



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

INTERAKCE HYALURONAN-AMINOKYSELINY

HYALURONAN-AMINO ACIDS INTERACTIONS

DIZERTAČNÍ PRÁCE

DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Ing. Adam Jugl

ŠKOLITEL

SUPERVISOR

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

BRNO 2020

Zadání dizertační práce

Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie Akademický rok: 2020/21
Student: **Ing. Adam Jugl**
Studijní program: Fyzikální chemie
Studijní obor: Fyzikální chemie
Vedoucí práce: **prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.**

Název dizertační práce:

Interakce hyaluronan–aminokyseliny

Zadání dizertační práce:

Prostudovat interakce mezi hyaluronanem a bazickou aminokyselinou v monomerní i oligomerní formě především technikami ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením a izotermické titrační kalorimetrie. Výsledky interpretovat i z hlediska biologických funkcí hyaluronanu nebo jeho medicínských aplikací.

Termín odevzdání dizertační práce: 23.12.2020:

Ing. Adam Jugl
student(ka)

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.9.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předložená dizertační práce se zaměřuje na nekovalentní interakce hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech (9–1 540 kDa) s bazickými (oligo)aminokyselinami (především argininem) a antimikrobiálním peptidem cecropinem B. Pro zkoumání interakcí byly zvoleny techniky ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením (HR-US), izotermické titrační kalorimetrie (ITC) a potenciometrických titrací. Práce se zaměřuje na charakterizaci interakcí zejména s ohledem na použitou molekulovou hmotnost interagujících polymerů a iontovou sílu prostředí. O tom, zda budou interakce probíhat, či nikoliv, rozhodovala především délka řetězce oligomerního argininu. U monomerních aminokyselin byly interakce zkoumány především za využití potenciometrických titrací. Interakce byly pozorovatelné od oligomerů argininu s osmi monomerními jednotkami. Molekulová hmotnost hyaluronanu ovlivňovala zejména intenzitu interakcí. Významný byl především přechod mezi jednotlivými konformacemi hyaluronanu (tyčinkou a náhodným klubkem). Zkoumání interakcí bylo prováděno ve vodě, v roztocích s různou koncentrací chloridu sodného a v PBS. Dostatečně vysoká iontová síla roztoku dokázala potlačit ve vodě probíhající interakce mezi oligomery argininu a hyaluronanem. Bylo prokázáno, že bazický antimikrobiální peptid cecropin B interaguje s hyaluronanem ve vodě, ale nikoliv v prostředí PBS. Na základě těchto výsledků bylo možné usuzovat, že systém hyaluronan-cecropin B by byl vhodný zejména pro topické aplikace.

KLÍČOVÁ SLOVA

ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením, izotermická titrační kalorimetrie, potenciometrické titrace, cecropin B, arginin, lysin, hyaluronan

ABSTRACT

The presented dissertation focuses on non-covalent interactions of hyaluronan of different molecular weights (9–1 540 kDa) with basic (oligo)-amino acids (especially arginine) and the antimicrobial peptide cecropin B. High-resolution ultrasonic spectroscopy (HR-US), isothermal titration calorimetry (ITC) and potentiometric titration techniques were chosen to investigate the interactions. The thesis focuses on the characterization of interactions, especially with respect to the used molecular weight of interacting polymers and the ionic strength of the environment. Whether interactions occur or not was determined primarily by the length of the arginine oligomer chain. For monomeric amino acids, the interactions were investigated mainly by potentiometric titrations. Interactions were observable from arginine oligomers with eight monomer units. The molecular weight of hyaluronan mainly affected the intensity of the interactions. The transition between the individual conformations of hyaluronan (rod and random coil) was especially significant. Investigation of interactions was performed in water, in solutions with different concentrations of sodium chloride and in PBS. The sufficiently high ionic strength of the solution was able to suppress the interactions in water between the oligomers of arginine and hyaluronan. The basic antimicrobial peptide cecropin B has been shown to interact with hyaluronan in water but not in PBS. Based on these results, it was possible to conclude that the hyaluronan-cecropin B system would be particularly suitable for topical applications.

KEYWORDS

high resolution ultrasound spectroscopy, isothermal titration calorimetry, potentiometric titration, cecropin B, arginine, lysine, hyaluronan

JUGL, A. *Interakce hyaluronan-aminokyseliny*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2020. 158 s. (přílohy 25 s.). Vedoucí dizertační práce: prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vypracoval samostatně a že jsem všechny použité literární zdroje citoval správně a úplně. Dizertační práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům pouze se souhlasem vedoucího dizertační práce a děkana FCH VUT.

.....
Ing. Adam Jugl

Poděkování

Na tomto místě bych velmi rád poděkoval mému vedoucímu dizertační práce prof. Ing. Miloslavu Pekařovi, CSc. Za vedení, cenné připomínky, čas a energii, kterou mi věnoval během mého doktorského studia.

Speciální poděkování patří mojí rodině za neustálou podporu, kterou mi poskytovala po celou dobu mého studia nejen na vysoké škole.

OBSAH

Obsah	6
1 Úvod	9
2 Cíle práce	10
3 Teoretická část; současný stav poznání	11
3.1 Hyaluronan a jeho vlastnosti.....	11
3.1.1 Struktura hyaluronanu.....	12
3.1.2 Biologické funkce hyaluronanu.....	13
3.1.3 Hyaluronan v medicíně.....	15
3.1.4 Elektrostatické komplexace hyaluronanu	16
3.2 Aminokyseliny	19
3.2.1 Lysin	20
3.2.2 Arginin	20
3.2.3 Polyaminokyseliny	20
3.3 Antimikrobiální peptidy	22
3.3.1 Mechanismus účinku	23
3.3.2 Rezistence	24
3.3.3 Cecropiny	24
3.3.4 Interakce kationtových antimikrobiálních peptidů.....	25
3.4 Ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením.....	26
3.4.1 Princip měření	27
3.4.2 Využití HR-US v praxi	29
3.5 Titrační kalorimetrie.....	30
3.5.1 Princip měření	30
3.5.2 Využití titrační kalorimetrie.....	31
4 Potenciometrické titrace	33
4.1 Chemikálie	33
4.2 Příprava roztoků.....	34
4.2.1 Příprava roztoků hyaluronanu	34
4.2.2 Příprava roztoků monomerních aminokyselin:	35
4.3 Metody a přístroje	35

4.3.1	Automatické titrace, měření pH	35
4.4	Výsledky	36
4.5	Diskuse	38
4.6	Závěr.....	40
5	Interakce hyaluronan-arginin studované pomocí HR-US a ITC.....	41
5.1	Chemikálie	41
5.2	Příprava roztoků.....	43
5.2.1	Molární poměr.....	43
5.2.2	Příprava roztoků hyaluronanu	43
5.2.3	Příprava roztoků o vyšší iontové síle.....	44
5.2.4	Příprava roztoků monomerních aminokyselin:	44
5.2.5	Příprava roztoků oligomerních forem argininu	44
5.3	Metody a přístroje	45
5.3.1	HR-US	46
5.3.2	Zpracování dat HR-US	47
5.3.3	ITC.....	49
5.4	Výsledky	50
5.4.1	Výsledky z HR-US	56
5.4.2	Výsledky z ITC	67
5.5	Diskuse	78
5.6	Závěr.....	86
6	Interakce hyaluronan-cecropin B studované pomocí HR-US a ITC.....	88
6.1	Chemikálie	88
6.2	Příprava roztoků.....	89
6.2.1	Příprava roztoků hyaluronanu	89
6.2.2	Příprava roztoků cecropinu B.....	89
6.3	Metody a přístroje	90
6.3.1	HR-US	90
6.3.2	ITC.....	90
6.3.3	Molární poměr.....	91
6.4	Výsledky	92
6.4.1	Výsledky z HR-US	94

6.4.2	Výsledky z ITC	96
6.5	Diskuse	99
6.6	Závěr.....	102
7	Závěr.....	104
8	Podíl doktoranda; význam výsledků	106
9	Seznam použitých zdrojů.....	107
10	Seznam symbolů a zkratk	126
11	vědecká a publikační činnost	130
11.1	Články v impaktovaném časopise.....	130
11.2	Konferenční příspěvky indexované v databázi WoS nebo Scopus.....	130
11.3	Příspěvky na mezinárodních konferencích.....	130
11.4	Abstrakty.....	131
11.5	Přednášky na mezinárodních konferencích	131
11.6	Postery na mezinárodních konferencích.....	131
11.7	Absolvovaná stáž	132
12	Přílohy	133
12.1	Články v impaktovaném časopise.....	138

1 ÚVOD

Hyaluronan je za fyziologického pH záporně nabitý polysacharid. Jedná se o látku vlastní všem obratlovcům a nachází se tedy i v lidském těle, kde plní řadu důležitých funkcí. Hyaluronan v organismu běžně interaguje s aminokyselinami. Řada z nich je součástí větších celků, především buněčných receptorů, na které se hyaluronan váže. Důsledkem intenzivního výzkumu bylo především v posledních letech rozšířeno využití hyaluronanu v oblasti medicíny (přípravky na hojení ran), kosmetiky (krémy s přídavkem hyaluronanu) i farmacie (oční kapky).

Současný trend výzkumu hyaluronanu je orientován směrem k cílené distribuci léčiv, kde by hyaluronan mohl sehrát důležitou roli především s ohledem na jeho vztah k rakovinným buňkám. Protože se jedná o polyanion, modifikace by mohly být nekovalentního charakteru (elektrostatické). V první fázi výzkumu se k modifikaci využívaly kationtové tenzidy. Vzhledem k lepší biokompatibilitě jsou však zkoumány i možné interakce s kladně nabitými aminokyselinami a proteiny. Jako zajímavé se z proteinů jeví antimikrobiální peptidy, z nichž některé mají i experimentálně prokázané selektivní protirakovinné účinky.

Některé studie již ukázaly na možnost tvorby nosičových systémů složených z hyaluronanu a oligomerních aminokyselin pro nukleové kyseliny, nicméně v žádné ze studií zatím nebyly dopodrobna rozebrány vlastnosti interakcí mezi hyaluronanem a oligomerní aminokyselinou, které tyto nosičové systémy tvoří.

Pro studium těchto interakcí mezi hyaluronanem a aminokyselinami, respektive antimikrobiálními peptidy, byly vybrány metody ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením (HR-US), izotermické titrační kalorimetrie (ITC) a potenciometrické titrace. HR-US i ITC jsou metody velmi citlivé na molekulární uspořádání a nevyžadují žádnou modifikaci vzorků.

2 CÍLE PRÁCE

Předložená dizertační práce je zaměřena na studium fyzikálně-chemických interakcí hyaluronanu, jehož molekulová hmotnost se pohybuje v intervalu 9–1 540 kDa jednak s bazickými (oligo)aminokyselinami argininem a lysinem, jednak s kationtovým antimikrobiálním peptidem cecropinem B. Tyto interakce jsou studovány s využitím potenciometrických titrací, ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením (HR-US) a izotermické titrační kalorimetrie (ITC) pro získání základních termodynamických parametrů interakcí.

V teoretické části práce je pozornost zaměřena na již známé vlastnosti jednotlivých látek (hyaluronanu, (oligo)aminokyselin, a antimikrobiálních peptidů) společně s jejich praktickými aplikacemi, zejména s přihlédnutím na elektrostatické komplexace. Kromě těchto látek jsou popsány také možnosti využití HR-US a ITC pro studium polyelektrolytových a elektrostatických interakcí.

Interakce s oligomerními argininovými řetězci jsou zkoumány zejména s ohledem na fakt, že se v literatuře objevují systémy využívající těchto oligomerů kombinovaných s hyaluronanem jako součást nosičových systémů pro nukleové kyseliny, avšak v žádné z publikací se neřeší původ a vlastnosti těchto interakcí. Hyaluronan navíc v organismu běžně interaguje s aminokyselinami, které jsou součástí buněčných receptorů, na které se hyaluronan váže. Oligomerní argininové řetězce tedy slouží i jako zjednodušený model interakčního centra buněčných receptorů. Cílem je popsat tyto interakce a zjistit, zda a za jakých podmínek probíhají.

První zvolenou technikou použitou v experimentální části práce s cílem určit, zda v systému probíhají interakce, jsou potenciometrické titrace, které jsou využívány pro monomerní arginin a lysin. V průběhu potenciometrických titrací je s pomocí kombinované elektrody zaznamenáváno pH roztoků a na jeho základě je usuzováno, zda v systému interakce probíhají, či nikoliv.

V případě oligomerních aminokyselin je cílem charakterizovat vliv molekulové hmotnosti oligomeru stejně jako hyaluronanu na interakce v prostředí vody, PBS a prostředích o různé koncentraci chloridu sodného za využití technik HR-US a ITC.

Na základě zkušeností z experimentů prováděných s oligomerními argininovými řetězci jsou navrženy a realizovány experimenty s antimikrobiálním peptidem cecropinem B. Práce je zaměřena na prozkoumání vlastností interakcí tohoto bazického antimikrobiálního peptidu s hyaluronanem o různé molekulové hmotnosti a je studován vliv různých prostředí (voda, PBS) za využití technik HR-US a ITC. Zde se jedná o základní charakterizaci interakcí mezi peptidem a polysacharidem s ohledem na možné využití komplexů hyaluronan-cecropin B pro biologické aplikace.

3 TEORETICKÁ ČÁST; SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ

V následujících podkapitolách jsou shrnuty teoretické poznatky pro jednotlivé techniky a molekuly používané v dizertační práci. Vzhledem k různorodosti technik i molekul nebyl současný stav poznání zařazen do zvláštní kapitoly, ale je vždy součástí jednotlivých celků v Teoretické části.

3.1 Hyaluronan a jeho vlastnosti

V roce 1934 byl Karlem Meyerem popsán způsob izolace nového glykosaminoglykanu ze sklivce hovězích očí [1]. Meyer však hyaluronan neobjevil, jak bývá často mylně uváděno, pouze popsal některé z jeho vlastností. Izolovaný polysacharid byl pojmenován hyaluronová kyselina z řeckého *hyalos* – skleněný [2–4]. Při používání názvů tohoto polysacharidu platí, že hyaluronan je obecný pojem na rozdíl od hyaluronové kyseliny a hyaluronátu, které označují kyselinu, respektive její sůl (nejčastěji sodnou) [3].

Hyaluronan se vyskytuje v tkáních všech obratlovců [5]. Produkují ho také některé bakterie (*Streptococcus*, *Pasteurella*), ale nenajdeme ho u hub, rostlin a hmyzu [6]. U bakterií slouží jako protiantigenní kapsule, která jim pomáhá v infekci hostitele [7]. Jedná se o jednu ze základních složek extracelulární matrix [2]. V některých případech je jejím hlavním prvkem. V extracelulární matrix interaguje s ostatními složkami, především proteiny. První interakce byly pozorovány v roce 1972 [4]. Jeho koncentrace kolísá v závislosti na typu tkáně mezi $0,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ve sklivci po $4 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ v synoviální tekutině [8]. U bakterií, podobně jako v tkáni kohoutích hřebínků, může koncentrace dosáhnout až $7,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ [6]. Zhruba polovina celkového množství hyaluronanu obsaženého v lidském těle se vyskytuje v kůži [9].

U dospělého člověka dochází k obnově hyaluronanu každý den. V závislosti na literatuře se liší uváděné množství od 34 mg až po 15 g denně [4, 7]. V různých tkáních má hyaluronan různou délku poločasu rozpadu, která se velmi liší [8]. Například u přední komory oka je to 1-1,5 h, ve sklivci 70 dní, v synoviální tekutině přibližně 12 h [8] a v krevním řečišti se poločas rozpadu hyaluronanu pohybuje pouze řádu minut [4, 10].

Hyaluronan byl původně získáván z kohoutích hřebínků, hovězích sklivců a pupečních šňůr [4, 8, 11]. Velkoprodukcí v řádu tun ročně umožnila až „fermentační“ produkce pomocí streptokoků (*Streptococcus zooepidemicus*) [4, 6, 7]. Hyaluronan získávaný z kohoutích hřebínků je stále využíván především pro klinickou praxi díky vysoké molekulové hmotnosti, čistotě a nezářlivým vlastnostem [6]. Jedním z potenciálních kandidátů je také *Bacillus subtilis*, který je geneticky modifikován a nese gen pro produkci hyaluronanu. Takto modifikovaný kmen je schopný produkovat hyaluronan o molekulové hmotnosti kolem 2 MDa, je snadno kultivovatelný a neprodukuje žádné exo nebo endotoxiny. Navíc neprodukuje žádný enzym, který by mohl vzniklý polysacharid štěpit [12, 13].

V padesátých a šedesátých letech byla intenzivně studovaná fyzikálně-chemická stránka hyaluronanu. Bylo objeveno mnoho rolí, které plní hyaluronan v lidském těle, jako je regulace vodní rovnováhy, osmotického tlaku, stabilizaci struktur díky elektrostatické interakci [8] nebo ovlivňování difuze velkých molekul [14].

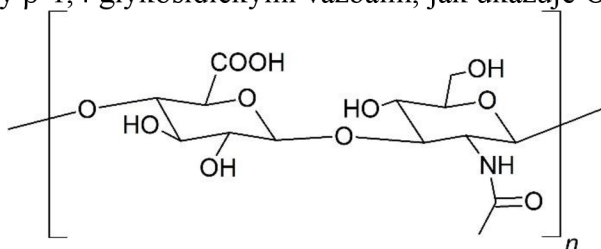
Za fyziologického pH jsou všechny karboxylové skupiny ve struktuře hyaluronanu disociovány, neboť hodnota disociační konstanty odpovídá $pK_a = 2,9-4$ [15, 16] v závislosti na iontové síle.

Katabolismus a anabolismus hyaluronanu byl popsán v devadesátých letech [4]. Bylo zjištěno, že hyaluronan je syntetizován přímo do extracelulárního prostoru z plazmatické membrány na rozdíl od ostatních glykosaminoglykanů, které jsou vytvářeny v Golgiho komplexu [2, 8].

3.1.1 Struktura hyaluronanu

3.1.1.1 Chemická struktura

Hyaluronan je lineární polysacharid patřící do skupiny záporně nabitých glykosaminoglykanů spolu s chondroitinsulfáty, keratansulfáty nebo heparansulfáty [4]. Na rozdíl od nich však ve své struktuře neobsahuje sulfátovou skupinu. Hyaluronan je tvořen opakujícími se disacharidovými jednotkami. Každá jednotka se skládá z D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu vzájemně spojených β -1,3 glykosidickými vazbami. Jednotlivé disacharidové jednotky jsou spojovány β -1,4 glykosidickými vazbami, jak ukazuje Obrázek 1 [8].



Obrázek 1: Struktura kyseliny hyaluronové, složená z opakujících se disacharidových jednotek D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu.

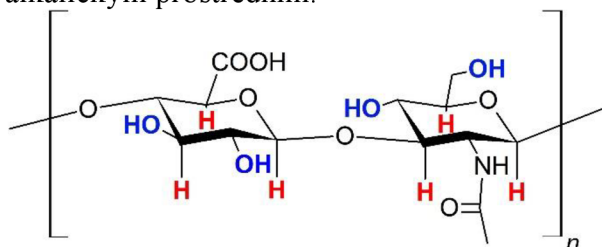
Každá disacharidová jednotka hyaluronanu odpovídá přibližně 400 Da. Délka řetězce může dosáhnout i více než 10 000 těchto jednotek v řadě s molekulovou hmotností dosahující až několika milionů Da [4, 8]. Syntetizovaný řetězec narůstá od redukujícího konce [8]. Substráty pro syntézu jsou uridin difosfát N-acetylglukosamin a uridin-difosfát-glukuronová kyselina, které poskytují energii pro syntézu. Narůstající řetězec se však nemůže zvětšovat do nekonečna především díky termodynamickému hledisku, neboť rostoucí řetězec snižuje entropii a ta musí být kompenzována volnou energií získatelnou ze štěpení aktivovaných nukleotidových cukrů [4, 17].

3.1.1.2 Struktura v roztoku

Ve fyziologickém prostředí se z hyaluronanu stává polyanion, který má ve své struktuře přidružené výměnné ionty, aby celá jeho struktura byla elektroneutrální. Mezi tyto kationty patří Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} a další [4]. Čistá hyaluronová kyselina vytváří ve vodě charakteristické vysoce viskózní a elastické roztoky [3].

Za fyziologických podmínek je struktura hyaluronanu tvořena chemickými vazbami tvořícími základ disacharidových jednotek a intramolekulárních vodíkových můstků, které jsou obtížně rozlišitelné s vodíkovými můstky tvořenými s molekulami vody [3]. Vzhledem k tomu, že jsou všechny hydrofilní skupiny uspořádány v ekvatoriální poloze a hydrofobní atomy vodíku v poloze axiální, jak ukazuje Obrázek 2, dochází v roztoku k tvorbě ploché, stuhu

připomínající, kroucí se struktury [10]. Tato stuha má ve své struktuře rozsáhlá hydrofobní místa, která se pravidelně opakují na opačných stranách stuhy a vytvářejí tak základ pro agregaci řetězců [18]. Kromě hydrofobních oblastí pomáhají hyaluronanu udržovat sekundární strukturu i intermolekulární vodíkové můstky [19]. Jejich příspěvek k sekundární struktuře může být narušen silně alkalickým prostředím.



Obrázek 2: Červeně zvýrazněné axiální vodíkové atomy a modře zdůrazněné ekvatoriální hydrofilní skupiny ve struktuře kyseliny hyaluronové.

Hyaluronan ve vodném prostředí tvoří rozsáhlá náhodná klubka [8], která se již od nízkých koncentrací (1 mg/ml) mohou proplétat za tvorby tří dimenzionální sítě [14]. Takto uspořádaný hyaluronan hraje v živém systému důležitou roli, neboť malé molekuly, jako je voda nebo elektrolyty, mohou jednoduše procházet skrze klubko, nikoliv však velké molekuly [8]. Molekuly s příliš velkým hydrodynamickým objemem jsou při průchodu skrz klubko výrazně zpomaleny. V konečném důsledku mohou i velké molekuly projít, neboť u klubka dochází k neustálému pohybu a vznikání a zanikání porů o různé velikosti. Takovéto chování vede k ovlivňování difuze u velkých molekul [14].

Hyaluronan o vysoké molekulové hmotnosti existuje ve vodných roztocích v konformaci náhodného klubka, naopak polymery s nižší molekulovou hmotností mají tyčinkovitou konformaci [20]. Jako hraniční molekulová hmotnost, kde se konformace mění, se jeví 90–130 kDa [21].

Hyaluronan se může vyskytovat i jako dvoušroubovice (stejně jako DNA), nicméně pouze za speciálních podmínek, které neodpovídají podmínkám fyziologickým [22].

3.1.2 Biologické funkce hyaluronanu

Hyaluronan ovlivňuje chování buněk v řadě oblastí, které se mohou zdát vzájemně protichůdné. Při migraci buněk, mitóze [23] nebo při vzniku nádoru dochází ke zvýšené syntéze hyaluronanu [24]. Přebytek tohoto polysacharidu v nádorové tkáni zvyšuje možnost růstu nezakotvených buněk [25, 26]. Hyaluronan však na druhé straně také zvyšuje buněčnou adhezi, agregaci buněk a inhibuje proliferaci. Všechny tyto akce jsou řízeny pomocí receptorů exprimovaných na povrch buňky, které mají ve své struktuře motiv pro vazbu hyaluronanu [4]. Mezi proteiny schopné takové interakce se řadí například HARE, kterým se řídí endocytóza hyaluronanu [27, 28], LYVE1 [2, 27] a mnohé další včetně intracelulárních receptorů, jejichž funkce zatím nebyla plně objasněna [4, 7].

Vzhledem k jednotvárné primární struktuře hyaluronanu se předpokládá, že funkci, jakou hyaluronan aktuálně plní, ovlivňuje jeho molekulová hmotnost [29]. Dlouhé polymerní řetězce vyplňují prostor, zabraňují tvorbě krevních kapilár a jsou imunosupresivní [29] na rozdíl od řetězců střední délky (25–50 disacharidových jednotek), které stimulují zánět, imunitu, jsou

silně angiogenní [6] a mají pozitivní vliv na tvorbu nových kapilár [30]. Oligosacharidy hyaluronanu působí proti apoptóze a indukují proteiny tepelného šoku [31]. Předpokládá se, že působí jako endogenní výstražné signály a spouštěče různých signálních drah [6]. Obecně lze však říci, že všechny hyaluronové fragmenty s molekulovou hmotností delší než 15 kDa (cca 37 disacharidových jednotek) jsou bezpečné a biologicky aktivní. V případě hyaluronanu s nízkou molekulovou hmotností jsou obavy na místě pouze v případě vysokých koncentrací [29].

Hyaluronan se vyskytuje i jako vnitřní součást některých buněk [6], zde však jeho funkce zatím nebyla plně pochopena [7]. Bylo také zjištěno, že buňky hladkého svalstva během virové infekce syntetizují povrchově vázaný hyaluronan ve formě, na kterou adherují mononukleární leukocyty [7].

3.1.2.1 Buněčné receptory pro hyaluronan

Hyaladheriny jsou heterogenní skupinou proteinů, které mají schopnost vázat hyaluronan [32]. Podle jejich umístění je dělíme na extracelulární a buněčné [2]. U většiny proteinů vážících hyaluronan je za vazbu odpovědná doména asi 100 aminokyselin, známá jako „Link module“ [2, 27, 33].

První popsany receptor pro hyaluronan – CD44 [7] je extracelulární receptor, který kromě hyaluronanu váže také fibronectin, laninim a řadu dalších molekul [2, 27]. Jedná se o hlavní buněčný receptor pro hyaluronan [34]. Je také zodpovědný za převod signálu do buňky [4, 7]. Účastní se řady buněčných procesů, jako je regulace růstu buněk, přežití nebo diferenciace [27]. V řadě nádorů (prsů, tlustého střeva, žaludku) dochází ke zvýšené expresi tohoto receptoru [29].

Za samotnou vazbu je zodpovědná část CD44 zvaná HABD. Jedná se o protein, který může být exprimovaný individuálně, je rozpustný a jeho schopnost poutat hyaluronan zůstává zachována [35]. Optimální velikost pro vazbu s receptorem CD44 se zdá být již hexasacharid [36, 37]. Řetězce delší než 20 monomerních jednotek hyaluronanu mají schopnost interagovat s dvěma CD44 receptory [36, 38]. Schopnost vazby s receptorem mají ale i kratší fragmenty přibližně mezi 3 a 5 disacharidovými jednotkami [34].

Vazba hyaluronanu k receptoru je řízena především tvarem a možnostmi vytvářet vodíkové můstky [39]. Iontové interakce ve fyziologickém roztoku přispívají do celkové energie interakce přibližně 25 %, navíc jsou velmi závislé na velikosti iontové síly [38]. Kontakt receptoru s hyaluronanem je řízen pomocí vodíkových můstků a van der Waalových sil, spíše než elektrostatických interakcí nebo patrových interakcí [39–41]. K interakci dochází v mělké drážce na povrchu receptoru. Celkem 13 aminokyselinových zbytků se podílí na interakci s hyaluronanem. Velkou část zprostředkovávají alifatické zbytky, zbytky aromatické a bazické [39].

RHAMM patří do skupiny proteinů vážící hyaluronan [42]. Vyskytuje se v několika formách a váže hyaluronan o nízké i vysoké molekulové hmotnosti [34]. Je exprimovaný na povrch buněk, vyskytuje se ale i v cytoplazmě a buněčném jádru [2]. Předpokládá se, že hraje roli při hyaluronanem zprostředkované migraci a proliferaci buněk [43]. Často je ve zvýšené míře exprimován v pozdních stádiích rakovinného bujení [34].

LYVE1 je protein vázající hyaluronan především v endoteliálních buňkách lymfatické soustavy, a na místech jako je jaterní tkáň, kde dochází k degradaci vysokomolekulárního hyaluronanu [2].

Řada z těchto receptorů bývá ve zvýšené míře exprimována v rakovinných buňkách, což z nich dělá vhodný cíl pro hyaluronanem naváděná léčiva [28].

3.1.3 Hyaluronan v medicíně

Přípravky na bázi hyaluronanu se využívají v řadě lékařských (oftalmologie, obohacování synoviální tekutiny, distribuce léčiv nebo pro separaci tkání po operaci, hojení ran) a kosmetických aplikací [6], díky biokompatibilitě, biodegradabilitě a viskoelastických vlastnostech hyaluronanu [2, 4].

První využití hyaluronanu se datuje do padesátých let dvacátého století, kdy byl použit jako náhrada očního sklivce během oční operace rakovským týmem [44]. Dodnes se během očních operací využívá 1% roztok hyaluronanu [7] pro ochranu buněk oka během operace i jako náhrada sklivce [2].

Hyaluronan obsažený v synoviální tekutině, které uděluje ne-newtonskou viskozitu a další nezbytné mechanické vlastnosti [2, 45], provádí nezbytnou lubrikaci kloubů, snižuje tření a slouží jako tlumič nárazů. Při zánětlivých procesech jako revmatoidní artritida dochází k poklesu molekulové hmotnosti tohoto polysacharidu [46]. Tato změna výrazně redukuje schopnost synoviální tekutiny plnit její funkce. K podobným změnám dochází v synoviální tekutině i v případě osteoartritidy [47]. Pro opětovné zlepšení funkčnosti kloubů se používají, jak ukázal již Balazs a Denlinger v roce 1989 u kloubů koní [48], injekce hyaluronanu přímo do oblasti kloubu.

3.1.3.1 Distribuce léčiv za použití hyaluronanu

V minulých letech byl hyaluronan výrazně využíván pro přepravu léčiv v dermálním a transdermálním podání, kde pomáhal léčivým látkám penetrovat do pokožky [49, 50]. Pro svoje viskoelastické a mukoadhezivní vlastnosti byl použit pro oční a nosní podání léčivých substancí a bylo také zjištěno, že vysokomolekulární hyaluronan na rozdíl od nízkomolekulárního [51] je schopen zvyšovat biologickou dostupnost různých léčiv (vasopressin, pilokarpin, gentimycin...) [52], právě na základě těchto vlastností.

Díky svým netoxickým vlastnostem byl využit i v parenterálním podání léčiv. Velmi zajímavé se jeví především konjugáty nízkomolekulárního hyaluronanu s butyrátem [53], paclitaxelem [54] nebo doxorubicinem [55] pro cílenou distribuci těchto léčiv do nádorových tkání. Především butyrát sodný s krátkým poločasem rozpadu přibližně 5 minut v lidském těle, bylo nutné pro jeho správnou aktivitu zacílit do nádorových tkání tak, aby došlo ke zvýšení koncentrace butyrátu. Za tímto účelem bylo zvoleno kovalentní napojení butyrátu na hyaluronan [53]. Dále byly vytvořeny různé druhy podobných konjugátů s liposomy, kopolymery nebo implantáty založené na modifikovaném hyaluronanu, pro distribuci protinádorových léčiv nebo peptidů [2, 56].

3.1.4 Elektrostatické komplexace hyaluronanu

Elektrostatická vazba nízkomolekulárních ligandů na hyaluronan byla studována řadou technik, jako je fluorescenční spektroskopie, izotermická titrační kalorimetrie [57], dynamický rozptyl světla nebo počítačové modelování [58].

Pomocí kapilární elektroforézy bylo zjištěno, že deriváty β -naftylamidu s Arg, Lys a Ala interagují ve fosfátovém pufru (pH 7,4; $I = 0,17$ M) velmi slabě na rozdíl od prostředí acetátového pufru (pH 4,65; $I = 0,05$ M), kde byla elektrostatická interakce silnější především díky nižší iontové síle [59].

Příklad elektrostatických interakcí hyaluronanu s kationtovými liposomy a plazmidovou DNA byl vytvořen Balbiniho skupinou [60], kde komplex liposom/DNA nechali interagovat s nízkomolekulárním hyaluronanem (16 kDa) ve vodném prostředí s cílem získat prostředek pro cílenou distribuci genů.

Pomocí elektrostatických interakcí byly také vytvořeny injektovatelné hydrogely, ve kterých dochází k interakci mezi nanočásticemi obsahujícími na svém povrchu amfifilní kopolymer polyethylenglykolu a mléčné kyseliny a dále kyselinou hyaluronovou, resp. karboxymethylcelulózou nekovalentně modifikovanou přidavkem kationtového tenzidu (CTAB) [61].

S využitím konduktometrie byl analyzován vznik komplexů mezi hyaluronanem a chitosanem, dvěma přírodními polymery a byla testována stabilita těchto komplexů v různých podmínkách [62]. Bylo zjištěno, že pro tvorbu elektrostaticky tvořených nanočástic s hyaluronanem je vhodný středně acetylovaný chitosan. Pouze v takovém případě jsou vzniklé částice stabilní a zároveň vhodné k interakci s buňkami [63].

Přidavkem fibrinogenu k roztoku hyaluronanu za neutrálních podmínek v přítomnosti 0,15 M NaCl vyvolává tvorbu volné elektrostatické 3D sítě, která byla charakterizována pomocí reologických měření [64]. Síť byla destabilizovaná při pH nižším než 4 nebo v přítomnosti proteáz, které hydrolyzovaly fibrinogen.

Studovány byly také elektrostatické komplexace hyaluronanu spolu s kationtovými surfaktanty s využitím ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením [65]. Bylo odhaleno několik různých typů interakcí mezi hyaluronanem a tenzidy v závislosti na koncentraci tenzidu. Množství typů interakcí bylo potlačeno v solném roztoku. Kromě elektrostatických interakcí jsou pravděpodobné i hydrofobní interakce, neboť vliv na výsledný profil titrace měla i délka hydrofobního řetězce surfaktantu.

3.1.4.1 Interakce s aminokyselinami

Myšlenka využití elektrostatické interakce hyaluronanu s aminokyselinami není revoluční. Již bylo dokázáno, že hyaluronan s polyaminokyselinami ve vhodných podmínkách interaguje [66]. Jako důležité se jeví především pH a iontová síla, přičemž pokud klesne pH na hodnotu kolem 2,5, není prakticky možné pozorovat žádné interakce, neboť karboxylové skupiny hyaluronanu zajišťující interakci nejsou nadále disociované [15, 16].

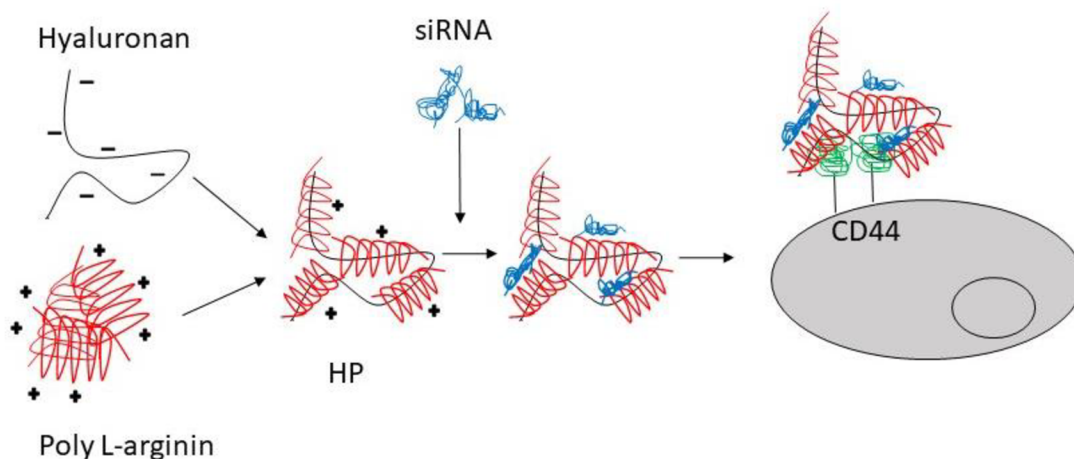
Výzkum v tomto případě navazuje na poznatky interakcí mezi hyaluronanem a kationtovými tenzidy, které podobně jako aminokyseliny za určitých podmínek nesou na atomu dusíku kladný náboj a jsou proto schopny elektrostatické interakce se záporně nabitou karboxylovou skupinou hyaluronanu. V tomto ohledu je důležitá především práce Kargerové [65], která se zabývá studiem interakcí hyaluronanu a kationtového tenzidu pomocí ultrazvukové spektroskopie (detailně popsáno v předchozí kapitole 3.1.4).

K měření interakcí mezi aminokyselinami a hyaluronanem byly využívány různé metody. Řada prací vzniklá na Fakultě chemické se této problematice věnovala. Byly využívány metody jako je potenciometrie, konduktometrie [67] nebo reologie [66]. Bylo zjištěno, že velký vliv na sílu interakcí má především iontová síla roztoku a také pH, při kterém dochází k interakcím mezi aminokyselinou a hyaluronanem [59, 66]. Vysoká iontová síla roztoku má za následek odstínění elektrostatických interakcí.

Z aminokyselin byly zkoumány arginin a lysin, především s ohledem na možnost nést větší celkový kladný náboj. Bylo zjištěno, že lysin spolu s hyaluronanem vykázal vyšší sílu interakcí (v porovnání s Arg a 6-aminokapronovou kyselinou) neboť může při vazbě využít obě nabitě skupiny a zároveň sloužit jako linker mezi dvěma řetězci hyaluronanu. V případě argininu dochází k menší intenzitě interakcí, pravděpodobně v důsledku s delokalizovanou hustotou náboje na guanidinové skupině. Podle výpočtů (density functional theory) tvoří arginin spolu s hyaluronanem více rigidní struktury, naopak lysin více flexibilní [66].

Roztok hyaluronanu byl míchán s roztokem polyargininu za vzniku nanočástic. Jejich vlastnosti (zeta potenciál) závisely na hmotnostním poměru mísených polymerů. Zároveň systémy s molekulovou hmotností hyaluronanu 165 kDa zůstávaly na rozdíl od nízkomolekulárního hyaluronanu stabilní ve fyziologickém prostředí [68]. Podobný systém s nízkomolekulárním hyaluronanem (29 kDa) a polyargininem (5–15 kDa) byl v přebytku hyaluronanu využit pro tvorbu houbovitých, vysoce porézních struktur s možným biomedicínským využitím [69].

Elektrostatická komplexace hyaluronanu byla také použita pro cílenou distribuci siRNA. Hyaluronan (Hya, 19 kDa) interagoval s poly L-argininem (PLR) ve vodném prostředí a výsledný komplex byl použit pro interakci s siRNA a její cílenou distribuci, jak ukazuje Obrázek 3. Účinnost cílené distribuce závisela především na množství exprimovaného receptoru CD44 na povrchu buněk a molekulové hmotnosti hyaluronanu. Částice byly testovány *in vivo* i *in vitro* [56]. Pro přípravu komplexů bylo využito jednoduchého smísení roztoků. Následně byly purifikovány v dialyzačním střívkku proti vodě po dobu 2 dnů a lyofilizovány. Prášek byl rozpuštěn ve vodě, vortexován po dobu 3 minut a následně 20 min sonifikován. Následně došlo ke smísení s siRNA.



Obrázek 3: Hypotetické schéma tvorby komplexu HP pro cílenou distribuci siRNA podle [56].

3.1.4.2 Interakce s proteiny

Předpokládá se, že spojení biodegradabilního polymeru a biologicky aktivního proteinu může maskovat jeho aktivitu a zvýšit jeho stabilitu v krevním řečišti, k obnovení aktivity je dosaženo po degradaci polymeru v místě určení [16].

Interakce mezi proteiny a polysacharidy za tvorby komplexů mohou být hnané entalpicky i entropicky v závislosti na hustotě náboje makromolekul. Slabě nabité proteiny a polysacharidy vytváří komplexy pomocí elektrostatických sil (entalpický příspěvek), ale formování těchto komplexů a agregátů u silně nabitých polyelektrolytů je často hnáno entropicky, pravděpodobně pomocí uvolněných protiiontů a molekul vody a konformačních změn polymerů při interakci [70]. Vazebná afinita polyelektrolytu k proteinu (hovězímu sérovému albuminu) je silně ovlivněna třemi strukturálními parametry polyelektrolytu: roste s flexibilitou řetězce (v případě hyaluronanu se jedná o tuhý polyelektrolyt) a mobilitou náboje, v případě hustoty náboje je problematika komplexnější [71]. Tuhý polymerní řetězec jako je hyaluronan nedokáže efektivně měnit svoji konformaci tak, aby byl ideálně schopen využít vazeb k opačným nábojům na proteinu a zároveň díky změně konformace nedocházelo k výrazným odpudivým interakcím se stejně nabitými skupinami na proteinu [72].

Bylo prokázáno, že BSA a hyaluronan je schopný elektrostatické komplexace kolem pH 4, nezávisle na délce hyaluronanu v rozsahu $1\ 000\text{--}1\ \text{milion}\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ (pH = 4 bylo zvoleno s ohledem na izoelektrický bod albuminu – 5,2 a pK_a hyaluronanu 2,9, tak aby bylo možné tvořit komplexy pomocí elektrostatických interakcí, k podpoření byly tyto interakce studovány také za nízké iontové síly) [73]. Rozpustnost tohoto komplexu je však závislá na délce hyaluronanového řetězce. Jednu molekulu BSA je možné obalit více krátkými řetězci Hya naopak dlouhá molekula hyaluronanu může interagovat s více molekulami BSA. Měřena byla turbidita, velikost komplexů, a byly analyzovány komplexy Hya-protein pomocí spektrofotometrického měření [74]. Komplexy mohou vznikat trojího typu, a to neutrálně nabitě, pozitivní nebo negativní dle poměru hyaluronanu a albuminu. [73].

Elektrostatické interakce by však měly fungovat i za fyziologické iontové síly a pH [74]. Při interakci mezi hyaluronanem a BSA v čisté vodě docházelo k zakalení roztoku, ale při iontové síle 150 mM roztok zůstával čirý. Formování komplexů bylo zjišťováno pomocí UV-VIS [73].

Byly studovány také komplexy hyaluronanu a hedvábného fibrinu. Tyto komplexy existují v pH oblasti 2,5–3,5 a komplexy se formují především pomocí elektrostatických interakcí [75]. Naopak lysozym, který má izoelektrický bod vyšší než albumin, formoval komplexy i v hodnotách pH výrazně vyšších (pH 3–9) [76].

Pomocí malouhlového rozptylu neutronů (SANS) byla studována struktura komplexů hyaluronanu spolu s lysozymem. Hyaluronan byl použit ve dvou molekulových hmotnostech 6 a 500 kDa. pH, při kterém byly experimenty prováděny, bylo 4,7 a 7,4, díky čemuž měl lysozym celkový náboj +10 resp. +8. Koncentrace lysozymu byla v rozsahu 3–40 g·l⁻¹, hyaluronanu pak 10 g·l⁻¹. Komplexy měly rozdílné struktury především v závislosti na poměru nábojů. Interakce mezi hyaluronanem a lysozymem má elektrostatickou povahu, což dokazuje především její stínění při zvýšené iontové síle (137 mM) [77].

Byl také vytvořen nový druh polyelektrolytových komplexů složených z hyaluronové kyseliny a protaminu (malé proteiny složené převážně z argininu, s vlastnostmi které umožňují penetrovat do buňky) [78]. Byly získány malé (60 nm) negativně nabitě částice s indexem polydispersity menším než 0,2. Vlastnosti byly závislé na poměru jednotlivých složek, koncentraci polyelektrolytů a molekulové hmotnosti hyaluronanu. Izoelektrický bod částic byl blízký pH 2 a negativní povrchový náboj se proto udržuje v neutrálním až slabě kyselém pH. Možné vhodné využití jako nosič pro orální aplikaci peptidů. Pozitivně nabitě částice nebyly stabilní [79].

Byly provedeny předběžné experimenty s thymosinem $\alpha 1$. Jedná se o peptidický hormon, který má imunitní regulační vlastnosti a je schválený v různých zemích pro léčbu virových infekcí a rakovin. S využitím NMR bylo zjištěno, že se interakce s hyaluronanem vyskytuje specificky kolem aminokyselinových zbytků lysinu v sekvenci LKEKK. Zároveň je možné, že thymosin $\alpha 1$ ruší vazbu hyaluronanu na receptory CD44 a RHAMM [80].

3.2 Aminokyseliny

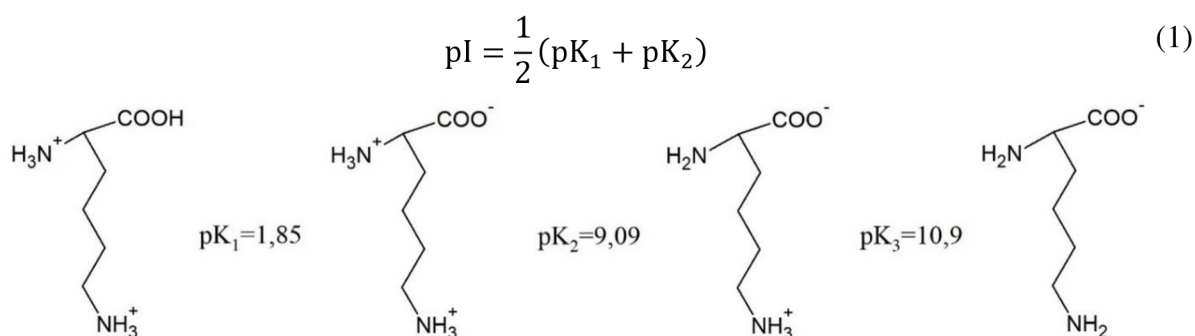
Aminokyseliny jsou základní stavební složky proteinů, ve kterých se v různém zastoupení vyskytuje přibližně 20 L- α -aminokyselin spojených do řetězců peptidovou vazbou. Aminokyseliny obsahují, jak název napovídá, aminoskupinu i karboxylovou skupinu. U α -aminokyselin jsou obě tyto skupiny vázány ke stejnému atomu uhlíku, který je chirální (s výjimkou glycinu). Dle struktury postranních řetězců dělíme aminokyseliny na zásadité, kyselé, aromatické, alifatické a sirné [81].

V závislosti na pH mohou aminokyseliny měnit svůj celkový náboj od kladně nabitých až po záporně nabitě. Jedná se tedy o amfolyty. Jako elektroneutrální se aminokyselina jeví v izoelektrickém bodě (pI), což je hodnota pH, kde v celkovém součtu nese aminokyselina nulový náboj. Obecně lze říci, že v oblasti pH pod izoelektrickým bodem aminokyseliny dochází k tvorbě kladně nabitě molekuly, naopak nad hodnotou izoelektrického bodu převládá

záporný náboj. Vzhledem k velkému počtu nabitých skupin ve struktuře aminokyselin se snadno rozpouští v polárních rozpouštědlech [81].

3.2.1 Lysin

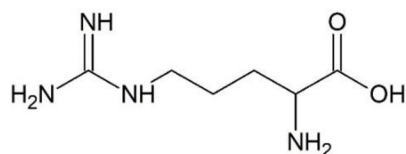
L-lysin (zkráceně Lys, K) je bazická aminokyselina, u člověka jedna z 10 esenciálních [81, 82]. Důležitou roli hraje v metabolismu mastných kyselin, vápníku a kolagenu. Využívá se při léčbě osteoporózy a oparů. Průmyslově se získává fermentačně pomocí *Corynebacterium glutamicum* [83]. Hodnoty disociačních konstant při 298,1 K a nulové iontové síle jsou $pK_{\text{COOH}} = 1,85$, $pK_{\text{NH}_2} = 9,09$ a $pK_{\text{e-NH}_2} = 10,9$ [84]. Izelektrický bod byl vypočítán pomocí rovnice (1) a jeho hodnota odpovídá $pI = 10,0$. Jeho chemickou strukturu v závislosti na pH znázorňuje Obrázek 4.



Obrázek 4: Struktura lysinu v závislosti na pH prostředí.

3.2.2 Arginin

L-arginin (zkráceně Arg, R) je bazická aminokyselina [81], pro člověka esenciální během růstu, po jeho ukončení již nikoliv, tedy tzv. semiesenciální aminokyselina. Produkován je pomocí extrakce z proteinového hydrolyzátu a pomocí fermentace mutovaných kmenů (*Corynebacterium*, *Bacillus* nebo *Serratia*) [85]. Hodnoty disociačních konstant pK_a při 298,1 K a nulové iontové síle jsou $pK_{\text{COOH}} = 1,97$, $pK_{\text{NH}_2} = 9,05$ [84] a $pK_{\text{e-NH}_2} = 13,8$ [86]. Izelektrický bod má hodnotu $pI = 10,76$ [87]. Chemická struktura argininu je znázorněna na obrázku (Obrázek 5).



Obrázek 5: Chemická struktura argininu.

3.2.3 Polyaminokyseliny

Polyaminokyseliny (PAA) jsou syntetické materiály obsahující pouze jeden druh aminokyseliny [88]. Jsou velmi dobře rozpustné ve vodě a odolné vůči změnám pH. Zároveň se jedná o biodegradabilní polymery [89]. Polyaminokyseliny a jejich deriváty (kopolymery) především polyglutamová a polyasparagová kyselina případně polylysin jsou široce používány, micely tvořící materiály zajímavé především pro distribuci léčiv [90].

3.2.3.1 *Polyarginin*

Polymerní kationtové aminokyseliny mají schopnost prostupovat do buněk (kvasinek, gram pozitivních i negativních bakterií) [91]. Nad ostatními polymery aminokyselin vyniká touto schopností polymer argininu [92]. Schopnost vstupovat do buňky je ovlivněna délkou argininového řetězce [91, 93], kdy polymery kratší než 5 monomerních jednotek mají výrazně horší schopnost pronikat do buněk než peptidy s více než 6 aminokyselinovými zbytky [91, 94]. Schopnost průniku se zvyšuje s rostoucí délkou řetězce až do 15 aminokyselinových zbytků, stejně jako buněčná toxicita [91]. Důvod proč delší řetězce polyargininu snadněji narušují membránu, je pravděpodobně změna konformace z náhodného klubka do α -šroubovice [93] při styku s fosfolipidovou dvojvrstvou. Polyarginin je také schopný se translokovat skrze savčí buněčnou membránu [88].

Této skutečnosti bylo využito při tvorbě polyelektrolytových komplexů polyargininu a plasmidové DNA s cílem zvýšit účinnost transfekce. Jako nejefektivnější se ukázal polyarginin složený ze sedmi aminokyselinových zbytků, navíc jeho cytotoxicita byla velmi mírná [94].

Polyarginin byl také využit jako součást nosičového systému pro RNA a chemokinů. Olejové jádro nanočástic bylo schopné enkapsulovat proteiny a jeho krytí zajišťovala polymerní slupka z polyargininu a hyaluronanu, usnadňující jejich cílené doručení a schopná nést RNA [95].

S ohledem na nutnost vytvoření antibakteriálních povrchů pro medicínské použití, především v oblasti implantátů, byla zkoumána možnost využití polyargininu a hyaluronanu. Byl zkoumán polyarginin o různých délkách řetězce (10, 30, 100 a 200 aminokyselin). Filmy obsahující polyarginin o délce 30 reziduí vykazaly silnou antimikrobiální aktivitu jak pro gram pozitivní, tak gram negativní patogenní bakterie. Důležitý je především poznatek délky polyargininového řetězce, neboť se jedná o první případ, kdy délka řetězce hraje významnou roli ve funkčnosti tenké vrstvy. Bakterie byly zneškodněny díky přítomnosti mobilních řetězců polyargininu, které s bakteriemi reagovaly, a v důsledku interakce zabíjely [96].

3.2.3.2 *Polylysin*

Jednou z prvních zkoumaných kationtových polyaminokyselin byl právě polylysin. Struktura tohoto polymeru je schopná ochránit genetický materiál proti rozkladu a zároveň zvýšit jeho buněčný příjem skrze nescifickou endocytózu [88]. Problémem však je jeho významná cytotoxicita závislá na molekulové hmotnosti polylysinu [97].

Poly-L-lysin (PLL) se vzájemně odpuzuje a na povrch fosfolipidových dvojvrstev se tedy adsorbuje mnohem menší intenzitou než polyarginin [98].

Hyaluronan v kombinaci s poly-L-lysinem byl využit pro tvorbu biokompatibilního filmu pomocí střídavé absorpce. Hnací silou byla kompenzace povrchového náboje. Tyto filmy narůstají exponenciálně, což je způsobeno pronikáním PLL dovnitř filmu v průběhu jeho kontaktu s roztokem PLL a opačným procesem v případě kontaktu filmu s roztokem hyaluronanu [99].

Byly také studovány interakce mezi polylysinem, jakožto potenciálního antimikrobiálního potravinářského přípravku a pektinem s různým stupněm esterifikace, pomocí ITC,

mikroelektroforézy a turbidimetrie. S klesajícím stupněm esterifikace, tedy s rostoucím nábojem na pektinu, rostla intenzita interakcí, což mělo za následek snížení antimikrobiální aktivity polylysinu [100].

3.3 Antimikrobiální peptidy

Antimikrobiální peptidy (AMP) jsou z hlediska evoluce velmi staré a hrály v ní důležitou roli [101]. Vyskytují se v širokém spektru organismů, jako jsou protozoa, prokaryota, eukaryota [28]. Přesto, že existují i aniontové antimikrobiální peptidy, většina přírodních AMP je kationtových s průměrným kladným nábojem +3,2 [102]. S ohledem na obsah práce je pozornost soustředěna právě na kationtové AMP.

Obecně se jedná o peptidy v délce 12 (6 pro aniontové AMP [103]) až 50 aminokyselinových zbytků [104, 105], vzhledem k jejich množství je však velmi obtížné je rozřadit [101], nicméně dělí se podle aminokyselinové sekvence a sekundární struktury [103]. Celkem rozeznáváme čtyři základní třídy: β -list, α -šroubovice, lineární peptidy se zvýšeným obsahem dané aminokyseliny a peptidy vytvářející smyčky (obsahují disulfidický můstek) [28].

Kationtové AMP jsou charakterizovány především jako β -list a α -šroubovice [106]. Jejich základním znakem je schopnost molekuly zaujmout takový tvar, ve kterém jsou hydrofobní aminokyseliny (I, V, F, Y, W [107], více než 30 % [108]), hydrofilní aminokyseliny a aminokyseliny nesoucí kladný náboj (R, K [107]) prostorově uspořádány do samostatných sektorů v molekule za tvorby tzv. amfifilní struktury [101, 107, 109], přestože v roztoku se vyskytují v konformaci náhodného klubka [28]. Většina antimikrobiálních peptidů má díky většímu množství aminokyselinových zbytků nesoucí kladný náboj (arginin, lysin [105]) celkový náboj +2 až +9 [110].

Mnohobuněčné organismy exprimují řadu různých antimikrobiálních peptidů [101, 104, 111], pravděpodobně proto, že žádný AMP nepokrývá celé antimikrobiální spektrum [112]. Kladně nabitě α -helikální peptidy často zaujímají ve vodném roztoku konformaci náhodného klubka [113] (například LL-37 [114]), to se však mění na uspořádanou strukturu v přítomnosti lipidů, sodium dodecyl sulfátu nebo liposomů, resp. v prostředí imitující cytoplazmatickou membránu [111, 115]. Zvýšená uspořádanost sekundární struktury koreluje se silnější antimikrobiální aktivitou [116].

Řadu AMP produkují živočichové za specifických podmínek [104]. AMP cílí na gram-pozitivní i negativní bakterie, houby nebo některé parazity [105, 117]. Viry jsou cílem AMP pouze ve specifických případech (HIV) [104]. Jeden AMP často zastává několik funkcí [102]. AMP také ovlivňují imunitní reakci na všech úrovních imunitního systému [105].

Vzhledem k rostoucí rezistenci ke konvenčním antibiotikům se pozornost farmaceutického průmyslu obrací právě na AMP [118], které by mohly převzít jejich roli při boji s infekcemi [111]. Největším problémem AMP při terapii je jejich efektivita proti infekci často až při vysokých dávkách (blízkých toxickým dávkám) [101]. Pro komerční využití ve farmacii je potřeba vyřešit řadu problémů spojených v AMP. Jejich možnou toxicitu a alergizující účinky (využíváním těla vlastních AMP), syntézu ve velkých množstvích (biosyntéza pomocí mikroorganismů – problém toxické pro mikroorganismy, syntéza do mléka geneticky

modifikovaných zvířat nebo v rostlinách), degradace AMP v případě trávení nebo zavedení do krevního oběhu (modifikace struktury AMP, tak aby nebyly dále rozpoznatelné) a případné problémy spojené s rezistencí (vzhledem k využití AMP vyššími organismy po miliony let se zdá, že rezistence se vyvíjí obtížně) [111, 119].

Růst mikrobů na površích syntetických materiálů, ze kterých jsou vyráběny medicínské přístroje, jako jsou například intravenózní katetry, je problém, který by mohli AMP pomoci vyřešit [118]. Peptid magainin, který je kovalentně vázaný, si ponechává svoji antimikrobiální aktivitu [120, 121].

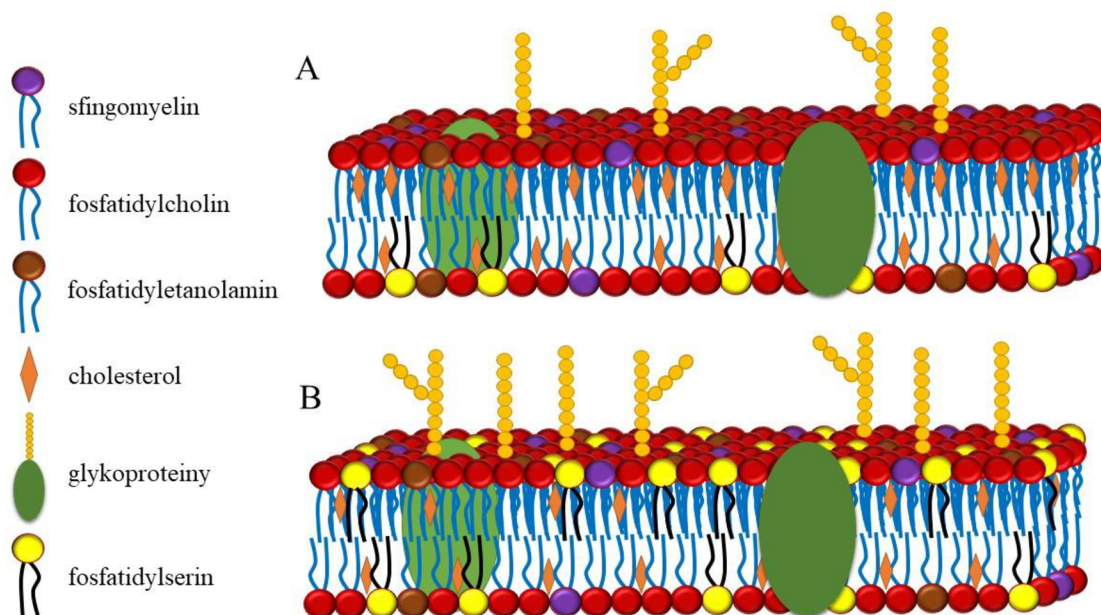
AMP jsou zatím využívány především v topických aplikacích [122]. Pro uchovávání potravin je už řadu let využíván peptid ampicin [119] a nisin [123].

Distribuce AMP pomocí nanočástic je jedním ze směrů výzkumu možného využití AMP v medicíně. Chitosanové částice se zachycením dermaseptinem byly zkoumány pro svoji výbornou protinádorovou aktivitu [124]. U nanočástic PLGA spolu s LL-37 bylo zjištěno rychlejší hojení ran, zároveň byl systém plně biodegradovatelný [125].

Magaininy, tachyplesin, cecropin B a BMAP-28 jsou přírodní AMP, u kterých je velký potenciál stát se novou třídou léčiv proti rakovině [28].

3.3.1 Mechanismus účinku

Antimikrobiální peptidy využívají základní rozdíl mezi membránami mikrobů a mnohobuněčných organismů. Bakteriální membrány jsou organizovány takovým způsobem, kdy je nejsvrchnější vrstva lipidové dvojvrstvy cytoplazmatické membrány osazená fosfolipidy, které nesou záporný náboj [101, 104, 107]. V případě mnohobuněčných organismů však platí, že svrchní vrstva cytoplazmatické membrány náboj nenesou a negativně nabitě lipidy se vyskytují především na vnitřní straně dvojvrstvy [101]. V případě rakovinných buněk dochází ke ztrátě symetrie (Obrázek 6) na vnitřní a vnější straně cytoplazmatické membrány, proto je jejich povrch záporně nabitý, což umožňuje některým AMP účinkovat i proti těmto buňkám [28, 107, 118]. Zároveň je na povrchu rakovinných buněk řada aniontových membránových komponent (glykoproteinů, glykolipidů, proteoglykanů), což dále zvyšuje atraktivitu a umožňuje AMP rozlišovat mezi rakovinnými buňkami a buňkami zdravými [126]. Cholesterol obsažený v membráně snižuje aktivitu AMP [111, 126], stejně jako rostoucí iontová síla [101]. Využití AMP jako základu protirakovinné léčby by mohlo být úspěšné ve spojitosti s novými nosičovými systémy [126].



Obrázek 6: Schématická prezentace rozdílů mezi cytoplazmatickou membránou zdravé buňky (A) a rakovinné buňky (B) podle [28].

Byla prezentována řada hypotéz o tom, jakým způsobem zabijí antimikrobiální peptidy mikroorganismy [118]. Patří mezi ně depolarizace bakteriální membrány, vytvoření kanálů, které umožňují únik buněčného obsahu [103, 105, 111] nebo aktivace hydroláz, které degradují buněčnou stěnu [101, 119]. Některé AMP mohou procházet cytoplazmatickou membránou a usmrcovat pomocí interakce s intracelulárními komponenty v buňce [103, 105, 107]. Většina AMP může pravděpodobně využívat více než jednu možnost, jak účinkovat v závislosti na prostředí [107]. Ať už je mechanismus účinku AMP jakýkoliv, faktem je, že AMP účinkují v řádu minut [103], tedy velmi rychle [119]. AMP tedy způsobují buněčnou smrt především díky fyzikální interakci peptid-lipid a jejich chování by se dalo přirovnat k detergentům [127].

U gram-negativních bakterií navíc dochází k výměně vápenatých a hořčnatých iontů v lipopolysacharidech, což má za následek poškození vnější buněčné stěny. AMP pak získají přístup do periplazmatického prostoru a k cytoplazmatické membráně [101].

3.3.2 Rezistence

Rezistentní rody jako jsou *Morganella* a *Serratia* neexprimují do vnější vrstvy cytoplazmatické membrány dostatek záporně nabitých lipidů. Jiné rezistentní druhy jako *Porphyromonas gingivalis* vylučují do prostředí proteázy, které AMP ničí [101]. Studie potvrzují, že pravděpodobnost vzniku rezistence na AMP je menší, v porovnání s běžnými antibiotiky [101, 119]. Obavy ze vzniku případné rezistence přetrvávají především v případech, kde AMP cílí na specifický protein v buňce. Zde je možnost genetické mutace a vzniku rezistence [107].

3.3.3 Cecropiny

AMP izolované z hmyzu jsou jedním z hlavních zdrojů AMP [128]. Prvním purifikovaným zástupcem byly cecropiny z kulek motýla *Hyalophora cecropia* [129], později byly cecropiny

objevy i u savců [130]. Skupina cecropinů se skládá ze silně zásaditých peptidů s velikostí okolo 4 kDa. Cecropiny se skládají z 34 až 55 aminokyselinových zbytků [131].

Cecropin A (KWKLFKKIEKVGQNIRDGIKAGPAVAVVVGQATQIAK) a cecropin B (KWKVFKKIEKMGRNIRNGIVKAGPAIAVLGEAKAL), jsou nejlépe prostudovanými zástupci této skupiny [132], vykazují silnou antimikrobiální aktivitu proti gram-pozitivním i negativním bakteriím a houbám [128, 133, 134], přitom však způsobují lyzi eukaryotických buněk až za vysokých koncentrací [128, 133, 135]. Ze základních experimentů vyplývá, že cecropin B vykazuje jistou selektivitu s ohledem na lipidické složení membrány [136]. Cecropin B působí selektivně proti rakovinným buňkám, kdy zdravé buňky zůstávají v přítomnosti cecropinu B nepoškozeny [131, 133, 134, 137]. Cecropin A i B vykázal aktivitu proti několika různým nádorovým buňkám [137–141]. V koncentracích, které nejsou škodlivé zdravým buňkám [140, 141]. Ve vodě nevytváří cecropiny žádnou sekundární strukturu a vyskytují se v konformaci náhodného klubka [128, 137, 142]. Sekundární struktura (α -helikální, amfipatická) se vytváří v přítomnosti hydrofóbního prostředí nebo polárních organických rozpouštědel [128, 137, 143, 144]. Aktivita cecropinů není spojená s buněčnými receptory ale, jak je tomu u AMP obvyklé, s jejich vazebnou afinitou k liposomům [135]. Cecropin B má nejvyšší antimikrobiální aktivitu z celé rodiny cecropinů [144].

3.3.4 Interakce kationtových antimikrobiálních peptidů

Byly zjišťovány účinky AMP LL-37 při reakci s biokompatibilními polysacharidy (hyaluronan, alginát). Bylo zjištěno, že LL-37 intenzivněji reaguje s alginátem v porovnání s hyaluronanem především díky rozdílné nábojové hustotě obou polysacharidů. Interakce byly zkoumány v prostředí fosfátového pufru ve dvou iontových silách (20 mM a 150 mM) pomocí cirkulárního dichroismu. Bylo zjištěno že LL-37 formuje svoji helikální strukturu především při interakci s alginátem, u hyaluronanu pouze v prostředí nižší iontové síly. Interakce mezi polysacharidem a AMP je tedy pravděpodobně elektrostatická a hydrofobní interakce s hydrofobními oblastmi hyaluronanového řetězce nebyly objeveny [145].

Interakce s glykosaminoglykany jako je heparin a dermatan sulfát, případně s dalšími molekulami vyskytujícími se na povrchu bakterií (kyselina teichoová, peptidoglykany nebo lipopolysacharidy) má obdobný efekt jako vazba k alginátu, tedy změny konformace, které vedou k vytvoření helikální struktury, která je schopná interagovat a destabilizovat cytoplazmatickou membránu [144]. Studovány byly také interakce mezi AMP (cecropin A) s peptidoglykany. Bylo zjištěno, že zkoumané AMP reagují s peptidoglykany stejně ochotně jako s fosfolipidy [146].

Krátký kationtový peptid CM11 byl využit v kombinaci s chitosanovými nanočásticemi pokrytými hyaluronanem pro cílenou distribuci do buněk s nadměrnou expresí receptoru CD44 v in vitro testech. Krytí nanočástic hyaluronanem mělo za následek mnohem lepší působení na rakovinné buňky v porovnání s volným peptidem nebo peptidem enkapsulovaným pouze do samotných nanočástic díky endocytóze zprostředkované receptorem CD44 [147].

Byly studovány parametry objemu a adiabatické stlačitelnosti u multi- a uni-lamelárních vesikulů složených z dimyristoylfosfatidylcholinu. Vesikuly obsahovaly různé množství antimikrobiálního peptidu gramicidinu S pomocí densitometrie a měření rychlosti průchodu

zvuku. Gramicidin je cyklický deka-peptid vykazující antibiotickou aktivitu. Terapeutické využití se zatím omezuje pouze na topické aplikace. Bylo dokázáno, že tento peptid zvyšuje neuspořádanost lipidové dvojvrstvy [148].

Pro prodloužení životnosti antimikrobiálních peptidů v krevní plazmě alespoň na 24 h byl vytvořen kopolymer polyalkylakrylové kyseliny spolu s amfifilními polyeteraminovými řetězci. Tento kopolymer byl pak následně využit k tvorbě nanokomplexů s kationtovým antimikrobiálním peptidem KSL-W. Byly studovány vlastnosti těchto komplexů v závislosti na jejich složení [149].

Antimikrobiální peptid novicidin byl enkapsulován do nanogelů tvořených modifikovaným hyaluronanem. Výsledkem této enkapsulace byla dobrá koloidní stabilita v různých iontových prostředích, uvolnění peptidu v průběhu 14 dnů. Navíc byl výrazně zvýšený bezpečnostní profil novicidinu v porovnání s neenkapsulovaným peptidem při zachování jeho antimikrobiální aktivity [150].

Byly studovány interakce několika záporně nabitých polymerů (hyaluronan, karboxymethylcelulóza, xantan) spolu s ozarelixem (kationtovým deka-peptidem). Byly zjišťovány vlivy polyelektrolytů, jako je velikost nebo hustota náboje na formování polyelektrolytových komplexů spolu s peptidem. Pomocí transmisní elektronové mikroskopie bylo zjištěno, že hyaluronan o vysoké molekulové hmotnosti tvoří extra dlouhé agregáty (delší než 5 μm), ve kterých individuální vlákna o velikosti 8 nm agregovala do větších [151].

Izotermická titrační kalorimetrie byla použita k určení disociační konstanty a dalších termodynamických parametrů. Disociační konstanta indikovala pro všechny elektrolyty silnou vaznou afinitu, ale také vykazovala vzájemné značné rozdíly. Hyaluronan dosahoval nejsilnější vazby ze všech zkoumaných elektrolytů (přestože má nejmenší hustotu nábojů). To dokazuje, že nejenom elektrostatické vazby, ale i hydrofobní interakce hrají při tvorbě agregátů významnou roli [151].

Hyaluronan byl modifikován antimikrobiálním peptidem nisinem v různých koncentracích, který byl k hyaluronanu kovalentně přichycen. Byla pozitivně testována antibakteriální aktivita jak roztoku takto připraveného roubovaného polymeru, tak hydrogelu, který umožňuje použití jako antimikrobiální povrch v různých aplikacích, jako jsou kontaktní čočky, kosmetické přípravky nebo obvazů na rány [152].

3.4 Ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením

Využití ultrazvuku jako nedestruktivní techniky pro charakterizaci a zkoumání materiálů bylo studováno po desetiletí. Nejprve se ultrazvuk jako analytický nástroj ujal v medicíně [153], kde způsobil malou revoluci. Avšak aplikace ultrazvuku v oblasti studia materiálů byla brzděna především nedostatečně vespělou elektronikou, nutností měřit pouze velké množství vzorku, nízkým rozlišením a komplikovaným postupem při měření [154].

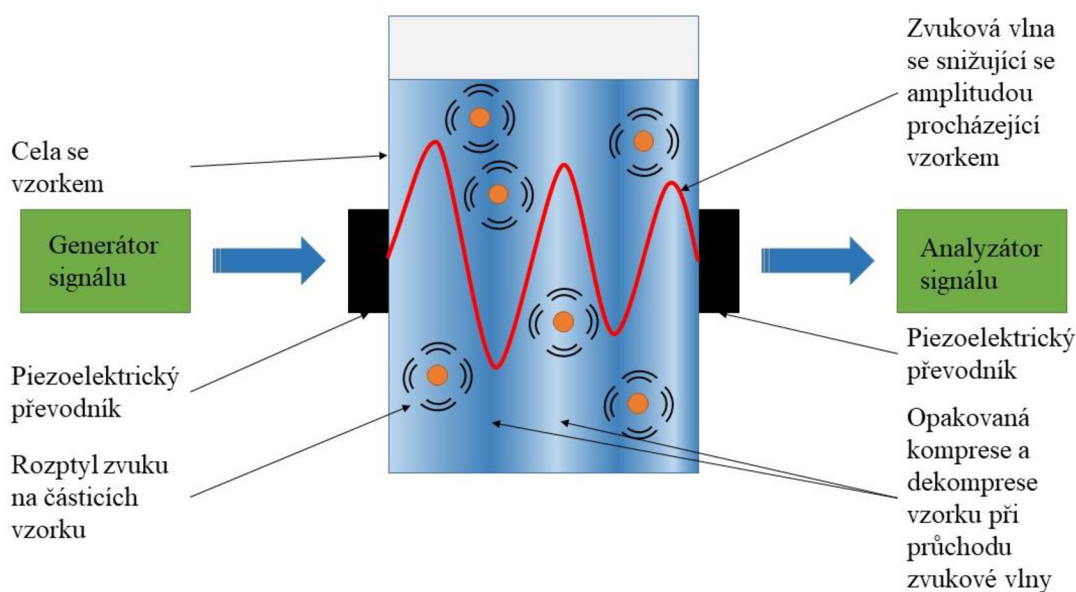
Podobně jako ostatní spektroskopické techniky, které využívají elektromagnetické záření, je ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením (HR-US), z anglického high resolution ultrasonic spectroscopy, taktéž spektroskopickou technikou. Pro analýzu, však na rozdíl od ostatních spektroskopií využívajících elektromagnetické záření (UV, VIS, IR, NMR atd.)

o různé vlnové délce, využívá zvukových vln o vysoké frekvenci (řádově MHz). To umožňuje využití této techniky ke studiu téměř jakéhokoliv materiálu nezávisle na jeho vlastnostech k elektromagnetickému záření [154]. Zkoumání vzorku pomocí zvukových vln navíc dovoluje měření až na osmi frekvencích najednou, neboť jsou zvukové vlny generovány elektronicky.

3.4.1 Princip měření

Zvukové vlny prochází ve spektrometru dvěma celami současně. Vzorek je umístěn do měrné cely a například čisté disperzní prostředí do cely referenční. Měření je tedy v ultrazvukovém spektrometru prováděno jako komparativní [155].

Analýza vzorku ultrazvukovou spektroskopií je založena na měření rychlosti průchodu ultrazvukové vlny vzorkem a změně její amplitudy, jak ukazuje Obrázek 7. Zvuková vlna je generovaná z elektrického signálu piezoelektrickým převodníkem na jedné straně cely, prochází vzorkem a v pozměněné podobě je detekovaná druhým piezoelektrickým převodníkem na opačné straně cely, který ji převádí zpět na elektrický signál (Obrázek 7). Ze změny charakteristik ultrazvukových vln jsou následně usuzovány vlastnosti měřeného vzorku [156].

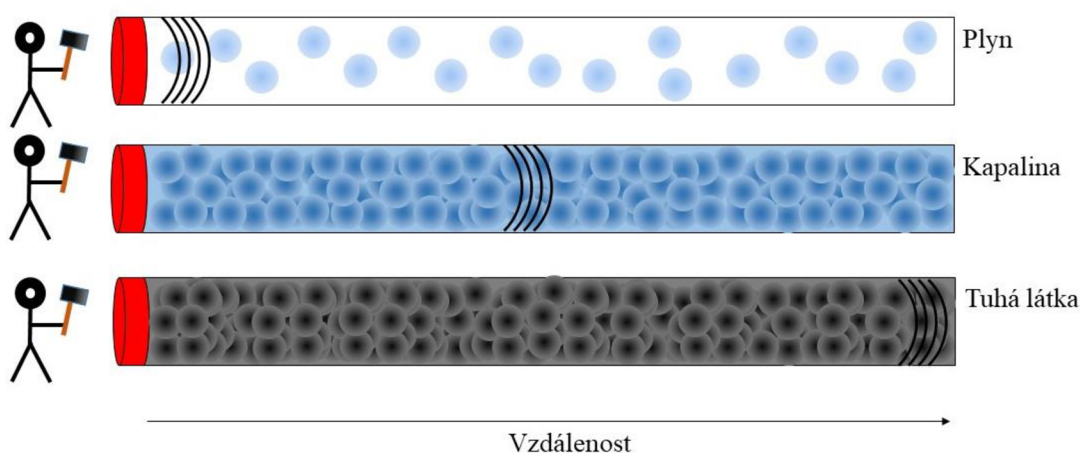


Obrázek 7: Schéma znázorňující princip měření ultrazvukového spektrometru a průchod zvukové vlny vzorkem.

Zvuková vlna procházející vzorkem, podobně jako vlna mechanická, testuje intermolekulární síly vzorku opakovanou kompresí a dekompresí při svém průchodu vzorkem [154]. Molekuly ve vzorku na sebe působí buď přitažlivě, nebo odpudivě a mění tím mikro-elastické vlastnosti vzorku, proto se každý vzorek v závislosti na svém složení stává během měření jedinečný. Protože je velikost komprese a dekomprese způsobená zvukovou vlnou velmi malá, jedná se o nedestruktivní techniku [157].

Studování vzorku pomocí ultrazvukové spektroskopie jde do jisté míry přirovnat k reologickému studování vzorku. Na rozdíl od klasické reologie, kde dochází k pomalým deformacím vzorku, způsobuje zvuková vlna deformace mnohem rychlejší [154].

Hustota a elasticita největší měrou ovlivňují rychlost, se kterou se zvuková vlna šíří vzorkem [157]. Vzhledem k tomu, že elasticita je velmi citlivá na intermolekulární uspořádání vzorku, je důležitějším znakem v porovnání s hustotou. Obecně platí, že nejnižší rychlost průchodu zvukové vlny mají plyny, kde se zvuková vlna šíří asi pětikrát pomaleji v porovnání s kapalinami [154]. Nejvyšší rychlost šíření je dosaženo v pevných látkách, neboť mají nejsilnější interakce mezi molekulami. Tuto závislost znázorňuje Obrázek 8. Rychlost šíření ultrazvukové vlny je velmi citlivá na molekulární uspořádání a mezimolekulové interakce [154, 158].



Obrázek 8: Zvuková vlna procházející různými druhy prostředí.

Zvuková vlna procházející vzorkem ztrácí část své energie tím, že ve vzorku způsobuje kompresi a dekompresi. Ztráta energie se promítne do snížení amplitudy zvukové vlny. Ultrazvukové zeslabení potom kvantifikuje míru ztráty této energie [156].

Obecně můžeme zeslabení ultrazvukové vlny rozdělit do dvou kategorií: zeslabení v homogenních vzorcích a ve vzorcích nehomogenních. Homogenní vzorky zeslabují zvukové vlny díky své kompresi a dekompresi. Měření zeslabení homogenních vzorků pomáhá pozorovat strukturální změny, asociace, vazbu ligandů k makromolekulám a další rychlé chemické změny [159]. Zatímco v nehomogenních vzorcích dochází k útlumu zvukových vln díky rozptylu na částicích uvnitř roztoku [154, 159].

Platí, že velikost zeslabení zvukové vlny, na rozdíl od rychlosti propagace zvukové vlny vzorkem, není závislá na teplotě [160].

Kromě měření rychlosti průchodu ultrazvukových vln a jejich zeslabení je možné získaný parametr ultrazvukové rychlosti (u) v $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ využít v kombinaci s měřením hustoty (ρ) v $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ vzorku pro výpočet stlačitelnosti vzorku (β) Pa^{-1} s využitím dobře známé rovnice (2), takzvané Laplaceovy rovnice [156, 161].

$$\beta = \frac{1}{\rho u^2} \quad (2)$$

3.4.2 Využití HR-US v praxi

Mezi typické příklady využití ultrazvukové spektroskopie patří agregace v suspenzích a emulzích, tvorba polymerních gelů [160], analýza vazby biopolymer-ligand, hydrolyza proteinů, změna konformace biopolymerů [156], tvorba micel [154] a mnoho dalších procesů včetně analýzy suspenzí a emulzí [160].

Pomocí spektroskopie lze též přesně určit hodnotu kritické micelární koncentrace (CMC). Podle Pekaře [155] je vznik micel provázen snížením rychlosti šíření zvukových vln díky elastickému micelárnímu jádru [160]. Mezi další experimenty ukazující citlivost ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením na uspořádání molekul ve vzorku patří například studium vazby protein-ligand, které bylo podobně jako v předchozím případě uspořádáno opět do titračního režimu. Tentokrát však docházelo k postupnému přidávku roztoku ligandu do měrné cely obsahující roztok proteinu. Výsledkem experimentu bylo snižování velikosti ultrazvukové rychlosti v důsledku uvolňování molekul vody z hydratačního obalu a jejich nahrazení ligandem. Voda v hydratačním obalu je totiž méně stlačitelná než voda objemová [155, 162] a zároveň je hustší [163], což zvyšuje rychlost šíření ultrazvukových vln [156].

Během měření vlastností roztoků hyaluronanu bylo zjištěno, že velikost relativní ultrazvukové rychlosti nezáleží na molekulové hmotnosti hyaluronanu, ale pouze na koncentraci dimerů D-glukuronové kyseliny a N-acetyl-D-glukosaminu, které se nacházejí ve vzorku [164]. S rostoucí koncentrací hyaluronanu ve vzorku dochází k lineárnímu nárůstu relativní rychlosti jak pro roztoky ve vodném prostředí, tak pro roztoky v 0,15 M chloridu sodném, a to díky tvorbě hydratovaných molekul hyaluronanu, neboť hydratační voda je méně stlačitelná než voda objemová [155, 162]. Protože stlačitelnost vody klesá s teplotou, dochází i k poklesu rychlosti šíření zvukových vln vzorkem. Tento efekt je mnohem výraznější v porovnání s efektem koncentrace [164].

Pomocí ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením bylo prováděno i zkoumání interakcí mezi hyaluronanem a kladně nabitými povrchově aktivními látkami (CTAB, TTAB) [65]. Experiment byl prováděn v titračním režimu ve vodném prostředí a v prostředí 0,15 M roztoku chloridu sodného s různými molekulovými hmotnostmi hyaluronanu. Díky citlivosti ultrazvukového spektrometru bylo ve vodném prostředí odhaleno až 6 různých druhů komplexů hyaluronan-tenzid.

Ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením byla využita pro posouzení rozdílů ve stlačitelnosti nanočástic hyaluronanu. Nanočástice tvořené z řetězců hyaluronanu o molekulové hmotnosti 17 kDa vykázaly výrazně nižší relativní rychlost v porovnání s částicemi tvořených z vysokomolekulárního hyaluronanu, což svědčí o jejich větší stlačitelnosti [165].

Studium micelizačního procesu poloxameru 407 bylo prováděno pomocí ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením a diferenciální skenovací kalorimetrie. Bylo zjištěno, že obě techniky poskytují dobrou korelaci. Hodnoty rychlosti zvuku byly vhodné především pro stanovení agregačního a deagregačního procesu, zatímco zeslabení zvukových vln bylo schopné identifikovat i proces gelace [166].

Ultrazvuková spektroskopie byla také použita ke studiu osmolality mléka v reálném čase. Kde byla, pomocí β -galaktosidázy štěpena laktóza. Zároveň bylo prokázáno, že ultrazvuková

spektroskopie s vysokým rozlišením poskytuje výsledky srovnatelné s diskontinuálními metodami získanými z měření HPLC a pomocí osmometrie [167].

Je důležité si ovšem uvědomit, že ultrazvuková spektroskopie je metoda nepřímá, a jak je interpretována příčina změny ve velikosti ultrazvukové rychlosti nebo zeslabení zvukové vlny, je především otázkou znalostí problematiky a zkušeností s touto technikou [155].

3.5 Titrační kalorimetrie

Izotermická titrační kalorimetrie (ITC) je biofyzikální technikou pro měření tvorby a rozpadu molekulárních komplexů. Pomocí měření tepla přijatého nebo uvolněného při tvorbě nebo zániku vazby ITC zprostředkovává přesné a rychlé měření termodynamických parametrů molekulárních interakcí [168, 169]. Vzhledem k tomu, že každá reakce vytváří nebo spotřebovává určité množství tepla, je možné v principu studovat kteroukoliv reakci s dostatečně citlivou instrumentací. Aplikační pole je velmi široké, neboť technika nevyžaduje složité úpravy vzorků [169]. Zahrnuje tak interakce mezi biomolekulami a léčivy, polymerní interakce, tvorbu micel nebo studování enzymové aktivity [168, 170].

3.5.1 Princip měření

Obecně jsou ITC experimenty prováděny tak, že je série přídavek roztoku ligandu přiváděna do cely se vzorkem. Alternativní přístup je nazýván „single injection mode“ (SIM) a zahrnuje jeden velký přírůstek ligandu do cely se vzorkem [168, 171].

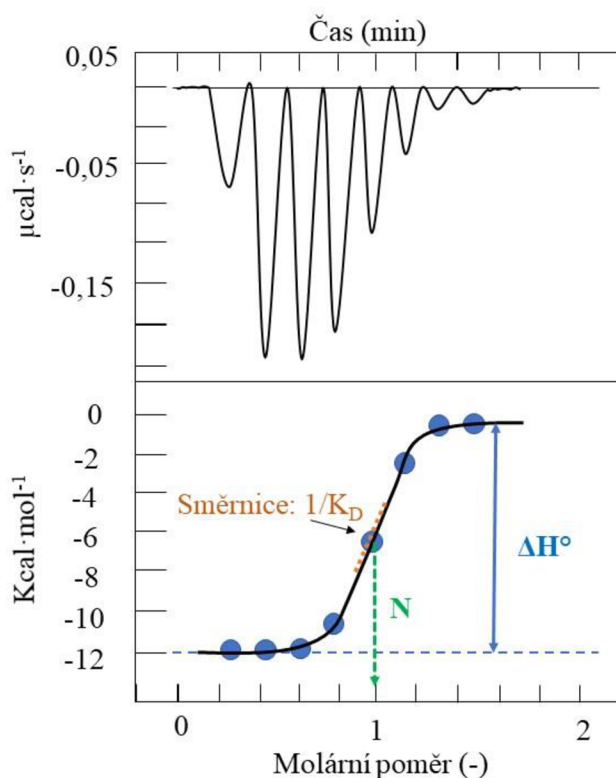
Při měření interakce mezi molekulami je ligand dávkován do roztoku vzorku, který je v cele [172, 173]. Teplo, které se měří, je v takovém případě buď uvolňováno (exotermní reakce) nebo přijímáno (endotermní reakce) [168] a je stanovováno skrze energii, která je potřebná pro udržení stejné konstantní teploty cely, jako má cela referenční [168, 171, 172]. Teplo pochází ze čtyř zdrojů: vazebné interakce, ředění ligandu, ředění makromolekuly a tepelného efektu mísení [172]. S tím, jak reakce postupuje, se postupně nasycují vazná místa a reakční teplo slábne [168]. Pomocí ITC měříme změnu entalpie pomocí získaného nebo absorbovaného tepla [173]. Surová data jsou převedena na vazebnou izotermu (Obrázek 9), která může být použita pro odvození standardní vazebné entalpie ΔH° (rozdíl mezi maximálním a minimálním produkovaným teplem během titrace), počtu vazných míst nebo stechiometrii vazby N (pozice inflexního bodu) a disociační konstanty K_D (sklon křivky v inflexním bodě) [173]. Je také možné určit standardní volnou Gibbsovu energii ΔG° a standardní entropický příspěvek $-T\Delta S^\circ$ [168, 171, 172] pomocí rovnic (3) a (4),

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_D \quad (3)$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (4)$$

kde R je univerzální plynová konstanta ($8,314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$) a T je teplota v kelvinech [168].

Součástí vyhodnocení měření je také odstranění vlivu rozpouštěcích tepel. Nejlepší cestou však pravděpodobně není odečtení získaných dat rozpouštěním od dat samotného měření, neboť dochází k násobení šumu v datech. Lepší strategií je proto odečtení průměrné hodnoty rozpouštěcího tepla od naměřených dat. V případě, že je systém saturován ještě před skončením titrace, je možné použít poslední přídávky, které poskytují konstantní signál k získání rozpouštěcích tepel [168].



Obrázek 9: Surová data zaznamenaná pomocí ITC při sérii přidavků (horní pole), pro získání termodynamických parametrů je vznikající teplo vyneseno proti molárnímu poměru reagujících molekul. Proložení naměřených dat vhodným modelem je možné stanovit standardní změnu entalpie ΔH° , stechiometrii reakce N a disociační konstantu K_D .

3.5.2 Využití titrační kalorimetrie

ITC je využívána v řadě oblastí, jako je tvorba léčiv, studium agregace amfifilních molekul a surfaktantů do micel [169] (data mají obvykle typickou sigmoidální křivku, jejíž maximum první derivace odpovídá CMC) nebo vazba kovových iontů na proteiny a biomolekuly [168].

Bylo prokázáno, že v případě opačně nabitého polymeru a léčiva, například doxorubicinu a kopolymeru pluronové a polyakrylové kyseliny, hrají významnou roli elektrostatické interakce a přidavek soli je oslabuje [174].

Pomocí ITC byly charakterizovány interakce mezi CTAB a TTAB spolu s opačně nabitým hyaluronanem. Fázová separace probíhala nejvýrazněji v moment, kdy náboje hyaluronanu a surfaktantu byly v roztoku v rovnováze. Vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu na průběh reakce byl malý, nicméně byly zaznamenány rozdíly mezi jednotlivými tenzidy. Tyto rozdíly byly připsány rozdílně dlouhým alkylovým řetězcům, neboť se jedná o jediný rozdíl ve studovaných systémech. Mimo pravděpodobně dominantní elektrostatické interakce mezi tenzidy a hyaluronanem přispíval také hydrofobní efekt [175].

Pomocí ITC byly také studovány polyelektrolytové komplexy. Polykationtové komplexy byly využívány jako vektory v genové terapii pro nukleové kyseliny [176]. Formování takovýchto komplexů probíhá samovolně, pokud je celková změna Gibbsova energie záporná [70, 177]. Bylo prokázáno, že formování komplexů mezi slabě nabitými polyelektrolyty je hnáno pomocí

negativní entalpie díky elektrostatickým silám, kde entropie hraje pouze minoritní roli. Na druhé straně u komplexů, které vznikly z vysoce nabitých polyelektrolytů, je hnací silou entropie vzniklá uvolněním protiiontů, proti které stojí kladná změna entalpie [70].

U studování komplexů protein-elektrolyt se typický experiment odehrává tak, že je polymer titrován do roztoku proteinu v cele. Příkladem může být interakce mezi chitosanem a albuminem [178].

S využitím ITC byly také studovány interakce mezi AMP a modelovými membránami. Experimenty byly prováděny v 40 mM fosfátovém pufru při pH 6,8 a 25 °C. Velikost přídavku byla 15 μ l 35 mM lipidu k 0,2 mM peptidu. Doba pro ustálení byla zvolena 700 s. ITC poskytuje všechny termodynamické parametry spojené s vazbou AMP k micelám a liposomům, jako jsou entalpie, entropie nebo změna v tepelné kapacitě [179].

Systém kationtového antimikrobiálního ϵ -polylysinu (ϵ -PL) spolu s aniontovým biopolymerem pektinem (heteropolysacharid, $pK_a = 3,5$) byl studován za použití ITC. ϵ -PL je homopolymer obsahující L-lysin vázaný vzájemně peptidovou vazbou mezi ϵ -amino a α -karboxylovou skupinou. Jeho isoelektrický bod je kolem 9. Bylo zjištěno, že k vazbám dochází a v závislosti na složení výchozích roztoků jsou vzniklé komplexy buď rozpustné, nebo nerozpustné. Významnou roli hrají elektrostatické interakce [180].

Předchozí studie dokázaly, že polylysin může interagovat s různými negativně nabitými polysacharidy (karagenan, alginát, chondroitin sulfát nebo heparin). Při studiu interakcí pomocí ITC je potřeba brát v úvahu, že nejenom molekuly polymerů přispívají ke zjištěnému teplu. Roli hrají i malé ionty nebo voda, k jejichž reorganizaci v průběhu titrace dochází [180].

Při studii byly zjištěny tři fáze, do kterých lze interakci rozdělit. První je přebytek kladného polyelektrolytu a tvorba primárních polyelektrolytových komplexů, které mají vysoký pozitivní náboj bránící další agregaci. Jak se koncentrace elektrolytů vyrovnávají, primární komplexy ztrácí náboj a formují velké sekundární komplexy. Při dalším zvyšování koncentrace záporného elektrolytu dochází ke zvyšování záporného náboje primárních komplexů a rozpadu sekundárních komplexů [88, 180].

Byl také studován vliv iontové síly a pH. Iontová síla obecně stíní elektrostatické interakce ve vodném prostředí, což se potvrdilo i v této studii. Polyelektrolyty mají svůj náboj často ovlivnitelný pH prostředím. ϵ -PL zůstává silně nabitý od pH 7 níže, zatímco pektin svůj náboj ztrácí pod pH 2 a silně nabitý je přibližně do pH 5. Při studiu interakcí polyelektrolytů je tedy vhodné se pohybovat ve vhodné oblasti pH, tak aby byly oba polymery správně nabité [180].

4 POTENCIOMETRICKÉ TITRACE

Cílem těchto titrací bylo velmi jednoduchou metodou prozkoumat (elektrostatické) interakce mezi hyaluronanem a jednoduchými aminokyselinami, disociovanými ve vodném prostředí. Na automatickém titrátoru byly prováděny titrace, během kterých byla přidávána kyselina chlorovodíková do roztoků hyaluronanu, aminokyseliny jak ve formě čisté, tak monohydrochloridové, a do roztoků obsahujících hyaluronan spolu s aminokyselinami opět v obou formách. Během titrace bylo pomocí kombinované elektrody zaznamenáváno pH. Titrace byly prováděny automaticky s ukončením přidávků po dosažení pH 2 a pouze ve vodném prostředí. Pokud by hyaluronan interagoval s aminokyselinou, pravděpodobně by nebyl schopen „přijímat“ protony od titrující kyseliny chlorovodíkové a pH by strmě klesalo. Na druhou stranu by je mohl přijímat karboxyl aminokyseliny, který do agregace pravděpodobně není zaangażován, proto se titrovaly roztoky čistého hyaluronanu i aminokyselin.

4.1 Chemikálie

Hyaluronan sodný: Contipro Biotech s.r.o. (Česká republika), použité šarže jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 1).

Tabulka 1: Hyaluronan sodný použitý pro potenciometrické titrace.

Hyaluronan sodný			
Mw (kDa)	Šarže	Vlhkost	Mw* (kDa)
8–15	213-6147	11 %	9
1 400–1 600	181214-4-D1	9 %	1 540

Mw (*) je molekulová hmotnost získaná analýzou HPLC/SEC-MALS u výrobce.

V tabulce (Tabulka 2) jsou shrnuty další v průběhu experimentů používané chemikálie.

Tabulka 2: Ostatní chemikálie využité pro pH-metrické titrace.

Chemikálie	Zdroj, vlastnosti
L-lysin	Sigma Aldrich (Německo), 98%, CAS: 56-87-1, šarže BCBL1852V
L-arginin	Sigma Aldrich (Německo), 99,5% NT, CAS: 74-79-3, šarže BCBB9650
L-lysin monohydrochlorid	Sigma Aldrich (Německo), 98%, CAS: 657-27-2, šarže SLBM5436V
L-arginin monohydrochlorid	Sigma Aldrich (Německo), 98% (HPLC), CAS: 1119-34-2, šarže SLBQ6919V
Kyselina chlorovodíková	Penta s.r.o. (Česká republika), 0,1 N vodný roztok, šarže 1609090915V
Voda	Ultračistá deionizovaná voda z přístroje PURELAB flex.

4.2 Příprava roztoků

Pro pH-metrické experimenty byly připravovány roztoky hyaluronanu, aminokyselin a aminokyselin spolu s hyaluronanem ve vodě. Jednotlivé postupy přípravy jsou popsány v následujících kapitolách.

4.2.1 Příprava roztoků hyaluronanu

Hyaluronan o různých molekulových hmotnostech byl připravován navažováním přesného množství hyaluronanu a doplněním vody (ultračistá deionizovaná voda z přístroje PURELAB). Všechny komponenty roztoků, tedy hyaluronan i voda, byly během přípravy váženy. Vlhkost hyaluronanu byla započítána do navážky. Roztoky byly před měřením ponechány 24 h v uzavřené nádobě míchat při laboratorní teplotě. Pokud vzorky nebylo možné použít ihned, byly uchovávány v chladničce při teplotě do 5 °C v uzavřených nádobách po dobu maximálně jednoho týdne z důvodu zamezení možné degradace hyaluronanu v roztoku [21]. Koncentrace byla stanovena na 0,1 %hm pro všechny experimenty. Tato koncentrace při úplné disociaci karboxylových skupin hyaluronanu přibližně odpovídá koncentraci záporného náboje přibližně 2,5 mM. K přepočtu z hmotnostní koncentrace byla použita rovnice (5) stanovující hustotu roztoku hyaluronanu [164],

$$\rho = a_0 + a_w c_w + a_t t + a_{tt} t^2, \quad (5)$$

kde ρ je hustota v $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, c_w je koncentrace hyaluronanu v gramech na kilogram roztoku, t je teplota ve °C a a_i jsou regresní parametry pro vodné roztoky (Tabulka 3). Molekulová hmotnost hyaluronanové disacharidové jednotky byla uvažována jako $401,229 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Tabulka 3: Parametry rovnice (5) pro výpočet hustoty vodného roztoku hyaluronanu

Parametr	Hodnota
$a_0 (\text{g}\cdot\text{cm}^{-3})$	1,001 31
$a_w (10^{-4} \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-3})$	4,1
$a_t (10^{-5} \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{°C}^{-1})$	-6,6
$a_{tt} (10^{-6} \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}\cdot\text{°C}^{-2})$	-4,0

4.2.2 Příprava roztoků monomerních aminokyselin:

Roztoky aminokyselin v monomerní podobě (Arg, Lys) a jejich monohydrochloridové formě byly připravovány v odměrných baňkách přímým rozpouštěním dané aminokyseliny (pomocí ultračisté deionizované vody z přístroje PURELAB). Všechny aminokyseliny ve formě prášku byly během přípravy váženy a následně kvantitativně převedeny do odměrné baňky tak, aby výsledná koncentrace aminokyseliny v roztoku byla 25 mM. Pokud uvažujeme existenci jednoho kladného náboje na každé molekule aminokyseliny, jedná se o desetinásobně vyšší koncentraci kladných nábojů v porovnání se zápornými náboji v používaných roztocích hyaluronanu.

4.2.2.1 Roztoky aminokyselin obsahující hyaluronan

Roztoky aminokyselin obsahující hyaluronan pro potenciometrické titrace s měřením pH byly připravovány z již připraveného roztoku aminokyseliny (včetně hydrochloridových forem). Poté byl navážen hyaluronan o požadované hmotnosti a doplněn roztokem aminokyseliny tak, aby vznikl roztok o koncentraci hyaluronanu 0,1 %hm. Všechny komponenty byly váženy. Roztok byl poté ponechán v uzavřené nádobě 24 h míchat na magnetické míchačce. Pokud nebylo možné roztok zpracovat ihned po promíchání, byl skladován v chladničce při teplotě do 5 °C v uzavřených nádobách po dobu maximálně jednoho týdne z důvodu zamezení možné degradace hyaluronanu v roztoku [21].

4.3 Metody a přístroje

- pH metr Metrohm, titrační modul 888 Titrando, kombinovaná pH-elektroda Metrohm, 6.0262.100, vnitřní elektrolyt 3 M KCl.

4.3.1 Automatické titrace, měření pH

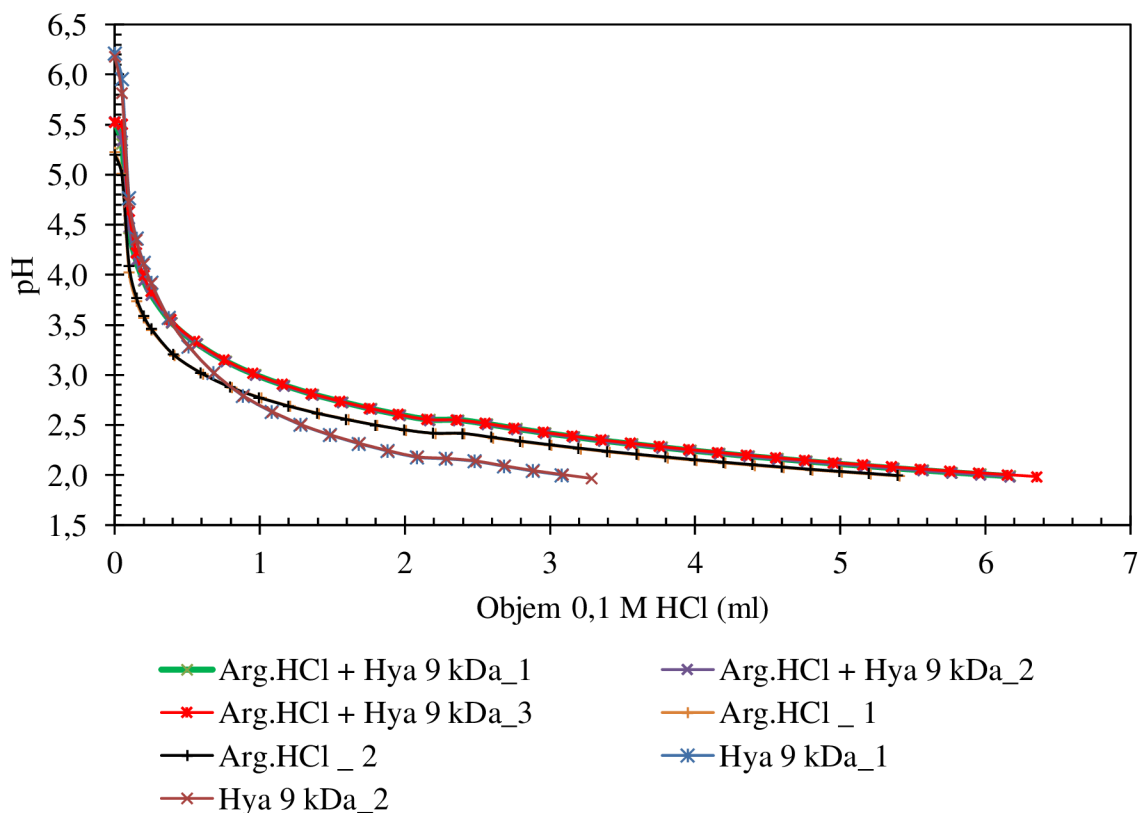
Automatické titrace byly realizovány pomocí automatického titrátoru (Metrohm, titrační modul Titrando 888 20 ml, 801 Stirrer, kombinovaná pH-elektroda Metrohm 6.0262.100). Před každým použitím byl pH metr kalibrován pomocí tří kalibračních pufrů v předpokládaném rozsahu měřeného pH, temperovaných na 25 °C. Titrace 0,1 M HCl probíhaly do přesného objemu roztoku 40 ml. Titrovaný roztok obsahoval čistou aminokyselinu (Arg, Lys), případně její monohydrochloridovou formu v koncentraci 24,9 mM, nebo samotný hyaluronan o koncentraci 0,1 %hm nebo hyaluronan v kombinaci s některou z aminokyselin. Pro titrace byly použity molekulové hmotnosti hyaluronanu 9 kDa a 1 540 kDa. Titrace kyselinou chlorovodíkovou probíhaly do pH 2, s ohledem na disociační konstantu hyaluronanu [15, 16].

Rychlost přidavku byla 0,05 ml za 1 min. Hodnoty pH byly automaticky zaznamenávány. Roztok byl po celou dobu titrace míchán pomocí magnetické míchačky. Teplota byla zaznamenána před měřením odečtením hodnoty z teploměru v laboratoři. Roztoky měly laboratorní teplotu.

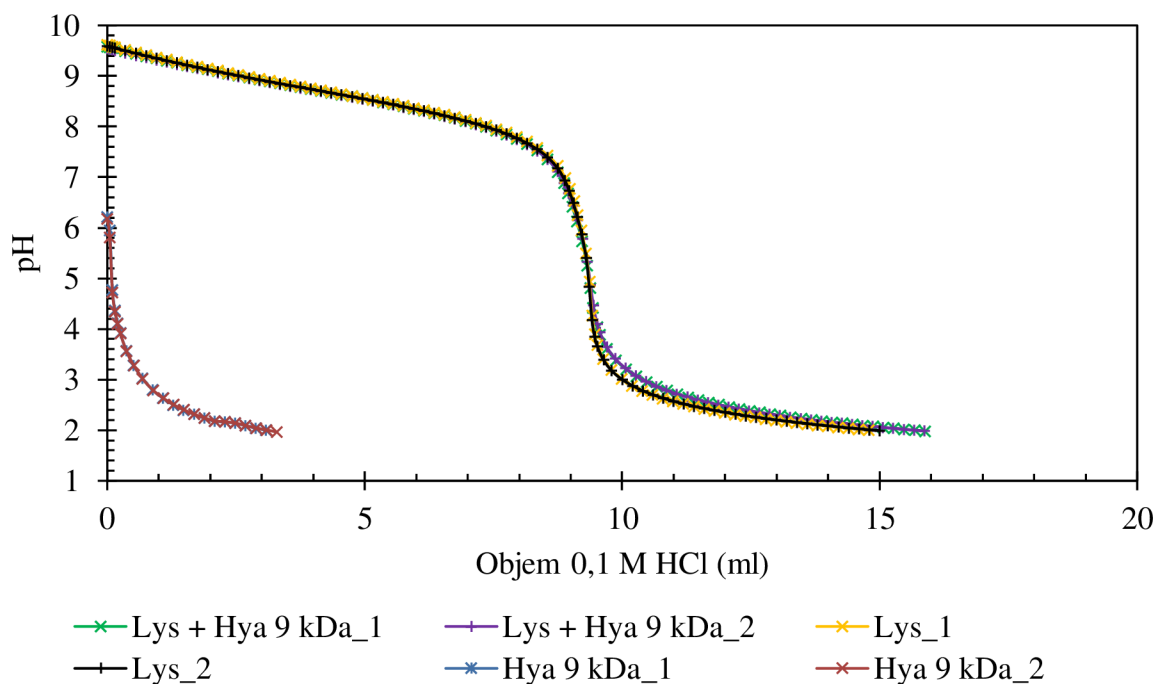
Získaná data byla vynášena do grafu, kde na svislé ose byly zobrazeny hodnoty naměřeného pH a na vodorovné ose objem přidané kyseliny chlorovodíkové. V grafech jsou vynášena jednotlivá měření, nikoli jejich průměry, neboť nebylo možné z každého měření získat hodnoty pH pro přesně definovaný objem přidané kyseliny chlorovodíkové. Z grafů je však patrné, že jednotlivá měření vzájemně velmi dobře korespondují.

4.4 Výsledky

Na automatickém titrátoru Metrohm byly prováděny titrace, během kterých byla přidávána 0,1 M kyselina chlorovodíková do jednotlivých roztoků. Roztoky obsahovaly hyaluronan nebo aminokyseliny jak ve formě čisté, tak monohydrochloridové, případně kombinaci polysacharidu s aminokyselinou. Titrace byly prováděny automaticky s ukončením přidavků po dosažení pH 2. Cílem těchto titrací bylo prozkoumat elektrostatické interakce mezi hyluronanem a aminokyselinami. Reprezentativní příklad získaných dat je uveden v grafech na obrázcích (Obrázek 10 a Obrázek 11). Ostatní data jsou shrnuta v grafech na obrázcích v příloze (Obrázek P 1 až Obrázek P 6).



Obrázek 10: Graf znázorňující změnu pH při titracích roztoků Arg-HCl spolu s hyaluronanem o molekulové hmotnosti 9 kDa roztokem 0,1 M HCl.



Obrázek 11: Graf znázorňující změnu pH při titracích roztoků Lys spolu s hyaluronanem o molekulové hmotnosti 9 kDa roztokem 0,1 M HCl.

Tabulka 4: Vlastnosti systému v bodě ekvivalence titrace

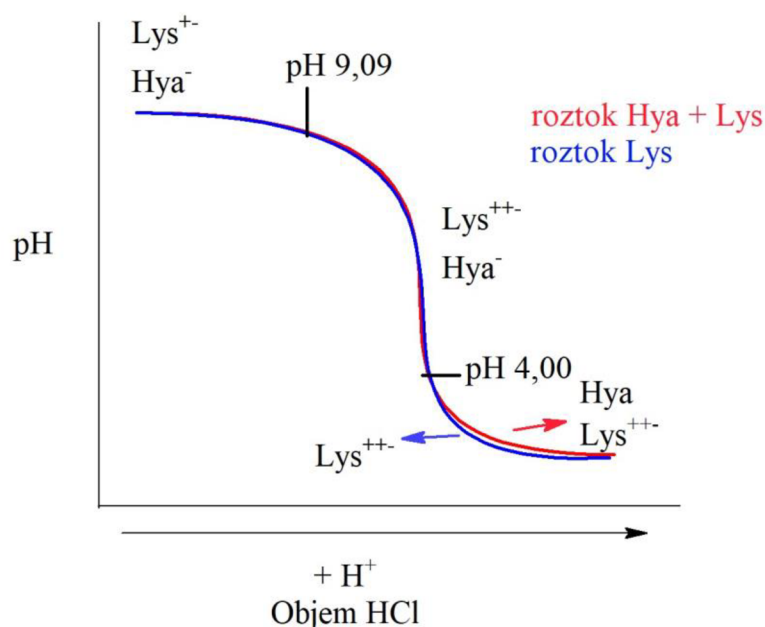
Systém	pH	Objem HCl (ml)	n (mol) přidaných H ⁺
Lys	4,88 ± 0,07	9,361 ± 0,002	(9,361 ± 0,002)·10 ⁻⁴
Lys + 9 kDa Hya	4,85 ± 0,04	9,379 ± 0,008	(9,379 ± 0,008)·10 ⁻⁴
Lys + 1 540 kDa Hya	4,96 ± 0,08	9,368 ± 0,003	(9,368 ± 0,003)·10 ⁻⁴
Arg	4,61 ± 0,02	8,82 ± 0,12	(8,82 ± 0,12)·10 ⁻⁴
Arg + 9 kDa Hya	4,94 ± 0,02	8,953 ± 0,006	(8,953 ± 0,006)·10 ⁻⁴
Arg + 1 540 kDa Hya	4,989 ± 0,006	8,973 ± 0,011	(8,973 ± 0,011)·10 ⁻⁴

Na první pohled se oba grafy na obrázcích (Obrázek 10, Obrázek 11) zdály rozdílné, při bližší analýze však bylo zjištěno, že monohydrochloridová forma aminokyselin poskytovala polovinu sigmoidní křivky čisté aminokyseliny. Parametry jednotlivých titrací pro čisté aminokyseliny jsou zobrazeny v tabulce (Tabulka 4). Zjednodušeně tedy můžeme tvrdit, že na začátku titrace monohydrochloridové formy aminokyseliny jsme byli v půlce celého děje pro čistou aminokyselinu.

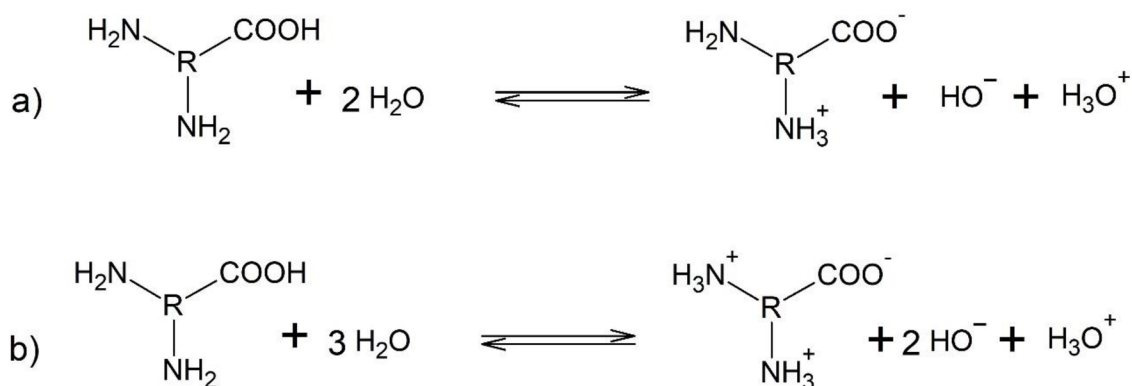
Ve všech změřených kombinacích hyaluronanu s aminokyselinami bylo možné si povšimnout ve spodní polovině sigmoidní křivky drobného rozdílu v hodnotě pH mezi roztoky aminokyselin a aminokyselin s hyaluronanem u stejného přidaného objemu HCl. Na rozdíl od předchozích výsledků [67] byl však tento rozdíl opačný. Při stejném objemu přidané 0,1 M kyseliny chlorovodíkové bylo pH nižší u roztoků samotných aminokyselin než u roztoků aminokyselin s hyaluronanem.

4.5 Diskuse

Pokud bychom se detailněji podívali na titrační křivku, objevili bychom několik dějů, které v ní probíhají, ty ilustruje obrázek (Obrázek 12). Jako příklad do diskuse byl zvolen lysin, nicméně popsané procesy probíhají u obou studovaných aminokyselin. Titrační křivka lysinu samotného začínala přibližně na hodnotě pH 9,5, tedy mírně pod hodnotou jeho izoelektrického bodu (pI = 10,0). Důvodem, proč mělo pH roztoku aminokyseliny ve vodě zásaditý charakter a nikoliv neutrální, jak se původně předpokládalo, byla pravděpodobně disociace ϵ -NH₂ skupiny na postranním řetězci, která při rozpouštění ve vodě na části molekul také disociovala, což vychýlilo pH z neutrální pozice, jak ukazuje schéma na obrázku (Obrázek 13), rovnice b). Nicméně v roztoku byly zastoupeny oba produkty hydratace, neboť se hodnota pH pohybovala velmi blízko oblasti izoelektrického bodu, kde se molekula aminokyseliny jeví jako elektroneutrální, v tomto případě tedy nesoucí jeden kladný a jeden záporný náboj. Toto uspořádání ilustruje schéma na obrázku (Obrázek 13), rovnice a).

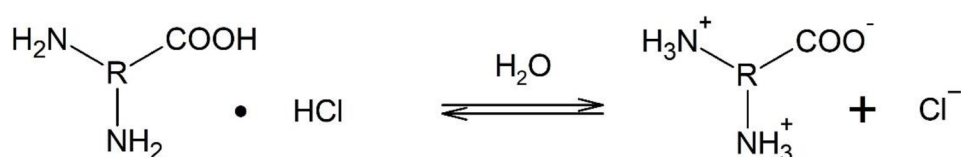


Obrázek 12: Ilustrační příklad procesů v průběhu titrace.



Obrázek 13: Schematicky znázorněná disociace lysinu ve vodě.

V případě monohydrochloridových forem aminokyselin by titrace roztoku aminokyseliny měly začínat přibližně v oblasti neutrálního pH (Obrázek 14). Důvodem proč titrace monohydrochloridových forem aminokyselin začínaly za nižšího pH než neutrálního (přibližně 5,5), mohl být vyšší než stechiometrický obsah kyseliny chlorovodíkové. Ze schématu na obrázku (Obrázek 14) je zároveň patrné, proč měla monohydrochloridová forma zdánlivě odlišnou titrační křivku. Je tomu proto, že monohydrochloridová forma přeskočila nabíjení zbylé části nenabítených ϵ aminoskupin na aminokyselině v průběhu titrace chlorovodíkovou kyselinou a vstoupila do roztoku jako plně disociovaná. Proto titrační křivka neměla klasický sigmoidní tvar (Obrázek 11), ale kopírovala svým tvarem pouze spodní polovinu křivky standardní aminokyseliny (Obrázek 10).



Obrázek 14: Schematicky znázorněné rozpouštění lysinu monohydrochloridu ve vodě.

Titrace tedy začínala přibližně v oblasti směsi amfoterního iontu a zcela nabitě aminokyseliny, kde přidávkem kyseliny chlorovodíkové docházelo postupně k úplné přeměně na zcela nabitou formu s převahou kladného náboje. Vyšší pH ve spodní části křivky v případě roztoků hyaluronanu s aminokyselinou v porovnání se samotným roztokem aminokyseliny bylo pravděpodobně způsobeno tím, že kromě spotřeby protonů na protonizaci aminokyseliny bylo potřeba ještě uvážit přítomnost karboxylových skupin hyaluronanu. Ty byly přítomné jako sodná sůl karboxylové kyseliny. Hyaluronan je slabá kyselina s pK_a v rozsahu 2,9–4 [15, 16]. Drobný rozdíl mezi jednotlivými titračními křivkami nastával právě od pH 4. Hyaluronan tedy spotřebovával další protony z roztoku a vytvářel neprotonizovanou formu a chlorid sodný. Díky této reakci zůstávalo pH roztoku při stejném přidávku kyseliny chlorovodíkové vyšší v porovnání se samotným roztokem aminokyseliny. Tato změna zároveň znamenala, že interakce mezi hyaluronanem a aminokyselinami pravděpodobně neprobíhaly. Pokud by byl hyaluronan vázaný na aminokyselinu, k rozdílu mezi titračními křivkami by pravděpodobně nedocházelo, neboť by byla disociovaná karboxylová skupina hyaluronanu zablokovaná v interakci s aminokyselinou, a tedy nepřístupná pro přijetí protonu z roztoku.

Díky ztrátě náboje na hyaluronanu v důsledku přijetí protonu hyaluronanem byla interakce mezi hyaluronanem a aminokyselinou při pH nižším než 4 nepravděpodobná.

Toto vysvětlení bylo platné pro arginin i lysin nezávisle na molekulové hmotnosti hyaluronanu.

Získané výsledky nepodpořily teorie [67, 181] o prokázání přítomnosti interakcí mezi hyaluronanem a aminokyselinou pomocí titrace kyseliny chlorovodíkové do roztoku a měření jeho pH.

4.6 Závěr

Díky měření pH při titracích kyseliny chlorovodíkové do roztoků obsahujících hyaluronan nebo monomerní aminokyseliny a to i v hydrochloridové formě, případně kombinaci polysacharidu a aminokyseliny nebylo možné, na rozdíl od předchozích prací [67, 181], potvrdit přítomnost interakcí. Z pohledu měření pH nezáleželo na použité formě aminokyseliny, ať už argininu nebo lysinu. Rozdíl v titračních křivkách byl zaznamenán až při pH nižším než 4, kde hyaluronan přecházel ze své disociované formy na nedisociovanou, což způsobovalo odchylku pH u roztoků obsahujících hyaluronan s aminokyselinou v porovnání s roztoky samotných aminokyselin. Tato odchylka zároveň ukazovala na nepřítomnost interakcí, neboť pokud by disociovaná karboxylová skupina hyaluronanu byla zablokována v interakci s aminokyselinou, byla by pravděpodobně hůře dostupná pro přijetí protonu z roztoku, díky čemuž by se neprojevil rozdíl mezi titračními křivkami. Tato technika nebyla v práci dále používána, neboť neposkytla významné informace.

5 INTERAKCE HYALURONAN-ARGININ STUDOVANÉ POMOCÍ HR-US A ITC

V rámci této kapitoly byl zkoumán vliv molekulové hmotnosti oligomeru argininu a hyaluronanu na vzájemné interakce s využitím technik ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením a izotermické titrační kalorimetrie v prostředí vody, PBS a prostředích o různých iontových silách. Cílem bylo charakterizovat interakce mezi polymery.

5.1 Chemikálie

Hyaluronan sodný: Contipro Biotech s.r.o. (Česká republika), použité šarže jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 5).

Tabulka 5: Hyaluronan sodný použitý pro experimenty.

Hyaluronan sodný			
M _w (kDa)	Šarže	Vlhkost	M _w * (kDa)
8–15	213-6147	11 %	9
15–30	213-6481	9 %	16
80–130	260315-E2	10 %	109
130–300	213-6213	10 %	137
250–450	120218-E1	5 %	310
600–800	210615-A-D2	6 %	680
1 400–1 600	181214-4-D1	9 %	1 540

M_w (*) je molekulová hmotnost získaná analýzou HPLC/SEC-MALS u výrobce.

Monomery a oligomery argininu ve formě hydrochloridu použité v dizertační práci a jejich vlastnosti jsou zobrazeny v tabulce (Tabulka 6):

Tabulka 6: Použité monomery a oligomery argininu.

Chemikálie	Zdroj, vlastnosti
Poly-L-arginin hydrochlorid triakontamer (30 Arg·HCl)	Alamanda polymers (USA), Mw = 5,8 kDa, CAS: 26982-20-7, čistota: 90-100%; šarže 000-R030-103
Poly-L-arginin hydrochlorid dodekamer (12 Arg·HCl)	Chempeptide limited (China), Mw = 2,329 kDa, čistota: >95%; šarže PT209181809
Poly-L-arginin hydrochlorid dekamer (10 Arg·HCl)	Chempeptide limited (China), Mw = 1,944 kDa, čistota: >95%; šarže PT303261912R1
Poly-L-arginin hydrochlorid oktamer (8 Arg·HCl)	Vidia s.r.o. (Česká republika), Mw = 403,31 Da, čistota: >95%; šarže 171103
Poly-L-arginin hydrochlorid tetramer (4 Arg·HCl)	Vidia s.r.o. (Česká republika), Mw = 788,60 Da, čistota: >95%; šarže 171102
Poly-L-arginin hydrochlorid dimer (2 Arg·HCl)	Vidia s.r.o. (Česká republika), Mw = 1 559,18 Da, čistota: >95%; šarže 171101
L-arginin monohydrochlorid (Arg·HCl)	Sigma Aldrich (Německo), 98% (HPLC), CAS: 1119-34-2, šarže SLBQ6919V

Seznam dalších použitých chemikálií je zobrazen v tabulce (Tabulka 7).

Tabulka 7: Použité chemikálie

Chemikálie	Zdroj, vlastnosti
Poly-L-lysine hydrochlorid (10 Lys·HCl)	Chempeptide limited (China), Mw = 1,664 kDa, čistota: 95,5%; šarže PT809171908
Chlorid sodný	Lachner (Česká republika), CAS: 7647-14-5, čistota 99,5%
Hydroxid sodný	G.R. Batch no. PP/2008/06964/0, Lach:ner, Czech Republic
PBS	VWR Life science, Lot NO.: 0016C297, E504-500ML, 137 mM chlorid sodný, 2,7 mM chlorid draselný, 12 mM fosfátový pufr; iontová síla 172 mM
Voda	Ultračistá deionizovaná voda z přístroje PURELAB flex, ELGA, Velká Británie

5.2 Příprava roztoků

Pro experimenty byly připravovány roztoky hyaluronanu nebo oligomerů argininu v hydrochloridové formě ve vodě nebo jiných vodných prostředích. Jednotlivé postupy přípravy jsou popsány v následujících kapitolách.

5.2.1 Molární poměr

Molární poměr byl počítán jako poměr počtu disacharidových jednotek hyaluronanu a argininových monomerních jednotek přítomných v roztoku. Molekulová hmotnost hyaluronanové disacharidové jednotky byla uvažována jako $401,229 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a molekulové hmotnosti hyaluronanu byly převzaty z SEC-MALS analýzy prováděné výrobcem. Pokud uvažujeme přítomnost jednoho kladného náboje na monomeru oligomeru argininu a jednoho záporného náboje na disacharidové jednotce hyaluronanu při jeho plné disociaci, dává molární poměr zároveň poměr pozitivních a negativních nábojů v roztoku. Molární poměr jinými slovy označuje poměr nábojů na hyaluronanu k nábojům na argininu.

5.2.2 Příprava roztoků hyaluronanu

Hyaluronan o různých molekulových hmotnostech byl připravován navažováním přesného množství hyaluronanu a doplněním vody (ultračistá deionizovaná voda z přístroje PURELAB). Všechny komponenty roztoků, tedy hyaluronan i voda, byly během přípravy váženy. Vlhkost hyaluronanu byla při navážce uvažována. Roztoky byly před měřením ponechány 24 h v uzavřené nádobě míchat při laboratorní teplotě. Pokud vzorky nebylo možné použít ihned, byly uchovávány v chladničce při teplotě do $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ v uzavřených nádobách po dobu maximálně jednoho týdne z důvodu zamezení možné degradace hyaluronanu v roztoku [21]. Koncentrace byla stanovena na 0,1 %hm pro všechny experimenty. Tato koncentrace při úplné disociaci karboxylových skupin hyaluronanu přibližně odpovídá koncentraci záporného náboje přibližně 2,5 mM (viz kapitola 4.2.1). Pro roztoky připravované v 150 mM NaCl platí stejná rovnice (5) jako pro vodné roztoky, avšak dosazované regresní parametry (Tabulka 8) jsou odlišné. Protože je rozdíl v koncentraci záporného náboje mezi vodnými roztoky hyaluronanu a roztoky hyaluronanu připravovanými v 150 mM NaCl zanedbatelný, byla ve všech případech uvažována společná koncentrace záporných nábojů 2,5 mM, bez ohledu na prostředí roztoku.

Tabulka 8: Parametry rovnice (5) pro výpočet hustoty roztoku hyaluronanu v 150 mM NaCl.

Parametr	Hodnota
$a_0 (\text{g}\cdot\text{cm}^{-3})$	1,007 97
$a_w (10^{-4} \text{ kg}\cdot\text{cm}^{-3})$	4,1
$a_t (10^{-5} \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}\cdot^{\circ}\text{C}^{-1})$	-9,1
$a_{tt} (10^{-6} \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}\cdot^{\circ}\text{C}^{-2})$	-3,7

5.2.3 Příprava roztoků o vyšší iontové síle

Roztoky o vyšší iontové síle s koncentrací chloridu sodného 10, 50, 100 a 150 mM byly připravovány rozpouštěním jednotlivých komponent v předem připraveném roztoku NaCl. Roztok chloridu sodného o požadované koncentraci byl připraven vážením chloridu sodného na analytických vahách a následným kvantitativním převedením do odměrné baňky a doplněním po rysku ultračistou deionizovanou vodou z přístroje PURELAB po rozpuštění soli. Roztok byl ponechán na magnetické míchačce po dobu 24 h k promíchání a následně byl použit pro rozpouštění přesně naváženého hyaluronanu nebo oligomeru argininu dle potřeby. Postup přípravy byl dále shodný s přípravou vodných roztoků.

Pro přípravu roztoků v PBS byl použit PBS vyráběný komerčně.

5.2.4 Příprava roztoků monomerních aminokyselin

Roztoky aminokyselin v monomerní monohydrochloridové formě (Arg, Lys) byly připravovány v odměrných baňkách přímým rozpouštěním dané aminokyseliny. Všechny aminokyseliny ve formě prášku byly během přípravy váženy a následně kvantitativně převedeny do odměrné baňky tak, aby výsledná koncentrace aminokyseliny v roztoku byla 41,5 mM. Tato koncentrace byla zvolena pro zajištění přebytku aminokyseliny v roztoku v průběhu titrace.

5.2.5 Příprava roztoků oligomerních forem argininu

Roztoky oligomerních argininů v hydrochloridové formě byly připravovány na výchozí koncentraci kladných nábojů 30 mM. Předpokladem byl jeden kladný náboj na monomerní jednotce (dimer tedy dva kladné náboje na molekule, tetramer 4 atd.). Příprava probíhala vážením požadovaných množství jednotlivých oligomerů na analytických vahách a následným kvantitativním převedením do odměrných baněk a doplněním po rysku ultračistou deionizovanou vodou z přístroje PURELAB. V případě roztoků s vyšší iontovou silou byly použity namísto vody předem připravené roztoky chloridu sodného nebo PBS. Koncentrace kladných nábojů 30 mM byla zvolena tak, aby přibližně v polovině titrace na ITC bylo dosaženo rovnosti kladných a záporných nábojů v roztoku, tedy molárního poměru rovného 1.

5.2.5.1 Úprava pH roztoků oligomerů argininu

Protože některé oligomery aminokyselin měly pH svých zásobních roztoků nižší, než je hodnota disociační konstanty hyaluronanu, jak ukazují data v tabulce (Tabulka 9), bylo potřeba upravit pH těchto roztoků. pK_a hyaluronanu se pohybuje v rozsahu 2,9–4,0 v závislosti na iontové síle [15, 16]. Pro úpravu těchto roztoků oligomerů aminokyselin byl použit roztok 2 M NaOH. pH bylo upravováno u dimeru, tetrameru a oktameru argininu, jejichž vodné roztoky měly pH pod disociační konstantou hyaluronanu, pravděpodobně v důsledku přebytku použité kyseliny v průběhu přípravy hydrochloridové formy. Hydroxid sodný byl přidáván k roztoku oligomeru argininu za stálého míchání a měření pH až do dosažení hodnoty pH roztoku přibližně 6, tak aby se pH roztoku dostalo nad disociační konstantu hyaluronanu a pH bylo podobné ostatním oligomerům argininu (Tabulka 10). Výsledné hodnoty pH a množství přidaného roztoku hydroxidu ukazuje tabulka (Tabulka 11).

Díky neutralizaci přebytečné HCl za použití NaOH v roztoku dochází k tvorbě NaCl a tedy zvýšení iontové síly roztoku. Pokud budeme uvažovat přeměnu veškerého přidaného NaOH na NaCl, získáme koncentrace NaCl, které jsou uvedené v tabulce (Tabulka 11). Koncentrace soli v průběhu titrace narůstá a na konci titrace dosahuje maximální hodnoty přibližně 8 mM, což, jak bylo dokázáno v experimentech se zvýšenou iontovou silou, nemá na interakce pozorovatelný efekt.

Tabulka 9: Velikost pH čistých roztoků oligomerů argininu, pH roztoků během titrací při molárním poměru 0,96 a 1,92.

Molekula	pH čistého roztoku	pH při molárním poměru 0,96	pH při molárním poměru 1,92
2 Arg·HCl	2,00 ± 0,03	3,09 ± 0,05	2,59 ± 0,06
4 Arg·HCl	1,95 ± 0,04	2,94 ± 0,04	2,52 ± 0,06
8 Arg·HCl	1,96 ± 0,02	2,92 ± 0,06	2,56 ± 0,07
Hyaluronan	6,20 ± 0,15	--	--

Tabulka 10: pH čistých roztoků aminokyselin a oligomerů

Oligomer	pH čistého roztoku
Arg·HCl	5,24 ± 0,08
10 Arg·HCl	5,71 ± 0,03
12 Arg·HCl	5,62 ± 0,04
30 Arg·HCl	6,77 ± 0,03

Tabulka 11: Úprava pH roztoků oligomerů argininu.

Oligomer	Výchozí objem (ml)	Přidaný objem (μl)	pH po úpravě	Koncentrace NaCl (mM)
2 Arg·HCl	4,0	70	6,46	34,40
4 Arg·HCl	4,0	60	6,84	29,55
8 Arg·HCl	3,5	50	6,82	28,17

5.3 Metody a přístroje

- NANO ITC 2G, cela 990 μl, syringe TA instruments 250 μl, TA instruments, USA
- MicroCal PEAQ-ITC (200 μl cela, 40 μl syringe), Malvern Panalytical Ltd, USA
- HR-US 102T, Ultrasonic Scientific, Irsko
- pH metr Metrohm, kombinovaná pH-elektroda Metrohm, 6.0262.100, vnitřní elektrolyt 3 M KCl.

5.3.1 HR-US

Ke zkoumání interakcí mezi hyaluronanem a oligomery argininu byl použit ultrazvukový spektrometr HR-US 102T od firmy Ultrasonic Scientific, Irsko. Všechny vzorky byly měřeny na šesti frekvencích v rozsahu 2,5–15 MHz, přičemž platí, že harmonická čísla píků, která se počítají jako podíl frekvence píku a rozdílu frekvencí dvou sousedních píků, byla stejná pro všechny měřené vzorky a referenční médium. Čísla píků, při kterých probíhalo měření, byla 22,4; 42,4; 64,8; 94,0; 99,0 a 120. Protože měření na ultrazvukovém spektrometru jsou prováděna jako komparativní [155], byly všechny vzorky měřeny proti vodě umístěné v referenční cele. Do přístroje byl dávkován vždy přesně jeden mililitr odplyněného vzorku. Odplynění bylo prováděno na centrifuze při $3\,000\text{ ot}\cdot\text{min}^{-1}$ po dobu 5 min. Pomocí automatického titrátoru byly prováděny titrace roztoků oligomerů argininu do roztoků hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech (9 až 1 540 kDa) při teplotě 25 °C, která byla kontrolována pomocí termostatu s vodní lázní (Thermo Scientific Haake PC 200) s přesností na 0,01 °C. Měření byla realizována v čisté vodě, PBS nebo prostředích s různou iontovou silou (koncentrace NaCl 10 mM, 50 mM, 100 mM a 150 mM). K analýze dat byl využit software Titration Analyzer (Ultrasonic Scientific, Irsko).

Kromě titrací oligomerů argininu do roztoků hyaluronanu byly prováděny i slepé titrace a oligomerů argininu do příslušného rozpouštědla spolu se slepými titracemi rozpouštědla do roztoků hyaluronanu, které byly následně odečítány od titrací oligomerů argininu do hyaluronanu.

V průběhu všech titrací byly zaznamenávány parametry ultrazvukové rychlosti a zeslabení ultrazvukových vln. Cela se vzorkem je značena jako cela 1.

Před každým měřením byla provedena korekce základní linie měřením vody proti vodě. Výsledky nevykázaly závislost na použité frekvenci, proto jsou zobrazeny pouze výsledky z měření při 11,6 MHz, což odpovídá číslu píku 94. Každé měření bylo opakováno třikrát a v grafech jsou zobrazeny průměrné hodnoty z těchto měření. Opakovatelnost byla výrazně lepší v případě relativní rychlosti než v případě zeslabení ultrazvukových vln v cele se vzorkem.

5.3.1.1 *Monomerní arginin monohydrochlorid*

Výchozí koncentrace argininu monohydrochloridu byla zvolena 41,5 mM s ohledem na maximální objem přídavku 0,7 ml k 1 ml roztoku hyaluronanu v cele. Přídavky roztoků aminokyselin probíhaly po 10 μl do celkového objemu 600 μl . Čas pro ustálení roztoku před začátkem titrace byl 1 h a po přídavku a promíchání roztoku byl čas ustalování zvolen na 10 min. Pro vyhodnocení byly odečítány hodnoty z posledních 100 s ustalování.

5.3.1.2 *Oligomerní argininy v hydrochloridové formě*

Koncentrace oligomerních argininů v hydrochloridové formě byla zvolena tak, aby výchozí koncentrace monomerních jednotek v roztoku byla 30 mM (předpoklad jednoho kladného náboje na monomerní jednotce), ostatní parametry titrace zůstaly zachovány stejné jako v případě monomerního argininu. Roztoky hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech od 9 kDa do 1 540 kDa byly používány v koncentraci 0,1 %hm.

5.3.2 Zpracování dat HR-US

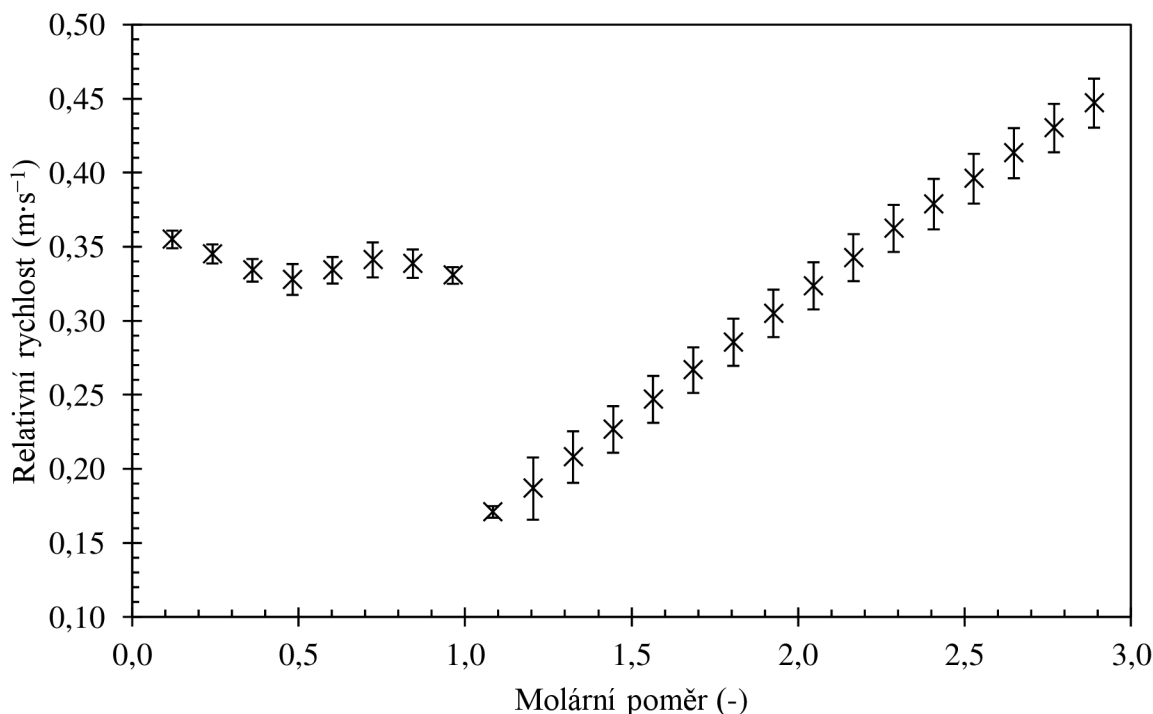
Vyhodnocování dat bylo v případě ultrazvukového spektrometru prováděno v několika krocích. V této kapitole je postup ukázán na vyhodnocování dat relativní rychlosti v systému dodekameru argininu spolu s 1 540 kDa hyaluronanem.

Nejprve došlo k naměření samotné titrace. Hodnoty z jednotlivých opakování se zprůměrovaly, výsledek je znázorněn v grafu na obrázku (Obrázek 15).

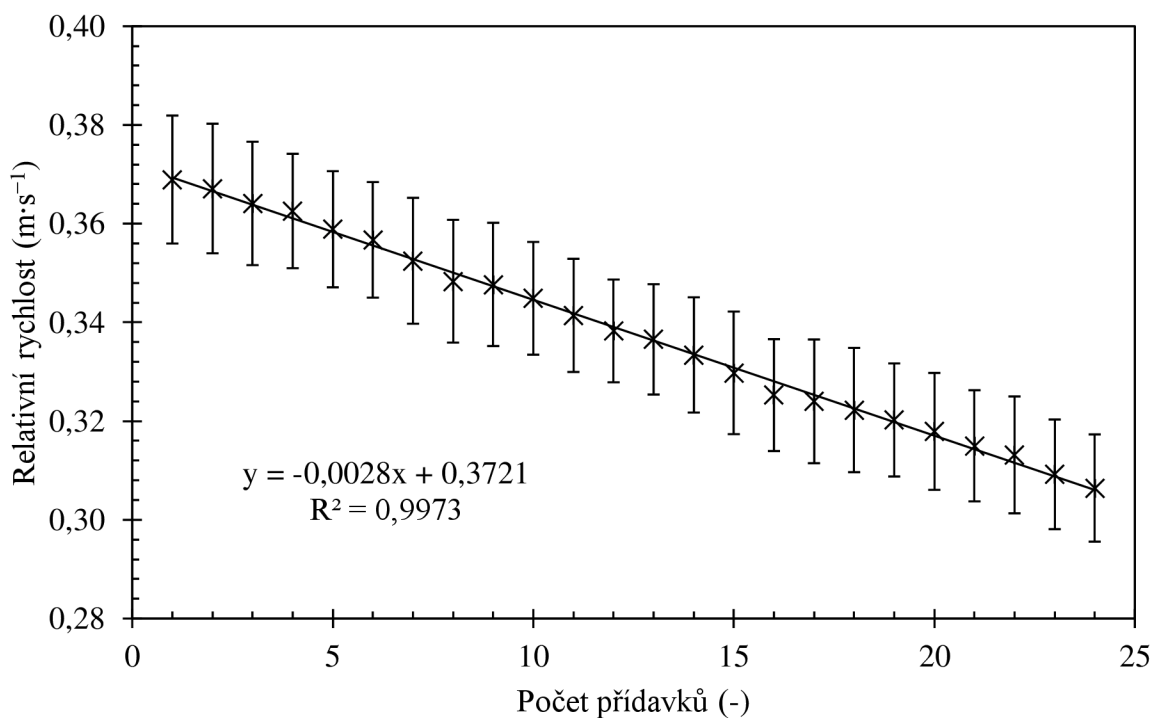
Na základě opakovaných titrací vody do hyaluronanu bylo zjištěno, že molekulová hmotnost hyaluronanu nemá vliv na ředění hyaluronanu. Proto bylo možné stanovit jednu univerzálně platnou závislost pro dané prostředí (vodné roztoky, PBS, zvýšenou iontovou sílu), která byla odečítána jako vliv ředění hyaluronanu. Tato univerzální závislost pro vodu je zobrazena v grafu na obrázku (Obrázek 16). Relativní rychlost byla v tomto případě vztažena na počet jednotlivých přídavek vody do systému.

Kromě ředění hyaluronanu byl odečítán i vliv ředění samotného oligomeru argininu. V tomto případě byl dodekamer titrován do vody v měřicí cele, výsledná závislost je zobrazena v grafu na obrázku (Obrázek 17). Získané průměrné hodnoty relativní rychlosti byly opět odečítány od hodnot titrace dodekameru do hyaluronanu.

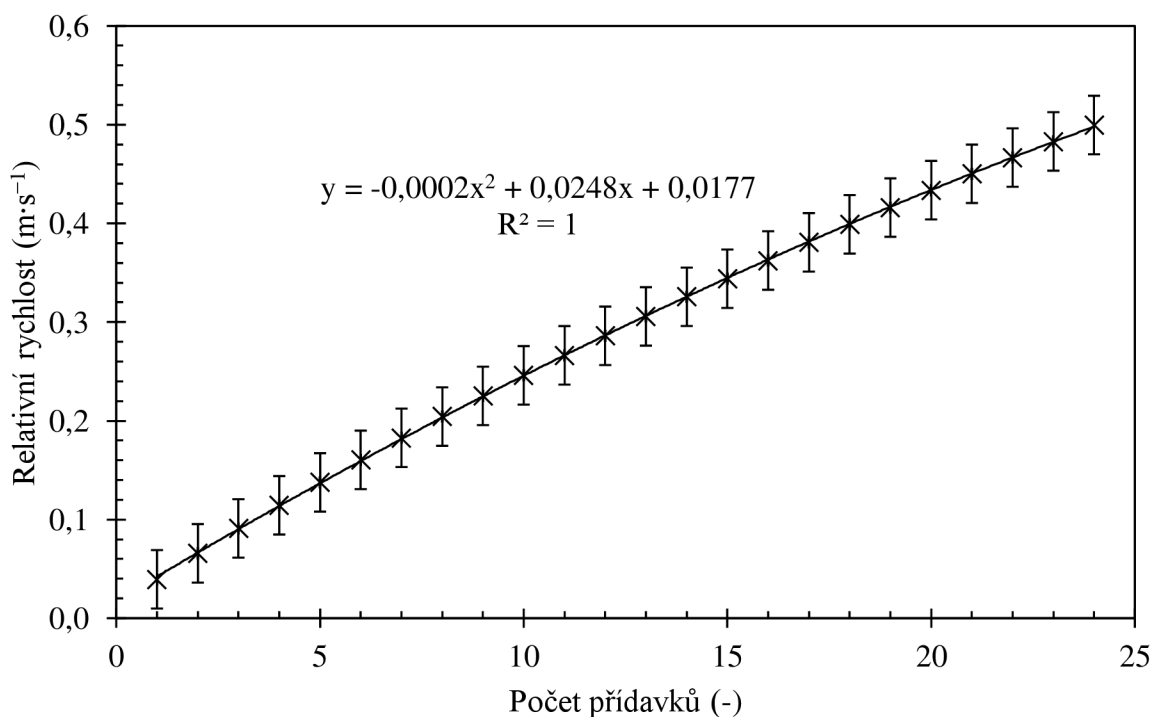
Stejným způsobem byla zpracována data i pro ostatní systémy a prostředí, včetně dat zeslabení zvukových vln. Výsledný graf pro relativní rychlost je prezentován na obrázku (Obrázek 18). V následujících kapitolách jsou zobrazené výsledky z HR-US vždy zpracované stejným způsobem.



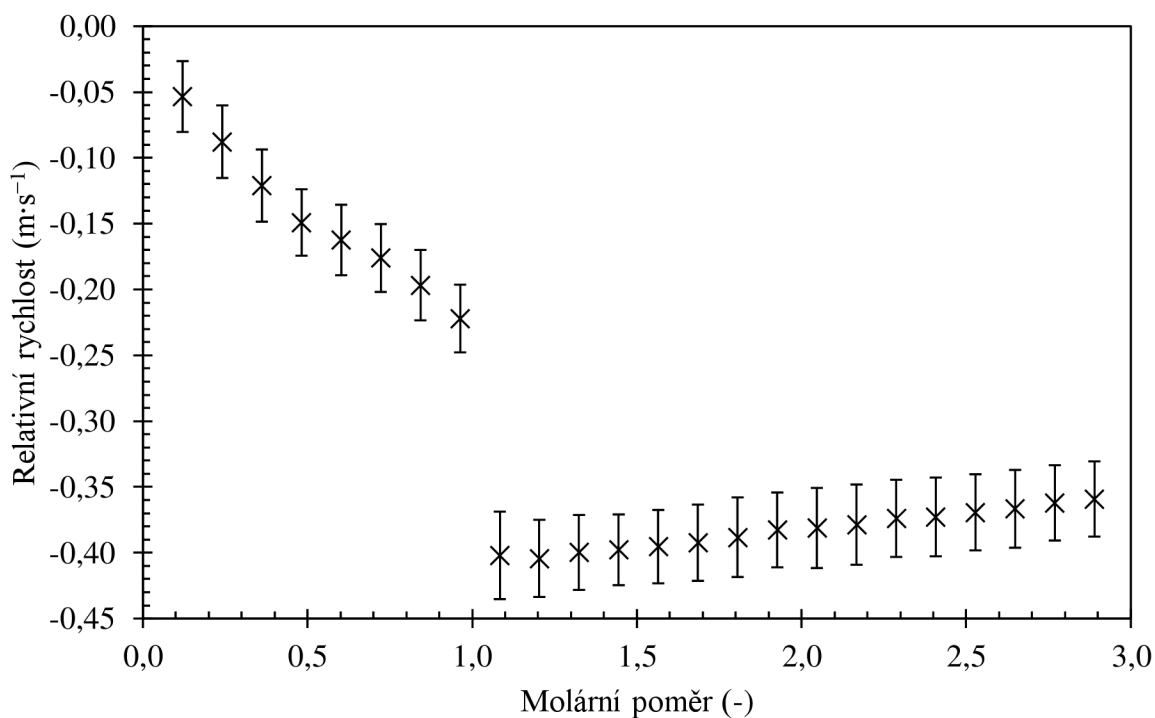
Obrázek 15: Graf znázorňující velikosti relativní rychlosti v závislosti na molárním poměru pro titraci 12 Arg·HCl do 1 540 kDa hyaluronanu, před odečtem vlivu ředění. (11,6 MHz, 25 °C)



Obrázek 16: Graf znázorňující průměrnou velikost relativní rychlosti v závislosti na počtu přidavků pro titraci vody do roztoků hyaluronanu. (11,6 MHz, 25 °C)



Obrázek 17: Graf znázorňující průměrnou velikost relativní rychlosti v závislosti na počtu přidavků pro titraci 12 Arg·HCl do vody. (11,6 MHz, 25 °C)



Obrázek 18: Graf znázorňující průměrnou velikost relativní rychlosti v závislosti na nábojovém poměru pro titraci 12 Arg·HCl do hyaluronanu o molekulové hmotnosti 1 540 kDa ve vodě po zpracování dat. (11,6 MHz, 25 °C)

5.3.3 ITC

Tepelné efekty z titrací roztoku titrantu do měrné cely byly ve většině případů měřeny pomocí MicroCal PEAQ-ITC (Malvern Panalytical Ltd, USA), menší část experimentů byla provedena na starším přístroji Nano ITC 2G (TA Instruments, USA). Titrace vody do vody byla provedena před každým experimentem, aby se zajistilo, že zařízení měří správně. Každé měření bylo provedeno alespoň třikrát, v práci jsou v grafech a tabulkách uváděny průměrné hodnoty spolu s odpovídajícími směrodatnými odchylkami v tabulkách a chybovými úsečkami v grafech. Referenční cely byla v průběhu všech měření naplněna vodou. Všechna měření byla prováděna při 25 °C, v čisté vodě, PBS nebo prostředích s různou iontovou silou (koncentrace NaCl 10 mM, 50 mM, 100 mM a 150 mM)

K integraci píků a vyhodnocení dat získaných z měření byly využity programy MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software (Malvern Panalytical Ltd.) a NanoAnalyze (TA instruments, USA), dodávané k oběma přístrojům. Oba programy využívají standardní procedury [170] k získání základních termodynamických parametrů, které jsou zde nazývány standardní interakční Gibbsova energie (ΔG°), standardní interakční entalpie (nebo také entalpický příspěvek; ΔH°) a standardní entropie (ΔS°) jako produkt $T\Delta S^\circ$ jsou nazývány entropickým příspěvkem. Programy také podávají informaci o rovnovážné konstantě, obvykle nazývané disociační konstanta (K_D). Tato terminologie je zachována i v této práci, přestože pro studované interakce není zcela správná.

Při zkoumání interakcí mezi oligomery argininu a hyaluronanem byl roztok hyaluronanu o koncentraci 0,1 %hm umístěn vždy v cele a roztok oligomeru argininu sehrál roli titrantu. Pro

zjištění rozpouštěcích tepel byly prováděny titrace oligomeru argininu do vody nebo příslušeného prostředí. Ředící tepla byla odečítána od tepel titrace na počátku vyhodnocení. Ředící teplo hyaluronanu nebylo bráno v úvahu, neboť je dle dostupné literatury [182–184] v porovnání s teplem uvolněným v průběhu titrace velmi malé a zanedbatelné. Teplo uvolněné během jednoho přídávku titrace se pohybuje řádově ve stovkách μJ , zatímco ředící teplo hyaluronanu odpovídá jednotkám μJ .

5.3.3.1 *NanoITC TA Instruments*

Všechny vzorky byly před měřením temperovány na $25\text{ }^\circ\text{C}$ a odplyněny pomocí odplyňovací stanice (TA instruments).

V cele (objem $990\ \mu\text{l}$) byl ve všech případech roztok hyaluronanu o koncentraci $0,1\ \text{‰}$ hm o molekulových hmotnostech 9 a $1\ 540\ \text{kDa}$. Pomocí syringe o objemu $250\ \mu\text{l}$ byl přidáván roztok argininu monohydrochloridu v koncentraci $41,5\ \text{mM}$. Rychlost míchání byla nastavena na $250\ \text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$. Interval mezi přídávky byl empiricky stanoven na $500\ \text{s}$. Titrace probíhaly s prvním přídávkem o menším objemu $5,14\ \mu\text{l}$ z důvodů možného zředění vzorku před začátkem titrace v titrační kapiláře. Ostatní přídávky měly shodnou velikost $12\ \mu\text{l}$.

Po odečtení ředících tepel byla získaná data vynášena do grafu, kde byl na vodorovné ose zobrazen molární poměr a na svislé ose změna entalpie. První přídavek s menším objemem nebyl do vyhodnocování výsledků zahrnut.

Pro titrace oligomerních aminokyselin v hydrochloridové formě konkrétně dimeru, tetrametu a oktameru argininu byla zvolena výchozí koncentrace kladných nábojů $30\ \text{mM}$. Ostatní parametry titrace zůstaly zachovány stejně jako v případě monomerních aminokyselin.

5.3.3.2 *MicroCal PEAQ-ITC*

Všechny vzorky byly před měřením odplyněny pomocí centrifugy ($5\ \text{min}$, $3\ 000\ \text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$).

Pro jednotlivé experimenty byl používán hyaluronan o různých molekulových hmotnostech (Tabulka 5). Pomocí syringe o objemu $40\ \mu\text{l}$ byl přidáván byl roztok oligomerů argininu v hydrochloridové formě (10 , 12 a $30\ \text{Arg}\cdot\text{HCl}$) o koncentraci kladných nábojů $30\ \text{mM}$ do cely o objemu $200\ \mu\text{l}$. Rychlost míchání byla nastavena na $750\ \text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$, interval mezi přídávky byl empiricky stanoven na $150\ \text{s}$. Titrace probíhaly s prvním přídávkem o menším objemu $0,8\ \mu\text{l}$, z důvodů možného zředění vzorku před začátkem titrace v titrační kapiláře. Ostatní přídávky měly shodnou velikost $2\ \mu\text{l}$.

5.4 **Výsledky**

Základní informace o systémech byly získány pomocí jednoduchého vizuálního pozorování. Pro tato pozorování byly zpravidla vybrány molekulové hmotnosti hyaluronanu 9 a $1\ 540\ \text{kDa}$. Výsledky všech vizuálních pozorování jsou shrnuty v tabulkách (Tabulka 12, Tabulka 13, Tabulka 14). Tabulka 12 ukazuje souhrnné výsledky pozorování ve vodě, Tabulka 13 pak zobrazuje tyto výsledky pro roztoky v PBS a Tabulka 14 obsahuje výsledky pro prostředí s různou iontovou silou. Žádné změny nebyly zaznamenány pro monomer, dimer a tetramer argininu hydrochloridu a roztoky zůstaly čiré po celou dobu titrace. V případě vyšších oligomerů argininu se systém mění z čirého k mléčnému až k zakalenému v případě $9\ \text{kDa}$

hyaluronanu. U 1 540 kDa hyaluronanu dochází dokonce k makroskopické separaci (precipitaci). K těmto změnám dochází ve vodě zpravidla kolem molárního poměru 1. Pokud jsou v roztoku přítomny další ionty, tyto změny se obvykle odehrávají za vyšších molárních poměrů. Tento posun je dobře patrný zejména v případě PBS.

Tabulka 12: Shrnutí výsledků jednotlivých titrací ve vodě včetně vizuálních pozorování.

Oligomer Arg / Hya Mw (kDa)	HR-US	ITC	Vizuální pozorování
Dimer a tetramer	Konstantní hodnoty.	Pouze pokles k molárnímu poměru 1.	Beze změny.
Oktamer 9 kDa	Statisticky nevýznamný pokles.	Pouze pokles k molárnímu poměru 1.	Tvorba slabě zakalených roztoků, které se vyčeřily při vyšších molárních poměrech (pravděpodobně díky nízkému pH). (Obrázek P 7)
1 540 kDa	Minimum ~ 1,0, opětovný nárůst hodnot relativní rychlosti díky rozpadu sraženin – efekt pH.	Pouze pokles k molárnímu poměru 1.	Tvorba slabě zakalených roztoků, které se mění ve sraženinu s mírným zákalem kolem molárního poměru 1. Nedochází k rozpadu vlivem nízkého pH. (Obrázek P 7)
Oktamer upravené pH 9 kDa	Sigmoidní křivka.	Pouze pokles.	Intenzivní zákal, nerozpouští se jako v případě roztoků s neupraveným pH. (Obrázek P 8)
1 540 kDa	Změna v relativní rychlosti ~ 1,7	Pozorován posun základní linie, sigmoidní křivka	Nebylo vizuálně testováno, hyaluronan s touto molekulovou hmotností interaguje i bez úpravy pH
Dekamer	Změna v relativní rychlosti ~ 1,2; malý vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu, ale výrazný rozdíl mezi 9 kDa hyaluronanem a vyššími molekulovými hmotnostmi hyaluronanu.	2 vazná místa, efekt molekulové hmotnosti hyaluronanu.	9 kDa – tvorba slabě zakalených roztoků (Obrázek P 9) 310 kDa – tvorba intenzivně zakalených roztoků (Obrázek P 9) 1 540 kDa – formování zakalených roztoků, které se mění ve sraženinu kolem molárního poměru 1,2 a roztok zůstává čirý. (Obrázek P 9)

Oligomer Arg / Hya Mw (kDa)	HR-US	ITC	Vizuální pozorování
Dodekamer	Změna v relativní rychlosti ~ 1,1; malý vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu ,ale výrazný rozdíl mezi 9 kDa hyaluronanem a vyššími molekulovými hmotnostmi hyaluronanu.	Sigmoidní křivka	9 kDa – tvorba slabě zakalených roztoků 1 540 kDa – formování zakalených roztoků, které se mění ve sraženinu kolem molárního poměru 1,1 a roztok zůstává čirý.
Triakontamer	Změna v relativní rychlosti ~ 1,0; malý vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu, rozdíl mezi 9 a 1 540 kDa hyaluronanem je nejmenší ze všech studovaných oligomerů.	Sigmoidní křivka	9 kDa – tvorba intenzivně zakalených roztoků, které se mění ve sraženiny a slabě zakalený roztok kolem molárního poměru 1,0. 1 540 kDa – tvorba intenzivně zakalených roztoků, které se mění ve sraženiny a čirý roztok kolem molárního poměru 1

Tabulka 13: Shrnutí výsledků jednotlivých titrací v PBS včetně vizuálního pozorování.

Oligomer Arg	HR-US	ITC	Vizuální pozorování
Triakontamer	Titrační křivky podobné těm ve vodě; posun k vyšším molárním poměrům ~ 1,5; změny v zeslabení patrné od 310 kDa	Sigmoidní křivka, vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu	9 kDa – tvorba slabě zakalených roztoků 1 540 kDa – tvorba slabě zakalených roztoků, které se mění ve sraženiny a čirý roztok kolem molárního poměru 1,5
Dodekamer	Neměřen	Bez interakcí	Roztok zůstává čirý se všemi testovanými molekulovými hmotnostmi
Dekamer	Neměřen	Bez interakcí	Roztok zůstává čirý se všemi testovanými molekulovými hmotnostmi

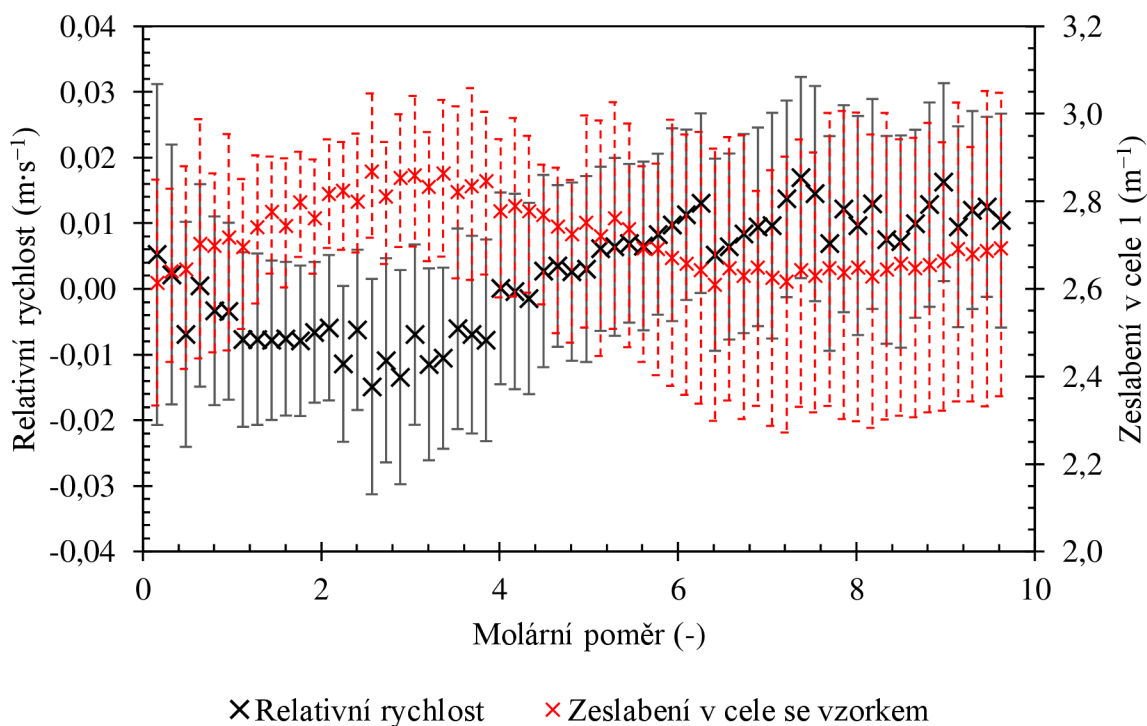
Tabulka 14: Shrnutí výsledků jednotlivých titrací v prostředích s různou koncentrací chloridu sodného, včetně vizuálního pozorování.

Oligomer Arg / Hya Mw	HR-US	ITC	Vizuální pozorování
Dodekamer 680 kDa	Titrační křivky podobné těm ve vodě; vyhlazování skoku relativní rychlosti s rostoucí iontovou silou; 150 mM NaCl posunuté do vyšších molárních poměrů	Sigmoidní křivka, bez měřitelných interakcí v případě 150 mM NaCl	Voda – tvorba zakalených roztoků, které se mění ve sraženinu a čirý roztok kolem molárního poměru 1,1 100 mM NaCl – tvorba slabě zakalených roztoků, které se mění ve sraženinu a slabě zakalený roztok kolem molárního poměru 1,1 150 mM NaCl – velmi slabě zakalený roztok pozorovatelný kolem molárního poměru 1,5
Dekamer 50 mM NaCl	Neměřeno	9 kDa – pokles k molárnímu poměru 1 1 540 kDa – sigmoidní křivka	9 kDa – tvorba slabě zakalených roztoků 1 540 kDa – tvorba intenzivně zakalených roztoků, které se mění v precipitát a čirý roztok kolem molárního poměru 1
Dekamer 10 mM NaCl	Neměřeno	9 kDa – pokles do molárního poměru 0,6 1 540 kDa – pozorován posun základní linie, sigmoidní křivka	9 kDa – tvorba intenzivně zakalených roztoků 1 540 kDa – tvorba intenzivně zakalených roztoků, které se mění ve sraženinu a čirý roztok kolem molárního poměru 1

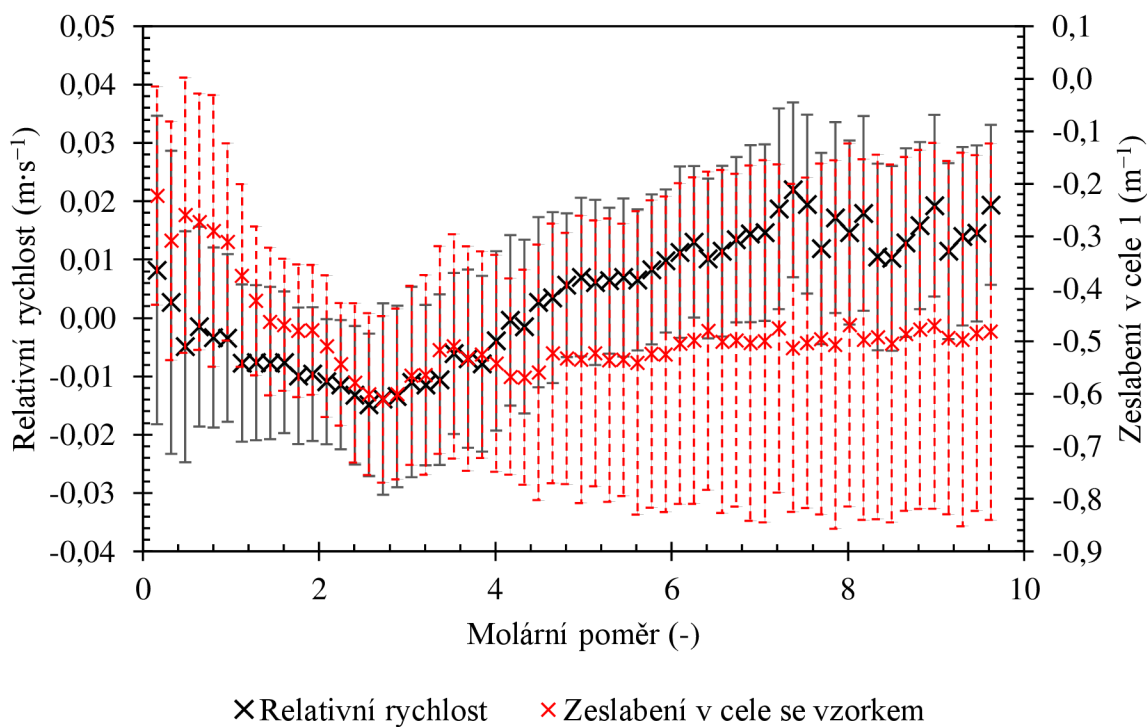
5.4.1 Výsledky z HR-US

Monomerní a oligomerní arginin až do 4 monomerních jednotek vykázal v průběhu titrace v prostředí vody téměř neměnnou relativní rychlost a zeslabení v cele se vzorkem. To ukázalo na nepřítomnost interakcí z pohledu ultrazvukového vlnění, data jsou znázorněná v grafech na obrázcích (Obrázek 19, Obrázek 20) pro monomerní arginin. Dimer a tetramer argininu pak na obrázcích (Obrázek 21, Obrázek 22, Obrázek 23, Obrázek 24) vždy pro nejnižší a nejvyšší molekulovou hmotnost hyaluronanu. Na parametr zeslabení ultrazvukových vln bylo nutné, s ohledem na velkou chybu stanovení, pohlížet spíše jako na podpůrný výsledek měření relativní rychlosti. K výraznému zeslabení ultrazvukových vln dochází především při přechodu na heterogenní systémy [156, 185].

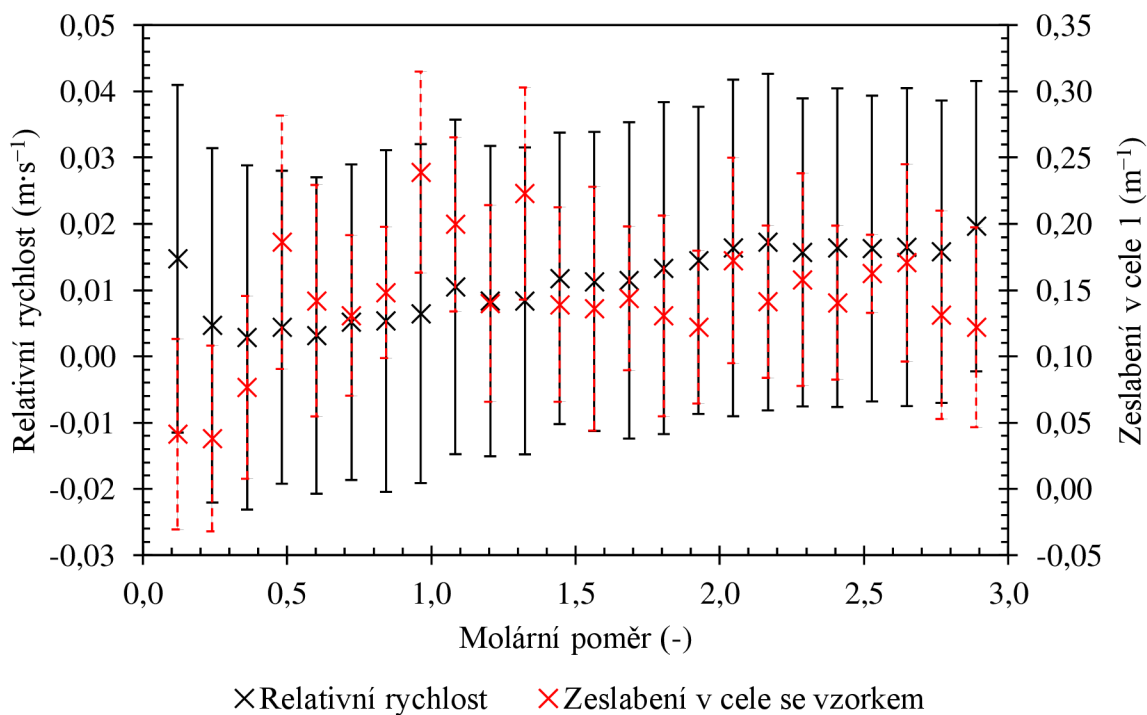
Jak bylo zmíněno v kapitole 5.2.5.1, pH roztoků dimeru a tetrameru argininu muselo být upraveno na neutrální hodnoty. Tyto úpravy však ani u jednoho z oligomerů nevyústily ve změněný záznam relativní rychlosti ultrazvukových vln, jak ukazují data na obrázku (Obrázek 25). Zkoumány byly pouze interakce s vysokomolekulárním hyaluronanem, neboť zde byl vyšší předpoklad pozorování interakcí.



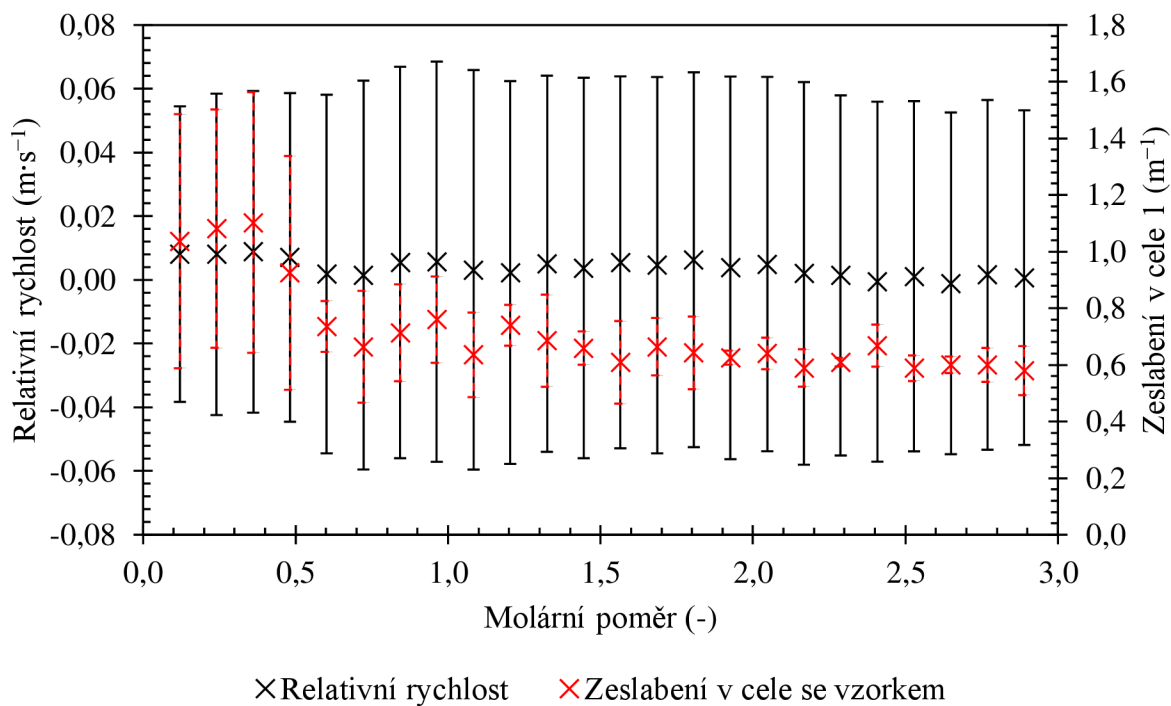
Obrázek 19: Graf znázorňující velikosti relativní rychlosti a zeslabení v cele 1 při titraci roztoku Arg·HCl do roztoku hyaluronanu 9 kDa ve vodě. (11,6 MHz, 25 °C)



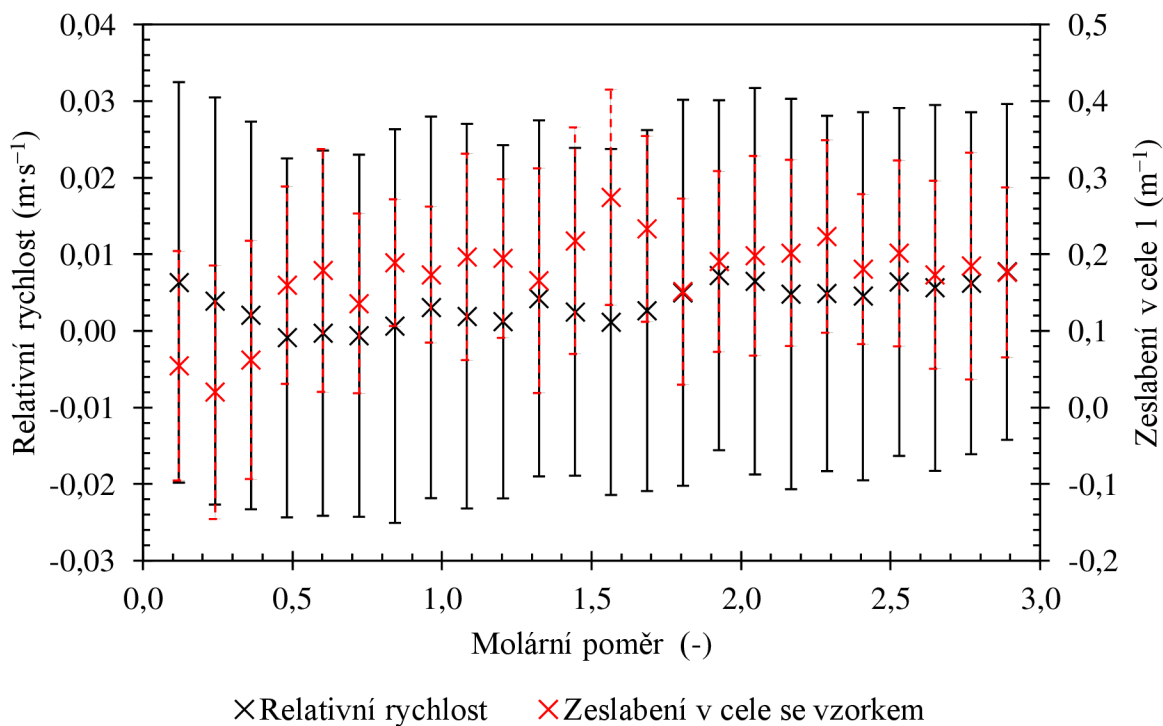
Obrázek 20: Graf znázorňující velikosti relativní rychlosti a zeslabení v cele 1 při titraci roztoku Arg-HCl do roztoku hyaluronanu 1 540 kDa ve vodě. (11,6 MHz, 25 °C)



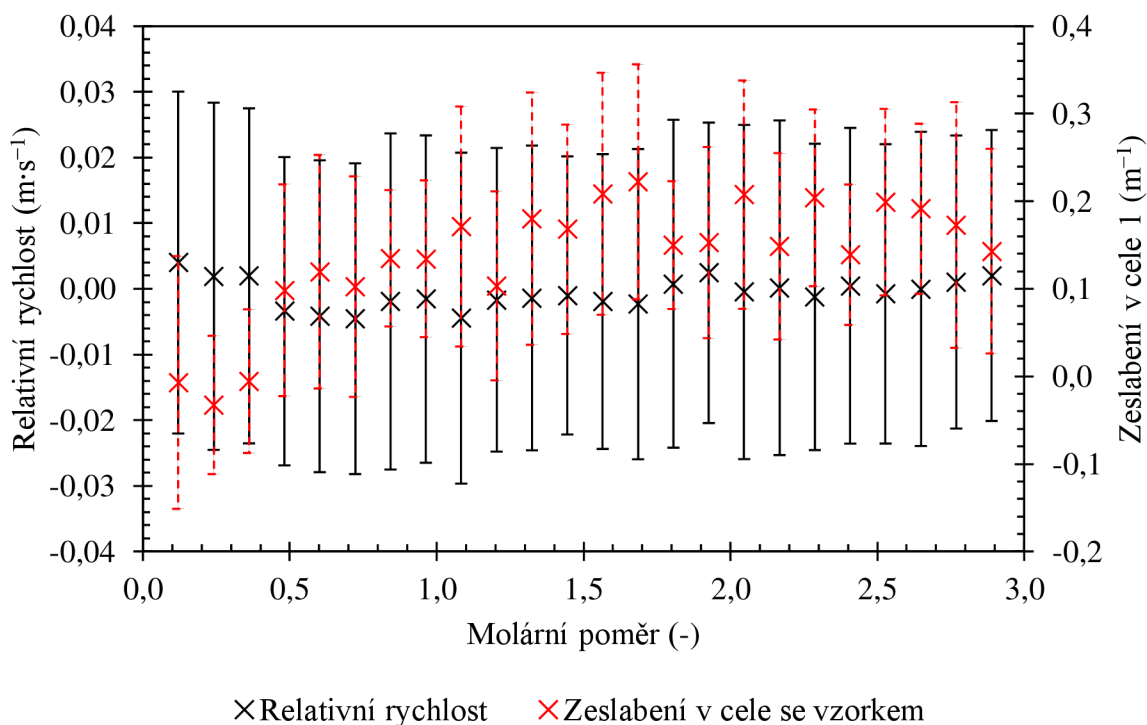
Obrázek 21: Graf znázorňující velikosti relativní rychlosti a zeslabení v cele 1 při titraci roztoku 2 Arg-HCl do roztoku hyaluronanu 9 kDa ve vodě. (11,6 MHz, 25 °C)



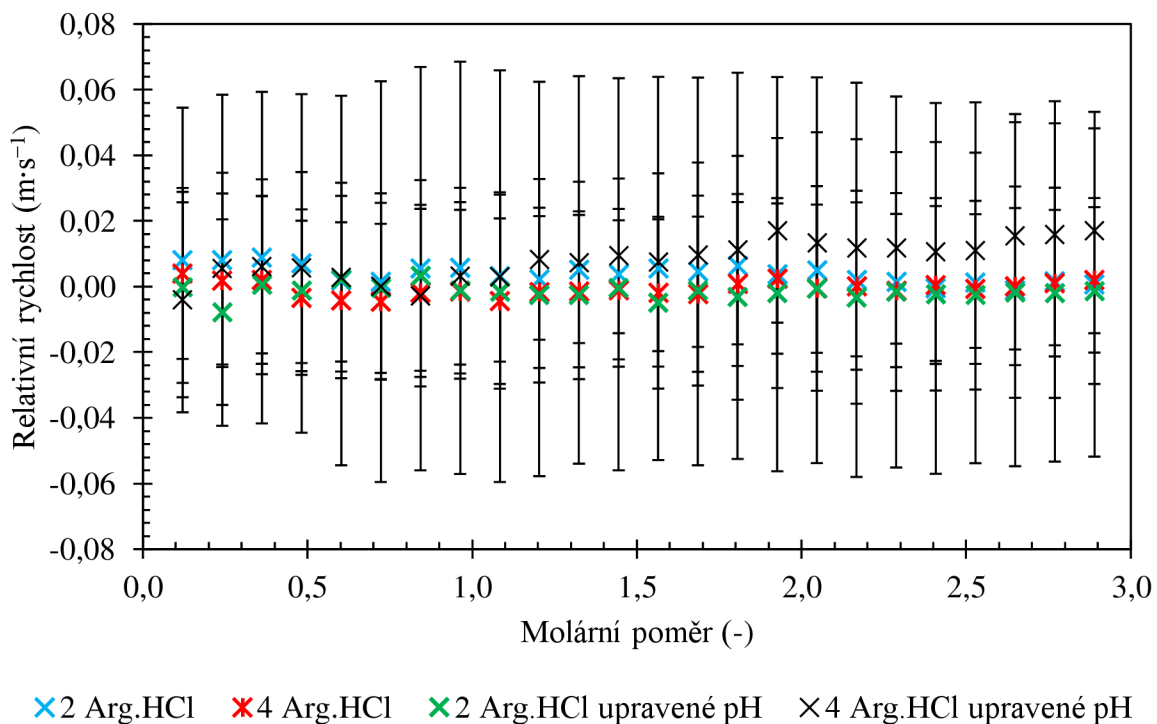
Obrázek 22: Graf znázorňující velikosti relativní rychlosti a zeslabení v cele 1 při titraci roztoku 2 Arg·HCl do roztoku hyaluronanu 1 540 kDa ve vodě. (11,6 MHz, 25 °C)



Obrázek 23: Graf znázorňující velikosti relativní rychlosti a zeslabení v cele 1 při titraci roztoku 4 Arg·HCl do roztoku hyaluronanu 9 kDa ve vodě. (11,6 MHz, 25 °C)



Obrázek 24: Graf znázorňující velikosti relativní rychlosti a zeslabení v cele 1 při titraci roztoku 4 Arg·HCl do roztoku hyaluronanu 1 540 kDa ve vodě. (11,6 MHz, 25 °C)



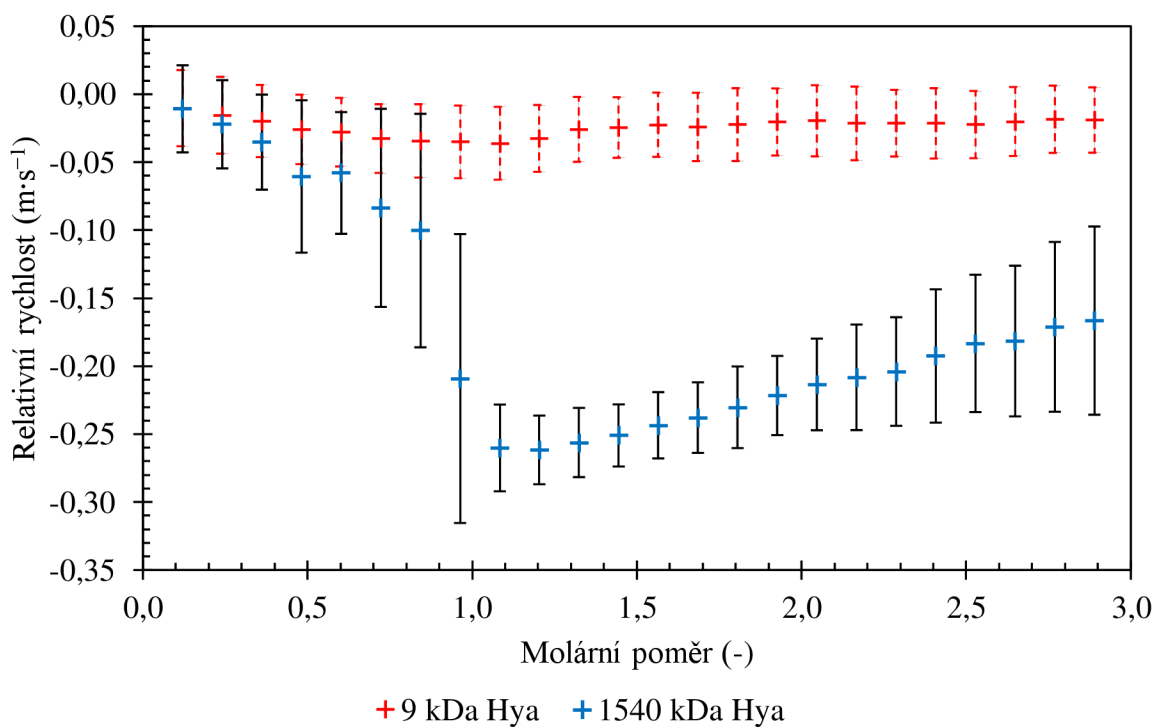
Obrázek 25: Závislost relativní rychlosti na molárním poměru při titraci dimeru a tetrameru argininu včetně roztoků s upraveným pH do roztoku hyaluronanu 1 540 kDa ve vodě. (11,6 MHz, 25 °C)

Situace se změnila v případě oktameru argininu ve vodě. Vizuální pozorování ukázala, že na rozdíl od kratších oligomerů argininu byl oktamer argininu schopen v průběhu titrace vytvořit zakalený roztok, respektive zakalený roztok se sraženinami, v závislosti na použité molekulové

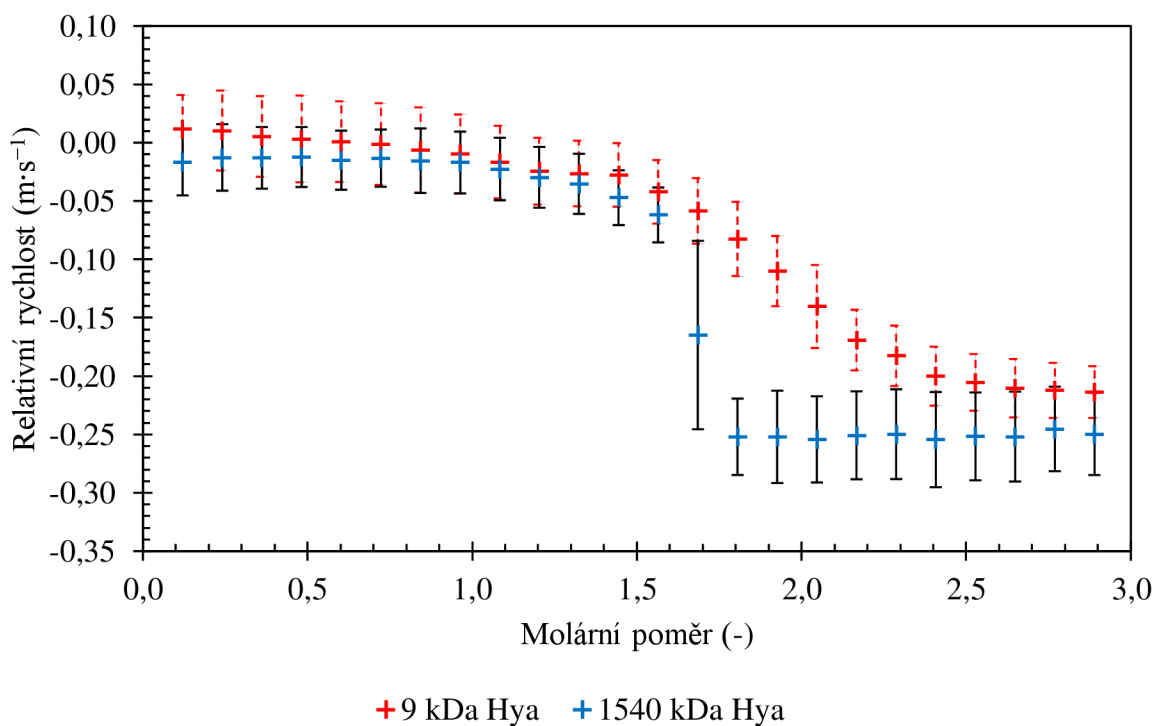
hmotnosti hyaluronanu (Tabulka 12). Na obrázku v příloze (Obrázek P 7) můžeme v levé vialce vidět systém po 8 přídavcích oktameru argininu do 9 kDa Hya, uprostřed pak stejný systém po 11 přídavcích, vpravo je pak systém oktameru argininu spolu s vysokomolekulárním hyaluronanem. V případě roztoků oktameru argininu s upraveným pH byla vizuální změna velmi dobře patrná i u nízkomolekulárního hyaluronanu, kde již nedocházelo k rozpouštění zákalu po jeho vytvoření (Obrázek P 8), v důsledku přílišného snížení pH v průběhu titrace. Nízkomolekulární hyaluronan byl zvolen z důvodu nízké intenzity interakcí pozorované v případě roztoků oktameru argininu s neupravovaným pH.

Na rozdíl od kratších oligomerů argininu došlo k poklesu relativní rychlosti v průběhu titrace díky uvolnění hydratační vody z hydratačního obalu. Tento rozdíl byl velmi dobře pozorovatelný u vysokomolekulárního hyaluronanu, jak ukazují data v grafu na obrázku (Obrázek 26). Pokles se zastavil kolem molárního poměru 1, to znamená kolem předpokládaného bodu nábojové ekvivalence, poté relativní rychlost mírně narůstá. Úprava pH roztoků argininu neměla za následek výrazné změny v titračním profilu. Při porovnání s pH neupravovanými vzorky došlo k výraznějšímu poklesu relativní rychlosti v případě nízkomolekulárního hyaluronanu. U obou molekulových hmotností hyaluronanu pak nedocházelo k opětovnému nárůstu relativní rychlosti a místo minima byla v obou případech pozorovaná sigmoidní závislost s inflexním bodem kolem molárního poměru 1,7–1,9, jak ukazují data v grafu na obrázku (Obrázek 27).

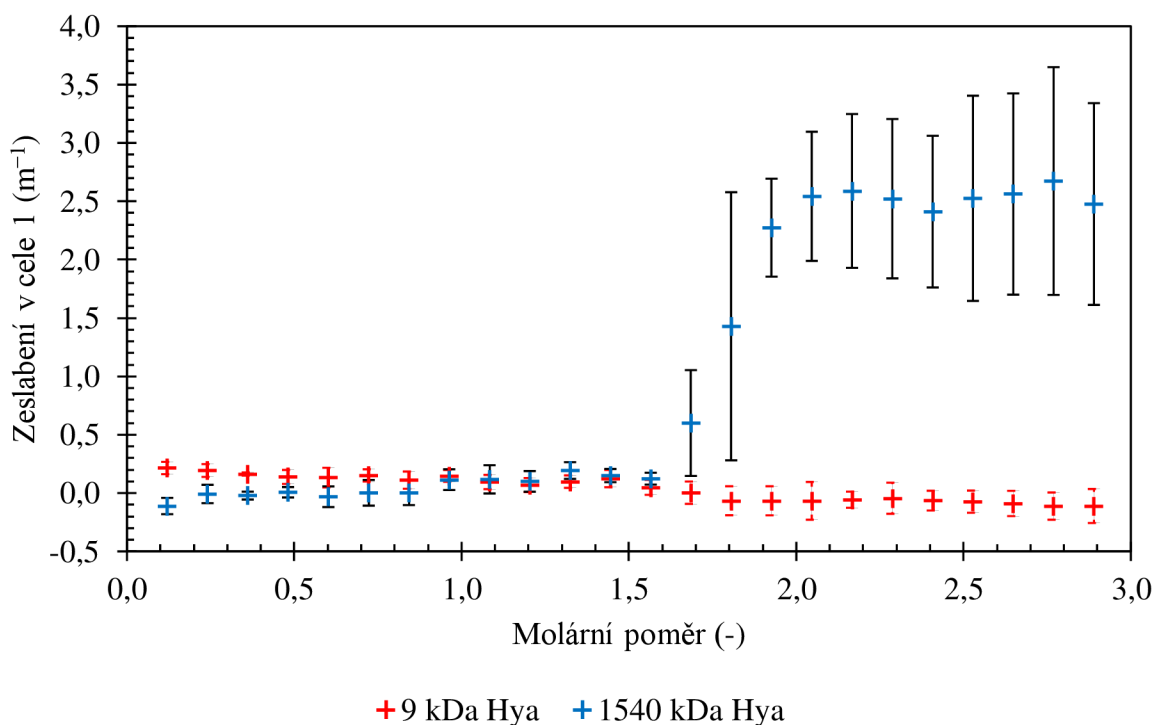
Parametr zeslabení ultrazvukových vln v celé se vzorkem se v případě 9 kDa hyaluronanu jevil v průběhu titrace jako téměř konstantní. V případě 1 540 kDa hyaluronanu byl nárůst v zeslabení jasně patrný (Obrázek 28) a svojí změnou dobře korespondoval s poklesem v parametru relativní rychlosti. Výrazný nárůst v parametru ultrazvukového zeslabení dobře ilustroval vznik sraženin v případě vysokomolekulárního hyaluronanu. Zvýšené zeslabení znamenalo vznik struktur nebo agregátů schopných rozptylovat ultrazvukové vlny a zvýšenou heterogenitu vzorku [156, 185].



Obrázek 26: Závislost relativní rychlosti na molárním poměru při titraci oktameru argininu do roztoku hyaluronanu o molekulových hmotnostech 9 a 1 540 kDa ve vodě. (11,6 MHz, 25 °C)



Obrázek 27: Závislost relativní rychlosti na molárním poměru při titraci pH upraveného roztoku oktameru argininu do roztoku hyaluronanu o molekulových hmotnostech 9 a 1 540 kDa ve vodě. (11,6 MHz, 25 °C)



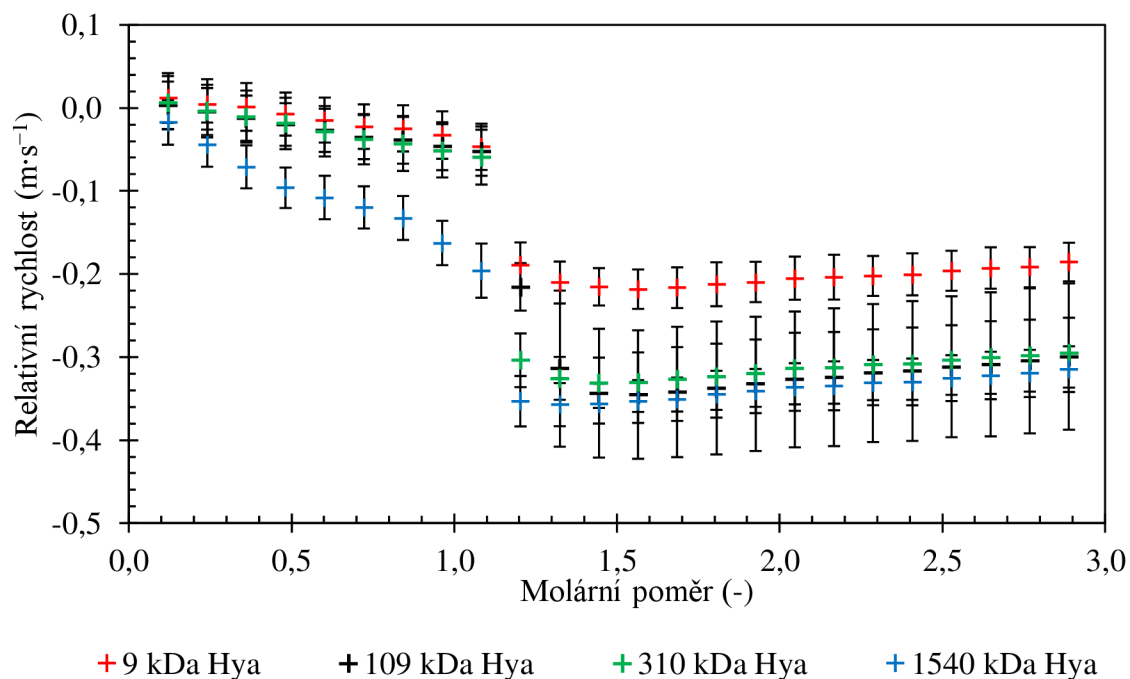
Obrázek 28: Závislost zeslabení ultrazvukových vln na molárním poměru při titraci pH upraveného roztoku oktameru argininu do roztoku hyaluronanu o molekulových hmotnostech 9 a 1 540 kDa ve vodě. (11,6 MHz, 25 °C)

Výsledky u delších oligomerů argininu (10, 12 a 30) si byly vzájemně podobné. V případě dekameru a dodekameru byl také detailněji studován vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu na interakce. Relativní rychlost v průběhu titrace nejprve téměř lineárně klesá až k molárnímu poměru 1. Pak nastává prudký pokles následovaný mírným nárůstem (dekamer, dodekamer) nebo konstantními hodnotami relativní rychlosti (trikontamer). Data jsou znázorněna v grafech na obrázcích (Obrázek 29, Obrázek 30, Obrázek 31). Zde je také možné pozorovat vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu. Hyaluronan s nejvyšší molekulovou hmotností (1 540 kDa) měl nejvyšší sklon v počáteční fázi titrace, zatímco ostatní molekulové hmotnosti nejsou vzájemně rozlišitelné. Naopak hyaluronan s nejnižší molekulovou hmotností (9 kDa) měl v průběhu titrace nejmenší pokles v relativní rychlosti. Nejmenší rozdíl mezi vysokomolekulárním (1 540 kDa) a nízkomolekulárním (9 kDa) hyaluronanem byl pozorován v případě trikontameru argininu (Obrázek 31).

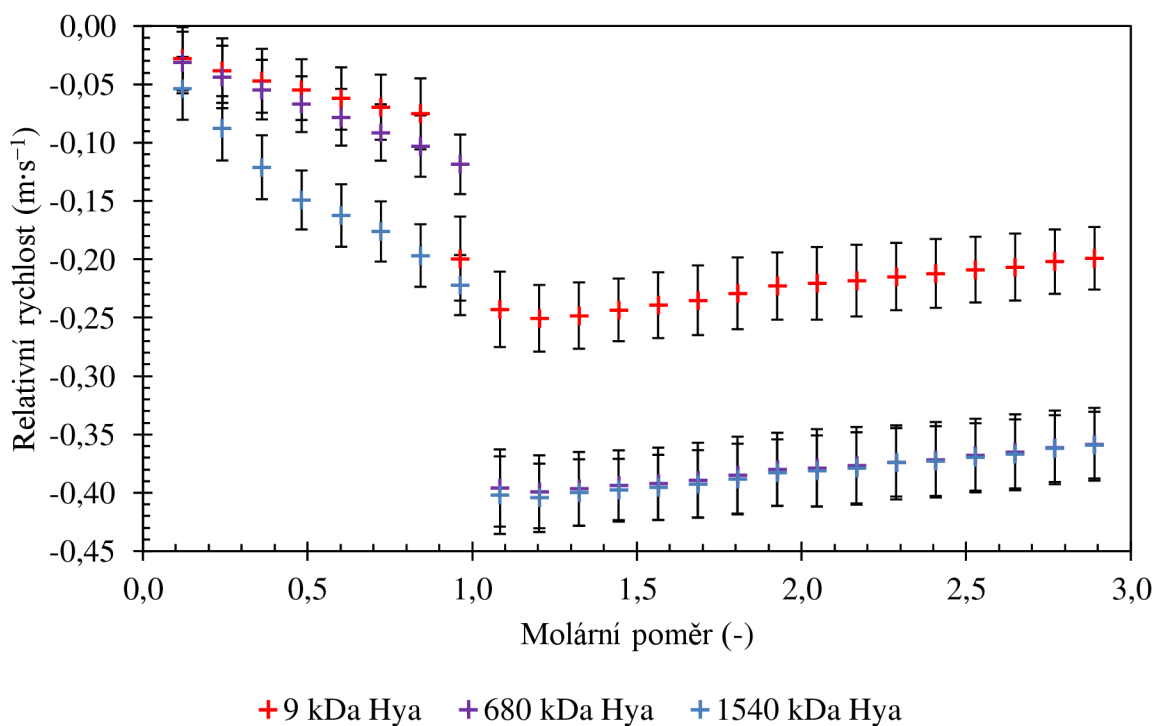
Výsledky vizuálních pozorování jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 12). V případě vysokomolekulárního hyaluronanu docházelo vždy k tvorbě zakaleného roztoku, který se kolem nábojového poměru 1 měnil na sraženiny a čirý roztok. U nízkomolekulárního hyaluronanu docházelo k tvorbě zakaleného roztoku u titrací s dekamerem a dodekamerem, zatímco u trikontameru argininu docházelo k tvorbě sraženiny obdobně jako u vysokomolekulárního hyaluronanu, ovšem v tomto případě zůstával roztok mírně zakalený i po jejím vytvoření.

V případě dekameru argininu parametr zeslabení opět dobře ilustroval vznik sraženin v roztoku, kdy docházelo ke skokové změně velikosti zeslabení v cele l a i přes vysokou chybu stanovení

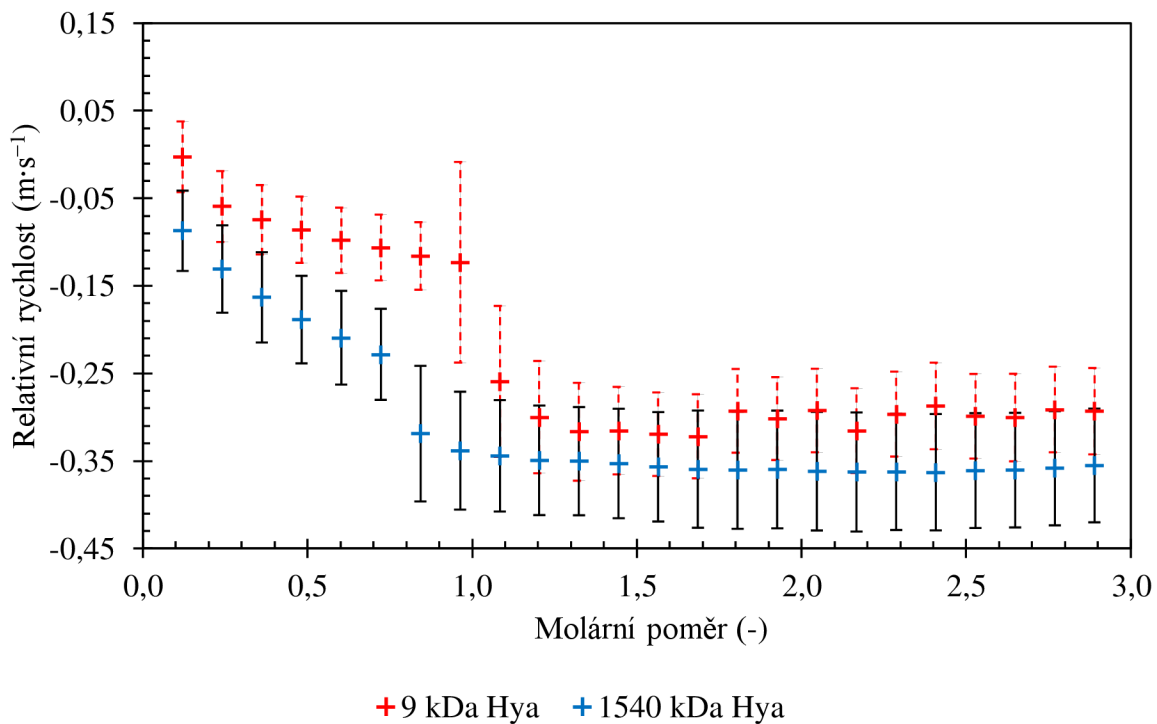
bylo možné tvrdit, že sraženiny vznikají v systémech s molekulovou hmotností hyaluronanu 1 540 a 310 kDa, jak ukazují data v grafu na obrázku (Obrázek 32). U dodekameru a trikontameru argininu nebylo možné z parametru zeslabení usuzovat na žádné závěry.



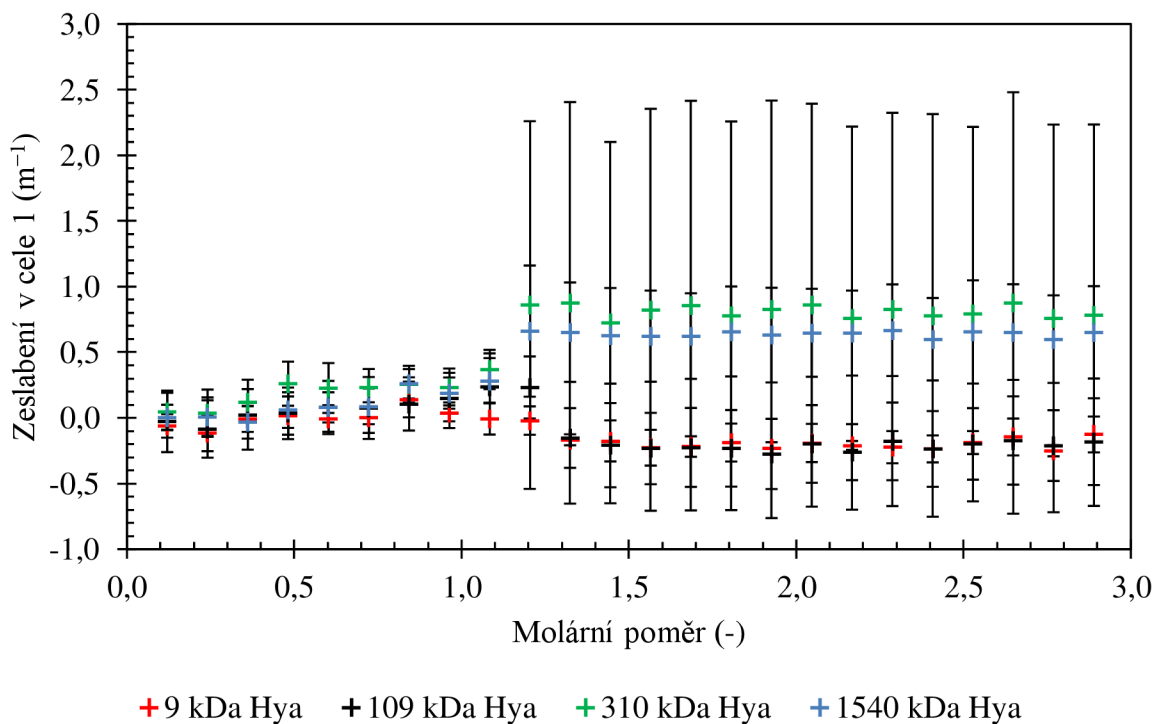
Obrázek 29: Závislost relativní rychlosti na molárním poměru při titraci dodekameru argininu do roztoku hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech ve vodě. (11,6 MHz, 25 °C)



Obrázek 30: Závislost relativní rychlosti na molárním poměru při titraci dodekameru argininu do roztoku hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech ve vodě. (11,6 MHz, 25 °C)



Obrázek 31: Závislost relativní rychlosti na molárním poměru při titraci triakontameru argininu do roztoku hyaluronanu o molekulových hmotnostech 9 a 1 540 kDa ve vodě. (11,6 MHz, 25 °C)

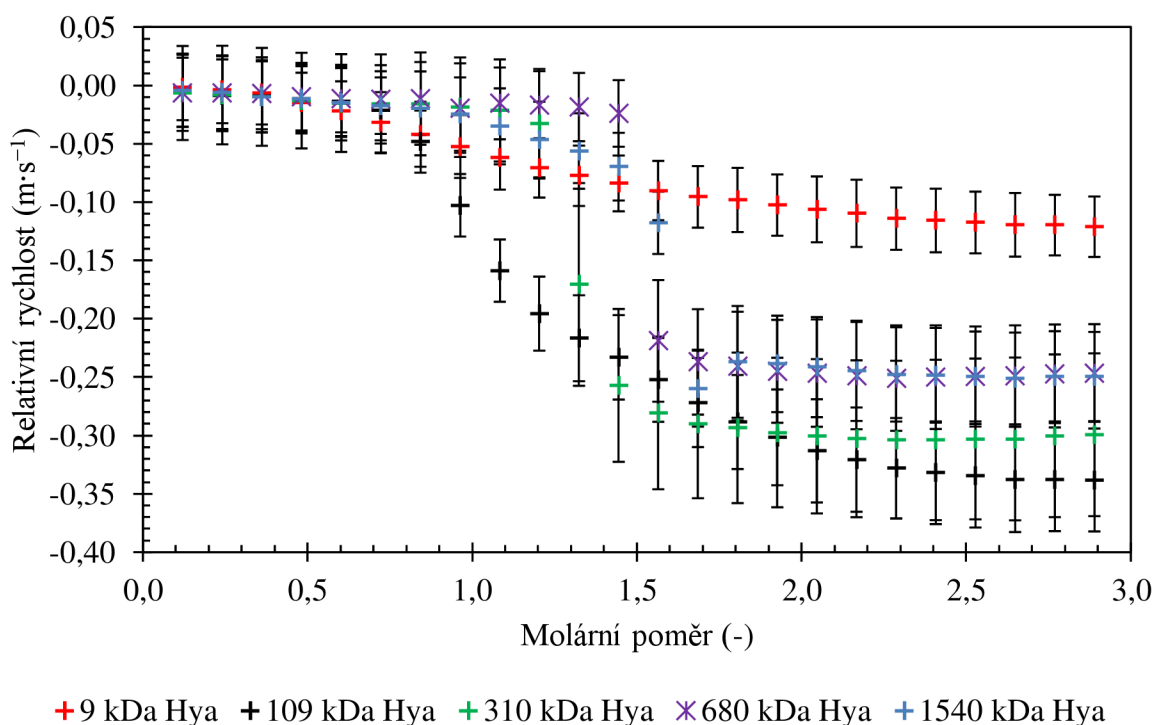


Obrázek 32: Graf znázorňující velikosti zeslabení v cele 1 v závislosti na molárním poměru pro titraci 10 Arg-HCl do roztoků hyaluronanu o jednotlivých molekulových hmotnostech ve vodě. (11,6 MHz, 25 °C)

5.4.1.1 Vliv prostředí

Pro tyto experimenty byly zvoleny oligomery argininu, tedy dekamer, dodekamer a triakontamer, s ohledem na výsledky měření ve vodě, neboť prokázaly interakce se všemi studovanými molekulovými hmotnostmi hyaluronanu. Vliv iontů a iontově řízeného pH byl studován přípravou roztoků v PBS nebo v roztocích NaCl s různou koncentrací soli.

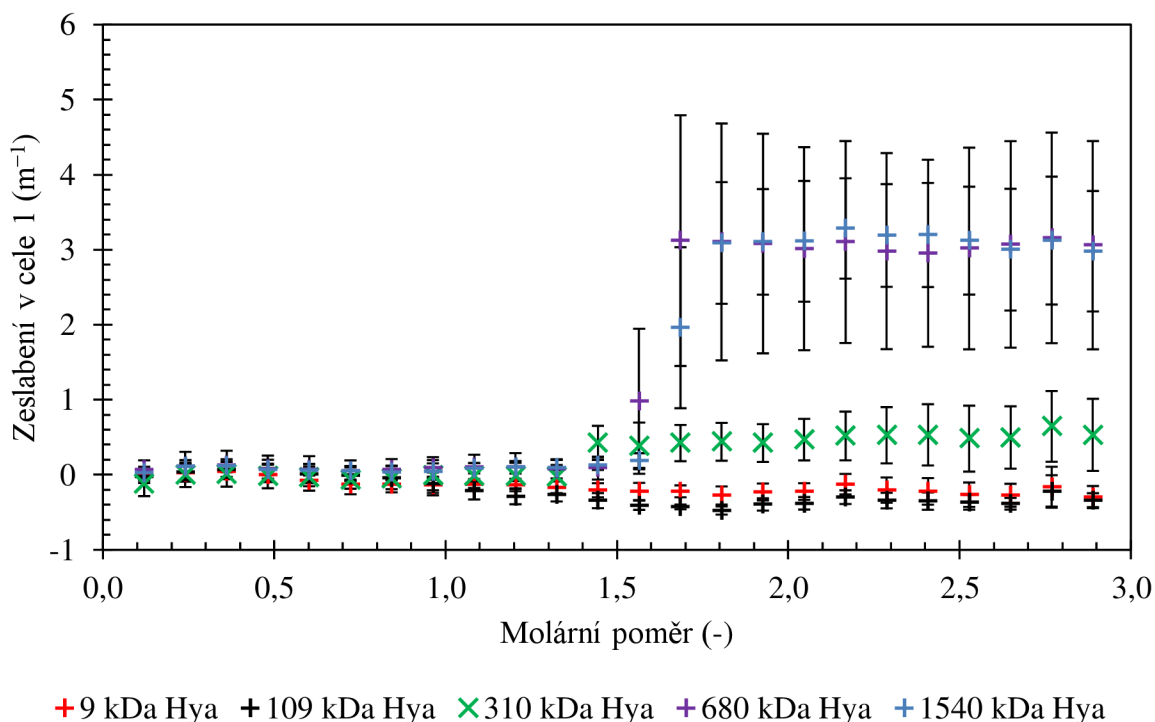
Efekt PBS byl studován na triakontameru argininu. Byly zkoumány vybrané molekulové hmotnosti hyaluronanu v rozsahu 9–1 540 kDa, jak ukazují data v grafu na obrázku (Obrázek 33). Pokles relativní rychlosti neprobíhal od prvního přídavku, jako tomu bylo ve vodném prostředí. Během prvních přídavků byly hodnoty relativních rychlostí konstantní a k interakcím během těchto přídavků pravděpodobně nedocházelo. Poté následoval rychlý pokles relativní rychlosti jako u titrací ve vodě. Výjimku tvořil 9 kDa hyaluronan, kde byl pokles relativní rychlosti mírnější a pozvolnější. Pokles v případě 109 kDa nebyl tak strmý jako pro zbývající molekulové hmotnosti a rozkládal se na poměrně širokém intervalu molárního poměru. Molární poměr, ve kterém se skokově mění relativní rychlost, byl obecně posunut do vyšších hodnot ve srovnání s vodným prostředím, nicméně vliv PBS na interakce byl do značné míry závislý na molekulové hmotnosti hyaluronanu.



Obrázek 33: Závislost relativní rychlosti na molárním poměru při titraci triakontameru argininu do roztoku hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech v prostředí PBS. (11,6 MHz, 25 °C)

Vliv molekulové hmotnosti byl také dobře pozorovatelný na parametru zeslabení ultrazvukových vln v cele se vzorkem, kde jak ukazuje graf na obrázku (Obrázek 34) nárůst hodnot zeslabení od molekulové hmotnosti hyaluronanu 310 kDa značil tvorbu sraženin a částic v roztoku, které umožňovaly rozptylovat zvuk. Tyto sraženiny byly v roztoku tvořeny od molárního poměru 1,5. Větší rozptyl (zeslabení) byl pozorován u vyšších molekulových

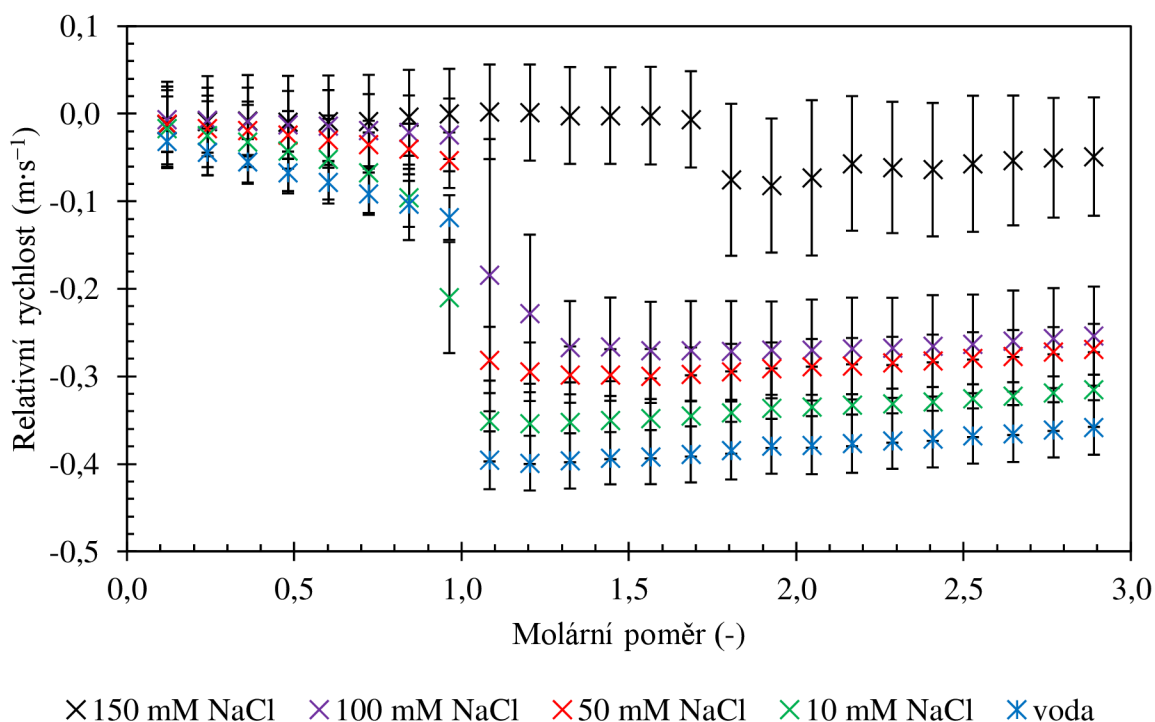
hmotností hyaluronanu. U molekulové hmotnosti 1 540 kDa byly tyto závěry potvrzeny i vizuálním pozorováním (Tabulka 13).



Obrázek 34: Graf znázorňující velikosti zeslabení v cele 1 v závislosti na molárním poměru pro titraci triakontameru argininu do roztoků hyaluronanu o jednotlivých molekulových hmotnostech v prostředí PBS. (11,6 MHz, 25 °C)

Arginin dodekamer a dekamer byly v prostředí PBS testovány pouze za použití ITC. Ani v jednom případě nebyly pozorované žádné tepelné efekty nezávisle na molekulové hmotnosti hyaluronanu. Vizuální pozorování také neukázala zakalení roztoku nebo vznik sraženin a roztok zůstal v případě obou oligomerů čirý po celou dobu titrace (Tabulka 13).

Efekt rostoucí koncentrace chloridu sodného (iontové síly) byl studován s využitím dodekameru argininu, který nevykázal interakce v PBS. Použita byla jedna molekulová hmotnost hyaluronanu 680 kDa. Jak ukazuje graf na obrázku (Obrázek 35), s rostoucí iontovou silou docházelo k postupnému zmenšení skokového poklesu relativní rychlosti. Sklon relativní rychlosti během počátečních přídavek s rostoucí iontovou silou také nebyl tak strmý a u dvou nejvyšších koncentrací NaCl byl téměř nulový. Vizuální pozorování odhalila, že až do koncentrace 100 mM docházelo k tvorbě sraženiny a čirého roztoku kolem molárního poměru 1,1, u 100 mM NaCl pak roztok kolem sraženiny zůstával zakalený a u nejvyšší iontové síly nedocházelo k tvorbě sraženiny, ale pouze k tvorbě velmi jemně zakaleného roztoku (Tabulka 14). V případě nejvyšší iontové síly byla vizuální pozorování v dobré shodě s daty získanými z ultrazvukového spektrometru, která ukázala, na pouze velmi malý pokles v parametru relativní rychlosti.



Obrázek 35: Závislost relativní rychlosti na molárním poměru při titraci dodekameru argininu do roztoku hyaluronanu o molekulové hmotnosti 680 kDa v prostředích o různých iontových silách. (11,6 MHz, 25 °C)

5.4.2 Výsledky z ITC

Metoda izotermické titrační kalorimetrie umožnila získání základních termodynamických parametrů interakcí mezi hyaluronanem a oligomery argininu. Po odečtení rozpouštěcích tepel od titrací, byly všechny interakce endotermického charakteru, jak ukazují data v tabulce (Tabulka 15).

Byly pozorovány tři druhy titračních křivek (závislosti změny entalpie na molárním poměru v průběhu titrace). Kromě sigmoidního tvaru, který je typický pro systémy s vysycením interakce v průběhu titrace, byl pozorován také prostý pokles a křivky dvou typů vazných míst.

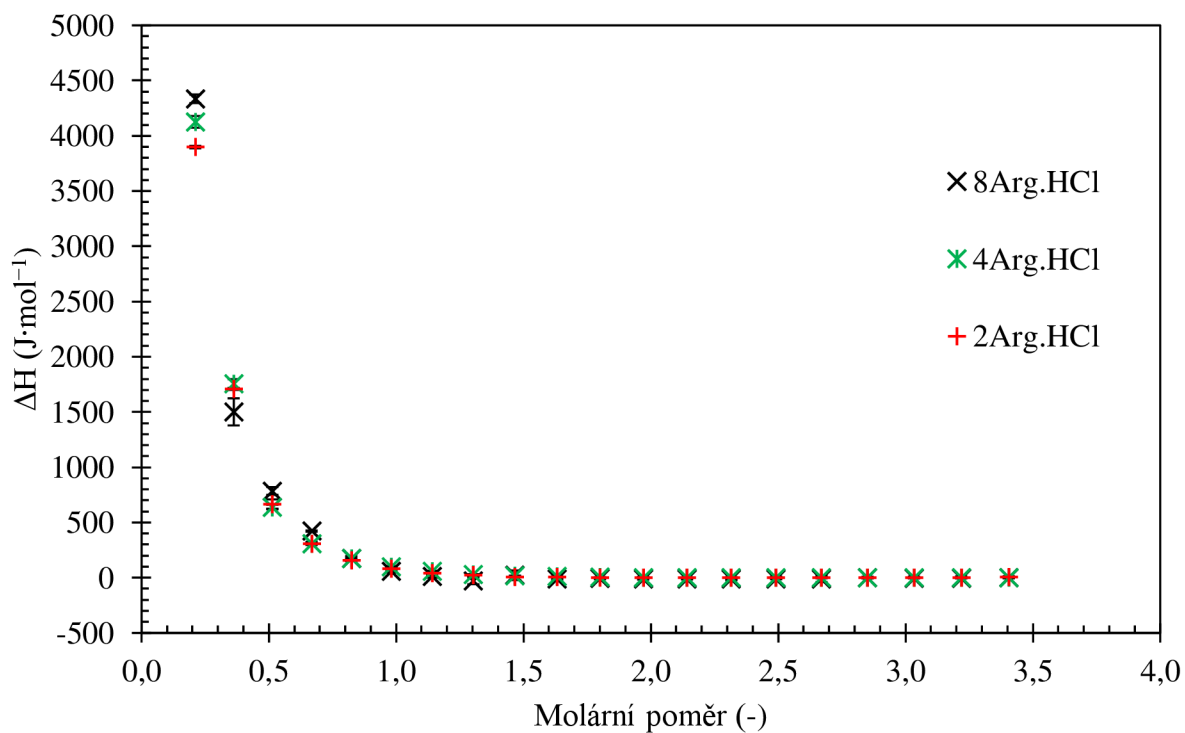
Pro nejkratší oligomery argininu (včetně oktameru), nezávisle na molekulové hmotnosti hyaluronanu, nebyl pozorován typický sigmoidní tvar. Jak ukazuje graf na obrázku (Obrázek 36, Obrázek 37), u všech závislostí docházelo k prudkému poklesu tepla přibližně do molárního poměru 1, s rostoucím molárním poměrem nebyly další tepelné efekty pozorovány. Tyto křivky připomínaly klesající část typické sigmoidní křivky, která indikuje nasycení vazných míst a konec interakcí. Vizuálně roztoky s dimerem a tetramerem argininu zůstaly čiré, zatímco oktamer a nízká molekulová hmotnost hyaluronanu tvořila v nízkých molárních poměrech jemný zákal. V případě vysoké molekulové hmotnosti hyaluronanu pak s oktamerem argininu docházelo až k tvorbě sraženiny kolem molárního poměru 1 (Tabulka 12). Tato pozorování však ITC nereflektovala a všechny systémy byly prakticky nerozlišitelné, jak ukazují data v grafu na obrázku (Obrázek 36). Z těchto titračních křivek byla stanovena pouze celková změna standardní entalpie (ΔH° , Tabulka 15) jako rozdíl mezi prvním a posledním přidavkem [173]. Z dat uvedených v tabulce (Tabulka 15) je patrné, že molekulová hmotnost hyaluronanu

výrazně ovlivňovala velikost změny standardní reakční entalpie v průběhu titrace. S rostoucí molekulovou hmotností hyaluronanu docházelo k nárůstu velikosti změny standardní reakční entalpie.

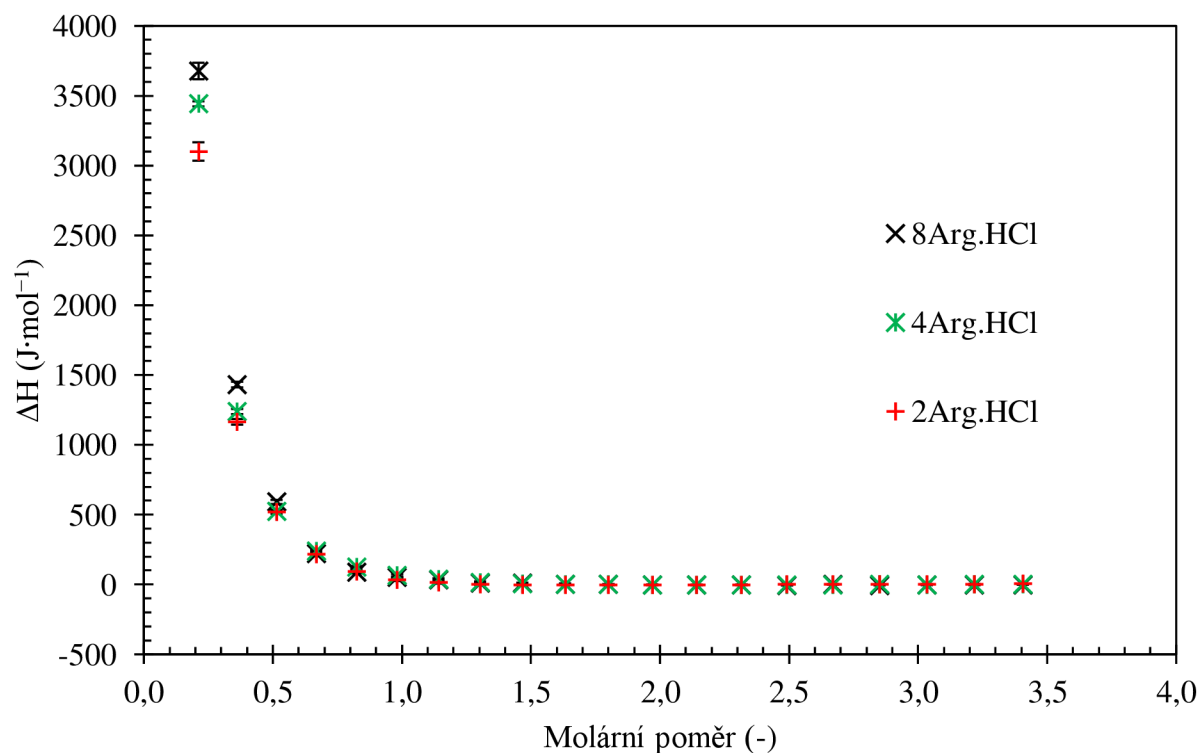
Tabulka 15: Shrnutí parametrů titrací oligomerů argininu do roztoků hyaluronanu stanovených pomocí ITC ve vodě (25 °C). N je molární poměr definovaný jako inflexní bod v ITC záznamu (bod nasycení interakce v textu), ΔH° , ΔG° , $-T\Delta S^\circ$ jsou definované na mol základní hyaluronanové jednotky.

Oligomer argininu	Hya Mw (kDa)	N (-)	ΔH° (kJ·mol ⁻¹)	K_D (M)	ΔG° (kJ·mol ⁻¹)	$-T\Delta S^\circ$ (kJ·mol ⁻¹)
Dimer	9	-	*3,10 ± 0,06	-	-	-
	1 540	-	*3,894±0,002	-	-	-
Tetramer	9	-	*3,44 ± 0,02	-	-	-
	1 540	-	*4,13 ± 0,05	-	-	-
Oktamer	9	-	*3,68 ± 0,06	-	-	-
	1 540	-	*4,33 ± 0,04	-	-	-
Oktamer, upravené pH	9	-	*3,21 ± 0,17	-	-	-
	1 540	1,5 ± 0,2	2,3 ± 0,4	(1,5 ± 1,3)·10 ⁻⁵	-28 ± 3	-31 ± 2
Dodekamer	9	1,02 ± 0,02	3,41 ± 0,05	(4 ± 2)·10 ⁻⁴	-19,4 ± 1,1	-22,8 ± 1,1
	109	0,91 ± 0,05	3,5 ± 0,2	(2,9 ± 1,1)·10 ⁻⁵	-26,1 ± 1,0	-29,5 ± 0,9
	137	0,88 ± 0,08	3,59 ± 0,19	(3,9 ± 0,9)·10 ⁻⁵	-25,3 ± 0,5	-28,9 ± 0,5
	680	0,89 ± 0,09	3,8 ± 0,2	(3 ± 2)·10 ⁻⁵	-25,8 ± 1,3	-29,7 ± 1,3
	1 540	0,98 ± 0,02	4,33 ± 0,12	(2,2 ± 0,4)·10 ⁻⁵	-26,6 ± 0,5	-31,0 ± 0,6
Triakontamer	9	1,04 ± 0,04	2,16 ± 0,04	(1,3 ± 0,7)·10 ⁻⁵	-29 ± 2	-31 ± 2
	16	1,11 ± 0,06	2,28 ± 0,04	(3,8 ± 1,7)·10 ⁻⁶	-31,2 ± 1,1	-33,5 ± 1,1
	109	1,09 ± 0,05	2,50 ± 0,14	(5 ± 3)·10 ⁻⁷	-36,2 ± 1,6	-39 ± 2
	137	1,11 ± 0,04	2,45 ± 0,11	(4 ± 7)·10 ⁻⁷	-38 ± 5	-40 ± 5
	310	1,03 ± 0,05	2,58 ± 0,05	(4 ± 3)·10 ⁻⁷	-38 ± 5	-41 ± 5
	680	0,97 ± 0,04	3,2 ± 0,1	(3 ± 5)·10 ⁻⁶	-39 ± 8	-42 ± 8
	1 540	1,02 ± 0,11	3,5 ± 0,3	(5 ± 5)·10 ⁻⁷	-37 ± 3	-40 ± 3

*viz text v části 5.4.2



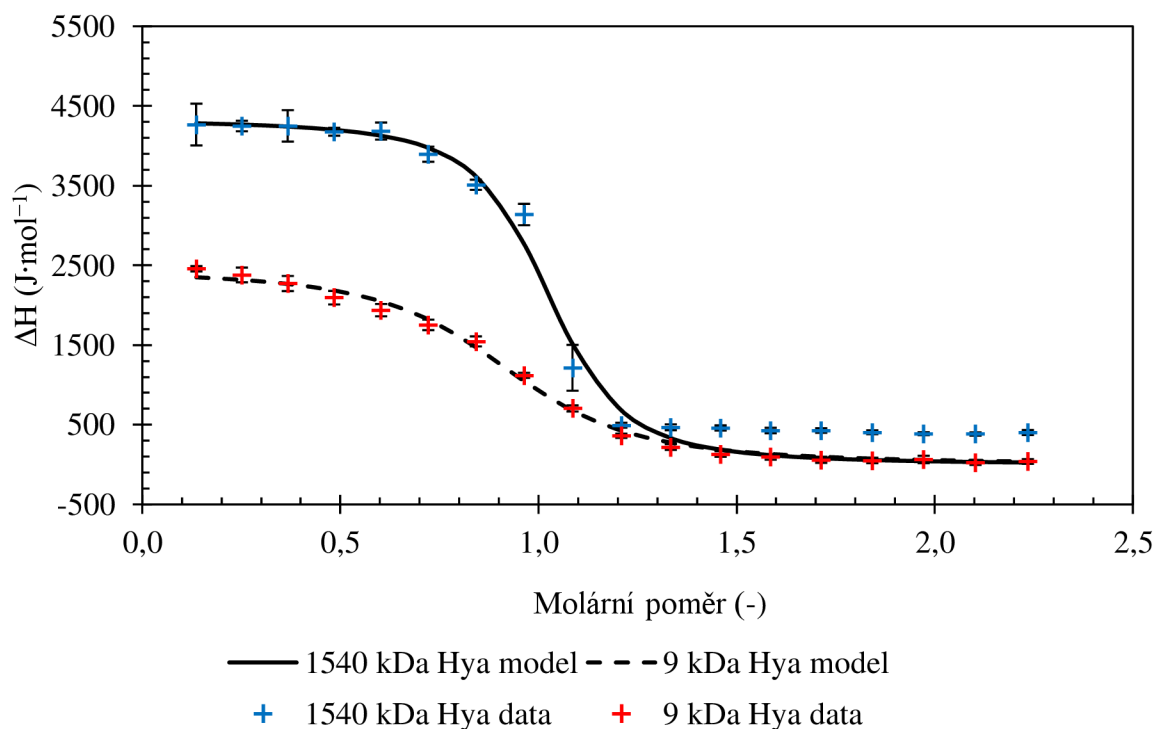
Obrázek 36: Graf zobrazující ITC záznamy různých argininových oligomerů ve formě hydrochloridu do roztoku 1 540 kDa hyaluronanu ve vodě (25 °C).



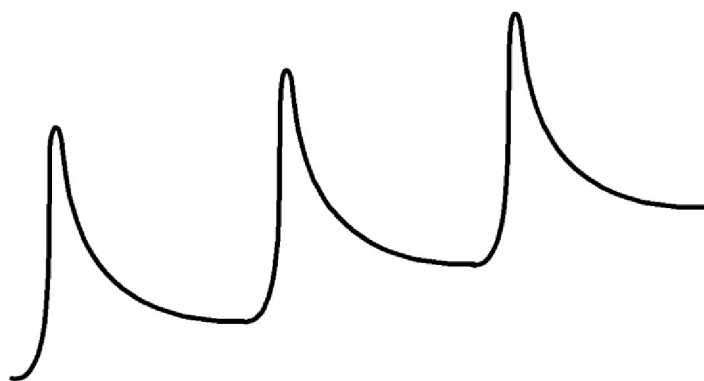
Obrázek 37: Graf zobrazující ITC záznamy různých argininových oligomerů ve formě hydrochloridu do roztoku 9 kDa hyaluronanu ve vodě (25 °C).

V případě dodekameru a tirakontameru argininu byl při interakcích s hyaluronanem získán typický sigmoidní tvar titračních křivek. Příklad je uveden v grafu na obrázku (Obrázek 38). Tento tvar titrační křivky ukazoval na přítomnost interakcí mezi hyaluronanem a oligomerem

argininu od prvního přídavku oligomeru až do vyčerpání vazných míst na hyaluronanu v okolí nábojového poměru 1 u všech studovaných případů. Sigmoidní tvar byl pozorován rovněž v případě oktameru argininu s upraveným pH při titraci do vysokomolekulárního hyaluronanu. V tomto případě byl inflexní bod posunut k vyššímu molárnímu poměru přibližně 1,5. V tomto systému byl také dobře pozorovatelný posun základní linie díky změně tepelné kapacity systému [186] v důsledku tvorby sraženin, který je vyobrazen na obrázku (Obrázek 39).



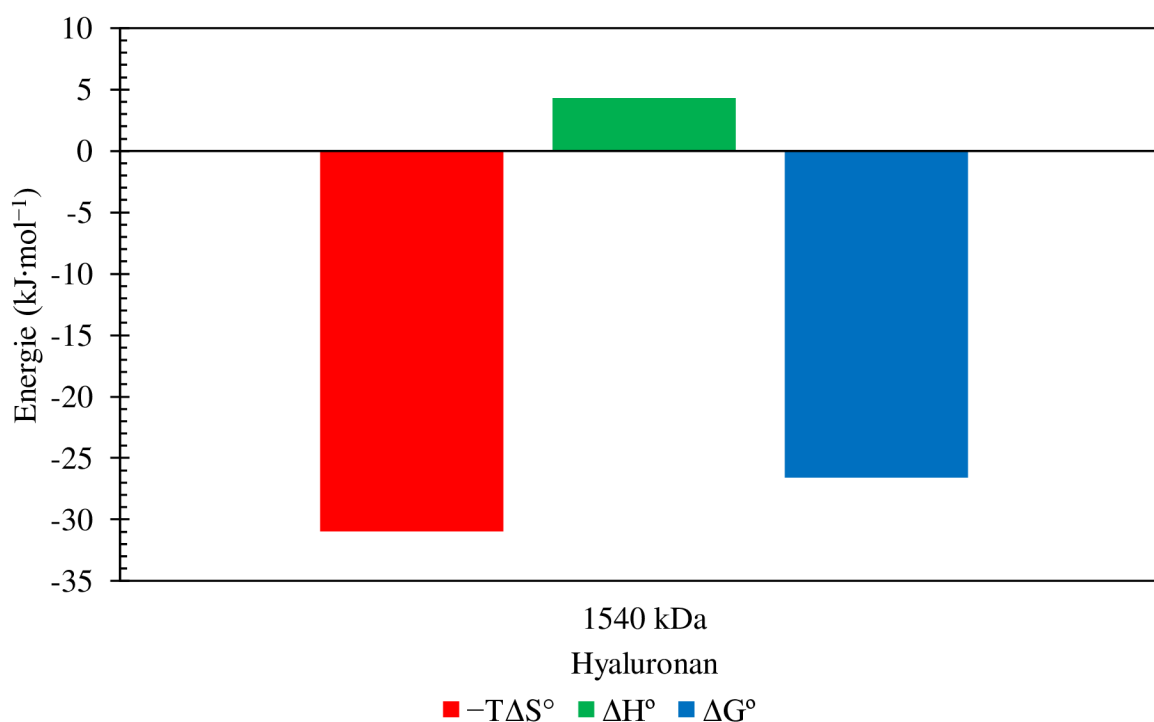
Obrázek 38: Graf zobrazující ITC záznamy titrací argininu dodekameru v hydrochloridové formě do roztoku 9 a 1 540 kDa hyaluronanu ve vodě (25 °C). Pro vyhodnocení dat byl použit model jednoho typu vazného místa.



Obrázek 39: Schodovitý posun základní linie díky změně v tepelné kapacitě systému

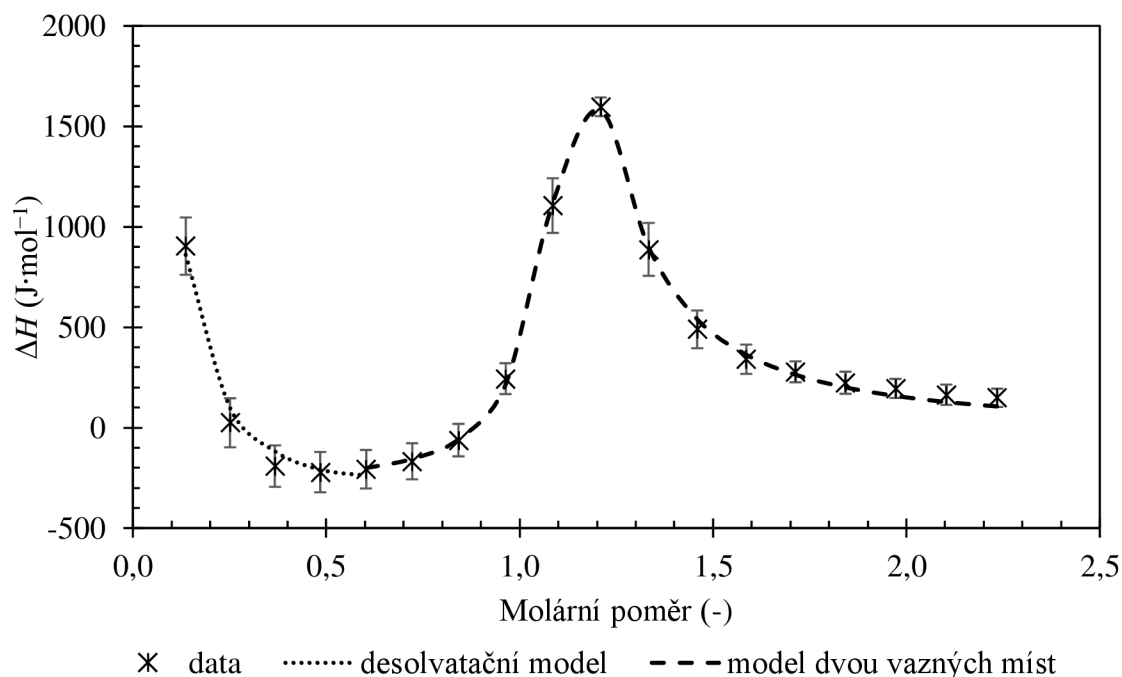
Pro stanovení termodynamických parametrů byly titrace s typickým sigmoidním tvarem prokládány modelem jednoho typu vazného místa. Využíván byl software, který je součástí zařízení (viz kapitola 5.3.3). Získané parametry jsou ukázány v tabulce (Tabulka 15). Termodynamické parametry interakcí pro různé oligomery argininu se příliš nelišily a poměr standardních entalpických a standardních entropických příspěvků byl velmi podobný.

Ilustrativní příklad je zobrazen v grafu na obrázku (Obrázek 40) pro arginin dodekamer. Interakce mezi oligomerem argininu a hyaluronanem byly charakterizovány malou nepříznivou hodnotou standardní entalpie a byly hnané entropicky. Nejnižší molekulová hmotnost hyaluronanu měla nejvyšší hodnotu disociační konstanty, zatímco molekulové hmotnosti hyaluronanu nad 109 kDa měly přibližně stejnou hodnotu disociační konstanty, která byla nižší. Navíc triakontamer argininu měl celkově nižší hodnotu disociační konstanty ve srovnání s dodekamerem argininu. Disociační konstanta byla nicméně stanovena s poměrně vysokou chybou díky vysoké citlivosti modelu na prudkou změnu titrační křivky, ze které byla disociační konstanta stanovena. Proto bylo možné tuto konstantu použít pouze pro odhad relativních rozdílů mezi různými titrovanými systémy.

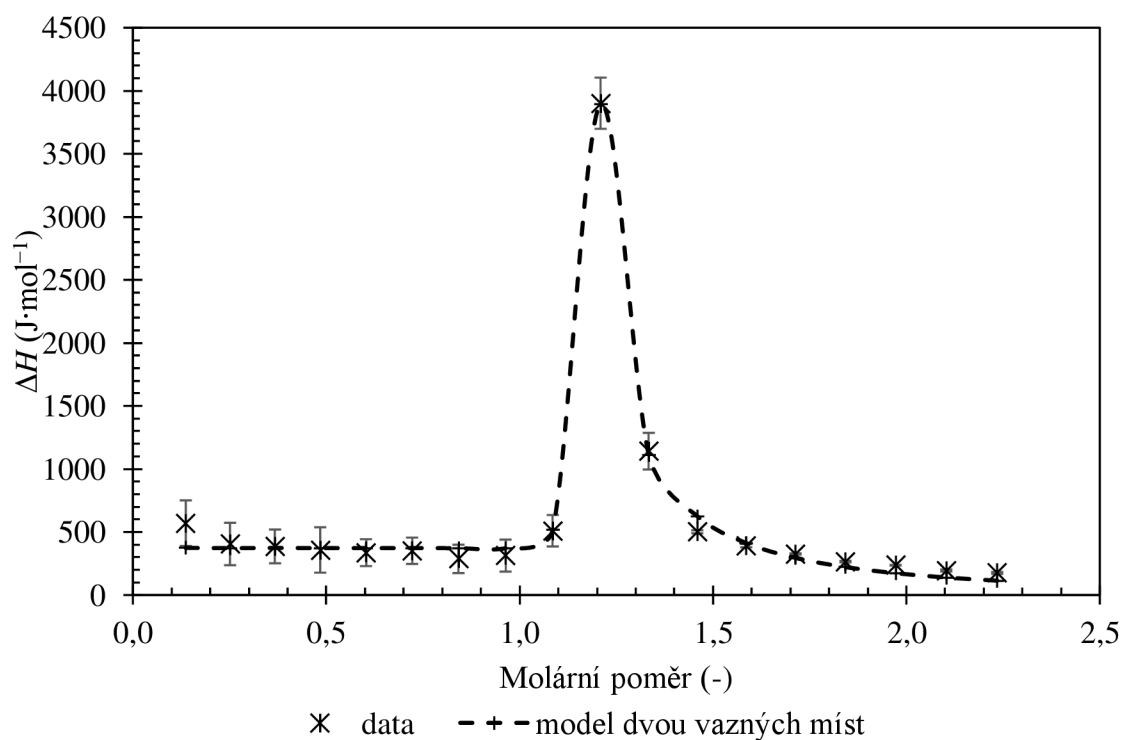


Obrázek 40: Příklad zastoupení termodynamických parametrů z ITC pro interakce argininu dodekameru v hydrochloridové formě s hyaluronanem o molekulové hmotnosti 1 540 kDa ve vodě (25°C).

Dekamer argininu byl z hlediska ITC unikátní oligomer. Příklad jeho titrační izotermy je uveden na obrázku (Obrázek 41). Titrační izoterma neměla typický sigmoidní nebo pouze klesající tvar, který byl pozorovatelný u nejkratších oligomerů, ale její tvar byl typický pro přítomnost několika typů vazných míst [170, 187], v tomto případě se jevil jako lepší výraz interakčních událostí.



Obrázek 41: Graf zobrazující ITC záznam titrací argininu dekameru v hydrochloridové formě do roztoku 9 kDa hyaluronanu ve vodě (25 °C). Model dvou typů vazných míst a desolvatační model byly použity pro vyhodnocení dat.



Obrázek 42: Graf zobrazující ITC záznam titrací argininu dekameru v hydrochloridové formě do roztoku 1 540 kDa hyaluronanu ve vodě (25 °C). Model dvou typů vazných míst byl použit pro vyhodnocení dat.

Prokládání naměřených výsledků bylo realizováno následovně. Data v grafu na obrázku (Obrázek 41) byla proložena dvěma modely. První model proložil klesající část izotermy, druhý model proložil zbylou část s maximem. První část izotermy připomínala data získaná z měření s krátkými argininovými oligomery (Obrázek 37) a byla proto nazvána desolvatačním modelem (částí). Druhá část byla proložena modelem dvou typů vazných míst zabudovaným přímo ve vyhodnocovacím softwaru a zde reprezentovala první a druhou interakční událost. Vyhodnocování se lišilo s molekulovou hmotností hyaluronanu. Všechny typy interakčních událostí byly pozorovatelné pro nejnižší molekulovou hmotnost hyaluronanu. S rostoucí molekulovou hmotností hyaluronanu desolvatační část vymizela a zůstaly pouze dvě interakční události, jak ukazuje graf na obrázku (Obrázek 42). Maximum v části dvou interakčních událostí bylo pozorováno stále za stejného molárního poměru, nezávisle na molekulové hmotnosti hyaluronanu. Termodynamické parametry pro každou studovanou molekulovou hmotnost jsou znázorněny v tabulce (Tabulka 16).

Tabulka 16: Parametry stanovené z ITC experimentů pro arginin dekamer (25 °C). *N* je molární poměr definovaný jako inflexní bod v ITC záznamu (bod nasycení interakce v textu), ΔH° , ΔG° , $-T\Delta S^\circ$ jsou definované na mol základní hyaluronanové jednotky.

Vazný model	10 Arg-HCl				
	<i>N</i> (-)	ΔH° (kJ·mol ⁻¹)	K_D (M)	ΔG° (kJ·mol ⁻¹)	$-T\Delta S^\circ$ (kJ·mol ⁻¹)
9 kDa Hya model jednoho typu vazného místa	0,030 ± 0,002	15 ± 2	(1 ± 0)·10 ⁻¹²	-69 ± 0	-84 ± 2
9 kDa Hya první interakční událost	1,12 ± 0,01	-0,5 ± 0,06	(4,7 ± 0,7)·10 ⁻⁶	-30,4 ± 0,6	-28,6 ± 0,4
9 kDa Hya druhá interakční událost	0,85 ± 0,03	2,5 ± 0,3	(3 ± 2)·10 ⁻⁴	-42 ± 5	-45 ± 9
109 kDa Hya první interakční událost	0,3 ± 0,2	22 ± 12	(3 ± 3)·10 ⁻⁴	-22 ± 3	-45 ± 9
109 kDa Hya druhá interakční událost	1,06 ± 0,02	-0,12 ± 0,03	(2 ± 1)·10 ⁻¹²	-67 ± 2	-67 ± 2
310 kDa Hya první interakční událost	1,06 ± 0,03	0,33 ± 0,03	(3 ± 3)·10 ⁻¹²	-67 ± 3	-66 ± 4
310 kDa Hya druhá interakční událost	0,32 ± 0,02	8,5 ± 0,7	(2,2 ± 1,2)·10 ⁻⁴	-28 ± 1,5	-37 ± 0,4
1 540 kDa Hya první interakční událost	0,10 ± 0,04	9 ± 4	(2,9 ± 1,4)·10 ⁻⁴	-21 ± 2	-31 ± 3
1 540 kDa Hya druhá interakční událost	1,09 ± 0,01	0,38 ± 0,04	(6,2 ± 1,2)·10 ⁻¹²	-63,8 ± 0,5	-64,2 ± 0,4

5.4.2.1 Vliv prostředí

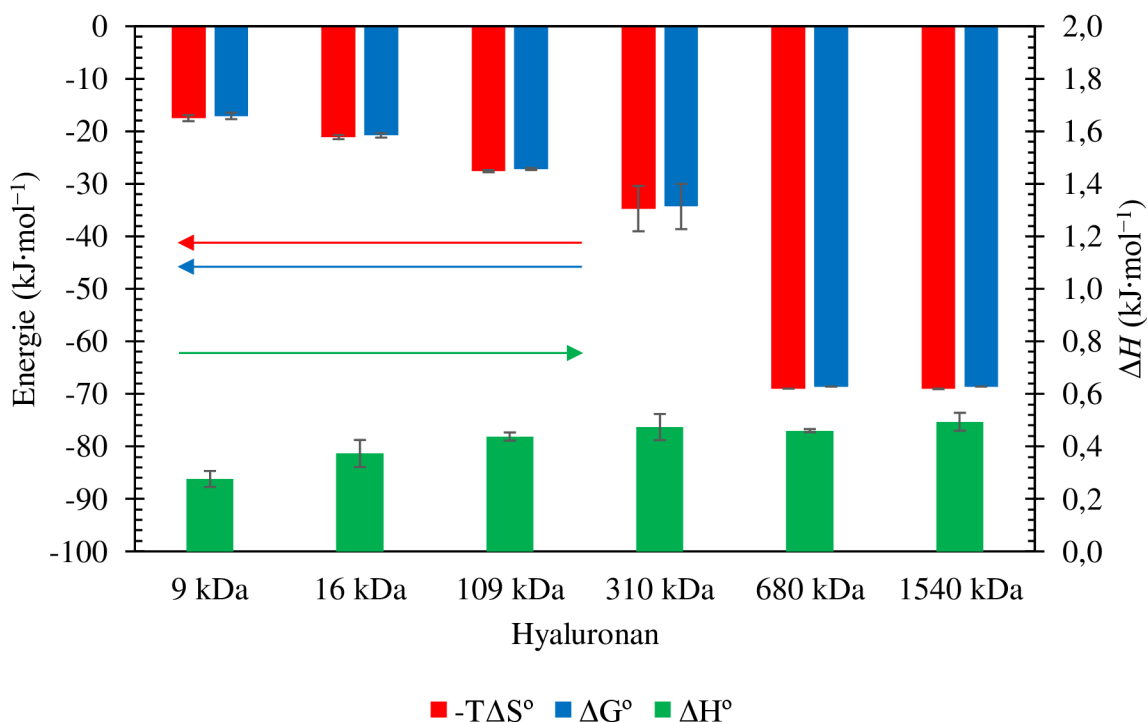
Stejně jako v případě ultrazvukové spektroskopie byly pro experimenty se zvýšenou iontovou silou vybrány nejdelší oligomery argininu. Na rozdíl od triakontameru argininu, dodekamer a dekamer argininu v prostředí PBS (pH 7,4) nevykázaly žádné interakce nezávisle na molekulové hmotnosti hyaluronanu (nebylo zaznamenáno měřitelné teplo). V případě

triakontameru argininu byl vždy pozorován sigmoidní tvar titrační křivky a vliv PBS na interakce hyaluronan-triakontamer argininu byl studován pomocí modelu s jedním vazným místem. Odhadované termodynamické parametry jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 17). Molární poměr odpovídající vysycení vazných míst (inflexní bod na ITC křivce) se zvyšoval s rostoucí molekulovou hmotností hyaluronanu až k 1,5. Velikost standardní interakční entalpie byla o řád nižší v porovnání s roztoky připravenými pouze ve vodě. Stejně jako v případě vodných roztoků byly interakce hnány standardním entropickým příspěvkem (Obrázek 43). Významný standardní entropický příspěvek v případě molekulových hmotností hyaluronanu 680 a 1 540 kDa v porovnání s ostatními molekulovými hmotnostmi byl způsoben nízkou hodnotou disociační konstanty pro tyto molekulové hmotnosti, jak ukazují data v tabulce (Tabulka 17).

Tabulka 17: Parametry stanovené z ITC experimentů pro arginin triakontamer v prostředí PBS (25 °C). N je molární poměr definovaný jako inflexní bod v ITC záznamu (bod nasycení interakce v textu), ΔH° , ΔG° , $-T\Delta S^\circ$ jsou definované na mol základní hyaluronanové jednotky.

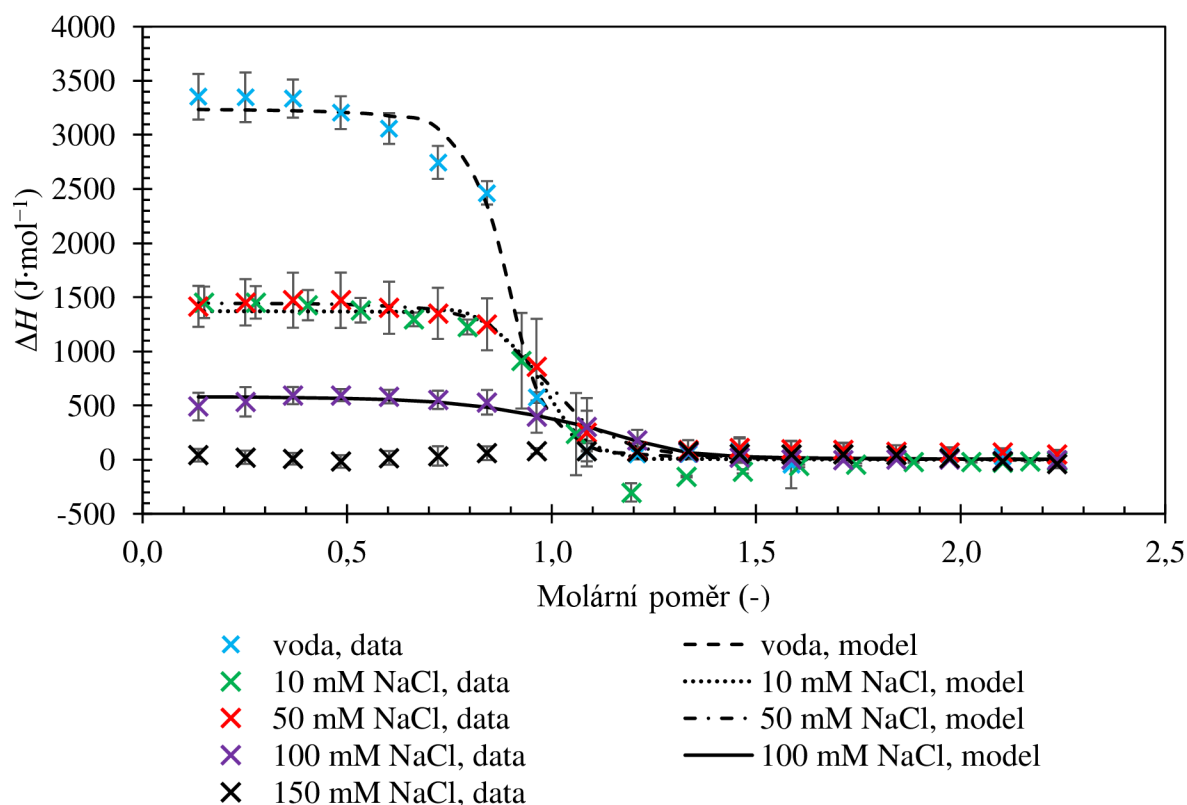
Oligomer argininu	Hya Mw (kDa)	N (-)	ΔH° (kJ·mol ⁻¹)	K_D (M)	ΔG° (kJ·mol ⁻¹)	$-T\Delta S^\circ$ (kJ·mol ⁻¹)
Triakontamer	9	0,93 ± 0,03	0,27 ± 0,03	(1,1 ± 0,3)·10 ⁻³	-17,1 ± 0,6	-17,5 ± 0,6
	16	1,07 ± 0,04	0,37 ± 0,05	(2,4 ± 0,4)·10 ⁻⁴	-20,8 ± 0,4	-21,1 ± 0,4
	109	1,42 ± 0,06	0,44 ± 0,02	(1,76 ± 0,14)·10 ⁻⁵	-27,2 ± 0,2	-27,6 ± 0,2
	310	1,37 ± 0,04	0,47 ± 0,05	(3 ± 5)·10 ⁻⁶	-34 ± 4	-34,7 ± 4,3
	680	1,46 ± 0,05	0,46 ± 0,01	(1,0 ± 0,0)·10 ⁻¹²	-69 ± 0	-69 ± 0
	1 540	1,47 ± 0,06	0,49 ± 0,03	(1,0 ± 0,0)·10 ⁻¹²	-69 ± 0	-69,05 ± 0,05

Protože arginin dodekamer nebyl schopen interagovat s hyaluronanem v PBS, byl tento oligomer vybrán pro testování efektu zvyšující se iontové síly. K testování byly určeny roztoky s koncentracemi 10, 50, 100 a 150 mM NaCl. Všechny titrace probíhaly s hyaluronanem o molekulové hmotnosti 680 kDa a s výjimkou 150 mM NaCl vykázaly všechny vzorky sigmoidní titrační křivku, jak ukazuje graf na obrázku (Obrázek 44). V případě 150 mM NaCl již interakce nebyly rozpoznatelné (nebylo zaznamenáno měřitelné teplo). Vyhodnocená data v tabulce (Tabulka 18) ukazují, že molární poměr odpovídající vysycení vazných míst zůstal kolem 1 a nedocházelo tedy k posunu pozorovanému v případě PBS roztoků. Velikost změny standardní interakční entalpie klesala s rostoucí iontovou silou, zatímco disociační konstanta zůstávala přibližně konstantní (Tabulka 18). Příspěvky v podobě změny standardní Gibbsovy energie a standardní entropie se zdály neovlivněné velikostí iontové síly. Z naměřených dat vyplývá, že iontová síla neměla významný vliv na intenzitu interakcí, pokud nebyla dostatečně vysoká (koncentrace NaCl 150 mM).



Obrázek 43: Zastoupení termodynamických parametrů z ITC pro interakce argininu trikontameru v hydrochloridové formě s hyaluronanem o různých molekulových hmotnostech v prostředí PBS (25°C).

Dekamer argininu, který vykázal velmi specifické chování zaznamenané pomocí ITC ve vodě, nevykázal žádné měřitelné interakce v prostředí PBS nezávisle na molekulové hmotnosti hyaluronanu. Vizualně roztok zůstal čirý po celou dobu titrace (Tabulka 13). V prostředích 10 a 50 mM NaCl dekamer argininu interagoval s hyaluronanem o molekulových hmotnostech 9 a 1 540 kDa obdobně. Vytvářel zakalené systémy s nízkou molekulovou hmotností hyaluronanu a sraženiny s vysokomolekulárním hyaluronanem (Tabulka 14). Všechny vzorky s vysokou molekulovou hmotností ukázaly sigmoidní titrační křivku s ještě menší hodnotou standardní interakční entalpie než jaká byla naměřená v případě dodekameru argininu ve shodném prostředí. Vzorky s nízkomolekulárním hyaluronanem vykázaly naopak pouhý pokles, podobný kratším oligomerům argininu. Z titračních křivek s 9 kDa hyaluronanem byla spočítána pouze celková změna změřené entalpie jako rozdíl mezi prvním a posledním přidavkem. Sigmoidní závislosti byly vyhodnoceny pomocí standardního modelu jednoho typu vazného místa. Výsledky individuálních titrací jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 19). Specifické chování dekameru argininu bylo potlačeno přítomností dalších iontů v roztoku.



Obrázek 44: Graf zobrazující ITC záznamy titrací argininu dodekameru v hydrochloridové formě do roztoku hyaluronanu o molekulové hmotnosti 680 kDa v prostředích o různých iontových silách (25 °C). Pro vyhodnocení dat byl použit model jednoho vazného místa.

Tabulka 18: Parametry stanovené z ITC experimentů pro arginin dodekamer v prostředích o různé iontové síle (25 °C). N je molární poměr definovaný jako inflexní bod v ITC záznamu (bod nasycení interakce v textu), ΔH° , ΔG° , $-T\Delta S^\circ$ jsou definované na mol základní hyaluronanové jednotky.

680 kDa Hya + 12 Arg·HCl					
Koncentrace NaCl (mM)	N (-)	ΔH° (kJ·mol ⁻¹)	K_D (M)	ΔG° (kJ·mol ⁻¹)	$-T\Delta S^\circ$ (kJ·mol ⁻¹)
voda	0,89 ± 0,09	3,8 ± 0,2	(3 ± 2) · 10 ⁻⁵	-25,8 ± 1,3	-29,7 ± 1,3
10 mM	0,96 ± 0,05	1,5 ± 0,2	(2,3 ± 2,9) · 10 ⁻⁶	-32 ± 4	-34 ± 4
50 mM	0,94 ± 0,04	1,4 ± 0,2	(1,7 ± 2,1) · 10 ⁻⁵	-28,5 ± 2,8	-29 ± 3
100 mM	0,98 ± 0,14	0,62 ± 0,05	(3 ± 1) · 10 ⁻⁵	-26,2 ± 1,5	-26,8 ± 1,5
150 mM	--	--	--	--	--

Tabulka 19: Parametry stanovené z ITC experimentů pro arginin dekamer v prostředích o různé iontové síle (25 °C). N je molární poměr definovaný jako inflexní bod v ITC záznamu (bod nasycení interakce v textu), ΔH° , ΔG° , $-T\Delta S^\circ$ jsou definované na mol základní hyaluronanové jednotky.

Hya Mw / koncentrace NaCl	Hya + 10 Arg·HCl				
	$N (-)$	ΔH° (kJ·mol ⁻¹)	$K_D (M)$	ΔG° (kJ·mol ⁻¹)	$-T\Delta S^\circ$ (kJ·mol ⁻¹)
9 kDa / 10 mM	--	1,00 ± 0,11	--	--	--
1 540 kDa / 10 mM	1,01 ± 0,10	0,52 ± 0,07	(1,2 ± 1,6) · 10 ⁻⁵	-31 ± 7	-32 ± 7
9 kDa / 50 mM	--	0,283 ± 0,012	--	--	--
1 540 kDa / 50 mM	0,95 ± 0,05	0,71 ± 0,06	(4,5 ± 2,2) · 10 ⁻⁶	-31 ± 5	-31 ± 4

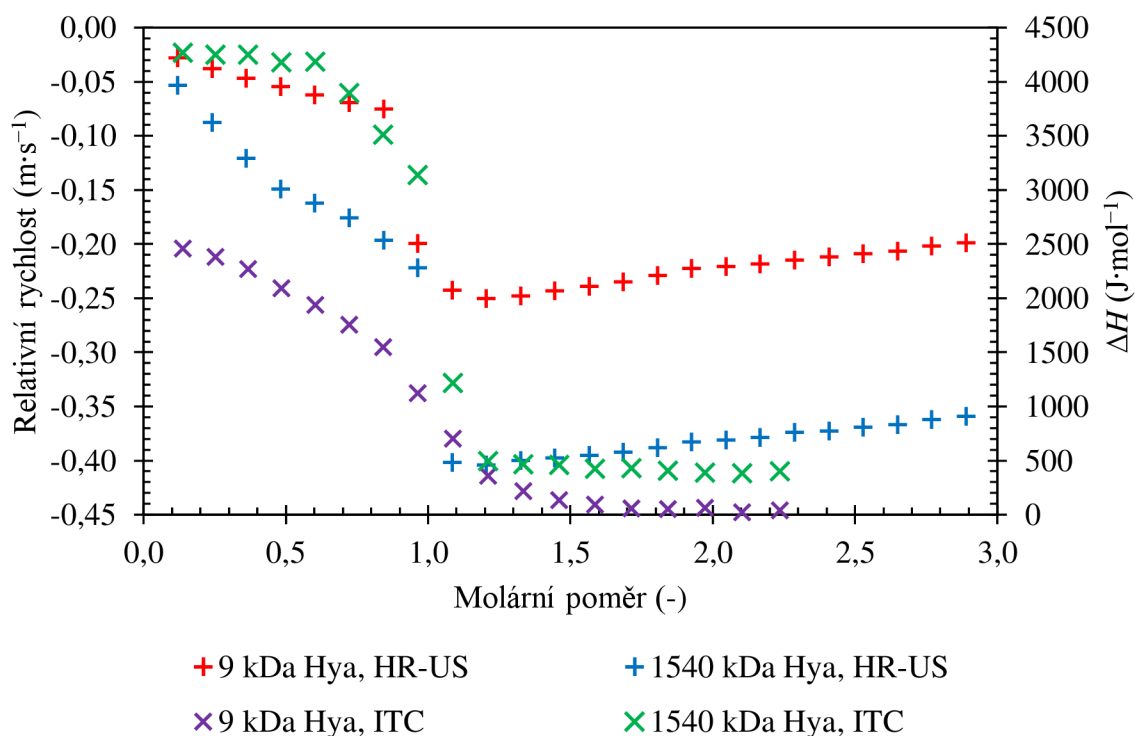
5.5 Diskuse

V případě monomerního argininu a oligomerů argininu až po tetramer (včetně) nebyly pro roztoky připravené ve vodě pozorovány žádné interakce nezávisle na použité molekulové hmotnosti hyaluronanu. Nepřítomnost interakcí se nezměnila ani po úpravě pH. Relativní ultrazvuková rychlost zůstávala konstantní (Obrázek 19–Obrázek 25), ITC záznam vykázal prostý pokles (Obrázek 36, Obrázek 37), vizuální pozorování v průběhu titrací neodhalila vznik zákalu nebo sraženiny a roztoky zůstaly čiré (Tabulka 12). Pouze klesající velikost entalpie byla zřídka publikována v literatuře. Podobné výsledky byly publikované pro vazbu dvou 9-O-(ω -amino) alkyl etherových analogů na RNA triplex [188], ovšem v exotermním směru a bez zvláštních komentářů autorů, kteří tuto křivku považovali za část tradiční sigmoidní křivky. Pokud bychom vzali do úvahy výsledky vizuálního pozorování a ultrazvukové spektroskopie, je možné, že tvar prostého poklesu byl pravděpodobně způsoben směšovacími teplem nebo entalpií míšení, které se vytrácejí s rostoucí koncentrací směsi hyaluronan-arginin.

Typická sigmoidní křivka na ITC byla získána pro arginin dodekamer a triakontamer (Tabulka 12) při interakcích spolu se všemi studovanými molekulovými hmotnostmi hyaluronanu. Záznamy z ITC dobře korespondovaly s daty získanými pomocí ultrazvukové spektroskopie, jak ukazuje graf na obrázku (Obrázek 45) pro arginin dodekamer. Prudký pokles na sigmoidní křivce korespondoval s náhlým poklesem relativní ultrazvukové rychlosti. Na druhou stranu ultrazvuková rychlost byla více senzitivní ke změnám odehrávajícím se v průběhu první části titrace, kde ITC zaznamenala prakticky konstantní hodnoty měřené změny entalpie ΔH . Obě techniky pak ukázaly, že se interakce lišily při použití různých molekulových hmotností hyaluronanu.

Pokles v relativní rychlosti obvykle indikuje změnu v hydratačních obalech molekul. Protože je voda v hydratačním obalu méně stlačitelná v porovnání s objemovou vodou [162], je také hustší [163], což pomáhá v šíření zvukových vln [156], dochází k poklesu relativní rychlosti, pokud je voda z hydratačního obalu uvolňovaná. Delší oligomery argininu narušily hydratační obal hyaluronanu za tvorby asociátů se společným hydratačním obalem, který měl méně molekul hydratační vody v porovnání s množstvím molekul hydratační vody obsažené v obou obalech samostatně. Relativní rychlost klesala až do vysycení všech vazebných míst na

hyaluronanu. Poté již k dalšímu uvolňování hydratační vody nedocházelo a relativní rychlost začala pouze mírně růst. Tento nárůst mohl být připsán zvyšujícímu se množství sodných a chloridových protiiontů z hyaluronanu a argininu nebo částečnému rozpouštění precipitátu v důsledku ředění. Bylo zajímavé, že se tyto interakce vysytily kolem molárního poměru 1, přestože by neměly být striktně elektrostatičkého původu. Změny v hydrataci se mohly odehrávat primárně na nabitých skupinách a byly indukovány pomocí elektrostričného efektu [189–192].



Obrázek 45: Porovnání záznamů z HR-US a ITC v průběhu titrací dodekameru argininu v hydrochloridové formě do 9 a 1 540 kDa roztoků hyaluronanu ve vodě. (11,6 MHz, 25 °C)

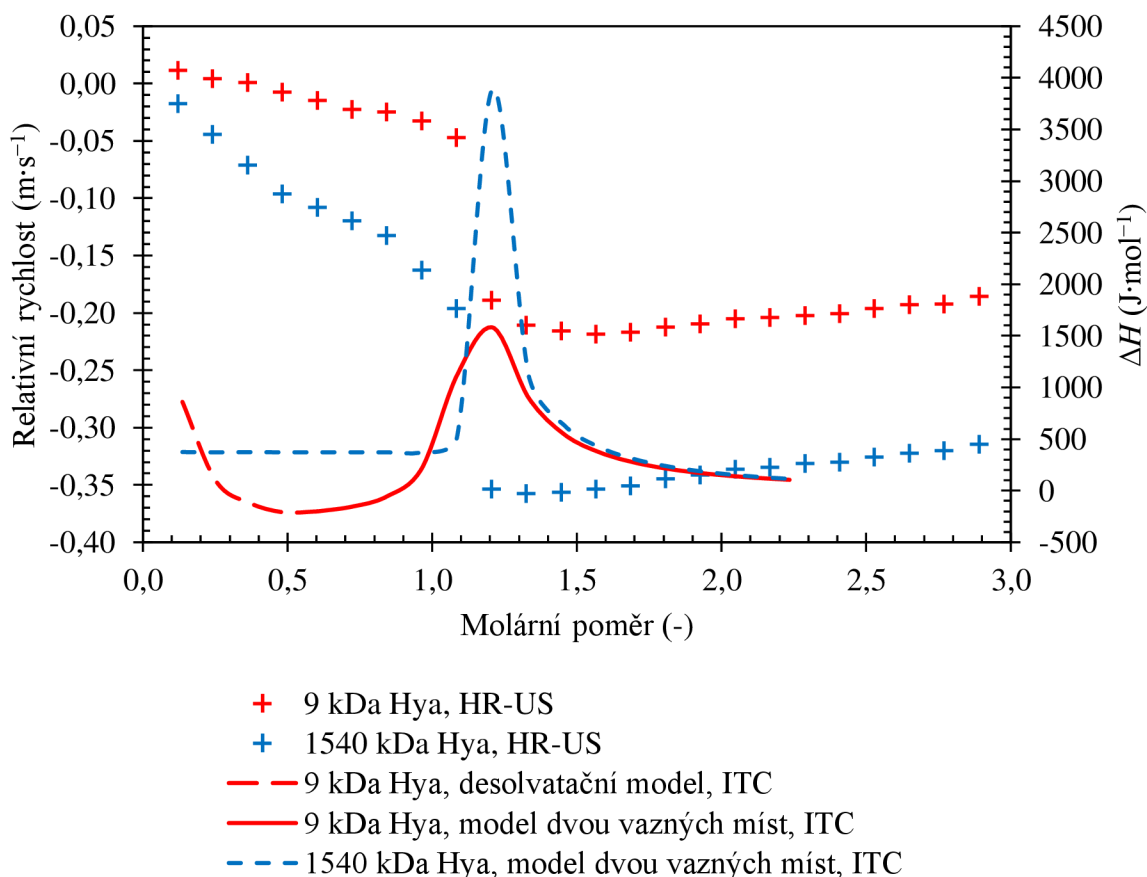
Klesající relativní ultrazvuková rychlost v první části titrace byla připsána hlavně změnám v hydrataci. Více hydratační vody bylo uvolněno s vysokomolekulárním hyaluronanem, neboť relativní rychlost dosahuje větších absolutních hodnot.

Kladná změna entalpie byla přisuzována desolvataci některých neiontových skupin v důsledku interakce [193]. Nové nekovalentní vazby v systému v průběhu interakcí pravděpodobně nevznikaly [194, 195]. Ze záznamů ITC bylo patrné, že Gibbsova volná energie byla tvořena především entropickým příspěvkem. Takto velký entropický příspěvek vznikal pravděpodobně také z uvolnění molekul vody v průběhu titrace [196]. Data tedy ukazovala na důležitou roli destrukce hydratačního obalu při interakcích hyaluronan-arginin. Navíc vztah mezi strmými změnami titračních křivek a molárním poměrem v těchto interakcích ukazoval na zapojení nabitých skupin a elektrostatičkých sil (a elektrostričce).

Byl také pozorován kombinovaný vliv molekulových hmotností oligomerů argininu a hyaluronanu u dekameru, dodekameru a triakontameru argininu. Nižší hodnoty relativní rychlosti byly pozorovány pro hyaluronan o síle 1 540 kDa a dodekamer argininu ve srovnání s hyaluronanem o molekulové hmotnosti 9 kDa. To znamená vyšší množství vody uvolněné

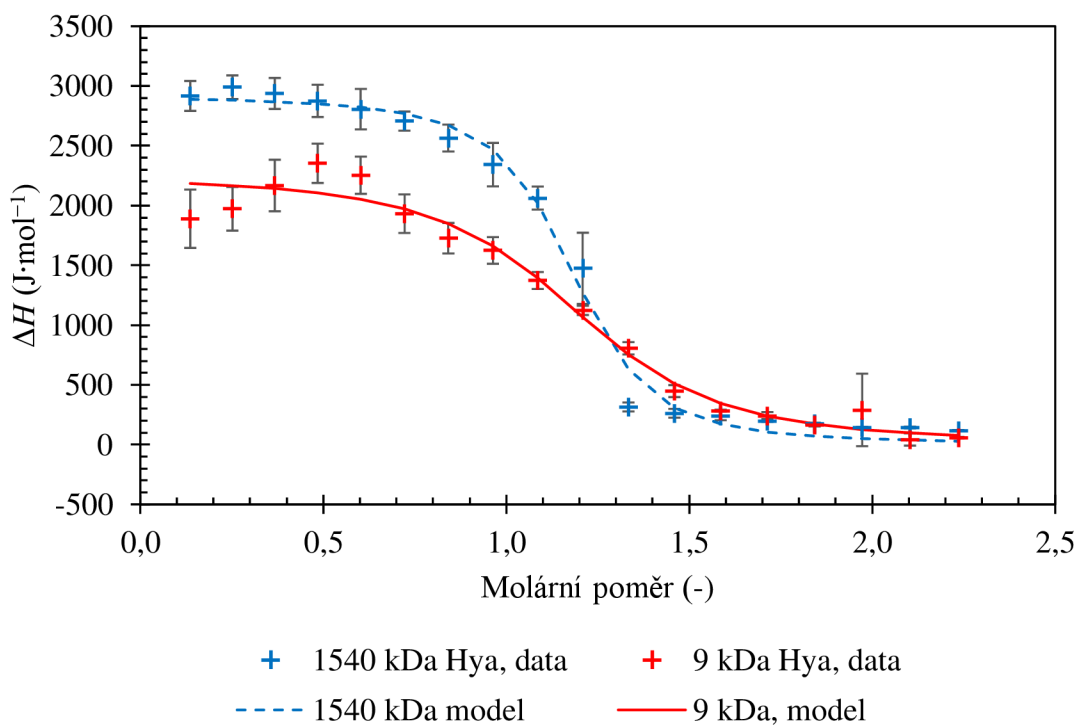
z hyaluronanu s vysokou molekulovou hmotností. To bylo v souladu s menší změnou entalpie a nižším entropickým příspěvkem naměřeným pro hyaluronan o molekulové hmotnosti 9 kDa (Tabulka 15), zejména pro dodekamer a triakontamer argininu. Situace byla podobná pro triakontamer argininu, ale 9 kDa hyaluronan vykázal mírnější pokles na ultrazvukové titrační křivce (Obrázek 31). Pro obě molekulové hmotnosti hyaluronanu byl však pozorován vývoj intenzivního zákalu během titrace triakontamerem argininu, který vyústil ke vzniku sraženiny kolem molárního poměru 1.

Největší rozdíl mezi oběma použitými technikami nastal v případě dekameru argininu. Zatímco ultrazvuková spektroskopie nerozlišovala mezi dekamerem a vyššími oligomery argininu, v případě ITC dekamer vykázal specifické výsledky, které nesdílely rysy jiných oligomerů argininu. Unikátní výsledky dekameru argininu získané pomocí ITC stále do jisté míry připomínaly výsledky ultrazvukových titrací a vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu byl podobný jako v případě dodekameru. Graf na obrázku (Obrázek 46) ukazuje, že maximum na ITC křivce, které bylo přiřazeno přechodu mezi první a druhou interakční událostí, odpovídalo prudkému poklesu v záznamu relativní ultrazvukové rychlosti. První klesající část ITC křivky u systému s 9 kDa hyaluronanem byla do jisté míry podobná ITC křivkám získaných z titrací kratších oligomerů argininu (Obrázek 37) a první části klesající ultrazvukové titrační křivky. Ta byla interpretována pomocí změn v hydrataci. I v této části titrační křivky bylo možné pozorovat interakce vizuálně jako zákal (Tabulka 12), jehož intenzita roste spolu s molekulovou hmotností hyaluronanu. V případě 1 540 kDa hyaluronanu dochází dokonce k tvorbě sraženin kolem molárního poměru 1,2, tedy kolem maxima na ITC křivce, jak je patrné z grafu na obrázku (Obrázek 46). Proto je podobnost mezi klesajícími částmi v nízkých molárních poměrech v grafech na obrázcích (Obrázek 37) a (Obrázek 46) pouze zdánlivá, neboť odrážejí rozdílné procesy s rozdílnými hodnotami ΔH .



Obrázek 46: Porovnání záznamů z HR-US a ITC v průběhu titrací dekameru argininu v hydrochloridové formě do 9 a 1 540 kDa roztoků hyaluronanu ve vodě. (11,6 MHz, 25 °C)

Obě metody používané v této práci neposkytovaly dostatek chemických informací, které by mohly vysvětlit termální chování dekameru argininu v průběhu interakcí s hyaluronanem. U kationtových postranních řetězců argininových oligomerů byla zjištěna schopnost tvorby stejně nabitých kontaktních iontových párů ve vodném prostředí [197]. Přestože tato schopnost není limitovaná počtem monomerních jednotek oligomeru, mohla by tato schopnost vést k odlišnému chování právě dekameru argininu. Je možné, že právě 10 monomerů argininu vede ke specifické dimenzi a tvaru oligomeru argininu, které umožňují specifické interakce s hyaluronanem. Tento požadavek na délku oligomeru argininu je podobný požadavku na vazbu hyaluronanu k primárnímu povrchovému buněčnému receptoru CD44, kde je vyžadován hyaluronan o délce alespoň 3 až 9 disacharidových jednotek pro monovalentní vazbu [34, 198]. Lysin nemá schopnost tvorby stejně nabitých kontaktních iontových párů. Byly provedeny pilotní experimenty s dekamerem lysinu (příprava shodná jako u oligomerních argininů, viz kapitola 5.2.5) a na záznamu z ITC byla nalezena pouze standardní sigmoidní křivka, jak ukazují data v grafu na obrázku (Obrázek 47) a tabulce (Tabulka 20). Pro vysvětlení pozorovaného chování při interakcích by bylo potřeba znát konformace různých argininových oligomerů a hyaluronanu včetně struktury jejich hydratačních obalů. Za účelem řešení tohoto problému byla nedávno zahájena studie molekulárního dynamického modelování.



Obrázek 47: Graf zobrazující ITC záznamy titrací dekameru lysinu v hydrochloridové formě do roztoku hyaluronanu o molekulových hmotnostech 9 a 1540 kDa (25 °C). Pro vyhodnocení dat byl použit model jednoho typu vazného místa.

Tabulka 20: Parametry stanovené z ITC experimentů pro lysin dekamer ve vodě (25 °C). N je molární poměr definovaný jako inflexní bod v ITC záznamu (bod nasycení interakce v textu), ΔH° , ΔG° , $-T\Delta S^\circ$ jsou definované na mol základní hyaluronanové jednotky.

Hya Mw (kDa)	Hya + 10 Lys·HCl				
	N (-)	ΔH° (kJ·mol ⁻¹)	K_D (M)	ΔG° (kJ·mol ⁻¹)	$-T\Delta S^\circ$ (kJ·mol ⁻¹)
9	1,17 ± 0,03	2,26 ± 0,22	(8,2 ± 1,2) · 10 ⁻⁵	-23,4 ± 0,4	-25,6 ± 0,3
1540	1,13 ± 0,03	2,91 ± 0,12	(2,4 ± 0,5) · 10 ⁻⁵	-26,5 ± 0,5	-29,4 ± 0,6

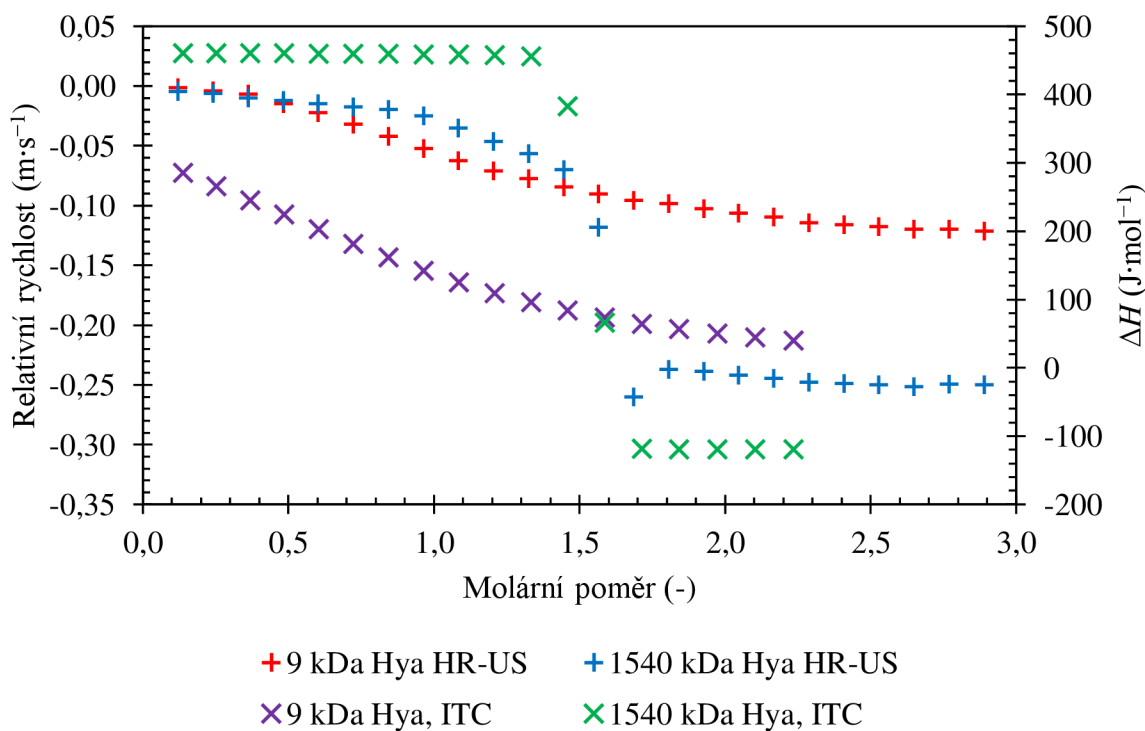
Nejnižší molekulové hmotnosti hyaluronanu 9 a 16 kDa, které jsou v tyčinkové konformaci [20], měly ze všech studovaných molekulových hmotností hyaluronanu ve vodě v případě dodekameru a triakontameru nejnižší absolutní hodnoty standardního entropického příspěvku, stejně jako standardní interakční Gibbsovy energie (Tabulka 15). Entalpický příspěvek narůstal pouze mírně s rostoucí molekulovou hmotností hyaluronanu. V případě odlišného dekameru argininu byl desolvatační model pozorován pouze pro 9 kDa hyaluronan. Pro vyšší molekulové hmotnosti hyaluronanu zůstal pouze model dvou typů vazných míst. Z hlediska ultrazvukové spektroskopie dosáhl 9 kDa hyaluronan nejmenší změny v relativní ultrazvukové rychlosti ze všech studovaných molekulových hmotností hyaluronanu u všech oligomerů. Je tedy pravděpodobné, že tyčinková konformace hyaluronanu uvolňuje v průběhu interakcí menší množství hydratační vody [196]. Naopak ostatní molekulové hmotnosti hyaluronanu v konformaci náhodného klubka [199] mají entropický příspěvek pro daný oligomer argininu ve vodě přibližně stejný. Hyaluronan s molekulovou hmotností 109 kDa, jehož konformace je

na blízko přechodu mezi tyčinkou a náhodným klubkem [21], se podle mikrokalorimetrických měření a dat z HR-US jevil při interakcích s oligomery argininu více jako náhodné klubko.

Interakce argininových oligomerů s nejkratším hyaluronanem také vykazala nejvyšší citlivost na přítomnost dalších iontů v roztoku. Tyto interakce byly nejvíce potlačeny se vzrůstající iontovou silou.

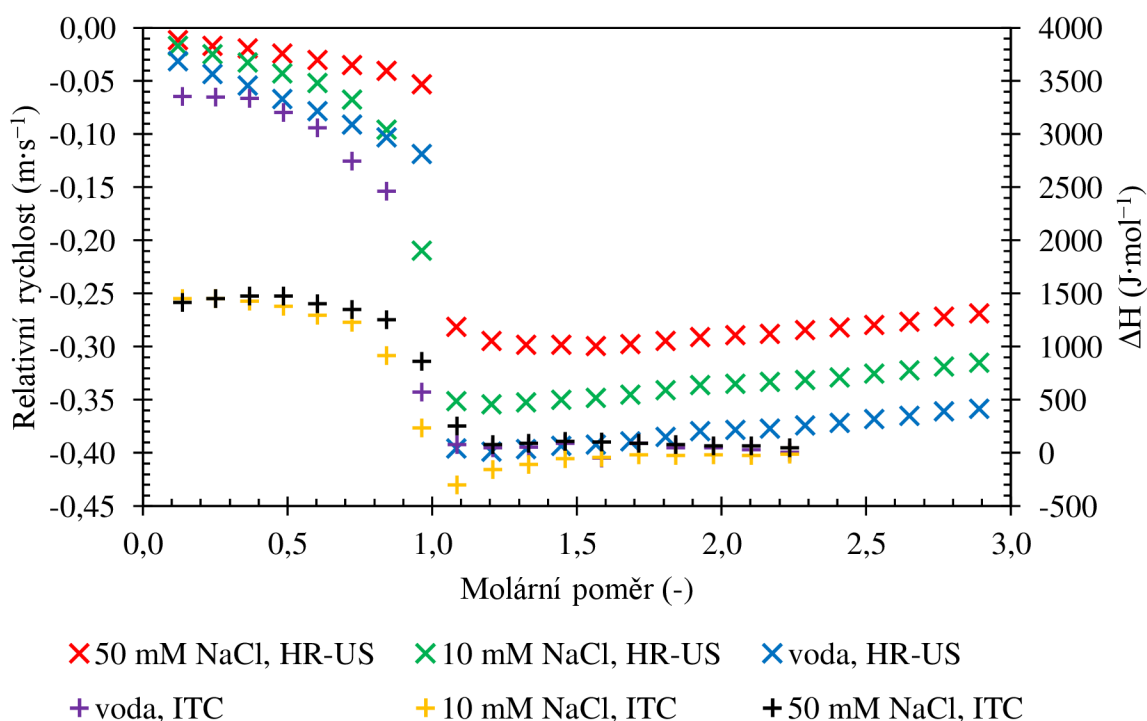
Pokud jde o účinek molekulové hmotnosti hyaluronanu, zdá se, že nejdůležitějším faktorem byla jeho konformace, tedy zda se vyskytoval v konformaci tyčinky nebo náhodného klubka. Studované molekulové hmotnosti hyaluronanu v tyčinkové konformaci (9 a 16 kDa) se v jednotlivých parametrech ITC a HR-US liší velmi výrazně od delších řetězců hyaluronanu v konformaci náhodného klubka. Konformace řetězce hyaluronanu byla tedy relevantní pro interakce s oligomery argininu, jakož i pro jejich citlivost na iontovou sílu.

Z hlediska účinku iontů na interakce došlo k velmi dobré korelaci mezi výsledky získanými jak z ITC tak z HR-US pro prostředí PBS, i pro prostředí s různými iontovými silami. Graf na obrázku (Obrázek 48) ukazuje vliv PBS a délky hyaluronanového řetězce na titrační křivky získané pomocí obou technik. Bod vysycení vazebných interakcí byl v případě obou technik posunut do molárního poměru kolem 1,5 pro vysokomolekulární hyaluronan a je také dobře patrné, že interakce byly mnohem méně intenzivní v případě nízkomolekulárního hyaluronanu. V prostředí PBS v případě triakontameru argininu, ITC detekovalo vzrůstající absolutní hodnoty standardní interakční Gibbsovy energie a entropického příspěvku s rostoucí molekulovou hmotností hyaluronanu až do 680 kDa (Obrázek 43). Entalpický příspěvek narůstal s rostoucí molekulovou hmotností hyaluronanu pouze slabě.

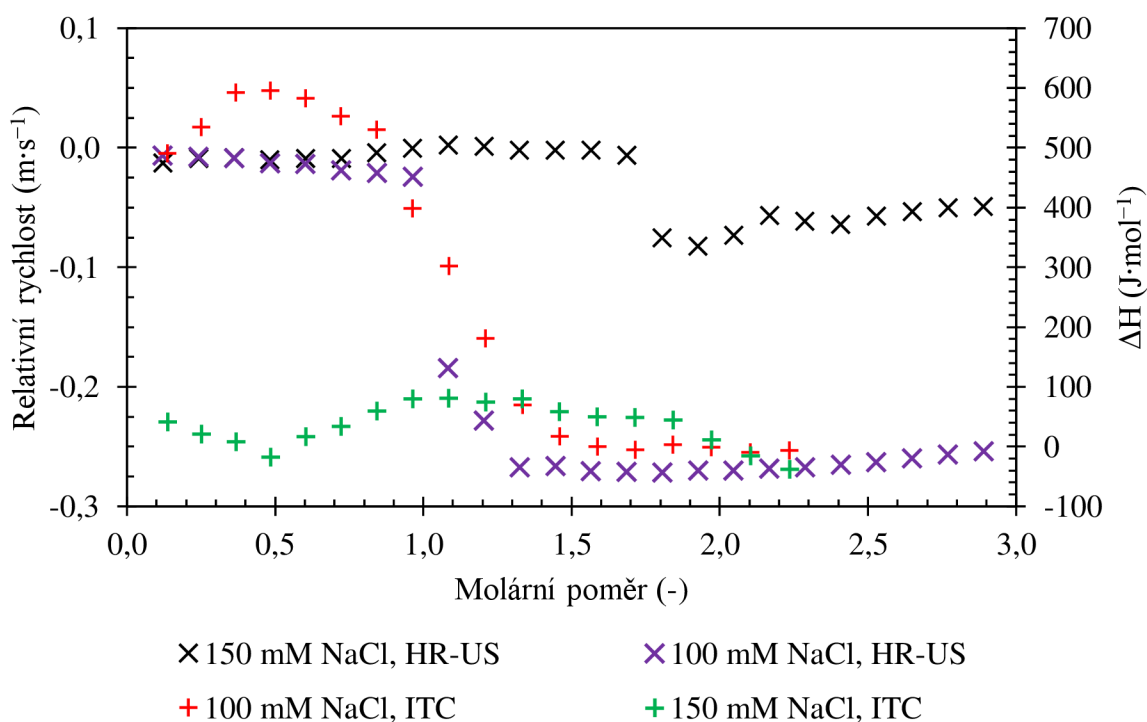


Obrázek 48: Porovnání záznamů z HR-US a ITC v průběhu titrací triakontameru argininu v hydrochloridové formě do 9 a 1 540 kDa roztoků hyaluronanu v PBS. (11,6 MHz, 25 °C)

V prostředích s rostoucí koncentrací chloridu sodného, tedy s rostoucí iontovou silou, nebyly zaznamenány žádné podstatné změny na titračních křivkách s výjimkou 150 mM koncentrace NaCl (Obrázek 35, Obrázek 44). V tomto případě titrační křivka zaznamenaná pomocí HR-US vykazala pouze velmi malý a statisticky nevýznamný pokles v relativní rychlosti kolem molárního poměru 1,7 (Obrázek 35) a v případě ITC nebyly zaznamenány tepelné efekty v průběhu titrace (Obrázek 44). Nicméně s rostoucí iontovou silou docházelo k poklesu hodnot velikosti změny standardní entalpie (Tabulka 18) stejně jako k poklesu absolutní hodnoty minimální relativní ultrazvukové rychlosti, jak ukazují grafy na obrázcích (Obrázek 49, Obrázek 50). Obecným rysem jak interakcí v prostředí PBS, tak v prostředích s dalšími ionty byl výrazný pokles velikosti standardní reakční entalpie v porovnání s vodnými roztoky. Interakce ve vodě byly nejintenzivnější a uvolňovaly největší množství hydratační vody. Díky tomu dosahovaly nejnižších hodnot relativních ultrazvukových rychlostí. S rostoucí iontovou silou množství uvolněné hydratační vody postupně klesalo.



Obrázek 49: Porovnání záznamů z HR-US a ITC v průběhu titrací dodekameru argininu v hydrochloridové formě do roztoku hyaluronanu o molekulové hmotnosti 680 kDa v prostředích o různých iontových silách. (11,6 MHz, 25 °C)



Obrázek 50: Porovnání záznamů z HR-US a ITC v průběhu titrací dodekameru argininu v hydrochloridové formě do roztoku hyaluronanu o molekulové hmotnosti 680 kDa v prostředích o různých iontových silách. (11,6 MHz, 25 °C)

Dostatečně velká iontová síla dokázala potlačit interakce mezi hyaluronanem a oligomery argininu, u kterých byla prokázána přítomnost ve vodě. S narůstající délkou oligomerního argininového řetězce se zvyšovala schopnost lépe odolávat vlivu iontů v prostředí, a tak zatímco triakontamer argininu byl schopen interagovat v prostředí PBS, dodekamer už interagoval pouze v roztocích o koncentraci NaCl do 100 mM. Molekulární hmotnost hyaluronanu měla podobný vliv. S rostoucí molekulovou hmotností hyaluronanu dochází k zesílení interakcí v daném prostředí, jak je patrné z interakcí dekameru v prostředích s různou iontovou silou (Tabulka 14).

Výsledky této studie mohou být shrnuty následovně. Ve vodě byl pro interakce s hyaluronanem nezbytný dostatečně dlouhý oligomer argininu nezávisle na molekulové hmotnosti hyaluronanu. Přechod od neinteragujících oligomerů argininu k interagujícím nastával mezi oktamerem a dodekamerem se zvláštním chováním dekameru argininu. Tento přechod byl pozorován na ultrazvukových titračních křivkách jako změna z téměř přímky (ultrazvuková rychlost nebyla závislá na molárním poměru), přes mírně ohnutou sigmoidu, až po křivku svým tvarem připomínající „Z“ v případě silně interagujících systémů. V případě ITC docházelo ke změně z prostého prudkého poklesu do křivky „Λ-tvaru“ s velkým maximem (pouze u dekameru argininu) až ke klasické sigmoidní křivce. Vizuálně tento přechod odpovídal změně z čirých roztoků přes zakalené roztoky až k roztokům obsahujícím sraženiny.

Hydratační síly (uvolnění molekul vody z hydratačního obalu hyaluronanu) hrály při interakcích důležitou roli. Pozorované mikrofáze (zákal) nebo dokonce makrofáze (sraženiny) v některých systémech by mohly mít příčiny analogické k desolvataci (dehydrataci), stejně jako

dobře známé vysolování proteinů. Elektrostatická složka nebyla zanedbatelná, jak bylo dokázáno pomocí nasycení interakčních míst kolem bodu nábojové rovnováhy, což je v rozporu s interakcemi mezi aminokyselinovými zbytky umožňující vazbu na receptoru CD44 a hyaluronanem. Význam elektrostatických interakcí byl ukázán také na vlivu iontů prostředí – interakce byly potlačeny dostatečně vysokou iontovou silou (přibližně kolem koncentrace 150 mM NaCl, tedy přibližně iontové síly fyziologického prostředí). Je velmi pravděpodobné, že hydratační síly byly kombinované spolu s elektrostatickými silami za vzniku elektrostrikčního efektu.

Nicméně potlačení interakcí přidanými ionty bylo možné eliminovat dostatečným prodloužením oligomeru argininu (triakontamer). Proto hrají roli pravděpodobně také vodíkové vazby a hydrofobní interakce mezi nepolárními částmi interagujících (makro)molekul, především když byl narušen jejich hydratační obal. U hyaluronanu byla v jeho struktuře popsána existence hydrofobních částí [18]. O postranních řetězcích oligomerů argininu tvořených uhlovodíkovými řetězci je možné uvažovat jako o místech vhodných pro hydrofobní interakce. Speciální schopnost argininu vytvářet stejně nabitě kontaktní iontové páry pravděpodobně stála za unikátním chováním pozorovaným pro dekamer argininu.

Přestože ze záznamu z ITC nebyl zánik nebo vznik vodíkových můstků patrný, v případě hyaluronanu bylo prokázáno, že hyaluronan interaguje s vodou ve svém okolí za tvorby vodíkových můstků [200]. Pravděpodobně docházelo současně v průběhu interakcí k zániku původních vodíkových můstků a vzniku nových, díky čemuž nebylo možné ze záznamu ITC tuto skutečnost pozorovat.

Konečně také molekulová hmotnost hyaluronanu, respektive jeho konformace, ať už tyčinková, nebo konformace náhodného klubka, měla vliv na interakce s oligomery argininu a také na citlivost interakcí na iontovou sílu.

Tyto interpretace jsou v souladu s publikovanými koncepty pro vazbu hyaluronanu na receptor, která se odehrává ve fyziologickém prostředí. Vazba hyaluronanu na CD44 receptor je kontrolována primárně pomocí tvaru a schopnosti vytvářet vodíkové můstky. Celkem 13 aminokyselinových zbytků je zapojeno v interakci s hyaluronanem [39]. Hydrofobní interakce mají až druhotný význam [40]. Elektrostatické interakce ve fyziologickém iontovém prostředí přispívají přibližně 25 % z celkové interakční energie a jsou vysoce závislé na velikosti iontové síly [38].

5.6 Závěr

Cílem této kapitoly bylo prozkoumat interakce mezi oligomery argininu v hydrochloridové formě a hyaluronanem. Interakce byly zkoumány s použitím izotermické titrační kalorimetrie a ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením. Ve vodě nebyly pozorovány žádné interakce pro dimer a tetramer argininu. Přejít od neinteragujících oligomerů k interagujícím nastal mezi oktamerem a dodekamerem se zvláštním chováním dekameru argininu. Dodekamer a triakontamer u obou technik představovaly jednoznačně interagující oligomery. Ve vodě je pro interakce s hyaluronanem nezbytná dostatečná délka argininového oligomeru nezávisle na molekulové hmotnosti hyaluronanu. Obě techniky ukázaly vysycení interakcí kolem molárního poměru základních jednotek (monomer argininu, disacharidová jednotka hyaluronanu)

odpovídajícímu jedné (tedy kolem bodu předpokládané nábojové rovnosti). Interakce byly potlačeny dostatečně vysokou iontovou silou (koncentrace chloridu sodného alespoň 150 mM, tedy kolem iontové síly fyziologického roztoku), za předpokladu, že řetězec oligomeru argininu nebyl příliš dlouhý (například triakontamer) nebo molekulová hmotnost hyaluronanu příliš nízká (například 9 kDa). Tyčinková konformace hyaluronanu nebo konformace náhodného klubka hyaluronanu byly pro interakce s argininovými oligomery důležité stejně jako jejich citlivost na iontovou sílu prostředí.

Obě techniky se celkově v poskytnutých výsledcích shodovaly, nicméně v jednotlivých případech byly v detailech výsledky rozdílné. Interakce mezi argininovými oligomery a hyaluronanem byly vysvětleny díky kombinaci jednotlivých efektů (síly): hydratační síly (uvolnění molekul vody z hydratačního obalu hyaluronanu), elektrostatických interakcí kombinovaných s elektrostrikcí stejně jako vodíkové můstky nebo hydrofobní interakce mezi desolvatovanými částmi (makro)molekul hrály roli společně se specifickou konformací hyaluronanu a argininových oligomerů (včetně schopnosti argininu tvořit kontaktní iontové páry). Použité techniky neposkytovaly přímé chemické informace, molekulární modelování by mohlo vnést další vysvětlení a podporu pro tyto závěry.

6 INTERAKCE HYALURONAN-CECROPIN B STUDOVANÉ POMOCÍ HR-US A ITC

V rámci této kapitoly byly zkoumány interakce zásaditého antimikrobiálního peptidu cecropinu B a hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech s využitím technik ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením a izotermické titrační kalorimetrie v prostředí vody a PBS. Cílem bylo charakterizovat interakce mezi oběma biopolymery. Na rozdíl od předchozí kapitoly, která byla spíše modelovým systémem, skrývá tato kapitola i praktické možnosti využití jako potenciálního nosičového systému.

6.1 Chemikálie

Hyaluronan sodný: Contipro Biotech s.r.o. (Česká republika), použité šarže jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 21).

Tabulka 21: Hyaluronan sodný použitý pro experimenty.

Hyaluronan sodný			
Mw (kDa)	Šarže	Vlhkost	Mw* (kDa)
8–15	213-6147	12 %	9
130–300	213-6213	9 %	137
600–800	241214-2D2	6 %	680
1 400–1 600	181214-4-D1	8 %	1 540

Mw* je molekulová hmotnost získaná pomocí HPLC/SEC-MALS analýzy provedenou výrobcem.

Antimikrobiální peptid použitý v dizertační práci (Tabulka 22).

Tabulka 22: Použité antimikrobiální peptidy.

Chemikálie	Zdroj, vlastnosti
Cecropin B	Chempeptide limited (Čína), 35 aminokyselin, čistota: >95%, modifikace: amid, C-konec, Mw = 3,835 kDa, šarže: PT209181808

Seznam dalších použitých chemikálií je zobrazen v tabulce (Tabulka 23).

Tabulka 23: Použité chemikálie

Chemikálie	Zdroj, vlastnosti
PBS	VWR Life science, Lot NO.: 0016C297, E504-500ML, 137 mM chlorid sodný, 2,7 mM chlorid draselný, 12 mM fosfátový pufr; iontová síla 172 mM
Voda	Ultračistá deionizovaná voda z přístroje PURELAB flex, ELGA, Velká Británie

6.2 Příprava roztoků

Pro experimenty byly připravovány roztoky hyaluronanu a antimikrobiálního peptidu cecropinu B ve vodě nebo prostředí PBS. Jednotlivé postupy přípravy jsou popsány v následujících kapitolách.

6.2.1 Příprava roztoků hyaluronanu

Hyaluronan o různých molekulových hmotnostech byl připravován navažováním přesného množství hyaluronanu a doplněním vody (ultračistá deionizovaná voda z přístroje PURELAB). Všechny komponenty roztoků, tedy hyaluronan i voda, byly během přípravy váženy. Vlhkost hyaluronanu byla při navážce uvažována. Roztoky byly před měřením ponechány 24 h v uzavřené nádobě míchat při laboratorní teplotě. Pokud vzorky nebylo možné použít ihned, byly uchovávány v chladničce při teplotě do 5 °C v uzavřených nádobách po dobu maximálně jednoho týdne z důvodu zamezení možné degradace hyaluronanu v roztoku [21]. Koncentrace byla stanovena na 0,1 %hm pro všechny experimenty. Tato koncentrace při úplné disociaci karboxylových skupin hyaluronanu odpovídá koncentraci záporného náboje 2,5 mM (viz kapitola 4.2.1, respektive 5.2.2).

V případě přípravy roztoků hyaluronanu v prostředí PBS byl postup shodný, pouze byl místo ultračisté vody použit právě PBS vyráběný komerčně.

6.2.2 Příprava roztoků cecropinu B

Roztoky cecropinu B byly připravovány na výchozí koncentraci kladných nábojů 30 mM. Předpokladem byl jeden kladný náboj na aminokyselinovém zbytku argininu resp. lysinu přítomném ve struktuře antimikrobiálního peptidu (molekula cecropinu B obsahuje 2 kladné náboje na argininových zbytcích a 7 na lysinových), spolu s volnou primární aminoskupinou lysinu, která dodávala další kladný náboj. Ve struktuře antimikrobiálního peptidu bylo za fyziologického pH přítomno celkem 10 kladných nábojů. Příprava probíhala vážením požadovaného množství antimikrobiálního peptidu na analytických vahách a následným kvantitativním převedením do odměrné baňky a doplněním po risku ultračistou deionizovanou vodou z přístroje PURELAB.

K úpravě pH nebylo přistoupeno, neboť pH čistého roztoku antimikrobiálního peptidu se pohybovalo nad hodnotou disociační konstanty hyaluronanu [15, 16], jak ukazují data v tabulce (Tabulka 24). Zároveň se pH roztoku ještě celkově mírně zvýšilo oproti výchozí hodnotě s ohledem na pH roztoku hyaluronanu, do kterého byl antimikrobiální peptid titrován.

V případě přípravy roztoků cecropinu B v prostředí PBS byl postup shodný, pouze byl místo ultračisté vody použit právě PBS vyráběný komerčně.

Tabulka 24: pH roztoku cecropinu B a hyaluronanu

Molekula	pH čistého roztoku
Cecropin B	4,23 ± 0,06
Hyaluronan	6,20 ± 0,15

6.3 Metody a přístroje

- MicroCal PEAQ-ITC (200 μ l cela, 40 μ l syringe), Malvern Panalytical Ltd, USA
- HR-US 102T, Ultrasonic Scientific, Irsko
- pH metr Metrohm, kombinovaná pH-elektroda Metrohm, 6.0262.100, vnitřní elektrolyt 3 M KCl.

6.3.1 HR-US

Ke zkoumání interakcí mezi hyaluronanem a cecropinem B byl použit ultrazvukový spektrometr HR-US 102T od firmy Ultrasonic Scientific, Irsko. Všechny vzorky byly měřeny na šesti frekvencích v rozsahu 2,5–15 MHz, přičemž platí, že harmonická čísla píků, která se počítají jako podíl frekvence píku a rozdílu frekvencí dvou sousedních píků, byla stejná pro všechny měřené vzorky a referenční médium. Čísla píků, při kterých probíhalo měření, byla 22,4; 42,4; 64,8; 94,0; 99,0 a 120. Protože měření na ultrazvukovém spektrometru jsou prováděna jako komparativní [155], byly všechny vzorky měřeny proti vodě umístěné v referenční cele. Do přístroje byl dávkován vždy přesně jeden mililitr odplyněného vzorku. Odplynění bylo prováděno na centrifuze při 3 000 $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$ po dobu 5 min. Pomocí automatického titrátoru byly prováděny titrace roztoků cecropinu B do roztoků hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech (9 až 1 540 kDa) při teplotě 25 °C, která byla kontrolována pomocí termostatu s vodní lázní (Thermo Scientific Haake PC 200) s přesností na 0,01 °C. Měření byla realizována v čisté vodě a PBS. K analýze dat byl využit software Titration Analyzer.

Přidávky roztoku cecropinu B probíhaly po 10 μ l do celkového objemu 600 μ l. Čas pro ustálení roztoku před začátkem titrace byl 1 h a po přidávku a promíchání roztoku byl čas ustalování zvolen na 10 min. Pro vyhodnocení byly odečítány hodnoty z posledních 100 s ustalování.

Kromě titrací cecropinu B do roztoků hyaluronanu byly prováděny i slepé titrace cecropinu B do příslušného prostředí spolu se slepými titracemi prostředí do roztoků hyaluronanu, které byly následně odečítány od titrací oligomerů argininu do hyaluronanu.

V průběhu všech titrací byly zaznamenávány parametry ultrazvukové rychlosti a zeslabení ultrazvukových vln. Cela se vzorkem je značena jako cela 1.

Před každým měřením byla provedena korekce základní linie měřením vody proti vodě. Výsledky nevykázaly závislost na použité frekvenci, proto jsou zobrazeny pouze výsledky z měření při 11,6 MHz, což odpovídá číslu píku 94. Každé měření bylo opakováno třikrát a v grafech jsou zobrazeny průměrné hodnoty z těchto měření. Opakovatelnost byla výrazně lepší v případě relativní rychlosti než v případě zeslabení ultrazvukových vln v cele se vzorkem.

Zpracování výsledků získaných pomocí HR-US probíhalo stejně jako v kapitole 5.3.2.

6.3.2 ITC

Tepelné efekty z titrací roztoku titrantu do měrné cely byly měřeny pomocí MicroCal PEAQ-ITC (Malvern Panalytical Ltd, USA). Titrace vody do vody byla provedena před každým experimentem, aby se zajistilo, že zařízení měří správně. Každé měření bylo provedeno alespoň

tříkrát, v práci jsou v grafech a tabulkách uváděny průměrné hodnoty spolu s odpovídajícími směrodatnými odchylkami v tabulkách a chybovými úsečkami v grafech. Referenční cela byla v průběhu všech měření naplněna vodou. Všechna měření byla prováděna při 25 °C, v čisté vodě nebo PBS.

K integraci piků a vyhodnocení dat získaných z měření byl využit program MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software (Malvern Panalytical Ltd.). Oba programy využívají standardní procedury [170] k získání základních termodynamických parametrů, které jsou zde nazývány standardní interakční Gibbsova energie (ΔG°), standardní interakční entalpie (nebo také entalpický příspěvek; ΔH°). Standardní entropie (ΔS°) jako produkt $T\Delta S^\circ$ je nazývána entropickým příspěvkem. Programy také podávají informaci o rovnovážné konstantě (K), obvykle nazývané disociační konstanta (K_D). Tato terminologie je zachována i v této práci, přestože pro studované interakce není zcela správná.

Při zkoumání interakcí mezi oligomery argininu a cecropinem B, byl roztok hyaluronanu o koncentraci 0,1 %hm umístěn vždy v cele a roztok cecropinu B sehrál roli titrantu. Pro zjištění rozpouštěcích tepel byly prováděny titrace cecropinu B do vody nebo příslušeného prostředí. Ředící tepla byla odečítána od tepel titrace na počátku vyhodnocení. Ředící teplo hyaluronanu nebylo bráno v úvahu, neboť je dle dostupné literatury [182–184] v porovnání s teplem uvolněným v průběhu titrace velmi malé a zanedbatelné. Teplo uvolněné během jednoho přidavku titrace se pohybuje řádově ve stovkách μJ , zatímco ředící teplo hyaluronanu odpovídá jednotkám μJ .

Všechny vzorky byly před měřením odplyněny pomocí centrifugy (5 min, 3 000 $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$). Pomocí syringe o objemu 40 μl byl přidáván byl roztok cecropinu B o koncentraci kladných nábojů 30 mM do cely o objemu 200 μl . Rychlost míchání byla nastavena na 750 $\text{ot}\cdot\text{min}^{-1}$, interval mezi přidavky byl empiricky stanoven na 150 s. Titrace probíhaly s prvním přidavkem o menším objemu 0,8 μl z důvodů možného zředění vzorku před začátkem titrace v titrační kapiláře. Ostatní přidavky měly shodnou velikost 2 μl .

6.3.3 Molární poměr

Molární poměr byl počítán jako poměr počtu disacharidových jednotek hyaluronanu a počtu kladných nábojů ve struktuře cecropinu B přítomných v roztoku. Molekulová hmotnost disacharidové jednotky hyaluronanu byla uvažována jako 401,229 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a molekulové hmotnosti hyaluronanu byly převzaty z SEC-MALS analýzy prováděné výrobcem. Pokud uvažujeme přítomnost 10 kladných nábojů na molekule cecropinu B a jednoho záporného náboje na disacharidové jednotce hyaluronanu při jeho plné disociaci, dává molární poměr zároveň poměr pozitivních a negativních nábojů v roztoku. Molární poměr jinými slovy označuje poměr nábojů na hyaluronanu k nábojům na cecropinu B.

6.4 Výsledky

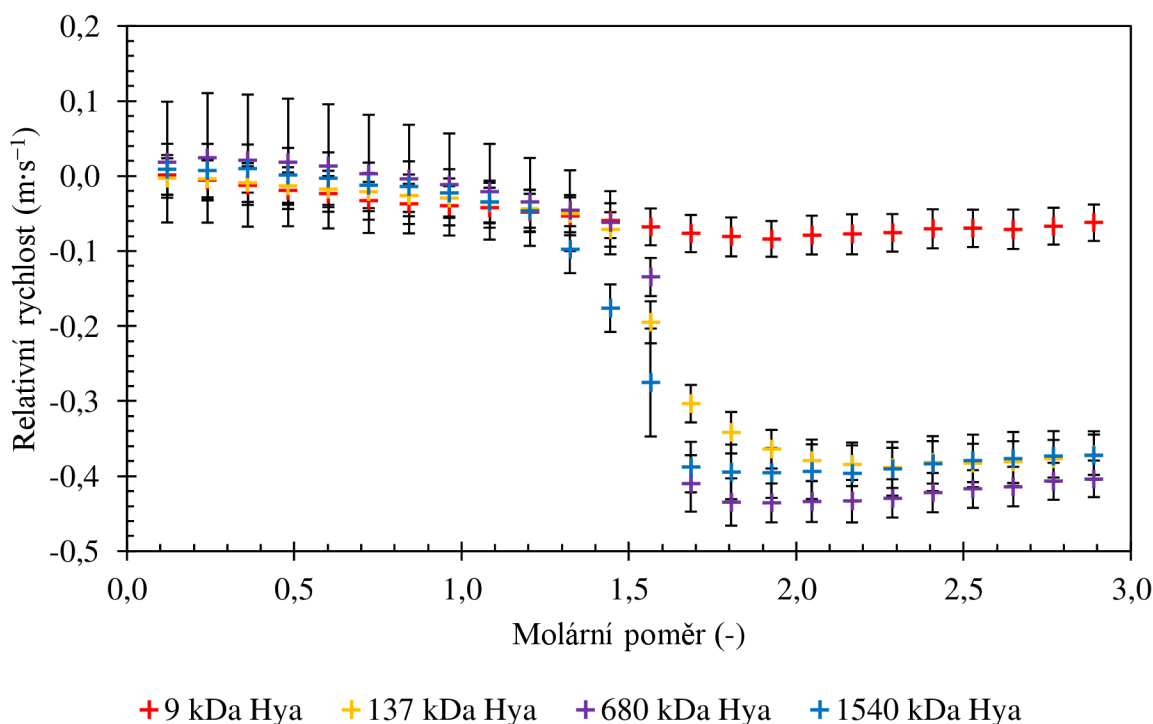
Základní informace o titracích cecropinu B do hyaluronanu byly získány pomocí jednoduchého vizuálního pozorování. Pro tato pozorování byly vybrány molekulové hmotnosti hyaluronanu 9, 680 a 1 540 kDa. Výsledky všech vizuálních pozorování jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 25). Tabulka 25 ukazuje souhrnné výsledky pozorování ve vodě a v prostředí PBS, ve kterém nebyly pozorovány žádné změny a roztoky zůstaly čiré po celou dobu titrace. V případě vodných roztoků dochází k přechodu systému od čirého až po sraženiny u vysokomolekulárního hyaluronanu. K těmto změnám dochází ve vodě zpravidla kolem molárního poměru 1,4.

Tabulka 25: Shrnutí výsledků jednotlivých titrací cecropinu B do hyaluronanu ve vodě a PBS včetně vizuálních pozorování.

Cecropin B			
Hya Mw (kDa)	HR-US	ITC	Vizuální pozorování
voda			
9	Velmi malý pokles relativní rychlosti ~ 1,5	Sigmoidní křivka, inflex ~1,5	Tvorba velmi jemně zakalených roztoků, které se mění na čirý roztok kolem molárního poměru 1,5. (Obrázek P 10)
680	Pokles v relativní rychlosti ~ 1,4	Sigmoidní křivka inflex ~1,5	Tvorba zákalu, který přechází v neprůhledný vzorek a následně vytváří sraženiny kolem molárního poměru 1,4. Dále se systém vizuálně nemění. (Obrázek P 10)
1 540	Pokles v relativní rychlosti ~ 1,4	Sigmoidní křivka inflex ~ 1,5	Tvorba zákalu, který přechází v neprůhledný vzorek a následně vytváří sraženiny kolem molárního poměru 1,4. Dále se systém vizuálně nemění. (Obrázek P 10)
PBS			
9	Neměřeno	Neměřeno	Roztok zůstává čirý.
1 540	Konstantní hodnoty.	Bez interakcí	Roztok zůstává čirý.

6.4.1 Výsledky z HR-US

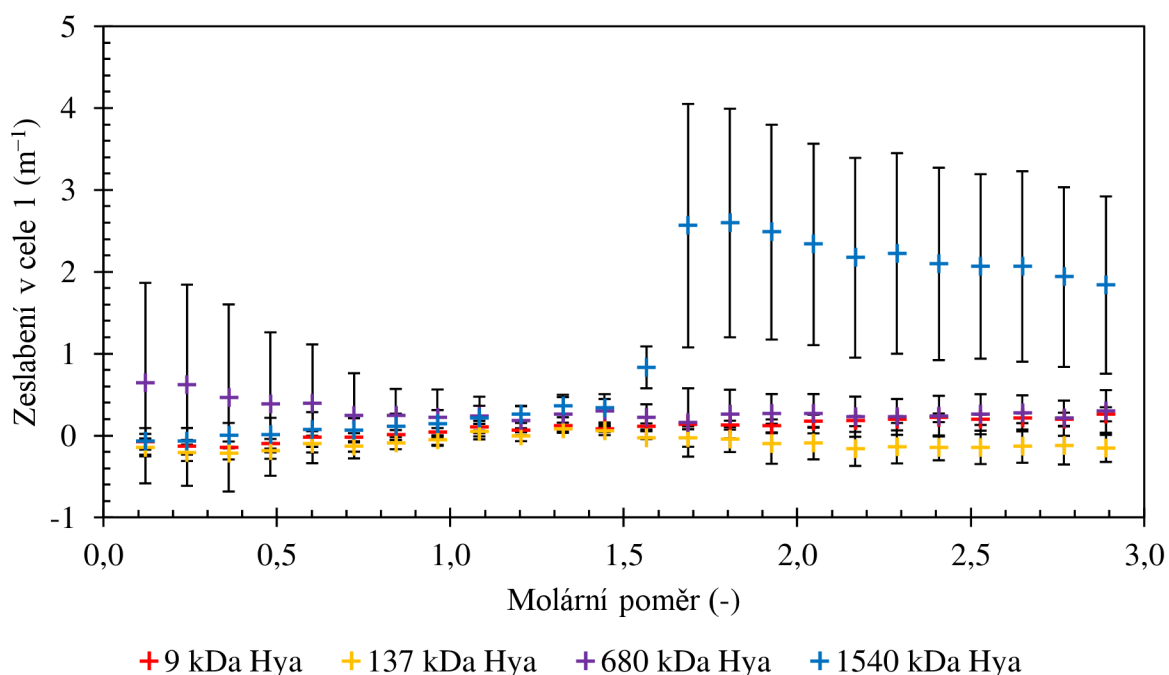
Ve vodném prostředí vizuální pozorování ukázala, že k interakcím docházelo se všemi molekulovými hmotnostmi hyaluronanu. V případě nejnižší molekulové hmotnosti 9 kDa byly interakce slabé, vytvářely pouze velmi jemný zákal a za vyšších molárních poměrů docházelo k vyčerení roztoku. To se na datech získaných z ultrazvukového spektrometru projevilo jako velmi mírný pokles v relativní rychlosti. Na rozdíl od hyaluronanu s nejnižší molekulovou hmotností došlo u všech ostatních studovaných molekulových hmotností hyaluronanu k výraznému poklesu relativní rychlosti v průběhu titrace díky uvolnění hydratační vody z hydratačního obalu. Změna velikosti relativní rychlosti v průběhu titrace je pro všechny studované molekulové hmotnosti zobrazena v grafu na obrázku (Obrázek 51). Pokles se zastavil kolem molárního poměru 1,7, tedy za předpokládaným bodem nábojové ekvivalence, poté relativní rychlost opět mírně narůstala. Výsledky vizuálních pozorování spolu s měřeními jsou shrnuty v tabulce (Tabulka 25). V případě vysokomolekulárního hyaluronanu docházelo vždy k tvorbě zakaleného roztoku, který se kolem nábojového poměru 1,4 měnil na sraženiny a čirý roztok (Obrázek P 10).



Obrázek 51: Závislost relativní rychlosti na molárním poměru pro titraci cecropinu B do roztoků hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech ve vodě. (11,6 MHz, 25 °C)

Zeslabení zvukových vln v cele se vzorkem se v průběhu titrací jeví jako téměř konstantní u všech zkoumaných molekulových hmotností hyaluronanu s výjimkou nejvyšší molekulové hmotnosti 1 540 kDa, kde byl nárůst zeslabení jasně patrný, jak ukazuje graf na obrázku (Obrázek 52). Zeslabení v tomto případě dobře korespondovalo s poklesem v parametru relativní rychlosti. Výrazný nárůst v parametru ultrazvukového zeslabení ilustroval vznik sraženin v případě vysokomolekulárního hyaluronanu. Zvýšené zeslabení znamená vznik

struktur nebo agregátů schopných rozptylovat ultrazvukové vlny a zvýšenou heterogenitu vzorku [156, 185].

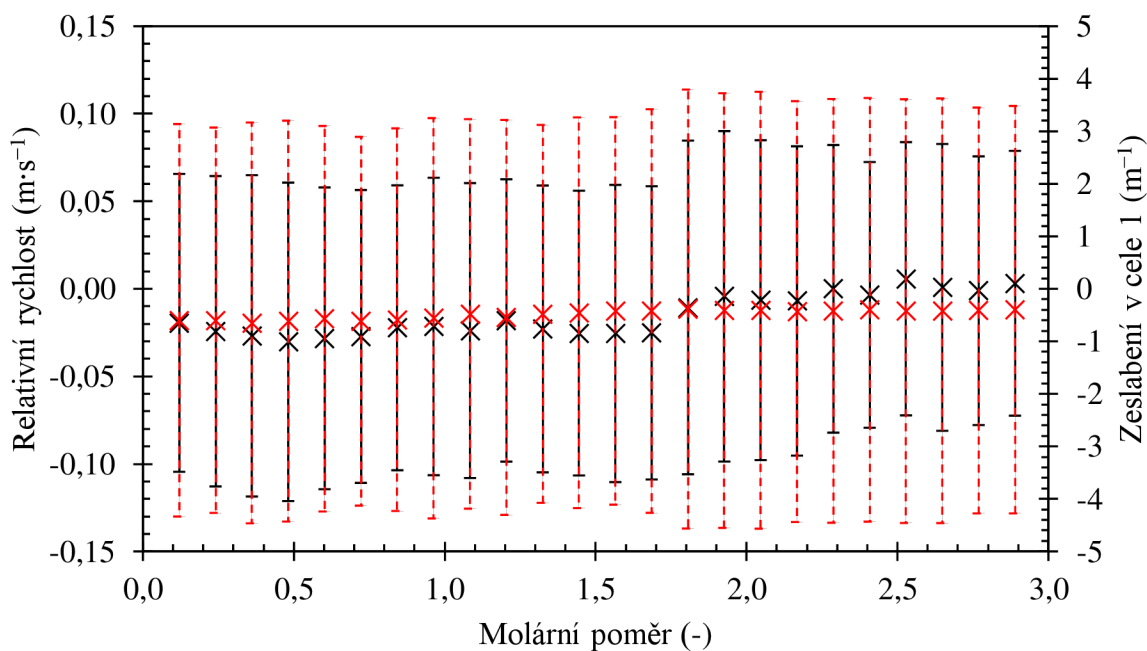


Obrázek 52: Graf znázorňující velikosti zeslabení v cele 1 v závislosti na molárním poměru pro titraci cecropinu B do roztoků hyaluronanu o jednotlivých molekulových hmotnostech ve vodě. (11,6 MHz, 25 °C)

Výsledky jednotlivých molekulových hmotností hyaluronanu si byly v průběhu prvních přídavek titrace vzájemně podobné. U všech molekulových hmotností docházelo k pozvolnému poklesu v relativní rychlosti, následovaným prudkým propadem v relativní rychlosti, s výjimkou 9 kDa hyaluronanu, kde k propadu nedošlo a změna relativní rychlosti je pouze velmi mírná. Výsledky z těchto pozorování jsou v souladu s výsledky obdrženy z měření interakcí oligomerů argininu v hydrochloridové formě (8, 10, 12 a 30 monomerních jednotek), kapitola 5.4.1, kde se hyaluronan o molekulové hmotnosti 9 kDa svým chováním také odlišoval od ostatních molekulových hmotností.

6.4.1.1 Vliv prostředí

Interakce cecropinu B byly studovány i v prostředí PBS, které by mělo imitovat fyziologické podmínky. Experimenty byly prováděny s hyaluronanem o nejvyšší molekulové hmotnosti 1 540 kDa. Bylo zjištěno, že relativní rychlost, stejně jako zeslabení v cele se vzorkem, zůstává konstantní v celém průběhu titrace, jak ukazují data na obrázku (Obrázek 53). Výsledky vizuálních pozorování jsou shrnuté v tabulce (Tabulka 25) a také nevykázaly zakalení roztoku nebo vznik sraženin a roztok zůstal, v případě obou testovaných molekulových hmotností hyaluronanu 9 a 1 540 kDa, čirý.



× Relativní rychlost × Zeslabení

Obrázek 53: Graf znázorňující velikosti relativní rychlosti a zeslabení v cele 1 při titraci roztoku cecropinu B do roztoku hyaluronanu 1 540 kDa v prostředí PBS. (11,6 MHz, 25 °C)

6.4.2 Výsledky z ITC

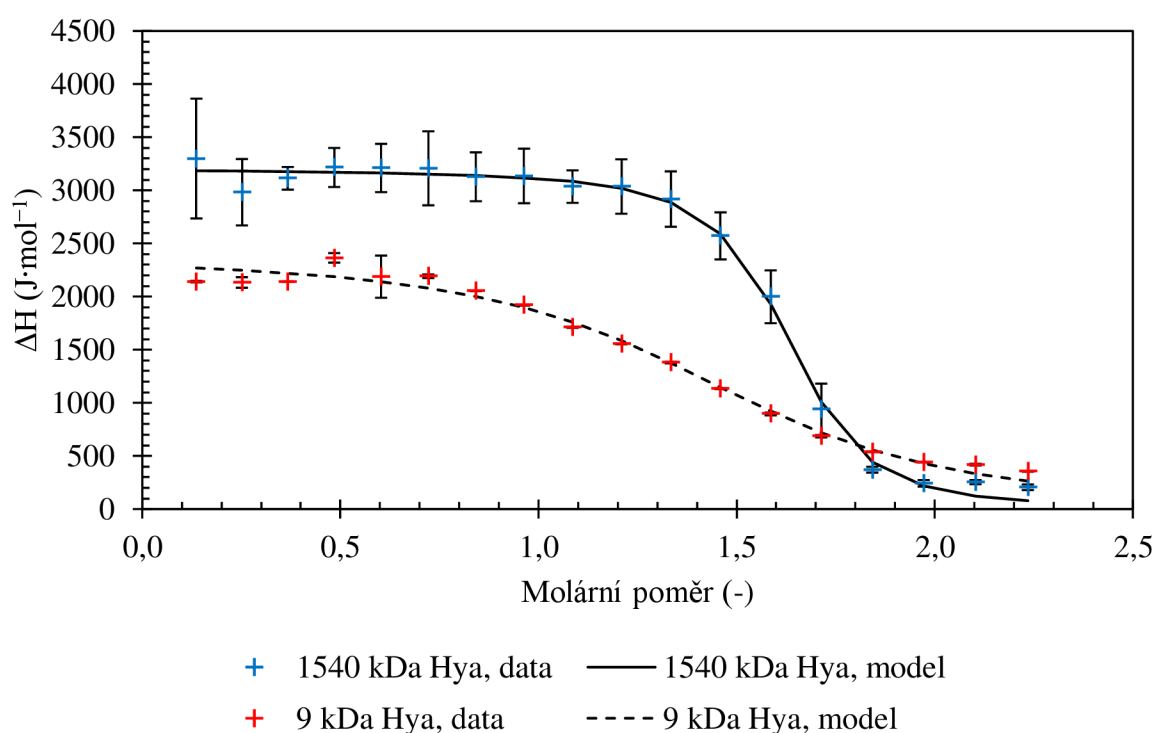
Pomocí izotermické titrační kalorimetrie byly stanoveny základní termodynamické parametry interakcí mezi hyaluronanem a cecropinem B. Bylo zjištěno, že všechny interakce měly endotermický charakter, jak ukazují data v tabulce (Tabulka 26).

U všech titrací byl pozorován typický sigmoidní tvar titračních křivek. Příklad pro molekulové hmotnosti hyaluronanu 9 a 1 540 kDa je uveden v grafu na obrázku (Obrázek 54). Tento tvar titračních křivek ukazoval na přítomnost interakcí mezi hyaluronanem a antimikrobiálním peptidem od prvního přidavku, až do vyčerpání vazných míst na hyaluronanu v okolí nábojového poměru 1,5 nezávisle na molekulové hmotnosti hyaluronanu. U všech molekulových hmotností hyaluronanu s výjimkou 9 kDa hyaluronanu byl dobře pozorovatelný posun základní linie díky změně tepelné kapacity systému [186] v důsledku tvorby sraženin. Posun je vyobrazen na obrázku (Obrázek 39).

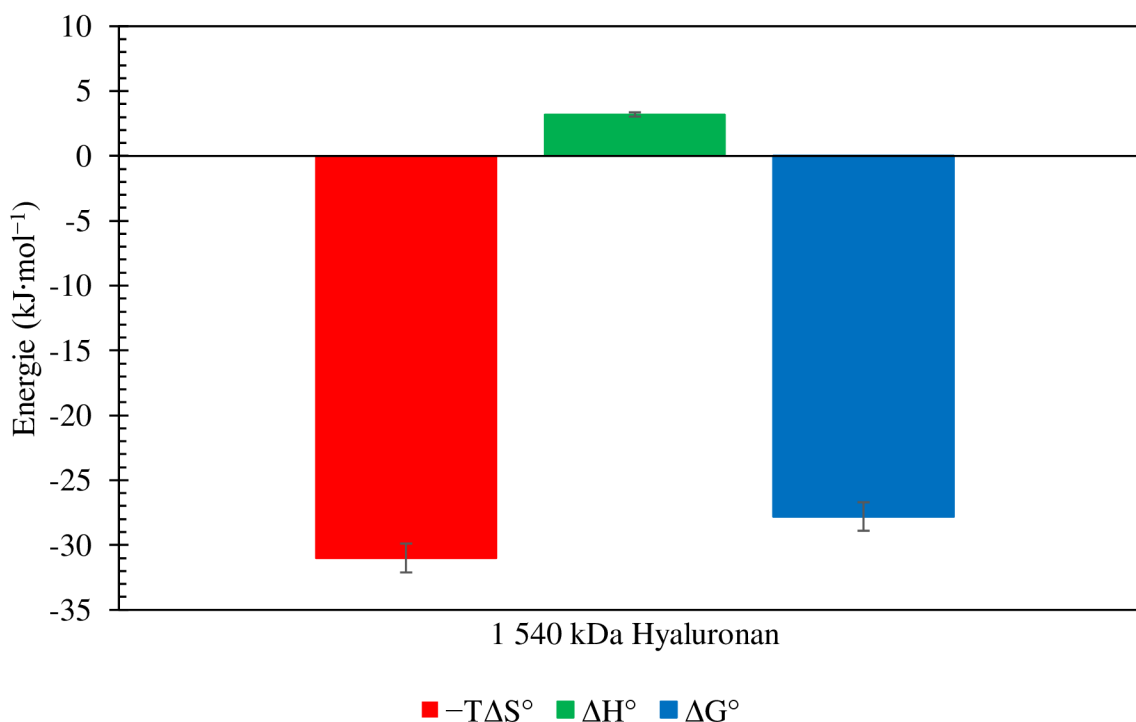
Pro stanovení termodynamických parametrů byly titrace prokládány modelem jednoho typu vazného místa. Využíván byl software, který je součástí zařízení (viz kapitola 6.3.2). Získané parametry jsou ukázány v tabulce (Tabulka 26). Termodynamické parametry interakcí se pro jednotlivé molekulové hmotnosti hyaluronanu příliš nelišily a poměr standardních entalpických a standardních entropických příspěvků byl velmi podobný. Ilustrativní příklad je zobrazen v grafu na obrázku (Obrázek 55) pro hyaluronan o molekulové hmotnosti 1 540 kDa. Interakce mezi antimikrobiálním peptidem a hyaluronanem byly charakterizovány malou nepříznivou hodnotou standardní entalpie a byly hnané entropicky.

Tabulka 26: Shrnutí parametrů titrací antimikrobiálního peptidu do roztoků hyaluronanu stanovených pomocí ITC ve vodě (25 °C). N je molární poměr definovaný jako inflexní bod v ITC záznamu (bod nasycení interakce v textu), ΔH° , ΔG° , $-T\Delta S^\circ$ jsou definované na mol základní hyaluronanové jednotky.

Hya Mw (kDa)	N (-)	ΔH° (kJ·mol ⁻¹)	K_D (M)	ΔG° (kJ·mol ⁻¹)	$-T\Delta S^\circ$ (kJ·mol ⁻¹)
9	1,46 ± 0,02	2,34 ± 0,06	(1,61 ± 0,05)·10 ⁻⁴	-21,65 ± 0,07	-24 ± 0
137	1,46 ± 0,05	2,27 ± 0,08	(3,2 ± 0,6)·10 ⁻⁵	-25,7 ± 0,4	-28,0 ± 0,5
680	1,52 ± 0,06	2,78 ± 0,05	(4,5 ± 1,0)·10 ⁻⁵	-26 ± 3	-29 ± 4
1 540	1,53 ± 0,03	3,19 ± 0,16	(1,5 ± 0,6)·10 ⁻⁵	-27,8 ± 1,1	-31,0 ± 1,1



Obrázek 54: Graf zobrazující ITC záznamy titrací cecropinu B do roztoku 9 a 1 540 kDa hyaluronanu ve vodě (25 °C). Pro vyhodnocení dat byl použit model jednoho typu vazného místa.

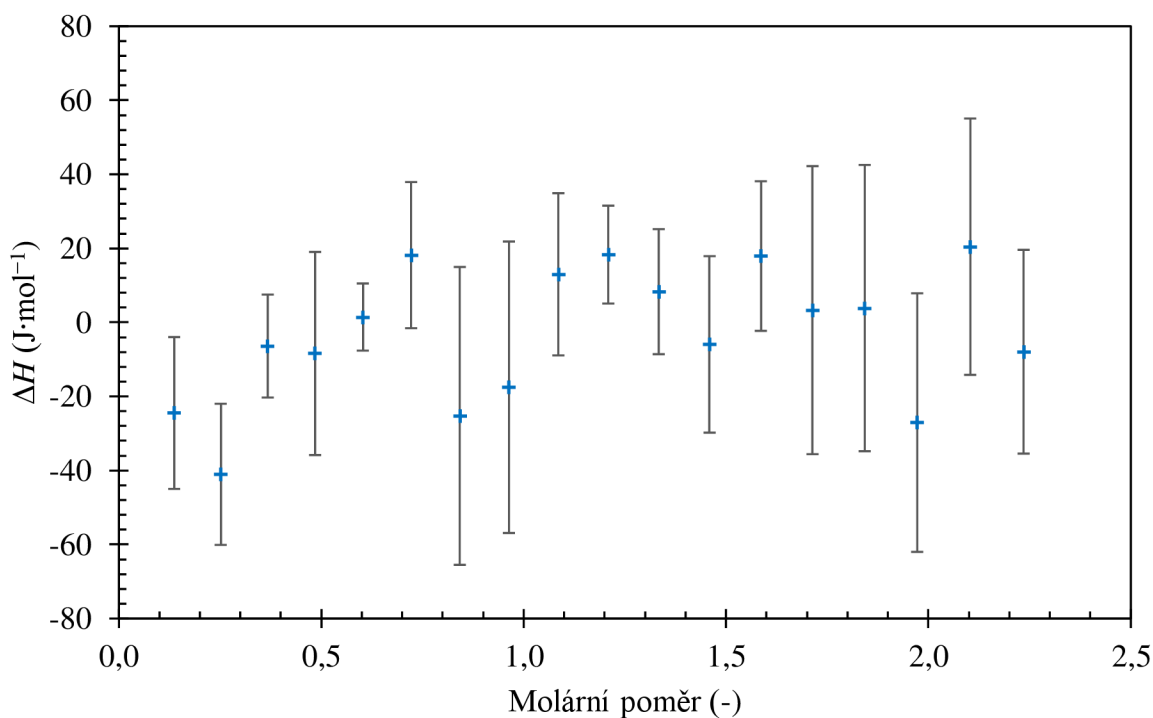


Obrázek 55: Příklad zastoupení termodynamických parametrů z ITC pro interakce cecropinu B s hyaluronanem o molekulové hmotnosti 1 540 kDa ve vodě (25 °C).

Nejnižší molekulová hmotnost hyaluronanu měla nejvyšší hodnotu disociační konstanty, zatímco molekulové hmotnosti hyaluronanu nad 137 kDa měly přibližně stejnou hodnotu disociační konstanty, která byla nižší. Disociační konstanta byla stanovena s poměrně vysokou chybou díky vysoké citlivosti modelu na prudkou změnu titrační křivky, ze které je disociační konstanta stanovena. Proto bylo možné tuto konstantu použít pouze pro odhad relativních rozdílů mezi různými titrovanými systémy.

6.4.2.1 Vliv prostředí

Stejně jako v případě ultrazvukové spektroskopie byly interakce testovány i v prostředí PBS. Výsledky se shodovaly se zjištěními z ultrazvukového spektrometru, a sice že v průběhu titrace po odečtení rozpouštěcích tepel nebylo zaznamenáno žádné měřitelné teplo, jak ukazují data v grafu na obrázku (Obrázek 56). Experimenty byly prováděny pouze s hyaluronanem o nejvyšší molekulové hmotnosti 1 540 kDa s ohledem na největší pravděpodobnost vzniku interakcí. Vizually roztok zůstal čirý po celou dobu titrace (Tabulka 25).

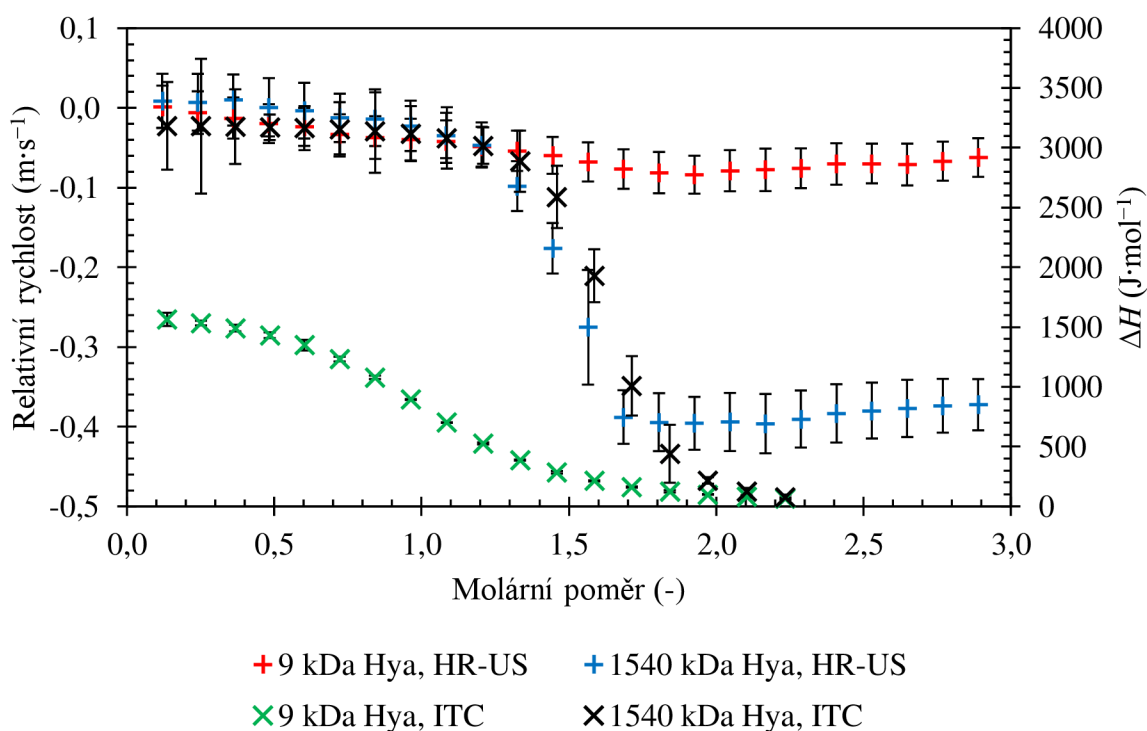


Obrázek 56: Graf zobrazující ITC záznamy titrací cecropinu B do roztoku 1 540 kDa hyaluronanu v PBS (25 °C).

6.5 Diskuse

Typická sigmoidní křivka na ITC byla pro cecropin B získána při interakcích se všemi studovanými molekulovými hmotnostmi hyaluronanu ve vodě (Tabulka 25). Záznamy z ITC byly v souladu s daty získanými pomocí ultrazvukové spektroskopie, stejně jako tomu bylo v případě oligomerů argininu, jak ukazuje graf na obrázku (Obrázek 57) pro molekulové hmotnosti hyaluronanu 9 a 1 540 kDa. Prudký pokles na sigmoidní křivce koresponduje s náhlým poklesem relativní ultrazvukové rychlosti. Obě techniky ukázaly, že se interakce lišily při použití různých molekulových hmotností hyaluronanu.

Pokles v relativní rychlosti obvykle indikuje změnu v hydratačních obalech molekul. Protože je voda v hydratačním obalu méně stlačitelná v porovnání s objemovou vodou [162], je také hustší [163], což pomáhá v šíření zvukových vln [156], dochází k poklesu relativní rychlosti, pokud je voda z hydratačního obalu uvolňovaná.



Obrázek 57: Porovnání záznamů z HR-US a ITC v průběhu titrací cecropinu B do 9 a 1 540 kDa roztoků hyaluronanu ve vodě. (11,6 MHz, 25 °C)

Cecropin B tedy narušil hydratační obal hyaluronanu za tvorby asociátů se společným hydratačním obalem, který obsahuje méně molekul hydratační vody v porovnání s množstvím hydratační vody obsažené v obou hydratačních obalech. Relativní rychlost klesala až do vysycení všech vazebných míst na hyaluronanu. Poté již k dalšímu uvolňování hydratační vody nedocházelo a relativní rychlost začala pouze mírně růst. Tento nárůst byl připisán částečnému rozpouštění precipitátu díky ředění. Je zajímavé, že tyto interakce nebyly vysyceny kolem molárního poměru 1, stejně jako u oligomerních argininů (kapitola 5), ale až kolem molárního poměru 1,5. Protože je cecropin B složen z 35 aminokyselinových zbytků, z nichž by 9 mělo za daného pH (Tabulka 24) nést kladný náboj (celkově 10 kladných nábojů na jedné molekule cecropinu B), projevovaly se zde ve větší míře pravděpodobně i další interakce kromě elektrostatických. Změny v hydrataci se mohly odehrávat na nabitých skupinách a byly indukovány pomocí elektrostrikčního efektu [189–192]. Posun k vyšším hodnotám molárních poměrů mohl být také zapříčiněn nedostupností některých nabitých skupin cecropinu B pro interakce, čímž došlo k poklesu množství efektivních kladných nábojů na molekule a předpoklad o 10 nábojích tak nebyl v reálu splněn.

Klesající relativní ultrazvuková rychlost v první části titrace byla připisána hlavně změnám v hydrataci. Molekulová hmotnost hyaluronanu nehraje v tomto případě roli a hydratační vody je v této části titrační křivky uvolněno přibližně stejně, neboť relativní rychlost dosahuje přibližně stejných absolutních hodnot nezávisle na molekulové hmotnosti hyaluronanu.

Kladná změna entalpie byla přisuzována desolvataci některých neiontových skupin v důsledku interakce [193]. Nové nekovalentní vazby v systému v průběhu interakcí pravděpodobně nevznikají [194, 195]. Ze záznamů ITC je patrné, že Gibbsova volná energie byla tvořena

především entropickým příspěvkem. Takto velký entropický příspěvek vznikal pravděpodobně také z uvolnění molekul vody v průběhu titrace [196]. Data tedy ukazovala na důležitou roli tvorby společného hydratačního obalu při interakcích hyaluronan-cecropin B.

Vztah mezi strmými změnami titračních křivek a molárním poměrem v těchto interakcích ukazoval na zapojení elektrostatických a dalších interakcí mezi oběma polymery. S ohledem na komplikovanou strukturu antimikrobiálního peptidu připadaly v úvahu především hydrofobní interakce. U hyaluronanu byla v jeho struktuře popsána existence hydrofobních částí [45], které by mohly interagovat s hydrofobními částmi aminokyselinových zbytků v řetězci cecropinu B, především když je narušen hydratační obal interagujících biopolymerů.

Byl také pozorován vliv molekulové hmotnosti hyaluronanu na interakce. Nižší hodnoty relativní rychlosti byly pozorovány pro hyaluronan o síle 1 540 kDa ve srovnání s hyaluronanem o molekulové hmotnosti 9 kDa. Zároveň platí, že nízkomolekulární hyaluronan nevytvářel, na rozdíl od vysokomolekulárního, při interakci sraženiny a při vyšších molárních poměrech docházelo během titrace ke vzniku čirého roztoku.

Nejnižší molekulová hmotnost hyaluronanu 9 kDa, která je v tyčinkové konformaci [20], měla ze všech studovaných molekulových hmotností hyaluronanu ve vodě nejnižší absolutní hodnoty standardního entropického příspěvku, stejně jako standardní interakční Gibbsovy energie (Tabulka 26). Entalpický příspěvek narůstal pouze mírně s rostoucí molekulovou hmotností hyaluronanu. Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky z ultrazvukové spektroskopie, kde 9 kDa hyaluronan dosáhl nejmenší změny v relativní ultrazvukové rychlosti ze všech studovaných molekulových hmotností hyaluronanu. Je tedy pravděpodobně, že tyčinková konformace hyaluronanu uvolňovala v průběhu interakcí menší množství hydratační vody [196]. Naopak ostatní molekulové hmotnosti hyaluronanu v konformaci náhodného klubka [199] měly entropický příspěvek ve vodě přibližně stejný. Hyaluronan s molekulovou hmotností 137 kDa, jehož konformace byla blízko přechodu mezi tyčinkou a náhodným klubkem [20], se podle mikrokolorimetrických měření a dat z HR-US jevil při interakcích cecropinem B více jako náhodné klubko.

Pokud jde o účinek molekulové hmotnosti hyaluronanu, zdá se, že nejdůležitějším faktorem byla, stejně jako v případě interakcí s argininovými oligomery, jeho konformace, tedy zda se vyskytoval v konformaci tyčinky nebo náhodného klubka. Molekulová hmotnost hyaluronanu v tyčinkové konformaci (9 kDa) se v jednotlivých parametrech ITC a HR-US lišil velmi výrazně od delších řetězců hyaluronanu v konformaci náhodného klubka. Konformace řetězce hyaluronanu tedy byla relevantní pro interakce s cecropinem B.

V prostředí PBS, které mělo imitovat prostředí fyziologické, bylo pomocí obou technik zjištěno, že k interakcím mezi polymery pravděpodobně nedocházelo. Ke studiu interakcí zde byl použit hyaluronan s nejvyšší molekulovou hmotností 1 540 kDa, u kterého byl předpoklad možných interakcí nejvyšší s ohledem na výsledky, kterých bylo dosaženo ve vodě. Jak ukazují data v grafech na obrázcích (Obrázek 53 a Obrázek 56) u obou technik zůstávaly hodnoty konstantní. I nadále tedy platila dobrá korelace mezi výsledky z HR-US a ITC. Výsledky těchto měření podporovaly i vizuální pozorování provedená kromě vysokomolekulárního hyaluronanu i s nízkomolekulárním hyaluronanem (Tabulka 25).

Platilo tedy, stejně jako v kapitole 5, že dostatečně velká iontová síla dokázala potlačit interakce mezi hyaluronanem a antimikrobiálním peptidem i v systémech, ve kterých byla jejich přítomnost ve vodě prokázána. Molekulová hmotnost hyaluronanu neměla na výsledek interakcí v prostředí PBS vliv.

Výsledky této studie mohou být shrnuty následovně. Ve vodě byl pro interakce s cecropinem B nutný dostatečně dlouhý hyaluronanový řetězec. Na základě měření a vizuálního pozorování různě dlouhých řetězců hyaluronanu bylo možné usuzovat, že u molekulových hmotností hyaluronanu pod 9 kDa by již interakce neprobíhaly. Bylo zjištěno, že existuje výrazný rozdíl mezi tyčinkovou konformací hyaluronanu a konformací náhodného klubka při interakcích s cecropinem B.

Důležitou roli hrály při interakcích hydratační síly (uvolnění molekul vody z hydratačního obalu hyaluronanu). Elektrostatická složka není zanedbatelná, jak bylo dokázáno pomocí vlivu iontů prostředí – interakce byly v prostředí PBS kompletně potlačeny. S ohledem na stechiometrii interakcí je pravděpodobné, že kromě elektrostatických interakcí byly součástí interakcí ještě další síly, například hydrofobní interakce s některými z hydrofobních aminokyselinových zbytků [87] ve struktuře cecropinu B, který se v roztoku vyskytuje v konformaci náhodného klubka [128, 137, 142] a nemá tedy α -helikální amfipatickou strukturu [128, 137, 143, 144], která by oddělovala hydrofilní a hydrofobní aminokyselinové zbytky. Je velmi pravděpodobné, že hydratační síly byly kombinované spolu s elektrostatickými silami za vzniku elektrostrikčního efektu.

Z výsledků je patrné, že systém nebyl schopen ustát iontovou sílu fyziologického prostředí, ale mohl by být vhodný například jako základ pro topické aplikace na kůži či některé sliznice [201–203].

6.6 Závěr

Cílem této kapitoly bylo prozkoumat interakce mezi hyaluronanem a antimikrobiálním peptidem cecropinem B. Interakce byly zkoumány s použitím izotermické titrační kalorimetrie a ultrazvukové spektroskopie s vysokým rozlišením. Cecropin B interagoval ve vodě se všemi studovanými molekulovými hmotnostmi hyaluronanu v rozsahu 9–1 540 kDa. Vysycení interakcí nastalo kolem molárního poměru (disacharidová jednotka hyaluronanu, předpokládaný počet kladných nábojů na antimikrobiálním peptidu) odpovídajícímu 1,5 (tedy za bodem předpokládané nábojové rovnosti). Je pravděpodobné, že kromě elektrostatických interakcí hrály roli ještě další síly, například hydrofobní interakce mezi hyaluronanem a některými hydrofobními aminokyselinovými zbytky ve struktuře cecropinu B. Posun k vyšším hodnotám molárních poměrů mohl být také zapříčiněn nedostupností některých nabitých skupin cecropinu B pro interakce, čímž došlo k poklesu množství efektivních kladných nábojů na molekule cecropinu B. Interakce byly v prostředí PBS potlačeny nezávisle na zvolené molekulové hmotnosti hyaluronanu. Jako zajímavá možnost pro další výzkum se jeví přenést sraženinu vzniklou ve vodě do prostředí PBS a prozkoumat, zda dochází k jejímu úplnému rozpadu, nebo zda zůstávají polymery například v nanoměřítku zagregovány.

Interakce výrazně ovlivňovala molekulová hmotnost hyaluronanu, zejména pak typ konformace hyaluronanu (tyčinka nebo náhodné klubko). Z výsledků se dá usuzovat, že příliš krátký řetězec hyaluronanu by s cecropinem B neinteragoval.

Cecropin B nebyl schopen interagovat s hyaluronanem ve fyziologickém prostředí. Z toho vyplývá omezený okruh praktických aplikací, neboť není možné jeho podání přímo do těla. Jako vhodné se jeví zejména topické aplikace například na kůži či některé sliznice.

7 ZÁVĚR

Předložená dizertační práce pojednává o základním výzkumu interakcí, jejich charakterizaci metodami ultrazvukové spektroskopie a izotermické titrační kalorimetrie, a potenciometrickými titracemi mezi hyaluronanem a (oligo)aminokyselinami, především argininem, respektive bazickým antimikrobiálním peptidem cecropinem B. Tato problematika dosud nebyla ve světové vědecké literatuře zkoumána. Dizertace tak představuje originální příspěvek k porozumění chování hyaluronanu ve vodném prostředí a jeho mezimolekulových interakcí.

Monomerní aminokyseliny byly studovány zejména pomocí potenciometrických titrací, v průběhu kterých bylo měřeno pH titrovaných roztoků. S pomocí této techniky se nepodařilo potvrdit přítomnost interakcí, což je v souladu s výsledky z ultrazvukové spektroskopie, která v případě monomerního argininu také žádné interakce neodhalila.

V případě argininových oligomerů bylo úspěšně ověřeno, že oligomery argininu interagují s hyaluronanem až od určité délky oligomeru argininu, přechod nastává mezi oktamerem a dekamerem argininu, vyšší oligomery jednoznačně interagují, zatímco u kratších se interakce prokázat nepodařilo nezávisle na molekulové hmotnosti hyaluronanu. Interakce bylo možné potlačit dostatečně vysokou iontovou silou, za předpokladu, že řetězec oligomeru argininu nebyl příliš dlouhý nebo molekulová hmotnost hyaluronanu příliš nízká. Tyčinková konformace hyaluronanu nebo konformace náhodného klubka hyaluronanu byly pro interakce s argininovými oligomery důležité z hlediska intenzity interakcí, obecně se interakce s hyaluronanem v tyčinkové konformaci jevily jako slabší a snadněji ovlivnitelné iontovou silou.

Interakce mezi argininovými oligomery a hyaluronanem byly vysvětleny kombinací účinků jednotlivých sil. Kromě elektrostatických interakcí kombinovaných s elektrostrikcí působí pravděpodobně ještě hydratační síly (uvolňování molekul vody z hyaluronanového hydratačního obalu), vodíkové vazby nebo hydrofobní kontakty mezi desolvatovanými částmi (makro)molekul spolu se specifickými konformacemi hyaluronanu a argininových oligomerů, které zahrnují schopnost argininu tvořit kontaktní iontové páry.

Navíc byly objeveny nečekané formy interakcí u specifických délek oligomeru argininu, nicméně použité techniky neposkytují dostatečné množství chemických informací pro jejich detailnější charakterizaci. Zde se otevírá zajímavá možnost pro další experimenty nebo molekulární modelování pro získání detailnějších informací o probíhajících procesech.

Zvolený zástupce bazických antimikrobiálních peptidů cecropin B prokázal pouze omezenou schopnost interakcí s hyaluronanem, které byly z podstaty podobné jako interakce mezi hyaluronanem a oligomery argininu. Ve vodě interakce probíhaly se všemi zvolenými molekulovými hmotnostmi hyaluronanu, interakce stejně jako v případě oligomerů argininu výrazně ovlivňoval typ konformace hyaluronanu. Ve fyziologickém prostředí nebyl cecropin B schopen s hyaluronanem interagovat nezávisle na zvolené molekulové hmotnosti hyaluronanu. Případné praktické aplikace jsou tak velmi limitované, především na topické podání. Pro praktické aplikace ve fyziologickém prostředí by bylo nutné najít jiný antimikrobiální peptid, který by byl schopen silnějších interakcí s hyaluronanem v prostředí o vyšší iontové síle.

Protože všechny experimenty probíhaly při teplotě 25 °C, další výzkum by se mohl zabývat interakcemi za zvýšené teploty, zejména fyziologické, 37 °C, a to jak v případě oligomerů argininu, tak u cecropinu B, zejména s ohledem na prostředí, ve kterém se interakce mezi hyaluronanem a aminokyselinami běžně odehrávají. Dále by bylo vhodné podobně podrobně prozkoumat chování oligomerů lysinu při interakcích s hyaluronanem, především pro jeho neschopnost tvořit, na rozdíl od oligomerního argininu, kontaktní iontové páry. Sraženina vzniklá při interakcích mezi antimikrobiálním peptidem cecropinem B a hyaluronanem při interakcích ve vodě by mohla být studována s ohledem na možnost jejího převodu na mikro- či nano-částice pro nosičové aplikace, pokud by již ve vodě vytvořená sraženina byla schopná existovat ve fyziologickém prostředí.

8 PODÍL DOKTORANDA; VÝZNAM VÝSLEDKŮ

Na základě vnitřního předpisu VUT - Studijní a zkušební řád VUT, článku 42 a směrnice č. 2/2017 - Pravidla pro organizaci studia na FCH včetně dodatků 1 a 2, je na tomto místě vymezen podíl doktoranda na dosažených výsledcích zahrnutých do dizertační práce a zhodnocen jejich přínos.

Všechny experimenty v dizertační práci byly po rámcových konzultacích se školitelem navrženy a prováděny doktorandem zcela samostatně, stejně jako vyhodnocení jejich výsledků. Do práce nebyla zapojena žádná další osoba. Publikační výstupy byly připravovány ve vzájemné spolupráci doktoranda a školitele s využitím externí jazykové revize.

Dizertační práce pojednává o základním výzkumu interakcí, o jejich charakterizaci metodami ultrazvukové spektroskopie a izotermické titrační kalorimetrie mezi hyaluronanem a oligomery argininu, respektive antimikrobiálním peptidem. Tato problematika dosud nebyla ve světové vědecké literatuře zkoumána. Dizertace tak představuje originální příspěvek k porozumění chování hyaluronanu a jeho mezimolekulových interakcí. Přínos výsledků je shrnut v kapitole 7 Závěr.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] MEYER, Karl a W. John PALMER. The Polysaccharide of the Vitreous Humor. *Journal of Biological Chemistry*. 1934, **107**, 629–634.
- [2] GIRISH, K.S. a K. KEMPARAJU. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sciences* [online]. 2007, **80**(21), 1921–1943. ISSN 00243205. Dostupné z: doi:10.1016/j.lfs.2007.02.037
- [3] HARGITTAI, István a Magdolna HARGITTAI. Molecular structure of hyaluronan: an introduction. *Structural Chemistry* [online]. 2008, **19**(5), 697–717. ISSN 1040-0400. Dostupné z: doi:10.1007/s11224-008-9370-3
- [4] PREHM, Peter. Polysaccharides I Polysaccharides from Prokaryotes. In: E. J. VANDAMME, S. DE BAETS a A. STEINBUCHHEL, ed. *Biopolymers*. B.m.: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2003. ISBN 3-527-30226-3.
- [5] MEYER, Karl. THE BIOLOGICAL SIGNIFICANCE OF HYALURONIC ACID AND HYALURONIDASE. *Physiological Reviews* [online]. 1947, **27**(3), 335–359. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.1947.27.3.335
- [6] KOGAN, Grigorij, Ladislav ŠOLTÉS, Robert STERN a Peter GEMEINER. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters* [online]. 2006, **29**(1), 17–25. ISSN 0141-5492. Dostupné z: doi:10.1007/s10529-006-9219-z
- [7] ALMOND, A. Hyaluronan. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2007, **64**(13), 1591–1596. ISSN 1420-682X. Dostupné z: doi:10.1007/s00018-007-7032-z
- [8] LAURENT, Torvard C. a J. Robert E. FRASER. Hyaluronan. *The FASEB Journal* [online]. 1992, **6**(7), 2397–2404. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fasebj.6.7.1563592
- [9] REED, R. K., K. LILJA a T. C. LAURENT. Hyaluronan in the rat with special reference to the skin. *Acta Physiologica Scandinavica* [online]. 1988, **134**(3), 405–411. ISSN 00016772. Dostupné z: doi:10.1111/j.1748-1716.1988.tb08508.x
- [10] NECAS, J., L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER a J. KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Veterinární Medicina* [online]. 2008, **53**(No. 8), 397–411. ISSN 03758427. Dostupné z: doi:10.17221/1930-VETMED
- [11] HAXAIRE, K., I. BRACCINI, M. MILAS, M. RINAUDO a S. PEREZ. Conformational behavior of hyaluronan in relation to its physical properties as probed by molecular modeling. *Glycobiology* [online]. 2000, **10**(6), 587–594. ISSN 0959-6658. Dostupné z: doi:10.1093/glycob/10.6.587
- [12] WIDNER, Bill, Régine BEHR, Steve VON DOLLEN, Maria TANG, Tia HEU, Alan SLOMA, Dave STERNBERG, Paul L. DEANGELIS, Paul H. WEIGEL a Steve BROWN. Hyaluronic Acid Production in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2005, **71**(7), 3747–3752. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.71.7.3747-3752.2005
- [13] JIN, Peng, Zhen KANG, Panhong YUAN, Guocheng DU a Jian CHEN. Production of specific-molecular-weight hyaluronan by metabolically engineered *Bacillus subtilis* 168. *Metabolic Engineering* [online]. 2016, **35**, 21–30. ISSN 10967176. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymben.2016.01.008

- [14] LAURENT, Torvard C. Biochemistry of Hyaluronan. *Acta Oto-Laryngologica* [online]. 1987, **104**(sup442), 7–24. ISSN 0001-6489. Dostupné z: doi:10.3109/00016488709102833
- [15] CLELAND, Robert L., John L. WANG a David M. DETWEILER. Polyelectrolyte properties of sodium hyaluronate. 2. Potentiometric titration of hyaluronic acid. *Macromolecules* [online]. 1982, **15**(2), 386–395. ISSN 0024-9297. Dostupné z: doi:10.1021/ma00230a037
- [16] MERO, Anna a Monica CAMPISI. Hyaluronic Acid Bioconjugates for the Delivery of Bioactive Molecules. *Polymers* [online]. 2014, **6**(2), 346–369. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym6020346
- [17] PREHM, Peter. Biosynthesis of hyaluronan: direction of chain elongation. *Biochemical Journal* [online]. 2006, **398**(3), 469–473. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/BJ20060431
- [18] SCOTT, John E. Secondary structures in hyaluronan solutions: chemical and biological implications. In: David EVERED a Julie WHELAN, ed. *Ciba Foundation Symposium 143 - The Biology of Hyaluronan* [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd., 1989, Novartis Foundation Symposia, s. 6–20. ISBN 9780470513774. Dostupné z: doi:10.1002/9780470513774
- [19] SCOTT, John E. a Frank HEATLEY. Biological Properties of Hyaluronan in Aqueous Solution Are Controlled and Sequestered by Reversible Tertiary Structures, Defined by NMR Spectroscopy. *Biomacromolecules* [online]. 2002, **3**(3), 547–553. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm010170j
- [20] SIMULESCU, Vasile, Jakub MONDEK, Michal KALINA a Miloslav PEKAŘ. Kinetics of long-term degradation of different molar mass hyaluronan solutions studied by SEC-MALLS. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2015, **111**, 257–262. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2014.12.005
- [21] SIMULESCU, Vasile, Michal KALINA, Jakub MONDEK a Miloslav PEKAŘ. Long-term degradation study of hyaluronic acid in aqueous solutions without protection against microorganisms. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2016, **137**, 664–668. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2015.10.101
- [22] SHEEHAN, J.K., K.H. GARDNER a E.D.T. ATKINS. Hyaluronic acid: a double-helical structure in the presence of potassium at low pH and found also with the cations ammonium, rubidium and caesium. *Journal of Molecular Biology* [online]. 1977, **117**(1), 113–135. ISSN 00222836. Dostupné z: doi:10.1016/0022-2836(77)90027-4
- [23] TOOLE, B. P. Hyaluronan in morphogenesis. *Journal of Internal Medicine* [online]. 1997, **242**(1), 35–40. ISSN 09546820. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2796.1997.00171.x
- [24] TOOLE, Bryan P., Thomas N. WIGHT a Markku I. TAMMI. Hyaluronan-Cell Interactions in Cancer and Vascular Disease. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2002, **277**(7), 4593–4596. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.R100039200
- [25] TOOLE, B. P. Hyaluronan promotes the malignant phenotype. *Glycobiology* [online]. 2002, **12**(3), 37R–42R. ISSN 0959-6658. Dostupné z: doi:10.1093/glycob/12.3.37R

- [26] KOSAKI, Rika, Ken WATANABE a Yu YAMAGUCHI. Overproduction of Hyaluronan by Expression of the Hyaluronan Synthase Has2 Enhances Anchorage-independent Growth and Tumorigenicity. *American Association for Cancer Research*. 1999, **59**(5), 1141–1145.
- [27] PONTA, Helmut, Larry SHERMAN a Peter A. HERRLICH. CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2003, **4**(1), 33–45. ISSN 1471-0072. Dostupné z: doi:10.1038/nrm1004
- [28] LEITE, Michel L., Nicolau B. DA CUNHA a Fabricio F. COSTA. Antimicrobial peptides, nanotechnology, and natural metabolites as novel approaches for cancer treatment. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2018, **183**, 160–176. ISSN 01637258. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2017.10.010
- [29] D'AGOSTINO, Antonella, Antonietta STELLAVATO, Luisana CORSUTO, Paola DIANA, Rosanna FILOSA, Annalisa LA GATTA, Mario DE ROSA a Chiara SCHIRALDI. Is molecular size a discriminating factor in hyaluronan interaction with human cells? *Carbohydrate Polymers* [online]. 2017, **157**, 21–30. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2016.07.125
- [30] GAO, Feng, Yiwen LIU, Yiqing HE, Cuixia YANG, Yingzhi WANG, Xiaoxing SHI a Guo WEI. Hyaluronan oligosaccharides promote excisional wound healing through enhanced angiogenesis. *Matrix Biology* [online]. 2010, **29**(2), 107–116. ISSN 0945053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.matbio.2009.11.002
- [31] XU, H., T. ITO, A. TAWADA, H. MAEDA, H. YAMANOKUCHI, K. ISAHARA, K. YOSHIDA, Y. UCHIYAMA a A. ASARI. Effect of Hyaluronan Oligosaccharides on the Expression of Heat Shock Protein 72. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2002, **277**(19), 17308–17314. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M112371200
- [32] TOOLE, B.P. Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins. *Current Opinion in Cell Biology* [online]. 1990, **2**(5), 839–844. ISSN 09550674. Dostupné z: doi:10.1016/0955-0674(90)90081-O
- [33] KOHDA, Daisuke, Craig J MORTON, Ashfaq A PARKAR, Hideki HATANAKA, Fuyuhiko M INAGAKI, Iain D CAMPBELL a Anthony J DAY. Solution Structure of the Link Module: A Hyaluronan-Binding Domain Involved in Extracellular Matrix Stability and Cell Migration. *Cell* [online]. 1996, **86**(5), 767–775. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/S0092-8674(00)80151-8
- [34] KAROUSOU, Evgenia, Suniti MISRA, Shibnath GHATAK, Katalin DOBRA, Martin GÖTTE, Davide VIGETTI, Alberto PASSI, Nikos K. KARAMANOS a Spyros S. SKANDALIS. Roles and targeting of the HAS/hyaluronan/CD44 molecular system in cancer. *Matrix Biology* [online]. 2017, **59**, 3–22. ISSN 0945053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.matbio.2016.10.001
- [35] VUORIO, Joni, Ilpo VATTULAINEN a Hector MARTINEZ-SEARA. Atomistic fingerprint of hyaluronan–CD44 binding. *PLOS Computational Biology* [online]. 2017, **13**(7), e1005663. ISSN 1553-7358. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pcbi.1005663
- [36] NAGAE, Masamichi a Yoshiki YAMAGUCHI. Three-Dimensional Structural Aspects of Protein–Polysaccharide Interactions. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2014, **15**(3), 3768–3783. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms15033768

- [37] RAO, N. Vijayakameswara, Hong Yeol YOON, Hwa Seung HAN, Hyewon KO, Soyoun SON, Minchang LEE, Hansang LEE, Dong-Gyu JO, Young Mo KANG a Jae Hyung PARK. Recent developments in hyaluronic acid-based nanomedicine for targeted cancer treatment. *Expert Opinion on Drug Delivery* [online]. 2016, **13**(2), 239–252. ISSN 1742-5247. Dostupné z: doi:10.1517/17425247.2016.1112374
- [38] DAY, Anthony J. a Glenn D. PRESTWICH. Hyaluronan-binding Proteins: Tying Up the Giant. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2002, **277**(7), 4585–4588. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.R100036200
- [39] BANERJI, Suneale, Alan J WRIGHT, Martin NOBLE, David J MAHONEY, Iain D CAMPBELL, Anthony J DAY a David G JACKSON. Structures of the Cd44–hyaluronan complex provide insight into a fundamental carbohydrate-protein interaction. *Nature Structural & Molecular Biology* [online]. 2007, **14**(3), 234–239. ISSN 1545-9993. Dostupné z: doi:10.1038/nsmb1201
- [40] PLAZINSKI, Wojciech a Agnieszka KNYS-DZIECIUCH. Interactions between CD44 protein and hyaluronan: insights from the computational study. *Mol. BioSyst.* [online]. 2012, **8**(2), 543–547. ISSN 1742-206X. Dostupné z: doi:10.1039/C2MB05399C
- [41] BHATTACHARYA, D. S., D. SVECHKAREV, J. J. SOUCHEK, T. K. HILL, M. A. TAYLOR, A. NATARAJAN a A. M. MOHS. Impact of structurally modifying hyaluronic acid on CD44 interaction. *J. Mater. Chem. B* [online]. 2017, **5**(41), 8183–8192. ISSN 2050-750X. Dostupné z: doi:10.1039/C7TB01895A
- [42] MISRA, Suniti, Vincent C. HASCALL, Roger R. MARKWALD a Shibnath GHATAK. Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer. *Frontiers in Immunology* [online]. 2015, **6**. ISSN 1664-3224. Dostupné z: doi:10.3389/fimmu.2015.00201
- [43] VIOLA, Manuela, Davide VIGETTI, Evgenia KAROUSOU, Maria Luisa D'ANGELO, Ilaria CAON, Paola MORETTO, Giancarlo DE LUCA a Alberto PASSI. Biology and biotechnology of hyaluronan. *Glycoconjugate Journal* [online]. 2015, **32**(3–4), 93–103. ISSN 0282-0080. Dostupné z: doi:10.1007/s10719-015-9586-6
- [44] HRUBY, Karl B. From a forester's boy to a university professor. *Survey of Ophthalmology* [online]. 1990, **34**(6), 463–469. ISSN 00396257. Dostupné z: doi:10.1016/0039-6257(90)90128-I
- [45] SCOTT, J E, C CUMMINGS, A BRASS a Y CHEN. Secondary and tertiary structures of hyaluronan in aqueous solution, investigated by rotary shadowing-electron microscopy and computer simulation. Hyaluronan is a very efficient network-forming polymer. *Biochemical Journal* [online]. 1991, **274**(3), 699–705. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj2740699
- [46] YOSHIDA, Mamoru, Shigaku SAI, Keishi MARUMO, Takaaki TANAKA, Naoki ITANO, Koji KIMATA a Katsuyuki FUJII. Expression analysis of three isoforms of hyaluronan synthase and hyaluronidase in the synovium of knees in osteoarthritis and rheumatoid arthritis by quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Arthritis research & therapy* [online]. 2004, **6**(6), R514-20. ISSN 1478-6362 (Electronic). Dostupné z: doi:10.1186/ar1223

- [47] BAND, P.A., J. HEETER, H.-G. WISNIEWSKI, V. LIUBLINSKA, C.W. PATTANAYAK, R.J. KARIA, T. STABLER, E.A. BALAZS a V.B. KRAUS. Hyaluronan molecular weight distribution is associated with the risk of knee osteoarthritis progression. *Osteoarthritis and Cartilage* [online]. 2015, **23**(1), 70–76. ISSN 10634584. Dostupné z: doi:10.1016/j.joca.2014.09.017
- [48] BALAZS, Endre A. a Janet L. DENLINGER. Sodium hyaluronate and joint function. *Journal of Equine Veterinary Science* [online]. 1985, **5**(4), 217–228. ISSN 07370806. Dostupné z: doi:10.1016/S0737-0806(85)80102-7
- [49] BROWN, Marc B., Ben FORBES, Manita HANPANITCHAROEN a Gary P. MARTIN. THE USE OF HYALURONAN IN TOPICAL DRUG DELIVERY. In: *Hyaluronan* [online]. B.m.: Elsevier, 2002, s. 249–256. Dostupné z: doi:10.1533/9781845693121.247
- [50] WOLF, John E., Joseph Richard TAYLOR, Eduardo TSCHEN a Sewan KANG. Topical 3.0% diclofenac in 2.5% hyaluronan gel in the treatment of actinic keratoses. *International Journal of Dermatology* [online]. 2001, **40**(11), 709–713. ISSN 00119059. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-4362.2001.01324.x
- [51] MORIMOTO, K, H YAMAGUCHI, Y IWAKURA, K MORISAKA, Y OHASHI a Y NAKAI. Effects of viscous hyaluronate-sodium solutions on the nasal absorption of vasopressin and an analogue. *Pharmaceutical research* [online]. 1991, **8**(4), 471–474. ISSN 0724-8741 (Print). Dostupné z: doi:10.1023/a:1015894910416
- [52] LIAO, Yong-Hong, Stuart A. JONES, Ben FORBES, Gary P. MARTIN a Marc B. BROWN. Hyaluronan: Pharmaceutical Characterization and Drug Delivery. *Drug Delivery* [online]. 2005, **12**(6), 327–342. ISSN 1071-7544. Dostupné z: doi:10.1080/10717540590952555
- [53] CORADINI, Danila, Cinzia PELLIZZARO, Giuliana MIGLIERINI, Maria Grazia DAIDONE a Alberto PERBELLINI. Hyaluronic acid as drug delivery for sodium butyrate: Improvement of the anti-proliferative activity on a breast-cancer cell line. *International Journal of Cancer* [online]. 1999, **81**(3), 411–416. ISSN 0020-7136. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19990505)81:3<411::AID-IJC15>3.0.CO;2-F
- [54] BANZATO, A., S. BOBISSE, M. RONDINA, D. RENIER, F. BETTELLA, G. ESPOSITO, L. QUINTIERI, L. MELENDEZ-ALAFORT, U. MAZZI, P. ZANOVELLO a A. ROSATO. A Paclitaxel-Hyaluronan Bioconjugate Targeting Ovarian Cancer Affords a Potent In vivo Therapeutic Activity. *Clinical Cancer Research* [online]. 2008, **14**(11), 3598–3606. ISSN 1078-0432. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-2019
- [55] CAI, Shuang, Sharadvi THATI, Taryn R. BAGBY, Hassam-Mustafa DIAB, Neal M. DAVIES, Mark S. COHEN a M. Laird FORREST. Localized doxorubicin chemotherapy with a biopolymeric nanocarrier improves survival and reduces toxicity in xenografts of human breast cancer. *Journal of Controlled Release* [online]. 2010, **146**(2), 212–218. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2010.04.006
- [56] KIM, Eun-Joong, Gayong SHIM, Kwangmyeung KIM, Ick Chan KWON, Yu-Kyoung OH a Chang-Koo SHIM. Hyaluronic acid complexed to biodegradable poly L-arginine for targeted delivery of siRNAs. *The Journal of Gene Medicine* [online]. 2009, **11**(9), 791–803. ISSN 1099498X. Dostupné z: doi:10.1002/jgm.1352

- [57] SANTOS, Hélder A., José A. MANZANARES, Lasse MURTO MÄKI a Kyösti KONTTURI. Thermodynamic analysis of binding between drugs and glycosaminoglycans by isothermal titration calorimetry and fluorescence spectroscopy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2007, **32**(2), 105–114. ISSN 09280987. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejps.2007.06.003
- [58] GRYPONPRÉ, Kristopher R., Bethany A. STAGGEMEIER, Paul L. DUBIN a Kevin W. MATTISON. Identification by Integrated Computer Modeling and Light Scattering Studies of an Electrostatic Serum Albumin-Hyaluronic Acid Binding Site. *Biomacromolecules* [online]. 2001, **2**(2), 422–429. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm005656z
- [59] YE, Fengbin, Yuanyi XIE, Henrik JENSEN, Susan Weng LARSEN, Anan YAGHMUR, Claus LARSEN a Jesper ØSTERGAARD. Interaction of Amino Acid and Dipeptide β -Naphthylamide Derivatives with Hyaluronic Acid and Human Serum Albumin Studied by Capillary Electrophoresis Frontal Analysis. *Chromatographia* [online]. 2013, **76**(1–2), 49–57. ISSN 0009-5893. Dostupné z: doi:10.1007/s10337-012-2369-3
- [60] BALBINO, Tiago A., Gabriela S.C. CORREA, Marianna T.P. FAVARO, Marcelo A.S. TOLEDO, Adriano R. AZZONI a Lucimara G. DE LA TORRE. Physicochemical and in vitro evaluation of cationic liposome, hyaluronic acid and plasmid DNA as pseudo-ternary complexes for gene delivery. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2015, **484**, 262–270. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2015.08.005
- [61] APPEL, Eric A., Mark W. TIBBITT, Jessica M. GREER, Owen S. FENTON, Klaus KREUELS, Daniel G. ANDERSON a Robert LANGER. Exploiting Electrostatic Interactions in Polymer–Nanoparticle Hydrogels. *ACS Macro Letters* [online]. 2015, **4**(8), 848–852. ISSN 2161-1653. Dostupné z: doi:10.1021/acsmacrolett.5b00416
- [62] RUSU-BALAITA, L., J. DESBRIERES a M. RINAUDO. Formation of a biocompatible polyelectrolyte complex: chitosan-hyaluronan complex stability. *Polymer Bulletin* [online]. 2003, **50**(1–2), 91–98. ISSN 0170-0839. Dostupné z: doi:10.1007/s00289-003-0144-1
- [63] FURLANI, Franco, Pasquale SACCO, Eva DECLEVA, Renzo MENEGAZZI, Ivan DONATI, Sergio PAOLETTI a Eleonora MARSICH. Chitosan Acetylation Degree Influences the Physical Properties of Polysaccharide Nanoparticles: Implication for the Innate Immune Cells Response. *ACS Applied Materials & Interfaces* [online]. 2019, **11**(10), 9794–9803. ISSN 1944-8244. Dostupné z: doi:10.1021/acsmi.8b21791
- [64] RINAUDO, Marguerite. Rheological investigation on hyaluronan–fibrinogen interaction. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2008, **43**(5), 444–450. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2008.08.009
- [65] KARGEROVÁ, Andrea a Miloslav PEKAŘ. High-Resolution Ultrasonic Spectroscopy Study of Interactions between Hyaluronan and Cationic Surfactants. *Langmuir* [online]. 2014, **30**(40), 11866–11872. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la501852a
- [66] CHYTIL, Martin, Martin TROJAN a Alexander KOVALENKO. Study on mutual interactions and electronic structures of hyaluronan with Lysine, 6-Aminocaproic acid and Arginine. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2016, **142**, 8–15. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2016.01.035

- [67] KROUSKÁ, Jitka. *Interactions between Hyaluronan and Surface Active Substances*. Brno, 2012, 101s. Dizertační práce. Brno University of Technology, Faculty of Chemistry.
- [68] OYARZUN-AMPUERO, Felipe A., Francisco M. GOYCOOLEA, Dolores TORRES a Maria J. ALONSO. A new drug nanocarrier consisting of polyarginine and hyaluronic acid. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2011, **79**(1), 54–57. ISSN 09396411. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2011.04.008
- [69] VILLAMIZAR-SARMIENTO, María Gabriela, Ignacio MORENO-VILLOSLADA, Samuel MARTÍNEZ, Annesi GIACAMAN, Victor MIRANDA, Alejandra VIDAL, Sandra L. ORELLANA, Miguel CONCHA, Francisca PAVICIC, Judit G. LISONI, Lisette LEYTON a Felipe A. OYARZUN-AMPUERO. Ionic Nanocomplexes of Hyaluronic Acid and Polyarginine to Form Solid Materials: A Green Methodology to Obtain Sponges with Biomedical Potential. *Nanomaterials* [online]. 2019, **9**(7), 944. ISSN 2079-4991. Dostupné z: doi:10.3390/nano9070944
- [70] TURGEON, S.L., C. SCHMITT a C. SANCHEZ. Protein–polysaccharide complexes and coacervates. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* [online]. 2007, **12**(4–5), 166–178. ISSN 13590294. Dostupné z: doi:10.1016/j.cocis.2007.07.007
- [71] COOPER, Christy L., Ann GOULDING, A. Basak KAYITMAZER, Serge ULRICH, Serge STOLL, Sibel TURKSEN, Shin-ichi YUSA, Anil KUMAR a Paul L. DUBIN. Effects of Polyelectrolyte Chain Stiffness, Charge Mobility, and Charge Sequences on Binding to Proteins and Micelles. *Biomacromolecules* [online]. 2006, **7**(4), 1025–1035. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm050592j
- [72] KAYITMAZER, A. B., E. SEYREK, P. L. DUBIN a B. A. STAGGEMEIER. Influence of Chain Stiffness on the Interaction of Polyelectrolytes with Oppositely Charged Micelles and Proteins †. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2003, **107**(32), 8158–8165. ISSN 1520-6106. Dostupné z: doi:10.1021/jp034065a
- [73] LENORMAND, Hélène, Brigitte DESCHREVEL, Frédéric TRANCHEPAIN a Jean-Claude VINCENT. Electrostatic interactions between hyaluronan and proteins at pH 4: How do they modulate hyaluronidase activity. *Biopolymers* [online]. 2008, **89**(12), 1088–1103. ISSN 00063525. Dostupné z: doi:10.1002/bip.21061
- [74] LENORMAND, Hélène, Brigitte DESCHREVEL a Jean-Claude VINCENT. Chain length effects on electrostatic interactions between hyaluronan fragments and albumin. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2010, **82**(3), 887–894. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2010.06.011
- [75] MALAY, Özge, Oguz BAYRAKTAR a Ayşegül BATIGÜN. Complex coacervation of silk fibroin and hyaluronic acid. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2007, **40**(4), 387–393. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2006.09.017
- [76] LENORMAND, Hélène, Brigitte DESCHREVEL a Jean-Claude VINCENT. pH effects on the hyaluronan hydrolysis catalysed by hyaluronidase in the presence of proteins: Part I. Dual aspect of the pH-dependence. *Matrix Biology* [online]. 2010, **29**(4), 330–337. ISSN 0945053X. Dostupné z: doi:10.1016/j.matbio.2009.12.007
- [77] MORFIN, I., E. BUHLER, F. COUSIN, I GRILLO a F. BOUÉ. Rodlike Complexes of a Polyelectrolyte (Hyaluronan) and a Protein (Lysozyme) Observed by SANS. *Biomacromolecules* [online]. 2011, **12**(4), 859–870. ISSN 1525-7797. Dostupné z: doi:10.1021/bm100861g

- [78] GONZÁLEZ-ARAMUNDIZ, José Vicente, Mercedes PELETEIRO OLMEDO, África GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, María José ALONSO FERNÁNDEZ a Noemi Stefánia CSABA. Protamine-based nanoparticles as new antigen delivery systems. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [online]. 2015, **97**, 51–59. ISSN 09396411. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejpb.2015.09.019
- [79] UMERSKA, Anita, Krzysztof J. PALUCH, Maria-Jose Santos MARTINEZ, Owen I. CORRIGAN, Carlos MEDINA a Lidia TAJBER. Self-Assembled Hyaluronate/Protamine Polyelectrolyte Nanoplexes: Synthesis, Stability, Biocompatibility and Potential Use as Peptide Carriers. *Journal of Biomedical Nanotechnology* [online]. 2014, **10**(12), 3658–3673. ISSN 15507033. Dostupné z: doi:10.1166/jbn.2014.1878
- [80] MANDALITI, Walter, Ridvan NEPRAVISHTA, Francesca PICA, Paola Sinibaldi VALLEBONA, Enrico GARACI a Maurizio PACI. Thymosin α 1 Interacts with Hyaluronic Acid Electrostatically by Its Terminal Sequence LKEKK. *Molecules* [online]. 2017, **22**(11), 1843. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules22111843
- [81] MURRAY, Robert K., Daryl K. GRANNER, Peter A. MAYES a Victor W. RODWELL. *Harperova Biochemie*. 23. vyd.,. Jinočany: H+H (H&H), 2002. ISBN 80-731-9013-3.
- [82] KIRSTE, Burkhard. *Lysine* [online]. 1998 [vid. 2020-07-03]. Dostupné z: http://www.chemie.fu-berlin.de/chemistry/bio/aminoacid/lysin_en.html
- [83] PFEFFERLE, Walter, Bettina MÖCKEL, Brigitte BATHE a Achim MARX. Biotechnological Manufacture of Lysine. In: *Microbial Production of L-Amino Acids* [online]. 2003, s. 59–112. ISBN 978-3-540-43383-5. Dostupné z: doi:10.1007/3-540-45989-8_3
- [84] NAGAI, Hidetada, Ko KUWABARA a Giorgio CARTA. Temperature Dependence of the Dissociation Constants of Several Amino Acids. *Journal of Chemical & Engineering Data* [online]. 2008, **53**(3), 619–627. ISSN 0021-9568. Dostupné z: doi:10.1021/je700067a
- [85] UTAGAWA, Takashi. Production of Arginine by Fermentation. *The Journal of Nutrition* [online]. 2004, **134**(10), 2854S-2857S. ISSN 0022-3166. Dostupné z: doi:10.1093/jn/134.10.2854S
- [86] FITCH, Carolyn A., Gerald PLATZER, Mark OKON, Bertrand GARCIA-MORENO E. a Lawrence P. MCINTOSH. Arginine: Its p K a value revisited. *Protein Science* [online]. 2015, **24**(5), 752–761. ISSN 09618368. Dostupné z: doi:10.1002/pro.2647
- [87] VODRÁŽKA, Z. a J. KRECHL. *Bioorganická chemie*. 1. vyd. Praha: SNTL - Nakladatelství technické literatury, n.p., 1991. ISBN 80-03-00547-7.
- [88] GONZÁLEZ-ARAMUNDIZ, José Vicente, María Victoria LOZANO, Ana SOUSA-HERVES, Eduardo FERNANDEZ-MEGIA a Noemi CSABA. Polypeptides and polyaminoacids in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery* [online]. 2012, **9**(2), 183–201. ISSN 1742-5247. Dostupné z: doi:10.1517/17425247.2012.647906
- [89] OSTOLSKA, Iwona a Małgorzata WIŚNIEWSKA. Application of the zeta potential measurements to explanation of colloidal Cr₂O₃ stability mechanism in the presence of the ionic polyamino acids. *Colloid and Polymer Science* [online]. 2014, **292**(10), 2453–2464. ISSN 0303-402X. Dostupné z: doi:10.1007/s00396-014-3276-y

- [90] XU, Helin, Qing YAO, Cuifang CAI, Jinxin GOU, Yu ZHANG, Haijun ZHONG a Xing TANG. Amphiphilic poly(amino acid) based micelles applied to drug delivery: The in vitro and in vivo challenges and the corresponding potential strategies. *Journal of Controlled Release* [online]. 2015, **199**, 84–97. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2014.12.012
- [91] MITCHELL, D.J., L. STEINMAN, D.T. KIM, C.G. FATHMAN a J.B. ROTHBARD. Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *Journal of Peptide Research* [online]. 2000, **56**(5), 318–325. ISSN 1397-002X. Dostupné z: doi:10.1034/j.1399-3011.2000.00723.x
- [92] FUCHS, Stephen M. a Ronald T. RAINES. Pathway for Polyarginine Entry into Mammalian Cells †. *Biochemistry* [online]. 2004, **43**(9), 2438–2444. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi035933x
- [93] TAKECHI, Yuki, Haruka YOSHII, Masafumi TANAKA, Toru KAWAKAMI, Saburo AIMOTO a Hiroyuki SAITO. Physicochemical Mechanism for the Enhanced Ability of Lipid Membrane Penetration of Polyarginine. *Langmuir* [online]. 2011, **27**(11), 7099–7107. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la200917y
- [94] ALHAKAMY, Nabil A. a Cory J. BERKLAND. Polyarginine Molecular Weight Determines Transfection Efficiency of Calcium Condensed Complexes. *Molecular Pharmaceutics* [online]. 2013, **10**(5), 1940–1948. ISSN 1543-8384. Dostupné z: doi:10.1021/mp3007117
- [95] LEDO, Adriana M., Maria S. SASSO, Vincenzo BRONTE, Ilaria MARIGO, Ben J. BOYD, Marcos GARCIA-FUENTES a María J. ALONSO. Co-delivery of RNAi and chemokine by polyarginine nanocapsules enables the modulation of myeloid-derived suppressor cells. *Journal of Controlled Release* [online]. 2019, **295**, 60–73. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2018.12.041
- [96] MUTSCHLER, Angela, Lorène TALLET, Morgane RABINEAU, Camille DOLLINGER, Marie-Hélène METZ-BOUTIGUE, Francis SCHNEIDER, Bernard SENGER, Nihal Engin VRANA, Pierre SCHAAF a Philippe LAVALLE. Unexpected Bactericidal Activity of Poly(arginine)/Hyaluronan Nanolayered Coatings. *Chemistry of Materials* [online]. 2016, **28**(23), 8700–8709. ISSN 0897-4756. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemmater.6b03872
- [97] PUTNAM, D., C. A. GENTRY, D. W. PACK a R. LANGER. Polymer-based gene delivery with low cytotoxicity by a unique balance of side-chain termini. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2001, **98**(3), 1200–1205. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.98.3.1200
- [98] ROBISON, Aaron D., Simou SUN, Matthew F. POYTON, Gregory A. JOHNSON, Jean-Philippe PELLOIS, Pavel JUNGWIRTH, Mario VAZDAR a Paul S. CREMER. Polyarginine Interacts More Strongly and Cooperatively than Polylysine with Phospholipid Bilayers. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2016, **120**(35), 9287–9296. ISSN 1520-6106. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jpcc.6b05604
- [99] PICART, C., Ph. LAVALLE, P. HUBERT, F. J. G. CUISINIER, G. DECHER, P. SCHAAF a J.-C. VOEGEL. Buildup Mechanism for Poly(l-lysine)/Hyaluronic Acid Films onto a Solid Surface. *Langmuir* [online]. 2001, **17**(23), 7414–7424. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la010848g

- [100] CHANG, Yuhua, Lynne MCLANDBOROUGH a David Julian MCCLEMENTS. Cationic Antimicrobial (ϵ -Polylysine)–Anionic Polysaccharide (Pectin) Interactions: Influence of Polymer Charge on Physical Stability and Antimicrobial Efficacy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2012, **60**(7), 1837–1844. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf204384s
- [101] ZASLOFF, Michael. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* [online]. 2002, **415**(6870), 389–395. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/415389a
- [102] WANG, Guangshun, Biswajit MISHRA, Kyle LAU, Tamara LUSHNIKOVA, Radha GOLLA a Xiuqing WANG. Antimicrobial Peptides in 2014. *Pharmaceuticals* [online]. 2015, **8**(1), 123–150. ISSN 1424-8247. Dostupné z: doi:10.3390/ph8010123
- [103] BROGDEN, Kim A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2005, **3**(3), 238–250. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro1098
- [104] HANCOCK, Robert E.W a Gill DIAMOND. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in Microbiology* [online]. 2000, **8**(9), 402–410. ISSN 0966842X. Dostupné z: doi:10.1016/S0966-842X(00)01823-0
- [105] BROWN, Kelly L a Robert EW HANCOCK. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current Opinion in Immunology* [online]. 2006, **18**(1), 24–30. ISSN 09527915. Dostupné z: doi:10.1016/j.coi.2005.11.004
- [106] LIU, Xiaoli, Rui CAO, Sha WANG, Junli JIA a Hao FEI. Amphipathicity Determines Different Cytotoxic Mechanisms of Lysine- or Arginine-Rich Cationic Hydrophobic Peptides in Cancer Cells. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2016, **59**(11), 5238–5247. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jmedchem.5b02016
- [107] BECHINGER, B. a S.-U. GORR. Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. *Journal of Dental Research* [online]. 2017, **96**(3), 254–260. ISSN 0022-0345. Dostupné z: doi:10.1177/0022034516679973
- [108] HANCOCK, Robert E.W a Robert LEHRER. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology* [online]. 1998, **16**(2), 82–88. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-7799(97)01156-6
- [109] GLUKHOV, Evgenia, Lori L. BURROWS a Charles M. DEBER. Membrane interactions of designed cationic antimicrobial peptides: The two thresholds. *Biopolymers* [online]. 2008, **89**(5), 360–371. ISSN 00063525. Dostupné z: doi:10.1002/bip.20917
- [110] LEI, Jun, Lichun SUN, Siyu HUANG, Chenhong ZHU, Ping LI, Jun HE, Vienna MACKEY, David H COY a Quanyong HE. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *American journal of translational research*. 2019, **11**(7), 3919–3931. ISSN 1943-8141 (Print).
- [111] HANCOCK, Robert E W a Hans-Georg SAHL. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology* [online]. 2006, **24**(12), 1551–1557. ISSN 1087-0156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt1267
- [112] ZASLOFF, Michael. Antimicrobial Peptides of Multicellular Organisms: My Perspective. In: K. MATSUZAKI, ed. *Advances in Experimental Medicine and Biology, 1117* [online]. B.m.: Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2019, s. 3–6. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-13-3588-4_1

- [113] YEAMAN, Michael R. a Nannette Y. YOUNT. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacological Reviews* [online]. 2003, **55**(1), 27–55. ISSN 0031-6997. Dostupné z: doi:10.1124/pr.55.1.2
- [114] JOHANSSON, Jan, Gudmundur H. GUDMUNDSSON, Martín E. ROTTENBERG, Kurt D. BERNDT a Birgitta AGERBERTH. Conformation-dependent Antibacterial Activity of the Naturally Occurring Human Peptide LL-37. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1998, **273**(6), 3718–3724. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.273.6.3718
- [115] GENNARO, Renato a Margherita ZANETTI. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers* [online]. 2000, **55**(1), 31–49. ISSN 0006-3525. Dostupné z: doi:10.1002/1097-0282(2000)55:1<31::AID-BIP40>3.0.CO;2-9
- [116] PARK, C. B., K.-S. YI, K. MATSUZAKI, M. S. KIM a S. C. KIM. Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: The proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2000, **97**(15), 8245–8250. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.150518097
- [117] BADER, Martin W., William Wiley NAVARRE, Whitney SHIAU, Hiroshi NIKAIDO, Jonathan G. FRYE, Michael MCCLELLAND, Ferric C. FANG a Samuel I. MILLER. Regulation of Salmonella typhimurium virulence gene expression by cationic antimicrobial peptides. *Molecular Microbiology* [online]. 2003, **50**(1), 219–230. ISSN 0950382X. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03675.x
- [118] O'BRIEN-SIMPSON, Neil M., Ralf HOFFMANN, C. S. Brian CHIA a John D. WADE. Editorial: Antimicrobial and Anticancer Peptides. *Frontiers in Chemistry* [online]. 2018, **6**. ISSN 2296-2646. Dostupné z: doi:10.3389/fchem.2018.00013
- [119] BRADSHAW, Jeremy P. Cationic Antimicrobial Peptides. *BioDrugs* [online]. 2003, **17**(4), 233–240. ISSN 1173-8804. Dostupné z: doi:10.2165/00063030-200317040-00002
- [120] HAYNIE, S. L., G. A. CRUM a B. A. DOELE. Antimicrobial activities of amphiphilic peptides covalently bonded to a water-insoluble resin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 1995, **39**(2), 301–307. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.39.2.301
- [121] HUMBLLOT, Vincent, Jean-Fabrice YALA, Pascal THEBAULT, Kada BOUKERMA, Arnaud HÉQUET, Jean-Marc BERJEAUD a Claire-Marie PRADIER. The antibacterial activity of Magainin I immobilized onto mixed thiols Self-Assembled Monolayers. *Biomaterials* [online]. 2009, **30**(21), 3503–3512. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2009.03.025
- [122] LAKSHMAIAH NARAYANA, Jayaram a Jyh-Yih CHEN. Antimicrobial peptides: Possible anti-infective agents. *Peptides* [online]. 2015, **72**, 88–94. ISSN 01969781. Dostupné z: doi:10.1016/j.peptides.2015.05.012
- [123] GHARSALLAOUI, Adem, Nadia OULAHAL, Catherine JOLY a Pascal DEGRAEVE. Nisin as a Food Preservative: Part 1: Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, and Main Uses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2016, **56**(8), 1262–1274. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2013.763765

- [124] MEDEIROS, Kelliane A., Graziella A. JOANITTI a Luciano P. SILVA. Chitosan nanoparticles for dermaseptin peptide delivery toward tumor cells in vitro. *Anti-Cancer Drugs* [online]. 2014, **25**(3), 323–331. ISSN 0959-4973. Dostupné z: doi:10.1097/CAD.0000000000000052
- [125] CHEREDDY, Kiran Kumar, Charles-Henry HER, Michela COMUNE, Claudia MOIA, Alessandra LOPES, Paolo E. PORPORATO, Julie VANACKER, Martin C. LAM, Lars STEINSTRÄESSER, Pierre SONVEAUX, Huijun ZHU, Lino S. FERREIRA, Gaëlle VANDERMEULEN a Véronique PRÉAT. PLGA nanoparticles loaded with host defense peptide LL37 promote wound healing. *Journal of Controlled Release* [online]. 2014, **194**, 138–147. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2014.08.016
- [126] KURODA, Kengo, Kazuhiko OKUMURA, Hiroshi ISOGAI a Emiko ISOGAI. The Human Cathelicidin Antimicrobial Peptide LL-37 and Mimics are Potential Anticancer Drugs. *Frontiers in Oncology* [online]. 2015, **5**. ISSN 2234-943X. Dostupné z: doi:10.3389/fonc.2015.00144
- [127] BECHINGER, Burkhard a Karl LOHNER. Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 2006, **1758**(9), 1529–1539. ISSN 00052736. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamem.2006.07.001
- [128] YI, Hui-Yu, Munmun CHOWDHURY, Ya-Dong HUANG a Xiao-Qiang YU. Insect antimicrobial peptides and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2014, **98**(13), 5807–5822. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-014-5792-6
- [129] HULTMARK, Dan, Håkan STEINER, Torgny RASMUSON a Hans G. BOMAN. Insect Immunity. Purification and Properties of Three Inducible Bactericidal Proteins from Hemolymph of Immunized Pupae of *Hyalophora cecropia*. *European Journal of Biochemistry* [online]. 1980, **106**(1), 7–16. ISSN 00142956. Dostupné z: doi:10.1111/j.1432-1033.1980.tb05991.x
- [130] LEE, J. Y., A. BOMAN, C. X. SUN, M. ANDERSSON, H. JORNVALL, V. MUTT a H. G. BOMAN. Antibacterial peptides from pig intestine: isolation of a mammalian cecropin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1989, **86**(23), 9159–9162. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.86.23.9159
- [131] BRADY, Daniel, Alessandro GRAPPUTO, Ottavia ROMOLI a Federica SANDRELLI. Insect Cecropins, Antimicrobial Peptides with Potential Therapeutic Applications. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2019, **20**(23), 5862. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20235862
- [132] HOSKIN, David W. a Ayyalusamy RAMAMOORTHY. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 2008, **1778**(2), 357–375. ISSN 00052736. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbamem.2007.11.008
- [133] ZIAJA, Maksymilian, Ada DZIEDZIC, Kacper SZAFRANIEC a Agnieszka CIESIELSKA-PIASTOWSKA. Cecropins in cancer therapies-where we have been? *European Journal of Pharmacology* [online]. 2020, 173317. ISSN 00142999. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejphar.2020.173317

- [134] DO, Nhung, Günther WEINDL, Lisa GROHMANN, Mario SALWICZEK, Beate KOKSCH, Hans Christian KORTING a Monika SCHÄFER-KORTING. Cationic membrane-active peptides - anticancer and antifungal activity as well as penetration into human skin. *Experimental Dermatology* [online]. 2014, **23**(5), 326–331. ISSN 09066705. Dostupné z: doi:10.1111/exd.12384
- [135] BECHINGER, B. Structure and Functions of Channel-Forming Peptides: Magainins, Cecropins, Melittin and Alamethicin. *Journal of Membrane Biology* [online]. 1997, **156**(3), 197–211. ISSN 0022-2631. Dostupné z: doi:10.1007/s002329900201
- [136] JUHANIEWICZ, Joanna, Lilianna SZYK-WARSZYŃSKA, Piotr WARSZYŃSKI a Sławomir SEK. Interaction of Cecropin B with Zwitterionic and Negatively Charged Lipid Bilayers Immobilized at Gold Electrode Surface. *Electrochimica Acta* [online]. 2016, **204**, 206–217. ISSN 00134686. Dostupné z: doi:10.1016/j.electacta.2016.04.080
- [137] CHEN, Hueih Min, Wei WANG, David SMITH a Siu Chiu CHAN. Effects of the anti-bacterial peptide cecropin B and its analogs, cecropins B-1 and B-2, on liposomes, bacteria, and cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 1997, **1336**(2), 171–179. ISSN 03044165. Dostupné z: doi:10.1016/S0304-4165(97)00024-X
- [138] CHAN, S C, L HUI a H M CHEN. Enhancement of the cytolytic effect of anti-bacterial cecropin by the microvilli of cancer cells. *Anticancer research* [online]. 1998, **18**(6A), 4467—4474. ISSN 0250-7005. Dostupné z: <http://europepmc.org/abstract/MED/9891511>
- [139] MOORE, A J, D A DEVINE a M C BIBBY. Preliminary experimental anticancer activity of cecropins. *Peptide research* [online]. 1994, **7**(5), 265—269. ISSN 1040-5704. Dostupné z: <http://europepmc.org/abstract/MED/7849420>
- [140] KUNDA, Nitesh K. Antimicrobial peptides as novel therapeutics for non-small cell lung cancer. *Drug Discovery Today* [online]. 2020, **25**(1), 238–247. ISSN 13596446. Dostupné z: doi:10.1016/j.drudis.2019.11.012
- [141] SUTTMANN, Henrik, Margitta RETZ, Friedrich PAULSEN, Jürgen HARDER, Ulrike ZWERGEL, Jörn KAMRADT, Bernd WULLICH, Gerhard UNTEREGGER, Michael STÖCKLE a Jan LEHMANN. Antimicrobial peptides of the Cecropin-family show potent antitumor activity against bladder cancer cells. *BMC Urology* [online]. 2008, **8**(1), 5. ISSN 1471-2490. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2490-8-5
- [142] WANG, Wei, David Keith SMITH a Hueih Min CHEN. The effect of pH on the structure, binding and model membrane lysis by cecropin B and analogs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 1999, **1473**(2–3), 418–430. ISSN 03044165. Dostupné z: doi:10.1016/S0304-4165(99)00200-7
- [143] STEINER, Håkan. Secondary structure of the cecropins: antibacterial peptides from the moth *Hyalophora cecropia*. *FEBS Letters* [online]. 1982, **137**(2), 283–287. ISSN 00145793. Dostupné z: doi:10.1016/0014-5793(82)80368-2
- [144] ANDERSSON, Emma, Victoria RYDENGÅRD, Andreas SONESSON, Matthias MÖRGELIN, Lars BJÖRCK a Artur SCHMIDTCHEN. Antimicrobial activities of heparin-binding peptides. *European Journal of Biochemistry* [online]. 2004, **271**(6), 1219–1226. ISSN 00142956. Dostupné z: doi:10.1111/j.1432-1033.2004.04035.x

- [145] TOPPAZZINI, Mila, Anna COSLOVI, Manuela BOSCHELLE, Eleonora MARSICH, Monica BENINCASA, Renato GENNARO a Sergio PAOLETTI. Can the interaction between the antimicrobial peptide LL-37 and alginate be exploited for the formulation of new biomaterials with antimicrobial properties? *Carbohydrate Polymers* [online]. 2011, **83**(2), 578–585. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2010.08.020
- [146] NEELAY, Om P., Christian A. PETERSON, Mary E. SNAVELY, Taylor C. BROWN, Ariam F. TECLEMARIAM, Jennifer A. CAMPBELL, Allison M. BLAKE, Sydney C. SCHNEIDER a Matthew E. CREMEENS. Antimicrobial peptides interact with peptidoglycan. *Journal of Molecular Structure* [online]. 2017, **1146**, 329–336. ISSN 00222860. Dostupné z: doi:10.1016/j.molstruc.2017.06.018
- [147] TAGHIPOUR-SABZEVAR, Vahid, Tahere SHARIFI, Shadab BAGHERI-KHOULENJANI, Vahabodin GOODARZI, Hamid KOOSHKI, Raheleh HALABIAN a Mehrdad MOOSAZADEH MOGHADDAM. Targeted delivery of a short antimicrobial peptide against CD44-overexpressing tumor cells using hyaluronic acid-coated chitosan nanoparticles: An in vitro study. *Journal of Nanoparticle Research* [online]. 2020, **22**(5), 99. ISSN 1388-0764. Dostupné z: doi:10.1007/s11051-020-04838-2
- [148] KRIVANEK, Roland, Peter RYBAR, Elmar J. PRENNER, Ronald N. MCELHANEY a Tibor HIANIK. Interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with dimyristoyl-phosphatidylcholine bilayer membranes: a densitometry and sound velocimetry study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* [online]. 2001, **1510**(1–2), 452–463. ISSN 00052736. Dostupné z: doi:10.1016/S0005-2736(00)00376-X
- [149] NIECE, Krista L., Asa D. VAUGHAN a David I. DEVORE. Graft copolymer polyelectrolyte complexes for delivery of cationic antimicrobial peptides. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* [online]. 2013, **101A**(9), 2548–2558. ISSN 15493296. Dostupné z: doi:10.1002/jbm.a.34555
- [150] WATER, Jorrit J., YongTae KIM, Morten J. MALTESEN, Henrik FRANZYK, Camilla FOGED a Hanne M. NIELSEN. Hyaluronic Acid-Based Nanogels Produced by Microfluidics-Facilitated Self-Assembly Improves the Safety Profile of the Cationic Host Defense Peptide Novicidin. *Pharmaceutical Research* [online]. 2015, **32**, 2727–2735. ISSN 0724-8741. Dostupné z: doi:10.1007/s11095-015-1658-6
- [151] FERSTL, Matthias, Markus DRECHSLER, Reinhard RACHEL, Matthias RISCHER, Jürgen ENGEL, Michael BACKOFEN a Achim GOEPFERICH. The Impact of Polyelectrolyte Structure on the Shape of Nanoassemblies with Cationic Peptides. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2013, **102**(8), 2599–2607. ISSN 00223549. Dostupné z: doi:10.1002/jps.23619
- [152] LEQUEUX, Isabelle, Emmanuel DUCASSE, Thierry JOUENNE a Pascal THEBAULT. Addition of antimicrobial properties to hyaluronic acid by grafting of antimicrobial peptide. *European Polymer Journal* [online]. 2014, **51**, 182–190. ISSN 00143057. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2013.11.012
- [153] ERIKSON, K R, F J FRY a J P JONES. Ultrasound in Medicine-A Review. *IEEE Transactions on Sonics and Ultrasonics* [online]. 1974, **21**(3), 144–170. ISSN 2162-1403. Dostupné z: doi:10.1109/T-SU.1974.29810

- [154] BUCKIN, Vitaly, Eugeny KUDRYASHOV a Breda O'DRISCOLL. High-Resolution Ultrasonic Spectroscopy for Material Analysis. *Spectroscopy perspectives*. 2002, (28), 38–31.
- [155] PEKAŘ, Miloslav, J. KUČERÍK a D. ŠMEJKALOVÁ. Nové možnosti ultrazvukové spektroskopie v koloidní chemii. *CHEMagazin*. 2005, **15**(1), 12–14.
- [156] BUCKIN, Vitaly A. High-resolution ultrasonic spectroscopy. *Journal of Sensors and Sensor Systems* [online]. 2018, **7**(1), 207–217. ISSN 2194-878X. Dostupné z: doi:10.5194/jsss-7-207-2018
- [157] SMYTH, C., Breda O'DRISCOLL, Jayne LAWRENCE, Sinead HICKEY, Therese O'REAGAN a Vitaly BUCKIN. High-resolution ultrasonic spectroscopy analysis of microemulsions. *Pharmaceutical Technology Europe*. 2004, **16**(6), 44–49.
- [158] HICKEY, Sinead, M. Jayne LAWRENCE, Sue A. HAGAN a Vitaly BUCKIN. Analysis of the Phase Diagram and Microstructural Transitions in Phospholipid Microemulsion Systems Using High-Resolution Ultrasonic Spectroscopy. *Langmuir* [online]. 2006, **22**(13), 5575–5583. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la052735t
- [159] LIU, Jinru, Marcela ALEXANDER, Edita VERESPEJ a Milena CORREDIG. Real-Time Determination of Structural Changes of Sodium Caseinate-Stabilized Emulsions Containing Pectin Using High Resolution Ultrasonic Spectroscopy. *Food Biophysics* [online]. 2007, **2**(2–3), 67–75. ISSN 1557-1858. Dostupné z: doi:10.1007/s11483-007-9032-9
- [160] O'DRISCOLL, Breda, C. SMYTH, A. C. ALTING, R.W. VISSCHER a Vitaly BUCKIN. Recent applications for high – resolution ultrasonic spectroscopy. *American Laboratory*. 2003, 54–57.
- [161] ŽWIRBLA, Wioletta, Anna SIKORSKA a Bogumił B.J. LINDE. Ultrasonic investigations of water mixtures with polyethylene glycols 200, 400 and ethylene glycol. *Journal of Molecular Structure* [online]. 2005, **743**(1–3), 49–52. ISSN 00222860. Dostupné z: doi:10.1016/j.molstruc.2005.02.019
- [162] BUCKIN, V.A., B.I. KANKIYA, A.P. SARVAZYAN a H. UEDAIRA. Acoustical investigation of poly(dA).poly(dT), poly[d(A-T)].poly[d(A-T)], poly(A) . poly(U) and DNA hydration in dilute aqueous solutions. *Nucleic Acids Research* [online]. 1989, **17**(11), 4189–4203. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/17.11.4189
- [163] MERZEL, F. a J. C. SMITH. Is the first hydration shell of lysozyme of higher density than bulk water? *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2002, **99**(8), 5378–5383. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.082335099
- [164] KARGEROVÁ, A. a M. PEKAŘ. Densitometry and ultrasound velocimetry of hyaluronan solutions in water and in sodium chloride solution. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2014, **106**, 453–459. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2014.01.020
- [165] FAKHARI, Amir, Quang PHAN, Santosh V. THAKKAR, C. Russell MIDDAUGH a Cory BERKLAND. Hyaluronic Acid Nanoparticles Titrate the Viscoelastic Properties of Viscosupplements. *Langmuir* [online]. 2013, **29**(17), 5123–5131. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la304575x

- [166] CESPI, Marco, Giulia BONACUCINA, Giovanna MENCARELLI, Stefania PUCCIARELLI, Gianfabio GIORGIONI a Giovanni F. PALMIERI. Monitoring the aggregation behaviour of self-assembling polymers through high-resolution ultrasonic spectroscopy. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2010, **388**(1–2), 274–279. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2009.12.053
- [167] LYNCH, Rian, Adrian BURKE, John BYRNE a Vitaly BUCKIN. Osmolality and molar mass of oligosaccharides in breast milks and infant formula during hydrolysis of lactose. Application of high-resolution ultrasonic spectroscopy. *Food Chemistry* [online]. 2020, **322**, 126645. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2020.126645
- [168] GHAI, Rajesh, Robert J. FALCONER a Brett M. COLLINS. Applications of isothermal titration calorimetry in pure and applied research-survey of the literature from 2010. *Journal of Molecular Recognition* [online]. 2012, **25**(1), 32–52. ISSN 09523499. Dostupné z: doi:10.1002/jmr.1167
- [169] BOUCHEMAL, Kawthar. New challenges for pharmaceutical formulations and drug delivery systems characterization using isothermal titration calorimetry. *Drug Discovery Today* [online]. 2008, **13**(21–22), 960–972. ISSN 13596446. Dostupné z: doi:10.1016/j.drudis.2008.06.004
- [170] FREYER, Matthew W. a Edwin A. LEWIS. Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions. In: *Methods in Cell Biology* [online]. 2008, s. 79–113. ISBN 0123725208. Dostupné z: doi:10.1016/S0091-679X(07)84004-0
- [171] FREIRE, Ernesto, Obdulio L. MAYORGA a Martin STRAUME. Isothermal titration calorimetry. *Analytical Chemistry* [online]. 1990, **62**(18), 950A-959A. ISSN 0003-2700. Dostupné z: doi:10.1021/ac00217a002
- [172] HOLDGATE, Geoffrey A. a Walter H.J. WARD. Measurements of binding thermodynamics in drug discovery. *Drug Discovery Today* [online]. 2005, **10**(22), 1543–1550. ISSN 13596446. Dostupné z: doi:10.1016/S1359-6446(05)03610-X
- [173] NÚÑEZ, Sara, Jennifer VENHORST a Chris G. KRUSE. Target–drug interactions: first principles and their application to drug discovery. *Drug Discovery Today* [online]. 2012, **17**(1–2), 10–22. ISSN 13596446. Dostupné z: doi:10.1016/j.drudis.2011.06.013
- [174] TIAN, Y., L. BROMBERG, S.N. LIN, T. ALAN HATTON a Kam C. TAM. Complexation and release of doxorubicin from its complexes with pluronic P85-b-poly(acrylic acid) block copolymers. *Journal of Controlled Release* [online]. 2007, **121**(3), 137–145. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2007.05.010
- [175] KROUSKÁ, J., M. PEKAŘ, M. KLUČÁKOVÁ, B. ŠARAC a M. BEŠTER-ROGAČ. Study of interactions between hyaluronan and cationic surfactants by means of calorimetry, turbidimetry, potentiometry and conductometry. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2017, **157**, 1837–1843. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2016.11.069
- [176] WETTIG, Shawn D., Chuanzhong WANG, Ronald E. VERRALL a Marianna FOLDVARI. Thermodynamic and aggregation properties of aza- and imino-substituted gemini surfactants designed for gene delivery. *Phys. Chem. Chem. Phys.* [online]. 2007, **9**(7), 871–877. ISSN 1463-9076. Dostupné z: doi:10.1039/B613269C

- [177] JELESAROV, Ilian a Hans Rudolf BOSSHARD. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *Journal of Molecular Recognition* [online]. 1999, **12**(1), 3–18. ISSN 0952-3499. Dostupné z: doi:10.1002/(SICI)1099-1352(199901/02)12:1<3::AID-JMR441>3.0.CO;2-6
- [178] ZHU, Ai-ping, Lan-hua YUAN, Tian CHEN, Hao WU a Feng ZHAO. Interactions between N-succinyl-chitosan and bovine serum albumin. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2007, **69**(2), 363–370. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2006.11.023
- [179] RUSSELL, Amanda L., Anthony M. KENNEDY, Anne M. SPUCHES, Divakaramenon VENUGOPAL, Jayendra B. BHONSLE a Rickey P. HICKS. Spectroscopic and thermodynamic evidence for antimicrobial peptide membrane selectivity. *Chemistry and Physics of Lipids* [online]. 2010, **163**(6), 488–497. ISSN 00093084. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemphyslip.2010.03.009
- [180] CHANG, Yuhua, Lynne MCLANDSBOROUGH a David Julian MCCLEMENTS. Interactions of a Cationic Antimicrobial (ϵ -Polylysine) with an Anionic Biopolymer (Pectin): An Isothermal Titration Calorimetry, Microelectrophoresis, and Turbidity Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2011, **59**(10), 5579–5588. ISSN 0021-8561. Dostupné z: doi:10.1021/jf104299q
- [181] JUGL, Adam. *Studium interakcí hyaluronan-aminokyseliny*. B.m., 2016. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická.
- [182] LIU, J a M K COWMAN. Thermal Analysis of Semi-Dilute Hyaluronan Solutions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* [online]. 2000, **59**(1), 547–557. ISSN 1572-8943. Dostupné z: doi:10.1023/A:1010114213475
- [183] CLELAND, Robert L. Enthalpy of Mixing Glycosaminoglycans with Aqueous NaCl. *Biopolymers* [online]. 1979, **18**(11), 2673–2681. ISSN 0006-3525. Dostupné z: doi:10.1002/bip.1979.360181104
- [184] BENEGAS, J. C., A. DI BLAS, S. PAOLETTI a A. CESÀRO. Some aspects of the enthalpy of dilution of biological polyelectrolytes. *Journal of thermal analysis* [online]. 1992, **38**(12), 2613–2620. ISSN 0022-5215. Dostupné z: doi:10.1007/BF01979737
- [185] LEHMANN, L. a V. BUCKIN. Determination of the Heat Stability Profiles of Concentrated Milk and Milk Ingredients Using High Resolution Ultrasonic Spectroscopy. *Journal of Dairy Science* [online]. 2005, **88**(9), 3121–3129. ISSN 00220302. Dostupné z: doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72994-5
- [186] RAMESH, Vasudevan. Biomolecular and bioanalytical techniques: theory, methodology and applications. In: . B.m.: Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2019, s. 576. ISBN 978-1-119-48396-0.
- [187] LE, Vu H., Robert BUSCAGLIA, Jonathan B. CHAIRES a Edwin A. LEWIS. Modeling complex equilibria in isothermal titration calorimetry experiments: Thermodynamic parameters estimation for a three-binding-site model. *Analytical Biochemistry* [online]. 2013, **434**(2), 233–241. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2012.11.030

- [188] BHOWMIK, Debipreeta, Suman DAS, Maidul HOSSAIN, Lucy HAQ a Gopinatha SURESH KUMAR. Biophysical Characterization of the Strong Stabilization of the RNA Triplex poly(U)•poly(A)*poly(U) by 9-O-(ω -amino) Alkyl Ether Berberine Analogs. *PLoS ONE* [online]. 2012, **7**(5), e37939. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0037939
- [189] CHALIKIAN, Tigran V., Armen P. SARVAZYAN a Kenneth J. BRESLAUER. Hydration and partial compressibility of biological compounds. *Biophysical Chemistry* [online]. 1994, **51**(2–3), 89–109. ISSN 03014622. Dostupné z: doi:10.1016/0301-4622(94)85007-0
- [190] GALEMA, Saskia A. a Harald HOEILAND. Stereochemical aspects of hydration of carbohydrates in aqueous solutions. 3. Density and ultrasound measurements. *The Journal of Physical Chemistry* [online]. 1991, **95**(13), 5321–5326. ISSN 0022-3654. Dostupné z: doi:10.1021/j100166a073
- [191] ZANA, R. Studies of Aqueous Solutions of Polyelectrolytes by Means of Ultrasonic Methods. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews* [online]. 1975, **12**(2), 165–189. ISSN 1532-1797. Dostupné z: doi:10.1080/15321797508076107
- [192] ISEMURA, Toshizo a Sachio GOTO. Studies of the Hydration and the Structure of Water and Their Roles in Protein Structure. II. The Hydration of Electrolytes by Ultrasonic Interferometry and Its Temperature Dependence. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* [online]. 1964, **37**(11), 1690–1693. ISSN 0009-2673. Dostupné z: doi:10.1246/bcsj.37.1690
- [193] CABANI, Sergio, Paolo GIANNI, Vincenzo MOLLICA a Luciano LEPORI. Group contributions to the thermodynamic properties of non-ionic organic solutes in dilute aqueous solution. *Journal of Solution Chemistry* [online]. 1981, **10**(8), 563–595. ISSN 0095-9782. Dostupné z: doi:10.1007/BF00646936
- [194] LAFONT, Virginie, Anthony A. ARMSTRONG, Hiroyasu OHTAKA, Yoshiaki KISO, L. MARIO AMZEL a Ernesto FREIRE. Compensating Enthalpic and Entropic Changes Hinder Binding Affinity Optimization. *Chemical Biology & Drug Design* [online]. 2007, **69**(6), 413–422. ISSN 1747-0277. Dostupné z: doi:10.1111/j.1747-0285.2007.00519.x
- [195] KAWASAKI, Yuko, Eduardo E. CHUFAN, Virginie LAFONT, Koushi HIDAKA, Yoshiaki KISO, L. MARIO AMZEL a Ernesto FREIRE. How Much Binding Affinity Can be Gained by Filling a Cavity? *Chemical Biology & Drug Design* [online]. 2010, **75**(2), 143–151. ISSN 17470277. Dostupné z: doi:10.1111/j.1747-0285.2009.00921.x
- [196] MERTINS, Omar a Rumiana DIMOVA. Binding of Chitosan to Phospholipid Vesicles Studied with Isothermal Titration Calorimetry. *Langmuir* [online]. 2011, **27**(9), 5506–5515. ISSN 0743-7463. Dostupné z: doi:10.1021/la200553t
- [197] VONDRÁŠEK, Jiří, Philip E. MASON, Jan HEYDA, Kim D. COLLINS a Pavel JUNGWIRTH. The Molecular Origin of Like-Charge Arginine–Arginine Pairing in Water. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2009, **113**(27), 9041–9045. ISSN 1520-6106. Dostupné z: doi:10.1021/jp902377q
- [198] LESLEY, J. Hyaluronan Binding by Cell Surface CD44. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2000. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M002527200

- [199] MONDEK, Jakub, Michal KALINA, Vasile SIMULESCU a Miloslav PEKAŘ. Thermal degradation of high molar mass hyaluronan in solution and in powder; comparison with BSA. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2015, **120**, 107–113. ISSN 01413910. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2015.06.012
- [200] ALMOND, Andrew, John K. SHEEHAN a Andy BRASS. Molecular dynamics simulations of the two disaccharides of hyaluronan in aqueous solution. *Glycobiology* [online]. 1997, **7**(5), 597–604. ISSN 0959-6658. Dostupné z: doi:10.1093/glycob/7.5.597
- [201] VAARA, M a T VAARA. Ability of cecropin B to penetrate the enterobacterial outer membrane. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 1994, **38**(10), 2498–2501. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.38.10.2498
- [202] BALLWEBER, L. M., J. E. JAYNES, W. E. STAMM a M. F. LAMPE. In Vitro Microbicidal Activities of Cecropin Peptides D2A21 and D4E1 and Gel Formulations Containing 0.1 to 2% D2A21 against *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2002, **46**(1), 34–41. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.46.1.34-41.2002
- [203] HANCOCK, Robert EW. Cationic antimicrobial peptides: towards clinical applications. *Expert Opinion on Investigational Drugs* [online]. 2000, **9**(8), 1723–1729. ISSN 1354-3784. Dostupné z: doi:10.1517/13543784.9.8.1723

10 SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

Tabulka 27: Seznam použitých zkratek

Zkratka	Význam zkratky
HR-US	ultrazvuková spektroskopie s vysokým rozlišením
ITC	izotermická titrační kalorimetrie
Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺	sodný, draselný, vápenatý a hořečnatý kation
DNA	deoxyribonukleová kyselina
HARE	receptor pro hyaluronan, kterým se řídí endocytóza hyaluronanu
LYVE1	receptor pro hyaluronan
CD44	receptor pro hyaluronan
HABD	část CD44 odpovědná za vazbu hyaluronanu
RHAMM	receptor pro hyaluronan
Arg, R	arginin
Lys, K	lysin
Ala	alanin
CTAB	cetyltrimethylamoniumbromid
siRNA	krátká dvouvláknová ribonukleová kyselina
Hya	hyaluronan
PLR	poly L-arginin
HP	označení komplexu hyaluronanu s poly L-argininem
BSA	hovězí sérový albumin
UV-VIS	ultrafialovo-viditelná spektroskopie
SANS	technika maloúhlového rozptylu neutronů
NMR	nukleární magnetická rezonance
L	leucin
E	kyselina glutamová
pI	izoelektrický bod
PAA	polyaminokyseliny
PLL	poly-L-lysin
AMP	antimikrobiální peptid
I	isoleucin

V	valin
F	fenylalanin
Y	tyrosin
W	tryptofan
LL-37	lidský antimikrobiální peptid
PLGA	kopolymer kyseliny mléčné a glykolové
BMAP-28	antimikrobiální peptid
G	glycin
Q	glutamin
N	asparagin
D	kyselina asparagová
A	alanin
P	prolin
T	threonin
M	methionin
CM11	kationtový antimikrobiální peptid
KSL-W	kationtový antimikrobiální peptid
IR	infračervená spektroskopie
CMC	kritická micelární koncentrace
TTAB	tetradecyltrimethylamoniumbromid
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
SIM	metoda jednoho přídavku
ϵ -PL	ϵ -polylysin
SEC-MALS	molekulová vylučovací chromatografie spojená detektorem pro víceúhlový roztyl světla
KCl	chlorid draselný
HCl	kyselina chlorovodíková
Arg·HCl	arginin monohydrochlorid
30 Arg·HCl	triakontamer Poly-L-arginin hydrochloridu
12 Arg·HCl	dodekamer Poly-L-arginin hydrochloridu
10 Arg·HCl	dekamer Poly-L-arginin hydrochloridu
8 Arg·HCl	oktamer Poly-L-arginin hydrochloridu

4 Arg·HCl	tetramer Poly-L-arginin hydrochloridu
2 Arg·HCl	dimer Poly-L-arginin hydrochloridu
10 Lys·HCl	dekamer Poly-L-lysin hydrochloridu
NaCl	chlorid sodný
NaOH	hydroxid draselný
ot·min ⁻¹	otáčky za minutu

Tabulka 28: Seznam použitých symbolů

symbol	význam	jednotka
pH	hodnota pH	
pK _a	Záporný dekadický logaritmus disociační konstanty kyseliny	
I	iontová síla	mol·dm ⁻³
pK _{COOH} , pK _{NH₂} , pK _{εNH₂}	Záporné dekadické logaritmy disociačních konstant jednotlivých skupin na aminokyselinách	
u	ultrazvuková rychlost	m·s ⁻¹
ρ	hustota	kg·m ⁻³
β	stlačitelnost	Pa ⁻¹
ΔH°	standardní změna entalpie	J·mol ⁻¹
N	stechiometrie vazby	
K _D	disociační konstanta	M
ΔG°	standardní změna gibbsovy energie	J·mol ⁻¹
TΔS°	standardní entropický příspěvek	J·mol ⁻¹
R	univerzální plynová konstanta	J·mol ⁻¹ ·K ⁻¹
T	teplota	K
M _w	molekulová hmotnost	Da
n	látkové množství	mol
c _w	koncentrae hyaluronanu	g·kg ⁻¹
t	teplota	°C
a ₀	regresní parametr	g·cm ⁻³
a _w	regresní parametr	kg·cm ⁻³
a _t	regresní parametr	g·cm ⁻³ ·°C ⁻¹
a _{tt}	regresní parametr	g·cm ⁻³ ·°C ⁻²
K	rovnovážná konstanta	

11 VĚDECKÁ A PUBLIKAČNÍ ČINNOST

11.1 Články v impaktovaném časopise

JUGL, Adam a Miloslav PEKAŘ. Hyaluronan-Arginine Interactions—An Ultrasound and ITC Study. *Polymers* [online]. 2020, 12(9) [cit. 2020-10-20]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: doi:10.3390/polym12092069

(IF=3,426; Příloha č. 1 v kapitole 12.1)

JUGL, Adam, Andrea HURČÍKOVÁ a Miloslav PEKAŘ. Hysteresis during heating and cooling of hyaluronan solutions in water observed by means of ultrasound velocimetry. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2020, **165**, 2419-2424 [cit. 2020-11-18]. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.10.165

(IF=5,162)

HAVLÍKOVÁ, Martina, Jana SZABOVÁ, Adam JUGL, Ludmila MRAVCOVÁ, Chien-Hsiang CHANG, Po-Sung HUANG, Miloslav PEKAŘ a Filip MRAVEC. Study of cholesterol's effect on the properties of cationic vesicular systems: Comparison of light-scattering results with ultrasonic and fluorescence spectroscopy. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2020, **607** [cit. 2020-10-20]. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2020.125526

(IF=3,99)

11.2 Konferenční příspěvky indexované v databázi WoS nebo Scopus

JUGL, A.; HEJNA, J.; PEKAŘ, M. HYALURONAN BASED NANOPARTICLES FORMED BY ELECTROSTATIC INTERACTIONS. In *NANOCON 2017 - Conference Proceedings, 9th International Conference on Nanomaterials - Research and Application. Scopus*. TANGER Ltd., 2018. p. 543-547. ISBN: 9788087294819. ISSN: 0250-4162.

11.3 Příspěvky na mezinárodních konferencích

JUGL, A. *Determination of Critical Micelle Concentration*. HRUS 2018 International Conference and School on High Resolution Ultrasonic Spectroscopy. Brno: University College Dublin, 2018. p. 60-64.

JARÁBKOVÁ, S.; LAŠTŮVKOVÁ, M.; JUGL, A.; VELCER, T.; SMILEK, J. PREPARATION AND RESEARCH OF COSMETIC EMULSIONS FROM SOLID TiO₂ AND EMULSIONS PREPARED FROM DISPERSION OF TiO₂. In *7th Meeting on Chemistry & Life. Czech Chemical Society Symposium Series*. no 6 (2018). Praha: Česká společnost chemická, 2018. p. 493-495. ISSN: 2336-7210.

JUGL, A.; PEKAŘ, M. STUDY OF ELECTROSTATIC INTERACTIONS BETWEEN HYALURONAN AND AMINO ACIDS. In *7th Meeting on Chemistry & Life. Czech Chemical Society Symposium Series*. No 6. Praha: Česká společnost chemická, 2018. p. 496-498. ISSN: 2336-7210.

JUGL, A.; PEKAŘ, M. Studium interakcí hyaluronan-aminokyseliny. In *TERMOANALYTICKÝ SEMINÁŘ SBORNÍK PŘÍSPĚVKŮ*. Brno: ČSCh, z.s., 2019. s. 89-95. ISBN: 978-80-88307-03-7.

11.4 Abstrakty

JUGL, A.; PEKAŘ, M.; HEJNÁ, J. *Hyaluronan Based Nanoparticles Formed by Electrostatic Interactions*. NANOCON 2017 - ABSTRACTS. 1st Edition, 2017. Ostrava: TANGER Ltd., 2017. p. 127-127. ISBN: 978-80-87294-78-9.

JUGL, A.; KARGEROVÁ, A. *High resolution ultrasonic spectroscopy used for the study of thermal behavior of hyaluronan*. International Workshop: "Recent applications of high-resolution ultrasonic spectroscopy for monitoring of hydrolytic activities in milks". Belfield 4, Dublin, Ireland: School of Chemistry, University College Dublin, 2017. p. 14-14.

JARÁBKOVÁ, S.; LAŠTŮVKOVÁ, M.; JUGL, A.; VELCER, T.; SMILEK, J. *Preparation and research of cosmetic emulsions from solid TiO₂ and emulsions prepared from dispersion of TiO₂*. 7th Meeting on Chemistry nad Life 2018. Book of abstracts. Ing. Petr Dzik, Ph.D. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, 2018. p. 77-77. ISBN: 978-80-214-5488-0.

JUGL, A.; PEKAŘ, M. *STUDY OF ELECTROSTATIC INTERACTIONS BETWEEN HYALURONAN AND AMINO ACIDS*. 7th Meeting on Chemistry and Life 2018. Book of abstracts. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, 2018. p. 77-77. ISBN: 978-80-214-5488-0.

JUGL, A.; KARGEROVÁ, A. *Characterization of hyaluronic acid by high resolution ultrasonic spectroscopy*. HRUS 2018 International Conference and School on High Resolution Ultrasonic Spectroscopy (HR-US) Final Program, Book of Abstract, and Practical Courses. Brno: Brno University of Technology, Faculty of Chemistry, 2018. p. 32-32.

JUGL, A.; PEKAŘ, M. *Study of electrostatic interactions between hyaluronan and amino acids*. Hyaluronan 2019. 1st. Cardiff: International Society of Hyaluronan Sciences, 2019. p. 75-75.

11.5 Přednášky na mezinárodních konferencích

International Conference and School on High Resolution Ultrasonic Spectroscopy (Brno, Česká republika, 2018), Characterization of hyaluronic acid by high resolution ultrasonic spectroscopy

11.6 Postery na mezinárodních konferencích

12th International Conference on Hyaluronan (Cardiff, Velká Británie)

7th Meeting on Chemistry and Life 2018 (Brno, Česká republika)

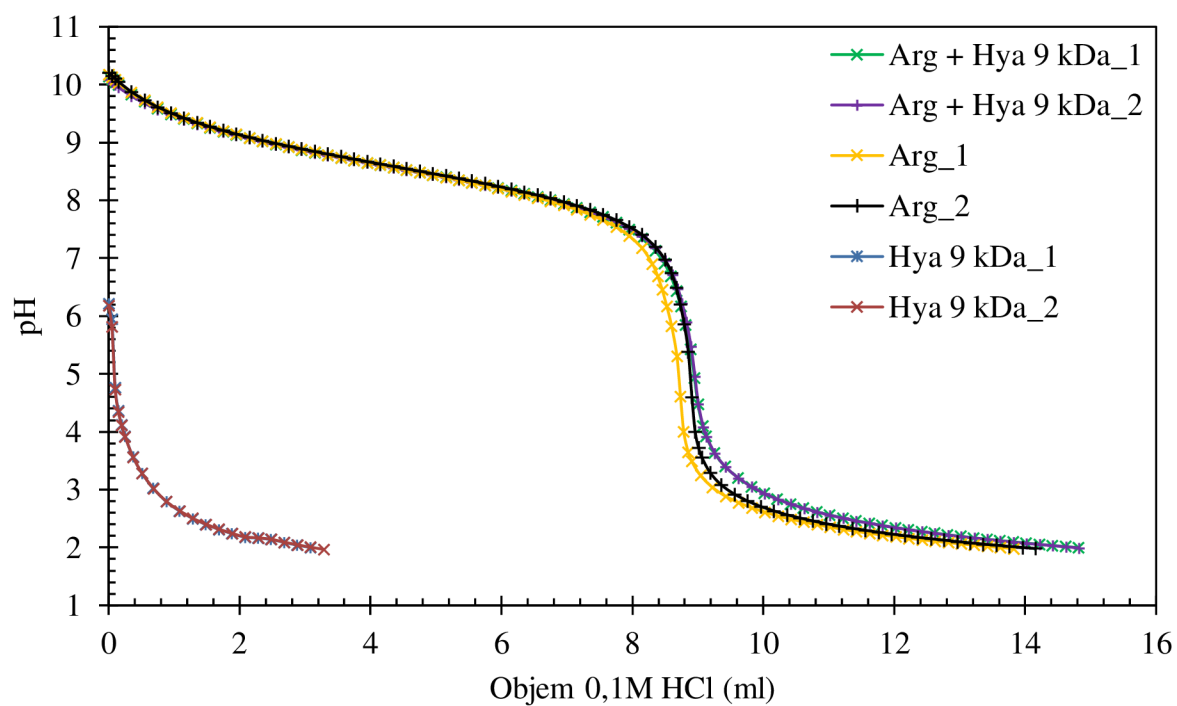
International Workshop: "Recent applications of high-resolution ultrasonic spectroscopy for monitoring of hydrolytic activities in milks" (Dublin, Irsko)

9th International Conference on Nanomaterials - Research & Application (Brno, Česká republika)

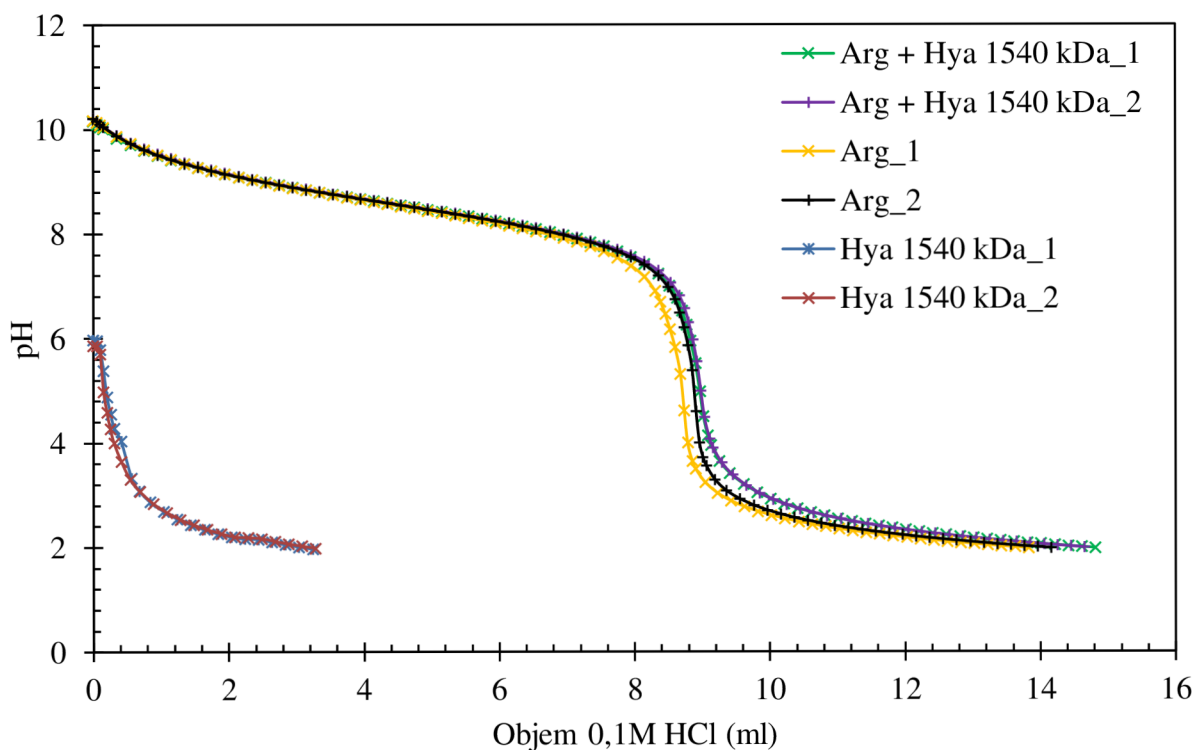
11.7 Absolvovaná stáž

09/2016 – 12/2016 Stáž na univerzitě v Záhřebu (Faculty of Science, University of Zagreb),
prof. dr. sc. Davor Kovačević

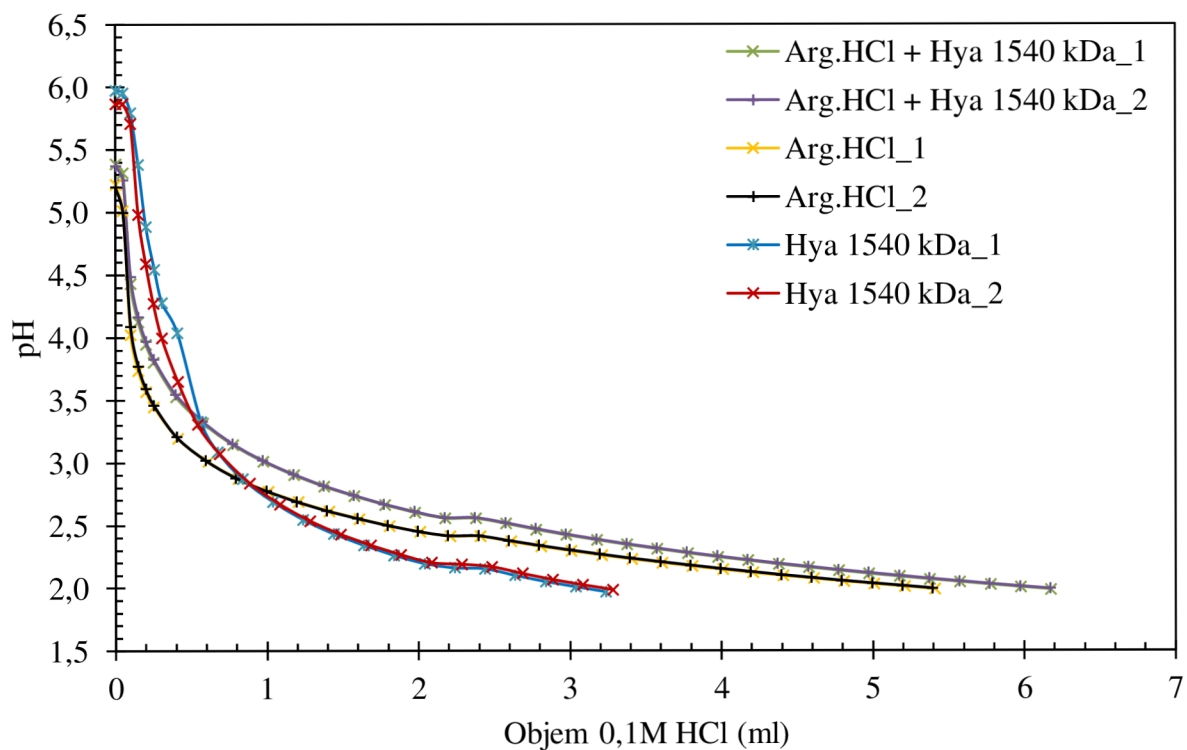
12 PŘÍLOHY



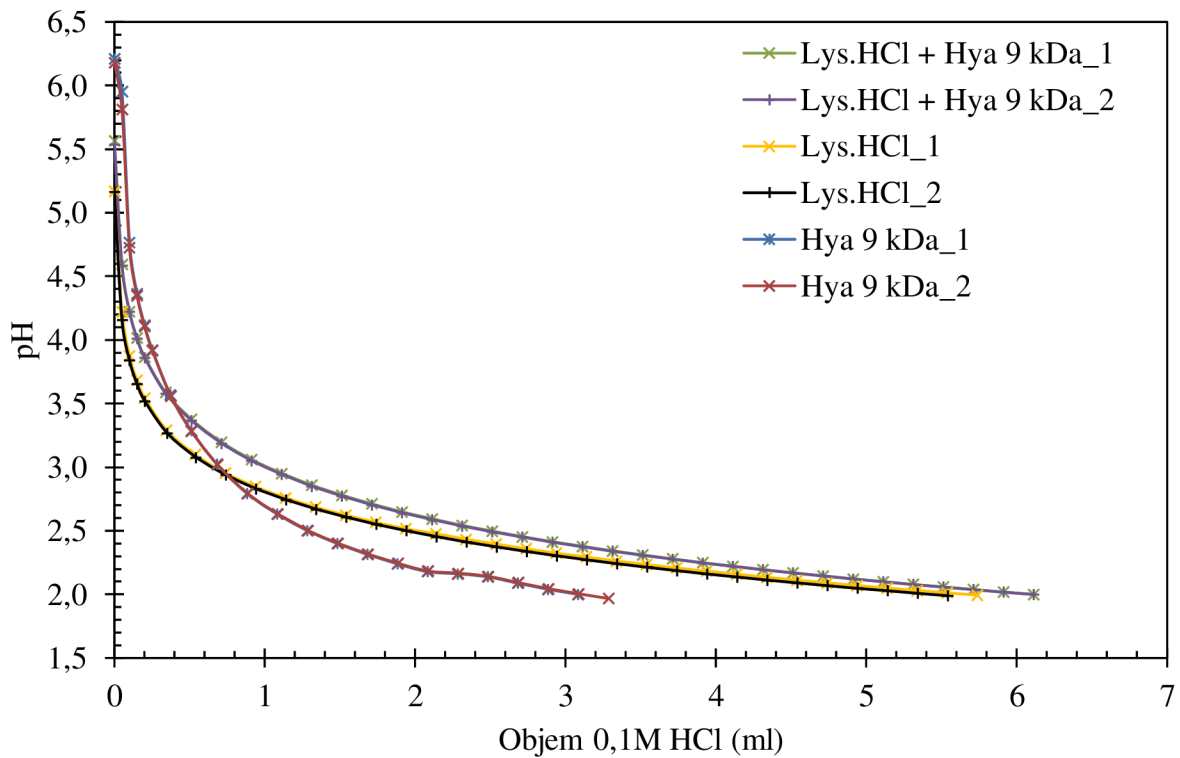
Obrázek P 1: Graf znázorňující změnu pH při titracích roztoků Arg spolu s hyaluronanem o molekulové hmotnosti 9 kDa roztokem 0,1 M HCl.



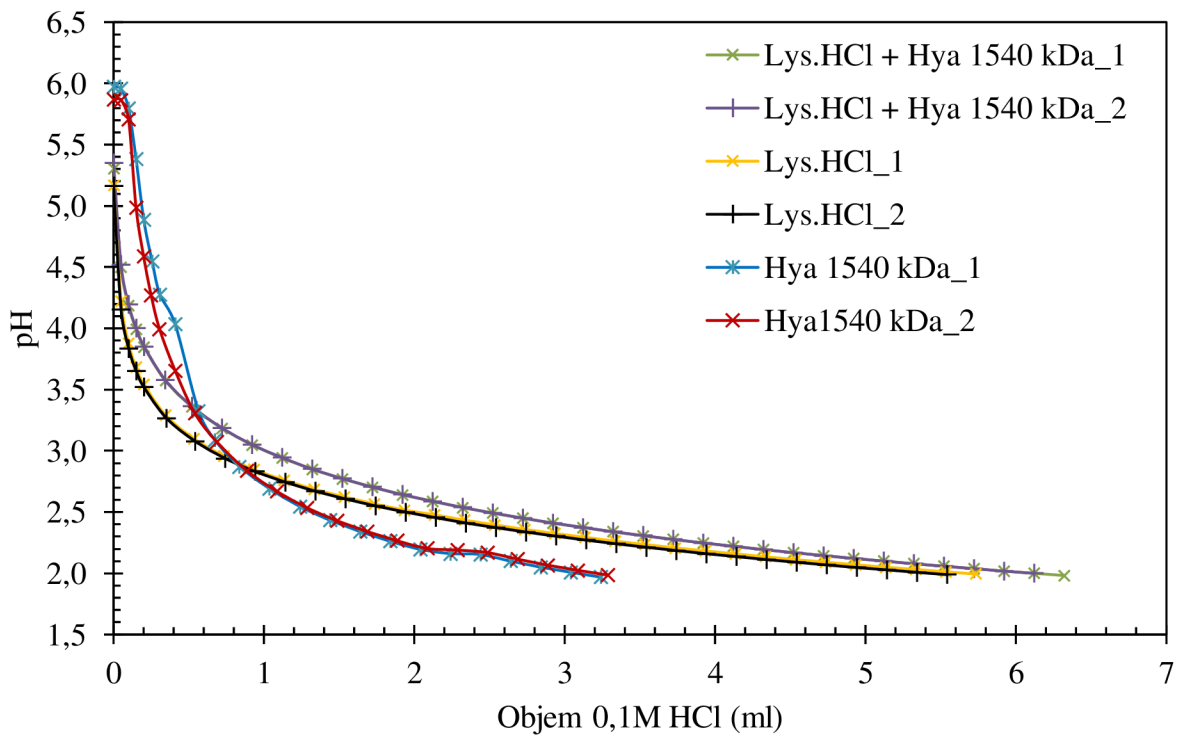
Obrázek P 2: Graf znázorňující změnu pH při titracích roztoků Arg spolu s hyaluronanem o molekulové hmotnosti 1 540 kDa roztokem 0,1 M HCl.



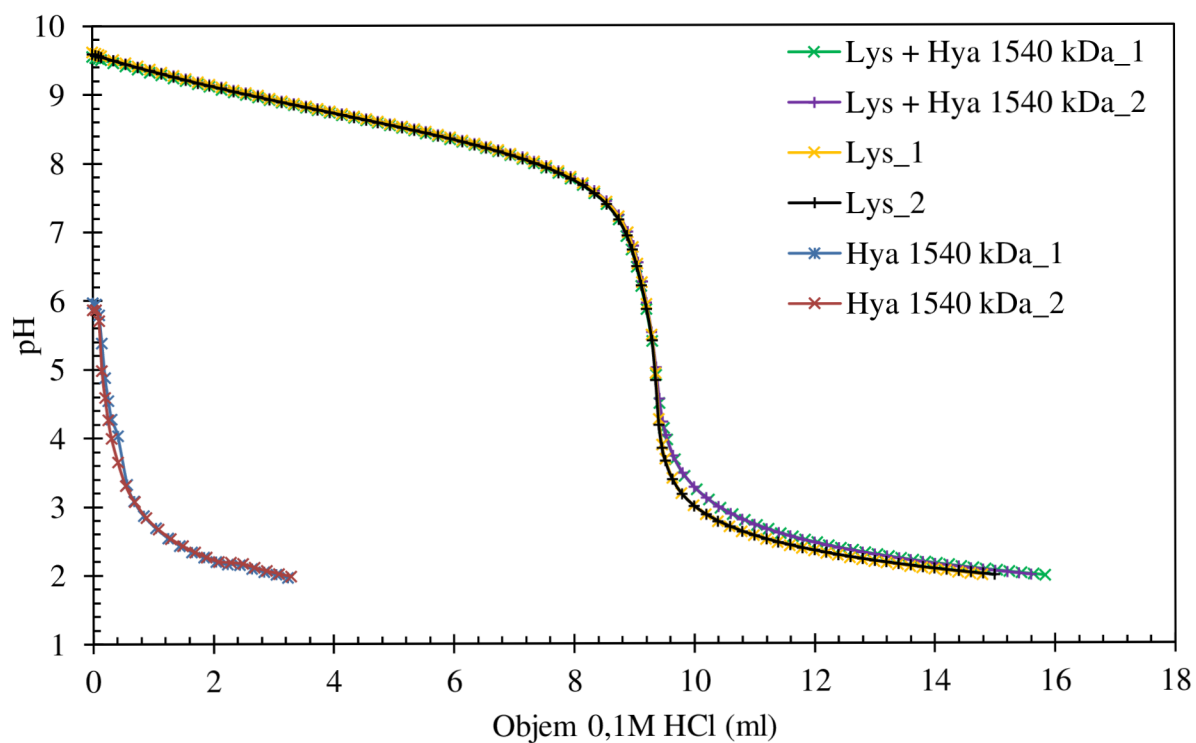
Obrázek P 3: Graf znázorňující změnu pH při titracích roztoků Arg.HCl spolu s hyaluronanem o molekulové hmotnosti 1 540 kDa roztokem 0,1 M HCl.



Obrázek P 4: Graf znázorňující změnu pH při titracích roztoků Lys.HCl spolu s hyaluronanem o molekulové hmotnosti 9 kDa roztokem 0,1 M HCl.



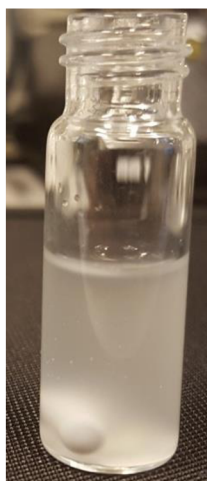
Obrázek P 5: Graf znázorňující změnu pH při titracích roztoků Lys.HCl spolu s hyaluronanem o molekulové hmotnosti 1 540 kDa roztokem 0,1 M HCl.



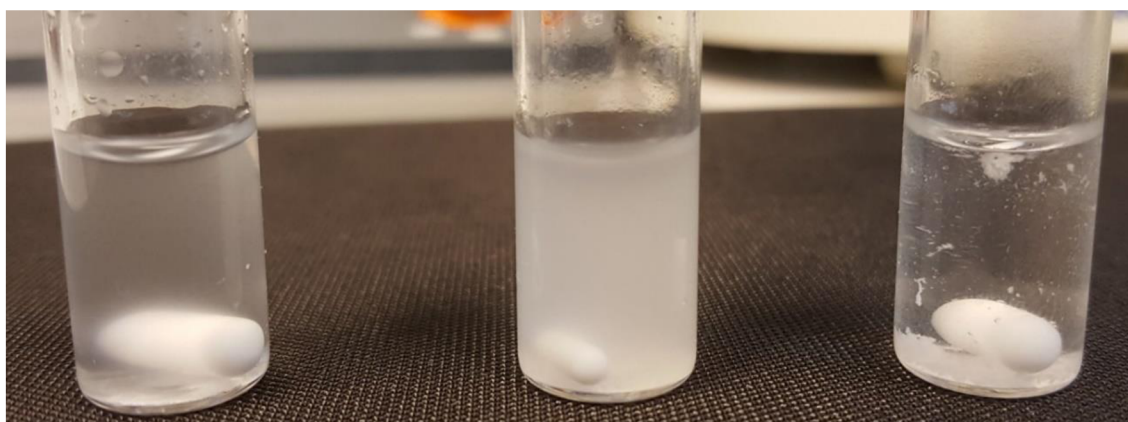
Obrázek P 6: Graf znázorňující změnu pH při titracích roztoků Lys spolu s hyaluronanem o molekulové hmotnosti 1 540 kDa roztokem 0,1 M HCl.



Obrázek P 7: Systém Hya + 8 Arg·HCl. Zleva 9 kDa Hya + 8 Arg·HCl po 8 přidavcích, stejný systém po 11 přidavcích. Vpravo systém 1 540 kDa Hya + 8 Arg·HCl po 20 přidavcích.



Obrázek P 8: Výsledek vizuálního pozorování titrace 8 Arg-HCl s upraveným pH do 9 kDa Hya.



Obrázek P 9: Výsledek vizuálního pozorování titrací 10 Arg-HCl do hyaluronanu. Zleva molekulová hmotnost hyaluronanu 9 kDa, 310 kDa a 1 540 kDa.



Obrázek P 10: Výsledek vizuálního pozorování titrací cecropinu B do hyaluronanu. Zleva molekulová hmotnost hyaluronanu 1 540 kDa, 680 kDa a 9 kDa.

12.1 Články v impaktovaném časopise

Příloha č. 1

JUGL, Adam a Miloslav PEKAŘ. Hyaluronan-Arginine Interactions—An Ultrasound and ITC Study. *Polymers* [online]. 2020, 12(9) [cit. 2020-10-20]. ISSN 2073-4360. Dostupné z: [doi:10.3390/polym12092069](https://doi.org/10.3390/polym12092069)

Article

Hyaluronan-Arginine Interactions—An Ultrasound and ITC Study

Adam Jugl  and Miloslav Pekař * 

Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Purkyňova 464, 612 00 Brno, Czech Republic; xcjugl@fch.vut.cz

* Correspondence: pekar@fch.vut.cz; Tel.: +420-541-149-330

Received: 6 August 2020; Accepted: 10 September 2020; Published: 12 September 2020



Abstract: High-resolution ultrasound spectroscopy and isothermal titration calorimetry were used to characterize interactions between hyaluronan and arginine oligomers. The molecular weight of arginine oligomer plays an important role in interactions with hyaluronan. Interactions were observable for arginine oligomers with eight monomer units and longer chains. The effect of the ionic strength and molecular weight of hyaluronan on interactions was tested. In an environment with increased ionic strength, the length of the arginine oligomer was crucial. Generally, sufficiently high ionic strength suppresses interactions between hyaluronan and arginine oligomers, which demonstrated interactions in water. From the point of view of the molecular weight of hyaluronan, the transition between the rod conformation and the random coil conformation appeared to be important.

Keywords: hyaluronan; arginine; interaction; high-resolution ultrasound spectroscopy; isothermal titration calorimetry

1. Introduction

Hyaluronan is a naturally occurring polysaccharide, which was discovered by Meyer and Palmer in the vitreous humor of cattle eyes [1]. This biopolymer, with a relatively simple primary structure, is synthesized by organisms from bacteria to humans [2]. However, according to research results to date, despite its simple composition [3], hyaluronan plays a significant role in many biological processes of the human body, such as regulating water balance and osmotic pressure, stabilizing structures [2], and influencing the diffusion of large molecules [4].

Hyaluronan is one of the basic components of the extracellular matrix, in which it interacts primarily with a number of proteins [5]. The first interaction with proteins was discovered in 1972 [6]. Proteins capable of such interactions are called hyaladherins [7], e.g., HARE, which controls the endocytosis of hyaluronan [8,9]; LYVE1 [5,9], which is structurally similar to the CD44 receptor [9]; and many others including, intracellular receptors whose functions have not yet been fully clarified [10]. For most hyaluronan binding proteins, a domain of about 100 amino acids, known as the “Link module,” is responsible for binding [5,8,11].

CD44 is the major cell receptor for hyaluronan [12]. The part of CD44 called HABD is responsible for binding with hyaluronan [13]. Hyaluronan hexasaccharide (2.4 kDa) seems to be of the optimum size for binding to the CD44 receptor [14,15]. However, shorter fragments of between about 3 and 5 disaccharide units (1.2–2.0 kDa) also have receptor binding capacity [12]. The binding of hyaluronan to the receptor is mainly driven by their shape and their ability to form hydrogen bonds and van der Waals forces, rather than by electrostatic interactions [16–18]. Electrostatic interactions in physiological saline solution contribute to the total energy of the interaction by approximately 25%, although at physiological pH, almost all carboxyl groups are dissociated [6]; moreover, they are strongly dependent on the ionic strength of the environment [19]. A total of 13 amino acid residues are involved in the

interaction between hyaluronan and CD44. A large part of the interaction is mediated by aliphatic, aromatic, and basic residues [16].

In addition to its binding to cellular receptors, where electrostatic interactions involving hyaluronan contribute only partially, the ability of hyaluronan to create electrostatic interactions has also become the basis for many other research studies.

The electrostatic binding of low-molecular-weight ligands to hyaluronan was studied by capillary electrophoresis [20]. It was found that β -naphthylamide derivatives with Arg, Lys, and Ala interact only very weakly in phosphate buffer (pH 7.4; $I = 0.17$ M), unlike in acetate buffer medium (pH 4.65; $I = 0.05$ M), where the electrostatic interaction was stronger mainly due to the lower ionic strength.

Oyarzun-Ampuero and his team [21] prepared nanoparticles by simply mixing solutions of hyaluronan (165 and 29 kDa) and polyarginine (5–15 kDa). It was found that systems can be prepared depending on the charge ratio between positive or negative zeta potential. At the same time, higher molecular weight hyaluronan was shown to form more stable particles. The stability of nanoparticles was tested as short term in PBS, as well as long term in water for 3 months. Systems with low-molecular-weight hyaluronan were shown to be unstable in PBS.

The electrostatic complexation of hyaluronan was also used for targeted siRNA distribution [22]. Hyaluronan (19 kDa) interacted with poly L-arginine (15–70 kDa) in aqueous media, and the resulting complex was used for interaction with siRNA and its targeted distribution. A simple mixing of the solutions was used to prepare the complexes.

A similar example of electrostatic interaction between hyaluronan and a cationic liposome/plasmid DNA complex was created by the Balbino group [23], where they allowed the liposome/DNA complex to interact with low-molecular-weight hyaluronan (16 kDa) in aqueous media in order to provide tools for targeted gene distribution.

Hyaluronan has already been shown to interact with amino acids under appropriate conditions [11]. In particular, pH and ionic strength appear to be important; when the pH drops to about 2.5, virtually no interactions can be observed, since the carboxyl groups of the hyaluronan providing the interaction are no longer dissociated [24]. According to calculations (density functional theory), Arginine together with hyaluronan form a more rigid structure, while lysine is more flexible [11].

The formation of complexes and aggregates between proteins and polysaccharides is often driven entropically in the case of strongly charged polyelectrolytes, probably through released counterions and water molecules and conformational changes in polymers during interaction [25].

Bovine serum albumin and hyaluronan have been shown to be capable of electrostatic complexation at around a pH 4, independently of the length of hyaluronan [26]. A single BSA molecule can be enveloped by multiple short HYA chains, while a long hyaluronan molecule can interact with multiple BSA molecules [26]. The turbidity of the solution and the size of the complexes were measured, and the HYA-protein complexes were analyzed by spectrophotometric measurement [26]. Complexes of hyaluronan and bovine serum albumin may be of three types [27]—namely, neutral insoluble complexes in the phase separation region and small positively charged complexes or large negatively charged complexes, which are soluble and are formed in an excess of albumin or hyaluronan, respectively.

Complexes of hyaluronan and silk fibrin (silk fibroin) have also been studied. These complexes exist in the pH range of 2.5–3.5, and the complexes are mainly formed by electrostatic interactions [27]. In contrast, lysozyme, which has an isoelectric point higher than albumin, formed complexes at significantly higher pH (pH 3–9) [28].

Thus, interactions between hyaluronan and amino acids, which also form proteins, are of interest from the point of view of both the functioning of hyaluronan in biological systems and its application in medical technologies and nanotechnologies. The aim of this work was to obtain a detailed picture of interactions between hyaluronan and various arginine oligomers using ultrasound spectroscopy and isothermal titration calorimetry, the latter also delivering basic thermodynamic parameters for these interactions. Such a system has not been investigated by these two techniques and only rarely by some other techniques [11].

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Hyaluronan samples were obtained from Contipro Biotech (Dolní Dobrouč, Czech Republic), where they were produced by extraction from cell walls of the bacteria *Streptococcus zooepidemicus*. The product types are named according to the range of molecular weights in which the particular product falls. Seven product types were used in this work. Their molecular weights ranged from 9 to 1540 kDa. The various product types and the exact molecular weights of all used samples, as determined by the producer using size exclusion chromatography with multi-angle light scattering (SEC-MALS) technique, can be found in Table S1 in Supplementary Materials.

Hyaluronan solutions were prepared at a concentration of 0.1% (weight, i.e., *w/w*, % are used throughout this work) by dissolving hyaluronan powder in ultrapure deionized water from a PURELAB purification system (OPTION R7/15; ELGA, High Wycombe, Great Britain), in PBS (VWR Life science, Radnor, PA, USA, Lot NO.: 0016C297, 137 mM sodium chloride, 2.7 mM potassium chloride, 12 mM phosphate buffer; ionic strength 172 mM), or in NaCl solutions of various concentrations (10, 50, 100, and 150 mM); both the hyaluronan powder and the solvents were weighed using analytical balances. The used hyaluronan concentration corresponded to a negative charge concentration of 2.5 mM at complete dissociation of the hyaluronan carboxyl groups. The mixture was stirred for 24 h in a closed vessel at room temperature to ensure complete dissolution [29].

Arginine hydrochlorides in monomeric and oligomeric forms were obtained from several suppliers, as shown in Table S2 in Supplementary Materials. Arginine oligomers were synthesized commercially according to our requirements. Monomeric arginine hydrochloride was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) as a commercially available product.

Arginine solutions were prepared as 30 mM solutions of monomer units, by direct dissolution of a given arginine oligomer in volumetric flasks containing water, PBS, or NaCl solutions of various concentrations. The mixture was stirred for 24 h at room temperature to ensure complete dissolution. Preprepared NaCl or PBS solutions were used instead of water to prepare solutions of higher ionic strength.

Because the stock solutions of some of the arginine oligomers (dimer, tetramer, and octamer) had too low a pH (probably due to some excess of acid used to prepare the hydrochloride form) (see Table S3 in Supplementary Materials), their values had to be adjusted so that their pH was above the hyaluronan dissociation constant [24] and similar to the pH of the other oligomers (around 6). The pH adjustment was done by adding a small volume of 2 M NaOH (G.R. Batch no. PP/2008/06964/0, Lach:ner, Neratovice, Czech Republic) to the stock solution (Table S4 in Supplementary Materials). Although these pH adjustments led to an increase in the ionic strength, their effect was negligible. The increase in ionic strength during titrations with the pH-adjusted solutions was at most 8 mM, which had no observable effect on the titration curves, as demonstrated in independent experiments on the effect of the ionic strength. Arginine decamer stock solution had a pH of 5.71 ± 0.03 , dodecamer, 5.62 ± 0.04 , and triacontamer (30-mer), 6.77 ± 0.03 .

2.2. Methods

2.2.1. High-Resolution Ultrasound Spectroscopy

The ultrasonic velocity for each sample was measured at six selected frequencies in the range from 2.5 to 14.9 MHz using an HR-US 102T ultrasonic spectrometer (ultrasonic Scientific, Dublin, Ireland) with titration accessory. This device is equipped with two cells enabling single-cell or differential measurements. The differential regime was used in this work. It allows a resolution of $0.2 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ for ultrasonic velocity (this corresponds to a value of $10^{-5}\%$ in water). The temperature was controlled with a Thermo Scientific Haake PC 200 heating bath, which provided a temperature stability of ± 0.01 °C. The temperature was recorded by a sensor inserted in the ultrasonic spectrometer by the

manufacturer. The measuring and reference cells were filled with deeply degassed sample solution and water, respectively, using a calibrated 1 mL Hamilton syringe. A volume of 1 mL was placed in each cell.

The measuring cell was filled with deeply degassed hyaluronan solution and solution containing amino acid was added through the titration accessory. The reference cell was filled with ultrapure and degassed deionized water. Ultrasonic velocity and attenuation were monitored continuously over the course of the titration at 25 °C.

Before each measurement, baseline correction was performed by taking measurements with deionized water in both cells. The measured dependences did not show any effect of the ultrasound frequency; consequently, only the results from measurements made at 11.6 MHz are reported.

Each measurement was made at least three times, and average values are reported in figures for the sake of clarity; error bars are shown in the figures. Reproducibility was much better in the case of relative velocity than in the case of attenuation in the sample cell, as expected.

From each amino acid titration to hyaluronan, the titrations of the solvent to hyaluronan and of the corresponding amino acid to the solvent were subtracted to account for dilution effects.

2.2.2. ITC

Heat effects resulting from the titration of a titrant solution into the measuring cell were, in most cases, measured using a MicroCal PEAQ-ITC instrument (Malvern Panalytical Ltd., Westborough, MA, USA). A minority of experiments were performed with a Nano ITC 2G instrument (TA Instruments, New Castle, DE, USA). The titration of water to water was performed prior to each experiment to ensure that the instrument measured correctly. Each measurement was performed at least three times; average values are reported in figures and tables for the sake of clarity; standard deviations are given in tables and corresponding error bars are shown in figures. The reference cell was filled with water in both devices.

All experiments performed with the MicroCal PEAQ-ITC calorimeter had the reference power set to 41.9 μ W. Peak integration and the processing of data obtained from the measurements were performed using MicroCal PEAQ-ITC Analysis Software (version 1.21, Malvern Panalytical Ltd., Westborough, MA, USA). In the case of Nano ITC 2G, data were processed using the NanoAnalyze Data Analysis program (version 2.1.13, TA instruments, New Castle, DE, USA). Both software use standard procedures [30] to determine basic thermodynamic parameters—specifically, here, the standard interaction Gibbs energy (ΔG), the standard interaction enthalpy (or the enthalpic contribution; ΔH), and entropy (ΔS); the product $T\Delta S$ is called the entropic contribution. The software also delivers an equilibrium constant (K), usually called the dissociation constant; this traditional terminology is kept here, although it is not exactly appropriate for the observed interactions.

When investigating interactions of arginine oligomers with hyaluronan, the hyaluronan solution (0.1 %wt) was, in all cases, placed in the cell and arginine oligomer solution was added. For MicroCal PEAQ-ITC, a 40 μ L syringe was used. The first addition was 0.8 μ L, other additions were 2 μ L; a total of 36.8 μ L of stock solution was added to 280 μ L of hyaluronan stock solution. The stirring rate was set to 750 rpm and the interaction parameters were measured at 25 °C. The interval between additions was empirically set at 150 s, which was sufficient time for the signal to return to the baseline. Measurements were performed in pure water, PBS, or NaCl solutions of various concentrations (10, 50, 100, and 150 mM).

In the case of Nano ITC 2G, a 250 μ L syringe was used with a first addition of 5.14 μ L followed by 20 additional additions of 12 μ L to a 990 μ L cell. The stirring rate was set to 250 rpm, and the interaction parameters were measured at 25 °C. The interval between additions was empirically set at 500 s, which was sufficient time for the signal to return to the baseline.

To determine the dilution heats, titrations of arginine oligomer into water were performed. The heat of dilution was subtracted from the titration at the start of the evaluation. The dilution heat of hyaluronan during the experiment was not taken into account, because the heat released during one

titration is in the order of hundreds of microjoule, while the dilution heat of hyaluronan is very small and, according to available literature [31–33], corresponded to the order of units of microjoule in water for our hyaluronan solutions.

2.2.3. The Molar Ratio

The molar ratio was calculated as the ratio of the number of hyaluronan disaccharide units and the number of arginine monomer units present in solution. A molecular weight of 401.229 g/mol for hyaluronan disaccharide repeating units was used together with its weight-average molecular weight as determined by SEC-MALS. If the presence of one negative charge on each hyaluronan disaccharide unit and one positive charge on each monomer unit of arginine hydrochloride oligomers is assumed, the molar ratio gives the ratio of negative and positive charges. In other words, the molar ratio is then the ratio of the number of charges on hyaluronan to the number of charges on arginine.

3. Results

Basic information about the system was obtained by simple visual observation. Molecular weights of hyaluronan of 9 and 1540 kDa were tested with all arginine oligomers. All visual observations for solutions in water, PBS, and environments with increased ionic strength are summarized in Tables S5 and S6 in Supplementary Materials. No changes were observed for the monomer or for the dimer and tetramer of arginine hydrochloride during addition to the hyaluronan solution and the solutions remained clear. In the case of higher oligomers, the system generally changed from clear to opaque and subsequently cloudy for 9 kDa hyaluronan; in the case of 1540 kDa hyaluronan, there was also a macroscopic phase separation (precipitation). These phase changes generally occurred in water at a molar ratio around one. If additional ions were present in the solution, these changes generally occurred at higher molar ratios. Such shifts were particularly evident in the case of PBS.

3.1. Results from High-Resolution Ultrasound Spectroscopy

Arginine monomer and oligomers up to and including four monomer units showed almost unchanged ultrasound velocity during the whole titration course in water; data are shown in Figures S1 and S2 in Supplementary Materials for hyaluronan of the lowest and highest molecular weights used. This indicated no interactions, at least from the point of view of the ultrasound wave. As noted above, the pH of dimer and tetramer solutions had to be adjusted to a neutral value; the adjustment resulted in no change in the ultrasound spectroscopy record (cf. Figure S2 in Supplementary Materials).

The situation changed with arginine octamer in water. Visual observations showed that, unlike the shorter arginine oligomers, arginine octamer developed turbidity during titration. Observations varied depending on the used molecular weight of the hyaluronan. In the case of pH-adjusted solutions of arginine octamer, the change was clearly evident for the smallest molecular weight of hyaluronan. Unlike with the shorter arginine oligomers, the relative velocity decreased during titration as the hydration water was released from the hydration shell. This was particularly evident with high-molecular-weight hyaluronan, as shown in Figure 1. The decrease stopped at around a molar ratio equal to one, i.e., around the supposed charge equilibration, then the relative velocity slightly increased. The pH-adjustment, which was also made for the octamer, did not result in essential changes in titration profiles; see Figure S3 in Supplementary Materials. In comparison with pH-untreated samples, the decrease in the relative velocity was more distinct in the case of very low-molecular-weight hyaluronan, whereas it was not so deep for the high-molecular-weight sample. The pH-adjustment also “smoothed” the velocity decrease and, instead of a minimum, a sigmoidal shape with a point of inflection at a molar ratio of about 1.7–1.9 was observed.

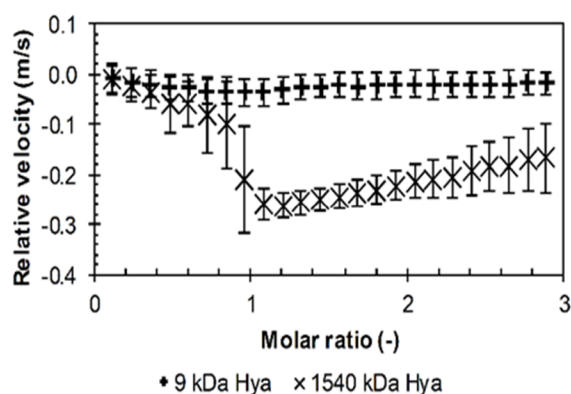


Figure 1. The relative ultrasonic velocity in dependence on molar ratio for titrations of arginine octamer in hydrochloride form to hyaluronan of different molecular weights in water (11.6 MHz, 25 °C).

The results for longer arginine oligomers (10, 12, and 30) were similar, and more detailed study of the effect of hyaluronan molecular weight was made using decamer and dodecamer. First, the relative velocity decreased almost linearly during the titration up to a molar ratio of about one. Afterwards, the velocity decreased more sharply and then, slightly increased (decamer and dodecamer) or remained almost constant (triacontamer). Data are shown in Figure 2 and in Figures S4 and S5 in Supplementary Materials. Here, also some effect of hyaluronan molecular weight can be seen. Hyaluronan with the highest molecular weight of 1540 kDa had the steepest slope in the initial titration phase while the lines of all the other samples were undistinguishable. Hyaluronan of the lowest molecular weight (9 kDa) gave the smallest drop in velocity during titrations. Further, the difference between the highest and lowest molecular weight of hyaluronan was smallest in the case of the arginine triacontamer (Figure S5 in Supplementary Materials).

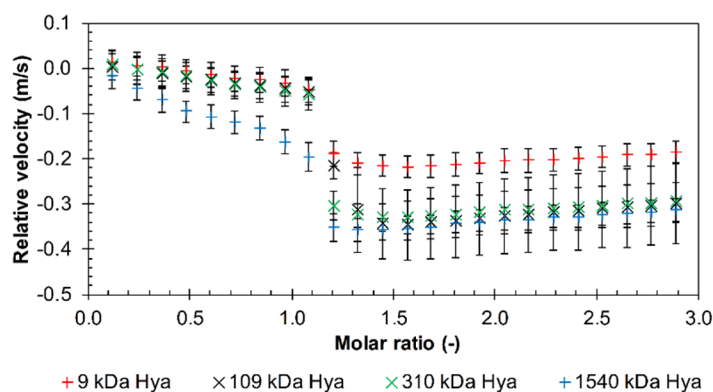


Figure 2. The relative ultrasonic velocity in dependence on molar ratio for titrations of arginine decamer in hydrochloride form into hyaluronan of different molecular weights in water (11.6 MHz, 25 °C).

The results of the visual observations for longer arginine oligomers are summarized in Table S5 in Supplementary Materials. In the case of hyaluronan with the highest molecular weight tested, a cloudy solution was always formed, which turned into a precipitate at around a molar ratio of 1, after which the solution remained clear. At the lowest molecular weight of hyaluronan, a cloudy solution was formed with the decamer and dodecamer of arginine. As with the highest molecular weight of hyaluronan, the triacontamer of arginine formed a precipitate, but at this time, the solution remained slightly cloudy even after its formation.

Influence of the Environment

The longest arginine oligomers, i.e., dodecamer and triacontamer, were chosen for these experiments based on the results of measurements in water, in which they demonstrated interactions with hyaluronan of all molecular weights studied. The influence of ions or ion-controlled pH was studied by preparing solutions in PBS or in NaCl solutions of varying concentration.

The effect of PBS at pH 7.4 on interactions was investigated with arginine triacontamer. Selected molecular weights of hyaluronan in the range of 9–1540 kDa were tested, as shown in the graph in Figure 3. The relative velocity decrease did not occur from the first titration step as it did in water. The first additions resulted in constant values of relative velocities, so it is likely that interactions did not occur during this time. Then a drop in relative velocity occurred—as in the case of titrations in water—perhaps with the exception of 9 kDa hyaluronan, where the velocity decrease was smooth and moderate. The drop in the case of 109 kDa was not as steep as for the remaining samples of higher molecular weight and spread over a certain range of the molar ratio. In general, the molar ratio at which the drop occurred was shifted to higher values in comparison to the titrations in water. However, the effect of PBS was dependent on the hyaluronan molecular weight. This is also seen in Figure S6 in Supplementary Materials, where the increasing ultrasound attenuation well illustrates the (micro)phase separation and the formation of precipitates that occurred at higher molecular weights of hyaluronan. Increased attenuation means the formation of structures or aggregates capable of scattering the ultrasound wave and increasing sample heterogeneity [34,35]. Precipitates were observable for hyaluronan molecular weights from 310 kDa and were formed from a molar ratio of 1.5. Thus, particles were created in the system that allowed the sound to be dispersed. Greater dispersion (higher attenuation) occurred with higher molecular weight hyaluronan.

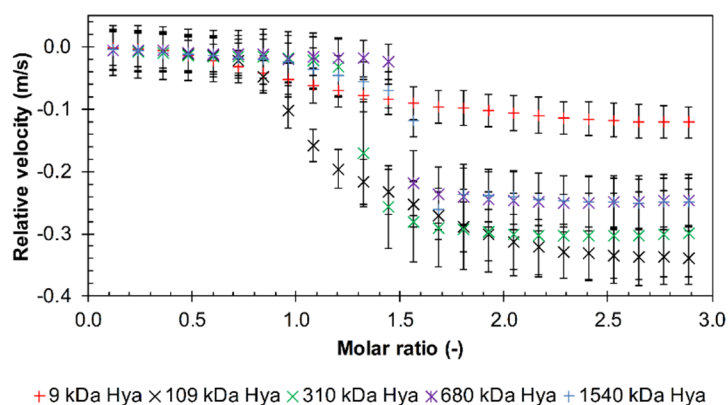


Figure 3. The relative ultrasonic velocity in dependence on the molar ratio for titrations of arginine triacontamer in hydrochloride form into hyaluronan of different molecular weights in PBS (11.6 MHz, 25 °C).

Arginine dodecamer in PBS were tested using ITC only; no heat effects were observed. Visual observations indicated that the solutions remained clear (Table S6 in Supplementary Materials).

The effect of increasing NaCl concentration, i.e., of increasing ionic strength, was investigated using arginine dodecamer, which did not show interactions in PBS, together with hyaluronan of molecular weight 680 kDa. As shown in Figure 4, as the ionic strength increased, the drop in the relative velocity value gradually decreased. The slope of the initial decrease in the relative velocity also decreased with increasing ionic strength and, at the two highest NaCl concentrations, it was almost zero. Visual observations showed that in both cases, a precipitate occurred around a molar ratio of 1.1, but in the case of increased ionic strength (100 mM NaCl), the supernatant solution remained cloudy (Table S6 in Supplementary Materials). At the highest NaCl concentration (150 mM), the drop in the relative ultrasound velocity was shifted to a significantly higher molar ratio but, at the same

time, seems not to be statistically significant. This is in good agreement with the visual observation, which showed only very slight turbidity in 150 mM NaCl (Table S6 in Supplementary Materials).

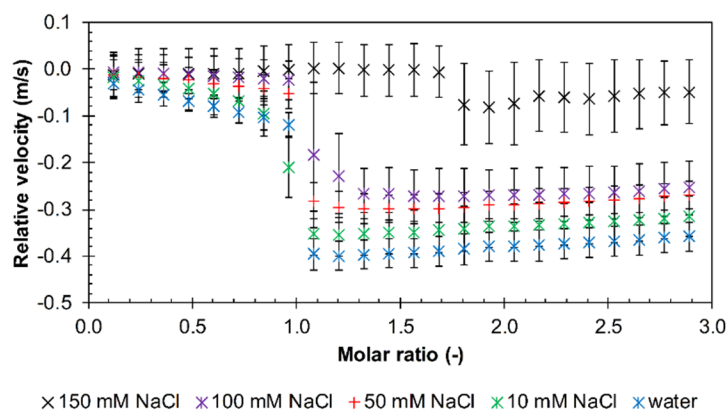


Figure 4. The relative ultrasonic velocity in dependence on the molar ratio for titrations of arginine dodecamer in hydrochloride form into 680 kDa hyaluronan solutions in different ionic strength environments (11.6 MHz, 25 °C).

3.2. Results from ITC

ITC enabled a basic thermodynamic characterization of interactions between hyaluronan and arginine oligomers to be obtained. All measurements reported in this part were performed in an aqueous medium without buffer. After subtracting the dissolution heat from the heat obtained during titration, all performed titrations were found to be endothermic, as shown in Table S8 in Supplementary Materials. Three types of titration curves (showing the dependence of the enthalpy change on the molar ratio during titration) were observed. Besides the sigmoidal shape typical for interacting systems with the saturation of interacting sites, simply decreasing and two-site curves were also obtained.

For the shortest arginine oligomers, including octamer, a typical sigmoidal titration pattern was not observed, irrespective of the hyaluronan molecular weight. As shown in Figure 5, the curves decreased steeply from the beginning of titrations up to the molar ratio of about one, from which no heat effects were recorded. These curves resembled the decreasing parts of typical sigmoidal ITC curves, which indicates the saturation of interaction sites and the end of interactions. Visually, dimer and tetramer systems remained clear, whereas octamer and low-molecular-weight hyaluronan systems were gently opaque at low molar ratios. The arginine octamer (pH untreated) and high-molecular-weight hyaluronan system also exhibited opacity, which did not disappear; a precipitate was even formed at around a molar ratio of one. These observations were not reflected in ITC curves, which were for all systems practically indistinguishable (cf. Figure 5). From these titration curves, only the overall change in the standard enthalpy change (ΔH ; Table S8 in Supplementary Materials) was calculated as the difference between the first and the last addition.

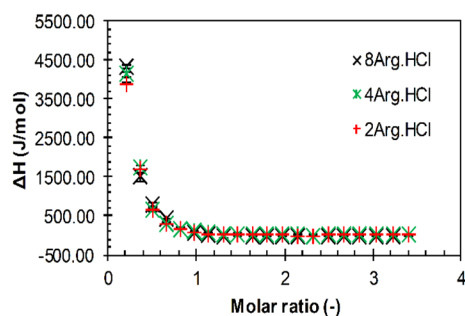


Figure 5. Isothermal titration calorimetry (ITC) records for the titration of various arginine oligomers in hydrochloride form into a 1540 kDa hyaluronan solution in water (25 °C).

Typical sigmoidal titration shapes were obtained with arginine dodecamer and triacontamer and hyaluronan of all tested molecular weights. An example is shown in Figure 6. This shape points to hyaluronan–arginine interactions from the first oligomer additions in all investigated cases, which continued until the available hyaluronan interaction sites in solution were depleted at a molar ratio of about one. The sigmoidal shape was also observed for titrations of arginine octamer with adjusted pH into high-molecular-weight hyaluronan, with an inflex point shift to a molar ratio of about 1.5. This system is also represented in Figure S7 in Supplementary Materials to illustrate the baseline shift observed because of the change in the heat capacity of the system [36] in cases with the formation of a precipitate.

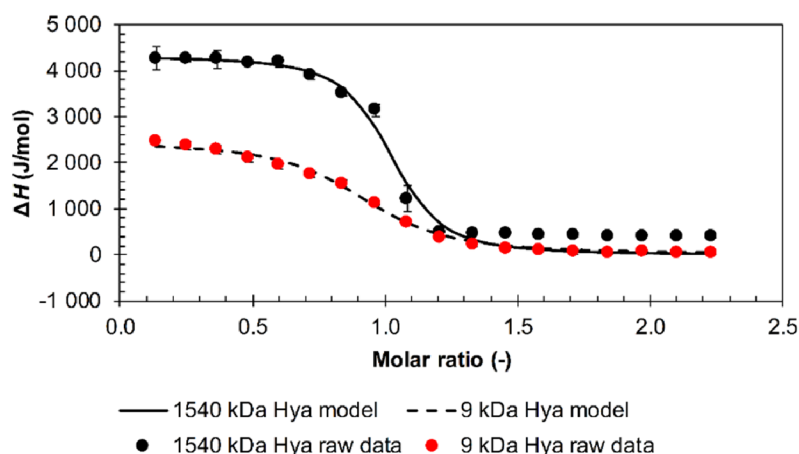


Figure 6. ITC records for the titration of arginine dodecamer in hydrochloride form into 9 and 1540 kDa hyaluronan solutions in water (25 °C). Single binding site models were used for data evaluation.

Using software implemented in the used apparatus, titrations with a typical sigmoidal shape were fitted with a traditional single binding site model to determine thermodynamic parameters (see Methods). The obtained parameters are shown in Table S8 in Supplementary Materials. Thermodynamic energy-based binding (or, more precisely, interaction) parameters for various arginine oligomers are not appreciably different, and the ratios of the standard enthalpic and standard entropic contributions were very similar; an illustrative example is given in Figure 7 for the arginine dodecamer. Arginine oligomer–hyaluronan interactions were characterized by small and unfavorable standard enthalpy changes and were entropically driven. The smallest molecular weight of hyaluronan (9 kDa) had the highest dissociation constant; other molecular weights above 109 kDa had lower dissociation constants with approximately the same values. In addition, the arginine triacontamer had, overall, lower dissociation constant values compared to the arginine dodecamer. However, the dissociation constants were determined with relatively high standard deviations due to the high sensitivity of the model used for fitting to the steep changes in the titration curves from which the constants are determined. Such constants can thus be used only for the estimation of relative differences between different titrated systems.

From the viewpoint of isothermal titration calorimetry, the decamer was a unique oligomer. Its titration isotherm (see example in Figure 8) did not manifest either a sigmoidal or simple decreasing shape as in the case of the other investigated oligomers; its shape was, however, typical for the case involving several binding sites [30,37] (interaction events seem to be a more appropriate term in our case).

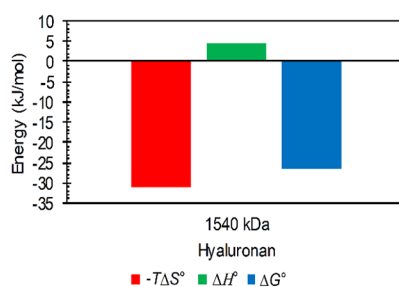


Figure 7. Example of magnitudes of thermodynamic parameters determined from ITC for interactions of arginine dodecamer in hydrochloride form with hyaluronan of molecular weight 1540 kDa in water (25 °C).

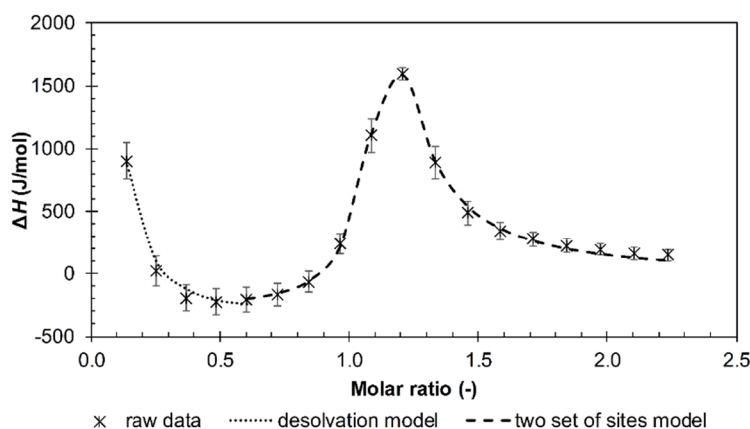


Figure 8. ITC records for the titration of arginine decamer in hydrochloride form into a 9 kDa hyaluronan solution in water (25 °C). Two sets of sites and the desolvation model were used for data evaluation.

The fitting of multievent results was realized as follows. Data exemplified in Figure 8 were fitted by two models. The first model fitted the first, decreasing, part of the isotherm, the second model fitted the subsequent part with a maximum. The first part resembled the ITC curves measured with shorter arginine oligomers (cf. Figure 5) and was, therefore, called the “desolvation” model (desolvation part). The second model was called the “Two Sets of Sites” model in the ITC software and represents here some first and second interaction events. This multievent fitting varied with the molecular weight of hyaluronan. All three types of interactions were recognizable for the lowest molecular weight (Figure 8). However, as the molecular weight increased, the desolvation part disappeared and only the two remaining interaction events were retained (Figure S8 in Supplementary Materials). Note that the maximum on the two-interaction event model was still observed at the same molar ratio regardless of the hyaluronan molecular weight. The thermodynamic parameters estimated for each used hyaluronan molecular weight and model are shown in Table S9 in Supplementary Materials.

Influence of the Environment

As in the case of ultrasonic spectrometer experiments, the longest arginine oligomers were chosen for experiments involving the presence of additional ions. Unlike arginine triacontamer, arginine dodecamer and decamer showed no interactions with hyaluronan in PBS (pH 7.4), regardless of the molecular weight of hyaluronan (no heat effects measured with ITC). In the case of arginine triacontamer, the titration curve was always observed to have a sigmoidal shape and the effect of PBS on interactions with hyaluronan of different molecular weights could be investigated with the single interaction site model. The estimated thermodynamic parameters are summarized in Table S7 in Supplementary Materials. The molar ratio corresponding to the saturation of interacting sites (the inflex point on the ITC curve) increased with increasing hyaluronan molecular weight. The change

in the standard interaction enthalpy was of one order of magnitude lower than in the case of the titration of solutions prepared only in water. As with aqueous solutions, interactions were dominated by the standard entropy contribution, as shown in Figure 9. The greater standard entropy contribution at hyaluronan molecular weights of 680 and 1540 kDa compared to that at other molecular weights of hyaluronan was due to the low value of the dissociation constant for these molecular weights, as shown in Table S7 in Supplementary Materials.

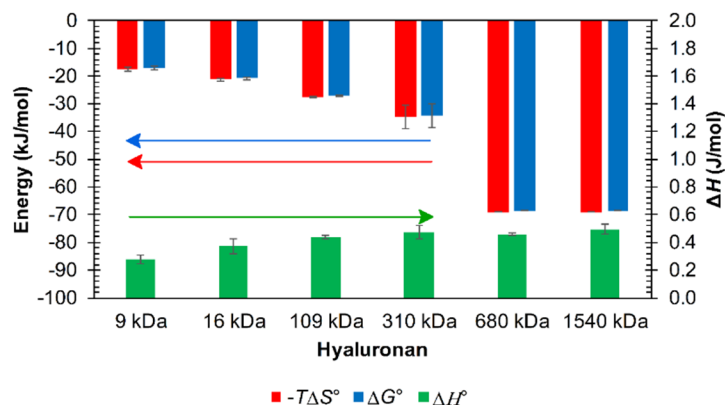


Figure 9. Graph showing the thermodynamic parameters obtained from ITC for the arginine triacontamer in hydrochloride form and hyaluronan of various molecular weights in the environment of PBS.

Due to the inability of the arginine dodecamer to interact with hyaluronan in PBS, this arginine oligomer was chosen for testing the effect of increasing ionic strength. Several media with ionic strengths of 10, 50, 100, and 150 mM (NaCl concentration) were tested with 680 kDa hyaluronan. All samples except for the 150 mM ionic strength medium exhibited a sigmoidal titration curve. With 150 mM NaCl, however, the interactions were no longer noticeable (no heat effects measured with ITC). The data in Table S10 in Supplementary Materials show that the molar ratio at the point of interaction saturation remained at about one and thus, no shift was observed as it was in PBS solution. The magnitude of the standard interaction enthalpy change decreased with increasing ionic strength, whereas the dissociation constant remained approximately constant (Table S10 in Supplementary Materials). The change in standard Gibbs energy and the standard entropy contribution appeared to be unaffected by the magnitude of the ionic strength. Thus, the ionic strength did not appear to have a significant effect on the intensity of the interactions, unless it was sufficiently high (150 mM).

The arginine decamer, which demonstrated very specific behavior in ITC performed in water, did not show any interactions in ITC performed in PBS, irrespective of the molecular weight of hyaluronan. The solution also remained clear throughout the titration (Table S6 in Supplementary Materials). Environments of 10 and 50 mM NaCl were also tested. In both cases, the decamer of arginine interacted similarly with hyaluronan of molecular weights 9 and 1540 kDa. It formed turbid systems or precipitates with low- or high-molecular-weight hyaluronan, respectively (Table S6 in Supplementary Materials). All samples with high-molecular-weight hyaluronan exhibited a sigmoidal titration curve with yet smaller values for the standard interaction enthalpy than those measured for the arginine dodecamer in a similar environment (cf. Table S10 in Supplementary Materials). In contrast, samples with low-molecular-weight hyaluronan exhibited only a simple decrease, similarly to shorter oligomers of arginine. From the titration curves with 9 kDa hyaluronan, only the overall change in the measured enthalpy change was calculated as the difference between the first and the last addition. Sigmoidal curves were evaluated by means of a standard model. The results of individual titrations are summarized in Table S11 in Supplementary Materials. The specific behavior of the decamer was thus suppressed by the presence of additional ions.

4. Discussion

For arginine monomer and oligomers up to and including four monomer units, no interactions were observed in solutions prepared in water, even after pH adjustment, regardless of the used molecular weight of the hyaluronan. The relative ultrasound velocity did not change (Figures S1 and S2 in Supplementary Materials), the ITC curve simply decreased (Figure 5), and visual observation revealed a clear solution during the corresponding titrations, as seen in Table S5 in Supplementary Materials presenting a basic overview of the results. A decreasing (and only decreasing) enthalpy change in ITC titrations is only very rarely reported in literature. A similar result was published [38] for the binding of two 9-O-(ω -amino) alkyl ether berberine analogues to the RNA triplex (though in an exothermic direction) but with no special comments—the authors simply considered it to be a part of the traditional sigmoidal curve. Taking into account the results of visual observation and ultrasound spectroscopy, we hypothesize that, in our case, the simple decreasing shape was probably the result primarily of some heat of mixing effects or of excess enthalpy (indicating nonideal behavior), which diminished with the increasing concentration of the hyaluronan–arginine mixture.

The situation began to change with arginine octamer. Although the ITC curves for the original (pH-untreated) samples still decreased simply for both studied molecular weights of hyaluronan (and were close to the curves obtained with shorter oligomers) (Figure 5), in the case of pH-adjusted solutions, a typical sigmoidal titration curve was obtained for high-molecular-weight hyaluronan (Table S8 in Supplementary Materials). The relative ultrasound velocity was not constant in this latter case but decreased from the beginning of the titration, especially when the hyaluronan molecular weight was high (Figure S3 in Supplementary Materials). In the case of 1540 kDa hyaluronan, interactions marked by increased opacity and even some precipitate were also visually observable from a molar ratio of about one.

The typical sigmoidal ITC curve was obtained for arginine dodecamer and triacontamer (Table S8 in Supplementary Materials) with hyaluronan of all tested molecular weights. The ITC records corresponded well with the data from ultrasound spectroscopy, as illustrated in Figure 10 for arginine dodecamer. The steep decrease in the sigmoidal curve corresponded to the sudden decrease in the relative ultrasound velocity. In contrast, ultrasound velocity was more sensitive to changes during the first part of titrations, where the ITC curve showed practically constant values of ΔH (the measured enthalpy change). Both techniques revealed some differences between the two different hyaluronan molecular weights.

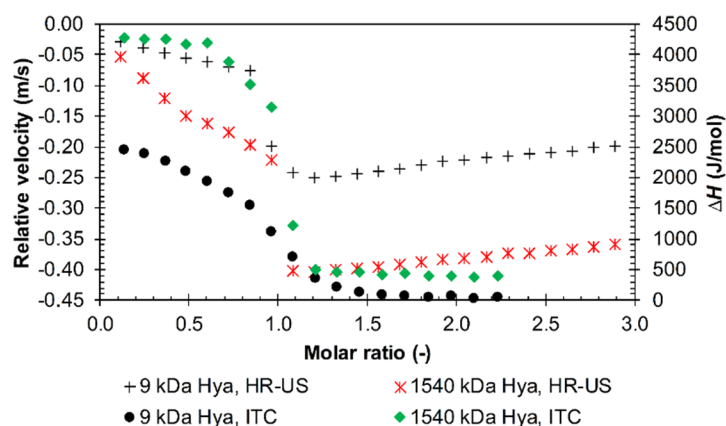


Figure 10. The comparison of HR-US (high-resolution ultrasound spectroscopy) and ITC titration records during the titration of arginine dodecamer in hydrochloride form into 9 and 1540 kDa hyaluronan solutions in water (11.6 MHz, 25 °C).

A decrease in the relative ultrasound velocity usually indicates changes in hydration shells. Because the water in the hydration shell is less compressible than the bulk water [39], it is also

denser [40], which helps sonic waves to propagate [34]; the relative velocity decreases when hydration water is released. Thus, the longer arginine oligomers disrupted the hyaluronan hydration shell to form an associate with a common hydration shell containing less hydration water molecules compared to the amount of hydration water in both shells separately. The relative velocity decreased until all corresponding interaction sites on the hyaluronan became saturated. Thereafter, these hydration changes no longer occurred, and the relative velocity started to increase only slightly. This increase can be attributed to the increasing amount of sodium and chloride counter-ions from hyaluronan and arginine, respectively, or to partial redissolution of the precipitate upon continuing dilution. It is interesting that these interactions were saturated at a molar ratio of about one, even though they are not strictly supposed to be electrostatic. The hydration changes might thus have occurred primarily on the charged groups and were induced by electrostriction effects [41–44].

The relative ultrasound velocity decrease in the first part of the titration was thus attributed mainly to hydration changes. More hydration water was released with high-molecular-weight hyaluronan as the relative velocity reached lower values.

A positive change in enthalpy was attributed previously also to the desolvation of some of the nonionic groups due to the interaction [45]. At the same time, new noncovalent bonds are not supposed to be formed during the interaction [46,47]. It is obvious from our ITC data that the entropic contribution to the Gibbs free energy was significant. Presumably, this large entropy gain arises also from the release of water molecules during titration [48]. Thus, our data indicate an important effect of the destruction of the hydration shell upon hyaluronan–arginine interactions. Moreover, the relationship between the (steep) changes in the titration curves and the molar ratio points to the involvement of charged groups and electrostatic forces (and electrostriction) in these interactions.

Further, the combined influence of arginine and hyaluronan molecular weights was observed with arginine dodecamer and triacontamer. Lower values of the relative ultrasound velocity were observed for 1540 kDa hyaluronan with the dodecamer in comparison to 9 kDa hyaluronan with the dodecamer. This means a higher amount of water released from the high-molecular-weight hyaluronan. This agrees with the lower enthalpy change and lower entropy contribution found for the 9 kDa hyaluronan (Table S8 in Supplementary Materials). The situation is similar for arginine triacontamer but, here, 9 kDa hyaluronan led to a more gentle decrease in the ultrasound titration curve (Figure S5 in Supplementary Materials). Nevertheless, for both forms of hyaluronan, the intensive development of turbidity was observed during titrations with arginine triacontamer, finally resulting in the formation of a precipitate around a molar ratio equal to one.

The greatest difference between the two used techniques appeared to arise in the case of arginine decamer. Although ultrasonic spectroscopy did not distinguish between decamer and higher arginine oligomers, in the case of ITC, decamer revealed specific results that did not share the features of other arginine oligomers. The unique results obtained in ITC for arginine decamer still corresponded in their principal features to ultrasound titrations, and the effect of hyaluronan molecular weight was similar to that found for dodecamer. Figure 11 shows that the maximum on the ITC curve, attributed to the transition between the first and second interaction events, corresponded to the steep decrease in the relative ultrasound velocity record. The first, decreasing, part of the ITC curve thus corresponded to the ITC curves for shorter arginine oligomers in Figure 5 and to the first decreasing branch of the ultrasound titration curve. The latter was interpreted in terms of decreasing hyaluronan hydration. Even in this titration region, interactions could be observed visually (Table S5 in Supplementary Materials) as a certain degree of opacity, the intensity of which increased with hyaluronan molecular weight. In the case of 1540 kDa, a precipitate even formed around a molar ratio of 1.2, which is around the maximum of the ITC curve in Figure 11. Thus, the similarity between the decreasing parts at low molar ratios in Figures 5 and 11 is only apparent—they reflect different processes (with different ΔH values).

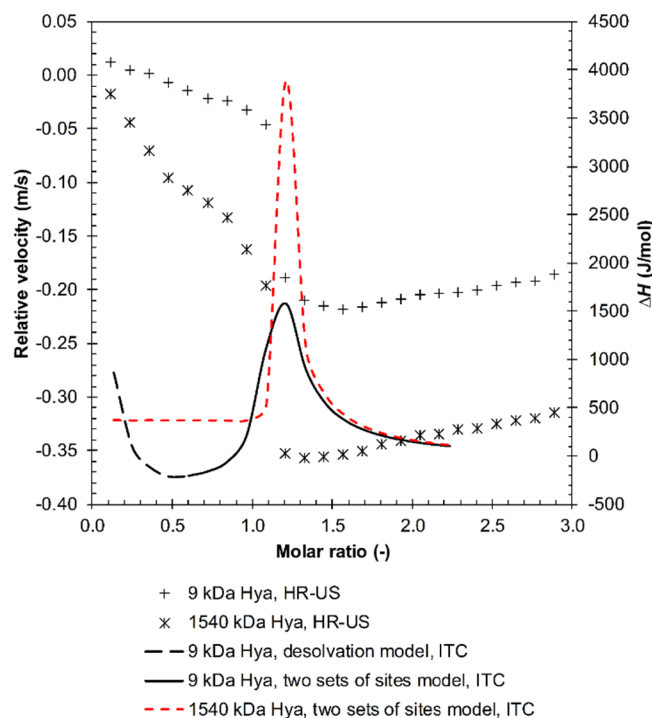


Figure 11. Comparison of the fitted ITC records and the measured relative ultrasound velocity changes during the titration of arginine decamer (hydrochloride form) into 9 and 1540 kDa hyaluronan solutions in water (25 °C, 11.6 MHz).

The two methods employed in this work do not provide sufficient chemical information to explain the specific thermal behavior of arginine decamer interacting with hyaluronan. Cationic side chains of arginine oligomers were found to have the ability to form like-charged contact ion pairs in an aqueous environment [49]. Although the ability to form like-charged contact ion pairs in the case of arginine is not limited by the number of monomers in the chain, it could be conducive with respect to establishing the different behavior of the arginine decamer—we speculate that just 10 arginine monomers result in a specific dimension and shape on the part of the corresponding oligomer, which is favorable for its specific interactions with hyaluronan. This length requirement mirrors a similar requirement in the binding of hyaluronan to the primary surface cell receptor CD44, which is found to require a hyaluronan sequence of at least 3–9 disaccharide units (1.2–3.6 kDa) for monovalent binding to occur [12,50]. Lysine does not have the ability to form like-charged contact ion pairs. We, therefore, conducted a pilot experiment with lysine decamer, in which no multievent ITC record was found (data not shown). Thus, the specific conformations of different arginine oligomers and hyaluronan and the structures of their hydration shells should be revealed to explain the observed interaction behavior. A molecular dynamic modelling study has recently been initiated to address this problem.

Of all the studied hyaluronan molecular weights in water, the standard entropic contribution (and also the standard interaction Gibbs energy) of the lowest studied molecular weights of hyaluronan (9 or 16 kDa), which were in the rod conformation [51], had the lowest absolute values for both dodecamer and triacontamer arginine (Table S8 in Supplementary Materials). The enthalpic contribution increased slightly with increasing hyaluronan chain length. For the distinctive arginine decamer, the desolvation model was only observable for 9 kDa hyaluronan and disappeared with increasing molecular weight, leaving only the model of the Two Sets of Sites. From the point of view of ultrasonic spectroscopy, 9 kDa hyaluronan achieved the smallest change in relative ultrasound velocity of all the studied molecular weights of hyaluronan for all arginine oligomers. Thus, it is likely that the rod conformation of hyaluronan releases less water during interactions [48]. In contrast, the other studied molecular weights of hyaluronan in random coil conformation [52] have approximately the same

entropy contribution. Hyaluronan with a molecular weight of 109 kDa, which has a conformation close to the transition between the rod and random coil forms [53], appears, from the microcalorimetric point of view, more like a random coil in terms of its interactions with arginine oligomers.

Arginine interactions with hyaluronan with the shortest chains also showed the highest sensitivity to the presence of added ions—they were most suppressed by increased ionic strength.

As far as the effect of the molecular weight of hyaluronan is concerned, the occurrence of the rod or random coil conformation appeared to be crucial. The forms of hyaluronan in the region of the rod conformation (9 and 16 kDa) differed significantly from longer chains of hyaluronan with respect to individual parameters of ITC and HR-US. The conformation of the hyaluronan chain is thus relevant for interactions with arginine and its oligomers as well as their sensitivity to ionic strength.

From the point of view of the effect of ions, there was very good correlation between the results of both techniques both in PBS solution and environments with different ionic strengths. Figure 12 illustrates the combined effect of PBS and hyaluronan chain length on titration curves obtained by the two methods. The saturation point was shifted to a molar ratio of about 1.5 for high-molecular-weight hyaluronan, and it is also clearly evident that the interactions were much less intense for 9 kDa hyaluronan, consistent with respect to both ITC and HR-US results. In PBS and for arginine triacontamer, ITC also detected increasing absolute values for the standard interaction Gibbs energy and entropic contribution with increasing hyaluronan molecular weight up to 680 kDa (Figure 9); the enthalpic contribution increased slightly.

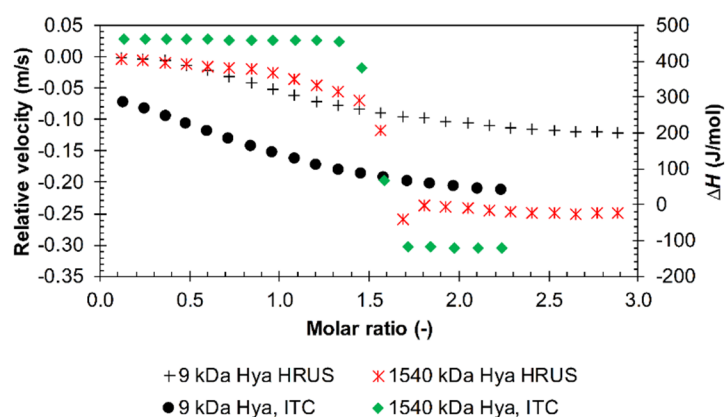


Figure 12. The comparison of HR-US and ITC titration records during the titration of arginine triacontamer (hydrochloride form) into 9 and 1540 kDa hyaluronan solutions in PBS (25 °C, 11.6 MHz).

In environments with increasing ionic strength, there were no significant changes in the titration curves, except for 150 mM NaCl (Figure 4 and Figure S9 in Supplementary Materials). In 150 mM NaCl, the HR-US titration curve showed a very small and statistically insignificant change around a molar ratio of 1.7 (Figure 4), while no heat effects were detected by ITC (Figure S9 in Supplementary Materials). However, with increasing ionic strength, there was a decrease in the change in enthalpy (Table S10 in Supplementary Materials) as well as a decrease in the absolute value of the minimum relative ultrasound velocity, as shown in the graphs in Figures S10 and S11 in Supplementary Materials. A common feature of both PBS and environments of varying ionic strength is a significant decrease in the size of the reaction enthalpy in comparison with aqueous solutions. Interactions in water are most intense, releasing the largest amount of hydration water and thus having the lowest relative ultrasound velocity value. With increasing ionic strength, the amount of hydration water released gradually decreases.

Generally, a sufficiently high ionic strength suppresses interactions between hyaluronan and arginine oligomers which occur in water. As the chain length of the arginine oligomer increases, the ability to better resist the influence of ions in the environment increases (the triacontamer is able to interact in PBS, whereas the dodecamer is only able to interact in a NaCl solution with a maximum

concentration of 100 mM). The molecular weight of hyaluronan contributes in a similar way, and as its value increases, the interactions in the given environment are strengthened, as can be seen from the results of titrations of the decamer in environments with different ionic strengths (Table S6 in Supplementary Materials).

The results of this study can be summarized as follows. In water, a sufficient length of arginine oligomer is necessary for it to be able to interact with hyaluronan, regardless of the molecular weight of hyaluronan. The transition from noninteracting to interacting oligomers occurs between octamer and dodecamer, with unique behavior observed for decamer. This is observed in the ultrasound titration curve by a change from an almost straight line (ultrasound velocity independent of molar ratio), by a slightly bent sigmoid, up to an approximately Z-shaped curve typical for a strongly interacting system. In ITC, a simply and steeply decreasing curve changes via an approximate Λ shape with a strong maximum (just arginine decamer) to the classical sigmoidal record. Visually, this transition corresponds to the change from a clear, through a turbid, to a precipitated system.

Hydration forces (relating to the release of water molecules from the hyaluronan hydration shell) play an important role in interactions. The microphase (turbidity) or even macrophase (precipitation) observed in some systems could have analogical desolvation (dehydration) causes such as the well-known salting out of proteins. Moreover, the electrostatic component is not negligible, as demonstrated by the saturation of interaction sites around the point of charge equilibration, which is in contrast to hyaluronan-CD44 interactions mediated through amino acid sequences on this receptor. The significance of these electrostatic forces was demonstrated also by the effect of ions from background electrolyte—the interactions were suppressed by a sufficiently high ionic strength (at least at a value of around 150 mM, i.e., the ionic strength of physiological solution). Very probably, hydration forces were combined with electrostatic forces forming electrostriction effects.

However, the suppression of interactions by the added ions could be eliminated by a sufficient length of arginine oligomer (for instance, 30-mer). Thus, hydrogen bonding and hydrophobic interactions between nonpolar parts of the interacting (macro)molecules also play a role, especially when their hydration shells are removed or disturbed. For hyaluronan, the existence of hydrophobic patches is described [54]; the hydrocarbon parts of arginine oligomer chains are hypothesized to form similar sites for hydrophobic interactions. Like-charge arginine pairing and the specific arginine properties behind it are probably responsible for the unique behavior observed for arginine decamer.

Finally, whether hyaluronan occurs in rod-like or coiled conformation is also relevant for its interactions with arginine as well as for their sensitivity to ionic strength.

These interpretations are consistent with published concepts on the receptor binding of hyaluronan, which occurs in ionic physiological environment. The binding of hyaluronan to the CD44 receptor is controlled primarily by the shape of both—though mainly of the CD44 receptor—and their ability to form hydrogen bonds. A total of 13 amino acid residues are involved in the interaction with hyaluronan [16]. Hydrophobic interactions are of secondary importance [17]. Ionic interactions in saline contribute to approximately 25% of the total interaction energy and are highly dependent on the magnitude of the ionic strength [19].

5. Conclusions

The aim of this work was to investigate the interactions between arginine oligomers in hydrochloride form and hyaluronan. Interactions were investigated using isothermal titration calorimetry and high-resolution ultrasound spectroscopy. In water, no interactions were observed for the arginine dimer and tetramer. The transition from noninteracting to interacting oligomers occurred between octamer and dodecamer, with unique behavior observed for decamer. Dodecamer and triacontamer demonstrated clear interactions using both techniques. In water, a sufficient length of arginine oligomer is thus necessary for it to be able to interact with hyaluronan, regardless of the molecular weight of hyaluronan. Both techniques showed the saturation of interaction sites at molar ratios of basic units (arginine monomer and hyaluronan dimer) of around one (at the point of supposed

charge equilibration). The interactions were suppressed by a sufficiently high ionic strength (a value of at least 150 mM or thereabouts, i.e., the ionic strength of physiological solution), providing the arginine oligomer was not too long (e.g., 30-mer) or the hyaluronan chain not too short (e.g., 9 kDa). Whether hyaluronan conformations were rod-like or coiled was important for hyaluronan's interactions with arginine oligomers as well as for their sensitivity to ionic strength.

The two techniques gave generally corresponding outcomes, while in some cases, these differed in their details. Interactions between arginine oligomers and hyaluronan were explained by means of the combination of effects (forces). That is, hydration forces (the release of water molecules from the hyaluronan hydration shell), electrostatic interactions combined with electrostriction, as well as hydrogen bonding or hydrophobic contacts between the desolvated parts of (macro)molecules all play a role together with specific conformations of hyaluronan and arginine oligomers (which subsume the pairing ability of arginine). The employed techniques did not provide direct chemical information—molecular modelling could provide additional explanations and support for our conclusions.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4360/12/9/2069/s1>, Table S1: A listing of the hyaluronan used for experiments, Table S2: A listing of monomeric and oligomeric forms of arginine, Table S3: pH of pure arginine oligomer solutions and pH of solutions during titrations at molar ratios of 0.96 and 1.92, Table S4: pH adjustment of arginine oligomer solutions, Table S5: Summary of results of individual titrations in water—the visual observation of individual systems, Table S6: Summary of results of individual titrations in PBS or in different NaCl solutions—visual observation of individual systems, Table S7: Parameters for arginine triacontamer in PBS determined from ITC (25 °C). N is the molar ratio at the ITC record inflex point (interaction saturation point in the main text); ΔH° , ΔG° , and $-T\Delta S^\circ$ are defined per mole of hyaluronan basic unit, Table S8: Summary of parameters determined from ITC in water (25 °C). N is the molar ratio at the ITC record inflex point (interaction saturation point in the main text); ΔH° , ΔG° , and $-T\Delta S^\circ$ are defined per mole of hyaluronan basic unit, Table S9: Parameters determined for arginine decamer from ITC in water (25 °C). N is the molar ratio at the ITC record inflex point (interaction saturation point in the main text); ΔH° , ΔG° , and $-T\Delta S^\circ$ are defined per mole of hyaluronan basic unit, Table S10: Parameters for arginine dodecamer (hydrochloride form) titration in environments of different ionic strength determined from ITC (25 °C). N is the molar ratio at the ITC record inflex point (interaction saturation point in the main text); ΔH° , ΔG° , and $-T\Delta S^\circ$ are defined per mole of hyaluronan basic unit, Table S11: Parameters for arginine decamer (hydrochloride form) titration in environments of different ionic strength determined from ITC (25 °C). N is the molar ratio at the ITC record inflex point (interaction saturation point in the main text); ΔH° , ΔG° , and $-T\Delta S^\circ$ are defined per mole of hyaluronan basic unit. Figure S1: Relative ultrasonic velocity in dependence on molar ratio for titrations of arginine dimer and tetramer into hyaluronan of molecular weight 9 kDa in water (11.6 MHz, 25 °C), Figure S2: Relative ultrasonic velocity in dependence on molar ratio for titrations of arginine dimer and tetramer with and without pH adjustments into hyaluronan of molecular weight 1540 kDa in water (11.6 MHz, 25 °C), Figure S3: Relative ultrasonic velocity in dependence on molar ratio for titrations of arginine octamer with adjusted pH into hyaluronan of different molecular weights in water (11.6 MHz, 25 °C), Figure S4: Relative ultrasonic velocity in dependence on molar ratio for titrations of arginine dodecamer into hyaluronan of different molecular weights in water (11.6 MHz, 25 °C), Figure S5: Relative ultrasonic velocity in dependence on molar ratio for titrations of arginine triacontamer into hyaluronan of different molecular weights in water (11.6 MHz, 25 °C), Figure S6: Attenuation in cell 1 in dependence on molar ratio for titrations of arginine triacontamer into hyaluronan of different molecular weights in PBS (11.6 MHz, 25 °C), Figure S7: The stepped shift of the baseline due to a change in the thermal capacity of the system, Figure S8: ITC records for the titration of arginine decamer in hydrochloride form into a 1540 kDa hyaluronan solution in water (25 °C). Two sets of site models were used for data evaluation, Figure S9: ITC records for the titration of arginine dodecamer in hydrochloride form into a 680 kDa hyaluronan solution in environments with different ionic strengths (25 °C). Single binding site models were used for data evaluation, Figure S10: The comparison of HR-US and ITC titration records during the titration of arginine dodecamer in hydrochloride form into a 680 kDa hyaluronan solution in environments of different ionic strength (11.6 MHz, 25 °C), Figure S11: The comparison of HR-US and ITC titration records during the titration of arginine dodecamer in hydrochloride form into a 680 kDa hyaluronan solution in environments of different ionic strength (11.6 MHz, 25 °C).

Author Contributions: Conceptualization, A.J. and M.P.; methodology, A.J. and M.P.; validation, A.J.; formal analysis, A.J. and M.P.; investigation, A.J.; resources, A.J. and M.P.; data curation, A.J.; writing—original draft preparation, A.J. and M.P.; writing—review and editing, A.J. and M.P.; visualization, A.J.; supervision, M.P.; project administration, M.P.; funding acquisition, M.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the MINISTRY OF EDUCATION, YOUTH AND SPORTS, Czech Republic (project No. FCH-S-20-6307).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Meyer, K.; Palmer, W.J. The Polysaccharide of the Vitreous Humor. *J. Biol. Chem.* **1934**, *107*, 629–634.
2. Laurent, T.C.; Fraser, J.R.E. Hyaluronan. *FASEB J.* **1992**, *6*, 2397–2404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Laurent, T.C.; Laurent, U.B.; Fraser, J.R. Functions of Hyaluronan. *Ann. Rheum. Dis.* **1995**, *54*, 429–432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Laurent, T.C. Biochemistry of Hyaluronan. *Acta Otolaryngol.* **1987**, *104* (Suppl. 442), 7–24. [[CrossRef](#)]
5. Girish, K.S.; Kemparaju, K. The Magic Glue Hyaluronan and Its Eraser Hyaluronidase: A Biological Overview. *Life Sci.* **2007**, *80*, 1921–1943. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Steinbuechel, A.; Hofrichter, M. *Biopolymers*; Wiley-VCH Verlag GmbH: Hoboken, NJ, USA, 2003; pp. 379–390.
7. Toole, B.P. Hyaluronan and Its Binding Proteins, the Hyaladherins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1990**, *2*, 839–844. [[CrossRef](#)]
8. Ponta, H.; Sherman, L.; Herrlich, P.A. CD44: From Adhesion Molecules to Signalling Regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 33–45. [[CrossRef](#)]
9. Leite, M.L.; da Cunha, N.B.; Costa, F.F. Antimicrobial Peptides, Nanotechnology, and Natural Metabolites as Novel Approaches for Cancer Treatment. *Pharmacol. Ther.* **2018**, *183*, 160–176. [[CrossRef](#)]
10. Almond, A. Hyaluronan. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 1591–1596. [[CrossRef](#)]
11. Chytil, M.; Trojan, M.; Kovalenko, A. Study on Mutual Interactions and Electronic Structures of Hyaluronan with Lysine, 6-Aminocaproic Acid and Arginine. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *142*, 8–15. [[CrossRef](#)]
12. Karousou, E.; Misra, S.; Ghatak, S.; Dobra, K.; Götte, M.; Vigetti, D.; Passi, A.; Karamanos, N.K.; Skandalis, S.S. Roles and Targeting of the HAS/Hyaluronan/CD44 Molecular System in Cancer. *Matrix Biol.* **2017**, *59*, 3–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Vuorio, J.; Vattulainen, I.; Martinez-Seara, H. Atomistic Fingerprint of Hyaluronan–CD44 Binding. *PLoS Comput. Biol.* **2017**, *13*, e1005663. [[CrossRef](#)]
14. Nagae, M.; Yamaguchi, Y. Three-Dimensional Structural Aspects of Protein–Polysaccharide Interactions. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 3768–3783. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Rao, N.V.; Yoon, H.Y.; Han, H.S.; Ko, H.; Son, S.; Lee, M.; Lee, H.; Jo, D.-G.; Kang, Y.M.; Park, J.H. Recent Developments in Hyaluronic Acid-Based Nanomedicine for Targeted Cancer Treatment. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2016**, *13*, 239–252. [[CrossRef](#)]
16. Banerji, S.; Wright, A.J.; Noble, M.; Mahoney, D.J.; Campbell, I.D.; Day, A.J.; Jackson, D.G. Structures of the Cd44–Hyaluronan Complex Provide Insight into a Fundamental Carbohydrate-Protein Interaction. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 234–239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Plazinski, W.; Knys-Dzieciuch, A. Interactions between CD44 Protein and Hyaluronan: Insights from the Computational Study. *Mol. Biosyst.* **2012**, *8*, 543–547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Bhattacharya, D.S.; Svehkarev, D.; Soucek, J.J.; Hill, T.K.; Taylor, M.A.; Natarajan, A.; Mohs, A.M. Impact of Structurally Modifying Hyaluronic Acid on CD44 Interaction. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5*, 8183–8192. [[CrossRef](#)]
19. Day, A.J.; Prestwich, G.D. Hyaluronan-Binding Proteins: Tying Up the Giant. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 4585–4588. [[CrossRef](#)]
20. Ye, F.; Xie, Y.; Jensen, H.; Larsen, S.W.; Yagmur, A.; Larsen, C.; Østergaard, J. Interaction of Amino Acid and Dipeptide β -Naphthylamide Derivatives with Hyaluronic Acid and Human Serum Albumin Studied by Capillary Electrophoresis Frontal Analysis. *Chromatographia* **2013**, *76*, 49–57. [[CrossRef](#)]
21. Oyarzun-Ampuero, F.A.; Goycoolea, F.M.; Torres, D.; Alonso, M.J. A New Drug Nanocarrier Consisting of Polyarginine and Hyaluronic Acid. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2011**, *79*, 54–57. [[CrossRef](#)]
22. Kim, E.-J.; Shim, G.; Kim, K.; Kwon, I.C.; Oh, Y.-K.; Shim, C.-K. Hyaluronic Acid Complexed to Biodegradable Poly L-Arginine for Targeted Delivery of siRNAs. *J. Gene Med.* **2009**, *11*, 791–803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Balbino, T.A.; Correa, G.S.C.; Favaro, M.T.P.; Toledo, M.A.S.; Azzoni, A.R.; de la Torre, L.G. Physicochemical and in Vitro Evaluation of Cationic Liposome, Hyaluronic Acid and Plasmid DNA as Pseudo-Ternary Complexes for Gene Delivery. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2015**, *484*, 262–270. [[CrossRef](#)]
24. Mero, A.; Campisi, M. Hyaluronic Acid Bioconjugates for the Delivery of Bioactive Molecules. *Polymers* **2014**, *6*, 346–369. [[CrossRef](#)]
25. Turgeon, S.L.; Schmitt, C.; Sanchez, C. Protein–Polysaccharide Complexes and Coacervates. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2007**, *12*, 166–178. [[CrossRef](#)]

26. Lenormand, H.; Deschrevel, B.; Vincent, J.-C. Chain Length Effects on Electrostatic Interactions between Hyaluronan Fragments and Albumin. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *82*, 887–894. [[CrossRef](#)]
27. Lenormand, H.; Deschrevel, B.; Tranchepain, F.; Vincent, J.-C. Electrostatic Interactions between Hyaluronan and Proteins at PH 4: How Do They Modulate Hyaluronidase Activity. *Biopolymers* **2008**, *89*, 1088–1103. [[CrossRef](#)]
28. Lenormand, H.; Deschrevel, B.; Vincent, J.-C. PH Effects on the Hyaluronan Hydrolysis Catalysed by Hyaluronidase in the Presence of Proteins: Part I. Dual Aspect of the PH-Dependence. *Matrix Biol.* **2010**, *29*, 330–337. [[CrossRef](#)]
29. Collins, M.N.; Birkinshaw, C. Hyaluronic Acid Solutions—A Processing Method for Efficient Chemical Modification. *J. Appl. Polym. Sci.* **2013**, *130*, 145–152. [[CrossRef](#)]
30. Freyer, M.W.; Lewis, E.A. Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions. *Methods Cell Biol.* **2008**, *84*, 79–113. [[CrossRef](#)]
31. Liu, J.; Cowman, M.K. Thermal Analysis of Semi-Dilute Hyaluronan Solutions. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2000**, *59*, 547–557. [[CrossRef](#)]
32. Cleland, R.L. Enthalpy of Mixing Glycosaminoglycans with Aqueous NaCl. *Biopolymers* **1979**, *18*, 2673–2681. [[CrossRef](#)]
33. Benegas, J.C.; Di Blas, A.; Paoletti, S.; Cesàro, A. Some Aspects of the Enthalpy of Dilution of Biological Polyelectrolytes. *J. Therm. Anal.* **1992**, *38*, 2613–2620. [[CrossRef](#)]
34. Buckin, V.A. High-Resolution Ultrasonic Spectroscopy. *J. Sensors Sens. Syst.* **2018**, *7*, 207–217. [[CrossRef](#)]
35. Lehmann, L.; Buckin, V. Determination of the Heat Stability Profiles of Concentrated Milk and Milk Ingredients Using High Resolution Ultrasonic Spectroscopy. *J. Dairy Sci.* **2005**, *88*, 3121–3129. [[CrossRef](#)]
36. Graeme, L.C. *Biomolecular and Bioanalytical Techniques*; Vasudevan, R., Ed.; Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2019; 576p.
37. Le, V.H.; Buscaglia, R.; Chaires, J.B.; Lewis, E.A. Modeling Complex Equilibria in Isothermal Titration Calorimetry Experiments: Thermodynamic Parameters Estimation for a Three-Binding-Site Model. *Anal. Biochem.* **2013**, *434*, 233–241. [[CrossRef](#)]
38. Bhowmik, D.; Das, S.; Hossain, M.; Haq, L.; Suresh Kumar, G. Biophysical Characterization of the Strong Stabilization of the RNA Triplex Poly(U)•poly(A)*poly(U) by 9-O-(ω -Amino) Alkyl Ether Berberine Analogs. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e37939. [[CrossRef](#)]
39. Buckin, V.A.; Kankiya, B.I.; Sarvazyan, A.P.; Uedaira, H. Acoustical Investigation of Poly(DA).Poly(DT), Poly[d(A-T)].Poly[d(A-T)], Poly(A).Poly(U) and DNA Hydration in Dilute Aqueous Solutions. *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 4189–4203. [[CrossRef](#)]
40. Merzel, F.; Smith, J.C. Is the First Hydration Shell of Lysozyme of Higher Density than Bulk Water? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 5378–5383. [[CrossRef](#)]
41. Chalikian, T.V.; Sarvazyan, A.P.; Breslauer, K.J. Hydration and Partial Compressibility of Biological Compounds. *Biophys. Chem.* **1994**, *51*, 89–109. [[CrossRef](#)]
42. Galema, S.A.; Hoeliland, H. Stereochemical Aspects of Hydration of Carbohydrates in Aqueous Solutions. 3. Density and Ultrasound Measurements. *J. Phys. Chem.* **1991**, *95*, 5321–5326. [[CrossRef](#)]
43. Zana, R. Studies of Aqueous Solutions of Polyelectrolytes by Means of Ultrasonic Methods. *J. Macromol. Sci. Part C Polym. Rev.* **1975**, *12*, 165–189. [[CrossRef](#)]
44. Isemura, T.; Goto, S. Studies of the Hydration and the Structure of Water and Their Roles in Protein Structure. II. The Hydration of Electrolytes by Ultrasonic Interferometry and Its Temperature Dependence. *Bull. Chem. Soc. Jpn* **1964**, *37*, 1690–1693. [[CrossRef](#)]
45. Cabani, S.; Gianni, P.; Mollica, V.; Lepori, L. Group Contributions to the Thermodynamic Properties of Non-Ionic Organic Solutes in Dilute Aqueous Solution. *J. Solut. Chem.* **1981**, *10*, 563–595. [[CrossRef](#)]
46. Lafont, V.; Armstrong, A.A.; Ohtaka, H.; Kiso, Y.; Mario Amzel, L.; Freire, E. Compensating Enthalpic and Entropic Changes Hinder Binding Affinity Optimization. *Chem. Biol. Drug Des.* **2007**, *69*, 413–422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Kawasaki, Y.; Chufan, E.E.; Lafont, V.; Hidaka, K.; Kiso, Y.; Mario Amzel, L.; Freire, E. How Much Binding Affinity Can Be Gained by Filling a Cavity? *Chem. Biol. Drug Des.* **2010**, *75*, 143–151. [[CrossRef](#)]
48. Mertins, O.; Dimova, R. Binding of Chitosan to Phospholipid Vesicles Studied with Isothermal Titration Calorimetry. *Langmuir* **2011**, *27*, 5506–5515. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

49. Vondrášek, J.; Mason, P.E.; Heyda, J.; Collins, K.D.; Jungwirth, P. The Molecular Origin of Like-Charge Arginine–Arginine Pairing in Water. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 9041–9045. [[CrossRef](#)]
50. Lesley, J. Hyaluronan Binding by Cell Surface CD44. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 26967–26975. [[CrossRef](#)]
51. Simulescu, V.; Mondek, J.; Kalina, M.; Pekař, M. Kinetics of Long-Term Degradation of Different Molar Mass Hyaluronan Solutions Studied by SEC-MALLS. *Polym. Degrad. Stab.* **2015**, *111*, 257–262. [[CrossRef](#)]
52. Mondek, J.; Kalina, M.; Simulescu, V.; Pekař, M. Thermal Degradation of High Molar Mass Hyaluronan in Solution and in Powder; Comparison with BSA. *Polym. Degrad. Stab.* **2015**, *120*, 107–113. [[CrossRef](#)]
53. Simulescu, V.; Kalina, M.; Mondek, J.; Pekař, M. Long-term degradation study of hyaluronic acid in aqueous solutions without protection against microorganisms. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *137*, 664–668. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Scott, J.E.; Cummings, C.; Brass, A.; Chen, Y. Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solution, Investigated by Rotary Shadowing-Electron Microscopy and Computer Simulation. Hyaluronan Is a Very Efficient Network-Forming Polymer. *Biochem. J.* **1991**, *274*, 699–705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).