

Aplikace a využití izotermální titrační mikrokalorimetrie

Nela Jančaříková

Bakalářská práce
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav chemie

Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Nela Jančaříková
Osobní číslo: T23528
Studijní program: B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin
Specializace: Chemie a analýza potravin
Forma studia: Kombinovaná
Téma práce: Aplikace a využití izotermální titrační mikrokolorimetrie

Zásady pro vypracování

Provedte literární rešerši na témata:

- Popis a princip izotermální titrační mikrokolorimetrie
- Aplikace izotermální titrační mikrokolorimetrie v medicíně, farmacii, supramolekulární chemii. aj.
- Praktické využití izotermální titrační mikrokolorimetrie.
- Zhodnocení a závěr

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

1. Hofr, C.: Mikrokalorimetrie biologicky významných molekul. Československý časopis pro fyziku 2006, 56, 288-292
2. Todd, M.J., Gomez, J.: Enzyme kinetics determined using calorimetry: A general assay for enzyme activity?. Analytical Biochemistry 2001, 296, 179-187.
3. Freyer, M.W., Lewis, E. A.: Experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions. Methods in cell biology 2008, 84, 79-113.
4. Freie, E., Mayorga, O. L., Straume, M.: Isothermal Titration. Analytical Chemistry 1990, 62(18), 950-959.
5. Atkins, P. W., De Paula, J.: Fyzikální chemie. Praha: VŠCHT, 2013.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Zdeňka Prucková, Ph.D.**
Ústav chemie

Datum zadání bakalářské práce: **2. ledna 2024**
Termín odevzdání bakalářské práce: **17. května 2024**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Michal Rouchal, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 20. února 2024

PROHLÁŠENÍ AUTORKY BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studentky:

.....
podpis studentky

ABSTRAKT

Izotermální titrační mikrokolorimetrie (ITC) je technika, která nám umožňuje studium interakcí mezi molekulami a analýzou termodynamických parametrů reakcí. ITC může být využita ke charakterizaci interakcí mezi léčivy a k jejich cílovým molekulám, k posouzení afinitních konstant biomolekulárních interakcí, k analýze termodynamických vlastností biomolekulárních reakcí nebo i pro monitorování chemických reakcí v reálném čase. ITC může být aplikována v oblasti vývoje nových léčiv, při kterém může přispět k objevu a k optimalizaci léčivých látek. Klíčovou roli rozvoje bude následná automatizace a zvyšování efektivity ITC. Lze předpokládat, že izotermální titrační mikrokolorimetrie bude i nadále velkým důvodem budoucího rozvoje ve vědeckém výzkumu a to hlavně díky své schopnosti poskytovat detailní informace o molekulárních interakcích a termodynamických vlastnostech studovaných systémů.

Klíčová slova: Izotermální titrační mikrokolorimetrie, molekulární interakce, vývoj nových léčiv

ABSTRACT

Isothermal titration microcalorimetry (ITC) is a technique that allows us to study interactions between molecules and analyze the thermodynamic parameters of reactions. ITC can be used to characterize interactions between drugs and their target molecules, assess the binding affinity constants of biomolecular interactions, analyze the thermodynamic properties of biomolecular reactions, or even monitor chemical reactions in real time. ITC can be applied in the development of new drugs, where it can contribute to the discovery and optimization of drug compounds. The key to future development will be the subsequent automation and increased efficiency of ITC. It can be expected that isothermal titration microcalorimetry will continue to be a major driver of future developments in scientific research, mainly due to its ability to provide detailed information about molecular interactions and the thermodynamic properties of studied systems.

Keywords: Isothermal titration microcalorimetry, molecular interactions, development of new medical products

*„Our greatest weakness lies in giving up.
The most certain way to succeed is always to try just one more time.“*

Thomas Alva Edison

Touto cestou chci poděkovat své vedoucí bakalářské práce, paní Ing. Zdeňce Pruckové, Ph.D., za její odborný dohled, za cenné rady, za vynaložený čas a její vstřícnost při konzultacích, který mi věnovala při zpracovávání této práce.

Rovněž děkuji všem pracovníkům FT UTB za vytvoření rodinné atmosféry a za jejich ochotu a vynaložené úsilí, které mi věnovali během mého studia.

Tímto bych také chtěla poděkovat svým rodičům a celé své rodině za veškeré porozumění a podporu v dosavadním studiu.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala svému partnerovi za psychickou podporu a neutuchající povzbuzování k mému studiu.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| ÚVOD..... | 9 |
| I TEORETICKÁ ČÁST..... | 11 |
| 1 KALORIMETRIE | 12 |
| 1.1 VYUŽITÍ KALORIMETRIE PŘI STUDIU TERMODYNAMIKY | 12 |
| 1.1.1 Termodynamické zákony | 16 |
| 1.2 HISTORICKÝ VÝVOJ KALORIMETRIE..... | 16 |
| 1.3 METODY KALORIMETRIE | 18 |
| 1.3.3 Izobarická kalorimetrie | 19 |
| 1.3.3 Izochorická kalorimetrie | 19 |
| 1.3.3 Diferenční skenovací kalorimetrie | 20 |
| 1.3.4 Izotermální titrační kalorimetrie | 22 |
| 2 IZOTERMÁLNÍ TITRAČNÍ KALORIMETRIE | 23 |
| 2.1 PRINCIP IZOTERMÁLNÍ TITRAČNÍ KALORIMETRIE | 23 |
| 2.2 TYPY MIKROKALORIMETRŮ | 26 |
| 2.2.1 MicroCal VP-ITC..... | 26 |
| 2.2.2 MicroCal PEAQ-ITC | 27 |
| 2.2.3 MicroCal PEAQ-ITC Automated | 28 |
| 2.2.4 MicroCal iTC200 | 29 |
| 2.2.5 Nano ITC..... | 29 |
| 3 APLIKACE IZOTERMÁLNÍ TITRAČNÍ MIKROKALORIMETRIE A VYUŽITÍ TÉTO TECHNIKY PŘI URČENÍ VZÁJEMNÝCH INTERAKCÍ | 32 |
| 3.1 VAZEBNÁ AFINITA A STECHIOMETRIE..... | 32 |
| 3.2 SVINOVÁNÍ PROTEINŮ A JEJICH STABILITA..... | 33 |
| 3.3 INTERAKCE HOST-MAKROMOLEKULA | 33 |
| 3.4 ENZYMOVÁ KINETIKA, ALOSTERIE | 35 |
| 3.5 INTERAKCE PROTEIN-PROTEIN | 36 |
| 3.6 INTERAKCE PROTEIN-DNA | 37 |
| 3.7 INTERAKCE PROTEIN-POLYSACHARID | 37 |
| 3.8 REKOMBINANTNÍ PROTEINY | 38 |
| 3.9 NANOTECHNOLOGIE PRO FARMACEUTICKÝ PRŮMYSL | 38 |
| ZÁVĚR | 40 |
| SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 42 |
| SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK..... | 50 |
| SEZNAM OBRÁZKŮ | 51 |
| SEZNAM TABULEK..... | 52 |

ÚVOD

Kalorimetrie, odvozená z latinského „calor“ (teplo) a řeckého „metry“ (měření), je odvětvím termodynamiky zabývající se měřením tepla uvolněného nebo absorbovaného během různých fyzikálních, chemických nebo biochemických procesů a výměnou energie mezi systémem a jeho okolím. Používá se v různých disciplínách jako chemie, fyzika a inženýrství, kde pomáhá při navrhování nových biomolekul a léčiv a také při studiu reakční kinetiky a termodynamiky fázových změn. Kalorimetrická měření nám umožňují přesně určit tepelné změny vzorku, a to pomocí vnitřní energie při konstantním objemu a entalpie při konstantním tlaku. Kalorimetrie má široké pole aplikací, přičemž každý obor ji využívá podle svých potřeb: chemie pro výpočet změn entalpie nebo vnitřní energie systému, biochemie k analýze termodynamických vlastností biomolekul a fyzika k průzkumu materiálových vlastností za různých podmínek.

První zmínky o kalorimetrii sahají do 18. století. Joseph Black, skotský fyzik, v roce 1761 sestrojil jeden z prvních kalorimetrů pro měření tepla. Jeho zařízení bylo jednoduchým blokem ledu s otvorem uprostřed, do něhož se umístil vzorek při určité teplotě. Ke konci 18. století vytvořili francouzský chemik Antoine Lavoisier a francouzský fyzik Pierre-Simon Laplace pokročilý kalorimetr, který umožňoval přesné měření tepla uvolněného při chemických reakcích. Lavoisier použil tento kalorimetr k experimentům s živočišným dýcháním, což mu pomohlo formulovat základní principy zachování energie a určit roli kyslíku v metabolismu. Technologie mikrokolorimetrie prošla v průběhu času významným vývojem, což vedlo ke zvýšení citlivosti, přesnosti a rychlosti přístrojů. Moderní mikrokolorimetry nyní umožňují měření molekulárních interakcí s extrémní přesností a poskytují cenné informace o biologických procesech na molekulární úrovni.

Izotermální titrační kalorimetrie (ITC) je výkonnou analytickou technikou, která najde uplatnění v mnoha oborech vědy. V farmakologii a léčivovém výzkumu umožňuje ITC přesné měření afinitních konstant a termodynamických parametrů interakcí mezi léčivými a jejich cílovými molekulami, což je klíčové pro návrh efektivních léčiv. V oblasti biochemie a biologie umožňuje ITC detailní studium vazebných interakcí mezi biomolekulami, jako jsou proteiny, ligandy a nukleové kyseliny, což poskytuje důležité poznatky o struktuře a funkci těchto molekul. V enzymologii je ITC užitečná pro studium kinetiky enzymatických reakcí a analýzu interakcí mezi enzymy a jejich substráty či inhibitory, což pomáhá porozumět mechanismům enzymatické katalýzy. V chemickém výzkumu umožňuje ITC analýzu chemických reakcí, studium rovnováhy a termodynamiky fázových změn, což má

aplikace ve vývoji nových materiálů a syntéze látek. ITC lze také použít k charakterizaci vlastností materiálů v rámci výzkumu materiálů. Nakonec v environmentálních vědách může ITC sloužit k analýze interakcí mezi látkami v životním prostředí, jako jsou adsorpce nebo vazby v půdě či vodě.

Celkově lze říci, že ITC hraje klíčovou roli ve vědeckém výzkumu a technologických aplikacích díky své schopnosti poskytovat detailní a kvantitativní informace o molekulárních interakcích a termodynamických vlastnostech různých systémů. Cílem mé práce bylo poskytnout přehled historie izotermální titrační mikrokalorimetrie, zahrnující vývoj této techniky od jejích počátků až po současnost. Byl kladen důraz na vysvětlení principů a metodiky izotermální titrační mikrokalorimetrie, což by mohlo pomoci čtenářům lépe porozumět této analytické technice. V neposlední řadě bylo cílem popsání aplikace a využití izotermální titrační kalorimetrie v různých oborech. Moje práce také slouží k identifikaci současných výzev a budoucích směrů výzkumu v oblasti izotermální titrační mikrokalorimetrie, v hlavní roli byl kladen důraz na vytvoření uceleného pohledu na izotermální titrační mikrokalorimetrii, podporující další pokrok a inovace v této oblasti.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 KALORIMETRIE

Kalorimetrie je obor termodynamiky, který studuje množství tepla absorbovaného nebo uvolněného během fyzikálních, chemických nebo biochemických procesů. Zahrnuje studium procesu výměny energie mezi systémem a jeho okolím. Kalorimetrie pochází z latinského slova „calor“, což znamená teplo, a řeckého slova „metry“, což znamená měření.¹ Kalorimetrie je využívána v mnoha oblastech, jako je chemie, fyzika a inženýrství; pomáhá při navrhování nových biomolekul a léčiv. Dále může být použita pro studium reakční kinetiky a termodynamiky fázových změn. Kalorimetrická měření nám umožňují přesně určit teplo absorbované nebo uvolněné vzorkem. Vnitřní energie se používá k vyjádření energetických změn během dějů probíhajících při konstantním objemu, zatímco entalpie počítá tytéž změny při aplikaci za konstantního tlaku.^{2,3}

Existuje několik různých typů kalorimetrie. Nejpopulárnějšími typy kalorimetrie, které se používají v biologických vědách, lékařských oborech a chemických vědách, jsou izobarická kalorimetrie a izochorická kalorimetrie.⁴

Kalorimetrie má mnoho aplikací, přičemž každý typ oboru může použít kalorimetrii dle svých preferencí. Chemie používá kalorimetrii k výpočtu změny entalpie nebo vnitřní energie systému; biochemie využívá kalorimetrii ke studiu termodynamických vlastností biomolekul, jako jsou proteiny, nukleové kyseliny nebo uhlohydráty; fyzika využívá kalorimetrii ke zkoumání materiálových vlastností za různých podmínek.^{5,6}

1.1 Využití kalorimetrie při studiu termodynamiky

Termodynamika zkoumá vlastnosti a interakce mezi makroskopickými systémy a vztahy mezi různými veličinami včetně vnitřní energie, teploty, tlaku, objemu, entropie a dalších. Tepelné změny se řídí termodynamickými zákony, kde je každý termodynamický systém popsán pomocí stavových veličin a stavových funkcí.^{1,7} Vztahy mezi stavovými funkcemi a stavovými veličinami lze znázornit matematicky pomocí stavových rovnic nebo graficky pomocí fázových diagramů. Stavové veličiny dělíme na veličiny extenzivní a intenzivní. Mezi extenzivní veličiny patří objem, hmotnost a molární hmotnost, vnitřní energie, entalpie a entropie. Kdy mezi intenzivní veličiny řadíme teplotu, tlak, hustotu, viskozitu a také molární vnitřní energii a molární entalpii. Extenzivní veličiny závisí na velikosti termodynamického systému, zatímco intenzivní veličiny jsou nezávislé na velikosti termodynamického systému.^{7,8}

Termodynamika je nedílnou součástí kalorimetrie, kde její principy aplikujeme k pochopení a analýze přenosu tepla mezi systémy. Kalorimetrie obecně zahrnuje dvě metody měření tepla: přímou kalorimetrii a nepřímou kalorimetrii.⁹ Přímá kalorimetrie zahrnuje přímé měření přenosu tepla mezi systémem a jeho okolím. Lze ji použít k měření rychlosti metabolismu živého organismu nebo ke studiu fyzikálních procesů nebo chemických reakcí. Zatímco nepřímá kalorimetrie zahrnuje měření rychlosti metabolismu organismu analýzou jeho výměny plynů, jako například spotřebu kyslíku a produkce oxidu uhličitého v organismu.¹⁰

Kalorimetrie se zabývá studiem přenosu tepla mezi systémem a jeho okolím při konstantní teplotě popřípadě při konstantním tlaku, kdy vyměňovaná energie může mít formu tepla nebo práce. Izotermický proces zajišťuje, že měřený přenos tepla je způsoben výhradně fyzikálními nebo chemickými změnami, ke kterým dochází v systému, beze změny teploty. V termodynamice je systém definován jako specifická část vesmíru, která si může vyměňovat energii a hmotu se svým okolím. Hranice systému mohou být fyzické nebo imaginární a jsou definovány pozorovatelem. Chování systému je hodnoceno pomocí jeho termodynamických vlastností jako je teplota, tlak, objem a vnitřní energie a další.^{7,11}

Jednou z důležitých veličin v termodynamice je entalpie, což je míra tepelného obsahu látky při konstantním tlaku. Entalpie je rozsáhlá stavová veličina, takže její absolutní hodnotu nelze měřit. Reakční teplo je množství tepla, které systém vymění s okolím při reakci probíhající za konstantního tlaku a v rozsahu jednoho molu základních reakčních přeměn, je znázorněno symbolem ΔH . V kalorimetrickém experimentu, kdy je měřeno teplo přenesené během reakce, můžeme použít princip zachování energie a vztáhnout jej ke zvýšení nebo snížení entalpie v systému; například při použití konstantní tlakové kalorimetrie se teplo přenesené během procesu rovná změně entalpie systému.^{1,7,11}

Dalším důležitým pojmem v kalorimetrii je Gibbsova energie. Gibbsova energie vyjadřuje společný působení entalpie a entropie na průběh chemické reakce. Charakterizuje rovnovážný stav při konstantní teplotě a tlaku. Značíme ji symbolem ΔG .¹

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (1)$$

Kde ΔG je změna hodnot Gibbsovy energie [J], ΔH je změna hodnot entalpie [g/mol], T je termodynamická teplota [K], ΔS je změna hodnot entropie [J/K].

Úbytek Gibbsovy energie systému je roven maximální práci, kterou systém může odevzdat do okolí pokud tlak i teplota bude konstantní.⁷

Pokud Gibbsova energie roste, systém práci nekoná a děj není samovolný. Systém může dosáhnout rovnováhy pokud Gibbsova energie bude rovna nule.⁷

$$\Delta G > 0 \quad (2)$$

Dle **vzorce 2** můžeme říct, že chemický nebo fyzikální proces je upřednostován v opačném směru. Jedná se o děj nesamovolný, tudíž systému musíme dodat energii; děj endergonický.^{1,7}

$$\Delta G < 0 \quad (3)$$

Dle **vzorce 3** můžeme říct, že chemický nebo fyzikální proces je upřednostován v přímém směru. Jedná se o děj samovolný, tudíž se energie bude uvolňovat; děj exergonický.^{1,7}

$$\Delta G = 0 \quad (4)$$

Dle **vzorce 4** můžeme říct, že chemický nebo fyzikální proces je v rovnováze. Tudíž koncentrace výchozích látek a produktů bude konstantní.^{1,7}

Termodynamické systémy jsou odděleny od svého prostředí buď skutečným nebo imaginárním rozhraním definovaným pozorovatelem. Existují tři základní typy termodynamických systémů: otevřené, uzavřené a izolované. Otevřený termodynamický systém si může s okolím vyměňovat energii i hmotu, zatímco uzavřený termodynamický systém pouze vyměňuje energii. Izolovaný termodynamický systém si nemůže s okolím vyměňovat energii ani hmotu. Je důležité poznamenat, že volba systému závisí na řešeném problému a v závislosti na situaci mohou být zvažovány různé systémy. Každý termodynamický systém, který je od určitého okamžiku v daných časově neměnných vnějších podmínkách, dospěje do rovnovážného stavu.^{1,7,12}

Termodynamické procesy mohou být reverzibilní, ireverzibilní, kvazistatické a nestatické. Reverzibilní proces je takový, který lze zvrátit, aniž by se změnil systém nebo jeho okolí. Naopak nevratný proces je takový, který nelze zvrátit tak, aby se systém a jeho okolí vrátily do původních stavů – opak vratného procesu. Kvazistatický proces probíhá velmi pomalu, v řadě nekonečně malých kroků, takže systém zůstává vždy v rovnováze. Kdežto nestatický proces probíhá rychle a nedosahuje rovnováhy v každém svém okamžiku.^{1,10}

Dále můžeme rozlišit děje izobarické, izochorické, izotermické, adiabatické, izoentropické a izoentalpické. Izobarický děj probíhá při konstantním tlaku, zatímco izochorický děj probíhá při konstantním objemu. Izotermický děj je takový, který probíhá při konstantní teplotě, zatímco adiabatický děj probíhá bez jakékoli výměny tepla mezi systémem a jeho okolím.¹²

1.1.1 Termodynamické zákony

Termodynamické zákony mají v kalorimetrii zásadní význam. Lze je odvodit z postulátů, které formulovány na základě zkušeností z klasické termodynamiky.¹

První zákon termodynamiky, také známý jako zákon zachování energie, říká, že energii nelze vytvořit nebo zničit, ale pouze přenést nebo přeměnit z jedné formy na druhou. To znamená, že jakákoli energie uvolněná nebo absorbovaná během procesu se musí rovnat energii, která byla přenesena mezi systémem a jeho okolím. Tento zákon je zvláště důležitý v kalorimetrii, protože spojuje přenos tepla se změnami vnitřních energetických hodnot látek.^{1,7,13}

$$\Delta U = Q - W \quad (5)$$

$$\Delta U = Q - p \cdot \Delta V \quad (6)$$

$$Q = \Delta U + p \cdot \Delta V \quad (7)$$

$$Q = (U_2 - U_1) + p(V_2 - V_1) \quad (8)$$

$$Q = U_2 - U_1 + p \cdot V_2 - p \cdot V_1 \quad (9)$$

$$Q = U_2 + p \cdot V_2 - U_1 - p \cdot V_1 \quad (10)$$

$$Q = (U_2 + p \cdot V_2) - (U_1 + p \cdot V_1) \quad (11)$$

$$\underbrace{\hspace{2cm}}_{H_2} \quad \underbrace{\hspace{2cm}}_{H_1}$$

$$\Delta H = H_2 - H_1 \quad (12)$$

$$\Delta H = \Delta U + p \cdot \Delta V \quad (13)$$

Kde ΔU je změna hodnot vnitřní energie [J], Q je celkové teplo [J], W je celková práce [J], p je tlak [Pa], ΔV je změnou hodnot objemu [l] a H je entalpie [g/mol].

Druhý termodynamický zákon, který se zabývá pojmem entropie, pomáhá předpovídat, jak bude teplo během procesu proudit. Entropie je mírou neuspořádanosti systému, značí se symbolem S . Nevratné děje mají vyšší hodnotu entropie než vratné děje. Zákon uvádí, že celková entropie uzavřeného systému se v průběhu času vždy zvyšuje. Teplo bude v podstatě přirozeně proudit z teplejších objektů do chladnějších, dokud nedosáhnou tepelné rovnováhy, kdy jsou jejich teploty stejné. Tento zákon je důležitý v kalorimetrii, protože nám umožňuje určit, kolik tepla se přenáší mezi vzorkem a jeho okolím.^{1,7,13}

$$\Delta S = \frac{\Delta Q}{T} \quad [\text{reverzibilní děj}] \quad (14)$$

$$\Delta S > \frac{\Delta Q}{T} \quad [\text{ireverzibilní děj}] \quad (15)$$

Kde ΔS je změna hodnot entropie [J/K], ΔQ je změna hodnot celkového tepla [J], T je termodynamická teplota [K].

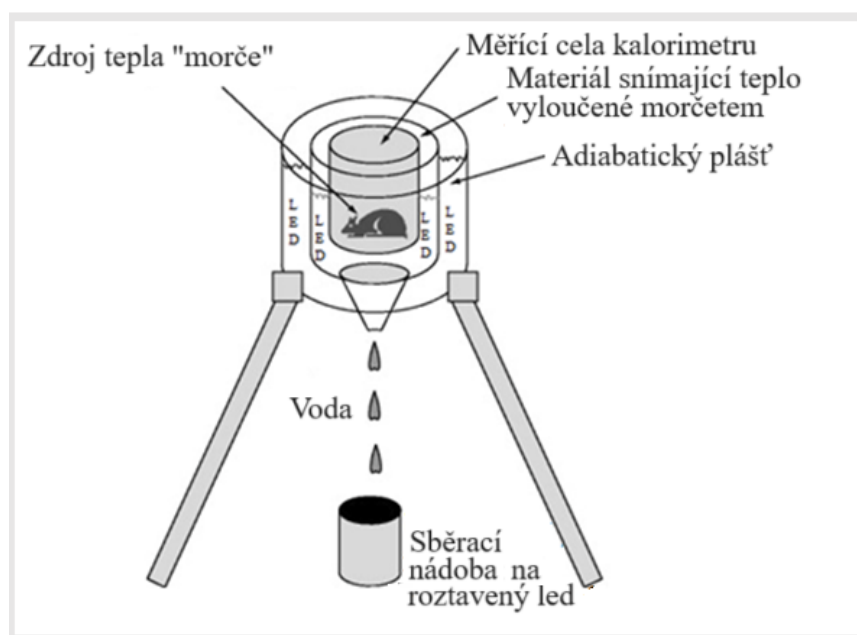
1.2 Historický vývoj kalorimetrie

První zmínky o kalorimetrii pochází z 18. století. V roce 1761 zkonstruoval Joseph Black, skotský fyzik, jeden z prvních přístrojů pro měření množství tepla. Jeho kalorimetr byl jednoduchý blok vyrobený z ledu, který měl uprostřed otvor, do kterého byl umístěn vzorek o dané teplotě. Poté, co teplota dosáhla tepelné rovnováhy, bylo změřeno množství roztaveného ledu. Měrné teplo jakékoli látky, která byla přidána do kalorimetru, bylo úměrné tomuto množství. Chyby způsobené neefektivitou v systému, kvůli neizolování soustavy, ovlivnily relativní hodnoty měrného tepla.¹⁴

Na konci 18. století vytvořil francouzský chemik Antoine Lavoisier společně s francouzským fyzikem Pierre-Simon Laplace pokročilý kalorimetr, který dokázal přesně měřit teplo vznikající při chemických reakcích. Lavoisier použil tento kalorimetr pro experimenty se zvířecím dýcháním, které mu pomohly stanovit principy zachování energie a roli kyslíku v metabolismu. Laplace–Lavoisierův kalorimetr byl uzavřený systém, měřil metabolické teplo produkované morčetem, které bylo umístěno v měřicí komoře. Vnější dřevěná vrstva obklopovala ledovou vrstvu sloužící jako adiabatický štít a další samostatná vrstva ledu přímo obklopovala centrální komoru. Roztavením této vrstvy vznikla voda, která byla měřena a použita k výpočtu metabolického tepla produkovaného morčetem. Schématické znázornění Laplace–Lavoisierova kalorimetru je uvedeno na **Obrázku 1**. Lavoisierovy pokusy na zvířatech se dnes mohou zdát kontroverzní, ale tehdy

to byla běžná praxe. Dýchání zvířat bylo tématem velké fascinace vědců během 18. století, protože se věřilo, že je klíčem k pochopení podstaty života a fungování lidského těla.

Životní dílo Laplace a Lavoisiera v kalorimetrii také přispělo k pozdějšímu objevu dvou základních zákonů moderní fyziky a chemie—zákon zachování hmotnosti a energie. Zákon zachování hmotnosti říká, že hmotnost látek, které do reakce vstupují se rovná hmotnosti látek z reakce vystupujících za podmínky kdy reakce probíhá v uzavřené soustavě.^{15,16}



Obrázek 1. Schéma Laplace–Lavoisierova kalorimetru (upraveno dle ¹⁷)

V 19. století vedly pokroky v termodynamice k převratným pokrokům v kalorimetrii. V roce 1845 navrhl německý fyzik Julius Robert von Mayer princip zachování energie. Tato teorie poskytla teoretický základ pro budoucí vývoj kalorimetrie.¹⁸

Na počátku 20. století vedl rozvoj moderní chemie a biochemie k zdokonalení kalorimetrických technik. Carl von Voit a Max Joseph von Pettenkofer upravili kalorimetr tak, aby mohl měřit spotřebu kyslíku a produkci oxidu uhličitého. Společně s Henri-Victor Regnault a Jules de Riesel popsali lidský metabolismus. Pozdější práce Carla von Voita, o metabolismu savců (včetně lidí), pomohla formovat moderní vědu o výživě lidí. Dokázal, že vylučování močí je spojeno s metabolismem bílkovin. Později dokázal popsat jak sacharidy, tuky nebo bílkoviny ovlivňují rychlost metabolismu celého těla.¹⁹

Ve 20. století byly vytvořeny první mikrokolorimetry umožňující přímé měření uvolněného nebo absorbovaného tepla. Byly dostatečně malé, na to aby se vešly na laboratorní stůl a taktéž vyžadovaly pouze minimální množství vzorku.¹⁷

V této době začali vědci aplikovat mikrokolorimetrii na biochemické reakce; jejich počáteční experimenty měřily například reakční teploty mezi enzymy a jejich substráty. Bohužel tyto rané studie byly omezeny nízkou citlivostí a přesností dostupných přístrojů.¹⁷

V 80. letech MicroCal Inc., později GE Healthcare (*General electric Healthcare*) vyvinul první komerční izotermální titrační kalorimetr. Jejich nástroje rychle získaly uznání mezi vědci a od té doby se staly široce využívány například při výzkumu interakcí protein-ligand.²⁰

V 90. letech se izotermální titrační kalorimetrie (*Isothermal titration calorimetry*, ITC) stala široce používanou technikou v biochemii a biofyzice, což vedlo k vývoji několika dalších komerčních přístrojů. Mezi těmito přístroji byly MicroCal VP-ITC a Nano-ITC od společnosti MicroCal Inc, spolu se zařízeními ITC200 a ITC2000 od společnosti GE Healthcare.^{20,21}

Technologie mikrokolorimetrie postupem času pokročila, což vedlo ke zvýšení citlivosti, přesnosti a rychlosti přístrojů. Nynější mikrokolorimetry mohou měřit molekulární interakce s extrémní přesností a nabízejí neocenitelný pohled na biologické procesy na molekulární úrovni. Dnes se izotermická titrační mikrokolorimetrie používá v různých aplikacích, jako jsou interakce protein-ligand, kinetika enzymů a interakce nukleových kyselin. Díky pokrokům v technologii, jako jsou vysoce citlivé detektory a vylepšený software pro analýzu dat, se měření ITC stala ještě citlivější a přesnější.²¹

1.3 Metody kalorimetrie

Existuje mnoho metod kalorimetrie, které jsou používány v různých vědních oborech. Mezi nejoblíbenější a nejvíce používané kalorimetrické metody, které jsou využívány v biologických oborech, chemických oborech, lékařských oborech, farmaceutickém a potravinářském průmyslu, jsou izobarická kalorimetrie, izochorická kalorimetrie, izotermická titrační kalorimetrie a diferenciální skenovací kalorimetrie.

1.3.1 Izobarická kalorimetrie

Izobarická kalorimetrie probíhá při konstantním tlaku, běžně se označuje jako kalorimetrie coffee cup, schéma tohoto kalorimetru je uvedeno na **Obrázku 2**. Zjednodušená verze izobarického kalorimetru se skládá ze dvou polystyrenových kalíšků, které jsou utěsněny izolovanou zátkou za účelem tepelné izolace systému od okolí. V zátkě jsou dva otvory, které umožňují použití teploměru a míchadla. Tento experiment se provádí v uzavřeném systému, a protože se provádí v podmínkách konstantního tlaku, měříme změnu entalpie. Entalpie je přímo úměrná tepelné kapacitě a změně teploty, kterou experimentálně měříme.²²

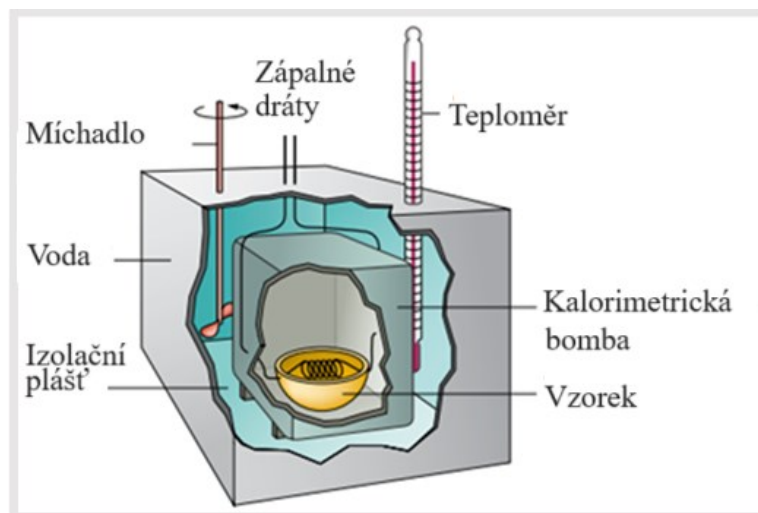


Obrázek 2. Schéma coffee cup kalorimetru (upraveno dle ²³)

1.3.2 Izochorická kalorimetrie

Izochorická kalorimetrie probíhá při konstantním objemu, běžně se označuje jako bombová kalorimetrie. Tato kalorimetrie měří změnu vnitřní energie. Bombový kalorimetr se skládá z izolačního pláště, teploměru, míchadla, reakční komory, kde je umístěna hermeticky uzavřená tlaková nádoba, kalorimetrická bomba, na kterou jsou napojeny zápalné drátky, pomocí kterých můžeme odpálit vzorek. Schématické znázornění bombového kalorimetru je uvedeno na **Obrázku 3**. Důvodem, proč nazýváme tento typ kalorimetrie bombovou kalorimetrií, je to, že používáme reakční komoru (kyslíkovou bombu), ve které dochází ke spalování.²⁴

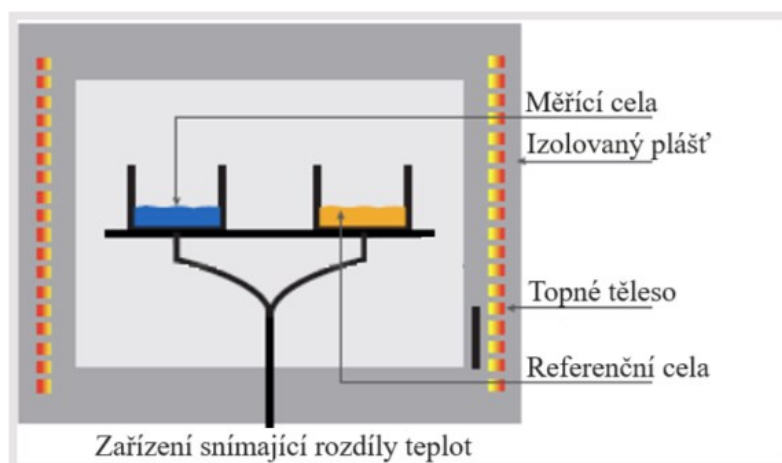
Jinými slovy, vzorek se vloží do reakční komory pod vysokým tlakem, a zároveň za podmínek konstantního objemu, poté dojde ke vznícení doprovázené spalováním. Všechny spalovací reakce budou exotermické, tudíž způsobí změnu teploty okolní vody.²⁴



Obrázek 3. Schéma bombového kalorimetru (upraveno dle ²³)

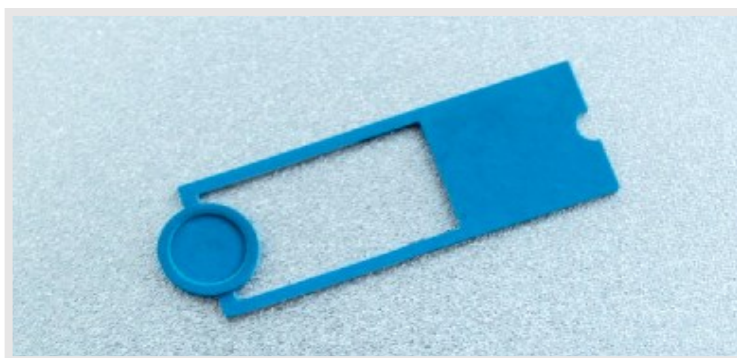
1.3.3 Diferenční skenovací kalorimetrie

Diferenční skenovací kalorimetrie, (*Differential scanning calorimetry*, DSC) je kalorimetrická technika probíhající za podmínek konstantního tlaku v uzavřeném systému. DSC je nejpoužívanější technikou v kalorimetrii. V tomto experimentu je vzorek uložen v měřící cele společně s daným roztokem, zatímco referenční cela obsahuje roztok kromě vzorku. Vzorek a referenční vzorek jsou během experimentu udržovány na téměř stejné teplotě a lze tak měřit tepelný tok.^{25,26} Na **Obrázku 4.** je uvedeno schéma diferenčního skenovacího kalorimetru.

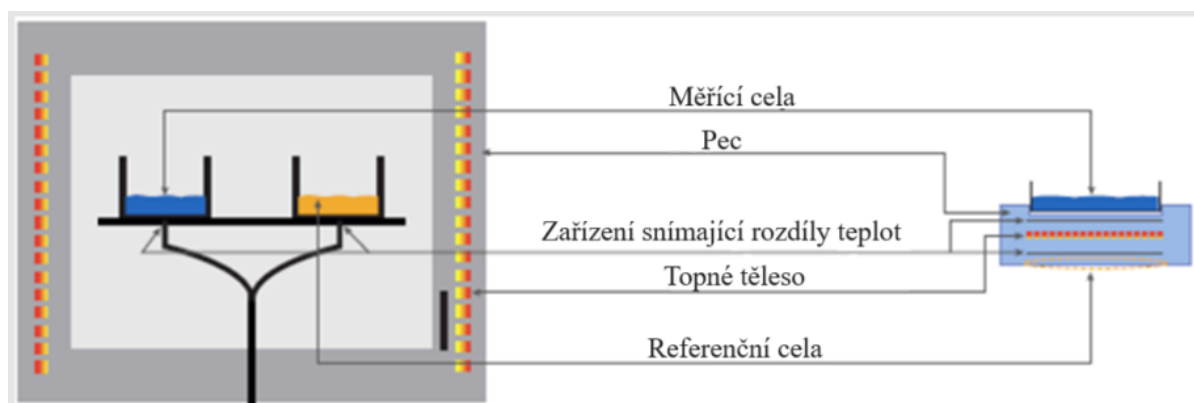


Obrázek 4. Schéma diferenčního skenovacího kalorimetru (upraveno dle ²⁷)

Nejnovějším vývojem v oblasti diferenčních skenovacíh kalorimetrů jsou čipové diferenční skenovací kalorimetry. Do čipu je integrován ohřev, vzorek, referenční vzorek a teplotní senzor z chemicky inertní sklokeramiky.²⁷ Čip diferenčního skenovacího kalorimetru je možné vidět na **Obrázku 5**. Schéma integrace částí kalorimetru je uvedeno na **Obrázku 6**.



Obrázek 5. Čip diferenčního skenovacího kalorimetru²⁷



Obrázek 6. Schéma integrace částí diferenčního skenovacího kalorimetru do čipu (upraveno dle²⁷)

Díky velmi malé hmotnosti tohoto čipu je experiment značně rychlejší, čip také disponuje vynikající citlivostí. Další výhodou čipového diferenčního skenovacího kalorimetru je flexibilita přístroje a jeho možná kombinace s dalším příslušenstvím jako například s optickou kamerou, UV lampou nebo s Ramanovým mikroskopem.²⁷

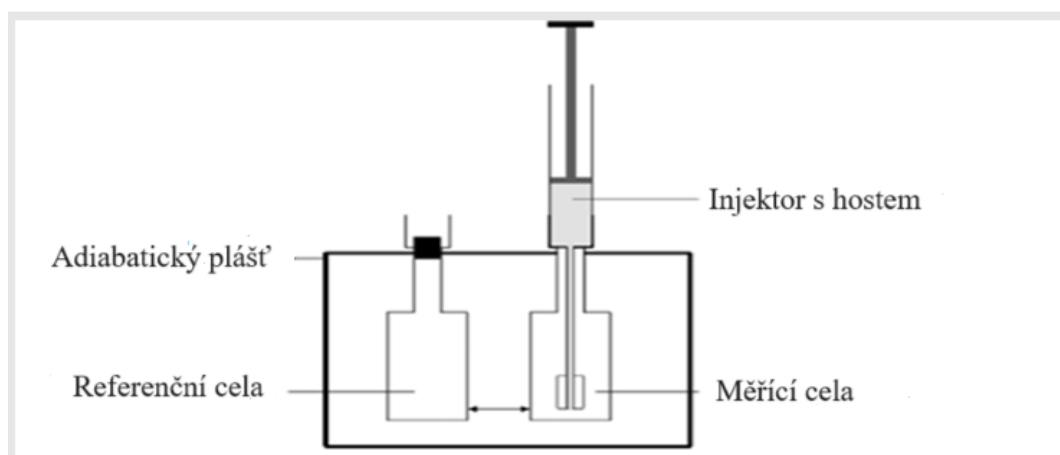
Čipy jsou součástí DSC čipových kalorimetrů. Na **Obrázku 7** je uveden jeden z čipových DSC a to kalorimetr Chip–DSC 1, tento model dokáže měřit do teplotní hodnoty 450 °C.²⁷



Obrázek 7. Chip–DSC 1²⁷

1.3.4 Izotermální titrační kalorimetrie

Izotermální titrační kalorimetrie, ITC, je typ kalorimetrie, která měří teplo uvolněné nebo absorbované při interakci molekul při konstantní teplotě. Interakce molekul je zahájena titrací roztoku jednoho reaktantu (hosta) do roztoku druhého reaktantu (hostitele). Přídavek roztoku hosta spouští vazebnou interakci s hostitelem za doprovodu absorpce nebo uvolnění tepla. Tato interakce způsobí rozdíl teplot, které systém zaznamená a následně ustanoví rovnováhu. Měření může být uskutečněno pomocí izotermálního titračního mikrokolorimetru, který zahrnuje měřící celou společně s referenční celou, která obsahuje pufr (roztok bez látky, kterou vkládáme do měřící cely), míchadlo a injektor. Všechny tyto části mikrokolorimetru jsou umístěny v adiabatickém plášti, viz **Obrázek 8**.²⁸



Obrázek 8. Schéma izotermálního titračního kalorimetru (upraveno dle²⁹)

2 IZOTERMÁLNÍ TITRAČNÍ KALORIMETRIE

Díky izotermální titrační kalorimetrii jsme schopni určit termodynamické parametry vazebných interakcí za izotermických podmínek. Izotermální titrační kalorimetrie je schopna v průběhu jednoho měření stanovit stechiometrii (n), vazebnou konstantu (K_v) a entalpii (ΔH), zároveň dokáže nepřímo určit entropii (ΔS) a Gibbsovu energii (ΔG). Při měření je do měřicí cely s roztokem hostitele (obvykle makromolekula) postupně, za stálého míchání, přidáván roztok vázající se molekuly (hosta).³⁰

Při vazbě vzájemné vazbě makromolekul se často uplatňují nekovalentní interakce. Jestliže bereme v potaz vazbu molekuly M s jinou molekulou L (ligand), můžeme reakci vyjádřit následovně:



Poté je vazebná konstanta (K_v) v příslušné reakci dána poměrem molární koncentrace vznikajícího komplexu $[M \cdot L]$ a součinu molárních koncentrací molekul $[M]$ a $[L]$.

$$K_v = \frac{[M \cdot L]}{[M][L]} \quad (17)$$

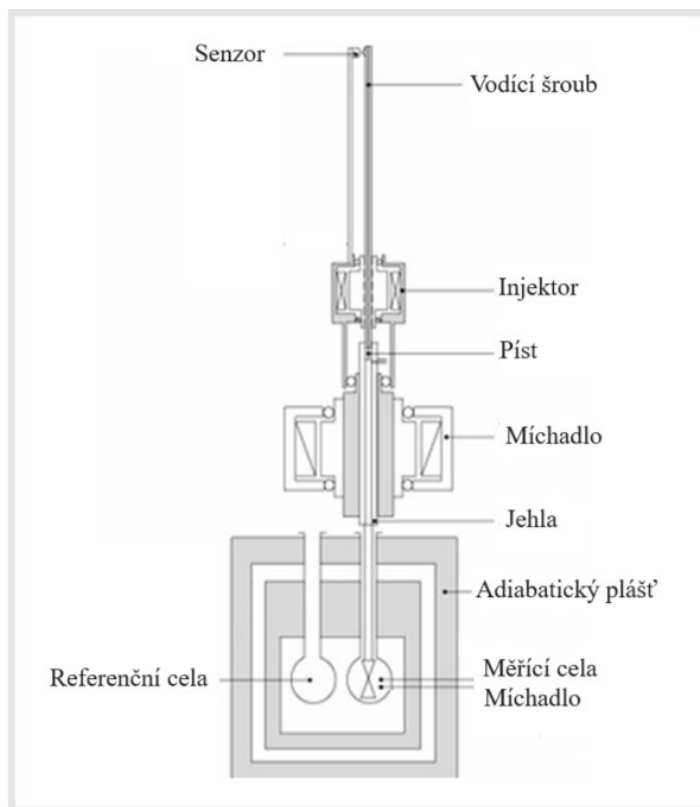
Kdy volná energie je pro dané molekuly $[M]$ a $[L]$ vyjádřena následovně.³¹

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_v \quad (18)$$

Kde R je molární plynová konstanta a T je absolutní teplota v Kelvinech. Z této rovnice lze poté odvodit vztah mezi volnou energií, entalpií a entropií systému molekul, viz rovnice číslo 1.³¹

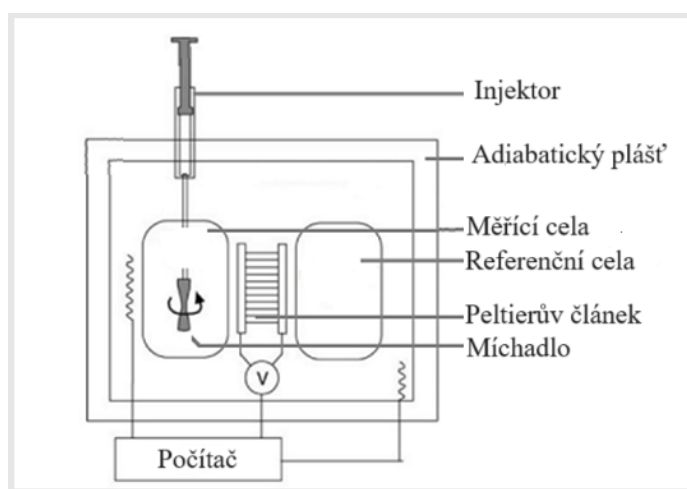
2.1 Princip izotermální titrační kalorimetrie

Izotermální titrační kalorimetr se skládá z referenční cely a vzorkové cely, které jsou umístěny v adiabatickém plášti, schéma takového mikrokolorimetru je uvedeno na **Obrázku 9**.³² V referenční cele je zpravidla pouze samostatné rozpouštědlo. Měření probíhá díky titraci hosta do roztoku obsahující hostitele. Koncentrace ligandu je přibližně desetkrát vyšší než koncentrace hostitele v reakční cele při vazebném poměru jedna molekula hosta ku jedné molekule hostitele.



Obrázek 9. Schéma ITC (upraveno dle ³²)

V měřící cele tedy dochází k interakci mezi hostem a hostitelem. Při této interakci dochází k tepelným efektům, tudíž měřící cela bude mít odlišnou teplotu než cela referenční. Tento rozdíl teplot je detekován pomocí Peltierova článku, který je umístěn mezi referenční a vzorkovou celou, jak je uvedeno na **Obrázku 10**.³³



Obrázek 10. Zjednodušené schéma mikrokalorimetru (upraveno dle ³⁴)

Tento termočlánek je spojen s okruhem, který při známé tepelné kapacitě cely vypočte tepelný rozdíl mezi celami, dle vztahu (19), a tím zajistí změnu přísunu elektrické energie, tak aby se vyrovnaly teploty referenční a vzorkové cely.³¹

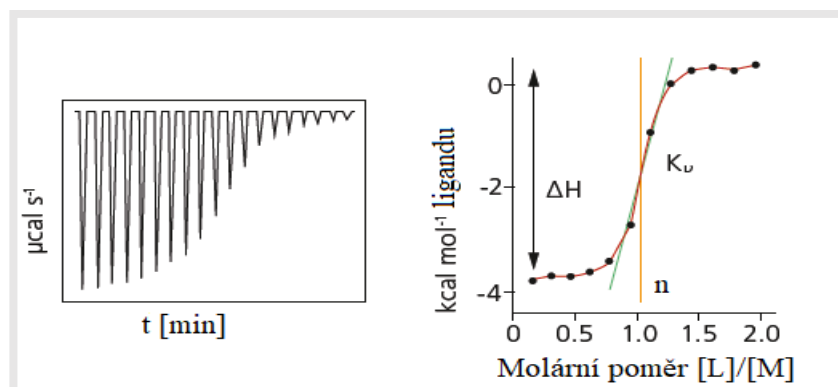
$$\Delta H = \int_{T_{poč}}^{T_{kon}} C_p dT \quad (19)$$

Kde C_p je tepelná kapacita, tato veličina udává teplo, které je nutné dodat soustavě za izobarických podmínek, tak aby se soustava ohřála o 1°C nebo 1K.³⁵

Pokud se při interakci molekul bude uvolňovat teplo, exotermická reakce, přísun energie bude snížen. Naopak pokud se bude jednat o reakci endotermickou, poločlánek tuto změnu teploty zaregistruje a zajistí přísun energie. Před samotným začátkem měření dodává systém nízkou hodnotu energie, na to abych určil základní energetickou úroveň celého měření. V závislosti na čase je změna dodávané energie zaznamenána a vztažena k okamžité koncentraci jednotlivých složek ve vzorkové cele, kdy po každé takto provedené injekci hosta systém ustanoví rovnováhu tím, že vyrovná teplotní rozdíl mezi celami.³⁵

Výsledek je zaznamenán jako závislost změny tepelné kapacity na čase. Poté musíme provést korekci tepelných vlivů spojených s ředěním hosta a mícháním, pomocí odečtu referenční křivky, která byla získána při měření za totožných podmínek, ovšem bez přítomnosti hostitele v roztoku. Následnou integrací lze vypočítat křivku závislosti vazebné entalpie na molárním poměru hosta a hostitele v cele.^{31,35,36}

Výsledkem nelineární diferenciální rovnice získáme sigmoidální křivku, kterou můžeme vidět na **Obrázku 11**. Tato křivka je tvořena body, které odpovídají vazebné entalpii příslušné ke každému přidávku hosta. Nejvyšší hodnotu signálu nalezneme na začátku titrace, a to z toho důvodu, že je v reakční cele vysoký nadbytek hostitele, zpravidla tedy určuje hodnotu vazebné entalpie (ΔH) hosta k hostiteli. Snižování tepelného signálu je způsobeno tím, že dochází k obsazení vazebných míst hostem až do nasycení vazebných míst. Z tvaru titrační křivky lze určit vazebnou konstantu (K_v), změnu volné energie (ΔG), také je možno určit stechiometrický poměr hosta a hostitele při jejich interakci, viz **Obrázek 11**.^{36,37}



Obrázek 11. Výsledný graf měření se sigmoidální křivkou (upraveno dle ³⁸)

Přímé měření termodynamických parametrů je velkou výhodou ITC, kromě toho ITC disponuje velkou citlivostí a přesností; právě to umožňuje detekci slabých vazebných interakcí, které mohou být jinými technikami mnohdy nedetekovány. Měření na ITC může v některých případech trvat i několik hodin. I když tato technika poskytuje informace o termodynamice molekulárních interakcí omezením nadále zůstává absence informací o struktuře molekul.^{36,37}

2.2 Typy mikrokalorimetrů

Mikrokalorimetr musí být vysoce citlivý, aby detekoval i nepatrné změny tepla, ale zároveň dostatečně robustní a stabilní, aby minimalizoval šum nebo rušení, které by mohly ovlivnit přesnost měření. Automatizované mikrokalorimetry snižují riziko kontaminace ke které by mohlo dojít během ručního vstřikování vzorku. Nezbytným zdrojem pro interpretaci experimentálních výsledků je software, díky kterému můžeme získat a analyzovat data. Při výběru daného přístroje by uživatel měl zvážit technické možnosti daného mikrokalorimetru.^{34,38}

2.2.1 MicroCal VP–ITC

Mikrokalorimetr VP–ITC společnosti Malvern Panalytical je přesný izotermický titrační kalorimetr určený pro studium biomolekulárních interakcí s objemy vzorků do hodnoty 2000 µl. VP-ITC Tento plně automatizovaný přístroj umožňuje efektivní měření více vzorků v rámci jednoho experimentu. Je široce používán v akademické sféře a výzkumných laboratořích pro studii biomolekulárních interakcí, jako je interakce protein–ligand, protein–protein a interakce nukleová kyselina–protein. Byl použit při výzkumu vazebných interakcí široké škály biologických systémů, jako jsou enzymy, protilátky, membránové proteiny a viry.^{38,39}



Obrázek 12. Obrázek modelu MicroCal VP-ITC ³⁸

2.2.2 MicroCal PEAQ-ITC

Mikrokalorimetr PEAQ-ITC disponuje výjimečnou citlivostí. Má široký rozsah afinity, právě proto umožňuje analýzu slabých vazebných interakcí až po analýzu interakcí molekul s vysokou afinitou. Software mikrokalorimetru typu PEAQ-ITC nabízí návrh výsledku měření, automatizované hodnocení kvality získaných dat a v neposlední řadě je velice uživatelsky přívětivý. V tomto softwaru jsou uživatelům přístupné video tutoriály s pracovními postupy, které napomáhají jednoduché manipulaci s přístrojem. Velkou výhodou je automatické vymývání cel a injekční jehly, které snižuje možnost chybného měření.^{38,40}



Obrázek 13. Obrázek modelu PEAQ-ITC ³⁸

2.2.1 MicroCal PEAQ–ITC Automated

Mikrokalorimetr PEAQ–ITC Automated zajišťuje bezoblužný provoz a plnou automatizaci. Tento přístroj se stal oblíbeným v mnoha výzkumných laboratořích a to zejména díky plné automatizaci, přívětivému softwaru, který zajišťuje automatizovanou analýzu dat. Tento přístroj dokáže měřit více měření najednou. Další měření může být na tomto přístroji zadáno i v případě průběhu jiného měření.^{38,41}



Obrázek 14. Obrázek modelu PEAQ–ITC Automated³⁸

Tabulka 1. Porovnání mikrokalorimetrů MicroCal PEAQ–ITC Automated, MicroCal PEAQ–ITC a MicroCal VP–ITC.

| Typ | Objem vzorku | Objem vzorkové cely | Operační systém | Počet měření |
|-----------------------------|--------------|---------------------|-----------------|--------------------------|
| MicroCal PEAQ–ITC Automated | 370 μ l | 200 μ l | Automatizovaný | 42 měření za 24 hodin |
| MicroCal PEAQ–ITC | 280 μ l | 200 μ l | Manuální | 8 – 12 měření za 8 hodin |
| MicroCal VP–ITC | 2 ml | 1400 μ l | Manuální | 4 – 8 měření za 8 hodin |

2.2.2 MicroCal iTC200

Mikrokalorimetr iTC200 je navržen pro snadné použití. Disponuje poloautomatickým čištěním jehel a cel. Tak jako jiné modely mikrokalorimetrů, dokáže analyzovat stechiometrii, entalpii nebo vazebnou konstantu. V porovnání s jinými mikrokalorimetry má nejnižší hmotnost a také rozměrově menší než VP-ITC. MicroCal iTC200 je vyzobrazen na **Obrázku 15.**⁴²



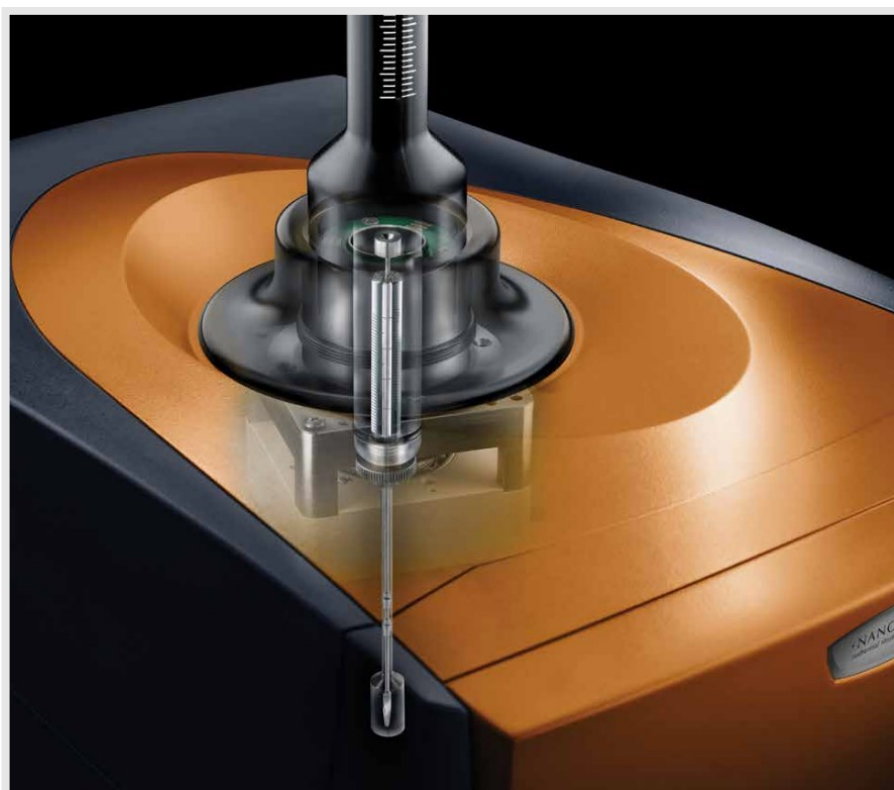
Obrázek 15. Obrázek modelu MicroCal iTC200³⁸

2.2.3 NanoITC

Modely Nano ITC Standard Volume a Nano ITC Low Volume jsou izotermální titrační kalorimetry od společnosti TA Instrument. Tyto přístroje disponují maximální citlivostí a flexibilitou pro studium vazby biomolekul. Oba tyto modely využívají termoelektrické systémy ohřevu a chlazení. Referenční a vzorková cela jsou vyrobeny ze speciální slitiny Hastelloy společně s 24K zlatem. Nano ITC Low Volume vyžaduje podstatně méně vzorku a může zkrátit čas potřebný k dokončení měření na polovinu oproti předcházejícím řadám mikrokalorimetrů.⁴³



Obrázek 16. 3D Schéma modelu Nano-ITC ⁴³



Obrázek 17. 3D Schéma modelu Nano-ITC, zaměřeno na injekční jehlu se zabudovaným míchadlem ⁴³

Tabulka 2. Detailní srovnání všech modelů kalorimetrů.

| Parametry | PEAQ-ITC Automated | PEAQ-ITC | iTC200 | VP-ITC | Nano-ITC |
|--------------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| Schopnost měřit [K_v] | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Schopnost měřit [n] | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Schopnost měřit [ΔH] | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Schopnost měřit [ΔS] | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Objem vzorkové cely | 370 μl | 280 μl | 280 μl | 2000 μl | 700 μl |
| Efektivní objem cely | 200 μl | 200 μl | 200 μl | 1400 μl | 190 μl |
| Objem injekční jehly | 40 μl | 40 μl | 40 μl | 300 μl | 50 μl |
| Počet měření / čas | 42 / 24 hodin | 8 – 12 / 8 hodin | 8 – 12 / 8 hodin | 4 – 8 / 8 hodin | N/A |
| Materiál cel | Hastelloy | Hastelloy | Hastelloy | Hastelloy | 24K Zlato |
| Rozpětí teplot | 2°C do 80°C | 2°C do 80°C | 2°C do 80°C | 2°C do 80°C | 2°C do 80°C |
| Čas odezvy | 8 s | 8 s | 10 s | 20 s | 11 s |
| Automatizované aktualizace | ✓ | ✓ | ✓ | N/A | ✓ |
| Hmotnost | 91 kg | 13,6 kg | 9,4 kg | 20,5 kg | 17 kg |
| Rozměry | 63 x 77 x 35 cm | 43 x 46 x 38 cm | 21 x 34 x 35 cm | 20 x 44 x 37 cm | 35 x 53 x 28 |

* N/A – výrobce informaci neuvádí

3 APLIKACE IZOTERMÁLNÍ TITRAČNÍ MIKROKALORIMETRIE A VYUŽITÍ TÉTO TECHNIKY PŘI URČENÍ VZÁJEMNÝCH INTERAKCÍ

Izotermální titrační mikrokolorimetrii lze použít ke studiu široké škály interakcí mezi různými typy hostů a hostitelů. Právě díky ITC jsme schopni určit přesné měření tepelných změn, které nastávají během interakcí mezi molekulami, proto je právě tato metoda jedinečná ke studiu interakci multimerních molekulových komplexů. V biochemii se izotermální titrační mikrokolorimetrie většinou používá ke studiu vazebných interakcí mezi různými biomolekulami, jako jsou proteiny, DNA, RNA, ligandy a mnoho dalších. Ve farmakologii se izotermální titrační mikrokolorimetrie využívá k charakterizaci interakcí mezi léčivy a jejich cílovými molekulami, což může pomoci při návrhu a optimalizaci léčiv. Všechny tyto aplikace ukazují široké využití izotermální titrační mikrokolorimetrie při studiu vzájemných interakcí a důležitost této techniky v moderní vědě a průmyslu. ITC je možno použít ve spojení s dalšími technikami, jako je například NMR spektroskopie, což veme k lepšímu porozumění molekulárních interakcí a tudíž i následné aplikaci této techniky v daném oboru.

3.1 Vazebná afinita a stechiometrie

Hlavní rolí ITC je měření afinit vazeb. Nejtěsnější afinita, která může být přímo změřena pomocí ITC, se pohybuje v nanomolárních jednotkách. Toto omezení plyne z potřeby studovat reakce v mikromolárních jednotkách, tak aby bylo možné detekovat dostatečné množství vazebného tepla. Protože podíl nevázaného ligandu klesá pod úroveň instrumentálního šumu, subnanomolární afinitní interakce prakticky nemohou být měřeny při mikromolárních koncentracích pomocí ITC. Slabé afinitní interakce mohou být měřeny, avšak vyžadují proporcionálně vyšší koncentrace reaktantů. Kvůli omezením rozpustnosti a dostupnosti jsou nejslabší změřené afinitní interakce biologických makromolekul v řádu milimolárních koncentrací.⁴⁴

Dalším důležitým přínosem ITC je přesné měření vazebné stechiometrie. ITC dokáže určit vazebnou stechiometrii s vysokou přesností. Tato přesnost je dána i tím, že reaktanty jsou analyzovány ve svých původních formách, což minimalizuje nevratné změny způsobené chemickými úpravami nebo imobilizačními postupy. Určení vazebné

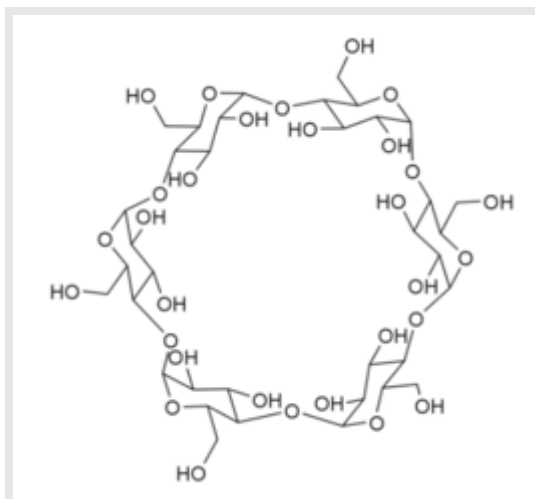
stechiometrie má klíčový význam při charakterizaci vazebných mechanismů biologických makromolekul.⁴⁴

3.2 Svinování proteinů a jejich stabilita

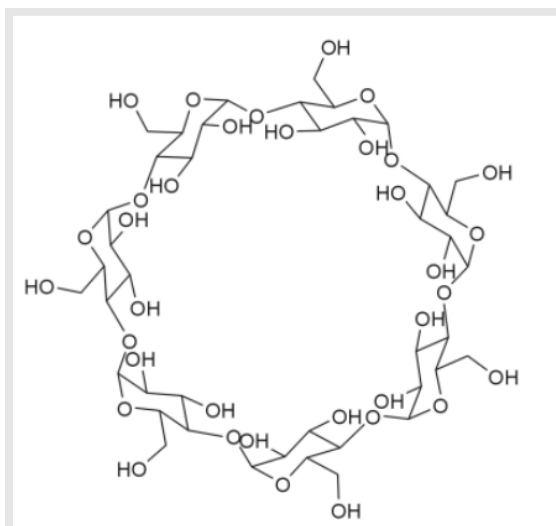
Navzdory tomu, že mechanismus svinování proteinů byl široce diskutován například od průkopnických studií doktora Anfinsena, naše znalosti o termodynamice svinování proteinů a jejich nesprávném skládání jsou stále omezené. ITC se ukázala v těchto studiích jako silný nástroj pro zkoumání jak termodynamických, tak kinetických vlastností skládání proteinů a to hlavně díky své univerzální použitelnosti a vysoké přesnosti. Nesprávné skládání a agregace proteinů jsou vzájemně propojené procesy, které hrají klíčovou roli v různých nemocích, včetně Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby včetně jiných prionových onemocnění. Z tohoto důvodu, je neustále navyšován zájem o studium svinování proteinů pomocí kombinací různých technik, včetně ITC.^{45,46}

3.3 Interakce host-makromolekula

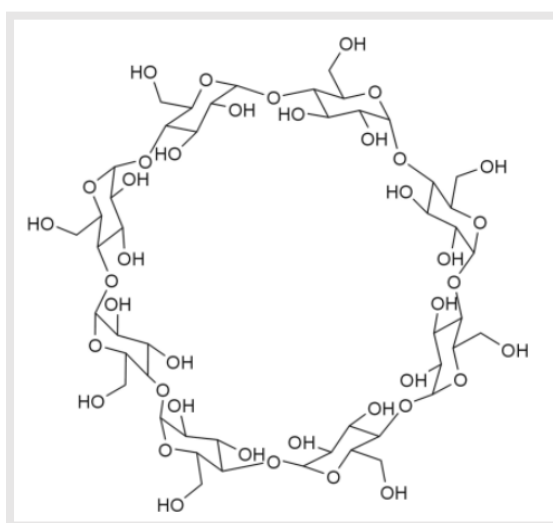
ITC můžeme použít i pro charakterizace interakcí makromolekuly-hosta. Jednou z takových makromolekul je například cyklodextrin, který má tvar dutého komolého kužele a je to cyklický oligosacharid složený z jednotek D-(+)-glukopyranósy, všechny v židličkové konformaci a spojené α -(1,4)-glykosidovými vazbami. Díky této konformaci mají cyklodextriny hydrofilní vnější povrch a lipofilní vnitřní dutinu, což umožňuje cyklodextrinu interagovat s méně polárními nebo hydrofobními částmi hosta. Cyklodextriny mohou být rozlišeny dle glukopyranosových jednotek. Minimálně se jedná o šest jednotek, protože u méně než šesti jednotek se v kruhu tvoří pnutí, které brání vzniku těchto struktur. Maximální běžně se vyskytující počet jednotek je osm.⁴⁷ Nejvíce zastoupenými makrocykly jsou α -cyklodextrin **Obrázek 18**, β -cyklodextrin **Obrázek 19** a γ -cyklodextrin na **Obrázku 20**.



Obrázek 18. Strukturní vzorec α -cyklodextrinu



Obrázek 19. Strukturní vzorec β -cyklodextrinu



Obrázek 20. Strukturní vzorec γ -cyklodextrinu

Vzhledem k fenoménu molekulární komplexace mohou být cyklodextriny použity ke zvýšení rozpustnosti molekul ve vodě špatně rozpustných a to bez potřeby pomocných rozpouštědel, povrchově aktivních látek a komplexotvorných činidel. Kromě toho nedávné studie zdůraznily použití cyklodextrinů k modulaci amfifility blokových kopolymerů, což umožňuje tvorbu nebo narušení micel nebo samovolné sestavení dvojité hydrofobních nebo hydrofilních blokových polymerů.⁴⁸

Byly navrženy různé mechanismy pro podporu vzniku inkluze cyklodextrinů s hostitelskými molekulami. Předpokládá se, že mírně apolární dutina cyklodextrinů je naplněna molekulami vody. V přítomnosti hydrofobní molekuly schopné interakce s dutinou cyklodextrinu může být voda nahrazena hydrofobní částí hostitelské molekuly, která je méně polární než voda, což vede ke stabilnějšímu, nižšímu energetickému stavu. Inkluze komplexace (tj. kombinace kationtu, často nazývaného centrální atom, s molekulou nebo aniontem obsahujícím volný elektronový pár, ligand) hostitelských molekul pomocí cyklodextrinů, ve vodných roztocích, vede k významnému přeuspořádání a odstranění molekul vody, které původně solvatovaly jak u cyklodextrinu, tak i u hostitelské molekuly.^{48,49}

3.4 Enzymová kinetika, alosterie

Katalytické proteiny známé jako enzymy se nacházejí v živých organismech a mají zásadní roli v různých buněčných procesech. Tyto procesy zahrnují metabolismus, aktivní transport, regulaci, přenos a integraci signálů. Enzymy tvoří přibližně 44 % všech ověřených cílů léčiv, včetně lidských enzymů spojených s dysregulací onemocnění a cizích enzymů exprimovaných patogeny. Enzymy jsou navíc proslulé svou pozoruhodnou účinností jako katalyzátory a nacházejí četné aplikace v průmyslu a medicíně. Hydrolázy jsou například schopny štěpit polysacharidy na jednotlivé cukry, toho může být využito v technologii potravin, výrobě buničiny a papíru, a v odvětví biopaliv. Kromě toho, výjimečná selektivita a kompatibilita enzymů s biologickými systémy, z nich učinila cenné nástroje v terapii a to například při léčbě fyto-bezoárů.⁵⁰

ITC se dá využít i pro popis komplexních alosterických enzymových interakcí, ITC byla například použita k měření kinetiky pyruvátkinázy, která katalyzuje konverzi fosfátu z fosfoenu během závěrečného kroku glykolýzy. Pyruvát je převeden do ADP. Alosterická vazba aminokyseliny fenylalaninu převádí pyruvátkinázu na neaktivní formu a předpokládá se, že se podílí na poškození buněk u genetického onemocnění fenylketonurie.⁵¹

3.5 Interakce protein–protein

Složitá a různorodá povaha molekulárního rozpoznávání je ilustrována interakcemi mezi biologickými makromolekulami, jako je protein-protein, protein-DNA, protilátka-antigen a hormonální receptor. Tyto interakce hrají klíčovou roli v imunitní odpovědi, kaskádách přenosu signálu a genové expresi. Pochopení sil, které přispívají ke stabilitě těchto interakcí, je nanejvýš důležité. V tomto ohledu je izotermická titrační kalorimetrie nejpřesnější metodou pro kvantitativní měření termodynamických vlastností interakcí protein-protein.⁵²

Aby bylo zajištěno těsné spojení, úspěšná interakce mezi dvěma povrchy proteinů vyžaduje harmonickou rovnováhu hydrofobnosti, náboje a tvaru. Tato úroveň komplementarity by měla odrážet hustě zabalený vnitřek proteinu. Interakce protein-protein lze klasifikovat do tří odlišných kategorií a to doména-doména, heteromerní interakce a homomerní interakce. Pokud jde o interakce doména-doména, ty se nejčastěji stanovují pomocí DSC. ITC je perfektní metoda pro zkoumání interakcí mezi heterodimery. Roztok obsahující jeden protein se postupně vstřikuje do roztoku druhého proteinu. Příkladem heteromerní interakce protein-protein je například vazba sójového inhibitoru trypsinu na prasečí pankreatický trypsin.^{52,53}

Protein-protein interakce hrají klíčovou roli v mnoha fyziologických procesech a jsou zapojeny do celé řady biologických jevů. Termodynamika, která je základem těchto specifických vazebných interakcí, si získala významnou pozornost kvůli jejímu potenciálnímu dopadu na chorobné stavy jedinců.

Zvyšuje se zájem o detailnější pochopení těchto interakcí, a to za účelem bližší charakteristiky základních biologických mechanismů látek, které se těchto interakcí účastní. V blízké budoucnosti můžeme očekávat mnoho nových studií za účelem rozvoje nových léčiv, popřípadě za účelem prevence či medikace nemocí.^{53,54}

3.6 Interakce protein–DNA

Uspořádání buněčného života je primárně řízeno interakcemi mezi proteinovými komplexy a DNA. Tyto interakce fungují jako centrální regulátory řídící aktivaci a zastavení nesčetných procesů – mezi které lze jmenovat transkripci, replikaci, rekombinaci, opravu a dokonce i strukturální organizaci chromozomů. Ve vědecké literatuře se studium interakcí protein-DNA ubírá odlišnými, ale komplementárními cestami: rozsáhlé studie na buněčné úrovni poskytují přehled, zatímco biofyzikální přístupy s purifikovanými materiály pomáhají určit přímou povahu těchto interakcí. Také kvantifikují sílu a specificitu mezi proteiny (nebo proteinovými komplexy) a jejich substráty DNA. Dvě široce používané metody, izotermická titrační kalorimetrie (ITC) a mikroškalová termoforéza (MST), hrají dvojí roli – kvalitativně charakterizují nukleoproteinové komplexy a také kvantitativně měří interakce protein-DNA s komplementaritou.⁵⁵

3.7 Interakce protein–polysacharid

Pro získání komplexního pochopení toho, jak se biomakromolekuly navzájem rozpoznávají, je klíčové nejen zkoumat struktury komplexů, ale také zkoumat roli kinetiky a termodynamiky v procesu vazby. Bohužel v této oblasti je stále nedostatek publikovaných studií a to hlavně pokud jde o komplexy protein-glykosaminoglykan (GAG).⁵⁶

Heparan sulfát, typ glykosaminoglykanu (GAG), je vysoce sulfatovaný polysacharid, který je exprimován různými typy buněk a má schopnost vázat proteiny, jako jsou růstové faktory, chemokiny a enzymy, díky čemuž je široce zapojen do buněčných procesů. Přirozeně se vyskytující lidské mutace a studie na zvířatech ukázaly, že interakce protein-GAG hrají zásadní roli v procesech od vývoje až po imunitní odpověď hostitele. Úplné pochopení biomakromolekulárních interakcí vyžaduje znalosti nejen o strukturách komplexů, ale také o tom, jak kinetika a termodynamika řídí vazebné procesy.⁵⁷ Termodynamický základ interakcí protein-GAG zůstává v tomto okamžiku do značné míry nepopsán.

Heparin a heparansulfát jsou lineární vysoce sulfatované polysacharidy složené z opakujících se disacharidových jednotek. Heparin působí jako náhrada za heparansulfát jak strukturálně, tak funkčně: je snadno dostupný ve velkých množstvích a široce dostupný. Bylo identifikováno, že chemokiny vážou GAG, jako je heparan sulfát, který je exprimován na endoteliálních a epiteliálních buňkách spolu s extracelulární matricí – prostřednictvím

sekvenční analýzy a vazebných studií, zatímco studie in vivo prokázaly, že vazba GAG slouží jako směrová vodítka a reguluje buněčný transport. Je nutné provést více experimentů pomocí ITC pro komplexy GAG-proteiny, tak aby se i nadále náš pohled na takové komplexy mohl rozvíjet.^{56,58,59}

3.8 Rekombinantní proteiny

Izotermální titrační kalorimetrie se široce používá i k měření afinit a entalpií interakcí mezi proteiny a malými molekulami. Kvantitativní povaha této techniky je zvláště užitečná při charakterizaci rekombinantních proteinů a to například při určování frakce proteinu schopného vázat specifický ligand a tím i čistoty proteinu. Odhalené termodynamické informace vrhají světlo na vazebný mechanismus, důležitý pro cílený návrh léčiv biologických látek.

Budoucností vývoje léčiv je studium interakcí Hsp90, což je vysoce hojný a všudypřítomný molekulární chaperon, který hraje zásadní roli v mnoha buněčných procesech včetně kontroly buněčného cyklu, přežití buněk, hormonů a dalších signálních drah. Pomocí inhibitorů Hsp90, protirakovinného cílového proteinu, jsou demonstrovány reakce spojené s jeho vazebnou afinitou. Ty silně ovlivňují pozorované termodynamické parametry, které jsou nezbytné pro strukturně založený racionální návrh léku.⁶⁰

3.9 Nanotechnologie pro farmaceutický průmysl

Obor nanotechnologie se věnuje zkoumání a manipulaci s hmotou v nanoměřítku, kde se ve srovnání s většími měřítky mohou projevit unikátní chemické, fyzikálně-chemické a behaviorální vlastnosti. Tato oblast studia je rozsáhle zkoumána farmaceutickým průmyslem, který využívá nanosystémy, jako jsou polymerní nanočástice, lipozomy, nanoemulze, micely a další, při výrobě různých produktů, jako jsou kosmetika, léky, barvy, katalyzátory, nátěry a tkaniny.

Nanosystémy se ukázaly jako účinná metoda pro zlepšení fyzikálně-chemických a biologických charakteristik léčiv, včetně zlepšené rozpustnosti, řízeného uvolňování, snížené toxicity a zvýšené specifčnosti v mechanismu jejich účinku. Implementace farmaceutické nanotechnologie prokázala, že nabízí četné výhody nejen při zvyšování kvality léčiv a vakcín, ale také při úpravě stávajících klinických léčiv.^{61,62}

Pro vývoj farmaceutických nanosystémů, jako jsou lipozomy, nanoemulze a nanočástice, jsou zapotřebí vhodné techniky pro specifickou fyzikálně-chemickou charakterizaci: tyto techniky umožňují pochopit, jak se tyto systémy chovají v těle. Izotermická kalorimetrická titrace (ITC) se objevila jako prominentní technika ve výzkumu, vývoji a inovaci systémů založených na nanotechnologiích pro studium molekulárních interakcí mezi jejich složkami.⁶³

ZÁVĚR

Izotermální titrační mikrokolorimetrie (ITC) se ukázala jako klíčová technika pro studium termodynamických vlastností molekulárních interakcí. Její schopnost měřit tepelné změny přímo spojené s vazebnými procesy poskytuje cenné informace o entalpii a entropii těchto interakcí. V průběhu mé práce bylo prokázáno, že ITC je nejen velmi citlivou a přesnou metodou, ale také univerzální metodou, umožňující studium široké škály biomolekulárních systémů včetně proteinů, nukleových kyselin a malých molekul a mnoha dalších.

Veškeré informace získané pomocí ITC přispívají k lepšímu porozumění mechanismů molekulárních interakcí, což je zásadní pro vývoj nových léčiv, optimalizaci biotechnologických procesů a design nových biomateriálů. ITC tak představuje nepostradatelný nástroj nejen pro základní výzkum, ale i pro aplikovaný výzkum v oblasti biomedicíny a farmaceutického průmyslu.

V blízké budoucnosti můžeme očekávat, že zájem a použití techniky ITC bude nadále růst a to úměrně s rozvojem nových technologií a metodických přístupů, které umožní ještě detailnější a rychlejší analýzu. Zlepšení citlivosti a automatizace ITC přístrojů otevírá nové možnosti pro vysokoprodukční screening a analýzu komplexních systémů. Tím se ITC stává klíčovým nástrojem pro pokrok v oblasti molekulární biologie, chemie a medicíny, čímž přispívá k řešení některých z největších výzev současné vědy a technologie.

V kontextu dalšího budoucího vývoje je ITC obzvláště významná díky své schopnosti poskytovat detailní termodynamické profily, které mohou být využity k pochopení jemných rozdílů mezi různými molekulárními interakcemi. To je kritické například při vývoji nových terapeutik, kde je důležité nejenom vědět, zda molekula váže na cíl, ale i jak silně a s jakými termodynamickými charakteristikami.

ITC rovněž nachází uplatnění ve výzkumu biomolekulárních mechanismů a v oblasti proteomiky, kde může přispět k odhalení nových interakčních sítí a funkcí proteinů. ITC ideální technikou pro studium nativních stavů biomolekul v jejich přirozeném prostředí.

Další perspektivní oblastí je aplikace ITC v nanotechnologiích a materiálových vědách, kde může pomoci při návrhu a charakterizaci nových materiálů s přesně definovanými vlastnostmi. V neposlední řadě se očekává, že ITC bude hrát klíčovou roli v oblasti environmentálních věd, například při studiu interakcí mezi znečišťujícími látkami a biologickými systémy.

Celkově lze říci, že izotermální titrační mikrokalorimetrie má před sebou slibnou budoucnost. Její neustálý vývoj a inovace zaručují, že bude nadále neocenitelným nástrojem ve vědeckém výzkumu i průmyslových aplikacích. Schopnost ITC poskytovat hluboké a přesné termodynamické informace posouvá hranice našich znalostí a otevírá nové možnosti pro inovace a objevování v různých vědních disciplínách.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ATKINS, Peter, Julio DE PAULA a James KEELER. *Atkins' Physical Chemistry*. Twelfth Edition. United Kingdom: OUP Higher Education Division, 2022. ISBN 9780198847816.
- [2] VYAZOVKIN, Sergey, Nobuyoshi KOGA a Christoph SCHICK. *Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry: Recent Advances, Techniques and Applications*. Second Edition. Germany: Elsevier Science, 2018. ISBN 9780444640628.
- [3] SHEEHAN, David. *Physical Biochemistry: Principles and Applications*. New Jersey: John Wiley, 2000. ISBN 978-0471986621.
- [4] AUGUST FRIES, Jöns. *Methods and Standards in Bomb Calorimetry: Investigations in Cooperation With the Institute of the Nutrition of the Pennsylvania State College*. Classic Reprint. United Kingdom: Forgotten Books, 2018. ISBN 978-1332157235.
- [5] A. CENGEL, Yunus, Michael A. BOLES a Mehmet KANOGLU. *Thermodynamics: An Engineering Approach*. Ninth Edition. Asia: McGraw-Hill Education, 2019. ISBN 9813157879.
- [6] M. KLOTZ, Irving a Robert M. ROSENBERG. *Chemical Thermodynamics: Basic Concepts and Methods*. Seventh Edition. New Jersey: John Wiley, 2008. ISBN 978-0-470-28522-0.
- [7] HALLIDAY, David, Robert RESNICK a Jearl WALKER. *Fyzika: 2. část - Mechanika - Termodynamika*. Překlady vysokoškolských učebnic. Praha: Prometheus, 2000. ISBN 80-214-1868-0.
- [8] NAVRÁTIL, Leoš, Josef ROSINA a KOLEKTIV. *Medicínská biofyzika. 2., zcela přepracované a doplněné vydání*. Praha: Grada, 2019. ISBN 978-80-271-0209-9.
- [9] BOUBLÍK, Tomáš. *Chemická termodynamika: Stavby hmoty, termodynamika a statistická termodynamika*. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 9788024612560.
- [10] GERRITS, Walter a Etienne LABUSSIÈRE. *Indirect calorimetry: Techniques, computations and applications*. Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 2015. ISBN 978-90-8686-261-0.
- [11] SVOBODA, Emanuel a Roman BAKULE. *Molekulová fyzika*. Praha: Československá akademie věd, 1992. ISBN 80-200-0025-9.

- [12] MALIJEVSKÝ, Anatol. *Lekce ze statistické termodynamiky*. Třetí vydání. Praha: VŠCHT Praha, 2009. ISBN 978-80-7080-710-1.
- [13] NOVÁK, Josef a KOLEKTIV. *Fyzikální chemie*. Praha: VŠCHT Praha, 2008. ISBN 978-80-7080-675-3.
- [14] RAMSAY, William a F. G. DONNAN. *The Life and Letters of Joseph Black*. London: 978-1140149064, 2010. ISBN 978-1140149064.
- [15] LAVOISIER, Antoine a Pierre-Simon LAPLACE. Mémoire sur La Chaleur. *Journal of the Röntgen Society*. 1921, **17**(67), 91-92. Dostupné z: doi:10.1259/jrs.1921.0040
- [16] MESCHEL, S. V. A brief history of heat measurements by calorimetry with emphasis on the thermochemistry of metallic and metal-nonmetal compounds. *Calphad*. 2020, **68**(1), 101714. ISSN 0364-5916. Dostupné z: doi:10.1016/j.calphad.2019.101714
- [17] FREYER, Matthew W. a Edwin A. LEWIS. Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions. *Methods in Cell Biology*. 2008, **84**(17), 79-113. Dostupné z: doi:10.1016/S0091-679X(07)84004-0
- [18] WALD, Alvin. Tutorial: Historical Review of the Study of Metabolism. *Journal of Clinical Engineering*. 1980, **5**(2), 113-115.
- [19] Calorimetry: The Basis of the Science of Nutrition. *AMA Arch Intern Med*. 1959, **103**(1), 146-154. Dostupné z: doi:10.1001/archinte.1959.00270010152020
- [20] BARANAUSKIENÉ, Lina, Jurgita MATULIENÉ a Daumantas MATULIS. Titration Calorimetry Standards and the Precision of Isothermal Titration Calorimetry Data. *International Journal of Molecular Sciences*. 2009, **10**(6), 2752-2762. Dostupné z: doi:10.3390/ijms10062752
- [21] BRAISSANT, Olivier, Dieter WIRZ, Beat GÖPFERT a Alma U. DANIELS. Use of isothermal microcalorimetry to monitor microbial activities. *FEMS Microbiology Letters*. 2010, **303**(1), 1-8. Dostupné z: doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01819.x
- [22] NOWOTTNY, Jonas. *High-Pressure Calorimetry: Evaluation of Methods and Measurement of Heat Capacities*. Germany: Shaker, 2021. ISBN 978-3-8440-8074-2.

- [23] ZUMDAHL, Steven S., Susan A. ZUMDAHL a Donald J. DECOSTE. *Chemistry*. Tenth Edition. Canada: Cengage Learning, 2018. ISBN 978-1305957404.
- [24] SARGE, Stefan M., Günther W. H. HÖHNE a Wolfgang HEMMINGER. *Calorimetry: Fundamentals Instrumentation and Applications*. Germany: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, 2014. ISBN 9783527327614.
- [25] WOODS, Amy a Lila CHAVEZ. *Differential Scanning Calorimetry: Basics and Applications*. New York: Nova Science Pub, 2018. ISBN 978-1536133356.
- [26] LEYVA-PORRAS, César, Pedro CRUZ-ALCANTAR, Vicente ESPINOSA-SOLÍS, Eduardo MARTÍNEZ-GUERRA, Claudia I. PIÑÓN-BALDERRAMA, Isaac COMPEAN MARTÍNEZ a María Z. SAAVEDRA-LEOS. Application of Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Modulated Differential Scanning Calorimetry (MDSC) in Food and Drug Industries. *Polymers* 2020, **12**(1), 1-21. Dostupné z: doi:10.3390/polym12010005
- [27] LINSEIS, Claus. *Diferencial scanning calorimeter*. USA: Linseis Inc, 2019. Dostupné z: <https://pdf.directindustry.com/pdf/linseis-thermal-analysis-30771.html>
- [28] FERNÁNDEZ, Matilde, Álvaro ORTEGA, Miriam RICO-JIMÉNEZ, David MARTÍN-MORA, Abdelali DADDAOUA, Miguel A. MATILLA a Tino KRELL. High-Throughput Screening to Identify Chemoreceptor Ligands. *Methods in Molecular Biology*. 2018, **1729**(1), 291-301. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-7577-8_23
- [29] MARTINEZ, Jose C., Javier MURCIANO-CALLES, Eva S. COBOS, Manuel I. IGLESIAS-BEXIGA, Irene LUQUE a Javier RUIZ-SANZ. Isothermal Titration Calorimetry: Thermodynamic Analysis of the Binding Thermograms of Molecular Recognition Events by Using Equilibrium Models. *Intech*. 2013, **13**(4), 73-104. Dostupné z: doi:10.5772/53311
- [30] MISRA, Gauri, ed. *Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources*. Great Britain: Academic Press, 2019. ISBN 978-0-12-816548-5.
- [31] HOFER, Ctirad. Mikrokalorimetrie biologicky významných molekul. *Československý časopis pro fyziku*. Česká republika: Fyzikální ústav AVČR, 2006, **56**(5), s. 288-292.
- [32] *VP-ITC MicroCalorimeter: User's Manual*. Northampton, USA: MicroCal, LL. 107 s. Dostupné z: https://ctrstbio.org.uic.edu/manuals/vpita_manual.pdf

- [33] FREIRE, Ernesto, Obdulio L. MAYORGA a Martin STRAUME. Isothermal titration calorimetry. *Analytical chemistry*. 1990, **62**(18), 950A-959A. Dostupné z: doi:10.1021/ac00217a002
- [34] VELÁZQUEZ-CAMPOY, Adrián, Hiroyasu OHTAKA, Azin NEZAMI, Salman MUZAMMIL a Ernesto FREIRE. Isothermal Titration Calorimetry. *Current Protocols in Cell Biology*. 2004, **23**(1), 17.8.1-.17.8.24. Dostupné z: doi:10.1002/0471143030.cb1708s23
- [35] COURTOIS, J. a Jean Francois BERRET. Probing Oppositely Charged Surfactant and Copolymer Interactions by Isothermal Titration Microcalorimetry. *Langmuir*. 2010, **26**(14), 11750-11758. Dostupné z: doi:10.1021/la101475x
- [36] ENNIFAR, Eric, ed. *Microcalorimetry of Biological Molecules*. New Jersey: Humana Press, 2019. ISBN 978-1-4939-9179-2.
- [37] SERDYUK, Igor N., Nathan R. ZACCAI a Joseph ZACCAI. Methods in Molecular Biophysics: Structure, Dynamics, Function. *Cambridge University Press*. 2007, 221-233. Dostupné z: doi:10.1017/CBO9780511811166.012
- [38] *Microcal ITC systems: Understanding biomolecular interactions*. Worcestershire, UK: Malvern Instruments Limited. 1-16 s. Dostupné z: <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/product-range/microcal-range/microcal-itc-range>
- [39] LEAVITT, Stephanie A. a Ernesto FREIRE, VELÁZQUEZ-CAMPOY, Adrian, ed. *Characterization of Protein-Protein Interactions by Isothermal Titration Calorimetry*. New Jersey: Humana Press, 2004. ISBN 978-1-58829-120-2.
- [40] LINKUVIENĖ, Vaida, Georg KRAINER, Wen-Yih CHEN a Daumantas MATULIS. Isothermal titration calorimetry for drug design: Precision of the enthalpy and binding constant measurements and comparison of the instruments. *Analytical Biochemistry*. 2016, **515**(1), 61-64. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2016.10.005
- [41] *MicroCal PEAQ-ITC Automated: User Manual*. Worcestershire, UK: Malvern Instruments Limited. 1-126 s. Dostupné

z: <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/product-range/microcal-range/microcal-itc-range>

[42] *MicroCal iTC200 system: User Manual*. Worcestershire, UK: Malvern Instruments Limited. 1-328 s. Dostupné

z: <https://www.isbg.fr/IMG/pdf/microcal-itc200-system-user-manual-malvern.pdf>

[43] *Nano Isothermal Titration Calorimetry: Nano ITC*. New Castle, USA: T.A. Instruments 1-50 s. Dostupné

z: <https://biochem.wisc.edu/sites/default/files/equipment/manuals/tainstrumentsnanoitcusermanual.pdf>

[44] DOYLE, Michael L. Characterization of binding interactions by isothermal titration calorimetry. Online. *Current Opinion in Biotechnology*. 1997, roč. 8, č. 1, s. 31-35. ISSN 09581669. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(97\)80154-1](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(97)80154-1).

[45] KARDOS, József; YAMAMOTO, Kaori; HASEGAWA, Kazuhiro; NAIKI, Hironobu a GOTO, Yuji. Direct Measurement of the Thermodynamic Parameters of Amyloid Formation by Isothermal Titration Calorimetry. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2004, roč. 279, č. 53, s. 55308-55314. ISSN 00219258. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074/jbc.M409677200>.

[46] LIANG, Y. Applications of isothermal titration calorimetry in protein folding and molecular recognition. Online. *Journal of the Iranian Chemical Society*. 2006, roč. 3, č. 3, s. 209-219. ISSN 1735-207X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/BF03247210>.

[47] BOUCHEMAL, Kawthar a MAZZAFERRO, Silvia. How to conduct and interpret ITC experiments accurately for cyclodextrin–guest interactions. Online. *Drug Discovery Today*. 2012, roč. 17, č. 11-12, s. 623-629. ISSN 13596446. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.01.023>.

[48] CAMERON, Diane L.; JAKUS, Joanna; PAULETA, Sofia R.; PETTIGREW, Graham W. a COOPER, Alan. Pressure Perturbation Calorimetry and the Thermodynamics of Noncovalent Interactions in Water: Comparison of Protein–Protein, Protein–Ligand, and Cyclodextrin–Adamantane Complexes. Online. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2010, roč. 114, č. 49, s. 16228-16235. ISSN 1520-6106. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jp107110t>.

- [49] WSZELAKA-RYLIK, Małgorzata a GIERYCZ, Paweł. Isothermal titration calorimetry (ITC) study of natural cyclodextrins inclusion complexes with drugs. Online. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2013, roč. 111, č. 3, s. 2029-2035. ISSN 1388-6150. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10973-012-2251-4>.
- [50] ZHENG, C. J.; HAN, L. Y.; YAP, C. W.; JI, Z. L.; CAO, Z. W. et al. Therapeutic Targets: Progress of Their Exploration and Investigation of Their Characteristics. Online. *Pharmacological Reviews*. 2006, roč. 58, č. 2, s. 259-279. ISSN 0031-6997. Dostupné z: <https://doi.org/10.1124/pr.58.2.4>.
- [51] LONHIENNE, Thierry G. A. a WINZOR, Donald J. Calorimetric Demonstration of the Potential of Molecular Crowding To Emulate the Effect of an Allosteric Activator on Pyruvate Kinase Kinetics. Online. *Biochemistry*. 2002, roč. 41, č. 22, s. 6897-6901. ISSN 0006-2960. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/bi020064h>.
- [52] VELAZQUEZ-CAMPOY, Adrian; LEAVITT, Stephanie A.; FREIRE, Ernesto a FU, Haiyan. Characterization of Protein–Protein Interactions by Isothermal Titration Calorimetry. Online. In: *Protein-Protein Interactions*. New Jersey: Humana Press, 2004, s. 035-054. ISBN 1-59259-762-9. Dostupné z: <https://doi.org/10.1385/1-59259-762-9:035>.
- [53] ZHAO, Lei a CHMIELEWSKI, Jean. Inhibiting protein–protein interactions using designed molecules. Online. *Current Opinion in Structural Biology*. 2005, roč. 15, č. 1, s. 31-34. ISSN 0959440X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2005.01.005>.
- [54] PRIVALOV, Peter L. a DRAGAN, Anatoly I. Microcalorimetry of biological macromolecules. Online. *Biophysical Chemistry*. 2007, roč. 126, č. 1-3, s. 16-24. ISSN 03014622. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2006.05.004>.
- [55] GONTIER, Amandine; VARELA, Paloma F.; NEMOZ, Clément; ROPARS, Virginie; AUMONT-NICAISE, Magali et al. Measurements of Protein–DNA Complexes Interactions by Isothermal Titration Calorimetry (ITC) and Microscale Thermophoresis (MST). Online. In: POTERSZMAN, Arnaud (ed.). *Multiprotein Complexes. Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer US, 2021, s. 125-143. ISBN 978-1-0716-1125-8. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1126-5_7.

- [56] DUTTA, Amit K.; RÖSGEN, Jörg a RAJARATHNAM, Krishna. Using Isothermal Titration Calorimetry to Determine Thermodynamic Parameters of Protein–Glycosaminoglycan Interactions. Online. In: BALAGURUNATHAN, Kuberan; NAKATO, Hiroshi a DESAI, Umesh R. (ed.). Glycosaminoglycans. Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2015, s. 315-324. ISBN 978-1-4939-1713-6. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1714-3_25.
- [57] PACE, C. Nick; VAJDOS, Felix; FEE, Lanette; GRIMSLEY, Gerald a GRAY, Theronica. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. Online. Protein Science. 1995, roč. 4, č. 11, s. 2411-2423. ISSN 0961-8368. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/pro.5560041120>.
- [58] RAJARATHNAM, Krishna a RÖSGEN, Jörg. Isothermal titration calorimetry of membrane proteins — Progress and challenges. Online. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 2014, roč. 1838, č. 1, s. 69-77. ISSN 00052736. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.05.023>.
- [59] VENKATARAMAN, G; SASISEKHARAN, V; HERR, A B; ORNITZ, D M; WAKSMAN, G et al. Preferential self-association of basic fibroblast growth factor is stabilized by heparin during receptor dimerization and activation. Online. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1996, roč. 93, č. 2, s. 845-850. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <https://doi.org/10.1073/pnas.93.2.845>.
- [60] BARANAUSKIENE, Lina; KUO, Tai-Chih; CHEN, Wen-Yih a MATULIS, Daumantas. Isothermal titration calorimetry for characterization of recombinant proteins. Online. Current Opinion in Biotechnology. 2019, roč. 55, s. 9-15. ISSN 09581669. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.06.003>.
- [61] LIMA CAVALCANTI, Iago Dillion; XAVIER JUNIOR, Francisco Humberto; SANTOS MAGALHÃES, Nereide Stela a LIRA NOGUEIRA, Mariane Cajubá de Britto. Isothermal titration calorimetry (ITC) as a promising tool in pharmaceutical nanotechnology. Online. International Journal of Pharmaceutics. 2023, roč. 641. ISSN 03785173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123063>.

[62] WANG, Shih-Ting; LIN, Yiyang; TODOROVA, Nevena; XU, Yingqi; MAZO, Manuel et al. Facet-Dependent Interactions of Islet Amyloid Polypeptide with Gold Nanoparticles: Implications for Fibril Formation and Peptide-Induced Lipid Membrane Disruption. Online. Chemistry of Materials. 2017, roč. 29, č. 4, s. 1550-1560. ISSN 0897-4756. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.6b04144>.

[63] TOSHIMA, Naoki; KANEMARU, Masao; SHIRAISHI, Yukihide a KOGA, Yoshikata. Spontaneous Formation of Core/Shell Bimetallic Nanoparticles: A Calorimetric Study. Online. The Journal of Physical Chemistry B. 2005, roč. 109, č. 34, s. 16326-16331. ISSN 1520-6106. Dostupné z: <https://doi.org/10.1021/jp051400h>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

GE general electric

ITC izotermální titrační kalorimetrie

DSC diferenční skenovací kalorimetrie

DNA deoxyribonukleová kyselina

NMR nukleární magnetická rezonance

ADP adenosindifosfát

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| Obrázek 1. Schéma Laplace–Lavoisierova kalorimetru (upraveno dle ¹⁷)..... | 17 |
| Obrázek 2. Schéma coffee cup kalorimetru (upraveno dle ²³) | 19 |
| Obrázek 3. Schéma bombového kalorimetru (upraveno dle ²³) | 20 |
| Obrázek 4. Schéma diferenčního skenovacího kalorimetru (upraveno dle ²⁷) | 20 |
| Obrázek 5. Čip diferenčního skenovacího kalorimetru ²⁷ | 21 |
| Obrázek 6. Schéma integrace částí diferenčního skenovacího kalorimetru do čipu (upraveno dle ²⁷) | 21 |
| Obrázek 7. Chip–DSC 1 ²⁷ | 22 |
| Obrázek 8. Schéma izotermálního titračního kalorimetru (upraveno dle ²⁹)..... | 22 |
| Obrázek 9. Schéma ITC (upraveno dle ³²) | 24 |
| Obrázek 10. Zjednodušené schéma mikrokolorimetru (upraveno dle ³⁴)..... | 24 |
| Obrázek 11. Výsledný graf měření se sigmoidální křivkou (upraveno dle ³⁸)..... | 26 |
| Obrázek 12. Obrázek modelu MicroCal VP-ITC (dle ³⁸)..... | 27 |
| Obrázek 13. Obrázek modelu PEAQ-ITC (dle ³⁸)..... | 27 |
| Obrázek 14. Obrázek modelu PEAQ-ITC Automated (dle ³⁸)..... | 28 |
| Obrázek 15. Obrázek modelu Microcal iTC200 (dle ³⁸) | 29 |
| Obrázek 16. 3D Schéma modelu Nano-ITC (dle ⁴³) | 30 |
| Obrázek 17. 3D Schéma modelu Nano-ITC, zaměřeno na injekční jehlu se zabudovaným míchadlem (dle ⁴³) | 30 |
| Obrázek 18. Strukturní vzorec α -cyklodextrinu | 34 |
| Obrázek 19. Strukturní vzorec β -cyklodextrinu | 34 |
| Obrázek 20. Strukturní vzorec γ -cyklodextrinu | 34 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|--|----|
| Tabulka 1. Porovnání mikrokalorimetrů MicroCal PEAQ-ITC Automated, MicroCal PEAQ-ITC a MicroCal VP-ITC | 28 |
| Tabulka 2. Detailní srovnání všech modelů kalorimetrů..... | 31 |