



BIOANALYTIKER MOMENA AKBAR
KØBENHAVNS PRAKTISERENDE LÆGERS LABORATORIUM (KPLL).

Ny screeningsteknik til vurdering af lægemidlers toxicitet

Momena Akbar har som den første bioanalytikerstuderende nogensinde deltaget i et forskningsteam på Det Farmaceutiske Fakultet på Københavns Universitet. Hun deltog i et forskningsprojekt, der gerne senere skal munde ud i en ny, forbedret teknik til at vurdere bivirkninger ved lægemidler.

Som 7. semester bioanalytikerstuderende fik jeg muligheden for at være en del af et forskningsteam i 6 måneder på FARMA (Det Farmaceutiske Fakultet på Københavns Universitet). Jeg skulle her afprøve en ide om en ny fremtidig screeningsteknik i forbindelse med udvikling af nye lægemidler. Derudover var jeg også den allerførste bioanalytikerstuderende på FARMA.

I løbet af de 6 måneder har jeg arbejdet med celledyrkning, analyseteknikkerne High Performance Liquid Chromatography væskechromatografi (HPLC) og Massespektrometri (MS) samt analyseimplementering og kvalitetssikring.

I denne artikel vil jeg komme ind på baggrunden for mit bachelorprojekt og beskrive de analysemetoder, jeg arbejdede med. Selve screeningsteknikken er stadig under udvikling af mine vejledere på FARMA, Lektor Claus Cornett og Lektor Lassina Bardolo. Resultaterne af hele projektet vil på et senere tidspunkt blive offentliggjort i et internationalt tidsskrift.

200 dør årligt af bivirkninger ved medicin

Når en patient får udleveret et lægemiddel, skal det gerne være patienten til gavn ved at lindre eventuelle sygdomssymptomer eller være med til at helbrede sygdommen. Men statistikken viser, at der dør omkring 200 patienter årligt i Danmark og omkring 6.000 pa-

tienter dagligt i USA på grund af alvorlige lægemiddelbivirkninger (drug toxicity). (1) Derfor er det uhyre vigtigt at have nogle gode metoder til at teste medicinen for bivirkninger, inden den sendes på markedet.

Udviklingen af nye lægemidler er ikke en nem opgave. Det kan tage helt op til 10-15 år i gennemsnit at udvikle, fremstille og sende et godkendt lægemiddel på markedet. Trods det lange tidsforløb samt brug af penge og ressourcer kan drug toxicity blandt lægemidler ikke helt undgås.

Under udviklingen af lægemidler indgår mange komplicerede delprocesser, herunder screeningsfasen. Det er under screeningsfasen, at man ønsker at opdage eventuelle drug toxicity blandt lægemiddelkandidater. Når forskerne screener for lægemiddelbivirkninger gøres der typisk brug af forsøgsdyr eller cellekulturer kombineret med cytotoxassays (undersøgelse for toksisk effekt mod celler). Ved at påvirke cellekulturer med lægemidler kan man for eksempel undersøge, om medicinen forårsager celledød, væksthæmning, nedsat vedhæftningsevne, nedsat kloningsevne, enzymudsvivning, hæmning af metabolisme og ændring af cellemorfologien. (1, 2)

Behov for bedre screeningsteknikker

Mange medicinalvirksomheder og institutter, herunder Institut for Farmaci og

Analytisk Kemi på FARMA, forsøger at finde nye og forbedrede metoder/teknikker, der kan være med til at opdage toksiske effekter af lægemidler, mens de er under udvikling. Dermed håber man at kunne reducere forekomsten af drug toxicity i nyudviklede lægemidler. Man forsøger også at udvikle nogle screeningsteknikker, der gør mindre brug af forsøgsdyr ved i stedet at anvende cellekulturer.

Den efterfølgende kliniske fase af lægemiddeludviklingen kan dog ikke helt udføres uden at bruge forsøgsdyr/forsøgspersoner, da den biologiske effekt af lægemidlet i mennesker ikke kan forudsiges udelukkende ud fra cellekulturer. (1)

På Institut for Farmaci og Analytisk Kemi har lektor Lassina Badolo og lektor Claus Cornett udtænkt en ide, som kan være indledningen til at udvikle en helt ny screeningsteknik, der kan være med til at detektere toksiske lægemidler i fremtiden.

Tanken er, at screeningsteknikken skal være generel og ikke organspecifik (som f.eks. screening for hepatotoxicitet). Den skal gøre brug af primære cellekulturer og analyseteknikkerne HPLC og MS, og glukose skal anvendes som cytotoxparameter, dvs. en parameter, som angiver et givent lægemiddels toksicitetsgrad.

Mit bachelorprojektet (min del af forskningsprojektet) bestod af to delundersøgelser: Dels en cellebiologisk/

farmakologisk undersøgelse, hvor jeg skulle undersøge om man kunne anvende primære rottehepatocytter og inkubere dem med lægemidlet tamoxifen og cytotoxparameteren glukose. Dels en analytisk undersøgelse, hvor jeg skulle afprøve, om man kunne anvende analyseteknikkene HPLC og MS til at få et kvantitativt mål på tamoxifens toksicitet.

Den Cellebiologiske/ Farmakologiske undersøgelse

I denne del af bachelorprojektet var målet at klargøre de primære rottehepatocytter, inden de blev inkuberet med lægemidlet i forskellige koncentrationer og cytotoxparameteren. For at opfylde dette mål skulle jeg arbejde med celledyrkning. Som cytotoxparameter skulle jeg afprøve, om man kunne anvende glukose for at vurdere tamoxifens toksicitet. Undervejs og efterfølgende skulle der udføres celleviabilitetsbestemmelse (læs herom senere) for at vurdere, hvor mange celler der var levende, og hvor mange der var døde. Denne del skulle desuden udgøre selve kontrolmetoden for hele mit bachelorprojekt.

Primære rottehepatocytter anvendes som cellekulturform

Der skulle anvendes optøede celler, nærmere præcist primære rottehepatocytter udtaget fra en frysetank.

Valget af primære rottehepatocytter byggede på fysiologiske samt cellemorfologiske overvejelser. Fysiologisk, fordi leveren er det organ i kroppen, der har til opgave at afgifte blodet, og dermed "nemt" bliver påvirket af lægemidlers toxiner. (3) Cellemorfologisk, fordi primære cellekulturer i højere grad end celleliniekulturer ligner de organer, de er opdyrket fra. Celleliniekulturer mister sine organcellulære karakteristika under tilpasningen til in vitro tilstand. Der er dog den ulempe ved at anvende primære cellekulturer frem for celleliniekulturer, at overlevelsestiden i in vitro tilstand er relativt kort (4-5 timer). Desuden vil resultaterne ikke være så reproducerbare som ved celleliniekulturer. (2).

Glukose anvendes som cytotoxparameter

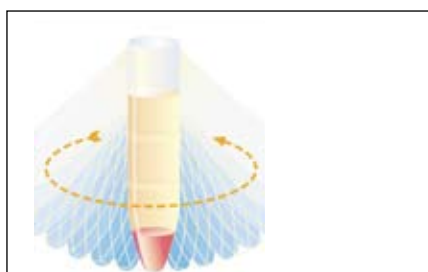
Valget af glukose som cytotoxparameter byggede på, at glukose er alle cellyperes vigtigste energikilde for at vokse og dele sig (1, 4, 5). Man kunne således forestille sig, at cellerne ændrer deres optagelsesmønster af glukose, når mil-

jøet omkring dem ændrer sig, for eksempel ved toksisk påvirkning. Tilsvarende ses det, at når mennesker er syge, har de en lav appetit.

Inden inkubering af hepatocytterne blev der foretaget centrifugeringer for blandt andet at fjerne ekstracellulær væske samt kryobeskyttende stoffer, som var til stede lige efter optøningen. Derudover blev der foretaget centrifugeringer for at fjerne døde celler ved hjælp af percoll-vask og desuden fjerne overskydende opløsninger som HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) cellevækstmedieopløsning og percoll reagens.

Døde celler isoleres

Percoll vask anvendes, når man gerne vil have isoleret og efterfølgende ekstraheret, i dette tilfælde, døde celler. Dette gøres ved en densitetscentrifugering. Percoll består af små kolloide silica partikler af størrelsesorden 15-30nm i diameter og har i vand en vægtprocent på 23% w/w. Disse kolloide silica partikler er desuden coatede med stoffet PVP (PolyVinylPyrrolidon), der gør, at de små silica partikler virker ikke-toksisk på cellerne. Efterhånden som centrifugeringen er i gang, vil de små silica partikler lægge sig imellem de døde celler, der vejer mindst, og de levende celler, der vil ligge i bunden. (6). Se også figur 1, der viser, hvordan resultatet af en percoll-vask kan se ud.



FIGUR 1

På billedet ser man et prøveglas indeholdende blod og percoll-reagens, der er i gang med at blive centrifugeret. Efterhånden som centrifugeringen er i gang, vil de døde celler lægge sig øverst, silica-partiklerne i midten og de levende celler nederst. Det er på grundlag af "væskernes" densitet, at de enkelte lag får den placering, de nu får under en centrifugering. Deraf kaldes en sådan centrifugering også en "densitetscentrifugering".

Samtlige celler tælles

Efter at cellerne var blevet optøet, og det kryobeskyttende stof var blevet ekstraheret, var det nødvendigt at foretage en celletælling. Celletællingen

blev anvendt for at bestemme antallet af celler i alt; herunder antallet af levende celler og antallet af døde celler. Endvidere skulle resultaterne af celletællingerne anvendes til at bestemme celleviabiliteten lige efter optøning, efter percoll-vask og endeligt efter inkubation med glukose og lægemidlet tamoxifen. Det var nemlig disse resultater fra celleviabilitetsbestemmelsen, der skulle udgøre selve kontrolmetoden for hele det eksperimentelle forsøg.

Efterfølgende blev rottehepatocytterne inkuberet med forskellige koncentrationer af tamoxifen og glukose. Efter inkubation blev der igen foretaget celleviabilitetsbestemmelse for at vurdere, hvor mange af cellerne der var levende og døde ved tilsætning af de forskellige koncentrationer af tamoxifen. Til sidst i delundersøgelsen blev cellematerialet frosset ned, indtil der skulle foretages glucosemålinger.

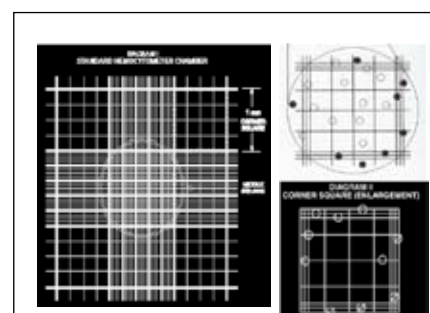
De levende celler tælles for sig

Celleviabilitetsbestemmelse kan udføres ved hjælp af en in vitro cellekvantiteringsmetode. (2)

In vitro cellekvantiteringsmetoden kan udføres på forskellige måder, men den mest anvendte metode er at anvende farvestoffet trypan blå. (2)

Princippet i metoden er, at farvestoffet trænger igennem de døde celler pga. deres utætte cellemembran og farver proteinerne i cytoplasmaet blåt. Farvestoffet kan ikke trænge ind igennem de levende celler, og de forbliver ufarvede og ses i mikroskopet som lyse celler. (2)

Man bestemmer celleviabiliteten ved



FIGUR 2

Her ses 3 billeder. Billedet til venstre viser, hvordan hæmocytometeret ses i mikroskopet (med de 4 kvadranter). Billedet øverst til højre viser, hvordan en af de fire kvadranter med celler (de lyse cirkler=levende celler; de mørke cirkler=døde celler) ser ud ved 100x objektiv. Det sidste billede nederst til højre viser, hvilke celler der ikke skal tælles med under celletællingen. Det er de runde cirkler med en streg over.

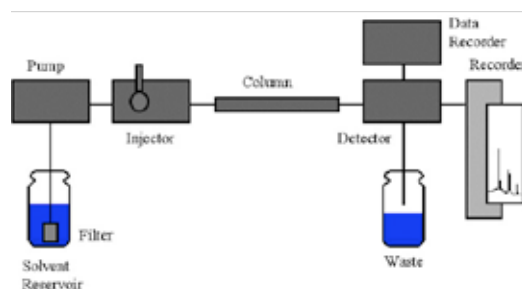


ANALYSETEKNIKKERNE – HPLC OG MS

VÆSKEKROMATOGRAFI (LIQUID CHROMATOGRAPHY)

LC (også kaldet HPLC) er en analytisk kromatografisk teknik, der bruges til separation af forskellige komponenter, som ioner eller molekyler, enkeltvis eller flere på en gang. Derudover bestemmes også den separerede komponents koncentration i en væske, eksempelvis et cellevækstmedie. Princippet bygger overordnet på "en stationær fase" og en "mobil fase". Den stationære fase kan for eksempel være en kolonne eller en væske. Den mobile fase er den væske, der er med til at eluere prøvematerialet til og fra kolonnen. Lige så snart den mobile fase kommer i kontakt med den stationære fase, vil der ske interaktioner imellem molekylerne i den mobile fase og molekylerne i den stationære fase. Der kan være tale om interaktioner i form af ionbytning, hydrofob interaktion, absorption mfl. Det er på baggrund af disse interaktioner, at molekylerne separeres, og koncentrationen af de separerede molekyler bestemmes så i detektor. I dette projekt var der tale om et HILIC (Hydrophilic Interaction Chromatography) princip; et hydrofilt interaktions princip, hvor den stationære fase består af meget polære molekyler, og den mobilefase består af en stærk organisk opløsning. (8, 9, 10).

Figur 3 viser et generelt billede af, hvordan et HPLC system er sammensat.



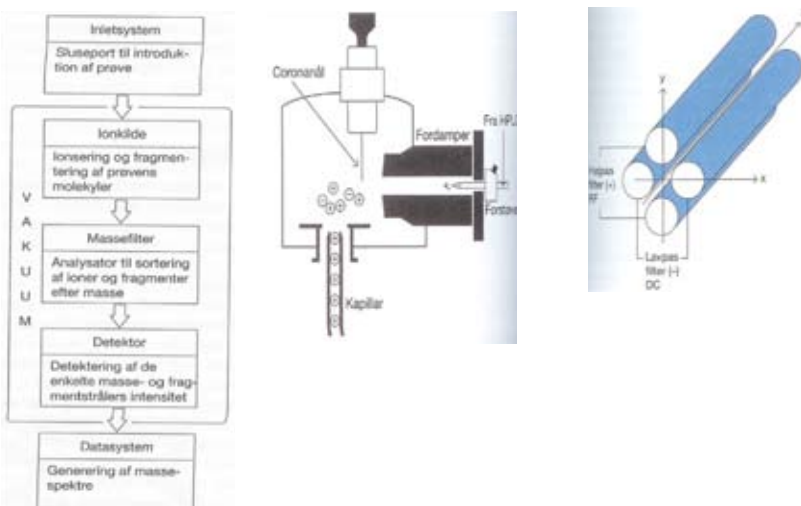
FIGUR 3

Illustrationen viser hvordan et HPLC system (apparat) er opbygget.

MASSESPEKTROMETRI

MS er en analyseteknik, der identificerer atomer og molekyler, i dette tilfælde glukose, ved at bestemme molekylernes vægt og ladning. Vægt og ladningen af molekylerne bestemmes ved, at det stof/molekyle, som man gerne vil have bestemt, ioniseres (her ved elektrospay) og bringes på gasform. Disse ioner bliver ført ind i en masseanalysator (her en quadropol-analysator), som herefter vil opdele ionerne efter deres masse-til-ladning forhold. De ioner, som passerer hele vejen igennem magnetfeltet/det elektriske felt, vil blive registreret af en detektor, som tæller antallet af ionerne og til sidst optegner et massespektrum. (8, 9)

Se desuden 3 billeder nedenfor (figur 4), der viser hvad et massespektrometer er opbygget af.



FIGUR 4

Her ses 3 billeder, der overordnet viser hvad et massespektrometer består af som system. Billedet til venstre viser en oversigt over de enkelte moduler, apparatet består af. Billedet i midten viser hvordan en elektrospay-ionisering forløber. Og billedet til højre viser en masseanalysator af typen quadropol.

at tælle antallet af levende celler i alt i cellesuspensionen i forhold til det totale antal af celler.

Celletællingen foretages ved hjælp af et mikroskop og et hæmocytometer. Se figur 2 for at se hvordan et hæmocytometer ser ud i et mikroskop, og hvordan man tæller cellerne i hæmocytometeret. (2)

Den analytiske undersøgelse

Ny analysemetode udvikles

Formålet med den analytiske delundersøgelse var at opsætte/udvikle og efterfølgende validere en analysemetode, der består af analyseteknikkerne LC og MS.

Målet var, at analysemetoden skulle detektere en mulig ændring i rottehepatocytters glukosemetabolisme, når cellerne kom under påvirkning af lægemidlet tamoxifen (der her fungerer som eksempel på et toksisk lægemiddel). Ændringen skulle findes ved kvantitativt at måle glukosekoncentrationen i rottehepatocytternes cytoplasma og cellevækstmedie. Man ønsker med målingen at få svar på, hvor stor en koncentration af glukose, der var blevet optaget af rottehepatocytterne, og hvor stor en koncentration der befandt sig tilbage i cellevækstmediet.

Grunden til, at analysemetoden skulle udvikles ved anvendelse af analyseteknikkerne HPLC (LC) og MS er, at man på sigt måske vil kunne anvende teknikkerne i forbindelse med metabonom-studier. I sådanne metabonom-studier måler man på mange forskellige parametre (såkaldte metabolitter; slutprodukter af metabolismen) samtidigt. Dette for at vurdere hvordan et givent lægemiddel i helhed påvirker de fysiologiske samt biokemiske mekanismer i kroppen. LC er i dag meget almindeligt brugt i diverse laboratorier og især i forbindelse med forskning (7). MS er også meget almindeligt anvendt, men i dette projekts sammenhæng anvendes MS på grundlag af dets høje sensitivitet (7)

Apparatet tjekkes inden forsøg

I denne del af projektet skulle der arbejdes med et HPLC apparat tilkoblet MS som detektor, ren glukoseopløsning med forskellige koncentrationer, forskellige mobilvæskefaser, HPLC-kolonner og det nedfrosne cellemateriale fra den cellebiologiske/farmakologiske delundersøgelse.

Inden selve HPLC apparatet blev anvendt, skulle der foretages et tjek af, om apparatets flowvolumenhastighed, gradienteluering og kolonne fungerede optimalt. Derudover skulle injektionsvolumene-

nets, temperaturens og gradientens indvirkning på fremkomst af toppe på chromatogrammet også testes. Alle disse tests var en forudsætning for, at apparatet kunne tages i brug.

Efter at man havde konstateret, at apparatet fungerede optimalt, kunne man opsætte analysemetoden, som skulle analysere koncentrationen af glukose i hepatocytterne og i cellevækstmediet.

Analysemetoden sættes op

Normalt når man skal opsætte en analysemetode, er der behov for nogle analysekriterier. Til opsætning af analysemetoden (måling af glukosekoncentrationen) blev firmaet Phenomenex' anbefaling anvendt som grundlag.

Første trin i udvikling af analysemetoden var at opsætte en FIA-metode (flow injektions analysis) (uden brug af kolonne), hvor en ren glukoseopløsning skulle analyseres ved FULL-scan mode og SIM-mode, hvor man ændrede på MS-parametre for at optimere fremkomst af toppe på chromatogrammet.

Ved en FULL-scan analysering af en ren glukoseopløsning finder man molar-massen af den dannede molekylar-ion. Derudover finder man også ud af, om toppen på chromatogrammet fremkommer ved anvendelse af positiv eller negativ elektropray. Under kørsel af FULL-scan er det nok bare at optimere 2 af MS-parametrene; kapillærspændingen (Vcap) og fragmentor voltage.

Glukoseopløsning analyseres på to måder

Når molar-massen af molekylar-ionen er fundet, skal glukoseopløsningen analyseres i SIM-mode (single ion monitoring), hvor analyseringen kun vil blive foretaget for en bestemt masse – eksempelvis ved SIM 181; glukose+1 H+. Under analysering i SIM-mode, skal alle MS parametrene: Vcap (V), fragmentor voltage (V), drying gas (L/min), nebulizer pressure (psig) og gas temperatur (oC), ændres undervejs, for at toppen, svarende til analytten, fremkommer pænest.

Efterfølgende skulle den samme glukoseopløsning analyseres med påsat kolonne.

Resultater valideres

Da jeg havde fundet frem til de forskellige analysekriterier, kunne selve analysemetoden anvendes til at analysere cellematerialet fra den forrige del af projektet.

Men inden da skulle den valideres for at sikre, at resultaterne som fremkom

efterfølgende var kvalitetsmæssigt korrekte.

En typisk valideringsprocedure på FARMA omfatter bestemmelse af analysemetodens

- linearitetsområde
- detektionsgrænse (LOD) og kvantiseringsgrænse (LOQ)
- intermediate reproducibility (intraseriel impræcision)
- præcision
- nøjagtighed
- selektivitet
- variation fra dag til dag (interseriel impræcision).

Resultater indtastes

Efter dataopsamling for de ovenstående punkter blev resultaterne indtastet i et i forvejen opstillet regneark (Excel). Regnearket optegnede ud fra de indtastede toparealer en standardkurve, en standardkurve med tilhørende 95%/99% konfidensintervaller og plots over de vægtede og uvægtede residualer. Derudover beregnede regnearket analysemetodens repeterbarhed – angivet som den relative standardafvigelse; variationskoefficient CV%. Endvidere beregnede regnearket ved kalibreringskurven en hældningskoefficient, skæring samt regressionskoefficient. Ved hældningen og skæringen blev der desuden beregnet SD og et 95%/99% konfidensinterval.

Afslutning

På nuværende tidspunkt arbejder forskerne på FARMA videre med de resultater – som jeg desværre ikke kan komme ind på – jeg frembragte under bachelorprojektet. Forhåbentlig vil det bidrage til, at ideen med screeningsteknikken kan anvendes i fremtiden.

Det har været en stor udfordring at få lov til at arbejde med celledyrkning samt de beskrevne analyseteknikker, som ellers ikke er en del af bioanalytikeruddannelsen.

At være en del af et forskningsteam har givet mig et indblik i, hvad forskning indenfor lægemiddelområdet indebærer, samt hvilke andre arbejdsfunktioner – og opgaver en bioanalytiker kan udføre.

For alt dette vil jeg gerne takke mine vejledere fra FARMA, lektor Claus Cornett, lektor Lassina Badolo og personalet ved Institut For Analytisk Kemi og Farmaci på FARMA. Derudover skal lektor Malene Bonné Meyer fra Bioanalytikeruddannelsen Københavns også have tak for hendes støtte og vejledning.

Til alle sammen tusind tak.



REFERENCER:

Artikler.

1. P. Kampmann, Jens. Basal og Klinisk Farmakologi. FADLS's forlag, 2.udg. 1. Opl. 1999
2. Kielberg, Vivi et.al. Celledyrkning – En praktisk håndbog i dyrkning af mammale celler. Gads Forlag, 2. Udg, 1. Opl, 2001
3. Haug, E., Sand, O. Sjaastad, Ø.V.: Menneskets fysiologi, 1996, G.E.C. Gad
4. D. Moe et.al. Elemtær biokemi, Nyt Nordisk Forlag, Arnold Busck, 6. Udg. 1991
5. Stilling, Bodil, Biokemi og Bioteknologi. Ingeniøren/Bøger, 1. Udg. 1.opg. 2003
6. <http://www.sigmaaldrich.com/sigma/product%20informa-tion%20sheet/p4937pis.pdf>
7. McIntosh, T.S et.al, A Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method to Measure Stable Isotopic Tracer Enrichments of Glycerol and Glucose in Human Serum, GlaxoSmithKline US. Clinical Pharmacology Unit, Philadelphia, PA. Analytical Biochemistry Volume 300, Issue 2, 15 January 2002, Pages 163-169
8. Simonsen, Flemming, et.al, Analyseteknik – Instrumentering og Metoder. Ingeniøren/Bøger, 1. Udg. 1. Opl. 2003
9. Simonsen, Flemming, Apparat-teknik, 3.udg, Akademisk Forlag, 1997.
10. <http://bio.aau.dk/download/KSN/K4/VaerkstedskursusC/Anvendelse%20af%20High%20Pressure%20Liquid%20Chromatography%20VKC%202005.pdf>