

Divya Fernando

Bioaktive lipofile stoffer og deres effekt på inflammasjon i SH-SY5Y celler.

Masteroppgave i Farmasi

Veileder: Bodil Bjørndal

Juni 2019

Divya Fernando

Bioaktive lipofile stoffer og deres effekt på inflammasjon i SH-SY5Y celler.

Masteroppgave i Farmasi
Veileder: Bodil Bjørndal
Juni 2019

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for medisin og helsevitenskap
Institutt for klinisk og molekylær medisin

FORORD

Arbeidet med denne oppgaven ble utført på Lipid forskningsgruppen ved Klinisk Institutt 2 fra august 2018 til mai 2019.

En varm takk rettes til min hovedveileder Bodil Bjørndal for faglige kunnskap, for gode råd, veiledning og innspill til oppgaven. Jeg vil også takke min biveileder Rolf Kristian Berge for ditt store engasjement og kompetanse, og interesse for å gjøre prosjektet best mulig.

I tillegg ønsker jeg å takke hele lipidgruppen; Liv Kristine Øyesæd, Kari Williams, Kari H. Mortensen og Randi Sandvik for hyggelig og sosialt samvær. En spesiell takk vil jeg rette til Liv Kristine Øyesæd, Randi Sandvik og Kari Williams som alltid har tatt seg tid til å hjelpe og også gitt meg god opplæring på laboratoriet, i tillegg til ulike laboratoriemetoder. Dere alle gjør en super jobb på laboratoriet. Takker også til Pavol Bohov som har tatt seg tid og utførte GS-MS analyse i løpet av kort tidsperiode for oss. En stor takk også til Lars Herfindal, Kimberley J. Hatfield, and Lasse Melvær som har delt kunnskap og erfaring.

Masterstudentene Dan Filip Blindheim og Jenny Kristine Rosmer Ihle takkes for hyggelig samarbeid på laboratoriet. Spesielt takk til Dan Filip, du har vært hjelpende hånd på laboratoriet under masteroppgaven.

Linn Camilla Dypvik takk for dine motiverende og oppmuntrende ord under hele masterperioden. Nichola Stephen, min tvilling som jeg har delt både gleder og frustrasjoner særlig under skriveperioden, sitter igjen med mange gode minner som jeg vil komme til å huske i lang tid framover. Evig takknemlig til Guro Osland som har tatt sin tid for innspill og korrekturlesing. Til slutt vil jeg takke familie for all støtte underveis i oppgaven, dere vært en stor støttepute til å jobbe med oppgaven og latt meg få være i min egen " lille boble" i en lang stund.

Bergen, mai 2019
Divya Fernando

Innholdsfortegnelse

FORORD	I
SAMMENDRAG	I
ABSTRACT	III
FORKORTELSER	V
1 INTRODUKSJON	1
1.1 NEURODEGENERATIV SYKDOMMER	1
1.2 INFLAMMASJONS RESPONS.....	1
1.3 CYTOKINER -INFLAMMASJONSMARKØRER	5
1.4 MITOKONDRIA -STRUKTUR, FUNKSJON OG PATOFYSIOLOGI.....	8
1.5 FRIE RADIKALER, REAKTIVE OKSYGENFORBINDELSER (ROS) OG OKSIDATIV STRESS.....	9
1.6 FETTSYRER	12
1.7 FETTSYRENS METABOLISME.....	15
1.8 FETTSYRENS OPPTAK OG METABOLISME I HJERNEN	17
1.9 MITOKONDRIENS ROLLE I NEURODEGENERATIVE SYKDOMMER	19
1.10 PEROKSISOM-PROLIFERATOR-AKTIVERTE RESEPTORER (PPARS)	21
1.11 UTTRYKKING.....	23
1.12 PPAR, INFLAMMASJON OG CNS	23
1.13 BIOAKTIVE FETTSYRER	25
2 FORMÅLET MED OPPGAVEN	28
3 MATERIALER OG METODER	29
3.1 MATERIALER OG UTSTYR	29
3.2 STANDARDPROSEDYRER OG TING AV CELLER.....	34
3.3 VIABILITETSMÅLING MED WST- 1 ASSAY	36
3.4 OPPTAK AV TTA I SH-SY5Y	37
3.5 INFLAMMASJONSASSAY SH-SY5Y: TILLAGING OG FORBEHANDLINGER – 1.....	39
3.6 INFLAMMASJONSASSAY SH-SY5Y: ISOLERING AV RNA, CDNA SYNTES E OG KVANTITATIV PCR – 2	41
3.7 DYRESTUDIER	49
3.8 STATISTIKK	51
4 RESULTATER	52
4.1 VIABILITETSMÅLING MED WST-1 ASSAY	52
4.2 INFLAMMASJONSASSAY - GENANALYSER SH-SY5Y	59
4.3 EKSPRESJON AV INFLAMMASJONSMARKØRER OG ANTIOKSIDATIVE GENER I DYRESTUDIENE.....	68
5 DISKUSJON	71
5.1 OPPDYR KING OG BRUK AV HUH-7 CELLER OG SH-SY5Y CELLER.	72
5.2 VIRKNING AV TTA OG TTA - ANALOGERE PÅ CELLEPROLIFERASJON.....	72
5.3 INFLAMMASJONSASSAY - GENANALYSER.....	76
5.4 OPPTAK AV TTA I SH-SY5Y	80
5.5 EFFEKT AV TTA PÅ OKSIDASJON	81
5.6 BEGRENSNINGER MED STUDIEN.....	84
6 VEIEN VIDERE	89
7 KONKLUSJON	90
8 REFERANSER	92

SAMMENDRAG

Bakgrunn: Nevrodegenerative sykdommer (ND) defineres som forstyrrelser i sentrale- og perifere nervesystemet. Kronisk inflammasjon og svikt i mitokondrier er faktorer som er involvert i nevrologiske lidelser. Tetradecyltioeddiksyre (TTA) er en fettsyre med svovel i β -posisjon har vist seg å ha oksidative og anti-inflammatoriske egenskaper vha peroksisomproliferator-aktivert reseptor (PPAR) *in vitro* og *in vivo*. Dermed var det ønske å klargjøre TTAs terapeutiske rolle i ND som involverer kronisk inflammasjon og ROS. Det var også ønske om å teste TTA-analoger *in vitro* for å se om de kunne vise lignende egenskaper som TTA.

Metode: Genuttrykk av cytokiner ved TNF- α induisert inflammasjon ble benyttet for å se på anti-inflammatoriske egenskaper av TTA i nevroblastom cellelinje SH-SH5Y. Det ble også sett på hvilke PPAR-gener som var uttrykket i udifferensierte SH-SH5Y-cellelinjen. Effekter av TTA-diett ble sett i dyslipidemi-modeller i hjernen *in vivo*; apoE^{-/-} mus og rotte. Anerkjente HuH-7 og SH-SH5Y-cellelinjen ble brukt som modell for å bestemme levedyktighet og evne til celleproliferasjon til TTA-analoger.

Resultat: Av de undersøkte gener viste TTA ingen anti-inflammatoriske effekter i udifferensierte SH-SH5Y cellelinjen. Det ble i midlertidig sett uttrykking av PPAR- δ sammenlignet med de andre PPAR-genene. I apoE^{-/-} mus som ble fôret med 0,4 % TTA diett ble det ikke observert oppregulering av *SOD 1* og *SOD 2*, men i lang-tidsstudie med 0,4% TTA i rotte ble det derimot sett en regulering av *SOD 1* og *SOD 2* sammenlignet med rotter som ble fôret med høy fett diett. For modifiserte TTA analogene ble det observert at tr-TTA- dose på opptil 62.5 -125 μ M var passende for begge cellelinjer over en behandlingsperiode på to dager. N-TTA så ut som til å være toksisk i dose 31.3 μ M både for HuH-7 celler og SH-SY5Y celler. Tr-N-TTA tolerert opptil 250 μ M i begge cellelinjene.

Konklusjon: Basert på funnene i dette prosjektet har vi ikke funnet noen grunnlag for anti-inflammatoriske effekter av TTA på *in vivo*. Det blir sett en tendens av oksidative egenskaper *in vitro* ved lang-tidsbehandling av TTA. Imidlertid er det behov for ytterligere studier for å

se om det på andre cytokiner og oksidative gener som er involvert i hjernen for å avdekke TTAs mulige neuro inflammatoriske og oksidative virkninger vha PPAR-aktivering. For å se på de generelle antiinflammatoriske effekter av TTA-analoger hadde det vært en fordel å se på andre modeller der TTA har påvist effekt.

ABSTRACT

Background: Neurodegenerative diseases (NDs) are defined as central- and peripheral nervous system disorders. Chronic inflammation and mitochondrial dysfunction plays an important role in NDs. Tetradecylthioacetic acid (TTA) is a fatty acid and has in previous studies showed potential as an antioxidant and an anti-inflammatory agent by involving peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in different models. Thus, it was desired to enlighten TTAs therapeutic role in ND, which involves chronic inflammation and ROS. Additionally, it was desired to examine if modified TTA analogs could exert similar characteristics by determining their growth-limiting effects as TTA.

Method: Gene expression of cytokines after TNF- α (alfa) induced inflammation were utilized to see anti-inflammatory properties of TTA in the neuroblastoma cell line SH-SH5Y. PPAR genes were also determined to see if they were expressed in the undifferentiated SH-SH5Y cell line. Additionally, effects of TTA diet in brain in models of hyperlipidemia apoE $^{-/-}$ mouse and rat were studied *in vivo*. TTA analogs and their viability were determined in the already recognized HuH-7 cell line and the SH-SH5Y cell line.

Results: On the gene expression level, TTA did not show anti-inflammatory effects in the undifferentiated SHSH5Y cell line. PPAR- δ (delta) was more highly expressed in this cell line compared to the other PPAR genes, and was up regulated by TNF- α treatment. In 0.4% TTA diet with apoE $^{-/-}$ mice, effects on gene expression of *SOD 1* and *SOD 2* were not seen, but in a long-term study with 0.4% TTA in rat within 50 weeks, there were differences of *SOD 1* and *SOD 2* compared to rats fed high fat diets. For the modified TTA analogs, it was observed that the tr-TTA dose up to 62.5 - 125 μ M was appropriate for both cell lines for two days treatment. N-TTA appeared to be toxic at dose 31.3 μ M for both HuH-7 cells and SHSY5Y cells. Tr-N-TTA tolerated up to 250 μ M in both cell lines.

Conclusion: Based on the findings of this project, there were no anti-inflammatory effects of TTA on *in vitro*. There was a tendency to affect genes involved in oxidative defense *in vivo* during long-term treatment of rats with TTA. However, further studies are needed to evaluate other cytokines and oxidative genes involved in the brain to reveal the potential role of TTA by PPAR activation on neuroinflammation and oxidative stress. It would have been beneficial to consider other models where TTA has demonstrated efficacy to determine the general anti-inflammatory effects of the modified TTA analogs.

FORKORTELSER

Forkortelser	Fullt navn
AA	Arakidonsyre/Arachidonic acid
AASA	Alfa-aminoadipic-semialdehyd/ Alpha-aminoadipic semialdehyde synthase
A β	Amyloid beta protein
AD	Alzheimer sykdom/Alzheimers Disease
ADP	Adenosindifosfat
ALA	Alfa-linolensyre/Alfa-linolenic acid
ANOVA	Variansanalyse/Analysis of variance
ApoE	Apolipoprotein E
ATP	Adenositriphosfat
BBB	Blod-hjerne barrier/Blood-brain barrier
BSA	Bovint serumalbumin/ Bovin serum albumin
CAT	Katalase
cDNA	komplementær DNA/Complementary DNA
CoA	Koenzym-A/Coenzym-A
COX-1,-2 osv.	Cyklooksygenase-1, -2 osv.
CNS	Sentral nervesystem/Central nervous system
CML	Karboksylmetyl-lysin/Carboxymethyl-lysine
CPT	Karnitin palmitoyltransferase/Carnitine palmitoyltransferase
CT	Terskelnivå/Cycle threshold
CXCL-1,-2 osv.	Kjemokin C-X-C motif ligang-1,-2 osv./ The chemokine (C-X-C motif) ligand-1,-2 etc.
DHA	Dokosaheksaensyre/Docosahexaenoic acid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetyl sulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre/Deoxyribonucleic acid
DNase	Deoksyribonuklease/Deoxyribonuclease
dNTP	Deoksyribonukleosidtrifosfater / Deoxyribonucleotidetriphosphate
EDTA	Etylendiamintetraacetat/Ethylenediaminetetraacetic acid
EPA	Eikosapentaensyre
ETC	Elektron transport kjede/Electron transport chain
FA	Fettsyre/Fatty acid
FAD	Flavin adenin dinukleotid/Flavin adenine dinucleotide
FADH ₂	Flavin adenin dinukleotid (redusert form)
FAME	Fettsyremetylestre/Fatty acid methyl ester
FBS	Fetal bovine serum
FFA	Fri fettsyre/Free fatty acid

FID	Flammeionisasjonsdetektor
GC	Gasskromatografi/Gasschromatography
GPx	Glutation peroksidase
GSA	Glutamat semialdehyd/glutamate 1- semialdehyde
GST	Glutation-S-transferase
ICAM-1,-2 osv.	Intercellulært adhesjonsmolekyl 1, 2 osv.
IL-1,-2,-3 osv.	Interleukin 1, 2, 3 osv.
IFN- γ	Interferon, gamma
iNOS	Induserbar nitrogenoksid syntase
LA	Linolsyre/Linoleic acid
LCFA	Langkjedede fettsyre/Long-chain fatty acid
MCFA	Fettsyrer med middels lange kjeder/Medium-chain fatty acid
MDAL	Malondialdehyd-lysine
mRNA	Budbringer-ribonukleinsyre/Messenger ribonucleic acid
MS	Massespektrometri/Mass spectrometry
mtDNA	Mitokondrie DNA
m/z	Molekylmasse/ladning/Mass-to-charge ratio
N-TTA	Tetradecylglycine
NAD ⁺	Nikotinamid adenin dinukleotid/ Nicotinamide adenine dinucleotide
NADH	Nikotinamid adenin dinukleotid (reduisert form)
ND	Nevrodegenerative sykdommer/Neurodegenerative disease
NF- κ B	Nukleær faktor kappa B
NO	Nitrogenoksid
NOS ₂	Nitrogenoksidase
NTC	No-template control
O ₂ ^{•-}	Superoksid anion
OH [•]	Hydroksylradikal
OXPHOS	Oksidativ fosforylering/Oxidative phosphorylation
PA	Palmitinsyre/Palmitic acid
PBS	Fosfatbufret saltløsning/ Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerasekjedereaksjon/Polymerase chain reaction
PD	Parkinson's sykdom/Parkinson's Disease
PGE-2	Prostaglandin E2
PPAR	Peroksisomproliferatoraktivert reseptor/ Peroxisome proliferator-activated receptor
PPRE	Peroksisomproliferator element/ Peroxisome proliferator response element
PUFA	Flerumettet fettsyre/Polyunsaturated fatty acid
q-PCR	Kvantitativ "real time polymerase chain reaction"
RNA	Ribonukleinsyre
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive oksygenforbindelser/Reactive oxygen species
RT-PCR	Reverstranskriptase-PCR

RXR	Retinoid-X-reseptor
SOD 1,-2	Superoksid dismutase 1,-2
SCFA	Kortkjedede fettsyrer/Short-chain fatty acid
STAT	Signal transducers and activators of transcription
TAG	Triglyserider/Triacylglycerol
TNF- α	Tumor nekrose faktor, alpha
tr-N-TTA	Tetradec-12-yn-1-ylglycine
tr-TTA	2-(tetradec-12-yn-1-ylthio) acetic acid
TTA	Tetradecyltioeddiksyre/Tetradecylthioacetic acid
UHRR	Universal human referanse RNA
UMRR	Universal mus referanse RNA
VCAM -1,-2 osv.	Vaskulær adhesjonmolekyl -1, -2 osv.

1 Introduksjon

1.1 Nevrodegenerativ sykdommer

Nevrodegenerativ sykdommer (ND) defineres som forstyrrelser i det sentrale og perifere nervesystemet (1). Det er en paraplybetegnelse for tilstander som påvirker nervecellene i hjernen (2). Eksempler på nevrodegenerative sykdommer er Parkinsons, Alzheimers (AD), multippel sklerose (MS), epilepsi og Huntingtons sykdom (3). Ofte refereres det til tap av nevroner eller nedsatt funksjon i nervesystemet. Hjernen endrer seg og det dannes nye nerveceller hele livet (4). Med økende alder er det to viktige faktorer som påvirker regenerering prosessen: sykdom og inaktivitet. Alder i seg selv kan bidra til nedsatt funksjon i nervesystemet. Dette fører til tap av kroppens funksjoner slik som mobilitet, balanse, tap av smak, tale og pust (5, 6). Det er det snakk om sykdommer som rammer i hele livsløpet og fører til betydelig funksjonstap og redusert livskvalitet.

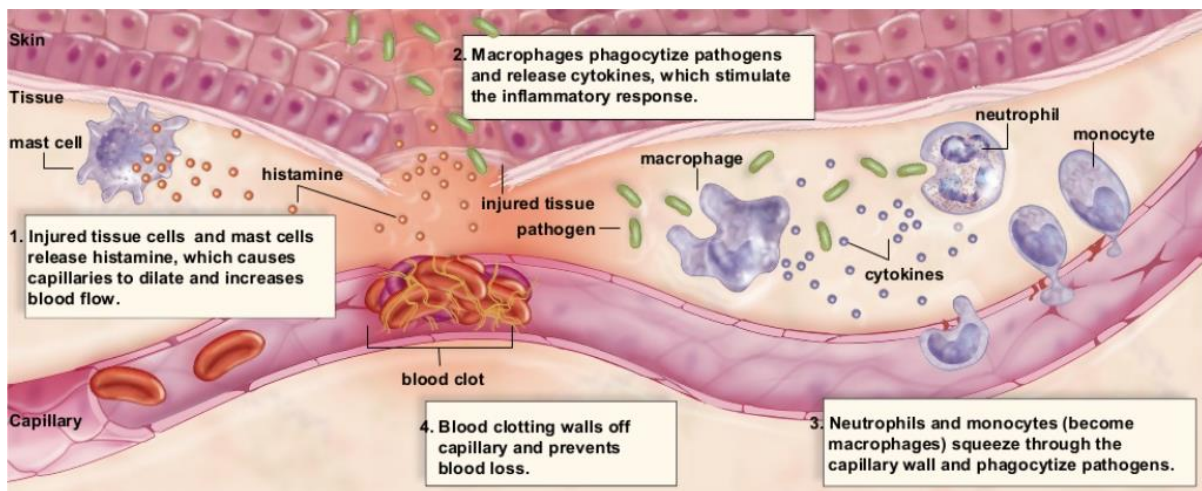
Per dato er lidelsene uhelbredelige og det finnes det kun symptoms lindrende legemidler (7). Verdens helseorganisasjon (WHO) har tall fra 2015 som angir at 12% av de totale dødsfallene globalt skyldes nevrologiske sykdommer. Innenfor disse er cerebrovaskulære sykdommer, lidelse forårsaket av svikt eller manglende blodforsyning til hjernen, ansvarlige for 85% av dødsfallene (1). Folkehelseinstituttet oppgir i 2016 at i Norge skyldes 10 % av alle dødsfall i aldersgruppen 70 år og eldre demens (inkludert Alzheimer). I tillegg oppgis det at både i Norge og globalt forventes demens å øke betydelig de kommende årene på grunn av flere eldre. Globalt er det anslått at antall personer med demens vil tredobles innen 2050 (8).

1.2 Inflammasjons respons

Inflammasjon er en kompleks biologisk prosess som skjer når kroppen utsettes for fysisk- eller kjemiske skader og infeksjoner. Motivet er å eliminere årsaken til celledskade og reparere skadene ved å sende ut leukocytter og kjemiske substanser (9).

Det finnes både akutt og kroniske varianter av inflammasjon. Forskjellen mellom akutt og kronisk inflammasjon avhenger av blant annet varigheten av skaden og reaksjonen på skaden. En kronisk inflammasjon trenger ikke å være en fortsettelse på en akutt inflammasjon. Det kan for eksempel være manglende eliminering av faktorer som forårsaker akutt betennelse, som smittsomme organismer som sopp og andre parasitter, som kan motstå vertsforsvar og forblir i vevet i en lengre periode. Et annet eksempel er når inflammatoriske mediatorer induserer oksidativt stress og mitokondriell dysfunksjon, som resulterer i økt produksjon av frie radikalmolekyler og sluttmolekyler som videre skaper en langvarig inflammasjon uten at den opprinnelige årsaken lenger er til stede (10). Ved en kronisk inflammasjon rekrutteres makrofager, lymfocytter og plasmaceller til stedet ved hjelp av cytokiner. Disse er substanser som tiltrekker immunceller; monocytter, naturlige drepeceller, T-lymfocytter, og flere dendritiske celler til inflammasjon stedet (11).

Det er fem klassiske symptomer som opptrer ved inflammasjon. Det er rubor (rødhet), tumor (hevelse), calor (varme), dolor (smerte) og functio laesa (funksjonsnedsettelse). Dersom det har oppstått skade i huden, vil stasjonære molekyler slik som makrofager og mastceller utskille signalmolekyler deriblant cytokiner og histaminer slik at blodtilførselen øker. Histamin fører til vasodilatasjon der kapillærer utvider seg slik at man får tilført mer blod. Rødhet og varme oppstår som resultat av blodårenes dilatasjon og økt blodtilførsel. Samtidig vil permeabilitet i årene økes, og fører til at leukocytter får tilgang til betente vev. Progressiv væsketransport siver derfor inn i vevet forårsaker hevelse, smerte og funksjonsnedsettelse. Store plasmaproteiner (f.eks komplementproteiner) som går gjennom kapillærer og inntil vevet og dette medfører høyere osmotisk trykk i betennelse området som resulterer smerte. Alt i alt kan dette føre til nedsatt bevegelighet i betente området. Dette kan videre føre til at systemiske responsen aktiveres og resultere med feber (11). Figur 1.1 illustrerer de ulike trinnene i inflammasjonsprosessen.



Figur 1.1: Beskriver kort lokale inflammasjonsprosessen. Ytre stimuli slik som patogen har trent inn i huden. Mastceller skiller ut histamin som fører til kapi lærårene dilatere og blodtilførselen til skadestedet øker. Det rammede området økes med nøytrofile granulocytter som sekreterer ut substanser som stimulerer inflammasjon ved å tiltrekke andre immunceller og aktiverer celler er sentrale for reparasjon. Patogenet skadeliggjøres ved hjelp av fagocytose utført av makrofager og nøytrofile granulocytter. Inflammasjonsprosessen fortsetter til patogenet er eliminert og vevet reparert, og aktivere ervervet immunforsvar for mer hjelp (12).

Kroppens evne til å hindre kroppsfremmede patogener i å forårsake skade, skyldes kroppens forsvarsmekanismer, immunforsvaret. Kroppens forsvarsmekanisme kan deles inn i uspesifikt (medfødte) og spesifikt (ervervede) immunforsvar. Det uspesifikke forsvarssystemet inkluderer fagocytterende celler blant annet dendritiske celler, mastceller, nøytrofile granulocytter og makrofager, og ytre barrierer som hud og slimhinner og komplement (et sett med proteiner). Det spesifikke forsvarssystemet består av celler som produserer antistoffer (B-lymfocytter) og cytotoksiske celler (T-lymfocytter) (13).

Det uspesifikke forsvarssystemet virker mot bredt spekter av kroppsfremmede mikrober, og er aktiv tidlige fase når sykdom utvikles (14). Antigen-presenterende celler (APC) altså fagocytterende celler utfører fagocytose som kan skadeliggjøre patogen som har fått mulighet til å trenge seg inn. Det er celler som ligger ute i vevet og møter mikrober i det de kommer inn i kroppen. Dersom de stasjonære cellene som ligger ute i vevet ikke klarer å skadeliggjøre patogen vil det spesifikke forsvaret bli aktivert.

Spesialiseringen involvere framvisning av antigen (deler av patogenet) T- og B-lymfocytter fra det ervervede immunforsvaret og differensiering av disse lymfocytene (15). Denne spesialiseringen tar tid, derfor kommer den spesifikke responsen i immunrespons mye senere.

1.1.1 Inflammasjons rolle i neurodegenerative sykdommer

Både uspesifikt og spesifikt immunforsvar er viktig for å bekjempe infiserte celler og ikke minst kreftceller og er derfor en viktig beskyttelsemekanisme. Immunsystemet kan også reagere på en måte som er ugunstig for kroppen, slik som ved auto immunitet -hvor kroppen går til angrep mot egne molekyler (16). Inflammasjon i sentralnervesystemet (CNS) (nevroinflammasjon) er anerkjent å ha en sentral rolle i alle neurologiske lidelser som medfører til nevrotisk celledød. Neurodegenerative sykdommer preget av kronisk og progressivt nevrontap og patologiske nivåer av cytotoksiske stoffer, som forhøyede nivåer av pro-inflammatoriske faktorer og produksjon av reaktive frie oksygenradikaler (ROS), noe som resulterer i oksidativ stress (17).

Den inflammatoriske responsen formidles av aktiverte mikrogliaene, variant av gliaceller i CNS, som normalt reagerer på nevronskader og fjerner de skadede cellene ved fagocytose. Mikrogliaeceller er lokalisert i CNS, og omfatter ca. 12 % av hjernen og på lik linje med makrofager og lymfocytter i periferien, deltar i hjernens immunforsvar mot sykdommer og skade. Normalt ligger mikrogliaeceller latent og kontinuerlig på overvåking omkringliggende miljø. Ved ekstracellulære signaler som tilstedeværelse av patogener, fremmedlegemer og døde eller døende celler, kan mikrogliaeceller gjennomgå en morfologisk forandring. Denne morfologiske forandringen er også ledsaget av endringer i signalering og genuttrykk som kan resultere i endringer i overflatereseptoruttrykk, frigjøring av pro- eller anti-inflammatoriske cytokiner og ROS, blant andre. Den kumulative effekten av disse endringene i morfologi og fenotype fører til at latente mikrogliaeceller blir til aktive mikrogliaeceller som resulterer i rekke inflammasjonsprosesser (18).

I multipel sklerose er det fremtredende infiltrering av leukocytter som krysser blod-hjernebarrieren (BB) i CNS og har høye nivåer av aktiverte mikroglia-celler hvor de forårsaker lokal inflammasjon som resulterer i demyelering, arrdannelse og aksonal degenerasjon (19). Det er ingen tegn på fremtredende infiltrering av leukocytter sett i Parkinson eller Alzheimers sykdom. En av kjennetegnene ved Alzheimers sykdomspatologi er opphopning av proteinet amyloidplakk, som i utgangspunktet blir fjernet mikroglia-celler. Proteinavleiring forårsaker aktivering av mikroglia-celler ender videre ender opp med nevronskader og celledød (20). Tilsvarende er aktivert mikroglia-celler assosiert med skadede nevroner hos pasienter med Parkinson. Inflammatoriske mediatorer som tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-1 (IL-1) og interleukin-6 (IL-6) har blitt identifisert i human Parkinson`s sykdom post-mortem-hjerner, i tillegg til oppregulering av nitrogenokid syntase (iNOS) og cyclooxygenase (COX) i mikroglia-celler hos pasientene (21).

1.3 Cytokiner -inflammasjonsmarkører

Cytokiner er polypeptider/glukoproteiner som utskilles fra kroppens celler, ofte som en respons på en aktiverende stimuli og fungerer som signalmolekyler. Disse proteinene er meget relevant og sentral i inflammasjonsprosessen, og er et viktig bindeledd mellom ulike celletyper (22).

Cytokiner bidrar med å koordinere aktiviteten i forsvar og reparasjon av kroppen, blant annet ved å oppregulere eller nedregulerer aktiviteten til immunceller. Overdreven inflammatorisk cytokinproduksjon kan imidlertid føre til vevskader, hemodynamiske endringer og organsvikt. Cytokiner utøver sin effekt ved å binde seg til spesifikke cytokinreseptorer på celleoverflaten. Cytokiner kan virke på produsentcellen (autokrin), på nabocellen (parakrin) eller systemisk (endokrin). Når antigen blir presentert for naive T-lymfocytter av antigenpresenterende celler (APC), igangsettes en kaskade som fører til celledeling, celledifferensiering av T-lymfocytter celler som resulterer effektorceller.

Denne celledifferensiering styres av cytokiner (23). Cytokiner klassifiseres på bakgrunn av celletyper som utskiller dem og biologisk aktivitet. Over 100 cytokiner har blitt identifisert (24), og inndeles etter struktur og funksjon i fem hovedgrupper; interferoner (IFN), interleukiner (IL), tumor nekrosefaktor familien (TNF), kjemokiner og kolonistimulerende faktorer (CSF) (25).

Cytokiner kan også deles inn grupper basert på om de fremmer eller hemmer inflammasjon. Cytokiner som modulerer inflammasjon angis som pro-inflammatorisk, mens cytokiner som hemmer pro-inflammatoriske cytokiner kalles anti-inflammatoriske cytokiner. Noen er både slik som å både være pro- og anti-inflammatorisk (26). Ved infeksjon vil det være økning av pro-inflammatoriske cytokiner slik som tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) og interleukin 1 (IL-1) som vil fremme produksjon pro-inflammatoriske cytokiner slik at man raskt får fjernet infeksjonen. I tillegg vil disse fremme genuttrykk av anti-inflammatoriske cytokiner blant annet som interleukin 4, 13 (IL-4, IL-13) som demper produksjon av cytokiner. Dermed er det hele tiden en balansen mellom de pro- og anti-inflammatoriske cytokinene, som igjen bestemmer utfallet av sykdom, på kort eller lang sikt (27).

Cytokiner er ikke kun signalstoffer mellom immunceller, men også mellom immunceller og nerveceller. Nerveceller har reseptorer for immuncellenes cytokiner, noe som erkjent at nervesystemet kan kontrollere inflammasjon tross for fåtall av immunceller i CNS. Blod-hjerne-barriere (BBB), hjernens beskyttende skjold begrenser ikke bare uønskede stoffer til hjernen men også migrasjon av leukocytter til CNS. Ulempe er at CNS har begrenset med reparasjon, og svekket funksjon selv i isolerte vevsområder kan derved føre til store skader (28).

Ved inflammasjon i hjernen, øker risiko for nerveskade og redusert blod-hjerne barriere permeabiliteten til forskjellige molekyler, dermed kan denne barrieren reguleres og svekkes ved ulike sykdomstilstander (28). Inflammasjons assosierte CNS-sykdommer

skyldes aktivering av hjernens immunceller blant annet mikroglia-celler, som produserer pro-inflammatoriske markører (29). Immunrespons i CNS skiller fra klassiske immunrespons i perifert vev, likevel er mange av de samme cellene involvert. Immunrespons i CNS aktiverer ikke kun stasjonære celler (mikroglia-celler, astrocytter og endotelceller) men også infiltrering av sirkulerende immunceller (monocytter, nøytrofiler og T-lymfocytter). Som i periferien uttrykker både de aktiverte stasjonære cellene i CNS og de infiltrerende cellene cytokiner og kan frigjøre og /eller reagerer på pro- og antiinflammatoriske cytokiner (28). Inflammatoriske responser i CNS kan også utløses av endogene ligander anerkjent av varme-sjokk proteiner og ekstracellulære degradasjonsmolekyler, som kommer inn i hjernen gjennom en skadet blod-hjernebarriere, kan initiere inflammatoriske responser. CNS-inflammatorisk respons er også aktiv ved hjerneskade, som for eksempel vevskader som observeres etter iskemisk, traumatisk eller eksitotoksisk hjerneskade, eller anfall (29).

Interleukin-1 (IL-1) og tumornekrosefaktor- α (TNF- α) er pro-inflammatoriske cytokiner som blir konstitutivt uttrykt i friske, voksne hjernen hvor de formidler normale nervefunksjoner, slik som søvn. De er nevromodulatorer og er uttrykt og virker på nevroner og mikroglia-celler. IL-1 og TNF α -uttrykk er oppregulert i flere viktige sykdommer og lidelser (30). Ved inflammatoriske tilstander i CNS, utskiller mikroglia-celler proinflammatoriske cytokiner som IFN- γ og TNF- α (29). I degenerative sykdommer, er CNS stasjonære celler dominerende produsenter av pro-inflammatoriske cytokiner, i motsetning i nevroinflammerte sykdommer slik som MS der pro-inflammatoriske cytokiner blir produsert av invaderte leukocytter (31).

Alzheimers sykdom (AD) er den vanligste aldersavhengige neurodegenerative lidelsen, og viser forhøyet uttrykk for cytokiner slik som TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-1 β , IL-6, IL-18 og oppregulering av tilhørende reseptorer, en situasjon som er framkalt av proteinansamling av amyloid og fiberknuter. Proteinansamling av β -amyloid (A β) and fiberknuter spiller en viktig rolle for patogenese for AD og forårsaker tap av synaptisk

funksjon, mitokondriell skade, aktivering av mikroglia celler og nervedød.

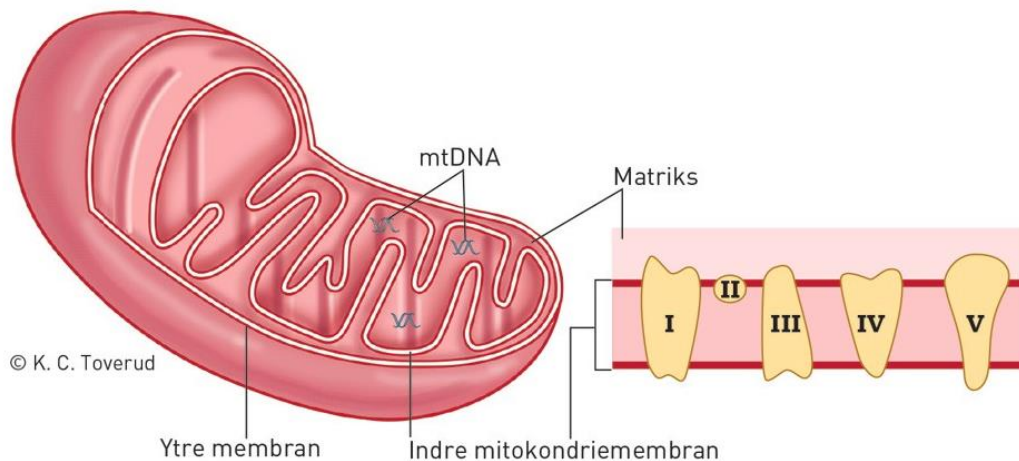
Proteinansamling av β -amyloid ($A\beta$) and fiberknuter fører til aktiverte mikroglia celler.

Mikroglia- aktivering har to effekter på AD-progresjon: aktivering av mikroglia celler, som fører til å redusere $A\beta$ -akkumulering ved å øke fagocytose, og nedbrytning, noe som forhindrer dannelsen av amyloidplakk i hjernen. På den andre siden fører langvarig mikroglia celler aktivering til frigjøring av proinflammatoriske cytokiner, som initierer en pro-inflammatorisk kaskade og deretter bidrar til nevrnskader og tap (32).

Kvantifisering av cytokinnivåer anvendes i klinisk praksis, ved at de gir nyttig informasjon om de patologiske prosessene for flere forskjellige sykdommer, for eksempel kardiovaskulære sykdommer og infeksjoner, og kan varsler om inflammatoriske sykdommer. På bakgrunn av at cytokiner står sentralt i regulering av immunsystemet, kan disse inflammasjons markører potensielt tjene som biomarkører for sykdomsdiagnose, prognose og vurdering om terapeutiske behandlinger (33).

1.4 Mitokondria -Struktur, funksjon og patofysiologi

Mitokondriene er intracellulære organeller med flere funksjoner og blir sett som cellenes energiproducent, hvor de omdanner proteiner, fett og sukker i maten vi spiser, til energi (adenosintrifosfat - ATP) som kroppen kan benytte seg av. Antall mitokondrier i en celle gjenspeiler cellens energibehov, slik at celler med høyt energibehov, som muskelceller og hjerneceller, kan ha flere tusen mitokondrier (34).



Figur 1.2: Oppbygning av mitokondrie. Mitokondriene er intracellulære organeller som er bygd opp av to membraner-den ytre og den indre. Organellen har et eget DNA (mitokondrie-DNA/mtDNA) derfor reprodusere seg selv og selv er medansvarlig for dannelsen av nødvendige proteiner. Hovedfunksjonen til mitokondrier er å produsere energi. For kroppen er omdanning av oksygen og energi (ATP) nødvendig for funksjon og overlevelse ved sykdomsprosesser. Forstyrrelser av den respiratoriske kjedens gi alvorlige skader og involvert i neurodegenerative sykdommer, kreft, diabetes og flere andre sykdommer som er kjent for å bli påvirket av mitokondrier (35).

Mitokondrier som nevnt ovenfor er omgitt av to membraner. Ytremembranen er permeable og mottakelig for små molekyler og ioner. I motsetning, er indre membranen mer avgrenset og inneholder enzymer og proteiner som er involvert i elektrontransportkjeden og ATP syntese. Mellom ytre og indre membran er det et hulrom som spiller en vesentlig rolle i dannelsen av ATP. Rommet innenfor den indre membranen, kalles matriks. Matrisen er tett pakket med enzymer som deltar i sitronsyre-syklusen. I tillegg inneholder det enzymer involvert i oksidasjon av fettsyrer og aminosyrer (35).

1.5 Frie radikaler, reaktive oksygenforbindelser (ROS) og oksidativ stress

Oksygen (O_2) er en forutsetning for at levende organismer, planter og dyr på jorden skal kunne opprettholde metabolismen (36). Samtidig kan O_2 kan skade cellene gjennom en nedbrytende kjemisk reaksjon som kalles oksidering, der elektroner overføres fra det oksiderte molekylet til et annet (37). Dette medfører til at de kjemiske egenskapene til

stoffene endres og kan gi opphav til skadelige kjedereaksjoner, noe som igjen kan gi store konsekvenser for cellene (38).

Frie radikaler er forbindelser som har ekstra uparede elektroner. Dette gjør at disse atomene eller molekylene blir svært reaktive og lett inngår i kjemiske reaksjoner. De vanligste forbindelsene er superoksid (O_2^-) hydrogenperoxid (H_2O_2), hydroksylradikalet (OH^\cdot) og peroksynitritt ($ONOO^-$). Disse forbindelser blir kalt reaktive oksygen forbindelser (reactive oxygen species, ROS) (39). Frie radikaler dannes naturlig i kroppes celler, f.eks i mitokondrie, ved inflammasjonsprosesser, trening og iskemi. I tillegg kan eksterne stimuli slik som infeksjoner, stråling, røyk, miljøgifter, alkohol, medikamenter og sykdommer føre til at produksjonen av frie radikaler øker (38). Frie radikaler og relaterte oksygenforbindelser dannes også som et resultat av normal oksidativ metabolisme og er med på ulike prosesser i cellene som signaloverføring (40)(43). ROS kan gi skade på cellulære strukturer slik som celledemembraner, og oksidasjon av proteiner, lipoproteiner, lipider og enzymer kan føre til defekter. Mitokondriell DNA (mtDNA) er også utsatt for reaksjoner med ROS, med tanke på at det ligger ubeskyttet, og dette kan føre til mutasjoner (38).

Mitokondriene er et av de den aller største produsenten av ROS, og under energiproduksjonen skjer det en lekkasje av elektroner, særlig ved enzymkompleks I og III i elektrontransportkjeden. Men elektronene blir vanligvis nøytralisert ved kontrollerte enzymatiske reaksjoner. Dersom det blir en ubalanse mellom nydannelsen og nøytraliseringen skjer det en opphopning av ROS. Denne tilstanden kalles oksidativ stress (43).

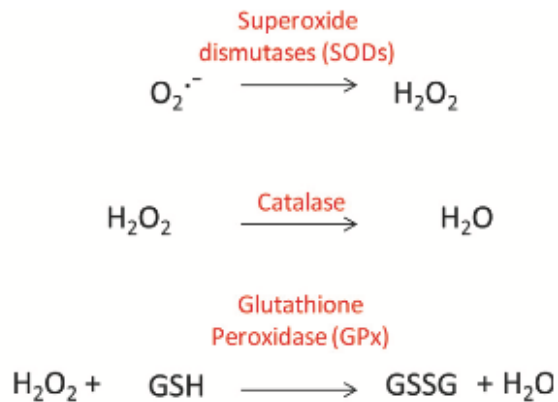
Kroppen vår har etablert et omfattende forsvar mot oksidativ stress. Dette innebærer både enzymatiske og ikke-enzymatiske komponenter som forebygger dannelsen av frie radikaler, reparere skade, nøytraliserer, eliminerer molekyler som har

oksidativ skade eller fjerne frie radikaler. Disse kalles antioksidanter, motvirker oksidasjonen ved selv å la seg oksidere for å beskytte andre molekyler (43). Antioksidanter er fellesbegrep for ulike stoffer i kroppen som hindrer eller reduserer oksidasjon av frie radikaler og deles inn i endogene antioksidanter (kroppen selv produsere), og eksogene antioksidanter (tilført via kosten) (41). Viktige endogene antioksidanter er blant annet proteiner katalase (CAT), superoksid dismutaser (SODs) og non-protein glutation (GSH) (figur 1.3) (42). I denne oppgaven er det lagt vekt på SOD, dermed blir omtalt videre.

Superoksid dismutaser (SODs) er en klasse av enzymer som katalyserer omdanningen av O_2^- til hydrogenperoksid (H_2O_2) og O_2 (figur 1.3). SOD enzymene inndeles videre inn i tre hovedfamilier, avhengig av hvilken metall-kofaktor som er tilstede i det reaktive setet; Cu/Zn (SOD 1, som binder både kobber og sink) Fe og Mn-typer (binder enten jern eller mangan, SOD 2) og Ni-type (binder nikkell, SOD3). Hos mennesker finnes det tre former for SOD. SOD 1 er en dimer (består av to enheter) og er lokalisert i cytoplasma, SOD 2 i mitokondriene, og SOD 3 er ekstracellulær. Ved økt oksidativ stress, vil det gi økt uttrykk av SODsene, og det økte uttrykket av antioksidant enzymene vil derfor være en slags forsvarsmekanisme for kroppen ved moderate konsentrasjoner av ROS (41).

Ved aldri ser man både en nedgang i respiratorisk funksjon i mitokondriene og en økning i ROS-produksjon. Dersom antioksidanter ikke får kontroll på oksidativ stress kan det påvirke utvikling av en rekke sykdommer og tilstander som kreft, kardiovaskulære sykdommer, kols, artritt, diabetes og nevrodegenerative sykdommer slik som Parkinson's sykdom, AD, MS, depresjon og hukommelsestap. Generelt er nevroner utsatt for ROS fordi de har høyt innhold av flerumettede fett som kan oksideres, og enkelte regioner i hjernen slik som hippocampus CA1 er sensitiv for skadelige effekter ved oksidativ stress. I tillegg har nevroner høyt oksygenbehov, og høyt innhold av redoksaktive metaller (jern og kobber) som kan virke katalyserende på syntesen av

hydroksylanion. Av den grunn har mitokondrier og oksidativ skade blitt sett på som en nøkkelfaktor i utvikling av neurologiske lidelser og aldring (43).



Figur 1.3: Antioksidanter er kroppens forsvarsmekanisme for å forsvare mot ROS. Superoksid dismutaser (SODs) katalyserer superoksid til oksygen og hydrogenperoksid. Katalase sørger for at hydrogenperoksidet omdannes til vann og oksygen. Glutathionperoxidase (GPx) reduserer hydrogenperoksid til oksidert glutathion (40).

1.6 Fettsyrer

Det er velkjent at omega-3 og omega-6 fettsyrer som vår kropp må ha tilført i kosten, er nødvendig for å unngå sykdommer som er relatert til inflammatoriske og sirkulasjon, så vel som synsfunksjon, også enkelte neurologiske og mentale lidelser (44).

1.1.2 Fettsyres struktur og egenskaper

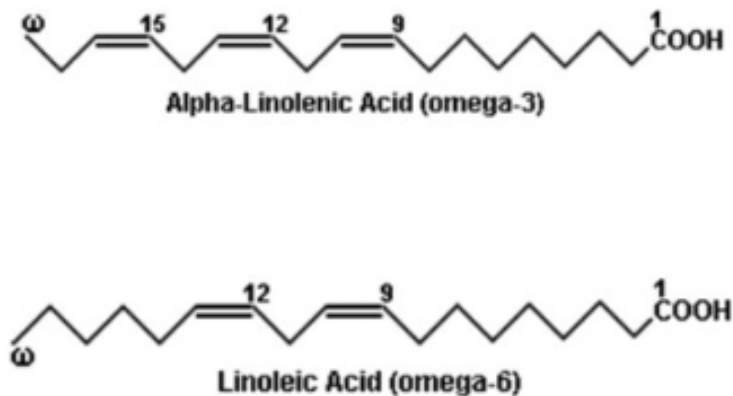
En fettsyre består av karbonkjede med varierende lengde av karbonatomer og hydrogenatomer med en karboksylgruppe (COOH) kovalent bundet til den ene enden. Fettsyrer inndeles inn i to hovedgrupper; mettede fettsyrer og umettede fettsyrer. Mettede fettsyrer har ingen dobbeltbindinger i kjeden, mens en umettet fettsyre har en eller flere dobbeltbindinger (45, 46).

Basert på kjedelenge kan fettsyrer også skilles inn i tre grupper; kortkjededede (short chain fatty acids, SCFA), fettsyrer med middels lange kjeder (medium chain fatty acids, MCFA) og langkjededede fettsyrer (long chain fatty acids, LCFA). Som tidligere nevnt har det lenge

påvist at fettsyrer i er viktige for hjernens struktur og funksjon, og tilstrekkelig inntak av disse er med på å sikre normal og optimal funksjon for hjernen som omtales senere i oppgaven (46).

Flerumettede fettsyrer (polyunsaturated fatty acids, forkortet PUFA) er fettsyrer med to eller flere dobbeltbindinger. α -linolensyrer (ALA, Omega-3) og linolsyre (LA, Omega-6) er de to essensielle flerumettede fettsyrene som kroppen trenger å få tilført gjennom kosten fordi kroppen har ikke de enzymene som er nødvendig for biosyntesen (46, 47).

Figur 1.4 viser eksempler på oppbyggingen av de umettede fettsyrene og deres posisjon av dobbeltbindinger.



Figur 1.4: Strukturen til omega-3 og omega-6 fettsyrer (48).

Kroppen bruker linolsyre og α -linolensyre til å syntetisere mange andre umettede fettsyrer som arakidonsyre, som er forløper for syntesen av prostaglandiner og eikosanoidene som er involvert i inflammasjon, og som er forstadier til eikosapentaensyre (EPA) og docosahexaensyre (DHA). I tillegg fungerer begge fettsyrene som strukturell komponent i celledmembraner (49).

1.1.3 Omega-3 fettsyren, DHA i nevroner

DHA syntetiseres fra ALA (omega-3) ved en rekke av enzymatiske og kjedeforlengelse reaksjoner. Blant EPA, DHA og dokosapentaensyre (DPA), har DHA essensiell rolle i hjernen og det har blitt gjort en rekke studier hjerte- og karsykdommer, inflammasjon samt utvikling av sentralnervesystemet og mental helse, der omega-3 fettsyren DHA har vist seg å kunne ha en positiv effekt (50).

Omega 3-fettsyre DHA bidrar riktignok på mange viktige områder i kroppen, og er en viktig bestanddel i nevroners membraner. Fosfolipider er viktige komponenter i cellemembraner, og påvirker cellulære egenskaper som signaloverføring, regulering av genuttrykk, cellulær metabolisme, næringsopptak og transport. Omega-3 fettsyren, DHA har mulighet til å inkorporere i fosfolipidene som videre kan påvirke membranens fluiditet, permeabilitet og funksjon (50). DHA gir økt membran fluiditet, noe som er kritisk for optimal overføring av neurotransmitter, slik som serotonin og dopamin. DHA er særlig konsentrert i nerveender hvor kjemiske signaler mellom celler utveksles. Mangel på omega-3 viser antydning på svekkelse av utvikling av synapser (51, 52). DHA er også forbundet til å stimulere nevrogenese både hos barn og voksne. Omega-3 fettsyren DHA deltar også med å opprettholde normal hjernefunksjon slik som for eksempel læring og hukommelse som er assosiert med hippocampus, dermed er omtalt som god forebyggende effekt mot neurodegenerative sykdommer (50). DHA har også en nevrobeskyttende effekt på glutamatindusert cytotoxicitet i rotte, ved å hemme nitrogenoksydproduksjon og kalsium tilstrømning, og øke aktivitetene av antioksidant enzymer glutation peroksidase (GSH-Px) (53).

Akkurat som eikosanoider som stammer fra EPA er inflammasjonsdempende, er DHA forløpere for ulike lipidformidlere (resolviner (RvD), protektiner og maresiner). Det er ennå usikkerheter om den spesifikke mekanismen til hvert av lipidderivatene, men de virker å være involvert i de første stadiene i inflammasjon ved å kontrollere andre immunmodulerende lipider derivater, smerte, sårheling, apoptose, modulering av

makrofager og kan også påvirke hormonbalansen og blodets strømningssegenskaper (54) (55).

1.7 Fettsyrens metabolisme

Menneskelige kroppen foregår det både oppbyggende prosesser og nedbrytende prosesser som skjer i kroppen. Metabolisme er et samlebegrep for både oppbyggende (anabolisme) og nedbrytende (katabolisme) prosesser (47, 56). I denne oppgaven er det lagt fokus den katabolske veien av fettsyremetabolismen.

Fettsyrer inneholder store mengder energi som kan nyttiggjøres og dette skjer ved en trinnvis oksidasjonsprosess indirekte genererer ATP, kroppens energi molekyl. Fettsyrer kan nedbrytes via forskjellige mekanismer, men den mest vanlige kalles beta (β) oksidasjon og er lokalisert i mitokondrier og peroxisomer (47).

1.1.4 Fettsyre aktivering

Fettsyrer, med unntak av de korte fettsyrer, kan ikke passere mitokondriemembranen og må dermed aktiveres ved kobling til koenzym A i en to-trinnsreaksjon. Dette skjer i cellens cytosol ved hjelp av enzymet fettsyre-CoA syntase og binding prosessen krever energi som kommer fra spaltning av ATP (47, 57). Tre typer fettsyre-CoA syntase: langkjedede, medium kjedelengde og kortkjedede fettsyrer har hver sin gruppe av isoenzymer (47).

1.1.5 Transport av aktivert fettsyre fra cytosol til mitokondrium

Den aktiverte fettsyren (acyl-CoA) må transporteres fra cellens cytosol til mitokondrium (mer presis mitokondrium-matriks), der betaoksidasjon foregår. Fettsyrer som har 12 karboner eller mindre klarer å passere membranene uten noe form for hjelp. Dersom fettsyren inneholder 14 karbonatomer eller mer kreves det transportproteiner, karnitin

palmitoyl transferase 1 og 2, og en bærersubstans, såkalt karnitin, for å kunne passere membranen. Transporten innebærer at CoA spaltes av slik at karnitin-bundet fettsyre kan videre passere gjennom den indre membranen. I matriksen binder fettsyren til CoA og er kan gjennomgå β -oksidasjonen som genererer acetyl-CoA-enheter (47, 57, 58).

1.1.6 β -oksidasjon og elektrontransportkjeden (ETC)

Selve nedbrytningen av fettsyrer kalles β -oksidasjon som kommer av at reaksjonen skjer på karbonatom nr. 2 (beta-karbonet) i fettsyrekjeden. Resultat av en runde med β -oksidasjon er produksjon av acetyl-CoA og en fettsyre som er to C-atomer kortere enn før syklusen. I tillegg dannes de elektronbærende molekylene $FADH_2$ (riboflavin) og NADH (niacin) som går inn i elektrontransportkjeden (ETC). Produksjonen av ATP foregår hovedsakelig i elektrontransportkjeden der elektroner flyter gjennom fire store proteinkomplekser (nummerert fra I til IV). Flyten av elektroner gjennom kjeden medfører redoksreaksjoner som frigjør kjemisk energi og det utvikles en spennings- og konsentrasjonsforskjell der energien som frigjøres brukes til å syntetisere ATP. Acetyl-CoA kan enten oksideres i sitronsyresyklus eller bli benyttet i produksjon av ketonlegemer under fasting avhengig av kroppens tilstand (47, 57, 58).

1.1.7 α -oksidasjon og ω -oksidasjon

Fettsyreene kan også nedbrytes ved α - eller ω -oksidasjon. Hvis β - karbonet på fettsyren er sterisk hindret vil oksidasjonen skje ved α -karbonet (α -oksidasjon) (59). ω -oksidasjon er også et annet mekanisme fettsyrer kan gjennom. Fettsyrer har også mulighet for å bli nedbrutt gjennom ω -oksidasjon, ved at ω -karbonet blir omgjort til en karboksylsyre vha enzymer og det vil det da være to karboksylgrupper i begge endene av molekylet. Alle tre mekanismer resulterer med å transportere fettsyrekjeden aktivert av CoA inn i sitronsyresyklus og elektrontransportkjeden hvor man får omdannet energimolekylet ATP (60).

1.8 Fettsyrens opptak og metabolisme i hjernen

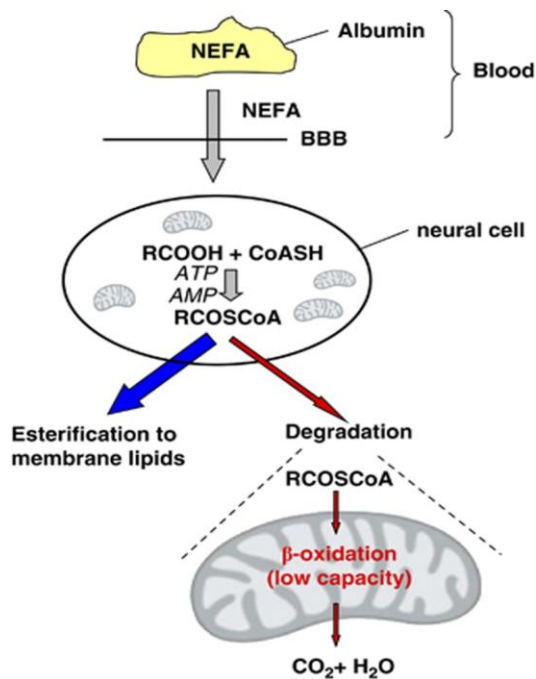
Hjernen krever mye av kroppens energi. Hjernen utgjør ikke med enn omtrent to prosent av kroppens vekt, men likevel står den for ca. 20 prosent av kroppens totale energiforbruk. Store mengder av ATP trengs i natriumpumpemekanismen for å opprettholde membranpotensialet, som er essensielt for overføringen av nerveimpulsene. I hjernen blir mer enn 90% av ATP generert i mitokondrier ved bruk av oksidativ fosforylering (oxPhos) (61). Glukose er det foretrukne/primære energisubstratet for hjernen både i hvile og under aktivitet og FAs rolle er begrenset (61, 62). Hjernen bruker ketonlegemene som energikilde i stedet for glukose særlig under perioder med redusert matinntak (61).

Den lave fettsyre oksidasjon i hjernen kan forklares i form av (I) økt inntak av mettede fettsyre kan skade/forstyrre blod-hjerne-barrieren (BBB) ved å øke inflammatoriske mediatorer (61, 63), (II) en lav enzymatisk kapasitet for degradering/nedbrytning av fettsyren i hjernen og (III) økt risiko for ubalanse mellom produkter fra elektronkjedetransporten som oksygenarter (ROS) (61).

Likevel må fettsyrer bli tatt opp under hjernens utvikling, og fettsyrebindende proteiner og karnitin er blitt funnet i hjernevevet som tyder på at fettsyremetabolismen har en rolle i nevrou utvikling, neurotransmisjon og reparasjonsprosesser. Karnitin som er kjent for sin viktige rolle i transport av fettsyrer over den indre mitokondriamembranen, har vist seg til å ha en avgjørende betydning for hjernens funksjon, blant annet vil mangel på karnitin forårsake utvikling av metabolsk encefalopati, preget av hovne astrocytter og utvidede mitokondrier (61, 64). Apolipoprotein E (apoE) som finnes på overflaten av flere lipoproteintyper har en viktig rolle i lipidmetabolismen og i reparasjon av vev. ApoE allele ((ε-4 variant (*APOE4*)) er en viktig risikofaktor for Alzheimers sykdom, noe som tyder på at aldersrelaterte lipidendringer i hjernen kan ligge til grunn for utviklingen av

Alzheimers sykdom (65, 66). Det er kjent at dyslipidemi er assosiert i utviklingen av demens og AD, men mekanismene bak dette er fortsatt uklart (67) .

På grunn av den funksjonelle betydningen av PUFA i hjernen, må fettsyrer transporteres/hentes fra lagringsplasser f.eks. fettvev eller leveren til hjernen. I slike tilfeller vil lipoproteinlipase (LPL) hydrolysere triglyserider som er lagret i fettvevet og hydrolyseres til fettsyrer og glyserol. De frigjorte fettsyrene (Ikke-esterifisert fettsyrer, NEFA) forlater vevet og diffunderer til blodet, hvor de bindes til albumin som er et bærerprotein og transporteres gjennom hele sirkulasjonssystemet. Ved CNS, må fettsyrene passere blodhjernebarrieren, etter å ha dissosiert fra albumin og nå inn i nevroner (figur 1.5)(68). BBB består av tette endotelceller med flere lag som fungerer som en barriere. Fettsyrer som DHA, PA og AA har mulighet til å gå gjennom BBB gjennom passiv diffusjon (61). Men generell transport av PUFA over BBB ser ut til å involverer fettsyre-transportproteiner (FATP-1 og FATP-4) (62). NEFA blir aktivert til acetyl-CoA-derivater i cytosolen. I aktivert form av kan fettsyren brukes enten til biosyntesen av membranlipider eller i β -oksidasjon (61, 62).



Figur 1.5: Transport fra blod til fettsyrenedbryning i hjernen. Etter dissosiering fra albumin vil uesterifisert fettsyrer (NEFA) migrerer over blod-hjernebarrieren (BBB) via passiv transport eller proteinmediert transport (FA transport protein -1 og -4, FATP-1 og FATP-4) (62). Deretter går inn i nevroner og aktiveres til acyl-CoA-derivater i cytosol. Aktiverte acyl-CoA fettsyrer vil enten gå inn biosyntese av membranlipider eller alternativt gjennomgå β -oksidasjon i mitokondriene for å generer ATP. CO_2 og H_2O er nedbrytningsprodukter som følge av β -oksidasjon (61, 62).

1.9 Mitokondriens rolle i neurodegenerative sykdommer

Mitokondrier som tidligere nevnt unike organeller som utøver et bredt utvalg av cellulære funksjoner. Ved siden av sin sentrale rolle i produksjonen av adenosintrifosfat (ATP) som har blitt omtalt tidligere er de involvert i et bredt utvalg av regulering av ionebalanse, redoksbalanse og involvert i forbindelse med celledød prosesser, hvorav frigjør proteiner som aktivere proteaser (69-72). Energibehovet er høyere i nevroner på grunn av høyt forbruk av oksygen i hjernen. Kontinuerlig ATP-regenerering er nødvendig fordi nevroner er svært differensierte celler som trenger store mengder ATP for vedlikehold av ioniske gradienter over cellemembranene og for neurotransmisjon.

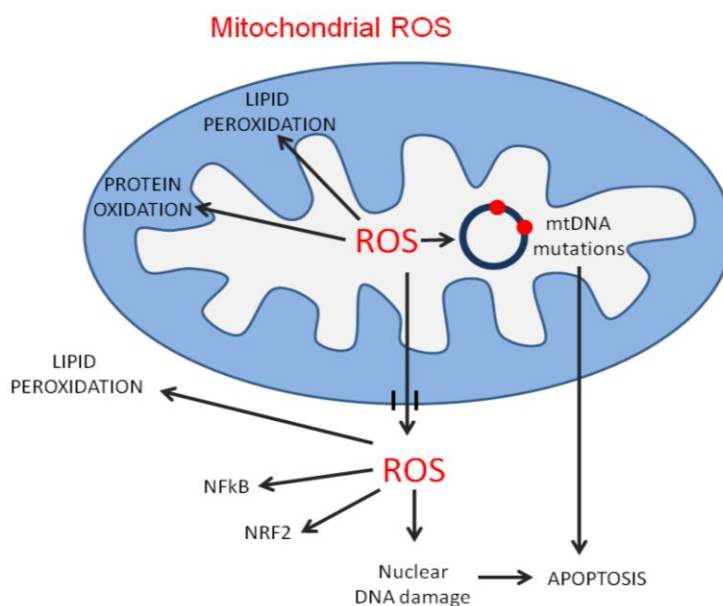
Mitokondriene anses å være hovedkilden for generering av ROS i CNS, noe som gjør dem sårbare for oksidativt stress skade. ROS genereres særlig i høye mengder ved β -oksidasjon og innen mitokondriene produserer de elektronlekkasje ved forskjellige trinn i elektrontransportkjeden det er fordi det er store antall elektroner som kanaliseres gjennom NADH/FADH₂ (61). Svikt i elektrontransportkjeden har vært forbundet med patogenesen av de vanligste kroniske aldersrelaterte neurodegenerative sykdommene som er forbundet med misfolding protein aggregering inkludert AD, PD, HD og ALS (73). Defekt i kompleks I, III og IV aktiviteter i elektrontransportkjeden er rapportert i blodplater og lymfocytter fra pasienter med AD og i postmortem hjernevev (74).

Den høye andelen PUFA i hjernen gjør vevet mer utsatt for lipidperoksidering. Oksidering av lipider dannes ved en kjede reaksjoner der en flerumettet fettsyre (LH) blir angrepet av et fritt radikal (75). Lipid peroksyldradikaler er svært reaktive og kan starte flere kjedereaksjoner ved nærliggende fettsyrer (76, 77). Tidligere studier har dokumentert økte nivåer av lipidperoksiderte produkter i hjernevev hos pasienter med Alzheimers sykdom sammenlignet med kontroll grupper som kan blant annet skyldes til oksidativ stress (78).

ROS kan også bidra til å aktivere signalveier som kjernefaktor erythroid 2-relatert faktor 2 (Nrf2) og kjernefaktor- κ B (NF- κ B) som regulerer inflammasjon og fører til infiltrering av mikroglia celler til CNS. Dermed er det med å promotere kronisk inflammasjon som har blitt sett i enkelte neurodegenerative sykdommer (figur 1.6)(79, 80). Mikroglia celler i tillegg til cytokinproduksjon kan bidra med å produsere betydelig mengder ROS via den NADPH-oksidase midlede enzymet (81).

Det er flere mekanismer der defekte mitokondrier bidrar til celledød, inkludert overdreven ROS-produksjon, mt-DNA mutasjon og mitokondriell membran permeabilisering (MMP). Irreversibel skadet mitokondria utløser MMP -mitokondrienes selvmordsapparat, som kan initiere både apoptose og nekrose. MMP kan bidra til tap av

mitokondria membran potensialet, etterfølgende defekt i ETC, redusert ATP-syntese, lysosom-oppløsning, celle-hevelse og tilsutt celledød (82). I tillegg kan MMP indusere brudd på mitokondrie membraner som fører til frigjøring av proteiner som induserer en selvdestruktiv enzymatisk kaskade ender i apoptose (83). Dysregulering av apoptose mekanisme er anerkjent i CNS-sykdommer (84). Det kan derfor antas at potensielle farmakologiske midler som reduserer oksidativt stress i nevroner kan bidra med å opprettholder mitokondriell funksjon i CNS og beskytte mot neurodegenerasjon.



Figur 1.6: Viser effekter av mitokondriell reaktive oksygen forbindelser (ROS). Defekte mitokondrier kan bli utsatt for lipid peroksidasjon og apoptose. ROS kan også aktivere baner som NF- κ B involvert i inflammasjon og fører til infiltrering av mikroglia celler til CNS og dermed promotere langvarig inflammasjon som har blitt sett i enkelte neurodegenerative sykdommer. Figuren er modifisert fra (85).

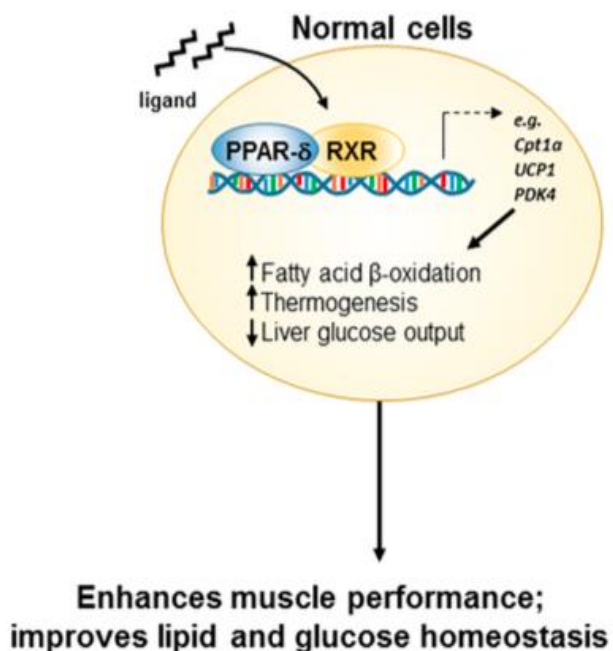
1.10 Peroxisom-Proliferator-Aktiverte Reseptorer (PPARs)

Peroxisom-Proliferator-Aktiverte reseptorer (PPAR) er proteiner som er en del av kjerne hormon reseptorfamilien (NHR), og består av tre undertyper: PPAR- α - (alfa), PPAR- δ (delta) også kjent som β , og PPAR- γ (gamma). Disse proteinene ble identifisert som reseptorer som induserer peroksisom-proliferasjon, og virker inn på

lipidmetabolismen ved å regulere cellulære nivåer av fettsyrer og fettsyrederivater fra lipoxygenase (LOX) og cyloocygenase (COX). Aktivering av PPAR-gener er vist også å være viktig for insulinfølsomhet, glukosekontroll og har effekt på inflammasjonsmarkører (86, 87).

Etter binding av ligand, vil PPARs heterodimerisere med retinoid X reseptor (RXR), og translokere til kjernen der de binde til spesifikke sekvenser på gener kalt peroksisom-proliferator-responsivt element (PPRE) som aktiverer genekspressjon (figur 1.7).

Transkripsjonsaktiveringen reguleres av koaktivatorer og korepressorer. Aktivering av PPRE fører til økt transkripsjon av de aktuelle genene som spiller en rolle i mekanismer som er assosiert med glukose og lipid metabolisme, inflammasjon, apoptose og DNA skade-respons (88-90).



Figur 1.7: Grunnleggende virkningsmekanisme for Peroxisom-Proliferator-Aktiverte reseptorer (PPAR). Etter ligand har bindet til til PPAR delta, vil reseptoren heterodimeriserer med retinoid X reseptor (RXR), som videre bindes til PPRE, spesifikke sekvenser og aktiverer transkripsjonen. Dette resulterer i produksjon av spesielle proteiner som er nødvendig for blant annet lipidmekanisme og glukose. Figur modifisert fra (90).

1.1.8 PPAR aktivering, inflammasjon og hjernen

1.11 Uttrykking

PPAR isoformer uttrykkes i CNS på forskjellige nivåer. *In vitro* studier viser at PPAR- α uttrykkes hos alle celletyper, mens PPAR- γ , er primært uttrykket i nevroner og astrocytter, men også sett i microglia-celler. Det observeres store forskjeller mellom hvor godt PPAR- δ er uttrykket i de ulike celletypene i CNS (91). Av alle isoformene så er PPAR- δ mindre analysert, men likevel er kjent å ha rolle i utviklingen av CNS og celleoverlevelse. PPAR- α og PPAR- γ er involvert i en rekke neurofysiologiske funksjoner som regulering av redoksresponsen, nevrogenese, celledifferensiering, inflammasjon samt sekundære funksjoner i regulering av kognisjon, angst og emosjonell oppførsel (92).

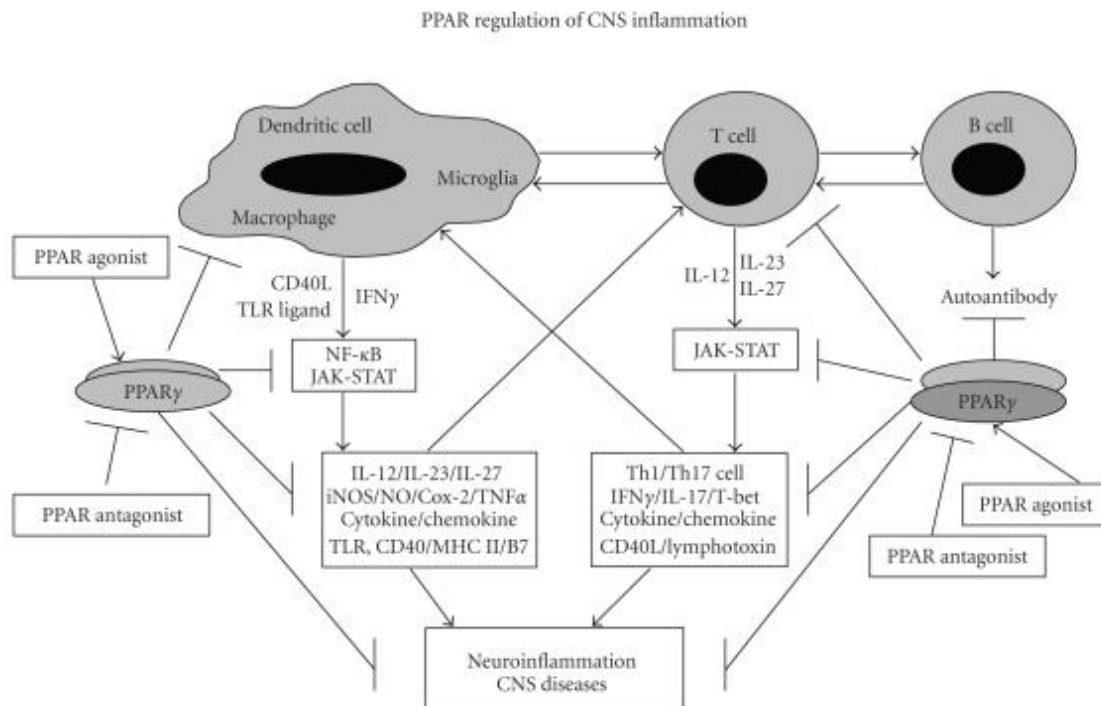
PPAR- α og PPAR- γ er lokalisert i hjerneområder som er selektivt involvert i reguleringen av følelser og stressresponsen. PPAR- α er mest uttrykt i basalganglia, amygdala, prefrontale cortex (PFC) med lavere nivåer i hippocampus i et studie i mushjerne. PPAR- γ er også svært uttrykt i basalganglia og amygdala (92). PPAR- δ derimot har viser til å være den mest utbredte isoptopen på tvert av hjerneområder (91, 93).

1.12 PPAR, Inflammasjon og CNS

Ulike varianter av fettsyre inkludert umettede, mettede og forgrenede fettsyrer, kan binde seg til og aktivere PPAR, med viss grad av spesifisitet til isoformen. Celler i immunsystemet bruker lipider som både intracellulære og ekstracellulære signalmediatorer (94). PPAR regulerer ulike typer inflammatorisk respons gjennom ulike signalveier som påvirker transkripsjonsfaktorer relatert til NF- κ B og JAK-STAT (figur 1.8) (95). Inhibering av NF- κ B og JAK-STAT undertrykker ekspresjon av flere gener som er involvert i den inflammatoriske respons. Disse inkluderer cytokiner,

celleadhesjonsmolekyler og andre proinflammatoriske signalmediatorer, slik som IL-12, TNF- α og induserbar nitrogenoksydsyntase (iNOS) (95, 96).

Innen feltet for CNS - sykdommer har det senere tid vært særlig fokus på PPAR- α og PPAR- γ , hvor PPAR- γ , har vært den mest viktigste isotypen i microglia, på grunn av sine dokumenterte antiinflammatoriske egenskaper og dens potensielle terapeutiske bruk i nevrodegenerative sykdommer og hjerneskade (95-97). PPAR- γ spesifikke ligander kan føre til hemming av produksjon av mange inflammatoriske cytokiner TNF- α , interleukin-1 β (IL-1 β) og IL-6 blant annet induksjonsproduksjonen av nitrogenoksid på forskjellige celletyper, inkludert monocytter, makrofager og epitelceller (96). I tillegg til å virke hemmende på inflammasjonsmediatorer, har reseptoren også egenskaper som kan indukere differensiering og utvikling av nevroner (figur 1.8) (93).

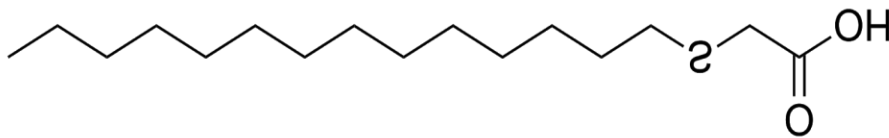


Figur 1.8: Regulering av nevroinflammasjon gjennom PPAR- γ i CNS-sykdommer. CD40 protein /Toll-like reseptorer TLR (proteiner) induserer aktiveringen av NF- κ B banen som fører til ekspresjon av IL-12 cytokiner fra antigen-presenterende celler (APC) som igjen signaliserer gjennom JAK-STAT-banen i T-celler som fører til Th1 / Th17-differensiering og utvikling av CNS-sykdommer. PPAR-agonister hemmer signalering og transkripsjon i APC og T-celler, dermed hemmer aktivering av ulike kaskader som er aktiv under inflammasjon og derved forebygger CNS-sykdommer (95).

1.13 Bioaktive fettsyrer

1.1.9 Tetradecyltioeddiksyre (TTA) og modifiserte fettsyrer

Tetradecyltioeddiksyre, også referert til som TTA er en syntetisk fettsyreanalog med et svovelatom satt inn i karbonkjeden i tredje posisjon fra karboksylenden (figur 1.9). På figur 1.9 ser man at TTA har lignende struktur som palmitinsyre (PA) som kroppen syntetiserer selv, men skiller seg fra ved at det er plassert en svovelatom i β -posisjon (98).



Figur 1.9: Strukturformel for Tetradecyltioeddiksyre (TTA).

På grunn av svovelatomet i β -posisjon kan TTA ikke metaboliseres gjennom β -oksidasjon eller α -oksidasjon, i stedet metaboliseres fettsyre via ω -oksidasjon (99). Siden den ikke er substrat for mitokondriell β -oksydasjon, får fettsyren en mye lengre virketid og har vist seg til å ha en rekke biologiske effekter.

1.1.10 TTAs effekter

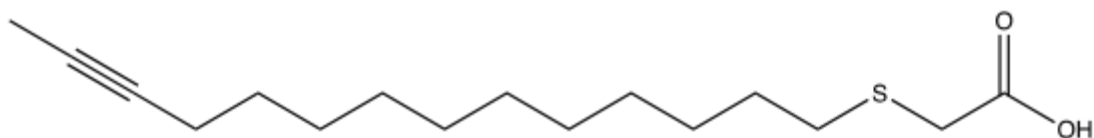
TTA har vist effekt både *in vivo* (mus, rotter og laks) og *in vitro* i diverse celler, blant annet muskelceller, leverceller og skjellemusklartur.

Svovel i β -posisjon har vist seg til å være mer potent enn naturlige fettsyrer når det kommer til å modulere regulering av lipidmetabolismen (100-102). Fettsyren har blant annet vist seg til økning av mitokondriell og peroxisomal proliferasjon, og hepatiske og peroksimale β -oksidasjonen av fettsyrer (100, 103-105). Videre har TTA også vist å redusere virke hypolipidemisk, ved å senke lipidnivået i blodet (98, 103, 104,

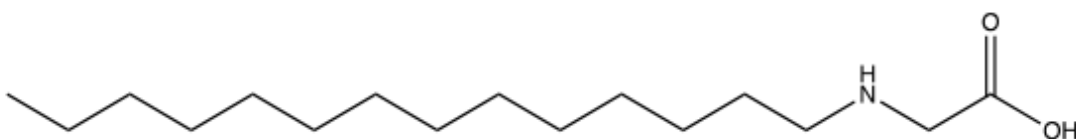
106). TTA har også vist til å forsterke/bedre insulin sensitiviteten og derved utvikling av diabetes type II (107).

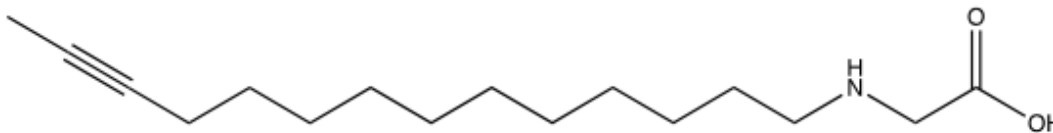
TTA sees på som lovende substans ved at fettsyren har vist seg å ha anti-inflammatoriske og antioksidative egenskaper (106, 108-112). Hovedmekanismen bak de anti-inflammatoriske og anti-oksидative effektene av TTA kommer fra evnen til at TTA har evnen til å aktivere PPARene. Alle tre isoformene er aktive under inflammasjon og oksidativ skade, men det antas at TTA- virker på inflammasjon via PPAR- γ og PPAR- α (108-110).

I denne oppgaven har det også blitt sett på om modifiserte fettsyrer med lignende struktur som TTA; tr-TTA, N-TTA og tr-N-TTA gir samme effekter som TTA (figur 2.0, figur 2.1 og figur 2.2). TTA unnslipper β -oksidasjon, men kan nedbrytes via ω -oksidasjon. Derfor har det blitt satt på en trippelbinding på 2. karbonet fra ω -karbonet i tr-TTA (figur 2.0). Figur 2.1 viser strukturen for N-TTA, hvor et nitrogenatom har blitt satt inn i karbonkjeden i tredje posisjon i stedet for svovel i TTA fra karboksylenden, mens for tr-N-TTA fettsyren har det blitt satt inn en trippelbinding på 2.karbonet fra ω -karbonet (figur 2.2).



Figur 2.0: Strukturformel for 2-(tetradec-12-yn-1-ylthio)acetic acid (2-tr-TTA) referert som tr-TTA i oppgaven.



Figur 2.1: Strukturformel for tetradecylglyserin (N-TTA).**Figur 2.2:** Strukturformel for tetradec-12-yn-1-ylglycine (tr-N-TTA).

1.1.11 TTAs potensialet i hjernen

I hjernen antas det at både PPAR- γ og PPAR- α er involvert i reguleringen av makrofagdifferentiering, syntese av nitrogenoksid, prostaglandiner, inflammatoriske cytokiner og kjemokiner, og har nevrobeskyttende rolle gjennom transkripsjon faktor NF- κ B (113). Det har blitt sett på dyremodeller at PPAR- γ agonister kan ha innvirkning på den inflammatoriske delen til AD-hjernen ved å undertrykke sekresjonen av pro-inflammatoriske molekyler og forbedringen av mitokondrie funksjonen (114). PPAR- α viser til å være involvert i regulering av cytokiner i CNS-sykdommer og blant annet aktivering av T-lymfocytter reduserer IL-2 produksjon og proliferasjon (95, 97).

Det har blitt vist at TTA-nivåene i hjernen er ca. 10-15% i forhold til nivået i plasma og lever (ikke publisert), noe som indikerer en effektiv transport over BBB. Dermed kan det være et potensielt drugtarget for å behandle pasienter med mild kognitiv svikt. Dette er med tanke på at det finnes ikke terapeutiske behandlinger som fungerer mot nevrodegenerative sykdommer. Således kan TTA og eventuelle modifiserte fettsyre være aktuelle substanser for behandling av flere nevrodegenerative sykdommer.

2 Formålet med oppgaven

Formålet med denne oppgaven var å undersøke inflammatoriske og oksidative endringer *in vitro* ved bruk av modifiserte fettsyrer i nerveceller. Det er tidligere funnet at TTA kan modulere inflammasjon induisert av TNF- α i cellekultur (109). Det har også blitt publisert artikler om at TTA og TTA-analoger har egenskaper som fører til endret metabolisme i rotter deriblant senket kolesterolnivå i plasma, og økt *in vitro* oksidasjon av palmitocyl-CoA i leverhomogenat (115). Det er imidlertid få publiserte artikler som tar for seg effekter på inflammasjonsparametre i humane nevroner behandlet med TTA-analoger. Inflammasjon er en viktig faktor i progresjon av nevrodegenerativ sykdom. Studien har således til hensikt å undersøke potensielle anti-inflammatoriske effekter av TTA på nerveceller ved å bruke *in vitro* modellen SH-SY5Y. Videre var det ønsket å se på effekter av TTA i CNS *in vivo* i dyslipidemi-modeller: mus og rotte.

Et sekundært mål er å teste TTA-analoger *in vitro* i celler for å se om de viste lignende eller forbedrede egenskaper i forhold til TTA. For å kunne samle inn tilstrekkelig kunnskap på effekten av de syntetiske fettsyrene var det viktig å: (1) bestemme dosen som er nødvendig for å kunne jobbe videre med, og (2) velge markører og en egnet metode for identifisering av antiinflammatoriske og antioksidative effekter.

3 Materialer og metoder

3.1 Materialer og utstyr

Tabell 3.1: Liste over løsningsmidler og fettsyrer som har blitt brukt i laboratoriearbeidet til denne oppgaven.

Navn	Produsent	Sted	Cat.log
Løsningsmidler og fettsyrer			
NaOH (natriumhydroksid)	Merck, KGaA	Darmstadt, Tyskland	106481000
DMSO (dimetylsulfoksid)	Sigma-Aldrich	St. Louis, Mo, USA	D2650-5X10ML
Fetak Bovine Serum (FBS)	Gibco Life Technologies	Pasiley, Skottland, UK	10270-106
PA	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA	P0500-10G
TTA	Innolipid AS	Eidsnes, Norge	B57003
Tr-TTA	Synthetica AS	Oslo, Norge	GH:DP-4:43
N-TTA x HCL	Synthetica AS	Oslo, Norge	SA:DIV-1:85
Tr-N-TTA x HCL	Synthetica AS	Oslo, Norge	EH:D-4:82
Reagenser			
Trypsin EDTA	Lonza BioWittaker	Verviers, Belgia	BE17-16IE
Fosfat buffer saline (PBS)	Lonza BioWittaker	Verviers, Belgia	17-516F
Trypan blue (0,4%)	Life Technologies	Eugene, OR, USA	T10282
WST-1 (Celleproliferasjons reagens)	Roche Diagnostic	Mannheim, Tyskland	11644807001
Rekombinert human TNF alfa lyopofilisert (TNF- α)	Thermo Fisher Scientific	Langeselbold, Tyskland	PHC3011
Diithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich	St. Louis, Mo, USA	D0632-5G
Rektifisert sprit (96%)	Kemetyl Norge AS	Oslo, Norge	600051
Nuclease-free Water (nuklease fritt vann)	Ambion	Austin, USA	AM9932
TaqMan Gene expression Masermix	Applied Biosystems	Foster City, USA	4369016
KIT			
RNeasymini Kit (250)	Qiagen Company	Hilden, Tyskland	74106
Rnase-Free Dnase Set (50)	Qiagen Company	Hilden, Tyskland	79254
High-Capacity RNA-to-cDNA Kit	Applied Biosystems	Foster City, USA	4368814
Rnase Inhibitor	Applied Biosystems	Foster City, USA	N8080119
Universal mouse reference RNA (UMRR)	Agilent Technologies,	Santa Clara, CA, USA	750600-41

Tabell 3.2: Liste over utstyr, materialer og programmer som har blitt benyttet.

Navn	Produsent	Sted	Cat.log
Utstyr			
BD vacutainer (serumrør) 10 ml	B Braun Melsungen AG	Melsungen, Tyskland	368430
Sterican 0,80-40 mms	B Braun Melsungen AG	Melsungen, Tyskland	4657577
Parafilm M	Sigma- Aldrich	St.Louis, MO, USA	P7793
BD plastipak 1 ml	Becton Dickinson S.A	New Jersey, USA	303122
OmniFix, Luer SOLO 2ml	B Braun	Melsungen, Tyskland	4616022V
CryoPure Tube 1.0 ml white	Sarstedt AG & CO	Nümbrecht, Tyskland	72.327
Pipette tips, universal 2-200 ul	VWR International	Radnor, PA, USA	612-5755
Pipette tips, universal 50-1000 ul	VWR International	Radnor, PA, USA	612-5755
Pipetteboy Comfort 15 mL Centrifuge Tube	Integra Biosciences AG Centristar TM, Corning Inc.	Hudson, USA NY, USA	62.554.502
50 mL Centrifuge Tube	Centristar TM, Corning Inc.	NY, USA	62.547.254
Pasturpipetter/transfer pipette	Sarstedt AG & CO	Nümbrecht, Tyskland	1171
Microtube 1,5 ml	Sarstedt AG & CO	Nümbrecht, Tyskland	72.690.001
Pipette 2 ml	Sarstedt AG & CO	Nümbrecht, Tyskland	1252025
Pipette 5 ml	Sarstedt AG & CO	Nümbrecht, Tyskland	1253025
Pipette 10 ml	Sarstedt AG & CO	Nümbrecht, Tyskland	1254025
Pipette 25 ml	Sarstedt AG & CO	Nümbrecht, Tyskland	1685020
Blue Vented Cap	Corning Ink	NY, USA	353108
Blue Vented Cap Tissue Culture Treated	Corning Ink	NY, USA	353136
Tissue Culture Plate 96-Well	Corning Inc.	NY, USA	353072
Tissue Culture Plate 6 Well	Corning Inc.	NY, USA	353046
Countess™ counting chamber slides	Gibco®, Invitrogen (Gibco Life Technologies)	Paisley, Skottland, UK	C10283
QIAxpert Slide 40(25)	Qiagen Company	Hilden, Tyskland	990700
Reagent Reservoir with dividers	VWR international	Radnor, Pennsylvania, USA	613-1175
Cell scrapers, 25 cm	Sarstedt AG & CO	Nümbrecht, Tyskland	83.1830
384 PCR-plate full skirt	Sarstedt AG & CO	Nümbrecht, Tyskland	72.1984.202
Sealing tape, optically clear	Sarstedt AG & CO	Nümbrecht, Tyskland	95.1994
Biosphere safeseal tube 1,5 ml	Sarstedt AG & CO	Nümbrecht, Tyskland	72.706.200
Multiply Pro cup 0,2 ml, PP	Sarstedt AG & CO	Nümbrecht, Tyskland	72.737.002
Multiply Pro cup 0,5 ml, PP	Sarstedt AG & CO	Nümbrecht, Tyskland	72.735.002
Instrumenter			
Nikon TMS microscope	Nikon	Tokyo, Japan	
Scanlaf Mars Pro	Scanlaf AS	Allerød, Danmark	
LAUDA AQUA line AL12	Lauda-Brinkmann LP	Delran, USA	
Sartorius R180D	Sartorius	Göttingen, Tyskland	
SANYO®, CO2 incubator, MCO-19AIC	Sanyo	Watford, UK	
MTS 2/4 Digital Microtiter Shaker	IKA	Staufen, Tyskland	3208000
Centrifuge 5702	Eppendorf	Hamburg, Tyskland	
QIAxpert System	Qiagen Company	Hilden, Tyskland	
Countess II	Invitrogen	Carlsbad, CA, USA	
Spectra Max Plus 384 Microplate	Molecular Devices	San Jose, California, USA	

Reader	Corporation		
GeneAmp PCR, Polymerase Chain Reaction system 2700	Applied Biosystems	Foster City, USA	
ABI PRISM 7900HT Sequence Detector System	Applied Biosystems	Singapore	
MYSPIIN 6	Thermo Fisher Scientific	Langenselbold, Tyskland	
Vortex Mixer, Labdancer	VWR international	Radnor, Pennsylvania, USA	444-0004
Heraeus Multifuge 35-R centrifuge	Thermo Fisher Scientific	Langenselbold, Tyskland	
Heraeus Fresco 17 Microcentrifuge	Thermo Fisher Scientific	Langenselbold, Tyskland	
Heraeus Biofuge Pico 24 Microcentrifuge	Thermo Fisher Scientific	Langenselbold, Tyskland	

Programvare

Softmax Pro	Molecular Devices Corporation	San Jose, CA, USA
Microsoft Excel 2008	Microsoft Corporation	Redmond, WA, USA
SDS 2.3	Applied Biosystems	Foster City, CA, USA
GraphPad Prism 8	GraphPad Software Inc.	San Diego, CA, USA

1.1.12 Tillaging av bioaktive lipofile stoffer og kontrollene

0,1 M NaOH ble benyttet for som oppløsningsmiddel. TTA og PA har molekylvekter på henholdsvis 288.5 g/mol og 256.4/mol. Mens Tr-TTA, N-TTA og Tr-N-TTA hadde molekylvekter på 284.5 g/mol, 307.9 g/mol og 303.9 g/mol.

Krystallinsk TTA, PA, Tr-TTA, N-TTA, Tr-N-TTA ble oppløst forsiktig i 0,1M NaOH i et sterilt glassrør i et glassbeger fylt med vann, plassert på kokeplate ved 80 °C til en konsentrasjon på 25 mM. 25 mM-oppløsningen av TTA, PA, Tr-TTA og N-TTA ble fortynnet sakte i inaktivert fetalt bovint serum (FBS) med en temperatur på 45 °C til en endelig konsentrasjon på 2 mM i kompleks med FBS, tilsvarende ble Tr-N-TTA fortynnet til 1 mM i kompleks med FBS. Disse sluttkonsentrasjonen ble anvendt som en stamløsning i etterfølgende eksperimenter. 0,1 M NaOH ble behandlet i på samme måte ved oppvarming til 80 °C og fortynning i FBS ved 45 °C, og ble anvendt som en kontroll for fettsyrene gjennom forsøkene. Det ble oppdaget utfelling på N-TTA ved høye konsentrasjoner og dermed ble den tillaget med en sluttkonsentrasjon på 1mM.

1.1.13 HuH-7- og SH-SY5Y cellelinje og dyrkningsmedium

I denne studien ble det benyttet to forskjellige celletyper: HuH-7-celler og SH-SY5Y celler (tabell 3.3). HuH-7 celler er veletablert cellelinje som har blitt benyttet for å representere en *in vitro* modell for leveren (116). HuH-7 celler ble benyttet for å kunne bestemme dose-respons for fettsyrene med tanke på at disse fettsyrene er mest studert i leverceller, og dermed fungerer som en kontroll for SH-SY5Y celler.

HuH-7 celler er en human hepatoma-cellelinje isolert fra en 57 år gammel japansk mann med leverkreft i 1982 (117). HuH-7 cellelinjen er en evigvarende cellelinje av epitel-lignende celler som kan forårsake tumor. Disse celler har høyt nivå av metaboliserende enzymer og er i stand til å utskille plasmaproteiner som albumin. HuH-7 celler har blitt brukt til å undersøke levertoksisitet av legemidler, hepatisk genregulering, og patogenese til hepatittvirusinfeksjon (118).

SH-SY5Y celler er en klonet sublinje av SK-N-SH celler som opprinnelig ble isolert på 1970 tallet fra en metastatisk beinmargsbiopsi fra et barn (jente, 4 år) som led av neuroblastom, en sjelden nervecellekreft (119, 120). SH-SY5Y celler har en cancercellelinje bakgrunn kombinert med evne til å bli differensiert til neuronlignende celler. Denne cellelinjen har blitt mye brukt som modell av nevroner siden 1980-tallet som følge av at cellene har mange biokjemiske og funksjonelle egenskaper til nevroner, blant annet retinsyre (RA) kan indusere differensiering i SH-SY5Y celler og kan utvikle fenotype som nerveutløpere. SH-SY5Y har mulighet til å uttrykke dopaminerge markører, muskariniske og nikotiniske adrenerge reseptorer (121).

Passasjenummer refererer til antall ganger cellene i kulturen har blitt subkultivert. Antall passasjenummer varierer mellom ulike celletyper. Cellekulturer har potensial til å forandres med tiden, og endring som tap av differensierte egenskaper eller endre følsomhet over infeksjon kan forekomme ved økende passasje nummer. Det anbefales ideelt å utføre analyser på cellekultur mellom 10-20 passasjer (122).

HuH-7-cellelinjen som ble brukt, var fra to forskjellige batcher; p35 og p37 hvor forsøkene ble gjort i passasjer på p41. Tilsvarende ble også SH-SY5Y cellelinje hente fra to ulike batcher fire ganger; p11 og p14, hvor forsøkene ble utført i passasje p16- p29.

Tabell 3.3: Oppsummering av cellelinjene som har blitt benyttet i oppgaven.

Cellelinje	Eksperimenter		Medium	Splitteratio	Opprinnelse Type	Produksjon (Cat.no)
	WST-1	Inflammasjonsessay/ genuttrykk				
HuH-7	+	-	DMEM: 12-604F	1:8-1:10	Humane leverceller	JCRB0403 ¹
SH-SY5Y	+	-	DHEM:F12 D6421	1:5-1:8-1:10	Humane neuroblastoma	94030304 ²

¹ HuH-7: human hepatocellular carcinoma fra JCRB Cell Bank (123).

² SH-SY5Y: human neuroblastoma fra ECACC General Cell Collection (124).

1.1.14 Tining av HuH-7 og SH-SY5Y fra nitrogentank

En ampulle med celler (+ DMSO + medium) ble tatt opp av nitrogentank og tint ved romtemperatur til kun en liten isklump var å se. Deretter ble cellene overført til 9 ml egnet medium oppgitt i tabell 3.3 i 25cm² flaske. Etter 24 timer med inkubering, var det nødvendig å fjerne DMSO ved å skifte medium og cellene ble dyrket videre som beskrevet nedenfor.

1.1.15 Medium

Både HuH-7- og SHSY5Y celler ble dyrket i forskjellige medier (tabell 3.4 og 3.5). Cellene ble dyrket i 25/75 cm² vevskulturflasker i inkubatorskap ved 37 °C og 5 % CO₂. All inkubasjon av celler ble også gjort under disse betingelsene. For å sikre adekvat tilførsel av næringsstoffer og vekstfaktorer ble medium skiftet jevnlig (ca. hver tredje-fjerde dag). Alt arbeid med celler i kultur ble utført med aseptiske arbeidsteknikker under sterile omgivelser i LAF-benk.

Tabell 3.4: Medium for HuH-7 celler.

Mengde	Ingredienser	Produsent	Cat.No
500 ml	DMEM	Lonza	L0106-500
50 ml	Fetal Bovine Serum (FBS) ¹	GIBCO	Lot: 41Q8095F
5 ml	Penicillin-Streptomycin 100X (Pen-Strep)	Lonza	L0022-100

¹ Inaktivert FBS ved 56 °C.

Tabell 3.5: Medium for SH-SY5Y celler.

Mengde	Ingredienser	Produsent	Cat.No
500 ml	DHEM:F12 HAM (1:1)	Lonza	D6421
75 ml	Fetal Bovine Serum (FBS) ¹	GIBCO	Lot: 42G2085K
5 ml	Penicillin-Streptomycin 100X (Pen-Strep)	Lonza	L0022-100
5 ml	L-Glutamin 2 mM	Biowest	X0557-100
5 ml	Non Essential Amino Acids 100x (NEAA) 1 %	Biowest	X0557-100

¹ Inaktivert FBS ved 56 °C.

3.2 Standardprosedyrer og tining av celler

1.1.16 1. Celleforsøk - splitting

Mediet for utsåing ble forvarmet i «vannbad» for å være tilpasset cellens temperaturbehov. For splitting ble mediet først fjernet fra HuH-7 celler, deretter ble cellene vasket med 3 ml PBS og behandlet med 2 ml trypsin-EDTA løsning i 5 minutter i inkubator. Trypsin bryter cellematrix forbindelser ved sin proteaseaktivitet, mens EDTA binder Ca^{2+} og bryter Ca^{2+} avhengige celle-celle adhesjoner. Dermed løsner cellene både fra hverandre og fra underlaget (125). Det ble kontrollert at cellene løsnet ved hjelp av lysmikroskop. Trypsin ble nøytralisert ved å tilsette 4 ml oppvarmet medium og løsningen ble spylt noen ganger for å løsne cellene fra hverandre vha 10 ml-engangspipette. Deretter ble løsningen sentrifugert i 3 min, 20 °C, 1000 rpm. Cellepelletten (inneholdt både levende og døde celler) ble resuspendert i 5 ml medium. Cellesuspensjonen ble fordelt i nye 25/75 cm² flasker sammen med 8/24 ml medium i hver flaske. Tilsvarende prosedyre ble gjennomført for SH-SY5Y celler, men disse ble kun behandlet med 1 ml trypsin-EDTA i 1 minutt i inkubator fordi cellene løsnet seg mye raskere.

1.1.17 Celletelling

Også ved måling av cellekonsentrasjon ble cellene ble trypsinert, deretter nøytralisert ved tilsetting av medium. Videre ble celleløsningen med trypsin sentrifugert i 3 min, 20 ° C i 1000 rpm, og cellepelletten (innholdt både levende og døde celler) ble resuspendert i mediet. Cellekonsentrasjonen ble telt ved anvendelse av Countess™ automated cell counter der løsningen som ble målt bestod av 10 µl celleløsning og 10 µl tryptanblått. Ved hjelp av celletelling ble det beregnet hvilket volum celleløsning og medium som trengtes til videre utsåing i 96-brønnersbrett for WST-1 og i seks-brønnersbrett for qPCR/inflammasjonsassay. Brettene med celler ble så satt til inkubering ved 37 °C med 5 % CO₂.

1.1.18 Splitteratio

Begge cellelinjene ble splittet som regel en gang i uken med splitteratio gitt i tabell 3.3. Splitte ratio refererer til hvilken grad cellesuspensjonen fortynnes for hver passasje. Splitte ratio 1:10 betyr at fra 5 ml cellesuspensjonen vil det tas ut 0.5 ml som overføres til en like stor flaske sammen med nytt medium.

1.1.19 Utsåing av celler

Fortynning av celler er avhengig av konfluensgrad og utsåing til eksperimenter for viabilitet og inflammasjonassay ble dermed utført når cellene var ca 80-90% konfluente. Som regel ble eksperimenter gjennomført i løpet av 1-5 dager, før cellene oppnådde full konfluens (ca. 80%).

Cellene ble sådd ut i 96 brønners-brett i 100 µl medium for viabilitetsmåling med WST-1-assay. På bakgrunn av antall levende celler ble det sådd ut 9000 celler per brønn av HuH-7 celler for 2 dager (48 timer) behandling med fettsyrer. For SH-SY5Y ble det sådd ut 25 000 celler per brønn 48 timer behandling med FA (resultat - figur 4.1).

For høsting til genanalyser ble cellene sådd ut i 6-brønners brett i 3 ml næringsmedium. Celleantall per brønn var da mellom 300-600 000 av SH-SY5Y for 24 timers FA behandling. Begge cellelinjene ble inkubert i minst ca.3-4 timer etter utsåing for at de skulle feste seg før videre behandling.

3.3 Viabilitetsmåling med WST- 1 assay

1.1.20 Forbehandling med TTA og TTA-analoger

Prinsipp for WST-1 metoden

Water soluble tetrazolium salt-1 (WST-1) er en kvantitativ kolorimetrisk test for måling av mitokondriell enzymaktivitet. Tetrazolium saltet er et vannløselig salt med svakt rød farge. Ved hjelp av saltet kan metabolsk aktivitet bli benyttet som et mål på cellenes generell aktiveringsgrad. Aktiveringsgrad gjenspeiler cellens evne til proliferasjon og levedyktighet (126). Kvantifiseringen av metabolsk aktivitet av cellene er basert på spektrofotometer. Ved inkubasjon med levende metabolsk aktive celler vil mitokondrielle enzymer, dehydrogenaser redusere tetrazolium saltet og danne uløselige fiolette formazankrystaller som absorberer lys ved 450 nm. Den målte absorbansen som funksjon av konsentrasjonen av formazankrystaller, altså mengde formazan som dannes i løsningen korrelerer med antall metabolsk aktive celler.

Fremgangsmåte: HuH-7 og SH-SY5Y cellelinje

Forbehandling med TTA-analoger ble utført i 2 dager (48 timer) både for HuH-7 og SH-SY5Y celler. For tilsetning av FA ble det fulgt et selvlaget skjema for hvilke substanser som ble tilsatt i hvilke brønner (figur 3.1). For hver fettsyre ble det i duplikater utført to-foldsfortynning fra 1mM-0.0078 mM. For N-TTA og Tr-N-TTA ble det utført fra 0,5 mM-0.0039 mM. For HuH-7 etter 48 timer inkubering ved 37°C med FA ble 5 µl WST-1 fortynnet med 5 µl PBS tilsatt hver brønn for å måle proliferasjon og levedyktighet etter

tilsetning og avlesningen ble utført etter 1-3 timer. I motsetning ble SH-SHSY tilsatt 10 μ l WST-1 og avlesningen ble utført etter 1-4 timer.

Etter inkubering med WST-1 for begge cellelinjene ble brettet satt på platerister i 1 minutt. Deretter ble brettet satt i spektrofotometer og absorbansen lest av ved 450 nm og 650 nm.

	1-2 NaOH m/FBS	3-4 PA m/FBS	5-6 TTA m/FBS	7-8 Tr-TTA m/FBS	9-10 N-TTA m/FBS	11-12 Tr-N-TTA m/FBS
A	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	0.5 mM	0.5 mM
B	0.5 mM	0.5 mM	0.5 mM	0.5 mM	250 μ M	250 μ M
C	250 μ M	250 μ M	250 μ M	250 μ M	125 μ M	125 μ M
D	125 μ M	125 μ M	125 μ M	125 μ M	62.5 μ M	62.5 μ M
E	62.5 μ M	62.5 μ M	62.5 μ M	62.5 μ M	31.3 μ M	31.3 μ M
F	31.3 μ M	31.3 μ M	31.3 μ M	31.3 μ M	15.6 μ M	15.6 μ M
G	15.6 μ M	15.6 μ M	15.6 μ M	15.6 μ M	7.81 μ M	7.81 μ M
H	7.81 μ M	7.81 μ M	7.81 μ M	7.81 μ M	3.90 μ M	3.90 μ M

Figur 3.1: Skjematisk oppsett for FA-behandling i 96 brønners brett for SH-SY5Y. Cellene ble dyrket opp til tidligere beskrevet tilstand i 96-brønnersbrett før de ble behandlet med fettsyrer i gitte konsentrasjonene i 2 dager (48 timer).

3.4 Opptak av TTA i SH-SY5Y

1.1.21 Kromatografi og separasjon av fettsyrer

Kromatografi er en samlebetegnelse på separasjonsmetoder som er basert på at to komponenter separerer fra hverandre ved at de fordeler seg mellom to ublandbare faser, hvorav den ene fasen er mobil mens den andre er stasjonær. Det finnes to typer separasjonsmetoder gasskromatografi (GC, gass chromatography) eller væskkromatografi (LC, liquid chromatography), og skilles fra hverandre etter hvilken mobilfase som blir benyttet (127). Gasskromatografi (GC) er en veletablert separasjonsmetode som brukes til å identifisere og kvantifisering av fettsyrer. Metoden

baserer seg på å retardere stoffer ut fra deres flyktighet (128) (129). I dette tilfelle ble gasskromatografi sammen med massespektrofotometer (MS) benyttet.

I gasskromatografi vil mobilfasen være en gass (bæregass) som har som oppgave å frakte med seg komponentene i prøven. Når stoffene er i gassfase er de uretardert, men med en gang de kondenserer vil de være retardert (128). På grunn av fettsyrenes ulike kjemiske og fysiske egenskaper vil de kunne fraktes gjennom kolonnen med ulike hastighet. For å identifisere toppene som dekretes i kromatogrammet, sammenlignes resultatene ofte med kromatogrammer av referanseblandinger med kjent innhold som er analysert under de samme betingelsene (130). GC kan kobles til massespektrofotometer (MS). MS bestemmer molekylmassen og strukturen til et molekyl. Fettsyrene går gjennom tre ulike prosesser som ioniseringsprosessen, masseseparasjon og massedeteksjon. GC-kolonnen ledes inn i ioniseringskammeret der molekylene blir bombardert av elektroner med høy energi og resultatet blir dermed positivt ladde molekylion (kation). Molekylionet er ustabil og spaltes til fragmenter med positivt ladning kalles fragmentioner. Ut ifra molekylmassen per ladning (m/z) og ulike fragmentionene kan utgangsmolekylet identifiseres (131) (132).

Fremgangsmåte

GC-MS-analysen ble utført på SH-SY5Y celler og dets medium før og etter behandling av TTA kompleksert med FBS for å se på opptaket av TTA. Utsåing og cellebehandlingene ble klargjort på forhånd, men selve tekniske arbeidet og analysen ble utført av Pavol Bohov.

Før analyse på GC måtte fettsyrene derivatiseres til mer flyktige og termisk stabile fettsyremetylestre (fatty acid methyl ester, FAME), ved hjelp av svovelsyre. Før løsningen bli injisert i kolonnen, ble den nøytralisert vha kaliumkarbonat (K_2CO_3) for å unngå lavt pH. Total medium og cellulær FA-sammensetningene ble analysert ved gassvæskrokromatografi ved oppvarming med en 1: 1 blanding av metanol og toluen ved 90°

C i 1 time. Forbindelsene i prøven ble derved ført så gjennom kolonnen ved hjelp av hydrogen (0.8ml/min strømming) og detektert til slutt via en detektor, FID (flammeionisasjonsdetektor). FID registrerer disse fettsyre derivatene etter hvert som de kommer ut av kolonnen.

Gasskromatogram Trace GC ultra (Finnigan, USA) var benyttet for analysering er utstyrt med temperatur som er justerbar (vaporisation injector, PTV), flammeionisasjonsdetektor (FID), AS autosampler, silikakolonne som består av dimethylpolysiloxane stasjonær fase. Kolonne temperatur var programmert fra 110 til 310 °C. Temperaturen av PTV injektoren og FID-detektoren var konstant (280 °C).

GC-signalet var detektert med Chromeleon programvare, hvor grunnlinjene av hvert topp fra hvert enkelt fettsyre ble rettet opp og justert for å identifisere og kvantifisere fettsyrer. Antall topper vil være lik antall forbindelser i prøve. Som tidligere nevnt ble identifikasjon av toppene i kromatogrammet sammenlignet med referanseblandingen C21:0 tilsatt i prøven. Resultater som var lavere enn 5% på variasjonskoeffisienten ble tillatt som nøyaktige.

3.5 Inflammasjonsassay SH-SY5Y: tillaging og forbehandlinger – 1

Grunnlaget for regulering av cellenes funksjoner ligger lagret i arvematerialet, DNA-molekylet. For at genene skal utøve sin funksjon må de uttrykkes i form av et genprodukt som i fleste tilfeller koder for et protein. Når cellen har behov for et bestemt protein, transkriberes genet til mRNA, som videre omdannes til proteinet. Mengden mRNA forteller oss i hvilken grad et gen blir uttrykt (133).

For å kunne måle genuttrykk i SH-SY5Y cellene og vev ble RNA isolert og konsentrasjonen av isolerte RNA ble målt ved hjelp av Agilent Bioanalyser. Deretter ble totale RNA transkribert til komplementært DNA (c-DNA) før genuttrykningsnivåene ble kvantifisert ved bruk av kvantitativ polymerase kjedereaksjon (qPCR). I denne oppgaven

er qPCR brukt for å sammenlikne genuttrykket før og etter behandling med TTA og TNF- α tilsetning, for gener som er tilknyttet inflammasjon i kroppen.

1.1.22 Tillaging av TNF- α og kontroll

100 μ g krystallinsk TNF- α ble oppløst forsiktig i 1 ml destillert vann (H₂O) i et glassrør. TNF- α ble oppvart i 100 μ l fra stokkløsningen ble videre fortynnet med 90 μ l FBS (oppvarmet til 37 °C) og 810 μ l PBS til 10 μ g/ml og fordelt i 20 eppendorfrører og nedfrost ved -20 °C. Dette ble benyttet som sluttkonsentrasjon og anvendt etterfølgende inflammasjonsanalyser. 90 μ l FBS og 810 μ l PBS ble tilsatt i 100 μ l vann i eppendorfrør og nedfrost -20 °C. H₂O blandet med FBS og PBS ble dermed benyttet som kontroll for TNF- α .

1.1.23 Tillaging av dithiothreitol (DTT)

Cellene ble lysert i RLT buffer fra RNeasy mini Kit, tilsatt 2M dithiothreitol (DTT). DTT har et molekylvekt på 154.2 g/mol, ble laget ved å oppløse 0,3084 g til 1 ml destillert vann. Påfølgende ble 125 μ l DTT fordelt i åtte eppendorfrører og nedfrost -20 °C.

1.1.24 Dyrking av celler for qPCR/cellebehandlinger

Mellom 598 000- 600 000 SHSY5Y celler var utsådd i seks-brønnsbrett ved 37 °C og 5 % CO₂ i 24 timer for å oppnå 80-90% konfluente celler.

1.1.25 Stimulering med ulike doser av TNF- α

I første omgang ble konfluente SH-SY5Y celler stimulert med 5, 10, 20 og 100 ng/ml TNF- α og H₂O som kontroll. Behandlingen varte i 6 timer før cellelysering og RNA rensing. Deretter ble stimulerte cellene med enten 15 ng/ml eller 5-10 ng/ml for videre forsøk.

1.1.26 Anti-Inflammasjon egenskaper i celler behandlet med TTA, PA og TNF- α

Konfluente SH-SY5Y celler ble stimulert med 62.5 og 125 μ M TTA/FBS og PA/FBS. Behandlingen varte i 24 timer før det ble tilsatt 5 ng/ml TNF- α i siste 6 timer av de 24 timene før cellelysering og RNA rensing.

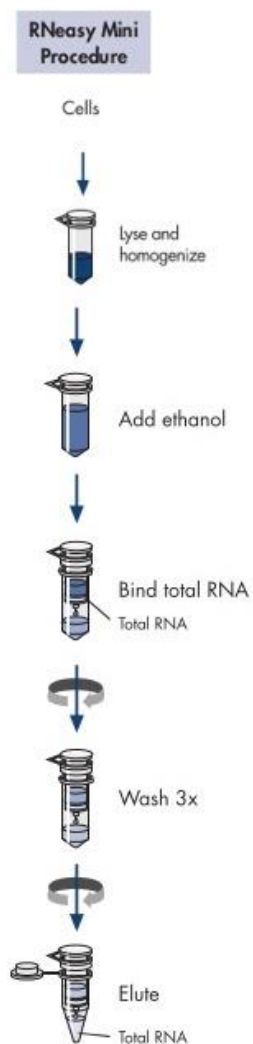
1.1.27 Lysering av celler

SH-SY5Y cellene ble først vasket med PBS og deretter lysert med 20 μ l DTT/ml lysisbuffer (RLT). 350 μ l RLT ble tilsatt per brønn. Tilsetning av DTT og RLT førte til lysering av plasmamembranen, kjernemembranen og cellelegemer som frigjør RNA og DNA. Lysering av cellen gav et viskøst lysat som ble overført til eppendorfrør. For homogenisering ble lysatet ført gjennom en 0,9 mm nål festet til en steril plastsprøyte minst 5-10 ganger. Eppendorfrøret med lysatet ble deretter direkte satt på is til prosedyren ble gjentatt for alle brønnene, og når de var ferdig, ble prøvene oppbevart ved -20 °C i påvente av RNA isolering.

3.6 Inflammasjonsassay SH-SY5Y: isolering av RNA, cDNA syntese og kvantitativ PCR – 2

1.1.28 Isolering av RNA i SH-SY5Y

For isolering av RNA ble det brukt kit og prosedyre fra Agilent Total RNA Isolation Protocol, hvor steg 6 ble erstattet med appendiks D for optimal DNase eliminering (134). RNeasy prosedyren er en veletablert metode som benyttes for å isolere og rens total RNA fra lysat. I denne prosedyren tar man i bruk spinnkolonner som inneholder silikamembran, som skal kunne binde seg opp til 100 μ g ribonukleinsyre (RNA) som er lengre enn 200 nukleotider. På denne måten vil RNA <200 nukleotider (som 5,8S rRNA, 5S rRNA og tRNAer), selektivt ekskluderes. Deoksyribonuklease (DNase) vil tilsettes direkte på kolonmembranen for å fjerne DNA, slik at man sitter igjen med intakt RNA. Forurensninger fjernes underveis i de ulike vasketrinn, og RNA blir tilslutt eluert i vann (figur 3.2).



RNeasy Mini Handbook 06/2012

9

Figur 3.2: RNA isolering av celler ved bruk av RNeasy Mini KiT. Prøvematerialet blir først lysert, homogenisert, deretter tilsatt etanol for å felle ut nukleinsyrer. RNA kan dermed binde seg til kolonne membranen. Videre utføres det en vaskeprosedyre, før RNA blir eluert i RNase-fritt vann. Modifisert figur fra (134).

Fremgangsmåte

Før selve RNA isoleringen ble flere løsninger laget. 70 % etanol framstilt ved å blande 96% etanol med RNase-fritt vann. Flasken med RPE-buffer ble tilsatt etanol slik at forholdet ble 1:4. DNase løsningen ble tillaget ved at DNase (1500 kU) og buffer RDD ble fortynnet 1:8 til en bruksløsning på 80 ul (134).

Eppendorfrørene med prøvene i ble tatt opp fra fryser og satt til tining. Hele volumet med prøven ble sentrifugert i fem minutter ved 13 000 rpm. Dette var for å sikre tilstrekkelig ødeleggelse av SH-SY5Y celler, og dermed sørger for at forurensningene samles som bunnfall. Deretter ble supernatant (cellelysatet) overført til et oppsamlingsrør hvor det ble tilsatt lik mengde 70 % etanol. Denne blandingen ble deretter overført til en RNeasy spin column stående i et oppsamlingsrør som ble sentrifugert i ett minutt ved 10 000 rpm i romtemperatur, og eluatet ble kastet. RNeasy spin column ble deretter tilsatt 350 µl RW1 Buffer, sentrifugert ved 10 000 rpm i ett minutt og eluatet kastet. Kolonnene ble deretter tilsatt 80 µl DNase-blanding og inkuberte i 15 min i romtemperatur. Ved endt inkubering, ble kolonnene igjen vasket med 350 µl RW1-buffer og sentrifugert i ett minutt ved 10 000 rpm i romtemperatur. Kolonnene ble vasket to ganger med 500 µl RPE-buffer og sentrifugert i ett minutt ved 10 000 rpm i romtemperatur. Eluatet ble kastet, og kolonnen overført til et nytt oppsamlingsrør for videre sentrifugering, 10 000 rpm i tre minutter. Dette er for å bli kvitt alle rester av etanol ifra PRE Bufferen. Deretter ble spin column overført til nytt merket eppendorfrør, og lot det stå åpent i halvtime slik at RPE og etanol kunne fordampes. 30 µl RNase-fritt vann ble pipettert direkte på kolonnemembranen og sentrifugert ved 10 000 rpm i et minutt for å eluere ut RNA. Rørene med RNA ble satt på is, fordelt og frosset ned i -80 °C etter kvantifisering av RNA konsentrasjon.

1.1.29 Kvantifisering av RNA-konsentrasjoner

RNA konsentrasjonen ble målt ved hjelp av QIAxpert System. Lys med ulike bølgelengder 230, 260 og 280 nm ble sendt gjennom prøvene og absorbansen ble målt. RNA har en absorbans med ultrafiolett (UV)-lys på 260 nm og forholdet mellom absorbansen $A_{260/280}$ og $A_{260/230}$ brukes for å undersøke renhet til RNA. En $A_{260/280}$ på mellom 1.8-2.0 og $A_{260/230}$ rundt 2.0 eller høyere er ønsket preferanse og anses som at RNA er rent. En lavere ratio enn 2 tyder på tilstedeværelse av proteiner som absorberer lys med

bølgelengde 280 nm eller forurensninger (salter, fenoler) som absorberer lys med bølgelengde 230 nm (135).

Fremgangsmåte

RNA ferdigisolerte prøvene beskrevet over ble tint på is. 2 µl av RNase-fritt vann ble benyttet som blank prøve og overført som en kontroll på avlesningsbrikken. 2 µl RNA, prøvematerialet ble plassert i hvert sitt avlesningsbrikke og konsentrasjonen ble målt i QIAxpert System. Prøvene ble videre oppbevart ved -80 °C i påvente av cDNA syntese.

1.1.30 Omvendt transkripsjon (C-DNA syntese)

Omvendt transkripsjon er en metode som brukes til å generere kopi/komplementær-DNA (cDNA) fra RNA for å kunne detektere genuttrykket. Hensikten med cDNA syntese skyldes RNA er ustabil og har økt risiko for degradering av RNaser (RNA-nukleaser).

Syntesen av cDNA fra mRNA gjennomføres ved bruk av enzymet revers transkriptase, nukleotider og en primer i tre trinn (136). De tre trinnene i syntesen er som vist i tabell 3.6.

Tabell 3.6: Ulike trinnene ved syntese av cDNA.

Trinn	Prosess	Temperatur (°C)	Tid (minutter)
1	Inkubasjon	25	10
2	Revers transkripsjon	48	30
3	Inaktivering av revers transkriptase	95	5
4	Slutt/nedkjøling	4	~

Tabell hentet fra (137).

Fremgangsmåte

Prosedyre og kit for syntesen av komplementært DNA (cDNA) fra mRNA er fra High-Capacity RNA-to-cDNA Kit og som tidligere nevnt baserer seg på tre trinn.

Først ble 10 µl reaksjonsblanding (RT-mix) laget som vist i tabell 3.7. 0.5-1 µg RNA ble tatt ut fra hver prøve, og resterende volum av nukleasefritt vann ble tilsatt i hver av eppendorfrørene med prøve slik at sluttvolumet ble 20 µl. 10 µl RT mix uten revers transkriptase ble også laget for å se om RNA er kontaminert, og 10 µl uten prøvematerialet (RNA) hvor det ble tilsatt 10 µl nukleasefritt vann sammen med 10 µl RT mix ble også tilberedt for å se om RT mix er kontaminert og gir utslag i PCR. Deretter for omdanning til cDNA, ble rørene plassert på en Thermal Cycler 2720 med innstilling listet i tabell 3.6. Deretter ble rørene ble satt på is og lagt i kjøleskapet.

Tabell 3.7: Thermo cycle reaksjonsblanding/revers transkriptase mix (RT -mix) og reaksjonsblanding uten revers transkriptase (-RT mix).

RT master mix komponenter	Volum per prøve (µl)	
	Med revers transkriptase (RT-mix)	Uten revers transkriptase (-RT-mix)
10 X RT buffer	2.0	2.0
25 X dNTP mix (100 mM)	0.8	0.8
10 X RT Random Primers	2.0	2.0
Revers transkriptase	1.0	-
RNAse inhibitor	1.0	1.0
Nukleasefritt vann	3,2	4,2
Total per reaksjon	10	10

Tabell hentet fra (137).

1.1.31 Real time quantitative PCR/Real-time PCR

PCR står for Polymerase Chain Reaction, noe som betegner *in vitro* amplifisering av DNA. PCR er en metode som brukes til å bestemme uttrykket av et gen, altså detektere sekvenser av interesse i cDNA. Målet med PCR er å kopiere en bit av en gensekvens i tilstrekkelig mange kopier, slik at deteksjon er mulig (138) (139).

Deteksjon av cDNA gjennomføres ved bruk av probe og primere som inneholder gensekvensen av interesse og taqman buffer fra Applied Biosystems. Som DNA-replikasjon i en human celle, krever PCR et DNA-polymerase enzym som lager nye DNA-

strenger, ved hjelp av eksisterende tråder som mal. DNA-polymerasen som vanligvis brukes i PCR, kalles Taq-polymerase. Som andre DNA-polymeraser, kan Taq-polymerase bare lage DNA dersom det gis en primer, en kort sekvens av nukleotider som gir et utgangspunkt for DNA-syntese og er konstruert for å være komplementær for et bestemt stykke DNA. Primere binder seg til malen ved komplementær baseparing og for at kopiene skal forekomme, må primeren binde seg til DNA-region og basene må samsvare (140).

Konvensjonell PCR og sanntid/kvantitativ PCR (qPCR)

Kort forklart består hver konvensjonell PCR syklus av tre trinn: denaturering, hybridisering ("annealing") og polymerisering ("elongation"). I denatureringstrinnet blir dobbeltrådet DNA oppvarmet til 93-98 °C (denaturering) slik at DNA splittes i to enkeltråder. Dette etterfølges av en temperaturreduksjon (45-65°C) i hybridiseringstrinnet, slik at primere får mulighet til å feste seg til komplementære sekvenser på de to adskilte DNA-trådene. I polymeriseringstrinnet økes temperaturen igjen (72 °C) som er enzymet DNA polymerases optimale temperatur og DNA syntesen starter. Her får enzymet bevege seg langs templatet fra primeren, og syntetisere den komplementære DNA-tråden ved hjelp av de fire basenukleotidene (adenin (ATP), tymin (TTP), cystin CTP) og guanin (GTP). Trinnene repeteres 25-40 ganger, og for hver syklus som går vil antallet DNA-molekyler fordobles (138) (141).

Det skilles mellom konvensjonell PCR og sanntid/kvantitativ PCR (qPCR).

Sanntid/kvantitativ PCR (qPCR) brukes samme mekanismene som konvensjonell PCR, men i tillegg ved tilsetting av et probe - radioaktiv/fluoriserende stoff muliggjøres deteksjon av DNAet. På denne måten blir DNA-opphoping målt ved hver PCR syklus istedenfor at sluttprodukt blir målt (138) (141).

Generelt i PCR er det benyttet referansegener (også kalt housekeepingsgener, husholdningsgener) som uttrykkes på konstant hos cellene. Referansegener er

nødvendige for generell cellulær funksjon og dermed uttrykt på et relativt stabilt nivå. Nivåene av ønsket genuttrykk ble normalisert i forhold til et referansegen (138) (141).

Ved utførelse av qPCR, bør andre prøver enn de aktuelle prøvene legges til for kvalitetskontroll. Det innebærer kontroller som -RT fra cDNA syntesen og blank kontroll (non template control, NTC). -RT-prøvene består av RNA (som ikke blitt omdannet til DNA), mens NTCene blir tilsatt vann i stedet for cDNA under fremstillingen av prøvene før qPCR. Begge er negative kontroller som teoretisk ikke bør forsterkes. Amplifisering av disse kontrollene antyder enten forurensning av prøvene under prosessen før qPCR eller dårlig kvalitet av RNA etter renseprosessen.

Fremgangsmåte

C-DNA som har blitt syntetisert ble blandet, sentrifugert og fortynnet til en stokkløsning på 10 ng/ μ l. I første omgang ble prøvene testkjørt i PCR for å se i hvilken konsentrasjon som er egnet for utrykning av ønsket gen. En prøve fra hver gruppe ble fortynnet til 1:8/1:4 og blandet med en mastermix som er listet i tabell 3.8 i eppendorfrør der man tilsatte polymerase, probe spesifikt for genet og nukleasefritt vann for test.

Probekonsentrasjonene og nukleasefritt vann varierte for hvert gen, og 9 μ l ble tilsatt i tre like paralleller i 384 brønnsplate, i tillegg til negative kontroll NTC og -RT. Deretter ble platen plassert i PCR maskin og kjørt.

I etterkant ble prøvene fortynnet til ønsket konsentrasjon som variert i henhold til hvert gen som ble uttrykket. En standardkurve for hvert gen ble etablert ved av hjelp av testkjøring av genene i først omgang. Standardløsningene bestod av en prøve som ble laget ekstra under c-DNA syntesen og ble fortynnet seks ganger, med kjente konsentrasjoner. Som tidligere nevnt ble cDNA for hver prøve, standardkurven og PCR-blanding tilsatt i rør, blandet og sentrifugert før pipettering til en 384 brønnsplate, tre paralleller av hver prøve. Genene som ble kjørt både for SH-SY5Y og dyrestudiene er

listet i tabell 3.9, og ble normalisert til referansegener etter at utvalgte ble funnet å være den mest stabile av referansegener som ble testet ved å bruke Excel.

Tabell 3.8: Reaksjonsblanding for qPCR-kjøring.

Komponenter for qPCR	Volum (μ l)	
	Per brønn	Per prøve, tre brønner
Buffer Taqman 2X	5.0	15
Probe 20X ²	0.5	1.5
Nukleasefritt vann	3.0	9.0
C-DNA ¹	1.5	4.5
Totalt	10	30

¹ Mengde C-DNA som tilsettes variere i henhold til hver gen som ble uttrykket.

² Forberedelse av probe og primer for 18S a wiket fra oppsettet.

Tabell 3.9: Genene for SH-SY5Y-celler og dyrestudiene som ble analysert i denne masteroppgaven.

Gene	Navn	No.
Human		
<i>Referansesgener</i>		
18S	18S, ribosomal	RT-CKFT-18S
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Hs99999905_m1
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	Hs02800695_m1
<i>Testet gener</i>		
IFN- γ	Interferon-gamma	Hs00989291_m1
IL-2	Interleukin-2	Hs00174114_m1
IL-6	Interleukin-6	Hs00985641_m1
IL-10	Interleukin-10	Hs00961622_m1
IL-15	Interleukin-15	Hs00542571_m1
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha	Hs00174128_m1
Mus		
<i>Referansesgener</i>		
18 S	18S, ribosomal	RT-CKFT-18S
Hprt1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	AX-045271-00
Rplp0	Ribosomal protein, large, P0	Mm00725448_s1

<i>Testet gener</i>		
CCL2 (MCP-1)	Chemokine (C-Cmotif) ligand 2	Mm00441242_m1
CCL5 (Rantes)	Chemokine (C-Cmotif) ligand 5	Mm01302427_m1
IL-1b	Interleukin 1 beta	Mm00434228_m1
Sod 1	Superoxide dismutase 1	Mm01344233_g1
Sod 2	Superoxide dismutase 2	Mm01313000_m1
Tnf- α	Tumor necrosis factor alpha	Mm00443258_m1
Rotte		
<i>Referansegener</i>		
Rplp0	Ribosomal protein, large P0	Rn03302271_gH
<i>Testet gener</i>		
Sod1	Superoxide dismutase 1	Rn00566938_m1
Sod2	Superoxide dismutase 2	Rn00690588_g1

Alle gener er fra Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), unntatt 18S fra Eurogentec (Liège, Belgia).

3.7 Dyrestudier

1.1.32 Genekspresjon i apoE^{-/-} mus etter 12 ukers behandling med TTA i diet.

Målet med studien var å undersøke effekten av TTA på utvikling av aterosklerose i 36 apolipoprotein (apo) E^{-/-} mus, som var føret med 0,4 % (v/v) TTA og 0,75% (v/v) TTA (data ikke publisert) i en periode på 12 uker (111, 142). ApoE^{-/-} mus er en allment anerkjent modell som brukes til å studere effekten av farmakologiske eller diettbehandlinger på utviklingen av aterosklerose (143). Kontrollmusene i denne studien ble føret med høy fett diett (23.7% v/v). Musene ble veid ukentlig, og det daglige fôr forbruket ble beregnet. Etter 84 dager ble dyrene avlivet med 2% isofluran og blod og ulike vev ble oppsamlet for videre undersøkelse. Det ble tatt fem hjernevevsprøver inkludert inkludert pre-frontal cortex, hjernestamme, hippocampus og prøver kalt "resten av hjernen" fra kontrollgruppen, lavt TTA og høy TTA gruppen for å studere TTA

opptak og effekt i dyremodell (111). I denne oppgaven ble det bare brukt prøver fra sistnevnte.

1.1.33 Genekspresjon i rotte etter 50 ukers behandling med TTA i diet.

Rottestudien ble basert på en 50 ukers eksperimentell forsøk hvor hensikten med studiet var å skille effekten av TTA i et langstidsforsøk sammenlignet med fiskeolje.

31-38 rotter randomisert i fire grupper og i løpet av 50 uker ble kontrolldyrene matet daglig med høy fett (25 %), og den andre gruppen (TTA-gruppen) fikk en høyfett diet med 0,4 % TTA. Den tredje gruppen (fiskeolje) fikk en diett med 10 % fiskeolje. Den fjerde gruppen ble mattet med begge diettene som overnevnte. Dyrene ble avlivet ved inhalering av 2 % isofluoran. Etter avlivning av dyrene ble plasma og organene fjernet og nedfrosset i flytende nitrogen (106). Det ble tatt syv-åtte hjernevevsprøver fra kontrollgruppen og TTA gruppen for å studere TTA opptak og effekt i dyremodell.

Fremgangsmåte

RNA fra vevsbiopsiene fra begge dyreeksperimentene ble isolert av lab kollegaer. C-DNA syntetisert fra apoE^{-/-} mus RNA ble utført av medstudent Dan Filip Blindheim, mens på rotteforsøket ble det utført av Kari Williams. Begge ble analysert for ekspresjon av utvalgte inflammatoriske, antioksidative, PPAR reseptor markører ved bruk av qPCR.

3.8 Statistikk

Microsoft Excel 2008 ble benyttet til databehandling og beregninger, mens alle statistiske analyser og fremstilling av grafer i denne oppgaven er gjort i dataprogrammet GraphPad Prism 8. Alle resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm (SD). Intervensjon gruppene (prøveanalysene) ble sammenlignet med kontrollgruppen ved hjelp av ensidig analyse av varians (ANOVA) med Dunnetts multiple sammenligningstest. Student t-test ble også benyttet det var to grupper som skulle sammenlignes.

P-verdier $\leq 0,05$ ble vurdert statistisk signifikante. De statistiske forskjellene er betegnet i grafer med stjerner; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ og **** $p < 0,0001$. Grubs test med 95% konfidensintervall ble utført i dyrestudier for å identifisere og eliminere uteligger.

For SH-SY5Y cellene ble *18S*, *HPRT-1* og *GAPDH* testet som referansegener, ble resultatene normalisert til *HPRT-1*, da det var den mest stabile av de tre.

For musgenene ble resultatene normalisert til *HPRT-1*, da det var det mest stabile referansegenet av *GAPDH* og *RPLP0* som også ble testet. For rottegene ble gene normalisert for *RPLP0*.

4 Resultater

4.1 Viabilitetsmåling med WST-1 assay

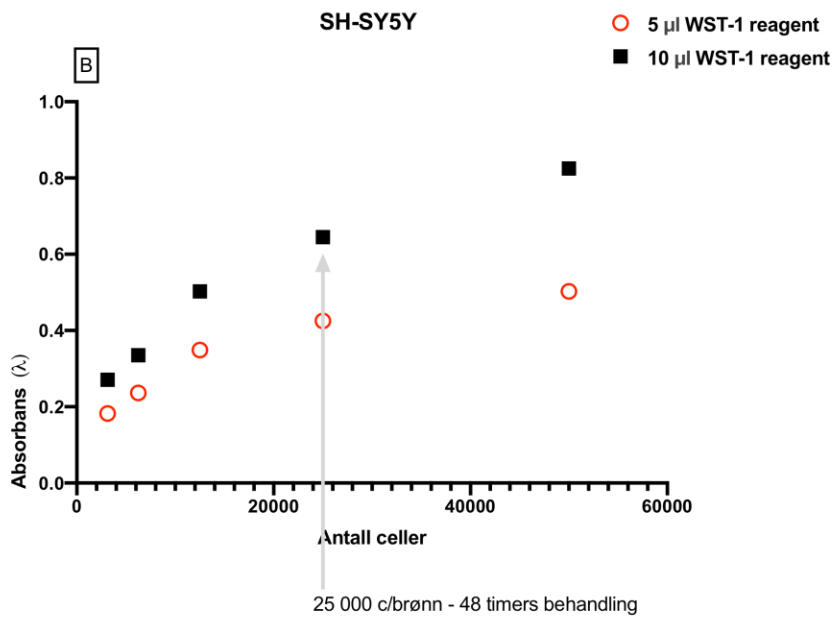
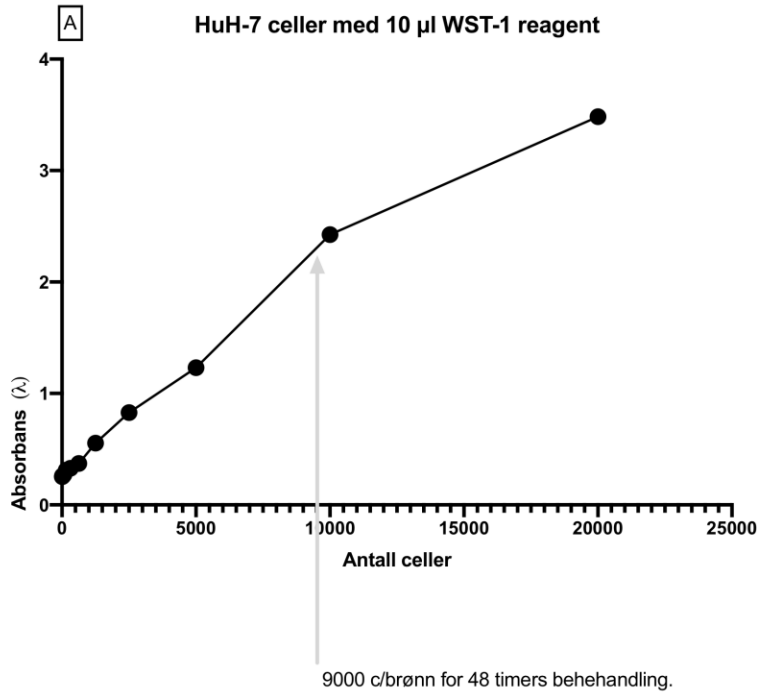
WST-1-viabilitetsanalysen ble utført for å bestemme hvilken dose av fettsyrene som ville ha en toksisk eller vekstbegrensende effekt på både HuH-7 og SH-SY5Y celler. For både HuH-7 og SH-SY5Y ble celleaktivitet etter 2 dager (48 timer) analysert ettersom man ønsket å se på anti-inflammatoriske effekter etter relativt korttidsbehandling med fettsyrene.

Absorbans i cellebrønner tilsatt WST-1 ble målt ved hjelp av spektrofotometer ved 450 nm og 650 nm. For hver brønn ble bakgrunnsabsorpsjon ved 650 nm subtrahert fra absorpsjonen ved 450 nm (data ikke vist). Den målte absorbansen for de behandlede celler ble deretter sammenlignet med kontrollene (blanke) som bare inneholdt celler og vekstmedium. Dette ble gjort for å korrigere for forskjeller i antall levedyktige celler fra forsøk til forsøk.

I enkelte tilfeller ble det observert fordamping i de ytterste brønnene, ergo var det her vanskelig å kunne forutsi om nedsatt celleproliferasjonen det skyldes FA behandling eller fordampningseffekten. Dermed ble disse ekskludert i alle forsøkene.

1.1.34 Celletetthetskurve: HuH-7 og SH-SY5Y.

HuH-7 og SH-SY5Y cellelinjer representerte modeller for henholdsvis lever og hjerne *in vitro*. Vi ønsket å først studere mitokondrieaktivitet i begge cellelinjer for å se på antall levende celler som var nødvendig for få optimalt signal i de videre forsøkene (figur 4.1).



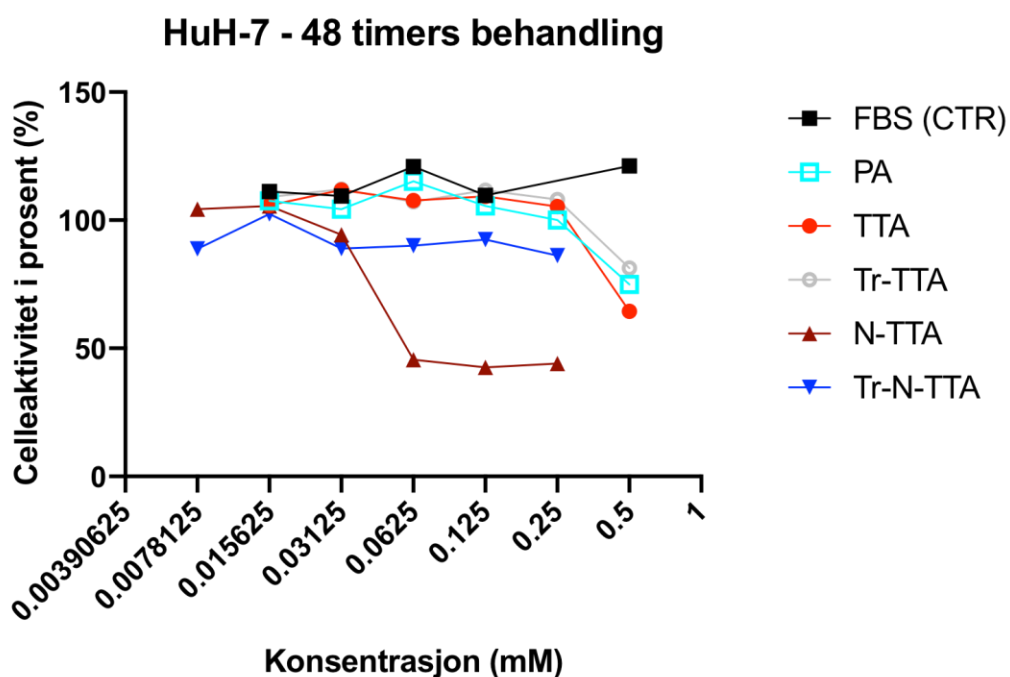
Figur 4.1: Absorbans målt med WST1-assayer plottet mot antall celler som ble utsådd per brønn i 96 brønners-brett og dyrket i 24 timer fulgt av fire timer med WST-1 behandling for HuH-7 cellelinje (A) og SH-SY5Y (B). Pilene indikerer antall celler som ble valgt til videre forsøk.

Ut ifra cellenes evne til proliferasjon og signalstyrken i WST-1 assayet til HuH-7-celler ble det bestemt å ha 9000 celler per brønn for 48 timer og tilsvarende for SH-SY5Y ble det

avgjort 25 000 celler per brønn etter det ble oppdaget at det var lite metabolske aktive celler.

1.1.35 WST-1 assay: Metabolsk aktivitet til HuH-7

Effekten av TTA på leverceller i kultur er studert tidligere (144, 145). HuH-7 ble derfor inkludert for å sammenligne TTA og de andre modifiserte fettsyrene i et kjent system. For å bestemme hvilken dose av TTA- analogene som ville ha en toksisk eller vekstbegrensende effekt på HuH-7-celler, ble proliferasjonen med en økende konsentrasjon av fettsyrene analysert.



Figur 4.2: Effekten av behandling med TTA, PA, Tr-TTA, N-TTA, og Tr-N-TTA kompleksert med FBS i 48 timer på proliferasjon og levedyktighet i HuH-7-celler etter fire timer WST-1 reagens. Resultatene er data fra 2 foldsfortynning av TTA-analogene, og kontroller (CTR) er tilsatt tilsvarende doser FBS. X-aksen er i en log₂ skala. Resultatene er presentert som gjennomsnitt fra to uavhengige forsøk i hver gruppe (n=2), og verdier relativt til ubehandlede celler på hvert brett (100%) er vist.

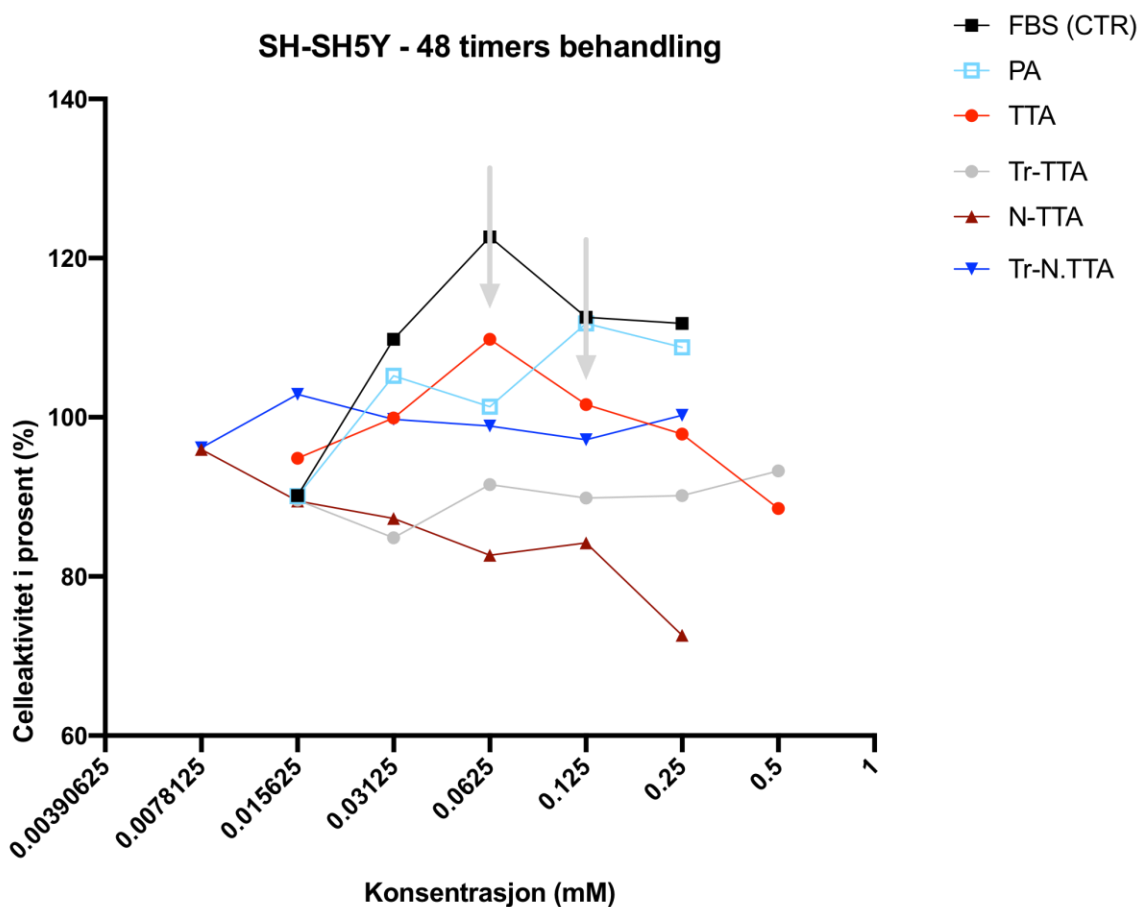
PA er en fettsyre kroppen syntetiserer selv og som er vanlig i kosten. PA ble dermed brukt som referanse-fettsyre og sammenlignet med TTA i HuH-7. Resultatene indikerte at TTA, tr-TTA og PA hadde lik effekt på HuH-7 celler med tilsvarende doser. Det var vanskelig å se forskjell på celletoksisitet mellom TTA, tr-TTA og PA, men ved 0.5 mM så det ut som alle reduserte viabiliteten i cellene sammenlignet med kontroll uten

fettsyrer. Siden fettsyrene var kompleksert med FBS, var final FBS-konsentrasjon i mediet stigende med stigende dose fettsyre. Dette så ikke ut til å stimulere celleveksten i HuH-7-celler, jf kontroll med bare FBS.

På grunn av fordamping av cellemedium i brønn med høyeste og laveste konsentrasjon måtte de utelates. Celleproliferasjon i HuH-7 behandlet med TTA og tr-TTA i økende doser var relativt høyere sammenlignet med N-TTA og tr-N-TTA. N-TTA gav en indikasjon på celledød i lave doser sammenlignet med TTA, mens tr-N-TTA ikke viste tydelige toksiske effekter i konsentrasjonsområder som ble analysert. Det er mulig en høyere dose tilsvarende TTA og tr-TTA ville gitt celledød for tr-N-TTA, men denne måtte utelates for pga fordamping i brønnene.

1.1.36 WST-1 assay: Metabolisk aktivitet til SH-SY5Y

Oppgaven er rettet mot SH-SY5Y, hvor det var ønskelig å undersøke effekter av de modifiserte variantene av TTA og hvilke doser som var optimale videre i oppgaven. Figur 4.3 viser celleaktivitet etter tilsetning av FA, TTA-analogene sammenlignet med ubehandlet i celler i 48 timer.



Figur 4.3: Effekten av behandling med TTA, PA, tr-TTA og N-TTA, tr-N-TTA i 48 timer på proliferasjon og levedyktighet i SH-SY5Y-celler i forhold til ubehandlede celler etter fire timer WST-1 reagent. Resultatene er data fra 2 foldsfortynning av TTA-analogene, og kontroller (CTR) er tilsatt tilsvarende doser FBS. Pilene indikerer hvilke doser som ble benyttet for analyse av gener. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SD fra 5 uavhengige forsøk i hver gruppe (n=5).

I disse cellene var det tydelig at økende mengde FBS stimulerte celleaktivitet, og ingen av fettsyrene tilsatt økte celleaktivitet ytterligere. Grunnet mulig effekt av fordamping på celleaktivitet ble de ytterste brønnene i enkelte paralleller ekskludert: 1mM og 7.8 μ M for TTA, PA, tr-TTA, og 0.5 mM og 3.9 μ M for N-TTA og tr-N-TTA. Den høyeste dosen gitt var dermed ikke tilstrekkelig til å oppnå celledød og det var derfor vanskelig å vurdere toksisiteten av TTA og PA i disse cellene. Siden dosen på 250 μ M TTA så ut til å redusere aktivitet sammenlignet med PA og FBS (CTR) ble en dose på 125 μ M og 62.5 μ M valgt for videre behandlinger. Sammenlignet med TTA, så det ut som tr-TTA og N-TTA fettsyrene hadde lavere proliferasjon i alle dosene. Generelt virket det som Tr-TTA gav lavere proliferasjon i SH-SY5Y sammenlignet med HuH-7 (figur 4.2). N-TTA var den eneste av de FBA-komplekserte fettsyrene der dosen var høy nok til å oppnå celledød og celletoksisk effekt ble observert ved 250 μ M (figur 4.3).

4.2 Inflammasjonsassay - genanalyser SH-SY5Y

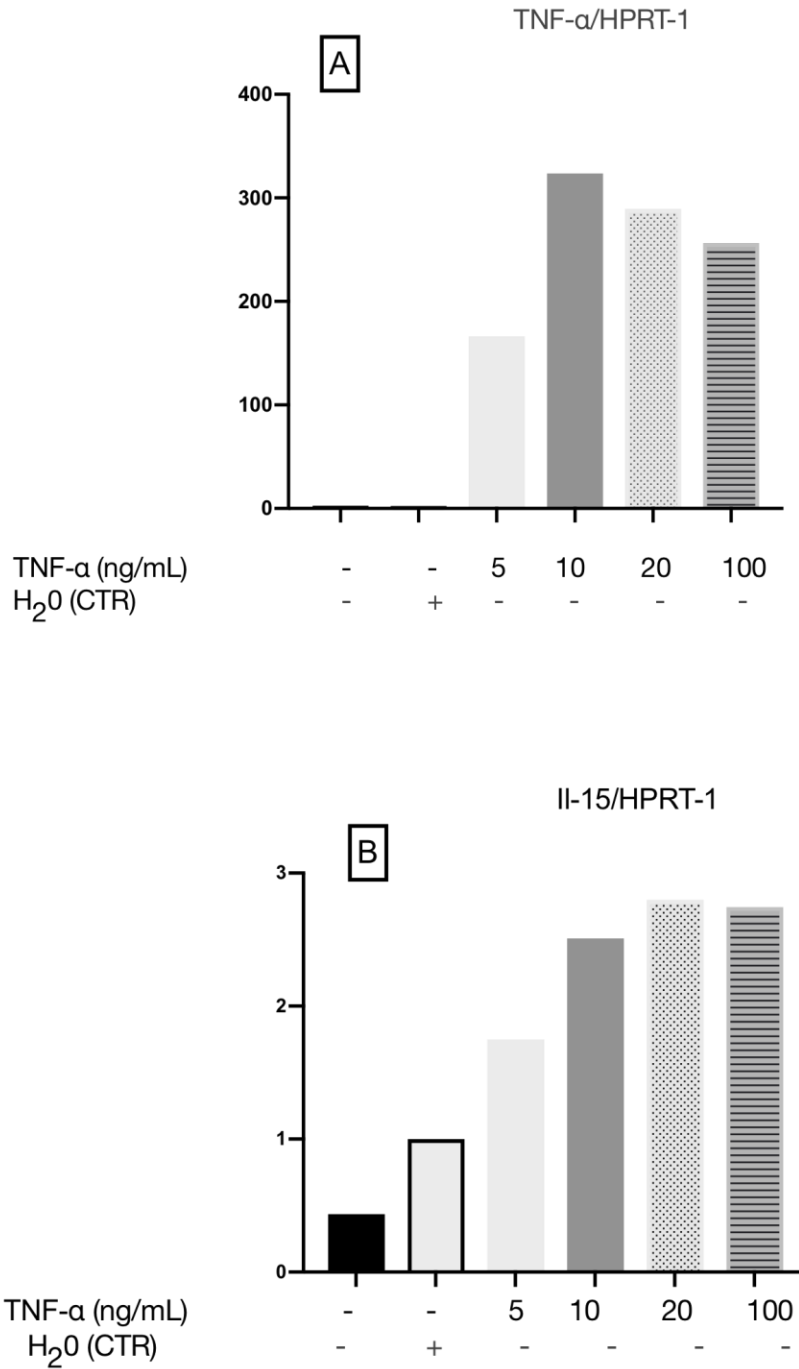
Kvalitetskontroll RNA-prøvene hadde i enkelte tilfeller ikke tilfredsstillende renhet (forholdet mellom A_{260}/A_{280} eller A_{260}/A_{230}) enn anbefalt. På grunn av et lavt antall prøver ble prøvene analysert ytterligere, men betraktet som mulige outliers. Det ble ikke observert noe forskjell i resultat, og dermed ble alle prøver inkludert i datasettene.

PCR-effektiviteten varierte for de ulike genanalysene fra 97%-106%. For genanalyser av cytokiner ble det tilsatt enkelte tilfeller ufortynnet prøve, altså mer template dermed var det umulig å få presisert PCR-effektivitet, men likevel var de innenfor anbefalt effektivitet. Det tas med i betraktning at det er usikkerhet tilknyttet til disse verdiene.

Små forskjeller i CT verdier mellom triplettene av hver prøve ble også observert som gav en god indikasjon på høy effektivitet og repeterbare. De ulike interne kontrollene som - RT og NTC indikerte effektiv eliminering av DNA under RNA-rensing i alle eksperimenter, og NTC-ene ga ingen uttrykk for forurensning for alle genanalysene.

1.1.37 Genekspresjon i SH-SY5Y behandlet med ulike doser TNF- α

For stimulering av inflammasjon i SH-SY5Y ble i første omgang konfluente SH-SY5Y celler stimulert med 5, 10, 20 og 100 ng/ml TNF- α og H₂O som kontroll for å avgjøre dosen av TNF- α . Figur 4.4 viser relativt genuttrykk av inflammasjonsmarkørene *TNF- α* og *IL-15* etter stimulering av TNF- α .



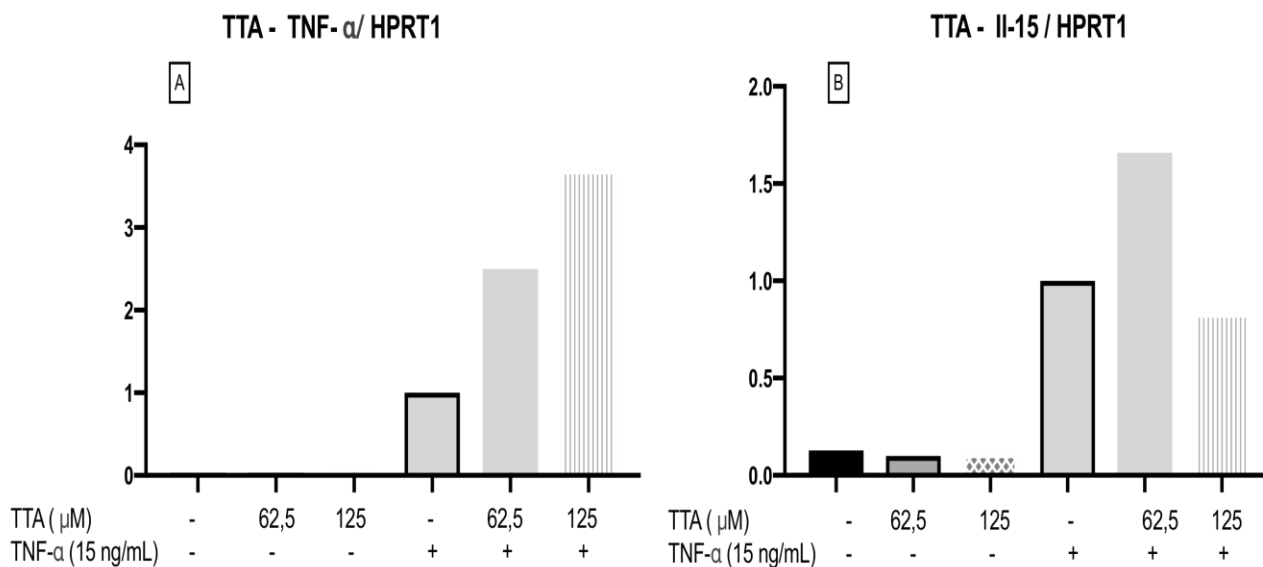
Figur 4.4: Det relative genuttrykket av TNF - α (A) og IL-15 (B) i SH-SH5Y celler etter stimulert med TNF- α . Gene ble normalisert til referansegenet HPRT-1, og resultatene er vist i forhold til kontrollgruppen, etter behandling med ulike TNF-doser i 6 timer (n=1). TNF- α : Tumor necrosis faktor alfa, IL-15: interleukin-15, HPRT-1: hypoxantin-guanin fosforibosyltransferase-1.

Begge genene som ble undersøkt viste at TNF- α mellom 5 og 20 ng/ml gav oppregulering av inflammasjonsmediatorer i SH-SY5Y celler, hvor dose på 10 ng/ml gav

høyeste nivå av stimulering på *TNF- α* genet (figur 4.4A), i motsetning *IL-15* som var høyest uttrykt ved 20mg/ml (figur 4.4B). Interferon gamma (*IFN- γ*), Interleukin-2 (*IL-2*), Interleukin-6 (*IL-6*) og Interleukin-10 (*IL-10*) var gener som ble testet, men ikke uttrykket hos SH-SY5Y og heller ikke oppregulert etter *TNF- α* stimulering (data ikke presentert).

1.1.38 Genekspresjon i SH-SY5Y etter forbehandling med to ulike doser av TTA ved stimulering av *TNF- α* (15 ng/ml).

Videre ble det undersøkt om disse inflammasjonsgene endret sin ekspresjon i celler som var forbehandlet med TTA før man behandlet cellene *TNF- α* . Tidligere har det blitt sett at forbehandling med TTA forhindret uttrykking av inflammasjonsgener i *TNF- α* stimulerede humane endotelceller (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVEC) (109).



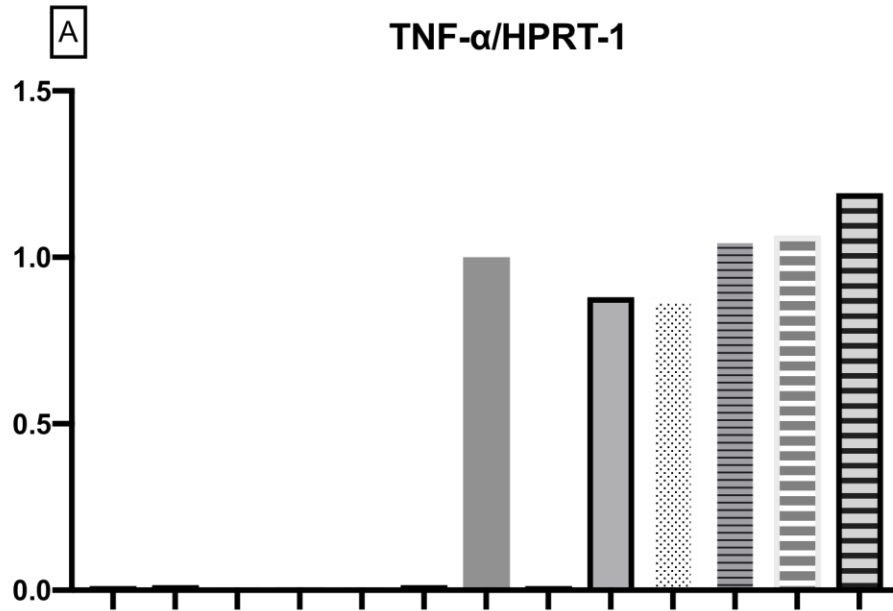
Figur 4.5: Det relative uttrykket av *TNF- α* (A) og *IL-15* (B). Genene ble normalisert til HPRT-1, og resultatene er vist i forhold til kontrollgruppen (SH-SY5Y celler behandlet med *TNF- α*), etter forbehandling med TTA i to doser (62.5 μ M og 125 μ M) og *TNF- α* (15 ng/ml) i 6 timer. Resultatene er presentert som relative verdier (n=1). *TNF- α* : Tumor necrosis faktor alfa, *IL-15*: interleukin-15, HPRT-1: hypoxantin-guanin fosforibosyltransferase-1.

Av figur 4.5 A og B ser en ingen klare antiinflammatoriske effekter av TTA, tvert imot øker inflammasjon idet cellene blir forbehandlet TTA før stimulering med *TNF- α* .

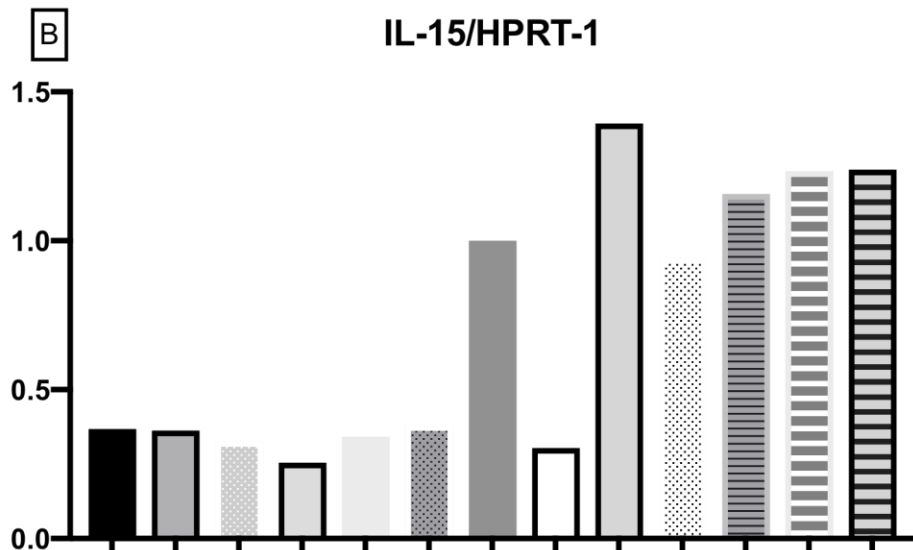
Uttrykket av *TNF- α* øker ved økende dose av TTA i *TNF- α* behandlede celler (figur 4.5A) Uttrykket av *IL-15* er også relativt høyere ved 62.5 μ M TTA stimulert med *TNF- α* (figur 4.5B).

1.1.39 Genekspresjon i SH-SY5Y etter forbehandling med to ulike doser av TTA og PA ved stimulering av *TNF- α* (5 ng/ml).

Som tidligere nevnt, 24 timers forbehandling med TTA og 6 timers stimulering av *TNF- α* (15 ng/ml) viste ingen lovende resultater på genekspresjon av *TNF- α* og *IL-15*. Derfor ble det forsøkt med lavere konsentrasjon av *TNF- α* (5 ng/ml) på cellebehandlinger med samme dose av TTA, der også PA ble tatt som kontroll. Denne testen ble utført for å se om eventuelle anti-inflammatoriske effekter av TTA ville være synlig med en lavere dose *TNF- α* . Figur 4.6 viser relativ genekspresjon av inflammasjonsmarkørene *TNF- α* og *IL-15* etter behandling med 62.5 μ M og 125 μ M av TTA og PA i 24 timer, stimulert av *TNF- α* (5 ng/ml) i 6 timer.



FBS (CTR)	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
TTA (μ M)	-	-	62,5	125	-	-	-	-	-	62,5	125	-	
PA (μ M)	-	-	-	-	62,5	125	-	-	-	-	-	62,5	125
H ₂ O (CTR)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
TNF- α (5 ng/mL)	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+



FBS (CTR)	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
TTA (μ M)	-	-	62,5	125	-	-	-	-	-	62,5	125	-	
PA (μ M)	-	-	-	-	62,5	125	-	-	-	-	-	62,5	125
H ₂ O (CTR)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
TNF- α (5 ng/mL)	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+

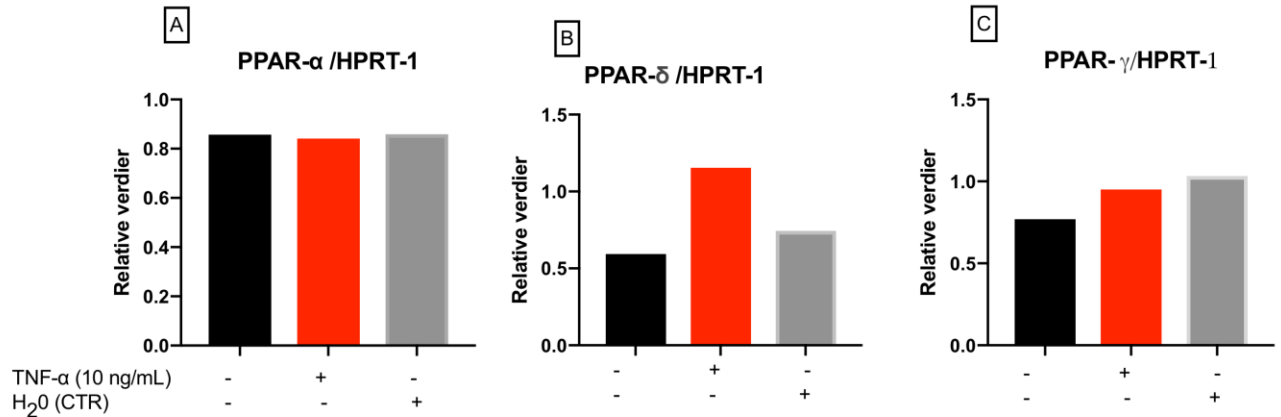
Figur 4.6: Det relative uttrykket av TNF- α (A) og IL-15 (B). Genene ble normalisert til HPRT-1, og resultatene er vist i forhold til SHSY5Y celler stimulert med TNF- α , etter forbehandling med TTA og PA i to doser (62.5 μ M og 125 μ M) og TNF- α (5 ng/ml) i 6 timer (n=1). TNF- α : Tumor necrosis faktor alfa, IL-15: interleukin-15, HPRT-1: hypoxantin-guanin fosforibosyltransferase-1.

Resultatene viser at SH-SY5Y forbehandlet med fettsyrene og stimulert med TNF- α ikke gav reduksjon i TNF- α genuttrykk (figur 4.6A). Tilsvarende for uttrykking av IL-15 gen, hvor TTA og PA alene i samme dose gir sammenfallende resultat, dernest tilføring av TNF- α økes uttrykket (figur 4.6B). Det kan se ut som TTA i lav dose (62.5 μ M) gir redusert uttrykking av IL-15 sammenlignet med FBS kontroll som tilsvarer høyeste dosen for TTA (125 μ M). FBS sammen med TNF- α så ut til å bidra til stigning av inflammasjon i cellene sammenlignet med TNF- α alene. Til tross for noen små forskjeller i genuttrykk, og med tanke på at forsøket bare ble utført en gang, så det ut som TNF- α -indusert inflammasjon i SH-SY5Y celler ble lite påvirket FBS kompleksert med TTA (figur 4.6 A og B).

1.1.40 Genekspresjon i SH-SY5Y etter stimulering av TNF- α (10 ng/ml)

Anti-inflammatoriske effekter av TTA kan involver aktivering av PPAR reseptorer (108-110). Derfor ble det valgt å se på uttrykkingen av PPAR-gen i SH-SY5Y celler. Figur 4.7 viser ekspresjonen av tre forskjellige gener etter stimulering av TNF- α (10 ng/ml) i 6 timer. Figuren viser relative verdier normalisert mot referansegenet HPRT-1.

Resultater



Figur 4.7: Det relative uttrykket av tre PPAR-reseptorgene; *PPAR-α* (A), *PPAR-δ* (B) og *PPAR-γ* (C). Genene ble normalisert til HPRT-1, og resultatene er vist i relative verdier etter SH-SY5Y celler har blitt stimulert med TNF- α (10 ng/ml) i 6 timer (n=1). PPAR- α : peroksisomproliferatoraktiverende reseptor alfa, PPAR- δ : Peroksisomproliferatoraktiverende reseptor delta, PPAR- γ : peroksisomproliferatoraktiverende reseptor gamma, HPRT-1: hypoxantin-guanin fosforibosyltransferase-1.

Av figur 4.7 kan vi se at av PPAR-genene som ble undersøkt virker det om PPAR- δ endrer sin ekspresjon etter stimulering av TNF- α (10 ng/ml) sammenlignet med kontroll. Dette kan tyde på PPAR- δ er involvert i inflammasjonsrespons i SH-SY5Y-cellelinjen. Det var også interessant å se på forskjeller i uttrykingsnivå. I ubehandlede celler hadde PPAR- α en gjennomsnittlig CT verdi på 28.03 og PPAR- γ hadde gjennomsnitt CT verdi på 31.82. PPAR- δ prøvene var i motsetning to andre genene fortynnet 1:4, og lå likevel på en middelverdi CT verdi på 27.03. Dersom cellene var ufortynnet hadde de vært på en CT-verdi ca. 25.03. Dette viser at nivået av PPAR- mRNA i SH-SY5Y celler i følgende rekkefølge: PPAR- δ >> PPAR- α > PPAR- γ . PPAR- δ mRNA nivået i cellene er høyere sammenlignet med andre PPAR-genene.

1.1.41 Opptak av TTA i SH-SY5Y - Gass-massespektrofotometer (GC-MS)

Ettersom det forventende effekt ble ikke observert med TTA i SH-SY5Y, også når det gjaldt uttrykking av PPAR-responsgen (data ikke vist), ble det lagt fokus på å finne årsak til lite respons hos disse cellene. Det ble sett på opptak av mengde TTA i SH-SY5Y og cellemedium. TTA behandling med SH-SY5Y ble klargjort på forhånd og selve analysen ble utført av Pavol Bohov. Resultatene er presentert i tabell 4.1

Tabell 4.1: Resultater av GC-MS analyse av totalt FA og TTA i cellemedium og SH-SY5Y. Resultatene er oppgitt i konsentrasjon og vektprosent (vekt %) av totalt fettsyrene mediet i parentes.

Komponent	Medium		Medium		SH-SY5Y	
	Start		24 timer		24 timer	
TTA	124 μ M	39.7%	112 μ M	37.5 %	1.71 μ M	18.7%
TTA:1n-8	-	-	0.53 μ M	0.18%	0.017 μ M	0.19 %
Totalt TTA	124 μ M	39.7%	112 μ M	37.7%	1.73 μ M	18.9 %
PA	41.2 μ M	13.2%	41.47 μ M	13.9 %	1.169 μ M	12.8%
Totalt FA	312 μ M	100%	298 μ M	100%	9.157 μ M	100%

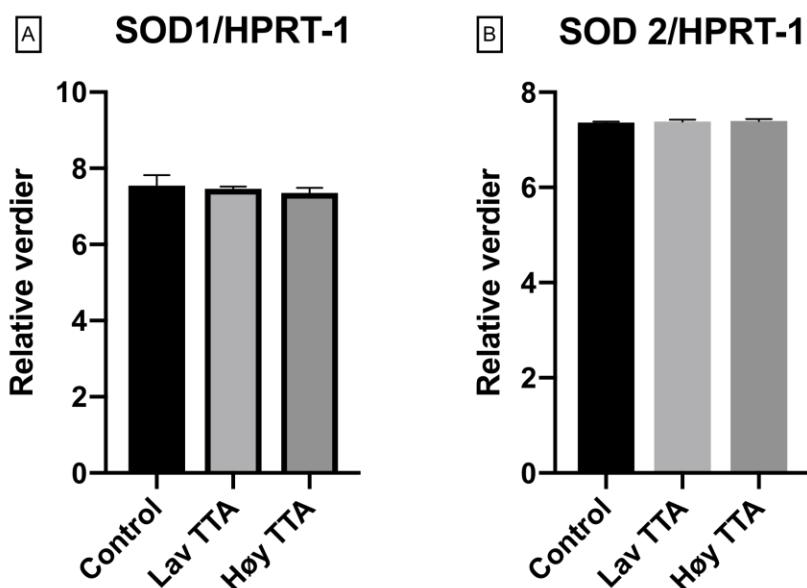
Tabell 4.1. viser resultatene av SH-SY5Y evne til å ta opp TTA etter 24 timers inkubasjon. 125 μ M var opprinnelig konsentrasjon av TTA som ble tilsatt i mediet med celler, men det ble målt til å være 124 μ M. Den totale mengden av TTA utgjorde 40% av de totale fettsyrene i mediet som cellene ble inkubert med. Etter inkubering i 24 timer, gikk denne ned til 112 μ M i mediet, hvor en av TTAs metabolitter, TTA: 1n-8, ble observert i cellemediet etter 24 timer. TTA-konsentrasjonen i SH-SY5Y-cellene etter 24 timer var

1.71 μM , som utgjorde omtrent 19% av den totale fettsyrene i cellene. Sammenlignet med PA så er det større andel av totale TTA som har blitt tatt opp fra start og etter 24 timers inkubasjon med TTA, som kan tyde på at PA også blir produsert av cellene.

4.3 Ekspresjon av Inflammasjonsmarkører og antioksidative gener i dyrestudiene.

1.1.42 Genekspresjon i mus etter 12 ukers behandling med TTA i diet.

Musestudien ble basert på en 12 ukers eksperimentell forsøk, hvor 24 apoE^{-/-} knockout mus ble føret en høfett-diet med 0,4 % og 0,75 % TTA i 12 uker, og genuttrykket i hjernen ble analysert. Dietten førte til hyperlipidemi, økt inflammasjon og aterosklerose i musene (111), og det var av interesse å undersøke om dette også hadde en effekt på genuttrykk i hjerne.

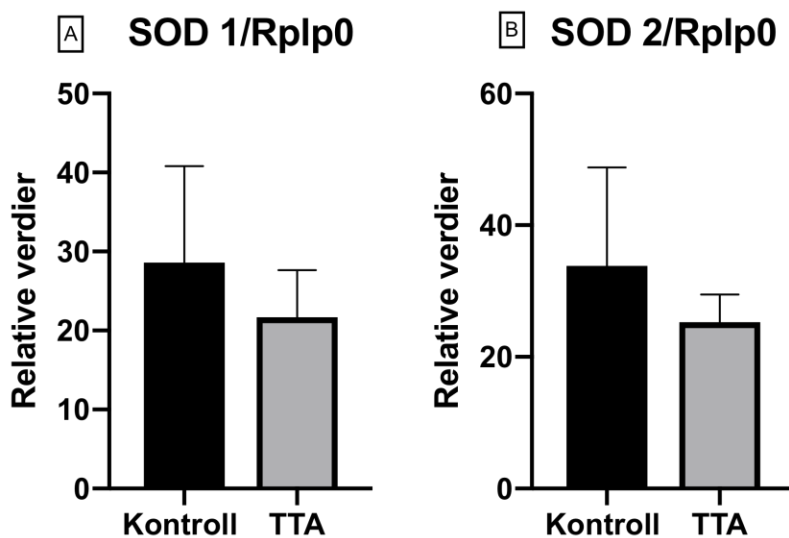


Figur 4.8: Det relative uttrykket av SOD 1 og SOD 2; SOD 1 (A) og SOD 2 (B) i hjerne fra ApoE^{-/-} mus gitt dietter med 0,4% og 0,6 % TTA i 12 uker. Genene ble normalisert til HPRT-1, og resultatene er vist i relative verdier. Resultatene er presentert som gjennomsnitt ± SD (n=5). Signifikansnivå for SOD 1 og SOD2 sammenlignet med kontrollgruppen ble bestemt ved bruk av enveis ANOVA med Dunnetts multiple sammenligningstest ($p < 0,05$). Outliers ble detektert og eliminert ved hjelp av Grubbs test. SOD1: Superoksid dismutase 1, SOD2: superoksid dismutase 2, HPRT-1: hypoxantin-guanin fosforibosyltransferase-1.

Det ble utført gentest på en del inflammatoriske markører slik som *IL-1 β* , *CCL2* og *TNF- α* , og antioksidantive markører som *SOD 1* og *SOD 2*. Ingen av de inflammatoriske markører var godt uttrykt til å få signal. *SOD 1* og *SOD 2* var relativt godt uttrykt som figur 4.8 illustrerer. Vi kan ikke se noen signifikant effekt av TTA hverken i gruppen med lav dose TTA eller høy dose TTA.

1.1.43 Genekspresjon i rotte etter 50 ukers behandling med TTA i diet.

Rottestudien ble basert på en 50 ukers eksperimentell forsøk med 31-38 rotter, hvor ene gruppen ble føret daglig med høy fett (25%), og andre gruppen (TTA-gruppen) fikk en høyfett diet med 0,4 % TTA. Kontrollgruppen hadde høye plasmanivå av kolesterol og triglyserider, mens nivåene i TTA gruppen var signifikant lavere (106). Genuttrykket av antioksidanter som *SOD 1* og *SOD 2* i hjernen ble analysert.



Figur 4.9: Det relative uttrykket av *SOD 1* (A) og *SOD 2* (B) i hjerne fra rotte gitt dietter med 0,4 % TTA i 50 uker. Genene ble normalisert til *Rplp0*, og resultatene er vist i relative verdier. Signifikansnivå for *SOD 1* og *SOD 2* sammenlignet med kontrollgruppen ble bestemt ved bruk av student t-test ($p < 0,05$). Outliers ble detektert og eliminert ved hjelp av Grubbs test. Resultatene er presentert som gjennomsnitt \pm SD ($n=7-8$). *SOD 1*: Superoksid dismutase 1, *SOD 2*: superoksid dismutase 2, *Rplp0*: large ribosomal protein.

Av figur 4.9 A og B kan vi se at begge genene, *SOD 1* og *SOD 2* som ble undersøkt ble ikke signifikant påvirket av TTA. *SOD 1* viste imidlertid en tendens til reduksjon med TTA i forhold til kontroll (t-test $p = 0.1761$) henholdsvis viste også *SOD 2* fall sammenlignet med kontroll (t-test $p = 0.1452$).

5 Diskusjon

Målet med oppgaven var finne ut av om TTA modulere inflammatoriske egenskaper i hjerneceller både *in vitro* og *in vivo*. Vi utforsket denne hypotesen ved å bruke den udifferensierte *in vitro* - modellen SH-SH5Y for å se om TTA har anti-inflammatoriske effekter via *PPAR-γ* og *PPAR-α*, som har blitt sett tidligere (108-110). For å studere mulige effekter *in vivo* ble genanalyser utført på hjerne fra hjernevev høstet fra mus og rotte fôret med TTA- dietter. Tillegg til å studere effekten av TTA ble modifiserte TTA analoger testet i to ulike cellemodeller; HuH-7 og SH-SH5Y for å se på deres evne til å stimulere cellenes levedyktighet og proliferasjon.

5.1 Oppdyrking og bruk av HuH-7 celler og SH-SY5Y celler.

Det er vist at flere metabolske prosesser, deres primære funksjoner/aktivitet blir gradvis redusert ved økende antall passasjer (122). I vårt tilfelle ble HuH-7 tatt ut i passasje 35 og eksperimenter utført innen p41. Ved høy passasjeantall øker man risiko for cellene til å proliferere langsomt (146), men i dette tilfelle ble det ikke observert. SH-SY5Y cellene ble tatt ut i tre omganger; p11 og p14 de to siste gangene. Siste eksperimenter ble utført alt innenfor p29. For denne cellelinje er det ikke anbefalt å oversige passasje 20 ettersom det øker risiko for tap av fenotypiske egenskaper (124).

Dermed i vårt tilfelle ble alle eksperimentene utført innenfor passasje 20, selv om det anbefalt å utføre i lavest mulig passasje. Hver gang man splitter økes risiko for at cellene gjennomgår seleksjonspress, altså de som tåler det best selekteres, dermed desto lengre cellene dyres desto mer skilles de fra utgangspunktet. I praksis hadde det vært tungvint å utføre eksperimentell forsøk i lave passasjer da måtte man ha tatt ut en ny kultur hver 2-3 uke. Vi valgte isteden å dyrke så lenge det var mulig og etter hvert som det nærmet seg passasje 20 ble det tatt ut nye celler.

5.2 Virkning av TTA og TTA - analogere på celleproliferasjon

TTA involverer i aktivering av PPAR reseptorer. PPAR er en familie kjernereseptorer som bidrar til regulering av flere cellulære funksjoner, inkludert cellulær proliferasjon, og PPAR-ligander har blitt vist å modulere proliferasjon og differensiering av celler (147, 148). Det har blitt utført eksperimenter hvor kreftceller ble behandlet med TTA i rotte og mennesker som har vist reduksjon i celleproliferasjon (98, 149). I denne oppgaven ble det utført 2-foldsfortynning for hver av TTA-analogene, dermed hadde man flere konsentrasjoner for hver substans som gav mulighet for å lage en dose-respons-kurve. På denne måten kunne man se om forskjellige konsentrasjoner gir endring i respons i

metabolismen til cellene, tillegg kunne det benyttes for å si noe om hvilken konsentrasjon som er tilstrekkelig for å gi effekt, eller om en konsentrasjon kan være toksisk.

1.1.44 HuH-7 cellelinje

Resultatene viste at det var vanskelig å skille celletoksitet mellom TTA og PA, og ved 0.5 med mer så det ut som begge reduserte viabiliteten (figur 4.2). Den optimale dosen for både TTA og PA så ut som til å være rundt 125 μM ved 48 timers behandling. For tr-TTA så det ut som cellene tålte opp til 125 μM . N-TTA bidro til en rask nedgang i celleproliferasjon sammenlignet med de andre TTA-analogene.

Det ble observert utfelling/krystallisering utfelling/krystaller ved høyeste konsentrasjon i viabilitetsforsøket med WST-1 assay med N-TTA og enkelte tilfeller tr-N-TTA. Mulig forklaring for utfelling til N-TTA kan diskuteres med forskjellen i struktur og kjemiske egenskaper, som følge av at fettsyren er substituert med nitrogenatom i stedet for svovel i β -posisjon som kunne ha påvirket oppløseligheten og opptak av cellene. N-TTA i teorien skal være løselig i vann med tanke på at man har nitrogen som er en sterk positiv ladning og er i nærheten av en syre gruppe som er negativ ladning. Ved nøytral pH i mediet, eksistere de ulike ladningene (+) og (-) separat uten binding og molekylet har ingen generell elektrisk ladning. Ettersom mediet fordampes øker det enda større risiko for utfelling med tanke på at da får man frie fettsyrer som øker risiko for å oppnå grensen for løselighet. Som følge av utfelling ble det forsøkt å oppvarme fettsyrene på 45 °C og fortynne N-TTA til lavere konsentrasjon (1 mM) i kompleks med FBS etterfølgende eksperimentene, men likevel ble noe utfelling observert i de høyeste konsentrasjonene i WST-1 assay. Dette betydde man konkret ikke kan si noe resultatene (toksiske effekten i cellene) skyldes direkte av tilsetning av N-TTA eller toksiske effekter av N-TTA salter.

Dermed var det utfordringer knyttet til oppløselighet av N-TTA, men ikke så stor grad med tr-N-TTA under denne masterperioden, som lot seg kompleksere med FBS ved den lavere konsentrasjonen, 1 mM. Et alternativ som kunne vært prøvd ut for å oppnå høyere konsentrasjoner var å løse disse bioaktive lipofile stoffer i Bovin Serum albumin (BSA). I et studie hvor det ble sett på cytokinfrigjøring og PPAR aktivitet *in vitro* med TTA-analog tetradecylselenoacetic syre (TSA), ble denne kompleksert med BSA (150). I et annet studie hvor det ble sett på effekten av TTA i humane perifere blodmononukleære celler (PBMCs) ble TTA kompleksert med BSA og høyere konsentrasjoner brukt ved behandling (100 μ M og 500 μ M) (110). Forskjellen mellom FBS og BSA er at BSA er et komponent i FBS, men mengden er ukjent og i FBS kan BSA alt være bundet til fettsyrer som allerede er tilstede. Fordelen med å kompleksere fettsyrer med FBS gir viktige næringsstoffer og vekstfaktorer som er avgjørende for å vedlikeholde og celleproliferasjon (151, 152). Dersom man hadde kompleksert med BSA hadde man hatt mulighet til å kompleksere fettsyrene i høyere konsentrasjon (6mM i stedet for 2 mM), men også BSA vil påvirke cellevekst og er ikke en nøytral faktor. Det var naturlig å kompleksere fettsyrene med FBS, av den grunn "utsettes" cellene kun for FA behandling. Men i praksis får cellene tilgang til "fersk" FBS tillegg til FBS som er allerede i mediet, noe som bidro til å stimulere vekst hos cellene. I HuH-7 cellene ble det observert at tilsetning av økende mengde FBS ikke ut til å påvirke cellevekst i kontrollen.

1.1.45 SH-SY5Y

Resultatene for SH-SY5Y derimot viste tydeligere at FBS (CTR) kontroll uten fettsyre stimulerer vekst i disse cellene. 125 μ M og 62.5 μ M PA synes også å stimulere cellevekst sannsynligvis på grunn av FBS-innholdet, og det samme med 62.5 μ M TTA, mens høyere doser var celletoksiske (figur 4.3). Det ble derfor valgt å bruke 125 μ M og 62.5 μ M TTA for genanalyser. Tr-TTA derimot hadde lavere proliferasjon i alle dosene sammenlignet med i HuH-7 cellene med tilsvarende lik doser. Det kan se ut som alle TTA-analogene gav nedsett proliferasjon etter økende dose, sammenlignet med kontroller. Den høyeste

dosen gitt var ikke tilstrekkelig til å oppnå celledød på grunn av mulig fordampningseffekt i medium, derfor er ikke det mulig å sammenligne toksisitet av fettsyrene i SH-SY5Y. N-TTA var den eneste av de FBS-komplekserte fettsyrene der dosen var høy nok til å kunne oppnå nedsatt celledød ved 250 μM . Det ble oppdaget krystallisering på N-TTA som tidligere nevnt i begge cellelinjene, dermed er disse resultatene vanskelig å kunne tolke, og nedsatt celleproliferasjon kan skyldes utkrystallisering av fettsyrene eller behandling av fettsyrene i seg selv.

Som konklusjon viste WST-1-analysene at TTA-, PA- og tr-TTA- dose på opptil 62.5 -125 μM var passende for begge cellelinjer over en behandlingsperiode på to dager. N-TTA så ut som til å være toksisk i dose 31.3 μM både for HuH-7 celler og SH-SY5Y celler. Tr-N-TTA ble tolerert opptil 250 μM i begge cellelinjene. Lavere proliferasjon synes likevel til å være uavhengig av modifikasjon av FA, men heller skyldes tilsetning av frie fettsyrer siden økende doser av alle behandlinger, inkludert PA- kontroll reduserte celleaktivitet.

5.3 Inflammasjonsassay - genanalyser

1.1.46 Effekt av TTA på inflammasjon og PPAR gener.

I nevrodegenerative sykdommer er inflammasjon et av faktorene som bidrar til sykdomsutvikling (153). TTA har vist seg til å være en lovende substans siden den har anti-inflammatoriske og antioksidative egenskaper både *in vitro* og *in vivo* (106, 108-112).

I første omgang ble det bestemt å stimulere SH-SY5Y cellene med ulike TNF- α doser for å se hvilke som var best egnet for induksjon av inflammasjon i cellene. Tidligere har det blitt dokumentert at TTA reduserte VCAM-1 og *IL-18* TNF- α stimulerte HUVEC celler og i klinisk studie med psoriasis pasienter (109). I et annet studie hvor Aukrust og medarbeidere undersøkte effekten av TTA på proliferasjon og cytokinsekresjon fra humane leukocytter, og fant de at TTA utøvde en antiinflammatorisk effekt ved å uttrykke *IL-10* og undertrykke *IL-2-sekresjon* fra aktiverte humane perifere blodmononukleære celler (PBMCs) (110). I den førstnevnte studien ble 10 ng/ml TNF- α benyttet som optimale dosen for å sette i gang inflammasjon hos cellene (109), mens i denne oppgaven ble det sett at TNF- α mellom 5-20 ng/ml som gav oppregulering av *TNF- α* og *IL-15* mRNA nivå av de seks undersøkte inflammasjonsmarkører i SH-SY5Y (figur 4.4). Det ble dermed først valgt å gå videre med 15 ng/ml som stimuleringsdose, men sammen med 62.5 μ M og 125 μ M TTA i 24 timer viste ingen effekt på genekspresjon av inflammasjonsmarkører av *TNF- α* og *IL-15* i SH-SY5Y (figur 4.5). Heller ikke ved en lavere dose TNF- α (5 ng/ml) viste TTA forbehandling tydelig anti-inflammatorisk effekt, hverken sammenlignet med FBS eller PA kontroll, som tyder på at manglende effekt ikke skyldtes styrken av det inflammatoriske signalet (figur 4.6). Dette bidro til at behandling med andre TTA-analogene i SH-SY5Y ble satt på vent.

Q-PCR blir mye brukt til å kvantifisere cytokiner fra celler, kroppsvæsker, vev eller vævsbiopsier. Det er betydelig og sensitiv metode kan brukes til å kvantifisere mRNA-

ekspressionsnivåer av cytokiner, som ofte er svært *lave* i utgangspunktet (154). For SH-SY5Y-celler ble *TNF- α* og *IL-15* valgt som inflammasjonsmarkører ettersom de var mest oppregulert av *TNF- α* av de seks inflammasjongsener som ble testet for.

Etter *TNF- α* behandling hadde *TNF- α* en CT-verdi: 30-38, mens *IL-15* var utgangspunktet lite oppregulert (CT- verdi: 34- 35.5) i SH-SY5Y. CT- verdier mellom 30-38 angir moderate til lite transkripsjonsmengde i prøven, som gjør at prøvene må kopieres opp gjennom mange sykluser og dermed bør analyseres med aktsomhet ettersom en qPCR-kjøring har rundt 40 sykluser (155-157). Derfor var det usikkerhet spesielt rundt CT-verdiene særlig for *IL-15*, ettersom det ble observert uttrykking av *IL-15* hos ubehandlede SH-SY5Y-celler. Grunnet av høyere CT-verdier, ble uforynnet c-DNA anvendt i prøvene. Det anbefales ikke å bruke uforynnet c-DNA (template) i mastermix for qPCR, fordi det kan gi økt risiko for DNA-inhibitorer som er ikke utgangspunktet tilstede fra RNA resing, men muligens tilstede nå pga større mengde tilsetning (158).

Derøy et.al. studiet med HUVECs ble effekten av TTA (10 μ M løst i DMSO) behandlet i 20 timer deretter stimulert i seks timer med *TNF alfa* 10ng/ml (109). Aukrust et.al. så på effekten av TTA (100 μ M, 500 μ M kompleksert i BSA) behandlet i 20 timer deretter stimulert med phytohemagglutinin (PHA) som T-celle aktivator (1:100) eller lipopolysakkaridet (LPS) (10 ng/ml) (110). På grunn av tidsbegrensinger ble SH-SY5Y behandlet i 24 timer, men det kunne vært et mulig alternativ å kunne behandlet cellene i kortere tidsperiode for å se på effekten av TTA.

Rita Vik et. al. studerte effekten av TTA på arteriosklerose hos apoE^{-/-} mus gitt etter et høyt fettrikt kosthold tilsatt 0.4% TTA i diett i 12 uker, og observerte at TTA hadde potensielt antiinflammatoriske effekter i aortabuen, hvor TTA reduserte flere inflammatoriske cytokiner og kjemokiner i apoE^{-/-} mus sammenlignet med kontroll. *IL-1 α* , *IL-6*, *IL-17*, *TNF- α* og *IFN- γ* - nivåer blant annet var signifikant lavere i TTA-behandelnde mus sammenlignet med kontroller (111).

Ettersom TTA har vist antiinflammatoriske effekter *in vivo* (endotellceller, PBMCs), og *in vitro* hos apo E^{-/-} ble det sett om oppregulering av PPAR-gener i SH-SY5Y ettersom TTA modulerer inflammasjon via disse gener. Tidligere har det blitt rapportert at TTA kan aktivere alle PPAR subtyper i forskjellige celler (leverceller, skjelettceller, muskelceller, keratinocytter, glioma celler, endotellceller, humane perifere blodmononukleære celler) (109, 110, 144, 145, 159-161).

Den anti-inflammatoriske effekter av TTA involverer *PPAR-γ* og *PPAR-α* (108-110). I studiet der det ble sett om TTA kan lindre dextransulfatnatrium (DSS) -inducert kolitt hos rotte har det vist at *PPARγ*-signalering kan være involvert i antiinflammatorisk respons av TTA, da *Pparg* mRNA-ekspressjon var signifikant oppregulert i kolon (108) . Dessuten er det vist at TTA markant forbedret *PPAR-α* relaterte mål - gener i leveren av hos villtype, men ikke i *PPAR-α*^{-/-} knockout mus (109).

I denne studien ble det observert at uttrykingsnivået til *PPAR-δ* var høyt sammenlignet med *PPAR-α* og *PPAR-γ* i SH-SY5Y (figur 4.7). Det virker også som *PPAR-δ* endrer sin ekspressjon markant etter stimulering av TNF- α , sammenlignet med kontroll. I tidligere studiene har det blitt sett på *PPAR-α* og *PPAR-γ* i større grad enn *PPAR-δ* (108-110), dermed hadde vi forventet lignende effekter i SH-SY5Y ettersom disse gener er involvert i inflammasjon i CNS (95-97).

PPAR-α og *PPAR-γ* er de mest studerte isoformene relatert til CNS-inflammasjon (162), men til tross for noe begrenset litteratur er det noen studier som har vist at administrering av *PPARδ* - agonister gir nevrobeskyttelse etter ulike akutte og kroniske skader på CNS, slik som slag, multippel sklerose og AD, og dermed er involvert i inflammasjon (163). Det har blitt observert at *PPAR-δ* er assosiert med proinflammatorisk respons og svulstprogresjon (164). Aktivering av *PPAR-δ* ved den syntetiske liganden GW501516 i tykktarmskreft cellelinjer eller muse-tarmepitelceller

oppregulerte *COX-2*-ekspresjon og *PGE2*-produksjon, som senere økte makrofagproduksjonen av proinflammatoriske cytokiner (*CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL4* og *IL-1 β*). Både kjemisk og genetisk induert kolitt og kolitt assosiert tarmkreft ble undertrykt i en *PPAR- δ* knockout-musemodell (165). Dermed kan oppregulering av *PPAR- δ* i SH-SY5Y tyde på at *PPAR- δ* er involvert i inflammatorisk respons i disse cellene.

Resultater i cellekultur reflekterer ikke nødvendigvis resultater *in vivo*, siden SH-SY5Y har en annen opprinnelse (nevroblast - kreftcellelinje) enn nevroner som er relatert til CNS. Dette kan mulig forklare oppregulering av *PPAR- δ* som er involvert i tumorprogresjon (164, 165). Med tanke på at det var oppregulering av *PPAR- δ* kan videre begrunne hvorfor TTA hadde lite effekt i SH-SY5Y ettersom det har tidligere vist anti-inflammatoriske effekter vha *PPAR- α* og *PPAR- γ* (108-110). TTA er vist å kunne aktivere *PPAR- δ* (166), og effekten på *PPAR- δ* respons gen bør undersøkes, og på grunn av tidsbegrensninger var dette dessverre ikke mulig å gjennomføre. Av den grunn hadde det også vært spennende å se om overuttrykking av *PPAR- α* og *PPAR- γ* ville ha gitt en antiinflammatorisk effekt, men det er utenfor målet for masteroppgaven.

Ettersom SH-SY5Y er lite metabolske aktive vil fettforbrenning være mer eller mindre avslått, noe som også kan forklare lite respons med TTA. I tillegg har tidligere studier benyttet TTA i DMSO, og BSA i andre konsentrasjoner som 10 μ M, 100 μ M og 500 μ M (109, 110). I dette tilfelle har det blitt brukt 62.5 μ M og 125 μ M i FBS, kombinert med få forsøk kan være en mulig forklaring på manglende resultater. Men etter analysering av opptak i SH-SY5Y tyder derimot på at TTA dosen ikke var problemet (diskutert i neste kapittel).

For å kunne konkludere noe om TTAs anti-inflammatoriske effekt i nevroner hadde det vært ønskelig å repetere effekten av TTA, ettersom det ble bare utført kun ett parallell, og å se på oppregulering av *PPAR* responsgener ved tilsetning av TTA for å oppnå mer valide resultat.

5.4 Opptak av TTA i SH-SY5Y

Det er tidligere funnet at TTA blir tatt opp i endotelceller (109) og makrofager (167) og vist effekt hos psoriasis pasienter (109), og ut i fra teorien om at fettsyrer har blitt tatt opp i hjernen (168, 169) ville vi forventet en effekt av TTA i SH-SY5Y cellemodellen. For å forklare hvorfor behandlingen med TTA kompleksert med FBS ikke syntes å nedregulere cytokiner vha PPAR gener, ble cellulær opptak av TTA etter 24 timer i SH-SY5Y-cellene testet ved bruk av GC-MS (resultat - tabell 4.1). Resultatet viste at opptak av cellene ikke var en begrensende faktor i forsøkene ved å kompleksere fettsyrene med FBS ettersom 20% av det totale fettsyre mengde var TTA i mediet, forbrenner den og produserer metabolitten TTA: 1n-8 omtrent 0.2% av total celle FA. Dermed kan det konkluderes med at lite respons som ble sett av TTA skyldes nok ikke opptak hos SH-SY5Y ettersom det har også blitt sett metabolitt i mediet.

5.5 Effekt av TTA på oksidasjon

På grunn av mangelen på observerte inflammasjons effekter i SH-SY5Y-cellemodellen *in vitro*, var det interessant å se om det kunne finnes noen bevis for TTAs effekt på antioksidant-forsvar *in vivo* i hjernen til rotte og mus behandlet med TTA i diett. Spesielt tatt i betraktning at det er vist at TTA-nivåene i hjernen er ca. 10-15% i forhold til nivået i plasma og lever (ikke publisert), noe som indikerer en effektiv transport over BBB.

Det ble sett på *SOD 1* og *SOD 2* genuttrykk på fem hjernevevsprøver fra apo E^{-/-} mus studie (111) og syv-åtte hjernevevsprøver fra lang-tidsbehandlet TTA rotte studie (106).

1.1.47 Oksidative egenskaper av TTA - Dyrestudiene - *in vitro*

Reaktive oksygenarter (ROS) har en viktig rolle i en rekke patologiske hendelser, som aterosklerose, kreft, aldring og skade på sentralnervesystemet. Hjernen, med høyt oksygenforbruk og lipidrikt innhold, er svært utsatt for oksidativt stress. Det er flere studier som viser positive resultater relatert til TTA involvering i oksidative effekter *in vivo* og *in vitro* (106, 108, 111, 112).

Effekten av TTA på arteriosklerose hos apoE^{-/-} mus ble det også observert at genuttrykket av induserbar nitrogenoksydase (NOS₂) var signifikant redusert i hjertet av TTA-behandlede apoE^{-/-} mus sammenlignet med kontroller, mens genuttrykk av antioksidantenzymet katalase (Cat) ble betydelig økt (111).

I denne studien fant vi ingen signifikante effekter på *SOD 1* og *SOD 2* gener som kan være involvert i antioksidativ respons av apoE^{-/-} mus i hjernen og det var heller ingen forskjell i lav dose og høy dose TTA-diet (figur 4.8). Både *SOD 1* og *SOD 2* er oppregulert under oksidative responser i mus *in vitro* i hjernen (170, 171), men vi observerte ingen effekter i denne studien. På samme studien var *verken SOD 1* og *SOD 2* oppregulert i

hjerter. Dermed om studien foregikk over en lengre periode og eventuelt hatt økning i inflammasjon kunne man muligens ha sett en forskjell.

Videre genanalyser på *NOS₂* som var signifikant redusert og *CAT* som var oppregulert i hjerte på samme studie, hadde det vært ønskelig å sett i hjernen, men på grunn av begrenset med tid ble dette ikke sett på.

I en langsiktig studie ble det tilsatt 0,4 % TTA i diett gitt til rotter over en periode på 50 uker. Dette førte til endringer i karboksylmetyl-lysin (*CML*) og malondialdehyd-lysin (*MDAL*) som er markører relatert til lipooksidative stress, og glutamat semialdehyd (*GSA*) og alfa-aminoadipic-semialdehyd (*AASA*) som er markører for direkte oksidativ skade i leveren (106). I nåværende studien ble det sett kun på uttrykk av *SOD 1* og *SOD 2* i hjernen og observert en økning i *SOD 1* og *SOD 2* hos kontroll rotter som ble føret med høyt fett diett enn rottene som ble foret med TTA (figur 4.9). Ettersom fett særlig mettet fett er kjent for å trigge inflammasjon hvor det foregår en latent kronisk inflammasjon (172, 173). Dette tilfelle ble kontroll rottene føret med 23 % svin og 2% soyaolje. Studien viste at høyt fettfôring kan indusere opphopning i hepatiske TAG-nivåer (forhøyede plasmalipider). Akkumuleringen av TAG skyldtes sannsynligvis leverens manglende evne til å håndtere den økte importen av plasma lipider og indikerte utviklingen av leverstatatose. Dette indikerer at kontrollene kan ha hatt forhøyet nivå av *SOD 1* og *SOD 2* pga muligens pågående inflammasjon (106). Frie radikaler kan forårsaker lipidperoksydasjon og oksidasjon, DNA-skade og rekruttering av nøytrofiler til steder med inflammasjon. Nøytrofiler initieres for å frigjøre ROS som videre generer kjemotaktiske mediatorer, slik som leukotrien B₄ eller ved oppregulering av adhesjonsmolekyler, slik som intracellulært adhesjonsmolekyl (*ICAM*). Eliminering av disse radikaler ved hjelp av *SOD* kan derfor anses å være antiinflammatorisk (174).

En reduksjon med TTA både i *SOD 1* og *SOD 2* sammenlignet med kontroll ble observert, selv om reduksjonen ikke var signifikant (resultat figur 4.9). Tidligere har det vært

omdiskutert om høye nivåer av *SOD* fører til økt lipidperoksydasjon og overfølsomhet mot oksidativt stress ved å ha sett høye nivåer av hydroksid radikaler i bakterier og transgene dyr. Men i ettertid har man sett bort i fra dette ettersom det viser seg at *SOD* ikke i seg selv bidrar til oksidativ stress (175). Per dato har *SOD* derimot vist seg til å være en beskyttende faktor hvor blant annet *SOD 2* knockout mus viste perinatal død sammen med alvorlig vekst reduksjon. Disse musene gav også en antydning for nevrodegenerasjon ledsaget av gliose (forandret variant av gliaceller). I tillegg hadde mutantmusene signifikant redusert mitokondrie kompleks II-aktivitet i hjernen (171). Overuttrykk av *SOD 2* har også vist til å reduserer superoksid radikaler i hippocampal, forhindret kognitiv svikt og reduserte A β -plakk i en musemodell av Alzheimers sykdom (176). Likeledes har overuttrykking av *SOD 1* sett til å reduserer oksidativt stress og påfølgende nevronal skade etter cerebral iskemi i mus (177). *SOD* er også vist til å være involvert i reduksjon av nøytrofil-mediert inflammasjon via å stimulere apoptose (174).

Det er flere gener som er involvert i oksidative stress i hjernen bortsett fra *SOD*, blant annet katalase (CAT), glutation peroksidase (GPx) og glutation-S-transferase (GST) er vesentlige gener for å bryte ned de skadelige sluttproduktene av oksidativ fosforlyring (178). Tidligere studier har vist at allelvariasjoner koder for disse antioksidanter er forbundet med abnormiteter/avvik i *SOD*, CAT, GPx og GST aktivitet i CNS. Flere dyrestudier viser at knockout i disse antioksidantene gir redusert aktivitet av flere viktig funksjoner i hjernen. For eksempel CAT-knockout-mus viser en langsommere frekvens av ATP-syntese i hjerne-mitokondrier sammenlignet med overekspresjon av CAT med transgene mus (179). Videre viser GPx1 knockout-mus økt apoptose som respons på iskemi/reperfusjonsskade (180).

Dermed bør analyser av disse genene utføres for å kunne si om anti-oxidative effekter av TTA effekter i hjernen.

5.6 Begrensninger med studien

1.1.48 Bruk av SHSY5Y cellemodell

Parkinson er for eksempel preget av tap av dopaminerge neuroner fra CNS, dermed er det mer pålitelig å kultivere nevroner fra dette hjerneområdet av pasienter og kontroller for å kunne finne mer informasjon om mekanismene som ligger til grunn for denne sykdommen. Men i reelle verden er det utilgjengeligheten og mangelen på slike nevroner som utelukker i bruk av dem. Som tidligere nevnt er SH-SY5Y anerkjent cellelinje som benyttes for analysering av neurologiske sykdommer, men likevel har SH-SY5Y-cellemodellen også sine begrensninger. I denne oppgaven har det blitt benyttet udifferensierte SH-SY5Y-celler på grunn av tidsaspektet. Udifferensierte SH-SY5Y-celler kan sammenlignes med stamceller, ergo har disse cellene i praksis mulighet til å differensiere seg til ulike celletyper. Flere studier innenfor neurologien har SH-SY5Y celler blitt brukt i deres udifferensierte form (120). Det hadde vært en fordel å ha utført eksperimenter i differensierte SH-SY5Y-celler siden man da hadde hatt mulighet til å se spesifikke egenskaper som for eksempel adrenerge nevroner noe som gjør cellene nyttige for en rekke neurobiologiske eksperimenter i kontrast til udifferensierte SH-SY5Y-celler som mangler enkelte fenotype som karakteriserer et nevron. Videre ble de fleste behandlinger utført kun én gang, noe som gjorde resultatene utsatt for naturlig variasjon og outliers.

Videre er udifferensierte SH-SY5Y-celler en cellelinje som deler seg kontinuerlig regelmessig sammenlignet differensierte SH-SY5Y-celler, som gjør dem vanskelig å skille mellom om det er nevrobeskyttende eller nevrotoksiske faktorer som påvirker proliferasjonshastigheten eller frekvensen av celledød. Udifferensierte SH-SY5Y cellelinje lav mitokondriell aktivitet noe var en begrensende faktor i denne oppgave mtp disse bioaktive fettsyrer påvirke metabolsk aktivitet til mitokondriene som kan muligens være en forklaring på hvorfor fettsyrene hadde lavere proliferasjon sammenlignet ned HuH-7

(181). Tillegg kan den lave metabolsk aktivitet også forklares med at for HuH-7 cellene var tre timers WST-1 behandling nok for å se forskjell av absorbans på den laveste og høyeste dosen i motsetning til SH-SY5Y måtte man opp til fire timer (som var maksimalt anbefalt), og tillegg hadde likevel lavere absorbans. For å bekrefte og styrke resultatene, bør ytterligere testing gjøres med et økt antall prøver og muligens også lengre behandlingsperioder for å se på celletoksitet. Dermed hadde det vært spennende å se om differensierte SH-SY5Y hadde gitt annerledes resultater. Annet forslag kan være å måle antall levedyktig celler akkurat ved når man skal tilsette fettsyrene som kan gi en bedre indikasjon på antall levedyktige celler før og etter fettsyrebehandling.

1.1.49 Begrensninger ved bruk av WST-1 assay

Målet med WST-1 assay var å bestemme hensiktsmessige doser av de forskjellige bioaktive substanser for å sikre at behandlingsdosene ikke utøvde noen skadelige effekter i forhold til celle-levedyktigheten og proliferasjon. Fordelen med denne assay er at den er klar til bruk og enkel å utføre hvor man får resultatet innen 3-4 timer. En annen fordel ved WST-1-analysen er at det ikke er behov for å vaske eller høste celler for analysen. Man trenger ikke å fjerne kulturmedier eller vaske med PBS for denne analysen.

Absorbansen, altså produksjonene av et fargestoff via en enzymatisk reaksjon, er avhengig av flere faktorer blant annet antall metabolsk aktive celler, mengde tilsatt av WST-1 reagent og inkubasjonsperioden (182). For å kunne sammenligne utfallet av assay var det viktig at antall levende celler per brønn og vekstforholdene i hver brønn er stabil. Celleaktivitet til aktive metabolske celler behandlet med TTA og TTA-analoger ble beregnet i forhold ubehandlet celler og utfordring knyttet til dette var at antall levedyktige ubehandlet varierte fra hver gang. Dermed når det man skulle sammenligne antall metabolske aktive celler fra de ulike eksperimentene ble det problematisk med tanke på at antall celler per brønn og vekstforholdene skulle utgangspunktet være

stabilt i hver brønn. I dette tilfelle varierte det fra eksperiment til eksperiment. Dette var noe som ble tatt med i bakhodet, og gir grunnlag for outline for resultatene.

Minus med denne assay er den måler ikke spesifikk mitokondriell dehydrogenase-enzymet i mitokondriene, men måler også enzymaktivitet som finnes utenfor cytoplasma (182). Alternativt kunne det ha vært brukt MTT-assay, på lik nivå som WST-1 måler metabolsk aktivitet. Assay måler aktiviteten til succinat-dehydrogenase-enzymet (SDE) som tar opp gule MTT substratet og reduserer den til blått formazanprodukt (183). Fordelen med denne er succinat-dehydrogenase-enzymet er involvert direkte i elektrontransportkjeden dermed er det direkte relatert til mitokondriene (182, 184).

1.1.50 utfordringer relatert til genanalyser

Etter RNA-rensing ble RNA-prøvene målt for konsentrasjon og testet for urenheter og ved bruk av QIAxpert. I begynnelsen av eksperimentene ble det enkelte tilfeller oppdaget urenheter ved RNA-rensing. Det var uklart om urenheterene kom fra lysering eller underveis i RNA-isoleringsprosessen. I begynnelsen studien ble noen RNA-prøver med kvalitet som ikke oppfyller de vanlige standardene, inkludert i analysene. Det ble dermed i etterkant valgt å utføre sprøyte-kanyle steget tidligere i RNA-isoleringsprosessen for å til det som er omtalt i RNA prosedyren. Dette medførte at kvaliteten på RNA-isoleringen forbedret seg markant. QIAxpert som ble benyttet i denne studien er ikke i stand til å teste RNA-integriteten, altså om DNA polymerase er tilstedet som øker sjansen for degradering. Dermed hadde det vært et fordel å se på RNA kvalitet før genanalyser, som ikke ble utført i denne studien.

PCR-effektiviteten er avhengig av analysen, masterblandingsytelsen og prøve kvaliteten. En standardkurve ble kun laget basert på et snitt av triplettene av seks konsentrasjoner. Det ble beregnet PCR-effektivitet fra fortynningsrekkene (185). På genanalyser med TTA ble effektiviteten observert mellom 97% - 106%. Vanligvis varierer ønsket

amplifikasjonseffektivitet fra 90% til 110% (158, 185, 186). Siden det har blitt observert effektivitet over 100 % kan det muligens skyldes polymerase inhibering. Det vil si dersom inhibitorer er tilstede i de konsentrerte prøvene, er det nødvendig med flere sykluser for å krysse tresholdslinje sammenlignet med prøvene uten inhibitorer (187). Inhibitorer av polymeraseenzymet inkluderer overdreven mengder DNA/RNA eller overføringsmateriale i prøven. I dette tilfelle ble det benyttet mer template i prøvene på grunn av at cytokiner var svakt uttrykket. Dette taler for at verdiene er usikre til å stole på selv om det kun er gjort en lang fortynningsrekke og en triplettanalyse, men på grunn av ufortynnet templat kan det resultere svak presisjon som en konsekvensen kan føre til dårlig kvantisering. Revers transkriptase og dårlig pipettering kan også påvirke PCR effektivitet (158, 188). Men under studie ble det tatt med slik som prøver uten revers transkriptase for å kunne utelukke det.

NK-kB transkripsjonsfaktor regulerer og kontrollerer i induksjon av proinflammatorisk genuttrykk og er avgjørende for å opprettholde immun homeostase (189, 190). Særlig ved CNS-sykdommer har det blitt sett at disse er involvert. Dermed kunne forslag vært å ha sett på andre gener bortsett fra *TNF- α* og *IL-15* involvert i denne banen; blant annet STAT-3, adhesjon molekyler (intercellular adhesion molecule, ICAM-1) vaskulær adhesjon molekyler (VCAM)-1 er involvert i hjernen (190). Ellers kunne cytokin deteksjon blitt analysert via teknikker som ELISA metode, men det tillater bare en begrenset antall cytokiner fra en enkelt prøve (154).

1.1.51 Dyrestudier

Ikke alle eksperimentene kan operasjonaliseres fra rotte/mus til menneskestudier og vice versa. Det må tas stilling til at det vil alltid være cellulære mekanismer som vil skilles fra mennesker og dyr. Foreløpig finnes det ingen dyremodeller som er egnet for CNS - forskning, men mus og rotte er den mest brukte (191).

I dyreforsøkene ble TTA gitt som et supplement med en kjent sammensetning i dietten. Den nøyaktige dosen av TTA gitt til hvert dyr er avhengig av fôr inntaket i det enkelte dyr og noe som ikke er kjent i detalj. For apo E^{-/-} studie ble en samling av ulike hjernevev tatt prøve av, mens i rottestudie er det ikke spesifisert hvilke hjernedel som ble tatt ut. For å kunne si noe om SOD uttrykking hadde det vært en fordel å vite spesifikk hvilke hjernedel som ble undersøkt.

Dyrestudie kan ikke i seg selv forutsi human risiko 100 %, siden det er forskjellig mellom arter. Antall analyserte dyr fra denne studien er relativt lave, varierende fra 5 til 8 individer. Dyrene ble valgt tilfeldig fra en større gruppe, og derved representere sin gruppe som helhet. Men likevel må det tas i betraktning at man skal kunne overføre informasjon fra dyr til mennesker krever forsøkene svært mange forsøksdyr for å ha tilstrekkelig statistisk styrke, men på grunn av tidsaspektet ble det kun tatt prøve fra 5-8 individer.

6 Veien videre

Det langsiktige målet med studier av TTA og dets effekter er å utvikle et legemiddel med potensielle egenskaper for behandling av neurodegenerative sykdommer. TTA oppfører seg som vanlige FA og involverer seg i prosesser som aktivering og modulere inflammasjon. Samtidig har de modifiserte TTA-analogene uvanlige egenskaper på grunn av tilstedeværelsen av et svovelatom, dobbelbinding og nitrogenatom.

I denne masteroppgaven ble det gjennomført forsøk med to cellelinjer HuH-7 og SH-SY5Y. Ettersom det ble oppdaget lite effekt av TTA i SH-SY5Y og med tanke på at en masteroppgaves arbeid i en begrenset periode, ble det her prioritert å gjennomføre oppgaven videre med TTA i stedet for å se anti-inflammatoriske og antioksidative effekter av TTA-analogene for SH-SY5Y. Det hadde vært en fordel å vurdere andre modeller der TTA har påvist effekt for å se på generelle antiinflammatoriske effekter av de nye fettsyrene. Det hadde vært interessant å se om hvordan disse fettsyrene hadde gitt respons i differensierte SH-SY5Y. Det ble oppdaget utfordringer knyttet til krystallisering ene TTA-analog, N-TTA noe man må vurdere andre administreringsformer senere.

Det hadde vært spennende å se om andre cellelinjer som er metabolsk aktive underbygger teorien. Det må gjøres flere forsøk og øke antallet i ulike cellelinjene for å kunne oppnå et valid resultat. Å undersøke flere gener som er involvert i inflammasjon, oksidative stress og PPAR-regulering hadde også vært interessant, for å kunne stadfeste virkningsmekanisme til TTA og de modifiserte fettsyrene i humane celler.

7 Konklusjon

Studien hadde som mål å undersøke potensielle anti-inflammatoriske og antioksidative effektene av TTA i nevroner ved å bruke SH-SY5Y cellelinjen i *in vitro* eksperimenter. Basert på de funnene i denne oppgaven, er hovedkonklusjonen at det ikke har funnet noen holdepunkter for inflammatoriske effekter av TTA på SH-SY5Y. Det ble sett på om SH-SY5Y uttrykker *PPAR- α* , *PPAR- δ* og *PPAR- γ* , fordi den anti-inflammatoriske effekten av TTA antas til å virke på *PPAR- α* og *PPAR- γ* , som er involvert i lipidmetabolisme, selv om TTA også er vist å aktivere *PPAR- δ* . Tidligere har det blitt sett at *PPAR- α* og *PPAR- γ* dominerer i hjerne, mens resultatene viste antydning til oppregulering av *PPAR- δ* ved inflammasjonsrespons i SH-SY5Y.

Et annet mål var å studere potensielle effekter av administrering av TTA til mus og rotte ved å analysere genuttrykket i hjernen. I apoE^{-/-} mus som ble føret med 0,4 % TTA diett ble det ikke observert oppregulering av *SOD 1* og *SOD 2*, men i lang-tidsstudie med 0,4% TTA i rotte ble det derimot sett en regulering av *SOD 1* og *SOD 2* sammenlignet med rotter som ble føret med høy fett diett.

Det var også ønske om å teste TTA-analoger *in vitro* for å se om de kunne vise lignende egenskaper som TTA. Det ble sett på hvilke doser som var tilstrekkelig for å gi effekt og hvilke konsentrasjoner som kunne være toksisk cellene. For tr-TTA ble det observert at dose på opptil 62.5 -125 μ M var passende for begge cellelinjer over en behandlingsperiode på to dager. N-TTA så ut som til å være toksisk i dose 31.3 μ M både for HuH-7 celler og SH-SY5Y celler. Tr-N-TTA tolerert opptil 250 μ M i begge cellelinjene.

Basert på funnene i dette prosjektet har vi ikke funnet noen grunnlag for anti-inflammatoriske effekter av TTA på *in vivo*. Det blir sett en tendens av oksidative egenskaper *in vitro* ved lang-tidsbehandling av TTA. Imidlertid er det behov for ytterligere studier for å se om det på andre cytokiner og oksidative markører som er

involvert i hjernen. Studier *in vitro* på differensiert SH-SY5Y-celler eller andre nevronmodeller bør også være av interesse for å studere virkningen av TTA og dets analoger på de cellulære mekanismer i CNS. For å se på de generelle antiinflammatoriske effekter av TTA-analoger hadde det vært en fordel å se på andre modeller der TTA har påvist effekt.

For å kunne studere effekten av TTA og TTA-analoger på både inflammatoriske og oksidative effekter er det nødvendig å jobbe med cellelinjer der de har høyt nivå av *PPAR- α* og *PPAR- γ* og cellelinjer.

8 Referanser

1. WHO. Global burden of neurological disorders: estimates and projections. 2006;232.
2. Research ND. WHAT IS NEURODEGENERATIVE DISEASE? [Available from: <http://www.neurodegenerationresearch.eu/nb/om-jpnd/hva-er-en-nevrodegenerativ-sykdom/>].
3. Gitler AD, Dhillon, P., & Shorter, J. . Neurodegenerative disease: models, mechanisms, and a new hope. Disease models & mechanisms. Dis Model Mech. 2017;10(5).
4. Shohayeb B, Diab M, Ahmed M, Ng DCH. Factors that influence adult neurogenesis as potential therapy. Transl Neurodegener. 2018;7:4.
5. Steward MM, Sridhar A, Meyer JS. Neural regeneration. Curr Top Microbiol Immunol. 2013;367:163-91.
6. Braaten AJ, Parsons TD, McCue R, Sellers A, Burns WJ. Neurocognitive differential diagnosis of dementing diseases: Alzheimer's Dementia, Vascular Dementia, Frontotemporal Dementia, and Major Depressive Disorder. Int J Neurosci. 2006;116(11):1271-93.
7. Duraes F, Pinto M, Sousa E. Old Drugs as New Treatments for Neurodegenerative Diseases. Pharmaceuticals (Basel). 2018;11(2).
8. Folkehelseinstitutt. Helsetilstanden i Norge 2018.
9. Rang HP-R, James M. - Flower, Rod J. - Henderson, Graeme. Rang & Dale's Pharmacology: Churchill Livingstone; 2015.
10. Jialal. RPI. Chronic Inflammation: StatPearls 2018. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK493173/>.

11. Neville A Punchard CJW, and Ian Adcock Journal of inflammation The Journal of inflammation 2004.
12. Sylvia S.Mader MW. Human Biology McGraw Hill Education; 2016.
13. Spurkland A. Immun: Spartacus Forlag AS; 2017 [cited 2019 03.04.19].
14. Cologne. The innate and adaptive immune systems Institute for Quality and Efficiency in Health Care (IQWiG): InformedHealth.org; 2006 [updated August 4, 2016; cited 2019 03.04.19]. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279396/>.
15. Fullerton JNG, D.W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. 2016;15 (8).
16. Rosenblum MD, Remedios KA, Abbas AK. Mechanisms of human autoimmunity. J Clin Invest. 2015;125(6):2228-33.
17. Wee Yong V. Inflammation in Neurological Disorders: A Help or a Hindrance? The Neuroscientist. 2010;16(4):408-20.
18. Block MELaML. Microglial Activation and Chronic Neurodegeneration. Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics. 2010;7(4):354-65.
19. Huang WJ, Chen WW, Zhang X. Multiple sclerosis: Pathology, diagnosis and treatments. Exp Ther Med. 2017;13(6):3163-6.
20. Navarro V, Sanchez-Mejias E, Jimenez S, Munoz-Castro C, Sanchez-Varo R, Davila JC, et al. Microglia in Alzheimer's Disease: Activated, Dysfunctional or Degenerative. Front Aging Neurosci. 2018;10:140.
21. Joe EH, Choi DJ, An J, Eun JH, Jou I, Park S. Astrocytes, Microglia, and Parkinson's Disease. Exp Neurobiol. 2018;27(2):77-87.
22. Garth J, Barnes JW, Krick S. Targeting Cytokines as Evolving Treatment Strategies in Chronic Inflammatory Airway Diseases. Int J Mol Sci. 2018;19(11).
23. Zygumt B, Veldhoen M. T helper cell differentiation more than just cytokines. Adv Immunol. 2011;109:159-96.

24. Kelvin MJCaDJ. Cytokines, Chemokines and Their Receptors: Landes Biocience, Austin (TX); 2013 [cited 2019 09.04].
25. Vinicius L. Ferreira HHLB, Aline de F. Bonetti, Leticia P. Leonart and Roberto Pontarolo. Cytokines and Interferons: Types and Functions: Open access peer-reviewed chapter - ONLINE FIRST; 2017 [cited 2019 09.04]. Available from: <https://www.intechopen.com/online-first/cytokines-and-interferons-types-and-functions>.
26. Cavaillon J-M. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. Cellular and Molecular Biology. 2001;47(4).
27. Dinarello CA. Proinflammatory Cytokines. Chest. 2000;118(2):503-8.
28. Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. Nat Rev Immunol. 2003;3(7):569-81.
29. Steinman L. Nuanced roles of cytokines in three major human brain disorders. J Clin Invest. 2008;118(11):3557-63.
30. L Vitkovic JK, J Bockaert, R Dantzer, V Homburger and C Jacque. Cytokine signals propagate through the brain. Molecular Psychiatry. 2000;5.
31. Becher B, Spath S, Goverman J. Cytokine networks in neuroinflammation. Nat Rev Immunol. 2017;17(1):49-59.
32. Wang WY, Tan MS, Yu JT, Tan L. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease. Ann Transl Med. 2015;3(10):136.
33. Chen L DH, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L. . Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. Oncotarget. 2017;9(6).
34. Cooper. GM. The Cell - A molecular Approach 2.edition ed: Sinauer Associates; 2000.
35. Kristin N. Varhaug CAV, Charalampos Tzoulis, Laurence A. Bindoff Multipipel sklerose – en mitokondriemediert sykdom? Tidsskrift for Den norske legeforening. 2017.
36. Martin D, McKenna H, Livina V. The human physiological impact of global deoxygenation. J Physiol Sci. 2017;67(1):97-106.

37. Pedersen B. Oksidasjon: I Store norske leksikon; 2018 [Available from: <https://snl.no/oksidasjon>]
38. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:8416763.
39. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010;4(8):118-26.
40. Lagouge M, Larsson NG. The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing. *J Intern Med*. 2013;273(6):529-43.
41. Lien Ai Pham-Huy HH, Chuong Pham-Huy. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International journal of Biomedical science*. 2008;4(2):89-96.
42. Aguilar TAF, Navarro BCH, Pérez JAM. Endogenous Antioxidants: A Review of their Role in Oxidative Stress. A Master Regulator of Oxidative Stress - The Transcription Factor Nrf22016.
43. Wang. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Frontiers in Aging Neuroscience*. 2010.
44. Simopoulos AP. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008;233(6):674-88.
45. Introduction to Chemistry: General, Organic, and Biological 2012 [02.01.19]. Available from: <https://2012books.lardbucket.org/books/introduction-to-chemistry-general-organic-and-biological/>.
46. Lei E, Vacy K, Boon WC. Fatty acids and their therapeutic potential in neurological disorders. *Neurochem Int*. 2016;95:75-84.
47. S.O.Farell MKC. *Biochemistry*. 7.edition ed: Brooks/Cole; 2012.
48. Peter A. McCullough M, MPH. Omega-6 Fatty Acids in the Hierarchy of Cardiovascular Protection American Heart Association: American Heart Association Nutrition Subcommittee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; and Council on Epidemiology and

Prevention; 2009 [cited 2019 27.03.19]. Available from:

https://professional.heart.org/professional/ScienceNews/UCM_433122_Omega-6-Fatty-Acids-in-the-Hierarchy-of-Cardiovascular-Protection.jsp.

49. Rang HP, Ritter, J. M. , Flower, R. J. ,Henderson G. Rang and Dales; Pharmacology. 8.edition ed: Churchill Livingstone; 2015.
50. Dyall SC. Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Front Aging Neurosci.* 2015;7:52.
51. Cutuli D. Functional and Structural Benefits Induced by Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids During Aging. *Curr Neuropharmacol.* 2017;15(4):534-42.
52. Kitajka K, Sinclair AJ, Weisinger RS, Weisinger HS, Mathai M, Jayasooriya AP, et al. Effects of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on brain gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(30):10931-6.
53. Tanaka K, Farooqui AA, Siddiqi NJ, Alhomida AS, Ong WY. Effects of docosahexaenoic Acid on neurotransmission. *Biomol Ther (Seoul).* 2012;20(2):152-7.
54. Serhan CN, Petasis NA. Resolvins and protectins in inflammation resolution. *Chem Rev.* 2011;111(10):5922-43.
55. Serhan CN, Chiang N, Dalli J, Levy BD. Lipid mediators in the resolution of inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;7(2):a016311.
56. Berg JM TJ, Stryer L. *Biochemistry: W. H. Freeman and Company;* 2002. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK22437/>.
57. Nguyen P, Leray V, Diez M, Serisier S, Le Bloc'h J, Siliart B, et al. Liver lipid metabolism. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 2008;92(3):272-83.
58. Bartlett K, Eaton S. Mitochondrial beta-oxidation. *European Journal of Biochemistry.* 2004;271(3):462-9.
59. Jansen GA, Wanders RJ. Alpha-oxidation. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1763(12):1403-12.
60. Kemp RJA WJKS. Fatty acid omega-oxidation as a rescue pathway for fatty acid oxidation disorders in humans. *The FEBS Journal.* 2011;278(2):182-94.

61. Schonfeld P, Reiser G. Why does brain metabolism not favor burning of fatty acids to provide energy? Reflections on disadvantages of the use of free fatty acids as fuel for brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013;33(10):1493-9.
62. Romano A, Koczwara JB, Gallelli CA, Vergara D, Micioni Di Bonaventura MV, Gaetani S, et al. Fats for thoughts: An update on brain fatty acid metabolism. *Int J Biochem Cell Biol.* 2017;84:40-5.
63. Telle-Hansen VH, Christensen JJ, Ulven SM, Holven KB. Does dietary fat affect inflammatory markers in overweight and obese individuals?-a review of randomized controlled trials from 2010 to 2016. *Genes Nutr.* 2017;12:26.
64. Flanagan JL, Simmons PA, Vehige J, Willcox MD, Garrett Q. Role of carnitine in disease. *Nutr Metab (Lond).* 2010;7:30.
65. Kim J, Basak JM, Holtzman DM. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron.* 2009;63(3):287-303.
66. Mahley RW. Apolipoprotein E: from cardiovascular disease to neurodegenerative disorders. *J Mol Med (Berl).* 2016;94(7):739-46.
67. Reitz C. Dyslipidemia and the risk of Alzheimer's disease. *Curr Atheroscler Rep.* 2013;15(3):307.
68. Tracey TJ, Steyn FJ, Wolvetang EJ, Ngo ST. Neuronal Lipid Metabolism: Multiple Pathways Driving Functional Outcomes in Health and Disease. *Front Mol Neurosci.* 2018;11:10.
69. M.T. Lin MFB. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature.* 2006;443:787-95.
70. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 12 October 2000.
71. Rosario Rizzuto PB, and Tullio Pozzan. Mitochondria as all-round players of the calcium game. *Journal of physiology.* 2000:37-47.
72. Misgeld T, Schwarz TL. Mitostasis in Neurons: Maintaining Mitochondria in an Extended Cellular Architecture. *Neuron.* 2017;96(3):651-66.

73. Golpich M, Amini E, Mohamed Z, Azman Ali R, Mohamed Ibrahim N, Ahmadiani A. Mitochondrial Dysfunction and Biogenesis in Neurodegenerative diseases: Pathogenesis and Treatment. *CNS Neuroscience & Therapeutics*. 2017;23(1):5-22.
74. Bosetti F BF, Barogi S, Mancuso M, Siciliano G, Tendi EA, Murri L, Rapoport SI, Solaini G. . Cytochrome c oxidase and mitochondrial F1F0-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 2002;23:371-6.
75. Salim S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. *J Pharmacol Exp Ther*. 2017;360(1):201-5.
76. Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:360438.
77. Wilson JXG, Adrian W. Free Radicals, Antioxidants, and Neurologic Injury: Possible Relationship to Cerebral Protection by Anesthetics. *Journal of Neurosurgical Anesthesiology*. 2002;14(1):66-79.
78. Arlt SB, Ulrikea; Kontush, Anatol. Lipid peroxidation in neurodegeneration: new insights into Alzheimer's disease. *Current Opinion in Lipidology*. 2002;13(3):289-94.
79. Sochocka M, Diniz BS, Leszek J. Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe? *Mol Neurobiol*. 2017;54(10):8071-89.
80. Paladino S, Conte A, Caggiano R, Pierantoni GM, Faraonio R. Nrf2 Pathway in Age-Related Neurological Disorders: Insights into MicroRNAs. *Cell Physiol Biochem*. 2018;47(5):1951-76.
81. Lassmann H, van Horssen J. Oxidative stress and its impact on neurons and glia in multiple sclerosis lesions. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1862(3):506-10.
82. Galluzzi L, Blomgren K, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(7):481-94.
83. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(9):621-32.

84. MP M. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000;1(2):120-9.
85. Barrera G, Gentile F, Pizzimenti S, Canuto RA, Daga M, Arcaro A, et al. Mitochondrial Dysfunction in Cancer and Neurodegenerative Diseases: Spotlight on Fatty Acid Oxidation and Lipoperoxidation Products. *Antioxidants (Basel).* 2016;5(1).
86. Michalik L, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(1):61-70.
87. Os I. PPAR γ -agonister – antidiabetika med gunstig effekt på kardiovaskulær risiko? *Tidsskrift for Den norske legeförening.* 2005.
88. Kersten S, Desvergne, BeÂatrice & Walter, Wahli. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Nature.* 2000;405:421-4.
89. B. Desvergne and W. Wahli. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocrine Reviews.* 1999;20(5):649-88.
90. Liu Y, Colby JK, Zuo X, Jaoude J, Wei D, Shureiqi I. The Role of PPAR-delta in Metabolism, Inflammation, and Cancer: Many Characters of a Critical Transcription Factor. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11).
91. Warden A, Truitt J, Merriman M, Ponomareva O, Jameson K, Ferguson LB, et al. Localization of PPAR isotypes in the adult mouse and human brain. *Sci Rep.* 2016;6:27618.
92. Nisbett KE, Pinna G. Emerging Therapeutic Role of PPAR-alpha in Cognition and Emotions. *Front Pharmacol.* 2018;9:998.
93. Zolezzi JM, Santos, M. J., Bastías-Candia, S., Pinto, C., Godoy, J. A. and Inestrosa, N. C. . PPARs in the central nervous system: roles in neurodegeneration and neuroinflammation. *Biological Reviews.* 2017;92(4):2046-69.
94. Bennett M, Gilroy DW. Lipid Mediators in Inflammation. *Microbiol Spectr.* 2016;4(6).
95. Bright JJ, Kanakasabai S, Chearwae W, Chakraborty S. PPAR Regulation of Inflammatory Signaling in CNS Diseases. *PPAR Res.* 2008;2008:658520.

96. Daynes RA, Jones DC. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(10):748-59.
97. Heneka MT, Landreth GE. PPARs in the brain. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1771(8):1031-45.
98. Berge RKS, Jona; Tronstad, Karl Johan; Berge, Kjetil; Gudbrandsen, Oddrun Anita; Grav, Hans. Metabolic effects of thia fatty acids. *Current Opinion in Lipidology.* 2002;13(3):295-304.
99. Berge KR, Hvattum, Erlend Impact of cytochrome P450 system on lipoprotein metabolism. Effect of abnormal fatty acids (3-thia fatty acids). *Pharmacol Ther.* 1994;61(3):345-83.
100. Berge KR, Aarsland, Asle, Kryvi, Harald, Bremer Jon, Aarsaether. Alkylthio acetic acids (3-thia fatty acids)—A new group of non- β -oxidizable peroxisome-inducing fatty acid analogues—II. Dose-response studies on hepatic peroxisomal- and mitochondrial changes and long-chain fatty acid metabolizing enzymes in rats. *Biochemical Pharmacology.* 1989;38(22):3969-79.
101. Gudbrandsen OA, et al.,. The metabolic effects of thia fatty acids in rat liver depend on the position of the sulfur atom. *Chemico-Biological Interactions* . 2005 155(1-2):71-81.
102. Dyroy E, et al.,. Thia fatty acids with the sulfur atom in even or odd positions have opposite effects on fatty acid catabolism. *Lipids.* 2006;42(2):169-77.
103. Asiedu. Daniel K. ASA, Rustan., Arild C., Björkhem., Ingemar, Berglund, Lars., Berge, Rolf K. . Hepatic fatty acid metabolism as a determinant of plasma and liver triacylglycerol levels. *FEBS journal.* 1995:715-22.
104. R.K.Berge KJTB, T.H.Rost, H.Wergedahl, O.A.Gudbrandsen. J.Skorve. The metabolic syndrome and the hepatic fatty acid drainage hypothesis. *Biochimie.* 2005;87(1).
105. Grav HJ, Tronstad, K. J., Gudbrandsen, O. A., Berge, K., Fladmark, K. E., Martinsen, T. C., . . . Berge, R. K. Changed energy state and increased mitochondrial

- beta-oxidation rate in liver of rats associated with lowered proton electrochemical potential and stimulated uncoupling protein 2 (UCP-2) expression: evidence for peroxisome proliferator-activated receptor- α independent induction of UCP-2 expression. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(33):30525-33.
106. Vigerust NF, et al., . Fish oil and 3-thia fatty acid have additive effects on lipid metabolism but antagonistic effects on oxidative damage when fed to rats for 50 weeks. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2012;23(11):1384-93.
107. Madsen L, et al.,. Tetradecylthioacetic acid prevents high fat diet induced adiposity and insulin resistance. *Journal of Lipid Research*. 2002;43(5):742-50.
108. Bjørndal B, Grimstad, T., Cacabelos, D. et al. Tetradecylthioacetic Acid Attenuates Inflammation and Has Antioxidative Potential During Experimental Colitis in Rats. *Digestive Diseases and Sciences*. 2013;58(1):97-106.
109. Dyroy E, Yndestad A, Ueland T, Halvorsen B, Damas JK, Aukrust P, et al. Antiinflammatory effects of tetradecylthioacetic acid involve both peroxisome proliferator-activated receptor α -dependent and -independent pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(7):1364-9.
110. Aukrust P WH, Muller F, Ueland T, Dyroy E, Damas JK, et al. Immunomodulating effects of 3-thia fatty acids in activated peripheral blood mononuclear cells. *European journal of clinical investigation*. 2003;33(5):426-33.
111. Romanovsky Andrej A, Vik R, Busnelli M, Parolini C, Bjørndal B, Holm S, et al. An Immunomodulating Fatty Acid Analogue Targeting Mitochondria Exerts Anti-Atherosclerotic Effect beyond Plasma Cholesterol-Lowering Activity in apoE^{-/-} Mice. *PLoS ONE*. 2013;8(12).
112. Ziad A. Munaa OAG, Hege Wergedahl, Pavol Bohova,, Jon Skorve, Rolf K. Berge. Inhibition of rat lipoprotein oxidation after tetradecylthioacetic acid feeding. *Biochemical Pharmacology*. 2002:1127-35.
113. Minghetti ABaL. PPAR- γ Agonists as Regulators of Microglial Activation and Brain Inflammation. *12*. 2006;93-109(1).

114. Kummer MP HM. PPARs in Alzheimer's Disease. Hindawi Publishing Corporation. 2008.
115. Lund J, Stensrud C, Rajender, Bohov P, Thoresen GH, Berge RK, et al. The molecular structure of thio-ether fatty acids influences PPAR-dependent regulation of lipid metabolism. *Bioorg Med Chem*. 2016;24(6):1191-203.
116. Nikolic M, Sustersic T, Filipovic N. In vitro Models and On-Chip Systems: Biomaterial Interaction Studies With Tissues Generated Using Lung Epithelial and Liver Metabolic Cell Lines. *Front Bioeng Biotechnol*. 2018;6:120.
117. Hidekazu Nakabayashi KT, Keiko Miyano, Takashi Yamane, and Jiro Sato. Growth of Human Hepatoma Cell Lines with Differentiated Functions in Chemically Defined Medium. *Cancer research* 1982;42 (9)
118. Choi S, Sainz B, Jr., Corcoran P, Uprichard S, Jeong H. Characterization of increased drug metabolism activity in dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated Huh7 hepatoma cells. *Xenobiotica*. 2009;39(3):205-17.
119. SH-SY5Y Cell line profile. Public Health England.
120. Shipley MM, Mangold CA, Szpara ML. Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line. *J Vis Exp*. 2016(108):53193.
121. XIE H-rH, Lin-sen; LI, Guo-yi. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line:in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese Medical Journal*. April 2010;Volume 123(8):1086–92.
122. Passage numbers explained. European Collection of Authenticated Cell Cultures. (M219.20170127.v2).
123. JCRB0403 HuH-7 National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition: JCRB Cell Bank (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank); 2005-2015 [Available from: https://cellbank.nibiohn.go.jp/~cellbank/en/search_res_det.cgi?ID=385].
124. ECACC General Cell Collection: SH-SY5Y: Public Health England; [cited 2019 05.05]. Available from: <https://www.phe->

culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=94030304&collection=ecacc_gc.

125. Cell Dissociation with Trypsin: Sigma aldrich; [cited 2019 12.01]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/cell-dissociation-with-trypsin.html>.

126. Cell Proliferation Reagent WST-1: Merck; [cited 2019 20.01]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/cellproro?lang=en®ion=NO>

127. Coskun O. Separation techniques: Chromatography. North Clin Istanbul. 2016;3(2):156-60.

128. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen, K.E. Legemiddelanalyse. Fagbokforlaget: Bergen; 2004.

129. Tang B, Row KH. Development of gas chromatography analysis of fatty acids in marine organisms. J Chromatogr Sci. 2013;51(7):599-607.

130. Mjos SA, Grahl-Nielsen O. Prediction of gas chromatographic retention of polyunsaturated fatty acid methyl esters. J Chromatogr A. 2006;1110(1-2):171-80.

131. Kates M. General Analytical Procedures. In Techniques in Lipidology. M Dates Elsevier Science Publishers. 1986,:112-85.

132. Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC/MS) Information: ThermoFisher Scientific; [cited 2019 20.05]. Available from: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/industrial/mass-spectrometry/mass-spectrometry-learning-center/gas-chromatography-mass-spectrometry-gc-ms-information/gc-ms-sample-preparation.html>.

133. Raquel de Sousa Abreu LOP, Edward M. Marcotte and Christine Vogel. Global signatures of protein and mRNA expression levels. Mol Biosyst. 2009.

134. RNeasy® Mini Handbook. QIAGEN. 2012.

135. QIAxpert® User Manual: Qiagen.; 2018.

136. Reverse Transcription (cDNA Synthesis): New England Biolabs; [Available from: <https://international.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-preparation/reverse-transcription-cdna-synthesis>].

137. User Guide: High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit: Thermo Fisher Scientific Baltics; 2016 12.11.18]. Available from:
https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0017977_highcap_cDNA_RT_UG.pdf&title=VXNlciBhdWlkZTogSGlnaCBDYXBhY2l0eSBjRE5BIFJldmVyc2UgVHJhbnNjcmlwdGlvbmlBLaXQ=
138. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*. 2002;30:503–12.
139. Polymerase Chain Reaction (PCR) 2017 [updated 2017-11-09. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>.
140. Polymerase Chain Reaction (PCR) U.S. National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information; [updated 09.11.2017. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>.
141. Wangh KEPaLJ. Effectiveness and limitations of uracil-DNA glycosylases in sensitive real-time PCR assays. *BioTechniques*. 2004;36.
142. Diet-composition Milano final.
143. Genovefa Kolovou KA, Dimitri P. Mikhailidis and Dennis V. Cokkinos. Apolipoprotein E Knockout Models. *Current Pharmaceutical Design*. 2008;14(4).
144. Wilfred A. The Effects of Tetradecylthioacetic acid and Tetradecylthiopropionic acid on One-Carbon Metabolism and Lipid Metabolism in Huh7 Cells and C57BL/6 Mice: Bergen University; 2014.
145. Karoliussen M. Effekter av tioeterfettsyrer på glukose- og lipidmetabolisme i muskel- og leverceller: UNIVERSITETET I OSLO; 2017.
146. HuH-7 Cell Line, hepato cellular carcinoma cells [cited 2019 22.05]. Available from: <https://huh7.com/general-information/cell-culture-information/>.
147. Antonelli A, Ferri C, Ferrari SM, Colaci M, Ruffilli I, Sebastiani M, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists reduce cell proliferation

- and viability and increase apoptosis in systemic sclerosis fibroblasts. *Br J Dermatol.* 2013;168(1):129-35.
148. Kajita K MI, Hanamoto T, Ikeda T, Fujioka K, Yamauchi M, Okada H, Usui T, Takahashi N, Kitada Y, Taguchi K, Kajita T, Uno Y, Morita H, Ishizuka T. Pioglitazone enhances small-sized adipocyte proliferation in subcutaneous adipose tissue. *Endocrine Journal.* 2012;59(12):1107-14.
149. Lundemo AG, Pettersen CH, Berge K, Berge RK, Schonberg SA. Tetradecylthioacetic acid inhibits proliferation of human SW620 colon cancer cells--gene expression profiling implies endoplasmic reticulum stress. *Lipids Health Dis.* 2011;10:190.
150. Dyrøy E RT, Pettersen RJ, Halvorsen B, Gudbrandsen OA, Ueland T, Muna Z, Müller F, Nordrehaug JE, Aukrust P, Berge RK. Tetradecylselenoacetic Acid, a PPAR Ligand With Antioxidant, Antiinflammatory, and Hypolipidemic Properties. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2007;27(3).
151. Gstraunthaler G, Lindl T, van der Valk J. A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. *Cytotechnology.* 2013;65(5):791-3.
152. Comparison of FBS and Other Bovine Serums Rocky Mountain Biologicals [Available from: <https://www.rmbio.com/comparison-of-fbs-and-other-bovine-serums>.
153. Amor S, Peferoen LA, Vogel DY, Breur M, van der Valk P, Baker D, et al. Inflammation in neurodegenerative diseases--an update. *Immunology.* 2014;142(2):151-66.
154. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods.* 2001;25(4):386-401.
155. Real Time PCR Ct Values: Wisconsin Veterinary Diagnostic Laboratory Madison; [cited 2019 20.05]. Available from: https://www.wvdl.wisc.edu/wp-content/uploads/2013/01/WVDL.Info_PCR_Ct_Values1.pdf.
156. Information on qPCR results Institute of research in immunology and cancer, University of Montreal: Genomic Platform; [

157. Rice R. PCR Arrays for Quantitative Expression Analysis of Specific Gene Pathways: Qiagen; 2011.
158. Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR. 2004.
159. Lovas K, et al.,. Tetradecylthioacetic acid attenuates dyslipidaemia in male patients with type 2 diabetes mellitus, possibly by dual PPAR-alpha/delta activation and increased mitochondrial fatty acid oxidation. *Diabetes Obes Metab.* 2009;11(4):11225-32.
160. Westergaard M, Henningsen J, Kratchmarova I, Kristiansen K, Svendsen ML, Johansen C, et al. Modulation of Keratinocyte Gene Expression and Differentiation by PPAR-Selective Ligands and Tetradecylthioacetic Acid. *Journal of Investigative Dermatology.* 2001;116(5):702-12.
161. Berge K TK, Flindt EN, Rasmussen TH, Madsen L, Kristiansen K, Berge RK. Tetradecylthioacetic acid inhibits growth of rat glioma cells ex vivo and in vivo via PPAR-dependent and PPAR-independent pathways. *Carcinogenesis.* 2001;22(11):1747-55.
162. Youssef J, Badr, Mostafa Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Inflammation Control. *J Biomed Biotechnol* 2004.
163. Schnegg CI, Robbins ME. Neuroprotective Mechanisms of PPARdelta: Modulation of Oxidative Stress and Inflammatory Processes. *PPAR Res.* 2011;2011:373560.
164. Qian Gou XG, Jianhua Jin,* , Juanjuan Shi and Yongzhong Hou. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are potential drug targets for cancer therapy. *Oncotarget.* 2017;8(36):60704-9.
165. Wang D, Fu L, Ning W, Guo L, Sun X, Dey SK, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor delta promotes colonic inflammation and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(19):7084-9.
166. Bhurruth-Alcor Y RT, Jorgensen MR, Rajender, Müller M, Skorve J, Berge RK, Miller AD. Novel phospholipid analogues of pan-PPAR activator tetradecylthioacetic acid are more PPAR α selective. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2010;20(3):1252-5.

167. Gjoen T, Kleveland EJ, Moya-Falcon C, Froystad MK, Vegusdal A, Hvattum E, et al. Effects of dietary thia fatty acids on lipid composition, morphology and macrophage function of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) kidney. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2007;148(1):103-11.
168. Chouinard-Watkins R, Lacombe RJS, Bazinet RP. Mechanisms regulating brain docosahexaenoic acid uptake: what is the recent evidence? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2018;21(2):71-7.
169. Lecerf F, TMC, DMB, L. Unsaturated Fatty Acids Esterified in 2-Acyl-1-Lysophosphatidylcholine Bound to Albumin Are More Efficiently Taken up by the Young Rat Brain than the Unesterified Form. *Journal of Neurochemistry.* 1992;59(3).
170. Watanabe K, Shibuya S, Ozawa Y, Nojiri H, Izuo N, Yokote K, et al. Superoxide dismutase 1 loss disturbs intracellular redox signaling, resulting in global age-related pathological changes. *Biomed Res Int.* 2014;2014:140165.
171. Izuo N, Nojiri H, Uchiyama S, Noda Y, Kawakami S, Kojima S, et al. Brain-Specific Superoxide Dismutase 2 Deficiency Causes Perinatal Death with Spongiform Encephalopathy in Mice. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:238914.
172. Lee H, Lee IS, Choue R. Obesity, inflammation and diet. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr.* 2013;16(3):143-52.
173. Deol P, Evans JR, Dhahbi J, Chellappa K, Han DS, Spindler S, et al. Soybean Oil Is More Obesogenic and Diabetogenic than Coconut Oil and Fructose in Mouse: Potential Role for the Liver. *PLoS One.* 2015;10(7):e0132672.
174. Yasui K, Baba A. Therapeutic potential of superoxide dismutase (SOD) for resolution of inflammation. *Inflamm Res.* 2006;55(9):359-63.
175. Kowald A, Lehrach H, Klipp E. Alternative pathways as mechanism for the negative effects associated with overexpression of superoxide dismutase. *J Theor Biol.* 2006;238(4):828-40.
176. Massaad, Cynthia A., Washington, Taneasha M. Pautler, Robia G., Klann, Eric. Overexpression of SOD-2 reduces hippocampal superoxide and prevents memory deficits

in a mouse model of Alzheimer's disease. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009;32(32):13576-81.

177. Noshita N, Sugawara T, Lewen A, Hayashi T, Chan PH. Copper-zinc superoxide dismutase affects Akt activation after transient focal cerebral ischemia in mice. Stroke. 2003;34(6):1513-8.

178. Salminen LE, Paul RH. Oxidative stress and genetic markers of suboptimal antioxidant defense in the aging brain: a theoretical review. Rev Neurosci. 2014;25(6):805-19.

179. Schriener SE LN, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, Coskun PE, Ladiges W, Wolf N, Van Remmen H, Wallace DC, Rabinovitch PS. Extension of Murine Life Span by Overexpression of Catalase Targeted to Mitochondria. Science 2005 308(5730):1909-11.

180. Crack PJ TJ, Flentjar NJ, de Haan J, Hertzog P, Iannello RC, Kola I. Increased infarct size and exacerbated apoptosis in the glutathione peroxidase-1 (Gpx-1) knockout mouse brain in response to ischemia/reperfusion injury. Journal of Neurochemistry. 2001;78(6):1389-99.

181. Forster JJ, Koglsberger S, Trefois C, Boyd O, Baumuratov AS, Buck L, et al. Characterization of Differentiated SH-SY5Y as Neuronal Screening Model Reveals Increased Oxidative Vulnerability. J Biomol Screen. 2016;21(5):496-509.

182. Terry L Riss P, Richard A Moravec, BS, Andrew L Niles, MS, Sarah Duellman, PhD, Hélène A Benink, PhD, Tracy J Worzella, MS, and Lisa Minor. Cell Viability Assays: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2013.

Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>.

183. Protocol Guide: MTT Assay for Cell Viability and Proliferation Sigma-Aldrich [cited 2019 13.05]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/roche/cell-proliferation-kit-i-mtt.html>.

184. Van Vranken JG, Na U, Winge DR, Rutter J. Protein-mediated assembly of succinate dehydrogenase and its cofactors. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2015;50(2):168-80.

185. Real-Time PCR: Understanding Ct: Thermo Fisher Scientific; [Available from: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html>].
186. Real-Time PCR Applications Guide. Bio-Rad Laboratories 2006.
187. Urska Cepin P. Understanding qPCR Efficiency and Why It Can Exceed 100% Biosistemika 2017 [Available from: <https://biosistemika.com/blog/qpcr-efficiency-over-100/>].
188. Suslov O, Steindler DA. PCR inhibition by reverse transcriptase leads to an overestimation of amplification efficiency. *Nucleic Acids Research*. 2005;33(20):e181.
189. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009;1(6):a001651.
190. Shih RH, Wang CY, Yang CM. NF-kappaB Signaling Pathways in Neurological Inflammation: A Mini Review. *Front Mol Neurosci*. 2015;8:77.
191. Milgram WN. Central Nervous System Diseases: Innovative Animal Models from Lab to Clinic. *J Psychiatry Neurosci*. 2002;27(4):292–3

