



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

AUTOREFERÁT DIZERTAČNÍ PRÁCE

SUMMARY OF DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Zuzana Hnylučová

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

BRNO 2016

OBSAH

1	ÚVOD	4
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	5
2.1	Aplikace mikrореologických metod ke studiu gelů	5
2.2	Aplikace mikrореologických metod ke studiu biomateriálů	8
2.3	Aplikace mikrореologických metod ke studiu micelárních roztoků	12
2.4	Aplikace mikrореologických technik ke studiu teplotních závislostí viskozity	13
3	CÍLE PRÁCE	15
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	15
5	DISKUZE NEJVZNAMNĚJŠÍCH VÝSLEDKŮ	15
5.1	Vytvoření MATLAB scriptu pro zpracování dat video-mikrореologie (mikroviskozimetrie)	15
5.2	Zavedení a ověření možnosti aplikace FCS mikrореologie	20
5.2.1	Měření homogenních vzorků	20
5.2.2	Měření heterogenních vzorků	21
5.3	Aplikace reologie a mikrореologie ke studiu vlivu teploty na viskozitu roztoku hyaluronanu	23
5.3.1	Porovnání teplotních křivek klasické reologie a DLS mikrореologie za použití 100 nm částic	24
5.3.2	Porovnání relativních viskozit	25
5.4	Aplikace mikrореologie ke studiu procesu gelace agarosy	27
5.4.1	Průběh gelace roztoků agarosy o různých koncentracích	27
5.5	Aplikace mikrореologie ke studiu vlastností mezifázového rozhraní	29
5.5.1	Změna viskozity mezifázového rozhraní v čase	30
6	ZÁVĚR	31
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	32

8	ŽIVOTOPIS	36
9	SEZNAM PUBLIKACÍ	37

MÍSTO ULOŽENÍ

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie,
Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, Česká republika

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 nejlepším.

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. Jejich následná aplikace a studium možnosti využití pro koloidní systémy jako jsou polymerní roztoky, gely, ke studiu vlastností mezifázového rozhraní a mnoha dalších.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Jak již bylo zmiňováno dříve, mikrореologie 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. Mikrореologie může také představovat vhodnou doplňkovou metodu ke klasické reologii[1]. Mnoho výzkumných prací je založeno na srovnávání výsledků jednotlivých mikrореologických 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 mikrореologických 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 [2,3].

Jak pasivní tak aktivní mikrореologické 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 řešební část je zaměřena na aplikace mikrореologických metod především na skupiny materiálů, které byly více či méně využívány také v této dizertační práci.

2.1 Aplikace mikrореologických metod ke studiu gelů

Gely spadají do skupiny materiálů, u kterých patří mikrореologické 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 mikrореologie je využívána Corriganem a kol. [4] 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 síť. Na základě mikrореologických 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. Mikrореologie 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. [5], 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. [6] se zabývali studiem komplexních systémů od částic a biopolymerních gelů, přes keramické suspenze až ke koncentrovaným roztokům surfaktantů pomocí klasické reologie a pasivní mikoreologie použitím DWS.

Studium sol-gel přechodu se stalo předmětem zájmů Moschakise a kol. [7]. Sol-gel přechod kaseinátu sodného podléhajícího gelaci pomocí acidifikace byl studován jednočásticovou mikoreologií a klasickou reologií. Jedním z hlavních účelů této studie bylo také srovnání mikoreologických 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, mikoreologicky získané hodnoty jednotlivých modulů byly jen nepatrně nižší v porovnání s daty makreologickými 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. Mikoreologická metoda opět vykazovala vyšší citlivost a tedy je schopna detekovat změny ve struktuře systému dříve než klasická reologie [8]

Heinemann C. [9] se zabývali studiem reologických vlastností přírodního biopolymeru škrobu za přítomnosti γ -dodecalactonu, který indukuje proces gelování. Pasivní mikoreologie s použitím polystyrenových částic představovala pro tyto účely nejvhodnější měřicí systém.

Stejně tak, jako několik výše zmiňovaných vědeckých skupin, se i Oppong a kol. [10] zabývali porovnáváním výsledků získaných mikoreologickými metodami s výsledky klasické reologie. Konkrétně využívali metody jako jednočásticová mikoreologie 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 ukazují 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 [11].

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 [12]. Stejný jev byl také prokázán u studia kolagenového gelu [13].

Na zkoumání rozdílů reologického chování v mikro a makroprostředí poukazuje také Jason Rich [14] 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 zabývajících se kinetikou gelace, strukturou vzniklého gelu a všech jevů, které s touto problematikou souvisí je soustředěna okolo E. Fursta [15] na universitě Delaware. Pro studium jednotlivých materiálů používají širokou škálu mikroreologických metod v kombinaci s reologií klasickou. Svou pozornost upírají na širokou problematiku mikroreologie,

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 mikrereologie velmi vhodnou metodou s ohledem na množství použitého vzorku a na rychlost pořizování dat [16,17].

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 [18,19].

Kinetika gelace byla studována také u hydrogelů obsahujících peptid β -hairpin MAX1, a to pomocí mikrereologie a CD mikroskopie. Vznik tohoto gelu je spjat se změnou teploty, pH či iontové síly [20]. Struktura β -hairpin MAX1 oligopeptidů byla také měněna a v konečném výsledku bylo dokázáno, že rychlost gelace je možné kontrolovat strukturou peptidových řetězců [21,22].

2.2 Aplikace mikrereologických 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 příliš vysoká, aby indukovala dostatečný signál, který může přístroj spolehlivě vyhodnotit (zředěné roztoky polymerů nebo zředěné suspenze). H. Kang a kol. [23,24]

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 [24] se zabývala otázkou jak cytoskeleton poskytuje buňce strukturní podporu, jelikož tento jev ještě nebyl zcela objasněn. Mikroreologické 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 příčinnou heterogenitu vzorku.

S.K. Lai a kol. [25] 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 vložení 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 mikroreologická 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 [26] studovala stupeň prostorové heterogenity v a bez přítomnosti fascininu - proteinu způsobujícího sesíťování F-aktinu. Byly porovnávány vysoce a nízké koncentrované roztoky F-aktinu s a bez přítomnosti fascininu. 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 mikrereologii 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 mikrereologických metod a to jak pro měření látek viskózních, elastických i viskoelastických [27].

Mikrereologií buněk se ve své studii zabývali také Hyungsuk L. a kol. [28,29], 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 mikrereologické techniky. U aktivního přístupu byla k manipulaci sondy použita optická pinzeta. U pasivního přístupu byl sledován pohyb termicky pohybujících se koloidů k odhadu frekvenční závislosti komplexu smykového modulu. Ačkoli aktivní i pasivní metody vykazovaly podobné výsledky za nízkého napětí, síť F-aktinu vystavena vyššímu napětí vykazovala nelineární chování.

Liu, J. a kol. [3] využili potenciál mikrereologie k měření viskoelasticity roztoku sesíťovaného F-aktinu s různou velikostí strukturních jednotek (length scales) v rozmezí 1 – 100 μm . Hlavním cílem však bylo srovnání jednočásticové mikrereologie s korelační metodou dvoučásticové mikrereologie. Ve výsledku byl viditelný rozdíl mezi jednočásticovou a dvoučásticovou mikrereologií se zvyšující se strukturní délkou F-aktinu.

Heinemann C. a kol. [9] 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 mikrereologie 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 [30] 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 značných zlatých nanočástic v cytoplazmě a jádru živých buněk byly studovány pomocí FCS mikrореologie Gernotem Guigasem a kol. [31]. 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. [32] 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. [33] porovnávali výsledky měření u vodných roztoků vysokomolekulárního polyethylenglykolu získaných pomocí DWS, DLS, video-mikrореologie a FCS mikrореologie. Výsledky mikrореologických 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 mikrореologických metod poskytuje FCS mnohem větší frekvenční rozsah.

2.3 Aplikace mikrореologických metod ke studiu micelárních roztoků

Různé druhy mikrореologických metod byly použity ke studiu micelárních roztoků. Buchanan a kol. [34] vyvinuli pokročilou mikrореologickou 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 přidavkem křemičitanu sodného jako silně vazného protiiontu. Jedním z pokročilých cílů experimentů bylo určení komplexního modulu vzorku v závislosti na frekvenci a srovnání výsledků této mikrореologické metody s výsledky reologie klasické. Závěrem bylo potvrzeno, že výsledky obou reologických metod vykazují excelentní shodu.

Hassan a kol. [35] se zabývali mikrореologií micelárních roztoků jako funkcí koncentrace organické soli, mikrореologií 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. [36] rozvinuli širokopásmovou dvoučásticovou mikrореologii k měření elastického a ztrátového modulu viskoelastických materiálů na základě laserové interferometrie, kterou porovnávali s mikrореologií jednočásticovou. Byla zjištěna kvantitativní shoda mezi jednočásticovou a dvoučásticovou mikrореologií u zesíťovaného 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 mikrореologie 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. [37]. 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. [38] použili optickou mikrореologii 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 mikrореologie u koncentrovaných roztoků surfaktantů. DWS byla představena jako metoda rozšiřující frekvenční rozsah ostatních mikrореologických metod až o několik řádů. Tato technika hraje významnou roli hlavně ve spojení s video-particle tracking microrheology (VPTM), neboli jednočásticové mikrореologie, která exceluje v oblastech velmi nízkých frekvencí.

2.4 Aplikace mikrореologických 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. [39], 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 [40].

Efekt vlivu teploty v rozsahu $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ na dynamické reologické chování vodního roztoku soli kyseliny hyaluronové (1%) byl studován Kennedym a jeho kol. [41]. Zvyšující se teplota významně snižovala smykový modul a komplexní viskozitu u všech studovaných vzorků. Tato změna je chápána na základě zvýšení populace konfirmace 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 [42][42]. 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 [43,44,45].

V roce 2007 publikoval Maleki a kol. [46] 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.

3 CÍLE PRÁCE

Cílem předložené dizertační práce je nastudovat principy a techniky mikrореologie a zavést pasivní techniky v podmínkách FCH VUT v Brně. Navrhnout vhodné, zejména biokoloidní systémy pro jejich otestování, navrhnout způsoby zpracování dat a prostudovat zavedenými technikami základní reologické vlastnosti vybraných systémů. Srovnat výsledky s klasickými makroskopickými reologickými postupy.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Pro samotné experimenty bylo použito několik pasivních mikrореologických technik jako jsou jednočásticová video – mikrореologie, DLS mikrореologie, založená na rozptylu budícího paprsku měřicími částicemi či FCS mikrореologie. Kromě toho byla pro porovnávání využívána také klasická reologie či viskozimetrie.

Pro mikrореologická měření byly použity různé velikosti a povrchové modifikace měřicích částic. Jako systémy pro měření a vyhodnocování využitelnosti mikrореologických metod byly vybrány roztoky kyseliny hyaluronové, gely tvořené roztokem hyaluronanu a tenzidu CTAB, roztoky a gely agarosy či mezifázová rozhraní mezi roztokem BSA (bovine serum albumin) a vzduchem.

5 DISKUZE NEJVZNAMNĚJŠÍCH VÝSLEDKŮ

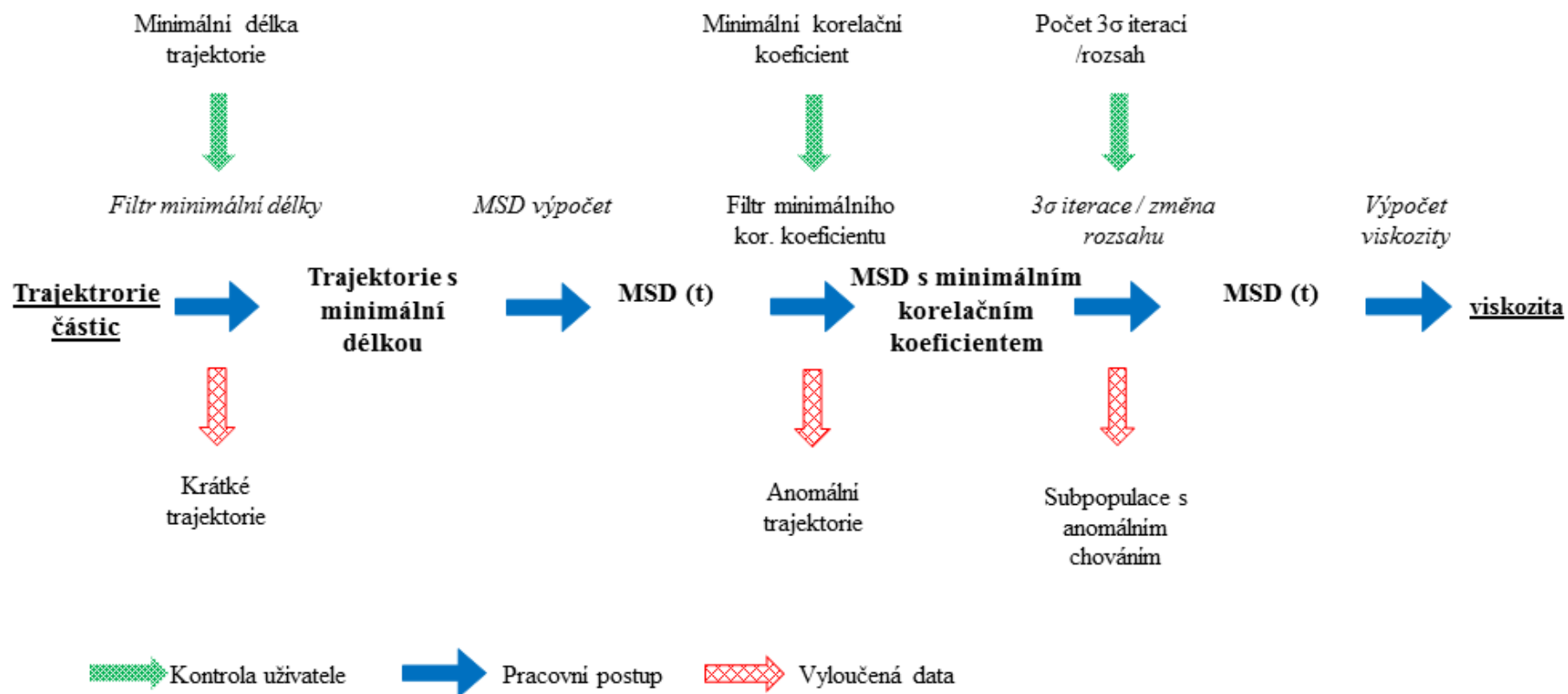
5.1 Vytvoření MATLAB scriptu pro zpracování dat video-mikrореologie (mikroviskozimetrie)

Softwarů pro zpracování videí pohybu mikrореologických částic existuje již celá řada. Na úplném počátku byly vytvořeny kódy v IDL (interactive data language) [47,48], které byly napsány samotnými autory mikrореologie. Tento způsob vyhodnocení dat byl také převážně použit v této dizertační práci. Jelikož však IDL není běžně dostupný software a jeho pořizovací cena je vyšší, byly kódy následně přepsány do programu MATLAB [49], programovacího jazyku Python [50] či byl vytvořen program Labview [51]. Všechny výše uvedené programy však vyžadují značnou znalost používaného programovacího jazyka a pro laického uživatele představují velmi obtížné využití.

Mikroreologie 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 mikroreologie 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.

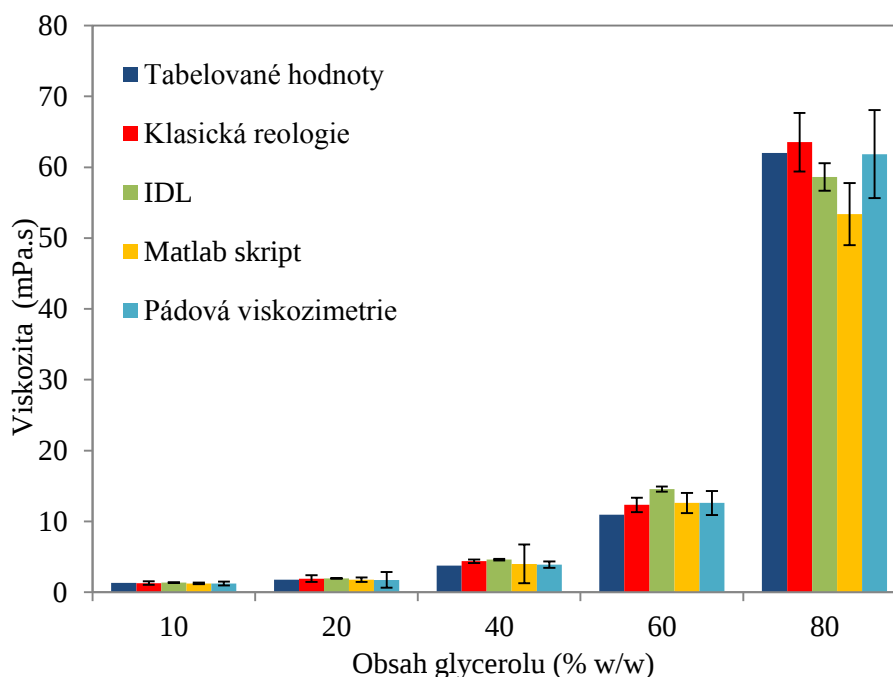
V rámci dizertační práce byl program tohoto typu vytvořen ve spolupráci s biofyzikálním ústavem akademie věd a fakultou informatiky Masarykovy univerzity v Brně. Jednoduchý skript je vytvořen v prostředí Matlabu, nevyžaduje však prakticky žádnou hlubší znalost zmíněného programovacího jazyka. Vyhodnocení 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. 1. 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 [47]**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů..** 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.1: 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 porovnávána také s tabelovanými hodnotami.

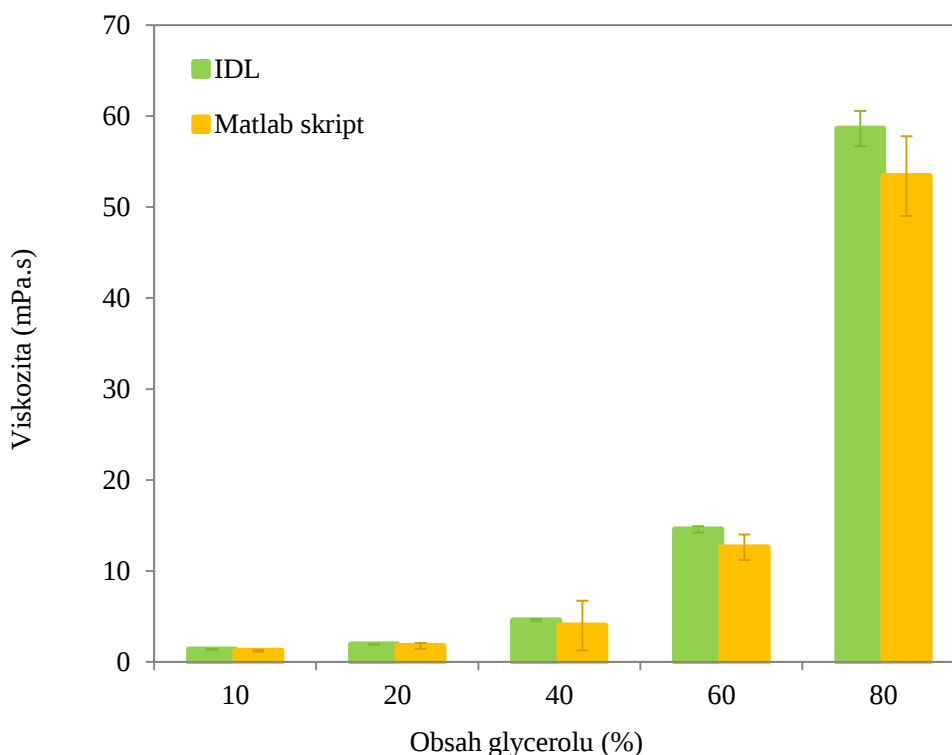


Obr.2: Výsledky měření viskozity glycerolové koncentrační řady

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. 2). Maximální nepřesnost nepřesahovala 15 %.



Obr.3: Výsledky měření roztoků vysokomolekulárního hyaluronanu o různých koncentracích

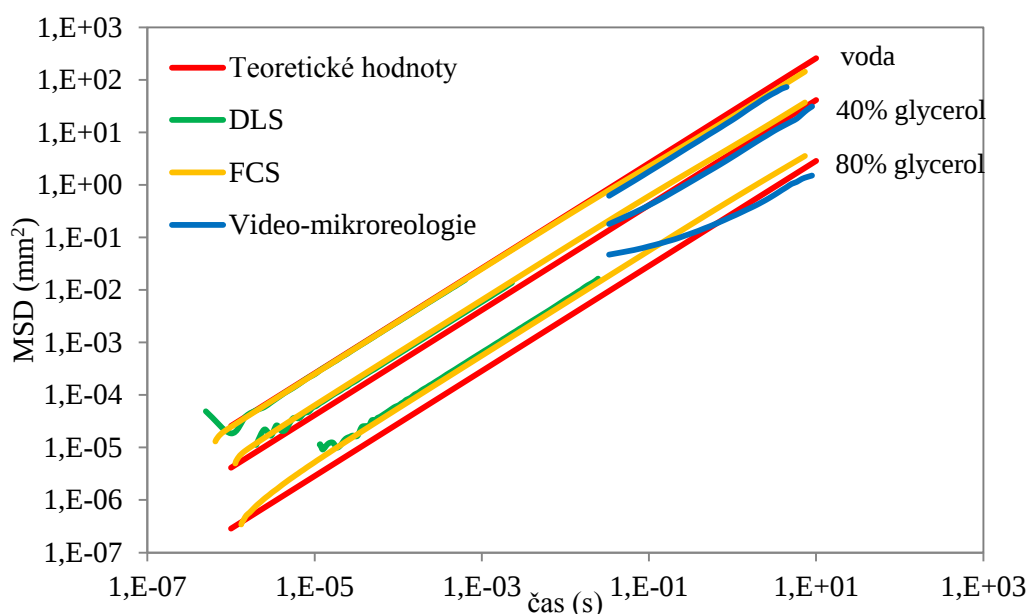
V případech, kdy je třeba měřit viskozitu biologických vzorků, může limitní množství biologického vzorku představovat v mnoha případech velkou překážku. Běžný reometr vyžaduje několik mililitrů vzorku pro jedno měření. Oproti tomu, videomikroreologie použitím Matlab skriptu poukazuje na své výhody při 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) [52].

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 Zavedení a ověření možnosti aplikace FCS mikroréologie

5.2.1 Měření homogenních vzorků

Možnosti FCS mikroréologie 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 mikroréologie (s použitím 100 nm částic) a video-mikroréologie (s použitím 1 μm částic). Přestože je velikost částic velmi důležitá pro interpretaci získaných výsledků, byla u video-mikroréologie 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 pro samotné rozpouštědlo za ideálních podmínek.



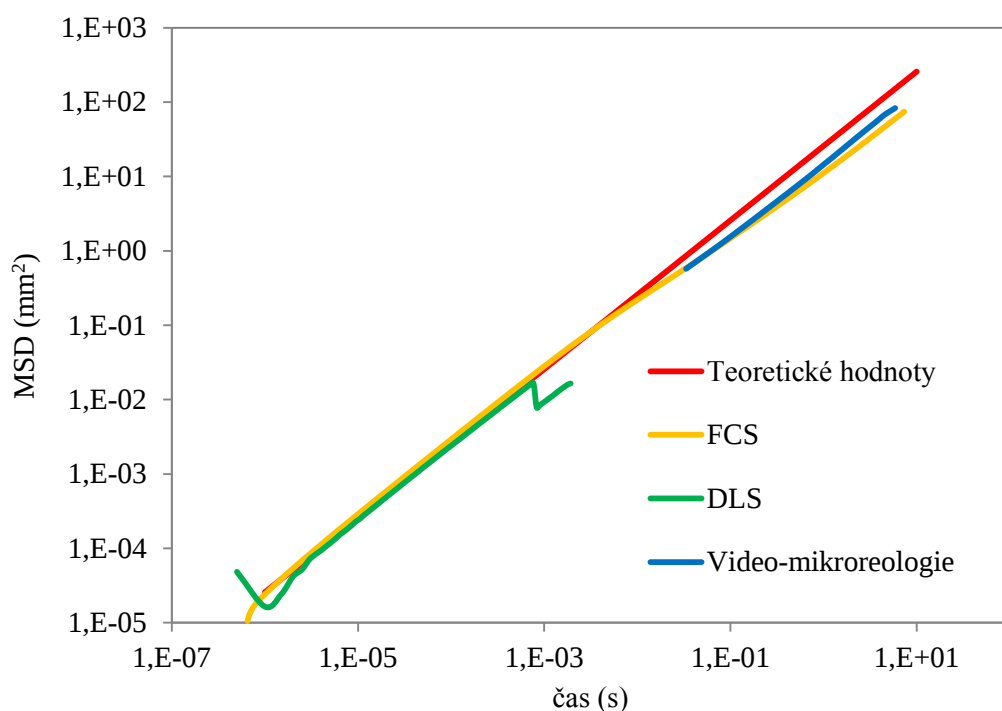
Obr.4: Porovnání výsledků měření FCS (100 nm), DLS (100 nm) a video-mikroréologie demineralizované vody, 40% a 80% roztoku glycerolu

Na první pohled je z grafu patrný rozdílný časový interval měřitelnosti pro jednotlivé metody. Zatímco DLS mikroréologie ukazuje data v nižších časech, video – mikroréologie naopak vyjadřuje pohyb částic ve vyšších časových intervalech. Tento fakt je dán charakterem

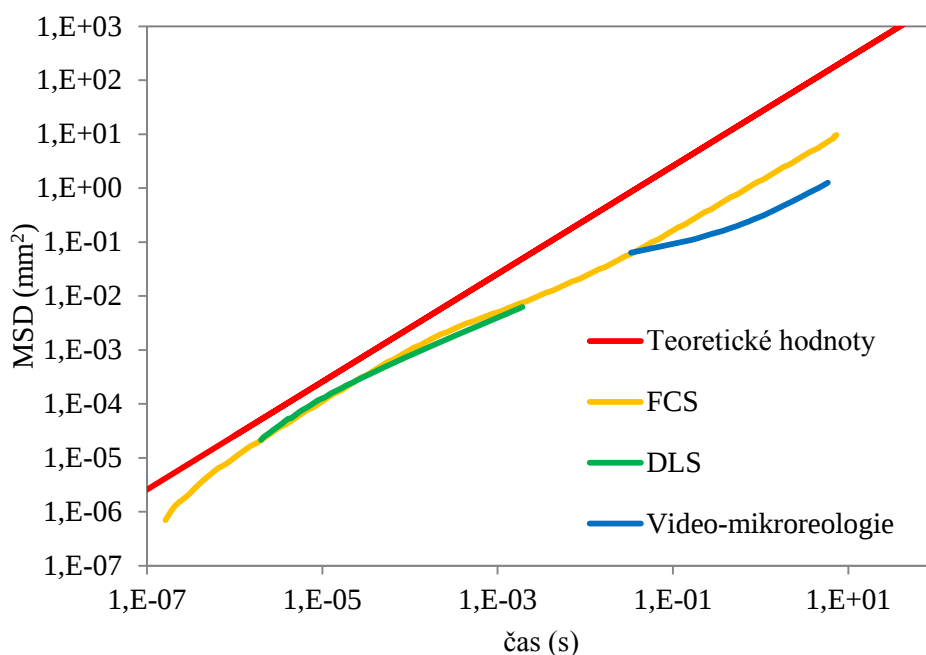
samotných měření. Oproti tomu FCS mikrореologie je schopna vykazovat MSD(t) od velmi nízkých až po velmi vysoké časy.

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 - mikrореologií je velice často způsobena vysokým šumem při měření a neodráží tak vlastnosti zkoumaného vzorku, ale pouze nedokonalosti samotného měřicího systému či postupu měření.

5.2.2 Měření heterogenních vzorků



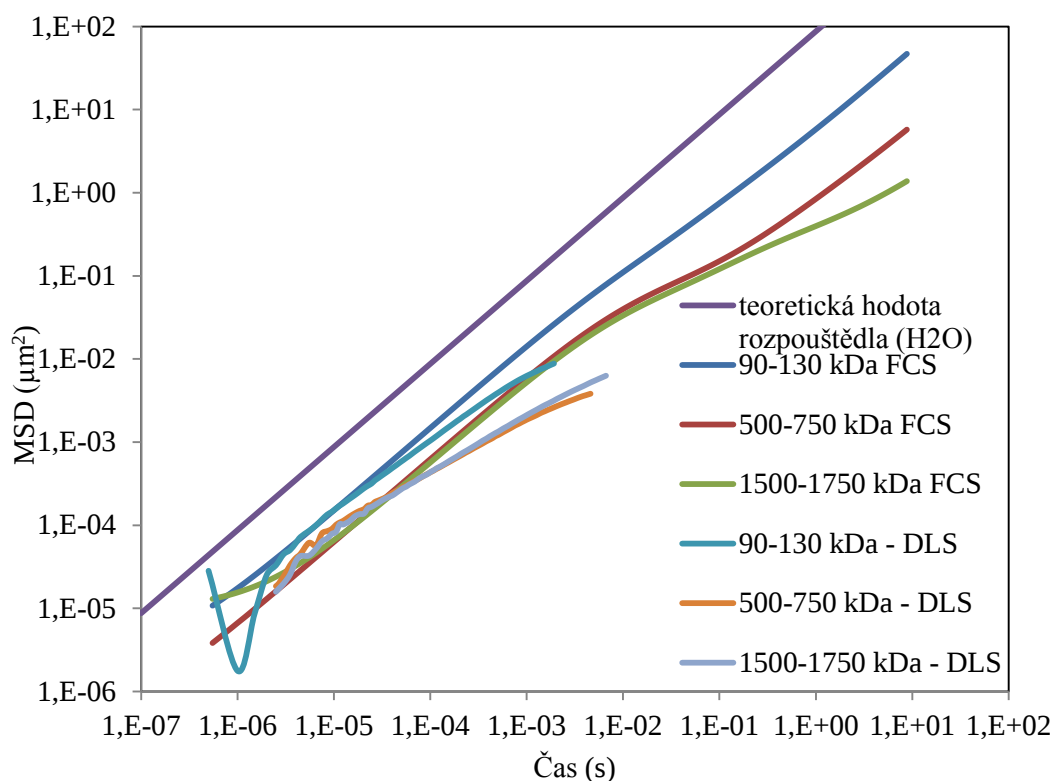
Obr.5: Porovnání výsledků měření FCS (100 nm), DLS (100 nm) a video - mikrореologie pro roztok hyaluronanu ($M_w = 1500 - 1750$ kDa) o koncentraci 0,01 mg/ml, teoretická hodnota v grafech znázorňuje tabelované hodnoty pro případ samotného rozpouštědla



Obr.6: 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.7: Porovnání výsledků měření FCS (100 nm) a DLS (100 nm) o třech molekulových hmotnostech ($M_w = 90 - 130$ kDa; $500 - 750$ kDa; $1500 - 1750$ kDa) a koncentraci 10 mg/ml s použitím 30 nm částic, teoretická hodnota v grafech 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 měřicích částic, a to 30 nm, které vykazují dostatečnou pohyblivost i u koncentrovanějších vzorků a pro samotné měření jsou tedy vhodnější. Pro video – mikrereologii 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 mikrereologie nejvhodnější volbou, jelikož je schopna sledovat pohyb velmi malých částic v dlouhém časovém intervalu v 3D systému.

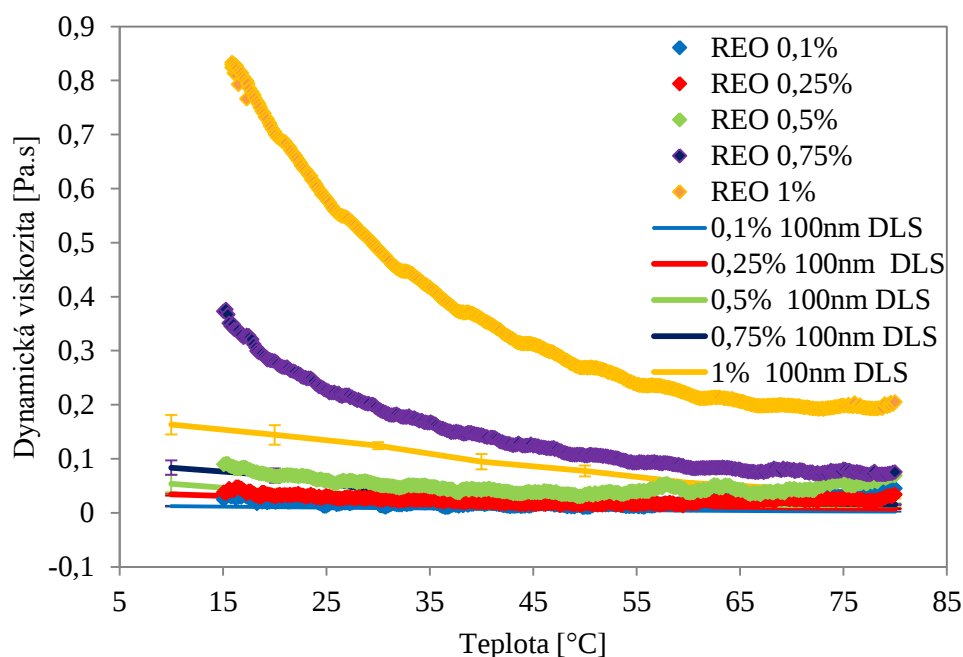
5.3 Aplikace reologie a mikrereologie ke studiu vlivu teploty na viskozitu roztoku hyaluronanu

Jako jedna z oblastí aplikace pasivních mikrereologických 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 mikrereologická měření byla jako nejvhodnější z dostupných technik zvolena DLS mikrereologie s použitím 100 nm částic. Tento typ mikrereologie 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.

5.3.1 Porovnání teplotních křivek klasické reologie a DLS mikrereologie za použití 100 nm částic



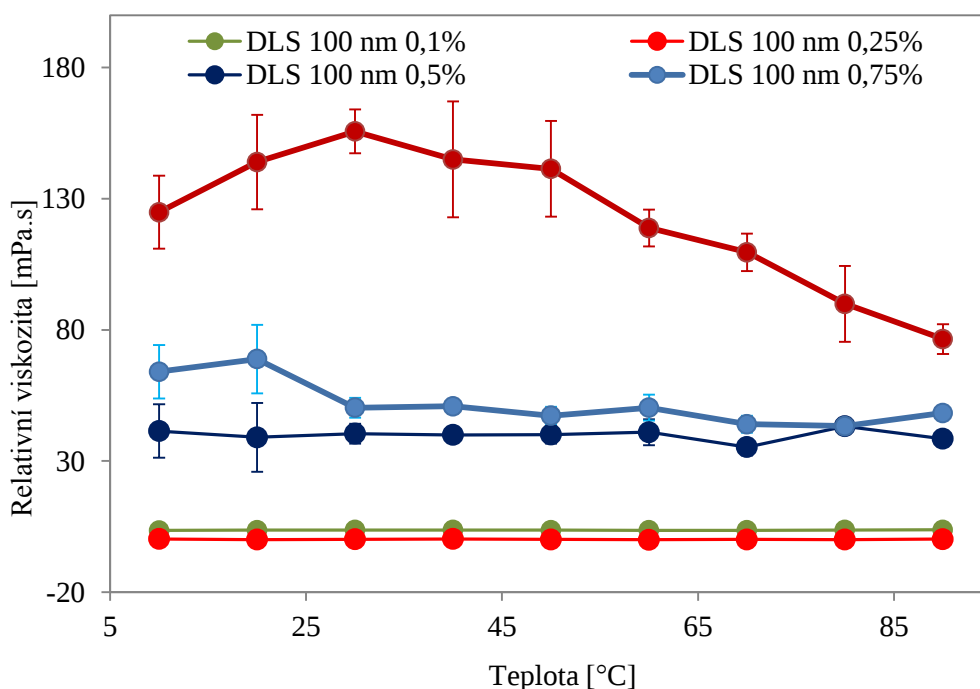
Obr.8: Teplotní křivky získané pomocí klasické reologie a DLS mikrereologie s použitím 100 nm částic pro roztoky hyaluronanu o koncentraci 0,1% - 1% ($M_w = 750$ Da)

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 mikrereologie. 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, 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.

5.3.2 Porovnání relativních viskozit

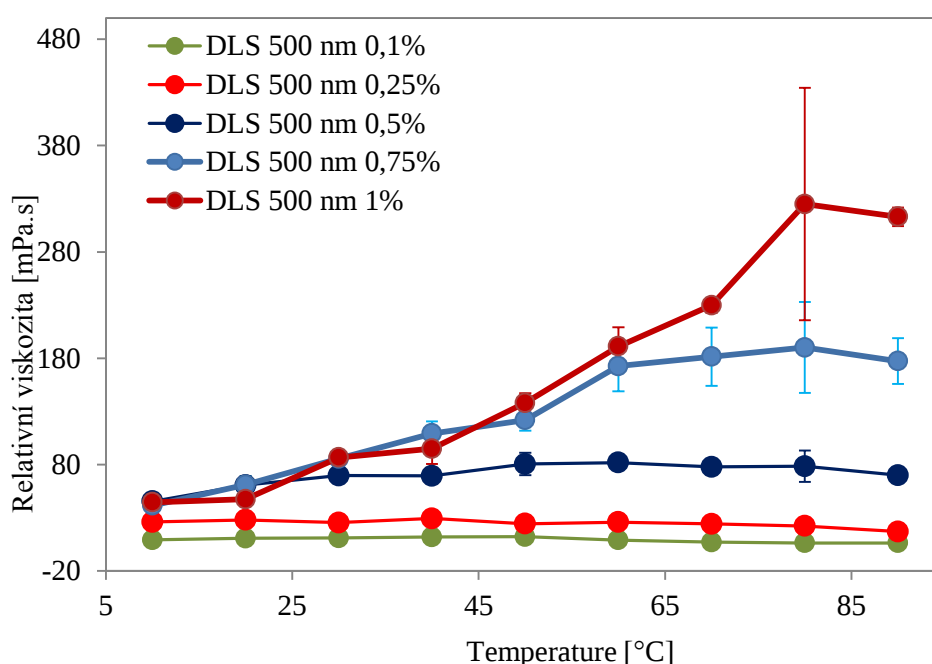


Obr.9: Relativní viskozita v závislosti na teplotě pro roztoky kyseliny hyaluronové o koncentraci 0,1% - 1% pomocí DLS mikroeologie použitím 100 nm částic

Snižování dynamické viskozity s rostoucí teplotou bylo poukázáno na předchozím případě. Dynamická viskozita samotného rozpouštědla je však také závislá na teplotě, a proto byl vyhodnocen i vliv teploty na relativní viskozitu vzorku pomocí DLS mikroeologie 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.10: 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 mikrореologické měření, či jejich správná kombinace pro získání co největšího množství informací vedoucí k odhalení viskoelastických a strukturních vlastností vzorků.

5.4 Aplikace mikrореologie ke studiu procesu gelace agarosy

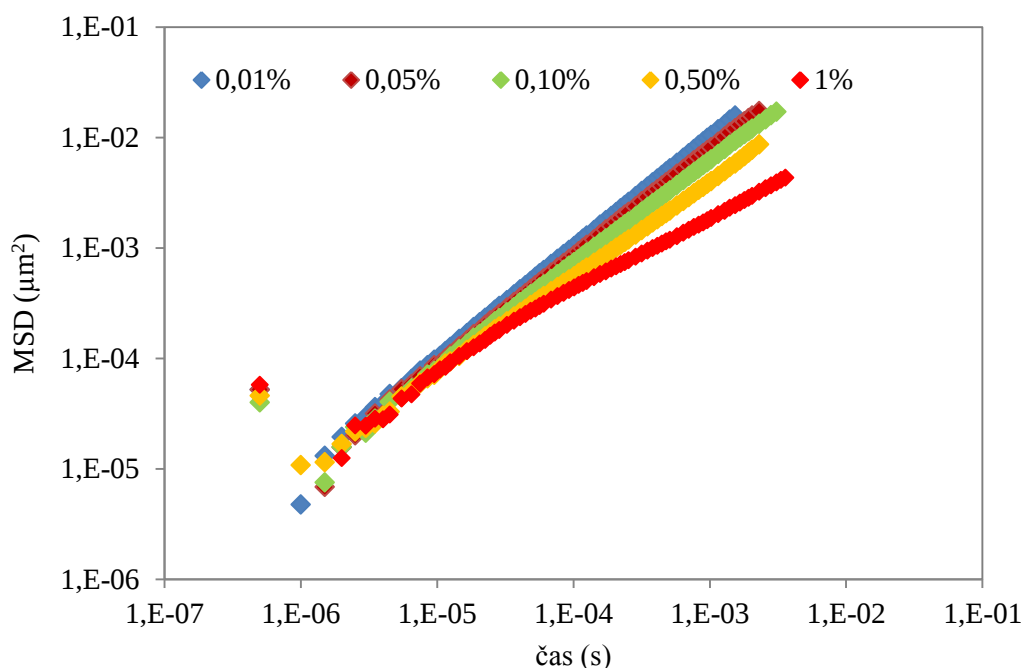
Následující část dizertační práce byla zaměřena na studium procesu gelace, výběr a aplikace vhodné mikrореologické metody ke studiu těchto procesů.

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

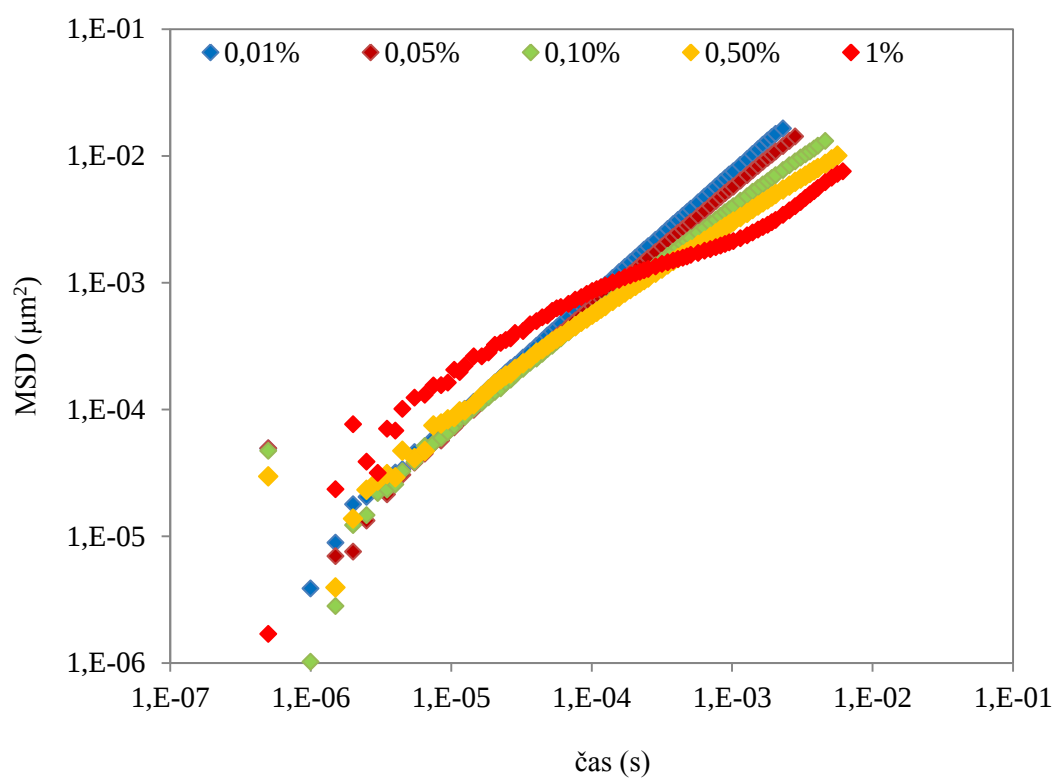
Agarosa je hojně využívaný biopolymer z mořské řasy, známý pro svou schopnost gelace již od 17 století. Své využití našla v molekulární biologii jako gelové medium pro elektroforézu či jako stacionární fáze v gelové permeační chromatografii, tvoří živné medium pro kultivaci mikroorganismů. Hojně využívána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

5.4.1 Průběh gelace roztoků agarosy o různých koncentracích

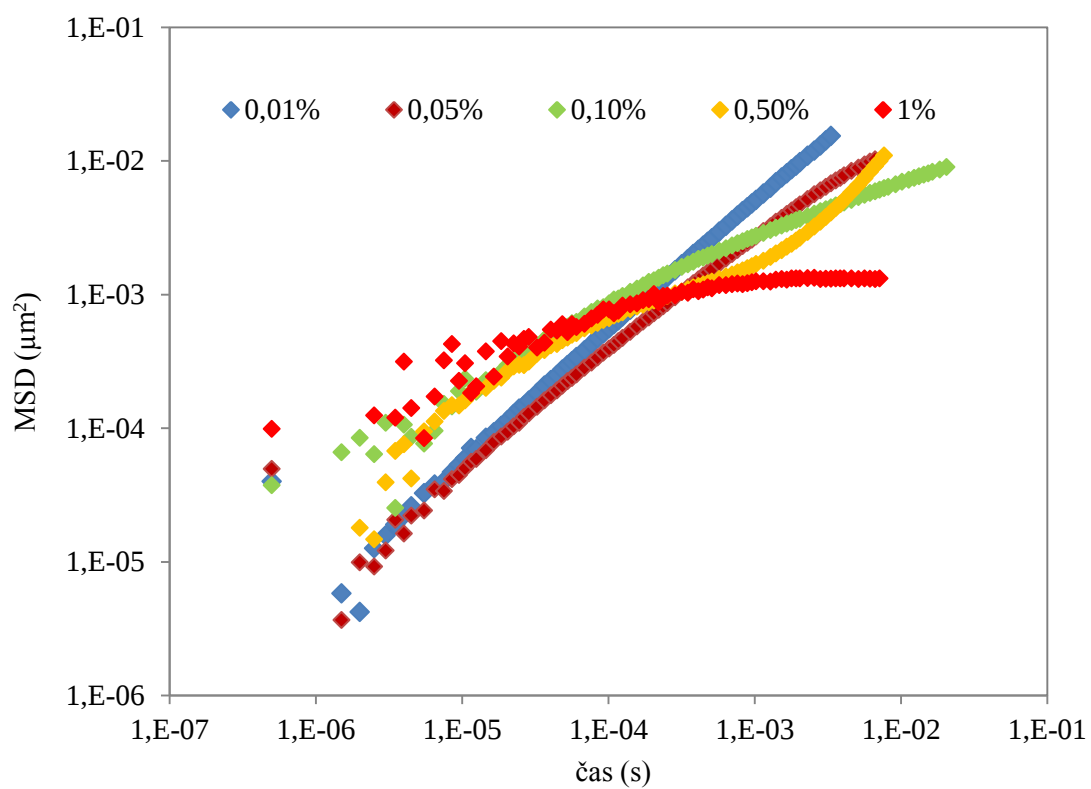
Pro sledování vlivu koncentrace roztoku agarosy na proces gelace byla vytvořena koncentrační řada od 0,01% až po 1% roztok. Proces gelace byl opět sledován při snižování teplot od 85 °C do 25 °C. K vyhodnocení samotného procesu byly porovnávány především tvary vznikajících křivek, které charakterizují 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.11: MSD koncentrační řady pro 45 °; 0,5 μm částice



Obr.12: MSD koncentrační řady pro 35 °C; 0,5 μm částice



Obr.13: 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.

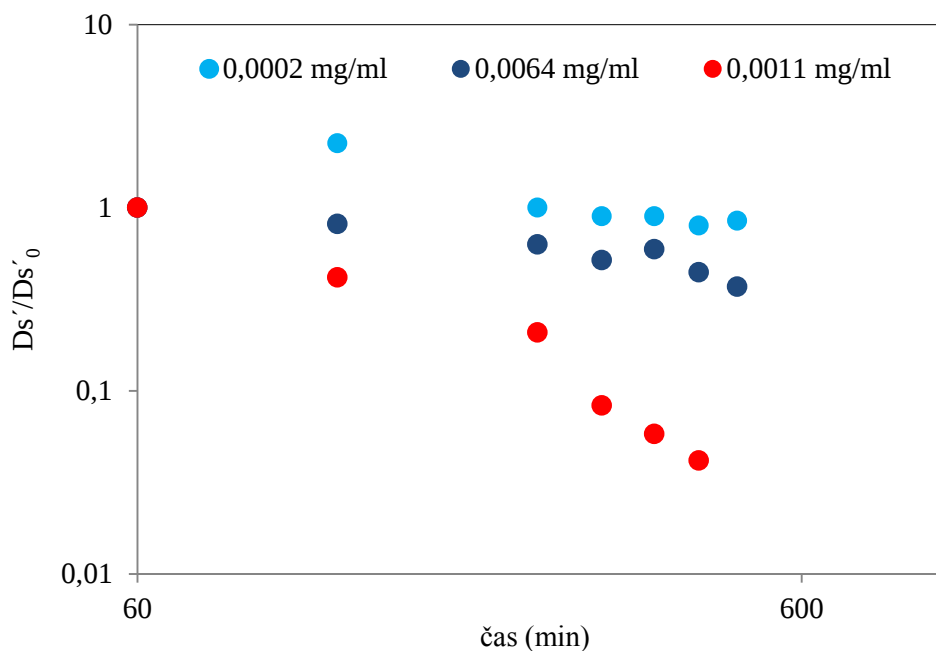
Z průběhů křivek elastického a ztrátového modulu vznikl průsečík charakterizující bod gelace. Pro hydrogel o koncentraci agarosy 1% byla stanovena teplota gelace 47 °C. Z DLS měření 1% roztoku agarosy s použitím 0,5 μm částic je patrné, že k procesu gelace dochází okolo 45 °C, kdy MSD křivky svým tvarem poukazují na přítomnost elastické složky v roztoku.

5.5 Aplikace mikrereologie 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 [53]. Viskoelastické vlastnosti povrchů jsou běžně studovány pomocí klasické reologie. V posledních letech vstupuje do obliby metoda mikrereologická s použitím měřících 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 mikrereologické metody (Magnetic Nanowire microrheology) [54] či metody založené na rozptylu světla [55], tak také pasivní metody, které jsou aplikovány ke studiu těchto systémů i v této práci, a to pomocí video - particle tracking microrheology (VPTM).

5.5.1 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 $\eta = 1$ mPa.



Obr.14: 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 v grafu 14 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.

6 ZÁVĚR

Mikroreologie představuje nové a v lecčem velmi přínosné přístupy ke studiu reologických vlastností nejrůznějších 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 skrip 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 agarózy 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] Moschakis, T.: Microrheology and particle tracking in food gels and emulsions. *Current Opinion in Colloid*. 2013, vydání 18, č. 4, s. 311-323.
- [2] 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
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Pashkovski, E., Masters, J. G., Mehreteab, A.: Viscoelastic Scaling of Colloidal Gels in Polymer Solutions. *Langmuir*. 2003, vydání 19, č. 9, s. 3589-3595.
- [12] Oppong, F., Coussot, F. P., De Bruyn, J.: Gelation on the microscopic scale. *Physical Review E*. 2008, vydání 78, č. 2.
- [13] 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.
- [14] 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.

- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] Larsen, T., Furst, E.: Microrheology of the Liquid-Solid Transition during Gelation. *Physical Review Letters*. 2008, vydání 100, č. 14.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] Wirtz, D.: Particle-Tracking Microrheology of Living Cells: Principles and Applications. *Annual Review of Biophysics*. 2009, roč. 38, č. 1, s. 301-326.
- [28] 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.
- [29] 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.

- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] 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.
- [33] 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.
- [34] Buchanan, M., Atakhorrami, M. Palierna, J., MacKintosh F., Schmidt, C.: High-frequency microrheology of wormlike micelles. *Physical Review E*. 2005, roč. 72, č. 1.
- [35] 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.
- [36] 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.
- [37] 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.
- [38] Carinaux, F. L., Cipelletti, L., Scheffold, F., Schurtenberger, F. B.: Microrheology of giant-micelle solutions. *Europhysics letters*. 2002, č. 57, s. 738-744.
- [39] 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.
- [40] 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.
- [41] Kennedy, J. F.: *Hyaluronan*. Cambridge, England: Woodhead Pub, 2002. ISBN 18-557-3570-9.
- [42] 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.
- [43] 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.
- [44] 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.

- [45] Mo, Y., Nishinari, K. Rheology of hyaluronan solutions under extensional flow. *Biorheology*, 2001, vydání. 38, s. 379-387.
- [46] Maleki, A.: *Characterization of Functional Biopolymers under Various External Stimuli*. 2007, Norway. Dizertace na Oniversity of Oslo, Vedoucí práce: Inger Sandved Anfinssen, s. 70.
- [47] 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.
- [48] 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.
- [49] 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.
- [50] 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.
- [51] Milne, G.: *Optical Sorting and Manipulation of microscopic particles*. 2007, Scotland. Dizertace na University of St. Andrews, Vedoucí práce: Prof. Kishan Dholakia, s. 184.
- [52] 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.
- [53] Langevin, D.: Influence of interfacial rheology on foam and emulsion properties, *Adv Colloid Interface Sci.* 2000, č. 88, s. 209–22.
- [54] 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.
- [55] 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.

8 ŽIVOTOPIS

Osobní informace

Jméno	Zuzana Hnyluchová
Adresa	Olšová 204, Český Těšín, 737 01
Datum narození	7. 8. 1988
Telefon	608 428 212
E-mail	Z.hnyluchova@seznam.cz
Národnost	česká

Vzdělání

2012-2016	VUT v Brně, Fakulta chemická, obor fyzikální chemie, doktorské studium
2010 - 2012	VUT v Brně, Fakulta chemická, obor fyzikální a spotřební chemie, magisterské studium
2007 - 2010	VUT v Brně, Fakulta chemická, obor fyzikální a spotřební chemie, bakalářské studium
2003 - 2007	Gymnázium Český Těšín
1994 - 2003	Základní škola Ostravská s rozšířenou výukou cizích jazyků, Český Těšín

Stáže

9/2012 - 12/2012	Emory University, Atlanta, USA Studium pasivních mikrореologických metod prof. Eric Weeks
1/2011 - 6/2011	Dánská Technická Univerzita v Kodani (DTU) - Erasmus program
10/2014	Jahnnes Kepler University, Linz, Polymerní Institut prof. Milan Kráčalík

Přednášky na mezinárodních konferencích

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

Poster na mezinárodních 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

Vedoucí bakalářské práce

Lucie Hradecká Vliv vlastností částic na mikoreologické měření
biopolymerních roztoků

Denisa Píšová Využití DLS mikoreologie ke studiu průběhu gelace polymeru

Konzultant bakalářské práce

Petra Kábrtová Mikoreologie pomocí fluorescenční korelační spektroskopie

Eva Habánková Mikoreologické studium roztoků hyaluronanu po vystavení
nízkým teplotám

Konzultant diplomové práce

Lucie Hradecká Mikoreologie v koloidních systémech

Pedagogická činnost

2013 Laboratorní cvičen z fyzikálníchemie II

2014 Chemická informatika I – praktická cvičení

9 SEZNAM PUBLIKACÍ

Články v impaktovaném 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.

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.

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.

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 doplnkové 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 metod byla zkoumána u nejrozličnějších biokoloidních systémů jako jsou roztoky či gely kyseliny hyaluronové, 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