

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Věra Pavlů

STUDIE INTERAKCE HEPARINU S TETRAARGINEM  
POMOCÍ KAPILÁRNÍ ELEKTROFORÉZY

Study of interaction of heparin and tetraarginine using capillary  
electrophoresis

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Tomáš Křížek, Ph.D.

Praha 2019

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 9. 8. 2019

## Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Tomáši Křížkovi za vedení mé bakalářské práce, odbornou pomoc, za cenné rady a v neposlední řadě také za věnovaný čas a trpělivost.

## Abstrakt

Tato práce se zabývá studiem interakce heparinu a tetraargininu pomocí kapilární zónové elektroforézy. Vychází ze základních principů afinitní kapilární elektroforézy. Tetraarginin jako jednodušší a přesně definovaná molekula zde nahrazuje složitý protamin, který se používá jako antidotum heparinu.

V teoretické části je obecně pojednáno o kapilární zónové elektroforéze a využívaných metodách detekce. Je zde představena metoda afinitní kapilární elektroforézy a její jednotlivá uspořádání. Dále pak jsou zahrnuty také základní informace o heparinu a tetraargininu.

Experimentální část tvoří z většiny experimenty, kde bylo použito netradiční uspořádání kapilární elektroforézy. Vzorek byl nejprve zasunut do kapiláry tlakem 5 kPa, poté bylo vloženo napětí 30 kV pouze na krátký časový interval a vše bylo mobilizováno tlakem směrem k detektoru. Detekce probíhala při vlnové délce 200 nm. Byla použita křemenná kapilára o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$ , jejíž celková délka byla 50,0 cm. Délka kapiláry k detektoru činila 41,5 cm. S výjimkou jednoho experimentu probíhalo měření s kyselinou fosforečnou o koncentraci 10  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  jako základním elektrolytem. Bylo proměřeno několik experimentů s různě dlouhou dobou působení napětí nebo s různou koncentrací heparinu.

Bylo zjištěno, že komplex, který vznikne interakcí tetraargininu a heparinu, nedisociuje vlivem vloženého napětí a migruje směrem k anodě. Prokázalo se, že prochází-li zóna tetraargininu zónou obsahující heparin, interakcí obou látek ubývá volný tetraarginin, čímž se zmenšuje plocha jeho detegovaného píku. Pokud je dávkován heparin tlakem 5 kPa po dobu 60 s, bezprostředně po něm tetraarginin tlakem 5 kPa po dobu 3 s a je vloženo napětí 30 kV po dobu 30 s, způsobují koncentrace heparinu v řádu tisícín až setin  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  lineární pokles plochy píku volného tetraargininu. To naznačuje, že metoda může být využita pro nepřímé stanovení heparinu v koncentracích, ve kterých není přímo detegovatelný UV detektorem.

## Klíčová slova

afinitní kapilární elektroforéza, heparin, tetraarginin

## Obsah

1	Cíl práce.....	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	Kapilární elektroforéza.....	9
2.1.1	Základní princip.....	9
2.1.2	Metody detekce.....	11
2.1.3	Afinitní kapilární elektroforéza .....	12
2.2	Heparin.....	14
2.2.1	Heparin v lidském organismu.....	15
2.2.2	Stanovení heparinu v klinické praxi .....	16
2.3	Protamin.....	17
2.3.1	Tetraarginin.....	18
3	Experimentální část .....	19
3.1	Použité chemikálie .....	20
4	Výsledky a diskuze.....	21
4.1	Klasické uspořádání .....	21
4.2	Mobilizace tlakem.....	22
4.3	Stanovení elektroforetických mobilit.....	22
4.3.1	Stanovení mobility tetraargininu a komplexu.....	23
4.3.2	Stanovení mobility heparinu.....	24
4.4	Interakce v průběhu migrace.....	24
4.5	Změny experimentálních podmínek.....	28
4.5.1	Vliv doby dávkování heparinu při konstantních koncentracích heparinu a tetraargininu.....	28
4.5.2	Vliv koncentrace heparinu při konstantní koncentraci tetraargininu....	30
4.5.3	Vliv změny základního elektrolytu.....	30
5	Závěr.....	32
6	Použitá literatura.....	33

## Seznam použitých symbolů a zkratek

ACE ..... afinitní kapilární elektroforéza (z angl. affinity capillary electrophoresis)

BGE ..... základní elektrolyt (z angl. background electrolyte)

EOF..... elektroosmotický tok (z angl. electroosmotic flow)

KCE ..... kinetická kapilární elektroforéza (z angl. kinetic capillary electrophoresis)

$E$ ..... intenzita elektrického pole

$l_c$ ..... celková délka kapiláry

$l_d$ ..... délka kapiláry k detektoru

$\mu$  ..... elektroforetická mobilita

$\mu_{app}$  ..... pozorovaná mobilita

$\mu_{eff}$  ..... efektivní mobilita

$t$ ..... čas

$t_{mig}$ ..... migrační čas

$t_{EOF}$ ..... migrační čas markeru elektroosmotického toku

$U$ ..... vložené napětí

$v$  ..... rychlost pohybu částice

$v_{EOF}$ ..... rychlost elektroosmotického toku

## 1 Cíl práce

Laboratoř, ve které byla tato práce vypracována, se již delší dobu zabývá studií interakcí heparinu a tetraargininu. Dosud provedené experimenty ale byly zaměřeny především na analytické využití této interakce. Cílem této práce bylo tedy systematicky prozkoumat a popsat interakci těchto dvou látek jako takovou.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza je elektromigrační separační metoda, pomocí níž je možné získat kvalitativní i kvantitativní data. Je to velmi rychlá a účinná metoda vhodná ke stanovení elektricky nabitých částic. Za určitých podmínek ji však lze použít i pro stanovení neutrálních molekul, metoda se poté nazývá micelární elektrokinetická chromatografie. Výhodou kapilární elektroforézy obecně je velmi malé množství spotřebovaného vzorku. Také lze pracovat s rozmanitými maticemi, což představuje velkou výhodu pro zpracování biologických vzorků, jako jsou krev a moč.

Měření probíhá v křemenné kapiláře velmi malého průměru, která je pokryta slabou vrstvou z polyimidu, aby byla pružnější a nedošlo k jejímu poškození. Oba konce kapiláry jsou ponořeny v základním elektrolytu (background electrolyte – BGE). V něm jsou umístěny také elektrody připojené na zdroj vysokého napětí, které vytváří elektrické pole, v němž lze látky rozdělit. Na vzdálenějším konci kapiláry je umístěn detektor, který zaznamenává procházející oddělené zóny analytů.

#### 2.1.1 Základní princip

K separaci látek dochází na základě jejich rozdílné pohyblivosti v elektrickém poli. Základní veličinou je elektroforetická mobilita  $\mu$ , která je definována jako rychlost pohybu iontů v roztoku v elektrickém poli o jednotkové intenzitě [1]. Vzorec pro výpočet je uveden jako rovnice 1, kde  $\mu$  [ $\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ] je elektroforetická mobilita,  $v$  [ $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ ] rychlost pohybu částice,  $E$  [ $\text{V} \cdot \text{m}^{-1}$ ] intenzita elektrického pole,  $l_c$  [m] je celková délka kapiláry,  $l_d$  [m] je délka k detektoru,  $t$  [s] je migrační čas a  $U$  [V] je vložené napětí.

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{l_c \cdot l_d}{t \cdot U} \quad (1)$$

Významným jevem, který ovlivňuje pohyb částice kapilárou, je elektroosmotický tok (electroosmotic flow – EOF). Na vnitřním povrchu křemenné kapiláry, ve které separace probíhá, se v důsledku disociace molekul základního elektrolytu vytvoří elektrická dvojvrstva. Na vnitřní straně kapiláry jsou siloxanové skupiny, ty se nejprve hydrolyzují na skupiny silanolové, které poté disociují, čímž získají záporný náboj.



Disociace ionogenních silanolových skupin je závislá na pH roztoku, z toho důvodu je EOF silně závislý na pH základního elektrolytu. Dochází k tomu, že kladně nabitě částice interagují s touto záporně nabitou stěnou kapiláry. V okamžiku vložení napětí se začnou kationty pohybovat směrem k záporně nabitě elektrodě, tedy ke katodě. Protože je vnitřní průměr kapiláry velmi malý a ionty jsou solvatované, strhnou s sebou celý objem roztoku v kapiláře a dochází tak k pohybu veškerého roztoku směrem ke katodě. Pokud je EOF dostatečně rychlý, všechny částice, ať už kladně nebo záporně nabitě, se pohybují jedním směrem, přičemž kationty jsou rychlejší než anionty. V důsledku toho, že EOF vzniká u stěn kapiláry, nemá proudění kapaliny uvnitř kapiláry parabolický profil typický pro tok poháněný čerpadlem. Jak je vidět na Obr. 1, v případě EOF je proudění pravoúhlé, takže EOF nepřispívá k rozmývání zón analytů [1,2].



**Obrázek 1: Typy proudění.** Při proudění kapaliny vyvolaném tlakem prochází kapalina s parabolickým profilem (1). Proudění za působení elektroosmotického toku (2) je pravoúhlé. Kapalína tak proudí kapilárou ve všech místech se stejnou rychlostí. Převzato z [2] a upraveno.

Nevýhodou přítomnosti elektroosmotického toku je fakt, že snižuje reprodukovatelnost migračních časů analytů. Vzorec pro výpočet mobility EOF je uveden v rovnici 2, kde  $v_{EOF}$  [ $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ] je rychlost elektroosmotického toku,  $E$  [ $\text{V}\cdot\text{m}^{-1}$ ] je intenzita elektrického pole,  $l_c$  [m] je celková délka kapiláry,  $l_d$  [m] je délka k detektoru,  $t_{EOF}$  [s] je migrační čas markeru elektroosmotického toku a  $U$  [V] je vložené napětí.

$$\mu_{EOF} = \frac{v_{EOF}}{E} = \frac{l_c \cdot l_d}{t_{EOF} \cdot U} \quad (2)$$

Samotná mobilita stanovované látky, se poté označuje jako efektivní elektroforetická mobilita  $\mu_{eff}$ , kterou vypočítáme dle rovnice 3, a je to hodnota pozorované mobility snižená o hodnotu mobility elektroosmotického toku. Pozorovaná mobilita  $\mu_{app}$  (viz. rovnice 4) je určena z migračního času analytu  $t_{mig}$ , který je získán z naměřeného elektroferogramu.

$$\mu_{eff} = \mu_{app} - \mu_{EOF} \quad (3)$$

$$\mu_{app} = \frac{v_{app}}{E} = \frac{l_c \cdot l_d}{t_{mig} \cdot U} \quad (4)$$

## 2.1.2 Metody detekce

Široká škála detektorů, které byly vyvinuty pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, se s úspěchem používá i pro kapilární elektroforézu. Používá se především UV detekce, dále fluorescenční, elektrochemické a hmotnostní detektory [2]. Pro UV absorpční nebo fluorescenční detekci na kapiláře je předem nutné zbavit kapiláru polyimidové ochranné vrstvy. Ta je neprůhledná, a pokud bychom ji neodstranili, nic by nebylo možné detegovat. Vytvoříme tedy tzv. detekční okénko.

### 2.1.2.1 UV absorpční detekce

V současné době nejvíce používané UV detektory jsou ve většině komerčně dodávaných přístrojů. Detekce pomocí absorpce UV záření je oblíbená pro svou relativně nízkou cenu a také pro téměř univerzální detekční schopnost, protože v případě analytů neobsahujících chromofory je možné využít nepřímou UV detekci.

### 2.1.2.2 Fluorescenční detekce

Fluorescenční detektor je výhodný pro jeho vysokou citlivost. Tato detekce navíc usnadňuje identifikaci molekul pomocí spektrální analýzy. Velkým omezením je však to, že ve většině molekul chybí fluorescenční skupiny. Proto je často potřeba provést derivatizaci látky, aby byla detekce vůbec možná.

### 2.1.2.3 Elektrochemická detekce

Elektrochemické metody detekce zahrnují měření potenciometrická, amperometrická nebo měření konduktivity, které označujeme jako tzv. vodivostní detekci. Potenciometrická a vodivostní detekce jsou relativně universální a finančně nenáročné metody. Amperometrický detektor je citlivý a selektivní, ale jeho použití brzdí to, že je použitelný jen pro elektroaktivní sloučeniny. Společným jmenovatelem všech tří elektrochemických metod je nutnost izolovat detekční systém od vysokého napětí v separačním prostoru, což může být nevýhodné pro uspořádání celého systému.

### 2.1.2.4 Hmotnostní detekce

Použití hmotnostní detekce poskytuje unikátní možnost identifikovat neznámé sloučeniny a určit jejich strukturu. Kombinace separační techniky s vysokou účinností, jako je kapilární elektroforéza, s hmotnostní detekcí zajišťuje silný nástroj pro analýzu komplexních směsí. Tato metoda je bohužel stále velmi drahá [3].

### 2.1.3 Afinitní kapilární elektroforéza

Afinitní kapilární elektroforéza (affinity capillary electrophoresis – ACE) je jednou z důležitých technik na poli biologie a medicíny. Používá se pro separaci a stanovení biologických makromolekul. Vyvinula se kombinací principů elektroforézy a vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Spojuje výhodu možnosti dosažení vysokého rozlišení elektroforézy s uspořádáním v kapiláře podobným gelové chromatografii.

#### 2.1.3.1 Základní princip

Všechny afinitní metody jsou založeny na nekovalentní vazbě ligandu a cílové molekuly. Dojde k vytvoření komplexu, jehož stabilitu udává rovnovážná disociační konstanta. Afinitní separační metody lze rozdělit na kinetické a nekinetické. V kinetických nedochází na rozdíl od nekinetických k ustavení rovnováhy, proto je lze využít ke kvantitativnímu stanovení nebo k určení rovnovážné konstanty dané reakce.

V ACE lze použít dvě základní uspořádání. Při heterogenním je ligand ukotven na povrchu kapiláry, v gelu nebo na chromatografickém nosiči. Cílová molekula, která je volně v roztoku, se poté nespecificky naváže. Interakce probíhají s maximální účinností, ale koncentrace aktivních molekul je po imobilizaci velmi nízká, což snižuje citlivost metody. V homogenním uspořádání jsou ligand i cílová molekula rozpuštěny v roztoku a dochází ke vzniku komplexu. Tato metoda je nejrozšířenější, protože je aplikovatelná na široké spektrum analytů. Pokud je však elektroforetická separace volných složek od komplexu nedostatečná, není možné homogenní uspořádání použít [4, 5].

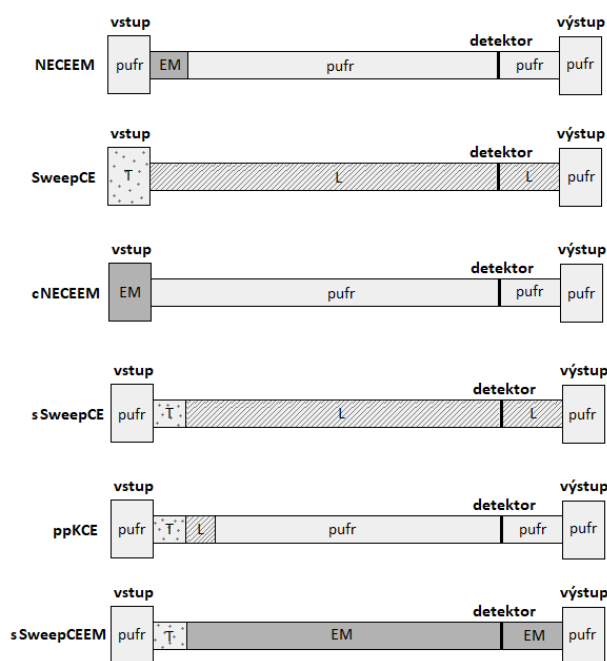
Kinetická kapilární elektroforéza (kinetic capillary electrophoresis – KCE) v homogenním uspořádání zahrnuje dva hlavní procesy – interakci ligandu a cílové molekuly a separaci ligandu, cílové molekuly a jejich komplexu na základě jejich odlišné elektroforetické mobility. Podle použitého způsobu dávkování můžeme rozlišit více typů této metody (viz. Obr. 2).

Mezi nejrozšířenější patří **nerovnovážná kapilární elektroforéza rovnovážných směsí** (nonequilibrium capillary electrophoresis of equilibrium mixtures – NECEEM). Zóna rovnovážné směsi ligandu a cílové molekuly se dávkuje do kapiláry, která je předem naplněna BGE. Ten je i ve vstupní a výstupní vialce. Komplex při elektroforéze postupně disociuje. Pokud je separace dostatečně účinná, může být zanedbána opětovná

asociace ligandu a cílové molekuly. Menší obměnou je pak **kontinuální nerovnovážná kapilární elektroforéza rovnovážných směsí** (cNECEEM), kdy je vstupní vialka naplněna rovnovážnou směsí, zatímco kapilára a výstupní vialka obsahují BGE [6, 7].

V jiném uspořádání nazývaném „**sweep capillary electrophoresis**“ (SweepCE) je naplněna ligandem celá kapilára, vstupní vialka obsahuje cílovou molekulu. Na výstupu je vialka s BGE. V průběhu elektroforézy neustále prochází cílová molekula roztokem s ligandem, takže dochází ke tvorbě komplexu po celou dobu. Variací na SweepCE je uspořádání „**short sweep capillary electrophoresis**“ (sSweepCE), kdy je krátká zóna cílové molekuly dávkována do kapiláry, která je předem naplněna ligandem. Vstupní i výstupní vialka obsahují BGE. Dále pak „**short sweep capillary electrophoresis of equilibrium mixtures**“ (sSweepCEEM), kdy je krátká zóna cílové molekuly dávkována do kapiláry naplněné rovnovážnou směsí [8, 9].

Při použití dávkování označovaného jako „**plug-plug kinetic capillary electrophoresis**“ (ppKCE) jsou zóny cílové molekuly a ligandu dávkovány do kapiláry, která je naplněna BGE. Během elektroforézy se cílová molekula pohybuje přes zónu ligandu a tvoří se tak komplex. Když zóna cílové molekuly projde až za zónu ligandu, začne komplex disociovat [10, 11]. V rámci této práce byla využita technika NEECEEM a dále techniky blížíící se svým uspořádáním sSweepCE a ppKCE.



**Obrázek 2: Typy KCE.** Vysvětlivky: EM z angl. equilibrium mixture značí rovnovážný roztok, T z angl. target znamená cílová molekula a L jako ligand. Převzato z [5] a upraveno.

### 2.1.3.2 Aplikace

Největší využití afinitní kapilární elektroforézy nalezneme v molekulární biologii. Sleduje se zde například posun elektroforetické mobility pro důkaz silných interakcí mezi DNA a jejími vazebnými proteiny [12].

Rovněž nalezneme široké uplatnění ve farmaceutické analýze. Poskytuje základní informaci o vytvoření komplexu ligandu a receptoru. Díky tomu lze charakterizovat proteiny na základě jejich specifické vazby na antigeny. Využití ACE se tedy dá najít i v imunochemických technikách. V enzymologii lze ACE použít ke studiu interakcí mezi enzymy, jejich substráty a inhibitory.

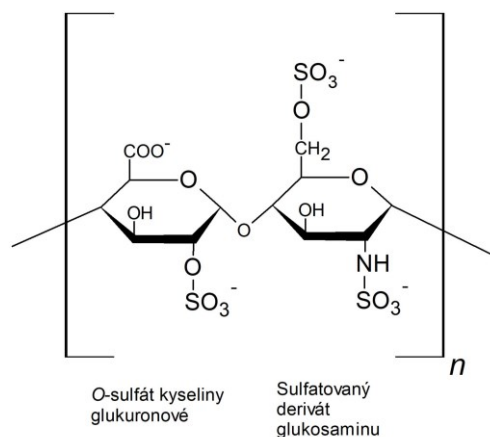
Využití ACE můžeme i pro enantiomerní separace. Přídavkem vhodné chirální molekuly, například cyklodextrinu, můžeme změnit prostředí v kapiláře a dosáhnout toho, že se naváže pouze jeden z enantiomerů, čímž je oddělíme [13].

## 2.2 Heparin

Heparin patří k nejstarším lékům, které jsou stále používány v klinické praxi. Výzkumy této látky se datují v Anglii od začátku 20. století. V roce 1918 se v laboratoři profesora Howella podařilo poprvé izolovat heparin ze psích jater, z čehož je odvozen jeho název (z řec. hepar = játra). Farmaceuticky se ve větším množství vyrábí od roku 1926, ale přesto probíhaly další výzkumy. V roce 1937 byla poprvé použita čistší forma heparinu pro léčbu člověka. Dalším, kdo se zasloužil o rozvoj v oblasti výzkumu heparinu, byl vědec John McLean [14, 15].

Heparin je sloučenina patřící do skupiny mukopolysacharidů, jinak též glykosaminoglykanů. Jsou to lineární heteropolysacharidy, ve kterých se opakuje disacharidová struktura složená z uronových kyselin (nejčastěji glukuronová, galakturonová a iduronová) a hexózy navázané na aminovou skupinu (zejména glukosamin a galaktosamin). V molekule heparinu se jedná o kyselinu D-glukuronovou, která může být nahrazena kyselinou L-iduronovou, a glukosamin. Kromě toho je hydroxylová skupina substituována sulfonovou skupinou, což dává molekule heparinu záporný náboj. Struktura heparinu je naznačena na Obr. 3. Molární hmotnost může dosahovat od 2 500 do 25 000 g·mol<sup>-1</sup>. Této molekule se říká nefrakcionovaný heparin. Jako frakcionovaný, nízkomolekulární heparin se pak označují úseky, dlouhé několik

monosacharidových jednotek, které se využívají jako antikoagulační léčiva. Konkrétní struktura závisí na zdroji použitého heparinu. Glykosidická vazba, která spojuje jednotlivé sacharidové jednotky, má omezenou možnost rotace, takže heparin nemůže tvořit terciární strukturu, kterou známe z proteinů [16].



*Obrázek 3: Struktura heparinu - disacharidová stavební jednotka. Místo kyseliny D-glukuronové může obsahovat kyselinu L-iduronovou. Některé zbytky glukosaminu místo sulfamidové vazby obsahují N-acetyl.*

### 2.2.1 Heparin v lidském organismu

V těle se heparin vyskytuje zejména v játrech, plicích a ve střevě. Je obsažen v granulech bazofilních neutrofilů a žírných buňkách, které ho produkují. Působí jako antikoagulant, buď v rámci endogenní produkce, nebo dodáváním exogenního heparinu do organismu. Ten se získává ze zvířecích mukózních tkání, jako jsou prasečí střeva nebo kravské plíce [17].

Heparin zasahuje do koagulační kaskády. To je proces, který vede ke srážení krve. Aby však byla zachována stálost vnitřního prostředí, probíhají současně i antikoagulační reakce. Hlavní roli zde hrají inhibitory serinových proteas, zejména  $\alpha_1$ -antitrypsin,  $\alpha_2$ -makroglobulin a antitrombin III. Antitrombin III je považován za hlavní fyziologický inhibitor trombinu. Působí také proti faktoru Va, VIIa, Xa a XIa. Dále heparin působí jako kofaktor antitrombinu III. Rovněž se váže na pozitivně nabitý antitrombin III a až tisíckrát zvyšuje jeho inhibiční efekt [18, 19].

Heparin se používá především u akutních stavů, kde je nutný rychlý a krátkodobý účinek. Čas nutný k metabolizování heparinu se v lidském organismu odvíjí od dávky a způsobu podání. Do těla se může podávat intravenózně nebo subkutánně. Využívá se zejména při stavech, jako jsou infarkt myokardu, akutní žilní trombóza nebo plicní embolie. Biologický poločas nefrakcionovaného heparinu je 1 až 2 hodiny, což je mnohem

kratší doba než nízkomolekulárních heparinů, kdy je biologický poločas až 6 hodin.

Antikoagulačních léčiva, obsahující nízkomolekulární heparin, se vyrábí chemickou nebo enzymovou úpravou nefrakcionovaného heparinu. V závislosti na výrobci se proto jejich molární hmotnost pohybuje od 4 000 do 6 000 g·mol<sup>-1</sup>. Obvykle v molekule nízkomolekulárního frakcionovaného heparinu chybí několik sacharidových podjednotek, a to v místě vazby antitrombinu III. Z toho důvodu takto upravený heparin reaguje především s koagulačním faktorem Xa a vazba na ostatní koagulační faktory není tak silná.

## 2.2.2 Stanovení heparinu v klinické praxi

V praxi se provádí odběr krve do zkumavek s antikoagulačními činidly, pro stanovení heparinu jsou to kyselina ethylendiamintetraoctová (ethylenediaminetetraacetic acid – EDTA) nebo citrát sodný. Po centrifugaci plné krve dále pokračuje pouze stanovení v plasmě. Měří se čas potřebný ke srážení, poté je provedena spektrofotometrická detekce.

### 2.2.2.1 Aktivovaný parciální tromboplastinový test

Pomocí aktivovaného parciálního tromboplastinového testu lze sledovat účinnost vnitřního koagulačního systému. Je to nejrozšířenější metoda pro stanovení heparinu v krvi, zároveň tento test ukazuje na těžké funkční defekty faktoru II, V, X nebo fibrinogenu. Tento test je založený na principu aktivace vnitřní koagulace. Ke vzorku je přidáván kaolin-kefalinový komplex a přebytek vápenatých iontů, který zahajuje společnou cestu srážení. Kaolin slouží jako záporně nabitý povrch, aby aktivoval vnitřní koagulační cestu a kefalin aktivuje faktor X. Porovnává se funkčnost tvorby komplexů oproti kontrolní plasmě [20].

### 2.2.2.2 Aktivovaný koagulační test

Aktivovaný koagulační test se využívá v případech, kdy jsou v krvi předpokládány vysoké koncentrace heparinu. Je to zejména u pacientů podstupujících kardiochirurgické operace, kdy mohou být dočasně napojeni na mimotělní oběh, dále u pacientů na jednotkách intenzivní péče nebo u pacientů po koronárních angioplastikách a při dialýze. Tento test probíhá přímo s plnou krví a měří se čas vzniku sraženiny od aktivace koagulace v porovnání se standardními roztoky [21].

#### 2.2.2.3 Quickův test

Quickův test, jinak nazývaný jako protrombinový nebo tromboplastinový čas, ukazuje rychlost, s jakou se přeměňuje protrombin na trombin. Test probíhá tak, že se do dekalifikované plasmy přidá tkáňový tromboplastin a přebytek vápenatých iontů, tím se aktivuje společná, vnější cesta koagulace a měří se čas do vzniku sraženiny [22].

#### 2.2.2.4 Trombinový čas

Trombinový čas je měřením rychlosti přeměny fibrinogenu na fibrin. Provádí se tak, že je do dekalifikované plasmy přidán trombin spolu s nadbytkem vápenatých iontů. Měří se čas do vzniku fibrinové sraženiny [23].

#### 2.2.2.5 Anti-Xa test

Test Anti-Xa se používá zejména pro frakcionovaný heparin, ale lze jej využít i pro sledování nefrakcionovaného heparinu. Využívá se v případě, že má pacient sníženou citlivost na heparin. Měření probíhá tak, že se k plasmě přidá známé množství heparinu a poté faktor Xa, vzniká tak komplex antitrombin III-faktor Xa. Spektrofotometricky lze sledovat inhibiční účinek komplexu na faktor Xa, protože ke kalibračním roztokům je přidáván chromogenní substrát [24].

#### 2.2.2.6 Imunochemická detekce

Další metodou je imunochemické stanovení (enzyme-linked immuno sorbent assay - ELISA), které je v laboratořích velmi rozšířené, avšak ne pro stanovení heparinu. Důvodem je zejména časová a finanční náročnost. Komerčně jsou dodávány sady, kdy je specifický antigen pro heparin ukotven v jamkách. Na tento antigen se váže heparin ze vzorků a do jamek je poté přidán konjugát protilátky heparinu s křenovou peroxidázou. Po dalších reakcích a promývání se deteguje žluté zbarvení, vytvořené reakcí s tetramethylbenzidinem při 450 nm.

### 2.3 Protamin

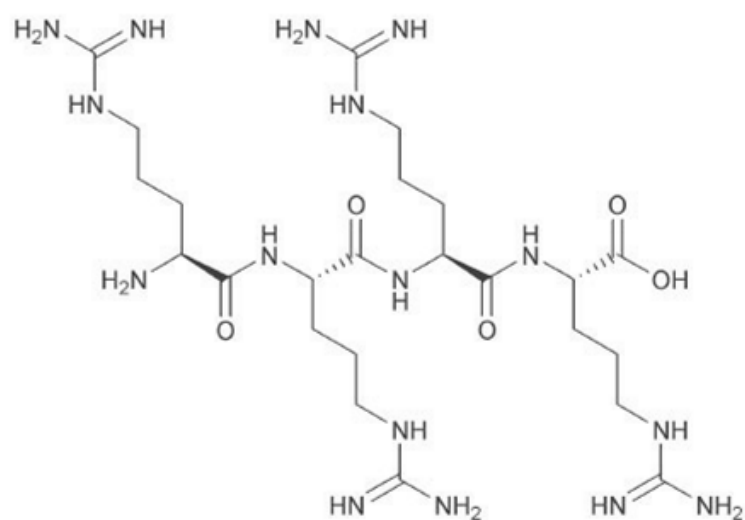
Protamin se skládá z argininu, alaninu, isoleucinu, prolinu, serinu, valinu a glycinu. Jeho složení není zcela přesně definováno, ale z 60 – 80 % obsahuje arginin. Protamin byl poprvé izolován ze spermatu lososa, ale nyní se vyrábí uměle rekombinantní biotechnologií. Nejprve byl protamin používán v inzulínových přípravcích



k prodloužení hypoglykemického účinku inzulínu. Na počátku 20. století byly objeveny jeho hemostatické účinky [25]. Komplex protamin-heparin je tvořen vazbou mezi sulfátovými a karboxylovými skupinami heparinu a guanidinovými skupinami argininu. Vzhledem ke svému vysokému kladnému elektrickému náboji v širokém rozmezí pH se protamin používá k neutralizaci účinku heparinu na ředění krve.

### 2.3.1 Tetraarginin

Jako antidotum se pro heparin používá molekula protaminu. Protamin obsahuje z větší části aminokyselinu arginin, proto je tetraarginin používán při experimentech jako modelová molekula, u které jsou zachovány některé vlastnosti protaminu a zároveň má jednoznačně definovanou, jednodušší strukturu. Tetraarginin se skládá ze čtyř molekul argininu, jak je patrné z Obr. 4. Tato aminokyselina nese kladný náboj a váže se tak na záporně nabitý heparin.



Obrázek 4: Struktura tetraargininu.

### 3 Experimentální část

Praktická část práce byla měřena na přístroji Agilent Technologies CE 1600 (Waldbronn, Německo), pro separaci byla použita křemenná kapilára od firmy Polymicro Technologies (Phoenix, USA) o vnitřním průměru 50  $\mu\text{m}$  a celkové délce 50,0 cm. Délka k detektoru činila 41,5 cm. Detekce probíhala spektrofotometricky při vlnové délce 200 nm, kapilára byla termostatována na teplotu 25  $^{\circ}\text{C}$ . Velikost vkládaného napětí byla 30 kV.

Příprava kapiláry pro experiment probíhala tak, že na začátku každého dne, kdy probíhalo měření, byla promyta roztokem hydroxidu sodného o koncentraci 1  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  po dobu 10 minut, následně byla po stejně dlouhou dobu promývána vodou. Před každým měřením pak byla ještě navíc promyta 2 minuty základním elektrolytem. Jako základní elektrolyt byla s výjimkou jednoho experimentu, použita kyselina fosforečná o koncentraci 10  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Byla prováděna měření při různých koncentracích interagujících látek, tj. heparinu a tetraargininu a dále při různě dlouhých dobách dávkování heparinu. Zásobní roztoky obou látek byly vodné a jejich koncentrace činila 10  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Pro stanovení elektroforetických mobilit tetraargininu, heparinu a jejich komplexu byla jako marker EOF použita thiomocovina připravena desetinásobným zředěním vodného zásobního roztoku o koncentraci 1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Hlavní část práce tvoří experimenty, kdy byl vzorek zasunut do kapiláry tlakem 5 kPa po dobu 210 s a napětí 30 kV bylo vkládáno pouze na krátký časový interval. Výpočet elektroforetické mobility látek tak neodpovídá rovnici 1, jako v případě klasického uspořádání. Byla proto nejprve spočítána lineární rychlost toku kapaliny v kapiláře při mobilizaci tlakem. Tato rychlost pak byla vynásobena rozdílem migračního času látky a thiomocoviny. Tím byla zjištěna vzdálenost  $\Delta l$  [m], do které látka domigruje. Výsledná mobilita látky  $\mu_i$  pak byla vypočítána dle rovnice 5, kde  $l_c$  [m] je celková délka kapiláry,  $t$  [s] je doba, po kterou vkládáme napětí a  $U$  [V] je vložené napětí.

$$\mu_i = \frac{\Delta l \cdot l_c}{U \cdot t} \quad (5)$$

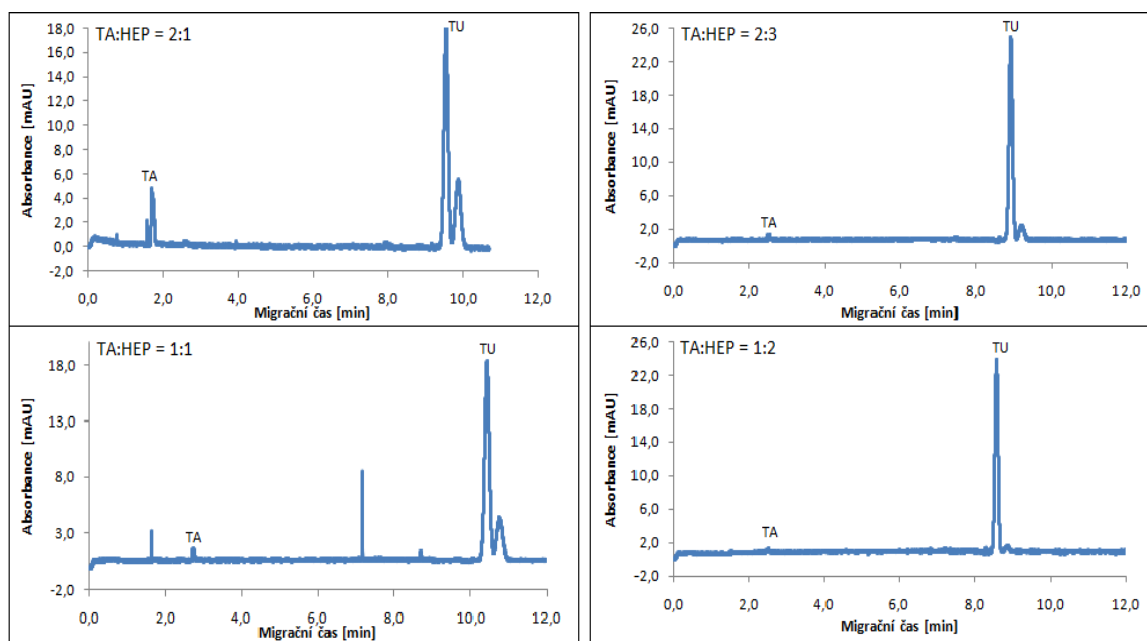
### 3.1 Použité chemikálie

- kyselina ortofosforečná 85 % w/w, p. a. (Lach-Ner, Česká republika)
- sodná sůl heparinu z vepřové střešní sliznice, třída I-A,  $\geq 180$  USP/mg (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)
- tetraarginintrifluoroacetát (Bachem AG, Bubendorf, Švýcarsko)
- thiomčovina 99 % (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)
- hydroxid sodný  $c=1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo)

## 4 Výsledky a diskuze

### 4.1 Klasické uspořádání

Nejprve bylo provedeno měření technikou NECEEM, při kterém bylo napětí vkládáno na celou dobu experimentu. Jeho cílem bylo zjistit, jak se látky chovají, pokud jsou nadávkovány společně. Byly připraveny směsné vzorky s hmotnostními poměry tetraarginin:heparin 2:1, 1:1, 2:3 a 1:2. Ve vzorku byla též thiomocovina o koncentraci  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .



**Obrázek 5: Elektroferogramy při tradičním uspořádání.** Tetraarginin (TA) a heparin (HEP) jsou ve směsném vzorku smíchány v různých poměrech. Měření bylo provedeno s 10 mM kyselinou fosforečnou jako BGE, vkládáno bylo napětí 30 kV. Při experimentu byla použita kapilára o průměru  $50 \mu\text{m}$  a celkové délce 50,0 cm. Délka kapiláry k detektoru činila 41,5 cm. Detekce byla provedena pomocí UV absorpce při vlnové délce 200 nm. Na elektroferogramech vidíme pik tetraargininu a pik thiomocoviny (TU), který se z neznámých příčin rozštěpil.

Z výsledných elektroferogramů (viz. Obr. 5) je patrné, že se vzrůstající koncentrací heparinu se pik tetraargininu snižuje. Znamená to tedy, že látky spolu interagují za vzniku pevného komplexu, který se nerozpadá okamžitě po vložení elektrického pole. Při běžném uspořádání v kapilární elektroforéze se napětí vkládá po celou dobu experimentu. V některých případech ale nemusí být z výsledku měření jasné, k jakým dějům během procesu dochází. Pro lepší porozumění těmto dějům může být výhodné zasunout nadávkový vzorek do kapiláry tlakem, vložit napětí pouze na krátký časový úsek a poté mobilizovat vzniklé zóny tlakem skrz detektor. Aby bylo možné zjistit, co

se v kapiláře v průběhu experimentu děje, použijeme toto nestandardní uspořádání. Pro naplánování takového experimentu je třeba nejprve zjistit rychlost pohybu roztoku v kapiláře při jeho mobilizaci tlakem.

## 4.2 Mobilizace tlakem

Třikrát bylo provedeno měření za těchto podmínek. Vzorek obsahoval tetraarginin o koncentraci  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  a heparin o koncentraci  $0,25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Byl zasunut do kapiláry působením tlaku 5 kPa. Výsledný pík se objevil v čase  $(7,82 \pm 0,22)$  minuty ( $s_r = 1,3 \%$ ) a lineární rychlost průtoku roztoku v kapiláře při mobilizaci tlakem byla spočítána  $(8,85 \pm 0,25) \cdot 10^{-2} \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$  ( $s_r = 1,3 \%$ ).

*Tabulka 1: Čas detekce píku smíšeného vzorku. V pravém sloupci uvedena vypočítaná lineární průtoková rychlost roztoku v kapiláře.*

Měření č.	Čas detekce s	Lineární rychlost toku $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$
1	465	0,0893
2	469	0,0885
3	475	0,0874
medián	469	0,0885
$s_r$	1,29	1,29

Znamená to tedy, že od začátku kapiláry k detektoru projde vzorek za 7,82 minuty. Pokud necháme působit tlak 5 kPa po dobu 210 sekund (tj. 3,5 minuty), dosáhneme toho, že vzorek doputuje do vzdálenosti 18,6 cm, což je přibližně polovina vzdálenosti od začátku kapiláry k detektoru. To poskytuje dostatek prostoru pro složky vzorku, které mohou migrovat oběma směry, aniž by vystoupily z kapiláry nebo předčasně prošly detektorem. Rovněž se tak vzorek dostává do termostatované části kapiláry. V experimentech, při kterých byla zóna vzorku zasouvána do kapiláry, byl proto použit tlak 5 kPa po dobu 210 sekund.

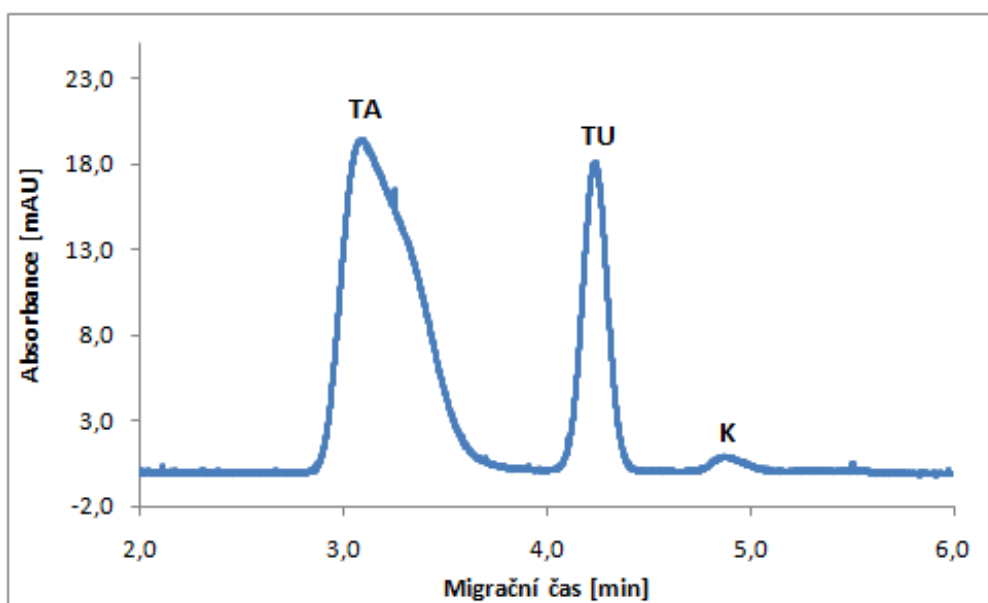
## 4.3 Stanovení elektroforetických mobilit

Pro úvahy o chování látek v kapiláře při aplikaci napětí je výhodné znát jejich elektroforetické mobility za daných podmínek.

### 4.3.1 Stanovení mobility tetraargininu a komplexu

Vzorek pro stanovení obsahoval tetraarginin o koncentraci  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , heparin o koncentraci  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  a thiomocovinu o koncentraci  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Na elektroferogramu (viz. Obr. 6) jsou vidět tři píky. Jako první prochází detektorem volný tetraarginin, který má kladný náboj, uprostřed je neutrální thiomocovina a za ní prochází komplex tetraargininu a heparinu. Proto lze konstatovat, že celkový náboj komplexu je záporný. Výsledná mobilita tetraargininu byla  $(6,8 \pm 1,3) \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  ( $s_r = 8,5 \%$ ) a výsledná mobilita komplexu byla  $(-3,8 \pm 1,5) \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  ( $s_r = 13,6 \%$ ) Naměřené hodnoty jsou uvedeny v Tab. 2 a 3.



**Obrázek 6:** Elektroferogram - stanovení elektroforetických mobilit tetraargininu (TA - 1.pík) a jeho komplexu (K - 3.pík) s heparinem pomocí thiomocoviny (TU - 2.pík) jako markeru EOF. Měření bylo provedeno se vzorkem, který obsahoval tetraarginin o koncentraci  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , heparin o koncentraci  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  a thiomocovinu o koncentraci  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Jako BGE byla použita kyselina fosforečná o koncentraci  $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Vzorek byl zasouván do kapiláry tlakem  $5 \text{ kPa}$  na dobu  $210 \text{ s}$ , poté bylo vkládáno napětí  $30 \text{ kV}$  na dobu  $15 \text{ s}$ .

**Tabulka 2:** Migrační časy tetraargininu a thiomocoviny. V posledním sloupci je vypočítána elektroforetická mobilita tetraargininu.

Měření č.	Migrační čas $t$ s		Rozdíl migračních časů $\Delta t$ s	Elektroforetická mobilita $\mu \cdot 10^{-8}$ $\text{m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
	tetraarginin	thiomocovina		
1	186	254	68	6,8
2	180	256	76	7,5
3	191	257	66	6,5
medián	186	256	68	6,8
$s_r$ [%]	3,60	0,62	8,52	8,57

*Tabulka 3: Migrační časy komplexu a thiomochoviny. V posledním sloupci je spočítaná elektroforetická mobilita komplexu.*

Měření č.	Migrační čas $t$ s		Rozdíl migračních časů $\Delta t$ s	Elektroforetická mobilita $\mu \cdot 10^{-8}$ $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$
	komplex	thiomochovina		
1	293	254	39	-3,8
2	303	256	47	-4,6
3	295	257	38	-3,2
medián	295	256	39	-3,8
$s_r$ [%]	1,84	0,624	13,6	13,6

#### 4.3.2 Stanovení mobility heparinu

Elektroforetická mobilita heparinu byla stanovena ze vzorku, který obsahoval heparin o koncentraci  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  a thiomochovinu o koncentraci  $0,1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Měření bylo provedeno třikrát a hodnoty migračních časů obou látek jsou uvedeny v Tab. 4. Výsledná elektroforetická mobilita heparinu byla  $(-4,5 \pm 0,3) \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  ( $s_r = 3,0 \%$ )

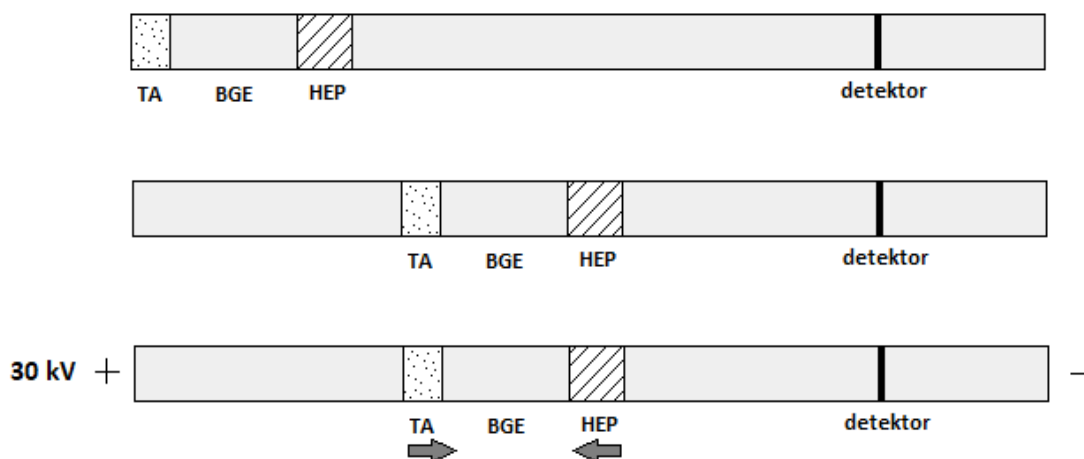
*Tabulka 4: Migrační časy heparinu a thiomochoviny. V posledním sloupci je spočítaná elektroforetická mobilita heparinu.*

Měření č.	Migrační čas $t$ s		Rozdíl migračních časů $\Delta t$ s	Elektroforetická mobilita $\mu \cdot 10^{-8}$ $m^2 \cdot V^{-1} \cdot s^{-1}$
	heparin	thiomochovina		
1	408	364	44	-4,4
2	415	368	47	-4,6
3	414	368	46	-4,5
medián	414	368	46	-4,5
$s_r$ [%]	0,914	0,659	2,99	3,00

#### 4.4 Interakce v průběhu migrace

V prvotních experimentech bylo zkoumáno, jak spolu tetraarginin a heparin interagují, pokud je před nástřikem do kapiláry připraven směsný vzorek. Jak tomu bude, pokud budou dávkovány odděleně, zjišťujeme v následujících experimentech. Při uspořádání, kdy napětí nevkládáme na celou dobu experimentu a zóny látek jsou od sebe odděleny zónou BGE, dochází k migraci látek proti sobě, pokud nadávkujeme nejprve heparin. Protože ten jako molekula se záporným nábojem migruje ke kladně nabitě elektrodě a kladně nabitý tetraarginin se pohybuje k záporně nabitě elektrodě.

Základní schéma dávkování je uvedeno na Obr. 7.



*Obrázek 7: Základní uspořádání experimentů. Heparin (HEP) je dávkován jako první, následuje zóna základního elektrolytu (BGE) a poté zóna tetraargininu (TA). Při vložení napětí dochází k migraci látek k elektrodám. Jdou směrem proti sobě.*

Vzdálenost mezi zónami heparinu a tetraargininu na počátku před vložení napětí lze spočítat jako dobu dávkování BGE mezi zónami vynásobenou lineární průtokovou rychlostí při mobilizaci tlakem (spočítaná v oddílu 4.2). vzdálenost při postupně se zvyšující době působení napětí vychází z rovnice 1, kdy elektroforetickou mobilitu látky vynásobíme velikostí vloženého napětí, dobou jeho působení a vydělíme celkovou délkou kapiláry. Dostaneme tak vzdálenost, do které daná látka domigruje. Vypočítané hodnoty pro obě látky odečteme od celkové vzdálenosti na počátku.

Při vložení napětí po dobu 20 a 30 s je vypočítaná vzdálenost záporná, což znamená, že zóny se začínají překrývat nebo dokonce už prošly skrz sebe. Skutečnou vzdálenost látek v kapiláře lze zjistit z rozdílu migračních časů obou látek odečtených na elektroferogramech vynásobených lineární průtokovou rychlostí při mobilizaci. Hodnoty jsou uvedeny v Tab. 5.

Při porovnání vypočítané a skutečné vzdálenosti lze vidět, že hodnoty jsou v relativně dobré shodě. Takový rozdíl může být způsoben tím, že lineární průtoková rychlost byla stanovena při použití směsného vzorku oproti současné situaci, kdy byly dávkovány zóny tetraargininu a heparinu odděleně. V průběhu migrace dochází také k jistému rozmytí zón látek, které není do výpočtu zahrnuto.

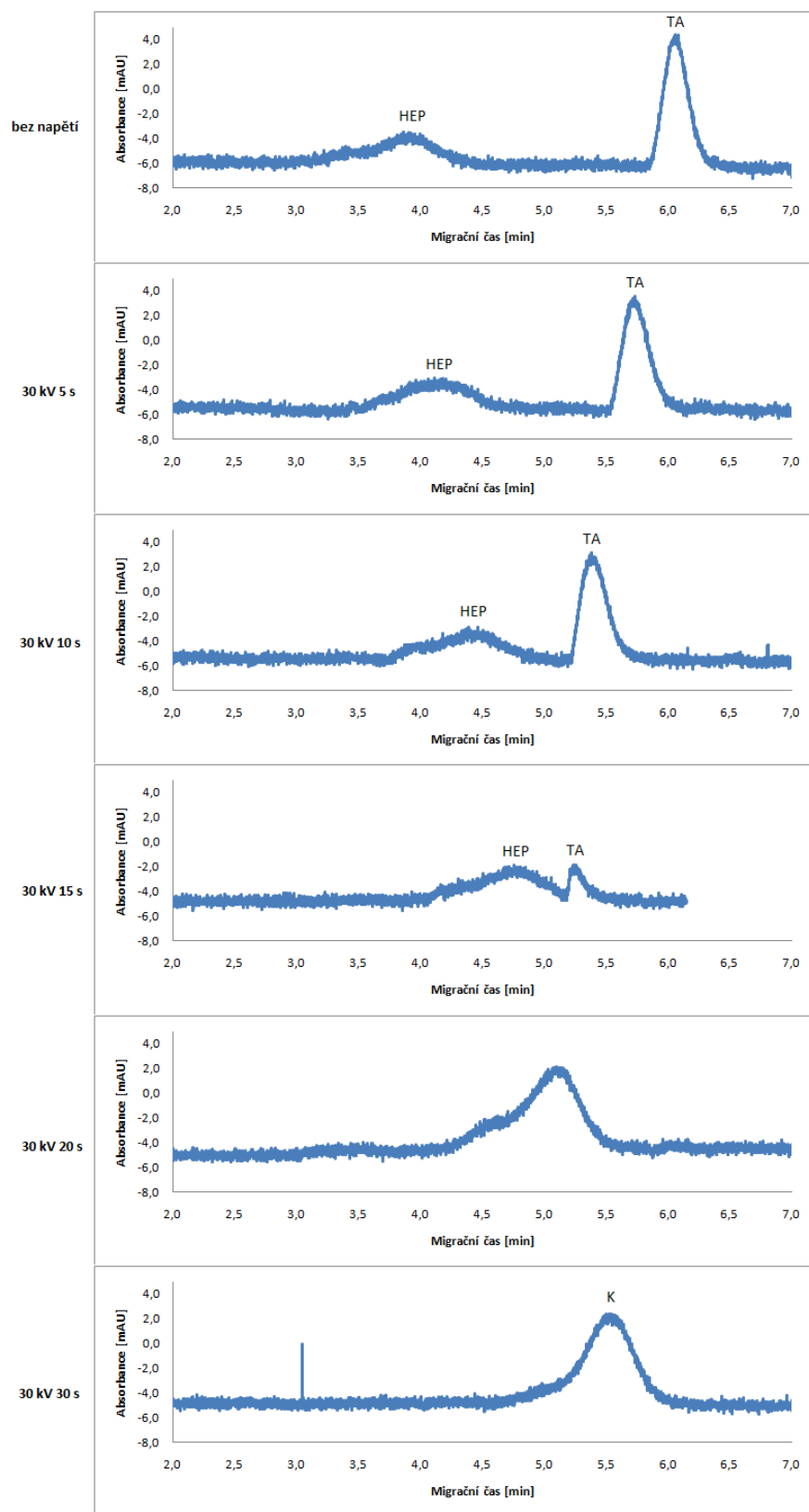


*Tabulka 5: Vzdálenost mezi zónami. Experiment probíhal při dávkování: 3 s heparin - 120 s BGE - 3 s tetraarginin.*

Doba působení napětí	Vzdálenost mezi zónami	
	vypočítaná	skutečná
s	cm	cm
0	10,6	11,4
5	7,3	8,6
10	3,9	4,9
15	0,5	2,7
20	-2,9	-
30	-9,6	-

Výpočty potvrzuje i Obr. 8, na kterém lze vidět postupné přibližování zón látek a vytvoření komplexu. V momentě, kdy se látky potkají, vytvoří komplex, který má jinou elektroforetickou mobilitu než jeho samotné složky.

V souladu s výpočtem při časech napětí 0, 5 a 10 s obě zóny migrují nezávisle směrem k sobě a jejich tvar se příliš nemění. V čase 15 s se již dostávají do těsné blízkosti a je vidět, že dochází k jisté interakci. V čase 30 s je patrné, že zóny migrovaly skrz sebe a vznikl komplex, jehož výsledná migrace je směrem k anodě, což odpovídá jeho změřené mobilitě.



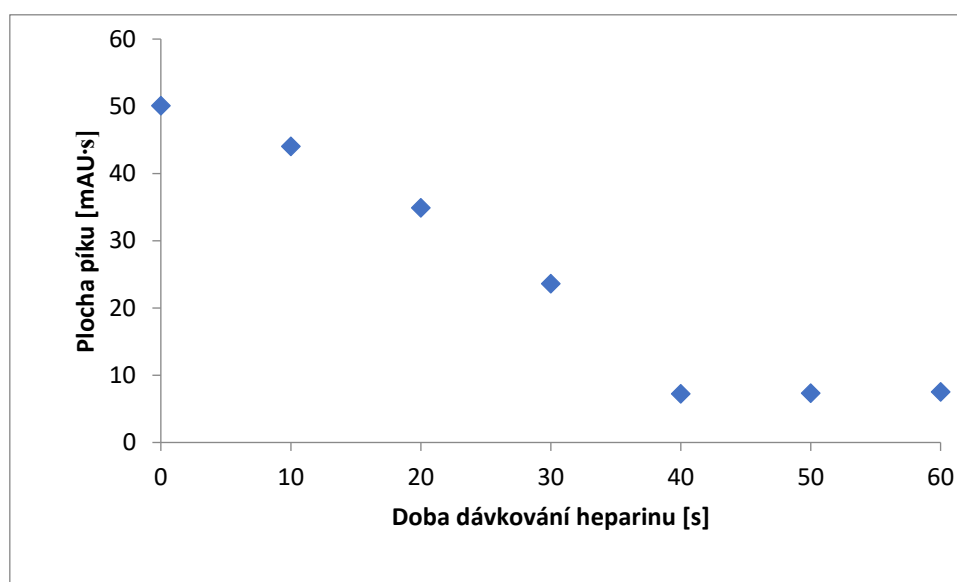
*Obrázek 8: Přibližování zón heparinu (HEP) a tetraargininu (TA). Zóny se k sobě přibližují díky různě dlouhé době působení napětí – postupně 0, 5, 10, 15, 20 a 30 s. Pro měření byl použit heparin o koncentraci  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  a tetraarginin o koncentraci  $0,25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Na posledním elektroferogramu lze vidět, že vytvořený komplex (K) má zápornou elektroforetickou mobilitu.*

## 4.5 Změny experimentálních podmínek

Aby bylo možné prozkoumat chování obou látek a jejich komplexu za různých podmínek, bylo proměřeno několik uspořádání experimentu, kdy se mění koncentrace látek, doba jejich dávkování nebo čas působení vloženého napětí.

### 4.5.1 Vliv doby dávkování heparinu při konstantních koncentracích heparinu a tetraargininu

Pro tento experiment bylo použito následující uspořádání. Nejprve byl dávkován heparin o koncentraci  $0,01 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , za ním zóna BGE po dobu 60 s a nakonec tetraarginin o koncentraci  $0,25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  po dobu 3 s. Napětí bylo vkládáno 20 s. Délka doby dávkování heparinu byla od 0 do 60 s.



Obrázek 9: Závislost plochy píku tetraargininu na délce doby dávkování heparinu. Doba dávkování zóny heparinu byla od 0 do 60 s.

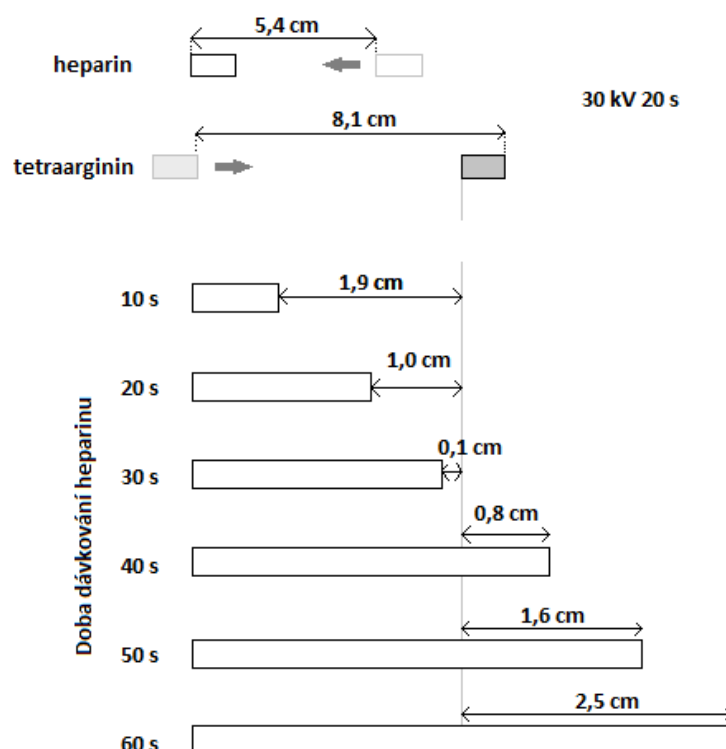
Ze závislosti na Obr. 9 je vidět, že při prodlužování doby dávkování heparinu dochází nejprve k téměř lineárnímu poklesu plochy píku, který odpovídá zbývajícimu nezreagovanému tetraargininu. Pokud však překročíme hranici doby dávkování 30 s, lze konstatovat, že další prodlužování zón nemá na úbytek plochy žádný vliv. Je to způsobeno tím, že maximální vzdálenost, do které může tetraarginin na základě své elektroforetické mobility dojít při vloženém napětí o velikosti 30 kV na dobu 20 s je 8,1 cm. Heparin při stejných podmínkách urazí vzdálenost 5,4 cm, ale délka jeho zóny se prodlužuje, takže tetraarginin nestihne promigrovat celou jeho zónu. Tato skutečnost

je doložena Tab. 6 a schématem na Obr. 10.

*Tabulka 6: Vzdálenost mezi zónami tetraargininu a heparinu před a po působení napětí 30 kV po dobu 20 s. Vysvětlivky: TA - tetraarginin*

Doba dávkování heparinu s	Vzdálenost mezi TA a koncem zóny heparinu		
	před vložení napětí s	po vložení napětí cm	
		cm	cm
10	70	6,2	1,9
20	80	7,1	1,0
30	90	8,0	0,1
40	100	8,9	-0,8
50	110	9,7	-1,6
60	120	10,6	-2,5

Z Tab. 6 lze vidět, že pokud bude dávkování delší než 40 s, je hodnota vzdálenosti zóny tetraargininu od konce zóny heparinu po ukončení působení napětí záporná, což je důkazem toho, že tetraarginin nestihne projít skrz celou zónu heparinu.

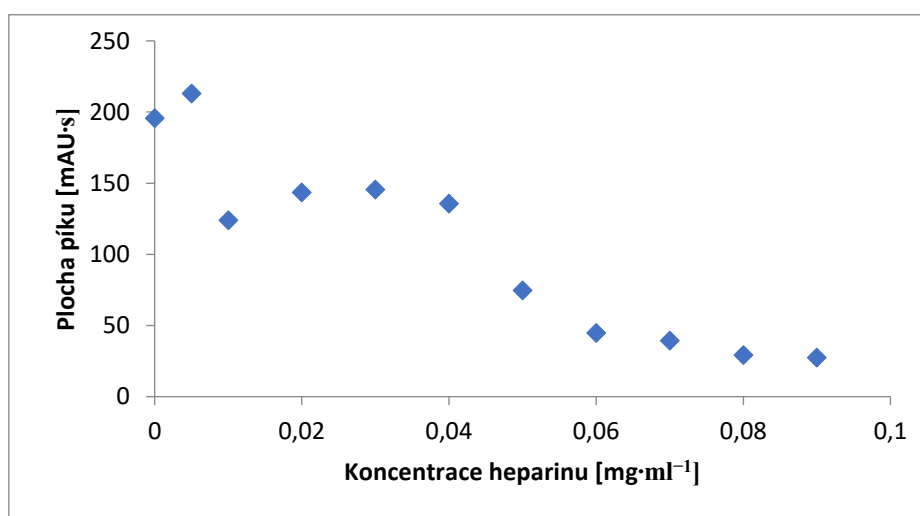


*Obrázek 10: Schéma pohybu zón heparinu a tetraargininu při působení napětí 30 kV po dobu 20 s. Obrázek*

znázorňuje prodlužující se dobu dávkování heparinu spolu se současným zobrazením toho, do jaké vzdálenosti uvnitř zóny heparinu projde tetraarginin.

#### 4.5.2 Vliv koncentrace heparinu při konstantní koncentraci tetraargininu

Dalším parametrem, který byl zkoumán a který má velký význam pro analytické využití interakce zkoumaných látek, byla změna koncentrace heparinu, při konstantní koncentraci tetraargininu a době dávkování. Dávkování bylo následující heparin po dobu 30 s, BGE po dobu 60 s a tetraarginin o koncentraci  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  po dobu 3 s. Doba působení napětí byla zvolena na 20 s, kdy by podle výpočtů mobilit měly zóny obou látek promigrovat zcela skrz sebe. Byla proměřena sada roztoků heparinu s koncentrací od 0 do  $0,09 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ .



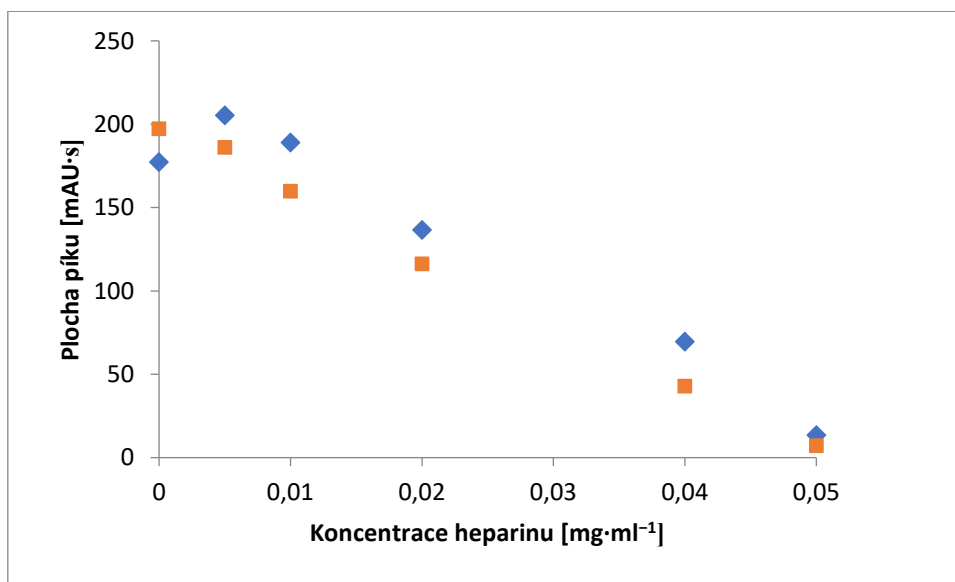
**Obrázek 11:** Závislost plochy píku na koncentraci heparinu. Měření bylo provedeno při následujícím dávkování: heparin po dobu 30 s, BGE po dobu 60 s a tetraarginin o koncentraci  $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  po dobu 3 s. Napětí 30 kV bylo vkládáno na dobu 20 s.

Na Obr. 11 lze vidět, že se zvyšující se koncentrací heparinu plocha píku ubývá. Závislost však nemá pravidelný charakter, proto nelze předvídat, jak by se systém choval při opakovaném měření a zda by byl vhodný pro stanovení heparinu v klinické praxi.

#### 4.5.3 Vliv změny základního elektrolytu

Ke zjištění toho, jak se bude systém chovat, pokud dojde ke změně BGE, bylo provedeno měření v 20 mM kyselině fosforečné. Dosud byly všechny experimenty prováděny s 10 mM kyselinou fosforečnou jako základním elektrolytem. Vyšší koncentrace kyseliny fosforečné byla testována, protože výsledný roztok má nižší pH a vyšší iontovou sílu. To vede k potlačení interakcí tetraargininu se stěnou kapiláry

a ke zlepšení tvaru jeho píku. Na druhé straně má 20 mM kyselina fosforečná vyšší vodivost, což vede k vyššímu proudu a tím i většímu riziku přehřívání roztoku. Porovnání je uvedeno na Obr. 12. Uspořádání experimentu bylo následující: Nejprve byl po dobu 60 s dávkován heparin o koncentraci  $0,01 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , ihned za ním po dobu 3 s tetraarginin, to znamená bez BGE mezi zónami. Napětí bylo vkládáno na dobu 30 s.



*Obrázek 12: Závislost plochy píku tetraargininu na koncentraci heparinu. Porovnání dvou různých koncentrací základního elektrolytu – kosočtverce značí 10 mM a čtverce 20 mM kyseliny fosforečné.*

Z porovnání obou koncentrací BGE lze vidět, že mezi nimi je pouze nepatrný rozdíl. Tudiž je možné konstatovat, že zvýšení koncentrace BGE stanovení příliš neovlivní.

Z porovnání Obr. 11 a 12 je však patrné, že vynechání zóny BGE mezi zónou heparinu a tetraargininu přineslo plynulejší pokles plochy píku tetraargininu s rostoucí koncentrací heparinu.

## 5 Závěr

V rámci této práce byla zmapována vzájemná interakce heparinu a tetraargininu pomocí metody afinitní kapilární elektroforézy. Potvrdilo se, že tetraarginin a heparin mezi sebou interagují za vzniku pevného komplexu, který se v elektrickém poli pohybuje směrem ke kladně nabitě elektrodě, tudíž je jeho celkový náboj záporný.

Nejprve bylo prováděno měření v klasickém uspořádání, kdy bylo vkládáno napětí na celou dobu experimentu a dávkována byla směs tetraargininu a heparinu. Tím se potvrdila interakce látek a vznik komplexu. Aby bylo možné interakci více prozkoumat, bylo přistoupeno k úpravě uspořádání. Vzorek byl pomocí tlaku 5 kPa zasunut do kapiláry, na krátký čas bylo vloženo napětí 30 kV a poté byl vzorek mobilizován tlakem k detektoru.

Díky použití netradičního uspořádání bylo možné pozorovat postupné přibližování zón tetraargininu a heparinu k sobě až do vzniku komplexu. Na základě elektroforetických mobilit obou látek byla spočítána jejich vzájemná vzdálenost. Ta poté byla porovnána s reálnou vzdáleností v kapiláře. Navzdory jistému rozdílu mezi spočítanými a změřenými hodnotami bylo pozorované chování v dobré shodě s předpovědí na základě výpočtu.

Dále bylo proměřeno několik uspořádání experimentu, kdy se měnila koncentrace heparinu a doba jeho dávkování. Bylo zjištěno, že plocha píku volného tetraargininu ubývá přibližně lineárně se zvyšující se koncentrací heparinu, což je jev, kterého lze využít pro stanovení heparinu v nízkých koncentracích, které nelze UV detektorem detegovat. Jestliže se prodlužovala doba dávkování, docházelo u plochy píku tetraargininu také k poklesu, který se při době dávkování 40 s a vyšší zastavil. Zóna tetraargininu zde nestihla promigrovat příliš dlouhou zónou heparinu, což bylo potvrzeno i výpočty na základě elektroforetických mobilit. Také byla testována změna koncentrace základního elektrolytu. Pro tento experiment byla použita kyselina fosforečná o koncentraci  $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , v předchozích experimentech byla použita stejná kyselina o koncentraci  $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Bylo zjištěno, že tato změna nemá téměř žádný vliv na plochu píku.

## 6 Použitá literatura

- [1] V. Kašička, „Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod“, *Chem. Listy*, č. 91, s. 320–327, 1997.
- [2] S. F. Y. Li, *Capillary electrophoresis: principles, practice and applications*, roč. 52. Elsevier Science Publishers B.V., 1992.
- [3] V. A. Galievsky, A. S. Stasheuski, S. N. Krylov, „Capillary Electrophoresis for Quantitative Studies of Biomolecular Interactions“, *Anal. Chem.*, roč. 87, č. 1, s. 157–171, led. 2015.
- [4] V. Pacáková a T. Vařilová, „Afinní kapilární elektroforéza“. [Online]. Prezentace dostupná z <https://docplayer.cz/36492747-Afinitni-kapilarni-elektroforeza.html> [Citováno: 29-čvc-2019]
- [5] A. Petrov, V. Okhonin, M. Berezovski, S. N. Krylov, „Kinetic Capillary Electrophoresis (KCE): A Conceptual Platform for Kinetic Homogeneous Affinity Methods“, *J. AM. CHEM. SOC.*, roč. 2005, č. 127, s. 17104–17110, zář. 2005.
- [6] M. Kanoatov, V. A. Galievsky, S. M. Krylov, L. T. Cherney, H. K. Jankowski, S. N. Krylov, „Using Nonequilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures (NECEEM) for Simultaneous Determination of Concentration and Equilibrium Constant“, *Anal. Chem.*, roč. 87, č. 5, s. 3099–3106, bře. 2015.
- [7] M. Kanoatov, S. Mehrabanfar, S. N. Krylov, „Systematic Approach to Optimization of Experimental Conditions in Nonequilibrium Capillary Electrophoresis of Equilibrium Mixtures“, *Anal. Chem.*, roč. 88, č. 18, s. 9300–9308, zář. 2016.
- [8] J. P. Quirino, J.-B. Kim, S. Terabe, „Sweeping: concentration mechanism and applications to high-sensitivity analysis in capillary electrophoresis“, *Journal of Chromatography A*, roč. 965, č. 1–2, s. 357–373, srp. 2002.
- [9] A. T. Aranas, A. M. Guidote, J. P. Quirino, „Sweeping and new on-line sample preconcentration techniques in capillary electrophoresis“, *Anal Bioanal Chem*, roč. 394, č. 1, s. 175–185, kvě. 2009.
- [10] M. Olabi, M. Stein, H. Wätzig, „Affinity capillary electrophoresis for studying interactions in life sciences“, *Methods*, roč. 146, s. 76–92, srp. 2018.
- [11] V. Okhonin, A. P. Petrov, M. Berezovski, S. N. Krylov, „Plug-plug kinetic capillary electrophoresis: method for direct determination of rate constants of complex formation and dissociation“, *Anal. Chem.*, roč. 2006, č. 78, s. 4803–4810.



- [12] K. Takeo, „Advances in affinity electrophoresis", *Journal of Chromatography A*, roč. 698, č. 1, s. 89–105, dub. 1995.
- [13] N. H. H. Heegaard, „Affinity in Electrophoresis", *ELECTROPHORESIS*, roč. 30, č. S1, s. S229–S239, čer. 2009.
- [14] J. McLean, „The Discovery of Heparin | Circulation", *Circulation*, roč. 19, č. 1, s. 75–78, 1959.
- [15] B. Filounová, „Nepřímé stanovení heparinu kapilární elektroforézou", diplomová práce (2018)
- [16] R. Liang, D. E. Piyathilake, *Heparin : Properties, Uses, and Side Effects*. Nova Science Publishers, Inc., 2012.
- [17] Ministerstvo zdravotnictví České republiky, *Český lékopis 2009*, 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2009.
- [18] A. Herber, „Hemostáza". [Online]. Dostupné z: <http://www.physiome.cz/atlas/hemostaza/01/>. [Citováno: 31-čvc-2019].
- [19] R. Gotti, B. Parma, F. Spelta, a L. Liverani, „Affinity capillary electrophoresis in binding study of antithrombin to heparin from different sources", *Talanta*, roč. 105, s. 366–371, úno. 2013.
- [20] IKEM, „Aktivovaný parciální tromboplastinový test". [Online]. Dostupné z: [https://www2.ikem.cz/plm\\_lp/\\_LP\\_15872-L0000006.htm](https://www2.ikem.cz/plm_lp/_LP_15872-L0000006.htm). [Citováno: 01-srp-2019].
- [21] IKEM, „Aktivovaný koagulační test". [Online]. Dostupné z: [https://www2.ikem.cz/plm\\_lp/\\_LP\\_03458-L0000006.htm](https://www2.ikem.cz/plm_lp/_LP_03458-L0000006.htm). [Citováno: 01-srp-2019].
- [22] IKEM, „Quickův test". [Online]. Dostupné z: [https://www2.ikem.cz/plm\\_lp/\\_LP\\_16551-L0000006.htm](https://www2.ikem.cz/plm_lp/_LP_16551-L0000006.htm). [Citováno: 01-srp-2019].
- [23] IKEM, „Trombinový test". [Online]. Dostupné z: [https://www2.ikem.cz/plm\\_lp/\\_LP\\_03675-L0000006.htm](https://www2.ikem.cz/plm_lp/_LP_03675-L0000006.htm). [Citováno: 01-srp-2019].
- [24] IKEM, „Stanovení nízkomolekulárního heparinu". [Online]. Dostupné z: [https://www2.ikem.cz/plm\\_lp/\\_LP\\_11251-L0000006.htm](https://www2.ikem.cz/plm_lp/_LP_11251-L0000006.htm). [Citováno: 01-srp-2019].
- [25] C. Boer, M. I. Meesters, D. Veerhoek, a A. B. A. Vonk, „Anticoagulant and side-effects of protamine in cardiac surgery: a narrative review", *British Journal of Anaesthesia*, roč. 120, č. 5, s. 914–927, kvě. 2018.