

UNIVERZITA PARDUBICE

CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2025

Bc. ADÉLA OLIVOVÁ

Univerzita Pardubice
Chemicko-technologická

Zavedení metody mikroelektrodialýzy pro separaci vybraných proteinů
Diplomová práce

The University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Establishment of the microelectrodialysis method for the separation of selected
proteins

Thesis

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Adéla Olivová**
Osobní číslo: **C23234**
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Téma práce: **Zavedení metody mikroelektrodialýzy pro separaci vybraných proteinů**
Téma práce anglicky: **Establishment of the Microelectrodialysis Method for the Separation of Selected Proteins**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

- 1) Porovnání metod dialýzy a elektrodialýzy – princip, podmínky, výhody a nevýhody
- 2) Popis uspořádání zařízení pro mikroelektrodialýzu
- 3) Využití mikroelektrodialýzy pro biologické aplikace, zejména se zaměřením na separaci směsi proteinů – konkrétní příklady z odborné literatury

Experimentální část:

- 1) Zavedení metody mikroelektrodialýzy – testování různého zapojení mikroelektrodialyzéru, výběr vhodných membrán pro separaci vybraných proteinů
- 2) Optimalizace podmínek pro účinnou separaci s využitím standardního proteinu a následně směsi proteinů – napětí, proud, pH a složení roztoku
- 3) Ověření separace po provedené mikroelektrodialýze pomocí standardních metod stanovení proteinů – UV/VIS spektrofotometrie, metoda stanovení koncentrace (dle Bradfordové, BCA), SDS-PAGE separace

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Recentní literatura dostupná v databázích *Web of Science, NCBI, PubMed, Google Scholar*, atd. Další dle pokynů vedoucí práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Lucie Korecká, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **20. prosince 2024**
Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

prof. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem „*Zavedení metody mikroelektrodialýzy pro separaci vybraných proteinů*“ jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 9. 5. 2025

Bc. Adéla Olivová v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych srdečně poděkovala paní doc. Lucii Korecké, Ph.D., vedoucí mé diplomové práce, za její odborné vedení, trpělivost a cenné rady, které mě provázely během celého procesu vypracování diplomové práce. Velmi si vážím toho, že se snažila si vždy udělat čas na konzultace a její schopnosti kombinovat profesionální přístup s přátelskou a podporující atmosférou.

Obrovské díky patří panu Mgr. Ondřeji Morávkovi, za jeho přátelský přístup, poskytnuté rady a pomoc v experimentální části.

Poděkování patří také všem ostatním doktorandům za přátelskou atmosféru v laboratoři a za to, že jsem se vždy měla na koho obrátit.

Rovněž bych ráda poděkovala své rodině a přátelům, kteří mi byli oporou během celého studia. Rodino, vaše trpělivost, víra a podpora mi pomohly překonat náročné chvíle. Přátelé, děkuji za všechny společné okamžiky, smích a povzbuzení, které mi umožnily udržet si nadhled a vytrvat i v těch nejtěžších obdobích. Vaše podpora byla pro mě neocenitelná. Děkuji Vám všem!

ANOTACE

Tato diplomová práce byla zaměřena na zavedení a optimalizaci metody mikroelektrodialýzy pro separaci vybraných proteinů podle jejich molekulové hmotnosti. Teoretická část popisuje principy dialýzy a elektrodialýzy, typy iontově selektivních membrán, využití metod v biotechnologii a medicíně. V experimentální části je řešen návrh a sestavení mikroelektrodialyzační aparatury, výběr vhodných membrán a studium vlivu provozních podmínek, jako jsou pH, napětí, doba separace a typ membrány, na průběh separace proteinů. Součástí práce je rovněž porovnání této metody se separací pomocí centrifugačních odsolovacích mikrokolon.

KLÍČOVÁ SLOVA

dialýza, membrána, rovnovážný dialyzér, mikroelektrodialýza, separace, proteiny

TITLE

Establishment of the Microelectrodialysis Method for the Separation of Selected Proteins

ANNOTATION

This thesis focuses on the implementation and optimization of a microelectrodialysis method for the separation of selected proteins based on their molecular weight. The theoretical part describes the principles of dialysis and electro-dialysis, types of ion-selective membranes, and the application of these methods in biotechnology and medicine. The experimental part addresses the design and assembly of a microelectrodialysis apparatus, selection of suitable membranes, and investigation of the influence of operating conditions such as pH, voltage, separation time, and membrane type on the course of protein separation. The thesis also includes a comparison of this method with centrifugal filtration.

KEYWORDS

dialysis, membrane, equilibrium dialyzer, microelectrodialysis, separation, proteins

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ.....	11
SEZNAM TABULEK.....	13
SEZNAM GRAFŮ.....	14
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK.....	15
ÚVOD.....	17
1 TEORETICKÁ ČÁST	18
1.1 PRINCIP A USPOŘÁDÁNÍ DIALÝZY	18
1.1.1 VYUŽITÍ DIALÝZY	19
1.1.2 DRUHY DIALÝZY	20
1.1.3 VLASTNOSTI DIALYZAČNÍCH MEMBRÁN	21
1.1.4 MATERIÁLY DIALYZAČNÍCH MEMBRÁN	22
1.1.5 FYZIKÁLNÍ A CHEMICKÉ FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ PRŮBĚH DIALÝZY	27
1.2 ELEKTRODIALÝZA	29
1.2.1 USPOŘÁDÁNÍ ELEKTRODIALÝZY	30
1.2.2 IONTOVĚ VÝMĚNNÉ MEMBRÁNY A JEJICH VLASTNOSTI	31
1.2.3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ PRŮBĚH ELEKTRODIALÝZY	33
1.2.4 KONKRÉTNÍ PŘÍKLADY VYUŽITÍ ELEKTRODIALÝZY V BIOTECHNOLOGICKÝCH APLIKACÍCH	34
1.2.5 RYCHLÝ MIKRO-ROVNOVÁŽNÝ DIALYZÉR.....	36
1.2.6 PŘÍKLADY APLIKACÍ MIKROELEKTRODIALÝZY V BIOTECHNOLOGII.....	38
1.3 SROVNÁNÍ DIALÝZY S ELEKTRODIALÝZOU	41
1.3.1 EKONOMICKÉ NÁKLADY NA PROVOZ	41
2 CÍLE PRÁCE.....	43
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	44
3.1 USPOŘÁDÁNÍ MIKRODIALYZÉRU	46
3.2 MEMBRÁNY	48
3.3 MIKROELEKTRODIALÝZA ROZTOKU JEDNOHO PROTEINU.....	49
3.3.1 METODA STANOVENÍ CELKOVÉ KONCENTRACE PROTEINU DLE BRADFORDOVÉ	50
3.3.2 POLYAKRYLAMIDOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA V PROSTŘEDÍ DODECYLSULFÁTU SODNÉHO	50
3.4 MIKROELEKTRODIALÝZA SMĚSI PROTEINŮ	51
3.5 OPAKOVANÉ POUŽITÍ MEMBRÁN A JEJICH REGENERACE	52
3.6 MIKROELEKTRODIALÝZA SUSPENZE NANOČÁSTIC Z KYSELINY HYALURONOVÉ S IMOBILIZOVANÝM A – CHYMOTRYPSINOGENEM A – ODDĚLENÍ NENAVÁZANÉHO PROTEINU	53

4 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	54
4.1 OPTIMALIZACE PARAMETRŮ MIKROELEKTRODIALÝZY S ROZTOKEM JEDNOHO MODELOVÉHO PROTEINU	55
.....	57
4.3 OPTIMALIZACE PARAMETRŮ MIKROELEKTRODIALÝZY S ROZTOKEM MODELOVÉ SMĚSI PROTEINŮ	61
4.4 OPAKOVANÉ POUŽITÍ MEMBRÁN A ÚČINNOST REGENERACE.....	73
4.5 MIKROELEKTRODIALÝZA SUSPENZE NANOČÁSTIC Z KYSELINY HYALURONOVÉ S IMOBILIZOVANÝM A – CHYMOTRYPSINOGENEM A – ODDĚLENÍ NENAVÁZANÉHO PROTEINU	76
<u>ZÁVĚR</u>	<u>78</u>
<u>POUŽITÁ LITERATURA</u>	<u>79</u>

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Princip metody laboratorní dialýzy.....	19
Obrázek 2: Strukturní vzorce materiálů na bázi celulózy.....	24
Obrázek 3: Porovnání hydrofobní a hydrofilní membrány.....	25
Obrázek 4: Strukturní vzorce materiálů syntetických membrán.....	26
Obrázek 5: Membrána z dutých vláken EVAL - řez membránou.....	26
Obrázek 6: Pohled v řezu na membránu z dutých vláken PSf.....	27
Obrázek 7: Schéma uspořádání elektrodialyzéru.....	30
Obrázek 8: Schéma a popis FMED.....	36
Obrázek 9: Postup přípravy mikroelektrodialyzéru k měření.....	37
Obrázek 10: Dialyzační komory.....	46
Obrázek 11: Porovnání mikroelektrodialyzérů.....	47
Obrázek 12: Zapojená aparatura pro mikroelektrodialýzu.....	47
Obrázek 13: a) membrána z acetát-celulózy s MWCO 100 kDa, b) dialyzační střívko s MWCO 14 kDa, c) membrána z regenerované celulózy 10 kDa.....	48
Obrázek 14: Schéma mikroelektrodialyzéru.....	49
Obrázek 15: Výsledek SDS-PAGE separace frakcí po mikroelektrodialýze – optimalizace proudu.....	57
Obrázek 16: Výsledek SDS-PAGE separace frakcí po mikroelektrodialýze – optimalizace času a napětí.....	59
Obrázek 17: Výsledek SDS-PAGE separace frakcí po mikroelektrodialýze – optimalizace pH (měření se střívkem).....	61
Obrázek 18: Výsledek SDS-PAGE separace frakcí po mikroelektrodialýze – optimalizace pH.....	63
Obrázek 19: Výsledek SDS-PAGE separace frakcí po mikroelektrodialýze – optimalizace proudu.....	65
Obrázek 20: Výsledek SDS-PAGE separace frakcí po mikroelektrodialýze – optimalizace napětí.....	69
Obrázek 21: Výsledek SDS-PAGE separace frakcí po mikroelektrodialýze – optimalizace koncentrace.....	73
Obrázek 22: Výsledek SDS-PAGE separace frakcí po mikroelektrodialýze – optimalizace proudu.....	74

Obrázek 23: Výsledek SDS-PAGE separace frakcí po mikroelektrodialýze – optimalizace proudu.....	75
--	----

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Přehled druhů dialýz využívaných ve zdravotnictví a pro laboratorní účely.....	21
Tabulka 2: Přehled parametrů membrány ovlivňující účinnost dialýzy..	22
Tabulka 3: Druhy materiálů membrán a jejich použití..	23
Tabulka 4: Membrány používané pro FMED..	38
Tabulka 5: Porovnání výhod a nevýhod u dialýzy a elektrodialýzy.	42
Tabulka 6: Příprava dělicího a zaostřovacího gelu	51
Tabulka 7: Přehled experimentálních podmínek použitých při mikroelektrodialýzy.	54
Tabulka 8: Výsledky z měření DLS α – chymotrypsinogenu A navázaného na nanočástice kyseliny hyaluronové.	77

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Závislost účinnosti mikroelektrodialýzy pro optimalizaci proudu.....	56
Graf 2: Závislost účinnosti mikroelektrodialýzy pro optimalizaci napětí.	58
Graf 3: Závislost účinnosti mikroelektrodialýzy pro optimalizaci pH (měření s bočními membránami MWCO 10kDa).	60
Graf 4: Závislost účinnosti mikroelektrodialýzy pro optimalizaci proudu.....	65
Graf 5: Závislost účinnosti mikroelektrodialýzy pro optimalizaci času.....	67
Graf 6: Závislost účinnosti mikroelektrodialýzy pro optimalizaci času.....	67
Graf 7: Závislost účinnosti mikroelektrodialýzy pro optimalizaci napětí..	68
Graf 8: Závislost účinnosti mikroelektrodialýzy pro optimalizaci napětí..	69
Graf 9: Závislost účinnosti mikroelektrodialýzy pro optimalizaci koncentrace.....	71
Graf 10: Závislost účinnosti mikroelektrodialýzy pro optimalizaci koncentrace.....	72
Graf 11: Závislost účinnosti mikroelektrodialýzy pro optimalizaci koncentrace.....	72
Graf 12: Závislost účinnosti mikroelektrodialýzy pro optimalizaci proudu.....	74
Graf 13: Závislost účinnosti mikroelektrodialýzy pro optimalizaci proudu.....	75

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AEM – aniontově výměnné membrány (z angl. „Anion Exchange Membranes“)

AN-69® – specifický typ membrány z polyakrylonitrilu

BSA – hovězí sérový albumin (z angl. „Bovine Serum Albumin“)

CDA – krystalická celulóza (z angl. „Crystalline Derivative of Cellulose“)

CEM – kationtově výměnné membrány (z angl. „Cation Exchange Membranes“)

CHT α – α -chymotrypsinogen A

ED – elektrodialýza

EDBM – elektrodialýza s bipolární membránou (z angl. „Electrodialysis with Bipolar Membrane“)

EDFM – elektrodialýza s filtrační membránou (z angl. „Electrodialysis with Filtration Membrane“)

EVAL – ethylen vinylalkohol

FMED – rychlý mikro-rovnovážný dialyzér (z angl. „Fast Micro-Equilibrium Dialyzer“)

HANPS – nanočástice kyseliny hyaluronové (z angl. „Hyaluronic Acid Nanoparticles“)

IEM – iontově výměnné membrány (z angl. „Ion Exchange Membranes“)

MWCO – mezní molekulová hmotnost (z angl. „Molecular Weight Cut-Off“)

PA – polyamid

PAN – polyakrylonitril

PC – polykarbonát

pI – izoelektrický bod (z angl. „Isoelectric Point“)

PES – polyethersulfon

PMMA – polymethylmethakrylát

PSf – polysulfon

PVP – polyvinylpyrrolidon

SA – kyselina salicylová (z angl. „Salicylic Acid“)

SDS PAGE – polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného (z angl. „Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“)

TCA – triacetát celulózy (z angl. „Cellulose Triacetate“)

TF4 – volný tyroxin (z angl. „Free Thyroxine“)

TCA – triacetát celulózy (z angl. „Cellulose Triacetate“)

ÚVOD

Separace biomolekul je důležitá v biotechnologii, farmaceutickém výzkumu i v klinické diagnostice. Biomolekuly mají rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti, proto je důležité zvolit vhodnou separační metodu, která zajistí vysokou účinnost separace, a tím čistotu separovaných molekul. Jednou z metod může být mikroelektrodialýza.

Mikroelektrodialýza umožňuje transport iontů a malých nabitých molekul přes iontově selektivní membrány pomocí elektrického pole. Díky malému objemu a velkému poměru plochy membrány k objemu vzorku přináší rychlou separaci. Mezi hlavní výhody patří nízká spotřeba činidel, možnost automatizace a šetrnost k biologickému materiálu, protože se nepracuje při vysokém tlaku ani teplotě.

V teoretické části je popsán princip dialýzy, porovnání dialýzy a elektrodialýzy, typy používaných membrán a faktory, které ovlivňují průběh přenosu látek přes membránu. Jsou zmíněny příklady využití dialýzy v laboratoři i v medicíně (např. hemodialýza). Následuje část o elektrodialýze a její variantě v mikroměřítku – mikroelektrodialýze, včetně zařízení FMED (rychlý mikro-rovnovážný dialyzér).

Experimentální část práce byla zaměřena na zavedení a optimalizaci metody mikroelektrodialýzy pro oddělení proteinů rozdílné molekulové hmotnosti a izoelektrického bodu. Cílem bylo navrhnout vhodné uspořádání aparatury, zvolit vhodné membrány, sledovat vliv různých parametrů (pH, napětí, proud, čas, koncentrace, druh membrány) na účinnost separace.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Princip a uspořádání dialýzy

Dialýza je separační metoda používaná k oddělení makromolekulárních látek, jako jsou bílkoviny od nízkomolekulárních látek, například solí. K separaci jsou využívány polopropustné (semipermeabilní) membrány, které umožňují průchod jen malým molekulám, zatímco větší makromolekuly jsou zadržovány membránou [1].

Tato metoda nachází uplatnění především v biochemii, biotechnologii a medicíně. V laboratořích se využívá k přečištění biomolekul z komplexní matrice [6], odstranění solí nebo přípravě vzorků pro různé analytické metody [1,17]. V lékařství je dialýza klíčovou metodou při hemodialýze [15], kde slouží k odstraňování odpadních látek z krve u pacientů se selháním ledvin.

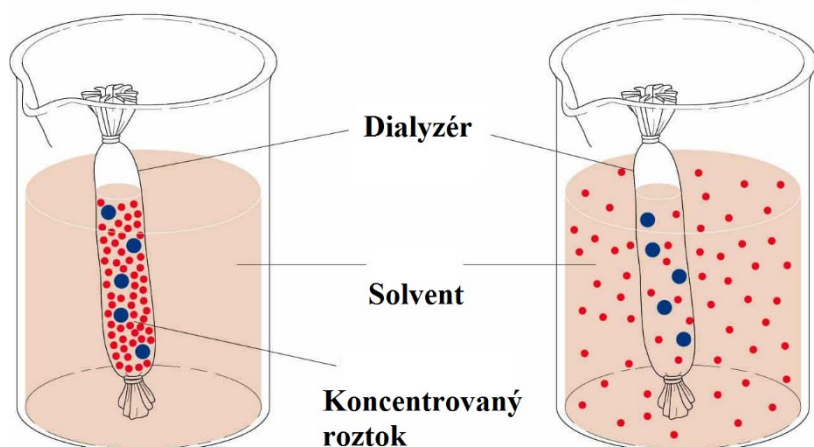
Principem dialýzy je selektivní difuze látek přes polopropustnou membránu, která umožňuje oddělení molekul podle jejich velikosti a koncentračního gradientu. Polopropustná membrána propouští pouze určité molekuly a ostatní zadržuje [1]. Selektivita membrány závisí na hodnotě mezní molekulové hmotnosti (MWCO), která určuje, jaké molekuly mohou projít membránou. Například membrána s MWCO 10 000 Da propustí molekuly menší než 10 000 Da, zatímco větší molekuly jsou zadržovány [1-4].

Roztok obsahující separovanou směs látek je umístěn do dialyzéru, který je ponořen do dialyzačního roztoku. Díky koncentračnímu gradientu molekuly, které mají menší velikost, než je cut-off membrány (MWCO), difundují ven z dialyzéru (vyšší koncentrace) do okolního dialyzačního roztoku (nižší koncentrace), zatímco molekuly, které jsou větší než hodnota cut-off membrány zůstávají uvnitř dialyzéru (obrázek 1) [1-4].

Proces probíhá do té doby, než dojde k ustavení rovnováhy, kdy je koncentrace malých molekul na obou stranách membrány stejná. V tomto bodě se difuze zastaví, protože koncentrační gradient neexistuje. Tímto způsobem dialýza účinně odděluje molekuly na základě jejich velikosti a koncentračních rozdílů [1-4].

Stav na začátku

Stav po vyrovnání koncentrací



Obrázek 1: Princip metody laboratorní dialýzy. Převzato a upraveno z: [5].

1.1.1 Využití dialýzy

Dialýza je široce využívanou separační metodou v řadě odvětví. Může být využita pro izolaci a purifikaci proteinů z komplexní matrice, pro studium a kvantifikaci afinity ligand – protein či pro řízenou agregaci proteinů [1-2].

Izolace a purifikace proteinů

Purifikace proteinů umožňuje studium izolovaných proteinů. Dialýza je využívána pro odsolování, odstranění nízkomolekulárních kontaminantů či převedení do požadovaného prostředí (výměnu pufru). Účinnost purifikace je ovlivněna několika faktory [6-9].

Zásadním faktorem je parametr dialyzační membrány, zejména vhodná MWCO neboli cut-off membrány, který musí být nižší než molekulová hmotnost proteinu, ale dostatečná pro odstranění kontaminantů. Vliv má i materiál, ze kterého je membrána vyrobena. Složení dialyzačního roztoku musí zajistit stabilitu a aktivitu proteinu, a to udržením stabilního pH, iontové síly, přidávkem stabilizátorů nebo redukčních činidel. Pro efektivní purifikaci je nutný dostatečný poměr objemu pufru k objemu vzorku. Proces probíhá běžně při laboratorní teplotě, pokud je ale omezená stabilita separované látky při laboratorní teplotě, pak je vhodné provádět za snížené teploty [6-9].

Dialýza je jednoduchá a levná metoda, sama o sobě ale někdy není dostatečně účinná pro vysokou čistotu produktů. Pro dosažení vysoké čistoty produktů je možné dialýzu kombinovat s dalšími purifikačními technikami, jako je například chromatografie [6-9].

Afinitní dialýza pro studium interakce protein-ligand

Afinitní dialýza je metoda, která se používá ke kvantifikaci vazebné afinity mezi ligandem a biomolekulou, např. proteinem. Princip je založen na tom, že se ustaví rovnováha volného ligandu mezi dvěma prostory, oddělenými polopropustnou membránou, která odděluje protein od objemové fáze roztoku. Membrána propouští volný ligand, ale ne protein ani komplex protein-ligand. V rovnovážném stavu se koncentrace volného ligandu v prostoru bez proteinu rovná koncentraci volného ligandu v prostoru obsahujícím protein. Tato metoda je užitečná např. při studiu enzymů a určení afinity k substrátu. Disociační konstanta udává koncentraci volného ligandu, při které je 50 % vazebných míst proteinu obsazeno. Dialyzační komora obsahuje dva oddíly oddělené polopropustnou membránou, do jedné komory se přidává protein (např. enzym, protilátka), do druhé radioaktivně značený ligand (odpovídající substrát, antigen). V rovnovážném stavu se měří intenzita radioaktivity v obou oddílech komory, která odpovídá koncentraci volného nebo vázaného značeného ligandu. Rozdíl v koncentraci radioaktivně značeného ligandu v obou oddílech komory odpovídá množství ligandu navázaného na protein [10-12].

Pro získání dat o vazebné afinitě je nutné provést sérii experimentů s různými koncentracemi ligandu a biomolekuly (proteinu). Následná analýza dat umožňuje stanovení disociační konstanty a maximální vazebné kapacity, která umožňuje určení počtu vazebných míst na biomolekule [10-12].

Dialýzou zprostředkovaná agregace proteinu

Udržení stálé konformace proteinů (sekundární, terciální a kvartérní struktura) je citlivé na podmínky prostředí, včetně pH, teploty, iontové síly a přítomnosti některých chemických látek. Pokud dojde ke změně podmínek během dialýzy mohou být proteiny nasměrovány ke změně konformačního stavu a následně k řízené agregaci [13-14].

Tato metoda se nabízí jako potenciální aplikace v materiálové vědě pro vytváření proteinových nanostruktur [13] a v biomedicíně pro tkáňové inženýrství. [2]. Vliv podmínek prostředí na agregaci proteinů je zásadní pro optimalizaci této techniky [13-14].

1.1.2 Druhy dialýzy

V tabulce 1 jsou uvedeny vybrané druhy dialýzy, přičemž některé z nich jsou určeny primárně pro laboratorní aplikace (např. elektrodialýza, Donnanova dialýza), zatímco jiné se využívají ve zdravotnické praxi (např. hemodialýza či peritoneální dialýza). Tabulka 1 zahrnuje popis jednotlivých metod, jejich využití, výhody a nevýhody.

Tabulka 1: Přehled druhů dialýz využívaných ve zdravotnictví a pro laboratorní účely. Převzato a upraveno z: [15-24].

Druh dialýzy	Popis	Aplikace	Výhody	Nevýhody
Zdravotnictví				
Hemodialýza	Krev je odváděna z těla do dialyzačního přístroje, kde se filtruje a zbavuje odpadních látek a přebytečné tekutiny.	Selhání ledvin, otrava, předávkování léky.	Efektivně odstraňuje odpadní látky. Dobrá dostupnost v dialyzačních centrech.	Časově náročné (3-5 hodin, 3x týdně), omezení ve stravování a příjmu tekutin, nutnost cévního přístupu.
Peritoneální dialýza	Dialyzační roztok se vstříkují do břišní dutiny, kde pobřišnice slouží jako semipermeabilní membrána.	Selhání ledvin, zejména pro pacienty, kteří nemohou podstoupit hemodialýzu.	Větší flexibilita, možnost domácí léčby.	Riziko infekce břišní dutiny (peritonitida), nutnost pravidelné výměny roztoku.
Mikrodialýza	Miniaturní sonda se zavádí do tkáně k měření koncentrace látek v extracelulární tekutině.	Výzkum v neurovědách, farmakologii, medicíně.	Minimálně invazivní, umožňuje kontinuální monitorování.	Omezeno na malé molekuly, náročnější na provedení a interpretaci.
Laboratorní účely				
Elektrodialýza	Používá elektrický proud k oddělení iontů z roztoku.	Úprava vody, osolování, zpracování potravin.	Efektivně odstraňuje soli a minerály.	Vyšší energetické nároky.
Donnanova dialýza	Využívá membránu k oddělení nabitých částic v roztoku na základě jejich velikosti a náboje.	Odstranění proteinů z roztoků, studium vazby léčiv.	Selektivní odstraňování látek.	Pomalý proces (2-20 hodin).

1.1.3 Vlastnosti dialyzačních membrán

Polopropustné membrány umožňují selektivní transport určitých látek, zatímco jiné zadržují. Specifickým typem těchto membrán jsou dialyzační střívka, která se vyrábějí z biokompatibilních materiálů, jako je celulóza nebo syntetické polymery. Materiál střívek je volen s cílem zvýšit účinnost dialýzy a zároveň minimalizovat potenciální nežádoucí účinky [16,25,27].

V medicínských aplikacích jsou dialyzační střívka součástí hemodialyzačních systémů, kde zajišťují odstraňování nízkomolekulárních odpadních látek a přebytečné vody z krve pacientů s renálním selháním. Mezi hlavní nevýhody spojené s použitím dialyzačních membrán v medicíně patří riziko nežádoucí imunitní reakce [16], aktivace komplementového systému [25],

zánětlivé odpovědi [16], hemolýza a potenciální trombogenicita [27], které mohou být ovlivněny fyzikálně-chemickými vlastnostmi membrán a délkou kontaktu s krví.

V laboratorních aplikacích se dialyzační střívkva využívají zejména pro separaci a purifikaci biomolekul. Nevýhody zahrnují nespecifickou adsorpci analytů na povrch membrány, denaturaci nebo degradaci citlivých sloučenin a ztrátu analytu při nesprávně zvoleném MWCO, což může vést ke zkreslení výsledků a snížení výtěžnosti separace [16,25,27].

Membrány lze klasifikovat podle použitého materiálu (např. celulóza, regenerovaná celulóza, polysulfon, polyakrylonitril) nebo podle velikosti pórů, resp. MWCO [16,25,27]. Účinnost membrán je ovlivněna řadou parametrů, které jsou shrnuty v tabulce 2.

Tabulka 2: Přehled parametrů membrány ovlivňující účinnost dialýzy. Převzato a upraveno z: [16,25,27].

Parametr	Funkce
Laboratorní i medicínské aplikace	
Permeabilita membrány	Určuje, jak snadno mohou látky procházet membránou. Vyšší permeabilita umožňuje efektivnější odstraňování odpadních produktů.
Velikost pórů membrány	Ovlivňuje, které látky mohou procházet membránou. Menší póry umožňují odstraňování menších molekul, zatímco větší póry umožňují odstraňování větších molekul.
Tloušťka membrány	Ovlivňuje rychlost, kterou mohou látky procházet membránou. Tenčí membrány umožňují rychlejší odstraňování odpadních produktů.
Medicínské aplikace	
Biokompatibilita	Určuje, jak dobře je membrána snášena tělem. Biokompatibilní membrány minimalizují zánětlivé reakce a další nežádoucí účinky.

1.1.4 Materiály dialyzačních membrán

Výběr materiálu membrány je klíčový pro biokompatibilitu a efektivitu dialýzy. Membrány jsou vyráběny z různých materiálů s ohledem na jejich specifické použití. Nejrozšířenější a nejvíce využívané jsou celulózové a syntetické membrány.

Celulózové membrány (např. celulóza, regenerovaná nebo modifikovaná celulóza) se nejčastěji využívají v laboratorních aplikacích, například při separaci a purifikaci proteinů, peptidů nebo metabolitů, kde je kladen důraz a dostatečnou účinností. Výběr membrány závisí na velikosti cílového proteinu a molekul, které je třeba odstranit. Tyto membrány jsou obvykle ve formě dutých vláken uspořádaných do svazků v dialyzátoru. Tloušťka stěny membrány ovlivňuje její vlastnosti, jako je propustnost [16]. Přehled využití materiálů pro různé aplikace v tabulce 3.

Naproti tomu syntetické membrány (např. polysulfon (PSf), polyethersulfon (PES) nebo poly-krylonitril (PAN) se vyznačují biokompatibilitou, chemickou stabilitou a přesnější kontrolovatelností velikosti pórů [26]. Díky těmto vlastnostem se široce využívají v klinické hemodialýze, kde je důležité minimalizovat imunitní a zánětlivé reakce. [16,25-26]. Používají se i membrány s upraveným povrchem, například potažené vitamínem E jako antioxidantem, které snižují oxidační stres [25]. K oxidačnímu stresu dochází v důsledku aktivace leukocytů a dalších imunitních buněk při kontaktu krve s membránou, což vede k nadprodukci reaktivních forem kyslíku a může přispívat k chronickému zánětu, poškození buněk a urychlení kardiovaskulárních komplikací u pacientů podstupujících dlouhodobou dialyzační léčbu. Peritoneální dialýza využívá přirozenou membránu v břišní dutině – peritoneum – k filtrování krve [26]. Tento typ dialýzy se liší od hemodialýzy a vyžaduje specifické vlastnosti membrány, jako je vysoká permeabilita pro nízkomolekulární látky, dostatečná absorpční kapacita pro tekutiny [26].

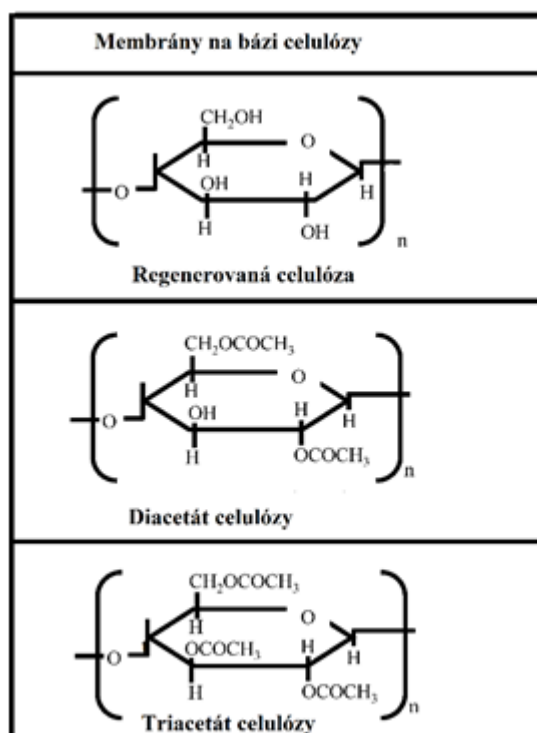
Tabulka 3: Druhy materiálů membrán a jejich použití. Převzato a upraveno z: [15,25-26].

Materiál	Hemodialýza	Peritoneální dialýza	Laboratorní dialýza
Celulóza	Ano	Ne	Ano (pro některé aplikace)
Regenerovaná celulóza	Ano	Ne	Ano
Syntetické polymery	Ano	Ne	Ano

Membrány na bázi celulózy

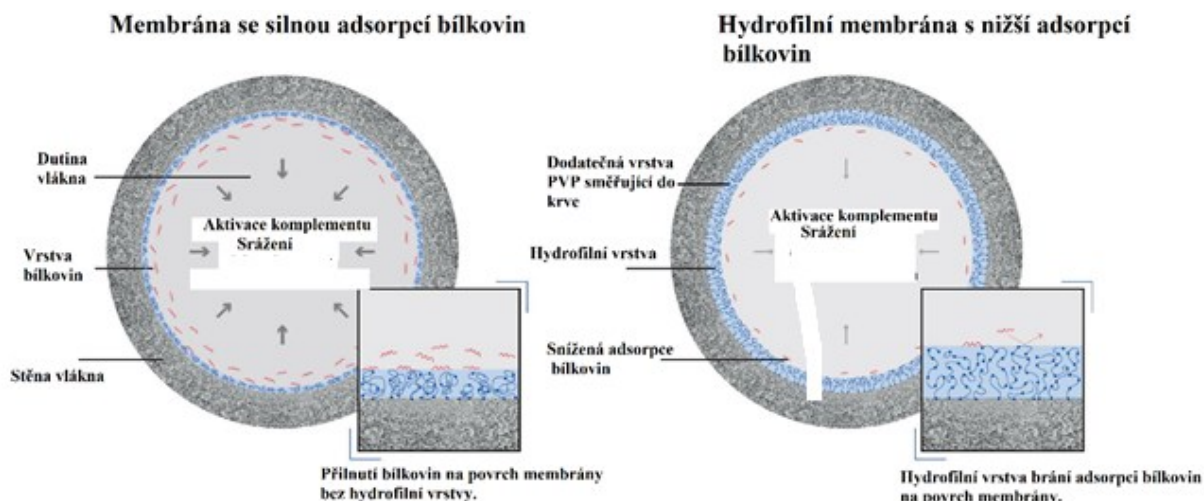
Membrány vyrobené z celulózy, pocházející z rostlinných polysacharidů, představují ekonomicky výhodné řešení díky nízkým nákladům a snadné dostupnosti. I když mají dobrou permeabilitu, jejich použití klesá kvůli problémům s biokompatibilitou z důvodů rozvoje zánětlivých reakcí a dalších komplikací při kontaktu s krví. V laboratorní dialýze se celulózové membrány stále využívají pro separaci biomolekul, kde se biokompatibilita neřeší, ale důraz je kladen na správnou velikost pórů a chemickou stabilitu [25].

Modifikace celulóзовých membrán se zaměřují na odstranění výše uvedených nedostatků. Základní formou používanou v dialýze je regenerovaná celulóza, která se získává rozpuštěním přírodní celulózy a jejím následným srážením ve formě tenkého filmu. Tato forma si zachovává strukturu polysacharidového řetězce, ale vykazuje chemickou stabilitu a může obsahovat volné hydroxylové skupiny, které jsou zodpovědné za potenciální imunologické reakce a sníženou biokompatibilitu. Chemické úpravy, jako je acylace hydroxylových skupin, vedly k vytvoření acetátových forem celulózy, konkrétně diacetátu celulózy (CDA) a triacetátu celulózy (CTA), strukturní vzorce jsou znázorněny na obrázku 2. CTA, díky těmto modifikacím, je považována za jednu z nejvíce biokompatibilních variant celulóзовých membrán, což ji činí ideální pro medicínské aplikace [25,28-29].



Obrázek 2: Strukturní vzorce materiálů na bázi celulózy. Převzato a upraveno z: [30].

Dalším příkladem chemické modifikace, která vede ke zlepšení vlastností membrány je zavedení aromatických benzylových skupin, které zvyšují hydrofobní charakter membrány. Membrána je hydrofobnější a tedy vodoodpudivá, čímž se omezuje adsorpce bílkovin a zvyšuje její účinnost [25,28–29,31]. Na druhé straně, hydrofilita membrány může být zlepšena pomocí přísavku polyvinylpyrrolidonu (PVP), který snižuje adsorpci proteinů na povrchu membrány [31]. Porovnání membrán je znázorněné na obrázku 3.

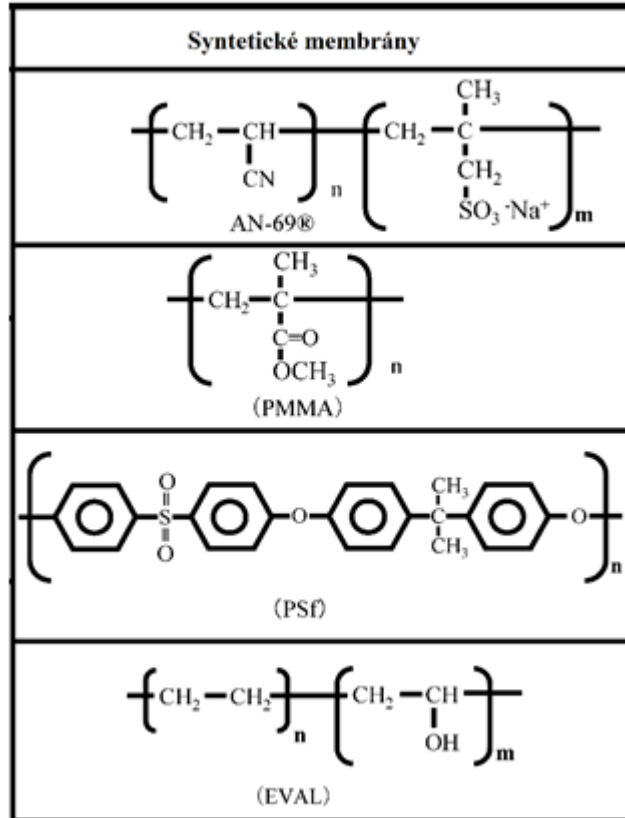


Obrázek 3: Porovnání hydrofobní a hydrofilní membrány. Převzato a upraveno z: [31].

Změny v chemické struktuře celulózy, jako zavedení různých funkčních skupin mohou zlepšit propustnost membrány pro specifické molekuly a zvýšit její celkovou biokompatibilitu. I když modifikované celulózové membrány představují výrazný pokrok oproti původním verzím, syntetické membrány jsou stále považovány za biokompatibilnější a dnes jsou preferovanou volbou v moderní medicíně [25,28-29].

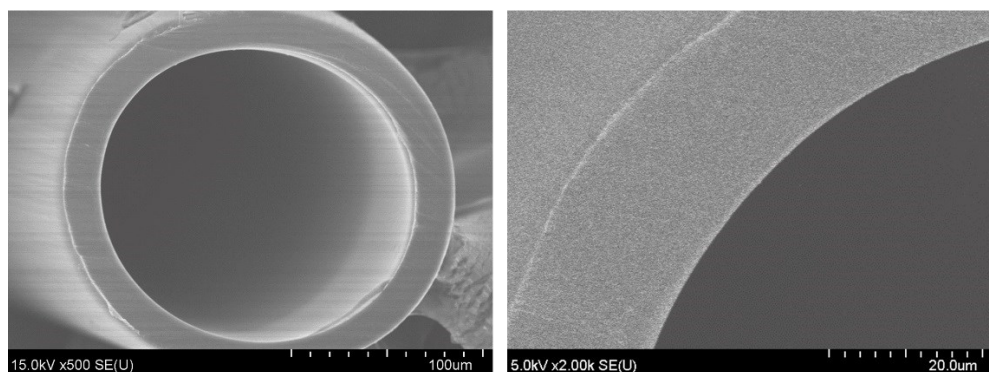
Syntetické membrány

Syntetické membrány jsou vyráběny z polymerů, jako je polysulfon, polyethersulfon, polymethylmethakrylát (PMMA), polyesterová polymerní slitina, polyakrylonitril polykarbonát, polyamid (PA) či polyethylen-co-vinylalkohol (EVAL) [30]. Strukturální vzorce těchto sloučeniny jsou znázorněny na obrázku 4.



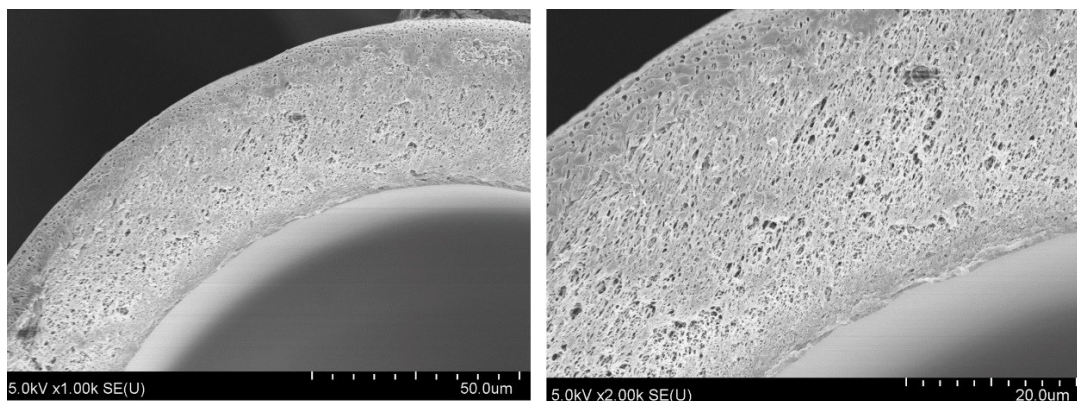
Obrázek 4: Strukturální vzorce materiálů syntetických membrán. Převzato a upraveno z: [30].

Tyto syntetické membrány mají oproti celulóзовým odlišné fyzikálně-chemické vlastnosti – mají větší velikosti pórů, a tím vyšší permeabilitu a filtrační kapacitu. Z hlediska struktury se celulóзовé membrány a některé syntetické (např. PMMA, EVAL, AN-69®) řadí mezi homogenní, tedy mají po celé své tloušťce stejnou pórovitost. Na obrázku 5 je pohled v řezu na membránu z dutých vláken EVAL [30].



Obrázek 5: Membrána z dutých vláken EVAL - řez membránou. Převzato a upraveno z: [30].

Většina syntetických polymerních membrán (např. PSf, PES) je ale asymetrická. Tyto membrány mají na vnitřním povrchu hustou separační vrstvu, tzv. „vrstvu kůže“, pod kterou se nachází nosná vrstva s pórovitou strukturou. Hustota této vrstvy směrem k vnějšímu okraji klesá, což umožňuje lepší průchod vody i rozpuštěných látek. Nosná vrstva zajišťuje mechanickou pevnost. Na obrázku 6 je průřez membrány z dutých vláken PSf [15,18,30].



Obrázek 6: Pohled v řezu na membránu z dutých vláken PSf. Převzato a upraveno z: [30].

Syntetické membrány navíc vykazují lepší biokompatibilitu, vyšší propustnost a tím jsou účinnější při odstraňování i větších molekul. Jejich povrch může být dále upravován, např. potažením vitamínem E, čímž se snižuje zánětlivá a imunitní reakce organismu, což je důležité zejména v medicínských aplikacích, jako je hemodialýza [25,28].

1.1.5 Fyzikální a chemické faktory ovlivňující průběh dialýzy

Účinnost dialýzy je ovlivněna mnoha faktory. Mezi nejdůležitější faktory patří: složení roztoku, typ a struktura membrány a vlivy prostředí jako pH, teplota a délka trvání procesu.

Vliv pH

Hodnota pH je klíčovým faktorem ovlivňujícím chemické a fyzikální vlastnosti látek v roztoku. Molekuly biologického původu, jako jsou aminokyseliny, peptidy a proteiny, mění své iontové formy v závislosti na pH, což ovlivňuje jejich rozpustnost, náboj a schopnost projít membránou během dialýzy [32-33].

pH také ovlivňuje interakce mezi složkami roztoku a účinnost pufrčních systémů. Výzkumy ukazují, že i malé odchylky v pH, způsobené například rozdílnou iontovou silou mezi roztokem solí a pufrům, mohou vést k neočekávaným změnám v procesu dialýzy. Tyto změny mohou mít

za následek ztrátu stability produktu, nesprávné pH cílového roztoku nebo omezenou propustnost pro některé iontové formy [32-33].

Celkově je tedy důležité kontrolovat pH během dialýzy, aby bylo dosaženo optimálního přenosu látek a zároveň byla zachována stabilita a správné vlastnosti cílového roztoku [32-33].

Vliv teploty na migraci látek a stabilitu membrán

Teplota má zásadní vliv na rychlost difuze přes membránu. S vyšší teplotou se zvyšuje kinetická energie molekul, což vede k rychlejšímu pohybu molekul a tím i k vyššímu množství přenosu. Snižuje také viskozitu roztoku, což usnadňuje pohyb látek a zvyšuje efektivitu celého procesu [34-36].

Bylo prokázáno, že s rostoucí teplotou se zvyšuje účinnost přenosu látek, jako např. anorganických kyselin, přes membránu. Vyšší teploty však mohou mít i negativní dopady. Bylo zjištěno, že mohou mírně snižovat selektivitu membrány, což znamená, že membrána může méně účinně oddělovat různé látky. V některých případech mohou vyšší teploty vést k postupné degradaci membrány, zejména pokud je překročena doporučená provozní teplota daného membránového materiálu. To může mít za následek snížení životnosti membrány a nutnost její častější výměny [34-36].

Celkově je tedy důležité pečlivě kontrolovat teplotu během dialýzy, aby bylo dosaženo optimálního přenosu látek a zároveň byla zachována integrita a funkčnost membrány [34-36].

Vlastnosti dialyzační membrány

Vlastnosti membrány, jako je tloušťka, pórovitost, iontová výměnná kapacita, chemická stabilita a schopnost vázat vodu, určují, které látky budou přeneseny a jak rychle. V laboratorních podmínkách se používají různé typy membrán, například membrány založené na celulóze nebo syntetických polymerech [37-39,60-62].

Výběr membrány závisí na povaze oddělovaných molekul a složení roztoku. Některé studie ukazují, že nová generace aniontově výměnných membrán nabízí vyšší selektivitu nebo rychlejší přenos určitých iontů. Tyto membrány však mohou vyžadovat specifické předúpravy nebo úzký rozsah provozních podmínek jako je napětí, teplota [37-39,60-62].

Vliv pH a teploty na samotnou membránu je také důležitý. Některé materiály jsou citlivé na extrémní hodnoty pH, zatímco jiné mohou ztrácet životnost při dlouhodobém vystavení vyšším teplotám. Proto je důležité pečlivě kontrolovat tyto parametry, aby byla zachována účinnost a stabilita membrány během dialýzy. Membrána je tedy nejen prostředkem pro přenos látek, ale také kritickým faktorem, který ovlivňuje celkovou účinnost a spolehlivost dialyzačního procesu. Výběr správné membrány a kontrola podmínek, za kterých je používána, jsou zásadní pro dosažení optimálních výsledků [37-39].

Složení dialyzovaného roztoku

Kromě fyzikálních parametrů prostředí je důležité i samotné složení dialyzovaného roztoku. Koncentrace látek, jejich náboj a velikost také ovlivňují celkovou dobu separace [40-42].

Studie ukazují, že přenos látek nelze předvídat pouze na základě jejich individuálních vlastností, ale je třeba brát v úvahu i jejich chemické interakce s ostatními složkami směsi a povrchem membrány. Složení roztoku hraje klíčovou roli v dialyzačním procesu. To dokazuje, že efektivní dialýza často vyžaduje kompromis mezi rychlostí separace a její selektivitou [40-42].

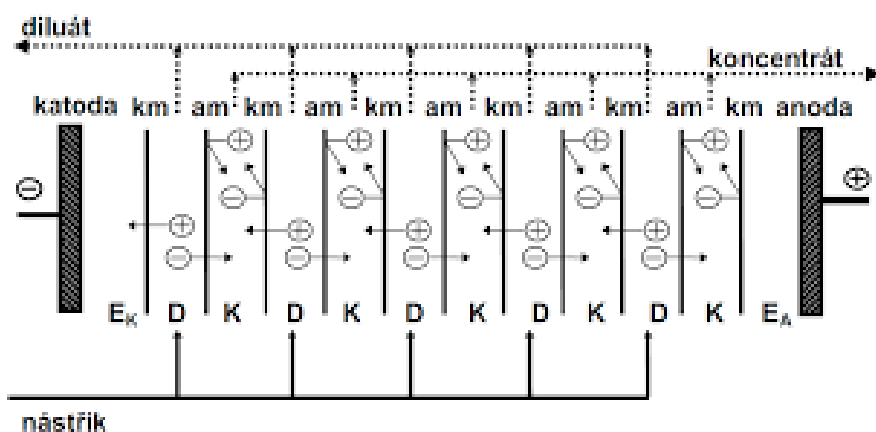
1.2 Elektrodialýza

Elektrodialýza (ED) je elektro-membránová separační metoda, která využívá elektrické pole k pohybu nabitých částic skrz semipermeabilní membrány, které umožňují selektivní separaci iontů. Tato metoda je v praxi využívána např. k odsolování brakických vod [43], čištění odpadních vod [46], úpravě roztoků v potravinářství a farmaceutickém průmyslu [45]. Existuje několik typů ED, liší se typem a uspořádáním membrán a celkovým uspořádáním elektrodialyzéru [43].

Separací proces ED probíhá bez fázových změn a použití chemických látek, proto je energeticky efektivní metodou pro separaci molekul. Dalšími výhodami jsou vysoká flexibilita provozu ED systémů a jednoduchá obsluha, zařízení mohou být automatizována. Ve srovnání s tradičními metodami jako je například chromatografie ED nezpůsobuje ztrátu nutričních, léčivých nebo senzorických vlastností produktu, což je častý problém při tepelném nebo chemickém zpracování surovin. Navíc je tato metoda v mnoha případech šetrná k životnímu prostředí [43-44].

1.2.1 Uspořádání elektrodialýzy

Tento proces probíhá v elektrodialyzéru (obrázek 7), kde jsou střídavě uspořádány aniontově a kationtově výměnné membrány mezi anodou a katodou. Mezi elektrody je přiváděn stejnosměrný elektrický proud. Stejnosměrné elektrické pole působí na pohyb disociovaných složek solí ve vodném roztoku tak, že záporně nabitě ionty (anionty) přitahované k anodě jsou propouštěny aniontově výměnnými membránami (AEM) a zadržovány na kationtově výměnných membránách (CEM), zatímco kladně nabitě ionty (kationty) pohybující se ke katodě jsou propouštěny kationtově výměnnými membránami a zadržovány aniontově výměnnými membránami. K rozdělení iontů ve dialyzovaném roztoku dojde při vhodné kombinaci AEM a CEM, čímž vzniká diluát a koncentrát. V průběhu ED je klíčové, aby membrány měly co nejnižší elektrický odpor, což minimalizuje celkový odpor a umožňuje efektivní přenos iontů mezi jednotlivými komorami. Na úspěšnost separace má vliv elektrické pole a permsektivita membrán, která je rozdílná pro jednotlivé složky v roztoku. Elektrodový roztok se využívá k omývání povrchu elektrod, nejčastěji se volí roztok indiferentní soli, může být i vstupující zpracováván roztok. Zpracováván roztok musí být oddělen od elektrodového roztoku, aby mohlo dojít k separaci plynů, které vznikají elektrodovými reakcemi. ED může negativně ovlivnit charakteristický posun pH katolytu do alkalické oblasti a anolytu do kyselé oblasti [43-45].



Obrázek 7: Schéma uspořádání elektrodialyzéru, D - diluát, K - koncentrát, EA - resp. EK - anodovou, resp. katodovou komoru, am - aniontově výměnnou membránu a km - kationtově výměnnou membránu. Převzato a upraveno z: [46].

1.2.2 Iontově výměnné membrány a jejich vlastnosti

Iontově výměnné membrány (IEM) se používají pro selektivní separaci iontů z roztoku a jsou charakteristické schopností propouštět ionty stejného náboje (kladné nebo záporné). IEM nejsou schopny propouštět neutrální molekuly nebo rozpouštědlo. Tyto membrány jsou vyrobeny z makromolekulárních materiálů jako je například polyethylen nebo polypropylen, které obsahují nabitě funkční skupiny schopné disociace ve vodném prostředí. Iontové funkční skupiny jsou součástí polymerní sítě, kde jsou pevně navázány na makromolekulární materiál, který tvoří kostru membrány. Nejčastěji se jedná o syntetické polymery, jako je PES, PSf, polyethylen [30]. Během separace musí být náboj těchto skupin vyvážen opačně nabitými ionty, nazývanými protiionty. Tyto protiionty nejsou pevně vázány a mohou se volně pohybovat, dokud se nenastaví rovnováha nábojů. Membrána je selektivně propustná pro tyto ionty. Ionty se stejným nábojem jako fixní náboj membrány, označované jako ko-ionty, obvykle membránou neprocházejí. Pokud však nejsou funkční skupiny v membráně pravidelně uspořádány, může to vést k narušení rovnoměrného rozmístění prostorového náboje a umožnit pronikání iontů se stejným nábojem, jaký mají vázané funkční skupiny v mřížce, i když v menší míře [44,47-48].

IEM se využívají v mnoha odvětvích pro své klíčové vlastnosti. Jednou z nich je selektivita, což je schopnost membrány rozlišovat ionty, které jsou propouštěny skrz membránu od iontů, které jsou zadržovány. Membrána musí mít vysokou propustnost pro cílové ionty, aby byl zajištěn efektivní transport při minimální energetické náročnosti. Jednou ze zásadních vlastností je i stabilita, membrána musí odolávat vysoké teplotě, vlastnostem prostředí (změny pH), dlouhodobému vystavování elektrického pole. Pro metody, jako je elektrodialýza je důležité, aby membrána měla nízký elektrický odpor. Nízký elektrický odpor zlepšuje energetickou efektivitu transportu iontů [49-50].

Heterogenní membrány

IEM se dělí na homogenní a heterogenní. Membrány se liší svým složením a strukturou. Na výrobu heterogenních membrán se používají dva různé typy polymerů. První polymer funguje jako strukturní prvek nebo matricový polymer, který tvoří základní kostru membrány a zajišťuje její mechanickou pevnost a stabilitu. Typickým příkladem je polystyren-divinylbenzen [30]. Druhý polymer, který je obvykle jemně mletá iontově výměnná pryskyřice, se používá k přenosu funkčních míst. Membrány se vyrábějí smícháním jemně mleté iontově výměnné pryskyřice s pojivem např. polyethylenem, směs se zahřívá na teplotu vyšší, než je teplota tání pojiva, ale nižší než teplota degradace iontově výměnných částic. Poté se směs zpracuje extruzí a

lisováním do podoby tenké plošné nebo trubkové membrány. Často je do membrány integrována stabilizační síťka, která pomáhá udržet její rozměrovou stabilitu, zejména při bobtnání. Hlavní výhodou heterogenních membrán je nízká cena, chemická odolnost a vysoká mechanická pevnost. Na druhou stranu, jejich hlavní nevýhodou je nižší iontová výměna ve srovnání s homogenními membránami [44,51].

Homogenní membrány

U homogenních membrán se tentýž polymer využívá jak pro vytvoření samotné membránové struktury, tak i pro nesení iontově funkčních skupin, které jsou nezbytné pro selektivní transport iontů. V celé tloušťce membrány je materiál chemicky a strukturně stejnorodý, což znamená, že transportní odpor je rovnoměrně rozložen a každá část membrány přispívá k iontové výměně. Typickými příklady homogenních membrán jsou EVAL, PMMA [30]. Jednou z možností výroby membrán je odlití polymeru obsahujícího iontově výměnnou skupinu na inertní podložku (např. sklo korozivzdorné oceli) ve formě tenkého filmu. Poté následuje odpaření rozpouštědla a odstranění vytvořené membrány z podložky. Druhá metoda výroby spočívá v zavedení iontově výměnné skupiny do již připraveného polymerního filmu pomocí chemické reakce. Homogenní membrány obvykle nabízejí výhody, jako je vysoká selektivita, vynikající vodivost pro ionty a nízký elektrický odpor. Mezi hlavní nevýhody však patří vysoké pořizovací náklady a nižší mechanická odolnost [44,52].

Kationtově a aniontově výměnné membrány

AEM propouští skrz membránu anionty a zadržují kationty. Anionty migrují kolem hlavního řetězce, který je spojený polymerní kostrou a postranním řetězcem tvořeným kationtovou skupinou spojenou chemickými vazbami, což umožňuje selektivní přenos aniontů a blokování kationtů. AEM obecně vyžadují vysokou elektrickou vodivost a dobrou tepelnou stabilitu. Různé funkční skupiny určují elektrickou vodivost membrány. Společně (zejména funkční skupiny) určují chemickou stabilitu membrány. AEM mají základní vzorec $RP-X^+$, RP je základní polymerní skelet membrány, X^+ může být např. $-NH_3^+$, $-NRH_2^+$, $-NR_2H^+$, $-NP_3^+$, $-PR_3^+$, $-SR_2^+$, R je vodík nebo alkylová skupina [44,53].

Kationtově výměnné membrány propouští skrz membránu kationty a zadržují anionty. Polymerní řetězce CEM obsahují skupiny s negativním elektrickým nábojem, obvykle ve formě sulfokyselin, fosfátových nebo karboxylových skupin. Tyto membrány bývají většinou homogenní, tedy složené pouze z jednoho polymeru nebo statického kopolymeru. Příprava membrán obvykle zahrnuje polymery s aromatickými jádry, která lze snadno sulfonovat, jako je například

polystyren a jeho kopolymery. Membrány obsahují funkční skupiny připojené na základní skelet membrán. Různé funkční skupiny ovlivňují klíčové vlastnosti membrán, přičemž zejména působí na jejich selektivitu a elektrický odpor [44,54].

1.2.3 Faktory ovlivňující průběh elektrodialýzy

Elektrodialýza je ovlivněna několika faktory, které lze rozdělit do kategorií. Mezi nejdůležitější patří elektrické parametry, vlastnosti roztoku a vlastnosti membrán. Optimalizace všech těchto faktorů je důležitá pro dosažení efektivního a ekonomicky výhodného provozu elektrodialýzy [43-45].

Elektrodialýza je ovlivněna faktory, které lze rozdělit do několika hlavních kategorií. Mezi nejdůležitější patří elektrické parametry, vlastnosti roztoku a vlastnosti membrán. Optimalizace všech těchto faktorů je důležitá pro dosažení efektivního a ekonomicky výhodného provozu elektrodialýzy [43-45].

Elektrické parametry

Mezi tyto parametry patří elektrická vodivost, aplikované napětí, aplikovaný elektrický proud a potenciál. Tyto parametry jsou zásadní pro efektivní fungování systému a ovlivňují celkovou účinnost procesu elektrodialýzy. Obecné účinky každého parametru jsou známé a teoreticky podložené. Jak udává Nernst-Planckova rovnice, dominantními mechanismy transportu iontů v procesu elektrodialýzy jsou difúze a migrace iontů [55-57].

Elektrický proud aplikovaný na membrány určuje pohyb iontů. Pokud však hustota proudu překročí hranici známou jako mezní proudová hustota, může to vést ke zvýšení elektrického odporu a poškození membrány. Vodivost roztoku je dalším důležitým faktorem. Vyšší vodivost obvykle umožňuje lepší transport iontů. Je ovlivněna koncentrací iontů v roztoku tzn. více iontů obecně znamená vyšší vodivost [55-57].

Aplikované napětí a potenciál také hrají významnou roli. Při velmi nízkém napětí je přenos iontů zanedbatelný kvůli elektrickému odporu iontoměničových membrán, při vyšších aplikovaných napětích se procento odstranění iontů zvyšuje. Ne všechny ionty jsou však ovlivněny napětím stejně, různé reakce iontů jsou výsledkem různých difuzivit iontů a různých interakcí ion-ion v roztoku a ve fázích iontoměničové membrány [55-57].

Vlastnosti roztoku

Zejména jsou důležité: koncentrace iontů, teplota a pH. Koncentrace iontů ovlivňuje transportní mechanismy, jako je difúze a elektro-migrace. Zvýšení teploty zlepšuje vodivost a snižuje viskozitu, což vede k efektivnější separaci. Použití teplotního gradientu přes membránu může vést k termoelektrickému efektu, který lze využít jako elektrickou práci. Tento teplotní gradient nemusí nutně vést k vývoji koncentračního gradientu přes membránu. Pokud je kromě teplotního gradientu aplikován i potenciálový nebo koncentrační gradient, může být selektivní transport iontů zesílen kombinací účinků teplotních gradientů s dalšími transportními jevy v systému. S vyšší teplotou roste difuzivita iontů v roztoku, což zvyšuje celkový proud a účinnost separace iontů [58-59].

Transport a filtrace hydroniových a hydroxidových iontů během úpravy vody, spolu s disociací vody, mohou vést k nežádoucí kyselosti nebo zásaditosti produktu, kompromitovat náboj membrány nebo zvýšit tendenci k zanášení membrány. Na druhou stranu, odchylky pH mohou být využity k optimalizaci specifikace slabých kyselin/zásad a zlepšení účinnosti [58-59].

1.2.4 Konkrétní příklady využití elektrodialýzy v biotechnologických aplikacích

Elektrodialýza s bipolární membránou pro purifikaci bioaktivních peptidů

Elektrodialýza s bipolární membránou (EDBM) byla využita pro purifikaci bioaktivních peptidů hovězího hemoglobinu s antimikrobiálními účinky po jeho enzymatické hydrolýze. Bipolární membrány generují ionty H^+ při disociaci vody elektrickým polem vyvolávajícím okyselení roztoku na kationtovém rozhraní bipolární membrány [63].

Z výsledků studie bylo prokázáno, že hydrolýza v EDBM má stejný enzymatický mechanismus jako konvenční hydrolýza. EDBM umožnila purifikaci peptidu α 137-141 bez zanášení membrány a s minimálním odporem než konvenční hydrolýza. Tato nová aplikace EDBM pro purifikaci α 137-141 z vedlejšího jatečního produktu má velké uplatnění do budoucna v hospodářství. Hemoglobin z krve totiž po hydrolýze umožňuje bioprodukcii aktivních peptidů, které lze následně použít v mase nebo masných výrobcích pro jejich konzervaci [63].

Izolace laktoferinu a imunoglobulinů z mléčné syrovátky

Typickou separační metodou syrovátkových bílkovin je chromatografie, jejíž nevýhodou je však zanášení kolony a vysoké náklady. Ve srovnání s chromatografií může být tlakově řízená membránová filtrace finančně výhodnější, ale má nízkou selektivitu. Pro zlepšení selektivity

filtrační metody byla navržena elektrodialýza s filtrační membránou (EDFM) [61]. Použití elektrodialýzy k separaci proteinů v kombinaci s filtrační membránou poprvé navrhla společnost Gradipore, která ukázala, že tento přístup lze využít k separaci imunoglobulinu G z lidské plazmy, proteinů z vaječného bílku a hemoglobinu ze směsi s hovězím sérovým albuminem. Vzhledem k relativně vysoké molekulové hmotnosti proteinů je intenzita elektrického pole potřebná k jejich přesunu přes membránu vysoká (10 V/cm až 2000 V/cm). Proto se musí používat nenabitě membrány, aby se zabránilo štěpení vody, přičemž Gradipore využila polyakrylamidové membrány, jejichž výroba je však obtížná kvůli nutnosti pracovat v bezkyslíkových podmínkách [64].

Roztok s agregovaným laktoferinem a dalšími mléčnými bílkovinami následně prochází filtrační membránou, přičemž menší proteiny mohou přes membránu projít, zatímco větší, jako je laktoferin a imunoglobuliny, jsou zadrženy. U této metody se od roku 2020 zkoumá, zda lze získat produkt s vyšším obsahem imunoglobulinů a laktoferinu [64]. Účinnost dialýzy však může postupně klesat, zejména v důsledku agregace proteinů, zanášení membrány, případné nevhodné intenzity elektrického pole nebo změn složení roztoku, které ovlivňují náboj a rozpustnost proteinů, a tím i jejich separaci [64].

Izolace oxymatrinu ze simulovaného výluhu elektrodialýzou s ultrafiltrační membránou

Tradiční čínská využívá pro léčbu biologicky aktivní molekuly, izolované obvykle z rostlinných zdrojů jako alkaloidy, aminokyseliny a flavonoidy, jejichž separace je složitá kvůli různým nábojům při různém pH. Tradiční metody, jako chromatografie, mají nízkou účinnost, což vede k nízké čistotě a výtěžnosti. Oxymatrin, významný alkaloid s protinádorovými, protizánětlivými a antivirovými účinky, je při nízkém pH kationt, což ztěžuje jeho izolaci. Vzhledem k tomu, že prolin byl přítomen v eluátu spolu s oxymatrinem, jeho únik přes membránu byl nežádoucí, protože by mohl kontaminovat finální produkt a snížit účinnost izolace oxymatrinu [65].

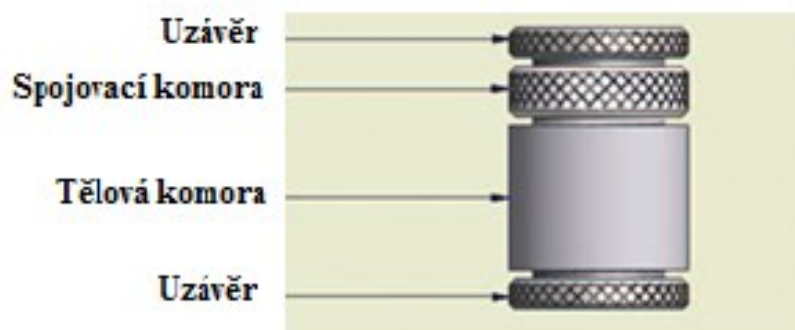
V tomto výzkumu byl navržen nový proces elektrodialýzy s ultrafiltrační membránou (EDUF) pro efektivní izolaci oxymatrinu z eluátu *Sophora flavescens*, který obsahoval oxymatrin, prolin a anorganické soli, jako je chlorid sodný. Experimenty ukázaly, že správný výběr velikosti membrány umožňuje efektivní separaci oxymatrinu na základě jeho velikosti a náboje. Při optimálních podmínkách bylo dosaženo vysoké účinnosti separace oxymatrinu a současně minimalizován únik prolinu. Po izolaci oxymatrinu bylo nutné provést desalinizaci pomocí

konvenční elektrodialýzy, aby se zvýšila jeho čistota. Tento nový proces nabízí vysokou separační účinnost, nízkou energetickou náročnost a možnost recyklace anorganických složek, čímž přispívá k rozvoji efektivnějších metod pro izolaci bioaktivních složek z tradiční čínské medicíny [65].

1.2.5 Rychlý mikro-rovnovážný dialyzér

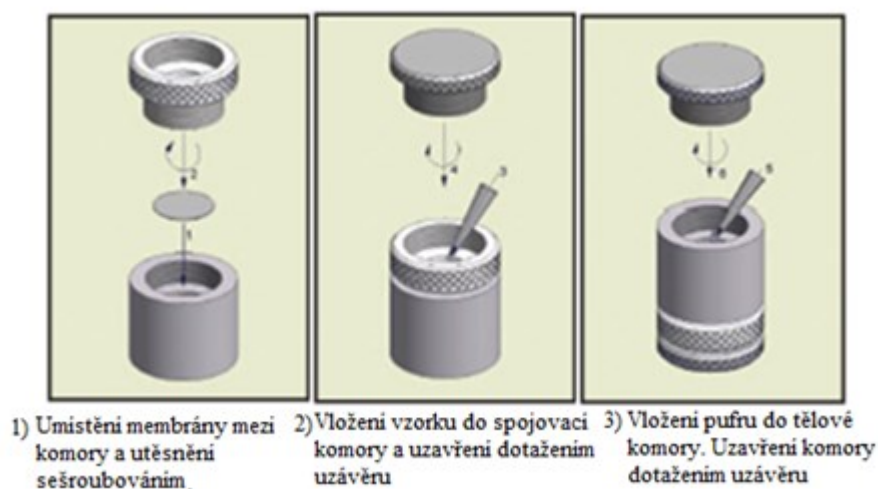
Fast Microequilibrium Dialyzer (FMED), neboli rychlý mikro-rovnovážný dialyzér, je rovnovážná dialyzační komora určená pro rychlou dialýzu malých vzorků (25–1500 μ l), ideální pro vazebné testy a studie molekulárních interakcí. Tyto studie se zaměřují na interakce mezi molekulami, jako jsou léky a proteiny, nebo DNA a ligandy, a jsou důležité pro pochopení biologických procesů a vývoj nových léčiv. FMED umožňuje efektivní měření koncentrace volného nebo vázaného analytu [66].

Velký poměr povrchu membrány k objemu umožňuje rychlejší dosažení rovnováhy a tím i zkrácení doby dialýzy. Inertní materiál PTFE (polytetrafluorethylen) zajišťuje maximální retenci vzorku, odolává chemikáliím a teple, a umožňuje sterilizaci dialyzéru v autoklávu pro opakované použití. Dialyzér vyrobený z PTFE se skládá z dialyzační a spojovací komory o stejném objemu a dvou pevných uzávěrů (viz obrázek 8). Membrána je umístěna mezi spojovací a dialyzační komoru před použitím. Při vazebných studiích jedna komora obsahuje vázanou molekulu, zatímco druhá obsahuje afinitní ligand. Afinitní ligand volně prochází membránou a váže se na vázanou molekulu. Jakmile je komplex vytvořen, je příliš velký na to, aby prošel membránou, a zůstává ve své komoře. Po dosažení rovnováhy se komory otevřou na každém konci pro vyjmutí vzorků k analýze, například pro stanovení vazebné afinity [66].



Obrázek 8: Schéma a popis FMED. Převzato a upraveno z: [66].

Před použitím FMED je nutné umístit a upevnit membránu mezi obě komory. Poté se dávkuje vzorek do spojovací komory, která se uzavře. Z druhé strany se do komory přidá pufr a komora se uzavře (obrázek 9). Po skončení separace se odšroubuje uzávěr a odeberou se roztoky z obou komor.



Obrázek 9: Postup přípravy mikroelektrodialyzéru k měření. Převzato a upraveno z: [66].

Dialyzér nabízí několik výhod, mezi které patří snadné použití, opakovaná použitelnost, inertnost vůči proteinům, nízká vazba proteinů (nespecifická sorpce na materiál dialyzéru). Dialyzér je ideální pro různé aplikace, včetně vazebných testů např. protein-léčivo, protein-protein a protein-DNA [66].

1.2.6 Membrány používané pro mikroelektrodialyzér

Membrány pro FMED jsou dodávány suché, aby se prodloužila jejich trvanlivost. Nejčastěji používané membrány jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4: Membrány používané pro FMED. Převzato a upraveno z: [66].

Materiál membrány	Popis
Regenerovaná celulóza	Membrány vyrobené z vysoce stabilní celulózy, odolné vůči rozpouštědlům a inertní vůči proteinům, čímž je zajištěna maximální retence vzorku. Dostupné v MWCO od 1 do 50 kDa. Membrány s méně definovanou velikostí pórů.
Acetát celulózy	Membrány jsou vyrobené z přírodní celulózy, ideální pro použití s vodnými roztoky. Tyto membrány jsou inertní vůči proteinům a zajišťují vysokou retenci vzorku. Nejsou určeny pro použití s organickými rozpouštědly. Dostupné v MWCO od 500 Da do 300 kDa, mají více definovanou velikost pórů než membrány z regenerované celulózy.
Polykarbonát	Membrány jsou chemicky odolné a ideální pro použití s kyselinami a organickými rozpouštědly. Polykarbonátové membrány jsou dostupné s ostře definovanými velikostmi pórů v rozmezí od 0,01 μm do 0,60 μm .

1.2.6 Příklady aplikací mikroelektrodialýzy v biotechnologii

Studium interakcí léčivo-protein s využitím mikrodialyzéru

Michalcová a Glatz (2015) použili metodu mikrodialýzy, konkrétně FMED, k analýze interakcí mezi bovinním sérovým albuminem (BSA) a kyselinou salicylovou (SA). V tomto případě byla provedena dialýza vzorků BSA s různými koncentracemi SA proti borátovému pufru, což umožnilo dosažení rovnováhy během 2 hodin za konstantního míchání [67].

Mikrodialyzér byl vybaven semipermeabilní membránou z regenerované celulózy s cut-off 10 kDa, což zajišťovalo selektivní průchod malých molekul, konkrétně SA, mezi komorami, zatímco BSA bylo zadrženo. Tato metoda poskytuje přesné údaje o koncentracích volného a vázaného léku, které byly následně analyzovány pomocí kalibrační křivky s využitím kapilární elektroforézy [67].

Výhody použití mikrodialyzerů jsou vysoká účinnost a možnosti využití pro vysokokapacitní testování v raných fázích vývoje léků [67].

Měření koncentrace volného tyroxinu v séru

Ribera a kol. (2023) se zaměřili na porovnání různých typů dialyzačních zařízení, konkrétně mikrodialyzéru a FMED pro měření koncentrace volného tyroxinu (FT4) v séru [68]. Zatímco mikrodialyzéry dokázaly dosáhnout rovnováhy po 4-5 hodinách, jejich výsledky vykazovaly nepřesnost nad 5 %, což je limit pro referenční měření. FMED, navzdory rychlejšímu návrhu, ukázaly výraznou variabilitu a nízkou přesnost, s odchylkou až 18,1 % a nepřesností přes 20 %, což je pro referenční měření nepřijatelné. Macro 1S je specifická analytická technika, která je validována pro přesné stanovení koncentrací FT4 v klinických laboratořích a je považována za velmi spolehlivou pro diagnostické účely díky své nízké variabilitě a vysoké přesnosti měření. Cílem bylo zajistit přesnost a stabilitu měření FT4, jako vhodnější se osvědčila dialýza s využitím mikrodialyzéru [68].

Studie afinity vankomycinu na plazmatické bílkoviny

Stove a kol. (2015) ve své studii zkoumali vazbu léčiv na plazmatické bílkoviny. Z biologického hlediska je významná především volná (nevázaná) frakce léčiva, která je schopná difundovat do cílových tkání a navázat se na příslušné receptory. U některých skupin pacientů, jako jsou například kriticky nemocní, dochází vlivem hypoproteinémie k výrazným změnám v míře vazby léčiv na bílkoviny. Tento efekt je důležitý u léčiv s vysokou mírou vazby, jako je vankomycin, kdy změna vázané a nevázané frakce může zásadně ovlivnit jeho distribuci a clearance. Přestože by stanovení volné frakce mohlo zlepšit optimalizaci dávkování, v klinické praxi se většinou monitorují pouze celkové koncentrace [69].

Cílem studie bylo posoudit vliv teploty na míru vazby vankomycinu na plazmatické bílkoviny a porovnat která z metod (rovnovážnou dialýza a ultrafiltrace) je přesnější pro určení afinity vankomycinu. Většina pacientů dostávala vankomycin kontinuální infuzí. Kromě standardních vzorků byly použity i vzorky s vyšší koncentrací imunoglobulinu A (IgA), aby byl zhodnocen vliv jednotlivých plazmatických proteinů na vazbu vankomycinu [69].

Rovnovážná dialýza byla provedena za použití FMED od společnosti Harvard Apparatus. Tyto znovupoužitelné teflonové zařízení obsahují dvě komory (každá o objemu 500 μ L), oddělené semipermeabilní membránou z regenerované celulózy s mezní propustností 25 kDa. Jedna komora byla naplněna sérem nebo plazmou a druhá komora obsahovala dialyzační pufr. Dialýza probíhala 24 hodin při konstantní teplotě $37 \pm 0,1$ °C za míchání ve vodní lázni.

Reprodukovatelnost metody byla ověřena na pěti identických vzorcích a vykazovala variační koeficient 5,4 % [69].

Výsledky studie ukázaly, že teplota má významný vliv na vazbu vankomycinu na plazmatické bílkoviny, a tedy i na stanovení volné frakce. Dále se ukázalo, že přítomnost některých proteinů, zejména zvýšené koncentrace IgA (například u pacientů s myelomem), může významně ovlivnit výsledky. Autoři rovněž poukázali na to, že ultrafiltrace sice představuje rychlejší metodu, ale je náchylnější k adsorpci léčiva na filtr a k ovlivnění vnějšími podmínkami. Naopak rovnovážná dialýza, zejména s využitím FMED, poskytuje reprodukovatelné výsledky, a proto zůstává referenční metodou pro stanovení volné frakce léčiv [69].

Vazebná studie testosteronu

Fiers a kol. (2015) porovnávali různé metody pro měření testosteronu ve slinách a porovnávali je s metodami měření v séru, jako je LC-MS/MS a rovnovážná dialýza. Cílem bylo zjistit, zda lze testosteron obsažený ve slinách použít jako náhradu za měření volného testosteronu v séru, kvůli méně invazivnímu odběru vzorku. K testování různých sběrových metod vzorků slin použili Salimetrix kit, přičemž použili i FMED což je zařízení pro rychlou separaci složek ve vzorcích [70].

FMED umožňuje rychlou separaci testosteronu ve slinách, čímž odděluje testosteron vázaný na proteiny od volného testosteronu. Ukázalo se, že pasivní slinění je nejlepší metodou pro sběr vzorků slin pro analýzu testosteronu. Výsledky ukázaly, že testosteron ve slinách vykazuje slušnou korelaci s volným testosteronem v séru u mužů, ale u žen byly hodnoty vyšší než očekávané, což bylo přičítáno vazbě na proteiny ve slinách [70].

Studie ukázala, že ačkoli FMED je účinnou metodou pro separaci testosteronu ve slinách, u žen to nelze považovat za přímou náhradu volného testosteronu v séru. Tento rozdíl je důsledkem specifického vázání testosteronu na proteiny obsažené ve slinách, což je faktor, který je třeba zohlednit při klinických studiích slinného testosteronu [70].

1.3 Srovnání dialýzy s elektrodialýzou

1.3.1 Ekonomické náklady na provoz

Ekonomické náklady spojené s provozem dialýzy zahrnují náklady na dialyzéry, pufry a reagenty, stejně jako náklady na údržbu zařízení. Laboratorní dialýza může být výhodnější pro malé objemy díky nižším počátečním a provozním nákladům, zatímco elektrodialýza se ukazuje jako nákladově efektivnější pro rozsáhlejší procesy. Volba mezi těmito metodami závisí na specifické aplikaci a rozsahu

Ekonomické náklady na provoz elektrodialýzy jsou ovlivněny několika faktory. Spotřeba energie je jedním z hlavních nákladů, jelikož elektrodialýza vyžaduje elektrickou energii pro provoz membrán a čerpadel. Optimalizace energetické spotřeby může výrazně snížit provozní náklady. Dalšími významnými náklady jsou náklady na membrány, které zahrnují nejen pořizovací cenu, ale také náklady na údržbu a výměnu. Pravidelná údržba a opravy zařízení, včetně čištění membrán a kontroly čerpadel, jsou rovněž podstatnými náklady. Některé procesy elektrodialýzy mohou vyžadovat použití chemikálií pro úpravu pH nebo odstranění usazenin na membránách. Personální náklady zahrnují mzdy, školení a další benefity pro kvalifikovaný personál [72-74].

Porovnání dialýzy s elektrodialýzou ukazuje, že elektrodialýza může být ekologicky efektivnější a ekonomicky výhodnější, což podporuje její využití v průmyslových aplikacích. Tabulka 5 poskytuje přehledné srovnání výhod a nevýhod dialýzy a elektrodialýzy.

Tabulka 5: Porovnání výhod a nevýhod u dialýzy a elektrodialýzy. Upraveno a převzato z: [75-79].

Metoda	Výhody	Nevýhody
Dialýza	Jednoduchá aparatura, která je rychle sestavitelná. Metoda je šetrná a nepoškozuje citlivé molekuly, je univerzální pro různé typy molekul a je široce dostupná.	Proces dialýzy je poměrně pomalý a omezený, separace podle na rozdílné molekulové hmotnosti. Metoda se často nevyužívá, může docházet ke zanesení membrány.
Elektrodialýza	Probíhá účinná separace iontů, lze snadno zvyšovat kapacitu. Metoda je úsporná z hlediska energie a široce se využívá pro různé aplikace.	Metoda je určena pouze pro iontové sloučeniny. Snadno může docházet ke zanesení membrány. Instalace zařízení je složitější než u dialýzy, s tím souvisí i vyšší pořizovací náklady. Elektrodialýza může způsobit změny pH.

2 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zavést a optimalizovat metodu mikroelektrodialýzy pro separaci proteinů a následně vyhodnotit účinnost separace na základě různých experimentálních podmínek. Konkrétní cíle byly následující:

1. Sestavení aparatury pro mikroelektrodialýzu a její správné nastavení pro separaci proteinů, včetně výběru vhodného typu membrán.
2. Optimalizace podmínek pro separaci jednotlivého proteinu (BSA), a to testováním různých parametrů, jako jsou pH, napětí a doba dialýzy, s cílem nalézt nejúčinnější podmínky pro separaci.
3. Ověření účinnosti separace směsi proteinů, zahrnující BSA a α -chymotrypsinogen A, a to za různých experimentálních podmínek.
4. Zhodnocení možnosti opakovaného použití membrán a jejich regenerace pro udržení efektivity separace.
5. Aplikace metody mikroelektrodialýzy pro separaci nenávaného proteinu při imobilizaci α -chymotrypsinogenu A (CHT α) na nanočástice z kyseliny hyaluronové (HANPS) a porovnání elektrodiálýzy se separací pomocí centrifugačních odsolovacích mikrokolon.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Seznam laboratorního vybavení

- Analytické váhy Scaltec SBC 32 (Scaltec Instruments, GmbH, Göttingen, Německo)
- Aparatura pro diskontinuální elektroforetickou separaci Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, CA, USA)
- Automatické pipety Eppendorf Research (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Centrifugační zařízení MiniSpin Plus (Merck, Eppendorf, Darmstadt, Německo)
- Destilační zařízení pro úpravu čistoty vody (zásobník s redestilovanou vodou) Halios 40 Type 1 (Neptec, Elbtal, Německo)
- Laboratorní třepačky: multifunkční Orbital Shaker PSU-20i (BioSan SIA, Riga, Lotyšsko), Vortex mixer Wx (VELP Scientifica, Usmate, Italy), Mini-rotátor Bio RS-24 (BioSan SIA, Riga, Lotyšsko)
- Magnetické míchadlo s ohřevem model MSH-300 (Biosan SIA., Riga, Lotyšsko)
- Mikrozkušavky (BioTech a.s., Praha, ČR a Eppendorf, Hamburg, Německo)
- pH metr model Orion 420 (Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA)
- Předvážky KERN 440-33N (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- Skla Mini-PROTEAN® Spacer Plates with 0,75 mm Integrated Spacers (Bio-Rad, CA, USA)
- Termostat (Biosan SIA., Riga, Lotyšsko)
- Zdroj napětí Power-Pac Basic (Bio-Rad, CA, USA)
- Zobrazovací systém pro denzitometrické vyhodnocení gelů G:BOX Chemi XX6 (CCD kamera s GeneSys a GeneTools softwarem) (Syngene, USA)
- UV/VIS spektrofotometr Libra S22 (Biochrom Ltd., UK)

Seznam laboratorního vybavení pro mikroelektrodialýzu

- PS300B Power Supply (Hoefer Inc., Bridgewater, MA, USA) – zdroj stejnosměrného napětí s možností nastavení konstantního napětí nebo proudu.
- Fast Micro-Equilibrium Dialyzers (mikroelektrodialyzéry, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA)

- Membrány pro mikroelektrodialýzu: Použity byly membrány z regenerované celulózy a celulóзовého acetátu s MWCO 2, 10, 25, 50 a 100 kDa. Membrány byly kompatibilní s mikro-dialyzéry od společnosti (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). Tyto membrány jsou vhodné pro rovnovážnou dialýzu malých objemů (25–1500 μ l) a jsou ideální pro separaci proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti.
- Dialyzační střívko z regenerované celulózy - Dialysis tubing, cut-off 14 kDa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Aparatura ElectroPrep Electrodialysis System (Harvard Apparatus, USA)

Seznam chemikálii

- 2x Laemmli Sample Buffer (roztok G, BioRad, CA, USA)
- Bradford Reagent (Bradfordovo činidlo, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Akrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Citronan sodný (LachNer, Neratovice, ČR)
- Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva, Heidelberg, Německo)
- Destilovaná voda, redestilovaná voda
- Dodecylsírán sodný, SDS (Lachema, Neratovice, ČR)
- Ethanol (96%, čistý, Penta, Chrudim, ČR)
- Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Kyselina citronová bezvodá (Lach-Ner, Neratovice, ČR)
- Kyselina octová (99% Penta, Chrudim, ČR)
- Methanol (Penta, Chrudim, ČR)
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin, TEMED (Bio-Rad, CA, USA)
- N,N'-methylen-bis-akrylamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Peroxodisírán amonný, APS (Penta, Chrudim, ČR)
- Standard molekulových hmotností (10–250 kDa) Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, CA, USA)

- α -chymotrypsinogen A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Pracovní roztoky

- 0,1M PBS pufr pH 7,4
- 0,1M glycinový pufr pH 3, 5, 7, 9
- 0,1M kyselina citronová
- 1M Tris-HCl, pH 9,4
- BSA 1 mg/ml v PBS pH 7,4
- BSA 1 mg/ml v 0,1M glycinovém pufru pH 3, 5, 7 a 9
- α -chymotrypsinogen A 1 mg/ml v 0,1M glycinovém pufru pH 3, 5, 7 a 9

3.1 Uspořádání mikrodialyzéru

Mikroelektrodialyzační aparatura byla sestavena pomocí dvou zařízení od firmy Harvard Apparatus – dialyzační jednotky mikrodialyzéru (Fast Micro-Equilibrium Dialyzer, FMED) a elektrodialyzačního systému ElectroPrep. Nejprve byl sestaven samotný mikrodialyzér, který se skládá minimálně ze dvou komor. Mezi tyto komory byla vložena membrána s definovanou mezní relativní molekulovou hmotností. Po vložení membrány byly komory sešroubovány. Do každé z komor byl následně přidán stejný objem roztoku – standardně 250 μ l. Dialyzační komora (obrázek 10a), prostor v komoře označován jako cela 1, do které byl pipetován roztok obsahující testovaný protein. Na horní okraj této komory byla poté opět umístěna membrána a komora byla uzavřena utáhnutím uzávěru.



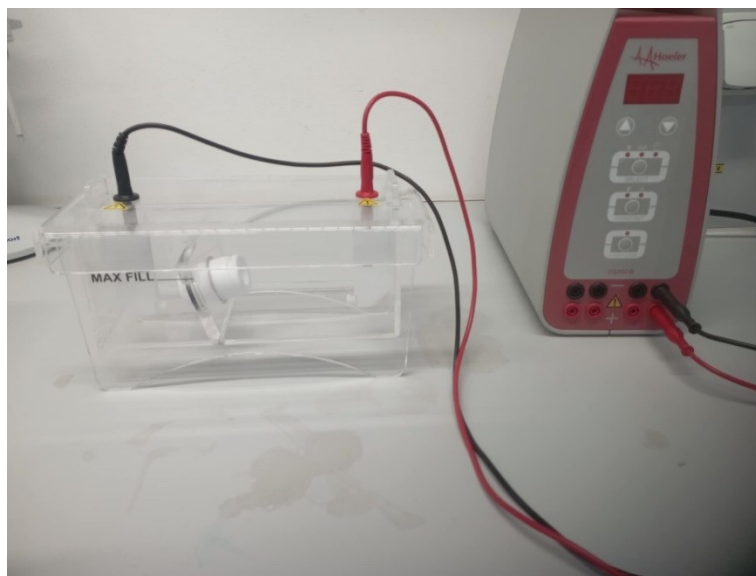
Obrázek 10: Dialyzační komory. a) dialyzační komora, b) spojovací komora.

Spojovací komora (obrázek 10b), prostor v komoře označován jako cela 2 do které byl pipetován dialyzační roztok – nejčastěji vhodný pufr o stejné hodnotě pH jako v okolním systému. Komora byla uzavřena druhou membránou a víčkem. Obě komory byly připraveny k vložení do elektrodialyzačního zařízení. K měření byly využívány mikrodialyzéry o objemu 250 μ l (mikroelektrodialýza jednoho proteinu a směsi proteinů) a 1500 μ l (mikroelektrodialýza pro separaci nenavázaného proteinu při imobilizaci α -chymotrypsinogenu A na nanočástice z kyseliny hyaluronové) viz obrázek 11.



Obrázek 11: Porovnání mikroelektrodialyzerů. 1500 μ l (vlevo) a 250 μ l (vpravo).

Kompletní dialyzér byl následně umístěn do aparatury ElectroPrep. Důležité bylo správné nasměrování: dialyzační komora byla orientována směrem ke katodě, zatímco spojovací komora směřovala k anodě (obrázek 12).



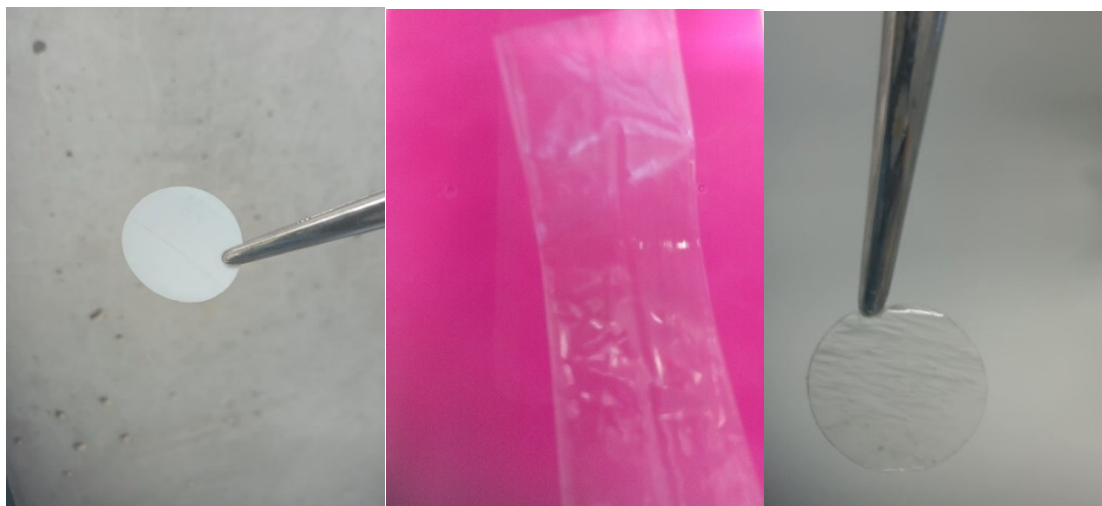
Obrázek 12: Zapojená aparatura pro mikroelektrodialýzu.

Vana pro elektrodialýzu byla následně naplněna elektrodo­vým pufr, a to tak, aby byly ponořeny obě komory dialyzéru. Použitý pufr měl shodné pH jako ten, který byl pipetován do spojovací

komory. Bylo nutné zajistit, aby uvnitř systému nezůstaly žádné vzduchové bubliny. Po správném usazení a naplnění byl systém připojen ke zdroji napětí Hoefler 300, kde byly nastaveny požadované podmínky (napětí, proud, čas).

3.2 Membrány

Pro experimenty byly použity dva typy polopropustných membrán, které se lišily jak materiálem, tak hodnotou MWCO. Membrány z acetát-celulózy byly využívány jako prostřední membrána mezi dialyzační a spojovací komorou, zatímco membrány z regenerované celulózy sloužily k uzavření celého mikroelektrodialyzačního systému z vnější strany. Před sestavením mikrodialyzéru byla mezi obě komory vložena membrána z acetát-celulózy s MWCO 100 kDa (obrázek 13a). Poté byly komory sešroubovány. Do dialyzační komory (cela 1) byl následně napipetován vzorek o definovaném objemu a koncentraci. Tato komora byla překryta membránou z regenerované celulózy s MWCO 10 kDa (obrázek 13c), nebo střívkem o MWCO 14 kDa (obrázek 13b) a utěsněna uzávěrem. Do spojovací komory (cela 2) byl přidán definovaný objem pufru. Komora byla překryta 10kDa membránou nebo 14kDa střívkem a opět utěsněna uzávěrem.



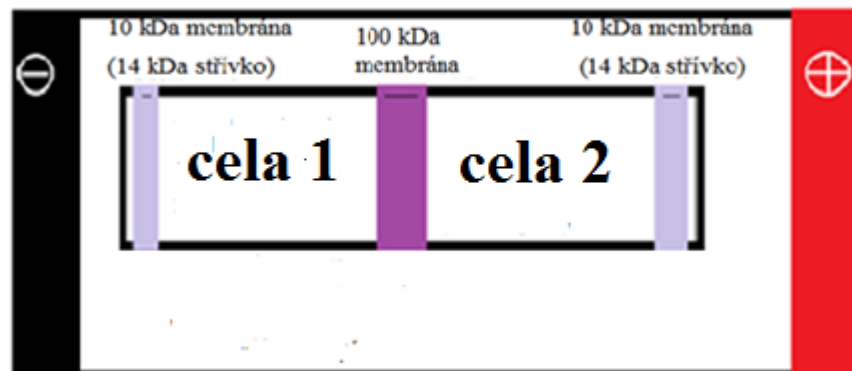
Obrázek 13: a) membrána z acetát-celulózy s MWCO 100 kDa, b) dialyzační střívko s MWCO 14 kDa, c) membrána z regenerované celulózy 10 kDa.

3.3 Mikroelektrodialýza roztoku jednoho proteinu

Použité roztoky

- roztok BSA 1 mg/ml v PBS pH 7,4
- roztok BSA 1 mg/ml v 0,1M glycinovém pufru pH 3 a 9
- 0,1M PBS pH 7,4
- 0,1M glycinový pufr pH 3 a pH 9

Roztok bovinního sérového albuminu (BSA) o koncentraci 1 mg/ml byl připraven v příslušném pufru. Mezi dvě komory mikroelektrodialyzéru byla vložena polopropustná membrána z acetát-celulózy s mezní relativní molekulovou hmotností (MWCO) 100 kDa a komory byly následně mechanicky spojeny. Do první cely bylo napipetováno 250 μ l roztoku BSA, otvor byl překryt membránou z regenerované celulózy s MWCO 10 kDa (případně střívkem s MWCO 14 kDa) a byla utěsněna uzávěrem. Do druhé cely bylo přidáno 250 μ l pufru, komora byla rovněž překryta membránou nebo střívkem a utěsněna uzávěrem. Mikroelektrodialyzér byl vložen do vany pro elektrodialýzu ElectroPrep tak, aby dialyzační komora (cela 1) směřovala k záporně nabitě elektrodě a spojovací komora (cela 2) ke kladně nabitě elektrodě viz obrázek 14.



Obrázek 14: Schéma mikroelektrodialyzéru.

Vana pro elektrodialýzu byla naplněna puftrem tak, aby byl mikroelektrodialyzér zcela ponořen. Vana byla připojena ke zdroji napětí. Měření probíhalo při proudu 5-30 mA, napětí 10-100 V a času 5-20 minut. Po každém měření byly použité membrány důkladně propláchnuty čerstvým puftrem. Při měřeních prováděných v prostředí o pH 3 bylo uspořádání komor obráceno, tedy dialyzační komora směřovala ke kladně nabitě elektrodě a spojovací komora k záporné. Po měření byly vždy odebrány frakce z obou komor a byla v nich stanovena koncentrace proteinů

metodou dle Bradfordové a byly analyzovány pomocí polyakrylamidové gelové elektroforézy v prostředí dodecylsulfátu sodného (SDS-PAGE).

3.3.1 Metoda stanovení celkové koncentrace proteinu dle Bradfordové

Chemikálie a roztoky

- Bradford Reagent (Bradfordovo činidlo, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- roztok BSA, α -chymotrypsinogenu A, oba v rozmezí koncentrace 0,1-1,25 mg/ml v 0,1 M glycinovém pufru pH 3, 5, 7, 9 a 0,1M PBS pH 7,2

Pracovní postup

Do mikrozkušavky o objemu 200 μ l bylo pipetováno 100 μ l proteinového roztoku k němu bylo přidáno 100 μ l Bradfordova činidla, obsah zkumavky byl promíchán na vortexu, vzorky byly přepipetovány do mikrotitrační destičky a inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 10 minut. Po inkubaci byla změřena absorbance vzorků na spektrofotometru při vlnové délce 595 nm. Z připravené kalibrační řady BSA byla následně vypočtena koncentrace proteinu ve vzorku před a po mikroelektrodialýze.

3.3.2 Polyakrylamidová gelová elektroforéza v prostředí dodecylsulfátu sodného

Chemikálie a roztoky

- Destilovaná voda
- Ethanol
- Roztok A (30% směs akrylamidu a bisakrylamidu)
- Roztok B (1,5M Tris-HCl, pH 8,8)
- Roztok C (1M Tris-HCl, pH 6,8)
- Roztok D (10% roztok SDS)
- Roztok E (10% roztok APS)
- TEMED
- Elektrodový pufr (0,025M Tris, 0,192M glycin, 0,1% SDS, pH 8,3–8,6)
- Fixační roztok (5% kyselina octová, 50% ethanol)
- Roztok barviva Coomassie Blue (0,001% Coomassie Brilliant Blue R-250, 50% methanol, 10% kyselina octová)
- Odbarvovací roztok (0,1% kyselina octová, 14% methanol)

Pracovní postup:

Skla pro gely byla omyta, očištěna ethanolem a upevněna do stojánku, spodní strana zalepena parafilmem. Byly smíchány roztoky pro přípravu gelů dle tabulky 6. Byl připraven 12% dělicí gel a 5% zaostřovací gel. Jako první byl pipetován dělicí gel mezi skla, byl převrstven destilovanou vodou, dokud nedošlo k polymerizaci, poté byla voda odsáta filtračním papírem. Následně byl na pipetován zaostřovací gel. Poté byl vložen hřebínek pro vytvoření jamek pro dávkování vzorků. Tabulka 6: Příprava dělicího a zaostřovacího gelu

Roztok	Destilovaná voda	Roztok A	Roztok B	Roztok C	Roztok D	Roztok E	TEMED
12% dělicí gel (na 2 gely)	3,36 ml	4 ml	2,5 ml	-	0,1 ml	0,1 ml	0,004 ml
5% Zaostřovací gel (na 2 gely)	2,1 ml	0,5 ml	-	0,375 ml	0,03 ml	0,03 ml	0,003 ml

Vzorky z jednotlivých frakcí byly pipetovány po 10 μ l do mikrozkuavek, ke kterým bylo přidáno 10 μ l roztoku G. Poté byly vzorky inkubovány 3 minuty v termobloku při 100 °C.

Po přípravě byly gely umístěny do elektroforetické vany, hřebínek vytažen a jamky propláchnuty elektroforetickým pufrem. Vzorky byly nanесeny do jamek, elektroforéza probíhala při napětí 180 V, 30 mA na každý gel po dobu 60 minut. Hotové gely byly opláchnuty destilovanou vodou, vložily se do misek s fólií a navlhčenými papírovými utěrkami. Gely mohly být ihned použity, nebo se uchovávaly při 4 °C.

Po elektroforéze byly gely fixovány fixačním roztokem po dobu 30 minut, následně rehydratovány 30 minut v destilované vodě. Poté byly 10 minut barveny roztokem Coomassie Brilliant Blue a následně promývány v odbarvovacím roztoku, který byl několikrát vyměněn. Vizualizace proteinových pruhů proběhla pomocí stanice G:BOX a programu GeneSys.

3.4 Mikroelektrodialýza směsi proteinů

Pracovní roztoky

- 0,1M glycinový pufr pH 3, 5, 7, 9
- roztok BSA o koncentraci 0,1-1,25 mg/ml v 0,1M glycinovém pufru pH 3, 5, 7 a 9
- roztok α -chymotrypsinogenu A o koncentraci 0,1-1,25 mg/ml v 0,1M glycinovém pufru pH 3, 5, 7 a 9

Roztoky proteinů BSA a α -chymotrypsinogenu A, oba o koncentraci 1 mg/ml, byly vždy připravovány v pufru, který byl následně použit i pro vlastní měření. Mezi obě komory mikrodialyzéru byla vložena membrána z acetát-celulózy s MWCO 100 kDa, komory byly sešroubovány. Do cely 1 (dialyzační komora) bylo napipetováno 125 μ l roztoku BSA a 125 μ l roztoku α -chymotrypsinogenu A, komora byla překryta membránou z regenerované celulózy s MWCO 10 kDa a utěsněna uzávěrem. Do cely 2 (spojovací komora) bylo napipetováno 250 μ l příslušného pufru, komora byla překryta membránou s MWCO 10 kDa a utěsněna uzávěrem. Schéma mikrodialyzéru viz obrázek 14. Při měřeních prováděných v prostředí 0,1M glycinového pufru o pH 3 bylo uspořádání komor obráceno, tedy dialyzační komora směřovala ke kladně nabitě elektrodě a spojovací komora k záporné, toto uspořádání bylo použito i u všech měření se změnou koncentrace (0,1M glycinový pufr pH 5, 7, 9). Takto připravený mikrodialyzér byl vložen do systému ElectroPrep tak, aby byl plně ponořen v příslušném pufru. Vana byla připojena ke zdroji napětí. Měření probíhalo při proudu 5-30 mA, napětí 10-120 V a času 5-20 minut a bylo použito rozmezí koncentrací proteinu 0,1-1,25 mg/ml. Byly optimalizovány parametry (proud, napětí a čas). Po měření byly vždy odebrány frakce z obou komor a byla v nich stanovena koncentrace proteinů metodou dle Bradfordové a byly analyzovány pomocí SDS-PAGE.

3.5 Opakované použití membrán a jejich regenerace

Pracovní roztoky

- 0,1M glycinový pufr pH 9
- BSA 1 mg/ml v 0,1M glycinovém pufru pH 9
- α -chymotrypsinogen A 1 mg/ml v 0,1M glycinovém pufru pH 9
- 0,1M kyselina citronová

Bylo testováno opakované použití membrán při mikroelektrodialýze směsi proteinů (1 mg/ml BSA a CHT α), jak je popsáno v kapitole 3.4. Postup odpovídal standardnímu uspořádání aparatury, přičemž byl použit 0,1M glycinový pufr o pH 9. Měření probíhalo při napětí 100 V po dobu 10 minut, s postupným zvyšováním proudu. Při prvním měření nebyla prostřední membrána s MWCO 100 kDa během celého experimentu měněna, pouze omývána 0,1M glycinovým pufrům pH 9, zatímco při druhém cyklu měření byla tato membrána vyměněna po každém zvýšení proudu. Po měření byly vždy odebrány frakce z obou komor a byla v nich stanovena koncentrace proteinů metodou dle Bradfordové a byly analyzovány pomocí SDS-PAGE.

Regenerace membrán

Použité membrány byly ponořeny do 0,1 M kyseliny citronové, která působí jako denaturační a čistící roztok, a následně byly umístěny do ultrazvukové lázně na dobu 30 minut. Po sonikaci byly membrány důkladně opláchnuty destilovanou vodou, aby se odstranily zbytky kyseliny a uvolněných látek. Z regeneračního roztoku 0,1 M kyselina citronová, ve kterém byly membrány ponořeny, bylo odebráno 100 μ l vzorku, který byl následně ověřen metodou Bradfordové. Tato analýza sloužila ke kvantitativnímu ověření, zda došlo k uvolnění proteinu z membrán.

3.6 Mikroelektrodialýza suspenze nanočástic z kyseliny hyaluronové s imobilizovaným α – chymotrypsinogenem A – oddělení nenavázaného proteinu

Pracovní roztoky

- 0,1M glycinový pufr pH 5
- 0,9% roztok NaCl

Nanočástice z kyseliny hyaluronové s imobilizovaným α – chymotrypsinogenu A byly připraveny v rámci jiné výzkumné práce. Obdržela jsem dva vzorky nanočástic, na kterých bylo imobilizováno 200 a 500 μ g CHT α . Částice byly připravovány ve vyšším pH, proto bylo nezbytné upravit podmínky prostředí na hodnoty pH mezi 5 a 6, vhodné pro následnou mikroelektrodialýzu. Průchodnost α – chymotrypsinogenu A v 0,1M glycinovém pufru s pH 5 byla již testována v rámci kapitoly 3.4. Vzorky byly naředěny na celkový objem 1000 μ l pomocí roztoku NaCl 0,9 %. Ke každému vzorku bylo následně přidáno 500 μ l 0,1 M glycinového pufru pH 5. Vzorek byl pipetován do cely 1 (dialyzační komora) mikroelektrodialyzační aparatury, následně byla komora překryta membránou s MWCO 10 kDa a utěsněna uzávěrem. Do cely 2 (spojovací komora) bylo přidáno 1000 μ l 0,9% roztoku NaCl a 500 μ l stejného glycinového pufru pH 5, opět byla komora překryta membránou s MWCO 10 kDa a utěsněna uzávěrem. Komory byly k sobě sešroubovány, takto připravený mikrodialyzér byl vložen do systému ElectroPrep tak, aby byl plně ponořen v příslušném pufru. Uspořádání mikrodialyzéru je zobrazeno na obrázku 14 a mikrodialyzér pro toto měření na obrázku 11 (vlevo). Mikroelektrodialýza probíhala za podmínek: proud 30 mA, napětí 100 V a čas 10 minut. Po ukončení separace byly 2 frakce ze spojovacích komor odebrány a analyzovány pomocí SDS-PAGE. Před dávkováním na gel byly frakce zakoncentrovány na objem 200 μ l. Na závěr bylo provedeno měření pomocí dynamického rozptylu světla (DLS).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem diplomové práce bylo zavést metodu mikroelektrodialýzy a optimalizovat podmínky pro účinnou separaci proteinů. Testovány byly různé parametry mikroelektrodialýzy, konkrétně napětí, proud a doba dialýzy, a to jak pro jeden protein, tak pro směs modelových proteinů. V tabulce 7 jsou uvedeny shrnuté experimenty realizované v rámci této diplomové práce a optimalizované parametry. V případě mikroelektrodialýzy roztoku jednoho proteinu byl použit hovězí sérový albumin (BSA), v případě modelové směsi BSA a chymotrypsinogen (CHT α). V posledním experimentu byla ověřena využitelnost mikroelektrodialýzy pro separaci nanočástic z kyseliny hyaluronové s imobilizovaným CHT α a volného nenavázaného CHT α . Pro tento účel je v laboratoři využívána dialýza v obvyklém uspořádání, která je časově náročná a pro tyto aplikace má mikroelektrodialýza velký potenciál.

Tabulka 7: Přehled experimentálních podmínek použitých při mikroelektrodialýze.

Separované proteiny	Účel	Testované parametry		
		Napětí (V)	Proud (mA)	Čas (min)
1 protein - BSA	Účinnost dialýzy	100	30	10
	Optimalizace času	100	30	5-20
	Optimalizace proudu	100	5-30	10
	Optimalizace napětí	10-100	30	10
Směs BSA + CHT α	Účinnost dialýzy	100	30	10
	Optimalizace času	100	30	5-20
	Optimalizace proudu	100	5-30	10
	Optimalizace napětí	10-120	30	10
CHT α + HANPs	Účinnost separace	100	30	10

Po mikroelektrodialýze byla hodnocena její účinnost stanovením koncentrace proteinů v jednotlivých frakcích metodou dle Bradfordové. Pro každou analýzu byla zároveň se vzorky měřena kalibrační řada standardů a výsledky byly vždy kalkulovány dle odpovídající rovnice regrese. Pro ověření, zda během mikroelektrodialýzy nedochází ke strukturním změnám separovaných proteinů, byla použita metoda polyakrylamidové gelové elektroforézy (SDS-PAGE).

4.1 Optimalizace parametrů mikroelektrodialýzy s roztokem jednoho modelového proteinu

Cílem byla optimalizace parametrů mikroelektrodialýzy, konkrétně pH dialyzačního roztoku, elektrického napětí, proudu a času. Proto byl pro první experimenty použit jen jeden modelový protein, a to hovězí sérový albumin (BSA). Experiment byl navržen tak, aby bylo možné určit ideální podmínky pro efektivní průchod proteinu přes membránu, a to při různém elektrickém napětí, proudu, čase a pH prostředí.

Pro optimalizaci napětí bylo provedeno měření při proudu 30 mA po dobu 10 minut a měnila se hodnota napětí v rozmezí 10-50 V. Pro optimalizaci proudu bylo měření provedeno při konstantním napětí 100 V po dobu 10 minut a měnila se hodnota proudu v rozmezí 5-30 mA. Pro optimalizaci doby trvání bylo provedeno měření při 30 mA a napětí 100 V, byly vyzkoušeny časy 5 a 10 minut. Experimenty byly provedeny v dialyzačních roztocích o pH 3; 7,4 a 9).

Roztok BSA byl aplikován v koncentraci 1 mg/ml (postup viz kapitola 3.3). Byl připraven v 0,1M glycinovém pufru s pH 9 a pipetován na anodickou stranu mikroelektrodialyzéru dle obrázku mikroelektrodialyzéru 14 (cela 1); na katodické straně byl stejný pufr (cela 2). Pro testování vlivu pH byly použity roztoky BSA v 0,1M PBS pufru (pH 7,4) a 0,1M glycinovém pufru (pH 3). Pro měření v pH 7,4 byl roztok BSA pipetován stejně jako při měření v pH 9, zatímco při měření v pH 3 byl roztok BSA pipetován na katodickou stranu a pufr na anodickou. Po mikroelektrodialýze byly odebrány frakce z cel na obou stranách membrány a ve frakcích byla stanovena koncentrace proteinu metodou dle Bradfordové. Současně se vzorky byla analyzována i kalibrační řada a výsledky kalkulovány dle odpovídající rovnice regrese a vyčíslena účinnost v procentech. Stabilita proteinu po mikroelektrodialýze byla ověřena pomocí SDS PAGE.

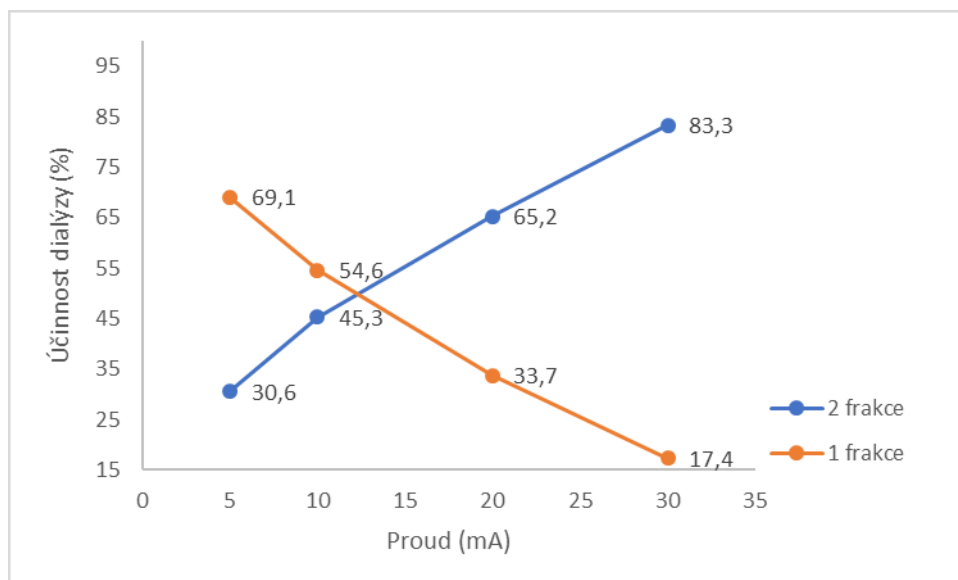
Optimalizace proudu

Pro optimalizaci proudu byl použit protein BSA o koncentraci 1 mg/ml v 0,1M glycinovém pufru pH 9, jak bylo uvedeno výše, byl dávkován do cely 1 mikroelektrodialyzéru, do cely 2 byl dávkován 0,1M glycinový pufr pH 9 viz obrázek 14. Membrány nebyly měněny při postupném zvyšování proudu. Ostatní parametry mikroelektrodialýzy jako je napětí a čas měření byly pro výchozí experimenty zvoleny na základě parametrů uvedených v článku [80] (napětí 100 V a doba dialýzy 10 minut). V daném experimentu nebyl na polyakrylamidový gel z důvodu zaplnění vzorky, dávkován standard molekulových hmotností (obrázek 15). Nicméně při

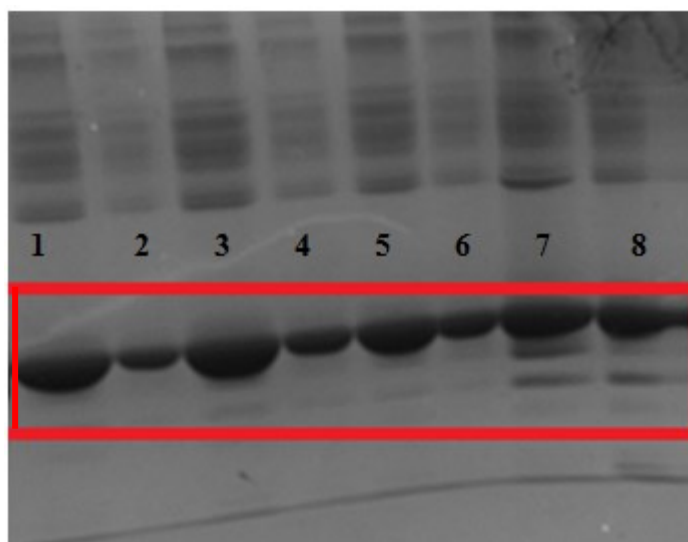
porovnání s dalšími gely ze stejné analýzy je charakter a pozice proteinu BSA odpovídající. Pro orientační ověření tak i tato analýza byla použita.

Z naměřených absorbancí byly následně z regresní rovnice $y = 0,1803x + 0,4596$ dopočítány koncentrace BSA v jednotlivých frakcích a přepočítány na účinnost dialýzy.

Z výsledku testování různých hodnot proudu (viz graf 1) je patrné, že s rostoucím proudem dochází k postupnému zvyšování účinnosti dialýzy, a tedy efektivnímu transportu molekul BSA přes dialyzační membránu s MWCO 100 kDa. Toto bylo potvrzeno i elektroforézou obrázků 15. Tento trend byl dle očekávání, kdy vyšší proud podporuje rychlejší pohyb iontů a molekul. Jako optimální byl stanoven proud 30 mA, dalším zvyšováním již nedocházelo ke zvýšení účinnosti. Tato hodnota proudu byla používána pro další experimenty.



Graf 1: Závislost účinnosti mikroelektrodialýzy pro optimalizaci proudu. Modelový protein BSA v 0,1M glycinovém pufru pH 9, 1 frakce BSA (množství proteinu, které zůstalo v cele 1), 2 frakce BSA (množství proteinu, které prošlo membránou do cely 2).



Obrázek 15: Výsledek SDS-PAGE separace frakcí po mikroelektrodialýze – optimalizace proudu. Modelový protein BSA v 0,1M glycinovém pufru pH 9. 1. 1 frakce 5 mA, 2. 2 frakce 5 mA, 3. 1 frakce 10 mA, 4. 2 frakce 10 mA, 5. 1 frakce 20 mA, 6. 2. frakce 20 mA, 7. 1 frakce 30.

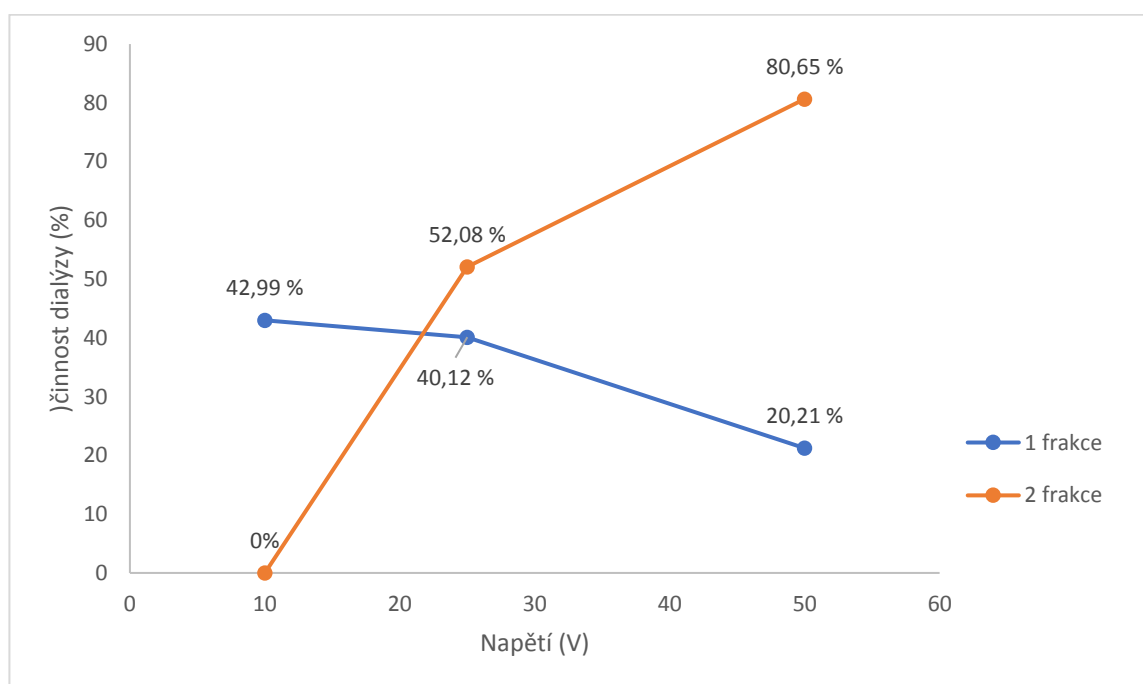
Optimalizace času a napětí

Pro optimalizaci času mikroelektrodialýzy a napětí byl použit opět modelový protein BSA o koncentraci 1 mg/ml připravený v 0,1M glycinovém pufru o pH 9. Roztok BSA byl pipetován do cely 1 mikroelektrodialyzéru, zatímco do cely 2 byl pipetován samotný pufr. Průchod BSA probíhal přes membránu s MWCO 100 kDa. Mezi jednotlivými měřeními nebyly membrány měněny, aby byly podmínky měření stejné jako u proudu. Při optimalizaci doby bylo napětí nastaveno na 100 V a proud na 30 mA, jak bylo stanoveno jako optimální v předchozích experimentech. Naopak při optimalizaci napětí byla doba experimentu fixována na 10 minut a proud 30 mA. Z naměřených absorbancí byly následně z regresní rovnice $y = 0,1726x + 0,4628$ dopočítány koncentrace BSA v jednotlivých frakcích a přepočítány na účinnost dialýzy.

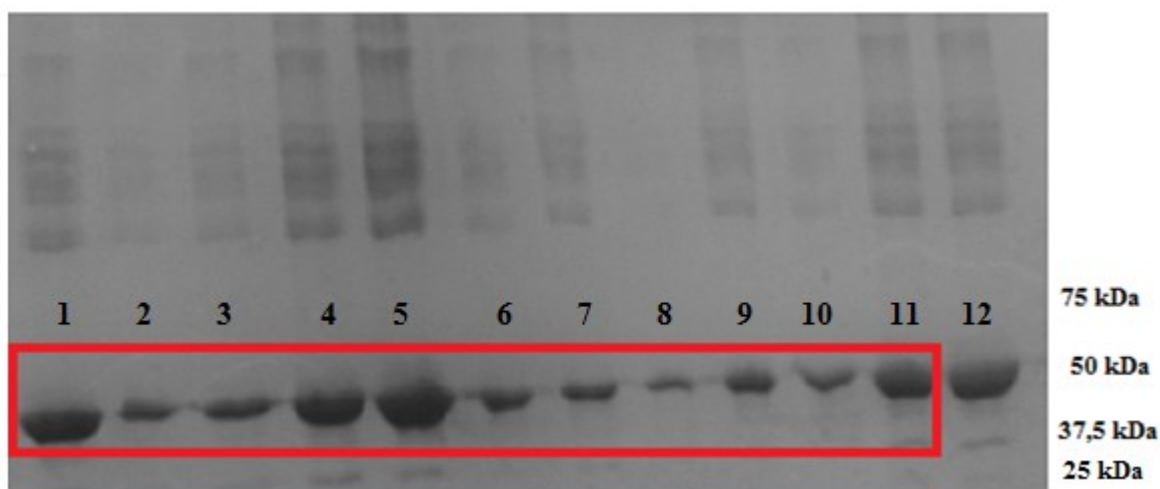
Z výsledků testování doby mikroelektrodialýzy (5 a 20 minut) bylo zjištěno, že při 5 minutách měření prošlo přes 100 kDa dialyzační membránu 55,4 % BSA do cely 2, v první cele zůstalo 44,5 % BSA. V případě doby 20 minut přes 100 kDa dialyzační membránu do cely 2 prošlo 60,6 % BSA a v cele 1 zůstalo 38,9 % BSA. Na základě těchto výsledků bylo zjištěno, že s prodloužující dobrou měření se zvyšuje průchodnost BSA do cely 2. Výsledky elektroforézy (obrázek 16) potvrdily, že mikroelektrodialýza nijak neovlivnila stabilitu proteinu a byly potvrzeny i výsledky metody stanovení koncentrace v jednotlivých frakcích. Gely nebyly denzitometricky

vyhodnoceny pro určení účinnosti mikroelektrodialýzy v %, jako přesné byly hodnoceny výsledky kvantitativní metody dle Bradfordové. Nejvyšší průchodnost (83 %) BSA do cely 2 byla při 10 minutách, jak bylo nastaveno při měření optimalizace proudu. Při dalších měřeních byla proto nastavena doba dialýzy na 10 minut jako optimální.

Z výsledků testování různých hodnot napětí (viz graf 2) je patrné, že s rostoucím napětím dochází k postupnému zvyšování účinnosti dialýzy, a tedy efektivnímu průchodu molekul BSA přes membránu. Tento trend byl dle očekávání, jelikož vyšší napětí podporuje rychlejší pohyb iontů a molekul. Optimální napětí bylo stanoveno na 100 V, při kterém byla dosažena nejvyšší účinnost bez známek poškození proteinu na základě výsledků získaných při optimalizaci proudu (průchodnost BSA do cely 2 83 %). Při použití vyššího napětí se snižovala účinnost (nižší koncentrace BSA v cele 1). Elektroforéza (Obrázek 16) potvrzuje, že při vyšším napětí dochází k výraznějšímu průchodu BSA mezi frakcemi. Optimální napětí 100 V bylo stanoveno jako optimální pro další experimenty.



Graf 2: Závislost účinnosti mikroelektrodialýzy pro optimalizaci napětí. Modelový protein BSA v 0,1M glycinovém pufru pH 9, 1 frakce BSA (množství proteinu, které zůstalo v 1 cele), 2 frakce BSA (množství proteinu, které prošlo membránou do cely 2).



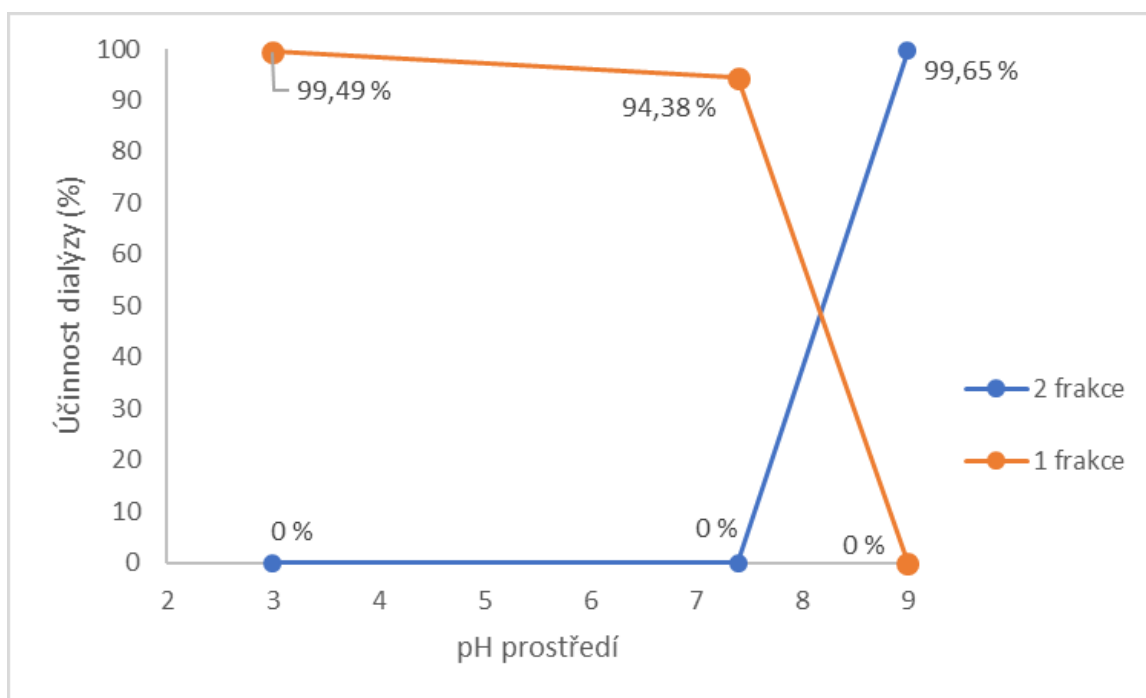
Obrázek 16: Výsledek SDS-PAGE separace frakcí po mikroelektrodialýze – optimalizace času a napětí. Modelový protein BSA v 0,1M glycinovém pufru pH 9. **1. 2 frakce 20 min, 2. 1 frakce 20 min, 3. 2 frakce 5 min, 4. 1 frakce 5 min, 5. 2 frakce 50 V, 6. 1 frakce 50 V, 7. 2 frakce 25 V, 8. 1 frakce 25 V, 9. 2 frakce 10 V, 10. 1 frakce 10 V, 11. standard BSA c = 1 mg/ml pufr pH 9, 12. molekulový marker.** (12% gel, dávkováno 10 μ l/jamku, barveno Coomassie Brilliant Blue).

Optimalizace pH prostředí

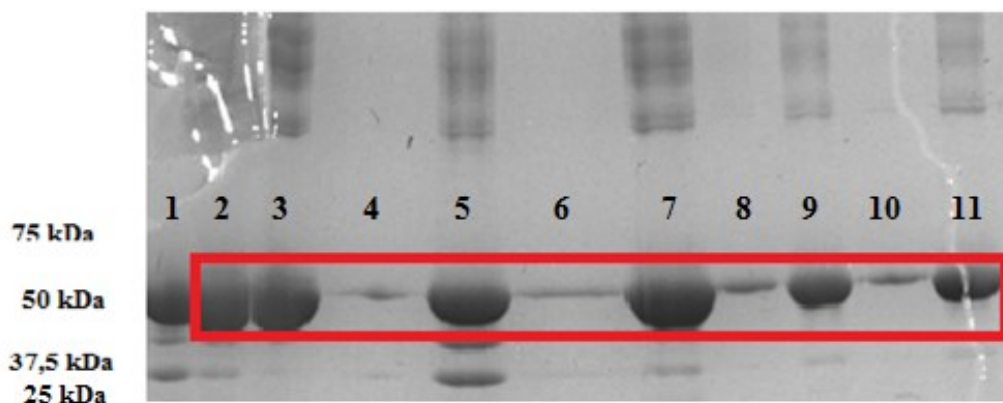
Pro optimalizaci pH prostředí byl použit stejný modelový protein BSA o koncentraci 1 mg/ml, který byl připraven ve třech různých pufrch: 0,1M glycinovém pufru pH 9; 0,1M fosfátovém pufru (PBS) pH 7,4 a 0,1M glycinovém pufru pH 3. Vzorky měřené v pH 9 a pH 7,4 byly pipetovány do cely 1 a pufr do cely 2. U varianty s pH 3 bylo uspořádání na dávkování opačné, komory mikroelektrodialyzéru byly prohozeny, dávkování do cel bylo ale stejné. Mezi jednotlivými měřeními byly membrány měněny, aby byly podmínky měření stejné pro každé pH. Bylo vyzkoušeno i měření s použitím dialyzačního střívka z regenerované celulózy s MWCO 14 kDa, ale jen pro měření v pH 3 a 9. Ve všech případech probíhala mikroelektrodialýza za optimalizovaných podmínek stanovených předchozím testováním: proud 30 mA, napětí 100 V, doba dialýzy 10 minut. Z naměřených absorbancí byly následně z regresní rovnice $y = 0,1719x + 0,4646$ dopočítány koncentrace BSA v jednotlivých frakcích a přepočítány na účinnost dialýzy.

Vliv pH na účinnost dialýzy byl testován v 0,1M glycinovém pufru s pH 3, 9 a 0,1M PBS pH 7,4 (graf 3). Výsledky ukazují, že pH prostředí má zásadní vliv na účinnost dialýzy, přičemž nejvyšší účinnost byla dosažena při pH 9. Toto je pravděpodobně způsobeno konformací BSA a jeho nábojem v alkalickém prostředí. BSA má izoelektrický bod (pI) 4,7, což znamená, že při pH 9 je protein silně negativně nabitý a snadněji migruje v elektrickém poli k anodě. Při pH 7,4 byla účinnost dialýzy nízká, protože BSA má menší negativní náboj, což zpomaluje migraci.

Při pH 3, které je blízko pI BSA, je protein elektroneutrální, což významně omezuje jeho pohyblivost, čímž se snižuje účinnost dialýzy. SDS-PAGE (Obrázek 17) tento závěr potvrdila – při pH 9 byla pozorována efektivní separace (do 2 cely při pH 9), zatímco při pH 3 (cela 2) byla separační účinnost výrazně nižší, což se projevilo slabšími proužky BSA na gelu (jamka 4 a 6). Při měřeních, kde byla použita střívka, bylo při pH 9 detekováno 99,73 % BSA v cele 2 zatímco při pH 3 98,52 %. V obou případech bylo v 1 frakci detekováno 0 % BSA, což potvrzuje úplný průchod proteinu do cely 2, potvrzeno elektroforézou obrázek 18. Bylo prokázáno, že nejvyšší účinnosti mikroelektrodialýzy BSA je dosaženo při pH 9, kdy je protein silně negativně nabitý a nejlépe migruje v elektrickém poli k anodě, tento závěr dále posloužil pro mikroelektrodialýzy směsi proteinů.



Graf 3: Závislost účinnosti mikroelektrodialýzy pro optimalizaci pH (měření s bočními membránami MWCO 10kDa). Modelový protein BSA v 0,1M glycinovém pufru pH 9, 1 frakce BSA (množství proteinu, které zůstalo v 1 cele), 2 frakce BSA (množství proteinu, které prošlo membránou do cely 2).



Obrázek 17: Výsledek SDS-PAGE separace frakcí po mikroelektrodialýze – optimalizace pH (měření se střívkou). Modelový protein BSA v 0,1M glycinovém pufru pH 9. 1. Molekulový marker, 2. standard BSA $c = 1 \text{ mg/ml}$ pufr pH 3, 3. 1 frakce použity membrány pufr pH 3, 4. 2 frakce použity membrány pufr pH 3, 5. 1 frakce použity střívka pufr pH 3, 6. 2 frakce použity střívka pufr pH 3, 7. standard BSA $c = 1 \text{ mg/ml}$ pufr pH 9, 8. 1 frakce použity membrány pufr pH 9, 9. 2 frakce použity membrány pufr pH 9, 10. 1 frakce použity střívka pufr pH 9. (12% gel, dávkováno 10 μl /jamku, barveno Coomassie Brilliant Blue).

4.3 Optimalizace parametrů mikroelektrodialýzy s roztokem modelové směsi proteinů

Cílem byla optimalizace parametrů při mikroelektrodialýze pro účinnou separaci modelové směsi dvou proteinů – hovězího sérového albuminu (BSA) a α -chymotrypsinogenu (CHT α). Experiment byl navržen tak, aby stanovil ideální podmínky pro selektivní průchodnost obou proteinů skrze 100 kDa dialyzační membránu, a to při různém elektrickém napětí, proudu, čase a pH prostředí. Bylo využito potvrzené účinnosti mikroelektrodialýzy s ohledem na rozdílný pI separovaných proteinů, a tedy rozdílného náboje v různém pH prostředí. BSA má pI přibližně 4,7, zatímco CHT α přibližně 8,75, což znamená, že v určitých podmínkách nesou opačné náboje a v elektrickém poli se pohybují opačnými směry. Na základě předchozích experimentů s BSA byly jako výchozí optimální podmínky zvoleny: proud 30 mA, napětí 100 V a doba trvání 10 minut. Zároveň byly experimenty provedeny v prostředí 0,1M glycinovém pufru s pH 9, protože v předešlých experimentech se potvrdilo, že je vněm nejvyšší průchodnost BSA. Všechny experimenty byly několikrát opakovány (minimálně 2x).

Optimalizované parametry:

- Elektrické napětí v rozmezí 10-120 V (měření při 30 mA po dobu 10 minut).
- Elektrický proud v rozmezí 5-20 mA (měření při 100 V po dobu 10 minut).
- Doba trvání, 5 a 20 minut (měření při 100 V a 30 mA).

- pH prostředí v 0,1M glycinovém pufru pH 3;5;7 a 9 (měření při 30 mA, 100 V a po dobu 10 minut).
- Koncentrace v rozmezí 0,1-1,25 mg/ml (měření při 30 mA, 100 V a po dobu 10 minut).

Koncentrace proteinů byla standardně 1 mg/ml, roztoky byly připravovány v příslušném pufru (0,1M glycinový pufr pH 3, 5, 7, 9), měření bylo provedeno dle postupu v kapitole 3.4. Při klasickém uspořádání byla směs pipetována do cely 1 a pufr do cely 2. Při opačném uspořádání byly prohozeny komory, dávkování do cel zůstalo stejné. Obě uspořádání byla využita pro měření s 0,1M glycinovým pufrům o pH 3; 5; 7 a 9. Po mikroelektrodialýze byly odebrány frakce na obou stranách membrány a ve frakcích byla stanovena koncentrace proteinu metodou dle Bradfordové. Současně se vzorky byla analyzována i kalibrační řada a výsledky kalkulovány dle odpovídající rovnice regrese (viz níže) a vyčíslena účinnost v procentech. Stabilita proteinu po mikroelektrodialýze byla ověřena pomocí SDS PAGE.

Regresní rovnice pro BSA:

- $y = 0,1926x + 0,4626$ (měření v 0,1M glycinovém pufru pH 3)
- $y = 0,1757x + 0,4626$ (měření v 0,1M glycinovém pufru pH 9)
- $y = 0,1709x + 0,5025$ (měření v 0,1M glycinovém pufru pH 5)

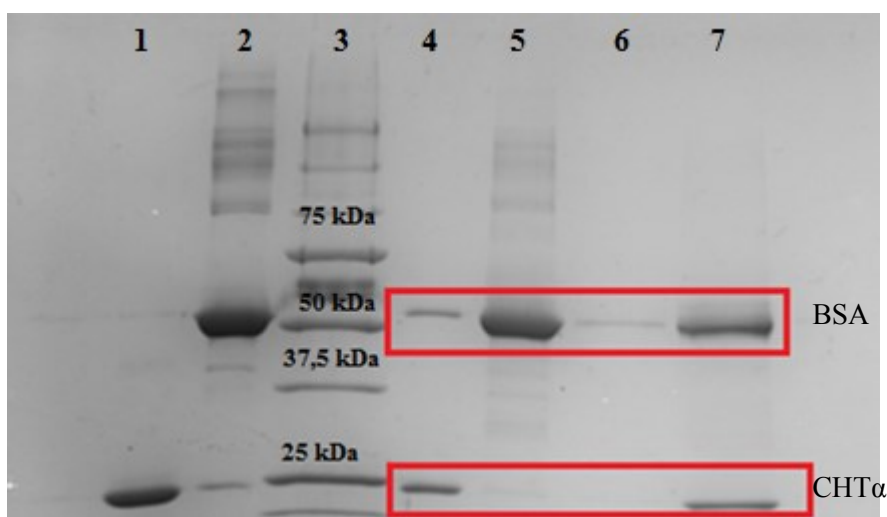
Regresní rovnice pro CHT α :

- $y = 0,1961x + 0,4753$ (měření v 0,1M glycinovém pufru pH 9)
- $y = 0,1857x + 0,4862$ (měření v 0,1M glycinovém pufru pH 3)
- $y = 0,1823x + 0,4781$ (měření v 0,1M glycinovém pufru pH 5)

Optimalizace pH prostředí

Pro optimalizaci pH prostředí byla použita směs proteinů BSA a CHT α , oba o koncentraci 1 mg/ml, připravená v 0,1M glycinovém pufru o pH 3 a pH 9 (viz kapitola 3.4). Cílem bylo zjistit, zda lze na základě rozdílného pI obou proteinů dosáhnout jejich účinné separace v elektrickém poli – BSA má pI přibližně 4,7, CHT α přibližně 8,75. Pro měření v pH 9 bylo použito klasické uspořádání: směs proteinů byla pipetována do cely 1 a pufr do cely 2. Pro pH 3 bylo použito opačné uspořádání, komory byly prohozeny ale dávkování do cel zůstalo stejné. Mezi jednotlivými měřeními byla měněna prostřední 100 kDa dialyzační membrána. Ve všech případech probíhala mikroelektrodialýza za předem optimalizovaných podmínek stanovených

předchozími experimenty: proud 30 mA, napětí 100 V, doba dialýzy 10 minut. Z předchozích měření bylo rovněž známo, že BSA vykazuje nejvyšší průchodnost v 0,1M glycinovém pufru o pH 9. Po ukončení dialýzy byly frakce analyzovány pomocí metody Bradfordové a SDS-PAGE. Koncentrace proteinů byly kalkulovány z odpovídajících regresních rovnic kalibračních řad analyzovaných společně se vzorky při každém experimentu. Následně byla na základě těchto hodnot stanovena účinnost přenosu a separace obou proteinů. Při pH 3 nebyl v cele 1 detekován žádný z proteinů – BSA i CHT α měly koncentraci 0 %. V cele 2 však byla účinnost přenosu velmi vysoká: 93,43 % pro BSA a 96,39 % pro CHT α . Naopak při pH 9 byly výsledky opačné, dle předpokladu. V cele 1 zůstal CHT α pouze z 4,82 %, BSA zde nebyl detekován (0 %). V cele 2 dosáhl BSA účinnosti 99,31 %, a CHT α měl 86,11 %. Na základě těchto výsledků a SDS-PAGE (obrázek 18) je patrné, že při pH 9, výrazně pod pI CHT α a nad pI BSA došlo k lepší separaci proteinů než při pH 3. BSA, který má při tomto pH záporný náboj, migroval směrem k anodě, zatímco CHT α byl blízko svého izoelektrického bodu, a je tím pádem méně pohyblivý. Naopak při pH 3, tedy pod pI obou proteinů, byly oba proteiny kladně nabitě. Ale protože CHT α má pI 8,75, byl při tomto pH kladně nabitý na rozdíl od BSA, který je při pH 3 blízko svého pI 4,7 a tudíž méně nabitý. CHT α se tedy v tomto případě pohyboval výrazněji směrem ke katodě, což přispělo k lepší separaci, než by se mohlo zdát podle pouhého rozdílu náboje.



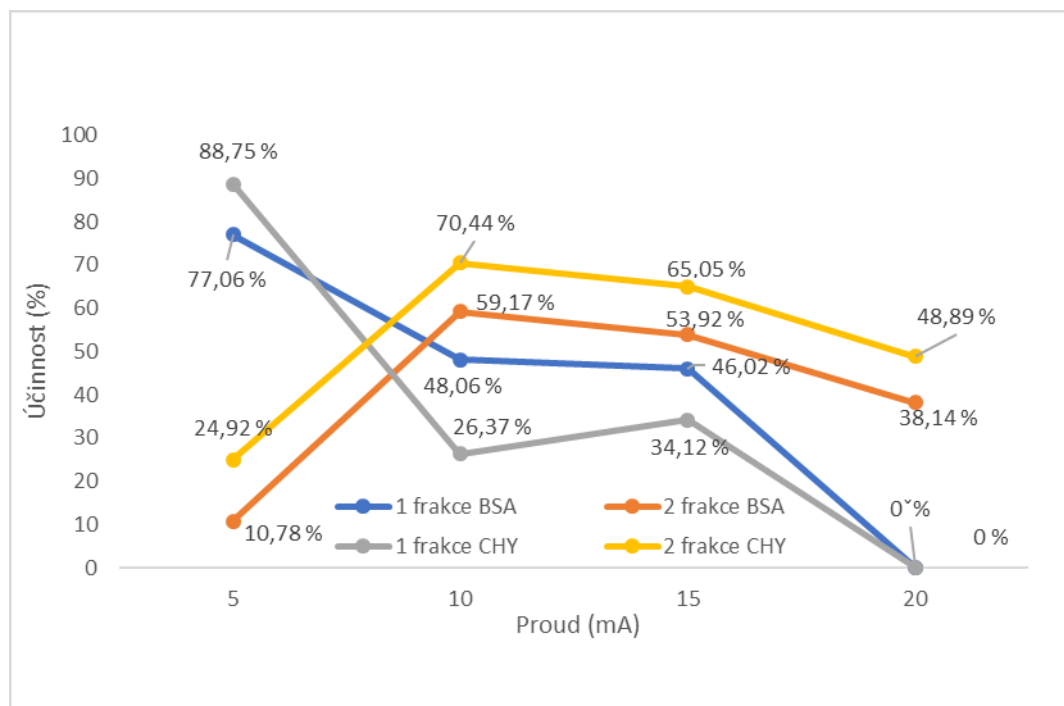
Obrázek 18: Výsledek SDS-PAGE separace frakcí po mikroelektrodialýze – optimalizace pH. Modelová proteinová směs BSA, CHT α v 0,1M glycinovém pufru pH 3 a 9. **1.** standard CHT α c = 1 mg/ml, **2.** standard BSA c = 1 mg/ml, **3.** molekulový marker, **4.** **1 frakce** pH 9, **5.** **2 frakce** pH 9, **6.** **1 frakce** pH 3, **7.** **2 frakce** pH 3. (12% gel, dávkováno 10 μ l/jamku, barveno Coomassie Brilliant Blue).

Na základě výsledků experimentu lze konstatovat, že optimalizace pH prostředí má zásadní vliv na účinnost separace proteinů metodou mikroelektrodialýzy. Bylo potvrzeno, že BSA nejlépe prochází membránou při pH 9, zatímco CHT α má vyšší účinnost přenosu při pH 3. Tyto závěry byly podpořeny jak kvantitativními daty (stanovením koncentrací proteinů v jednotlivých frakcích), tak výsledky SDS-PAGE.

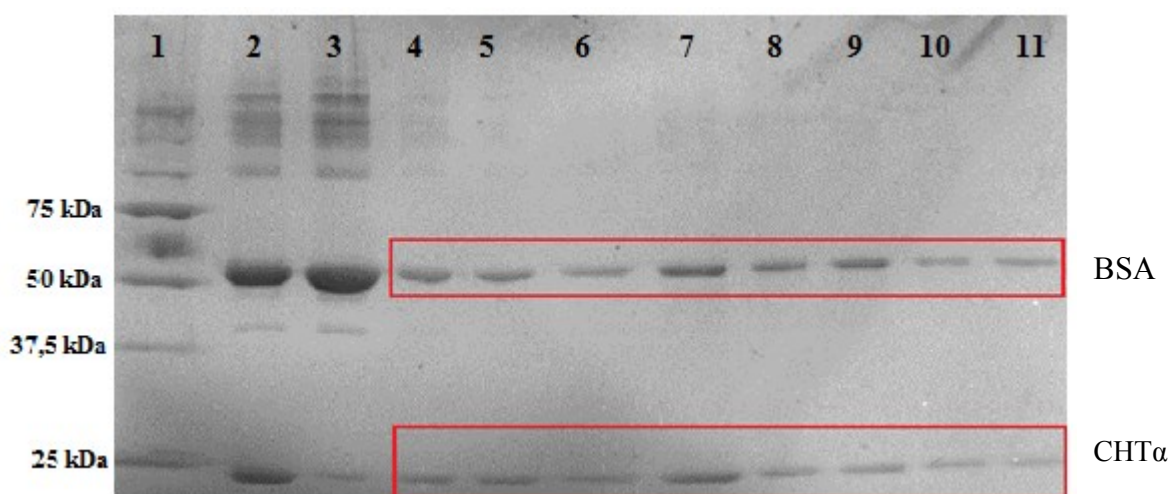
Optimalizace proudu

Cílem experimentu bylo stanovit optimální podmínky elektrického proudu pro efektivní separaci proteinů BSA a CHT α pomocí mikroelektrodialýzy. Pro optimalizaci elektrického proudu byla použita směs proteinů BSA a CHT α , oba o koncentraci 1 mg/ml, připravená v 0,1M glycinovém pufru o pH 3 a pH 9 (postup viz kapitola 3.4). Pro měření při pH 9 bylo použito klasické uspořádání mikroelektrodialyzéru: směs proteinů byla pipetována do cely 1 a pufr do cely 2. Při měření při pH 3 bylo zapojení opačné, komory byly prohozeny, dávkování do cel zůstalo stejné. Mezi jednotlivými měřeními nebyla měněna prostřední 100 kDa membrána. Mikroelektrodialýza probíhala za předem optimalizovaných podmínek stanovených na základě předchozích experimentů: napětí 100 V, doba dialýzy 10 minut. Po ukončení dialýzy byly frakce analyzovány pomocí metody Bradfordové a SDS-PAGE. Koncentrace proteinů byly kalkulovány z odpovídajících regresních rovnic kalibračních řad analyzovaných společně se vzorky při každém experimentu. Následně byla na základě těchto hodnot stanovena účinnost přenosu a separace obou proteinů.

Optimalizace proudu byla provedena v 0,1M glycinovém pufru o pH 3, které je blízké pI BSA (přibližně 4,7). V důsledku toho měl BSA v tomto prostředí nízký náboj, a tedy i nízkou elektroforetickou mobilitu. Naproti tomu protein CHT α , jehož pI je přibližně 8,75, nesl při pH 3 výrazný kladný náboj, což vedlo k jeho vysoké průchodnosti elektrickým polem a migraci ke katodě. SDS-PAGE (Obrázek 19), zde je vidět že při 10–15 mA je průchodnost proteinů do cely 2 viditelnější, zatímco při 5 mA je proužek slabý, při 20 mA pravděpodobně mohlo dojít k ucpání membrány proužek je na gelu slabý a v grafu 4 je vidět pokles účinnosti. Z grafu 4 vyplývá, že jako optimální proud pro separaci těchto proteinů při pH 3 lze použít 10 nebo 15 mA.



Graf 4: Závislost účinnosti mikroelektrodialýzy pro optimalizaci proudu. Modelová proteinová směs BSA, CHT α v 0,1M glycinovém pufru pH 3. 1 frakce BSA, CHT α (množství proteinu, které zůstalo v 1 cele), 2 frakce BSA, CHT α (množství proteinu, které prošlo membránou do 2 cely).



Obrázek 19: Výsledek SDS-PAGE separace frakcí po mikroelektrodialýze – optimalizace proudu. Modelová proteinová směs BSA, CHT α v 0,1M glycinovém pufru pH 3. 1. Molekulový marker, 2. standard CHT α c = 1 mg/ml, 3. standard BSA c = 1 mg/ml, 4. 1 frakce 5 mA, 5. 2 frakce 5 mA, 6. 1 frakce 10 mA, 7. 2 frakce 10 mA, 8. 1 frakce 15 mA, 9. 2 frakce 15 mA, 10. 1 frakce 20 mA, 11. 2 frakce 20 mA. (12% gel, dávkováno 10 μ l/jamku, barveno Coomassie Brilliant Blue).

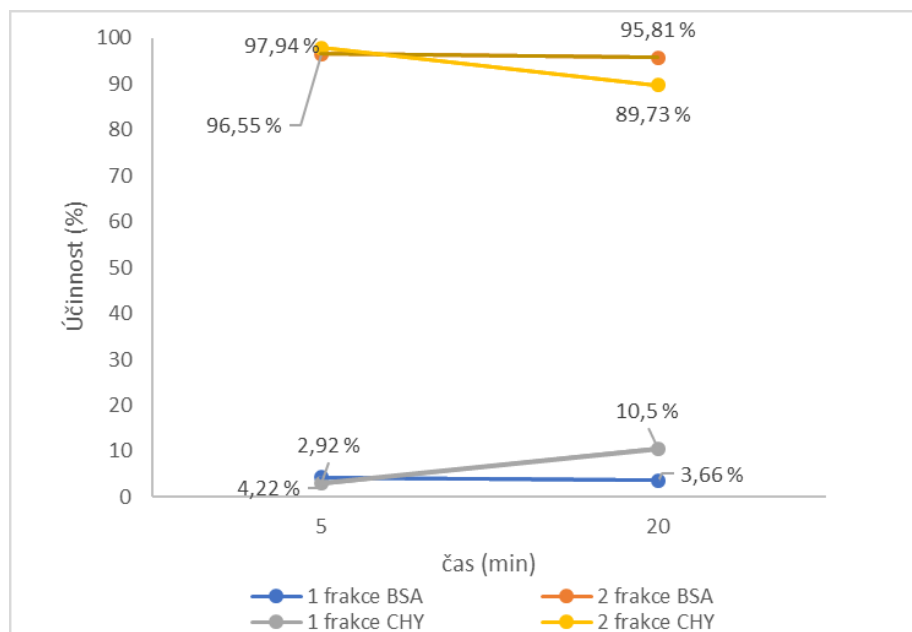
Při optimalizaci elektrického proudu pro mikroelektrodialýzu směsi proteinů BSA a CHT α v prostředí s pH 3 bylo zjištěno, že účinnost separace klesá s rostoucím proudem. To bylo

pravděpodobně způsobeno postupným zanášením a částečným ucpáváním prostřední dialyzační membrány s MWCO 100 kDa, která nebyla mezi jednotlivými měřeními měněna. Snížená propustnost membrány tak mohla negativně ovlivnit transportní vlastnosti systému a tím i celkovou účinnost separace. Na základě tohoto závěru bylo poté zkoušeno opakované použití membrán při mikrodialýze směsi proteinů v porovnání s mikroelektrodialýzou, kde byly membrány měněny viz kapitola 4.4. Výsledky z měření při 0,1M glycinovém pufru pH 9 nejsou zobrazeny zde, ale příslušné graf a obrázky elektroforézy jsou uvedeny v kapitole 4.4.

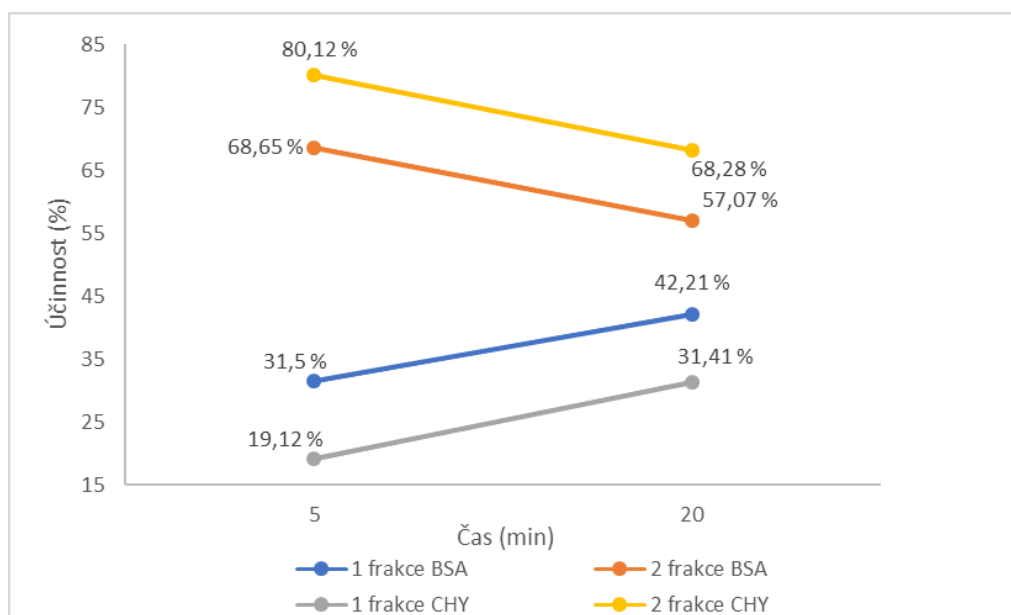
Optimalizace času

Cílem experimentu bylo stanovit optimální dobu pro efektivní separaci proteinů BSA a CHT α pomocí mikroelektrodialýzy. Pro optimalizaci času byla použita směs proteinů BSA a CHT α , oba o koncentraci 1 mg/ml, připravená v 0,1M glycinovém pufru o pH 3 a pH 9 (viz kapitola 3.4). Pro měření při pH 9 bylo použito klasické uspořádání mikroelektrodialyzéru: směs proteinů byla pipetována do cely 1 a pufr do cely 2. Při měření v pH 3 bylo zapojení opačné, komory byly prohozeny, ale dávkování do cel bylo stejné. Mezi jednotlivými měřeními nebyla měněna prostřední membrána s MWCO 100 kDa. Mikroelektrodialýza probíhala za předem optimalizovaných podmínek stanovených na základě předchozích experimentů: napětí 100 V a proud 30 mA. Po ukončení dialýzy byly frakce analyzovány pomocí metody Bradfordové a SDS-PAGE. Koncentrace proteinů byly kalkulovány z odpovídajících regresních rovnic kalibračních řad analyzovaných společně se vzorky při každém experimentu. Následně byla na základě těchto hodnot stanovena účinnost přenosu a separace obou proteinů.

Z grafů 5 a 6 vyplývá, že doba dialýzy měla vliv na účinnost separace. S prodlužujícím se časem se zvyšovala účinnost průchodu proteinů přes dialyzační membránu s MWCO 100 kDa. SDS-PAGE (obrázek 20) toto tvrzení potvrzuje, jsou vidět intenzivnější proužky proteinů v 2. frakcích (jamka 4-7). Tyto výsledky potvrzují, že doba mikrodialýzy, která byla používána jako standardní (10 minut) byla dostačující.



Graf 5: Závislost účinnosti mikroelektrodialýzy pro optimalizaci času. Modelová proteinová směs BSA, CHT α v 0,1M glycinovém pufru pH 9. 1 frakce BSA, CHT α (množství proteinu, které zůstalo v 1 cele), 2 frakce BSA, CHT α (množství proteinu, které prošlo membránou do 2 cely).

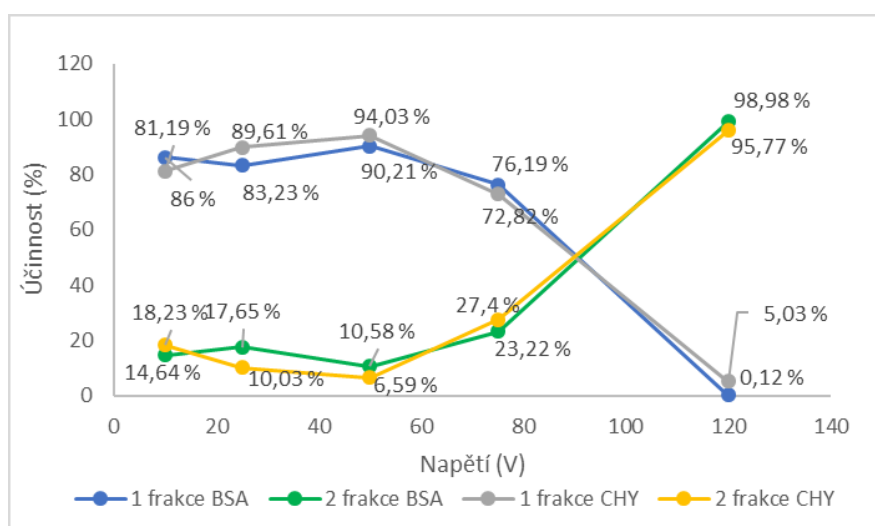


Graf 6: Závislost účinnosti mikroelektrodialýzy pro optimalizaci času. Modelová proteinová směs BSA, CHT α v 0,1M glycinovém pufru pH 3. 1 frakce BSA, CHT α (množství proteinu, které zůstalo v 1 cele), 2 frakce BSA, CHT α (množství proteinu, které prošlo membránou do 2 cely).

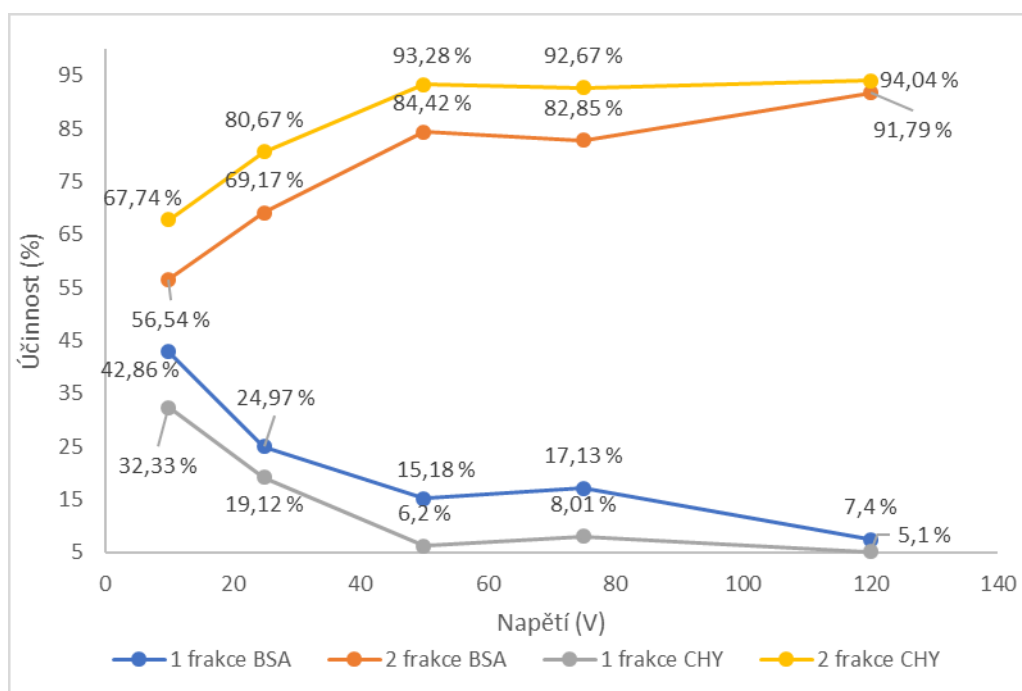
Optimalizace napětí

Cílem experimentu bylo stanovit optimální napětí pro efektivní separaci proteinů BSA a CHT α pomocí mikroelektrodialýzy. Pro optimalizaci napětí byla použita směs proteinů BSA a CHT α , oba o koncentraci 1 mg/ml, připravená v 0,1M glycinovém pufru o pH 3 a pH 9 (viz kapitola 3.4). Pro měření při pH 9 bylo použito klasické uspořádání mikroelektrodialyzéru: směs proteinů byla pipetována do cely 1 a pufr do cely 2. Při měření při pH 3 bylo zapojení opačné, komory byly prohozeny a dávkování do cel zůstalo stejné. Mezi jednotlivými měřeními nebyla měněna prostřední membrána s MWCO 100 kDa. Mikroelektrodialýza probíhala za předem optimalizovaných podmínek stanovených na základě předchozích experimentů: proud 30 mA, doba dialýzy 10 minut. Po ukončení dialýzy byly frakce analyzovány pomocí metody Bradfordové a SDS-PAGE. Koncentrace proteinů byly kalkulovány z odpovídajících regresních rovnic kalibračních řad analyzovaných společně se vzorky při každém experimentu. Následně byla na základě těchto hodnot stanovena účinnost přenosu a separace obou proteinů.

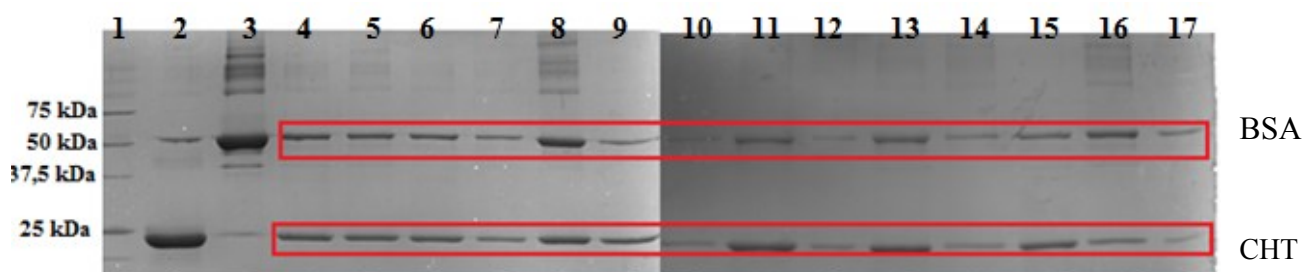
Z grafu 7 a 8 je viditelné, že se účinnost separace zvyšuje v závislosti na aplikovaném napětí a zároveň se snižuje účinnost v prvních frakcích. Platí to při měření v obou pH. Nejvyšší účinnost průchodu proteinů je při 120 V. SDS-PAGE (obrázek 20) potvrzuje, že se zvyšujícím se napětím vzrůstá i průchodnost proteinů to lze vidět na vrůstající intenzitě proužků v 2 frakcích (jamky 13; 15 a 16), přičemž proužek s nejvyšší intenzitou je v jamce 16, která odpovídá 2 frakci při 120 V.



Graf 7: Závislost účinnosti mikroelektrodialýzy pro optimalizaci napětí. Modelová proteinová směs BSA, CHT α v 0,1M glycinovém pufru pH 9. 1 frakce BSA, CHT α (množství proteinu, které zůstalo v 1 cele), 2 frakce BSA, CHT α (množství proteinu, které prošlo membránou do 2 cely).



Graf 8: Závislost účinnosti mikroelektrodialýzy pro optimalizaci napětí. Modelová proteinová směs BSA, CHTa v 0,1M glycinovém pufru pH 3. 1 frakce BSA, CHTa (množství proteinu, které zůstalo v 1 cele), 2 frakce BSA, CHTa (množství proteinu, které prošlo membránou do 2 cely).



Obrázek 20: Výsledek SDS-PAGE separace frakcí po mikroelektrodialýze – optimalizace napětí. Modelová proteinová směs BSA, CHTa v 0,1M glycinovém pufru pH 3. 1. Molekulový marker, 2. standard CHTa c = 1 mg/ml, 3. standard BSA c = 1 mg/ml, 4. 1 frakce 5 min, 5. 2 frakce 5 min, 6. 1 frakce 20 min, 7. 2 frakce 20 min, 8. 1 frakce 10 V, 9. 2 frakce 10 V, 10. 1 frakce 25 V, 11. 2 frakce 25 V, 12. 1 frakce 50 V, 13. 2. frakce 50 V, 14. 1 frakce 75 V, 15. 2 frakce 75 V, 16. 2 frakce 120 V, 17. 1 frakce 120 V. (12% gel, dávkováno 10 µl/jamku, barveno Coomassie Brilliant Blue).

Použití napětí 120 V však vedlo i k nežádoucím efektům, zejména k výraznému zahřívání systému a tím hrozila denaturace proteinů, což by mohlo negativně ovlivnit výslednou analýzu i samotný separační proces. Z těchto důvodů se jako nejvhodnější volba pro následné experimenty potvrdilo napětí 100 V, které představuje optimální kompromis mezi účinností separace, stabilitou elektrochemického systému a zachováním nativní struktury proteinů.

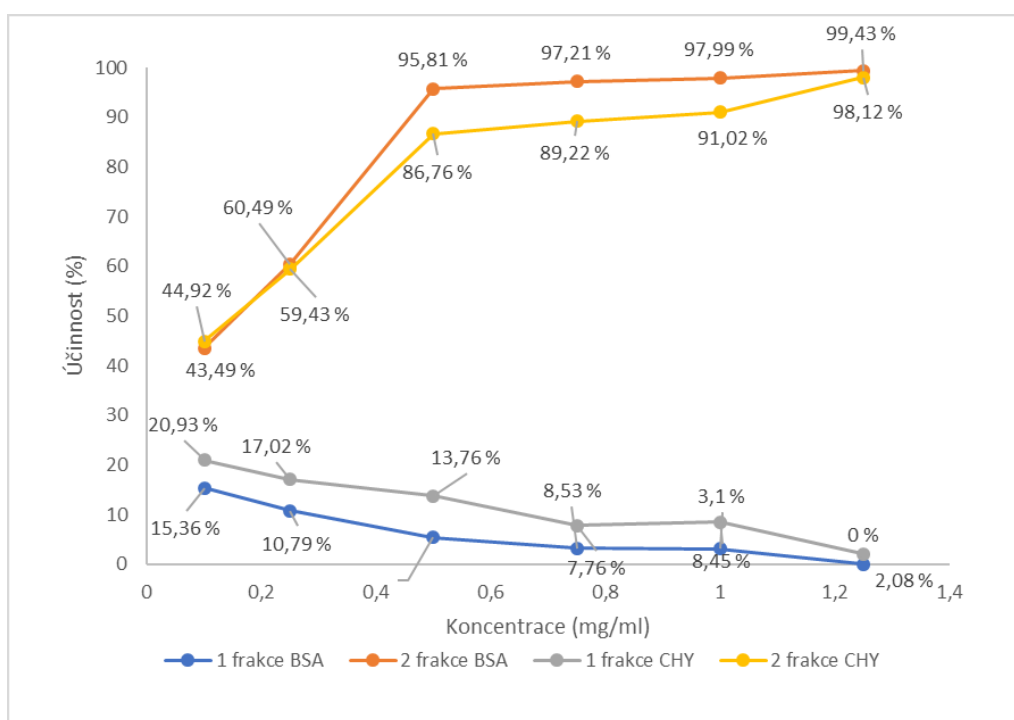
Optimalizace koncentrace

Cílem experimentu bylo stanovit optimální koncentraci proteinů BSA a CHT α pro efektivní separaci pomocí mikroelektrodialýzy. Pro optimalizaci koncentrace byla použita směs proteinů BSA a CHT α o koncentracích v rozmezí 0,1–1,25 mg/ml, připravená v 0,1M glycinovém pufru o pH 3; 5; 7 a 9 (viz kapitola 3.4). Pro každé pH byly testovány oba druhy uspořádání mikroelektrodialyzéru: klasické, při kterém byla směs pipetována do cely 1 a pufr do cely 2 a opačné, kdy byly prohozeny komory při uspořádání /dávkování bylo stejné). Mezi jednotlivými měřeními nebyla měněna prostřední membrána s MWCO 100 kDa. Mikroelektrodialýza probíhala za konstantních podmínek: proud 30 mA, napětí 100 V a doba dialýzy 10 minut. Po ukončení dialýzy byly frakce analyzovány pomocí metody Bradfordové a SDS-PAGE. Koncentrace proteinů byly kalkulovány z odpovídajících regresních rovnic kalibračních řad analyzovaných společně se vzorky při každém experimentu. Následně byla na základě těchto hodnot stanovena účinnost přenosu a separace obou proteinů.

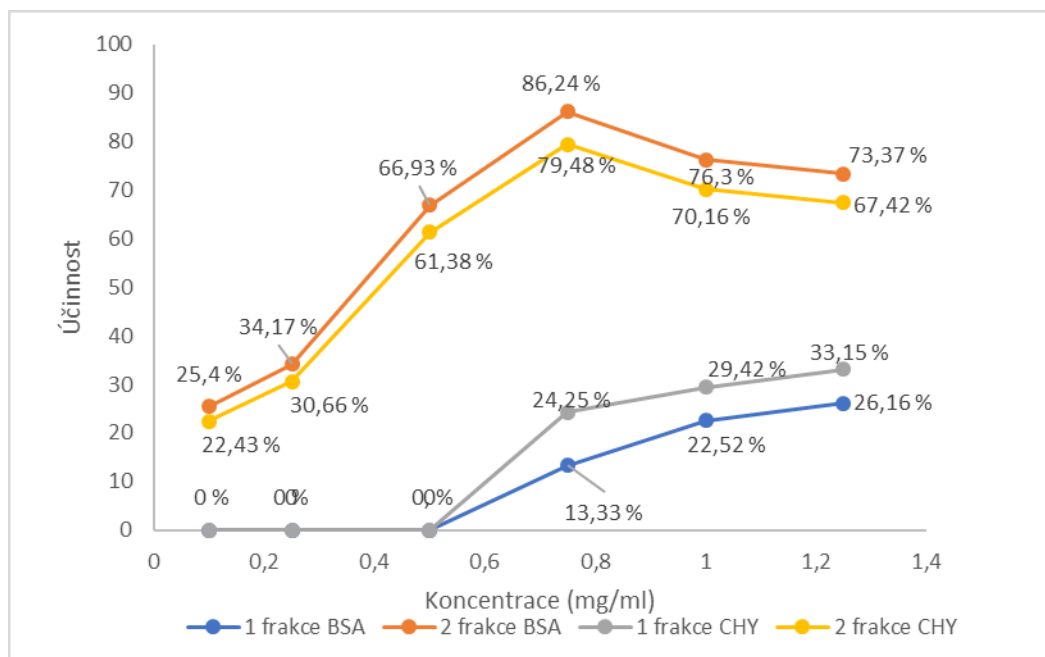
Grafy 9-11 potvrzují, že BSA a CHT α v různých koncentracích (0,1–1,25 mg/ml) a pH potvrzují vliv pH na náboj proteinů a jejich separaci při mikroelektrodialýze. Pro účely této diskuze byly vybrány pouze výsledky, kde byla pozorována separace proteinů, a to v následujících podmínkách: 0,1M glycinový pufr pH 9 v klasickém uspořádání, v opačném uspořádání 0,1M glycinový pufr pH 5 a pH 3. V 0,1M glycinovém pufru pH 9 (graf 9) byl pozorován nejlepší průchod BSA. Při pH 9 je BSA v aniontové formě, což zvyšuje jeho elektroforetickou mobilitu a umožňuje jeho efektivní průchod přes membránu v klasickém uspořádání. V tomto pH účinnost separace rostla se zvyšující se koncentrací proteinů a maxima dosáhla při koncentraci 1,25 mg/ml. Naopak při 0,1M glycinovém pufru pH 3 (graf 10), kde má CHT α silný kladný náboj, byla pozorována výrazná migrace v opačném uspořádání. To je způsobeno tím, že v kationtové formě se CHT α snadněji pohybuje směrem ke katodě, což usnadňuje jeho separaci. Účinnost zde zpočátku rostla se zvyšující se koncentrací proteinů, maxima bylo dosaženo při koncentraci 0,75 mg/ml, poté účinnost opět klesala. V 0,1M glycinovém pufru pH 5 (graf 11, SDS-PAGE obrázek 21) došlo v opačném uspořádání k průchodu jak BSA, tak CHT α . To ukazuje na to, že při této hodnotě pH jsou proteiny stále dostatečně nabitě, což zvyšuje jejich mobilitu a umožňuje jejich efektivní separaci. I zde účinnost rostla se zvyšující se koncentrací směsi proteinů a maxima dosáhla při koncentraci 1 mg/ml. V 0,1M glycinovém pufru pH 7 nebyl pozorován žádný průchod proteinu v žádném uspořádání, což je důsledkem toho, že proteiny jsou v tomto

pH blízko svým izoelektrickým bodům a jsou elektrostaticky neutrální. V této formě nemají proteiny dostatečnou elektroforetickou mobilitu, což nevede k separaci.

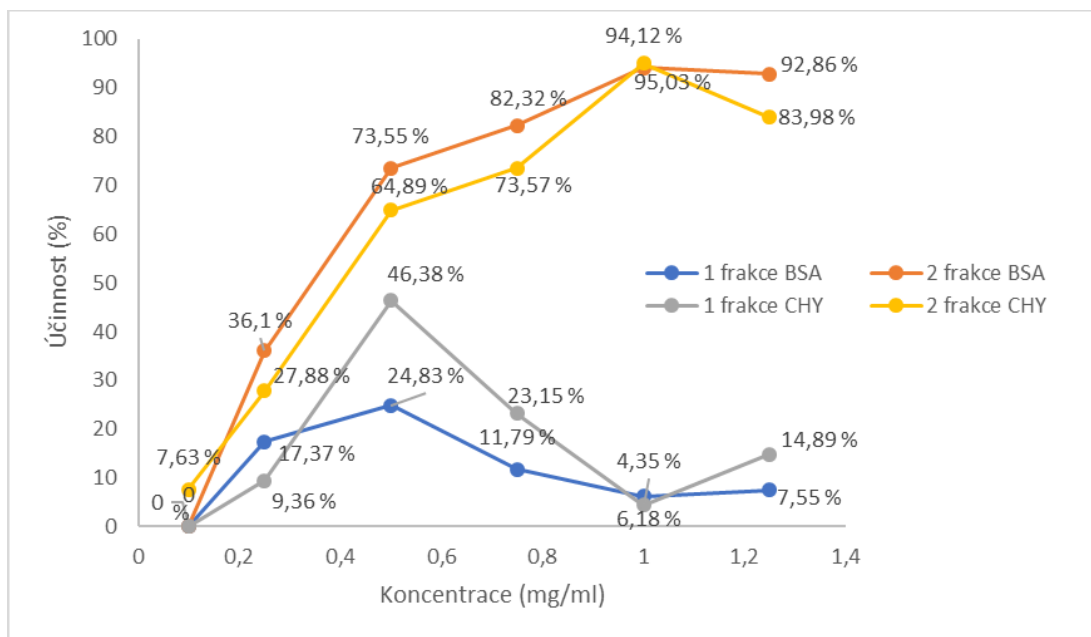
Výsledky potvrzují význam pH jako klíčového faktoru pro optimalizaci mikroelektrodialýzy. Nejlepší separace a průchod proteinů jsou dosaženy tehdy, když je pH dialyzačního roztoku (v tomto případě pufru) dostatečně vzdálené od izoelektrických bodů jednotlivých proteinů. V takovém prostředí proteiny získávají výraznější náboj, což zvyšuje jejich elektroforetickou mobilitu a zefektivňuje separaci. Kromě pH ovlivňuje účinnost separace také koncentrace proteinů, s rostoucí koncentrací směsi dochází zpravidla ke zvyšování účinnosti separace až do určitého optima, za kterým může dojít k nasycení nebo poklesu efektivity v důsledku omezené kapacity systému.



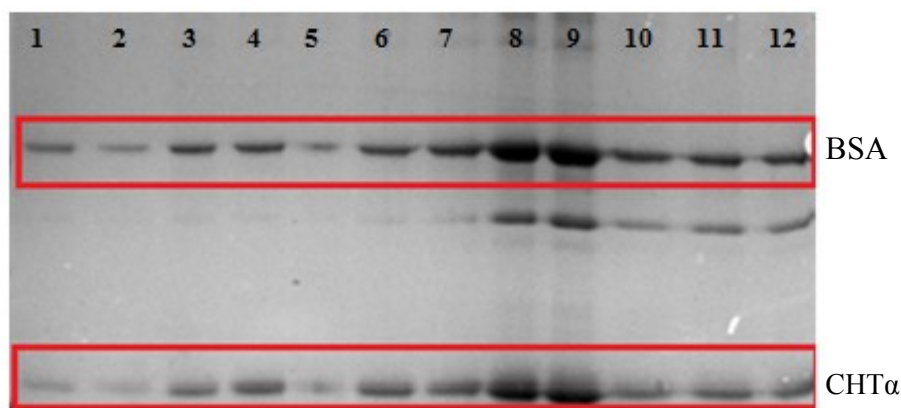
Graf 9: Závislost účinnosti mikroelektrodialýzy pro optimalizaci koncentrace. Modelová proteinová směs BSA, CHT α v 0,1M glycinovém pufru pH 9. 1 frakce BSA, CHT α (množství proteinu, které zůstalo v 1 cely), 2 frakce BSA, CHT α (množství proteinu, které prošlo membránou do 2 cely).



Graf 10: Závislost účinnosti mikroelektrodialýzy pro optimalizaci koncentrace. Modelová proteinová směs BSA, CHT α v 0,1M glycinovém pufru pH 3. 1 frakce BSA, CHT α (množství proteinu, které zůstalo v 1 cele), 2 frakce BSA, CHT α (množství proteinu, které prošlo membránou do 2 cely).



Graf 11: Závislost účinnosti mikroelektrodialýzy pro optimalizaci koncentrace. Modelová proteinová směs BSA, CHT α v 0,1M glycinovém pufru pH 5. 1 frakce BSA, CHT α (množství proteinu, které zůstalo v 1 cele), 2 frakce BSA, CHT α (množství proteinu, které prošlo membránou do 2 cely).

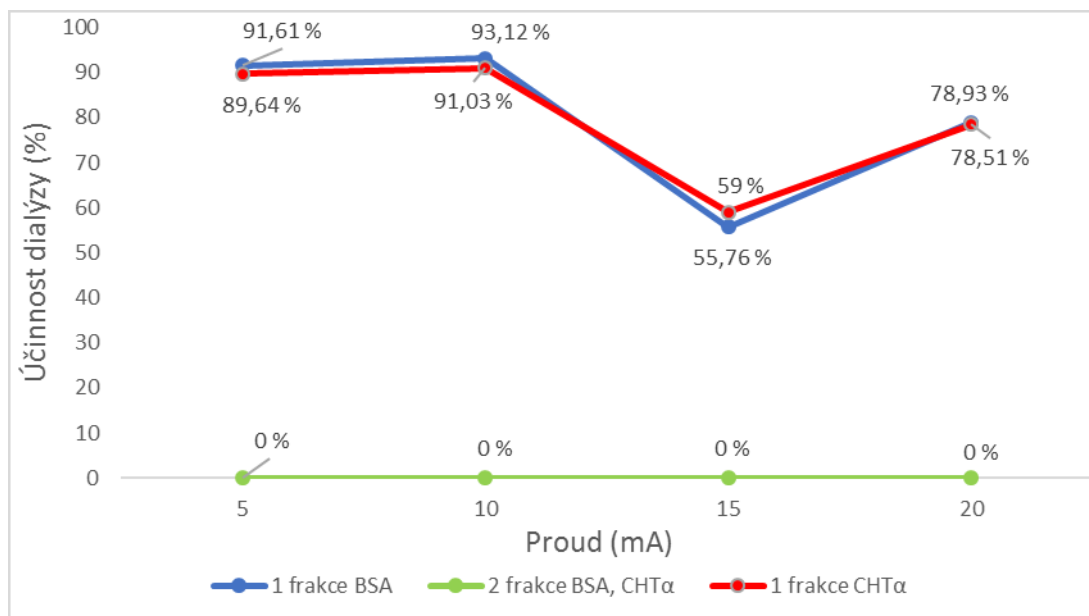


Obrázek 21: Výsledek SDS-PAGE separace frakcí po mikroelektrodialýze – optimalizace koncentrace. Modelová proteinová směs BSA, CHT α v 0,1M glycinovém pufru pH 5. **1. 1 frakce** 0,1 mg/ml, **2. 2 frakce** 0,1 mg/ml, **3. 1 frakce** 0,25 mg/ml, **4. 2 frakce** 0,25 mg/ml, **5. 1 frakce** 0,5 mg/ml, **6. 2 frakce** 0,5 mg/ml, **7. 1 frakce** 0,75 mg/ml, **8. 2 frakce** 0,75 mg/ml, **9. 2 frakce** 1 mg/ml, **10. 1 frakce** 1 mg/ml, **11. 2 frakce** 1,25 mg/ml, **12. 1 frakce** 1,25 mg/ml. (12% gel, dávkováno 10 μ l/jamku, barveno Coomassie Brilliant Blue).

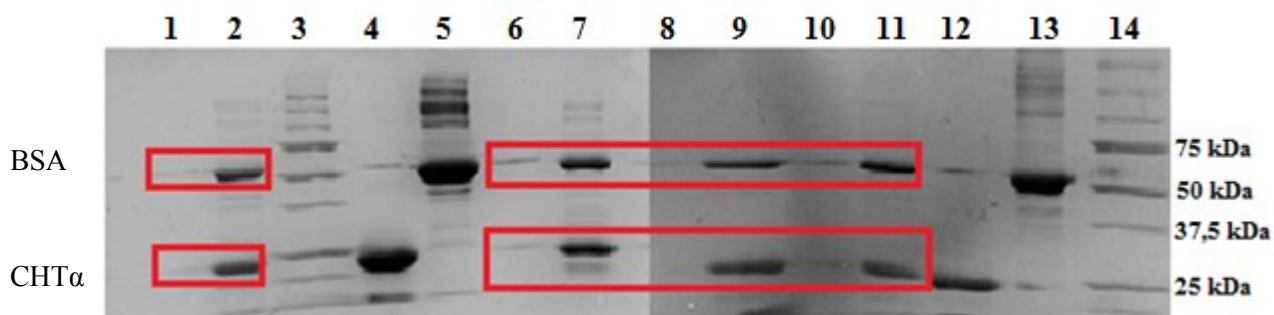
4.4 Opakované použití membrán a účinnost regenerace

Byl sledován vliv opakovaného použití membrán bez regenerace a s výměnou na účinnost separace proteinové směsi pomocí mikroelektrodialýzy. Pro testování byly zvoleny měření se změnou proudu, kde se již v dřívějších experimentech potvrdilo, že s rostoucím proudem dochází k ucpání membrán, pokud není prostřední membrána s MWCO 100 kDa pravidelně měněna. Jako modelová směs byly použity proteiny BSA a CHT α o koncentraci 1 mg/ml v 0,1M glycinovém pufru pH 9. Pro měření při pH 9 bylo použito klasické uspořádání mikroelektrodialyzéru: směs proteinů byla pipetována do cely 1 a pufr do cely 2. Mikroelektrodialýza probíhala za předem optimalizovaných podmínek stanovených na základě předchozích experimentů: napětí 100 V, doba dialýzy 10 minut. Po jejím ukončení byly jednotlivé frakce analyzovány pomocí Bradfordovy metody a SDS-PAGE. Koncentrace proteinů byly určeny na základě naměřených absorbancí s využitím regresních rovnic uvedených v kapitole 4.3.

Při opakovaném použití stejných membrán bez výměny prostřední membrány s MWCO 100 kDa lze vidět na grafu 12, že v cele 2 byla nulová průchodnost proteinů a lze vidět, že zůstaly zadrženy v cele 1. To mohlo být způsobeno postupným zanášením pórů membrány. SDS-PAGE (Obr. 22) potvrdila nižší rozlišení mezi proteiny v cele 2, což poukazuje na možnou adsorpci proteinů na povrch membrány.



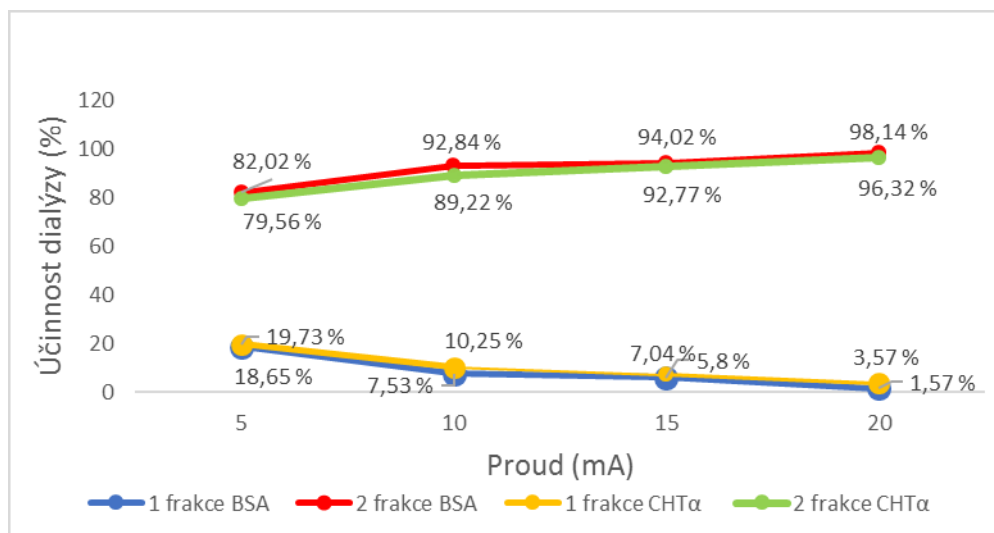
Graf 12: Závislost účinnosti mikroelektrodialýzy pro optimalizaci proudu. Modelová proteinová směs BSA, CHTα v 0,1M glycinovém pufru pH 9 (membrány neměněny). 1 frakce BSA, CHTα (množství proteinu, které zůstalo v 1 cele), 2 frakce BSA, CHTα (množství proteinu, které prošlo membránou do 2 cely).



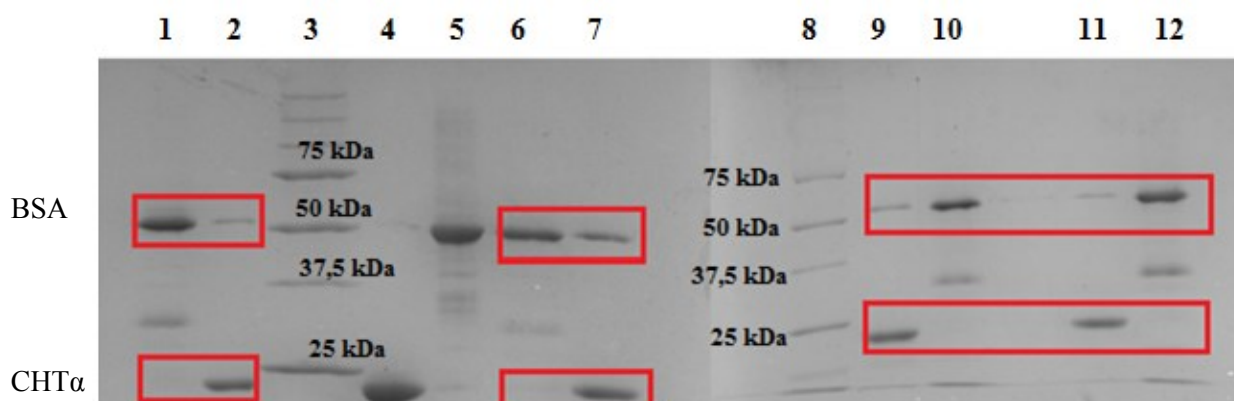
Obrázek 22: Výsledek SDS-PAGE separace frakcí po mikroelektrodialýze – optimalizace proudu. Modelová proteinová směs BSA, CHTα v 0,1M glycinovém pufru pH 9 (membrány neměněny). 1. 2 frakce 10 mA, 2. 1 frakce 10 mA, 3. molekulový marker, 4. standard CHTα c = 1 mg/ml, 5. standard BSA c = 1 mg/ml, 6. 2 frakce 5 mA, 7. 1 frakce 5 mA, 8. 2 frakce 20 mA, 9. 1 frakce 20 mA, 10. 2 frakce 15 mA, 11. 1 frakce 15 mA, 12. standard CHTα c = 1 mg/ml, 13. standard BSA c = 1 mg/ml, 14. molekulový marker. (12% gel, dávkováno 10 μl/jamku, barveno Coomassie Brilliant Blue).

Při měření s výměnou membrán roste účinnost separace spolu s proudem viz graf 13, v cele zůstalo minimum proteinu a většina proteinu prošla skrz dialyzační membránu s MWCO 100 kDa do 2 cely. SDS-PAGE (Obrázek 23) ukázala lepší že v cele 2 jsou vidět intenzivní proužky BSA a v cele 1 je vidět že zůstal CHTα.

Měření s výměnou membrán naznačuje oproti předešlému měření, že výměna membrán vede k lepší reprodukovatelnosti a přesnosti separace. Membrány není vhodné používat opakovaně.



Graf 13: Závislost účinnosti mikroelektrodialýzy pro optimalizaci proudu. Modelová proteinová směs BSA, CHTα v 0,1M glycinovém pufru pH 9 (membrány měněny). 1 frakce BSA, CHTα (množství proteinu, které zůstalo v 1 cele), 2 frakce BSA, CHTα (množství proteinu, které prošlo membránou do 2 cely).



Obrázek 23: Výsledek SDS-PAGE frakcí po mikroelektrodialýze – optimalizace proudu. Modelová proteinová směs BSA, CHTα v 0,1M glycinovém pufru pH 9 (membrány měněny). 1. 2 frakce 10 mA – BSA, 2. 1 frakce 10 mA, 3. molekulový marker, 4. standard CHTα c = 1 mg/ml, 5. standard BSA c = 1 mg/ml, 6. 2 frakce 5 mA, 7. 1 frakce 5 mA, 8. molekulový marker, 9. 1 frakce 15 mA, 10. 2 frakce 15 mA, 11. 1 frakce 20 mA, 12. 2 frakce 20 mA. (12% gel, dávkováno 10 μl/jamku, barveno Coomassie Brilliant Blue).

Regenerace membrán

Membrány byly použity pro dvě měření mikroelektrodialýzy 1 mg/ml BSA v 0,1 M PBS (pH 7,4), přičemž nebyl zaznamenán žádný průchod proteinu skrze membránu. To mohlo indikovat adsorpci nebo ucpaní membrány. Následná regenerace v 0,1 M kyselině citronové (pH pod pI BSA) měla za cíl uvolnit případný sorbovaný protein z membrány a její očištění. Analýza supernatantu pomocí stanovení celkové bílkoviny metodou Bradfordové však prokázala pouze nízkou absorbanci (0,134), což ukazuje na minimální množství uvolněného BSA. Z výsledků

lze usuzovat, že i přes nízkou absorbanční zůstává membrána po kontaktu s BSA při pH 7,4 částečně nepropustná, a běžná regenerace kyselinou nemusí být dostatečná k jejímu úplnému obnovení.

4.5 Mikroelektrodialýza suspenze nanočástic z kyseliny hyaluronové s imobilizovaným α – chymotrypsinogenem A – oddělení nenavázaného proteinu

Měření bylo provedeno v prostředí 0,1M glycinovém pufru pH 5, tohle pH bylo zvoleno, protože je to prostředí vhodné pro kyselinu hyaluronovou a stabilitu nanočástic. Na Nanočásticích byly vázány dvě množství α – chymotrypsinogenu A: 0,2 mg/ml a 0,5 mg/ml. Pro kvantifikaci α -chymotrypsinogenu A v cele 2 získaných mikroelektrodialýzou byla použita metoda dle Bradfordové. Koncentrace byla vypočtena na základě regresní rovnice $y = 0,178x + 0,4803$, koncentrace v cele 2 po dosažení do regresní rovnice vyšla nulová.

DLS bylo využito ke kontrole změn velikosti částic imobilizovaného CHT α . Dle experimentálních výsledků měření pomocí DLS, lze potvrdit, že CHT α je imobilizován a pevně navázan na nanočástice kyseliny hyaluronové, což brání jeho separaci do cely 2. Po mikroelektrodialýze byla frakce obsahující nanočástice analyzována pomocí dynamického rozptylu světla (DLS) pro ověření, zda nanočástice i po mikroelektrodialýze mají stejnou velikost částic a nedochází k ovlivnění velikosti. Pro nanočástice, na které bylo vázáno 0,2 mg CHT α , zůstala velikost částic po dialýze srovnatelná s velikostí před. V případě nanočástic, kde bylo imobilizováno 0,5 mg však došlo k výraznému nárůstu velikosti částic (hydrodynamický průměr) i indexu polydispersity. Z toho lze usuzovat, že u nanočástic došlo k jejich agregaci, což může být důsledkem navázání většího množství proteinu na nanočástice. V tabulce 8 jsou uvedeny výsledky měření DLS u obou vzorků a výsledky byly porovnány s další metodou separace proteinů, a to pomocí centrifugačních mikrokolon. V případě této metody zůstala velikost oproti původním vzorkům nezměněna. Mikroelektrodialýza se v tomto případě potvrdila jako vhodná metoda pouze pro vzorky s nižší koncentrací a elektrické pole ovlivnilo chování nanočástic s vyšším podílem proteinů na povrchu.

Tabulka 8: Výsledky z měření DLS α – chymotrypsinogenu A navázaného na nanočástice kyseliny hyaluronové.

Koncentrace (mg CHT α / 1 mg HANPs) 1 frakce	Metoda	Hydrodynamický průměr (nm)	Index polydisperzity
0,200 mg / 1 mg	Separace pomocí centrifugačních od-solovacích mikroko-lon	151,2	0,644
0,500 mg / 1 mg	Separace pomocí centrifugačních od-solovacích mikroko-lon	155,2	0,701
0,200 mg / 1 mg	Mikroelektrodialýza	145,44	0,704
0,500 / 1 mg	Mikroelektrodialýza	568,2	3,49
HANPs-původní	-	167,67	0,667

ZÁVĚR

V rámci diplomové práce byla úspěšně zavedena a optimalizována metoda mikroelektrodialýzy pro separaci vybraných proteinů. Byla navržena různá uspořádání aparatury, která byla následně experimentálně ověřena. Důraz byl kladen na výběr vhodných membrán a optimalizaci klíčových parametrů procesu, jako je pH, napětí, proud a doba separace. Výsledky potvrdily, že mikroelektrodialýza umožňuje účinnou separaci proteinů na základě rozdílů v jejich molekulové hmotnosti a náboji. Oproti klasické dialýze nabízí řadu výhod, mezi něž patří rychlost separace, nízká spotřeba vzorku a činidel, práce s malými objemy a šetrnost k biologickému materiálu. Optimalizací experimentálních podmínek se podařilo dosáhnout vysoké účinnosti separace, což bylo prokázáno při práci s modelovými proteiny, jako jsou BSA a CHT α . Byly stanoveny optimální podmínky mikroelektrodialýzy pro jednotlivé proteiny. U samotného proteinu BSA bylo nejvyšší účinnosti průchodu dosaženo při proudu 30 mA, napětí 100 V, době separace 10 minut a v prostředí 0,1M glycinového pufru o pH 9. Ve směsi proteinů BSA a CHT α se jako optimální podmínky pro separaci ukázaly proud 30 mA, napětí 100 V a doba 10 minut. Pro BSA byl nejvyšší průchod opět při pH 9 v 0,1M glycinovém pufru, zatímco pro CHT α byl nejlepší průchod zaznamenán při pH 3 v 0,1M glycinovém pufru. Při pH 5 v 0,1M glycinovém pufru docházelo k částečnému průchodu obou proteinů. Mikroelektrodialýza je vhodnou alternativou, pokud je zapotřebí rychlá a selektivní separace malého množství proteinů. Výsledky zároveň podtrhují význam správného výběru membrány a pečlivého nastavení experimentálních podmínek, které zásadně ovlivňují efektivitu celého procesu. Závěrem lze konstatovat, že mikroelektrodialýza je perspektivní separační technikou, vhodnou pro laboratorní i aplikační účely v oblasti biotechnologií a analytické chemie. Její další vývoj může významně přispět k efektivnějšímu zpracování biologických vzorků a k rozšíření možností separace proteinů v moderních vědeckých disciplínách.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Thermo Fisher Scientific. Dialysis Methods for Protein Research. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/dialysis-methods-protein-research.html> [cit. 2025-03-02].
- [2] Creative Proteomics. Dialysis in Protein Purification. Dostupné z: <https://www.creative-proteomics.com/resource/dialysis-protein-purification.htm> [cit. 2025-03-02].
- [3] *Laboratory Methods in Microbiology and Molecular Biology*. Online. Elsevier, 2023. ISBN 9780323950787. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/C2021-0-02319-1>. [cit. 2025-03-07].
- [4] ARMAREGO, W. L. F. *Purification of laboratory chemicals*. Eighth edition. Amsterdam: Elsevier, BH, [2017]. ISBN 978-0-12-805456-7. Dostupné také z: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/natl-ebooks/detail.action?docID=4822993>.
- [5] MASTERING COLLEGE BIOCHEMISTRY. *Protein Purification – Dialysis* [online]. 25. 1. 2019 Dostupné z: <https://masteringcollegebiochemistry.wordpress.com/2019/01/25/protein-purification-dialysis/> [cit. 17. 4. 2025].
- [6] MARATHE, G. K.. When to Avoid Dialysis during Protein Purification? Online. *Advances in Industrial Biotechnology*. 2019, 2(1), s. 1-5. Dostupné z: <https://doi.org/10.24966/AIB-5665/100009>.
- [7] ZAKOWICZ, H... "Dialysis or Desalting? Choosing a Protein Purification Method." *Thermo Fisher Scientific*, 2024, <https://www.thermofisher.com/blog/life-in-the-lab/dialysis-or-desalting-choosing-a-protein-purification-method/>. [cit. 2025-03-09].
- [8] WINGFIELD, P. T. Protein Precipitation Using Ammonium Sulfate. Online. *Current Protocols in Protein Science*. 2016, 8. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/0471140864.psa03fs84>.
- [9] DENNISON, C. *A Guide to Protein Isolation*. Online. Dordrecht: Springer Netherlands, 2002. ISBN 978-0-7923-5751-3. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/0-306-46868-9>.
- [10] HACKER, M. (2008). *Antibody affinity*. University of Texas at Austin. Dostupné z: <https://hackert.cm.utexas.edu/courses/ch370/old2008/Ligand%20Binding/Antibody%20Affinity.htm> [cit. 2025-03-09].
- [11] PROVOST, J. (n.d.). *Ligand Binding Module*. University of San Diego. Dostupné z: <https://home.sandiego.edu/~josephprovost/MCC%20Ligand%20Binding%20Module.pdf> [cit. 2025-03-09].
- [12] SMITHWICK, E. R., BHAGI-DAMORADAN, A., & DAMORADAN, A. R. (2024). *Equilibrium dialysis with HPLC detection to measure substrate binding affinity of a non-heme iron halogenase*. *bioRxiv: The preprint server for biology*. Dostupné z: <https://doi.org/10.1101/2024.04.03.588023> [cit. 2025-03-09].
- [13] ROYSTER, A.; MIR, S.; MIR, M., A. A novel approach for the purification of aggregation prone proteins. Online. *PLOS ONE*. 2021, 16(11), e0260143. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260143>.

- [14] ROBERTS, C. J. Therapeutic protein aggregation: mechanisms, design, and control. Online. *Trends in Biotechnology*. 2014, 32(7), s. 372-380. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.05.005>.
- [15] NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Electrodialysis*. In: A Century of Separation Science [online]. Washington, D.C.: National Academies Press, 2018. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK492981/> [cit. 2025-03-08].
- [16] SAKAI, K.. Dialysis membranes for blood purification. Online. *Frontiers of Medical and Biological Engineering*. 2000, 10(2), s. 117-129. Dostupné z: <https://doi.org/10.1163/15685570052061973>.
- [17] NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. *Choosing a Dialysis: Which Type is Right for Me?* [online]. 2000. Dostupné z: <https://www.kidney.org/kidney-topics/choosing-dialysis-which-type-right-me> [cit. 2025-03-08].
- [18] PALMER, S. C; PALMER, A. R; CRAIG, J. C; JOHNSON, D. W; STROUMZA, P. et al. Home versus in-centre haemodialysis for end-stage kidney disease. Online. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2014, 2014(12), CD009535. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD009535.pub2>
- [19] GOKAL, R. a HUTCHISON, A.. Imaging in the Dialysis Patient: Dialysis Therapies for End-Stage Renal Disease. Online. *Seminars in Dialysis*. 2002, 15(4), s. 220-226.. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1525-139X.2002.00064.x>.
- [20] HA, V. a CHUGH, K. S. The Practice of Dialysis in the Developing Countries. Online. *Hemodialysis International*. 2003, 7(3), s. 239-249. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1492-7535.2003.00044.x>.
- [21] O'CONNELL, M. T. a KREJCI, J.. Microdialysis techniques and microdialysis-based patient-near diagnostics. Online. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2022, 414(10), s. 3165-3175. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03830-6>.
- [22] DE SOUZA, C. A. P.; NISHINO, F. A. ; DO AMARAL, F. G. a CIPOLLA-NETO, J. Pineal Microdialysis. Online. In: JOCKERS, R., a CECON, E. (ed.). *Melatonin*. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer US, 2022, s. 63-74. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2593-4_9.
- [23] SUN, L.,; CHEN, Qingbai; L., H.; WANG, J,; ZHAO, J. et al. Electrodialysis with porous membrane for bioproduct separation: Technology, features, and progress. Online. *Food Research International*. 2020, 137, 109343. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109343>.
- [24] TANAKA, Y. Chapter 7 Donnan Dialysis. Online. In: *Ion Exchange Membranes - Fundamentals and Applications*. Membrane Science and Technology. Elsevier, 2007, s. 495-503. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0927-5193\(07\)12021-0](https://doi.org/10.1016/S0927-5193(07)12021-0).
- [25] KERR, PETER G a HUANG, LOUIS. Review: Membranes for haemodialysis. Online. *Nephrology*. 2010, 15(4), s. 381-385. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2010.01331.x>.

- [26] SOHAIL, M., A.; KOVACH, C., a VACHHARAJANI, T., J. Principles of Hemo- and Peritoneal Dialysis. Online. In: ILLIG, Karl A.; SCHER, Larry A. a ROSS, John R. (ed.). *Principles of Dialysis Access*. Cham: Springer Nature Switzerland, 2024, s. 17-29. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-031-70514-4_3.
- [27] HOENICH, N, A. Update on the Biocompatibility of Hemodialysis Membranes. Online. *Hong Kong Journal of Nephrology*. 2004, 6(2) s. 74-78. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1561-5413\(09\)60162-9](https://doi.org/10.1016/S1561-5413(09)60162-9).
- [28] CHEN, Y.; OU, S., a LIN, C.,. Influence of Dialysis Membranes on Clinical Outcomes: From History to Innovation. Online. *Membranes*. 2022, 12(2), 152. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/membranes12020152>.
- [29] GRZYBEK, P.; DUDEK, G., a VAN DER BRUGGEN, B.. Cellulose-based films and membranes: A comprehensive review on preparation and applications. Online. *Chemical Engineering Journal*. 2024, 495(2), 153500. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.153500>.
- [30] YAMASHITA, A. C. a SAKURAI, K.. Dialysis Membranes — Physicochemical Structures and Features. Online. In: SUZUKI, Hiromichi (ed.). *Updates in Hemodialysis*. InTech, 2015. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/59430>.
- [31] ZAWADA, A. M.; LANG, T.; OTTILLINGER, B.; KIRCELLI, F.; STAUSS-GRABO, M. et al. Impact of Hydrophilic Modification of Synthetic Dialysis Membranes on Hemocompatibility and Performance. Online. *Membranes*. 2022, 12(10), 932. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/membranes12100932>
- [32] PINEDA, S. P.; BLANCO, P. M.; STAÑO, R. a KOŠOVAN, P.. Patchy Charge Distribution Affects the pH in Protein Solutions during Dialysis. Online. *Langmuir*. 2025, 41(8), s. 5387-5398. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.4c04942>.
- [33] AEK, Y.; YANG, D.; SINGH, N.; ARUNKUMAR, A.; GHOSE, S. et al. PH variations during diafiltration due to buffer nonidealities. Online. *Biotechnology Progress*. 2017, 33(6), s. 1555-1560. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/btpr.2544>.
- [34] LUO, J.; WU, C.; WU, Y. a XU, T.. Diffusion dialysis of hydrochloride acid at different temperatures using PPO–SiO₂ hybrid anion exchange membranes. Online. *Journal of Membrane Science*. 2010, 347(1-2), s. 240-249. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2009.10.029>
- [35] LIU, Q.; WU, Y.; DUAN, J., a NI, H.,. Membrane fouling, chemical cleaning and separation performance assessment of ion-exchange membrane for diffusion dialysis in alkali recovery. Online. *Journal of Water Process Engineering*. 2025, 69, s106782 Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2024.106782>.
- [36] BENDO VÁ, H. a PALATÝ, Z. Continuous Separation of an H₂SO₄/CuSO₄ Mixture by Diffusion Dialysis. Online. *Chemical Engineering & Technology*. 2011, 34(2), s. 217-224. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ceat.201000381>.
- [37] YUE, X.; WU, W.; CHEN, G.; YANG, C.; LIAO, S., et al. Influence of 2,2',6,6'-tetramethyl biphenol-based anion-exchange membranes on the diffusion dialysis of hydrochloride acid. Online. *Journal of Applied Polymer Science*. 2017, 134(39), s45333. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/app.45333>.

- [38] BENDO VÁ, H., a DUŠEK, L.,. Treatment of Spent Pickling Solutions by Diffusion Dialysis Using Anion-Exchange Membrane Neosepta-AFN. Online. *Membranes*. 2023, 13(1), 9 Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/membranes13010009>
- [39] PARK, M.S.; CHOI, S.R.; SONG, Y.S.; YOON, S.Y.; LEE, S.Y. et al. New insight of amino acid-based dialysis solutions. Online. *Kidney International*. 2006, 70, s. S110-S114. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5001925>.
- [40] MERKEL, A.; ČOPÁK, L.; DVOŘÁK, L.; GOLUBENKO, D., a ŠEDA, L.,. Recovery of Spent Sulphuric Acid by Diffusion Dialysis Using a Spiral Wound Module. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, 22(21), e11819 Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms222111819>.
- [41] BANSAL, P.,t a AJAY, D.,. Laboratory Dialysis-Past, Present and Future. Online. *Recent Patents on Biotechnology*. 2012, 6(1), s. 32-44. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/187220812799789217>.
- [42] PALATÝ, Z., a BENDO VÁ, H.,. Continuous dialysis of hydrochloric acid and sodium chloride mixture. Online. *Separation Science and Technology*. 2017, 52(16), s. 2611-2621. ISSN 0149-6395. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/01496395.2017.1363230>.
- [43] BERNARDES, M.; SIQUEIRA RODRIGUES, A.; ZOPPAS, M. A.; FERREIRA, J. (ed.). *Electrodialysis and Water Reuse*. Online. *Topics in Mining, Metallurgy and Materials Engineering*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. ISBN 978-3-642-40248-7. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-40249-4>.
- [44] PALATÝ, Z. a BERNAUER, B.,. *Membránové procesy*. V Praze: Vysoká škola chemicko-technologická, 2012. ISBN 978-80-7080-808-5.
- [45] JELÍNEK, L.,. *Desalinační a separační metody v úpravě vody*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-705-7. Dostupné také z: http://aleph.vkol.cz:80/F?func=service&doc_library=SVK01&doc_number=000891090&line_number=0001&func_code=DB_RECORDS&service_type=MEDIA.
- [46] STRATHMANN, H. Electrodialysis, a mature technology with a multitude of new applications. Online. *Desalination*. 2010, 264(3), s. 268-288. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.04.069>.
- [47] RAN, J.; WU, L.; HE, Y. YANG, Z.; WANG, Y. et al. Ion exchange membranes: New developments and applications. Online. *Journal of Membrane Science*. 2017, 522, s. 267-291. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2016.09.033>.
- [48] TANAKA, Y. *Ion exchange membranes: fundamentals and applications*. Second edition. Amsterdam: Elsevier, 2015. ISBN 978-0-444-63319-4.
- [49] FAN, H.; HUANG, Y., a YIP, N., Y. Advancing ion-exchange membranes to ion-selective membranes: principles, status, and opportunities. Online. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*. 2023, 17(2), . Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11783-023-1625-0>.
- [50] JIANG, Ch.; HOSSAIN, Md. M.; LI, Y.; WANG, Y. a XU, T.. Ion Exchange Membranes for Electrodialysis: A Comprehensive Review of Recent Advances. Online. *Journal of*

Membrane and Separation Technology. 2014, 3(4), s. 185-205.. Dostupné z: <https://doi.org/10.6000/1929-6037.2014.03.04.2>.

[51] ARIONO, D; KHOIRUDDIN; S. , WENTEN, I G. Heterogeneous structure and its effect on properties and electrochemical behavior of ion-exchange membrane. Online. *Materials Research Express*. 2017, 4(2), e024006. Dostupné z: <https://doi.org/10.1088/2053-1591/aa5cd4>.

[52] 49KARABACAĞLU, Belgin; TEZAKIL, Filiz a GÜVENÇ, Altan. Removal of hardness by electrodialysis using homogeneous and heterogeneous ion exchange membranes. Online. *Desalination and Water Treatment*. 2015, 54(1), s. 8-14. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/19443994.2014.880159>.

[53] 50YU, R., YANG, H.; YU, X.; CHENG, J.; TAN, Y. et al. Preparation and research progress of anion exchange membranes. Online. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2024, 50, s. 582-604. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2023.08.322>.

[54] TEKINALP, Ö.; ZIMMERMANN, P.; HOLDCROFT, S.; BURHEIM, O. S., a DENG, L., Cation Exchange Membranes and Process Optimizations in Electrodialysis for Selective Metal Separation: A Review. Online. *Membranes*. 2023, 13(6), e566 . Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/membranes13060566>.

[55] MARDER, L., a PÉREZ HERRANZ, V.,. Electrodialysis Control Parameters. Online. In: MOURA BERNARDES, Andréa; SIQUEIRA RODRIGUES, Marco Antônio a ZOPPAS FERREIRA, Jane (ed.). *Electrodialysis and Water Reuse. Topics in Mining, Metallurgy and Materials Engineering*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014, s. 25-39. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-3-642-40249-4_4.

[56] KARIMI, L.,; GHASSEMI, A., a ZAMANI SABZI, H.,. Quantitative studies of electrodialysis performance. Online. *Desalination*. 2018, 445, s. 159-169. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.desal.2018.07.034>.

[57] WU, X., LV, Yibo; SUN, Dexin; ZHANG, Youwen a XU, Shiming. Effects of electrode rinse solution on performance of hydrogen and electricity cogeneration system by reverse electrodialysis. Online. *Energy Conversion and Management*. 2023, 287, e117122. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2023.117122>.

[58] BENNEKER, A., M.; RIJNAARTS, T.,; LAMMERTINK, R. G .H. a WOOD, J.,. A. Effect of temperature gradients in (reverse) electrodialysis in the Ohmic regime. Online. *Journal of Membrane Science*. 2018, 548, s. 421-428. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2017.11.029>.

[59] Operating Principle of Electrodialysis and Related Processes. Online. In: *Ion-Exchange Membrane Separation Processes. Membrane Science and Technology*. Elsevier, 2004, s. 147-225. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0927-5193\(04\)80035-4](https://doi.org/10.1016/S0927-5193(04)80035-4)

[60] NAZIF, A.; KARKHANECHI, H.,; SALJOUGH, E.,; MOUSAVI, S. M., a MATSUYAMA, H.,... Recent progress in membrane development, affecting parameters, and applications of reverse electrodialysis: A review. Online. *Journal of Water Process Engineering*. 2022, 47, e102706. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102706>.

- [61] MIER, M.P.; IBAÑEZ, R. a ORTIZ, I. Influence of ion concentration on the kinetics of electro dialysis with bipolar membranes. Online. *Separation and Purification Technology*. 2008, 59(2), s. 197-205. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.06.015>.
- [62] MIKHAYLIN, S.; NIKONENKO, V.; PISMENSKAYA, N.; POURCELLY, G.; CHOI, S., et al. How physico-chemical and surface properties of cation-exchange membrane affect membrane scaling and electroconvective vortices: Influence on performance of electro dialysis with pulsed electric field. Online. *Desalination*. 2016, 393, s. 102-114. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.desal.2015.09.011>.
- [63] ABOU-DIAB, M.; THIBODEAU, J.; DERACINOIS, B.; FLAHAUT, Ch.; FLISS, I. et al. Bovine Hemoglobin Enzymatic Hydrolysis by a New Ecoefficient Process—Part I: Feasibility of Electro dialysis with Bipolar Membrane and Production of Neokyotorphin (α 137-141). Online. *Membranes*. 2020, 10(10), 257. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/membranes10100257>.
- [64] WANG, Q.; CHEN, G., Q. a KENTISH, S., E. Isolation of lactoferrin and immunoglobulins from dairy whey by an electro dialysis with filtration membrane process. Online. *Separation and Purification Technology*. 2020, 233, e115987. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.115987>.
- [65] DONG, Z.; ZHOU, R.; WEI, Z.; DONG, Y.; SUN, L. et al. Electro dialysis with ultrafiltration membrane for efficient isolation of oxymatrine from simulated eluent of traditional Chinese medicine. Online. *Desalination*. 2024, 592, e118058. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.desal.2024.118058>.
- [66] Harvard Apparatus. *Fast Micro Equilibrium Dialyzer (25 to 1,500 μ l Sample Volume): Quick Start Guide*. Rev. 2.1. Harvard Apparatus. Dostupné z: <https://www.harvardapparatus.com/media/manuals/Product%20Manuals/QuikPrep%20Fast%20Micro%20Equilibrium%20Dialyzer%209511-021%20Rev%202.1.pdf>. [cit. 2025-03-09].
- [67] MICHALCOVÁ, L., a GLATZ, Z., Comparison of various capillary electrophoretic approaches for the study of drug–protein interaction with emphasis on minimal consumption of protein sample and possibility of automation†. Online. *Journal of Separation Science*. 2015, 38(2), s. 325-331. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jssc.201400914>.
- [68] RIBERA, A; ZHANG, L; RIBEIRO, C; VAZQUEZ, N; THONKULPITAK, J., et al. Practical considerations for accurate determination of free thyroxine by equilibrium dialysis. Online. *Journal of Mass Spectrometry and Advances in the Clinical Lab*. 2023, 29, s. 9-15. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jmsacl.2023.06.001>.
- [69] STOVE, V.; COENE, L.; CARLIER, M.; DE WAELE, J., J.; FIERS, T., et al. Measuring Unbound Versus Total Vancomycin Concentrations in Serum and Plasma. Online. *Therapeutic Drug Monitoring*. 2015, 37(2), s. 180-187. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/FTD.0000000000000122>.
- [70] FIERS, T.; DELANGHE, J.; T'SJOEN, G.; VAN CAENEGEM, E.; WIERCKX, K., et al. A critical evaluation of salivary testosterone as a method for the assessment of serum testosterone. Online. *Steroids*. 2014, 86,s. 5-9. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.stero-ids.2014.04.013>.

- [71] SIGMA-ALDRICH. Laboratory Dialysis & Diafiltration Devices [online]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/US/en/products/protein-biology/protein-sample-prep/laboratory-dialysis-and-diafiltration-devices> [cit. 14. dubna 2025].
- [72] HIMMELSTEIN, S. This electro dialysis tech cuts desalination costs [online]. GlobalSpec, Dostupné z: <https://insights.globalspec.com/article/21072/this-electrodialysis-tech-cuts-desalination-costs> [cit. 14. dubna 2025]
- [73] GENEROUS, M., M.; QASEM, N., A.A.; AKBAR, U., A. a ZUBAIR, S., M. Techno-economic assessment of electro dialysis and reverse osmosis desalination plants. Online. *Separation and Purification Technology*. 2021, 272, e118875. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.118875>.
- [74] PATEL, S., K.; LEE, B.; WESTERHOFF, P., a ELIMELECH, M.. The potential of electro dialysis as a cost-effective alternative to reverse osmosis for brackish water desalination. Online. *Water Research*. 2024, 250, s121009 Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.121009>.
- [75] LENNTECH. Electro dialysis [online]. Dostupné z: <https://www.lenntech.com/electrodialysis.htm> [cit. 14. dubna 2025]
- [76] STRATHMANN, H.. *Electrodialysis and related processes*. In: *Membrane science and technology*. Amsterdam: Elsevier, 1995, s. 213–281
- [77] NIKONENKO, Victor V., et al. *Intensive current transfer in membrane systems: Modelling, mechanisms and application in electro dialysis*. Advances in Colloid and Interface Science, 2010, 160(1–2), 101–123. Dostupné z DOI: 10.1016/j.cis.2010.06.007
- [78] BANSAL, P., a D. AJAY. *Laboratory Dialysis – Past, Present and Future*. Recent Patents on Biotechnology, 2012, 6(1), 32–44. ISSN 1872-2083
- [79] BAZAEV, N. A.; FEDERYAKIN, D. V.; STRELTSOV, E. V.; BAKLANOVA, A.V. a ZHILO, N. M. Scientific Aspects of Lab and Animal testing of Wearable Dialysis Equipment. Online. In: *2020 IEEE Conference of Russian Young Researchers in Electrical and Electronic Engineering (EIConRus)*. IEEE, 2020, s. 2465-2468. Dostupné z: <https://doi.org/10.1109/EIConRus49466.2020.9039179>.
- [80] WANG, Y., ZHANG, W., ZHANG, Y., ZHANG, S. a ZHANG, Y. Electro dialysis of a binary protein mixture: Effects of operation parameters on the separation performance. *Separation and Purification Technology* . 2015, 149, 163–172. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2015.04.003>