



EXAMENSARBETE
Hösten 2015

Adsorption av Low Density Lipoprotein (LDL) till modifierade agaros matriser

Författare

Negin Khandan

Handledare

Lennart Ljunggren. professor

Examinator

Ann-Sofi Rehnstam-Holm. Leg BMA, professor i mikrobiologi

Sektionen för Lärande och Miljö
Biomedicinsk laboratorievetenskap

Sammanfattning

Individer med homozygot familjär hyperkolesterolemi (FH), har höga halter av Low Density Lipoprotein (LDL) vilket leder till ökad risk för kardiovaskulära sjukdomar. Behandling av dessa individer kan göras med extrakorporal elimination av LDL med hjälp av specifika reningskolonner. Syftet med studien var att utvärdera några agaros modifierade adsorbenter för denna applikation.

Adsorbenterna, modifierad polyakrylat (DALI), agaros (Zetaros), direkt sulfaterad Zetarose och taurin immobiliserad Zetarose, inkuberas med humant plasma spädd med PBS, och en volyms förhållande mellan matris och plasman på 1:5. Inkubering utfördes i rumstemperatur under 60 min med kontinuerlig blandning i rotator. Efter inkubation centrifugerades proverna och LDL bestämdes i såväl supernatant som pellet. Totalmängd adsorberade proteiner analyserades också i eluat från erhållen pellet. LDL bestämdes indirekt med hjälp av Friedewalds formel ($LDL = \text{total kolesterol (TC)} - \text{high density lipoprotein (HDL)} - (0,45 \times \text{Triglycerider (TG)})$). TC och TG bestämdes enzymatiskt medan HDL kvantifierades som TC efter utfällning av LDL med dextransulfat. Resultaten visar tydligt att DALI har god adsorptionsförmåga. Dock uppvisar de modifierade Zetaroserna begränsad adsorptionskapacitet för LDL. Vid desorption av adsorbenterna visar SDS en bättre elueringsförmåga än NaCl relaterat till protein, vilket tyder hydrofoba proteiner. Metodiken som används i studien är lämplig för vidare studier av andra adsorbenter som förväntas användas i kliniska applikationer för elimination av LDL hos FH patienter.

Nyckelord: Low Density Lipoprotein, Apolipoprotein B-100, Familjär hyperkolesterolemi, LDL-apheresis, kardiovaskulära sjukdomar, Modifierade agaros matriser.

Abstract

Individuals that suffer from homozygote Familial Hyperkolesterolemia (FH), has increased amounts of Low Density Lipoproteins (LDL) which leads to a higher risk of cardiovascular diseases. Treatment of these individuals can be achieved by extracorporeal elimination of LDL using specific columns. The aim of this study was to evaluate different agarose-modified adsorbents ability to adsorb LDL from human plasma. The adsorbents (DALI, Zetarose, sulphonated Zetarose and taurine immobilized onto Zetarose) were incubated for 60 minutes with human plasma diluted with PBS, in a ratio of 1:5 between the matrix and the plasma during rotation with a rotator. After incubation the samples were centrifuged and the LDL content was determined in both the supernatant and the pellet. The amount proteins adsorbed were assayed by eluting the pellets. LDL was determined indirectly using Friedwalds equation; $LDL = Total\ cholesterol\ (TC) - High\ density\ lipoprotein\ (HDL) - (0,45 \times Triglycerides\ (TG))$. The values of TC and TG in the sample were determined enzymatically, whilst HDL was quantified as TC after LDL-precipitation by dextran sulfate. The results clearly show that DALI has good adsorption capacity, but none of the modified Zetaroses shows any capacity to absorb LDL from human plasma. Desorption of the adsorbents using SDS gave higher amounts of eluated protein compared to NaCl elution, indicating hydrofobic proteins. However, the methods used in this study could be used to evaluate new adsorbents for LDL-elimination applications in patients with chronic hyperlipemia.

Keywords: Low-density lipoprotein, Apolipoprotein B-100, Familial hypercholesterolemia, LDL apheresis, Cardiovascular diseases, Modified agarose matrices.

Innehållsförteckning

Innehållsförteckning.....	Sida
1.0 Inledning.....	5
1.1 Syfte och frågeställning.....	7
2.0 Material och Metod.....	7
2.1 Material.....	7
2.2 Adsorptions försök.....	7
2.3 Bestämning av Triglycerider (TG).....	8
2.4 Bestämning av Totalkolesterol (TC).....	8
2.5 Bestämning av Hight Density Lipoprotein (HDL).....	8
2.6 Bestämning av Low Density Lipoprotein (LDL).....	8
2.7 Bestämning av protein adsorption.....	8
2.8 Frontalkromatografi.....	9
2.9 Eluering av adsorberat protein efter frontalkromatografi.....	9
3.0 Resultat.....	9
3.1 Extraktion av LDL från plasma med olika adsorbenter.....	9
3.2 Protein adsorption.....	9
3.3 Resultat för frontalkromatografi.....	10
4.0 Diskussion.....	11
5.0 Slutsats.....	12
Tackord.....	12
Referenser.....	13
Populärvetenskapligtext.....	14

1.0 Inledning

Den ökade övervikten är ett generellt problem som leder till en förtidig död i hjärt-kärl sjukdomar. Detta beror bland annat på en överkonsumtion av mat. Fett tillhör de livsviktiga näringsämnen som kroppen är beroende av. Exogena fetter intas via födan medan endogena fetter produceras av levern (Nilsson-Ehle, P., Berggren Söderlund, M. & Theodorsson, E. 2012).

Eftersom fetter är hydrofoba måste de förpackas så att de kan transporteras i blodbanan. Detta sker med hjälp av lipoproteiner. Lipoproteiner är komplex av fetter och specifika yt-proteiner så kallade apolipoproteiner (apoLP) som transporterar lipider till olika vävnader. Alla lipoproteiner har samma principiella uppbyggnad. Deras kärna består av hydrofoba komponenter, främst triglycerider och förestrat kolesterol, medan ytskiktet utgörs av ett monomolekylärt lager av amfofila komponenter, framförallt fosfolipider, oförestrat kolesterol och apolipoproteiner (Nilsson-Ehle, P., Berggren Söderlund, M. & Theodorsson, E. 2012). Apolipoproteiner som finns på lipoproteiner är inte bara nödvändiga för att upprätthålla lipoprotein partiklarnas struktur, de har även en grundläggande betydelse för deras omsättning. Med hjälp av apoLP regleras lipoproteinernas bildning, utsöndring samt deras slutliga destination genom att interagera med organspecifika receptormekanismer. Några av de olika apoLP som finns är apoLP A, B48, B100, C och E (Nilsson-Ehle, P., Berggren Söderlund, M. & Theodorsson, E. 2012).

De exogena lipiderna som intas via födan förekommer främst i form av triglycerider. Dessa spjälkas vidare i tunntarmen till fria fettsyror och monoglycerider som diffunderar över tarmepitelet. Inuti epitelcellen bildar de triglycerider på nytt. Triglycerider, kolesterol samt apo-B48 går ihop och bildar chylomikroner, som är ett av de lipoproteiner som vi har i kroppen. Kylomikronernas uppgift är att transportera triglycerider från tarmen till fettvävnad och muskler. Med hjälp av enzymet lipoproteinlipas hydrolyseras triglyceriderna i kylomikronerna så att fria fettsyror och monoglycerider frigörs i målorganen. Fettsyrorna går in i fettvävnaden och lagras som triglycerider eller används som direkt energi i muskelcellerna. Kylomikron resterna endocyteras därefter av levern, varpå de degraderas och kvarvarande kolesterol och monoglycerider frigörs (Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. 2008).

Very Low Density-lipoprotein (VLDL), produceras i levern och innehåller främst endogena triglycerider. VLDL är transportformen för triglycerider från levern till kroppens övriga vävnader, främst fettvävnad, hjärta och muskulatur. Väl framme kommer lipoproteinlipas hydrolysera triglyceriderna som VLDL bär på. Förutom detta så sker det en utbytesreaktion där High Density Lipoprotein (HDL) tar emot en del triglycerider från VLDL och i utbyte lämnar tillbaka kolesterylestrar. Utbytet sker med hjälp av Cholesteryl Ester Transfer Protein (CETP). Den huvudsakliga funktionen hos LDL är att transportera endogent kolesterol till perifera vävnader (Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. 2008).

Det apoLP som finns på LDL är apoB-100. Mängden apoB-100 per partikel förblir hela tiden konstant, det vill säga en apoB-100 per LDL partikel, och eftersom varje LDL-partikel bär en apoB-molekyl reflekterar apoB-nivån antalet LDL-partiklar (Nilsson-Ehle, P., Berggren Söderlund, M. & Theodorsson,

E. 2012). När triglyceriderna har brutits ned från VLDL återstår en partikel som huvudsakligen innehåller apoB-100, apoE och förestrat kolesterol och bildar Intermediate Density Lipoprotein (IDL). Då halveringstiden är kort för IDL kan inga mätbara koncentrationer i plasman undersökas. IDL funderar som en extra transport tillbaka till levern innan den omvandlas till LDL och apoE försvinner från IDL partiklens yta. Beroende på mängden matintag eller mängden fria fettsyror så utsöndrar levern samtidigt en större mängd triglyceridrika VLDL. Detta resulterar i tätare LDL-partiklar (small dense LDL), som i regel förekommer i samband med hypertriglyceridemi oavsett bakomliggande orsak. LDL har en lång halveringstid (3-4 dagar) och förblir det dominerande lipoproteinet i plasman. LDL innehåller större delen av apoB-100 och ca 70 % av det kolesterol som finns i blodet. Genom integrering med organspecifika receptormekanismer tas kolesterol upp från LDL. Det är främst två receptorer som LDL interagerar med, dels LDL-receptorn (LDLR) och dels scavenger-receptorn (SR-A2). Beroende på vilken receptor som tar upp LDL, påverkas kolesterolbalansen olika i cellen och därmed även kolesterolinlagring samt utveckling av åderförkalkning (Nilsson-Ehle *et al.*, 2012).

LDL är det plasmalipoprotein som spelar stor roll för kolesterolinlagring i kärlvägg och vidare för utveckling av åderförkalkning. Lipoproteinet är en indikator för rubbningar i kroppens lipid omsättning och analyseras därför vid bedömning av kardiovaskulär risk men även vid utredning och uppföljning av patienter med metabola sjukdomar (Nilsson-Ehle *et al.*, 2012).

Individer med homozygot familjär hyperkolesterolemi (FH), har mutationer i båda allelerna för LDL-receptorgenen, vilket försämrar funktionen och i sin tur leder till överskott av fritt LDL i plasman. För höga halter av fritt LDL i plasma är en början till åderförkalkning och risken att kolesterol fastnar i kärlväggar blir högre. Den person som har FH har högre risk att drabbas av hjärt- och kärlsjukdomar (Raal *et al.* 2010).

Individer med kronisk förhöjd LDL genomgår behandling som heter LDL apheresis, vilket hjälper till att reducera halten LDL i kroppen, som annars är mycket skadligt för patienten. Behandling med LDL aferes har visat sig ha positiv effekt på hjärt- och kärlsjukdomar hos patienter med homozygot och svår heterozygot form av FH (Heigl *et al.*, 2014). Behandlingen innebär att patientens blod genomgår en extrakorporal rening för att reducera LDL halten i kroppen. Direkt adsorption av LDL med i kolonner (DALI) har visat sig vara effektiv (Dräger *et al.*, 1998).

LDL-aferes är en välkänd behandlingsmetod som har genomgått olika modifieringar för att förbättra tekniken, men även för att öka adsorptionsförmågan. Det finns publicerade studier som beskriver olika tekniker för LDL-aferes, så som icke selektivt plasma byte (Thompson, G.R.1981), membranfiltrering (Soltys, P.J. & Etzel, M.R. 1998), kemisk adsorption med dextransulfat (Yokoyama, S., Hayashi, R., Satani, M. & Yamamoto, A. 1985) och immunoadsorption (Koll, R.1998). Det sker kontinuerligt utveckling med olika modifierade partiklar för att kunna förbättra LDL behandlingen men även för att för minska behandlingskostnaden.

1.1 Syfte och frågeställning

Syftet med studien var att testa olika modifierade agaros matrisers förmåga att selektivt kunna adsorbera LDL från humanplasma.

Frågeställning: Adsorberas LDL till någon av de tre olika modifierade kulorna och i så fall är resultatet jämförbart med kliniskt använda adsorbenter?

2.0 Material och metod

2.1 Material

I studien användes oidentifierad utgången human blodplasma från klinisk immunologi och transfusionsmedicin, Centralsjukhuset i Kristianstad. Två olika kovalent modifierade agaros kulorna som användes i studien, direkt sulfonerad Zetarose och Zetarose som immobiliserats med 2-aminetansulfonsyra (Taurin immobiliserad Zetarose), tillhanda hölls av L. Ljunggren Malmö Högskola. Omodifierade agaros kulor (Zetaros, BMP, Tyskland) användes som negativ kontroll och negativt laddade polyacrylat kulor som positiv kontroll (DALI, Fresenius AG Tyskland). Storleken på Zetarose kulorna var 100 µm och för DALI 130 µm.

Vid bestämning av triglycerider (RX MONZA TR 210) och total kolesterol (RX MONZA CH 200) användes kit från Randox, UK. Vid protein koncentrationsbestämning användes Pierce™ BCA Protein Assay Kit från Thermo Scientific, USA. För desorption av protein användes Natrium Dodecylsulfat (SDS) (Bio-Rad Laboratories, USA), fosfatbuffrad saltlösning (PBS) pH 7,4 och 1M NaCl (Sigma-Aldrich, USA).

Dextransulfat (VWR Collection), manganklorid (MnCl₂) (Sigma-Aldrich, USA) samt mikrotiterplattor (Thermo Scientific MUNC EDGE, AB Ninolab Sweden) användes. De instrument som användes var en minicentrifug (MiniStar, VWR Collection), rotator (Bio RS-24 Mini-Rotator, Biosan), samt en centrifug Sigma 1-14k, (Sigma-Aldrich, USA) och en spektrofotometer för mikrotiterplattor, Victor X3, (Perkin Elmer, USA).

2.2 Adsorptions försök

De Zetaros modifierade matrisernas negativa laddning har tidigare verifierades genom adsorption av lysosym, ett katjoniskt protein. Vid analys av DALI:s adsorptionsförmåga användes 100 µl DALI matris och för de andra adsorbenterna användes 200 µl. Adsorbenterna tvättades tre gånger med 500 µl PBS, centrifugerades (1 min vid 3000 rpm), efter sista tvätten torkades matriserna varsamt med filterpapper för att reducera kvarvarande PBS. Inför försöket späddes lika delar plasma med lika delar PBS, som överfördes (500 µl) till rören med de tvättade adsorbenterna. Proverna inkuberades i rumstemperatur (RT) under kontinuerlig blandning i rotator inställd på hastighet 3, under en timme. Därefter centrifugerades samtliga rör i minicentrifug under 1 min och 450 µl av supernatanterna överfördes till nya eppendorfrör för analys. Pelletarna användes för direkt mätning av LDL och även för mätning av adsorberad mängd protein.

2.3 Bestämning av triglycerider (TG)

TG bestämdes enligt tillverkarens instruktioner. Metoden baseras på att triglycerider spjälkas av lipaser vilket ger produkter som reagerar med en indikator vilken ger en färgomslag som är proportionell med mängden TG i provet. Av vardera TG standard (2,17 mmol/l) vatten (blank) samt prover togs 5 µl till 500 µl reagens, inkuberades i RT under 10 min. Därefter överfördes 300 µl av respektive lösning till brunnar i en mikrotiterplatta för absorbans mätning vid 490nm. TG i proverna bestämdes mot standard efter korrigerig för reagensblank.

2.4 Bestämning av total kolesterol (TC)

Principen för bestämning av TC i plasma går ut på enzymatisk hydrolys av kolesterolestrar vars produkter bildar ett färgat komplex med reagens lösningen. Färg intensiteten är proportionell mot kolesterol koncentrationen i provet. Standardens koncentration var 5,33 mmol/L och till samtliga rör tillsattes 10 µl av varje standard och 350 µl reagens. Efter blandning inkuberades proven i 10 minuter i RT. Därefter överfördes 300 µl av varje prov till mikrotiterplatta och absorbansen mättes vid 490 nm. TC i proverna bestämdes mot standard och efter korrigerig för reagensblank.

2.5 Bestämning av High Density Lipoprotein (HDL)

HDL bestäms i plasma efter tillsats av dextransulfat och manganklorid för att fälla kylomikroner, VLDL och LDL. Till 200 µl plasma från respektive prov tillsattes 40 µl 20 mg/ml dextransulfat och 5 µl 1M MnCl₂. Lösningen i eppendorfrören mixades och centrifugerades därefter under 10 min i 20 °C i 16602 x g. Efter centrifugering pipetterades 6 µl av respektive prover till 300 µl reagens för bestämning av kolesterol enligt punkt 2.4 .

2.6 Bestämning av Low Density Lipoprotein (LDL)

LDL bestäms indirekt efter analys av TC och TG med hjälp av Friedwalds formel $LDL = TC - HDL - 0,45 TG$.

2.7 Bestämning av proteinadsorption

Principen för metoden gick ut på att med hjälp av Bicinchoninic Acid (BCA) bestämma proteinkoncentrationen i plasman. Metodens princip är baserad på en kemisk reaktion med kopparjoner som gör att färg uppkommer om protein finns närvarande. Intensiteten på färgen mäts fotometriskt och relateras till mängden protein i provet. Bovint serum albumin (BSA) används för att göra en standardkurva och utifrån grafen kan okända proteinkoncentrationer indirekt bestämmas. För att eluera protein från pelletarna tvättades respektive pellet tre gånger med 500 µl PBS med pH 7,4 och överskott av PBS reducerades försiktigt med filterpapper för att minska spädningsfaktorn. Till 50 µl adsorbent tillsattes 200 µl 1M NaCl, mixades snabbt och centrifugerades (300 rpm) i en minut. Supernatanten överfördes till nya rör och kvar varande NaCl sögs försiktigt bort med filterpapper för att minska spädningsfaktorn. Därefter tillsattes 200 µl 4 % SDS till adsorbenterna, lösningen mixades och eppendorfrören centrifugerades (3000 rpm, 1 min) supernatanterna användes för analys av protein. I nya rör tillsattes 400 µl av Working Reagent (WR) samt 50 µl av respektive prov, blank och standarder. Efter inkubation i 37 °C i 30 min, överfördes 250 µl av proven till en mikrotiterplatta och absorbanser mättes vid 595 nm. Gentemot kända standarder bestämdes proteinkoncentrationen i

proverna efter korrigerig för blank. Utifrån kända proteinkoncentrationer (mg/ml) erhöles absorbans värden för prover och standarder och därmed kunde en standardgraf konstrueras.

2.8 Frontalkromatografi

Vid frontalkromatografi späddes plasman 1:10 med PBS (pH 7,4). Vid försöken användes 500 µl av respektive matris, DALI och Zetaros, som överförts till 2 ml kolonner. Adsorbenterna ekvilibrerades genom att låta PBS (10 ml) passera över respektive kolonn. Därefter låts plasman passera över kolonnerna med gravitation och efter passage över respektive kolonn samlades plasman upp i fraktioner om 2 ml i eppendorfrör. Samtliga fraktioner analyseras med avseende på LDL enligt ovan.

2.9 Eluering av adsorberat protein efter frontalkromatografi

Efter frontalkromatografi eluerades kolonnerna med tre kolonnvolymer PBS (pH 7,4), därefter eluerades kolonnerna först med 2 ml 1 M NaCl och därefter med 2 ml 4 % SDS. Eluaten samlades upp och analyserade med avseende på proteininnehåll enligt ovan.

3.0 Resultat

3.1 Extraktion av LDL från plasma med olika adsorbenter

Extraktionsresultaten visar att polyacrylat adsorbenten (DALI) extraherar nästan fem gånger mer LDL från plasma jämfört med de undersökta Zetarose-adsorbenterna. Det erhöles ingen skillnad i LDL upptag från plasma mellan såväl de olika modifierade Zetaroserna som obehandlad Zetaros, vilket visas i tabell 1. Mängd LDL som adsorberats till de olika matriserna bestämdes direkt efter plasma extraktion och tvätt med PBS. Analysen av de olika adsorbenterna uppvisar samma tendens som vid upptag från plasma, men i lägre nivåer (tabell 1).

Tabell 1: Extraherad koncentration LDL från plasma samt adsorberad koncentration LDL från respektive matris angivet i µmol/ml våt matris.

Adsorbent	Extraherad LDL	Adsorberad LDL
DALI	9,10	3,14
Zetarose	2,03	0,11
Zetarose-SO ₃	2,03	0,12
Zetarose-Taurin	1,8	0,10

3.2 Proteinadsorption

Mängden protein som adsorberats kvantifierades genom att extrahera kända mängder av respektive matris efter att dessa tvättats med PBS. Proteinerna eluerade först med 1M NaCl, därefter med 4 %

SDS och halten bestämdes fotometriskt med BCA reagens och kvantifierades med BSA som standard. De uppmätta proteinkoncentrationerna i tabell 3 är relaterade till BSA.

Tabell 2: Eluerad proteinkoncentration relaterade till BSA i mg/ml våt adsorbent.

Adsorbent	NaCl	SDS
DALI	0,92	0,98
Zetarose	0,30	0,46
Zetarose-SO ₃	0,30	0,52
Zetarose-Taurin	0,24	0,38

Vid desorption av protein efter frontalkromatografi med DALI erhöles ett medelvärde på 0,16 mg/ml för eluering med 1M NaCl och 0,46 mg/ml då eluering utfördes med 4 % SDS. De resultat som erhöles vid eluering av protein från Zetarose med 1M NaCl blev 0,06 mg/ml och med 4 % SDS 0,19 mg/ml. SDS gav genomgående en högre halt av proteiner vid eluering jämfört med NaCl.

3.3 Resultat för mätnad av matriser vid frontalkromatografi

Obehandlad Zetarose blir mättad med avseende på LDL efter 3 ml. DALI adsorberar LDL under längre tid innan mättnad vilket illustreras i diagram 1. Ingångs koncentration av LDL var 0,55 $\mu\text{mol/ml}$ i den utspädda plasman. Mängden adsorberad LDL utgörs av skillnaden mellan ingående och utgående LDL koncentration plasma från kolonnen och relateras därefter till mängd per ml adsorbent. Till Zetarose adsorberades 0,41 $\mu\text{mol/ml}$ beads och till DALI 6,2 $\mu\text{mol/ml}$ beads.

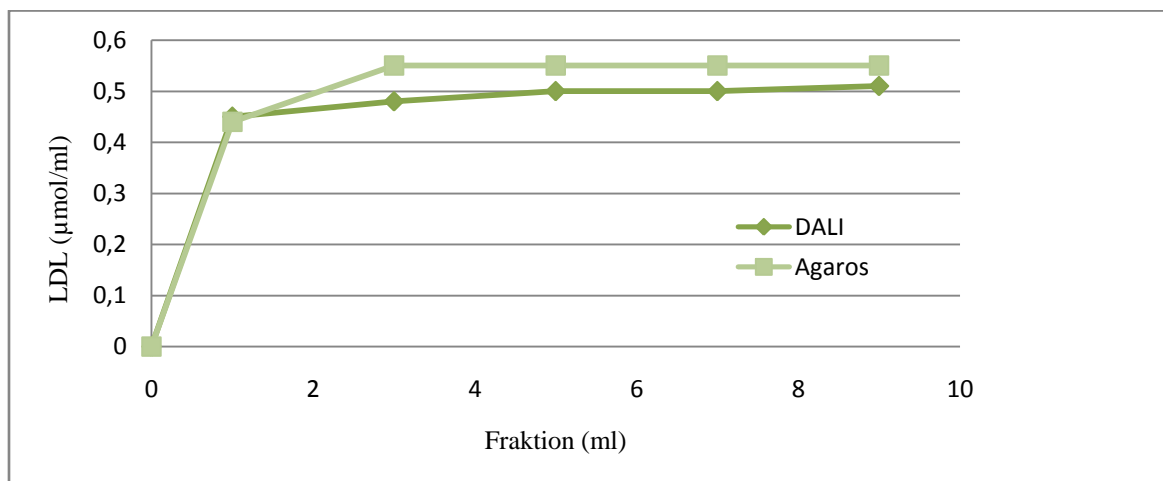


Diagram 1: Visar LDL koncentrationen i fraktioner som passerat 500 μl av respektive adsorbent med frontalkromatografi.

4.0 Diskussion

Resultaten som erhöles visar att DALI har en god adsorptionsförmåga, dock har ingen av de modifierade Zetaroserna kunnat visa samma adsorption. Detta kan bero på ligand tätheten på de olika adsorbenterna och/eller spacer längden (Suen & Tsai. 2000). Frontalkromatografin visar inte heller något större upptag av LDL från plasma, vilken kan bero på de parametrar som användes eller en för hög koncentration av LDL i provlösningen, eventuellt i kombination med en för hög hastighet av den mobilafasen genom kolonnen. Alla undersökta adsorbenter är negativt laddade vilket innebär att andra plasmakomponenter förutom LDL kommer att ha en viss affinitet till dessa och därmed påverka LDL-adsorptionen negativt. Proteinadsorption som redovisats ger vid handen att det är ca tre gånger lägre halt vid frontal kromatografi jämfört med extraktion, förmodligen relaterad till sämre tvätt vid extraktion. Vid desorption av adsorbenterna eluerade 4 % SDS mer protein än 1M NaCl, vilket tyder på adsorption av hydrofoba proteiner hos de olika adsorbenterna.

En av de behandlingar som erbjuds patienter med FH är Heparin-Inducerad LDL utfällning (HELP). Vid behandlingen avskiljs plasman och blandas med acetatbuffert med surt pH och heparin, vilket medför att LDL fälls ut tillsammans med fibrinogen. Bildat precipitat avlägsnas genom membranfiltrering och kvarvarande heparin avlägsnas med hjälp av en kolonn samtidigt som pH normaliseras med bikarbonat. Plasman återförs därefter till patienten med blodcellerna (Eisenhauer *et al.* 1976). Metoden är inte selektiv eftersom andra proteiner också fälls ut då heparin tillsätts. Dock är den pålitlig och effektiv. Genom att förändra pH och jonstyrkan kan stora mängder av LDL elimineras. Likheter med vår studie är att vi också använde negativt laddade strukturer för att adsorbera LDL, vilket i HELP metoden utgörs av den negativt laddade molekylen heparin. Mängden heparin är avgörande för utbytet. Vi har en begränsning i negativt laddade grupper i de undersökta adsorbenterna och har inte valt att manipulera pH för att öka utbytet. Variation av de parametrar som redovisats för HELP medför mer komplicerad behandling än att kunna behandla blodet direkt.

Adsorption av LDL från serum med hjälp av O-karboxymetylkitosan pärlor (O-CM) har gjorts med serum från FH patienter (Yihua & Binglin. 2009). Serum inkuberades med adsorbent i volymförhållandet 2:1 under 2 timmar i 37 °C. Resultaten visade att substitutionsgraden av oleinsyra påverka adsorptionen av LDL. Då förhållandet ökades mellan substituerad oleinsyra till kitosan, minskade LDL adsorptionen medan adsorption av TG ökade och HDL påverkas nästa inte alls. Adsorptionsmekanismen anses vara av både kemisk och fysikalisk natur, beroende på ökad hydrofobicitet samtidigt som karboxylat andelen ökas. I vår studie kunde ingen signifikant påverkan av adsorption av HDL och TC ses, vilket tyder på att adsorbenterna är till stor del specifika för just LDL-molekylen.

I en studie av Cao *et al.* (Cao *et al.*, 2002) användes immobiliserad bärnstenssyra på dextranmodifierade agarpärlor för att avlägsna LDL från serum hos patienter med FH. Adsorptionskapaciteten för LDL ökade med ligandtätheten. Den ökade ligandtätheten påverkade även upptaget av TG som HDL. Jämfört med vår studie där adsorptionen av LDL till de modifierade

Zetarose adsorbenterna var låg kan resultaten tolkas som att ligandmängden var begränsad och dessutom påverkades varken HDL eller TG.

Protein adsorption till DALI och de olika Zetaroserna visade att det föreligger två protein fraktioner, en som interagerat joniskt kopplat till eluering med NaCl och en hydrofob inbindning som eluerats med SDS. Det senare kan mycket väl vara rester av lipoproteiner, vilket vi har visats med analys av TC på de olika matriserna. I en framtida studie bör man undersöka dessa proteinfractioner med SDS-PAGE och western blot för att kunna dra konklusiva slutsatser om vilka proteiner som adsorberats på liknande sätt som presenterats tidigare (Cornelius, *et al.*, 2015).

5.0 Slutsats

Studien visar att modifierad Zetaros inte uppvisar någon adsorptionskapacitet för LDL i humanplasma, men metodiken är lämplig för vidare studier av adsorbenter som förväntas användas i kliniska applikationer för eliminering av LDL hos patienter med kronisk hyperlipemi.

Tackord

Jag vill tacka min handledare Lennart Ljunggren för det intressanta projekt som han dela med sig utav och ett gott samarbete.

Referenser:

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2008). *Molecular Biology of THE CELL*. Garland Science, upplaga: 5.
2. Cornelius, R.M., Macri, J., Cornelius, K.M. & Brash J.L. (2015). Interactions of Apolipoproteins AI, AII, B and HDL, LDL, VLDL with Polyurethane and Polyurethane-PEO Surface. *Langmuir*. DOI: 10.1021,p. 12087-12095.
3. Dräger, L.J., Julius, U., Kraenzle, K., Schaper, J., Toepfer, M., Zygan, K., Otto, V & Steinhagen-Thiessen, E. (1998). DALI—the first human whole-blood low-density lipoprotein and lipoprotein (a) apheresis system in clinical use: procedure and clinical results. *European Journal of Clinical Investigation*.12:994-1002.
4. Eisenhauer T, Armstrong VW, Koren E. (1976). Heparin extracorporeal LDL-precipitation (HELP): technical aspects and influence on plasma lipoproteins and apolipoproteins. In: Gotto AM, Manchini M, Richter WO, et al., editors. *Treatment of Severe Hypercholesterolemia in the Prevention of Coronary Heart Disease*. Basle, Switzerland: Karger; p. 3.
5. Heigl, F., Hettich, R., Lots, N., Reeg, H., Pflederer, T., Osterkorn, D., Osterkorn, K & Klingel, R. (2014). Efficacy, Safety, and tolerability of long-term lipoprotein apheresis in patients with LDL- or Lp(a) hyperlipoproteinemia: Findings gathered from more than 36,000 treatments at one center in Germany. *Atherosclerosis Supplements-Journal*.18: 154-162.
6. Koll, R. (1998). LDL-therasorb immunoadsorption for the treatment of severe hypercholesterolemia refractory to conventional therapy. *Pubmed*. 2: 142–6.
7. Leigh Anderson, N & Anderson, N.G. (2002). The Human Plasma Proteome History, Character, and Diagnostic Prospects. *MCP MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS*. 1: 845-67.
8. Nilsson-Ehle, P., Berggren Söderlund, M. & Theodorsson, E. (2012). *KLINISK KEMI I PRAKTISK MEDICIN*. LAURELLS.
9. Cao,N.N., Yu,Y.T., Wang, M.Y. & Chen, C.Z.. (2002) IN VITRO STUDY OF A NOVEL LOW-DENSITY LIPOPROTEIN ADSORBENT. *Artificial Cells, BloodSubstitutes, and Biotechnology*. 30:1, 53-61.
10. Raal, F.R., Santos, R.D., Blom, D.J., Marais, A.D., Charng, M.J., Cromwell, W.C., Lachmann, R.H., Gaudet, D., Tan, J.L., Chasan-Taber, S., Tribble, D.L., Flaim, J.D & Crooke, S.T. (2010). Mipomersen, an apolipoprotein B synthesis, for lowering of LDL cholesterol concentrations in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a randomised, double-blind, placebo. controlled trial. *THE LANCET*.375: 998-1006.
11. Soltys, P.J. & Etzel, M.R. (1998). In vitro characterization of a membrane-based low-density lipoprotein affinity adsorption device. *BloodPurif*. 16:123–134.
12. Thompson, G.R. (1981). Plasma exchange for hypercholesterolemia. *Lancet*.1: 1246–1248.
13. Yokoyama, S., Hayashi, R., Satani, M., Yamamoto, A. (1985) Selective removal of LDL by plasmapheresis in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 5: 613–622.

Populärvetenskaplig text

Individer med homozygot familjär hyperkolesterolemi (FH) har mutationer i båda gen sekvenserna för Low Density Lipoprotein (LDL) -receptorgenen, vilket resulterar i ett nedsatt upptag och nedbrytning av LDL-kolesterol i kroppens celler. Defekten kan bland annat vara i apolipoprotein B-100, vilket bidrar till att LDL inte kan fästa in på cellers receptorer. I vissa fall bidrar defekten till överproduktion av LDL från levern. Höga halter av fritt LDL i kroppen ökar risken för åderförkalkning och hjärt- kärlsjukdomar. Därför är det viktigt att behandla patienter med FH genom att reducera LDL i blodet. Behandling som heter LDL apheresis, reducerar halten LDL i blodet och har visat på en minskad risk av hjärt- och kärlsjukdomar. Apheresis innebär att patientens blod behandlas utanför kroppen där LDL elimineras med hjälp av en kolonn fylld med negativt laddade adsorbenter som binder till det katjoniska apolipoproteinet B-100 som finns på ytan hos LDL. Syftet med studien var att testa olika modifierade agaros adsorbenters förmåga att selektivt kunna ta bort LDL från human plasma. Aidentifierad utgången human blodplasma användes för att studera adsorption av LDL för ett antal olika negativt laddade adsorbenter, i form av partiklar ca 0,1 mm i diameter, polyacrylat kulor som positiv kontroll (DALI), omodifierade agaros kulor som negativ kontroll (Zetarose) samt två olika kovalentmodifierade agaros kulor; direkt sulfonerad Zetarose (SO₂) och Taurin immobiliserad Zetarose. Adsorbenterna utvärderas genom att inkubera med plasma, spädd med lika delar PBS, till volyms förhållande 1:5 i rumstemperatur under 60 min med kontinuerlig blandning i rotator. Efter inkubation centrifugeras proverna och LDL bestämdes i såväl supernatant som pellet. Totalmängd adsorberade proteiner analyserades också i eluat (1M NaCl och 4 % SDS) från pelleten, det vill säga matriserna. Adsorbenterna DALI och Zetarose undersöktes även med frontal kromatografi. Metoden baseras på kontinuerligt provtillförsel till en kolonn (2 ml) med 0,5 ml adsorbent. Eluatet samlas i fraktioner om 2 ml som analyseras med avseende på LDL och efter avslutat försök även adsorberade proteiner. LDL bestämdes indirekt med hjälp av Friedewalds formel ($LDL = \text{Totalkolesterol (TC)} - \text{High density lipoprotein (HDL)} - (0,45 \times \text{Triglycerider (TG)})$). TC och TG bestämdes enzymatiskt medan HDL kvantifierades som TC efter utfällning av LDL med dextransulfat. Resultaten visar tydligt att DALI har en god adsorptionsförmåga, dock har inte de modifierade matriserna kunnat visa samma adsorptions förmåga. Detta kan bero på adsorbenternas ligand täthet och/eller spacer längd. Frontalkromatografien visar inte heller något större upptag av LDL från plasma, vilken kan bero på de parametrar som tidigare har redovisats i kombination med en för hög flödes hastighet av den mobila fasen. Alla undersökta adsorbenter är negativt laddade vilket innebär att andra plasma komponenter förutom LDL kommer till att ha en viss affinitet till dessa och därmed påverka LDL adsorptionen negativt. Protein adsorption är ca 3 gånger lägre vid frontal kromatografi jämfört med extraktion, förmodligen relaterad till sämre tvätt vid efter extraktion. Vid desorption av adsorbenterna visar SDS en bättre elueringsförmåga än NaCl relaterad till protein, vilket tyder på en större andel av lipofila proteiner. Studien visar att de modifierade agaroserna inte uppvisar någon adsorptions kapacitet för LDL i human plasma, men metodiken som används i studien är lämplig för studier av nya adsorbenter att användas för elimination av LDL hos patienter med kronisk hyperlipemi.