

Levering av vannløselige molekyler gjennom hud

Diffusjon av molekyler gjennom stratum corneum

Karianne Birkestøl Eiken

Industriell kjemi og bioteknologi

Oppgaven levert: Juni 2011

Hovedveileder: Kurt Ingar Draget, IBT

Biveileder(e): Ingvild Johanne Haug, IBT

Øystein Grimstad, IKM

Lise Lyngsnes Randeberg, IME

Forord

Denne oppgaven er utarbeidet som undertegnede masteroppgave i fordypningsemnet TBT4900 ved NTNU, Institutt for Bioteknologi. Laboratoriearbeid og rapportskriving er gjennomført våren 2011.

En takk rettes til faglærer Kurt Ingar Draget, veileder Øystein Grimstad og Lise Lyngsnes Randaberg for hjelp gjennom semesteret. En ekstra stor takk rettes til hovedveileder Ingvild Johanne Haug, for svært god veiledning av laboratoriearbeid og hjelp med rapportskriving gjennom hele semesteret.

De ansatte ved Rheodor laboratoriet takkes for at laboratoriearbeidet ble til en fornøyelse. Det rettes spesielt en takk til Magnus Nergård Hattrem for hans gode innspill og korrekturlesing.

I tillegg takkes Wenche Iren Strand, Ann-Sissel Teialeret Ulset og Kåre Andre Kristiansen for gjennomføring av henholdsvis $^1\text{H-NMR}$, SEC-MALLS og MALDI-TOF.

Stian Eiken takkes for god hjelp med korrekturlesing.

Til sist rettes en takk til Lene Andersen for godt samarbeid og hjelp med noen resultater.

Trondheim 6. juni 2011

Karianne Birkestøl Eiken

Sammendrag

En transdermal leveringsform gir store fordeler framfor oral, intramuskulær og intravenøs levering, men byr også på noen utfordringer. Den største utfordringen er at kun et begrenset antall molekyler kan administreres på denne måten. Hudens øverste lag, *stratum corneum*, er en effektiv barriere, som bare noen molekyler kan penetrere. Disse molekylene er karakterisert som lavmolekylære ($\leq 500\text{Da}$) og lipofile (hydrofobe).

Det er gjennomført forsøk på fullskala hud fra mennesker, for å undersøke om vannløselige (hydrofile) molekyler som fiskegelatinpeptider og G-blokk vil kunne penetrere huden og diffundere ned i dermis. G-blokk og fiskegelatin ble først fraksjonert for å lage mest mulig monodisperse prøver, og deretter fluorescensmerket med alexa 488/532 fluorokrom. De fluorescensmerkede prøvene ble løst i 60 % dimetyl sulfoksid (DMSO), før de ble påført epidermis-siden av hudbiter montert i Franz-celler. Huden ble først forbehandlet med mikronåler. Konfokal laser skanning mikroskop ble benyttet for å undersøke fluorescensintensiteten i vevet, og dermed penetrasjonsevnen til de ulike G-blokkene og fiskegelatinpeptidene. Ved hjelp av hyperspektral avbildning ble det også undersøkt fluorescensintensitet i tillagde hudfantomer.

I oppgaven er det lagt vekt på hvordan penetrasjonsevnen til ulike molekyler avhenger av molekylvekt, merkningsgrad, forbehandling (mikronåler og DMSO) og individuelle forskjeller mellom donorer. Det ble også undersøkt hvor lang tid det tar før det observeres en betydelig mengde fiskegelatinpeptider i vevet.

Noen G-blokker og fiskegelatinpeptider ble funnet til å kunne penetrere huden. Det ble påvist at en forbehandling med mikronåler og 60 % DMSO som vehikkel, øker permeabiliteten til huden. I tillegg ble det observert store variasjoner i penetrasjonsevnen til prøvene når forsøk ble utført på samme eller ulike donorer. Fiskegelatinpeptider ble vist til å begynne å penetrere forbehandlet hud allerede etter 8 timer, men først etter 18 timer inkubasjonstid ble det observert en betydelig mengde fiskegelatinpeptider i vevet.

Det ble funnet en sammenheng mellom fraksjon høymolekylære peptider i fiskegelatinprøvene og fluorescensintensitet i vevet etter endt inkubasjonstid (24 timer). Det

ble observert høyere fluorescensintensitet i vevet etter påførte prøver med høyt innhold av lavmolekylære peptider, enn for prøver med flere høymolekylære peptider.

Det ble også observert en sammenheng mellom merkningsgrad og detektert penetrasjonsevne. Der prøver med høy merkningsgrad ga høyere fluorescensintensitet i vevet og fluorescens i reseptorfasen, enn prøver med lavere merkningsgrad.

I tillegg ble det observert lite eller ingen elektrostatiske binding av fluorescensmerkede prøver av fiskegelatin og G-blokk til papillær dermis, mens *stratum corneum* ble observert som den store barrieren i huden ved at den hadde høyest fluorescensintensitet.

Fiskegelatinprøvene ble funnet veldig polydisperse selv etter fraksjonering ved hjelp av dialysemembraner med ulike størrelser. Det er observert liten sammenheng mellom molekylvekts cut-off på dialysemembran, og faktisk størrelse av peptider som trekkes ut.

Hyperspektral avbildning ble funnet til å fungere for hudfantomer med mer enn 25 mg kovalent merket gelatin.

Innholdsfortegnelse

Forord.....	I
Sammendrag.....	II
Innholdsfortegnelse.....	IV
Forkortelser og definisjoner.....	VIII
1. Innledning	1
1.1. Motivasjon og målet med oppgaven	1
1.2. Huden	2
1.3. Transdermal levering.....	6
1.3.1. Mikronålteknikk	8
1.4. Alginat	9
1.5. Fra kollagen til gelatinpeptider	12
1.5.1. Kollagen.....	12
1.5.2. Gelatin	13
1.5.3. Fiskegelatin.....	15
1.6. Fluorescens og fluorescensmerking.....	16
2. Materialer og metoder	17
2.1. Materialer.....	17
2.2. Løsninger	18
2.2.1. PBS løsning	18
2.2.2. Lipidløsning.....	18
2.2.3. 5(w/v) % gelatin – Høy bloom	18
2.2.4. 3(w/v) % gelatin – Lav bloom	19
2.2.5. Kovalent merking av gelatin (middels bloom) med Alexa 488 (gelatin-alexa)	19
2.3. Tilberedelse av G-blokk-prøver	19

2.3.1.	Felling av G-blokk fra Na-G-blokk.....	19
2.3.2.	Nedbrytning av G-blokk.....	19
2.3.3.	Konjugering av G-blokk til alexa	20
2.4.	Tilberedelse av fiskegelatinpeptider	20
2.4.1.	Nedbrytning av fiskegelatin	20
2.4.2.	Fraksjonering av fiskegelatinpeptider	21
2.4.3.	Konjugering av fiskegelatinpeptider til alexa	23
2.5.	Bestemmelse av molekylvekt og kjemisk karakterisering av fiskegelatinpeptider og G-blokk	25
2.5.1.	¹ H-NMR.....	25
2.5.2.	SEC-MALLS.....	25
2.5.3.	MALDI-TOF	26
2.5.4.	Aminosyreanalyse	26
2.5.5.	Merkningsgrad	26
2.6.	Diffusjon/pentrasjon av G-blokk og fiskegelatinpeptid i hud	27
2.6.1.	Forbehandling og forsøksoppsett	27
2.6.2.	Utstansing av biopsier og måling av fluorescens i reseptorfase.....	28
2.6.3.	Snitting av biopsier.....	29
2.7.	Konfokal laser skanning mikroskop.....	30
2.7.1.	Teori.....	30
2.7.2.	Metode	31
2.8.	Hyperspektral avbildning av hudfantomer	34
2.8.1.	Teori.....	35
2.8.2.	Tilberedning av hudfantomer	36
2.8.3.	Hypodermis	37
2.8.4.	Dermis	37

2.8.5.	Epidermis.....	37
2.8.6.	Støping av hudfantomer	37
3.	Resultater og diskusjon.....	39
3.1.	Bestemmelse av molekylvekt og kjemisk karakterisering av gelatinpeptider og G-blokk	39
3.1.1.	Utbytte av fiskegelatinpeptider og G-blokk.....	39
3.1.2.	¹ H-NMR - Kjemisk- og molekylvektsbestemmelse av G-blokk.....	43
3.1.3.	SEC-MALLS - Molekylvektsbestemmelse av fiskegelatinpeptider	44
3.1.4.	MALDI-TOF - Molekylvektsbestemmelse av fiskegelatinpeptider.....	46
3.1.5.	Justert molekylvekt for fiskegelatinpeptider med hensyn på SEC-MALLS og MALDI-TOF	47
3.1.6.	Aminosyreanalyse av fiskegelatinpeptider	49
3.1.7.	Merkningsgrad og gjennomsnittlig molekylvekt for G-blokk og fiskegelatinpeptider med konjugert alexa	51
3.2.	Diffusjon/penetrasjon av G-blokk og fiskegelatinpeptider i hud.....	54
3.2.1.	Kontrollprøver	55
3.2.2.	Tidsstudie for penetrasjon av fiskegelatinpeptider	57
3.2.3	Alexa	63
	Alexa 488 SE	63
	Alexa 532 SE	67
3.2.3.	G-blokk	71
	G-DP18.....	71
	G-DP22.....	74
3.2.4.	Fiskegelatinpeptid	78
	FG-2t-A-488	78
	FG-2t-C-488	82
	FG-6t-A-488.....	87
	FG-6t-C-488	91

FG-18t-A-532	95
FG-18t-C-532	99
FG-24t-A-532	104
FG-24t-C-532	106
3.2.5. Sammenligning av hudpenetrasjonsevnen til alle G-blokk og FG-peptidene	110
3.2.6. Forbehandling av huden	113
3.2.7. Svakheter med hudpenetrasjonsforsøket og forslag til forbedring.....	116
3.3. Hyperspektral avbildning av hudfantomer	120
3.4. Forslag til videre arbeid.....	121
4. Konklusjon.....	124
Litteraturliste.....	125
Vedleggsliste.....	131

Forkortelser og definisjoner

Alexa 488 HSS	Alexa Fluor 488 hydrazide, sodium salt
Alexa 488/532 SE	Alexa Fluor 488/532 carboxylic acid, succinimidyl ester
A_{\max}	Absorbansen målt ved absorbansmaksimum.
Biopsi	Hudprøve
CF	Korrigeringsfaktor
C_{prot}	Protein konsentrasjon
DIC	Differensiell interferens kontrast
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DOL	Merkningsgraden
\overline{DP}_n	Gjennomsnittlig polymerisasjonsgrad
ϵ	Ekstinksjons-koeffisient
FG-peptid	Fiskegelatin peptid
F_G	Fraksjonen av α -L-guluronsyre monomerer i en alginatprøve.
F_M	Fraksjonen av β -D-mannuronsyre monomerer i en alginatprøve.
F_{peptid}	Peptider beregnet ut fra RI konsentrasjonsdetektoren i SEC-MALLS (kalkulert masse/injisert masse). Dette antas som den høyemolekylære delen av prøven.
G-blokk	Sekvens med repeterende α -L-guluronsyre monomerer.
Gelatin type A	Gelatin produsert under basiske betingelser.
Gelatin type B	Gelatin produsert under sure betingelser.
$^1\text{H-NMR}$	Proton magnetisk resonans spektrometri

$h\nu_{EM}$	Emittert lys
$h\nu_{EX}$	Eksitert lys
$I_{\text{autofluorescens}}$	Den gjennomsnittlige autofluorescensen i vevet
IEP	Isoelektriskpunkt
$I_{\text{prøve}}$	Fluorescensintensiteten i vevet bare fra penetrasjon av en fluorescensmerket prøve.
I_{vev}	Fluorescensintensiteten i vevet som følge av penetrasjon av en fluorescensmerket prøve og autofluorescens.
KLSM	Konfokal laser skanning mikroskop(i)
λ_{emisjon}	Emisjon maksimum
λ_{max}	Absorbansmaksimum
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry
M-blokk	Sekvens med repeterende β -D-mannuronsyre monomerer.
MG/GM-blokk	Sekvens med kombinasjon av de to monomerene β -D-mannuronsyre og α -L-guluronsyre.
M_n	Antalls gjennomsnittlig molekylvekt
$M_{n_{\text{høymol}}}$	Molekylvektene for den høymolekylære delen av prøven ($F_{\text{peptid}} * M_n$).
MQ-vann	Milli-Q-vann
Mucosa	Slimhinne
M_w	Vektbasert gjennomsnittlig molekylvekt
MWCO	Molekylvekt cut-off

$Mw_{høymol.}$	Molekylvektene for den høymolekylære delen av prøven ($F_{peptid} * Mw$).
PBS	Fosfatbufret saltvann
σ	Standardavvik
S'_1	Eksitert fase
S_0	Hvilefase
S_1	Stabiliseringsfase
SC	<i>Stratum corneum</i> , hudens øverste lag.
SEC-MALLS	Size Exclusion Chromatography - Multi-Angle Laser Light Scattering
μS	Mikrosimens/cm – Måleenhet for vannets konduktivitet.
α -kjede	Langstrakt polypeptidkjede. Kollagen består av tre α -kjeder.

1. Innledning

1.1. Motivasjon og målet med oppgaven

I flere tusen år har mennesker påført substanser på huden for å oppnå terapeutisk effekt. Den transdermale leveringsformen gir store fordeler framfor oral, intramuskulær og intravenøs levering (Prausnitz et al., 2008).

En av fordelene med en transdermal levering av legemidler er den lave enzymaktiviteten som medisinene møter i huden, sammenlignet med en intravenøs, intramuskulær eller oral leveringsform. Dette betyr at medikamentet vil unngå tilsvarende grad av metabolisering og kan potensielt leveres i mindre brukerdoser (Benson et al., 2008).

En transdermal leveringsform av legemidler gir også et alternativ for barn og eldre, som ofte har vanskelig for å svelge tabletter og kapsler. Tablettene til disse pasientgruppene blir ofte knust og kapsler åpnet, for å unngå ubehagelig svelging. Pulveret/innholdet blir deretter blandet i syltetøy, yoghurt eller annen mat. Dette vanskeliggjør kontrollen av hvor mye virkestoff pasienten har fått i seg, noe som kan gi store konsekvenser. Et studie utført ved sykehjemmene i Nord Trøndelag viser at 15 prosent av tablettene som ble knust var depot- eller enterotabletter. Knusing av disse tablettene vil gi økt toksisitet, økt/reduert effekt av virkestoffet eller gi en risiko for den som håndterer medikamentet (Wannebo, 2009).

Transdermal levering byr også på noen utfordringer. Den største utfordringen er at kun et begrenset antall molekyler kan administreres på denne måten. Hudens øverste lag, *stratum corneum* (SC), er en effektiv barriere, som bare noen molekyler kan penetrere. Disse molekylene er karakterisert som lavmolekylære ($\leq 500\text{Da}$) og lipofile (hydrofobe) (Scheidlin, 2004). Mange metoder er tatt i bruk for å øke permeabiliteten til huden, og dermed slippe inn andre typer molekyler, men mye forskning foregår fortsatt innenfor dette området (Tanner et al., 2008).

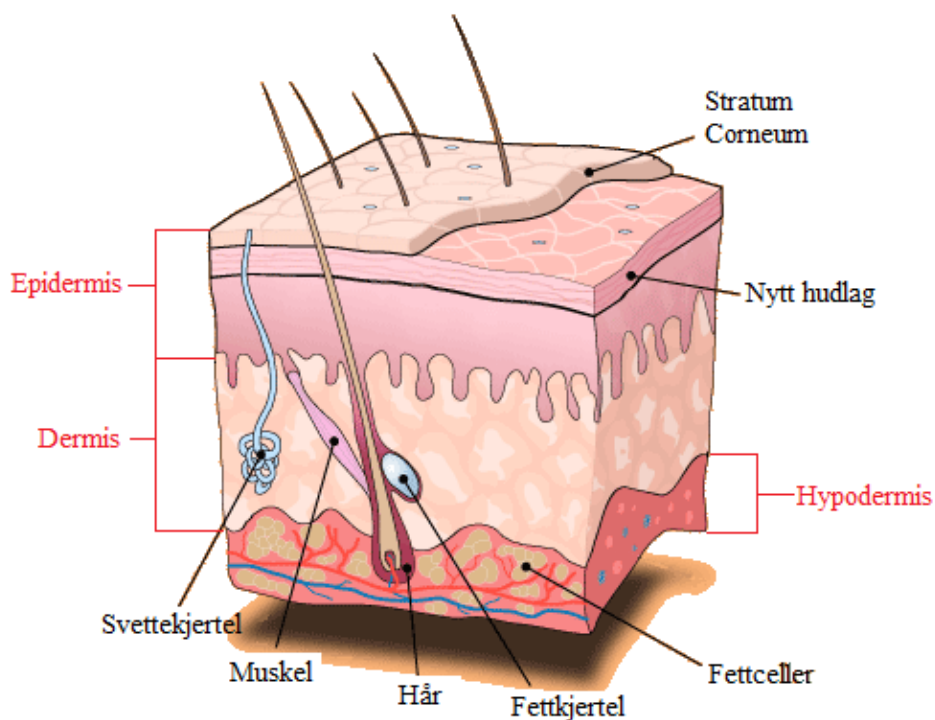
Målet med oppgaven er å undersøke om vannløselige (hydrofile) molekyler som fiskegelatinpeptider (FG-peptider) og G-blokk (repeterende α -L-guluronsyre enheter ekstrahert fra alginat) vil kunne penetrere huden og diffundere ned i dermis. Det er ønskelig å lage mest mulig monodisperse fraksjoner med FG-peptider, for å se om det er en tydelig

sammenheng mellom penetrasjonsevne og molekylvekt. I tillegg var et av målene å undersøke hvor stor innvirkning forbehandling av huden med mikronåler har på penetrasjonsevnen.

Hyperspektral avbildning tas til sist med som et mulig alternativ for konfokalmikroskopering av utførte hudforsøk. En slik metode vil kunne være svært nyttig og tidsbesparende innenfor forskning på transdermale leveringssystem i framtiden.

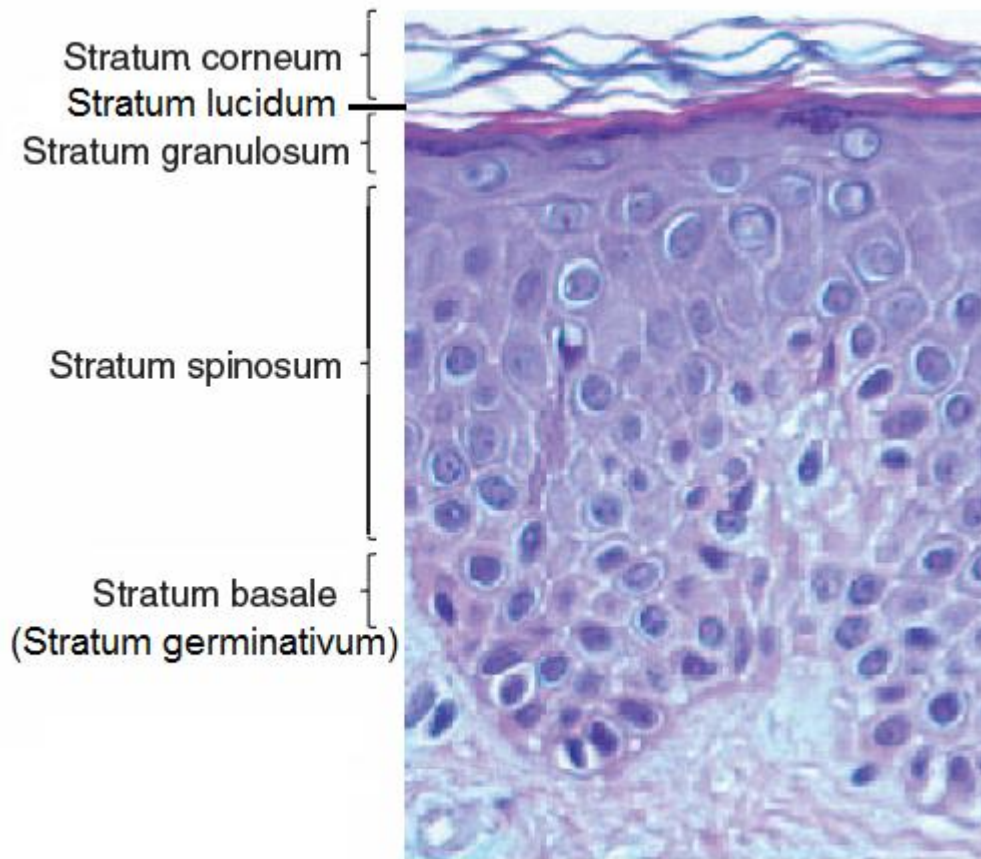
1.2. Huden

Huden utgjør omtrent 10 % av kroppsvekten til et menneske, dekker omtrent 1,7 m² og er derfor det største organet i menneskekroppen (Williams, 2003). Huden er en beskyttende barriere mot miljøet rundt oss. Denne barrieren hindrer at virus, bakterier og kjemikalier kommer inn i kroppen (Klosterman, 2009). Huden er også viktig for beskyttelse av indre organer mot støt, friksjon, dehydrering, samt for regulering av kroppstemperaturen (Schrieber et al., 2007). Huden består av tre lag, epidermis (overhud), dermis (lærhud) og hypodermis (underhud), som vist i figur 1.1.



Figur 1.1: De tre hudlagene: Epidermis, dermis og hypodermis. Hår, muskel, svettekjertel og fettceller er også vist i figuren (Brain, 2011).

Tykkelsen til epidermis kan variere fra 0.006 mm på øyelokket til 0.8 mm på håndflaten (Aulton, 2007). Epidermis er organisert i fem lag: *stratum basale*, *s.spinosum*, *s.granulosum*, *s.lucidum* og *s.corneum* som vist i figur 1.2, og består hovedsakelig av epitelceller og keratinocytter (Mitchell et al., 2009).



Figur 1.2: De fem lagene i epidermis: *Stratum corneum*, *s.lucidum*, *s.granulosum*, *s.spinosum* og *s.basale*. Basalcellene, som dannes i nederste lag, deler seg for å danne keratinocytter. De sistnevnte cellene beveger seg mot hudoverflaten (Jahnsen, 2010).

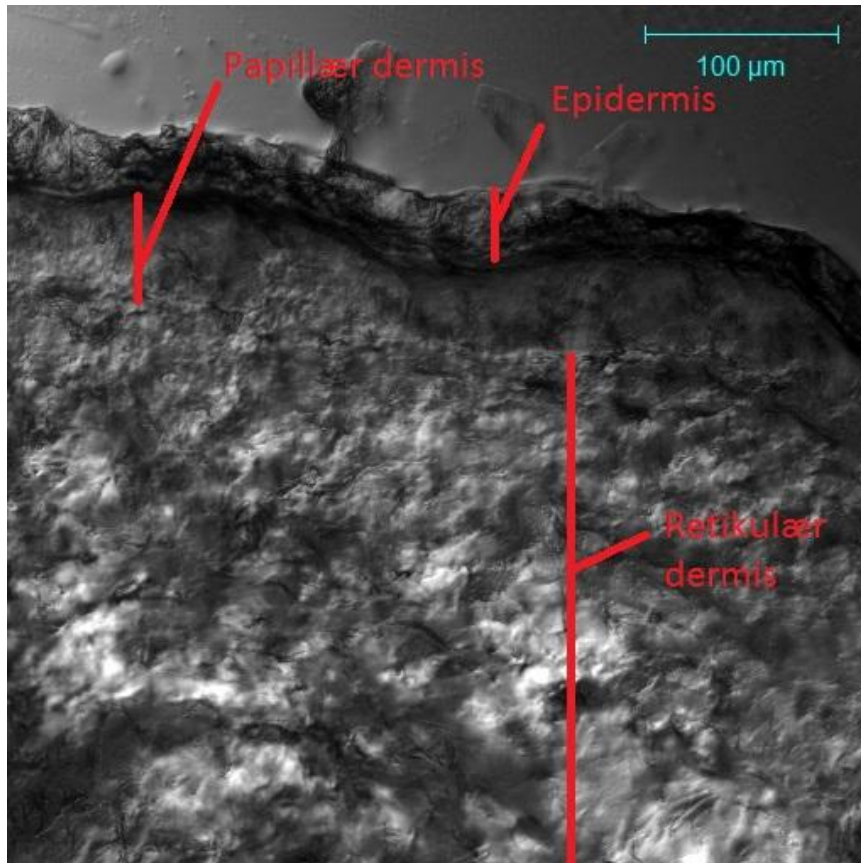
Alle de fem lagene i epidermis er bare tilstede i tykk hud, som for eksempel håndflatene og fotsålene. Epidermis fornyes kontinuerlig ved at de nederste cellene, basalcellene, (i *stratum basale*), gjennomgår mitose og gir keratinocytter som beveger seg oppover mot hudoverflaten (Mitchell et al., 2009). Samtidig som disse cellene beveger seg mot overflaten, gjennomgår de en form for differensiering som gjør dem i stand til å produsere keratin (Jahnsen, 2010). Etter hvert som keratinocytterne nærmer seg overflaten dør de, og

cellekjerne og cellemembran forsvinner. Disse flate og kjerneløse keratinocytterne fylt med keratin (såkalte korneocytter) ender opp i SC. SC består av mellom 10-15 lag med korneocytter, som ligger i en hydrofob intercellulær matriks (Benson, 2005; Mitchell et al., 2009). Denne matriksen består blant annet av frie fettsyrer, ceramider, kolesterol og triglyserider (Benson et al., 2008). Den intercellulære matriksen skiller seg fra matriksen i resten av epidermis, som stort sett består av fosfolipider (Rhein et al., 1990). SC er omtrent ugjennomtrengelig og er derfor kritisk i vannregulering og ved absorpsjon av medisiner, kjemikalier og mikroorganismer gjennom huden (Mitchell et al., 2009).

Dermis, som er mellom 3 og 5 mm tykk, er naturlig elastisk og består av en matriks av bindevev (kollagen, elastin ol.). I dermis finnes også hårsekker, fettkjertler og svettekjertler (Aulton, 2007). Dermis deles inn i to lag: papillær og retikulær dermis. Papillær dermis binder dermis sammen med epidermis og består blant av epitelceller, blodkar, nerveceller og små bunter av løst bindevev som kollagen fibre og umodene elastinfibre. I mellomrommet mellom cellene ligger den ekstracellulære matriksen som gjør at cellene kan bevege seg fritt (Mitchell et al., 2009; Narayan, 2009).

Den ekstracellulære matriksen består i hovedsak av kollagen (se kap. 1.5.1), men den kan også inneholde glykosaminglykaner. De sistnevnte er lineære negativt ladde karbohydratkjeder som består av et varierende antall disakkarid molekyler (Pischinger, 2007).

I retikulær dermis finnes det færre celler enn i papillær dermis, men større mengder med bindevev som kollagen og elastin. Retikulær dermis binder huden til hypodermis. Fraværet av modent elastin og store kollagenfibre i papillær dermis, gjør at denne delen av dermis er mer tettpakket enn retikulær dermis. Elastin er "bølgete" og bidrar dermed til at vevet blir mindre kompakt (Mitchell et al., 2009; Narayan, 2009). Figur 1.3 viser huden med epidermis, papillær dermis og retikulær dermis.



Figur 1.3: Gjennomlysningsbilde tatt av huden. Epidermis, papillær dermis og retikulær dermis vises godt. Det sees tydelig at papillær dermis er mer tettpakket enn retikulær dermis.

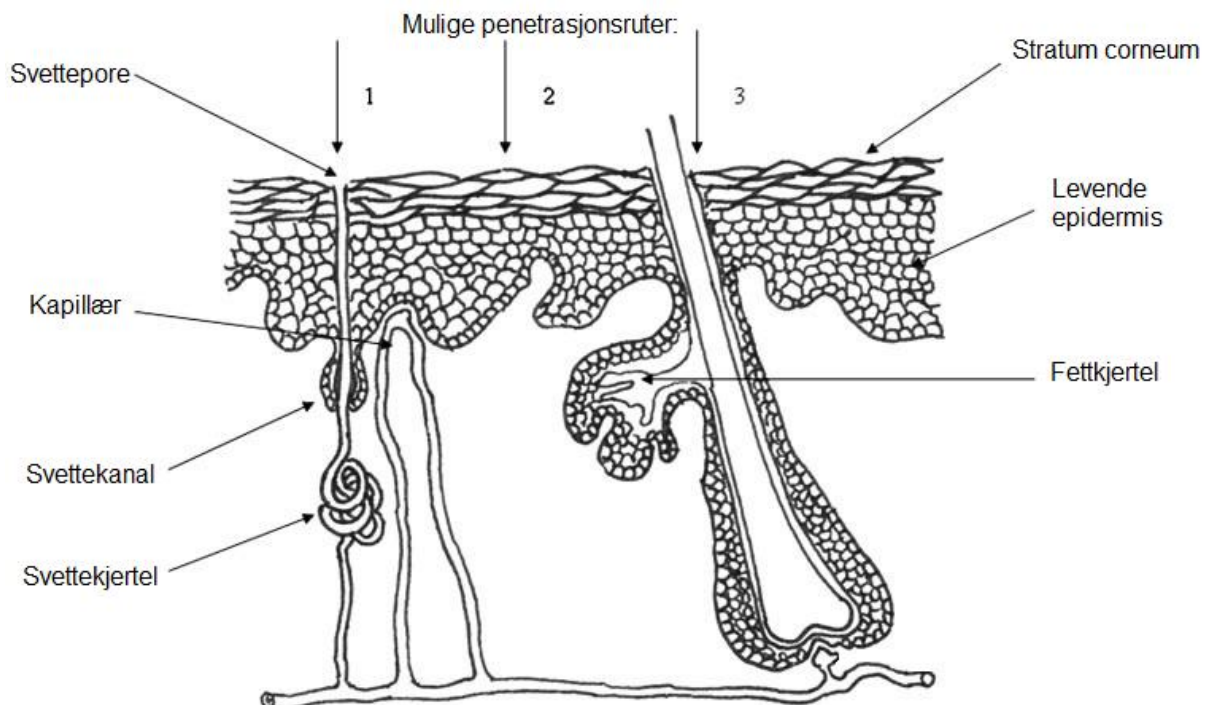
Hypodermis, eller underhudsfettet, fungerer som en mekanisk demper og isolasjon mot varme og kulde. Denne delen av huden fungerer som energireserve, siden lett tilgjengelige energirike forbindelser lagres her (Aulton, 2007). Hypodermis består av løst bindevev og fettceller. Bindevevet er gjennomtrengt av fiber som har opphav i dermis og er direkte bundet til de sterke kollagenfibrene som er plassert under hypodermis (Mitchell et al., 2009).

Aldringen av huden er et resultat av redusert evne til å fornye cellene i hudlagene. For eksempel vil epidermis hos en ung person ha flere lag enn epidermis hos en eldre person. Som følge av dette kan en ung person binde mer fuktighet enn en eldre person. Huden ser glattere og friskere ut hvis den kan binde mye fuktighet. Selve rynkene som dannes skyldes forandringer i dermis. Kollagen produseres saktere og danner flere kryssbindinger enn tidligere, og dermed kan mindre fuktighet bindes samt at elastisitetnivået i huden reduseres (Schrieber et al., 2007).

1.3. Transdermal levering

Som nevnt i kap. 1.1, har mennesker påført substanser på huden i flere tusen år for å oppnå terapeutisk effekt, men mekanismene bak denne effekten har ikke vært kjent i mange år. Først i 1979 kom det første kommersielle produktet for transdermal levering på markedet i USA. Dette var et 3- dagers plaster som hindret reisesyke (Prausnitz et al., 2008). Det finnes nå over 35 transdermale produkter på markedet (Tanner et al., 2008) og over 19 transdermale leveringsystemer for ulike molekyler/medisiner (Prausnitz et al., 2008). Det er estimert en økning i denne formen for levering av medikamenter i årene som kommer (Scheindlin, 2004).

Medikamenter som påsettes huden har tre mulige penetrasjonsruter: gjennom svettekanalene, gjennom SC eller via hårsekker med forbundet fettkjertel (Aulton, 2007). For transport gjennom SC er det kjent at den intercellulære penetrasjonen gjennom lipidmatriksen rundt korneocytene er dominerende (Benson et al., 2008). Figur 1.4 viser de mulige penetrasjonsrutene.



Figur 1.4: Illustrasjon av mulige penetrasjonsruter for molekyler som administreres transdermalt. 1, 2 og 3 viser penetrasjon henholdsvis gjennom svettekanal, gjennom SC eller via hårsekk med forbundet fettkjertel (Benson et al., 2008).

En transdermal leveringsform vil unngå førstepassasjemetabolisme. Dette er en betegnelse på omdannelse av legemidler og andre stoffer i leveren, før de når det store kretsløpet. Levermetabolismen kan inaktivere virkestoffet, slik at større mengder legemiddel må administreres for å få den ønskede terapeutiske effekten (Springhouse, 2008).

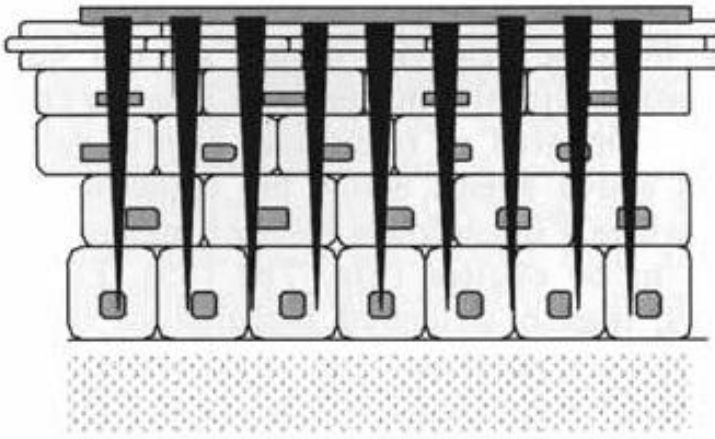
Den store utfordringen med transdermal levering er det begrensende antallet medisiner som kan administreres på denne måten. SC er en effektiv barriere, som bare noen molekyler slipper gjennom. Disse molekylene er karakterisert som lavmolekylære ($\leq 500\text{Da}$) og lipofile (hydrofobe) (Scheindlin, 2004). Tidligere var markedet for transdermal levering kun basert på passiv-plasterteknologi som er avhengig av en enkel diffusjon gjennom huden. Nyere produkter har tatt i bruk en form for aktiv-plasterteknologi. Innenfor denne teknologien er det ønskelig å øke permeabiliteten til huden og benytte en drivkraft, for å gjøre det lettere å transportere medikamentene inn i huden, samtidig som skader på vevet unngås. Den aktive-plasterteknologien gjør det mulig å levere større molekyler gjennom huden. Det forgår mye forskning innenfor dette fagfeltet, og mange teknologier er allerede tatt i bruk. Mikronåler er et eksempel på dette (kap. 1.3.1) (Tanner et al., 2008).

Det finnes mange metoder for å øke permeabiliteten til huden. Dette kan gjøres både med fysiske og kjemiske endringer i SC. Vann er den mest brukte og sikreste måten til å øke hudens permeabilitet, for både hydrofile og lipofile medikamenter. Andre kjemikalier som for eksempel dimethyl sulfoxide (DMSO) har også vist å gi økende permeabilitet i huden. Dette skyldes frembringelse av uorden i lipidstrukturen i SC (Benson, 2005). Problemet med DMSO er at det er påvist giftig og irriterende for huden ved høye konsentrasjoner (Song et al., 2005) (Aspevik, 2010).

Andre metoder for å øke permeabiliteten i huden er eksempelvis ultralyd eller iontoforese (Cross et al., 2004; Schuetz et al., 2005; Tanner et al., 2008). I denne oppgaven vil anvendelsen av mikronåler sees nærmere på som et hjelpemiddel i transdermal levering.

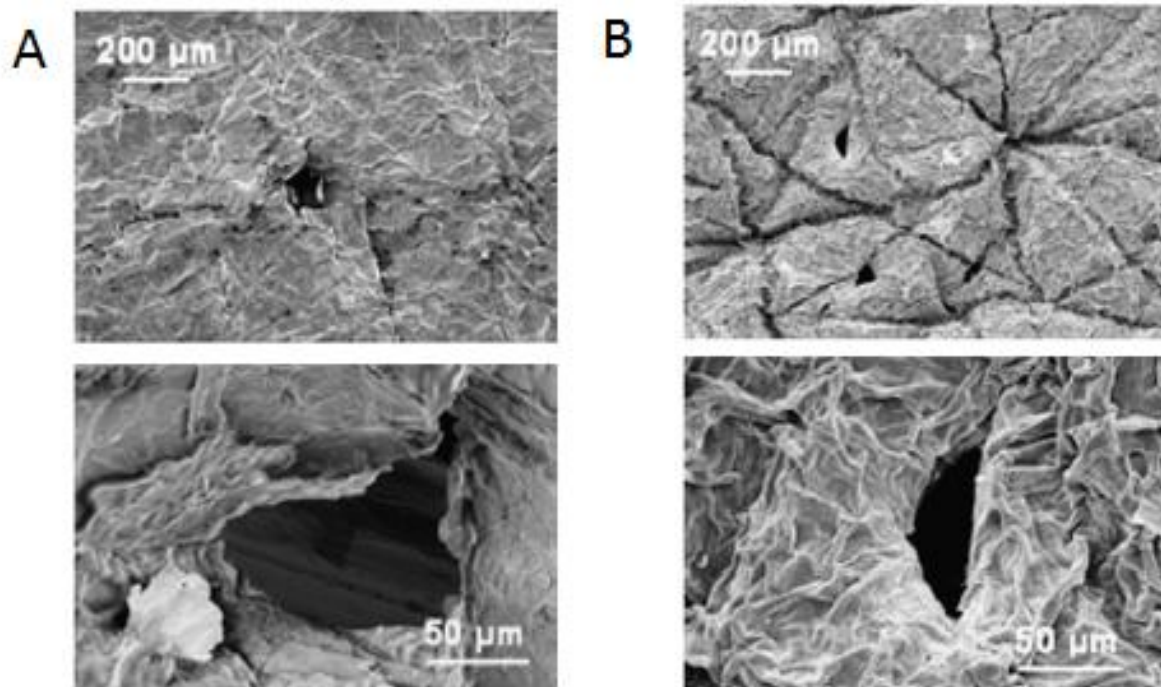
1.3.1. Mikronålteknikk

Mikronåler består av små nåler som er designet for å lage en fysisk kanal gjennom den øverste delen av epidermis. Nålene skal ikke være så lange at de treffer nervene i epidermis, men de skal heller ikke være så korte at de ikke øker permeabiliteten til huden (Cross et al., 2004). Figur 1.5 viser hvordan mikronålene går inn i øverste del av epidermis.



Figur 1.5: Mikronåler som er stukket ned i huden. Nålene går inn i øvre del av epidermis uten å treffe nervene som finnes litt dypere i huden (Cross et al., 2004).

Økningen i hudpermeabiliteten ved bruk av mikronåler er påvist firedoblet for fluorescensfargestoffet Calcein (MW: 622.5) (Henry et al., 1998). Badran et al. (2009) viste hvordan mikronåler gir en økning i det transdermale vanntapet. Dette vanntapet ble funnet på sitt høyeste en time etter behandling med mikronåler, og sank deretter jevnt. Dette skyldes at porestørrelsen gradvis blir mindre. I tillegg ble det påvist at porestørrelsen var avhengig av lengden på mikronålene. Figur 1.6 viser hvordan porestørrelsen endrer seg fra påføring av mikronåler til det har gått to timer (Badran et al., 2009).



Figur 1.6: Elektronmikroskopibilder av hud behandlet med mikronåler med nål-lengde 1500 µm. A) Studert direkte etter behandling. B) Studert to timer etter behandling (Badran et al., 2009)

Det er gjennomført mye forskning på bruken av mikronåler til levering av vaksiner. Forsøk på dyr har vist at dette er mulig ved bruk av hule mikronåler som medikamenter kan administreres direkte i (Laurent et al., 2007; Prausnitz et al., 2009).

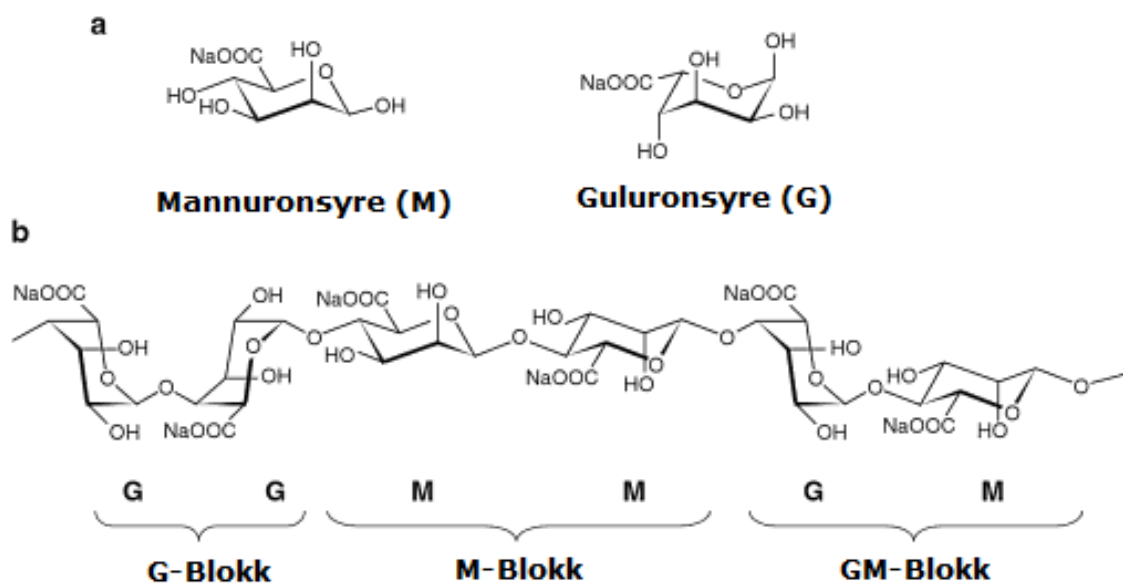
Det finnes også ulemper med mikronåler. Helt siden denne metoden ble tatt i bruk, har risikoen for at nåler kan brette av i huden vært tilstede (Prausnitz, 2004). Forsøk har vist at denne risikoen er svært liten. Det er også påvist at de påførte nålene kan utløse hudirritasjon (Henry et al., 1998; Maibach et al., 2006).

1.4. Alginat

Alginat er et polysakkarid som kan ekstraheres fra brunalger som for eksempel stortare. Denen biopolymeren har liknende funksjon for stortaren, som cellulose har for planter, altså fungerer den stabiliserende og styrkende (Sletbakk et al., 2007). Alginat kan også produseres av bakterieartene *Pseudomonas* og *Azobacter* (Remminghorst et al., 2006). I dag er alginat en av de mest anvendbare biopolymerene til industrielt bruk. Spesielt er bruken

knyttet til egenskapene som geldanner, bindemiddel, fortykningsmiddel og stabilisator, samtidig som evnen til å holde på vann også er viktig i noen av sammenhengene. Alginat er hyppig brukt i både i næringsmiddel- og farmasøytiskindustri. Alginat finnes for eksempel i iskrem, frossenmat, syltetøy og innkapslet insulin (Rehm, 2009). I tillegg forgår mye forskning angående bruk av alginat i diverse behandlingsmetoder som for eksempel behandling av kreft (Sletbakk et al., 2007).

Alginat er et lineært molekyl som bygges opp av β -D-mannuronsyre (M) og α -L-guluronsyre (G). Disse to monomerene bindes sammen ved hjelp av en 1-4-glykosid binding (Remminghorst et al., 2006). Alginat er store molekyler som kan bestå av 50 til 200 000 monomerer. Monomerene er distribuert i blokker av repeterende mannuronsyre (M-blokker), repeterende guluronsyre (G-blokk) eller en kombinasjon av de to monomerene (MG-blokker) (Rehm, 2009). Figur 1.7 viser den kjemiske strukturen av alginat.



Figur 1.7: Kjemisk struktur av alginat. A) Konformasjonen av monomerene β -D-mannuronsyre og α -L-guluronsyre natriumsalt. B) S sammensetningen av monomerene β -D-mannuronsyre og α -L-guluronsyre natriumsalt i G-blokker, M-blokker og MG-blokker.

Mengde og sekvens av de to monomerene avhenger av hvilken organisme alginatet stammer fra. Variasjonen i sammensetning gir også variasjon i de fysiske egenskapene, noe som gjør at det snakkes om ulike alginater og ikke alginat som sådan (Smidsrød et al., 1995).

Siden de fysiske egenskapene er avhengige av sekvensen av blokkene, er det viktig å ha gode metoder for å kvantifisere sekvensene, og muligheter for å oppnå tilnærmet ønsket sekvens (Draget et al., 2005).

Alginat kan depolymeriseres på ulike måter. Glykosidbindingen brytes ved både syre og base degraderingsmekanismer og ved oksidasjon med frie radikaler. Degraderingen av alginat er ved et minimum med nøytral pH (Draget et al., 2005).

Alginat er et polyanion siden karboksylgruppen er dissosiert ved fysiologisk pH (Gu et al., 2004). Dette gir alginat evne til å binde divalente kationer som for eksempel kalsium (Ca^{2+}). Denne ionebindingsevnen er selve basisen for alginatets evne til å danne geler. Denne evnen øker med økende innhold av α -L-guluronsyre i kjedene (Draget et al., 2011; Holtan, 2006).

Kalsium-alginat har i mange år blitt benyttet i sårforbindinger. Dette er siden kalsium er funnet som en forbindelse som kan hjelpe til med å stoppe blødninger (Lansdown, 2002).

G-blokk er tidligere ikke funnet cytotoxisk eller i stand til å indusere en immunrespons (Otterlei et al., 1991; Park et al., 2005). Nylig forskning, derimot, har vist at oligoguluronater er i stand til å modifisere mucosa (slimhinne) nettverkstrukturene på en slik måte at det åpner seg opp. Dette gir muligheten til behandling av patologiske luftveissykdommer, samt en økt biotilgjengelighet av legemidler som må leveres over mucosa (Draget et al., 2011).

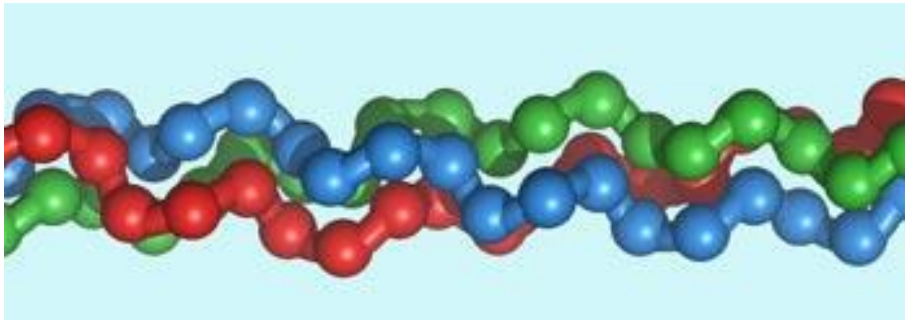
Den orale mucosa er på mange måter svært lik huden når det gjelder oppbygning og funksjon (Haschek et al., 2010). Mucosa består stort sett av negativt ladde glykoproteiner som ligner de negativt ladde glykosaminglykaner som finnes i hudens ekstracellulære matriks (se kap. 1.2) (Draget et al., 2011). Det er derfor stilt spørsmål med om G-blokker kan forenkle levering av legemidler gjennom ekstracellulær matriks med en liknende metode som gjennom slim (Aspevik, 2010).

1.5. Fra kollagen til gelatinpeptider

1.5.1. Kollagen

Kollagen er det proteinet som det finnes mest av i pattedyr. Dette proteinet gir mekanisk styrke, fasthet og elastisitet til en rekke komponenter i kroppen som hud, bein, bindevev og ekstracellulær matriks (Fratzl, 2008).

Kollagen eksisterer i ulike former, men som et kjennemerke består alle kollagenmolekylene av tre α -kjeder (langstrakte polypeptidkjeder) som stabiliseres av hydrogenbindinger. α -kjedene inneholder en eller flere områder som er karakterisert av gjentakende aminosyresekvenser av typen Glysin-X-Y, der X og Y kan være hvilken som helst aminosyre, men X ofte er prolin og Y ofte er hydroxyprolin (Karim et al., 2009). Det er prolin og hydrokxyprolin som er ansvarlige for sekundærstrukturen til kollagen (Schrieber et al., 2007). Kollagens trippelheliksstruktur er vist i figur 1.8.

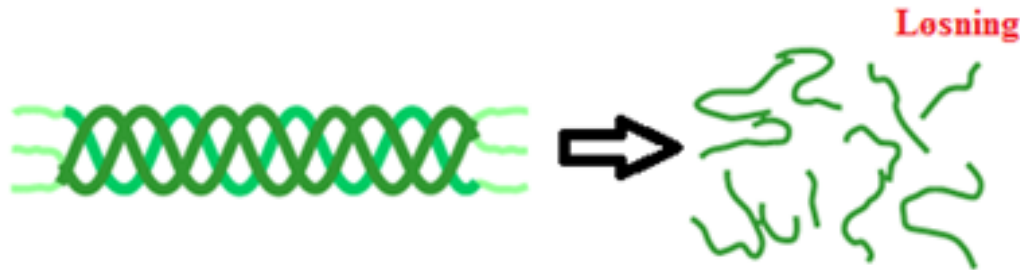


Figur 1.8: En illustrasjon av trippelheliksstrukturen til kollagen (Evans, 2006).

Degradering og kryssbindinger av kollagen i huden fører til rynker (kap. 1.2). Det foregår mye forskning angående hvordan kollagen biosyntesen kan stimuleres. Det er funnet noen peptider som er spesielt effektive i hudfornyelsen. Dette er blant annet peptider som består av gjentakende aminosyresekvens med Gly-Pro-Hyp. Disse peptidene er vist til å fremme syntesen av kollagen og glykosaminglykan i dermis (Choi et al., 2009).

1.5.2. Gelatin

Gelatin produseres ved hjelp av partiell hydrolyse av kollagen. Figur 1.9 viser hvordan kollagenets trippelheliks denatureres og danner gelatin (Babel, 1996).



Figur 1.9: Denaturering av kollagenets trippelheliks til gelatinløsning (Nittagelatinindialimited, 2011).

Mange forbinder gelatin med produkter som gelé, aspik og fromasj, men gelatin benyttes også i mange andre sammenhenger som for eksempel kosmetiske produkter.

De viktigste parameterne til gelatin er viskositet, gelstyrke, lagringsmodul, smelte- og gelingstemperatur. Disse egenskapene påvirkes av faktorer som gjennomsnittlig molekylvekt, molekylvektsfordeling, konsentrasjon av gelatinløsningen, pH og saltinnhold (Karim et al., 2009).

Gelstyrken til gelatiner angis ved hjelp av bloom verdi. Bloom verdien er hovedsakelig rigiditeten av en gelatingel dannet under standard forhold. Bloom verdien måles som den vekten (i gram) som må til for å senke overflaten av en gelatin med 4 med mer, ved å bruke et flatbunnet sylindrisk stempel med en diameter på 12.7 mm (Haug et al., 2009).

Produksjonen av vannløselig gelatin fra uløselig kollagen kan skje under sure eller basiske betingelser, noe som gir henholdsvis gelatintype A og gelatintype B (Babel, 1996). Det isoelektriskepunktet (IEP) styres ut fra produksjonsmetoden. Gelatintype A har ofte et IEP på mellom 8 og 9, mens IEP for gelatintype B ligger mellom 4.7 og 5.6 (Schrieber et al., 2007). Gelatintype A har et isoelektriskpunkt som ligger nært det for kollagen, mens gelatintype B har en mye lavere verdi. Dette skyldes de alkaliske forholdene som gelatintype B produseres

under. Under et basisk miljø vil omtrent 35 % av glutamin og asparagin blir omformet til henholdsvis glutaminsyre og asparaginsyre (Babel, 1996). Dette kan sees ved å sammenligne aminosyreinnholdet for gelatintype A, gelatintype B og kollagen som gjort i tabell 1.1.

Tabell 1.1: Aminosyre sammensetningen i gelatintype A, gelatintype B og kollagen pr. 1000 tripletter (Mark, 1985).

Amino Acid	Gelatine Type A	Gelatine Type B	Type 1 collagen (cattle)
Alanine	112	117	114
Arginine	49	48	51
Asparagine	16	0	16
Aspartic acid	29	46	29
Cysteine	–	–	–
Glutamic acid	48	72	48
Glutamine	25	0	25
Glycine	330	335	332
Histidine	4	4.2	4.4
Hydroxyproline	91	93	104
Hydroxylysine	6.4	4.3	5.4
Isoleucine	10	11	11
Leucine	24	24.3	24
Lysine	27	28	28
Methionine	3.6	3.9	5.7
Phenylalanine	14	14	13
Proline	132	124	115
Serine	35	33	35
Threonine	18	18	17
Tryptophan	–	–	–
Tyrosine	2.6	1.2	4.4
Valine	26	22	22

Tabell 1.1 viser at det ikke finnes asparagin eller glutamin for gelatintype B, mens det foreligger en større mengde asparaginsyre og glutaminsyre i gelatintype B enn for gelatintype A og for kollagen.

Kollagenet som benyttes i gelatinproduksjon, kommer tradisjonelt fra skinn, bindevev og bein fra dyr (gris og kveg), men i senere tid er fisk sett på som et mulig alternativ (Gmia, 2001).

1.5.3. Fiskegelatin

Fiskegelatin produseres fra fiskeskinn, bein og finner fra varmtvanns- eller kaldtvannsfisk. Denne alternative gelatinkilden ble spesielt vurdert etter utbruddet av kugalskap på 80-tallet (Haug et al., 2004).

Fiskeavfall byr på en god alternativ kilde for gelatinproduksjon både med tanke på kulturelle og religiøse forskjeller som problemer med halalproduksjon og forurensing (Karim et al., 2009).

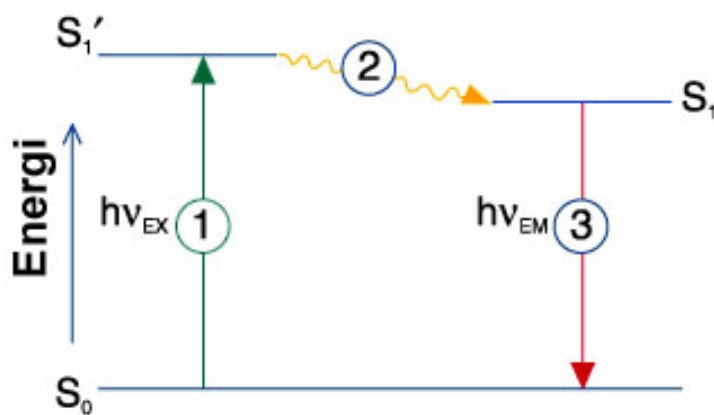
FG-peptider har lavere innhold av aminosyrene prolin og hydroxyprolin enn mammalsk gelatin. Innholdet av disse aminosyrene er ca. 30 % i mammalsk gelatin, 22-25 % i varmtvanns fiskegelatin og 17 % i kaldtvanns fiskegelatin (Karim et al., 2009). Dette er grunnen til at fiskegelatin har lavere lagringsmodul, gelings- og smeltetemperatur enn mammalsk gelatin (Haug et al., 2004).

Mange fiskegelatiner har god funksjon som emulgator eller filmdanner, men blir lite brukt pga. pris. Mye av grunnen til dette er høye utgifter til transport og lav konsentrasjon av kollagen i fiskeskinnet (Schrieber et al., 2007)

Det er også funnet andre områder der FG-peptider kan ha en positiv virkning. Det er blant annet funnet en antioksidantaktivitet i peptider utvunnet fra for eksempel tunfisk og kveite (Alemán et al., 2011). Det har lenge vært kjent at lipidoksidasjon i mat ødelegger kvaliteten til maten og gjør holdbarheten dårligere (Mendis et al., 2005). Det foreligger også forskning som har vist at frie radikaler kan føre til skade på vevet hos mennesker. Ukontrollert dannelse av frie radikaler som angriper membranlipider, proteiner og DNA, er antageligvis involvert i flere sykdommer som diabetes og kreft (Fuchs et al., 2001). Antioksidantaktiviteten til FG-peptidene er derfor blant annet av stor interesse for mat- og legemiddelindustrien (Wang et al., 2010).

1.6. Fluorescens og fluorescensmerking

Fluorescensmerkede molekyler gjør det mulig å se hvor langt ulike molekyler trekker ned i huden. Fluorescens er resultatet av en 3-trinns prosess (figur 1.10): eksitasjon av et foton, den eksiterte levetiden og emisjon av et foton. Dette fenomenet skjer med noen molekyler som kalles fluorokromer eller fluorescensfargestoff. Når disse molekylene er konjugert til andre organisk aktive substanser, kalles de for fluorescensprober eller fluorofor. Andre komponenter kan også vise fluorescens. Dette kalles autofluorescens (Haugland, 2001; Zeiss, 2011b).



Figur 1.10: Prosessen bak fluorescens vist i et Jablonski diagram. Prosessen deles i tre trinn: eksitasjon, den eksiterte levetid og emisjonen. Trinnene er videre forklart under figuren (Haugland, 2001).

Trinn 1 i figur 1.10 viser en eksitasjon som utspiller seg ved at fluorokromen bestråles av en lyskilde med fotoner ($h\nu_{EX}$), og dens energi blir absorbert. Dette gjør at fluorokromen går fra hvilefasen (S_0) til eksitert fase (S_1'). I trinn 2 tapes noe av ladningen pga. vibrasjoner, konformasjonsendringer og spredning av energien. Fluorokromen stabiliseres derfor til fase S_1 . I det siste trinnet går fluorokromen tilbake til hvilefasen, ved emisjon ($h\nu_{EM}$, gir lys fra seg). Emisjonen kan detekteres med et konfokalmikroskop (Haugland, 2001; Zeiss, 2011b).

Ulike fluorokromer bindes på ulike måter til molekyler. Alexa Fluor 488/532 carboxylic acid succinimidyl ester er fluorokromer som bindes til primære aminer lokalisert på peptider eller proteiner, med en veldig stabil amidbinding. Denne bindingen sees på som like stabil som en peptidbinding. Alexa Fluor 488 hydrazide sodium salt binder seg til den reduserende enden av et polysakkarid med en aldehydbinding (Invitrogen, 2011).

2. Materialer og metoder

Dette kapitlet presenterer de ulike materialer og metoder som er benyttet.

2.1. Materialer

Tabell 2.1. viser de ulike materialene som ble benyttet i prosjektet.

Tabell 2.1: Beskrivelse, produksjonsfirma og batch-nummer for materialene som ble benyttet i prosjektet. Det foreligger batch-nummer for kun noen av materialene.

Materialer	Beskrivelse	Produksjonsfirma	Batch nr.
Kaltdvanns fiskegelatin F6	Fiskegelatin produsert fra kaltdvannsfisk	Norland products inc.	8004
Mammalsk gelatin (260A)	Gelatin type A med tidligere målt bloomverdi på 260 g Bloom	Gelita	-
Mammalsk gelatin (150B)	Gelatin type B med tidligere målt bloomverdi på 150 g Bloom	Gelita	627469
Mammalsk gelatin (211A)	Gelatin type A med tidligere målt bloomverdi på 211 g Bloom	Gelita	
Na-G-blokk	Degradert alginat	FMC Technologies	907-255-01
β -karoten 0,3 %	En kartoenid. Benyttes som fargestoff og gir oransje farge i løsning	Sensient Food Colors, Tyskland	5051069
Maisolje	Olje ekstrahert fra mais	Landlord	-
Nescafe, Brasero	Pulverkaffe	A/S Nestlé Norge	-
Glyserin	Hygroskopisk viskøs væske	Merck AS	-
β -lactoglobulin	Protein fra kumelk	Davisco	-
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Løsningsmiddel til bruk i transdermale forsøk	Sigma	-
NaHCO ₃ (Natriumbikarbonat)	Brukes som buffer i dette forsøket	Sigma	-
PBS-tabletter	Til fremstilling av PBS-buffer	Sigma	-
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	En blanding som benyttes til å legge over hudprøver som en beskyttende matriks før nedfrysning og frysning	Sakura	-

Tabell 2.2 viser molekylvekt (M_w), absorbans/emisjon maksimum (λ_{\max} / λ_{emisjon}), ekstinksjonskoeffisient (ϵ) og korrigeringsfaktor (CF) for fluorokromene som ble benyttet i prosjektet. Alle fargestoffene er fra Invitrogen.

Tabell 2.2: Molekylvekt, absorbans/emisjon maksimum (λ_{\max} / λ_{emisjon}), ekstinksjonskoeffisient (ϵ) og korrigeringsfaktor (CF) for fluorokromene som ble benyttet i prosjektet (Haugland, 2001).

	M_w [Da]	$\lambda_{\max}/\lambda_{\text{emisjon}}$ [nm]	ϵ [$\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$]	CF
Alexa Fluor 488 carboxylic acid, succinimidyl ester (Alexa 488 SE)	643.41	495/519	71000	0.11
Alexa Fluor 532 carboxylic acid, succinimidyl ester (Alexa 532 SE)	723.77	532/554	81000	0.09
Alexa Fluor 488 hydrazide, sodium salt (Alexa 488 HSS)	570.48	493/517	71000	0.11

2.2. Løsninger

Løsninger som er benyttet i prosjektet er beskrevet i dette kapitlet.

2.2.1. PBS løsning

Fosfatbufret saltvann (PBS) som ble framstilt ved å løse PBS-tabletter i MQ-vann. En tablett løse i MQ-vann (200 mL), og gir en 0.01 M fosfatbuffer, 0.0027 M kaliumklorid og 0.0137 M natriumklorid med pH 7.4 ved 25 °C.

2.2.2. Lipidløsning

β -lactoglobulin (1.5 g) ble løst i MQ-vann (107.5 g) ved romtemperatur og røring. Etter fullstendig oppløsning ble glycerin (2.8 g) tilsatt løsningen. Deretter ble maisolje (12.5 g) blandet inn, og en emulsjon ble dannet ved bruk av en Ultra-turrax T18 homogenisator med maksimum hastighet i 20-30 sekunder.

2.2.3. 5(w/v) % gelatin – Høy bloom

Denne løsningen ble lagd ved å blande gelatin (type A, 260 g Bloom, 5 g) med MQ-vann (95 g) ved 60 °C. Blandingen ble rørt til gelatinen var fullstendig oppløst.

2.2.4. 3(w/v) % gelatin – Lav bloom

Denne løsningen ble lagd ved å blande gelatin (type B, 150 g Bloom, 3 g) med MQ-vann (95 g) ved 60 °C. Blandingen ble rørt til gelatinen var fullstendig oppløst.

2.2.5. Kovalent merking av gelatin (middels bloom) med Alexa 488 (gelatin-alexa)

Alexa Fluor 488 SE (1 mg) ble løst i 99 % DMSO (0.2 mL) og tilsatt en løsning med gelatin (type A, 211 g Bloom, 1.0 g) i NaHCO₃ (0.1 M, pH 7.6). Systemet ble rørt ved romtemperatur over natta, og dekt med aluminiumsfolie for å unngå belysning. Overflødig salt og alexa ble fjernet ved hjelp av dialyse mot MQ-vann. Det ble benyttet en dialysemembran med molekylvekt cut-off (MWCO) 12000-14000 Da. Dialysen foregikk i mørket ved 4 °C. Innholdet i dialysemembranen ble frysetørket og oppbevart i fryseboks (-40 °C) innpakket i aluminiumsfolie inntil bruk.

2.3. Tilberedelse av G-blokk-prøver

2.3.1. Felling av G-blokk fra Na-G-blokk

Na-G-blokk (20 g) ble løst i MQ-vann (1 L) med god omrøring i ca. 3 timer. pH ble deretter justert til 2.8 ved hjelp av HCl (2M/0.5M), og løsningen ble rørt i ca. 2.5 timer. Løsningen ble så sentrifugert ved 800 rpm i 20 minutter ved 20 °C. Supernatanten ble kastet, og bunnfallet ble suspendert i HCl (0.5 L, 0.01 M). Deretter ble det sentrifugert på ny med samme betingelser. Supernatanten ble kastet og bunnfallet ble suspendert i MQ-vann (0.5 L). En ny sentrifugering og dekantering ble gjennomført, og deretter ble bunnfallet løst i MQ-vann (0.5 L) og nøytralisert. Løsningen ble filtrert på GF/A filter med porestørrelse 1.6 µm og deretter frysetørket. Det frysetørkede produktet ble veid og oppbevart i fryseboks (-40 °C) i små plastikkposer. Noe av produktet ble videre nedbrutt (se kap. 2.3.2).

2.3.2. Nedbrytning av G-blokk

G-blokk (2 g, se kap. 2.3.1) ble løst i MQ-vann (40 mL). Deretter ble pH justert til 3.8 med HCl (1 M), og prøven ble satt i varmeskap med 95 °C i 8 timer. Løsningen ble så avkjølt på is, og

pH ble justert til 7 med NaOH (0.5 M). Løsningen ble deretter dialysert med en dialysemembran med MWCO 12-14000 Da til konduktiviteten var < 2 mS. Dialysen ble gjennomført i spann med lokk (10 L) som ble satt på kjølerom (4 °C). Dialysevannet ble skiftet ca. seks ganger, eller til konduktiviteten < 2 uS. Deretter ble innholdet i dialysemembranen filtrert over et GF/A filter med porestørrelse 1.6 μm og frysetørket. Det frysetørkede produktet ble veid og deretter oppbevart i fryseboks (-40 °C) i små plastikkposer. Noe av produktet ble konjugert til alexa (se kap. 2.3.3).

2.3.3. Konjugering av G-blokk til alexa

Nedbrutt G-blokk (50 mg, kap.2.4.2) ble løst i PBS-buffer (10 mL). Glasset som ble brukt til oppløsning ble pakket inn i aluminiumsfolie. Alexa 488 HSS (1 mg) ble løst i 99 % DMSO (1 mL) og rørt på en vortex mikser. Deretter ble det oppløste fargestoffet (300 μL) tilsatt G-blokkløsningen under røring. Løsningen ble satt på risting i ca. 6 timer. Etter endt risting ble prøvene satt på kjølerom (4 °C) over natt.

Overskuddsfarge ble fjernet ved hjelp av dialysering mot MQ-vann med en dialysemembran med MWCO 1000 Da. Dialyseringen ble gjennomført i spann med lokk (10 L) som ble satt på kjølerom (4 °C). Dialysevannet ble skiftet ca. 4 ganger og sjekket for fluorescence. Det fluorescensmerkede proteinet ble fryst inn og frysetørket. Det frysetørkede produktet ble veid og oppbevart i fryseboks (-40 °C) i små plastikkposer dekket med aluminiumsfolie.

Det ble farget to G-blokk prøver, en ble framstilt som beskrevet i 2.3.1-2.3.2 (G-DP22) og en prøve ble funnet i fryseboks (G-DP18). Disse prøvene får navn etter bestemt gjennomsnittlig polymeriseringsgrad fra $^1\text{H-NMR}$ (kap. 3.1.2).

2.4. Tilberedelse av fiskegelatinpeptider

2.4.1. Nedbrytning av fiskegelatin

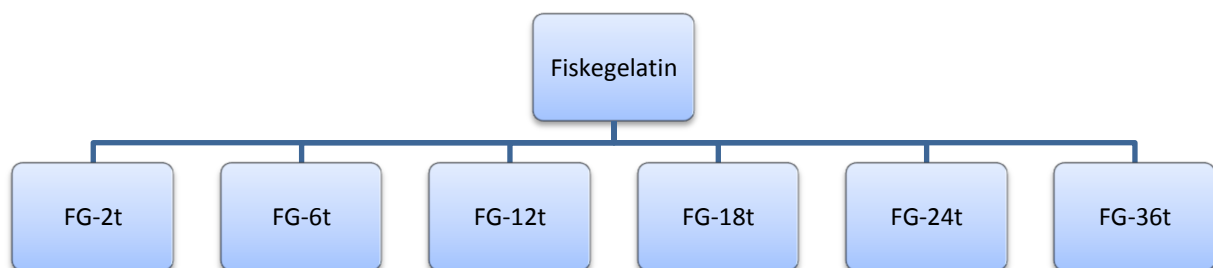
I en blåkorkflaske ved romtemperatur ble kaldtvanns fiskegelatin F6 (5 g) løst i HCl (50 mL, 0.2 M). Fiskegelatinen ble tilsatt væsken under røring, for å unngå uløselige klumper. Løsningen ble rørt med magnetrører (0.5-1 time). Den samme prosedyren ble gjennomført

for seks blåkorkflasker, en flaske pr. nedbrytningstid. Blåkorkflaskene ble satt i varmeskap (90 °C) i ulikt antall timer (2, 6, 12, 18, 24 og 36 timer). Flaskene ble deretter satt på is og justert til pH 7 ved hjelp av 1 M NaOH. pH ble kontrollert med pH-strips.

FG-peptidløsningene ble dialysert for å fjerne salt og små FG-peptider. En dialysemembran med MWCO 100-500 Da ble benyttet. Det ble dialysert mot MQ-vann i målesylindere (1 L). Hver blåkorkflaske ble fordelt i to dialysepølser i to ulike målesylindere. Dialysevannet ble byttet inntil konduktiviteten ble < 2 uS. Dialyseringen ble gjennomført ved 4 °C.

Etter endt dialyse, ble innholdet i dialysemembranene helt i rundkolber, væsken ble fryst inn og frysetørket. Produktene ble veid og oppbevart i fryseboks (– 40 °C) inntil videre bruk.

Gjennomføring av denne metoden ga seks ulike FG-peptider, en for hver nedbrytningstid som vist i figur 2.1.



Figur 2.1: Fiskegelatin ble brutt ned i seks ulikt antall timer: 2, 6, 12, 18, 24 og 36, noe som ga seks ulike FG-peptider å jobbe videre med.

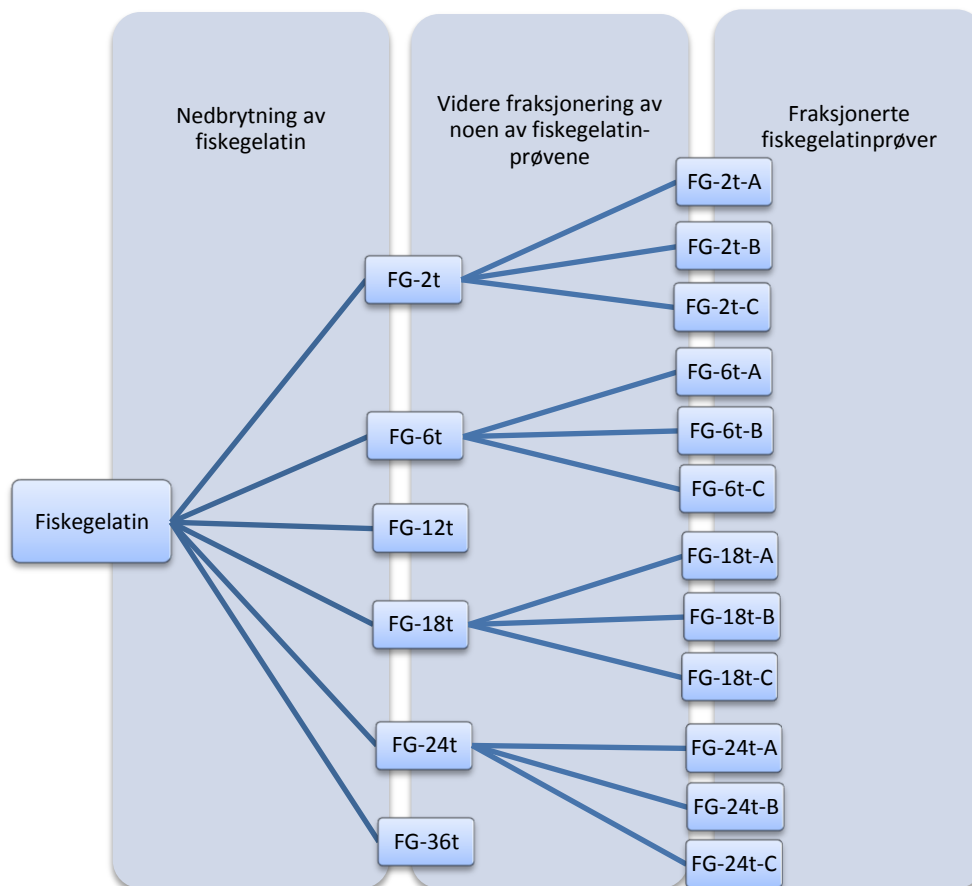
FG-2t, FG-6t, FG-18t og FG-24t ble videre benyttet i metoden beskrevet i kapitel 2.4.2.

2.4.2. Fraksjonering av fiskegelatinpeptider

For å oppnå bedre kontroll over massen på FG-peptidene, ble mer dialysering gjennomført. Nedbrutt FG-peptider (3 g, se kap. 2.4.1) ble løst i MQ-vann (15 mL). Denne løsningen ble dialysert mot MQ-vann ved hjelp av en dialysemembran med MWCO 2000 Da. Dialyseringen ble gjennomført i begerglass (1 L) ved 4 °C.

Etter 24 timer dialysering ble dialysevannet skiftet ut, og en ny dialyseringsperiode på 24 timer ble gjennomført. Dialysevannene for begge periodene ble dampet inn på rotavapor og deretter frysetørket. Innholdet i dialysemembranen ble overført til en ny dialysepølse med MWCO 3500 Da. Denne dialyseringen ble gjennomført på samme måte som den forrige. Dialysevannet etter begge døgnene ble spart, dampet inn på rotavapor og frysetørket hvis konduktiviteten $> 10 \mu\text{S}$. Til slutt ble innholdet i dialysemembranen frysetørket. Dette ga tre FG-peptidfraksjoner 500-2000 Da (A), 2000-3500 Da (B), > 3500 Da (C). Det frysetørkede produktet ble veid og oppbevart i fryseboks (-40°C) i små plastikkposer.

Gjennomføringen av denne fraksjoneringen ga FG-peptidene vist i figur 2.2.



Figur 2.2: Flyttdiagram som viser hvilke fire FG-peptider som fraksjoneres videre og hva disse kalles. A, B og C fraksjoner ligger forholdsvis mellom 500-2000 Da, 2000-3500 Da og > 3500 Da.

FG-peptider av størrelse 500-2000 Da (A) og > 3500 Da (C) ble videre fluorescensmerket ved hjelp av metoden beskrevet i kap. 2.4.3.

2.4.3. Konjugering av fiskegelatinpeptider til alexa

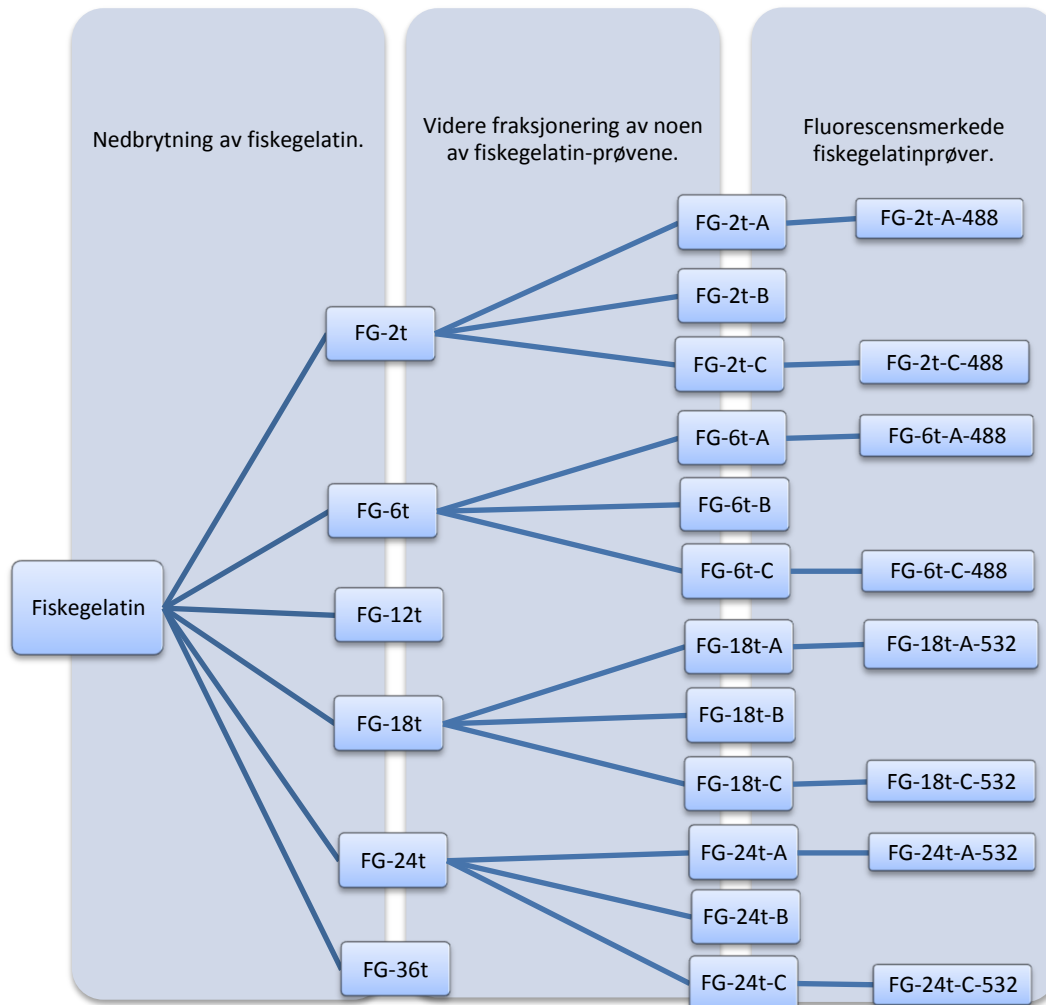
Fraksjonerte FG-peptider (100 mg) (fra 2.4.2) ble løst i MQ-vann (1-2.5 mL). Dette ble blandet i forholdet 1:1 med NaCO₃-buffer (0.2 M). pH i løsningen ble kontrollert til å være over 7.

Alexa Fluor 488/532 SE (1 mg) ble løst i 99 % DMSO (0.2 mL) mens det ble godt blandet på en vortex mikser og hele tiden skjermet fra lyset ved hjelp av aluminiumsfolie.

Deretter ble utblandet alexa (50 µL) dråpevis tilsatt FG-peptidløsningene under lett risting. Prøveglasset ble hele tiden dekket med aluminiumsfolie. Etter tilsats ble prøven satt på risting (4 timer).

Etter endt risting ble løsningen dialysert mot MQ-vann ved hjelp av en dialysemembran med MWCO 1000 Da. Dialyseringen ble gjennomført i målebeger (1 L) dekket med aluminiumsfolie. Dialysevannet ble skiftet ca. 6 ganger og sjekket for fluorescence. Det fluorescensmerkede proteinet ble fryst inn og frysetørket. Produktet ble veid og oppbevart i fryseboks (– 40 °C) i små plastikkposer dekket med aluminiumsfolie.

Figur 2.3 viser et flytdiagram over prosessen fra utgangsstoffet kaldtvanns fiskegelatin F6 (kap. 2.4.1) til ferdig fluorescensmerkede FG-peptider.



Figur 2.3: Flyttdiagram som viser hele behandlingen av fiskegelatin prøvene fra nedbrytning til fraksjonering og deretter konjugering med alexa. A, B og C fraksjoner ligger forholdsvis mellom 500-2000 Da , 2000-3500 Da og > 3500 Da. 488 og 532 står for henholdsvis konjugering med alexa 488 SE og alexa 532 SE.

2.5. Bestemmelse av molekylvekt og kjemisk karakterisering av fiskegelatinpeptider og G-blokk

Molekylvekten til prøvene av G-blokk og FG-peptider (kap. 2.3 og 2.4) ble bestemt ved hjelp av metodene beskrevet i kap. 2.5.1 - 2.5.3. Aminosyreanalyse (kap. 2.5.4) ble gjennomført for fire av FG-peptidene. Merkningsgraden ble bestemt for alle prøvene med metoden beskrevet i kap. 2.5.5.

2.5.1. $^1\text{H-NMR}$

G-blokkprøvene ble undersøkt med $^1\text{H-NMR}$ (proton magnetisk resonans spektrometri). Ut fra dette ble gjennomsnittlig polymerisasjonsgrad (\overline{DP}_n) og fraksjonene av M- og G monomerer (F_M og F_G) i prøvene bestemt.

Teorien bak metoden baseres på bruk av en oscillerende elektromagnetisk puls. Ulike kjerner absorberer energi og gir slipp på denne i ulike mønstre. Dette gjør at det kan detekteres strukturelle og kjemiske sammensetninger (Silverstein et al., 1991).

$^1\text{H-NMR}$ ble utført som beskrevet av Holtan (2006). Med unntak av at i dette tilfellet ble det ikke gjennomført en syrehydrolyse. $^1\text{H-NMR}$ spekteret ble registrert med et Bruker Avance DPX 300 spektrometer. $^1\text{H-NMR}$ ble utført av Wenche Iren Strand, avdelingsingeniør ved institutt for bioteknologi.

2.5.2. SEC-MALLS

SEC-MALLS (Size Exclusion Chromatography - Multi-Angle Laser Light Scattering) ble i dette forsøket benyttet for å finne molekylvektene den gjennomsnittlige molekylvekten for FG-peptidene. M_n (Antalls gjennomsnittlig molekylvekt) bestemmes ved å ta totalvekten av alle molekylene som er tilstede i prøven og dele på det totale antallet av molekyler i prøven. M_w (vektbasert gjennomsnittlig molekylvekt), derimot, vektlegger større molekyler mer enn de mindre molekylene (Eysturskarð, 2010; Smidsrød et al., 1995; Tromp et al., 2002).

SEC-MALLS ble gjennomført som beskrevet av Eysturskarð (2010). Metoden ble utført av Ann-Sissel Teialeret Ulset, avdelingsingeniør ved institutt for bioteknologi.

2.5.3. MALDI-TOF

MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry) er en type laserbasert massespektrometri som kan benyttes til molekylvektbestemmelse. En UV-lysabsorberende matriks og et molekyl bestråles av en laser. Det meste av laserenergien absorberes av matriksen. Dette hindrer uønsket fragmentering av molekylet. Det ioniserte molekylet akselereres i et elektrisk felt og går inn i en kolonne. Ulike molekyler separeres i henhold til molekylvekt og ladning, og de når detektoren ved ulike tidspunkt. Dermed vil hvert molekyl gi et tydelig signal. Denne metoden benyttes for å karakterisere og detektere molekyler med molekylvekt mellom 400 og 350 000 Da (Camp, 2004; Webster et al., 2005).

Metoden er utført som i bruker – Quick start for flexSeries Instruments, Version 2.0 (1998). MALDI-TOF ble utført av Kåre Andre Kristiansen, overingeniør ved institutt for bioteknologi.

2.5.4. Aminosyreanalyse

Det ble gjennomført en aminosyreanalyse for de nedbrutte FG-peptidene FG-2t-A, FG-6t-A, FG-18t-A og FG-24t-A (kap. 2.4.2). Aminosyreanalysen ble utført ved universitetet for miljø- og biovitenskap (UMB). Aminosyreanalysen ble utført som beskrevet av Eysturskarð (2010).

2.5.5. Merkningsgrad

Merkningsgraden ble kontrollert for prøvene FG-2t-A-488, FG-2t-C-488, FG-6t-A-488, FG-6t-C-488, FG18t-C-532, FG-24t-C-532, G-DP18 og G-DP22 (kap. 2.3.3 og 2.4.3).

Alle prøvene ble fortynnet til 0.1 mg/mL. Deretter ble absorbansen målt ved λ_{\max} (tabell 2.2) med et Lambda 25 UV/VIS spektrofotometer (Perkin Elmer Instruments, USA). Merkningsgraden (DOL) er gitt av likning 2.1 (Invitrogen, 2011).

$$\text{DOL} = \frac{A_{\max} \times M_W}{C_{\text{prot}} \times \epsilon_{\text{fluorokrom}}} \quad (2.1)$$

Der A_{\max} er absorbansen målt ved λ_{\max} , M_w er den gjennomsnittlige molekylvekten til proteinet i g/mol (kap. 3.1.5), c_{prot} er protein konsentrasjonen i mg/mL og $\epsilon_{\text{fluorkrom}}$ er ekstinksjonskoeffisienten for den aktuelle fluorkromen (se tabell 2.2 i kap.2.1) (Invitrogen, 2011).

Proteinkonsentrasjonen antas til å være 0.1 mg/mL i dette tilfellet. Merkningsgraden angir mol alexa pr. mol kjede.

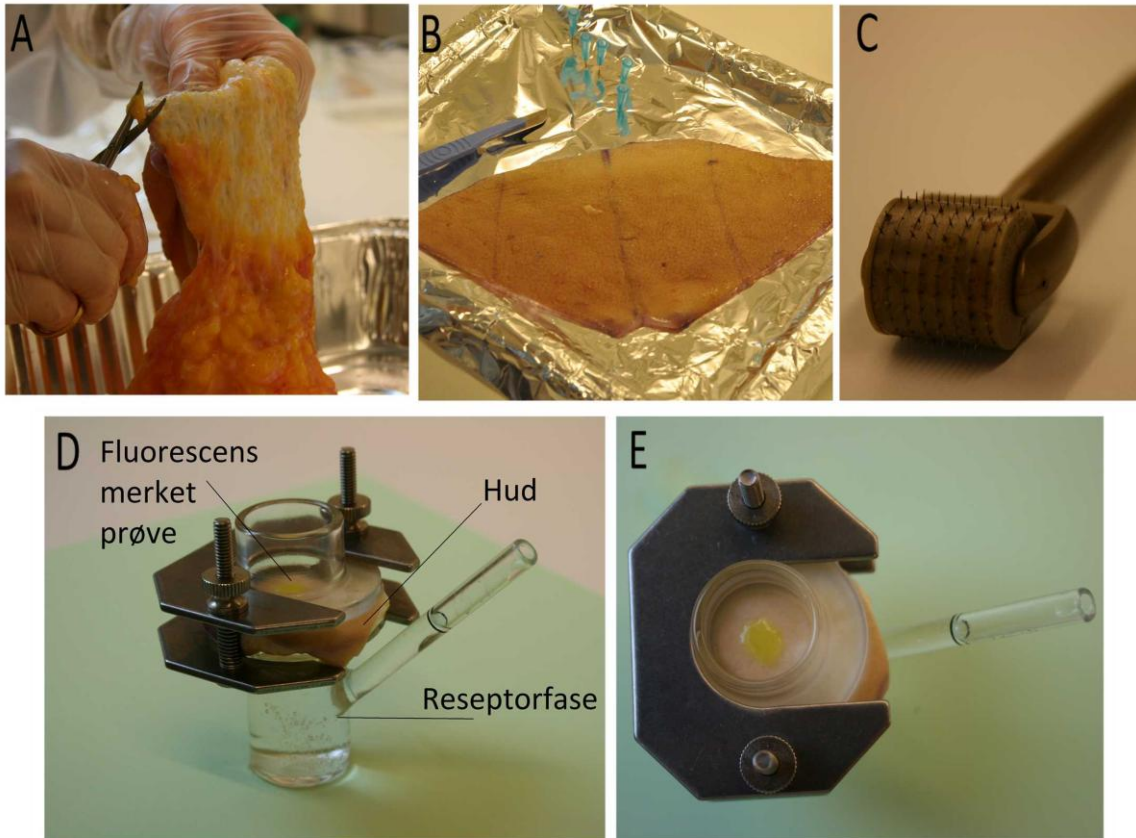
2.6. Diffusjon/pentrasjon av G-blokk og fiskegelatinpeptid i hud

Fluorescensmerkede prøver av FG-peptider og G-blokk (kap. 2.3-2.4) ble benyttet for å studere leveringen av vannløselige molekyler gjennom huden. Materialer og løsninger som er benyttet finnes det mer informasjon om i kap. 2.1 og 2.2.

2.6.1. Forbehandling og forsøksoppsett

Human hud fra klinikk Stokkan ble hentet og fraktet til Gløshaugen umiddelbart etter operasjoner. På laboratoriet ble underhudsfettet/hypodermis (se kap. 1.2) fjernet ved hjelp av en saks (figur 2.4A). Saksen hadde bøyd spisser for å unngå å lage hull i dermis og epidermis. Når underhudsfettet var fjernet, ble hudbiten lagt på en isoporplate dekket med aluminiumsfolie (figur 2.4B). Hudbiten ble holdt på plass ved hjelp av sprøytespisser, og huden ble forbehandlet med mikronåler (1500 μm , Derma Roller, UK, kap. 1.3.1, figur 2.4C) for å lage små kanaler som øker penetrasjonsevnen til molekylene.

Etter forbehandling ble huden delt opp i passende biter for å dekke en diffusjonscelle (Franz-celle, $d=20$ mm). Hudbitene ble montert på diffusjonscellen og kammeret under huden ble tilsatt PBS buffer ved hjelp av en sprøyte med sprøytespiss. PBS-nivået justeres når alle diffusjonscellene er ferdig montert. Fluorescensmerkede prøver (30 μl , kap. 2.3-2.4) ble påført hudoverflaten. Figur 2.4D og 2.4E viser en Franz-celle med en montert hudbit med påført fluorescensmerket prøve. Væsken i kammeret under huden kalles reseptorfasen.



Figur 2.4: A) Fjerning av hypodermis med saks. B) En hudbit uten hypodermis. C) Mikronålene som ble benyttet til forbehandlingen av huden. D) og E) viser Franz-cellen med montert hudbit med påført fluorescensmerket prøve. Kammeret under huden (reseptorkammeret) ble tilført PBS.

De fluorescensmerkede prøvene (kap. 2.3.3 og 2.4.3) ble løst i 60 % DMSO (40 mg/mL) før de ble påført huden. I tillegg ble det påført prøver med bare alexa 488/532 SE løst i 99 % DMSO (0.3 mg/mL) og kontrollprøver (99 % DMSO) for å studere autofluorescens.

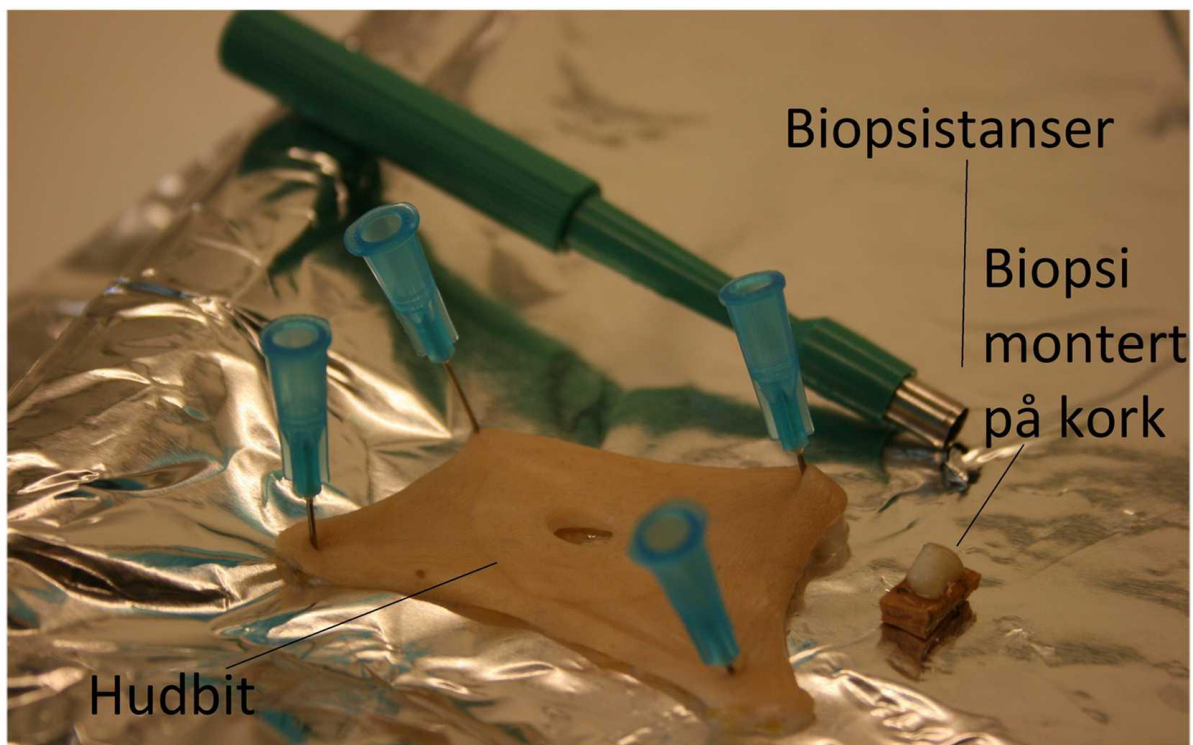
Etter påføring av fluorescensmerkede prøver, ble diffusjonscellene dekket med parafilm og aluminiumsfolie, og inkubert ved 32 °C i varmeskap i 24 timer. For gjennomføring av tidsstudie (kap. 3.2.2) ble denne innkuberingstiden variert mellom 2 timer – 24 timer.

2.6.2. Utstansing av biopsier og måling av fluorescens i reseptorfasen

Etter 24 timer ble diffusjonscellene tatt ut av varmeskapet og hudbitene ble plassert på en isoporplate dekt med aluminiumsfolie. Det ble samlet inn prøver av reseptorfasen fra hver diffusjonscelle i godt merkede cryorør. Disse prøvene ble sjekket for fluorescens.

Hudbitene ble spent opp på isoporplaten ved hjelp av sprøytespisser. Deretter ble det stanset ut en hudprøve (biopsi, $d=5$ mm) pr. hudbit fra omtrent midten. Biopsien ble montert på kork ved hjelp av Tissue Tek, og deretter fryst ned i flytende nitrogen. Hele biopsien ble dekket med Tissue Tek og fryst ned på ny. Biten ble deretter lagt i cryorør og fryst ned i flytende nitrogen. Prøvene ble oppbevart i fryseboks (-40 °C) inntil snitting.

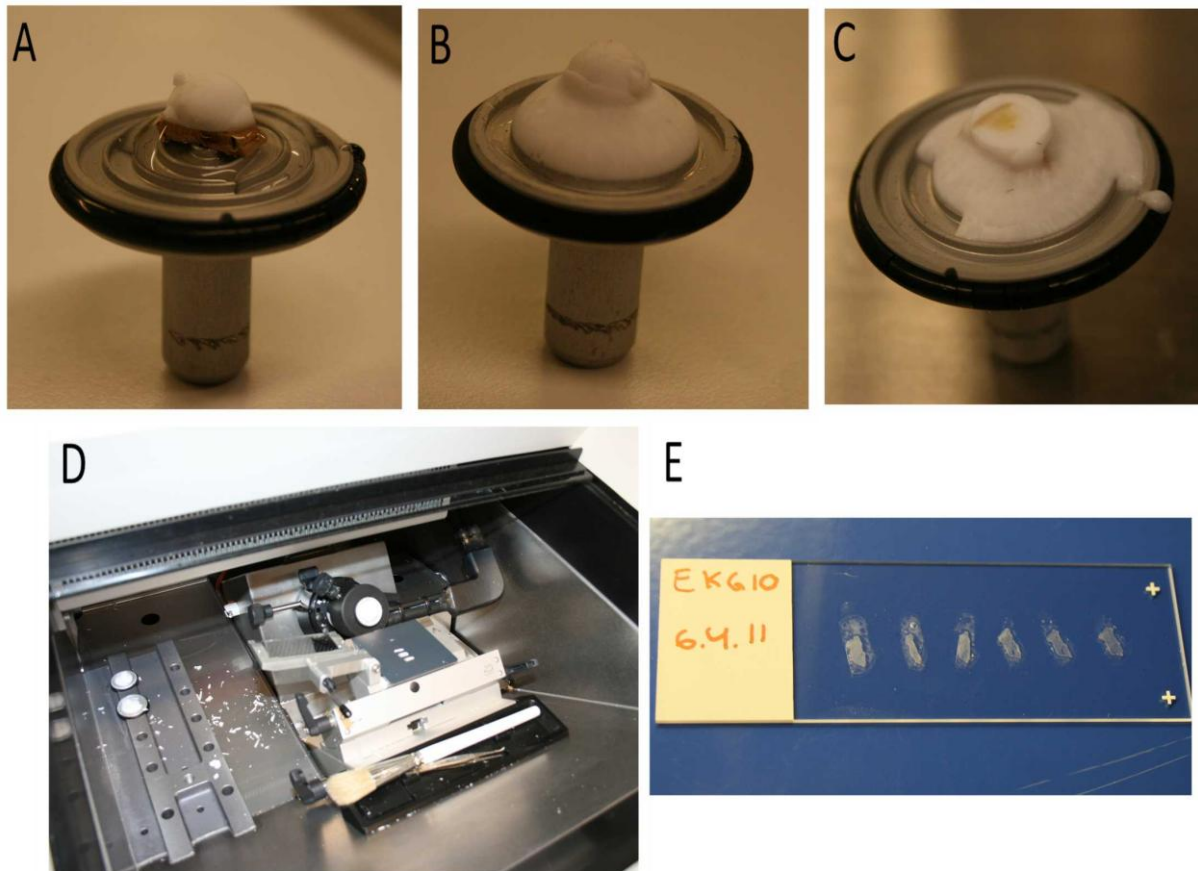
Figur 2.5 viser hvordan hudbiten spennes opp med sprøytespisser på en isoporplate, og en biopsi stanses ut for så å bli montert på kork.



Figur 2.5: Hudbiten spennes opp med sprøytespisser og biopsistanseren benyttes for å stanse ut en biopsi. Denne bli deretter montert på en korkbit ved hjelp av Tissue Tek og flytende nitrogen

2.6.3. Snitting av biopsier

Snitting av biopsier ble gjennomført på Gastroenteret på St. Olavs sykehus. Hudbiopsiene ble fraktet til snitting i flytende nitrogen. Hver hudbiopsi ble montert på en innretning som vist i figur 2.6 A-C ved hjelp av Tissue Tek. Snittingen ble utført på en kryomikrotom av type Leica CM 3050 (figur 2.6 D). Snittene (tykkelse 20 μ m) ble satt på objektglass som vist i figur 2.6 E. Objektglassene med snitt ble oppbevart i lystette bokser ved romtemperatur.



Figur 2.6: A) Hudbiopsier monteres på en innretning ved hjelp av Tissue Tek. B) Etter noen minutter i mikrotomen (venstre i D) fryser Tissue Tek, og biopsiene er klare for snitting. C) Ferdig snittet biopsi. D) Mikrotomen med plass til innfrysning (venstre) og snitting (høyre). E) Ferdig monterte snitt klare for konfokal mikroskopi.

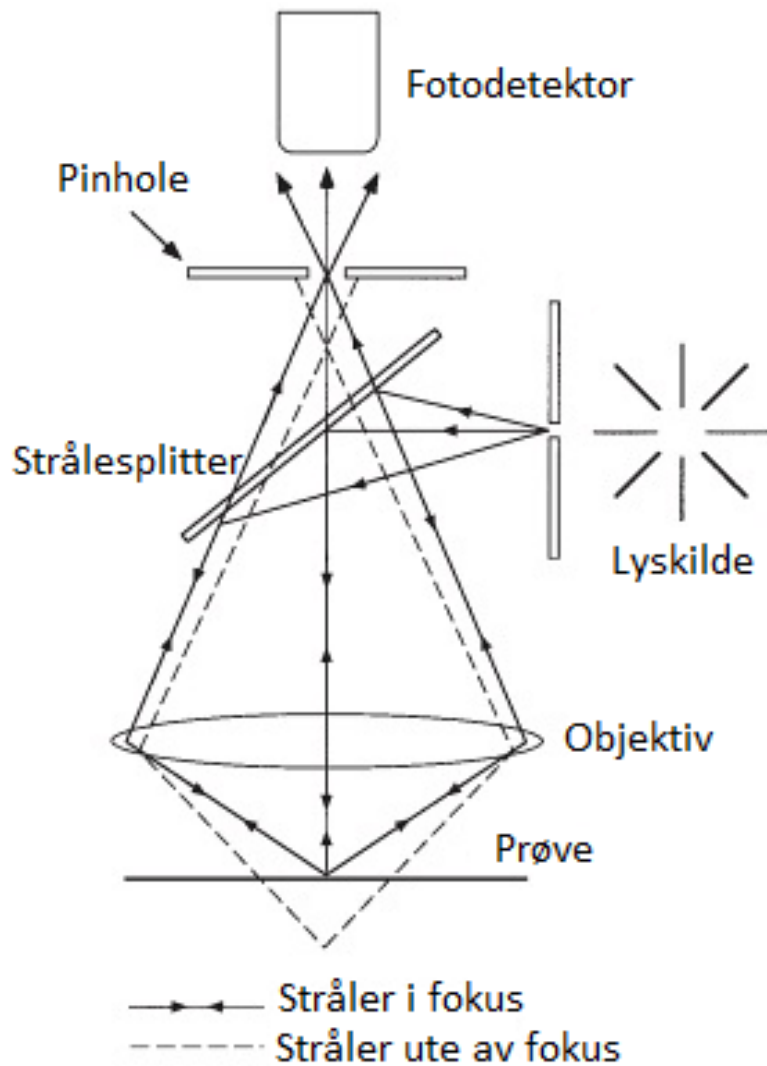
2.7. Konfokal laser skanning mikroskop

Et konfokal laser skanning mikroskop (KLSM) ble benyttet for å undersøke om G-blokk og FG-peptidene hadde penetrert SC og diffundert ned til den levende delen av huden. Dette ble undersøkt ved å se på snitt av hudbiopsier (se kap. 2.6.3) og detektere fluorescensintensiteten ulike steder i snittet.

2.7.1. Teori

Et laserlys treffer prøven via objektivet. Dette fører til at molekyler eksiteres, og den emiterte fluorescensen kan da gjenkjennes av en detektor. Det emiterte lyset separeres av en strålesplitter og går gjennom et pinhole. Deretter når strålene fotodetektoren, som

sammen med en pc og et kamera viser et bilde på skjermen. Figur 2.7 viser hvordan et konfokalmikroskop fungerer på en forenklet måte (Paddock, 1999; Zeiss, 2011a).



Figur 2.7: En illustrasjon av hvordan konfokalmikroskopet fungerer. En lyskilde sender stråler på prøven. Dette fører til eksitasjon. Det emiterte lyset detekteres av en fotodetektor (Paddock, 1999).

2.7.2. Metode

Konfokalmikroskopet som ble benyttet for å undersøke hudsnittene, var av typen Zeiss LSM 510 Meta, som vist i figur 2.8.

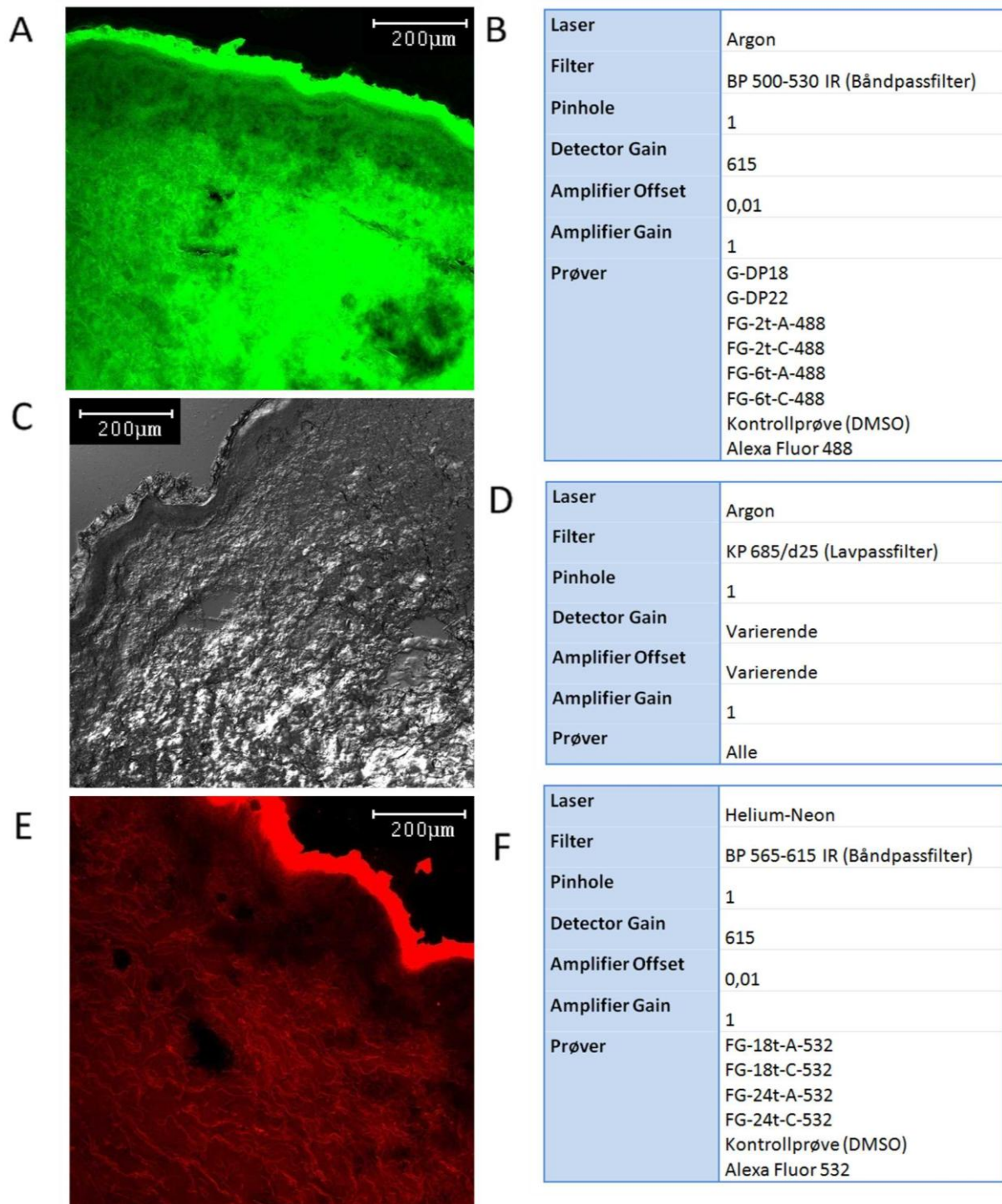


Figur 2.8: Konfokal mikroskopet som ble benyttet i detektering av fluorescensintensitet i snitt av hud.

Det ble benyttet et objektiv av type C-Apochromat 10X/0,45W. For prøver farget med alexa 488 SE/HSS og alexa 532 SE ble henholdsvis argon og helium-neon laser benyttet. Det ble brukt ulike filtre avhengig av hvilke prøver som ble undersøkt. Alle bildene ble tatt med en oppløsning på 1024x1024 piksler. Det ble benyttet de samme innstillingene for alle bildene for å kunne gi et sammenligningsgrunnlag.

Hver gang fluorescens ble fotografert ble det på samme sted tatt et bilde med differensiel interferens kontrast (DIC), en form for gjennomlysning. Dette ble gjort for å få et bedre inntrykk av vevet i dette området, og hvor langt ned de fluorescensmerkede prøvene har diffundert. For gjennomlysningsfotografering ble innstillingene ikke holdt konstante, men ble justert for best mulig bilde.

Figur 2.9 viser de ulike KLSM bildene som ble tatt, hvilke innstillinger som ble benyttet for de ulike KLSM bildene, samt hvilke G-blokker og FG-peptider disse ble benyttet for (se kap. 2.6.1).



Figur 2.9: KLSM bilder og tilhørende innstillinger. A og B viser bilde og innstillinger for prøver farget med alexa 488 SE/HSS. C og D viser gjennomlysningsbilde og innstillinger for dette bildet. E og F viser bilde og innstillinger for prøver farget med alexa 532 SE.

For noen donorer ble det også tatt doble bilder, der innstillingene for gjennomlysning ble kombinert med en av de andre innstillingene.

Bildebehandlingen ble gjennomført med LSM FCS 4.2. Dette programmet gir mange muligheter. Intensiteten i bildene (fra 0=svart til 255=klar grønn) ble undersøkt på tre ulike måter:

1. Tredimensjonal kurve

En tredimensjonal kurve avbilder intensitetsvariasjonene i bildet. Z-aksen viser intensitet mens x- og y-aksen angir pikslene i bildet.

2. Histogram - gjennomsnittlig fluorescensintensitet

Den gjennomsnittlige fluorescensintensiteten kan finnes fra den ønskede delen av bildet. Et histogram viser frekvensen av de ulike intensitetsverdiene.

3. Intensitet som funksjon av dybde i vevet

Intensiteten som funksjon av dybde i vevet ble funnet langs tre linjer i bildet. Disse linjene ble tegnet fra starten av epidermis og så langt inn i vevet som mulig.

For metode 2 og 3 ble det tatt hensyn til autofluorescens, som vist i likning 2.2.

$$I_{\text{prøve}} = I_{\text{vev}} - I_{\text{autofluorescens}} \quad (2.2)$$

Der $I_{\text{prøve}}$ er fluorescensintensiteten i vevet bare fra penetrasjon av den fluorescensmerkede prøven. I_{vev} er fluorescensintensiteten som følge av penetrasjon av fluorescensmerket prøve og autofluorescens. $I_{\text{autofluorescens}}$ er den gjennomsnittlige autofluorescensen i vevet (se kap. 1.6).

2.8. Hyperspektral avbildning av hudfantomer

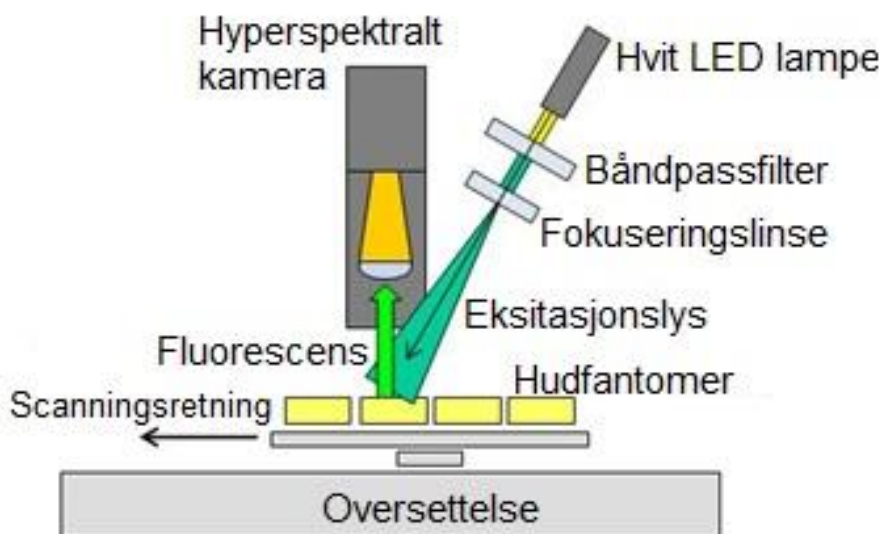
Hyperspektral avbildning ble benyttet for å detektere fluorescensintensitet i tillagde hudfantomer. Avbildningen ble utført av Lise Lyngsnes Randeberg, førsteamanuensis ved institutt for elektronikk og telekommunikasjon. Teorien bak denne teknikken beskrives kort i kap. 2.8.1. Hudfantomene ble lagd som beskrevet i kapittel 2.8.2.

2.8.1. Teori

Hyperspektral avbildning er en avbildningsmetode som kombinerer avbildning og spektrometri i ett og samme system. Dette er en teknikk som har stort potensial innenfor medisinsk diagnostikk (Payne et al., 2007; Sorg et al., 2005).

Det foregår en del forskning på bruken av hyperspektralavbildning for å karakterisere diffusjonsegenskaper i human hud. I dette arbeidet er ofte hudfantomer blitt benyttet. Dette er kjemisk fremstilte hudmodeller med kjente spektrale egenskaper. Disse hudfantomene tilsettes varierende konsentrasjon av et enkelt fluorkrom (Hernandez-Palacios et al., 2011).

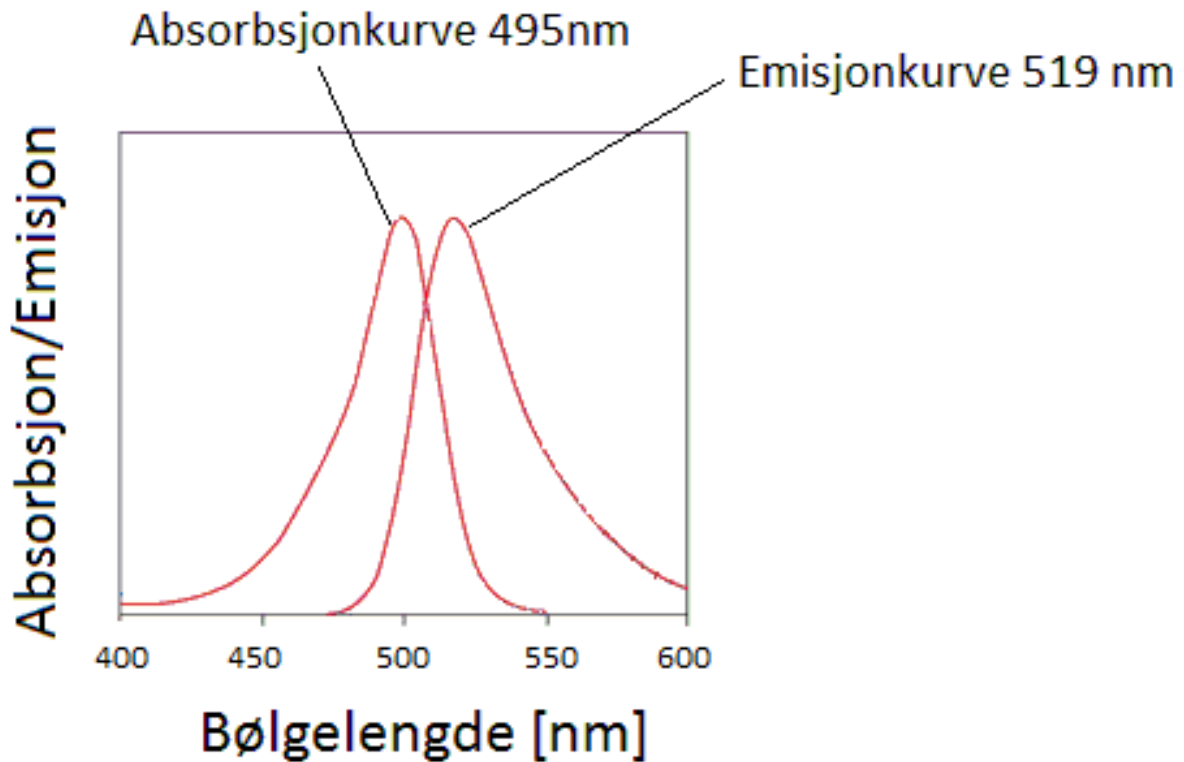
Kameraet som benyttes for denne metoden er basert på designet av HySpex VNIR-1600 som er produsert av Norsk Elektro Optikk AS (Norskelektrooptikk, 2011). Målingen foregår på oversiden av fantomene. Figur 2.10 viser forsøksoppsettet for den hyperspektrale avbildningen (Hernandez-Palacios et al., 2011).



Figur 2.10: Forsøksoppsett for hyperspektral avbildning. En hvit LED lampe belyser hudfantomene. Det hyperspektrale kameraet detekterer fluorescens og signalene blir deretter oversatt (Hernandez-Palacios et al., 2011).

Resultatet av avbildningen kan fremstilles i kurver, som vist i figur 2.11, med fluorescens/intensitet langs y-aksen og bølgelengde langs x-aksen. Hvis alexa 488 SE er

benyttet vil dette gi to topper, der den første er emisjonstoppen (495 nm) og den andre er absorpsjonstoppen (519 nm) (se kap. 2.1). I emisjonstoppen avtar intensiteten med økende fluorescens, mens i absorpsjonstoppen er intensiteten proporsjonal med konsentrasjonen av fluorokromen (Hernandez-Palacios et al., 2011).



Figur 2.11: Absorpsjon og emisjonsprofil for alexa 488 etter hyperspektral avbildning (Invitrogen, 2011).

2.8.2. Tilberedning av hudfantomer

Det ble lagd syv ulike hudfantomer i små petriskåler. Disse bestod av tre ulike lag som skulle etterligne henholdsvis hypodermis, dermis og epidermis. Det var kun fluorescens innholdet i dermis som varierte i de ulike hudfantomene. De kjemisk framstilte hudlagene beskrives først, og deretter kommer et avsnitt om hvordan hudfantomene ble støpt. Materialer og løsninger som er benyttet er det gitt mer informasjon om i kap. 2.1 og 2.2.

2.8.3. Hypodermis

Hypodermis ble lagd ved å blande 5(w/v) % gelatin (40.0 g, se kap. 2.2.3), maisolje (20.0 g) og β -karoten (0.4 g) ved ~ 50 °C. En emulsjon ble fremstilt ved å bruke en VWR VDI 12 homogenisator med maksimum hastighet i ca. 30 sekunder.

2.8.4. Dermis

Det ble lagd syv ulike lag med dermis. Slik at de ulike hudfantomene fikk ulikt innhold av fluorescensmerket gelatin. 5(w/v) % gelatin, lipidløsning og gelatin-alexa er henholdsvis beskrevet i kap. 2.2.3, 2.2.2 og 2.2.5. De syv lagene med dermis bestod av følgende:

- I Blanding av 5(w/v) % gelatin (5.0 g) og lipidløsning (130 μ L).
- II Blanding av 5(w/v) % gelatin (5.0 g), gelatin-alexa (10 mg) og lipidløsning (130 μ L).
- III Blanding av 5(w/v) % gelatin (5.0 g), gelatin-alexa (20 mg) og lipidløsning (130 μ L).
- IV Blanding av 5(w/v) % gelatin (5.0 g), gelatin-alexa (25 mg) og lipidløsning (130 μ L).
- V Blanding av 5(w/v) % gelatin (5.0 g), gelatin-alexa (40 mg) og lipidløsning (130 μ L).
- VI Blanding av 5(w/v) % gelatin (5.0 g), gelatin-alexa (50 mg) og lipidløsning (130 μ L).
- VII Blanding av 5(w/v) % gelatin (5.0 g), gelatin-alexa (80 mg) og lipidløsning (130 μ L).

Løsningene ble rørt ved 50 °C.

2.8.5. Epidermis

Epidermis ble lagd av en løsning bestående av 3(w/v) % gelatin (4.0 g, kap. 2.2.4), pulverkaffe (6.1 mg) og lipidløsning (170 μ L, kap. 2.2.2). Løsningen ble rørt ved 50 °C.

2.8.6. Støping av hudfantomer

Løsningene ble tilsatt syv ulike petriskåler ($d=51.8$ mm). Først ble hypodermisløsning (10.0 mL) tilsatt. Deretter ble dermisløsning (3.15 mL) og til sist epidermisløsningen (270 μ L)

tilsatt. Mellom hvert lag ble skålene satt i kjøleskapet for å gele. Det er viktig å la det ene laget oppnå romtemperatur før et nytt lag tilsettes. Til slutt ble skålene dekket med parafilm og aluminiumsfolie.

Hudfantomene ble undersøkt ved hjelp av hyperspektral avbildning som beskrevet i kap. 2.8.1.

3. Resultater og diskusjon

Resultatene i dette prosjektet er funnet ved hjelp av metodene beskrevet i kap. 2.

3.1. Bestemmelse av molekylvekt og kjemisk karakterisering av gelatinpeptider og G-blokk

Gjennomsnittlig molekylvekt til G-blokkene og FG-peptidene (kap. 2.3 og 2.4) ble bestemt ved hjelp av metodene beskrevet i kap. 2.5.1 - 2.5.3. $^1\text{H-NMR}$ ble benyttet for G-blokk mens SEC-MALLS og MALDI-TOF ble benyttet for FG-peptider. Aminosyreanalyse (kap. 2.5.4) ble gjennomført for fire av de fraksjonerte FG-peptidene. Merkningsgraden ble bestemt for alle prøvene med metoden beskrevet i kap. 2.5.5.

3.1.1. Utbytte av fiskegelatinpeptider og G-blokk

Vekten av alle d frysetørkede prøver er gitt i dette kapitelet. Alle trinnene for tilberedelsen av de fluorescensmerkede prøvene til hudpenetrasjonsforsøkene er tatt med (se kap. 2.3 og 2.4).

Tabell 3.1 viser utveid utgangsstoff og vekt av prøven etter frysetørking, for de ulike trinnene i tilberedningen av G-DP22. G-DP18 er ikke tatt med i dette kapitelet da denne prøven bare ble fluorescensmerket.

Tabell 3.1: Utveid utgangsstoff og vekt av prøven etter frysetørking for de ulike trinnene i tilberedningen av G-DP22.

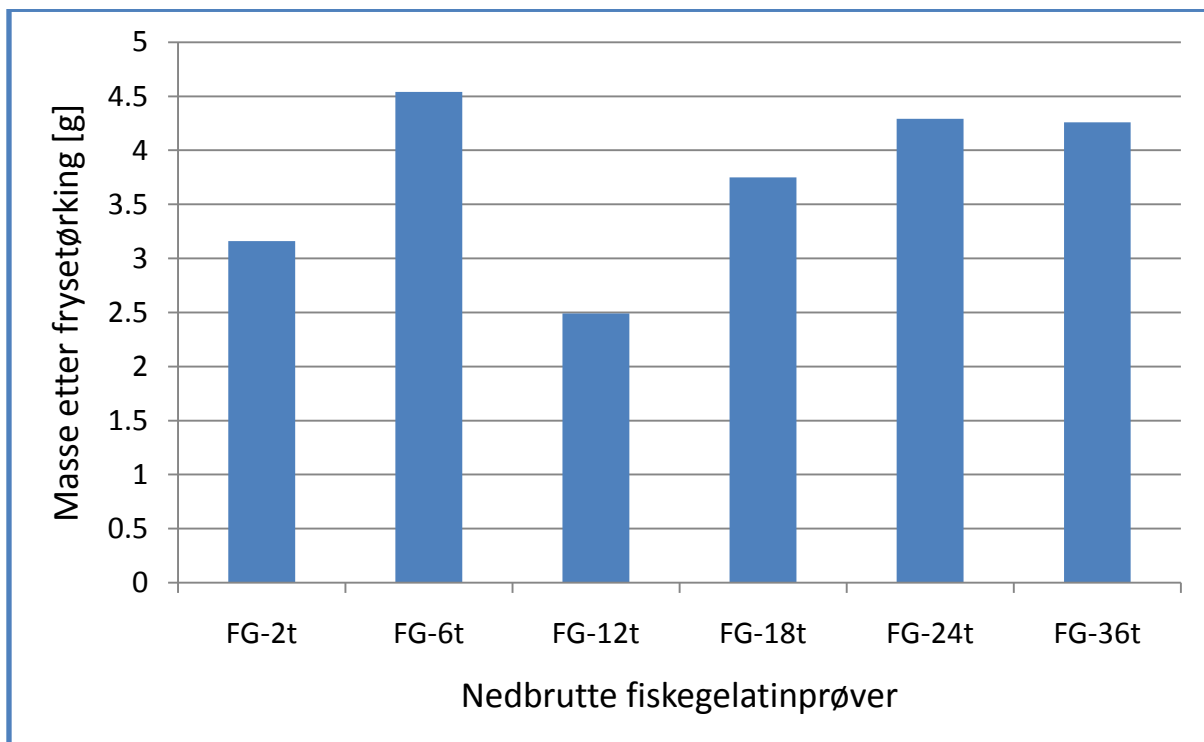
Trinn i tilberedningen av G-DP22	Utgangsstoff [g]	Etter frysetørking [g]
Felling av G-blokk fra Na-G-blokk	20	19
Nedbrytning av G-blokk	2.0	1.2
Konjugering av G-blokk til alexa	0.050	0.060

Tabell 3.1 viser at lite skjer med massen under felling av G-blokk fra Na-G-blokk. Det betyr at lite ble igjen i filteret som ble benyttet. Utgangstoffet Na-G-blokk må altså være nokså rent. For nedbrutt G-blokk ble massen etter frysetørking målt til 1.2 g. Dette er 60 % av

utgangsstoffet, altså har en del forsvunnet under dialysen. Dialyseringen ble gjennomført med en dialysemembran med MWCO 12-14000 Da, altså må det har vært en del store G-blokker i denne prøven. Det er viktig å påpeke at MWCO for dialysemembranen er gitt for globulære proteiner, altså vil ikke en dialysemembran med MWCO 12-14000 Da direkte bety at alle molekyler mindre enn dette vil forsvinne ut i dialysevannet. Det vises også tydelig i kap. 3.1.2.

Den siste delen av tillagingen av G-DP22 var en konjugering med alexa 488 HSS. Det ser ut som om noe alexa har festet seg og gitt en høyere masse etter frysetørking. Molekylvekten til fluorokromen er gitt i kap. 2.1. Hovedgrunnen til at massen etter fluorescensmerking er høyere enn før, skyldes antageligvis rester av salt i prøvene.

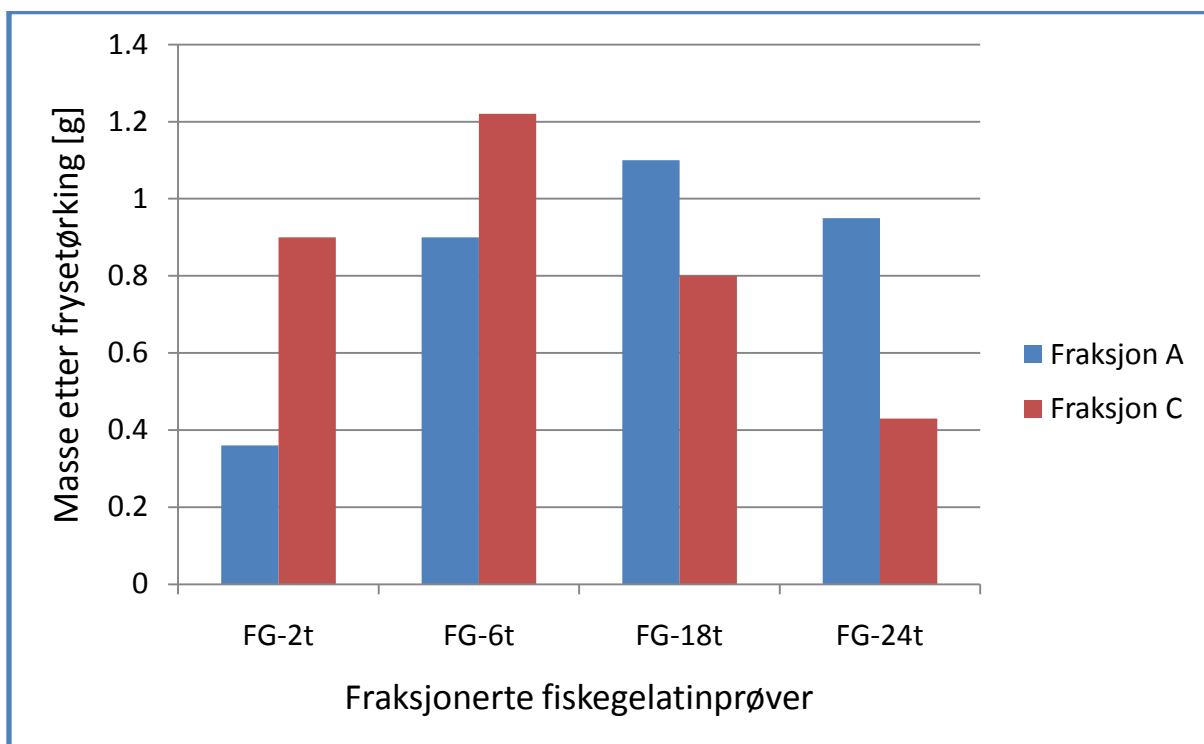
Figur 3.1 viser vekten av de nedbrutte FG-peptidene etter frysetørking (se kap. 2.4.1). Det ble veid ut 5 g utgangsstoff.



Figur 3.1: Vekten etter frysetørking av fiskegelatin nedbrutt i 2, 6, 12, 18, 24 og 36 timer for å gi seks ulike FG-peptider.

Figur 3.1 viser at alle de nedbrutte FG-peptidene har en lavere masse enn utgangsstoffet. Dialysemembranen med MWCO 100-500 Da har altså fjernet noe i alle prøvene. Dette tyder på at det har vært en del salt eller små FG-peptider til stede i prøvene. Det oppdages ikke noe system mellom masse etter frysetørking og nedbrytningstid.

Figur 3.2 viser masse etter frysetørking av de ulike fraksjonene etter gjennomført fraksjonering av FG-peptidene (kap. 2.4.2). Fraksjon A, B og C tilsvarer FG-peptider av henholdsvis 500-2000 Da, 2000-3500 Da og > 3500 Da. Disse molekylvektene er som tidligere nevnt, gitt for globulære proteiner, og kan derfor ikke overføres direkte når det er snakk om utstrakte FG-peptider. MWCO er bare benyttet for å holde orden på hvilke dialysemembraner som er benyttet i framstillingen av de ulike fraksjonene.



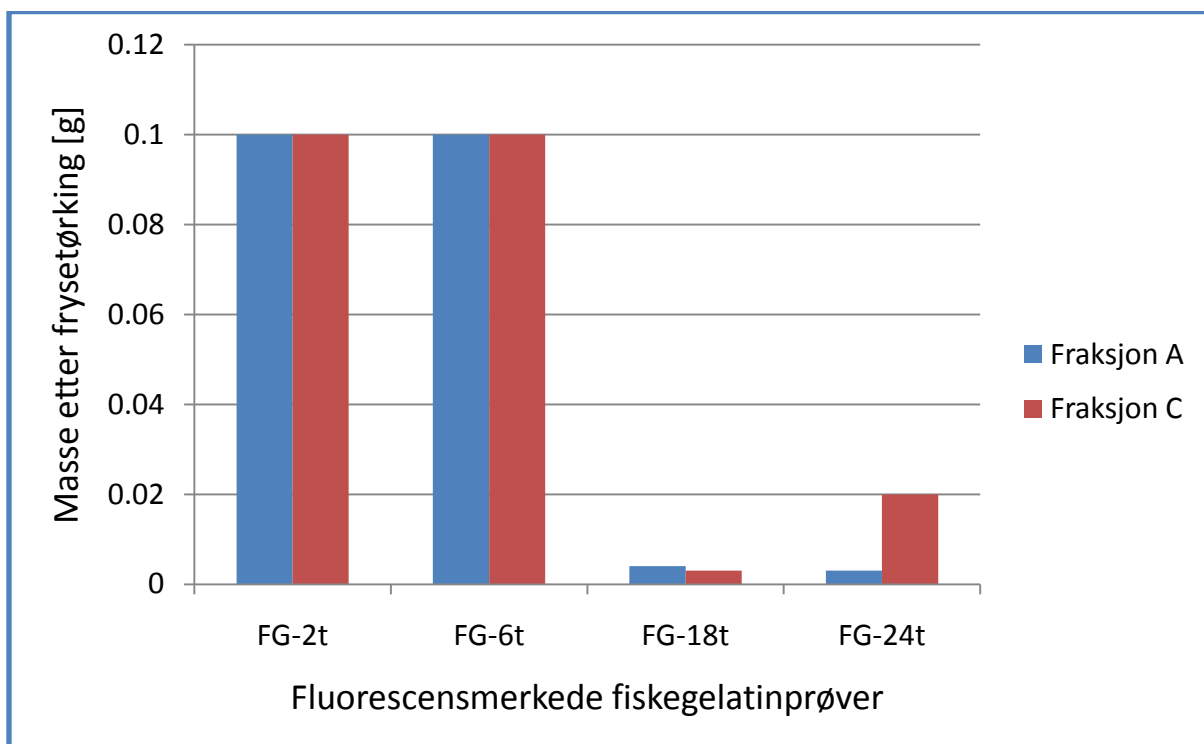
Figur 3.2: Masse etter frysetørking av de ulike fraksjonene etter gjennomført fraksjonering av FG-peptider. Fraksjon A og C tilsvarer peptider av henholdsvis 500-2000 Da og > 3500 Da.

Fra figur 3.2 sees det at massen av fraksjon C er større enn fraksjon A for FG-2t og FG-6t. For FG-18t og FG-24t er det motsatt. Dette kan trolig forklares med at FG-2t og FG-6t bare er nedbrutt i henholdsvis 2 og 6 timer, og dermed har flest store molekyler, mens FG-18t og FG-24t er nedbrutt i henholdsvis 18 og 24 timer, og dermed har flere små gelatinpeptider

tilstede i prøven. Dette stemmer også godt overens med den gjennomsnittlige molekylvekten som er bestemt for de ulike fraksjonene (kap. 3.1.3-3.1.4).

Fraksjon B vises ikke i diagrammet da det ikke ble detektert noe masse av denne fraksjonen for noen av nedbrytningstidstidene. En mulig forklaring på dette er at få molekyler har vært små nok til å passere gjennom dialysemembranen med MWCO 3500 Da. De molekylene av lavere molekylvekt hadde nok allerede blitt separert i fraksjon A, mens resterende andel kan ha vært for store til å slippe gjennom denne dialysemembranen. Fraksjon B tas ikke med videre i prosjektet.

Figur 3.3 viser masse etter frysetørking for FG-peptider med konjugert alexa. Fraksjon A og C er vist i diagrammet.



Figur 3.3: Masse av frysetørket FG-peptider etter konjugert alexa. Fraksjon A og C vises henholdsvis som blå og rød kurve.

Det er lite å trekke ut fra figur 3.3. FG-18t og FG-24t ga svært dårlig utbytte etter konjugering med alexa 532 SE. For fraksjon A kan dette skyldes at prøven består av en del små molekyler som vist i kap. 3.1.3 og 3.1.4. Disse molekylene kan ha sluppet ut av dialysemembranen med

MWCO 1000 Da. Det samme kan ha skjedd for fraksjon C. På grunn av problemer med å fluorescensmerke FG-24t-A, ble hudpentrasjonforsøk bare gjennomført en gang (kap. 3.2) og merkningsgrad ble ikke bestemt (kap. 3.1.7).

3.1.2. $^1\text{H-NMR}$ - Kjemisk- og molekylvektbestemmelse av G-blokk

Tabell 3.2 viser resultatene av $^1\text{H-NMR}$ (kap. 2.5.1). Tabellen viser gjennomsnittlig polymeriseringsgrad ($\overline{\text{DP}}_n$) og fraksjonene av M- og G monomerer i G-blokkene G-DP18 og G-DP22. $^1\text{H-NMR}$ spektrene er gitt i vedlegg A.

Tabell 3.2: Gjennomsnittlig polymeriseringsgrad og fraksjonene av M- og G-monomerer i G-blokkene G-DP18 og G-DP22 bestemt ut fra $^1\text{H-NMR}$.

Prøve	F_G (intern)	F_M	F_{GG}	F_{MG} F_{GM}	F_{MM}	F_G (red.)	F_G (tot.)	$\overline{\text{DP}}_n$
G-DP18	0.90	0.10	0.82	0.083	0.012	0.056	0.96	18
G-DP22	0.92	0.08	0.85	0.070	0.007	0.045	0.97	22

Tabell 3.2 viser at den største delen av prøvene G-DP18 og G-DP22 består av G-monomere, $F_G > 0.95$. Det ble også påvist ~10 % M-monomere, ~1 % M-blokker og ~10 % MG/GM-blokker, noe som betyr at den lille andelen med β -D-mannuronsyre i prøven stort sett foreligger som monomer.

Selv om $\overline{\text{DP}}_n$ bestemmes til 18 og 22 trenger det ikke å bety at det finnes noen molekyler med denne polymeriseringsgraden i prøvene. Det kan foreligge både mindre og større molekyler. En MALDI-TOF analyse burde vært gjennomført, for å få mer informasjon om molekylvektfordelingen i prøvene.

Molekylvekten for Na-alginat monomerer er 198 Da. Dette gir $\overline{M}_{n,G-DP18} \approx 3.6$ kDa og $\overline{M}_{n,G-DP22} \approx 4.4$ kDa ($198 \text{ Da} * \overline{\text{DP}}_n$).

3.1.3. SEC-MALLS - Molekylvektbestemmelse av fiskegelatinpeptider

Molekylvektbestemmelsen av de fraksjonerte FG-peptidene (kap. 2.4.2) ble gjennomført ved hjelp av SEC-MALLS (i tillegg til MALDI-TOF). Metoden er beskrevet i kap. 2.5.2. Resultatet er vist i tabell 3.3. F_{peptid} er fraksjonen peptider beregnet ut fra RI konsentrasjonsdetektoren (kalkulert masse/injisert masse). Dette antas som den høyemolekulære delen av prøven. $Mw_{\text{høymol.}}$ og $Mn_{\text{høymol.}}$ er molekylvektene for den høyemolekulære delen av prøven ($F_{\text{peptid}} * Mw$ eller $F_{\text{peptid}} * Mn$). Rådata er gitt i vedlegg B.

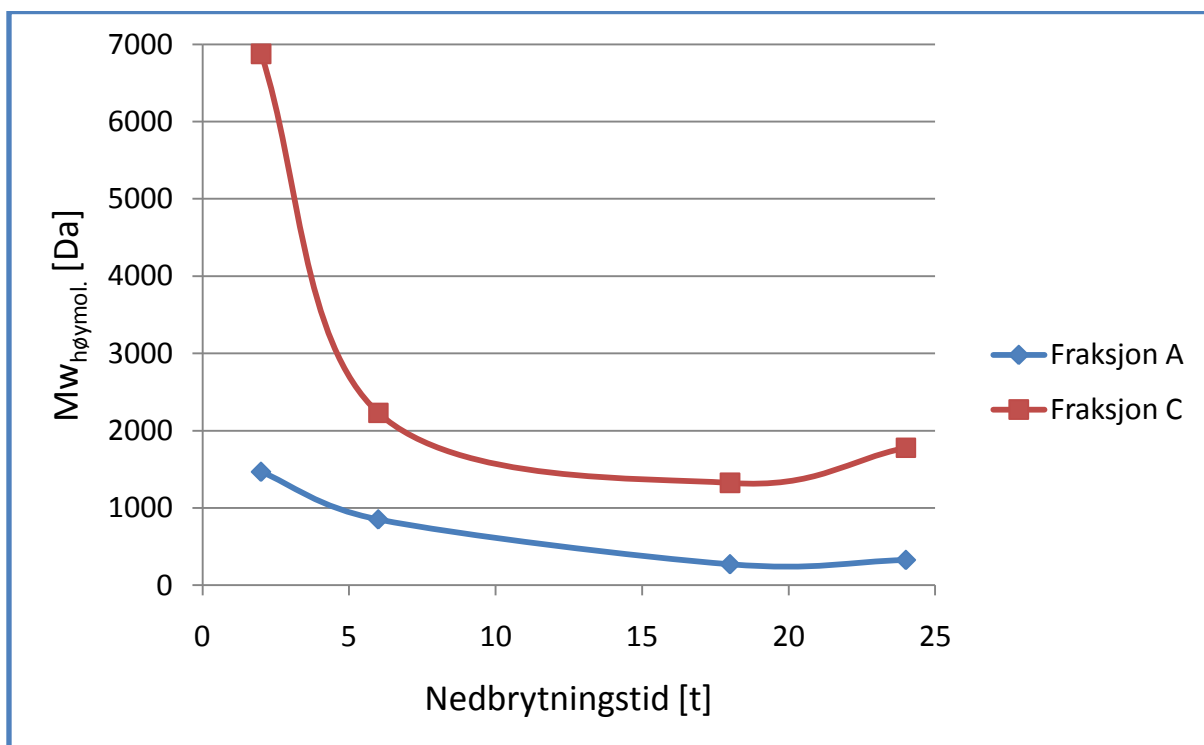
Tabell 3.3: Molekylvekt gitt av SEC-MALLS analyse for FG-peptidene nedbrutt i 2, 6, 18 og 24 timer og fraksjonert. F_{peptid} bestemmes som kalkulert masse/injisert masse. $Mw_{\text{høymol.}}$ og $Mn_{\text{høymol.}}$ gir molekylvekten til den høyemolekulære delen av prøven.

Prøve	Injisert masse [g]	Kalkulert masse [g]	Mw [Da]	Mn [Da]	F_{peptid}	$Mw_{\text{høymol.}}$	$Mn_{\text{høymol.}}$
FG-2t-A	1.00e-3	2.78e-4	5280	4300	0.28	1468	1195
FG-2t-C	1.00e-3	7.54e-4	9120	7130	0.75	6876	5376
FG-6t-A	5.00e-4	1.04e-4	4090	3860	0.21	851	803
FG-6t-C	1.00e-3	5.07e-4	4400	3810	0.51	2231	1932
FG-18t-A	1.00e-3	1.46e-4	1850	1640	0.15	270	239
FG-18t-C	1.00e-3	3.99e-4	3320	3000	0.40	1325	1197
FG-24t-A	1.00e-3	1.18e-4	2760	2640	0.12	326	312
FG-24t-C	1.00e-3	5.28e-4	3370	3050	0.53	1779	1610

Som tabell 3.3 viser, er det kun en liten del av prøven som molekylvekten bestemmes for (F_{peptid}). Resten av stoffet havner i salttoppen (voiden). For denne delen av prøven lykkes det ikke å bestemme molekylvekt. Dette skyldes at det finnes en nedre grense av molekylvekt som SEC-MALLS kan detektere på. Dermed vil små molekyler havne i salttoppen. Det regnes

derfor en $Mw_{høymol.}$ og en $Mn_{høymol.}$ som gir molekylvekten for den høymolekylære delen av prøven. Denne vil videre kunne benyttes sammen med resultatene fra MALDI-TOF (kap. 3.1.4) for å gi en gjennomsnittlig molekylvekt for FG-peptidene (kap. 3.1.5 og 3.1.7).

Figur 3.4 viser molekylvekten for den høymolekylære delen av prøven som funksjon av nedbrytningstid.



Figur 3.4: Molekylvekt ($Mw_{høymol.}$), funnet ved hjelp av SEC-MALLS, som funksjon av nedbrytningstid for FG-peptider av fraksjon A og C.

Figur 3.4 viser hvordan $Mw_{høymol.}$ avtar med økende nedbrytningstid. Det er kun nedbrytning i 18 og 24 timer som ikke stemmer helt med systemet. Dette kan skyldes utilstrekkelig fjerning av salter og små FG-peptider ved dialysering, eller tilfeldigheter og unøyaktigheter med målingene.

Fraksjon A forventes til å ha en molekylvekt < 2000 Da, som forklart i kap. 2.4.2. Dette stemmer for alle A fraksjoner som vist i figur 3.4. Fraksjon C, derimot, forventes en molekylvekt på > 3500 . Dette ser ikke ut til å stemme ut fra figur 3.4. En grunn til dette kan

som nevnt tidligere, være at MWCO for dialysemembranen er beregnet for globulære proteiner og ikke utstrakte FG-peptider.

3.1.4. MALDI-TOF - Molekylvektbestemmelse av fiskegelatinpeptider

Molekylvektbestemmelsen av FG-peptider ble gjennomført ved hjelp av MALDI-TOF (i tillegg til SEC-MALLS). Metoden er beskrevet i kap. 2.5.3. Resultatet av analysen er vist i tabell 3.4, mens rådata er gitt på vedlagt cd og i vedlegg C.

Tabell 3.4: Molekylvekter gitt av MALDI-TOF analyse for fraksjonerte FG-peptidene nedbrutt i 2, 6, 18 og 24 timer.

Prøve	Basert på areal		Basert på intensitet	
	M _w [Da]	M _n [Da]	M _w [Da]	M _n [Da]
FG-2t-A	680.6	660.7	662.6	645.1
FG-2t-C	709.4	696.2	709.2	697.8
FG-6t-A	1103.6	974.15	929.65	840.15
FG-6t-C	629.1	616.65	618.75	607.7
FG-18t-A	1275.5	800.9	742.9	636.9
FG-18t-C	691.3	705.1	701.2	689.6
FG-24t-A	656.8	642.3	646.6	633.4
FG-24t-C	674.3	663.8	665.5	655.3

Tabell 3.4 viser små forskjeller mellom de fraksjonerte prøvene (A og C) innefor nedbrytningstiden 2 og 24 timer. For 6 og 18 timer derimot vises uventede resultater, der fraksjon A for begge tilfellene er detektert med høyere molekylvekt enn fraksjon C. Som beskrevet i kap. 2.4.2 og nevnt i kap. 3.1.3, forventes fraksjon A og C til å ha en molekylvekt

på henholdsvis < 2000 Da og > 3500 . Dette stemmer for alle A fraksjoner, men ikke for alle C fraksjonene, som vist i tabell 3.4.

Grunnen til at FG-6t-A og FG-18t-A gir større molekylvekt enn henholdsvis FG-6t-C og FG-18t-C kan skyldes lekkasje i dialysemembranen. Ved å sammenligne resultatene fra MALDI-TOF med resultatene fra SEC-MALLS virker det ulogisk at det ikke detekteres flere høymolekylære forbindelser i dette tilfellet. Det finnes begrensninger med MALDI-TOF som kan være grunnen til at det bare detekteres molekyler med forholdsvis lave molekylvekter. Små mengder med molekyler kan gi et signal som er så nær baselinjen at det er vanskelig å oppdage. Matriksen som er benyttet fungerer opp til $20\,000$ Da, og er derfor ikke en begrensning for målingene. Det ble derimot funnet ut at øvre grense for Mw ble satt til 4 kDa på grafen. Dette kan forklare hvorfor høymolekylære peptider ikke ble detektert i prøven.

3.1.5. Justert molekylvekt for fiskegelatinpeptider med hensyn på SEC-MALLS og MALDI-TOF

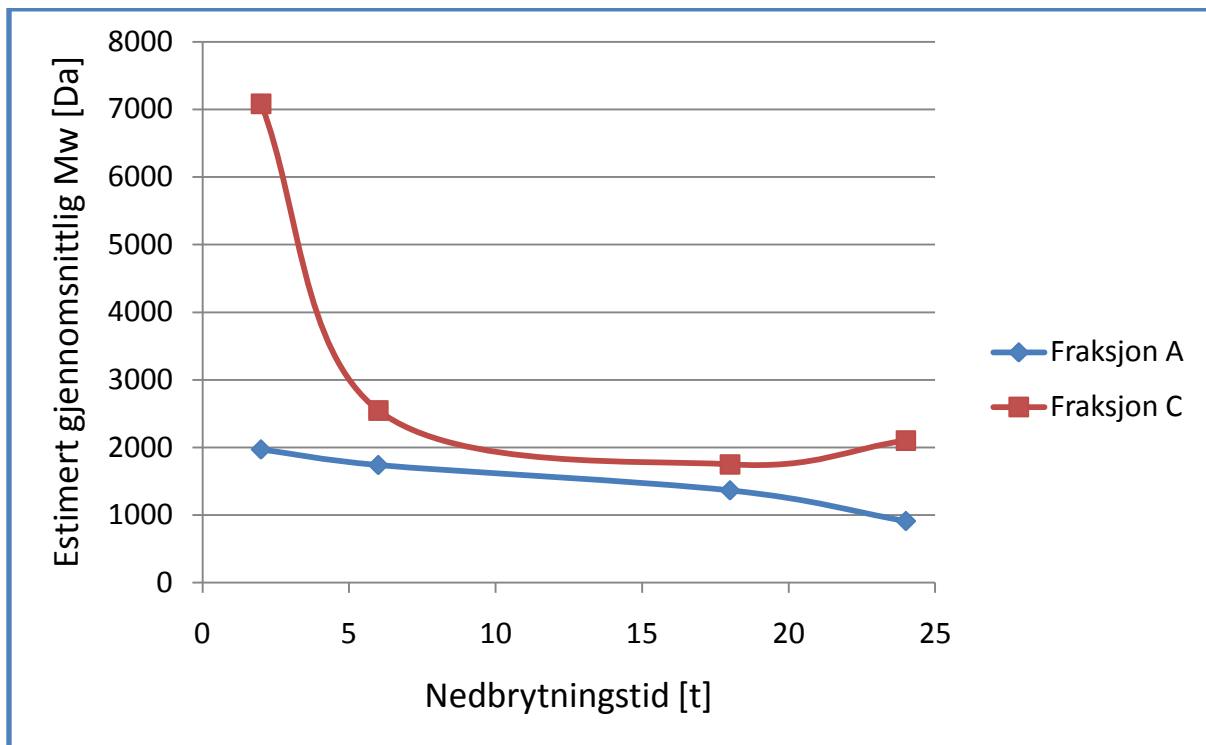
Siden SEC-MALLS og MALDI-TOF ga svært ulike molekylvekter for FG-peptidene, ble det estimert en gjennomsnittlig molekylvekt (\bar{M}_w) ved bruk av resultatene fra begge metodene. \bar{M}_w er basert på $M_{w_{høymol.}}$ og F_{peptid} fra SEC-MALLS og Mw basert på areal fra MALDI-TOF.

Tabell 3.5 viser estimert \bar{M}_w for alle FG-peptidene.

Tabell 3.5: Estimert \bar{M}_w for alle FG-peptidene. \bar{M}_w er beregnet fra resultatene av MALDI-TOF og SEC-MALLS analysene.

Prøver	\bar{M}_w [Da]
FG-2t-A	1959
FG-2t-C	7051
FG-6t-A	1725
FG-6t-C	2541
FG-18t-A	1359
FG-18t-C	1740
FG-24t-A	905
FG-24t-C	2098

Verdiene i tabell 3.5 er videre benyttet i figur 3.2 for å gi en bedre oversikt over \bar{M}_w som en funksjon av nedbrytningstid for de ulike FG-peptidene.



Figur 3.5: Estimert gjennomsnittlig molekylvekt (\bar{M}_w) som funksjon av nedbrytningstid for FG-peptider av fraksjon A og C. \bar{M}_w er estimert med hensyn på analyser utført med MALDI-TOF og SEC-MALLS.

Figur 3.5 viser som forventet at \bar{M}_w for fraksjon A er lavere enn for fraksjon C for samtlige nedbrytningstider. Fraksjon A og fraksjon C er henholdsvis < 2000 Da og ikke > 3500 Da for alle prøvene. Dette kan skyldes at MWCO beregnes for globulære proteiner, som beskrevet tidligere. Det er vist at \bar{M}_w synker med økende nedbrytningstid akkurat som i kap. 3.1.3.

3.1.6. Aminosyreanalyse av fiskegelatinpeptider

Det ble gjennomført en aminosyreanalyse av de fraksjonerte FG-peptidene FG-2t-A, FG-6t-A, FG-18t-A og FG-24t-A (kap. 2.4.2). Utgangstoffet til disse prøvene, kaldtvanns fiskegelatin F6, ble også analysert for å kunne sammenligne aminosyresammensetningen før og etter hydrolyse. Metoden er beskrevet i kap. 2.5.4. Resultatet av analysen er vist i tabell 3.6, mens rådata er gitt på vedlagt cd.

Tabell 3.6: Aminosyresammensetningen av utgangsstoffet (kaldtvanns fiskegelatin F6) og FG-peptidene FG-2t-A, FG-6t-A, FG-18t-A og FG-24t-A. Verdiene er uttrykt som g aminosyre/ 100 g prøve.

Aminosyrer	Kaldtvanns fiskegelatin F6	FG-2t-A	FG-6t-A	FG-18t-A	FG-24t-A
Cystein	0.03	0.08	0.087	0.067	0.058
Methionin	2.28	1.55	1.431	1.437	1.486
Asparaginsyre	7.10	8.61	10.112	11.374	9.372
Threonin	2.89	2.60	2.632	2.536	2.588
Serin	7.27	6.79	6.843	6.869	6.855
Glutaminsyre	11.40	9.26	9.09	8.969	9.514
Prolin	11.54	10.32	10.16	10.014	10.371
Glysin	17.87	23.17	21.722	21.998	22.705
Alanin	9.30	9.16	9.220	9.143	9.139
Valin	2.26	2.16	2.263	2.125	2.160
Isoleucin	1.51	1.29	1.294	1.150	1.209
Leucin	2.67	2.34	2.436	2.195	2.244
Tyrosin	0.42	0.16	0.302	0.288	0.309
Fenylalanin	2.09	1.77	1.785	1.638	1.705
Histidin	1.37	1.36	1.278	1.265	1.271
Lysin	4.34	4.51	4.691	4.626	4.494
Arginin	9.63	9.37	9.289	9.068	9.171
Hydroxyprolin	5.14	4.73	4.550	4.433	4.549
Hydroxylysin	0.90	0.77	0.814	0.805	0.799

Tabell 3.6 viser at samtlige prøver, som forventet, inneholder mest glysin (se kap. 1.5). Det er lite variasjoner i aminosyresammensetningene mellom de fraksjonerte FG-peptidene og utgangsstoffet. Det som kan trekkes ut av tabellen, er en nedgang i prosentinnholdet av samtlige aminosyrer unntatt asparaginsyre, glysin og lysin fra utgangsstoffet til FG-peptidene. Det er vanskelig å komme med en grunn for dette uten å vite mer om rekkefølgen av aminosyrene. Dette kunne vært undersøkt nærmere med hjelp av proteomics.

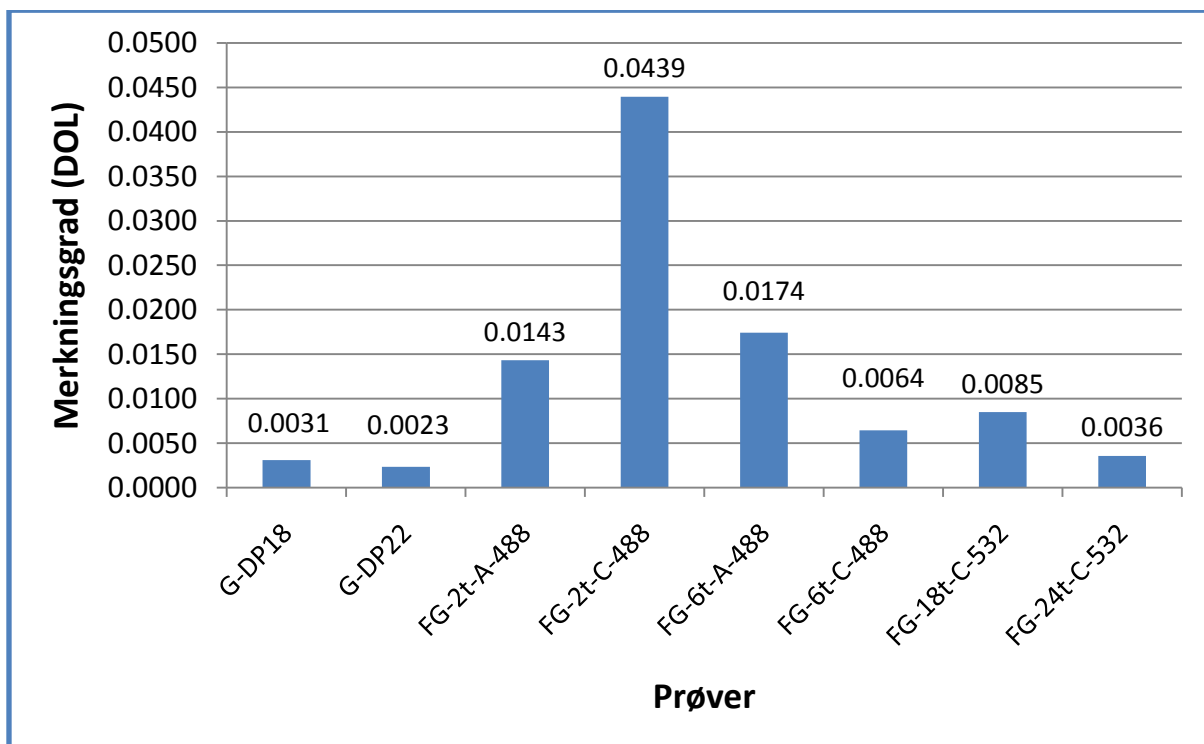
Som presentert i kap. 1.5.3 har fiskegelatin et lavere innhold av aminosyrene prolin og hydroxyprolin enn mammalsk gelatin. Det er funnet at innholdet av disse to aminosyrene ligger på ca. 17 % av totalinnholdet av aminosyrer, for kaldtvanns fiskegelatin (Karim et al., 2009). Dette stemmer godt med resultatene i tabell 3.6, der innholdet av prolin og hydroxyprolin er funnet til 16.7 % av totalinnholdet av aminosyrer, for kaldtvanns fiskegelatin F6, mens FG-peptidene gjennomsnittlig består av 14.8 % hydroxyprolin og prolin.

Det er detektert små variasjoner mellom de ulike FG-peptidene i aminosyresammensetning. Det hadde vært interessant å kontrollere aminosyresammensetningen i peptidfraksjon C, for å se om det er variasjoner i sammensetning av fraksjon A og C. Det vil forventes at peptidfraksjon A og C har variasjoner i aminosyresammensetningen på grunnlag av ulike fremstillingsmetoder.

3.1.7. Merkningsgrad og gjennomsnittlig molekylvekt for G-blokk og fiskegelatinpeptider med konjugert alexa

Merkningsgraden for de fluorescensmerkede peptidene og G-blokkene ble beregnet etter metoden beskrevet i kap. 2.5.5. Rådata er gitt på vedlagt cd og i vedlegg D.

Figur 3.6 viser merkningsgraden for de ulike prøvene. Merkningsgraden for FG-18t-A-532 og FG-24t-A-532 ble ikke bestemt. Dette skyldes utilstrekkelig mengde med prøve for å gjennomføre målingene (kap. 3.1.1). Merkningsgraden angir mol alexa pr. mol kjede.



Figur 3.6: Merkningsgraden til de fluorescensmerkede peptidene og G-blokkene. Merkningsgraden ble bestemt for G-DP18, G-DP22, FG-2t-A-488, FG-2t-C-488, FG-6t-A-488, FG-6t-C-488, FG-18t-C-532 og FG-24t-C-532. Tallene for hver kurve viser nøyaktig beregnet merkningsgrad.

Figur 3.6 viser at merkningsgraden skiller seg mest ut for FG-2t-C-488. Dette vil ha innvirkning på den detekterte fluorescensintensiteten i hudpenetrasjonsforsøkene (se kap. 3.2). Et godt merket molekyl vil gi høyere fluorescensintensitet, enn et molekyl som er dårligere merket. På samme måte vil en prøve med mange fluorescensmerkede molekyler, gi en høyere fluorescensintensitet. Den høye merkningsgraden til FG-2t-C-488 kan skyldes fritt alexa i prøven. Dette vil i så fall gi molekyler med lav molekylvekt som lettere vil kunne penetrere huden. Dette vil kunne gi høy fluorescensintensitet i vevet på KLSM bilder. Det er vanskelig å vite om det er ca. 5 % av FG-peptidene som er merket i FG-2t-C-488, eller om det er fritt alexa tilstede. Dette kunne blitt detektert ved hjelp av en MALDI-TOF analyse av FG-2t-C-488 i stedet for umerket FG-2t-C.

G-blokk prøvene og FG-24t-C-532 ser ut til å være dårligst merket. Disse har bare mellom 0.002 og 0.003 mol alexa molekyler bundet pr. mol kjede. Altså er det bare mellom 0.2 og 0.3 % av kjedene som inneholder alexa. Dette betyr at svært mange molekyler kan penetrere huden uten at de kan detekteres ved hjelp av KLSM bilder.

Alexa 488/532 SE binder seg til primære aminer som nevnt i kap. 1.6. De primære aminene for FG-peptidene finnes på aminosyrene asparagin, glutamin, arginin, lysin og hydroksylisin, i tillegg til den N-terminal enden av peptidet. Dette betyr at merkningsgraden for de peptidene som inneholder flere av de nevnte aminosyrene, antas til å være høyere enn for prøver med få primære aminer. Det ble detektert liten forskjell i aminosyresammensetningen for peptidfraksjon A (se kap. 3.1.6), derfor kan ikke merkningsgraden begrunnes ut fra innholdet av aminosyrer med primære aminogrupeer.

En lav reaktivitet mellom det primære aminet og alexa kan også være en årsak til lav merkningsgrad. For alexa 488/532 SE er det funnet svært lav reaktivitet med aminosyrene tyrosin og histidin (Invitrogen, 2011). Disse aminosyrene ble det funnet lite av i samtlige av A peptidfraksjonene, og det er derfor logisk å anta at alexa ikke er bundet til disse aminosyrene. Prolin inneholder ingen primære aminogrupeer, og kan derfor ikke binde alexa 488/532 SE.

Merkningsgraden til prøvene ble tatt hensyn til, når en ny gjennomsnittlig molekylvekt ble bestemt. \bar{M}_w for FG-peptidene ble bestemt ut fra verdiene i tabell 3.5 i kap. 3.1.5 i tillegg til

molekylvekten til de konjugerte alexa molekylene (merkningsgrad * Mw_{alexa}). \bar{M}_n for G-blokkene ble bestemt ut ifra $^1\text{H-NMR}$ verdiene i kap. 3.1.2 og molekylvekten til de konjugerte alexa molekylene (merkningsgrad * Mw_{alexa}). Molekylvekten til alexa molekylene er gitt i kap. 2.1.

Tabell 3.7 viser gjennomsnittlig molekylvekt for alle G-blokkene og FG-peptidene med konjugert alexa som ble benyttet i hudpenetrasjonsforsøkene (kap. 3.2). For FG-18t-A-532 og FG-24t-A-532, som det ikke ble funnet en merkningsgrad for, ble gjennomsnittet av merkningsgradene til FG-18t-C-532 og FG-24t-C-532 benyttet for å regne gjennomsnittlig molekylvekt. Videre i oppgaven vil en henvisning til de gjennomsnittlige molekylvektene til prøvene være verdiene i tabell 3.7.

Tabell 3.7: Gjennomsnittlig molekylvekt for G-blokkene og FG-peptidene med konjugert alexa. Denne gjennomsnittlige molekylvekten ble benyttet videre i forsøket. \bar{M}_w er for FG-peptidene, mens \bar{M}_n er for G-blokkene.

Prøver	\bar{M}_w eller \bar{M}_n [Da]
G-DP18	3566
G-DP22	4358
FG-2t-A-488	1971
FG-2t-C-488	7082
FG-6t-A-488	1740
FG-6t-C-488	2546
FG-18t-A-532	1366
FG-18t-C-532	1749
FG-24t-A-532	911
FG-24t-C-532	2101

3.2. Diffusjon/penetrasjon av G-blokk og fiskegelatinpeptider i hud

Resultatene fra hudforsøkene er gitt i dette kapitlet. Det er presentert KLSM bilder med medfølgende beskrivende diagrammer og kurver. Det er tatt både KLSM bilder og bilder med gjennomlysning for å gi en bedre oversikt over hvordan vevet ser ut (innstillinger er gitt i kap. 2.7.2). For noen gjennomføringer er det også tatt doble bilder med begge innstillingene samtidig.

Det ble tatt tre-fire KLSM bilder for hver hudbiopsi, der kun et av disse ble studert videre. Bildet ble valgt ut ved å se på resterende bilder fra samme donor og andre donorer. Utvelgelsen av KLSM bilde som skal presentere forsøket er en av svakhetene med metoden. Andre svakheter med metoden er videre diskutert i kap. 3.2.7.

Det er kun valgt å presentere omtrent et bilde pr. prøve, for å unngå for mye informasjon i denne delen av rapporten. Alle bilder og rådata er gitt på vedlagt cd.

Gjennomsnittlig fluorescensintensitetsverdi (I_{vev}) ble funnet direkte som beskrevet i kap. 2.7.2. Denne verdien ble justert med hensyn på autofluorescens ($I_{\text{vev}} - I_{\text{autofluorescens}}$) for å gi et best mulig bilde av penetrasjonen.

Standardavviket (σ) for den gjennomsnittlige fluorescensintensiteten er svært høy for samtlige forsøk. Dette er forventet, da standardavviket regnes ut fra intensitetsverdien til alle pikslene i bildet. Intensitetsverdien varierer mellom 0-255 og gir derfor stor mulighet for at verdiene avviker fra gjennomsnittet, noe som gir et høyt standardavvik.

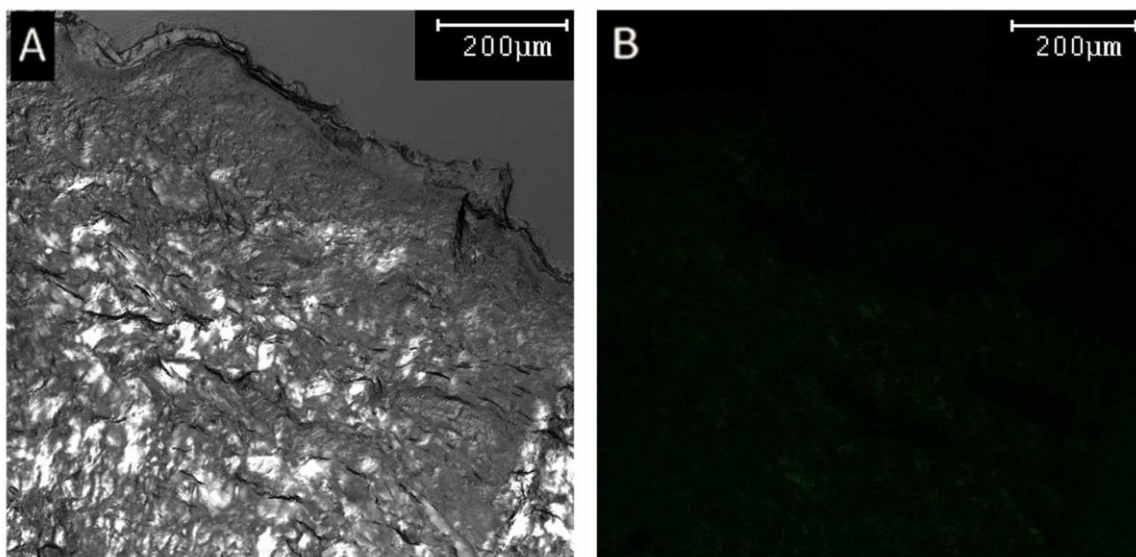
Omtrent samtlige bilder der prøvene penetrerer SC og diffunderer inn i dermis, viser et fenomen med et mørkt felt etter epidermis. Dette sees tydelig fra intensitetsfordelingen gjennom vevet og ofte også fra de tredimensjonale diagrammene. Det er tydelig hvordan intensiteten starter på et høyt nivå, deretter blir den lavere, for så å stige opp til et tilsvarende høyt nivå. En slik tendens kan skyldes strukturen av dermis (se kap. 1.2). Den mer kompakte papillære dermis vil antageligvis ha mindre plass til de fluorescensmerkede prøvene enn den mer løst sammenvevde retikulær dermis. Dermed vil det bli mindre detektert fluorescensintensitet i papillær dermis enn i resterende del av dermis.

For mange av KLSM bildene kan det sees hull eller bretter i vevet. Dette skyldes antageligvis nedfrysningen i flytende nitrogen eller snittingen av hudbitene. Dette har ingen innvirkning på selve penetrasjonen, men vil gi kunstig høy eller lav fluorescensintensitet i bildet. En nøyere undersøkelse av gjennomlysningsbildet gir muligheten til å se kvaliteten på snittet.

For alle tredimensjonale intensitetsfordelingsdiagrammer gjenspeiler blå-, grønn-, gul- og rødfarge henholdsvis intensitetsverdiene 0 - 50, 50 – 100, 100 – 150 og 150 – 255.

3.2.1. Kontrollprøver

En hudbit fra hver donor påført 99 % DMSO. Denne prøven ble benyttet som kontroll, for å detektere autofluorescens i vevet. Figur 3.7 viser bilder tatt av kontrollprøven med mest detektert autofluorescens. Resten av bildene er gitt på vedlagt cd.



Figur 3.7: KLSM bilder av hud fra donor A med påført 99 % DMSO. A) Gjennomlysningsbildet viser strukturen i vevet. B) Fluorescensintensiteten i KLSM-bildet er autofluorescens.

Figur 3.7 viser at det ble detektert noe autofluorescens i vevet. Tabell 3.8 - 3.9 viser gjennomsnittlig fluorescensintensitet detektert på all donorhud etter påført 99 % DMSO. KLSM bildene som er undersøkt i tabell 3.8 og 3.9 er henholdsvis kontrollert med innstillinger for alexa 488 og alexa 532 (se figur 2.9 i kap. 2.7.2).

Tabell 3.8: Detektert autofluorescens og standardavvik (σ) i vevet til ulike donorer ved påføring av 99 % DMSO. Fluorescensintensiteten er funnet fra KLSM bilder tatt med innstillinger for alexa 488.

Donor	Gjennomsnittlig fluorescensintensitet	σ
A	6.54	4.55
B	3.65	2.44
C	1.89	1.47
D	1.24	1.77
E	3.10	2.01
F	1.94	1.20
G	1.60	1.50
H	2.59	2.46
Gjennomsnitt	2.82	2.18

Tabell 3.9: Detektert autofluorescens og standardavvik (σ) i vevet til ulike donorer ved påføring av 99 % DMSO. Fluorescensintensiteten er funnet fra KLSM bilder tatt med innstillinger for alexa 532.

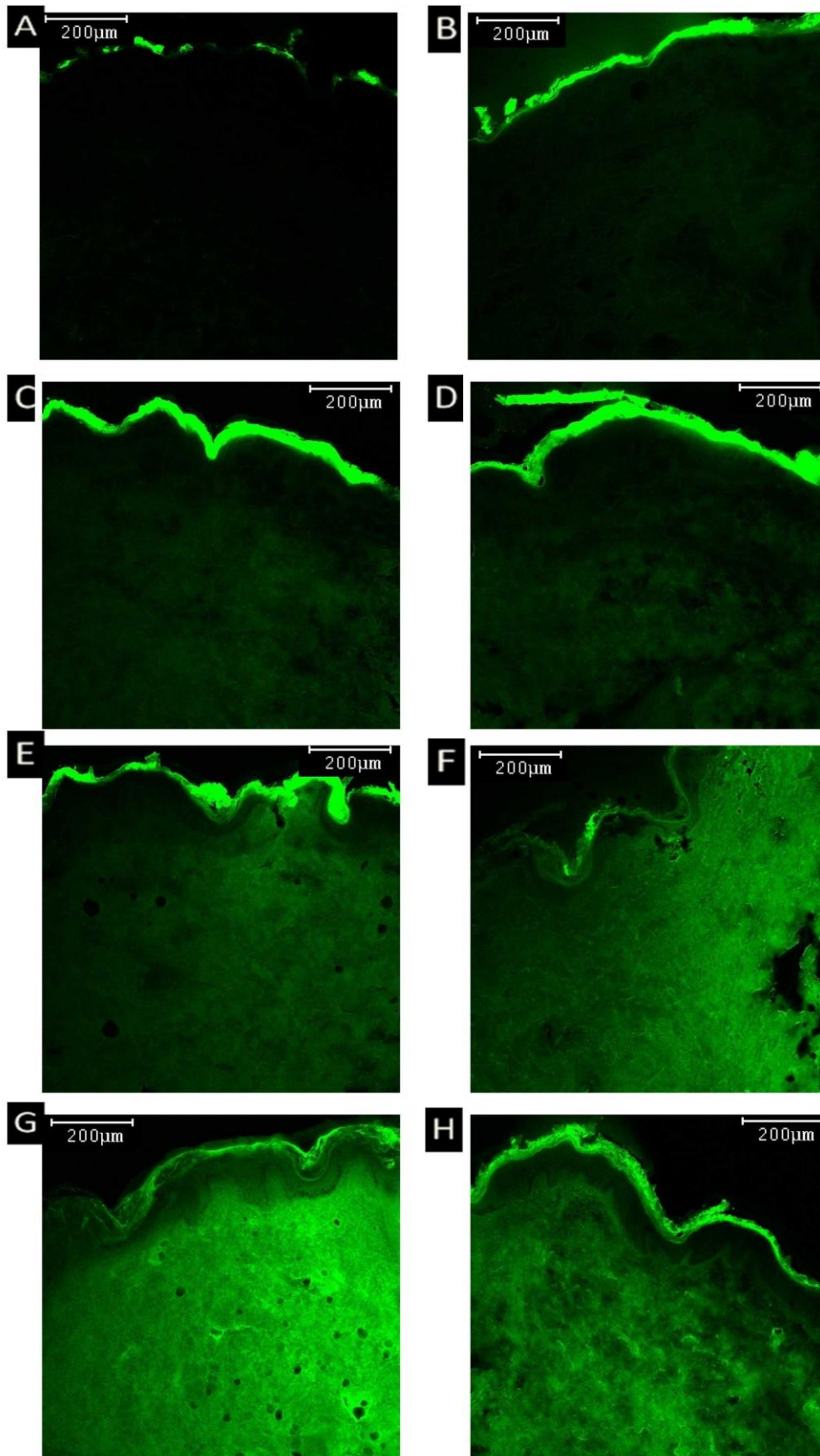
Donor	Gjennomsnittlig fluorescensintensitet	σ
D	0.35	0.62
E	0.37	0.66
G	0.47	0.78
Gjennomsnitt	0.40	0.69

Tabell 3.8 viser at det detekteres autofluorescensintensitet på gjennomsnittlig 2.82 ± 2.18 for KLSM bilder tatt med innstillinger for alexa 488. For KLSM bilder tatt med innstillinger for alexa 532, derimot, detekteres en lavere autofluorescensintensitet på gjennomsnittlig 0.40 ± 0.69 (tabell 3.9). Dette indikerer at autofluorescensen i huden detekteres nærmere en bølgelengde på 488 nm enn en på 532 nm.

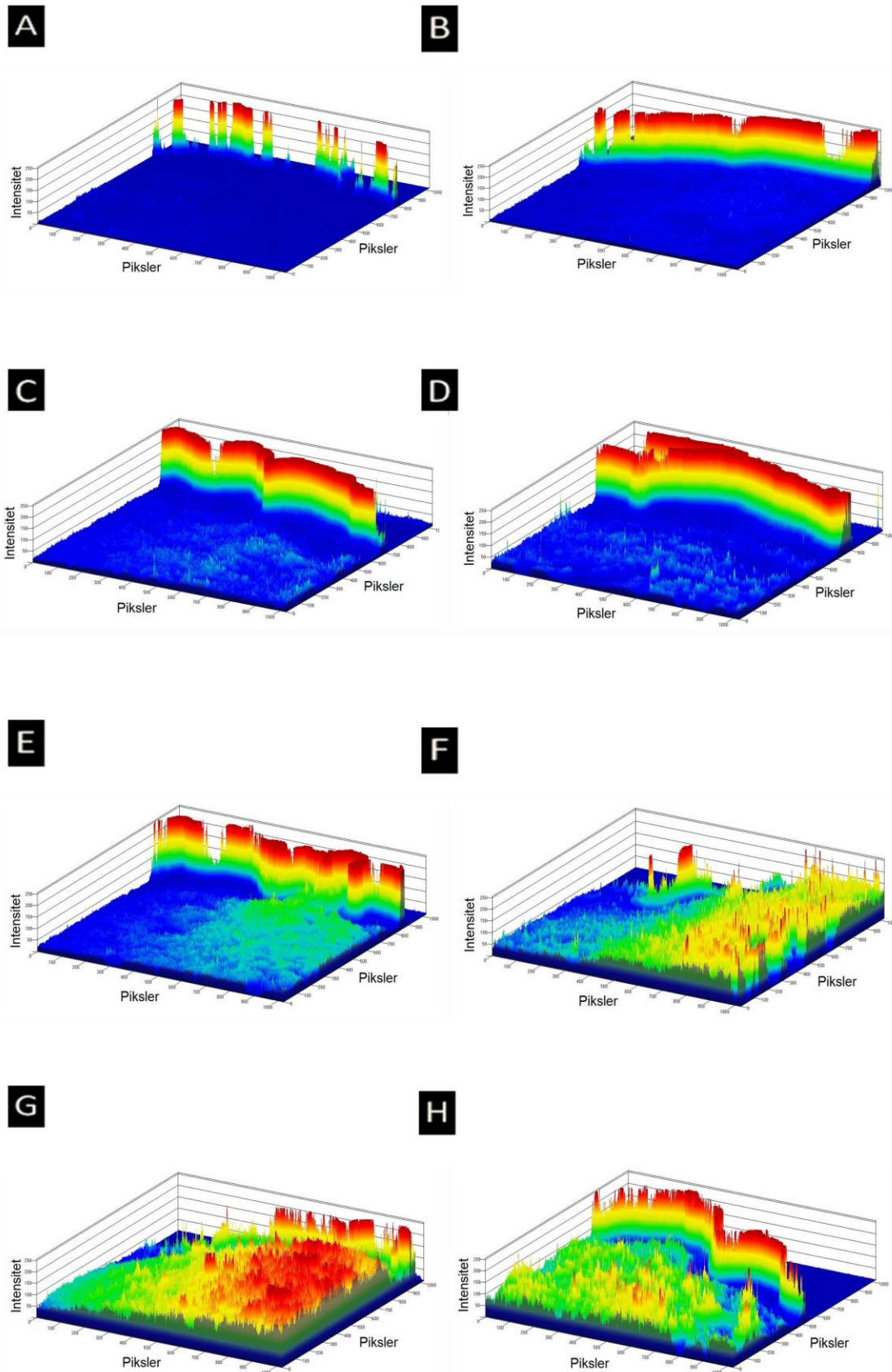
For å eliminere bidraget av autofluorescens i gjennomsnittsverdien for fluorescensintensitet ble likning 2.2 benyttet (se kap. 2.7.2). $I_{\text{autofluorescens},488}$ og $I_{\text{autofluorescens},532}$ ble henholdsvis detektert til 5.0 og 1.1 ($I_{\text{autofluorescens},\text{kontrollprøve}} + \sigma$).

3.2.2. Tidsstudie for penetrasjon av fiskegelatinpeptider

Et tidsstudie ble gjennomført for å finne ut hvor lang tid det tar før fluorescensmerkede FG-peptider penetrerer SC og diffunderer ned i dermis. Mikronåler ble benyttet før FG-2t-C-488 med gjennomsnittlig molekylvekt 7082 Da, ble påført huden. Figur 3.8 og 3.9 viser henholdsvis KLSM bilder og tredimensjonale intensitetskurver for resultatene. Forsøket ble gjennomført på hud fra donor F.

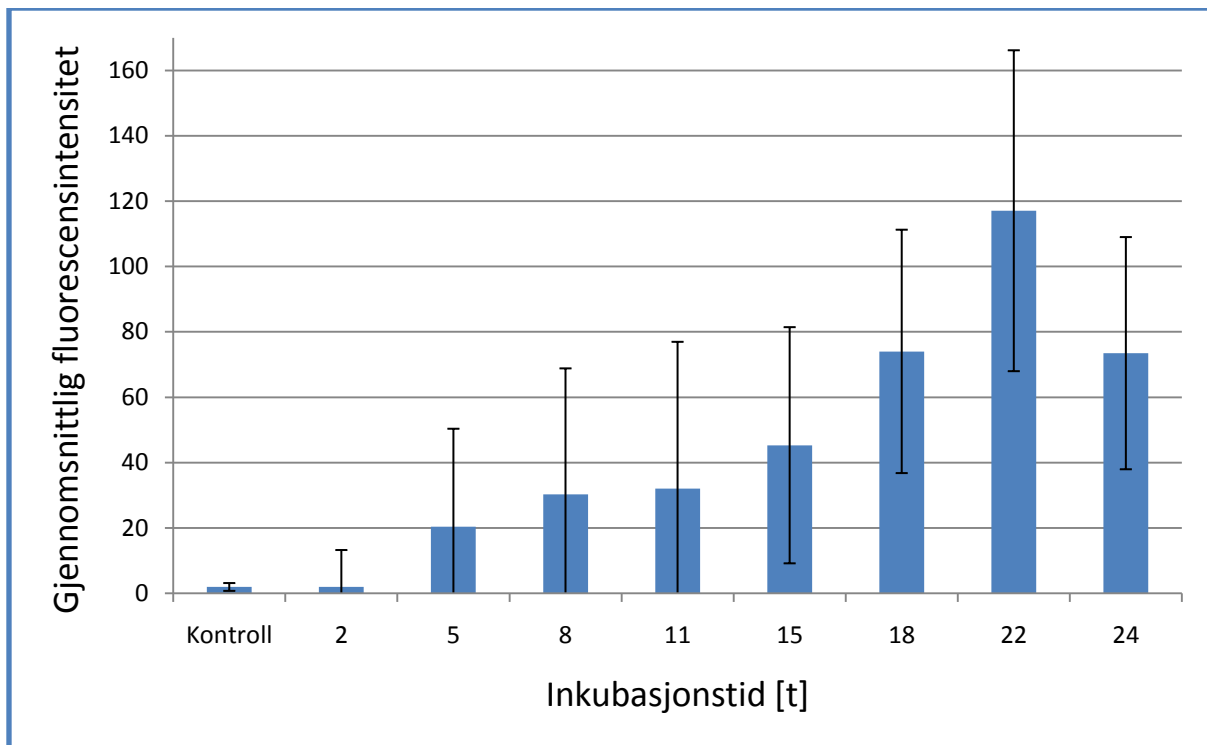


Figur 3.8: KLSM bilder som illustrerer diffusjon av FG-2t-C-488 ($\bar{M}_w = 7082$ Da) i vevet til forbehandlet hud fra donor F, som er innkubert i A) 2 timer, B) 5 timer, C) 8 timer, D) 11 timer, E) 15 timer, F) 18 timer, G) 22 timer og H) 24 timer.



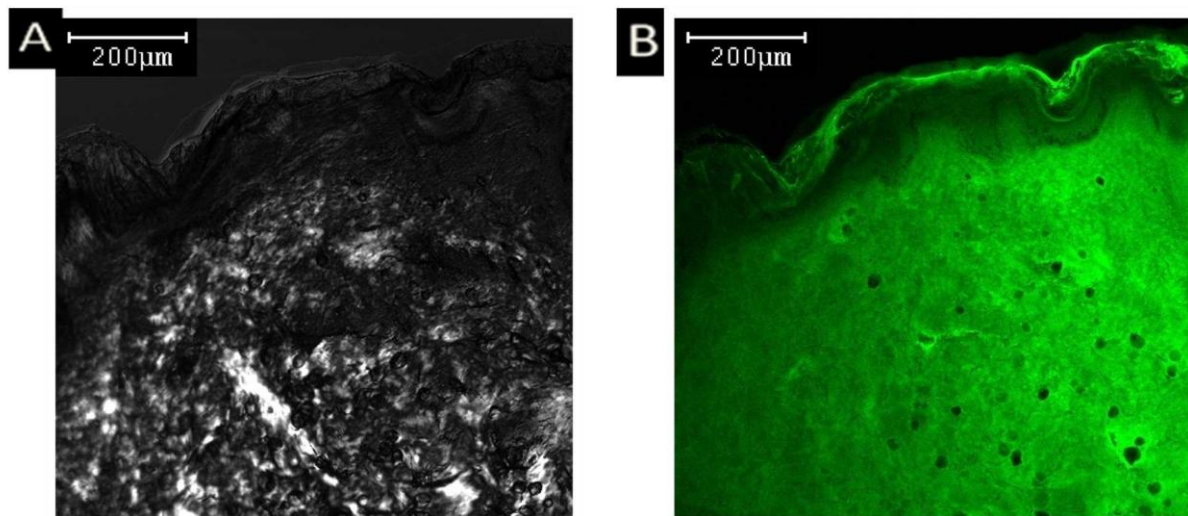
Figur 3.9: Tredimensjonale intensitetsfordelings diagrammer som illustrerer diffusjon av FG-2t-C-488. ($\bar{M}_w = 7082$ Da) i forbehandlet hud fra donor F, som er innkubert i A) 2 timer, B) 5 timer, C) 8 timer, D) 11 timer, E) 15 timer, F) 18 timer, G) 22 timer og H) 24 timer.

Figur 3.10 viser gjennomsnittlig fluorescensintensitet for KLSM bildene i figur 3.8.



Figur 3.10: Gjennomsnittlig fluorescensintensitet og standardavvik for KLSM bildene tatt ved ulike inkubasjonstid (2-24 timer) for påføring av FG-2t-C-488 på forbehandlet hud fra donor F. Kontrollprøven er inkubert i 24 timer.

Ut fra figur 3.8-3.10 ser det ut som fluorescensintensiteten i vevet øker jevnt med økende inkubasjonstid. Det sees litt fluorescensintensitet allerede etter 8 timer (figur 3.8.C og 3.9.C). Ut fra figur 3.10 ser det ut som om gjennomsnittlig fluorescensintensitet etter 11 timer er omtrent lik som for 8 timer. Dette sees også i figur 3.8.D og 3.9.D. Fra figur 3.8.E og 3.9.E ser det ut som en betydelig mengde fluorescensmerket FG-peptider penetrerer SC og diffunderer ned i dermis, først etter 15 timer. Etter 18 timer inkubasjonstid (figur 3.8.F og 3.9.F) er fluorescensintensiteten i vevet enda høyere. Dette sees også godt ut fra figur 3.10. 22 timer inkubasjonstid gir den høyeste gjennomsnittlige fluorescensintensiteten. Ut fra gjennomlysningsbildet for dette snittet, kan det se ut som om det er en brett i vevet. Figur 3.11 viser gjennomlysnings- og KLSM bilde for hudpenstrasjonen etter 22 timer inkubasjonstid.



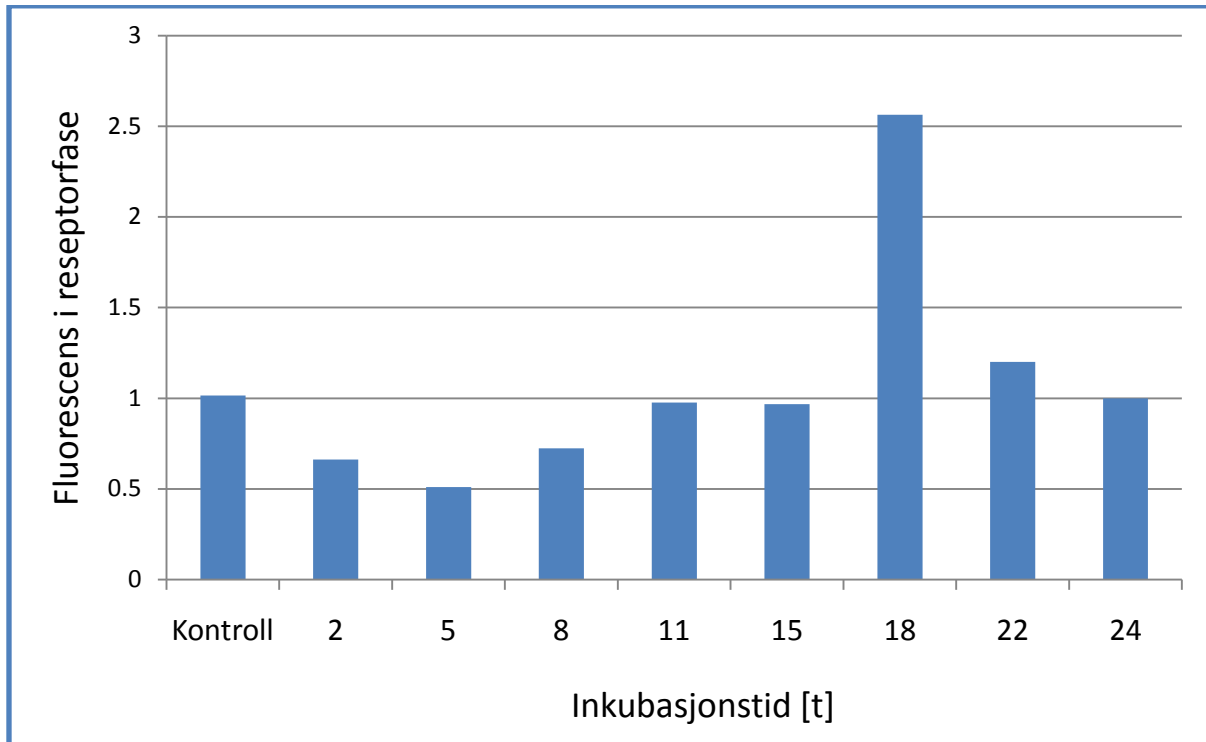
Figur 3.11: A) Gjennomlysningsbildet som viser vevets utseende. B) KLSM bilde som illustrerer penetrasjonen av FG-2t-C-488 ($\bar{M}_w = 7082$ Da) i forbehandlet hud som er inkubert i 22 timer.

Brettene i figur 3.11.A kan komme fra nedfrysningen av biopsiene i flytende nitrogen eller fra snittingen. Det betyr at bretten ikke har noen innvirkning på selve hudpenetrasjonen. Fluorescensintensiteten, derimot, kan påvirkes av et snitt som ligger dobbelt. Den brettede delen vil da få en høyere intensitetsverdi enn hva som er tilfellet for dette området.

Den høye fluorescensintensiteten for 22 timer inkubasjonstid kan også skyldes forsøkens uavhengighet. Altså kan det være påsatt mer fluorescensmerket FG-peptid for 22 inkubasjonstid enn for resterende inkubasjonstider.

Hvis det antas at forsøket med 22 timers inkubasjonstid har et kunstig høyt intensitetsnivå, vil det kunne sies at vevet når like høy fluorescensintensitet etter 18 timer, som etter 24 timer. Dermed kunne antageligvis hudpenetrasjonsforsøkene blitt gjort med en inkubasjonstid på 18 timer. Siden tidsstudie kun ble gjennomført en gang, og for bare en FG-peptid, ble allikevel inkubasjonstiden holdt til 24 timer i resterende forsøk. Flere tidsstudier vil kunne gi en bedre besvarelse på hvor lang tid penetrasjonen/diffusjonen faktisk tar. Dette vil kunne føre til tidsbesparelser i fremtiden.

Figur 3.12 viser målt fluorescens i reseptorfasen for de ulike inkubasjonstidene.



Figur 3.12: Målt fluorescens i reseptorfase for inkubasjonstid (2-24 timer) for penetrasjon av FG-2t-C-488 i forbehandlet hud fra donor F.

Det er vanskelig å trekke noen konklusjoner ut fra den målte fluorescensen i reseptorfase som vist i figur 3.12. Det er bare inkubasjonstiden på 18 timer som viser en forhøyet fluorescens sammenlignet med kontrollprøven. Dette kan da bety at noe fluorescensmerket FG-peptid har penetrert huden og diffundert ned i vevet og videre inn i reseptorfase. Hudbiten for denne Franz-cellen kan ha vært ekstra tynn eller så har den blitt påført ekstra mange runder med mikronåler. Eventuelt kan noe fluorescensmerket FG-peptid være sølt ned i reseptorfase, og dermed gi et kunstig høyt fluorescensnivå. Det kan også ha vært ulike væsknivå i reseptorkammerene. Det er vanskelig å si noe helt sikkert om den detekterte fluorescensen i reseptorfase, da det er usikkert om det har vært kontakt mellom huden og reseptorfase for samtlige forsøk. En slik kontakt er avgjørende for diffusjon av prøven fra vevet og til reseptorfase. Den detekterte fluorescensen i kontrollprøven og resterende prøver, kan skyldes hudbiter som faller ned i reseptorfase og gir autofluorescens.

Det er mange faktorer som spiller inn på hudpenetrasjonsforsøkene når de gjelder bestemmelse av fluorescensintensitet for snittene og fluorescens i reseptorfasen. Dette er nærmere diskutert i kap. 3.2.7.

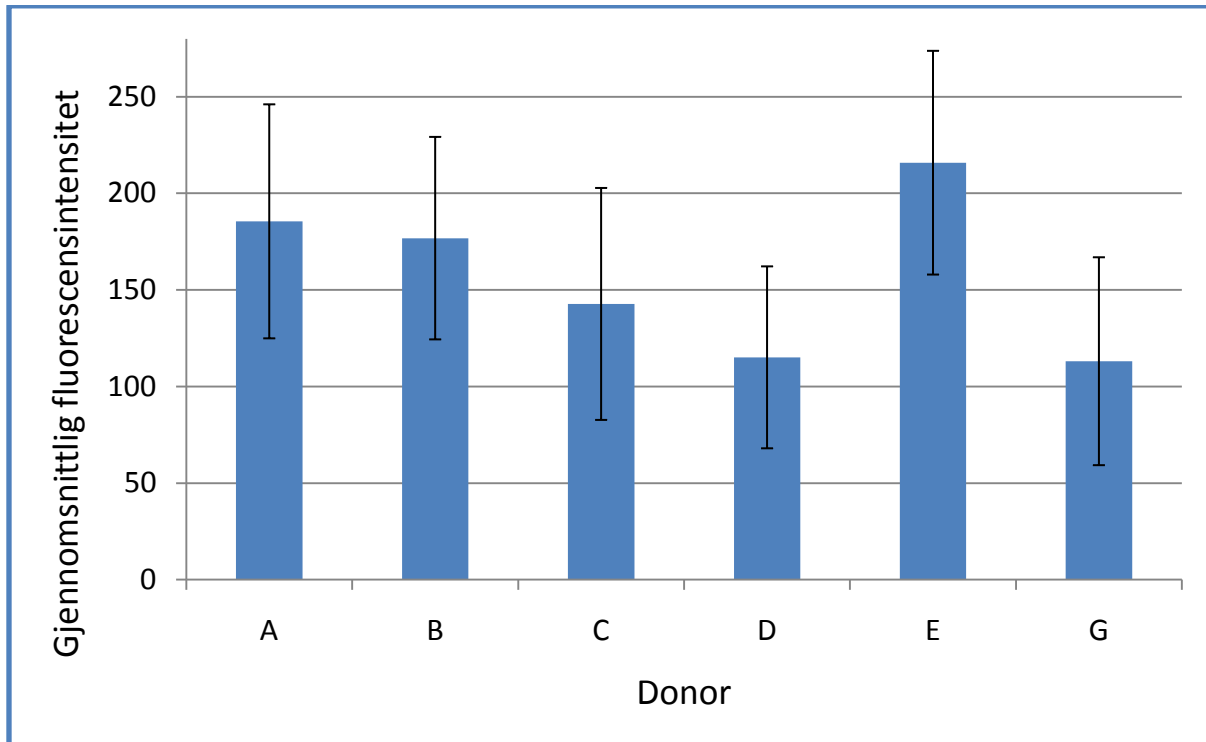
Det er tidligere vist at fluorescensmerkede peptider ($M_w = 1000$ Da) begynte å penetrere forbehandlet hud etter en inkubasjonstid på 9 timer (Aspevik, 2010). Penetrasjon av aminosyren taurin ($M_w = 125,48$ Da) i hud fra bryst, er vist til å penetrere signifikant etter en inkubasjonstid på kun 1 time (Da Silva et al., 2008). Begge disse tilfellene viser penetrasjon av små molekyler. FG-2t-C er bestemt til å ha en molekylvekt på 709 Da ut fra MALDI-TOF (kap. 3.1.4). Ved hjelp av SEC-MALLS (kap. 3.1.3) ble derimot 75 % av injisert masse bestemt til å ha en molekylvekt på 9120 Da. Polydispersiteten til FG-2t-C-488 kan forklare hvorfor FG-peptider med $\bar{M}_w = 7082$ Da kan diffundere ned i dermis.

3.2.3 Alexa

Det ble gjennomført hudpenetrasjonsforsøk der kun alexa 488 SE eller alexa 532 SE ble påført huden. Informasjon om fluorokromene er gitt i kap. 2.1.

Alexa 488 SE

Figur 3.13 viser gjennomsnittlig fluorescensintensitet for hudpenetrasjonsforsøk utført med alexa 488 SE på forbehandlet hud fra donor A, B, C, D, E og G.

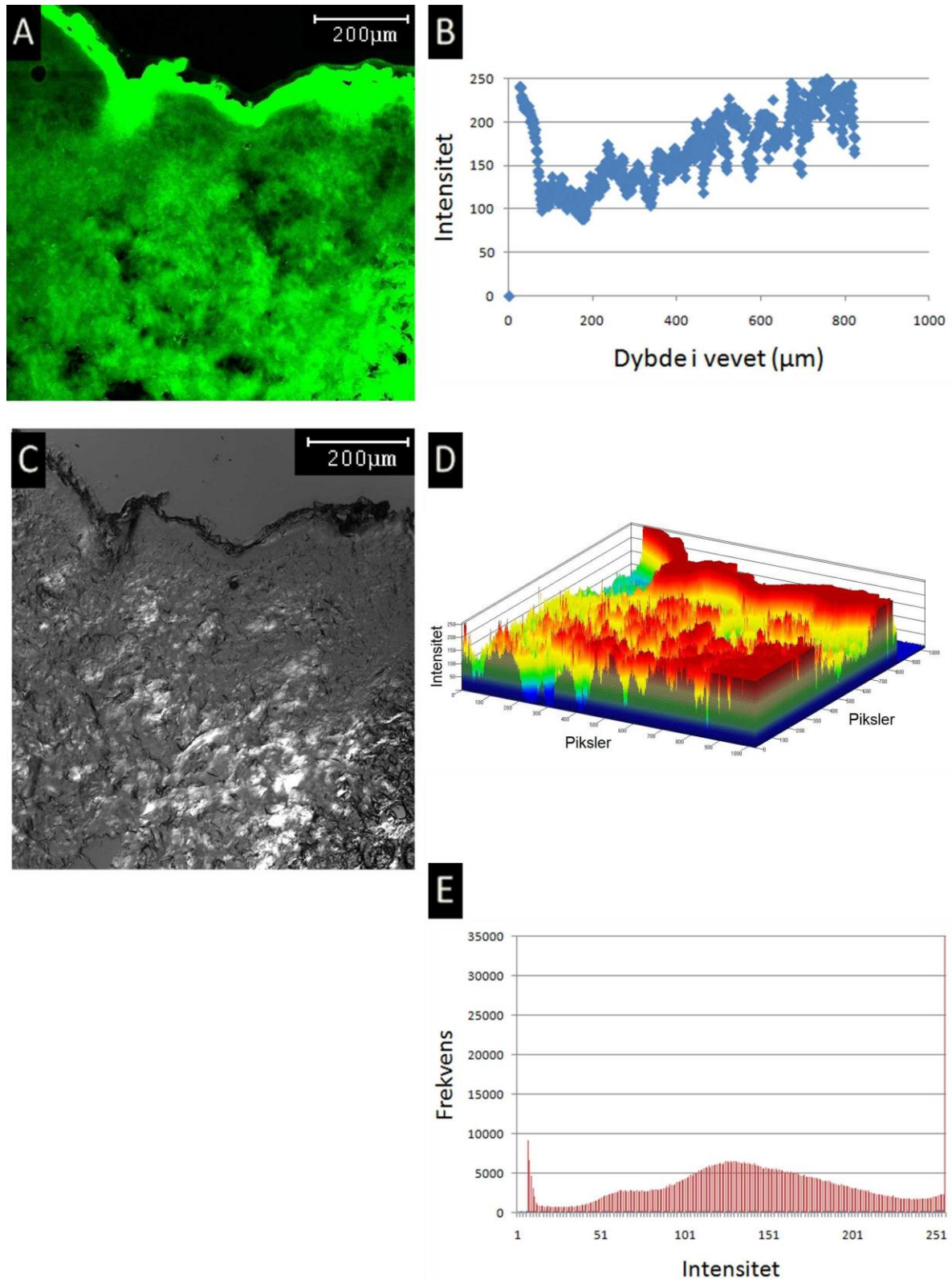


Figur 3.13: Gjennomsnittlig fluorescensintensitet for hudpenetrasjonsforsøk utført med alexa 488 SE på forbehandlet hud fra donor A, B, C, D, E og G.

Figur 3.13 viser at forsøk på samtlige donorer gir en fluorescensintensitet > 100 . Variasjonene i de observerte intensitetsverdiene kan skyldes svakheter med metoden som er beskrevet i kap. 3.2.7.

Gjennomsnittlig $I_{\text{Alexa 488 SE}}$ bestemmes til 158 ± 55 . En sammenligning med kontrollprøven, som ga en fluorescensintensitet på 2.82 ± 2.18 , bekrefter at alexa 488 SE penetrerer SC og diffunderer ned i dermis.

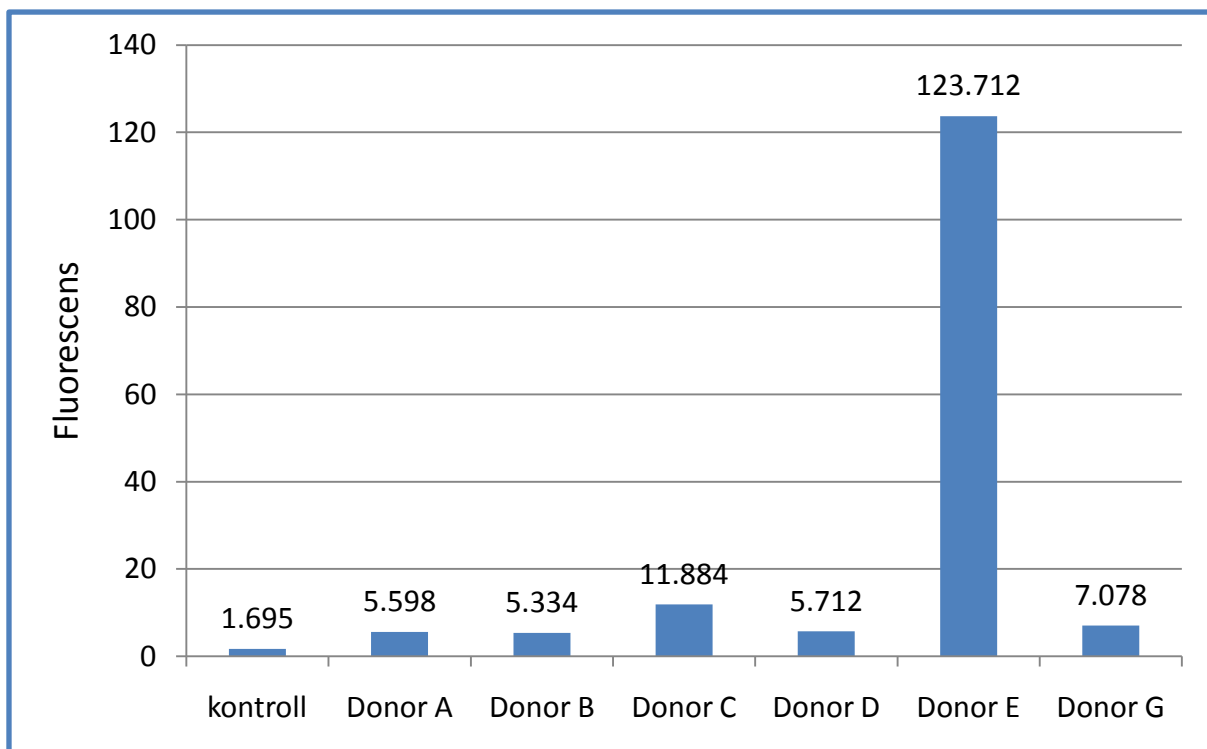
Siden resultatene fra donor C ligger i nærheten av $I_{\text{Alexa 488 SE}}$, sees det nærmere på dette systemet. Figur 3.14 viser KLSM bilder, intensitetsfordelingen inn i vevet, tredimensjonal fremstilling av intensiteten i bildet og frekvensen av de ulike intensitetsverdiene for penetrasjon av alexa 488 SE for donor C. Resultater for resterende donorer er gitt på vedlagt cd.



Figur 3.14: Resultater for penetrasjon av alexa 488 SE i hud fra donor C. Alle resultater er funnet fra KLSM bildet vist i A. A) KLSM bildet viser fluorescensen i vevet. B) Intensiteten som funksjon av dybde i vevet. C) Gjennomlysningsbildet viser strukturen i vevet. D) Tredimensjonal kurve som viser intensitetsfordelingen i bildet. E) Frekvensen av de ulike intensitetsverdiene (0-255).

Figur 3.14.A viser at det er mye fluorescens i hele bildet, akkurat som figur 3.13 antydte. SC vises som en ekstra klar grønn strek øverst i bildet. Dette kan skyldes overflødig farge som har ligget på hudoverflaten ved utstansing av biopsi, nedfrysning og snitting. Dette er også et tegn på hvor penetrasjonsbarrieren i huden ligger, som beskrevet i kap. 1.2. Figur 3.14.B viser hvordan intensiteten varierer som funksjon av dybden i vevet. Det er tydelig hvordan intensiteten starter på et høyt nivå, deretter blir den lavere, for så å stige opp til et tilsvarende høyt nivå. Det samme sees ut fra figur 3.14.D. Dette fenomenet er beskrevet i starten av kap. 3.2, og skyldes strukturen til dermis. Figur 3.14.C viser at det kan være antydning til noen bretter i vevet. Dette kan gi et kunstig høyt intensitetsnivå i området. 3.14.E viser at de fleste pikslene i bildet ligger på et intensitetsnivå på mellom 100 og 175.

Figur 3.15 viser detektert fluorescens i reseptorfasen for hudpenetrasjonsforsøk gjennomført med alexa 488 SE.



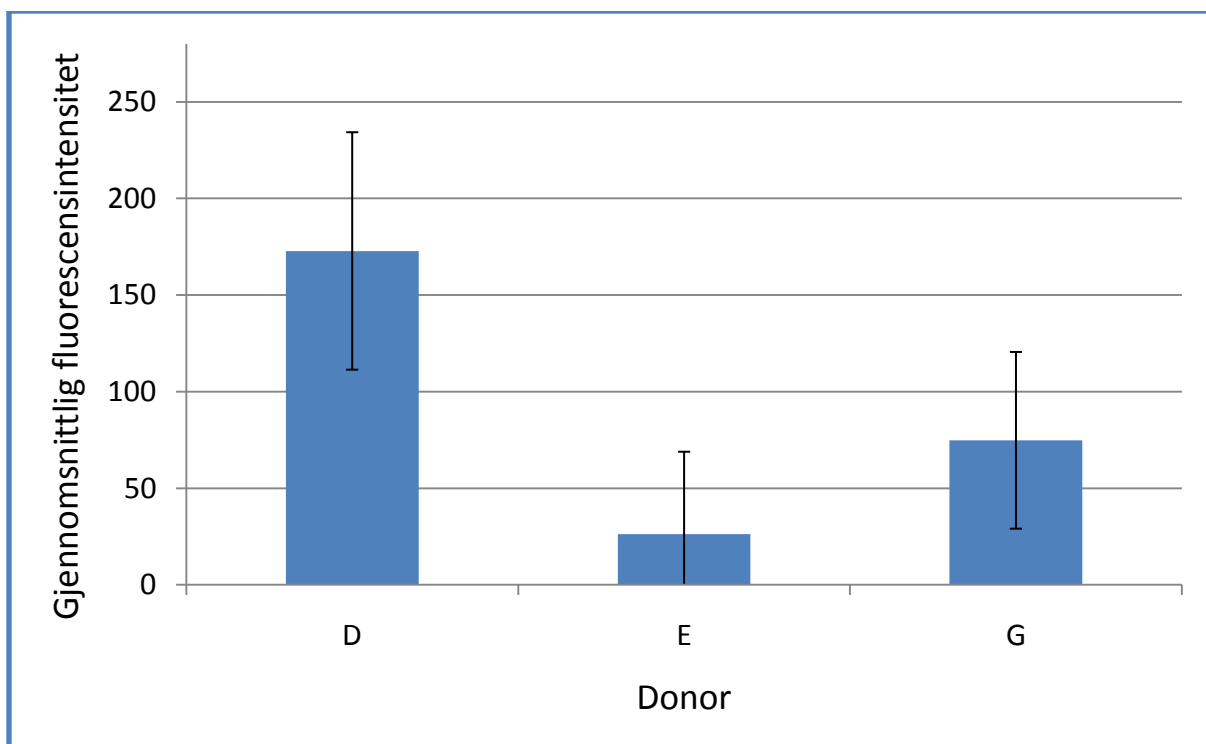
Figur 3.15: Detektert fluorescens i reseptorfasen for hudpenetrasjonsforsøkene gjennomført med alexa 488 SE på forbehandlet hud fra donor A, B, C, D, E og G. Kontroll angir gjennomsnittlig fluorescens i reseptorfasen ved påført kontrollprøve for disse seks donorene.

Figur 3.15 viser høyere detektert fluorescens i reseptorfasen for samtlige gjennomføringer med alexa 488 SE enn for kontrollprøven. Dermed er det logisk å anta at noe av prøven har diffundert dermis og havnet i reseptorfasen. Donor E viser den høyeste fluorescensen i reseptorfasen. Dette kan skyldes søl av prøve direkte i reseptorkammeret. Men trolig betyr det at for donor E har alexa 488 SE penetrert godt helt gjennom hudbiten samtidig som mye prøve fortsatt er å finne i vevet.

Grunnen til at det detekteres mer fluorescens i reseptorfasen for penetrasjon av alexa 488 SE enn for penetrasjon av FG-2t-C-488 under tidsstudie, kan forklares ut i fra en lavere merkningsgrad og en høyere \bar{M}_w for den sistnevnte prøven.

Alexa 532 SE

Figur 3.16 viser gjennomsnittlig fluorescensintensitet for hudpenetrasjonsforsøk utført med alexa 532 SE på forbehandlet hud fra donor D, E og G.

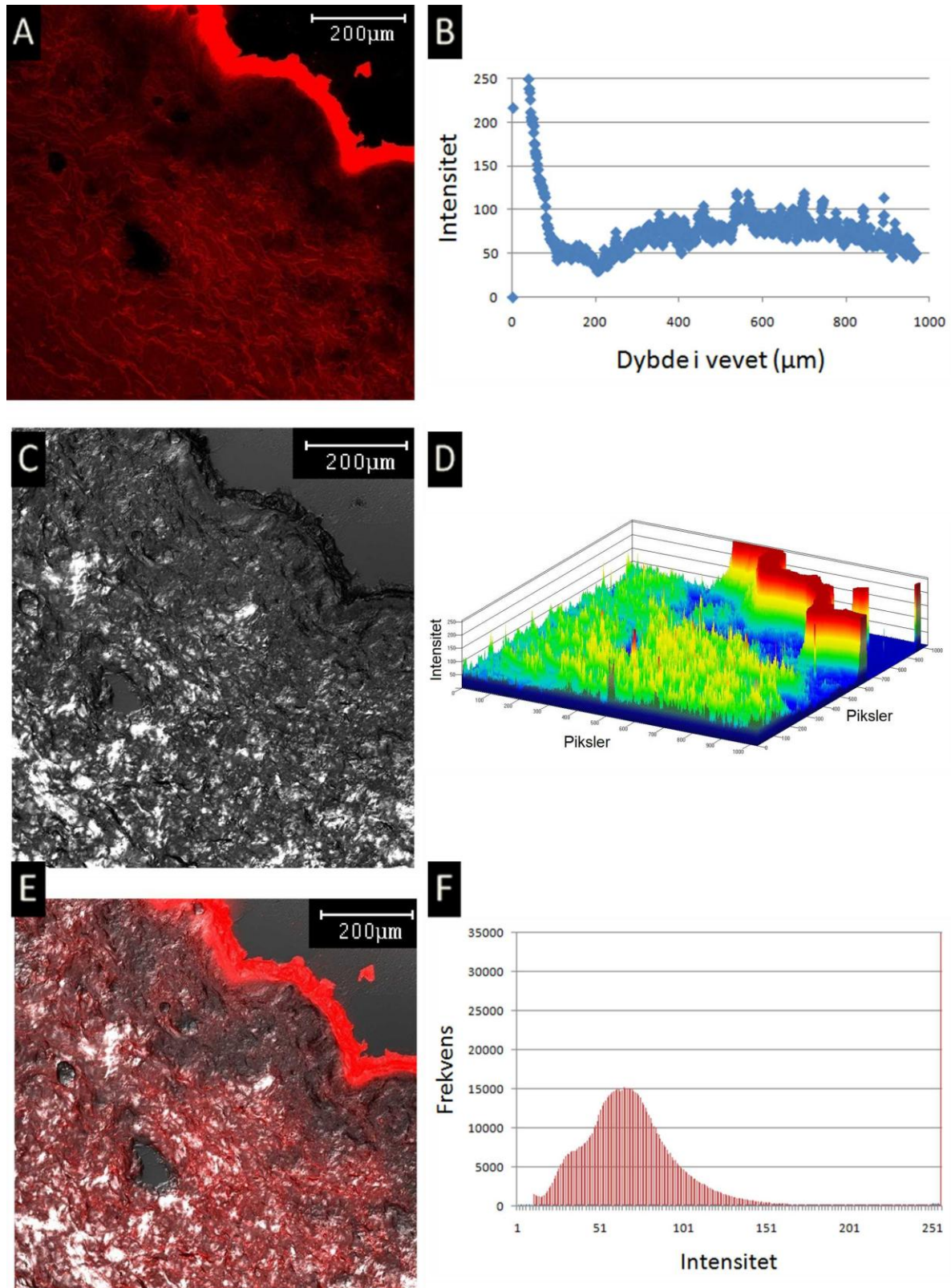


Figur 3.16: Gjennomsnittlig fluorescensintensitet for hudpenetrasjonsforsøk utført med alexa 532 SE på forbehandlet hud fra donor D, E og G.

Figur 3.16 viser at forsøkene ikke har overensstemmende resultater. Donor E skiller seg ut med en svært lav fluorescensintensitet, akkurat som for donor H for penetrasjon av alexa 488 SE. Fluorescensintensiteten for donor E er funnet til 27 ± 44 . Denne lave intensiteten kan skyldes utstansing av biopsien på feil sted, eller utilstrekkelig bruk av mikronåler, som diskutert i kap. 3.2.7.

Hvis det sees bort fra resultatet for donor E blir gjennomsnittlig $I_{\text{Alexa 532 SE}}$ bestemt til 100 ± 52 . En sammenligning med kontrollprøven, som ga en fluorescensintensitet på 0.40 ± 0.69 , bekrefter at alexa 532 SE penetrerer SC og diffunderer ned i dermis.

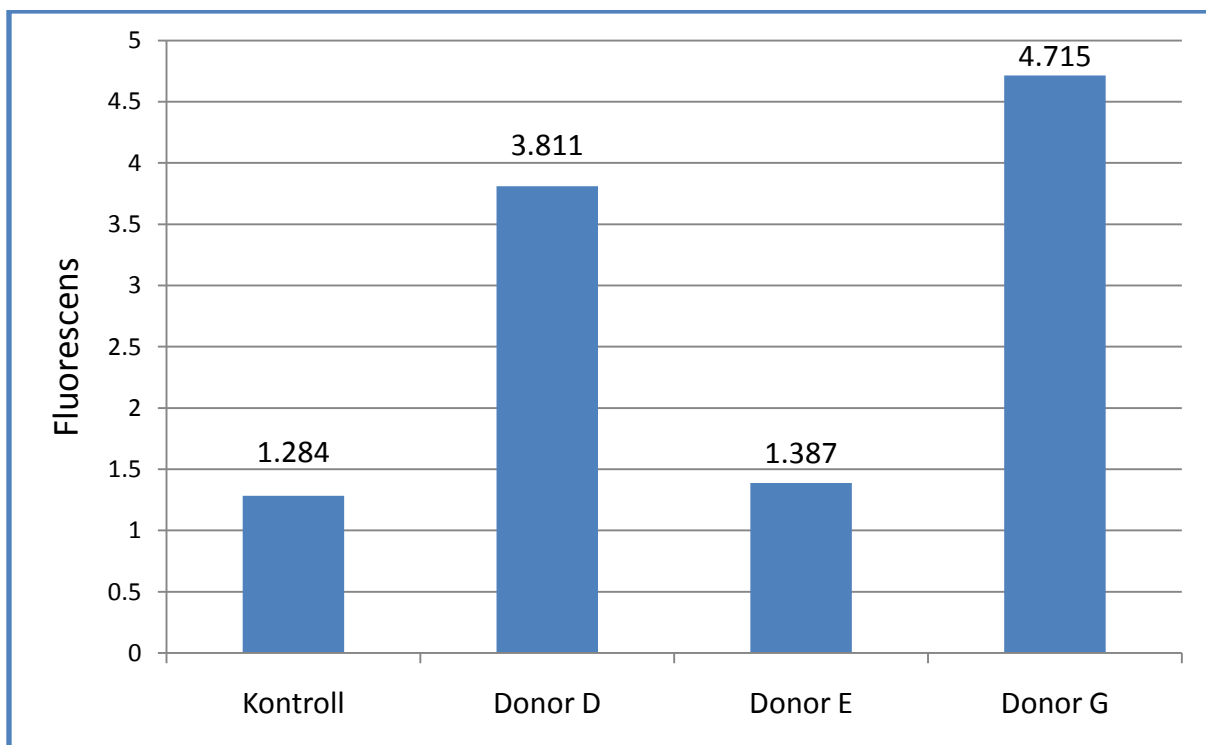
Siden resultatene fra donor G ligger i nærheten av $I_{\text{Alexa 532 SE}}$, sees det nærmere på dette systemet. Figur 3.17 viser KLSM bilder, intensitetsfordelingen inn i vevet, tredimensjonal fremstilling av intensiteten i bildet og frekvensen av de ulike intensitetsverdiene for penetrasjon av alexa 532 SE for donor G. Resultater for resterende donorer er gitt på vedlagt cd.



Figur 3.17: Resultater for penetrasjon av alexa 532 SE i hud fra donor G. Alle resultater er funnet fra KLSM bildet vist i A. A) KLSM bildet viser fluorescensen i vevet. B) Intensiteten som funksjon av dybde i vevet. C) Gjennomlysningsbildet viser strukturen i vevet. D) Tredimensjonal kurve som viser intensitetsfordelingen i bildet. E) Frekvensen av de ulike intensitetsverdiene (0-255).

Figur 3.17 A viser at det er mye fluorescens i hele bildet. SC vises som en ekstra klar rød strek. Som nevnt for hudforsøk med alexa 488 SE, kan dette skyldes overflødig farge før utstansing av biopsi, nedfrysning og snitting. Dette viser også tydelig hvor penetrasjonsbarrieren til huden ligger, som beskrevet i kap. 1.2. 3.17.B og D viser hvordan intensiteten varierer som funksjon av dybden i vevet. Fenomenet med lite fluorescensintensitet i papillær dermis er også observert i dette forsøket (se kap. 3.2). Figur 3.17.C og E viser hvordan et nokså stort hull i vevet gir ingen detektert fluorescensintensitet i dette området. Figur 3.17.F viser at det er flest piksler med en intensitet mellom 50 og 100.

Figur 3.18 viser detektert fluorescens i reseptorfasen til hudpenetrasjonsforsøkene utført med alexa 532 SE.



Figur 3.18: Detektert fluorescens i reseptorfasen for hudpenetrasjonsforsøkene gjennomført med alexa 532 SE på forbehandlet hud fra donorer D, E og G. Kontroll angir gjennomsnittlig fluorescens i reseptorfasen ved påført kontrollprøve for disse tre donorene.

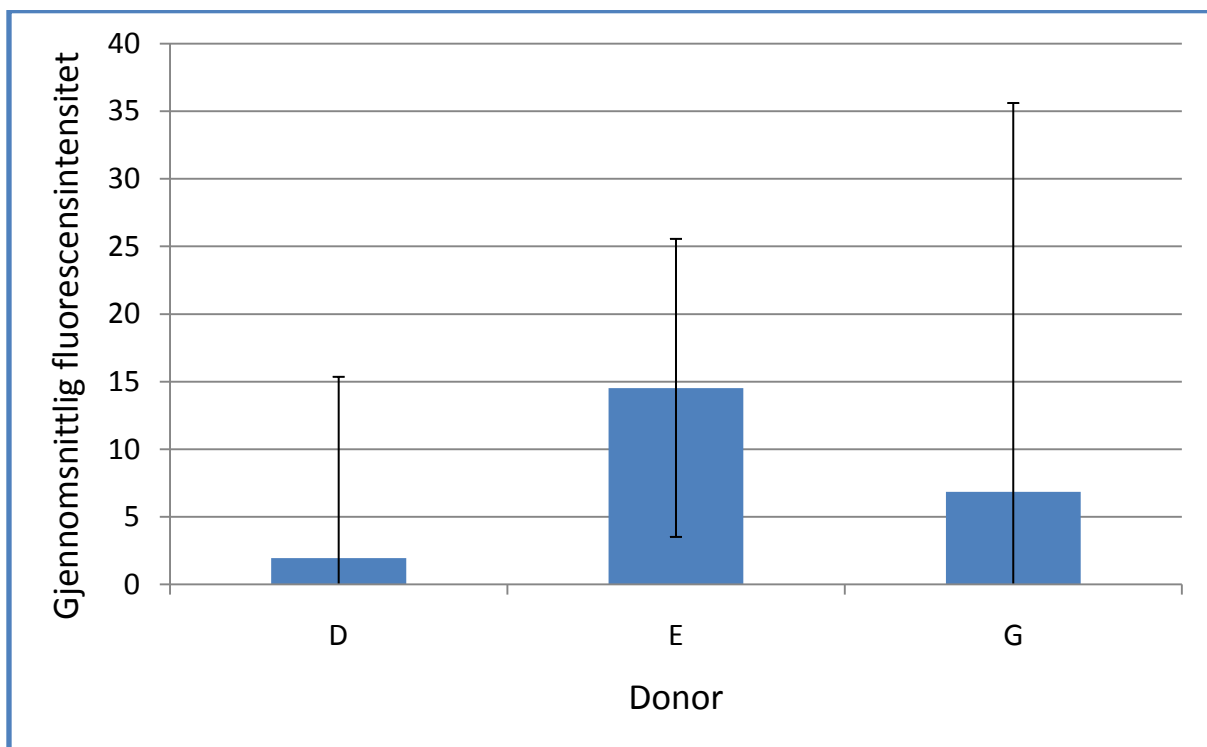
Figur 3.18 viser at det ser ut til å detekteres fluorescens i reseptorfase for samtlige donorer utenom for donor E. Dette var den donoren som ga lavest fluorescensintensitet i figur 3.16. Dette kan skyldes dårlig gjennomføring av forbehandlingen som diskutert i kap. 3.2.7.

3.2.3. G-blokk

Resultatene for hudpenetrasjonsforsøkene gjennomført med G-blokk prøvene G-DP18 og G-DP22 (kap. 2.3.3) er presentert i dette kapitlet.

G-DP18

Figur 3.19 viser gjennomsnittlig fluorescensintensitet for hudpenetrasjonsforsøk utført med G-DP18 på forbehandlet hud fra donor D, E og G.



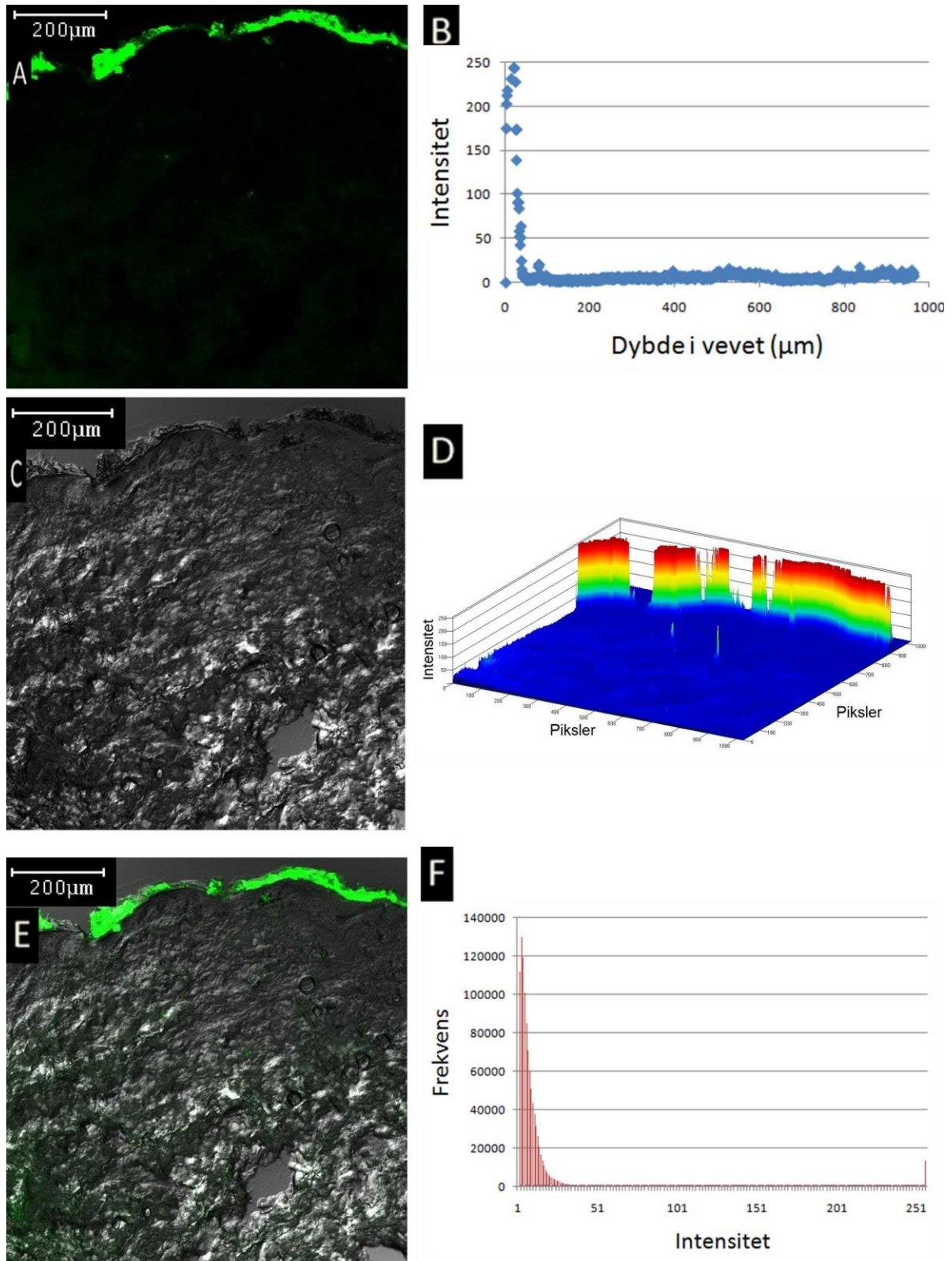
Figur 3.19: Gjennomsnittlig fluorescensintensitet og standardavvik for hudpenetrasjonsforsøk utført med G-DP18 på forbehandlet hud fra donor D, E og G

Figur 3.19 viser at det er noen variasjoner i resultatmaterialet. Fluorescensintensiteten varierer mellom 2 og 15. Gjennomsnittlig I_{G-DP18} ble bestemt til 8 ± 18 . En sammenligning

med kontrollprøven, som ga en fluorescensintensitet på 2.82 ± 2.18 , antyder at G-DP18 i liten grad penetrerer SC og diffunderer ned i dermis. I_{G-DP18} er en lav intensitetsverdi sett i sammenheng med resultatene for penetrasjon av alexa 488 SE. Altså penetrere G-DP18 huden i mindre grad enn alexa 488 SE. Dette er også forventet da $\bar{M}n_{G-DP18} > Mw_{Alexa\ 488\ SE}$.

Hudpenetrasjonsforsøket for alexa 532 SE er også utført på donorer D, E og G. For donorer E ble det antatt dårlig bruk av mikronålene i forsøk med alexa 532 SE, noe som ikke ser ut til å stemme for dette denne gjennomføringen. All hud ble stort sett behandlet med mikronåler under ett. Noen ganger ble hudbiten delt i to, og deretter behandlet. Det kan se ut som det sistnevnte har blitt gjort for donorer E. Det er svært vanskelig å si noe sikkert, når standardavvikene er så store som for donorer G i figur 3.19.

Siden resultatene fra donorer G ligger i nærheten av I_{G-DP18} , sees det nærmere på dette systemet. Figur 3.20 viser KLSM bilder, intensitetsfordelingen inn i vevet, tredimensjonal fremstilling av intensiteten i bildet og frekvensen av de ulike intensitetsverdiene for penetrasjon av G-DP18 for donorer G. Resultater for resterende donorer er gitt på vedlagt cd.

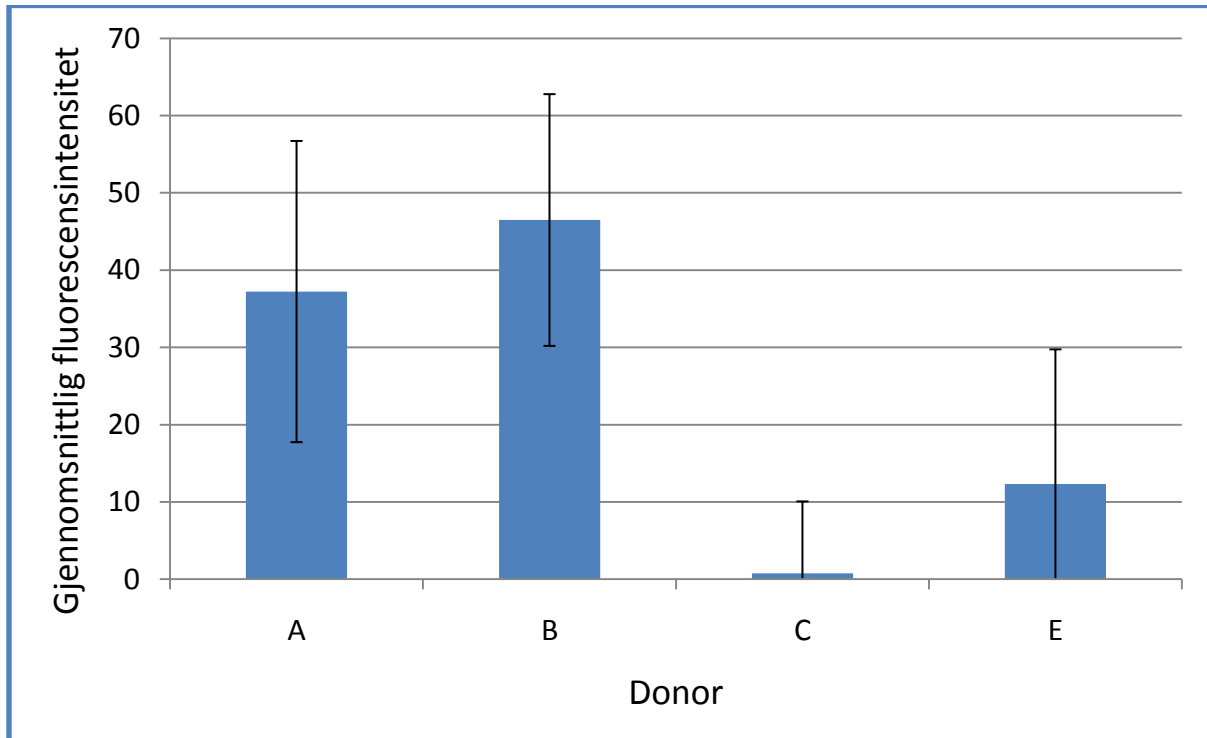


Figur 3.20: Resultater for penetrasjon av G-DP18 i hud fra donor G. Alle resultater er funnet fra KLSM bildet vist i A. A) KLSM bildet viser fluorescensen i vevet. B) Intensiteten som funksjon av dybde i vevet. C) Gjennomlysningsbildet viser strukturen i vevet. D) Tredimensjonal kurve som viser intensitetsfordelingen i bildet. E) Kombinasjon av bilde A og C. F) Frekvensen av de ulike intensitetsverdiene (0-255).

Figur 3.20.A og B, viser at det er lite fluorescens i vevet utenom i epidermis. Det samme sees fra figur 3.20.D. Figur 3.10.C og E viser at det finnes noen hull i snittet. Dette har nok ikke stor påvirkning på resultatene, da det allikevel er observert lite fluorescens i vevet. Figur 3.20.F viser at det er flest piksler med en intensitet på mellom 0 og 15. Altså kan det oppsummeres med at G-DP18 med $M_w = 3.8$ kDa har liten eller ingen evne til å penetrere gjennom SC og ned i dermis. Dette kan ikke sies med sikkerhet, siden det ikke foreligger et KLSM bilde av hele dermis. Kanskje G-blokken har diffundert lenger ned i dermis og bundet seg med kollagenkjeder her. Det ble ikke detektert noe fluorescens i reseptorfasen. Dette styrker begrunnelsen om at G-DP18 ikke klarer å penetrere huden.

G-DP22

Figur 3.21 viser gjennomsnittlig fluorescensintensitet for hudpenetrasjonsforsøk utført med G-DP22 på forbehandlet hud fra donor A, B, C og E.



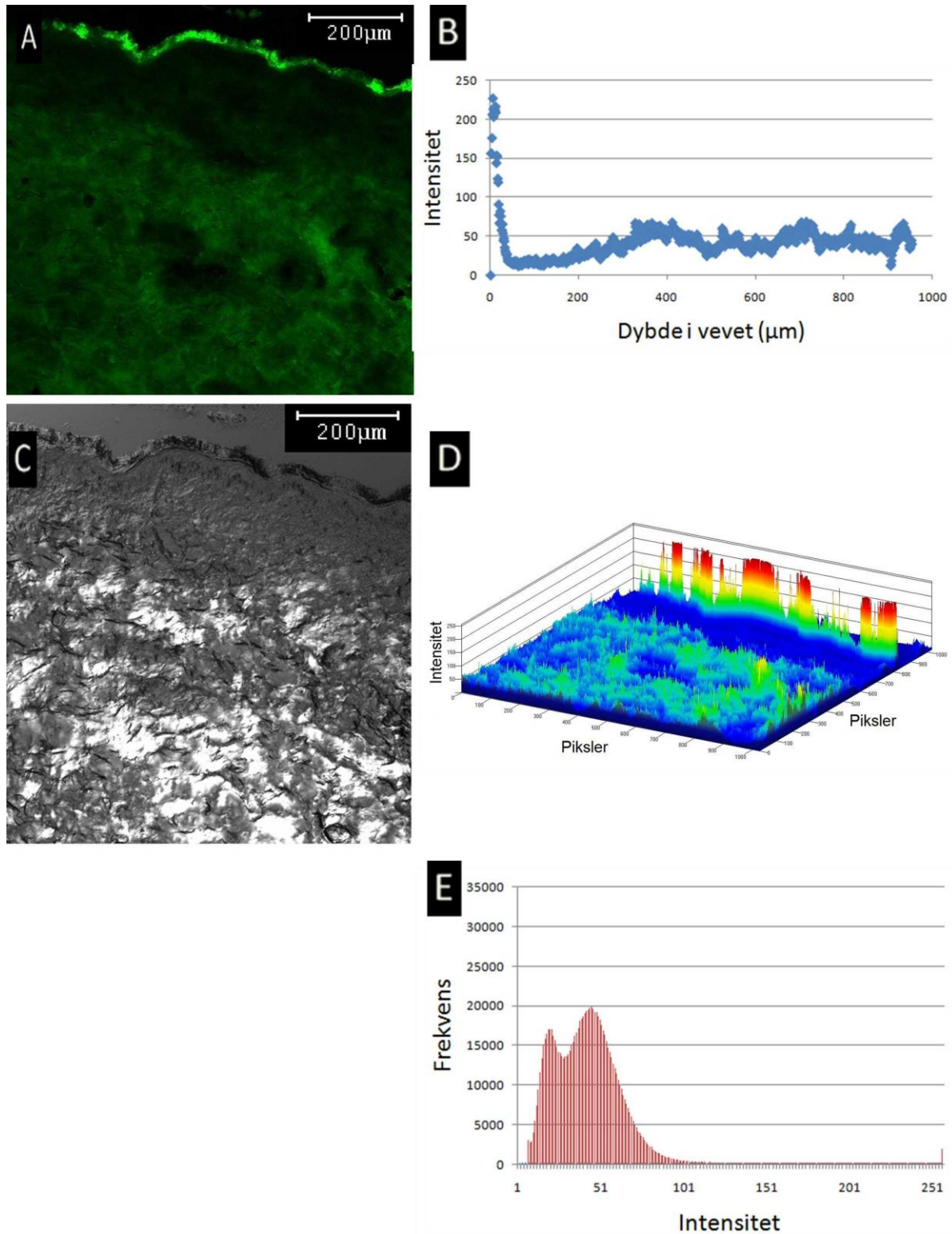
Figur 3.21: Gjennomsnittlig fluorescensintensitet og standardavvik for hudpenetrasjonsforsøk utført med G-DP22 på forbehandlet hud fra donor A, B, C og E.

Figur 3.21 viser høyere verdier og litt større spredning i resultatmateriale enn for G-DP18. Intensiteten varierer mellom 1 og 50. Det er vanskelig å si noe om grunnen til spredningen i resultatene. Eventuelt kan mikronålene blitt brukt mindre på hud fra donor C og E, eller det kan foreligge bretter eller ujevnheter som gir kunstig høy intensitet for donor A og B. Flere svakheter med metoden er diskutert i kap. 3.2.7.

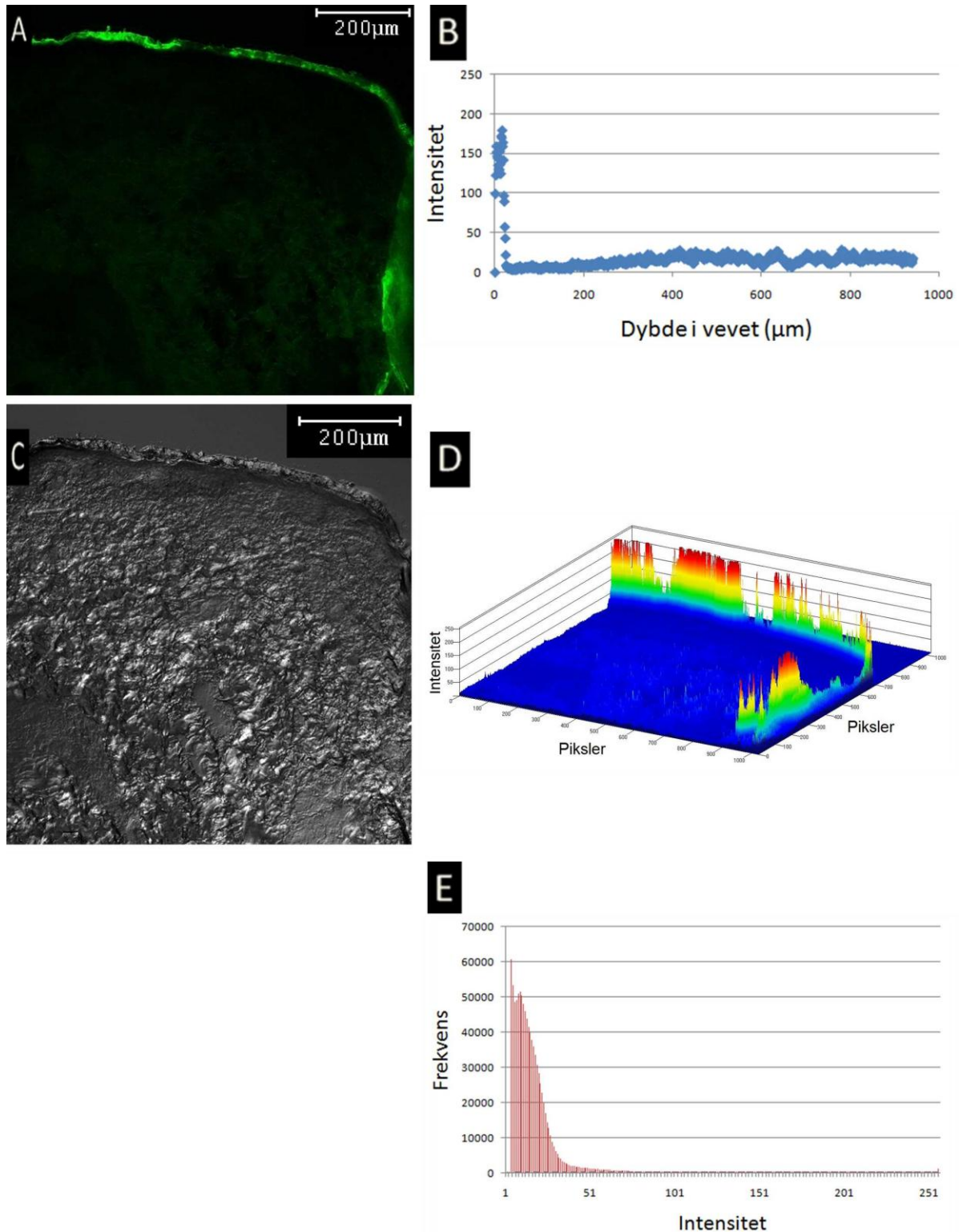
Gjennomsnittlig I_{G-DP22} ble bestemt til 24 ± 16 . En sammenligning med kontrollprøven, som ga en fluorescensintensitet på 2.82 ± 2.18 , bekrefter at G-DP22 penetrerer SC og diffunderer ned i dermis. I_{G-DP22} er lav sammenlignet med $I_{Alexa\ 488}$, altså penetrerer G-DP22 huden i mindre grad enn alexa 488 SE. Dette er også forventet da $\bar{M}_{n_{G-DP22}} > M_{w_{Alexa\ 488\ SE}}$. Det er derimot ikke forventet at G-DP22 skal penetrere huden bedre enn G-DP18, siden $\bar{M}_{n_{G-DP22}} > \bar{M}_{n_{G-DP18}}$. En grunn til dette kan være utilstrekkelig blanding av prøven med DMSO før påføring på huden. Dette var spesielt et problem for G-DP22 som var svært viskøs, og dermed vanskelig å fordele utover på hudbiten. Fargestoffet kan også ha tapt seg over tid ved gjentatt eksponering for lys.

Det må i tillegg påpekes at uten en MALDI-TOF analyse, er det vanskelig å si noe helt bestemt om molekylvekten til prøven. G-DP22 kan ha flere kjeder av mindre lengde enn G-DP18, selv om \bar{DP} er funnet større for G-DP22 enn G-DP18.

Siden spredningen i resultatene er nokså stor, sees det nærmere på resultatene for både donor A og E. Figur 3.22 og figur 3.23 viser KLSM bilder, intensitetsfordelingen inn i vevet, tredimensjonal fremstilling av intensiteten i bildet og frekvensen av de ulike intensitetsverdiene for penetrasjon av G-DP22 for henholdsvis donor A og E. Resultater for resterende donorer er gitt på vedlagt cd.



Figur 3.22: Resultater for penetrasjon av G-DP22 i hud fra donor A. Alle resultater er funnet fra KLSM bildet vist i A. A) KLSM bildet viser fluorescensen i vevet. B) Intensiteten som funksjon av dybde i vevet. C) Gjennomlysningsbildet viser strukturen i vevet. D) Tredimensjonal kurve som viser intensitetsfordelingen i bildet. E) Frekvensen av de ulike intensitetsverdiene (0-255).



Figur 3.23: Resultater for penetrasjon av G-DP22 i hud fra donor E. Alle resultater er funnet fra KLSM bildet vist i A. A) KLSM bildet viser fluorescensen i vevet. B) Intensiteten som funksjon av dybde i vevet. C) Gjennomlysningsbildet viser strukturen i vevet. D) Tredimensjonal kurve som viser intensitetsfordelingen i bildet. E) Frekvensen av de ulike intensitetsverdiene (0-255).

Figur 3.22.A, B og D viser mer fluorescens i vevet enn figur 3.23.A, B og D, akkurat som diskutert tidligere. Figur 3.22.F og 3.23.F viser henholdsvis at det er flest piksler med en intensitet på 40-60 og 0-20.

Hvis 3.22.C og 3.23.C sees i sammenheng, ser det ut som det kan være en brett i snittet fra donor A. Dette kan forårsake et kunstig høyt intensitetsnivå. Individuelle forskjeller mellom donorer som hudtykkelse, hårmengde, strekkmerker osv. er også faktorer som virker inn på resultatet. I tillegg gir forbehandlingen med mikronåler åpning for store forskjeller mellom de ulike donorene. Det er vanskelig å benytte like mye kraft og like mange påføringer med nålene for hver donor. I tillegg ble forsøkene utført i samarbeid med en annen student. Derfor vil det kunne være forskjeller på forsøkene, etter hvem som har utført dem. Disse svakhetene med oppgaven er nærmere diskutert i kap. 3.2.7.

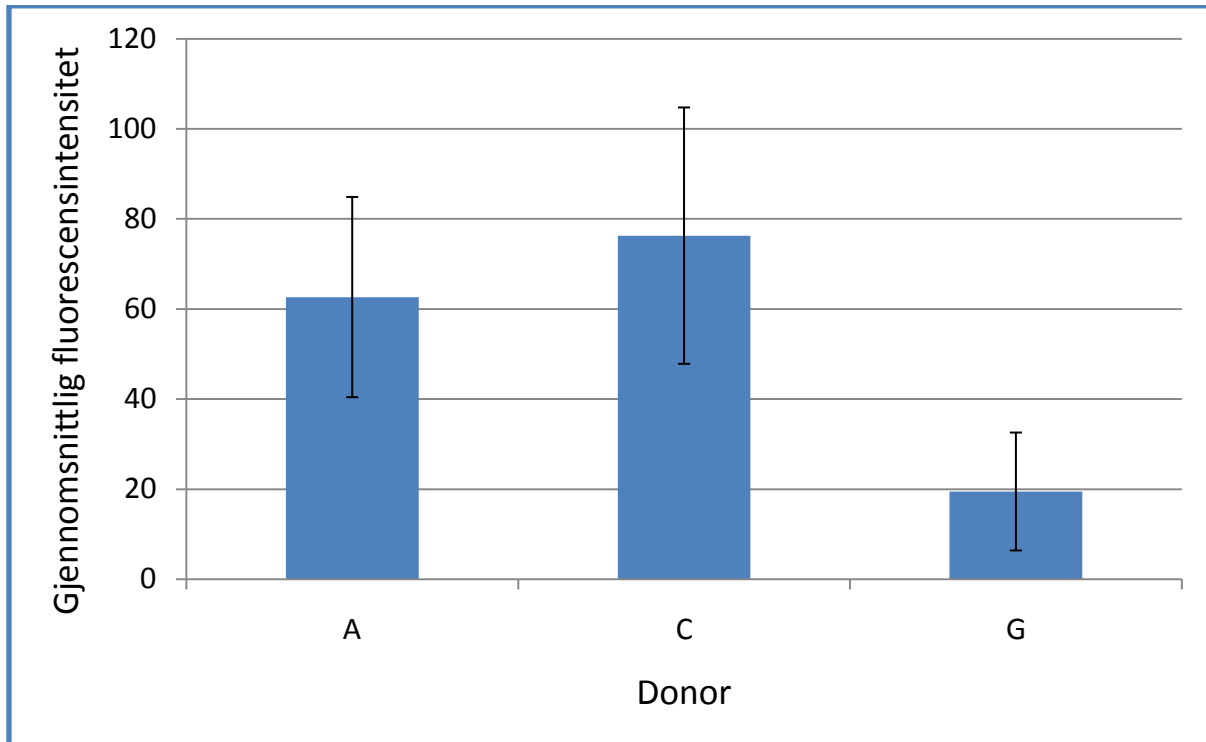
Det er ikke detektert noe fluorescens i reseptorfasen for noen av donorene ved påført G-DP22. Dette tyder på at ingen fluorescensmerket G-blokk har diffundert helt ned i reseptorfasen. En mulig forklaring på dette kan være at molekylene er bundet eller vekselvirker med molekyler i den ekstracellulære matriks som diskutert i kap. 1.4.

3.2.4. Fiskegelatinpeptid

Resultatene av hudpenetrasjonsforsøkene med påført FG-peptider (se kap. 2.4.3) er gitt i dette kapitlet.

FG-2t-A-488

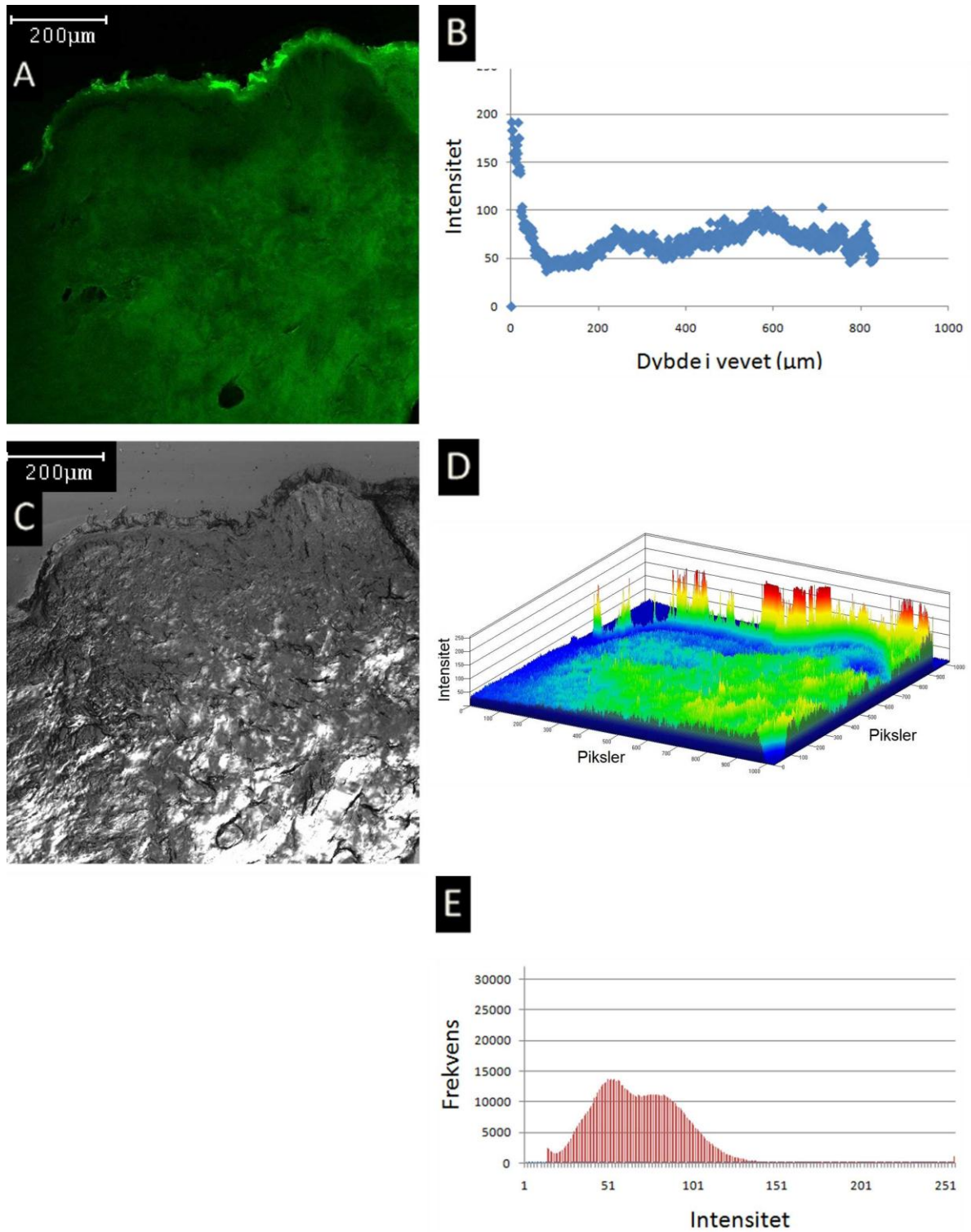
Figur 3.24 viser gjennomsnittlig fluorescensintensitet for hudpenetrasjonsforsøk utført med FG-2t-A-488 på forbehandlet hud fra donor A, C og G.



Figur 3.24: Gjennomsnittlig fluorescensintensitet og standardavvik for hudpenetrasjonsforsøk utført med FG-2t-A-488 på forbehandlet hud fra donorer A, C og G.

Figur 3.24 viser at det er litt variasjoner i resultatmaterialet. Intensiteten varierer mellom 20 og 60 for de ulike donorene. Gjennomsnittlig $I_{\text{FG-2t-A-488}}$ bestemmes til 53 ± 21 . En sammenligning med kontrollprøven, bekrefter at FG-2t-A-488 penetrerer SC og diffunderer ned i dermis. I sammenligning med resultatene for penetrasjon av alexa 488 SE, så er $I_{\text{FG-2t-A-488}}$ en lav intensitetsverdi. Altså penetrerer FG-2t-A-488 huden i mindre grad enn alexa 488 SE. Dette er også forventet da $\bar{M}w_{\text{FG-2t-A-488}} > Mw_{\text{Alexa 488 SE}}$.

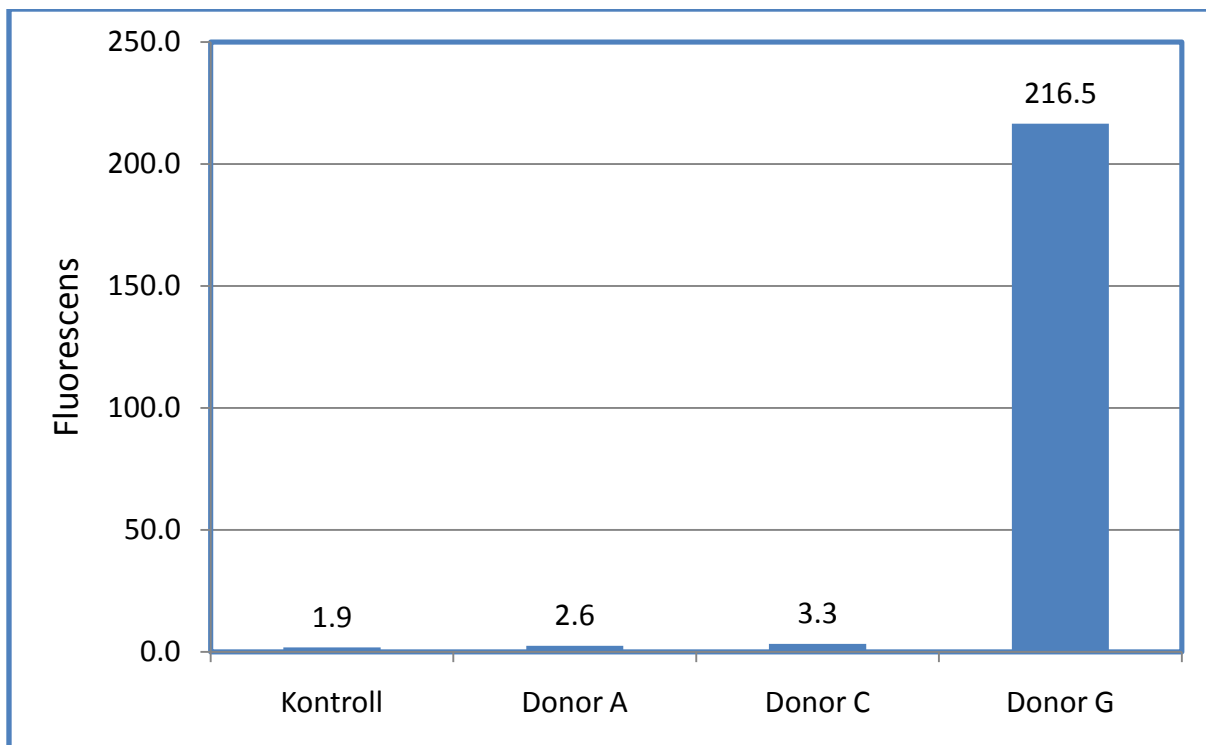
Siden resultatene fra donorer A ligger i nærheten av $I_{\text{FG-2t-A-488}}$, sees det nærmere på dette systemet. Figur 3.25 viser KLSM bilder, intensitetsfordelingen inn i vevet, tredimensjonal fremstilling av intensiteten i bildet og frekvensen av de ulike intensitetsverdiene for penetrasjon av FG-2t-A-488 for donorer A. Resultater for resterende donorer er gitt på vedlagt cd.



Figur 3.25: Resultater for penetrasjon av FG-2t-A-488 i hud fra donor A. Alle resultater er funnet fra KLSM bildet vist i A. A) KLSM bildet viser fluorescensen i vevet. B) Intensiteten som funksjon av dybde i vevet. C) Gjennomlysningsbildet viser strukturen i vevet. D) Tredimensjonal kurve som viser intensitetsfordelingen i bildet. E) Frekvensen av de ulike intensitetsverdiene (0-255).

Figur 3.25. A, B og D viser at det har penetrert en del fluorescensmerket FG-peptid inn i vevet. Ut fra figur 3.25.C kan det se ut som det er en brett i snittet. Det er tydelig at det er i dette området det er høyest intensitet (figur 3.25.D). Det kan derfor forventes at $I_{FG-2t-A-488}$ er kalkulert kunstig høyt. Figur 3.25.E viser at det er flest piksler med en intensitet mellom 50 og 100. Ut fra figuren er det også tydelig at intensiteten starter på et høyt nivå og deretter blir den lavere for så å stige igjen. Dette fenomenet er beskrevet i starten av kap. 3.2.

Figur 3.26 viser detektert fluorescens i reseptorfasen for de ulike hudforsøkene gjennomført med FG-2t-A-488.



Figur 3.26: Detektert fluorescens i reseptorfasen for hudpenetrasjonsforsøkene gjennomført med FG-2t-A-488 på forbehandlet hud fra donorer A, C og G. Kontroll angir gjennomsnittlig fluorescens i reseptorfasen ved påført kontrollprøve for disse tre donorene.

Figur 3.26 viser at det ble detektert en svært høy fluorescens i reseptorfasen for hudpenetrasjonsforsøket utført med FG-2t-A-488 på hud fra donorer A, C og G. Dette kan være med på å forklare den lave gjennomsnittlige fluorescensintensiteten som ble kalkulert for donorer A, C og G som vist i figur 3.24. Mye av fiskgelatinprøven har antageligvis diffundert gjennom dermis

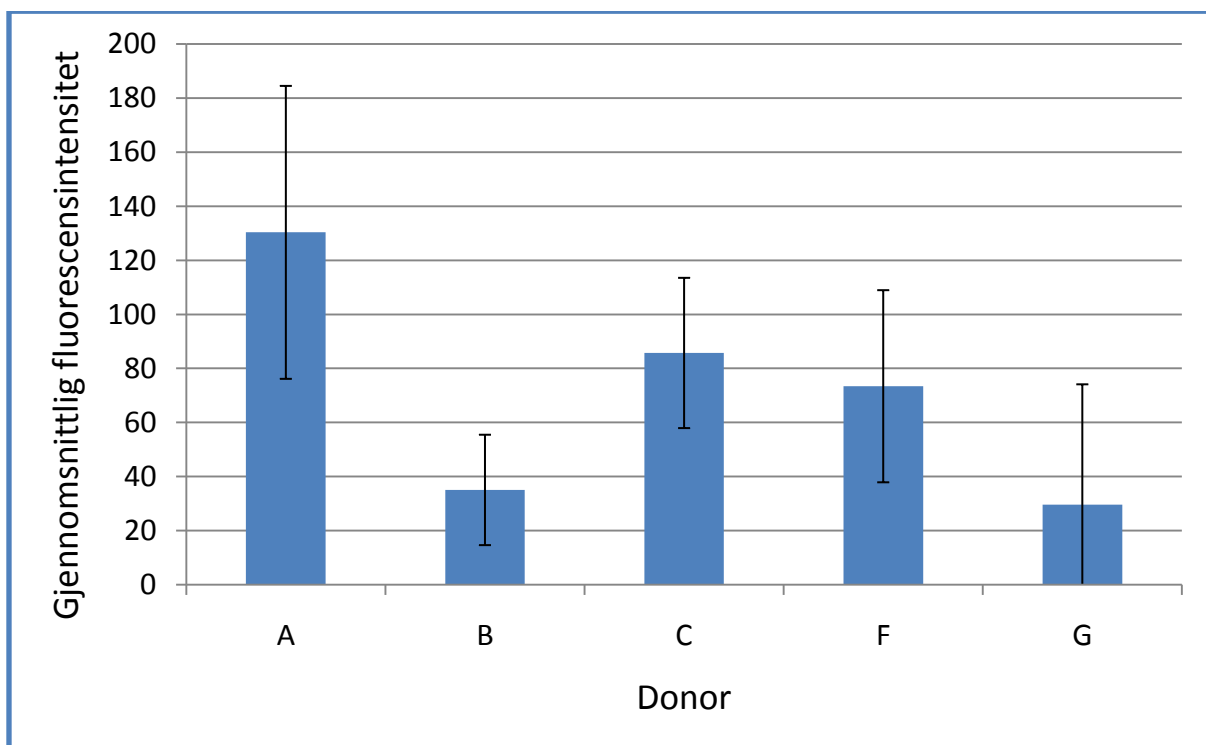
uten å elektrostatisk binde seg til komponenter i den ekstracellulære matriksen, og dermed er en lav fluorescensintensitet detektert.

Den høye fluorescensen detektert i reseptorfasen for donor G, kan også skyldes søl av prøve.

Det var vanskelig å få likt nivå med PBS-buffer i reseptorfasekammeret, dette kan ha stor innvirkning for diffusjonen av FG-peptid nedover i dermis og ned i reseptorfasen. For noen av gjennomføringene var det ikke kontakt mellom reseptorfasen og hudbiten. Dette ble først oppdaget helt sist i forsøksperioden, og dermed antas at denne kontakten var der for donor G, men ikke for donor A og C. Noe som også kan være med på å forklare fluorescensnivået som detekteres i de ulike reseptorfasene.

FG-2t-C-488

Figur 3.27 viser gjennomsnittlig fluorescensintensitet for hudpenetrasjonsforsøk utført med FG-2t-C-488 på forbehandlet hud fra donor A, B, C, F og G.



Figur 3.27: Gjennomsnittlig fluorescensintensitet og standardavvik for hudpenetrasjonsforsøk utført med FG-2t-C-488 på forbehandlet hud fra donor A, B, C, F og G.

Figur 3.27 viser at det er en del variasjoner i resultatmaterialet. Intensiteten varierer mellom 30 og 130 for de ulike donorene. Gjennomsnittlig $I_{FG-2t-C-488}$ bestemmes til 71 ± 36 . En sammenligning med kontrollprøven, som ga en fluorescensintensitet på 2.82 ± 2.18 , bekrefter at FG-2t-C-488 penetrerer SC og diffunderer ned i dermis. $I_{FG-2t-C-488}$ er lav sammenlignet med $I_{Alexa\ 488\ SE}$, altså penetrerer FG-2t-C-488 huden i mindre grad enn alexa 488 SE. Dette er forventet ut fra molekylvektene til prøvene. Det som ikke er forventet er at denne prøven skal penetrere bedre enn FG-2t-A-488. $\bar{M}_{w_{FG-2t-C-488}}$ ble bestemt til 7.1 kDa, noe som er omtrent 11 ganger større enn $M_{w_{Alexa\ 488\ SE}}$ og 3.5 ganger større enn $\bar{M}_{w_{FG-2t-A-488}}$. Molekylvektsresultatene i kap. 3.1 vises at 75 % av FG-2t-C har en gjennomsnittlig molekylvekt på 9120 Da, mens resterende del er mye mindre, og umulig å måle ved hjelp av SEC-MALLS. Resterende 25 % av prøven antas å ha en gjennomsnittlig molekylvekt på 709 Da (fra MALDI-TOF målinger). Dermed er det tilstrekkelig mengde med lavmolekylære fiskegelatinkjeder i prøven som kan forårsake den høye fluorescensintensiteten som er detektert i dette forsøket.

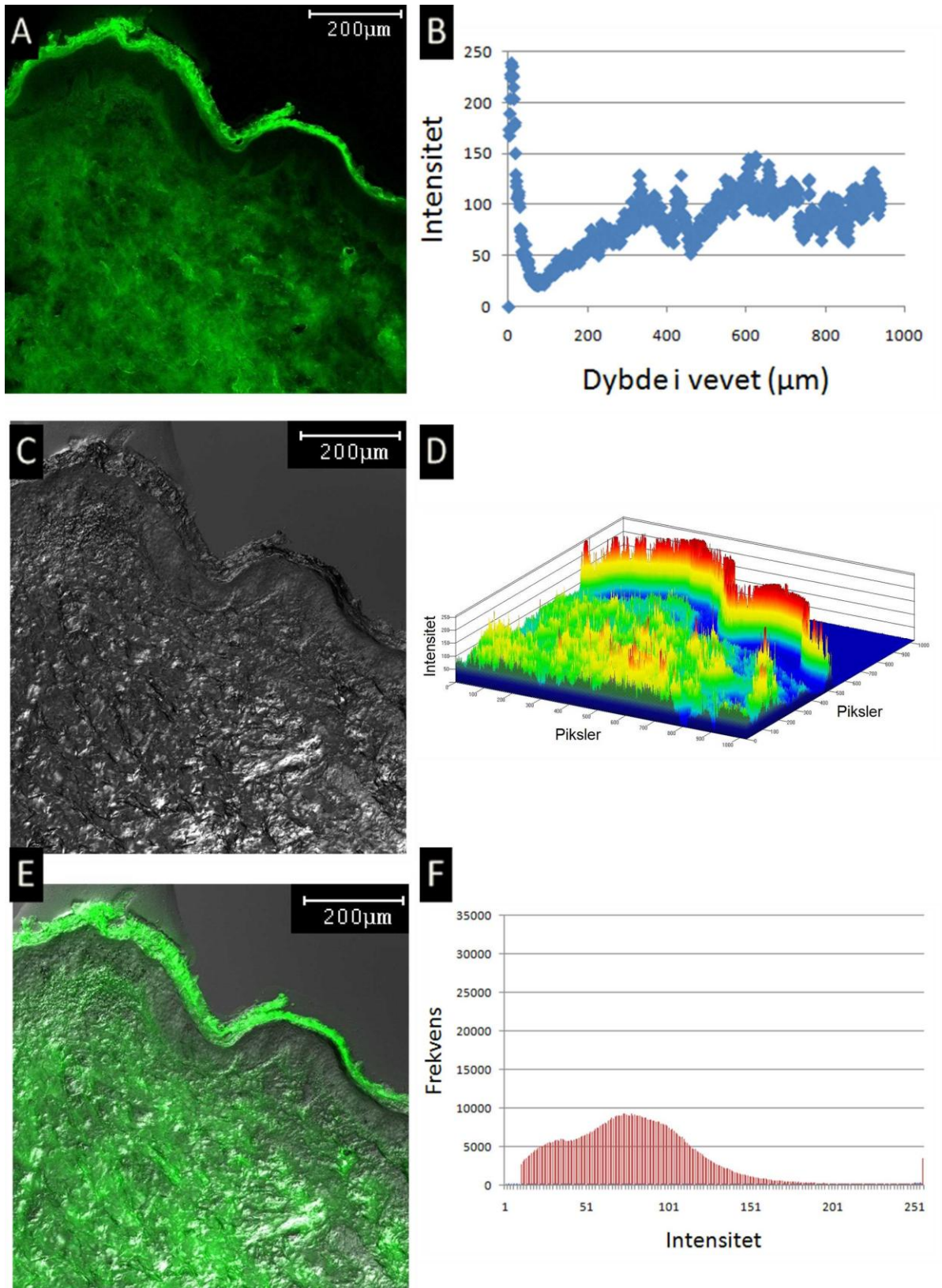
En annen grunn til den høye fluorescensintensiteten, som er detektert for denne prøven skyldes antageligvis merkningsgraden (se kap. 3.1.7). Merkningsgraden for FG-2t-C-488 er omtrent 2.5 ganger høyere enn for FG-2t-A-488. Dette betyr at omtrent 5 % av FG-2t-C-488 har alexa 488 SE bundet til seg, mens for FG-2t-A-488 er det bare 2 % av prøven som er bundet til fluorokromen. Dette vil absolutt gjenspeiles i KLSM bildene og detektert gjennomsnittelig fluorescensintensitet. Den høye merkningsgraden til FG-2t-C-488 kan også skyldes fritt alexa.

Variasjonene i resultatmaterialet kan også skyldes individuelle forskjeller eller ulik forbehandling av huden, som beskrevet i kap. 3.2.7.

Det kan også diskuteres om store FG-peptider som i prøve FG-2t-C-488 kan sette seg bedre fast i dermis og ekstracellulær matriks, enn små peptider som for eksempel de i prøve FG-2t-A-488. Hvis dette er tilfellet, vil dette kunne forklare mer fluorescensintensitet i vevet ved påføring av FG-2t-C-488 enn ved påføring av FG-2t-A-488.

Siden resultatene fra donør F ligger i nærheten av $I_{FG-2t-C-488}$, sees det nærmere på dette systemet. Figur 3.28 viser KLSM bilder, intensitetsfordelingen inn i vevet, tredimensjonal

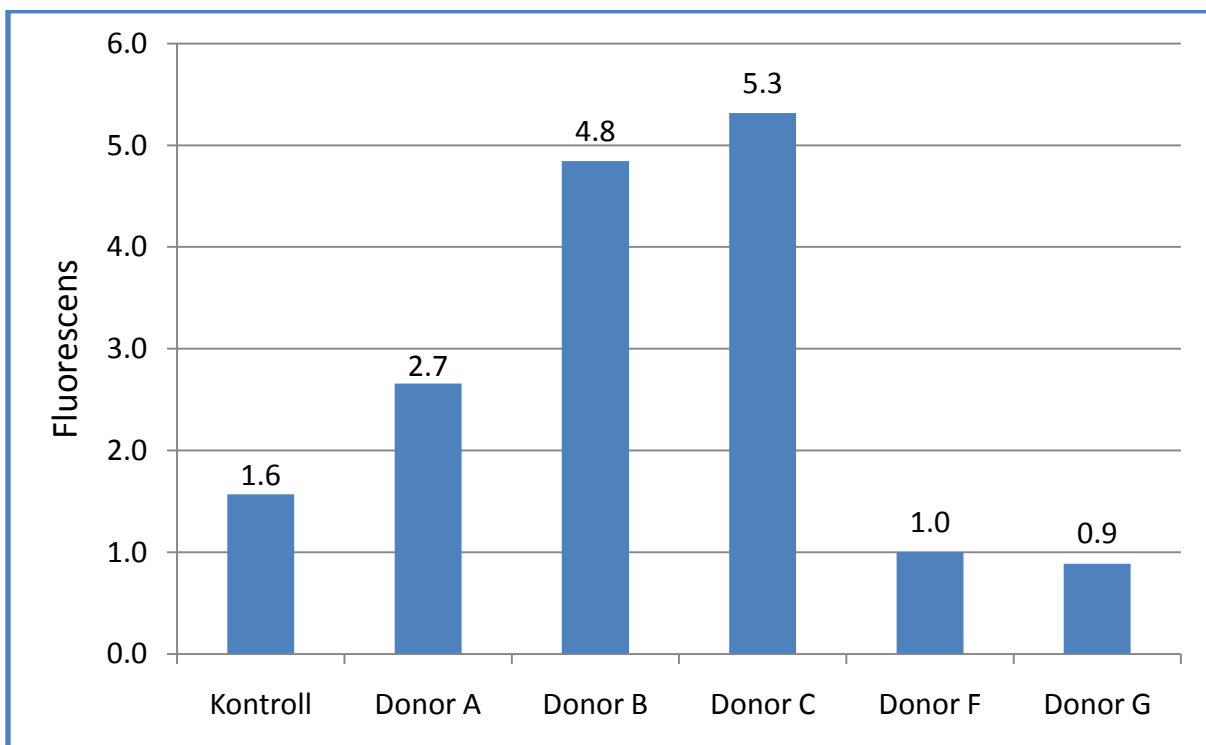
fremstilling av intensiteten i bildet og frekvensen av de ulike intensitetsverdiene for penetrasjon av FG-2t-C-488 for donor F. Resultater for resterende donorer er gitt på vedlagt cd.



3.28: Resultater for penetrasjon av FG-2t-C-488 i hud fra donor F. Alle resultater er funnet fra KLSM bildet vist i A. A) KLSM bildet viser fluorescensen i vevet. B) Intensiteten som funksjon av dybde i vevet. C) Gjennomlysningsbildet viser strukturen i vevet. D) Tredimensjonal kurve som viser intensitetsfordelingen i bildet. E) Kombinasjon av A og C. F) Frekvensen av de ulike intensitetsverdiene (0-255).

Figur 3.28 A, B, D og E viser at deler av FG-2t-C-488 prøven penetrerer SC og diffunderer videre inn i dermis. Figuren viser også fenomenet med et mørkt felt med lite fluorescensintensitet i øverste del av dermis. Dette er forklart nærmere i begynnelsen av kap. 3.2. Figur 3.28.C og E viser at det ikke ser ut til å være noen store bretter i snittet. Figur 3.28.F viser at det er flest piksler med en intensitet mellom 60 og 100.

Figur 3.29 viser detektert fluorescens i reseptorfasen for de ulike hudforsøkene gjennomført med FG-2t-C-488.



Figur 3.29: Detektert fluorescens i reseptorfasen for hudpenetrasjonsforsøkene gjennomført med FG-2t-C-488 på forbehandlet hud fra donor A, B, C, F og G. Kontroll angir gjennomsnittlig fluorescens i reseptorfasen ved påført kontrollprøve for disse fem donorene.

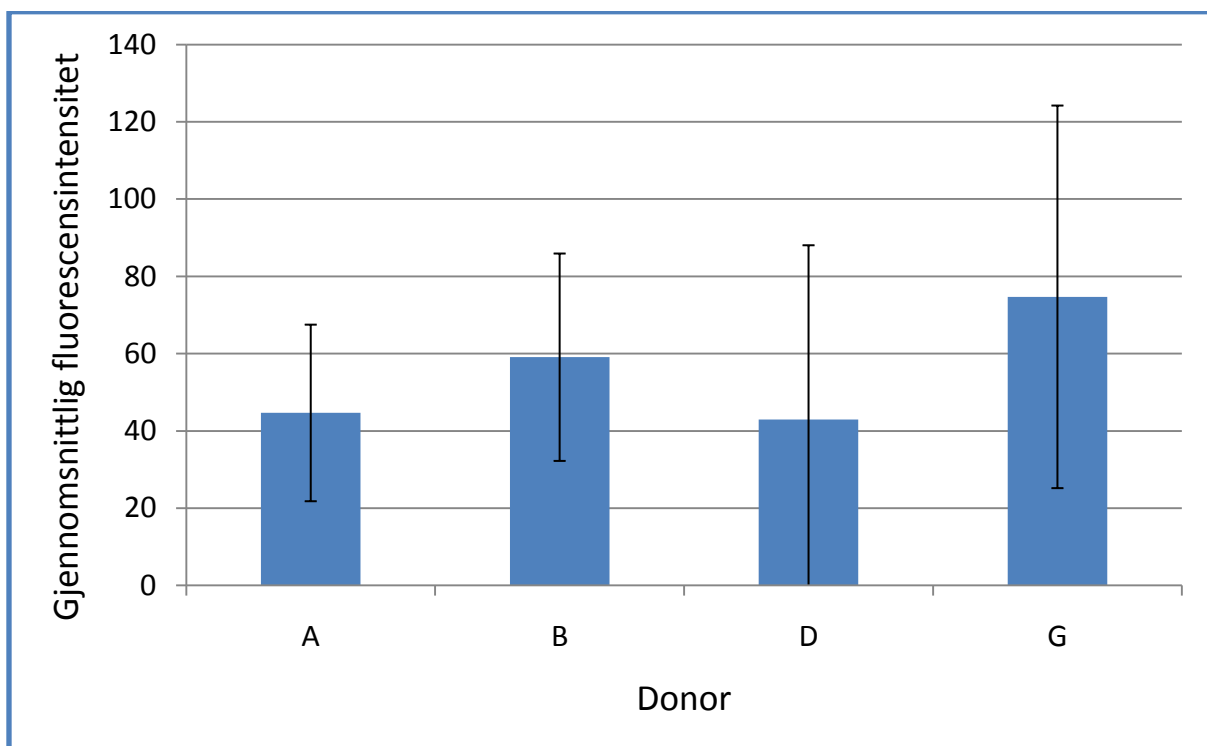
Figur 3.29 viser at det er stor variasjon i fluorescens i reseptorfasen. Det ser ut som noe fluorescensmerket fiskgelatinpeptid har havnet i reseptorfasen for donor A, B og C. Sett i sammenheng med figur 3.27 kan det ikke trekkes mange konklusjoner. For donor B ser det ut som om det kan ha havnet FG-2t-C-488 i reseptorfasen (figur 3.29), samtidig som det detekteres en lav gjennomsnittlig fluorescensintensitet i vevet. Dette kan skyldes at en del

av prøven bare har trukket gjennom uten å binde seg elektrostatiske til komponentene i den ekstracellulære matriksen. En liknende tendens ble sett for FG-2t-A-488.

For donor G detekteres en relativt lav gjennomsnittlig fluorescensintensitet samtidig som fluorescensen i reseptorfasen er detektert lav. Dette kan tyde på dårlig bruk av mikronåler eller dårlig kontakt mellom hudbiten og reseptorfasen (se kap. 3.2.7).

FG-6t-A-488

Figur 3.30 viser gjennomsnittlig fluorescensintensitet for hudpenetrasjonsforsøk utført med FG-6t-A-488 på forbehandlet hud fra donor A, B, D og G.

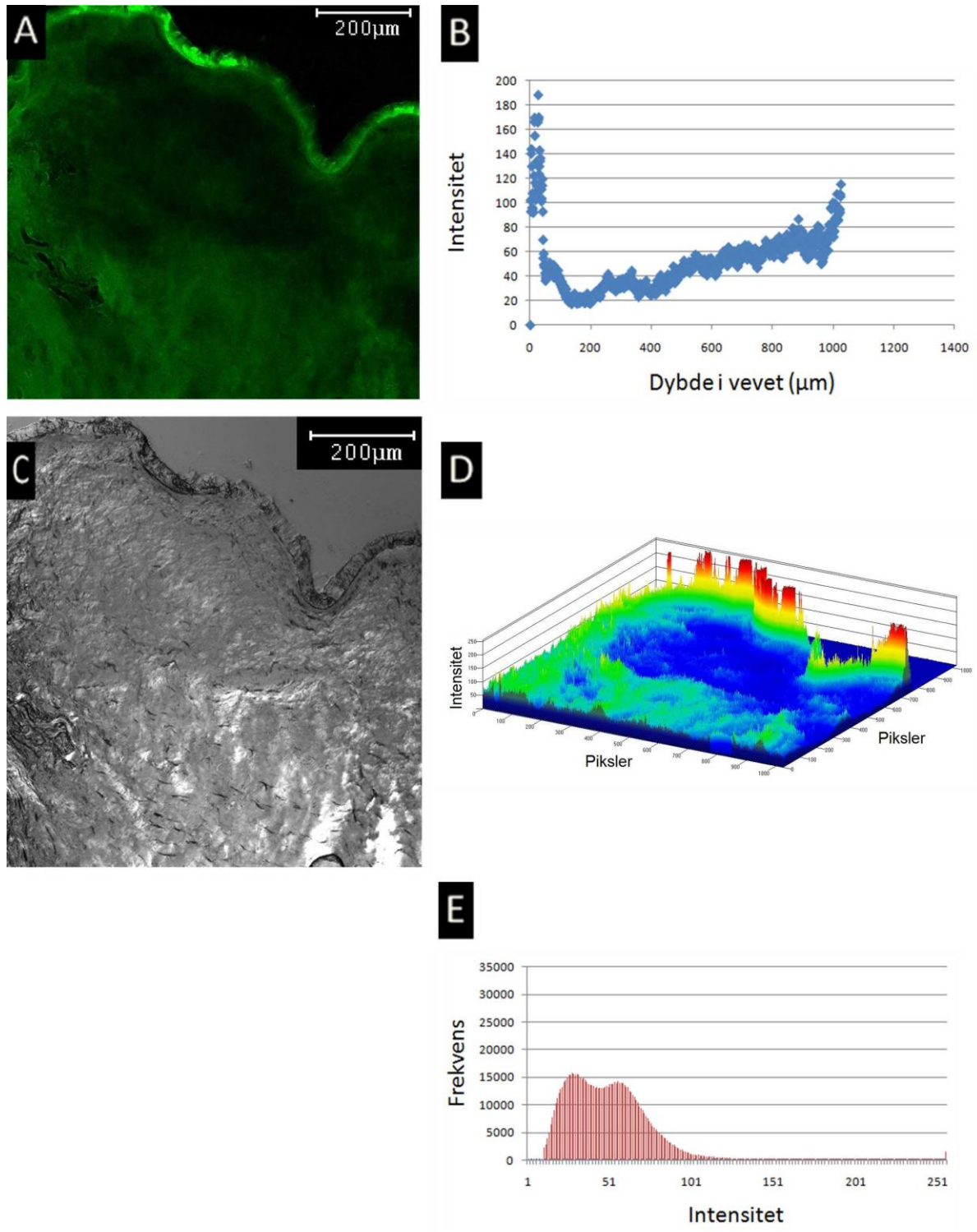


Figur 3.30: Gjennomsnittlig fluorescensintensitet og standardavvik for hudpenetrasjonsforsøk utført med FG-6t-A-488 på forbehandlet hud fra donor A, B, D og G.

Figur 3.30 viser at det er noen variasjoner i resultatmaterialet. Intensiteten varierer mellom 43 og 75 for de ulike donorene. Disse variasjonene kan skyldes ulik bruk av mikronåler eller individuelle forskjeller som diskutert tidligere og i kapittel 3.2.7. Gjennomsnittlig $I_{FG-6t-A-488}$

bestemmes til 55 ± 36 . Denne verdien sammenlignet med $I_{\text{autofluorescens } 488}$, bekrefter at FG-6t-A-488 penetrerer SC og diffunderer ned i dermis. I sammenligning med resultatene for penetrasjon av alexa 488 SE, så er $I_{\text{FG-6t-A-488}}$ en lav intensitetsverdi. Altså penetrere FG-6t-C-488 huden i mindre grad enn alexa 488 SE. Dette er også forventet da $\bar{M}_w_{\text{FG-6t-A-488}} > \bar{M}_w_{\text{Alexa 488 SE}}$.

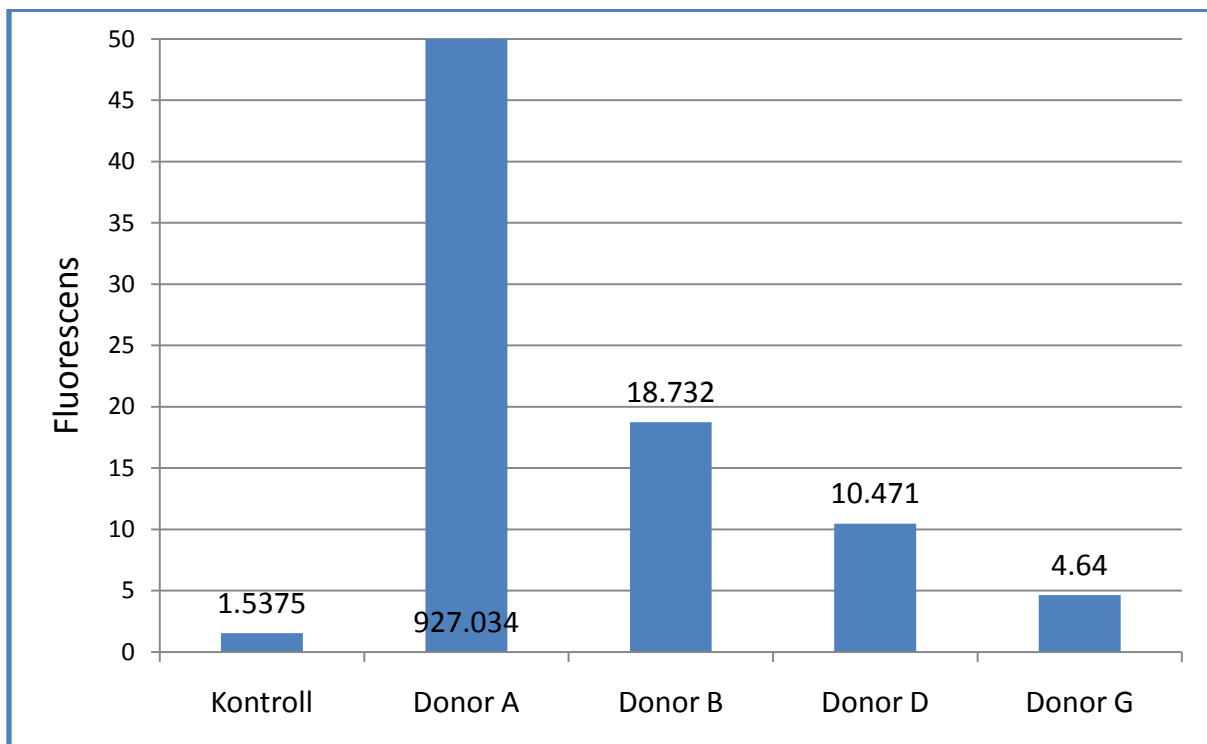
Siden resultatene fra donor A ligger i nærheten av $I_{\text{FG-6t-A-488}}$, sees det nærmere på dette systemet. Figur 3.31 viser KLSM bilder, intensitetsfordelingen inn i vevet, tredimensjonal fremstilling av intensiteten i bildet og frekvensen av de ulike intensitetsverdiene for penetrasjon av FG-6t-A-488 for donor A. Resultater for resterende donorer er gitt på vedlagt cd.



Figur 3.31: Resultater for penetrasjon av FG-6t-A-488 i hud fra donor A. Alle resultater er funnet fra KLSM bildet vist i A. A) KLSM bildet viser fluorescensen i vevet. B) Intensiteten som funksjon av dybde i vevet. C) Gjennomlysningsbildet viser strukturen i vevet. D) Tredimensjonal kurve som viser intensitetsfordelingen i bildet. E) Frekvensen av de ulike intensitetsverdiene (0-255).

Figur 3.31. A, B og D viser at noe FG-6t-A-488 penetrerer SC og diffunderer ned i dermis. Men ved å sammenligne disse figurene med figur 3.31.C ser det ut som det er en brett helt til venstre i vevet. Dette har antageligvis gjort fluorescensintensiteten kunstig høyt for denne donoren. Figur 3.31.E viser at flest pikser har en intensitet mellom 25 og 75. Ved å se på figur 3.31.B ser det ut som fluorescensintensiteten stiger jevnt innover i vevet. I slike tilfeller ville det være interessant å ta flere KLSM bilder av dermis, dypere i vevet, for å se hvordan fluorescensen er i dette området.

Figur 3.32 viser detektert fluorescens i reseptorfase for de ulike hudforsøkene gjennomført med FG-6t-A-488.



Figur 3.32: Detektert fluorescens i reseptorfase for hudpenetrasjonsforsøkene gjennomført med FG-6t-A-488 på forbehandlet hud fra donorer A, B, D og G. Kontroll angir gjennomsnittlig fluorescens i reseptorfase ved påført kontrollprøve for disse fire donorene.

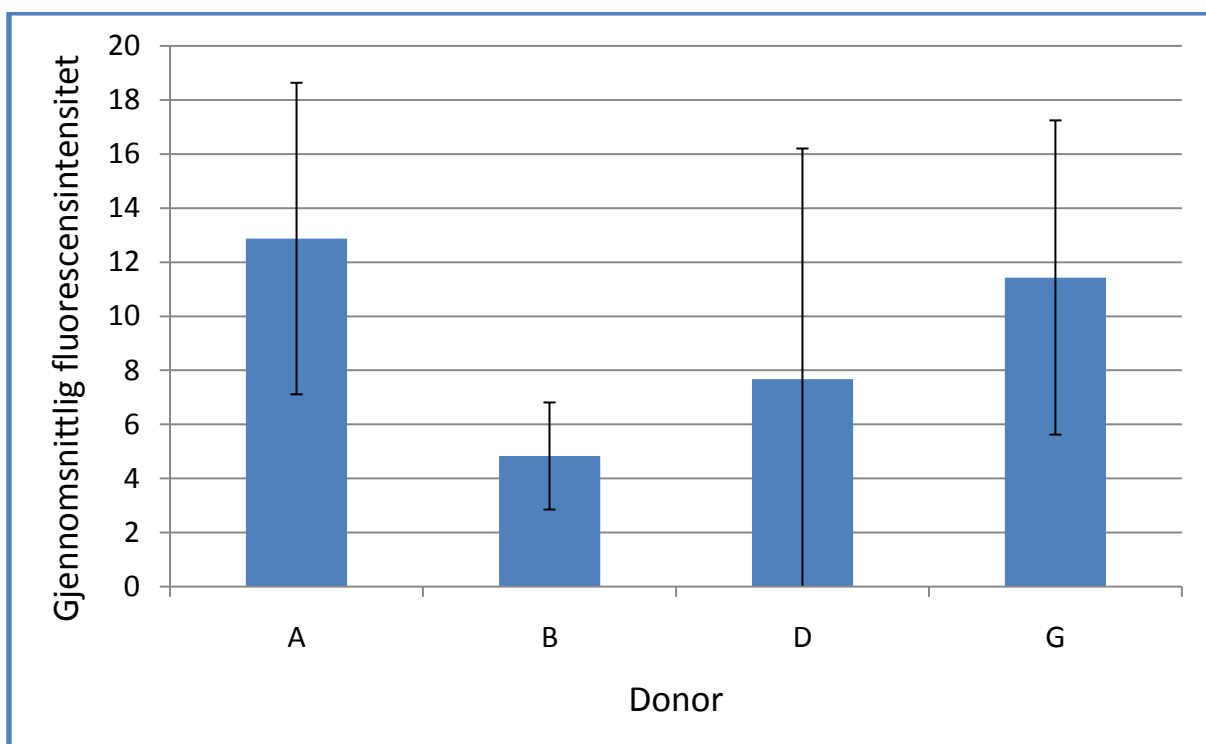
Fra figur 3.32 ser det ut som FG-6t-A-488 har diffundert gjennom dermis og ned i reseptorfase for samtlige donorer. Som forklart for FG-2t-A-488 og FG-2t-C-488 ser det

også ut som at for donor A har mye fluorescensmerket FG-peptider havnet i reseptorfasen, samtidig som det er detektert en relativt lav gjennomsnittlig fluorescensintensitet. Dette kan skyldes god kontakt mellom hudbiten og reseptorfasen og lite elektrostatiske interaksjoner mellom de fluorescensmerkede peptidene og ekstracellulær matriks. Dette kan også sees ved å se på figur 3.31.B som viser en økende intensitet dypere inn i vevet. En så høy fluorescens i reseptorfasen kan også skyldes søl eller fritt alexa.

Ut fra disse resultatene kan det se ut som FG-6t-A-488 med $\bar{M}_w = 1,7$ kDa penetrerer SC og diffunderer ned i dermis og videre ned i reseptorfasen.

FG-6t-C-488

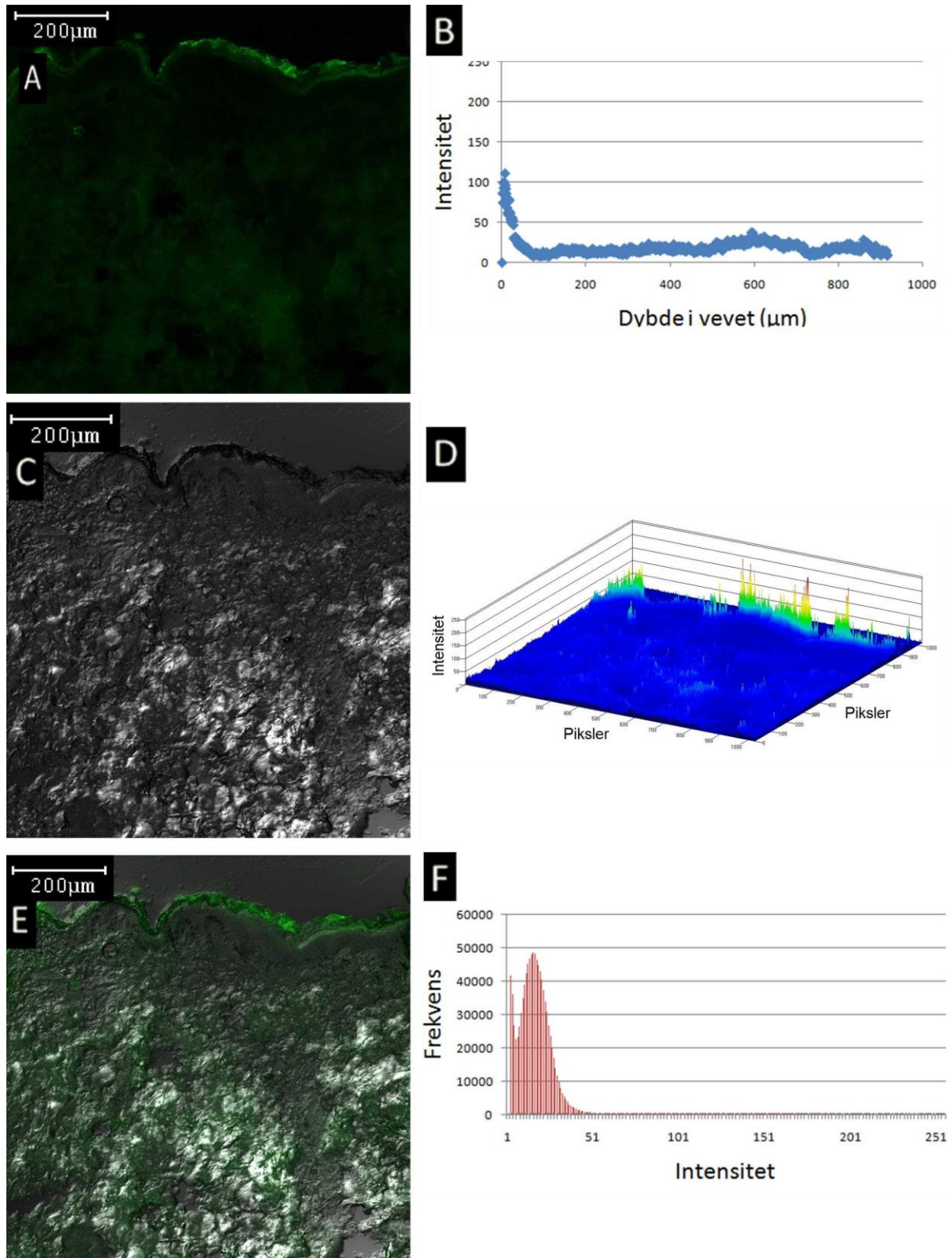
Figur 3.33 viser gjennomsnittlig fluorescensintensitet for hudpenetrasjonsforsøk utført med FG-6t-C-488 på forbehandlet hud fra donor A, B, D og G.



Figur 3.33: Gjennomsnittlig fluorescensintensitet og standardavvik for hudpenetrasjonsforsøk utført med FG-6t-C-488 på forbehandlet hud fra donor A, B, D og G.

Figur 3.33 viser lite variasjoner i resultatmaterialet. Intensiteten varierer mellom 5 og 13 for de ulike donorene. Gjennomsnittlig $I_{\text{FG-6t-C-488}}$ bestemmes til 9 ± 6 . En sammenligning med kontrollprøven, som ga en fluorescensintensitet på 2.82 ± 2.18 , bekrefter at FG-6t-C-488 i liten grad penetrerer SC og diffunderer ned i dermis. Som forventet ser FG-6t-C-488 ut til å penetrere huden i mindre grad enn alexa 488 SE. Dette er diskutert tidligere.

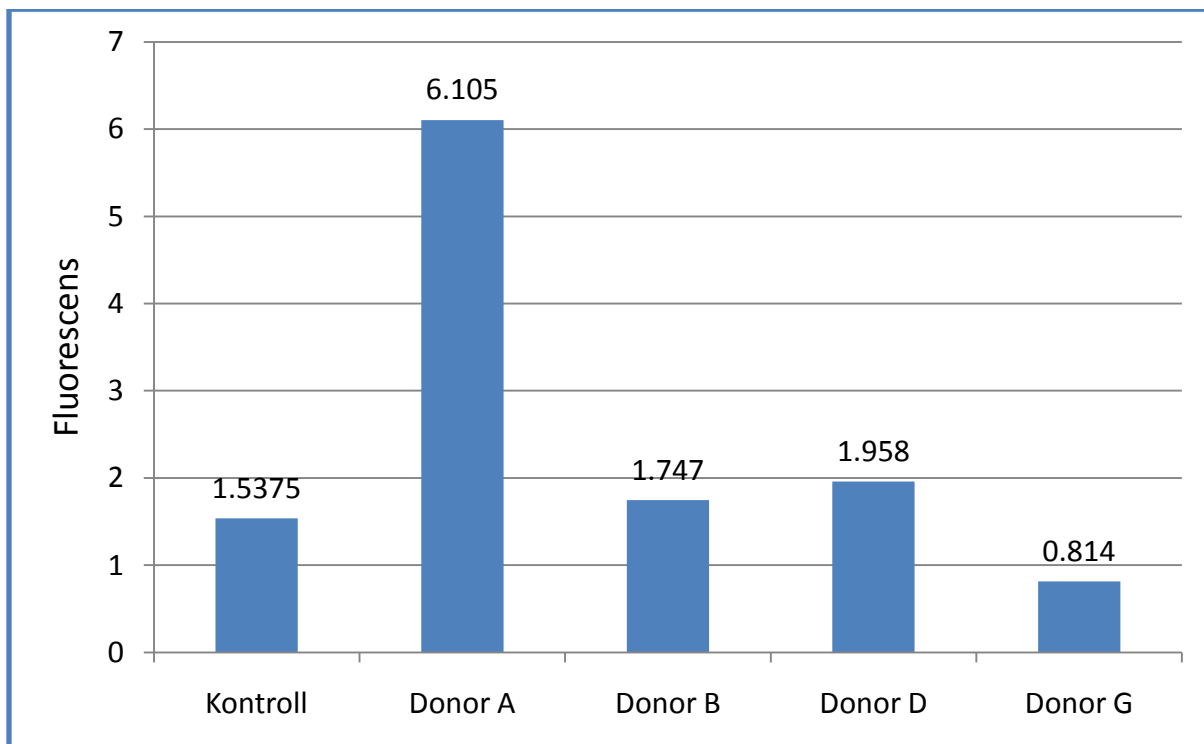
Siden resultatene fra donor G ligger i nærheten av $I_{\text{FG-6t-A-488}}$, sees det nærmere på dette systemet. Figur 3.34 viser KLSM bilder, intensitetsfordelingen inn i vevet, tredimensjonal fremstilling av intensiteten i bildet og frekvensen av de ulike intensitetsverdiene for penetrasjon av FG-6t-C-488 for donor G. Resultater for resterende donorer er gitt på vedlagt cd.



Figur 3.34: Resultater for penetrasjon av FG-6t-C-488 i hud fra donor A. Alle resultater er funnet fra KLSM bildet vist i A. A) KLSM bildet viser fluorescensen i vevet. B) Intensiteten som funksjon av dybde i vevet. C) Gjennomlysningsbildet viser strukturen i vevet. D) Tredimensjonal kurve som viser intensitetsfordelingen i bildet. E) Kombinasjon av A og C. F) Frekvensen av de ulike intensitetsverdiene (0-255).

Figur 3.34. A, B og D viser at litt fluorescensintensitet kan detekteres i dermis. Figur 3.34.C og E viser at det er noen ujevnheter og bretter i vevet som kan gi en forhøyet intensitet, men dette er nok ikke utslagsgivende for resultatene i dette tilfellet. Figur 3.34.F viser at de fleste pikslene har en intensitet mellom 10 og 40.

Figur 3.35 viser detektert fluorescens i reseptorfasen for de ulike hudforsøkene gjennomført med FG-6t-C-488.



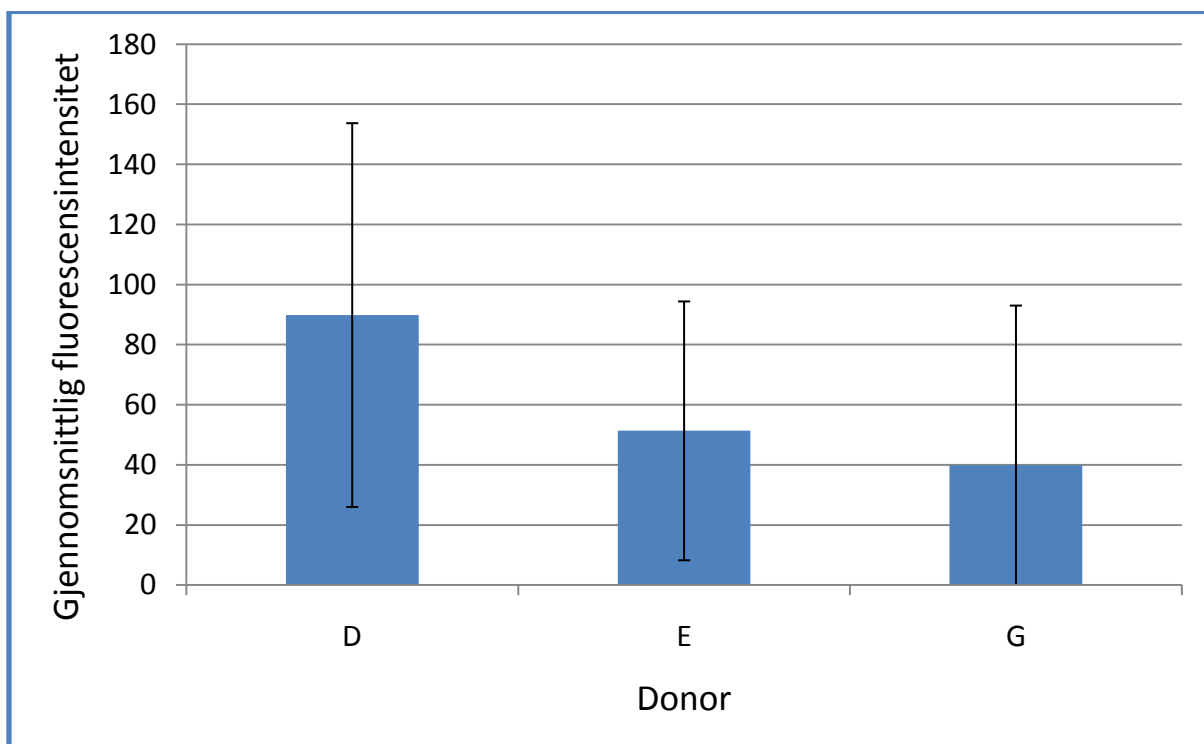
Figur 3.35: Detektert fluorescens i reseptorfasen for hudpenetrasjonsforsøkene gjennomført med FG-6t-C-488 på forbehandlet hud fra donor A, B, D og G. Kontroll angir gjennomsnittlig fluorescens i reseptorfasen ved påført kontrollprøve for disse fire donorene.

Figur 3.35 sett i sammenheng med figur 3.33 antyder at det kun er for donor A at det oppdages en penetrasjon av FG-6t-C-488 gjennom SC og en diffusjon ned i reseptorfasen. $\bar{M}_{w,FG-6t-C-488}$ er bare 500 Da større enn $\bar{M}_{w,FG-2t-A-488}$, altså forventes det at disse prøvene viser liknende egenskaper. Det er observert en bedre penetrasjon for FG-2t-A-488 enn for FG-6t-C-488. En grunn til at det observeres en lav fluorescensintensitet i vevet og SC, samt en lav fluorescens i reseptorfasen for FG-6t-C-488, kan skyldes merkningsgraden (se kap.

3.1.7). Det kan tydelig sees at merkningsgraden av FG-6t-C-488 er lav ved å sammenligne figur 3.32 med tilsvarende figurer i rapporten. SC vises ikke som en tydelig barriere, men ser mer diffus ut, noe som ikke er sett for noen av de andre forsøkene. Merkningsgraden er bare 0.0081. Noe som tilsvarer omtrent 2/5 av merkningsgraden til FG-2t-A-488. Dette kan gi en forklaring på hvorfor det detekteres mer fluorescens i vevet for hudpenetrasjonsforsøk utført med FG-2t-A-488 enn for FG-6t-A-488.

FG-18t-A-532

Figur 3.36 viser gjennomsnittlig fluorescensintensitet for hudpenetrasjonsforsøk utført med FG-18t-A-532 på forbehandlet hud fra donor D, E og G.

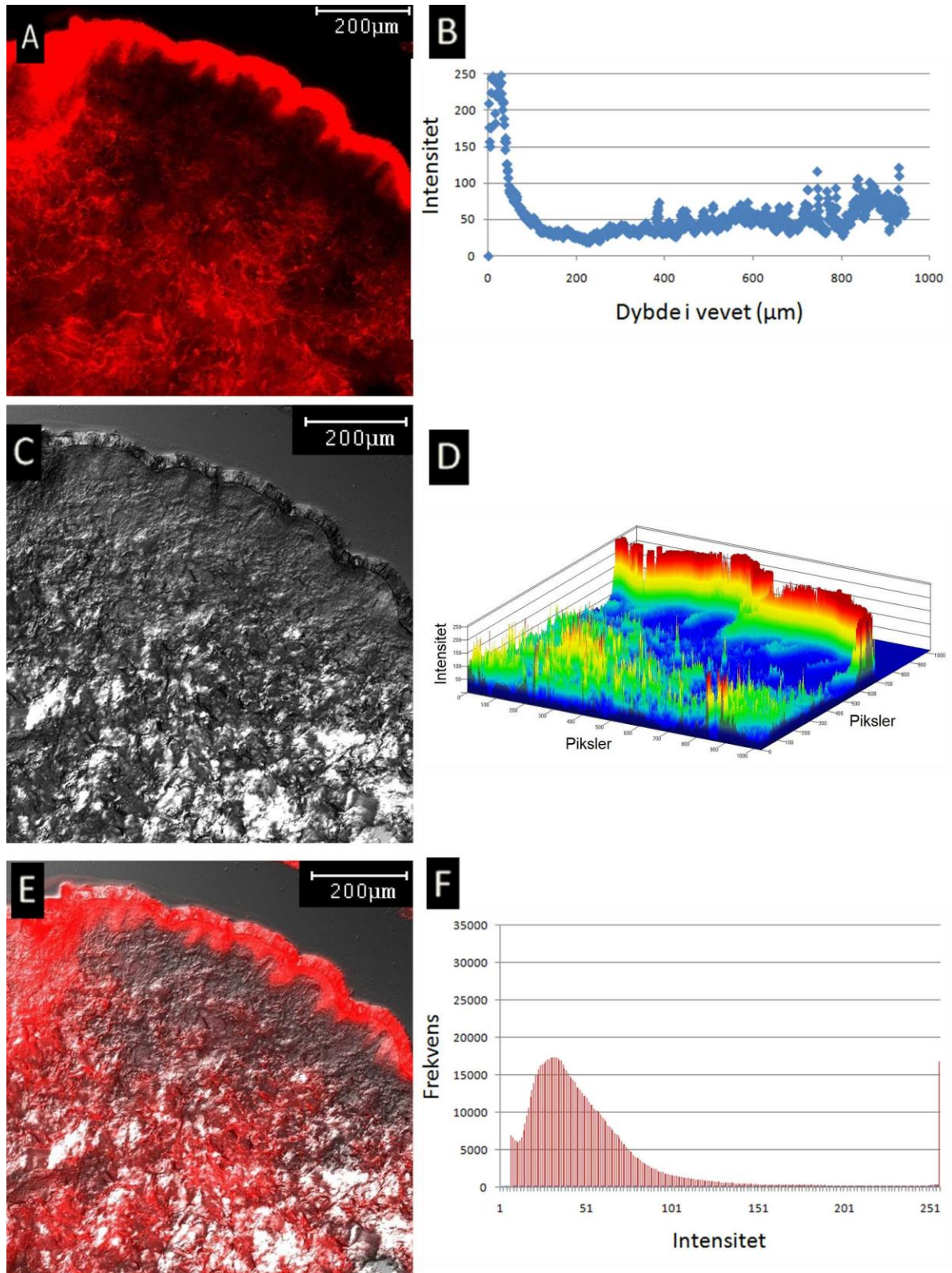


Figur 3.36: Gjennomsnittlig fluorescensintensitet og standardavvik for hudpenetrasjonsforsøk utført med FG-18t-A-532 på hud fra donor D, E og G.

Figur 3.36 viser litt variasjoner i resultatmaterialet. Intensiteten varierer mellom 40 og 90 for de ulike donorene. Dette kan skyldes individuelle forskjeller eller ulik utførelse av forsøket som diskutert tidligere og i kap. 3.2.7. Gjennomsnittlig $I_{\text{FG-18t-A-532}}$ bestemmes til 60 ± 53 . En

sammenligning med kontrollprøven, som ga en fluorescensintensitet på 0.4 ± 0.69 , bekrefter at FG-18t-A-532 penetrerer SC og diffunderer ned i den levende delen av huden. Hvis $I_{\text{FG-18t-A-532}}$ sammenlignes med resultatene for penetrasjon av alexa 532 SE, så er dette en lav intensitetsverdi. Altså penetrere FG-18t-A-532 huden i mindre grad enn alexa 532 SE. Dette er også forventet da $\bar{M}_w_{\text{FG-18t-A-532}} > M_w_{\text{Alexa 532 SE}}$.

Siden resultatene fra donor E ligger i nærheten av $I_{\text{FG-18t-A-532}}$, sees det nærmere på dette systemet. Figur 3.37 viser KLSM bilder, intensitetsfordelingen inn i vevet, tredimensjonal fremstilling av intensiteten i bildet og frekvensen av de ulike intensitetsverdiene for penetrasjon av FG-18t-A-532 for donor E. Resultater for resterende donorer er gitt på vedlagt cd.

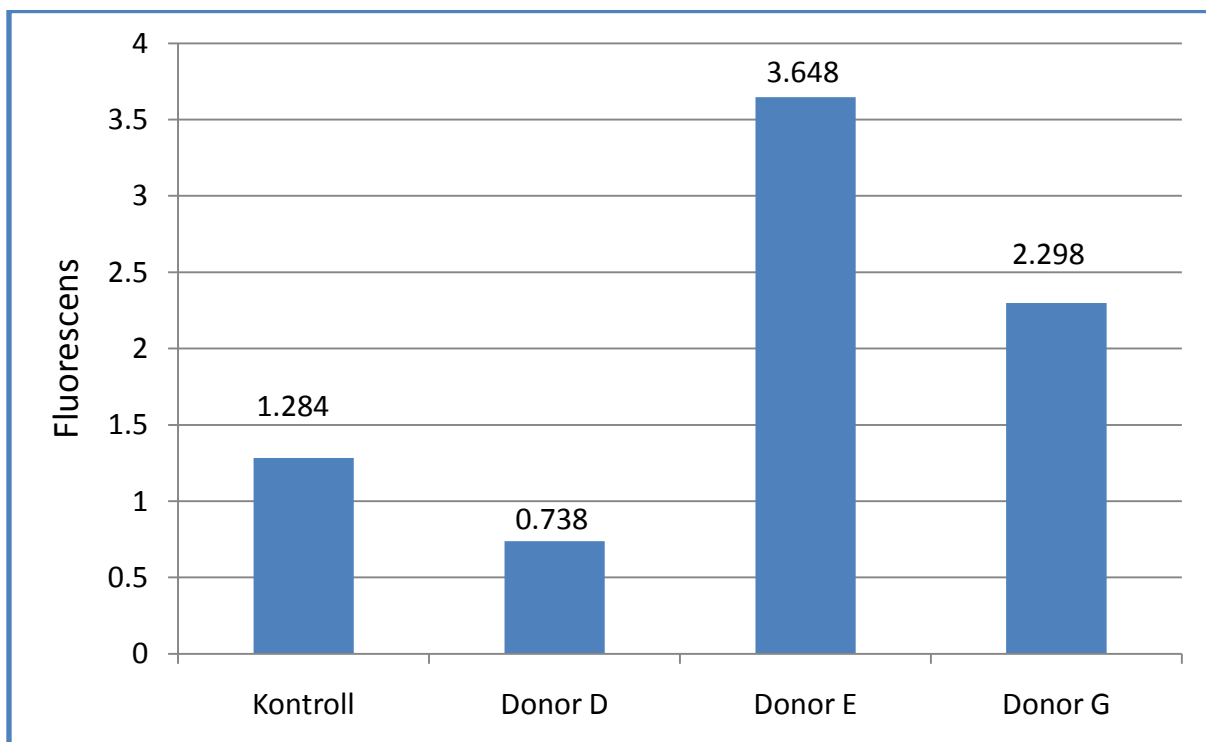


Figur 3.37: Resultater for penetrasjon av FG-18t-A-532 i hud fra donor E. Alle resultater er funnet fra KLSM bildet vist i A. A) KLSM bildet viser fluorescensen i vevet. B) Intensiteten som funksjon av dybde i vevet. C) Gjennomlysningsbildet viser strukturen i vevet. D) Tredimensjonal kurve som viser intensitetsfordelingen i bildet. E) Kombinasjon av A og C. F) Frekvensen av de ulike intensitetsverdiene (0-255).

Figur 3.37.A, B, D og E viser tydelig at deler av FG-18t-532 penetrerer epidermis og diffunderer ned i dermis. Ut fra figur 3.37.C og E ser det ut som det kan være en brett øverst i venstre hjørne. Dette vil i så fall gi en høyere intensitetsverdi enn hva som er tilfellet. Figur 3.37.F viser at flest piksler i bildet har en intensitet på mellom 30 og 60. Det sees tydelig at det bindes lite eller ingen FG-18t-A-532 til øvre del av dermis. Dette skyldes et fenomen diskutert i begynnelsen av kap. 3.2.

Ved å se på figur 3.25.B ser det ut som fluorescensintensiteten øker jevnt nedover i vevet. Det kan derfor forventest at det finnes mer fluorescensmerket FG-peptid som er elektrostatisk bundet til komponenter i ekstracellulær matriks dypere i dermis, og eventuelt ned i reseptorfase.

Figur 3.38 viser detektert fluorescens i reseptorfase for de ulike hudforsøkene gjennomført med FG-18t-A-532.

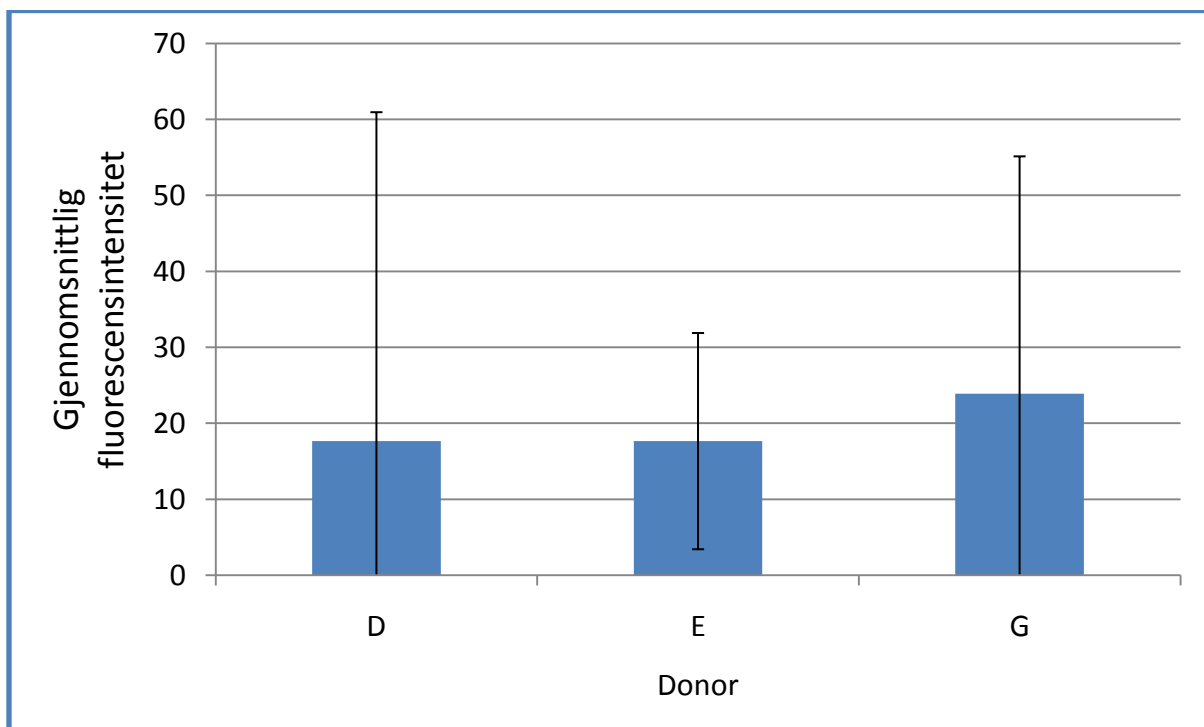


Figur 3.38: Detektert fluorescens i reseptorfase for hudpenetrasjonsforsøkene gjennomført med FG-18t-A-532 på forbehandlet hud fra donor D, E og G. Kontroll angir gjennomsnittlig fluorescens i reseptorfase ved påført kontrollprøve for disse tre donorene.

Akkurat som forventet ut fra figur 3.37, viser figur 3.38 en forhøyet fluorescens i reseptorfasen for donor E. Det vises også en forhøyet fluorescens for donor G, som var den donoren med minst detektert fluorescensintensitet i vevet for FG-18t-A-532. For donor G kan en lav fluorescensintensitet være detektert siden det meste av det fluorescensmerkede FG-peptidene har havnet i reseptorfasen og lengre nede i dermis, som diskutert tidligere. Det samme kan forklare den høye fluorescensintensiteten for donor D. Her kan FG-18t-A-532 fortsatt være elektrostatisk bundet i øverste del i dermis, og dermed gi høy vevs intensitet og lav fluorescens i reseptorfasen. Grunnen til at den samme prøven kan bruke ulik tid på penetrasjon og diffusjon i vevet, kan skyldes individuelle forskjeller fra donor til donor. Ulikt fettinnhold og tykkelsen i huden samt mengde hår, er faktorer som spiller inn. Dette er videre diskutert i kap. 3.2.7.

FG-18t-C-532

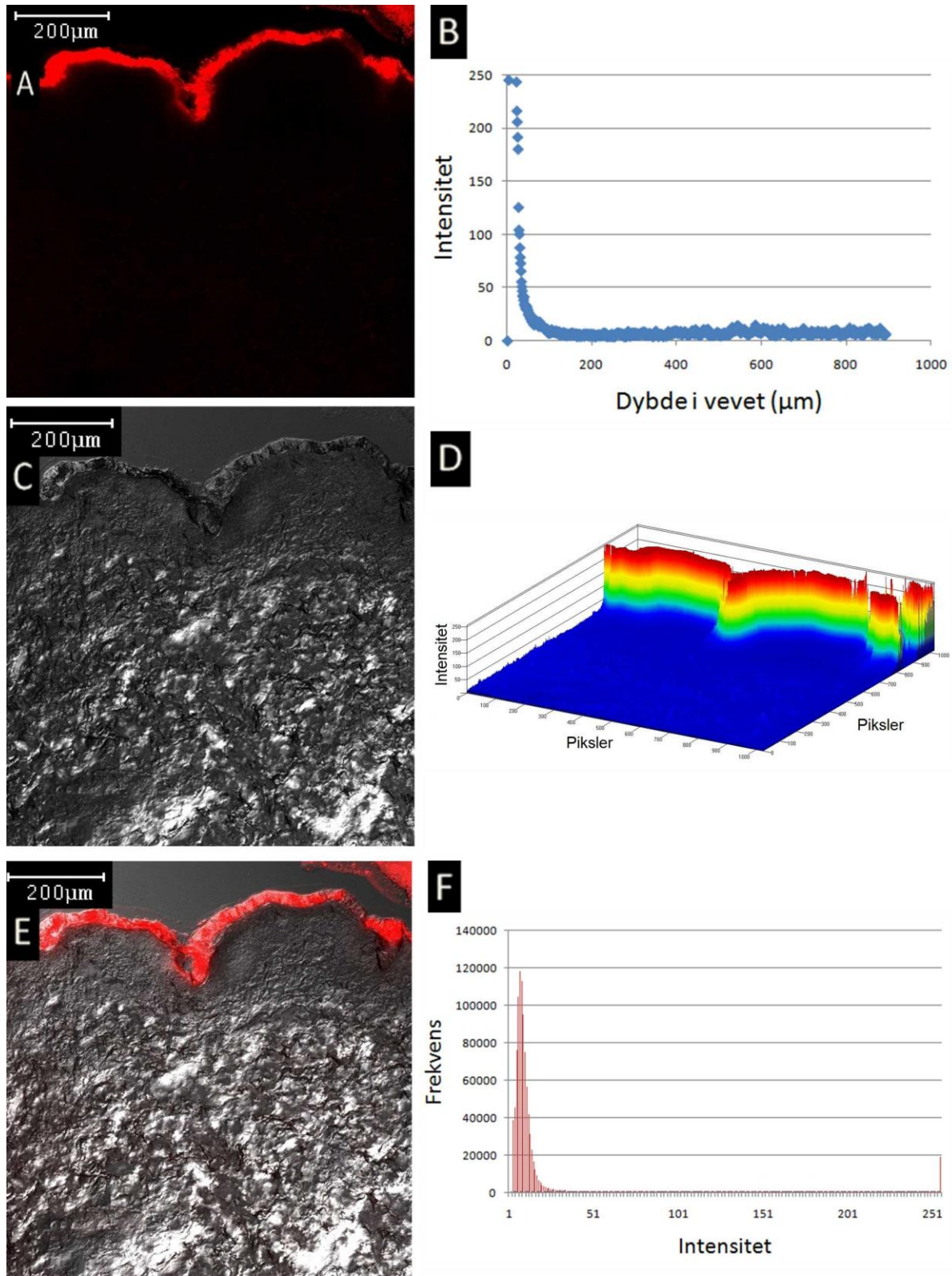
Figur 3.39 viser gjennomsnittlig fluorescensintensitet for hudpenetrasjonsforsøk utført med FG-18t-C-532 på forbehandlet hud fra donor D, E og G.



Figur 3.39: Gjennomsnittlig fluorescensintensitet og standardavvik for hudpenetrasjonsforsøk utført med FG-18t-C-532 på forbehandlet hud fra donor D, E og G.

Figur 3.39 viser lite variasjoner i resultatmaterialet. Intensiteten varierer mellom 19 og 24 for de ulike donorene. Gjennomsnittlig $I_{\text{FG-18t-C-532}}$ bestemmes til 20 ± 30 . Denne verdien sammenlignet med $I_{\text{autofluorescens 532}}$, bekrefter at noe FG-18t-C-532 penetrerer SC og diffunderer ned i dermis. I sammenligning med resultatene for penetrasjon av alexa 532 SE, så er $I_{\text{FG-18t-C-532}}$ en lav intensitetsverdi. Altså penetrere FG-6t-A-488 huden i mindre grad enn alexa 532 SE, som forventet fra molekylvekten.

Siden resultatene fra donor D ligger i nærheten av $I_{\text{FG-18t-C-532}}$, sees det nærmere på dette systemet. Figur 3.40 viser KLSM bilder, intensitetsfordelingen inn i vevet, tredimensjonal fremstilling av intensiteten i bildet og frekvensen av de ulike intensitetsverdiene for penetrasjon av FG-18t-C-532 for donor D. Resultater for resterende donorer er gitt på vedlagt cd.

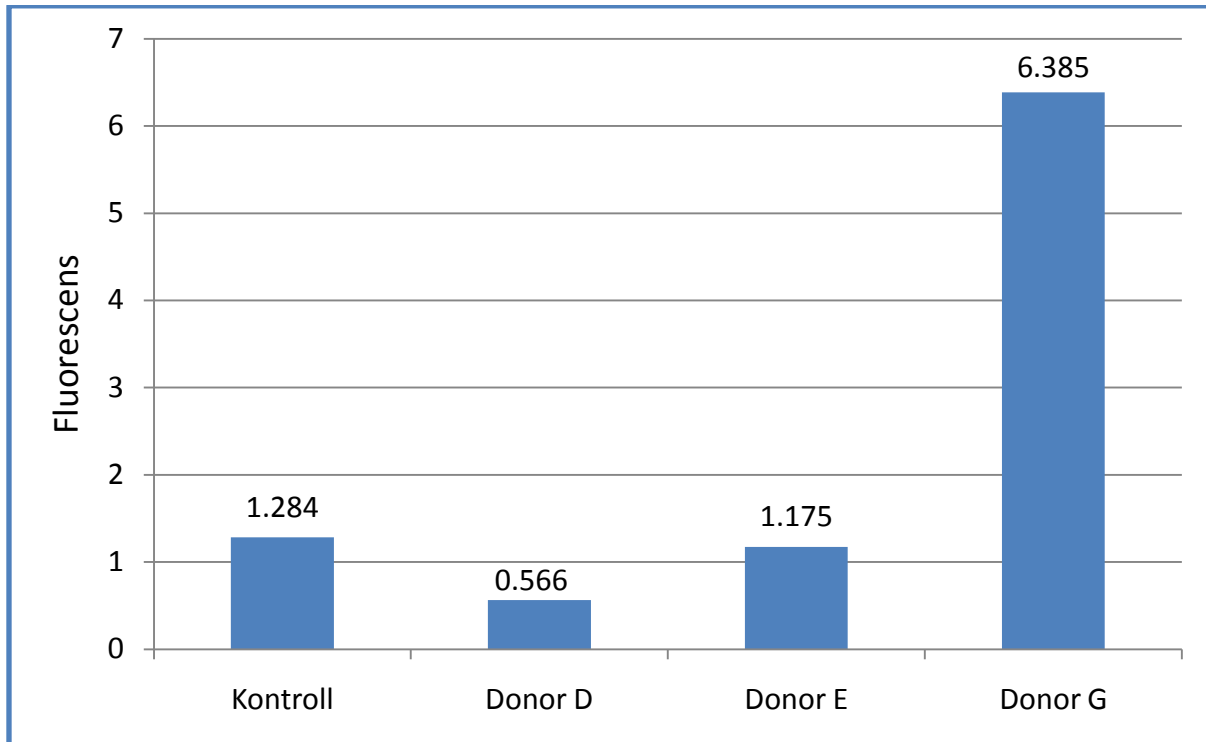


Figur 3.40: Resultater for penetrasjon av FG-18t-C-532 i hud fra donor D. Alle resultater er funnet fra KLSM bildet vist i A. A) KLSM bildet viser fluorescensen i vevet. B) Intensiteten som funksjon av dybde i vevet. C) Gjennomlysningsbildet viser strukturen i vevet. D) Tredimensjonal kurve som viser intensitetsfordelingen i bildet. E) Kombinasjon av A og C. F) Frekvensen av de ulike intensitetsverdiene (0-255).

Figur 3.40 A, B, D og E viser lite fluorescensintensitet i dermis. Størsteparten av intensiteten finnes i SC og epidermis. Dette tyder på at svært lite eller ingen FG-18t-C-532 er i stand til å penetrere SC og diffundere ned i dermis. Figur 3.40.C viser at det er noen ujevnheter i vevet, men i dette tilfellet har dette nok ikke noen innvirkninger. Figur 3.40.F viser at det er flest piksler med en intensitet mellom 1 og 15. Dette er lave intensiteten som tyder på lite detektert fluorescens. $\bar{M}w_{FG-18t-C-532}$ er 1.7 kDa, noe som ikke skiller så mye fra $\bar{M}w_{FG-2t-A-488}$ (=2.0 kDa). Selv om disse to prøvene har omtrent lik molekylvekt, er det detektert nokså ulik gjennomsnittlig fluorescensintensitet i vevet. Dette kan ikke skyldes merkningsgraden (kap. 3.1.7), siden disse varierer lite. Det er mer sannsynlig at forskjellen i fluorescensintensitet skyldes fraksjonen med høymolekylære og lavmolekylære peptider i prøven. FG-18t-C har 40 prosent av prøvene med $Mw = 3320$ Da (kap. 3.1.3), mens resterende del har $Mw = 691$ Da. For FG-2t-A-488, derimot, er Mw for 28 % av prøven kalkulert til 5280 Da, mens resterende del har $Mw = 681$ Da. Altså vil FG-2t-A-488 bestå av flere lavmolekylære peptider og dermed gi en høyere fluorescensintensitet i vevet enn FG-18t-C-532. Dessuten bør det tas i betraktning at KLSM bilder for FG-2t-A-488 og FG-18t-C-532 er tatt med ulike innstillinger og lasere (kap. 2.7.2), og kan dermed ikke sammenlignes direkte.

Det er også logisk å sammenligne FG-18t-C-532 med FG-6t-A-488. Disse to prøvene har begge en gjennomsnittlig molekylvekt på 1.7 kDa. Ut fra kapitlet om FG-6t-A-488 ser det ut som om denne prøven penetrerer bedre enn FG-18t-C-532. Dette kan skyldes at FG-18t-C-488 har en lavere merkningsgrad og en høyere andel høymolekylære peptider enn hva FG-6t-A-488 har.

Figur 3.41 viser detektert fluorescens i reseptorfasen for de ulike hudforsøkene gjennomført med FG-18t-C-532.



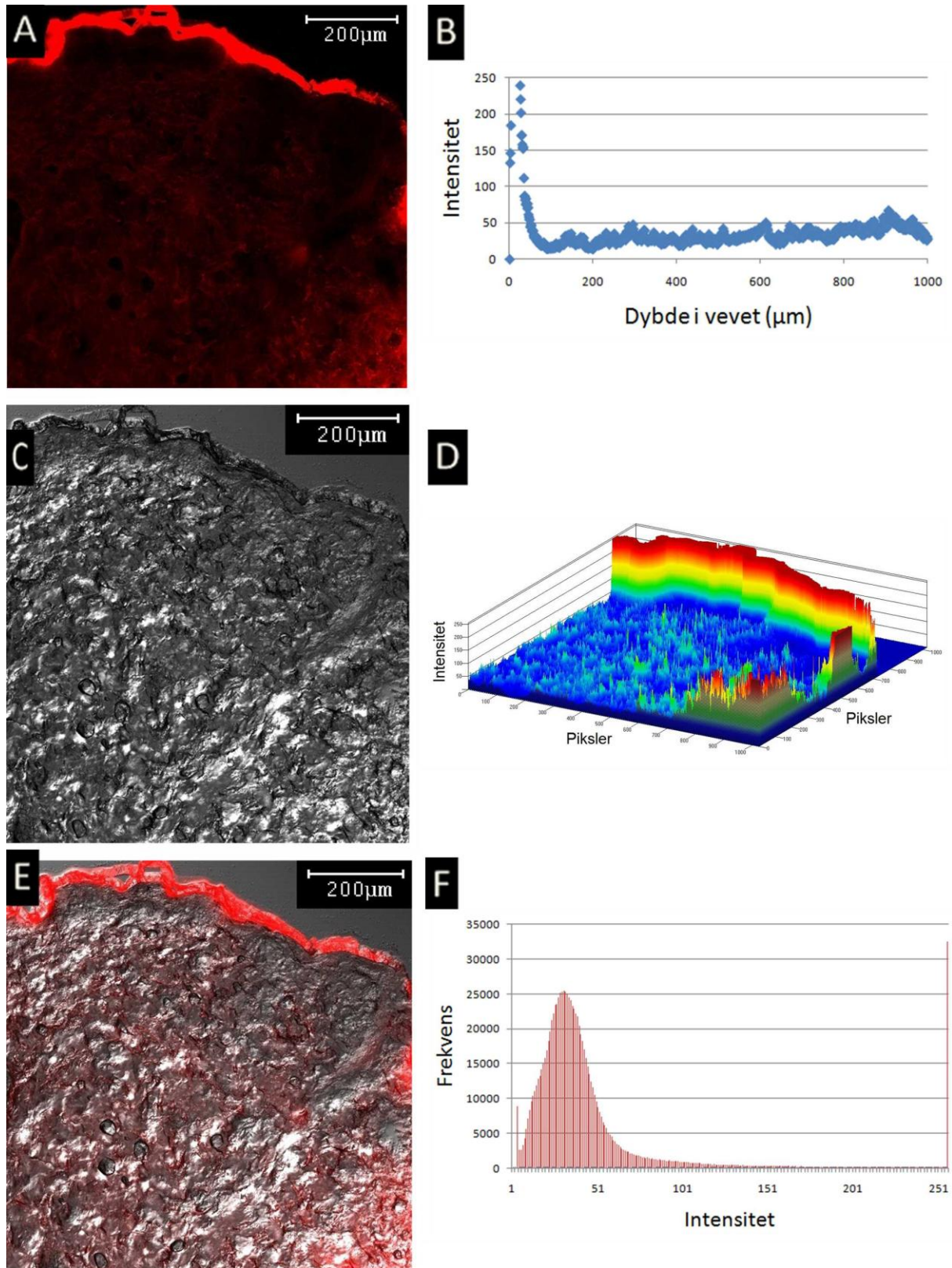
Figur 3.41: Detektert fluorescens i reseptorfase for hudpenetrasjonsforsøkene gjennomført med FG-18t-C-532 på forbehandlet hud fra donorer D, E og G. Kontroll angir gjennomsnittlig fluorescens i reseptorfase ved påført kontrollprøve for disse tre donorene.

Fra figur 3.39 sees en forhøyet fluorescens detektert i reseptorfase for donorer G. Dette var den donoren med høyest fluorescensintensitet i vevet (figur 3.39). Dette kan bety at det har foregått en penetrasjon gjennom SC og en diffusjon nedover i dermis og reseptorfase. For donorer D og E ser det ikke ut som noe fluorescens kan detekteres i reseptorfase. Individuelle forskjeller mellom donorer eller ulik bruk av mikronålene kan gi en forklaring på variasjonene i forsøket (se kap. 3.2.7).

FG-24t-A-532

Hudpenetrasjonsforsøk med påføring av FG-24t-A-532 ble bare gjennomført en gang, pga. vanskeligheter med å få merket FG-24t-A prøven (se kap. 3.1.1). Gjennomsnittlig $I_{\text{FG-24t-A-532}}$ bestemmes til 46 ± 48 . En sammenligning med kontrollprøven, som ga en fluorescensintensitet på 0.40 ± 0.69 , bekrefter at alexa 532 SE penetrerer SC og diffunderer ned i den levende delen av huden. I sammenligning med resultatene for penetrasjon av alexa 532 SE, så er $I_{\text{FG-24t-A-532}}$ en lav intensitetsverdi. Altså penetrere FG-24t-A-532 huden i mindre grad enn alexa 532 SE. Dette er også forventet da $\bar{M}_w_{\text{FG-24t-C-532}} > M_{w_{\text{Alexa 532 SE}}}$.

Figur 3.42 viser KLSM bilder, intensitetsfordelingen inn i vevet, tredimensjonal fremstilling av intensiteten i bildet og frekvensen av de ulike intensitetsverdiene for penetrasjon av FG-18t-C-532 for donor D.



Figur 3.42: Resultater for penetrasjon av FG-24t-A-532 i hud fra donor D. Alle resultater er funnet fra KLSM bildet vist i A. A) KLSM bildet viser fluorescensen i vevet. B) Intensiteten som funksjon av dybde i vevet. C) Gjennomlysningsbildet viser strukturen i vevet. D) Tredimensjonal kurve som viser intensitetsfordelingen i bildet. E) Kombinasjon av A og C. F) Frekvensen av de ulike intensitetsverdiene (0-255).

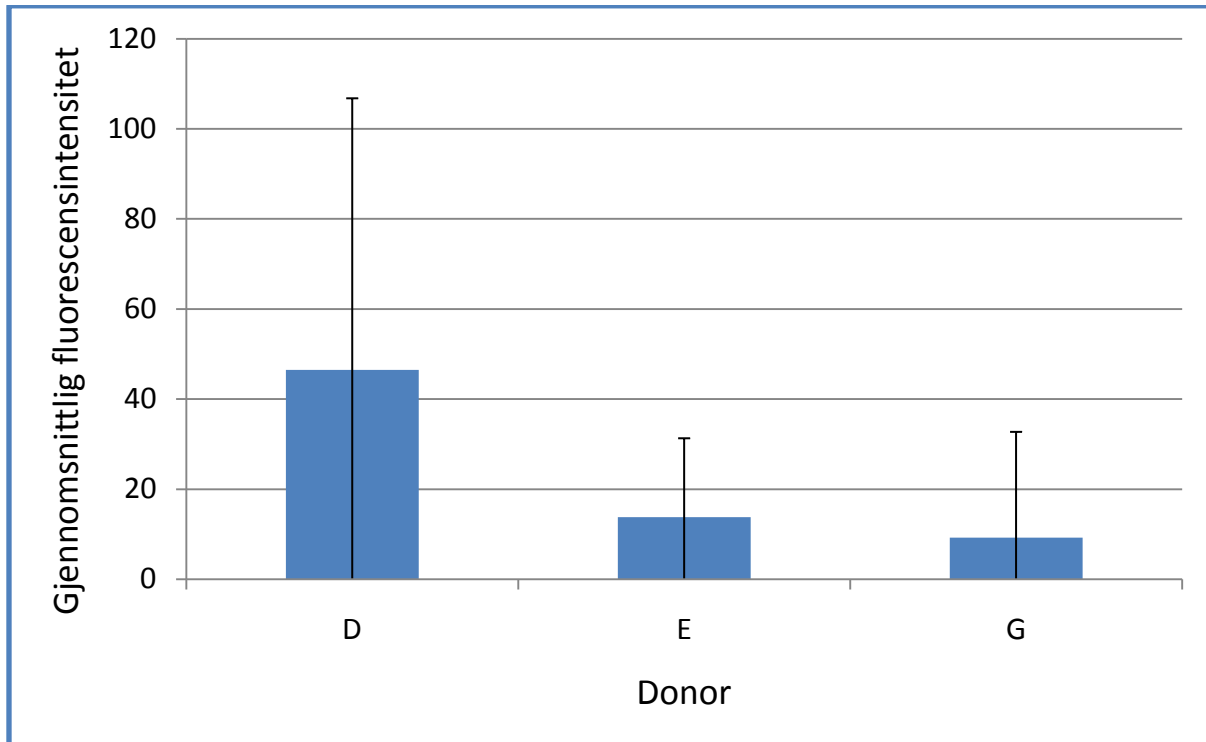
Figur 3.42. A, B, D og E viser at noe av FG-24t-A-532 har penetrert SC og diffundert ned i dermis. Figur 3.42 D viser at det finnes noen ujevnheter i vevet som kan forårsake kunstig høye intensitetsverdier. Figur 3.42. F viser at de fleste pikslene i bildet har en intensitet på mellom 20 og 50.

FG-24t-A-532 er den prøven med lavest detektert \bar{M}_w (= 0.9 kDa). Dette betyr at det vil forventes en god penetrasjon og diffusjon av prøven. Dette spesielt siden bare 12 % av prøven har en M_w = 2760 Da, mens resterende del har M_w = 656 Da. Det detekteres ikke noe høy fluorescensintensitet i forhold til de andre prøvene. Det er vanskelig å komme med en grunn for dette, da det bare er gjennomført en parallell av forsøket. Eventuelt kan dette skyldes den ukjente merkningsgraden.

Fluorescensen i reseptorfasen ble kalkulert lavere enn for kontrollprøven. Altså kan det ikke konkluderes med at noe av prøven har havnet i reseptorfasen.

FG-24t-C-532

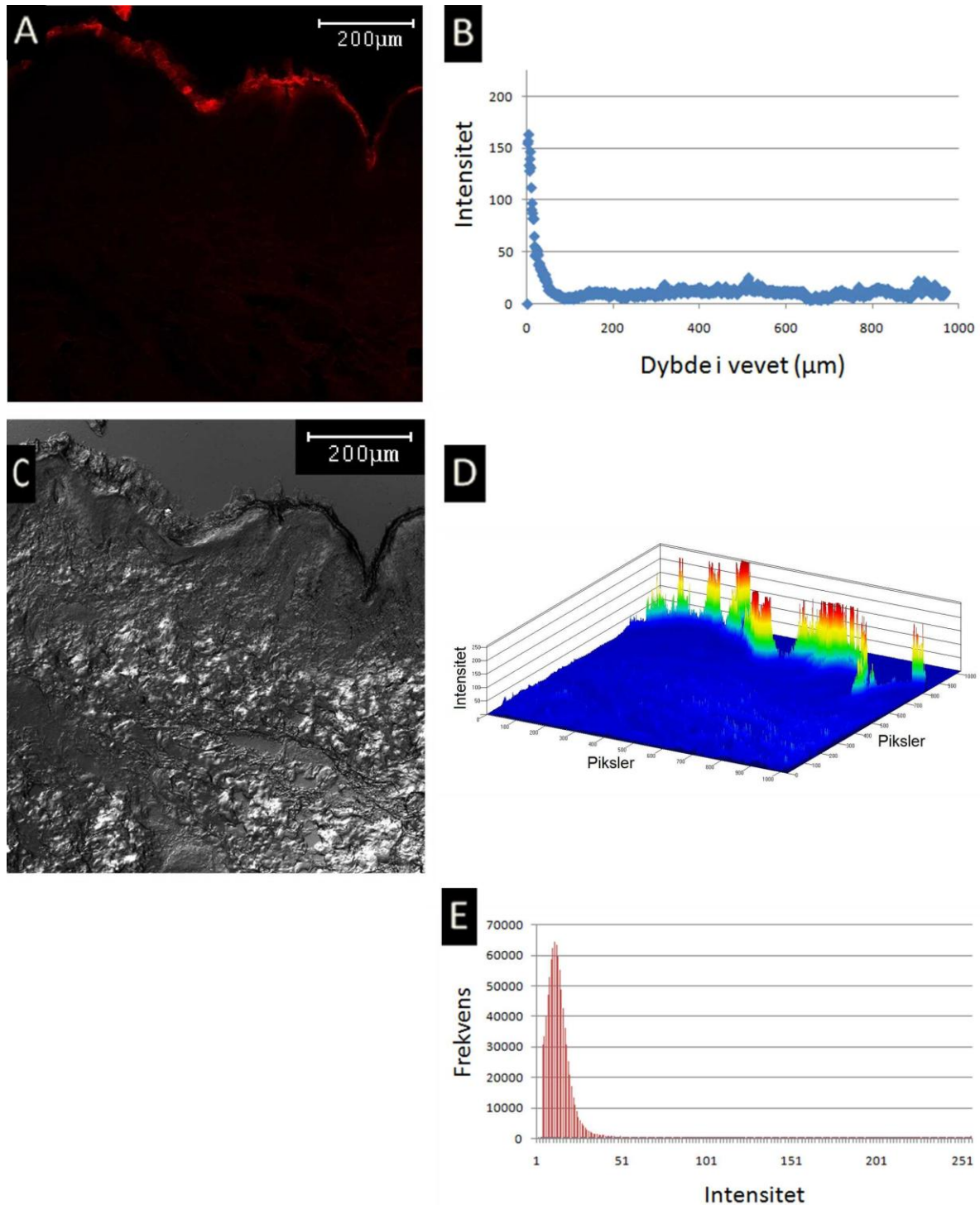
Figur 3.43 viser gjennomsnittlig fluorescensintensitet for hudpenetrasjonsforsøk utført med FG-24t-C-532 på forbehandlet hud fra donor D, E og G.



Figur 3.43: Gjennomsnittlig fluorescensintensitet og standardavvik for hudpenetrasjonsforsøk utført med FG-18t-C-532 på forbehandlet hud fra donorer D, E og G.

Figur 3.43 viser litt variasjoner i resultatmaterialet. Intensiteten varierer mellom 10 og 47 for de ulike donorene. Dette kan skyldes ulikheter fra donor til donor som for eksempel hudtykkelse osv. Flere grunner til variasjoner i målingene er diskutert i kap 3.2.7. Gjennomsnittlig $I_{FG-24t-C-532}$ bestemmes til 23 ± 34 . En sammenligning med kontrollprøven, som ga en fluorescensintensitet på 0.40 ± 0.69 , bekrefter at FG-18t-C-532 penetrerer SC og diffunderer ned i den levende delen av huden. I sammenligning med resultatene for penetrasjon av alexa 532 SE, så er $I_{FG-24t-C-532}$ en lav intensitetsverdi. Altså penetrerer FG-24t-C-532 huden i mindre grad enn alexa 532 SE. Dette er også forventet da $\bar{M}_w_{FG-18t-C-532} > M_{w_{Alexa\ 532\ SE}}$.

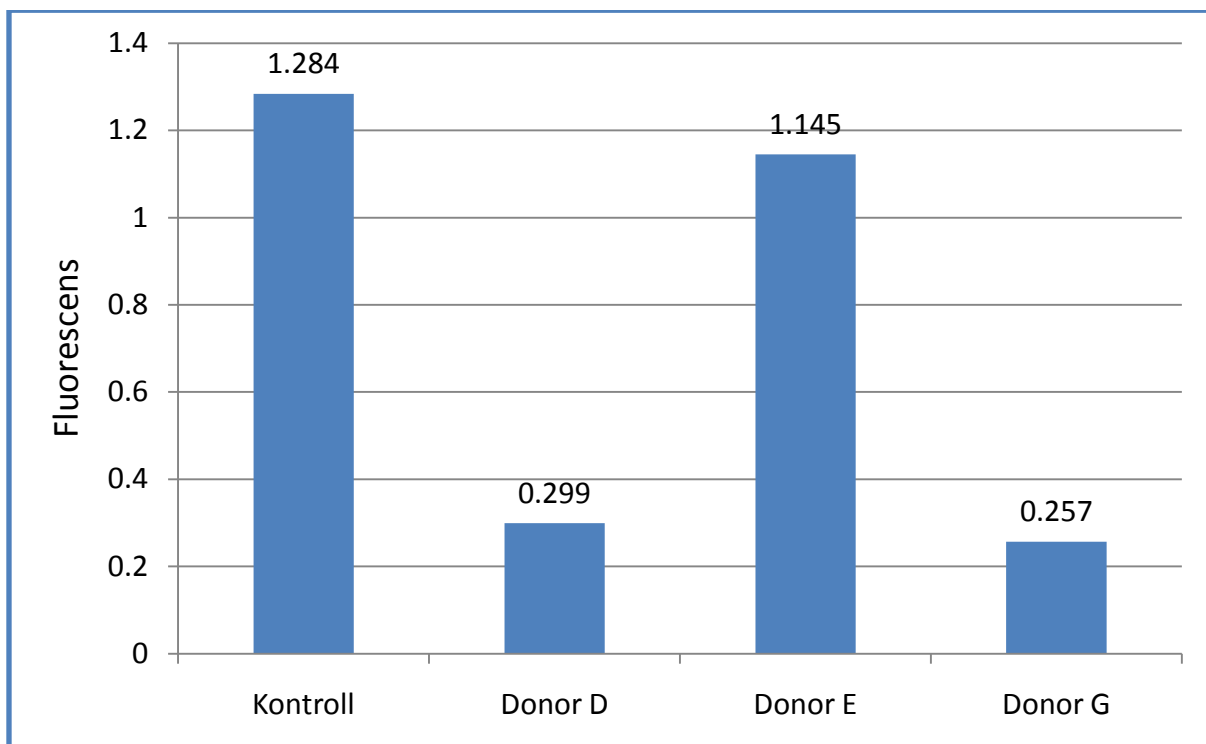
Siden resultatene fra donor E ligger i nærheten av gjennomsnittet, sees det nærmere på dette systemet. Figur 3.44 viser KLSM bilder, intensitetsfordelingen inn i vevet, tredimensjonal fremstilling av intensiteten i bildet og frekvensen av de ulike intensitetsverdiene for penetrasjon av FG-18t-C-532 for donor E. Resultater for resterende donorer er gitt på vedlagt cd.



Figur 3.44: Resultater for penetrasjon av FG-18t-A-532 i hud fra donor E. Alle resultater er funnet fra KLSM bildet vist i A. A) KLSM bildet viser fluorescensen i vevet. B) Intensiteten som funksjon av dybde i vevet. C) Gjennomlysningsbildet viser strukturen i vevet. D) Tredimensjonal kurve som viser intensitetsfordelingen i bildet. E) Frekvensen av de ulike intensitetsverdiene (0-255).

Figur 3.44. A, B og D viser at det detekteres litt fluorescensintensitet i vevet, men det meste detekteres i epidermis. Figur 3.44.C viser noen bretter og ujevnheter som kan forårsake den lille intensiteten som vises i dermis. Det ser uansett ut som om lite FG-24t-C-532 penetrerer SC. Figur 3.44.E viser at flest piksler har en intensitet på mellom 5 og 20.

Figur 3.45 viser detektert fluorescens i reseptorfasen for de ulike hudforsøkene gjennomført med FG-24t-C-532.



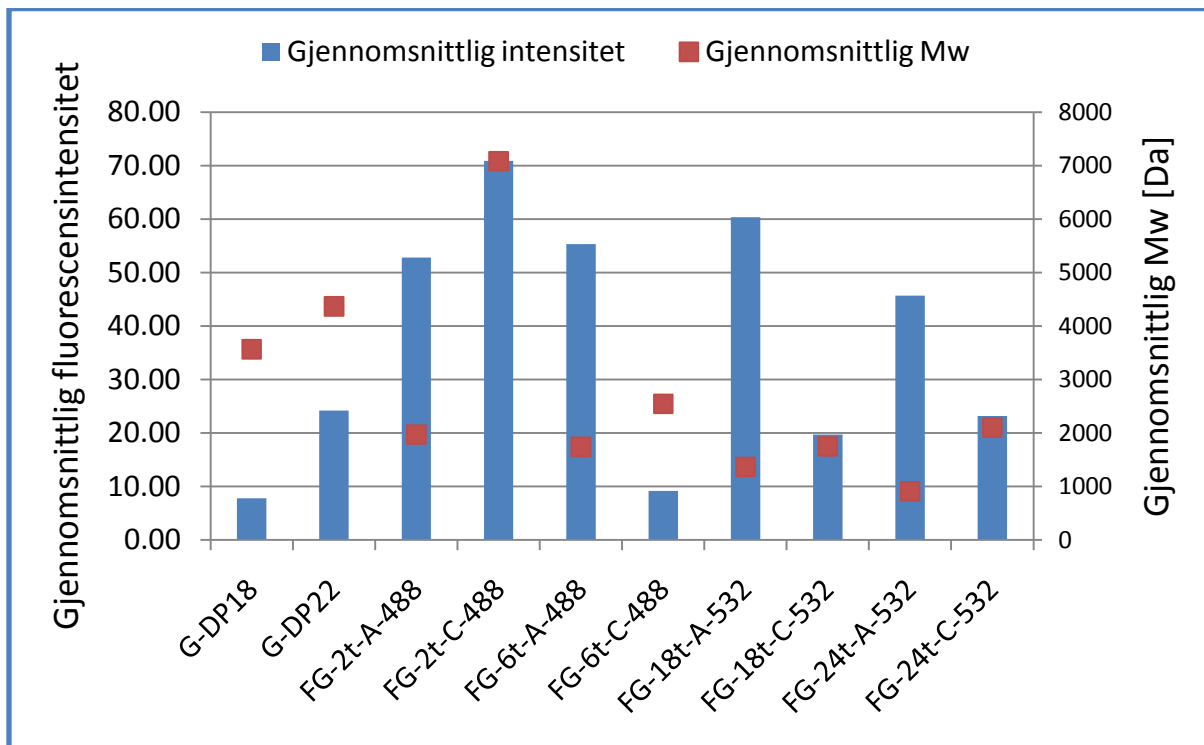
Figur 3.45: Detektert fluorescens i reseptorfasen for hudpenetrasjonsforsøkene gjennomført med FG-24t-C-532 på forbehandlet hud fra donor D, E og G. Kontroll angir gjennomsnittlig fluorescens i reseptorfasen ved påført kontrollprøve for disse tre donorene.

Figur 3.45 viser høyest fluorescens i reseptorfasen for kontrollprøven. Resterende donorer gir lavere fluorescensverdier. Dette viser hvordan metoden for måling i reseptorfasen kanskje ikke er ideell. Grunnen til variasjonene kan skyldes rester av fluorescens i glassutstyret fra forrige forsøk eller søling av prøve. Det kan også være hudrester eller andre komponenter i glassutstyret som fører til autofluorescens.

Fra figur 3.45 ser det ikke ut til å komme noe fluorescensmerket prøve i reseptorfasen. Men grunnen til at det ikke detekteres kan også skyldes den svært lave merkningsgraden.

3.2.5. Sammenligning av hudpenetrasjonsevnen til alle G-blokk og FG-peptidene

Gjennomsnittlig fluorescensintensitet og \bar{M}_w for alle G-blokkene og FG-peptidene som ble benyttet i hudpenetrasjonsforsøk, er vist i figur 3.46.

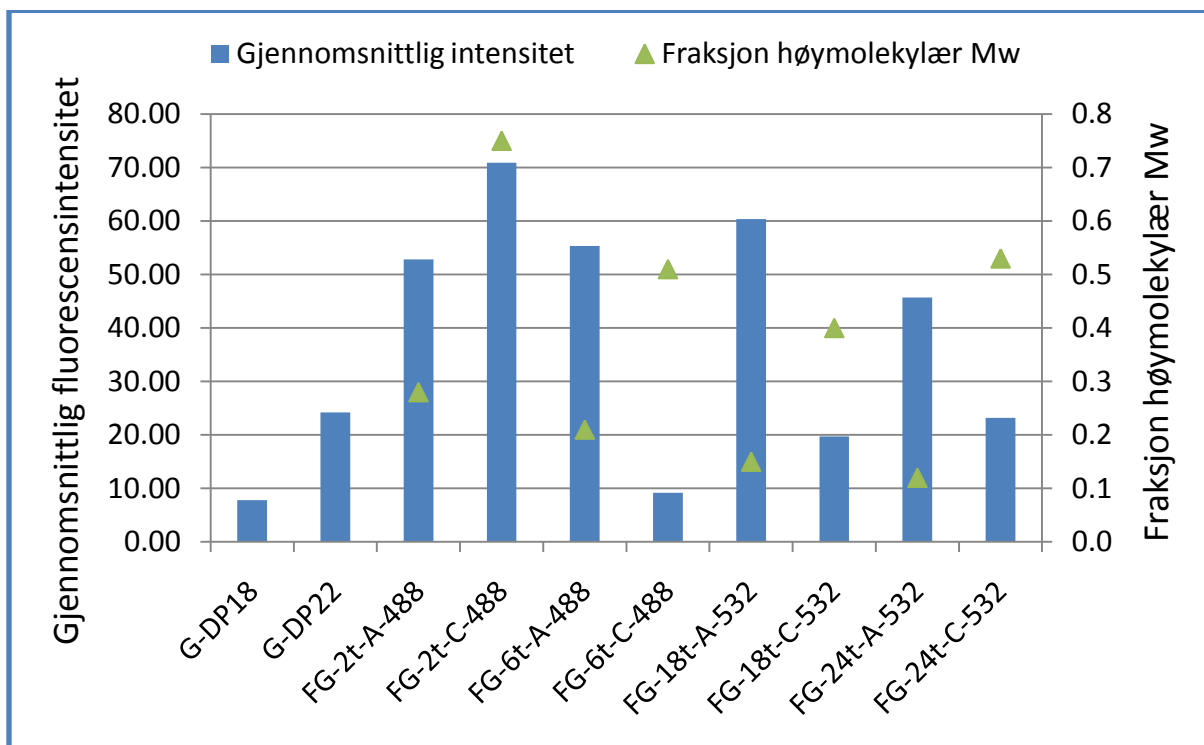


Figur 3.46: Gjennomsnittlig fluorescensintensitet (primær y-akse) og \bar{M}_w (sekundær y-akse) for G-blokkene og FG-peptidene benyttet under hudpenetrasjonsforsøkene. Gjennomsnittlig fluorescensintensitet er funnet fra KLSM-bilder og \bar{M}_w er funnet fra SEC-MALLS og MALDI-TOF analyser.

Som diskutert tidligere i kapitelet, bør en høy gjennomsnittlig molekylvekt gi en lav gjennomsnittlig fluorescensintensitet i vevet. Dette stemmer ikke helt for de gjennomførte forsøkene med hudpenetrasjon som vist i figur 3.46. For FG-2t-A-488, FG-6t-A-488, FG-18t-A-532 og FG-24t-A-532 ser det ut som dette stemmer. En lav \bar{M}_w gir en høy gjennomsnittlig fluorescensintensitet. Dette er alle A fraksjonen av FG-peptid. Disse fraksjonene er det som har trukket av en dialysemembran med MWCO 2000 Da (kap. 2.4.2). Dette kan da tyde på at en slik fraksjon fører til penetrasjon av SC og diffusjon inn i vevet.

For G-blokk prøvene kan det også sees at en høy \bar{M}_w gir en lav fluorescensintensitet. Den prøven som skiller seg mest ut er FG-2t-C-488. Den ga høyest \bar{M}_w av alle prøvene, men gir samtidig også høyest detektert fluorescensintensitet i vevet. Dette skyldes antageligvis fraksjonen høymolekulære peptider eller merkningsgrad som sees nærmere på i de to neste figurene.

Figur 3.47 viser gjennomsnittlig fluorescensintensitet og fraksjon av høymolekulær Mw (F_{peptid}) bestemt fra SEC-MALLS (kap. 3.1.3) for ulike fiskgelatinpeptider som ble benyttet under hudpenetrasjonsforsøk.

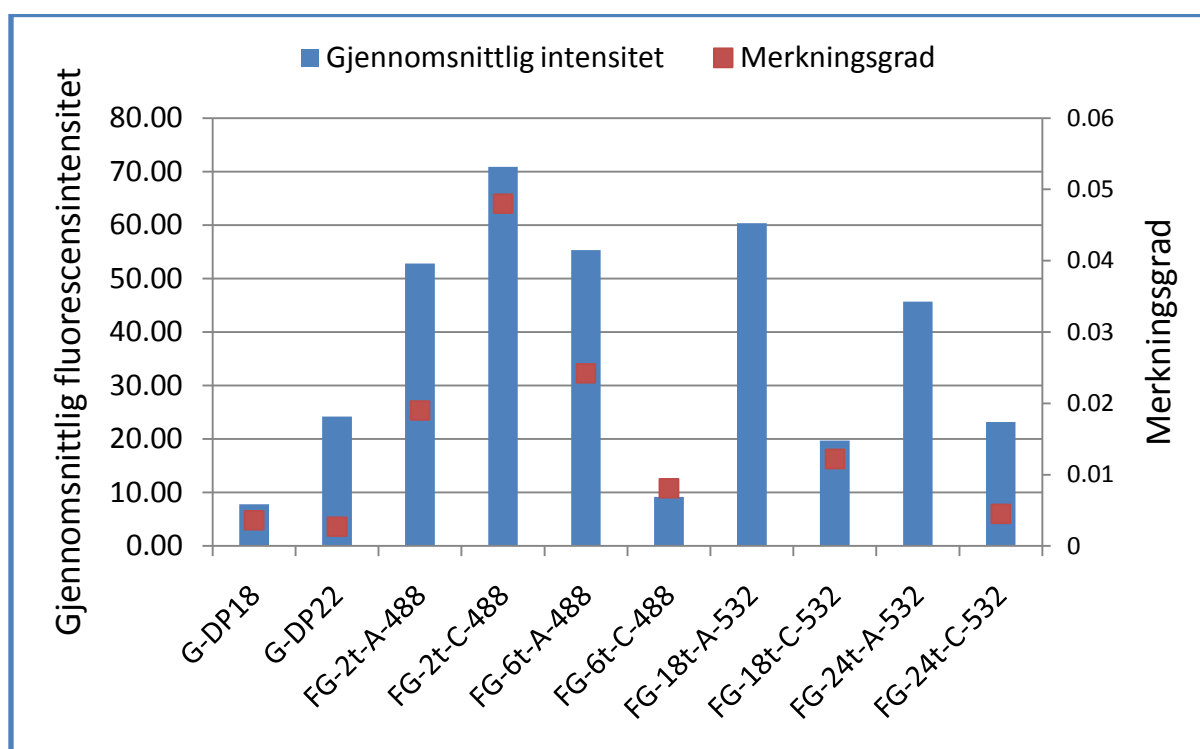


Figur 3.47: Gjennomsnittlig fluorescensintensitet (primær y-akse) for alle G-blokkene og fiskgelatinprøvene benyttet under hudpenetrasjonsforsøk. Samt fraksjon høymolekulær Mw (sekundær y-akse) for alle FG-peptidene benyttet. Gjennomsnittlig fluorescensintensitet er funnet fra KLSM bilder og fraksjon høymolekulær Mw (F_{peptid}) er funnet fra SEC-MALLS.

Figur 3.47 viser at FG-6t-C-488, FG-18t-C-532 og FG-24t-C-532 har en relativt stor fraksjon med høymolekulære peptider. Dette forklarer ennå bedre hvorfor den gjennomsnittlige fluorescensintensiteten ble lav for disse forsøkene. Det samme gjelder for alle A-fraksjonene

som ser ut til å inneholde en lite fraksjon med høymolekylære forbindelser som antatt og diskutert tidligere. Det kan derimot ikke trekkes noen konklusjoner om de litt annerledes resultatene for FG-2t-C-488.

Figur 3.48 viser gjennomsnittlig intensitet og merkningsgrad for G-blokkene og FG-peptidene som ble benyttet i hudpenetrasjonforsøk. Det ble ikke funnet noen merkningsgrad for FG-18t-A-532 og FG-24t-A-532 (se kap. 3.1.7).



Figur 3.48: Gjennomsnittlig intensitet og merkningsgrad for G-blokkene og FG-peptidene som ble benyttet i hudpenetrasjonforsøk. Det ble ikke funnet noen merkningsgrad for FG-18t-A-532 og FG-24t-A-532 pga. mangel på prøve.

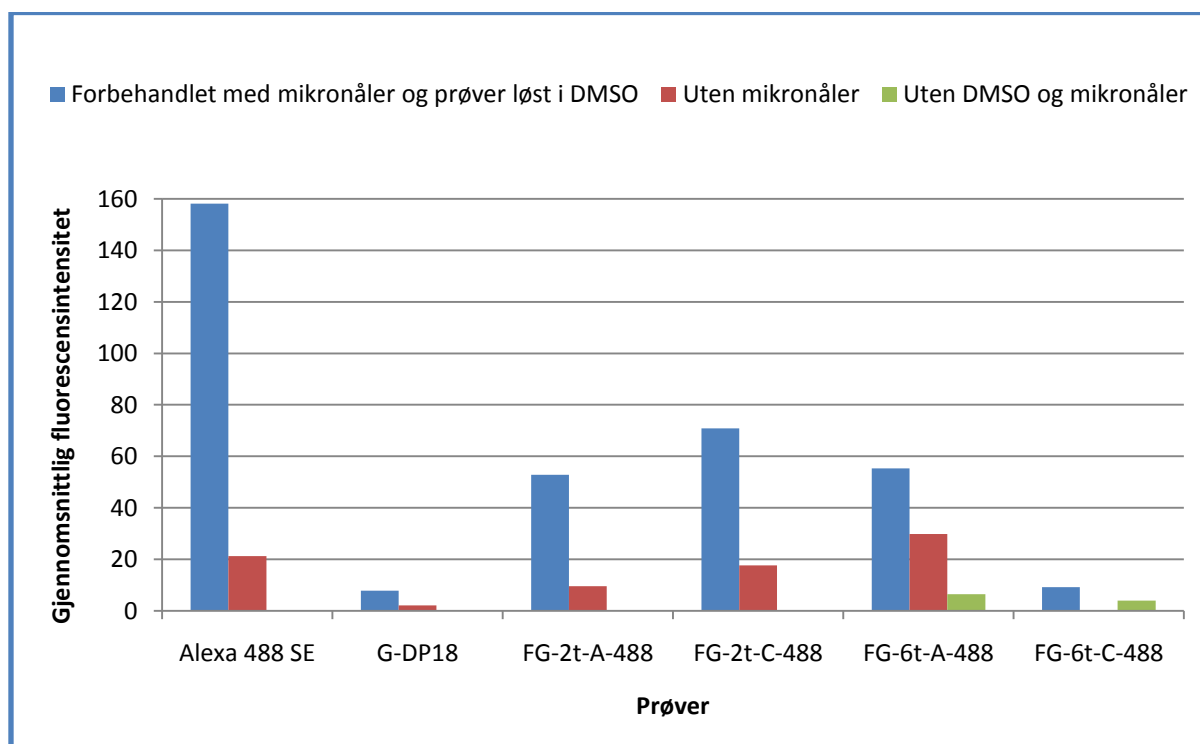
Figur 3.48 viser at merkningsgraden har mye å si for den gjennomsnittlige fluorescensintensiteten som detekteres i vevet. Prøve FG-2t-C-488 har høyest merkningsgrad, noe som kan forklarer den høye intensiteten på tross av en høy \bar{M}_w .

For G-blokkene, derimot, forklarer ikke merkningsgraden den økte intensiteten for G-DP22 i forhold til G-DP18 med lavere \bar{M}_w . Det som kan forklare dette er at det antagelig finnes flere små molekyler i G-DP22 enn i G-DP18. Som diskutert i kap. 3.2.3.

3.2.6. Forbehandling av huden

I dette kapitlet presenteres de signifikante forskjellene i den transdermale leveringsevnen til huden ved forbehandling med mikronåler og når den forblir ubehandlet.

Figur 3.49 viser gjennomsnittlig fluorescensintensitet for et utvalg prøver som ble benyttet i hudpenetrasjonsforsøk. Blå kurve viser intensitet med vanlig gjennomføring av hudpenetrasjonsforsøket (kap. 2.6), der prøvene er utblandet i 60 % DMSO og huden er forbehandlet med mikronåler. Rød kurve viser vanlig gjennomføring utenom at mikronåler ikke er benyttet. For grønn kurve er prøvene blandet ut i vann og det er ikke benyttet mikronåler.



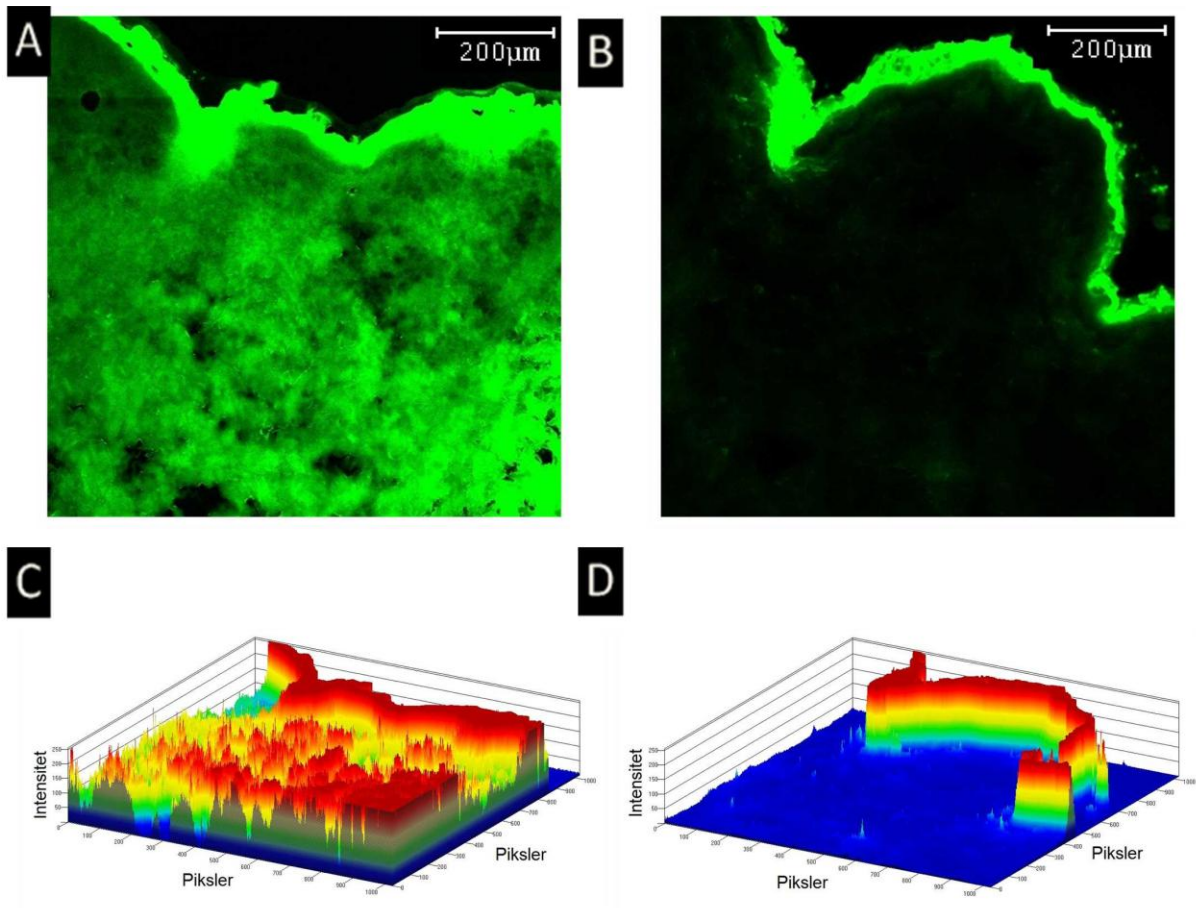
Figur 3.49: Gjennomsnittlig fluorescensintensitet for et utvalg prøver som ble benyttet i hudpenetrasjonsforsøk, der huden er forbehandlet med mikronåler og prøven er løst i 60 % DMSO (blå), huden er ubehandlet (rød) og der huden er ubehandlet og prøven er løst i vann.

Figur 3.49 viser at for samtlige prøver ble det observert lavere fluorescensintensitet i vevet når huden ikke ble forbehandlet med mikronåler. Det ble også observert en lavere intensitet når prøven ble løst i vann i forhold til DMSO. Dette var forventede resultater ut fra tidligere forskning.

Forskning av Henry et al. (1998) viste blant annet at permeabiliteten til huden ble fire ganger så stor ved bruk av mikronåler i forbehandlingen. Dette ble vist for fluorescensfargestoffet Calcein (MW: 622.5). Annen forskning viser at mikronåler av samme type som benyttet i dette forsøket, ga en porestørrelse på ca. 180 μm og 75 μm henholdsvis rett etter behandling og to timer etter behandling (Badran et al., 2009). Dette betyr at det er store pore i huden også en stund etter behandling. Dette gir tydelig en økning i permeabilitet som vist i figur 3.47.

Fra figur 3.49 ser det ut som det er for alexa 488 SE det er størst økning i permeabiliteten ved bruk av mikronåler. Alexa 488 SE har en molekylvekt som ligger svært nær $M_w = 500 \text{ Da}$, som mange mener er grensen for hvor store molekyler som kan penetrerer SC uten forbehandling (Bos et al., 2000).

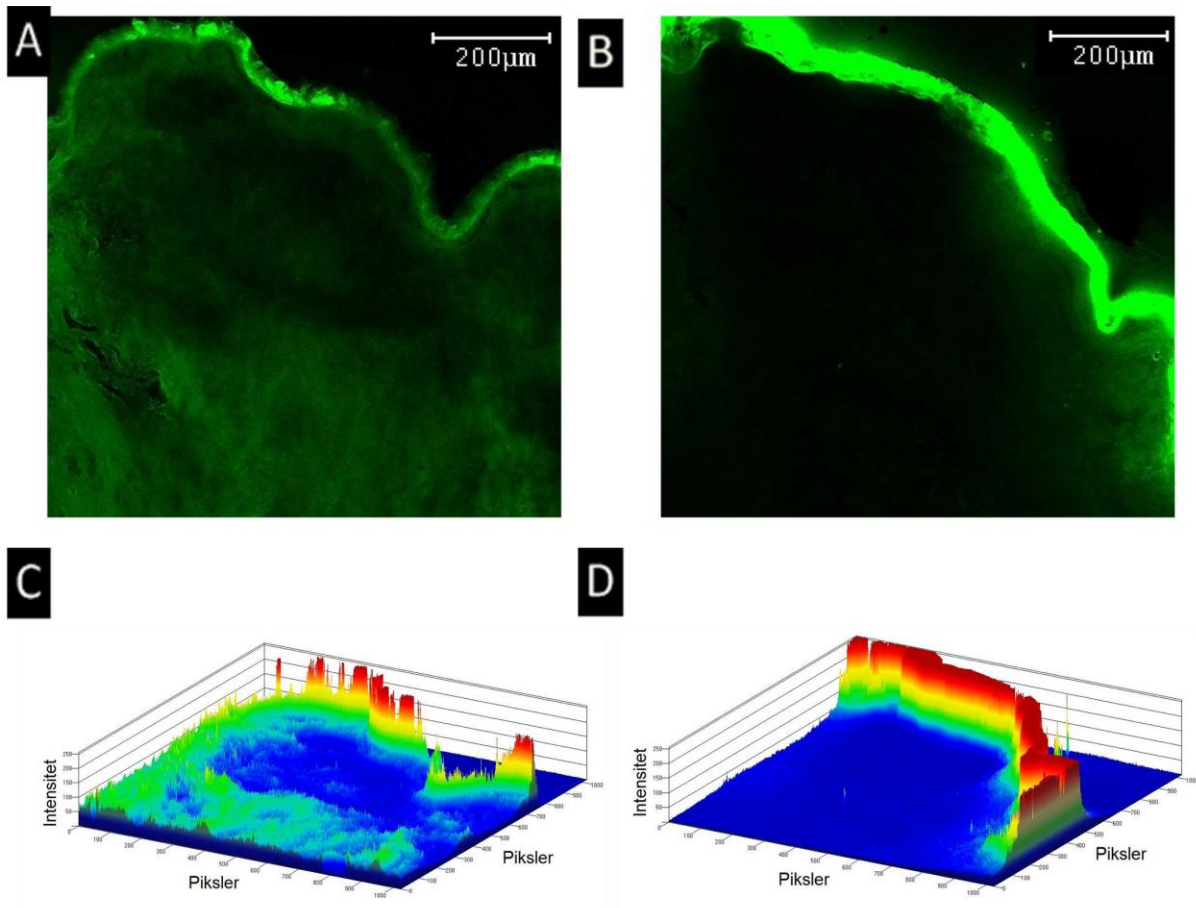
Figur 3.50 viser KLSM bilder og en tredimensjonal fremstilling av intensiteten i bildene for penetrasjon av alexa 488 SE for forbehandlet hud fra donor C og ubehandlet hud fra donor H.



Figur 3.50: KLSM bilder og en tredimensjonal fremstilling av intensiteten i bildet fra hudpenetrasjonsforsøk med påført alexa 488 SE på A og C) forbehandlet hud fra donor C. B og D) Ubehandlet hud fra donor H.

Figur 3.50 viser at alexa 488 SE penetrerer bedre i forbehandlet enn i ubehandlet hud. Det detekteres svært lite fluorescens i vevet uten forbehandling av huden.

Ut fra figur 3.49 ser det ut som FG-6t-A-488 penetrerer huden uten forbehandling med mikronåler. Dette er ikke forventet når en ser på $\bar{M}w_{\text{FG-6t-A-488}}$ som er 1.7 kDa. Figur 3.51 viser KLSM bilder og en tredimensjonal fremstilling av intensiteten i bildene for penetrasjon av FG-6t-A-488 for forbehandlet hud fra donor A og ubehandlet hud fra donor H.



Figur 3.51: KLSM bilder og en tredimensjonal fremstilling av intensiteten i bildene fra hudpenetrasjonsforsøk med påført FG-6t-A-488 på A) forbehandlet hud fra donor A. B) Ubehandlet hud fra donor H.

Figur 3.51.B viser bare litt fluorescensintensitet helt til høyre i bildet. Dette kan skyldes en brett eller sølt fluorescens. Det ser ikke ut som FG-6t-A-488 penetrerer huden uten forbehandling slik som det så ut i figur 3.49.

3.2.7. Svakheter med hudpenetrasjonsforsøket og forslag til forbedring

Det er mange svakheter og rom for unøyaktigheter i forsøksoppsettet til hudpenetrasjonsforsøkene (kap. 2.6). En av de største kildene til feil i dette forsøket, skyldes et samarbeid med en annen student. Altså var det to personer som byttet på å gjøre de ulike trinnene i prosessen. Dette er en stor kilde til usikkerhet.

Forskning har vist at det ikke ble funnet noe signifikant forskjell mellom permeabiliteten til hud som er fersk eller oppbevart ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i opptil 466 dager. Denne forskningen ble utført

med vann (Harrison et al., 1984). Andre liknende forsøk har vist at nedfrysing av hundehud (- 20 °C) øker den transdermale penetrasjonen av hydrokortison (Ahlstrom et al., 2007). I dette forsøket ble huden benyttet bare noen timer etter henting. På den måten ble det unngått nedfrysning og faren for at huden skal få en kunstig høy penetrasjonsevne.

En stor usikkerhetskilde er selve forbehandlingen av huden. Underhudsfettet ble fjernet, og huden ble behandlet med mikronåler. Det ble ikke avtalt et antall ganger disse skulle ruller over hudbiten, noe som med fordel burde vært gjort. Det er vanskelig å kontrollere kraftbruken under mikronålbehandling. Badran et al. (2009) viste hvordan ulik lengde på mikronålene ga ulik porestørrelse og ulik tetthet med porer, samt at det transdermale vanntapet økte med økende lengde på mikronålene. Dette betyr at ulik behandling med mikronålene vil kunne gi ulike resultater, også i dette forsøket.

Det er også rom for feil i monteringen av hud på Franz-cellen. Det ble benyttet hudbiter av ulik størrelse. Små biter ble mer strekt i spenn for å passe inn i Franz-cellen, mens større biter ofte ble lagt rett på cellen uten å strekkes opp før skruene på siden ble festet. Det var også svært stor forskjell på kvaliteten til huden som ble benyttet. Noen donorer hadde mer hår og strekkmerker enn andre. Det var også tydelig forskjell på tykkelsen av huden fra donor til donor, selv etter underhudsfettet var fjernet. Med fordel kunne tykkelsen til huden blitt målt, for å se om dette hadde noen innvirkning på permeabiliteten eller fluorescens i reseptorfasen.

Reseptorfasekammeret ble fylt med PBS-buffer etter at hudbiten var montert på Franz-cellen. I slutten av forsøksperioden ble det oppdaget store variasjoner med væsknivået i Franz-cellene, selv om alle kammerene hadde PBS opp til den markerte streken (se figur 2.4 i kap. 2.6.1). Dårlig kontakt mellom væske og hud vil antageligvis ha gitt dårligere diffusjon gjennom dermis og ingen/lite fluorescens i reseptorfasen. Det finnes mange design av diffusjonsceller som er modifikasjoner av den originale Franz-cellen (Friend, 1992). Slike diffusjonsceller burde vært prøvd for å se om dette gir liknende resultater.

Prøvene ble påført hudoverflaten ca. midt i åpningen av Franz-cellen. Det var vanskelig å få prøven fordelt jevnt utover, siden den ofte var litt viskøs. I tillegg hadde huden ofte en liten forhøyning i dette området. Denne forhøyningen kan føre til at noe av prøven beveger seg

bort fra midten av hudbiten. Dette kan gi store usikkerheter i den detekterte fluorescensintensiteten, da det kan være lite prøve som blir liggende der biopsien stanses ut. Det samme kan skje hvis biopsien ikke stanses ut på midten av hudbiten. Når det var overflødig prøve igjen på huden, var det lett å se hvor biopsien burde stanses ut. Dette var verre når det ikke var prøve igjen på huden. Dermed ble dette gjort omtrentlig. En utstansing utenfor der prøven er påsatt vil gi kunstig lave fluorescensintensiteter. Med fordel burde området med påført prøve være markert. Dette burde ikke gjøres med tusj eller farger som kan penetrere huden å gi misvisende resultater.

Når prøven var påført, ble cellene dekket med parafilm og aluminiumsfolie. Litt tapelse av fargestoffets fluorescens kan ha forekommet pga. eksponering av lys i rommet. Denne usikkerheten er ikke av de største, siden alle prøvene ble belyst omtrent like lenge.

Etter inkubasjonstiden var over, ble hudbitene fjernet fra Franz-cellene, og det ble samlet sammen prøver av reseptorfasene. Under dette arbeidet kan noe overflødig fluorescensmerket prøve ha havnet i reseptorfasen. Derfor burde hudbitene blitt tørket for overflødig prøve før de ble fjernet fra Franz-cellene. Dessuten gir utstyret som ble benyttet for å måle fluorescens, en kilde til usikkerhet. Lampen i fluorometeret burde stå å varmes opp i minst 10 minutter før målingene ble tatt. Denne oppvarmingstiden ble ikke overholdt nøyaktig under alle målingene.

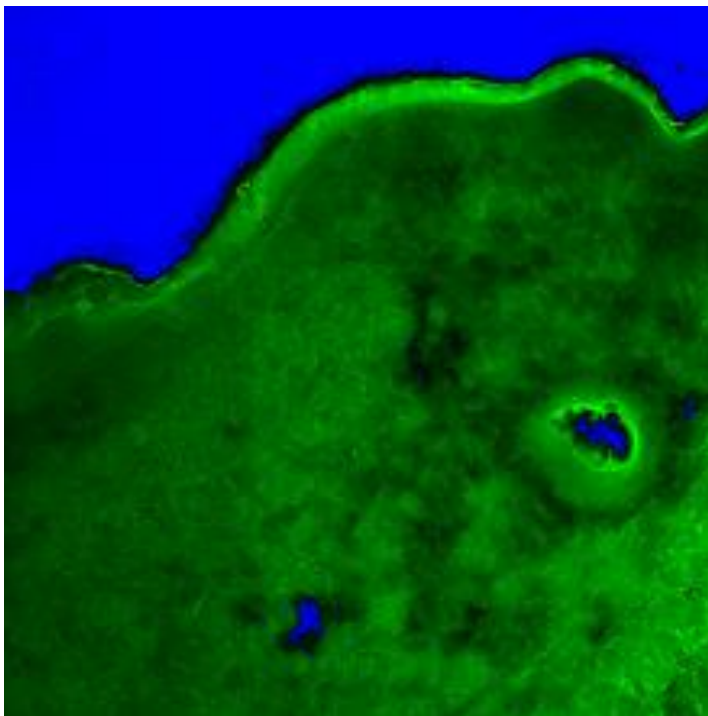
Etter utstansing ble biopsien montert på kork og deretter fyst ned i flytende nitrogen. Det ble forsøkt å legge biopsien på en slik måte at epidermis ble rett. Dette er nokså utfordrende, og unøyaktigheter i dette trinnet førte lettere til bretter under snittingen.

Snittingen ble gjennomført på en kryomikrotom. Det var en spesiell teknikk som måtte læres for å få snittene fine og uten bretter. Det var tydelig at snittene som ble lagd i starten hadde flere bretter enn de som ble lagd senere i forsøksperioden. Det var også andre problemer som var knyttet til snittingen. Biopsiene ble som sagt oppbevart i cryorør. Disse rørene var egentlig litt for små i diameter for noen av biopsiene montert på kork. Det var i noen tilfeller vanskelig å få ut biopsiene av rørene uten at de måtte tines litt. Når prøvene tiner litt vil det kunne skje endringer i fluorescensintensiteten i vevet. Det burde vært godt notert for hvilke prøver denne ekstra tineprosessen ble gjort, for å se om dette har noen innvirkning på

resultatene. Eventuelt kunne det blitt brukt cryorør med større diameter, for å unngå problemet helt.

Objektglassene med snitt ble oppbevart i lystette bokser i romtemperatur. Konfokalmikroskopi ble gjennomført ca. en uke etter snittingen. Ellers burde kanskje snittene vært oppbevart i fryseboks.

Noe av usikkerheten i forsøket ligger i bildebehandlingen av KLSM bildene. Disse bildene ble undersøkt på tre ulike måter (kap. 2.7.2). Laging av en tredimensjonal kurve ble gjort automatisk, mens de to andre metodene måtte gjøres mer manuelt. For å finne den gjennomsnittlige fluorescensintensiteten i bildet ble det benyttet en del av programmet der det svarte i bildet kunne fjernes. Dette ga noen unøyaktigheter for snitt som hadde hull i vevet. Disse hullene ble også tatt bort i beregningen av fluorescensintensiteten. I slike tilfeller ble det forsøkt å kompensere for det som ble tatt bort inne i vevet, med å ha litt mer av det svarte utenfor vevet med i beregningene. Dette er bedre vist i figur 3.52, der det blå feltet er det som ikke er tatt med i beregningen av gjennomsnittlig fluorescensintensitet i vevet.

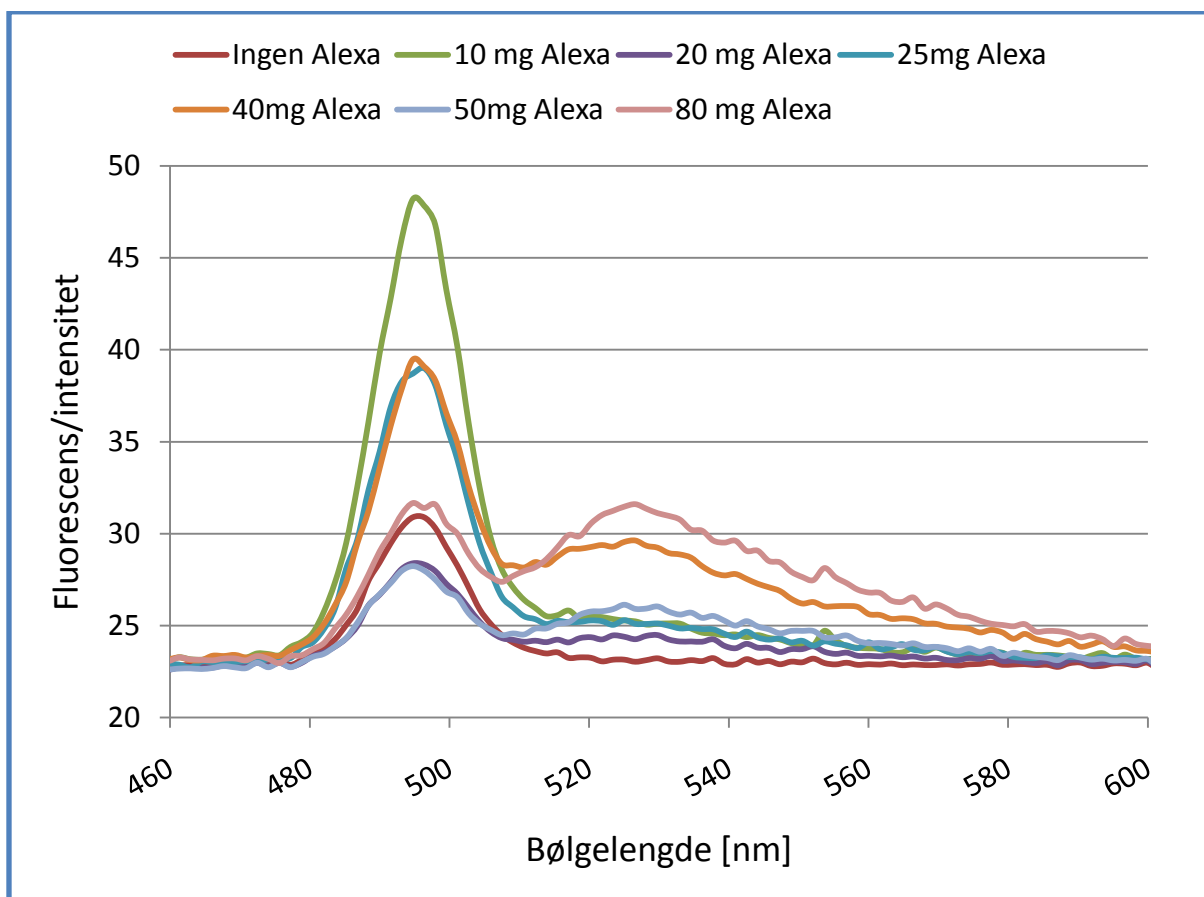


Figur 3.52: Et KLSM bilde med to tydelige hull i vevet. Det blå feltet er den delen av bildet som ikke er tatt med i beregningen av gjennomsnittlig fluorescensintensitet i vevet.

Det er også en del usikkerheter i beregningen av intensiteten som funksjon av dybden i vevet. For denne beregningen ble det lagt tre linjer i bildet, der intensiteten ble registrert for disse linjene. Problemet med denne metoden var at det var stor forskjell i hvor disse linjene ble tegnet. I noen av snittene var det vanskelig å tegne linjen i rett retning (fra SC mot der hypodermis skulle vært) pga. mange ujevnheter i vevet. I tillegg vil det være store forskjeller i intensiteten i vevet, ettersom det finnes bretter og hull her. Det ble gjort et forsøk på å unngå disse områdene for å gi en minst mulig usikkerhet.

3.3. Hyperspektral avbildning av hudfantomer

Hyperspektral avbildning ble gjennomført som beskrevet i kap. 2.8. Figur 3.53 viser resultatene av den hyperspektrale avbildningen.



Figur 3.53: Detektert fluorescens/intensitet ved ulike bølgelengder for de ulike hudfantomene lagt med henholdsvis ingen, 10 mg, 20 mg, 25 mg, 40 mg, 50 mg og 80 mg kovalent merket gelatin med alexa 488 SE. Resultatene er funnet ved hjelp av hyperspektral avbildning.

Resultatet av den hyperspektraleavbildningen gitt i figur 3.53 viser to topper. En emisjonstopp (495 nm) og en absorpsjonstopp (519 nm) (se kap. 2.1). Det kan ikke tydelig sees at intensiteten avtar med økende konsentrasjon av alexa i emisjonstoppen. Det er 10 mg alexa som gir høyest intensitet, mens deretter kommer 25 mg og 40 mg alexa nokså likt. 50 mg kommer helt nederst sammen med 20 mg.

Det er i absorpsjonstoppen det er mest interessant å se. Teorien gir at hudfantomen med mest alexa skal gi høyest intensitet i denne toppen. Det stemmer for fantomet med 80 mg alexa, som kommer først etterfulgt av 40 mg. 50 mg prøven kommer lengre nede. Så kommer 10 mg, 20 mg og 25 mg veldig tett, før hudfantomen uten alexa gir lavest intensitet. Resultatene tyder på at det er vanskelig å skille hudfantomene med 25 mg eller mindre kovalent merket gelatin fra hverandre. Det kan se ut som prøven med 50 mg kan ha vært byttet med en av de andre eller lagd med feil mengde alexa. Det burde vært gjennomført målinger på flere hudfantomer for å kunne si noe sikkert om målingene og målemetoden.

3.4. Forslag til videre arbeid

Hudpenetrasjonsforsøkene bør fortsettes for å finne ut med sikkerhet hvilke av de ulike fluorescensmerkede prøvene som penetrerer huden. I det videre arbeidet bør svakhetene med metoden i kap. 3.2.7 tas nøye i betraktning. Forsøkene bør gjennomføres med en annen diffusjonselle enn den tradisjonelle Franz-cellen, for å få flere resultater som kan sammenlignes. Alle forsøkene kan med fordel gjøres med KLSM og hyperspektral avbildning parallelt. Flere gjennomføringer av hyperspektrale forsøk, ville kunne gi en bedre fortrolighet til metoden. Hvis stabile resultater oppnås, kan denne metoden brukes som et alternativ til KLSM. Dette vil gi store tidsbesparelser. Denne metoden gir også en mulighet for å finne ut hvor langt ulike fluorescensmerkede prøver har diffundert ned i huden. Samtidig som den gir en god måte for å måle autofluorescens i vevet.

Det bør også gjennomføres flere hudpenetrasjonsforsøk på ubehandlet hud for å få mer sammenligningsmateriale. Det hadde i tillegg vært interessant å se på ulike forbehandlingsmetoder eller mikronåler med ulik lengde og tykkelse, for å se hvor stor innvirkning forbehandlingen har på resultatene. I Denne sammenheng kan det også gjøres

forsøk der det benyttes andre kjemikalier enn DMSO for å øke opptaket til huden. Dette bør spesielt gjøres siden DMSO er funnet toksisk i høye konsentrasjoner (Aspevik, 2010).

I det videre arbeidet bør forsøkene generelt sett gjennomføres i helhet av en person, for å unngå en stor feilkilde. Det bør i tillegg fastsettes mer detaljerte framgangsmåter som blant annet inneholder antall ganger mikronålene blir påført, og hvor mange vinkler de blir påført fra.

For videre arbeid med KLSM bør det tas flere bilder lengre ned i dermis, for å få et bedre inntrykk av hvordan diffusjonen har foregått, og hvor langt en fluorescensmerket prøve eventuelt har diffundert.

Som diskutert i kap. 3.2.7 er det funnet uoverensstemmende resultater på om nedfrysning av huden før penetrasjonsforsøk, vil gi en økning i penetrasjonsevnen til huden eller ikke. Det hadde vært interessant å gjøre noen forsøk for å finne ut mer om dette.

For at hudpenetrasjonsforsøkene skal være mest mulig relevante, er det nødvendig med flere molekylvektbestemmelser, for å få bestemt en mer nøyaktig \bar{M}_w . FG-peptidene bør analyseres med MALDI-TOF på nytt, men denne gang uten en øvre grense for Mw på 4 kDa på grafen (se kap. 3.1.4).

Med fordel bør MALDI-TOF gjennomføres for prøvene med G-blokk også. Dette vil gi informasjon om distribusjonen av molekylvektene i disse prøvene. Noe som bedre kan forklare penetrasjonsresultatene.

Som diskutert i kap. 3.2.7 kunne det vært spennende å gjøre mer omfattende kontroll av huden til de ulike donorene. Tykkelse av huden med og uten underhudsfettet kunne vært målt, samtidig som det kunne blitt notert mer om antall strekkmerker og hårmengde for donorhuden. En slik gjennomføring av forsøk, vil kunne gi et bedre svar på om individuelle forskjeller mellom hud fra ulike mennesker har en innvirkning på permeabiliteten eller fluorescens i reseptorfasen.

Som nevnt i kap. 1.4 er det diskutert at G-blokk kanskje kan forenkle leveringen av medisiner transdermalt. For G-DP22 ble det påvist penetrasjon gjennom epidermis og inn i dermis for noen av donorene. Flere forsøk burde gjennomføres for å finne ut om antagelsene om

G-blokk kan stemme. Videre kunne forsøk med G-blokk og legemidler blitt gjennomført, for å kontrollere om G-blokk kan ha en positiv påvirkning på levering av legemidler gjennom huden.

Som nevnt i kap. 1.5 er det påvist at peptider som består av gjentakende aminosyresekvens med Gly-Pro-Hyp har en positiv virkning på kollagen- og glykosaminglykanproduksjonen i dermis (Choi et al., 2009). Forsøkene viste at disse aminosyrene fantes i FG-peptidene (kap. 3.1.6). Det hadde derfor vært interessant å se nærmere på om disse molekylene kan ha en slik positiv virkning på kollagen- og glykosaminglykanproduksjonen. Penetrasjonen av flere av FG-peptidene var funnet til å være effektiv, og det er derfor ønskelig å finne ut om mer om bruken av disse i en teknikk for å gjøre huden "yngre".

4. Konklusjon

Diffusjonsforsøk utført på human hud har vist at vannløselige molekyler med en \bar{M}_w opp til 7 kDa er i stand til å penetrere SC og diffundere ned i den levende delen av huden. Dette forutsetter forbehandling av huden med mikronåler og bruk av kjemikalier som forbedrer opptaket.

DMSO, som ble benyttet for å øke opptaket til huden i denne oppgaven, er ikke anbefalt, da denne tidligere er funnet toksisk ved høye konsentrasjoner. En alternativ kjemikalie for DMSO og bruk av mikronåler vil være en forutsetning for at vannløselige legemidler skal kunne leveres transdermalt.

Effektiviteten til hyperspektral avbildning ser ut til å begrenses av konsentrasjonen av fargestoffet i hudfantomen. Det var vanskelig å skille hudfantomer med 25 mg eller mindre kovalent merket gelatin fra hverandre.

Litteraturliste

Ahlstrom, L. A., Cross, S. E. & Mills, P. C. (2007). The effects of freezing skin on transdermal drug penetration kinetics. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, **30**(5), 456-463.

Alemán, A., Giménez, B., Montero, P. & Gómez-Guillén, M. C. (2011). Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *LWT - Food Science and Technology*, **44**(2), 407-413.

Aspevik, T. (2010). *Transdermal administration of hydrophilic biopolymers*. Masteroppgave. Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet. Trondheim. 71 s.

Aulton, M. E. (2007). *Aulton's pharmaceuticals: the design and manufacture of medicines*. Churchill Livingstone. Edinburgh. X, 717 s.

Babel, W. (1996). Gelatine - a versatile biopolymer. *Chemie in unserer Zeit*, **06/98**, 10 s.

Badran, M. M., Kuntsche, J. & Fahr, A. (2009). Skin penetration enhancement by a microneedle device (Dermaroller®) in vitro: Dependency on needle size and applied formulation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **36**(4-5), 511-523.

Benson, H. A. E. (2005). Transdermal Drug Delivery: Penetration Enhancement Techniques. *Current Drug Delivery*, **2**, 23-33.

Benson, H. A. E. & Namjoshi, S. (2008). Proteins and peptides: Strategies for delivery to and across the skin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **97**(9), 3591-3610.

Bos, J. D. & Meinardi, M. M. H. M. (2000). The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs. *Experimental Dermatology*, **9**(3), 165-169.

Brain, M. (2011). *What is skin?* [online]. Kilde: Discovery Health. Tilgjengelig fra: <http://health.howstuffworks.com/skin-care/beauty/sun-care/sunscreen1.htm>. (Lesedato: 12.01.2011)

Camp, H. O. D. (2004). *MALDI-TOF* [online]. Kilde: Radbound University Nijmegen. Tilgjengelig fra: <http://www.microbiology.science.ru.nl/tech/malдитof/>. (Lesedato: 10.05.11)

Choi, H.-I., Kim, H.-J., Park, J.-I., Shin, E.-H., Kim, D.-W. & Kim, S.-S. (2009). Design and efficient synthesis of novel ascorbyl conjugated peptide with high collagen biosynthesis stimulating effects. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **19**(7), 2079-2082.

Cross, S. E. & Roberts, M. S. (2004). Physical Enhancement of Transdermal Drug Application: Is Delivery Technology Keeping up with Pharmaceutical Development? *Current Drug Delivery*, **1**, 81-92.

da Silva, D., Thiago, S., Pessôa, F., Mrestani, Y., Rüttinger, H., Wohlrab, J. & Neubert, R. (2008). Penetration Profile of Taurine in the Human Skin and Its Distribution in Skin Layers. *Pharmaceutical Research*, **25**(8), 1846-1850.

Draget, K. I., Smidsrød, O. & Skjåk-Bræk, G. (2005), Alginates from Algae. Steinbüchel, A., & Rhee, S. K. . *Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry. Properties, Production and Patents*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim. 1-30.

Draget, K. I. & Taylor, C. (2011). Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food Hydrocolloids*, **25**(2), 251-256.

Eysturskarð, J. (2010). *Mechanical properties of gelatin gels: effect of molecular weight and molecular weight distribution*. Doktoravhandling. Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet. Trondheim.

Fratzl, P. (2008). *Collagen: Structure and Mechanics*. Springer. Boston. 510 s.

Friend, D. R. (1992). In vitro skin permeation techniques. *Journal of Controlled Release*, **18**(3), 235-248.

Fuchs, J. & Packer, L. (2001). *Environmental stressors in health and disease*. Taylor & Francis Inc. New York. 504 s. .

Gu, F., Amsden, B. & Neufeld, R. (2004). Sustained delivery of vascular endothelial growth factor with alginate beads. *Journal of Controlled Release*, **96**(3), 463-472.

Harrison, S. M., Barry, B. W. & Dugard, P. H. (1984). Effects of freezing on human skin permeability. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **36**(4), 261-262.

Haschek, W. M., Rousseaux, C. G. & Wallig, M. A. (2010). *Fundamentals of toxicologic pathology*. Elsevier/AP. Amsterdam. XXI, 691 s.

Haug, I. J. & Draget, K. I. (2009), Gelatine. Phillips, G.O. , & Williams, P.A. *Handbook of hydrocolloids*. CRC Press. Boca Raton. 142-163.

Haug, I. J., Draget, K. I. & Smidsrød, O. (2004). Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids*, **18**(2), 203-213.

Haugland, R. P. (2001). *Handbook of fluorescent probes and research products*. 8th ed. Molecular Probes. 421 s.

Henry, S., McAllister, D. V., Allen, M. G. & Prausnitz, M. R. (1998). Microfabricated microneedles: a novel approach to transdermal drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **87** (8), 922–925.

Hernandez-Palacios, J., Randeberg, L. L., Haug, I. J., Baarstad, I., Loke, T. & Skauli, T. (2011). *Low-light hyperspectral imager for characterization of biological samples based on an sCMOS image sensor*. In Raghavachari, Ramesh, & Liang, Rongguang. San Francisco, California, USA: SPIE.

Holtan, S. (2006). *Structural tailoring of alginates: a study of the mode of action of mannuronan C-5 epimerases*. Doktoravhandling. Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet. Trondheim.

Invitrogen (2011). *The Molecular Probes® Handbook—11th Edition* [online]. Kilde: Tilgjengelig fra: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook.html>. (Lesedato: 15.05.2011)

Jahnsen, F. (2010). Redusert barrierefunksjon og immunpatologi ved atopisk dermatitt. *Allergi i Praksis*, **nr. 1**, s. 20 - 24.

Karim, A. A. & Bhat, R. (2009). Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, **23**(3), 563-576.

Klosterman, L. (2009). *Skin*. Marshall Cavendish Benchmark. New York. 79 s.

Lansdown, A. B. G. (2002). Calcium: a potential central regulator in wound healing in the skin. *Wound Repair and Regeneration*, **10**(5), 271-285.

Laurent, P. E., Bonnet, S., Alchas, P., Regolini, P., Mikszta, J. A., Pettis, R. & Harvey, N. G. (2007). Evaluation of the clinical performance of a new intradermal vaccine administration technique and associated delivery system. *Vaccine*, **25**(52), 8833-8842.

Maibach, H. I. & Smith, E. W. (2006). *Percutaneous penetration enhancers*. CRC Press. Boca Raton, Fla. X, 432 s.

Mark, H. F. (1985). *Encyclopedia of polymer science and engineering*. Wiley. New York. 19 b.

Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H.-G. & Kim, S.-K. (2005). Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sciences*, **77**(17), 2166-2178.

Mitchell, B. & Peel, S. (2009). *Histology: an illustrated colour text*. Churchill Livingstone Elsevier. Edinburgh. VII, 139 s.

Narayan, R. (2009). *Biomedical Materials*. Springer-Verlag US. Boston. 550 s.

NittaGelatinIndiaLimited (2011). *Amino acid composition* [online]. Kilde: NGIL. Tilgjengelig fra: <http://www.gelatin.in/products-gelatin.html>. (Lesedato: 03.06.2011)

NorskElektroOptikk (2011). *HySpex Cameras* [online]. Kilde: Tilgjengelig fra: <http://www.hyspex.no/products/hyspex/vnir1600.php>. (Lesedato: 15.05.2011)

Otterlei, M., Østgaard, K., Skjåk-Bræk, G., Smidsrød, O., Soon-Shiong, P. & Espevik, T. (1991). Induction of Cytokine Production from Human Monocytes Stimulated with Alginate. *Journal of Immunotherapy*, **10**(4), 286-291.

Paddock, S. W. (1999). *Confocal microscopy methods and protocols*. 1. Humana Press Inc. Totowa. 446 s.

Park, D.-J., Choi, B.-H., Zhu, S.-J., Huh, J.-Y., Kim, B.-Y. & Lee, S.-H. (2005). Injectable bone using chitosan-alginate gel/mesenchymal stem cells/BMP-2 composites. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, **33**(1), 50-54.

Payne, G., Langlois, N., Lennard, C. & Roux, C. (2007). Applying visible hyperspectral (chemical) imaging to estimate the age of bruises. *Med Sci Law*, **47**(3), 225-232.

Pischinger, A. (2007). *The Extracellular Matrix and Ground Regulation*. Hartmut Heine. Berkeley. 205 s.

Prausnitz, M. R. (2004). Microneedles for transdermal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **56**(5), 581-587.

Prausnitz, M. R. & Langer, R. (2008). Transdermal drug delivery. *Nat Biotech*, **26**(11), 1261-1268.

Prausnitz, M. R., Mikszta, J. A., Cormier, M. & Andrianov, A. K. (2009), Microneedle-Based Vaccines. Compans, Richard W., & Orenstein, Walter A. *Vaccines for Pandemic Influenza*. Springer Berlin Heidelberg. Atlanta. 369-393.

Rehm, B. H. A. (2009). *Alginates: biology and applications*. Springer-Verlag. 266 s.

- Remminghorst, U. & Rehm, B. (2006). Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. *Biotechnology Letters*, **28**(21), 1701-1712.
- Rhein, L. D., Simion, F. A., Froebe, C., Mattai, J. & Cagan, R. H. (1990). Development of a stratum corneum lipid model to study the cutaneous moisture barrier properties. *Colloids and Surfaces*, **48**, 1-11.
- Scheidlin, S. (2004). Transdermal Drug Delivery: PAST, PRESENT, FUTURE. *Molecular Interventions*, **4**(6), 308-312.
- Schrieber, R. & Gareis, H. (2007). *Gelatine handbook: theory and industrial practice*. Weinheim. XII, 334 s.
- Schuetz, Y. B., Naik, A., Guy, R. H. & Kalia, Y. N. (2005). Emerging strategies for the transdermal delivery of peptide and protein drugs. *Expert Opinion on Drug Delivery*, **2**(3), 533-548.
- Silverstein, R. M., Bassler, G. C. & Morrill, T. C. (1991). *Spectrometric identification of organic compounds*. Wiley. New York. x, 419 s.
- Sletbakk, M., Gjørevoll, I., Håpnes, A., Hessen, D. O. & Heskestad, P. A. (2007). *Bios biologi 1*. Cappelen Damms.
- Smidsrød, O. & Moe, S. T. (1995). *Biopolymerkjemi*. Tapir. Trondheim. 459 s.
- Song, Y., Xiao, C., Mendelsohn, R., Zheng, T., Strekowski, L. & Michniak, B. (2005). Investigation of Iminosulfuranes as Novel Transdermal Penetration Enhancers: Enhancement Activity and Cytotoxicity. *Pharmaceutical Research*, **22**(11), 1918-1925.
- Sorg, B. S., Moeller, B. J., Donovan, O., Cao, Y. & Dewhirst, M. W. (2005). Hyperspectral imaging of hemoglobin saturation in tumor microvasculature and tumor hypoxia development. *Journal of Biomedical Optics*, **10**(4), 044004-044011.
- Springhouse (2008). *Clinical Pharmacology Made Incredibly Easy!* 3rd. Lippincott Williams & Wilkins (LWW). 448 s.
- Tanner, T. & Marks, R. (2008). Delivering drugs by the transdermal route: review and comment. *Skin Research and Technology*, **14**(3), 249-260.
- Tromp, R. H., ten Grotenhuis, E. & Olieman, C. (2002). Self-aggregation of gelatine above the gelling temperature analysed by SEC-MALLS. *Food Hydrocolloids*, **16**(3), 235-239.

Wang, J., Wang, Y., Tang, Q., Wang, Y., Chang, Y., Zhao, Q. & Xue, C. (2010). Antioxidation activities of low-molecular-weight gelatin hydrolysate isolated from the sea cucumber. *Journal of Ocean University of China (English Edition)*, **9**(1), 94-98.

Wannebo, W. (2009). Tablettknusing i sykehjem. *forskning*, **nr 1**, 6-15.

Webster, J. & Oxley, D. (2005), Peptide Mass Fingerprinting. Zanders, Edward D. *Chemical genomics: reviews and protocols*. Totowa. 227-240.

Williams, A. (2003). *Transdermal and topical drug delivery: from theory to clinical practice*. Pharmaceutical Press. London. xii, 242 s.

Zeiss, C. (2011a). *Confocal fluorescence microscopy* [online]. Kilde: Carl Zeiss MicroImaging GmbH. Tilgjengelig fra: <http://www.zeiss.de/c1256b5e0047ff3f/Contents-Frame/ff9e322f5bce42ccc1256c3e003679fd>. (Lesedato: 11.05.2011)

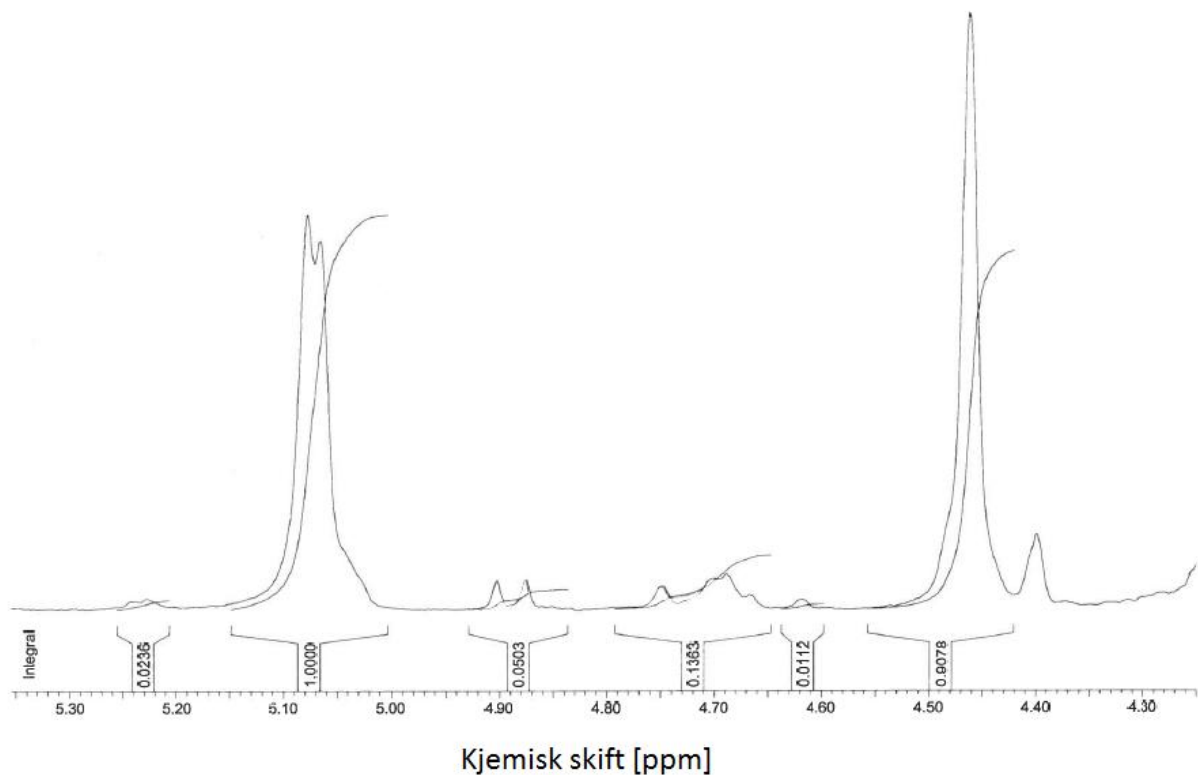
Zeiss, C. (2011b). *Origin of Fluorescence* [online]. Kilde: Carl Zeiss MicroImaging GmbH. Tilgjengelig fra: <http://www.zeiss.de/C12567BE0045ACF1/Contents-Frame/74D566FAF1BBD9B4C1256AB2003F3376>. (Lesedato: 11.05.2011)

Vedleggsliste

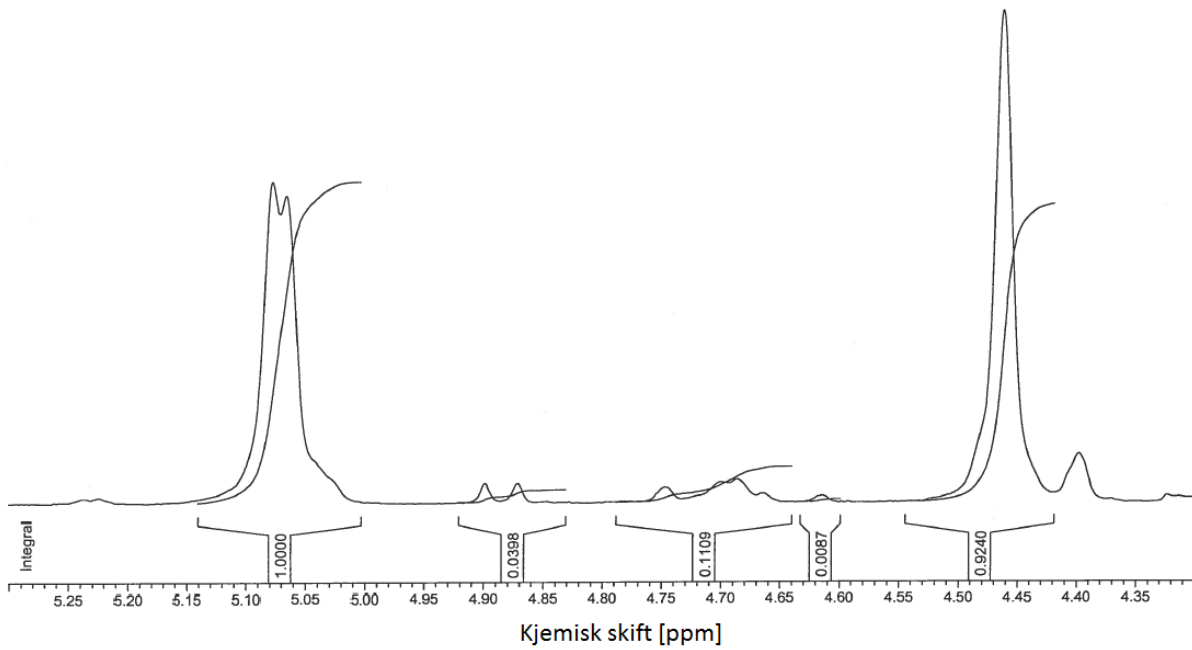
Vedlegg A: $^1\text{H-NMR}$	A
Vedlegg B: SEC-MALLS.....	C
B.1 FG-2t-A.....	C
B.2 FG-2t-C.....	D
B.3 FG-6t-A	E
B.4 FG-6t-C.....	F
B.5 FG-18t-A	G
B.6 FG-18t-C.....	H
B.7 FG-24t-A	I
B.8 FG-24t-C.....	J
Vedlegg C: MALDI-TOF	K
C.1 FG-2t-A	K
C.2 FG-2t-C.....	L
C.3 FG-6t-A	M
C.4 FG-6t-C.....	O
C.5 FG-18t-A	Q
C.6 FG-18t-C.....	R
C.7 FG-24t-A	S
C.8 FG-24t-C.....	T
Vedlegg D: Merkningsgrad	U

Vedlegg A: $^1\text{H-NMR}$

$^1\text{H-NMR}$ ble benyttet for å finne gjennomsnittlig polymerisasjonsgrad (\overline{DP}_n) og fraksjonene av M- og G monomerer (F_M og F_G) for G-blokk prøvene G-DP18 og G-DP22. Metoden ble gjennomført av Wenche Iren Strand, avdelingsingeniør ved institutt for bioteknologi. Fremgangsmåten er beskrevet i kapitel 2.5.1. $^1\text{H-NMR}$ spektrene for henholdsvis G-DP18 og G-DP22 er gitt i figur A.1 og A.2. De kalkulerte verdiene fra spektrene er gitt i kapitel 3.1.2.



Figur A.1: $^1\text{H-NMR}$ spektret for G-blokkprøven G-DP18.

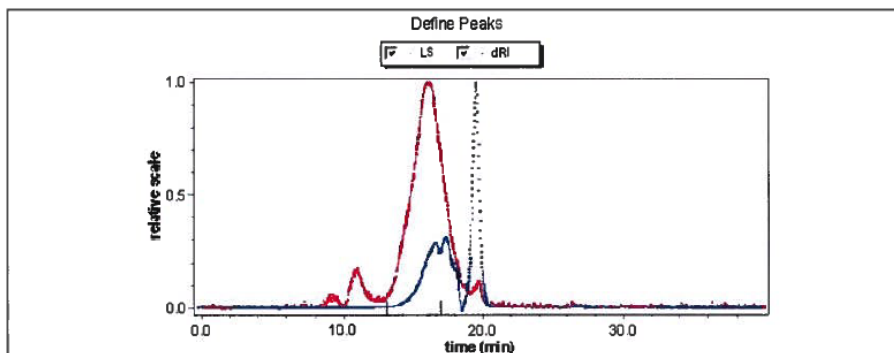


Figur A.2: $^1\text{H-NMR}$ spektret for G-blokkprøven G-DP22.

Vedlegg B: SEC-MALLS

SEC-MALLS ble benyttet for å finne molekylvektene M_w og M_n , for de ulike fraksjonerte FG-peptidene (kap. 2.4.2). Metoden ble gjennomført av Ann-Sissel Teialeret Ulset, avdelingsingeniør ved institutt for bioteknologi. Fremgangsmåten er beskrevet i kapittel 2.5.2. All data funnet fra SEC-MALLS er gitt i dette vedlegget.

B.1 FG-2t-A



CONFIGURATION

Light scattering instrument: DAWN HELEOS
 Cell type: K5
 Laser wavelength: 658.0 nm
 Calibration constant: 2.8301e-5 1/(V cm)
 RI instrument: Optilab rEX
 UV instrument: n/a
 Solvent: water
 Refractive index: 1.331
 Flow rate: 0.500 mL/min

PROCESSING

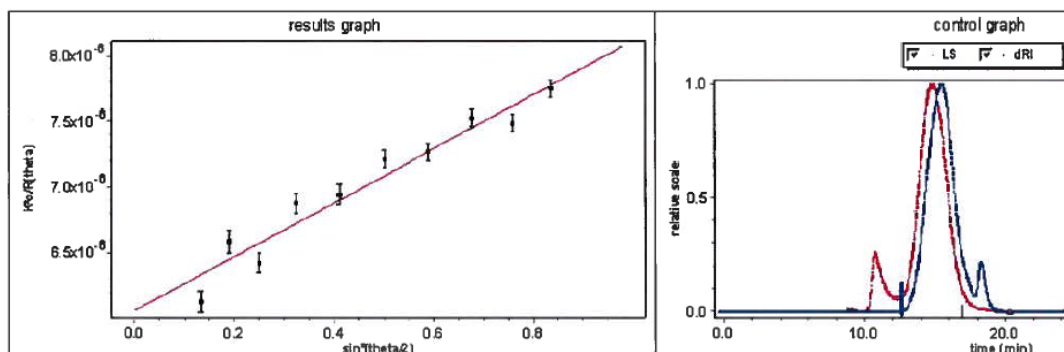
Processing time: Friday April 29, 2011 02:11 PM W. Europe Daylight Time
 Collection time: Thursday April 28, 2011 07:31 PM W. Europe Daylight Time
 Detectors used: 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
 Concentration detector: RI
 Mass results fitting: none (fit degree: n/a)
 Radius results fitting: none (fit degree: n/a)

Peak 1	
Peak limits (min)	13.129 - 16.884
dn/dc (mL/g)	0.190
A_2 (mol mL/g ²)	1.000e-3
UV ext. (mL/(g cm))	0.000
Model	Zimm
Fit degree	1
Injected mass (g)	1.0000e-3
Calc. mass (g)	2.7830e-4

RESULTS

Peak 1	
Polydispersity	
Mw/Mn	1.228 (2%)
Mz/Mn	1.730 (4%)
Molar mass moments (g/mol)	
Mn	4.297e+3 (2%)
Mp	3.097e+3 (2%)
Mv	n/a
Mw	5.276e+3 (2%)
Mz	7.433e+3 (4%)
rms radius moments (nm)	
Rn	17.5 (22%)
Rw	17.4 (21%)
Rz	17.7 (20%)

B.2 FG-2t-C

**CONFIGURATION**

Light scattering instrument: DAWN HELEOS
 Cell type: K5
 Laser wavelength: 658.0 nm
 Calibration constant: $2.8301e-5$ 1/(V cm)
 RI instrument: Optilab rEX
 UV instrument: n/a
 Solvent: water
 Refractive index: 1.331
 Flow rate: 0.500 mL/min

PROCESSING

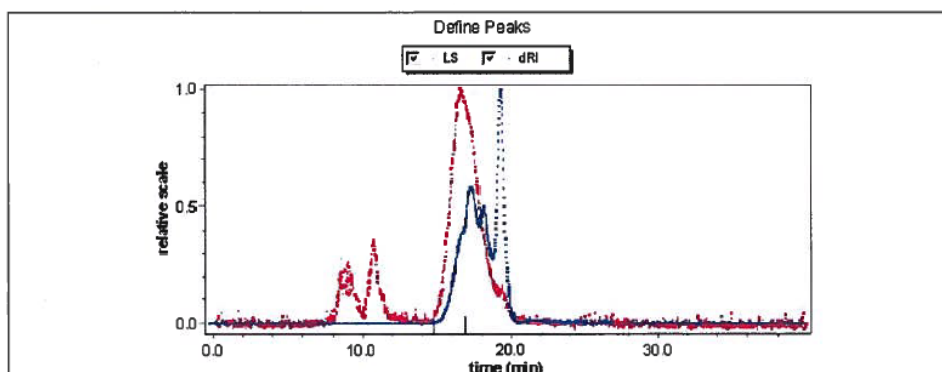
Processing time: Friday April 29, 2011 02:08 PM W. Europe Daylight Time
 Collection time: Thursday April 28, 2011 06:49 PM W. Europe Daylight Time
 Detectors used: 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
 Concentration detector: RI
 Mass results fitting: none (fit degree: n/a)
 Radius results fitting: none (fit degree: n/a)

Peak 1	
Peak limits (min)	12.679 - 16.907
dn/dc (mL/g)	0.190
A_2 (mol mL/g ²)	$1.000e-3$
UV ext. (mL/(g cm))	0.000
Model	Zimm
Fit degree	1
Injected mass (g)	$1.0000e-3$
Calc. mass (g)	$7.5409e-4$

RESULTS

Peak 1	
Polydispersity	
Mw/Mn	1.280 (2%)
Mz/Mn	1.832 (4%)
Molar mass moments (g/mol)	
Mn	$7.130e+3$ (2%)
Mp	$6.817e+3$ (1%)
Mv	n/a
Mw	$9.124e+3$ (2%)
Mz	$1.306e+4$ (3%)
rms radius moments (nm)	
Rn	16.7 (22%)
Rw	16.7 (21%)
Rz	18.1 (18%)

B.3 FG-6t-A



CONFIGURATION

Light scattering instrument: DAWN HELEOS
Cell type: K5
Laser wavelength: 658.0 nm
Calibration constant: 2.8301e-5 1/(V cm)
RI Instrument: Optilab rEX
UV Instrument: n/a
Solvent: water
Refractive index: 1.331
Flow rate: 0.500 mL/min

PROCESSING

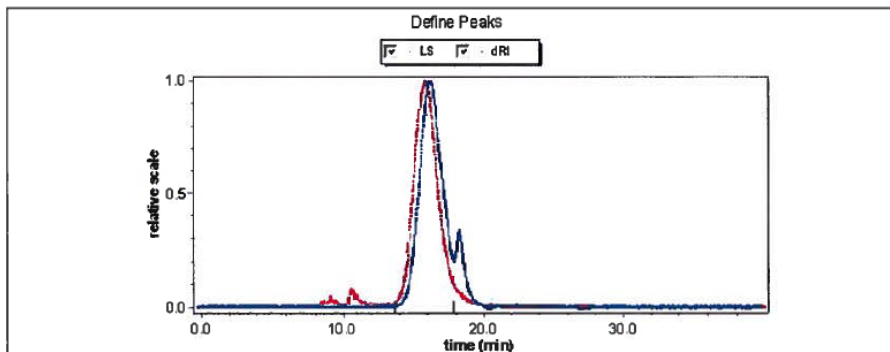
Processing time: Friday April 29, 2011 02:00 PM W. Europe Daylight Time
Collection time: Thursday April 28, 2011 03:59 PM W. Europe Daylight Time
Detectors used: 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
Concentration detector: RI
Mass results fitting: none (fit degree: n/a)
Radius results fitting: none (fit degree: n/a)

Peak 1
Peak limits (min) 14.790 - 16.905
dn/dc (mL/g) 0.148
A₂ (mol mL/g²) 2.000e-4
UV ext. (mL/(g cm)) 0.000
Model Zimm
Fit degree 1
Injected mass (g) 5.0000e-4
Calc. mass (g) 1.0398e-4

RESULTS

Peak 1
Polydispersity
Mw/Mn 1.060 (3%)
Mz/Mn 1.188 (8%)
Molar mass moments (g/mol)
Mn 3.857e+3 (2%)
Mp 3.116e+3 (2%)
Mv n/a
Mw 4.090e+3 (2%)
Mz 4.583e+3 (8%)
rms radius moments (nm)
Rn 16.7 (24%)
Rw 16.4 (27%)
Rz 16.8 (31%)

B.4 FG-6t-C



CONFIGURATION

Light scattering instrument: DAWN HELEOS
 Cell type: K5
 Laser wavelength: 658.0 nm
 Calibration constant: 2.8301e-5 1/(V cm)
 RI instrument: Optilab rEX
 UV instrument: n/a
 Solvent: water
 Refractive index: 1.331
 Flow rate: 0.500 mL/min

PROCESSING

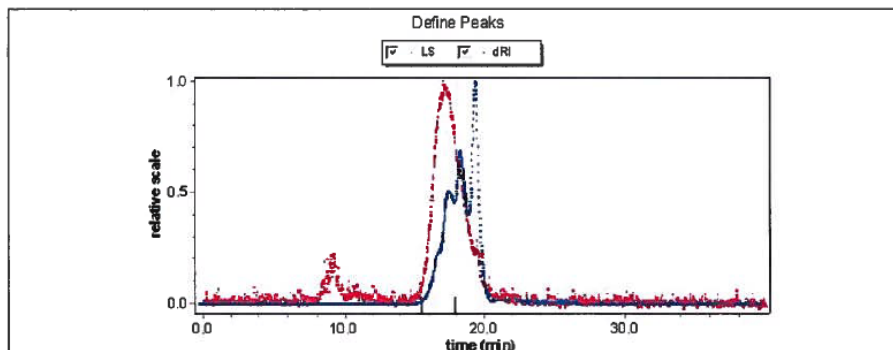
Processing time: Friday April 29, 2011 02:02 PM W. Europe Daylight Time
 Collection time: Thursday April 28, 2011 04:41 PM W. Europe Daylight Time
 Detectors used: 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
 Concentration detector: RI
 Mass results fitting: none (fit degree: n/a)
 Radius results fitting: none (fit degree: n/a)

Peak 1	
Peak limits (min)	13.753 - 17.943
dn/dc (mL/g)	0.190
A ₂ (mol mL/g ²)	1.000e-3
UV ext. (mL/(g cm))	0.000
Model	Zimm
Fit degree	1
Injected mass (g)	1.0000e-3
Calc. mass (g)	5.0732e-4

RESULTS

Peak 1	
Polydispersity	
Mw/Mn	1.154 (3%)
Mz/Mn	1.406 (5%)
Molar mass moments (g/mol)	
Mn	3.814e+3 (2%)
Mp	3.881e+3 (2%)
Mv	n/a
Mw	4.402e+3 (2%)
Mz	5.361e+3 (4%)
rms radius moments (nm)	
Rn	21.2 (20%)
Rw	20.5 (20%)
Rz	19.9 (19%)

B.5 FG-18t-A

**CONFIGURATION**

Light scattering instrument: DAWN HELEOS
 Cell type: K5
 Laser wavelength: 658.0 nm
 Calibration constant: 2.8301e-5 1/(V cm)
 RI instrument: Optilab rEX
 UV instrument: n/a
 Solvent: water
 Refractive index: 1.331
 Flow rate: 0.500 mL/min

PROCESSING

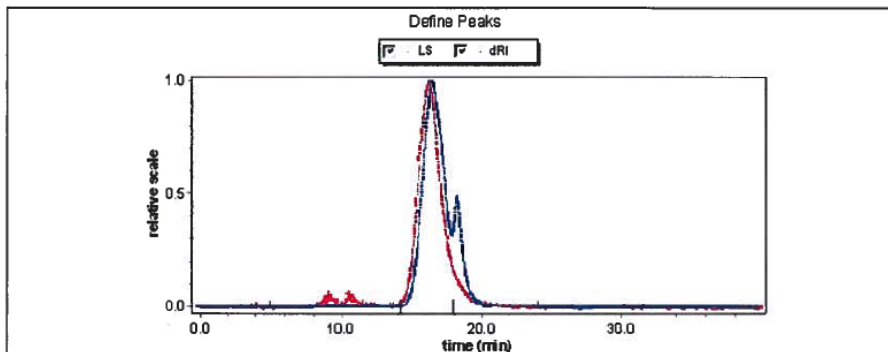
Processing time: Friday April 29, 2011 02:40 PM W. Europe Daylight Time
 Collection time: Thursday April 28, 2011 05:24 PM W. Europe Daylight Time
 Detectors used: 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
 Concentration detector: RI
 Mass results fitting: none (fit degree: n/a)
 Radius results fitting: none (fit degree: n/a)

Peak 1
 Peak limits (min) 15.443 - 17.877
 dn/dc (mL/g) 0.190
 A₂ (mol mL/g²) 1.000e-3
 UV ext. (mL(g cm)) 0.000
 Model Zimm
 Fit degree 1
 Injected mass (g) 1.0000e-3
 Calc. mass (g) 1.4570e-4

RESULTS

Peak 1
Polydispersity
 Mw/Mn 1.130 (3%)
 Mz/Mn 1.319 (6%)
Molar mass moments (g/mol)
 Mn 1.635e+3 (2%)
 Mp 1.310e+3 (2%)
 Mv n/a
 Mw 1.847e+3 (2%)
 Mz 2.156e+3 (6%)
rms radius moments (nm)
 Rn 21.9 (18%)
 Rw 21.4 (18%)
 Rz 20.9 (20%)

B.6 FG-18t-C



CONFIGURATION

Light scattering instrument: DAWN HELEOS
 Cell type: K5
 Laser wavelength: 658.0 nm
 Calibration constant: 2.8301e-5 1/(V cm)
 RI Instrument: Optilab rEX
 UV Instrument: n/a
 Solvent: water
 Refractive Index: 1.331
 Flow rate: 0.500 mL/min

PROCESSING

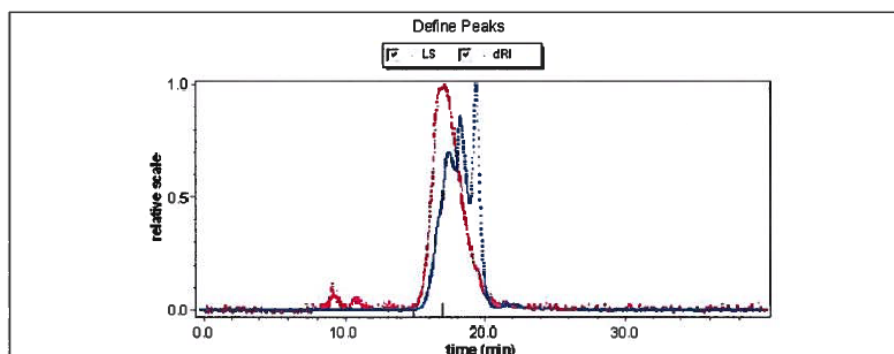
Processing time: Friday April 29, 2011 02:07 PM W. Europe Daylight Time
 Collection time: Thursday April 28, 2011 06:06 PM W. Europe Daylight Time
 Detectors used: 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
 Concentration detector: RI
 Mass results fitting: none (fit degree: n/a)
 Radius results fitting: none (fit degree: n/a)

Peak 1	
Peak limits (min)	14.279 - 17.951
dn/dc (mL/g)	0.190
A ₂ (mol mL/g ²)	1.000e-3
UV ext. (mL/(g cm))	0.000
Model	Zimm
Fit degree	1
Injected mass (g)	1.0000e-3
Calc. mass (g)	3.9870e-4

RESULTS

Peak 1	
Polydispersity	
Mw/Mn	1.108 (3%)
Mz/Mn	1.285 (5%)
Molar mass moments (g/mol)	
Mn	3.005e+3 (2%)
Mp	3.061e+3 (2%)
Mv	n/a
Mw	3.329e+3 (2%)
Mz	3.861e+3 (4%)
rms radius moments (nm)	
Rn	19.6 (22%)
Rw	19.0 (22%)
Rz	18.2 (22%)

B.7 FG-24t-A

**CONFIGURATION**

Light scattering instrument: DAWN HELEOS
 Cell type: R5
 Laser wavelength: 658.0 nm
 Calibration constant: 2.8301e-5 1/(V cm)
 RI instrument: Optilab rEX
 UV instrument: n/a
 Solvent: water
 Refractive index: 1.331
 Flow rate: 0.500 mL/min

PROCESSING

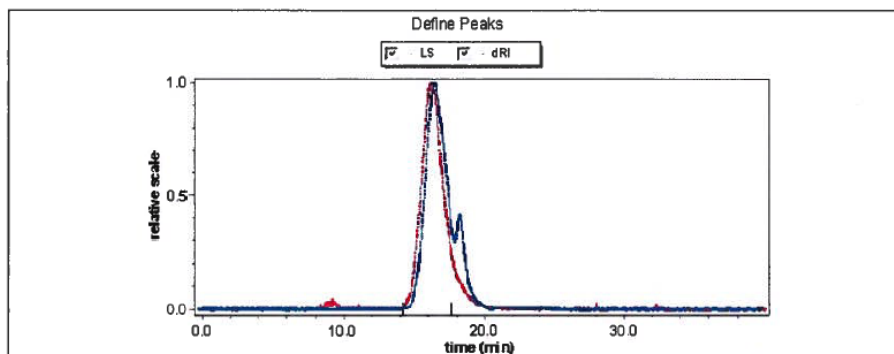
Processing time: Friday April 29, 2011 02:05 PM W. Europe Daylight Time
 Collection time: Thursday April 28, 2011 08:57 PM W. Europe Daylight Time
 Detectors used: 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
 Concentration detector: RI
 Mass results fitting: none (fit degree: n/a)
 Radius results fitting: none (fit degree: n/a)

	Peak 1
Peak limits (min)	14.872 - 16.947
dn/dc (mL/g)	0.190
A ₂ (mol mL/g ²)	1.000e-3
UV ext. (mL/(g cm))	0.000
Model	Zimm
Fit degree	1
Injected mass (g)	1.0000e-3
Calc. mass (g)	1.1814e-4

RESULTS

	Peak 1
Polydispersity	
Mw/Mn	1.045 (3%)
Mz/Mn	1.138 (7%)
Molar mass moments (g/mol)	
Mn	2.644e+3 (2%)
Mp	2.165e+3 (2%)
Mv	n/a
Mw	2.763e+3 (2%)
Mz	3.010e+3 (7%)
rms radius moments (nm)	
Rn	15.1 (34%)
Rw	14.9 (36%)
Rz	14.8 (41%)

B.8 FG-24t-C

**CONFIGURATION**

Light scattering instrument: DAWN HELEOS
 Cell type: K5
 Laser wavelength: 658.0 nm
 Calibration constant: 2.8301e-5 1/(V cm)
 RI Instrument: Optilab rEX
 UV Instrument: n/a
 Solvent: water
 Refractive index: 1.331
 Flow rate: 0.500 mL/min

PROCESSING

Processing time: Friday April 29, 2011 02:13 PM W. Europe Daylight Time
 Collection time: Thursday April 28, 2011 08:14 PM W. Europe Daylight Time
 Detectors used: 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
 Concentration detector: RI
 Mass results fitting: none (fit degree: n/a)
 Radius results fitting: none (fit degree: n/a)

Peak 1
 Peak limits (min) 14.234 - 17.785
 dn/dc (mL/g) 0.190
 A₂ (mol mL/g²) 1.000e-3
 UV ext. (mL/(g cm)) 0.000
 Model Zimm
 Fit degree 1
 Injected mass (g) 1.0000e-3
 Calc. mass (g) 5.2845e-4

RESULTS

Peak 1
 Polydispersity
 Mw/Mn 1.107 (3%)
 Mz/Mn 1.292 (5%)
 Molar mass moments (g/mol)
 Mn 3.048e+3 (2%)
 Mp 3.068e+3 (2%)
 Mv n/a
 Mw 3.374e+3 (2%)
 Mz 3.938e+3 (4%)
 rms radius moments (nm)
 Rn 19.3 (22%)
 Rw 18.8 (22%)
 Rz 18.3 (22%)

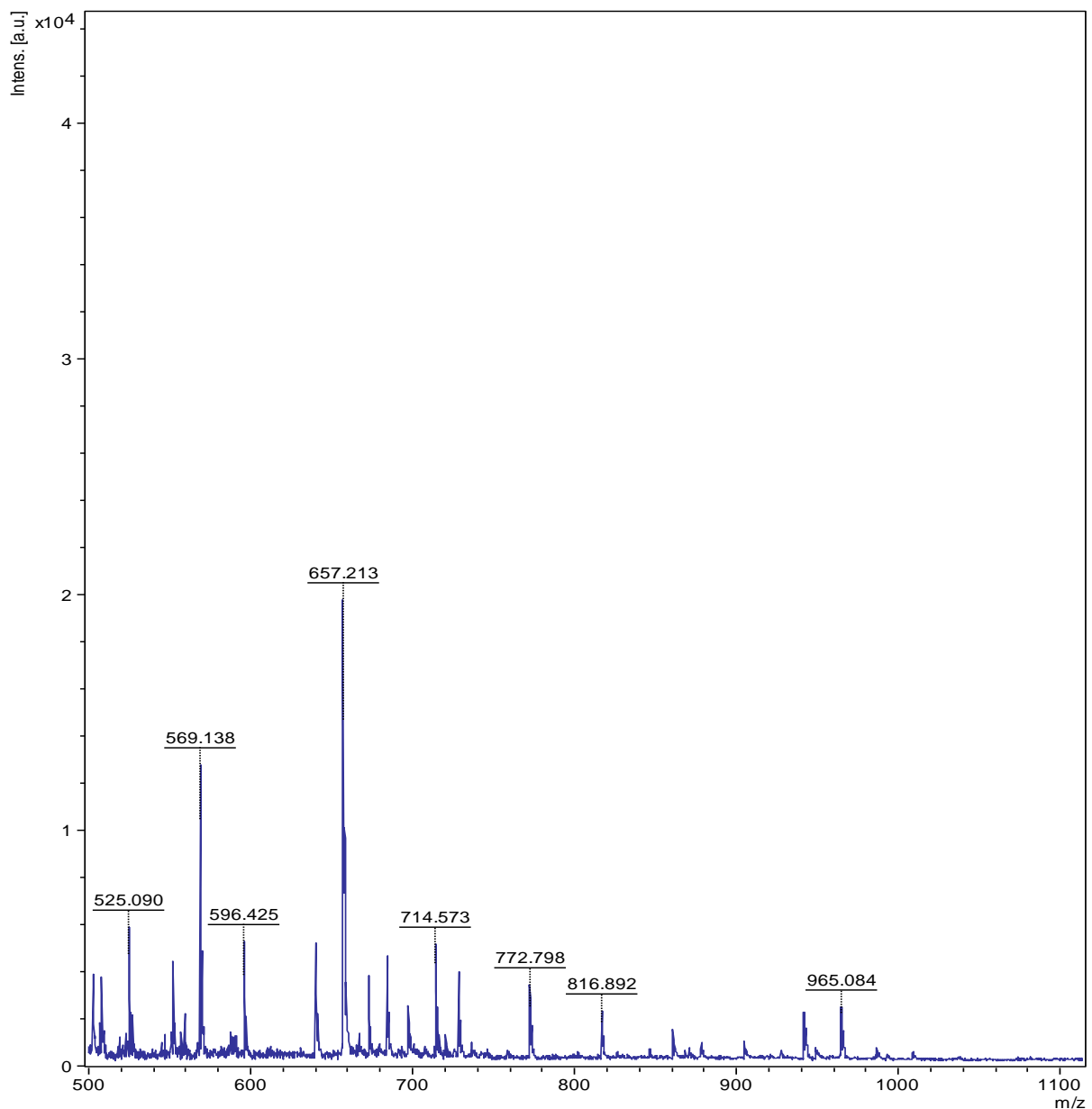
Vedlegg C: MALDI-TOF

MALDI-TOF ble benyttet for å finne molekylvektene M_w og M_n , for de ulike fraksjonerte FG-peptidene (kap. 2.4.2). Metoden ble gjennomført av Kåre Andre Kristiansen, overingeniør ved institutt for bioteknologi. Fremgangsmåten er beskrevet i kapitel 2.5.3.

MALDI-TOF spektrene er gitt i dette vedlegget, mens rådata er gitt på vedlagt cd.

C.1 FG-2t-A

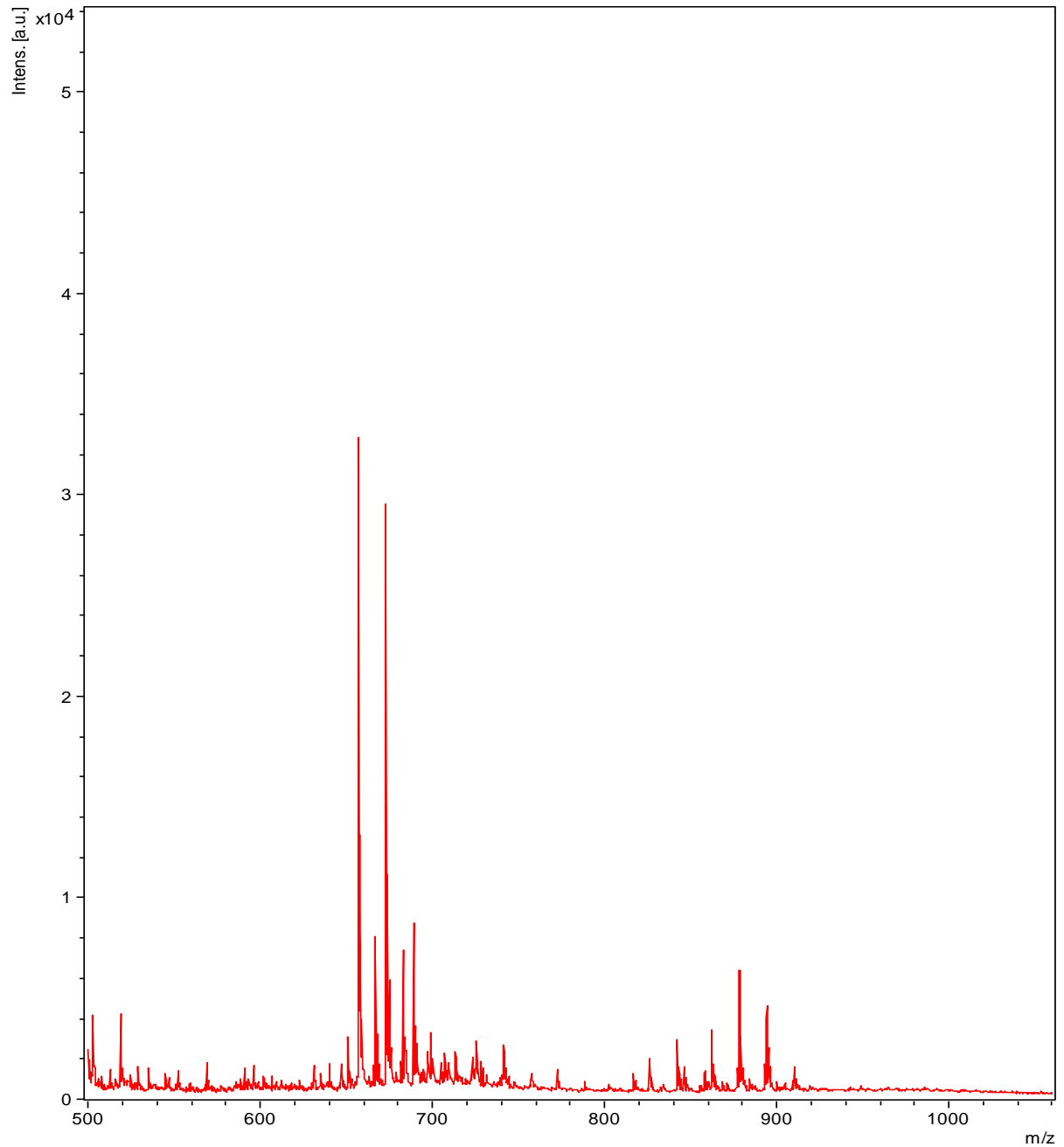
Figur C.1 viser MALDI-TOF spekteret for FG-2t-A.



C.1: MALDI-TOF spekter for FG-2t-A. Der x-aksen og y-aksen henholdsvis gir molekylvekt og intensitet. Verdiene i diagrammet er molekylvekten til toppene som vises.

C.2 FG-2t-C

Figur C.2 viser MALDI-TOF spekteret for FG-2t-C.



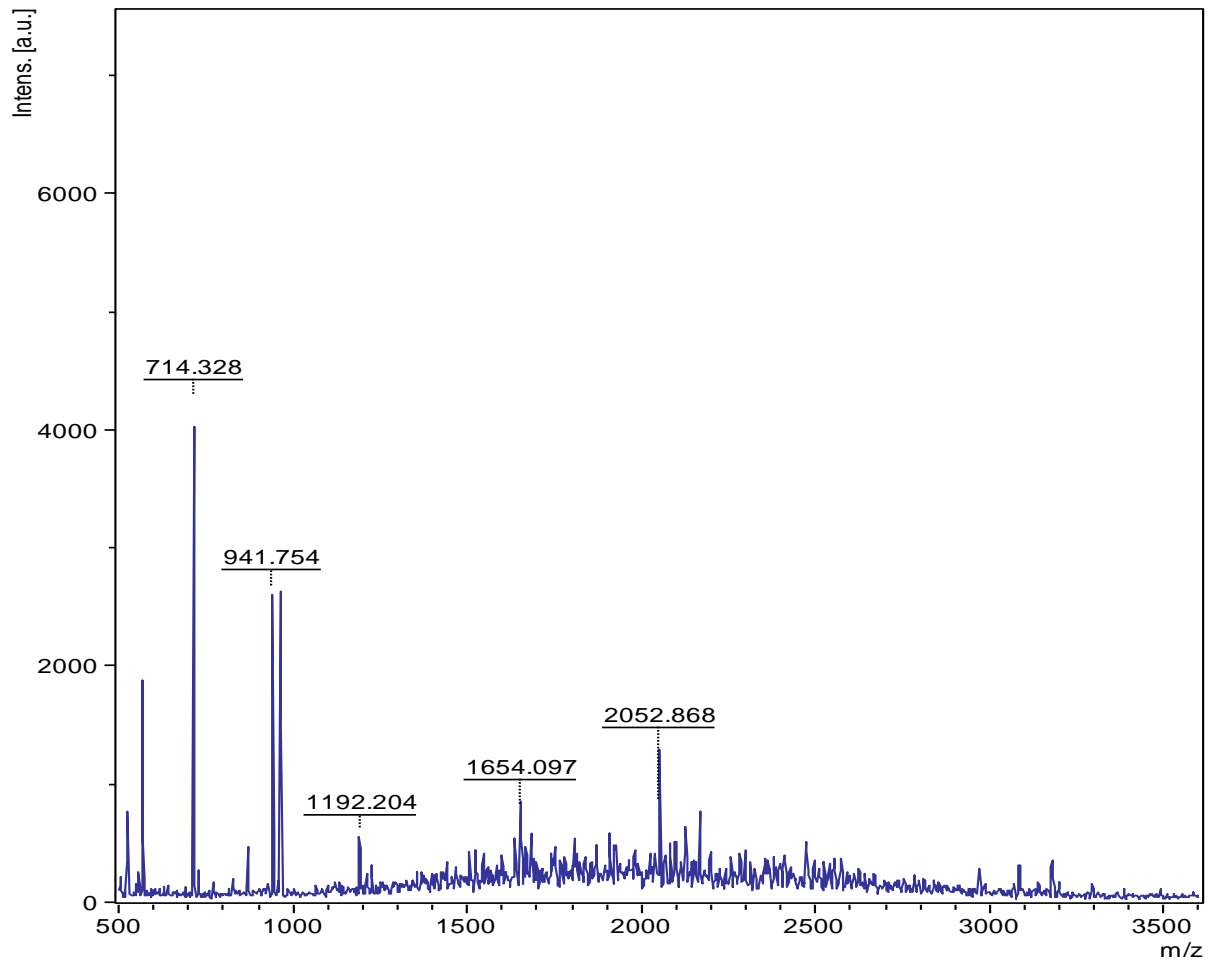
Figur C.2: MALDI-TOF spekter for FG-2t-A. Der x-aksen og y-aksen henholdsvis gir molekylvekt og intensitet. Verdiene i diagrammet er molekylvekten til toppene som vises.

C.3 FG-6t-A

Analysen av FG-6t-A ble gjennomført to ganger, for å få mest mulig korrekte resultater.

Parallell 1

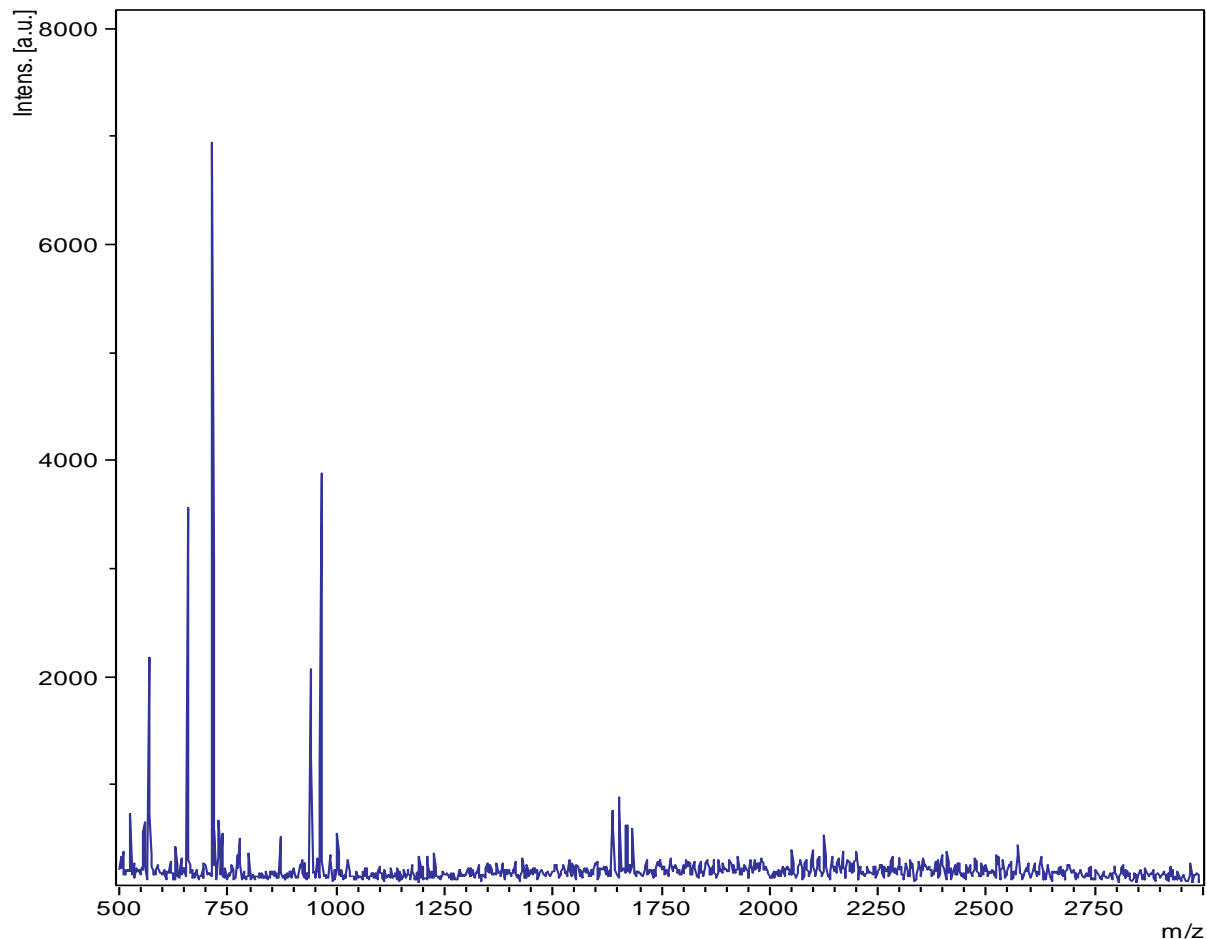
Figur C.3 viser MALDI-TOF spekteret for FG-6t-A.



Figur C.3: MALDI-TOF spekter for FG-6t-A. Der x-aksen og y-aksen henholdsvis gir molekylvekt og intensitet. Verdiene i diagrammet er molekylvekten til toppene som vises.

Parallell 2

Figur C.4 viser MALDI-TOF spekteret for FG-6t-A.



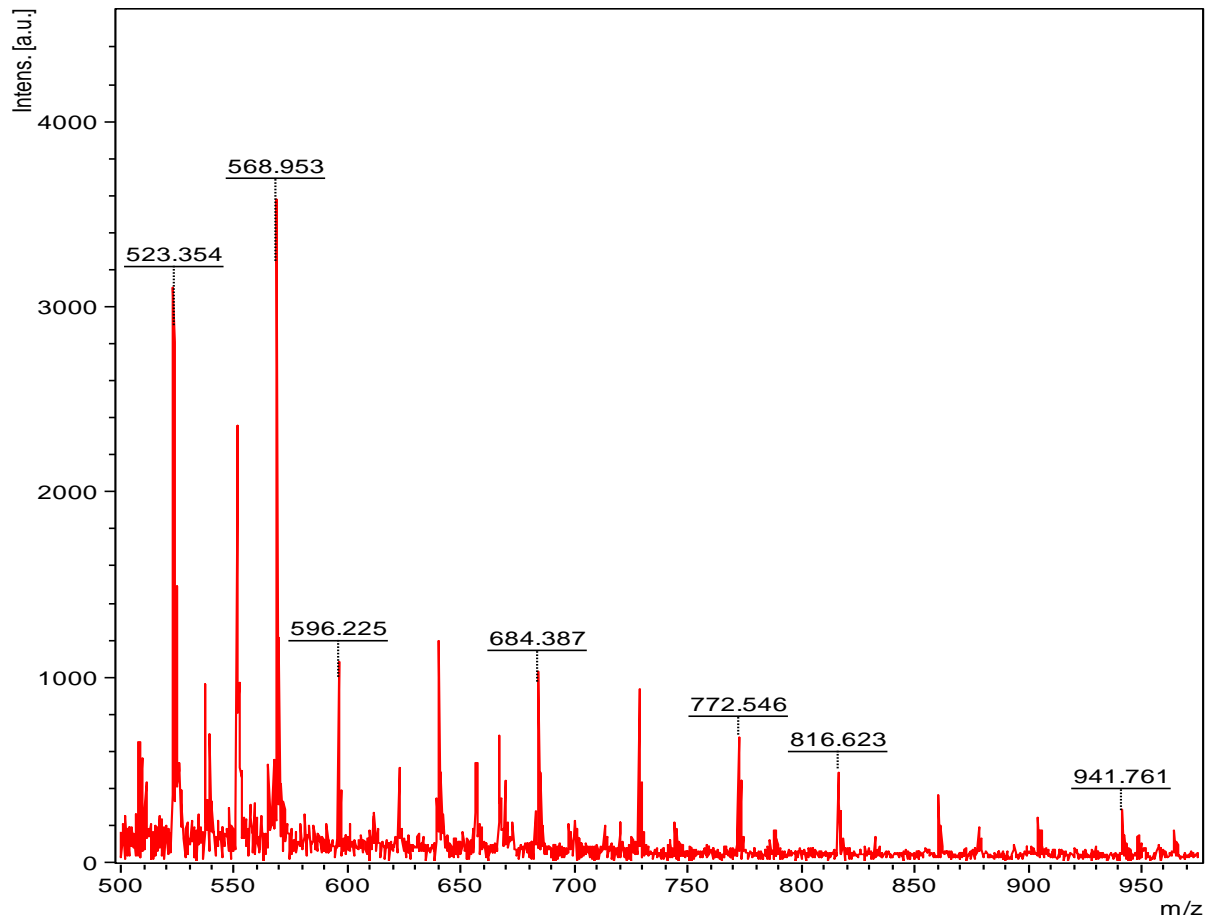
Figur C.4: MALDI-TOF spekter for FG-6t-A. Der x-aksen og y-aksen henholdsvis gir molekylvekt og intensitet. Verdiene i diagrammet er molekylvekten til toppene som vises.

C.4 FG-6t-C

Analysen av FG-6t-C ble gjennomført to ganger, for å få mest mulig korrekte resultater.

Parallell 1

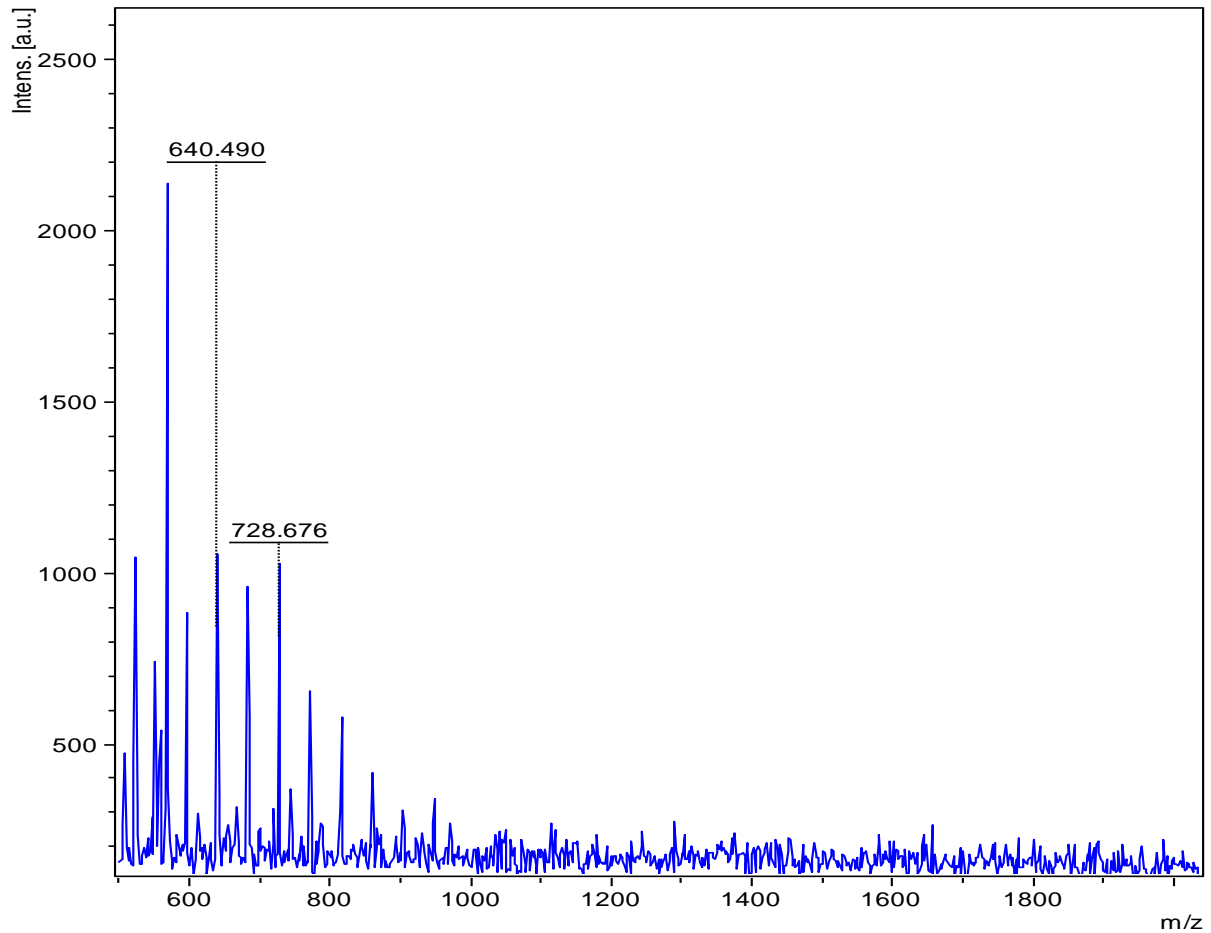
Figur C.5 viser MALDI-TOF spekteret for FG-6t-C.



Figur C.5: MALDI-TOF spekter for FG-6t-C. Der x-aksen og y-aksen henholdsvis gir molekylvekt og intensitet. Verdiene i diagrammet er molekylvekten til toppene som vises.

Parallell 2

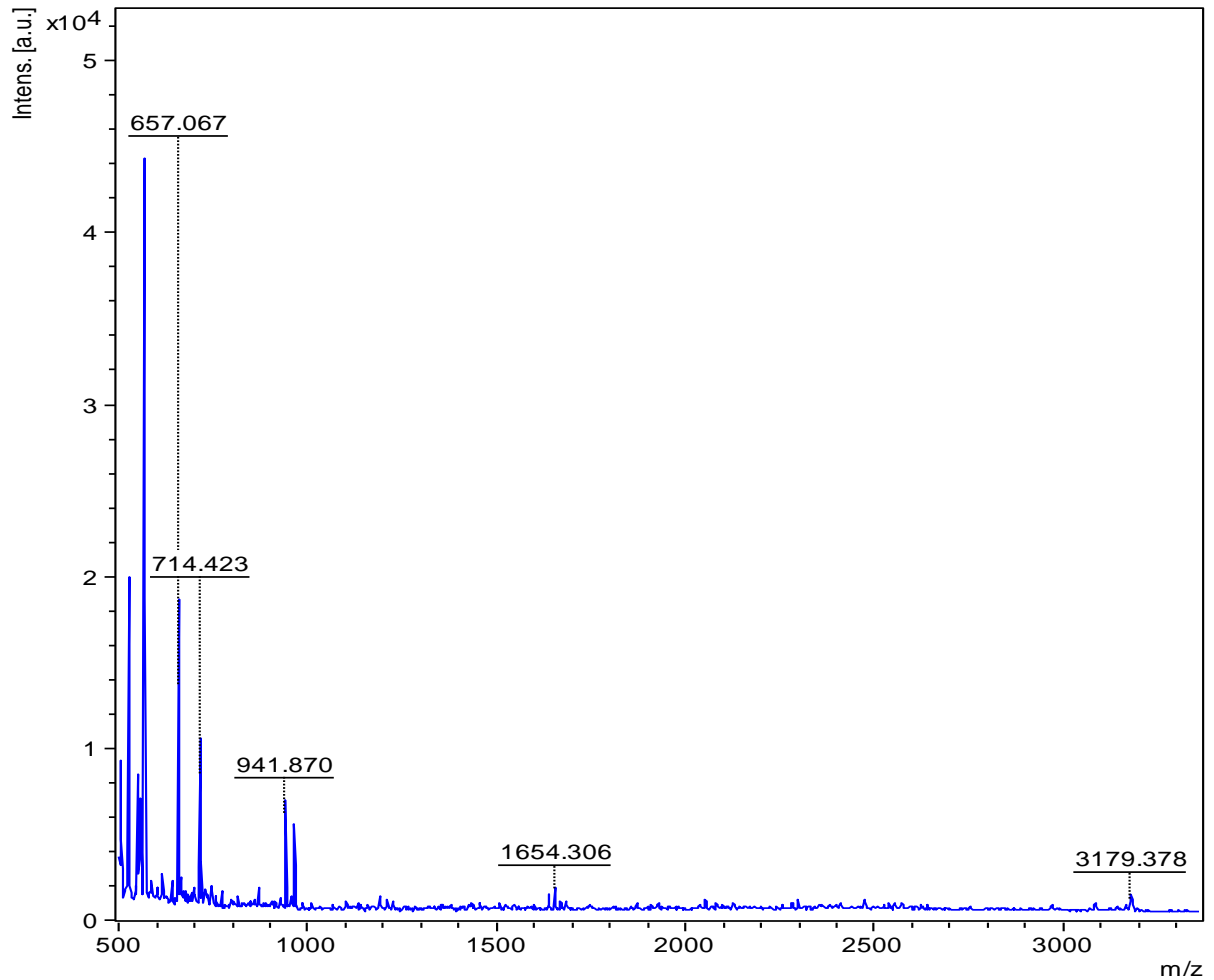
Figur C.6 viser MALDI-TOF spekteret for FG-6t-C.



Figur C.6: MALDI-TOF spekter for FG-6t-C. Der x-aksen og y-aksen henholdsvis gir molekylvekt og intensitet. Verdiene i diagrammet er molekylvekten til toppene som vises.

C.5 FG-18t-A

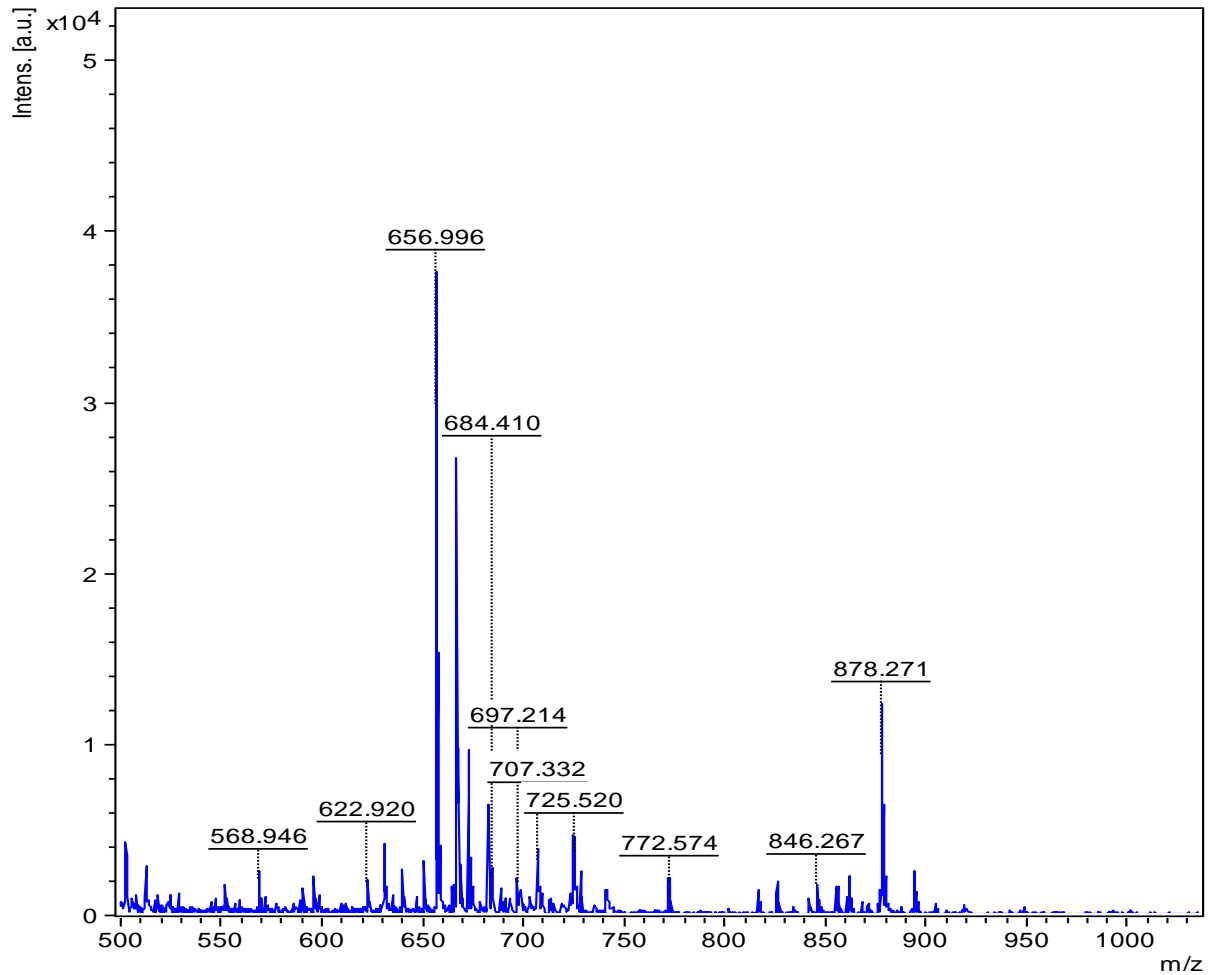
Figur C.7 viser MALDI-TOF spekteret for FG-18t-A.



Figur C.7: MALDI-TOF spekter for FG-18t-A. Der x-aksen og y-aksen henholdsvis gir molekylvekt og intensitet. Verdiene i diagrammet er molekylvekten til toppene som vises.

C.6 FG-18t-C

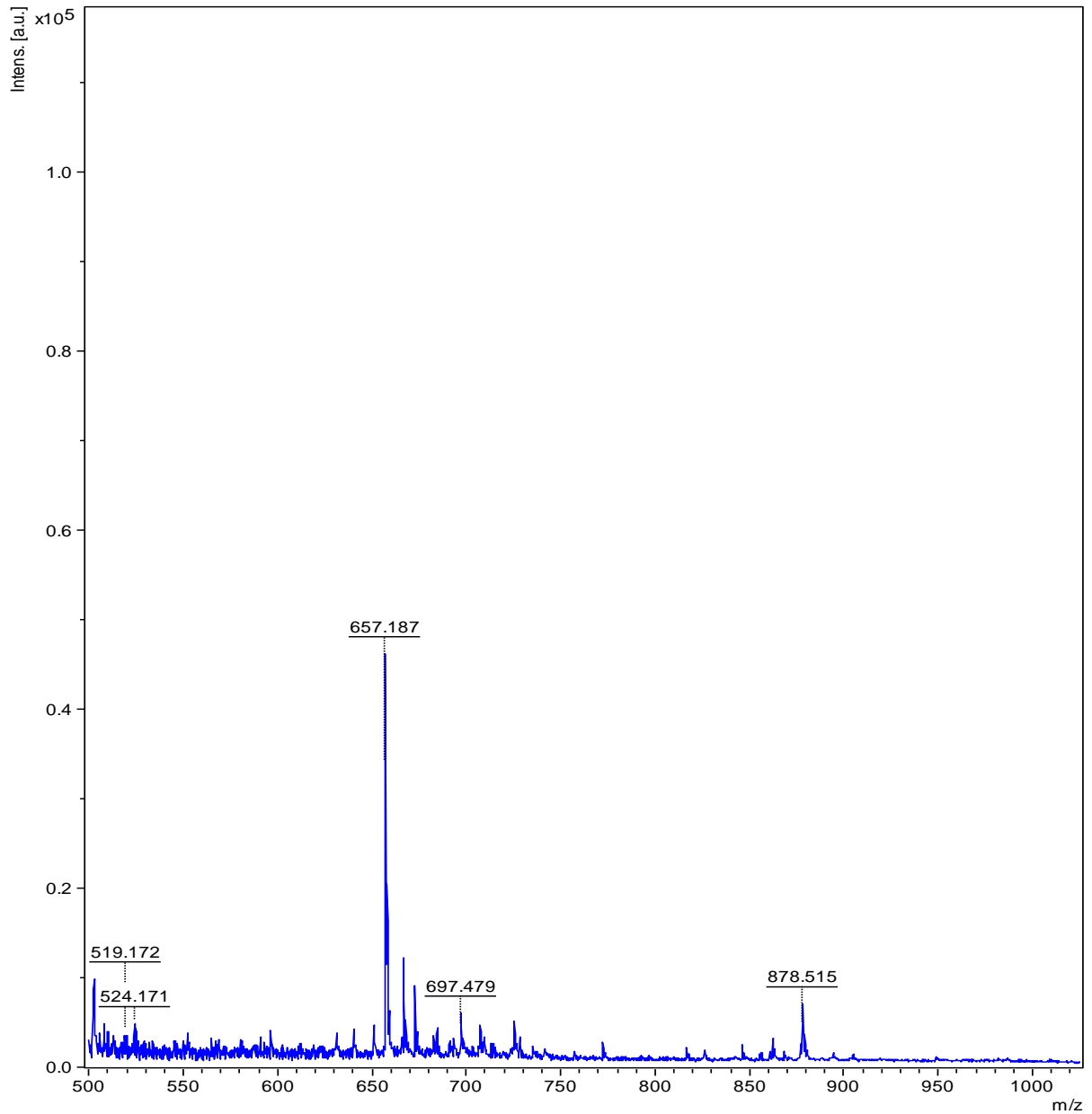
Figur C.8 viser MALDI-TOF spekteret for FG-18t-C.



C.8: MALDI-TOF spekter for FG-18t-C. Der x-aksen og y-aksen henholdsvis gir molekylvekt og intensitet. Verdiene i diagrammet er molekylvekten til toppene som vises.

C.7 FG-24t-A

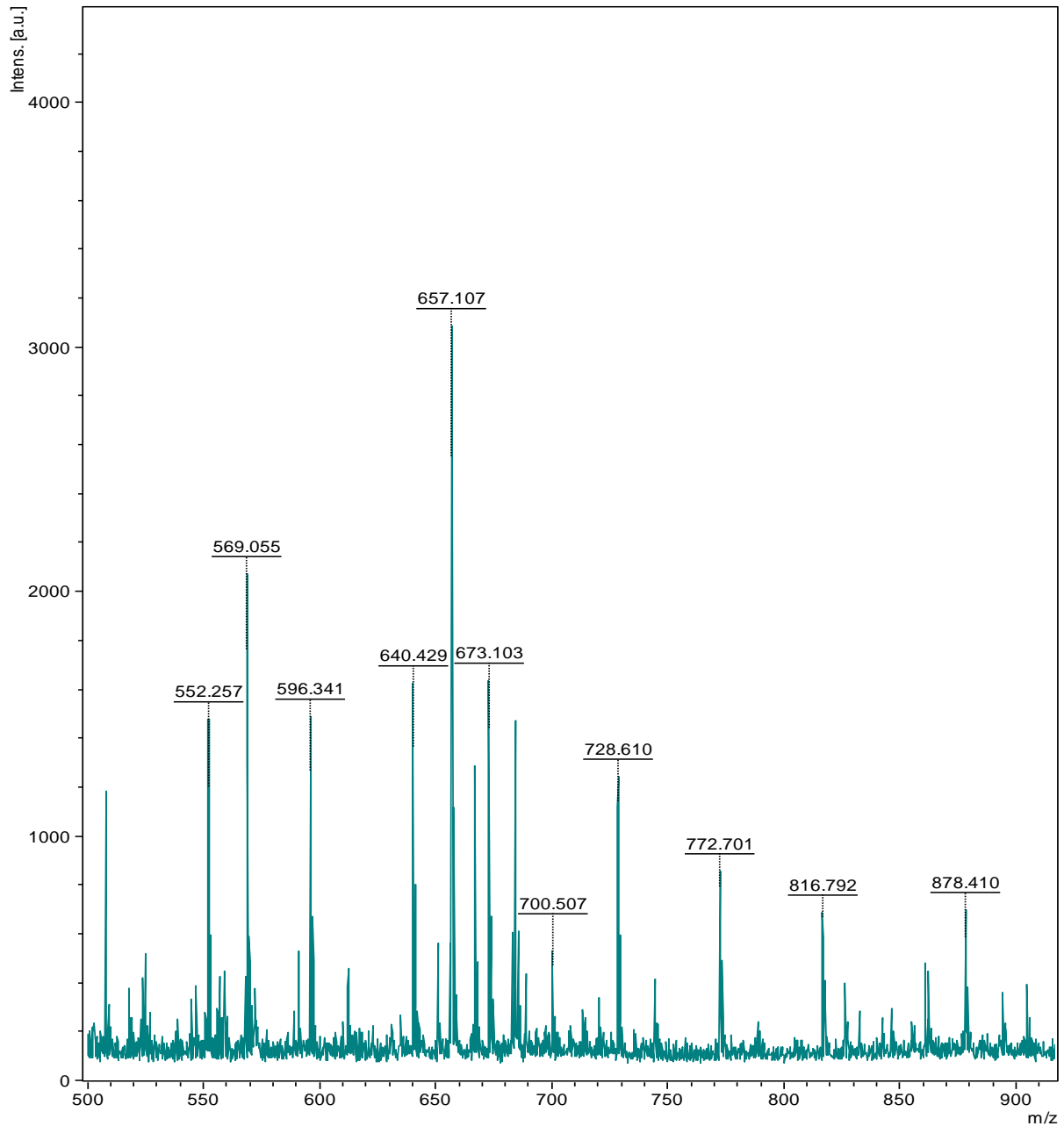
Figur C.9 viser MALDI-TOF spekteret for FG-24t-A.



Figur C.9: MALDI-TOF spekter for FG-24t-A. Der x-aksen og y-aksen henholdsvis gir molekylvekt og intensitet. Verdiene i diagrammet er molekylvekten til toppene som vises.

C.8 FG-24t-C

Figur C.10 viser MALDI-TOF spekteret for FG-24t-C.



Figur C.10: MALDI-TOF spekter for FG-24t-C. Der x-aksen og y-aksen henholdsvis gir molekylvekt og intensitet. Verdiene i diagrammet er molekylvekten til toppene som vises.

Vedlegg D: Merkningsgrad

Merkningsgraden ble funnet ved hjelp av metoden beskrevet i kapittel 2.5.5. A_{\max} for de ulike prøvene er gitt i tabell D.1, der A_{\max} er absorbansen målt ved λ_{\max} .

Tabell D.1: A_{\max} for de ulike G-blokkene og FG-peptidene benyttet i forsøkene. A_{\max} ble videre benyttet for å regne ut merkningsgraden til prøvene.

Prøver	A_{\max}
G-DP18	0.007
G-DP22	0.004
FG-2t-A-488	0.053
FG-2t-C-488	0.046
FG-6t-A-488	0.074
FG-6t-C-488	0.019
FG-18t-C-532	0.040
FG-24t-C-532	0.014