

# Billigere analyse med egne reagenser

Bekostelig analyse til måling af membranlipider kan anvendes i diagnosticeringen af bl.a. cancer og diabetes. Dette bachelorprojekt viser, at analysen kan gøres langt billigere. Prisen kan mere end halveres ved selv at fremstille de benyttede reagenser til analysen

- Et bachelorprojekt i samarbejde med forskningsafsnittet tilknyttet Klinisk Biokemisk Afdeling på Hvidovre Hospital, KBA Hvidovre, og bioanalytikeruddannelsen på Professionshøjskolen Metropol.

## Formål

Formålet med bachelorprojektet var at undersøge muligheden for at udvikle en billigere analyse end et allerede eksisterende kommercielt kit til bestemmelse af humant P/S-sphingomyelin fra Cayman Chemical Company. Dette skulle gøres ved dels at fremstille de anvendte reagenser selv, dels ved at optimere koncentrationerne af reagenserne. Analysekitet ønskes anvendt til forskningen på Klinisk Biokemisk Afdelings forskningsafsnit på Hvidovre Hospital.

## Baggrund for forsøget

Der har gennem de sidste årtier været stigende interesse for sphingolipider som andet end blot produkter i cellernes membran. Det har gennem forskning vist sig, at sphingolipiderne også har en rolle inden for cellesignalering. Nogle sphingolipidprodukter kan for eksempel gennem signalering være med til at afgøre, om cellen skal vokse, afgå ved apoptose (reguleret celledød) eller overleve (1,2). Man har også gjort afgørende fund vedrørende sphingolipidernes rolle under visse sygdomme og behandling af bl.a. cancer (3,4,5).

Det har derfor en stor betydning for patienter med disse sygdomme, at der udvikles en analyse, som kan bruges til forskning, således at man kan opnå en dybere forståelse af lipidernes betydning for mennesket og for behandlingen af bl.a. cancer.

Klinisk Biokemisk Afdeling på Hvidovre Hospital har en forskningsafdeling tilknyttet, hvor der forskes inden for bl.a. endokrinologiske lidelser som diabetes og andre stofskiftesyg-

domme. Det er yderst interessant for forskningsafdelingen at få udviklet en billigere analyse, som vil kunne bruges i forskningsarbejdet vedrørende de nævnte lidelser.

Der findes allerede et analysekit fra Cayman Chemical Company til analysering af humant S/P-sphingomyelin (6). Kittet koster ca. 24,50 kroner pr. analyse. Denne pris lyder måske ikke af meget, i forhold til hvad man potentielt kan få ud af analysen. Men da man endnu ikke har fundet ud af, præcis hvilke funktioner sphingolipiderne har i kroppen, og dermed hvad en høj eller lav koncentration af disse i plasma eller serum nøjagtigt betyder, skal der stadig udføres en masse forskning og senere validering af analysen. Det vil derfor være meget gavnligt, rent økonomisk, at få prisen bragt ned. Det er derfor interessant, om dette projekt kan lede til en analyse, der er billigere per patientanalyse.

Analysen skal først og fremmest anvendes på Hvidovre Klinisk Biokemisk Afdelings forskningsafdeling og herefter, ved succes, indkøres i den daglige drift på Klinisk Biokemisk Afdeling til analysering af sphingomyelinkoncentrationen i plasma eller serum, sådan at man, med henblik på behandling af patienter, kan rette den terapeutiske behandling direkte mod den del af cellesignaleringen, sphingolipiderne har indvirkning på (3).

## Sphingolipider og sphingomyelin

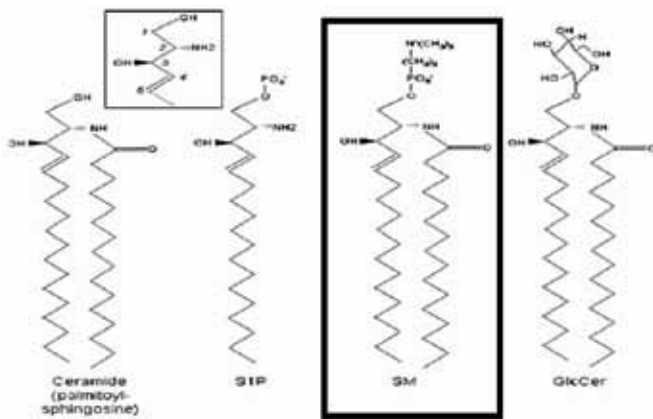
Der findes flere forskellige typer af sphingolipider. Fælles for dem alle er, at de er en naturlig bestanddel af eukaryote celler og findes i cellens membran. Sphingomyelin er en sådan type



**Af bioanalytiker // Lene Kjær Callesen**  
Finsenlaboratoriet

**bioanalytiker // Karina Justesen**  
Klinisk Biokemisk Afdeling,  
Roskilde Sygehus

**Vejledere //**  
Henrik Hansen, lektor, cand.scient.,  
bioanalytikeruddannelsen i Køben-  
havn, Professionshøjskolen Metropol  
Pernille Munck, bioanalytikerunder-  
viser, Klinisk Biokemisk Afdeling,  
Hvidovre Hospital



**Figur 1** viser de forskellige typer af sphingolipid. Det ses af Sphingomyelin (SM) er en af dem.

lipid (figur 1). Sphingomyelin har vigtige strukturelle og funktionelle roller for cellen og deltager i mange signaleringsprocesser.

### Sphingomyelins rolle for cellen

Sphingomyelinmetabolismen omdanner sphingomyelin til mange forskellige produkter. Disse produkter spiller yderligere store roller for cellen (figur 2).

Det er hovedsageligt ceramid og sphingosin-1-phosphat, der mistænkes for at have stor betydning for cellers vækst og død. Dog har både sphingosin og ceramide-1-phosphat samme effekter (1).

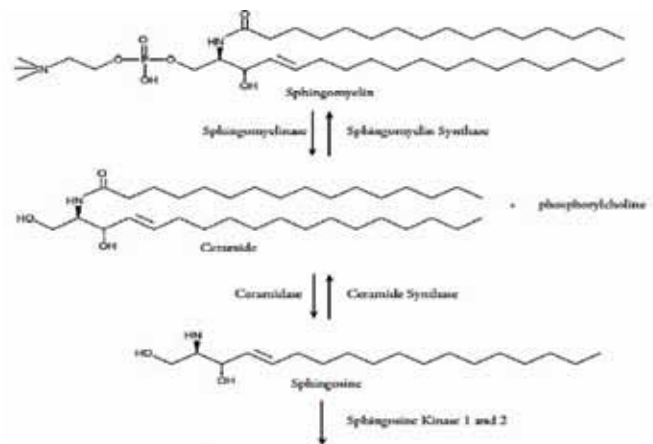
Sphingosin-1-phosphat er involveret i mange regulationsprocesser som fx rearrangering af cellens cytoskelet, cellemigration og vækst, flere processer af betydning for hjerte og kar og suppression af apoptose (1). Det er særligt sphingosin-1-phosphats evne til at inducere cellevækst og undertrykke apoptose, der kan gøre lipidet problematisk i fx cancersammenhænge (4).

Ceramider fungerer modsat sphingosin-1-phosphat og er involveret i en række processer, der inducerer apoptose (1). Forenklet kan man sige, at en celleds fremtid er bestemt af bl.a. balancen mellem sphingosin-1-phosphat og ceramid (1).

### Sphingolipider og sygdomme

Der forskes stadigt i sphingolipidernes rolle i diverse sygdomme, og det er endnu uvist, præcis hvad de kan gøre ved cellerne gennem signalering. Der findes mange teorier, fx at ceramider nedsætter insulinresponsen i cellerne, kan betyde død af insulinproducerende  $\beta$ -celler i de langerhanske øer og bidrager til andre diabetiske komplikationer (2).

Det er også set, at sphingolipider kan have en betydning for cancerpatienter, da mange af disse patienter har forhøjet koncentration af det cellevækstfremmende lipid sphingosin-1-phosphat. Denne forhøjede koncentration er i flere studier korreleret med forhøjet tumorgrad, kemoterapeutisk resistens og forkortet patientoverlevelse (4).



**Figur 2** viser sphingomyelin metabolismen. Det ses at sphingomyelin reversibelt kan omdannes til ceramid, som igen reversibelt kan omdannes til sphingosin. Sphingosin kan herefter irreversibelt phosphoryleres af sphingosin kinaser til sphingosin-1-phosphat.

### Sphingolipider og behandling

Den omtalte forenklede måde at beskrive cellens fremtid på har visse studier og forskning valgt at gøre brug af, og det forsøges fx. at finde behandlingsmetoder, der stopper lipidproduktens evne til at fremme vækst og migration af cancerceller, eller metoder der hæmmer evnen til at inducere apoptose, og på den måde undgå tab af fx. de insulinproducerende celler.

Ved coloncancer og brystcancer kan ses en reduceret celleoverlevelse og vækst, hvis man inhiberer enzymet sphingosin-kinase (SK), som spalter sphingosin til sphingosin-1-phosphat. Man forsøger altså at undgå dannelsen af for meget sphingosin-1-phosphat, som kan få cancercellerne til at migrere og vokse (4).

Andre studier har fundet resultater, der indikerer, at sphingolipider kan virke fremmende for virkningen af kemobehandlinger ved cancer og endda kan gavne disse behandlinger ved resistente cencertyper (4,5). Dertil kan føjes, at man har fundet, at ceramider kan gøre celler, der ikke er sensitive over for strålebehandling, mere sensitive, og de vil derved nemmere undergå apoptose (7).

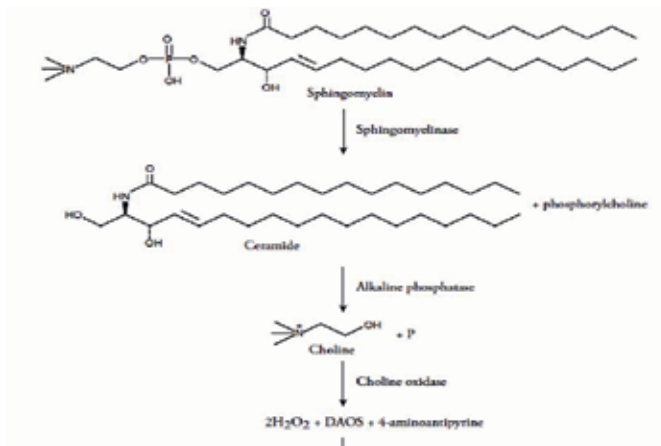
Der findes endnu ikke meget litteratur om anvendelsen af sphingolipider som en del af den terapeutiske behandling. Det er vigtigt at få udviklet brugbare analyser, der kan måle de forskellige sphingolipider, så der kan blive forsket mere dybtgående på dette vigtige område.

Dette projekt har blot været et lille skridt i udviklingen.

### Analyseprincip og måleprincip

Analysen beror på en række enzymatiske reaktioner. Reaktio-nerne nedbryder tilsammen sphingomyelin i prøven til hydrogen peroxid, som kan måles i en farveregning (figur 3).

Først spaltes sphingomyelin i prøven ved hjælp af det tilsatte sphingomyelinase til ceramid og phosphorylcholin. Den tilsatte alkaliske phosphatase spalter herefter phosphorylcholin til cholin og phosphor. Cholinoxidase fra reaktionsmikset omdanner cholin til hydrogen peroxid ( $H_2O_2$ ) og biproduktet betain aldehyd. Herefter katalyserer peroxidase reaktionen mellem hydrogen peroxid og det tilsatte DAOS



**Figur 3** viser analyseprincippet for analysen. Sphingomyelinase, alkalisk fosfatase, cholin oxidase, DAOS, 4-aminoantipyrin og peroxidase er de enzymer det er forsøgt at optimere. Cholin oxidase og peroxidase viste sig at være de to enzymer der skulle have en højere koncentration, for at opnå brugbare resultater.

(*N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfo-propyl)-3,5-dimethoxyaniline*) og 4-aminoantipyrin. Derved fremkommer der en blå farve, som kan aflæses i en Plade Reader ved en bølglængde på 595 nm.

Humant P/S-sphingomyelin måles ved en fotometrisk endepunktsmåling. Den målte absorbans er ligefrem proportional med koncentrationen af sphingomyelin i prøven. Absorbansen måles ved endt reaktion.

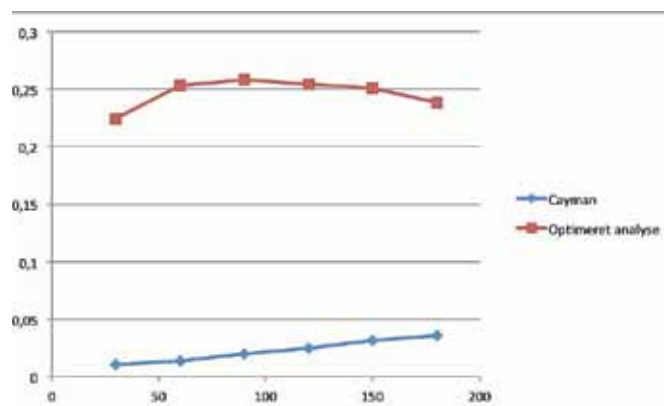
## Resultater

Ved første opsætning af analysen benyttedes der samme enzymkoncentrationer som i det kommercielle kit fra Cayman Chemical Company. Da der ved denne opsætning ikke fremkom et målbart resultat, skulle der optimeres på et eller flere enzymer. Vi opsatte derefter en analyse med 10 gange så høj enzymkoncentration for alle enzymer. Dette viste et langt større og brugbart udslag, og vi skulle derefter finde ud af, hvilke enzymoptimeringer der havde givet denne gunstige virkning på resultatet (figur 4). Dette gjorde vi ved at opsætte optimeringsanalyser for hvert enzym med afprøvning af fem og 10 gange så høj enzymkoncentration.

Efter hver optimering sammenlignede vi resultaterne fra de forrige opsætninger. Hver gang blev reaktionstid og absorbans holdt op mod hinanden for at se, om reaktionens betingelser var forbedrede. Vi fandt, at ved at øge koncentrationen på cholin oxidase og peroxidase kunne vi opnå absorbanser af en kvalitet, der kan sammenlignes med Cayman-kittets.

Cholin oxidase er en katalysator i reaktionen. Hvis der ikke er nok af denne, vil alt cholin i prøven ikke kunne omdannes til hydrogen peroxid ( $H_2O_2$ ), og man vil derfor få et for lavt resultat i sidste ende i forhold til den sande koncentration.

Ved optimeringen på cholin oxidase opnåede vi forbedrede resultater ved både fem og 10 gange enzymkoncentration. Da



**Figur 4** viser to endepunktskurver. Den blå kurve er absorbansudviklingen, når analysen var præcist sat op som Cayman Chemical Company. Den røde kurve er absorbansudviklingen efter enzymoptimeringerne. Det ses at der opnåes væsentligt højere og målbare absorbanser, når cholin oxidase og peroxidase koncentrationerne er 5 gange højere. Samtidig er absorbansniveauet sammenlignelig med det absorbansniveau der forventes opnået ved brug af kittet fra Cayman Chemical Company.

resultaterne fra optimeringen med fem gange højere koncentration af cholin oxidase viste sig at være på samme absorbansniveau som beskrevet i Cayman-kittet (6), besluttede vi, at dette fremover skulle være koncentrationen for cholin oxidase. Derudover er cholin oxidase et af de mest bekostelige reagenser i analysen, og det vil derfor være gunstigt for analysens pris at holde koncentrationen af cholin oxidase så lav som muligt.

Vi fandt, at en optimering på fem gange så meget peroxidase var fordelagtig for reaktionen. Peroxidase benyttes i det sidste trin af reaktionskaskaden, og det er her, det blå farveudslag bliver dannet. Hvis der ikke er nok peroxidase i opløsningen til at katalysere hydrogen peroxid, vil der ikke fremkomme et stort nok farveudslag, og der vil derfor ske en fejltolkning af prøven, da det ikke er det sande resultat, der kommer frem.

Da optimeringen på de resterende enzymer ikke gav et brugbart udslag på analysen, vil det ikke være til gavn at opkoncentrere disse.

Gennem optimeringen af de to omtalte reagenser, cholin oxidase og peroxidase, opnåedes sammenlignelige absorbanser, og gennem en prisudregning for analysen fandt vi, at prisen pr. analyse ville være ca. 10 kr. Dermed kan en prisbesparelse på ca. 14 kr. pr. analyse opnås (8).

Da vi kun har lavet optimeringsanalyser med fem og 10 gange enzymkoncentration, er dette kun et lille skridt på vejen mod den færdige analyse. Det kan altså være, at analysen forløber bedre med yderligere nogle mindre optimeringer, men pga. tidsrammen ved udarbejdelsen af projektet kunne vi ikke nå at bestemme dette nærmere. Vores arbejde viser altså blot, hvilken retning man bør arbejde i.

## Konklusion

Ud fra dette bachelorprojekt viste vi, at det er muligt at gøre

analysen billigere ved at fremstille de anvendte reagenser selv. Dog var optimeringer på to af de anvendte enzymer nødvendige for at kunne opnå samme kvalitet som ved anvendelse af analysen fra Cayman Chemical Company.

Der opnås en prisbesparelse på ca. 14 kr. pr. patient-analyse.

### Perspektivering

Før denne analyse kan anvendes, først til forskningsbrug på Klinisk Biokemisk Afdeling, Hvidovre Hospital, og senere i den daglige drift, skal der laves yderligere forsøg. Dette projekt var kun et skridt i retningen mod en anvendelig analyse.

I fremtiden kan man forestille sig, at denne analyse til måling af humant P/S-sphingomyelin vil kunne blive anvendt i et panel af sphingolipidanalyser til diagnosticering og evt. behandling af bl.a. cancer og metaboliske lidelser. Der skal fremadrettet også udvikles analyser til måling af de andre typer af sphingolipider. Grunden til, at dette projekt tager udgangspunkt i lipidet sphingomyelin, er, både at der i forvejen er udviklet et kommercielt analysekit, og at sphingomyelin er et af de sphingolipider, der er nemmest at måle i humant blod.

### Tak

Vi vil gerne takke overlæge Mogens Fenger og personalet på KBA Hvidovres forskningsafsnit for hjælpen under udførelsen af forsøget. Derudover vil vi også takke lektor, cand.scient. Henrik Hansen for hjælp med at udarbejde denne artikel. ■

### Referencer:

1. Lahiri S., Futerman A.H. The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2007; Vol. 64, s. 2270-2284.
2. Hannum Y.A., Obeid L.M. Principles of bioactive lipid signalling: Lessons from sphingolipids. *Nature reviews | Molecular cell biology*. 2008 Februar; Vol. 9, s. 139-150.
3. Wymann M.P., Schneider R. Lipid signalling in disease. *Nature reviews | Molecular cell biology*. 2008 Februar; Vol. 9, s. 162-176.
4. Pyne S. and N.J. Translational aspects of sphingosine 1-phosphate biology. *Trends in Molecular Medicine*. 2011; 17 No. 8: s. 463-472.
5. Ricci C., Onida F., Ghidoni R. Sphingolipid players in the leukemia arena. *Biochimica et Biophysica*. 2006; No. 1758: s. 2121-2132.
6. Sphingomyelin Assay Kit [kit insert på Cayman Chemicals hjemmeside]. USA: Cayman Chemical Company [lokaliseret d. 17/1 2013]. Tilgængelig på <https://www.caymanchem.com/pdfs/10009928.pdf>
7. Sathishkumar S., Boyanovsky B., Karakashian A.A., Rozenova K., Giltiy N.V., Kudrimoti M. et al. Elevated Sphingomyelinase Activity and Ceramid Concentration in Serum of Patients Undergoing High Dose Spatially Fractionated Radiation Treatment. *Cancer Biology & Therapy*. 2005 September; 4:9: s. 979-986.
8. Callesen, L.K. Opsætning af Analyse-Kit til måling af humant P/S-Sphingomyelin. Justesen, K. Erstatning af kommercielt kit til måling af humant P/S-sphingomyelin.