

UNIVERZITA KARLOVA
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Ondřej Petrák

Studie vlivu protaminu na nepřímé elektroforetické stanovení
heparinu

Characterization of protamine influence on indirect
electrophoretic determination of heparin

Bakalářská práce

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

Praha 2018

Prohlášení

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

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

V Praze dne 21.8.2018

Poděkování

Rád bych chtěl poděkovat mému školiteli RNDr. Tomáši Křížkovi, PhD., za jeho neocenitelné rady a pomoc při tvorbě této práce. Chtěl bych též poděkovat mé rodině, přátelům a přítelkyni za veškerou podporu, kterou mi při psaní této práce poskytli.

Obsah

Seznam použitých zkratk a symbolů	5
1 Cíl práce.....	6
2. Úvod.....	7
2.1 Heparin.....	7
2.2 Existující metody pro stanovení heparinu	8
2.2.1 Metody biochemické.....	8
2.2.2 Metody spektrofotometrické.....	8
2.2.3 Metody elektrochemické	9
2.2.4 Metody separační.....	9
2.3 Protamin.....	11
2.3.1 Interakce protaminu s heparinem.....	11
2.4 Afinitní elektroforéza	11
2.4.1 Historie	11
2.4.2 Využití.....	12
2.4.3 Využití afinitní elektroforézy pro stanovení heparinu	12
3. Experimentální část.....	13
3.1 Použité chemikálie a přístroje	13
3.2 Chemikálie	13
3.3 Přístroje a jiné vybavení.....	13
3.4 Metoda stanovení heparinu	14
4. Výsledky a diskuse.....	15
4.1 Optimalizace metody	15
4.2 Vliv heparinu na pík TA	19
4.3 Vliv protaminu na pík TA.....	21
4.4 Vliv směsí heparinu a protaminu na pík TA	23
5 Závěr	25
6 Literatura:	26

Seznam použitých zkratk a symbolů

BGE – background electrolyte, základní elektrolyt.

CE – capillary electrophoresis, kapilární elektroforéza

CZE – capillary zone electrophoresis, kapilární zónová elektroforéza

LC – liquid chromatography, kapalinová chromatografie

LMWH – low molecular weight heparin, nízkomolekulární heparin

MS – mass spectrometry, hmotnostní spektrometrie

NH – nefrakcionovaný heparin

PAGE–polyacrylamide gel electrophoresis, elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

TA – tetraarginin

λ – vlnová délka

1 Cíl práce

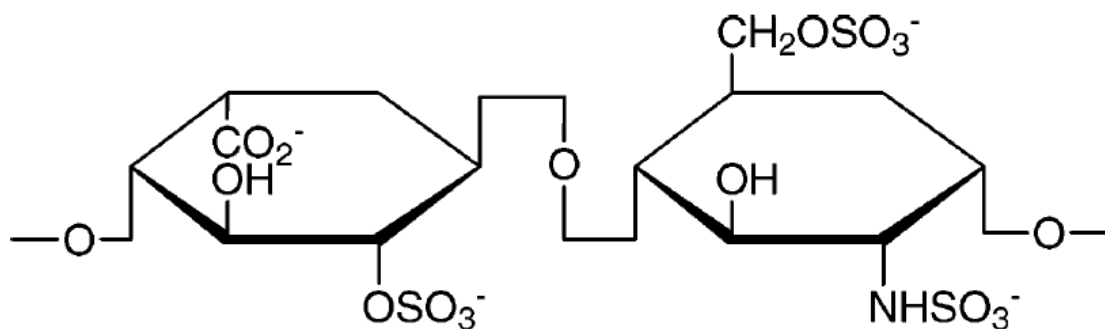
Heparin je látkou se širokým využitím v medicíně, a proto jsou zapotřebí analytické metody pro jeho rychlé a přesné stanovení v lidské plasmě či krvi při co nejnižších nákladech. Cílem mé bakalářské práce je zjištění, jaký vliv má přítomnost protaminu na stanovení heparinu ve vzorku metodou afinitní kapilární elektroforézy.

2. Úvod

2.1 Heparin

Heparin je sulfatovaný polysacharid patřící mezi glykosaminoglykany. Jedná se o lineární polysacharid tvořený proměnlivými sekvencemi disacharidů, jehož struktura je studována již více než 50 let. Důvodem tohoto studia je vysvětlení jeho silné antikoagulační aktivity [1]. Tento řetězec je nazýván jako tzv. nefrakcionovaný heparin (NH). Nejvíce se v něm vyskytuje hlavní opakující se disacharidová jednotka – Obr. 1. Molekula heparinu je silně negativně nabitá a není možné přesně určit její relativní molekulovou hmotnost – ta se u heparinu pohybuje v rozmezí 5 000 – 40 000 [2]. Jelikož je skladba disacharidových podjednotek rozdílná, je heparin polydisperzní, a proto je nemožné určit jeho přesnou strukturu [3]. Lze získat pouze frakce s podobnou molekulovou hmotností. Tyto frakce obsahující pouze krátké oligosacharidové podjednotky jsou nazývány nízkomolekulární hepariny (low-molecular-weight-heparin, LMWH). Heparin se přirozeně vyskytuje v lidském těle v bazofilních granulocytech a žírných buňkách [4], kde bývá syntetizován ze svého prekurzoru, kterým je N-acetyl heparosan. [1]

Bývá získáván ze střevní sliznice vepřů a plic skotu. Zdroj má vliv na strukturu heparinové molekuly.



Obr. 1 – Hlavní opakující se disacharidová podjednotka heparinu. Převzato z [2]

Bylo popsáno vícero proteinů schopných vázat heparin, které obsahují stejnou sekvenci zodpovědnou za tuto interakci [5]. Nejlépe popsanou interakcí mezi heparinem a proteinem je ta s antithrombinem III. Antithrombin inhibuje thrombin ve velmi pomalé reakci, což přirozeně reguluje srážení krve. Tato reakce je značně urychlena působením heparinu, který tedy vystupuje jako antikoagulant [1].

Jelikož heparin může, ve vyšších dávkách, způsobit krvácení, je třeba jeho hladinu kontrolovat. Toho může být docíleno například jeho navázáním na molekuly protaminu [6].

2.2 Existující metody pro stanovení heparinu

Důležitost použití heparinu v lékařství je důvodem pro potřebu jeho stanovení. Heparin je v současnosti jednou z nejsledovanějších biomolekul vůbec. Jeho správné dávkování je klíčové – při malých dávkách může dojít k trombotickým komplikacím, při příliš velkých dávkách naopak hrozí vykrvácení. Metody lze rozdělit do několika typů – biochemické, spektrofotometrické, elektrochemické a separační.

2.2.1 Metody biochemické

Týkají se především lékových forem. Například stanovení heparinu založené na *in vitro* porovnání rychlosti srážení rekalciifikované citrátové ovčí plazmy proti standardu [7]. Další možností je využití interakce heparinu s protaminem, která má vliv na fluorescenci 8-anilinonaftalen-1-sulfonátu. Samotný heparin či protamin tuto fluorescenci ovlivňují velmi málo, jejich společný komplex ji výrazně zvyšuje. [8]

Nejčastější metodou je však využití tzv. aktivovaného parciálního tromboplastinového času. [9]

2.2.2 Metody spektrofotometrické

Khoklov a kol. [10] využili pro stanovení heparinu v modelových vzorcích absorpční spektrometrii v UV oblasti. Největší míra absorpce záření heparinových roztoků byla zjištěna při $\lambda = 257$ nm. Tato metoda vykazuje schopnost detekce heparinu až do koncentrací v řádu 10^{-6} g/l. Nevýhodou je však nízká selektivita stanovení a s ní související riziko interferencí. Alternativní možností je využití komplexu heparinu s barvivem Azure A. Tento komplex absorbuje při $\lambda = 540$ nm.

Při tomto stanovení je mez detekce heparinu 10^{-5} g/l [10]. Je vytvořeno i několik spektrofotometrických stanovení, která využívají různé chromogenní substráty, např. Chromozym-Th. Ten inaktivuje thrombin, který je ve vzorku přítomen. [11]

2.2.3 Metody elektrochemické

Heparin je též možno stanovit vícero elektrochemickými metodami. Například Piech a kolektiv [12] využili stripping voltametrii. Tato metoda umožňuje stanovení heparinu až do koncentrací 10^{-6} g/l. Dalším možným řešením je i použití potenciometrického sensoru založeného na polymeru, který vytvořil Li a kolektiv [13]. Tento sensor je vytvořen na kostře ze skelného uhlíku, která je potažena polymerem s otisknutými molekulami heparinu. Tento sensor vykazuje vysokou selektivitu a citlivost – umožňuje stanovení heparinu až do koncentrací 10^{-9} mol/l. Tato koncentrace odpovídá, podle molekulové hmotnosti stanovovaného heparinu, zhruba 10^{-6} nebo 10^{-5} g/l [13].

2.2.4 Metody separační

Lin a kolektiv [14] vytvořil funkční metodu pro stanovení směsi heparinů pomocí kapilární elektroforézy s hmotnostní spektrometrickou (MS) detekcí spojenou s elektrosprejovým zdrojem iontů. Přínosem této metody je lepší rozlišení směsí oligosacharidů ve vzorcích, než měly předchozí metody využívající MS detekci.

Tým Petera Mikuše [15] byl schopen vytvořit metodu s využitím kapilární zónové elektroforézy (CZE), která je určena pro analýzu vysokomolekulárního heparinu. Oproti předchozím postupům je tento systém hydrodynamicky uzavřený a využívá vodivostní detektor. Metoda umožňuje vysokomolekulární hepariny separovat, detekovat a kvantifikovat. Mez detekce u této metody je $4 \cdot 10^{-6}$ g/l.

Další metoda vhodná k separaci vysokomolekulárních heparinů byla vyvinuta Gunayem a Linhardtem [16]. Studované rozmezí pokrývá tetra- až tetradecasacharidy. Je při ní využita kapilární elektroforéza (CE) kompatibilní s MS detekcí, avšak v citovaném provedení metody byla využita detekce pomocí detektoru diodového pole při $\lambda = 232$ nm, na kterou navazuje PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis), která byla prováděna pro srovnání. Nevýhodou této metody je delší doba nutná pro její dokončení – samotná PAGE trvá 3,5 hodiny. Poslední zmiňovanou separační metodu navrhl Patel a kol. [17] Na rozdíl od předchozí metody je tato vhodná pro separaci nízkomolekulárních a nefrakcionovaných heparinů. Dosahuje skvělé reprodukovatelnosti a je proto vhodná pro zjišťování možných rozdílů mezi jednotlivými šaržemi lékových heparinů. Jedná se o CE metodu spřaženou se spektrometrickou detekcí (deuteriová UV lampa a detektor diodového pole).

Metody umožňující separaci heparinů využívají i jiné techniky než CE. Jednou z možností je využití kapalinové chromatografie (LC, liquid chromatography). Tento postup navrhl Patel a kol. [18] Je při něm používána kolona se stacionární fází typu C_{18} . Tato metoda je vhodná pro separaci nízkomolekulárních heparinů. Alternativou může být využití LC-MS, jak navrhl Mourier a kol. [19]. Tato metoda je také využitelná pro nízkomolekulární hepariny. Její nevýhodou je značná spotřeba dusíku, který slouží k desolvataci vzorku. Tato spotřeba dosahuje celkem 775 l/min.

2.3 Protamin

Je směsí malých molekul peptidů, které vznikají v haploidní fázi spermatogeneze [20]. Obvykle je získáván z rybího mlíčí, nejpoužívanější je lososí. Protamin z lososího mlíčí je někdy nazýván salmin. Všechny protaminy jsou bohaté na arginin. Jejich struktury jsou napříč živočišnou říší rozdílné. Při určování jejich struktury bylo zjištěno, že tyto struktury neobsahují volné primární aminoskupiny, což by mohlo být vysvětleno cyklicitou molekuly. Pozdější výzkum však vysvětlil tuto absenci jiným zjištěním – řetězce protaminu jsou na N-koncích zakončeny prolinem. [21]. Stejně jako u heparinu je u protaminu velmi proměnlivá molekulová hmotnost, která se obvykle pohybuje v rozmezí od 7 000 do 10 000 Da [21]. Protamin je využíván v potravinářství jako konzervant [22] a ve farmacii jako antidotum heparinu [23].

2.3.1 Interakce protaminu s heparinem

Protamin tvoří s heparinem elektrostaticky vázané komplexy, a proto může být využíván jako heparinové antidotum. Záporně nabitě karboxylové- a síranové skupiny interagují s kladně nabitými guanidinovými skupinami ve zbytcích argininu obsažených v molekule protaminu. Molekula protaminu o $M_r = 4000$ je kompletně satureována heparinem v poměru 20 – 21:1 [24]. Jelikož je protamin cca ze 70 % tvořen argininem, víme, že se v jeho molekule vyskytuje zhruba 20 guanidinových skupin. Při výzkumu, který provedl Cundall a kolektiv bylo zjištěno, že na jednu molekulu protaminu se naváže 20 – 21 molekul heparinu. Téměř všechny tyto skupiny tedy vážou záporně nabitá místa heparinu [24].

2.4 Afinitní elektroforéza

2.4.1 Historie

Afinitní elektroforéza je metoda, která byla vytvořena Hořejším a Kocourkem v roce 1973 na Univerzitě Karlově v Praze [25]. Metoda vznikla kombinací principů afinitní chromatografie a elektroforézy. Její výhodou je mj. možnost rychlé analýzy směsi proteinů v mikroměřítku spojená se selektivní separací složek směsi, které se vážou s afinitním ligandem.

2.4.2 Využití

Tato metoda našla široké využití zejména při separaci a analýze biomolekul. Umožňuje získání jak kvantitativních, tak kvalitativních výsledků. Její přínos tkví ve využití rozdílných pohyblivostí nabitých molekul v závislosti na jejich případné interakci s jinými molekulami, ke kterým mají afinitu [26]

2.4.3 Využití afinitní elektroforézy pro stanovení heparinu

V laboratoři, kde byla vypracována tato práce, byla v minulosti studována interakce heparinu a protaminu s cílem ověření její využitelnosti v kapilární elektroforéze. První diplomová práce na toto téma [27] ukázala, že interakce heparinu a protaminu je málo reprodukovatelná kvůli tomu, že ani jedna z látek není jasně definována. Ukázalo se však, že při použití tetraargininu (TA) namísto protaminu se reprodukovatelnost dějů v kapiláře výrazně zvyšuje. Nadávkuje-li se do kapiláry nejprve zóna vzorku obsahujícího záporně nabitý heparin následovaná zónou kladně nabitého TA a mezi konce kapiláry se vloží napětí, migrují obě látky proti sobě a vzájemně spolu interagují. Díky tomu je část TA odnesena heparinem směrem k anodě. Po vypnutí napětí se zóny v kapiláře mobilizují tlakem a projdou detektorem. Velikost zaznamenaného píku TA se v určitém rozmezí lineárně snižuje s rostoucí koncentrací heparinu ve vzorku. Tento jev je možné využít ke stanovení obsahu heparinu. Druhá práce [28] se pak zabývala optimalizací podmínek tohoto stanovení a z ní vycházejí podmínky použité v této práci.

3. Experimentální část

3.1 Použité chemikálie a přístroje

3.2 Chemikálie

Hydroxyethylcelulóza (Hercules Natrosol, Wilmington, Německo)

Hydroxid sodný, 1M roztok (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo)

Heparin, sodium salt from porcine intestinal mucosa, Grade I-A, 193 USP units/mg (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Protaminsulfát, Grade X (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)

Deionizovaná voda

Tetraarginin (Bachem, Bubendorf, Švýcarsko)

Kyselina ortho-fosforečná 85%, p. a. (Lach:ner, Neratovice, Česká republika)

3.3 Přístroje a jiné vybavení

Agilent Technologies CE 1600 (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo)

Elmasonic S15, Elma Schmidbauer (Singen, Německo)

Křemenná kapilára: délka 50,0/41,5 cm, vnitřní průměr 50 μm (Polymicro Technologies, Phoenix, USA)

Aquatec CDP 6800 (Aquatec, Irvine, USA)

3.4 Metoda stanovení heparinu

Teplota kazety s kapilárou: 25°C.

Příprava nové kapiláry: promytí 1M roztokem hydroxidu sodného po dobu 10 minut, poté promytí deionizovanou vodou po dobu 10 minut.

Příprava kapiláry před začátkem série měření: promytí kapiláry deionizovanou vodou po dobu 5 minut do odpadní vialky.

Příprava kapiláry před každým jednotlivým měřením: promytí kapiláry základním elektrolytem (BGE, background electrolyte) do odpadní vialky po dobu 1 min, poté do vialky s BGE další 1 min.

Injektáž vzorku byla realizována pomocí hydrodynamického dávkování. Vzorek byl dávkován tlakem 5,0 kPa po dobu 120 s, následně byla dávkována zóna BGE stejným tlakem po dobu 90 s. Tetraarginin (TA) byl dávkován tlakem taktéž 5,0 kPa, po dobu 3 s. V posledním kroku bylo vloženo separační napětí 30 kV po dobu 30 s. Po ukončení vkládání separačního napětí byly zóny v kapiláře mobilizované tlakem 5,0 kPa a detegovány UV detektorem při $\lambda = 200$ nm. Metoda byla optimalizována – viz kapitola 4.1.

Složení BGE: 0,01M H₃PO₄ + 0,1% hydroxyethylcelulóza.

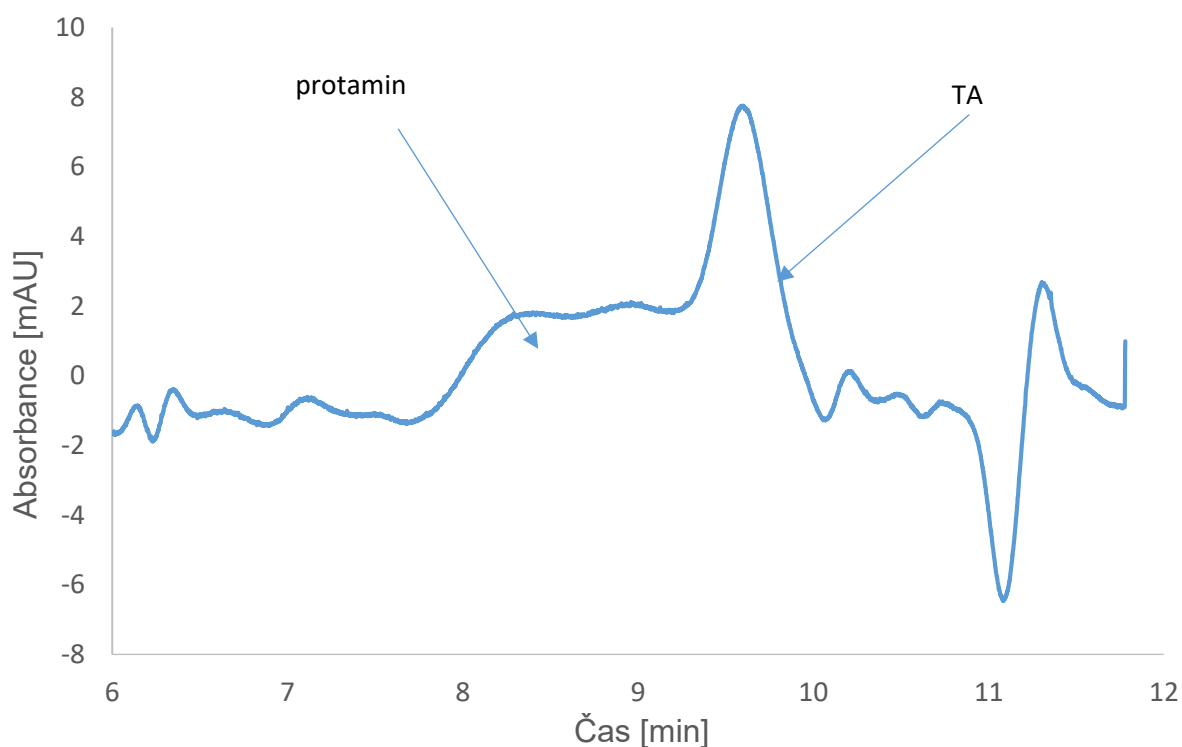
Roztok TA měl vždy koncentraci 1 mg/ml a byl připraven naředěním BGE z vodného zásobního roztoku o koncentraci 10 mg/ml.

Roztoky heparinu, protaminu a jejich směsí byly také ředěny BGE.

4. Výsledky a diskuse

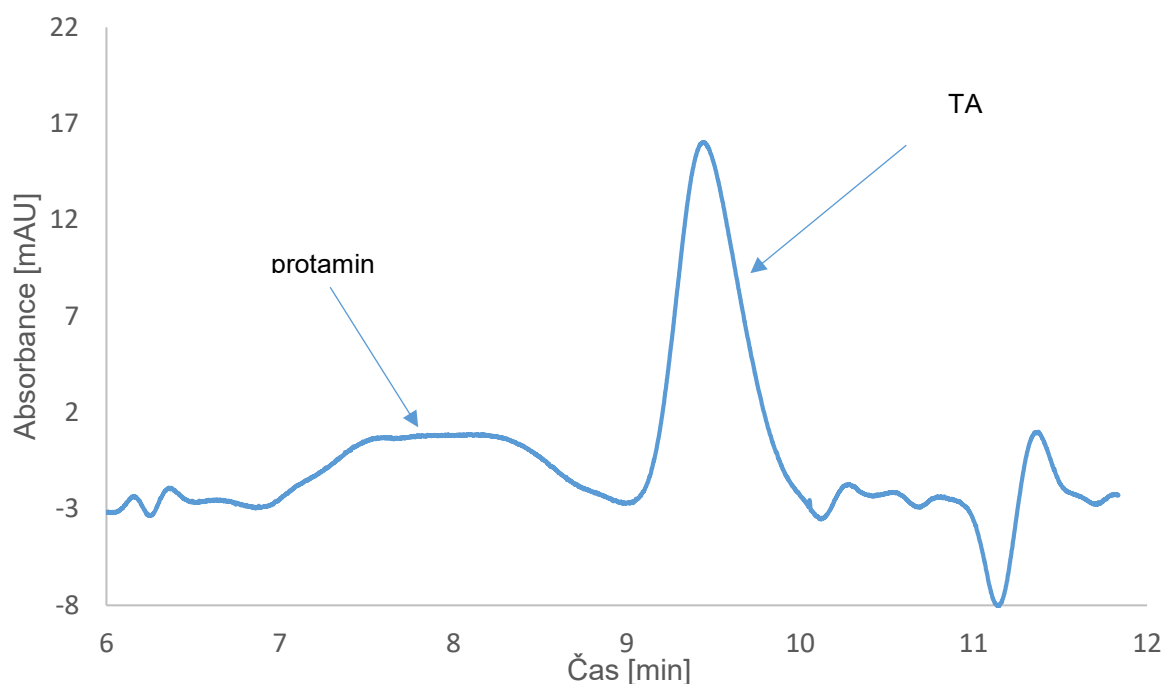
4.1 Optimalizace metody

V průběhu měření bylo vyzkoušeno několik variant, nakonec byla použita výše zmíněná metoda. Na rozdíl od předchozích prací byl do vzorku obsahujícího heparin přidáván i protamin, protože doposud nebylo studováno chování směsi heparinu, protaminu a TA v prostředí CE. Popis vlivu přítomnosti protaminu ve vzorku na stanovení heparinu je zásadní díky tomu, že protamin se používá k regulaci antikoagulačního účinku heparinu a lze tedy očekávat jeho přítomnost ve vzorcích krve. V průběhu měření bylo zjištěno, že při použití původní metody pro analýzu vzorků obsahujících protamin nedochází k úplnému rozdělení zón protaminu a TA, které jsou shodně kladně nabitě a při vložení separačního napětí tedy putují stejným směrem (ke katodě). Toto je dobře vidět na Obr. 2. Ve snaze o oddělení píku TA a protaminu byla mezi zóny vzorku a TA vložena zóna BGE. K této optimalizaci bylo přistoupeno z důvodu snahy o rozdělení píků TA a protaminu. V průběhu těchto optimalizací nebyl ve směsi přítomen heparin za účelem zjednodušení systému.



Obr 2. – Elektroforeogram z měření provedeného podle původní metody [28]. Úsek v čase 8 až 10 min dobře ukazuje důvod následné úpravy metody vložení zóny BGE. Vzorkem byl roztok protaminu v BGE o koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$.

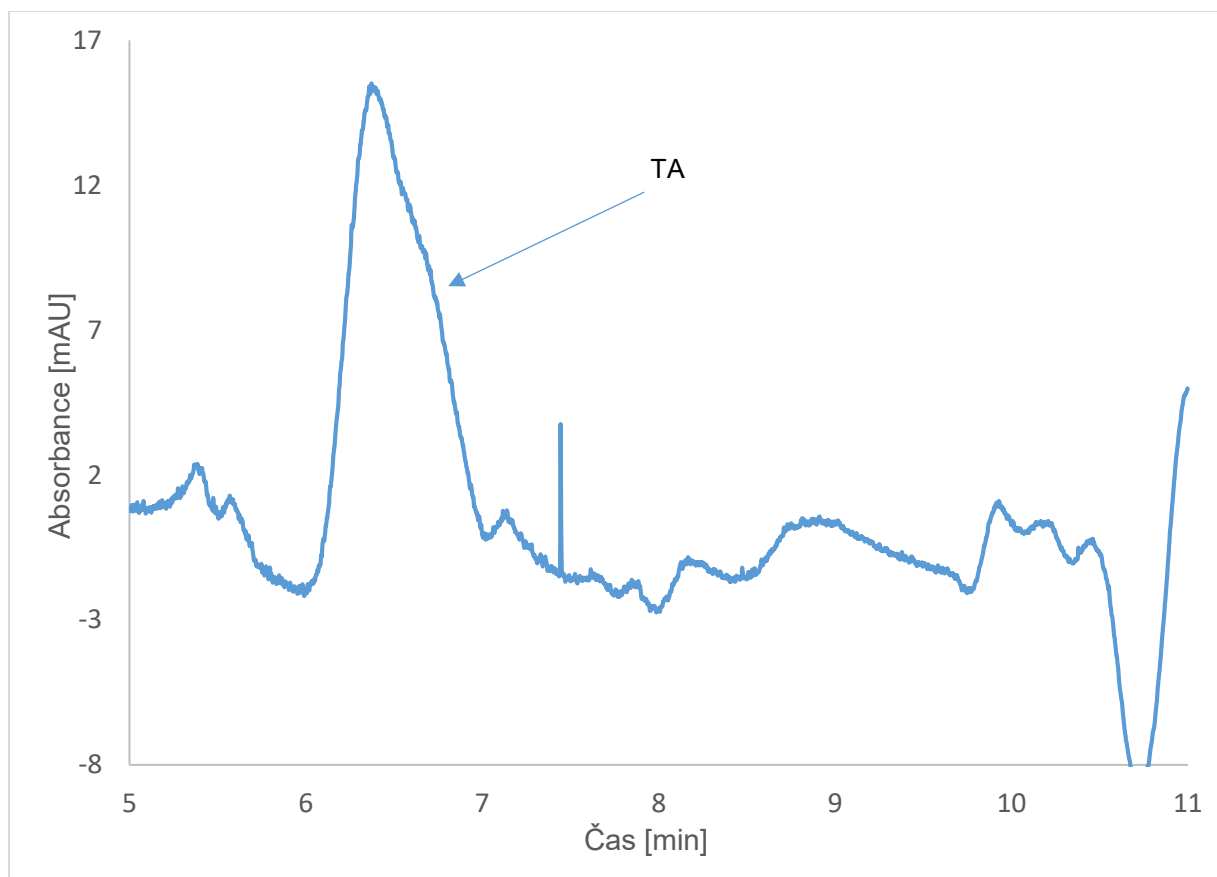
Díky této optimalizaci došlo k výraznému zvýšení rozlišení obou píků. Tato skutečnost je dobře zobrazena na Obr. 3.



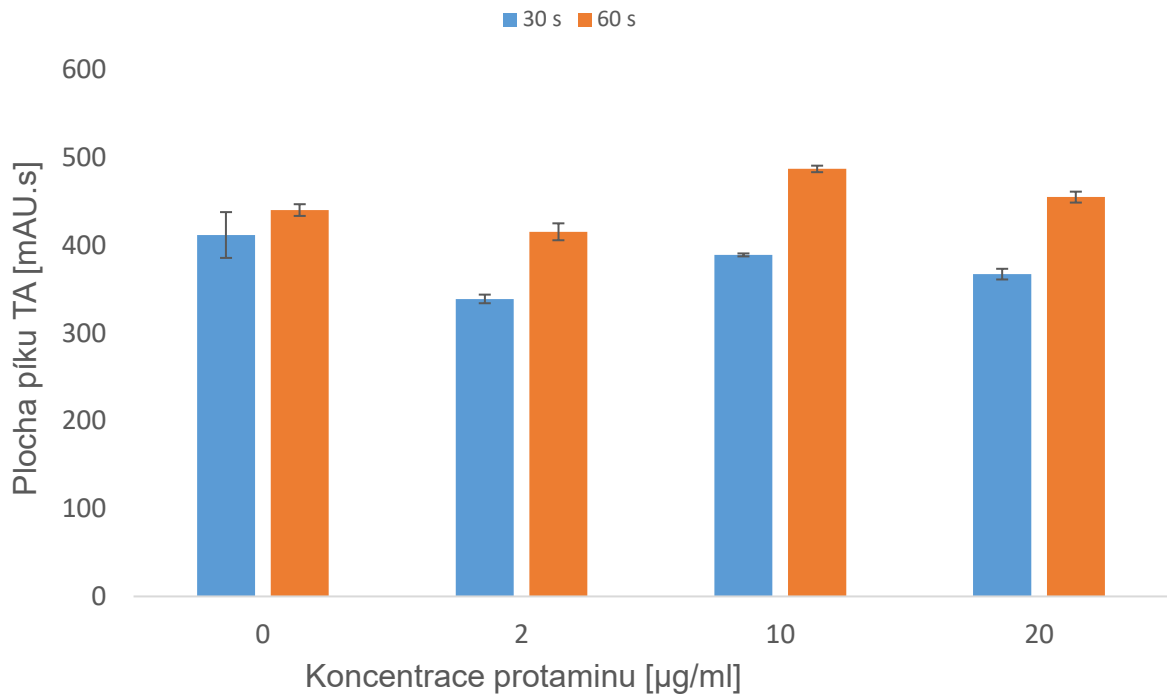
Obr. 3 – Elektroforeogram z měření po optimalizaci metody. Jak je dobře vidět na úseku v čase 8 až 10 min, došlo zde k úplnému rozdělení píků protaminu a TA. Vzorkem byl také roztok protaminu v BGE o koncentraci 20 $\mu\text{g/ml}$

Další zvažovanou optimalizací bylo prodloužení ukládání separačního napětí z 30 na 60 s. Vložení zóny BGE mezi zóny TA a vzorku přineslo otázku, zda zóny TA a heparinu, které jsou nyní více vzdáleny, stihnou během 30 s vzájemně promigrovat jedna skrz druhou. Proto bylo testováno prodloužení doby ukládání napětí. Experimenty byly prováděny s roztokem heparinu o koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$ jako vzorkem. Tato optimalizace měla pozitivní přínos ve zkrácení času, který byl potřeba pro analýzu. Pík TA procházel detektorem již v 7. minutě, tedy o 3 minuty dříve než v původní 10. minutě. Její nevýhodou však bylo značné chvostování píku TA, to mohlo být způsobeno například výraznější adsorpcí TA na povrch kapiláry při ukládání separačního napětí, tedy platilo že delší ukládání napětí odpovídá výraznější adsorpci TA. Toto je dobře vidět na Obr 4. Při ukládání separačního napětí po delší dobu došlo k nárůstu plochy píků TA ve srovnání s kratší dobou ukládání separačního napětí, a to i v přítomnosti různých koncentrací protaminu. Toto je vidět na Obr. 5.

Není jasné, proč se plocha píku TA zvětšila, nicméně fakt, že se nezmenšila, poukazuje na to, že již při vložení napětí na 30 s obě zóny zcela promigrovaly jedna skrz druhou a dobu vkládání napětí tedy není nutné prodlužovat.



Obr. 4 – Elektroforeogram po prodloužení doby vkládání separačního napětí na 60 s. Je zde patrné jak urychlení analýzy, tak výrazné chvostování píku TA. Vzorkem byl roztok heparinu v BGE o koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$.



Obr. 5 – Porovnání velikostí ploch píku TA při různých dobách vkládání separačního napětí a při různých koncentracích protaminu ve vzorku. Koncentrace heparinu byla vždy 5 $\mu\text{g/ml}$.

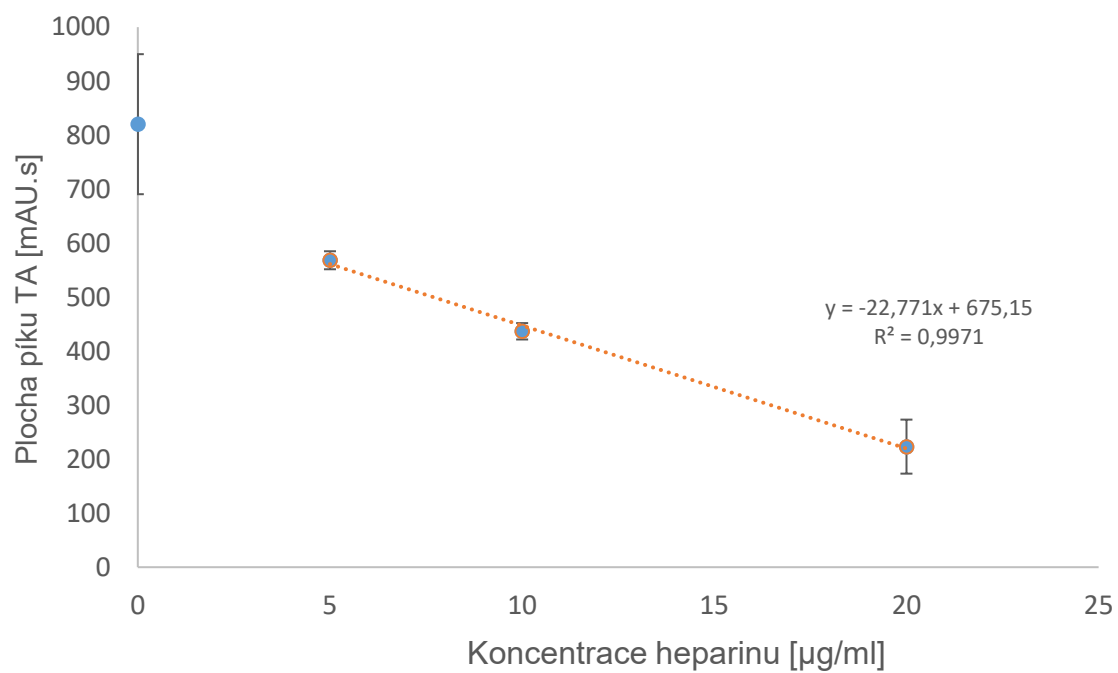
4.2 Vliv heparinu na pík TA

V souladu s očekáváním má heparin výrazný vliv na plochu píku TA, toto je dáno především silnou elektrostatickou interakcí mezi záporně nabitým heparinem a kladně nabitým TA. Toto je znázorněno v Tab. 1. Všechna měření byla provedena 3× a získaná data byla podrobena Dean-Dixonovu testu pro vyřazení odlehlých hodnot, pak byla plocha píku vypočítána opět aritmetickým průměrem.

Tabulka č. 1 – Vliv heparinu na plochu píku TA

Koncentrace heparinu [$\mu\text{g/ml}$]	Plocha píku TA [mAU.s]	Směrodatná odchylka [mAU.s]	Relativní plocha píku TA [%]
0.0	820.3	129.6	100.0
5.0	568.4	16.7	69.3
10.0	436.8	15.1	53.3
20.0	223.3	50.0	27.2

Jak je v této tabulce vidět, heparin má na plochu píku TA značný vliv. Tento vliv je graficky znázorněn na obrázku č. 6.



Obr. 6 – Grafické znázornění závislosti plochy píku TA (1 mg/ml v BGE) na koncentraci heparinu ve vzorku.

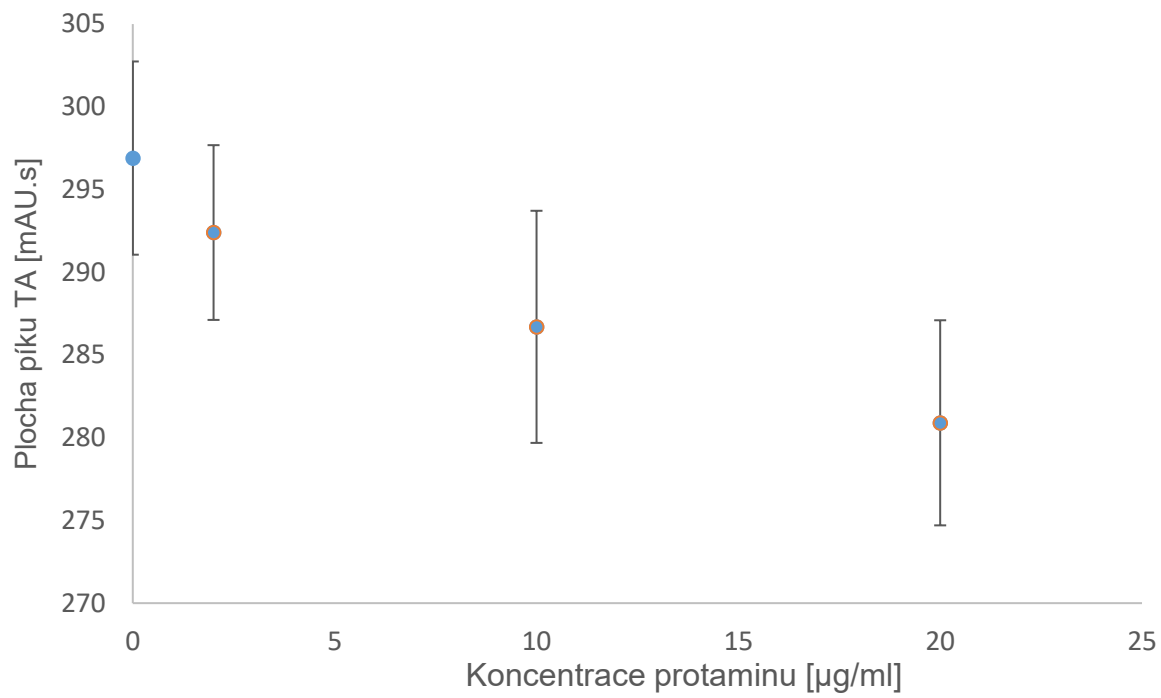
4.3 Vliv protaminu na pík TA

V průběhu měření byl prokázán vliv přítomnosti protaminu na plochu píku TA – se zvyšováním koncentrace protaminu dochází k mírnému zmenšení plochy píku TA. Referenčním bodem byla plocha píku TA při měření s BGE, jako vzorkem, tedy s nulovou koncentrací protaminu. Vliv protaminu je znázorněn v Tab. 2. Všechna měření byla provedena 3× a z nich získané výsledky byly podrobeny Dean-Dixonovu testu pro vyřazení odlehlých hodnot. Z těchto hodnot byla plocha píku vypočítána aritmetickým průměrem.

Tabulka 2 – Vliv různých koncentrací protaminu na plochu píku TA.

Koncentrace protaminu [$\mu\text{g/ml}$]	Plocha píku TA [mAU.s]	Směrodatná odchylka [mAU.s]	Relativní plocha píku TA [%]
0.0	296.9	5.8	100.0
2.0	292.4	5.3	98.5
10.0	286.7	7.0	96.6
20.0	280.9	6.2	94.6

Jak je vidět na Obr. 7, není vliv protaminu na TA lineární v celém rozsahu, ale pouze v jeho části, se zvyšující se koncentrací protaminu je jeho vliv na plochu píku TA menší. Je také nutno poznamenat, že celkově se jedná o velmi slabý vliv. Pomocí funkce T.TEST v programu Excel 2016 bylo dokonce zjištěno, že rozdíly mezi plochami píku TA při různých koncentracích protaminu nejsou statisticky významné. Ve srovnání velikosti účinku dané koncentrace na velikost píku TA je evidentní, že mnohem výraznější vliv na tento pík má daná koncentrace heparinu. V případě neexistence interakce mezi heparinem a protaminem by byl vliv protaminu na velikost píku TA minoritní. Přítomnost protaminu by tedy způsobovala pouze malou chybu (nejvýše 5 %).



Obr. 7 – Grafické znázornění závislosti plochy píku TA (1 mg/ml v BGE) na koncentraci protaminu ve vzorku.

4.4 Vliv směsí heparinu a protaminu na pík TA

Po zjištění vlivu přítomnosti samotného heparinu/ protaminu bylo zjišťováno chování směsí heparinu a protaminu v různých vzájemných poměrech, protože bylo nutno zjistit, zda by tato metoda mohla vykazovat nějaké odchylky, pokud by byl heparin v krvi částečně neutralizován protaminem. Testovány byly hmotnostní poměry heparin:protamin 5:1, 1:1 a 1:2. Pro znázornění vlivu jejich různých vzájemných poměrů na pík TA byla zvolena koncentrace heparinu 10 µg/ml.

Všechna měření byla provedena 3×, podrobena Dean-Dixonovu testu a plocha píku byla vypočítána pomocí aritmetického průměru. Přehled výsledků je uveden v Tab. 3.

Tabulka č. 3 – Vliv směsí heparinu a protaminu v různých poměrech na plochu píku TA.

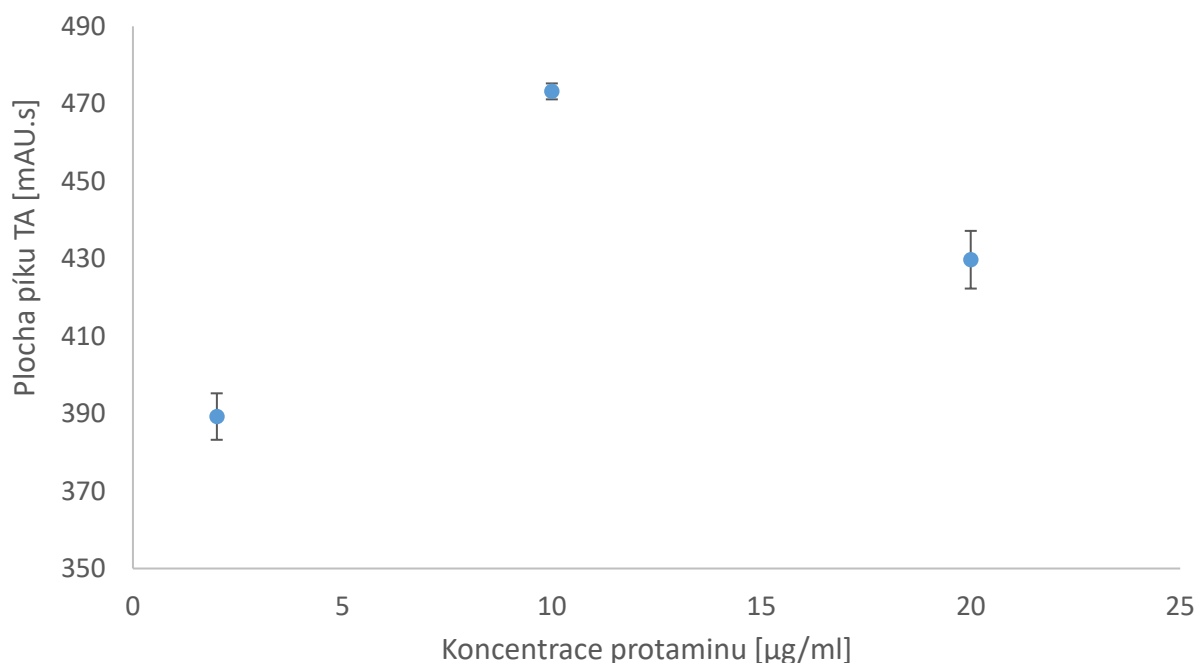
Koncentrace heparinu [µg/ml]	Koncentrace protaminu [µg/ml]	Plocha píku TA [mAU.s]	Směrodatná odchylka [mAU.s]	Relativní plocha píku TA [%]
0.0	0.0	517.5	6.9	100.0
10.0	2.0	389.2	6.0	75.2
10.0	10.0	473.2	2.0	91.5
10.0	20.0	429.7	7.5	83.1

Na základně známých skutečností bylo možno očekávat jeden z následujících dvou scénářů: 1) Interakce protaminu s heparinem není natolik silná, aby ovlivnila chování heparinu při měření. V tom případě by neměla mít koncentrace protaminu vliv na výsledek měření. 2) Část heparinu zůstane v průběhu měření zneutralizována protaminem. V tom případě by s rostoucí koncentrací protaminu měla při konstantní koncentraci heparinu plocha píku TA narůstat.

Jak je Tab. 3 vidět, do koncentrace protaminu 10 $\mu\text{g/ml}$ se systém chová podle scénáře č. 2. Plocha píku TA tedy s rostoucí koncentrací protaminu narůstá.

Z neznámých důvodů zde však dochází k anomálii – při koncentraci protaminu 20 $\mu\text{g/ml}$ by měl být veškerý heparin, podle literatury a výsledků předchozích měření ve stejné laboratoři [27], zneutralizován a neměl by tedy mít na plochu píku TA žádný vliv. V naměřených datech tuto skutečnost nejde nalézt, při vzájemném poměru heparin:protamin 1:2 se plocha píku TA zmenšuje oproti poměru 1:1, jak v tomto konkrétním, tak i v jiných zde neuvedených měřeních. Plocha píku TA by přitom měla díky neutralizaci veškerého heparinu zůstat stejná jako v případě měření s nulovou koncentrací heparinu.

Grafické znázornění této skutečnosti je zobrazeno na Obr. 8.



Obr. 8 – Grafické znázornění závislosti plochy píku TA na různých koncentracích protaminu při koncentraci heparinu 10 $\mu\text{g/ml}$.

5 Závěr

Cílem této práce bylo posouzení vlivu přítomnosti protaminu ve vzorku na stanovení heparinu pomocí kapilární afinitní elektroforézy. Bylo ověřeno, že přítomnost heparinu ve vzorku ovlivňuje plochu píku tetraargininu a se zvyšující se koncentrací heparinu dochází ke zmenšení píku tetraargininu. Nově bylo zjištěno, jak je velikost tohoto účinku ovlivněna přítomností protaminu. Přítomnost protaminu ve vzorku bez heparinu způsobila mírné zmenšení plochy píku tetraargininu. Toto zmenšení je však statisticky nevýznamné oproti ploše píku samotného tetraargininu v BGE. V případě směsí heparinu s protaminem došlo k překvapivému zjištění. Při nižších koncentracích protaminu odpovídalo chování systému částečné neutralizaci heparinu protaminem. Za takového předpokladu by tedy metoda měřila koncentraci pouze volného, nezneutralizovaného heparinu. Při vyšší koncentraci protaminu však došlo z neznámých důvodů k obrácení efektu. Toto pozorování má zásadní význam pro použitelnost metody k analýze reálných vzorků. Je zřejmé, že chování systému musí být dále podrobněji prostudováno.

6 Literatura:

- [1] Casu, B., 2005. Chapter 1 - Structure and Active Domains of Heparin, in: Garg, H.G., Linhardt, R.J., Hales, C.A. (Eds.), *Chemistry and Biology of Heparin and Heparan Sulfate*. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 1–28. <https://doi.org/10.1016/B978-008044859-6/50002-2>
- [2] Guo, J., Yuan, Y., Amemiya, S., 2005. Voltammetric Detection of Heparin at Polarized Blood Plasma/1,2-Dichloroethane Interfaces. *Anal. Chem.* 77, 5711–5719. <https://doi.org/10.1021/ac050833d>
- [3] Casu, B., Naggi, A., Torri, G., 2015. Re-visiting the structure of heparin. *Carbohydr. Res.* 403, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.06.023>
- [4] da Silva, E.Z.M., Jamur, M.C., Oliver, C., 2014. Mast Cell Function: A New Vision of an Old Cell. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 62, 698–738. <https://doi.org/10.1369/0022155414545334>
- [5] Torrent, M., Nogués, M.V., Andreu, D., Boix, E., 2012. The “CPC Clip Motif”: A Conserved Structural Signature for Heparin-Binding Proteins. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042692>
- [6] Glauser, B.F., Santos, G.R.C., Silva, J.D., Tovar, A.M.F., Pereira, M.S., Vilanova, E., Mourão, P. a. S., 2018. Chemical and pharmacological aspects of neutralization of heparins from different animal sources by protamine. *J. Thromb. Haemost.* <https://doi.org/10.1111/jth.14221>
- [7] *Český lékopis 2009 – Doplněk 2011*, Praha, Grada 2011.
ISBN 978-80-247-3785-0

- [8] Nakamura, N., Iinuma, F., Kinoshita, T., 1987. Determination of Heparin by use of Heparin–Protamine Complex. *Analytical Sciences* 3, 261–263. <https://doi.org/10.2116/analsci.3.261>
- [9] Korte, W., Clarke, S., Lefkowitz, J.B., 2000. Short activated partial thromboplastin times are related to increased thrombin generation and an increased risk for thromboembolism. *Am. J. Clin. Pathol.* 113, 123–127. <https://doi.org/10.1309/C7N9-J2AU-5TB9-5FRL>
- [10] Khokhlov, V.Y., Selemenev, V.F., Khokhlova, O.N., Shcherbinin, R.L., 1999. Heparin determination by spectrophotometric and photocolometric methods. *Pharm Chem J* 33, 450–451. <https://doi.org/10.1007/BF02510101>
- [11] van Putten, J., van de Ruit, M., Beunis, M., Hemker, H.C., 1984. Automated spectrophotometric heparin assays. Comparison of methods. *Haemostasis* 14, 195–204. <https://doi.org/10.1159/000215056>
- [12] Piech, R., Paczosa-Bator, B., Goleń, K., 2012. Study on Heparin Determination Using Cathodic Stripping Voltammetry. *Int. J. Electrochem. Sci.* 7, 11.
- [13] Li, L., Liang, Y., Liu, Y., 2013. Designing of molecularly imprinted polymer-based potentiometric sensor for the determination of heparin. *Anal. Biochem.* 434, 242–246. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.12.007>
- [14] Lin, L., Liu, X., Zhang, F., Chi, L., Amster, I.J., Leach, F.E., Xia, Q., Linhardt, R.J., 2017. Analysis of heparin oligosaccharides by capillary electrophoresis–negative-ion electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 409, 411–420. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9662-1>
- [15] Mikus, P., Valaskova, I., Havranek, E., 2004. Analytical characterization of heparin by capillary zone electrophoresis with conductivity detection and polymeric buffer additives. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36, 441–446. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.07.017>

- [16] Gunay, N.S., Linhardt, R.J., 2003. Capillary electrophoretic separation of heparin oligosaccharides under conditions amenable to mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* 1014, 225–233. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01288-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01288-3)
- [17] Patel, R.P., Narkowicz, C., Hutchinson, J.P., Hilder, E.F., Jacobson, G.A., 2008. A simple capillary electrophoresis method for the rapid separation and determination of intact low molecular weight and unfractionated heparins. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.10.009>
- [18] Patel, R.P., Narkowicz, C., Jacobson, G.A., 2009. Effective reversed-phase ion pair high-performance liquid chromatography method for the separation and characterization of intact low-molecular-weight heparins. *Anal. Biochem.* 387, 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.01.007>
- [19] Mourier, P., Anger, P., Martinez, C., Herman, F., Viskov, C., 2015. Quantitative compositional analysis of heparin using exhaustive heparinase digestion and strong anion exchange chromatography. *Analytical Chemistry Research* 3, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.ancr.2014.12.001>
- [20] Balhorn, R., 2007. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biology* 8, 227. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-9-227>
- [21] Velick, S.F., Udenfriend, S., 1951. The Amino End-Group and the Amino Acid Composition of Salmine. *J. Biol. Chem.* 191, 233–238.
- [22] Brock, T.D., 1958. The effect of salmine on bacteria. *Can. J. Microbiol.* 4, 65–71.
- [23] Glauser, B.F., Santos, G.R.C., Silva, J.D., Tovar, A.M.F., Pereira, M.S., Vilanova, E., Mourão, P. a. S., 2018. Chemical and pharmacological aspects of neutralization of heparins from different animal sources by protamine. *J. Thromb. Haemost.* <https://doi.org/10.1111/jth.14221>

[24] Cundall, R.B., Jones, G.R., Murray, D., n.d. Polyelectrolyte complexes, 3. The interaction between heparin and protamine. *Die Makromolekulare Chemie* 183, 849–861. <https://doi.org/10.1002/macp.1982.021830409>

[25] Hořejší, V., Kocourek, J., 1974. Studies on phytohemagglutinins XVIII. Affinity electrophoresis of phytohemagglutinins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 336, 338–343. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(74\)90413-9](https://doi.org/10.1016/0005-2795(74)90413-9)

[26] Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Koike, T., 2015. The Cutting Edge of Affinity Electrophoresis Technology. *Proteomes* 3, 42–55. <https://doi.org/10.3390/proteomes3010042>

[27] Martínková E. *Studie interakce protaminu s heparinem a její využitelnosti v kapilární elektroforéze*, Praha 2017, Diplomová práce, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta

[28] Filounová B. *Nepřímé stanovení heparinu kapilární elektroforézou*, Praha 2018, Diplomová práce, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta