

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



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

**STUDIUM DIFÚZE V GELECH NA MIKROSKOPICKÉ
ÚROVNI**

DIFFUSION CHARACTERIZATION OF HYDROGELS AT MICROSCOPIC LEVEL

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Tadeáš Uher

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.

BRNO 2017

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1164/2016
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Tadeáš Uher**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Petr Sedláček, Ph.D.**
Akademický rok: 2016/17

Název bakalářské práce:

Studium difúze v gelech na mikroskopické úrovni

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracovat literární rešerši na téma využití různých instrumentálních technik při studiu difúze v hydrogelových materiálech.
2. Na základě literární rešerše na vybraném modelovém hydrogelu a modelovém solutu otestovat využitelnost instrumentálních technik v dispozici CMV při experimentálním popisu difúze solutu v gelu na mikroskopické úrovni.

Termín odevzdání bakalářské práce: 26.5.2017

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Tadeáš Uher
student(ka)

Ing. Petr Sedláček, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Táto bakalárska práca je zameraná na štúdium difúzie v géloch na mikroskopickú úroveň. Pri študovaní difúzie sa používa metóda fluorescenčnej korelačnej spektroskopie, ktorá je založená na sledovaní difúzných koeficientov v konfokálnych objemoch študovanej látky. Ako fluorescenčná sonda sa používa organické farbivo rhodamin 6G a difúzne experimenty sa uskutočňujú v hydrogélovej matrici na báze termoreverzibilného lineárneho polysacharidu – agarózy s prídavkom reaktívnej zložky – biopolyméru polystyrénsulfonátu sodného v určitých koncentráciách.

Cieľom práce je preskúmať vplyvy interakcií medzi difundujúcim farbivom a príslušným typom gélu na výsledný difúzny koeficient farbiva. Predpokladá sa, že prítomnosť polystyrénsulfonátu sodného v agarózovom gély ovplyvňuje difúziu fluoroforu – rhodaminu 6G.

ABSTRACT

This Bachelor's thesis deals with study of diffusion in gels on microscopic level. The method of fluorescence correlation spectroscopy is used for the study of diffusion and this method is based on monitoring the diffusion coefficients in a confocal volume of studied substance. As fluorescence probe is used organic pigment called Rhodamin 6G and diffusion experiments are realized in hydrogel matrix, whose medium forms thermoreversible linear polycarbohydrate – agarose, with addition of reactive component – biopolymer called sodium polystyrenesulphate in certain concentrations.

The purpose of the thesis is to research the impacts of interaction between diffusing pigment and specific type of hydrogel. The change of final diffusion coefficient is observed. It is assumed, that sodium polystyrenesulphate influences the diffusion of fluorophore (Rhodamin 6G) in agarose hydrogel.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Hydrogély, agaróza, difúzia, fluorescenčná korelačná spektroskopia, rhodamin 6G

KEYWORDS

Hydrogels, agarose, diffusion, fluorescence correlation spectroscopy, Rhodamin 6G

UHER, T. *Studium difúzie v gelech na mikroskopické úrovni*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 31 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Petr Sedláček, Ph.D..

PREHLASENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracoval samostatne a že všetky použité literárne zdroje som použil správne a úplne citoval. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....

POĎAKOVANIE

Na tomto mieste by som sa rád poďakoval vedúcemu mojej bakalárskej práce, pánovi Ing. Petru Sedláčkovi, Ph.D. za jeho čas v podobe konzultácií, ochotu, rady, odborné vedenie práce a predovšetkým za jeho trpezlivosť. Taktiež by som sa chcel poďakovať aj Bc. Kateřine Bílkovej za pomoc s meraním na fluorescenčnom korelačnom mikroskope. Ďakujem patrí aj Fakulte chemickej za vytvorenie pracovných podmienok a možnosť realizovať túto prácu. V neposlednom rade chcem poďakovať svojej rodine a priateľom za podporu, bez ktorej by táto práca nemohla vzniknúť.

Obsah

1	ÚVOD	6
2	TEORETICKÁ ČASŤ	7
	2.1. Difúzia	7
	2.1.1. Fickove zákony	8
	2.2. Gély.....	9
	2.2.1. Vznik gélu.....	9
	2.2.2. Delenie gélov	9
	2.2.3. Vlastnosti gélov	10
	2.2.4. Využitie gélov	11
	2.3. Agaróza.....	11
	2.4. Rhodamin 6G.....	12
	2.5. Polystyrensulfonát sodný.....	13
	2.6. Fluorescenčná korelačná spektroskopia (FCS).....	14
	2.6.1. Aparatúra FCS	16
3	SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	16
4	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	17
	4.1. Použité chemikálie.....	17
	4.2. Použité prístroje	17
	4.3. Príprava vzoriek.....	18
	4.3.1. Roztok rhodaminu 6G.....	18
	4.3.2. Zásobný roztok polystyrensulfonátu.....	18
	4.3.3. Agarózové hydrogély.....	18
	4.4. Nastavenie FCS	18
	4.5. Optimalizácia FCS.....	18
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA	19
	5.1. Autofluorescencia agarózy	19
	5.2. Porovnanie difúzných koeficientov rhodaminu 6G vo vode a v čistej agaróze.....	20
	5.3. Difúzne koeficienty rhodaminu inkorporovaného metódou „vo vnútri gélu“ a „na povrchu gélu“ s obsahom polystyrénsulfonátu sodného	20
	5.4. Doba života fluorescence.....	25
6	ZÁVER.....	27
7	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV	28
8	ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV	29

1 ÚVOD

Bakalárska práca sa zaoberá štúdiom difúzie agarózových hydrogélů na mikroskopickej úrovni. Agarózové hydrogély sú známe svojou trojdimenzionálnou štruktúrou. Sledovaná je zmena difúzneho koeficientu D organického farbiva rhodaminu 6G v tomto prostredí. Pre meranie difúzneho koeficientu D rhodaminu 6G bola zvolená technika fluorescenčnej korelačnej spektroskopie. Ďalej je táto bakalárska práca zameraná na modifikovanie spomínanej trojdimenzionálnej štruktúry agarózového hydrogélů pomocou biopolyméru – polystyrénsulfonátu sodného o koncentrácii 0,0; 0,002; 0,005 a 0,010 hm. %. Sleduje sa, aký vplyv má polystyrénsulfonát na zmenu intramolekulárneho pohybu rhodaminu 6G a predpokladá sa, že so zvyšujúcou sa koncentráciou polystyrénsulfonátu bude klesať hodnota difúzneho koeficientu D rhodaminu 6G v agarózovom hydrogély.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1. Difúzia

Difúzia je prestup látky na základe tepelného pohybu častíc, z prostredia o vyššom chemickom potenciáli do prostredia s nižším chemickým potenciálom. Chemický potenciál veľmi úzko súvisí s entropiou a s koncentráciou, môžeme teda tvrdiť, že difúzia je vlastne prestup látky z prostredia s vyššou koncentráciou do prostredia s nižšou koncentráciou. Ide teda o prestup látky na základe koncentračného gradientu. Rýchlosť, ktorou difúzia prebieha, závisí na veľkosti častíc, teplote a aj vlastnostiach prostredia. Počas difúzie sa energia nespotrebováva a výsledkom by malo byť rovnomerné rozptýlenie rozpustenej látky v rozpúšťadle. Neusporiadaný pohyb molekúl je spôsobený dôsledkom Brownovho pohybu. Molekuly sa nikdy nepohybujú po preferovanej dráhe, avšak pohyb je riadený smerom koncentračného spádu. V situácii, kedy budeme chcieť uskutočniť prechod látky vo fáze bez pohybu, tak pre pohyb molekúl bude kľúčový rozdiel koncentrácií určitej látky medzi dvoma miestami [1]. Pokým budú v systéme, v ktorom je chemický potenciál funkciou priestorovej súradnice x , nastavené podmienky konštantnej teploty, konštantného tlaku a maximálnej práce dw , dostávame rovnicu [2]:

$$dw = \left(\frac{\partial \mu}{\partial x} \right)_{p,T} dx. \quad (1)$$

Pokiaľ porovnáme rovnicu (1) s všeobecným teoretickým vyjadrením práce, dostávame vzťah:

$$dw = -Fdx, \quad (2)$$

kde F je sila pôsobiaca v opačnom smere a získavame výsledný vzťah

$$F = - \left(\frac{\partial \mu}{\partial x} \right)_{p,T}. \quad (3)$$

Táto sila popisuje samovoľnú schopnosť častíc rozptýliť sa do priestoru [3]. Druhý termodynamický zákon hovorí o pôsobení tejto sily ako o zvýšení celkovej entropie, čo znamená, že sa systém dostane do stavu najnižšej vnútornej energie [4].

Nemusi sa vždy jednať o jednostrannú difúziu. Bežne sa stretávame aj s binárnou difúziou. Ide o typ difúzie, kedy obidve látky do seba vzájomne difundujú. Ako príklad môžeme uviesť systém pevnej látky a rozpúšťadla, kedy difunduje pevná látka do rozpúšťadla a súčasne difundujú aj molekuly rozpúšťadla medzi molekuly pevnej látky [5].

Ďalším príkladom difúzie môže byť tzv. samodifúzia. Jedná sa o difúziu prebiehajúcu v rovnovážnych zmesiach, kedy sa hodnota koncentračného gradientu rovná nule. Rýchlosť takejto difúzie bude ovplyvňovať predovšetkým teplota, tlak, veľkosť častíc, viskozita okolia, zatiaľ čo u nerovnovážnych systémoch je difúzia záležitosťou najmä koncentračného gradientu, ktorý nenadobúda nulových hodnôt.

Všeobecne môžeme povedať, že difúzia závisí na rozmeroch difundujúcich častíc, teplote a na vlastnostiach prostredia. Difúzia najrýchlejšie prebieha v plynách, pomalšie v kvapalinách (posúvanie častíc) a najpomalšie v pevných látkach, kde častice preskakujú na prázdne miesta kryštálovej mriežky [6].

2.1.1. Fickove zákony

Na základe neusporiadaného pohybu molekúl Adol Eugene Fick definoval dva zákony. Prvý z týchto zákonov definuje súvislosť medzi rýchlosťou prenosu látky difúziou a koncentračným gradientom v určitom mieste. Podľa druhého zákona je rýchlosť zmeny koncentrácie v určitom mieste spôsobená difúziou, ktorá je úmerná zmene koncentračného spádu v danom mieste. Konštantou tejto úmernosti je difúzny koeficient D [3] a [5].

2.1.1.1. Prvý Fickov zákon

Jednorozmerný difúzny tok je definovaný ako

$$J_1 = A j_1 = AD \frac{\partial c_1}{\partial x}, \quad (4)$$

kde symbol A znázorňuje veľkosť plochy, cez ktorú látka difunduje, j_1 je difúzny tok cez jednotkovú plochu, c_1 predstavuje molárnu koncentráciu látky a x je vzdialenosť. Difúzny koeficient D je veličina udávajúca mieru mobility molekúl v danej látke a je priamo úmerná difúznemu toku. Niekedy sa stretávame s označením difúzneho koeficientu pojmom difuzivita. Ide teda o totožnú veličinu, ktorá sa udáva v jednotkách $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Difúzny koeficient je závislý na tlaku, teplote a veľkosti difundovaných častíc [5].

V prípade už spomínanej binárnej difúzie platí, že ak existuje koncentračný gradient 1. zložky, ktorý spôsobuje difúzny tok, musí v ustálenom stave zároveň existovať aj koncentračný gradient 2. zložky, ktorý má rovnakú veľkosť. Ten spôsobuje difúzny tok 2. zložky v smere opačnom. Z tohto dôvodu je jedna rovnica popisujúca difúzny tok jednej látky v danom systéme dostačujúca. Všeobecne je teda možné 1. Fickov zákon zapísať v tvare:

$$\mathbf{j}_1 = -D \cdot \text{grad } c_1, \quad (5)$$

kde difúzny tok má vektorový charakter a je rovný množstvu látky, ktorá je prenesená cez jednotkový objem za jednotku času. Jej rozmer je teda $\text{mol} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Difúzia prebieha proti smeru koncentračného spádu a z tohoto dôvodu je na pravej strane rovnice (5) záporné znamienko. Pre popis nestacionárnej difúzie slúži 2. Fickov zákon [7].

2.1.1.2. Druhý Fickov zákon

Tento zákon popisuje nestacionárnu difúziu v systémoch, kde dochádza k zmene koncentrácie difundujúcej látky s časom. Pokiaľ D nie je funkciou c , je možné ho všeobecne zapísať v tvare [3]:

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = \text{div}(D \cdot \text{grad } c_1) = D \cdot \text{div grad } c_1. \quad (6)$$

Takto zapísaná rovnica je úplne nezávislá na súradnicovom systéme a môže byť vyjadrená pre rôzne súradnicové systémy (napr. cylindrický, sférický a karteziánsky) [1]. Nestacionárnu difúziu v smere osy x je možné zapísať v tvare (ale len v prípade, že sa zanedbá nútená konvencia a D nie je funkciou c):

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = D \left(\frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2} + \frac{1}{A} \frac{\partial A}{\partial x} \frac{\partial c_1}{\partial x} \right), \quad (7)$$

ak je plocha A nemenná, je možné výraz zapísať v tvare:

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2}. \quad (8)$$

Pretože vyjadrenie difúzných procesov je často totožné s procesmi vedenia tepla, je možné túto rovnicu previesť pri zhodne zadaných počiatkových a okrajových podmienkach na úlohy, ktoré sa zaoberajú difúznou problematikou a naopak [8].

2.2. Gély

Gély sú koloidné disperzie pevných látok v kvapalinách. Štruktúrne sa gély môžu charakterizovať ako trojrozmerné makromolekulárne siete, ktoré vytvárajú súvislú štruktúru, ktorá prestupuje celým disperzným prostredím. Disperzné častice sa nepohybujú nezávisle na disperznom prostredí. Sily, ktoré pôsobia na častice v tejto sústave, môžu byť chemickej alebo fyzikálnej podstaty [7], [9], [10].

2.2.1. Vznik gélu

Proces vzniku gélu sa nazýva gelácia, samotný gél vzniká z lineárneho polyméru alebo z jeho roztoku. Disperzné častice, vďaka ktorým vzniká sieťová štruktúra gélu, majú koloidné rozmery. Gelácia je ovplyvnená rôznymi podmienkami, pre geláciu roztokov vysokomolekulárnych látok sú to podmienky ako teplota, koncentrácia, pH či tvar daných častíc [7].

Zvýšenie teploty zvyčajne bráni vzniku gélu, narastá intenzita tepelného pohybu jednotlivých častí systému a dochádza tak k poklesu množstva väzieb medzi molekulami. Zníženie teploty zase naopak podporuje tvorbu gélu. Je ale nutné spomenúť, že z niektorých látok zvýšením teploty dochádza k chemickým zmenám potrebným pre vznik gélu [7].

Pri zvyšujúcej sa koncentrácii dochádza k častejším zrážkam makromolekúl a tým k vzrastu počtu väzieb medzi nimi. V prípade amfotérnych vysokomolekulárnych látkach, ako sú napríklad bielkoviny, dochádza k najlepšej gelácii pri hodnote pH odpovedajúcej izoelektrickému bodu [7].

2.2.2. Delenie gélov

2.2.2.1. Podľa charakteru disperzného prostredia:

- hydrogély – vodné disperzné prostredie
- organogély – disperzné prostredie je tvorené organickým rozpúšťadlom

2.2.2.2. Podľa chemického zloženia disperzného podielu:

- anorganické
- organické

2.2.2.3. Podľa povahy síl, ktoré držia sieťovú štruktúru pohromade:

- fyzikálne sieťované hydrogély – vznikajú z roztoku polyméru tak, že sa úseky makromolekulárnych reťazcov združujú pôsobením fyzikálnych síl do útvarov, ktoré plnia funkciu uzlu. Tie sú v jednom, dvoch alebo aj v troch rozmeroch väčšie než uzly

kovalentné. Pre porovnanie s kovalentnými uzlami nie je možné zanedbať fakt, že ich uzly môžu v čase zanikať a v inom usporiadaní zase vznikať. Oproti tomu sa kovalentné uzly pokladajú za nekonečne trvanlivé.

- gély s kovalentnými väzbami – predstavujú nekonečnú trojrozmernú sieťovú štruktúru, ktorá je tvorená chemickými väzbami.

2.2.2.4. Podľa chovania vo vysušenom stave:

- reverzibilné gély – gély, ktoré znižujú pri vysušení svoj objem a dávajú vznik kompaktným xerogélom. Sú schopné prechádzať naspäť do pôvodného stavu prijatím disperzného prostredia, tzv. bobtnanie gélu. Reverzibilné gély vznikajú z roztokov lineárnych polymérov (napr. agaróza) alebo bobtnaním xerogélov. Proces vzniku gélov sa nazýva gelácia.
- ireverzibilné gély – vo vysušenom stave majú prakticky rovnaký objem, ale poréznu štruktúru. Pri kontakte s disperzným prostredím absorbujú určité množstvo kvapaliny, ale lyogél nevzniká. Zmena ireverzibilného gélu na xerogél je teda nevratná. Jedným zo spôsobov vzniku ireverzibilného gélu je gelácia lyofóbnych sólov. Jedná sa o pomalý proces, pri ňom sól prechádza na gél cez viskózne polotuhé štádiá. Okamih, kedy sól úplne stuhol, je preto veľmi náročné. Teplota, pri ktorej začína gelácia, je označovaná ako bod gelácie.

2.2.3. Vlastnosti gélov

2.2.3.1. Mechanické vlastnosti

Mechanické vlastnosti sú charakteristické pre tuhé stavy aj napriek tomu, že disperzné prostredie je kvapalné. Až do určitej hodnoty sú odolné voči tečnému napätiu. Pod touto hodnotou sa chovajú ako elasticky tuhé telesá. Pokiaľ nie je napätie príliš veľké, nedochádza k trvalej deformácii, ale dochádza k deformácii vratnej či elastickej. Koncentrácia uzlov, pevnosť a druh spoja udáva hodnotu kritického napätia. Spoje vytvorené fyzikálne sú slabšieho charakteru než uzly vzniknuté chemicky.

Niektoré reverzibilné a ireverzibilné gély môžu mať tixotropné vlastnosti. Príliš prudkým pretrepaním týchto gélov môžu vzniknúť sóly vďaka slabým silám medzi jednotlivými uzlami gélov. Pri nastavení pokojových podmienok dochádza k opätovnému vzniku nového gélu [4]. Menej častý jav nazývaný reopexia je pravým opakom vyššie spomenutej tixotropie. V prípade reopexie dochádza k nárastu viskozity kvapaliny za konštantnej šmykovej rýchlosti.

2.2.3.2. Elektrická vodivosť a difúzivita

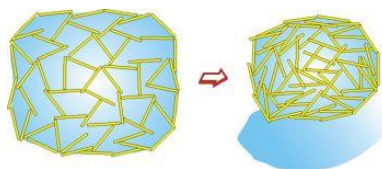
Disociované nízkomolekulárne elektrolyty a elektrická vodivosť sú súčasťou disperzného prostredia gélu a majú rovnaké hodnoty ako v pôvodnom sóle, z ktorého gél vznikol. Ióny rozpustených látok a malé molekuly sa pohybujú v disperznom prostredí v sieti disperzného podielu rovnakou rýchlosťou ako v sóle. Vďaka sieťovej štruktúre nie je difúzivita nízkomolekulárnych látok obmedzovaná prúdením ani tepelnými konvenciami. Typickým príkladom je vznik Liesegangových obrazcov, ktoré vznikajú nerušenou difúziou v géloch. Difúziou ďalšej látky do gélu s nízkomolekulárnou látkou sa vytvorí nerozpustná zrazenina, začne prebiehať proces zrážania len v určitých miestach systému [4].

2.2.3.3. Optické vlastnosti vysokomolekulárnych lyogélov

Systém, v ktorom si rozptýlené častice koloidných či väčších rozmerov, môže po prechode zväzku lúčov v bočnom pozorovaní zviditeľniť rozptýlené svetlo, ktoré má tvar kúžela. Jedná sa o tzv. Tyndallov kúžeľ. Vrchol kúžela je v mieste, kde dochádza k prechodu svetla do nehomogénneho prostredia. Dostatočné veľké častice môžu byť pozorované ako jasne viditeľné a žiariace body a v prípade malých častíc je možné pozorovať difúzny svetelný pruh [4].

2.2.3.4. Starnutie gélu

Gély, ktoré sú spojené kovalentnými väzbami, vykazujú elastické vlastnosti. Ich kovalentné väzby sa v jednotke objemu vyskytujú v malom množstve. Keď sa zvýši ich počet v jednotke objemu, zmenší sa možnosť zmeny ich tvaru. U novo vzniknutých gélov dochádza k samovoľným dejom, gély sa dostávajú do termodynamickej rovnováhy. Tento dej sa nazýva starnutie. V procese starnutia dochádza k vytlačovaniu disperzného prostredia zo štruktúry gélu, zmenšovaniu sieťovej štruktúry a zväčšovaniu počtu uzlov (synerézia). Po dosiahnutí termodynamickej rovnováhy teda dochádza k finálnemu formovaniu hydrogelových štruktúr. Vplyvom vyšších teplôt, pridaním elektrolytu, môžeme proces uzlovania urýchliť [7].



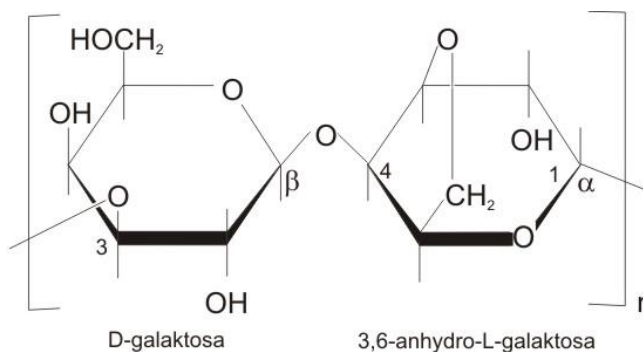
Obr. 1: Proces synerézie [11]

2.2.4. Využitie gélov

Organizmy rastlín a živočíchov sú z veľkej časti tvorený gélom, a preto gély nachádzajú uplatnenie v lekárstve a biológii. Gély používané v potravinárstve slúžia ako zahusťovadlá, želatínujúce látky alebo stabilizačné peny. Vo farmácii našli uplatnenie v príprave gélových kapslí. Všeobecne možno tvrdiť, že proces gelácie patrí medzi dôležité technické procesy. V stavebníctve a príprave stavebných materiálov sa využívajú gély v poréznych membránach, izolačných penách [7, 10, 12].

2.3. Agaróza

Agar sa získava z morskej červenej riasy rodu Rhodophyta. Agaróza je lineárny polysacharid, jeho základnou štruktúrnou jednotkou je D-galaktóza a 3,6-anhydro-L-galaktóza.



Obr. 2: Štruktúra agarózy [13]

Agaróza je termoreverzibilný gél obsahujúci hrubé zväzky agarózových reťazcov, ktoré sú vzájomne držané pomocou vodíkových mostíkov. Agarózu tvoria stále sa opakujúce monoméne jednotky agarobiózy. Agaróza je schopná prijať veľké množstvo vody, čo je spôsobené dutinou, ktorú vytvára trojrozmerná štruktúra závitnice s trojnásobne zalomenou osou. Skupiny týchto reťazcov môžu taktiež vytvárať dvojité závitnice, vďaka čomu vzniká gél, ktorý je stabilný [14]. Agaróza nie je toxická a jednoducho sa pripravuje. Nevýhodou však je, že agaróza je prírodný produkt, a preto sa jednotlivé šarže od rovnakého výrobcu môžu líšiť, čo môže poskytovať odlišné výsledky [15].

Medzi ďalšie vlastnosti agarózy patrí, že sa nezachováva termodynamická rovnováha. Teplota stekutenia je v rozmedzí 85 – 95 °C, naproti tomu teplota gelácie je v oblasti 35 – 42 °C. Rozmedzie teplôt je spôsobené štruktúrou agarózy (prítomnosť vodíkových mostíkov), pri opakovanej gelácii či stekutení agarózy sa teploty môžu líšiť [15].

Najznámejšie využitie agarózy je v analytickej chémii a biochémií. Agarózový hydrogél sa v týchto oblastiach chémie využíva ako nosné médium pre gélovú elektroforézu, najčastejšie nukleových kyselín. Nedochádza k interakciám nukleových kyselín s agarózovým hydrogélom, vyznačuje sa dobrou vodivosťou a voľbou vhodnej koncentrácie gélu môžeme separovať rôzne dlhé úseky DNA. Ide o pohyb záporne nabitých iónov v trojdimenzionálnej agarózovej sieti ku katóde vplyvom elektrického poľa. Ako už bolo spomenuté, pri separácii rôznych molekúl je veľmi dôležité zvoliť správnu koncentráciu gélu. Čím je väčšia koncentrácia agarózy, tým je menšia veľkosť pórov vo vnútri gélu a elektroforéza tak prebieha pomaly. V tomto odvetví chémie môžeme agarózu využiť aj vo forme stacionárnej fázy v gélovej permeačnej chromatografii [16].

V potravinárstve sa využívajú menej koncentrované gély na bázy agarózy. O veľkom využití tohto polysacharidu v potravinárstve poukazuje referencia [17]. Svoje uplatnenie si tento hydrogél našiel aj vo farmácii a mikrobiológii, čo je spôsobené tým, že agarózový hydrogél obsahuje až 99 hm. % vody, je vhodným médiom pre rast a rozmnožovanie mikroorganizmov. Agarózu je taktiež možné použiť ako scaffold v tkanivovom inžinierstve a to vďaka už spomínanému vysokému obsahu vody [18].

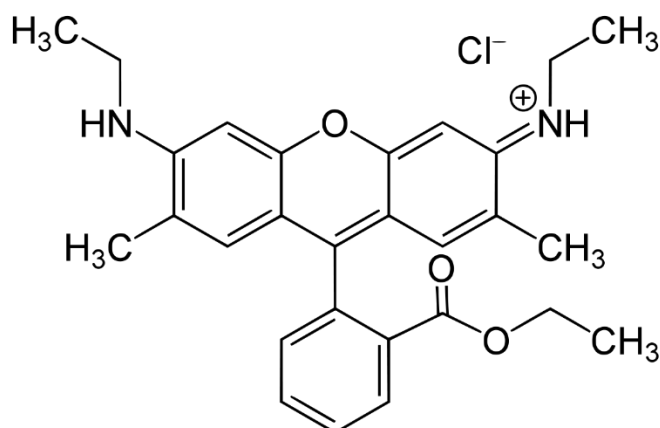
Agaróza má svoje uplatnenie aj vo fyzikálnej chémii. Využíva sa k štúdiu polymérov a rady ďalších látok. Vyplýva to z veľmi nízkej afinity k interakciám hydrogélu so študovanou látkou, ktorá je predmetom štúdia. Štúdium týchto látok prebieha na základe difúzných experimentov. Na vyhodnocovanie výsledkov z týchto experimentov je možné potom použiť fyzikálne či matematické teoretické modely [19].

2.4. Rhodamin 6G

Pod rhodaminom rozumieme celú skupinu chemických farbív odvodených od zlúčenín fluoronu. Fluoron je heterocyklická zlúčenina, ktorá tvorí jadro fluorescenčných farbív.

Rhodamin patrí medzi fluorescenčné sondy, ktoré sa ako nevlastné fluorofory nekovalentne viažu k danej štruktúre. Voľba fluorescenčnej sondy je kľúčovou súčasťou v fluorescenčnej korelačnej spektroskopii.

Rhodamin 6G je červenohnedý prášok rozpustný vo vode a v alkoholoch. Sumárny vzorec tejto zlúčeniny je $C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$.



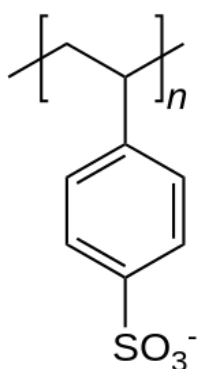
Obr. 3: Štruktúra rhodaminu 6G

Pre svoju veľmi dobrú schopnosť fluoreskovať môže byť rhodamin 6G veľmi dobre detekovateľný. Svoje využitie má v biotechnologických aplikáciách. Ako príklad môžeme uviesť fluorescenčnú mikroskopiu, fluorescenčnú korelačnú spektroskopiu. Taktiež sa používa ako laserové farbivo [20, 21, 22, 23].

Medzi veľmi dobré vlastnosti rhodaminu 6G patrí jeho rozpustnosť, no treba podotknúť, že sa vyznačuje svojou vysokou tendenciou korodovať takmer vo všetkých kovoch. Z tohto hľadiska existujú aj iné formy rhodaminu, ktoré sú menej rozpustné, ale aj menej korozívne [21].

2.5. Polystyrensulfonát sodný

Polystyrensulfonát (PSS) je syntetický polymér odvodený od polystyrenu. Obsahuje kyslé sulfonátové alebo sulfonové funkčné skupiny. Polystyrensulfonát je biely prášok, značí sa dobrou rozpustnosťou vo vode, ale už ako zosieťovaný materiál sa vo vode nerozpúšťa a obvykle má potom jantárové zafarbenie.



Obr. 4: Štruktúra polystyrénsulfonátu

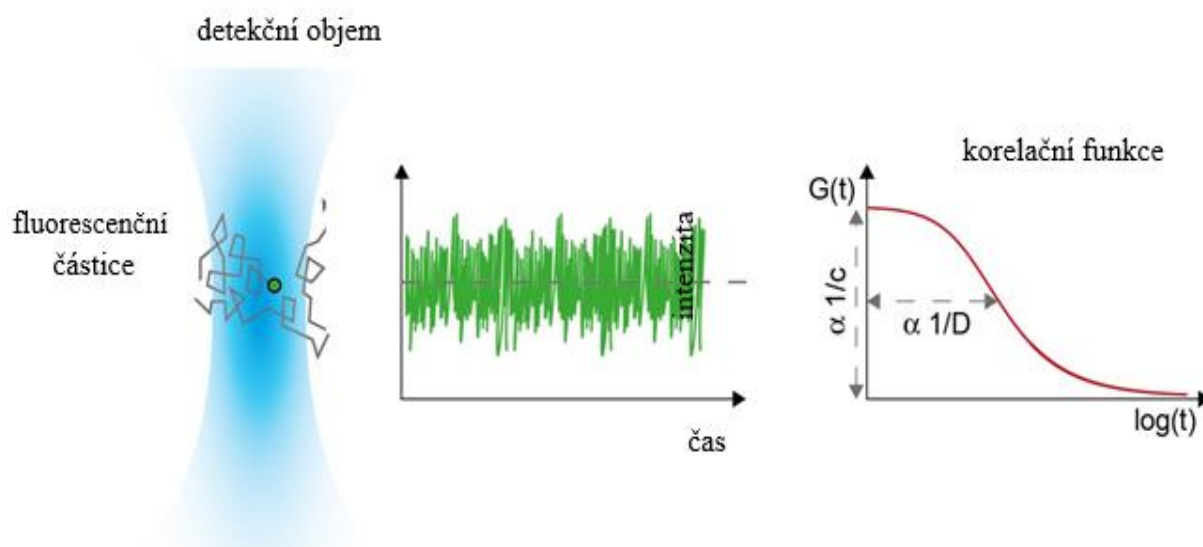
Polystyrensulfonát má veľké uplatnenie v medicíne, kde sa používa na znižovanie koncentrácie draslíku v krvi a v pečeni u ľudí trpiacich hyperkaliémiou [24]. Táto choroba najviac postihuje srdce, taktiež môže nastať neurosvalová dráždivosť či dokonca celková paralýza. Používa sa z dôvodu nulovej metabolizácie v ľudskom tele (nekumuluje sa v tele). V chemickom priemysle sa využíva k zmäkčovaniu vody a to vďaka vlastnostiam, že môže fungovať ako

iónomenič. Môže plniť funkciu testovacieho a kontrolného polyméru pri porovnávaní s ďalšími biopolymérmi, akými sú napr. kyselina hyalurónová, chitosan a pod [25, 26]. V stavebníctve našiel svoje uplatnenie ako plastifikátor cementov. Vo forme živice je využívaný ako katalyzátor organickej syntézy [27].

2.6. Fluorescenčná korelačná spektroskopia (FCS)

Táto metóda je založená na získavaní dynamických štruktúrnych informácií na základe fluktuácie intenzity fluorescence v čase. Fluorescencia je emitovaná jednou alebo viacerými molekulami fluoroforu. Zmena intenzity sa získava z veľmi malého objemu, ktorý je tvorený laserovým lúčom a je spôsobená pohybom fluorescenčných molekúl skrz daný konfokálny objem.

Pohyb častíc je daný translačnou difúziou alebo tokom. Vďaka malej veľkosti konfokálneho objemu (jeden femtoliter alebo menší) sa do nej zmestí obmedzené množstvo častíc – v ideálnom prípade sa jedná o jednu molekulu na jeden femtoliter, čo odpovedá koncentrácii fluoroforu $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Tým je možné sledovať prítomnosť alebo absenciu fluorescenčných častíc v objeme a zaznamenávať zmenu intenzity. Fluktuácia ale môže byť tiež spôsobená chemickou reakciou v systéme alebo prebiehajúcim fotochemickým procesom, ktorým je napr. medzisystémový prechod do tripletového stavu. Základom pre získanie informácií z nameraných FCS dát je znalosť rýchlosti, s akou jednotlivé procesy prebiehajú. Zmena intenzity, ktorá je spôsobená translačnou difúziou molekúl, trvá v radách stoviek mikrosekúnd. Oproti tomu fotochemické procesy sú aspoň o rád rýchlejšie [28].



Obr. 5: Základný princíp merania difúzie molekúl pomocou techniky FCS [29]

Zaznamenávaná zmena intenzity je potom analyzovaná autokorelačnou funkciou. Tá popisuje stupeň korelácie medzi dvomi určitými hodnotami intenzity fluorescence v danom časovom intervale. Vyjadruje teda pravdepodobnosť výskytu molekuly v čase $t + \tau$ za predpokladu, že sa molekula nachádzala v detekčnom objeme v čase τ . Autokorelačnú funkciu je možné vypočítať zo zaznamenaných fluktuácií intenzity fluorescence $I(t)$ podľa rovnice.

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t) \cdot I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}. \quad (9)$$

Z hodnoty autokorelačnej funkcie G v čase $\tau = 0$ potom môžeme získať informácie o rozsahu fluktuácií snímaného fluorescenčného signálu. Je nepriamo úmerná počtu molekúl v konfokálnom objeme, teda pri zvyšovaní koncentrácie molekúl sa hodnota autokorelačnej funkcie znižuje. Z tejto skutočnosti vyplýva, že FCS je veľmi citlivá na zmeny koncentrácie. Akákoľvek kontaminácia iným fluoroformom môže viesť k znehodnoteniu nameraných dát.

Pre preloženie FCS dát sú využívané nasledujúce základné matematické modely, ktorých označenie bolo prevzaté z vyhodnocovacieho program SymPhoTime 64.

Tab. 1: Matematické modely preloženia FCS dát a ich označenie:

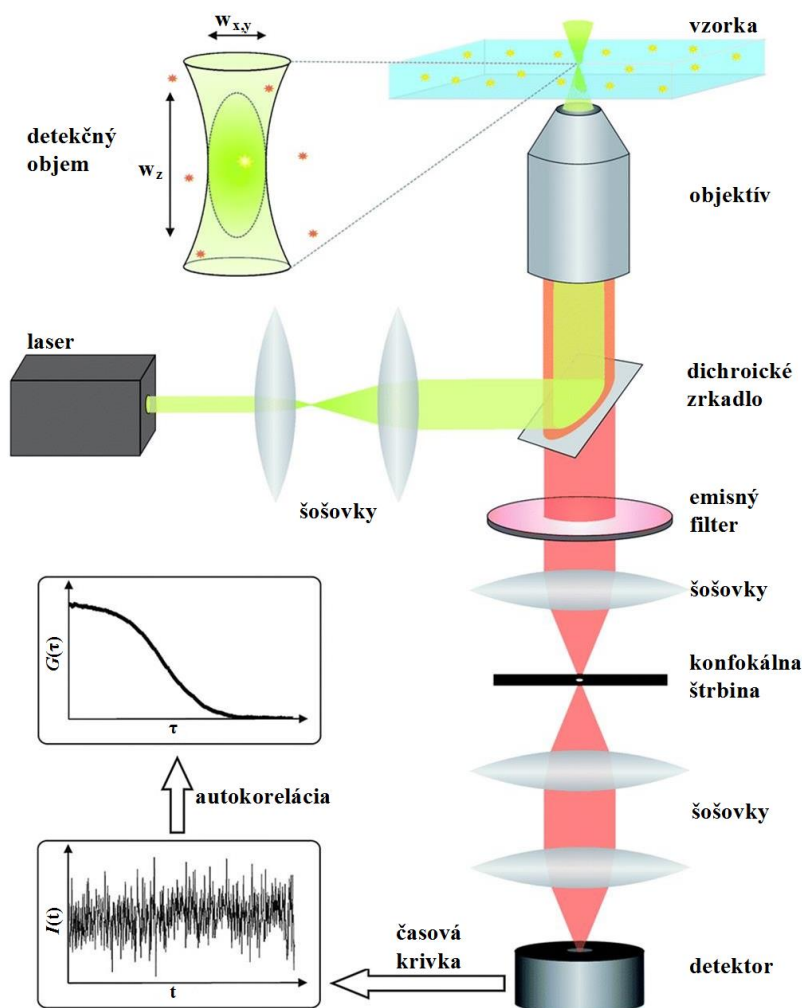
Čistá difúzia	$G(\tau) = \sum_{i=0}^{n_{Diff}-1} \frac{\rho[i]}{\left[1 + \frac{t}{\tau_{Diff}[i]}\right] \cdot \left[1 + \frac{t}{\tau_{Diff}[i] \cdot \kappa^2}\right]^{0.5}} \quad (10)$
Triplet	$G(\tau) = \left[1 + T \left[\exp\left(-\frac{t}{\tau_{Trip}}\right) - 1 \right]\right] \cdot \sum_{i=0}^{n_{Diff}-1} \frac{\rho[i]}{\left[1 + \frac{t}{\tau_{Diff}[i]}\right] \cdot \left[1 + \frac{t}{\tau_{Diff}[i] \cdot \kappa^2}\right]^{0.5}} \quad (11)$
Rozšírený triplet 3D	
$G(\tau) = \left[1 + \sum_{j=0}^{n_{Trip}-1} T(j) \left[\exp\left(-\frac{t}{\tau_{Trip}(j)}\right) - 1 \right]\right] \cdot \sum_{i=0}^{n_{Diff}-1} \frac{\rho[i]}{\left[1 + \left(\frac{t}{\tau_{Diff}[i]}\right)\right]^{\alpha[i]} \cdot \left[1 + \frac{\left(\frac{t}{\tau_{Diff}[i]}\right)^{\alpha[i]}}{\kappa^2}\right]^{0.5}} + G_i \quad (12)$	

Pokiaľ sa jedná o translačnú difúziu, tak v tomto prípade závisí difúzny čas a z neho odvodený difúzny koeficient na veľkosti konfokálneho objemu. Ten ovplyvňuje rada faktorov, medzi ktoré patrí napríklad typ objektívu, intenzita laseru, jeho vlnová dĺžka a ďalšie [28].

Matematický model Pure Diffusion sa využíva pre analýzu difúzie fluoroformu v danom prostredí. Predpokladá sa, že fluoroform nevykazuje žiadny medzifázový prechod, teda sa nemenia fotofyzikálne vlastnosti.

Matematický model Triplet sa používa pre analýzu, kedy fluoroform prechádza do tripletového stavu alebo stavu s podobnou fotofyzikou. Pre rozšírenie tejto funkcie bol navrhnutý model Triplet Extended 3D. Táto funkcia sa používa, keď priemerná rýchlosť nie je úplne stabilná a/alebo fluoroform difunduje vo všetkých troch smeroch v prostredí typu bunka alebo polymér [30].

2.6.1. Aparatúra FCS



Obr. 1: Typická aparatúra FCS spolu so znázornením detekčného objemu, časových fluktuácií intenzity a výslednej autokorelačnej funkcie. [20]

Základom FCS aparatúry (Obr. 1), je invertovaný konfokálny mikroskop. Laserový lúč excitačného svetla je fokusovaný systémom šošoviek a objektívom na detekčný objem elipsoidného tvaru. Časť emitovaného svetla je následne pomocou dichroického zrkadla a emisného filteru oddelená od excitačného žiarenia. Emitované svetlo je fokusované na konfokálnu štrbinu (pinhole), ktorá blokuje svetlo pochádzajúce z oblasti mimo ohniskovú rovinu. Fotóny prechádzajúce konfokálnou štrbinou sú následne detekované a výsledkom sú časové fluktuácie intenzity a autokorelačná funkcia. [22]

3 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

Difúziou organických farbív prostredníctvom agarózových gélov sa zaoberá pomerne široká skupina vedcov. Cieľom je stanoviť hodnoty difúzných koeficientov a zistiť faktory ovplyvňujúce ich hodnotu.

Difúzne procesy realizované v agarózových géloch hlavnou náplňou publikácie [33]. Golmohamadi a kol. študovali difúziu kadmiových iónov a tiež aj organických zlúčenín iónového charakteru v agarózových géloch pomocou fluorescenčnej korelačnej

spektrofotometrie a metódou difúzných ciel'. Cieľom tejto štúdie boli parametre ako iónová sila a vplyv pH. Organické farbivo, ktorá autori využívali, bol rhodamin 6G. Záverom tohto článku bolo, že difúzivita nabitých látok je funkciou pH a klesá od zásaditého pH ku kyslému.

K. Samprovalaki a kol. skúmali vplyv rôznej koncentrácie organických farbív líšiacich sa molekulovou hmotnosťou na hodnotu difúzneho koeficientu. Difúzia prebiehala cez 1,5 % agarózový gél obohatený o 3 % roztok CaCl_2 metódou in situ. Experimenty prebiehali pri troch rôznych teplotách 30 °C, 50 °C a 70 °C. Bolo zistené, že s rastúcou teplotou prípravy agarózového hydrogélu sa difúzny koeficient u oboch farbív zvyšuje. Pri organických farbivách bolo použitých päť rôznych koncentrácií pre rhodamin a ako najlepšia sa javila $c = 1 \cdot 10^{-3}$ g/l, ktorá vykazovala najväčšie hodnoty difúzných koeficientov. Pri použití methylovej sa brala v úvahu rovnaká koncentrácia. Rýchlosť, akou difundovala methylová modrá bola väčšia než u rhodaminu, pretože molekuly methylovej modrej majú menšiu veľkosť (nižšiu molekulovú hmotnosť), čo sa odrazilo aj v hodnote difúzneho koeficientu, ktorá vyšla pre methylovú modrú vyššia [34].

Metóda difúznej cely je veľmi obľúbená a často využívaná pre štúdium difúzných procesov v agarózových hydrogéloch. Pomocou tejto metódy sa predovšetkým študujú efektívne hodnoty difúzneho koeficientu, čas prechodu prvotnej molekuly difundujúcej látky, adsorbovaná/absorbovaná koncentrácia difundujúcej látky vo vnútri alebo na povrchu hydrogélu. Difúzne cely našli svoje uplatnenie pri študovaní etanolu [35], humínových kyselín [36] alebo proteínov [37].

V článku [19] Klučáková a spol. použili hydrogély s rôznym obsahom agarózy a humínových kyselín vo forme trubičiek. Použité farbivá boli rovnako ako v článku [34] rhodamin 6G a methylová modrá a ich koncentráciou v agarózových géloch bola sledovaná spektrofotometricky v rôznych vzdialenostiach. Taktiež bol skúmaný vplyv teploty, pH a iónovej sily. Hodnota rovnovážnej konštanty sa zvyšovali s obsahom humínovej kyseliny v gély a tiež s klesajúcou hodnotou pH vo vnútri gélu.

Autori už spomínaného článku [19] pre stanovenie difúzneho koeficientu methylovej modrej zvolili metódu difúznej cely. Farbivo difundovalo cez agarózový gél o rôznej teplote. K najlepším výsledkom difúzneho koeficientu sa dospelo pri najvyššej teplote (50 °C) a pri najnižšom obsahu agarózy v gély (1 hm. %). Prišlo sa tiež na to, že so zvyšujúcou sa koncentráciou agarózy v hydrogély bude štruktúra tohto gélu hustejšie zosieťovaná a bude klesať efektívna veľkosť pórov.

4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

4.1. Použité chemikálie

- Agaróza, Sigma Aldrich
- Polystyrensulfonyl sodný, Sigma Aldrich
- Rhodamin 6G, Sigma Aldrich
- Deionizovaná voda (ELGA)

4.2. Použité prístroje

- Ultrazvuk (bandelin sonorex digitec)

- Analytické váhy
- Fluorescenčný korelačný spektroskop (MicroTime 200, PicoQuant)

4.3. Príprava vzoriek

4.3.1. Roztok rhodaminu 6G

Z rhodaminu 6G v práškovom stave bol pripravený roztok o koncentrácii $1 \cdot 10^{-9}$ M. Po úplnom rozpustení v danom množstve deionizovanej vody bol tento roztok uschovaný v chladničke.

4.3.2. Zásobný roztok polystyrensulfonátu

Zásobný roztok polystyrensulfonátu bol pripravený o koncentrácii 1 g/l. Po úplnom rozpustení navážky v danom množstve deionizovanej vody bol tento roztok uložený v chladničke.

4.3.3. Agarózové hydrogély

Pred každým meraním na FCS boli pripravené roztoky agarózových hydrogélů, pričom koncentrácia agarózy v hydrogély bola 1 hm. %. V závislosti od typu merania bol pripravovaný buď agarózový hydrogél bez prídavku polystyrensulfonátu alebo agarózový hydrogél s prídavkom polystyrensulfonátu. Koncentračná rada polystyrensulfonátu v hydrogély bola 0,002; 0,005 a 0,01 hm. %. Všetky vzorky roztokov boli pripravené na objem 5 ml, pretože dané množstvo postačovalo na dve merania, a teda na prípravu dvoch hydrogélů rovnakého zloženia.

Rhodamin 6G bol do hydrogélů včlenený buď pri príprave roztoku agarózových hydrogélů pridaním 10 μ l dopredu pripraveného roztoku rhodaminu 6G o známej koncentrácii (tzv. „rhodamin vo vnútri gélu“) alebo až po gelácii, kedy bol rhodamin pridaný procesom difúzie z roztoku, ktorý sa nalial už na stuhnutý hydrogél.

Vlastný proces gelácie prebiehal tak, že pripravené roztoky agarózy (či už bez alebo s prídavkom rhodaminu 6G) boli za stáleho miešania zohrievané až na teplotu 85 °C, aby došlo k úplnému rozpusteniu. Potom boli vzorky vložené na 1 minútu do ultrazvuku predhriateho na 80 °C a následne rozliate do držiakov na FCS, kde sa postupne vytvoril gél. Dbalo sa o to, aby hydrogél obsahoval čo najmenej vzduchových bubliniek.

4.4. Nastavenie FCS

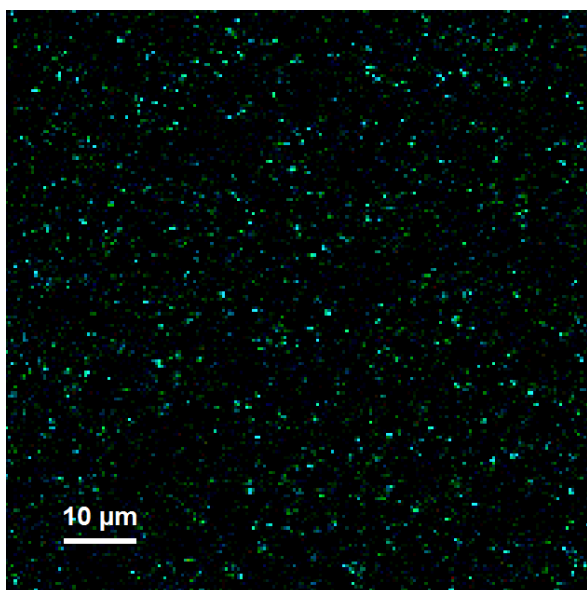
FCS analýzy prebiehali na prístroji MicroTime 200 od firmy PicoQuant s inverzným konfokálnym mikroskopom Olympus IX71. Využívaný bol objektív s vodnou imerziou, pinhole o veľkosti 50 μ m a laser (excitačný zdroj) s vertikálnou polarizáciou o vlnovej dĺžke 507 nm. Dichroické zrkadlo bolo nastavené na hodnotu 510/640 nm a emisný filter bol nastavený na 550/49 nm.

4.5. Optimalizácia FCS

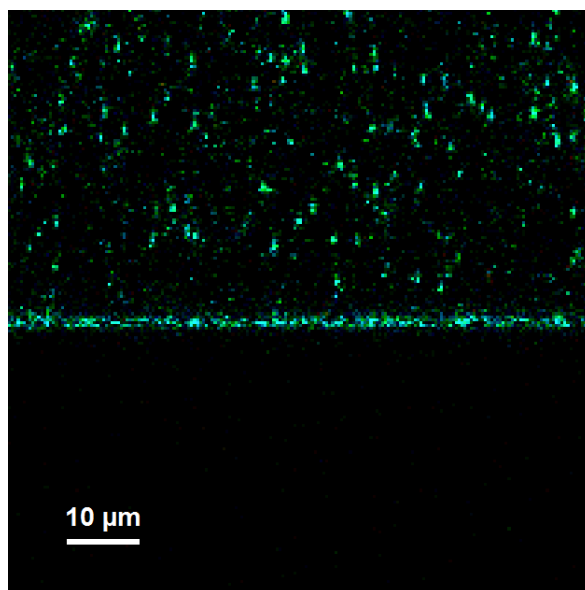
Pred samotným meraním je potrebné zistiť veľkosť detekčného objemu, pretože veľkosť je pri každom meraní iná. Rozmery detekčného (konfokálneho) objemu získame kalibráciou pomocou roztoku fluorescenčnej sondy, ktorá má presne danú koncentráciu a známu hodnotu

difúzneho koeficientu pri danej teplote. Keďže sa difúzne koeficienty tabelujú pre teplotu 25 °C, je potrebné difúzny koeficient prepočítať na teplotu v laboratóriu. V našom prípade sa k stanoveniu rozmerov konfokálneho objemu použil vodný roztok rovnakej fluorescenčnej sondy (rhodamin 6G), ktorá bola následne využívaná pre meranie difúzneho koeficientu v hydrogélach.

Na začiatku merania bolo nutné vykonať zameranie v ose z, čiže vykonať xz alebo yz sken (FLIM analýza – Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy), aby bolo nájdené rozhranie vzorka/sklíčko. Samotné meranie prebiehalo 5 μm nad zistenou hornou hranicou sklíčka (hodnota osy z), aby bolo uskutočnené meranie vo vzorke. V tomto bode je možné určiť, či je gél homogénny, či nie sú vo vzorke vzduchové bubliny a podobne.



Obr.9: Rez rovinou xy



Obr.10: Rez rovinou xz

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Cieľom tejto bakalárskej práce bol popis procesu difúzie v agarózových hydrogélach, a to konkrétne prostredníctvom stanovenia difúzných koeficientov rhodaminu 6G (R6G) ako difúznej sondy, ktorej pohyb bol študovaný v závislosti na štruktúre použitých agarózových hydrogélach. Štruktúra týchto hydrogélach bola modifikovaná prídavkom reaktívnej zložky polystyrénsulfonátu (PSS). Sledovaním zmien hodnôt difúzných koeficientov získame informácie o interakciách medzi agarózovým gélom, rhodaminom 6G a pridávaným PSS.

5.1. Autofluorescencia agarózy

Na začiatku bola kladená otázka, či aj samotná agaróza nevykazuje známky fluorescence. Jednoduchým experimentom, pri ktorom bola meraná intenzita fluorescence v čistom agarózovom gély bez prídavku fluoroforu (R6G). Z výsledkov bolo vidieť, že pri vysokej citlivosti meracieho zariadenia je možné skutočne zaznamenať aj vlastný fluorescenčný signál agarózového hydrogélu.

Pre potreby porovnania s výsledkami FCS analýz gélov s inkorporovaným fluoroforom (R6G) bol rovnakou metódou analyzovaný aj autofluorescenčný signál agarózového gélu. Z vyhodnotenia tejto analýzy bol stanovený difúzny koeficient agarózy v čistom hydrogély o hodnote $231 \pm 24 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Dá sa to vysvetliť intramolekulárnym rotačným pohybom vlastných reťazcov agarózy v sieti hydrogély.

5.2. Porovnanie difúzných koeficientov rhodaminu 6G vo vode a v čistej agaróze

V ďalšom experimente bol študovaný vplyv inkorporácie fluoroforu (R6G) do agarózového hydrogély na spôsob, akým sa fluorofor v gély pohybuje. Predpokladalo sa, že inkorporácia R6G do gélu už v momente jeho prípravy by mohla zvýšiť riziko imobilizácie R6G v pevnej sieti agarózových reťazcov. Ďalej je táto príprava spojená so zahrievaním gelačného roztoku, čo prináša riziká ďalších experimentálnych artefaktov (tepelný rozklad fluoroforu a pod.).

Výsledky experimentu prináša Tab. 2, kde je uvedená hodnota difúzneho koeficientu R6G vo vode (použitá pre kalibráciu merania podľa kapitoly 4.5) a experimentálne stanovenej hodnoty difúzných koeficientov R6G v géloch pripravených metódou inkorporovania R6G „vo vnútri gélu“ a „na povrchu gélu“.

D [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	rhodamin vo vode (pozri [39])	414 ± 10
	rhodamin „vo vnútri gélu“	324 ± 24
	rhodamin „na povrchu gélu“	321 ± 5

Tab. 2: Porovnanie difúzných koeficientov s obsahom rhodaminu 6G vo vode a v čistom agarózovom hydrogély

Hodnota difúzneho koeficientu rhodaminu vo vode bola zobratá z údajov určených pre kalibráciu fluorescenčného korelačného mikroskopu MicroTime 200 (pozri [39]). Rhodamin svieti vo vode a aj v systéme agarózového hydrogély a fluorescenčný korelačný mikroskop zaznamenáva, ako sa translačným pohybom pohybuje celá molekula rhodaminu. Z hodnôt rhodaminu inkorporovaného metódou „vo vnútri gélu“ a „na povrchu gélu“ vyplýva, že R6G v gély difundoval bez nejakých ťažkostí, jeho pohyb v póroch hydrogély je voľný a je len čiastočne obmedzovaný reťazcami agarózy, o čom svedčí zníženie difúzneho koeficientu, ktorý R6G nadobudol vo vode. Vplyv prípravy hydrogély s rhodaminom inkorporovaným metódou „vo vnútri gélu“ a „na povrchu gélu“ je minimálny, v oboch prípadoch je rhodamin rovnakým spôsobom inkorporovaný do siete hydrogély. Ďalšie obávané artefakty tiež neboli potvrdené.

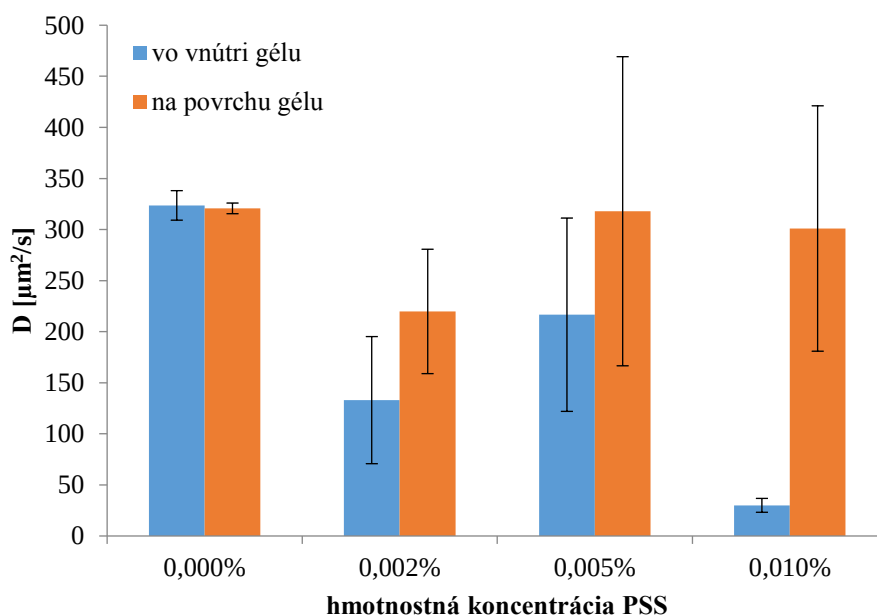
5.3. Difúzne koeficienty rhodaminu inkorporovaného metódou „vo vnútri gélu“ a „na povrchu gélu“ s obsahom polystyrénsulfonátu sodného

Ďalším predmetom bakalárskej práce bolo aj začlenenie reaktívnej zložky do štruktúry gélu (prostredníctvom pridávaného polystyrénsulfonátu sodného) a jeho vplyv na difúziu fluoroforu. PSS bol zvolený kvôli vysokej hustote záporného náboja na jeho reťazci, z tohto dôvodu je možné očakávať silnú príťažlivú elektrostatickú interakciu s opačne nabitým fluoroforom. Merané boli agarózového hydrogely s 0,002; 0,005 a 0,01 hm. % obsahom PSS. Získané difúzne koeficienty sú uvedené v Tab. 3. Taktiež bol zostavený stĺpcový graf pre znázornenie

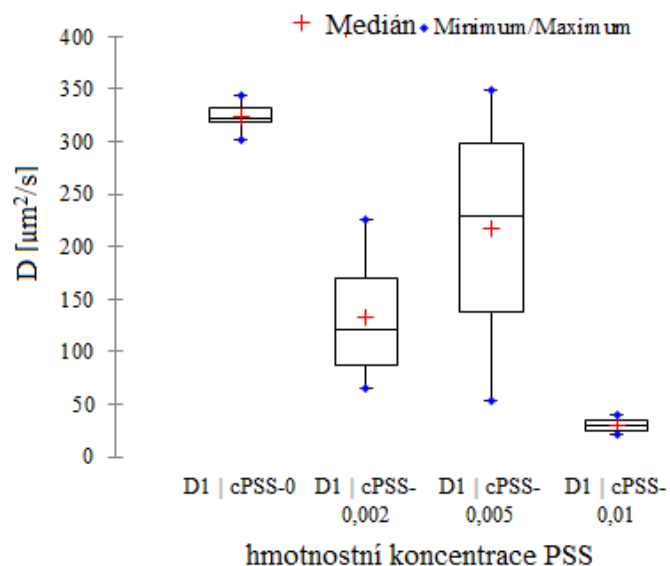
difúzných koeficientov získaných pri jednotlivých koncentráciách PSS v porovnaní s čistým agarózovým hydrogélom (Obr. 9).

Tab. č.3: Namerané difúzne koeficienty bez prídavku PSS a s pridaným PSS

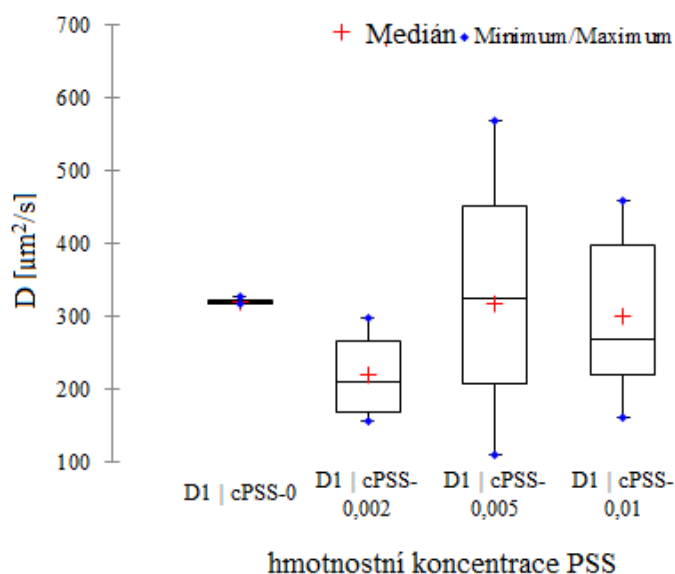
koncentrácia PSS [hm. %]		0	0,002	0,005	0,010
D [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	vo vnútri gélu	324 $\pm$ 24	133 $\pm$ 62	217 $\pm$ 95	30 $\pm$ 7
	nad gélom	321 $\pm$ 5	220 $\pm$ 61	318 $\pm$ 151	301 $\pm$ 120



Obr. 9: Difúzne koeficienty bez prídavku PSS a s pridaným PSS



Obr. 10: Krabicový diagram pre rhodamin inkorporovaný metódou „vo vnútri gélu“



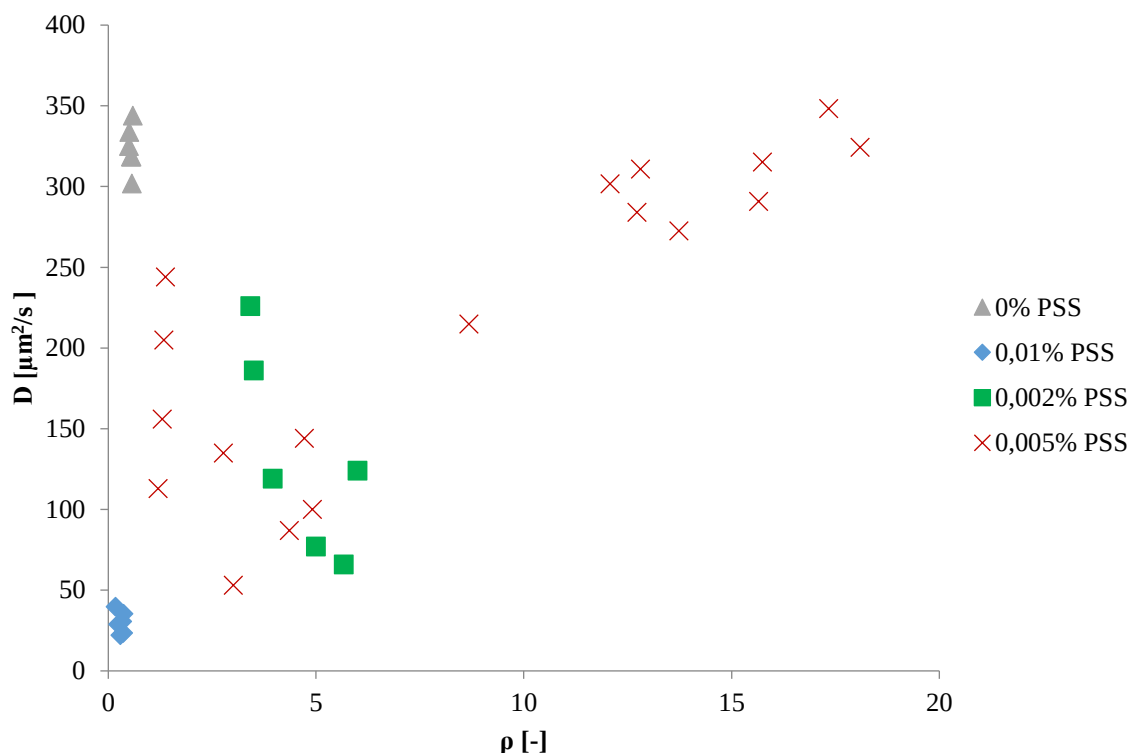
Obr. 11: Krabicový diagram pre rhodamin inkorporovaný metódou „na povrchu gélu“

Na Obr. 9 pri metóde inkorporovania rhodaminu „vo vnútri gélu“ je možné vidieť istý trend v poklese difúzných koeficientov v závislosti na pridávanom polystyrensulfonáte. Výsledky naznačujú, že PSS má viditeľný vplyv na reaktivitu fluoroforu. Možným vysvetlením je vplyv prídavku PSS na stupeň zosieťovania výsledného hydrogélú a s tým spojené ovplyvnenie priestorovej štruktúry tohto hydrogélú. Pri porovnaní hmotnostných koncentrácií agarózy a PSS v gély je výrazný vplyv na výslednú štruktúru gélovej siete nepravdepodobný. Pravdepodobným riešením sa zdá byť potvrdenie predpokladu prítlačlivej interakcie medzi PSS a fluorofom R6G, ktorá logicky vedie k spomaleniu pohybu R6G v gély.

Naopak výsledky stanovené pre rhodamin inkorporovaný metódou „na povrchu gélu“ (pozri Obr. 9 a 11) nepotvrdzujú spomalenie pohybu R6G v géloch s prídavkom PSS. Spoločným znakom oboch metód je značne vysoký rozptyl výsledných hodnôt difúzných koeficientov, čo môže byť spôsobené nehomogénnosťou gélu, kedy sa pri meraní na prístroji zasvietilo na časť hydrogélú, ktorá mohla byť zakalená.

Korelácia medzi difúznym koeficientom a koncentráciou polystyrensulfonátu pri metóde inkorporovania rhodaminu „vo vnútri gélu“ bola potvrdená aj pomocou ANOVA metódy matematickej štatistiky v dôsledku dostatočného množstva pripravovaných vzoriek hydrogélú. ANOVA metóda je vlastne analýza rozptylu, ktorá umožňuje overiť, či na hodnotu náhodnej veličiny (difúzny koeficient D) má štatistický význam hodnota niektorého parametru, ktorý sa dá pozorovať pri všetkých meraniach (koncentrácia polystyrensulfonátu). Preukázal sa vzťah, kedy sa difúzny koeficient znižuje so zvyšujúcou sa koncentráciou polystyrensulfonátu. U rhodaminu inkorporovaného metódou „na povrchu gélu“ táto hypotéza potvrdená nebola.

Pre vysoký rozptyl hodnôt difúzných koeficientov pri oboch metódach prípravy bolo potrebné zamerať sa na parameter ρ , ktorý popisuje prevrátenú hodnotu počtu častíc nachádzajúcich sa v konfokálnom objeme. Predpokladalo sa, že parameter ρ nijak neovplyvňuje hodnotu difúzneho koeficientu.

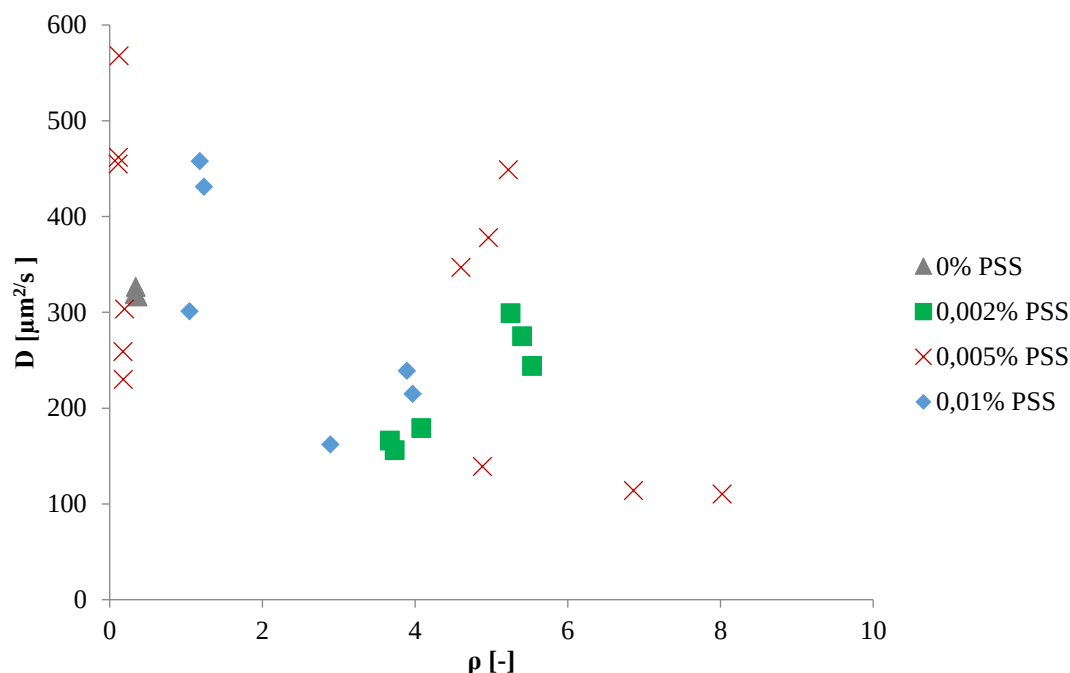


Obr. 12: Závislosť difúzneho koeficientu na parametri ρ pri metóde inkorporovania rhodaminu „vo vnútri gélu“

Na Obr. 12 je znázornená závislosť difúzneho koeficientu D na parametri ρ pre rhodamin inkorporovaný metódou „vo vnútri gélu“.

Je možné tvrdiť, že korelácia sa medzi týmito parametrami vôbec nepreukázala v gély bez obsahu PSS a pri koncentracii 0,01 hm. % PSS. Avšak, koncentrácia 0,002 a 0,005 hm. % má dosť vysoký rozptyl hodnôt. Ideálnym prípadom by bolo, aby sa tieto hodnoty vôbec rádovali. Pri koncentracii 0,002 hm. % PSS korelácia sa líši o rád jednotiek, pri koncentracii 0,005 hm. % je táto hodnota rozlíšená rádoval o desiatky. Vzorky bez obsahu PSS nemajú žiadny rozptyl v parametri ρ , difúzny koeficient D fluoroforu nie je ovplyvnený prítomnosťou PSS v štruktúre hydrogélu, pretože sa tam ani nenachádza. Taktiež parameter ρ nevykazuje výrazný rozptyl pri hydrogélach s 0,01 hm. % PSS.

Vysoký rozptyl parametru ρ pri vzorkách s obsahom 0,002 a 0,005 hm. % je pravdepodobne spôsobený tým, že práve v premeriavanom mieste sa v konfokálnom objeme nenachádzali žiadne molekuly alebo ich bolo málo, prípadne koncentrácia polystyrensulfonátu bola tak nízka, že sa PSS nedostal do všetkých súčastí hydrogélu. Výsledkom je heterogenita hydrogélu, ktorú bolo možné sledovať aj vizuálne (zakalenosť gélu). Pri vysokých hodnotách ρ taktiež mohla byť hodnota difúzneho koeficientu ovplyvnená samotnou autofluorescenciou agarózy (pozri kap. 5.1.).



Obr. 13: Závislosť difúzneho koeficientu na parametre ρ pre rhodamin inkorporovaný metódou „na povrchu gélu“

Na Obr. 13 je znázornená závislosť difúzneho koeficientu D na parametre ρ inkorporovaného rhodaminu metódou „na povrchu gélu“. Z grafu vyplýva, že v tomto prípade nízky rozptyl hodnôt ρ nenastal len v prípade hydrogélu, ktorý neobsahoval žiadny PSS. Avšak v ostatných prípadoch gélov opäť vykazujú hodnoty parametre ρ , rovnako ako difúzneho koeficientu D vysoký rozptyl. Hodnoty ρ sa pre jednotlivé koncentrácie líšia rádovo (vykazuje hodnoty v jednotkách až desiatkach). To môže byť rovnako ako v prítomnosti rhodaminu inkorporovaného metódou „vo vnútri gélu“ spôsobené nedostatočným množstvom molekúl v konfokálnom objeme alebo sa v tomto objeme nenachádzala žiadna molekula fluoroformu, tým pádom sa úplne nevie vyhodnotiť pohyb fluoroformu.

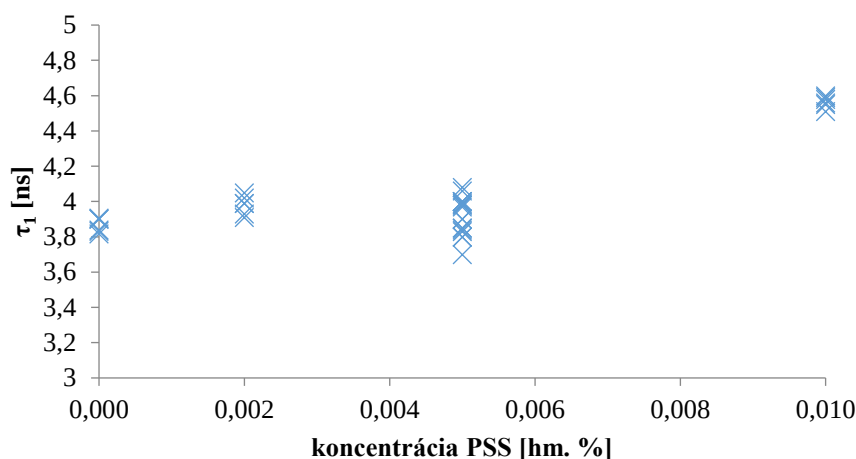
Vyššie uvedená analýza vplyvu parametre ρ teda nenaznačuje, že sa difúzny koeficient R6G s vyšším obsahom PSS znižuje, avšak jeho stanovená hodnota je zaťažená chybou ovplyvňovanou práve spomínaným parametrom ρ . Molekuly rhodaminu sa teda nemuseli dostať do študovaného konfokálneho objemu a namiesto merania difúzneho koeficientu fluoroformu rhodaminu boli výsledky skreslené samotnou autofluorescenciou agarózy a heterogenitou hydrogélu.

Pre objektívne posúdenie korelácie bol medzi difúznym koeficientom D a ρ bol použitý Pearsonov korelačný koeficient pri rhodamine inkorporovanom metódou „vo vnútri gélu“ a nadobúdala hodnotu 0,835 3. Tento koeficient odpovedá štatisticky významnej korelácii oboch parametrov. Pre potvrdenie vplyvu parametre ρ na rozptyl hodnôt difúzneho koeficientu D bola potvrdená tiež korelačná analýza medzi relatívnou smerodajnou odchýlkou difúzných koeficientov D stanovených pre danú koncentráciu PSS v gély a odpovedajúcou priemernou hodnotou ρ . Taktiež tu bola potvrdená významná korelácia Pearsonovho korelačného koeficientu o hodnote 0,834 8. Čím viac sa táto hodnota blíži k jednotke, tým viac sa dokazuje korelácia medzi difúznym koeficientom D a parametrom ρ . Je možné tvrdiť,

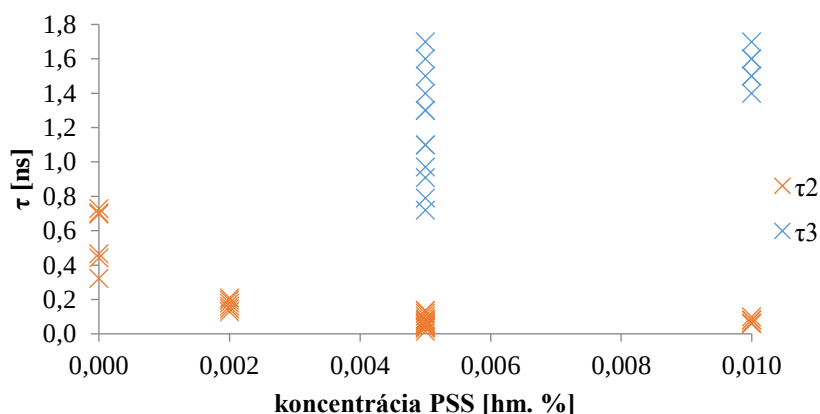
že pri 0,002 a 0,005 hm. % koncentracii PSS u rhodaminu inkorporovanom metódou „vo vnútri gélu“ je korelácia takmer priamo úmerná. Meranie teda prebieha v takom rozmedzí hodnôt ρ (v konfokálnom objeme sa nachádza malé množstvo molekúl), že sa môže prejavovať autofluorescencia samotnej agarózy v hydrogély.

5.4. Doba života fluorescence

Okrem hodnôt difúzneho koeficientu bola pre dané experimenty študovaná doba života fluorescence τ rhodaminu. Pre všetky analyzované vzorky gélov boli preukázané aspoň dve hodnoty (pri vyššiu koncentraciu PSS v gély až tri) doby života fluorescence τ (pozri Obr. 14 a 15), čo znamená, že by mali existovať minimálne dva resp. tri typy fluoroforov. Z vyhodnotenia relatívnych četností sa potvrdilo, že najvyššia doba života fluorescence τ (cca 4 ns) výrazne prevažuje, nižšie doby života sú minoritné. Na Obr. 14 je vidieť nárast doby života fluorescence τ_1 so zvyšujúcou sa koncentraciou PSS pri R6G inkorporovanom metódou „vo vnútri gélu“. Ako je zrejmé, majoritná doba života fluorescence τ_1 rastie s obsahom PSS v gély, čo opäť naznačuje väzbu fluoroforu na reaktívnu zložku (PSS).

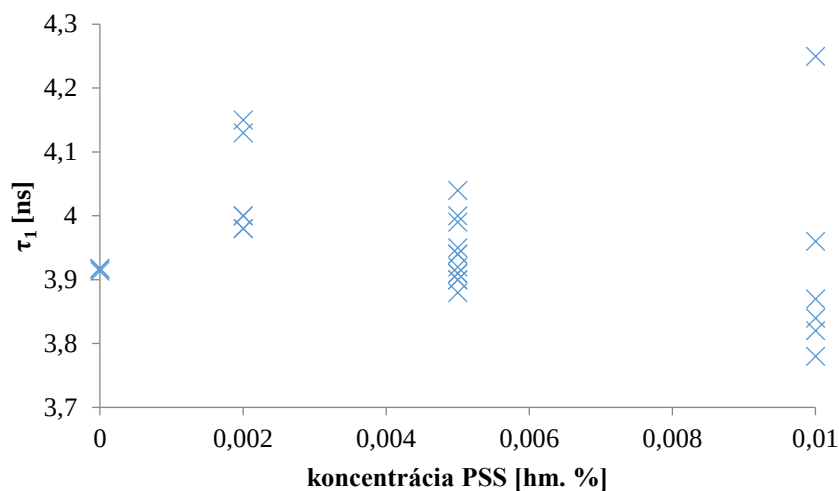


Obr. 14: Závislosť doby života τ_1 na koncentrácii PSS u rhodaminu inkorporovanom metódou „vo vnútri gélu“

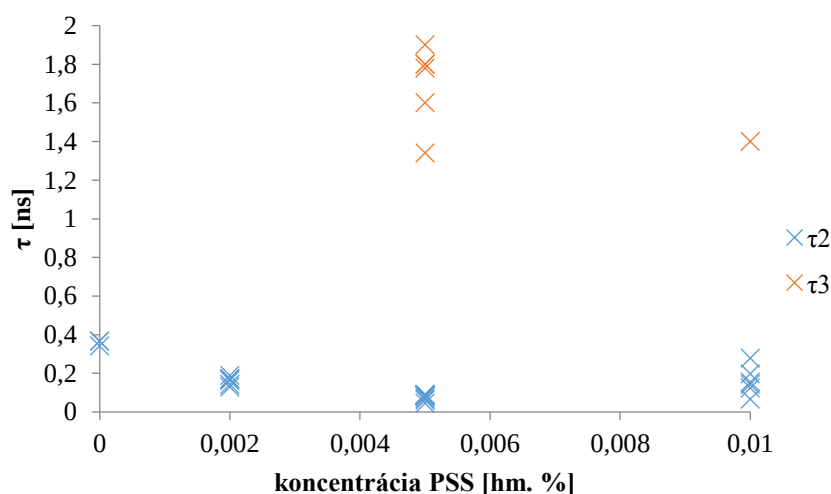


Obr. 15: Závislosť doby života τ_2 a τ_3 na koncentrácii PSS u rhodaminu inkorporovanom metódou „vo vnútri gélu“

Na Obr. 15 sú ukázané ďalšie doby života. Je vidieť, že doba života τ_2 so zvyšujúcou sa koncentráciou polystyrénsulfonátu klesá, avšak pri koncentrácii 0,005 a 0,010 hm. % sa začína objavovať ďalšia doba života τ_3 , čo sa dá vysvetliť prítomnosťou ďalšieho typu fluoroforu. Získanie informácií o tomto fluore by mohlo byť predmetom ďalších štúdií.



Obr. 16: Závislosť doby života τ_1 na koncentrácii PSS u rhodaminu inkorporovanom metódou „na povrchu gélu“



Obr. 17: Závislosť doby života τ_2 a τ_3 na koncentrácii PSS u rhodaminu inkorporovanom metódou „na povrchu gélu“

Čo sa týka metódy prípravy hydrogél, kedy sa rhodamin inkorporoval metódou „na povrchu gélu“, nemožno tvrdiť, že by so zvyšujúcou sa koncentráciou PSS stúpala alebo klesala doba života fluorescencie τ_1 . Je to spôsobené práve vysokým rozptylom dát. Dôvodom tohto rozptylu môže byť skutočnosť, že sa v konfokálnom objeme v momente merania nachádzalo málo alebo sa nenachádzala žiadna molekula rhodaminu či iného fluoroforu. Na Obr. 15 sú zobrazené ďalšie doby života. Doba života fluorescencie τ_2 nadobúda klesajúci trend pri obsahu 0,0; 0,002 a 0,005 hm. % PSS. Rovnako ako pri rhodamine inkorporovanom metódou „vo vnútri gélu“ sa tu objavuje doba života τ_3 , čo môže byť spôsobené výskytom ďalšieho fluoroforu. Táto problematika by mohla byť predmetom ďalšej štúdie v budúcnosti.

6 ZÁVER

Táto bakalárska práca sa zaoberá štúdiou difúzie agarózových hydrogélů na mikroskopickej úrovni. K tomuto účelu bola využitá metóda fluorescenčnej korelačnej spektroskopie za cieľom sledovania difúzneho koeficientu fluorescenčnej sondy – organického farbiva rhodaminu 6G cez agarózový hydrogél bez prídavku a s prídavkom polystyrensulfonátu sodného.

Prvým zistením bola neočakávaná autofluorescencia agarózy. Jav autofluorescencie sa nepredpokladal z dôvodu bežného využívania agarózy pri ďalších experimentoch zameraných na meranie intenzity fluorescencie pridaných zlúčenín, napr. na imobilizáciu alebo skúmanie transportných vlastností biologických systémov. Autofluorescencia sa preukázala meraním bez pridávania rhodaminu v čistom agarózovom gély. Hodnota difúzneho koeficientu bola stanovená na $D = 231 \pm 24 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Autofluorescenciu je možné vysvetliť intramolekulárnym rotačným pohybom vlastných reťazcov agarózy v sieti hydrogélů.

V ďalšom kroku sa riešila otázka difundovania rhodaminu v systéme hydrogélů v porovnaní s difúziou rhodaminu vo vode. Z hodnôt uvedených v Tab. 2 je možné tvrdiť, že rhodamin sa v agarózovom hydrogély pohybuje voľne a jeho hodnota difúzneho koeficientu oproti difúznemu koeficientu rhodaminu vo vode klesla len čiastočne vplyvom reťazcov agarózy.

Výsledné hodnoty difúzných koeficientov D rhodaminu inkorporovaného metódou „vo vnútri gélu“ a „na povrchu gélu“ bez prídavku polystyrensulfonátu sa od seba líšia len minimálne. Z toho vyplýva, že difundovanie rhodaminu sa nijak neobmedzuje spôsobom inkorporovania rhodaminu do agarózového hydrogélů.

Hypotéza poklesu difúzneho koeficientu s rastúcou koncentráciou polystyrensulfonátu sa potvrdila v metóde rhodaminu vo vnútri gélu. Tento fakt dokazuje aj matematická štatistická ANOVA metóda. Naopak, pri metóde rhodaminu na povrchu gélu sa hypotéza nepotvrdila.

Ďalej bola testovaná závislosť difúzneho koeficientu D na niektorom z parametrov popisujúcich kvalitu analýzy pri fluorescenčnej korelačnej mikroskopii. Zvolil sa parameter ρ , ktorý charakterizuje prevrátenú hodnotu počtu molekúl rhodaminu v konfokálnom objeme. Táto korelácia sa potvrdila v metóde prípravy inkorporovania rhodaminu „vo vnútri gélu“ pri 0,002 a 0,005 hm. % obsahu polystyrensulfonátu v hydrogély. Potvrdzuje to aj Pearsonov korelačný koeficient (hodnota 0,835 3) medzi difúznym koeficientom a parametrom ρ a Pearsonov korelačný koeficient (hodnota 0,834 8) medzi rozptylom difúzneho koeficientu D (charakterizovaného pomocou relatívnej smerodajnej odchýlky) a priemerným ρ pri rovnakej koncentrácii PSS v gély. Dôvodom je pravdepodobne heterogenita hydrogélů pri niektorých koncentráciách PSS, kedy sa hydrogél na niektorých miestach javí niekedy viac a niekedy menej zakalený. Taktiež vysoký rozptyl dát môže byť spôsobený tým, že sa v konfokálnom objeme nachádzal len malý respektíve žiadny počet molekúl rhodaminu. Podobná korelácia vznikala aj v prípade metóde prípravy inkorporovania rhodaminu „na povrchu gélu“ pri koncentráciách 0,002; 0,005 a 0,010 hm. % PSS.

Nakoniec sa skúmala doba života fluorescencie v závislosti na koncentrácii polystyrensulfonátu, kedy sa v obidvoch spôsoboch inkorporovania rhodaminu do hydrogélů pri 0,005 a 0,010 hm. % obsahu PSS objavila doba života fluorescencie τ_3 , ktorá charakterizuje prítomnosť ďalšieho fluoroforu, ktorý by mohol byť predmetom ďalších štúdií a výskumov.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

FCS – fluorescenčná korelačná spektroskopia

FLIM – Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (časovo rozlíšená zobrazovacia fluorescenčná mikroskopia)

R6G – rhodamin 6G

PSS – polystyrensulfonát sodný

D – difúzny koeficient

ρ – amplitúda, parameter označujúci prevrátenú hodnotu počtu častíc v konfokálnom objeme u fluorescenčnej korelačnej spektroskopii

τ – doba života fluorescencie

8 ZOZNAM POUŽITÝCH ZDROJOV

- [1] DOJČANSKÝ, Ján. a Jaroslav. LONGAUER. *Chemické inžinierstvo II: difúzne procesy, prestup látky, absorpcia, adsorpcia, destilácia a rektifikácia, extrakcia, úprava vzduchu a chladenie vody, sušenie, kryštalizácia, membránové procesy*. Bratislava: Malé Centrum, 2000. ISBN 80-967-0648-9.
- [2] ATKINS, P. W. a Julio. DE PAULA. *Atkins' Physical chemistry: difúzne procesy, prestup látky, absorpcia, adsorpcia, destilácia a rektifikácia, extrakcia, úprava vzduchu a chladenie vody, sušenie, kryštalizácia, membránové procesy*. 8th ed. New York: Oxford University Press, 2006. ISBN 01-987-0072-5.
- [3] SEDLÁČEK, Petr. *Hydrogely huminových kyselin - experimentální model i aplikační forma = Hydrogels of Humic Acids - Experimental Model and Application Form: autoreferát disertační práce*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2009, 44 s.
- [4] NOVÁK, Josef P. a Julio. DE PAULA. *Fyzikální chemie II: difúzne procesy, prestup látky, absorpcia, adsorpcia, destilácia a rektifikácia, extrakcia, úprava vzduchu a chladenie vody, sušenie, kryštalizácia, membránové procesy*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001. ISBN 80-708-0436-X.
- [5] CUSSLER, E. L. a Julio. DE PAULA. *Diffusion: mass transfer in fluid systems*. 3rd ed. New York: Cambridge University Press, 2009. ISBN 05-218-7121-2.
- [6] KALINA, Michal. *Využití průtokové coulometrie ve studiu transportu kovových iontů v huminových gelech = Utilization of flow-coulometry in study of transport metal ions in humic gels*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2010, 62 l. : il.
- [7] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav: mass transfer in fluid systems*. Vyd. 5., přeprac. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0579-X.
- [8] HLAVÁČ, Jan. *Základy technologie silikátů*. 2. uprav.vyd. Praha: SNTL, 1988, 516 s.
- [9] POUCHLÝ, Julius a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav: mass transfer in fluid systems*. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-674-6.
- [10] NOVÁK, Josef a Marie ŠIŠKOVÁ. *Fyzikální chemie: bakalářský a magisterský kurz*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-675-3.
- [11] Termoreverzibilní gel. In: *Vydavatelství VŠCHT Praha* [online]. 2005 [cit. 2014- 04- 29]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/synereze.html
- [12] SCHERER, George W. *Structure and properties of gels*. DOI: 10.1016/S0008-8846(99)00003-4. ISBN 10.1016/S0008-8846(99)00003-4.
- [13] wikiskripta.eu [online] Česky. Dostupný z www: <<http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Agarosa.jpg>>.
- [14] BOURNE, M. C. (1978). *Texture profile analysis*. Food Technology , 62–66 (July).
- [15] DJABOUROV, M., A.H. CLARK, D.W. ROWLANDS a S.B. ROSS-MURPHY. Small-angle X-ray scattering characterization of agarose sols and gels. *Macromolecules* [online]. 8901, 22(1), 180-188 [cit. 2017-05-15]. DOI: 10.1021/ma00191a035. ISSN 00249297.

- [16] HUANG, R. L., Y. L. YIN, G. Y. WU, et al. *Effect of dietary oligochitosan supplementation on ileal digestibility of nutrients and performance in broilers*. DOI: 10.1093/ps/84.9.1383. ISBN 10.1093/ps/84.9.1383.
- [17] WILLIAMS, Peter A a Glyn O PHILLIPS. *Gums and Stabilisers for the Food Industry 16: 16*. Royal Society Of Chemistry, 2012. DOI: 10.1039/9781849734554. ISBN 1849733589.
- [18] STOKOLS, Shula, Jeff SAKAMOTO, Chris BRECKON, Todd HOLT, James WEISS a Mark H. TUSZYNSKI. *Templated Agarose Scaffolds Support Linear Axonal Regeneration*. DOI: 10.1089/ten.2006.12.2777. ISBN 10.1089/ten.2006.12.2777.
- [19] SEDLÁČEK, Petr, Jiří SMILEK, Martina KLUČÁKOVÁ, Todd HOLT, James WEISS a Mark H. TUSZYNSKI. *How the interactions with humic acids affect the mobility of ionic dyes in hydrogels – Results from diffusion cells*. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2013.07.008.
- [20] DREXHAGE, K.H. Fluorescence efficiency of laser dyes. *Journal of Research of the National Bureau of Standards Section A: Physics and Chemistry* [online]. 7605, **80A**(3), 421 [cit. 2017-05-15]. DOI: 10.6028/jres.080A.044.
- [21] GHASEMI, Jahanbakhsh, Ali NIAZI a Mikael KUBISTA. Thermodynamics study of the dimerization equilibria of rhodamine B and 6G in different ionic strengths by photometric titration and chemometrics method. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2005, vol. 62, 1–3, s. 649–656. DOI: 10.1016/j.saa.2005.02.012.
- [22] JOSEPH R. LAKOWICZ. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006. ISBN 978-038-7463-124.
- [23] FISCHER, M a J GEORGES. Use of thermal lens spectrometry for the investigation of dimerization equilibria of rhodamine 6G in water and aqueous micellar solutions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 1997, vol. 53, issue 9, s. 1 419–1 430. DOI: 10.1016/S0584-8539(97)00027-5.
- [24] SEIFTER, J.L. *Potassium disorders*. [EDITED BY] LEE GOLDMAN, Andrew I. Cecil Medicine Expert Consult Premium Edition. 24th ed. London: Elsevier Health Sciences, 2011. ISBN 1437736084.
- [25] PINERI, Michel a A EISENBERG. *Structure and properties of ionomers*. Norwell, MA, U.S.A.: Sold and distributed in the U.S.A. and Canada by Kluwer Academic Publishers, c1987,xvi, 581 p. NATO ASI series, no. 198. ISBN 90-277-2458-X.
- [26] ZEBROWSKI, B. E. a G. G. FULLER. Rheo-Optical Studies of Polyelectrolyte Solutions in Simple Shear Flow. *Journal of Rheology*. 1985, č. 29.
- [27] GÁLVEZ, Erik, Pedro ROMEA a Fèlix URPÍ. Stereoselective Synthesis of anti α -Methyl- β -Methoxy Carboxylic Compounds. *Organic Syntheses*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2003, 81. DOI: 10.1002/0471264229.os086.09. ISBN 0471264229. ISSN 2333-3553.
- [28] VALEUR, B. a BERBERAN-SANTOS, M.: *Molecular fluorescence: principles and applications*. 2. vyd. Weinheim: Wiley, 2012, 569 p. ISBN 978-3-527-65003-3.

- [29] Mobility and Interaction Measurements. *BioQuant: University of Heidelberg* [online]. [cit. 2017-04-16]. Dostupné z: <http://malone.bioquant.uni-heidelberg.de/methods/mobility/mobility.html>
- [30] Calculate and Fit FCS Traces with the FCS Script. *PicoQuant: Leading in Single Photon Counting Applications* [online]. 2013 [cit. 2017-04-18]. Dostupné z: https://www.picoquant.com/images/uploads/downloads/calculate_and_fit_fcs-traces_with_the_fcs-script_step_by_step.pdf
- [31] BERANOVÁ, Lenka, Jana HUMPOLÍČKOVÁ a Martin HOF. *Fluorescenční korelační spektroskopie*. Chemické listy [online]. 2009, 103(2), 125-129 [cit. 2017-03-30]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_02_125-129.pdf
- [32] WÖLL, Dominik. *Fluorescence correlation spectroscopy in polymer science*. RSC Adv [online]. 2014, 4(5), 2447-2465 [cit. 2017-03-16]. DOI: 10.1039/C3RA44909B. ISSN 20462069. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3RA44909B>
- [33] GOLMOHAMADI, Mahmood, Thomas DAVID a Kevin WILKINSON. Diffusion and partitioning of cations in an agarose hydrogel. *The Journal of Physical Chemistry A*. 2012, vol. 116, no. 25, pp. 6505-6510. ISSN 1089-5639.
- [35] SAMPROVALAKI, K., P.T. ROBBINS a P.J. FRYER. *Investigation of the diffusion of dyes in agar gels*. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2012.03.024. ISBN 10.1016/j.jfoodeng.2012.03.024.
- [36] WESTRIN, Bengt a Anders AXELSSON. A diaphragm diffusion cell applied to ethanol diffusion in agarose gel: a reproducibility study. *Biotechnology Techniques*. 1991, vol. 5, no. 4, pp. 303-306. ISSN 0951-208X.
- [37] LEAD, Jamie, Konstantin STARCHEV a Kevin WILKINSON. Diffusion coefficients of humic substances in agarose gel and in water. *Environmental Science and Technology*. 2003, vol. 37, no. 3, pp. 482-487. ISSN 0013-936X.
- [38] GUTENWIK, Jan, Bernt NILSSON a Anders AXELSSON. Determination of proteindiffusion coefficients in agarose gel with a diffusion cell. *Biochemical Engineering Journal*. 2004, vol. 19, no. 1, pp. 1-7. ISSN 1369-703X.
- [39] CULBERTSON Ch. T., JACOBSON S. C., RAMSEY J. M. *Diffusion coefficient measurements in microfluidic devices*. *Talanta*, 56 (2002) 365. Dostupné z [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(01\)00602-6](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(01)00602-6)