) nebo enzymaticky N-deacetylase [9]. Je možné získat chitosan o různé molekulové hmotnosti a s různým stupněm acetylace. Chitin ani chitosan se tedy nevyskytují jako homopolymery, ale vždy obsahují podíl N-acetylglukosaminových a acetylglukosaminových jednotek. V pevném skupenství tvoří chitosan částečně krystalický polymer a lze ho získat úplnou deacetylací chitinu o nízké molekulové hmotnosti. Chitosan je rozpustný ve vodném kyselém mediu a to díky protonaci aminoskupiny na druhém uhlíkovém atomu, v kyselém prostředí tvoří tedy polyelektrolyt. Chitosan je mezi přírodními polymery jedinečný právě díky kladně nabitým iontovým skupinám, a proto má velký potenciál v mnoha aplikacích [8].



Obrázek 2: Chemická struktura chitinu (a) a chitosanu (b) [8]

2.2.2 Výskyt, vlastnosti a funkce

Jak už bylo zmíněno výše, chitosan se získává z přírodního chitinu, lze ho tedy označit jako pseudopřírodní polysacharid. Chitosan je rozpustný ve vodném roztoku a toho se využívá v různých aplikacích při přípravě roztoků, gelů nebo filmů a vláken. Rozpustnost však závisí na mnoha faktorech jako stupeň deacetylace, molekulová hmotnost, koncentrace iontů, pH, povaha kyseliny použité k protonaci a distribuce acetylových skupin na řetězci polymeru [8].

Chitosan je možné využít ve farmaceutickém průmyslu a biomedicíně pro cílené doručování a uvolňování léčiv. Byla pozorována i antimikrobiální aktivita proti gram pozitivním i gram negativním bakteriím a houbám při hodnotě pH nižší než 6. Přesný mechanismus sice zatím není zcela objasněn, ale zřejmě dochází k interakcím kladně nabitých aminoskupin glukosaminových jednotek a záporně nabitých složek mikrobiálních buněčných membrán, čímž se změní propustnost, intracelulární obsah se uvolní a buňky se rozpadnou. Biologická aktivita závisí na mnoha faktorech a snahou výzkumníků je vytvářet modifikovaný chitosan s lepšími a cílenými účinky [9].

Chitosan s nižší molekulovou hmotností vykazuje i protinádorovou aktivitu, která kromě molekulové hmotnosti závisí na rozpustnosti a obsahu acetylových skupin. Ke štěpení polymerů se používají přirozeně se vyskytující enzymy chitosanasy a chitinasy. Na velikosti molekuly a stupni acetylce závisí další vlastnost chitosanu a to antioxidační aktivita, i když přesný mechanismus zatím není plně znám [9].

Chitosan má výjimečné vlastnosti, díky kterým nachází uplatnění v široké škále oborů, některé už byly vyjmenovány výše. V zemědělství se používá v přípravcích pro ochranu rostlin, pro stimulaci jejich růstu, pro ochranu semen např. proti mrazu, a také se přidává do přípravků s postupným uvolňováním hnojiv a živin do půdy. Chitosan má využití v čištění odpadních vod jako flokulační činidlo, odstraňovač kovových iontů a zápachu. V potravinářském průmyslu se používá jako doplněk pro snížení hladiny cholesterolu, protože ho na sebe váže ještě společně s tuky, a odvádí je z trávicí soustavy ještě dřív, než mohou být zpracovány. Mimo to se používá jako konzervační a stabilizační činidlo a jako ochranný antibakteriální obal na ovoce. V kosmetice se chitosan používá v přípravcích určených pro pleť a vlasy, protože udržuje pokožku hydratovanou, pomáhá proti akné a zlepšuje pružnost vlasů. Tvoří také součást zubních past a žvýkaček [8].

2.3 Reologie

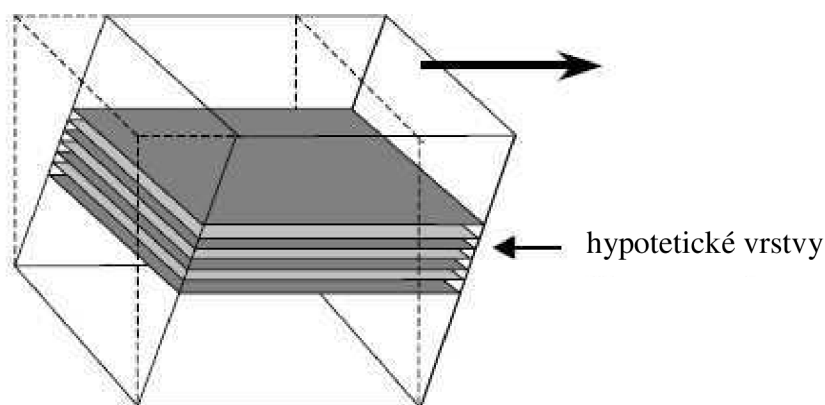
Termín reologie byl poprvé použit v roce 1929 profesorem E. C. Binghamem, ale lidé se zabývali tokovými vlastnostmi a deformací látek už od 17. století. Reologické parametry jsou v podstatě mechanickými parametry, zahrnují fyzikální vlastnosti tekutin a pevných látek, které popisují tokové chování a napětí v nich. Reologie je tedy definována jako věda, která studuje tok a deformaci materiálů v závislosti na vloženém napětí. Experimentální techniky sloužící ke studiu reologických vlastností se označují termínem reometrie [10].

Zpočátku byly zkoumány vlastnosti materiálů jako asfalt, mazadla, barvy, plast a guma. Pak se však reologie rozšířila do dalších oborů, např. bioreologie, reologie polymerů nebo suspenzí. Reologické parametry jsou důležité i pro chemický nebo biotechnologický průmysl [11]. Znalost viskozity, meze toku nebo modulů pružnosti je důležitá u surovin nebo produktů a také pro účely navrhování, zdokonalování a kontrolu různých průmyslových zařízení [12].

Když je na materiál aplikována vnější síla, částice jsou vůči sobě navzájem posunuty, dochází tedy k deformaci. Charakteristické vlastnosti látek jsou dány typem a rozsahem deformace. *Ideálně elastická látka* podléhá elastické deformaci působením vnějších sil. Energie potřebná k deformaci je uložena v materiálu. Jakmile vnější síly přestanou působit, vrátí se látka do původního stavu. *Ideálně viskózní látky* jsou deformovány nevratně, pokud na ně působí vnější síla. Energie je transformována a odvedena viskózním tokem. Velice málo látek se chová ideálně, většina není ani ideálně viskózní ani ideálně plastická. Častěji se projevuje chování, které je kombinací obou a materiály vykazují *viskoelastické chování* [10].

2.3.1 Smykové napětí

Smykové napětí označované symbolem τ je přímo úměrné síle a nepřímo úměrné ploše, na kterou síla působí. Smyková rychlost označovaná $\dot{\gamma}$ závisí na rychlosti pohybu přilehlých vrstev a na jejich vzdálenosti. Schéma hypotetických vrstev při smykovém toku viz *Obrázek 3*. Pro správné reologické výsledky je důležitý laminární tok, protože turbulentní tok zvyšuje odpor kapaliny a výsledky jsou zkreslené [10].



Obrázek 3: Teoretické vrstvy při smykovém toku [13]

2.3.2 Viskoelastické vlastnosti

V případě proudění tekutiny, kdy sousední vrstvy mají různou rychlost, dochází na jejich rozhraní ke tření a ke vzniku smykového napětí [14]. Vnitřní tření v materiálech charakterizuje veličina nazývaná viskozita. Závisí na vzdálenosti sousedních vrstev (dx) a dává do poměru smykové napětí a změnu rychlosti při proudění (du). V ideálních tekutinách nedochází k vnitřnímu tření, jejich viskozita je tedy nulová [15].

Pro ideálně viskózní materiál platí Newtonův zákon, podle kterého je tečné napětí dáno vztahem:

$$\tau = \eta \frac{du}{dx} = \eta \cdot D \quad (1)$$

kde η je dynamická viskozita, du je vzájemná rychlost pohybu sousedních vrstev, které jsou vzdálené o dx . Veličina D charakterizuje tvarové změny v tekutině a nazývá se gradient rychlosti [12].

Dynamická viskozita charakterizuje vnitřní tření a závisí na teplotě a tlaku, u plynů s teplotou roste a u kapalin klesá. U newtonovských kapalin se její hodnota nemění v závislosti na tečném napětí. U nenewtonovských kapalin hodnota dynamické viskozity závisí na tečném napětí a gradientu rychlosti [16].

Kinematická viskozita je dána podílem dynamické viskozity a hustoty tekutiny. Používá se např. při popisu procesů hydrodynamiky, kdy probíhající děje závisí na viskozitě i na hustotě tekutiny [12].

Tok a deformace materiálu může být ovlivněna několika vnějšími faktory. Velký vliv na viskozitu materiálu mají jeho fyzikální vlastnosti, chemické vlastnosti a teplota, a u většiny materiálů ji ovlivňuje smyková rychlost. Projevují se také případné předchozí deformace a tlak, protože při vysokém tlaku působícím na materiál jsou částice blíže u sebe, může docházet k více interakcím a viskozita vzroste [10].

Elasticita materiálu určuje míru jeho náchylnosti k návratu do původního stavu po deformaci vnějším tlakem. Elastický materiál se okamžitě deformuje a po dobu působení vnějšího napětí tato deformace trvá, jakmile však přestane působit, vrátí se do svého počátečního tvaru. Elastická deformace je tedy deformace vratná. Naproti tomu v čistě viskózní kapalině dochází k odvádění energie tokem a materiál se tak nikdy nevrátí do svého původního stavu. U viskoelastického materiálu lze pozorovat elastickou i viskózní odezvu a existuje časová závislost na aplikovaném tlaku. Tato závislost nemusí být lineární jako u viskózních látek ani konstantní jako u elastických materiálů [18].

2.3.3 Elastický a viskozitní modul

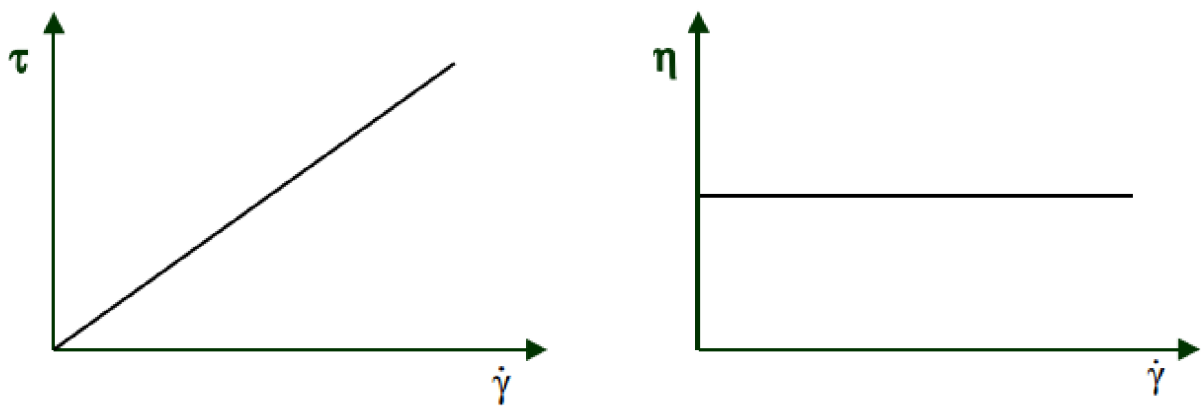
Většina běžně používaných materiálů vykazuje komplexní reologické chování, kdy se viskozita i viskoelasticita může měnit v závislosti na vnějších podmínkách, jako je aplikované napětí, deformace, časový interval působení nebo teplota [17]. Komplexní smykový modul je pak definován:

$$G^*(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega) \quad (2)$$

kde G' je elastický modul, který popisuje energii uloženou v systému, když je aplikováno napětí. Tvoří reálnou složku komplexního modulu. Imaginární částí komplexního modulu je viskozitní modul G'' , který popisuje energii odvedenou tekutinou při aplikovaném napětí [15].

2.3.4 Newtonovské a nenewtonovské kapaliny

Newtonovské kapaliny se řídí Newtonovým zákonem, kdy gradient rychlosti viskózního toku je úměrný aplikovanému tečnému napětí. Newtonovské materiály jsou ideálně viskózní a pro jejich viskozitu platí, že nezávisí na smykové rychlosti (viz *Obrázek 4*). Viskozita newtonovských materiálů je konstantní, závisí pouze na teplotě. Příkladem takových materiálů je voda, mléko, roztok cukru nebo minerální olej [10].



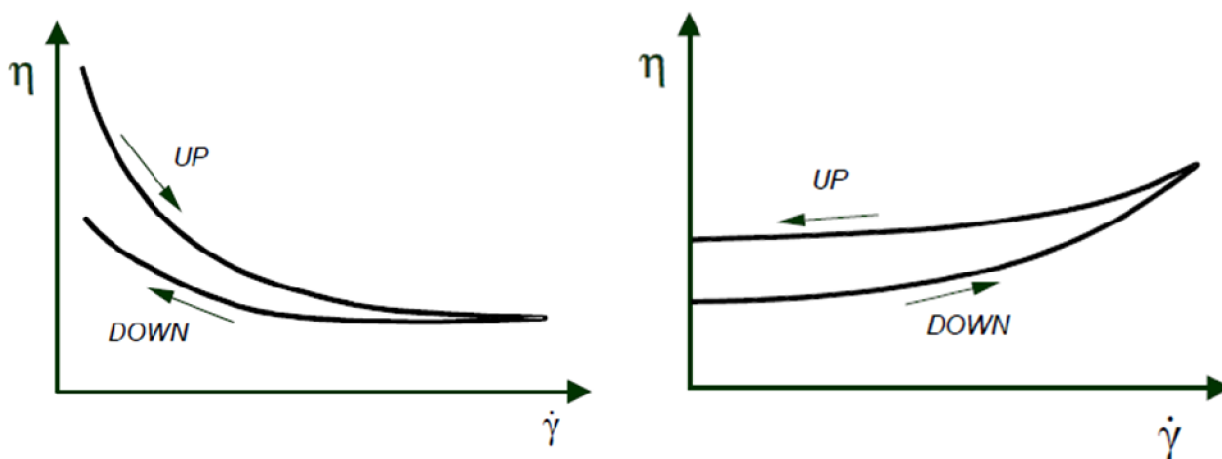
Obrázek 4: Toková (vlevo) a viskozitní (vpravo) křivka pro Newtonovský materiál [10]

Nenewtonovské kapaliny jsou reologicky složitější a neplatí pro ně Newtonův zákon. Řídí se však analogicky s Newtonovým zákonem podle rovnice:

$$\tau = \eta \cdot D \quad (3)$$

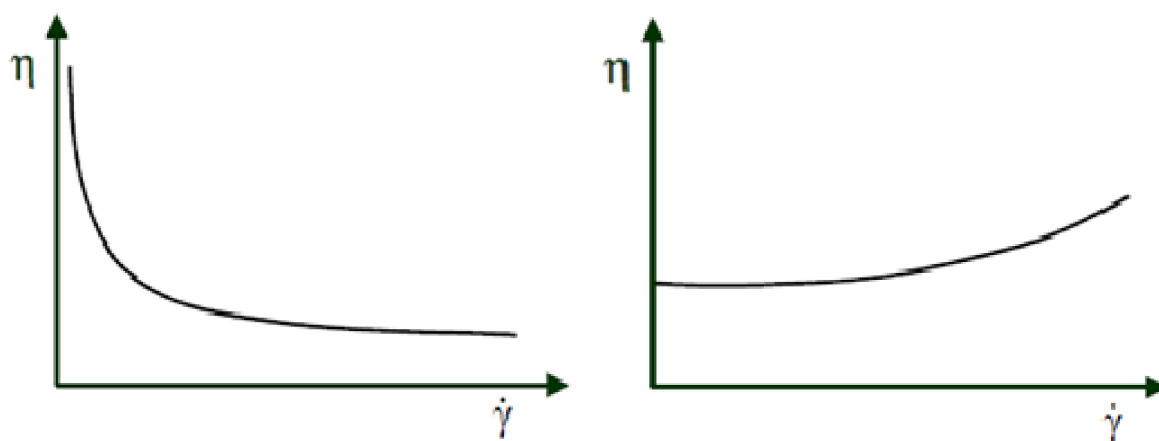
kde η je zdánlivá viskozita. Není to látková konstanta, ale je závislá na rychlosti deformace nebo na tečném napětí [19].

Nenewtonovské látky, jejichž viskozita závisí na čase, se rozdělují na tixotropní a reopektické. Viskozita tixotropních látek s časem klesá. U reopektických materiálů viskozita s časem roste (viz *Obrázek 5*). Viskozita tixotropních i reopektických látek se vrátí na svou původní hodnotu po uplynutí určité doby po ukončení mechanického působení a ponechání látek v klidu [10], [19].



Obrázek 5: Průběh závislosti viskozity na rychlosti deformace tixotropních (vlevo) a reopektických (vpravo) látek [10]

Newtonovské látky, jejichž viskozita nezávisí na čase ale na teplotě, se dělí na pseudoplastické, dilatantní a plastické [16]. U pseudoplastických materiálů viskozita klesá s rostoucím gradientem rychlosti (viz Obrázek 6). Tento jev je technologicky velmi důležitý, protože oproti ideálně viskózním kapalinám, mohou být tyto materiály dopravovány potrubím s nižší energií při stejné rychlosti. Pseudoplastickou látkou jsou např. suspenze, disperzní soustavy, barvy, laky nebo krémy. Naproti tomu viskozita dilatantních materiálů roste s vyšší rychlostí a to může způsobovat problémy v technologických procesech [10].



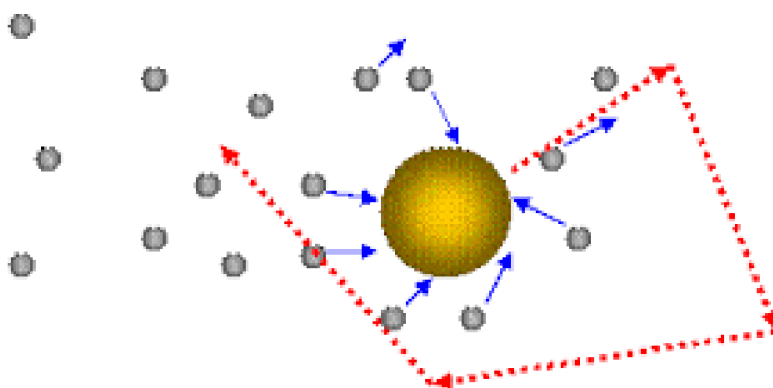
Obrázek 6: Průběh závislosti viskozity na rychlosti deformace pseudoplastických (vlevo) a dilatantních (vpravo) materiálů [10]

Plastické materiály jsou definovány jako viskózní s mezí toku. Když je vnější působící síla menší než vnitřní mezimolekulární síly, chová se materiál jako pevná látka a deformace je vratná. Jakmile vnější síly převažují, objeví se tok materiálu a z pevné látky se stane tekutá [10].

2.4 Brownův pohyb

Brownův pohyb je fyzikální jev, kdy mikroskopické částice v koloidních systémech podléhají ustavičnému neuspořádanému pohybu. Tento jev byl poprvé pozorován skotským botanikem Robertem Brownem v roce 1827 [19]. Termín Brownův pohyb tedy popisuje náhodný pohyb mikroskopických částic rozptýlených v kapalině nebo plynu [20].

Částice v koloidním prostředí vykonává chaotický tepelný pohyb. Mění se rychlost i směr jejího pohybu kvůli vzájemným srážkám částic i srážkám s molekulami disperzního prostředí (viz *Obrázek 7*). V případě srážek s velkým počtem molekul prostředí se částice pohybuje po složité dráze, protože počet srážek není stejný ze všech stran. Částice vykonávají translační i rotační pohyb. Větší částice, s efektivním průměrem přibližně 4 μm , pouze vibrují, protože čím jsou částice větší a mají vyšší hmotnost, tím pravděpodobněji dojde ke kompenzaci nárazů. U částic větších než 4 μm už tepelný pohyb není pozorován [19].



Obrázek 7: Znárodnění Brownova pohybu [21]

Protože dochází k častým změnám rychlosti i směru, není možné stanovit skutečnou délku dráhy koloidní částice. V případě pozorování pohybu částice pod mikroskopem a zaznamenání její polohy v pravidelných časových intervalech, je získána dvourozměrná dráha pohybu. Změny pohybu částic pak stačí sledovat pouze podél jedné zvolené osy, protože všechny směry jsou rovnocenné. Průmět skutečného přemístění do zvolené osy za daný časový interval je označován jako posuv částice. Střední posuv částice je kvadratický průměr posuvů dané částice a udává statistickou charakteristiku intenzity tepelného pohybu [19].

Fyzikální jev, při kterém se Brownův pohyb projevuje na makroskopické úrovni, se nazývá difuze. Tepelný pohyb vede k ustavení sedimentační rovnováhy, když současně působí gravitační nebo odstředivé pole. Zapřičiňuje také membránové jevy, např. osmóza nebo Donnanovy rovnováhy [19].

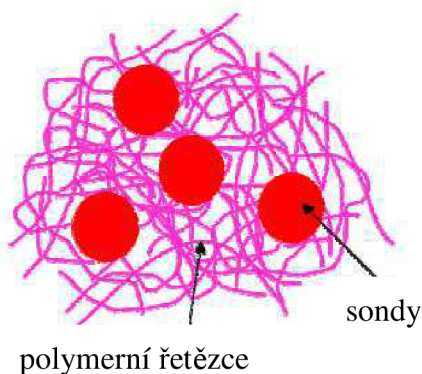
2.5 Mikroreologie

Reologie je interdisciplinární věda, která zahrnuje chemické inženýrství, fyziku, vědy o materiálech a chemii. Pro průmysl je velmi důležitá, protože znalosti toku komplexních tekutin se využívají v mnoha technologiích od barviv po potraviny nebo od těžby ropy až po zpracování plastů [22].

V klasické reologii se viskoelastické vlastnosti materiálů měří pomocí reometrů, u nichž je možné podle rozsahu měřených vlastností zvolit vhodnou geometrii (např. válec-válec, kužel-deska). Výsledné viskoelastické vlastnosti, charakterizované třeba viskozitním a elastickým modulem, udávají informaci o vzorku jako celku. Tyto vlastnosti lze také studovat pomocí mikroreologických metod. Termín mikroreologie totiž zahrnuje několik technik, které mají své výhody oproti klasické reologii. K experimentům je potřeba velmi malé množství vzorku, zkoumaným objektem může být i tenký film, vnitřek buňky, membrána, atd. Mikroreologické techniky mohou zkoumat i lokální mikroprostředí vzorků, což se uplatní nejen u heterogenních vzorků ale i u navenek homogenních látek s heterogenním mikroprostředím [22].

Tyto techniky však mají i své nevýhody, zkoumané materiály musí alespoň částečně propouštět světlo, jejich aplikace na pevné nebo hodně viskózní materiály je výzvou a matematické výpočty jsou složité. Předpona „mikro-“, v názvu souvisí s velikostí používaných sond, což jsou nejčastěji koloidní částice o průměru v řádech mikrometrů. Zároveň také naznačuje, že potřebné množství pro experimenty bude velmi malé, řádově v mikrolitrech [22].

Principem mikroreologických metod je sledování sond (částic), které jsou vloženy do vzorku a lokálně deformují jeho mikroprostředí (viz *Obrázek 8*). Metody, u nichž je pohyb sond řízen mechanicky, se nazývají aktivní. Částicemi se manipuluje vnějším magnetickým nebo elektrickým polem [23], [15].



Obrázek 8: Znárodnění uspořádání vložených částic do roztoku polymeru [23]

Druhou skupinou jsou pasivní mikreologické techniky, které k určení reologických vlastností využívají tepelnou energii částic, definovanou $k_B T$, a jsou založeny na sledování Brownova pohybu. Do této skupiny se řadí mnoho mikreologických technik, mezi ty nejběžnější patří jednočásticová mikreologie (VPT – *video particle tracking*), dvoučásticová mikreologie (TPM – *two point microrheology*), difuzní vlnová spektrometrie (DWS – *diffusive wave spectrometry*), dynamický rozptyl světla (DLS – *dynamic light scattering*) nebo mikroskopie atomárních sil (ATM – *atomic force microscopy*) [24].

2.5.1 Jednočásticová mikreologie

Princip metody jednočásticové mikreologie (*single particle tracking* nebo také *video particle tracking*) spočívá ve sledování částic, které byly vloženy do vzorku. Jedná se tedy o video-analýzu trajektorií vložených sond (částic). Náhodný pohyb částic je dán pouze Brownovým pohybem. Zaznamenáním a vyhodnocením trajektorií částic lze získat informace o viskoelastických vlastnostech zkoumaného materiálu [26].

Dynamika pohybu částic se popisuje časově závislou korelační funkcí značenou MSD (mean square displacement). MSD částic odráží odezvu materiálu vůči vnějšímu napětí, které je způsobeno tepelným pohybem částic. Existují dva limitní případy závislosti MSD na odpovědi materiálu. V čistě viskózním materiálu MSD tepelného pohybu částic roste lineárně s časem (viz *Obrázek 9*). Naproti tomu částice vložené do elastického media nebudou vykazovat rostoucí závislost MSD na čase, pozice částice se bude pohybovat okolo rovnovážné polohy. Většina materiálů obzvlášť v oblasti biofyziky má viskoelastické vlastnosti a závislost MSD na čase v takových materiálech bude mezi limitními případy [26].



Obrázek 9: Závislost MSD na čase pro viskózní a viskoelastický materiál [27]

MSD tepelného pohybu částic vložených do viskózního media je definováno:

$$\langle r^2(\tau) \rangle = 2dD\tau \quad (4)$$

kde τ udává časový interval, d značí dimenzi a D je difuzní koeficient. Závislost difuzního koeficientu na viskozitě prostředí je dána Stokes-Einsteinovou rovnicí:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \quad (5)$$

kde k_B značí Boltzmannovu konstantu, jejíž hodnota je $1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$, T je termodynamická teplota, a udává poloměr sledované částice. Součin $k_B T$ udává tepelnou energii pohybu částic [26].

Pro částice vložené do viskoelastického media neplatí tak jednoduchý vztah pro závislost mezi MSD a difuzním koeficientem. Nicméně je možné použít zobecněnou Stokes-Einsteinovu rovnici, která zohledňuje závislost viskoelastických vlastností komplexního materiálu na frekvenci:

$$\tilde{G}(s) = \frac{k_B T}{\pi a s \langle \tilde{r}^2(s) \rangle} \quad (6)$$

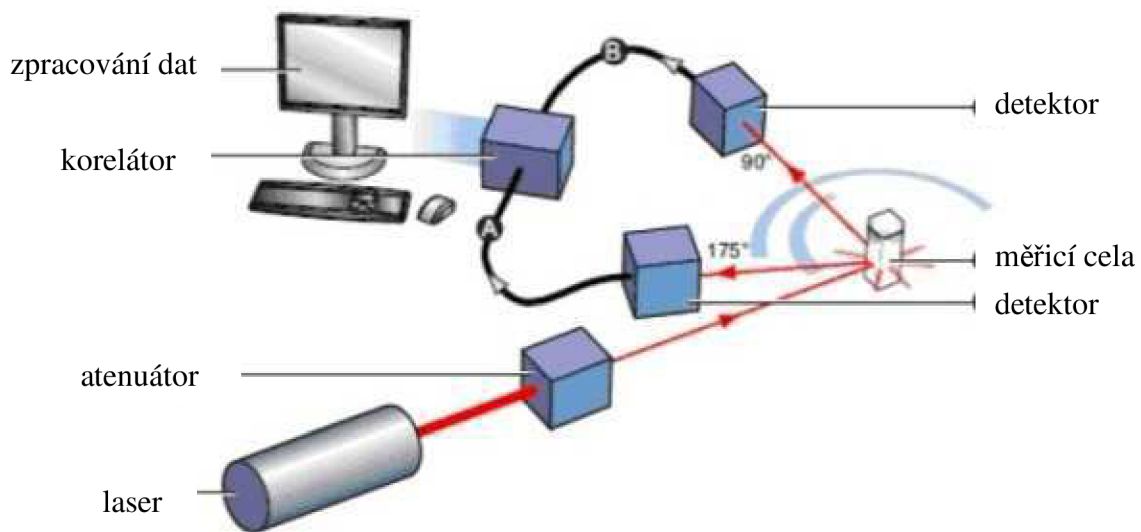
kde s je Laplaceova frekvence, $\langle \tilde{r}^2(s) \rangle$ je Laplaceova transformace MSD a $\tilde{G}(s)$ je Laplaceova transformace viskoelastického modulu. Pomocí této rovnice je možné charakterizovat reologické vlastnosti viskoelastického media a z hodnoty MSD lze vypočítat elastický a viskozitní modul [15].

2.5.2 Dynamický rozptyl světla

Dynamický rozptyl světla bývá také označován jako kvazielastický rozptyl světla nebo fotonová korelační spektroskopie [25]. Metodu dynamického rozptylu světla lze považovat za předchůdce současné mikroreologie. Mnohé teoretické i praktické aspekty mikroreologie vychází právě z této metody. Hlavním rozdílem je, že metody využívající rozptyl světla poskytují informace o vzorku jako celku. Principem metody je sledování změn intenzity rozptýleného světla. Tak lze získat informace nejen o viskozitě prostředí, ale také o elastickém modulu viskoelastického materiálu [22].

Pro mikroreologické účely jsou použity koherentní monochromatický zdroj záření a detekční optika, která snímá intenzitu světla rozptýleného od částic o známé velikosti, které jsou vloženy do media o neznámých viskoelastických vlastnostech. Tradičně se technika rozptylu světla používá pro určení velikosti částic vložených do vzorku o známé viskozitě. Vzorek pro účely měření DLS obsahuje malé množství vložených sond, aby se zajistilo, že

každý foton procházející mediem bude rozptýlen jen jednou. Jedná se o pasivní mikreologickou techniku, kdy částice podléhají pouze náhodnému Brownovu pohybu [26].



Obrázek 10: Schéma uspořádání při měření dynamického rozptylu světla [28]

Dynamický rozptyl světla představuje neinvazivní techniku, kdy se měří změny intenzity rozptýleného světla, jehož zdrojem je obvykle laser (viz Obrázek 10). Protože částice vykonávají Brownův pohyb, dochází k interferenčnímu zesilování a zeslabování světla. Čím rychlejší je pohyb částic, tím rychleji se mění intenzita rozptýleného světla. Požadovanou hodnotu MSD lze získat z korelační funkce, která popisuje okamžitou fluktuaci intenzity světla v čase τ a je definována:

$$g_2(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (7)$$

kde I je intenzita, t je čas a ostré závorky naznačují, že se jedná o průměrnou hodnotu v čase. Takto vypočítaná korelační funkce může být převedena na korelační funkci pole za použití Siegertova vztahu:

$$g_2(\tau) = 1 + \beta |g_1(\tau)|^2 \quad (8)$$

Faktor koherence β souvisí s experimentálním nastavením detektoru. U experimentů využívajících dynamický rozptyl světla je důležitou veličinou vlnový vektor definovaný:

$$q = \frac{4n\pi}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (9)$$

kde λ představuje vlnovou délku budícího záření, n index lomu media a θ je úhel, který svírá budící paprsek a detektor. Z korelační funkce pole pak lze získat MSD:

$$g_1(t, q) = \exp\left(\frac{-q^2 \langle \Delta r^2(\tau) \rangle}{6}\right) \quad (10)$$

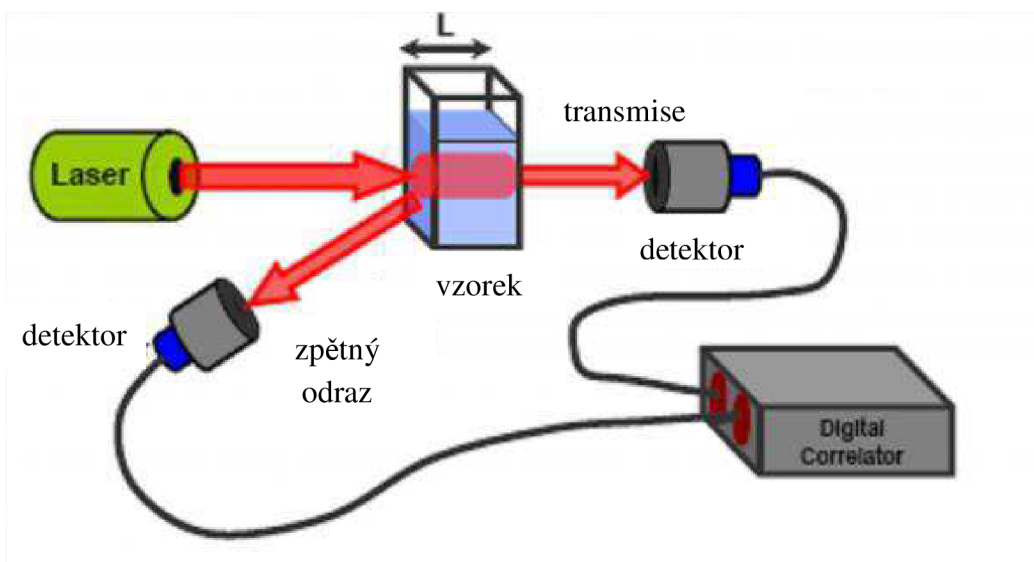
Pro experimentální měření metodou dynamického rozptylu světla je třeba použít transparentní vzorky, aby se zajistilo, že k rozptylu světla dojde pouze jednou. U mírně zakalených vzorků je možné řešení v podobě dalšího polarizátoru umístěného před detektor. Je nastaven tak, aby propouštěl světlo s podobnou polaritou, jakou má zdroj záření, čímž blokuje vícenásobně rozptýlené světlo před vstupem do detektoru. Nicméně pro velmi zakalené nebo neprůsvitné vzorky je tato technika nepoužitelná a je nutné zvolit jiný přístup např. difuzní vlnovou spektrometrii [22], [23], [25].

2.5.3 Difuzní vlnová spektrometrie

Vícenásobný rozptyl je u výše popsané metody dynamického rozptylu světla nežádoucí a limituje využití při studiu vícefázových vzorků. Později bylo zjištěno, že i vícenásobný rozptyl a časově korelační funkce intenzity rozptýleného světla přináší užitečné informace, a tak se vyvinula technika známá jako difuzní vlnová spektrometrie. Oproti předchozí metodě umožňuje zkoumat i zakalené vzorky, jako jsou koncentrované roztoky polymerů nebo gely [22].

V difuzní vlnové spektrometrii je do vzorku vloženo větší množství částic než u dynamického rozptylu světla. V přítomnosti vysokého počtu sond dochází k mnohonásobnému rozptylu fotonu a lze předpokládat, že se světlo v mediu šíří difuzí. Světlo se tedy pohybuje po zcela náhodných drahách charakterizovaných střední volnou dráhou l (mean-free path) [26].

Přístrojové vybavení u difuzní vlnové spektrometrie (viz *Obrázek 11*) je podobné jako u dynamického rozptylu světla s tím rozdílem, že není potřeba goniometr, protože intenzita rozptýleného světla není úhlově závislá, a dopadající paprsek prochází kyvetou se vzorkem po celé šířce [26].



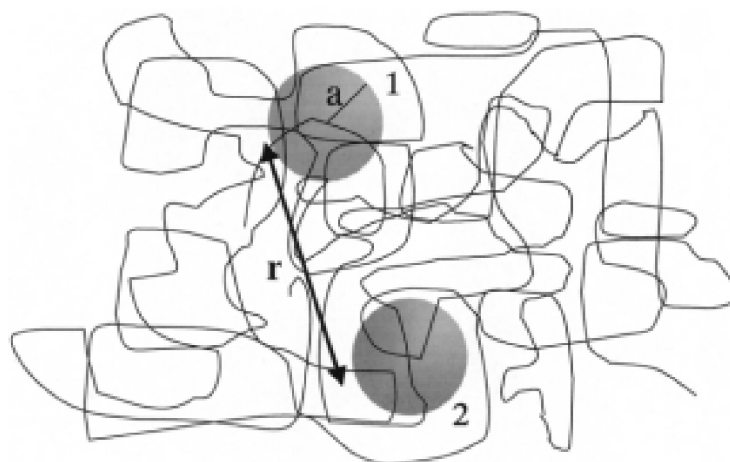
Obrázek 11: Schéma uspořádání difuzní vlnové spektrometrie [29]

Dalšími výhodami difuzní vlnové spektrometrie jsou posuny k vyšším frekvencím v průběhu experimentů a dosažení vysokého rozlišení. Nicméně tato metoda je limitována potřebným objemem vzorku, který se pohybuje v řádech mililitrů, a stejně jako u dynamického rozptylu světla nelze zkoumat lokální heterogenity mikroprostředí zkoumaného vzorku [22].

Techniky využívající rozptyl světla jsou velmi užitečné a s jejich využitím je možné získat spolehlivé výsledky. Ovšem výsledná informace popisuje vzorek jako celek a mnoho materiálů obsahuje místní nehomogenní části, které se základním vybavením zkoumat nejde. Takové vzorky lze sledovat modifikovaným přístrojem s přidanou videokamerou. Právě ke studiu vzorků s různým mikroprostředím jsou vhodné metody založené na sledování trajektorie částic v reálném čase [22], [26].

2.5.4 Dvoučásticová mikrореologie

U jednočásticové mikrореologie dochází ke zkreslení výsledků vlivem interakcí vložených sond s mediem. Tento nedostatek lze eliminovat tím, že místo jednotlivých částic budou sledovány dvojice částic. Tento přístup se nazývá dvoučásticová mikrореologie (*Two point microrheology*). Interakce částic se vzorkem neovlivní negativně výsledek a navíc tato metoda nezávisí na velikosti a tvaru vložených částic. Dvoučásticová mikrореologie se tedy zaměřuje na dvojici částic (viz Obrázek 12) a vyhodnocuje kos-korelační funkci jejich pohybu [30].



Obrázek 12: Princip dvoučásticové mikrorologie [31]

Viskoelastické vlastnosti zkoumaného materiálu lze studovat na základě znalosti vzdálenosti mezi částicemi, tepelné energie a kros-korelační funkce. Dvoučásticová mikrorologie je však velmi citlivá na jakékoliv mechanické vibrace. Oproti jednočásticové mikrorologii je také potřeba mnohem větší množství dat, aby mohlo být analyzováno mnoho párů částic v různých vzdálenostech. Výsledné hodnoty se pak shodují s jinými metodami např. s klasickou reologií více než u jednočásticové mikrorologie [15], [32].

3 Současný stav řešené problematiky

Mikroreologie tvoří souhrn metod, které se používají čím dál víc pro charakterizaci viskoelastických vlastností látek. Jak už bylo zmíněno, velkou výhodou mikroreologie je potřeba velmi malého množství vzorku a toho se velmi cení např. v oblasti biologie. Další velkou předností je možnost zkoumat lokální mikroprostředí, protože látky nemusí být a často nejsou v celém objemu homogenní. V současnosti se ve studiích stále častěji setkáváme s tím, že autoři používají částice o různých velikostech a s různě modifikovaným povrchem. Ještě pořád jsou mikroreologické postupy považovány za nové, a proto se ve většině studií používají další metody pro srovnání a ověření výsledků např. klasická reologie.

Konformační změny polymerů lze sledovat pomocí metod, jako jsou dynamický rozptyl světla (DLS), fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) nebo mikroskopie atomárních sil (AFM). Jako alternativní metoda byla navržena i reologie k odhalení souvislostí změn hydrodynamického objemu a viskozity polymerního roztoku. Nicméně při reologických experimentech dochází k hydrodynamickému toku, což může způsobit deformaci řetězců polymeru. Proto tedy **Chih-Hsing Huang a kol.** zvolili pasivní mikroreologii, která umožňuje zkoumat viskozitu roztoků pomocí vložených částic aniž by se muselo působit vnějšími silami a současně dovoluje studovat mikroprostředí polymerních řetězců. Ke svým experimentům použili fluorescenční mikročástice o průměru 0,92 μm . Jako modelový polymer zvolili poly-2-vinylpyridin (P2VP) a z mikroreologických dat se snažili získat velikosti klubek (coils) a globulí P2VP. Ke konformačním změnám docházelo vlivem různého pH. Autoři během experimentů pozorovali, že k fázovému přechodu klubko-globule docházelo okolo hodnoty $\text{pH} = 4$, což souhlasí s předchozími studiemi jiných autorů. I další hodnoty charakterizující bobtnání polymeru se shodují s předpokládanými hodnotami podle Flory-Hugginsovy teorie. Aby ještě lépe pronikli do konformačních změn vlivem pH, použili další techniky jako malouhlový rozptyl rentgenového záření (SAXS) a emisní spektrometrii s pyrenovou sondou [33].

Moschakis T. a kol. ve svých experimentech studovali gelovatění vodného roztoku β -glukanu z ječmene. Kromě pasivní mikroreologické metody použili i klasickou reologii a mikroskopii s fázovým kontrastem. Pro stanovení primární struktury izolovaného β -glukanu použili enzymové metody a HPLC. Cílem jejich studie bylo prozkoumat lokální dynamiku vodného roztoku β -glukanu, který podléhá gelovatění během skladování. Gelovatění spočívá v agregaci řetězců tedy zesíťování. Pro mikroreologické účely byly do vzorku vloženy polystyrenové fluorescenční částice na povrchu modifikované karboxylátem (COOH-PS) o průměru 0,75 μm . V systémech obsahujících proteiny nejsou vyloučeny interakce vložených částic a proteinů. V tomto případě však autoři předpokládali, že k takovým interakcím nedocházelo, kvůli hydrofilní povaze jak β -glukanů (nenabité molekuly) tak povrchu částic. Tento předpoklad potvrzovalo i to, že během mikroskopických měření nebyly pozorovány shluky částic ani při nízkých koncentracích biopolymeru. Pozorování během experimentů ukázalo, že při tvorbě sítě během gelovatění docházelo ke vzniku pórů, které způsobily nehomogenitu systému. Proto se metoda jednočásticové mikroreologie prokázala jako

citlivější ve srovnání s klasickou reologií, vložené částice se totiž nacházely v různém mikroprostředí během gelovatění. Mikrореologie byla navíc schopná detekovat změny při vzniku polymerní sítě dřív než se projeví u reologických experimentů [34].

Koagulace mléka je důležitým procesem ve výrobě mléčných produktů, jako jsou jogurty a některé sýry. Micely kaseinu v důsledku snižování pH disociují a agregují, až nakonec vytvoří 3-D síť. Dynamiku procesu gelovatění kaseinu lze sledovat různými metodami a v poslední době byla k tomuto účelu použita i mikrореologie. **Moschakis T. a kol.** zkoumali přechod sol-gel pomocí klasické reologie a pasivní mikrореologie s použitím konfokálního mikroskopu. Pro mikrореologické experimenty použili fluorescenční částice o různých velikostech (0,21 μm ; 0,32 μm ; 0,5 μm a 0,89 μm) a s různým povrchem (poly(ethylenglykol) a karboxylové skupiny). Autoři pomocí konfokálního mikroskopu pozorovali, že všechny částice měly tendenci adsorbovat se na proteinovou síť, která vznikala, když se hodnota pH blížila hodnotě pI kaseinu. I přesto se výsledky mikrореologie a klasické reologie výrazně nelišily a body gelovatění byly u obou metod podobné [35].

Pro oblasti jako jsou dávkování léčiv do zadní části oka nebo genové terapie se jeví velmi slibně intravitreální aplikace odbouratelných nanočástic. V některých případech je potřeba, aby se nanočástice přemístily z místa aplikace do cílových buněk, jindy je lepší aby částice zůstaly v místě podání a pomalu uvolňovaly léčivé látky, které by pak difundovaly do cílových míst. Proto je důležité znát mikrostrukturu sklivce, kde nanočástice s různou velikostí a rozdílným povrchem budou penetrovat nebo delší dobu zůstanou. **Qingguo Xu a kol.** studovali pomocí mikrореologie mikrostrukturu biologického materiálu, konkrétně hovězího sklivce, s polystyrenovými částicemi o různé velikosti a s různě modifikovaným povrchem. Použili polystyrenové částice s aminovými skupinami (PS-NH₂), karboxylovými skupinami (PS-COOH) a částice potažené poly(ethylenglykolem) (PS-PEG) o velikostech 100 nm, 200 nm, 500 nm, 750 nm a 1000 nm. PS-PEG částice až do velikosti 510 nm rychle penetrovali v prostředí, ale trajektorie největších částic byly výrazně omezené bez ohledu na modifikaci povrchu. PS-NH₂ částice byly kladně nabitě v prostředí sklivce o pH = 7,2 a nehýbaly se. Naproti tomu záporně nabitě PS-COOH částice o velikostech 100 nm a 200 nm snadno difundovaly. Při vyšších koncentracích částic však docházelo k jejich shlukování. Autoři zjistili, že gel sklivce se chová jako permeabilní viskoelastická tekutina pro objekty menší než 510 nm, zatímco pro částice 1190 nm a větší představuje nepermeabilní viskoelastickou pevnou látku. Z jejich výsledků tedy vyplývá, že nanočástice menší než 510 nm s neadhezivním povrchem mohou v prostředí sklivce penetrovat, naproti tomu částice větší než 1190 nm by mohly být použity pro léčiva s protražovaným účinkem [36].

Mikrореologie může být velmi užitečná i pro výzkum buněk a tkání. Viskozita je důležitý parametr a provedené studie ukazují, že změna viskozity souvisí s nemocí nebo dysfunkcí na buněčné úrovni nebo malformací na úrovni tkání. Dochází totiž ke změnám mobility chemikálií v buňce, což ovlivní základní procesy, jako jsou ty probíhající v membránách, při sbalování proteinů nebo udržování tvaru buňky. Byly použity metody mikroskopie atomárních sil, magnetická pinzeta nebo sledování pohybu částic, které se do buňky dostaly

endocytózou. Živé systémy jsou velmi komplexní, a proto je potřeba vyvíjet další nano- a mikrosondy a to zejména takové, u kterých budou kontrolovány interakce s okolním mediem. **Chevry L. a kol.** ve své studii představili využití drátků (wires) jako potenciálních sond v experimentech s myšními fibroblasty a epiteliálními buňkami z ledvin psa. Drátky připravili z nanokrystalů oxidu železitého a pro zvýšení stability je obalili polyakrylátem sodným. Pro experimenty na modelovém systému (voda a glycerol) měly drátky délku od 1 μm do 100 μm (střední délku 27 μm), pro experimenty s fibroblasty měly střední délku 4 μm . Průměr drátků se pohyboval okolo 400 nm. Měření elektroforetické mobility a zeta-potenciálu ukázalo, že drátky byly elektricky neutrální. Z experimentů vyplynuly některé výhody, jako že drátky byly snadno začleněny do živých buněk, nacházely se rozptýleny v cytosolu a nevykazovaly toxicitu. Autoři provedli i srovnávací měření s kulovými částicemi, ale s nimi nebyla zjištěna hodnota efektivní viskozity intracelulárního media [37].

Mikroreologie může být využita i ke studiu reologických vlastností žaludečního hleny (mucus). **Bansil R. a kol.** ve své práci zkoumali tyto vlastnosti a jejich cílem bylo zjistit, jakým způsobem je ovlivňuje bakterie *Helicobacter Pyroli*. *H. Pyroli* způsobuje žaludeční vředy a rakovinu, umí plavat viskoelastickým hlenem na vnitřním povrchu žaludku a kolonizuje v kyselém prostředí. V předchozích studiích byly pozorovány rozdíly ve výsledcích mikroreologických a reologických experimentů s mucinovým gelem při $\text{pH} = 2$. Tyto rozdíly naznačovaly nehomogenost mikroprostředí gelu. Autoři v této studii tedy zajímalo, jestli jsou mikroreologické výsledky získané pomocí sledování pohybu částic ovlivněny přítomností pohyblivých bakterií. Navíc bakterie samotné mohou být využity jako mikroreologické sondy, a tak další otázkou bylo, zda je Brownův pohyb pohyblivých bakterií, které aktivně plavou v prostředí, odlišný od Brownova pohybu bakterií, které se kromě Brownova pohybu jinak nehýbou. Pro experimenty použili fluorescenční polystyrenové latexové částice o průměru 1 μm a žaludeční mucin z prasete (porcine gastric mucin, PGM). Autoři pozorovali, že viskozitní i elastický modul roztoků mucinu byl nižší v přítomnosti bakterie. Sledováním Brownova pohybu samotných bakterií zjistili, že pohyblivé (plavající) bakterie vykazovaly superdifúzní anomální Brownův pohyb, zatímco ty ostatní se pohybovaly pouze Brownovým pohybem [38].

Med se používá jako potravinářské aditivum, ale je také intenzivně studován kvůli své antimikrobiální a protizánětlivé aktivitě a urychlování hojení ran. Reologie medu souvisí s teplotou a složením, konkrétně závisí na podílu cukru a obsahu vody. **Cohein I. a Weihs D.** zkoumali čtyři druhy izraelského medu pomocí reologie a mikroreologie. Použili jak klasický med, tak i med se sníženým množstvím kalorií, který je stále populárnější díky trendu snižování cukrů přijímaných v potravě. U takových medů je procento přírodních cukrů nahrazeno molekulami s pomalým nebo žádným metabolismem. Cílem je zredukovat obsah kalorií, ale zachovat konzistenci a chuť. Pro mikroreologické experimenty byly použity fluorescenční částice o velikosti 200 ± 10 nm a s povrchem modifikovaným karboxylovými skupinami. Autoři pozorovali, že se všechny druhy použitých medů chovaly jako newtonovské kapaliny a že vykazovaly Arrheniovskou závislost na teplotě. Výsledky získané

pomocí obou metod se shodovaly. Autoři tak ukázali použitelnost pasivní mikroreologie i pro vzorky s relativně vysokou viskozitou [39].

4 Materiály a metody

4.1 Materiály

Hyaluronan	HySilk, $M_w = 250 - 450$ kDa, CPN s. r. o., číslo šarže 230 215 – E1
Chitosan	Low molecular weight, Sigma – Aldrich, číslo šarže 448869 – 250G
Glycerol	$C_3H_8O_3$, čistota $\geq 99,5\%$, Sigma – Aldrich, číslo šarže 69012 – 1L
Částice	Micro particle size standard based on polystyrene monodisperse, velikost $1 \mu\text{m}$, Sigma – Aldrich, číslo šarže 72938 – 10ML – F PS – Particles, carboxylated, velikost $(0,816 \pm 0,02) \mu\text{m}$, microParticles GmbH, číslo šarže PS – COOH – B1477 SiO_2 – Particles, aminated, velikost $(1,16 \pm 0,02) \mu\text{m}$, microParticles GmbH, číslo šarže $SiO_2 - NH_2 - AR113 - 2$
Rozpouštědla	Mili-Q voda (Milipore Academic) Kyselina octová, CH_3COOH , čistota 99 %, Lach – Ner, s.r.o. číslo šarže 30436 0305

4.2 Vybavení

NICON Eclipse Ci	optický mikroskop, možnosti zvětšení 20x až 100x
CCD kamera (CMOS USB 3.0)	kamera propojená s mikroskopem, se softwarem uEye Cockpit, rozlišení 1280 x 1024, maximální rychlost snímání 60 snímků/s
Reometr AR G2	system souosých válců
ZetaSizer Nano ZS	přístroj pro měření metodou dynamického rozptylu světla
Programy	ImageJ program pro převádění videí do jiných formátů Cell Sens Entry program pro úpravu videí IDL software pro vyhodnocení trajektorií částic

4.3 Příprava vzorků

Byla připravena koncentrační řada glycerolu o hmotnostních procentech ve vodě v rozmezí od 10 % do 80 %. Pro metodu dynamického rozptylu světla bylo potřeba vždy 5 ml roztoku. Do tohoto objemu byly pipetovány roztoky s částicemi, tedy 10 μl polystyrenových (PS) a polystyrenových s karboxylovými skupinami (PS-COOH) a 40 μl roztoku s částicemi z oxidu křemičitého s aminoskupinami ($\text{SiO}_2\text{-NH}_2$). Pro mikrореologické experimenty byl připraven 1 ml každého vzorku a bylo přidáno 10 μl PS nebo PS-COOH částic nebo 40 μl $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ částic. Všechny vzorky byly po přidání částic promíchány na vortexu.

Byl připraven 1% zásobní roztok hyaluronanu ve vodě, který byl ponechán jeden den na magnetické míchačce. Následující den z něj byly ředěním připraveny roztoky o hmotnostních koncentracích 0,01 %; 0,1 % a 0,5 %. Pro veškeré experimenty byl použit hyaluronan o molekulové hmotnosti 250-450 kDa. Pro měření metodou dynamického rozptylu světla bylo připraveno 5 ml každého vzorku a bylo přidáno 10 μl PS nebo PS-COOH částic nebo 40 μl $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ částic. Pro mikrореologickou metodu byl připraven vždy 1 ml roztoku, do kterého bylo pipetováno 10 μl PS nebo PS-COOH částic nebo 40 μl $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ částic. Veškeré vzorky byly po přidání částic promíchány na vortexu.

Byl připraven zásobní roztok chitosanu o hmotnostní koncentraci 0,2 % v 1% kyselině octové, který byl ponechán přes noc na magnetické míchačce. Z tohoto roztoku byly ředěním připraveny roztoky o hmotnostních koncentracích 0,01 %; 0,06 % a 0,1 %. Pro měření na klasickém reometru bylo připraveno 10 ml každého vzorku. Pomocí metody dynamického rozptylu světla byly změřeny vzorky, do nichž bylo přidáno 10 μl PS nebo PS-COOH částic nebo 40 μl $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ částic. Pro mikrореologické experimenty byla potřeba 1 ml každého vzorku, do kterého bylo přidáno 10 μl PS nebo PS-COOH částic nebo 40 μl $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ částic. Opět byly všechny vzorky po přidání částic promíchány na vortexu.

Celkem byly připraveny a změřeny tři koncentrační řady glycerolu, tři koncentrační řady hyaluronanu a čtyři koncentrační řady chitosanu. Do první řady každé látky byly přidány PS částice, do druhé PS-COOH částice a do třetí $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ částice. Každé měření metodami dynamického rozptylu světla a mikrореologie bylo provedeno třikrát. Čtvrtá řada chitosanu byla použita pro metodu klasické reologie. Koncentrační řada glycerolu i hyaluronanu o daných koncentracích byla proměřena klasickou reologií již v bakalářské práci [40].

5 Měření a vyhodnocení dat

5.1 Měření metodou dynamického rozptylu světla

Viskozita všech vzorků byla měřena na přístroji Zetasizer Nano ZS (viz *Obrázek 13*). Část připraveného vzorku s částicemi (sondami) byla přelita do plastové kyvety a temperována přístrojem na 25 °C po dobu 120 s. Byly použity moduly *Size* a *Microrheology*. Pomocí modulu *Size* byla ověřována velikost mikrorheologických částic udávaná výrobcem. Modulem *Microrheology* byla změřena závislost MSD na čase a relativní viskozita vzorku. Hodnoty relativních viskozit byly přepočítány na viskozity roztoků a ty byly vyneseny do grafů a porovnány s výsledky dalších metod.



Obrázek 13: Přístroj ZetaSizer Nano ZS [41]

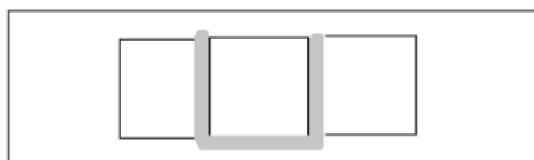
5.2 Měření metodou jednočásticové mikrореologie

Metoda jednočásticové mikrореologie, nazývaná také jako *video particle tracking* (VPT), představuje celkem zdlouhavý proces, kdy samotné měření není tak časově náročné jako vyhodnocování. Celý proces sestává z několika částí. Nejprve je potřeba připravit vzorky s částicemi, kamerou připojenou k mikroskopu se zaznamená tepelný pohyb částic, pak se trajektorie pohybu vyhodnotí pomocí softwaru IDL a získané hodnoty difuzních koeficientů jsou následně přepočítány na viskozitu pomocí Stokes-Einsteinovy rovnice (rovnice 5).



Obrázek 14: Optický mikroskop NICON Eclipse Ci a CCD kamera [40]

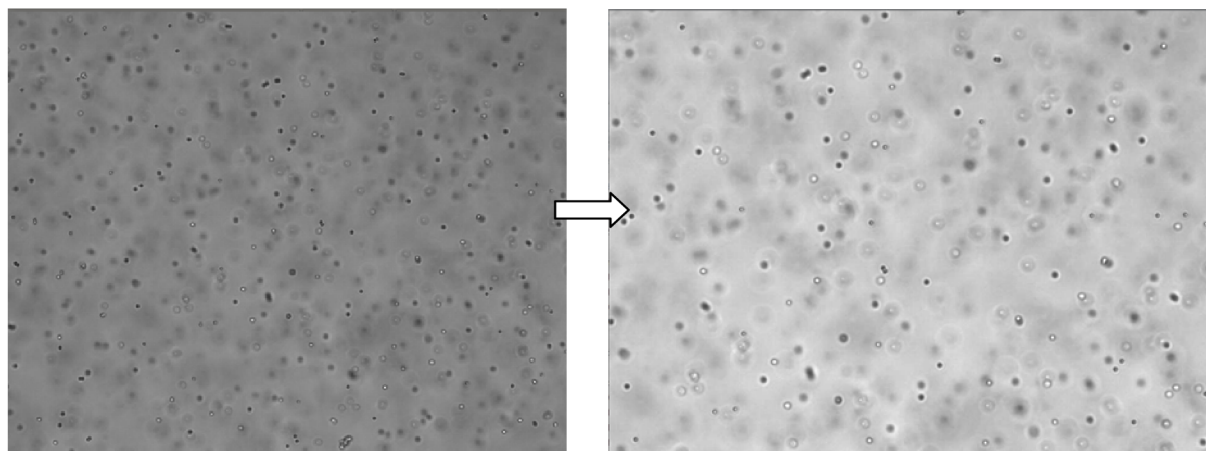
K měření byl použit optický mikroskop NICON Eclipse Ci, ke kterému byla připojena CCD kamera. Pomocí tohoto aparátu byly pořízeny videa s pohybujícími se částicemi. Aby se zabránilo pohybu nebo případnému vysychání vzorků, byl každý roztok pipetován do přihrádky sestavené z laboratorních sklíčků (viz Obrázek 15). Přihrádka byla vytvořena z jednoho podložního sklíčka a tří krycích. Pro upevnění krycích sklíčků bylo použito lepidlo, které bylo vytvrzeno pod UV lampou. Objem takto připravené přihrádky se pohyboval kolem 30 μl roztoku.



Obrázek 15: Schéma přihrádky z laboratorních sklíčků pro metodu VPT [40]

Na optickém mikroskopu bylo nastaveno čtyřicetinasobné zvětšení pro všechny použité částice. U každého vzorku byla snaha zaostřit na prostřední vrstvu objemu přihrádky, aby nedošlo k zaznamenání pohybu částic příliš blízko sklíčků, a tak k negativnímu ovlivnění výsledné viskozity. Pomocí softwaru uEye Cockpit byly nahrány videa. Rychlost nahrávání byla 21,50 snímků/s a každé video tvořilo přibližně 280 snímků. Software uložil videa ve formátu avi, ale pro další zpracování je bylo potřeba převést na formát tiff, k čemuž byl použit program ImageJ. Tak bylo každé video převedeno na požadovaný formát, kdy bylo v podstatě rozloženo na sekvenci snímků. Dále byly videa upraveny v programu Cell Sens Entry, kde byl upraven jas a vylepšen kontrast částic (viz Obrázek 16). Snímky byly také v rámci možnosti

ořezány, aby se odstranily případné nečistoty, které by negativně ovlivnily výsledky, jako například dvojice částic nebo rozostřené částice.



Obrázek 16: Úprava jasů a kontrastu videa v programu Cell Sens Entry

Po úpravě byly videa vyhodnoceny v softwaru IDL (Interactive Data Language), který je využíván pro obrazovou analýzu. V případě mikrореologie umožňuje sledovat jednotlivé částice a vyhodnotit jejich trajektorie. Původně bylo možné pracovat pouze s kombinací bílé částice na tmavém pozadí, ale dnes už program umožňuje i opačnou variantu. Nejprve byly na jednom snímku označeny požadované částice, které měly být dále analyzovány, a pak byl výběr aplikován na celý soubor snímků. Při výběru lze nastavit minimální hmotu (mass) částic, což představuje hustotu výplně částice. Pro kontrolu lze vybrané částice zakroužkovat a zobrazit. Během vyhodnocování bylo možné výběr částic ještě upravit tak, aby byly eliminovány částice s hodnotou excentricity větší než 0,2. Excentricita ideálně kulových částic je rovna nule, ale po hodnotu 0,2 jsou částice stále přijatelné pro vyhodnocení. Trajektorie vybraných částic pak byly vyhodnoceny a výsledkem byla závislost MSD na čase, ze které byla získána hodnota difuzního koeficientu. Hodnoty difuzních koeficientů byly následně přepočítány na viskozitu a hodnoty viskozit byly vyneseny to grafů a porovnány s hodnotami získanými z ostatních metod.

5.3 Měření metodou klasické reologie

Viskozita vzorků byla změřena také pomocí klasické reologie. Hodnoty viskozit byly získány měřením na reometru AR G2 od firmy TA Instruments. Každý vzorek byl před měřením pět minut ustálen a temperován na 21 °C. Při stejné teplotě probíhalo i mikroreologické měření metodou VPT. Na reometru byla použita soustava válec-válec a metoda ustáleného stavu (Steady state), kdy jsou měřeny tokové vlastnosti. Doba měření jednoho bodu viskózní křivky byla omezena na maximálně 3 minuty [40].

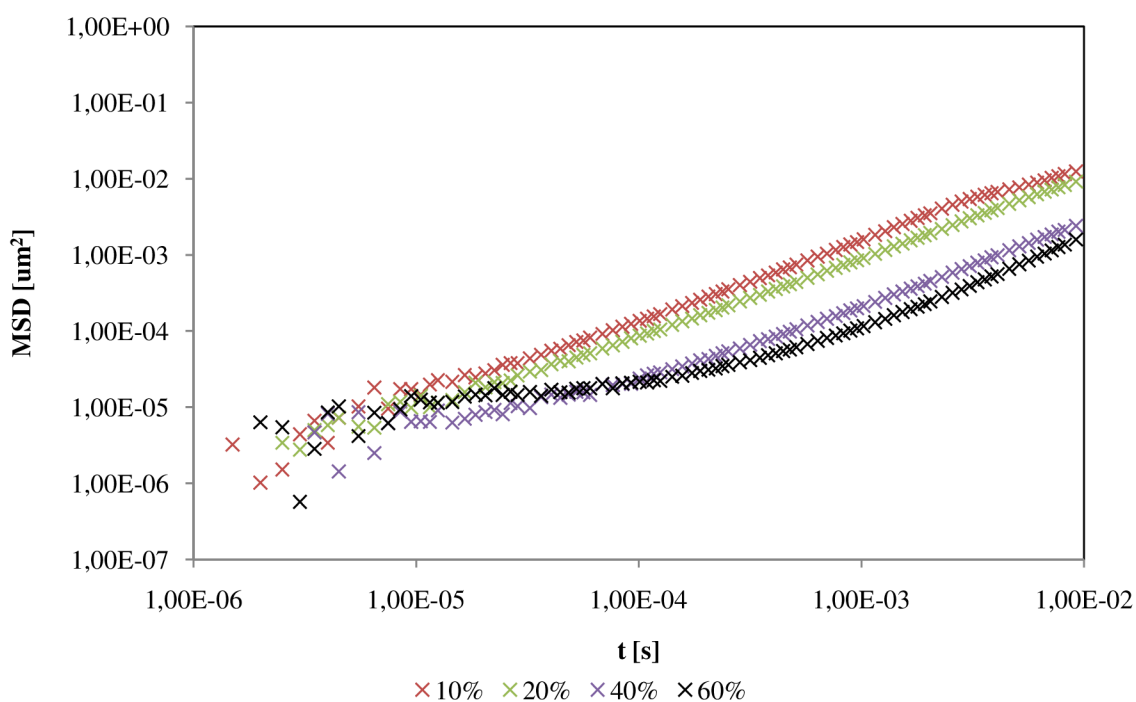


Obrázek 17: Reometr Ar G2

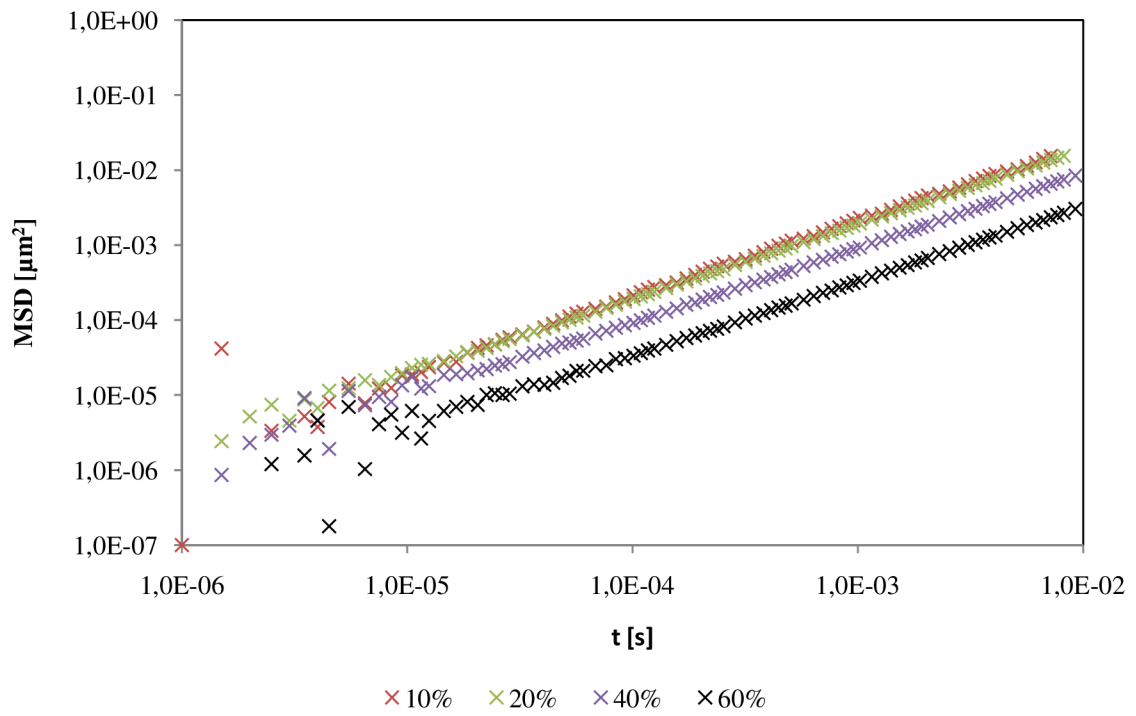
6 Výsledky a diskuze

6.1 Glycerolová řada

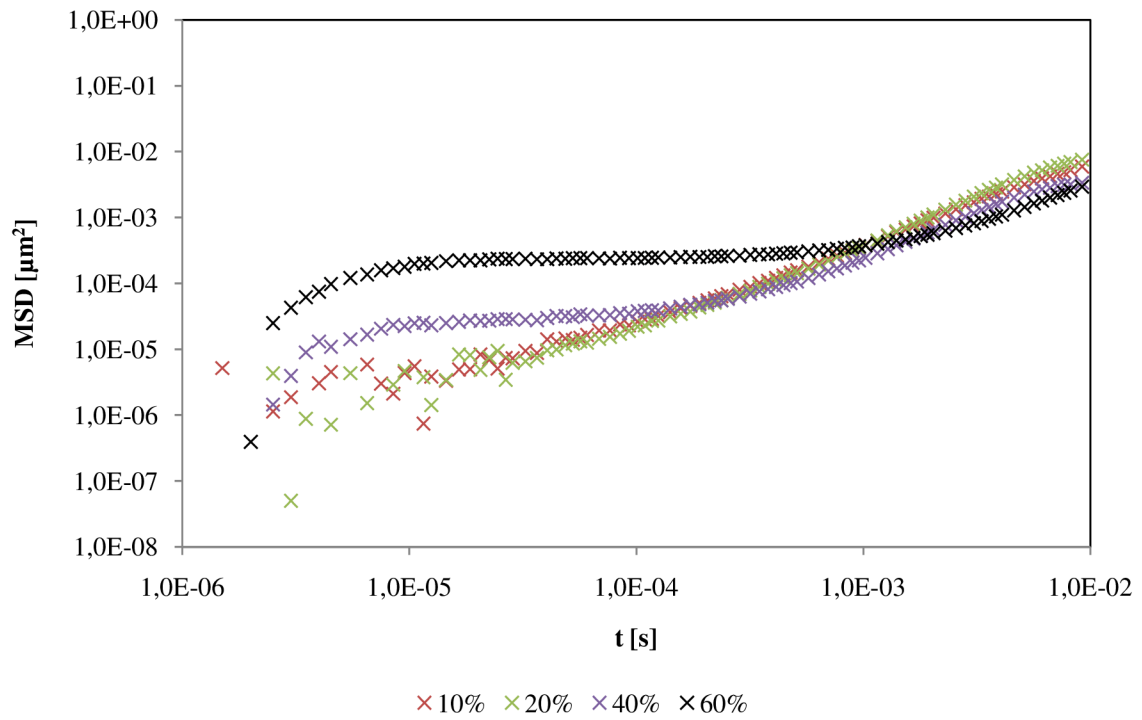
Glycerol byl zvolen jako modelový systém, jelikož se jedná o homogenní kapalinu, pro kterou jsou hodnoty viskozit uvedeny v tabulkách. Výsledky mikroreologických metod (DLS a VPT) a klasické reologie byly s těmito hodnotami porovnány. Metodou DLS byly měřeny závislosti MSD na čase pro jednotlivé koncentrace a byly získány hodnoty relativních viskozit, které pak byly přepočítány na hodnoty dynamických viskozit. Měření reologických vlastností metodami DLS i VPT proběhlo pro každý vzorek třikrát, ze tří měření pak byl vypočítán průměr a u viskozit byly určeny i chybové úsečky. Měření na reometru bylo z časových důvodů provedeno jednou.



Obrázek 18: Závislost MSD na čase pro koncentrační řadu glycerolu s PS částicemi ($1 \mu\text{m}$)



Obrázek 19: Závislost MSD na čase pro koncentrační řadu glycerolu s PS-COOH částicemi (0,816 μm)



Obrázek 20: Závislost MSD na čase pro koncentrační řadu glycerolu s SiO₂-NH₂ částicemi (1,16 μm)

Na obrázcích 18 až 20 jsou vyneseny závislosti MSD na čase pro glycerol o hmotnostních koncentracích 10 – 60 %. Data pro 80% roztok glycerolu nejsou uvedena, protože dle následujícího předpokladu je viskozita tohoto vzorku daleko za hranicí měřitelnosti přístroje pro DLS měření se zvolenými částicemi. Výrobce přístroje uvádí maximální velikost částic měřitelnou přístrojem 10 μm [42]. A tak byl vypočítán teoretický maximální difuzní koeficient pro tuto velikost částic ze Stokes-Einsteinovy rovnice (viz Rovnice 5), jehož hodnota po dosazení do rovnice vyšla $4,30 \cdot 10^{-14} \mu\text{m}^2/\text{s}$. Pomocí této hodnoty pak byla vypočítána teoretická nejvyšší měřitelná viskozita metodou DLS s použitím částic o daných velikostech opět dosazením do Stokes-Einsteinovy rovnice.

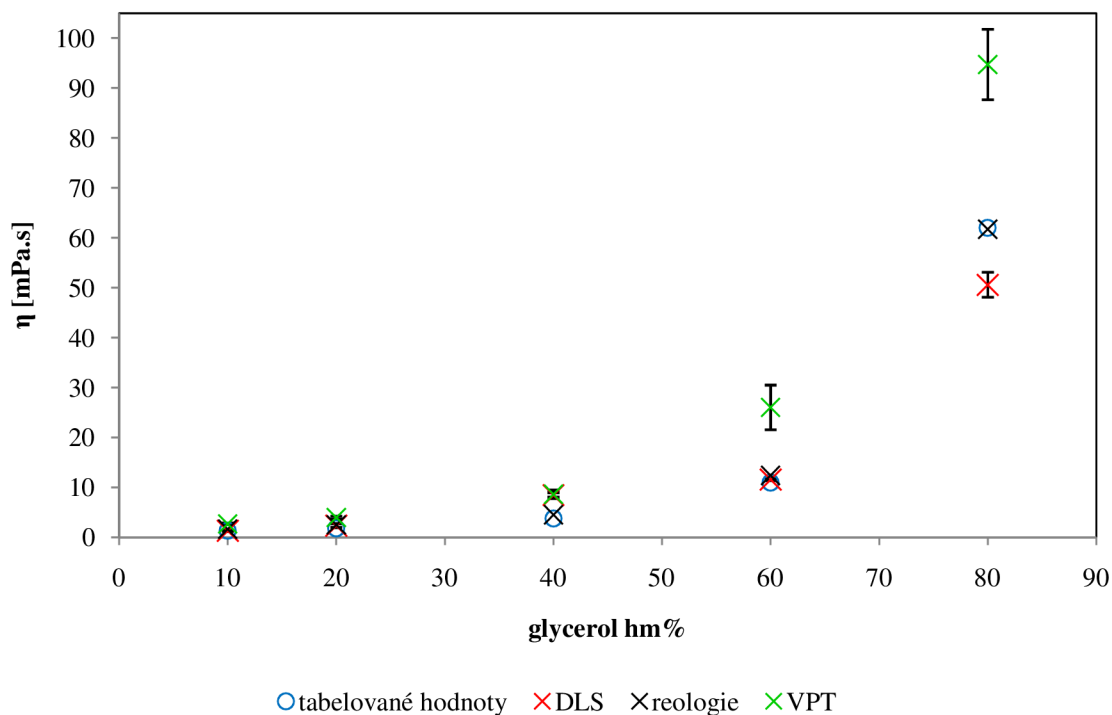
Tabulka 1: Teoretické hodnoty viskozit spolehlivě měřitelné metodou DLS vypočítané ze Stokes-Einsteinovi rovnice

Částice	Velikost částic [μm]	η_{max} [mPa.s]
PS-COOH	0,816	12,25
SiO ₂ -NH ₂	1,16	8,62
PS	1,0	10,00

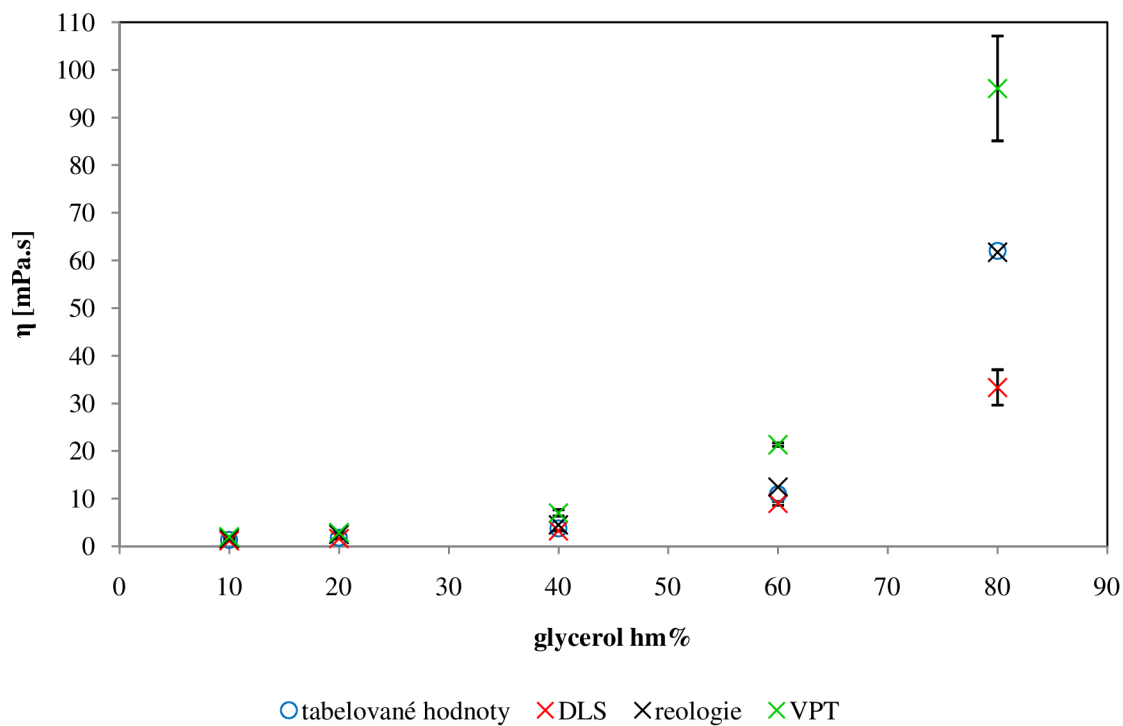
Tabulka 2: Tabelované hodnoty viskozit pro glycerolovou koncentrační řadu

Hmotnostní procenta glycerolu ve vodě	10 %	20 %	40 %	60 %	80 %
Viskozita [mPa.s]	1,31	1,77	3,75	10,96	62

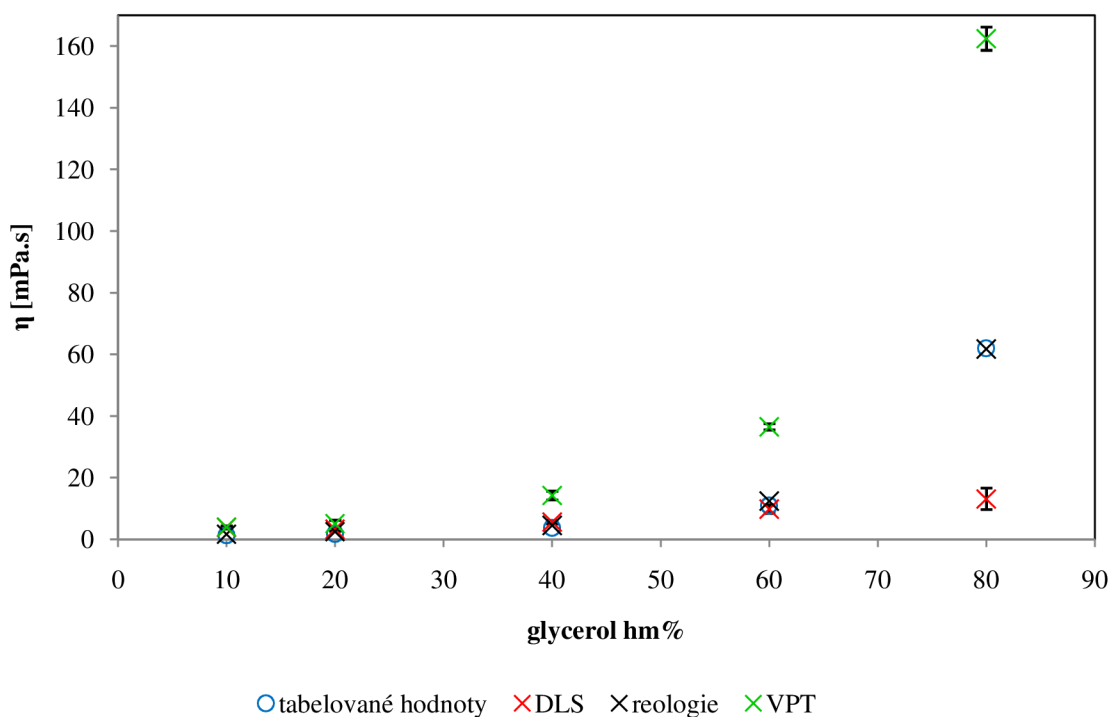
Z tabulek 1 a 2 tedy vyplývá, že viskozita 80 % roztoku glycerolu je daleko za hranicí měřitelnosti metody DLS s použitými částicemi. Viskozita 60 % vzorku se pohybuje na hranici spolehlivé měřitelnosti s použitím částic o velikosti kolem 1 μm , čímž lze u grafů s SiO₂-NH₂ a PS částicemi vysvětlit změnu tvaru MSD křivky, která by u komplexních kapalin představovala elasticitu vzorku. S rostoucí koncentrací a tedy se zvyšující se viskozitou by měly být použity menší částice, aby bylo dosaženo přesnějších výsledků.



Obrázek 21: Graf znázorňující závislost viskozity na obsahu glycerolu ve vzorku, porovnání výsledků metod DLS, VPT (PS částice, 1 μm) a klasické reologie s tabelovanými hodnotami



Obrázek 22: Graf znázorňující závislost viskozity na obsahu glycerolu ve vzorku, porovnání výsledků metod DLS, VPT (PS-COOH částice, 0,816 μm) a klasické reologie s tabelovanými hodnotami

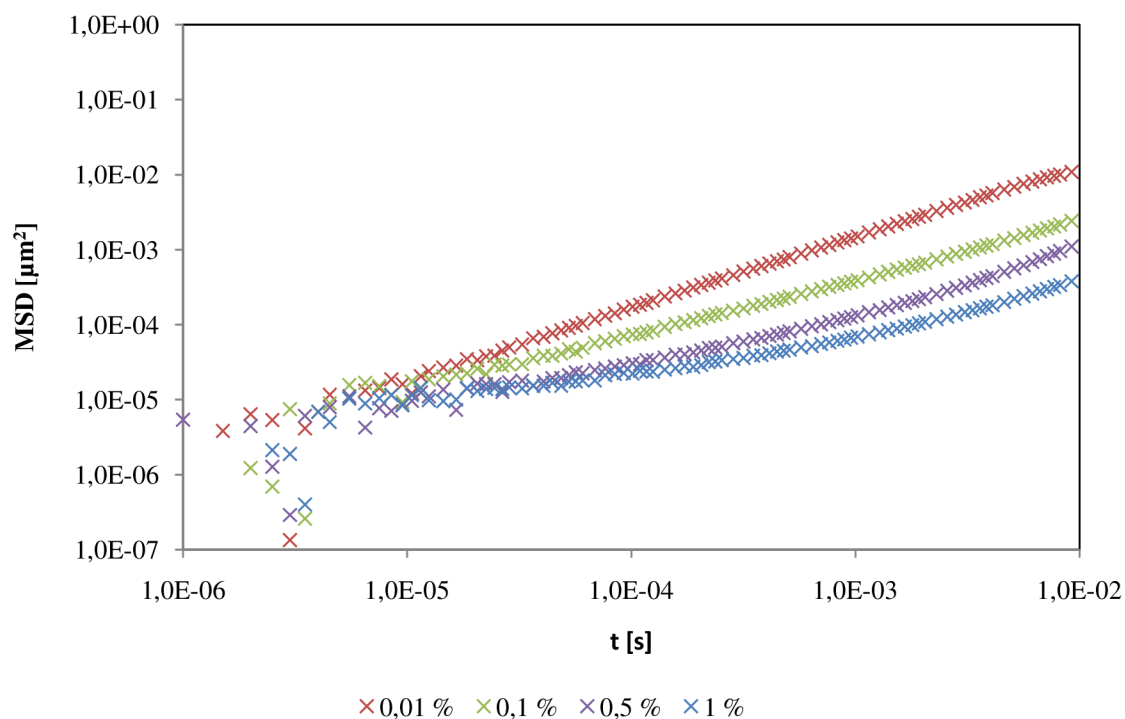


Obrázek 23: Graf znázorňující závislost viskozity na obsahu glycerolu ve vzorku, porovnání výsledků metod DLS, VPT ($\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ částice, $1,16 \mu\text{m}$) a klasické reologie s tabelovanými hodnotami

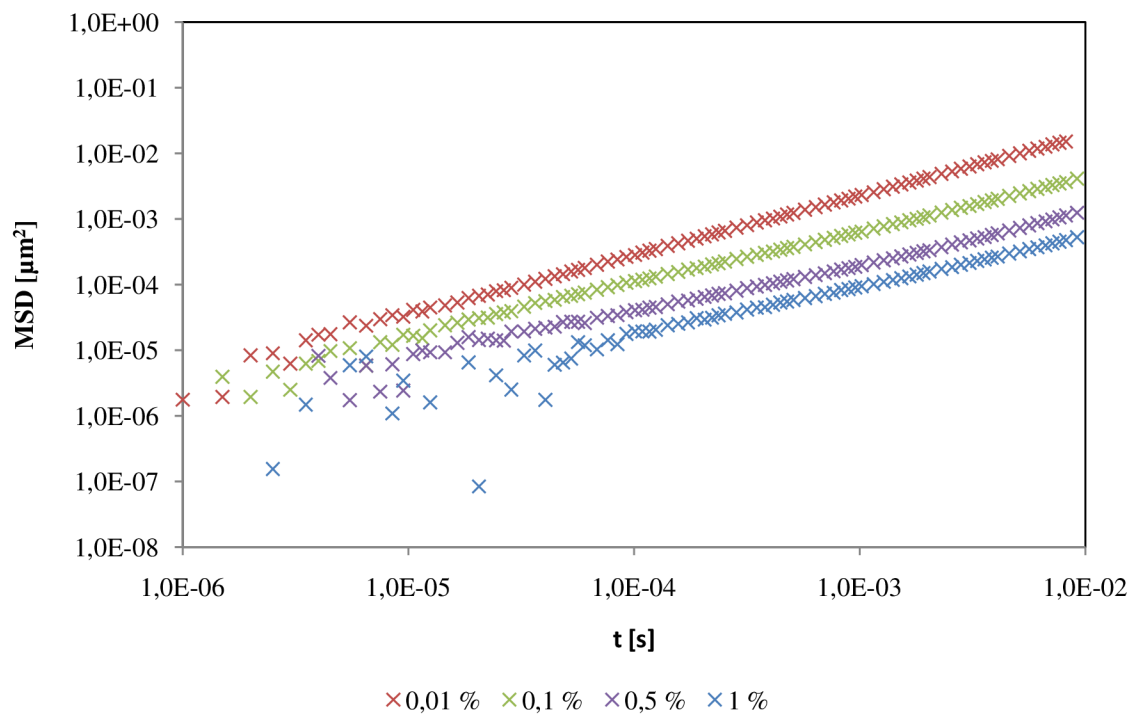
Na obrázcích 21 až 23 jsou zobrazeny závislosti viskozit pro glycerolovou řadu i s chybovými úsečkami. Číselné hodnoty viskozit jsou uvedeny v tabulce 4 v příloze 1. V grafech jsou pro ukázkou ponechány hodnoty viskozit i pro 80 % roztok glycerolu. Je zde vidět, že viskozita tohoto vzorku je příliš vysoká pro obě mikroreologické metody. Z těchto metod se s tabelovanými hodnotami více shodují viskozity měřené pomocí DLS. Může to být dáno tím, že přístroj pro DLS měří ve 3-D a vyhodnocuje pohyb mnohem většího počtu částic než je tomu u VPT, která sleduje trajektorie částic ve 2-D a pouze v určité části vzorku, na kterou je zaměřena kamera při nahrávání videí.

6.2 Hyaluronová řada

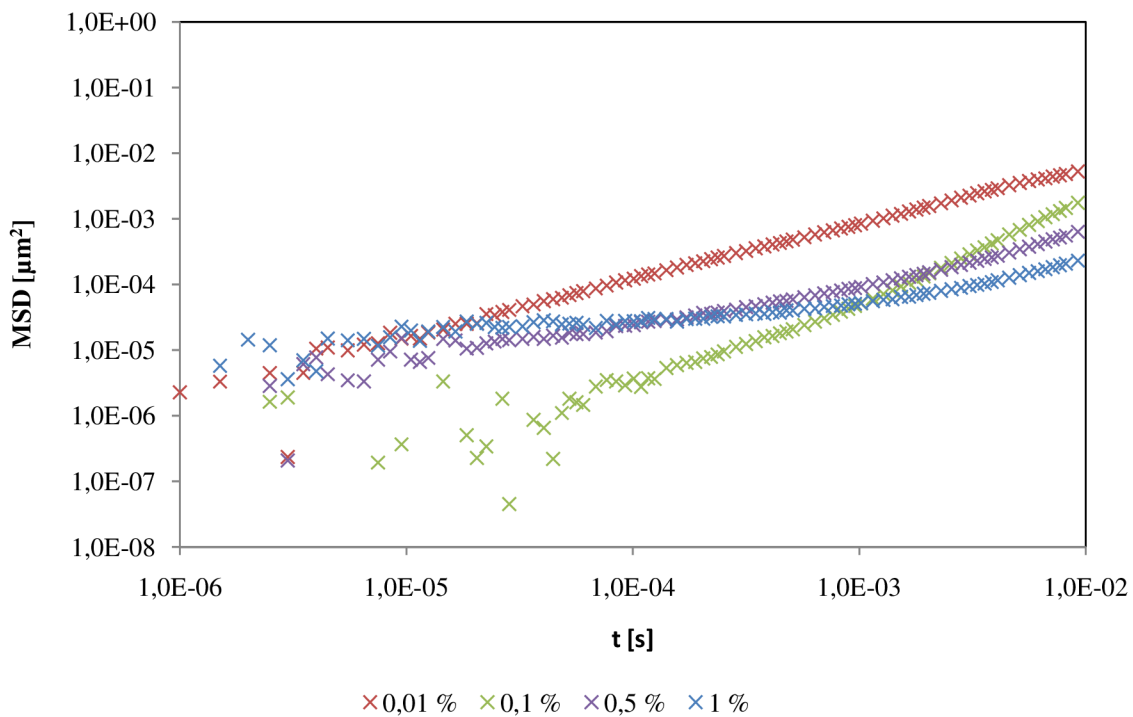
Byly změřeny hodnoty viskozit roztoků hyaluronanu o stejné molekulové hmotnosti metodami VPT, klasické reologie a DLS. Metodou DLS byly získány závislosti MSD na čase. Hmotnostní koncentrace hyaluronanu ve vodě byly 0,01 %; 0,1 %; 0,5 % a 1 %. Byly použity částice s neutrálním (PS), kladným ($\text{SiO}_2\text{-NH}_2$) a záporně nabitým (PS-COOH) povrchem. Všechna měření metodami DLS a VPT byla provedena celkem třikrát, hodnoty byly zprůměrovány a u viskozit byly vytvořeny i chybové úsečky. Měření na reometru bylo z časových důvodů provedeno jednou.



Obrázek 24: Závislost MSD na čase pro koncentrační řadu hyaluronanu (250 – 450 kDa) s PS částicemi ($1\mu\text{m}$)



Obrázek 25: Závislost MSD na čase pro koncentrační řadu hyaluronanu (250 – 450 kDa) s PS-COOH částicemi (0,816 μm)



Obrázek 26: Závislost MSD na čase pro koncentrační řadu hyaluronanu (250 – 450 kDa) s SiO₂-NH₂ částicemi (1,16 μm)

Na obrázcích 24 až 26 jsou vyneseny závislosti MSD na čase pro koncentrační řadu hyaluronanu měřené s danými částicemi. Stejně jako v případě s glycerolem bylo i zde provedeno srovnání teoreticky vypočítaných maximálních měřitelných hodnot viskozit metodou DLS s viskozitami vzorků, konkrétně s viskozitami měřenými na reometru. Pro přehlednost je zde znovu uvedena tabulka 1.

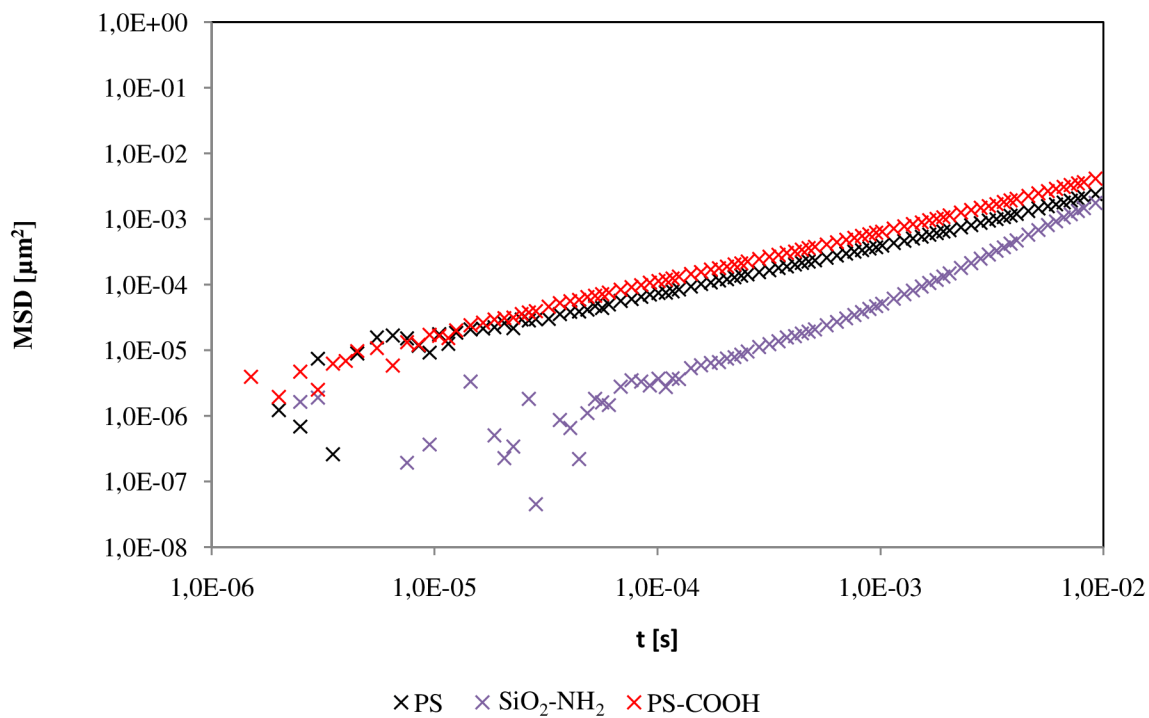
Tabulka 1: Teoretické hodnoty viskozit spolehlivě měřitelné metodou DLS vypočítané ze Stokes-Einsteinovy rovnice

Částice	Velikost částic [μm]	η_{max} [mPa.s]
PS-COOH	0,816	12,25
SiO ₂ -NH ₂	1,16	8,62
PS	1,0	10,00

Tabulka 3: Hodnoty viskozit koncentrační řady hyaluronanu naměřené klasickou reologií [40]

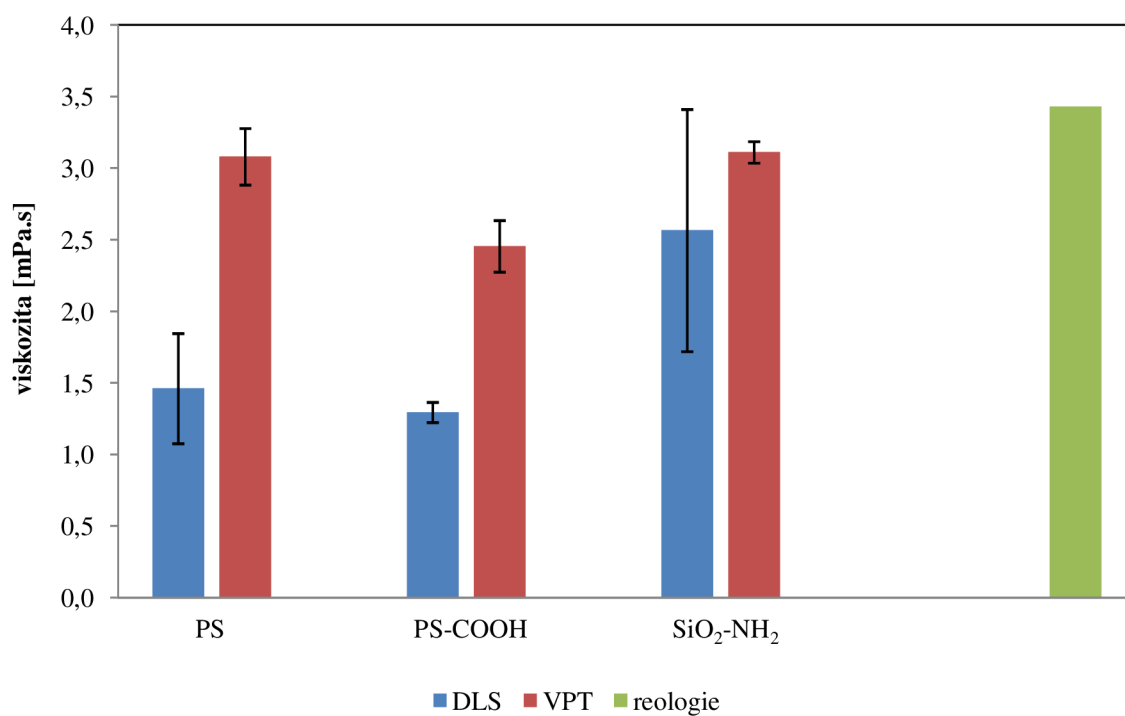
Hmotnostní procenta hyaluronanu ve vodě	0,01 %	0,1 %	0,5 %	1 %
Viskozita [mPa.s]	3,43	12,80	60,47	251,60

Z porovnání tabulek 1 a 3 vyplývá, že 0,5 % a 1 % roztok hyaluronanu už je daleko za hranicí spolehlivé měřitelnosti metody DLS s částicemi o velikosti kolem 1 μm . Proto lze na obrázcích 24 a 26 vidět změnu tvaru MSD křivky u těchto koncentrací. Na obrázku 25 je vidět lineární závislost MSD na čase pro všechny koncentrace. U PS-COOH částic v roztoku hyaluronanu mohlo docházet k odpuzování částic a řetězců, částice by se tedy pohybovaly převážně v rozpouštědle, a proto není pozorována změna tvaru MSD křivky u viskóznějších vzorků.

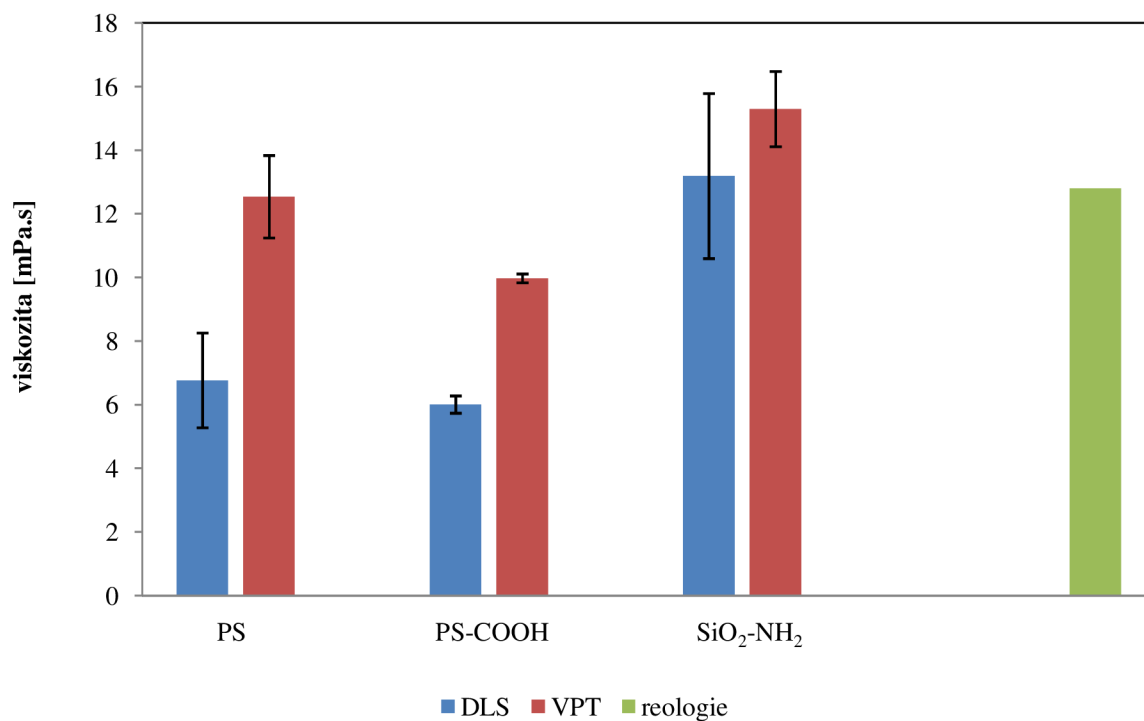


Obrázek 27: Graf závislosti MSD na čase pro 0,1 % roztok hyaluronanu (250 – 450 kDa)

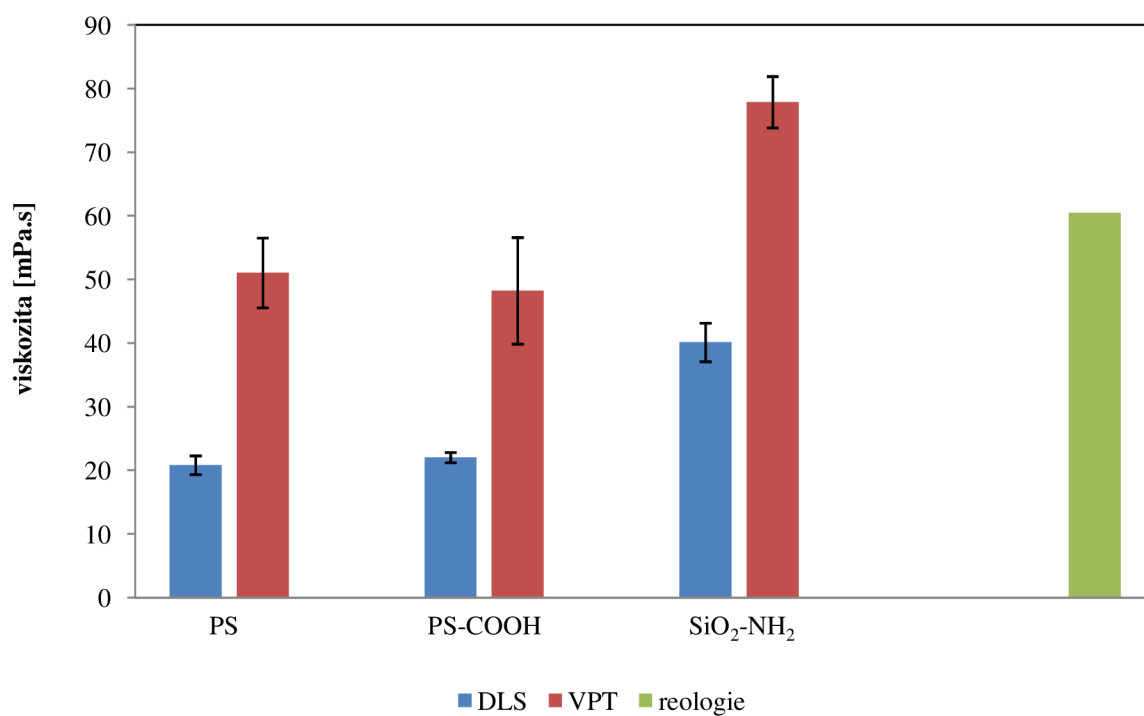
Na obrázku 27 jsou pro lepší srovnání vyneseny závislosti MSD na čase pro 0,1 % vzorek hyaluronanu naměřené s jednotlivými částicemi. Je zde vidět odlišný sklon závislosti získané s SiO₂-NH₂ částicemi. Možným vysvětlením by mohly být případně interakce těchto částic s polymerem. Na videích pro vyhodnocení metodou VPT byly pozorovány shluky částic, převážně u vyšších koncentrací, ale začínaly se tvořit už i 0,1 % vzorku, což také mohlo ovlivnit výsledky.



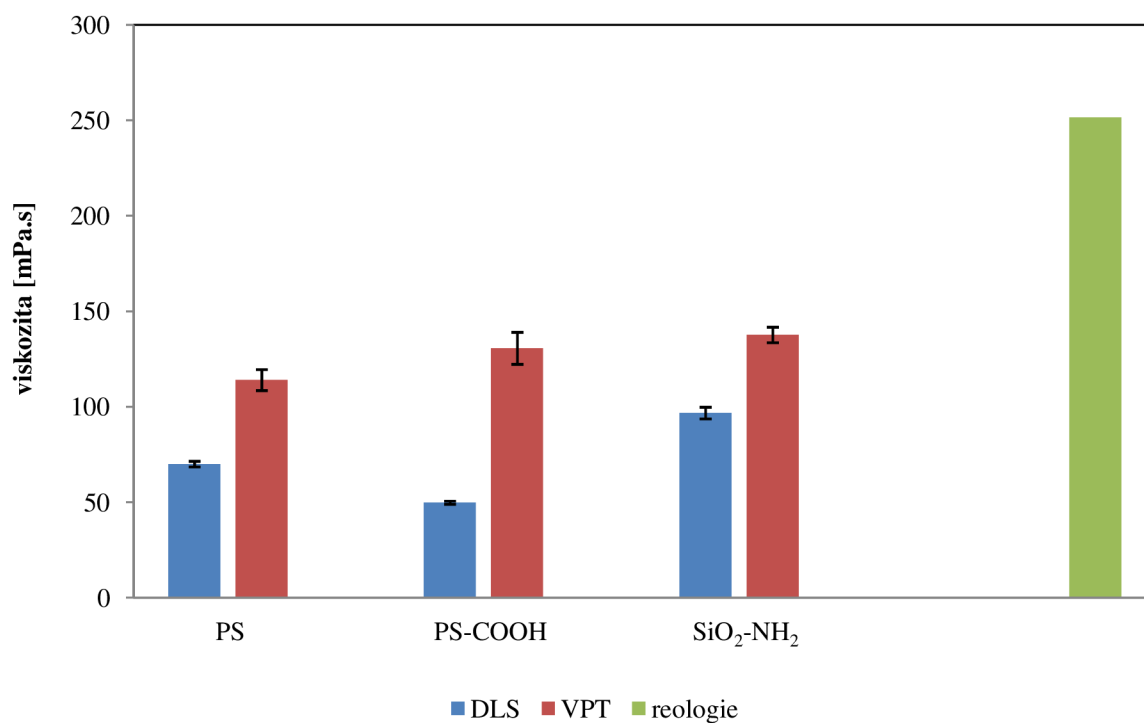
Obrázek 28: Porovnání hodnot viskozit 0,01 % roztoku hyaluronanu (250 – 450 kDa)



Obrázek 29: Porovnání hodnot viskozit 0,1 % roztoku hyaluronanu (250 – 450 kDa)



Obrázek 30: Porovnání hodnot viskozit 0,5 % roztoku hyaluronanu (250 – 450 kDa)

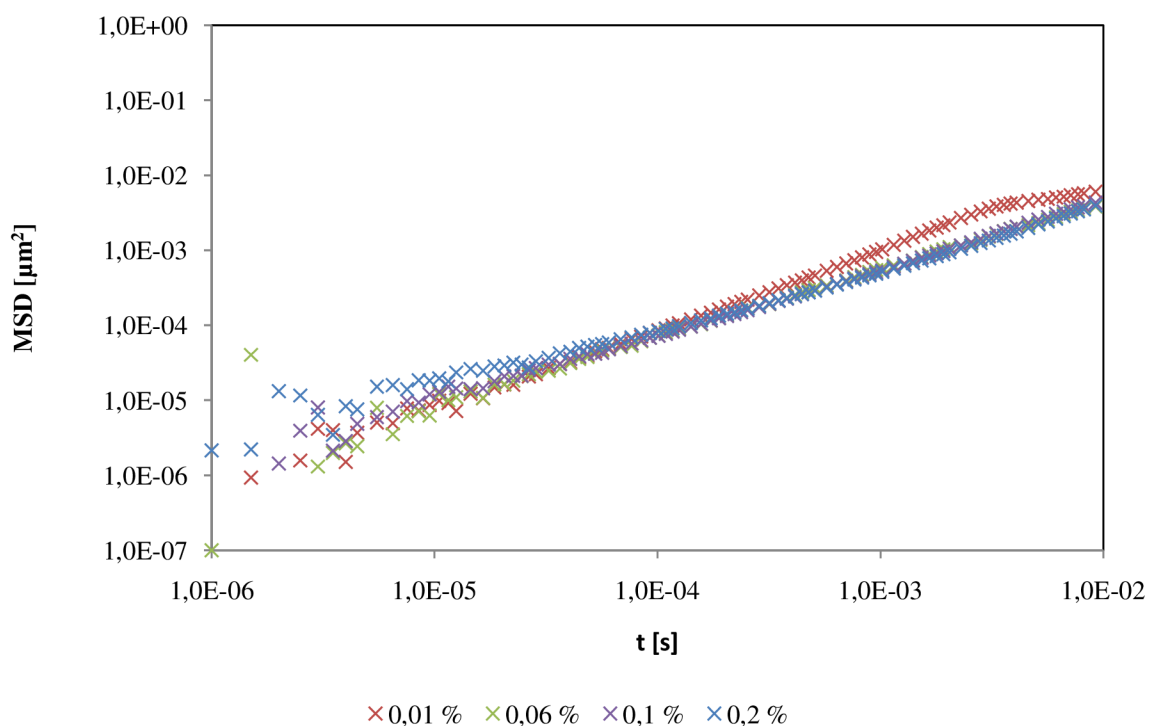


Obrázek 31: Porovnání hodnot viskozit 1 % roztoku hyaluronanu (250 – 450 kDa)

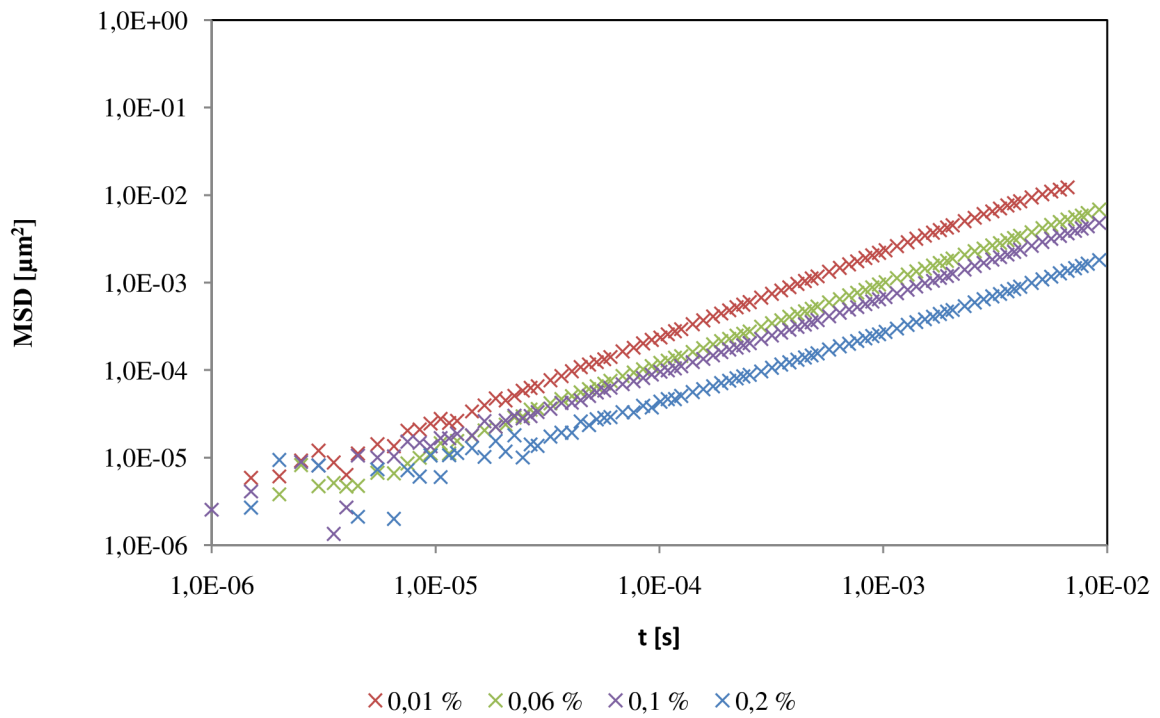
Na obrázcích 28 až 31 jsou zobrazeny hodnoty viskozit získané metodami DLS a VPT a porovnány s hodnotami naměřenými na reometru, číselné hodnoty jsou pak uvedeny v tabulce 5 v příloze 1. Ve většině případů se hodnotám z klasické reologie více blíží výsledky metody VPT. Jak už bylo psáno výše, metoda DLS měří spolehlivě pouze po určitou hodnotu viskozity a porovnáním tabulek 1 a 3 lze zjistit, že 0,5 % a 1 % roztoky hyaluronanu mají viskozitu mnohem vyšší. Dokonce už 0,1 % vzorek se pohybuje na hranici spolehlivé měřitelnosti metodou DLS s danými částicemi. Proto jsou přesnější výsledky získány mikrorheologickou metodou VPT. U nižších koncentrací lze pozorovat nižší hodnoty viskozit naměřené s PS-COOH částicemi. Pravděpodobně to koresponduje s tím, co bylo zmíněno výše, že vliv mohou mít odpuzivé síly mezi částicemi a řetězcí polymeru. U 0,01 % vzorku je viskozita srovnatelná u PS a SiO₂-NH₂ částic. U dalších koncentrací je však hodnota získaná s SiO₂-NH₂ částicemi trochu vyšší, měření pravděpodobně ovlivňují interakce částic s polymerem nebo tvorba shluků, ale pro spolehlivější vysvětlení by bylo vhodné provést další experimenty. Na obrázku 32 je vidět, že 1 % vzorek už se pohybuje za hranicí měřitelnosti obou mikrorheologických metod při použití daných částic. Stejně jako v případě glycerolu, by bylo vhodné pro další měření použít menší částice pro koncentrovanější roztoky.

6.3 Chitosanová řada

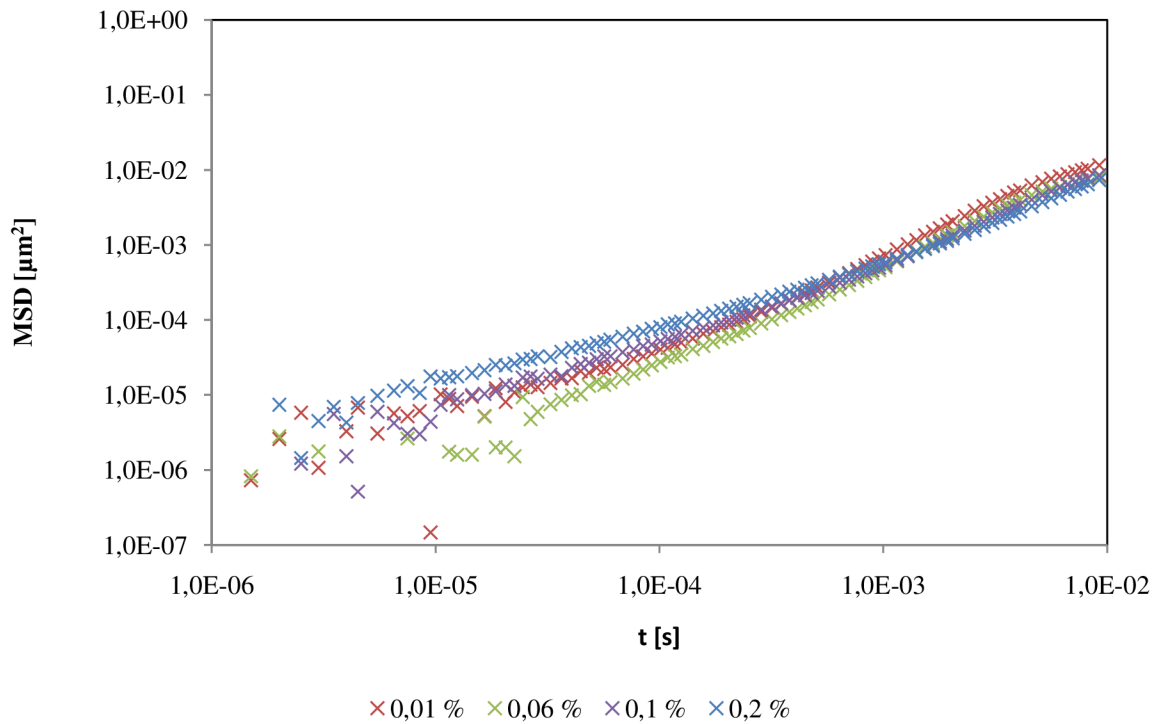
Byly změřeny hodnoty viskozit koncentrační řady nízkomolekulárního chitosanu metodami DLS, VPT a klasickou reologií. Metodou DLS byly měřeny závislosti MSD na čase a získány relativní viskozity, které byly následně přepočítány na hodnoty dynamických viskozit. Byla připravena řada o hmotnostních koncentracích 0,01 %; 0,06 %; 0,1 % a 0,2 % v 1% kyselině octové. Byly použity stejné částice jako v případě hyaluronanu. Každý vzorek byl změřen třikrát, z výsledků byly získány průměrné hodnoty a u viskozit i chybové úsečky. Měření na reometru proběhlo z časových důvodů jednou.



Obrázek 32: Závislost MSD na čase pro koncentrační řadu chitosanu (nízkomolekulární) s PS částicemi ($1 \mu\text{m}$)

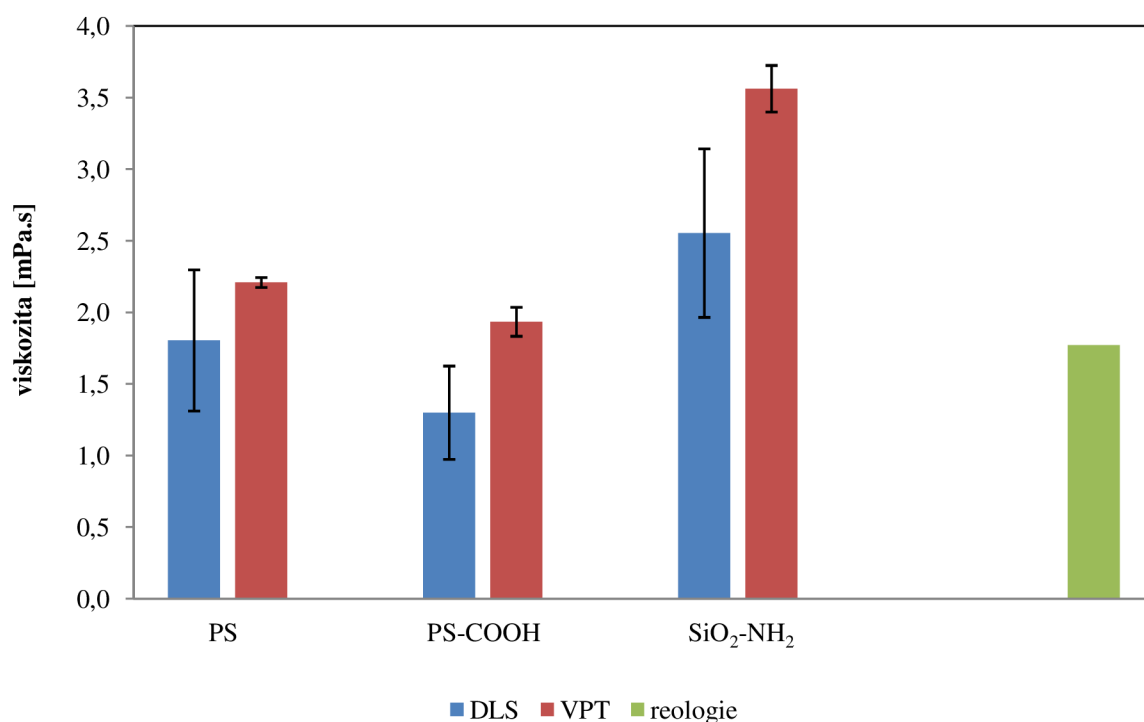


Obrázek 33: Závislost MSD na čase pro koncentrační řadu chitosanu (nízkomolekulární) s PS-COOH částicemi ($0,816 \mu\text{m}$)

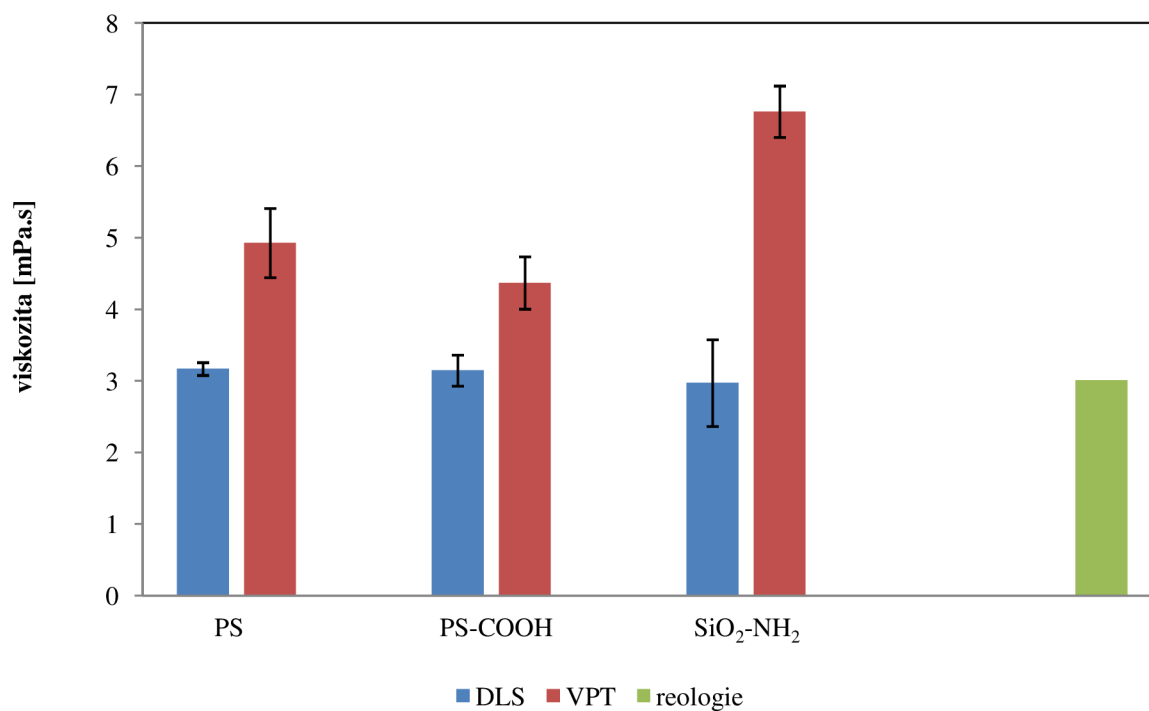


Obrázek 34: Závislost MSD na čase pro koncentrační řadu chitosanu (nízkomolekulární) s SiO₂-NH₂ částicemi ($1,16 \mu\text{m}$)

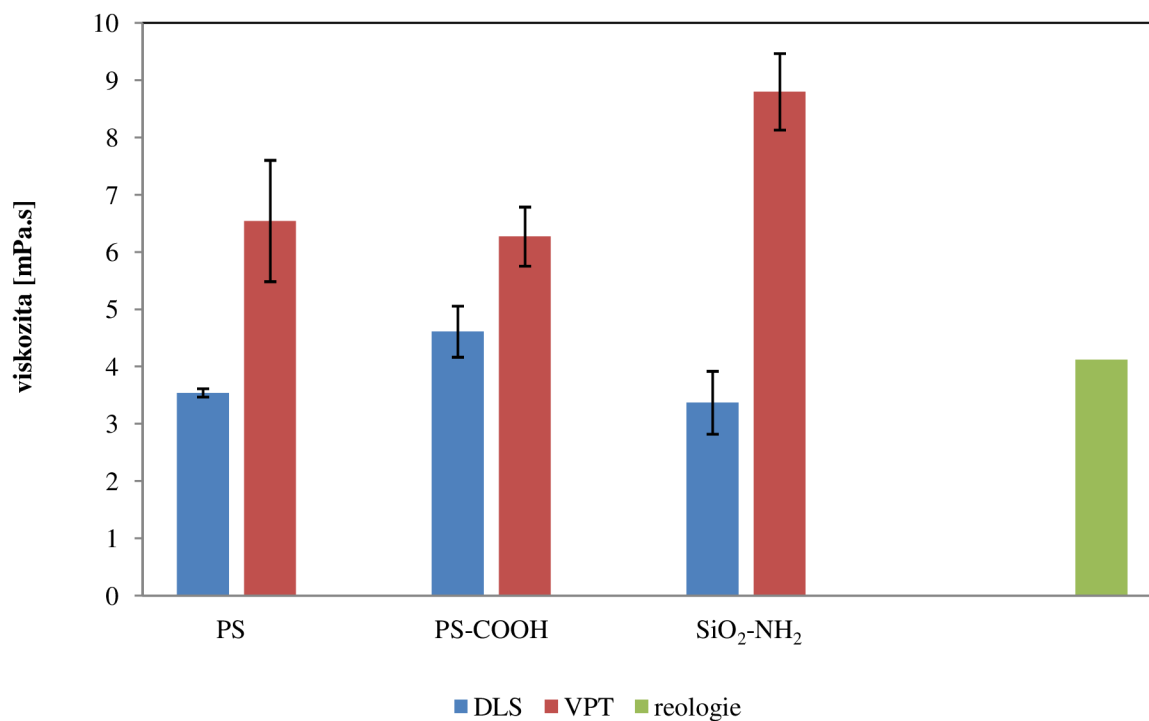
Na obrázcích 32 až 34 jsou zobrazeny závislosti MSD na čase koncentrační řady chitosanu s jednotlivými částicemi. Lze pozorovat velmi podobné výsledky získané s PS a SiO₂-NH₂ částicemi. U PS-COOH částic je lineární závislost s klesajícím trendem pro rostoucí koncentraci chitosanu v 1% kyselině octové. V případě chitosanu byla u nejvyšší zvolené hmotnostní koncentrace (0,2 %) naměřena na reometru viskozita 5,82 mPa.s, nebyla tedy překročena hranice spolehlivé měřitelnosti metody DLS, jako tomu bylo u vyšších koncentrací glycerolu a hyaluronanu. I když lze předpokládat, že viskozita měřená s SiO₂-NH₂ částicemi už se této hranici blíží. Pro tento případ už by pravděpodobně bylo vhodné zvolit menší částice.



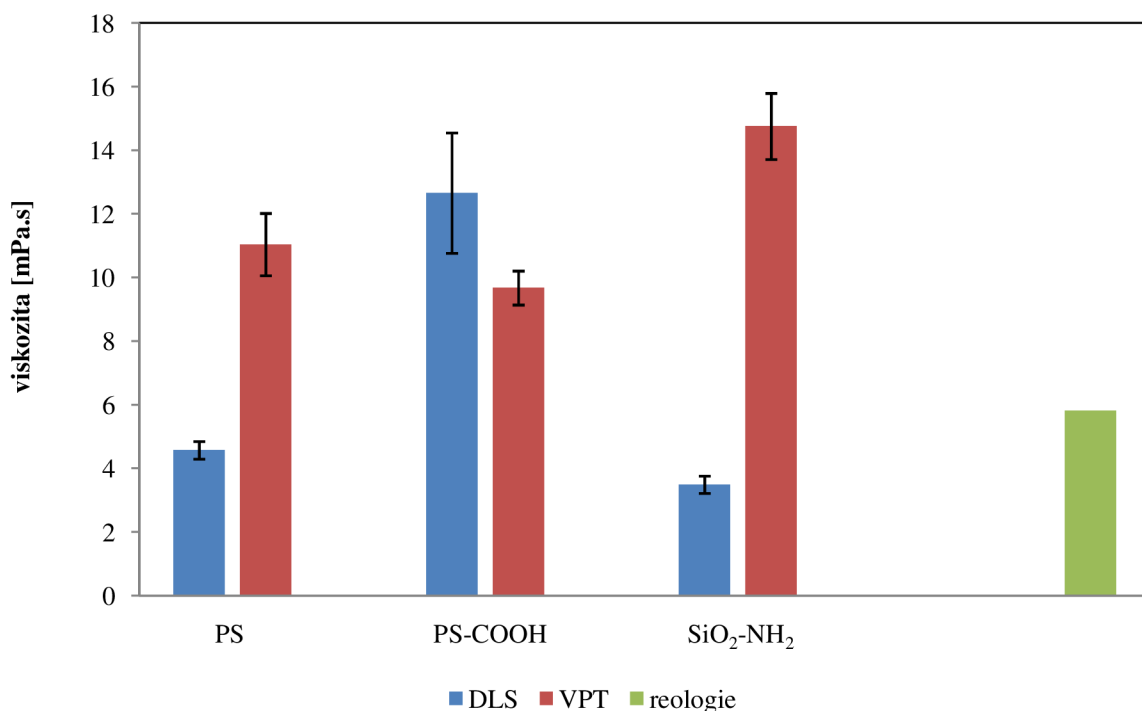
Obrázek 35: Porovnání hodnot viskozit 0,01 % roztoku chitosanu (nízkomolekulární)



Obrázek 36: Porovnání hodnot viskozit 0,06 % roztoku chitosanu (nízkomolekulární)



Obrázek 37: Porovnání hodnot viskozit 0,1 % roztoku chitosanu (nízkomolekulární)



Obrázek 38: Porovnání hodnot viskozit 0,2 % roztoku chitosanu (nízkomolekulární)

Na obrázcích 35 až 38 jsou zobrazeny hodnoty viskozit naměřené metodami DLS, VPT a klasickou reologií. Číselné hodnoty jsou pak uvedeny v tabulce 6 v příloze 1. Při porovnání mikreologických metod s klasickou reologií je patrné, že ve většině případů byly přesnější výsledky získané metodou DLS. Je to pravděpodobně dáno tím, že tato metoda bere v úvahu mnohem větší počet částic než je tomu u VPT. Vyšší hodnota u metody DLS s použitím PS-COOH částic u 0,2 % vzorku může být ovlivněna tím, že se u této koncentrace nejspíš začínají projevovat interakce částic s polymerem. Viskozity měřené pomocí VPT s PS a PS-COOH částicemi se většinou od sebe příliš neliší, oproti hodnotě z klasické reologie jsou většinou trochu vyšší. U těchto částic mohou být výsledky zkresleny tvorbou shluků, které byly pozorovány pod mikroskopem při pořizování videí pro vyhodnocení. Viskozity získané z experimentů s SiO₂-NH₂ částicemi pomocí VPT jsou výrazněji vyšší oproti ostatním. Na videích bylo možné pozorovat sedimentaci částic ke dnu přihrádky ze sklíček, do které byl vzorek pipetován. Během nahrávání videí je kamera zaměřena na určitou vrstvu vzorku, unikáním částic z této vrstvy se snižuje počet částic pro vyhodnocení, až jich může zůstat příliš málo pro kvalitní vyhodnocení. Pokud by sedimentace částic měla ovlivnit viskozitu měřenou pomocí DLS, byly by výsledné hodnoty nižší oproti reologickým, z grafů je však patrné, že tomu tak není. Byla spočítána dráha, o kterou částice za dobrou měření (přibližně 0,02 s) klesnou, a ta je v porovnání s velikostí částic velmi krátká. Pro další experimenty metodou VPT by bylo vhodné použít částice z jiného materiálu.

7 Závěr

Jedním z cílů této diplomové práce byla rešerše v oblasti pasivní mikreologie se zaměřením na částice použité pro experimenty. Dále bylo třeba zvolit příslušné metody pro studium interakcí mezi nabitými částicemi a polyelektrolyty. Výsledky pro jednotlivé částice pak měly být porovnány. Hlavní cíle této diplomové práce byly splněny. Z literární rešerše vyplývá, že mikreologické metody jsou často srovnávány s jinými metodami, převážně s klasickou reologií, pokud je k dispozici dostatečné množství vzorku. Stejná strategie byla použita i v této diplomové práci, kdy výsledky mikreologických metod (DLS a VPT) byly porovnány s klasickou reologií. V experimentální části byl použit glycerol jako modelový systém, hyaluronan jako záporně nabitý polymer a chitosan jako kladně nabitý polymer. U glycerolu byly zvoleny hmotnostní koncentrace 10 %, 20 %, 40 %, 60 % a 80 %. U hyaluronanu byly hmotnostní koncentrace 0,01 %; 0,1 %; 0,5 % a 1 %. U chitosanu byla použita koncentrační řada o hmotnostních koncentracích 0,01 %; 0,06 %; 0,1 % a 0,2 %. Částice použité mikreologickými metodami měly neutrální povrch (PS částice), záporně nabitý povrch (PS-COOH částice) a kladně nabitý povrch ($\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ částice). Výsledky obou mikreologických metod byly porovnány navzájem a také s hodnotami měřenými klasickou reologií. Výsledné hodnoty viskozit roztoků glycerolu byly navíc porovnány s tabelovanými hodnotami.

V grafech se závislostmi MSD na čase lze ve většině případů pozorovat lineární závislost s klesajícím trendem pro rostoucí koncentrace. Byly provedeny výpočty pomocí Stokes-Einsteinovy rovnice pro získání teoretických maximálních hodnot viskozit spolehlivě měřitelných metodou DLS se zvolenými částicemi. U glycerolu bylo zjištěno, že viskozita 80 % roztoku je mnohem vyšší. Vzorek o hmotnostní koncentraci 60 % se pohybuje na hranici spolehlivé měřitelnosti s částicemi o velikosti kolem 1 μm , což se projevilo změnou tvaru MSD křivky v grafech. Porovnáním mikreologických metod s klasickou reologií lze pozorovat, že se více shodují viskozity měřené metodou DLS. Je to pravděpodobně dáno tím, že DLS vyhodnocuje pohyb částic ve 3-D, což umožňuje přesnější měření, zatímco u VPT jsou částice sledovány ve 2-D. Také pro metodu VPT je 80 % roztok glycerolu příliš viskózní a nelze získat kvalitní trajektorie částic pro vyhodnocení.

U hyaluronanu bylo zjištěno, že 0,5% a 1% roztoky jsou daleko za hranicí spolehlivé měřitelnosti metody DLS s použitými částicemi a vzorek o hmotnostní koncentraci 0,1 % se pohybuje na hraně, proto lze v grafech pozorovat změnu tvaru MSD křivky. Navíc je vidět jiný sklon závislosti MSD na čase u 0,1 % vzorku s $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ částicemi, což může být způsobeno interakcemi částic s polymerem. Z mikreologických metod se s klasickou reologií více shodují výsledky VPT, protože u DLS byla u většiny roztoků překročena hranice měřitelnosti s danými částicemi. Viskozity měřené s PS a PS-COOH částicemi jsou velmi podobné, s $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ částicemi jsou o něco vyšší, tyto výsledky mohly být ovlivněny tvorbou shluků částic. Pro experimenty s hyaluronanem by tedy pravděpodobně bylo vhodné použít částice s neutrálním nebo záporně nabitým povrchem, protože u těchto částic shluky pozorovány nebyly.

V případě chitosanu nebyly viskozity zvolených koncentrací nad hranicí měřitelnosti metody DLS s použitými částicemi. U závislostí MSD na čase byly pozorovány podobné výsledky u PS a SiO₂-NH₂ částic. Porovnáním mikrereologických metod lze zjistit, že více se shodují výsledné viskozity získané metodou DLS s klasickou reologií. Je to pravděpodobně dáno tím, že DLS počítá s mnohem větším množstvím částic než VPT. Viskozita měřená s SiO₂-NH₂ částicemi metodou VPT je vždy vyšší než u ostatních částic. Na videích byl pozorován pokles částic ke dnu přihrádky, čímž se snižoval počet částic pro vyhodnocení a mohlo tak dojít k ovlivnění výsledků. Na videích s PS a hlavně s PS-COOH částicemi zase byly pozorovány shluky částic, které také mohly ovlivnit výslednou viskozitu. Pro další studium chitosanu mikrereologickými metodami by pravděpodobně bylo vhodné použít částice s neutrálním nebo kladně nabitým povrchem a pro metodu VPT zvolit kladně nabitě částice z jiného materiálu.

Mikrereologické metody jsou použitelné pro studium reologických vlastností biopolymerů, je však potřeba zvolit vhodnou velikost částic pro dané koncentrace zkoumaných vzorků. Z porovnání použitých mikrereologických metod lze usuzovat, že v případě, kdy nedojde k překročení hranice spolehlivé měřitelnosti metody DLS, jsou tyto výsledky přesnější oproti VPT, protože se zde vyhodnocuje pohyb většího počtu částic. Pro metodu VPT je dobré zvolit takové částice, které netvoří ve vzorku shluky nebo neklesají ke dnu, protože tyto jevy negativně ovlivní změřenou hodnotu viskozity. Pro další studium by bylo vhodné použít částice s povrchovým nábojem o různých velikostech a také metodu dvoučásticové mikrereologie, u které by byly eliminovány případné interakce částic s polymerem.

8 Seznam použitých zdrojů

- [1] DICKER, Kevin T., et al. Hyaluronan: a simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta biomaterialia*, 2014, 10.4: 1558-1570.
- [2] LAURENT, Torvard C.; FRASER, J. R. Hyaluronan. *The FASEB Journal*, 1992, 6.7: 2397-2404.
- [3] LAPČÍK, Lubomír, et al. Hyaluronan: preparation, structure, properties, and applications. *Chemical reviews*, 1998, 98.8: 2663-2684.
- [4] NECAS, J., et al. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinarni medicina*, 2008, 53.8: 397-411.
- [5] BULPITT, Paul; AESCHLIMANN, Daniel. New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels. *Journal of biomedical materials research*, 1999, 47.2: 152-169.
- [6] Postižení kloubní chrupavky u osteoartrózy. *EDUKAFARM* [online]. 2003 [cit. 2015-11-10]. Dostupné z: <http://www.edukafarm.cz/>
- [7] ATKINS, E. D. T.; SHEEHAN, J. K. Structure for hyaluronic acid. *Nature*, 1972, 235.60: 253-254.
- [8] RINAUDO, Marguerite. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in polymer science*, 2006, 31.7: 603-632.
- [9] VAVŘÍKOVÁ, EVA; VINŠOVÁ, JARMILA. Chitosan a jeho farmaceutické aplikace. *Chem. listy*, 2009, 103: 56-65.
- [10] *Introduction to Rheology: Basics* [online]. [cit. 2015-11-19]. Dostupné z: <http://www.dongjins.com/>
- [11] BARNES, Howard A.; HUTTON, John Fletcher; WALTERS, Kenneth. *An introduction to rheology*. Elsevier, 1989.
- [12] Mechanika hornin, Reologie [online], [cit. 2015-01-20]. Dostupné z: <http://departments.fsv.cvut.cz/>
- [13] BARNES, Howard A. *A handbook of elementary rheology*. 2000.
- [14] JANALÍK, Jaroslav. Viskozita tekutin a její měření. *Ostrava: Vysoká škola Báňská–Technická univerzita Ostrava*, 2010.
- [15] MANSEL, Bradley William. Setup and calibration of a suite of state-of-the-art microrheology techniques: a thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of Science in Physics at Massey University, Palmerston North, New Zealand. 2011. PhD Thesis.
- [16] HOLUBOVÁ, Renata. *Základy reologie a reometrie kapalin*. Univerzita Palackého v Olomouci, 2014.
- [17] Rheology and Viscosity: Rheometers for measuring viscosity and viscoelasticity - from formulation to product use. *Malvern* [online]. [cit. 2015-11-23]. Dostupné z: <http://www.malvern.com/>
- [18] MEISSNER, Bohumil a ZILVAR, Fyzika polymerů: Struktura a vlastnosti polymerních materiálů. Praha: SNTL, 1987. ISBN 8732198530.

- [19] Bartovská Lidmila, Šišková Marie: Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav [online]. Version 1.0. Praha: VŠCHT Praha, 2005 [cit. 2015-11-24]. Dostupné z: <http://147.33.74.135/knihy/>
- [20] Brownian motion. *Encyclopaedia Britannica* [online]. [cit. 2015-11-30]. Dostupné z: <http://www.britannica.com/science/Brownian-motion>
- [21] Brownian motions. *Clarkson University: Fluid Mechanics of Aerosols* [online]. 2005 [cit. 2015-11-30]. Dostupné z: <http://web2.clarkson.edu/projects/>
- [22] CICUTA, Pietro a Athene M. DONALD. Microrheology: a review of the method and applications. *Soft Matter*. 2007, vol. 3, issue 12, s. 1449-1455. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=b706004c>
- [23] Dasgupta BR. Microrheology and Dynamic Light Scattering Studies of Polymer Solutions. PhD Thesis; Harvard University, Cambridge, Massachusetts, 2004.
- [24] GARDEL, Margaret L.; VALENTINE, Megan T.; WEITZ, David A. Microrheology. In: *Microscale diagnostic techniques. Springer Berlin Heidelberg*, 2005. p. 1-49.
- [25] ŠEVČÍKOVÁ, Petra, et al. Dynamický rozptyl světla v analýze koloidních systémů. *Chemické listy*, 2014.
- [26] W., Bradley, Stephen KEEN, Philipus J., Yacine HEMAR a Martin A.K. A Practical Review of Microrheological Techniques. *Rheology - New Concepts, Applications and Methods* [online]. InTech, 2013-02-13 [cit. 2015-03-11]. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/rheology-new-concepts-applications-and-methods/a-practical-review-of-microrheological-techniques>
- [27] Microrheology: a new domain of Rheology. *Formulation: Smart scientific analysis* [online]. [cit. 2015-12-02]. Dostupné z: <http://www.formulation.com/microrheology-viscoelasticity.html>
- [28] Dynamic Light Scattering - Understanding the Basics. *AZO NANO* [online]. 2013 [cit. 2016-02-10]. Dostupné z: <http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=3662>
- [29] Droplet formation: Diffuse Wave Spectroscopy. *University of Cambridge: Department of Chemical Engineering and Biotechnology* [online]. [cit. 2016-02-16]. Dostupné z: <http://www.ceb.cam.ac.uk/research/>
- [30] Crocker JC, Valentine MT, Weeks ER, Gisler T, Kaplan PD, Yodh AG, Weitz DA. Two-point microrheology of inhomogeneous soft materials. *Physical Review Letters* 2000; 85.
- [31] MUKHOPADHYAY, Ashis; GRANICK, Steve. Micro-and nanorheology. *Current opinion in colloid & interface science*, 2001, 6.5: 423-429.
- [32] Levine AJ, Lubensky TC. Two-point microrheology and the electrostatic analogy. *Physical Review E* 2002; 65.
- [33] HUANG, Chih-Hsing, et al. Probing conformational transitions of polymer chains by microrheology. *Polymer*, 2014, 55.14: 3168-3177.
- [34] MOSCHAKIS, Thomas; LAZARIDOU, Athina; BILIADERIS, Costas G. Using particle tracking to probe the local dynamics of barley β -glucan solutions upon gelation. *Journal of colloid and interface science*, 2012, 375.1: 50-59.

- [35] MOSCHAKIS, Thomas; MURRAY, Brent S.; DICKINSON, Eric. On the kinetics of acid sodium caseinate gelation using particle tracking to probe the microrheology. *Journal of colloid and interface science*, 2010, 345.2: 278-285.
- [36] XU, Qingguo, et al. Nanoparticle diffusion in, and microrheology of, the bovine vitreous ex vivo. *Journal of Controlled Release*, 2013, 167.1: 76-84.
- [37] CHEVRY, Loudjy, et al. Intracellular micro-rheology probed by micron-sized wires. *Biomaterials*, 2013, 34.27: 6299-6305.
- [38] BANSIL, Rama, et al. microrheology of mucin: Tracking Particles and Helicobacter Pylori Bacteria.
- [39] COHEN, Itai; WEIHS, Daphne. Rheology and microrheology of natural and reduced-calorie Israeli honeys as a model for high-viscosity Newtonian liquids. *Journal of food engineering*, 2010, 100.2: 366-371.
- [40] HRADECKÁ, L. Vliv vlastností částic na mikrorheologické měření biopolymerních roztoků. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 34 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Zuzana Hnylučová.
- [41] Centrum materiálového výzkumu, [online], [cit. 10. 3. 2016]. Dostupné z: <http://www.materials-research.eu/cz/laboratore/laborator-biokoloidu/>
- [42] Zetasizer Nano ZS. Malvern [online]. [cit. 2016-04-06]. Dostupné z: <http://www.malvern.com/en/products/>

9 Seznam použitých zkratk

VPT	video particle tracking
TPM	two point microrheology
DWS	diffusive wave spectroscopy
DLS	dynamic light scattering
ATM	atomic force microscopy
MSD	mean squared displacement
FCS	fluorexcenční korelační spektrometrie
P2VP	poly-2-vinylpyridin
SAXS	maloúhlový rozptyl rentgenového záření
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
PS-COOH	polystyrenové částice s karboxylovými skupinami
PS-NH ₂	polystyrenové částice s aminovými skupinami
PS-PEG	polystyrenové částice potažené poly(ethylenglykolem)
PGM	porcine gastric mucin
PS	polystyrenové částice
SiO ₂ -NH ₂	částice z oxidu křemičitého s aminovými skupinami
IDL	interactive data language

10 Seznam příloh

Příloha 1 Tabulky s hodnotami viskozit pro glycerol a biopolymery

11 Přílohy

Příloha 1

Tabulka 4: Naměřené a tabelované hodnoty viskozit koncentrační řady glycerolu

Viskozita [mPa.s]	Hmotnostní procenta glycerolu ve vodě				
	10 %	20 %	40 %	60 %	80 %
Tabelované hodnoty	1,31	1,77	3,75	10,96	62
Reologie [40]	1,63	2,47	4,5	12,4	61,71
DLS:					
PS částice	1,29 ± 0,13	2,33 ± 0,39	8,47 ± 0,43	11,56 ± 0,18	50,59 ± 2,51
PS-COOH částice	1,17 ± 0,13	1,59 ± 0,05	3,24 ± 0,05	8,99 ± 0,41	33,33 ± 3,71
SiO ₂ -NH ₂ částice	3,86 ± 0,49	3,25 ± 0,63	5,58 ± 0,57	9,78 ± 1,41	13,10 ± 3,47
VPT:					
PS částice	2,70 ± 0,16	3,94 ± 0,29	8,60 ± 0,85	26,02 ± 4,47	94,71 ± 7,05
PS-COOH částice	1,98 ± 0,08	2,84 ± 0,11	6,99 ± 0,68	21,31 ± 0,37	96,07 ± 10,99
SiO ₂ -NH ₂ částice	3,94 ± 0,08	5,08 ± 1,08	14,18 ± 1,45	36,47 ± 1,02	162,36 ± 3,76

Tabulka 5: Naměřené hodnoty viskozit koncentrační řady hyaluronanu

Viskozita [mPa.s]	Hmotnostní procenta hyaluronanu ve vodě			
	0,01 %	0,1 %	0,5 %	1 %
Reologie [40]	3,43	12,80	60,47	251,60
DLS:				
PS částice	1,46 ± 0,38	6,77 ± 1,49	20,85 ± 1,47	69,95 ± 3,09
PS-COOH částice	1,30 ± 0,07	6,00 ± 0,27	22,03 ± 0,80	49,73 ± 0,25
SiO ₂ -NH ₂ částice	2,57 ± 0,85	13,19 ± 2,59	40,14 ± 3,02	96,71 ± 12,16
VPT:				
PS částice	3,08 ± 0,20	12,54 ± 1,30	51,09 ± 5,48	113,97 ± 2,56
PS-COOH částice	2,46 ± 0,18	9,97 ± 0,14	48,25 ± 8,37	130,63 ± 4,75
SiO ₂ -NH ₂ částice	3,11 ± 0,08	15,29 ± 1,18	77,89 ± 4,04	137,62 ± 5,41

Tabulka 6: Naměřené hodnoty viskozit koncentrační řady chitosanu

Viskozita [mPa.s]	Hmotnostní procenta chitosanu v 1% kyselině octové			
	0,01 %	0,06 %	0,1 %	0,2 %
Reologie	1,77	3,01	4,12	5,82
DLS:				
PS částice	1,80 ± 0,49	3,17 ± 0,09	3,54 ± 0,07	4,58 ± 0,28
PS-COOH částice	1,30 ± 0,33	3,15 ± 0,22	4,61 ± 0,45	12,66 ± 1,89
SiO ₂ -NH ₂ částice	2,55 ± 0,59	2,97 ± 0,61	3,37 ± 0,55	3,49 ± 0,27
VPT:				
PS částice	2,21 ± 0,03	4,93 ± 0,48	6,54 ± 1,06	11,04 ± 0,98
PS-COOH částice	1,93 ± 0,10	4,37 ± 0,36	6,27 ± 0,52	9,68 ± 0,53
SiO ₂ -NH ₂ částice	3,56 ± 0,16	6,76 ± 0,36	8,80 ± 0,67	14,76 ± 1,04