

Osteoarthritis & Cartilage (1)

# **"Badanie porównawcze właściwości fizykochemicznych dostawowych Kwasów Hialuronowych"**

Odpowiedzialny naukowiec:

Dr. Julio Gabriel Prieto Fernandez  
Uniwersytet León, Hiszpania

León, PAŹDZIERNIK 2016

## PRZEDSTAWIONE CELE:

Konkretne cele niniejszego projektu są następujące:

1. Przygotowanie i przeprowadzenie charakterystyki reologicznej poprzez moduł sprężystości i moduł lepkości ( $G'$  i  $G''$ ) kwasu hialuronowego "Chondrovital Gel 2,5%, 3 ml"
2. Określenie masy cząsteczkowej tychże kwasów hialuronowych, poprzez HPLC techniką SEC.

## ZASTOSOWANY MATERIAŁ:

Aby zrealizować założone cele projektu, postępowaliśmy zgodnie z protokołem, według którego przeprowadzone zostały trzy powtórzenia dla każdego pomiaru badanej próbki Chondrovital Gel® 2,5% (SERIA: CGP35300, DATA WAŻN. 2018-09).

### 1. Właściwości reologiczne:

W celu pomiaru właściwości reologicznych zastosowano tryb oscylacyjny, jako że dla produktów lepkosprężystych jest on bardziej adekwatny. Zastosowana została częstotliwość wzrastająca od 0,01Hz do 20Hz z naprężeniem (20 Pa), które zostało wybrane dla celów badania zgodnie z wynikami otrzymanymi w badaniu wstępnym, w którym zostało określone naprężenie dla lepkosprężystości liniowej (VLR), jako średnia naprężeń między różnymi konsystencjami cieczy do badań. Zastosowana została geometria najbardziej odpowiednia do otrzymania dobrej powtarzalności pomiarów, czyli stożek-płytką (40 mm).

Parametry, takie jak moduł dynamiczny sprężystości lub moduł przechowywania ( $G'$ ) (który oznacza przechowywanie sprężyste energii odnawialnej odkształcenia w ciele stałym elastycznym) i moduł lepkości lub moduł stratności ( $G''$ ) (który opisuje rozpraszanie elastyczne lub stratność energii poprzez stałe odkształcanie cieczy), które m.in. są bardzo przydatne w charakteryzowaniu lepkosprężystych właściwości roztworów polimerowych, w naszym badaniu kwasu hialuronowego, oraz również chciano podkreślić funkcję biomechaniczną tych cieczy przeznaczonych do uzupełniania płynu stawowego.

W laboratorium przeprowadzone zostały badania próbek kwasu hialuronowego opisanego powyżej, z którego w wyniku różnych powtórzeń otrzymano średnie wartości.

Wykresy mogą pokazać następujące wyniki:

Oдноśnie lepkosprężystości, może być przedstawiona w łatwy sposób za pomocą wykresu modułów lepkości i sprężystości vs częstotliwość, ukazując oba składniki produktów lepkosprężystych (Tabela 1 i Rys. 1):

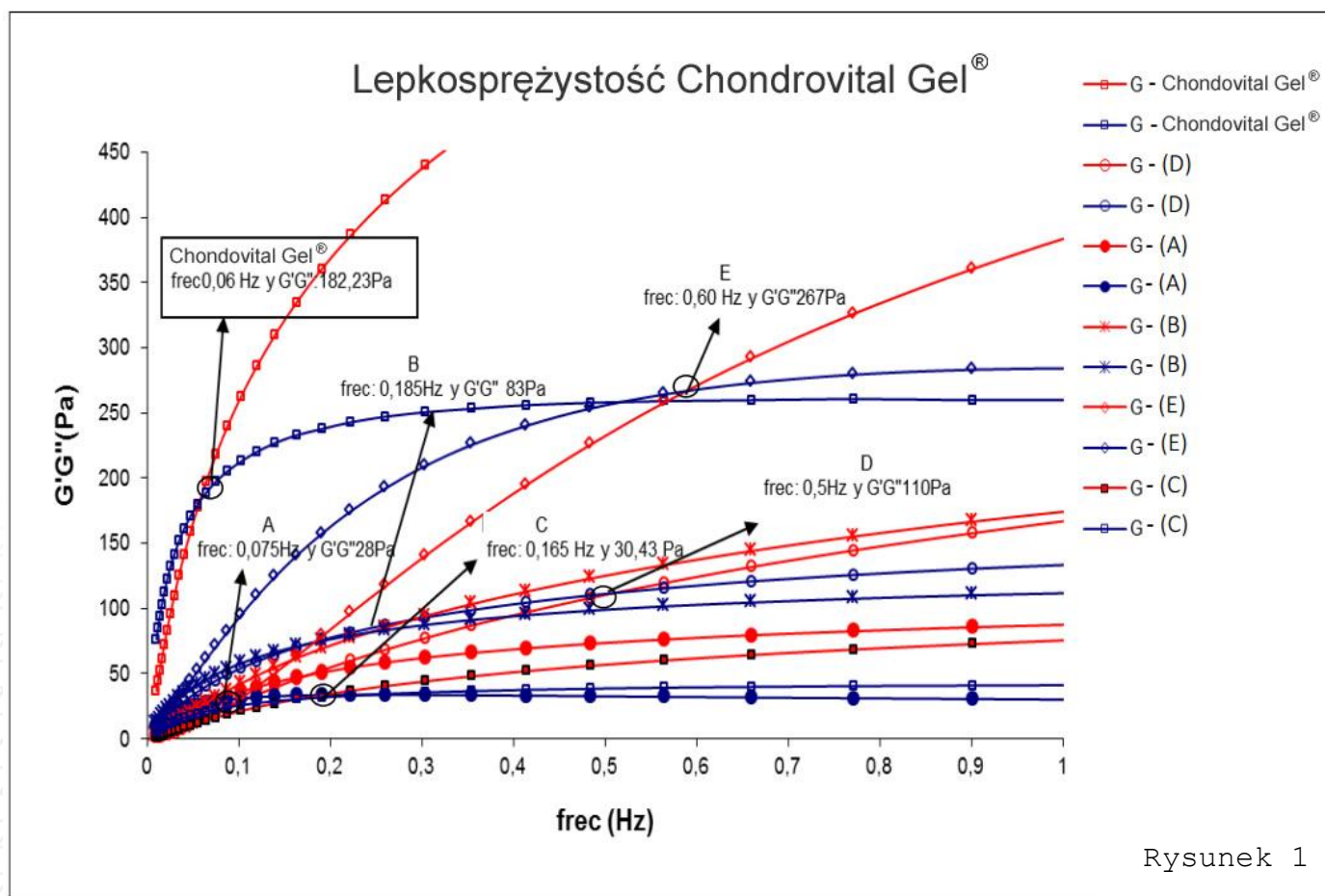
Na Rys. 1 przedstawione są modele reologiczne w zestawieniu, w porównaniu z innymi wynikami doświadczeń otrzymanymi przez naszą grupę w innych kwasach hialuronowych (zaznaczonych A, B, C, D, E). Trzeba wziąć pod uwagę, że im mniejsze będą częstotliwości, przy których produkt osiągnie punkt podziału pasma ("cross over point"), tym większe będzie miał właściwości sprężyste. Oczekuje się, że przy zwiększeniu masy cząsteczkowej i stężenia, punkt podziału pasma

zostanie osiągnięty przy niższych częstotliwościach. W naszym przypadku otrzymujemy efekt synergiczny obu parametrów (wysoka m. cz. i wysokie stężenie).

Tabela 1.

### "Cross Over point"

Produkty	Częst. (Hz)	G'=G''(Pa)
A	0,07	28,21
B	0,185	83,10
C	0,165	30,43
D	0,51	111,93
E	0,60	268,10
Chondrovital Gel	0,06 ± 0,006	182,23 ± 6,40



Rysunek 1

## 1. - Badanie odporności na degradację:

### 1.1 - Degradacja chemiczna z rodnikami OH, przez zastosowanie reakcji Fentona.

Z każdej próbki pobrano równo 200mg, które zostały zinkubowane w 37 °C przez 24 godziny, następnie dodano 10 pL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, po czym mieszając energicznie przez 1 min, kontynuowano kinetykę degradacji metodą HPLC opisaną w projekcie. Wyniki będą mierzone w różnych odstępach czasu między 0 a 90 minutami (0, 15, 30, 45, 60, 75, y 90) po uprzednim dodaniu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Badania zostały przeprowadzone trzykrotnie.

Wykres porównujący wszystkie próbki, otrzymany jako średni wynik trzech powtórzeń:

Tabela 2.

<b>t reakcja</b>	<b>% rem prom</b>
<b>0</b>	<b>100</b>
<b>15</b>	<b>93,5 ± 4,8</b>
<b>30</b>	<b>92,6 ± 4,6</b>
<b>45</b>	<b>91,5 ± 4,9</b>
<b>60</b>	<b>91,2 ± 4,4</b>
<b>75</b>	<b>90,4 ± 4,6</b>
<b>90</b>	<b>90,2 ± 4,5</b>

### 1.2 - Degradacja enzymatyczna, poprzez reakcję z hialuronidazą.

Z każdej próbki pobrano równo 150 mg, które wprowadzono w reakcję z 50UI otrzymując objętość końcową hialuronidazy z jądra wołu (H3884 - Sigma), gdzie kinetyka reakcji była mierzona co 15 minut w HPLC w temperaturze 37 °C w strumienicy. Jako początek reakcji ustanawia się fiolkę z próbkę bez reakcji, przyjmując jako wartość reakcji 0 (t<sub>0</sub>). W Tabeli 3 przedstawiono degradację w procentach:

Tabela 3.

<b>t reakcja</b>	<b>% rem prom</b>
<b>0</b>	<b>100</b>
<b>15</b>	<b>95,1 ± 3,4</b>
<b>30</b>	<b>88,6 ± 3,0</b>
<b>45</b>	<b>86,3 ± 3,1</b>
<b>60</b>	<b>84,6 ± 3,0</b>
<b>75</b>	<b>83,5 ± 2,7</b>
<b>90</b>	<b>82,6 ± 2,2</b>

## 2. - Określenie masy cząsteczkowej:

Masa cząsteczkowa obliczana jest za pomocą uprzedniej budowy wzorca standardowego, w którym użyte zostały wzorce Kwasu hialuronowego o znanej masie cząsteczkowej (pochodzące z Life Score) poprzez HPLC techniką SEC (GPC), która oparta jest na określaniu czasu retencji dla każdej użytej masy cząsteczkowej.

Otrzymano reprezentację liniową przedstawiając Log m.cz. vs czas retencji (tR)

Otrzymane równanie dla krzywej standardowej:

$$Y (\text{Log m. cz.}) = -0,4829 \times tR + 6,5644 (R^2 = 0,9943)$$

Jako że tR dla Chondrovital Gel® wynosi 6,45 zastosowanie tego równania pozwala nam otrzymać wartość przybliżoną dla jej masy cząsteczkowej 2840 KDa.

## Wnioski

Wyniki otrzymane w badaniu reologicznym wskazują na bardzo korzystne zachowanie lepkosprężyste jako konsekwencję efektu synergicznego wysokiego stężenia kwasu hialuronowego i stosunkowo dużej masy cząsteczkowej, nie będąc produktem wynikającym z procesów crossing-over. Otrzymano wysoką twardość (182,23 Pa) w punkcie podziału pasma, gdzie występuje zmiana w zachowaniu z "lepkiego" na "sprężysty". Ta wysoka twardość ukazuje zdolność zmniejszania ścinania się stawu podczas chodzenia i oferowania większej lubrykacji, aby zapobiec uszkodzeniu chrząstki, a tym samym w celu jej ochrony.

W odniesieniu do właściwości sprężystych, produkt wykazuje wysoką sprężystość przy niskiej częstotliwości (0,06Hz), umieszczając go w tym zakresie na czele kwasów hialuronowych o największej sprężystości, które są dostępne obecnie na rynku (Rysunek 1).