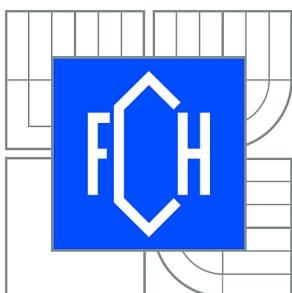




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

MIKROREOLOGIE VE STUDIU BIOPOLYMERNÍCHH KOLOIDŮ

MICRORHEOLOGY IN STUDY OF BIOPOLMER COLLOIDS.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. ZUZANA HNYLUCHOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. FILIP MRAVEC, Ph.D.

BRNO 2012



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0614/2011	Akademický rok: 2011/2012
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Bc. Zuzana Hnylučová	
Studijní program:	Spotřební chemie (N2806)	
Studijní obor:	Spotřební chemie (2806T002)	
Vedoucí práce	Ing. Filip Mravec, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Mikrorheologie ve studiu biopolymerních koloidů

Zadání diplomové práce:

- 1) Literární rešerše na téma mikrorheologie v biokoloidních systémech.
- 2) Návrh experimentů na využití pasivní mikrorheologie spojenou s analýzou obrazu.
- 3) Provedení experimentů s vybranými modelovými systémy a následně se zvolenými biopolymery.
- 4) Zhodnocení využitelnosti mikrorheologie ve studiu biokoloidů.

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2012

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Zuzana Hnylučová
Student(ka)

Ing. Filip Mravec, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 16.1.2012

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Byla zavedena a prověřena nová metoda pro měření viskoelastických materiálů zvaná mikrorheologie. Pro určení správnosti měření byly porovnány výsledky pro tři řady vzorků získané pomocí jednočásticové mikrorheologie, DLS mikrorheologie a klasické reologie. Jako modelový systém byly zvoleny směsi glycerolu o různých viskozitách. V případě glycerolové řady byly výsledky srovnány také s tabelovanými hodnotami. Modelovým biopolymerem byl zvolen hyaluronan o různých molekulových hmotnostech a pro mikrorheologická měření byly použity polystyrenové částice. Bylo zjištěno, že hodnoty viskozit biopolymerních vzorků naměřené jednotlivými metodami jsou až na malé výjimky srovnatelné.

ABSTRACT

A new method for determining the viscoelastic properties of materials was introduced and investigated. Results of three groups of samples obtained using one particle microrheology method, DLS microrheology method and classical rheology method were compared to be sure of correctness of measurements. As a model system were chosen mixtures of glycerol of different viscosities. In case of samples containing glycerol, results were also compared with tabulated values. Hyaluronan of various molecular weights was used as a biopolymer and polystyrene particles were used for microrheology. It was confirmed, that viscosity values of biopolymer samples obtaining by each method are comparable.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mikrorheologie, kyselina hyaluronová, reologie

KEY WORDS

Microrheology, hyaluronic acid, rheology

HNYLUCHOVÁ, Z. *Mikroreologie ve studiu biopolymerních koloidů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 59 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Filip Mravec, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. 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 Ing. Filipu Mravcovi Ph.D. za odborný dohled a Ing. Tereze Halasové za obětavou spolupráci. Rovněž bych také chtěla poděkovat i Centru materiálového výzkumu, projektu OP VaVpI CZ.1.05/2.1.00/01.0012.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1 Kyselina hyaluronová	8
2.1.1 Struktura	8
2.1.2 Výskyt	9
2.2 Reologie.....	9
2.3 Brownův tepelný pohyb.....	13
2.4 Viskoelastické vlastnosti materiálu	14
2.5 Smykový a elastický modul.....	14
2.6 Mikroreologie	15
2.6.1 Jednočásticová mikroreologie	16
2.6.2 Dvoučásticová mikroreologie	18
2.6.3 Dynamic light scattering (DLS)	20
2.6.4 Diffusing wave spectroscopy (DWS).....	24
2.6.5 Mikroskopie atomárních sil (AFM)	25
2.7 Omezení použití mikroreologie	27
3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	27
4. MATERIÁLY A METODY	29
4.1 Materiály.....	29
4.2 Příprava vzorků.....	30
5. MĚŘENÍ A VYHODNOCENÍ DAT	30
5.1 Měření a vyhodnocování pomocí mikroreologie.....	30
5.1.1 Příprava vzorků pro mikroreologické měření.	31
5.1.2 Záznam videa	31

5.1.3	Zpracování videa	32
5.1.4	Analýza obrazu.....	33
5.1.5	Výpočty v MS Excel	34
5.1.6	Výpočet modulů pomocí MrLab	34
5.2	Měření klasickou reologií	35
5.3	Měření pomocí DLS	35
6.	VÝSLEDKY A DISKUZE	36
6.1	Glycerolová řada ve vodě	36
6.2	Řada hyaluronanu o stejné koncentraci s různými molekulovými hmotnostmi.....	42
6.3	Koncentrační řada hyaluronanu (750 kDa)	45
6.4	Využitelnost mikrorologie ve studiu biokoloidů	47
7.	ZÁVĚR.....	48
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	50
9.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	55
10.	SEZNAM PŘÍLOH	56
11.	PŘÍLOHY.....	57

1. ÚVOD

Reologie je interdisciplinární obor rozšířený do mnoha oblastí zahrnujících chemické inženýrství, fyziku, materiálové vědy či chemii. Je to ale také zároveň velmi důležité odvětví mající obrovský průmyslový význam. Opravdu široké rozmezí technologií od barviv k potravinám, přes ropný průmysl až ke zpracování plastů, všechny tyto obory značně závisí na porozumění toku komplexních kapalin. Tradičně jsou viskoelastické vlastnosti materiálů zkoumány pomocí klasického reometru, není to však jediná metoda, kterou je možno použít. Tato měření lze také provést metodou zvanou mikroreologie. Pojmem mikroreologie neoznačujeme pouze jedinou metodu, ale hned několik přístupů, kterými je možno nejen změřit viskoelastické vlastnosti materiálu, jak je tomu u klasické reologie, ale dokonce překonat i mnohá omezení, přes která už nejsme schopni se touto běžnou metodou dostat. Velmi významným přínosem mikroreologie je možnost studia nehomogenních materiálů. Tato výhoda přímo nabízí využití v oblasti buněčných systémů. Množství těchto materiálů pro výzkum je velmi omezeno, což u mikroreologického měření není žádnou překážkou, jelikož je potřeba opravdu jen velmi malé množství vzorku. Mezi nejčastější cíle mikroreologie patří zkoumání buněčného cytoskeletonu či vlastností zdravých i rakovinových buněk, sacharidů, biofilmů, bakterií nebo plicní kapaliny. Metoda je také velmi vyhledávaná k prozkoumání procesu gelace, monitorování průběhu polymerace, pro měření vlastností na mezifázových rozhraních, pro aplikaci v koloidních suspenzích a v mnoha dalších oblastech.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Kyselina hyaluronová

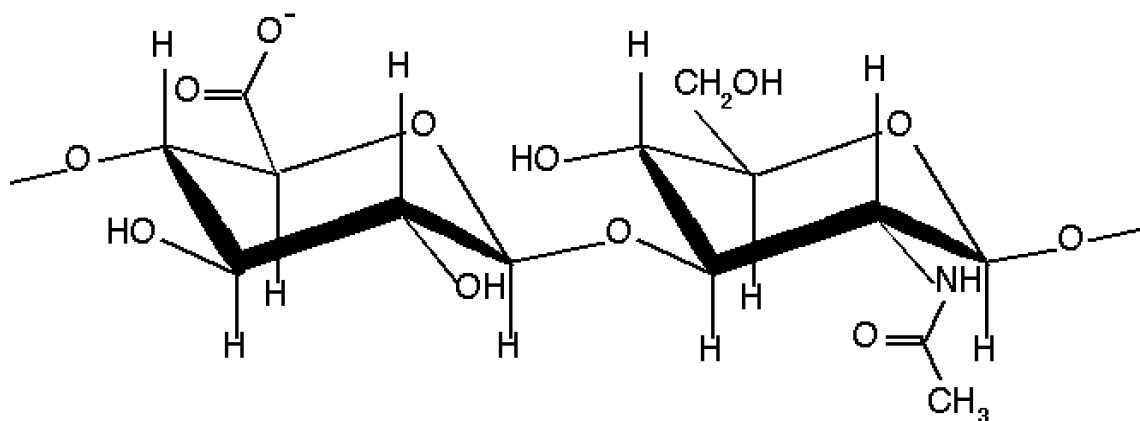
Kyselina hyaluronová - látka poprvé izolovaná v polovině čtyřicátých let devatenáctého století, která se stala jednou z nejzajímavějších a nejpoužívanějších přírodních makromolekul. Tento bílý krystalický prášek našel velké uplatnění v mnoha významných oblastech, a to především v lékařství například ve funkci fyziologického lubrikantu. Další významnou roli hraje v kosmetickém průmyslu při výrobě krémů proti vráskám či ve veterinární medicíně, především pro léčbu kloubních onemocnění.

2.1.1 Struktura

Kyselina hyaluronová patří do malé skupiny mukopolysacharidů. Lineárně - polymerní molekula hyaluronanu je složená ze dvou opakujících se disacharidových podjednotek, kterými jsou kyselina D - glukuronová a N - acetylglukosamin. Tyto části jsou střídavě propojeny β - 1,4 a β - 1,3 glykosidickými vazbami. Glukóza v β konfiguraci, se kterou jsou spojeny oba cukry, dovoluje prostorově objemným skupinám zaujmout stericky výhodnější ekvatoriální polohu. Vodíkové atomy jsou pak umístěny na méně výhodných axiálních pozicích. Struktura disacharidu je tedy energeticky velmi stabilní [1].

Ve fyziologickém roztoku je molekula hyaluronanu zpevněna kombinací chemické struktury disacharidu, vnitřními vodíkovými vazbami a interakcemi s rozpouštědlem. Axiální vodíkové atomy tvoří nepolární hydrofobní část, kdežto odvrácená část řetězce tvoří polárnější hydrofilní část a tímto se vytváří struktura takzvané zakroucené stuhly. Roztoky hyaluronanu jsou mimořádně viskózní.

Při syntéze hyaluronanu hraje podstatnou roli enzym zvaný hyaluronansyntáza. Počet disacharidových jednotek v konečném řetězci hyaluronanu může dosáhnout i 10 000 těchto jednotek. Relativní molekulová hmotnost se pak pohybuje okolo 4 milionů. Průměrná délka disacharidu je přibližně 1 nm.



Obrázek 1: Základní strukturní jednotka molekuly hyaluronanu [2]

2.1.2 Výskyt

Hyaluronan je látka vyskytující se ve všech živých organismech. V lidském těle se nejčastěji objevuje ve formě hyaluronátu sodného či draselného. Tato látka je jednou z komponent mimobuněčné matrix. Ve vysokých koncentracích ji můžeme nalézt také v kloubní chrupavce, kde snižuje tření a tlumí nárazy. Velké množství je přítomno i v pojivových tkáních. Dále se vyskytuje v pupeční šňůře, v očním sklivci, v plicích, ledvinách, mozku a svalové tkáni. Hyaluronan je jednou z hlavních složek kůže a plní svou funkci hlavně při obnově poškozených tkání. Při nadměrném vystavení pokožky UVB záření dochází k jejímu zarudnutí a buňky v povrchové vrstvě přestávají produkovat hyaluronan. Bez přítomnosti této látky dochází k mnohem rychlejšímu stárnutí a poškození kůže. Hyaluronan přispívá k migraci buněk a účastní se řady interakcí na buněčném povrchu. Průměrný sedmdesátikilový muž má zhruba 15 g hyaluronanu v těle. Jedna třetina tohoto množství je přeměňována každý den [3].

2.2 Reologie

Pojem reologie má původ ve dvou řeckých slovech, z nichž „rheo“ znamená téci a „logos“ studovat. Z překladu pak vyplývá, že se reologie zabývá studiem toku hmoty nebo kapaliny, tedy pojednává o pohybu kapalin a přetváření hmot. Jedním z hlavních úkolů tohoto odvětví je nalezení vztahů mezi napětím, deformací a rychlostí deformace pro jednotlivé druhy látek. Základní stavební kameny reologie tvoří teorie velkých deformací a teorie viskoelastivity. Reologické chování tekutých materiálů hraje důležitou roli v řadě technologických operací, a tedy znalost základních reologických veličin, viskozity, meze toku a modulů pružnosti je potřebná nejen k charakterizování surovin nebo eventuálně produktů, ale i k řešení mnoha

technických úloh. Matematickým vyjádřením tokových vlastností kapalin jsou reologické stavové rovnice, které zpravidla vyjadřují vztah mezi deformačním smykovým (tečným, vazkým) napětím t a deformací kapaliny. Graficky mohou být tyto deformace popisovány tokovými křivkami [4].

Látky jsou z reologického hlediska rozděleny do šesti základních skupin:

1. Tuhá látka (Euklidova hmota)

Tuhá látka (označovaná TU) se nepřetváří ani při namáhání libovolně velkými silami, její modul přetvoření je nekonečně velký, zůstává stále dokonale tuhá a používá se hlavně při popisu pohybu hmotných těles.

2. Tekutá kapalina (Pascalova kapalina)

Tekutá kapalina (označovaná TE) neklade žádný odpor pohybu při jakýchkoli rychlostech a nevznikají v ní žádná napětí a její vazkost je nulová. Používá se při popisu proudění a v úlohách hydrodynamiky.

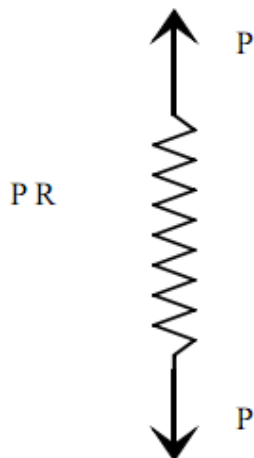
3. Pružná látka (Hookova hmota)

Pružná látka (označovaná PR) má při přetváření napětí vždy přímkově úměrné přetvoření a chová se tedy podle Hookova zákona:

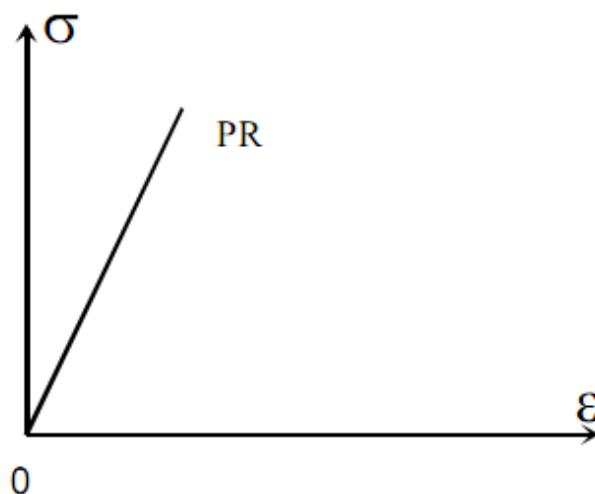
$$\sigma = E \cdot \varepsilon \quad (1)$$

$$\tau = G \cdot \gamma \quad (2)$$

kde σ je normálové napětí, E modul pružnosti v tahu, ε je přetvoření, τ tangenciální napětí, G modul pružnosti ve smyku a γ je poměrné zkosení. Pružná hmota se po odlehčení vrací do svého původního stavu a její přetváření je nezávislé na předchozím namáhání.



Obr. 2: Reologický model pružné látky [6]



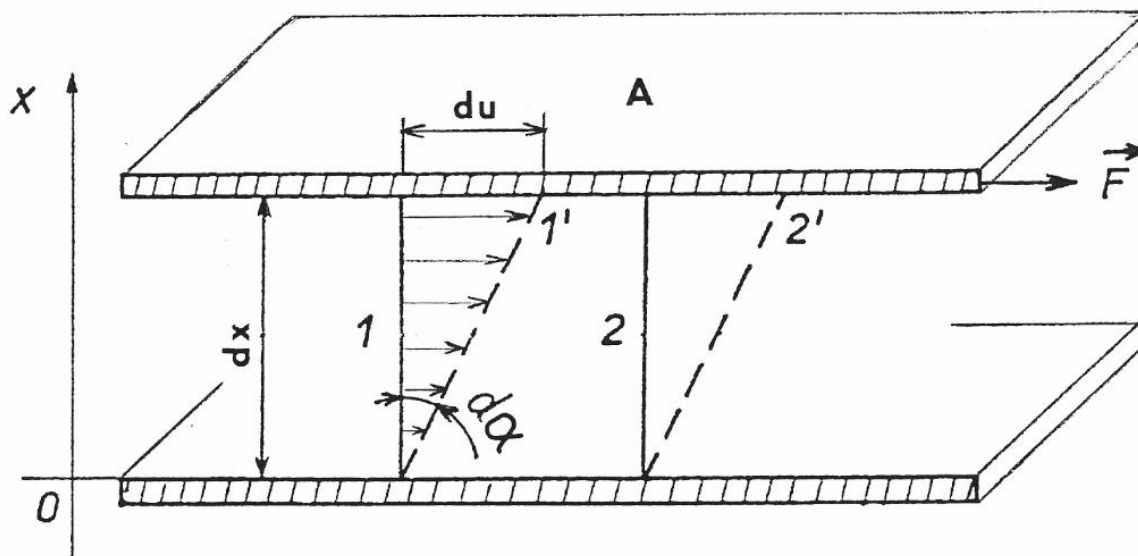
Obr. 3: Pracovní diagram pružné látky [6]

4. Vazká kapalina (Newtonova kapalina)

V případě ideálně viskózního materiálu platí pro tečné napětí klasický Newtonův zákon:

$$\tau = \eta \frac{du}{dx} = \eta \cdot D \quad (3)$$

kde součinitel η je dynamická viskozita charakterizující vnitřní tření newtonské kapaliny, du je vzájemná rychlost pohybu smykových rovin vzdálených o dx a D je takzvaný gradient rychlosti, který charakterizuje tvarové změny v proudící tekutině.



Obr. 4: Rychlostní profil toku v kapalině mezi nepohyblivou a pohybující se deskou [6]

Dynamická viskozita je látkovou charakteristikou, jejíž hodnota závisí na teplotě a tlaku. U plynů s teplotou roste, u kapalin naopak klesá. V soustavě SI je jednotkou pascal sekunda [$\text{Pa}\cdot\text{s} = \text{kg}/\text{m}\cdot\text{s}$].

5. Tvárná látka (St. Venantova látka)

Tvárná látka, označována TV, se někdy nazývá plastickou. Je pouze abstrakcí a ve skutečnosti nikdy neexistuje samostatně, ale jen ve spojení s jinými látkami (nejčastěji s látkou pružnou). Tvárná látka se do meze plasticity chová jako látka tuhá a po překročení této meze jako látka tekutá. Tření v klidu je větší než za pohybu (pokles napětí při uvedení do pohybu, pak je napětí již konstantní).

6. Vláčná látka

Když vláčná látka (označována VL) dosáhne meze vláčnosti, má závislost mezi napětím a rychlostí přetváření stejnou jako vazká kapalina (VA):

$$\sigma = \sigma_{vl} + \lambda \frac{d\varepsilon}{dt} \quad (4)$$

$$\tau = \tau_{vl} + \eta \frac{d\tau}{dt} \quad (5)$$

kde σ je normálové napětí, σ_{vl} mezní normálové napětí tvárného prvku, λ součinitel normální vazkosti, ε přetvoření, τ tangenciální napětí, τ_{vl} mezní tangenciální napětí tvárného prvku,

η součinitel tangenciální vazkosti, γ poměrné zkosení a t je čas. Vláčná látka má vystihnout projevy vláčnosti jako jsou dotváření (plouživost) a relaxace (ochabování). Reologické vlastnosti vláčné látky vyjadřuje vztah paralelního spojení tvárného a vazkého prvku:

$$VL = \frac{TV}{VA} \quad (6)$$

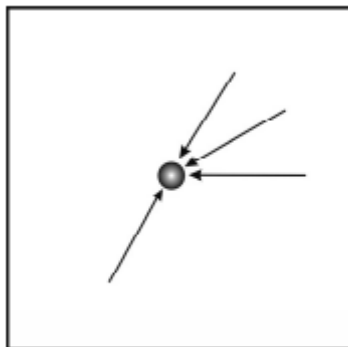
Reologickým modelem vláčné hmoty je válec s pístem naplněným sypkou hmotou. Vláčná hmota se od vazké kapaliny liší tím, že je schopna při nulové rychlosti mít určité napětí.

Mnohdy však jsou tyto základní skupiny reologických modelu nedostatečné a je nutno využít kombinované modely složené z výše uvedených základních typů [4, 5, 6].

2.3 Brownův tepelný pohyb

Tento pohyb byl poprvé zaznamenán v roce 1827 biologem Robertem Brownem při pozorování pylových zrnků ve vodě. Aby vyloučil možnost, že pohyb je projevem případného života, opakoval experiment s částicemi prachu. Podstatu tohoto jevu objasnil v roce 1905 Albert Einstein, vycházející z kinetické teorie látek [7].

Brownův pohyb popisuje náhodný pohyb mikroskopických částic v kapalném nebo plynném médiu. Vysvětlením Brownova pohybu je neustálé srážení molekul v roztoku vlivem tepelného pohybu, přičemž směr a síla těchto srážek jsou náhodné, a proto je i okamžitá poloha částice náhodná. Tento pohyb je tím intenzivnější, čím jsou částice menší a čím je teplota vyšší. Je-li například v disperzním prostředí částice velikosti několika mikrometrů, obdrží v uvažovaném čase takové množství nárazů, že se jejich působení ve všech směrech navzájem vyruší, nehledě na její ohromnou setrvačnost ve srovnání s molekulami disperzního prostředí. Naproti tomu koloidní částice (obr. 5) získá ve stejném časovém intervalu daleko menší počet nárazů. Potom je velmi málo pravděpodobné, že se jejich působení navzájem vyruší. Převládne výslednice v určitém směru a v tomto směru se částice pohybuje, dokud ji další nárazy molekul disperzního prostředí nevychýlí jiným směrem. Brownův pohyb se projevuje zejména v difúzi, sedimentaci a má značný vliv na stabilitu koloidních soustav [7].



Obr. 5: Nárazy molekul disperzního prostředí do koloidní částice [7]

2.4 Viskoelastické vlastnosti materiálu

Viskozita je fyzikální veličina udávající poměr mezi tečným napětím a změnou rychlosti v závislosti na vzdálenosti mezi sousedními vrstvami při proudění skutečné kapaliny. Je to veličina charakterizující vnitřní tření a závisí především na přitažlivých silách mezi částicemi. Kapaliny s větší přitažlivou silou mají větší viskozitu a větší viskozita znamená větší brždění pohybu kapaliny nebo těles v kapalině. Pro ideální kapalinu má viskozita nulovou hodnotu. Kapaliny s nenulovou viskozitou se označují jako viskózní [8].

Elasticita materiálu je definovaná jako míra náchylnosti pevné látky k návratu do původního tvaru po deformaci způsobené vnějším tlakem. V čistě viskózní kapalině je energie vždy disipována díky viskóznímu toku a materiál se nikdy nedostane do svého původního tvaru. Na druhé straně, v čistě elastickém materiálu je energie uchovávána a po ukončení působení vnějšího napětí se materiál vrátí zpět do svého původního tvaru. Viskoelastický materiál vykazuje jak elastickou, tak také viskózní odezvu. U těchto materiálů se vyskytuje časová závislost na aplikovaném tlaku. Závislost však nemusí být lineární, jak je tomu u viskózních materiálů, či konstantní u elastických materiálů [9].

2.5 Smykový a elastický modul

Většina materiálů je tedy povahy viskoelastické, což znamená, že u nich nelze z reologického hlediska nalézt pevnou hranici mezi pevnou a kapalnou fází a do určité míry se tedy chovají jako tuhé a kapalné látky zároveň. Materiálové vlastnosti jsou kvantifikovány jako elastický modul pro pevné látky a jako viskozitní modul pro kapaliny. Elastický či také ztrátový modul (G') vyjadřuje energii uloženou v materiálu během napěťového cyklu a tvoří reálnou část komplexního smykového modulu G^* ,

$$G^*(\omega) = G'(\omega) + G''(\omega) \quad (7)$$

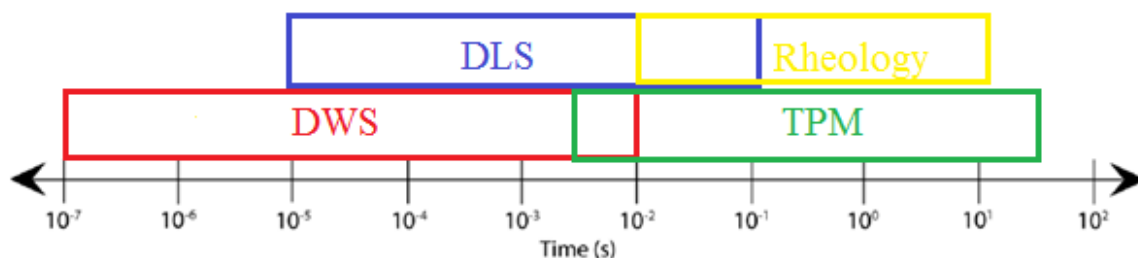
viskozitní modul G'' sděluje ztrátu energie během napěťového cyklu. Jedná se o imaginární složku komplexního smykového modulu G^* [10].

2.6 Mikroreologie

Jednou z nejdůležitějších a nejčastěji studovaných vlastností jemných materiálu, jako jsou polymerní roztoky, gely či vláknité proteiny, je smykový modul, který vyjadřuje míru viskozity či elasticity materiálů. Teoretická či experimentální studie těchto vlastností má podstatný a nesmírný praktický význam. Měření viskoelastických vlastností se provádí na běžném reometru, který má schopnost mapovat vzorky o vyšších objemech (v řádu mililitrů), ale s omezeným rozsahem frekvencí (do 10 Hz). Standardní reologické měření bylo používáno pro charakterizaci jemných materiálu a komplexních kapalin. To však nebylo vhodné pro veškeré systémy, jelikož tak velký objem vzorku nebylo možno vždy zajistit nebo zajištění takového objemu vzorku bylo finančně náročné. Nevýhodou klasické reologie je poskytování pouze celkové odezvy materiálu, a proto nedovoluje měření nehomogenních systémů. Nevýhody klasické reologie se proměnily ve výhody nové metody zvané mikroreologie. Tato technika slibuje velké výhody při měření vlastností materiálů, u kterých nebyla klasická reologie vždy vhodná. Mimo jiné také možnosti studia viskoelasticity materiálů při frekvenci nad 1 kHz, což běžná reologie nedovoluje [11].

Základním principem mikroreologie je narušování struktury materiálů drobnými částicemi, které jsou ponořeny do materiálu a narušují okolní prostředí. Podle způsobu pohybu těchto částic můžeme mikroreologii rozdělit do dvou oblastí. První z nich je aktivní mikroreologie, jenž používá aktivní manipulaci částic pomocí magnetického či elektrického pole nebo jiných mikromechanických sil, jako je například užití optické pinzety. Tato měření jsou analogická s klasickou reologií, kde je na vzorek vkládán vnější tlak a výsledné napětí je použito k získání smykového modulu. Druhá třída mikrorheologie používá pouze Brownova pohybu začleněné mikročástice. Tento přístup pracuje pouze s tepelnou energií sondy k určení struktury a reologických vlastností materiálu. V každé této podskupině se nachází velká řada mikroreologických technik, z nichž každá vykazuje jisté výhody či nevýhody pro zvolený vzorek (viz. příloha 1). Mezi nejběžněji používané pasivní metody patří jednočásticová mikroreologie (particle tracking microrheology PTM), zvaná také jako videomikroreologie (video based particke tracking), doučásticová mikroreologie (two particle microrheology -

TPM), diffusing wave spectrometry (DWS), diffusing light spectrometry (DLS), či mikroskopie atomárních sil (atomic force microscopy, AFM).



Obr. 6: Graf ukazující rozsah frekvencí vhodný pro některé mikroreologické techniky [12]

2.6.1 Jednočásticová mikroreologie

U jednočásticové mikroreologie je k pohybu částic využíváno pouze Brownova tepelného pohybu. Až tisíce částic o velikosti přibližně jednoho mikrometru mohou být sledovány pomocí videomikroreologie. Pohyb těchto začleněných sond může být určen se sub-pixelovou přesností pomocí speciálního softwaru vytvořeného J. C. Crockerem a jeho kolektivem [13, 14].

Dynamika pohybu jednotlivé částice je popsána v čase pomocí korelační funkce každé z částic, která je také známá jako mean squared displacement ($\langle \Delta x^2(\tau) \rangle$) a je definována jako:

$$\langle \Delta x^2(\tau) \rangle = \langle |x(t + \tau) - x(t)|^2 \rangle \quad (8)$$

kde x je d -rozměrná pozice částice, τ je časový interval a závorky naznačují, že se jedná o průměrnou hodnotu v čase. S konstantou úměrností D , která je definována jako difuzní koeficient translačního pohybu:

$$\langle \Delta x^2(\tau) \rangle = 2dD\tau \quad (9)$$

Při difuzi částic viskoelastickým médiem nebo transportem částic jiným způsobem než difúzí, $\langle \Delta x^2(\tau) \rangle$ se stává nelineárním v čase a může být formálně zapsán silovým zákonem $\langle \Delta x^2(\tau) \rangle = 2nCt^\alpha$, kde α je difuzní koeficient a C je konstanta. V jednoduché Newtonské

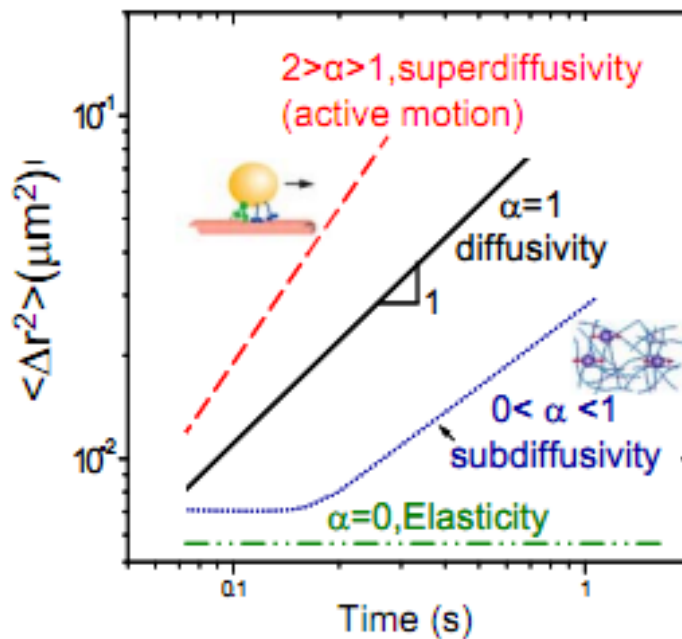
kapalině (voda, glycerol) je hodnota $\alpha = 1$. Viskozita okolního prostředí částice o poloměru a je pak získána ze Stokes - Einsteinovy rovnice:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi a \eta} \quad (10)$$

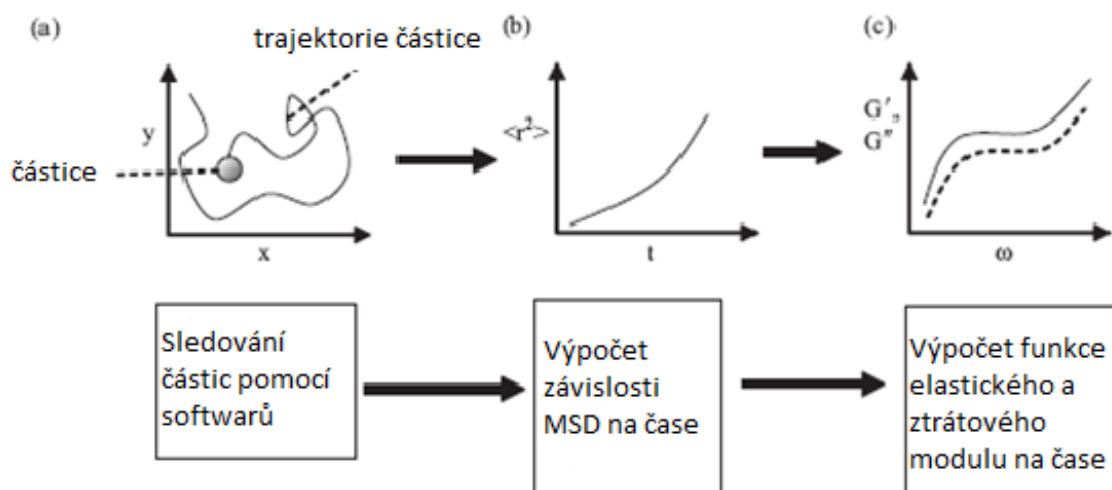
V jednoduchém Hookově materiálu (elastický) je α roven 0 a tedy MSD je nezávislý na čase. Elastický smykový modul může být vypočítán jako

$$G = \frac{k_B T}{6\pi a (\Delta x^2(\tau))} \quad (11)$$

V případě pasivních komplexních kapalin, kde je obsažena jak elastická, tak i viskózní složka, pozorujeme sub-difuzivní chování, $0 < \alpha < 1$. U nepasivních kapalin, jako jsou například živé buňky, můžeme nalézt $0 < \alpha < 2$, což odpovídá chování, které je nazýváno superdifúzní [15].



Obr. 7: Typy MSD vyskytující se v PTR (particle tracking microrheology) [14, 15]



Obr. 8: Schéma zisku viskozitního a ztrátového modulu z trajektorie částic

Lineární viskoelasticita je vyjádřena pomocí viskozitního (G') a ztrátového modulu (G''). Časová závislost tepelně řízeného pohybu částic v inertních jemných materiálech, může být interpretován v rámci zobecněné Stokes – Einsteinovy rovnice:

$$\tilde{D}(s) = \frac{k_B T}{6\pi a s \eta_s} \quad (12)$$

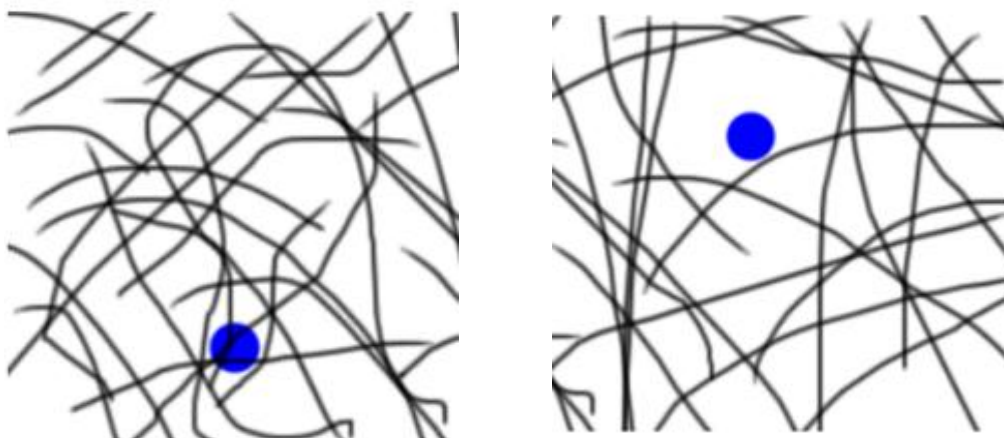
kde η_s je Laplaceova transformace viskozity závislé na frekvenci, $\tilde{D}(s)$ je Laplaceova transformace difuzního koeficientu závislého na frekvenci a s je Laplaceova frekvence [14, 15].

Výhodou jednočásticové mikrereologie je její větší frekvenční rozsah v porovnání s klasickou mikrereologií. V tomto případě hrají hlavní roli ve frekvenčním rozsahu metody vlastnosti použité kamery. Například CCD kamera napojená na optický mikroskop je většinou schopna dosáhnout frekvencí jen do 50 – 100 Hz v závislosti na jejím časovém a prostorovém rozlišení [16, 17].

2.6.2 Dvoučásticová mikrereologie

Jednočásticová mikrereologie je metoda vhodná pro měření zcela homogenních materiálů jako je například glycerol. Její nevýhodou je však velká citlivost začleněné sondy vůči okolnímu prostředí. Jestliže daná částice svým pohybem modifikuje pouze své nejbližší okolí v heterogenním materiálu, pak tato metoda určí pouze strukturu a vlastnosti nejbližšího okolí částice místo reologických vlastností celého materiálu. Nově rozvinutá technika

dvoučasticové mikrorheologie (Two point microrheology TPM) eliminuje lokální změny, vzhledem k nejbližší struktuře měřením korelačního pohybu dvojice částic ve vzorku. Tento pohyb není ovlivněn velikostí nebo dokonce tvarem částic a je také nezávislý na specifické interakci mezi povrchem částice a okolním prostředím. Mimo to, nepozorujeme velikost individuální sondy a , jako v případě jednočasticové mikrorheologie, ale vzájemnou vzdálenost pozorované dvojice částic, r , která se pohybuje v rozmezí 10 – 100 mikronů. Tento nárůst vzdálenosti znamená, že technika je citlivá na heterogenity ve vzorku menším, než je vzájemná vzdálenost částic, a tedy je možno změřit reologii celkového materiálu, což u jednočasticové metody nebylo možné. U jednočasticové mikrorheologie může nastat problém také v případě, že velikost částice je mnohem menší než velikost ok v síti vzorku a tudíž nemůže tato částice odrážet vlastnosti materiálu, se kterým nemusí být ani v kontaktu. Tento případ je demonstrován na obrázku 9 [9, 14, 18].



Obr. 9: Heterogenní systém se začleněnými částicemi pro dva různé systémy lišící se koncentracemi polymerních vláken [9, 19].

S menšími modifikacemi je možno TPM provádět většinou pasivních i aktivních mikrorheologických metod. Sledování sond na základě video nahrávek je zejména velmi vhodná metoda pro určování korelačního pohybu více částic, jelikož až několik stovek sond může být zobrazováno zároveň. V typické TPM je možno pozorovat zhruba stovky částic po dobu stovek sekund pro získání dostatečného množství dat. Vektor posunu pro individuální částici je vypočítán jako funkce časového intervalu τ a absolutního času t :

$$t : \Delta r_{\alpha}(t, \tau) = r_{\alpha}(t + \tau) - r_{\alpha}(t) \quad (13)$$

poté je tensor průměrné hodnoty souboru částic vektoru posunu vypočítán:

$$D_{\alpha,\beta}(r,t) = \left\langle \left(\Delta r_{\alpha}^i(t,\tau) \Delta r_{\beta}^j(t,\tau) \right) \delta \left[r - R^{ij}(t) \right] \right\rangle_{i \neq j, t} \quad (14)$$

kde i a j označuje jednotlivé částice, α a β označuje jednotlivé souřadnice a R^{ij} je vzdálenost mezi částicemi i a j [18, 20].

Dvoučásticová korelace mezi sondami v nestlačitelném kontinuu je vypočítána uvažováním každé termální částice jako tlakového bodu a mapováním očekávané deformace pole. V krajním případě, kdy vzdálenost částic r je mnohem větší, než je poloměr částice a ($r \gg a$), je deformace vypočítána vynásobením jednočásticové MSD, která je predikovaná zobecněnou Stokes – Einsteinovou reakcí pro získání:

$$D_{rr}(r,s) = \frac{k_B T}{2\pi r s G(s)} \quad (15)$$

kde $D_{rr}(r,s)$ je Laplaceova transformace $D_{rr}(r,t)$ a $D_{rr}(r,t)$ je kros - korelační funkce v radiálním směru [9, 19].

Dosud byly v této práci vyzdvihovány pouze výhody TPM. Je zapotřebí ale také definovat určité nepřesnosti či nevýhody, které tato metoda vykazuje. První z nich je množství částic, které je nutno sledovat. U PTM bylo zapotřebí přibližně 100 částic, ale u korelačního pohybu dvou částic je jich nutno použít mnohem více a to až 3000 [21]. Druhou nevýhodou může být poměrně vysoké procento nečistot a šumu, které jsou součástí signálu při měření korelačních pohybů. I přes tyto nedostatky je TPM velmi dobrou a často využívanou mikoreologickou metodou [9].

2.6.3 Dynamic light scattering (DLS)

Již od počátku minulého století byl zpozorován významný jev, při styku světla a látky vykazující lokální nehomogenity, kdy dochází k značnému rozptylu budícího světla. Tento fakt dal za vznik mnoha hojně využívaným metodám, mezi které patří i DLS. Rozptylové techniky v oblasti mikoreologie využívají koherentní monochromatické záření a optické prvky k měření intenzity světla rozptýleného přítomnou sondou, kdy částice s danou velikostí jsou začleněny v materiálu o neznámých viskoelastických vlastnostech [21]. Dynamics light scattering (DLS) se stala jednou z nejrozšířenějších metod ve studiu nehomogenit v malých objemech vzorku. Získala si tedy velice široké pole působnosti. Mezi nejhojněji zkoumané materiály můžeme zařadit například koloidní suspenze, gely či polymerní směsi [23, 24].

V klasickém DLS aparátu dochází ke styku laserového paprsku se vzorkem a následnému rozptylu fotonů pomocí začleněných částic. Tyto fotony dopadají na detektor umístěný pod úhlem θ , vzhledem ke směru budícího laserového paprsku. V ideálním případě je každý foton rozptýlen jen jednou a ihned je nasměrován přímo k detektoru. Intenzity fluktuací jsou měřeny jako funkce času $I(t)$ a normalizovaná intenzitní fluktuační funkce $g_2(\tau)$ je dána výpočtem:

$$g_2(\tau) = \frac{(I(t)I(t+\tau))}{(I(t))^2}, \quad (16)$$

kde ostré závorky označují průměrnou hodnotu v čase, τ znázorňuje časový interval a t je čas [25]. Naměřená g_2 může být vztažena k autokorelační funkci pole g_1 , která je dána:

$$g_1(\tau) = \frac{(E(t)E^*(t+\tau))}{(|E(t)|)^2}, \quad (17)$$

kde E je rozptýlené elektrické pole, použitím Siegertova vztahu:

$$g_2(\tau) = 1 + \beta |g_1|^2, \quad (18)$$

faktor β je určen koherencí detekčního zařízení. Pokud jsou všechny částice na sobě nezávislé a pohybují se náhodně pouze na základě tepelného pohybu, pak:

$$g_1(\tau) = \exp\left[-\frac{q^2(\Delta r^2(\tau))}{6}\right], \quad (19)$$

kde $(\Delta r^2(\tau))$ je průměrná hodnota MSD všech částic v 3 - dimenzionálním systému a q je rozptylový vlnový vektor daný:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (20)$$

kde n znázorňuje index lomu světla vzorku, λ je vlnová délka budícího záření a θ je úhel svírající budící paprsek s detektorem [24, 26].

Výsledkem použití DLS a výše uvedených vztahů je průměrná hodnota MSD všech částic ve vzorku. To znamená, že není možno určit vlastnosti prostředí pouze v okolí určité částice a tedy není možno použít tuto metodu pro vzorky vykazující lokální heterogenity. Důležitou

podmínkou pro měření pomocí této metody je transparentnost vzorku (aby zde byla jistota, že každý foton vstupující do detektoru byl rozptýlen pouze jednou). Dalším předpokladem je výskyt náhodných trajektorií, které jsou výsledkem pouze Brownova pohybu. Není podmínkou znát přesné složení použitých částic, jejich velikost se může pohybovat v rozsahu 0,5 nm až 6 μm , což může být mnohdy také velkou výhodou [26]. DLS ovšem není schopna přesně rozpoznat, zda se jedná právě o námi začleněnou sondu. V přítomnosti jakékoli nečistoty může být MSD například prachové částice přidáno do celkové průměrné hodnoty MSD a tím dojde ke zkreslení konečného výsledku [24, 26].

Určení viskozity pomocí DLS

DLS je neinvazivní metoda pro určování velikosti částic v suspenzi nebo molekulárním roztoku. Tato technika měří translační difuzní koeficient částice nebo molekuly, které podléhají náhodnému Brownově pohybu. Difuzní koeficienty jsou převedeny do hydrodynamických velikostí použitím Stokes – Einsteinovy rovnice:

$$d(H) = \frac{kT}{6\pi\eta D}, \quad (21)$$

kde $d(H)$ je hydrodynamický průměr částice, D je difuzní koeficient, k je Boltzmanova konstanta, T je absolutní teplota a η je viskozita. Přímý vztah mezi viskozitou, která je určena v nastavení přístroje a získanou hydrodynamickou velikostí částic vyzdvihuje přesnost s jakou je viskozita určena. Pro velmi zředěné vzorky můžeme uvažovat pouze viskozitu rozpouštědla. Nicméně pokud je viskozita rozpouštědla modifikována, například přidáním polymeru, rostoucí viskozita modifikovaného rozpouštědla musí být určena s větší přesností pro přesnou výslednou hodnotu velikosti částic. Viskozita rozpouštědla může být změřena například na vhodném viskozimetru. Alternativní metodu pro stanovení viskozity daného vzorku nabízí také DLS. Způsob pro určení viskozity vzorku spočívá v začlenění polystyren – latexových částic o známé velikosti do vzorku. Ze změřených hodnot velikosti částic jsme pak schopni vypočítat viskozitu vzorku podle rovnice:

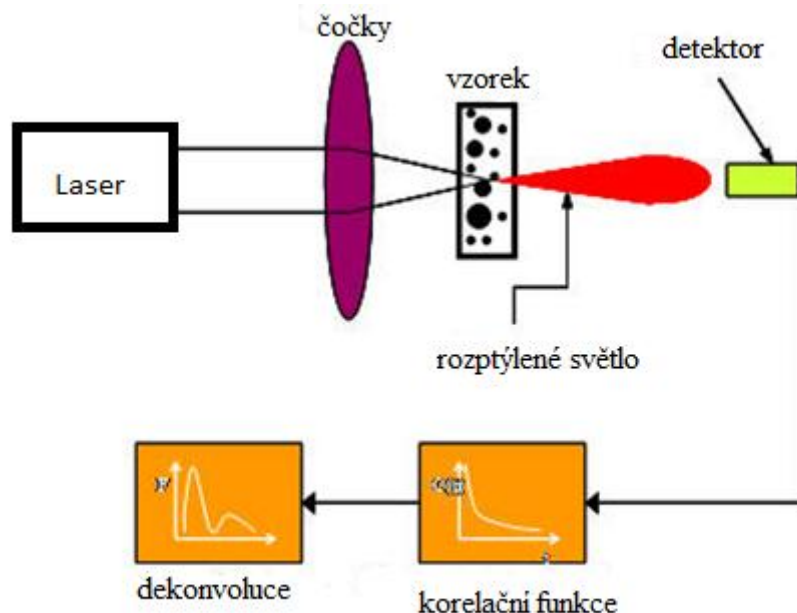
$$\eta = \frac{\eta_{H_2O}}{\frac{D_{H(H_2O)}}{D_{H(X)}}}, \quad (22)$$

kde η je vypočítána viskozita, η_{H_2O} je známá viskozita vody (rozpouštědla) při dané teplotě, $D_{H(H_2O)}$ je naměřená velikost částic ve vodě, $D_{H(x)}$ je naměřená hodnota velikosti částic v daném vzorku (v softwaru označeno jako Z - average diameter).

Přesné určení viskozity touto metodou je založeno na dostatečném zvětšení počtu rozptylů laserového paprsku na částicích ve vzorku ve srovnání se vzorkem bez vložených částic. Z tohoto důvodu je důležitý správný výběr vhodné velikosti částic. Je také poměrně velmi důležité sledovat hodnotu PDI (polydispersity index). Tato hodnota by se s rostoucí koncentrací vzorku neměla významně lišit. Velká změna PDI by mohla naznačovat tvorbu agregátů začleněných částic a tudíž nekompatibilitu polystyrenové částice s daným vzorkem [27].

Experimentální nastavení

Typický DLS aparát zahrnuje světelný zdroj, goniometr nesoucí vzorek a definující geometrii rozptylu, detektor a digitální korelátor, který počítá intenzitní autokorelační funkci v reálném čase. Světelným zdrojem je nejčastěji kontinuální vlnový laser - koherentní monochromatický zdroj světla s emisní vlnovou délkou v rozsahu 400 - 700 nm.



Obr. 10: Schéma DLS [26]

2.6.4 Diffusing wave spectroscopy (DWS)

Navzdory tomu, že DLS našla široké uplatnění ve studiu mnoha fyzikálních systémů, je tato metoda do jisté míry omezena vícenásobným rozptylem světla, což je pro měření a následné výpočty velice nežádoucí. Řešením tohoto problému se stala metoda zvaná diffusing wave spectroscopy, která je také na rozdíl od DLS vhodnější pro zakalené vzorky, jako jsou například koncentrované polymerní roztoky a gely, suspenze nebo roztoky surfaktantů. Z těchto důvodů byl upřednostňován rozvoj techniky DWS na úkor DLS. Ačkoliv je úhlová závislost rozptýleného světla zakaleného vzorku zastíněna mnohonásobným rozptylem, můžeme zde zaznamenat zásadní časovou informaci z intenzity rozptýleného světla, které může být použito k charakterizaci dynamických procesů probíhajících ve vzorku. Za předpokladu velmi vysokého množství rozptylu fotonu, šíření světla skrz medium o šířce L , může být považováno za difuzivní proces, ve kterém transport světla nastává ve zcela náhodných drahách. Ty jsou charakterizovány jako transport fotonu zvaný „střední volná délka dráhy“ (mean free path length) l^* , kdy $l^* \ll L$. Interference mezi těmito dráhami vyúsťují v zrnité modely (speckle pattern) intenzity rozptýleného světla, která kolísá v čase díky relativnímu pohybu individuálních rozptýlených částic [28].

DWS je technika používaná hojně ke studiu dynamických vlastností širokého rozsahu materiálů, zahrnující například koloidní suspenze a gely, koncentrované emulze, elektro-reologické kapaliny, pěny, kapalně krystalové polymerní roztoky a mnoho dalších. [28, 29]. Pro DWS experiment, intenzitní autokorelační funkce $g_2(\tau)$ je dána vztahem:

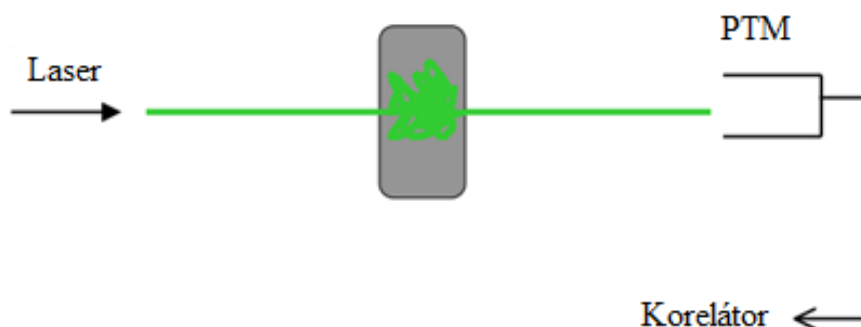
$$\int_0^{\infty} P(s) \cdot e^{-\left(\left(\frac{s}{l^*}\right) k^2 \Delta r^2(\tau)\right)^2} ds, \quad (23)$$

kde k je vlnový vektor světla v mediu, $P(s)$ je distribuční funkce délky dráhy (path lengths) fotonů ve vzorku a může být vypočítána na základě difuzního modelu. l^* je takzvaná transportní střední volná dráha (transport mean free path) [30, 31].

Experimentální nastavení

DWS přístroj je velmi podobný DLS nastavení a obsahuje laserový zdroj, jednoduchý optický prvek (většinou čočku), držák vzorku, detektor a digitální korelátor. Hlavním rozdílem oproti DLS aparátu je nepřítomnost goniometru. Také zde není žádná úhlová

závislost mezi budícím zářením a detektorem. Dalším rozdílem je rozšíření budícího paprsku až do šířky 8 mm, aby došlo k distribuci záření do celé šířky kyvety.



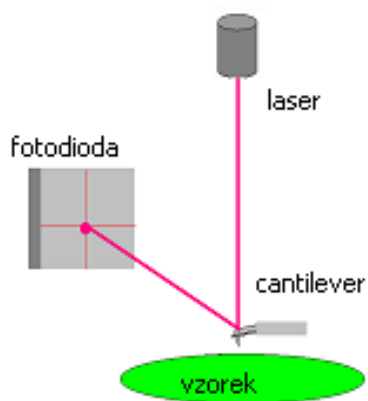
Obr. 11: Schématické znázornění DWS aparátu [28]

2.6.5 Mikroskopie atomárních sil (AFM)

Pro získání mikreologických parametrů komplexních látek můžeme kromě nejvíce používaných metod jako je PTM (particle tracking microrheology) nebo TPM (two particle microrheology), využít také metodu zvanou mikroskopie atomárních sil (AFM – atomic force microscopy). Základem AFM je velmi ostrý hrot upevněn na ohebném kantilévru, jenž je mírně vtlačován do vzorku a následkem působících sil je kantilévra ohýbána. Během měření se hrot pohybuje po povrchu vzorku v pravidelném rastru. Je-li povrch vzorku nerovný, má nosník v různých místech vzorku různou velikost ohybu [32]. Změny polohy nosníku jsou detekovány pomocí laserového paprsku, který je odrážen proti zadní straně konzoly. Poloha tohoto bodu je pak neustále monitorována citlivým fotodetektorem a následný rozdíl mezi dvěma signály naznačuje ohyb nebo zkroucení konzoly. Tyto vzájemné odchylky signálů mohou být použity jak pro určení informací týkajících se topografie povrchu látky, tak také k určení mechanických vlastností dané látky. Síla F aplikovaná mikroskopem může být získána z Hookova zákona:

$$F = K_c d \quad (24)$$

kde K_c je tuhost pružiny konzoly a d je odchylka koncové části konzoly. Tato síla je obecně vyvážena zpětnou silou materiálu, která je často vyjadřována jako funkce hloubky odsazení (indentation depth), jenž je získána odečtením odchylky od přemístění konzolové základny Z [31, 34, 34].



Obr. 12: Schématické znázornění měření pomocí AFM [33]

Pro měření v různých materiálech můžeme použít větší množství měřících módů. Mezi nejčastější režimy pro měření viskoelastických vlastností jemných materiálu jako jsou biopolymery, patří:

1. Silově – distanční režim

Nejčastěji je režim používán pro měření elastických vlastností například buněčných membrán a základního cytoskeletonu. Zatěžovací síla konzoly může být vynesena jako funkce hloubky odsazení, když je hrot tlačěn proti zkoumanému materiálu.

2. Režim toku

V tomto režimu dochází k měření přemístění povrchu materiálu jako funkci času za konstantní budící síly, což je kontrolováno zpětnou vazbou AFM. Také v tomto režimu je odezva na aplikovanou sílu závislá na viskoelastických vlastnostech materiálu.

3. Režim silových modulací

Jedná se o měření dynamické odezvy na aplikovanou budící sílu s ohledem na vnější periodické napětí. Tento režim dovoluje měření frekvenčních závislostí jak ztrátového, tak také elastického modulu daného materiálu.

4. Napět'ově – relaxační režim

Dochází zde k měření časové závislosti budící síly AFM, zatímco konzolový základ je ponecháván v klidu [32].

2.7 Omezení použití mikrereologie

Pro studium nelineární odezvy materiálu je použití mikrereologické metody velmi obtížné. Další limitace mikrereologie nastává při měření transparentních nebo částečně transparentních materiálů. Velkou nevýhodou je také délka zpracování naměřených dat. V dnešní době se běžně pořizují videa délky 10 minut. Jejich kvalitní zpracování pak ale může zabrat až 10 hodin ve speciálních programech. Pro velmi tuhé nebo viskózní materiály může být náročné pozorování velmi malých pohybů začleněných částic. Limit maximálního modulu, který jsme schopni naměřit, závisí hlavně na rozlišení experimentu [17].

3. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Přestože je mikrereologie metoda poměrně nová, již mnoho vědců a badatelů ji používá ve svých výzkumech pro její unikátní přednosti. Díky tomuto se stává stále více využívanou a rozvinutou metodou. Mezi její největší výhody patří bezesporu možnost studovat nehomogenní materiály, a to ve velmi malých objemech, což je vítáno hlavně v oblasti mikrobiologie. *Daphne W. a spol.* se zabývali studiem deformace a toku biologických materiálů a k určení odrazu regionálních změn ve struktuře a fyziologii buňky. V této práci používali jak pasivní tak také aktivní metody mikrereologie, kterou nazvali bio - mikrereologie. U termického způsobu byl jako sonda vybrán fluorescentní polystyreno průměru 100 nm s karboxylovaným povrchem, kdy daná sonda byla do buňky začleněna pomocí mikroinjekce. Dynamika pohybující se částice uvnitř buňky byla studována nahráváním 20 s videa s 30 obrázky za sekundu. Pohyb částic byl zachycen v nanometrovém rozlišení ve speciálním programu MATLAB. 7.0. Cílem této studie bylo pozorovat chování sond v biologickém prostředí a nastavit jakýsi základ pro užívání dané metody a interpretaci dat. Dále se zabývali také problematikou začleňování částic do buňky a interakce částice s vnitřním prostředím buňky. Bio - mikrereologie se stala velice rychle se rozvíjející vědou, jelikož poskytuje potenciál k lepšímu porozumění buněčné fyziologie a pro pozdější využití, například k monitorování účinků nosičů léčiv do specifických buněk [36].

Mikrereologií buněk se ve své studii zabývali také *Hyungsuk L. a spol.*, kteří se konkrétně zaměřili na buněčný cytoskelet, hlavně pak na F - actin. Ačkoli mechanické vlastnosti F - actinové sítě byly již značně prozkoumávány, základní mechanismus pro její elasticitu není ještě úplně jasný. V této studii byly rozvinuty jak aktivní tak pasivní mikrereologické

techniky. U aktivního přístupu byla k manipulaci sondy použita optická pinzeta. U pasivního přístupu byl sledován pohyb termicky pohybujících se koloidů k odhadu frekvenční závislosti komplexu smykového modulu. Ačkoli aktivní i pasivní metody vykazovaly podobné výsledky za nízkého napětí, síť F-actinu vystavena vyššímu napětí vykazovala nelineární chování [37, 38].

Heinemann C. a spol. se zabývali studiem reologických vlastností přírodního biopolymeru - škrobu za přítomnosti částice γ -dodecalactone, která indukuje proces gelovatění. Byl zde pozorován bod gelovatění. Použitou metodou se stala pasivní mikreologie a jako rozrušující částice, založena na Brownově pohybu, zde byl zvolena polystyrenová částice. Byla pozorována časová závislost MSD polystyrenu začleněného do systému škrob/ γ -dodecalactone a po dobu 5 min., 15 min., 70 min a 23 hodin byla zaznamenána do grafu [39].

Procesem gelovatění se zabýval i *Moschakis T. a spol.*, kdy sol-gel přechod modelového mléčného systému, který podstupuje gelaci acidifikací, byl studován klasickou reologií a mikreologií. Mikreologické hodnoty modulů byly jen slabě nižší než makroskopicky určené hodnoty a body gelace u obou technik se velmi blízce shodovaly. Nicméně mikreologie jeví vyšší citlivost a možnost zachytit změny ve struktuře systému dříve, než je dokáže zaregistrovat běžný reometr. Mikreologické metody běžně používané k sol-gel přechodům je difuzní vlnová spektroskopie (DWS). Sodium kaseinát byl zvolen jako protein způsobující gelaci. K pozorování je používán konfokální mikroskop, částice: karboxylátově modifikovaný polystyren označený fluoresceinem ($d = 0,5 \mu\text{m}$), PS označený křiklavě červenou (flesh red), ($d = 0,21 \mu\text{m}$ a $0,89 \mu\text{m}$), PEG označený rhodaminem B ($d = 0,32 \mu\text{m}$). Měření byla prováděna při 20°C . Při měření na běžném reometru byl pozorován náhlý nárůst v G' čase. Tento dobře definovatelný čas (gel point) se měnil s koncentrací SC (sodium caseinate). Jak se očekávalo, G' se stává výrazně větší než G'' , když gelace postupuje. Bylo používáno 20 - 40 začleněných částic, aby se vyvarovalo interakcím mezi těmito částicemi [40].

Další skupina vědců, mezi které patřil *Cohen I. a spol.*, si vybrala mikreologii pro měření několika druhů izraelského medu jako model vysoce viskózní Newtonské kapaliny. U mikreologie byly použity fluorescenční karboxylově modifikované polystyrenové částice ($d = 200 \pm 10 \text{ nm}$). Cílem této studie bylo také určit teplotní a vlhkostní závislost vybraného

květového medu, odrůdy izraelského medu, srovnání přírodního a kaloricky redukováného medu. Tyto výsledky byly pak srovnávány s hodnotami získanými opět klasickou reologií. Naměřené závislosti odpovídaly Arrheniově rovnici, kdy viskozita exponenciálně klesala s teplotou. Arrheniova aktivační energie a viskozita byly závislé i na vlhkosti a bylo zjištěno, že změna vlhkosti o 1 % způsobuje stejné změny jako změna teploty o 3,5 °C. Tato data byla srovnatelná s dříve publikovanými hodnotami získanými klasickou reologií medu z různých částí světa. Ve výsledku bylo dokázáno, že reologie odpovídá mikroreologii, jak bylo očekáváno u Newtonských kapalin. Kombinace klasické reologie a mikroreologie měla vést k zlepšení charakterizace reologie medu, stejně jako jiných více komplexních materiálů. Hlavním cílem této studie bylo určit teplotní a vlhkostní závislost vybraného květového medu, odrůdy izraelského medu, srovnání přírodního a kaloricky redukováného medu [41].

Touto metodou byly pozorovány také viskoelastické vlastnosti na mezifázovém rozhraní kapalin. Z výsledků této studie je jasné, že pro mezifázové rozhraní kapalin je potřeba mnohem více experimentálních a teoretických poznatků k vysvětlení, proč smyková povrchová mikroviskozita je mnohem menší než byla naměřena klasickou reologií [42, 43].

4. MATERIÁLY A METODY

4.1 Materiály

Hyaluronan	HyActive $M_w = 73$ kDa, CPN s.r.o., číslo šarže: 071207 - P1
	HySilk $M_w = 300$ kDa, CPN s.r.o., číslo šarže: 160708 - E1
	HySilk $M_w = 750$ kDa, CPN s.r.o., číslo šarže: 031007 – 8 - D1
	Hyal. acid $M_w = 1,46$ MDa, CPN s.r.o. číslo šarže: 071207 - P1
Částice	Polystyrenové částice (PS), velikost 1 μ m, Sigma - Aldrich číslo šarže: 72938 - 5ML – F
Glycerol	$C_3H_8O_3$, čistota $\geq 99,5$ %, Sigma – Aldrich, číslo šarže: 191612 - 1L
Rozpouštědla	Mili-Q voda (Milipore Academic)
Silikonový olej	Certified viscosity reference standard, číslo šarže: 09101

4.2 Příprava vzorků

Byla připravena glycerolová řada vzorků o různých hmotnostních procentech glycerolu ve vodě od 10 % do 80 %. Pro měření klasickou reologií bylo odebráno přibližně 20 ml od každého vzorku. Pro mikoreologické měření byl odebrán 1 ml vzorku a bylo přidáno přibližně 10 μ l (1 kapka) roztoku polystyrenových částic o velikosti 1 μ m. Všechny vzorky byly promíchány na vortexu.

Byla připravena hyaluronová řada vzorků o různých molekulových hmotnostech hyaluronanu se stejnou koncentrací 0,1 %. Byly použity molekulové hmotnosti 73 kDa, 300 kDa, 750 kDa, 1,46 MDa. Zásobní roztoky hyaluronanu byly ponechány na míchače do druhého dne. Celkový objem každého zásobního roztoku byl 30 ml. Bylo odebráno 20 ml pro měření klasickou reologií. Byl odebrán 1 ml vzorku pro mikoreologické měření a bylo k němu přidáno 10 μ l (1 kapka) roztoku polystyrenových částic o velikosti 1 μ m. Vzorky byly promíchány na vortexu.

Byla připravena koncentrační řada hyaluronanu o $M_w = 750$ kDa v mili-Q vodě. Byly připraveny zásobní roztoky příslušného hyaluronanu o koncentraci $c_1 = 1$ g/l a $c_2 = 5$ g/l. Následně byla připravena koncentrační řada v rozsahu od 0,01% - 0,5%.

5. MĚŘENÍ A VYHODNOCENÍ DAT

5.1 Měření a vyhodnocování pomocí mikoreologie

Měření a vyhodnocování dat pomocí mikoreologické metody je poněkud náročný a zdlouhavý proces skládající se z několika kroků. Základními pomůckami pro zvládnutí tohoto úkolu byly v mém případě klasický optický mikroskop značky Nikon Eclipse e200, barevná CCD kamera Canon EOS 550D, konvertor souborů ve formátu MOV na soubor AVI se zachováním co nejvyšší kvality obrazu, program VirtualDub pro úpravu videa, software ImageJ pro obrazovou analýzu, MS Excel pro následné výpočty a MrLab pro získání viskozitních a ztrátových modulů.



Obrázek 13: Optický mikroskop Nikon Eclipse e200 a fotoaparát Canon EOS 550D [44, 45]

5.1.1 Příprava vzorků pro mikreologické měření.

Vzorky byly namíchány v laboratoři (viz. míchání vzorků). Poté bylo 12 μl vzorku aplikováno na podložní sklíčko a přiklopeno sklíčkem krycím. Následovalo několika minutové ustálení vzorku podle potřeby, aby nedocházelo k pohybu celého vzorku, ale pouze částic umístěných uvnitř. Jelikož je tato metoda citlivá na jakýkoliv pohyb (například na jemné drcnutí do stolu, na němž je umístěn mikroskop, či pohybu jiných osob po laboratoři, zavírání poliček či třískání dveří v okolních laboratořích), doba jeho ustálení mohla zabrat i delší časový úsek. Následně však nastával problém vysychání daného vzorku. Částice byly ve vyschlém vzorku mnohem pomalejší a vypočítané výsledky pak ukazovaly hodnoty viskozit jiné, než ve skutečnosti byly. Tento problém byl vyřešen aplikací roztoku silikonu po obvodu krycího sklíčka. Silikon je se vzorkem nemísitelný, nebo mísitelný pouze minimálně, proto nedochází k ovlivňování viskozity vzorku, ale pouze k zamezení jeho vyschnutí. Doba ustálení vzorku pak může být jakkoliv dlouhá.

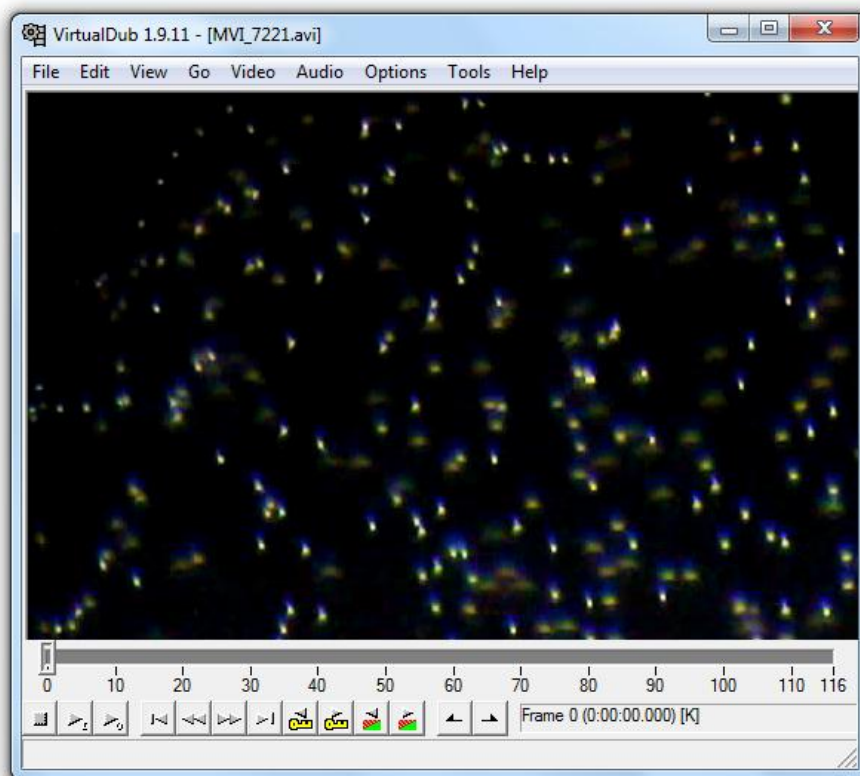
5.1.2 Záznam videa

Připravený vzorek byl vložen pod mikroskop, a po dostatečné době ustálení byly částice nasvíceny baterkou ze spodní části, aby byly získány světlé body na tmavém pozadí, což je žádoucí pro následné zpracovávání. Částice byly pozorovány při čtyřicetinásobném zvětšení. Poté byla natočena videa pohybu částic ve vzorku. Pro každý vzorek byla pořízena minimálně tři videa v různých místech vzorku. Ani tento krok se neobešel bez problémů. Již při pozorování mikroskopem byly viditelné dvě různě se pohybující populace částic, z nichž se

některé pohybovaly značně pomaleji, nebo prakticky vůbec. V případě nepohyblivých částic se pravděpodobně jedná o částice, které ulpěly na povrchu krycího sklíčka a neodráží tak viskozitní vlastnosti daného vzorku. Proto bylo při získávání nahrávek zaostřováno vždy na částice pohyblivější a ležící v nižší vrstvě vzorku. Pro zamezení ulpívání částic na krycím sklíčku bylo provedeno několik kroků. Sklíčka podložní i krycí byla silanizována, poté byla otestována sklíčka plastová a také bylo vyvýšeno krycí sklíčko, aby vznikl větší prostor pro vzorek. Žádný z těchto kroků však nezamezil ulpívání částic na povrchu krycího sklíčka. V případě vyvýšeného krycího sklíčka jsem po čase zjistila, že částice, které ulpěly na povrchu, časem sedimentují, a proto je pak jednodušší zaměřit se na pohyblivé částice, které jsou začleněny v polymerní síti vzorku a odráží tak jeho skutečnou viskozitu. Pro následné potřeby byla získána převodní hodnota pixelů na mikrometry pro používaný fotoaparát.

5.1.3 Zpracování videa

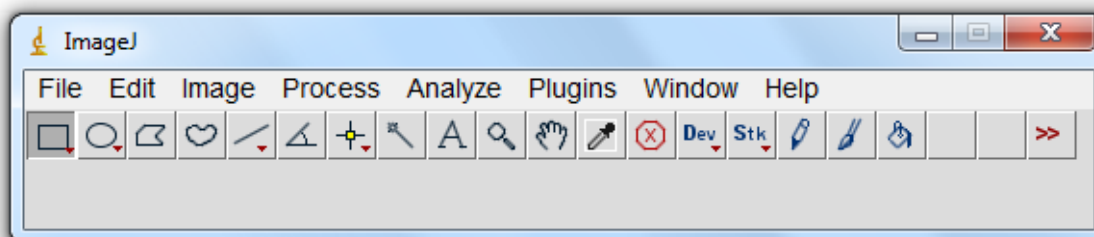
Získané video muselo být nejdříve převedeno z formátu MOV do formátu AVI, aby byla možná další manipulace s videem. K tomu byl použit MOVtoAVI Converter. Poté bylo video dále upraveno v programu VirtualDub 1.9.11. kde musel být nejdříve nastaven filtr v záložce Video → Filters s názvem null transform a poté byl vytvořen menší výřez videa se skupinkou vybraných částic pomocí funkce cropping. Takto upravené video bylo uloženo opět ve formátu AVI.



Obr. 14: Program pro zpracování videa VirtualDub1.9.11

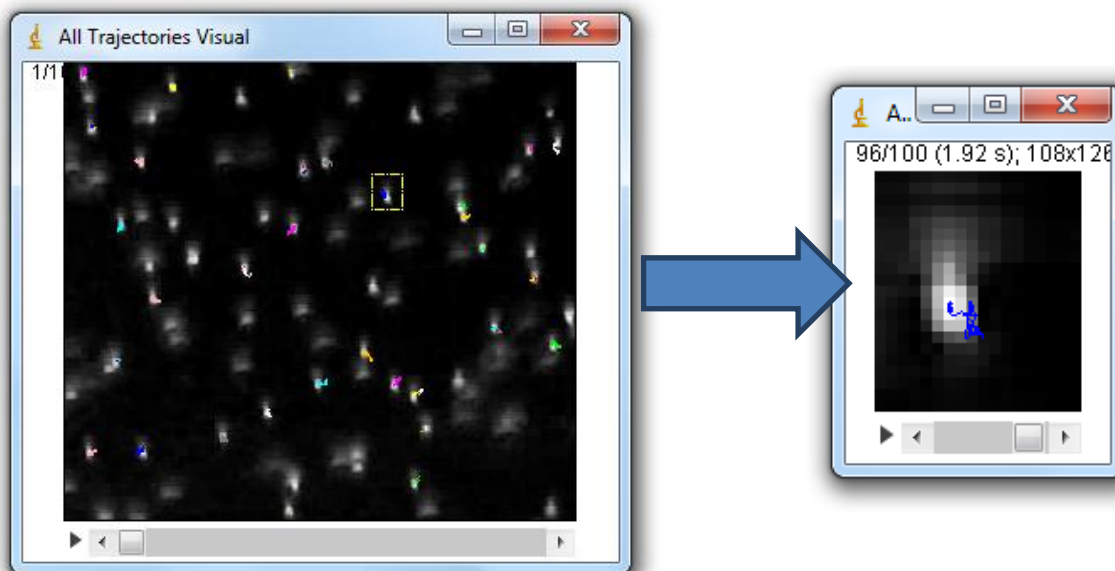
5.1.4 Analýza obrazu

Upravené a ořezané video bylo otevřeno v programu ImageJ, kde musely být dříve nainstalovány speciální aktualizace pro sledování částic (particle tracking).



Obr. 15: Program pro obrazovou analýzu ImageJ

Po otevření videa, bylo nastaveno následování jednotlivých částic pomocí záložky Plugins → Particle Detector & Tracker → Particle Tracker. Pohyby částic, které byly zaznamenány softwarem, byly barevně vykresleny ve formě trajektorií. Po označení mohla být každá z trajektorií viditelná detailně.



Obr. 16: Ukázka vizualizace trajektorií v programu ImageJ

Následně byly získány hodnoty posunu každé částice ve směru osy x a osy y , pomocí tabulky Results a záložky Trajectories info. Tyto hodnoty byly exportovány do MS Excel.

5.1.5 Výpočty v MS Excel

Exportované hodnoty posunu částice však byly v pixelech, proto musely být převedeny pomocí převodního čísla získaného dříve pomocí sklíčka s natištěnými přímkami přesné velikosti v μm , na hodnoty posunu v jednotkách μm . Poté byly pomocí rovnice 8 vypočítány hodnoty MSD pro skupinu 17 částic. Byl vynesena graf průměrné hodnoty MSD těchto 17 částic na čas. Byla vytvořena spojnice trendu vycházející z bodu $[0;0]$, zobrazena rovnice v grafu a hodnota spolehlivosti. Z rovnice grafu byla získaná hodnota dosazena do rovnice 9 a 10 a byla vypočítána hodnota viskozity pro daný vzorek.

5.1.6 Výpočet modulů pomocí MrLab

MicrorheologyLab (MrLab) je americký software pro získání nejen elastického a viskozitního modulu, ale také plno dalších doplňujících informací. Zde nastal problém hned na počátku pokusu, jelikož program odmítal fungovat na kterémkoli počítači. Řešením byl americký počítač, který byl pořízen k jinému druhu měření. Zde již ze záhadných důvodů software konečně funguje. Vstupními daty pro získání jednotlivých modulů jsou hodnoty posunů částice ve směru osy x a y opět převedené na jednotky μm . Program pak vytvoří závislost elastického a ztrátového modulu na frekvenci.

5.2 Měření klasickou reologií

Měření viskozity pomocí klasické reologie bylo prováděno přístrojem AR - G2, od firmy TA Instruments. Před samotným měřením bylo vždy nastaveno pětiminutové ustálení vzorku a teploty na 25 °C. Pro měření byly použity dvě měřicí soustavy. Na viskóznější směsi obsahující vyšší podíl glycerolu byl použit systém kužel - deska s kuželem C60mm/1 ° (průměr kužele/úhel zkosení). Pro méně viskózní vzorky byla použita soustava souosých dvouválců (*double gap*). Byla použita metoda ustáleného stavu (*Steady state*), což je metoda pro měření tokových vlastností. Každý bod viskózní křivky byl měřen pro jedno určité tečné napětí třikrát. V průběhu každého opakování nesměla odchylka překročit hranici 5 % průměrné naměřené viskozity po dobu 10 s. Maximální doba měření jednoho bodu byla omezena maximálním časem, který byl nastaven na 3 minuty 10 sekund. Do dalšího vyhodnocování byly brány pouze ty body, které dosáhly rovnováhy před dosažením maximálního času. Celé měření probíhalo při teplotě 25 °C.



Obr. 17: Reometr ARG2

5.3 Měření pomocí DLS

K určování viskozity pomocí DLS byl použit ZetaSizer Nano ZS, kde byl nastaven měřicí modul Size. Měření probíhalo při 25 °C ve skleněné kyvetě. Do vzorku byly přidány mikroreologické PS částice o velikosti 1 μ m. Každý vzorek byl změřen třikrát. Z hodnoty

velikosti částice, pak byla vypočítána viskozita daného vzorku pomocí rovnice 22. Byla sledována také kontrola kvality měření vzorku na základě hodnoty polydisperzitivního indexu.



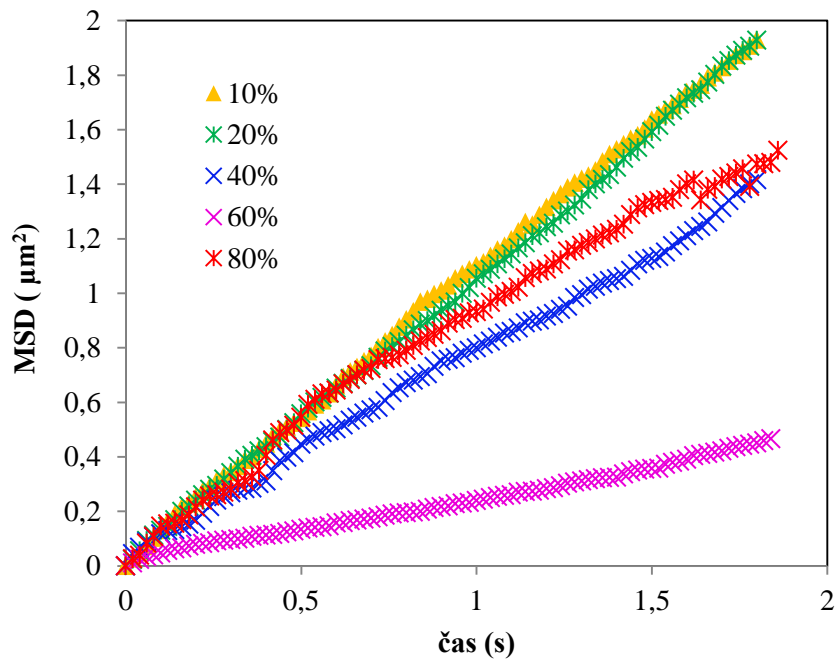
Obr. 18: Reometr ARG2 a ZetaSizer Nano ZS [46]

6. VÝSLEDKY A DISKUZE

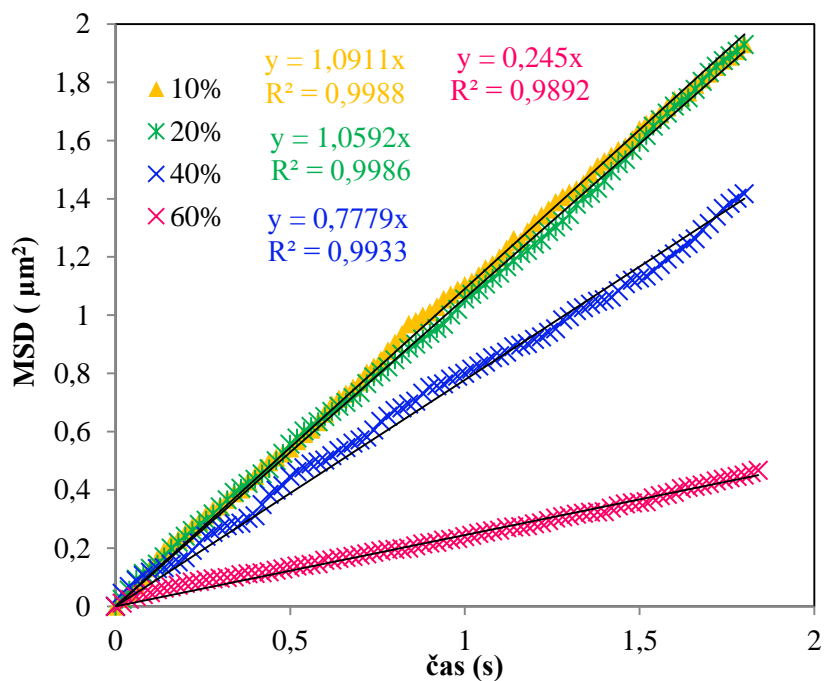
6.1 Glycerolová řada ve vodě

Pro potvrzení správnosti mikrereologických metod byly stanoveny reologické vlastnosti homogenní kapaliny – glycerolu a porovnány s tabelovanými hodnotami. Měření bylo provedeno pomocí jednočásticové mikrereologie (PTM), pomocí klasické makrereologie a mikrereologické DLS metody. Měření každou metodou bylo provedeno třikrát, následně byla vypočítána průměrná hodnota viskozity a určeny chybové úsečky u jednotlivých vzorků. Pouze v případě klasické makrereologie byly vzorky z časových důvodů proměřeny pouze jednou. Výsledky měření a tabelované hodnoty jsou uvedeny v tabulce 1.

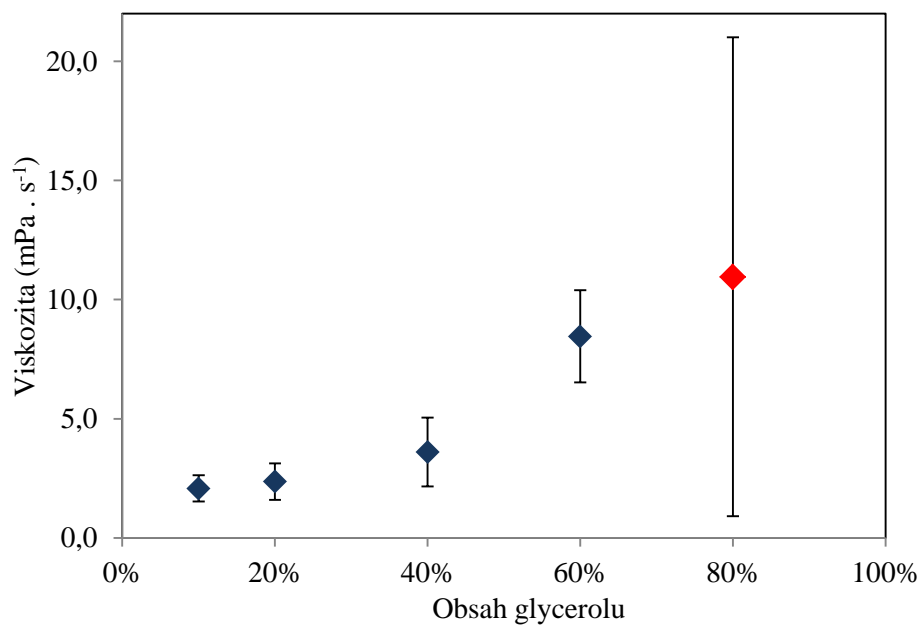
Jednočásticová mikrereologie (PTM)



Obr. 19: Závislost MSD na čase pro jednotlivá objemová procenta glycerolu ve vzorcích. Je zde viditelný rozdílný trend u vzorku obsahující 80 % glycerolu.

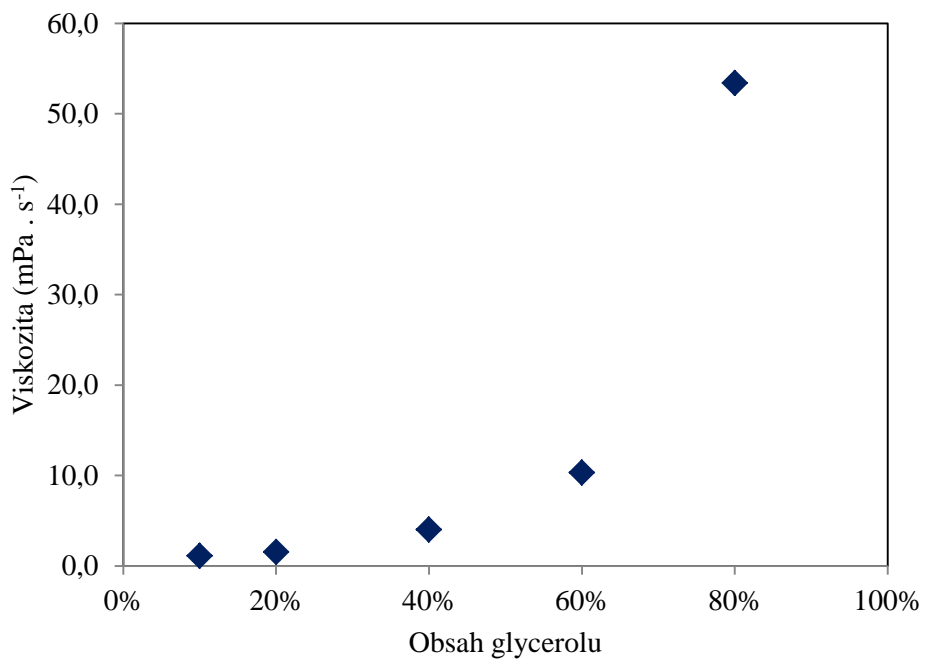


Obr. 20: Znárodnění lineárních trendů závislosti MSD na čase pro vzorky obsahující 10 % - 60 % glycerolu.



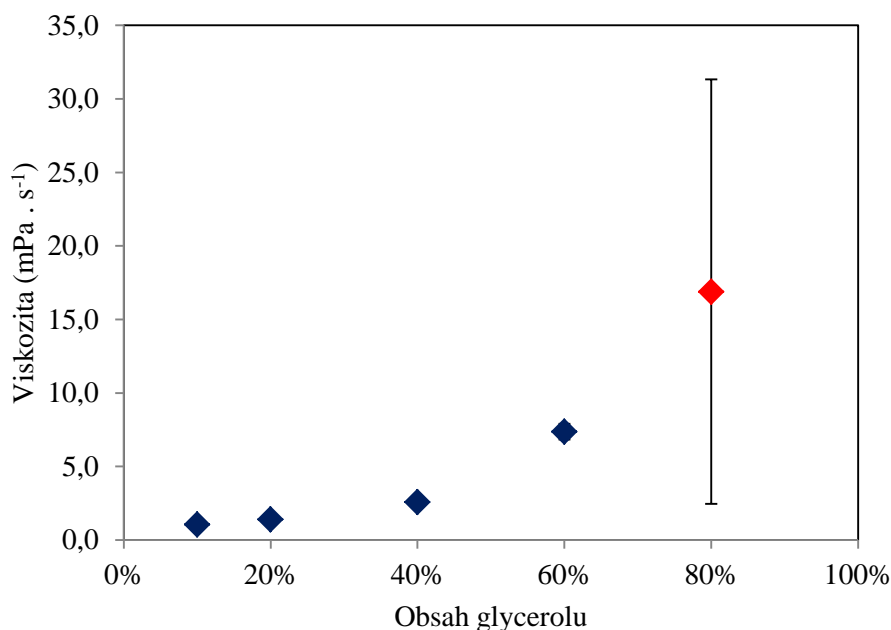
Obr. 21: Graf znázorňující závislost velikosti viskozity na obsahu glycerolu ve vzorku, měřeno metodou PTM

Klasická reologie



Obr. 22: Graf znázorňující závislost velikosti viskozity na obsahu glycerolu ve vzorku, měřeno metodou klasické reologie

DLS



Obr. 23: Graf znázorňující závislost velikosti viskozity na obsahu glycerolu ve vzorku, měřeno metodou DLS

Tabulka 1: Naměřené a tabelované hodnoty viskozit

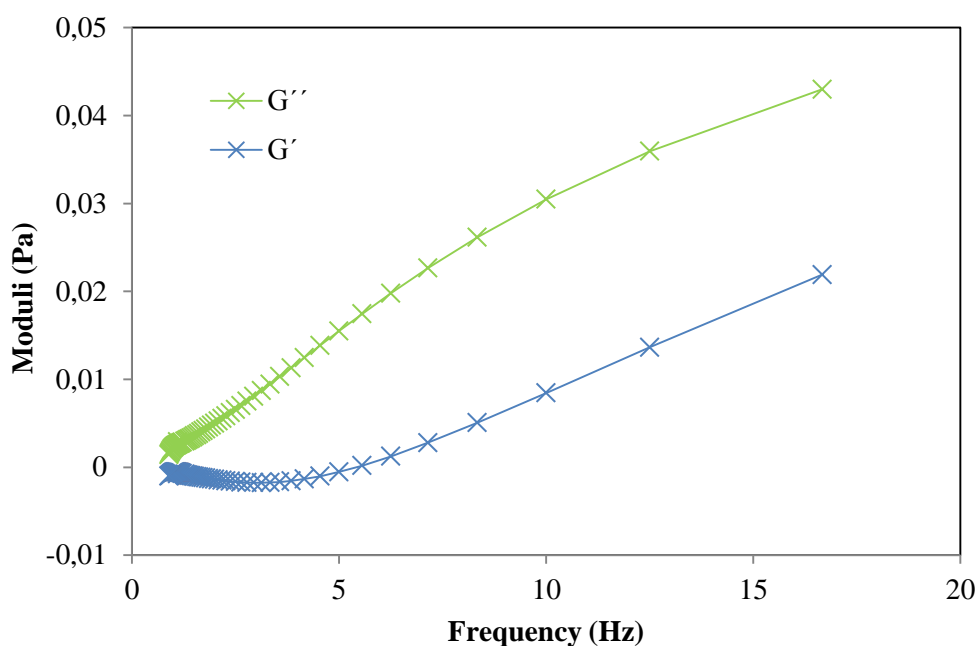
		HMOTNOSTNÍ PROCENTA GLYCEROLU VE VODĚ				
		10%	20%	40%	60%	80%
VISKOZITA (Pa · s ⁻¹) (10 ³)	TABEL. HODNODA	1,29	1,73	3,65	10,66	59,78
	VYSLEDKY KL. REOLOGIE	1,12	1,54	4,02	10,30	53,40
	MIKROREOLOGIE	2,07 ± 0,50	2,36 ± 0,70	3,60 ± 1,41	8,46 ± 1,90	10,95 ± 10,00
	DLS	1,04 ± 0,02	1,40 ± 0,05	2,5 ± 0,02	7,36 ± 0,54	16,8 ± 14,30

Obrázek 19 znázorňuje závislost MSD na čase. Již na tomto grafu můžeme pozorovat pokles gradientu závislosti s rostoucím obsahem glycerolu ve vzorku. Pouze v případě 80% glycerolu můžeme pozorovat jistou anomálii která je pravděpodobně způsobena překročením

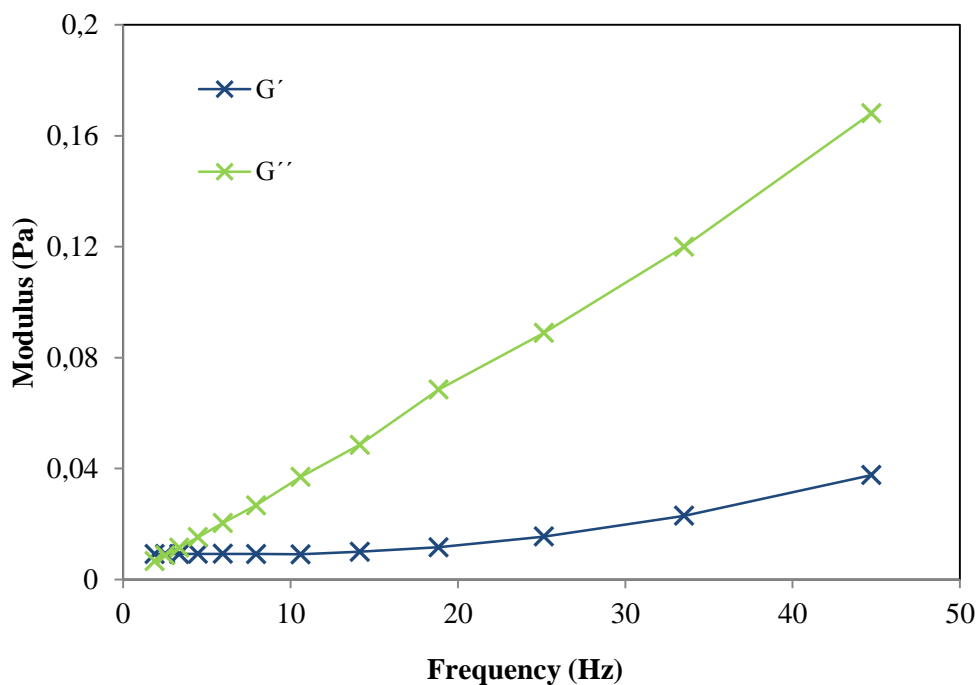
viskozitního limitu pro mikrereologické měření při použití 1 μm částic. Pohyb částic v takto viskózním vzorku je již velmi zbrzděný a získané trajektorie jsou velmi nejednoznačné. Řešením této situace by mohly být částice o menším poloměru, nebo použití vnější síly k pohybu částic, tedy aktivní mikrereologie. Na obrázku 19 můžeme vidět nárůst viskozity s rostoucím hmotnostním obsahem glycerolu ve vodě spojen s klesajícím se trendem závislosti MSD na čase. Zde také můžeme vidět velký odskok 80% glycerolu, který nenásleduje trend ostatních vzorků. Stejná tendence se projevuje na obrázcích 21, 22 a 23. Tento nárůst sledujeme u všech použitých metod.

V tabulce 1 vidíme však také jisté odchylky od tabelovaných hodnot. Ve většině případů jsou výkyvy však velmi malé a případné nepřesnosti mohly být způsobeny hlavně vlivem okolních podmínek, kdy při mikrereologii nemuselo dojít k úplnému ustálení vzorku, či mohlo dojít k nepatrnému pohybu mikroskopu, který na první pohled není vidět, na výsledcích se však projeví. V tabulce je také patrná opravdu velmi nízká hodnota viskozity pro případ vzorku s 80% obsahem glycerolu u mikrereologického měření. Tento vzorek nedosáhl ani po opakovaném měření uspokojující hodnoty viskozity, která by byla srovnatelná s tabelovanou hodnotou. Tento fakt je pravděpodobně vysvětlitelný již vysokou viskozitou 80% glycerolu ve vzorku. Jednočásticová mikrereologie je metoda určena pro měření viskoelastických vlastností materiálů s nižšími hodnotami viskozity. 80% vzorek se tedy pravděpodobně již vyskytuje na hranici či spíše za hranicí měřitelnosti této metody. V případě viskozit určených pomocí DLS, došlo k větší odchylce opět pouze u 80% glycerolu, což mohlo být taktéž způsobeno již vysokou viskozitou vzorku.

Porovnání viskozitního a elastického modulů získaných klasickou reologií a mikrereologií pomocí softwaru MrLab



Obr. 24: Závislost viskozitního a ztrátového modulu na frekvenci pro 40% obsah glycerolu ve vodě získáno pomocí programu MrLab

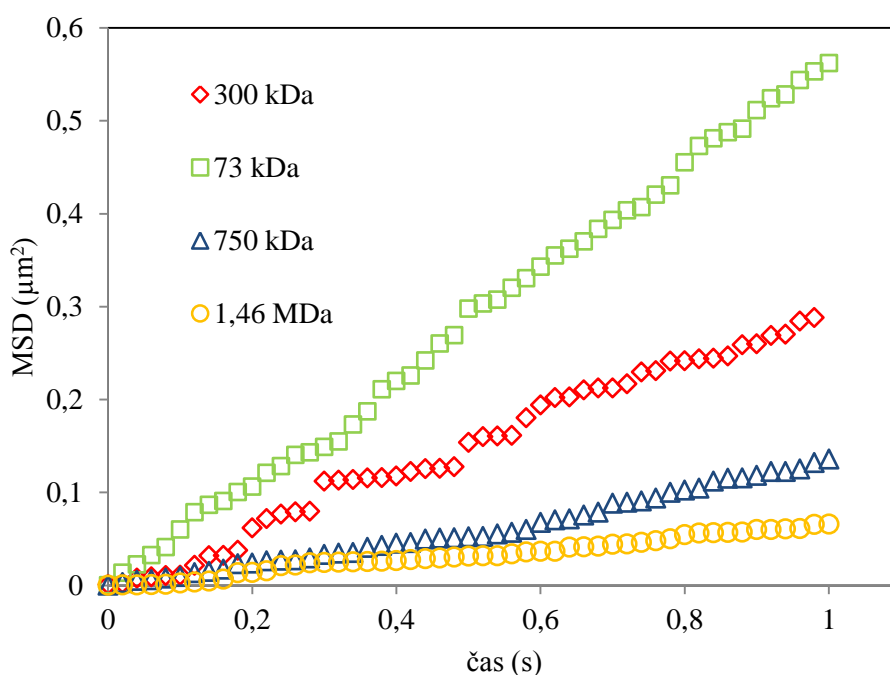


Obr. 25: Závislost viskozitního a ztrátového modulu na frekvenci pro 40% obsah glycerolu ve vodě získáno pomocí klasické reologie

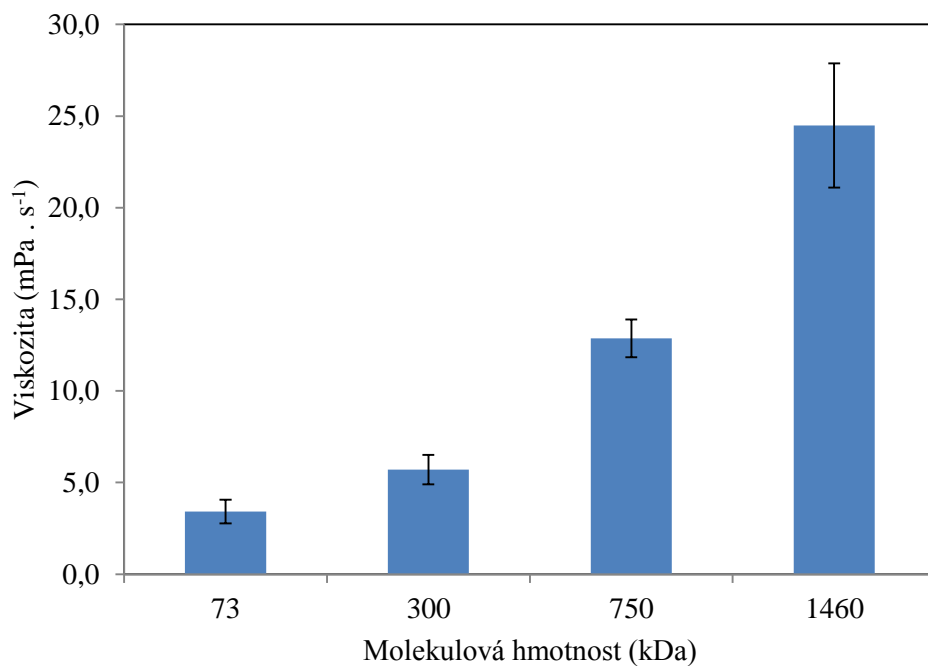
V obou těchto grafech (obr. 24 a 25) je patrný rostoucí trend hodnoty obou modulů s rostoucí hodnotou frekvence. Mnohem vyšších hodnot nabývá viskozitní modul označený zelenou barvou, než modul elastický, což znamená, že ve vzorku převyšuje viskózní charakter nad elastickým. Kvůli své nízké viskozitě se vzorek také nachází na hranici měřitelnosti pro účely určení těchto dvou modulů. Elastická složka se zde totiž prakticky nevyskytuje.

6.2 Řada hyaluronanu o stejné koncentraci s různými molekulovými hmotnostmi

Jednočásticová mikreologie

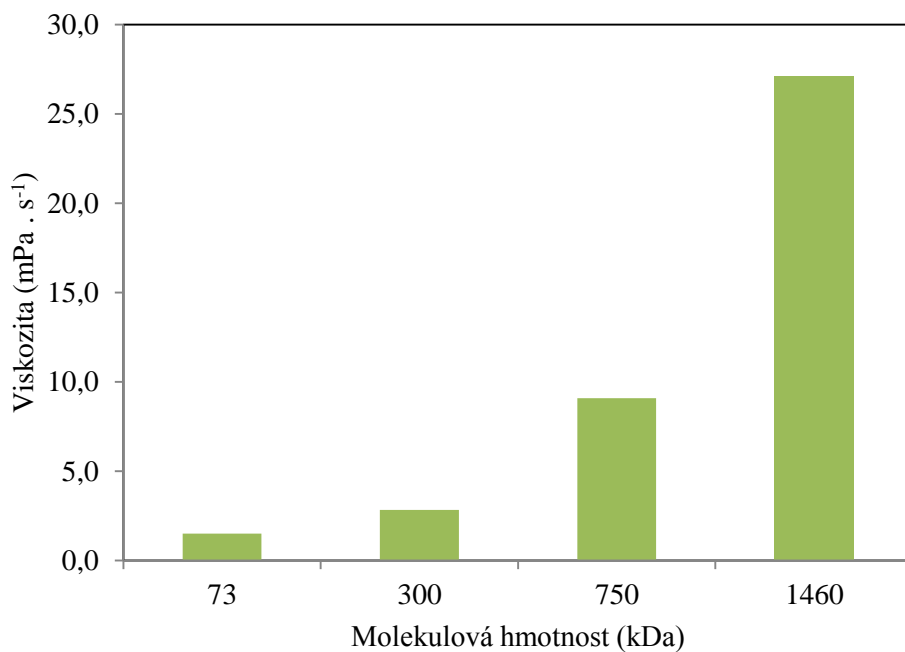


Obr. 26: Závislost průměrných hodnot MSD na čase pro různé molekulové hmotnosti hyaluronanu ve vodě



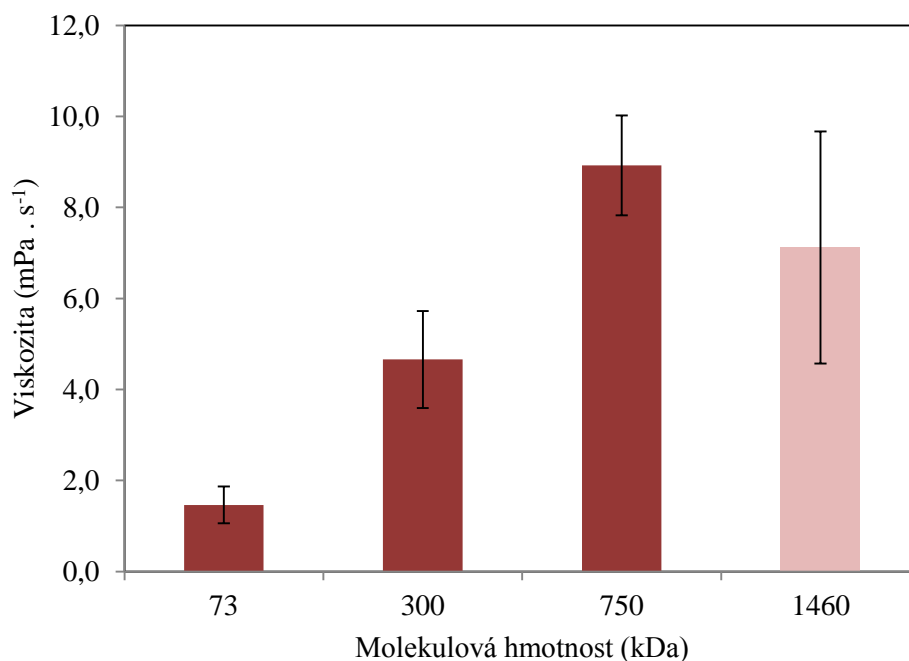
Obr. 27: Hodnoty viskozity pro jednotlivé molekulové hmotnosti hyaluronanu metodou PTM

Klasická reologie



Obr. 28: Hodnoty viskozity pro jednotlivé molekulové hmotnosti hyaluronanu metodou klasické reologie

DLS



Obr. 29: Hodnoty viskozity pro jednotlivé molekulové hmotnosti hyaluronanu metodou DLS

Tabulka 2: Srovnání viskozit různých molekulových hmotností hyaluronanu získaných různými metodami

		MOLEKULOVÁ ŘADA HYALURONANU VE VODĚ			
		73 kDa	300 kDa	750 kDa	1,46 MDa
VISKOZITA (mPa · s ⁻¹)	VYSLEDKY KL. REOLOGIE	1,50	2,84	9,085	27,12
	MIKROREOLOGIE	3,4 ± 1,30	5,70 ± 2,03	12,85 ± 2,70	24,48 ± 1,87
	DLS	1,46 ± 0,41	4,65 ± 1,07	8,92 ± 1,09	7,12 ± 2,55

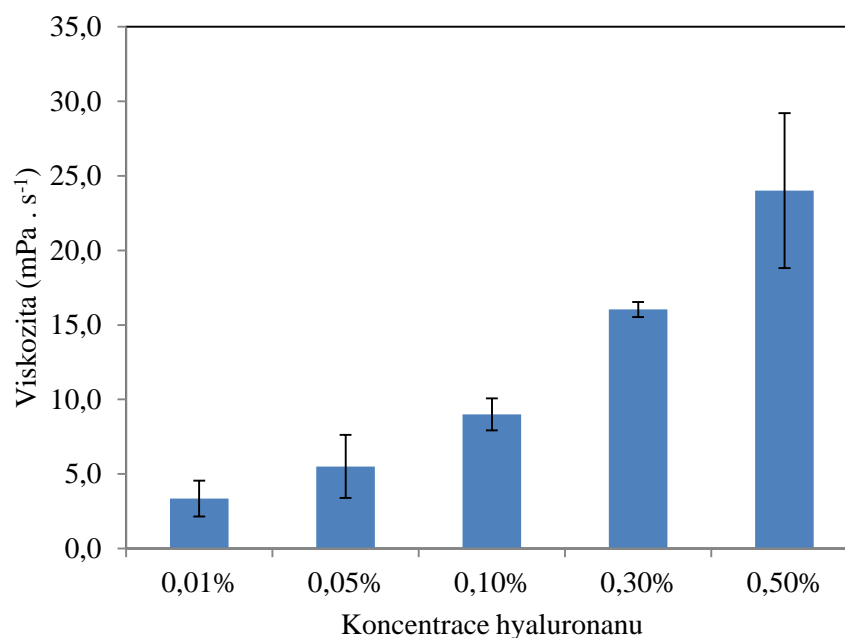
Obrázek 26 znázorňuje klesající gradient závislosti MSD na čase s rostoucí molekulovou hmotností hyaluronanu ve vzorcích a s konstantní koncentrací 0,1 %. Již tento trend

naznačuje, že dochází k postupnému snižování hodnoty viskozity, které pak můžeme pozorovat i na obrázcích 27, 28 a 29 v závislosti na čase. Opět byla získána průměrná hodnota viskozity každého vzorku ze tří opakování a byly vytvořeny chybové úsečky. Jediná významná odchylka nastala v případě vzorku obsahujícího 1,46 MDa hyaluronan. Byla zde naměřena velmi nízká hodnota viskozity, která ani vzdáleně neodpovídá hodnotám získaným ostatními metodami. Odchylka mohla způsobena vyšší hodnotou viskozity, pravděpodobněji však tuto anomálii způsobila nevhodná velikost vložených částic. 1 μm částice byly v tomto případě příliš velké na to, aby vykazovaly přesné výsledky. Tento jev byl vyzorován významným zvýšením hodnoty polydisperzního indexu (viz. Příloha 2). Samotný přístroj pak také upozorňoval na chybu nastávající ve výsledcích, jelikož se jednalo o měření, kde byl překročen velikostní limit částic.

V tabulce 2 jsou zobrazeny hodnoty viskozit pro jednotlivé vzorky příslušící jednotlivým měřením. Největší rozdíl můžeme vidět v případě vzorku obsahující nejvyšší molekulovou hmotnost hyaluronanu naměřené metodou DLS.

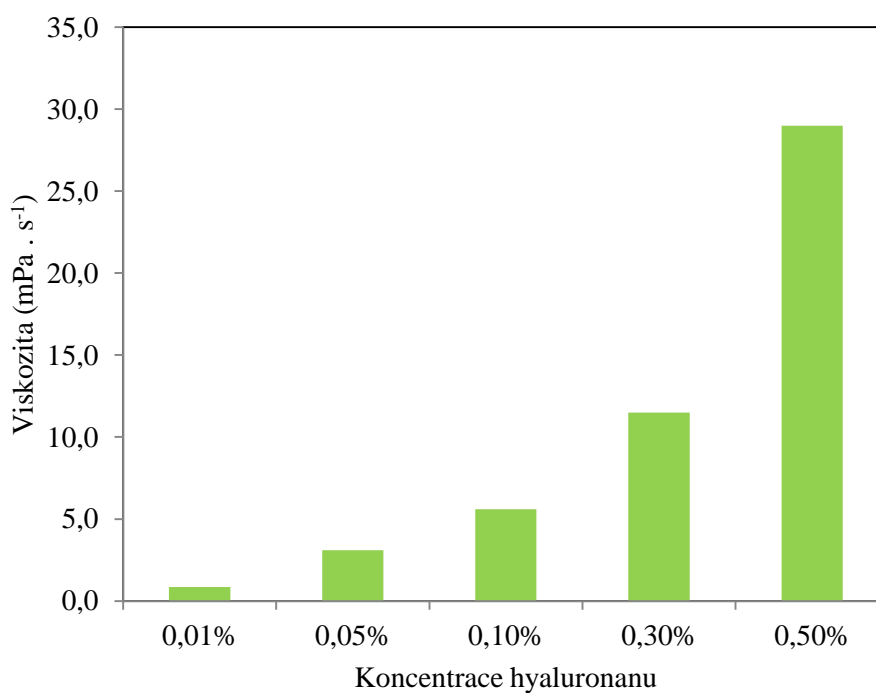
6.3 Koncentrační řada hyaluronanu (750 kDa)

Jenočásticová mikreologie



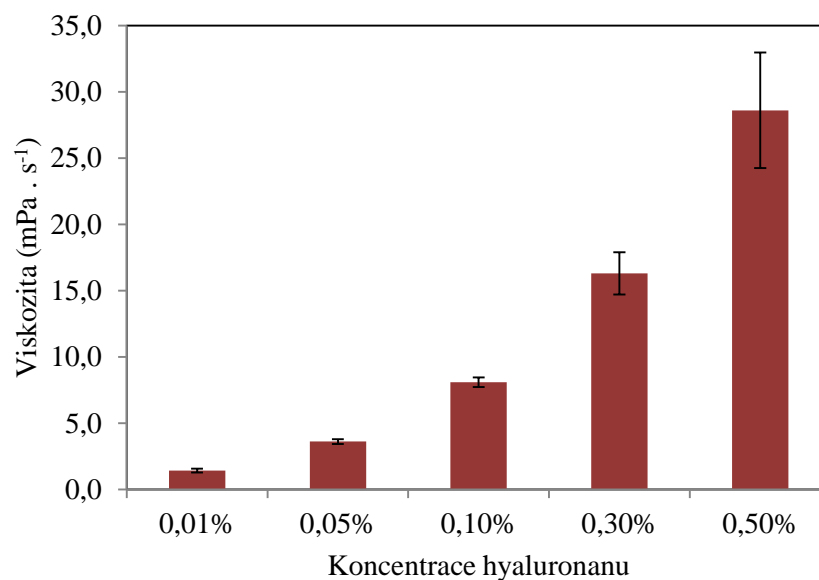
Obr. 30: Hodnoty viskozity pro jednotlivé koncentrace hyaluronanu metodou PTM

Klasická reologie



Obr. 31: Hodnoty viskozity pro jednotlivé koncentrace hyaluronanu získané klasickou reologií

DLS



Obr. 32: Hodnoty viskozity pro jednotlivé koncentrace hyaluronanu získané pomocí DLS

Tabulka 3: Srovnání viskozit různých koncentrací hyaluronanu získaných různými metodami

		KONCENTRAČNÍ ŘADA HYALURONANU VE VODĚ				
		0,01%	0,05%	0,10%	0,30%	0,50%
VISKOZITA (mPa. s ⁻¹)	VYSLEDKY KL. REOLOGIE	0,86	3,10	5,60	11,50	29,00
	MIKROREOLOGIE	3,34 ± 1,20	5,50 ± 2,11	8,99 ± 1,07	16,04 ± 050	24,00 ± 5,19
	DLS	1,43 ± 0,14	3,62 ± 0,19	8,09 ± 037	16,30 ± 1,59	28,60 ± 4,36

Pro případ koncentrační řady byl vybrán hyaluronan o molekulové hmotnosti 750 kDa, jelikož byla u všech metod ověřena dobrá měřitelnost této molekulové hmotnosti. Koncentrační rozsah byl zvolen od 0,01 % do 0,5 %. Pro vyšší koncentrace by mohlo již docházet ke špatné měřitelnosti, způsobené vysokou viskozitou vzorku a následně nízkou pohyblivostí částic. V tomto případě nedošlo ke vzniku žádné významné odchylky, ani v případě vzorku s nejvyšší koncentrací hyaluronanu. Všechny vzorky vykazovaly s rostoucí koncentrací zvyšující se hodnotu viskozity, jak bylo očekáváno.

V tabulce 3 jsou vypsány konkrétní hodnoty viskozit naměřené jednotlivými metodami spolu s chybovými úsečkami, které byly získány opakováním experimentu. Nejvyšší odchylka je v tomto případě zaznamenána u vzorku s nejvyšší koncentrací hyaluronanu měřeného metodou jednočásticové mikrereologie. O málo menší odchylka byla také pozorována pro stejný vzorek měřený metodou DLS.

6.4 Využitelnost mikrereologie ve studiu biokoloidů

Biokoloid pochází se složení dvou slov: bio, což zahrnuje člověka a přírodu a ze slova koloid. Koloidní soustavou označujeme disperzní soustavu obsahující částice, které svou velikostí spadají do rozmezí 1 nm až 1000 nm. Částice v tomto rozmezí udělují danému systému specifické vlastnosti. Pod pojmem biokoloidy si můžeme představit velké množství biomateriálů od vnitřního prostředí buněk, přes bílkoviny, proteiny, gely, tělní tekutin až roztoky biopolymeru a mnoho dalších. Pro měření viskoelastických vlastností může být klasická reologie v mnoha ohledech nedostačující. Často nemůže být splněn hlavní požadavek

reologie, a to na množství vzorku potřebného k měření. Velkou nevýhodou je také nutnost homogenního vzorku, což v případě výzkumu buněk není vůbec možné. Ve své diplomové práci se zabývám aplikací pasivní mikrorologie ve studiu roztoků hyaluronanu. Z výsledků je patrné, že tato metoda je vhodná pro měření biopolymerů s nižší viskozitou, jelikož energie Brownova pohybu není postačující pro narušování polymerní sítě viskóznějších vzorků. V tomto případě by však bylo přijatelné využití aktivní mikrorologické metody, která působením vnější síly dodala vložené částici potřebnou energii. Druhou alternativou by bylo použití menších částic u jednočásticové mikrorologie, které by měly ve viskóznějších vzorcích větší pohyblivost než použité 1 μm částice.

Největší využití nachází pasivní mikrorologie ve studiu viskoelastických vlastností buněk a jejich struktury, převážně cytoplazmy, a jejich okolí [48]. A to ne pouze zdravých buněk, ale také buněk rakovinových. Významnou roli hraje tato metoda také ve studiu tělních tekutin, mezi které patří krev a krevní buňky či oční tekutina. Pasivní metoda může být využita pro studium polymerních gelů, zejména pro pozorování procesu gelovatění [47]. Významným bodem je také studium hydrodynamických vlastností na mezifázovém rozhraní dvou kapalin či pevné látky a kapaliny [51]. AFM mikrorologickou metodou se provádí studium plicních buněk. Aktivní mikrorologie pak našla svou oblast využití u vzorků, které již nevykazují lineární odezvu, jako jsou například koloidní roztoky vyskytující se v blízkosti skelného přechodu [49,50].

7. ZÁVĚR

V této diplomové práci byla prověřena metoda pasivní mikrorologie. I přes mnohé překážky, které nastávaly v průběhu práce, se podařilo metodu uvést do chodu. A to nejen metoda jednočásticové mikrorologie, ale také mikrorologie pomocí DLS byla prověřena. Výsledky obou pasivních mikrorologických postupů byly porovnány s výsledky už dobře známé a léty prověřené metody, klasické reologie. V případě glycerolové řady byly výsledky všech metod porovnávány také s tabelovanými hodnotami. Toto měření nám potvrdilo, že výsledky získané metodou PTM i DLS jsou si velmi blízké a shodují se velmi upokojivě s hodnotami viskozit získaných klasickou reologií. Všechny tři metody vykazovaly mírné odchylky od tabelovaných hodnot, což mohlo být samozřejmě způsobeno vlivem vnějších podmínek, například nedosažením přesné teploty 25 °C při temperování vzorku, případně přítomností drobných nečistot. Také zde byl potvrzen fakt, že metoda pasivní mikrorologie

je vhodná pouze pro vzorky s menší hodnotou viskozit. Vzorky s vysokým obsahem glycerolu byly kvalitně změřeny pouze na klasickém reometru. U této sady vzorků také bylo demonstrováno měření viskozitního a elastického modulu pro klasickou reologii a také pomocí softwaru MrLab. I zde byla zaznamenána poměrně uspokojující shoda naměřených dat.

V druhém souboru vzorků s různými molekulovými hmotnostmi o stejné koncentraci hyaluronanu bylo taktéž potvrzeno, že výsledky ze všech tří metod jsou s malými odchylkami shodné. Také zde se však projevil fakt, že viskozita vysokomolekulárního hyaluronanu byla při dané koncentraci na hranici měřitelnosti mikroreologických metod.

I u koncentrační řady hyaluronanu byly získány uspokojivé výsledky viskozit u všech tří metod. S rostoucí viskozitou však byly získávány většinou větší hodnoty chybových úseček, které naznačovaly, že se blížíme ke krajní hranici použitelnosti pasivní mikroreologie.

Byly zde také zhodnoceny možnosti využití těchto metod při studiu biokoloidů. Na základě získaných výsledků byla odvozena možnost využití pasivní mikroreologie převážně v případě méně viskózních vzorků. U vzorků více viskózních by bylo již vhodné využít některé s aktivních mikroreologických metod. Podle výsledků literární rešerže byla zmapovaná oblast využitelnosti těchto metod. Cílem působnosti jsou převážně biologické systémy, heterogenní systémy různých typů či systémy, u kterých není možno získat větší množství vzorku.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

1. Atkins E. D., Sheehan J. K.: *The molecular structure of hyaluronic acid.*, 1971, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1178299/?page=1>
2. Hascall, C. V., Laurent, C. T.: *Hyaluronan: Structure and Physical Properties.* Glycoforum [online], 1997, [cit. 3. 1. 2010], <http://www.glycoforum.gr.jp/>
3. Harrison, K., Hyaluronan. *Hyaluronan @ 3Dchem.com* [online], 2008, [cit. 2. 2. 2010] <http://www.3dchem.com/molecules.asp?ID=425#>
4. Mechanika hornin, Reologie [online], [cit. 8. 2. 2012], dostupné z <http://departments.fsv.cvut.cz/k135/data/wp-upload/2010/05/mechanika-hornin-6.pdf>
5. Rheology, Wikipedie [online], [cit. 8. 2. 2012], dostupné z <http://en.wikipedia.org/wiki/Rheolog>
6. Barnes, H. A.: *An introduction to rheology*, 1998
7. Kvítek, L., Panáček, A.: *Základy koloidní chemie.* 2007
8. Viskozita, [online], [cit. 22. 11. 2011], <http://cs.wikipedia.org/wiki/Viskozita>
9. Bekah, Devesh. *Measurement of viscoelastic properties of treated and untreated cancer cells using passive microrheology: Dissertation.* Toronto: Ryerson University, 2010, 53 p.
10. Chen, D. T. N., Wen, Q., Janmey, P. A., Crocker, J. C., Yodh, A. G.: *Rheology of Soft Materials.* Matter Physics, 2010, vol. 1, p. 301 – 32
11. Mizuno, D., Head, D. A., MacKintosh, F. C., Schmidt, C. F.: *Active and passive microrheology in equilibrium and nonequilibrium systems,* *Macromolecules*, 2008, vol. 41, p. 7194 – 7202
12. Mansel, B. W.: *Setup and calibration of a suite of The-state-of the Art Microrheology techniques,* *disertation thesis,* Massey university, New Zeland, 2011
13. J.C. Crocker and D.G. Grier. *Methods of digital video microscopy for colloidal studies.* *Journal of colloid and interface science*, 1996, vol. 71, p. 298–310

14. Tien – Nang Chen, Daniel. Microrheology of soft matter: Dissertation. Pennsylvania: Faculty of the University of Pennsylvania, 2010, 171 p. Supervisor of Dissertation Arjun G. Yodh.
15. Yixuan, L.: Linking particle dynamics to intracellular micromechanics in living cells: Disertation, University of Twente, 2009
16. Gardel, M. L., Valentine, M. T., Weitz, D. A: Microrheology
17. Valentine, M. T., Perlman, Z. E., Gardel, M. L. Shin, J. H., Matsudaira, P., Mitchinson, T. J., Weitz, D. A.: Colloid surface chemistry critically affects multiple tracking measurements of biomaterials. Biophysical journal, 2004, vol. 86, p. 4004 – 4014
18. Gardel, M. L., Valentine, M. T., Weitz, D. A: Microrheology
19. Valentine, M. T., Perlman, Z. E., Gardel, M. L. Shin, J. H., Matsudaira, P., Mitchinson, T. J., Weitz, D. A.: Colloid surface chemistry critically affects multiple tracking measurements of biomaterials. Biophysical journal, 2004, vol. 86, p. 4004 – 4014
20. Corrigan, M. A., Donald, A. M.: Lengthscale dependence of critical exponents determined by vibration corrected two - particle microrheology. The Royal society ofchemistry, 2010, vol. 6, p. 4105 – 4111
21. John C. Crocker and Brenton D. Hoffman: Multiple-particle tracking and two-point microrheology in cells, Methods in cell biology, 2007, vol. 83, p. 141–178
22. Schmitz, K.: Dynamics light scattering by macromolecules. Academic press. Inc, New York, 1990
23. Dynamic light scatering: [online], poslední revize 2. 1. 2012,[cit. 23. 1. 2012], dostupné z: http://en.wikipedia.org/wiki/Dynamic_light_scattering
24. Mansel, B. W.:Setup and calibration of a suite of The-state-of the Art Microrheology techniques, disertation thesis, Massey university, New Zeland, 2011
25. Pecora. R.: Dynamic Light Scattering: application of photon correlation spectroscopy, Plenum Press, 1985

26. Proven performance for a wide range of analytical application, [online], [cit. 23. 1. 2012], dostupné z: <http://dspace.mit.edu/bitstream/handle/1721.1/36673/44031337.pdf?sequence=1>
27. Determining dispersant viscosity using dynamics light scattering, [online], [cit. 1. 3. 2012], dostupné z www.malvern.com
28. Harden, J. L., Viasnoff, V.: Recent advances in DWS-based microrheology. *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 6, 2001, p. 438 – 445
29. Institute for Mechanical Process Engineering and Mechanics: Microrheology-Diffusing wave spectroscopy, [online], [cit. 23. 1. 2012]
30. Wyss, M. H., Romer, S., Scheffold, F., Schurtenberger, P., Gauckler, L. J.: Diffusing-Wave Spectroscopy of Concentrated Alumina Suspensions during Gelation. *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 240, 2001, p. 89 – 97
31. Scheffold, F., Romer, S., Cardinaux, F.: New trends in optical microrheology of complex fluids and gels. *Progr. Colloid Polym Sci*, 2004, vol. 123, p. 141–146
32. Li, Y.: Linking particle dynamics to intracellular micromechanics in living cells. Dissertation thesis, 2009, University of Twente, The Netherlands
33. Atomic force microscopy, [online], [cit. 26. 1. 2012], dostupné z <http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:AFM.PNG>
34. Atomic force microscopy, Nanoscience, [online], [cit. 26. 1. 2012], dostupné z <http://www.nanoscience.com/education/afm.html>
35. Atomic force microscopy, [online], [cit. 26. 1. 2012], dostupné z <http://www.chembio.uoguelph.ca/educmat/chm729/afm/introdn.htm>
36. Weihs, D., Mason, Michael, T. G., Teitell, A.: Bio-Microrheology: A Frontier in Microrheology. *Biophysical Journal*, vol. 91, 2006, 4296-4305 p.
37. Hyungsuk, L., Ferrer, J. M., Nakamura, F., Lang, M. J., Kamm, R. D.: Passive and active microrheology for cross-linked F-actin networks *in vitro*. *Acta Biomaterialia*, vol. 6, 2009, 1207-1218 p.

38. Palmer, A., Mason, T. G., Xu, J., Kuo, C. S., Wirtz, D.: Diffusing Wave Spectroscopy Microrheology of Actin Filament Networks. *Biophysical Journal*, vol. 76, 1999, p. 1063-1071
39. Heinemann, C., Cardinaux, F., Scheffold, F., Schurtenberger, P., Escher, F., Conde-Petit, B.: Tracer microrheology of γ -dodecalactone induced gelation of aqueous starch dispersions. *Carbohydrate Polymers*, vol. 55, 2004, 155-161
40. Moschakis, T., Murray, B. S. Dickinson, E.: On the kinetics of acid sodium caseinate gelation using particle tracking to probe the microrheology. *Journal of Colloid and Interface science*, 2010, vol. 345, 278-285 p.
41. Cohen, I., Weihs, D.: Rheology and microrheology of natural and reduced-calorie Israeli honeys as a model for high-viscosity Newtonian liquids. *Journal of food Engineering*, vol. 100, 2010, 366-371 p.
42. Ortega, F., Ritacco, H., Rubio, R. G.: Interfacial microrheology: Particle tracking and related techniques. *Current Opinion in Colloid & Interface science*, 2010, vol. 15, 237-245 p.
43. Sohn, I. S., Rajagopalan, R., Dogariu, A. C.: Spatially resolved microrheology through a liquid/liquid interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 269, 2004, 503-513p.
44. Nikon [online], [cit. 29. 11. 2011], <http://www.labwrench.com/?equipment.view/equipmentNo/9417/Nikon/Eclipse-E200>
45. Kamery [online], [cit. 29. 11. 2011] <http://www.google.cz/imgres?q=canon+eos+550d&hl=cs&biw=1366&bih=600&tbnm=isch&tbnid=5Y2s6hFdbxo2IM:&imgrefurl=http://onlinerecenze.cz/kamery-fotoaparaty/canon-eos-550d347/&docid=xenTIUbC322OZM&imgurl=http://onlinerecenze.cz/images/products/original/canon-eos-550d1300570305.jpg&w=900&h=900&ei=BLPUTtWHMczZ4QSDkIiZAQ&zoom=1&iact=hc&vpx=499&vpy=263&dur=639&hovh=225&hovw=225&tx=133&ty=122&sig=100855292525998657958&page=1&tbnh=135&tbnw=135&start=0&ndsp=21&ved=1t:429,r:9,s:0>
46. Centrum materiálového výzkumu, [online], [cit. 3. 3. 2012], dostupné z <http://www.materials-research.eu/cz/laboratore/laborator-biokoloidu/stanoveni-velikosti-a-naboje-castic/>
47. Mahaffy, R. E., Shih, C. K., MacKintosh, F. C., Kas, J.: Scanning probe-based frequency dependent microrheology of polymer gels and biological cells. *Phys. Rev. Lett.*, 2000, vol. 85, p. 880-883

48. Daniels, B. R., Masi, B. C., Wirtz, D.: Probing single-cell micromechanics in vivo: The microrheology of *C. elegans* developing embryos, *Biophysics Journal*, 2006, vol. 90, p. 4712-4719
49. Habdas, P., Schaar, D., Levitt, A. C., Weeks, E. R.: Forced motion of a probe particle near the colloidal glass transition. *Europhysics letters*, 2004, vol. 67, p. 477-483
50. Khair, S. A., Brady, J. F.: Microrheology of colloidal dispersions: Shape matters. *Journal of microrheology*, 2008, vol. 52, p. 165
51. Joly, L., Ybert, C., Bocquet, L.: Probing the nanohydrodynamics at liquid-solid interfaces using thermal motion, *Physics Rev. Lett*, 2006, vol. 96

9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

MSD	Mean squared displacement
DWS	Diffusing wave spectroscopy
DLS	Diffusing light spectroscopy
AFM	Atomic force microscopy
PTM	Particle tracking microrheology
TPM	Two point microrheology
CCD	Coupled charge device
G'	Elastický modul
G''	Viskozitní modul
G^*	Komplexní smykový modul
l^*	střední volná délka dráhy (mean free path length)
L	šířka vzorku
TU	Tuhá látka
TE	Tekutá kapalina
PR	Pružná látka
TV	Tvárná látka
VL	Vláčná látka
VA	Vazká kapalina
PS	Polystyren
PEG	Polyetylenglykol
SC	Sodium kaseinát

10. SEZNAM PŘÍLOH

- Příloha 1 Tabulka výhod a nevýhod jednotlivých skupin mikroreologie
- Příloha 2 Tabulky hodnot polydisperzitních indexů u měření glycerolové řady na DLS

11.PŘÍLOHY

Příloha 1, Tabulka 1: Výhody a nevýhody jednotlivých skupin mikreologie

Metoda	Výhody (+)	Nevýhody (-)
Aktivní mikreologie	Frekvenční rozsah 0,1 Hz - 100 kHz	limitováno ve vysokých frekvencích
Pasivní mikreologie	nižší cena	limitováno pro tuhé materiály
	jednodušší zařízení	
	bez nutnosti použití vnější síly	problém v nelineárních systémech
	měření je vždy v lineárním vizkoelastickém režimu	
nemůže docházet ke změnám ve stuktuře materiálu působením vnější síly		
Metoda	Výhody (+)	Nevýhody (-)
PTM	poskytuje pohled do vnitřní struktury a reologie okolního prostředí	pouze do 50 kHz
	není limitováno časovým a prostorovým rozlišením	obtížné určení MSD většího množství částic
	pozorování pohybu jedné částice dovoluje studium nehomogenit ve vzorku	
TPM	je nezávislá na chemii povrchu částice	-
	možnost určit reologické chování inhomogenních materiálů	-
AFM	vhodné pro studiu tuhých materiálů s elastickým modulem v okolí 1 Gpa	-
DWS	MSD je získáno pro větší soubor částic	není možnost získat MSD pro jednotlivé částice
	vhodné i pro zakalené vzorky	
DLS	MSD je získáno pro větší soubor částic	nevhodné pro zakalené vzorky

Příloha 2

Tabulka 2: Hodnoty polydisperzitivních indexů u měření glycerolové řady na DLS

	POLYDISPERZITNÍ INDEX					
	Mili-Q	10%	20%	40%	60%	80%
Glyc. řada I	0,075	0,025	0,0105	0,084	0,12	0,34
Glyc. řada II	0,61	0,04	0,05	0,07	0,06	0,21
Glyc. řada III	0,03	0,06	0,16	0,18	0,29	0,30

Tabulka 3: Hodnoty polydisperzitivních indexů u měření molekulové řady hyaluronanu (01 %) na DLS

	POLYDISPERZITNÍ INDEX				
	Mili-Q	73 kDa	300 kDa	750 kDa	1,46 MDa
Molekulová řada I	0,06	0,15	0,3	0,4	0,61
Molekulová řada II	0,03	0,13	0,21	0,29	0,79
Molekulová řada III	0,09	0,28	0,36	0,45	0,58

Tabulka 4: Hodnoty polydisperzitních indexů u měření koncentrační řady hyaluronanu (750 kDa) na DLS

	POLYDISPERZITNÍ INDEX					
	Mili-Q	10%	20%	40%	60%	80%
Konc. řada I	0,08	0,29	0,36	0,31	0,22	0,56
Konc. řada II	0,08	0,36	0,41	0,31	0,25	0,26
Konc. řada III	0,33	0,28	0,20	0,34	0,30	0,54