



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE**

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**METODY ROZPTYLU SVĚTLA A KALORIMETRIE VE  
STUDIU SYSTÉMŮ HYALURONAN-ALBUMIN**

STUDY OF HYALURONAN-ALBUMIN SYSTEMS USING LIGHT SCATTERING METHODS AND  
CALORIMETRY

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. Alena Sereda**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**Ing. Martin Chytil, Ph.D.**

**BRNO 2016**



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

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	<b>FCH-DIP1005/2015</b>	Akademický rok: <b>2015/2016</b>
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	<b>Bc. Alena Sereda</b>	
Studijní program:	Chemie pro medicínské aplikace (N2846)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808T031)	
Vedoucí práce	<b>Ing. Martin Chytil, Ph.D.</b>	
Konzultanti:	Ing. Michal Kalina, Ph.D.	

### Název diplomové práce:

Metody rozptylu světla a kalorimetrie ve studiu systémů hyaluronan-albumin

### Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše na téma interakcí hyaluronanu s albuminem, včetně vlivu teploty a fyziologických podmínek.
2. Návrh a provedení experimentů interakcí hyaluronanu a albuminu za fyziologických podmínek pomocí metody SEC-MALLS a zjistit vliv teploty inkubace na sledované interakce.
3. Studium fázového chování systému hyaluronan-albumin ve vodných roztocích pomocí DLS titrací.
4. Návrh, nastavení a provedení experimentů sledování interakcí mezi hyaluronanem a albuminem pomocí titrační kalorimetrie. Nalezení vhodných experimentálních parametrů pro sledování tohoto typu interakcí.
5. Vyhodnocení výsledků.

### Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

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

-----  
Bc. Alena Sereda  
Student(ka)

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

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

V Brně, dne 31.1.2016

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

## **ABSTRAKT**

Tato diplomová práce, která navazuje na předchozí bakalářskou práci, je věnována studiu polyelektrolytových komplexů mezi hyaluronanem (HA) a hovězím sérovým albuminem (BSA). Interakce mezi HA a BSA a tvorba komplexů byly studovány metodou SEC-MALLS, kde byly stanovovány molekulová hmotnost, gyrační a hydrodynamický poloměry a vnitřní viskozita částic systému. Dále byly interakce zkoumány pomocí kalorimetrického měření ITC, kde byl stanoven termodynamický charakter tvorby komplexů. Dodatečně byly aplikovány metody dynamického a elektroforetického rozptylu světla (DLS a ELS), kde byly stanovovány hydrodynamický poloměr a velikost zeta potenciálu částic systému. Byl rovněž zkoumán vliv zvýšené teploty na charakter a tvorbu komplexů při SEC-MALLS a ITC měření. Bylo stanoveno, že k interakcím HA a BSA dochází v jakémkoliv prostředí ale s různou účinností. Bylo také prokázáno, že s rostoucí koncentrací BSA se komplexy zmenšují, snižuje se také vnitřní viskozita komplexů. Dále bylo prokázáno, že velká iontová síla stíní povrchové náboje molekul HA a BSA a brání tak jejím vzájemným interakcím. Při zvýšené iontové síle se rovněž zvyšují stanovené velikosti komplexů, jejich vnitřní viskozita a zeta potenciál. Zvýšená teplota má na tvorbu komplexů pouze minimální vliv.

## **ABSTACT**

This thesis, which is a continuation of the previous Bachelor thesis, is dedicated to the study of polyelectrolyte complexes between hyaluronan (HA) and bovine serum albumin (BSA). Interactions between HA and BSA and a formation of complexes were studied by SEC-MALLS method, where a molar mass, a root mean square (rms) radius, a hydrodynamic radius and an intrinsic viscosity of particles of the system were defined. Furthermore the interactions were studied by calorimetric measurement ITC, where thermodynamic character of complex formation was determined. Additionally, dynamic and electrophoretic light scattering methods (DLS and ELS) were applied, where hydrodynamic radius and a value of the zeta potential were defined. Also the effect of higher temperature on the character and complex formation was examined by SEC-MALLS and ITC measurements. The interactions were confirmed at any of the used media, but with different efficiency. It was also proved that complexes become smaller in their radii and viscosity with growing BSA concentration. Furthermore it was proved, that the high ionic strength hinders surface charges of HA and BSA molecules and minimizes their mutual interactions. At the higher ionic strength the radii of the complexes, their intrinsic viscosity and zeta potential are increased. The higher temperature has only minimal effect on the formation of the complexes.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

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

## **KEY WORDS**

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

## **PROHLÁŠENÍ**

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

.....  
podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Martinu Chytilovi, Ph.D. za poskytnuté odborné rady, a pomoc při vypracování této práce. Rovněž bych chtěla velmi poděkovat svému konzultantu Ing. Michalu Kalinovi, Ph.D. za jeho pomoc při teoretickém zpracování a také za jeho spolupráci a odborné rady při experimentálním vypracování této diplomové práce.

## OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>8</b>
<b>2.1. Hyaluronan</b> .....	<b>8</b>
<b>2.2. Albumin</b> .....	<b>11</b>
2.2.1. Struktura molekuly albuminu .....	11
2.2.2. Vazebná afinita .....	11
<b>2.3. Polyelektrolytové komplexy</b> .....	<b>13</b>
2.3.1. Interakce polysacharid – protein .....	14
<b>2.4. Interakce molekul hyaluronanu a hovězího sérového albuminu</b> .....	<b>16</b>
2.4.1. Vliv Iontové síly .....	17
2.4.2. Vliv pH .....	17
2.4.3. Vliv poměru molekul proteinu k molekulám polysacharidu .....	18
<b>2.5. SEC 19</b> .....	
2.5.1. Teorie vylučovací chromatografie .....	20
<b>2.6. MALLS</b> .....	<b>21</b>
2.6.1. Důležitost inkrementu indexu lomu při analýze rozptylu světla polyelektrolyty .....	26
2.6.2. Aplikace metody SEC MALLS pro analýzu biopolymerů .....	26
<b>2.7. Viskozitní detektor</b> .....	<b>28</b>
<b>2.8. Dynamický rozptyl světla</b> .....	<b>29</b>
2.8.1. Aplikace metody DLS pro analýzu biopolymerů .....	31
<b>2.9. Zeta potenciál</b> .....	<b>33</b>
<b>2.10. Isotermní titrační kalorimetrie</b> .....	<b>36</b>
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>40</b>
<b>3.1. Materiály</b> .....	<b>40</b>
<b>3.2. Metody</b> .....	<b>40</b>
3.2.1. Příprava zásobních roztoků .....	40
3.2.2. SEC-MALLS příprava vzorků .....	40
3.2.3. SEC-MALLS měření vzorků .....	41
3.2.4. DLS měření vzorků .....	42
3.2.5. Měření ITC .....	42
<b>4. VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>43</b>
<b>4.1. Řada BSA</b> .....	<b>43</b>

4.1.1. Výsledky SEC-MALLS měření .....	43
4.1.2. Vliv zvýšené teploty na BSA v pufru pH 7 .....	45
4.1.3. Výsledky isothermní titrační kalorimetrie .....	45
<b>4.2. Řada s nízkomolekulovou HA (340 kDa).....</b>	<b>46</b>
4.2.1. Výsledky SEC-MALLS měření .....	47
4.2.2. UV-VIS signál u měření SEC-MALLS .....	50
4.2.3. Vliv zvýšené teploty na komplexy NMHA a BSA (SEC-MALLS měření) .....	52
4.2.4. Výsledky DLS měření .....	54
4.2.5. Zeta potenciál částic (DLS měření) .....	56
4.2.6. Měření pH hodnoty (DLS měření) .....	56
4.2.7. Výsledky ITC měření .....	57
<b>4.3. Řada s vysokomolekulovou HA (1500-1750 kDa) .....</b>	<b>58</b>
4.3.1. Výsledky SEC-MALLS měření .....	58
4.3.2. Vliv zvýšené teploty na komplexy VMHA a BSA (SEC-MALLS měření).....	62
4.3.3. UV-VIS signál u měření SEC-MALLS .....	64
4.3.4. Výsledky DLS měření .....	66
4.3.5. Zeta potenciál částic (DLS měření) .....	71
4.3.6. Měření pH hodnoty (DLS měření) .....	72
4.3.7. Výsledky ITC měření .....	74
<b>5. ZÁVĚR .....</b>	<b>78</b>
<b>6. REFERENCE .....</b>	<b>80</b>

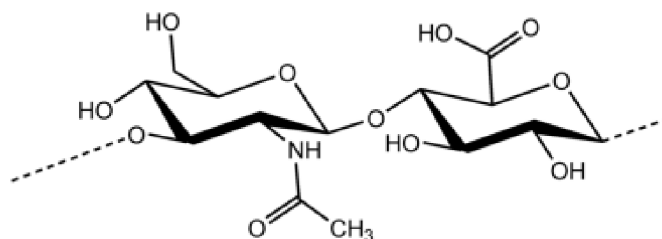
## 1. ÚVOD

Studium interakcí mezi polyelektrolyty je zajímavé z hlediska široké možnosti jejich praktického uplatnění a to v různých odvětvích. Interakce mezi polyelektrolyty přirozeně probíhají jak v přírodě, tak i v lidském těle, jsou většinou reverzibilní a vyskytují se za určitých podmínek. Interakce mezi hyaluronovou kyselinou a albuminem je jedním z příkladů takových interakcí. Tyto dva polyelektrolyty mají zajímavé vlastnosti a jejich komplexy by mohly najít své uplatnění jak v medicíně, tak i v průmyslu. Jsou to biokompatibilní a biodegradabilní biopolymery, což z nich dělá výborný výchozí materiál pro aplikace v medicíně. Hyaluronan je rovněž signální molekulou mnoha buněčných receptorů, což může být využito při směřování a lokalizaci jeho výsledných komplexů s albuminem v určitých částech živého organismu. Albumin je významný protein, který je schopen vázat širokou škálu léčiv a jiných molekul. Ve výsledku, komplexy polyelektrolytů hyaluronanu a albuminu by mohly mít velký potenciál při cílené distribuci léčiv v organismu. Cílem této diplomové práce je prozkoumat charakter interakcí hyaluronanu a albuminu pomocí metod SEC-MALLS, DLS a ITC. SEC-MALLS a DLS jsou metody založené na detekci rozptylu světla. SEC-MALLS využívá výhodného spojení rozměrově vylučovací chromatografie a detekce statického rozptylu světla, což umožňuje stanovení molekulové hmotnosti a dalších základních částicových charakteristik jako je hydrodynamický poloměr částic, gyrační poloměr či konformace polymerů. DLS je metoda založená na měření dynamického rozptylu světla částicemi vykonávajícími Brownův pohyb v roztoku. ITC neboli izotermická titrační kalorimetrie je metoda založena na měření tepelného toku, způsobeného probíhající interakcí mezi jednotlivými komponentami ve studovaném systému. Dodatečně měření zeta potenciálu komplexů hyaluronanu a albuminu má za úkol poskytnout doplňující informace o náboji a stabilitě zkoumaných polyelektrolytových komplexů. Kompletní výsledky ze všech měření mají poskytnout informaci o termodynamice probíhajících interakcí, vznikajících komplexech, jejich molekulové hmotnosti, poloměrů, vnitřní viskozitě a stabilitě. Zpracování těchto informací by mělo napomoci při stanovení celkového charakteru tvorby komplexů hyaluronové kyseliny a albuminu.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

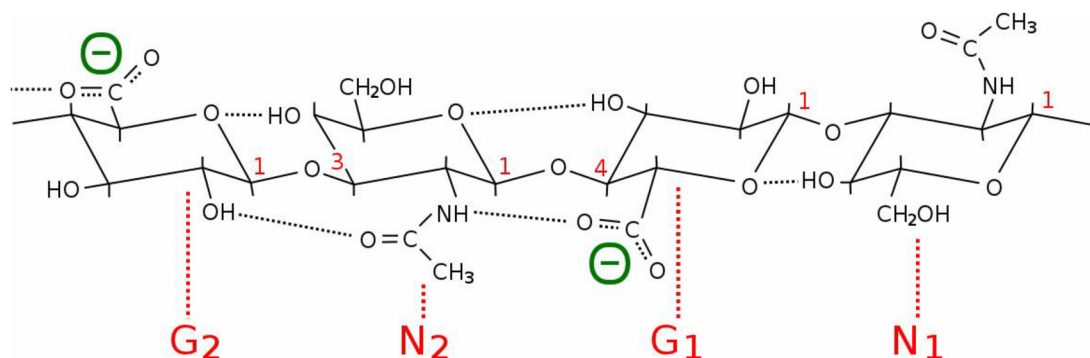
### 2.1. Hyaluronan

Hyaluronová kyselina je polysacharid přirozeně se vyskytující u všech obratlovců. Je to lineární aniontový polyelektrolyt s karboxylovými funkčními skupinami, 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 spojené  $\beta$ -1,4-glykosidickou vazbou. Jedna taková jednotka má hmotnost 415 Da a délku přibližně 1 nm. Jedná molekula hyaluronanu může obsahovat až 10 000 takových monomerních jednotek (4 MDa, 10  $\mu$ m).

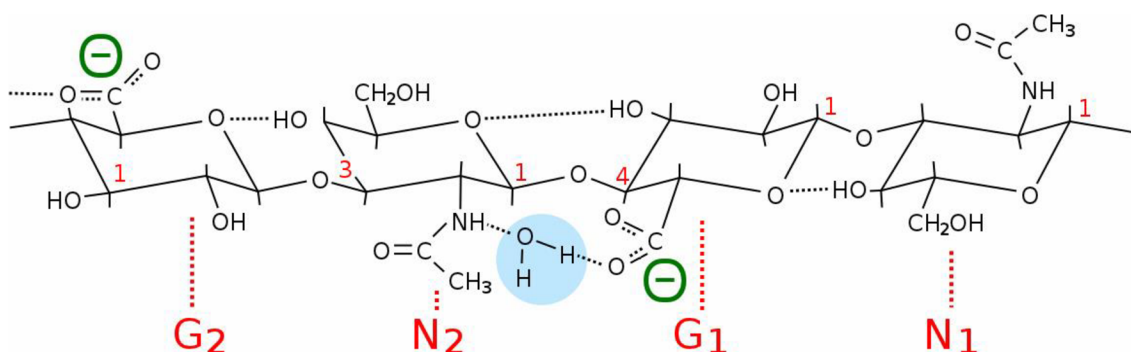


Obrázek 1. Struktura kyseliny hyaluronové

Axiální vodíky tvoří hydrofobní části molekuly. Objemné hydroxylové a karboxylové skupiny v ekvatoriálních polohách jsou hydrofilní povahy. Za stabilizaci molekuly odpovídají vodíkové můstky. Ve vodě jsou nahrazeny tzv. „vodními můstky“, kdy se do vodíkových vazeb zabudují molekuly vody (viz Obrázek 2, Obrázek 3).



Obrázek 2. Vodíkové můstky v molekule HA



Obrázek 3. "Vodné můstky" v molekule HA

Molekula HA má amfifilní povahu, její helikální struktura je stabilizována vodíkovými můstky. V roztoku HA zaujímá finální konformaci nahodilého klubka. Tato specifická struktura spolu s vysokým obsahem OH skupin způsobuje hygroskopicitu molekuly. Kyselina hyaluronová tak je schopná zachytit množství vody až o 1000x větší než je celková hmotnost



samotné molekuly [1]. S těmito vlastnostmi souvisí i jedna ze zásadních funkcí kyseliny hyaluronové v organismu – zadržování vody.

Její hydroxylové skupiny mají hodnotu disociační konstanty  $pK_a = 2,9$  [2] a proto se za fyziologických podmínek (pH 7,2 - 7,4) molekula vyskytuje jako sodná sůl.

Analýza a kvantifikace hyaluronové kyseliny je možná pomocí několika metod. Nejstarší a nejvíce využívanou metodou je karbazolová metoda pro detekci kyseliny uronové, kde principem je detekce barevného produktu uronové kyseliny a karbazolu po předchozí degradaci polysacharidu [3]. Jiná modernější metoda je například imunoreakce s proteiny, které mají vazebnou afinitu vůči hyaluronanu. Takové proteiny slouží jako protilátky pro detekci kyseliny hyaluronové metodou ELISA [4]. Pro stanovení molekulové hmotnosti je možnost využít dalších metod jako kapilární elektroforéza a gelová permeační chromatografie [5].

Hyaluronan je zcela biokompatibilní látka. Degraduje na látky, které organismus dokáže využít v navazujících se metabolických dráhách.

Nejvíce je zastoupena v extracelulárním matrixu (ECM) buněk synoviální tekutiny, pupeční šňůry a očního sklivce savců. Ale také se nachází v různých koncentracích v celém těle. Největší její koncentrace je v měkkých pojivových tkáních, a nejmenší je v krvi.

Syntéza probíhá na plasmatické membráně pomocí enzymů syntáz, což jsou integrální membránové proteiny trojího druhu: HAS1, HAS2, HAS3 [6]. Jako substráty pro syntézu slouží nukleotidové prekurzory UDP-glukuronová kyselina a UDP-N-acetylglukosamid. Syntéza HA probíhá směrem od redukujícího konce [80]. Průmyslově se syntetizuje pomocí bakterii *Streptococcus equi* (nízkomolekulová HA), a *Streptococcus zooepidemicus* (vysokomolekulová až 2 MDa). Izoluje se ale v menší míře také z kohoutích hřebínků, pupeční šňůry a jiných měkkých tkání obratlovců.

Degradaci HA, na druhé straně, způsobují enzymy hyaluronidáza (hyáza),  $\beta$ -D-glukuronidáza a  $\beta$ -N-acetyl-hexosaminidáza. Tyto enzymy jsou převážně intracelulární. Hyáza štěpí vysokomolekulovou HA na oligosacharidovou HA, kdy  $\beta$ -D-glukuronidáza a  $\beta$ -N-acetyl-hexosaminidáza degradují oligosacharidy [8]. 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, a rychlost její degradace se liší podle lokalizace (od pár hodin až po několik dnů). Každý den se v těle vymění zhruba 1/3 množství celkové hyaluronové kyseliny přítomné v organismu. Její degradace začíná většinou endocytózou uskutečněnou buňkami okolní tkáně, pokračuje jejím transportem do lymfatických uzlů anebo do krevního řečiště a následně ukončena degradací v játrech. Její cirkulace v krevním řečišti trvá pouze několik minut, kdy potom následně je odbourána v endoteliálních buňkách jater [4]. Po její endocytóze buňkami je enzymaticky odbourána v lysozomech hyaluronidázami.

Hyaluronan slouží jako stabilizátor extracelulárního matrixu buněk. Po vazbě na určité proteoglykany (např. agrekany) a povrchové receptory buněk vytváří hustou polymerní síť proteoglykanu chránící prostředí buňky proti difúzi nežádoucích molekul. Přítomnost takové sítě v kloubech umožňuje vysokou rezistenci proti aplikované mechanické zátěži [9]. Obecně se takový obal z hyaluronové kyseliny intenzivně tvoří při pochodech spojených s migrací buňky a také při mitóze [4].

Za určitých podmínek může probíhat rovněž štěpení HA na kratší fragmenty [10]. V závislosti na své molekulové hmotnosti HA může vykonávat různé funkce v organismu [11]. Nízkomolekulová HA s velmi krátkým řetězcem (cca 6 kDa) má například angiogenní schopnosti (tvorba nových kapilár) [12] ale také aktivuje genovou expresi makrofágů, což ve výsledku podporuje vznik zánětů. Vysokomolekulová HA má naopak protizánětlivé účinky,

kvůli tomu že vytvoří viskóznější prostředí, které zamezí pohybu makrofágů a leukocytů. Obecně lze shrnout, že za fyziologických podmínek HA je přítomná v extracelulárním matrixu jako vysokomolekulový polymer o molekulové hmotnosti v řádech MDa, při poškození tkáni se však štěpí na fragmenty nízkomolekulové HA, které při molekulových hmotnostech nižších než 100 kDa, mohou být signálními molekulami, a jejich následná vazba na receptory může vyvolávat imunitní odpověď vedoucí k zánětlivým reakcím [13]. Nízkomolekulová HA je většinou signálem „nebezpečí“ pro organismus a proto její přítomnost v okolí rakovinné tkáně by mohla být signálem pro degradaci poškozené tkáni buňkami imunitního systému a následně mít vliv na inhibici rakovinového bujení [14].

Hyaluronan slouží jako biologický lubrikant v organismu, a to kvůli svým viskoelastickým vlastnostem pseudoplastické kapaliny. Za klidového stavu je roztok hyaluronanu vysoce viskózní kapalina, při aplikovaném tečném napětí a silovém působení však snižuje svou viskozitu. Je to důsledkem vzájemného propletení řetězců vysokomolekulové HA, které při působení fyzického namáhání (např. smykové rychlosti) rozplétají, což má za následek snížení viskozity. Nízkomolekulová HA však v určitém rozsahu molekulových hmotností se v roztoku chová jako newtonovská kapalina, tj. nedochází u ní k proplétání řetězců.

Jelikož HA je substrátem pro spoustu extracelulárních enzymů, má rovněž důležitou regulační funkci (hlavně nízkomolekulová HA). Reguluje tak vazbu mezi buňkami, jejich migraci, diferenciaci, proliferaci, mitózu ale také i bujení rakovinné tkáně a zánětlivé procesy [15,16]. Kyselina hyaluronová má také významný vliv na embryogenezi.

Některé z receptorů vázající HA jsou: CD44, TSG6, GHAP, LYVE-1, RHAMM. Z nich jsou dva, CD44 a RHAMM, nejvýznamnější při vývoji rakoviny [15]. Tyto receptory mají extrémně vysokou afinitu k HA. Tuto vazbu na receptory je možné využít pro cílenou distribuci léčiva biokonjugovaného s hyaluronanem. V početných studiích bylo objeveno, že rakovinné buňky mají na svém povrchu zvýšený počet receptorů CD44 a RHAMM, které se podílí na migraci a proliferaci buněk a podporují tak rakovinné bujení, kromě toho bylo prokázáno, že rakovinné buňky akumulují ve svém okolí větší množství vysokomolekulové hyaluronové kyseliny. Vazba extracelulárního hyaluronanu na CD44 receptor u zdravé buňky probíhá pouze po předchozí aktivaci receptoru. Za určitých podmínek (většinou doprovázejících zánětlivé reakce) taková vazba může vyvolat endocytózu a následné štěpení molekuly polysacharidu. V rakovinných buňkách je však receptor CD44 již konstantně aktivovaný a intenzivně váže molekuly HA. Receptor RHAMM je na druhé straně zodpovědný převážně za pohyb buňky a je schopen vázat komponenty cytoskeletálního systému. Specifickou afinitu CD44 a RHAMM receptorů vůči hyaluronanu je možné využít pro formulaci potenciálních systémů pro cílenou distribuci léčiv, zejména pro léčbu rakoviny. Existuje několik principů léčby rakoviny, které jsou založené na interakcích výše zmíněných receptorů s hyaluronanem. Jednak je možné inkorporovat určité protilátky s afinitou vůči CD44 a RHAMM receptorům, které mají za úkol potlačit vazbu HA na receptor. Jiná možnost je použití degradujícího polysacharid enzymu hyaluronidázy, který eliminuje polysacharid z okolí rakovinné buňky a dělá ji tak více přístupnou pro léčivou látku. Dále se také používají krátké oligosacharidové řetězce HA, které jako v případě protilátek vytlačují vysokomolekulovou HA z receptorů. Kromě toho takové krátké úseky jsou signálními molekulami, které aktivují imunitní odpověď. Další široce využívanou metodou je biokonjugace léčiva s hyaluronovou molekulou, která se váže na receptor rakovinné buňky, a takový biokonjugát potom hraje roli cíleného dopravce léčiva [17].

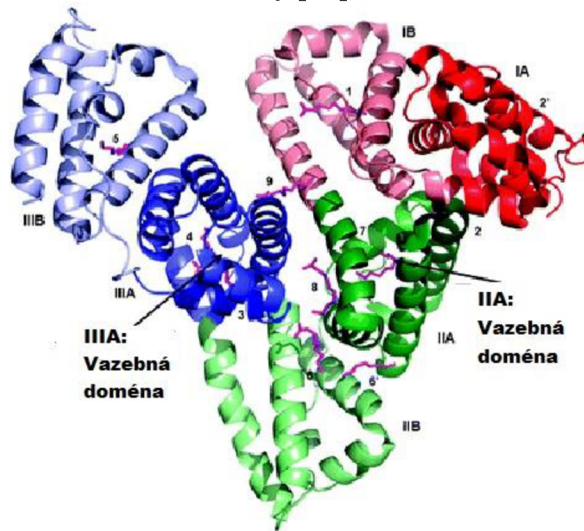
Mimo léčby rakoviny existují i jiné praktické aplikace kyseliny hyaluronové. Používá se například při injekci do synoviální tekutiny kloubu, při očních operaci a hojení ran (scaffoldy a různé obvazy). Takové aplikace hyaluronanu umožňují jeho unikátní viskoelastické vlastnosti, biodegradovatelnost a biokompatibilita a v neposlední řadě jeho schopnost absorpce a udržení velkého množství vody ve své struktuře.

## 2.2. Albumin

Albumin je nejrozšířenější protein vyskytující se v krevní plazmě, s obsahem v rozmezí 52-60 hm.% plazmy [18], a s příslušnou koncentrací 0,6 mM [19], kvůli čemuž se také výrazně podílí na osmotickém tlaku v krevních cévách. Syntéza proteinu probíhá v parenchymálních buňkách jater, a do krevního řečiště se dostává ve formě neglykosilovaného proteinu. Životnost albuminu v krvi je zhruba 36 dní [20].

### 2.2.1. Struktura molekuly albuminu

Molekulová hmotnost albuminu je přibližně 66 kDa. Jeho primární struktura je polypeptidový řetězec obsahující 585 aminokyselin (u albuminu lidského séra, 583 u BovineSA). Sekundární a terciární struktura proteinu je stabilizována pomocí 17 disulfidických můstků, molekula obsahuje také volnou thiolovou SH skupinu, díky čemuž je schopná tvorby dimerů. Aktivní molekula albuminu má globulární terciární strukturu, která se skládá z třech helikálních domén (I, II a III). Každá taková doména se skládá ze dvou subdomén (A, B), které představují 4 až 6 mezi sebou spojených helixů [21,22], přičemž  $\alpha$ -helikální struktura tvoří 67% celé molekuly [23].



Obrázek 4. Terciární struktura albuminu

Izoelektrický bod (pI) BSA (Bovine Serum Albumin) je 4,7. Náboj proteinu při fyziologickém pH je záporný a roven  $-18 C$  u Human Serum Albumin (HSA) a  $-15 C$  u BSA [21,23,24]. Struktura proteinu je pochopitelně závislá na pH prostředí [21,25]. Například při pH od 4,5 do 7 je globulární, při pH od 4,0 do 4,5 je částečně rozbalená (náhodné klubko).

Obecně albumin má vysoký obsah Cysteinu a nízký obsah Tryptofanu. Albumin ze séra hovězího skotu se shoduje s albuminem lidské krevní plazmy z 76% [22]. Rozdíl BSA je hlavně v obsazení 1 Tryptofanu navíc [21].

### 2.2.2. Vazebná afinita

BSA váže nesespecificky 3 kationty  $Ca^{2+}$  prostřednictvím třech vazeb v doméně I, díky čemuž udržuje 45% celkového obsahu vápníku vyskytujícího v krevní plazmě. S nižší afinitou váže rovněž ionty  $Mg^{2+}$ , a to ve stejném množství [21].

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 helikálních struktur a tvorbu struktury náhodného klubka a v některých případech i denaturaci.

Aktivní léčivé látky se většinou váží buď přes doménu IIA, nebo IIIA [26]. IIA doména zprostředkuje spíše hydrofobní interakce, IIIA – buď hydrofobní, vodíkové vazby, nebo elektrostatické interakce [27]. Když jsou interakce hydrofobní, dochází ve většině případů k minimálním změnám v konformaci proteinu, při elektrostatických interakcích dochází ke změně konformace.

Albumin již dávno byl studován z hlediska schopnosti interagovat s velkou škálou látek. Příkladem jsou různé detergenty, léky, polymery, liposomy a nanomaterialy.

### ***Vazba detergentů***

Existuje několik studií vazby albuminu na molekuly povrchově aktivních látek a surfaktantů jako SDS (dodecyl sulfát sodný) [28], CPC (cetylpyridinium chlorid) [29] CTAB (cetyltrimethylammonium bromid) [30]. V těchto relevantních studiích byla popsána silná vazba detergentu na molekulu albuminu. V závislosti na délce své hydrofobní části, tyto detergenty mají různý vliv na výslednou strukturu molekuly proteinu. Bylo prokázáno, že detergenty s větší délkou hydrofobní části, způsobují větší změnu ve struktuře albuminu, který ztrácí větší část své helikální struktury [31]. Bylo také odvozeno, že větší koncentrace surfaktantu způsobují částečnou denaturaci albuminu, zatímco menší – naopak, stabilizují jeho strukturu proti denaturačním podmínkám. [32] Při vazbě surfaktantu se mohou uplatnit jak hydrofobní interakce a vodíkové vazby, tak i elektrostatické interakce, což ve výsledku ovlivňuje entalpii nebo entropii reakce. Pomocí kalorimetrického měření, bylo objeveno, že při nižší koncentraci CPC, je interakce exotermická a na teplotě nezávislá, nicméně při vyšších koncentracích, je tato reakce již endotermická [29].

### ***Vazba aktivních léčivých látek***

Při studiu interakcí molekul aktivní léčivé látky s albuminem, bylo objeveno, že i přes velkou podobnost struktury albuminu z hovězího a lidského sera, jejich vazebné domény mají rozdílnou afinitu vůči aktivním léčivým látkám. Při studiu interakcí s molekulou tetracyklinu (TC) U. Anand a spol. objevili, že při nižších poměrech léčivé látky k proteinu, vazba způsobila částečnou denaturaci, když při vyšších poměrech této látky, naopak stabilizaci helikální struktury proteinu. Dalším jejich objevem bylo, že vazba je řízená entalpií [33]. Charakter vazby je také v mnoha případech závislý na hodnotě pH. Při studiu vazby Ciprofloxacin Hydrochloridu (CpH) bylo stanoveno, že při fyziologickém pH 7,4 vazba byla endotermická a řízená entalpií přes hydrofobní interakce, když při pH 4,5 nebo 9,2 vazba byla již exotermická a řízená změnou entropie s uplatněním vodíkových a van der Waalových vazeb [34].

### ***Vazba polymerů***

Jak v případě detergentů a aktivních léčivých látek, vazba albuminu na molekuly polymerů a dendrimerů může probíhat jak přes polární vazby, tak i přes hydrofobní interakce a vodíkové můstky. Bylo stanoveno, že při vazbě na molekulu dendrimerů složených s různých polymerů, albumin ztrácí velkou část své sekundární a terciární struktury, a rovněž se drasticky snižuje jeho helikální obsah (částečně denaturuje). Také bylo objeveno, že zavedené aminoskupiny v molekule takových dendrimerů zvyšují sílu interakcí s proteinem [35]. Ve studiu vazby albuminu na poly(N-isopropylakrylamid) (PNIPAM) Chen a spol. stanovili, že interakce se uskutečňují hlavně kvůli vodíkovým vazbám a hydrofobním interakcím, což ve výsledku výrazně ovlivní strukturu albuminu [36].

### **Vazba na lipidy**

Lipidy jsou hlavní složkou liposomů, které mají velký potenciál jako cílené distributory léčiv. Proto studium jejich interakci s albuminem, jakožto s nejvíce zastoupeným proteinem v krevní plasmě, je velmi zajímavé z hlediska jejich potenciálního uplatnění v medicíně. Podle charakteru a struktury lipidů se liší charakter interakcí s albuminem. Bylo objeveno, že lipidy typu cholesterol a DOPE se jeví jako stabilizátory struktury albuminu a navíc zvyšují helikální podíl v jeho struktuře. Na druhé straně, kationické lipidy (DDAB a DOTAP), stejně jako v případě detergentů, způsobují částečnou denaturaci albuminu. Lipidy jako cholesterol se vážou na molekulu albuminu jak elektrostaticky tak i se zapojením hydrofobních interakcí, naopak kationické lipidy se vážou převážně hydrofobními vazbami [37].

### **Vazba na nanomateriály**

Interakce albuminu s nanomateriály je silně ovlivněna strukturou zvoleného nanomateriálu. Ve výzkumu zabývajícím se interakcemi proteinu se zlatými nanočásticemi, bylo zjištěno, že nanočástice se vážou entalpicky bez výrazného ovlivnění struktury. Naopak na zlaté nanotyčinky se vážou již entropicky a způsobují výraznou ztrátu sekundární a terciární struktury albuminu a uvolnění molekul vody [38]. Různé funkcionalizace a derivatizace povrchu nanomateriálu jsou rovněž schopné ovlivnit vazbu s albuminem. Nanočástice modifikované citrátem na povrchu po vazbě molekuly albuminu vykazovaly zvětšení jejich hydrodynamického poloměru. Dle práce [39] však nebyla objevena žádná interakce při modifikaci povrchu nanočástic pomocí polyethylenglykolu (PEG).

## **2.3. Polyelektrolytové komplexy**

Studium elektrostatických interakcí mezi polyelektrolyty biologického a syntetického původu je předmětem zájmu vědců již poměrně dlouhou dobu.

Komplexy polyelektrolytů a proteinů například byly zkoumány z hlediska jejich praktického uplatnění při separaci proteinů [40], možnosti imobilizace nebo stabilizace enzymů v polyelektrolytových komplexech [41], a modifikaci afinity substrátu vůči proteinu [42]. Jako další možné využití komplexů proteinu s polyelektrolyty je ochrana proteinu vůči denaturaci při vysokých teplotách, a to díky zvýšenému elektrostatickému odpuzování komplexů proteinu s polyelektrolytem ve srovnání s molekulami čistého proteinu v roztoku [43].

Existuje určité množství dosavadních poznatků ze studií systémů různých polyelektrolytových komplexů. Každý takový systém se chová vždy trochu jinak, jelikož charakteristika proteinu a polyelektrolytových řetězců má zásadní vliv na chování výsledných komplexů. Pro každý takový komplex však platí určitá obecná pravidla [44]:

- Ještě před bodem ekvivalence, odpovídajícím vzájemné kompenzaci povrchových nábojů, fázové separaci a intenzivní tvorbě nerozpustných komplexů existuje určitý poměr množství obou polyelektrolytů odpovídající iniciační tvorbě rozpustných komplexů.
- Při určitém poměru množství molekul proteinu k množství molekul polyelektrolytu, kdy dochází k vzájemné neutralizaci povrchových nábojů obou molekul, jsou komplexy neutrální a agregují do větších koacervátů
- Iontová síla stíní povrchové náboje obou makromolekul a při vyšší koncentraci je dokonce schopná vyvolat disociaci polyelektrolytových komplexů
- Když jeden z polyiontů je silným polyelektrolytem, probíhá převážně tvorba nerozpustných komplexů
- Teplota nemá vliv na tvorbu polyelektrolytových komplexů, pokud uvažujeme pouze elektrostatickou povahu interakcí, řízených entropicky.

Bylo prokázáno, že hodnota pH při které se uskuteční fázová separace takových komplexů je silně závislá na poměru koncentraci polyelektrolytu a proteinu a také na iontové síle [45].

Byla také zkoumána závislost charakteru komplexů na hustotě povrchového náboje obou komponent. Studium bylo provedeno pomocí turbidimetrických titrací a dynamického rozptylu světla. Byly vybrány několik kationických (poly(dimethyldiallyl ammonium chlorid) DMDAAC, homopolymer N,N,N-(trimethylamino)ethyl chlorid akrylátu LBN52b) a několik aniontových (polystyrenulfonát PSS, polyvinylsulfát PVS, poly(((2-akrylamido)propyl methyl sulfát] PAMPS) polymerů syntetického původu. Zkoumané proteiny byly BSA, RNAza a lysozym. Při konstantním poměru polymeru k proteinu a iontové síle, byla postupně měněna hodnota pH. Bylo objeveno zvýšení turbidity při určitých hodnotách  $pH_{\phi}$ , odpovídajících vzájemné neutralizaci povrchových nábojů proteinu a polymeru, jejich následné fázové separaci a agregaci do větších sedimentujících komplexů. Byla také objevena hodnota  $pH_c$  odpovídající tvorbě rozpustných komplexů polymer-protein, kde se turbidita zvýšila, ale ne tak výrazně jako v případě fázové separace. Zajímavým objevem byla výrazná disymetrie hodnot pH fázové separace a tvorby rozpustných komplexů pro aniontové a kationtové polymery. Vznik komplexů mezi BSA a kationickými polymery vyžadovalo výrazně negativního povrchového náboje proteinu, ale v případě použití polyaniontu, vznik komplexu byl pozorován při pH odpovídajícím izoelektrickému bodu BSA, a dokonce i při pH větší než pI, kdy protein nese negativní náboj. Toto může být důkazem nerovnoměrné distribuci náboje na povrchu molekuly BSA, a pravděpodobnou existenci pozitivně nabitých domén, i při celkově negativním náboji molekuly. Měření DLS definovalo pH hodnoty odpovídající fázové separaci a vzniku komplexu. Vznik těchto komplexů byl provázen výskytem piku intenzity odpovídajícímu pomalejšímu částicím s větším poloměrem [46].

### 2.3.1. Interakce polysacharid – protein

Konkrétním příkladem interakcí polyelektrolytů, jsou interakce mezi polysacharidy a proteiny. Při smíchání obou biopolymerů obecně dochází k elektrostatickým interakcím a může se následně objevit fázová separace, která vzniká dvěma odlišnými mechanismy. První je koacervace komplexů (asociativní agregace) a druhý je termodynamická inkompatibilita komplexů (segregační mechanismus). Termodynamická inkompatibilita se může projevit při vysoké iontové síle, a také při pH vyšším než izoelektrický bod proteinu. Termodynamická inkompatibilita se může však také projevit jako omezená mísitelnost obou polymerů, v případě neutrálních nebo stejně nabitých molekul.

Většinou je protein schopen tvořit komplex s polysacharidem, a to když nese pozitivní náboj, takže při hodnotě pH pod pI. Většinou se polyelektrolytové komplexy tvoří v rozsahu pH hodnot mezi  $pK_a$  hodnotou polysacharidu a pI hodnotou proteinu. Když se jedná o pouze elektrostatickou povahu interakcí, komplexy jsou reverzibilní, když však se zapojují další typy interakcí, jako vodíkové vazby, hydrofobní interakce a van der Waalsove síly, komplexy mají ireverzibilní charakter. Takové ireverzibilní interakce se uplatňují při vzniku velkých koacervátů z komplexu, kdy povrchový náboj biopolymerů je navzájem neutralizován.

I přesto, že obecně vazba dvou molekul je řízená enthalpií, v případě interakcí mezi polyelektrolyty se výrazně zvyšuje entropie, a to díky uvolnění velkého počtu protiiontů a molekul vody. Ve výsledku proto celková změna entropie je řídicí silou vzniku polyelektrolytových komplexů.

Z předchozích úvah logicky vyplývá, že tvorba polyelektrolytových komplexů je silně závislá na pH a iontové síle. Hodnota pH ovlivňuje výsledný poměr proteinu k polysacharidu neboli stechiometrii komplexů, a také rozpustnost těchto komplexů.

Zajímavý jev je hystereze rozpustnosti komplexů, připravovaných různou cestou. Tento jev byl objeven při studiu systému albuminu a sulfátu dextranu. Při smíchání proteinu

a polyaniontu za podmínek vedoucích k silné vzájemné interakci (pH hodně nižší, než pl albuminu) se vytvořily nerozpustné komplexy. Při postupném zvyšování pH došlo k jejich disociaci, ale po opětovném snížení pH komplexy zůstaly rozpustné. Taková disymetrie je pravděpodobně důsledkem odlišného způsobu vazby molekul albuminu za různých podmínek [47,48]. Stejný jev hysterezi je možné objevit při manipulaci s iontovou silou [49].

Při tvorbě komplexů blízko hodnoty pl proteinu byl objeven další jev tzv. kooperativní adsorpce proteinu, kdy byla objevena výrazná nehomogenita distribuce molekul proteinu podél řetězce polysacharidu. Příčinou toho je vazba agregátů molekul proteinu, které se tvoří při pH blízko pl. Dalším důvodem takové kooperativní adsorpce může být určitá konformační změna řetězce polyaniontu po vazbě molekuly proteinu. Taková vazba může způsobit lokální síťování a zvýšení lokální hustoty náboje řetězce polyaniontu, což způsobí intenzivnější lokální adsorpci proteinových molekul [48,49].

Stabilitu takových polyelektrolytových komplexů proti zvýšené iontové síle a vysokým pH hodnotám (vyšším než pl) je možné zvýšit pomocí denaturace proteinové komponenty nebo zavedením bivalentního kationtu (např.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ). Bivalentní kation zde slouží jako síťovací činidlo, čímž zvyšuje stabilitu vazby. Denaturace proteinu na druhé straně vede ke zvýšení podílu hydrofobních, vodíkových a koordinačních vazeb s polysacharidem [50,51].

Komplexy proteinů a polysacharidů mají široké možnosti praktického využití. Mohou být použity pro zvýšení náboje a následně rozpustnosti a stability proteinů v roztoku.

Hydrofilita komplexů se definuje počtem volných povrchových skupin a tím i celkovým povrchovým nábojem. Čím méně je těch volných skupin, tím menší je hydrofilita, ale kompaktnější struktura komplexu. Této vlastnosti je možné využít pro selektivní precipitaci proteinu neboli frakcionaci.

Další možností je stabilizace olejových emulzí pomocí vrstvy polyelektrolytových komplexů, která má vysokou povrchovou aktivitu a viskozitu. Taková vrstva je využívána rovněž při enkapsulaci různých látek, postupným snižováním pH.

Tvorbou komplexu polysacharidu s enzymem, je možné také ovlivnit pH závislost enzymatické aktivity. Vazba na polysacharid je schopná zachovat například aktivitu trypsinu i při vyšších pH [52].

Existuje početné množství studií tvorby a charakteru komplexů polysacharidů a proteinů. Ball a spol. například studovali interakce mezi poly(allylamin hydrochloridem) a BSA. Pomocí turbidimetrie a mikrokolorimetrie ve své studii potvrdili stínící efekt vysoké iontové síly, která brání interakcím. Použitím DLS metody rovněž stanovili větší velikost částic při fázové separaci komplexů a rovněž za vyšší iontové síly. Měření titrační kalorimetrie potvrdili, že proces asociace je endotermický, a je řízen změnou entropií, kdy největší příspěvek ke zvýšení entropie mělo uvolnění velkého množství protiiontů do roztoku [53].

Weinbreck a spol. v jiné studii komplexů karagenanu a Whey proteinu rovněž potvrdili závislost rozpustnosti komplexů na iontové síle a na poměru množství proteinu k polymeru. Objevili také, že přidání bivalentního vápenatého kationtu výrazně zvýší pH hodnoty, odpovídající fázové separaci komplexů, což může být odůvodněno zapojením jiných než elektrostatických vazeb. Dalším jejich objevem při turbidimetrickém měření bylo to, že malá iontová síla (45 mM NaCl) podporuje tvorbu komplexů, kdy protiionty soli dokážou odstínit náboj komplexů a způsobí jejich agregaci. Dále rovněž objevili zvýšení pH hodnoty po přidání malého množství proteinu k roztoku karagenanu v nepřítomnosti soli, což bylo vysvětleno zachycením  $\text{H}^+$  iontů nabitými skupinami karagenanu. Při větších koncentracích molekuly proteinu již schopny vytěsnit tyto  $\text{H}^+$  ionty, což má za následek opětovné snížení pH hodnoty [54].

Obecně, skoro v každém studiu tvorby polyelektrolytových komplexů se můžeme setkat s popisem minimálně dvou hodnot pH. Nejvyšší je  $\text{pH}_c$  hodnota, odpovídající počátku tvorby rozpustných komplexů, které se identifikují převážně pomocí metod rozptylu světla. Další

hodnota je  $pH_{\phi}$ , která je nižší a odpovídá vzájemné neutralizaci náboje makromolekul a jejich následné agregaci a precipitaci. V případě slabých polyaniontů, existuje také další nejnižší hodnota  $pH_{\phi 2}$ , která odpovídá disociaci již vytvořených nerozpustných komplexů, díky neutralizaci molekuly polyaniontu při pH nižším, než  $pK_a$  hodnota jeho záporně nabitých skupin. Tato hodnota však nebyla prokázána v případě silného polyelektrolytu [55,56].

Dalším příkladem je studium interakcí alginátu a  $\beta$ -laktoglobulinu (18,3 kDa). Pomocí isothermické titrační kalorimetrie, dynamického rozptylu světla, turbidimetrické titrace a měření zeta-potenciálu byla zkoumána rozpustnost komplexů v závislosti na pH. Byla prokázána tvorba nerozpustných komplexů a exotermický charakter vazby při nízkých hodnotách pH 3-4. Tvorba jak rozpustných tak i nerozpustných komplexů a endotermické procesy byly objeveny při pH 5. Výrazný příspěvek k endotermnímu signálu pravděpodobně má uvolnění velkého množství malých molekul laktoglobulinu po disociaci jeho agregátů, vyvolané přidáním silně nabitých molekul alginátu. Turbidimetrická měření stanovily závislost rozpustnosti komplexů při tomto pH na koncentraci alginátu. Nerozpustné agregáty se tvořily při jeho nižších koncentracích, ale se zvýšením koncentrace polyaniontu se rovněž zvýšila rozpustnost komplexů, což bylo vysvětleno zavedením většího negativního náboje do systému a tím zvýšení stability. Při dalším zvyšování pH na hodnoty 6–7 byla tvorba komplexů téměř potlačena, což bylo prokázáno nízkým signálem změny entalpie, konstantním množstvím volného proteinu v roztoku supernatantu, a čirosti roztoku u turbidimetrických měření, a to u všech koncentrací alginátu [57].

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

Interakce mezi BSA a HA jsou jedním z příkladů interakcí mezi kladně nabitým proteinem a záporně nabitým polysacharidem. Z toho vyplývá, že jsou hlavně elektrostatické povahy [58,43,59]. Nemůžeme však úplně vyloučit uplatnění hydrofobních interakcí a vodíkových můstků. Tvorba komplexů mezi hyaluronanem a albuminem je obecně řízena poklesem Gibbsové energie  $\Delta G < 0$ , která má entalpickou a entropickou složky  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ . Každá vazba mezi dvěma molekulami snižuje celkovou vazebnou energii a přispívá tak k entalpické složce  $\Delta H$ . V našem případě jsou to vodíkové vazby a hydrofobní interakce. Zvýšení nebo snížení uspořádanosti systému přispívá k entropické složce  $\Delta S$ . Při elektrostatické interakci dvou makromolekul dochází k uvolňování malých protiiontů a zvýšení volné entropie  $\Delta S > 0$ . Dochází však i ke změně struktury molekuly, případně i k zabudování molekuly vody do její struktury. Proces elektrostatické vazby je endotermní  $\Delta H > 0$ . Při uplatnění však dalších nekovalentních vazeb dochází k uvolnění vazebné entalpie  $\Delta H < 0$  a vyšší uspořádanosti systému  $\Delta S < 0$ , proces je exotermní. Jelikož uvažujeme hlavně uplatnění elektrostatických vazeb ve zkoumaných polyelektrolytových komplexech, hnací silou je změna entropie. Obecně podle hustoty povrchového náboje makromolekul můžeme předpovědět termodynamické chování komplexů. Se silně nabitými polyelektrolyty komplexy vznikají endotermní reakci, se slabě nabitými - exotermní [43].

Při interakcích mezi hyaluronanem a albuminem mohou vzniknout buď rozpustné komplexy, nebo nerozpustné koacerváty. To je určeno takovými faktory, jako poměr molekul albuminu k hyaluronanu v roztoku, iontová síla, pH, a délka řetězce HA.

Takové komplexy, můžeme rozdělit na tři druhy [58]:

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

Při takové elektrostatické interakci interaguje záporně nabitá karboxylová skupina HA a kladně nabitě protonizované aminoskupiny albuminu. Většinou jeden řetězec HA s určitým počtem karboxylových skupin váže na sebe několik aminoskupin BSA.



Ve studii [60] bylo prokázáno, že 5% přebytek náboje výsledných komplexů je hranicí tvorby nerozpustných agregátů, přebytek náboje do 10% postačí pro tvorbu malorozpustných komplexů, a přebytek náboje více jak 30% má za následek tvorbu velmi rozpustných komplexů.

Když se jedná o závislosti struktury komplexů na délce hyaluronanového řetězce, ve stejné studii bylo navrženo, že:

- několik HA s velmi krátkým řetězcem (do cca 2400 Da) 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 [60]



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

#### 2.4.1. Vliv iontové síly

Jak už bylo řečeno, iontová síla má základní vliv na elektrostatické interakce, což platí i pro komplexy HA a BSA [61]. Takové interakce jsou nejsilnější při slabé ale však ne nulové iontové síle [62]. Soli nízkomolekulárních látek totiž stíní řetězec polysacharidu před interakcemi s albuminem. Čím je iontová síla větší, tím méně molekul BSA je schopno vazby na molekulu HA. Kromě toho, iontová síla ovlivňuje velikost a náboj výsledných komplexů. Ve svém studiu systému HA-BSA Lenormand a spol. [58] objevili, že bez iontové síly jsou vznikající komplexy malé a kompaktní, s přebytkem pozitivního náboje (pochází z albuminu). Pro iontovou sílu 5-80 mmol.l<sup>-1</sup> jsou tyto 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. Takže čím je větší koncentrace nízkomolekulární soli v roztoku, tím větší jsou komplexy a negativnější náboj těchto komplexů (což vyplývá ze stínění řetězce). Velikost náboje komplexů je v neposledně řadě také ovlivněna délkou řetězce hyaluronové kyseliny a vlastnostmi použitého nízkomolekulárního elektrolytu.

#### 2.4.2. Vliv pH

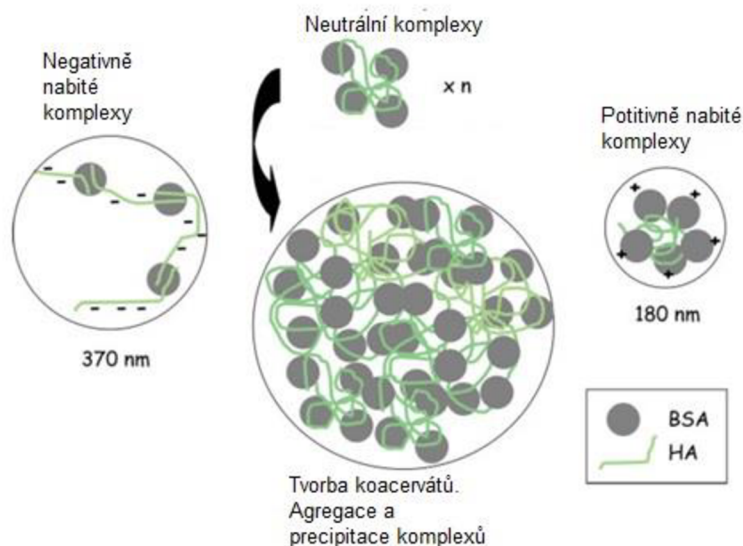
Hodnota pH má také zásadní vliv na tvorbu komplexu mezi HA a BSA, což obecně platí pro všechny polyelektrolytové komplexy. Při nižším pH, než hodnota izoelektrického bodu albuminu, aminoskupiny na povrchu BSA jsou více protonizované, a proto lépe interagují s karboxylovými skupinami HA. Optimální pH pro takovou interakci se pohybuje kolem hodnoty 4, jelikož hodnota izoelektrického bodu albuminu je  $pI = 4,9$  [63] a disociační konstanta karboxylových skupin hyalurové kyseliny  $pK_a = 2,9$  [2]. Při vyšším pH než 4 protonizace se zhorší, a tím se sníží počet interakcí [59]. Grymonpre a spol. studovali vliv kombinace iontové síly a pH na chování molekuly BSA v roztoku [64]. Jejich objevem bylo, že při vyšší iontové síle je potřeba nižšího pH na protonizaci aminoskupin proteinu. Xu a spol. studovali vliv pH na rozpustnost komplexů HA-BSA. 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. Je to pravděpodobně spojené s výše zmíněnou protonizací molekuly albuminu. Čím nižší je pH, tím větší je protonizace, a tím méně molekul je potřeba pro neutralizaci náboje HA [65].

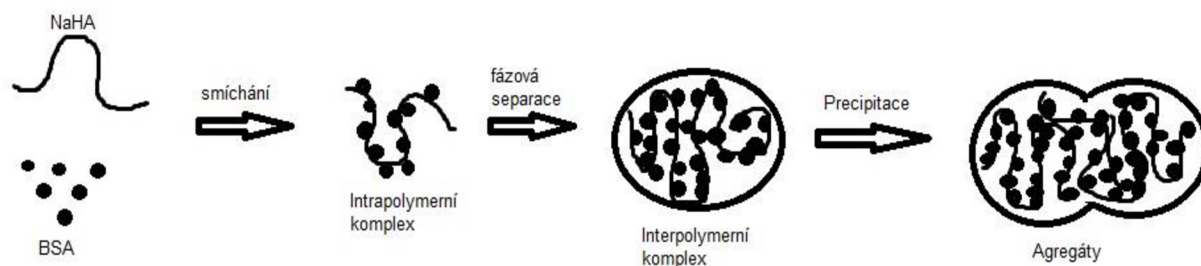
### 2.4.3. Vliv poměru molekul proteinu k molekulám polysacharidu

Poměr koncentrace BSA ke koncentraci HA  $\varphi = \frac{[BSA]}{[HA]}$  ovlivňuje tvar a pochopitelně i výsledný náboj komplexů. Při nízkém zastoupení BSA molekul a  $\varphi$  menším, než hodnota odpovídající fázové separaci, jsou komplexy velké. Takový jev je možné vysvětlit tím, že "náhodné klubko" polysacharidového řetězce se začíná vlivem interakcí s molekulami BSA "rozplétat", komplex je potom záporně nabitý (přebytek volných COO<sup>-</sup> skupin). Při koncentraci BSA, odpovídající poměru  $\varphi$  fázové separace, komplexy HA a BSA jsou neutrální, podléhají agregaci a sedimentují. Při koncentraci odpovídající poměru  $\varphi$  vyššímu, než  $\varphi$  fázové separaci, komplexy jsou nabitě kladně, což zajišťuje přebytek volných aminoskupin albuminu, jsou malé díky tzn. "smrštění" řetězce HA plně nasyceného molekulami BSA. Volné kladné náboje BSA se rozmístí na povrchu komplexu (Obrázek 6). Předpokládané elektrostatické odpuzování molekul BSA v rámci jednoho řetězce HA je pravděpodobně kompenzováno jednak vazbou na záporně nabitý řetězec HA a za druhé také kvůli nerovnoměrné distribuci náboje na povrchu molekuly albuminu a tím možnosti výskytu interakcí mezi molekulami proteinu. Toto ale platí s předpokladem použití vysokomolekulové HA [58].

Lenomard a spol. ve svém výzkumu kvantitativně stanovili poměr počtu molekul BSA ku HA v komplexech v momentě fázové separace, a to na hodnotu  $\varphi = \frac{[BSA]}{[HA]} = 3,14$ . Výpočet byl proveden pro hyaluronovou kyselinu s molekulovou hmotností 0,9 MDa a pro BSA s předpokladem molekulové hmotností 67 kDa při pH 4 [58].



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



Obrázek 7. Model vzniku komplexů HA-BSA [65]

## 2.5. SEC

**Size exclusion chromatography** – je chromatografická metoda založena na rozdělení částic analytu podle jejich hydrodynamického objemu (velikosti).

Princip SEC spočívá v tom, že povrch stacionární fáze je bohatý na póry různé velikosti, které tvoří soustavu různě velkých kanálků, kterými musí projít částice analytu rozpuštěné v mobilní fázi. Čím menší je částice, tím větším počtem kanálků projde, a tím je její retenční čas vyšší. Větší částice projdou menším počtem kanálků a zdrží se v koloně méně. Takhle se uskuteční rozdělení analytu na základě hydrodynamického objemu jeho částic. Tomuto efektu se také říká „**molekulové síto**“ [66].

Instrumentace SEC v sobě zahrnuje několik důležitých komponent, na výběru kterých závisí celá přesnost měření. Nejdůležitější komponentou je separační kolona. Naplnění kolony je založeno buď na pórovitém silikagelu anebo na různých organických gelech. Pro správný výběr kolony, za prvé musí být pečlivě vymezen rozsah separace pro vysoko nebo nízkomolekulový analyt. Kolony s menší velikostí částic náplně mají vyšší rozlišení, ale způsobují větší tlak v koloně, mohou způsobit narušení struktury obzvláště u vysokomolekulových analytů a jsou více náchylné na kontaminaci. Existují kolony i s kombinovanou náplní, které mají částice náplně o různé velikosti, a proto se vyznačují různou porozitou podél kolony. Za účelem prodloužení životnosti kolony by se neměla měnit mobilní fáze a kolona by se rovněž nikdy neměla použít v opačném směru. Měl by se také dávat pozor na vzduchové bubliny a znečištěné analyty, které mohou výrazně poškodit náplň kolony, [67,68]. 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. Použitá mobilní fáze musí být dobrým rozpouštědlem pro analyt, který musí být rovněž bez případných agregátů.

Během separace je nezbytné udržení konstantního průtoku, který zaručí pumpa. Hlavní podmínkou je bezpulsový tok, které mohou zaručit stříkačkové reciproké dvoupístové pumpy. Poslední mohou mít buď paralelní anebo sériové uspořádání. Pulsový tok zde může být vyrovnán použitím speciálního tlumiče pulsů [67].

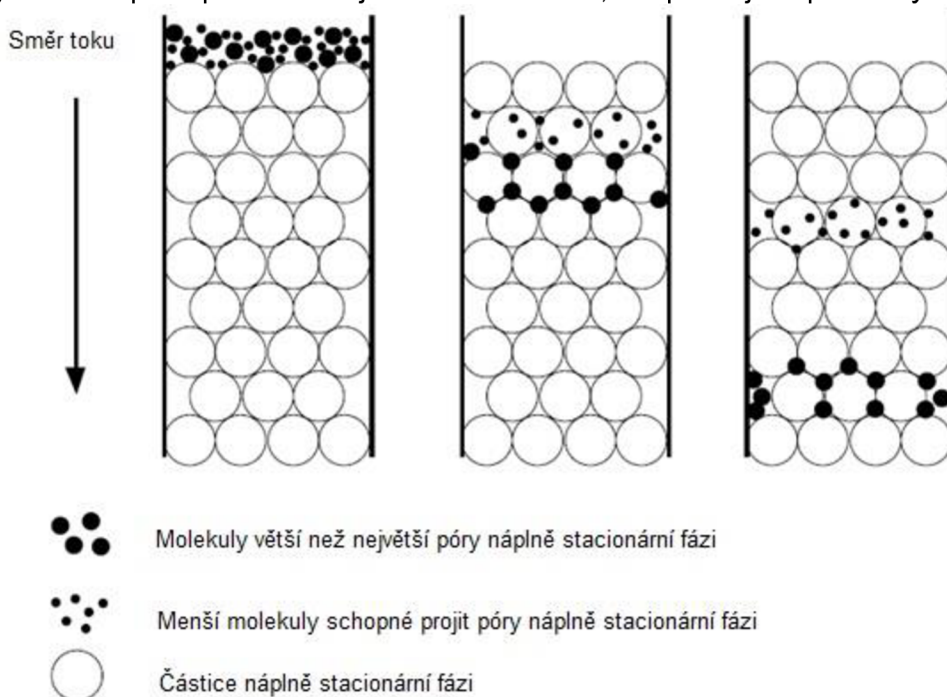
Další důležitou komponentou je detektor. Koncentrační detektor je nezbytným minimem pro analýzu a nejčastěji se jako koncentrační detektor používá diferenční refraktometr (dRI). Další detektory se volí podle potřeby a charakteru analytu. Příkladem je UV-VIS detektor, který se používá hlavně pro detekci proteinů [69], a fluorescenční detektor, který je citlivější než UV-VIS detektor. Nejvýznamnějším detektorem v SEC je však detektor rozptylu světla. 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. Detektory rozptylu světla jako LALS a MALLS při znalosti přesné koncentrace dovolují určit molekulovou hmotnost analytu

vycházejícího z kolony. LS detektory navíc mohou eliminovat různá zkreslení molekulové hmotností, která jsou určena jenom pomocí SEC (vlivy interakcí, tvaru atd.). Další možností je viskozitní detektor, kterému je věnována celá kapitola (viz kapitola 2.7), a rovněž hmotnostní spektrometrický detektor, použití kterého je však dost omezené, kvůli možnosti kontaminaci detektoru ionty mobilní fáze.

Chování analytu během separace bohužel není vždy ideální. Více nebo méně dochází k nežádoucím interakcím analytu se stacionární fází, které vedou ke zkreslení retenčních časů. Tyto interakce jsou ve většině případů elektrostatické nebo hydrofobní povahy [70]. Nejběžnější způsob eliminace těchto nežádoucích interakcí je zvýšení iontové síly přidávkem soli do mobilní fáze [71]. Mechanismus je založen na stínění nabitých skupin stacionární fáze ionty soli. Příliš vysoké koncentrace soli však již mohou způsobit shlukování částic analytu [72]. Zabránit sekundárním interakcím může také přidavek organických látek, jako například arginin [73]. Dalším způsobem je změna pH mobilní fáze, což hlavně ovlivní konformaci biomakromolekul analytu a tím i možnost interagovat se stacionární fází [71].

### 2.5.1. Teorie vylučovací chromatografie

Na Obrázek 8 je znázorněn celý princip GPC analýzy (gelová permeační chromatografie). Kde můžeme vidět rozdělení částic analytu podle jejich velikosti. Největší částice mají nejkratší dráhu při průchodu kolonou a vylučují se z kolony jako první, protože jejich rozměr jim nedovoluje vstoupit do menších pórů stacionární fáze. Menší částice již vstupují do pórů stacionární fáze a jejich výsledná dráha v koloně je delší, a proto je rovněž delší retenční čas takových částic při separaci. Čím jsou částice menší, tím později se potom vylučují z kolony.



Obrázek 8. Struktura stacionární fáze a princip retence

SEC separace je v ideálním případě řízena pouze entropií. Termodynamiku SEC chromatografii je možné popsat pomocí rovnice:

$$\ln K_D = -\Delta S^0/R \quad (1)$$

Kde  $\Delta S^0$  je rozdíl entropie,  $R$  je plynová konstanta,  $K_D$  je termodynamický retenční faktor v SEC

Jelikož zde entalpický příspěvek je nulový  $\Delta H^0 = 0$ , teplota by neměla ovlivňovat retenci.

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

$$K_D = \frac{V_R - V_0}{V_i} \quad (2)$$

$V_R$  je retenční objem analytu,  $V_0$  objem kolem částic stacionární fáze (mezní),  $V_i$  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. Pokud z výpočtu vychází hodnota  $K_D > 1$ , znamená to, že se uplatňují nežádoucí interakce analytu se stacionární fází.

Kinetický aspekt chromatografické metody lze popsat základní rovnicí Van Deemtera, která popisuje výšku teoretického patra:

$$H = ad_p + bD_m/u + cud_p^2/D_m \approx ad_p + cud_p^2/D_m \quad (6)$$

Kde  $u$  je lineární rychlost průtoku,  $D_m$  difuzní koeficient,  $d_p$  velikost částice.

Z rovnice je vidět, že čím větší jsou částice ( $d_p^2$ ), a čím vyšší je průtoková rychlost  $u$ , tím vyšší je hodnota teoretického patra a tím horší je separace. Naopak čím menší jsou částice náplně kolony a čím je pomalejší průtok, tím nižší je teoretické patro a vyšší účinnost kolony.

Optimální podmínky provedení separace by se měly volit podle konkrétní analýzy. Existují však určité zásady provedení analýzy pomocí SEC. Koncentrace soli v mobilní fázi nesmí být moc vysoká, jinak se zvyšuje riziko shlukování molekul a tím dochází i ke zvětšení jejich molekulové hmotnosti. Mělo by se rovněž zabránit kontaminaci bakteriemi, které jsou schopné rozkládat některé biomolekuly a jsou těžko odstranitelné z kolony [74]. Objem nastříkovaného vzorku nemá přesahovat objem kolony a většinou činí pouze 5-10 % od objemu kolony. Velké objemy nástřiku způsobují asymetrii a rozšiřování píků [75]. Kvůli lepšímu rozlišení rychlost průtoku mobilní fáze má být docela nízká [76]. Délka kolony je rovněž důležitá, optimální separaci dosáhneme s délkou kolony 30 cm. Pro zlepšení separace je možné zapojit několik kolon sériově (tandemově) za sebou [77], ale samozřejmě v tom případě se prodlouží i čas analýzy. Velikost částic stacionární fáze by měl být co nejmenší, optimální průměr částic je 1-2  $\mu\text{m}$  [78].

## 2.6. MALLS

Multi Angle (Laser) Light Scattering neboli MALLS je další metoda detekce na výstupu SEC kolony. Výhodou takové kombinace je absolutní charakterizace a určení molekulové hmotnosti analytu i v případě jeho výrazné polydisperzity. Při použití MALLS není potřeba kalibrace pomocí standardů s přesně definovanou molekulovou hmotností. A navíc určení molekulové hmotnosti pomocí MALLS není zkresleno tvarem molekul analytu. S takovým zkreslením se můžeme setkat u konvenční analýzy SEC (bez detektoru rozptylu světla MALLS), kde tvar molekul analytu se může lišit od tvaru molekul použitých standardů, a ve výsledku vest k odlišné retenci a výsledně k chybě při určení molekulové hmotnosti [79].

Obecný princip rozptylu světla je takový, že při dopadu světelného paprsku na částici, elektrická složka elektromagnetické vlny tohoto paprsku způsobuje polarizaci této částice. A tímto způsobem v částici vzniká indukovaný dipól, který emituje elektromagnetickou vlnu o stejném kmitočtu jako dopadající světlo, což ve výsledku pozorujeme jako rozptýlené světlo. Při dopadu primárního paprsku světla na částici dochází k jeho rozptylu do různých směrů, detektor zaznamenává intenzitu tohoto rozptýleného světla vždy pod určitým úhlem. Detekce MALLS je detekce statického rozptylu světla. Při statickém rozptylu se měří časově průměrná intenzita rozptýleného světla. Při dynamickém rozptylu světla se měří jeho fluktuaace s časem.

**Rayleighova rovnice** pro rozptyl světla molekulami zředěného plynu byla vyjádřena jako vztah [80]:

$$\frac{i_p(\theta)}{I_0} = \frac{\pi^2 \cdot \alpha_p^2 \cdot F(\theta)}{\varepsilon_0^2 \cdot \lambda^4 \cdot r^2} \quad (3)$$

$i_p(\theta)$  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.

V teorii rozptylu světla obecně bereme v úvahu elastický rozptyl světla, kde kmitočet a vlnová délka primárního a rozptýleného světla se od sebe neliší. Rozptyl světla a vztahující k němu rovnice se hlavně liší podle koncentrace částic a jejich velikosti.

Po vyjádření polarizovatelnosti částic  $\alpha_p$  v rovnici (3) pomocí inkrementu indexu lomu  $\partial n / \partial w$  dostaneme vztah pro intenzitu rozptylu světla v **zředěných soustavách s částicemi velikosti menší než  $\lambda/20$** :

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

Kde  $n_0^2$  je index lomu disperzního prostředí.

Pro eliminaci geometrického uspořádání celého systému se zavádí **Rayleighův poměr**, který vyjadřuje intenzitu rozptýleného světla, přepočítanou 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.

$$R(\theta) = \frac{r^2}{F(\theta)} \cdot \frac{i_v(\theta)}{I_0} \quad (5)$$

Kde konstanta  $F(\theta)$  charakterizuje polarizaci světla.

Je-li dopadající světlo **vertikálně polarizováno**, rozptýlené záření se šíří taky ve vertikální ose a ve všech směrech se stejnou intenzitou. Pro jednoduchost výpočtu se v experimentech používá jen vertikálně polarizované světlo, kde

$$F(\theta) = 1 \quad (6)$$

Při **horizontálně polarizovaném** světle, intenzita rozptýleného světla již závisí na úhlu pozorování:

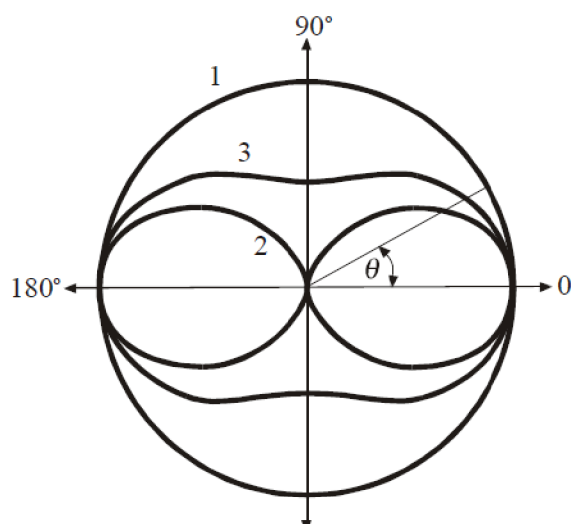
$$F(\theta) = \cos^2 \theta \quad (7)$$

Takže při úhlu  $\theta = 0^\circ$  intenzita je nezměněná a při  $\theta = 90^\circ$  klesne až na nulovou hodnotu.

**Nepolarizované světlo** považujeme za složené ze dvou kolmých komponent. Pod úhlem  $\theta$  je intenzita dána součtem horizontálně a vertikálně polarizované složky:

$$F(\theta) = (1 + \cos^2 \theta) / 2 \quad (8)$$

Na následujícím obrázku je znázorněna závislost intenzity rozptýleného světla na polarizace světla.



Obrázek 9. Úhlové rozložení intenzity světla rozptýleného malou izotropní částicí v rovině xy při: 1 - vertikálně polarizovaném, 2 – horizontálně polarizovaném, 3 - nepolarizovaném primárním paprsku. Délka průvodiče udává intenzitu rozptylu pod úhlem  $\theta$

V případě dokonale homogenity disperzní soustavy nepozorovali bychom žádný rozptyl světla kvůli interferenci rozptýlených paprsků vycházejících z jednotlivých částic a jejich vzájemnému vyrušení. Žádný systém však není dokonale homogenní, fluktuace hustoty v kapalinách a hlavně fluktuace koncentrace v disperzních soustavách způsobují změnu polarizovatelnosti objemových elementů systému.

$$\alpha_e = \langle \alpha_e \rangle + \delta\alpha_e \quad (9)$$

Kde  $\langle \alpha_e \rangle$  je průměrná polarizovatelnost objemového elementu,  $\delta\alpha$  je její časová odchylka, Výsledná intenzita rozptýleného světla je dána podílem vln, které se interferencí neruší, a je závislá na okamžité hodnotě  $\delta\alpha$ .

Po vyjádření těchto fluktuací polarizovatelnosti  $\delta\alpha$  přes koncentrační fluktuace a derivaci osmotického tlaku, a po dosažení těchto hodnot do původní **Rayleighovy rovnice** (3) dostaneme **Enstein-Debyeův vztah**:

$$\frac{i_v(\theta)}{I_0} = \frac{1}{V_e} \cdot \frac{4\pi^2 \cdot n_0^2 \cdot F(\theta) \cdot w}{N_A \cdot \lambda^4 \cdot r^2 \cdot \left( \frac{1}{M} + 2 \cdot A_2 \cdot w + \dots \right)} \cdot \left( \frac{\partial n}{\partial w} \right)^2 \quad (10)$$

Přítomnost druhého virálního koeficientu  $A_2$  znamená, že intenzita rozptýleného světla závisí také na termodynamickém chování systému, neboli na interakcích či vzájemném působení mezi částicemi a rozpouštědlem. Tyto interakce mají převažně vliv na koncentrační fluktuace a následně na polarizovatelnost.

U částic střední velikosti (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 rozptýleného světla se nemění, při  $\theta = 180^\circ$  je intenzita nejvíce zeslabená. Z tohoto důvodu se zavádí rozptylový faktor  $P(\theta)$ , který charakterizuje interferenční zeslabení rozptylu na větších částicích a je vyjádřen pomocí rovnice:

$$P(\theta) = \frac{R(\theta)}{R(0)} \quad (11)$$

Kde  $R(\theta)$  je Rayleighův poměr,  $R(0)$  je Rayleighův poměr v nepřítomnosti zeslabení

Pro výpočet rozptylového vektoru  $P(\theta)$  je potřeba vyjádřit rozdíl fází světelných paprsků ve formě goniometrické funkce, sečíst funkce vln pocházejících ze všech bodů částice. Dostaneme tak výslednou vlnu přicházející do detektoru. Částice navíc má určitou polohovou orientaci vůči vlnovému vektoru, a vykonává tepelný rotační pohyb. Proto musíme vypočítat i průměr přes všechny možné orientace částice.  $P(\theta)$  představuje poměr takto vypočtené intenzity k hodnotě  $i_p(\theta)$  z Rayleighovy rovnice (3)

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

$$P(\theta) = \frac{1}{n^2} \sum_{j=1}^n \sum_{i=1}^n \frac{\sin qr_{ij}}{qr_{ij}} \quad (12)$$

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

Pokud uhel  $\theta$  nebo poměr  $\frac{d}{\lambda}$  jsou malé, obecnou rovnici pro  $P(\theta)$  můžeme psát ve formě rozvoje:

$$\frac{\sin x}{x} = 1 - \frac{x^2}{6} + \frac{x^4}{120} - \dots \quad (13)$$

Kde  $x = qr_{ij}$  a  $q$  je vlnový vektor, který je roven:

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \cdot \sin \frac{\theta}{2} \quad (14)$$

$$P(\theta) = 1 - \frac{1}{3} q^2 s^2 + \dots = 1 - \frac{16\pi^2}{3} \cdot \frac{s^2}{\lambda^2} \cdot \sin^2 \frac{\theta}{2} + \dots \quad (15)$$

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

$$s^2 = \frac{1}{2n^2} \sum_{j=1}^n \sum_{i=1}^n r_{ij}^2 \quad (16)$$

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

Pro **experimentální stanovení** intenzity rozptýleného světla **částicemi menšími než  $\lambda/20$**  se používá zjednodušený Einstein-Debyeův vztah:

$$\frac{K \cdot w}{\Delta R(\theta)} = \frac{1}{M} + 2A_2 \cdot w + \dots \quad (17)$$

$$\Delta R(\theta) = R(\theta) - R_0(\theta) \quad (18)$$

Kde  $R_0(\theta)$  je Rayleighův poměr v čistém disperzním prostředí, a  $R(\theta)$  je Rayleighův poměr v prostředí s měřeným disperzním podílem

Soubor optických konstant na pravé straně rovnice (17)  $K$  je vyjádřen rovnicí:

$$K = \frac{4\pi^2 \cdot n_0^2}{N_A \cdot \lambda^4} \left( \frac{\partial n}{\partial w} \right)^2 \quad (19)$$

Která v sobě zahrnuje index lomu čistého rozpouštědla  $n_0$ , vlnovou délku primárního záření  $\lambda$  a inkrement indexu lomu  $\partial n / \partial w$ .



Vynesení do grafu  $\frac{K \cdot w}{\Delta R(\theta)}$  proti  $w$  a při extrapolaci na nulovou koncentraci dostaneme přímkou, z úseku které na ose  $y$  vypočítáme  $M$  a ze směrnice  $A_2$ . U malých částic rozptyl světla nezávisí na úhlu pozorování, vzhledem k čemuž nemůžeme zde vypočítat gyrační poloměr.

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

$$\frac{K \cdot w}{\Delta R(\theta)} = \frac{1}{M \cdot P(\theta)} + \frac{2A_2 \cdot w}{P(\theta)} + \dots \quad (20)$$

$$\frac{K \cdot w}{\Delta R(\theta)} = \frac{1}{M} + \frac{16\pi^2}{3M} \cdot \frac{s^2}{\lambda^2} \cdot \sin^2 \frac{\theta}{2} \quad (w \rightarrow 0) \quad (50)$$

Podle této rovnice jsme schopni sestavit graf  $\frac{K \cdot w}{\Delta R(\theta)}$  oproti  $\sin^2 \frac{\theta}{2}$ , a po extrapolaci na

$\theta = 0^\circ$  z úseku na ose  $y$  stanovit  $\frac{1}{M}$ , a ze směrnice přímkou odpovídající  $\theta = 0^\circ$  rovněž gyrační poloměr  $s$ .

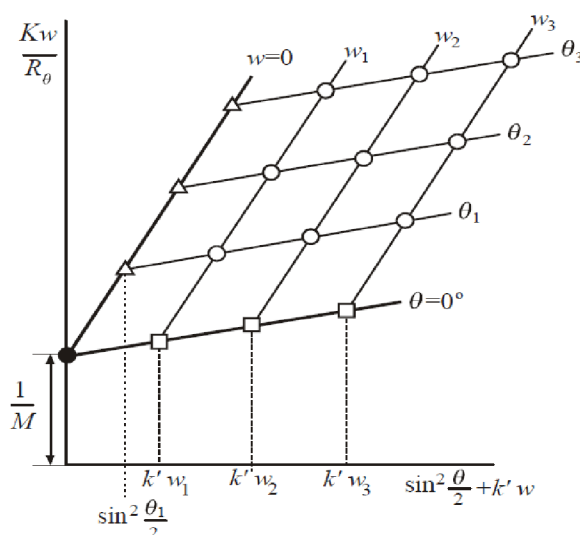
Zimmův diagram (11) nám současně dovoluje zahrnout extrapolaci na  $\theta \rightarrow 0^\circ$  a  $w \rightarrow 0$ .

Po extrapolaci dostaneme dvě protínající na ose pořadnic čáry (v bodě  $\frac{1}{M}$ ) s rovnicemi:

$$\frac{K \cdot w}{\Delta R(\theta)} = \frac{1}{M} + 2 \frac{A_2}{k'} \cdot k' w \quad \text{pro } \theta \rightarrow 0^\circ \quad (21)$$

$$\frac{K \cdot w}{\Delta R(\theta)} = \frac{1}{M} + \frac{16\pi^2}{3M} \cdot \frac{s^2}{\lambda^2} \cdot \sin^2 \frac{\theta}{2} \quad \text{pro } w \rightarrow 0 \quad (22)$$

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



Obrázek 10. Zimmův diagram

Spojením SEC chromatografie a MALLS detektoru můžeme určit hodnoty  $M_w$  (hmotnostní průměrná),  $M_n$  (početní průměrná),  $M_z$  (velikostní-průměr), gyrační poloměr  $s$  a druhý viriální koeficient  $A_2$ . Při zapojení viskozimetru jsme také schopni určit i vnitřní viskozitu  $[\eta]$ .

Teorii rozptylu světla v podrobnějším vykladu je možné najít v použitých zdrojích: [79,80,81,82].

### 2.6.1. Důležitost inkrementu indexu lomu při analýze rozptylu světla polyelektrolyty.

Polyelektrolyty na rozdíl od klasických polymerů vykazují zvýšenou expanzi struktury nahodilého klubka (ve vodném prostředí bez přítomnosti přidaných protiiontů), což se projevuje hlavně na hodnotě gyračního poloměru. Kromě toho, polyelektrolyty mění výrazněji své vlastnosti se změnou okolních podmínek. Kvůli přítomnosti velkého počtu protiiontů, termodynamické vlastnosti a druhý viriální koeficient jsou silně závislé na charakteru těchto protiiontů. Měření rozptylu světla u elektrolytu je možné pouze v přítomnosti nízkomolekulárního elektrolytu (solí). V případě měření rozptylu světla polyelektrolytů se musí brát v úvahu přítomnost protiiontů na povrchu polymeru, které dokážou ovlivnit jak hodnotu molekulové hmotnosti, tak i poloměr.

V svém studiu Maret a spol. prokázali, že charakter použitých protiiontů v roztoku rozpouštědla a mobilní fázi dokáže výrazně ovlivnit hodnotu inkrementu indexu lomu a s tím spojenou hodnotu molekulové hmotnosti. V této práci byly studovány poly L-lysinové (DGL) dendrigraftové polyelektrolyty s použitím různých protiiontů (Trifluoracetát TFA,  $\text{CO}_3^{-2}$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$ ,  $\text{Cl}^{-1}$ ). Byly předem naměřeny hodnoty inkrementu indexu lomu pomocí diferenciálního refraktometru, které byly dále použity při analýze rozptylu světla při SEC-MALLS analýze vzorků. Hodnoty inkrementu indexu lomu se výrazně lišily v závislosti na použitém protiiontu v rozsahu od 0,1149 až po 0,1905  $\text{mL g}^{-1}$ . Bylo stanoveno, že čím vyšší je molekulová hmotnost protiiontu, tím nižší je hodnota inkrementu indexu lomu daného polyelektrolytu ( $\text{Cl}^{-1} < \text{CO}_3^{-2} < \text{PO}_4^{-3} < \text{TFA}$ ), což mělo za následek výrazné rozdíly ve výsledné střední molekulové hmotnosti  $M_n$  (21 500 až 38 700  $\text{g mol}^{-1}$ ). Následně byla provedena korekce hodnot inkrementu indexu lomu podle obsahu celkového Lysinu pomocí stanovení celkového dusíku Kjeldahlovou metodou (TKN). Podle hodnoty aktuální koncentrace DGL bez protiiontů byla provedena korekce naměřených hodnot inkrementu indexu lomu, které už byly výrazně vyšší, a zpětně vypočítaná střední molekulová hmotnost, která už odpovídala teoretické hodnotě příslušející stupni polymerizace L-lysinu v DGL [83].

### 2.6.2. Aplikace metody SEC MALLS pro analýzu biopolymerů

#### Polysacharidy

Polysacharidy jsou bioaktivní sloučeniny přírodního původu a jsou významnou látkou v biomedicinských, farmaceutických a potravinářských aplikacích. Nicméně jejich vlastnosti úzce souvisí s jejich molekulovou hmotností, což dělá její přesné stanovení nezbytným krokem při použití hlavně v oblasti medicinských aplikacích. Bylo vyvinuto spousta způsobů kvantitativní analýzy a charakterizace polysacharidů, většina z nich však představuje příliš složité postupy s nutností degradace molekuly polymeru anebo příliš časově náročné metody, jako HPLC-MS. SEC-MALLS se proto nabízí jako poměrně rychlá a jednoduchá metoda bez nutnosti degradace analytu. Pro analýzu vybraných polysacharidů pocházející z medicinských rostlin *P. ginseng*, *P. notoginseng* a *P. quinquefolius* byly použity metody SEC-MALLS, HPLC-ELSD a zkouška na fenol a kyselinu sírovou. Přičemž se zde metoda SEC-MALLS projevila jako nejpresnější [84].

Metoda SEC-MALLS byla také využita při stanovení molekulové hmotnosti hyaluronové kyseliny a to v několika studiích. Je dobře známo, že funkce hyaluronové kyseliny v organismu je závislá na její molekulové hmotnosti. Proto pro medicínské aplikace je nesmírně důležité přesné stanovení jak molekulové hmotnosti, tak i její polydispersity. Jako jedna z metod pro tento účel je již používána kapilární viskozimetrie, která na základě Mark-Houwinkové rovnice a stanovené hodnoty vnitřní viskozity je schopna určit střední

molekulovou hmotnost a také parametry spojené s konformací molekuly. Při využití metody SEC-MALLS, rozptyl světla je také schopen kromě molekulové hmotnosti poskytnout i hodnotu druhého viriálního koeficientu nesoucího informaci o chování molekuly v roztoku (vyloučený objem, a expanse struktury). Existují ale určité limitace, a to hlavně u vysokomolekulového hyaluronanu, který má tendenci částečně degradovat vlivem mechanického tlaku při průchodu kolonou a také interagovat se sousedními molekulami i při velmi nízkých koncentracích. Částečnou degradaci polymeru však může způsobit i filtrace před samotným měřením. V jedné studii byla porovnána přesnost několika metod pro stanovení molekulové hmotnosti jak nízkomolekulového tak i vysokomolekulového hyaluronanu. Vybrané metody k porovnání byly kapilární viskozimetrie, metoda koncentračního gradientu s detekcí rozptylu světla (CG-MALLS), SEC-MALLS, metoda frakcionaci v asymetrickém silovém toku opět s detekcí rozptylu světla (AFIFFF-MALLS) a horizontální elektroforéza na agarozovém gelu. Výsledkem bylo stanovení stejné efektivity analýzy SEC-MALLS v porovnání s ostatními metodami [85].

V další práci byla metodou SEC-MALLS studována degradace hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech v závislosti na podmínkách a době skladování. Metodou SEC-MALLS zde byl pozorován pokles molekulové hmotnosti hyaluronanu skladovaného při různé teplotě během různé doby [86].

### **Proteiny**

Kromě polysacharidů metodou SEC-MALLS je možné zkoumat i další biopolymery jako proteiny. Velké množství současných biofarmaceutických preparátů jsou formulovány na základě proteinových molekul, a udržení jejich stability je nezbytné pro zachování biologické aktivity. Pro studium agregaci proteinů existuje velké množství dostupných technik jako analytická ultracentrifugace, hmotnostní spektrometrie, gelová elektroforéza (SDS-PAGE) a také SEC-MALLS. SEC-MALLS metoda má obrovskou výhodu v tom, že poskytuje absolutní hodnotu molekulové hmotnosti a je prakticky nedestruktivní vůči struktuře proteinu.

Hongping Ye ve své studii [87] se zaměřil na zkoumání stability různých proteinů za různých stressových podmínek a to jak metodou SEC-MALLS tak i gelovou elektroforézou. V této práci byla prokázána výhoda využití metody SEC-MALLS jako přesné a rychlé analytické metody pro stanovení molekulové hmotnosti, agregace a degradace proteinů. Byly zkoumány proteiny BSA, glykoprotein r-hCG, monoklonální protilátky ReoPro, Herceptin a glycerinaldehyd-3-fosfat dehydrogenáza (GAPDH). Vybrané molekuly proteinů byly podrobené různým denaturačním podmínkám včetně zvýšené teploty (40-70°C) a nízkého pH, a rovněž byla zkoumaná dlouhodobá stabilita při laboratorní a snížené teplotě (4°C). Pro komplexní biopolymery jako glykoprotein r-hCG neexistují tabelované hodnoty dn/dc. Měření inkrementu indexu lomu glykoproteinu bylo provedeno se zapojením třetího UV detektoru, a inkrement indexu lomu byl následně přepočítan podle obsahu proteinové složky. Molekula glycerinaldehyd-3-fosfat dehydrogenáza (GAPDH) se skládá ze 4 podjednotek, které však při analýze gelovou elektroforézou disociují. Proto velkou výhodou metody SEC-MALLS zde je to, podjednotky zůstávají pohromadě, což umožňuje následné určení přesné molekulové hmotnosti celého enzymu [87].

### **Komplexy biomakromolekul**

Více komplikovaný přístup pro analýzu metodou SEC-MALLS vyžadují komplexy skládající se z molekul různé povahy. Obecně komplexy protein-polysacharid mají relativně vysokou polydisperzitu a často obsahují dvě hlavní frakce s různou molekulovou hmotností [88,89].

Yanfei Peng a Lina Zhang se ve své práci [88] zabývali studiem glukano-proteinového komplexu izolovaného z houby *G. tsugae*. Při své studii využili metody SEC-MALLS, kde

metodou detekci sloužil opět rozptyl světla, ale na rozdíl od MALLS pouze s jednoúhlovým rozptylem světla (laser light scattering). Před provedením samotného měření, byl opět předem stanoven inkrement indexu lomu a to měřením na optickém refraktometru. Bylo objeveno dvě frakce s velkou polydisperzitu. První frakce měla molekulovou hmotnost kolem 3,5 MDa a strukturu kompaktního klubka, když druhá frakce (s největší zastoupením) měla molekulovou hmotnost pouze 63 kDa a strukturu flexibilního řetězce. Po ošetření vzorku trypsinem, byla objevena degradace komplexů a uvolnění molekul proteinu z komplexů. Dále v analýze byl také zapojen UV detektor, který prokázal přítomnost většího proteinového podílu u lehčí frakce (63 kDa) [88].

V další práci [89] metoda SEC-MALLS byla využita pro charakterizaci komplexů celulosových derivátů s tenzidem SDS. Před měřením, stejně jako v předchozích studiích, prvně byla stanovena hodnota  $dn/dc$ , a to měřením nejprve samotných komponent komplexů a následné matematické kalkulací podle obsahu každé komponenty v komplexu. V tomto studiu molekuly detergentu SDS byly obsaženy pouze v mobilní fázi, takže k interakcím mezi deriváty celulózy a detergentem docházelo během separace v SEC koloně. Bylo objeveno, že při nízkých koncentracích SDS v mobilní fázi, molekuly polymeru měly tendenci k intermolekulárním elektrostatickým a také hydrofobním interakcím. Obecně do koncentrace detergentu cca 5 mM, molekulová hmotnost vylučovaných částic narůstala, což pravděpodobně znamenalo akumulaci molekul detergentu podél řetězce polymeru. Od určité limitní koncentrace však (5 mM) molekulová hmotnost začala klesat až k hodnotě odpovídající čistému polymeru. Během experimentu nebyla však stanovena výrazná změna gyračního poloměru, což svědčí o celkem stabilní konformaci polymeru, a to při různých koncentracích přidaného detergentu.

Zkoumat pomocí metody SEC-MALLS interakce mezi polysacharidy a proteiny a jejich komplexy je možné při zapojení minimálně třech detektorů, jeden z kterých je UV-VIS detektor. Příkladem tomu je studium interakcí vysokomolekulového heparinu se základním fibroblastovým růstovým faktorem (bFGF), kde pomocí zapojení UV-VIS detektoru bylo umožněno stanovení přesného množství vazebného proteinu a také celkové stechiometrii komplexů [89].

## 2.7. Viskozitní detektor

Viskozitní detektor určuje hodnotu vnitřní viskozity  $[\eta]$  neboli limitní viskozitní číslo, které je dáno následující rovnicí:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0 c} = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{sp}}{c}$$

Kde  $\eta$  je viskozita disperzní soustavy [Pa.s],  $\eta_0$  je viskozita disperzního prostředí [Pa.s],  $\eta_{sp}$  je specifická viskozita a  $c$  je koncentrace disperzního podílu (hmotnostní, molární, objemový zlomek)

Diferenciální viskozimetr měří jak viskozitu čistého rozpouštědla (mobilní fáze) tak viskozitu roztoku analytu. Měří se tlakový rozdíl na konci kapilár. U různých typů viskozitních detektorů se používá různý počet kapilár. Viskotec detektor například zapojuje až 4 kapiláry, které jsou uspořádány do tzv. Wheatstonového okruhu.

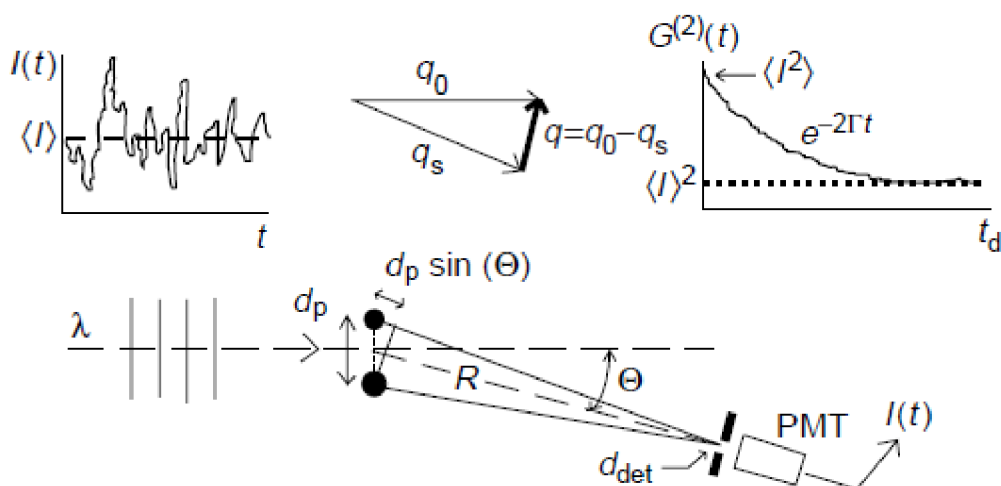
Viskozimetr je často spojen s refraktometrem. Z naměřené viskozity a z ní odvozené vnitřní viskozity, pomocí kalibrační křivky (univerzální kalibrace) je možné podle Mark-Houwinkovy rovnice vypočítat molekulovou hmotnost polymeru:

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

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

## 2.8. Dynamický rozptyl světla

Dynamický rozptyl světla neboli fotonová korelační spektroskopie měří fluktuace intenzity rozptýleného světla v čase.



Obrázek 11: Základní uspořádání DLS

Brownův pohyb dispergovaných částic hraje zásadní roli pro stanovení rozptylu světla, jelikož různě velké částice se mezi sebou liší rychlostí pohybu. Světlo se rozptyluje částici jen po dobu, kdy se ta nachází v oblasti dopadajícího záření. Kvůli velkému množství částic v disperzní soustavě dochází k interferenci rozptýlených paprsků pocházejících z různých částic. Interferenční obrázek se mění s časem (řadově  $10^{-7}$  až  $10^{-9}$  s), a to kvůli výše zmíněnému Brownovu pohybu částic. V metodě dynamického rozptylu světla se porovnávají tyto interferenční záznamy. V časovém intervalu  $\Delta t = 0$  se záznamy neliší, korelace je rovna 1 (intenzita je stejná), se zvyšujícím se časovým intervalem  $\Delta t$  se korelace snižuje až k nule, což znamená, že 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 **Einstein – Stokesové rovnice**:

$$D = \frac{k_B \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot R_H} \quad (23)$$

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

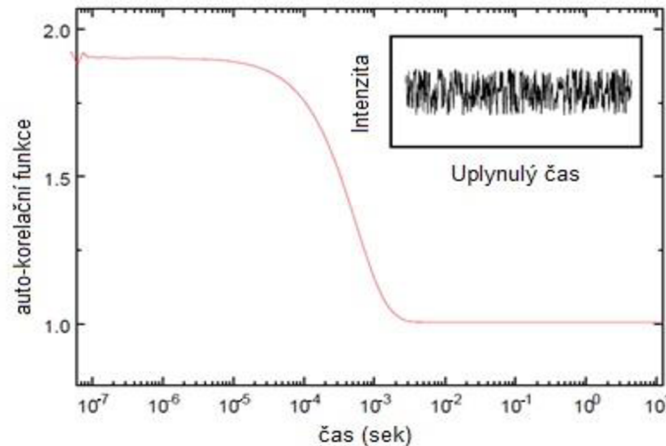
Tuto rovnici je možné použít pouze pro částice sférického (kulovitěho) tvaru. Pokud tomu tak není, částice se extrapoluje na kulovitý tvar. **Hydrodynamický poloměr**  $R_H$  je tak poloměr kulovité částice i se solvatačním obalem, která vykazuje stejný difúzní koeficient jako měřená částice. Čím větší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

Obecně se měří spektrální hustota elektrického pole rozptýleného světla, která se pak převádí pomocí Fourierovy transformace na autokorelační funkci [90].

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

$$G^{(2)}(t) = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N I(t_i)I(t_i + \tau) = \langle I(t_i)I(t_i + \tau) \rangle \quad (24)$$

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

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

Po normalizaci a vyjádření funkci ACF přes ACF elektrického pole  $g^{(1)}$  potom ji můžeme vyjádřit jako:

$$g^{(2)} = 1 + \sigma (g^{(1)}(\tau))^2 \quad (25)$$

Kde  $\sigma$  je instrumentální konstanta, vystihující počet koherentních ploch zachycených detektorem. Čím víc koherentních ploch je zachyceno, tím víc se intenzity těch ploch překrývají, a tím slabší je signál.

Pro monodisperzní soustavy potom platí:

$$g^{(1)}(\tau) = e^{-\frac{\tau}{\tau}} \quad (26)$$

$$\tau = \frac{1}{Dq^2} \quad (27)$$

Kde  $q$  je Braggův vlnový neboli rozptylový vektor

Z předchozích rovnic (29),(30) můžeme vypočítat difúzní koeficient  $D_f$ , a z něho podle rovnice (24) hydrodynamický poloměr  $R_H$ .

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

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

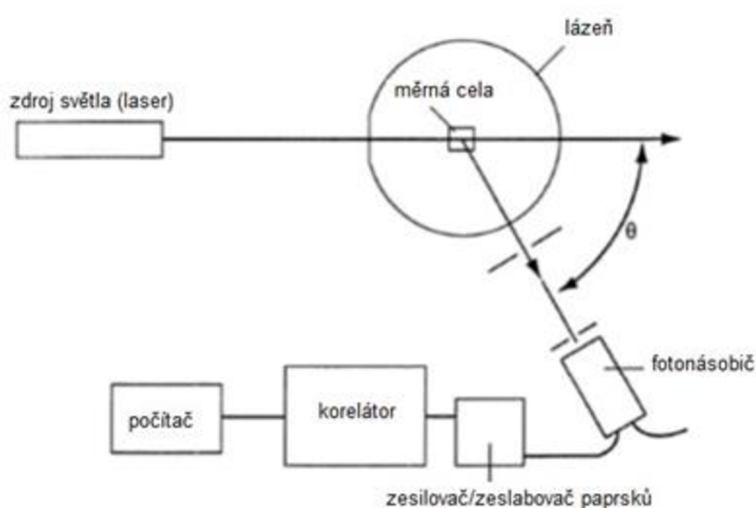
Kde  $A(\tau)$  nese informaci o distribuci velikostí částic.

Podrobnější vyklad teorie dynamického rozptylu světla a bližší detaily k odvození použitých rovnic lze nalézt v literatuře [91 - 96].

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 mnohonásobného rozptylu světla, 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, který se v instrumentaci přístroje zetasizer umístí pod úhlem  $173^\circ$  (tzv. zpětný rozptyl světla). 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 a s tím spojený 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.

Celá instrumentace je schematicky znázorněna na následujícím obrázku.



Obrázek 13. Instrumentace DLS

### 2.8.1. Aplikace metody DLS pro analýzu biopolymerů

DLS jako další metoda rozptylu světla je dost využívána pro analýzu různých biopolymerů a jejich komplexů.

#### **Polyelektrolyty**

Jedním z příkladů studia polyelektrolytových polymerů je studium chitosanu. Metodu dynamického rozptylu světla ke studiu chitosanových analytů využil Oliveira [97]. Byly studovány relaxační časy molekul chitosanu v jeho různě koncentrovaných roztocích, kde bylo objeveno, že se zvyšující se koncentrací chitosanu, relaxační časy se výrazně snižují, což by mohlo být důsledkem zvýšené pohybové homogenity molekul v roztoku. S ohledem na snižující se hodnotu entalpie, tento objev byl rovněž vysvětlen uplatněním fyzikálních intermolekulárních interakcí hydrofobní povahy mezi nepolárními skupinami chitosanu. Výsledné intermolekulární komplexy chitosanu mají pravděpodobně kompaktnější, ale méně flexibilní strukturu, což má za následek jejich rychlejší pohyb.

V jiném výzkumu polyelektrolytů [98] se poměrně explicitně zabývali studiem difúzních koeficientů pro různé polymerní polyelektrolytové systémy. Při měření DLS polyelektrolytů

v roztoku bez přidané soli, nebo s minimálním jejím množstvím, byly objeveny dva píky, odpovídající rychlejší (menším) a pomalejší (větším) částicím. Na podobný jev se narazila spousta vědců i v předchozích studiích. Existuje dokonce i určitá teorie, která se to pokouší vysvětlit. Rychle difundující se částice jsou pravděpodobně jednotlivé polyelektrolytové řetězce spárované s protiionty. Takové protiionty vykazují určitý fluktuující pohyb v blízkosti příslušného polyelektrolytu, čímž generují elektrické pole, které je ve výsledku schopné urychlit pohyb částic. Větší částice, na druhé straně, jsou pravděpodobně agregáty několika polyelektrolytových řetězců, které vznikají díky elektrostatickým interakcím. V daném studiu se pokusili o ověření této teorie, kde byl využit syntetický polymer (P('amidine'MS)-co-PS), který je schopen reverzibilně přecházet z nabitého do neutrálního stavu probubláváním CO<sub>2</sub> nebo N<sub>2</sub> v dimethylformamidu (DMF). Při studiu takového přechodu pomocí dynamického rozptylu světla, byly objeveny dva vyše zmíněné píky při nabitém stavu polymeru, ale pouze jeden pík při stavu neutrálním. Když se k polymeru v nabitém stavu (probublávání CO<sub>2</sub>) přidalo větší množství soli (LiBr), zůstal pouze jeden pík, odpovídající částicím o trochu větším, než v neutrálním stavu (bez soli), a to pochopitelně kvůli odstínění elektrostatických interakcí polyelektrolytů.

### **Proteiny**

Metoda DLS je také dobře aplikovatelná na studium proteinů, jejich případné agregaci a denaturaci

Aschi Adel a spol. se zabývali studiem denuraci molekuly globulárního proteinu (BSA) působením denaturačních činidel jako hydrochlorid guanidinu (GdmCl) a močovina, a také denuraci vlivem zvýšené teploty. [99] Bylo zjištěno, že tyto dvě denaturační činidla působí odlišnými mechanismy, a mají různé rychlosti a průběhy denurace. Působením obou denaturačních činidel hydrodynamický poloměr molekuly BSA se zvýšil ze 4 nm na cca 8,5 nm, s tím rozdílem, že pro kompletní denuraci v případě GdmCl bylo potřeba nižší koncentrace činidla. Zvýšená teplota, dodatečně k přidaným denaturačním činidlům, výrazně zvýšila výsledný poloměr denaturovaného albuminu až na hodnotu 17 nm. Podle stanoveného druhého viriálního koeficientu, který charakterizuje interakce mezi molekulami proteinu a solventem, bylo stanoveno, že v plně denaturovaném stavu se výrazně uplatňují mezimolekulové interakce a interakce se solventem, jelikož všechny funkční skupiny se stávají plně přístupnými těmto interakcím.

### **Komplexy biomakromolekul**

Hiroshi Matsunami a spol. [100] ve své studii elektrostatických interakcí mezi BSA a poly(vinyl alkohol)sulfátem draslíku (KPVS) využili jak metodu DLS, tak i turbidimetrické titrace a elektroforetický rozptyl světla (ELS). Studium bylo provedeno při konstantní hodnotě pH 3 a měnící se iontové síle v rozsahu hodnot 0,001 - 0,2 M. Při turbidimetrických titracích, kde KPVS byl titrován do roztoku albuminu, byla sledována zvyšujícími se absorbance, přičemž narůst byl tím výraznější, čím vyšší byla iontová síla. Toto se ověřilo i při DLS měření. Pro každý z vzorků byl naměřen pouze jeden pík odpovídající hydrodynamickému poloměru přítomných částic. Hodnota tohoto poloměru se zvyšovala s rostoucí iontovou silou (0,001 - 0,2 M), ale neměnila se s množstvím přidaného polyelektrolytu (0,3 nebo 0,6 mL).

V dalším studiu Caterina Branca a spol. [101] se zabývali charakteristikou komplexů alginátu a myoglobinu metodou DLS a infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací. Jako první byl stanoven difúzní koeficient samotné molekuly alginátu, a to měřením dynamického rozptylu z více úhlů a při několika koncentracích polyelektrolytu. Z extrapolace hodnot naměřené intenzity byly získány hodnoty efektivního difúzního koeficientu, který se snižoval se zvyšující se koncentrací polyelektrolytu. Rychlejší pohyb při nižších koncentracích je pravděpodobně spojen s difúzí polyiontů spárovaných s protiionty,



když pomalejší pohyb při vyšších koncentracích pravděpodobně odpovídá interakcím mezi jednotlivými polyionty a vzniku větších domén z několika řetězců. Pro komplexy alginátu a myoglobinu bylo naopak objeveno zvýšení difúzního koeficientu s rostoucí koncentrací proteinu, což bylo vysvětleno tvorbou stabilnějších komplexů s menší tendencí k agregaci. Difúzní koeficient ale rovněž byl závislý na pH hodnotě. Při pH nižších, než pl myoglobinu (7,2) difúzní koeficient komplexu byl výrazně nižší, což se vysvětluje vzájemnou neutralizací nábojů proteinu a polysacharidu a následnou tvorbou větších agregátů. Zvyšující se iontová síla má rovněž za následek snižující se hodnotu difúzního koeficientu, což vystihuje elektrostatickou povahu komplexů, a s tím spojené stínění povrchových nábojů molekulami přidané soli.

## 2.9. Zeta potenciál

Obecně elektrický potenciál se vytváří kolem každé nabitě částice (elektrické pole). Většina látek získává povrchový náboj, když je v kontaktu s polárním rozpouštědlem (např. voda) [102]. Existuje několik mechanismů získání náboje:

- Rozdíl elektronové afinity mezi dvěma fázemi (pevná látka – roztok)
- Ionizace povrchových skupin
- Rozdílná adsorpce iontů z roztoku elektrolytu
- Rozdílné schopnost rozpuštění iontů z krystalické matice
- Povrchová anisotropie
- Isomorfní substituce

V této diplomové práci se hlavně bude jednat o mechanismus povrchové ionizace částic, kde hodně důležitou roli hraje pH prostředí.

Každá nabitá částice ovlivňuje distribuci iontů v okolním prostředí, což vede ke zvýšené koncentraci protiiontů u povrchu dané částice (iontů s opačným nábojem, než má částice). Akumulace nábojů na rozhraní dvou fází (částice/rozpouštědlo) vytváří elektrickou dvovrstvu. Nejjednodušším modelem takového systému je Helmholtzův model, kde se předpokládá, že obě vrstvy jsou zafixovány paralelně a vytváří tak kondenzovaný obal kolem částice. Tento model však zdaleka neplatí pro roztoky, jelikož neuvažuje difúzi iontů. Goyl a Chapman proto navrhli model difúzní dvovrstvy. Takový model předpokládá, že jedna z vrstev představuje pevně vázané ionty obalujících nabitou částici, neboli kompaktní nehybnou Sternovou vrstvu, když druhá vnější vrstva protiiontů se postupně difunduje do okolního prostředí s rostoucí vzdáleností od částice (difúzní vrstva) [103].

Zeta ( $\zeta$ ) potenciál je elektrokinetický potenciál existující v difúzní vrstvě. Nachází se na hranici tzv. Roviny skluzu neboli povrchu hydrodynamického smyku, který charakterizuje iontový obal nabitě částice pohybující se spolu s touto částicí.

S rostoucí vzdáleností od nabitě částice elektrický potenciál klesá lineárně z hodnoty  $\psi_0$  (aktuální termodynamický potenciál na povrchu částice) do hodnoty  $\psi_d$  (Sternův potenciál), a dále exponenciálně k nulové hodnotě v difúzní vrstvě.

$$\psi = \psi_d \exp[-\kappa x] \quad (28)$$

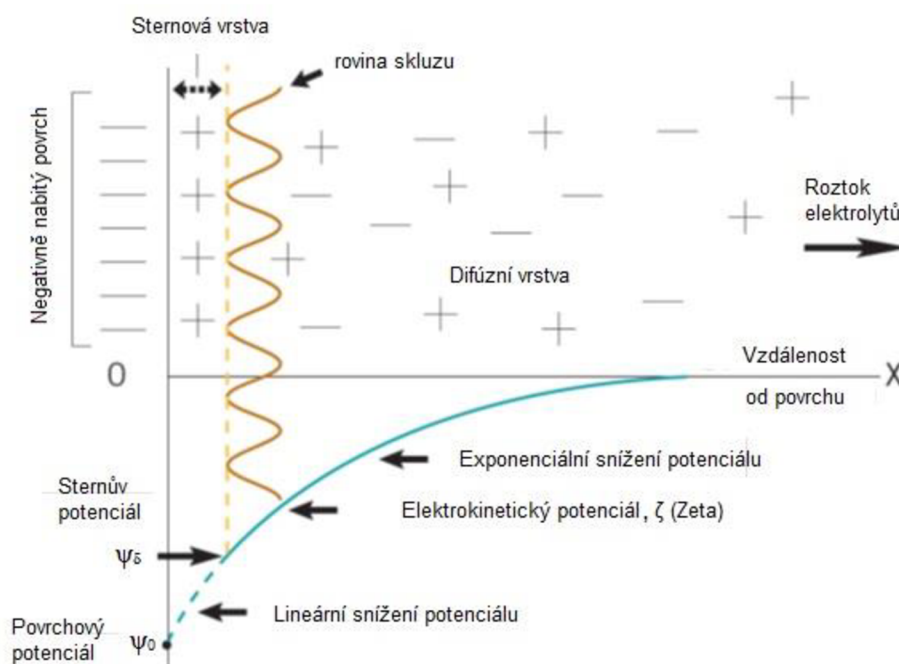
Kde  $x$  je vzdálenost od povrchu a  $\kappa$  je Debye-Huckelův parametr, definovaný rovnicí:

$$\kappa = \left[ 2e^2 N_A c z^2 / \epsilon \epsilon_0 k_B T \right]^{1/2} \quad (29)$$

Kde  $e$  je elementární náboj,  $N_A$  je Avogadrova konstanta,  $c$  je koncentrace elektrolytu s valenci  $z$ ,  $\varepsilon$  je dielektrická konstanta a  $\varepsilon_0$  je permitivita vakua a  $k_B$  je Boltzmannova konstanta

Z rovnic (28) a (29) je vidět, že elektrický potenciál je přímo závislý na kompozici disperzního prostředí (iontová síla). Proto je nutné zdůraznit, že iontová síla ovlivňuje tloušťku dvojvrstvy. Čím je ta iontová síla vyšší, tím více je vrstva stlačena k povrchu a je ve výsledku kompaktnější. Pro charakterizaci tloušťky dvojvrstvy existuje konstanta  $\kappa$ , která je přímo uměrná odmocnině iontové síly.

Hodně důležitých vlastností koloidních systémů je funkcí náboje (potenciálu) koloidních částic. Mezi takové vlastnosti patří schopnost adsorpce částic (ionty a dipóly), a schopnost vzájemné interakce mezi částicemi a s tím spojená koagulace, sedimentace a stabilita částic v koloidním roztoku. Čím větší je absolutní hodnota zeta potenciálu částic, tím jsou ty částice stabilnější v roztoku, kvůli uplatňujícím se odpudivým elektrostatickým interakcím, které zabraňují koagulaci částic a následné sedimentaci. Za stabilní se považují částice s absolutní hodnotou Zeta potenciálu větší než 30 mV. Bohužel nejsme schopni přímo změřit hodnotu elektrodynamického potenciálu na povrchu částice  $\psi_0$  [104]. Ale jsme schopni stanovit hodnotu elektrokinetického potenciálu ( $\zeta$ -potenciálu). I když Zeta potenciál není identický s elektrickým potenciálem na povrchu, je často považován za identický se Sternovým potenciálem ( $\psi_d$ )



Obrázek 14. Rozložení elektrického potenciálu nabitého povrchu v roztoku

Důležitost znalosti zeta potenciálu vedla k vyvinutí několika metod pro jeho stanovení. Existuje několik technik, které jsou založeny na třech základních elektrokinetických jevech: elektroforéza, elektroosmóza, and streaming potenciál.

V této diplomové práci měření zeta potenciálu bude založené na elektroforéze.  $\zeta$ -potenciál se při této metodě určuje měřením elektroforetické mobility  $v_E$  částice umístěné v elektrickém pole, za použití vhodné mikroskopické techniky. Mobilita potom definuje hodnotu zeta potenciálu pomocí Smoluchowského rovnice:

$$v_E = 4\pi\varepsilon_0\varepsilon_r \frac{\zeta}{6\pi\mu} (1 + \kappa r) \quad (30)$$

Kde  $\varepsilon_0$  a  $\varepsilon_r$  jsou permitivity vakua a relativní dielektrická konstanta respektive,  $\mu$  je viskozita roztoku,  $r$  je rádius částice a  $\kappa$  je Debye–Hückelův parametr (viz rovnice 29),  $n_0$  je koncentrace iontů v celém objemu,  $z$  je valence iontu,  $e$  je elementární náboj (elektron),  $k_B$  je Boltzmannova konstanta, a  $T$  je absolutní teplota.

Zeta potenciál je možné stanovit pomocí Laserové Dopplerové Elektroforézy [105], LDE je technika schopná měřit pohyb nabitých částic v aplikovaném elektrickém poli a zakládá se na Dopplerovém principu, který nám říká, že pohybující se částice rozptylují dopadající světlo s větší intenzitou, než částice statické. V dané metodě se měří posun frekvencí mezi rozptýleným a původním zářením dopadajícím na pohybující se nabitě částice. Jelikož frekvence světla je řádově  $10^{14}$  Hz, takový posun frekvencí je možné změřit pouze optickým smíšením anebo interferometrickou technikou. To se uskuteční pomocí dvou koherentních paprsků světla se stejnou délkou dráhy a pocházejících z jednoho zdroje. Jeden z těchto paprsků prochází disperzí se vzorkem, druhý slouží jako reference. Rozptýlený paprsek se kombinuje s referenčním paprskem, kde výsledkem je modulovaná vlna, která má nižší již měřitelnou frekvenci, a která je rozdílem frekvencí obou vln a nese v sobě informaci o mobilitě částic. Frekvence modulované vlny se porovnává s referenční vlnou, která představuje modulovaný pomocí oscilačního zrcadla původní laserový paprsek. Při použití fázové analýzy rozptýleného světla, princip měření zůstává stejný, jediné zde již místo frekvenčního posunu se měří fázový posun porovnávaných vln. Takový fázový posun je přímo úměrný změně pozice pohybující se částice. A střední posun částice s časem nám udává informaci o elektroforetické mobilitě potřebné ke stanovení zeta potenciálu. Během takového měření se aplikované napětí rychle mění několikrát. Ze směrnic několika přímků závislosti fázového posunu s časem dostáváme střední hodnotu zeta potenciálu. Tento fázový posun můžeme vyjádřit pomocí následující rovnice:

$$\Delta f = \frac{2v_E \sin \frac{\theta}{2}}{\lambda} \quad (31)$$

Kde  $v_E$  je elektroforetická rychlost částice,  $\lambda$  vlnová délka aplikovaného laserového paprsku,  $\theta$  je úhel rozptylu světla.

Závislost elektroforetické mobility na zeta potenciálu se potom dá vyjádřit pomocí Henryho rovnice:

$$v_E = \frac{2\varepsilon\zeta F(\kappa a)}{3\eta} \quad (32)$$

Kde  $v_E$  je mobilita částice,  $\zeta$  je zeta potenciál,  $\eta$  je viskozita prostředí a  $F(\kappa a)$  je Henryho funkce,  $\kappa$  je Debye–Hückelův parametr.

Zetasizer Nano ZS je přístroj, který využívá LDE principu pro stanovení zeta potenciálu. Zahrnuje v sobě Mach–Zenderův interferometr a využívá také principu fázové analýzy rozptýleného světla (PALS). Jako zdroj vloženého napětí slouží Uzigurisova ponorná cela.

Jako u každého analytického měření, i u této metody se můžeme setkat s určitými chybami. Největší zkreslení výsledku může být způsobeno vznikajícími agregáty a přítomností částic prachu [105]. Analyzovaný vzorek by měl rovněž být transparentní. Z toho vyplývá nutnost filtrace vzorku před samotným měřením. Vysoká iontová síla a s tím spojená vysoká vodivost vzorku, a stejně tak vysoká koncentrace vzorku, mohou rovněž nepříznivě ovlivnit přesnost měření. Příčinou tomu je polarizační koncentrační efekt, spojený s migrací nábojů a následným vyloučením Joulova tepla. Obecně se těmto vlivům dá zabránit pomocí snížení koncentrace vzorku a také zvýšením rychlosti změny vloženého napětí.

## 2.10. Izotermická titrační kalorimetrie

Izotermická titrační kalorimetrie je metoda umožňující termodynamickou charakterizaci reakcí mezi molekulami analytu. Je to velmi citlivá metoda měřící reakční teplo vyloučené nebo spotřebované při interakci dvou molekul při konstantní teplotě. Tato metoda funguje na kompenzačním principu, a měří fakticky elektrickou práci (v  $\text{J s}^{-1}$  neboli W), potřebnou na vyrovnání rozdílu teplot mezi referenční celou a celou se vzorkem, způsobeného vyloučením nebo spotřebováním tepla doprovázejícího reakci mezi molekulami analytu [106].

Instrumentace v sobě zahrnuje dvě identické cely z chemicky inertního materiálu s dobrou tepelnou vodivostí obalené do adiabatického pláště. Jako materiál pro cely se používá například slitina Hastelloy anebo také zlato. Jedna celda slouží jako referenční, obsahuje stejné rozpouštědlo jako u měrné cely se vzorkem, a ještě před začátkem měření se tam vkládá konstantní tepelný tok (méně než 1 mV). Druhá celda slouží pro samotné měření vzorku. Do této cely se umístí roztok jednoho analytu a do titrační nádoby se umístí roztok analytu druhé interagující komponenty. Poslední se titruje v přesně definovaných množstvích do roztoku prvního analytu a sleduje se při tom tepelná změna vazebné reakce. Veškeré potřebné termodynamické parametry reakce se stanovují z reakční izotermie, která v sobě zahrnuje reakční teplo při každém titračním kroku. Rozdíl teplot mezi celami je zaznamenán pomocí mikrovoltmetru, který posílá signál do počítače, a poslední upravuje tepelný kompenzační tok aplikovaný do měrné cely [106,109].

Nezpracovaný výstup měření vypadá, jako soubor po sobě následujících píků, které odpovídají jednotlivým přídávkům titrovaného roztoku do měrné cely. Plocha pod každým píkem odpovídá reakčnímu teplu, neboli práci vykonané pro vyrovnání teplot mezi referenční a měrnou celou. Integrací těchto píků dostáváme celkovou hodnotu vyměněného tepla pro každý přírůstek analytu. Z výsledné izotermie jsme schopni definovat vazebnou afinitu ligandu ( $K_a$ ), volnou Gibbsovou energii reakce ( $\Delta G_r^0$ ), vazebnou energii neboli entalpii  $\Delta H_r^0$ , a následně změnu entropie  $\Delta S_r^0$  a stechiometrii reakci neboli počet vazebných míst  $n$ . A to vše s použitím základních termodynamických rovnic:

$$\begin{aligned}\Delta G_r^0 &= -RT \ln K_a \\ \Delta G_r^0 &= \Delta H_r^0 - T\Delta S_r^0\end{aligned}\quad (33)$$

Gibbsová energie každé asociační reakce je však funkcí teploty, a můžeme ji vyjádřit rovnicí:

$$\Delta G(T) = \Delta H(T_R) + \int_{T_R}^T \Delta C_p dT - T\Delta S(T_R) - T \int_{T_R}^T \Delta C_p d \ln T \quad (34)$$

Kde  $\Delta H$  a  $\Delta S$  jsou změny entalpie a entropie,  $\Delta C_p$  je změna tepelné kapacity,  $T_R$  je vhodná referenční teplota.

Když  $\Delta C_p$  není závislá na teplotě, výraz se zjednoduší na:

$$\Delta G(T) = \Delta H(T_R) - T\Delta S(T_R) - \Delta C_p \left[ T - T_R - T \ln \left( \frac{T}{T_R} \right) \right] \quad (35)$$

Změny entalpie a entropie jsou ale na teplotě závislé:

$$\Delta C_p = \frac{\partial \Delta H}{\partial T} = T \frac{\partial \Delta S}{\partial T} \quad (36)$$

Popis termodynamiky každé reakce vyžaduje definování hodnot volné Gibbsové energie  $\Delta G$ , entalpie  $\Delta H$  a entropie  $\Delta S$  při dané referenční teplotě.

Je potřeba podotknout, že někdy afinita a s tím spojená volná Gibbsova energie u dvou různých reakcí může být stejná, ale mechanismus vazby se přitom může radikálně lišit, jelikož na změně Gibbsové energie se podílí jak entalpický tak i entropický členy. Když v první

reakci se vazba skuteční převážně kvůli entalpické změně, v druhé reakci již může převládat entropicky člen [106].

Když interakce probíhá kvůli přímé vazbě ligandu na makromolekulu nebo díky vodíkovým vazbám, obecně převažující vliv na Gibbsovou energii má entalpická změna  $\Delta H$ . Pokud však interakce nese hydrofobní nebo elektrostaticky charakter, uplatňuje se při tom solvatace a s tím spojené uvolnění malých molekul vody do prostředí, anebo tam také probíhá výrazná konformační změna. Jedna se již o entropicky řízenou interakci, což znamená, že člen  $T\Delta S$  převládá nad entalpickým členem  $\Delta H$ . Bylo zjištěno například, že při titraci silně nabitých polyelektrolytů vazba ligandu nese hlavně entropickou povahu kvůli intenzivnímu uvolnění protiiontů do roztoku, a změna entalpie je kladná  $\Delta H > 0$ . Slabě nabité polyelektrolyty však vážou ligandy převážně entalpicky ( $\Delta H < 0$ ), kvůli výraznému uplatnění vodíkových a van der Waalsových vazeb. U některých polyelektrolytů můžeme dokonce pozorovat smíšený signál jak s kladnou tak i zápornou změnou entalpie, což je pravděpodobně kvůli uplatnění různých mechanismů vazby, možným konformačním změnám, ionizaci funkčních skupin a interakci s rozpouštědlem. Toto výrazně komplikuje interpretaci výsledků kalorimetrie. Samozřejmě musíme uvažovat také externí vlivy jako pH a iontová síla, které mají také velký vliv na výsledky měření.

Při provádění titrací při různých teplotách je také možné stanovit změnu tepelné kapacity, která doprovází danou reakci podle výrazu  $\Delta C_p = \frac{\partial \Delta H}{\partial T}$ . Obvykle  $\Delta C_p$  nese zápornou hodnotu, jelikož většinou výsledný komplex má nižší tepelnou kapacitu, než součet kapacit jednotlivých komponent. Většinou se to děje kvůli změně hydratačního povrchu komplexů oproti hydratačnímu povrchu jednotlivých komponent, ale rovněž kvůli změně vibračních stavu molekul [107].

Obecně, všechny reakce můžeme rozdělit na exotermní, kde teplo se reakcí vylučuje, a endotermní, kde se teplo reakcí spotřebovává. Tomu odpovídá směr píků odpovídajících přídávků titrovaného ligandu při kalorimetrickém měření. Píky jsou směřovány nahoru, pokud se teplo do systému zavádí, což se děje při kompenzací probíhající endotermní reakce. Píky, které jsou směřovány dolů, odpovídají exotermním reakcím, jelikož definují teplo, které se ze systému odvádí pro vyrovnání způsobeného teplotního rozdílu.

Klasická reakční izoterma je většinou sigmoidálního charakteru. První přídávky většinou vyvolávají nejintenzivnější tepelný tok, píky jsou výrazné, vazebná místa analytu jsou plně dostupné pro molekuly ligandů, ale s postupnou saturací těchto vazebných míst, se tepelný tok snižuje, až vymizí úplně při kompletní saturaci všech vazebných míst makromolekuly. Zůstává pouze malý signál odpovídající rozpouštěcímu teplu molekul přidaného ligandu.

Pro každý pík, tepelný tok můžeme vyjádřit pomocí rovnice:

$$\Delta q = V\Delta H\Delta[L_B] \quad (37)$$

Kde  $\Delta q = q_i - q_{i-1}$  je změna tepla spojená se změnou množství navázaného ligandu,  $\Delta[L_B]$  je změna koncentrace navázaného ligandu,  $\Delta H$  je vazebná entalpie a  $V$  je reakční objem.

Protože změna tepelného toku  $\Delta q$  je primo úměrná zvýšení množství navázaného ligandu, amplituda tepelného toku klesá s postupnou saturací všech vazebných míst. Takové teplo však v sobě zahrnuje nejenom teplo spojené s probíhající interakcí ale také rozpouštěcí teplo ligandu  $\Delta q_{i,dil}$  a teplo spojené s nescifickými interakcemi  $\Delta q_{i,ns}$

$$\Delta q_{i,app} = \Delta q_i + \Delta q_{i,dil} + \Delta q_{i,ns} \quad (38)$$

Nejjednodušší model předpokládá, že makromolekula obsahuje určité množství nezávislých vazebných míst se stejnou afinitou k ligandu. V tomto případě koncentraci navázaného ligandu můžeme vyjádřit:

$$[L_{B,i}] = [M] \frac{n_i K_i [L]}{1 + K_i [L]} \quad (39)$$

Kde  $[L_{B,i}]$  je koncentrace navázaného ligandu na vazebných místech z  $i$ -setu,  $[M]$  je celková koncentrace makromolekul dostupných pro vazbu ligandů,  $K_i$  je vnitřní asociační konstanta pro vazebná místa z  $i$ -setu,  $n_i$  je počet vazebných míst typu  $i$  na každé makromolekule, a  $[L]$  je koncentrace volného ligandu.

Celkové teplo potom je vyjádřeno rovnicí:

$$Q = V \sum_i \Delta H_i \Delta [L_{B,i}] = V [M] \sum_i \frac{n_i \Delta H_i K_i [L]}{1 + K_i [L]} \quad (40)$$

Pro vyjádření koncentrace ligandu  $[L]$  můžeme rovněž použít výraz pro celkovou koncentraci ligandu  $[L_T] = [L_B] + [L]$ , kde  $[L_T]$ ,  $[L_B]$  a  $[L]$  představují celkovou koncentraci, koncentraci navázaného a volného ligandu respektive.

Jednotlivé parametry jako  $n_i$ ,  $K_i$  a  $\Delta H_i$  se vypočítávají buď z jednotlivých píků tepelných toků  $q$ , anebo z integrační hodnoty celkového tepla  $Q$ . Pro eliminaci vlivu nepřesnosti doprovázejících každý pík  $q$  na výslednou analýzu, preferuje se vypočet parametrů z jednotlivých  $q$  hodnot.

Pokud makromolekula obsahuje více než jeden typ vazebných míst, celkový vypočet se komplikuje zaváděním dalších vazebných parametrů, jako afinitní konstanta, vazebná entalpie a počet odpovídajících vazebných míst dalšího typu ( $n_2 K_2 \Delta H_2$ ). Celkové integrační teplo se potom skládá ze dvou částí odpovídajících každému typu vazebných míst  $Q = Q_1 + Q_2$ .

Experimentálně stanovena hodnota  $\Delta H_{i,app}$  však v sobě zahrnuje nejen příspěvek vazebné reakce, ale také všechny další příspěvky nspecifických interakcí, jako například reorganizace molekul rozpouštědla, nebo také solvatační efekt rozpouštědla [108]. Nemůžeme také zanedbat vliv protonačního efektu, jelikož vyloučené protony jsou schopny ionizovat molekuly rozpouštědla a přispívají tak k hodnotě ionizační entalpii tohoto rozpouštědla  $\Delta H_{buff}$ , a také k hodnotě entalpie odpovídající protonizační reakci  $\Delta H_{H^+}$ .

Entropie vazebné reakce  $\Delta S$  se stanoví jako poslední, ze znalostí všech předchozích termodynamických parametrů. Většinou je to pozitivní hodnota, a to kvůli již zmíněné redukci solvatačního povrchu a souvisejícímu uvolnění velkého počtu malých molekul rozpouštědla [109].

Pro úspěšnou analýzu vzorku je potřeba přesně a správně stanovit veškeré parametry měření včetně koncentrací obou vazebných komponent, množství každého přídatku, frekvence míchaní a časové odstupy mezi přídatky. Pokud koncentrace vazebných míst molekuly je o hodně vyšší, než převrácená hodnota afinitní vazebné konstanty  $\frac{1}{K_a}$ , všechny

přidané molekuly ligandů budou navázané až do úplného nasycení vazebných míst, a vazebná izoterma bude mít místo sigmoidálního, čtvercový tvar, se směrnicí o nekonečné hodnotě. V opačném případě, kdy koncentrace molekulárních vazebných míst je o hodně nižší, než reciproká hodnota afinity  $\frac{1}{K_a}$ , kompletního nasycení vazebných míst se dosahuje,

a izoterma nemá výrazný sklon. Existuje určitá hodnota  $C$ , která pomáhá určit optimální koncentraci výchozích látek [110]. Tato hodnota  $C$  se získá vynásobením  $K_a$  a celkové

koncentraci vazebných míst. V některých případech však optimální koncentrace není dosažitelná. Při vysokých  $K_a$  hodnotách (vice jak  $10^9 \text{ M}^{-1}$ ) optimální koncentrace je příliš nízká pro realizaci měření, když v opačném případě, při příliš nízké hodnotě  $K_a$ , optimální koncentrace je příliš vysoká a je riziko nežádané agregaci částic. V těchto případech je potřeba buď upravit  $K_a$  hodnotu změnou pH prostředí anebo využít kompetitivní titrace jako alternativní variantu. Kde ligand s vysokou afinitou se titruje do roztoku makromolekuly s již navázaným ligandem se slabou vazebnou afinitou [111].

Ještě před začátkem měření, veškeré roztoky se mají vytemperovat na konstantní teplotu. Roztoky obou komponent by se mely připravovat ve stejném pufru a měla by se provést kalibrace přístroje pro minimalizaci až vyloučení signálu rozpouštěcího tepla. Nicméně vyloučení tohoto signálu je možné realizovat pomocí dvojitě titrace do měrné cely a do cely referenční. Vzorek by se rovněž měl zbavit veškerých bublin, které dokážou výrazně zkreslit výsledky měření. V ideálním případě by se vzorek mel také zbavit veškerých soli a dialyzován. Je potřeba také dbát na čistotu měrné cely a její správné umístění v přístroji během měření.

Hlavní problém, s kterými se můžeme potkat u výsledků kalorimetrie, je nesigmoidální průběh izotermy, což znemožňuje stanovení potřebných termodynamických parametrů. Příčinou nesigmoidálního průběhu může sloužit několik faktorů. Takové externí faktory jako přítomnost bublin, znečištění měrné cely, anebo její špatné umístění můžeme upravit a dostat se ve výsledku k správnému sigmoidálnímu průběhu. Je ale také možnost uplatnění jiných faktorů, jako jiné mechanismy a typy vazeb, které kvůli konformačním změnám se mohou měnit v průběhu měření, což má za následek komplikace při definování termodynamických parametrů reakce.

## 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1. Materiály

Na přípravu vzorků byl použit hyaluronan sodný od společnosti Contipro Biotech s.r.o (Dolní Dobrouč, Česká Republika) v rozsahu molekulových hmotností 90-130 kDa, 190-340 kDa, 1500-1750 kDa. Všechny použité vzorky hyaluronanu měly označení Technical Grade. Albumin hovězího séra (BSA) byl dodán společností Sigma-Aldrich ve formě lyofilizovaného prášku a s čistotou >98%. Z dalších chemikálií byl použit dusičnan sodný ( $\text{NaNO}_3$ ) s obsahem 99,0% (Sigma-Aldrich). Na přípravu pufrů byly použity kyselina citronová monohydrát s obsahem 99,8 hm.% (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; 9 (Mettler Toledo). Všechny vzorky a zásobní roztoky byly připravené v deionizované vodě Milli-Q, připravovane v přístroji Purelab Option ELGA.

### 3.2. Metody

#### 3.2.1. Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztoky hyaluronanu sodného a hovězího sérového albuminu byly připraveny v MilliQ vodě. Pro přípravu byl použit vrstvovací způsob, kde za stálého míchání na magnetické míchačce se biopolymer střídavě přidával do MilliQ vody, až do maximálního možného převedení navážky. Takto připravené zásobní roztoky byly míchány minimálně 24 hodin při laboratorní teplotě.

#### 3.2.2. SEC-MALLS příprava vzorků

Příprava pufrů o pH 4 a pH 7 byla provedena v MilliQ vodě. Nejprve byly připraveny roztoky kyseliny citronové o koncentraci  $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  a hydrogenfosforečnanu disodného o koncentraci 0,1 M. Po kalibraci pH metru pomocí pufrů o známých pH hodnotách (pH 2; 4,0 a 7) se změřila pH hodnota roztoku kyseliny citronové/hydrogenfosforečnanu disodného, potom byl, za neustáleného míchání, postupně přidáván hydrogenfosforečnan disodný/kyselina citronová, až do dosažení požadované hodnoty pH pufru. Po půl hodiny míchání bylo provedeno kontrolní měření a ověření pH hodnoty připraveného pufru. V případě pufru o pH 4 se hydrogenfosforečnan disodný po dávkách přidával ke kyselině citronové. V případě pufru o pH 7 se naopak kyselina citronová postupně přidávala k hydrogenfosforečnanu disodnému.

Ze zásobních roztoků byly 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 8 řad vzorků, které se lišily prostředím a molekulovou hmotností použitého hyaluronanu sodného. Takto připravené vzorky byly míchány na magnetické míchačce po dobu minimálně 12 hodin. V případě pufru,  $\text{NaNO}_3$  sůl byla již obsažena v zásobních roztocích a následně ve vzorcích, ale v případě prostředí  $\text{NaNO}_3$ , sůl byla přidána až po 12 hodinovém míchání roztoků vzorků v Milli-Q vodě. Výsledná koncentrace  $\text{NaNO}_3$  ve všech prostředích vzorků byla  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

Dále v prostředí pufru o pH 7 byla připravena další řada s použitím stejných koncentrací hyaluronanu a albuminu, ale po dobu přípravy a 12 hodinového míchání byla udržována při teplotě  $37^\circ\text{C}$ . Teplota byla udržována pomocí umístění vzorků do vodní lázni nacházející se v sušárně nastavené na  $37^\circ\text{C}$ . Takto byly připraveny celkem 2 další řady s použitím vysoko a nízkomolekulového hyaluronanu.

Dodatečně byly připraveny vzorky obsahující pouze BSA o různé koncentraci ve stejných prostředích jak u předchozích vzorků hyaluronanu a albuminu (Milli-Q,  $\text{NaNO}_3$ , pH 4, pH 7).



Měření pH pufrů a vzorků bylo provedeno pomocí přístroje SevenMulti Metler toledo s použitím elektrody Mettler Toledo InLab Routine Pro pH 0 -14. Hodnota pH byla vždy odečtena až po ustálení a byla rovněž použita korekce teploty.

Podrobnější složení výsledných roztoků vzorků je popsáno v tabulce níže (viz Tabulka 1,2)

Dále v textu pro zjednodušení budou použité zkratky:

- **NMHA** pro nízkomolekulovou hyaluronovou kyselinu
- **VMHA** pro vysokomolekulovou hyaluronovou kyselinou

Tabulka 1. Příprava vzorku HA/BSA

Řada	NM/VMHA	prostředí	c (HA) [g·dm <sup>-3</sup> ]	c (BSA) [g·dm <sup>-3</sup> ]
1	NMHA 90-130 kDa	Milli-Q	5	0
2		NaNO <sub>3</sub>		0,25
3		Pufr pH 4		0,5
4		Pufr pH 7		1
5	VMHA 1500-1750 kDa	Milli-Q	1	2
6		NaNO <sub>3</sub>		5
7		Pufr pH 4		10
8		Pufr pH 7		

Tabulka 2. Příprava vzorků BSA

Řada	Prostředí	c (BSA) [g·dm <sup>-3</sup> ]
1	Milli-Q	0,25
2	NaNO <sub>3</sub>	0,5
3	Pufr pH 4	0,75
4	Pufr pH 7	1
5	Milli-Q	1,5
6	NaNO <sub>3</sub>	2
7	Pufr pH 4	5
8	Pufr pH 7	10

### 3.2.3. SEC-MALLS měření vzorků

Měření SEC-MALLS bylo provedeno za použití SEC-MALS (GPC-MALS) systému. Byly použité detektory: MALLS víceúhlový detektor (17 úhlů) pro statický rozptyl světla, 18. detektor pod úhlem 90° pro dynamický rozptyl světla; VISKOSTAR detektor k určení viskozity; diferenční refraktometr sloužící ke stanovení koncentraci a UV-VIS detektor. Použitá mobilní fáze byla 0,1 mol·dm<sup>-3</sup> roztok NaNO<sub>3</sub>. Inkrement indexu lomu byl zadán v konstantní hodnotě 0,165 pro HA a směsi HA a BSA a 0,185 pro čistý BSA. Objem nástřiku byl nastaven na hodnotu 50 µL. Průtok byl nastaven na hodnotu 0,4 ml/min. Použitá separační kolona byla PL aquagel-OH MIXED 8 µm, kde náplň je hydrogel na bázi porózní

siliky. Jako standard pro molekulovou hmotnost byl použit analytický standard pro GPC Dextran 410 kDa a 150 kDa. Vzorky ještě před měřením byly vždy přefiltrovány přes filtr 0,45  $\mu\text{m}$ . Odběr vzorků byl prováděn automatickým dávkovačem (autosampler).

#### 3.2.4. DLS měření vzorků

Měření DLS bylo provedené v titračním modu na přístroji Malvern Zetasizer Nano ZS. Roztok BSA byl titrován do roztoku HA. Měření bylo provedeno celkem 8krát s použitím buď VMHA nebo NMHA a v 4 různých prostředích (Milli-Q,  $\text{NaNO}_3$ , pH 4 a pH 7). Počáteční objem roztoku HA v kyvetě byl 10 mL s koncentrací HA v případě NMHA  $10 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  a  $2 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  u VMHA. Koncentrace titrovaného BSA byla vždy  $40 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Do programu byly zadány následující parametry: konečná koncentrace BSA v roztoku byla stanovena na hodnotu  $13,3 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ , a inkrement odpovídajícího zvýšení koncentrace BSA s každým přídatkem v hodnotě  $0,35 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Hodnoty koncentrace byly zvoleny pro relevantnost a možnost následujícího porovnání dat DLS a SEC-MALLS měření s ohledem na stejné koncentrační poměry u vzorků obou metod. V režimu autotitrace byly automaticky zaznamenány hodnoty velikosti částic, zeta potenciálu a pH roztoku. Po celou dobu měření byla zajišťována konstantní teplota  $25^\circ\text{C}$ , a to pomocí termostatu, který je součástí instrumentace přístroje. Pro měření byla použita průtočná plastová cela.

Pro měření velikosti částic ve vzorcích byl použit He-Ne laser o vlnové délce 632,8 nm pod úhlem  $173^\circ$ . Čas temperování vzorků před měřením byl nastaven na 60 sekund. V nastavení měření bylo zvoleno dalších několik parametru. Byl zvolen materiál „protein“ s indexem lomu materiálu RI 1,450 a absorpci A 0,001. Voda byla zvolena jako rozpouštědlo, s viskozitou 0,8872 mPa·s, indexem lomu 1,330. Nastavení počtu měření velikostí bylo stanoveno na 3krát, s automatickou délkou trvání každého měření. Nastavení počtu měření zeta potenciálu bylo stanoveno na pouze jedno měření, ale s automatickým počtem opakování limitovaným na maximum 25krát.

#### 3.2.5. Měření ITC

Kalorimetrické měření bylo provedeno na modulárním mikrokolorimetru TAM III (TA Instruments, USA). Pro měření ITC byly použité připravené zásobní roztoky HA a BSA, ale nařaděné v definovaných poměrech. Roztok BSA byl titrován do roztoku HA, stejně jako u DLS titrací. Ředění nebylo aplikováno na roztok BSA, neboli byl použit přímo zásobní roztok BSA o koncentraci  $40 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Koncentrace HA byla stanovena na hodnotu  $0,1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  v případě VMHA a  $1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  v případě NMHA. Celkem bylo provedeno 8 měření s použitím VMHA anebo NMHA v různých prostředích (Milli-Q,  $\text{NaNO}_3$ , pH 4 a pH 7).

V každém z těchto měření celkem bylo nastaveno 25 přídatků, které obsahovaly 10  $\mu\text{L}$  roztoku BSA v různých prostředích. Výchozí objem roztoku HA v měrné cele byl 750  $\mu\text{L}$ . Výsledný objem vzorku po proběhnutí měření proto byl 1 mL. V průběhu měření byla udržována konstantní teplota  $25^\circ\text{C}$ . Interval mezi titračními přídatky byl nastaven na 10 minut.

Nastavení výstupního signálu bylo provedeno, tak že píky odpovídající exotermnímu signálu tepelného toku vždy odpovídaly probíhajícím exotermním interakcím (vylučujícím teplo), když endotermní signál tepelného toku odpovídal reakcím endotermním (teplo spotřebujícím).

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Předmětem studia dané diplomové práce bylo stanovení struktury a charakteru tvorby komplexů HA-BSA, a rovněž posouzení vlivu teploty na tvorbu těchto komplexů. K tomuto účelu byly použity metody rozptylu světla (SEC-MALLS, DLS a ELS) a izotermické titrační kalorimetrii. Výsledky z těchto metod budou diskutovány v následujících kapitolách pro typy hyaluronanu s různou molekulovou hmotností a rovněž pro srovnání i pro samotný albumin.

### 4.1. Řada BSA

Koncentrační řady samotného BSA (viz Tabulka 2) v různých prostředích byly zkoumány za účelem porovnání těchto výsledků s výsledky následujícího měření komplexů HA-BSA. Hlavním účelem bylo rovněž určení povahy BSA molekul v různých prostředích a stanovení vlivu případné změny struktury BSA na charakter výsledných komplexů.

#### 4.1.1. Výsledky SEC-MALLS měření

Obecně molekuly BSA jsou výrazně menší v porovnání s dlouhými řetězci molekul HA. Albumin má globulární kompaktní strukturu. A protože jsou to malé sférické molekuly, neměly by vykazovat úhlovou závislost rozptylu světla, a proto by nebylo možné stanovit jejich gyrační poloměr  $R_w$  metodou SEC-MALLS. Gyrační poloměr byl přesto naměřen u částic BSA při jeho menších koncentracích a hlavně v prostředích s vyšší iontovou silou (pufrů pH 4 a pH 7), což svědčí o pravděpodobném vlivu vysoké iontové síly na narušení struktury molekuly BSA. Molekulová hmotnost monomeru BSA je rovná 66 kDa. Naměřená molekulová hmotnost však byla o trochu vyšší v případě prostředí MilliQ a  $\text{NaNO}_3$ , což může být způsobeno podílem iontů z iontového obalu.

Bylo objeveno, že již samotné molekuly BSA se chovají odlišně v různých prostředích a při různých koncentracích z hlediska rozptylu světla. V prostředích MilliQ a v  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  roztoku  $\text{NaNO}_3$  byly objeveny celkem tři chromatografické píky s odpovídajícím signálem rozptylu světla. Částice jednotlivých molekul BSA se pravděpodobně vylučovaly ve druhém po pořadí, největším a nejvýznamnějším píku. Velké hmotné částice s malou viskozitou v prvním píku pravděpodobně představovaly agregáty molekul BSA. V třetím po pořadí píku se objevily již menší částice s větší viskozitou, což by mohly být fragmenty nebo rovněž kompaktnější agregáty BSA.

Bylo prokázáno, že přítomnost soli skoro vůbec neovlivní jednotlivé molekuly BSA (hlavní nejvyšší pík), ale zvýší molekulovou hmotnost agregátu prvního píku a naopak zredukuje velikost menších fragmentů posledního třetího píku. Proto můžeme usoudit, že iontová síla dokáže vyvolat intenzivnější agregaci molekul BSA stíněním jejich povrchových nábojů a výsledně způsobit výraznější rozdělení částic podle velikosti.

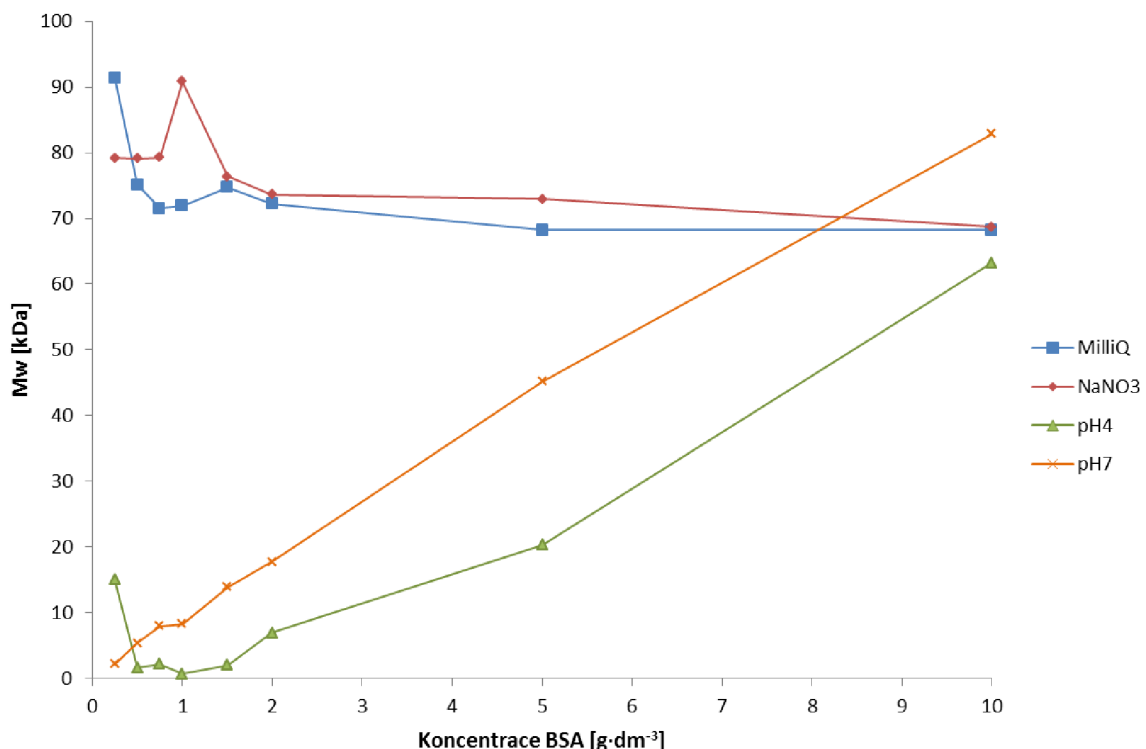
Tento fakt potvrzuje i UV signál z příslušného detektoru, který je o něco nižší v případě přítomnosti soli (směrnice přímky koncentrační závislosti je 0,0757 oproti 0,0761 v MilliQ), což může znamenat odfiltrování většího podílu agregovaného BSA (filtr má velikost pórů  $0,45 \mu\text{m}$ ). Po kvantitativním stanovení signálu UV-VIS (hodnota napětí) u všech vzorků koncentračních řad BSA v různých prostředích byla následovně sestavena kalibrační křivka koncentrační závislosti UV-VIS signálu. Tato křivka byla následovně využita pro stanovení koncentraci BSA v komplexech HA-BSA.

V případě použití pufrů (o pH 4 respektive pH 7) jako prostředí pro přípravu vzorků, chromatografický signál obsahuje 4 píky, což značí ještě výraznější rozdělení částic podle velikosti, než tomu bylo v případě  $\text{NaNO}_3$  roztoku. Zde je však těžko identifikovat, ve kterém z píků se vylučují monomerní molekuly BSA. Částice podle molekulové hmotnosti neodpovídají teoretické hodnotě BSA (66 kDa) v žádném z přítomných píků, a jsou výrazně menší podle molekulové hmotnosti, hydrodynamického poloměru a vnitřní viskozity, než částice v prostředích MilliQ anebo  $\text{NaNO}_3$ , což může být následkem disociaci podjednotek

BSA vlivem příliš velké iontové sily pufru (mimo iontů pufru jsou ještě přítomny ionty  $\text{NaNO}_3$  soli). Dalším důvodem může sloužit poškození a fragmentace molekul BSA v průběhu filtraci, hlavně v pufru pH 4, kde molekuly BSA jsou hodně blízko svého izoelektrického bodu a proto dochází k intenzivní precipitaci (což bylo patrně i podle vizuálního pozorování). Odfiltrování (vzorky byly filtrovány stříkačkovým filtrem s póry o velikosti  $0,45 \mu\text{m}$ ) většího podílu BSA však rovněž výrazně sníží poměr molekul BSA k iontům, přítomných v roztoku, které se díky své velké koncentraci již mohou výrazně ovlivnit strukturu zbylých útvarů a ovlivnit tak signál rozptylu světla a následný výpočet hodnot molekulové hmotnosti a poloměrů. Ve výsledku takový vliv iontů způsobí výrazné snížení odpovídajících hodnot. Tento jev může být také příčinou vyšší hodnoty molekulové hmotnosti v případě pH 7 pufru v porovnání s pufrům pH 4, kde pochopitelně odfiltrovaný podíl molekul BSA bude menší a poměr zbylých rozpustných fragmentů k iontům prostředí větší. Vliv iontů potom na výsledné hodnoty molekulové hmotnosti je pochopitelně menší. Fakt ovlivnění rozptylu světla velkou koncentrací iontů byl již objeven v roce 1952 Paulem Dotym a Robertem Steinerem ve své studii makro iontů [112].

Signál UV-VIS je rovněž nižší u obou pufrů, což potvrzuje větší podíl odfiltrovaného BSA z roztoku, a to jak v případě pH 4 tak i případě pH 7 pufru. V případě však pufru pH 7 signál je pochopitelně o něco vyšší, než v pufru pH 4 (daleko od izoelektrického bodu). Vyšší iontová síla zde pravděpodobně způsobuje ještě větší agregaci molekul BSA a následně jejich odfiltrování a výše zmíněnou možnou mechanickou fragmentaci.

Na následujícím grafu (viz Graf 1) je ukázka hodnot molekulové hmotnosti čistého BSA v různých prostředích v závislosti na koncentraci BSA. Zde je vidět hlavně výše zmíněný velký rozdíl mezi molekulovou hmotností částic v prostředích pufrů a v prostředích s nižší iontovou silou (MilliQ a  $\text{NaNO}_3$ ).



Graf 1. Závislost molekulové hmotnosti ( $M_w$ ) částic čistého BSA na koncentraci BSA v prostředích MilliQ,  $\text{NaNO}_3$ , pH 4 a pH 7

#### 4.1.2. Vliv zvýšené teploty na BSA v pufru pH 7

V práci byl zkoumán vliv zvýšené teploty na tvorbu a strukturu komplexů HA-BSA v různých prostředích. Zvýšená teplota o hodnotě 37°C byla aplikována buď v koloně během SEC separace, anebo vzorky byly předem inkubovány při dané teplotě po dobu 12 hodin (teplota kolony v tomto případě byla 25°C).

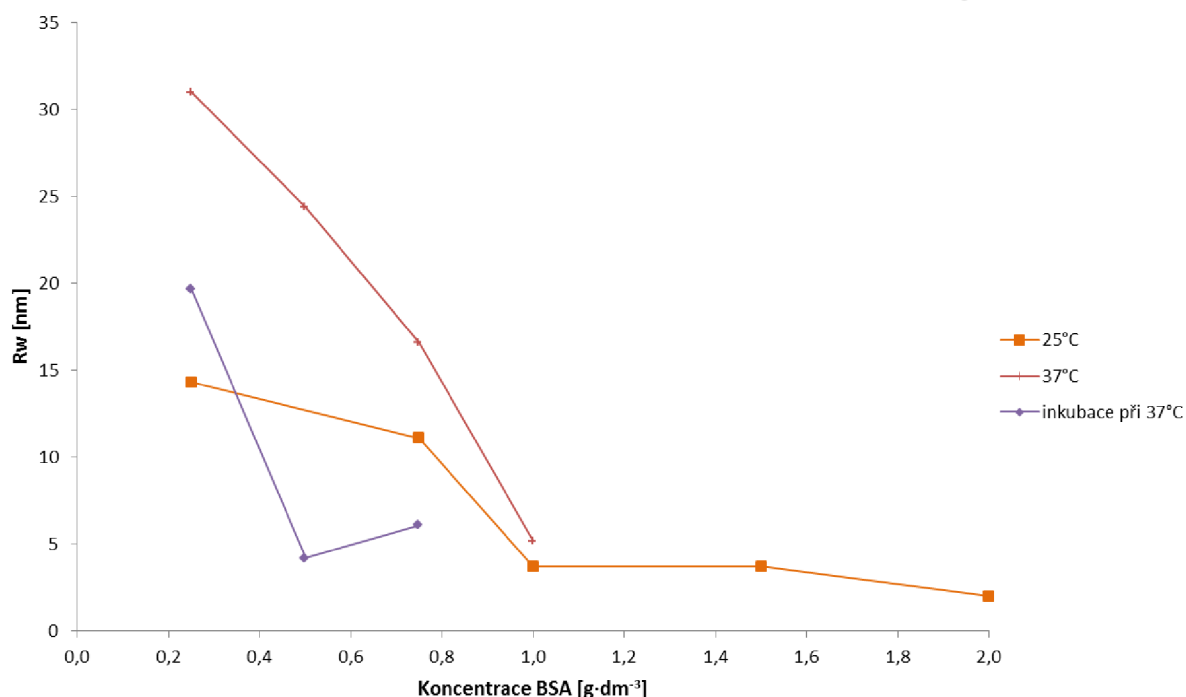
Obecně molekula albuminu je stabilní vůči denaturaci až do teploty zhruba 66°C [113]. Proto v našem případě zvýšená teplota 37°C by neměla výrazně ovlivnit strukturu molekuly BSA.

Při zvýšené teplotě kolony 37°C částice ale vykazovaly vyšší hodnoty gyračního poloměru a vnitřní viskozity, přičemž molekulová hmotnost byla při zvýšené teplotě naopak nižší, což mohlo být následkem částečné denaturace a rozplétání 3D struktury BSA vlivem vysoké iontové síly pufru a dodatečně zvýšenou teplotou. Zvýšené hodnoty gyračního poloměru ukazují rovněž na pravděpodobnou změnu struktury částic molekul BSA pod vlivem vyšší teploty.

Po inkubaci molekul BSA při teplotě 37°C po dobu 12 hodin, molekulová hmotnost se rovněž snížila spolu s gyračním poloměrem, což rovněž naznačuje na pravděpodobnou změnu konformace ale vznik již stabilnějších a kompaktnějších struktur při působení zvýšené teploty po delší dobu.

Stanovené hodnoty se však s rostoucí teplotou liší minimálně, z čehož můžeme odvodit, že vliv zvýšené teploty na BSA je také minimální.

Na následujícím grafu (viz Graf 2) je ukázka ovlivnění gyračního poloměru částic molekul BSA vlivem zvýšené teploty v prostředí pH 7 pufru. Je také vidět, že hodnota gyračního poloměru je zaznamenána pouze v rozmezí koncentrací BSA od 0,25 až 2 g·dm<sup>-3</sup>.



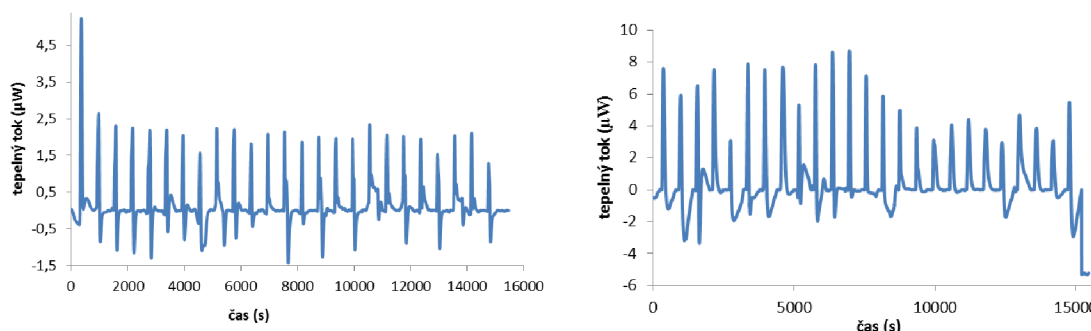
Graf 2. Hodnoty gyračního poloměru částic BSA v pufru pH 7 v závislosti na koncentraci BSA. Vliv zvýšené teploty kolony (37°C), a inkubace při 37°C po dobu 12 hodin

#### 4.1.3. Výsledky isothermní titrační kalorimetrie

Titrace molekul BSA byly provedeny do MilliQ vody a do roztoků NaNO<sub>3</sub> a obou pufrů. Ideálně bychom zde měli pozorovat pouze signál odpovídající rozpouštěcímu teplu molekul

BSA v příslušném prostředí. V různých prostředích však byl pozorován odlišný charakter a velikost signálu.

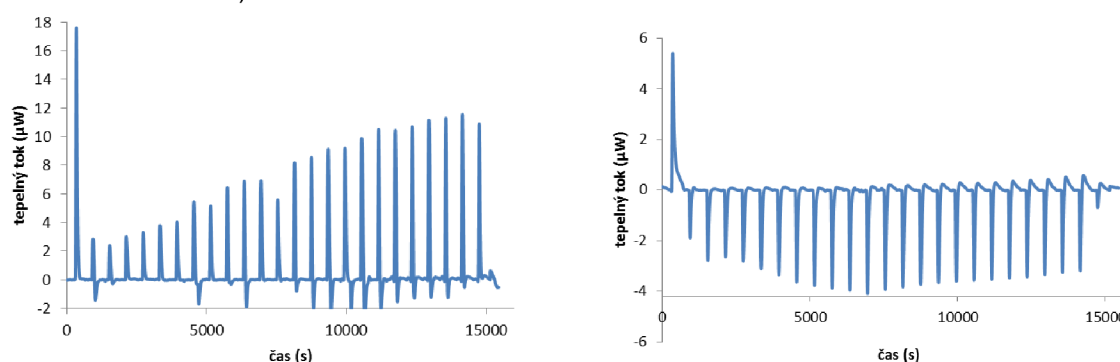
Titrace BSA do MilliQ anebo do roztoku  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaNO}_3$  nesou exotermní charakter. Přičemž signál titrace do  $\text{NaNO}_3$  je cca 2-3x větší, než signál u titrací do vody (viz Graf 3 a Graf 4), což může znamenat intenzivnější interakce mezi molekulami samotného BSA v přítomnosti soli, která odstíní negativní náboj molekul a sníží tak odpuzivé interakce, což ve výsledku vede k agregaci. Tento předpoklad koreluje s výsledky SEC-MALLS měření, kde sůl vyvolala zvětšení částic a celkově výraznější rozdělení částic podle velikosti. Dalším možným důvodem většího exotermního signálu v případě prostředí  $\text{NaNO}_3$  je změna uspořádání samotných iontů solí kolem molekul BSA.



Graf 3 a Graf 4. Signál tepelného toku ITC titrací BSA v MilliQ do MilliQ vody (vlevo) nebo  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaNO}_3$  roztoku (vpravo) v závislosti na čase.

ITC titrace BSA do pufru pH 7 nese rovněž exotermní charakter, signál však narůstá s rostoucí koncentrací BSA, což znamená, že nejintenzivnější interakce asociční povahy pravděpodobně probíhají až při vyšších koncentracích BSA. Při nižších koncentracích BSA pravděpodobně příliš vysoký poměr iontů prostředí k molekulám albuminu již brání jejich vzájemným interakcím (viz Graf 5).

Titrace inkubovaného při  $37^\circ\text{C}$  BSA do pufru pH 7 jsou již s endotermním signálem (viz Graf 5 a Graf 6), což pravděpodobně znamená, že zde převládají disociační procesy. Je dalším potvrzením změny struktury, které bylo stanoveno u SEC-MALL měření (viz Odstavec 4.1.2).



Graf 5 a Graf 6. Signál tepelného toku ITC titrací BSA v pufru pH 7 do pufru pH 7 v závislosti na čase. Vliv inkubaci BSA při teplotě  $37^\circ\text{C}$  (neinkubovaný BSA vlevo, inkubovaný BSA vpravo)

#### 4.2. Řada s nízkomolekulovou HA (340 kDa)

Zde byly zkoumány komplexy BSA s NMHA pomocí metod rozptylu světla (SEC-MALLS, DLS a ELS) a izotermické titrační kalorimetrii. Výsledky těchto měření budou popsány v následujících kapitolách.

#### 4.2.1. Výsledky SEC-MALLS měření

I přesto, že SEC-MALLS se považuje za velmi přesnou analytickou metodu i v případě velké polydisperzity vzorků, přesné výsledky bychom mohli očekávat pouze u homogenních vzorků, obsahujících pouze jeden typ analytu. V našem případě komplexy HA-BSA jsou velmi heterogenní, což se projevuje i na velkém počtu píku, odpovídajících vylučujícím se částicím.

Ve všech prostředích kromě MilliQ vody, můžeme nalézt tři chromatografické píky odpovídající třem druhům částic. V prostředí MilliQ jsou pouze dva píky, přičemž druhý pik se objevuje až při vyšších koncentracích BSA ( $5-10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ). Proto můžeme odvodit, že větší iontová síla vyvolává větší rozdělení částic podle velikosti, stejně jak v případě pouze molekul BSA (viz Kapitola 4.1.1). Za zvýšené iontové síly ( $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaNO}_3$ ) se objevuje další pik odpovídající největším částicím, které se vylučují z kolony první po pořadí, mají nízkou viskozitu a velké hodnoty molekulové hmotnosti a gyračního poloměru, což jsou pravděpodobně větší roztáhlé agregáty komplexů. Takovou agregaci pravděpodobně vyvolává iontová síla. Větší agregáty částic se rovněž objevují ve druhém píku částic v prostředí MilliQ vody, ale, jak již bylo zmíněno, pouze u nejvyšších koncentrací BSA ( $5-10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), mají viskóznější charakter a větší molekulovou hmotnost. Větší koncentrace BSA v prostředí MilliQ zde pravděpodobně vedou k neutralizaci povrchového náboje HA a k následné tvorbě agregátů komplexů.

Částice hlavního píku vykazují pokles všech hodnot s rostoucí koncentrací BSA. Kde klesající molekulová hmotnost nemusí znamenat faktický její pokles, ale pouze menší rozměr částic, které se vylučují později z kolony, a mají signál odpovídající menším částicím. Hlavně k takové chybě může docházet kvůli měnícímu inkrementu indexu lomu, který se do rovnice softwaru Astra (doprovázející SEC-MALLS instrumentaci) zadává jako konstantní za předpokladu homogenity analytu. V tomto případě však analyt vykazuje docela vysokou heterogenitu, což ve výsledku vede k chybě při výpočtu hodnoty absolutní molekulové hmotnosti.

Sůl  $\text{NaNO}_3$  způsobí malé zmenšení částic obou píků hlavně podle  $M_w$  a  $R_w$ , částice se stávají kompaktnější, a rovněž dochází k výraznějšímu rozdělení na tyto dva píky. Ale zároveň se při vyšších koncentracích, jak již bylo zmíněno, objevuje další pik větších agregátů. Výsledné zvýšení rozdílu ve velikosti částic mezi píky je dalším důkazem intenzivnějšího rozdělení částic podle velikosti.

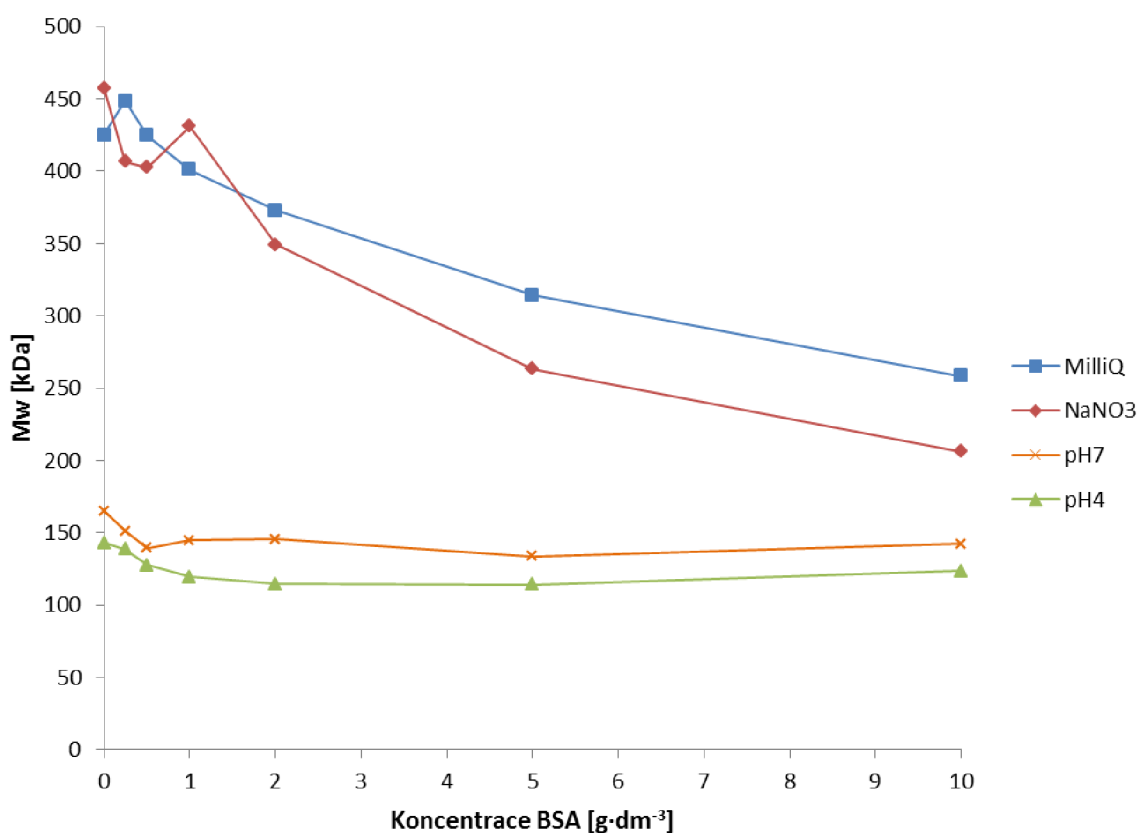
V pufrch pH 4 a pH 7 částice jsou výrazně menší, než v prostředích MilliQ a  $\text{NaNO}_3$ , a to hlavně podle molekulové hmotnosti, hydrodynamického poloměru a vnitřní viskozity. Mají však docela velký gyrační poloměr, který je velikostně srovnatelný s hodnotou gyračního poloměru částic v prostředích MilliQ a  $\text{NaNO}_3$ . Mají potom pochopitelně i větší poměr gyračního k hydrodynamickému poloměru ( $R_w/R_h$ ), což naznačuje, že částice již nemají kompaktní strukturu a vzhledem k tak nízké molekulové hmotnosti jsou to pravděpodobně fragmenty denaturovaných struktur komplexů.

Hodnoty molekulové hmotnosti, hydrodynamického poloměru a vnitřní viskozity zejména u částic hlavního píku se zde s rostoucí koncentrací BSA skoro nemění, na rozdíl od těch samých částic v prostředích MilliQ a  $\text{NaNO}_3$ , což je důkazem toho, že příliš velká iontová síla (v pufrch jsou kromě iontů citrátu a hydrogenfosforečnanu disodného přítomné ionty přidané soli  $\text{NaNO}_3$ ) brání kontrakci komplexů a navíc, vzhledem k výrazně nižším velikostem částic, pravděpodobně vyvolává částečnou denaturaci nebo disociaci částic komplexů. Rovněž je možné, že tak vysoká iontová síla (a hlavně v případě pH 4) vyvolává tvorbu příliš velkých agregátů neutrálních komplexů, které se odfiltrují ještě před samotným měřením přes filtr o velikosti  $0,45 \mu\text{m}$ . Zbylé rozpustné částice jsou pouze fragmenty těchto komplexů o výrazně nižší molekulové hmotnosti, které jsou navíc přítomné v menší koncentraci. Poměr iontů prostředí k takovým částicím se stává poměrně vysokým,

a setkáváme se znovu se situací, kdy velká koncentrace iontů výrazně ovlivnují výslednou hodnotu molekulové hmotnosti částic, stejně tak bylo v případě pouze částic BSA v prostředích obou pufrů (viz Kapitola 4.1.1).

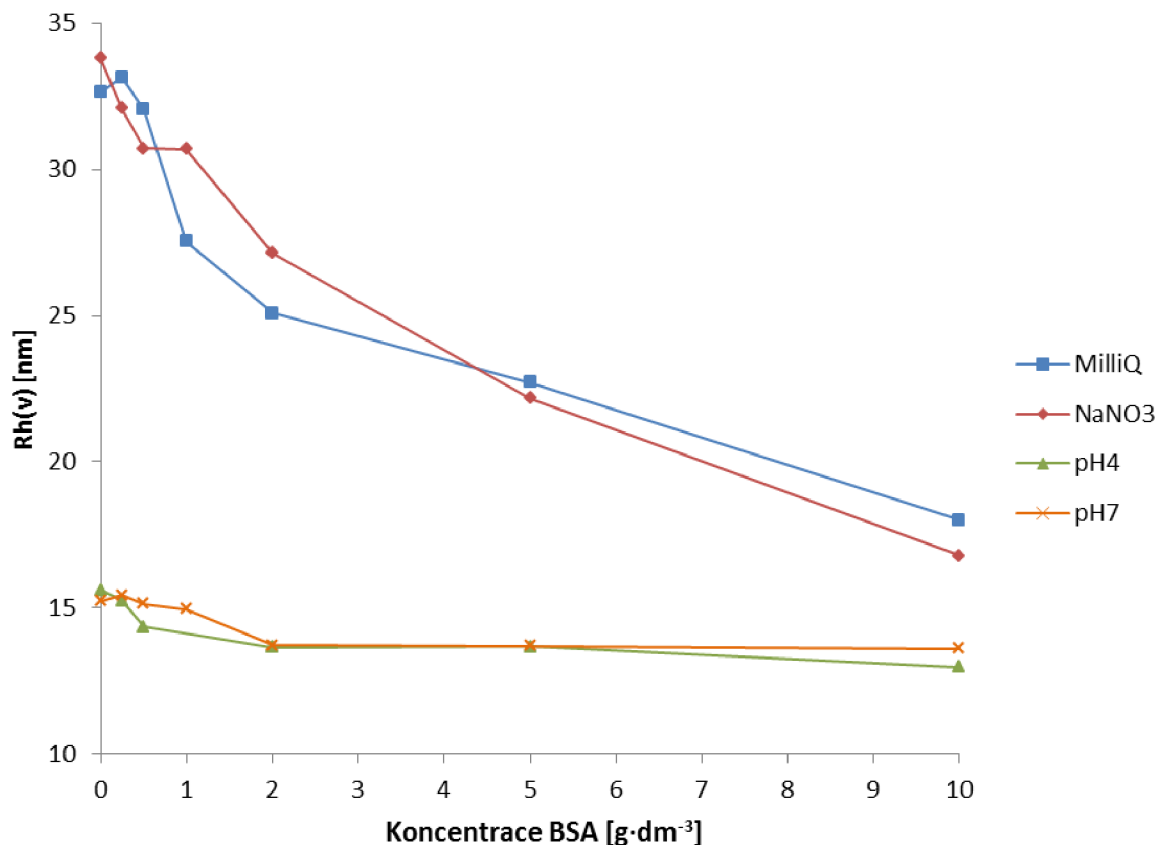
V případě pufru o pH 7 však částice mají o něco větší molekulovou hmotnost, než částice v pufru o pH 4, ale jsou menší podle hydrodynamického poloměru a rovněž mají menší vnitřní viskozitu, což pravděpodobně naznačuje na kompaktnější částice a rovněž na menší vliv mechanického poškození při průchodu filtrem. Nedochozí zde k tak intenzivní precipitaci jak v pH 4 pufru (kde precipitace byla pozorována vizuálně), ale velká iontová síla pravděpodobně rovněž způsobuje buď disociaci komplexů anebo tvorbu větších agregátů, které jsou následně odfiltrovány.

V následujících grafech (viz Graf 7 a Graf 8) jsou znázorněny hodnoty molekulové hmotnosti a hydrodynamického poloměru částic komplexů v různých prostředích, kde je patrně vidět výše zmíněný rozdíl mezi částicemi v prostředích obou pufrů a v prostředích 0,1 mol·dm<sup>-3</sup> NaNO<sub>3</sub> a MilliQ.



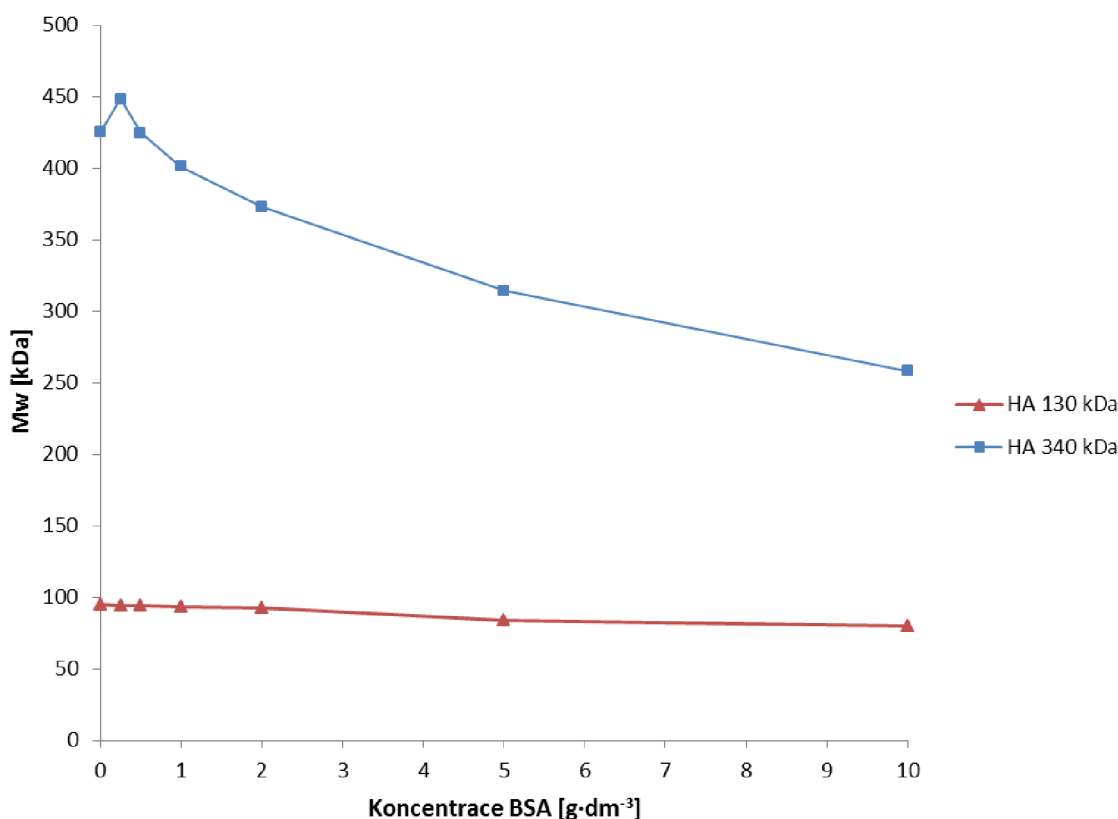
Graf 7. Hodnota molekulové hmotností  $M_w$  komplexů NMHA a BSA v závislosti na koncentraci BSA. Vliv různých prostředí (0,1 mol·dm<sup>-3</sup> NaNO<sub>3</sub>, MilliQ, pH 4 a pH 7 pufrů)





Graf 8. Hodnota hydrodynamického poloměru  $R_h(v)$  komplexů NMHA a BSA v závislosti na koncentraci BSA. Vliv různých prostředí ( $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaNO}_3$ , MilliQ, pH 4 a pH 7 pufrů)

V porovnání s měřením SEC-MALLS u řad s ještě nižší molekulovou hmotností HA (130 kDa) z předchozí bakalářské práce, je možné odvodit, že pokles veškerých hodnot ( $M_w$ ,  $R_h$  a vnitřní viskozity  $[\eta]$ ) s rostoucí koncentrací BSA je výraznější v případě delšího řetězce (340 kDa), kde větší počet funkčních skupin zaručuje intenzivnější interakce s molekulami albuminu a výraznější kontrakci výsledných komplexů. Což je vidět v následujícím grafu (viz Graf 9).



Graf 9. Hodnota molekulové hmotnosti  $M_w$  částic komplexů HA a BSA v závislosti na koncentraci BSA v prostředí MilliQ. Srovnání komplexů s HA o molekulové hmotnosti 130 kDa a 340 kDa

#### 4.2.2. UV-VIS signál u měření SEC-MALLS

Signál UV-VIS byl vyhodnocen kvantitativně, a to odečtením hodnoty napětí odpovídajícího signálu z UV-VIS detektoru. Následující vypočet koncentraci BSA v příslušném signálu byl proveden s použitím kalibrační závislosti, která byla sestavena dříve. Tato kalibrační závislost byla sestavena z naměřených hodnot u řad molekul čistého BSA v různých prostředích.

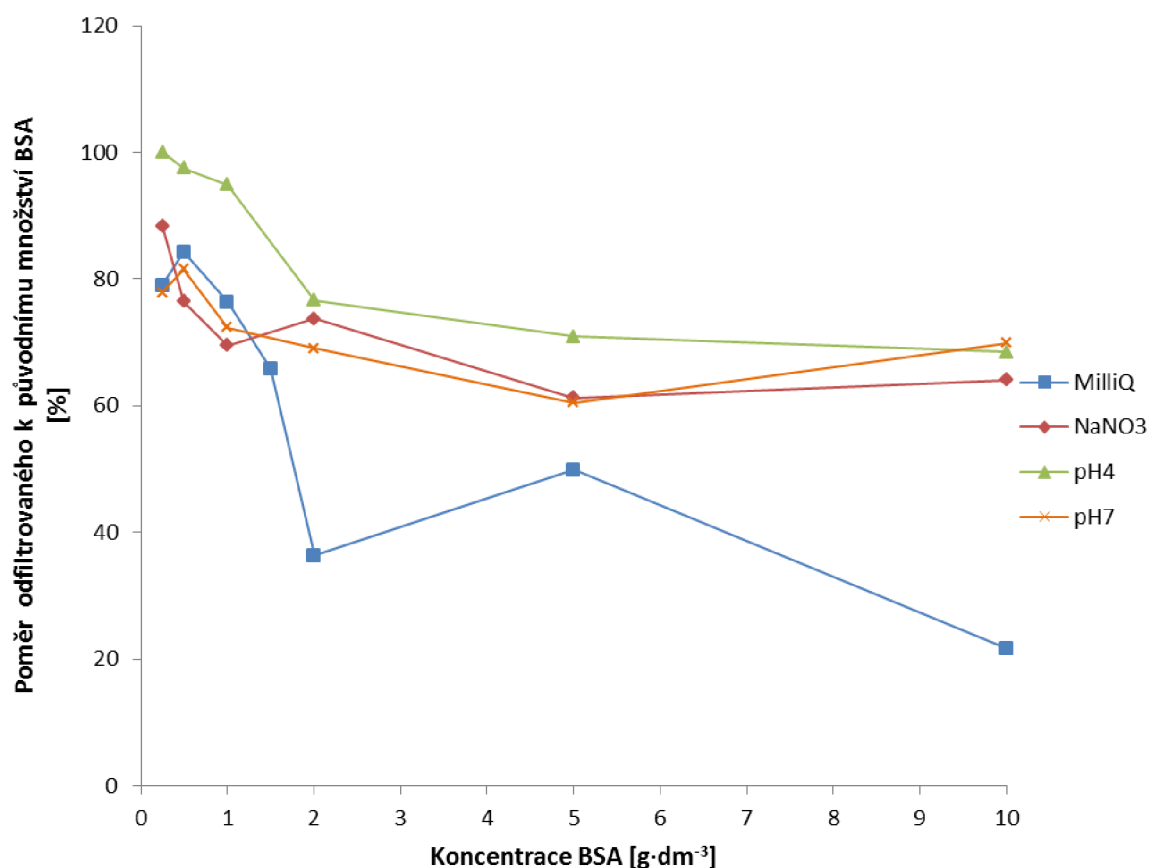
Celkově signál z UV-VIS detektoru ve všech prostředích je výrazně nižší (asi 3,5x) než u čistého albuminu (referenční řady BSA v odpovídajících prostředích), což je důkazem vazby albuminu na molekulu HA v každém prostředí a rovněž tvorby větších agregátů, které jsou patrně následně odfiltrovány ještě před samotným měřením, proto výsledné množství detekovaného albuminu v roztoku je menší. Dalším možným důvodem nižšího signálu je tzv. „skrytí“ části molekul BSA dovnitř struktury řetězce HA, což dělá BSA částečně neviditelným pro UV detektor.

S rostoucí koncentrací BSA UV signál prvního píku roste v každém prostředí, což naznačuje, že při vyšších koncentracích BSA buď jsou intenzivnější interakce mezi HA a BSA, anebo se tvoří komplexy menších velikostí, které projdou filtrem při filtraci.

Po přidání  $\text{NaNO}_3$  se výrazně sníží UV signál částic hlavního píku (viz Graf 11), což je v souladu s dřívějším odvozením o tvorbě větších částic při zvýšené iontové síle (viz kapitola 4.2.1), které se odfiltrují před měřením. Ve výsledku koncentrace BSA přítomného v rozpustných komplexech je nižší, a proto je také nižší UV signál. Procenta odfiltrovaného BSA (respektive zabudovaného do struktury komplexů s HA) se s rostoucí koncentrací BSA snižuje již méně výrazně, než v prostředí MilliQ (viz Graf 10).

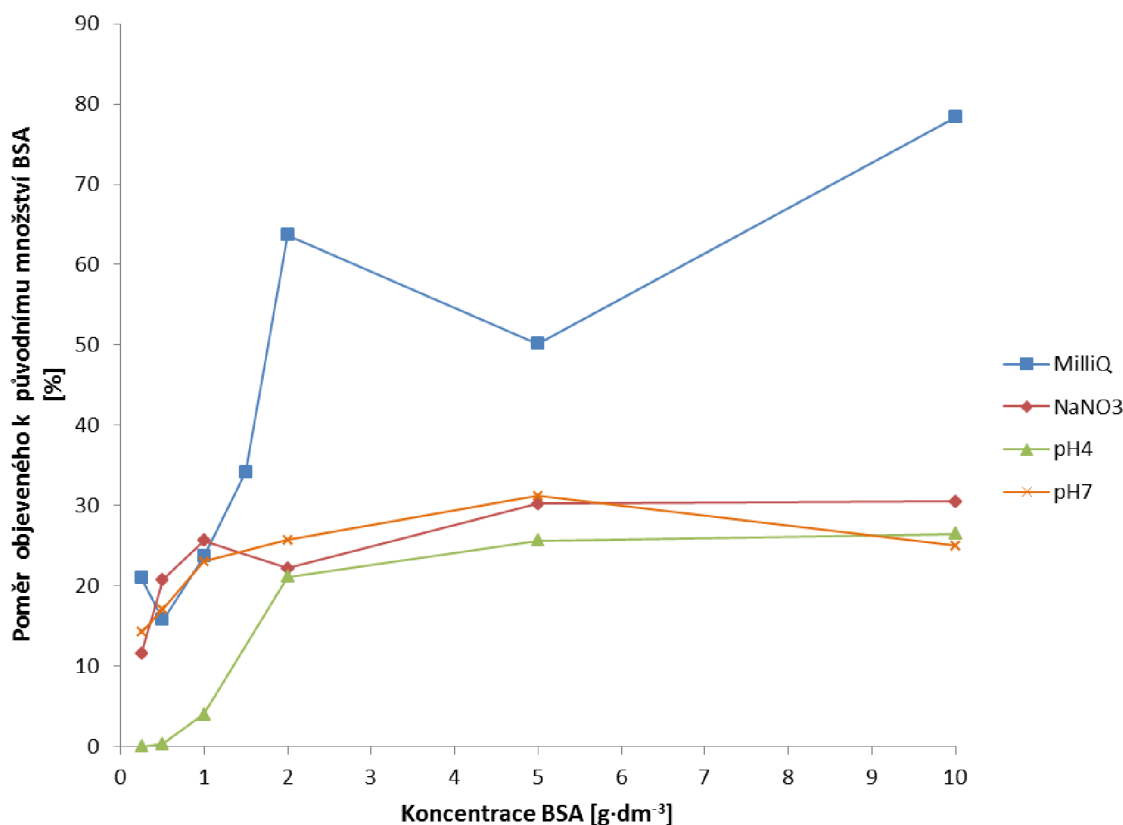
V prostředí pH 4 pufru je UV-VIS signál pochopitelně nejnižší vzhledem k intenzivní precipitaci (která byla pozorována vizuálně) a odfiltrování většího podílu BSA v nerozpustné formě (viz Graf 11). V pufru o pH 7 signál je o něco vyšší, než v pH 4 pufru, ale přesto stále nižší, než v MilliQ vodě, což je dalším důkazem tvorby větších agregátů při zvýšené iontové síle. Procenta odfiltrovaného BSA se zvyšující se koncentrací BSA zde skoro nemění, což potvrzuje rovněž méně výraznou kontrakci částic.

V následujícím grafu (viz Graf 10), jsou znázorněny procenta odfiltrovaného množství albuminu od původní koncentrace v roztoku v různých prostředích. Je zde vidět, že nejméně odfiltrovaného BSA je u komplexů s HA v MilliQ vodě. Hodnoty množství odfiltrovaného BSA byly získány odečtením vypočtené koncentraci BSA, přítomné v signálu příslušného píku (viz začátek kapitoly 4.2.2), od počáteční koncentrace BSA v roztoku (viz Tabulka 1) a následným převodem na procenta od počátečního množství BSA v roztoku.



Graf 10. Procentuální množství odfiltrovaného BSA (v poměru k původnímu množství BSA v roztoku) v nerozpustných komplexech s NMHA v závislosti na koncentraci BSA a prostředí (MilliQ, NaNO<sub>3</sub>, pH 4 a pH 7)

V následujícím grafu (viz Graf 11) jsou znázorněny procentuální množství objeveného BSA u částic komplexů hlavního píku v různých prostředích. Je zde vidět, že největší množství BSA ve formě rozpustných komplexů je přítomno zase v MilliQ vodě. Tato množství byla získána výše zmíněným vypočtem z kalibrační křivky koncentrační závislosti UV-VIS signálu molekul BSA (viz začátek kapitoly 4.2.2)



Graf 11. Procentuální množství BSA přítomného v rozpustných komplexech s NMHA hlavního píku v poměru k výchozí koncentraci BSA v závislosti na koncentraci BSA a prostředí (MilliQ, NaNO<sub>3</sub>, pH 4 a pH 7)

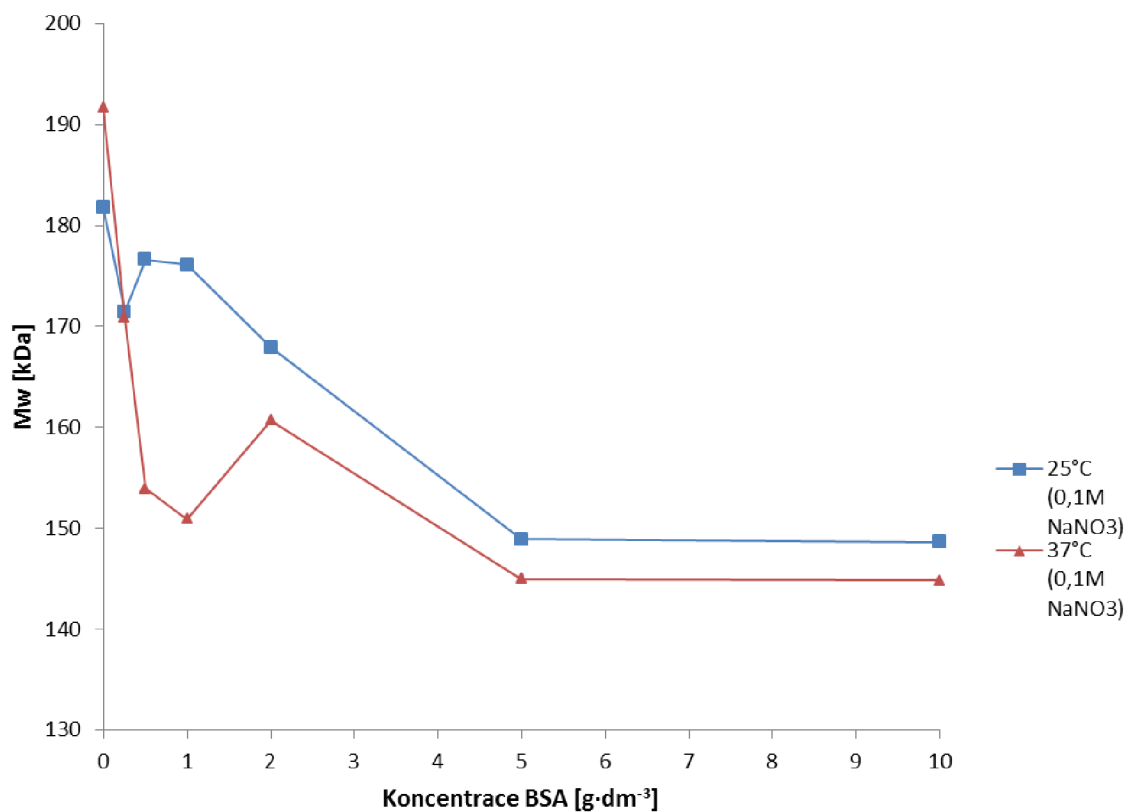
#### 4.2.3. Vliv zvýšené teploty na komplexy NMHA a BSA (SEC-MALLS měření)

Při posouzení vlivu zvýšené teploty byl využit stejný postup jak i v případě pouze řad BSA. Byla aplikována teplota 37°C během separace nebo rovněž během přípravy vzorků.

Za předpokladu, že komplexy HA-BSA jsou elektrostatické povahy a jsou řízené převážně entropicky, entalpická složka a s tím související teplota by neměly mít zásadní vliv na tvorbu a strukturu těchto komplexů (viz Kapitola 2.3)

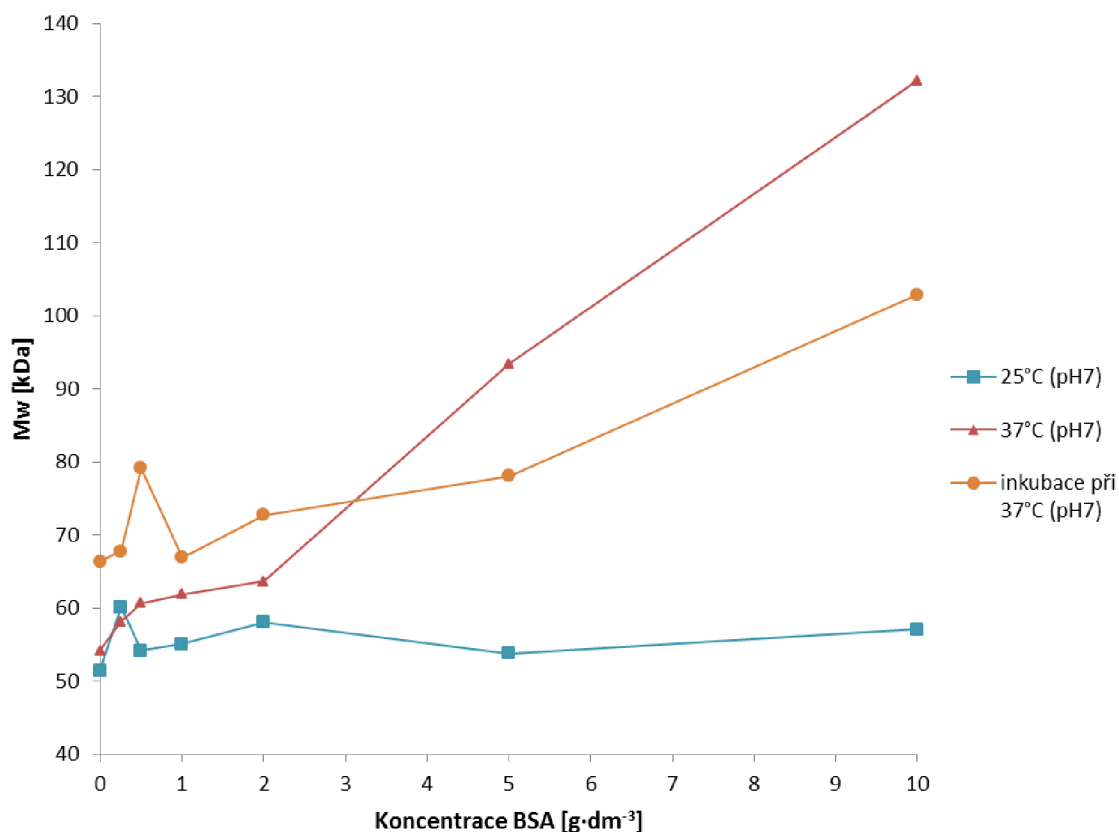
Zvýšená teplota však působí různě na částice komplexů v jednotlivých prostředích. V případě 0,1 mol·dm<sup>-3</sup> roztoku NaNO<sub>3</sub> zvýšená teplota kolony snižuje výsledné hodnoty molekulové hmotnosti (viz Graf 12), poloměrů a vnitřní viskozity částic. Jelikož rozdíl je velmi malý, zde vyšší teplota pravděpodobně způsobí pouze redukci iontového obalu částic. V prostředí obou pufrů pozorujeme opačný jev. Výsledné hodnoty molekulové hmotnosti, vnitřní viskozity a gyračního poloměru a poměru  $R_w/R_h$  se zvýší, což s ohledem na to, že částice jsou původně v těchto prostředích menší, než v MilliQ a NaNO<sub>3</sub>, ukazuje na fakt, že zvýšená teplota vyvolává tzv. „rozbalení“ částic a následně výraznější asociaci iontů. Po inkubaci při 37°C v prostředí pufru pH 7, částice se stávají ještě větší (viz Graf 13), ale snižuje se poměr gyračního k hydrodynamickému poloměru ( $R_w/R_h$ ), což může být důsledkem asociaci dalších iontů na malé částice a zvýšení tak hydrodynamického poloměru těchto částic, zatímco gyrační poloměr se nezmění.

V následujícím grafu (viz Graf 12) je znázorněno malé snížení molekulové hmotnosti  $M_w$  komplexů v prostředí 0,1 mol·dm<sup>-3</sup> NaNO<sub>3</sub> se zvýšením teploty kolony.



Graf 12. Závislost molekulové hmotnosti  $M_w$  komplexů NMHA a BSA na koncentraci BSA. Vliv teploty kolony.

Na následujícím grafu (viz Graf 13) vidíme zvýšení molekulové hmotnosti (a potom i velikosti) částic komplexů se zvyšující se teplotou v prostředí pufru pH 7. Rovněž je vidět výše zmíněný vliv inkubace při zvýšené teplotě 37°C, kdy pozorujeme ještě větší velikost částic.



Graf 13. Závislost molekulové hmotnosti  $M_w$  komplexů NMHA a BSA na koncentraci BSA v prostředí pufru pH 7. Vliv zvýšené teploty kolony a inkubace vzorků při teplotě 37°C po dobu 12 hodin

#### 4.2.4. Výsledky DLS měření

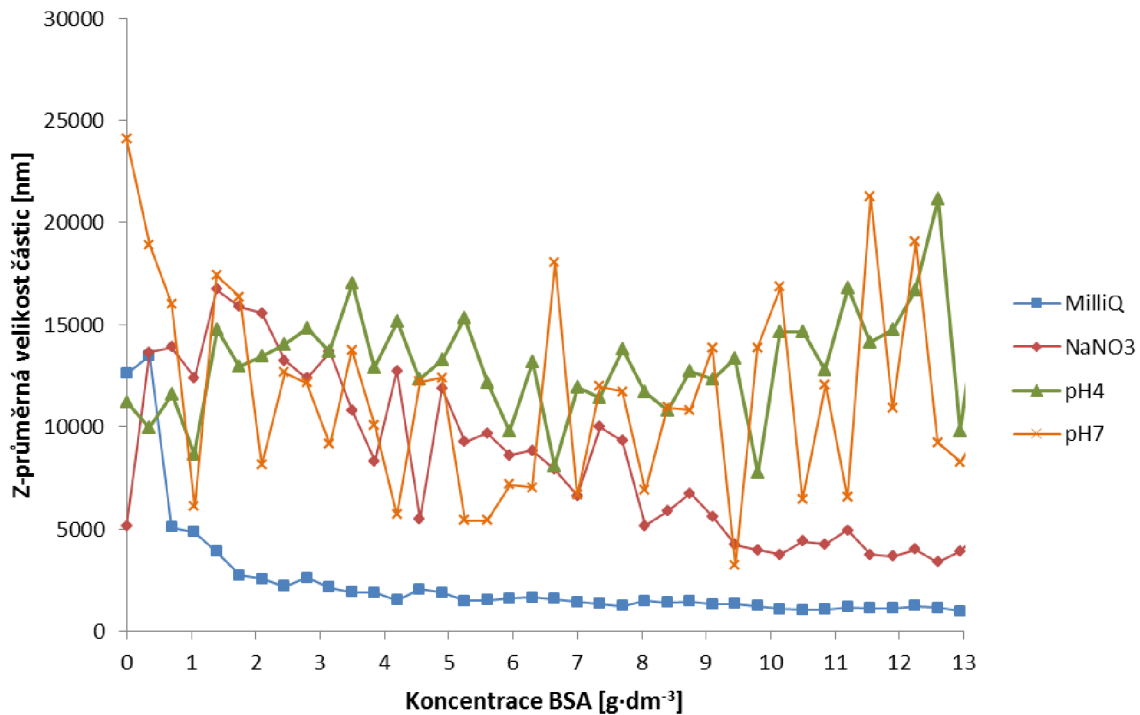
DLS měření bylo provedeno pomocí titraci BSA do roztoku hyaluronanu. Vzorky na rozdíl od měření SEC-MALLS nebyly předem filtrovány, a proto se vznikající velké agregáty výrazně podílely na extrémně vysoké polydisperzitě a následně nízké přesnosti výsledků měření. Pravděpodobně kvůli této vysoké polydisperzitě a přítomnosti velkých agregátů byla naměřena extrémně velká Z-průměrná velikost částic, a to v každém prostředí. U všech řad vzorků s NMHA byl objeven však pouze jeden pík, odpovídající rozptylu světla malých částic.

V prostředí MilliQ a NaNO<sub>3</sub> s rostoucí koncentrací BSA velikost částic roste, a jejich zastoupení klesá, což znamená, že při vyšších koncentracích BSA v roztoku je větší zastoupení menších částic, když při nižších koncentracích BSA v roztoku naopak převládají větší částice. Je to v souladu s poklesem velikosti částic se zvyšující se koncentrací BSA, který byl stanoven pomocí SEC-MALLS měření. Velikost těchto nejmenších částic je o něco nižší v prostředí NaNO<sub>3</sub>, než v prostředí MilliQ (viz Graf 15), což se shoduje se zmenšující se velikosti částic hlavního píku u měření SEC-MALLS. Naměřena Z-průměrná velikost však v roztoku NaNO<sub>3</sub> je větší, než v MilliQ (viz Graf 14), což znovu koreluje s výsledky SEC-MALLS, když vezmeme v úvahu objevení dalšího píku větších agregátů v přítomnosti NaNO<sub>3</sub> soli. Výsledky DLS tím pádem potvrzují vznik větších agregátů při zvýšení iontové síly a rovněž výraznější rozdělání částic podle velikosti.

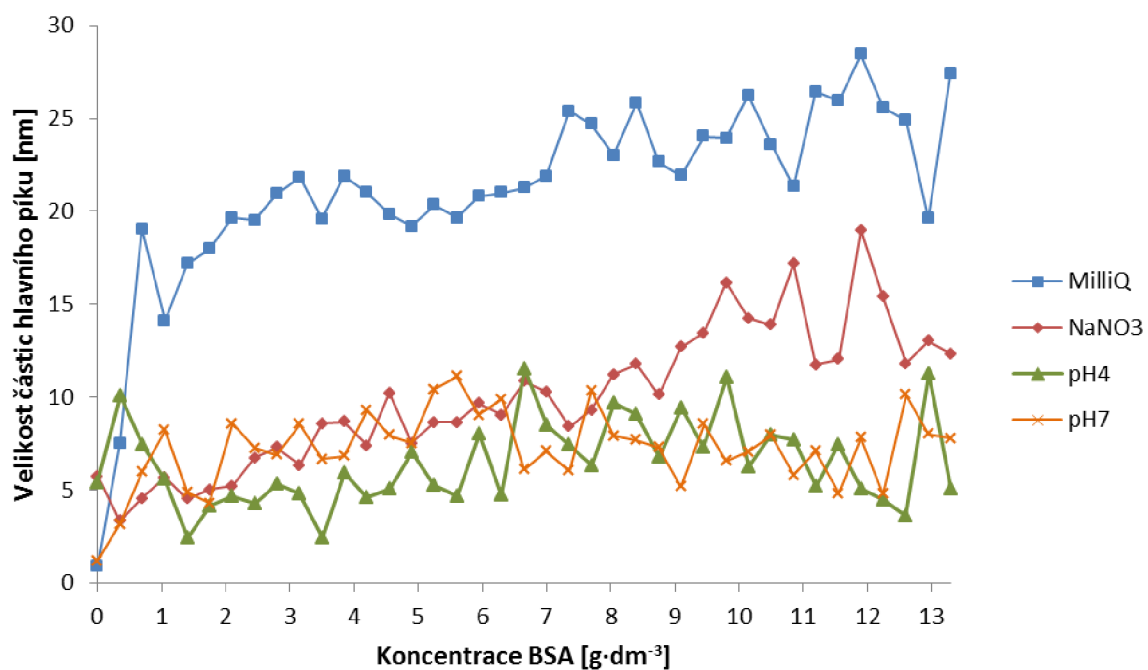
DLS signál v prostředí obou pufrů ukazuje na zhruba stejnou velikost a povahu částic jak v pH 4 tak i v pH 7 pufru. Částice se však zde výrazně liší od částic v prostředích MilliQ a NaNO<sub>3</sub>. Celkově hodnoty jsou hodně fluktuující a zatížené velkou chybou, pravděpodobně kvůli vysoké heterogenitě vzorků a přítomnosti ještě větších agregátů v těchto prostředích. Z-průměrná velikost částic je potom pochopitelně větší, než v prostředích MilliQ a NaNO<sub>3</sub>

(viz Graf 14), ale velikost částic hlavního píku je naopak menší (viz Graf 15), což znovu koreluje s daty SEC-MALLS měření, kde se velikost částic hlavního píku výrazně zmenší v prostředích obou pufrů.

Na následujících grafech je zobrazeno porovnání Z-průměrné velikosti částic komplexů HA-BSA a rovněž velikost částic prvního píku s největším zastoupením v různých prostředích.



Graf 14. Z-průměrná velikost částic komplexů NMHA a BSA v závislosti na koncentraci BSA v různých prostředích



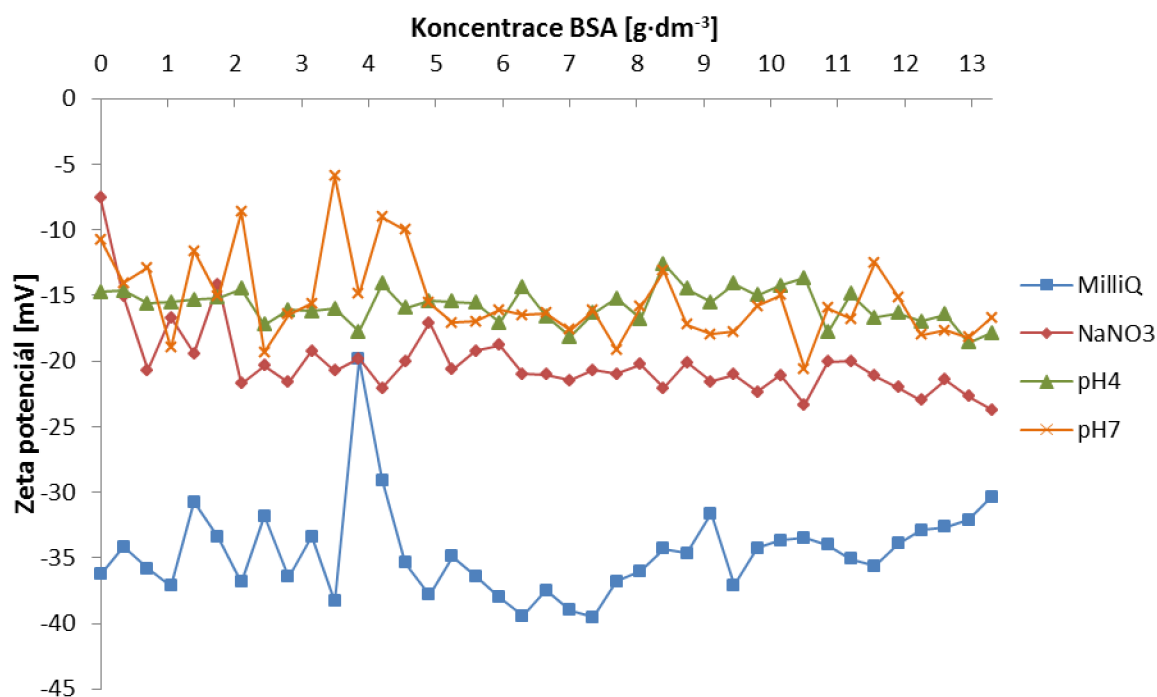
Graf 15. Velikost částic komplexů NMHA a BSA v hlavním píku s největším zastoupením v závislosti na koncentraci BSA v různých prostředích

#### 4.2.5. Zeta potenciál částic (DLS měření)

Hodnota zeta potenciálu vzorků byla stanovena během DLS titrací použitím metody elektroforetického rozptylu světla ELS, a to po každém přidavku BSA k roztoku NMHA.

Zeta potenciál vypovídá obecně o stabilitě částic v roztoku. Čím větší je absolutní hodnota, tím stabilnější je částice. Při tvorbě komplexů HA-BSA se předpokládá vzájemná neutralizace povrchových nábojů HA a BSA a s tím spojené snížení absolutní hodnoty zeta potenciálu těchto komplexů (viz Kapitola 2.4).

Naměřené hodnoty zeta potenciálu jsou pochopitelně nejnižší v prostředí čisté MilliQ vody (viz Graf 16), kde rovněž lehce narůstají s rostoucí koncentrací BSA, což slouží jako indikace probíhajících interakcí mezi HA a BSA a částečné neutralizaci náboje HA vazbou molekul BSA. Po přidavku soli se však absolutní hodnota zeta potenciálu výrazně sníží a již se zvyšující se koncentrací BSA skoro nemění, což pravděpodobně slouží indikací méně intenzivních interakcí HA-BSA. Jednoduše iontová síla zde stíní molekuly obou komponent a snižuje kapacitu vazby velkého počtu molekul BSA, jak tomu bylo v nepřítomnosti soli. V pufrch zeta potenciál částic je velmi fluktuující hodnota, je ještě vyšší, než v roztoku  $\text{NaNO}_3$  a má skoro stejnou hodnotu v obou pufrch. Částice jsou zde nejméně stabilní a pochopitelně agregují do větších komplexů, což i bylo odvozeno z měření SEC-MALLS a DLS.



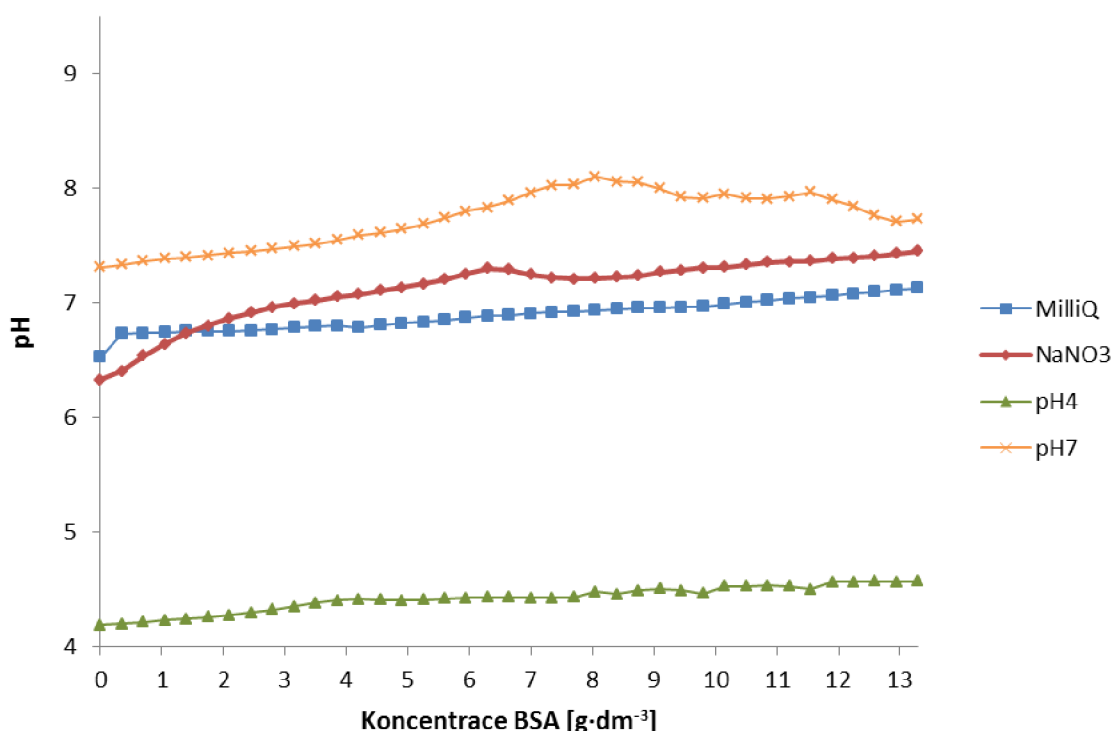
Graf 16. Zeta potenciál částic komplexů NMHA a BSA v závislosti na koncentraci BSA v různých prostředích (MilliQ,  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaNO}_3$ , pufr pH 4 a pH 7)

#### 4.2.6. Měření pH hodnoty (DLS měření)

Během DLS titrací byla rovněž pomocí ponořené do roztoku elektrody zaznamenána hodnota pH prostředí. Zajímavým objevem u těchto titrací bylo postupné zvyšování pH hodnoty v roztoku s rostoucí koncentrací BSA, a to ve všech prostředích. Nejintenzivněji však pH narůstá v roztoku  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaNO}_3$ . Narůst pH je pravděpodobně způsoben vazbou  $\text{H}^+$  iontů na volné molekuly BSA v roztoku. BSA v tomto případě rovněž můžeme považovat za slabou bázi, která po přidání do roztoku pochopitelně zvýší pH hodnotu. V přítomnosti soli interakce, jak již bylo dříve odvozeno, jsou méně intenzivní, a je větší podíl volného BSA, který je následně schopný vázat větší množství  $\text{H}^+$  iontů z roztoku a výrazněji zvyšovat hodnotu pH. V pH 4 pufru však narůst pH je nejmenší, pravděpodobně kvůli



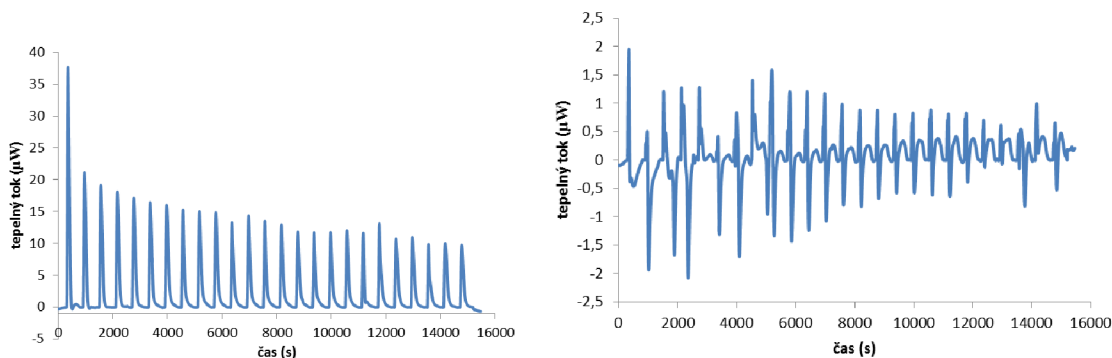
precipitaci většího množství BSA z roztoku. Je rovněž potřeba zdůraznit, že v případě prostředí obou pufrů narůst pH po přidání slabé bázi (BSA) může být výrazně potlačen kvůli pufrací kapacitě pufrů. Roztok  $\text{NaNO}_3$  však takové vlastnosti nemá a narůst pH hodnoty potom může být intenzivnější, než v případě prostředí pufrů.



Graf 17. Hodnota pH v roztoku při titracích BSA do NMHA v závislosti na koncentraci BSA v různých prostředích (MilliQ,  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NaNO}_3$ , pufrы pH 4 a pH 7)

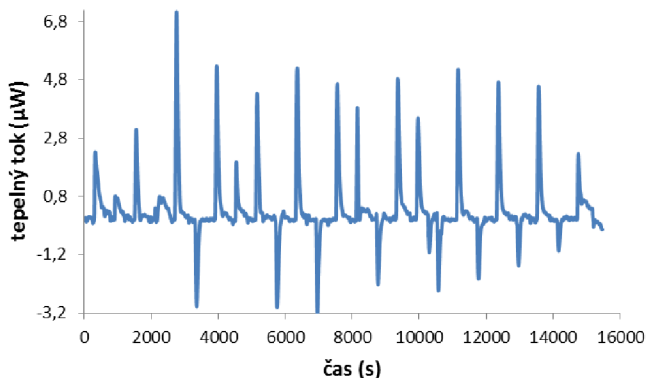
#### 4.2.7. Výsledky ITC měření

Měření ITC zkoumaných interakcí mezi albuminem a nízkomolekulovým hyaluronanem v mnoha případech poskytlo velmi heterogenní signál tepelného toku, který nebylo možné dále analyzovat. Důvodem tomu pravděpodobně slouží docela komplikovaná povaha tvorby komplexů a interakce molekul analytů s dalšími složkami systému, jako například ionty prostředí. Pravděpodobně zde probíhá jak asociační procesy tvorby komplexů a vazby iontů, tak i disociační pochody buď u již vytvořených komplexů nebo iontů. Signál je však výsledkem poskládání veškerých exo a endotermních procesů, kde některé se mohou navzájem rušit. Nejméně heterogenní exotermní signál tepelného toku byl zaznamenán pouze v MilliQ vodě (viz Graf 18), přičemž v případě sady s HA o nižší molekulové hmotnosti (90-130 kDa), tento signál byl skoro zanedbatelný vůči signálu u komplexů s HA o vyšší molekulové hmotnosti (340 kDa). Po přidavku soli se signál výrazně snížil (asi 20x) a rovněž se tam začaly objevovat jak exo tak i endotermní píky signálu tepelného toku (viz Graf 19). Toto potvrzuje, že iontová síla pravděpodobně docela výrazně stíní interakce HA-BSA, anebo signál těchto méně intenzivních exotermních interakcí se může také vyrušit signálem disociaci malých iontů solí, které nejsou přítomné v MilliQ vodě.



Graf 18 a 19. Signál tepelného toku při ITC titrací BSA do roztoku NMHA (340 kDa) v prostředí MilliQ (vlevo) a v prostředí  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaNO}_3$  (vpravo) v závislosti na čase

V ostatních prostředích s vyšší iontovou silou (pH 4 a pH 7 pufrů) signál je, jak již bylo zmíněno, velmi heterogenní, a nejde z toho určit žádný trend nebo povahu interakcí mezi HA a BSA. Příklad je znázorněn v následujícím grafu (viz Graf 20), kde BSA byl titrován do roztoku NMHA v pufru o pH 7.



Graf 20. Signál tepelného toku při ITC titrací BSA do roztoku NMHA v prostředí pH 7 pufru v závislosti na čase

### 4.3. Řada s vysokomolekulovou HA (1500-1750 kDa)

Zde byly zkoumány komplexy BSA s VMHA taktéž pomocí metod rozptylu světla (SEC-MALLS, DLS a ELS) a izotermické titrační kalorimetrii. Výsledky měření budou popsány v následujících kapitolách.

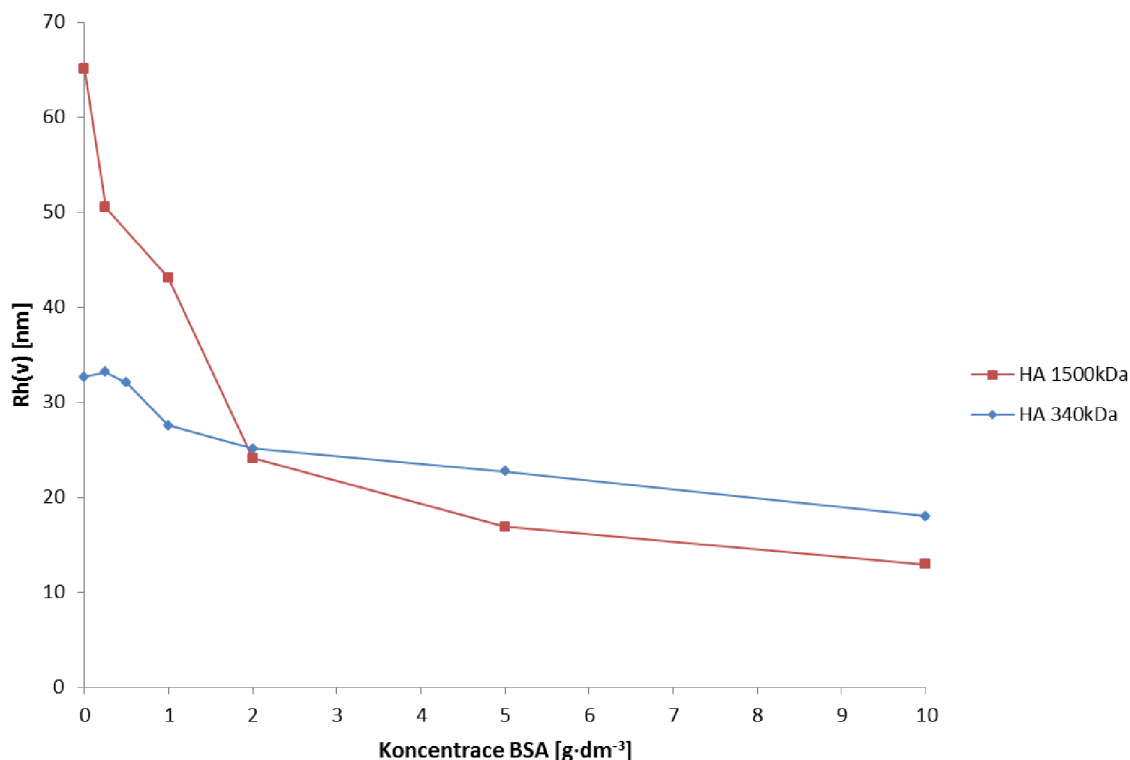
#### 4.3.1. Výsledky SEC-MALLS měření

Nastavení měření rozptylu světla u komplexů BSA-VMHA bylo obdobné jak u komplexů s NMHA. Při měření SEC-MALLS těchto komplexů byla objevená ještě větší heterogenita analytu. Chromatografické píky byly k tomu více od sebe separované.

U částic komplexů řady s vysokomolekulovou HA jsou rovněž přítomny tři píky částic, ale již ve všech prostředích (včetně MilliQ). Charakter vylučovaných částic a jejich pořadí je však stejný jak u řad s NMHA. Ve druhém píku se ve většině případů vylučují hmotnější, ale kondenzovanější částice, než částice prvního píku. Větší částice 3. píku, se vylučují z kolony nejdříve a mají nízkou viskozitu, ale velkou molekulovou hmotnost a gyrační poloměr, jsou to pravděpodobně velké expandované agregáty.

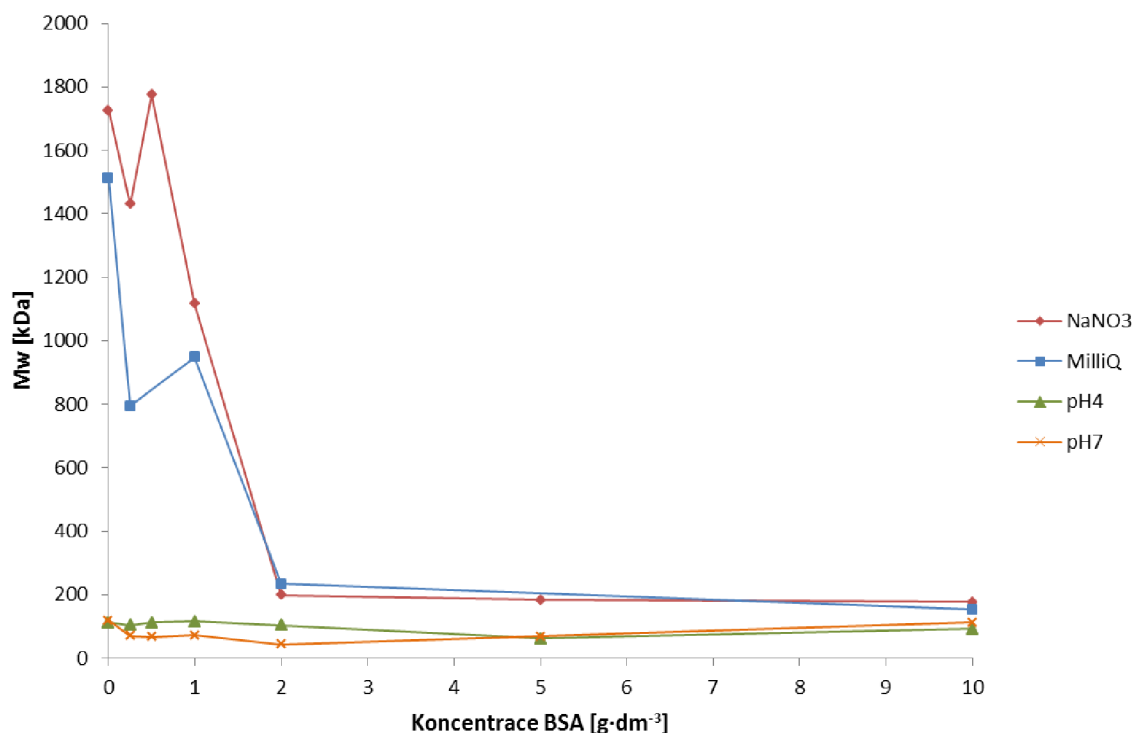
Všechny naměřené hodnoty (molekulové hmotnosti, poloměry, vnitřní viskozity) se zde rovněž snižují s rostoucí koncentrací BSA, a dokonce při nejvyšších koncentracích BSA jsou hodnoty někdy i menší, než v případě řad s nízkomolekulovou HA, což může být způsobeno intenzivnějšími interakcemi vysokomolekulové HA s BSA, a jako důsledek větší kontrakci

velikosti výsledných komplexů. V následujícím grafu (Graf 21) je znázorněn jev, kdy hydrodynamický poloměr komplexů s VMHA je nižší než u komplexů s NMHA při vyšších koncentracích.

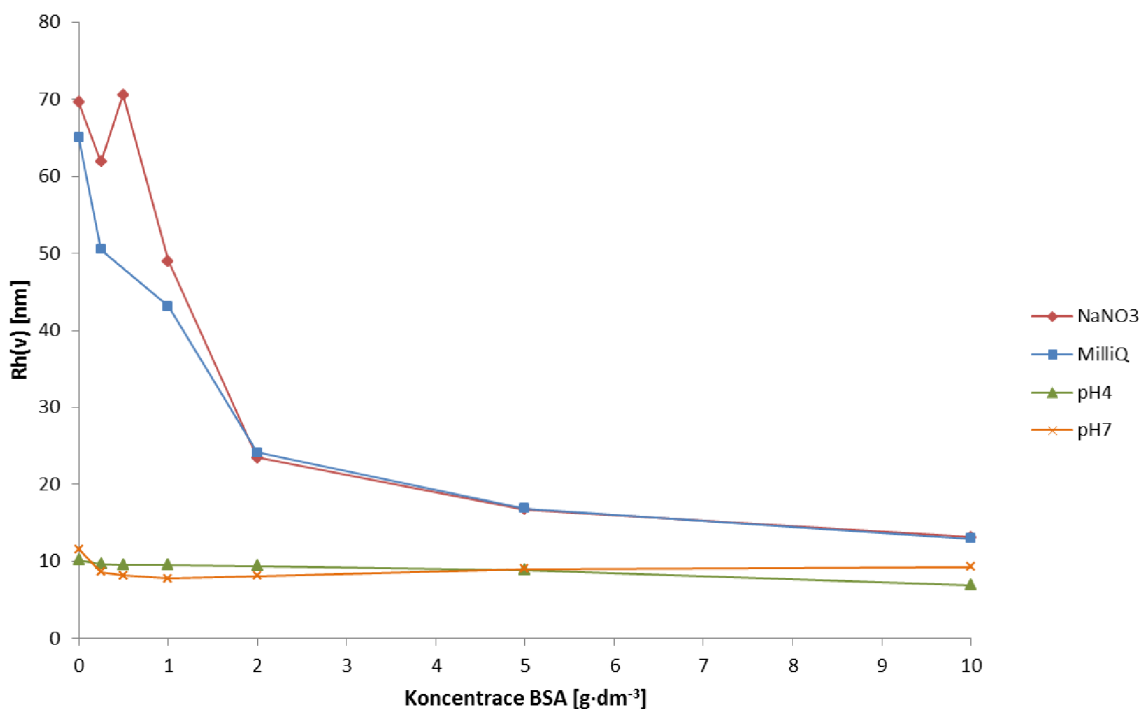


Graf 21. Velikost hydrodynamického poloměru  $R_h(v)$  částic komplexů HA a BSA v závislosti na koncentraci BSA v prostředí MilliQ u řad s vysoko a nízkomolekulovou HA.

Iontová síla v roztoku  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaNO}_3$  stále stíní i delší řetězec VMHA před interakcemi s BSA, ale pravděpodobně již méně výrazně, než tomu bylo v případě kratšího řetězce NMHA. Nedochozí zde k tak intenzivní agregaci komplexů, jelikož molekula VMHA pravděpodobně stále obsahuje větší počet nabitých skupin, které tomu dokážou zabránit. Ale kvůli většímu stínění ionty soli se na HA řetězec naváže menší množství molekul BSA a komplexy nepodlehnu tak výrazné kontrakci jak v MilliQ prostředí. Ve výsledku se potom dá říct, že sůl způsobuje expanzi komplexů hlavního píku a relevantní zvětšení veškerých hodnot (molekulové hmotnosti, poloměrů a vnitřní viskozity) částic těchto komplexů. Ukázka toho je znázorněna v následujících grafech (viz Graf 22 a Graf 23), kde je vidět zvýšení molekulové hmotnosti a hydrodynamického poloměru komplexů v přítomnosti soli.



Graf 22. Molekulová hmotnost  $M_w$  částic komplexů hlavního píku VMHA a BSA v závislosti na koncentraci BSA v různých prostředích (MilliQ, 0,1 mol·dm<sup>-3</sup> NaNO<sub>3</sub>, pufrů pH 4 a pH 7)

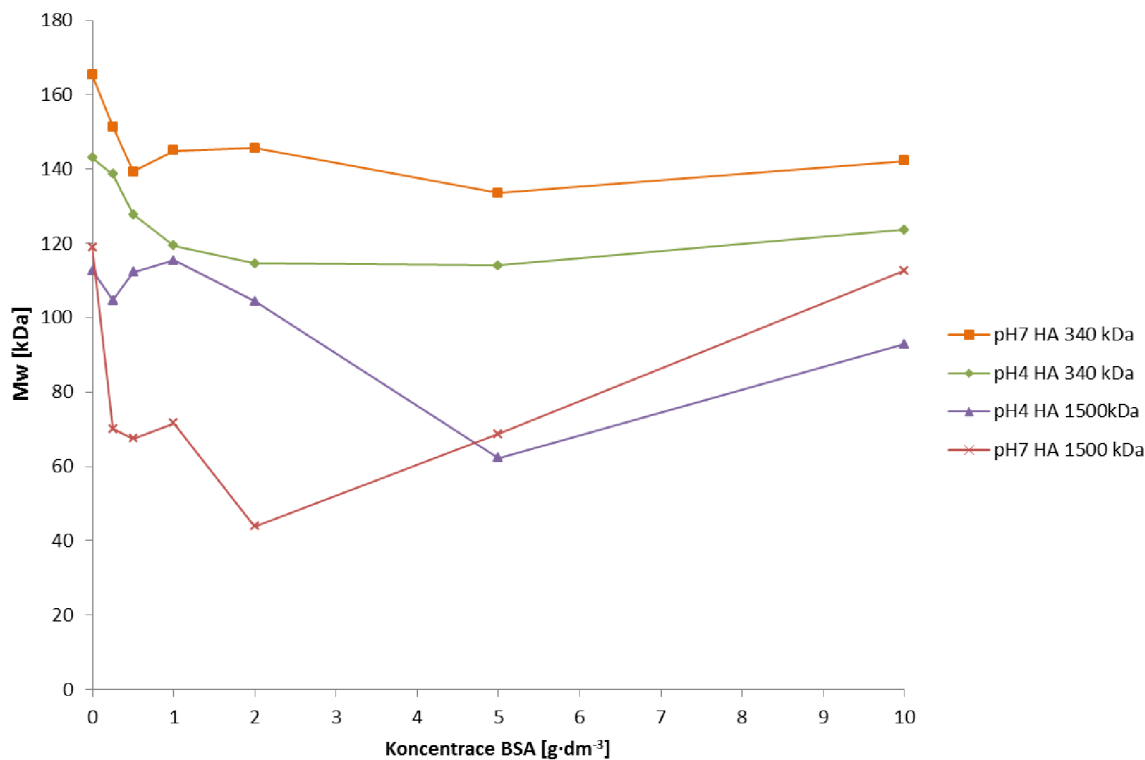


Graf 23. Hydrodynamický poloměr  $R_h(v)$  částic komplexů vysokomolekulové HA a BSA v závislosti na koncentraci BSA v různých prostředích (MilliQ, 0,1 mol·dm<sup>-3</sup> NaNO<sub>3</sub>, pufrů pH 4 a pH 7)

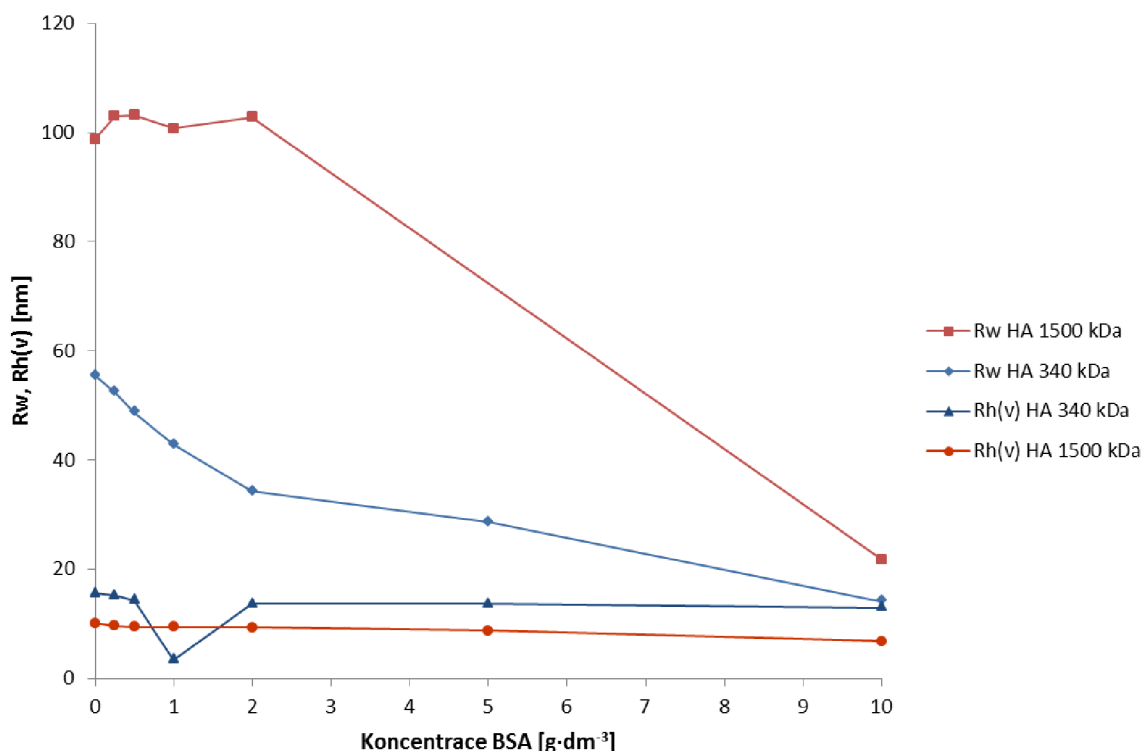
V případě prostředí pufrů jsou výsledky obdobné, jak tomu bylo u nízkomolekulové HA. Zde jsou částice výrazně menší podle všech parametrů, než v případě prostředí MilliQ

a  $\text{NaNO}_3$  (viz Graf 22, Graf 23), kromě gyračního poloměru  $R_w$ , který zůstává stejně velký, jak v případě prostředí MilliQ a  $\text{NaNO}_3$ . (až 100-120 nm při nízkých koncentracích BSA) Větší je potom pochopitelně i poměr  $R_w/R_h$  v prostředích pufrů, indikující výraznou expanzi částic buď vlivem velké iontové síly, jak tomu bylo v  $\text{NaNO}_3$  prostředí (oproti MilliQ), anebo fragmentací (či mechanickým poškozením) při průchodu filtrem. Důvod takové výrazné redukce velikosti částic v prostředích pufrů je pravděpodobně obdobný, jak to bylo popsáno u řad nízkomolekulové HA. Vysoká iontová síla způsobí buď větší agregaci komplexů a tím pádem jejich odfiltrování ještě před měřením, anebo rovněž možnou fragmentací těchto komplexů při průchodu filtrem. Vysoký poměr iontů ke zbylým rozpustným fragmentům pravděpodobně může mít vliv na 3D strukturu vznikajících útvarů, což následně má za následek změny v intenzitě rozptýleného záření a výrazný vliv na výpočet hodnot molekulové hmotnosti a gyračního poloměru ze signálu rozptylu světla. Vysoká iontová síla je rovněž schopná sama o sobě způsobit disociaci komplexů a výsledně zvětšit zastoupení menších částic.

Překvapivě částice komplexů vysokomolekulové HA v pufrch jsou velikostně a hmotnostně srovnatelné anebo i menší, než komplexy nízkomolekulové HA (viz Graf 24), s výjimkou gyračního poloměru  $R_w$ , který zůstává větší u komplexů s HA o vyšší molekulové hmotnosti (viz Graf 25). Je to velmi pravděpodobně důkazem výše zmíněné hypotézy tvorby větších komplexů v prostředích obou pufrů, a jejich následného odfiltrování před měřením, a rovněž uplatnění mechanického poškození (fragmentace) při průchodu filtrem. Zbývající po filtraci rozpustné částice (útvary) jsou podobné u obou HA, ale v případě vysokomolekulové HA jsou jenom více prostorově „roztažené“ (větší poměr  $R_w/R_h$  v případě VMHA). Popsaný jev je znázorněn na následujících grafech, kde můžeme vidět větší hodnoty molekulové hmotnosti  $M_w$  v případě komplexů s NMHA (Graf 24), ale větší gyrační poloměr  $R_w$  v případě komplexů BSA s VMHA (Graf 25)



Graf 24. Molekulová hmotnost  $M_w$  částic komplexů HA a BSA v závislosti na koncentraci BSA v prostředích pufru pH 4 nebo pH 7 a u řad VM a NMHA

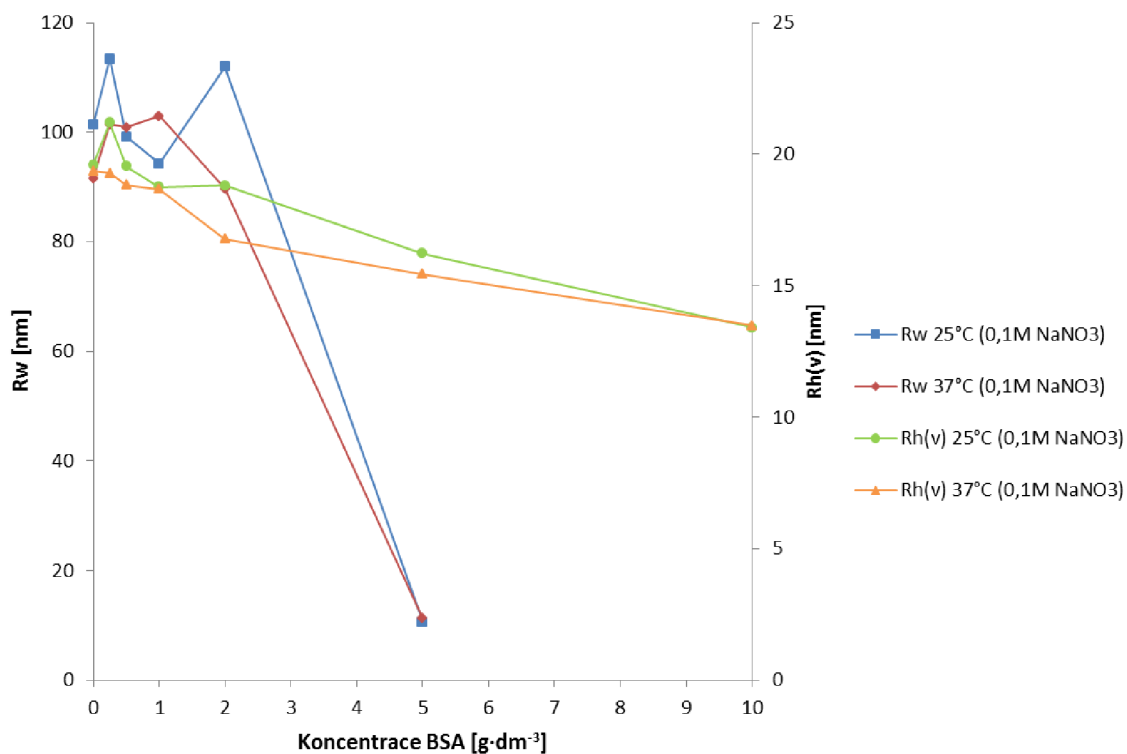


Graf 25. Velikost gyračního  $R_w$  a hydrodynamického poloměru  $R_h(v)$  částic komplexů HA a BSA v závislosti na koncentraci BSA v prostředí pH 4 pufru a s použitím HA o různých molekulových hmotnostech (340 kDa NMHA a 1350-1500 kDa VMHA).

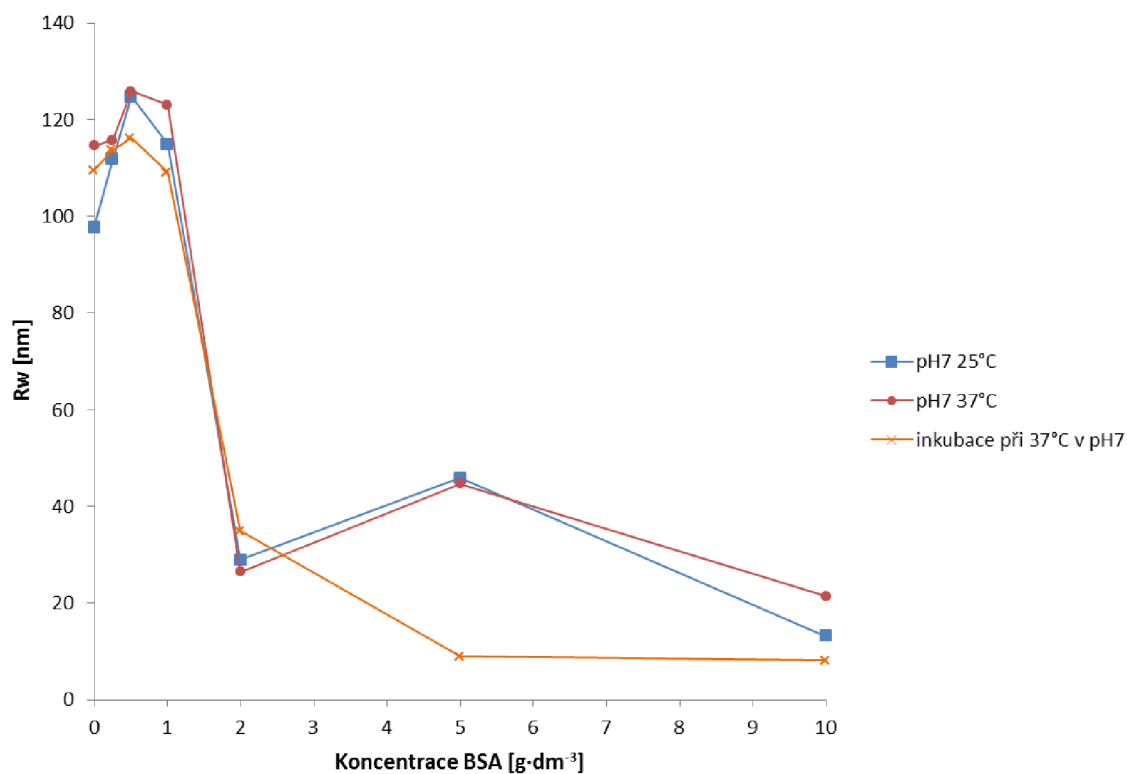
#### 4.3.2. Vliv zvýšené teploty na komplexy VMHA a BSA (SEC-MALLS měření)

Pro posouzení vlivu zvýšené teploty na tvorbu a strukturu komplexů BSA-VMHA byla rovněž aplikována teplota 37°C buď během separace v koloně SEC, nebo již během přípravy inkubovaných vzorků při dané teplotě po dobu 12 hodin. Zde rovněž za předpokladu entropicky řízených elektrostatických interakcí, teplota by neměla výrazně ovlivnit strukturu a tvorbu komplexů.

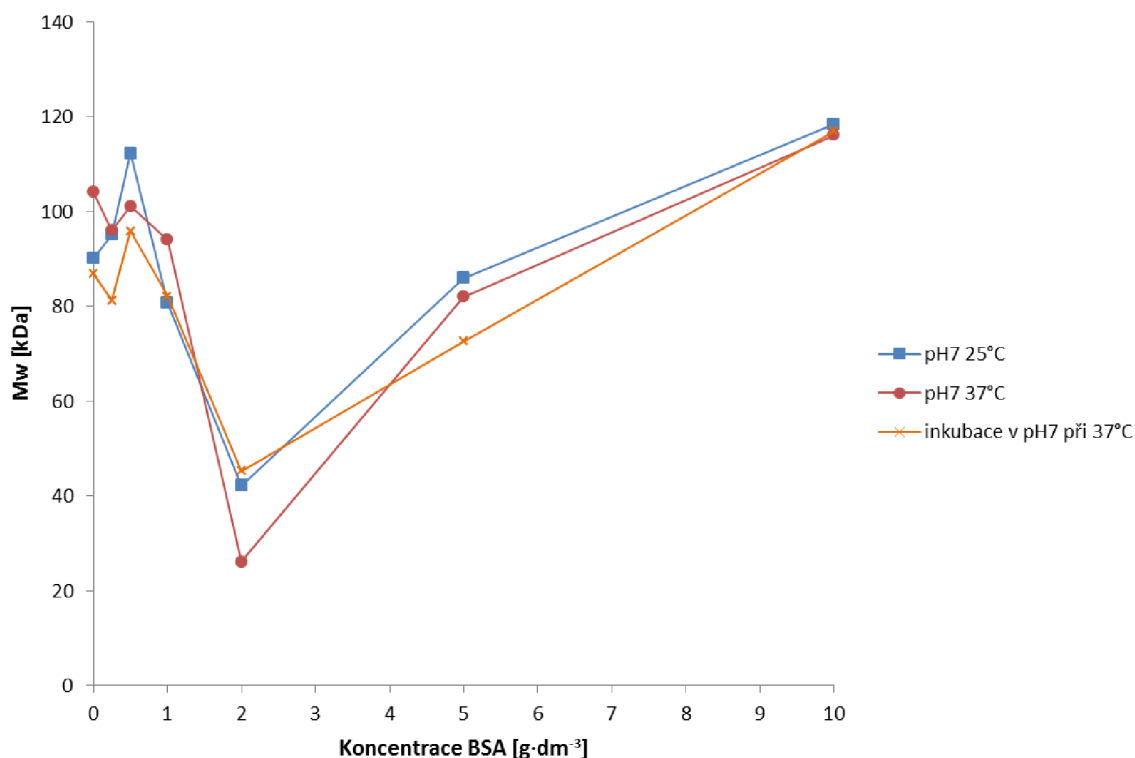
Zvýšená teplota kolony v prostředí 0,1 mol·dm<sup>-3</sup> NaNO<sub>3</sub> zase způsobí zmenšení hodnot gyračního, hydrodynamického poloměru částic (viz Graf 26), ale skoro neovlivní poloměry částic v prostředí pufru o pH 7 (viz Graf 27). Inkubace však v prostředí pufru o pH 7 při teplotě 37°C po dobu 12 hodin způsobí zmenšení částic podle molekulové hmotnosti a gyračního poloměru (viz Graf 27, Graf 28), sníží se zde rovněž poměr  $R_w/R_h$ , což naznačuje, že se částice po inkubaci stávají kompaktnější. Je zřejmé, že, jak v případě komplexů s NMHA, tak i v případě komplexů s VMHA, taková inkubace vyvolává změny ve struktuře komplexů. Změny způsobené zvýšenou teplotou jsou rovněž velmi malo výrazné, z čehož můžeme odvodit, že teplota ovlivňuje komplexy HA-BSA minimálně. Tyto minimální změny způsobené zvýšenou teplotou můžeme vidět na následujících grafech, které znázorňují změny hydrodynamického, gyračního poloměru a molekulové hmotnosti v závislosti na koncentraci BSA v prostředích 0,1 mol·dm<sup>-3</sup> NaNO<sub>3</sub> a pH 7 pufru.



Graf 26. Gyrací  $R_w$  a hydrodynamický  $R_h(v)$  poloměr částic komplexů VMHA a BSA v závislosti na koncentraci BSA v prostředí  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaNO}_3$ . Porovnání hodnot při normální ( $25^\circ\text{C}$ ) a zvýšené teplotě ( $37^\circ\text{C}$ ) kolony



Graf 27. Gyrací poloměr  $R_w$  částic komplexů VMHA a BSA v závislosti na koncentraci BSA v prostředí pH 7 pufru. Porovnání výsledků při normální ( $25^\circ\text{C}$ ), zvýšené teplotě ( $37^\circ\text{C}$ ) kolony a po inkubaci vzorků při  $37^\circ\text{C}$  po dobu 12 hodin.



Graf 28. Molekulová hmotnost  $M_w$  částic komplexů VMHA a BSA v závislosti na koncentraci BSA v prostředí pH 7 pufru. Porovnání výsledků při normální (25°C), zvýšené teplotě (37°C) kolony a po inkubaci při 37°C po dobu 12 hodin.

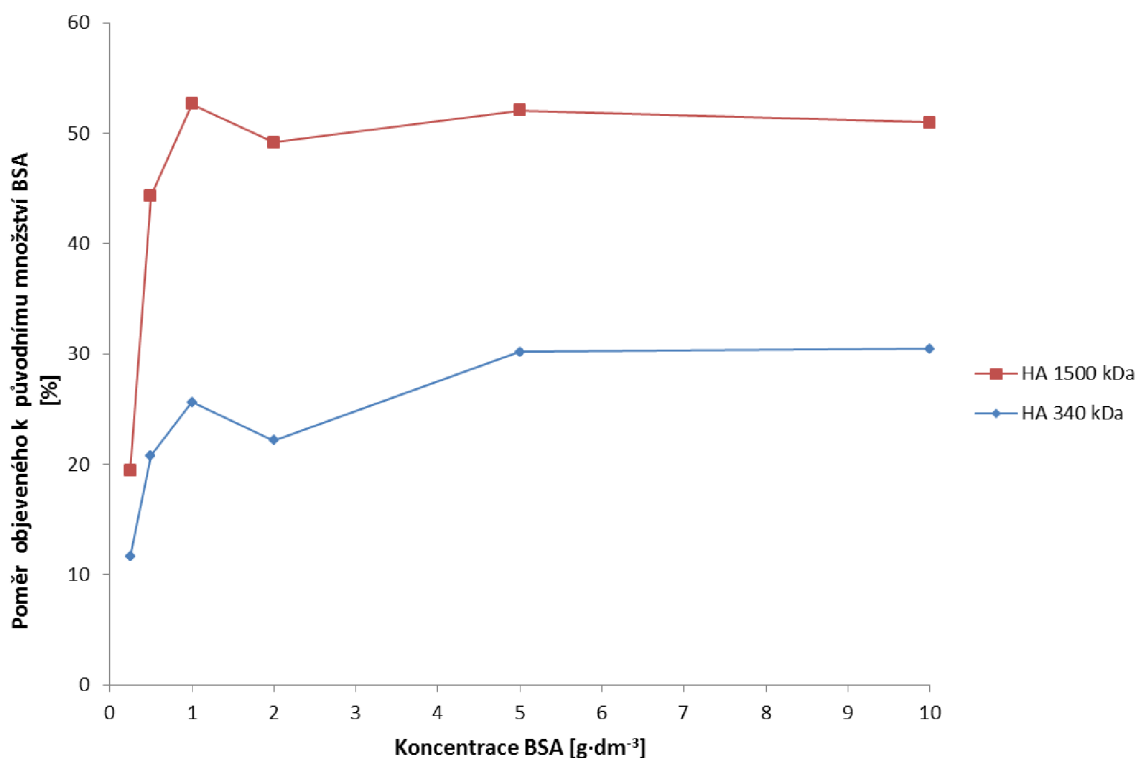
#### 4.3.3. UV-VIS signál u měření SEC-MALLS

Z UV-VIS signálu byla stanovena koncentrace přítomného BSA v komplexech s VMHA. Koncentrace byla stanovena stejným způsobem jako v případě komplexů s NMHA. Z kalibrační křivky sestavené z měření čistého BSA a odpovídající hodnoty UV-VIS signálu komplexů byla vypočítána koncentrace BSA přítomného v těchto komplexech. Tato koncentrace byla vyjádřena v procentuálním poměru k množství původní koncentrace BSA v roztoku. Zbytek byl rovněž převeden na procenta od celkového množství BSA v roztoku a vyjádřen jako odfiltrovaný podíl.

Oproti signálu u komplexů s HA o molekulové hmotnosti 340 kDa, signál komplexů s vysokomolekulovou HA (1500-1750 kDa) je výrazně vyšší (hodnota napětí), což naznačuje na intenzivnější interakce BSA s vysokomolekulovou HA, a větší množství BSA přítomného v rozpustných komplexech (viz Graf 29). UV signál rovněž roste s rostoucí koncentrací BSA, jak tomu bylo u komplexů s NMHA. Největší podíl odfiltrovaného množství BSA a nejnižší UV signál je zase v případě pH 4 pufru, kde došlo k intenzivní precipitaci a odfiltrování většího podílu BSA ve formě nerozpustných komplexů. Největší UV signál je v MilliQ prostředí, kde pravděpodobně nejvíce navázaného BSA je ve formě rozpustných komplexů. Po přidavku soli  $\text{NaNO}_3$  se signál sníží, a to hlavně při nižších koncentracích BSA, což asi slouží důkazem méně intenzivních interakcí v tomto prostředí a větším podílem odfiltrovaného BSA, znovu stejně, jak tomu bylo u komplexů s nízkomolekulovou HA. V případě však komplexů s vysokomolekulovou HA můžeme pozorovat rozdělení UV signálu již na dva píky, což slouží indikaci větší heterogenity komplexů s vysokomolekulovou HA.

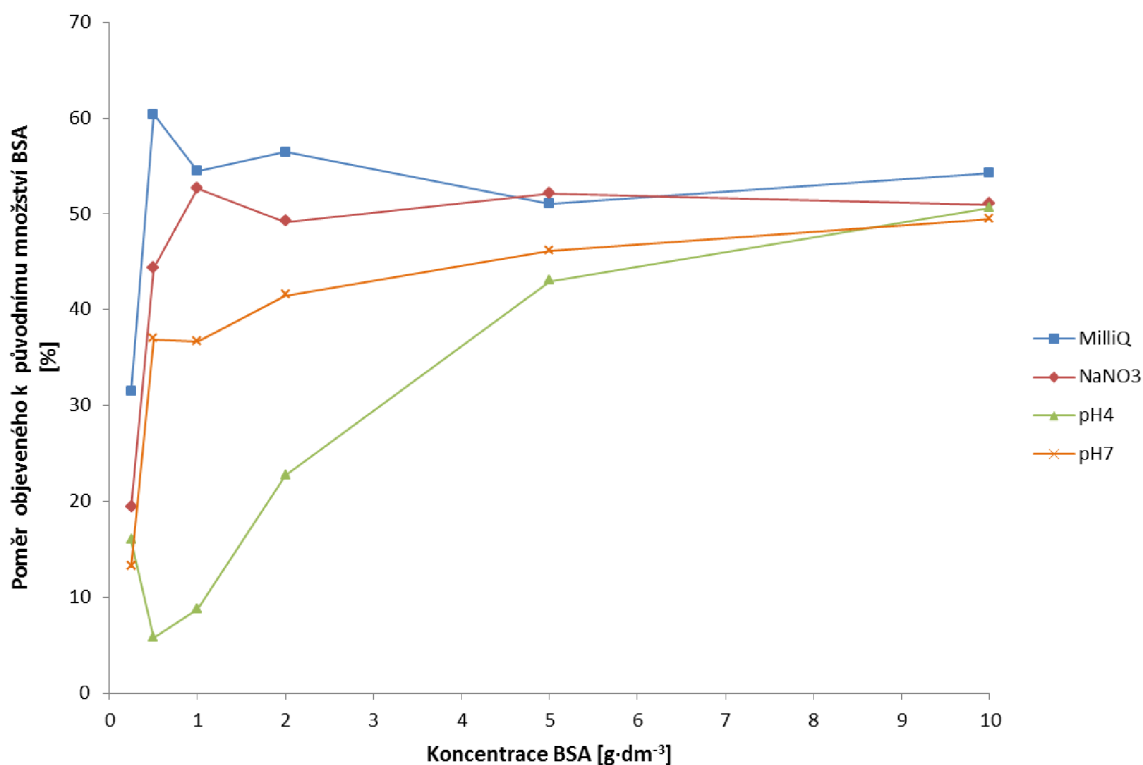
Na následujícím grafu (viz Graf 29) můžeme rovněž vidět rozdíl signálu UV-VIS u komplexů s VMHA a s NMHA. Menší procentuální množství BSA přítomného v komplexech s NMHA, jak již bylo odvozeno, je důkazem intenzivnějších interakcí v případě komplexů s vysokomolekulovou HA.





Graf 29. Procentuální množství přítomného BSA v rozpustných komplexech s HA hlavního chromatografického píku (v poměru k výchozímu množství BSA) v závislosti na koncentraci BSA v prostředí  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaNO}_3$ . Porovnání výsledků u komplexů s VMHA (1500 kDa) a s NMHA (340 kDa).

Procentuální množství BSA přítomného v chromatografickém hlavním píku částic od celkové původní koncentrace můžeme vidět v následujícím grafu (viz Graf 30). Je vidět, že s rostoucí iontovou silou se množství BSA v komplexech s HA snižuje, což může sloužit jako důkaz odfiltrování většího množství BSA ve formě větších nerozpustných komplexů HA-BSA. Zajímavý však je jev, že toto množství BSA, přítomné v částicích hlavního píku, se téměř srovná ve všech prostředích při vyšších koncentracích BSA ( $10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), což pravděpodobně svědčí o maximálním možném množství navázaného BSA a uniformitě komplexů při těchto nejvyšších koncentracích v jakémkoliv prostředí. Část zbylého BSA, která nebyla objevena v částicích hlavního píku, může být rovněž „skrytá“ uvnitř struktury HA, což se taktéž projeví na snížení signálu UV-VIS. Tento jev zejména můžeme očekávat v prostředí s nízkou iontovou silou (MilliQ a  $\text{NaNO}_3$ ), kde signál UV při vyšších koncentracích BSA, jak můžeme vidět z následujícího grafu (viz Graf 30), je skoro konstantní, zatímco data ze SEC-MALLS svědčí o pokračujících interakcích a vazbě dalších molekul BSA (viz Kapitola 4.3.1).



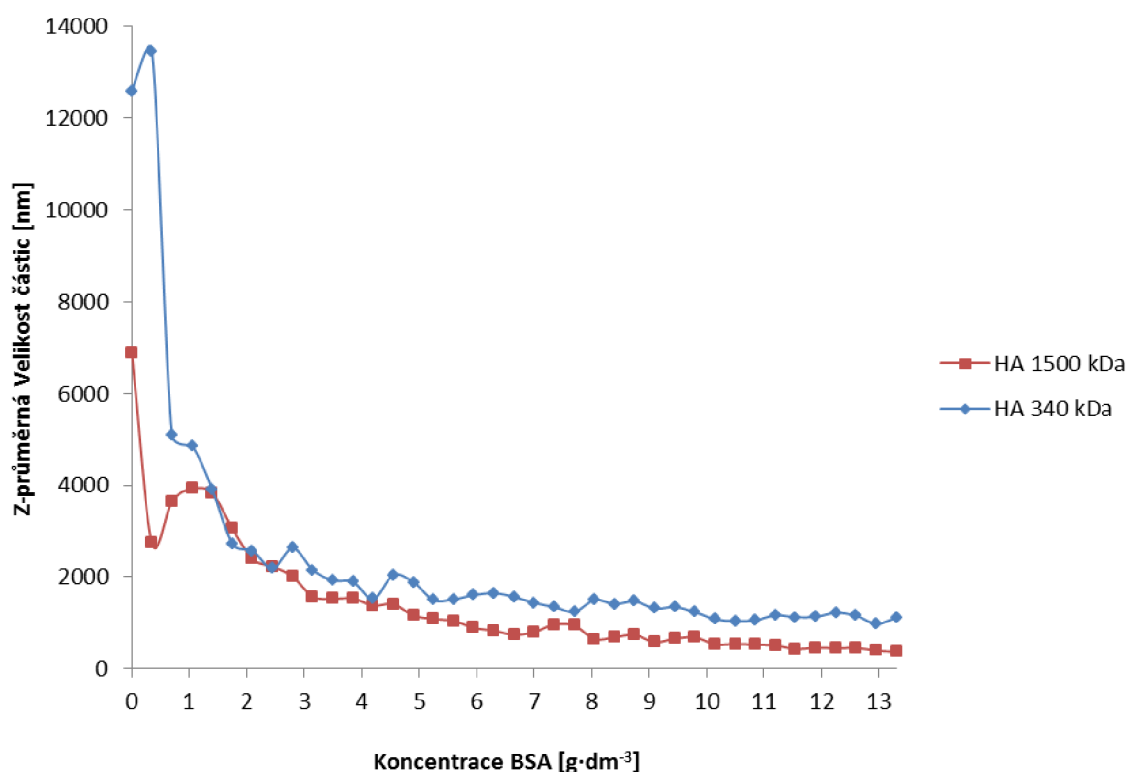
Graf 30. Procentuální množství přítomného BSA v rozpustných komplexech s VMHA hlavního chromatografického píku (v poměru k výchozímu množství BSA) v závislosti na koncentraci BSA v různých prostředích (MilliQ, NaNO<sub>3</sub>, pH 4 a pH 7)

#### 4.3.4. Výsledky DLS měření

DLS měření komplexů BSA-VMHA bylo rovněž provedeno v titračním modu, kde roztok BSA byl titrován do roztoku VMHA. Během měření byla rovněž zaznamenána hodnota zeta potenciálu a pH roztoku. Stejně jako komplexy s NMHA, vzorky komplexů s VMHA vykazovaly velkou polydisperzitu, a proto výsledky DLS měření těchto vzorků jsou velmi nepřesné a měly by sloužit pouze jako orientační.

Hlavní rozdíl řad komplexů s nízkomolekulovou HA od řad komplexů s vysokomolekulovou HA je ve zvýšeném počtu píků rozptylu světla, což svědčí o větší heterogenitě částic v případě komplexů HA-BSA s vysokomolekulovou HA. Zde již můžeme pozorovat tři píky v prostředích MilliQ, NaNO<sub>3</sub> a pH 7 pufru, a dokonce 4 píky v pufru pH 4, kde dochází k intenzivní precipitaci částic. Je vidět, že s rostoucí délkou řetězce HA se zvyšuje množství píků a související heterogenita částic komplexů. Zajímavý je jev, že Z-průměrná velikost částic je menší u komplexů s VMHA, než u komplexů s NMHA (viz Graf 31), což pravděpodobně svědčí o intenzivnější tvorbě větších agregátů a následné precipitaci komplexů BSA s nízkomolekulovou HA, zatímco komplexy s vysokomolekulovou HA, kvůli intenzivnějším interakcím, jsou výsledně menší a jsou rovněž stabilnější v roztoku a nepodléhají tak intenzivní agregaci. Je potřeba také podotknout, že s ohledem na velkou polydisperzitu systému je vypočet průměrné velikosti zatížen velkou chybou. To se může rovněž podílet na rozdílu Z-průměrné velikosti u komplexů s VM a NMHA.

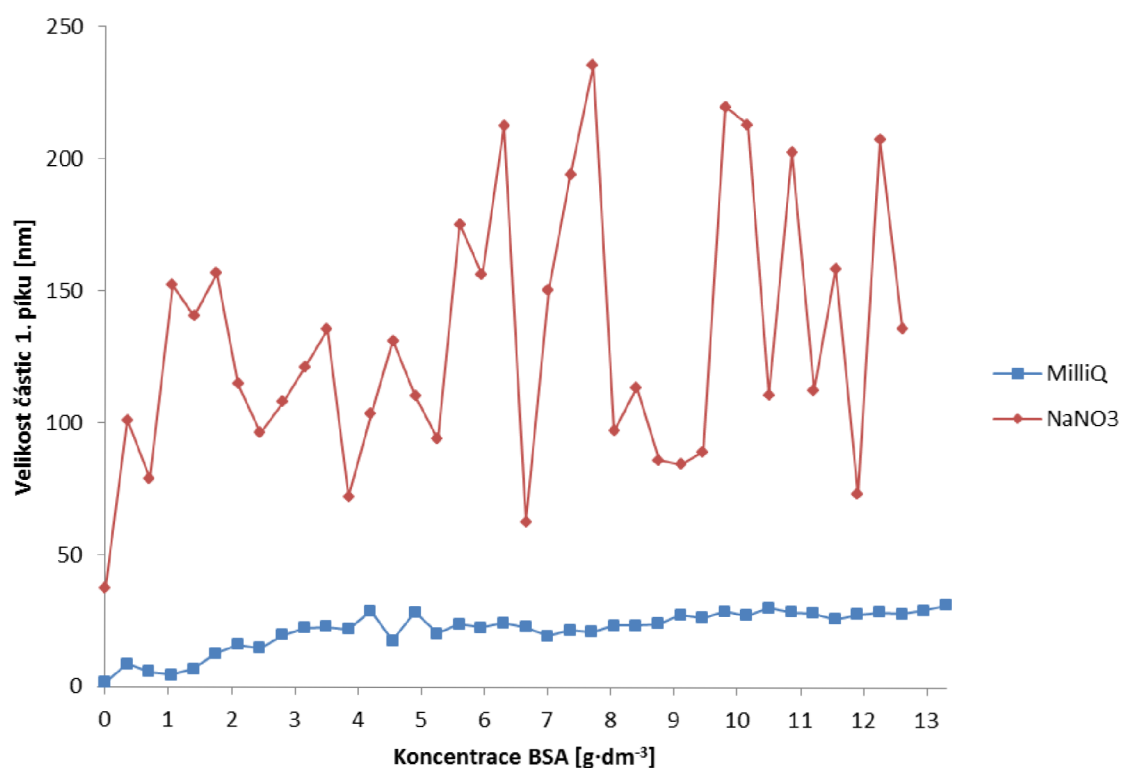
Zde rovněž dochází ke snížení Z-průměrné velikosti částic s rostoucí koncentrací BSA, zejména v prostředí MilliQ (můžeme vidět na následujícím grafu, viz Graf 31), což je v korelaci s daty SEC-MALLS (viz Kapitola 4.3.1).



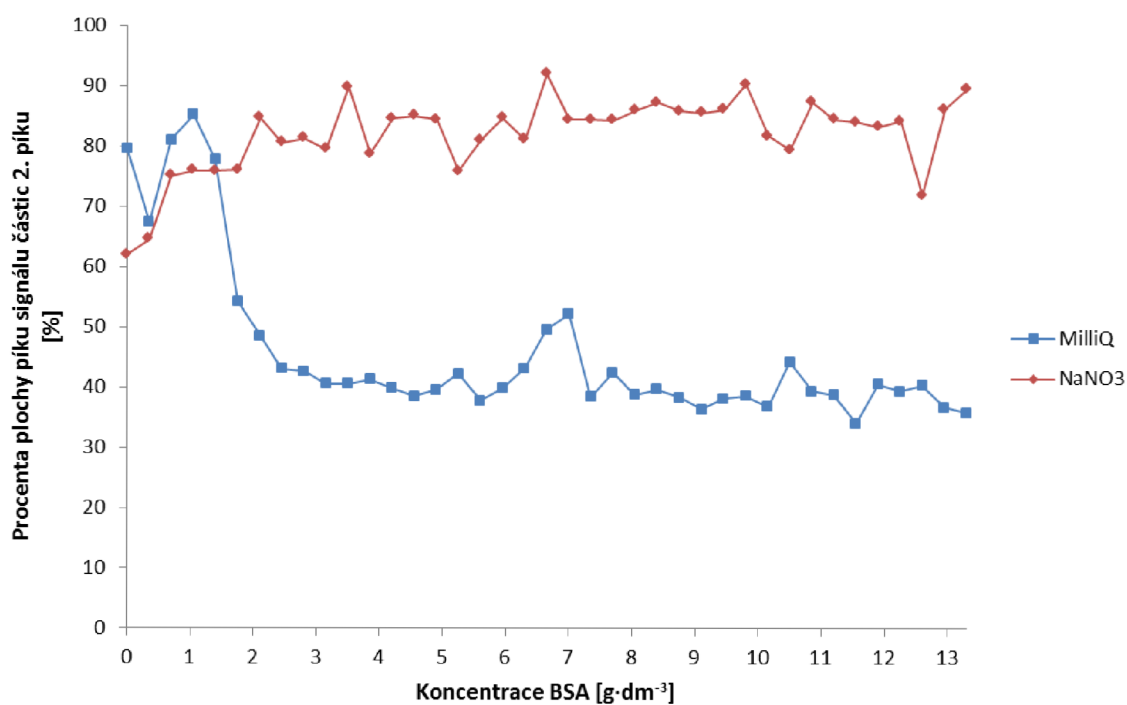
Graf 31. Závislost Z-průměrné velikosti částic komplexů HA-BSA v závislosti na koncentraci BSA u řad s VMHA (1500-1750 kDa) a NMHA (340 kDa) v prostředí MilliQ.

Částice prvního píku jsou malé a velikostně srovnatelné se stejnými částicemi komplexů s NMHA, ale však s výrazně menším zastoupením. Největší zastoupení zde již mají větší částice dalších píků.

Přídavek soli  $\text{NaNO}_3$  zde způsobí zvětšení velikosti jak menších tak i větších částic, a to hlavně při nižších koncentracích BSA (viz Graf 32), a rovněž zvýšení zastoupení větších částic v roztoku analytu (viz Graf 33), což koreluje s daty ze SEC-MALLS, kde zvýšení iontové síly rovněž způsobilo malé zvětšení částic hlavního píku a to také spíše při nižších koncentracích BSA (viz Graf 23). Tyto výsledky jsou v souladu s výše popsanou expanzí komplexů s vysokomolekulovou HA v případě vzorků se zvýšenou iontovou silou (viz Kapitola 4.3.1).

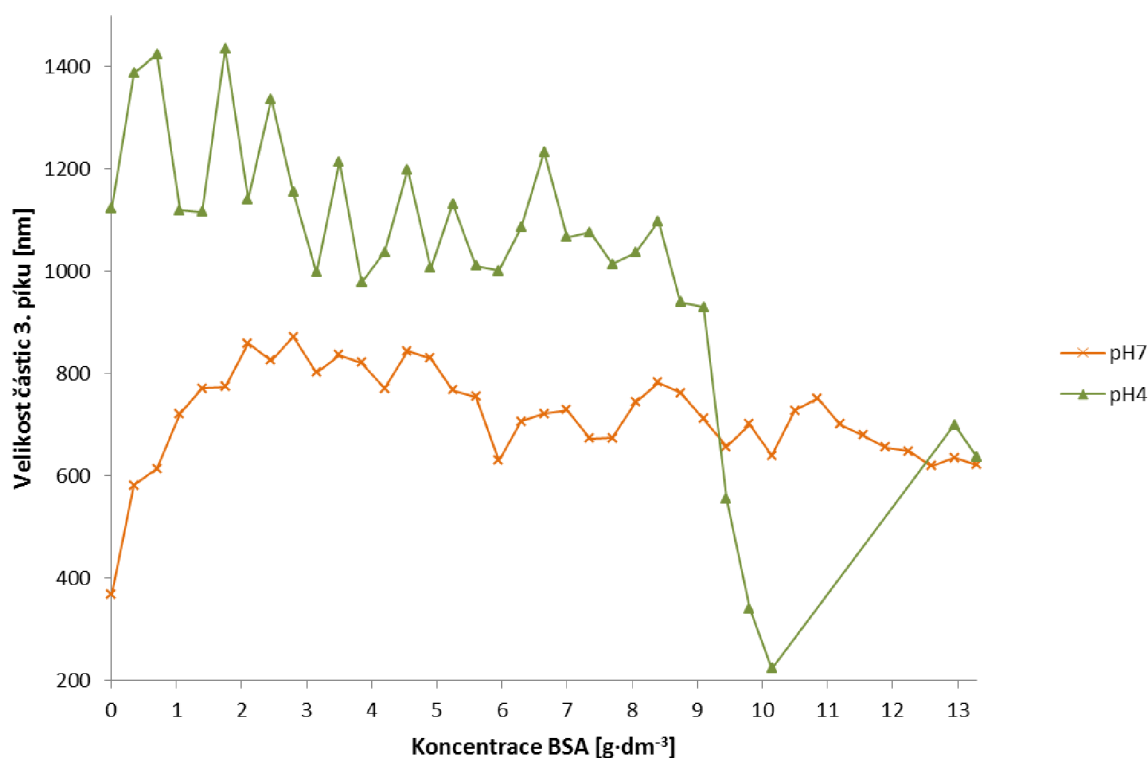


Graf 32. Velikosti nejmenších částic 1. píku komplexů VMHA a BSA v závislosti na koncentraci BSA v prostředích  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$   $\text{NaNO}_3$  nebo MilliQ

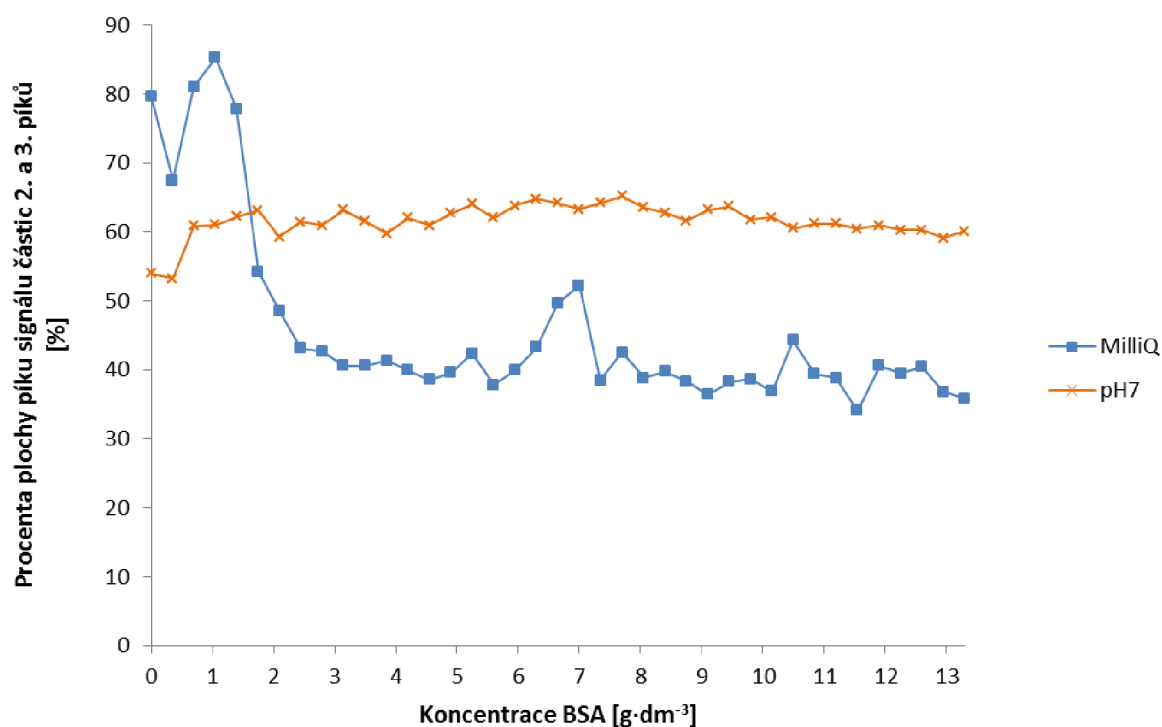


Graf 33. Procenta plochy píku větších částic 2. píku komplexů VMHA a BSA v závislosti na koncentraci BSA v prostředích  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$   $\text{NaNO}_3$  nebo MilliQ

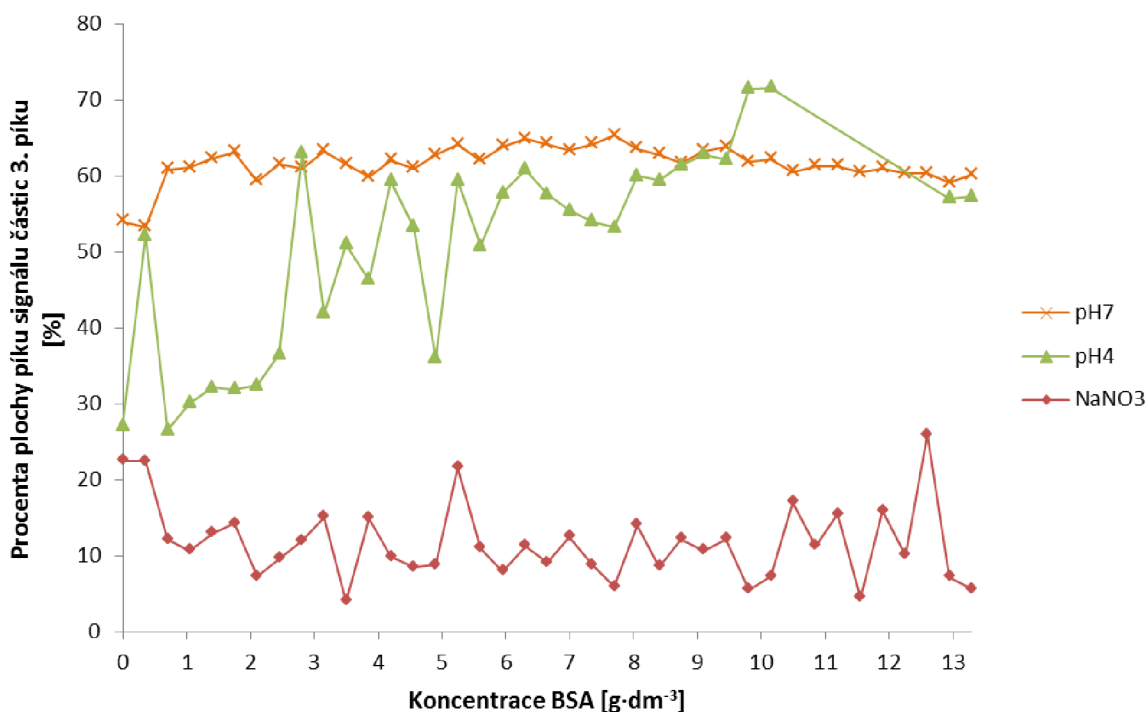
V prostředí pufru pH 4 Z-průměrná velikost částic je výrazně větší, než v případě prostředí MilliQ a NaNO<sub>3</sub>. V pH 7 pufru jsou částice pochopitelně o něco menší, než v pufru pH 4 (viz Graf 34), když vezmeme v úvahu precipitaci komplexů při pH4. V těchto prostředích hydrodynamicky poloměr projevuje rovněž největší fluktuace, jak tomu bylo u komplexů s NMHA. I když menší částice prvního píku v prostředích obou pufrů jsou menší, než v případě prostředí s nižší iontovou silou (stejně jak tomu bylo u řad komplexů s nízkomolekulovou HA), jejich zastoupení je zde nejmenší. Naopak zastoupení větších částic je v prostředí pufrů větší, než například v prostředí MilliQ a NaNO<sub>3</sub> (viz Graf 35, Graf 36), což je dalším důkazem tvorby větších komplexů a jejich intenzivnější precipitaci v prostředích s vysokou iontovou silou. Na následujících grafech je znázorněné porovnání velikost a plochy píku signálu rozptylu světla odpovídajícím větším částicím komplexů VMHA a BSA. Je zde vidět, že větší iontová síla způsobí tvorbu větších komplexů.



Graf 34. Velikost větších částic 3. píku komplexů VMHA a BSA v závislosti na koncentraci BSA v prostředích pufrů o pH 4 a pH 7



Graf 35. Procenta plochy píku větších částic 2. a 3. píku komplexů VMHA a BSA v závislosti na koncentraci BSA v prostředích MilliQ a pufru o pH 7

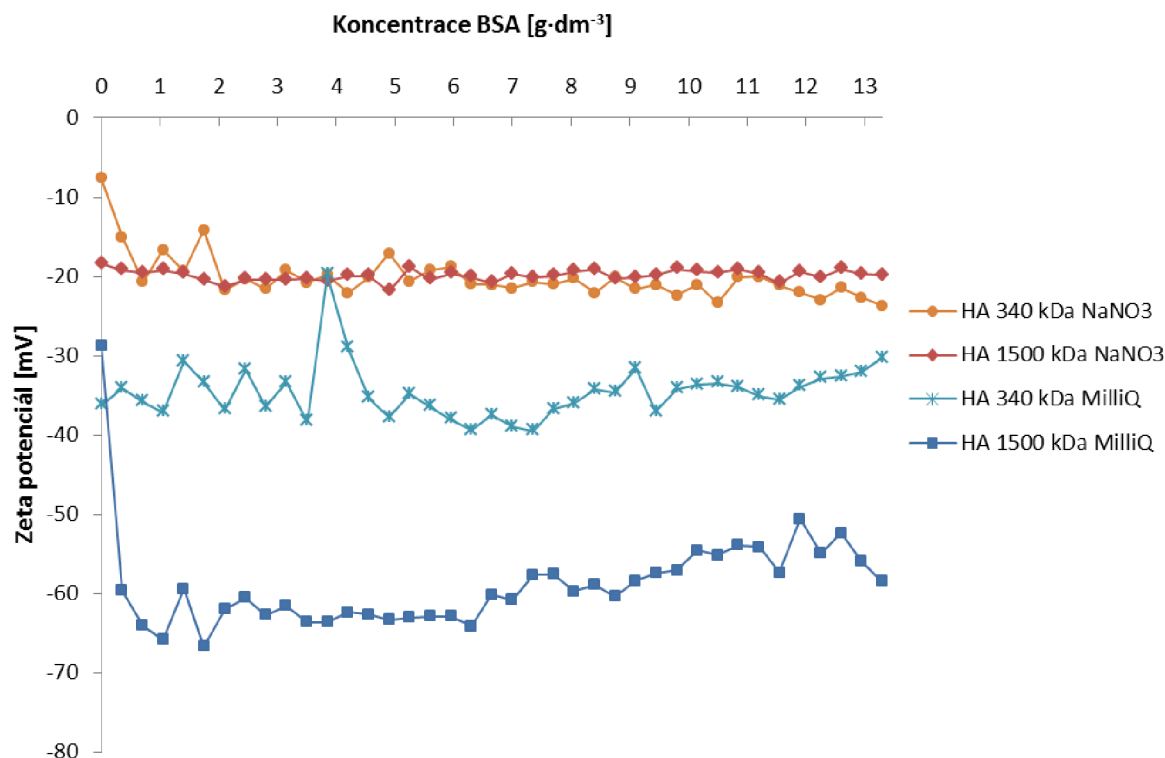


Graf 36. Procenta plochy píku větších částic 3. píku komplexů VMHA a BSA v závislosti na koncentraci BSA v prostředích 0,1 mol·dm<sup>-3</sup> NaNO<sub>3</sub> a pufru o pH 7 a pH 4

#### 4.3.5. Zeta potenciál částic (DLS měření)

Stanovení zeta potenciálu částic metodou ELS bylo rovněž součástí DLS titrací, stejně jako v případě komplexů s NMHA.

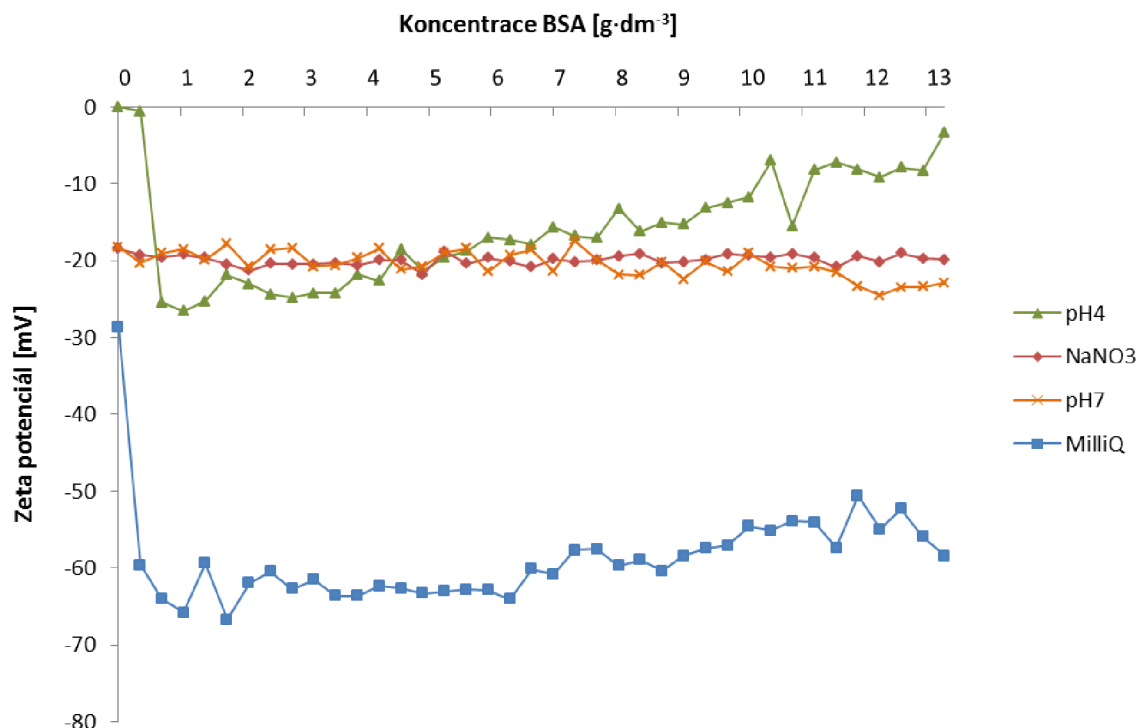
Zeta potenciál částic komplexů s vysokomolekulovou HA v prostředí MilliQ byl výrazně nižší, než zeta potenciál komplexů s nízkomolekulovou HA, což bylo pravděpodobně kvůli většímu počtu nabitých skupin v případě vysokomolekulové HA. Po zvýšení iontové síly však v prostředích  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaNO}_3$  v případě obou pufrů se zeta potenciál u komplexů s VMHA a NMHA liší jen minimálně, což je znázorněno v následujícím grafu (viz Graf 37).



Graf 37. Zeta potenciál částic komplexů HA a BSA v závislosti na koncentraci BSA v prostředích MilliQ nebo  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaNO}_3$ . Srovnání komplexů s VMHA (1500-1750 kDa) a NMHA (340 kDa)

Zvyšující se zeta potenciál s rostoucí koncentrací BSA najdeme pouze v případě prostředí MilliQ a pH 4 pufru, což pravděpodobně ukazuje na nejintenzivnější interakce molekul HA a BSA v těchto prostředích. U komplexů s nízkomolekulovou HA takový narůst zeta potenciálu byl objeven pouze v prostředí MilliQ (viz Graf 16), což naznačuje, že iontová síla stíní interakce HA-BSA více v případě nízkomolekulové HA. Téměř konstantní hodnota zeta potenciálu však nemusí vůbec znamenat chybějící interakce, ale může být pouze důsledkem kompenzace ztráty náboje v průběhu interakce molekul HA s BSA nábojem na povrchu navázaného BSA (který je rovněž negativně nabitý ve všech prostředích, kromě pH 4 pufru)

Z následujícího grafu (viz Graf 38) je rovněž vidět, že absolutní hodnota zeta potenciálu je nízká ve všech prostředích se zvýšenou iontovou silou (všechna prostředí kromě MilliQ), což je dalším důkazem nestability částic v těchto prostředích a jejich následné agregace do větších komplexů, což je zase v souladu s výše diskutovanými výsledky z měření SEC-MALLS a DLS (viz Kapitoly 4.3.1, 4.3.4). Ve srovnání s řadami komplexů BSA s nízkomolekulovou HA můžeme rovněž vidět větší rozdíl mezi zeta potenciálem částic v MilliQ a v prostředích se zvýšenou iontovou silou. (viz Graf 37). Podobnost hodnot zeta potenciálu v prostředí  $\text{NaNO}_3$  u komplexů s VMHA nebo NMHA svědčí o nestabilitě částic komplexů při zvýšené iontové síle, a to jak s VMHA tak i s NMHA.



Graf 38. Zeta potenciál částic komplexů VMHA (1500-1750 kDa) s BSA v závislosti na koncentraci BSA v různých prostředích (MilliQ, 0,1 mol·dm<sup>-3</sup> NaNO<sub>3</sub>, pufru pH 4 a pH 7)

Z grafu (viz Graf 38) je také vidět, že částice v pufru pH 4, kde došlo k precipitaci, a v jiných prostředích se zvýšenou iontovou silou, kde k takové precipitaci nedošlo, mají nízké absolutní hodnoty zeta potenciálu a jsou stejně nestabilní v roztoku. Je to důkazem tvorby větších, ale pravděpodobně rozpustných agregátů v případě prostředí pufru pH 7 a NaNO<sub>3</sub>. Tento předpoklad je v souladu s předchozími stanovění z měření SEC-MALLS a DLS.

#### 4.3.6. Měření pH hodnoty (DLS měření)

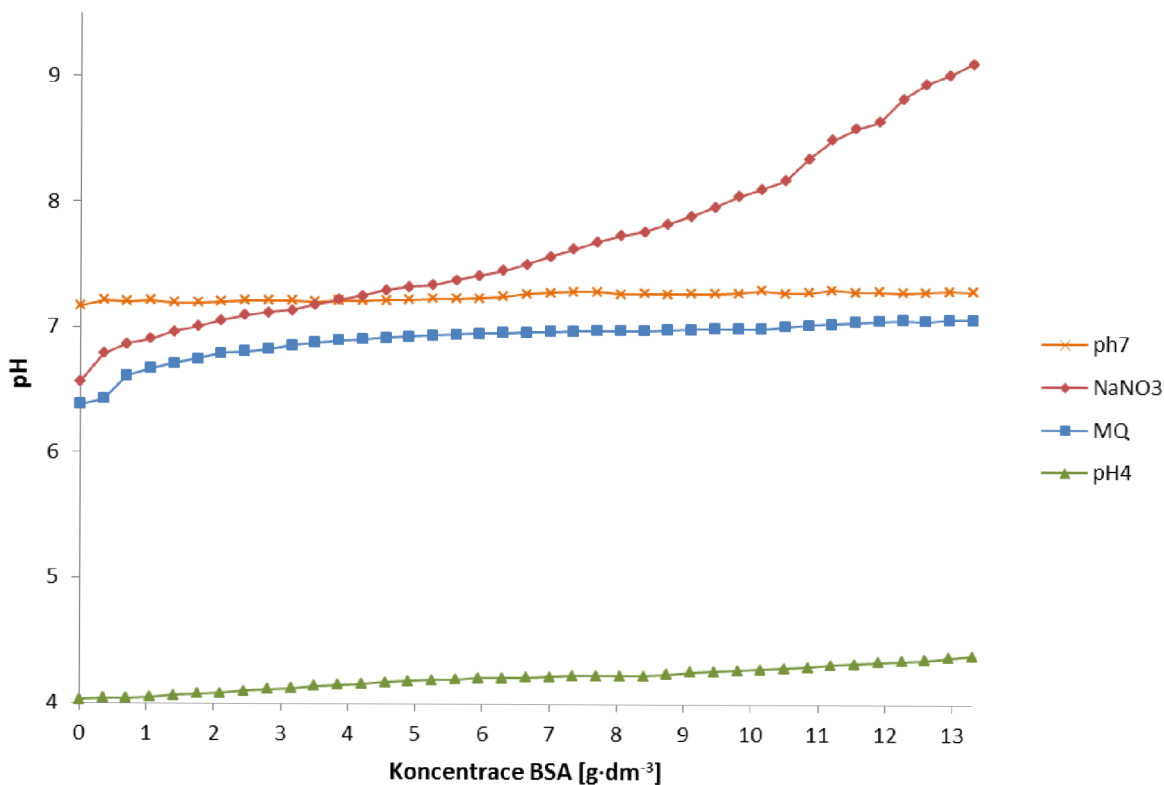
Měření pH prostředí bylo provedeno pomocí použití ponorné elektrody během DLS titrací BSA do roztoku VMHA.

Hodnota pH, stejně jak v případě komplexů s nízkomolekulovou HA, roste v každém prostředí s rostoucí koncentrací BSA, což pravděpodobně má stejný důvod jak v případě řady s NMHA (vazba H<sup>+</sup> iontů volnými molekulami BSA v roztoku, molekuly BSA jsou zde slabou bází).

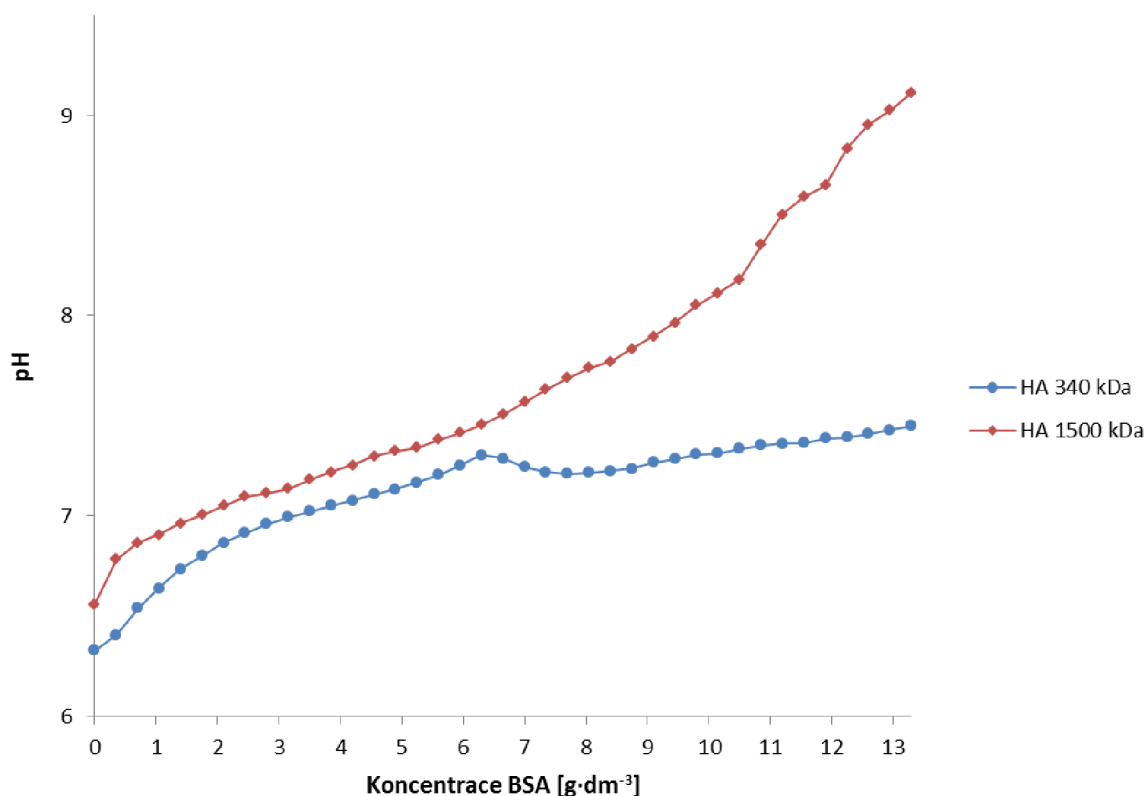
Nejintenzivnější narůst můžeme vidět v prostředí 0,1 mol·dm<sup>-3</sup> NaNO<sub>3</sub> (viz Graf 39), což je stejný jev jaký jsme mohli pozorovat u komplexů s nízkomolekulovou HA (viz Graf 17). Tento narůst je však větší případě komplexů s vysokomolekulovou HA (viz Graf 40). Zde pravděpodobně dochází k intenzivnější vazbě vodíkových iontů molekulami přidaného BSA, anebo tyto ionty může rovněž vázat molekula HA, která má větší počet nabitých karboxylových skupin, schopných vázat H<sup>+</sup> ionty, ve srovnání s nízkomolekulovou HA. V případě prostředí pufru o pH 7, hodnota pH je naopak skoro konstantní (viz Graf 39), což naznačuje na to, že výměna H<sup>+</sup> iontů zde skoro neprobíhá. Rovněž je potřeba zdůraznit pufráčnou kapacitu obou pufrů, kvůli které narůst pH v těchto prostředích po přidání slabé báze (molekuly BSA) může být rovněž výrazně potlačen, což je dalším důvodem tak



výrazného nárůstu pH hodnoty v prostředí roztoku  $\text{NaNO}_3$ , který takovou pufrací schopnost nemá.



Graf 39. Hodnota pH v roztoku při titracích BSA do VMHA v závislosti na koncentraci BSA v různých prostředích (MilliQ,  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3} \text{ NaNO}_3$ , pufrů pH 4 a pH 7)

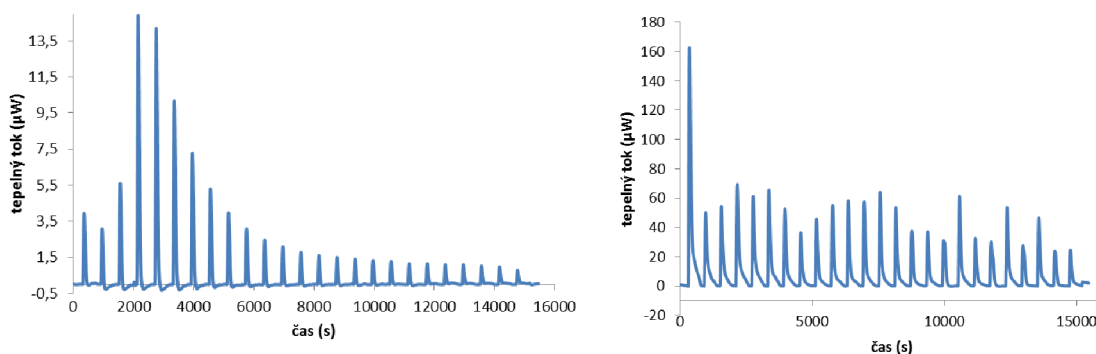


Graf 40. Hodnota pH v roztoku při titracích BSA do NMHA (340 kDa) nebo do VMHA (1500-1750 kDa) v závislosti na koncentraci BSA v prostředí 0,1 mol·dm<sup>-3</sup> NaNO<sub>3</sub>.

#### 4.3.7. Výsledky ITC měření

Izotermické kalorimetrické titrace byly provedeny stejným způsobem, jak i v případě řad vzorků s nízkomolekulovou HA, kde roztok BSA byl titrován do roztoku HA. Rovněž v řadě měření, zejména v prostředích obou pufrů (pH 4 a pH 7), byl objeven velmi heterogenní signál, který nebylo možné dále analyzovat, což znovu ukazuje na komplikovanost daného systému a probíhající v něm interakcí analytů s vícero složkami systému na jednou.

Nejméně heterogenní signál je znovu pouze u vzorků připravovaných v prostředí MilliQ a 0,1 mol·dm<sup>-3</sup> NaNO<sub>3</sub>. Signál v těchto prostředích ukazuje na exotermický vazebný proces. Na následujícím grafu (viz Graf 41) je vidět výrazný klesající průběh signálu tepelného toku s rostoucí koncentrací BSA od 4. přidavku. Je rovněž vidět, že nejvyšší exotermní signál se objeví u 4. - 5. přidavku, což v přepočtu na koncentrace BSA znamená cca 2 g·dm<sup>-3</sup> (každý přidavek obsahuje 10 μL BSA s koncentrací BSA 40 g·dm<sup>-3</sup>, po 4x přidavku celkový objem roztoku je 790 μL). Při této koncentraci u měření SEC-MALLS můžeme pozorovat strmý pokles velikosti a molekulové hmotnosti částic (viz Graf 22, Graf 23). Při cca stejné koncentraci BSA můžeme rovněž pozorovat strmý pokles plochy píku signálu větších částic u DLS měření a také pokles Z-průměrné velikosti částic (viz Graf 31, Graf 33). To pravděpodobně slouží indikaci nejvýraznějších interakcí mezi molekulami HA a BSA při této koncentraci BSA. Nižší signál při nižších koncentracích BSA je možné vysvětlit probíhajícím procesem změny struktury náhodného klubka molekuly HA při těchto koncentracích BSA, a pravděpodobně uvolněním většího počtu malých molekul protiiontů. Taková disociace je endotermní proces, s odpovídajícím endotermním signálem, který částečně vyruší exotermní signál vazby molekul BSA a HA. U řad vzorků s NMHA takový jev není pozorován pravděpodobně kvůli minimální změně struktury NMHA v průběhu iniciační vazby molekul BSA.

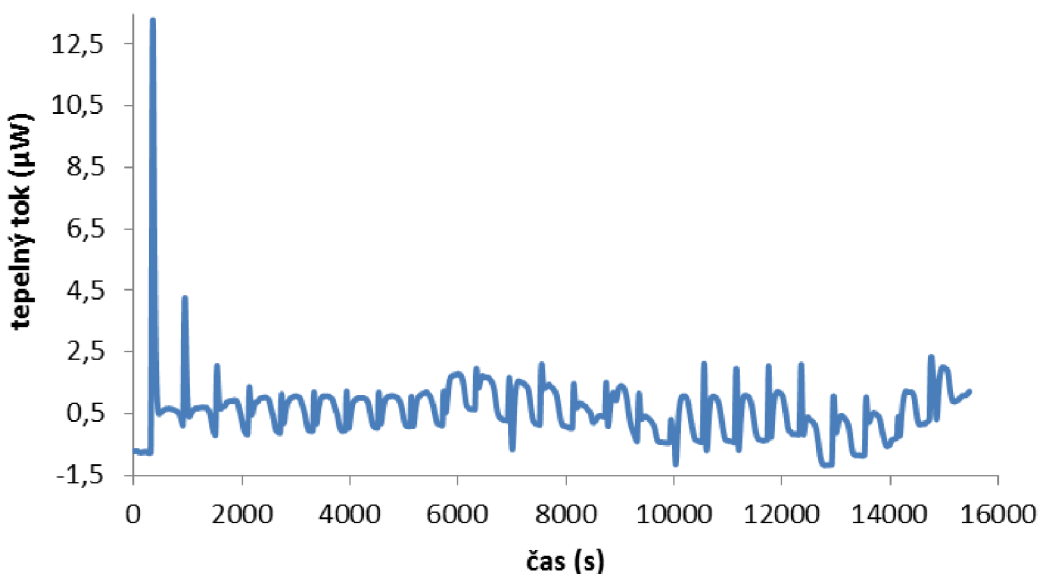


Graf 41. a Graf 42. Signál tepelného toku při ITC titraci BSA do roztoku VMHA (1500-1750 kDa) v prostředí MilliQ (vlevo) nebo v prostředí  $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaNO}_3$  (vpravo) v závislosti na čase.

Z porovnání se signálem titraci BSA do NMHA ve stejném prostředí (MilliQ) je vidět, že signál u VMHA je výrazně menší (cca 3-4x), což ale nemusí znamenat méně intenzivní interakce v tomto případě, ale, jak již bylo zmíněno výše, uvolnění většího počtu molekul protiiontů v důsledku změny struktury molekuly HA a značné vyrušení exotermního signálu signálem endotermním, odpovídajícím těmto disociačním procesům. Výraznější změnu struktury komplexů s VMHA rovněž potvrzují data ze SEC-MALS, kde velikost komplexů má strmější pokles, než u komplexů s NMHA (viz Graf 21).

Dalším zajímavým objevem bylo, že po přidání malé koncentrace ( $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) soli  $\text{NaNO}_3$ , exotermní signál se výrazně zvýšil (cca 15x), což je vidět v grafech (viz Graf 41 a 42). Pravděpodobně zde poloviční koncentrace soli ( $0,05$  oproti  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) již způsobila intenzivnější interakce, než v prostředí bez soli. Dalším možným důvodem je méně výrazná změna struktury a také méně intenzivní kontrakce řetězce molekuly HA, s tím spojené potlačení disociačních procesů malých protiiontů z molekuly HA, a výsledně snížení poměru endotermního signálu vůči exotermnímu signálu odpovídajícímu interakcím. Méně intenzivní změna struktury molekuly HA v průběhu interakcí v prostředí  $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaNO}_3$  se rovněž potvrzuje chybějícím maximem signálu v průběhu ITC měření, který jsme však mohli vidět v prostředí MilliQ. Pokles signálu s rostoucí koncentrací BSA za přítomnosti soli je rovněž méně strmý, než v případě MilliQ prostředí, což je důkazem většího stínění funkčních skupin řetězce HA a následně pomalejšího „nasycení“ vazbou molekul BSA.

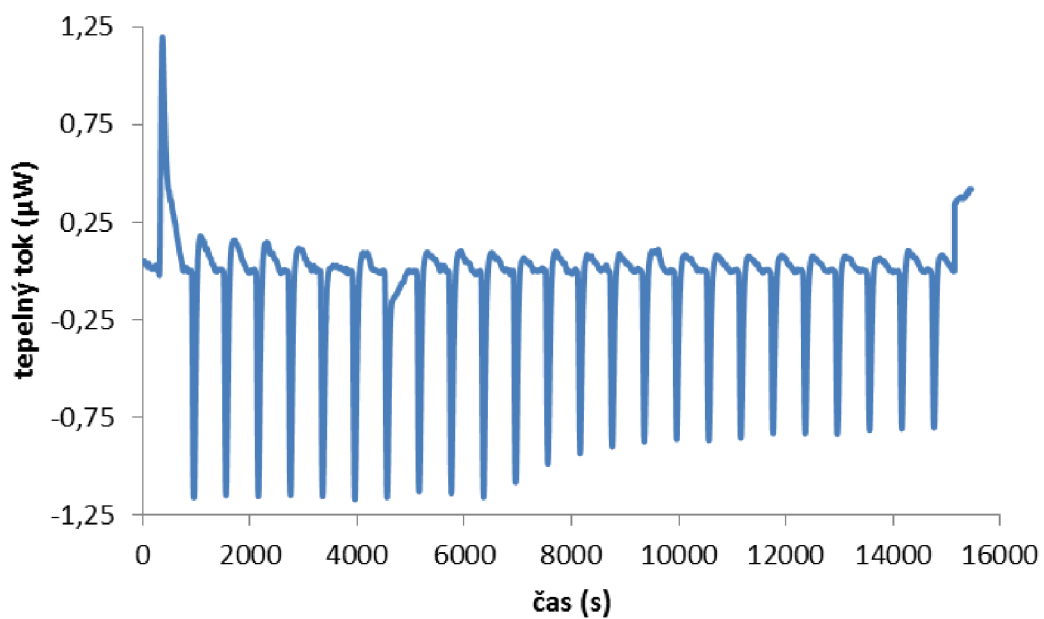
Na následujícím grafu (viz Graf 43) je znázorněna ukázka ITC titrace BSA do VMHA v prostředí s vysokou iontovou silou pH 7 pufru potvrzují velké stínění molekul ionty prostředí a následně méně výrazní interakce, což je v korelaci s výsledky ze SEC-MALLS a DLS.



Graf 43. Signál tepelného toku při ITC titraci BSA do roztoku VMHA (1500-1750 kDa) v prostředí pH 7 pufru v závislosti na čase.

Po inkubaci roztoků VMHA a BSA v prostředí pufru pH 7 při teplotě 37°C po dobu 12 hodin již vidíme endotermní signál (viz Graf 44), pravděpodobně odpovídající převládajícím disociačním procesům.

Signál je však extrémně nízký (pouze kolem  $-1 \mu\text{W}$ ), což je zase ukazatelem velkého stínícího efektu iontů prostředí na interakce HA a BSA. Po inkubaci, jak již bylo zmíněno při posouzení efektu zvýšené teploty (viz Kapitola 4.3.24.3.2), pravděpodobně dochází ke změně struktury komplexů. Pravděpodobně stejná změna se rovněž vztahuje i na jednotlivé komponenty těchto komplexů. Vzhledem k tomu, že ITC titrace inkubovaného BSA do pufru o pH 7 je doprovázena rovněž endotermním signálem tepelného toku, ale větším cca 3-4x (viz Graf 5, 6), celkově endotermní signál u titraci BSA do VMHA je způsoben disociačními procesy tykajícími se převážně molekuly albuminu (pravděpodobně disociace iontů), která pravděpodobně podléhá největší změně v průběhu takové inkubace. Trochu nižší výsledný endotermní signál titraci BSA do VMHA naznačuje na částečnou kompenzaci exotermním signálem odpovídajícím interakcím BSA s molekulou HA, a to i při výrazném stínění molekulami iontů.



*Graf 44. Signál tepelného toku při ITC titraci BSA do roztoku VMHA (1500-1750 kDa) v závislosti na čase, kde jak BSA tak VMHA byly před měřením inkubovány v prostředí pH 7 pufru při teplotě 37°C po dobu 12 hodin.*

## 5. ZÁVĚR

Bylo stanoveno, že k interakcím mezi HA a BSA dochází v každém prostředí ale s různou intenzitou. Tyto interakce se projevují jako snížení hodnot hydrodynamického a gyračního poloměru, vnitřní viskozity a rovněž molekulové hmotnosti částic s rostoucí koncentrací BSA. Takové snížení vypovídá o kontrakci komplexů v průběhu interakcí HA s molekulami albuminu, což bylo již stanoveno v dřívější bakalářské práci.

Výsledný systém je velmi heterogenní a experimentální data získaná z metod rozptylu světla jsou díky tomu velmi těžko analyzovatelná. U matematických rovnic popisující rozptyl světla se spousta parametrů zadává jako konstantní, což vyžaduje vysokou homogenitu systému a ideálně pouze jeden druh analytu. V tomto případě však systém je, jak již bylo zmíněno, heterogenní a spousta parametrů se mění v průběhu průchodu analytu kolonou SEC. Inkrement indexu lomu se například zadává v software před měřením jako konstantní hodnota, ale fakticky se mění podle obsahu albuminu a hyaluronanu ve vznikajících komplexech. Proto snížení vypočítané molekulové hmotnosti komplexů s rostoucí koncentrací BSA nemusí fakticky znamenat její snížení, ale v tomto případě pouze indikuje zmenšující se rozměr částic a následně jejich pozdější vylučování a detekci.

Tyto interakce a tvorba komplexů jsou intenzivnější v případě vysokomolekulové HA, kde pokles velikosti částic s rostoucí koncentrací BSA je strmější (data ze SEC-MALLS měření). Dochází také k větší kontrakci komplexů s VMHA, a to díky možnosti vazby většího počtu molekul BSA na větší počet karboxylových skupin VMHA. Vyšší UV-VIS signál, v případě komplexů s VMHA je rovněž důkazem vazby většího počtu BSA molekul a intenzivnějších interakcí.

Zvýšená iontová síla stíní náboj na funkčních skupinách molekuly HA a BSA. To způsobuje blokování vzájemných interakcí, což se odrazí na větším rozměru částic v roztoku, objevených při měření DLS. Iontová síla díky stínicímu efektu pravděpodobně má za následek vazbu menšího množství molekul BSA na řetězec HA, dřívější neutralizaci povrchového náboje komplexů a následnou agregaci a precipitaci komplexů. Proto interakce zde můžeme považovat za méně intenzivní. Rozpustné a nerozpustné velké agregáty jsou odfiltrovány ještě před měřením SEC-MALLS, proto nejsou vidět ve výsledcích. Velmi malé částice objevené při SEC-MALLS měření v prostředích obou pufrů (pH 4 a pH 7) jsou pravděpodobně pouze zbylé rozpustné fragmenty větších odfiltrovaných komplexů nebo malé komplexy, které zůstaly v roztoku po filtraci. Pravděpodobně koncentrace takových fragmentů/komplexů je velmi nízká, a poměr iontů prostředí k těmto částicím je naopak vysoký, proto ionty prostředí mohou mít výrazný vliv na konformaci těchto molekul, což může mít za následek změny v intenzitě rozptýleného záření a nižší hodnoty molekulové hmotnosti. Dalšími důkazy tvorby větších agregátů v prostředích s vyšší iontovou silou jsou nízké absolutní hodnoty zeta potenciálů, odpovídající nízké stabilitě částic, větší hydrodynamicky poloměr částic stanoveny u DLS měření a rovněž nízký UV-VIS signál, ze kterého vyplývá fakt většího podílu odfiltrovaného BSA.

Měření izotermické titrační kalorimetrii interakcí albuminu s hyaluronanem v mnoha případech mělo za výsledek velmi heterogenní signál, který nebylo možné dále analyzovat (hlavně v prostředích s vysokou iontovou silou pufrů pH 4 a pH 7). Důvodem tomu je složitost systému z hlediska kombinace různých probíhajících pochodů. Molekuly HA a BSA mohou podléhat interakcím jak mezi sebou tak i interakcím s dalšími složkami v systému (například ionty prostředí). Dále mohou současně probíhat jak asociační procesy interakcí mezi komponenty tak i disociační procesy iontů nebo složek analytů. Výsledný signál tepelného toku je potom součtem exotermních a endotermních procesů, které se mohou navzájem rušit.

Exotermní signál byl objeven v prostředích MilliQ a  $\text{NaNO}_3$  u komplexů BSA s NMHA a s VMHA. V prostředí s nižší iontovou silou ( $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaNO}_3$ ) je vidět výraznou redukci signálu tepelného toku v případě tvorby komplexů BSA s NMHA, což je dalším důkazem méně intenzivních interakcí v prostředích se zvýšenou iontovou silou.

U VMHA se však signál tepelného toku po přidání malého množství iontů soli ( $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaNO}_3$ ) naopak zvýší několikanásobně (15x), což nemusí znamenat intenzivnější interakce v přítomnosti soli, ale pouze zvýšení poměru exotermního signálu vazby k endotermnímu signálu disociace protiiontů v průběhu změny struktury VMHA.

Obecně zvýšení teploty kolony při SEC-MALLS analýze komplexů HA-BSA mělo pouze minimální vliv na tyto komplexy. Vyšší teplota způsobila malé zmenšení částic a snížení jejich viskozity v prostředí  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaNO}_3$ , ale naopak zvětšení částic v prostředích obou pufrů. Inkubace při teplotě  $37^\circ\text{C}$  po dobu 12 hodin v prostředí pufru o pH 7 na druhou stranu vyvolala zmenšení poměru  $R_w/R_h$ , což ukazuje spíše na kontrakci částic komplexů. Takové efekty zvýšené teploty jsou pravděpodobně způsobeny menší změnou struktury komplexů nebo pouze jejich iontového obalu. Změna struktury v průběhu inkubaci se rovněž potvrdila u měření ITC, kde se objevuje endotermní signál tepelného toku, zatímco v ostatních prostředích (MilliQ a  $\text{NaNO}_3$ ) je tento signál exotermní. Toto slouží jako důkaz převládání disociačních procesů v daném systému.

U měření zeta potenciálu částic se hlavně potvrdila nestabilita komplexů v každém prostředí kromě MilliQ vody. To souvisí se zvětšením částic a možnou agregací a precipitací komplexů v prostředích se zvýšenou iontovou silou. Zeta potenciál částic komplexů v těchto prostředích se navíc liší jen velmi málo mezi komplexy s VMHA a NMHA. Částice proto jsou stejně nestabilní bez ohledu na délku řetězce HA. Hodnota zeta potenciálu je rovněž téměř konstantní i se zvyšující se koncentrací BSA, a to opět hlavně v prostředích se zvýšenou iontovou silou. To slouží důkazem buď stínění molekul před vzájemnými interakcemi anebo rovněž odstínění a kompenzace ztráty povrchového náboje výsledných komplexů ionty prostředí.

Dále bylo prokázáno, že hodnota pH prostředí narůstá s rostoucí koncentrací BSA, což souvisí se slabou bazickou povahou BSA. Nejintenzivnější je takový nárůst v prostředí  $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ NaNO}_3$ , což jednak ukazuje na méně intenzivní interakce a větší množství volného bazického BSA v prostředí se zvýšenou iontovou silou. Nejméně intenzivní je nárůst pH v prostředí pufru o pH 4, což může být odůvodněno precipitací většího podílu BSA nebo rovněž puфраční kapacitou samotného pufru.

V této práci, která navazuje na moji bakalářskou práci se stejným tématem, jsem se pokusila prostudovat charakter tvorby komplexů mezi HA a BSA již z několika úhlů pohledu, a to s použitím kombinace různých technik. V této práci jsem ke studiu komplexů HA-BSA kromě SEC-MALLS metody, která již zahrnovala data z UV-VIS detektoru, použila měření ITC. DLS měření bylo rovněž provedeno v titračním modu. Byla rovněž pomocí ponorné elektrody zaznamenána pH hodnota prostředí, a pomocí ELS metody i hodnota zeta potenciálu. Rovněž jsem do analýzy zahrнула vliv krátkodobého a dlouhodobého zvýšení teploty na povahu komplexů. Po vyhodnocení veškerých výsledků a jejich vzájemného porovnání domnívám, že se mi podařilo popsat povahu těchto komplexů ve větší míře. Vybraný systém HA-BSA je však velmi komplexní a komplikovaný, a zcela jistě potřebuje další výzkum, který však již přesahuje obsah této diplomové práce.

## 6. REFERENCE

1. COWMAN a Shiro MATSUOKA. Experimental approaches to hyaluronan structure. *Carbohydrate Research*. 11 April 2005, roč. 340, č. 5, 791–809.
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.
3. SONG, Jung-Min, Jong-Hyuk IM, Jae-Hoon KANG a Dae-Jung KANG. A simple method for hyaluronic acid quantification in culture broth. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2009, **78**(3): 633-634 [cit. 2015-12-22]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2009.04.033. ISSN 01448617.
4. LAURENT, Torvard. C., FRASER, J. Robert. Hyaluronan. *FASEB J*. 1992 **6**(7), 2397-2404.
5. LIAO, Yong-Hong, Stuart A. JONES, Ben FORBES, Gary P. MARTIN a Marc B. BROWN. Hyaluronan: Pharmaceutical Characterization and Drug Delivery. *Drug Delivery* [online]. 2015, **12**(6): 327-342 [cit. 2015-12-22]. DOI: 10.1080/10717540590952555. ISSN 1071-7544.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. BASTOW, E. R., S. BYERS, S. B. GOLUB, C. E. CLARKIN, A. A. PITSILLIDES a A. J. FOSANG. Hyaluronan synthesis and degradation in cartilage and bone. *Cellular and Molecular Life Sciences* [online]. 2008, **65**(3): 395-413 [cit. 2015-12-22]. DOI: 10.1007/s00018-007-7360-z. ISSN 1420-682x.
10. MISRA, Suniti, Vincent C. HASCALL, Roger R. MARKWALD a Shibnath GHATAK. Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer. *Frontiers in Immunology* [online]. 2015, **6**: - [cit. 2015-12-22]. DOI: 10.3389/fimmu.2015.00201. ISSN 1664-3224.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. NECAS, J., L. BARTOSIKOVA, P. BRAUNER a J. KOLAR. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *VETERINARNI MEDICINA*. 53(8), 2008, s. 397-411.
15. 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.
16. TURLEY, E. A. Signaling Properties of Hyaluronan Receptors. *Journal of Biological Chemistry*. vol. 277, issue 7, s. 4589-4592. DOI: 10.1074/jbc.R100038200.



17. TOOLE, B. P. Hyaluronan-CD44 Interactions in Cancer: Paradoxes and Possibilities. *Clinical Cancer Research* [online]. 2009, **15**(24): 7462-7468 [cit. 2015-12-22]. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0479. ISSN 1078-0432.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. PETERS Theodore, Jr. *All About Albumin Biochemistry, Genetics, and Medical Applications* [online]. Burlington: Elsevier, 1995 [cit. 2014-05-02]. ISBN 978-008-0527-048.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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>
27. 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.
28. ANAND, Uttam, Chandrima JASH a Saptarshi MUKHERJEE. Spectroscopic Probing of the Microenvironment in a Protein–Surfactant Assembly. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2010, **114**(48): 15839-15845 [cit. 2015-12-22]. DOI: 10.1021/jp106703h. ISSN 1520-6106.
29. BORDBAR, Abdol-Khalegh, Asghar TAHERI-KAFRANI, Seyed Habib-Allah MOUSAVI a Thomas HAERTLÉ. Energetics of the interactions of human serum albumin with cationic surfactant. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 2008, **470**(2): 103-110 [cit. 2015-12-22]. DOI: 10.1016/j.abb.2007.11.015. ISSN 00039861.
30. GULL, N., P. SEN, R. H. KHAN a KABIR-UD-DIN. Spectroscopic Studies on the Comparative Interaction of Cationic Single-Chain and Gemini Surfactants with Human Serum Albumin. *Journal of Biochemistry*[online]. 2008, **145**(1): 67-77 [cit. 2015-12-22]. DOI: 10.1093/jb/mvn141. ISSN 0021-924x.

31. ZHOU, Ting, Mingqi AO, Guiying XU, Teng LIU a Juan ZHANG. Interactions of bovine serum albumin with cationic imidazolium and quaternary ammonium gemini surfactants: Effects of surfactant architecture. *Journal of Colloid and Interface Science* [online]. 2013, **389**(1): 175-181 [cit. 2015-12-22]. DOI: 10.1016/j.jcis.2012.08.067. ISSN 00219797.
32. DUGGAN L. Edward and LUCK J. Murray. Denaturation stabilization against urea anions with serum albumin: IV. The combination of organic article: *J. Biol. Chem.* 1948, 172:205-220.
33. ANAND, Uttam, Chandrima JASH, Ravi Kiran BODDEPALLI, Aseem SHRIVASTAVA a Saptarshi MUKHERJEE. Exploring the Mechanism of Fluorescence Quenching in Proteins Induced by Tetracycline. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2011, **115**(19): 6312-6320 [cit. 2015-12-22]. DOI: 10.1021/jp2008978. ISSN 1520-6106.
34. ANAND, Uttam, Lisha KURUP a Saptarshi MUKHERJEE. Deciphering the role of pH in the binding of Ciprofloxacin Hydrochloride to Bovine Serum Albumin. *Physical Chemistry Chemical Physics* [online]. 2012, **14**(12): 4250- [cit. 2015-12-22]. DOI: 10.1039/c2cp00001f. ISSN 14639076.
35. FROELICH, E., J. S. MANDEVILLE, C. J. JENNINGS, R. SEDAGHAT-HERATI a H. A. TAJMIR-RIAHI. Dendrimers Bind Human Serum Albumin. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2009, **113**(19): 6986-6993 [cit. 2015-12-22]. DOI: 10.1021/jp9011119. ISSN 1520-6106.
36. SU, Zhiqiang, Liang ZHANG, Jiaohong ZHAO a Xiaonong CHEN. Investigation of the complexation of proteins with neutral water soluble polymers through model analysis method. *Polymer* [online]. 2011, **52**(4): 1084-1091 [cit. 2015-12-22]. DOI: 10.1016/j.polymer.2011.01.012. ISSN 00323861.
37. CHARBONNEAU, David, Marc BEAUREGARD a Heidar-Ali TAJMIR-RIAHI. Structural Analysis of Human Serum Albumin Complexes with Cationic Lipids. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2009, **113**(6): 1777-1784 [cit. 2015-12-22]. DOI: 10.1021/jp8092012. ISSN 1520-6106.
38. CHAKRABORTY, Soumyananda, Prachi JOSHI, Virendra SHANKER, Z. A. ANSARI, Surinder P. SINGH a Pinak CHAKRABARTI. Contrasting Effect of Gold Nanoparticles and Nanorods with Different Surface Modifications on the Structure and Activity of Bovine Serum Albumin. *Langmuir* [online]. 2011, **27**(12): 7722-7731 [cit. 2015-12-22]. DOI: 10.1021/la200787t. ISSN 0743-7463.
39. DOMINGUEZ-MEDINA, Sergio, Steven MCDONOUGH, Pattanawit SWANGLAP, Christy F. LANDES a Stephan LINK. In Situ Measurement of Bovine Serum Albumin Interaction with Gold Nanospheres. *Langmuir* [online]. 2012, **28**(24): 9131-9139 [cit. 2015-12-22]. DOI: 10.1021/la3005213. ISSN 0743-7463.
40. XU, Yisheng, Malek MAZZAWI, Kaimin CHEN a Lianhong SUN. *Biomacromolecules* [online]. 2011, **12**(5) [cit. 2015-12-22]. DOI: 10.1021/bm101465y. ISSN 1525-7797.
41. MANSFELD, J., M. FÖRSTER, A. SCHELLENBERGER a H. DAUTZENBERG. Immobilization of invertase by encapsulation in polyelectrolyte complexes. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 1991, **13**(3): 240-244 [cit. 2015-12-22]. DOI: 10.1016/0141-0229(91)90135-W. ISSN 01410229.
42. RUCKPAUL, K.,H. REIN, GR. JANIG, W. PFEIL, O. RISTAU, G. DAMASCHU, H. DAMASCHU, JJ. MULLER, HV. PURSCHEL, et al. Interaction of hemoglobin with ions - effect of heparin on oxygen affinity of adult human hemoglobin. *Studia Biophysica*. po box 90, reading, berks, england rg1 8jl: gordon breach sci publ ltd, 1972, **34**(2): 81-96. issn 0081-6337.

43. 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.
44. DE KRUIF, Cornelus G., Fanny WEINBRECK a Renko DE VRIES. Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid* [online]. 2004, **9** (5), 340-349 [cit. 2016-02-06]. DOI: 10.1016/j.cocis.2004.09.006. ISSN 13590294.
45. STREGE, M.A,P.L. DUBIN, J.S. WEST, Daniel C.D FLINTA, M. LADISCH, R.C. WILLSON, C.C. PAINTON aS. E BUILDER. Protein purification:: From Molecular Mechanisms to Large Scale Processes. *Separation & Purification Reviews* [online]. American Chemical Society, Washington, D.C, 1990, **19**(2): chap. 5. ISSN 1542-2127.
46. PARK, Jeongsook M., Barry B. MUHOBERAC, Paul L. DUBIN a Jiulin XIA. Effects of protein charge heterogeneity in protein-polyelectrolyte complexation. *Macromolecules* [online]. 1992, **25**(1): 290-295 [cit. 2015-12-22]. DOI: 10.1021/ma00027a047. ISSN 0024-9297.
47. TOLSTOGUZOV, V. B., V. Ya. GRINBERG a A. N. GUROV. Some physicochemical approaches to the problem of protein texturization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 1985,**33**(2), 151-159 [cit. 2016-02-06]. DOI: 10.1021/jf00062a001. ISSN 0021-8561.
48. TOLSTOGUZOV, V. B. Some physico-chemical aspects of protein processing in foods. Multicomponent gels. *Food Hydrocolloids* [online]. 1995, **9** (4), 317-332 [cit. 2016-02-06]. DOI: 10.1016/S0268-005X(09)80262-2. ISSN 0268005x.
49. TOLSTOGUZOV, V. B. Functional properties of protein polysaccharide mixtures. *Functional properties of food macromolecules*. 2nd ed. /. Gaithersburg, Md.: Aspen, 1998, s. 252-275. ISBN 0751404217. (12)
50. TOLSTOGUZOV, V. B Functional properties of food proteins and role of protein-polysaccharide interaction. *Food Hydrocolloids* [online]. 1991, **4** (6), 429-468 [cit. 2016-02-06]. DOI: 10.1016/S0268-005X(09)80196-3. ISSN 0268005x.
51. SHERYS, A.Y., A.N. GUROV a V.B. TOLSTOGUZOV. Water-insoluble triple complexes: Bovine serum albumin-bivalent metal cation-alginate. *Carbohydrate Polymers* [online]. 1989, **10**(2), 87-102 [cit. 2016-02-06]. DOI: 10.1016/0144-8617(89)90059-3. ISSN 01448617.
52. TOLSTOGUZOV, B. Vladimir. *Food proteins and their applications: Protein-Polysaccharide interactions*. New York: Marcel Dekker, 1997, s. 171-198. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 80. ISBN 0824798201.
53. ALL, V., M. WINTERHALTER, P. SCHWINTE, Ph. LAVALLE, J.-C. VOEGEL a P. SCHAAF. Complexation Mechanism of Bovine Serum Albumin and Poly(allylamine hydrochloride). *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2002, **106**(9), 2357-2364 [cit. 2016-02-06]. DOI: 10.1021/jp012522m. ISSN 1520-6106.
54. WEINBRECK, Fanny, Hans NIEUWENHUIJSE, Gerard W. ROBIJN a Cornelis G. DE KRUIF. Complexation of Whey Proteins with Carrageenan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [online]. 2004, **52**(11), 3550-3555 [cit. 2016-02-06]. DOI: 10.1021/jf034969t. ISSN 0021-8561.
55. KAIBARA, K., T. OKAZAKI, H. B. BOHIDAR a P. L. DUBIN. PH-Induced Coacervation in Complexes of Bovine Serum Albumin and Cationic Polyelectrolytes. *Biomacromolecules* [online]. 2000,**1** (1), 100-107 [cit. 2016-02-06]. DOI: 10.1021/bm990006k. ISSN 1525-7797.

56. MATTISON, Kevin W., Isabelle J. BRITAIN a Paul L. DUBIN. Protein-Polyelectrolyte Phase Boundaries. *Biotechnology Progress* [online]. 1995, **11**(6), 632-637 [cit. 2016-02-06]. DOI: 10.1021/bp00036a005. ISSN 8756-7938.
57. HARNILAWAT, T, R PONGSAWATMANIT a D MCCLEMENTS. Characterization of  $\beta$ -lactoglobulin–sodium alginate interactions in aqueous solutions: A calorimetry, light scattering, electrophoretic mobility and solubility study. *Food Hydrocolloids* [online]. 2006, **20**(5), 577-585 [cit. 2016-02-07]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2005.05.005. ISSN 0268005x.
58. 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.
59. 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.
60. 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.
61. 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.
62. 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.
63. 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+.
64. GRAYMONPR E, 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.
65. 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.
66. 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.
67. TRATHNIGG, Bernd. Size-Exclusion Chromatography of Polymers. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2006 [cit. 2015-12-17]. DOI: 10.1002/9780470027318.a2032. ISBN 0471976709.
68. FEKETE, Szabolcs, Alain BECK, Jean-Luc VEUTHEY a Davy GUILLARME. Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2014, **101**: 161-173 [cit. 2015-12-17]. DOI: 10.1016/j.jpba.2014.04.011. ISSN 07317085.

69. 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.
70. 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.
71. 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.
72. 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.
73. 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.
74. 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.
75. 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.
76. 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.
77. 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.
78. 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.
79. WYATT, Philip J. Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Analytica Chimica Acta*. 1993, č. 272, s. 1-40.
80. POUCHLÝ, Julius. *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav*. Vyd. 3. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008, 205 s. ISBN 978-80-7080-674-6.
81. 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.
82. HARDING, Stephen E a Kornelia JUMEL. Light Scattering. *Current Protocols in Protein Science*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley, 2001. DOI: 10.1002/0471140864.ps0708s11.

83. MARET, Barbara, Agnès CRÉPET, Clément FAYE, Laurent GARRELLY a Catherine LADAVIÈRE. Molar-Mass Analysis of Dendrigraft Poly(L-lysine) (DGL) Polyelectrolytes by SEC-MALLS: The “Cornerstone” Refractive Index Increment. *Macromolecular Chemistry and Physics* [online]. 2015, **216**(1): 95-105 [cit. 2015-12-17]. DOI: 10.1002/macp.201400400. ISSN 10221352.
84. LIN, Peng-Cheng, Ding-Tao WU, Jing XIE, Jing ZHAO a Shao-Ping LI. Characterization and comparison of bioactive polysaccharides from the tubers of *Gymnadenia conopsea*. *Food Hydrocolloids* [online]. 2015, **43**: 199-206 [cit. 2015-12-25]. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2014.05.015. ISSN 0268005x.
85. LUAN, Tu, Yapeng FANG, Saphwan AL-ASSAF, Glyn O. PHILLIPS a Hongbin ZHANG. Compared molecular characterization of hyaluronan using multiple-detection techniques. *Polymer* [online]. 2011, **52**(24): 5648-5658 [cit. 2015-12-25]. DOI: 10.1016/j.polymer.2011.10.024. ISSN 00323861.
86. SIMULESCU, Vasile, Michal KALINA, Jakub MONDEK a Miloslav PEKAŘ. Long-term degradation study of hyaluronic acid in aqueous solutions without protection against microorganisms. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2016, **137**: 664-668 [cit. 2015-12-25]. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.10.101. ISSN 01448617.
87. YE, Hongping. Simultaneous determination of protein aggregation, degradation, and absolute molecular weight by size exclusion chromatography–multiangle laser light scattering. *Analytical Biochemistry* [online]. 2006, **356**(1), 76-85 [cit. 2016-02-03]. DOI: 10.1016/j.ab.2006.05.025. ISSN 00032697.
88. PENG, Yanfei a Lina ZHANG. Characterization of a polysaccharide–protein complex from *Ganoderma tsugae* mycelium by size-exclusion chromatography combined with laser light scattering. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* [online]. 2003, **56**(1-3), 243-252 [cit. 2016-02-03]. DOI: 10.1016/S0165-022X(03)00062-9. ISSN 0165022x.
89. ARAKAWA, T., J. WEN a J.S. PHILO. Stoichiometry of Heparin Binding to Basic Fibroblast Growth Factor. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 1994, **308**(1), 267-273 [cit. 2016-02-03]. DOI: 10.1006/abbi.1994.1037. ISSN 00039861.
90. BERNE, Bruce J a Robert PECORA. *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*. Dover ed. Mineola, N.Y.: Dover Publications, 2000, vii, 376 p. ISBN 04-864-1155-9.
91. 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.
92. PECORA, Robert. *Dynamic light scattering: applications of photon correlation spectroscopy*. New York: Plenum Press, c1985, xiv, 420 p. ISBN 03-064-1790-1.
93. TSCHARNUTER, Walther. Photon Correlation Spectroscopy in Particle Sizing. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Chichester, UK: John Wiley, 2006-09-15. DOI: 10.1002/9780470027318.a1512.
94. SARTOR, Marta. Dynamic Light Scattering: to determine the radius of small beads in Brownian motion in a solution. University of California. San Diego
95. SVANBERG, Christer a Rikard BERGMAN. Photon Correlation Spectroscopy. September 2005.
96. 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 .

97. DE OLIVEIRA, V.A.V, W.A.DE MORAIS, M.R. PEREIRA a J.L.C. FONSECA. Dynamic light scattering in semidilute and concentrated chitosan solutions. *European Polymer Journal* [online]. 2012,**48**(11), 1932-1939 [cit. 2016-02-04]. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2012.07.017. ISSN 00143057.
98. LI, Junfang, To NGAI a Chi WU. *The slow relaxation mode: from solutions to gel networks* [online]. [cit. 2016-02-04]. DOI: 10.1038/pj.2010.59. ISBN 10.1038/pj.2010.59.
99. ADEL, Aschi, Mbarek NADIA, Othman MOHAMED a Gharbi ABDELHAFIDH. Study of thermally and chemically unfolded conformations of bovine serum albumin by means of dynamic light scattering. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2008, **28**(5-6), 594-600 [cit. 2016-02-04]. DOI: 10.1016/j.msec.2007.10.004. ISSN 09284931.
100. MATSUNAMI, Hiroshi, Rie KIKUCHI, Kazuyoshi OGAWA a Etsuo KOKUFUTA. Light scattering study of complex formation between protein and polyelectrolyte at various ionic strengths: fejetony, které vycházely od roku 1997 na internetu na adrese <http://svet.namodro.cz>. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* [online]. 2007, **56**(1-2), 142-148 [cit. 2016-02-04]. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2006.10.003. ISSN 09277765.
101. BRANCA, Caterina, Ulderico WANDERLINGH, Giovanna D'ANGELO, Cristina CRUPI a Simona RIFICI. Study of the dynamical behavior of sodium alginate/myoglobin aqueous solutions: A dynamic light scattering study. *Journal of Molecular Liquids* [online]. 2015, **209**, 294-300 [cit. 2016-02-04]. DOI: 10.1016/j.molliq.2015.06.002. ISSN 01677322.
102. HUNTER, Robert J. *Zeta potential in colloid science: principles and applications*. New York: Academic Press, 1981, xi, 386 p. Colloid science (London, England: 1976): 1976), 2. ISBN 01-236-1960-2.
103. PARSONS, Roger. The electrical double layer at solid/liquid interfaces. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* [online]. 1981, **118**, 3-18 [cit. 2016-02-04]. DOI: 10.1016/S0022-0728(81)80528-1. ISSN 00220728.
104. GUGGENHEIM, E. A. The Conceptions of Electrical Potential Difference between Two Phases and the Individual Activities of Ions. *The Journal of Physical Chemistry* [online]. 1928, **33**(6), 842-849 [cit. 2016-02-04]. DOI: 10.1021/j150300a003. ISSN 0092-7325.
105. TUCKER, I.M., J.C.W. CORBETT, J. FATKIN, R.O. JACK, M. KASZUBA, B. MACCREATH a F. MCNEIL-WATSON. Laser Doppler Electrophoresis applied to colloids and surfaces. *Current Opinion in Colloid* [online]. 2015, **20**(4), 215-226 [cit. 2016-02-07]. DOI: 10.1016/j.cocis.2015.07.001. ISSN 13590294.
106. FREIRE, Ernesto, Obdulio L. MAYORGA a Martin STRAUME. Isothermal titration calorimetry. *Analytical Chemistry*. 1990, **62**(18), 950A-959A. DOI: 10.1021/ac00217a002. ISSN 0003-2700.
107. STURTEVANT, J. M. Heat capacity and entropy changes in processes involving proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1977, **74**(6), 2236-2240 [cit. 2016-02-11]. DOI: 10.1073/pnas.74.6.2236. ISSN 0027-8424.
108. CONNELLY, Patrick R., John A. THOMSON, Matthew J. FITZGIBBON a Frank J. BRUZZESE. Probing hydration contributions to the thermodynamics of ligand binding by proteins. Enthalpy and heat capacity changes of tacrolimus and rapamycin binding to FK506 binding protein in deuterium oxide and water. *Biochemistry* [online]. 1993, **32**(21), 5583-5590 [cit. 2016-02-11]. DOI: 10.1021/bi00072a013. ISSN 0006-2960.
109. JELESAROV, Ilian a Hans Rudolf BOSSHARD. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics

- of biomolecular recognition. *Journal of Molecular Recognition* [online]. University of Zurich, Zürich, Zurich, Switzerland, 1999, **12**(1), 3-18 [cit. 2016-02-11].
110. WISEMAN, Thomas, Samuel WILLISTON, John F. BRANDTS a Lung-Nan LIN. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Analytical Biochemistry* [online]. 1989, **179**(1), 131-137 [cit. 2016-02-11]. DOI: 10.1016/0003-2697(89)90213-3. ISSN 00032697.
111. SIGURSKJOLD, Bent W. Exact Analysis of Competition Ligand Binding by Displacement Isothermal Titration Calorimetry. *Analytical Biochemistry* [online]. 2000, **277**(2), 260-266 [cit. 2016-02-11]. DOI: 10.1006/abio.1999.4402. ISSN 00032697.
112. DOTY, Paul a Robert F. STEINER. Macro-Ions. I. Light Scattering Theory and Experiments with Bovine Serum Albumin. *The Journal of Chemical Physics* [online]. 1952, **20**(1), 85- [cit. 2016-04-15]. DOI: 10.1063/1.1700201. ISSN 00219606.
113. MICHNIK, A. Thermal stability of bovine serum albumin DSC study. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* [online]. **71**(2), 509-519 [cit. 2016-04-14]. DOI: 10.1023/A:1022851809481. ISSN 14182874.