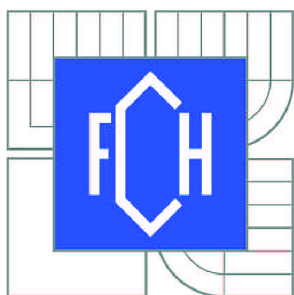


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU

FACULTY OF CHEMISTRY

MATERIALS RESEARCH CENTRE

# STUDIUM INTERAKCÍ HYALURONANU A ALBUMINU METODOU SEC-MALLS

SEC-MALLS STUDY ON HYALURONAN-ALBUMIN INTERACTIONS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

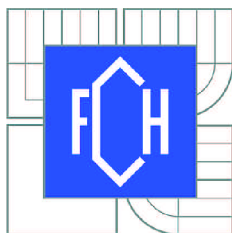
ALENA SEREDA

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. MARTIN CHYTIL, Ph.D.

BRNO 2014



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

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0809/2013** Akademický rok: **2013/2014**  
Ústav: Centrum materiálového výzkumu  
Student(ka): **Alena Sereda**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie (B2801)  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)  
Vedoucí práce **Ing. Martin Chytil, Ph.D.**  
Konzultanti:

### Název bakalářské práce:

Studium interakcí hyaluronanu a albuminu metodou SEC-MALLS

### Zadání bakalářské práce:

Prostudovat interakce albuminu a hyaluronanu pomocí metody SEC-MALLS.

Vyhodnotit míru interakcí dle parametrů vnitřní viskozity, gyračního poloměru, molekulové hmotnosti a indexu polydisperzity.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 23.5.2014

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

-----  
Alena Sereda  
Student(ka)

-----  
Ing. Martin Chytil, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Tato práce je zaměřená na interakce hyaluronanu (HA) a hovězího sérového albuminu (BSA). Interakce byly studovány pomocí metody SEC-MALLS, kde byly stanovovány molekulová hmotnost, gyrační a hydrodynamický poloměry a vnitřní viskozita částic systému. Dodatečně byly interakce zkoumány pomocí měření DLS a zeta potenciálu, kde byly stanovovány hydrodynamický průměr a velikost zeta potenciálu částic systému. Bylo stanoveno, že k interakcím HA a BSA dochází v jakémkoliv prostředí ale s různou účinností. Bylo prokázáno, že velká iontová síla zmenšuje rozsah interakcí HA s BSA, zvyšuje poloměry komplexů, jejich vnitřní viskozitu a zeta potenciál. Bylo také prokázáno, že s rostoucí koncentrací BSA se komplexy zmenšují ve svých poloměrech, snižuje se taky vnitřní viskozita komplexů.

## **ABSTRACT**

This work is focused on interactions of hyaluronan (HA) and bovine serum albumin (BSA). These interactions were studied by SEC-MALLS method, where molar mass, root mean square (rms) radii, hydrodynamic radius and intrinsic viscosity of particles of the system were defined. Additionally, interactions were examined by measurement of DLS and zeta potential, where hydrodynamic radius and a value of the zeta potential were defined. The interactions were confirmed at any of the used media, but with different efficiency. Furthermore it was found out, that the high ionic strength minimizes the range of the interactions, magnifies the radii of the complexes, their intrinsic viscosity and zeta potential. It was proved that complexes become smaller in their radii and viscosity with growing BSA concentration.

## **KÍČOVÁ SLOVA**

Interakce, hyaluronan, albumin, SEC-MALLS, DLS, zeta potenciál, molekulová hmotnost, gyrační poloměr, hydrodynamický poloměr, vnitřní viskozita

## **KEY WORDS**

Interactions, hyaluronan, albumin, SEC-MALLS, DLS, zeta potential, molar mass, root mean square (rms) radii, hydrodynamic radii, intrinsic viscosity

SEREDA, A. *Studium interakcí hyaluronanu a albuminu metodou SEC-MALLS*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 54 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Martin Chytil, Ph.D..

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Martinu Chytilovi, Ph.D. za poskytnuté odborné rady, pomoc a trpělivost. Také bych chtěla poděkovat Ing. Michalu Kalinovi za spolupráci a odborné rady, které byly nezbytné při pochopení teoretických mechanismů.



# OBSAH

1. Úvod.....	6
2. Teoretická část.....	7
2.1. Hyaluronan	7
2.2. Albumin	9
2.3. Interakce molekul hyaluronanu a hovězího sérového albuminu	10
2.4. SEC	13
2.4.1. Teorie vylučovací chromatografie	14
2.4.2. Detektory	16
2.5. MALLS	16
2.6. DLS	21
3. Experimentální část.....	25
3.1. Materiály	25
3.2. Metody	25
3.2.1. Příprava vzorků	25
3.2.2. DLS měření vzorků	27
3.2.3. SEC-MALLS měření vzorků	27
4. Výsledky a Diskuze k DLS.....	27
4.1. DLS sady nízkomolekulové HA v Milli-Q a 0,1M NaNO <sub>3</sub>	27
4.2. DLS sady vysokomolekulové HA v Milli-Q a 0,1M NaNO <sub>3</sub>	32
5. Výsledky a Diskuze k SEC-MALLS.....	35
5.1. SEC-MALLS sady nízkomolekulové HA v Milli-Q a 0,1M NaNO <sub>3</sub>	35
5.2. SEC-MALLS sady vysokomolekulové HA v 0,1M roztoku NaNO <sub>3</sub>	38
5.3. Porovnání sad nízkomolekulové HA	40
5.4. Porovnání sad vysokomolekulové HA	45
6. Závěr.....	47
7. Seznam použitých zkratk.....	49
8. Reference.....	50

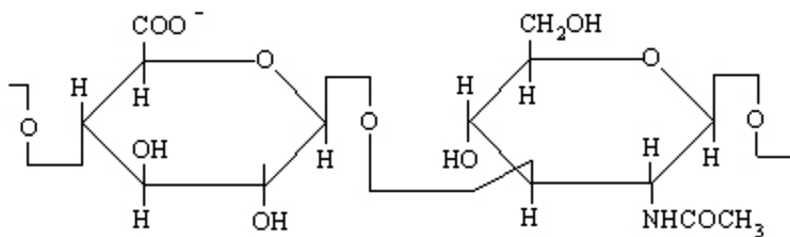
## 1. ÚVOD

Interakce hyaluronanu a albuminu je téma mnoha jak současných, tak i dřívějších vědeckých prací a výzkumů. Je to díky výjimečným vlastnostem jak hyaluronové kyseliny, tak i albuminu. Jsou zcela biokompatibilní a vyskytují přirozeně v těle člověka. Hyaluronová kyselina se nachází nejvíce v kloubech a očním sklivci a také v extracelulárním matrixu. Je signální molekulou mnoha receptorů, a tím se stává důležitou součástí mnoha významných pochodů v organismu. Hyaluronová kyselina má také výjimečné viskoelastické vlastnosti. Albumin je významný kvůli své schopnosti vázat různé látky, včetně léčiv. Interakce hyaluronanu s albuminem by nám mohly poskytnout výborný nosič léčiv. To se stává současným cílem vědeckých výzkumů. Prozkoumat interakce hyaluronanu a albuminu pomocí metody SEC-MALLS je cílem této práce. SEC-MALLS je moderní, vysokoúčinná a velice přesná chromatografická metoda pro stanovení takových důležitých parametrů (bio)polymerů jako molekulová hmotnost a gyrační poloměr. Dodatečně v této práci budou zkoumané interakce pomocí měření dynamického rozptylu světla DLS. Jak SEC-MALLS tak i DLS mají optickou metodu detekce. Výsledky by měly poskytnout informaci o vznikajících komplexech, jejich molekulové hmotnosti, gyračním a hydrodynamickým poloměru a vnitřní viskozitě. Z těchto údajů by se mělo posoudit, zda k interakcím dochází a jaký je charakter případných vznikajících komplexů hyaluronové kyseliny a albuminu.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

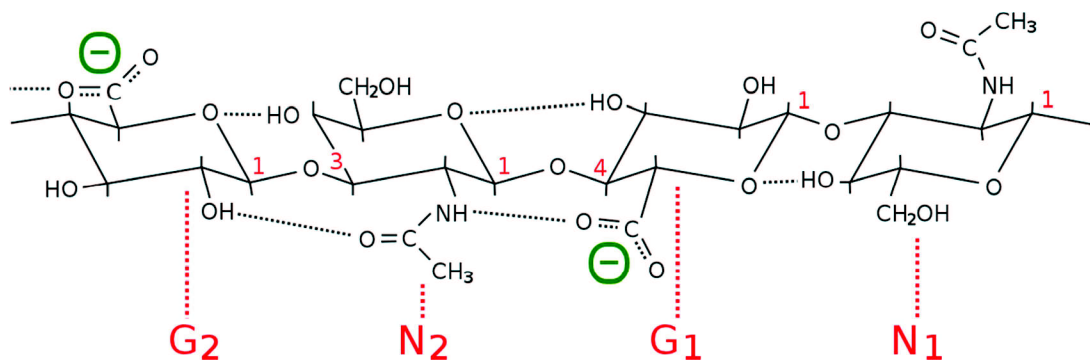
### 2.1. Hyaluronan

Hyaluronová kyselina byla poprvé izolována K.Mayerem v roce 1934 z očního sklivce hovězího skotu. Je to polysacharid (mukopolysacharid) přirozeně se vyskytující u obratlovců. Je to lineární polyaniont díky karboxylovým skupinám, skládající se z opakujících disacharidových jednotek. Každá taková jednotka se skládá z N-acetyl-D-glukosaminu a D-glukuronové kyseliny spojené  $\beta$ -1,3-glykosidickou vazbou. Disacharidové jednotky jsou mezi sebou spojeny  $\beta$ -1,4-glykosidickou vazbou. Jedna disacharidová jednotka má hmotnost kolem 400 Da a délku přibližně 1 nm. V jedné molekule hyaluronanu může být až 10 000 takových jednotek (4 MDa, 10  $\mu$ m).

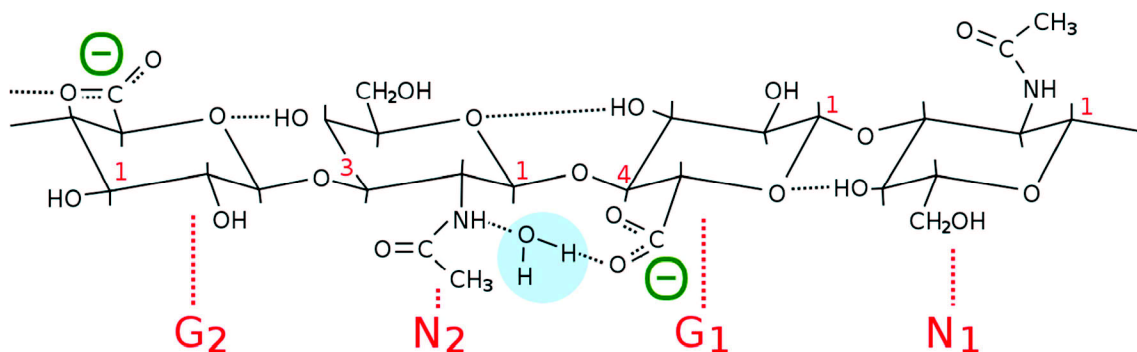


Obrázek 1. Struktura kyseliny hyaluronové

Vodíky se nacházejí v axiální poloze a tvoří hydrofobní části molekuly. Objemné skupiny, jako hydroxylové a karboxylové, jsou v ekvatoriálních polohách a jsou hydrofilní. Za stabilizaci molekuly odpovídají vodíkové můstky. Ve vodě jsou nahrazeny tzv. „vodními můstky“, kdy se do vodíkových vazeb zabudují molekuly vody.



Obrázek 2. Vodíkové můstky v molekule HA



Obrázek 3. "Vodné můstky" v molekule HA

Kvůli vodíkovým můstkům a amfifilní povaze (hydrofobní/hydrofilní části), se molekula HA v roztoku stáčí do helixu, který se pak stáčí do náhodného klubka, což je výsledná struktura molekuly. Kyselina hyaluronová díky takové své struktuře a vysokému obsahu OH skupin je vysoce hygroskopická. Je schopná zachytit vodu až o 1000x větší celkové hmotnosti než samotná molekula [1].

Její hydroxylové skupiny mají hodnotu  $pK_a = 2,9$  [2] a proto se za fyziologických podmínek (pH 7,2-7,4) vyskytuje ve formě aniontu, jako sodná sůl (hyaluronan sodný).

Nejvíce je zastoupena v extracelulárním matrixu (ECM) buněk synoviální tekutiny, pupeční šňůry a očního sklivce savců. Ale také se nachází v plicích, ledvinách, mozku a svalech. Syntéza probíhá na plasmatické membráně, zúčastní se jí enzymy syntázy, což jsou integrální membránové proteiny (HAS1, HAS23, HAS3) [3]. Jako substráty tyto enzymy používají nukleotidové prekurzory UDP-glukuronovou kyselinu a UDP-N-acetylglukosamid. Syntéza probíhá od redukujícího konce [4].

Průmyslově se syntetizuje pomocí bakterii *Streptococcus equi* (nízkomolekulová HA), a *Streptococcus zooepidemicus* (vysokomolekulová až 2 MDa). Izoluje se ale v menší míře taky z kohoutích hřebínků, pupeční šňůry a jiných měkkých tkání savců.

HA je zcela biokompatibilní a nevyvolává negativní imunitní odpověď jak samotná tak její degradační metabolity.

Degradaci HA způsobují enzymy hyaluronidáza (hyáza),  $\beta$ -D-glukuronidáza a  $\beta$ -N-acetylhexosaminidáza. Tyto enzymy jsou převážně intracelulární. Hyáza štěpí vysokomolekulovou HA na oligosacharidovou HA, kdy  $\beta$ -D-glukuronidáza a  $\beta$ -N-acetylhexosaminidáza degradují oligosacharidy [5]. Enzym hyaluronidáza a tím i schopnost štěpit řetězce hyaluronové kyseliny byly taky objeveny u bakterie jako *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes et pneumonia* a *Clostridium perfringens*.

Životnost HA v organismu je poměrně krátká (1-3 dnů), to se ale kompenzuje jejím vysokým koloběhem krevním řečištěm a lymfatickým systémem. Z krve se odbourává v játrech a částečně v ledvinách.

Je známo, že v závislosti na své molekulové hmotnosti HA může vykonávat různé funkce [6]. Například nízkomolekulová HA má angiogenní schopnosti (tvoření nových kapilár) [7] ale zároveň vyvolává genovou expresi u makrofágů, což vede k zánětlivým procesům. Vysokomolekulová HA má naopak protizánětlivé účinky, kvůli tomu že vytvoří viskóznější prostředí, které zamezí pohybu makrofágů a leukocytů. Obecně lze shrnout, že v normálním nepoškozeném stavu buňky či tkáně v jejich okolním extracelulárním matrixu obsahují převážně vysokomolekulovou HA, při poškození se však štěpí na fragmenty nízkomolekulové HA, které se vážou na určité receptory buněčné membrány, vyvolávají imunitní odpověď a vedou tak k zánětu [8]. Nízkomolekulová HA je také známá jako inhibitor rakoviny [9].

Hyaluronan má unikátní viskoelastické vlastnosti a chová se jako pseudoplastická kapalina, což z něho dělá ideální biologický lubrikant. Za klidového stavu je vysoce viskózní kapalinou, při tlaku a silovém působení však snižuje svou viskozitu (nenewtonovské chování). To je způsobeno vzájemným propletením řetězců vysokomolekulové HA, které při fyzickém namáhání (např. smykové rychlosti) rozplétají, a tím se snižuje výsledná viskozita. Nízkomolekulová HA o určitém rozsahu molekulových hmotností se v roztoku chová zcela jako newtonovská kapalina, tj. nedochází u ní k proplétání řetězců.

Důležitou funkcí hyaluronanu v organismu je hydratace tkání a transport vody kvůli jeho extrémní schopnosti ji vázat do své struktury.

Další funkcí HA (nízkomolekulové) je regulační, jelikož je substrátem pro spoustu extracelulárních enzymů. Reguluje tak vazbu buněk mezi sebou, jejich migraci, diferenciaci,

proliferaci, mitózu a také bujení rakovinné tkáně a zánětlivé procesy [Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.,Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.]. Nepostradatelná je také při embryogenezi.

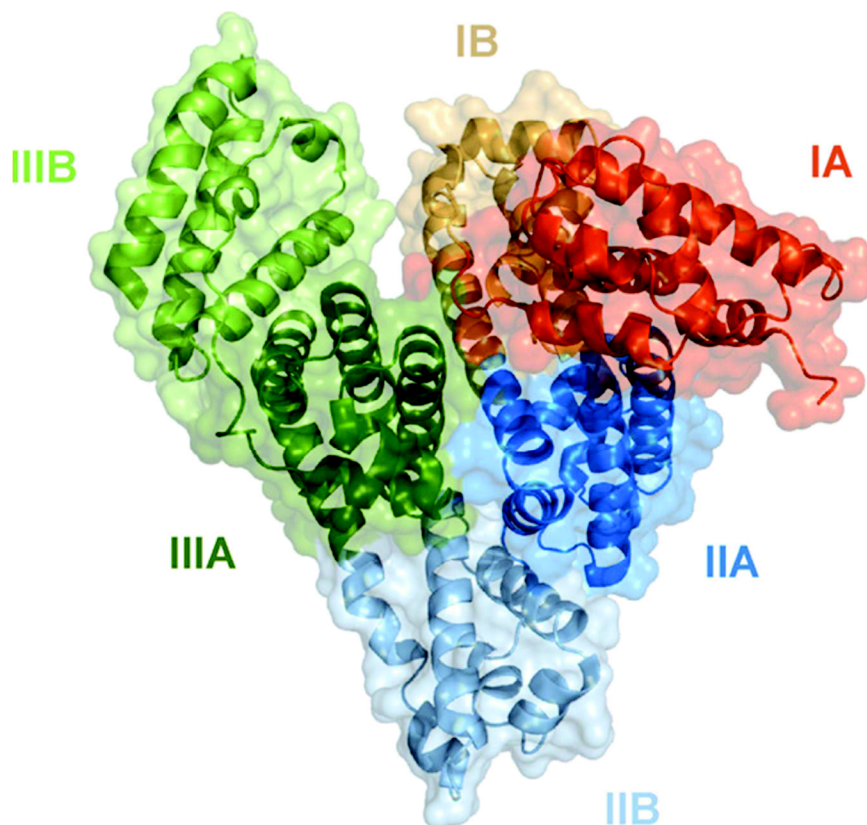
Některé z receptorů vázající HA jsou: CD44, TSG6, GHAP, LYVE-1, RHAMM. Z nich jsou dva, CD44 a RHAMM, nevýznamné při vývoji rakoviny [10]. Tyto receptory mají extrémně vysokou afinitu k HA.

Využití kyseliny hyaluronové je dosti rozsáhlé. Používá se například při injekci do synoviální tekutiny kloubu, kvůli zvýšení viskoelasticity, při očních operaci, hojení ran (scaffoldy). V poslední době je také snahou vědců vytvořit z hyaluronanu prostředek pro cílenou distribuci léčiv.

## 2.2. Albumin

Albumin je nejvíce zastoupený protein v krevní plazmě savců, jeho obsah se pohybuje v rozmezí 52-60 % plazmy [22], a koncentrace činí 0,6 mM [21]. Jeho syntéza probíhá v parenchymálních buňkách jater, a do krevního řečiště se dostává ve formě neglykosilovaného proteinu. Kvůli jeho poměrně vysoké koncentraci se podílí na osmotickém tlaku. Životnost albuminu v krvi je zhruba 36 dní [17].

Albumin je poměrně velká molekula o přibližné molekulové hmotnosti 66 kDa. Jeho primární struktura je řetězec obsahující 585 aminokyselin (u albuminu lidského séra, 583 u BovineSA), sekundární a terciární struktura je stabilizována pomocí 17 disulfidických můstků, molekula obsahuje také volnou thiolovou SH skupinu, pomocí které je schopná tvořit dimery s dalšími molekulami albuminu. Její 3D terciární struktura je globulární, která se skládá z 3 helikárních domén. Každá doména se skládá ze dvou subdomén, které představují 4 až 6 spojených helixů [12,13].  $\alpha$ -helikální struktura tvoří 67 % celé molekuly [15].



Obrázek 4. Struktura BSA (Bovine Serum Albumin)

Izoelektrický bod (pI) BSA (Bovin Serum Albumin) je 4,7. Náboj proteinu při fyziologickém pH je záporný a roven u HSA - 18 a u BSA - 15 [12,14,15]. Struktura proteinu je pochopitelně závislá na pH prostředí [12,16]. Například při pH od 4,5 do 7 je globulární, při 4,0-4,5 je částečně rozbalená (náhodné klubko).

Obecně albumin obsahuje vysoký obsah Cysteinu a nízký obsah Tryptofanu. Albumin ze séra hovězího skotu se shoduje s albuminem lidské krevní plazmy z 76% [13]. Rozdíl BSA je hlavně v obsazení 1 Tryptofanu navíc [12].

BSA váže nescificky 3 kationty  $\text{Ca}^{2+}$  prostřednictvím 3 vazeb v doméně I (ze 3). I když tato vazba je slabá, přesto udržuje 45% celkového obsahu vápníku vázaného v plazmě na albuminu. S nižší afinitou váže albumin také ionty  $\text{Mg}^{2+}$ , a to rovněž 45% z celkového množství [18].

Albumin je multifunkční protein s velkou kapacitou vazby ligandů. Je schopen vázat a transportovat širokou řadu látek, jako různé metabolity, živiny, léky, biomakromolekuly, mastné kyseliny, aminokyseliny, bilirubin a jiné. Vazba různých ligandů způsobuje změnu konformaci proteinu, nejčastěji částečné rozbalení, ztrátu v obsahu helikárních struktur a tvorbu struktury náhodného klubka a v některých případech i denaturaci.

Léky se většinou váží buď přes doménu IIA, nebo IIIA [19]. IIA doména zprostředkuje spíše hydrofobní interakce, IIIA – buď hydrofobní, vodíkové vazby, nebo elektrostatické interakce [20]. Když jsou interakce hydrofobní, dochází ve většině případů k minimálním změnám v konformaci proteinu, při elektrostatických interakcích dochází ke změně konformaci.

### 2.3. Interakce molekul hyaluronanu a hovězího sérového albuminu

Bylo prokázáno, že interakce mezi BSA a HA jsou hlavně elektrostatické povahy [23,24,25]. V malé míře se také uplatňují hydrofobní interakce a vodíkové můstky. Důsledkem interakcí hyaluronanu s albuminem jsou agregáty. Vytvoření agregátů je řízeno poklesem Gibbsovy energie  $\Delta G < 0$ . Jak víme, Gibbsova energie se skládá z entalpické a entropické složky  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ . Vodíkové můstky a hydrofobní interakce přispívají k  $\Delta H$  (snižují vazebnou energii), elektrostatické – k  $\Delta S$  (uvolňování iontů s volnou entropií; vyšší neuspořádanost). Při elektrostatické interakci dochází hlavně ke změně struktury molekuly, případně i k zabudování molekuly vody do struktury makromolekuly a uvolnění volných iontů, takže  $\Delta H > 0$  a  $\Delta S > 0$ , proces je endotermní. Při vedlejších nekovalentních interakcích dochází k uvolnění vazebné entalpie  $\Delta H < 0$  a vyšší uspořádanosti systému  $\Delta S < 0$ , proces je exotermní. Jelikož uvažujeme nejvíce o elektrostatických interakcích, je změna entropie hnací silou. Interakce se silně nabitými polyelektrolyty jsou endotermní, se slabě nabitými jsou exotermní [24].

Při interakci vznikají buď komplexy anebo koacerváty, a to určují takové faktory, jako poměr koncentrací albuminu k hyaluronanu, iontová síla, pH, délka řetězce HA.

Existují tři druhy komplexů [23]:

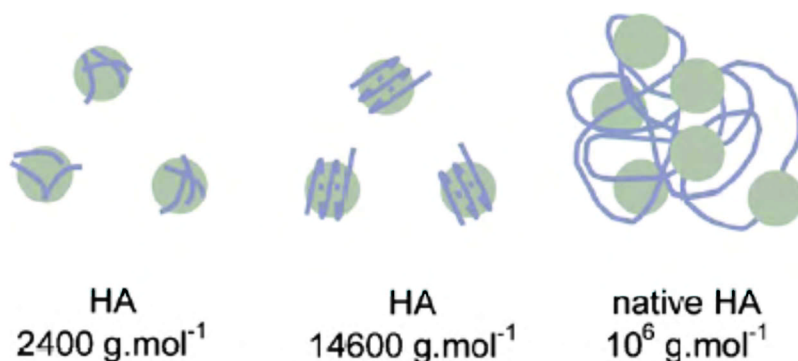
1. Nerozpustné komplexy bez náboje.
2. Málo rozpustné s malým nábojem, které mohou sedimentovat při centrifugaci.
3. Extrémně rozpustné komplexy s velkým nábojem.

Při elektrostatické interakci albuminu a kyseliny hyalurové interaguje záporně nabitá karboxylová skupina HA a kladně nabitě protonizované aminoskupiny BSA. Celkem tedy reaguje určité množství aminoskupin BSA s karboxylovými skupinami jedné molekuly HA.

Bylo prokázáno, že nerozpustné komplexy jsou s přebytkem volného náboje do 5 % (přebytek náboje), malorozpustné s přebytkem do 10 % a extrémně rozpustné jsou s přebytkem náboje více než 30 % [26].

Když se jedná o strukturu komplexů v závislosti na délce řetězce hyaluronanu, je předpokládáno, že:

- několik HA s moc krátkým řetězcem (do cca 2400 g/mol) interaguje s jednou molekulou albuminu,
- HA o střední délce (15 kDa) se ovine kolem 1 molekuly BSA,
- do struktury klubka nativní vysokomolekulové HA se zabuduje několik molekul albuminu [26]



Obrázek 5. Struktura komplexů HA-BSA v závislosti na délce řetězce

Iontová síla má největší vliv na elektrostatické interakce [27], které jsou největší při slabé ale ne nulové iontové síle [28]. Soli nízkomolekulárních látek stíní řetězec hyaluronové kyseliny před interakcemi s albuminem. Takže čím je iontová síla větší, tím méně molekul BSA bude navázáno na molekulu HA, a tím menší počet karboxylových skupin bude vázáno na albumin. Iontová síla ovlivňuje také velikost a náboj výsledných komplexů. Ve svém studiu Lenormand a spol. [23] objevili, že bez iontové síly jsou komplexy malé kompaktní, s přebytkem pozitivního náboje (pochází z albuminu). Pro iontovou sílu 5-80 mmol.l<sup>-1</sup> jsou komplexy neutralizované a sedimentující (velké koacerváty). S iontovou silou větší než 80 mmol.l<sup>-1</sup> jsou komplexy negativně nabitě, a při 300 mmol.l<sup>-1</sup> – velké a také negativně nabitě (pochází z nízkomolekulárního elektrolytu). Z toho můžeme odvodit, že čím větší je iontová síla, tím větší jsou komplexy a negativnější náboj (kvůli stínění řetězce). Velikost náboje a komplexů je v neposledně řadě také ovlivňována molekulovou hmotností neboli délkou řetězce hyaluronové kyseliny a vlastnostmi použitého nízkomolekulárního elektrolytu.

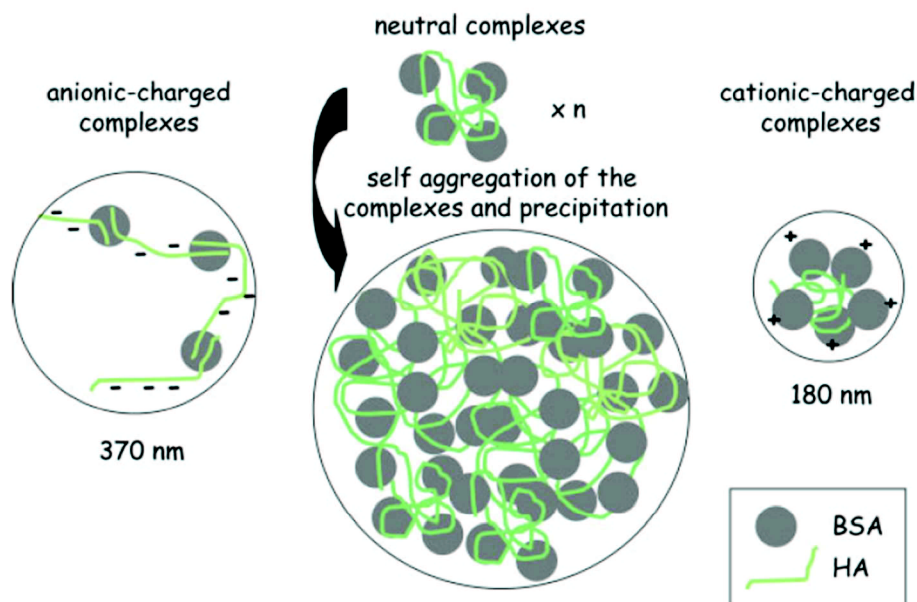
Zásadní vliv na tvorbu komplexu mezi HA a BSA má také pH. Je známo, že při nižším pH se dosáhne lepší protonizace aminoskupin proteinu. A čím lépe je albumin protonizován, tím lépe bude interagovat s karboxylovými skupinami HA. Optimální pH je kolem 4, s ohledem na hodnoty izoelektrického bodu albuminu  $pI = 5,2$  [29] a disociační konstanty karboxylových skupin hyalurovové kyseliny  $pK_a = 2,9$  [2]. Při vyšším pH než 4 se zhorší protonizace albuminu, a tím interakce nebudou moc efektivní [25]. Grymonpre a spol. studovali kombinaci iontové síly a pH [30], jejich objevem bylo, že při zvýšení iontové síly je potřeba nižšího pH na protonizaci proteinu. Xu a spol. studovali vliv pH na rozpustnost komplexů. Výsledkem bylo, že pH, při kterém docházelo k vysrážení komplexů, záviselo na koncentraci přidaného albuminu. Čím vyšší ta koncentrace byla, tím vyšší hodnota pH byla potřebná pro vyvolání fázové separace [32].

Lenomard a spol. stanovili ve svém výzkumu teoretický a praktický poměr počtu molekul BSA ku HA v komplexech ve fázi separace na hodnotu  $\varphi = \frac{[BSA]}{[HA]} = \frac{0,628}{0,2} = 3,14$ . Výpočet

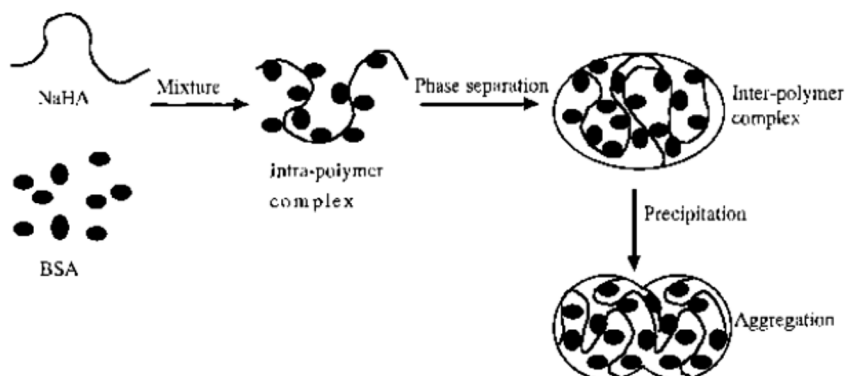


byl proveden pro hyaluronovou kyselinu s molekulovou hmotností 0,9 MDa a pro BSA při pH 4 s předpokladem molekulové hmotnosti 67 kDa [23].

Poměr  $\phi$  ovlivňuje tvar a pochopitelně i náboj komplexů. Při nízké koncentraci BSA a  $\phi$  menším, než hodnota fázové separace jsou komplexy velké, kvůli tomu, že „náhodné klubko“ HA se začíná interakcemi s molekulami BSA „rozplétat“, komplex nese záporný náboj (přebytek volných COO<sup>-</sup> skupin). Při koncentraci BSA, odpovídající poměru  $\phi$  fázové separace komplexů HA a BSA, nabývají komplexy neutrální náboj a nejsou nadále od sebe odpuzovány, shlukují se do agregátů a sedimentují. Při koncentraci odpovídající poměru  $\phi$  vyššímu, než při fázové separaci, mají komplexy přebytek kladného náboje (přebytek aminoskupin albuminu), jsou malé kvůli „smrštění“ řetězce HA nasyceného molekulami BSA. Kontrakce vlákna probíhá kvůli elektrostatickým odpuzováním v struktuře komplexu, tím že se volné kladné náboje BSA rozmístí nejvýhodnějším způsobem, a to tak, že „sbalený řetězec“ HA zůstane uvnitř struktury a volné aminoskupiny budou na povrchu (Obrázek 6). Oddálení molekul BSA v důsledku elektrostatického odpuzování kladných nábojů nenastane kompletně kvůli existenci také záporně nabitých skupin v molekule albuminu, které budou částečně interagovat s volnými aminoskupinami. V tomto odvození je předpokládána vysokomolekulová HA [23].



Obrázek 6. Struktura komplexů HA-BSA v závislosti na množství BSA



Obrázek 7. Model vzniku komplexů HA-BSA [32]



Jako užitečné využití mechanismu elektrostatických interakcí protein-polyelektrolyt se také předpokládá teorie stabilizace proteinu vůči vysokým teplotám, a to díky zvýšenému elektrostatickému odpuzování komplexů s polyelektrolytem oproti komplexům čistého proteinu [24].

## 2.4. SEC

SEC – **size exclusion chromatography** – je chromatografická metoda založena na rozdělení částic analytu podle jejich velikostí. První separaci na základě velikosti uskutečnili Whetton a Bauman [31]. Separaci biomakromolekul (proteinů) provedli Lindqvist a Storgards, kde jako náplň pro kolonu použili škrob [33].

Během vývoje této metody byly používané různé stacionární fáze (náplně kolon – kolonová chromatografie). Rozlišujeme typy kolon na bázi dextranu, polyakrylamidu a silikagelu, s kuličkovou a monolitní naplní. Mezi kuličkové náplně patří dextransy zesítené epichlorhydrinem s obchodním názvem **Sephadex**, které vykazují dobrou mechanickou odolnost a minimální interakci s proteiny [34]. Polyakrylamidové gely s komerčním názvem **Bio-Gel** [35] jsou také dost populární. V sedmdesátých letech byl pórovitý **silikagel** predominantní kvůli své mechanické odolnosti, neobtnavosti a inertnosti vůči analytu v širokém rozmezí podmínek. Dále Lia a spol. připravili první monolitní kolonu z poly(ethylen glykol methyl ether akrylat-ko-polyethylen glykol diakrilátu). Monolitní kolony vykazovaly výborné separační schopnosti i přes velké rozmezí molekulových hmotností.

Mobilní fáze se používá buď vodní, a v tom případě je to **gelová filtrační chromatografie**, nebo organická, pro kterou se používá termín **gelová permeační chromatografie**.

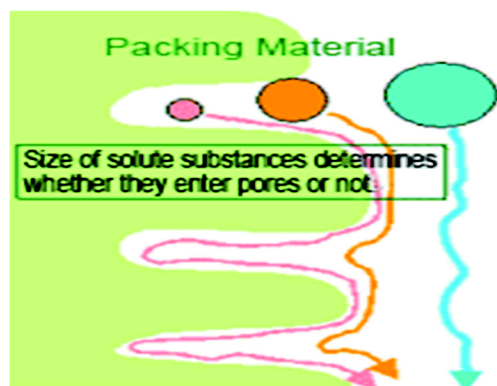
Princip SEC spočívá v tom, že povrch stacionární fáze je bohatý na póry a různě velké vrypy. Tím pádem stacionární fáze je soustava různě velkých kanálků, kterými prochází částice analytu v mobilní fázi. Čím menší je částice, tím větším počtem kanálků projde, a tím se zdrží po delší dobu (retenční čas). Středně velké částice projdou menším počtem kanálků a tím pádem se tam zdrží méně, velké částice projdou minimálním počtem kanálků a pórů stacionární fáze a opustí kolonu jako první. Takhle se uskuteční rozdělení analytu na základě velikosti jeho částic (Stokesův poloměr), z čeho se dá vypočítat distribuce molekulových hmotností a poloměr (například pomocí kalibrační křivky sestavenou podle eluci makromolekul o známých rozměrech). Tomuto efektu se také říká „**molekulové síto**“. [36]

Molekuly analytu se v SEC separují vyloženě podle hydrodynamického ( $R_H$ ) poloměru, který je dále možné převést pomocí kalibrační křivky (relativní metoda) nebo spojením různých detektorů (LS - light scattering, absolutní metoda) na molekulovou hmotnost.

Takové chování analytu během separace je však ideální, čemuž tak vždy není. Více nebo méně dochází k nežádoucím interakcím analytu se stacionární fází, které vedou většinou k jeho adsorpci na povrch a tím ke zkreslení retenčních časů. Tyto interakce jsou ve většině případů elektrostatické nebo hydrofobní povahy [37]. Při elektrostatických interakcích se stejně nabitě částice analytu a stacionární fáze odpuzují a dochází k omezení vstupu analytu do pórů, pozorujeme tak dřívější eluci. Když jsou opačně nabitě, tak se přitahují, a vzniká adsorpce, což se projeví delším retenčním časem. Obdobně působí hydrofobní interakce (hydrofobní síť stacionární fáze) – částice se adsorbuje. Iontové interakce také způsobují rozšíření a asymetrii píků a v neposlední řadě i 3D konformaci biomakromolekul (narušují sekundární, terciární a vyšší struktury molekuly) [38].

Tyto nežádoucí interakce je však možné minimalizovat. Nejběžnější způsob je zvýšení iontové síly přidávkem soli do mobilní fáze [38]. Mechanismus je možné vysvětlit stíněním nabitých skupin stacionární fáze ionty soli. Příliš vysoké koncentrace soli však způsobují

shlukování částic analytu a efekt vyloučení iontu [39]. Přídavek organických látek, jako například arginin, taky zabraňuje sekundárním interakcím [40Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.]. Další metoda je změna pH mobilní fáze, což hlavně ovlivňuje 3D konformaci biomakromolekul a tím možnost interakcí se stacionární fází [38].



Obrázek 8. Struktura stacionární fáze a princip retence

## 2.4.1. Teorie vylučovací chromatografie

### 2.4.1.1. Termodynamika

Chromatografické procesy je možné popsat základní termodynamickou rovnicí:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 = RT \ln k \quad (1)$$

Kde  $\Delta G^0$  je rozdíl standardní volné energie,  $\Delta H^0$  rozdíl entalpie,  $\Delta S^0$  rozdíl entropie,  $R$  je plynová konstanta,  $T$  absolutní teplota,  $k$  rozdělovací koeficient.

Většina chromatografických modelů separace je řízená hlavně změnou volné Gibbsové energie kvůli entalpii adsorpce. SEC je unikátní v tom, že je řízená hlavně entropickými procesy, a adsorpce se tam v ideálním případě vůbec neuplatňuje, a proto  $\Delta H^0 = 0$  a rovnice (1) se zjednoduší a upraví:

$$\ln K_D = -\Delta S^0/R \quad (2)$$

$K_D$  je **termodynamický retenční faktor** v SEC

$\Delta H^0 = 0$  (vyloučení možností interakcí analytu se stacionární fází v ideálním případě) a proto teplota by neměla ovlivňovat retenci, ale uplatňuje se nepřímo a v malé míře změnou konformace molekuly, viskozity mobilní fáze a difúze analytu.

**Retenční faktor v SEC** je možné také definovat jako objem pórů přístupných analytu:

$$K_D = \frac{V_R - V_0}{V_i} \quad (3)$$

$V_R$  je retenční objem analytu,  $V_0$  objem kolem částic stacionární fáze (mezni),  $V_i$  objem uvnitř pórů.

$K_D$  může nabývat hodnot od 0, kdy analyt je úplně vyloučen z pórů stacionární fáze, až do 1, kdy analyt má plný přístup k pórům uvnitř stacionární fáze.

Při sestavení kalibrační křivky (relativní metoda za použití standardu jako například polystyren PS: sestaví se kalibrační křivka proměřením polystyrenových makromolekul o definované molekulové hmotnosti) do grafu se vynáší hodnota molekulové hmotnosti  $\log M$  oproti retenčnímu objemu  $V_R$ . Výsledná závislost je ve formě polynomu třetího stupně, obsahujícího lineární úsek. Tento úsek potom používáme pro výpočet  $M_w$  (molekulové hmotnosti) vzorků, ukazuje rozsah molekulových hmotností, pro který je tato kolona vhodná. Sklon křivky, který vykazuje selektivitu kolony, je závislý na velikosti pórů kolony. Komplikace při výpočtu a zkrácení tady vznikají zaprvé kvůli sekundárním interakcím analytu se stacionární fází elektrostatické a hydrofobní povahy, a za druhé kvůli tomu, že biomakromolekuly se liší i ve tvaru (globulární, lineární atd.), a proto jejich změřený Stokesův (hydrodynamický) poloměr, který je vždy aproximován na kouli, neodpovídá přesné molekulové hmotnosti, protože se tvar molekuly, někdy více či méně, liší od tvaru koule.

Selektivita stacionární fáze je definovaná rovnicí:

$$\log M = m \cdot K_D + b \quad (4)$$

Čím je distribuce velikosti pórů stacionární fáze užší, tím menší je sklon  $m$ , a tím je větší selektivita pro rozlišení úzkého rozsahu molekulových hmotností.

Podíl objemů roztoků uvnitř pórů a kolem částic SP (stacionární fáze) je definován konstantou  $k'$  [41]:

$$k' = K_D \frac{V_i}{V_0} \quad (5)$$

Když rovnice (5) dosadíme do rovnice (4), můžeme se přesvědčit, že selektivita kolony může být zvýšena zmenšením  $V_0$  anebo zvětšením  $V_i$ . Toho můžeme dosáhnout větší hustotou umístění částic SP (stacionární fáze) v koloně anebo použitím částic s větším celkovým objemem pórů. Ale a i v tom existují určité limity. Objem mezi částicemi stacionární fáze není tak jednoduché zredukovat pod 35 % z celkového objemu. Díky vysokým tlakům, musí póry vykazovat minimální mechanickou odolnost (hlavně vůči vysokým tlakům HPLC - high performance liquid chromatography).

Existují určité optimální podmínky k provedení analýzy pomocí SEC. Některé z nich jsou dost důležité pro správnou analýzu vzorku. Koncentrace soli v mobilní fázi nesmí být moc vysoká, jinak se zvyšuje riziko shlukování molekul a tím dochází i ke zvětšení jejich molekulové hmotnosti. Velký podíl vody v mobilní fázi může na druhou stranu způsobit kontaminaci bakteriemi, které jsou schopné rozkládat některé biomolekuly a jsou těžko odstranitelné z kolony [42]. Objem nástřikovaného vzorku, na rozdíl od jiných chromatografických metod, nemá přesahovat objem kolony. Většinou činí 5-10 % objemu kolony [43]. Velké objemy nástřiku způsobují asymetrii a zvětšenou šířku píků. Rychlost průtoku mobilní fáze má být docela nízká, důvod je jasný z Van Deemterovy rovnice:

$$H = ad_p + bD_m/u + cud_p^2/D_m \approx ad_p + cud_p^2/D_m$$

kde vyšší průtok odpovídá zvýšenému teoretickému patru, a tím i horšímu rozlišení (délka kolony je konstantní a kolona je rozdělena na různý počet teoretických pater. Čím více je pater, tím lepší je rozlišení analytů) [44]. V HP-SEC (high performance) dochází k disperzi analytu, a tím se zeširují píky. Řešením je zvětšení vnitřního průměru kolony, které významně potlačí disperzi. V HP-SEC systémech se používá obvykle kolony s průměrem

7,5 mm [45], u nízkodisperzních systému jako u UHPLC (ultra high performance liquid chromatography) vystačíme s průměrem 4,6 mm. Rovněž délka kolony má být dlouhá, optimální separaci dosáhneme s délkou 30 cm. Pro zlepšení separace je možné zapojit několik kolon sériově (tandemově) za sebou [46], ale samozřejmě v tom případě musíme počítat s delším časem analýzy. Velikost částic stacionární fáze má být co nejmenší, optimální průměr je 1-2  $\mu\text{m}$  [47].

#### 2.4.2. Detektory

**UV-detektor** se používá hlavně u proteinů, které mohou absorbovat elektromagnetické záření v UV oblasti kvůli aromatickým aminokyselinám, je možné ho regulovat pomocí vlnové délky záření. Při nízkých vlnových délkách  $\lambda$  je zvýšena senzitivita a je možné tak detekovat vzorky s nižší koncentrací. Při vyšších vlnových délkách dostaneme větší lineární rozsah [48].

**Fluorescenční detektor** je o hodně citlivější a selektivnější metoda, nežli UV, takže je vhodná spíše pro detekci určitých analytů ve vzorku, a sice opět proteiny (kvůli absorpci).

Nejvýznamnějším detektorem v SEC je **detektor rozptýlu světla (LS - light scattering)**. LALS – Low Angle Light Scattering – je metoda detekce, kde se používá jeden detektor rozmístěný pod úhlem blízkým  $0^\circ$ , a je možné ho měnit v rozsahu  $3^\circ$  až  $5^\circ$ . RALS – Right Angle Light Scattering – detektor je umístěn v  $90^\circ$  k dopadajícímu světlu. MALS detektor využívá většího počtu detektorů, umístěných pod různými úhly. Je nejvíce senzitivní pro analýzu agregátů s vysokými molekulovými hmotnostmi. Právě LS detektory mohou eliminovat různá zkreslení molekulové hmotností, která jsou určena jenom pomocí SEC (vlivy interakcí, tvaru atd.).

**Hmotností spektrometrie** se rovněž používá, ale je nejvíce problematická, jelikož rozpuštěné soli v mobilní fázi způsobují kontaminaci detektoru.

**Viskozimetr** je často spojen s **refraktometrem**. Z naměřené viskozity a z ní odvozené vnitřní viskozity, pomocí kalibrační křivky (univerzální kalibrace) je možné podle Mark-Houwinkovy rovnice vypočítat molekulovou hmotnost polymeru:

$$[\eta] = K \cdot M^a$$

Kde  $[\eta]$  je vnitřní viskozita,  $K$  je konstanta,  $M$  je molekulová hmotnost, a je konstanta charakterizující dvojici polymer-rozpouštědlo.

#### 2.5. MALLS

Další metodou detekce je MALLS – Multi Angle (Laser) Light Scattering. Při dopadu primárního paprsku světla na částici dochází k jeho rozptýlu do různých směrů, detektor zaznamenává intenzitu tohoto rozptýleného světla pod určitým úhlem. Při statickém rozptýlu světla, na čemž je založen MALLS detektor, se měří časový průměr intenzity. Světlo jako elektromagnetická vlna se skládá ze dvou kmitajících a navzájem kolmých polí: elektrického a magnetického. Když taková vlna se naráží do částici, kmitající elektrické pole vyvolává polarizaci částice. Tak vznikne oscilující indukovaný dipól, v jehož okolí vzniká periodické elektrické pole o stejném kmitočtu jako dopadající světlo. Tím se částice stává zdrojem rozptýleného světla. **Rayleighova rovnice** pro rozptýl světla molekulami zředěného plynu byla vyjádřena jako vztah [49]:

$$\frac{i_p(\theta)}{I_0} = \frac{\pi^2 \cdot \alpha_p^2 \cdot F(\theta)}{\epsilon_0^2 \cdot \lambda^4 \cdot r^2} \quad (6)$$

$i_p(\theta)$  je intenzita světla rozptýleného jednou částicí pod úhlem  $\theta$ ,

$I_0$  je celková intenzita primárního záření,

$\alpha_p$  polarizovatelnost částice (moment indukovaného dipólu),

$\theta$  rozptylový úhel (úhel pozorování),

$\varepsilon_0$  permitivita vakua,

$\lambda$  vlnová délka primárního rozptýleného záření ( $l_0$ ),

$r$  vzdálenost detektoru.

Při použití vztahu pro polarizovatelnost a ve velmi zředěném prostředí (plynu) rovnice 6 se upraví na vztah:

$$\frac{i_v(\theta)}{I_0} = \frac{4\pi^2 \cdot F(\theta)}{N_A \cdot \lambda^4 \cdot r^2} \cdot \left(\frac{\partial n}{\partial w}\right)^2 \cdot M \cdot w \quad (7)$$

kde  $\frac{\partial n}{\partial w}$  je inkrement indexu lomu.

Ve zředěných soustavách s částicemi velikosti menší než  $\lambda/20$  platí rovnice (7), jen je vynásobená na pravé straně  $n_0^2$  (index lomu disperzního prostředí). Rozptýlené světlo je velice závislé na vlnové délce, zmenšení  $\lambda$  dvakrát vyvolává zvýšení intenzity až 15 krát. Vždy bereme v úvahu elastický rozptyl světla, kde kmitočet a vlnová délka primárního a rozptýleného světla je totožná.

Pro eliminaci geometrického uspořádání se zavádí **Rayleighův poměr**:

$$R(\theta) = \frac{r^2}{F(\theta)} \cdot \frac{i_v(\theta)}{I_0} \quad (8)$$

Kde  $F(\theta)=1$  při vertikálně polarizovaném světle,  $F(\theta)=\cos^2 \theta$  při horizontálně polarizovaném světle a  $F(\theta)=(1+\cos^2 \theta)/2$  při nepolarizovaném světle. Většinou se v experimentu používá vertikálně polarizované světlo, kde  $F(\theta)=1$ .

Takto se naměřená intenzita přepočítává na jednotkovou vzdálenost od detektoru a úhel  $\theta=0^\circ$ . U malých částic Rayleighův poměr na úhlu pozorování nezávisí, což ale neplatí pro větší částice.

Kdyby uvažovaný systém byl dokonale homogenní, na každý objemový element by se našel jiný objemový element s intenzitou paprsků v opačné fázi, a tím by se rozptýlené vlny vyloučily a nepozorovali bychom žádný rozptyl do stran. Ale žádný systém není dokonale homogenní, fluktuace hustoty v kapalinách a hlavně fluktuace koncentrace v disperzních soustavách způsobují změnu polarizovatelnosti objemových elementů systému. Výsledná intenzita rozptýleného světla je dána podílem vln, které se interferencí neruší, a je závislá na okamžité hodnotě  $\delta\alpha$ .

Úpravou rovnice (7) s vyjádřením polarizovatelnosti přes fluktuaci koncentrace a viriální rozvoj osmotického tlaku dostaneme **Enstein-Debyeův vztah**:

$$\frac{i_v(\theta)}{I_0} = \frac{1}{V_e} \cdot \frac{4\pi^2 \cdot n_0^2 \cdot F(\theta) \cdot w}{N_A \cdot \lambda^4 \cdot r^2 \cdot \left(\frac{1}{M} + 2 \cdot A_2 \cdot w + \dots\right)} \cdot \left(\frac{\partial n}{\partial w}\right)^2 \quad (9)$$

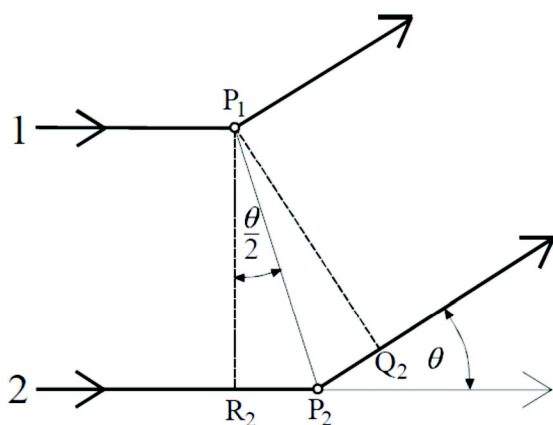
Přítomnost druhého virálního koeficientu znamená, že intenzita rozptýleného světla závisí také na termodynamickém chování systému. To znamená, že koncentrační fluktuace jsou tím významnější, čím menší lokální zvýšení Gibbsové energie způsobují. Druhý virální koeficient charakterizuje Interakce či vzájemné působení mezi částicemi a rozpouštědlem. Nabývá záporných hodnot, když převládají přitažlivé síly mezi částicemi, a tím částice projevují tendenci k shlukování, potom intenzita rozptylu je vyšší. Při kladných hodnotách částice se odpuzují, lokální fluktuace jsou minimální, intenzita je pak nižší.

U částic střední velikostí (větší než  $\lambda/20$ ) už musíme počítat s interferencí světla vycházejícího z jednotlivých bodů jedné částice. Vlny přicházející do detektoru z jedné částice nejsou ve stejné fázi a výsledná intenzita je nižší. Zeslabení je však závislé na úhlu pozorování  $\theta$ . Při  $\theta = 0^\circ$  intenzita se nemění, při  $\theta = 180^\circ$  je intenzita v největším zeslabení. Proto se zavádí rozptylový faktor  $P(\theta)$ , který charakterizuje interferenční zeslabení rozptylu na větších částicích:

$$P(\theta) = \frac{R(\theta)}{R(0)} \quad (10)$$

$R(\theta)$  je Rayleighův poměr

$R(0)$  je Rayleighův poměr v nepřítomnosti zeslabení



Obrázek 9. Rozdíl dráhy paprsků mezi jednotlivými body

Na obrázku 9 vidíme vektor spojnice bodů P1 a P2  $r$ , symetrálu úhlu  $(180 - \theta)$  - vlnový (rozptylový) vektor  $q$ . V daném obrázku uvažujeme symetrický případ, kdy směry vektorů  $q$  a  $r$  jsou totožné. Dráhový rozdíl je  $\overline{R_2P_2} + \overline{P_2Q_2}$ .

Fázový rozdíl potom :

$$\varphi = 2\pi \frac{\Delta l}{\lambda} = 4\pi \frac{r}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2} \quad (11)$$

Velikost vlnového vektoru:

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \cdot \sin \frac{\theta}{2} \quad (12)$$

$$\varphi = q \cdot r \quad (13)$$

V případě, kdy spojnice bodů a rozptylový vektor nemají totožný směr (svírají určitý úhel  $\psi$ ) platí skalární součin těchto vektorů:

$$\varphi = \mathbf{q} \cdot \mathbf{r} = q \cdot r \cdot \cos \psi \quad (14)$$

Dále pro výpočet rozptylového vektoru  $P(\theta)$  je potřeba vyjádřit rozdíl fází ve formě goniometrické funkce, sečíst funkce vln pocházejících ze všech bodů částice. Dostaneme tak výslednou vlnu přicházející do detektoru. Výsledná intenzita světla je pak úměrná čtverci amplitudy. Dostaneme tak intenzitu rozptýleného světla částicí, která má určitou polohovou orientaci vůči vlnovému vektoru, která není stálá vůči tepelnému rotačnímu pohybu, a proto musíme vypočítat průměr i přes všechny myslitelné orientace.  $P(\theta)$  představuje poměr takto vypočtené intenzity k hodnotě  $i_p(\theta)$  z Rayleighove rovnice (6)

**Obecná rovnice pro rozptylový faktor**, kterou odvodil Debye je:

$$P(\theta) = \frac{1}{n^2} \sum_{j=1}^n \sum_{i=1}^n \frac{\sin qr_{ij}}{qr_{ij}} \quad (15)$$

$n$  je počet bodových zdrojů, kterým je nahrazena velká částice,  $r_{ij}$  je vzdálenost mezi  $i$ -tým a  $j$ -tým bodovým zdrojem.

Po úpravě rovnici (15) za použití viriálního rozvoje při malém úhlu  $\theta$  nebo poměru  $\frac{d}{\lambda}$  a také rovnic (11) a (13) dostaneme vztah pro rozptylový faktor:

$$P(\theta) = 1 - \frac{1}{3} q^2 s^2 + \dots = 1 - \frac{16\pi^2}{3} \cdot \frac{s^2}{\lambda^2} \cdot \sin^2 \frac{\theta}{2} + \dots \quad (16)$$

$s^2$  je gyrační poloměr (střední kvadratický poloměr), který charakterizuje rozložení hmotností v částici, můžeme vyjádřit pomocí vztahu:

$$s^2 = \frac{1}{2n^2} \sum_{j=1}^n \sum_{i=1}^n r_{ij}^2 \quad (17)$$

Z těchto rovnic můžeme usoudit, že rozptylový faktor klesá s rostoucí velikostí (součinem  $qr_{ij}$ ), a jelikož  $q^2$  je umřené  $\sin^2 \frac{\theta}{2}$  (vlnový vektor),  $P(\theta)$  klesá při nárůstu úhlu pozorování  $\theta$  od 0 do 180°, kde nabývá své minimum.

Pro **experimentální stanovení** intenzity rozptýleného světla **částicemi menšími než  $\lambda/20$**  byla odvozena Einstein-Debyeova rovnice:

$$\frac{K \cdot w}{\Delta R(\theta)} = \frac{1}{M} + 2A_2 \cdot w + \dots \quad (18)$$

$$\Delta R(\theta) = R(\theta) - R_0(\theta) \quad (19)$$

$$K = \frac{4\pi^2 \cdot n_0^2}{N_A \cdot \lambda^4} \left( \frac{\partial n}{\partial w} \right)^2 \quad (20)$$

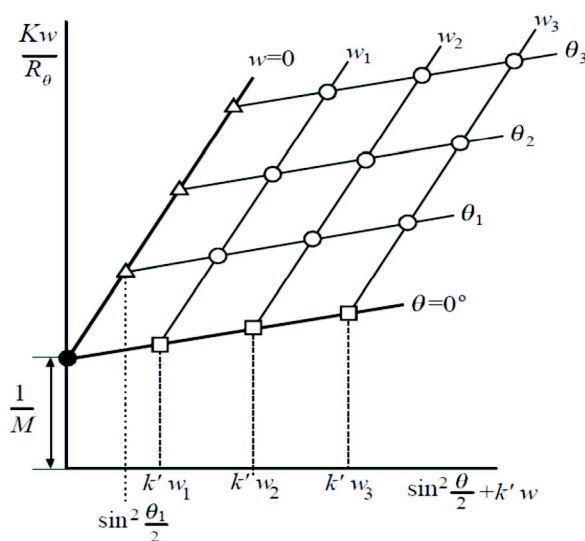
Do konstanty  $K$  se zahrnuje index lomu čistého rozpouštědla  $n_0$ , vlnová délka primárního záření  $\lambda$  a inkrement indexu lomu  $\partial n / \partial w$ .

Vyneseme do grafu  $\frac{K \cdot w}{\Delta R(\theta)}$  proti  $w$  a při extrapolaci na nulovou koncentraci dostaneme přímku, z úseku které na ose  $y$  vypočítáme  $M$  a ze směrnice  $A_2$ . Gyracní poloměr pro malé částice není možné vypočítat.

Pro částice větší než  $\lambda/20$  do předchozí rovnice musíme započítat rozptylový faktor  $P(\theta)$

$$\frac{K \cdot w}{\Delta R(\theta)} = \frac{1}{M \cdot P(\theta)} + \frac{2A_2 \cdot w}{P(\theta)} + \dots \quad (21)$$

$$\frac{K \cdot w}{\Delta R(\theta)} = \frac{1}{M \cdot P(\theta)} \quad \text{při } w \rightarrow 0 \quad (22)$$



Obrázek 10. Zimmův diagram

Zimmův diagram nám současně dovoluje zahrnout extrapolaci na  $\theta \rightarrow 0^\circ$  a  $w \rightarrow 0$ . Na osu  $y$  se vynesou  $\frac{K \cdot w}{\Delta R(\theta)}$  a na osu  $x$  lineární kombinace nezávislých proměnných  $\sin^2 \frac{\theta}{2} + k'w$ , kde  $k'$  je libovolná konstanta. Po extrapolaci dostaneme dvě protínající na ose pořadnic čáry (v bodě  $\frac{1}{M}$ ) s rovnicemi:

$$\frac{K \cdot w}{\Delta R(\theta)} = \frac{1}{M} + 2 \frac{A_2}{k'} \cdot k'w \quad \text{pro } \theta \rightarrow 0^\circ \quad (23)$$



$$\frac{K \cdot w}{\Delta R(\theta)} = \frac{1}{M} + \frac{16\pi^2}{3M} \cdot \frac{s^2}{\lambda^2} \cdot \sin^2 \frac{\theta}{2} \quad \text{pro } w \rightarrow 0 \quad (24)$$

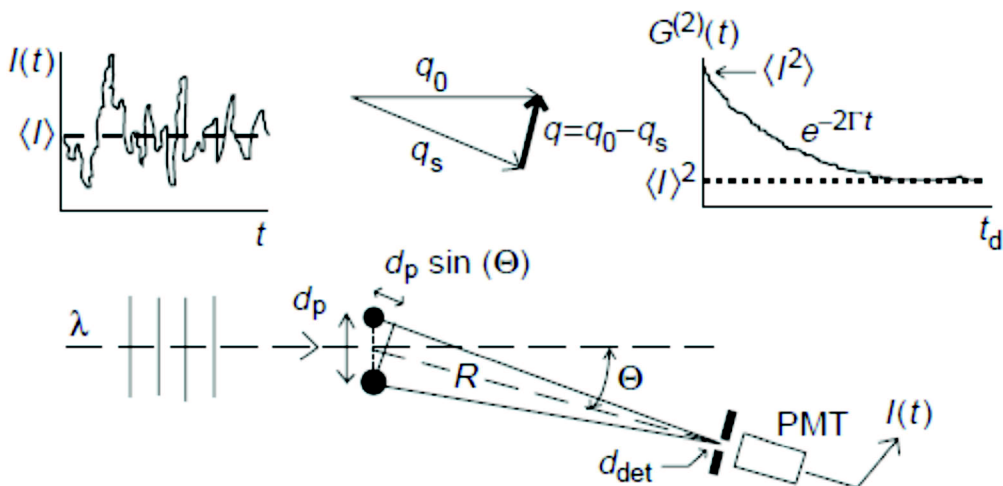
Ze směrnice první rovnice vypočítáme druhý viriální koeficient  $A_2$ , ze směrnice druhé rovnice gyrační poloměr  $s$ .

Při MALLS se měření provádí při několika úhlech, a získaná data se extrapolují na nulovou hodnotu úhlu  $\theta \rightarrow 0^\circ$  a současně také na nulovou koncentraci  $w \rightarrow 0$ . Spojením SEC chromatografie a MALLS detektoru můžeme určit hodnoty  $M_n$  (početní průměrná),  $M_w$  (hmotnostní průměrná),  $M_z$  (velikostní-průměr), gyrační poloměr  $s$  a druhý viriální koeficient  $A_2$ . Při zapojení viskozimetru určíme i vnitřní viskozitu  $[\eta]$ .

Teorii rozptylu světla v podrobnějším vykladu je možné najít v použitých zdrojích: [49,50,51,55].

## 2.6. DLS

DLS neboli dynamický rozptyl světla, fotonová korelační spektroskopie či kvazielastický rozptyl světla je založen jako MALLS také na rozptylu světla částicí. Zásadní rozdíl oproti statickému rozptylu světla je, že se měří fluktuace intenzity rozptýleného světla v čase, namísto měření časového průměru intenzity.



Obrázek 11 Základní uspořádání DLS

V disperzním systému se uplatňuje jako v každém jiném Brownův pohyb částic. Částice různých velikostí se pohybují s různou rychlostí. Když na takovou částici dopadá světelný paprsek, bude vykazovat rozptyl jenom po dobu, kdy se bude nacházet v oblasti dopadajícího záření. Jelikož je částic v systému hodně, dochází k interferenci rozptýlených paprsků dopadajících na detektor z různých částic. V konkrétním okamžiku záznamu dostáváme konkrétní interferenční obrázek intenzity, který se s časem mění (řadově  $10^{-7}$  až  $10^{-9}$  s), jelikož rozptylující částice se pohybují díky tepelnému pohybu částic. V DLS se porovnávají tyto interferenční záznamy, jak moc mezi sebou korelují. V časovém intervalu  $\Delta t = 0$  je tato korelace rovna 1 (intenzita je stejná), se zvyšujícím se časovým intervalem  $\Delta t$  se korelace snižuje až k nule, kdy interferenční obrazce jsou úplně odlišné. Snížení korelace,

kromě většího časového intervalu, je také dána zvětšující se velikostí částic. Tímto korelace určuje jak velká je částice a jak rychle se pohybuje v systému, pomocí difúzního koeficientu vypočítaného z **Enstein – Stokesové rovnice**:

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R_H} \quad (25)$$

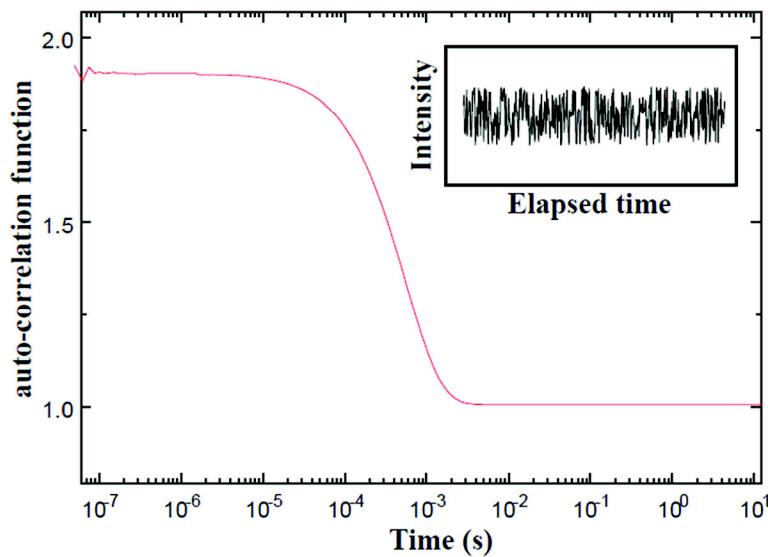
Kde  $k_B$  je Boltzmanová konstanta,  $T$  je absolutní teplota,  $\eta$  je dynamická viskozita disperzního prostředí,  $R_H$  je hydrodynamický poloměr.

Tuto rovnici je možné použít pouze pro částice sférického (kulovitého) tvaru. Pokud tomu tak není, tak se částice extrapoluje na kulovitý tvar. **Hydrodynamický poloměr**  $R_H$  je tak poloměr kulovité částice i se solvatačním obalem, která vykazuje stejný difúzní koeficient jako měřená částice. Čím větší je částice, tím menší difúzní koeficient má a tím pomaleji se pohybuje.

Distribuce velikostí částic se vypočítává z **autokorelační funkce (ACF)**:

$$G^{(2)}(t) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N I(t_i)I(t_i + \tau) = \langle I(t_i)I(t_i + \tau) \rangle \quad (26)$$

Kde index <sup>(2)</sup> označuje, že se jedná o intenzitu záření, ale ne intenzitu elektrického pole,  $\tau$  je časový interval mezi záznamy.



Obrázek 12. Autokorelační funkce

Jelikož  $\tau$  se volí o hodně kratší, než čas fluktuace, můžeme psát:

$$\lim_{\tau \rightarrow 0} \langle I(t_i)I(t_i + \tau) \rangle = \langle I^2(t) \rangle \quad (27)$$

Pro hodně velké intervaly, kdy korelace je nulová:

$$\lim_{\tau \rightarrow \infty} \langle I(t_i)I(t_i + \tau) \rangle = \langle I(t) \rangle^2 \quad (28)$$

Takže  $\langle I(t_i)I(t_i + \tau) \rangle$  by měla klesat v rozmezí hodnot od  $\langle I^2(t) \rangle$  do  $\langle I(t) \rangle^2$

Autokorelační funkce ACF je nezávislá na počátečním času, takže můžeme psát:

$$\langle I(t_i)I(t_i + \tau) \rangle = \langle I(0)I(\tau) \rangle \quad (29)$$

Normalizovaná ACF potom je:

$$g^{(2)} = \frac{\langle I(0)I(\tau) \rangle}{\langle I \rangle^2} \quad (30)$$

Kterou můžeme napsat přes autokorelační funkci ACF elektrického pole záření:

$$g^{(2)} = 1 + \sigma (g^{(1)}(\tau))^2 \quad (31)$$

Kde

$$g^{(1)}(\tau) = \frac{\langle E(0)E(\tau) \rangle}{\langle E^2 \rangle} \quad (32)$$

$\sigma$  je instrumentální konstanta, vystihující počet koherenčních ploch zachycených detektorem, musí se směřovat k hodnotě 1 (čím víc koherenčních ploch je zachyceno, tím víc se intenzity těch ploch překrývají, tím slabší je signál).

Pro monodisperzní soustavy platí:

$$g^{(1)}(\tau) = e^{-\frac{\tau}{\tau}} \quad (33)$$

$$\tau = \frac{1}{Dq^2} \quad (34)$$

Kde  $q$  je Braggův vlnový neboli rozptylový vektor:

$$q = \frac{4\pi \cdot n_0}{\lambda} \cdot \sin \frac{\theta}{2} \quad (35)$$

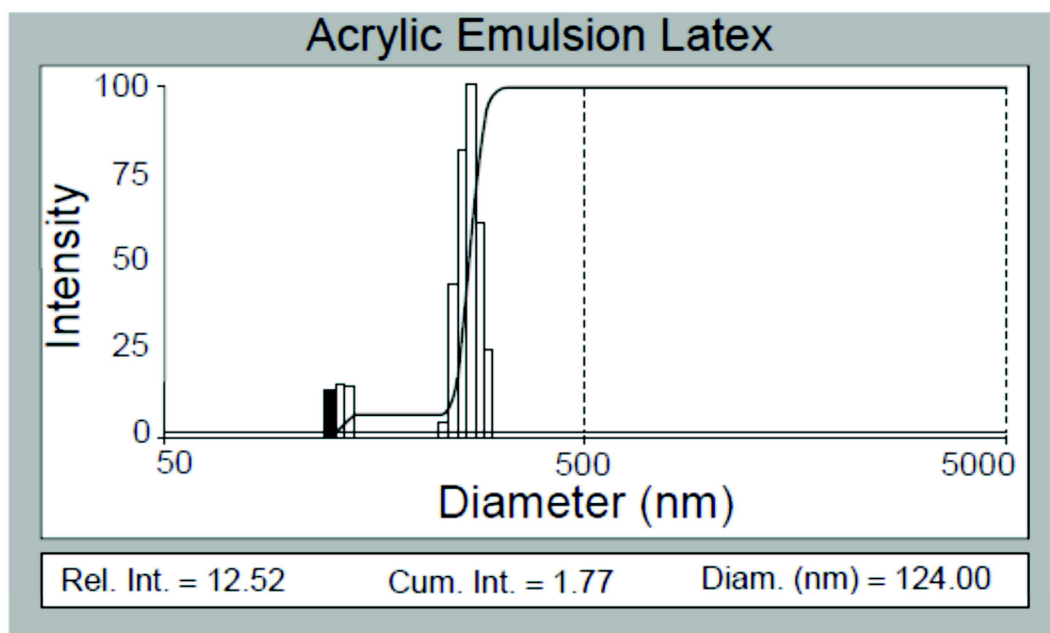
Kde  $n_0$  je index lomu disperzního prostředí,  $\lambda$  je délka primárního světla ve vakuu,  $\theta$  je úhel pozorování (Obrázek 11).

Z rovnic (31),(33),(34),(35) můžeme vypočítat difúzní koeficient  $D_f$ , a z něho podle rovnice (25) hydrodynamický poloměr  $R_H$ .

**U heterodisperzních systémů** se provádí integrální výpočet:

$$g^{(1)}(\tau) = \int_0^{\infty} A(\tau) \cdot e^{-\frac{\tau}{\tau}} \partial \tau$$

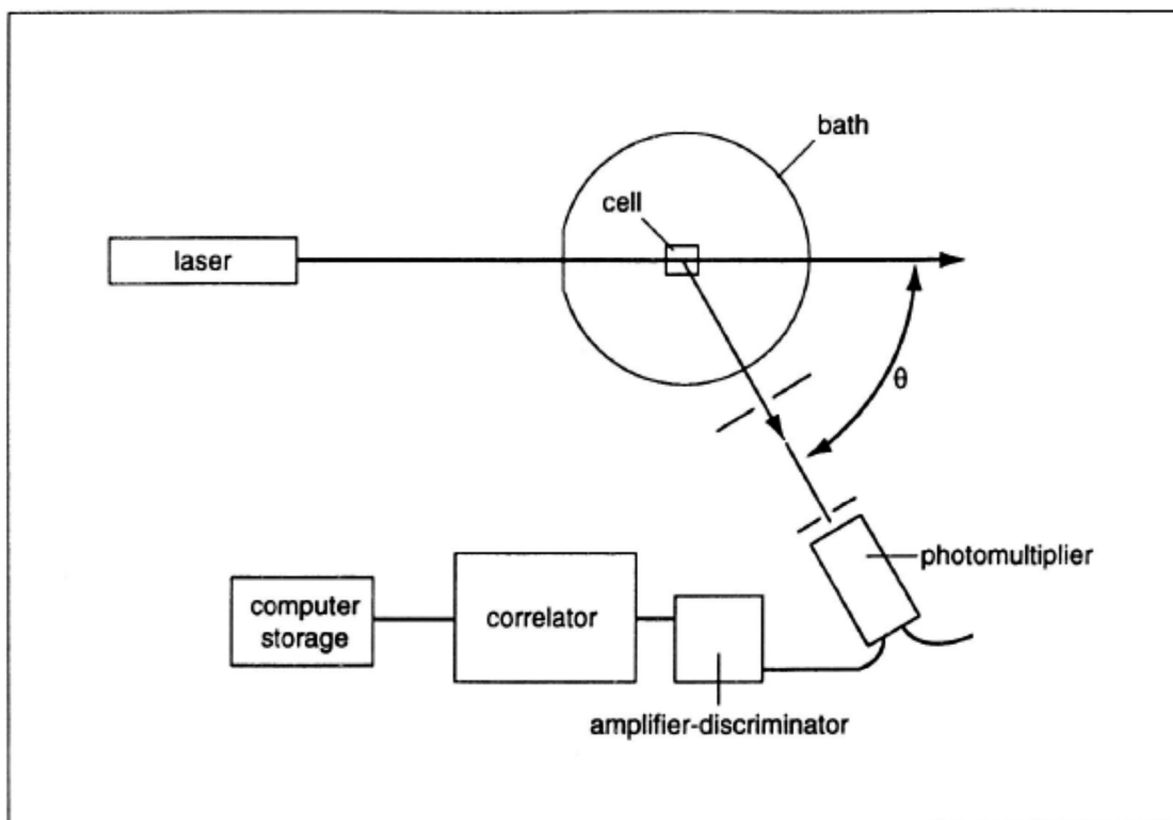
Kde  $A(\tau)$  nese informaci o distribuci velikostí částic.



Obrázek 13. Distribuce velikosti částic. Výstup z DLS

Většina moderních přístrojů měří při jednom fixním úhlu, a s laserovým paprskem o vlnové délce 675 nm jako zdroj primárního světla. Při měření musí být eliminován nežádoucí jev několikanásobného rozptýlení paprsků, a proto se volí co nejmenší koherentní plocha (ideální je rozptyl na 1 částici bez interference), dostatečně nízká koncentrace vzorku, co nejmenší optická dráha, a také se musí zabránit dopadu primárního paprsku na detektor (90°). Co se týče požadavků na vzorek, tak se musí zabránit kontaminaci částicemi prachu, které kvůli extrémní citlivosti přístroje budou rušit signál, a proto se musí vzorek předem přefiltrovat. Musí se použít také vhodná iontová síla a vhodná (konstantní a přesně definovaná) teplota, jelikož viskozita prostředí a také tepelný pohyb částic neboli difúzní koeficient, jsou na ní extrémně závislé).

Detektorem pro signál slouží fotonásobič, který společně s korelátorem, případně zeslabovačem či zesilovačem paprsků převádí světelnou intenzitu na elektrickou, která je dále zpracována počítačem.



Obrázek 14. Instrumentace DLS

Podrobnější vyklad teorie je možné najít v použitých referencích [52 - 58].

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1. Materiály

Na přípravu vzorku byl použit hyaluronan sodný dodávaný společností Contipro Biotech s. r. o (Dolní Dobrouč, Česká Republika) v rozsahu molekulových hmotností 90-130 kDa, 110-130 kDa a 130-150 kDa, a 1500-1750 kDa. Všechny použité vzorky hyaluronanu byly označený jako Technical Grade. Albumin hovězího séra (BSA) byl dodán společností Sigma-Aldrich ve formě lyofilizovaného prášku zbaveného esenciálních mastných kyselin a s čistotou >98%. Z dalších chemikálií byl použit dusičnan sodný ( $\text{NaNO}_3$ ) (Sigma-Aldrich), Hydroxid sodný (Sigma-Aldrich). Na přípravu pufru byly použity kyselina citronová monohydrát s obsahem 99,8% (PENTA) a hydrogenfosforečnan disodný dihydrát s obsahem 99,0% (PENTA). Pro kalibraci pH metru byly použité komerčně dodávané pufrы o pH 2; 4,01; 7 (Mettler Toledo). Všechny vzorky a zásobní roztoky byly připravené v deionizované vodě Milli-Q, připravené pomocí přístroje Purelab Option ELGA.

#### 3.2. Metody

##### 3.2.1. Příprava vzorků

Nejdřív byly připravené zásobní roztoky hyaluronanu sodného a hovězího sérového albuminu v Milli-Q vodě. Navážka Hyaluronanu byla nejprve usušena v sušárně při  $90^\circ\text{C}$  po dobu maximálně 30 minut. Přesná množství hyaluronanu a albuminu byly za stálého míchání na magnetické míchačce po dávkách postupně střídavě smíchány s vodou. Takto připravené

zásobní roztoky byly míchány minimálně 24 hodin při laboratorní teplotě. Z těchto zásobních roztoků byly dále připraveny roztoky hyaluronanu a albuminu dle tabulky níže (viz. Tabulka 1). Jedna sada obsahovala 8 vzorků s konstantní koncentrací hyaluronanu a proměnnou koncentrací albuminu. Celkem bylo tak připraveno 12 řad vzorků, které se lišily prostředím a molekulovou hmotností. Takto připravené vzorky byly míchány na magnetické míchačce po dobu minimálně 12 hodin. Po této době byl teprve přidán  $\text{NaNO}_3$ , tak aby jeho výsledná koncentrace ve vzorku byla 0,1 M. Potom se vzorky ještě míchaly přibližně 3 h.

Na neutralizaci sady vzorků připravených v pufru o pH 4 na výsledný pH 7 byl použit hydroxid sodný o koncentraci 1,5 M. Přídavek do každého vzorku činil přibližně 550  $\mu\text{l}$ . Ještě před neutralizací ze vzorků bylo odebráno zhruba 2 ml a změřeno na SEC-MALLS.

Před neutralizací posledních dvou sad vzorků byl pH-metr kalibrován pomocí pufrů o známých pH hodnotách (pH 2; 4,01 a 7). Neutralizace byla prováděna následujícím způsobem: byla nejdříve změřena hodnota pH vzorku a postupně se přidával hydroxid sodný až po dosažení požadované hodnoty vzorků pH 7.

Příprava pufru o pH 4 a 7 byla uskutečněna v Milli-Q vodě. Nejprve byly připraveny roztoky kyseliny citronové o koncentraci 0,05 M a hydrogenfosforečnanu disodného o koncentraci 0,1 M. Po kalibraci pH metru se změřila pH hodnota roztoku kyseliny citronové (hydrogenfosforečnanu disodného), potom se za neustálého míchání přidával hydrogenfosforečnan disodný (kyselina citronová) až po dosažení požadované hodnoty pH pufru. Potom se výsledný pufr půl hodiny míchal pro ustálení pH, a bylo provedeno kontrolní měření pH hodnoty. V případě pufru o pH 4 se hydrogenfosforečnan disodný po dávkách přidával ke kyselině citronové. V případě pH 7 to bylo opačně.

Podrobnější složení výsledných roztoků je popsáno v tabulce níže (tabulka 1)

Dále v textu pro zjednodušení budou použité zkratky:

- **NMHya** pro nízkomolekulovou hyaluronovou kyselinu
- **VMHya** pro vysokomolekulovou hyaluronovou kyselinou

Tabulka 1. Příprava roztoků

Sada	NM/VMHya	prostředí	c(Hya) [g/L]	c(BSA) [g/L]	c( $\text{NaNO}_3$ ) [mol/L]	$V_{\text{CELK}}$ [ml]
1	NMHya	Milli-Q	5	0	0	7
2		Milli-Q			0,1	7
3		Pufr pH 4			0	7
4		Pufr pH 4			0,1	7
5		Pufr pH 7			0,1	7
6		Pufr pH 4*			0,1	12
7	VMHya	Milli-Q	1	1	0	7
8		Milli-Q			0,1	7
9		Pufr pH 4			0	7
10		Pufr pH 4			0,1	7
11		Pufr pH 7			0,1	7
12		Pufr pH 4*			0,1	12

\*Vzorky označené hvězdičkou byly následně neutralizovány na výsledné pH 7

### 3.2.2. DLS měření vzorků

Měření DLS bylo provedené pomocí přístroje Malvern Zetasizer Nano ZS s použitím plastových jednorázových kyvet na měření velikosti částic a ponorné cely zetasizer nanoseries Malvern pro měření zeta potenciálu.

Měření pH pufrů a vzorků bylo provedeno pomocí přístroje SevenMulti Mettler toledo s použitím elektrody Mettler Toledo InLab Routine Pro pH 0-14.

Měření velikosti vzorků bylo provedeno při úhlu  $173^\circ$  a při teplotě  $25^\circ\text{C}$ . Jako zdroj světla byl použit He-Ne laser o vlnové délce 632,8 nm. Čas pro vytemperování vzorků byl nastaven na 60 sekund. Nastavení bylo provedeno pro materiál protein s refrakčním indexem RI 1,450 a absorpci A 0,001. Rozpouštědlo bylo nastaveno jako voda s viskozitou 0,8872 cP, refrakčním indexem 1,330. Viskozita rozpouštědla byla použita jako viskozita vzorku. Počet měření byl stanoven na 3, délka trvání jednoho měření byla vybrána jako automatická. Multiparametrová analýza byla vybrána pro analýzu agregačního bodu a bylo také nastaveno automatické vyhledávání optimální pozice měření. Na měření zeta potenciálu bylo nastaveno jedno měření, obsahující v sobě od 10 do 100 opakování. Detektor při měření zeta potenciálu byl umístěn v přímém směru pod úhlem  $17^\circ$ .

Před měřením dynamického rozptylu světla byly všechny vzorky jedné sady vytemperovány na laboratorní teplotu, a dále přefiltrovány přes filtr o velikosti  $0,45\ \mu\text{m}$  do plastových kyvet o optické délce 1 cm. Po filtraci se vzorky nechaly stát cca 30 minut pro ustálení případné struktury analytů. Po skončení DLS měření všech osmi vzorků jedné sady, byl proměřen jejich zeta potenciál. Potom bylo měření DLS a zeta potenciálu ještě jednou opakováno: nové vzorky se přefiltrovaly do nových kyvet přes filtr o stejné velikosti pórů, a druhé měření bylo provedeno za stejných podmínek.

### 3.2.3. SEC-MALLS měření vzorků

Měření SEC-MALLS bylo provedeno za použití SEC-MALS (GPC-MALS) systému. Použité detektory jsou: MALS víceúhlový detektor ( $17$  úhlů) pro statický rozptyl světla, 18. detektor pod úhlem  $90^\circ$  pro dynamický rozptyl světla; VISKOSTAR detektor k určení viskozity; diferenční refraktometr sloužící pro stanovení koncentrací. Použitá mobilní fáze byla  $0,1\text{M}$  roztok  $\text{NaNO}_3$ . Inkrement indexu lomu byl zadán jako  $0,165$  pro Hya a směsi Hya a BSA a  $0,185$  pro čistý BSA. Objem nástřiku byl definován na  $50\ \mu\text{L}$ . Průtok byl použit  $0,4\ \text{ml/min}$ . Měření jednoho vzorku tak probíhalo cca 85 minut. Použitá separační kolona byla PL aquagel-OH MIXED  $8\ \mu\text{m}$ . Je to hydrogel na bázi porózní silicy. Jako standard pro molekulovou hmotnost byl použit analytický standard pro GPC Dextran  $410\ \text{kDa}$  a  $150\ \text{kDa}$ .

Vzorky vždy, jak i v případě měření DLS, byly přefiltrovány přes filtr  $0,45\ \mu\text{m}$ . Odběr byl prováděn automatickým dávkovačem (autosampler).

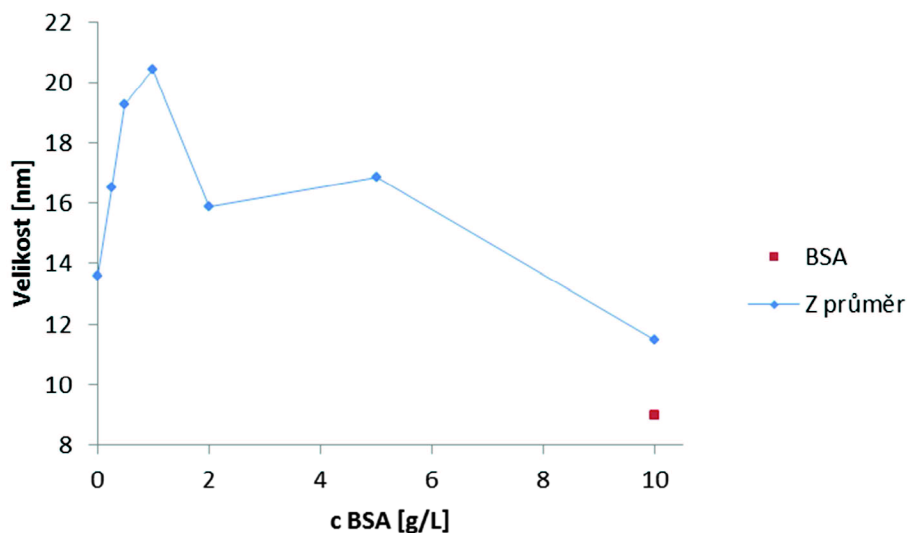
## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE K DLS

### 4.1. DLS sady nízkomolekulové HA v Milli-Q a $0,1\ \text{M}\ \text{NaNO}_3$

Vzhledem k poměrně velkému množství dat, bude uvedena do výsledku a vyhodnocena pouze určitá část výsledků.

Pro vyhodnocení byla vybrána sada nízkomolekulové HA, připravena ve vodě s přídavkem  $\text{NaNO}_3$ .

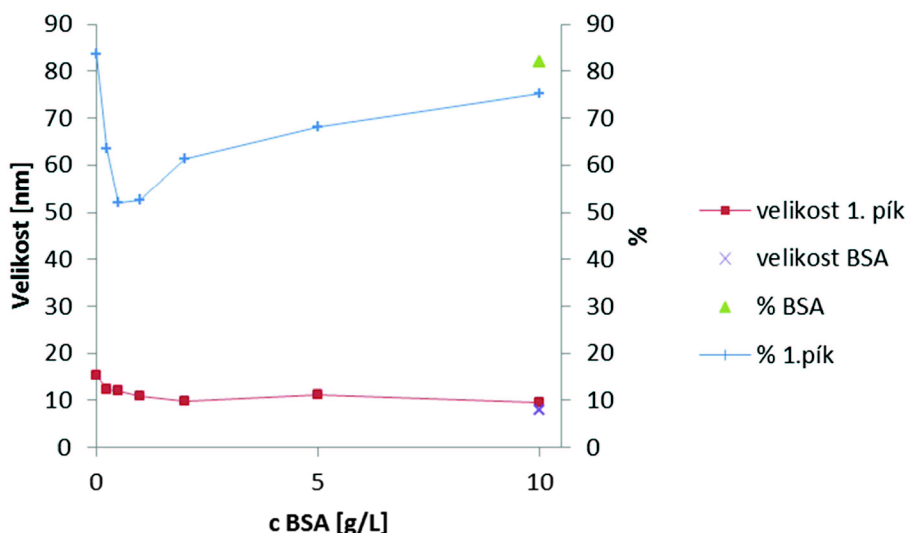
Je důležité si uvědomit, že při měření DLS byly velké odchylky u jednotlivých měření a to u všech sad vzorků. Pravděpodobně to bylo způsobeno vysokou polydisperzitou vzorků, nejvíc to bylo vidět na kvalitě korelačních křivek. Proto nemůžeme považovat výsledné hodnoty měření a ani samotné měření za přesné. Třetí pík je zanedbatelný vzhledem jinak k jeho malému zastoupení, za druhé kvůli nepřítomnosti žádného trendu.



Graf 1. Závislost Z-průměru velikosti částic na koncentraci přidaného BSA ve vzorcích Hya s přidavkem BSA o různých koncentracích (NMHya v Milli-Q a 0,1 M NaNO<sub>3</sub>)

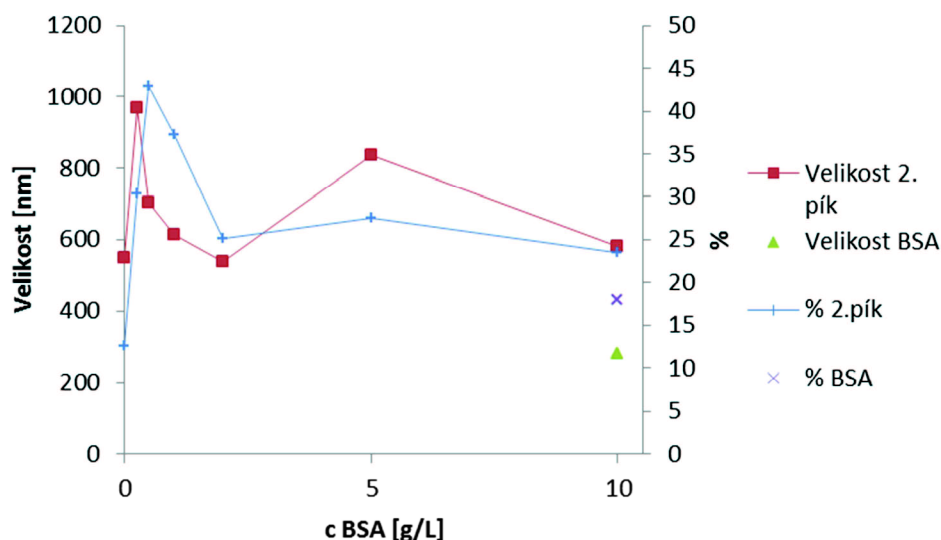
Z grafu 1 je vidět narůst střední velikostí částic v rozmezí koncentrací BSA 0-1 g/L, který může být způsoben tím, že v tomto rozmezí dochází k vytěsnění iontů dusičnanu sodného molekulou BSA z molekuly HA. Probíhá zde kompetice (soutěživost) o navázání resp. výměnu nabitých BSA molekul se sodnými ionty. Tím se HA stává vysoce nabitá, a proto expanduje. O tom, že se náboj HA sníží, potvrzují data zeta potenciálu, který se sníží po přidavku BSA. Při koncentraci BSA 1 g/L částice nabývají své maximální velikosti 20,4 nm, v roztoku je pravděpodobně při této koncentraci nejvíce expandovaných částic hyaluronové kyseliny nebo komplexů, a je to pravděpodobně způsobeno určitým poměrem nábojů a s tím spojeným elektrostatickým odpuzováním. Od koncentrace BSA 2 g/L a výše jsou částice komplexů výrazně menší. Je pravděpodobně dosaženo určitého poměru navázaných molekul BSA k volným karboxylovým skupinám u Hya, kdy působením BSA se komplexy začnou zmenšovat. Velikost částic BSA činí 9 nm. Podle rozdělení dat na 2 píky je možné říct, že se částice rozdělí do dvou populací.





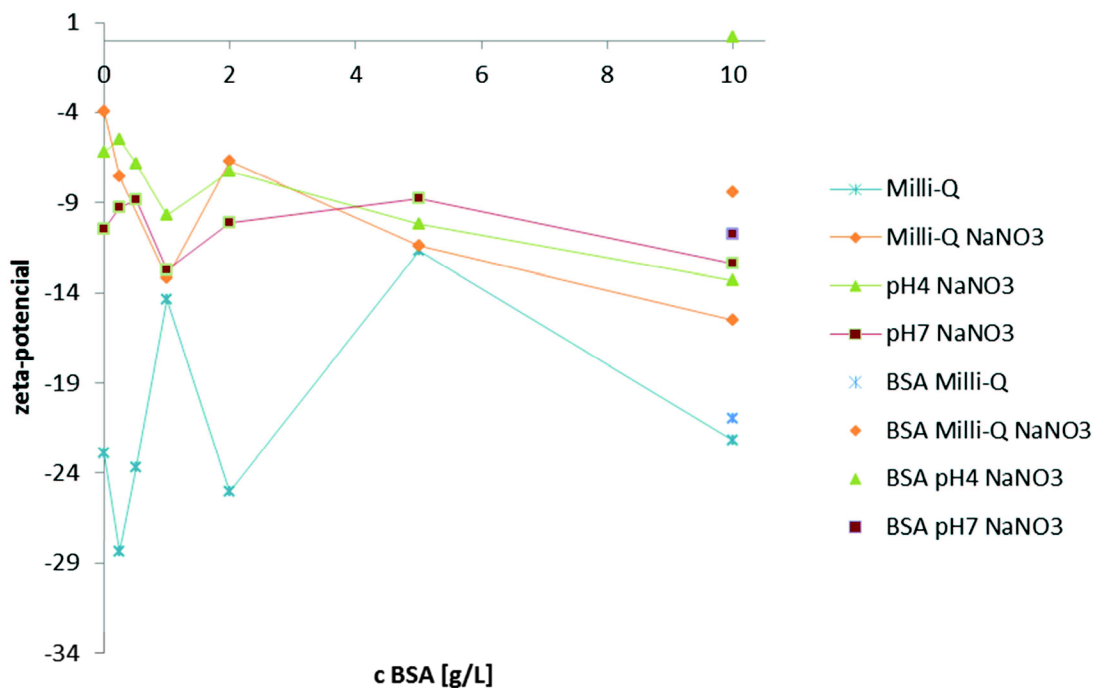
Graf 2. Závislost velikosti částic a procenta plochy 1. píku na koncentraci přidaného BSA ve vzorcích Hya s přidavkem BSA o různých koncentracích (NMHya v Milli-Q a 0,1 M NaNO<sub>3</sub>)

V grafu 2 je vidět že velikost menších částic klesá od 15,3 do 9,5 nm. Toto je asi způsobeno tím, že nemají moc nabitých a dostupných pro BSA karboxylových skupin na svém povrchu, a tím pochopitelně i velké iontové stínění, takže malá koncentrace BSA je postačující jednak pro vytěsnění existující iontové síly, a také pro interakcí se všemi dostupnými skupinami, a tím dochází ihned ke „smrštění“ částic. Plocha 1. píku v procentech klesá do koncentraci BSA 1 g/L z 83,6 % na 52 %, a to pravděpodobně kvůli přechodu některé části do druhé větší populace. Ale navzdory poklesu plochy píku 1, se stále jeho plocha pohybuje nad 50 %, což svědčí, že částice malé velikosti jsou stále nejvíce zastoupené. Potom, od koncentrace BSA 2 g/L, po překročení limitního poměru koncentraci BSA k HA, se procenta plochy začínají zvyšovat, pravděpodobně kvůli „smrštění“ větších částic druhé populace a jejich přechodu do první menší. Při koncentraci BSA 10 g/L činí procenta plochy tak 75 %. Velikost čistého BSA je 8 nm. Plocha v procentech 1. píku BSA je 82 %. Takže BSA v roztoku vzorků převažuje ve formě menších částic.



Graf 3. Závislost velikosti částic a procenta plochy 2. píku na koncentraci přidaného BSA ve vzorcích Hya s přidavkem BSA o různých koncentracích (NMHya v Milli-Q a 0,1 M NaNO<sub>3</sub>)

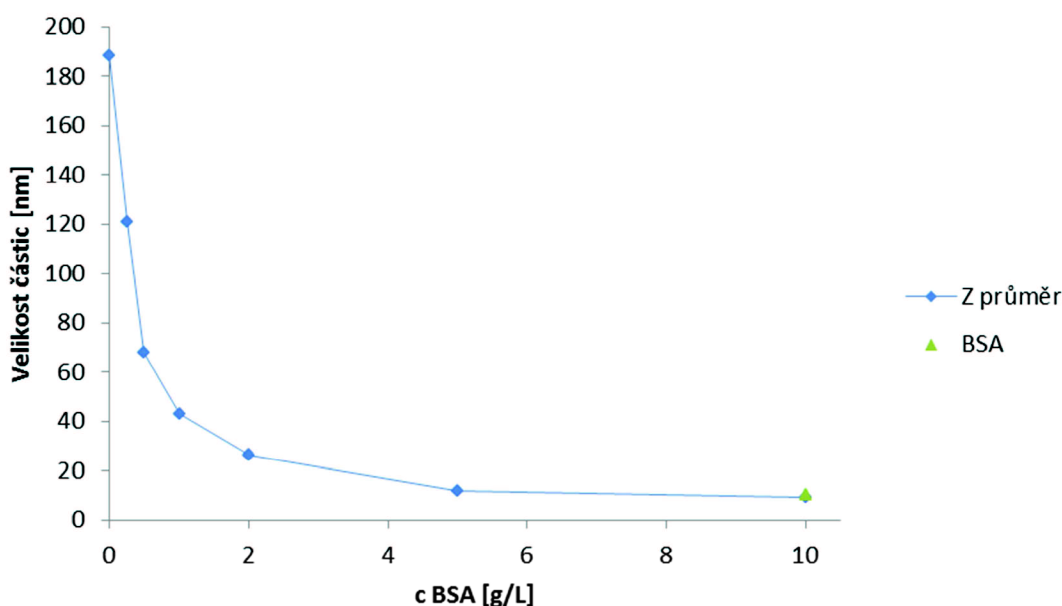
Na grafu 3 je vidět, že se velikost částic druhé populace zvýší po přidání BSA o koncentraci 0,25 g/L z hodnoty 550 nm do 968 nm, pravděpodobně kvůli expanzi nabitých částic. Při zvyšování koncentraci BSA do 2 g/L se velikost částic zmenšuje, pravděpodobně kvůli „smrštění“ komplexů molekulami BSA. Hodnota velikostí částic při koncentraci BSA 5 g/L je nejspíš odlehlá. Procenta plochy 2. píku je podstatně nižší, než u menších částic první populace. Zvyšují se na hodnotu až 45 % při menších koncentracích BSA (1 g/L), kde pravděpodobně mají největší význam. Od koncentrace BSA 2g/L se však udržují přibližně na hodnotě 25 %. Velikost čistého BSA je 279 nm, což svědčí o tom, že i BSA tvoří dvě populace částic, ale zřejmě až při vyšších koncentracích. Plocha 2. píku čistého BSA je pouze 18 %, což svědčí o tom, že větší agregáty BSA jsou v roztoku přítomné ale s výrazně menším zastoupením.



Graf 4. Závislost zeta potenciálu na koncentraci BSA u různých sad vzorků HA s přidavkem BSA o různých koncentracích v odlišných prostředích (NMHyA)

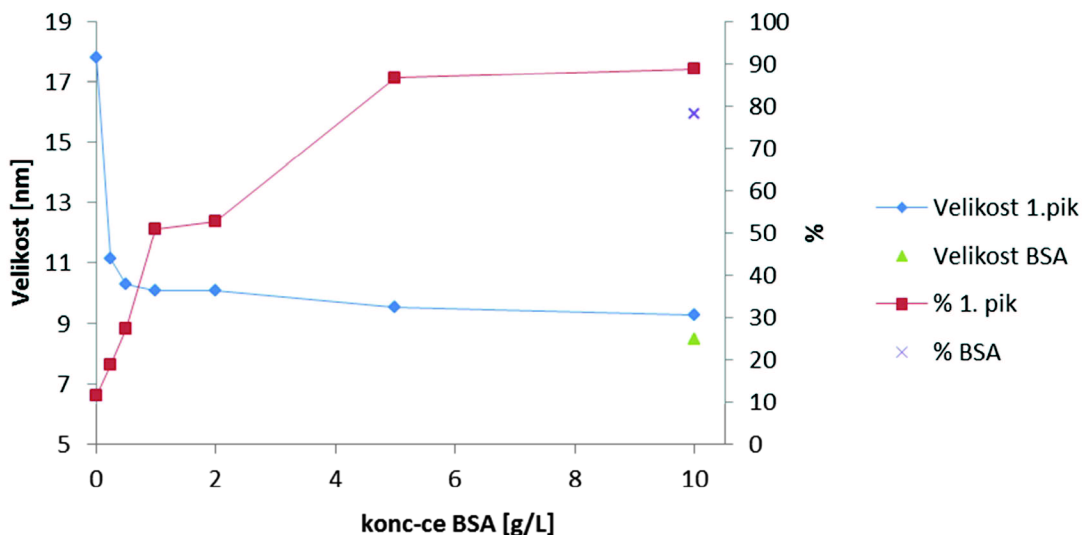
V grafu 4 je vidět, že sada připravena v Milli-Q vodě má nepravidelný a nejnižší zeta potenciál, kvůli záporně nabitým karboxylovým skupinám a pravděpodobně i kvůli nepřítomnosti žádné stínící iontové síly. Ostatní sady se v zeta potenciálu mezi sebou skoro neliší a s rostoucí koncentrací BSA se nepatrně snižují. Skoro konstantní hodnota zeta potenciálu je pravděpodobně způsobená vlivem různě velké iontové síly, která celkem stabilně stíní molekulu HA před molekulami BSA. Domnívám se, že iontová síla má také vliv na nepatrné snížení zeta potenciálů komplexů. Nejnižší zeta potenciál mezi čistými BSA má částice BSA připravené ve vodě (- 21 mV), nejvyšší je v pufru o pH 4 s přidavkem  $\text{NaNO}_3$  (0,22 mV). Je to logické vzhledem k hodnotě pH roztoku 7 a izoelektrickému bodu BSA kolem 5.

## 4.2. DLS sady vysokomolekulové HA v Milli-Q a 0,1 M NaNO<sub>3</sub>



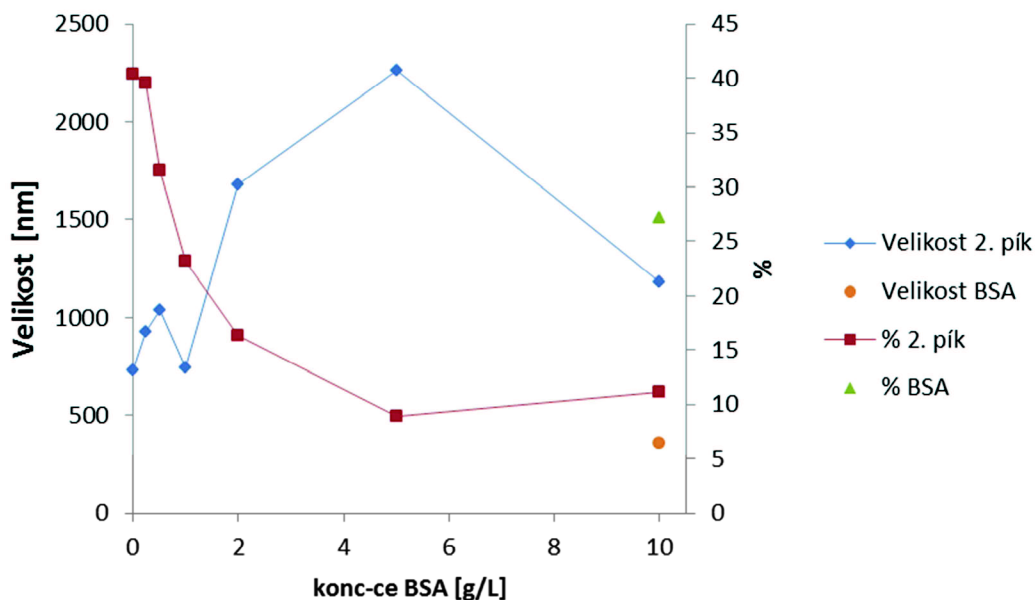
Graf 5. Závislost Z-průměru velikosti částic na koncentraci přidaného BSA ve vzorcích Hya s přidavkem BSA o různých koncentracích (VMHya v Milli-Q a 0,1 M NaNO<sub>3</sub>)

Na grafu 5 je vidět že střední velikost jenom klesá na rozdíl od sady s nízkomolekulovou HA. Pokles se zmírňuje nad koncentrací BSA cca 2 g/L, kdy se velikost částic příliš nemění. Pravděpodobně má vysokomolekulová HA i s přítomností stínících iontů dost dostupných karboxylových skupin pro BSA. Proto současně dochází k vytěsnění stínících iontů molekulou BSA ze stíněných karboxylových skupin HA a interakcím volných COO<sup>-</sup> skupin s dalšími molekulami BSA. Navázané molekuly BSA se snaží dostat do co nejvýhodnější polohy, a to pomocí interakcí s dalšími navázanými BSA, a tak pravděpodobně „sbalí“ řetězec HA do kompaktnějšího tvaru, částice se tak zmenšuje. Interakce s dalšími molekulami BSA při vyšších koncentracích HA ještě více „smršťují“. Střední velikost BSA je 10 nm.



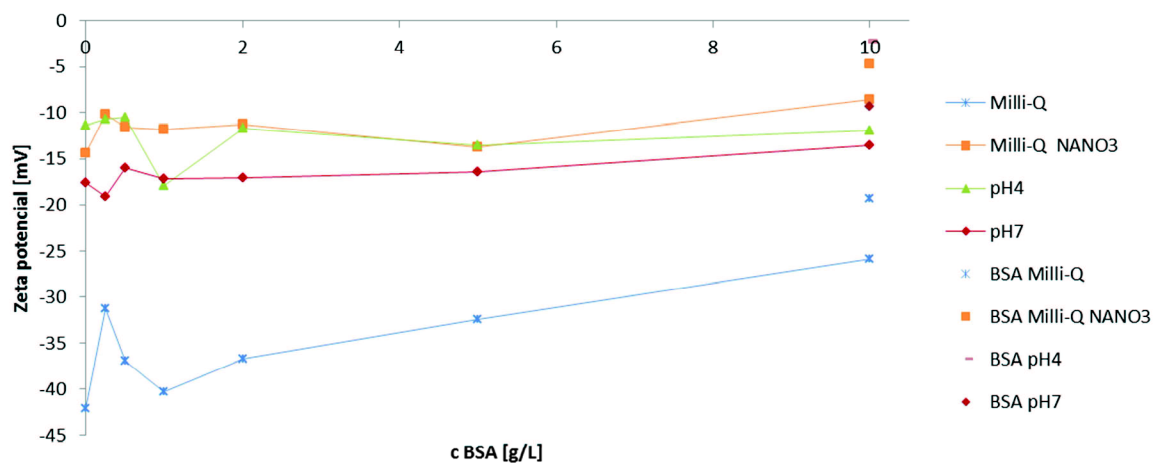
Graf 6. Závislost velikosti částic a procenta plochy 1. píku na koncentraci přidaného BSA ve vzorcích Hya s přidavkem BSA o různých koncentracích (VMHya v Milli-Q s 0,1 M NaNO<sub>3</sub>)

Na grafu 6 je vidět, že velikost částic 1. píku klesá, přičemž ihned při minimální koncentraci BSA 0,25 g/L prudce z hodnoty 17,8 na 11,2 nm. Potom je pokles pomalý z 11,2 do 9,3 nm. Podle rostoucí plochy 1. píku s rostoucí koncentrací BSA lze říct, že částice 1. populace převažují při vysokých poměrech koncentrací BSA ku HA. Na rozdíl od sady s nízkomolekulovou HA je vidět, že zastoupení populace menších částic je nízké na začátku a roste s rostoucí koncentrací BSA. Velikost BSA je 8,5 nm. Procenta plochy 1. píku čistého BSA je 78,2 %.



Graf 7. Závislost velikosti částic a procenta plochy 2. píku na koncentraci přidaného BSA ve vzorcích Hya s přidavkem BSA o různých koncentracích (VMHya v Milli-Q a 0,1 M NaNO<sub>3</sub>)

V grafu 7 je vidět, že velikost částic 2. píku se zvyšuje do koncentrace BSA 5 g/L a to od 733 nm až do 2262 nm. Narůst velikosti částic 2. píku je pravděpodobně způsoben agregací komplexů kvůli snížení jejich celkového povrchového náboje s rostoucí koncentrací BSA. Mohlo by se také jednat o podobnou situaci, jaká byla probrána u částic 2. píku nízkomolekulové HA. Při koncentraci BSA 10 g/L se velikost sníží na hodnotu 1181 nm, a to nejspíš kvůli konformační změně řetězce molekuly Hya, který se pravděpodobně sbalí. Molekula HA pravděpodobně v tomto bodě má minimum volných karboxylových skupin. Procenta plochy 2. píku vykazují stálý pokles v rozmezí hodnot od 40 % při čisté HA do 11,2 % při koncentraci BSA 10 g/L. Takže zastoupení částic 2. populace větších částic na rozdíl od sady NMHya jen klesá. Velikost čistého BSA je 361 nm. Plocha píku BSA je 27 %.



Graf 8. Závislost zeta potenciálu na koncentraci BSA u různých sad vzorků HA s přidavkem BSA o různých koncentracích v odlišných prostředích (VMHya)

Z grafu 8 je vidět, že nejnížší zeta potenciál má sada připravena jenom v čisté vodě, a to z pochopitelných důvodů, nestíní záporně nabitě skupiny HA žádné protiionty. Na rozdíl od sady s nízkomolekulovou HA má celkem pravidelný průběh a zvyšuje se s rostoucí koncentrací BSA, což by znamenalo, že po navázání BSA se snižuje celkový povrchový (záporný) náboj částic. Toto zvýšení zeta potenciálu ihned při nejnižších koncentracích BSA na rozdíl od sady NMHya potvrzuje přítomnost nestíněných karboxylových skupin HA, jejichž počet se ale evidentně snižuje po přidání BSA.

Ostatní sady s různě velkou iontovou silou se liší v zeta potenciálu jen nepatrně a s rostoucí koncentrací BSA se jeho hodnota v rámci jednotlivých sad skoro nemění. Je to pravděpodobně způsobeno tím, že přidané protiionty stabilizují konformaci HA v prostředích s různou iontovou silou. Poměrně vysoké hodnoty zeta potenciálů ve srovnání se sadou v čisté vodě pravděpodobně mají důvod v různě velké iontové síle, která odstíní náboj molekuly Hya.

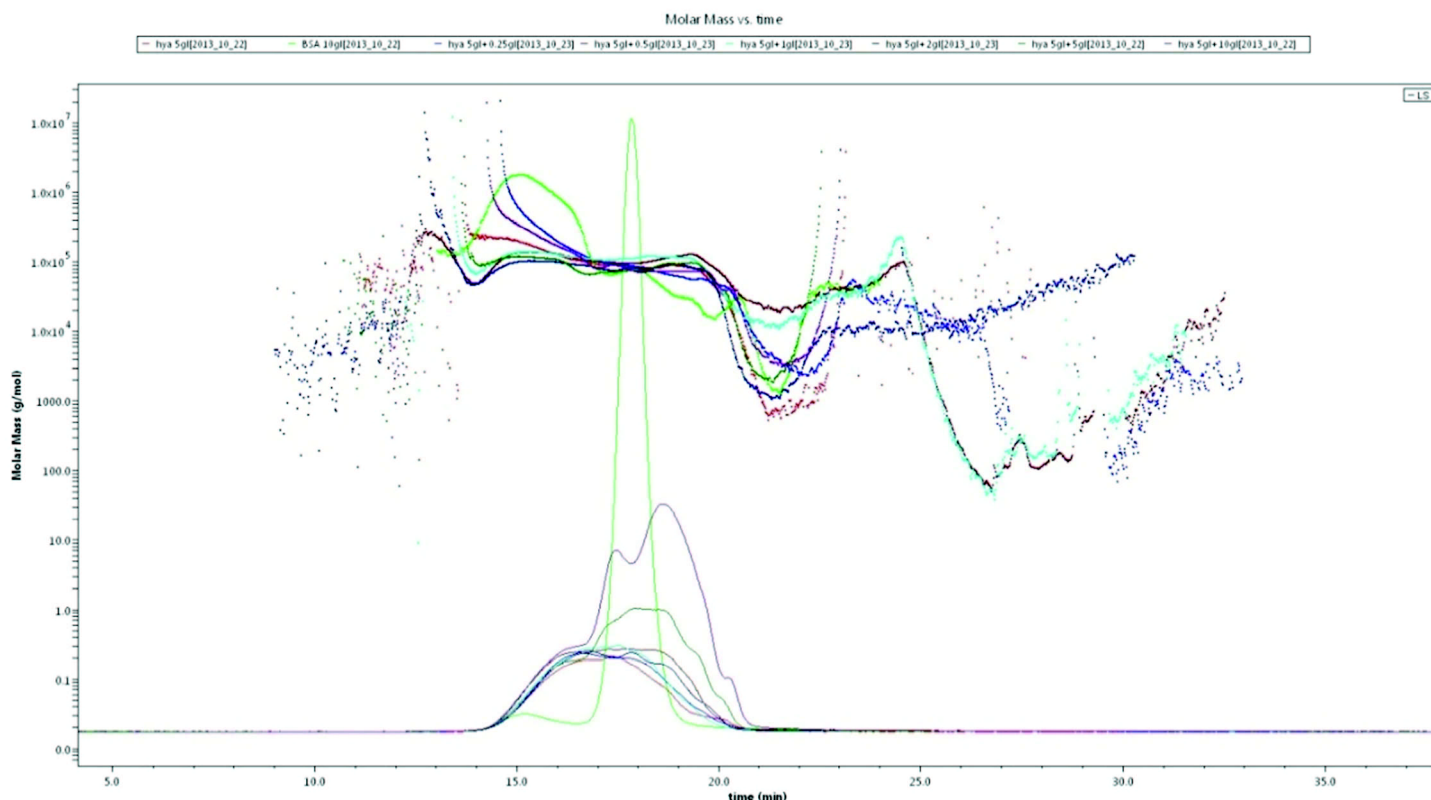
Nejnižší zeta potenciál u čistého BSA má zase BSA připravený ve vodě v hodnotě  $-9,3 \text{ mV}$ . Nejvyšší zeta potenciál má čistý BSA připravený v pufru o pH 4 s přidavkem NaNO<sub>3</sub>, jehož hodnota je  $-2,2 \text{ mV}$ .

## 5. VÝSLEDKY A DISKUZE K SEC-MALLS

### 5.1. SEC-MALLS sady nízkomolekulové HA v Milli-Q a 0,1 M NaNO<sub>3</sub>

Vzhledem k poměrně velkému množství dat, pro vyhodnocení byla vybrána sada NMHyA, připravena v 0,1 M roztoku NaNO<sub>3</sub>.

Dále je uveden ukázkový chromatogram vzorků (Graf 9). Druhý pík ve většině měření byl považován za bezvýznamný. Významnější 2. pík měly jediné vzorky s vyšší koncentrací BSA 5-10 g/L, což je vidět z chromatogramu. Druhý pík u těchto koncentrací pravděpodobně představuje z větší části vylučovaný BSA, který se nezúčastnil interakcí s Hya.

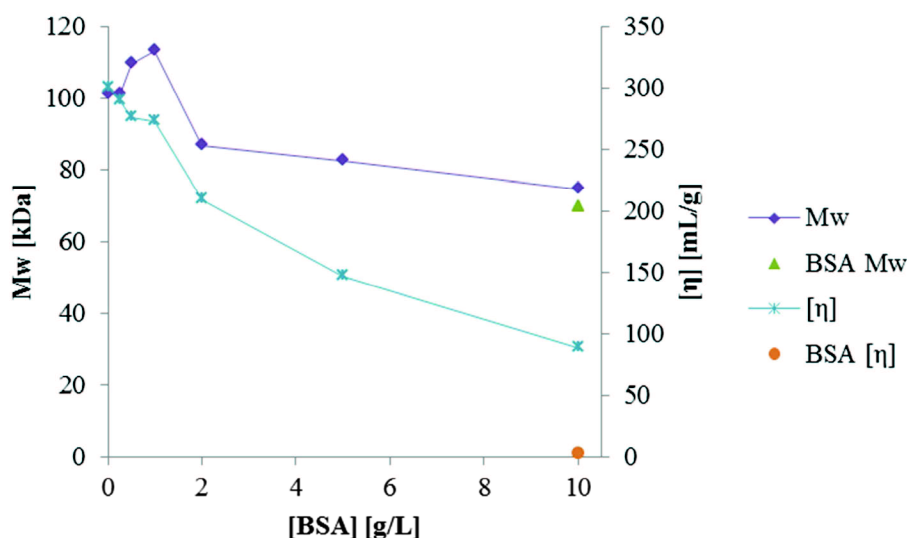


Graf 9. Chromatogram. Závislost  $M_w$  na retenčním čase s vlivem koncentrace BSA u vzorků Hya s přidaným BSA o různých koncentracích (NMHyA v Milli-Q a 0,1 M NaNO<sub>3</sub>)

Výsledky z výstupu ukazují přítomnost u některých sad více píků. Do vyhodnocení byl zahrnut vždy pouze první nejvýznamnější pík. Významnost byla posouzena z výšky a šířky píku poskytovaných z LS (light scattering) signálu. Z daného chromatogramu je vidět, že částice vystupují z kolony mezi 15-20 minutou. Nejvyšší koncentrační signál má čistý BSA, který má také nejužší pík. Dále výška koncentračního signálu klesá s poklesem koncentrací BSA ve vzorcích.

Obecně molekulová hmotnost klesá podél jednotlivých píků, jak lze vidět v grafu 10.

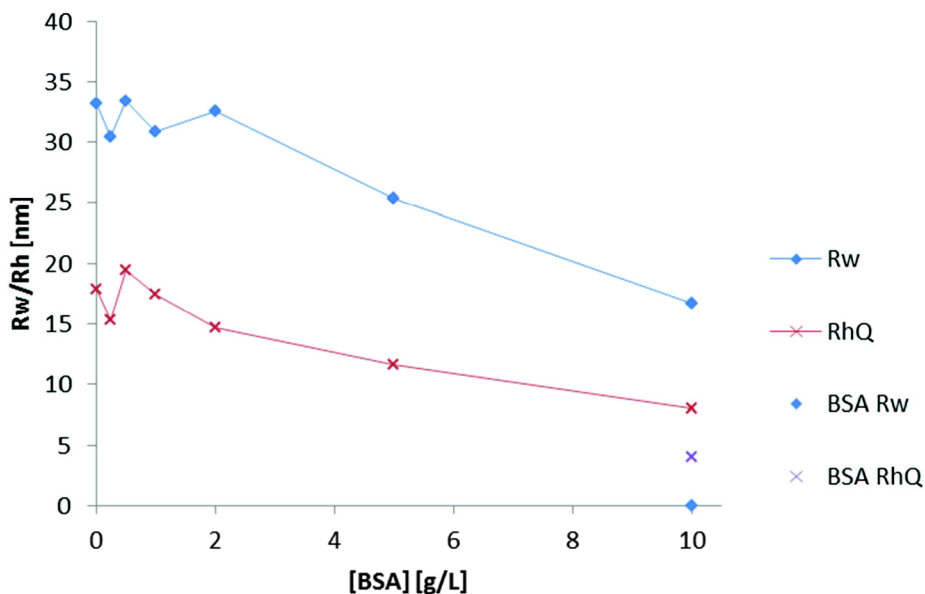




Graf 10.  $M_w$ ,  $[\eta]$  komplexů v závislosti na koncentraci BSA u vzorků Hya s přidaným BSA o různých koncentracích (NMHya v Milli-Q a 0,1 M  $\text{NaNO}_3$ )

Z grafu 10 je vidět, že do koncentrace BSA cca 1 g/L roste  $M_w$  od hodnoty 101,3 do 113,5 kDa. Při vyšších koncentracích BSA molekulová hmotnost klesá až do hodnoty 74,7 kDa. Snížení molekulové hmotností komplexů s rostoucí koncentrací BSA může být způsobeno nastavením inkrementů indexu lomu, který se zadává v nastavení přístroje jako konstantní. V našem případě byl zvolen inkrement indexu lomu buď pro čistou HA, nebo čistý BSA. Jelikož u komplexů dochází k interakcím, mění se jejich celkový inkrement indexu lomu. Z rovnice (21) je možné odvodit nepřímou závislost inkrementu indexu lomu na molekulové hmotnosti. Takže čím větší je inkrement, tím menší je molekulová hmotnost. Stejným způsobem se na tom může podílet i koncentrace, kterou se násobí konstanta na levé straně rovnice obsahující inkrement. Ta se zadává také jako konstantní. Takže snížení molekulové hmotností u částic sady nízkomolekulové HA ve vodě s přidavkem  $\text{NaNO}_3$  nejspíš znamená zvýšení inkrementu indexu lomu. Je to zcela logické, jelikož i zadávaný inkrement indexu lomu BSA v hodnotě 0,185 je větší než inkrement HA 0,165. Vnitřní viskozita vykazuje konstantní pokles v rozmezí hodnot od 300 do 88,8 mL/g, což svědčí o tom, že k interakcím dochází, a výsledné komplexy se stávají kompaktnější s rostoucí koncentrací BSA. Molekulová hmotnost čistého BSA je 69,7 kDa a je odpovídající jeho teoretické molekulové hmotnosti. Ve druhém píku molekulová hmotnost BSA je extrémně vysoká (1300 kDa), což mohlo být pravděpodobně způsobeno nečistotami. Vnitřní viskozita BSA je 3,117 mL/g, což je o hodně nižší hodnota, než u komplexů HA-BSA.





Graf 11.  $R_w$  a  $R_{H}Q$  komplexů v závislosti na koncentraci BSA u vzorků Hya s přidaným BSA o různých koncentracích (NMHya v Milli-Q a 0,1 M  $\text{NaNO}_3$ )

Na grafu 11 je vidět, že gyrační poloměr  $R_w$  se skoro nemění v rozmezí koncentrací BSA 0 až 2 g/L, a je v hodnotě cca 30 nm. Snižuje se teprve od koncentrace BSA 5 g/L až do hodnoty 16,7 nm při koncentraci BSA 10 g/L. Z rovnice 24 je vidět, že gyrační poloměr je přímo úměrný konstantě na levé straně rovnice. Takže by změna inkrementu indexu lomu v konstantě měla ovlivnit i gyrační poloměr. Snížení gyračního poloměru a vnitřní viskozity (viz. Graf 10) částic nejspíš znamená, že dochází k interakcím mezi molekulami HA a BSA a tím ke „smrštění“ vznikajících komplexů.

Hydrodynamický poloměr má stejný průběh jak gyrační poloměr, ale je menší než gyrační, což z hlediska teorie roztoků polymerů je zcela logické (viz. rovnice 36):

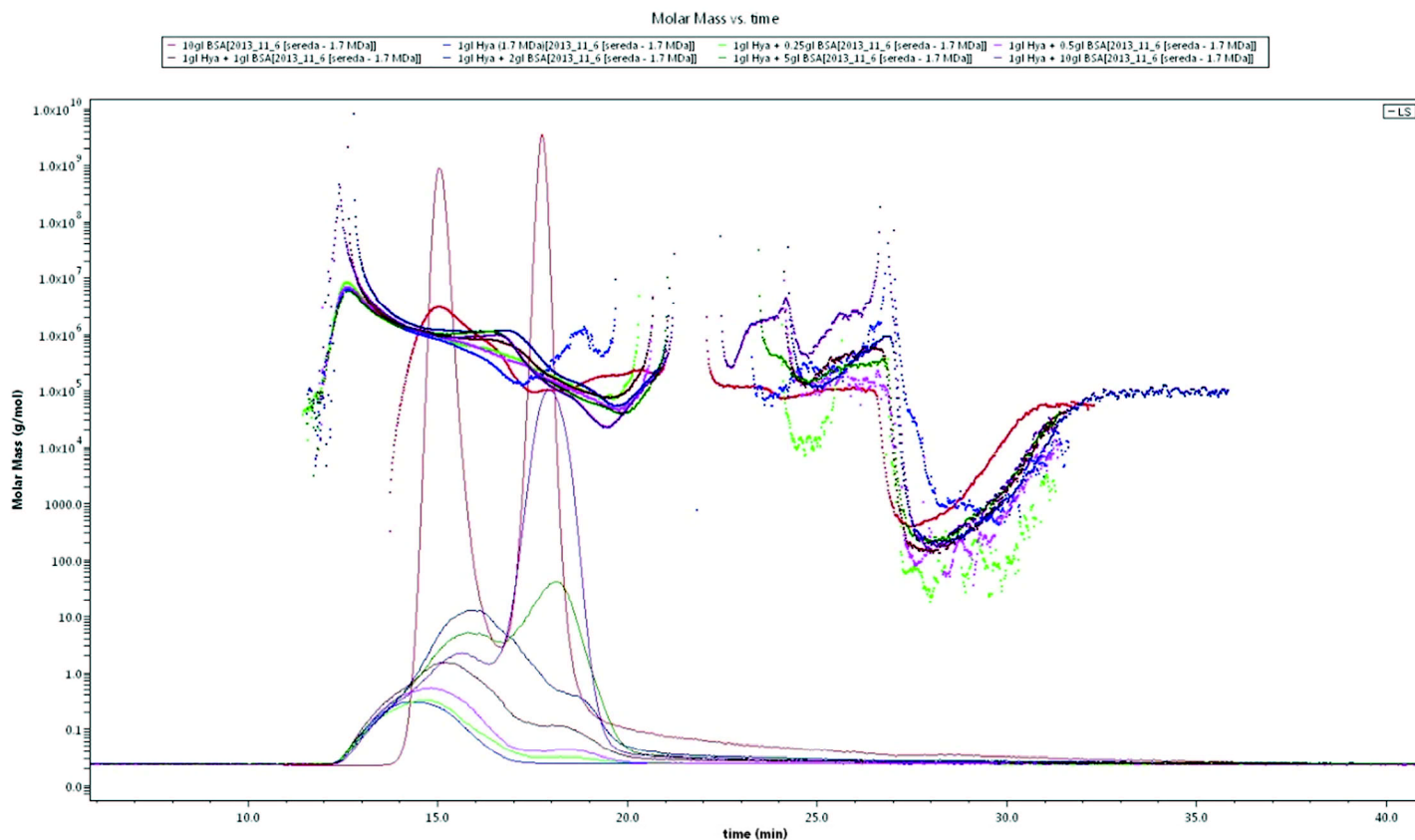
$$R_H = 0,68 \cdot \langle s^2 \rangle^{\frac{1}{2}} \quad (36)$$

Částice nejsou kompaktní, ale docela rozsáhlé v rozložení své hmotnosti. S rostoucí koncentrací BSA oba dva poloměry klesají z důvodu vzniku kompaktnějších komplexů HA a BSA.

Gyrační poloměr čistého BSA je nulový, hydrodynamický poloměr má hodnotu 4 nm a je větší, než gyrační. To by mohlo znamenat, že jsou to kompaktní částice, nejpravděpodobněji ve tvaru koule se silným solvatačním obalem

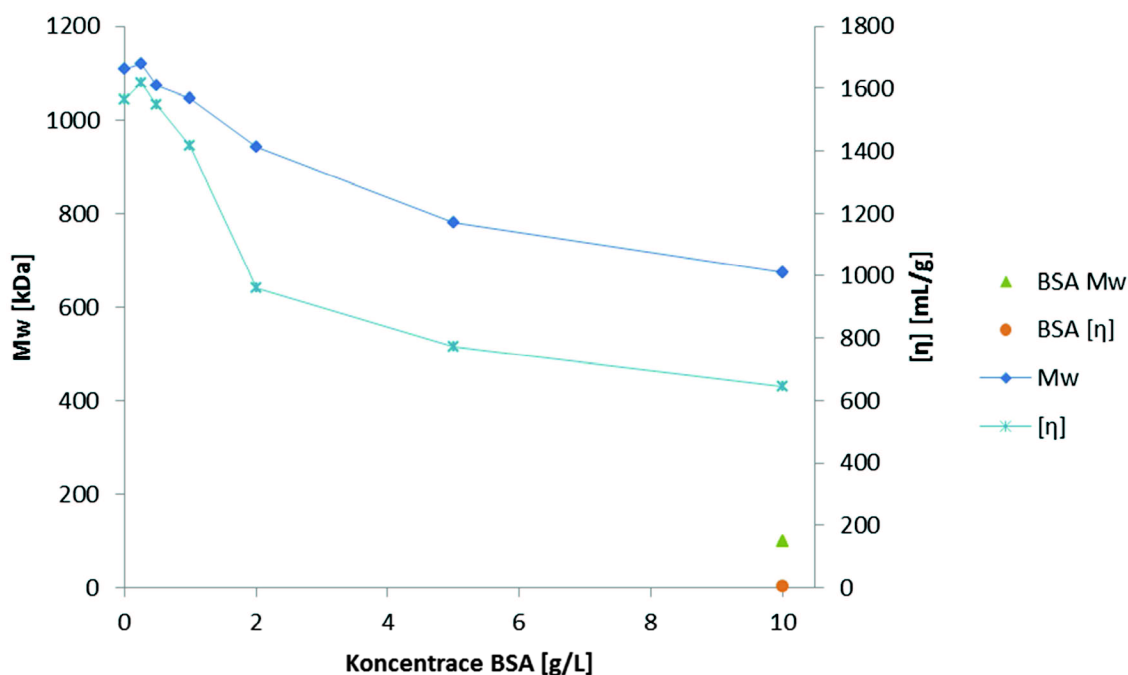
## 5.2. SEC-MALLS sady vysokomolekulové HA v 0,1 M roztoku NaNO<sub>3</sub>

K vyhodnocení byla vybrána kromě sady NMHya také sada VMHya v 0,1 M roztoku NaNO<sub>3</sub>. Dále je uveden ukázkový chromatogram.



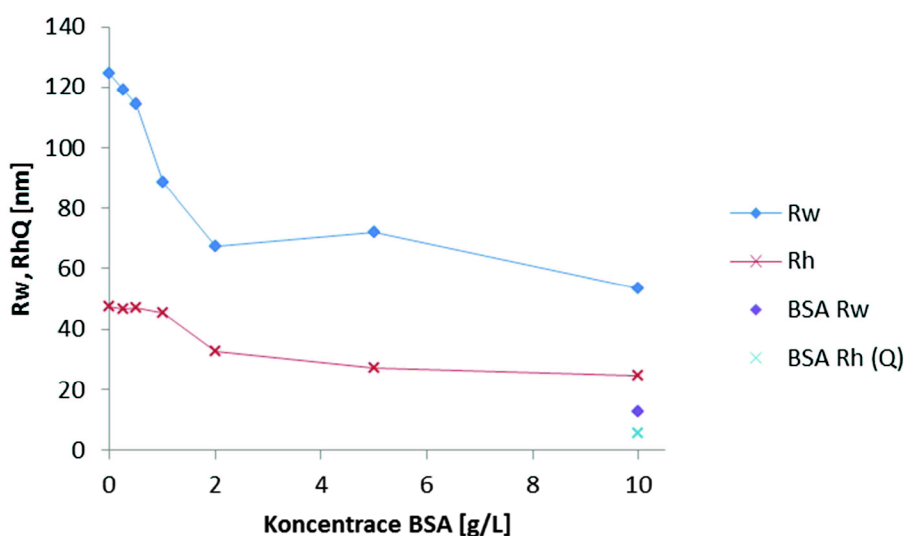
Graf 12. Chromatogram. Závislost molekulové hmotnosti na retenčním čase s vlivem koncentrace BSA u vzorků Hya s přidaným BSA o různých koncentracích (VMHya v Milli-Q a 0,1 M NaNO<sub>3</sub>)

Z chromatogramu 12 je vidět hlavní rozdíl mezi vysokomolekulovou a nízkomolekulovou Hya. Začíná se vylučovat z kolony o něco dříve mezi 12-20 minutami. Je vidět pokles sledovaných hodnot (molekulové hmotnosti, vnitřní viskozity, gyračního a hydrodynamického poloměru) v rámci jednotlivých píků. Jednotlivé píky jsou také více od sebe oddělené, než u nízkomolekulové HA. Je také vidět, že se s rostoucí koncentrací BSA píky rozšiřují, což pravděpodobně svědčí o tvorbě komplexů s rozsáhlou distribucí velikosti částic. Podle chromatogramu lze usoudit, že u VMHya došlo k výraznějšímu rozdělení částic do dvou populací, než u NMHya. Pravděpodobně se ve druhém píku vylučoval jednak volný BSA, který se nezúčastnil interakcí, a také nejmenší komplexy.



Graf 13 Závislost  $M_w$  a  $[\eta]$  na koncentraci BSA u vzorků Hya s přidaným BSA o různých koncentracích (VMHya v Milli-Q a 0,1 M  $\text{NaNO}_3$ )

V grafu 13 je vidět stálý pokles  $M_w$  od 1107,6 kDa u čisté HA do 673,6 kDa při koncentraci BSA 10 g/L. Pokles je výraznější a celková hodnota je pochopitelně vyšší, než u nízkomolekulové HA. Pokles molekulové hmotnosti komplexů s rostoucí koncentrací BSA má pravděpodobně stejný důvod, jak i u nízkomolekulové HA (rostoucí inkrement indexu lomu). Vnitřní viskozita klesá od 1565 mL/g při čisté HA do 642 mL/g při koncentraci BSA 10 g/L, je o hodně větší, než u sady nízkomolekulové HA. Vnitřní viskozita komplexů klesá z důvodu tvorby kompaktnějších částic. Molekulová hmotnost BSA je 98 kDa, což je pravděpodobně chybná hodnota vzhledem k teoretické hodnotě 67 kDa. Naměřená vnitřní viskozita čistého BSA byla 3,2 mL/g.



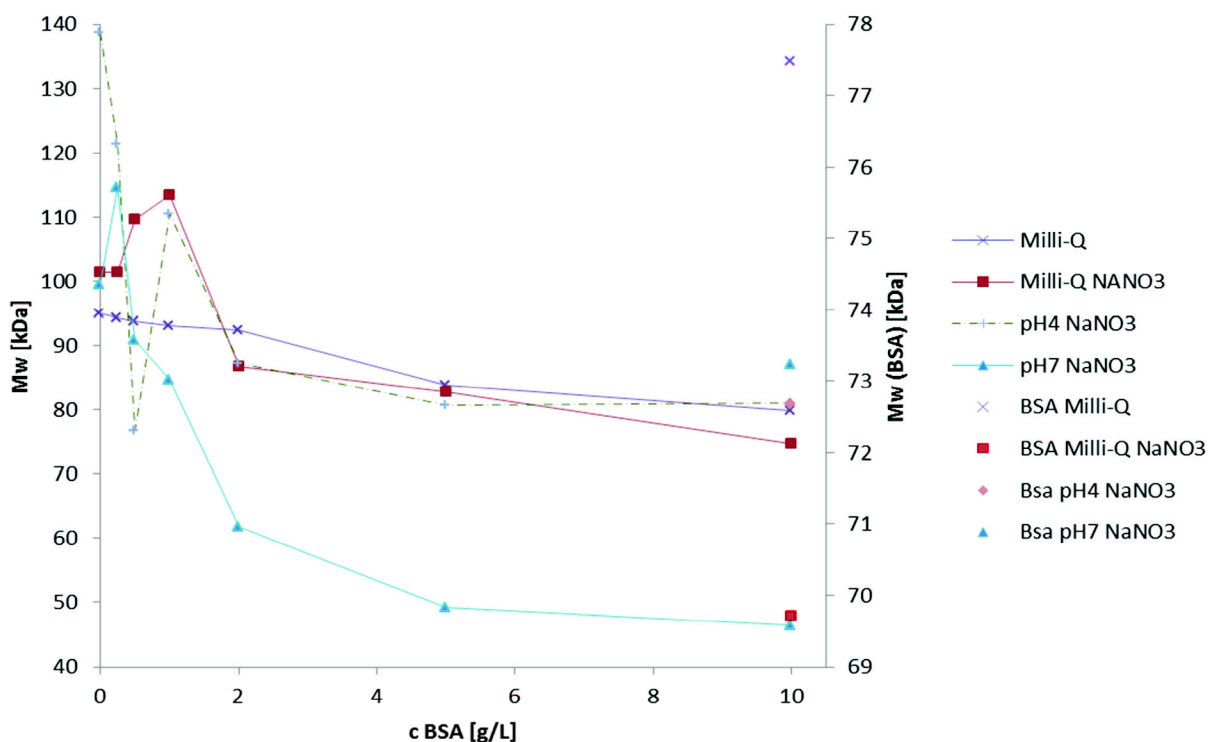
Graf 14. Závislost  $R_w$  a  $R_H(Q)$  na koncentraci BSA u vzorků Hya s přidaným BSA o různých koncentracích (VMHyA v Milli-Q a 0,1 M NaNO<sub>3</sub>)

Na grafu 14 je vidět, že gyrační poloměr strmě klesá od 124 nm u čisté HA do 67,3 nm při koncentraci BSA 2 g/L. Při vyšších koncentracích klesá jen nepatrně, při koncentraci BSA 10 g/L je 53,6 nm. Gyrační poloměr komplexů se zmenšuje z důvodu tvorby kompaktnějších částic, stejně jak u sady s nízkomolekulovou HA, ale má z pochopitelných důvodů celkově větší hodnoty.

Ve srovnání s nízkomolekulovou HA gyrační a hydrodynamický poloměr sady VMHyA jsou větší. Je také vidět, že gyrační poloměr je větší, než hydrodynamický, což je v souladu s teorií roztoků polymerů, a znamená to, že jsou to částice s velkým rozložením hmotností. Gyrační poloměr BSA v hodnotě 12,6 nm je větší, než hydrodynamický poloměr 5,7 nm. Tento rozdíl od sady s NMHyA (spolu s chybnou hodnotou molekulové hmotností 98 kDa) byl pravděpodobně způsoben chybou během přípravy roztoku nebo při samotném měření.

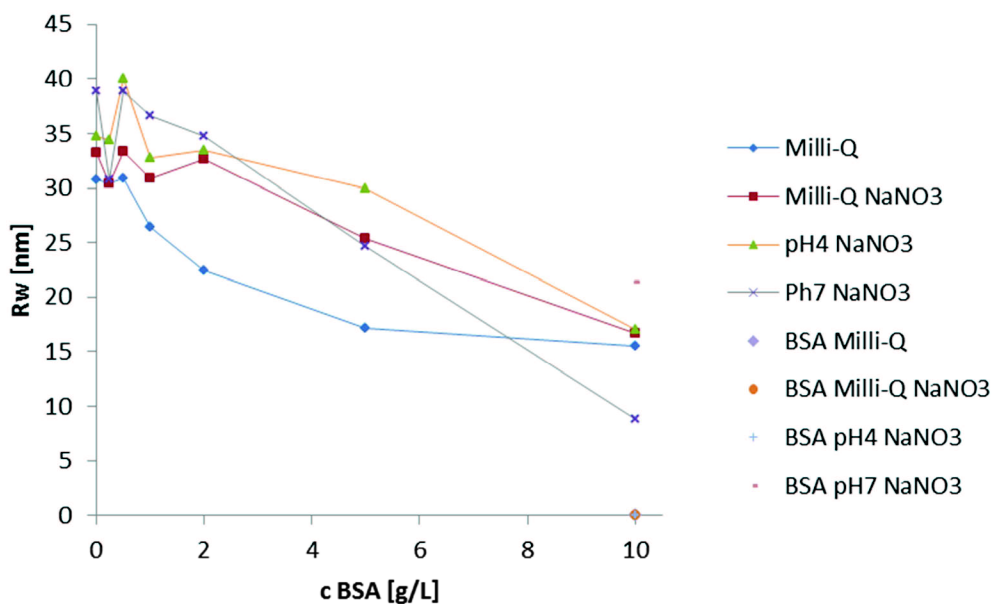
### 5.3. Porovnání sad nízkomolekulové HA

Částice komplexů HA-BSA se v různých prostředích projevují nepravidelným průběhem molekulové hmotnosti, gyračního a hydrodynamického poloměru v rozmezí koncentrací BSA 0 až cca 2 g/L, je to pravděpodobně způsobeno různými typy a velikostmi iontových sil a jejich ovlivnění schopnosti BSA interagovat s HA.



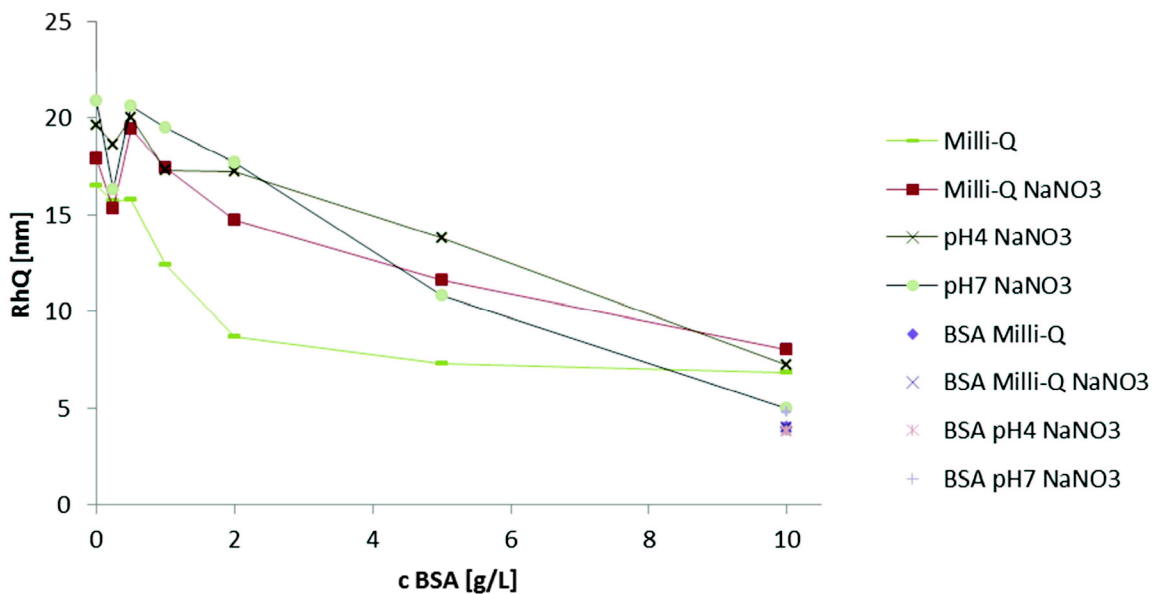
Graf 15. Závislost  $M_w$  na koncentraci BSA u vzorků Hya s přidaným BSA o různých koncentracích (různá prostředí, NMHy)

Na grafu 15 je vidět, že v každém prostředí molekulová hmotnost klesá s rostoucí koncentrací BSA. Sady se nejvíce liší mezi sebou a také mají nepravidelný průběh v rozmezí koncentrací BSA 0-2 g/L. Největší molekulovou hmotnost má sada připravená v pufru o pH 4 s přidavkem  $\text{NaNO}_3$ . Nejnižší molekulovou hmotnost má sada připravena v pufru o pH 7 s přidavkem  $\text{NaNO}_3$  pravděpodobně kvůli nejvyšší hodnotě inkrementu indexu lomu, která by mohla být způsobena vysokou nábojovou hustotou. Rozdíl v tomto případě od sad připravených v čisté vodě, kde pH je taky neutrální, je pravděpodobně způsoben větším stíněním ionty molekul HA v pufru o pH 7. Pokles molekulové hmotnosti sady v Milli-Q vodě je nejvíc pravidelný, to pravděpodobně lze vysvětlit nepřítomností žádné iontové síly. Nelinearity u ostatních sad jsou více nebo méně spojené s procesem vytěsňování stínících iontů z molekuly HA molekulami BSA, což se většinou odehrává v rozmezí koncentrací BSA 0 až cca 2 g/L. BSA u všech sad vykazuje zhruba stejnou molekulovou hmotnost, která odpovídá teoretické hodnotě.



Graf 16. Závislost  $R_w$  na koncentraci BSA u vzorků Hya s přidaným BSA o různých koncentracích (různá prostředí, NMHya)

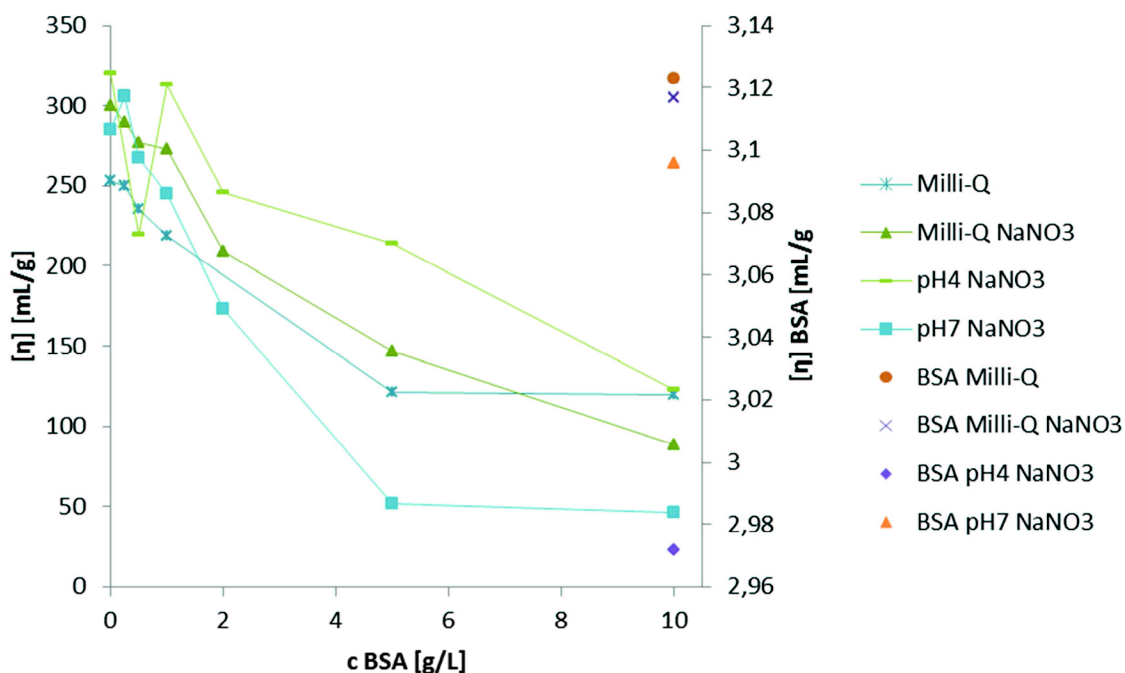
Na grafu 16 je vidět, že v každém prostředí gyrační poloměr klesá s rostoucí koncentrací BSA. Největší rozsah gyračního poloměru má sada připravena v pufru o pH 7 s přídavkem  $\text{NaNO}_3$ , což je pravděpodobně spojené s velkým nábojem karboxylových skupin HA, které se elektrostaticky odpuzují. Při nízkých koncentracích BSA proto převládají expandované řetězce HA, při vysokých koncentracích BSA se komplexy „smrští“ kvůli interakcím a iontové síle. Nejmenší gyrační poloměr má sada připravena v čisté vodě, a to pravděpodobně z důvodu nepřítomnosti žádné iontové síly. Jediný nenulový  $R_w$  má čistý BSA připravený v pufru o pH 7 s přídavkem  $\text{NaNO}_3$ , a to pravděpodobně z důvodu změny konformaci molekuly BSA při tomto pH a iontové síle. V ostatních sadách má BSA nulový gyrační poloměr, což svědčí o tom, že v jiných prostředích molekula BSA je velice kompaktní.



Graf 17.  $R_{H}Q$  v závislosti na koncentraci BSA u vzorků Hya s přidaným BSA o různých koncentracích (různá prostředí, NMHya)

Z grafu 17 je vidět, že v každém prostředí hydrodynamický poloměr klesá s rostoucí koncentrací BSA. Hydrodynamický poloměr u všech sad je menší, než gyrační poloměr, což svědčí o tom, že částice všech sad jsou rozsáhlého tvaru. Největší rozsah hydrodynamického poloměru má sada připravena v pufru o pH 7 s přidavkem  $\text{NaNO}_3$ , to by vysvětloval vysoký náboj více disociované HA, tak jako i u gyračního poloměru. Nejmenší je v čisté vodě, což je pochopitelné z důvodu nepřítomnosti žádné iontové síly. Hydrodynamický poloměr čistého BSA je zhruba stejný u všech sad. Kromě sady v pufru o pH 7, je také větší, než gyrační. To svědčí o tom, že BSA molekula je kompaktní a vysoce solvatovaná. U sady v pufru o pH 7 čistý BSA má hydrodynamický poloměr menší, než gyrační, což by mohlo být způsobeno narušením struktury BSA při tomto pH a iontové síle.





Graf 18. Závislost vnitřní viskozity  $[\eta]$  na koncentraci BSA u vzorků Hya s přidaným BSA o různých koncentracích (různá prostředí, NMHya)

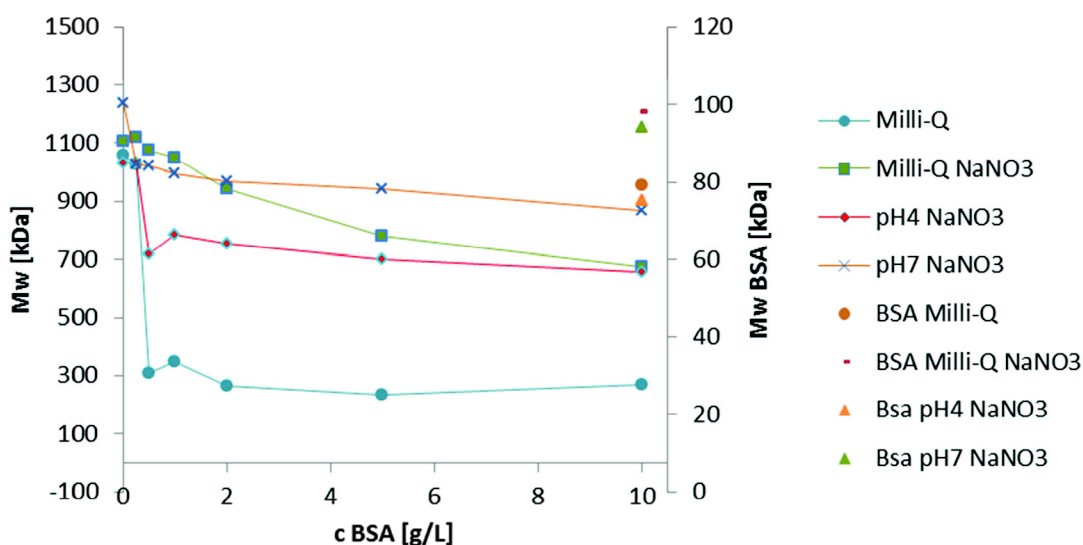
Z grafu 18 je vidět, že v každém prostředí vnitřní viskozita klesá s rostoucí koncentrací BSA. Největší vnitřní viskozitu má sada připravena v pufru o pH 4 s přídavkem NaNO<sub>3</sub>, a to pravděpodobně kvůli tomu, že má největší částice (i přesto, že by při tomto pH mělo docházet k nejvýraznějším interakcím). Pravděpodobně se na tom podílí dostatečně velká iontová síla pufru. Při vyšších koncentracích BSA je nejmenší v pufru o pH 7 s přídavkem NaNO<sub>3</sub>, což pravděpodobně potvrzuje kompaktnost částic při vyšších koncentracích BSA v tomto prostředí. Přídavek NaNO<sub>3</sub> ve vodě vyvolává zvýšení iontové síly a tím stínění HA řetězce a zvětšení částic komplexů, což způsobuje i o něco větší viskozitu sady ve vodě s přídavkem NaNO<sub>3</sub> oproti sadě jen ve vodě. Molekuly čistého BSA mají nízkou vnitřní viskozitu ve všech prostředích. Dohromady s předchozími odvozeními lze říct, že BSA jsou velmi kompaktní částice nesoucí velký solvatační obal.

U některých vzorků chyběl signál z viskozitního detektoru, a proto jejich data nebyly zařazené do grafu 18 a do vyhodnocení. (u sady v pufru o pH 4 s 0,1 M NaNO<sub>3</sub> při koncentraci BSA 0,25 g/L, a u sady v Milli-Q vodě při koncentraci BSA 2 g/L)



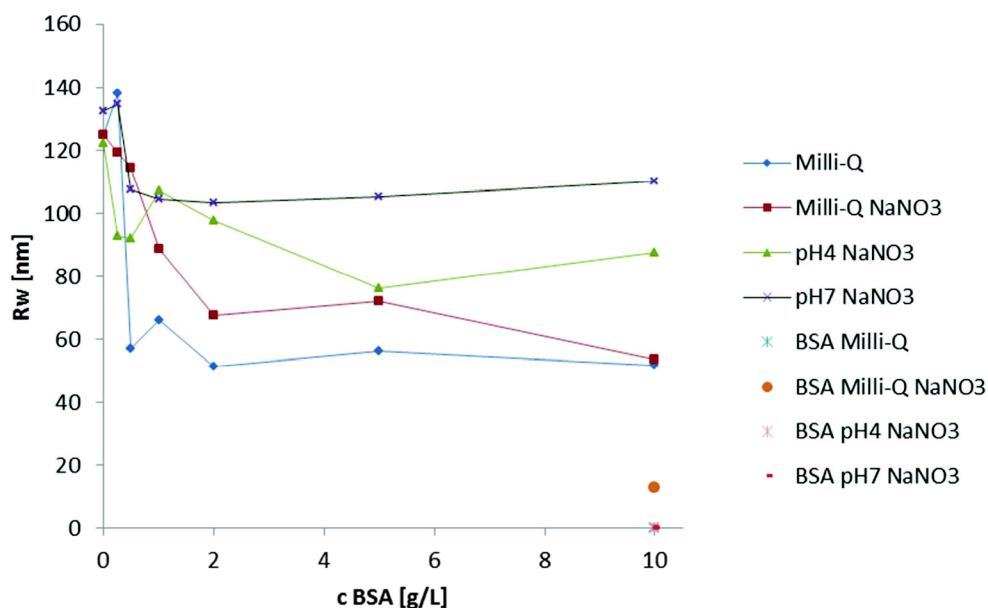
#### 5.4. Porovnání sad vysokomolekulové HA

Druhý pík byl většinou významný pouze při větších koncentracích BSA a to ve všech prostředích, pravděpodobně to byl z větší části volně vyloučený BSA.



Graf 19. Závislost  $M_w$  na koncentraci BSA u vzorků Hya s přidaným BSA o různých koncentracích (různá prostředí, VMHya)

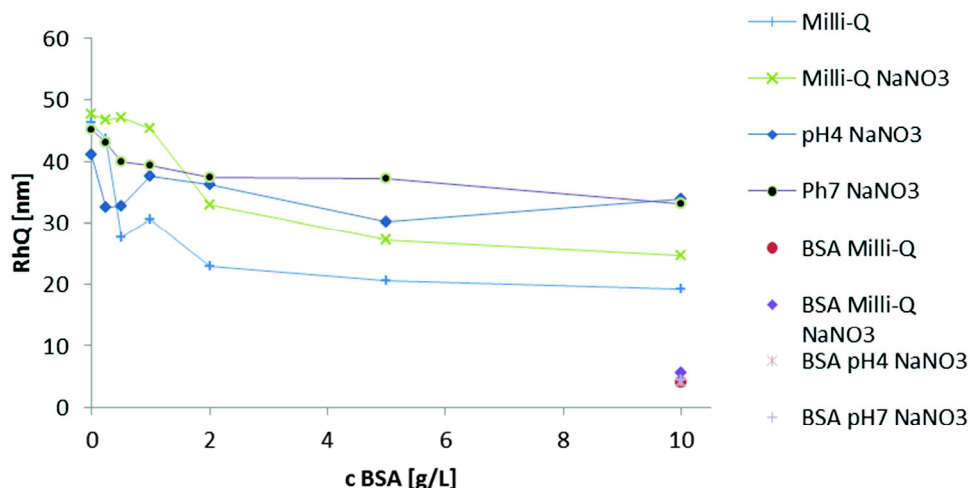
Na grafu 19 je vidět, že průběh závislosti molekulové hmotnosti na koncentraci BSA je více pravidelný u sad vysokomolekulové HA, než u sad nízkomolekulové HA. Důvodem tomu může být menší stínění karboxylových skupin HA iontovou silou, čím se v menší míře uplatní vytěsňování iontů molekulami BSA, a tím by mělo dojít k výraznějším interakcím HA s BSA. Kvůli přítomnosti volných karboxylových skupin HA i za přítomnosti iontové síly, pravděpodobně dochází současně k navázání některých molekul BSA a vytěsňování části stínících iontů. Tyto protichůdné děje pravděpodobně působí kompenzačně. Největší molekulovou hmotnost má sada připravená v pufru o pH 7 s přidavkem  $\text{NaNO}_3$ , u nízkomolekulové HA tato sada naopak má nejnižší  $M_w$  (viz. Graf 15). Pravděpodobně je to spojeno s nižším inkrementem indexu lomu a menším nábojem komplexů. Menší náboj komplexů může být vyvolán výraznějším odstíněním celkového náboje HA interakcemi s BSA. U nízkomolekulové HA k tomu nedochází pravděpodobně kvůli většímu stínění iontovou silou, a při nižších koncentracích BSA tak dochází více k vytěsňování iontů z HA, než k interakcím s BSA. Nejnižší hodnoty molekulových hmotností má sada připravena v čisté vodě, a to pravděpodobně kvůli největšímu inkrementu indexu lomu, který je spojen s rozsáhlejšími interakcemi. Rozdíl od NMHya, kde sada v čisté vodě nemá nejmenší molekulovou hmotnost, je pravděpodobně způsoben jiným poměrem karboxylových skupin na jednu molekulu VMHya, a také jinou konformací HA a tím i disociací karboxylů, což pravděpodobně ovlivňuje rozsah interakcí mezi HA a BSA a tím i hodnoty molekulových hmotností komplexů. Největší molekulovou hmotnost má čistý BSA připravený v Milli-Q vodě s přidavkem  $\text{NaNO}_3$ , nejnižší je v pufru o pH 4 s přidavkem  $\text{NaNO}_3$ . A i přesto, že se mírně od sebe liší, pohybují se v rozmezí teoretických hodnot.



Graf 20. Závislost  $R_w$  na koncentraci BSA u vzorků Hya s přidaným BSA o různých koncentracích (různá prostředí, VMHya)

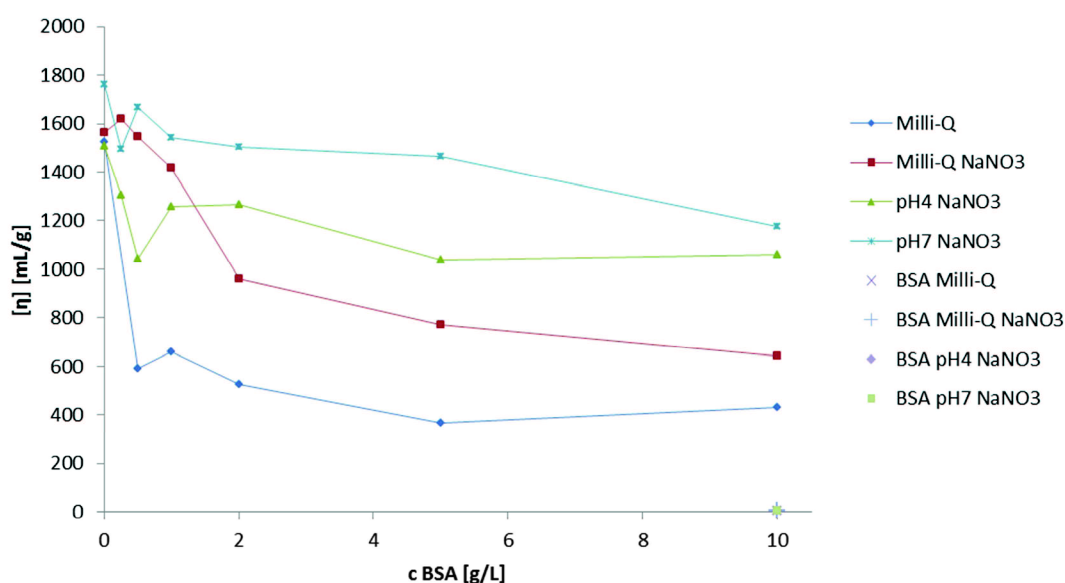
Na grafu 20 je vidět, že největší hodnoty gyračního poloměru má sada připravena v pufru o pH 7 s přídavkem  $\text{NaNO}_3$ , nejmenší jsou u sady připravené v čisté vodě. U sady v pufru o pH 7 na rozdíl od té samé sady s nízkomolekulovou HA zůstává gyrační poloměr v rozmezí koncentrací BSA 0,5 až 10 g/L téměř konstantní. Takové chování by bylo možné vysvětlit tím, že interakce při pH 7 jsou nejslabší a nejvíce se projevují do koncentrace BSA cca 1 g/L.

Jediný nenulový gyrační poloměr má čistý BSA připravený v Milli-Q vodě s přídavkem  $\text{NaNO}_3$  a to o hodnotě 12,6 nm.



Graf 21. Závislost  $R_{HQ}$  na koncentraci BSA u vzorků Hya s přidaným BSA o různých koncentracích (různá prostředí, VMHya)

Na grafu 21 je vidět, že do koncentrace BSA cca 2 g/L má největší hodnoty hydrodynamického poloměru sada připravena v Milli-Q vodě s přidavkem  $\text{NaNO}_3$ . Od koncentrace BSA cca 5 g/L je však největší u sady v pufru o pH 7 s přidavkem  $\text{NaNO}_3$ . Nejmenší hodnoty hydrodynamického poloměru má sada připravena v Milli-Q vodě a to opět z důvodu nepřítomnosti iontové síly. Celkově je hydrodynamický poloměr menší, než gyrační, a rozdíl je výraznější, než u sady s nízkomolekulovou HA. To pravděpodobně svědčí o tom, že komplexy jsou více roztažené s neuspořádaným rozložením hmotnosti. V průběhu závislosti velikosti na koncentraci BSA odpovídají hydrodynamické poloměry zcela trendu gyračních poloměrů. Oba poloměry klesají s rostoucí koncentrací BSA, což je potvrzením stejného mechanismu vzniku komplexů, jak u VMHya, tak i u NMHya. Čistý BSA má skoro stejný hydrodynamický poloměr přibližně v hodnotě 4 nm ve všech prostředích.



Graf 22. Závislost vnitřní viskozity  $[\eta]$  na koncentraci BSA u vzorků Hya s přidaným BSA o různých koncentracích (různá prostředí, VMHya)

Na grafu 22 je vidět, že vnitřní viskozita klesá s rostoucí koncentrací BSA u všech sad, což zcela odpovídá průběhu závislosti jejich hydrodynamických poloměrů a také potvrzuje vznik komplexů ve všech prostředích, přičemž, ale nejméně v pufru o pH 7 s přidavkem  $\text{NaNO}_3$ . Největší vnitřní viskozitu má sada připravena v pufru o pH 7 s přidavkem  $\text{NaNO}_3$ , nejmenší je v čisté Milli-Q vodě. Na rozdíl od těchto dat, u nízkomolekulové HA má sada v pufru o pH 7 nejnižší vnitřní viskozitu (viz. Graf 18), což pravděpodobně svědčí o tom, že komplexy VMHya v tomto prostředí jsou větší, než komplexy NMHya.

Vnitřní viskozita čistého BSA je skoro stejná u všech sad a rovná se přibližně 3,1 mL/g.

## 6. ZÁVĚR

Proměřením různých sad vzorků metodou SEC-MALLS a DLS bylo stanoveno, že dochází více nebo méně k elektrostatickým interakcím mezi HA a BSA u každé z proměřených sad.

U DLS byly vyhodnoceny sady nízko a vysokomolekulové HA připravené v čisté vodě s přidavkem  $\text{NaNO}_3$ . Bylo stanoveno, že u nízkomolekulové HA dochází k nárůstu střední

velikostí částic v rozmezí koncentrací BSA cca 0-1 g/L, od koncentrace BSA cca 2 g/L se částice už jenom zmenšovaly, když u vysokomolekulové HA bylo pozorované stále zmenšení střední velikostí částic s rostoucí koncentrací BSA. Pravděpodobným důvodem bylo větší iontové stínění nízkomolekulové HA, při čemž docházelo k vytěsňování stínících iontů molekulami BSA a tak k expanzi molekul HA. U vysokomolekulové HA i za přítomnosti iontové síly byly stále k dispozici volné karboxylové skupiny HA, a proto k vytěsňování stínících iontů pravděpodobně docházelo v menší míře, než k interakcím HA a BSA.

Z dat zeta potenciálu různých sad bylo stanoveno, že nejnižší zeta potenciál měly sady připravené v čisté vodě a to z důvodu žádného stínění iontovou silou. Víceméně konstantní a k tomu vysoký zeta potenciál v ostatních prostředích je pravděpodobně důsledkem různě velké iontové síly, která tvoří docela stabilní solvatační obal řetězce HA, a tím zamezuje interakcím s molekulami BSA.

Významné data SEC-MALLS obsahovala pouze první pík. Druhý pík byl považován za bezvýznamný, resp. významnější 2. pík měly jediné vzorky při vyšších koncentracích BSA. Pravděpodobně 2. pík představuje z větší části vylučovaný BSA, který se již nezúčastnil interakcí s HA.

Hlavní trend dat SEC-MALLS s rostoucí koncentrací BSA je: zmenšení molekulové hmotnosti, gyračního a hydrodynamického poloměru a vnitřní viskozity. Tento obecný trend svědčí o tom, že interakce mezi HA a BSA způsobují kontrakci částic.

U sad vysoko a nízkomolekulové HA bylo stanoveno, že zmenšení molekulové hmotnosti je způsobeno zvýšením inkrementu indexu lomu s přidáním větší koncentraci BSA. Bylo také zaznamenáno, že hydrodynamický poloměr je menší, než gyrační. Důvodem tomu jsou rozsáhlejší tvary výsledných komplexů, což by bylo v souladu s teorií roztoků polymerů.

U sady s vysokomolekulovou HA pravděpodobně docházelo k výraznějšímu rozdělení částic do dvou populací, což bylo vidět na chromatogramech.

Z porovnání dat SEC-MALLS různých sad bylo objeveno, že sady vysoko a nízkomolekulové HA v pufru o pH 7 s přidavkem  $\text{NaNO}_3$  se chovají odlišně. Molekulová hmotnost sady s nízkomolekulovou HA v tomto pufru měla nejmenší hodnotu, když u vysokomolekulové naopak největší. Nejnižší molekulová hmotnost sady NMHyA byla pravděpodobně způsobena nejvyšším inkrementem indexu lomu, největším nábojem řetězce HA a nejmenším rozsahem interakcí souvisejícím s větším iontovým stíněním. U VMHyA v porovnání s NMHyA byl menší náboj (absolutní hodnota), kvůli nižšímu iontovému stínění a tím většímu rozsahu interakcí. Rozsah interakcí však byl pravděpodobně stále minimální jak u nízkomolekulové, tak i u vysokomolekulové HA, což je vidět na hodnotách gyračního poloměru a vnitřní viskozity VMHyA, které byly v tomto prostředí největší. Vnitřní viskozita v tomto prostředí byla největší u sady s vysokomolekulou HA, pravděpodobně kvůli značné velikosti molekul, když u nízkomolekulové HA byla nejmenší, což by mohlo být zdůvodněné větší kontrakcí komplexů.

U sad připravených v čisté vodě jak u VMHyA tak i u NMHyA byl zaznamenán nejmenší gyrační a hydrodynamický poloměr a k tomu i nejnižší vnitřní viskozitu. To bylo pravděpodobně způsobeno nepřítomností žádných stínících iontů, které by mohly omezit interakce.

BSA měl skoro vždy a všech prostředích stejné hodnoty, jak molekulové hmotnosti, tak obou poloměrů a vnitřní viskozity. Hydrodynamický poloměr byl ve většině případů větší, než gyrační. Z toho bylo odvozeno, že tyto částice jsou velice kompaktní s výrazným solvatačním obalem.

## **7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK**

SECMALLS - size exclusion chromatography – multi angle laser light scattering

DLS - dynamic light scattering

HA - hyaluronic acid (hyaluronová kyselina)

Hya - hyaluronová kyselina/hyaluronan

BSA - bovin serum albumin (hovězí sérový albumin)

NMHya - nízkomolekulová hyaluronová kyselina

VMHya - vysokomolekulová hyaluronová kyselina

rms (radii) - root mean square (radii)

Rw – gyrační (rms) poloměr

RhQ – hydrodynamický poloměr

Mw – molekulová hmotnost

## 8. REFERENCE

1. COWMAN a Shiro MATSUOKA. Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate Research*. 11 April 2005, roč. 340, č. 5, 791–809. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2005.01.022>
2. CLELAND, Robert L. Polyelectrolyte properties of sodium hyaluronate. 1. Salt exclusion in sodium chloride solution. *Macromolecules*. 1982, vol. 15, issue 2, s. 382-386. DOI: 10.1021/ma00230a036. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma00230a036>
3. LEE, Janet Y a Andrew P SPICER. Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Current Opinion in Cell Biology*. 2000, vol. 12, issue 5, s. 581-586. DOI: 10.1016/S0955-0674(00)00135-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955067400001356>
4. FRASER, J. R. E., T. C. LAURENT a U. B. G. LAURENT. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*. 1997, vol. 242, issue 1, s. 27-33. DOI: 10.1046/j.1365-2796.1997.00170.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2796.1997.00170.x>
5. LEACH J.B. a SCHMIDT C.E. *Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering: Hyaluronan*. 2nd ed. Edited by Gary E. WNEK a Gary L BOWLIN. New York: Informa Healthcare USA, 2008, 779–789. ISBN 9781420078022.
6. NOBLE, Paul W. Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biology*. 2002, vol. 21, issue 1, s. 25-29. DOI: 10.1016/S0945-053X(01)00184-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0945053X01001846>
7. MIO, Kazuhiro a Robert STERN. Inhibitors of the hyaluronidases. *Matrix Biology*. 2002, vol. 21, issue 1, s. 31-37. DOI: 10.1016/S0945-053X(01)00185-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0945053X01001858>
8. CHEN, W. Y. JOHN a GIOVANNI ABATANGELO. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair and Regeneration*. 1999, vol. 7, issue 2, s. 79-89. DOI: 10.1046/j.1524-475X.1999.00079.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1524-475X.1999.00079.x>
9. NECAS, J., L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER a J. KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *VETERINARNI MEDICINA*. 53(8), 2008, s. 397-411. Dostupné z: <http://www.vri.cz/docs/vetmed/53-8-397.pdf>
10. TOOLE, B. P. Hyaluronan-Cell Interactions in Cancer and Vascular Disease. *Journal of Biological Chemistry*. vol. 277, issue 7, s. 4593-4596. DOI: 10.1074/jbc.R100039200. Dostupné z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.R100039200>
11. TURLEY, E. A. Signaling Properties of Hyaluronan Receptors. *Journal of Biological Chemistry*. vol. 277, issue 7, s. 4589-4592. DOI: 10.1074/jbc.R100038200. Dostupné z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.R100038200>
12. PETERS Theodore, Jr. *All About Albumin Biochemistry, Genetics, and Medical Applications* [online]. Burlington: Elsevier, 1995 [cit. 2014-05-02]. ISBN 978-008-0527-048.
13. HE, Xiao Min a Daniel C. CARTER. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*. 1992-7-16, vol. 358, issue 6383, s. 209-215. DOI: 10.1038/358209a0. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1038/358209a0>
14. FOSTER, J.F. *Albumin Structure, Function and Uses*. V.M ROSENOER (ed.), M.ORATZ (ed.) a M.A.ROTHSCHILD (ed.). Oxford, U.K: Ergamon Press Inc, 1977.
15. VIJAI, Kamala Kant a Joseph F. FOSTER. The Amphoteric Behavior of Bovine Plasma Albumin. Evidence for Masked Carboxylate Groups in the Native Protein

- \*. *Biochemistry*. 1967, vol. 6, issue 4, s. 1152-1159. DOI: 10.1021/bi00856a027. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi00856a027>
16. MICHNIK, Anna, Katarzyna MICHALIK a Zofia DRZAZGA. Stability of bovine serum albumin at different pH. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2005, vol. 80, issue 2, s. 399-406. DOI: 10.1007/s10973-005-0667-9. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10973-005-0667-9>
  17. NAVEENRAJ, Selvaraj a Sambandam ANANDAN. Binding of serum albumins with bioactive substances – Nanoparticles to drugs. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 2013, vol. 14, s. 53-71. DOI: 10.1016/j.jphotochemrev.2012.09.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389556712000639>
  18. PETERS Theodore, Jr. *All About Albumin Biochemistry, Genetics, and Medical Applications* [online]. Burlington: Elsevier, 1995 [cit. 2014-05-02]. ISBN 978-008-0527-048.
  19. ERCELEN, Sebnem, Andrey S. KLYMCHENKO, Yves MÉLY a Alexander P. DEMCHENKO. The binding of novel two-color fluorescence probe FA to serum albumins of different species. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2005, vol. 35, issue 5, s. 231-242. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2005.02.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813005000279>
  20. CHUANG, Victor Tuan Giam a Masaki OTAGIRI. Stereoselective binding of human serum albumin. *Chirality*. 2006, vol. 18, issue 3, s. 159-166. DOI: 10.1002/chir.20237. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/chir.20237>
  21. MAJOREK, Karolina A., Przemyslaw J. POREBSKI, Arjun DAYAL, Matthew D. ZIMMERMAN, Kamila JABLONSKA, Alan J. STEWART, Maksymilian CHRUSZCZ a Wladek MINOR. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Molecular Immunology*. 2012, vol. 52, 3-4, s. 174-182. DOI: 10.1016/j.molimm.2012.05.011. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589012002842>
  22. ANAND, Uttam a Saptarshi MUKHERJEE. Binding, unfolding and refolding dynamics of serum albumins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2013, vol. 1830, issue 12, s. 5394-5404. DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.05.017. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416513002134>
  23. 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*. 2008, vol. 89, issue 12, s. 1088-1103. DOI: 10.1002/bip.21061. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bip.21061>
  24. TURGEON, S.L., C. SCHMITT a C. SANCHEZ. Protein–polysaccharide complexes and coacervates. *Current Opinion in Colloid*. 2007, vol. 12, 4-5, s. 166-178. DOI: 10.1016/j.cocis.2007.07.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359029407000684>
  25. LENORMAND, Hélène, Frédéric TRANCHEPAIN, Brigitte DESCHREVEL a Jean-Claude VINCENT. The hyaluronan–protein complexes at low ionic strength: How the hyaluronidase activity is controlled by the bovine serum albumin. *Matrix Biology*. 2009, vol. 28, issue 6, s. 365-372. DOI: 10.1016/j.matbio.2009.04.008. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0945053X09000572>
  26. LENORMAND, Hélène, Brigitte DESCHREVEL a Jean-Claude VINCENT. Chain length effects on electrostatic interactions between hyaluronan fragments and albumin. *Carbohydrate Polymers*. 2010, vol. 82, issue 3, s. 887-894. DOI:

- 10.1016/j.carbpol.2010.06.011. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861710004662>
27. MOSS, Jonathan M., Marie-Paule I. VAN DAMME, William H. MURPHY a Barry N. PRESTON. Dependence of Salt Concentration on Glycosaminoglycan–Lysozyme Interactions in Cartilage. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1997, vol. 348, issue 1, s. 49-55. DOI: 10.1006/abbi.1997.0365. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003986197903659>
28. BURGESS, D.J. Practical analysis of complex coacervate systems. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1990, vol. 140, issue 1, s. 227-238. DOI: 10.1016/0021-9797(90)90338-O. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002197979090338O>
29. WANG, Y.-f., J.Y. GAO a P.L. DUBIN. Protein Separation via Polyelectrolyte Coacervation: Selectivity and Efficiency. *Biotechnology Progress*. 1996-06-05, vol. 12, issue 3, s. 356-362. DOI: 10.1021/bp960013+. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1021/bp960013>
30. 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*. 2001, vol. 2, issue 2, s. 422-429. DOI: 10.1021/bm005656z. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm005656z>
31. WHEATON, R. M. a W. C. BAUMAN. NON-IONIC SEPARATIONS WITH ION EXCHANGE RESINS. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1953, vol. 57, issue 3, s. 159-176. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1953.tb36394.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.1953.tb36394.x>
32. XU, Shouhong, Junpei YAMANAKA, Shizuko SATO, Isamu MIYAMA a Masakatsu YONESE. Characteristics of Complexes Composed of Sodium Hyaluronate and Bovine Serum Albumin. *CHEMICAL*. 2000, vol. 48, issue 6, s. 779-783. DOI: 10.1248/cpb.48.779. Dostupné z: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/cpb1958/48.779?from=CrossRef>
33. LINDQVIST, BÖRJE a TORSTEN STORGÅRDS. Molecular-sieving Properties of Starch. *Nature*. 1955-3-19, vol. 175, issue 4455, s. 511-512. DOI: 10.1038/175511a0. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/175511a0>
34. GELOTTE, Bertil. Studies on gel filtration. *Journal of Chromatography A*. 1960, vol. 3, s. 330-342. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)97007-4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967301970074>
35. HJERTÉN, Stellan a Rolf MOSBACH. "Molecular-sieve" chromatography of proteins on columns of cross-linked polyacrylamide. *Analytical Biochemistry*. 1962, vol. 3, issue 2, s. 109-118. DOI: 10.1016/0003-2697(62)90100-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269762901008>
36. O'CALLAGHAN, D. M., W. J. DONNELLY, H. M. SLATTERY a D. M. MULVIHILL. Non-Size Exclusion Effects During Gel Permeation Chromatography of Milk Protein Hydrolysates on an FPLC Superose 12 Column. *Journal of Liquid Chromatography*. 1995, vol. 18, issue 8, s. 1543-1562. DOI: 10.1080/10826079508009294. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10826079508009294>
37. ARAKAWA, Tsutomu, Daisuke EJIMA, Tiansheng LI a John S. PHILO. The critical role of mobile phase composition in size exclusion chromatography of protein pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009, n/a-n/a. DOI: 10.1002/jps.21974. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jps.21974>
38. KOPACIEWICZ, W. a F.E. REGNIER. Nonideal size-exclusion chromatography of proteins: Effects of pH at low ionic strength. *Analytical Biochemistry*. 1982, vol. 126,



- issue 1, s. 8-16. DOI: 10.1016/0003-2697(82)90102-6. Dostupné z:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269782901026>
39. ERDNER, Jeanine M., Howard G. BARTH, Joe P. FOLEY a William G. PAYNE. Size-exclusion chromatography using deuterated mobile phases. *Journal of Chromatography A*. 2006, vol. 1129, issue 1, s. 41-46. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.06.073. Dostupné z:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967306012490>
40. YUMIOKA, Ryosuke, Haruna SATO, Hiroshi TOMIZAWA, Yosuke YAMASAKI a Daisuke EJIMA. Mobile phase containing arginine provides more reliable SEC condition for aggregation analysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009, n/a-n/a. DOI: 10.1002/jps.21857. Dostupné z:<http://doi.wiley.com/10.1002/jps.21857>
41. GHRIST, B.F.D., M.A. STADALIUS a L.R. SNYDER. Predicting bandwidth in the high-performance liquid chromatographic separation of large biomolecules. *Journal of Chromatography A*. 1987, vol. 387, s. 1-19. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)94510-8. Dostupné z:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967301945108>
42. LINK, G.W., P.L. KELLER, R.W. STOUT a A.J. BANES. Effects of solutions used for storage of size-exclusion columns on subsequent chromatography of peptides and proteins. *Journal of Chromatography A*. 1985, vol. 331, s. 253-264. DOI: 10.1016/0021-9673(85)80031-5. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0021967385800315>
43. ENGELHARDT, H. a U. M. SCHÖN. Optimal conditions for size exclusion chromatography of proteins. *Chromatographia*. 1986, vol. 22, 7-12, s. 388-390. DOI: 10.1007/BF02268796. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02268796>
44. EJIMA, Daisuke, Ryosuke YUMIOKA, Tsutomu ARAKAWA a Kouhei TSUMOTO. Arginine as an effective additive in gel permeation chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2005, vol. 1094, 1-2, s. 49-55. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.07.086. Dostupné z:<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967305015840>
45. GRITTI, Fabrice, Tivadar FARKAS, Josuah HENG a Georges GUIOCHON. On the relationship between band broadening and the particle-size distribution of the packing material in liquid chromatography: Theory and practice. *Journal of Chromatography A*. 2011, vol. 1218, issue 45, s. 8209-8221. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.09.034. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967311013951>
46. RICKER, R.D. a L.A. SANDOVAL. Fast, reproducible size-exclusion chromatography of biological macromolecules. *Journal of Chromatography A*. 1996, vol. 743, issue 1, s. 43-50. DOI: 10.1016/0021-9673(96)00283-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002196739600283X>
47. GUIOCHON, Georges a Michel MARTIN. Theoretical investigation of the optimum particle size for the resolution of proteins by size-exclusion chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1985, vol. 326, s. 3-32. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)87429-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002196730187429X>
48. BOND, Michael D., Mark E. PANEK, Zheru ZHANG, Dana WANG, Promod MEHNDIRATTA, Hui ZHAO, Keith GUNTON, Alex NI, Michael L. NEDVED, Sudhir BURMAN a David B. VOLKIN. Evaluation of a dual-wavelength size exclusion HPLC method with improved sensitivity to detect protein aggregates and its use to better characterize degradation pathways of an IgG1 monoclonal antibody. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009. DOI: 10.1002/jps.22034. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jps.22034>
49. POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008, 205 s. ISBN 978-80-7080-674-6.

50. WYATT, Philip J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Analytica Chimica Acta*. 1993, č. 272, s. 1-40. Dostupné z: [http://mmrc.caltech.edu/PD\\_Expert/Intros/Light%20Scattering%20and%20MW.pdf](http://mmrc.caltech.edu/PD_Expert/Intros/Light%20Scattering%20and%20MW.pdf)
51. DUPONT, C. Gelatine sizing of paper and its impact on the degradation of cellulose during aging: a study using size-exclusion chromatography: Chapter 4. Size-Exclusion Chromatography (SEC) and Multiangle Light Scattering (MALS) detection: principles and application to the study of cellulose. Amsterdam, 2003. ID 68926. Dostupné z: <http://dare.uva.nl/document/68926>. Dissertation. University of Amsterdam (UvA): Faculty of Science.
52. BROWN Wyn. *Dynamic light scattering: the method and some applications*. Oxford [England]: Clarendon Press; c1993, xvi, 735 s. Monographs on the physics and chemistry of materials. ISBN 978-0-19-853942-1.
53. PECORA, Robert. *Dynamic light scattering: applications of photon correlation spectroscopy*. New York: Plenum Press, c1985, xiv, 420 p. ISBN 03-064-1790-1.
54. TSCHARNUTER, Walther. Photon Correlation Spectroscopy in Particle Sizing. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester, UK: John Wiley, 2006-09-15. DOI: 10.1002/9780470027318.a1512. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470027318.a1512>
55. HARDING, Stephen E. a Kornelia JUMEL. Light Scattering. *Current Protocols in Protein Science*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2001. DOI: 10.1002/0471140864.ps0708s11. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/0471140864.ps0708s11>
56. SARTOR, Marta. Dynamic Light Scattering: to determine the radius of small beads in Brownian motion in a solution. University of California. San Diego Dostupné z: [http://physics.ucsd.edu/neurophysics/courses/physics\\_173\\_273/dynamic\\_light\\_scattering\\_03.pdf](http://physics.ucsd.edu/neurophysics/courses/physics_173_273/dynamic_light_scattering_03.pdf)
57. SVANBERG, Christer a Rikard BERGMAN. Photon Correlation Spectroscopy. September 2005. Dostupné z: [http://fy.chalmers.se/~f1xjk/TIF060/home\\_files/pcstheo.pdf](http://fy.chalmers.se/~f1xjk/TIF060/home_files/pcstheo.pdf)
58. AHRER, K., A. BUCHACHER, G. IBERER, D. JOSIC a A. JUNGBAUER. *Analysis of aggregates of human immunoglobulin G using size-exclusion chromatography, static and dynamic light scattering*. *Journal of Chromatography A*. 2003, vol. 1009, 1-2, s. 89-96. DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00433-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967303004333>