



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

MIKROREOLOGIE BIOKOLOIDNÍCH SYSTÉMŮ

MICRORHEOLOGY OF BIOCOLLOIDS

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Zuzana Hnylučová

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

BRNO 2016



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

Zadání dizertační práce

Číslo dizertační práce:	FCH-DIZ0124/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Ing. Zuzana Hnylučová	
Studijní program:	Fyzikální chemie (P1404)	
Studijní obor:	Fyzikální chemie (1404V001)	
Vedoucí práce	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.	
Konzultanti:		

Název dizertační práce:

Mikroreologie biokoloidních systémů

Zadání dizertační práce:

Cílem práce je nastudovat principy a techniky mikroreologie, zavést pasivní techniky v podmínkách FCH VUT v Brně a využít je ke studiu vybraných biokoloidních systémů.

Termín odevzdání dizertační práce: 22.4.2016

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

Ing. Zuzana Hnylučová
Student(ka)

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2015

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

ABSTRAKT

Cílem předložené dizertační práce bylo důkladné studium pasivních mikrореologických technik, jakožto nových metod pro možnost charakterizace viskoelastických vlastností látek, které vykazují jisté výhody či možnosti poskytnou dopňkové informace k dlouhodobě využívané klasické reologii. Z široké škály pasivních metod byly během přípravy dizertační práce v praxi zavedeny a využity jednočásticová video - mikrореologie s vyhodnocením pomocí IDL softwaru, mikrореologie založená na rozptylu světla – DLS mikrореologie a FCS mikrореologie. Navíc byl také vytvořen skript v prostředí Matlabu pro jednoduché vyhodnocení viskozity vzorku z velmi malého objemu. Aplikovatelnost těchto metoy byla zkoumána u nejrůznějších biokoloidních systémů jako jsou roztoky či gely kyseliny hyauronové, ke studiu vlastností mezifázových rozhraní či studiu procesu gelace agarosových gelů. Z velké části byly výsledky porovnávány a s výsledky klasické reologie. Na základě získaných dat byla diskutována možnost využitelnosti dané metody pro konkrétní systém, či případná doporučení pro budoucí měření. Byly také nastíněny hlavní výhody či limity měřitelnosti jednotlivými technikami v porovnání s metodou klasické reologie.

KLÍČOVÁ SLOVA

reologie, pasivní mikrореologie, viskoelastická, biokoloidy

ABSTRACT

The main aim of the doctoral thesis was thorough study of passive microrheological techniques as advanced methods for characterisation of viscoelastic properties of soft material. These techniques are able to provide certain advantaged or additional information on classical rheology. Several techniques from the wide range of passive microrheological group such as one particle video – microrheology with IDL data procesing, microrheology based on light scattering – DLS or FCS microrheology have been applied in practice during my PhD studies. New Matlab script has been also invented to simply obtain information about viscosity of low volume samples. Aplicability of techniques were studied on several various bicolloids such as solutions or gels of hyaluronic acid, on study of properties at the interfaces or on gelation proces studies of agarose. Obtained data were compared classical rheology results. Suitability of each technique for investigated systems or appropriate reccomendations for further measurements were didcussed based on obtained data. Main advantages and limites of passive microrheology techniques were also described in comparison wih classical rheology method.

KEY WORDS

Rheology, passive microrehology, viscoelasticity, haluronic acid, biocolloids

HNYLUCHOVÁ, Z. Mikrореologie biokoloidních systémů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 137 s. (přílohy 17 s.). Vedoucí dizertační práce: prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato dizertační práce byla vypracována samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsou správně a úplně citovány. Tato práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické, Vysokého učení technického v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího dizertační práce a děkana FCH VUT.

.....
Ing. Zuzana Hnyluchová

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala mému vedoucímu dizertační práce prof. Ing. Miloslavu Pekařovi, Csc. za vedení, cenné připomínky, čas a energii, kterou mi věnoval během mého doktorského studia. Mé poděkování si zaslouží také prof. Eric Weeks, který mi poskytoval cenné rady a konzultace v oblasti mikrореologie převážně během mé stáže na Emory Univerzitě. Dále bych ráda poděkovala všem kolegům a kolegyním z Fakulty chemické za spolupráci, podnětné diskuze a konzultace při řešení experimentálních problémů.

Speciální poděkování patří mojí rodině a blízkým za neustálou podporu, kterou mi poskytovali po celou dobu mého studia.

OBSAH

1	ÚVOD	10
2	TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1	Základní principy mikrorheologie	11
2.1.1	Hierarchie mikrorheologických metod	12
2.2	Podstata pasivní mikrorheologie	14
2.2.1	Brownův pohyb	14
2.2.2	Einsteinova teorie Brownova pohybu	17
2.3	Jednočásticová mikrorheologie	18
2.3.1	Metody inverze dat	22
2.4	Dvoučásticová mikrorheologie	26
2.5	DLS mikrorheologie	31
2.5.1	Základní princip DLS mikrorheologie	31
2.5.2	Využitelnost DLS mikrorheologie	33
2.5.3	Výhody a nevýhody DLS mikrorheologie	34
2.6	FCS mikrorheologie	34
2.6.1	Základní princip FCS mikrorheologie	34
2.6.2	Výhody a nevýhody FCS mikrorheologie	35
2.7	Rozsah použitelnosti a správný výběr jednotlivých mikrorheologických metod	36
2.8	Mikrorheologické částice a jejich správný výběr	38
2.8.1	Velikost částice	38
2.8.2	Hustota částic	39
2.8.3	Povrch částice	40
3	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	42
3.1	Aplikace mikrorheologických metod ke studiu gelů	42

3.2	Aplikace mikrореologických metod ke studiu biomateriálů	46
3.3	Aplikace mikrореologických metod ke studiu micelárních roztoků	49
3.4	Aplikace mikrореologických technik ke studiu teplotních závislostí viskozity	50
4	MATERIÁLY A METODY	52
4.1	Použité materiály	52
4.2	Příprava vzorků	53
4.2.1	Roztoky kyseliny hyaluronové	53
4.2.2	Roztoky glycerolu	53
4.2.3	Gely kyseliny hyaluronové	53
4.2.4	Agarosové gely pro studium průběhu gelace	53
4.2.5	Roztoky HSA a BSA pro mezifázová měření	54
4.3	Použité přístroje a programy	54
4.3.1	FCS	54
4.3.2	DLS	54
4.3.3	Video-mikrореologie	55
4.3.4	Reologie	55
4.3.5	Viskozimetrie	56
4.4	Měřicí metody:	57
4.4.1	Klasická reologie	57
4.4.2	FCS mikrореologie	57
4.4.3	Video-mikrореologie	60
4.4.4	Měření mikrореologie mezifázového rozhraní	64
4.4.5	Statické a dynamické chyby měření PTM	67
4.4.6	DLS mikrореologie	69
5	VÝDLEDKY A DISKUZE	70

5.1	Vytvoření MATLAB scriptu pro zpracování dat video-mikroreologie (mikroviskozimetrie)	70
5.2	Vliv vlastností částic na mikroreologická měření	75
5.2.1	Vliv povrchu částice	75
5.2.2	Vliv velikosti částic	77
5.3	Zavedení a ověření možnosti aplikace FCS mikroreologie	79
5.3.1	Měření homogenních vzorků	79
5.3.2	Měření heterogenních vzorků	81
5.4	Aplikace reologie a mikroreologie ke studiu vlivu teploty na viskozitu roztoku hyaluronanu	84
5.4.1	Porovnání teplotních křivek klasické reologie a DLS mikroreologie za použití 100 nm částic	85
5.4.2	Porovnání teplotních křivek Reologie a DLS mikroreologie o různých velikostech částic	86
5.4.3	Porovnání relativních viskozit	88
5.5	Aplikace mikrorologie ke studiu hyaluronových gelů	90
5.6	Aplikace mikroreologie ke studiu procesu gelace agarosy	96
5.6.1	Vliv teploty na viskozitu samotného rozpouštědla	97
5.6.2	Porovnání velikostí části	99
5.6.3	Průběh gelace roztoků agarosy o různých koncentracích	102
5.7	Aplikace mikroreologie ke studiu vlastností mezifázového rozhraní	105
5.7.1	Změna viskozity mezifázového rozhraní v čase	106
5.7.2	Vliv výšky roztoku na viskozitu mezifázového rozhraní	108
6	ZÁVĚR	112
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	113
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	125

9	SEZNAM TABULEK	127
10	SEZNAM OBRÁZKŮ	127
11	PŘÍLOHY	132
11.1	Příloha 1	132
12	VĚDECKÁ A PUBLIKAČNÍ ČINNOST	135
12.1	Články v časopise:	135
12.2	Příspěvky na mezinárodních konferencích	135
12.3	Abstrakty na mezinárodních konferencích	136
12.4	Přednášky na konferencích	136
12.5	Postery na konferencích	137
12.6	Absolvované stáže	137

1 ÚVOD

Reologie, jakožto věda zabývající se studiem viskózních a elastických vlastností materiálů hraje důležitou roli v mnoha průmyslových oblastech. Charakterizace reologických parametrů každého materiálu zásadně napomáhá při vyladění jejich vlastností tak, aby byl pro daný účel co nejlepší.

Reologie našla své uplatnění v široké škále průmyslových oborů. V kosmetice je stanovení reologických parametrů využíváno například u přípravy krémů, kde je velmi důležitá jejich roztíratelnost. V potravinářství reologie pomáhá sledovat změny vlastností při přípravě pokrmů, charakterizovat ideální složení některých potravin pro jeho nejjednodušší dávkování z láhve či kelímku. Své využití našla reologie i v oborech jako jsou lékařství či farmaceutický průmysl při výrobě či užívání léku nebo charakterizaci viskoelastických vlastností tělních tekutin jako je krev či plazma.

Měření reologických vlastností je již desítky let běžně prováděno pomocí takzvaného reometru. V poslední době však vstoupila na reologické pole nová metoda, zvaná mikroreologie, nabízející jisté výhody oproti léty prověřené klasické reologii. Jak již název napovídá, hlavní výhodou je množství vzorku potřebné pro měření. Mikroreologie je schopna určit viskoelastické vlastnosti materiálu z pouhé jedné kapky (10 μ l) a je tedy mnohem vhodnější k měření biologických, těžce dostupných či velmi drahých materiálů. Mikroreologie však nepředstavuje pouze jednu jedinou metodu. Jedná se o celou škálu technik, přičemž každá z nich vykazuje jisté výhody či nevýhody a ke každému účelu a materiálu a můžeme vždy vybrat tu nejvhodnější.

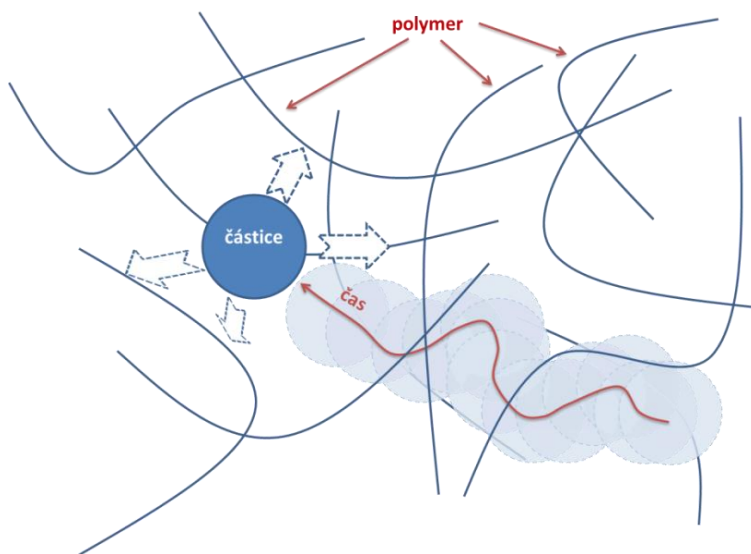
Cílem této dizertační práce je důkladné studium a zavedení pasivních mikroreologických metod na fakultě chemické. A dále jejich následná aplikace a studium možností využití pro koloidní systémy jako jsou polymerní roztoky, gely, ke studiu vlastností mezifázového rozhraní a mnoha dalších.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Základní principy mikrореologie

Základní princip metody zvané mikrореologie je zdánlivě velmi jednoduchý. Jedná se o začlenění drobných částic do struktury zkoumaného materiálu, jak naznačuje schéma na obrázku 1. Vyhodnocením pohybu těchto sond v čase je pak možné určit vlastnosti daného materiálu.

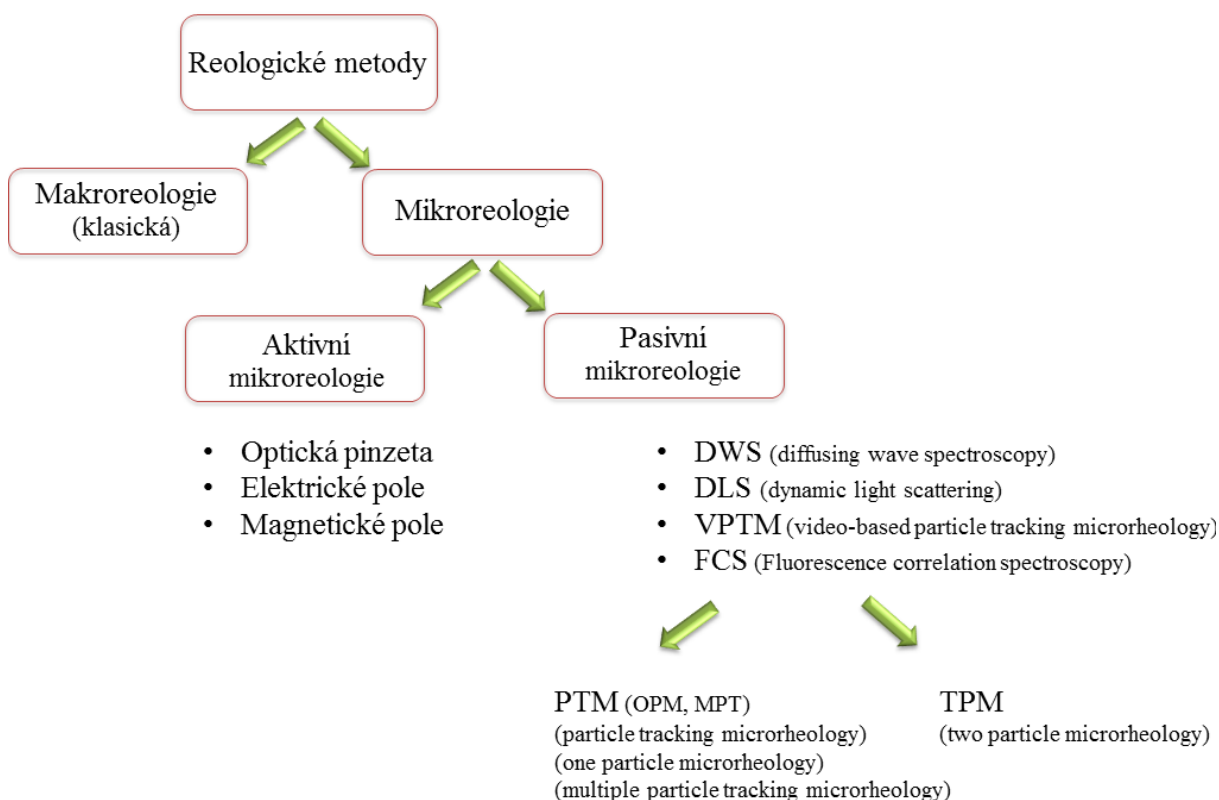
Prvním důležitým bodem, u něhož je nutné se pozastavit, a který stojí za diskuzi, je zdroj energie pohybu začleněných sond a jeho dopad na vyhodnocování vlastností daného vzorku. Podle zdroje pohybu rozdělujeme mikrореologii do dvou základních podskupin, a to mikrореologii pasivní, využívající pouze tepelného Brownova pohybu a mikrореologii aktivní, která používá aktivní manipulaci částic. Aktivní přístup spočívá ve využití 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 tedy je nutno použít pro měření externí sílu [1].



Obr.1: Schéma pohybu začleněné částice ve vzorku, kterým je v tomto případě roztok polymeru

2.1.1 Hierarchie mikrореologických metod

V počátcích této práce je vhodné začlenit mikrореologii do širšího kontextu, logicky nastínit její hierarchii, vymezit jednotlivé metodiky a vyjasnit zkratky, které se v literatuře i v následných kapitolách velmi hojně vyskytují. Jednoduchý přehled možných metod, které jsou schopny stanovovat viskoelastické vlastnosti materiálů se nachází na následujícím obrázku (Obr. 2).



Obr.2: Hierarchie reologických metod

Jak již bylo zmiňováno v úvodu, společným znakem a cílem celé skupiny reologických metod je měření viskoelastických vlastností materiálů. Tyto postupy můžeme rozdělit na dvě základní podjednotky, které se od sebe podstatně liší, a to nejen množstvím vzorku potřebného k měření. První z nich je již léta používaná a dobře prověřená metoda zvaná makrореologie, klasická reologie či jednoduše reologie, jelikož se jednalo dlouhou dobu pouze o jedinou metodu určenou k těmto měřením. Reometr, který je k tomuto účelu využíván, vkládá na zkoumaný vzorek napětí či tlak a sleduje jeho odezvu pomocí makroskopických senzorů v podobě válců, desek nebo kuželů. Oproti tomu, mikrореologie využívá pomocných mikroskopických částic, které

se začleňují do vzorku a na základě jejich pohybu v daném materiálu je pak možné určit jeho viskoelastické vlastnosti.

Následné rozdělení mikrореologie souvisí se zdrojem pohybu začleněných částic. Pasivní mikrореologie využívá pouze tepelnou energii pro takzvaný Brownův pohyb, která není příliš velká, a proto je tato metoda vhodnější spíše k měření jemnějších materiálů. Pasivní mikrореologii je možné provádět s použitím několika postupů a přístrojů, z nichž ty nejzákladnější jsou vyobrazeny ve schématu na obrázku 2 [2].

U aktivního přístupu, kdy již tepelná energie není k pohybu částic dostačující, je částicím dodávána vnější energie. Typickým příkladem je použití elektrického či magnetického pole k manipulaci částic, které jsou k tomuto účelu speciálně přizpůsobené. Velmi populární je použití takzvané optické pinzety, kdy jsou částice rozpořhybovány pomocí laserového paprsku.

První významná stupina pasivní mikrореologie je označována jako VPTM neboli „video-based particle tracking microrheology“. Techniky spadající do této skupiny jsou založeny na nahrávání videa pohybu částic ve vzorku a jeho dalším zpracování. Všechny následně popsané metody pracují na stejném principu, avšak v literatuře se často popisují pod různými termíny a zkratkami. Sledování každé částice ve vzorku odděleně je označováno jako PTM – „particle tracking microrheology“ nebo také OPM – „one particle microrheology“ neboli jednočásticová mikrореologie. Dále se může v literatuře objevit termín MPT – „multiple particle tracking“, který je v podstatě totožný s jednočásticovou mikrореologií. MPT však na první pohled naznačuje, že konečná data jsou tvořena z desítek až stovek sledovaných částic. Druhou metodou založenou na získávání videí pohybu je TPM – „two particle microrheology“ - dvoučásticová mikrореologie, která sleduje kroskorelační pohyb dvou částic. Detailněji se každou z těchto metod budu zabývat v následujících kapitolách [3,4,5].

Mikrореologické metody založené na začlenění malých částic a následném sledování rozptylu působícího paprsku můžeme také zařadit mezi pasivní metody. Jedná se o DWS – „difusing wave spectroscopy“ založené na vícenásobném rozptylu paprsku [6,7,8] a DLS – „dynamic light scattering“, kde se předpokládá pouze jednonásobný rozptyl záření [9,10]. U těchto metod je možné pracovat v mnohem větším rozsahu frekvencí ve srovnání s ostatními pasivními mikrореologickými metodami. Aplikací pasivních technik se zabývám v této dizertační práci, a proto se budu zabývat mnohem detailněji i jejich teoretické podstatě.

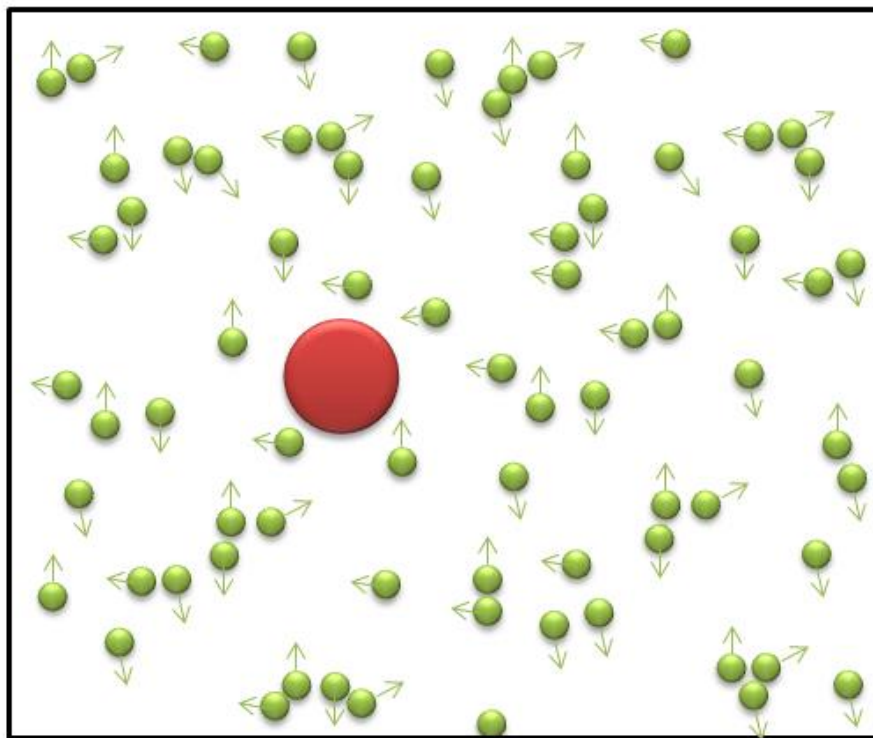
2.2 Podstata pasivní mikrореologie

Jak už bylo zmíněno dříve, základem pasivní mikrореologie je pohyb částic pouze na základě tepelného Brownova pohybu. Typická energie Brownova tepelného pohybu představuje součin $k_B T$. Ani odvětví pasivní mikrореologie však není tvořeno jediným přístupem, kterým bychom byli schopni spokojeně naměřit jakékoliv požadované vzorky. Do této podskupiny řadíme jednočásticovou [11] a dvoučásticovou mikrореologii [12], což jsou nejběžnější a nejhojněji používané metody zvané také jako VPTM (video particle tracking microrheology). Na základě tepelného pohybu můžeme také stanovit vlastnosti materiálu použitím DWS (Diffusing wave spectroscopy) [13], DLS (diffusing light spectroscopy) [14] či FCS (fluorescence correlation spectroscopy). Každou z těchto metod jsme schopni v zásadě určit reologické vlastnosti daného materiálu, avšak každá z nich má určité přednosti či nedostatky, čímž se stává vhodnou pro jiný typ materiálu s požadovanými parametry [15].

2.2.1 Brownův pohyb

Teorie Brownova pohybu je jedním ze základních pilířů pasivní mikrореologie. Nejčastěji používaný model sloužící k popisu náhodného pohybu částic vyskytujících se v roztoku byl popsán Albertem Einsteinem v jeho dizertační práci z roku 1905. Charakterizací tepelného pohybu mohou být odvozeny mechanické vlastnosti materiálu, v němž se částice pohybují.

Fenomén Brownova pohybu se datuje již od dob, kdy byl vynalezen jeden z prvních mikroskopů. Tento jev nese název po botanikovi Robertu Brownovi, kterému je také přisuzován jeho objev. Robert Brown pozoroval pohybující se zrnka pylu ve vodě, a aby se ujistil, že se nejedná o žádné známky života, uložil pylová zrnka na 11 měsíců do alkoholu a dokázal, že zrnka se po této době stále stejně pohybovala. Později se také ukázalo, že není podstatný typ materiálu pohybujících se částic, ale že hlavní podmínkou k pohybu je jejich velikost [16]. Ani přes tyto poznatky Robert Brown nebyl schopen vysvětlit záhadu tohoto pohybu.

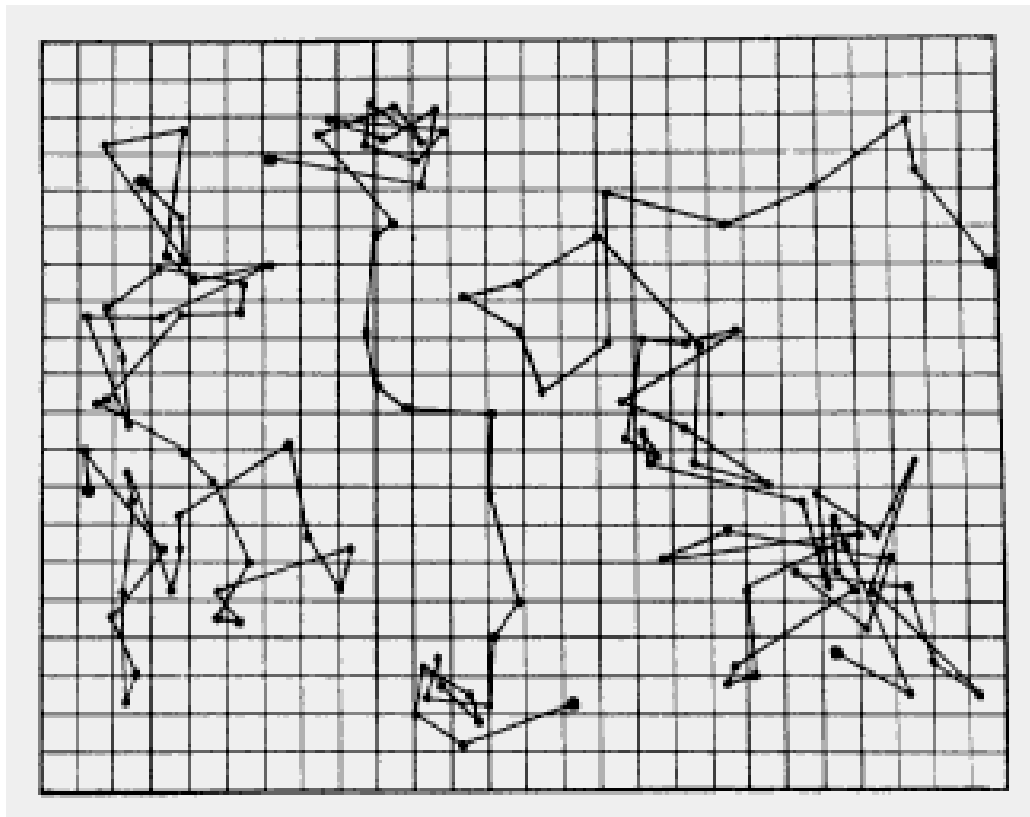


Obr.3: Pohybující se částice obklopena molekulami vody [17,18]

Další pokrok týkající se Brownova pohybu byl zaznamenán až po formulaci kinetické teorie plynů. Existovalo několik charakteristik Brownova pohybu, které byly vypořizovány [19]:

- Částice se mohou pohybovat přímočaře, ale mohou také rotovat. Oba typy pohybu jsou zcela nepravidelné.
- Pohyby jednotlivých částic jsou na sobě nezávislé.
- Čím jsou částice menší, tím je jejich pohyb rychlejší.
- Charakter pohybu nezávisí na chemickém složení částic.
- Čím je kapalina méně viskózní, tím je pohyb částic rychlejší.
- Za vyšších teplot je pohyb rychlejší.
- Pokud je zabráněno vysychání vzorku, pohyb částic neustává.

Bylo odvozeno několik teorií k popisu Brownova pohybu například Marianem Smoluchowskim či Louisem Bachelierem. Až Albert Einstein však byl schopen poskytnout kompletnější matematický popis tohoto jevu. Předpokládal, že vlivem tepelného pohybu se molekuly v roztoku neustále srážejí, přičemž směr a síla těchto srážek jsou zcela náhodné, díky čemuž je i okamžitá poloha částice náhodná. Svě soustředění zaměřil na průměrný pohyb velkého počtu částic a potvrdil, že se jedná o náhodný proces charakterizovaný difuzní konstantou, která závisí na parametrech, jako je Avogadrovo číslo, absolutní teplota, velikost částice či viskozita roztoku. Experimentální potvrzení Einsteinovy teorie a tedy potvrzení existence atomů přinesl Jean Perrin prací, za kterou obdržel Nobelovu cenu v roce 1926. V závěru bylo tedy vysvětleno a dokázáno, že vlivem tepelného pohybu se molekuly v roztoku neustále srážejí, přičemž směr a síla těchto srážek jsou zcela náhodné, díky čemuž je i okamžitá poloha částice náhodná.



Obr.4: Originální kresba Jeana Perrina ukazující polohu částice zaznamenanou každých deset sekund [20]

2.2.2 Einsteinova teorie Brownova pohybu

Einsteinova teorie se skládá ze dvou základních částí. První oddíl formuluje difuzní rovnici Brownovy částice, kde difuzní koeficient souvisí s MSD („mean squared displacement“ neboli střední kvadratickou hodnotou posunu) pohybujících se částic. Druhá část teorie vztahuje difuzní koeficient k měřitelným fyzikálním veličinám (velikost částice, Avogadrovo číslo). Prvním Einsteinovým cílem bylo určit, jak dalece se částice pohybují v daném časovém intervalu. Tuto vzdálenost není možno určit pomocí klasické mechaniky, kvůli velkému počtu srážek, které částice během daného časového intervalu podstoupí. Einstein uvažoval kolektivní pohyb částic a prokázal platnost difuzní rovnice pro hustotu $\rho(x, t)$ částic v bodě x a čase t :

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = D \frac{\partial^2 \rho}{\partial x^2}, \quad (1)$$

kde D je difuzní koeficient. Za předpokladu, že všechny částice mají stejný počáteční čas $t = 0$, může být stanoveno řešení difuzní rovnice jako:

$$\rho(x, t) = \frac{\rho_0}{(4\pi Dt)^{1/2}} e^{-x^2/4Dt}, \quad (2)$$

pro první mocninu je x vyrušeno, jelikož se částice pohybuje do všech směrů rovnoměrně. Druhá mocnina je dána vztahem:

$$\overline{x^2} = 4Dt, \quad (3)$$

kde horizontální čára naznačuje, že se jedná o průměrnou hodnotu. Na základě této rovnice Einstein potvrdil, že MSD není úměrný času, ale jeho druhé mocnině.

Druhá část Einsteinovy teorie vztahuje difuzní koeficient k fyzikálním veličinám jako MSD v daném časovém intervalu. Experimentálně je možno zjistit Avogadrovo číslo či velikost částice. Einstein analyzoval dynamickou rovnováhu ustanovenou mezi dvěma silami působícími proti sobě a zjistil, že konečný výsledek nezávisí na druhu působících sil. Primárně pracoval s osmotickým tlakem a názorným příkladem je uvažování částice začleněné ve viskózní kapalině v gravitačním poli. Částice jsou usazovány gravitací rychlostí $v = mg\mu$, kde m je hmotnost částice, g je gravitační zrychlení a μ je mobilita částice. Ze Stokesovy teorie je možno vypočítat danou mobilitu jako

$$\mu = \frac{1}{6\pi\eta a}, \quad (4)$$

kde η je viskozita kapaliny a a znázorňuje velikost částice. Na druhé straně způsobuje difuze pohyb částic z oblasti větší koncentrace do oblasti s menší koncentrací látky. V konečném stavu dynamické rovnováhy jsou částice rozděleny podle barometrické distribuce:

$$\rho = \rho_0 e^{-mgh/k_B T} \quad (5)$$

kde $\rho - \rho_0$ je rozdíl v hustotě částic oddělených od sebe výškovým rozdílem h , k_B je Boltzmanova konstanta a T je absolutní teplota. Dynamická rovnováha je ustanovena působením vlivu gravitace částic a jejich protichůdné difuze. Tento tok je dán Fickovým zákonem:

$$J = -D \frac{dc}{dh}, \quad (6)$$

kde $J = \rho v$ a zavedením vztahu pro ρ , může být předešlý vztah definován jako:

$$v = \frac{Dmg}{k_B T} \quad (7)$$

Ve stavu dynamické rovnováhy musí být rychlost také rovna $v = \mu mg$. Je zřejmé, že oba vztahy pro výpočet rychlosti jsou úměrné součinu $m \cdot g$, což odráží fakt, že odvození je nezávislé na typu uvažovaných sil. Porovnáním dvou typů vyjádření získáme vztah pro difuzivitu [21].

$$\frac{\overline{x^2}}{2t} = D = \mu k_B T = \frac{\mu RT}{N} = \frac{RT}{6\pi\eta r N} \quad (8)$$

Konečná rovnice může být vyjádřena jako:

$$\overline{x^2} = \frac{RT}{N} \frac{1}{6\pi\eta r} t \quad (9)$$

a získala název Stokes-Einsteinova.

2.3 Jednočásticová mikrореologie

Jednočásticová mikrореologie je jednou ze stěžejních mikrореologických metod. Až stovky částic o velikosti přibližně jednoho mikrometru mohou být sledovány pomocí videomikrореologie. Tento přístup poskytuje přímou vizualizaci možných nehomogenit přítomných ve vzorku sledováním jednotlivých částic. Stejně tak jsme ale schopni určit vlastnosti vzorku jako celku zprůměrováním pohybu těchto částic [22].

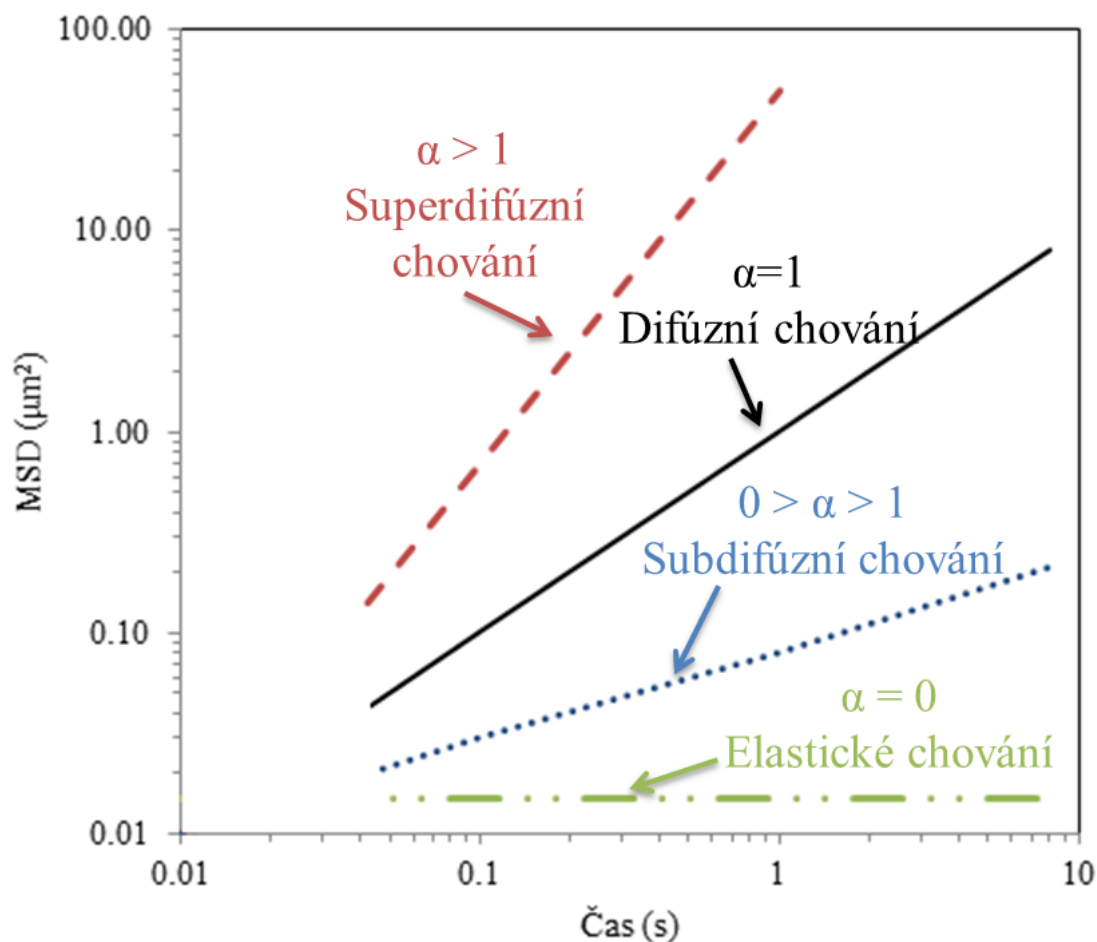
Princip této techniky spočívá ve sledování a vyhodnocování trajektorií částic odděleně. Dynamika jejich pohybu je popsána v čase pomocí korelační funkce, která je také známa jako mean squared displacement ($MSD = \langle \Delta x^2(t) \rangle$) a je definována jako:

$$(\Delta x^2(\tau)) = \langle |x(t+\tau) - x(t)|^2 \rangle, \quad (10)$$

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

$$(\Delta x^2(t)) = 2dDt^\alpha, \quad (11)$$

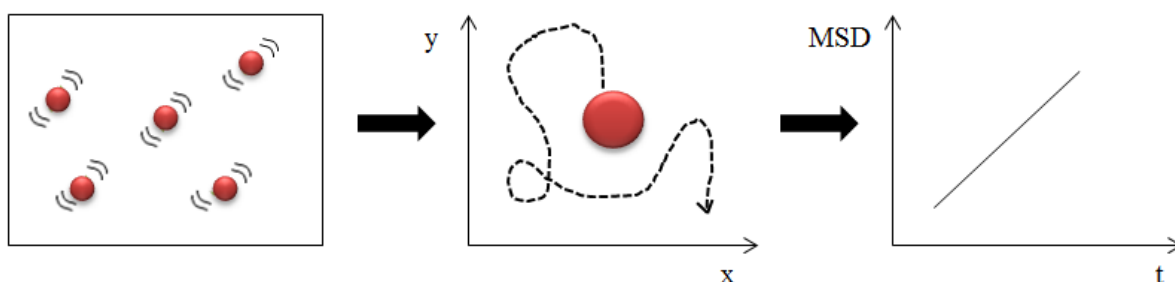
kde α je časový exponent.



Obr.5: Tvar $MSD(t)$ pro pohyb částic v různém prostředí [23,24]

V případě čistě viskózních látek neboli Newtonských kapalin, mezi které patří voda či glycerol, je hodnota časového exponentu rovna jedné, a závislost MSD na čase je tedy lineární. V případě, že je časový exponent roven nule, funkce $MSD(t)$ vytváří plató, které je způsobeno zaklíněním začleněných částic v elastickém mediu, a částice se tedy nepohybují vůbec. Nejčastějším typem

chování u běžných kapalin, je chování subdifúzní. Jedná se o materiály viskoelastické, které vykazují komplexní odezvu na vložené napětí. Můžeme tedy u nich zaznamenat jak chování elastické, tak viskózní a jejich časový exponent se pohybuje v rozmezí od nuly do jedné. Speciální případ představuje chování superdifúzní, které však musí být podmíněno působením vnější energie pro pohyb začleněné částice. Jednotlivé typy chování jsou znázorněny na obrázku 5. Ke každému z těchto druhů pohybu však musíme přistupovat ve vyhodnocování odlišným způsobem. Vraťme se tedy nejprve k nejjednoduššímu případu a tím je chování difúzní typické pro viskózní látky.



Obr.6: Schéma tvorby $MSD(t)$ pro viskózní látky [23]

Jak již bylo zmíněno výše, hodnota časového koeficientu pro tento případ je rovna jedné, z rovnice (8) tedy můžeme jednoduše odvodit difúzní koeficient pohybu částice použitím Einsteinova vztahu:

$$D = \frac{k_B T}{f}, \quad (12)$$

kde k_B je Boltzmanova konstanta, T značí termodynamickou teplotu, a f je frikční koeficient. Jelikož jsou pro měření využívány pouze sférické částice, je frikční koeficient dán Stokesovým vztahem pro částice s malým Reynoldsovým číslem $f = 6\pi\eta a$, kde a je poloměr částice a η je viskozita media. Celková rovnice pro popis difúzního koeficientu má tedy tvar [21,25,26]:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \quad (13)$$

Toto jednoduché vyjádření však není možno použít u vzorků komplexních, kde se časový exponent pohybuje v intervalu od nuly do jedné. Závislost střední hodnoty posunu na čase pak není lineární a využití Stokes-Einsteinova zákona je tedy nemožné. V tomto případě je třeba

přistoupit k charakterizaci materiálů pomocí komplexního modulu G^* , který se skládá z reálné a imaginární složky charakterizující elastický a viskózní modul:

$$G^* = G' + iG'' \quad (14)$$

Elastický či také ztrátový modul G' vyjadřuje energii uloženou v materiálu během napěťového cyklu, zatímco viskozitní modul G'' sděluje ztrátu energie během tohoto cyklu. Odvození frekvenčně závislého komplexního modulu z časové funkce střední hodnoty posunu není jednoduchá záležitost a je založena na zobecněném Stokes-Einsteinově vztahu (GSE) [27]. Otázkou zůstává, jak převést funkci střední hodnoty posunu částice z fluktuačního spektra mikreologických experimentů na frekvenčně závislý komplexní modul. V literatuře je uvedena celá řada různých metod pro výpočet této transformace. Můžeme ji zařadit do dobře známé matematické třídy takzvaných inverzních problémů, které mají stejné základní rysy s klasickými technikami jako Fourierova transformace [28].

GSE byla původně navržena na základě analýzy termálně fluktuačního spektra kulovitých sond [29]. Toto odvození bylo později postaveno na stabilnější teoretické základy [30], jejichž algebraická forma se podobá klasické Stokes-Einsteinově rovnici, ačkoliv nyní zahrnuje Laplaceovu transformaci

$$D(s) = \frac{k_B T}{6\pi a s \eta_s}, \quad (15)$$

kde a je poloměr částice, $\tilde{\eta}_s$ je Laplaceově transformovaná, frekvenčně závislá viskozita, $\tilde{D}(s)$ značí Laplaceově transformovaný, frekvenčně závislý difúzní koeficient a s je Laplaceova frekvence. GSE aplikovaná na koloidní roztoky je považována za platnou v případě, že setrvačné síly částice, setrvačné síly kapaliny a režim podélné komprese tekutiny mohou být zanedbány v daném frekvenčním rozsahu. Bylo dokázáno, že efekt setrvačných sil částic může být zanedbatelný v případě, že frekvence odpovídá nerovnosti:

$$\omega \ll \left(\frac{9G(\omega)}{2a^2 \rho_f} \right)^{1/2}, \quad (16)$$

kde $G(\omega)$ je frekvenčně závislý smykový modul, a je poloměr částice a ρ_f je hustota částice. Tato podmínka zavádí horní frekvenční limit měření, v řádu 10 MHz u modelového systému, který zahrnuje polystyrenové částice o průměru 0,2 μm v roztoku polyethylenoxidu.

Obdobně můžeme charakterizovat zanedbatelnost setrvačnosti kapaliny, a to v případě, že frekvence odpovídá nerovnosti:

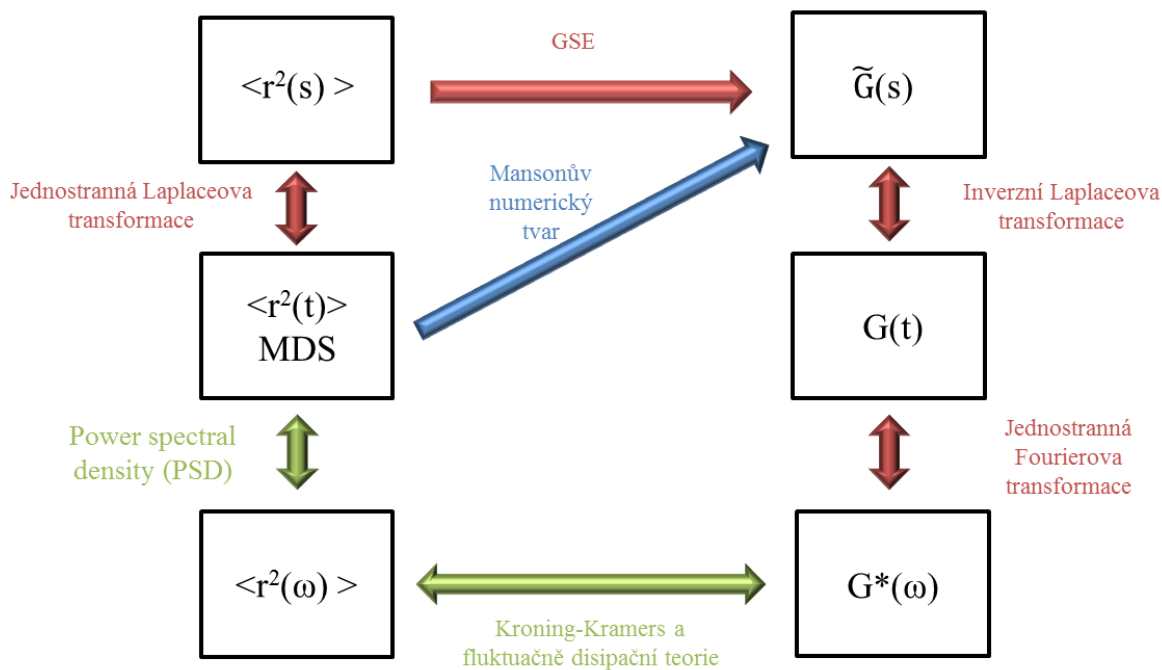
$$\omega \ll \left(\frac{\pi^2 G(\omega)}{4a^2 \rho_f} \right)^{1/2}, \quad (17)$$

I tato frekvence se pohybuje v řádech 10 MHz. Režim podélné komprese se typicky pohybuje v řádech 10 Hz v případě polymerního materiálu, který představuje spodní frekvenční limit měření [30]. Na základě těchto podmínek jsme pak schopni odvodit možný frekvenční interval mikrореologického měření, ve kterém můžeme použít GSE u koloidních roztoků. Z předchozích odvození získáme interval $<10 - 10^7 \text{ Hz}>$, ve kterém GSE přesně určí hodnotu komplexního modulu [23],[31]. Tato frekvence je tedy mnohem vyšší než maximální frekvence, kterou jsme schopni dosáhnout pomocí klasické makrореologie, kde viskózní penetrační hloubka vede ke vzniku setrvačného efektu již při frekvenci $\sim 50 \text{ Hz}$ [21].

2.3.1 Metody inverze dat

Ačkoliv by měly být jednotlivé inverzní metody MSD(t) na $G^*(\omega)$ srovnatelné pro dobře definovaná MSD data, je velmi užitečné porovnat také jednotlivé metody a jejich případné výhody či nevýhody. Na následujícím obrázku je graficky zobrazeno zastoupení tří základních inverzních metod pro získání komplexního modulu daného materiálu.

1. Metoda Fourierovy transformace [32]
2. Numerická metoda s využitím analytického pokračování [11]
3. Masonův numerický tvar [33]



Obr.7: Schéma tří základních metod inverze dat pro výpočet komplexního modulu [34]

2.3.1.1 Metoda Fourierovy transformace

Jedná se o jednu z prvních metod odvozených pro výpočet komplexního a následně viskózního a elastického modulu z funkce MSD(t). Není však již příliš využívána, jelikož je pro tuto techniku zapotřebí získat data s širokým rozsahem frekvencí. Pro frekvenčně limitovaná data, jak je tomu i ve většině případů mikroeologických měření, je upřednostňována numerická metoda s analytickou kontinuálností [11]. Metoda Fourierovy transformace může vyprodukovat data s velkým obsahem šumu a vysokofrekvenčními výkyvy.

Pro popis této metody je nutné zavést novou veličinu - shodu α^* (compliance), která je definována jako $\alpha^* = \alpha'(\omega) + i\alpha''(\omega)$ a je to funkce komplexní odezvy pro posun částice ve vzorku. Na základě flukтуаčně-disipační teorie, PSD (power spectral density) souvisí s imaginární částí $\alpha''(\omega)$:

$$\langle x_{\omega}^2 \rangle = \frac{4kT\alpha''(\omega)}{\omega} \quad (18)$$

Za předpokladu, že α'' je definovaná v širokém frekvenčním intervalu, je možno vyjádřit reálnou složku α' funkce z Kramers-Kronigových rovnic vyhodnocením disperzního integrálu.

$$\alpha'(\omega) = \frac{2}{\pi} P \int_0^{\infty} \frac{\zeta \alpha''(\zeta)}{\zeta^2 - \omega^2} d\zeta = \frac{2}{\pi} \int_0^{\infty} \cos \omega t dt \int_0^{\infty} \alpha''(\zeta) \sin(\zeta t) d\zeta \quad (19)$$

Následně jsme schopni explicitně vypočítat elastický a viskózní modul $G'(\omega)$ a $G''(\omega)$. Písmeno P ve výše uvedeném vztahu značí hlavní hodnotu integrálu. Konečný výraz je tedy roven postupné sinusové a kosinusové transformaci $\alpha''(\omega)$, které jsou výhodně provedeny pro diskrétní datové body dlouhočasových sérií. Standardní Frouierův postup může být použit k hodnocení jednotlivých PSD pro následné provedení sinové a kosinové transformace. Výsledky obou postupů mohou být upraveny bez většího ovlivnění výsledků. V závěru se dostáváme k odvození elastického $G'(\omega)$ a viskózního modulu $G''(\omega)$ z $\alpha^*(\omega)$:

$$G'(\omega) = \frac{1}{6\pi R} \frac{-\alpha''(\omega)}{\alpha'(\omega)^2 + \alpha''(\omega)^2}, \quad (20)$$

$$G''(\omega) = \frac{1}{6\pi R} \frac{-\alpha''(\omega)}{\alpha'(\omega)^2 + \alpha''(\omega)^2} \quad (21)$$

2.3.1.2 Numerická metoda s využitím analytického pokračování

Za předpokladu, že komplexní kapalina může být brána jako izotropní, nestlačitelné kontinuum v okolí částice, jednostrannou Laplaceovou transformací MSD(t) a GSE rovnic jsme schopni určit spektrum viskoelastické kapaliny $\tilde{G}(s)$ jako:

$$G(s) = \frac{k_B T}{\pi a s \langle \Delta r^2(s) \rangle}, \quad (22)$$

kde s je Laplaceova frekvence a k_B je Boltzmanova konstanta. Tato rovnice je založena na zobecněné Langevinově rovnici, která popisuje popis částic v kontinuu (při zanedbání setrvačnosti částic) a je v souladu s ekviparticí energií a flukтуаčně-disipační teorií. Tato rovnice je však také založena na předpokladu, že takzvané „non-slip“ (neklouzavé) hraniční podmínky viskózních kapalin mohou být zobecněny také pro viskoelastické kapaliny pro všechny hodnoty s . Jelikož daný předpoklad nemusí být obecně pravdivý, je tato rovnice fenomenologická. Z hodnoty $\tilde{G}(s)$ jsme pak schopni pomocí inverzní Laplaceovy transformace určit modul relaxace napětí $G(t)$, který popisuje časový rozsah relaxace tlaku (stress) v materiálu k fixnímu napětí po smykovém kroku [35]. Následně pak pomocí jednostranné Fourierovy transformace určíme frekvenčně závislý komplexní modul [36]. Stejně tak zde je produkováno určité množství

šumu, jelikož opět používáme Fourierovy a Laplaceovy transformace vyžadující nekonečně velký soubor dat, který nejsme schopni mikrореologickým měřením získat.

2.3.1.3 *Masonův numerický tvar*

Jelikož mikrореologická data jsou obecně charakterizována pro konkrétní časy v omezeném časovém intervalu, výpočty transformací do frekvenční domény mohou způsobit chyby ve výsledných frekvenčních modulech. Na příklad, pro implementaci Laplaceovy transformace, je možné jednoduše vybrat konkrétní frekvenci s , vynásobit $\langle \Delta r^2(t) \rangle$ klesající exponenciálou a integrovat v čase užitím lichoběžníkového pravidla. Zatímco je tato metoda velmi přesná v intervalu frekvenčních extrémů, zavádí chybu právě v blízkosti těchto extrémů díky ořezávání souboru dat [36]. Podobná chyba v oblasti extrémů nastává také v případě Fourierovy transformace. Abychom zabránili této chybě, můžeme odhadnout transformaci algebraicky rozšířením $\langle \Delta r^2(t) \rangle$, v místě požadované frekvence s , použitím mocninného zákona a zachováním hlavního výrazu [23]:

$$\langle \Delta r^2(t) \rangle \approx \left\langle \Delta r^2 \left(\frac{1}{s} \right) \right\rangle (st)^{\alpha(s)} \quad (23)$$

kde $\langle \Delta r^2(1/s) \rangle$ je rozsah $\langle \Delta r^2(t) \rangle$ při $t = 1/s$ a

$$\alpha(s) = \frac{d \ln \langle \Delta r^2(t) \rangle}{d \ln t} \bigg|_{t=1/s} \quad (24)$$

je mocninný exponent popisující logaritmický sklon $\langle \Delta r^2(t) \rangle$ při $t = 1/s$. Pro tepelně řízené částice musí být tento sklon v rozsahu mezi 0 a 1. Hodnota exponentu 0 odpovídá elastickému uvěznění částice a hodnota 1 odpovídá difúznímu pohybu částice ve viskózní látce. Vyhodnocení Laplaceovy transformace mocninného zákona vede k:

$$s \langle \Delta r^2(s) \rangle \approx \langle \Delta r^2(1/s) \rangle \Gamma[1 + \alpha(s)] \quad (25)$$

kde Γ je funkce gama. Toto vyjádření předpokládá, že příspěvek k transformačnímu integrálu z chování $\langle \Delta r^2(t) \rangle$ v časech velmi se lišících od $1/s$ mohou být efektivně zanedbány. Substitucí

do rovnice $\tilde{G}(s) = \frac{k_B T}{\pi a s \langle \Delta \tilde{r}^2(s) \rangle}$ získáme tvar:

$$G(s) \approx \frac{k_B T}{\pi a \langle \Delta r^2(t) \rangle \Gamma[1 + (d \ln \langle \Delta r^2(t) \rangle / d \ln(t))]} \bigg|_{t=1/s}, \quad (26)$$

kde gama funkce je dobře reprezentována: $\Gamma[1 + \alpha] \approx 0,457(1 + \alpha)^2 - 1,36(1 + \alpha) + 1,90$ pro daný rozsah α .

Analogická technika ve Fourierově doméně může být použita k získání vyhodnocení $G^*(\omega)$. Rozšířením $\langle \Delta r^2(t) \rangle$ v blízkosti $t = 1/\omega$ získáme: $\langle \Delta r^2(t) \rangle \approx \langle \Delta r^2(1/\omega) \rangle (\omega t)^{\alpha(\omega)}$, kde α je definována stejně, jako v předešlém případě. Použití Fourierovy transformace vede ke vztahu:

$$i\omega \mathcal{F}_u\{\langle \Delta r^2(t) \rangle\} \approx \langle \Delta r^2\left(\frac{1}{\omega}\right) \rangle \Gamma[1 + \alpha(\omega)] i^{-\alpha(\omega)}.$$

$$i\omega \text{Fu}\left\langle \Delta r^2(t) \right\rangle \approx \left\langle \Delta r^2\left(\frac{1}{\omega}\right) \right\rangle \Gamma[1 + \alpha(\omega)] i^{-\alpha(\omega)} \quad (27)$$

Substitucí do rovnice $G^*(\omega) = \frac{k_B T}{\pi a i \omega \mathcal{F}_u\{\langle \Delta r^2(t) \rangle\}}$ a využitím výsledků Eulerovy rovnice získáme:

$$G'(\omega) = |G^*(\omega)| \cos\left(\frac{\pi \alpha(\omega)}{2}\right) \quad (28)$$

$$G''(\omega) = |G^*(\omega)| \sin\left(\frac{\pi \alpha(\omega)}{2}\right) \quad (29)$$

kde

$$|G^*(\omega)| \approx \frac{k_B T}{\pi a \left\langle \Delta r^2\left(\frac{1}{\omega}\right) \right\rangle \Gamma[1 + \alpha(\omega)]} \quad (30)$$

Pokud se částice pohybují difuzně, α je rovna jedné a dominuje viskózní modul $G''(\omega)$, zatímco když je částice uvězněna v elastické struktuře komplexní kapaliny, α je roven nule a dominuje elastický modul $G'(\omega)$. V případě, že se α blíží k nule ve velkém časovém rozsahu, hodnocení pro převládající $G'(\omega)$ bude excelentní, zatímco hodnocení pro $G''(\omega)$ se bude zhoršovat. Tento princip platí také obráceně. Pokud α se bude blížit k jedné ve velkém časovém intervalu, hodnocení převládajícího $G''(\omega)$ bude vynikající, zatímco hodnocení pro $G'(\omega)$ se bude zhoršovat.

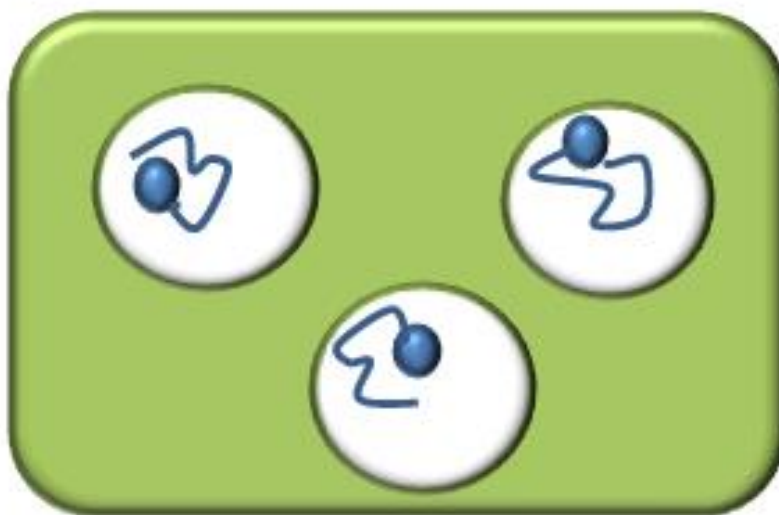
Metoda používající Masonův numerický tvar je v současné době nejpoužívanější, jelikož poskytuje nejpresnější transformaci dat s minimální produkcí nadbytečného šumu ve výsledcích.

2.4 Dvoučásticová mikrореologie

Do této chvíle bylo diskutováno sledování a vyhodnocování pohybu začleněných sond jednotlivě a pro získání reologických vlastností materiálu jako celku se přiklání ke zprůměrování

jednotlivých funkcí posunu $MSD(t)$ všech částic. Tento postup však může být v některých případech nedostačující a způsobit nepřesnosti ve výsledném měření.

Prvním důležitým faktem, který si je třeba uvědomit je skutečnost, že výše odvozené rovnice pro jednočásticovou mikrореologii předpokládají převážnou homogenitu zkoumaného vzorku. V praxi je množství zkoumaných, plně homogenních vzorků však jen menšina. Jaké nepřesnosti tedy mohou nastat použitím jednočásticové mikrореologie pro určení viskoelastických vlastností nehomogenního materiálu? Ani tady nejsme schopni určit jednoznačnou odpověď, do jaké míry budou tato data zatížená chybou. Vše závisí na míře nehomogenity a vnitřní struktuře zkoumaného vzorku. Záleží zde také na úhlu pohledu na danou problematiku. Důležité je si ujasnit, jestli chceme určit reologické vlastnosti materiálu jako celku, či se chceme na dané nehomogenity ve vzorku cíleně zaměřit.



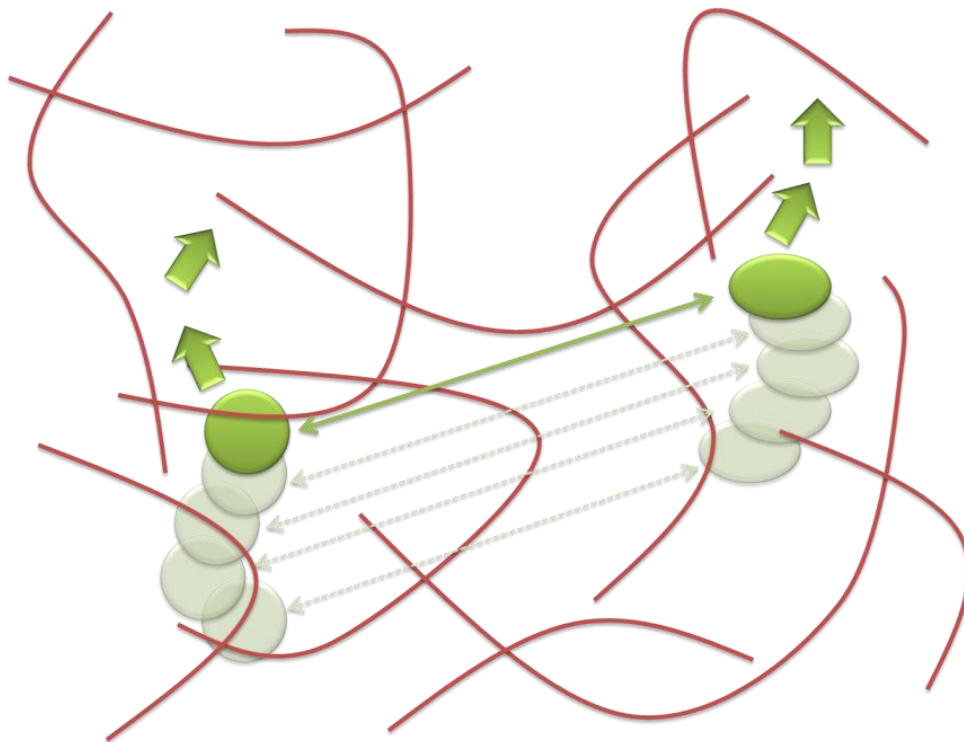
Obr.8: Schématická situace, kdy částice jsou začleněny v pórech, a odrážejí tedy vlastnosti pórů (rozpouštědla v pórech) místo reologických vlastností celého materiálu [23]

Představme si situaci, kdy jsou částice začleněny do heterogenního pórovitého materiálu (Obr. 8). Pravděpodobně dojde k uzavření většiny sond v pórech, což závisí samozřejmě na také typu zkoumaného materiálu. Za předpokladu, že zvolené částice jsou mnohem menší, než je velikost strukturních ok materiálu, pak se tyto sondy pohybují pouze v pórech materiálu, jak je vidět na obrázku 8. Při vyhodnocování pohybu každé částice zvlášť (jednočásticová mikrореologie) pak výsledná funkce $MSD(t)$ neodpovídá vlastnostem daného heterogenního

materiálu, ale pouze viskoelastickým vlastnostem pórů materiálu, tedy pravděpodobně rozpouštědla.

Další problém může nastat při špatné volbě materiálu pro použité sondy. Naším cílem samozřejmě je, aby nedocházelo k žádným interakcím mezi materiálem částice a okolním vzorkem. Jelikož je samotný tepelný pohyb velmi nepatrný, mohly by tyto interakce velkou měrou ovlivnit měření a zkreslit tak skutečné hodnoty výsledné pohybové funkce. Důležitý není samozřejmě jen materiál začleněné částice, velmi podstatnou roli zde hraje také jejich velikost. Více k této problematice je uvedeno v kapitole 2.8 - Mikroreologické částice a jejich správný výběr [10,37].

K překonání všech těchto nevýhod, nejistot a problémů byla vytvořena nová technika mikroreologických měření zvaná dvoučásticová mikroreologie – TPM (Two particle microreology). Na rozdíl od klasické pasivní mikroreologie zde sledujeme kros-korelační pohyb dvou začleněných 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 jednočásticové mikroreologie, ale vzájemnou vzdálenost pozorované dvojice částic, r , která se pohybuje v rozmezí 10 – 100 mikronů. Tento nárůst vzdáleností znamená, že technika je citlivá na heterogenitu ve vzorku menší, než je vzájemná vzdálenost částic, a tedy je možno změřit reologii materiálu jako celku, což u jednočásticové metody těchto heterogenních vzorků nebylo možné. Sledování sond na základě video nahrávek je zejména velmi vhodná metoda pro určování korelačního pohybu více částic současně, jelikož až několik stovek sond může být zobrazováno zároveň. V typické TPM je možno pozorovat zhruba stovky částic po dobu až několika minut pro získání dostatečného množství dat.



Obr.9: Schéma dvoučásticové mikrореologie

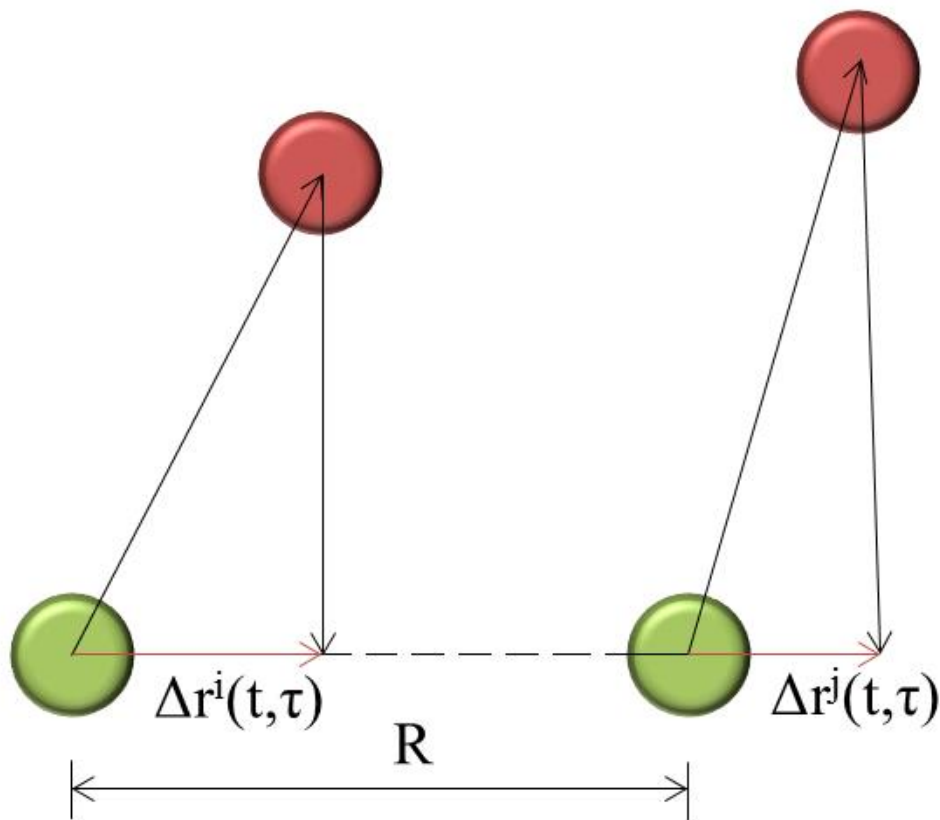
Vektor posunu pro individuální částici je vypočítán jako funkce časového intervalu τ a absolutního času t :

$$\Delta r_{\alpha}(t, \tau) = r_{\alpha}(t + \tau) - r_{\alpha}(t), \quad (31)$$

a tenzor průměrné hodnoty souboru částic vektoru posunu je vypočítán:

$$D_{\alpha, \beta}(r, t) = \left\langle \left(\Delta r_{\alpha}^i(t, \tau) \Delta r_{\beta}^j(t, \tau) \delta(r - R^{i,j}(t)) \right) \right\rangle_{i \neq j, t}, \quad (32)$$

kde i a j označuje jednotlivé částice, α a β označuje jednotlivé souřadnice a $R^{i,j}$ je vzdálenost mezi částicemi i a j .



Obr.10: Schéma vzájemného pohybu dvou částic. V tomto zobrazení je D_{rr} kros-korelační funkce v radiálním směru $D_{rr} = \langle \Delta r_1(\tau) \Delta r_2(\tau) \rangle$, která je produktem posunu částic podél linie spojující částice o vzdálenosti R [23]

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 predikována zobecněnou Stokes-Einsteinovou reakcí pro získání:

$$D_{rr}(r, s) = \frac{k_B T}{2\pi s D(s)}, \quad (33)$$

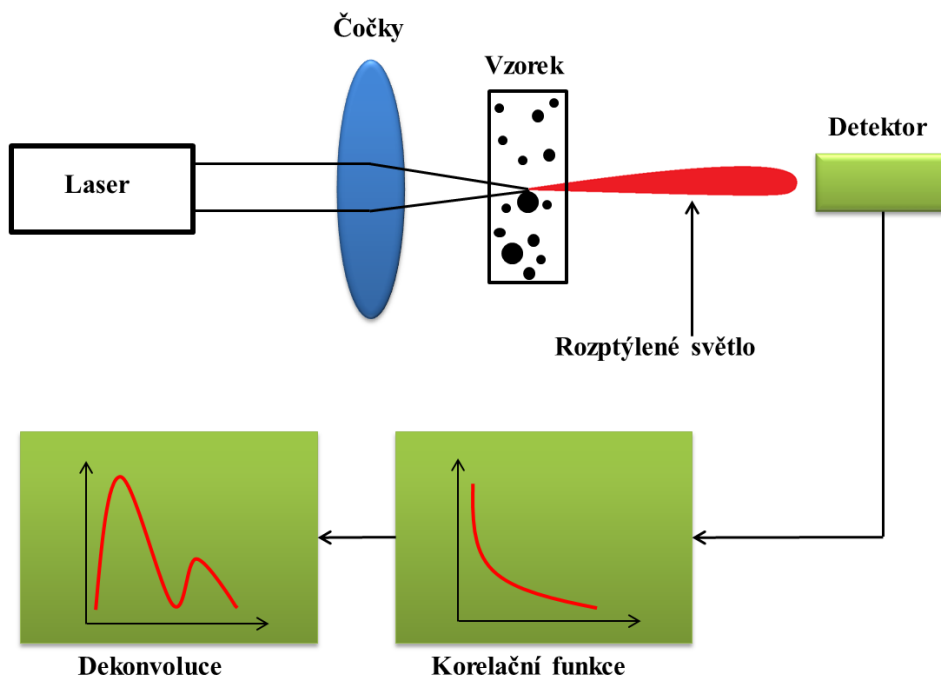
kde $D_{rr}(r, s)$ je Laplaceova transformace $D_{rr}(r, t)$ a $D_{rr}(r, t)$ je kros-korelační funkce v radiálním směru [3,33,38,39].

2.5 DLS mikrereologie

Již od počátku minulého století byl zpozorován významný jev, při styku světla a látky vykazující lokální nehomogenity, kdy dochází ke značnému rozptylu budícího světla. Tento fakt dal za vznik mnoha hojně využívaným metodám, mezi které patří i DLS (dynamic light scattering). Rozptylové techniky v oblasti mikrereologie 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 [40]. 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 [26].

2.5.1 Základní princip DLS mikrereologie

Mikrereologie pomocí DLS patří do skupiny pasivních mikrereologických technik, tedy využívá pouze tepelné energie k pohybu měřicích částic. Tato metoda je schopna poskytnout jisté výhody pro vzorky s nízkou viskozitou, transparentní a málo strukturované vzorky. Poskytuje širší frekvenční rozsah v porovnání s klasickou jednočásticovou mikrereologií. Není však vhodná pro vzorky heterogenní a zakalené.



Obr.11: Schéma DLS [43]

Dynamic light scattering (DLS), označována také jako Photon correlation spectroscopy (PCS) či Quasi-Elastic light scattering (QUELS) je běžně užívána technika k měření velikosti částic suspendovaných v kapalném prostředí, většinou v sub-mikrometrovém měřítku [43].

Funkce ACF značená také jako $g_1(\tau)$, může být zapsána jako funkce MSD(t):

$$g_1(\tau) = g_1(0) \exp[-q^2 \langle \Delta r^2(\tau) \rangle / 6], \quad (34)$$

kde $g_1(0)$ je hodnota autokorelační funkce v čase $t = 0$ a q je vektor rozptylu a je dán jako

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (35)$$

kde n je index lomu zkoumaného materiálu, λ je vlnová délka a θ je rozptylový úhel. Korelační čas τ je vztažen k času t vztahem $\tau = 2\pi t$, pak $\omega = 1/\tau$.

Mikroreologie pomocí DLS opět vyžaduje přidání částic o známé velikosti do zkoumaného vzorku k získání ACF rozptýleného světla na částicích. Poté může být z rovnice (34) odvozen vztah mezi MSD a ACF:

$$\langle \Delta r^2(\tau) \rangle = \frac{6}{q^2} [\log(g_1(0)) - \log(g_1(\tau))] \quad (36)$$

Obecně platí, že vysoká počáteční hodnota funkce ACF (nad 0,8) je ukazatelem skutečně jednonásobného rozptylu světla, což je v tomto případě velmi žádoucí [51].

Viskoelastický modul může být získán pomocí Fourierovy transformace MSD a následného dosazení do rovnice:

$$G^*(\omega) = \frac{k_B T}{\pi a i \omega \langle \Delta r^2(i\omega) \rangle} \quad (37)$$

Jelikož je korelace dat vždy rozložena v čase a nehodí se pro klasickou metodu Fourierovy transformace, metoda založená na mocninném rozšiřování MSD může být použita místo rovnice (36). Tento postup získáváme komplexní modul algebraicky rozšířením $\langle \Delta r^2(t) \rangle$ lokálně v místě $t = 1/\omega$ pro dosažení:

$$\langle \Delta r^2(t) \rangle \approx \langle \Delta r^2(1/\omega) \rangle (\omega t)^{\alpha(\omega)} \quad (38)$$

kde

$$\alpha(\omega) = \left. \frac{d \ln \langle \Delta r^2(t) \rangle}{d \ln t} \right|_{t=1/\omega} \quad (39)$$

je mocninný exponent popisující logaritmickou směrnici $\langle \Delta r^2(t) \rangle$ v čase $t = 1/\omega$.

Užití Fourierovy transformace mocninného zákona MSD(t), substitucí do rovnice (37) a užití Eulerovy rovnice vede k vyjádření viskoelastického modulu v závislosti na frekvenci G^* , elastického G' a viskózního modulu.

$$G'(\omega) = G^*(\omega)\cos[\pi\alpha(\omega)/2] \quad (40)$$

$$G''(\omega) = G^*(\omega)\sin[\pi\alpha(\omega)/2], \quad (41)$$

kde

$$G^*(\omega) = \frac{k_B T}{\pi\alpha\langle\Delta r^2(\frac{1}{\omega})\rangle\Gamma[1+\alpha(\omega)]} \quad (42)$$

Γ značí gama gunkci, která vyplývá z Fourierovy transformace mocninného zákona MSD. Komplexní viskozita pak může být vypočítána pomocí následujícího vztahu:

$$\eta^*(\omega) = \sqrt{\frac{[G''(\omega)]^2 + [G'(\omega)]^2}{\omega^2}} \quad (43)$$

2.5.2 Využitelnost DLS mikrореologie

U všech DLS měření je nutné se ujistit, že začleněné částice jsou právě ty, na kterých bude probíhat rozptyl působícího paprsku a že podmínka jednonásobného rozptylu světla bude zachována. Mohou být také aplikována některá následná opatření, která zaručí požadavky na kvalitu získaných dat. Mezi nejvýznamnější patří aplikování autokolerační funkce. Jak již bylo zmíněno dříve, hlavní roli v získání mikrореologických dat hraje Stokes-Einsteinova rovnice. Nicméně existují případy, kdy se stává tento předpoklad neplatným a získaná mikrореologická data jsou napadena chybou a tudíž nekorelují s daty získanými klasickou reologií [27]. Do této skupiny spadá:

- **Interakce mezi sondou a okolním prostředím.** Klíčovou podmínkou DLS mikrореologických experimentů minimalizace interakcí částice-matrix, jelikož tyto chemické či fyzikální interakce mohou ve značné míře omezit pohyblivost sond a tím zkreslit výsledný difuzní koeficient.
- **Vliv velikosti sond a heterogenita okolního materiálu.** Zvolená velikost částic pro DLS měření může mít zásadní vliv na výsledná reologická data [44]. Obecně by velikost částice měla převyšovat velikost strukturních ok materiálu, aby byly získány vlastnosti materiálu jako celku. Sondy však nesmí být tak velké, aby během doby experimentu nedocházelo k jejich sedimentaci.
- **Agregace či gelace systému v blízkosti bodu gelace.** DLS je velmi vhodnou metodou ke studiu procesů agregace či gelace. Je však nutno mít na paměti, že po překročení bodu

gelace se systém stává neergodickým, dochází k rozptylu paprsku nejen na částicích, ale také na vzniklých agregátech, což způsobuje nespolehlivost DLS měření[43,45].

2.5.3 Výhody a nevýhody DLS mikrореologie

Pro charakterizaci reologických vlastností jemných, komplexních, transparentních či mírně zakalených materiálů, poskytuje DLS mikrореologie následující benefity:

- Měření vyžadují relativně malé množství vzorku, které se pohybuje v rozmezí 0,5 ml – 1 ml.
- DLS mikrореologie poskytuje širší frekvenční rozsah ve srovnání s reologií klasickou.
- Doba trvání a vyhodnocení DLS experimentů je mnohonásobně rychlejší ve srovnání s reologií klasickou či VB-PTM.
- Použití DLS techniky umožňuje použití nižší koncentrace sond, což minimalizuje pravděpodobnost interakcí s okolním prostředím [46].

2.6 FCS mikrореologie

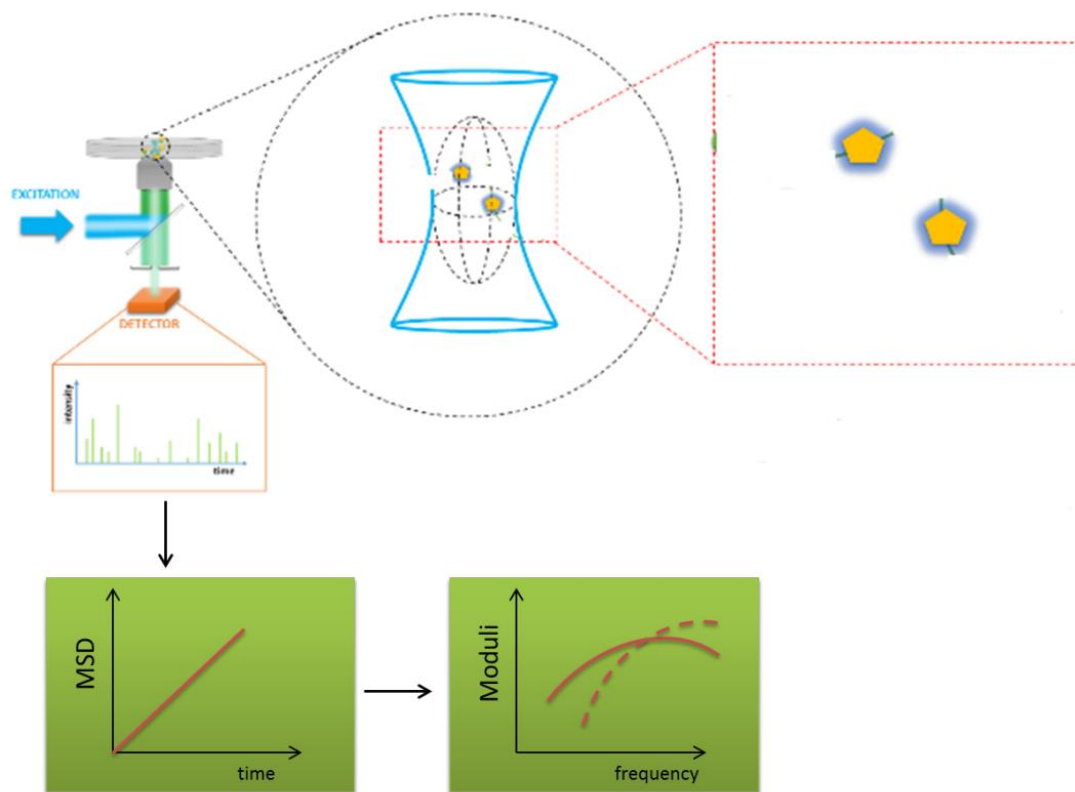
2.6.1 Základní princip FCS mikrореologie

FCS (fluorescence correlation spectroscopy) je metoda založena na monitorování fluktuací intenzity fluorescence, která je způsobena difúzí fluorescenčních sond (například fluorescenčně značené mikro či nanočástice) přes velmi malý pozorovaný objem. Pomocí korelačních analýz fluktuací lze získat informace o difúzních koeficientech těchto sond, jejich koncentraci či vlastnostech okolního prostředí [49].

FCS je spektroskopická metoda, která má velký potenciál mimo jiné také k měření viskoelastických vlastností materiálů, jako jedna z nejpokročilejších pasivních mikrореologických metod. FCS využívá konfokální mikroskopie ke sledování pohybu fluorescenčních částic začleněných ve vzorku femtolitrového objemu. Fluktuace fluorescenčního signálu může být kvantifikována na základě její délky a trvání na základě intenzity nahrávaného signálu. Z tohoto signálu mohou být stanoveny nejen veličiny jako efektivní difúzní koeficient, relaxační čas, ale také například časová funkce MSD pohybujících se částic.

FCS je schopna poskytnout určité specifické výhody oproti ostatním mikrореologickým přístupům. Je schopna měřit lokální reologické vlastnosti heterogenních vzorků pozorováním velmi malých částic (cca 20 nm) ve fokálním objemu. Jiné mikrореologické metody jako

například DWS či DLS nejsou schopny poskytnout takové prostorové rozlišení z důvodu velkého objemu osvětlovacího paprsku. Funkci MSD je možné převést na elastickou a viskózní odezvu pomocí rovnic odvozených Masonem a Wirtzem stejně jako u ostatních mikrereologických metod [41,47,48].



Obr.12: Schéma měření viskoelastických parametrů pomocí FCS

2.6.2 Výhody a nevýhody FCS mikrereologie

FCS mikrereologie je nově se rozvíjející technikou v oblasti měření reologických vlastností materiálů a v mnoha ohledech dokáže překonat ostatní reologické či mikrereologické techniky. Hlavním přínosem této metody je časový rozsah dat (cca od 10^{-7} s do 100 s). Maximální hodnota je dána dobou, kterou značená částice stráví v daném konfokálním objemu. Délka tohoto intervalu je samozřejmě ovlivněna jak velikostí částice, tak okolní teplotou a v nemalé míře také viskozitou prostředí. Nespornou výhodou je velmi malé množství vzorků potřebné pro měření (max. 10 μ l), což usnadňuje měření biologických, drahých a těžko dostupných materiálů. Poměrně náročné je však zpracování naměřených dat a v rámci nevýhod je třeba také poukázat na

pořizovací cenu přístroje, která je v porovnání s ostatními mikreologickými metodami mnohonásobně vyšší.

FCS mikreologií lze bohužel detekovat pouze specifické struktury, které vykazují fluorescenci či byly fluorescenčně označeny. Nicméně u mnoha biologických vzorků způsobuje problém právě autofluorescence, kterou excitační/emisní filtry přístroje nejsou schopny zcela eliminovat [52].

2.7 Rozsah použitelnosti a správný výběr jednotlivých mikreologických metod

Mikreologie, jakožto soubor několika přístupů k určení viskoelastických vlastností materiálů má také své limitace typické pro jednotlivé metody. Tato omezení hrají klíčovou roli při výběru vhodného postupu k charakterizaci požadovaného materiálu. V této kapitole se zaměřuji na základní a nejpoužívanější techniky, kterými jsou OPM (jednočásticová mikreologie), TPM (dvoučásticová mikreologie), DWS (diffusing wave spectroscopy), DLS (dynamic light scattering) a klasická reologie a jejich porovnání na základě množství vzorku potřebného pro měření, dosažitelného frekvenčního rozsahu a charakteru vzorku.

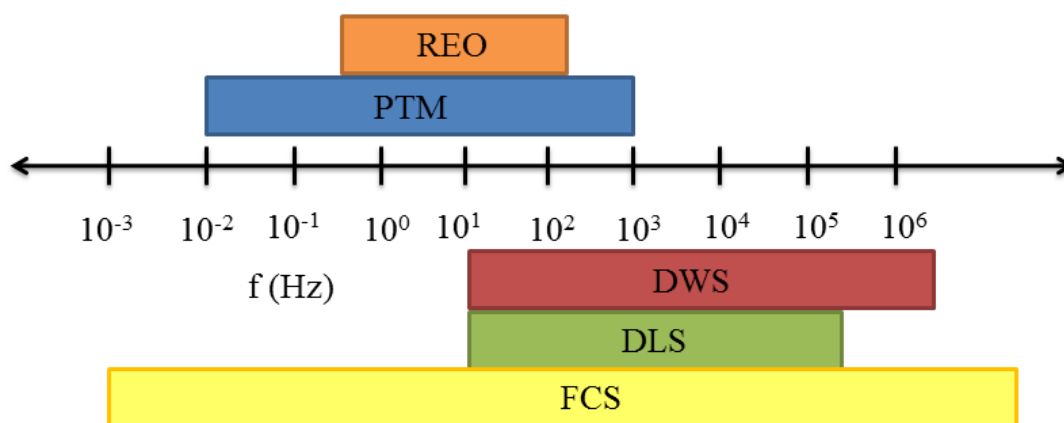
2.7.1.1 Množství vzorku

Jak již bylo v úvodu poznamenáno, mikreologie je unikátní metodou hlavně z hlediska množství vzorku potřebného pro měření v porovnání s klasickou reologií, kde je potřeba většího objemu vzorku. Pojem „velké“ množství vzorku je dosti relativní, jedná se přibližně o 5 mililitrů, které však mohou znamenat nedosažitelné množství například u biologických vzorků či finančně nedostupné u velmi drahých materiálů. V tomto ohledu dominují mikreologické metody, jejichž požadavky na objem vzorku se pohybují v rozmezí několika mikrolitrů. Nejméně náročné mikreologické metody v tomto směru jsou jednočásticová a dvoučásticová mikreologie, kde je k charakterizaci potřeba pouze 10 μl . Tento fakt staví metodu do popředí v oblasti charakterizace biologických materiálů. V případě DWS či DLS je minimální měřitelné množství stanoveno na 50 μl , jelikož vzorek musí být umístěn v kyvetě [53].

2.7.1.2 Frekvenční rozsah naměřené oblasti

Měřitelné frekvenční rozsahy se v jednotlivých případech podstatně liší. Při volbě metody je důležité si uvědomit, co chceme u daného vzorku pozorovat a v jaké frekvenční oblasti bychom se chtěli pohybovat. Pokud se chceme zaměřit na nízkofrekvenční oblast, pak je nevýhodnější

sáhnout po jednočásticové či dvoučásticové mikrореologii. Ve středním rozsahu frekvencí se spokojíme s mikrореologií klasickou či DLS a vysokofrekvenční data získáme pomocí DWS. Ideálním případem je kombinace metod pro získání širokofrekvenčního spektra dat [26,53].



Obr.13: Frekvenční rozsah vybraných mikrореologických metod [11]

2.7.1.3 Charakter vzorku

Nemalý vliv na výběr vhodné měřicí techniky má vzorek samotný. Materiály transparentní je možno měřit všemi zmiňovanými metodami bez výjimky. U materiálů netransparentních je důležitá míra jejich transparentnosti. Jednočásticová PTM v takových případech většinou selhává. Řešení může představovat fluorescenční mikroskop a fluorescenčně značené částice, které budou viditelné i v méně průhledném vzorku. U DLS by mohlo nastat riziko vícenásobného rozptylu světla, což je nežádoucí, a proto se nejčastěji používá buďto reologie klasická či DWS.

Velkou skupinu mohou tvořit také vzorky nehomogenní, což jsou z velké části vzorky biologické povahy. Zde je použití klasické reologie možné pouze v případě, že nás nezajímají heterogenity přítomné ve vzorku a chceme zjistit pouze průměrné hodnoty měřených veličin materiálu jako celku. Stejně tak tomu bude u DLS či DWS. V případě, že nás však zajímá vnitřní struktura vzorku, pak je nejlepším řešením přistoupit k mikroskopickým metodám, ideálně k TPM, která neměří pouze okolní prostředí částice jako OPM, ale sleduje vzájemný pohyb dvou částic, čímž může odhalit možné nehomogenity přítomné ve vzorku [11].

2.7.1.4 Další kritéria

Mezi spíše okrajová kritéria jednotlivých metod můžeme zařadit cenu měřicího systému. Vzhledem k tomu, že k PTM je zapotřebí většinou klasického optického mikroskopu

a vysokorychlostní kamery, řadí se tento systém k cenově nejdostupnějším. Využitím fluorescenčního mikroskopu však již cena patřičně narůstá. O cenový stupeň výše můžeme zařadit zařízení pro DWS či DLS. Pořizovací cena FCS je nejvyšší [38].

2.8 Mikroreologické částice a jejich správný výběr

Výběr částic pro měření je velmi důležitý, jelikož může kriticky ovlivnit výsledky mikroreologických měření [38]. Mezi nejdůležitější parametry částice, na které je kladen velký důraz, patří velikost částice, její hustota vztažená k hustotě okolního vzorku a materiál povrchu částice.

2.8.1 Velikost částice

Největší pozornost při výběru velikosti částice by měla být věnována charakteristické velikosti struktur ve sledovaném vzorku. Například polymerní sítě jsou charakterizovány pomocí velikosti strukturních ok ξ (mesh size), která závisí částečně na koncentraci polymeru. Pokud je požadováno určení reologických vlastností polymerní sítě, stejně jak je tomu u klasické reologie, pak ideální částice bude mít průměr, který je větší než ξ . Jestliže jsou vybrané částice mnohem menší než je velikost ok polymeru, pak budou tyto částice „prokluzovat“ polymerní sítí a nebudou poskytovat přesné výsledky reologické odezvy materiálu [54,55,56]. Velikost ok polymeru může být vypočítána jako

$$\xi = R_g \left(\frac{c^*}{c} \right)^{0,75}, \quad (44)$$

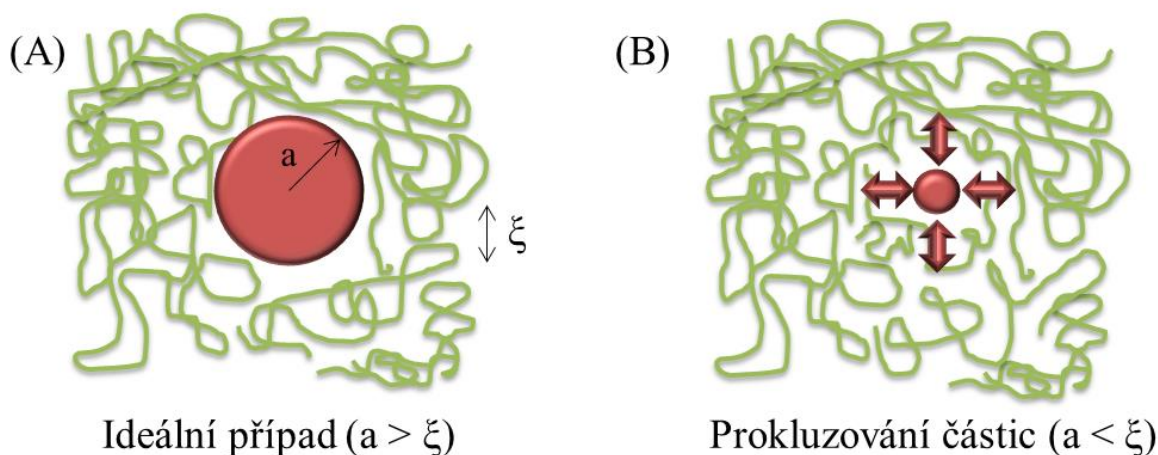
kde R_g je gyrační poloměr, c^* a c značí překryvovou koncentraci polymeru a koncentraci materiálu ve vzorku [57]. Závislost molekulární hmotnosti na gyrační poloměr byl experimentálně stanoven na:

$$R_g = 0,215 M_w^{0,583 \pm 0,031} A, \quad (45)$$

kde M_w značí molekulovou hmotnost polymer. Jelikož se jednotlivé polymerní řetězce navzájem dotýkají při koncentraci c^* , poloměr gyrace může být vztažen k překryvové koncentraci podle následující rovnice:

$$c^* = \frac{M_w}{\frac{4}{3} N_A \pi R_g^3}, \quad (46)$$

kde N_A je Avogadrovo číslo. Na druhé straně, částice o průměru větším než je velikost ok mohou charakterizovat reologickou odezvu materiálu jako celku, z jejich pohybu ale nebude možno získat informace o distribuci pórů materiálu. V zásadě je tedy velmi užitečné znát aspoň přibližně charakteristické délky struktury zkoumaného materiálu před výběrem částic pro měření. Obecně je poloměr částice limitován rozsahem $200 \text{ nm} < a < 10 \text{ }\mu\text{m}$, přičemž spodní limit je určen optickým rozlišením mikroskopu a kvalitou použité kamery. Algoritmus zpracování obrazu požaduje nejméně 5 pixelů k určení těžiště částice s dostačující přesností. Horní limit pak vychází z požadavků Brownova pohybu, kdy u nadlimitní velikosti již tyto částice nevykonávají tepelný pohyb.



Obr.14: (A) Ideální částice k určení reologických vlastností celkového materiálu, kdy je velikost částic větší než velikost polymerních ok. (B) Částice, které jsou mnohem menší „prokluzují“ polymerní síť a jejich pohyb neodráží reologickou odezvu materiálu [21,23]

2.8.2 Hustota částic

U mikrereologických měření představuje sedimentace částic poměrně značné překážky. V krajním případě sedimentace posune systém mimo rovnovážný stav a ovlivní časový interval, ve kterém se částice nachází v zorném poli. Tento efekt má podstatný vliv zejména na délku trvání experimentu. Rychlost sedimentace v_{sed} částic, ovlivňuje několik parametrů a je vyjádřena silovou bilancí mezi gravitační silou a Stokesovým vztahem pro inertní částice v čistě viskózním prostředí:

$$v_{sed} = \frac{2a^2 \Delta \rho g}{9\eta}, \quad (47)$$

kde a je poloměr částice, η je viskozita, g gravitační zrychlení a $\Delta\rho$ je gradient hustoty mezi částicí a prostředím. Za účelem minimalizace vlivu sedimentace se používají částice, které mají hustotu totožnou s okolním prostředím. V praxi je však poněkud obtížné získat naprostou shodu těchto hodnot. V tomto případě je možné problém vyřešit použitím menších částic, které nepodléhají sedimentaci v takové míře, pokud si to však můžeme vzhledem ke struktuře materiálu dovolit. Obecně platí, že čím větší částice, tím většího souladu hustot musí být dosaženo.

Další komplikace v souvislosti se sedimentací nastává s prodlužující se dobou experimentu, kdy se částice usazují na povrchu vzorku. Rovnovážná distribuce hustoty počtu částic, $N(z)$, jako funkce výšky od povrchu vzorku je snadno odvoditelná pomocí Boltzmanovy distribuce:

$$\frac{N(z)}{N(0)} = e^{-\Delta\rho Vgz / k_B T}, \quad (48)$$

kde $N(0)$ je hustota částic na povrchu. V ideálním případě by koncentrace částic ve vzorku i na jeho povrchu měla být uniformní a nízká ($\phi \sim 10^{-4}$). Vyšší hustota částic může způsobovat častý překryv jednotlivých částic a tím snížit efektivitu platnost algoritmu pro jejich sledování[23].

Pasivní mikrореologie použitím nefluorescenčních částic ve světelném poli může představovat také určité nevýhody. Částice v takovémto případě podléhají stochastickému pohybu, a tudíž se pohybují také ve směru kolmém na ohniskovou rovinu. Na základě ohniskové roviny, ve které se částice nachází, se částice mohou jevit od uniformně černého kruhu na bílém pozadí až k černé kružnici s bílým vnitřním kruhem. V případě fluorescenčních částic, se všechny sondy jeví jednotně – tedy jako světlé body na tmavém pozadí a stávají se tak velmi používanými pro účely pasivní mikrореologie. Ani mikrореologie použitím fluorescenčních částic však není bez nevýhod, z nichž hlavní je snížení intenzity signálu. Fluorescence částic nacházejících se mimo ohniskovou rovinu snižuje kontrast obrázku [59].

2.8.3 Povrch částice

Téměř všechny mikrореologické částice mají povrch upraven za účelem jejich stabilizace. Nejčastěji dochází k pokrytí povrchu nabitými skupinami nebo vrstvou polymeru. Přidávání karboxylových ($-\text{COOH}$), aminových ($-\text{NH}_4$) či sulfonátových skupiny ($-\text{SO}_4$) na povrch polystyrenových částic nebo hydroxylových skupin ($-\text{OH}$) na povrch částic z křemíku (Si), je nejlepší volbou pro vodné roztoky s malou iontovou silou ($<10 \text{ mM}$). Tyto skupiny ve vodě

ionizují za současného uvolňování H^+ protiiontu a ve výsledku se částice stávají nabitými a stabilizovanými pomocí odpuzivých sil. Při vyšších iontových silách prostředí nebo v přítomnosti dvojmocných iontů, nastává fluktuace vlivem náboje. Na druhou stranu, sterické ustálení je vhodnější pro stabilizaci přitažlivých sil s krátkými vzdálenostmi jako jsou van der Waalsovy síly, vzájemným působením nábojů nebo naopak nepolárních úseků molekul. Na základě mnoha experimentů bylo zjištěno, že karboxylově modifikované polystyrenové částice jsou nejvhodnější a nejpoužívanější částice pro inertní polymery ve vodném systému jako je například PEO (polyethylenoxid) za běžných podmínek. Pro vzorky s velkým nábojem jako jsou biopolymery nebo bakterie, se BSA (Bovine serum Albumin) používá k potažení povrchu částic a působí tak jako vhodný blokátor [23].

Pokud je tedy povrch částice schopen ovlivnit strukturu materiálu v nejbližším okolí, výsledek jednočásticové mikrorheologie bude odezvou spíše lokálního mikroprostředí než celkového vzorku. V případě experimentů s PEO není zaznamenán žádný efekt působení povrchu částice na materiál [41], nicméně v případě biopolymeru může mít povrch částice významný vliv na konečné výsledky [10,61].

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Jak již bylo zmiňováno dříve, mikoreologie je, na základě svých rysů, unikátní metoda vhodná ke studiu viskoelastických vlastností takových materiálů, u kterých to do této chvíle nemuselo být vůbec možné. Převážně z hlediska objemu potřebného vzorku. Mikoreologie může také představovat vhodnou doplňkovou metodu ke klasické reologii [54]. Mnoho výzkumných prací je založeno na srovnávání výsledků jednotlivých mikoreologických metod s výsledky získanými klasickou reologií. V mnoha případech byla pozorována excelentní shoda těchto dat. Podmínkou souladu je však homogenita studovaného materiálu, kdy je délka strukturních jednotek malá ve srovnání s velikostí použitých mikoreologických částic. Důležitou podmínkou pro porovnávání výsledků je také inertnost použitých částic vůči zkoumanému materiálu. V případě porušení poslední podmínky, dochází k vytváření takzvané zóny vyčerpání („depletion zone“) okolo použitých částic, což způsobí jejich větší pohyblivost a nesprávné vyhodnocení viskoelastických vlastností [63,64].

Jak pasivní tak aktivní mikoreologické metody jsou v poslední době hojně využívány pro studium široké škály materiálů. Mezi základní oblast použití spadají micelární roztoky, studium biomateriálů, gelů či průběhu gelace biopolymerů. Následující rešeršní část je zaměřena na aplikace mikoreologických metod především na skupiny materiálů, které byly více či méně využívány také v této dizertační práci.

3.1 Aplikace mikoreologických metod ke studiu gelů

Gely spadají do skupiny materiálů, u kterých patří mikoreologické metody mezi hojně využívané postupy. Metoda se využívá pro schopnost získat zajímavé informace o mikrostruktuře vzorku, na rozdíl od reologie klasické poskytující zprávu o jeho makrostruktuře. I pro své potencionální využití v mnoha oblastech přitahují tyto materiály velké skupiny badatelů po celém světě.

Metoda pasivní mikoreologie je využívána Corriganem a kol. [65] ke studiu síťování mléčného proteinu β -lactoglobulinu při zvýšené teplotě a nízkém pH. Tyto podmínky způsobují agregaci proteinu a formování takzvaných amyloidních fibril, které později vytvářejí elastické sítě. Na základě mikoreologických měření bylo zjištěno, že gel se vytváří již ve významně nižších koncentracích, než jak naznačovalo měření klasickou reologií. Tento jev je dán skutečností, že oscilační smykové síly klasické reologie mohou narušit vznikající fibrily či

vznikající síťové struktury. Mikroreologie je tedy vhodnou metodou ke studiu gelů v blízkosti kritické koncentrace, kde klasická reologie nevykazuje dostatečnou citlivost.

Studiem proteinových gelů se zabývá také Balakrishnan a kol. [66], konkrétně se jeho zájem upíná na roztoky laktoglobulinu s měnící se koncentrací a různé iontové síle, které následně vytvářejí gelové struktury. Ve svém studiu také používají částice různých velikostí, pro přesnější charakterizaci mikrostruktury vzniklých gelů.

Scheffold a kol. [67] se zabývali studiem komplexních systémů od částic a biopolymerních gelů, přes keramické suspenze až ke koncentrovaným roztokům surfaktantů pomocí klasické reologie a pasivní mikroreologie použitím DWS.

Studium sol-gel přechodu se stalo předmětem zájmů Moschakise a kol. [68]. Sol-gel přechod kaseinátu sodného podléhajícího gelaci pomocí acidifikace byl studován jednočásticovou mikroreologií a klasickou reologií. Jedním z hlavních účelů této studie bylo také srovnání mikroreologických výsledků s makroskopickými viskoelastickými vlastnostmi měřenými klasickým reometrem. Při hodnotě pH blízké izoelektrickému bodu kaseinu, kde tvorba proteinové sítě začíná být zřejmá, mají všechny částice tendenci se upevnit ke vznikající síti. Navzdory tomuto jevu, mikroreologicky získané hodnoty jednotlivých modulů byly jen nepatrně nižší v porovnání s daty makroreologickými a bod gelace určený oběma metodami se lišil pouze minimálně. Nicméně, PTM vykazuje vyšší citlivost a je schopna detekovat změny ve struktuře systému dříve, než je tomu u klasického reometru.

Stejná skupina vědců se zabývala také studiem sol-gel přechodu β -glukanu vodného ječmene, k čemuž využívali klasickou reologii a PTM (particle tracking microrheology). Ve výsledku bylo zjištěno pomocí obou použitých metod, že rostoucí koncentrace polysacharidu vede ke snížení času potřebného k jeho gelaci a současně ke zvýšení pevnosti gelu. Mikroreologická metoda opět vykazovala vyšší citlivost a tedy je schopna detekovat změny ve struktuře systému dříve než klasická reologie [69].

Heinemann C. [70] se zabývali studiem reologických vlastností přírodního biopolymeru škrobu za přítomnosti γ -dodecalactonu, který indukuje proces gelování. Pasivní mikroreologie s použitím polystyrenových částic představovala pro tyto účely nejvhodnější měřicí systém.

Stejně tak, jako několik výše zmiňovaných vědeckých skupin, se i Oppong a kol. [71] zabývali porovnáváním výsledků získaných mikroreologickými metodami s výsledky klasické reologie. Konkrétně využívali metody jako jednočásticová mikroreologie a DWS pro studium viskozitních

vlastností Carbopolu ETD 2050 jako funkce jeho koncentrace. Carbopol ETD 2050 je polymer založený na zesíťovaných lineárních řetězcích kyseliny polyakrylové, který je používán komerčně například k úpravě reologických vlastností kosmetických a farmaceutických produktů. Křivky časové funkce MSD získané pomocí DWS a MPT vykazují velmi dobrou shodu. Při bližší studii trajektorií jednotlivých částic získaných z MPT je však opravdu zřejmé, že u vyšších koncentrací pozorujeme odlišnosti v časové funkci posunu od částice k částici. Některé z částic jsou dokonce v materiálu zaklíněny do takové míry, že nevykazují jakýkoliv pohyb. Je však také možno definovat částice, kterým v pohybu nic nebrání. Z tohoto pozorování lze dedukovat, že Carbopol je velmi nehomogenní materiál tvořen mikroprostředími lišícími se reologickými vlastnostmi. Tuto skutečnost můžeme také potvrdit přítomností negaussovske distribuce. Výskyt takového chování už sám o sobě napovídá nehomogennímu prostředí, jelikož Brownův pohyb v homogenním prostředí představuje Gaussovskou distribuci. Mikroreologické výsledky ukazují, že ve velmi malých měřících materiálu dominuje viskózní modul přes široký rozsah frekvencí a koncentrací. Proto hodnoty elastického i viskózního modulu jsou menší v porovnání s hodnotami získanými klasickou reologií a výsledky se liší často i o celé řády. Tyto efekty jsou v souladu s charakterem heterogenního materiálu v měřítku velikosti zvolených částic.

Struktura a tvorba sítě viskoelastického roztoku biopolymeru byla studována pomocí klasické reologie a mikroreologie užitím DWS. Na základě těchto měření bylo zjištěno, že elasticita polymerní matrice má významný vliv na strukturu výsledného koloidního gelu [71].

PTM využili ke studiu gelace koloidních suspenzí syntetického jílu Laponitu. Z výsledků je jasně patrná heterogenní struktura vznikajícího gelu, která se projevovala různou pohyblivostí začleněných částic [73]. Stejný jev byl také prokázán u studia kolagenového gelu [74].

Na zkoumání rozdílů reologického chování v mikro a makroprostředí poukazuje také Jason Rich [75] se svou skupinou spolupracovníků. Centrem jejich zájmu jsou jemné koloidní materiály, mezi které patří koloidní skla či gely. U těchto látek mikroreologie odhaluje výskyt velmi jemných gelů na počátku gelace, které klasický reometr ještě není schopen detekovat, či je svým působením zcela rozruší. Konkrétně ve své práci zkoumali průběh gelace a reologického stárnutí vodních disperzí syntetického jílu zvaného Laponitu RD použitím pasivní mikroreologie. Zabývali se zde také vlivem velikosti použitých mikroreologických částic na konečné výsledky. Co se týče homogenního materiálu, data získaná použitím částic s měnícím se poloměrem by se měla překrývat pro vzorek se stejným disperzním věkem. Z výsledků je patrné, že výsledné

funkce $MSD(t)$ se s měnící velikostí částic nepřekrývají a demonstrují tak rozdílné chování u stejného vzorku, což opět naznačuje vysokou heterogenitu vzorku.

Významná skupina vědců zabývající se kinetikou gelace, strukturou vzniklého gelu a všech jevů, které s touto problematikou souvisí je soustředěna okolo E. Fursta [76] na universitě Delaware. Pro studium jednotlivých materiálů používají širokou škálu mikrореologických metod v kombinaci s reologií klasickou. Svou pozornost upírají na širokou problematiku mikrореologie, kam bezesporu patří i studium vlivu povrchu částice na konečné výsledky. Tento jev byl pozorován na vzorcích F-aktinu s použitím klasických a polystyrenových částic, na nichž byl adsorbován BSA (bovine serum albumin). Výsledkem jejich práce bylo zjištění, že částice ošetřené tak, aby limitovaly adsorpci polymerní sítě, vykazovaly menší subdifúzivní chování než částice neošetřené. Bylo také zjištěno, že v okolí ošetřených částic se vytváří takzvaná vyčerpaná zóna s rozdílným komplexním modulem v porovnání s komplexním modulem celkového vzorku. Velikost této zóny je závislá pouze na velikosti částice a nesouvisí s koncentrací polymerní sítě. Z výsledků vyplývá, že vyčerpaná zóna je způsobena vyloučením a orientací vláken F-aktinu v blízkosti částice na základě jejich délky a rigidity.

Velká část jejich práce zahrnuje studium sol-gel přechodů týkajícího se převážně hydrogelových materiálů. Tyto látky jsou v současné době hojně studovanými látkami, díky jejich unikátním vlastnostem, a to převážně pro biomedicínské, kosmetické a terapeutické účely. Publikované výsledky poskytují důležitý pohled do reologie, struktury a jejich kinetiky gelace. Speciálně ve studiu slabých vznikajících gelů, stejně jako ve studiu vzácných materiálů, pro které je mikrореologie velmi vhodnou metodou s ohledem na množství použitého vzorku a na rychlost pořizování dat [77,78].

Průběh gelace byl studován konkrétně pro systém PEH-heparin metodou MPT. Jednotlivé vzorky se lišily molekulovou hmotností PEG a koncentrací heparinu i PEG. Kinetika gelace je charakterizována pomocí gelačního času t_c a kritickým relaxačním exponentem, n . Nejrychlejší kinetika byla zaznamenána u vzorku heparinu s nejvyšší mírou funkcionalizace. Hydrogely na bázi heparinu vykazují speciální vlastnosti, jako například schopnost izolace a stabilizace proteinu či růstového faktoru, díky nimž jsou velmi žádané pro terapeutické aplikace [79,80].

Kinetika gelace byla studována také u hydrogelů obsahujících peptid β -hairpin MAX1, a to pomocí mikrореologie a CD mikroskopie. Vznik tohoto gelu je spjat se změnou teploty, pH či iontové síly [81]. Struktura β -hairpin MAX1 oligopeptidů byla také měněna a v konečném

výsledku bylo dokázáno, že rychlost gelace je možné kontrolovat strukturou peptidových řetězců [82,83].

3.2 Aplikace mikrореologických metod ke studiu biomateriálů

Klasická reologie je široce využívána k charakterizaci viskoelastického chování komplexních kapalin. Nicméně, je velmi obtížné precizně určit reologické vlastnosti materiálů, jejichž viskozita není patřičně vysoká, aby indukovala dostatečný signál, který může přístroj spolehlivě vyhodnotit (zředěné roztoky polymerů nebo zředěné suspenze). **H. Kang a kol.** [84,85] porovnávali reologické vlastnosti různých polymerních roztoků použitím klasické reologie a PTM. Hlavním cílem této studie je stanovit a porovnat nulovou smykovou viskozitu a dynamický modul polymerního roztoku s měnící se koncentrací pomocí reologie a PTM. K tomuto účelu byly použity dva různé semiflexibilní polymerní roztoky s různou molekulovou hmotností jako modelová viskoelastická kapalina. Prvním modelovým polymerem je PEG s dvěma molekulovými hmotnostmi, druhým polymerem je akrylamid opět o několika molekulových hmotnostech. Jako částice byly použity karboxylově modifikované polystyrenové fluorescenčně značené částice o velikosti 1 μm a 500 nm. Po provedení experimentu dospěli vědci k závěru, že data získaná pomocí PTM se shodovala s teoretickou predikcí lépe než data získaná pomocí DWS techniky. Ve výpočtech dynamického modulu z MSD(t) funkce bylo dokázáno, že použití Maxwellova modelu je spolehlivější ve srovnání s modelem Eulerovým díky dodatečnému vyhlazení dat. Ačkoliv existují omezení použití PTM na základě limitovaného rozlišení přístroje, je zřejmé, že je tato metoda velmi účinná při měření viskoelastivity jemných elastických materiálů.

Skupina vědců v okolí Yiider Tsenga [85] se zabývala otázkou jak cytoskeleton poskytuje buňce strukturní podporu, jelikož tento jev ještě nebyl zcela objasněn. Mikrореologické metody poskytují lokální mechanické vlastnosti a jsou vhodné pro ověření hypotéz, které byly odvozeny z in vitro modelů cytoskeletálních sítí. Byly hodnoceny aplikace OPM a MPT s důrazem na semiflexibilní polymer F-actin a flexibilní polymer keratin, dvě významné složky cytoskeletonu. Pro měření byla použita jak OPM tak TPM pro prozkoumání přítomných heterogenit. V závěru bylo poukázáno na fakt, že výsledky pro OPM se podstatně lišily od TPM, což naznačovalo patřičnou heterogenitu vzorku.

S.K. Lai a kol. [86] se zabývali studiem mukusu, jako komplexního biologického materiálu, který splňuje funkci lubrikační a ochrannou. V makroměřítku se mukus chová jako neNewtonský gel, který je od pevných látek a kapalin odlišován svou odezvou na vložené napětí a tlak, zatímco v nanoměřítku se chová jako nízkoviskózní kapalina. Výhody v charakterizaci v mikro i makroměřítku přispívají k celkovému pochopení fyziologie hlenu, patologií chorob a k rozvoji systémů pro dávkování léčiv určených k podání skrze plochy obalené hlenem. Dynamika a lubrikační vlastnosti mukusu úzce souvisí s jeho viskoelasticitou, která se mění jako funkce amplitudy napětí, smykové rychlosti a podnětů prostředí. Makro a mikrореologická charakterizace mukusu s různou velikostí strukturních ok přispívá k porozumění funkce mukusu, přenosu patogenů, vývoji nanočásticových léčiv stejně jako strategií prevence.

Monitorováním začleněných částic ve vzorku použitím fluorescenční mikroskopie skupina vědců v okolí Joshua Apgara [87] studovala stupeň prostorové heterogenity v a bez přítomnosti fascin - proteinu způsobujícího sesítování F-aktinu. Byly porovnávány vysoce a níže koncentrované roztoky F-aktinu s a bez přítomnosti fascin. Ve výsledku bylo zjištěno, že při nízké koncentraci F-aktinu v roztoku, MSD je distribuce symetrická a její standardní odchylka je podobná odchylce homogenního roztoku glycerolu. Zvyšování koncentrace F-aktinu v roztoku vykazovalo širší a asymetrickou distribuci MSD, jedná se o efekt způsoben fascinem. Kvantitativní změny tvaru v distribuci MSD korelují kvalitativně s přítomností velkého množství heterogenit v roztoku F-aktinu, které vznikly na základě zvyšující se koncentrace F-ctinu a přítomnosti síťujícího proteinu.

Denis Wirtz ve svém článku představil PTM mikrореologii jako metodu vhodnou k měření viskoelastických vlastností cytoplazmy s vysokým prostorovým a časovým rozlišením. Tato metoda je schopna měřit vlastnosti živých buněk ve velmi obtížných podmínkách. Jako modelový příklad bylo uvedeno měření viskoelastických vlastností sítě F-aktinu, poté měření vlastností cytoplazmy a nakonec ukázka měření vlastností živých buněk. Obecně byly také popsány principy, výhody a nevýhody aktivních a pasivních mikrореologických metod a to jak pro měření látek viskózních, elastických i viskoelastických [4].

Mikrореologií buněk se ve své studii zabývali také Hyungsuk L. a kol. [88,89], 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 objasněn. V této studii byly rozvinuty jak aktivní tak pasivní mikrореologické

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.

Liu, J. a kol. [64] využili potenciál mikrореologie k měření viskoelasticity roztoku sesíťovaného F-actinu s různou velikostí strukturních jednotek (length scales) v rozmezí 1 – 100 μm . Hlavním cílem však bylo srovnání jednočásticové mikrореologie s korelační metodou dvoučásticové mikrореologie. Ve výsledku byl viditelný rozdíl mezi jednočásticovou a dvoučásticovou mikrореologií se zvyšující se strukturní délkou F-actinu.

Heinemann C. a kol. [70] 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 mikrореologie a jako materiál částice byl zvolen polystyren. Byla pozorována časová závislost MSD polystyrenu začleněného do systému škrob/ γ -dodekalaktonu a po dobu 5 min., 15 min., 70 min a 23 hodin byla zaznamenána do grafu.

I.Y. Wong [90] se svou skupinou zkoumali termální pohyb koloidních částic v F-aktinové síti, kde poloměr částic byl srovnatelný s velikostí strukturních jednotek F-aktinové sítě. V této oblasti, průměrná hodnota funkce MSD(t) začleněných částic je úměrná τ^α , kde $0 < \alpha < 1$.

FCS mikrореologie je jednou z nejmodernějších metod patřících do skupiny pasivních mikrореologických technik. Tato metoda poskytuje velké využití především v oblasti biologických vzorků. Přestože se jedná o velmi novou techniku, bylo již publikováno několik studií popisujících využitelnost této techniky.

Anomální difúzní vlastnosti fluorescenčně značených zlatých nanočástic v cytoplazmě a jádru živých buněk byly studovány pomocí FCS mikrореologie Gernotem Guigasem a kol. [91]. Ze získaných hodnot MSD(t) byli schopni určit komplexní modul pružnosti ve smyku G' pro oba buněčné kompartmenty. Díky této technice také popsali rozdíly ve viskoelastické odezvě a anomální difúzi u buněk před a po vystavení osmotickému stresu.

Fluorescenční korelační spektroskopie nicméně nemusí být nástrojem pro měření pouze biologických vzorků. T. Cherdhirankorn a kol. [92] využili tuto metodu ke stanovení difúzních koeficientů malých molekul chromoforů v různých homopolymerech s rozdílnými molekulovými hmotnostmi při teplotách vysoko nad teplotami skelných přechodů polymerů. Jedinečná citlivost

FCS techniky umožňující použít nanomolární koncentrace sond zajistila, že sondy nijak neovlivnily vlastnosti polymerní matrix. U všech pozorovaných systémů bylo potvrzeno, že se rychlost difúze polymerů neřídí okolní viskozitou, která se extrémně zvyšuje s vysokou molekulovou hmotností polymerů. Naopak bylo zjištěno, že difúzní koeficienty malých sond úzce korelují se segmentovou dynamikou polymerů a současně si zachovávají vlastnosti částic.

Silke Rathgeber a kol. [93] porovnávali výsledky měření u vodných roztoků vysokomolekulárního polyethylenglykolu získaných pomocí DWS, DLS, video-mikroreologie a FCS mikroreologie. Výsledky mikroreologických měření porovnávali také s konvenčními reologickými experimenty za použití klasického rotačního reometru. Z hlediska rozsahu $MSD(t)$ je FCS srovnatelná se standardními laserovými metodami a DLS. Na rozdíl od ostatních mikroreologických metod poskytuje FCS mnohem větší frekvenční rozsah.

3.3 Aplikace mikroreologických metod ke studiu micelárních roztoků

Různé druhy mikroreologických metod byly použity ke studiu micelárních roztoků. Buchanan a kol. [94] vyvinuli pokročilou mikroreologickou metodu, která je postavena na laserové interferometrii a její předností je rozšířený rozsah dosažitelných frekvencí. Tato skupina vědců se zabývala studiem roztoků protáhlých micel cetylpyridinium chloridu ve vodě s přídavkem křemičitanu sodného jako silně vazného protiiontu. Jedním z pokročilých cílů experimentů bylo určení komplexního modulu vzorku v závislosti na frekvenci a srovnání výsledků této mikroreologické metody s výsledky reologie klasické. Závěrem bylo potvrzeno, že výsledky obou reologických metod vykazují excelentní shodu.

Hassan a kol. [95] se zabývali mikroreologií micelárních roztoků jako funkcí koncentrace organické soli, mikroreologií pomocí QUELS (quasielastic light scattering) v jednorozptylovém režimu. Při nízkých koncentracích solí jsou micely většinou sférické a roztok vykazuje nízkou viskozitu. V této studii byly použity dva druhy organické soli, a to p-toluen sulfonát sodný a salicylát sodný, které způsobovaly změny v mikrostruktuře CTAB micel. Solí indukovaný přechod od sférických po protáhlé micely a s tím spojené změny ve viskozitě roztoku jsou jasně zřetelné. Z výsledků je také patrné, že $MSD(t)$ přechází z viskózní oblasti do viskoelastické oblasti se zvyšující se koncentrací solí.

Atakhorrami a kol. [96] rozvinuli širokopásmovou dvoučásticovou mikroreologii k měření elastického a ztrátového modulu viskoelastických materiálů na základě laserové interferometrie,

kteřou porovnávali s mikrereologií jednočásticovou. Byla zjištěna kvantitativní shoda mezi jednočásticovou a dvoučásticovou mikrereologií u zesíťného roztoku protáhlých micel CTAB, které byl vybrán jako modelový viskoelastický systém. Výsledky také potvrzují, že v jednoduchém systému, kde strukturní délky roztoku jsou mnohem menší než vložena mikročástice, je jednočásticová mikrereologie schopna měřit viskoelastické vlastnosti vzorku jako celku.

Frekvenčně závislý komplexní modul vodního roztoku protáhlých micel CTAB a salicylátu sodného byl měřen v širokém rozsahu frekvencí také Oelschaegrem a kol. [97]. Měřicí technikou byla zvolena DWS, jelikož jako jediná umožňuje přístup k frekvencím nad 10^4 rad/s. V závěru bylo poukázáno na fakt, že při nízké koncentraci solí jsou micely lineární a jejich průměrná délka roste s rostoucí iontovou silou. První viskozitní maximum odpovídá přechodu micel z lineárního do rozvětveného módu. Druhý viskozitní nárůst odpovídá poklesu větvení micel doprovázené zvyšující se délkou micel a druhé viskozitní maximum odpovídalo opětovnému zkrácení micel a jejich rozvětvení.

Cardinaux a kol. [98] použili optickou mikrereologii ke studiu reologických vlastností koncentrovaného roztoku povrchově aktivních látek. Za vybraných podmínek se tyto surfaktanty samy shlukují a formují takzvané obří polymerní micely, které vytváří silně viskoelastický roztok. V této práci byl prezentován nový přístup analýzy lokálních dynamických vlastností začleněných částic založený na kombinaci single- and multi-speckle DWS. $C_{16}E_6$ byl použit jako surfaktant. Jelikož se tyto micely velmi často rozpadají a znovu vytvářejí, jsou nazývány žijící nebo také rovnovážné polymery. Na základě výsledků pak vyplývá, že DWS je schopna pokrýt zvyšující se rozsah frekvencí, jak bylo předpokládáno. V závěru byly demonstrovány aplikace optické mikrereologie u koncentrovaných roztoků surfaktantů. DWS byla představena jako metoda rozšiřující frekvenční rozsah ostatních mikrereologických metod až o několik řádů. Tato technika hraje významnou roli hlavně ve spojení s video-particle tracking microrheology (VPTM), neboli jednočásticové mikrereologie, která exceluje v oblastech velmi nízkých frekvencí.

3.4 Aplikace mikrereologických technik ke studiu teplotních závislostí viskozity

Několik studií zabývajících se charakterizací viskoelastických vlastností roztoku kyseliny hyaluronové bylo již publikováno. Vůbec první reologické měření hyaluronanu bylo provedeno

v roce 1968 *Gibbsem a kol.* [99], které měřil dynamické viskoelastické vlastnosti sodné soli hyaluronanu v širokém frekvenčním rozsahu. Byl studován také efekt měnící se teploty, koncentrace, pH a iontové síly na smykový modul a bylo dokázáno, že HA se chová jako ne-Newtonská kapalina. Se zvyšující se iontovou silou jsou elektrostatické repulze potlačeny, což může způsobovat zesílení přítomných vazeb [100].

Efekt vlivu teploty v rozsahu 25 °C – 68 °C na dynamické reologické chování vodního roztoku soli kyseliny hyaluronové (1%) byl studován Kennedym a jeho kol. [101]. Zvyšující se teplota významně snižovala smykový modul a komplexní viskozitu u všech studovaných vzorků. Tato změna je chápána na základě zvýšení populace konformace s vyšší energií se zvyšující se teplotou, což vede ke snížení perzistenční délky polymerního řetězce. Tato data jsou kompatibilní s hodnotami viskozit, které byly stanoveny pomocí obecné rovnice, kterou navrhli Matsuoka a Cowman pro polymerní roztoky.

Reologické vlastností roztoku hyaluronanu souvisí nejen s molekulovou hmotností či koncentrací HA, ale také s původem samotného vzorku [102]. Řetězce HA se mohou volně pohybovat ve zředěném roztoku. V koncentrovaném roztoku však dochází k zaplétání řetězců a tvorbě dočasné sítě. Překryv řetězců je také nazýván kritickou koncentrací. Pro HA byla hodnota kritické koncentrace stanovena okolo 1 mg/ml. Tato hodnota však závisí na iontové síle či molekulové hmotnosti kyseliny hyaluronové [103,104,105].

V roce 2007 publikoval Maleki a kol. [138] nová zjištění týkající se vlivu ustáleného smykového toku na intramolekulární asociace ve zředěném a polozředěném roztoku HA. Bylo zjištěno, že roztok HA nepodléhá degradaci ani při velmi vysokých smykových rychlostech (1000 s^{-1}) po dobu 10 minut. Změna teploty (10 °C - 40 °C) vykazovala snížení viskozity 1% roztoku HA při nízkých hodnotách smykové rychlosti o 40 %. Bylo také zjištěno, že nárůst silněji asociovaných struktur při nízkých koncentracích HA byl pravděpodobně způsoben snazší reorganizací HA řetězců v roztoku. Autor předpokládá, že smykově indukované sjednocení a protažení polymerních řetězců preferuje formaci vodíkově vázaných struktur a vzájemné „zipování“ protažených řetězců vede ke tvorbě propojené sítě. U vyšších hodnot smykové rychlosti ($0,1 \text{ s}^{-1}$) byly polymerní řetězce spojeny s poklesem viskozity v čase. V tomto případě vyšší smykový tok brání řetězcům v tvorbě společných komplexů.

4 MATERIÁLY A METODY

4.1 Použité materiály

Hyaluronan:	Hyal. acid $M_w = 90-130$ kDa, CPN s.r.o., číslo šarže: 071207 - P1 Hyal. acid $M_w = 300-500$ kDa, CPN s.r.o., číslo šarže: 212-2082 Hyal. acid $M_w = 500-750$ kDa, CPN s.r.o., číslo šarže: 213-4245 Hyal. acid $M_w = 1500-1750$ MDa, CPN s.r.o. číslo šarže: 213-5226
Částice:	Polystyrenové částice (PS), velikost $1\ \mu\text{m}$, Sigma - Aldrich číslo šarže: 72938 - 5ML – F Polystyrenové částice (PS), velikost $0,1\ \mu\text{m}$, Microparticles GmbH. Číslo šarže: BCBM7378 Polystyrenové částice (PS), velikost $2\ \mu\text{m}$, Microparticles GmbH. Číslo šarže: 1482339 PS-COOH částice, velikost: $0,816\ \mu\text{m}$, Microparticles GmbH. Číslo šarže: B1477 SiO ₂ částice, velikost: $1,16\ \mu\text{m}$, Microparticles GmbH. Číslo šarže: AR113-2
HSA	Human serum albumin, Sigma Aldrich, A9511
BSA	Bovine serum albumin, Sigma Aldrich, A0281
Agarosa	Agarose powder, Sigma Aldrich, A9414
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromid, $M_w = 364,45$ g/mol, Sigma - Aldrich, Ultra $\geq 99,0\ \%$, šarže: 40808244
Glycerol	C ₃ H ₈ O ₃ , čistota $\geq 99,5\ \%$, Sigma – Aldrich, číslo šarže: 191612 - 1L
Rozpouštědla	Deionizovaná voda, (ELGA) Isopropylalkohol – Sigma Aldrich, 190764, 99,5% Fosfátový pufr, pH, Sigma Aldrich, P5244, 0,1 M
NaCl	Chlorid sodný $M_w = 58,44$ g/mol, Lach-Ner s. r. o., Assay = 99,5 %, šarže: 30453

4.2 Příprava vzorků

4.2.1 Roztoky kyseliny hyaluronové

Pro měření byl vždy připraven zásobní roztok o objemu 50 ml rozpuštěním daného množství kyseliny hyaluronové v demineralizované vodě. Roztok byl ponechán 24 hodin na míchačce a poté skladován za snížené teploty (4°C). Finální roztoky pak byly připraveny smícháním vypočítaného objemu zásobního roztoku a rozpouštědla - demineralizované vody.

4.2.2 Roztoky glycerolu

Koncentrační řada roztoků glycerolu byla připravena z 99,9% glycerolu. Jednotlivé koncentrace byly připraveny promícháním vypočítaného poměru glycerolu a demineralizované vody.

4.2.3 Gely kyseliny hyaluronové

Nejprve byly připraveny roztoky CTAB o koncentracích $c_1 = 50 \text{ mM}$ a $c_2 = 200 \text{ mM}$ v 0,15 M NaCl. Poté roztoky 0,5% (w/v) a 2% (w/v) roztoky hyaluronanu o $M_w = 90 - 130 \text{ kDa}$ v 0,15 M NaCl. Gely kyseliny hyaluronové byly připraveny smícháním roztoku hyaluronanu a CTAB v poměru 1:1. Roztok byl ponechán 24 hodin za laboratorní teploty. Vzniklý gel byl odstředěn pomocí laboratorní ultracentrifugy po dobu 15 minut při otáčkách 40 ot/min x 100.

4.2.4 Agarosové gely pro studium průběhu gelace

Roztoky agarosy o hmotnostních koncentracích 0,01%; 0,05%; 0,5% a 1% byly připraveny vždy těsně před samotným měřením rozpuštěním vypočítaného množství polymeru v daném množství vody. Ke každému roztoku (5 ml) bylo napipetováno 10 μl mikoreologických částic. Vzorky byly ponechány 15 minut v ultrazvukové lázni při teplotě 70 °C, aby došlo k rozpuštění veškeré práškové agarosy a k oddělení případných agregátů mikoreologických částic. Pro měření pomocí DLS byly připraveny také referenční vzorky obsahující pouze rozpouštědlo a mikoreologické částice.

4.2.5 Roztoky HSA a BSA pro mezifázová měření

Zásobní roztoky BSA a HSA ($c = 1 \text{ mg/ml}$) byly připraveny rozpuštěním samotného proteinu ve fosfátovém pufru ($\text{pH} = 7,4$) a poté byly vortexovány minimálně 1 hodinu. Roztoky o jednotlivých koncentracích ($c_1 = 11 \cdot 10^{-4} \text{ mg/ml}$, $c_2 = 6,4 \cdot 10^{-4} \text{ mg/ml}$, $c_3 = 2,2 \cdot 10^{-4} \text{ mg/ml}$) pak byly připraveny ředěním ze zásobního roztoku v daných poměrech. Roztoky byly uchovávány za teploty 4°C .

4.3 Použité přístroje a programy

4.3.1 FCS

Přístroj: *MicroTime 200* (Time-resolved Fluorescence Microscope), PicoQuant

Software: *SymPhoTime 64*.

Nastavení: excitace - laser 510 H IN MOU („horizontal in main optical units“) – excitační horizontálně polarizovaný laser o vlnové délce 510 nm; Emise: misní pásmový filtr o vlnové délce 550/49 nm.



Obr.15: Přístroj FCS

4.3.2 DLS

Přístroj: *Zetasizer Nano ZS*

Software: *Zetasizer Nano ZS*

Nastavení: Světelný zdroj - červený laser o vlnové délce 633 nm.



Obr.16: Zeta Sizer Nano

4.3.3 Video-mikroreologie

Přístroj 1: mikroskop *NIKON Eclipse Ci* s kamerou *Canon EOS 550D*

Přístroj 2: pi fluorescenční mikroskop se suchým, vodním a olejově imerze objektivem (Olympus) a CCD kamerou (Andor)

Přístroj 3 (Emory University): inverzní mikroskop *Leica*

Software: *Eye Cockpit-UI 324 x CP* (nahrávání videí ve formátu AVI), *ImageJ* (převod formátu AVI na TIF), *CellSens Entry* (inverze barev, úprava kontrastu a jasu) a ke zpracování nahraných videí software *IDL* (Interactive data language).



Obr.17: Optický mikroskop

4.3.4 Reologie

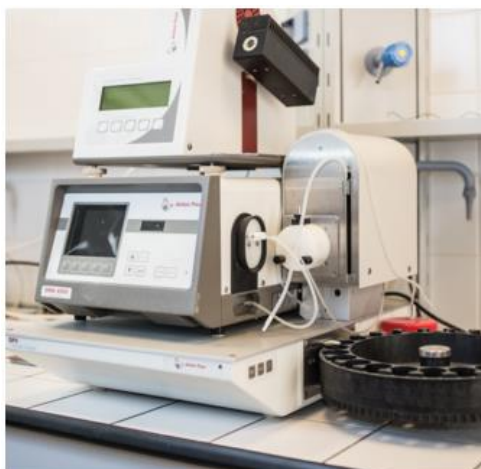
Přístroj: Reometr ARG2 s geometrií souosých válců a geometrií kužel - deska



Obr.18: *Klasický reometr ARG2*

4.3.5 Viskozimetrie

Přístroj: Kapilární mikroviskozimetr AMVn



Obr.19: *Kapilární viskozimetr*

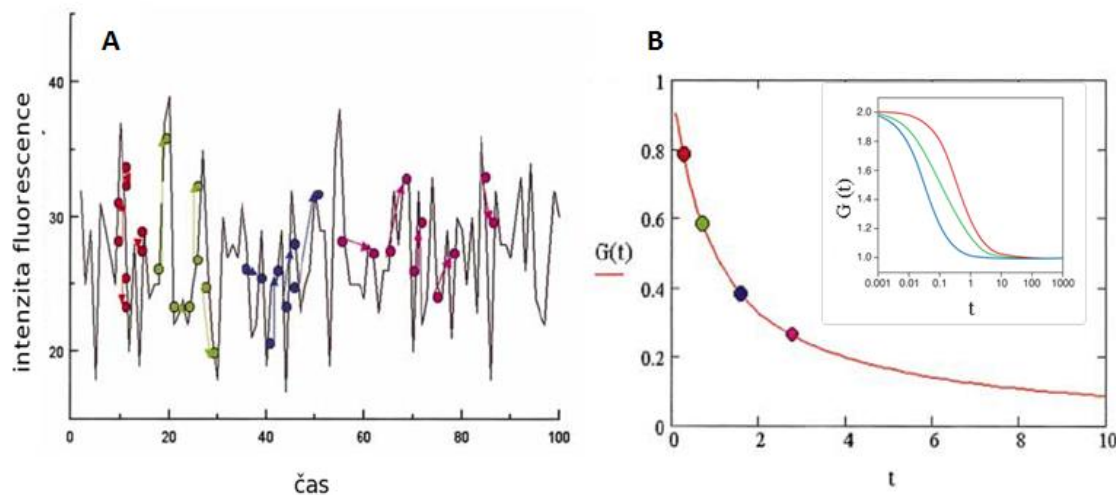
4.4 Měřicí metody:

4.4.1 Klasická reologie

AR G2 reometr od společnosti TA Instruments s geometrií souosých válců pro vzorky s nízkou viskozitou a geometrií kužel-deska (60 mm, 1 °C) pro vzorky s vyšší viskozitou. Měřicí systém obsahuje Peltierův termostat, který zaručuje velmi přesnou a rychlou temperaci vzorku. Pomocí testovacích vzorků byly vždy stanoveny nejvhodnější hodnoty smykových rychlostí. V případě měření vzorků v teplotním intervalu, byl jako nejvhodnější krok stanoven 4 °C/min pro nízkomolekulární vzorky a 1 °C/min pro vysokomolekulární hyaluronan.

4.4.2 FCS mikrореologie

U konfokálního nastavení, excitační světlo laseru postupuje pomocí soustavy zrcadel do objektivu, který fokusuje světlo na střed vzorku. Emitované fluorescenčního záření je soustředěno zpět přes stejný objektiv a dále postupuje skrz štěrbinu („pinhole“), která má funkci filtru propouštějící pouze část záření. Následně je světlo vedeno do detektoru, který zaznamenává intenzitu fluktuujícího záření (obr. 20). Na základě naměřených dat jsou poté vypočítány požadované parametry.

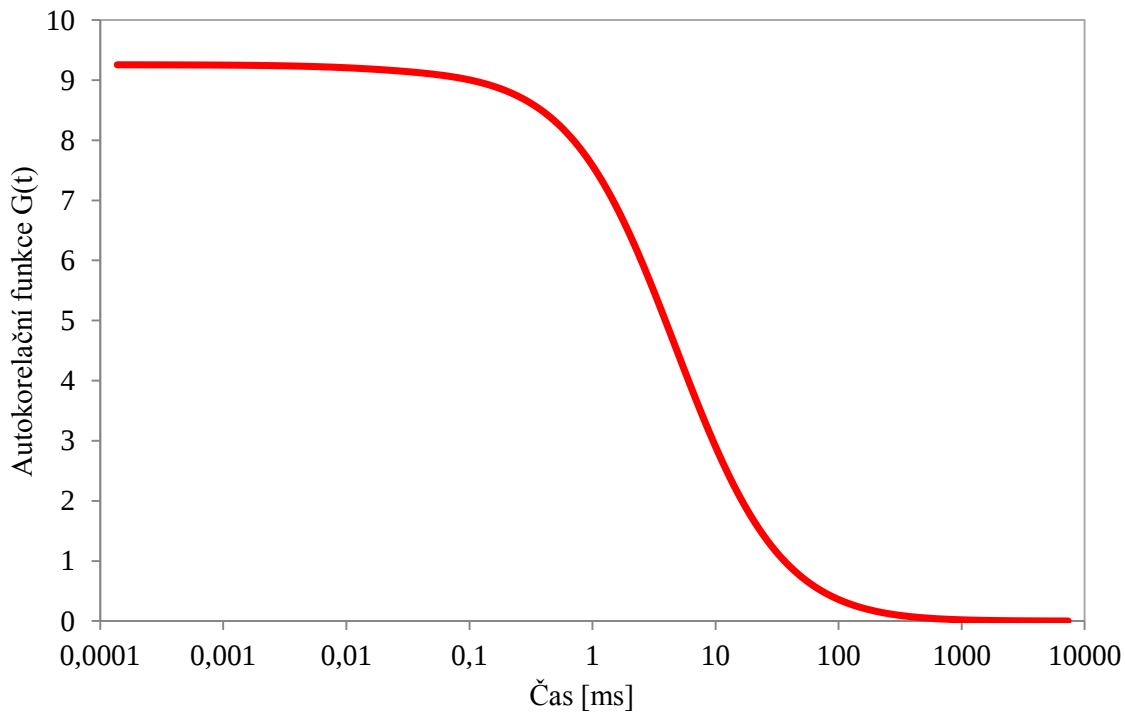


Obr.20: Znáznornění fluktuace intenzity fluorescence v čase (A) a tvar autokolerační funkce v závislosti na čase (B). V rámečku je tvar autokolerační funkce v závislosti na čase v logaritmickém měřítku.

Výstupem měření jsou data tvořící křivku závislosti funkce $G(t)$ na čase. Tato křivka je poté softwarově prokládána matematickým modelem pro difuzi částic s příspěvkem tripletového stavu a na základě statistických metod byl vypočítán počet difúzních komponent v matematickém modelu. Tvar efektivního objemu je aproximován pomocí Gaussova profilu [139,140]:

$$G(t) = \left[1 + T \left[\exp\left(-\frac{t}{\tau_{Trip}}\right) - 1 \right] \right] \sum_{i=0}^{\eta_{Diff}-1} \frac{\rho[i]}{\left[1 + \frac{t}{\tau_{Diff}[i]} \right] \left[1 + \frac{t}{\tau_{Diff}[i]\kappa^2} \right]^{0,5}} \quad (49)$$

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



Obr.21: Autokorelační funkce v závislosti na čase [48]

Tato autokorelační funkce může být popsána rovnicí:

$$G(t) = \frac{1}{N} \left(1 + \frac{2}{3w_n^2} MSD(t) \right)^{-1} \left(1 + \frac{2}{3z_{nz}^2} MSD(t) \right)^{-1/2} \quad (50)$$

MSD může být vyjádřena kubickou rovnicí:

$$MSD(t) = x \rightarrow \frac{2}{3w_0^4 z_0^2} x^3 + \left(\frac{2}{w_0^2 z_0^2} + \frac{4}{9w_0^4} \right) x^2 + \left(\frac{4}{3w_0^2} + \frac{3}{2z_0^2} \right) x + 1 - \frac{1}{N^2 G(t)^2} = 0 \quad (51)$$

Jednotlivé parametry rovnice jsou softwarově vypočítány z autokorelační křivky: N – průměrné množství molekul v efektivním objemu

$$N = \left[[1 - T] \sum_{i=0}^{nDiff} \rho[i] \right] \quad (52)$$

c – koncentrace molekul v efektivním objemu

$$C = \frac{N}{V_{Eff} N_A} \quad (53)$$

w_0 – efektivní laterální fokální poloměr při intenzitě $1/e^2$

$$w_0 = \left[\frac{V_{eff}}{\kappa} \right]^{\frac{1}{3}} \pi^{-0,5} \quad (54)$$

z_0 – efektivní fokální poloměr

$$z_0 = \kappa w_0 \quad (55)$$

D – difúzní koeficient difundující částice

$$D[k] = \frac{w_0^2}{4 \tau_{Diff}[k]} \quad (56)$$

kde V_{eff} je efektivní excitační objem.

Při zanedbání členu v rovnici autokorelační funkce, získáme její aproximovanou formu a MSD pak lze vyjádřit jako:

$$MSD(t) = \frac{3}{2} w_0^2 \left(\frac{1}{NG(t)} - 1 \right) \quad (57)$$

Výpočet $MSD(t)$ z aproximované rovnice má však jisté omezení, které představuje oblast, ve které experimentální hodnoty již nekorelují s teoretickými. Jelikož $w_0^2/z_0^2 \ll 1$, lze výraz v odmocnině v rovnici (50) zanedbat pouze tehdy, je-li $MSD < 3 z_0^2/2$.

Pro celkové porovnání výsledků byly vypočítány teoretické hodnoty MSD podle rovnice:

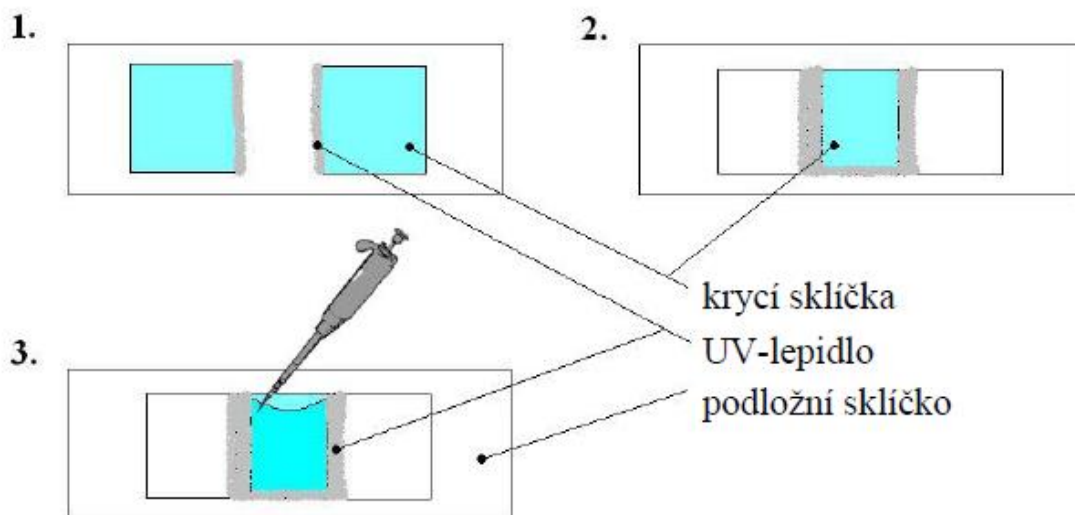
$$MSD = 6Dt: D = \frac{k_B T}{6\pi\eta d_c} \rightarrow MSD_{teor.} = \frac{k_B T}{\pi\eta d_c} t \cdot 10^{12} [\mu m^2] \quad (58)$$

kde D je difúzní koeficient, k_B Boltzmanova konstanta, T je termodynamická teplota, η je dynamická viskozita, d_c průměr částice a t je čas.

Kořeny kubické rovnice (51) byly získány pomocí programu MTLAB (pro výpočet MSD byl použit pouze reálný kořen) a k vytvoření grafických závislostí základním výpočtům byl použit MS Excel [48].

4.4.3 Video-mikroreologie

Připravené vzorky byly před měření aplikovány do speciálně vytvořeného mikroskopického sklíčka, kde bylo nutno pomocí krycích sklíček a UV lepidla vytvořit kapsli pro nadávkování vzorku. Tato kapsle byla zaplněna vzorkem pomocí pipety Eppendorf (20 μm) a zabráňovala tak nechtěnému pohybu vzorku na podložním sklíčku.



Obr.22: Příprava podložního sklíčka pro měření VPT mikroreologie

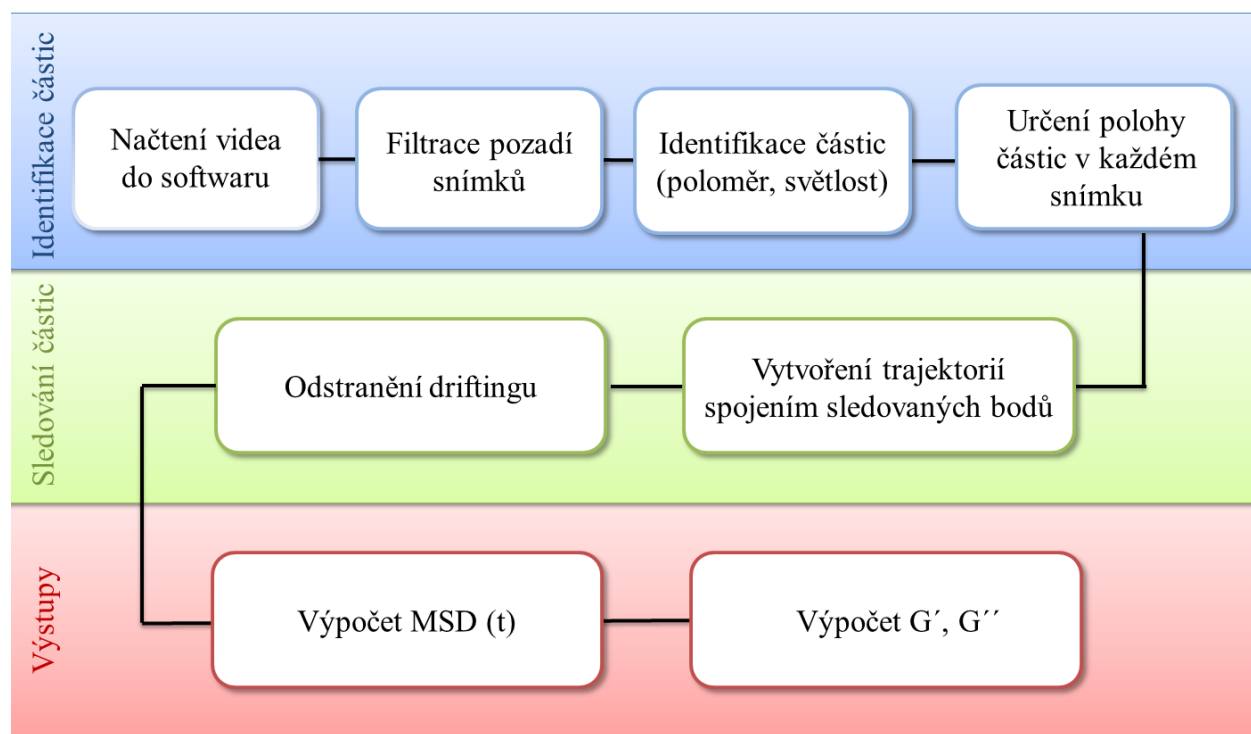
Základem úspěšného zpracování dat a získání kvalitních výsledků je použití mikroskopu, ať už klasického optického či fluorescenčního. Nejdůležitější součástí měřicího systém je však kamera, jejíž kvalita může významně ovlivňovat kvalitu nahraného videa a tím i výsledky samotné. Rozlišení zvolené kamery má vliv na poměr signál/šum. Podstatnou roli hraje i rychlost snímání vzorků, která určuje minimální frekvenční rozsah výsledných funkcí.

Délka pořízeného videa je variabilní a měla by být zvolena vzhledem k rychlosti snímání videa a charakteru vzorku. U viskoelastických látek je pohyb částic mnohdy velmi nepatrný a je nutno pořídit delší záznam, aby byl i tento velmi pomalý pohyb zaznamenán. Délka získaného videa samozřejmě také ovlivňuje rychlost a komplikovanost zpracovávání dat. U viskózních vzorků, mezi které patří Newtonské kapaliny a kde tepelný pohyb probíhá plynule je vhodné pořízení kratšího videa a zabránit tak zbytečně zdlouhavému procesu zpracovávání dat.

Použitím klasického optického mikroskopu získáme obraz tmavých částic na světlém pozadí na rozdíl od fluorescenčního mikroskopu, kde jsou výstupem světlé částice na tmavém pozadí.

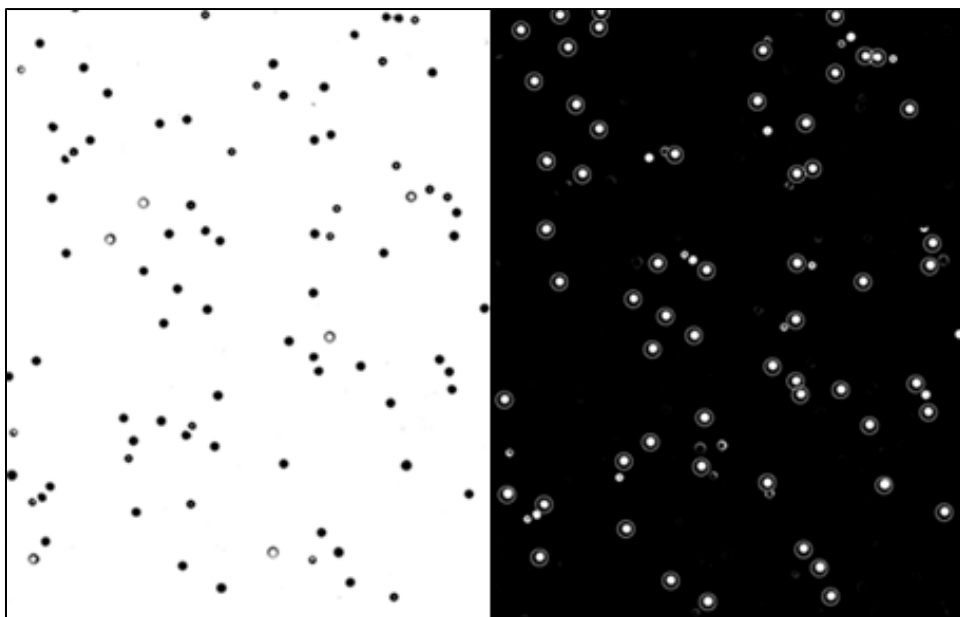
Tento druhý případ je žádoucí pro zpracovávání získaných videí v IDL softwaru. Pokud však máme k dispozici pouze klasický optický mikroskop, pak je možnost videa jednoduše invertovat pro získání požadovaného formátu v samotném softwaru.

Po nahrání kvalitního videa jsou data zpracovávána pomocí postupů v softwaru IDL. Celý proces vyhodnocování dat může být rozdělen do tří základních fází, jak je znázorněno v následujícím diagramu.



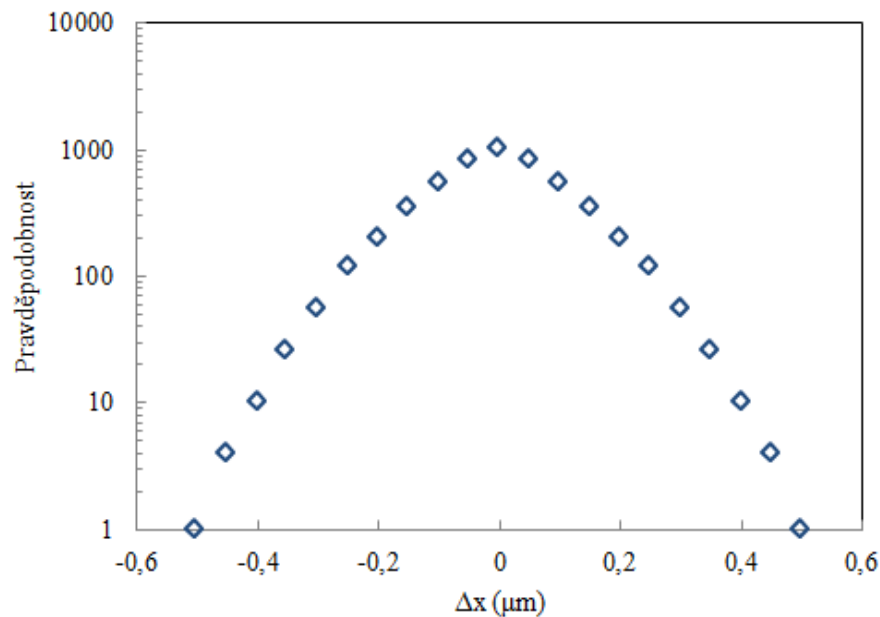
Obr.23: Pracovní postup zpracování videa pro získání výsledných závislostí pro charakterizaci vzorku [23]

První fáze - identifikace částic začíná načtením videa v IDL, po kterém následuje filtrace pozadí snímků potřebná pro zlepšení identifikace částic. Tento krok eliminuje vzniklý šum a usnadňuje lokaci skutečných částic. Částice jsou identifikovány na základě jejich velikostí, excentricity a světlosti v každém jednotlivém snímku.



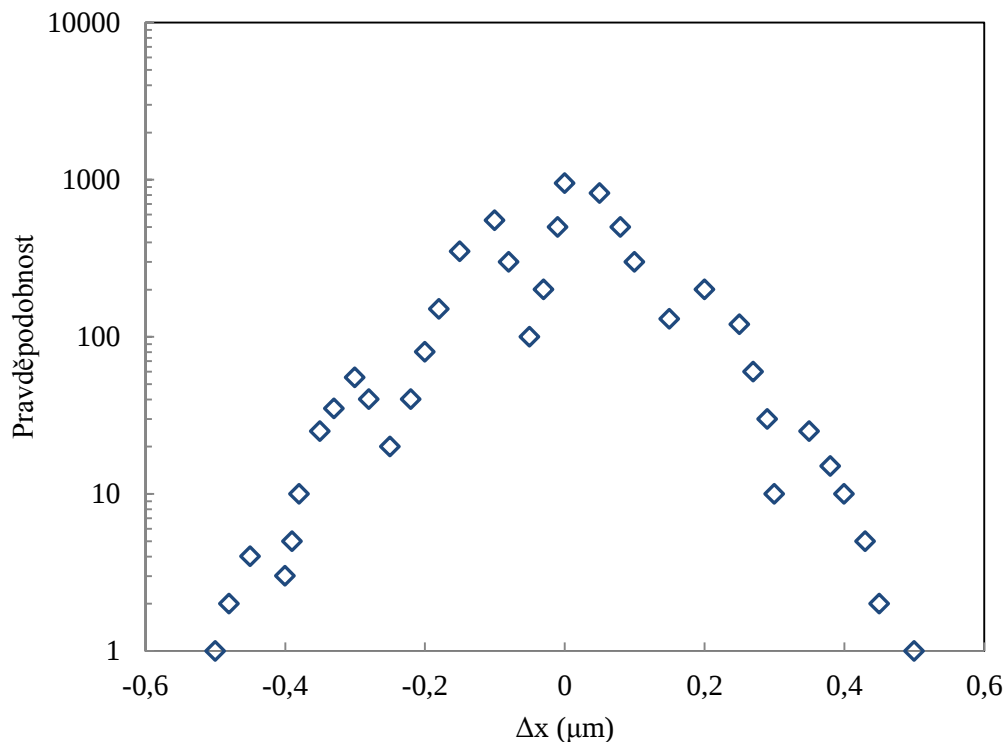
Obr.24: *Znázornění konverze snímku a identifikace částic podle zadanych parametrů*

Precizní identifikace částic je nezbytná pro následné zpracování a eliminování případných chyb. Propojením polohy částice v delším časovém intervalu se vytváří její trajektorie, po jejichž zobrazení je zřetelný průběžný pohyb v čase, který by měl odpovídat pouze tepelnému Brownovu pohybu, a tedy být zcela náhodný ve všech směrech. Možnosti zobrazení zahrnují také histogramy, tedy grafické znázornění distribuce pohybu částic. Brownův pohyb je charakterizován Gaussovskou distribucí a jakákoliv odchylka od této skutečnosti naznačuje rozdílný pohyb částic v jednotlivých částech vzorku, tedy míru heterogenity zkoumaného systému.



Obr.25: *Gaussovská distribuce pohybu částice*

V některých případech však může docházet k negaussovským distribucím vlivem nedostatečného rozlišení použitého měřicího systému. Hlavním důvodem je tzv. „pixel biasing“, kdy jednotlivým částicím není přisouzen dostatečný počet pixelů a jemný pohyb částic pak není dostatečně důkladně sledován. Vlivem tohoto jevu se pak může zdát, že částice poskakují v určitých intervalech, což se projeví ve van't Hoffově distribuci tvorbou „kopců“, jak je vidět na obrázku 26. Zejména pro menší velikosti částic je bohužel tento jev poměrně častý i v systémech s relativně dobrým prostorovým rozlišením. Tento fakt komplikuje interpretaci naměřených dat s ohledem na homogenitu či heterogenitu vzorku.



Obr.26: *Van Hofova distribuční funkce ovlivněna tzv. „pixel biasing“*

V některých případech může nastat situace, kdy pohyb částic se nejeví jako náhodný, ale převažuje v jednom směru. Tento jev, zvaný „drifting“, je způsoben celkovým pohybem vzorku či okolními nežádoucími vlivy prostředí a pro správnost výsledků je nutné jej eliminovat použitím speciálně vytvořeného skriptu. Neodstranění driftingu ze vzorku by vedlo k zavedení velké chyby měření a nesprávné interpretaci výsledků.

4.4.4 Měření mikoreologie mezifázového rozhraní

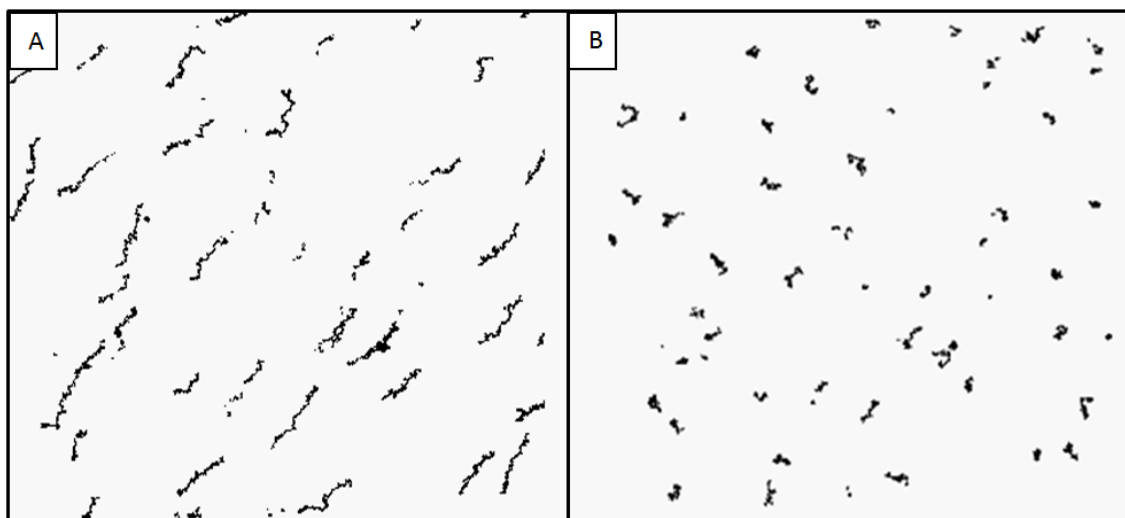
Jelikož bylo třeba docílit toho, aby částice zůstaly na mezifázovém rozhraní, byl do roztoku mikoreologických částic přidán roztok isopropylalkoholu, tedy látky s nižší hustotou, která se bude držet na mezifázovém rozhraní. Po mnoha pokusech byl stanoven poměr: 2,7 ml vody + 0,3 ml roztoku izopropanolu + 15 μm mikoreologických částic) jako nejlepší pro dané měření.

K samotnému měření byla použita speciální cela vyrobena pro tento typ měření.



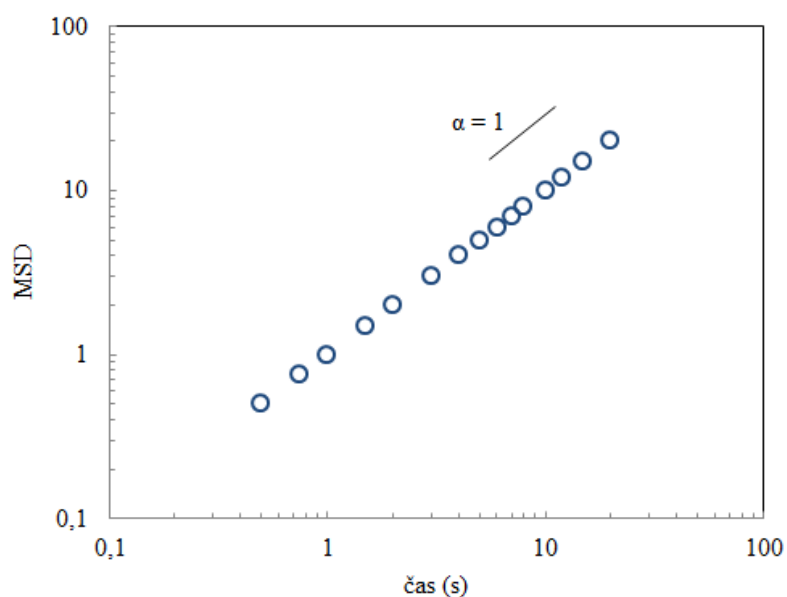
Obr.27: Cella pro měření mezifázové mikrореologie upravena pro dvě různé výšky zásobního roztoku

Zásobní roztok HSA nebo BSA byl napipetován do připravené a precizně vyčištěné cely. Ihned byl na povrch roztoku nadávkován připravený roztok částic pomocí injekční stříkačky (60 - 70 μl). Čas nadávkování částic na mezifázové rozhraní byl označen jako čas t_0 . Roztok byl ponechán 30 min v laboratoři pro odpaření izopropanolu z roztoku. Poté byla cela přikrytá krycím sklíčkem. První měření bylo provedeno v čase $t = 60$ min. Pro tyto experimenty byl použit inverzní mikroskop (jak na Emory Univerzitě, tak na FCH VUT). Pro vyhodnocení byl využit stejný postup jako u vyhodnocení klasické jednočásticové mikrореologie.



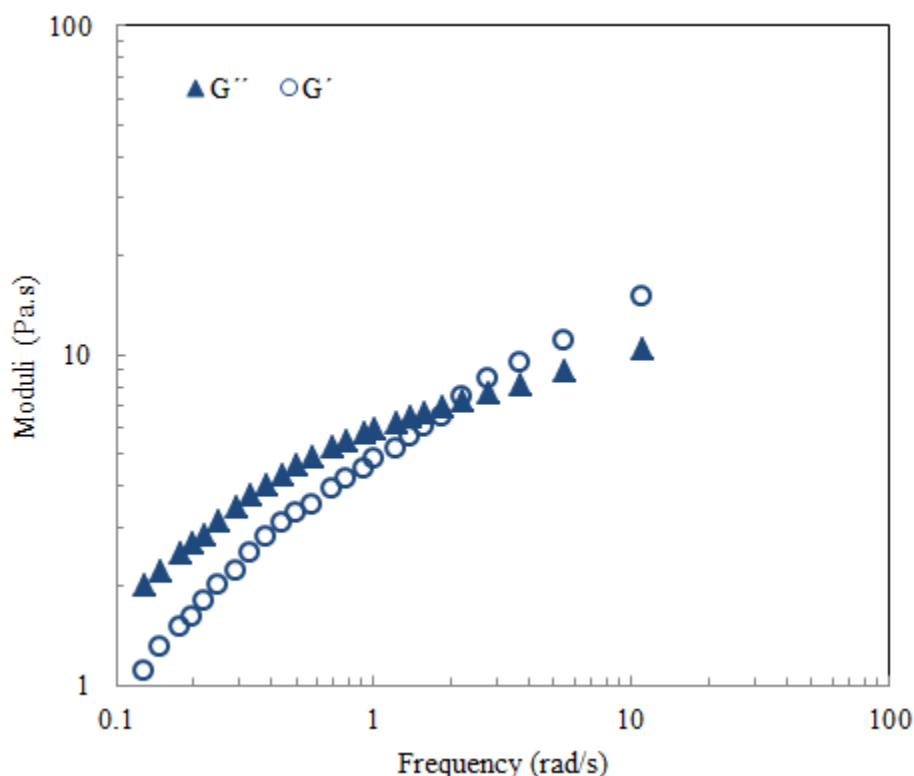
Obr.28: Ukázka trajektorií částic před (A) a po (B) použití skriptu na odstranění driftingu

Poslední fáze je zaměřena na získávání výstupních informací vedoucí k identifikaci charakteru vzorku na základě pohybu sledovaných částic. Důležitým bodem je získání časové funkce MSD. Z této závislosti je možné získat také elastický či ztrátový modul v závislosti na frekvenci, který charakterizuje míru elasticity či viskozity zkoumaného systému [23,106]. Vyhodnocení částic pohybujících se na mezifázovém rozhraní se mírně liší od částic, které se nachází v roztoku (viz. Kapitola 5.7).



Obr.29: $MSD(t)$ pro Newtonskou kapalinu ($\alpha = 1$)

Ze získaných hodnot závislosti MSD na čase použitím již připravených IDL skriptů pro transformaci a tvorbu elastického a viskozitního modulu na frekvenci, je vytvořena závislost charakterizující míru elastické a viskózní složky v závislosti na frekvenci, stejně, jak je tomu u klasické reologie.



Obr.30: *Elastický (trojúhelníky) a viskózní modul (kolečka) v závislosti na frekvenci pro viskoelastickou látku*

4.4.5 Statické a dynamické chyby měření PTM

Standartní vybavení pro mikrereologické měření (VPT) zahrnuje vysokorychlostní kameru spolu s optickým mikroskopem, na jejichž základě je možno získat videa pohybujících se částic ve vzorku. Sestava umožňuje široký časový rozsah měření pro vysokorychlostní kamery (high - speed cameras). Subpixelové prostorové rozlišení je získáno přesnou lokací středu částice, odpovídajícího nejlépe několika pixelům [107]. Při obvyklém zvětšení stovek nanometrů na pixel je zpravidla dosaženo prostorového rozlišení v desítkách nanometrů [108].

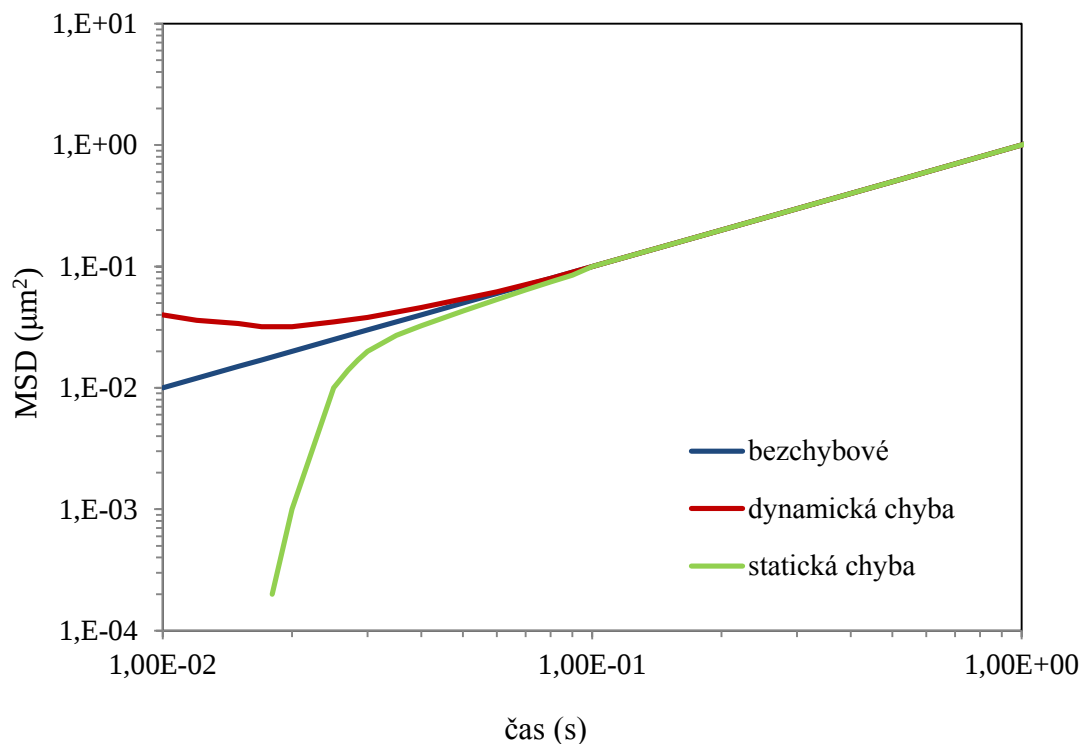
Pro sledování částic s maximální přesností je zapotřebí již sofistikovanějšího a cenově nákladnějšího vybavení zahrnujícího citlivé detektory zlepšující kvalitu signálu [108]. Jiné zdokonalení představuje použití konfokálního mikroskopu či vícefotonové mikroskopie, což má

za následek snížení šumu pozadí. Za těchto optimalizovaných podmínek je možno dosáhnout prostorového rozlišení v rozmezí několika jednotek nanometrů [109].

K charakterizaci pohybu částice jsou stanovovány veličiny jako MSD (mean squared displacement) či PSD (power spectral density) charakterizující pohyb částice. Z algoritmu pro získání těchto hodnot vyplývá potřeba získání velkých souborů dat k zajištění vysoké statistické přesnosti měření. V mnoha studiích byl prokázán vliv limitovaného prostorového rozlišení na přesnost výsledků a vzniklé chyby mohou významně ovlivnit fyzikální interpretace výsledků [109]. Prostorové rozlišení bylo kvalitativně i kvantitativně studováno na nepohyblivých částicích, přičemž příspěvek prostorového rozlišení je nazýván „statickou chybou“ v lokalizaci částice. Díky konečnému času expozice vyvstává další skupina lokalizačních chyb, které závisí na dynamice pohybujících se částic a jsou označovány jako „chyby dynamické“. Existuje již odhad vlivu těchto dvou chyb na konečnou hodnotu $MSD(t)$ díky němuž je možno získat precizní data k vyhodnocení dynamiky pohybu částice [110].

Vliv experimentálních chyb na funkci $MSD(t)$

Jak již bylo zmíněno, u typického PTM experimentu mohou nastat dvě základní chyby, a to chyba takzvaně statická, vycházející z prostorového rozlišení, a tedy z přesnosti lokace těžiště sledované částice. Druhou chybou je chyba dynamická vznikající omezením rychlostí pořizování snímku zaznamenávající pohyb částic [110]. Statická chyba je spojena s přesnou lokalizací středu částice a závisí na poměru signál-šum, na velikosti každého pixelu a na zvoleném algoritmu sledování částic [110]. Dynamická chyba závisí na dynamice částice a může být snížena zvýšením rychlosti snímání pohybu částice.



Obr.31: Efekt možných chyb na MSD Newtonských kapalin. Modrá čára představuje skutečná data bez vlivu jakékoliv chyby, zatímco barevné čáry reprezentují MSD zahrnující experimentální chybu: zelená čára (subdifúzivní chování částic $\alpha < 1$) – dominuje statická chyba. Červená čára (superdifúzivní chování $\alpha > 1$) – dynamická chyba je dominantní[112].

4.4.6 DLS mikrореologie

Měření mikrореologie pomocí DLS je komplexní proces, který se skládá ze dvou základních částí:

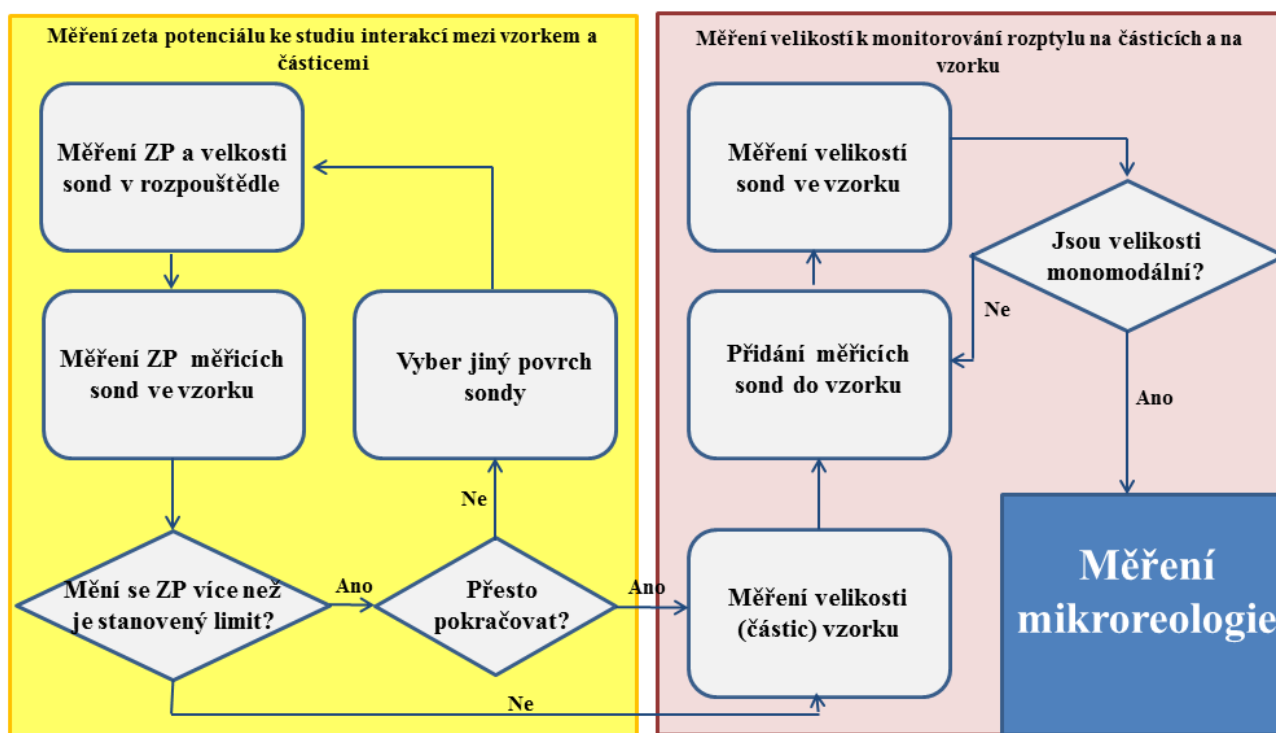
Měření zeta potenciálu a velikosti částic.

- Měření zeta potenciálu slouží k zjištění, zda dochází k interakcím mezi částicemi a samotným vzorkem. Pro mikrореologická měření je důležité zvolit částice, které neinteragují se zkoumaným vzorkem, aby výsledky odrážely vlastnosti samotného okolního prostředí.
- Měření velikosti částic odhalí, zda dochází ve vzorku ke shlukování částic nebo zda signál částic vzorku překrývá signál mikrореologických částic.

- Pro porovnání částice změřeny nejprve v rozpouštědle a poté v samotném vzorku. Pokud by se výsledek diametrálně lišil, pak je třeba zvolit částice s vhodnějším povrchem nebo do vzorku přidat větší množství částic, aby byl signál částic intenzivnější.

Měření mikrореologie

V případě, že byla potvrzena správná volba mikrореologických částic pomocí měření zeta potenciálu a velikosti částic, lze měřit samotnou mikrореologii. Pohyb částic ve vzorku je sledován pomocí laserového paprsku a poté MSD(t) křivky a hodnota viskozity jsou z pohybu vyhodnoceny pomocí softwaru.



Obr.32: Schéma měření mikrореologie pomocí DLS, Zeta Sizer ZS software

5 VÝLEDKY A DISKUZE

5.1 Vytvoření MATLAB scriptu pro zpracování dat video-mikrореologie (mikroviskozimetrie)

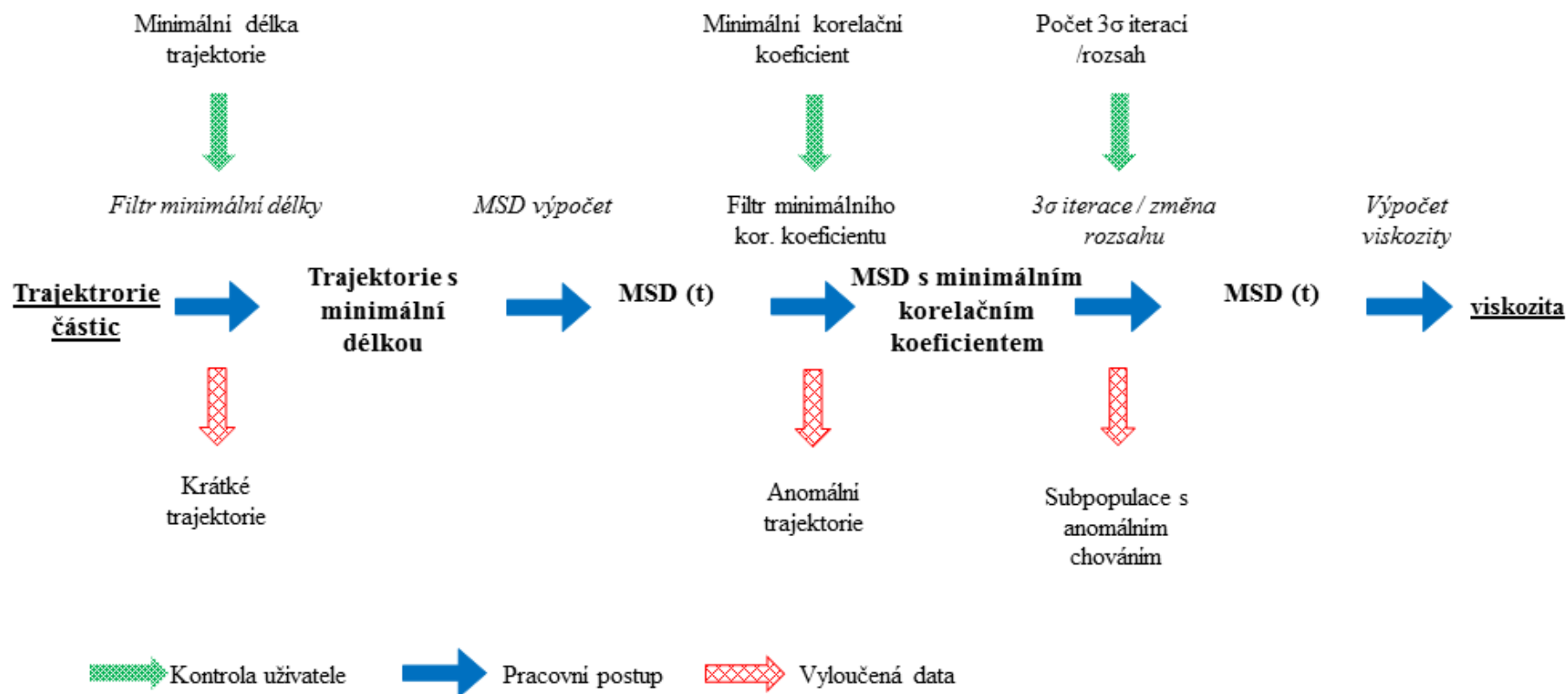
Softwarů pro zpracování videí pohybu mikrореologických částic existuje již celá řada. Na úplném počátku byly vytvořeny kódy v IDL (interactive data language) [40,111], které byly napsány

samotnými autory mikrореologie. Tento způsob vyhodnocení dat jsem také převážně používala v této dizertační práci. Jelikož však IDL není běžně dostupný software a jeho pořizovací cena je vyšší, byly kódy následně přepsány do programu MATLAB [113], programovacího jazyku Python [114] či byl vytvořen program Labview [115]. Všechny výše uvedené programy však vyžadují značnou znalost používaného programovacího jazyka a pro laického uživatele představují velmi obtížné využití.

Mikrореologie umožňuje charakterizaci viskoelastických vlastností materiálů z velmi malého objemu vzorku a tyto parametry jsou popsány pomocí elastického a viskózního modulu. Tvorba a výpočet modulů je matematicky velmi náročný proces a výše uvedené softwary jsou k tomuto účelu přizpůsobené. Pomocí mikrореologie je možné také charakterizovat viskozitu materiálu z funkce MSD(t), což představuje poměrně nekomplikovaný postup zpracování dat. Jednoduchý software určený k tomuto účelu, který by byl volně dostupný a uživatelsky přívětivý však chybí.

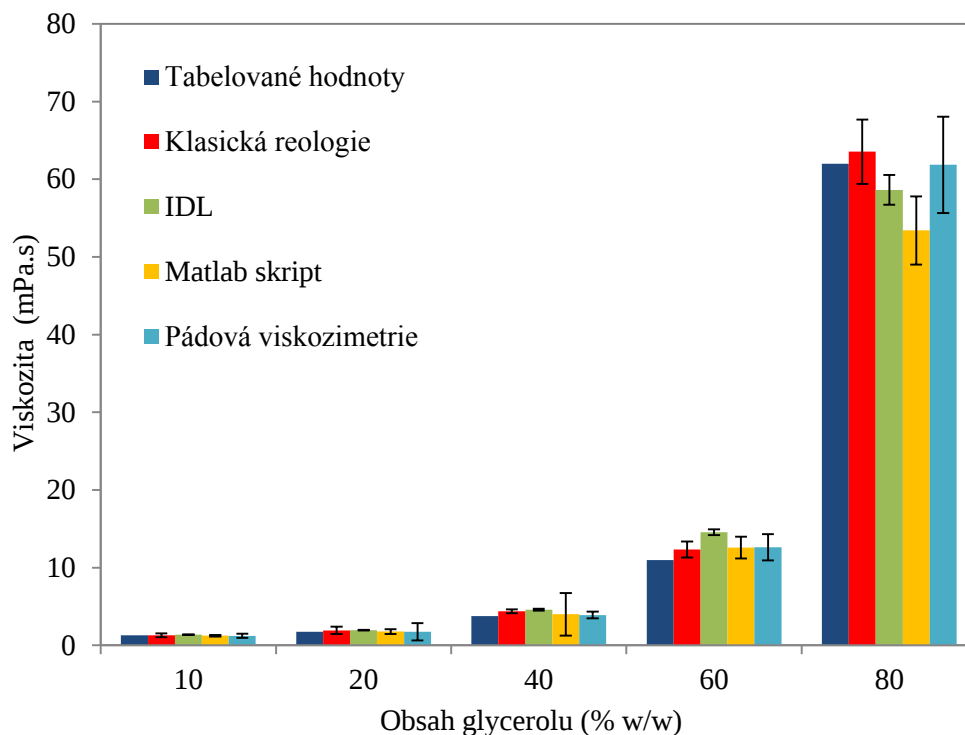
V rámci dizertační práce byl program tohoto typu vytvořen ve spolupráci s biofyzikálním ústavem akademie věd a fakultou informatiky Masarykovy univerzity v Brně. Jednoduchý skript je vytvořen v prostředí Matlabu, nevyžaduje však prakticky žádnou hlubší znalost zmíněného programovacího jazyka. Vyhodnocení viskozity pomocí matlabu předchází použití softwaru ImageJ či ICY k úpravě základního videa sledování částic pomocí Particle tracking pluginu ImageJ softwaru, který je uživatelsky jednoduchý a volně dostupný na internetu.

Grafické znázornění jednotlivých kroků při vyhodnocování viskozity zkoumaného materiálu zobrazuje obr. 33. Celý proces je tvořen z několika základních kroků, během kterých dochází k výběru vhodných částic a jejich trajektorií pro výpočet viskozity. V první fázi dochází k vyfiltrování příliš krátkých trajektorií (kratších než 30 snímků), které jsou pro vyhodnocení nevhodné, jelikož se ve velké míře jedná pouze o šum [40]. Následuje výpočet MSD jako funkce času a filtrace funkce minimálního korelačního koeficientu vedoucí k vyloučení anomálních trajektorií. Pomocí změny rozsahu 3σ iterací jsou vyloučeny subpopulace s anomálním chováním. V konečné fázi pak dochází k výpočtu viskozity vzorku z vybraných trajektorií částic.



Obr.33: Proces vyhodnocení viskozity z trajektorií částic pomocí vytvořeného skriptu v MATLABu

Pomocí základních experimentů byla dokázána funkčnost tohoto postupu u modelových materiálů. Software by použit k vyhodnocení viskozity homogenního materiálu–koncentrační řady glycerolu (10, 20, 40, 60, 80% w/w). Viskozita těchto vzorků byla pro porovnání změřena také pomocí pádového viskozimetru a klasického reometru. Video pohybu mikrореologických částic o velikosti 1 μm byla vyhodnocena jak pomocí nově vytvořeného softwaru, tak také pomocí IDL. Závěrem byla data porovnána také s tabelovanými hodnotami.

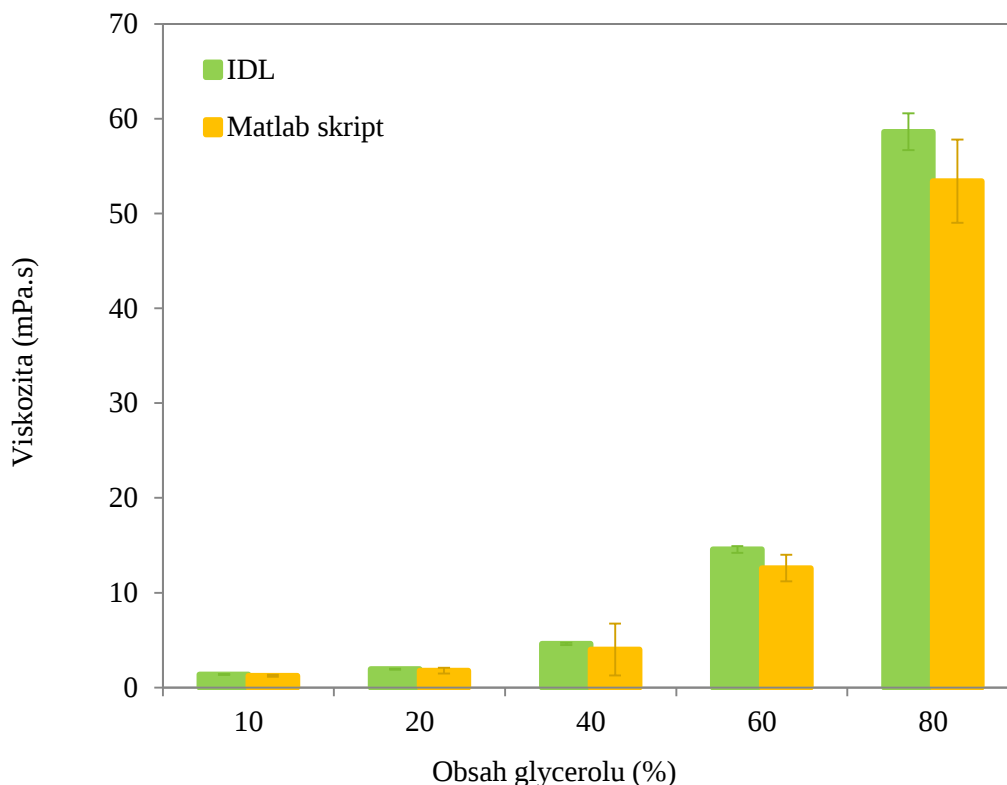


Obr.34: Výsledky měření viskozity glycerolové koncentrační řady

Z výsledků měření a vyhodnocení roztoků glycerolu několika metodami je při jejich porovnání viditelná výrazná shoda dat především pro vzorky s nižším obsahem glycerolu. Pokud se cíleně zaměříme na výsledky získané vyhodnocením dat pomocí nově vytvořeného MATLAB skriptu, můžeme konstatovat, že je tato metoda velmi vhodná pro měření viskozity homogenních vzorků. Data jsou získávána se stejnou přesností, jako je tomu u ostatních viskozimetrických technik. Mírné odchylky převážně u roztoku s nejvyšší koncentrací glycerolu (80%) mohly být způsobeny nejenom chybou daného měření, ale také mohly být ovlivněné chybou při přípravě vzorků a prací s velmi viskózním 99,8% glycerolem.

Jako heterogenní reprezentativní vzorek pro mikrореologická měření byl vybrán vysokomolekulární ($M_w = 1500 - 1750 \text{ kDa}$) vodný roztok kyseliny hyaluronové. Video pohybu částic v roztoku HA bylo vyhodnoceno jak pomocí MATLAB skriptu, tak také

pomocí IDL softwaru. Oba přístupy ukazovaly v podstatě totožné výsledky (Obr. 35). Maximální nepřesnost nepřesahovala 15 %.



Obr.35: *Výsledky měření roztoků vysokomolekulárního hyaluronanu o různých koncentracích*

V případech, kdy je třeba měřit viskozitu biologických vzorků může limitní množství biologického vzorku představovat v mnoha případech velkou překážku. Běžný reometr vyžaduje několik mililitrů vzorku pro jedno měření. Oproti tomu, videomikroreologie použitím Matlab skriptu poukazuje na své výhody při měření viskozity myší plazmy (objem vzorku 10 μ l). Naměřená hodnota myší plazmy pomocí video-mikroreologie a následném vyhodnocení videí pomocí Matlab skriptu souhlasí s hodnotou uvedenou v literatuře (1,9 mPa) [116].

Optická mikroreologie v kombinaci s Matlab skriptem představuje velmi jednoduchou a spolehlivou cestu ke stanovení viskozity převážně jemných a transparentních materiálů. Všechny potřebné softwary jsou volně dostupné na internetu, a proto nepředstavují pro uživatele žádné další finanční výdaje. Pro jeho jednoduchost je software vhodný pro běžného uživatele bez hlubších znalostí speciálního softwaru.

5.2 Vliv vlastností částic na mikrereologická měření

5.2.1 Vliv povrchu částice

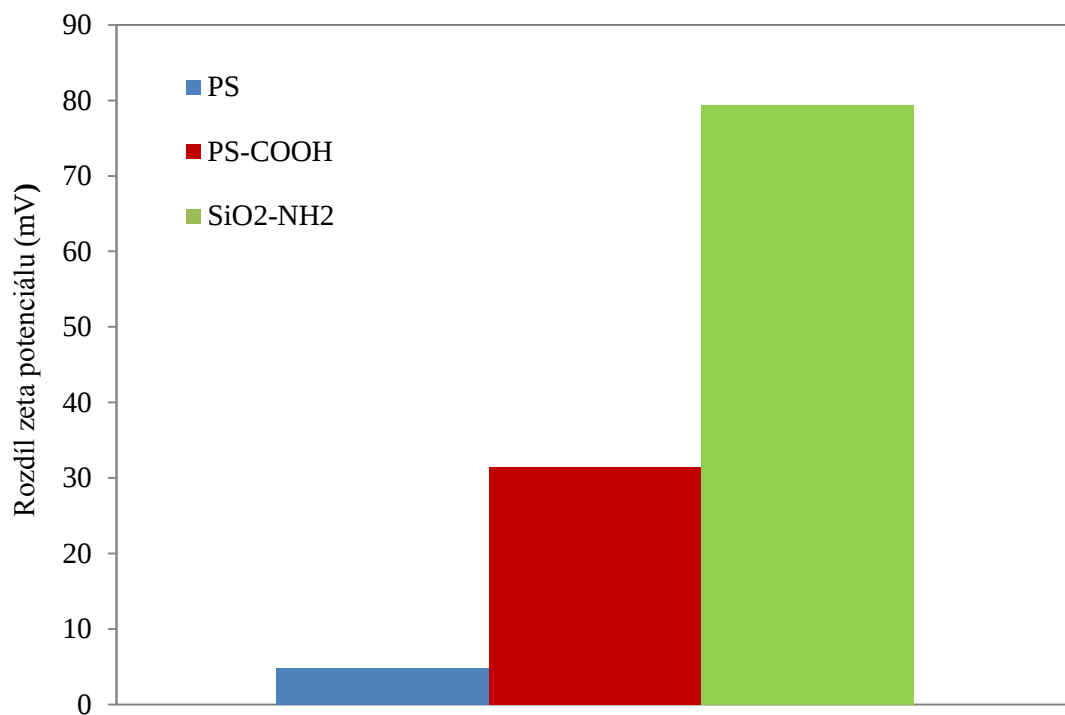
Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.8, správná volba měřicích částic - sond hraje významnou roli v získání kvalitních a spolehlivých mikrereologických výsledků. Mezi nejdůležitější kritéria patří velikost částice, hustota materiálu, ze kterého je částice vyrobena a povrch sledované částice. Správná velikost částice by měla být zvolena vzhledem k mikrostruktuře zkoumaného vzorku. U ideálně vybrané velikosti se částice pohybuje v materiálu a během svého pohybu naráží na strukturní jednotky okolního vzorku. Z trajektorií částic je poté možno vydedukovat vlastnosti okolního prostředí. V případě, že je částice příliš malá, může se pohyb odehrávat pouze v strukturních pórech materiálu a odrážet tedy vlastnosti samotného rozpouštědla místo vlastností zkoumaného materiálu.

Hustota materiálu zvolené částice musí být co nejbližší hustotě zkoumaného vzorku, abychom zamezili nežádoucí sedimentaci částic nebo jejich vyplavání na povrch. Stejně tak je nežádoucí interakce částice s okolním prostředím, aby nebyly negativně ovlivněny reologické výsledky. Z těchto důvodů je důležité zvolit takový povrch částice, který by byl inertní ke zkoumanému materiálu. Možné interakce mezi částicí a materiálem mohou být odhaleny pomocí charakterizace zeta potenciálu měřicích částic v rozpouštědle a porovnáním s hodnotou zeta potenciálu sond ve zkoumaném vzorku. Pokud dochází ke zmíněným interakcím, pak se hodnota zeta potenciálu částic ve vzorku bude zásadně lišit od zeta potenciálu částic v samotném rozpouštědle.

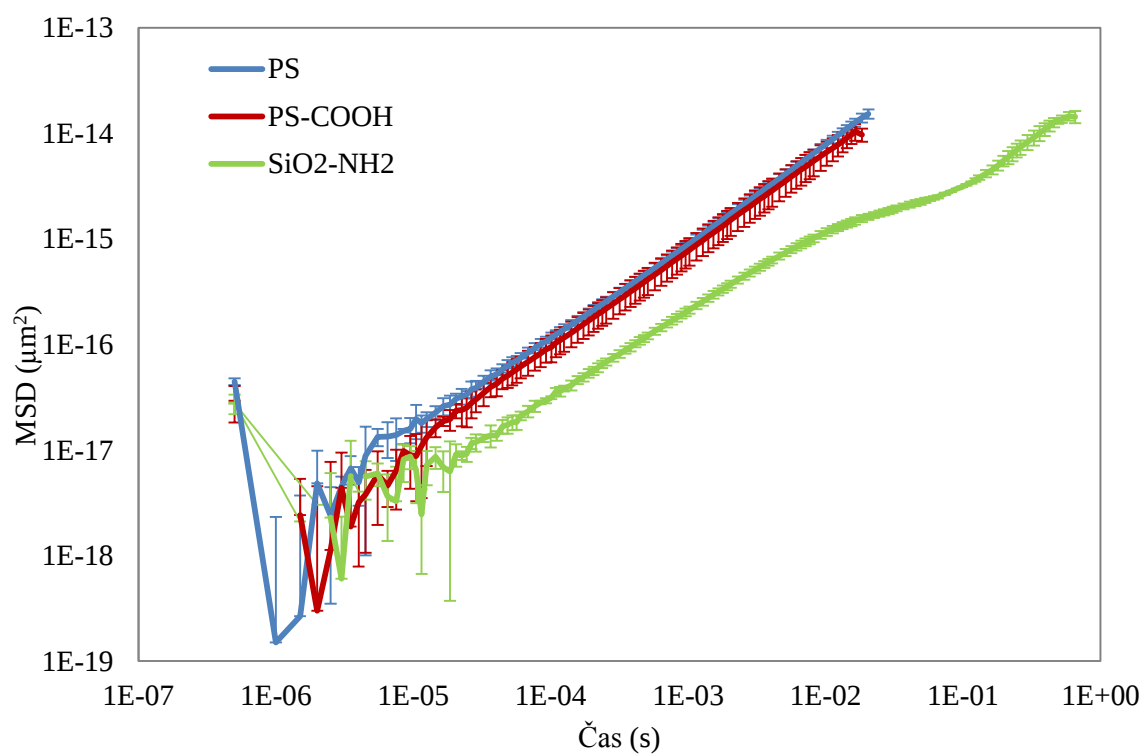
Pro měření byly vybrány tři druhy částic s různě nabitým povrchem: PS (polystyrenové částice), PS – COOH (polystyrenové částice se záporně nabitým povrchem), SiO₂ – NH₂ (částice s kladně nabitým povrchem). Interakce mezi částicemi a okolním prostředím byly sledovány ve vodném roztoku hyaluronanu ($M_w = 750$ kDa, $c = 1$ g/l).

Tabulka 1: Hodnoty zeta potenciálů částic ve vodě a ve vodném roztoku hyaluronanu:

Částice	Zeta potenciál ve vodě (mV)	Zeta potenciál ve vzorku (mV)
PS	$-17,87 \pm 0,75$	$-22,76 \pm 0,34$
PS-COOH	$-19,83 \pm 1,26$	$-51,22 \pm 2,83$
SiO ₂ -NH ₂	$33,8 \pm 3,99$	$-45,64 \pm 3,66$



Obr.36: Rozdíl zeta potenciálu částic ve vodě a ve vzorku



Obr.37: Hodnoty $MSD(t)$ pro vodný roztok HA (750 kDa, $c = 1$ g/l) použitím tří sond s různým povrchem

Obrázek 36 znázorňuje rozdíl zeta potenciálů jednotlivých částic ve vodě a ve zkoumaném vzorku, kterým je vodný roztok kyseliny hyaluronové ($M_w = 750$ KDa). U kyseliny hyaluronové, jakožto záporně nabitého polymeru, je předpokladem, že nejvhodnější z trojice částic určených k měření viskoelastických vlastností budou částice záporně nabitě (PS-COOH), které by neměly s biopolymerem nijak interagovat. Na druhém místě v žebříčku vhodnosti povrchu částic pro biopolymerní roztok jsou polystyrenové částice bez náboje (PS). Nejméně vhodné by měly logicky být částice kladně nabitě, kde by měly nastat interakce mezi kladně nabitými částicemi a záporně nabitým biopolymerem.

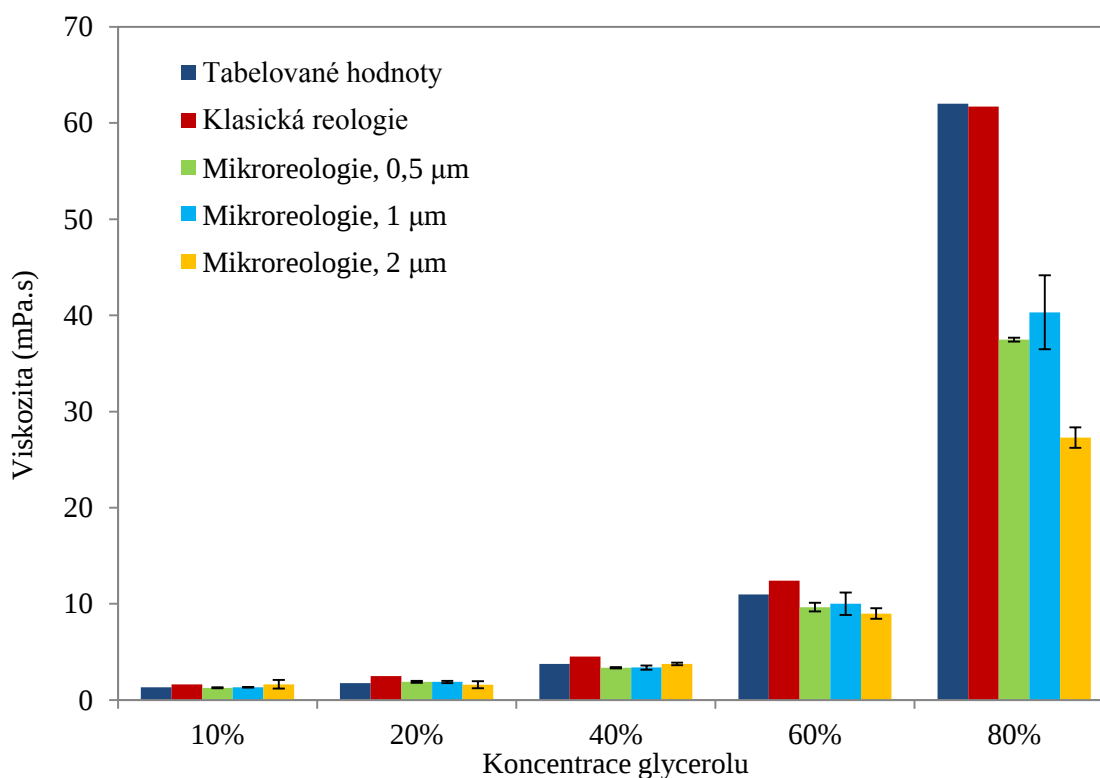
Z naměřených hodnot zeta potenciálu je však patrné, že nejvhodnější částice s nejmenším rozdílem zeta potenciálu jsou nenabitě polystyrenové částice. Záporně nabitě polystyrenové částice vykazovaly o něco větší rozdíl zeta potenciálu. Značný rozdíl zeta potenciálu byl pozorován u kladně nabitých částic, tedy docházelo zde k největší míře interakcí a tyto částice nejsou vůbec vhodné pro mikrореologické měření roztoků kyseliny hyaluronové. Tento fakt je také podpořen měřením MSD(t) pro všechny zkoumané částice (Obr. 37). Pro nenabitě (PS) a záporně nabitě částice (PS-COOH) se křivky liší pouze minimálně. Rozdíl pro kladně nabitě částice byl však poměrně markantní a potvrzuje teorii, že kladně nabitě částice nejsou vhodné pro měření záporně nabitých biopolymerních roztoků.

5.2.2 Vliv velikosti částic

Pro eliminaci vlivu nehomogenit na měření pomocí částic o různé velikosti, bylo prováděno měření v koncentrační řadě glycerolu. Pro měření byly použity tři různé velikosti částic (0,5 μm ; 1 μm ; 2 μm). Velikost částice by v případě homogenního vzorku neměla hrát žádnou podstatnou roli. Jediný rozdíl může nastat v případě velmi koncentrovaného vzorku, kde je viskozita poměrně vysoká, a menší částice se mohou pohybovat ve vzorku lépe než částice větší (což vyplývá z teorie Brownova pohybu). Tento jev byl potvrzen, jak je vidět v následující tabulce (tabulka 2) i obrázku (obr. 38). Všechny naměřené hodnoty odpovídaly hodnotám tabelovaným, s výjimkou nejkoncentrovanějšího vzorku. 80% glycerol již byl pro tepelný pohyb mikrореologických částic příliš viskózní a vyskytuje se tedy již za hranicí měřitelnosti pasivní mikrореologie při použití částic o průměru větším než 0,5 μm . Částice o menších velikostech by teoreticky byly schopny pohybu i ve více koncentrovaných vzorcích, vyžadují však mnohem vyspělejší aparaturu s větším rozlišením a rychlostí snímání pohybu. Tento systém je finančně mnohem náročnější než optika, kterou využíváme pro mikrореologická měření. Pro názornost byly výsledky porovnány s tabelovanými hodnotami a hodnotami získanými měřením na klasickém reometru.

Tabulka 2: Hodnoty viskozit glycerolové koncentrační řady určené různými metodami

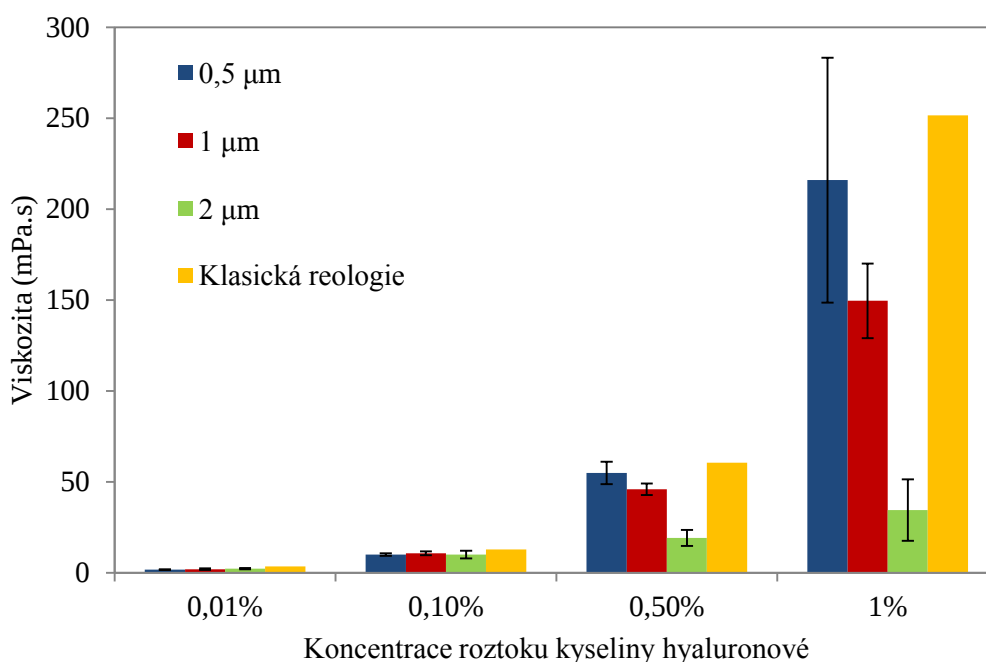
Viskozita [mPa.s]	Hmotnostní procenta glycerolu ve vodě				
	10 %	20 %	40 %	60 %	80 %
Tabelované hodnoty	1,31	1,77	3,75	10,96	62,00
Klasická reologie	1,63	2,47	4,50	12,40	61,71
Mikroreologie:					
0,5 μm částice	$1,26 \pm 0,05$	$1,89 \pm 0,10$	$3,35 \pm 0,06$	$9,65 \pm 0,45$	$37,48 \pm 0,19$
1 μm částice	$1,32 \pm 0,03$	$1,88 \pm 0,12$	$3,37 \pm 0,22$	$10,05 \pm 1,17$	$40,31 \pm 3,85$
2 μm částice	$1,63 \pm 0,44$	$1,58 \pm 0,36$	$3,74 \pm 0,13$	$8,98 \pm 0,55$	$27,28 \pm 1,06$



Obr.38: Hodnoty viskozit glycerolové koncentrační řady určené různými metodami a 3 různými velikostmi částic (0,5 μm , 1 μm , 2 μm)

Vliv velikosti částic byl poté zkoumán také na nehomogenní řadě vzorků, kterou byla koncentrační řada vodného roztoku kyseliny hyaluronové (300 - 500 kDa). Zde se naměřené hodnoty použitím různé velikosti částic zásadně lišily. Rozdíl se zvětšoval s rostoucí koncentrací kyseliny hyaluronové. Vzorky byly pro porovnání změřeny také metodou

klasické reologie. Z obrázku 39 je patrné, že hodnoty viskozit naměřené pomocí polystyrenových částic o velikosti 0,5 μm odpovídají nejvíce hodnotám získaným klasickou reologií. Pro velmi nízké koncentrace (0,01% a 0,1%) roztoku hyaluronanu vykazují výsledky velmi dobrou shodu. Pro 0,5% a 1% roztoku jsou 2 μm částice příliš veliké, aby se mohly ve vzorku pohybovat tepelným pohybem a tudíž částice nejsou schopny charakterizovat přesnou hodnotu viskozity.



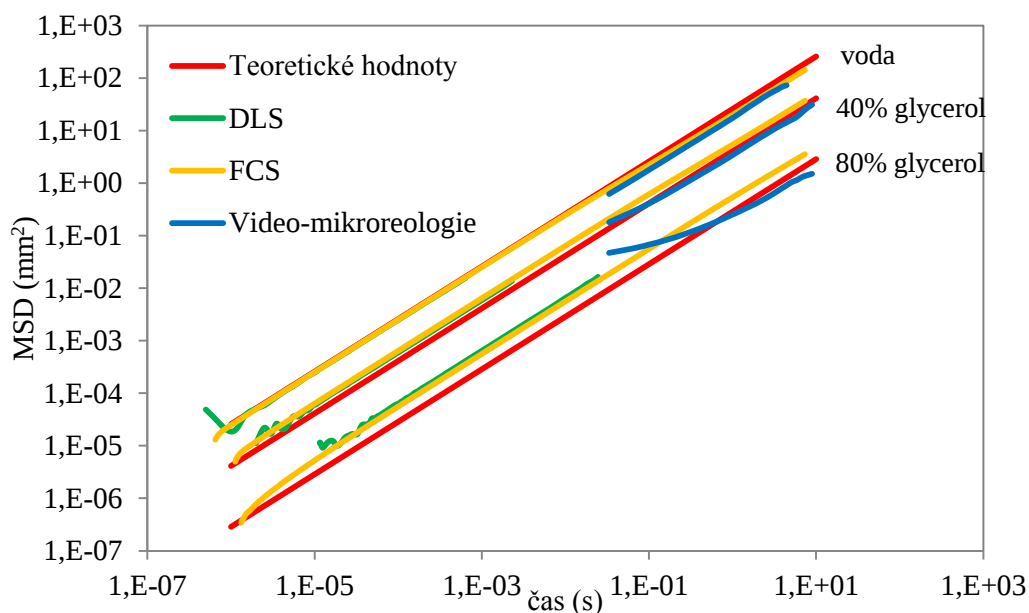
Obr.39: Hodnoty viskozit hyaluronové koncentrační řady pomocí mikrereologického měření s různou velikostí částic a pomocí klasické reologie

5.3 Zavedení a ověření možnosti aplikace FCS mikrereologie

5.3.1 Měření homogenních vzorků

Možnosti FCS mikrereologie byly testovány na homogenních vzorcích roztoků glycerolu a čistém rozpouštědle – vodě, s použitím 100 nm částic. Pro tyto vzorky jsou známy hodnoty viskozit při dané teplotě, a tudíž je zde možnost porovnání s tabelovanými hodnotami. Pro srovnání byly stejné vzorky měřeny také pomocí DLS mikrereologie (s použitím 100 nm částic) a video-mikrereologie (s použitím 1 μm částic). Přestože je velikost částic velmi důležitá pro interpretaci získaných výsledků (viz. kapitola 2.8), byla u video-mikrereologie zvolena odlišná velikost částic pro měření. Důvodem větší velikosti částic byla jejich snížená mobilita ve vodě a tímto se mnohonásobně prodloužil interval, ve kterém bylo možné částice pozorovat pod mikroskopem v dané 2D hladině. Pro porovnatelnost byla z výsledků MSD(t) 1 μm částic vypočítána viskozita roztoku a z výsledné viskozity byla zpětně určeny hodnoty

funkce $MSD(t)$, které by platily pro případ 100 nm částic. Jelikož se jedná o homogenní vzorky, můžeme si tento způsob přepočítání dovolit. V grafu je také vyobrazena funkce $MSD(t)$ na základě tabelovaných hodnot – tedy představující výsledek za ideálních podmínek.

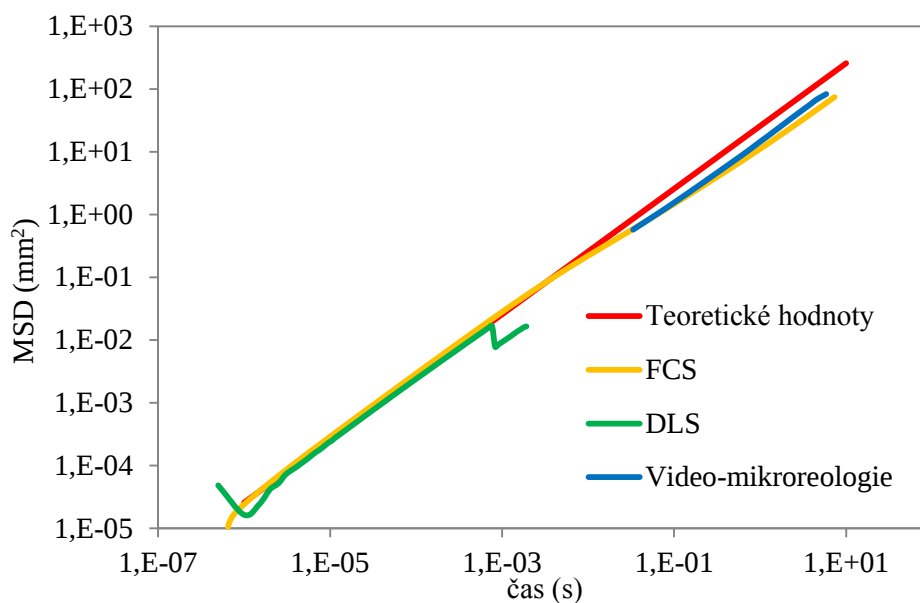


Obr.40: Porovnání výsledků měření FCS (100 nm), DLS (100 nm) a video-mikroreologie demineralizované vody, 40% a 80% roztoku glycerolu

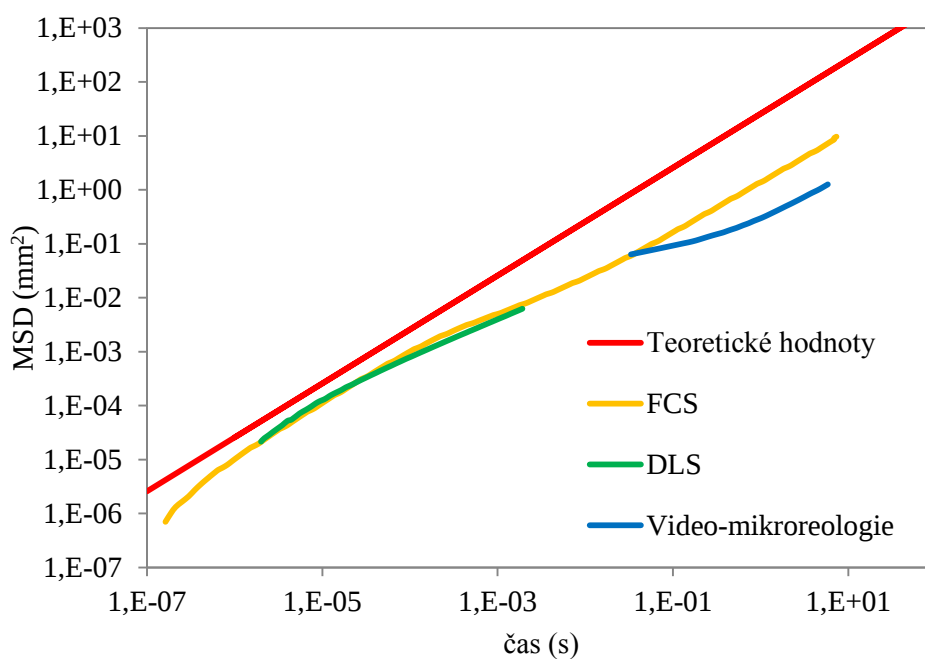
Na první pohled je z grafu patrný rozdílný časový interval měřitelnosti pro jednotlivé metody. Zatímco DLS mikroreologie ukazuje data v nižších časech, video – mikroreologie naopak vyjadřuje pohyb částic ve vyšších časových intervalech. Tento fakt je dán charakterem samotných měření, (které jsou charakterizovány v kapitolách 2.3, 2.4 a 2.6). Oproti tomu FCS mikroreologie je schopna vykazovat $MSD(t)$ od velmi nízkých až po velmi vysoké časy.

U vzorku demineralizované vody jsou výsledky všech použitých metod srovnatelné s tabelovanými hodnotami. Také výsledky měření 40% glycerolu jsou velmi blízké ideálním hodnotám. Drobné odchylky můžeme pozorovat v případě 80% roztoku glycerolu. K tomuto faktu však mohou přispívat různé faktory, jako například chyba při pipetování velmi viskozního 99,9% glycerolu. Odchylka křivky od linearity na počátku u výsledků získaných video - mikroreologií je velice často způsobena vysokým šumem při měření a neodráží tak vlastnosti zkoumaného vzorku, ale pouze nedokonalosti samotného měřicího systému či postupu měření.

5.3.2 Měření heterogenních vzorků



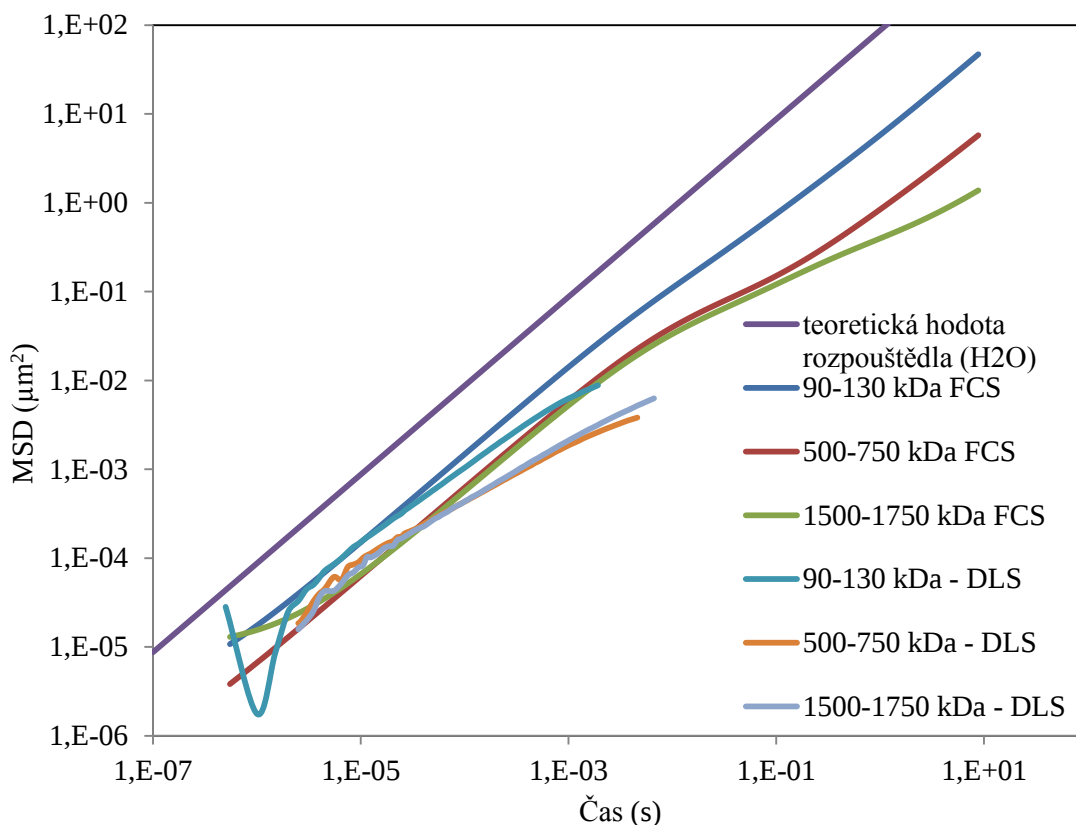
Obr.41: Porovnání výsledků měření FCS (100 nm), DLS (100 nm) a video - mikroreologie pro roztok hyaluronanu ($M_w = 1500 - 1750$ kDa) o koncentraci 0,01 mg/ml, teoretická hodnota v grafech znázorňuje tabelované hodnoty pro případ samotného rozpouštědla



Obr.42: Porovnání výsledků měření FCS (100 nm), DLS (100 nm) a video-mikroreologie pro roztok hyaluronanu ($M_w = 1500 - 1750$ kDa) o koncentraci 1 mg/ml; teoretická hodnota v grafech znázorňuje tabelované hodnoty pro případ samotného rozpouštědla

Jako příklad heterogenních vzorků byly zvoleny dva roztoky hyaluronanu o koncentracích 0,01 mg/ml a 1 mg/ml. Teoretická hodnota v grafech v tomto případě znázorňuje hodnoty pro případ rozpouštědla, tedy demineralizované vody. U 0,01 mg/ml roztoku hyaluronanu není patrný žádný podstatný rozdíl vzhledem k výsledkům měření demineralizované vody. Pouze u vysokých časů je patrný mírný odklon MSD(t) křivky od tabelované hodnoty, poukazující na fakt, že se nejedná čistě o homogenní vzorek s lineární odezvou, ale vzorek, který vlivem přítomnosti i malého množství vysokomolekulárního hyaluronanu vykazuje jistou míru viskoelastivity. Koncentrace řetězců hyaluronanu je v tomto případě tak malá, že jsme schopni jejich přítomnosti zachytit pouze ve vyšších měřených časech.

Křivky MSD(t) popisující roztok hyaluronanu o koncentraci 1 mg/ml již vykazují odlišný tvar oproti málo koncentrovanému vzorku. Je zde velmi patrný odklon od hodnot samotného rozpouštědla a jejich pokles charakterizuje zvýšení viskozity měřeného vzorku. Nelinearita a „esovitý“ tvar křivky naopak charakterizuje přítomnost elastické složky zkoumaného materiálu. Jelikož se již jedná o silně heterogenní vzorek, nejsou přepočítané hodnoty video-mikroreologie srovnatelné s výsledky ostatních metod měřených pomocí 100 nm částic. Oproti tomu výsledky DLS mikroreologie kopírují křivku získanou pomocí FCS mikroreologie. Jak je tedy z výsledků měření patrné, obě tyto metody jsou schopny v daném časovém intervalu charakterizovat vlastnosti vzorku se stejnou přesností.



Obr.43: Porovnání výsledků měření FCS (100 nm) a DLS (100 nm) o třech molekulových hmotnostech ($M_w = 90 - 130 \text{ kDa}$; $500 - 750 \text{ kDa}$; $1500 - 1750 \text{ kDa}$) a koncentraci 10 mg/ml s použitím 30 nm částic, teoretická hodnota v grafu znázorňuje tabelované hodnoty pro případ samotného rozpouštědla

Roztoky o koncentraci 10 mg/ml vykazují již podstatně vyšší viskozitu, než tomu bylo u předchozích vzorků, a to hlavně u vyšších molekulových hmotností. Proto byly pro měření zvoleny částice o nižší velikosti měřících částic, a to 30 nm, které vykazují dostatečnou pohyblivost i u koncentrovanějších vzorků a pro samotné měření jsou tedy vhodnější. Pro video – mikrореologii jsou naopak tyto 30 nm částice nepoužitelné, jelikož optika přístrojového vybavení je omezená a není schopna zobrazovat tak malé částice v dostatečném rozlišení. Pro tyto případy je metoda FCS mikrореologie nejvhodnější volbou, jelikož je schopna sledovat pohyb velmi malých částic v dlouhém časovém intervalu v 3D systému.

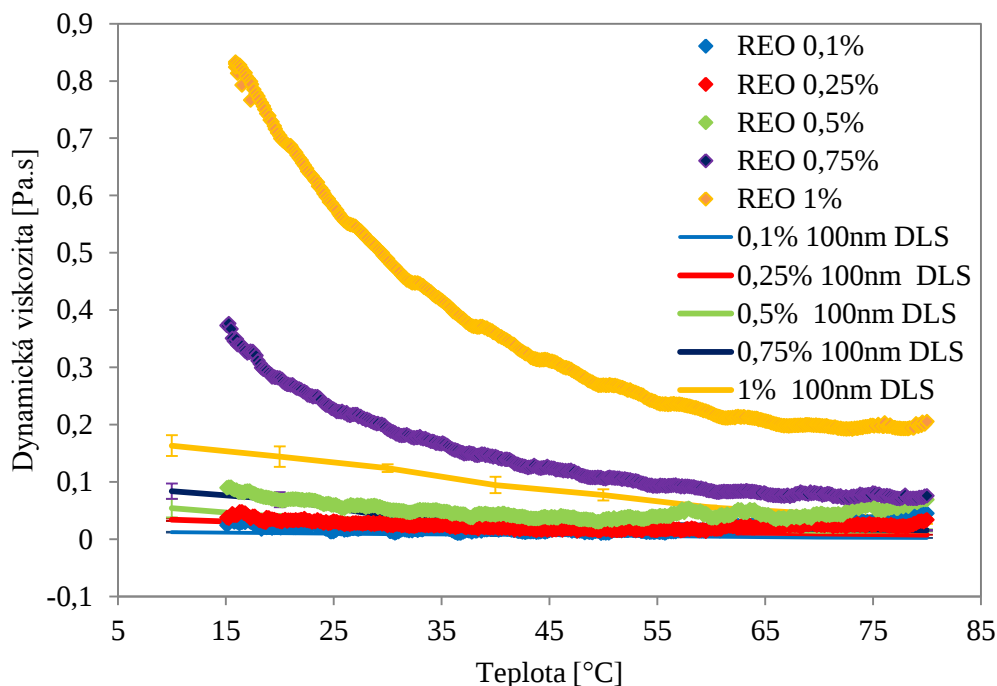
5.4 Aplikace reologie a mikrореologie ke studiu vlivu teploty na viskozitu roztoku hyaluronanu

Jako jedna z oblastí aplikace pasivních mikrореologických technik zavedených a rozvinutých během dizertační práce byly zvoleny roztoky kyseliny hyaluronové. Pochopení viskoelastického chování roztoků kyseliny hyaluronové při různých teplotách, hraje důležitou roli pro její využití v mnoha průmyslových odvětvích, ve výrobním procesu, v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu či medicínských aplikacích.

Viskoeastické vlastnosti tohoto biopolymeru jsou již na FCH dlouhodobě zkoumány pomocí klasické reologie. Pro mikrореologická měření byla jako nejvhodnější z dostupných technik zvolena DLS mikrореologie s použitím 100 nm částic. Tento typ mikrореologie byl vybrán z důvodu přítomnosti termostatu v přístroji a tedy možnosti přesné kontroly momentální teploty měřeného vzorku, a to až po teplotu 90 °C. Jako porovnávací metoda byla zvolena klasická reologie. Podle rozsahu teplot běžně používaných při produkci hyaluronanu, byl teplotní rozsah pro měření určen v rozmezí 15 °C až 90 °C. Jedná se také o maximální rozsah, který může být použit při měření na reometru AR-G2. Teploty nižší než je 15 °C je velmi obtížné dosáhnout a teplota přesahující 90 °C se blíží teplotě varu, což by způsobovalo vypařování použitého rozpouštědla, a následné měření by bylo nerelevantní.

Pro měření byla vybrána koncentrační řada (0,1% - 1%) kyseliny hyaluronové s molekulovou hmotností $M_w = 750$ kDa. Všechna měření byla opakována minimálně třikrát a vyobrazené křivky odpovídají průměrné hodnotě výsledků z opakovaných měření. Některé chybové úsečky nejsou pro přehlednost v grafech vyobrazeny.

5.4.1 Porovnání teplotních křivek klasické reologie a DLS mikoreologie za použití 100 nm částic



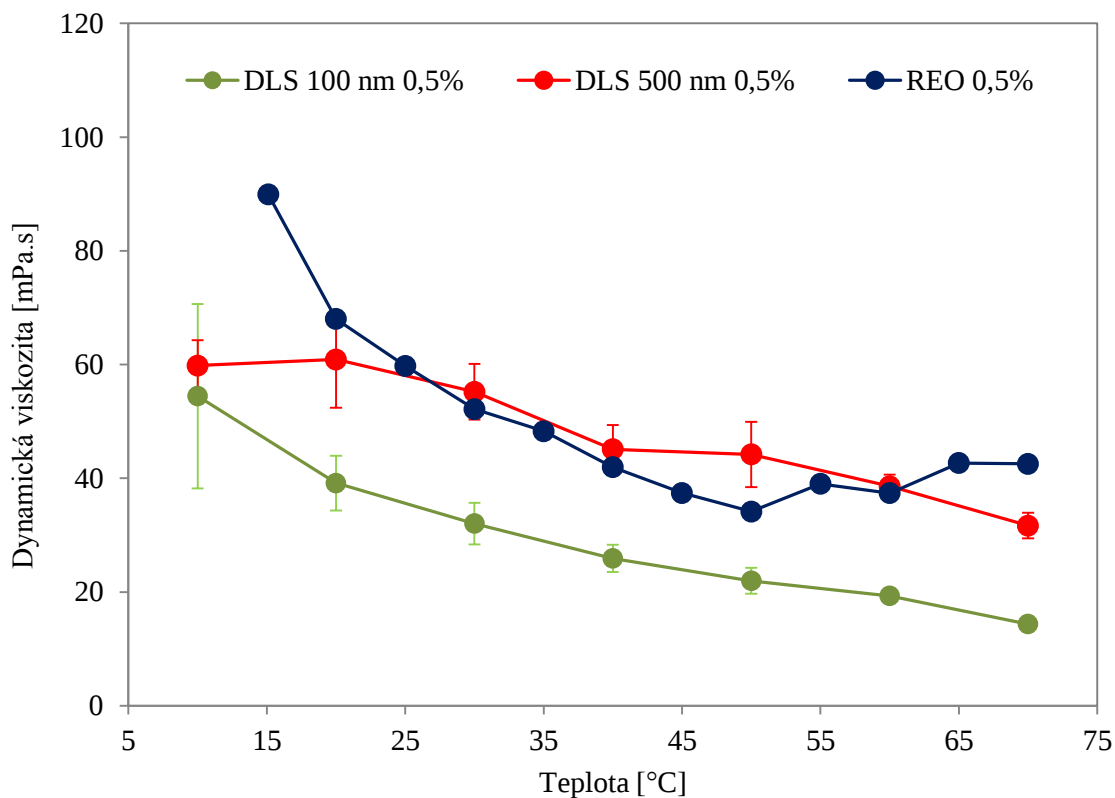
Obr.44: Teplotní křivky získané pomocí klasické reologie a DLS mikoreologie s použitím 100 nm částic pro roztoky hyaluronanu o koncentraci 0,1% - 1% ($M_w = 750 \text{ Da}$)

S rostoucí teplotou je patrný pokles dynamické viskozity roztoků kyseliny hyaluronové pro všechny zvolené koncentrace. Tento trend je viditelný jak z výsledků získaných pomocí klasické reologie, tak z výsledků 100 nm DLS mikoreologie. Rozdíly mezi výsledky získanými jednotlivými metodami jsou však na první pohled zřejmé, hlavně u roztoků s vyšší koncentrací hyaluronanu. Podstata odlišností výsledků leží v samotném charakteru měřících metod. Klasická reologie zkoumá vzorek jako celek a tedy jeho „makrostrukturu“, kdežto 100 nm částice odráží vlastnosti vzorku na úrovni velikosti měřících částic (viz. kapitola 2.3), tedy charakterizuje „mikrostrukturu zkoumaného vzorku“. Z výsledků je tedy patrné, že viskozita vzorku se mění s měnící se teplotou na úrovni mikrostruktury v menším měřítku, více však na úrovni makrostruktury vzorku.

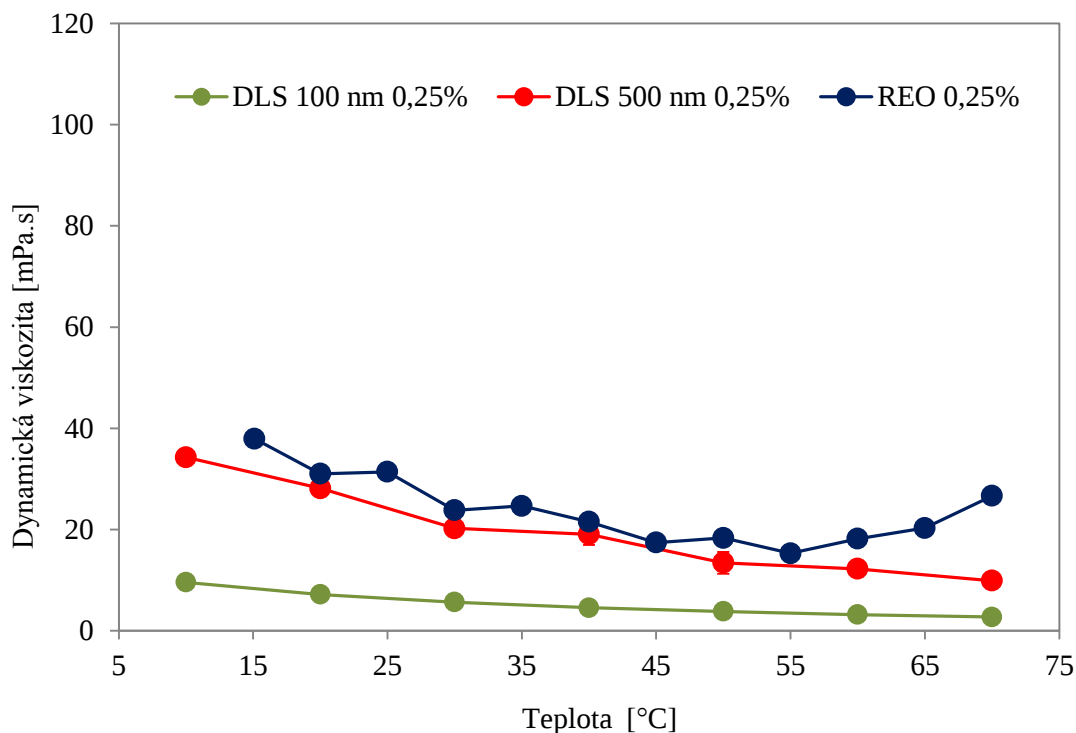
U vzorků s vyšší koncentrací 0,75% a 1% hraje také významnou roli vysoká viskozita vzorku v případě molekulové hmotnosti 750 kDa. V těchto případech a za nízkých teplot je hyaluronová síť natolik hustě propletena, že pohyb 100 nm částic je značně znemožněn. Proto nejsou tyto výsledky porovnatelné s hodnotami klasické reologie. Aplikace Stokes-

Einsteinovy rovnice je také již zatížena významnou chybou v důsledku nenewtonského charakteru zmiňovaných vzorků.

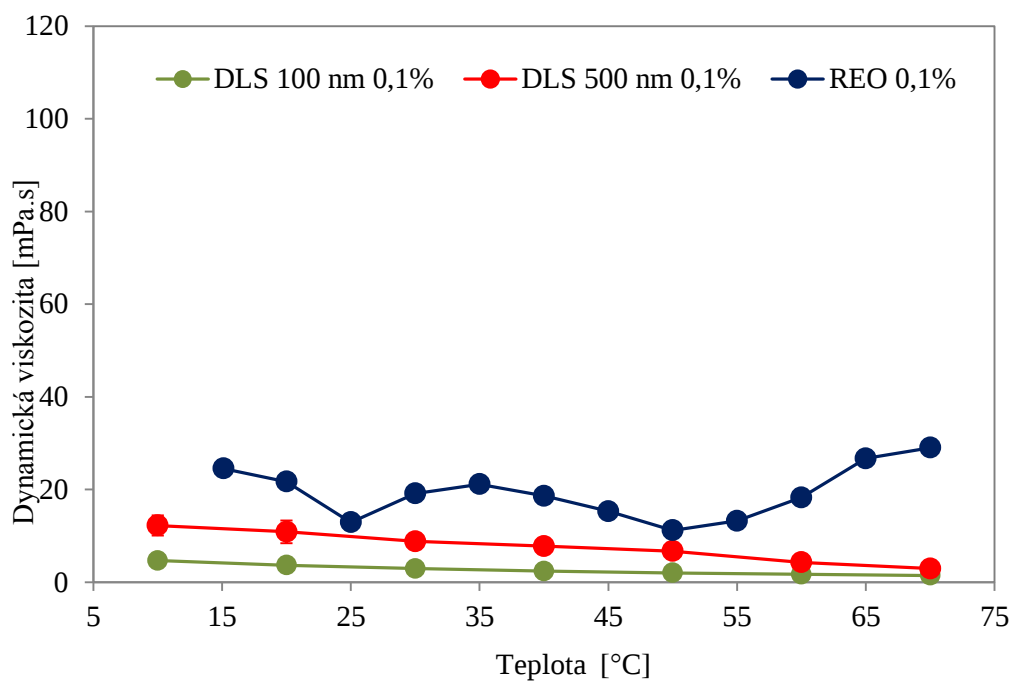
5.4.2 Porovnání teplotních křivek Reologie a DLS mikrereologie o různých velikostech částic



Obr.45: *Dynamická viskozita v závislosti na teplotě pro 0,5% roztok kyseliny hyaluronové (750 kDa) měřena klasickou reologií a DLS mikrereologií s použitím dvou velikostí částic (100 nm a 500 nm)*



Obr.46: *Dynamická viskozita v závislosti na teplotě pro 0,25% roztok kyseliny hyaluronové měřena klasickou reologií a DLS mikrореologií s použitím dvou velikostí částic.*

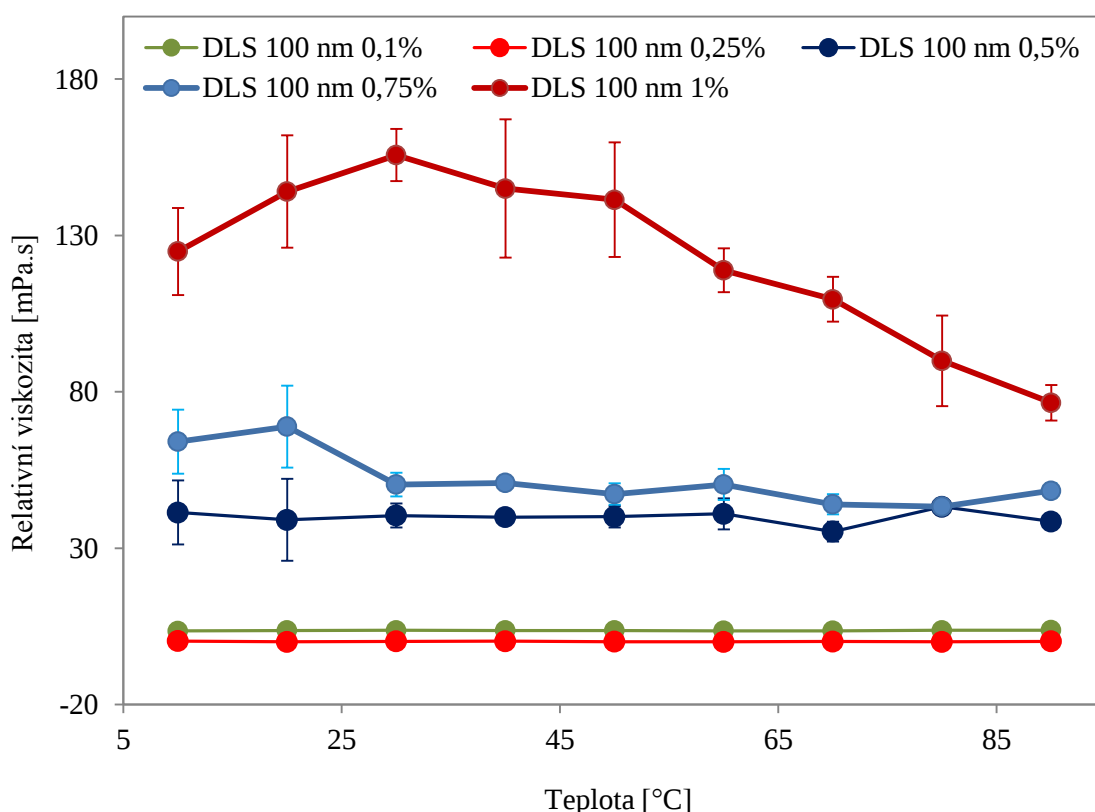


Obr.47: *Dynamická viskozita v závislosti na teplotě pro 0,1% roztok kyseliny hyaluronové měřena klasickou reologií a DLS mikrореologií s použitím dvou velikostí částic.*

Viskozita roztoků kyseliny hyaluronové ($M_w = 750$ kDa) o koncentracích 0,75 % a 1 % jsou pro měření pomocí 500 nm DLS mikrореologie příliš vysoké. Tento fakt vyplývá z charakteru měření mikrореologie pomocí DLS (viz. kapitola 2.5). Přestože byly proměřeny všechny zvolené koncentrace vzorků, v následujících grafech jsou však uvedeny pouze vzorky s maximální koncentrací hyaluronanu 0,5 %.

Výsledky klasické reologie vykazují velmi podobné výsledky jako 500 nm DLS mikrореologie, kdežto výsledky 100 nm částic vždy vykazují vždy hodnoty nižší. Z tohoto trendu je patrné, že makrореologie síťové struktury roztoku hyaluronanu na úrovni 500 nm částic je srovnatelná s makrostrukturou získanou pomocí klasické reologie. Tento trend je patrný hlavně u koncentrací 0,25% a 0,5%. Z porovnání výsledků jednotlivých metod jsme tedy schopni blíže rozpoznat a pochopit strukturu zkoumaného vzorku.

5.4.3 Porovnání relativních viskozit

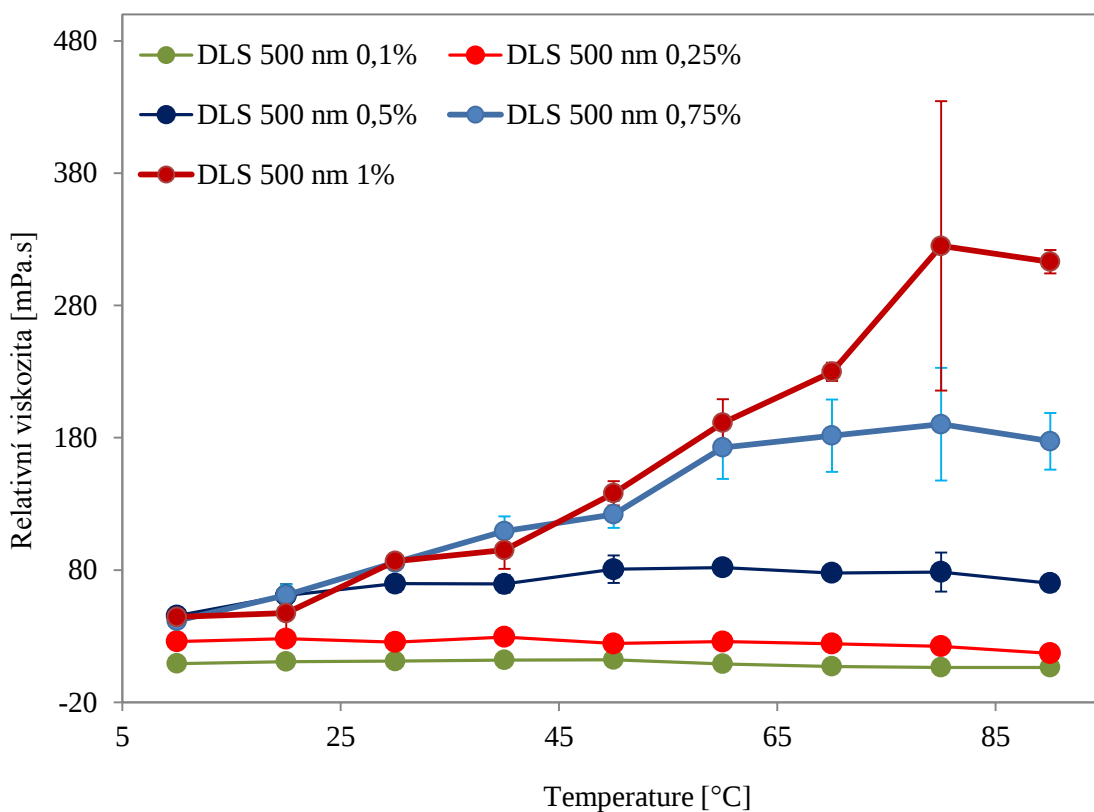


Obr.48: Relativní viskozita v závislosti na teplotě pro roztoky kyseliny hyaluronové o koncentraci 0,1% - 1% pomocí DLS mikrореologie použitím 100 nm částic

Snížování dynamické viskozity s rostoucí teplotou bylo poukázáno na předchozích případech. Dynamická viskozita samotného rozpouštědla je však také závislá na teplotě, a

proto byl vyhodnocen také vliv teploty na relativní viskozitu vzorku pomocí DLS mikrореologie použitím 100 nm a 500 nm částic. Relativní viskozita vyjadřuje poměr viskozity disperzního systému η nebo roztoku k viskozitě čistého disperzního prostředí nebo rozpouštědla η_0 .

V případě měření pomocí 100 nm částic, není u nižších koncentrací kyseliny hyaluronové patrný žádný velký vliv teploty na výslednou relativní viskozitu roztoku. Pouze u nejvyšší zvolené koncentrace - 1 % roztoku kyseliny hyaluronové můžeme pozorovat pokles relativní viskozity s rostoucí teplotou. Tento výsledek koresponduje s předchozími výsledky, kdy 100 nm částice nejsou schopny detekovat síť hyaluronanu v roztoku, jelikož jejich velikost je mnohonásobně menší než strukturní jednotky síťové struktury hyaluronanu („mesh size“) u nižších koncentrací kyseliny hyaluronové (0,1%; 0,25% a 0,5%) a částice pak odráží prakticky pouze viskozitu použitého rozpouštědla.



Obr.49: Relativní viskozita v závislosti na teplotě pro roztoky kyseliny hyaluronové o koncentraci 0,1% - 1% pomocí DLS mikrореologie použitím 500 nm částic

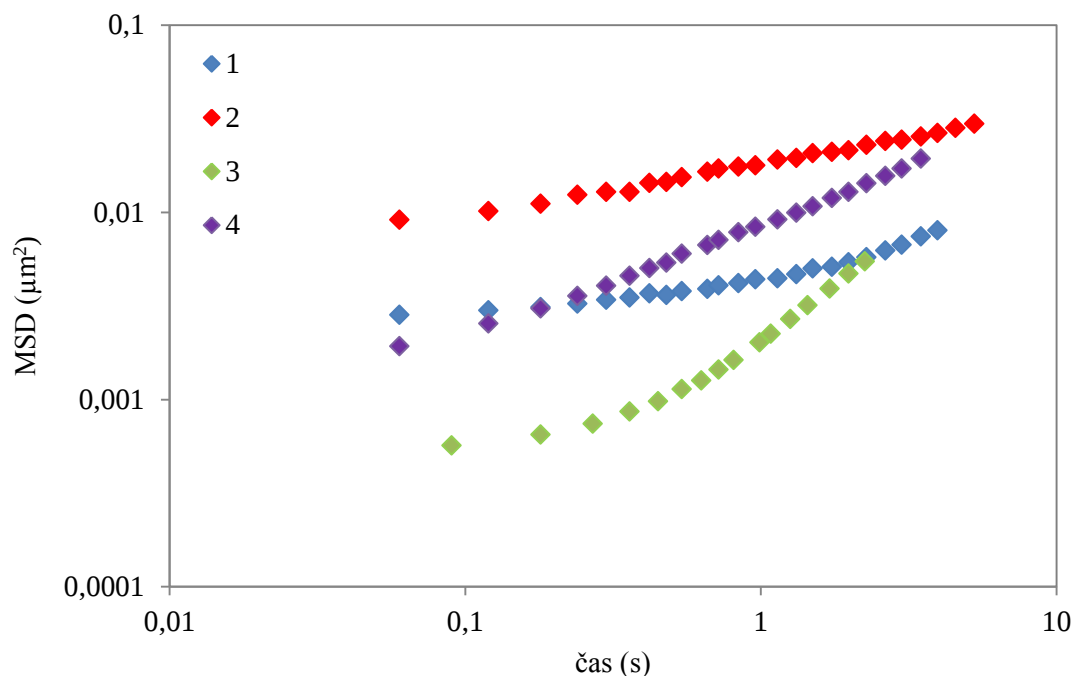
Z porovnání výsledků měření viskoelastických vlastností pomocí DLS mikrореologie a klasické reologie je patrné, že kombinací těchto metod jsme schopni získat internější informace o struktuře vzorku na úrovni mikro a makro struktury. Důležitá je však znalost

rozsahů měřitelnosti metod, ve kterých tyto metody poskytují relevantní informace o zkoumaném vzorku. Velmi důležitým prvkem je také správné zvolení velikostí částic pro mikrorheologické měření, či jejich správná kombinace pro získání co největšího množství informací vedoucí k odhalení viskoelastických a strukturních vlastností vzorků.

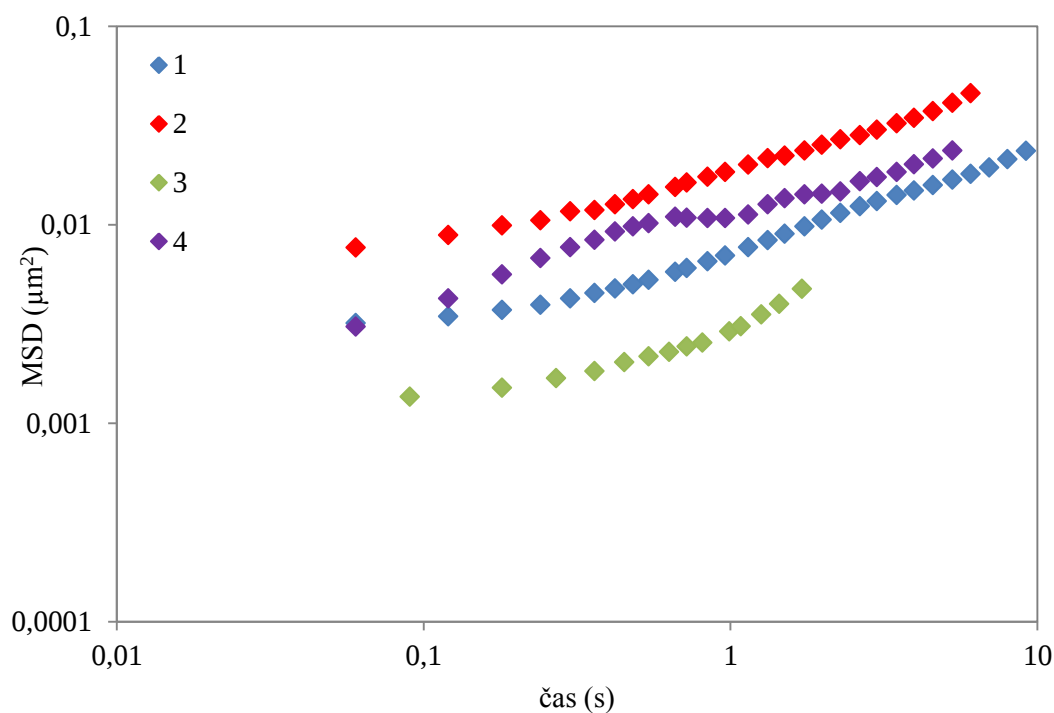
5.5 Aplikace mikrorologie ke studiu hyaluronových gelů

Gely spadají do skupiny materiálů, pro jejichž studium jsou mikrorheologické metody velmi hojně využívány. Výhodou těchto technik je schopnost získat zajímavé informace o mikrostruktuře vzorku, na rozdíl od reologie klasické poskytující zprávu o jeho makrostruktuře. Pro své potencionální využití jsou gely oblastí zkoumání velké skupiny badatelů po celém světě.

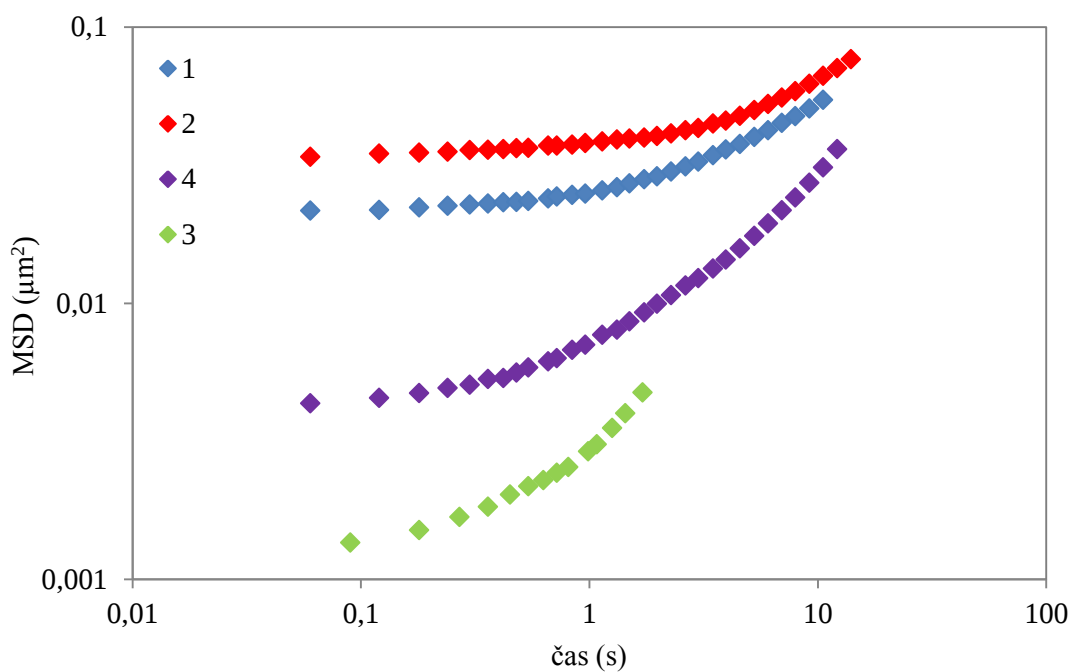
V této práci byla použita pasivní jednočásticová video - mikrorheologie ke studiu gelů kyseliny hyaluronové o molekulové hmotnosti $M_w = 90 - 130$ kDa v kombinaci s tenzidem CTAB a s použitím tří velikostí měřicích mikrorheologických částic (100 nm, 500 nm, 1000 nm). Jelikož tyto gely nejsou plně transparentní, byla zde vyloučena možnost využití mikrorheologických metod založených na rozptylu paprsku světla (DLS, FCS). Zároveň byly všechny vzorky proměřeny klasickou makrorheologií.



Obr.50: MSD v závislosti na čase pro jednotlivé gely kyseliny hyaluronové ($M_w = 90 - 130$ kDa) s použitím 100 nm částic; gel 1: (50 mM CTAB + 0,5% HYA); gel 2 (200 mM CTAB + 0,5% HYA); gel 3: (50 mM CTAB + 2% HYA); gel 4: (50 mM CTAB + 0,5% HYA)



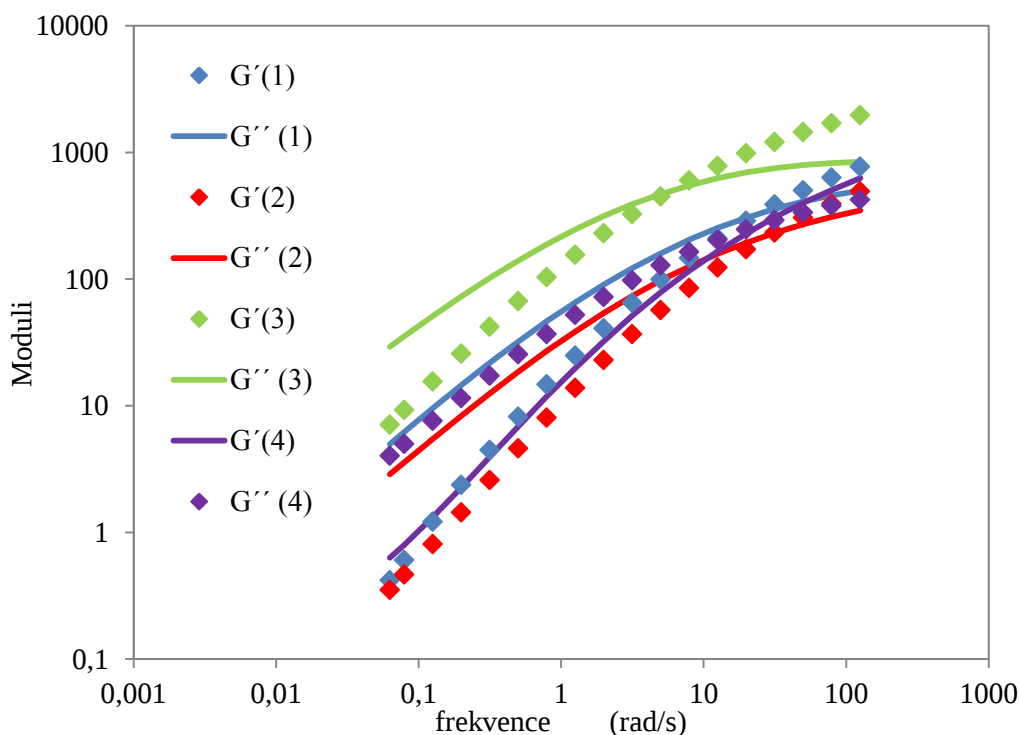
Obr.51: MSD v závislosti na čase pro jednotlivé gely kyseliny hyaluronové ($M_w = 90 - 130$ kDa) s použitím 500 nm částic; gel 1: (50 mM CTAB + 0,5% HYA); gel 2 (200 mM CTAB + 0,5% HYA); gel 3: (50 mM CTAB + 2% HYA); gel 4: (50 mM CTAB + 0,5% HYA)



Obr.52: MSD v závislosti na čase pro jednotlivé gely kyseliny hyaluronové ($M_w = 90 - 130$ kDa) s použitím 1000 nm částic; gel 1: (50 mM CTAB + 0,5% HYA); gel 2 (200 mM CTAB + 0,5% HYA); gel 3: (50 mM CTAB + 2% HYA); gel 4: (50 mM CTAB + 0,5% HYA)

Data získaná měřením pomocí různých velikostí částic vykazují velmi podobné výsledky. Podle naměřených výsledků vykazuje nejvyšší viskozitu gel číslo 3 (50 mM CTAB + 2% HYA), což bylo potvrzeno pomocí všech měření. Difuze částic v tomto gelu je nejobtížnější a nejpomalejší a tudíž je hodnota MSD(t) vždy ze čtveřice gelů nejnižší. Gel číslo 2 (200 mM CTAB + 0,5% HYA) naopak vykazuje viskozitu nejnižší, difuze částic všech velikostí ve vzorku je nejrychlejší, čemuž odpovídá i vypočítaná hodnota MSD(t).

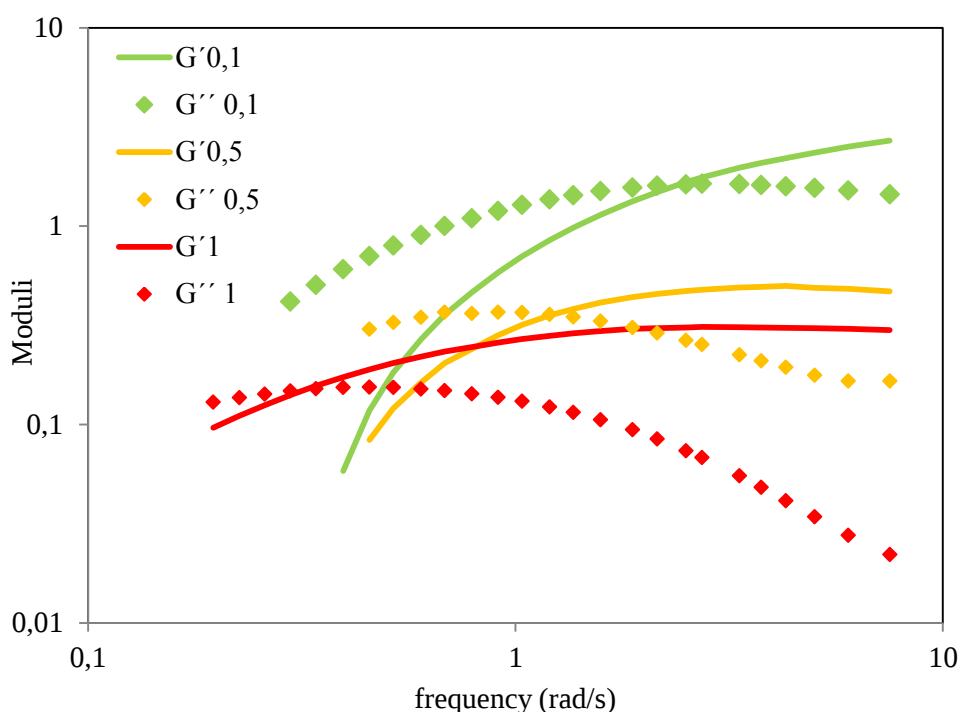
V případě gelu číslo 1 (50 mM CTAB + 0,5% HYA) je měření pomocí 1 μm částic při porovnání s gelem č 4 (50 mM CTAB + 0,5% HYA) poměrně jednoznačné – částice v gelu číslo 4 poukazují na vyšší viskozitu vzorku než u gelu číslo 1. U velikosti částic 500 nm a 100 nm již tak podstatný rozdíl mezi hodnotami patrný není. U 100 nm částic dokonce dochází v jistých časech k překryvu MSD(t) křivek. Z výsledků můžeme dedukovat, že u těchto gelů se 100 nm částice pravděpodobně nachází v rozmezí strukturních ok gelu. Z porovnání výsledků použitím různých velikostí částic jsme schopni vydedukovat bližší strukturní obraz daného vzorku. Hodnocení míry elasticity vzorku je již z těchto vzorků poněkud obtížnější. Elastický příspěvek je v MSD(t) křivce charakterizován jako jisté plató. V nižších časových hodnotách však může být výsledky zkresleny velkým množstvím šumu, které se u málo transparentních vzorků dá předpokládat.



Obr.53: Výsledky měření gelů pomocí klasické reologie

Výsledky měření klasickou reologií vykazují souhlasné výsledky v porovnání s jednočásticovou video-mikroreologií. Vzorek číslo 3 nabývá nejvyšších hodnot elastického i viskózního modulu a takzvaný „cross point“, tedy bod, kdy elastická složka je totožná se složkou viskózní, se nachází při nejnižší frekvenci (v porovnání s ostatními gely). Gel číslo 2 opět vykazuje nejnižší hodnoty elastického i viskózního modulu. Gely 1 a 4 jsou porovnatelně stejné.

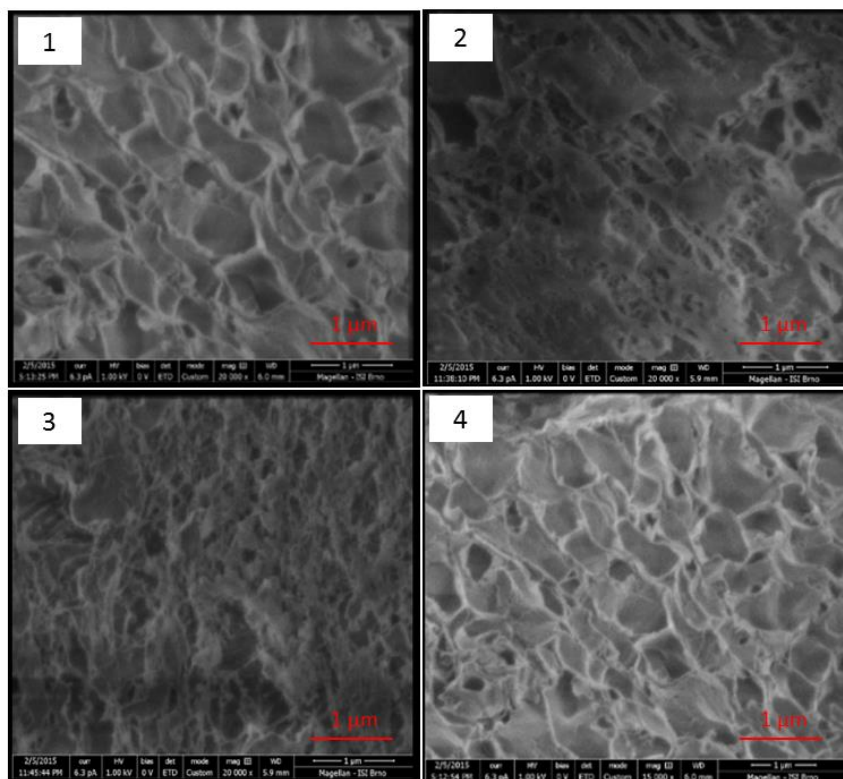
Z těchto výsledků je patrné, že jednočásticová mikroreologie je schopna poskytnout porovnatelné výsledky s výsledky klasické reologie. Jelikož však můžeme využívat různých velikostí částic, jsme schopni z měření získat i doplňující informace o mikrostruktuře měřeného vzorku.



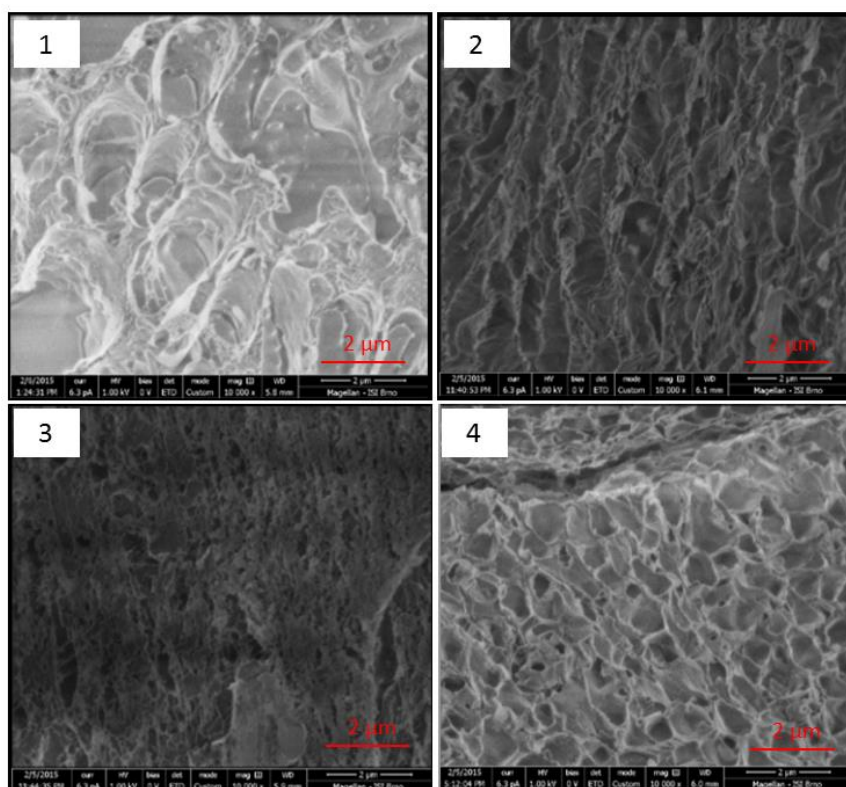
Obr.54: Porovnání výsledků použitím různých velikostí částic (0,1 μm ; 500 μm ; 1000 μm) pro hyaluronový gel č. 2

Porovnání elastických a ztrátových modulů u gelu číslo 2 použitím různých velikostí částic. Zde je patrný postup „cross pointu“ od nejnižší frekvence (1 μm částice) k nejvyšší frekvenci (0,1 μm částice). Tyto výsledky popisují možnost detekovatelnosti v jednotlivých strukturních hladinách ve vzorku. 1 μm částice jsou schopny detekovat větší strukturní jednotky na své úrovni, kdežto 100 nm částice se mohou vyskytovat ve strukturních okách a odrážet spíše viskozitu požitého rozpouštědla.

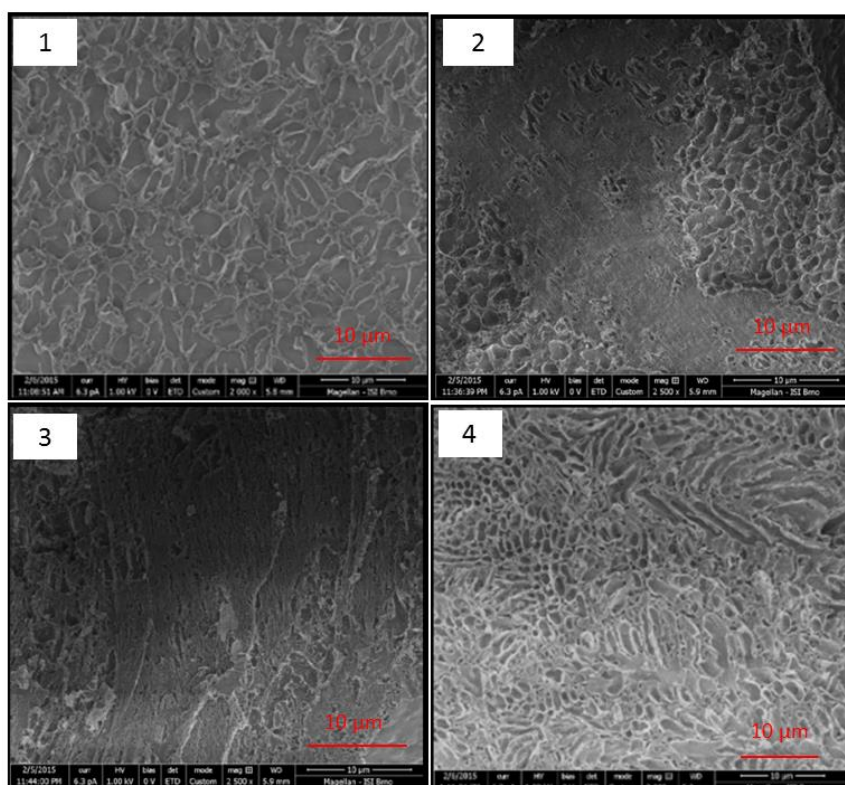
Pro bližší přiblížení struktury jednotlivých gelů bylo měření doplněno fotkami z KRYO-SEM mikroskopu. Obrázky byly pořízeny ve spolupráci s Ústavem přístrojové techniky AV ČR.



Obr.55: KRYO-SEM měření hyaluronových gelů po sublimaci, 1 minuta - 100 °C + 4 minuty -90 °C



Obr.56: KRYO-SEM měření hyaluronových gelů po sublimaci; 1 minuta - 100 °C + 4 minuty -90 °C



Obr.57: KRYO-SEM měření hyaluronových gelů po sublimaci; 1 minuta - 100 °C + 4 minuty - 90 °C

Přestože je možné z výsledků jednočásticové video-mikroreologie jistá fakta a charakteristiky měřených vzorků vydedukovat, přesto nemůžeme jednoznačně říci, že je tato metoda pro měření poměrně viskózních a netransparentních vzorků tou nejvhodnější. Vzhledem k poněkud viskózní netransparentní povaze měřených vzorků by bylo vhodnější zvolit částice fluorescenčně značené o průměru menším než je 100 nm. Jedinou pro nás dostupnou technikou splňující tyto požadavky je FCS mikroreologie. Pro další studium těchto vzorků by bylo nejvhodnější se zaměřit právě na použití FCS mikroreologie.

Z KRYO-SEM fotografií je patrné, že zkoumané gely jsou velmi heterogenní a získané výsledky mohou být ovlivněny pouze lokální strukturou gelu, ve kterém došlo k měření.

5.6 Aplikace mikroreologie ke studiu procesu gelace agarosy

Následující práce byla zaměřena na studium procesu gelace, výběr a aplikace vhodné mikroreologické metody ke studiu těchto procesů.

Jelikož byl ke studiu vybrán agarosový gel, k jehož tvorbě je nutná změna teplot, byla jako nejvhodnější metoda vybrána DLS mikroreologie. Součástí přístroje Zeta Sizer nano, který byl k měření DLS mikroreologie použit je termostat, který zajišťuje okamžitou teplotu celého vzorku na požadovanou teplotu, což je pro sledování průběhu gelace agarosy velmi důležité.

Agarosa je hojně využívaný biopolymer z mořské řasy, známý pro svou schopnost gelace již od 17 století. Své využití našla v molekulární biologii jako gelové medium pro elektroforézu či jako stacionární fáze v gelové permeační chromatografii, tvoří živné medium pro kultivaci mikroorganismů. Hojně využívána je také v potravinářství, farmacii či biomedicínských aplikacích [117].

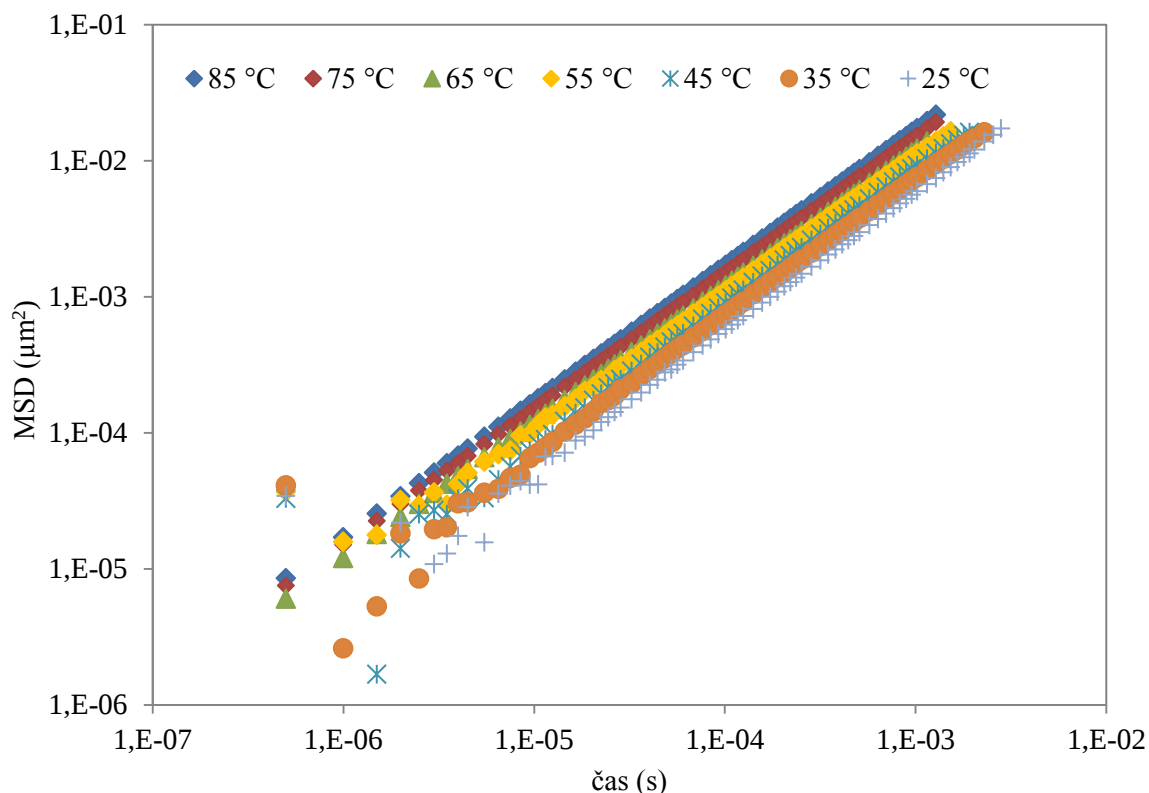
Agarosa je lineární polysacharid tvořený opakujícími se galaktózovými a 3,6-anhydrogalaktózovými podjednotkami agarobiózy. Jedná se o inertní polysacharid. Každý řetězec agarosy obsahuje asi 800 molekul galaktózy a agarosové polymerní řetězce tvoří helikální struktury, které agregují do struktury nadšroubovice. 3D struktura je udržována pomocí vodíkových vazeb a může být narušena vysokou teplotou, kdy je gel převeden zpět do kapalného stavu [118].



Průběh gelace byl studován pro koncentrační řadu agarosy: 0,01%, 0,05%, 0,1%, 0,5% a 1%.

Jak již bylo zmíněno v úvodu této kapitly, je proces gelace agarosy podmíněn změnou teploty zkoumaného vzorku.

97

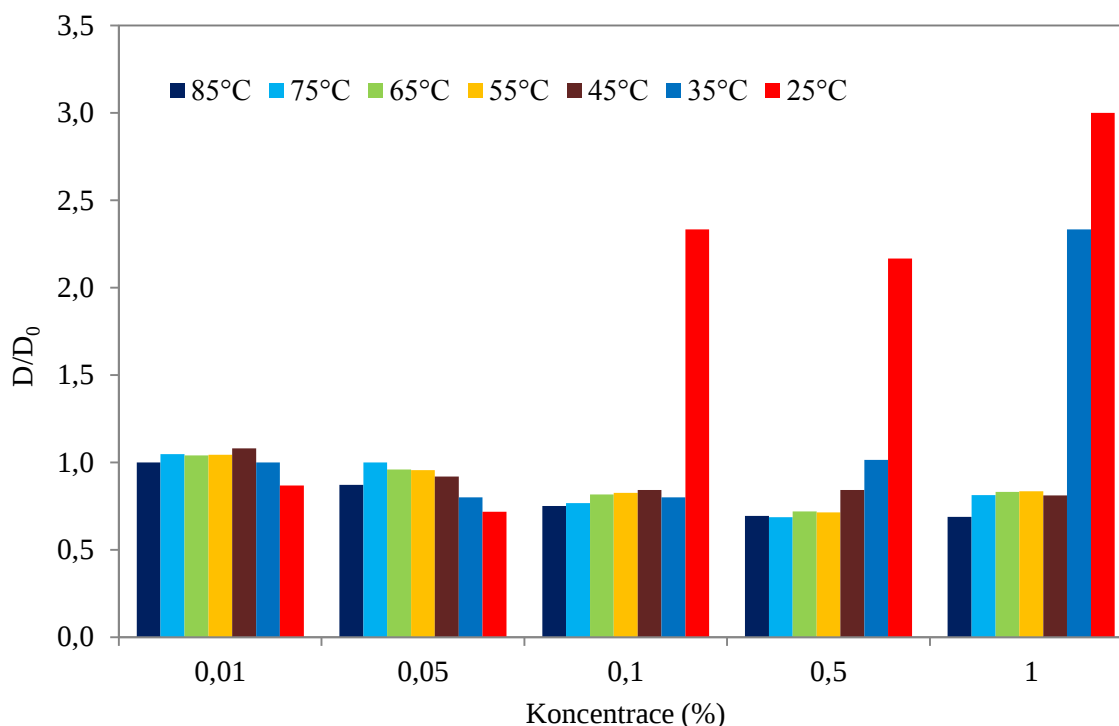


Obr.59: MSD(t) 0,5 μm částic ve vodě při teplotách od 25 – 85 °C

Roztoky agarosy o jednotlivých koncentracích byly měřeny od teploty 85 °C po teplotu 25 °C. K získání numerického porovnání procesu gelace v daném teplotním rozptylu, byly stanoveny hodnoty difuzních koeficientů pro jednotlivé hmotnostní koncentrace agarosy v roztoku. Pro eliminaci vlivu samotné teploty na pohyb měřicích částic, byly jednotlivé difuzní koeficienty vždy vztaženy k difuznímu koeficientu rozpouštědla za dané teploty (D_0).

Tabulka 3: Difuzní koeficienty vztažené k difuznímu koeficientu rozpouštědla za dané teploty.

t (°C)	0,01% (D/D_0)	0,05% (D/D_0)	0,1% (D/D_0)	0,5% (D/D_0)	1% (D/D_0)
85	1,000	0,872	0,750	0,694	0,689
75	1,047	1,000	0,767	0,687	0,813
65	1,040	0,960	0,816	0,720	0,832
55	1,043	0,956	0,826	0,713	0,835
45	1,081	0,919	0,843	0,843	0,811
35	1,000	0,800	0,800	1,014	2,334
25	0,867	0,717	2,333	2,167	3,000



Obr.60: Graf znázorňující difuzní koeficienty vztažené k difuznímu koeficientu rozpouštědla za dané teploty; částice 0,5 μm

U nejnižších koncentrací agarosy (0,01% a 0,05%) nebyla pozorována žádná významná změna ve zkoumaném teplotním rozsahu. Tyto koncentrace agarosy v roztoku jsou pravděpodobně natolik nízké, že nedochází k žádné významné tvorbě gelové struktury, která by byla detekovatelná pomocí zvolených velikostí mikoreologických částic.

Oproti tomu 0,1% roztok agarosy vykazuje prudký nárůst poměrů difúzních koeficientů pro teplotu 25 °C. Můžeme tedy vyvozovat, že v teplotním intervalu 25 °C – 35 °C dochází k intenzivnímu proplétání řetězců agarosy ve strukturním rozsahu odpovídajícímu velikosti použitých částic.

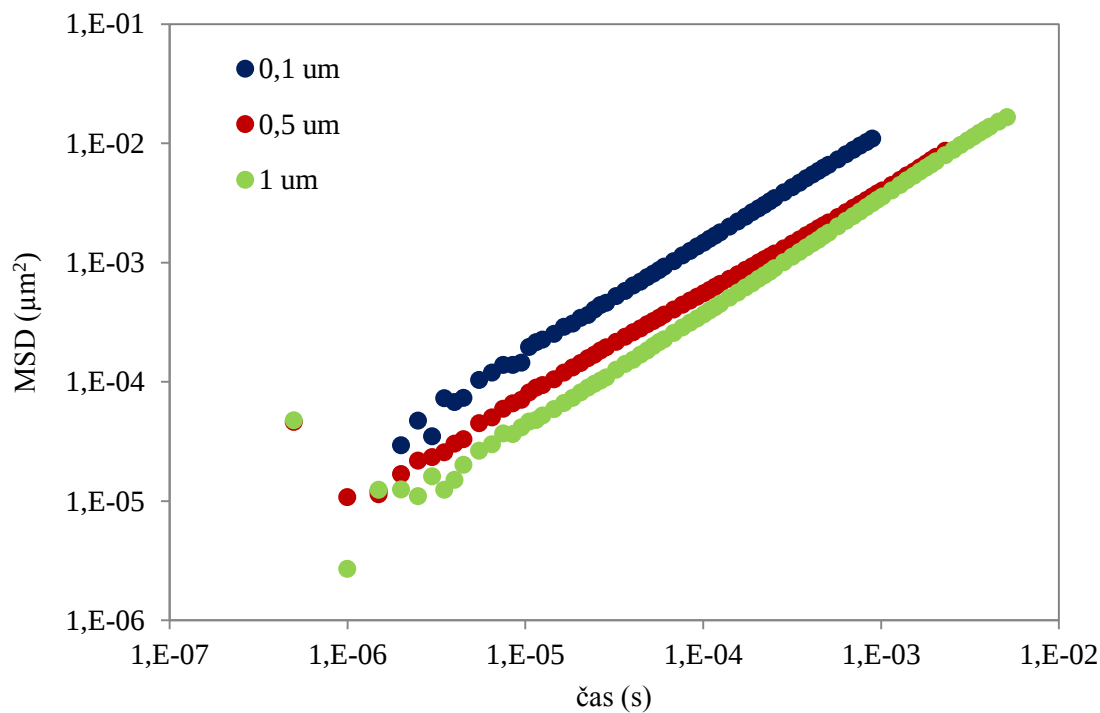
U 0,5% roztoku můžeme pozorovat mírný nárůst D/D_0 již při teplotě 35 °C. Rostoucí trend pak pokračuje se snižující se teplotou. U této koncentrace je možné konstatovat, že intenzivní proces gelace na úrovni detekovatelnosti 0,5 μm částic, nastává při teplotě okolo 35°C.

Roztok s nejvyšší koncentrací agarosy vykazuje velmi intenzivní znaky gelace již při teplotě 35°C a nejvyšší hodnotu D/D_0 při teplotě 25 °C.

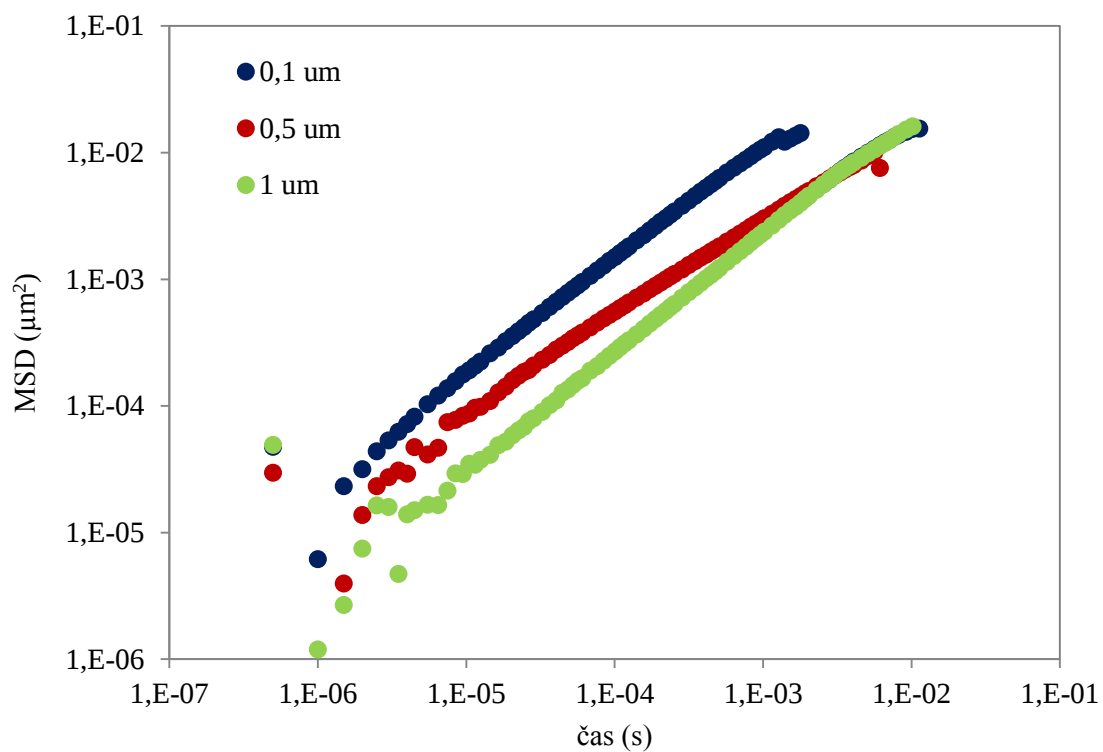
5.6.2 Porovnání velikostí částic

Pro předchozí měření byla a pouze jedna velikost částic o průměru 0,5 μm . V kapitole 2.8.1 popisující vliv velikosti částic na mikoreologická měření je patrné, že velikost částice může

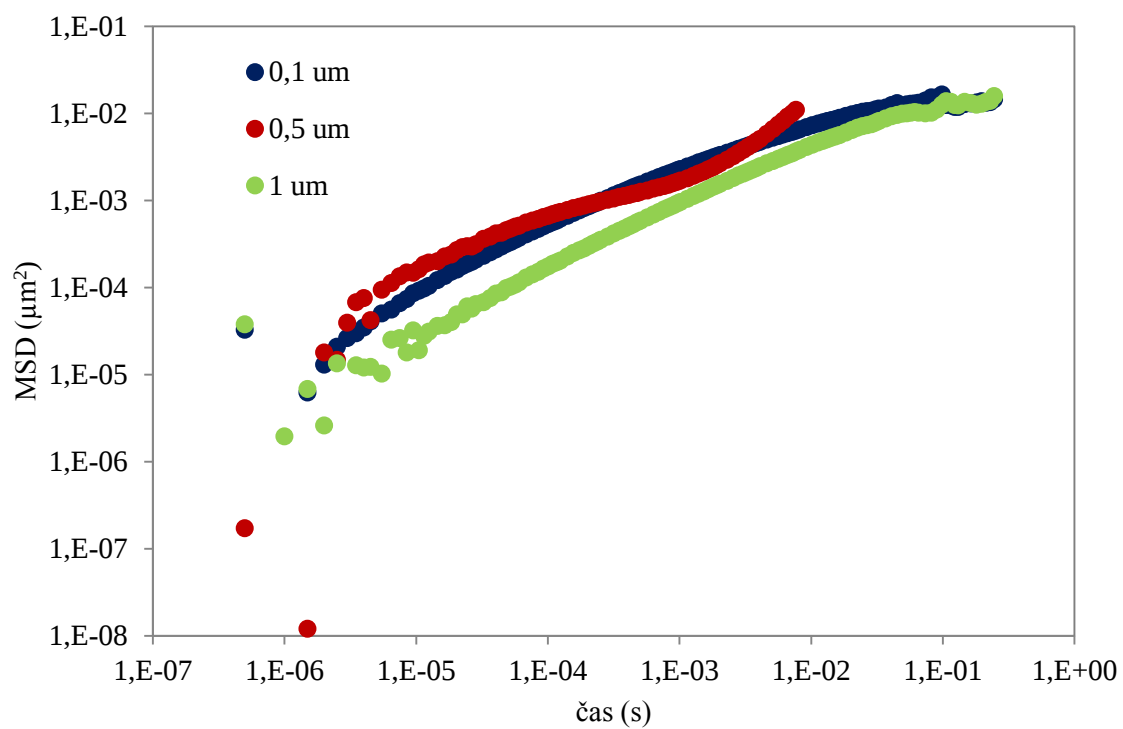
hrát podstatnou roli v získávání a následné interpretaci naměřených dat. Pro porovnání byly použity 3 velikosti částic (0,1 μm ; 0,5 μm a 1 μm) u 0,5% roztoku agarosy. Měření byla opět provedena ve stejném teplotním intervalu (25 $^{\circ}\text{C}$ – 85 $^{\circ}\text{C}$). U teplot 85 $^{\circ}\text{C}$ -55 $^{\circ}\text{C}$ nebyly pozorovány žádné zásadní rozdíly, proto jsou v grafech uvedeny křivky povídající teplotám nižším než 45 $^{\circ}\text{C}$.



Obr.61: $MSD(t)$ 0,1 μm , 0,5 μm a 1 μm částic v 0,5% roztoku agarosy při teplotě 45 $^{\circ}\text{C}$.



Obr.62: $MSD(t)$ $0,1 \mu\text{m}$, $0,5 \mu\text{m}$ a $1 \mu\text{m}$ částic v $0,5\%$ roztoku při teplotě $35 \text{ }^\circ\text{C}$.



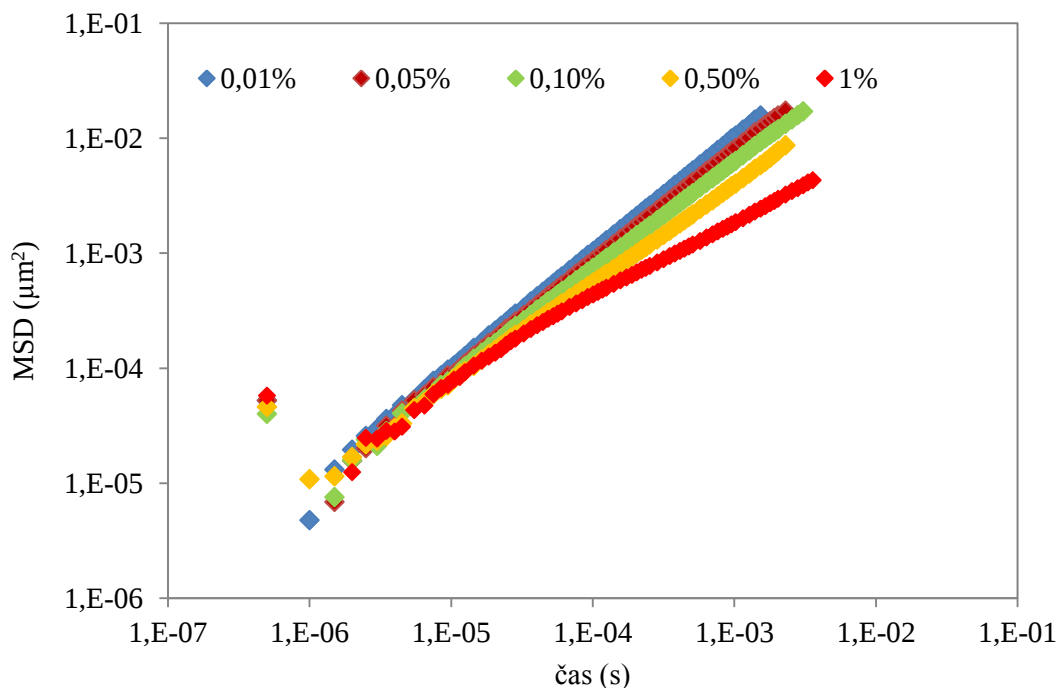
Obr.63: MSD $0,1 \mu\text{m}$, $0,5 \mu\text{m}$ a $1 \mu\text{m}$ částic v $0,5\%$ roztoku při teplotě $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

U výsledků naměřených při 45 °C je patrný rozdíl mezi středním posunem 0,1 μm částic vzhledem k ostatním dvěma velikostem. Větší částice jsou již schopny detekovat jemné tvořící se struktury. Pro 100 nm částice jsou však tyto struktury natolik rozsáhlé, že se většinou pohybují pouze v prostoru mezi jednotlivými řetězci, kde se nachází pravděpodobně jen samotné rozpouštědlo.

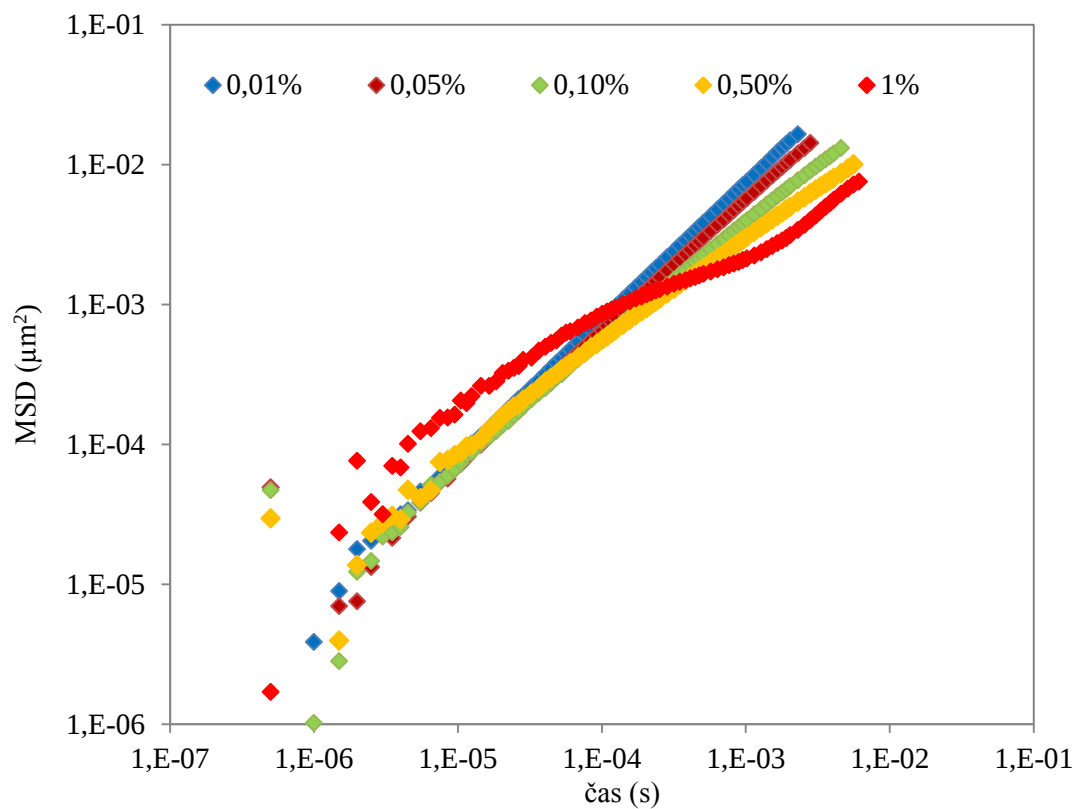
Data získaná měřením při teplotě 35 °C nevykazují velké rozdíly oproti 45 °C, kdežto u 25 °C jsou výsledky jednotlivých velikostí částic mnohem bližší. Tento jev poukazuje již na silně zesíťovanou strukturu agarosy, kdy i 100 nm částice svým pohybem detekují přítomnost okolní struktury vzniklého gelu. Tuto teorii podporují i tvary všech tří křivek, které již nejsou striktně lineární, jak tomu bylo v předchozích případech, ale jejich zaoblení ve vyšších časech charakterizuje přítomnost elastické složky zkoumaného materiálu.

5.6.3 Průběh gelace roztoků agarosy o různých koncentracích

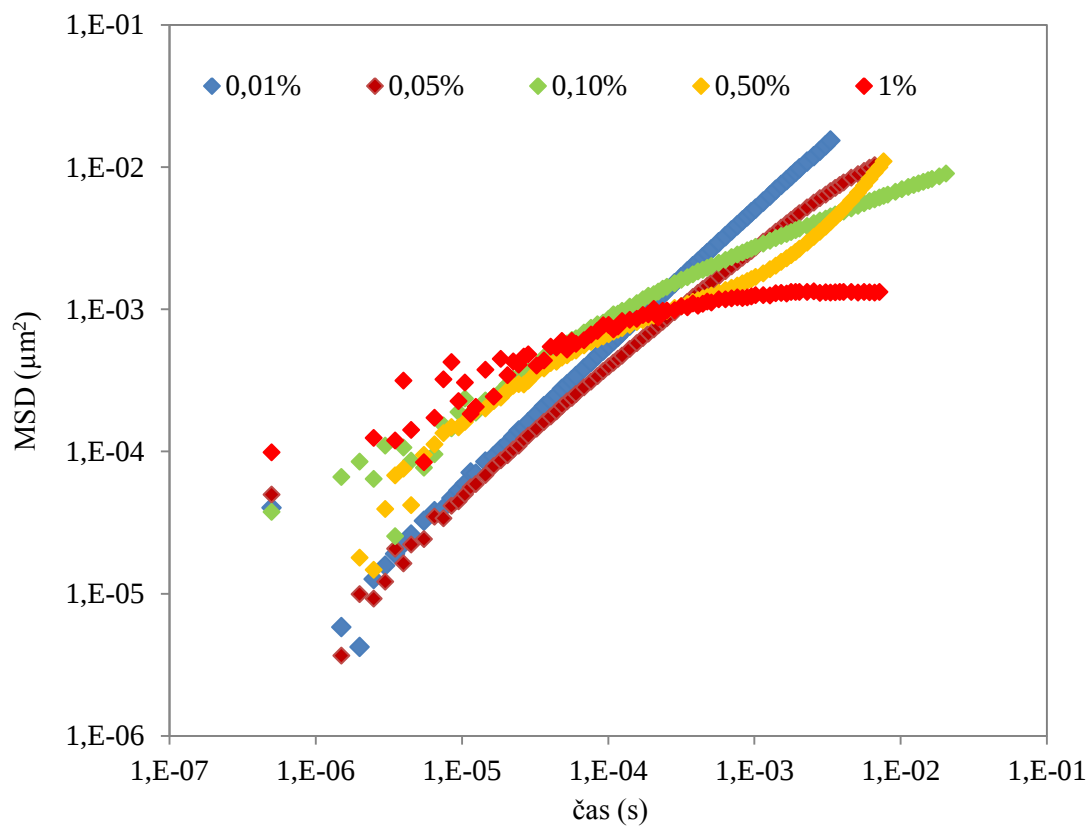
Pro sledování vlivu koncentrace roztoku agarosy na samotný proces gelace byla vytvořena koncentrační řada od 0,01% až po 1% roztok. Proces gelace byl opět sledován při snižování teplot od 85 °C do 25 °C. K vyhodnocení samotného procesu byly porovnávány především tvary vznikajících křivek, které charakterizují míru viskózních a elastických vlastností v okolním prostředí částic. Výsledky jsou znázorněny od 45°C, kdy byly pozorovány první náznaky tvorby gelové struktury agarosy v roztoku.



Obr.64: MSD koncentrační řady pro 45 °; 0,5 μm částice



Obr.65: MSD koncentrační řady pro 35 °C; 0,5 μm částice

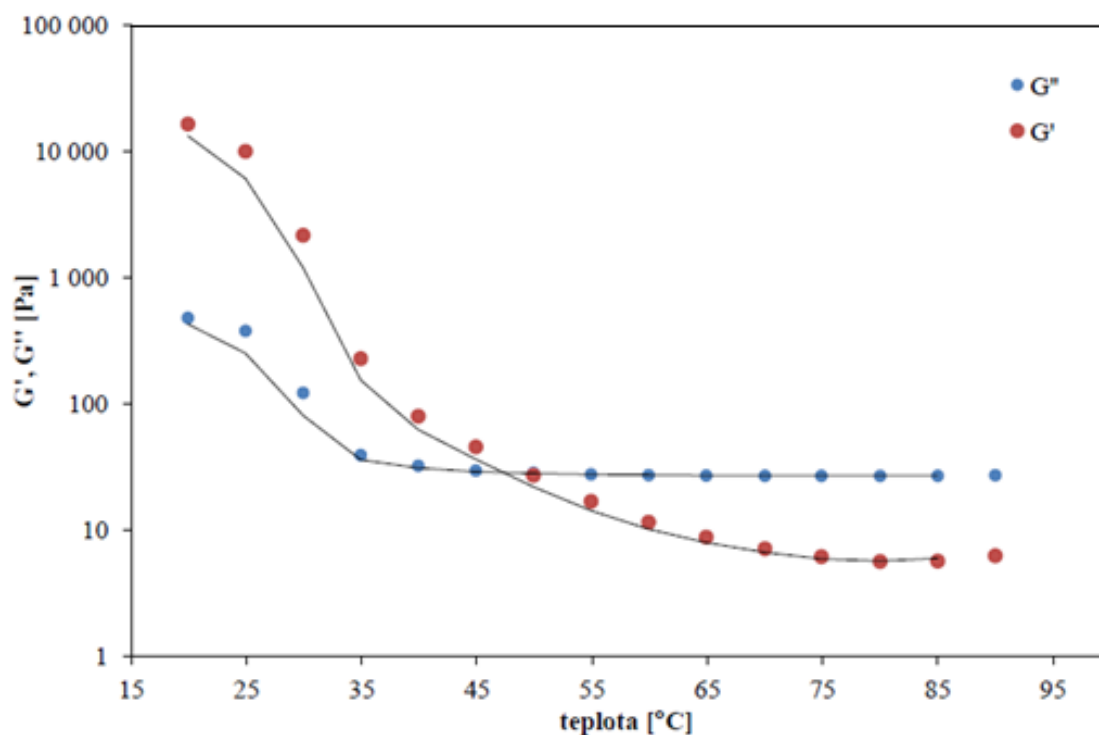


Obr.66: MSD koncentrační řady pro 25 °C; 0,5 μm částice

Při teplotě 45 °C nejsou viditelné žádné rozdíly MSD funkcí pro nízké koncentrace (0,01% - 0,1%). V těchto případech částice odrážejí vlastností samotného rozpouštědla, jelikož gelová struktura není ještě dostatečně vytvořena. Pouze u 1% roztoku agarosy jsou schopny 0,5 μm částice detekovat jemnou vznikající strukturu agarosové sítě – křivka v oblasti vyšších časů mění tvar a odklání se od linearity.

Po ochlazení roztoků na 35°C je možné pozorovat jemné odklání křivek pro jednotlivé koncentrace charakterizující vznikající jemnou strukturu. U 1% roztoku je viditelný vznik esovité křivky, kdy plató odráží přítomnost elastické složky okolního materiálu. Vznik gelovité struktury je nejpatrnější po ochlazení roztoků agarosy na 25 °C. Esovitý tvar křivky se objevuje již u koncentrace agarosy 0,5%, kde je vidět poměr elastické a viskózní složky zkoumaného materiálu. Pohyb 0,5 μm částic v 1% roztoku agarosy je již značně omezen vzniklou síťovou strukturou. Křivka středního posunu částice v čase svým tvarem poukazuje na převahu elastické složky okolního prostředí.

Pro porovnání byl vzorek 1% roztoku agarosy proměřen také pomocí klasické reologie.



Obr.67: Závislost viskoelastických modulů na změně teploty pro 1% koncentraci agarosy

Z průběhů křivek elastického a ztrátového modulu vznikl průsečík charakterizující bod gelace. Pro hydrogel o koncentraci agarosy 1% byla stanovena teplota gelace 47 °C. Z DLS měření 1% roztoku agarosy s použitím 0,5 μm částic je patrné, že k procesu gelace dochází

okolo 45 °C, kdy MSD křivky svým tvarem poukazují na přítomnost elastické složky v roztoku.

5.7 Aplikace mikrореologie ke studiu vlastností mezifázového rozhraní

Mezifázová rozhraní hrají dominantní roli v chování mnoha komplexních tekutin a jsou považována za klíčové faktory stability pěn, emulzí, kompatibilizaci polymerních směsí a mnoha dalších důležitých technologických materiálů [119]. Viskoelastické vlastnosti povrchů jsou běžně studovány pomocí klasické reologie. V posledních letech vstupuje do obliby metoda mikrореologická s použitím měřicích sond, využívající se v systémech pro cílenou distribuci léčiv, stabilizaci pěn a emulzí či produkce zmrzliny. Interakce sond na mezifázovém rozhraní jsou komplexnější než v roztoku. Dynamické vlastnosti částic na povrchu jsou silně ovlivněny přímými mezičásticovými silami jakou jsou kapilární, stérické, elektrostatické či van der Waalsovy a komplikovanými hydrodynamickými interakcemi, které zprostředkovává okolní tekutina. Pro měření mezifázových rozhraní jsou vhodné jak aktivní mikrореologické metody (Magnetic Nanowire microrheology) [120] či metody založené na rozptylu světla [121], tak také pasivní metody, které jsou aplikovány ke studiu těchto systémů i v této práci, a to pomocí video - particle tracking microrheology (VPTM).

Difuze částic v třidimenzionálním systému je známá již od roku 1905 [121],[123], kdy bylo dokázáno, že pohyb částice v kapalině je úměrný viskozitě dané kapaliny a tento pohyb byl také dostatečně matematicky popsán. Jak se však bude částice chovat v 2D systému, kterým může být lipidová vrstva na mezifázovém rozhraní kapalina - vzduch [123] či lipidové vrstvy v buněčných membránách [124]?

Pro částice zachycené na mezifázovém rozhraní je Einsteinova rovnice stále platná. Nicméně, nemůže být použita Stokesova rovnice pro výpočet frikčního koeficientu a odvození povrchové viskozity. Frikční koeficient je funkcí viskozity fází, geometrie částice, kontaktním úhlu mezi částicí a povrchem a dalších. Neexistuje řešení pro rovnici pomalého viskózního toku rovnovážného translačního pohybu částice v ideální 2D kapalině (Stokesův paradox). Tento problém jako první vyřešili Saffman a Delbrück, kteří uvažovali disk o poloměru a pohybující se viskózní membránou o tloušťce h . Pracovali s membránou o konečné velikosti a oběma fázemi obklopující membránu jako nekonečnými vodními fázemi [126]. Pro jednočásticovou mikrореologii 2D povrchu platí pro výpočet MSD vztah $\langle \Delta r^2 \rangle = \frac{k_B T}{\pi \eta_s} \tau$, kde η_s je viskozita na mezifázovém rozhraní.

Ve většině případů je však striktní dvoudimenzionální povrch pouze idealizací, a ve skutečnosti je tento 2D systém obklopen okolní 3D kapalinou [124] Pro tento případ je nutno pro výpočet MSD použít modifikovaný Stokes-Einsteinův vztah [128]:

$$\langle \Delta r^2(\tau) \rangle = 4D'_s \tau \quad (59)$$

kde $D'_s = D_s [\ln(2\eta_s/\eta a) - \gamma_E + O(\eta a/\eta_s)]$ a $D_s = k_B T / 4\pi\eta_s a$ γ_E je Eulerova konstanta a nabývá hodnoty $\gamma_E = 0.577$. Tato rovnice odvozena Saffmanem a Delbrückem pro případ, že platí $\eta_s/\eta a \gg 1$ byla modifikována Hughesem [128] také pro limitní případ, kdy $\eta_s/\eta a \gg 1$. Tato rovnice byla využita k popisu různých biologických systémů [129],[130],[131] a v našem případě byla použita pro výpočet viskozity z jednočásticové mikreologie [133].

Pro studium mezifázového rozhraní byl použit roztok proteinu HSA (human serum albumin). HSA je nejhojnější protein v krevní plazmě. Jeho běžná koncentrace je okolo 42 g/l a tvoří 60 % všech plazmatických proteinů. Albumin představuje hlavní bílkovinu, která udržuje osmotický tlak krve. Je přítomen také v lymfatickém systému a malé množství se vyskytuje také v kůži. Kromě osmoregulační funkce je albumin i důležitým transportním proteinem. Mastné kyseliny, aminokyseliny, steroidní hormony, některé těžké kovy, ale i řada léků je distribuována v těle pomocí vazby na albumin.

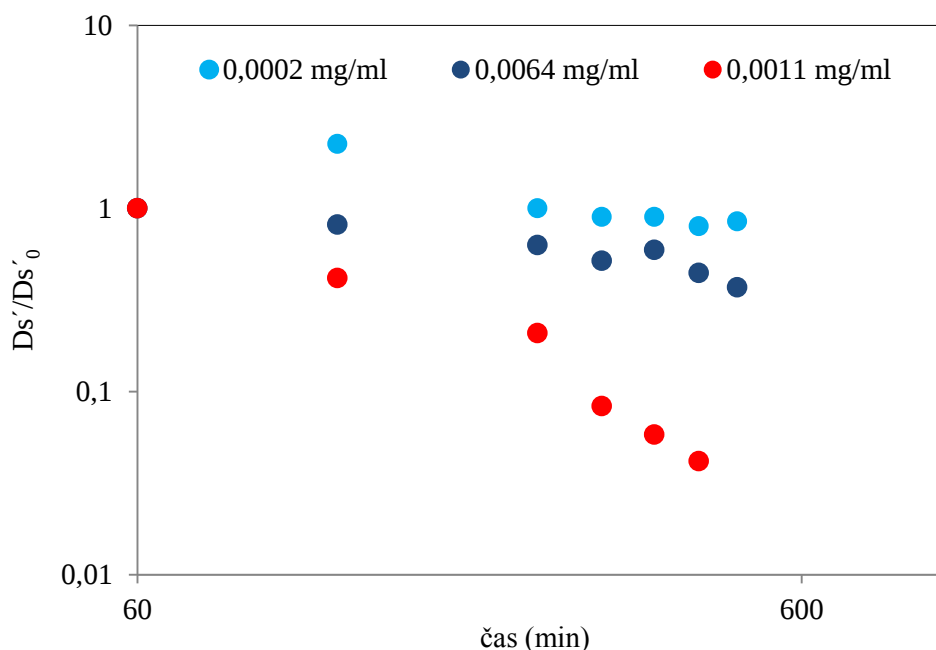


Obr.68: Struktura HSA

Molekuly HSA difundují na rozhraní kapalina - vzduch a tvoří zde tenkou proteinovou vrstvu (cca 3 nm) a dochází také k vytvoření povrchové viskozity [134].

5.7.1 Změna viskozity mezifázového rozhraní v čase

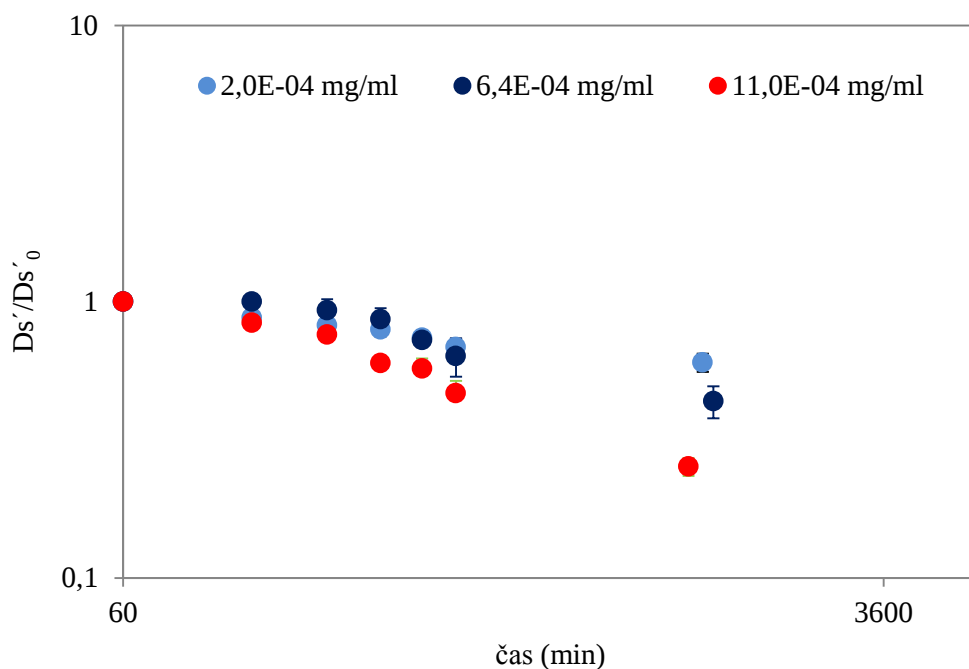
Uvažujeme-li homogenní roztok HSA, který tvoří se vzduchem mezifázové rozhraní kapalina - plyn, pak koncentrace tohoto proteinu na mezifázovém rozhraní v čase roste, a tím se zvyšuje také jeho viskozita. Pro samotné výpočty byl zaveden předpoklad, že viskozita zásobního roztoku je zanedbatelná vzhledem k viskozitě vody a je teda rovna $\eta = 1 \text{ mPa}$.



Obr.69: Hodnoty Ds'/Ds'_0 v čase pro tři různé koncentrace HSA roztoků (měřeno Emory University)

Z naměřených výsledků je patrná zvyšující se koncentrace molekul HSA na mezifázovém rozhraní kapalina – plyn. Jak je vidět na obrázku 69. Koncentrace roztoku HSA má podstatný vliv na rychlost tvorby povrchové vrstvy a tím na změnu viskoelastických vlastností povrchu. Se zvyšujícím se časovým úsekem měření (60 – 600 minut) dochází k poklesu uniformovaného difuzního koeficientu Ds'/Ds'_0 tím rychleji, čím je vyšší koncentrace roztoku HSA. Na povrchu dochází ke zvyšování koncentrace molekul HSA a měřicí sondy se pohybují pomaleji vlivem zvyšující se viskozity mezifázového rozhraní, jak bylo předpokládáno.

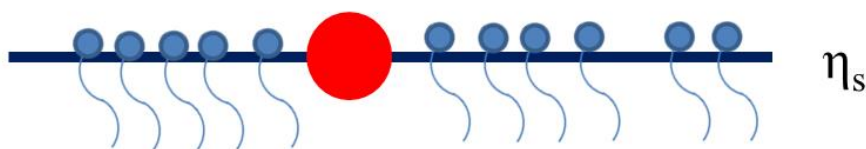
Výše uvedená data byla získána během stáže na Emory University v Atlantě s místním dostupným materiálem, měřicími částicemi a přístrojovým vybavením. Na stejném principu byla měření opakována také na fakultě chemické na základě dostupných materiálů a přístrojové techniky. Jak materiál, tak měřicí částice a přístrojová technika byly mírně odlišné. Základním rozdílem byla velikost měřicích částic (Emory University – 1,4 μm ; FCH – 1 μm) a použitý materiál (Emory – human serum albumin; FCH – bovine serum albumin). Zásadě by se však tyto proteiny neměly nijak lišit.



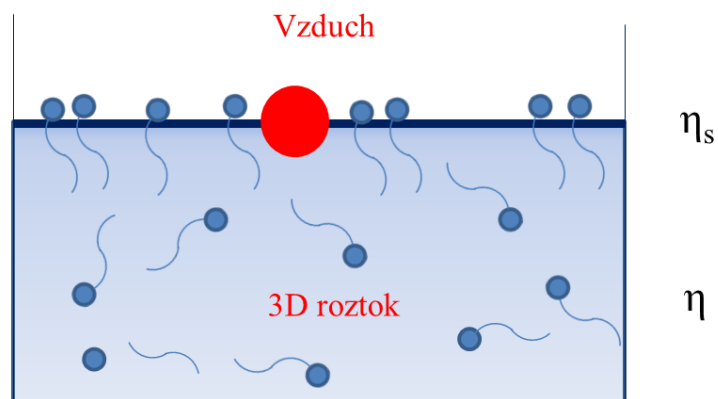
Obr.70: Hodnoty Ds'/Ds'_0 v čase pro tři různé koncentrace BSA roztoků (měřeno FCH VUT)

U výsledků, které byly opakovány na fakultě chemické VUT je patrný stejný trend, jako v předchozím případě. S rostoucím časem tedy docházelo k poklesu hodnot Ds'/Ds'_0 v závislosti na koncentraci roztoku HSA. Vzhledem k výsledkům získaných na Emory University, není rozdíl hodnot mezi jednotlivými koncentracemi tak výrazný, jak v předchozím případě. Tato skutečnost může být ovlivněna mnoha faktory ovlivňující měření. Nejpodstatnější roli však může hrát samotný použitý protein (BSA místo HSA) či rozdílná velikost použitých částic. Větší částice jsou schopny dříve detekovat zvyšující se koncentraci proteinu na mezifázovém rozhraní.

5.7.2 Vliv výšky roztoku na viskozitu mezifázového rozhraní



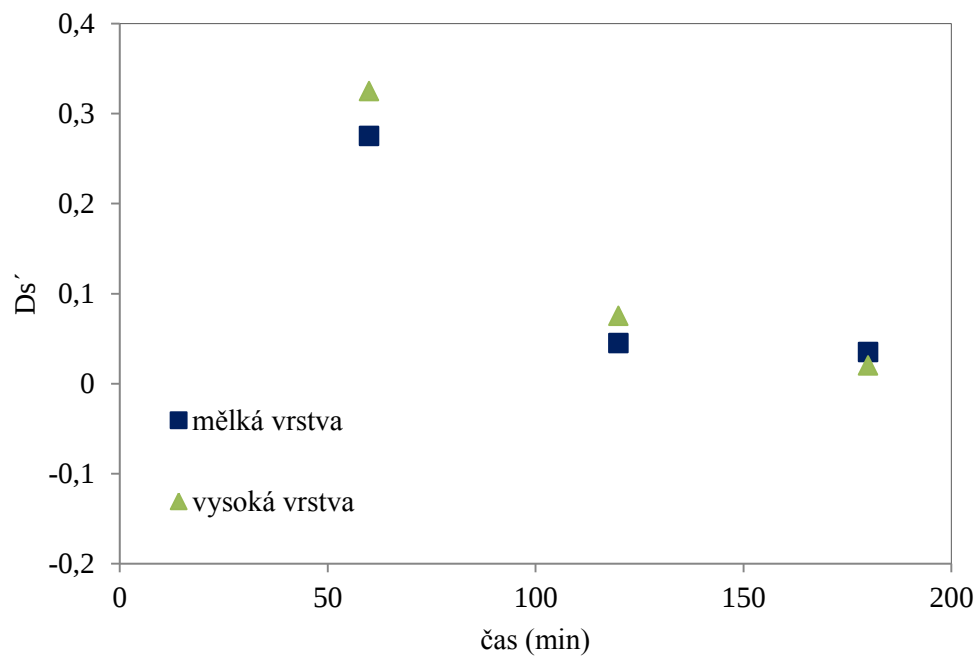
Obr.71: 2D membrána na mezifázovém rozhraní tvořena proteiny



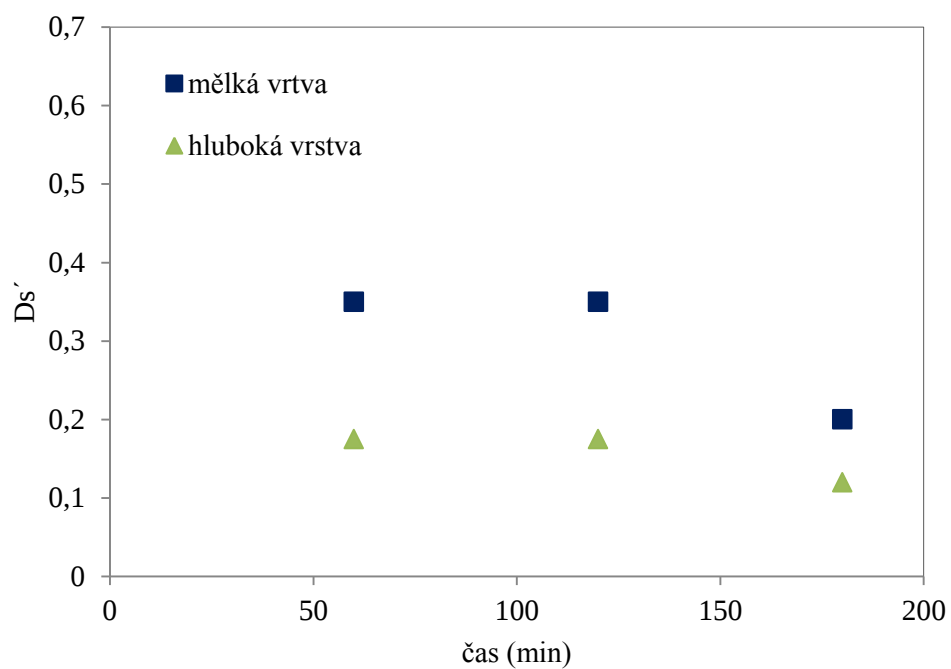
Obr.72: 2D systém obklopen 3D roztokem

Podle Seki a kol. [135] je však viskozita membrány oddělující odlišné fáze závislá nejen na samotné membráně, ale také na množství, respektive šířce vrstvy 3D systému obklopující danou membránu, tedy jejího okolí. Na základě svých studií interakcí mezi membránou a vrstvou roztoku libovolné výšky, došli k závěru: Obecně platí, že difuzní koeficient částice v membráně se snižuje se snižující se výškou 3D vrstvy okolního roztoku [136]. Přítomné rozpouštědlo indukuje tah oproti toku membrány a výsledkem je potlačení difuze částic v membráně. Samotný tah se zvyšuje se snižující se vzdáleností mezi membránou a substrátem. Přes mnoho studií, které již byly provedeny, Brownův pohyb částic v kapalně membráně ještě nebyl zcela detailně vysvětlen [137].

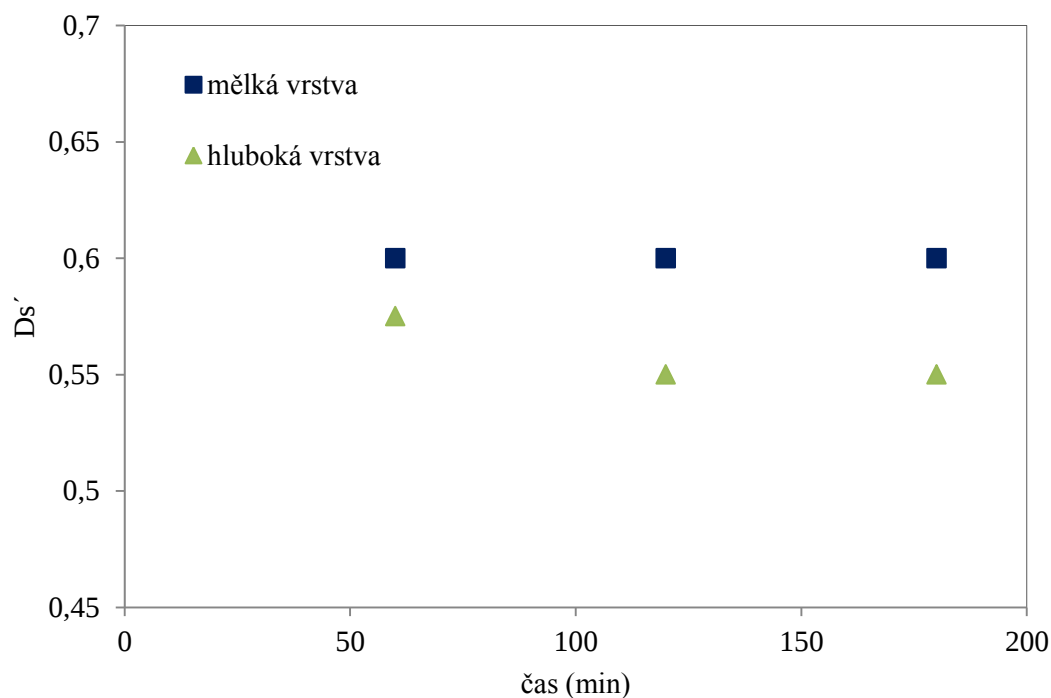
Na základě těchto teorií bylo provedeno měření difuzních koeficientů částic začleněných na mezifázovém rozhraní pro 3 různé koncentrace roztoku HSA a rozdílné výšky vrstvy rozpouštědla. Pro zjednodušení měření byla vytvořena speciální cela, kde mohlo docházet k měření difuzních koeficientů částic v blízkosti dvou odlišně vysokých vrstev rozpouštědla (viz. kapitola 4. Materiály a metody)



Obr.73: Závislost difuzního koeficientu na čase pro mělkou a hlubokou část vzorku,
 $c = 11e-4 \text{ mg/ml}$



Obr.74: Závislost difuzního koeficientu na čase pro mělkou a hlubokou část vzorku,
 $c = 6,4e-4 \text{ mg/ml}$



Obr.75: Závislost difuzního koeficientu na čase pro mělkou a hlubokou část vzorku, $c = 2,2 \cdot 10^{-4}$ mg/ml

Podle teoretických předpokladů, by v případě přítomnosti většího množství rozpouštědla, tedy vyšší vrstvy rozpouštědla pod membránou, mělo docházet k potlačení difúze částic začleněných v membráně. Na základě výsledků získaných měřeními tří různých vodných roztoků HSA byl tento trend lehce patrný u roztoků s nižší koncentrací. U koncentrovanějších roztoků se tento trend nepotvrdil a hodnoty difuzních koeficientů byly totožné jak v případě nízké, tak v případě vyšší vrstvy.

Vzhledem k tomu, že jsme byli schopni v tomto měření dosáhnout nejnižší možné hodnoty výšky roztoku okolo 150 μm a použité měřicí částice měly průměr $d = 1 \mu\text{m}$ je pojem tenké vrstvy velmi relativní. I tato šířka mohla být vzhledem k šířce vrstvy proteinu na povrchu definovaná jako široká.

6 ZÁVĚR

Mikroreologie představuje nové a v lecčem velmi přínosné přístupy ke studiu reologických vlastností nejrozličnějších materiálů. Oproti klasické reologii vyniká převážně z pohledu množství vzorku nutného pro měření, kde jsme prakticky i z jedné jediné kapky (10 μm) materiálu schopni získat mnoho důležitých informací. Možnost měření nehomogenních vzorků či konkrétních oblastí daného materiálu také staví mikroreologii do popředí reologických metod. V mnoha případech může mikroreologie představovat vhodou doplňkovou metodu ke klasické reologii pro získání většího rozsahu užitečných dat.

Cílem této dizertační práce bylo studium jednotlivých pasivních mikroreologických metod, jejich zavedení na fakultě chemické a možnosti aplikovatelnosti těchto metod ke studiu vlastností biopolymerních systémů.

V rámci dizertační práce byly využity nejen stávající přístroje a programy, ale ve spolupráci s Biofyzikálním ústavem Akademie věd a Fakultou informatiky na Masarykově univerzitě byl také vytvořen Matlab skript pro jednoduché vyhodnocení vizkozity vzorku z video – mikroreologie.

Několik metod pasivní mikroreologie bylo zavedeno na fakultě chemické VUT v Brně. Mezi ně patří optická video – mikroreologie pomocí mikroskopu a vysokorychlostní kamery s využitím několika vyhodnocovacích softwarů, DLS mikroreologie a také jedna z nejnovějších a nejpokročilejších technik - FCS mikroreologie, jejíž možnosti využití obecně ještě nejsou příliš prozkoumány.

Metody pasivní mikroreologie byly aplikovány ke studiu roztoků či gelů kyseliny hyaluronové, ke studiu procesu gelace agarosy či ke studiu vlastností mezifázového rozhraní. U většiny těchto systémů byly výsledky porovnávány daty získanými klasickou reologií. V mnoha případech, převážně u homogenních vzorků byla dosažena velmi dobrá shoda těchto výsledků. Naopak u vzorků nehomogenních byly pomocí mikroreologických metod získány další informace, které mohou vést k odhalení mikrostruktury zkoumaného vzorku.

Každá z použitých metod vykazuje jisté výhody či nevýhody oproti ostatním mikroreologickým technikám. Ne všechny je však možné použít pro měření jakéhokoliv vzorku. Volba správné metody či mikroreologických částic má na získání relevantních dat velký vliv. Důkladná znalost těchto metod je velmi kritická nejen pro samotné měření, ale také pro vyhodnocování interpretaci získaných dat.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Bekah, D.: *Measurement of viscoelastic properties of treated and untreated cancer cells using passive microrheology*. Toronto, 2010. Dizertační práce na Ryerson University. Vedoucí práce: Michael C. Kolios.
- [2] Yao, A., Tassieri, M., Padgett, M., Cooper, J.: Microrheology with optical tweezers. *Lab on a Chip*. 2009, roč. 9, č. 17, s. 2568-2575.
- [3] Levine, A., Lubensky, T. C.: One- and two-particle microrheology, *Phys. Rev. Lett*, 2000, č. 85, s. 1774–7.
- [4] Wirtz, D.: Particle-Tracking Microrheology of Living Cells: Principles and Applications. *Annual Review of Biophysics*. 2009, roč. 38, č. 1, s. 301-326.
- [5] Wu, Ch., Song, Y. Dai, L. L.: Two-particle microrheology at oil-water interfaces. *Applied Physics Letters*. 2009, roč. 95, č. 14, s. 14410-14420.
- [6] Sarmento-Gomez, E., Montalvan-Sorrosa, D., Garza, C., Mas-Oliva, C., Castillo, R.: Rheology and DWS microrheology of concentrated suspensions of the semiflexible filamentous fd virus. *The European Physical Journal E*. 2012, roč. 35, č. 5
- [7] Hemar, Y., Pinder, D. N.: DWS Microrheology of a Linear Polysaccharide. *Biomacromolecules*. 2006, roč. 7, č. 3, s. 674-676.
- [8] Harden, J. L., Viasnoff, D.: Recent advances in DWS-based micro-rheology. *Current Opinion in Colloid*. 2001, roč. 6, s. 438-445.
- [9] Cicuta, P., Donald, A. M: Microrheology: a review of the method and applications. *Soft Matter*. 2007, roč. 3, č. 12, s. 1449-1455.
- [10] Gardel, M. L., Valentine, M. T., Weitz, D. A: Microrheology. In *Microscale Diagnostic Techniques*, 1. vydání KS Breuer, 2005, s. 1-50.
- [11] Mason, T. G., Ganesan, K., vanZanten, J. H., Wirtz, D., and Kuo, S. C.: Particle tracking microrheology of complex fluids. *Physical Review Letters*, 1997, roč. 79, č. 17, s. 3282-3285.
- [12] Crocker, J. C., Valentine, M. T., Weeks, E. R., Gisler, T., Kaplan, P. D., Yodh, A. G., Weitz, D. A.: Two-point microrheology of inhomogeneous soft materials, *Physical Review Letters*, 2000, roč. 85, č. 4, s. 888-891.

- [13] Pine, D. J., Weitz, D. A., Chaikin, P. M., and Herbolzheimer, E.: Diffusing wave spectroscopy. *Phys. Rev. Lett.*, 1988, ročník 60, č. 12, s. 1134-1137
- [14] Maret, G., Wolf, P.: Multiple light scattering from disordered media. The effect of Brownian motion of scatterers. *Zeitschrift für Physik B Condensed Matter*, 1987, ročník 65, č. 4, s. 409 - 413.
- [15] Atakhorrami, M.: *High-bandwidth microrheology of complex fluids and biopolymer networks*. Vrije, 2006. Dizertační práce na University of Vrije Amsterdam, Vedoucí práce: Simon Tindemans.
- [16] Brown, R.: A brief account of microscopical observations made in the months of June, July and August, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies. *Philosophical Magazine*, 1828, č. 4, s. 161–173.
- [17] Einstein, A.: *Investigations on the theory of Brownian movement*. New York: Dover Publications, 1956, New York, ISBN 04-866-0304-0.
- [18] Perrin, J. B.: Discontinuous Structure of Matter. *Nobel Lecture*, 1926.
- [19] Haw, M. D.: Colloidal suspensions, Brownian motion, molecular reality: a short history. *Journal of Physics: Condensed Matter*. roč. 14, č. 33, s. 7769-7779.
- [20] Perrin, J.: *Les atomes*. Paris: Flammarion, c1991, s. 292, Champs. ISBN 20-808-1225-4.
- [21] Bradley, W., Keen, S., Philipus J., Hemar, Y., Martin, A. K.: A Practical Review of Microrheological Techniques. *Rheology - New Concepts, Applications and Methods*. InTech, 2013, ročník 2, č. 13.
- [22] Bekah, D.: *Measurement of viscoelastic properties of treated and untreated cancer cells using passive microrheology*. Toronto, 2010. Disertační práce na Ryerson University. Vedoucí práce: Michael C. Kolios
- [23] Tien – Nang Chen, D.: *Microrheology of soft matter*, Dizertační práce na University of Pennsylvania, 2010, 171 s. Vedoucí práce: Arjun G. Yodh.
- [24] Yixuan, L.: *Linking particle dynamics to intracellular micromechanics in living cells*. Entchede, 2009. Dizertační práce na University Twente. Vedoucí práce: prof. Dr. H. Brinksma.

- [25] Howard, J.: *Mechanics of motor and the cytoskeleton*, 2. Vydání, 2011, Sinauer Associated, Publishers, s. 384.
- [26] Mansel, B. W.: *Setup and calibration of a suite of state-of-the art microrheology techniques*. New Zeland, 2011. Dizertační práce na Massey University. Vedoucí práce Bill Williams.
- [27] Squires, T. M., Mason. T. G.: Fluid Mechanics of Microrheology. *Annual Review of Fluid Mechanics*. 2010, vydání 42, č. 1, s. 413-438.
- [28] Bracewell, R. N.: *The Fourier transform and its applications*. 3. vydání. New York: McGraw-Hill, c 1988, 616 s. ISBN 00-730-3938-1.
- [29] Mason, T. G., Weitz, D. A.: Optical measurements of frequency-dependent linear viscoelastic moduli of complex fluids, 1995, *Phys. Rev. Lett.*, č. 74, s. 1250-1270.
- [30] Levine, A., Lubensky, T.: Response function of a sphere in a viscoelastic two-fluid medium. *Physical Review Lett.* 2001, ročník. 63, č. 4.
- [31] Marple, S.: *Digital spectral analysis: with applications*. Englewood Cliffs, N.J.: Prentice-Hall, 1987, 492 p. ISBN 01-321-4149-3.
- [32] Schnurb, B., F. Gittes, F.C. MacKintosh a F.C. Schmidt: Detemining microscopic viscoelasticity in flexible and semiflexible polymer networks from thermal fluctuations. *Macromolecules*. 1997, č. 30, s. 7781-7792
- [33] Mason, T.G.: Estimating the viscoelastic moduli of complex fluids using the generalized Stokes-Einstein equation. *Rheo Acta*. 2000, č. 39, s. 371-378.
- [34] Waigh, T.A.: Microrheology of complex fluids. *Reports on progress in physics*. 2005, č. 68, s. 685-742.
- [35] Ferry, J. D. Viscoelastic properties of polymers. 3. vydání. New York: John Wiley, 1980, 641 s. ISBN 04-710-4894-1.
- [36] Bird, R. Dynamics of polymeric liquids. 2 vydání, New York: Wiley, 1977, s. 773. ISBN 04-710-7375-X
- [37] Corrigan, A. M., Donald, A. M.: Lengthscale dependence of critical exponents determined by vibration-corrected two-particle microrheology. *Soft Matter*. 2010, roč. 6, č. 17, ISSN s. 1744-1683

- [38] Valentine, M. T., Perlman, Z.E, Gardel, M. L., Shin, J. H, Matsudaira, P., Mitchison, T. J., Weitz, D. A.: Colloid Surface Chemistry Critically Affects Multiple Particle Tracking Measurements of Biomaterials, *Biophysical Journal*. 2004, roč. 86, č. 6, s. 4004-4014. ISSN 00063495.
- [39] Prasad, V., Koehler, S., Weeks, E.: Two-Particle Microrheology of Quasi-2D Viscous Systems. *Physical Review Letters*. 2006, roč. 97, č. 17, ISSN 0031-9007.
- [40] Crocker, J.C., Hoffman, B.F.: Multiple-particle tracking and two-point microrheology in cells. *Methods in cell biology*, 2007, vol. 83, s. 141–178.
- [41] Waigh, T.A.: Microrheology of complex fluids. *Reports on progress in physics*. 2005, č. 68, s. 685-742.
- [42] LS Instruments: Dynamics Light Scattering: Measuring the Particle Size Distribution [online], 2016, [cit. 15.2.2016], dostupné z: <http://pssnicomp.com/definitions/dynamic-light-scattering>
- [43] Malvern instruments: An introduction to DLS microrheology [online], 2016 [cit. 7.2.2016], <http://www.malvern.com/en/products/measurement-type/microrheology/>
- [44] Solomon, M. J., Lu, Q.: Probe size effects on the microrheology of associating polymer solutions. *Physical Review E*, 2002, ročník 6.
- [45] Larsson, M., Rega, C. A., Duffy, J., Jankevics, H.: Detection of viscoelasticity in aggregating dilute protein solutions through DLS-based optical microrheology. *Annual transaction of the nordic rheology society*, 2012, ročník 20, s. 18.
- [46] Peters, R.: *Fiber optic device for detecting the scattered light or fluorescent light from a suspension*. Patent, 2000, s. 9.
- [47] Dasgupta, B., Tee, S.Y, Crocker, J., B. Frisken, B., Weitz, D.: Microrheology of polyethylene oxide using diffusing wave spectroscopy and single scattering. *Physical Review E*. 2002, roč. 65, s. 5.
- [48] Rathgeber, S., Beauvisage, H. J., Hubert Chevreau, N., Willenbacher, H, Oelschlaeger, C.: Microrheology with Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Langmuir*, 2009, ročník 25, číslo 11, s. 6368-6376.

- [49] Koynov, K., Butt, H.J.: Fluorescence correlation spectroscopy in colloid and interface science. *Current Opinion in Colloid*. 2012, ročník 17, číslo 6, s. 377-387.
- [50] Squires, T. M., Mason, T. G.: Fluid Mechanics of Microrheology. *Annual Review of Fluid Mechanics*. 2010, roč. 42, č. 1, s. 413-438
- [51] Sprakel, J., Van Der Gucht, J. a Martien A. Stuart, C.: Brownian particles in transient polymer networks. *Physical Review E*. 2008, . vydání. 77, č. 6.
- [52] Jensen, E. C., Yan, Y., Marriot, G., Bright, R. Right, G.W., Fisher, W. J. R .: Types of Imaging, Part 2: An Overview of Fluorescence Microscopy. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*. 2012, vydání. 295, č. 10, s. 271-306.
- [53] LS Instruments: Diffusing wave spectroscopy, [online]. 2016 [cit. 7.2.2016], dostupné z: http://www.lsinstruments.ch/technology/diffusing_wave_spectroscopy_dws/
- [54] Moschakis, T.: Microrheology and particle tracking in food gels and emulsions. *Current Opinion in Colloid*. 2013, vydání 18, č. 4, s. 311-323.
- [55] Valentine, M., Kaplan, P., Thota, D., Crocker, J., Gisler, T., Pruda, M., Beck, M., Weitz, D.: Investigating the microenvironments of inhomogeneous soft materials with multiple particle tracking. *Physical Review L*. 2001, vydání 64, č. 6.
- [56] Suh, J. Real-time multiple-particle tracking: applications to drug and gene delivery. *Advanced :Drug Delivery Reviews*. 2005, vydání 57, č. 1, s. 63-78.
- [57] Cooper, E.C, Johnson, P., Donald, A. M.: Probe diffusion in polymer solutions in the dilute/semi-dilute crossover regime: 1. Poly(ethylene oxide). *Polymer*. 1991, vydání 32, č. 15, s. 2815-2822.
- [58] Bradley, W., Keen, S., Philipus J., Hemar, Y., Martin, A. K.: A Practical Review of Microrheological Techniques. *Rheology - New Concepts, Applications and Methods. InTech*. 2013, ročník 2, č. 13.
- [59] Larsen, T. H.: *Microrheology of responsive hydrogels*. Newark 2009. Dizertační práce na University of Delaware. Vedoucí práce: Eric M. Furst, 272 s.
- [60] Dasgupta, B., Tee, S. Y., Crocker, J., Frisken, N., Weitz, D.: Microrheology of polyethylene oxide using diffusing wave spectroscopy and single scattering. *Physical Review E*. 2002, roč. 65, č. 5.

- [61] McGrath, J. L., Hartwing, J. H., Kuo, S. C.: The Mechanics of F-actin Microenvironments depend on the chemistry of probing surfaces. *Biophysical Journal*. 2000, č. 79, s. 3258-3266.
- [62] Moschakis, T.: Microrheology and particle tracking in food gels and emulsions. *Current Opinion in Colloid*. 2013, vydání 18, č. 4, s. 311-323.
- [63] Caggioni, M., Spicer, P. T., Blair, D. L., Lindberg, S. E., Weitz, D. A.: Rheology and microrheology of a microstructured fluid: The gellan gum case. *Journal of Rheology*. 2007, vydání 51, č. 5, s. 851-866
- [64] Liu, J., Gardel, M., Kroy, K., Frey, E., Hoffman, B., Crocker, J., Bausch, A., Weitz, D.: Microrheology Probes Length Scale Dependent Rheology. *Physical Review Letters*. 2006, vydání 96, č. 11.
- [65] Corrigan, A. M., Donald, A. M.: Particle tracking microrheology of gel-forming amyloid fibril networks. *The European Physical Journal E*. 2009, roč. 28, č. 4, s. 457-462.
- [66] Balakrishnan, G., Drurand, D., Nicolai, T.: Particle Diffusion in Globular Protein Gels in Relation to the Gel Structure. *Biomacromolecules*. 2011, vydání 12, č. 2, s. 450-456.
- [67] Scheffold, F., Romer, S., Cardinaux, F., Bissig, H.: New trends in optical microrheology of complex fluids and gels. *Progress in Colloid and Polymer Science*. 2004, č. 123, s. 141-146.
- [68] Moschakis, T. B., Murray, 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, vydání 345, č. 2, s. 278-285.
- [69] Moschakis, T. B., Lazaridou, A., Billiaderis, C. G.: Using particle tracking to probe the local dynamics of barley β -glucan solutions upon gelation. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2012, vydání 375, č. 1, s. 50-59.
- [70] 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*, 2004, č. 55, s. 155-161.
- [71] Oppong, F., Rubatat, L., Frisken, B., Bailey, A., De Bruyn, J.: Microrheology and structure of a yield-stress polymer gel. *Physical Review E*. 2006, roč. 73, č. 4.

- [72] Pashkovski, E., Masters, J. G., Mehreteab, A.: Viscoelastic Scaling of Colloidal Gels in Polymer Solutions. *Langmuir*. 2003, vydání 19, č. 9, s. 3589-3595.
- [73] Oppong, F., Coussot, F. P., De Bruyn, J.: Gelation on the microscopic scale. *Physical Review E*. 2008, vydání. 78, č. 2.
- [74] Velegol, D. Lanni, F.: Cell Traction Forces on Soft Biomaterials. I. Microrheology of Type I Collagen Gels. *Biophysical Journal*. 2001, vydání 81, č. 3, s. 1786-1792.
- [75] Rich J. P., McKinley, G. H., Doyle, P. S.: Size dependence of microprobe dynamics during gelation of a discotic colloidal clay. *Journal of Rheology*. 2011, roč. 55, č. 2.
- [76] Chae, B. S., Furst, F. M.: Probe Surface Chemistry Dependence and Local Polymer Network Structure in F-Actin Microrheology. *Langmuir*. 2005, vydání 21, č. 7, s. 3084-3089.
- [77] Larsen, T. H., Schultz, K. M., Furst, E. M.: Hydrogel microrheology near the liquid-solid transition, *Korea-Aust. Rheol. Journal*, 2008, č. 20, s. 165-173.
- [78] Larsen, T., Furst, E.: Microrheology of the Liquid-Solid Transition during Gelation. *Physical Review Letters*. 2008, vydání 100, č. 14.
- [79] Schultz, K. M., Baldwin, A. D., Kiick, K. L., Furst, F. M.: Gelation of Covalently Cross-Linked PEG–Heparin Hydrogels. *Macromolecules*. 2009, vydání. 42, č. 14, s. 5310-5316.
- [80] Schultz, K. M., Baldwin, A. D., Kiick, K. L., Furst, F. M.: Rapid rheological screening to identify conditions of biomaterial hydrogelation. *Soft Matter*. 2009, vydání 5, č. 4.
- [81] Veerman, C., Rajagopak, K., Palla, Ch. S., Pochan, D. J., Schneider, J. P., Furst, E. M.: Gelation Kinetics of β -Hairpin Peptide Hydrogel Networks. *Macromolecules*. 2006, vydání. 39, č. 19, s. 6608-6614.
- [82] Larsen, T. H., Branco, M. C., Rajagopal, J., Schneider, J. P., Furst, E. M.: Sequence-Dependent Gelation Kinetics of β -Hairpin Peptide Hydrogels. *Macromolecules*. 2009, vydání 42, č. 21, s. 8443-8450.
- [83] Larsen, T. H., Rajagopak, K., Schneider, J. P., Furst, E. M., Co, A., Leal, G. L., Colby, R. H., Giacomini, R. J.: Microrheology of Responsive Hydrogel Networks. *AIP Conference Proceedings*. AIP, 2008, s. 1090-1092.
- [84] Kang, H., Ahn, K. H., Lee, S. J.: Rheological properties of dilute polymer solutions determined by particle tracking. *Korea-Australia Rheology Journal*. 2010, č. 22, s. 11-19.

- [85] Tseng, Y., Kole, T. P., Ssu-Hsien, Lee, J. Wirtz, D.: Local dynamics and viscoelastic properties of cell biological systems. *Current Opinion in Colloid*. 2002, vydání 7, č. 3-4, s. 210-217.
- [86] Lai, S. K., Wang, Y.-Y., Wirtz, D., Hanes, J.: Micro- and macrorheology of mucus. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009, vydání. 61, č. 2, s. 86-100.
- [87] Apgar, J., Tseng, Y., Fedorov, E., Herwig, M. B., Almo, S. C., Wirtz, D.: Multiple-Particle Tracking Measurements of Heterogeneities in Solutions of Actin Filaments and Actin Bundles. *Biophysical Journal*. 2000, vydání. 79, č. 2, s. 1095-1106.
- [88] 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*, 2009, č. 6, s. 1207-1218.
- [89] Palmer, A., Mason, T. G., Xu, J., Kuo, C. S., Wirtz, D.: Diffusing Wave Spectroscopy Microrheology of Actin Filament Networks. *Biophysical Journal*, 1999, č. 76, s. 1063-1071.
- [90] Wong, I., Gardel, M., Reichman, D., Weeks, E., Valentine, M., Bausch, A., Weitz, D.: Anomalous Diffusion Probes Microstructure Dynamics of Entangled F-Actin Networks. *Physical Review Letters*. 2004, vydání 92, č. 17.
- [91] Guigas, G, Kalla, C., Weiss, M.: Probing the Nanoscale Viscoelasticity of Intracellular Fluids in Living Cells. *Biophysical Journal*. 2007, vydání 93, číslo 1, s. 316-323.
- [92] Cherdhirankorn, T., Harmandaris, V., Juhari, A., Voudouris, P., Fytas, G., Kremer, K., Koynov, K.: Fluorescence Correlation Spectroscopy Study of Molecular Probe Diffusion in Polymer Melts. *Macromolecules*. 2009, vydání 42, č. 13, s. 4858-4866.
- [93] Rathgeber, S., Beauvisage, H-J., Chevreau, H., Willenbacher, N., Oelschlaeger, C.: Microrheology with Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Langmuir*. 2009, vydání. 25, č. 11, s. 6368-6376.
- [94] Buchanan, M., Atakhorrami, M. Palierna, J., MacKintosh F., Schmidt, C.: High-frequency microrheology of wormlike micelles. *Physical Review E*. 2005, roč. 72, č. 1.
- [95] Hassan, P. A., Bhattacharya, K., Kulshreshtha, S. K., Raghvan, S. R.: Microrheology of Wormlike Micellar Fluids from the Diffusion of Colloidal Probes. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2005, vydání 109, č. 18, s. 8744-8748.

- [96] Atakhorrami, M., Schmidt, C. F.: High-bandwidth one-and two-particle microrheology in solutions of wormlike micelles. *Rheologica Acta*. 2006, vydání 45, č. 4, s. 449-456.
- [97] Oelschlaeger, C., Schopferer, M. C., Scheffold, F., Willenbacher, N.: Linear-to-Branched Micelles Transition: A Rheometry and Diffusing Wave Spectroscopy (DWS) Study. *Langmuir*. 2009, vydání 25, č. 2, s. 716-723.
- [98] Carinaux, F. L., Cipelletti, L., Scheffold, F., Schurtenberger, F. B.: Microrheology of giant-micelle solutions. *Europhysics letters*. 2002, č. 57, s. 738-744.
- [99] Balazs, E. A., Gibbs, D. A.: The rheological properties and the biological function of hyaluronic acid. v: Balazs EA, ed. *Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix*, London: Academic press, 1970, s. 1241-1254.
- [100] Morris, E. R., Rees, D. A., Welsh, E. J. Conformation and dynamic interactions in HA solutions. *J. Mol. Biol.*, 1980, č. 138, s. 383-400.
- [101] Kennedy, J. F.: *Hyaluronan*. Cambridge, England: Woodhead Pub, 2002. ISBN 18-557-3570-9.
- [102] Milas, M., Rinaudo, M., Roure, I.: Rheological behaviour of hyaluronan, healon and hylan in aqueous solutions. *Hyaluronan – Chemical, biochemical and biological aspects*. 2000, č. 1, s. 181-193.
- [103] Smedt, S.C., Dekeyser, P., Ribitsch, V.: Viscoelastic and transient network properties of hyaluronic acid as a function of the concentration. *Biorheology*, 1993, č. 30, s. 31-41.
- [104] Mo, Y., Takaya, T., Nishinari, K., Kubota, K., Okamoto, A.: Effects of sodium chloride, guanidine hydrochloride, and sucrose on the viscoelastic properties of sodium hyaluronate solutions. *Biopolymers*, 1999, č. 50, s. 23–34.
- [105] Mo, Y., Nishinari, K. Rheology of hyaluronan solutions under extensional flow. *Biorheology*, 2001, vydání. 38, s. 379-387.
- [106] Crocker, J. C., Weeks, E.: Particle tracking using IDL. *Particle tracking using IDL* [online]. 1996 [cit. 2013-06-03]. Dostupné z: <http://www.physics.emory.edu/~weeks/idl>
- [107] Cheesum, M. K., Walker, W.F., Guilford, W.H.: Quantitative Comparison of Algorithms for Tracking Single Fluorescent Particles, *Biophysical Journal*. 2001, č. 81.
- [108] Gelles, J., Schnapp, B. J., Sheetz, P.: Tracking kinesin-driven movements with nanometre-scale precision. *Nature*. roč. vydání, č. 6155, s. 450-453.

- [109] Martin, D. S., Forstner, M. B., Kas, J. A.: Apparent Subdiffusion Inherent to Single Particle Tracking. *Biophysical Journal*. vydání 83, č. 4, s. 2109-2117.
- [110] Savin, T., Doyle, P. S.: Static and Dynamic Errors in Particle Tracking Microrheology. *Biophysical Journal*. vydání. 88, č. 1, s. 623-638.
- [111] Crocker, J.C., Grier, D.G.: Methods of digital video microscopy for colloidal studies. *Journal of Colloid and Interface Science*, 1996, č. 179, s. 298–310.
- [112] Moschakis, T.: Microrheology and particle tracking in food gels and emulsions. *Current Opinion in Colloid*. 2013, vydání 18, č. 4, s. 311-323.
- [113] Pelletier, V., Gal, N., Fournier, P., Kilfoil, M.: Microrheology of Microtubule Solutions and Actin-Microtubule Composite Networks. *Physical Review Letters*, 2009, č. 102, s. 188303-1-4.
- [114] Gao, Y., Kilfoil, M.: Accurate detection and complete tracking of large populations of features in three dimensions. *Optics Express*, 2009, č. 17, s. 4685-4704.
- [115] Milne, G.: *Optical Sorting and Manipulation of microscopic particles*. 2007, Scotland. Dizertace na University of St. Andrews, Vedoucí práce: Prof. Kishan Dholakia, s. 184.
- [116] Windberger, U., Bartholovitch, A., Plasenzotti, R., Korak, K.J. & Heinze, G. Whole blood viscosity, plasma viscosity and erythrocyte aggregation in nine mammalian species: reference values and comparison of data. *Experimental Physiology*, 2009, č. 88, 431-440.
- [117] Serwer, P.: Agarose gels: Properties and use for electrophoresis. *Electrophoresis*. 1983, vydání 4, č. 6, s. 375-382.
- [118] Smilek, J.: *Studium reaktivity biopolymerů v gelové fázi*. Brno, 2012. Diplomová práce na Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, s. 94. Vedoucí práce: Sedláček.
- [119] Langevin, D.: Influence of interfacial rheology on foam and emulsion properties, *Adv Colloid Interface Sci*. 2000, č. 88, s. 209–22.
- [120] Lee, M.H, Reich, D.H, Stebe, K.J, Leheny, R.L.: Combined passive and active microrheology study of protein-layer formation at an air–water interface. *Langmuir*, 2009, č. 25, s. 7976–82.

- [121] Aveyard, R., Binks B.P, Clint, J.H., Fletcher, P.D.I, Horozov, T.S., Neumann, B.: Measurement of long-range repulsive forces between charged particles at an oil–water interface. *Phys Rev Lett*, 2002, č. 88, s. 246102.
- [122] Einstein, A.: Über einen die Erzeugung und Verwandlung des Lichtes betreffenden heuristischen Gesichtspunkt, *Ann. Phys.*, 1905, č. 17, s. 549
- [123] Sutherland, W.: Dynamical theory of diffusion for non-electrolytes and the molecular mass of albumin, *Philos. Mag.*, 1905, č. 9, s. 781.
- [124] Sickert, M., Rondelez, F.: Shear Viscosity of Langmuir Monolayers in the Low-Density Limit. *Phys. Rev. Lett.*, 2003, č. 90, s. 126104
- [125] Pralle, A.: Sphingolipid–Cholesterol Rafts Diffuse as Small Entities in the Plasma Membrane of Mammalian Cells, *J. Cell Biol.*, 2000, č. 148, s. 997.
- [126] Ortega, F., Ritacco, H., Rubio, R.G.: Interfacial microrheology: Particle tracking and related techniques. *Current Opinion in Colloid*. 2010, vydání 15, č. 4, s. 237-245.
- [127] Gambin, Y.: Lateral mobility of proteins in liquid membranes revisited, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2006, č. 103, s. 2098.
- [128] Saffman, P. G., Delbruck, M.: Brownian motion of biological membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1975, č. 72, s. 3111.
- [129] Hughes, B.D., Pailthorpe, B.A., White, L.R.: Translational Diffusion in Lipid Membranes beyond the Saffman-Delbrück Approximation, *J. Fluid Mech.* 1981, č. 110, s. 349.
- [130] Peters, R., Cherry, R. J.: Lateral and rotational diffusion of bacteriorhodopsin in lipid bilayers: experimental test of the Saffman-Delbrück equations, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1982, č. 79, s. 4317.
- [131] Vaz, W. L. C., Goodsaid-Zalduondo, F., Jacobson, K.: Lateral diffusion of lipids and proteins in bilayer membranes *FEBS Lett.*, 1984, č. 174, s. 199.
- [132] Vaz, W. L.C., Clegg, R.M., Hallmann, D.: Bounding fluid viscosity and translational diffusion in a fluid lipid bilayer, *Biochemistry*, 1985, č. 24, s. 781.
- [133] Prasad, V., Koehler, S., Weeks, E.: Two-Particle Microrheology of Quasi-2D Viscous Systems. *Physical Review Letters*. 2006, vydání 97, č. 17.
- [134] Lu, J.R., Su, T.J, Penfold, J.: Adsorption of serum albumins at the air/water interface, *Langmuir*, 1999, č. 15, s. 6975.

- [135] Seki, K., Ramachadran, S., Komura, S.: Diffusion coefficient of an inclusion in a liquid membrane supported by a solvent of arbitrary thickness, *Physical Review E*, 1993, č. 47, s. 2377.
- [136] Saffman, P.G.: Brownian motion in thin sheets of viscous fluid. *J. Fluid Mech.* 1976, č. 73, s. 593-602.
- [137] Shigeyuki, K., Ohta, T.: *Non-equilibrium soft matter physics*. Singapore: World Scientific Pub. Co., 2012, Series in soft condensed matter, č. 4, s. 422. ISBN 978-981-4360-62-3.
- [138] Maleki, A.: *Characterization of Functional Biopolymers under Various External Stimuli*. 2007, Norway. Dizertace na Oniversity of Oslo, Vedoucí práce: Inger Sandved Anfinssen, s. 70.
- [139] Jesen, E.C., Yan, Y., Marriott, G., Bright, G.R., Fisher, G.W., Rogowska, R., Taylor, D.L., Agard, D.A., Hiraoka, Y., Shaw, P. Peter, Sedat, J.W., Brakenhoff, G.J., Van Spronsen, E.A., Van Der Voort, V.T.M., Nanninga, N., Arndt-Jovind, D.T., Jovin, T.M., Axelrod, D., Inoué, S., Hellen, E.H., Wolf, D.E.: *Types of Imaging, Part 2: An Overview of Fluorescence Microscopy. The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*. 2012, č. 295, vydání 10, s. 271-306.
- [140] Elson, E.L., Ma, X., Foo, Y.H., Wohland, Y., Hink, M.A., Pramanik, A.: *Fluorescence Correlation Spectroscopy Measures Molecular Transport in Cells. Traffic*. 2001, č. 2, vydání 11, s. 279-290.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

VPTM	Video-mikrореologie („Video-based particle tracking microrheology“)
PTM	Mikrореologie sledování částic („Particle tracking microrheology“)
OPM	Jednočásticová mikrореologie („One particle microrheology“)
MPT	Vícečásticová mikrореologie („Multiple particle tracking“)
TPM	Dvoučásticová mikrореologie („Two particle microrheology“)
DWS	„Diffusing wave spectroscopy“
DLS	Dynamický rozptyl světla („Dynamic light scattering“)
FCS	Fluorescenční korelační spektroskopie
MSD	Střední hodnota rozptylu („Mean squared displacement“)
T	Termodynamická teplota
D	Difuzní koeficient
G^*	Komplexní modul
G'	Elastický modul
G''	Viskózní modul
GSE	Zobecněná Stokes-Einsteinova rovnice („Generalized Stokes-Einstein equation“)
PSD	Power spectra density
PEO	Polyetylen oxid
BSA	„Bovine serum albumin“
HSA	„Human serum albumin“
HA	Kyselina hyaluronová „Hyaluronic acid“
QUELS	„Quasielastic light scattering“
CTAB	Cetyltrimethylamonium bromid
PEG	Polyetylen glykol
kB	Boltzmanova konstanta
ρ	Hustota
x	Poloha částice
π	Ludolfovo číslo
v	Rychlost

m	Hmotnost
g	Gravitační zrychlení
a	Velikost částice
h	Výška
J	Difuzní tok
c	Koncentrace
R	Univerzální plynová konstanta
r	Poloměr
τ	Časový interval
α	Časový exponent
f	Frikční koeficient
i	Imaginární složka
ω	Frekvence
t	Čas
μ	Mobilita
η	Viskozita
M_w	Molekulová hmotnost
N_A	Avogadrovo číslo
R_G	Gyrační poloměr
Γ	Gama funkce
$\tilde{\eta}_s$	Laplaceově transformovaná, frekvenčně závislá viskozita
$\tilde{D}(s)$	Laplaceově transformovaný, frekvenčně závislý difúzní koeficient
s	Laplaceova frekvence
$\mathcal{F}$	Furierova transformace
ξ	Velikost strukturních ok „mesh size“
θ	Rozptylový úhel
V	Objem
Δ	Gradient
n	Index lomu
λ	Vlnová délka
ACF	Autokorelační funkce

9 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Hodnoty zeta potenciálů částic ve vodě a ve vodném roztoku hyaluronanu

Tabulka 2: Hodnoty viskozit glycerolové koncentrační řady určené různými metodami

Tabulka 3: Difuzní koeficienty vztažené k difuznímu koeficientu rozpouštědla za dané teploty.

10 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr.1.: Schéma pohybu začleněné částice ve vzorku, kterým je v tomto případě roztok polymeru

Obr.2.: Hierarchie reologických metod

Obr.3.: Pohybující se částice obklopena molekulami vody

Obr.4.: Originální kresba Jeana Perrina ukazující polohu částice zaznamenanou každých deset vteřin

Obr.5.: Tvar MSD(t) pro pohyb částic v různém prostředí

Obr.6.: Schéma tvorby MSD(t) pro viskózní látky

Obr.7.: Schéma tří základních metod inverze dat pro výpočet komplexního modulu

Obr.8.: Schématická situace, kdy částice jsou začleněny v pórech, a odrážejí tedy vlastnosti pórů (rozpouštědla v pórech) místo reologických vlastností celého materiálu

Obr.9.: Schéma dvoučásticové mikrореologie

Obr.10.: Schéma vzájemného pohybu dvou částic. V tomto zobrazení je Drr kros-korelační funkce v radiálním směru $D_{rr} = \langle \Delta r_1(\tau) \Delta r_2(\tau) \rangle$, která je produktem posunu částic podél linie spojující částice o vzdálenosti R

Obr.11.: Schéma DLS

Obr.12.: Schéma měření viskoelastických parametrů pomocí FCS

Obr.13.: Frekvenční rozsah vybraných mikrореologických metod

Obr.14.: (A) Ideální částice k určení reologických vlastností celkového materiálu, kdy je velikost částic větší než velikost polymerních ok. (B) Částice, které jsou mnohem menší „prokluzují“ polymerní síť a jejich pohyb neodráží reologickou odezvu materiálu

Obr.15.: Přístroj FCS

- Obr.16.: Zeta Sizer Nano
- Obr.17.: Optický mikroskop
- Obr.18.: Klasický reometr ARG2
- Obr.19.: Kapilární viskozimetr
- Obr.20.: Znázornění fluktuace intenzity fluorescence v čase (A) a tvar autokolerační funkce v závislosti na čase (B). V rámečku je tvar autokolerační funkce v závislosti na čase v logaritmickém měřítku.
- Obr.21.: Autokorelační funkce v závislosti na čase
- Obr.22.: Příprava podložního sklíčka pro měření VPT mikrореologie
- Obr.23.: Pracovní postup zpracování videa pro získání výsledných závislostí pro charakterizaci vzorku
- Obr.24.: Znázornění konverze snímku a identifikace částic podle zadaných parametrů
- Obr.25.: Gausovská distribuce pohybu částice
- Obr.26.: Van Hofova distribuční funkce ovlivněna tzv. „pixel biasing“
- Obr.27.: Cella pro měření mezifázové mikrореologie upravena pro dvě různé výšky zásobního roztoku
- Obr.28.: Ukázka trajektorií částic před (A) a po (B) použití skriptu na odstranění driftingu
- Obr.29.: MSD(t) pro Newtonskou kapalinu ($\alpha = 1$)
- Obr.30.: Elastický (trojúhelníky) a viskózní modul (kolečka) v závislosti na frekvenci pro viskoelastickou látku
- Obr.31.: Efekt možných chyb na MSD Newtonských kapalin. Modrá čára představuje skutečná data bez vlivu jakékoliv chyby, zatímco barevné čáry reprezentují MSD zahrnující experimentální chybu: zelená čára (subdifúzivní chování částic $\alpha < 1$) – dominuje statická chyba. Červená čára (superdifúzivní chování $\alpha > 1$) – dynamická chyba je dominantní
- Obr.32.: Schéma měření mikrореologie pomocí DLS, Zeta Sizer ZS software
- Obr.33.: Proces vyhodnocení viskozity z trajektorií částic pomocí vytvořeného skriptu v MATLABu
- Obr.34.: Výsledky měření viskozity glycerolové řady
- Obr.35.: Výsledky měření roztoků vysokomolekulárního hyaluronanu o různých koncentracích
- Obr.36.: Rozdíl zeta potenciálu částic ve vodě a ve vzorku
- Obr.37.: Hodnoty MSD(t) pro vodný roztok HA (750 kDa, $c = 1$ g/l) použitím tří sond s různým povrchem

- Obr.38.: Hodnoty viskozit glycerolové koncentrační řady určené různými metodami a 3 různými velikostmi částic (0,5 μm , 1 μm , 2 μm)
- Obr.39.: Hodnoty viskozit hyaluronové koncentrační řady pomocí mikrereologického měření s různou velikostí částic a pomocí klasické reologie
- Obr.40.: Porovnání výsledků měření FCS (100 nm), DLS (100 nm) a video-mikrereologie demineralizované vody, 40% a 80% roztoku glycerolu
- Obr.41.: Porovnání výsledků měření FCS (100 nm), DLS (100 nm) a video - mikrereologie pro roztok hyaluronanu ($M_w = 1500 - 1750 \text{ kDa}$) o koncentraci 0,01 mg/ml, teoretická hodnota v grafech znázorňuje tabelované hodnoty pro případ samotného rozpouštědla
- Obr.42.: Porovnání výsledků měření FCS (100 nm), DLS (100 nm) a video-mikrereologie pro roztok hyaluronanu ($M_w = 1500 - 1750 \text{ kDa}$) o koncentraci 1 mg/ml; teoretická hodnota v grafech znázorňuje tabelované hodnoty pro případ samotného rozpouštědla
- Obr.43.: Porovnání výsledků měření FCS (100 nm) a DLS (100 nm) o třech molekulových hmotnostech ($M_w = 90 - 130 \text{ kDa}$; $500 - 750 \text{ kDa}$; $1500 - 1750 \text{ kDa}$) a koncentraci 10 mg/ml s použitím 30 nm částic, teoretická hodnota v grafech znázorňuje tabelované hodnoty pro případ samotného rozpouštědla
- Obr.44.: Teplotní křivky získané pomocí klasické reologie a DLS mikrereologie s použitím 100 nm částic pro roztoky hyaluronanu o koncentraci 0,1% - 1% ($M_w = 750 \text{ Da}$)
- Obr.45.: Dynamická viskozita v závislosti na teplotě pro 0,5% roztok kyseliny hyaluronové (750 kDa) měřena klasickou reologií a DLS mikrereologií s použitím dvou velikostí částic (100 nm a 500 nm)
- Obr.46.: Dynamická viskozita v závislosti na teplotě pro 0,25% roztok kyseliny hyaluronové měřena klasickou reologií a DLS mikrereologií s použitím dvou velikostí částic.
- Obr.47.: Dynamická viskozita v závislosti na teplotě pro 0,1% roztok kyseliny hyaluronové měřena klasickou reologií a DLS mikrereologií s použitím dvou velikostí částic.
- Obr.48.: Relativní viskozita v závislosti na teplotě pro roztoky kyseliny hyaluronové o koncentraci 0,1% - 1% pomocí DLS mikrereologie použitím 100 nm částic
- Obr.49.: Relativní viskozita v závislosti na teplotě pro roztoky kyseliny hyaluronové o koncentraci 0,1% - 1% pomocí DLS mikrereologie použitím 500 nm částic
- Obr.50.: MSD v závislosti na čase pro jednotlivé gely kyseliny hyaluronové ($M_w = 90 - 130 \text{ kDa}$) s použitím 100 nm částic; gel 1: (50 mM CTAB + 0,5% HYA); gel 2

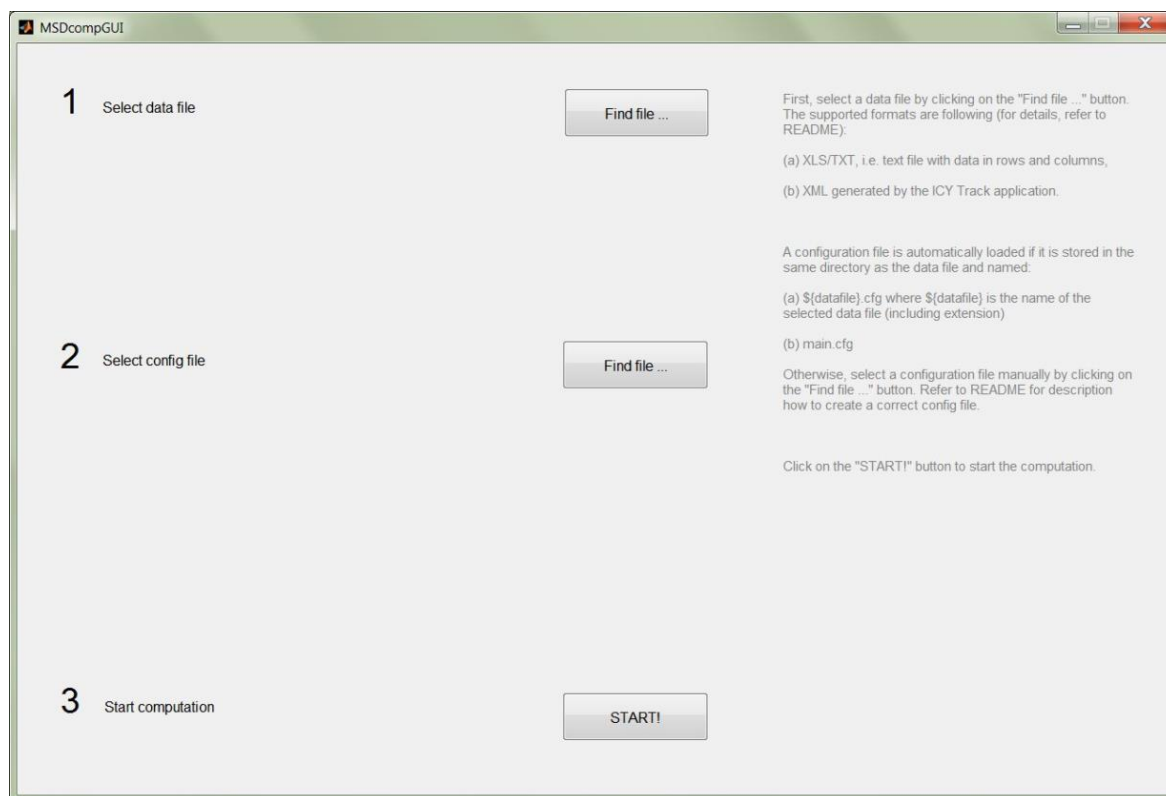
- (200 mM CTAB + 0,5% HYA); gel 3: (50 mM CTAB + 2% HYA); gel 4: (50 mM CTAB + 0,5% HYA)
- Obr.51.: MSD v závislosti na čase pro jednotlivé gely kyseliny hyaluronové ($M_w = 90 - 130$ kDa) s použitím 500 nm částic; gel 1: (50 mM CTAB + 0,5% HYA); gel 2 (200 mM CTAB + 0,5% HYA); gel 3: (50 mM CTAB + 2% HYA); gel 4: (50 mM CTAB + 0,5% HYA)
- Obr.52.: MSD v závislosti na čase pro jednotlivé gely kyseliny hyaluronové ($M_w = 90 - 130$ kDa) s použitím 1000 nm částic; gel 1: (50 mM CTAB + 0,5% HYA); gel 2 (200 mM CTAB + 0,5% HYA); gel 3: (50 mM CTAB + 2% HYA); gel 4: (50 mM CTAB + 0,5% HYA)
- Obr.53.: Výsledky měření gelů pomocí klasické reologie
- Obr.54.: Porovnání výsledků použitím různých velikostí částic (0,1 μm ; 500 μm ; 1000 μm) pro hyaluronový gel č. 2
- Obr.55.: KRYO-SEM měření hyaluronových gelů po sublimaci, 1 minuta - 100 °C + 4 minuty -90 °C
- Obr.56.: KRYO-SEM měření hyaluronových gelů po sublimaci; 1 minuta - 100 °C + 4 minuty -90 °C
- Obr.57.: KRYO-SEM měření hyaluronových gelů po sublimaci; 1 minuta - 100 °C + 4 minuty - 90 °C
- Obr.58.: Strukturní vzorec agarosy
- Obr.59.: MSD(t) 0,5 μm částic ve vodě při teplotách od 25 – 85 °C
- Obr.60.: Graf znázorňující difuzní koeficienty vztažené k difuznímu koeficientu rozpouštědla za dané teploty; částice 0,5 μm
- Obr.61.: MSD(t) 0,1 μm , 0,5 μm a 1 μm částic v 0,5% roztoku agarosy při teplotě 45 °C.
- Obr.62.: MSD(t) 0,1 μm , 0,5 μm a 1 μm částic v 0,5% roztoku při teplotě 35 °C.
- Obr.63.: MSD 0,1 μm , 0,5 μm a 1 μm částic v 0,5% roztoku při teplotě 25 °C.
- Obr.64.: MSD koncentrační řady pro 45 °; 0,5 μm částice
- Obr.65.: MSD koncentrační řady pro 35 °C; 0,5 μm částice
- Obr.66.: MSD koncentrační řady pro 25 °C; 0,5 μm částice
- Obr.67.: Závislost viskoelastických modulů na změně teploty pro 1% koncentraci agarosy
- Obr.68.: Struktura HSA
- Obr.69.: Hodnoty $D_s'/D_s'0$ v čase pro tři různé koncentrace HSA roztoků (měřeno Emory University)

- Obr.70.: Hodnoty $Ds'/Ds'0$ v čase pro tři různé koncentrace BSA roztoků (měřeno FCH VUT)
- Obr.71.: 2D membrána na mezifázovém rozhraní tvořena proteiny
- Obr.72.: 2D systém obklopen 3D roztokem
- Obr.73.: Závislost difuzního koeficientu na čase pro mělkou a hlubokou část vzorku, $c = 11e-4$ mg/ml
- Obr.74.: Závislost difuzního koeficientu na čase pro mělkou a hlubokou část vzorku, $c = 6,4e-4$ mg/ml
- Obr.75.: Závislost difuzního koeficientu na čase pro mělkou a hlubokou část vzorku, $c = 2,2 \cdot 10^{-4}$ mg/ml
- Obr.76.: Výchozí mód skriptu
- Obr.77.: Vložení videa a výchozích parametrů pro zpracování
- Obr.78.: Rozložení trajektorií částic
- Obr.79.: Aplikace sigma testu
- Obr.80.: Zobrazení výsledků, směrnice MSD(t) a viskozity

11 PŘÍLOHY

11.1 Příloha 1

Vyhodnocení mikroviskozimetrie pomocí MATLAB scriptu



Obr.76: *Výchozí mód skriptu*

MSDcompGUI

1 Data file:
Results_MVI_6722_vyrez.xls

Find file ...

Working directory is
D:\Dokumenty\JV\IBP_postdoc3\Glycocalix\Viskozimetrie\2012_10_22_skript_nova_verze\
Log will be saved as Results_MVI_6722_vyrez.xls.log

2 Config file:
config_example.txt

Find file ...

framerate = 30 fps
radius = 0.5 μm
scale = 0.1848 μm
min_length = 50 frames
min_correlation = 0.93
max_sigma_iterations = 10 iterations

3 Start computation

START!

First, select a data file by clicking on the "Find file ..." button. The supported formats are following (for details, refer to README):

(a) XLS/TXT, i.e. text file with data in rows and columns,
(b) XML generated by the ICY Track application.

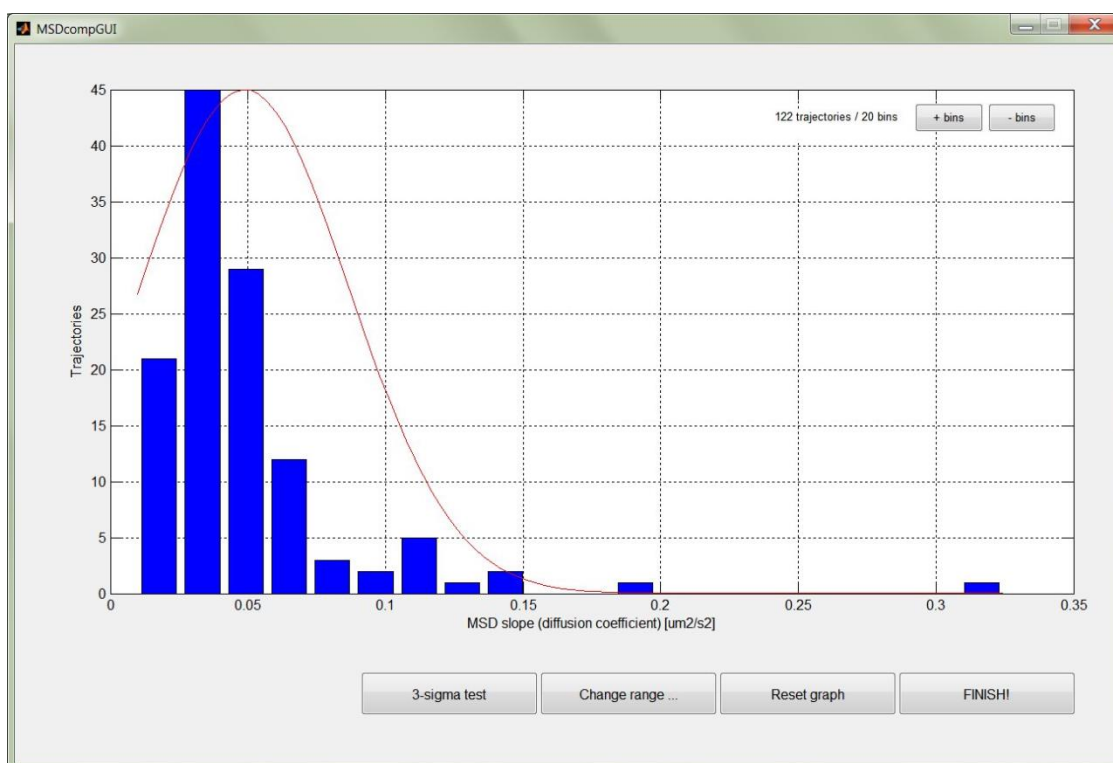
A configuration file is automatically loaded if it is stored in the same directory as the data file and named:

(a) \$(datafile).cfg where \$(datafile) is the name of the selected data file (including extension)
(b) main.cfg

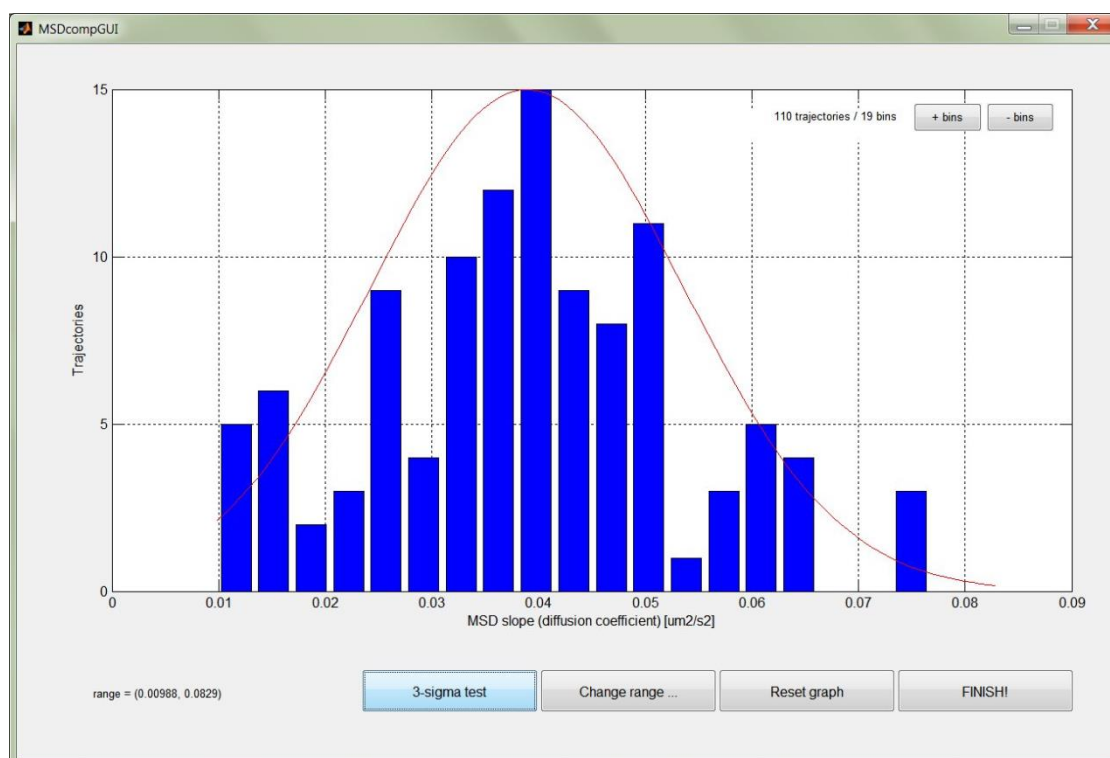
Otherwise, select a configuration file manually by clicking on the "Find file ..." button. Refer to README for description how to create a correct config file.

Click on the "START!" button to start the computation.

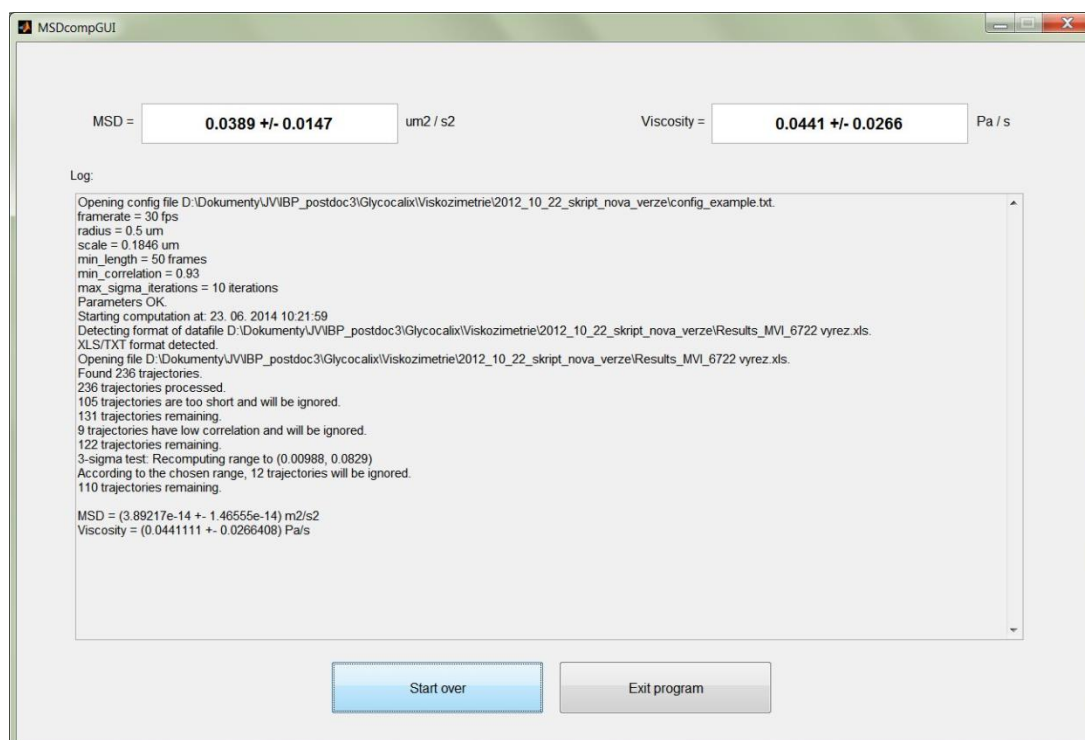
Obr.77: Vložení videa a výchozích parametrů pro zpracování



Obr.78: Rozložení trajektorií částic



Obr.79: Aplikace sigma testu



Obr.80: Zobrazení výsledků, směrnice MSD(t) a viskozity

12 VĚDECKÁ A PUBLIKAČNÍ ČINNOST

12.1 Články v časopise

HNYLUCHOVÁ, Zuzana, Petra BJALONČÍKOVÁ, Pavel KARAS, Filip MRAVEC, Tereza HALASOVÁ, Miloslav PEKAŘ, Lukáš KUBALA a Jan VÍTEČEK. A simple microviscometric approach based on Brownian motion tracking. *Review of Scientific Instruments*. 2015, 86(2), 023710-. DOI: 10.1063/1.4913386. ISSN 0034-6748

MONDEK, Jakub, Filip MRAVEC, Tereza HALASOVÁ, Zuzana HNYLUCHOVÁ a Miloslav PEKAŘ. Formation and Dissociation of the Acridine Orange Dimer as a Tool for Studying Polyelectrolyte–Surfactant Interactions. *Langmuir*. 2014, 30(29), 8726-8734. DOI: 10.1021/la502011s. ISSN 0743-7463.

12.2 Příspěvky na mezinárodních konferencích

MONDEK, J., HNYLUCHOVÁ, Z., PEKAŘ, M. Comparison of Microrheological Measurements by Three Techniques, *Chemistry and life 2014 – book of abstracts*, Brno 2014, s. 337-342. ISBN 978-80-214-5078-3.

HNYLUCHOVÁ, Z., MONDEK, J., PEKAŘ, M. DLS Microrheology of biopolymer solution, Probe size effect, *Nanocon 2014 Conference Proceedings*, Brno 2014, s. 1-5, ISBN 978-80-87294-55-0.

MONDEK, J.; HNYLUCHOVÁ, Z.; PEKAŘ, M. From Micro to Nanorheology: Basic Principles of Microrheology Measurements with Fluorescence Correlation Spectroscopy, *Nanocon 2014: Conference Proceedings*, Brno 2014, s. 1-5. ISBN 978-80-87294-55-0.

HNYLUCHOVÁ, Z.; HALASOVÁ, T.; PEKAŘ, M. Microrheology characterization of hyaluronic acid gels. *XIV. Pracovní setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků, sborník příspěvků*, 2014, s. 47-50, ISBN 978-80-210-6842-1.

HNYLUCHOVÁ, Z.; BJALONČÍKOVÁ, P.; HALASOVÁ, T.; PEKAŘ, M. Microrheology in systems of polymeric colloids. *Nanocon 2013 conference proceedings*, 2013, s. 131, ISBN 978-80-87294-44-4.

12.3 Abstrakty na mezinárodních konferencích

HNYLUCHOVÁ, Z.; PEKAŘ, M.; BJALONČÍKOVÁ, P.; VENEROVÁ, T.; MRAVEC, F.; KUBALA, L.; KARAS, P.; VÍTEČEK, J. A simple microviscometric approach based on Brownian motion tracking, 2015, Ceitec Conference 2015.

HNYLUCHOVÁ, Z.; VENEROVÁ, T.; PEKAŘ, M. Hyaluronic acid gel characterization using classical rheology and passive microrheology technique, 2014, *6th International Conference on Polymer Behaviour – book of abstracts*, s. 47.

HNYLUCHOVÁ, Z.; PEKAŘ, M. Microrheological study of hyaluronan based system for dermal delivery applications, *1st European Conference on Pharmaceutics 2015 - Book of Abstracts*, 2015 s. 47-50.

MONDEK, J.; HNYLUCHOVÁ, Z.; PEKAŘ, M. Nanorheology of Hyaluronan Solutions, *Nanocon 2015 – Book of Abstracts*, s. 117. ISBN 978-80-87294-59-8.

HNYLUCHOVÁ, Z., VÍTEČEK, J., MRAVEC, F., PEKAŘ, M., KUBALA, J. Passive Microrheology in study of interactions between myeloperoxidase and glycosaminoglycans, *International Soft Matter Conference – Book of Abstracts*, 2013

MONDEK, J.; HNYLUCHOVÁ, Z.; KÁBRTOVÁ, P.; PEKAŘ, M. The Advantage of Microrheology Measurements Performed by Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy - Comparison with Video Microrheology and Dynamic Light Scattering, *The 14th Conference on Methods and Applications in Fluorescence – Book of Abstracts*, 2014. S. 68.

12.4 Přednášky na konferencích

XIV. Setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků (Brno, Česká Republika) 2014

12.5 Postery na konferencích

International Soft Matter Conference (Roma, Italy) 2013

5th International Conference on Nanomaterials (Brno, Česká republika) 2013

6th International Conference on Nanomaterials (Brno, Česká republika) 2014

6th International Conference on Polymer Behaviour (Vienna, Austria) 2014

XIV. Setkání fyzikálních chemiků a elektrochemiků (Brno, Česká Republika) 2014

1st European Conference on Pharmaceutics (Rheim, France) 2015

12.6 Absolvované stáže

01/2011-06/2011 Stáž na Dánské Technické Univerzitě v Kodani, Dánsko (DTU)

09/2012 -12/2012 Stáž na Emory University Atlanta, USA (studium pasivních mikroreologických metod; prof. Eric Weeks)

10/2014 Johannes Kepler University, Polymer Institut, Linz
prof. Milan Kračalík

Příloha č. 2 – odborný článek v impaktovaném časopise *Review of Scientific Instruments*

HNYLUCHOVÁ, Zuzana, Petra BJALONČÍKOVÁ, Pavel KARAS, Filip MRAVEC, Tereza HALASOVÁ, Miloslav PEKAŘ, Lukáš KUBALA a Jan VÍTEČEK. A simple microviscometric approach based on Brownian motion tracking. *Review of Scientific Instruments*. 2015, 86(2), 023710-. DOI: 10.1063/1.4913386. ISSN 0034-6748

A simple microviscometric approach based on Brownian motion tracking

Zuzana Hnyluchová, Petra Bjalončíková, Pavel Karas, Filip Mravec, Tereza Halasová, Miloslav Pekař, Lukáš Kubala, and Jan Víteček

Citation: *Review of Scientific Instruments* **86**, 023710 (2015); doi: 10.1063/1.4913386

View online: <http://dx.doi.org/10.1063/1.4913386>

View Table of Contents: <http://scitation.aip.org/content/aip/journal/rsi/86/2?ver=pdfcov>

Published by the *AIP Publishing*

Articles you may be interested in

[Extensional flow of hyaluronic acid solutions in an optimized microfluidic cross-slot devicea\)](#)

Biomechanics **7**, 044108 (2013); 10.1063/1.4816708

[Simulations of magnetic nanoparticle Brownian motion](#)

J. Appl. Phys. **112**, 124311 (2012); 10.1063/1.4770322

[Clinical diagnostic of pleural effusions using a high-speed viscosity measurement method](#)

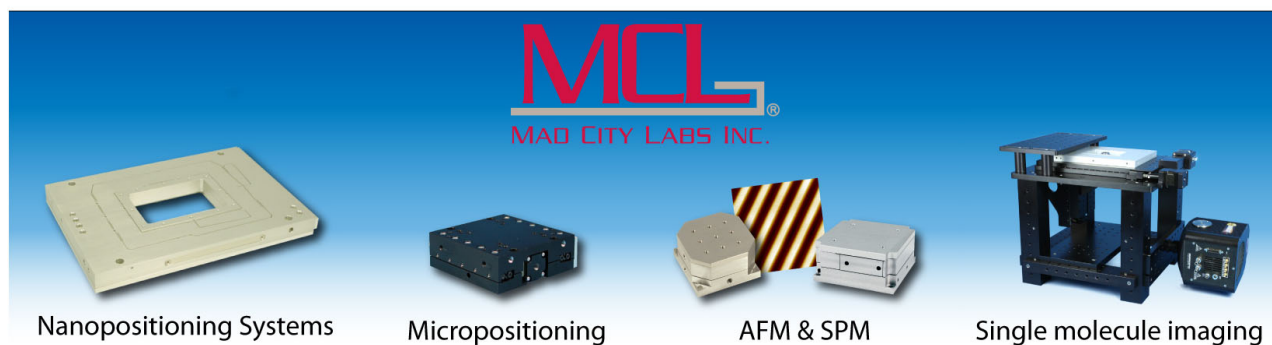
J. Appl. Phys. **110**, 034701 (2011); 10.1063/1.3615964

[Estimating the viscoelastic moduli of a complex fluid from observation of Brownian motion](#)

J. Chem. Phys. **131**, 164904 (2009); 10.1063/1.3258343

[The time, size, viscosity, and temperature dependence of the Brownian motion of polystyrene microspheres](#)

Am. J. Phys. **75**, 111 (2007); 10.1119/1.2386163



A simple microviscometric approach based on Brownian motion tracking

Zuzana Hnylučová,¹ Petra Bjalončíková,¹ Pavel Karas,² Filip Mravec,¹ Tereza Halasová,¹ Miloslav Pekař,¹ Lukáš Kubala,^{3,4} and Jan Víteček^{3,4,a)}

¹Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 118, 612 00 Brno, Czech Republic

²Faculty of Informatics, Masaryk University in Brno, Botanická 68A, 602 00 Brno, Czech Republic

³International Clinical Research Center—Center of Biomolecular and Cell Engineering,

St. Anne's University Hospital Brno, Pekařská 53, 656 91 Brno, Czech Republic

⁴Institute of Biophysics, AS CR, Královopolská 135, 612 65 Brno, Czech Republic

(Received 10 October 2014; accepted 10 February 2015; published online 25 February 2015)

Viscosity—an integral property of a liquid—is traditionally determined by mechanical instruments. The most pronounced disadvantage of such an approach is the requirement of a large sample volume, which poses a serious obstacle, particularly in biology and biophysics when working with limited samples. Scaling down the required volume by means of microviscometry based on tracking the Brownian motion of particles can provide a reasonable alternative. In this paper, we report a simple microviscometric approach which can be conducted with common laboratory equipment. The core of this approach consists in a freely available standalone script to process particle trajectory data based on a Newtonian model. In our study, this setup allowed the sample to be scaled down to 10 μ l. The utility of the approach was demonstrated using model solutions of glycerine, hyaluronate, and mouse blood plasma. Therefore, this microviscometric approach based on a newly developed freely available script can be suggested for determination of the viscosity of small biological samples (e.g., body fluids). © 2015 AIP Publishing LLC. [<http://dx.doi.org/10.1063/1.4913386>]

I. INTRODUCTION

A wide variety of scientific approaches as well as technologies rely heavily on understanding the flow of complex fluids. Traditionally, viscoelastic properties (i.e., viscosity, elastic modulus, etc.) of fluids were studied with mechanical rheometers (i.e., rheometry—the determination of complex rheological properties) and viscometers (i.e., viscometry—the determination of viscosity only) in various geometries and measurement modes. Despite providing valuable information, classical rheometry or viscometry exhibits certain limitations. First, conventional instruments require a relatively high volume of sample (a few milliliters) for each measurement, which limits their use for materials that are difficult to obtain in large quantities.^{1,2} Further, a rheometer or viscometer can operate reliably only in a fixed range of viscosity.³ Additionally, these instruments fail to detect local variations in properties in heterogeneous systems due to the averaged response.

Nowadays, microrheological approaches have been widely used to overcome the abovementioned problems. They are based on determination of the movements of microscopic particles within the sample environment. According to the character of the energy moving with the particles, microrheology covers both passive (thermal energy-driven Brownian motion) and active (light beam-, electric field-, or magnetic field-driven directed motion) approaches. The passive microrheology approach includes video-based particle tracking microrheology, which is the most common and accessible method. Its theoretical background has been extensively re-

viewed^{1,4} (for a brief description see supplementary material section “Passive Microrheology Principles” in brief⁵).

This approach requires only simple instrumentation (an optical microscope and a CCD camera). The choice of particles is, however, a crucial step, which can affect the final microrheology results.⁶ Greatest attention must be paid to the size of the particle. In the case of the determination of macrostructural properties comparable with those investigated in classical rheology, it is necessary to use particles with a radius bigger than the expected mesh size of the sample. Further, the density should be close to that of the material to be examined in order to avoid particle sedimentation.^{7–9} The surface of the particle should be inert in regard to the material to be examined.^{4,6,10}

Undoubtedly, the biggest advantage of the microrheological approach is the remarkable reduction in the amount of sample needed for one measurement, which makes this method the best solution for expensive, hard to obtain, and small-volume biological materials (such as fluids from small animals). The most challenging aspects of this approach are particle tracking, data analysis, and calculation of the viscoelastic parameters of the sample, which can be performed using specialized software.

Algorithms were developed by Crocker and Grier¹¹ and were implemented in the Integrated Data Language (IDL) platform.¹² They have recently been transferred into other software platforms such as Matlab,¹³ Python,¹⁴ and Labview.¹⁵ These scripts can provide comprehensive information about the viscoelastic properties of a liquid. On the other hand, well-trained staff is needed to operate them. Further, a license has to be obtained for the software platform in many cases. Strikingly, a simpler, easier-to-use microrheological approach to determine viscosity (i.e., microviscometry) has been missing.

a) Author to whom correspondence should be addressed. Electronic mail: jan.vitecek@ibp.cz. Telephone: +420 541 517 104. Fax: +420 541 517 104.

In this paper, we report a simple and straightforward microviscometric approach based on the Newtonian model, which can be conducted with simple laboratory equipment, freely available image analysis software, and our freeware custom-made script to process particle tracking data. Thus, we provide a tool comprehensible to a broad range of scientists interested in the determination of the viscosity of small samples (e.g., body fluids).

II. MATERIALS AND METHODS

A. Sample preparation

Model experiments were performed using glycerine solutions, which were chosen as homogeneous, Newtonian fluids with known values of viscosity. A dilution set including concentrations of 10%, 20%, 40%, 60%, and 80% (w/w) of glycerine in demineralized water was prepared.

Solutions of sodium hyaluronate (mean molecular weight 550 kDa, Contipro, Czech Republic) with concentrations of 0.01%, 0.1%, 0.5%, 1% (w/w) were prepared in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4).

A mouse blood sample was obtained by heart puncture of a 10-week-old anesthetized (ketamine, xylazine) male C57 BL/6 mouse. Coagulation was prevented by means of citrate treatment. Plasma was prepared by centrifugation at 2000 g for 10 min at room temperature. All animal experiments were approved by the local ethics committee (IBP, Brno, Czech Republic) and in harmony with the EU and U.S. National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

All samples were supplemented with a 0.02% (V/V) suspension of polystyrene latex microspheres (density 1.05 g cm^{-3} , refractive index 1.59, Sigma Aldrich) immediately before the determination of viscosity.

B. Microviscometry

Ten to fifty μL of sample was loaded into a glass chamber to prevent drying and convectional flow. The bottom part of the chamber was made out of a microscope slide. Two coverslips served as spacers (about 100 μm high) and an optical window was created out of third coverslide. The individual parts of the chamber were set together by UV light cure adhesive (CONLOC UV 651). One side of the chamber was left open as a slit to inject a sample (see supplementary material for more details⁵). This slit was sealed with silicone oil after sample injection. The chamber with the sample was mounted on the microscope stage (Nikon Ci-L). The microscope was seated in an air conditioned room ($20 \pm 1^\circ\text{C}$). The temperature of the air was monitored in the vicinity of the sample. All equipment and samples were equilibrated to ambient temperature for at least 20 min before measurement. Microscopy took tens of seconds. The light intensity was kept as low as possible. With such settings, we did not observe any impact of the microscopy procedure on the rate of Brownian motion. The Brownian motion of particles was captured by a CCD camera (CMOS USB 3.0, resolution 1280×1024) using a $40\times$ objective. These conditions resulted in a pixel size of 0.1846 μm . Particle movement was analyzed using the Mosaic plugin¹⁶ in ImageJ¹⁷ or Spot

Track plugin¹⁸ in ICY¹⁹ in order to determine particle trajectories. The trajectory data were processed using our custom made script. In parallel, the viscosity was determined using the well-established particle tracking codes first developed by Crocker and Grier¹¹ and integrated into IDL.

The total net time required per complete analysis of one single sample was 10–50 min. The most time-consuming step was the analysis of particle movement. Our script processed vast majority of trajectory data files within a minute.

C. Bulk rheometry

Rheological measurements were carried out with an AR-G2 Rheometer (TA Instruments). Double gap cylindrical geometry was used because of the low viscosity of the sample. The samples were allowed to relax for 5 min before measurements. A temperature of 20°C was maintained with a circulating fluid bath during the experiment. A steady state flow test was performed with the shear rate ranging from 10 to 500 s^{-1} . Viscosity was determined using the Newtonian model.

D. Viscometry

Viscometry was performed by means of an Anton Paar AMVn viscosimeter according to Höppler's falling ball principle. The temperature was kept constant by a thermostat at 20°C .

III. RESULTS

In order to determine the viscosity of small samples (tens of microliters), a simple microviscometric method was developed. As a probe, polystyrene particles (spheres) having a density of 1.05 g/cm^3 were chosen. One μm particles showed clearly detectable Brownian motion in all tested conditions (in standard solutions as well as biological samples). The much slower movements of 5 μm particles approached the resolution limits of the imaging system. Therefore, 5 μm particles were not used for further experiments. The experimental setup resulted in a pixel size of 0.1846 μm . Particle trajectory data were obtained using the Mosaic plugin¹⁶ in ImageJ¹⁷ or Spot Track plugin¹⁸ in ICY.¹⁹ A comparison of viscosity values produced with tracking data in ImageJ and ICY indicated negligible differences (data not shown). The data generated were processed by a custom made script (script is available at <http://www.ibp.cz/local/software/microviscometry/>). It accepts output files of the abovementioned plugins containing trajectory data. The script requires a configuration file formatted in plain text that covers the video frame rate (frames/s), particle radius (μm), pixel size (μm), minimum trajectory length (frames), minimum correlation coefficient of the mean squared displacement (MSD) curve, and maximum number of 3σ test iterations in the statistical exclusion of outlying data.

After reading the data, the script applies the criterion of the minimum trajectory length in order to omit short trajectories. Then, MSD curves are calculated for individual trajectories. Linear approximation is applied to each individual MSD curve (see Sec. IV for rationale), and the slope and

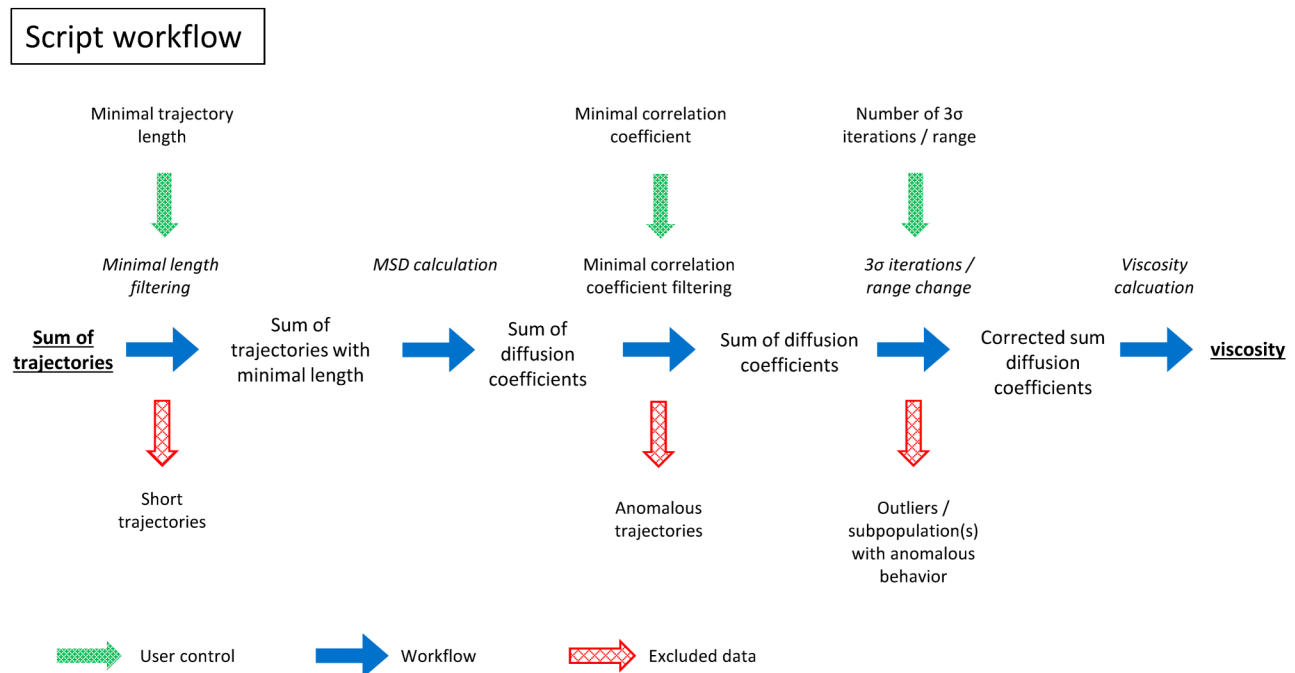


FIG. 1. Script workflow.

correlation coefficient are determined by means of linear regression statistics. The diffusion coefficient is calculated as $\frac{1}{4}$ of the MSD slope (see supplementary material for further explanation⁵). MSD curves which show a too low correlation coefficient (<0.93) are excluded (see Sec. IV for details). The distribution of the remaining diffusion coefficients is displayed and the operator may consider the iterative application of the 3σ rule to exclude outlying data and/or changing the range manually. The latter allows the user to focus on a narrow subpopulation of diffusion coefficients (Fig. 1). The viscosity is calculated from the mean diffusion coefficient using the Stokes–Einstein formula for 2D space,⁴

$$\eta = \frac{k_B T}{6\pi r D},$$

where η [Pa s] is the dynamic viscosity, k_B [$1.380\,65\,\text{m}^2\,\text{kg}\,\text{s}^{-2}\,\text{K}^{-1}$] is the Boltzmann constant, T [K] is thermodynamic temperature, r [m] is particle radius, and D [$\text{m}^2\,\text{s}^{-1}$] is the diffusion coefficient. See supplement material for further explanation.⁵

The value of the dynamic viscosity is displayed together with standard deviation (SD) and a protocol showing the step-by-step processing of data. The protocol also contains information about the excluded data.

The approach was tested using glycerine standards in water.²⁰ Thus, the data obtained using our microviscometric approach were compared with the data obtained with the AR-G2 rheometer, the AMVn viscometer, and a standard microviscometric approach integrated into IDL.¹¹ The average sample volume was 5 ml for the AR-G2 rheometer, 5 ml for the AMVn viscometer, 20 μl for the microviscometric approach integrated into IDL, and 20 μl for our approach. Within the range of 10%–80% of glycerine, the viscosity increased gradually from 1.1 to 62 mPa s in accordance with literature data. There was essentially no difference between the data obtained by our approach and tabulated values or the data acquired by other methods (Fig. 2). Further, our approach showed an

average precision of 12% over the whole range of glycerine concentrations tested.

To determine the utility of our microviscometric approach for more complex environments, the viscosity of a solution of sodium hyaluronate, a ubiquitous natural polymer, was assayed. A high molecular weight preparation (mean molecular weight 550 kDa) was chosen. The viscosity gradually increased with concentration. There were no statistically significant differences from the data obtained by the microviscometric approach integrated into IDL (Fig. 3). The average precision of our approach was 15% in this case.

Our microviscometric approach allowed sample volumes to be scaled down to a remarkable degree. Thus, to demonstrate the utility of this method, the viscosities of small-volume biological samples were determined. Mouse blood plasma (10 μl sample) showed a viscosity of 1.958 ± 0.103 mPa s (mean $\pm$ SD, $n = 4$) at 20 $^\circ\text{C}$.

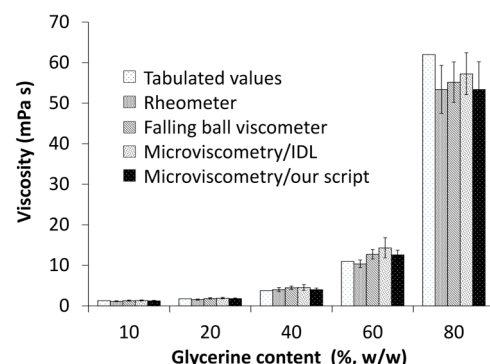


FIG. 2. Comparison of tabulated data and the results of well-established approaches to determine viscosity with the output of our microviscometric approach: viscosities were determined by an AR-G2 rheometer, an AMVn viscometer, a microviscometric approach integrated into IDL, and our simplified microviscometric approach. Data are displayed as mean value $\pm$ SD, $n = 3$. There were no statistically significant differences ($\alpha = 0.05$) among viscosity data and the literature value at particular concentrations of glycerine.

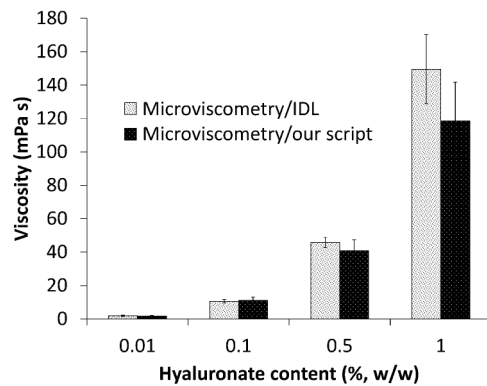


FIG. 3. Viscosities of model sodium hyaluronate solutions: sodium hyaluronate was dissolved in phosphate buffered saline (pH 7.4). The viscosity was determined by means of a microviscometric approach integrated into IDL and our microviscometric approach. Data are displayed as mean value $\pm$ SD, $n=3$. There were no statistically significant differences ($\alpha=0.05$) among viscosity data at particular concentrations of hyaluronate.

IV. DISCUSSION

Determination of the viscosity of very small samples poses a significant challenge in biophysical and biological research. Indeed, many well-established rheological approaches fail because larger sample volumes ($>1000\ \mu\text{l}$) are required.² This is why microrheological methods are very promising. Among them, passive microrheology which focuses on thermally driven Brownian motion has proven itself to be the approach of choice because the instrumentation required is very simple. The evaluation of Brownian motion has been implemented into a set of multipurpose software packages (e.g., Matlab, Python, IDL modules, see above) which are well suited to provide comprehensive information about an experimental model including viscosity viscous and elastic moduli, etc. Out of them a well-established microviscometric approach integrated to IDL was used in parallel. We shared the same principle of operation (particle tracking and application of Stokes–Einstein formula to calculate viscosity) with this approach. A major difference consisted in using external particle trackers (see below) whereas the approach integrated in IDL relies on internal particle tracker. Concerning the processing of particle trajectories and viscosity calculation, we adopted presumption of Newtonian behavior of a liquid to maintain the simplicity of calculation. Further, our script is focused on calculation of viscosity only. Contrary there is no limitation to Newtonian behavior in the approach integrated in IDL. More complex characteristics like viscous and elastic moduli can be determined as a function of frequency. The control of IDL based microviscometric approach is based on command line with a possibility to display results in a graphic interface. Our script relies completely on graphic interface. The particle tracking in ImageJ or ICY is controlled by graphic interface as well. The complexity of operations of the microviscometric approach integrated to IDL as well as its less user-friendly interface highlights a requirement for a well trained staff. Our approach is, however, comprehensible without any special training.

Freely available particle tracking software was used in combination with our custom-made script (available at <http://www.ibp.cz/local/software/microviscometry/>) to compute the

viscosity. In detail, the Mosaic plugin¹⁶ in ImageJ¹⁷ detecting bright particles over a dark background and the Spot Track plugin¹⁸ in ICY¹⁹ detecting either bright or dark particles over a dark or light background, respectively, were used. The essential procedure of our script is based on the presumption of the Newtonian (i.e., viscosity is independent of shear stress) or nearly Newtonian behavior of the fluid. The calculation was performed by means of a 2D application of the Stokes–Einstein equation (see above). The approach allowed the sample to be scaled down to $10\ \mu\text{l}$. Further, the whole procedure required only commonly available laboratory equipment.

When implementing such a microviscometric approach, certain important parameters need to be considered. These are particle size and density. In our study, inert polystyrene spheres with diameters of 1 and $5\ \mu\text{m}$ were used. The larger ones, however, failed to exhibit clearly detectable Brownian motion. The density of the spheres ($1.05\ \text{g/cm}^3$) was close to that of the samples ($1.00\text{--}1.20\ \text{g cm}^{-3}$), minimizing the effect of particle sedimentation or floating. Further, the size of the particles was well above the internal heterogeneities (i.e., the sizes of macromolecules) of the polymer and the biological samples reflecting the global viscosity of the environment in the sample.^{7–9} The video of the Brownian motion of particles was recorded at a spatial resolution of $0.1846\ \mu\text{m}$ per pixel. This ensured that the criterion of at least four pixels per particle for sufficient particle detection was met.¹² The temporal resolution was limited by the camera frame rate (30 frames/s). Though this masked diffusive events occurring at higher frequencies, reliable data in terms of viscosity were still collected. The processing of videos using the Mosaic plugin (ImageJ) or Spot Track plugin (ICY) in order to obtain trajectory data required just a simple 64-bit computer with 4 GB of memory, indicating no need for highly specialized IT equipment. Extensive care was taken to obtain videos which would result in 50 (or better, 100) or more trajectories, as recommended in literature.²¹

The core of our microviscometric approach consisted in a custom made script to process trajectory data. After loading the particle tracking data, the script first removed particle trajectories not meeting the minimum length parameter. This was to exclude noise generated by either particle detection errors or the disappearance of particles from the focal plane. Generally, such events result in very short trajectories.¹² Setting a value between 30 and 100 ensured a strong population of trajectories for further analysis. Changing the value within the specified interval showed a negligible impact on the determined viscosity value. Next, the linear approximation of the MSD curve was carried out (i.e., the fluid was expected to exhibit Newtonian or nearly Newtonian behavior) with a chance of excluding anomalous trajectories by means of setting a minimum correlation coefficient. A value of 0.93, based on linear regression statistics, allowed the exclusion of diffusion coefficients representing linearized MSD curves which explain less than 95% of experimental data points in the particular MSD curve. Finally, the script allowed the possibility of removing outlying data by applying a 3σ iterative approach. The default value of ten 3σ iterations was sufficient in most cases. In the case of failure of the 3σ statistical approach (e.g., when used with a heterogeneous sample with two or

more subdomains with different viscosities), the operator may set the data range manually.

As a proof of concept, the experiment with glycerine standards showed that our approach could provide essentially the same results as standard rheology methods as well as a microviscometric approach integrated into IDL for a broad range of viscosities (Fig. 2). Such a range covers the viscosities of various biological fluids (e.g., plasma, aqueous humor and vitreous humor).^{22–24} The average precision of our approach (12%) in the case of glycerine standards was comparable to that of standard rheology methods. The particular advantage of our approach consists in its very low demand on sample volume, which, in our study, was reduced to as little as 10 μl . Samples with volumes below 10 μl suffered from evaporation during handling and imprecision of particle dosage as well.

Complex solutions of polymers are frequently found in body fluids. The natural polymer sodium hyaluronate is present in the interstitial space of animal cells²⁵ as well as in some liquids like vitreous humour.²² In our study, high molecular weight hyaluronate solutions were investigated to provide further proof of the effectiveness of our microviscometric approach. It showed essentially the same results as the microviscometric approach integrated into IDL (Fig. 3). The average precision achieved a value of 15%. Compared to the microviscometric approach integrated to IDL, our approach brought significant simplification of viscosity determination.

The availability of only a small amount of biological sample poses an obstacle to the determination of its biophysical characteristics. Conventional rheometry or viscometry requires samples up to a few milliliters in volume. Thus, our microviscometric approach demonstrated its utility in the case of the determination of the viscosity of mouse plasma (sample volume 10 μl). The determined value of the viscosity of mouse blood plasma matched the literature-derived value²⁴ recalculated to 20 °C (1.900 mPa s).

V. CONCLUSIONS

A simple procedure to determine viscosity in a small sample (down to 10 μl) by means of evaluating the Brownian motion of embedded microparticles has been established. The core of the approach consists in a freely available standalone script to process particle trajectory data based on a Newtonian model. The script accepts data formats from two major open-source particle tracking plugins (Mosaic/ImageJ and Spot Track plugin/ICY). The instrumentation required comprises commonly available laboratory equipment. The procedure of data evaluation was simplified compared to multipurpose software packages (see above). Altogether this should make the approach attractive to a broad range of scientists. Proof of concept experiments have demonstrated that the procedure can yield reliable data.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Czech Science Foundation (Grant No. P305/12/J038), the European Regional Development Fund—Project FNUSA-ICRC (No. CZ.1.05/1.1.00/

02.0123), and by European Union—project ICRC-ERA-HumanBridge (No. 316345) and the Materials Research Centre at FCH BUT-Sustainability and Development, Project REG LO1211, with financial support from the National Programme for Sustainability I (Ministry of Education, Youth and Sports).

- ¹P. Cicuta and M. Donald, “Microrheology: A review of the method and applications,” *Soft Matter* **3**, 1449–1455 (2007).
- ²T. Larsen, K. Schultz, and E. M. Furst, “Hydrogel microrheology near the liquid-solid transition,” *Korea-Australia Rheol. J.* **20**, 165–173 (2008).
- ³H. Kang, K. H. Ahn, and S. J. Lee, “Rheological properties of dilute polymer solutions determined by particle tracking microrheology and bulk rheometry,” *Korea-Australia Rheol. J.* **22**, 11–19 (2009).
- ⁴W. B. Mansel, S. Keen, P. J. Patty, Y. Hemar, and A. K. A. Williams, “Practical review of microrheological techniques,” *Rheology-New Concepts, Applications and Methods*, edited by R. Durairaj (InTech, 2013), pp. 1–22.
- ⁵See supplementary material at <http://dx.doi.org/10.1063/1.4913386> for a description of passive microrheology principles and chamber construction.
- ⁶T. Moschakis, “Microrheology and particle tracking in food gels and emulsions,” *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **18**, 311–323 (2013).
- ⁷Q. Lu and M. J. Solomon, “Probe size effects on the microrheology of associating polymer solutions,” *Phys. Rev. E* **66**, 061504 (2002).
- ⁸J. Suh, “Real-time multiple-particle tracking: Applications to drug and gene delivery,” *Adv. Drug Delivery Rev.* **57**, 63–78 (2005).
- ⁹M. Valentine, P. Kaplan, D. Thota, J. Crocker, T. Gisler, M. Pruda, M. Beck, and D. Weitz, “Investigating the microenvironments of inhomogeneous soft materials with multiple particle tracking,” *Phys. Rev. E* **64**, 061506 (2001).
- ¹⁰M. L. Gardel, M. T. Valentine, and D. A. Weitz, “Microrheology,” *Microrheology Diagnostic Techniques*, edited by K. Breuer (Springer, Berlin, 2005), pp. 1–50.
- ¹¹J. C. Crocker and D. G. Grier, “Methods of digital video microscopy for colloidal studies,” *J. Colloid Interface Sci.* **179**, 298–310 (1996).
- ¹²J. C. Crocker and B. D. Hoffman, “Multiple-particle tracking and two-point microrheology in cells,” *Methods Cell Biol.* **83**, 141–178 (2007).
- ¹³V. Pelletier, N. Gal, P. Fournier, and M. Kilfoil, “Microrheology of microtubule solutions and actin-microtubule composite networks,” *Phys. Rev. Lett.* **102**, 188303 (2009).
- ¹⁴Y. Gao and M. Kilfoil, “Accurate detection and complete tracking of large populations of features in three dimensions,” *Opt. Express* **17**, 4685–4704 (2009).
- ¹⁵G. Milne, “Optical sorting and manipulation of microscopic particles,” Ph.D. thesis (University of St. Andrews Press, St. Andrews, 2007).
- ¹⁶I. F. Sbalzarini and P. Koumoutsakos, “Feature point tracking and trajectory analysis for video imaging in cell biology,” *J. Struct. Biol.* **151**, 182–195 (2005).
- ¹⁷C. A. Schneider, W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri, “NIH image to imageJ: 25 years of image analysis,” *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).
- ¹⁸N. Chenouard, I. Bloch, and J. C. Olivo-Martin, “Multiple hypothesis tracking for cluttered biological image sequences,” *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* **35**, 2736–2750 (2013).
- ¹⁹F. De Chaumont, S. Dallongeville, N. Chenouard, N. Hervé, S. Pop, T. Provost, V. Meas-Yedid, P. Pankajakshan, T. Lecomte, Y. Le Montagner, T. Lagache, A. Dufour, and J. C. Olivo-Martin, “Icy: An open bioimage informatics platform for extended reproducible research,” *Nat. Methods* **9**, 690–696 (2012).
- ²⁰J. B. Segur and H. E. Oberstar, “Viscosity of glycerol and its aqueous solutions,” *Industrial* **43**, 2117–2120 (1951).
- ²¹D. Wirtz, “Particle-tracking microrheology of living cells: Principles and applications,” *Annu. Rev. Biophys.* **38**, 301–326 (2009).
- ²²S. A. Abdelkawis, “The rheological properties of vitreous humor after q-switched Nd:YAG laser photo disruption,” *Biophys. Rev. Lett.* **7**, 29–39 (2012).
- ²³J. A. Beswick and C. McCulloch, “Effect of hyaluronidase on the viscosity of the aqueous humor,” *Br. J. Ophthalmol.* **40**, 545–548 (1956).
- ²⁴U. Windberger, A. Bartholovitch, R. Plasenzotti, K. J. Korak, and G. Heinze, “Whole blood viscosity, plasma viscosity and erythrocyte aggregation in nine mammalian species: Reference values and comparison of data,” *Exp. Physiol.* **88**, 431–440 (2003).
- ²⁵T. C. Laurent and J. R. E. Fraser, “Hyaluronan,” *Faseb J.* **6**, 2397–2404 (1992).

Příloha č. 3 – odborný článek v impaktovaném časopise *Langmuir*

MONDEK, Jakub, Filip MRAVEC, Tereza HALASOVÁ, Zuzana HNYLUCHOVÁ a Miloslav PEKAŘ. Formation and Dissociation of the Acridine Orange Dimer as a Tool for Studying Polyelectrolyte–Surfactant Interactions. *Langmuir*. 2014, 30(29), 8726-8734. DOI: 10.1021/la502011s. ISSN 0743-7463.

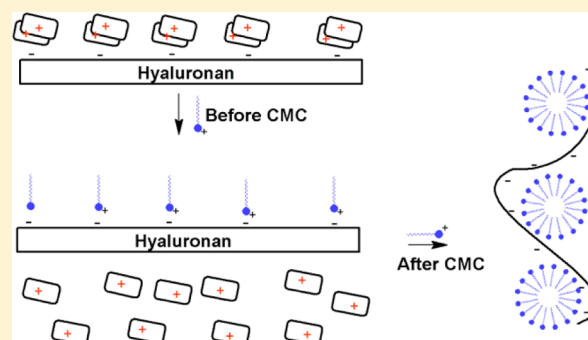
Formation and Dissociation of the Acridine Orange Dimer as a Tool for Studying Polyelectrolyte–Surfactant Interactions

Jakub Mondek,* Filip Mravec, Tereza Halasová, Zuzana Hnyluchová, and Miloslav Pekař

Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, Institute of Physical and Applied Chemistry and Materials Research Centre, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Czech Republic

Supporting Information

ABSTRACT: Steady-state and time-resolved fluorescence and UV–vis techniques were used to study the formation and dissociation of acridine orange dimer in order to investigate hyaluronan–acridine orange, hyaluronan–CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), polystyrenesulfonate–acridine orange, and polystyrenesulfonate–CTAB interactions in aqueous solution. Steady-state and time-resolved fluorescence and the dimer:monomer absorbance ratio of acridine orange (AO) were used to determine dimer formation on polymer chains of polyelectrolytes. Acridine orange clearly formed dimers on polystyrenesulfonate chains as well as on hyaluronan, but we show that the electrostatic interaction is much weaker in the case of hyaluronan. After the addition of surfactant, we observed an enhancement of fluorescence intensity, indicating the dissociation of AO dimers into monomers and the replacement of acridine orange on polymer chains by surfactant molecules. Importantly, we show that surfactant molecules bind to polymer chains before the critical micelle concentration is reached and form the so-called “bottle-brush” structure.



1. INTRODUCTION

The solubilization of hydrophobic molecules in water—micellar environments is a very well known phenomenon^{1–3} which enables further investigation of micelle microenvironments or interfaces by fluorescence techniques. For example, critical micelle concentrations (CMC)^{4–7} and micellar aggregation numbers^{8–10} are widely studied by steady-state or time-resolved fluorescence spectroscopy. The aggregation of acridine dyes is also a well-described phenomenon.^{11–14} Negative charge, represented for example by a polyelectrolyte or surfactant, added to a solution of acridine dye causes the aggregation of these molecules into dimers due to van der Waals forces and the strong coupling of molecular transition dipole moments. Coupling causes a wavelength shift in the absorption spectrum. When a red or blue shift occurs, aggregates are called J-aggregates or H-aggregates, respectively.¹² The H-type aggregates have forbidden radiative decay from the excited state, and their absorption band is blue-shifted. From a spectroscopic point of view, the fluorescence of the sample at nearly 530 nm decreases with an increasing amount of dye aggregate; the probability of absorption at 492 nm (monomer band, the α -band) decreases with a concomitant increase in absorption at 465 nm (dimer band, β -band) and at 450 nm (oligomer band, the γ -band). The formation of dye aggregates is, of course, concentration-dependent, and in the case of acridine orange (AO) the aggregates appear at and above its concentration of $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ in aqueous solution.¹¹ In the presence of a negative binding site, for example, the negative

charge of a surfactant or a polyanion, monomers of AO condense on these sites and the dimer form of AO is preferred, which changes its fluorescence intensity and a dimer fluorescent peak appears in the fluorescence spectrum at around 657 nm.¹² This depends on the concentration of both AO and binding sites, and above a critical concentration, AO starts to form nonfluorescent condensate dimers or even oligomers.^{11–16} Acridine orange aggregates were used to study negatively charged polyelectrolytes,¹² probe–DNA interactions,^{15–17} and probe–protein or protein–surfactant interactions.^{18,19}

In this study, acridine orange was used as a fluorescent label which is physically attached to the oppositely charged polyelectrolyte. Physical (electrostatic) binding is supposed to provide an advantage over traditional chemical (covalent) fluorescence labeling in the study of interactions between (labeled) polyelectrolytes and oppositely charged surfactants. The label is attached directly to the interaction site, but its weak physical bond should not prevent interactions with the surfactant, which can be detected by changes in the aggregation behavior of the acridine orange label. Systems comprising oppositely charged polyelectrolytes and surfactants are of growing interest not only as a subject of pure research but also due to their various practical applications. For an overview of this area see several excellent reviews.^{20–23}

Received: May 23, 2014

Revised: July 7, 2014

Published: July 8, 2014

Hyaluronan (more precisely, the sodium salt of hyaluronic acid), one of the most important polysaccharides originating from the mammalian body, was selected as the anionic polyelectrolyte for this study due to our long-term interest in its behavior and its potential applications in delivery systems. The understanding of its importance has increased dramatically over the last two decades. Many studies have focused on its physical–chemical behavior, its role in tissues, and its cell proliferation capacity, and methods have been developed to use this polysaccharide in the healing of injuries, drug delivery systems, antiaging applications, and so on. Hyaluronan is a biocompatible and biodegradable polysaccharide consisting of disaccharide units D-glucuronic acid and N-acetyl-D-glucosamine²⁴ (Figure 1). Hyaluronan–surfactant or hyaluronan–

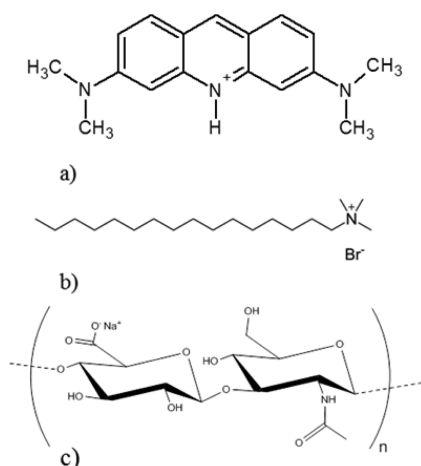


Figure 1. Structure of (a) acridine orange, (b) CTAB, and (c) hyaluronic acid.

liposome interactions provide a useful model for anticancer drug delivery systems based on hyaluronan sensitivity to the CD44 receptor.^{25–27} Delivery systems based on hyaluronan should be quite selective for tumor cells because CD44 is overexpressed in cancer cells.²⁸ Micelles provide, in this model, a good environment for drug solubilization and controlled release, and hyaluronan provides controlled targeting of the drug.

The paper is organized as follows. In the first part, we present a study of the interaction between hyaluronan and acridine orange in the absence of surfactant; in the following part, the interaction between cationic surfactant and a hyaluronan–AO system is presented. Then, a comparative study of the interaction between polystyrenesulfonate (PSS) and acridine orange in the presence of cationic surfactant is added to compare a synthetic polymer with a higher charge density (a “stronger polyelectrolyte”) and hyaluronan biopolymer. PSS was selected because it is a well-known and defined polymer and a strong polyelectrolyte and because interactions between PSS and cationic surfactants have been proven and investigated in other studies.^{12,29} On the other hand, hyaluronan is known to have a low charge density and to interact relatively weakly with cationic surfactants.³⁰

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials. All reagents and solvents were used as received, and their purity was higher than 97%. Hyaluronan (molecular weight of 300 kDa) was purchased from CPN spol. s.r.o. (Czech Republic). Polystyrenesulfonate (molecular weight 70 kDa), CTAB, and acridine

orange hydrochloride hydrate were purchased from Sigma-Aldrich. Stock solutions of hyaluronan, polystyrenesulfonate, surfactant, and acridine orange were prepared in deionized water. For experiments in the presence of NaCl, 0.15 or 0.5 M NaCl solution was used. Samples for acridine orange and polyelectrolyte interaction were prepared as follows: 25 μL of acridine orange stock solution were added to plastic vials and a fluorescent probe was diluted with an appropriate volume of hyaluronan and solvent to achieve a concentration range for hyaluronan from 5×10^{-4} to $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and that for polystyrenesulfonate from 1.25×10^{-5} to $3.6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Samples for polymer–surfactant interaction were prepared with a constant concentration of acridine orange and polymer (respective equivalence point for each polymer determined by the formation of acridine orange dimer) and with an increasing concentration of surfactant ranging from 3×10^{-7} to $4 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. All samples were stirred overnight to ensure equilibration. The concentration of the fluorescent probe (AO) in all samples was $1.7 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ to avoid the presence of the dimer absorption band in the bulk solution.¹¹ The determined pH of all hyaluronan samples varied between 6.6 and 5.6 (see examples in Supporting Information, Table S1), which is well above the hyaluronan intrinsic pK_a (3.2^{31}). It can therefore be reasonably expected that hyaluronan was fully dissociated. PSS is fully ionized in the 6.2–8.9 pH range.³² The determined pH of all PSS samples varied between 6.7 and 4.6, but pH was, in most cases, below 6.2 (see Supporting Information, Table S1). It can be expected that PSS was not fully dissociated. All measurements were made at 22 $^{\circ}\text{C}$.

2.2. UV–Vis and Fluorescence Spectroscopy. Absorption spectra were recorded on a Varian Cary 50 UV–vis spectrophotometer with a wavelength range from 200 to 700 nm, and fluorescence spectra were recorded on a FluoroLog Horiba Jobin Yvon spectrofluorimeter. Fluorescence spectra were recorded with the excitation monochromator at 492 nm and in the emission wavelength range of 500 to 650 nm. Because of the inner filter effect, the correction of emission spectra was made according to the equation³³

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{obs}} \times 10^{1/2(A_{\text{ex}} + A_{\text{em}})} \quad (1)$$

where F_{corr} and F_{obs} are the corrected and observed fluorescence intensities, respectively, and A_{ex} and A_{em} represent absorbance at the excitation and emission wavelengths, respectively. Time-resolved measurements were performed with a Fluorocube Horiba Jobin Yvon spectrometer by means of a time-correlated single photon counting technique. A 469 nm LED was used as the excitation source. Fluorescence decays were collected with a 495 nm cut-off filter. A time-to-amplitude (TAC) converter was set to the 50 ns window for the measurement of acridine orange and the acridine orange–hyaluronan system. During measurements of polystyrenesulfonate–acridine orange, the TAC range was changed from the 50 ns to the 200 ns window because of the increase in the fluorescence lifetime. The repetition rate was set to 1 MHz, and the delay of the signal caused by the cable path was always set 15 ns higher than the respective TAC range.

Time-resolved fluorescence decays were analyzed by the iterative reconvolution procedure of fitting the model function to experimental data, and the fit was judged by nonlinear least-squares analysis.^{34,35} Time-resolved data analyses were performed with DAS6 software from Horiba Jobin Yvon using models for multiexponential decay with n components using the equation

$$I(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i \exp(-t/\tau_i) \quad (2)$$

where α_i is a preexponential factor which relates to the amount of each fluorescent component present in the system and τ_i is the fluorescence lifetime of the i th component. The goodness of fit was judged by reduced χ_R^2 , which evaluates a mismatch between the data and the fitted function and is independent of the number of degrees of freedom.³³

2.3. Microrheology. For microrheology experiments, a concentration series of hyaluronan solutions in water was prepared by diluting a stock solution. Ten microliters of a 1 μm polystyrene particle 2.5%

suspension obtained from Sigma-Aldrich was added to 5 mL of sample. Samples were stirred using a vortex stirrer for 10 s and then were left to stand for 1 h.

Hardware for the microrheology experiments consisted of a Nikon Eclipse e200 microscope and a Canon digital camera. Particle movement in samples was recorded for 10 s at 50 fps and at a resolution of 1280×720 in a dark field. Open source program ImageJ with the ParticleTracking plugin was used for image analysis and the determination of particle trajectories. This program yielded the x and y coordinates of particle position as a function of time, which are used to determine the dependency of the mean square displacement (MSD) on time. The MSD is given by

$$\text{MSD} = \langle [x(t + \tau) - x(t)]^2 + [y(t + \tau) - y(t)]^2 \rangle = 2dD\tau \quad (3)$$

where d is the dimensionality or spatial extent³⁶ (in our case two dimensions), D is the diffusion coefficient, $x(t)$ and $y(t)$ are the positions of particle i at time t , and $\langle \rangle$ represents an average over time. For the determination of the microviscosity of the medium in the vicinity of tracer particles, the Stokes–Einstein equation was used.^{37,38}

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (4)$$

As the hydrodynamic radius (r), the radius of tracer particles reported by the manufacturer was used ($0.5 \mu\text{m}$). The final viscosity is the mean value of the viscosities obtained from the MSD of at least 30 particles.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Results are displayed as the dependency of the studied physical quantity on the polymer/dye ratio (P/D). The P/D ratio represents moles of binding sites (carboxylic groups of hyaluronan or sulfonate groups of polystyrenesulfonate) per moles of dye. For hyaluronan, the molecular weight of its basic dimer unit bearing one carboxyl group is 401.299 g/mol .

3.1. Interaction of Hyaluronan with Acridine Orange. The spectral properties of AO are shown in Figure 2. At a

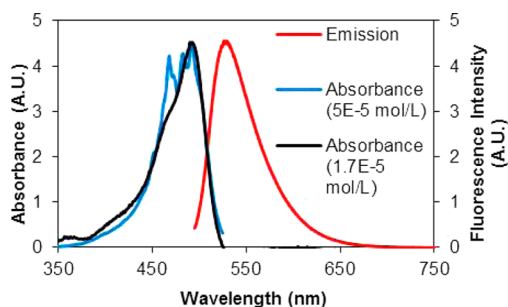


Figure 2. Spectral properties of acridine orange in aqueous solution at a concentration of $5 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of the dye and the absorption spectrum for the aqueous solution at a concentration of $1.7 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

concentration of around $5 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, it is clearly shown that the monomer absorption band is joined by the dimer absorption band. The absorption band of the dye oligomers appears as a shoulder at 450 nm. These results also determined the experimental setup of measurements with AO. To avoid the formation of AO dimers in solution, we used a lower concentration of acridine orange in samples ($1.7 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$); the absorption spectrum is shown in Figure 2. To cover a wide range of P/D , our experiments were carried out with a constant amount of dye and with changing polyelectrolyte concentration.

Figure 3a shows the dependency of the relative fluorescence intensity measured at 527 nm (the emission maximum shown

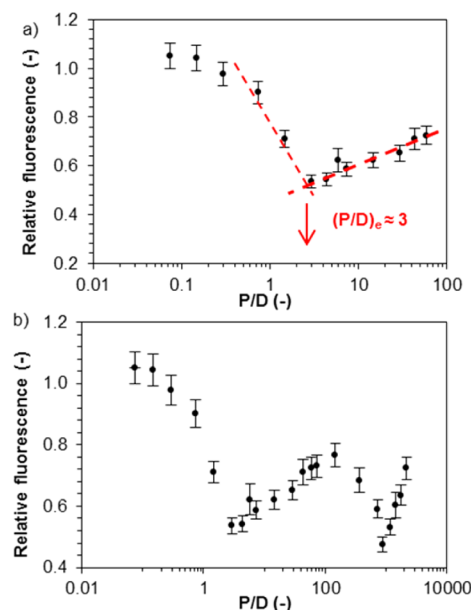


Figure 3. Dependency of the relative fluorescence intensity on the P/D of the system with a constant concentration of acridine orange of $1.7 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Fluorescence is relative to the sample in which hyaluronan is not present. The concentration of hyaluronan in (a) covers the range from 0.5 to 400 mg L^{-1} . In (b), we expanded the concentration range up to 15 g L^{-1} .

in Figure 2) on the P/D . (A table of P/D values and the respective hyaluronan concentrations is shown in the Supporting Information.) Relative fluorescence was relative to the fluorescence of the sample without hyaluronan. It is necessary to take into account the fact that the displayed data are not obtained as titration curves. Rather, all points from this dependency were prepared as separate samples, measured at least three times and averaged.

The minimum in the relative fluorescence intensity can be found in the dependency in Figure 3a. This minimum is considered to be a point of equivalence, the point where all probe molecules condense as dimers on the accessible binding sites of the polymer. If all carboxylic groups are taken into account as possible binding sites and the acridine orange molecules condense to form dimers, then a value of 0.5 for the point of equivalence can easily be predicted (for each carboxylic anion, two probe molecules are necessary). As is obvious from Figure 3a, the fluorescence intensity starts to decrease only at a P/D of 0.5, and the experimental value of the equivalence point is found at around $P/D = 3$ and is denoted as $(P/D)_e$.

The high value of the equivalence point can be explained in three different ways. First, hyaluronan is not fully dissociated under these experimental conditions, but the pH of samples suggests the full dissociation of hyaluronan. Second, some carboxylic groups are not accessible for AO molecules, or AO dimer formation is prevented probably because of interchain interactions. Third, interactions between AO and hyaluronan are weak, which contributes to the high value of the equivalence point. It is possible that AO dimers are formed via interchain interactions which could cause the inaccessibility of other carboxylic groups. The value $P/D = 3$ means that only (100/6)% of polymer binding sites (carboxylic groups) are accessible

for the formation of acridine orange dimers. The calculation of the accessibility of polymer binding sites is based on the assumption that, for fully dissociated polymer, each carboxylic group possesses two molecules of acridine orange to form dimers and to obtain the minimum in fluorescence intensity. In other words, $P/D = 3$ represents a 6-fold less efficient degree of AO dimer formation when compared to the ideal case. It should be noted that the real concentration of hyaluronan in the sample at this equivalence point is 20 mg L^{-1} . At this concentration we are dealing with a highly diluted polymer regime; therefore, the polyelectrolyte hyaluronan should be stretched and fully dissociated.³⁹ However, in the presence of oppositely charged acridine orange, a similar phenomenon of a partial collapse may occur, as observed in polyelectrolyte–surfactant systems²² in which the chain extension is decreased, which may also result in the hiding of hyaluronan carboxylic groups. If this is the case, then the hyaluronan concentration for such collapse in the presence of AO should be around 0.02 g/L . The relatively high $(P/D)_e$ value is also consistent with the observation of no phase separation in hyaluronan–AO systems, which again indicates some similarity with polyelectrolyte–surfactant systems in which the formation of electrostatically stabilized colloidal dispersions was observed at high polyelectrolyte-to-surfactant ratios.²²

Above the $(P/D)_e$, the number of available polymer binding sites increases with a concomitant increase in the fluorescence intensity because of the dissociation of acridine orange dimers. It is remarkable that when the concentration of binding sites, in fact, of sodium hyaluronate, increases nearly 30 times (from $P/D \approx 3$ –90), the fluorescence intensity measured for $P/D \approx 90$ is lower than the values at low P/D . This suppressed fluorescence intensity may be caused by conformational changes in hyaluronan.

If we expand the P/D range to the higher concentrations of hyaluronan, then unexpected results are obtained. As can be seen in Figure 3b, above a P/D of 147 (when the hyaluronan concentration is exactly 1 g L^{-1}) another decrease in fluorescence intensity is observed; a second minimum can be found at $P/D = 882$ (when the concentration of hyaluronan is around 6 g L^{-1}).

At first sight it seems that this decrease cannot be easily explained by dimer condensation because the theoretical number of polymer binding sites is too high. On the other hand, the decrease and subsequent increase in fluorescence is statistically relevant. Because of the sensitivity of the excited state with respect to many conditions (e.g., viscosity, polarity, the presence of ions,...) another method to confirm the obtained results would be useful. In the case of AO, absorption spectroscopy can yield important information.

The absorption maximum of the monomeric form of AO is located at 492 nm and is often called the α -band. In absorption spectra, another two peaks can be found. The first, the β -band, is located at 465 nm and is related to the dimer peak. Between the α - and β -bands, an isosbestic point can be found at around 470 nm . At a high concentration of AO in the system, the β -band is replaced by the γ -band at $\sim 450 \text{ nm}$. This band is related to the absorption band for AO oligomers.¹¹

In our study we compared fluorescence and absorption data (Figure 4). For the absorption spectra we used the ratio of dimer to monomer absorbance determined at 465 and 492 nm , respectively (in Figure 4 depicted as dimer:monomer, which directly reflects changes in dimer presence in the sample). Despite the fact that the fluorescence and absorption data were

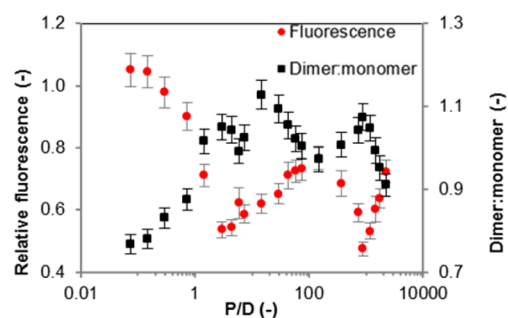


Figure 4. Comparison of dependencies of the relative fluorescence intensity and dimer:monomer ratio on the P/D . The concentration of hyaluronan covers the range from 0.5 mg L^{-1} to 15 g L^{-1} . Fluorescence is relative to the sample in which hyaluronan is not present.

collected according to different photophysical processes, they exhibit correlation behavior. In the region where fluorescence decreases, an increasing dimer:monomer ratio can be found and vice versa.

It can also be shown that interactions between acridine orange and hyaluronan have an electrostatic origin. In this case, the addition of low-molecular-weight salt can directly suppress the interaction via the shielding of charges. Figure 5

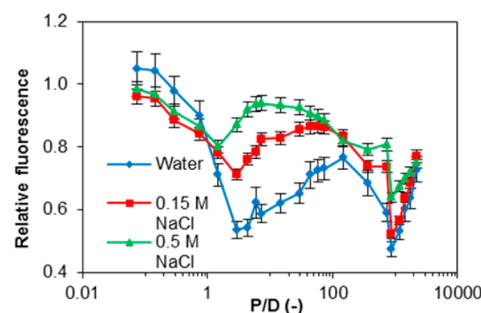


Figure 5. Dependencies of relative fluorescence intensity on P/D at different ionic strengths of the solution. The ionic strength was influenced by sodium chloride. Fluorescence is relative to the sample in which hyaluronan is not present.

summarizes the results from these experiments. At first sight, the addition of sodium chloride to the environment leads to suppression of the interaction between probe and polymer. This is manifested in higher values of relative fluorescence around $(P/D)_e$ with increasing ionic strength. The value of $(P/D)_e$ remains roughly the same for 0.15 M and decreases slightly from 3 to 2 for 0.5 M NaCl . Also, for the region between $(P/D)_e$ and a P/D of around 147, values of relative fluorescence follow changes in ionic strength.

A remarkable phenomenon occurs in the second-decrease region. This decrease is still present, and for 0.15 M NaCl , it seems not to be suppressed as much as the decrease around $(P/D)_e$. This phenomenon is interesting because hyaluronan occurs in mammalian tissue in units of grams per liter, and 0.15 M is the ionic strength of the human physiological environment. However, the mechanism behind it is open to discussion.

Thus, it can be concluded that the obtained results from the fluorescence measurements are a relevant reflection of dimer:monomer proportions in solution and that changes in fluorescence intensities are not caused by probe concentration fluctuations. AO labels at least a portion of hyaluronan

carboxylic groups with the equivalence point of $(P/D)_e = 3$, which corresponds to some saturation of the label on the labeled groups. However, these results do not directly explain the second decrease or rather the second region where the amount of AO dimer significantly increases.

One of the possible explanations of this phenomenon could be found in conformational changes in hyaluronan chains in solution or intrachain interactions. In units of grams per liter, hyaluronan should take a conformation that makes most binding sites inaccessible for electrostatic interaction with acridine orange. We showed changes in conformation using microrheology. This method allows the determination of the mean viscosity of the microstructure of a sample because small sensors used for microrheology determine the microviscosity of the microenvironment in contrast to macroscopic rheology or viscosity measurements. These small sensors better reflect small conformational changes in a sample. Of course, hyaluronan solutions, especially at concentrations above tens of milligrams per liter, are non-Newtonian fluids, so the obtained microviscosity values from microrheology are relevant only for comparison between them. The microrheology method was calibrated to the viscosity of water.

Figure 6 compares the obtained fluorescence and viscosity data. Both types of data were obtained for hyaluronan with a

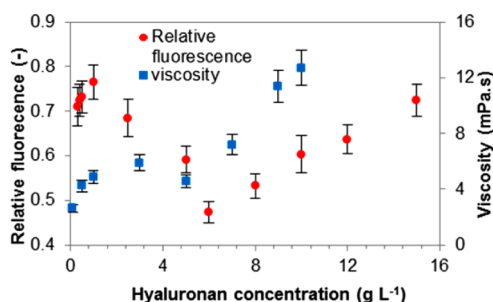


Figure 6. Dependencies of the fluorescence intensity and viscosity obtained from microrheology experiments on the hyaluronan concentration. Fluorescence is relative to the sample in which hyaluronan is not present.

molecular weight of 300 kg mol^{-1} in aqueous solution. The dependency of viscosity on concentration increases steeply at first and then shows a leveling off with a weak maximum within the range of roughly 3–5 g of hyaluronan per liter. It then exhibits an abrupt increase, which corresponds to the reincrease in relative fluorescence (after the second minimum in Figure 4).

More accurately, after $(P/D)_e = 3$ (hyaluronan concentration of 0.02 g L^{-1} , cf. Table S1), there is a region where the viscosity as well as fluorescence intensity (or dimer:monomer ratio) increases. This can be explained by the increasing concentration of polymer in solution, with more polymer chains meaning more binding sites and more barriers. An increase in viscosity is hindered in the region around 1 g L^{-1} hyaluronan, and at this point, the fluorescence starts to decrease significantly with increasing hyaluronan concentration. Thus, in the concentration region of 1 to 5 or 6 g L^{-1} , it appears that more chains in solution mean fewer binding sites and a smaller effect on the viscosity of the solution. In the region between 5 and 6 g L^{-1} both dependencies have their minimum, and above this region the viscosity as well as fluorescence intensity increases linearly. This increase can be explained by interchain interactions of

hyaluronan because at this concentration the chain domains start to overlap.

Here it can be concluded that changes in the occupation of polymer binding sites by cationic probes are commensurate with changes in viscosity. Especially in the region from 1 to 5 or 6 g L^{-1} it seems that polymer chains added to the solution form some kind of aggregate which does not affect the microviscosity and shields charged binding sites against interactions with cationic probes.

3.2. Interaction of CTAB with the Acridine Orange–Hyaluronan System. In this part of our study we were interested in whether the cationic surfactant CTAB is able to replace acridine orange dimers attached to the hyaluronan chain. We used a constant concentration of hyaluronan and acridine orange corresponding to the equivalence point determined in the previous section.

The absorption spectra showed a significant increase in absorbance when even $10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ CTAB was added to the acridine orange–hyaluronan system (spectra are shown in Supporting Information; they are represented also by the dimer:monomer ratio in Figure 7, see further in the text). In the

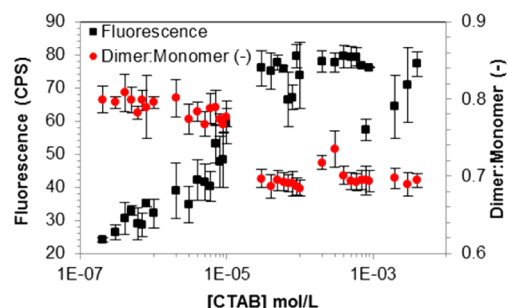


Figure 7. Dependencies of the fluorescence intensity and dimer:monomer ratio as a function of CTAB concentration in the AO–hyaluronan–CTAB system (concentrations of AO and hyaluronan correspond to the equivalence point $(P/D)_e = 3$).

absence of hyaluronan, there was no change in absorption spectra when CTAB was added to the AO solution; thus, the changes in absorption spectra in the presence of hyaluronan and with increasing CTAB concentration were caused by the electrostatic interaction of CTAB with hyaluronan. CTAB started to replace the acridine orange dimers, the dimers dissociated, and the dimer:monomer ratio decreased (i.e., the absorbance increased), especially around the CTAB concentration of 10^{-5} M . An interesting phenomenon occurred around the critical micelle concentration (in the literature, the CMC of CTAB is $0.92\text{--}1 \text{ mM}^6$) as the dimer:monomer ratio increased again (i.e., the absorbance decreased). CTAB probably started to form free micelles, which led to electrostatic attraction between acridine orange monomers in bulk solution and dissociated carboxylic groups. Acridine orange dimers were formed again, which was the reason for the increase in the dimer:monomer ratio. The reaggregation of acridine orange dimers caused both an increase in absorbance and a change in the dimer:monomer ratio.

The interaction of CTAB with the AO–hyaluronan system was further studied by steady-state fluorescence (Figure 7). The fluorescence intensity of acridine orange in a sample at the equivalence point $(P/D)_e$ without the addition of CTAB was significantly smaller than the fluorescence intensity in the presence of CTAB at the lowest concentration used, which

indicates that, at the equivalence point, there should be significant occupation of carboxylic groups of hyaluronan by AO dimers. The AO dimer has a reported emission band at around 650 nm.^{16,12,40} In our case, no such peak appeared around this region in any sample, which would suggest either no or very weak aggregation of AO on carboxylic groups of hyaluronan. However, the dependency of both relative fluorescence and the dimer:monomer ratio on P/D depicted in Figure 4 shows changes in the fluorescence intensity and dimer:monomer ratio, respectively, and confirms the formation of AO dimers.

After the addition of surfactant at a concentration lower than its CMC, the fluorescence intensity increased rapidly (Figure 7). This increase in fluorescence intensity (as well as the decrease in absorbance described above in the text) could be ascribed to the electrostatic interaction between hyaluronan and CTAB and to the dissociation of AO dimers. When the surfactant concentration was close to its CMC, the fluorescence intensity decreased (Figure 7). Such a phenomenon may be caused by the aggregation of some AO monomers into dimers again. Before the critical micelle concentration was reached, the electrostatic interaction caused the molecules of the surfactant not to remain at the air–water interface but to bind to carboxylic groups of hyaluronan.^{20–23} When the CMC of CTAB was reached, the surfactant molecules formed micelles not only on the hyaluronan chain but also in bulk water, which may again have led to the reavailability of some binding sites for AO. We believe that after the formation of micelles there are again some free binding sites on the hyaluronan chain where acridine orange forms dimers and that this is the reason that the fluorescence intensity decreased. This situation was seen also in absorption spectra, where the ratio of acridine orange dimer and monomer absorption increased when the CMC of CTAB was reached. In our study, the polyelectrolyte caused the single surfactant molecules to be pulled electrostatically into the water environment and to bind to the polymer chain before the critical micelle concentration was reached. Therefore, in general, electrostatic interactions must be stronger than repulsion between the surfactant chain and bulk water. Molecular dynamics simulations performed by Liu et al.⁴¹ showed the formation of the so-called “bottle-brush” structure caused by the adsorption of surfactants on the polyelectrolyte chain. We believe that this structure can also explain our results with AO. This hypothesis is supported by (unpublished) data from our other fluorescence study, which used traditional fluorescent probe pyrene to investigate the polarity of the microenvironment of the probe. The pyrene excitation polarity index (ExPI) as a function of surfactant concentration was used to evaluate this measurement. The ExPI is based on the fact that in the ground state the pyrene absorption band is shifted bathochromically in a nonpolar environment. The ExPI is obtained when the fluorescence intensities at two positions of the excitation monochromator (333 and 338 nm) are measured while the position of the emission monochromator (392 nm) remains constant.⁴² An example of data collected for hyaluronan is shown in Figure S3 in the Supporting Information, together with the data from this work. At low surfactant concentrations (before the critical aggregation concentration) we can see no change in ExPI when compared to water, while the fluorescence intensity of AO increases (cf. Figure 7). This means that surfactants bind to the polyelectrolyte chain but do not form any micellelike aggregates (i.e., they probably form the bottle-brush structure). The

formation of aggregates is detected at higher concentrations by decreasing ExPI (and by the leveling-off of the AO fluorescence intensity).

Fluorescence lifetimes were determined in the pure AO solution and in hyaluronan–AO and hyaluronan–AO–surfactant systems. In a diluted solution of acridine orange, we assumed monoexponential decay; in the AO–hyaluronan system, we assumed bi- or triexponential decay according to the formation of the AO dimer and/or oligomer with longer lifetimes than that of the monomer because fluorescence from the AO dimer excited state is a forbidden process.¹² Then, we assumed that after the addition of surfactant there should be an increase in the relative amplitude of the acridine orange monomer lifetime and that the decay should be monoexponential after the dissociation of all of the dimers. We obtained a monoexponential decay for diluted pure acridine orange solution with a lifetime of 1.75 ns as expected. The lifetime calculated from the decay curve of the equivalence point in hyaluronan–AO was 1.78 ns (i.e., very close to the value determined for pure AO). The equivalence point was determined by steady-state fluorescence as described in the previous section, where we also showed that the decrease in fluorescence intensity suggests the formation of AO aggregates. Lifetime measurements do not confirm the formation of AO dimers, but fluorescence from acridine orange aggregates is a forbidden process, which means that the lifetimes of acridine orange aggregates may not appear in the fluorescence decay. We assume that in steady-state measurements of samples around the equivalence point all we can see is the weak fluorescence of remaining nonaggregated acridine orange monomers. This was also assumed from the fluorescence spectra, where no dimer fluorescence peak appeared. The interaction between acridine orange and hyaluronan is probably not as strong as we assumed (also we have to consider that only 16% of binding sites appear to be available); however, there is still a weak electrostatic interaction and the dimers are still formed, which could be the reason that the fluorescence intensity decreased so rapidly before the equivalence point (Figure 4). Yet, the probability of fluorescence in these aggregates is low; thus, we do not see any other (dimer or oligomer) fluorescence peak in addition to the monomer lifetime. But if we had observed no increase in fluorescence intensity, it would have meant that the surfactant had not replaced acridine orange. It is also possible that the hydrophilic head of CTAB is too large to bond electrostatically to carboxylic groups of hyaluronan because of the hydration of the hyaluronan chain; however, we believe that this is not the case because we see changes in fluorescence intensities as a function of surfactant concentration. The hyaluronan hydration shell was probably the reason that acridine orange formed dimers with no significant fluorescence and why we saw only decreasing (or increasing in the case of interaction with the surfactant) fluorescence from acridine orange monomers.

3.3. Interaction of CTAB with an Acridine Orange–Polystyrenesulfonate System. According to the fluorescence and absorption spectra of acridine orange in the presence of polystyrenesulfonate (PSS), we assume that acridine orange forms dimers in the presence of polystyrenesulfonate (Figure 8). As in the case of hyaluronan, the fluorescence intensity of AO decreased with a concomitant increase in PSS concentration; the minimum was very shallow (Figure 8a) and it was not easy to determine the equivalence point. Apparently, the break point is at a P/D close to 1, in agreement with Peyratout

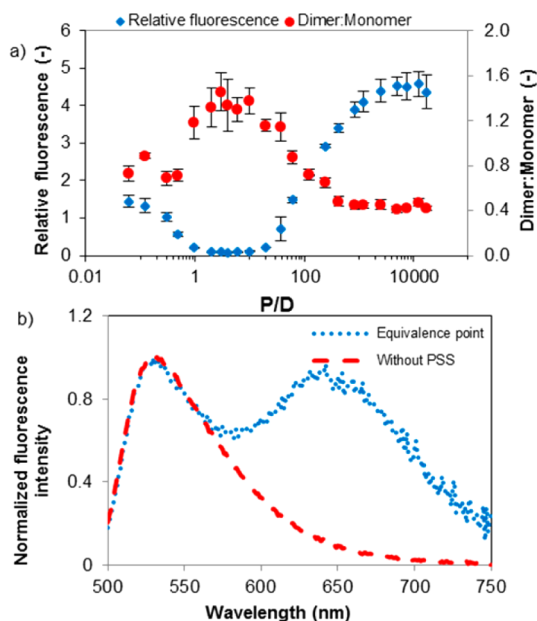


Figure 8. (a) Ratio of relative fluorescence and absorbance (D:M) of acridine orange monomer and dimer in the PSS-AO system. Fluorescence is relative to the sample in which PSS is not present. (b) Emission spectrum of acridine orange from a sample without PSS and with PSS (at the equivalence point determined in this section, $P/D = 4$).

et al.¹² in which, however, a very narrow range of P/D was used. Taking into account the numerical values of fluorescence intensities at P/D above 1 (and up to 20–30), their error bars, the corresponding D:M absorbance, and the relative representation of dimer fluorescence lifetimes (see further in the text), the equivalence point for $(P/D)_e$ was determined to be around 4 (0.825 mg/L). We assume that this value and the shallow minimum are a result of stronger AO interactions with PSS because of the formation of AO oligomers, which were determined using time-resolved fluorescence as described further in the text. Fluorescence spectra also showed the formation of a new (dimer) peak at around 650 nm (see the example of the system at the equivalence point in Figure 8b) when the PSS concentration was increased.^{12,19} This result suggests that AO dimer formation is much stronger in the presence of polystyrenesulfonate than in the presence of hyaluronan. At a P/D of around 10, there was an increase in fluorescence intensity accompanied by a decrease in the dimer:monomer absorbance ratio, which was obviously caused by the dissociation of acridine orange dimers due to the existence of too many binding sites to occupy. At this moment, acridine orange binds to the PSS chain, preferably in monomeric form.

After the addition of a premicellar concentration of surfactant (10^{-5} mol/L) to the PSS-AO system, the absorbance of the dimer:monomer ratio rapidly decreased, which suggests the dissociation of acridine orange dimers. Most importantly, however, the dimer peak at around 650 nm disappeared and the fluorescence intensity increased rapidly (results not shown). This means that the surfactant replaced the acridine orange dimers on the polystyrenesulfonate chain. The acridine orange dimers dissociated, which caused an increase in fluorescence intensity and the disappearance of the emission band of the AO dimer. Fluorescence lifetime measurements confirmed steady-state data. The fluorescence decay of acridine orange at the

determined equivalence point of $(P/D)_e = 4$ exhibited a lifetime of 1.66 ns for monomer, 15.94 ns for dimer, and 6.15 ns probably for other AO aggregates or the formation of an acridine orange–PSS complex, as reported for acridine orange–DNA complexes.⁴³ We assumed that the lifetime of 15.94 ns was the dimer lifetime because iterative reconvolution recovered the majority of long-lived components when we set the emission monochromator to 650 nm, where the emission maximum of the AO dimer is located. According to Ito et al., the lifetime of the AO dimer in the PVA film was around 10 ns.¹⁶ The relative representation of AO dimers increased with increasing P/D , and the maximum was recovered at around $P/D = 4$. Then, the relative representation of AO dimers decreased with the increasing representation of AO oligomers. A triexponential function to fit data around the equivalence point was used because the correlation between the measured data and fitting parameters was poor for a biexponential function (Figure S2 in Supporting Information). When a triexponential function was used, standard deviation values were randomly distributed around zero (Figure S2) and the χ_R^2 value decreased from 2.3 to 1.2 when compared to the biexponential function. After the addition of the above-mentioned concentration of surfactant (10^{-5} mol/L), fluorescence decay became monoexponential with a lifetime of 1.8 ns.

On the basis of the above results, the titration of acridine orange and PSS solution with CTAB was performed with an automatic titrator, and the emission spectrum of acridine orange was measured after every addition of surfactant. We managed to obtain a micro- to millimolar concentration range with minimized human error during the preparation of such small concentrations and the pipetting of such small volumes. From the plot of fluorescence intensity as a function of CTAB concentration, it is obvious that after the addition of a micromolar concentration the fluorescence intensity increased (Figure 9a). The increase in fluorescence intensity means that monomeric surfactant molecules replaced acridine orange dimers. These assumptions are confirmed in a plot of the monomer:dimer fluorescence intensity ratio as a function of CTAB concentration (Figure 9b). The monomer/dimer fluorescence intensity ratio increased after the first addition of surfactant until this ratio stabilized. The stabilization suggests the replacement of most of the AO dimers with surfactant molecules. Figure 9b suggests that the monomer:dimer ratio was stable after the addition of more than 1×10^{-5} M concentration of surfactant. This means that, as suggested in Figure 9a, the decrease in fluorescence intensity was caused by the dilution of the sample while the system was titrated by the surfactant.

3.4. Comparison of the Two Polyelectrolytes. A comparison of Figures 4 and 8a shows that labeling the two polyelectrolytes with acridine orange initially followed the same pattern (at low values of P/D) except for the first two or three points where the polymer concentration was very low, when the fluorescence intensity decreased with increasing P/D , and the absorbance ratio of dimer:monomer decreased in the same time. After the equivalence (saturation) point was reached, the fluorescence intensity in the case of PSS (the polyelectrolyte with higher charge density) started to increase and the dimer:monomer ratio decreased, which corresponded to the increasing number of AO bound in monomeric form to the increased number of available sulfonate groups. In the case of hyaluronan, the polyelectrolyte with low charge density, the

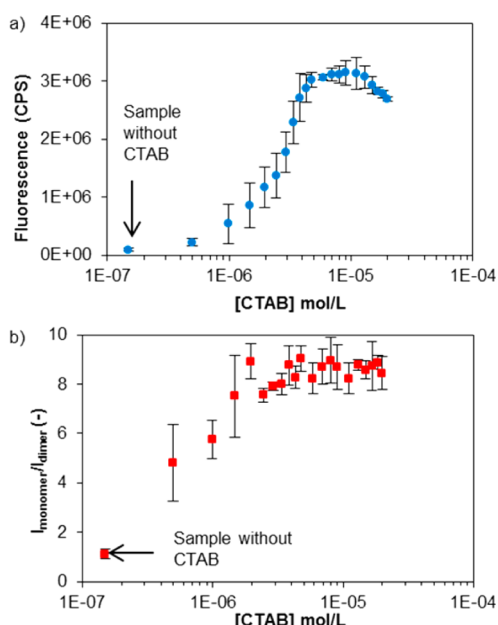


Figure 9. (a) Plot of the acridine orange fluorescence intensity as a function of increasing CTAB concentration. (b) Plot of the AO monomer/dimer fluorescence intensity ratio as a function of surfactant concentration. The concentrations of AO and PSS were held constant in all samples.

situation above the equivalence point was more complex. The fluorescence intensity showed a second minimum accompanied by a maximum in the dimer:monomer ratio dependence. This was probably caused by overlapping hydrated biopolymer chains and related microrheological effects at high hyaluronan concentrations. In the hyaluronan-containing systems, no fluorescence characteristics (either stationary or time-resolved) corresponding to the AO dimer were detected. In these systems, AO dimer fluorescence was quenched by effects of the dimer microenvironment, and dimer existence could be followed by absorption spectroscopy only. Both hyaluronan- and PSS-based systems prepared at the equivalence point composition responded to the addition of CTAB already at very low concentrations. The fluorescence intensity increased in comparison to both the surfactant-free system and with increasing surfactant concentration, and at the same time, the proportion of AO dimer decreased (which was more pronounced for the PSS-based systems). This demonstrated interactions between (AO-labeled) polyelectrolyte and surfactant. The changes in spectroscopic characteristics with surfactant concentration leveled off at a CTAB concentration of about 3×10^{-5} M for hyaluronan and 4×10^{-6} M for PSS, which are believed to correspond to the replacement of AO by the surfactant. These concentrations can be viewed as kinds of critical aggregation concentrations determined by the fluorescence method; as expected on the basis of charge density, the value for the PSS-based system was significantly lower than that for the hyaluronan-based system. These conclusions are also supported by the experiments with pyrene mentioned above and are illustrated for hyaluronan in Figure S3 and for PSS in Figure S4 in the Supporting Information. At the stated concentrations, the pyrene excitation polarity index started to decrease, indicating the formation of aggregates with hydrophobic domains. The value for PSS was significantly lower than characteristic values reported in the literature on the basis of

surface tension measurements,²¹ but the value for hyaluronan was in excellent agreement with the critical binding concentration determined from NMR self-diffusion measurements.³⁰ The fluorescence method presented in this work, like the NMR measurements, is more sensitive to interactions on the molecular level than methods such as surface tension.

4. CONCLUSIONS

Acridine orange was used as a fluorescent label attached to oppositely charged functional groups of biopolymer or synthetic polyelectrolyte–hyaluronan and polystyrenesulfonate, respectively. The labeling changed the fluorescence and absorption properties of dye molecules due to the formation of AO dimers. The ratio of the number of polymer binding sites to the number of dye molecules (P/D) at the equivalence point was determined at the point of the fluorescence intensity minimum. In the case of hyaluronan, a second minimum was detected at a much higher P/D value, probably caused by hyaluronan conformational changes at high concentrations. The dissociation of the AO dimer upon the addition of surfactant to the system corresponding to the equivalent P/D value was then used to study polymer–surfactant interactions. The interactions between hyaluronan and AO or surfactant were found to be weaker than the interactions with polystyrenesulfonate, probably due to the high hydration of hyaluronan chains. Critical aggregation concentrations of CTAB determined by the fluorescence method were 3×10^{-5} M for hyaluronan and 4×10^{-6} M for PSS. In the presence of both polyelectrolytes, surfactant molecules were pulled into the solution before the critical micelle concentration was reached. The formation and dissociation of acridine orange dimer exhibited the formation of the bottle-brush structure caused by the adsorption of surfactants on the polyelectrolyte chain.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Hyaluronan and PSS concentrations and respective P/D and pH values. UV–vis spectra of acridine orange in the presence of hyaluronan with increasing concentration of CTAB. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: xcmondek@fch.vutbr.cz.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by project no. LO1211 (Ministry of Education, Czech Republic).

■ REFERENCES

- (1) Hiemenz, P. C.; Rajagopalan, R. *Principles of Colloid and Surface Chemistry*, 3rd ed.; Marcel Dekker: New York, 1997; p 650.
- (2) Kabanov, A. V.; Nazarova, I. R.; Astafieva, I. V.; Batrakova, E. V.; Alakhov, V. Y.; Yaroslavov, A. A.; Kabanov, V. A. Micelle Formation and Solubilization of Fluorescent Probes in Poly(oxyethylene-b-oxypropylene-b-oxyethylene) Solutions. *Macromolecules* **1995**, *28*, 2303–2314.
- (3) Weiss, J.; Coupland, J. N.; McClements, D. J. Solubilization of Hydrocarbon Emulsion Droplets Suspended in Nonionic Surfactant Micelle Solutions. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 1066–1071.

- (4) Goddard, E. D.; Turro, N. J.; Kuo, P. L.; Ananthapadmanabhan, K. P. Fluorescence probes for critical micelle concentration determination. *Langmuir* **1985**, *1*, 352–355.
- (5) Dominguez, A.; Fernandez, A.; Gonzalez, N.; Iglesias, E.; Montenegro, L. Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques. *J. Chem. Educ.* **1997**, *74*, 1227.
- (6) Aguiar, J.; Carpena, P.; Molina-Bolívar, J. A.; Carnero Ruiz, C. On the determination of the critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ratio method. *J. Colloid Interface Sci.* **2003**, *258*, 116–122.
- (7) Yu, L.; Tan, M.; Ho, B.; Ding, J. L.; Wohland, T. Determination of critical micelle concentrations and aggregation numbers by fluorescence correlation spectroscopy: Aggregation of a lipopolysaccharide. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *556*, 216–225.
- (8) Gehlen, M. H.; De Schryver, F. C. Time-resolved fluorescence quenching in micellar assemblies. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 199–221.
- (9) Alargova, R. G.; Kochijashky, I. I.; Sierra, M. L.; Zana, R. Micelle Aggregation Numbers of Surfactants in Aqueous Solutions: A Comparison between the Results from Steady-State and Time-Resolved Fluorescence Quenching. *Langmuir* **1998**, *14*, 5412–5418.
- (10) Wattebled, L.; Laschewsky, A.; Moussa, A.; Habib-Jiwan, J.-L. Aggregation Numbers of Cationic Oligomeric Surfactants: A Time-Resolved Fluorescence Quenching Study. *Langmuir* **2006**, *22*, 2551–2557.
- (11) Costantino, L.; Guarino, G.; Ortona, O.; Vitagliano, V. Acridine orange association equilibrium in aqueous solution. *J. Chem. Eng. Data* **1984**, *29*, 62–66.
- (12) Peyratout, C.; Donath, E.; Daehne, L. Electrostatic interactions of cationic dyes with negatively charged polyelectrolytes in aqueous solution. *J. Photochem. Photobiol., A* **2001**, *142*, 51–57.
- (13) Lamm, M. E.; Neville, D. M. The Dimer Spectrum of Acridine Orange Hydrochloride. *J. Phys. Chem.* **1965**, *69*, 3872–3877.
- (14) Antonov, L.; Gergov, G.; Petrov, V.; Kubista, M.; Nygren, J. UV-Vis spectroscopic and chemometric study on the aggregation of ionic dyes in water. *Talanta* **1999**, *49*, 99–106.
- (15) Lauretti, F.; Lucas de Melo, F.; Benati, F.; amp, x; cio, J.; de Mello Volotão, E.; Santos, N.; Linhares, R. E. C.; Nozawa, C. Use of acridine orange staining for the detection of rotavirus RNA in polyacrylamide gels. *J. Virol. Methods* **2003**, *114*, 29–35.
- (16) Ito, F.; Kakiuchi, T.; Nagamura, T., Excitation Energy Migration of Acridine Orange Intercalated into Deoxyribonucleic Acid Thin Films. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 6983–6988.
- (17) Sarkar, D.; Misra, T. N. Electrical conduction in some nucleic acid base complexes with acridine orange dye: study of localized levels. *Biomaterials* **1989**, *10*, 202–205.
- (18) Smal, J.; Kathuria, S.; De Meyts, P. Acridine orange, an inhibitor of protein kinase C, abolishes insulin and growth hormone stimulation of lipogenesis in rat adipocytes. *FEBS Lett.* **1989**, *244*, 465–468.
- (19) Wang, F.; Yang, J.; Wu, X.; Wang, X.; Feng, L.; Jia, Z.; Guo, C. Study on the formation and depolymerization of acridine orange dimer in acridine orange–sodium dodecyl benzene sulfonate–protein system. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *298*, 757–764.
- (20) Goddard, E. D. Polymer/Surfactant Interaction: Interfacial Aspects. *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *256*, 228–235.
- (21) Taylor, D. J. F.; Thomas, R. K.; Penfold, J. Polymer/surfactant interactions at the air/water interface. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2007**, *132*, 69–110.
- (22) Bain, C. D.; Claesson, P. M.; Langevin, D.; Meszaros, R.; Nylander, T.; Stubenrauch, C.; Titmuss, S.; von Klitzing, R. Complexes of surfactants with oppositely charged polymers at surfaces and in bulk. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2010**, *155*, 32–49.
- (23) Goddard, E. D.; Ananthapadmanabhan, K. P. Applications of Polymer-Surfactant Systems. In *Polymer-Surfactant Systems*; Kwak, J. C. T., Ed.; Marcel Dekker: New York, 1998; Vol. 77, pp 21–65.
- (24) Lapčák, L.; De Smedt, S.; Demeester, J.; Chabreček, P. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2663–2684.
- (25) Di Meo, C.; Panza, L.; Capitani, D.; Mannina, L.; Banzato, A.; Rondina, M.; Renier, D.; Rosato, A.; Crescenzi, V. Hyaluronan as Carrier of Carboranes for Tumor Targeting in Boron Neutron Capture Therapy. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 552–559.
- (26) Qhattal, H. S. S.; Liu, X. Characterization of CD44-Mediated Cancer Cell Uptake and Intracellular Distribution of Hyaluronan-Grafted Liposomes. *Mol. Pharmaceutics* **2011**, *8*, 1233–1246.
- (27) Oh, E. J.; Park, K.; Kim, K. S.; Kim, J.; Yang, J.-A.; Kong, J.-H.; Lee, M. Y.; Hoffman, A. S.; Hahn, S. K. Target specific and long-acting delivery of protein, peptide, and nucleotide therapeutics using hyaluronic acid derivatives. *J. Controlled Release* **2010**, *141*, 2–12.
- (28) Platt, V. M.; Szoka, F. C. Anticancer Therapeutics: Targeting Macromolecules and Nanocarriers to Hyaluronan or CD44, a Hyaluronan Receptor. *Mol. Pharmaceutics* **2008**, *5*, 474–486.
- (29) Vitagliano, V.; Costantino, L.; Zagari, A. Interaction between Acridine Orange and poly(styrenesulfonic acid). *J. Phys. Chem.* **1973**, *77*, 204–210.
- (30) Thalberg, K.; Lindman, B. Interaction between hyaluronan and cationic surfactants. *J. Phys. Chem.* **1989**, *93*, 1478–1483.
- (31) Cowman, M. K.; Matsuoka, S. Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340*, 791–809.
- (32) Francius, G.; Hemmerlé, J.; Voegel, J. C.; Schaaf, P.; Senger, B.; Ball, V. Anomalous Thickness Evolution of Multilayer Films Made from Poly-L-lysine and Mixtures of Hyaluronic Acid and Polystyrene Sulfonate. *Langmuir* **2006**, *23*, 2602–2607.
- (33) Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer: New York, 2006; p 954.
- (34) Periasamy, N. Analysis of Fluorescence Decay by the Nonlinear Least Squares Method. *Biophys. J.* **1988**, *54*, 961–967.
- (35) Grinvald, A.; Steinberg, I. Z. On the analysis of fluorescence decay kinetics by the method of least-squares. *Anal. Biochem.* **1974**, *59*, 583–598.
- (36) Gardel, M. L.; Valentine, M. T.; Weitz, D. A. Microrheology. In *Microscale Diagnostic Techniques*; Springer: Berlin, 2005; pp 1–50.
- (37) Mason, T. G.; Weitz, D. A. Optical Measurements of Frequency-Dependent Linear Viscoelastic Moduli of Complex Fluids. *Phys. Rev. Lett.* **1995**, *74*, 1250–1253.
- (38) Wirtz, D. Particle-Tracking Microrheology of Living Cells: Principles and Applications. *Annu. Rev. Biophys.* **2009**, *38*, 301–326.
- (39) Matteini, P.; Dei, L.; Carretti, E.; Volpi, N.; Goti, A.; Pini, R. Structural Behavior of Highly Concentrated Hyaluronan. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 1516–1522.
- (40) Byrne, C. D.; de Mello, A. J.; Barnes, W. L. Variable-Angle Time-Resolved Evanescent Wave-Induced Fluorescence Spectroscopy (VATR-EWIFS): A Technique for Concentration Profiling Fluorophores at Dielectric Interfaces. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 10326–10333.
- (41) Liu, Z.; Shang, Y.; Feng, J.; Peng, C.; Liu, H.; Hu, Y. Effect of Hydrophilicity or Hydrophobicity of Polyelectrolyte on the Interaction between Polyelectrolyte and Surfactants: Molecular Dynamics Simulations. *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 5516–5526.
- (42) Astafieva, I.; Zhong, X. F.; Eisenberg, A. Critical micellization phenomena in block polyelectrolyte solutions. *Macromolecules* **1993**, *26*, 7339–7352.
- (43) Kononov, A. I.; Moroshkina, E. B.; Tkachenko, N. V.; Lemmetyinen, H. Photophysical Processes in the Complexes of DNA with Ethidium Bromide and Acridine Orange: A Femtosecond Study. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *105*, 535–541.