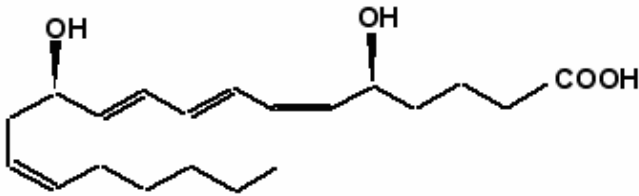
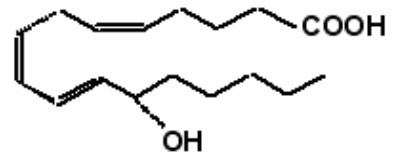


LEUKOTRIENLABORATION

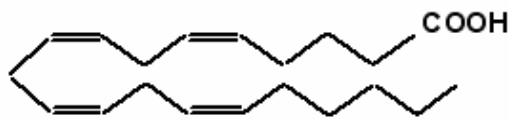
Biomedicinarlinjen
Medicinsk Biokemi



LEUKOTRIEN B4



12-HHT



ARAKIDONSYRA

Vårterminen 2009



**Karolinska
Institutet**

Reviderad januari -09 Craig Wheelock

Syftet med laborationen är:

- 1) att du skall lära dig hantera humana blodprodukter vid laboratoriearbete
- 2) att studera hur leukotrienbildningen resp prostaglandin- och tromboxanbildningen påverkas av icke-steroida anti-inflammatoriska läkemedel, tex Magnecyl
- 3) att du skall lära dig hur högtrycksvätskekromatografi (HPLC) används för separation och analys av metaboliter från den fleromättade fettsyran arakidonsyra
- 4) att du ska förstå skillnaden mellan extern och intern standard

Schema för leukotrienlaborationen

Dag 0:	Laborationsföreläsning
Dag 1 (heldag):	Laborationsgenomgång + <i>moment 1 och 2</i>
Dag 2 (halvdag):	<i>Moment 3</i>

Innan du börjar laborera

- Läs igenom "Handhavande av blodprodukter", tänk på smittorisen
- Läs alltid igenom hela laborationshandledningen, kontakta amanuensen innan du går vidare om det är något moment du inte förstår

Förslag till kompletterande litteratur:

Nelson & Cox :
Lehninger Principles of Biochemistry, 4:e upplagan:
 Biologiska membraner kap. 11
 Eicosanoider kap. 10.3 och 21.1

Berg, Tymoczko & Stryer:
Biochemistry, 6:e upplagan:
s. 337-338, 643-644

Claesson:
Prostaglandiner, Tromboxaner & Leukotriener, teori och praktik

Handhavande av blodprodukter på laboratoriet.

- * Betrakta alltid blodprover som potentiella smittokällor
 - iakttä försiktighet och håll hela tiden rent omkring dig
- * Engångshandskar, rock med lång ärm och skyddsglasögon skall alltid användas
 - en vanlig smittoväg av blodburna sjukdomar är via ögonen
- * Munpipettera aldrig.
 - försäkra dig om att du inte kontaminerar pipetthållaren
- * Vidrör ej rena ytor med förorenade handskar

Om du kontaminerar något:

- * Flergångsmaterial desinficeras
 - skölj omgående ur pipetter med dekontamineringsmedel (Decon)
 - andra kärl lämnas i dekontamineringsmedel i minst en timme
- * Blodkontaminerat engångsmaterial kastas i speciell avfallskartong märkt "Riskavfall"
- * All förtäring, rökning och snusning på laboratoriet är förbjuden
- * Tvätta alltid händerna och ta av skyddsrocken innan du lämnar laboratoriet

Bakgrund

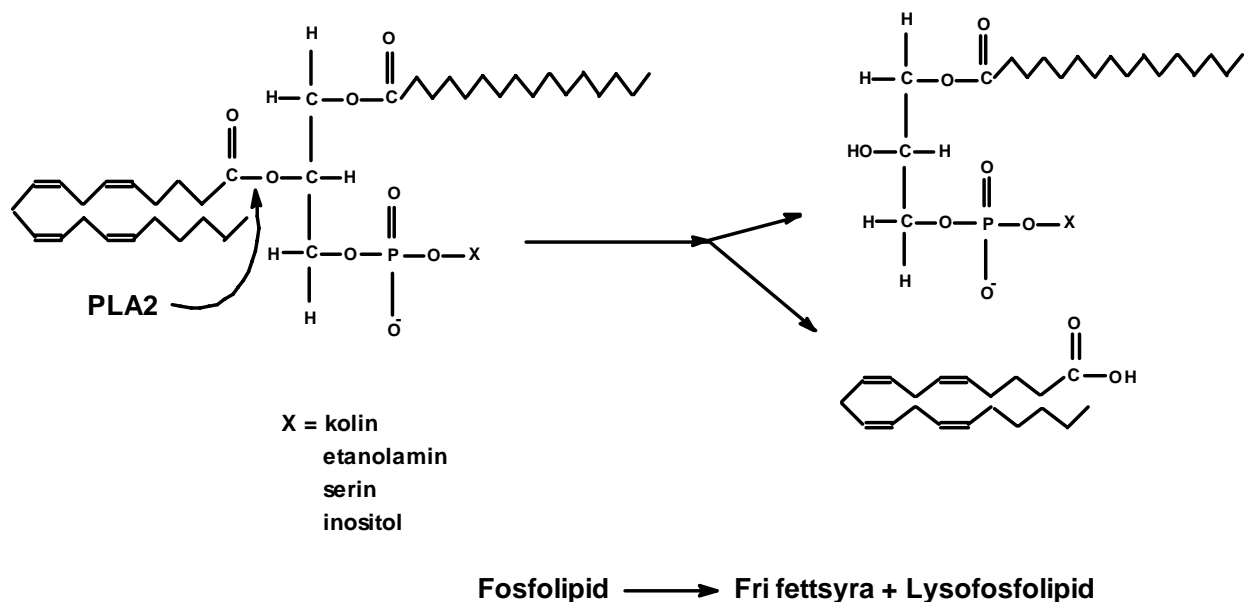
Inflammation är kroppens reaktion på en cell- eller vävnadsskada samt ett försvarssystem mot bla bakterier, virus och parasiter. De celler som är involverade i en inflammatorisk process är till största delen de vita blodkropparna, leukocyterna.

Leukocyter kan delas upp i *lymfoida* (B- och T-lymfocyter), vilka mognar i kroppens lymfvävnad, och *myeloida* (granulocyter och monocyter/makrofager). Granulocyterna är de dominerande cellerna vid en inflammatorisk reaktion och de rekryteras till det inflammatoriska stället genom lösliga mediatorsubstanser. Dessa mediatorsubstanser kan antingen lagras inne i cellerna (tex histamin) eller nysyntetiseras av cellerna (tex lipidmediatorer), för att sedan frisättas.

Lipidmediatorer bildas ofta från de fosfolipider (se fig 1) som utgör cellernas membraner.

Metabolismen av fosfolipider sker främst genom en grupp enzymer som kallas för fosfolipaser vilka kan hydrolysera olika bindningar på fosfolipiden. Av speciellt intresse är enzymet *fosfolipas A₂* (*PLA₂*) vilken hydrolyserar acylbindningen till fettsyran i sn-2 positionen och skapar därmed en fri fettsyra samt en lysosfosfolipid. En vanlig fettsyra i sn-2 positionen är den fleromättade fettsyran arakidonsyra, som är en 20-kols förening med fyra dubbelbindningar med det systematiska namnet *cis-5,8,11,14-eicosatetraensyra*. Arakidonsyra kan frisättas av *PLA₂* och därefter metaboliseras vidare till flera olika lipidmediatorer, bla leukotriener och prostaglandiner.

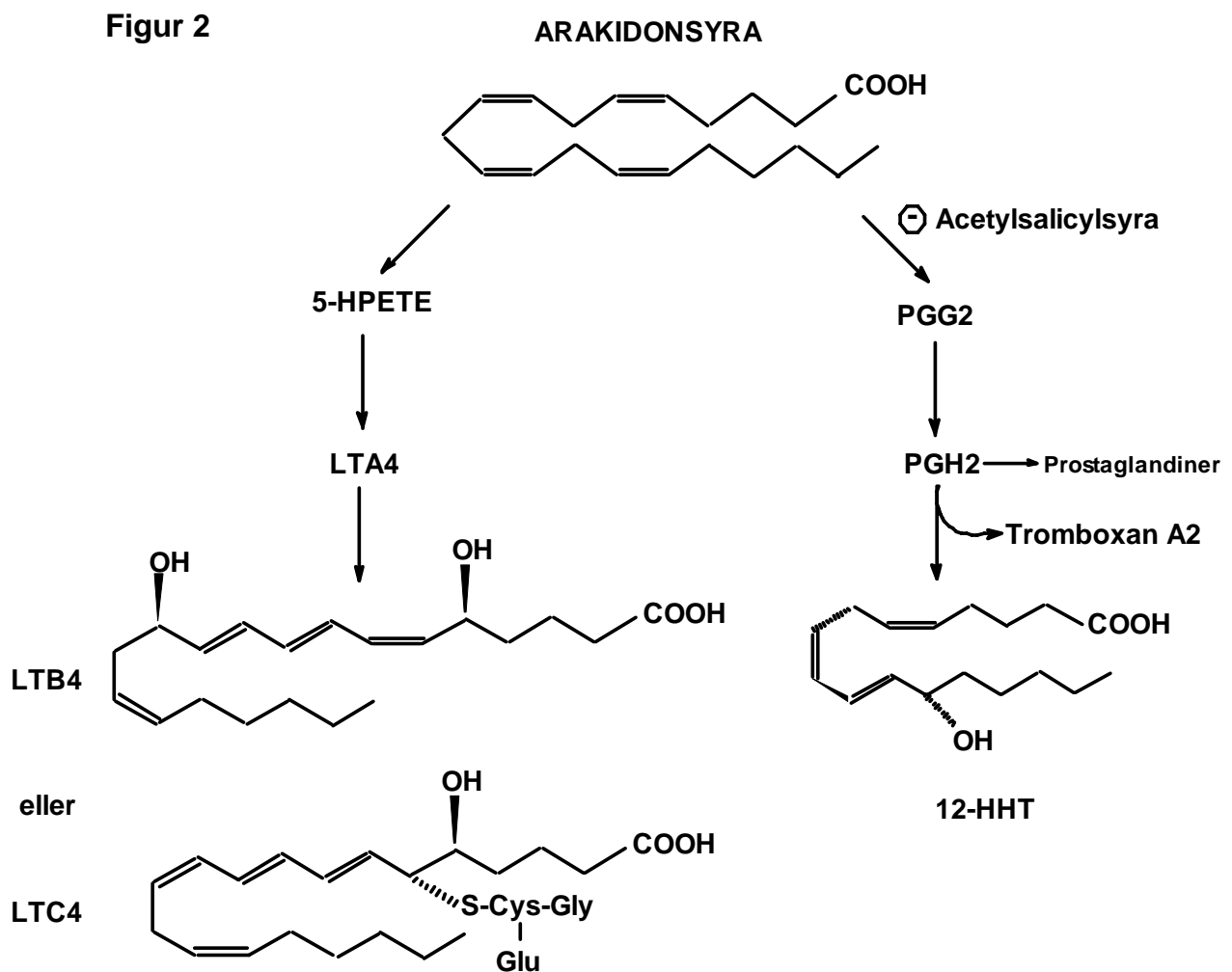
Figur 1



Leukotriener (LT) bildas från arakidonsyra i flera steg varav de första två stegen katalyseras av enzymet *5-lipoxygenas (5-LO)* (se fig 2). LTB₄ och LTC₄ är viktiga lipidmediatorer med i första hand leukocyterna som "målceller" där de har flera effekter bla frisättning av syrgasradikaler och enzymer samt rekrytering av ytterligare leukocyter.

Prostaglandiner (PG) bildas från arakidonsyra av enzymet *prostaglandin H syntas (PGHS)*, även kallat *cyklooxygenas (COX)*, vilken katalyserar bildningen av PGH₂, via PGG₂. PGH₂ kan sedan metaboliseras vidare till andra prostaglandiner och tromboxaner. Produktionen av tromboxan A₂ (TXA₂) sker via enzymet *tromboxan A₂ syntas*, detta enzym katalyserar i en parallell reaktion bildningen av 12-hydroxy-heptadekatriensyra (12-HHT). Bildningen av 12 HHT kan användas som markör på PGHS/COX aktiviteten i cellen. Prostaglandiner utövar många effekter på olika vävnader och celltyper. Effekterna beror på vilken prostaglandin det är samt i vilken vävnad som molekylerna befinner sig i. I hypothalamus tex verkar prostaglandiner feberhöjande och de verkar även kunna sänka retningsströskeln för smärtreceptorer vilket medför en ökad känslighet för smärta. Tromboxaner verkar genom att aggregera trombocyter och få blodkärl att dra ihop sig.

Läkemedel som innehåller acetylsalicylsyra, tex Magnecyl eller Albyl, verkar febernedsättande, smärtlindrande och antiinflammatoriskt. De utövar sin effekt bla genom att irreversibelt hämma prostaglandin H syntaset och därmed bildningen av prostaglandiner.



Dag 1

Moment 1: Blodprovstagning, avskiljning av röda blodkroppar, inkubering med kalciumjonofor.

Moment 2: Extraktion av arakidonsyrametaboliter.

Teori

I moment 1 skall ni få leukocyter och trombocyter att producera leukotriener, prostaglandiner och tromboxaner. För detta krävs det en stimulerande faktor för att aktivera cellerna. Faktorer som kan aktivera blodceller är tex kemotaktiska peptider från bakterier och komplementfragment C5a. Gemensamt för flera av dessa faktorer är att de verkar genom receptorer på cellytan, som bla leder till en ökad intracellulär koncentration av kalcium. Detta aktiverar i sin tur fosfolipas A2 som frisätter arakidonsyra från cellernas membraner. I den här laborationen skall ni använda er av en kalciumjonofor (A23187) för att framkalla en plötslig ökning av den intracellulära Ca^{2+} -koncentrationen för att sedan kunna studera leukotrien- och prostaglandinbildning i frånvaro resp. närvaro av Magnecyl. För att erhålla ett överskott på substrat för att se tydligare effekter kommer ni dessutom att tillsätta extra arakidonsyra. Inkubationerna görs på celler (leukocyter + trombocyter) som ni isolerat fram från helblod. Som mått på leukotrienproduktionen studeras LTB_4 -bildningen och som mått på prostaglandin- och tromboxanproduktionen studeras bildningen av 12-HHT.

I moment 2 skall proverna renas med hjälp av fastfas (solid phase)-extraktion innan de analyseras med hjälp av HPLC. Fettsyror och metaboliter av fettsyror är mer eller mindre opolära, dvs de löser sig bättre i organiska lösningsmedel än i vatten. Graden av polaritet avgörs av flera faktorer såsom längden på fettsyran, antalet dubbelbindningar och vilka samt hur många substituenten (tex -OH) föreningen innehåller. Extraktion av fettsyror och deras metaboliter från en sammansatt lösning sker ofta med ett opolärt organiskt lösningsmedel och vatten (polärt). Dessa bildar ett tvåfas-system där fettsyror hamnar i den opolära fasen medan salter och andra laddade föreningar hamnar i den polära fasen. Ett alternativ till att ha ett system med två lösliga faser är istället ett system med en stationär fas (opolär) samt en löslig fas. Den opolära stationära fasen kan bestå av en lång kolgedja som är ihopkopplad med tex kiselsyra. Den stationära fasen är ofta förpackad i kolonner. När opolära föreningar kommer i kontakt med den opolära stationära fasen adsorberas de på grund av den hydrofoba interaktion som uppstår mellan dem. Polära föreningar kan sedan tvättas bort med tex vatten. För att eluera av de fastsittande opolära föreningarna använder man sig av ett opolärt lösningsmedel, som förstör de hydrofoba interaktionerna (allt enligt regeln "lika löser lika").

Moment 1:

Material

1 Magnecyl brustablett	200-1000 µl automatpipett
Vacutainer-rör med tillhörande kanyl	0,5-10 µl automatpipett
Ca-innehållande fosfatbuffert pH 7,4 (PBS +Ca ²⁺)	PGB ₂ (15µM i 50% EtOH)
Dextranlösning (2%)	A23187 (1 mM stamlösning)
Centrifugrör av plast + propp	Arakidonsyra 20:4(20mM stamlösning)

Utförande

Vidtag lämpliga förebyggande skyddsåtgärder (handskar, glasögon) – ni labbar med blod! Arbeta därför extra lugnt, rent och metodiskt. Spar på engångsmaterial och kemikalier.

1. Tag ett Vacutainer-rör med blod (minst 5 ml) från försökspersonen. Detta är rör nummer 1. Blodprovtagning sker av utbildad sjuksköterska på lab.
2. Låt försökspersonen dricka en Magnecyl-brus tablett och vänta 90 minuter innan nästa blodprov tages. Jobba under tiden vidare med blodet från rör 1 enligt punkt 3 nedan osv.

Prov nummer 1:

3. Sätt på vattenbadet på 37°C (kan delas av flera grupper).
4. Häll över 5 ml blod till ett plast-centrifugrör (mellersta strecket på röret).
5. Tillsätt 5 ml 2% dextranlösning med plastpipett (översta strecket på röret).
6. Sätt i en propp och blanda genom att vända röret försiktigt några gånger.
7. Tag ur proppen och låt stå i 30 minuter (det ska ha separerat så att två lika stora faser bildats).
8. Sug av ovanfasen (~5 ml) med en plast-pasteurpipett till ett nytt plast-centrifugrör.
9. Centrifugera med hastighet III i 15 min, med lock (glöm inte att balansera).
10. Häll bort supernatanten i blodslasken och lös pelleten i 1 ml PBS.
11. Tillsätt (med automatpipett):
5 µl 1 mM kalciumjonofor (A23187)
5 µl 20 mM arakidonsyra (20:4)
12. Sätt en propp i röret och blanda väl men försiktigt. Inkubera sedan röret i 20 minuter vid 37°C.
13. Stoppa reaktionen genom att tillsätta 1 ml metanol, vortexa försiktigt.
14. Låt stå i isvatten i minst 10 minuter.
15. Tillsätt 1 ml PBS. Tillsätt 20µl PGB₂-standard.
16. Centrifugera röret i 15 minuter på hastighet III (balansera centrifugen).
17. För över supernatanten till ett nytt rör. Spara på is.

Prov nummer 2:

18. Prov nummer två behandlas enligt punkt 3-17 (dvs exakt likadant som prov nr. 1)
19. Fortsätt med moment 2 med båda proverna. Glöm inte att märka era rör!

Moment 2

Material

2 st C18-kolonner	Dest-H ₂ O
2 st 2 ml engångssprutor	25% Metanol
Eppendorfrör	Metanol
HPLC-vialer	20% ättiksyra

Utförande

1. Tvätta C18-kolonnerna först med 2 ml 100%-ig metanol och sedan med 2 ml dest-vatten, genom att försiktigt spruta lösningarna genom kolonnen.
2. Surgör proverna från punkt 16, moment 1 genom tillsatts av 3 droppar 20%-ig ättiksyra (kolla med pH-papper, pH skall vara 3-4)
3. Injicera de surgjorda proverna på C18-kolonnerna med sprutorna, injektionshastigheten skall vara 1 droppe per sekund.
4. Tvätta kolonnerna med 2 ml dest-H₂O, genom att försiktigt spruta vattnet genom kolonnen.
5. Tvätta på samma sätt med 2 ml 25%-ig metanol.
6. Eluera arakidonsyrametaboliterna från kolonnerna försiktigt med 0,5 ml 100%-ig metanol, 1 droppe per sekund. Samla eluatet i 1,5 ml Eppendorfrör märkta med grupp- och provnummer. ***Spruta luft genom kolonnen efter det att du har sprutat metanol så får du med hela eluatet***
7. Tillsätt 500 µl dest-H₂O till varje rör, blanda lätt.
8. Märk 2 HPLC-burkar med gruppnummer och provnummer (1 burk för varje prov, eftersom LTB₄ och 12-HHT ska analyseras med samma HPLC metod, men olika våglängder). ***OBS! skriv direkt på burken med spritpenna och använd inte tejp.***
9. För över 500 µl prov till de märkta HPLC-burkarna, sätt på lock och placera burkarna i gruppnummerordning i de två utställda provrörställena för LTB₄-analys resp. 12-HHT-analys. Se till att provrörställena står på is.
10. Sätt även Eppendorfrören med kvarvarande eluat i utställda ställ (vi spar dessa som reserv ifall något går fel vid HPLC-körningen).

Dag 2

Moment 3: HPLC-analys av arakidonsyrametaboliter

Teori

Analys av arakidonsyrametaboliter utförs med högtrycksvätskekromatografi (HPLC, High Pressure Liquid Chromatography). Ett HPLC-system består av en eller flera pumpar som är kopplade till en kolonn. Pumparna pumpar vätska (mobilfas) genom kolonnen och vidare genom en detektor som är kopplad till en skrivare eller dator. Kolonnen innehåller en stationär fas som består av små likstora partiklar (5 µm). De små partiklarna gör att en mycket hög upplösning kan erhållas. Nackdelen är att dessa partiklar orsakar ett högt flödesmotståndet i kolonnen varför pumparna måste klara av att leverera vätska i en jämn hastighet även vid ett mycket stort mottryck.

Principen för HPLC separation av arakidonsyrametaboliter med en kolonn innehållande C18-material, är densamma som vid fastfas-extraktionen. Generellt vandrar polära föreningarna snabbare än de mindre polära. LTB₄, som har två hydroxylgrupper, kommer sålunda att vandra snabbare än 12-HHT, som bara har en hydroxylgrupp. Valet av mobilfas påverkar hur snabbt, och till viss del också i vilken ordning olika föreningar eluerar ut från kolonnen.

Föreningar som absorberar ljus kan koncentrationsbestämmas med hjälp av Lambert-Beers lag: $A = c \times l \times \epsilon$, där A är absorbansen som uppmäts vid den våglängd där föreningen absorberar mest (absorptionsmaximum), c är föreningens koncentration i molar, l är kyvettens längd i cm och ϵ är en konstant (extinktionskoefficienten) vid absorptionsmaximum. Koncentrationen är således direkt proportionell mot absorbansen och det är detta samband som utnyttjas av HPLC-detektorn. Detektorn, i detta fall en UV-detektor, levererar kontinuerligt en signal till en dator, om hur mycket ljus som absorberas. När en UV-absorberande förening passerar ökar absorbansen. Resultatet från en HPLC-körning är ett kromatogram där de olika topparna representerar de olika föreningarna som har separerats i kolonnen och som detektorn sedan har detekterat, dvs som absorberade vid den aktuella våglängden. Med hjälp av datorprogram beräknas topparnas areor och varje topparea är proportionell mot mängden av respektive förening.

Metaboliter av arakidonsyra absorberar UV-ljus på grund av att de har konjugerade dubbelbindningar. Antalet konjugerade dubbelbindningar avgör vid vilken våglängd de olika föreningarna absorberar. LTB₄, som har tre konjugerade dubbelbindningar, har absorptionsmaximum vid 270 nm, medan 12-HHT, som har två konjugerade dubbelbindningar, har absorptionsmaximum vid 235 nm. För att samtidigt kunna analysera LTB₄ och 12-HHT skulle vi behöva ha två detektorer kopplade i serie, en inställd på 235 nm och den andra på 270 nm. Vi kommer istället att använda oss av en sk diode-arraydetektor som registrerar absorbansen över hela spektrat.

HPLC-betingelser

Kolonnen vi använder är en Phenomenex Luna C₁₈ (2.0 x 150 mm, 5 µm) och mobilfas är MeOH:vatten:ättiksyra 70:30:0,01. Flöde 0.8 ml/min. 50µl av era prover (totalvolym 1 ml) injiceras.

Tolkning av HPLC-kromatogram

För att kunna identifiera topparna från PGB₂, LTB₄ resp 12-HHT i era HPLC-kromatogram jämförs retentionstiderna för de olika topparna med retentionstiderna i kromatogram från standardprover, dvs prover med ren PGB₂, LTB₄ resp 12-HHT. Retentionstiden är den tid det tar för föreningen från det att den injiceras tills dess topp når sitt maximum. Retentionstiden för varje förening är karakteristisk för ett visst HPLC-system. I era provsvar redovisas retentionstider och areor för alla toppar i tabellen vid kromatogrammet. Arean hos varje topp är proportionell mot mängden av föreningen. För att få ett mått på hur stor mängd i mol som arean motsvarar, kan man antingen använda en intern eller en extern standardmetod.

Den externa standardmetoden ska ni använda för 12-HHT. Då jämförs arean från en identifierad 12-HHT-topp i ert kromatogram, med den area som en känd mängd av 12-HHT ger i ett kromatogram från ett standardprov. Mängden 12-HHT beräknas alltså från förhållandet mellan de två areorna samt mängden 12-HHT i standardprovet. Vanligtvis gör man en standardkurva baserad på mätningar av flera standardprover med kända (olika) koncentrationer. Det okända provets koncentration kan sedan läsas av direkt ur standardkurvan.

För LTB₄ använder ni PGB₂ som intern standard. En intern standard är en förening som liknar föreningen man vill kvantifiera, men som skiljer sig i retentionstid. PGB₂ absorberar liksom LTB₄ vid 270 nm och har en något kortare retentionstid. En stor fördel med en intern standard är att den kan tillsättas till provet tidigt (ni tillsatte PGB₂ så fort ni stoppat inkuberingsreaktionen).

Eventuella förluster och spädningar, som sedan görs under uppberedningssteg mm, påverkar då internstandarderna på samma sätt som föreningen man vill mäta. En nackdel med en intern standard är att man måste kalibrera den mot sin förening så att man kan ta hänsyn till eventuella skillnader i respons vid detektionen, i första hand pga olika extinktionskoefficienter hos föreningarna.

Extinktions-koefficienterna för LTB₄ och PGB₂ vid 270 nm är 50000 resp 30000 cm⁻¹M⁻¹.

Kalibreringskörningar har visat att den teoretiska kvoten 50000/30000 = 1.67 stämmer bra.

Beräkningar

1. Identifiera LTB₄, PGB₂ och 12-HHT i kromatogrammen med hjälp av retentionstider och standardkörningar.
2. Beräkna mängden LTB₄ i era prover med hjälp av areavärdet för LTB₄-toppen i relation till areavärdet för PGB₂-toppen i samma kromatogram. Ni vet ju hur mycket PGB₂ ni tillsatte till era prover. Använd följande samband (där 1,67 är en kvot mellan extinktionskoefficienterna för LTB₄ och PGB₂ vid 270 nm):

$$\frac{\text{area LTB}_4}{\text{area PGB}_2} \times \frac{\text{mängd tillsatt PGB}_2}{1,67} = \text{mängd LTB}_4$$

3. Beräkna mängden 12-HHT i era prover med hjälp av areavärdena av 12-HHT-toppen i kromatogrammen från era prover i förhållande till arean i standardprovets kromatogram där en känd mängd 12-HHT injicerats. Tänk på hur stor del av provet som injicerades vid HPLC-analysen.
4. Justering av 12-HHT-mängderna pga eventuella förluster vid provupparbetningen.
Vid punkt 2 ovan användes en ”intern-standardmetod” för att beräkna mängden LTB₄ och då behöver man inte fundera över eventuella förluster efter standardtillsatsen. Vid beräkningen av 12-HHT (punkt 3) ovan använde ni däremot en ”extern.standardmetod” som bara ger mängden 12-HHT i slutprovet (=det som analyserades med HPLC) och man kan inte veta hur mycket 12-HHT som fanns i provet före fastfasextraktionen, dvs hur mycket 12-HHT som faktiskt bildades under inkubationen.

Genom att HPLC-analysa ett standardprov av PGB₂ och sedan med hjälp av detta beräkna mängden PGB₂ i era LTB₄-prover och därefter jämföra detta PGB₂-värde med mängden PGB₂ som ni tillsatte till era prover, kan man få ett mått på hur stora era förluster var vid provupparbetningen av LTB₄-proverna. Antag att förlusterna var motsvarande i 12-HHT-proverna och använd detta värde (medelvärde från PGB₂-förlusten i de två LTB₄-proverna) för att korrigera mängden 12-HHT som beräknats i pkt.3.

5. Beräkna slutligen mängden totalt bildad LTB₄ och 12-HHT i de ursprungliga blodproverna med hänsyn till de spädningar som gjorts och vilka mängder som injicerades vid HPLC-körningarna. Ange värdena i pmol/ml blod och presentera resultatet i form av ett stapeldiagram.

Resultatredovisning

Labrapporten skall som vanligt innehålla:

Namn och gruppnummer, Abstract, Inledning (syfte och teori), Material och Metoder, Resultat, Diskussion.

Resultaten skall presenteras med **stapeldiagram** (bildad LTB₄ och 12-HHT med och utan ASA). Beräkningarna av mängderna LTB₄ och 12-HHT i era prover ska redovisas och kromatogrammen ska självklart bifogas. Diskutera varför fick ni de resultat ni fick. Vad förväntade ni er? Hur verkar Magnecyl? Var era resultat som ni förväntat er? Om inte; varför? (dvs kommentera ev. avvikelser).