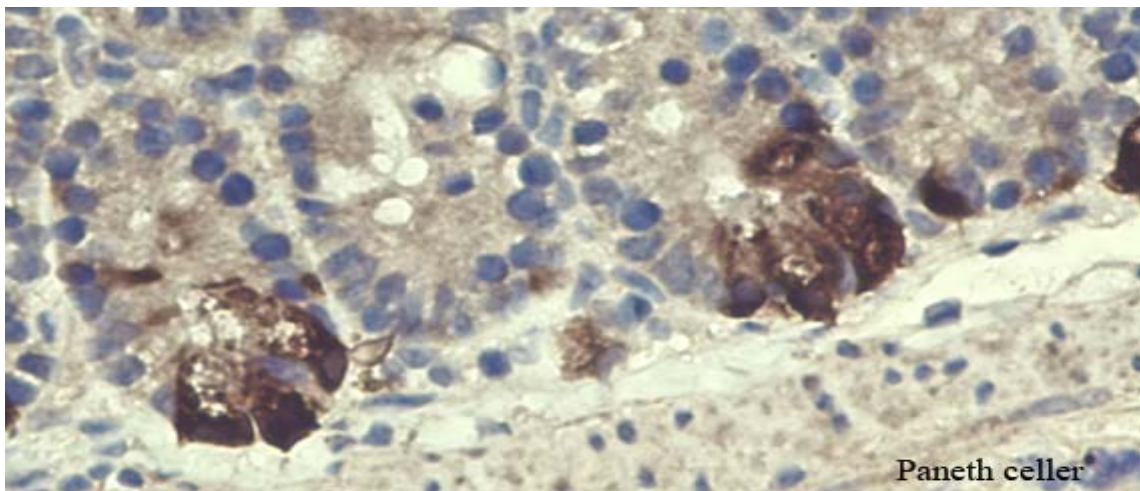


MASTERGRADSOPPGAVE

Toksikologi
2005

**Betydningen av paneth
celler for PhIP-indusert
svulstutvikling i tarmen
hos Min-mus**



av
Camilla Svendsen

FORORD

Masteroppgaven ble utført på Nasjonalt folkehelseinstitutt, Divisjon for miljømedisin, Avdeling for næringsmiddel toksikologi. Formålet med prosjektet var å undersøke betydningen av paneth celler for PhIP-indusert svulstutvikling i Min-mus.

Jeg vil først og fremst rette en takk til min hovedveileder Trine Husøy, som har vært til stor hjelp både under utføringen av den eksperimentelle delen og under skriveprosessen. Hun har med sitt gode humør og pågangsmot gitt meg motivasjon gjennom hele dette året. TAKK!

Videre ønsker jeg å takke Ewa Andruchov for utføring av genotypingen og Victor Ongh og Kari Gulbrandsen Løken for god hjelp på dyrestallen. Jeg vil også takke Hege Hjertholm og Jan Aleksander for konstruktiv kritikk til oppgaven.

Dette siste året har vært både spennende og utfordrende, og læringsutbyttet har vært stort! Det er en utrolig lettelse endelig å være ferdig, men samtidig litt vemodig.

Lindern, september 2005

Camilla Svendsen

SUMMARY

Mutations in the tumour suppressor gene *adenomatous polyposis coli* (APC), resulting in truncated APC protein, are important in the development of both sporadic (> 80%) and inherited (familial adenomatous polyposis; FAP) colon cancer. Multiple intestinal neoplasia (Min) mice with heterozygous mutations in the *Apc* gene, a model for FAP, spontaneously develop hundreds of adenomas in the small intestine. Although the adenomas originate from the enterocytes in the intestinal epithelia, progression of the adenoma development may be affected by several additional factors such as changed function of other types of epithelial cells. Paneth cells are found in the bottom of the crypt in the small intestine. Their main function is to secrete antibacterial peptides into the intestine which participate in the regulation of the bacterial growth. It is previously shown that Min-mice have changes in the secretion from paneth cells, but the significance of this change on the adenoma growth in Min-mice is not known. Alterations in the bacterial growth in the intestine may also affect the metabolism of compounds in the intestine, and also of bioactivation of toxic compounds in food like heterocyclic amines (HA). We examined the effect of reduced development of paneth cells and consequently reduced secretion of antibacterial peptides on adenoma development in the small intestine of wild type (wt) mice and Min-mice. Additionally we studied whether the effect of the HA, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP), on adenoma development in Min-mice increased as a function of reduced development of paneth cells. Min-mice were crossed with the transgenic Paneth-mice, which have delayed development of paneth cells caused by the transfection of a *diphtheria toxin* gene into paneth cells. The offspring was given a subcutaneous injection of PhIP. The results showed that delayed development of paneth cells had no significant effect on adenoma development neither in untreated wt mice nor in PhIP treated wt mice. Most interestingly the delayed paneth cell development significantly increased the number of adenomas in the Min-mice when treatment was not taken into account. We also found a strong tendency that reduced number of paneth cells increased the effect of PhIP on adenoma development in Min-mice, although the increase did not reach statistical significance. The conclusion is that delayed development of paneth cells increases the adenoma development in Min-mice as a function of heterozygous *Apc* mutation, and that it may increase the potency of PhIP as a mutagen in the intestine.

INNHOLDSFORTEGNELSE

1.0 INNLEDNING	6
1.1 ARVELIG TARMKREFT.....	7
1.1.1 <i>Familiær Adenomatøs Polypose (FAP)</i>	7
1.1.2 <i>Adenomatøs Polyposis Coli (APC)</i>	8
1.2 SPORADISK TARMKREFT.....	9
1.3 KOSTHOLD OG TARMKREFT.....	10
1.4 HETEROSYKLISKE AMINER (HA).....	10
1.4.1 <i>Effekter på mennesker</i>	11
1.4.2 <i>Dannelse av HA</i>	11
1.4.3 <i>Metabolisering</i>	13
1.4.4 <i>PhIP (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine)</i>	14
1.5 TYNNTARM.....	16
1.5.1 <i>Paneth celler</i>	17
1.5.2 <i>Tarmflora</i>	18
1.6 DYREMODELLER.....	18
1.6.1 <i>Min-mus (Multiple intestinal neoplasia)</i>	19
1.6.2 <i>Paneth-mus</i>	19
1.7 DYREFORSØK OG ETIKK.....	19
1.8 PROBLEMSTILLING.....	21
2.0 MATERIAL OG METODE	22
2.1 AVL AV MIN-MUS.....	22
2.2 AVL AV PANETH-MUS.....	22
2.3 FORSØKET.....	23
2.3.1 <i>Eksperimentell behandling av dyrene</i>	23
2.3.2 <i>Uttak av biologiske prøver</i>	24
2.3.3 <i>Analyse av genotype ved hjelp av PCR og gelelektroforese</i>	24
2.3.4 <i>Telling av svulster</i>	27
2.4 PREPARATER.....	28
2.4.1 <i>Telling av panethceller</i>	28
2.5 STATISTISK ANALYSE.....	28
3.0 RESULTATER	30
3.1 AVLSREGNSKAP.....	30
3.2 VEKT VED AVLIVNING.....	31
3.3 ANTALL PANETHCELLER PER KRYPT.....	32
3.4 EFFEKT AV PHIP OG PANETH CELLER I WT-MUS.....	33
3.5 EFFEKT AV PHIP PÅ MIN-MUS.....	33

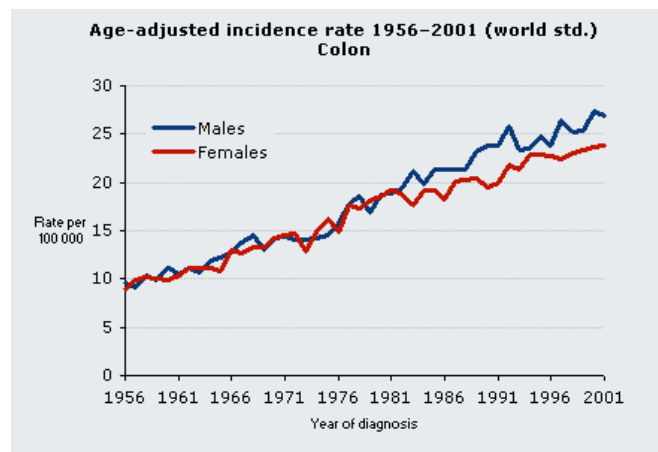
3.5.1 Antall svulster.....	33
3.5.2 Gjennomsnittlig svulststørrelse	34
3.6 EFFEKT AV PANETHCELLER PÅ SVULSTUTVIKLING I MIN-MUS	36
3.6.1 Antall svulster.....	36
3.6.2 Gjennomsnittlig tumorstørrelse	39
4.0 DISKUSJON.....	41
4.1 EFFEKT AV PHIP	41
4.2 EFFEKT AV PANETH CELLER PÅ SVULSTUTVIKLING	42
4.3 EFFEKT AV PANETHCELLER PÅ METABOLISME AV PHIP	43
4.4 ANTALL PANETH CELLER PER KRYPT	45
5.0 KONKLUSJON.....	46
5.1 VIDERE ARBEID	46
6.0 REFERANSELISTE.....	47

1.0 INNLEDNING

Kreft er en sykdomsgruppe som karakteriseres av ukontrollert vekst og spredning av unormale/skadede celler. De normale reguleringsmekanismene som kontrollerer cellevekst, celledød og differensiering er forstyrret som følge av mutasjoner i DNA. Tarmkreft er den vanlige betegnelsen på ondartede svulster i tykktarmen eller endetarmen (HELSE BERGEN, 2003).

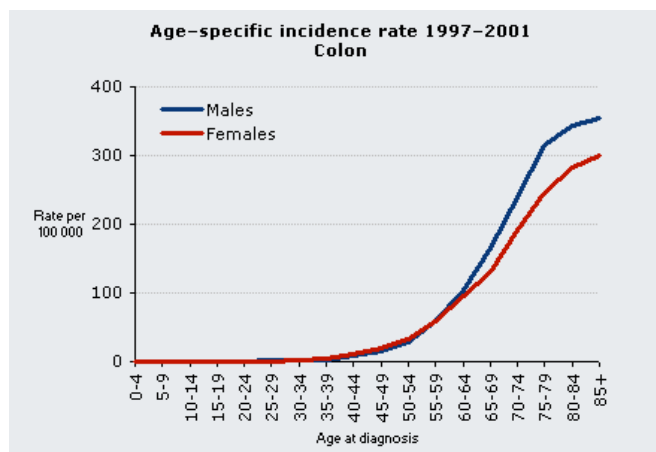
Tarmkreft er den nest hyppigste kreftformen i vesten/industriland, men er sjelden i utviklingsland (World Health Organization, 2003b). Kostholds-relaterte faktorer kan stå for opptil 80 % av ulikhetene mellom landene (World Health Organization, 2003a). Migrerende populasjoner får raskt like høy risiko som populasjonen i det nye landet, noe som tyder på at miljøfaktorer/ kosthold spiller en stor rolle (World Health Organization, 2003b)

Tarmkreft er den hyppigste kreftformen i Norge med 3.291 nye tilfeller i 2002, og Norge har høyest forekomst av tarmkreft i Norden. Blant menn var det 1026 nye tilfeller av tykktarmskreft og 622 nye tilfeller av endetarmskreft. De tilsvarende tallene for kvinner var 1179 og 464. Tynntarmskreft er mye mer sjeldent med 108 nye tilfeller i 2002 (Kreftregisteret, 2002).



Figur 1. Aldersjusterte insidensraten av tykktarmskreft i Norge fra 1956-2001 (Kreftregisteret, 2001).

Av Figur 1 ser vi at risikoen for å få tykktarmskreft i Norge har økt kraftig siden 1956. Fordelingen mellom menn og kvinner er ganske jevn, men med litt høyere hyppighet hos menn de siste årene.



Figur 2. Oversikt over antall tilfeller av tykktarmskreft hos ulike aldersgrupper i tidsrommet 1997-2001 (Kreftregisteret, 2001).

Vi ser at det er få tilfeller av tykktarmskreft hos personer under 40 år, og deretter stiger kurven kraftig (Figur 2). Her ser vi også at menn har hatt en litt høyere forekomst av tykktarmskreft enn kvinner de siste årene.

1.1 Arvelig tarmkreft

Med arvelig kreft menes kreft som skyldes en medfødt skade på et enkelt gen (mutasjon) som fører til høyere kreftrisiko. Tykktarmskreft forekommer vanligvis sporadisk, og man antar at bare 5-10 % av tilfellene er arvelige. Alle former for arvelig tykktarmskreft nedarves etter et autosomt dominant arvemønster. Det vil si at barn av en person med påvist genfeil har 50 % risiko for å arve genfeilen (HELSE BERGEN, 2003). De to arvelige kreftsykdommene som er best studert er Familiær Adenomatøs Polypose (FAP) og Hereditær Non-Polypos Colorectal Cancer (HNPCC). HNPCC skyldes mutasjon i DNA mismatch repair (MMR) gener (Behrens and Lustig, 2004).

1.1.1 Familiær Adenomatøs Polypose (FAP)

FAP er en sjelden type av arvelig tykktarmskreft, hvor pasientene har en nedarvet mutasjon i det ene allelet av tumorsuppressorgenet *APC* (Narayan and Roy, 2003). Siden det ene allelet allerede er skadet vil det andre allelet være ekstra utsatt for ytterligere skade for eksempel fra miljøpåvirkning (Kinzler and Vogelstein, 1996). Sykdommen kjennetegnes ved at det dannes hundre- til tusentalls polypper (adenomer) i tarmen. Adenomer er vortelignende utvekster på tarmslimhinnen (HELSE BERGEN, 2003). I adenomene er begge allelene av *APC* skadet. I

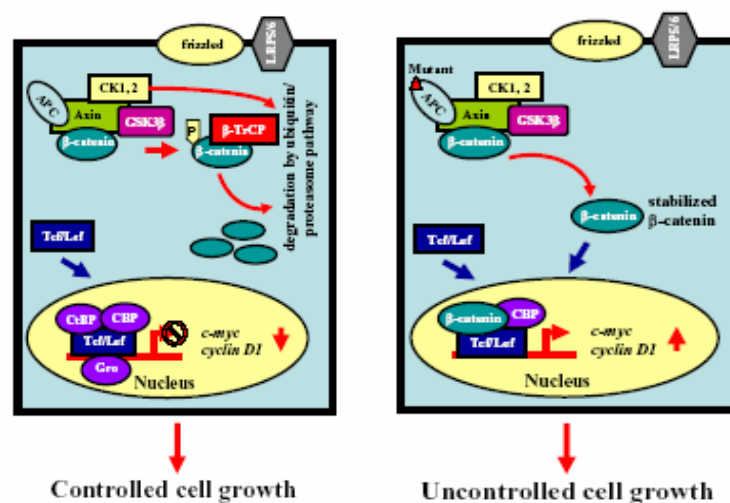
motsetning til sporadisk tykktarmskreft som oftest inntreffer sent i livet, utvikler personer med FAP polypper i løpet av de første tiårene i livet. I utgangspunktet er disse polyppene godartede, men noen av dem vil før eller siden utvikle seg til ondartede svulster hvis de ikke blir fjernet (Varesco, 2004).

1.1.2 Adenomatøs Polyposis Coli (APC)

APC er et 310 kDa protein som blir uttrykt i det normale tarmepitelet og er lokalisert både i cytoplasma og cellekjernen (Narayan and Roy, 2003).

Funksjonen til APC i tarmen er bare delvis avklart. APC er en viktig komponent i Wnt-signalveien. Wnt-signalveien er viktig i regulering av cellevekst og differensiering. APC vil i samarbeid med glykogen syntase kinase-3 β (GSK-3 β) og aksin fosforylere og bryte ned fritt β -katenin (Figur 3). β -Katenin fungerer både som adhesjons molekyl og transkripsjonsfaktor. Mutasjon i APC genet hemmer APC -kompleksets evne til å binde β -katenin, slik at β -katenin akkumuleres i cellekjernen og stimulerer transkripsjonen av Wnt målgener (Figur 5).

Resultatet blir ukontrollert celleproliferasjon som promoterer utvikling av kreft. Begge APC allelene må gå tapt før dette skjer (Alberts, 2002).



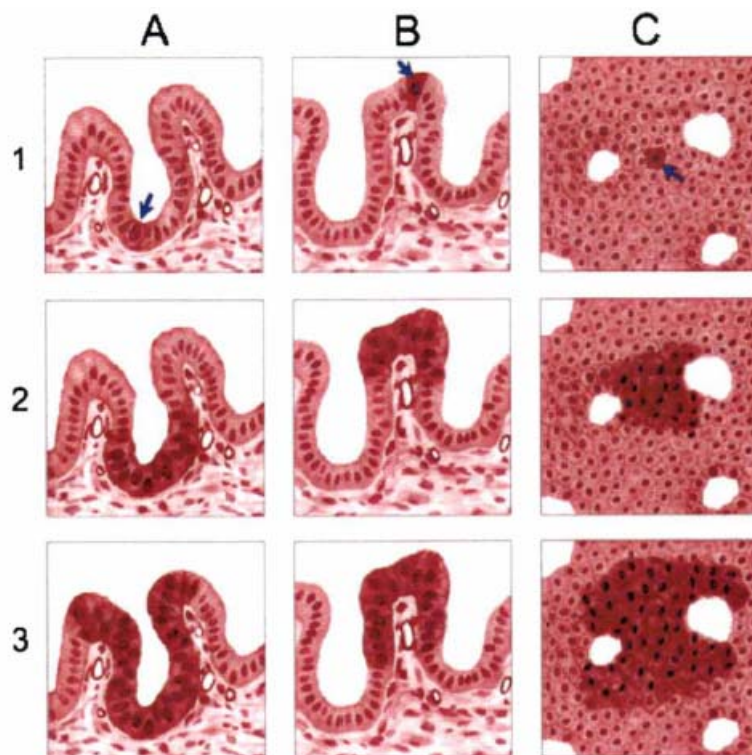
Figur 3. Wnt signalisering ved kontrollert cellevekst og ukontrollert cellevekst når APC er mutert. (Narayan and Roy, 2003)

Det er også vist at APC-proteinet kan binde direkte til mikrotubuli og delta i regulering av polymerisering/depolymerisering av mikrotubuli. Som følge av dette er det vist at homozygot mutasjon i APC fører til forstyrrelser i kromosom deling som igjen fører til kromosom instabilitet (Kaplan et al., 2001; Fodde et al., 2001). Det er derimot tilstrekkelig med

heterozygot mutasjon i *APC* for å få endringer i mikrotubulipolymeriseringen (Husoy et al., 2003; Green and Kaplan, 2003).

1.2 Sporadisk tarmkreft

Mutasjoner i *APC* er ikke bare involvert i arvelig tarmkreft. Mer enn 80% av sporadisk utviklede adenomer i tarmen har mutasjoner i *APC* (Powell et al., 1992; Miyoshi et al., 1992). Dette tyder på at mutasjon i *APC* er en svært tidlig og viktig forandring også i utvikling av sporadisk tarmkreft. Det antas at sporadisk tarmkreft starter ved at først det ene og så det andre *APC*-allelet muteres eller tapes som følge av ytre påvirkning, deretter følger ytterligere skader i DNA. Det er en vanlig oppfatning at en enkelt epitelcelle blir skadet og prolifererer slik at transformerte celler til slutt dekker en eller flere krypter, kalt dysplastiske krypter (Figur 4).



Figur 4. Modell for utvikling av sporadiske adenomer i tarmen. (A) Transformasjon av en enkelt epitelcelle i krypten som følge av *APC* mutasjon. Transformert celle prolifererer og transformerte celler beveger seg oppover krypten og over i nabokrypter. (B) Samme forløp som (A), men her skjer mutasjonen øverst i krypten og sprer seg nedover. (C) Overflatebilde av spredningen av transformerte celler til dysplastiske krypter. (Shih et al., 2001).

1.3 Kosthold og tarmkreft

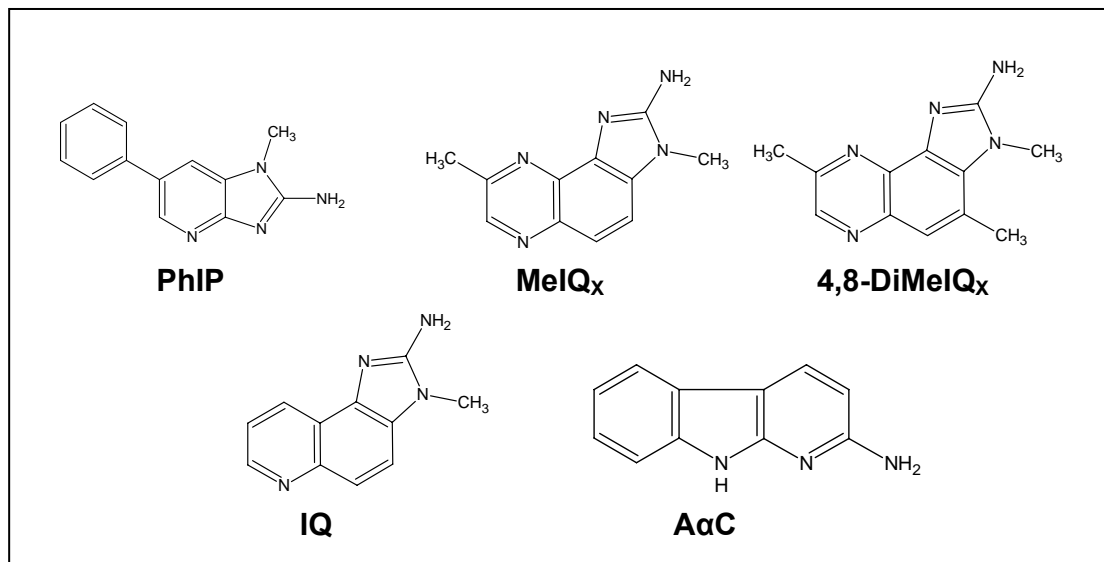
Epidemiologiske undersøkelser viser at kosthold og miljøfaktorer både fremmer og hemmer utvikling av tarmkreft. Vi antar at de tidlige stadiene i kreftutvikling er reversible, og at kostholdsfaktorer har størst betydning i denne fasen av sykdomsutviklingen. Høyt inntak av frukt og grønnsaker er assosiert med redusert risiko for en rekke kreftsykdommer. Hvilke komponenter som er ansvarlig for denne beskyttende effekten er ikke avklart. Potensielle beskyttende faktorer inkluderer ulike karotenoider, folat, vitamin C, flavenoider, phytoestrogen, isothiocyanater og fiber (Willett, 2000).

På den andre siden kan ulike typer mat øke kreftrisikoen. Stort inntak av kjøtt, fett og alkohol er antatt å øke risikoen for kreft, muligens ved økt dannelse av frie radikaler. Maten kan også inneholde komponenter og/eller fremmedstoffer som øker risikoen for kreft. Behandling av mat ved høy temperatur, for eksempel grilling av kjøtt og steking av poteter og brød, kan føre til dannelsen av mutagene og kreftfremkallende stoffer i maten som heterosykliske aminer (se nedenfor) og akrylamid. I tillegg kan maten inneholde kreftfremmende stoffer som tungmetaller, pesticider og andre kontaminanter (Berlau et al., 2004).

1.4 Heterosykliske aminer (HA)

En svensk forsker, Widmark, ved Lund Universitet rapporterte allerede i 1939 at stekt hestekjøtt førte til svultstdannelse når det ble påført på huden til mus (Skog, 2003).

HA ble først identifisert på overflaten av stekt kjøtt og fisk av Sugimura og hans kolleger i Japan i 1977. Eksperimenter viste at forbindelsene var potente mutagene, dvs. forbindelsene ga mutasjon eller forandring i det genetiske materialet. Stoffene er blant de mest potente som finnes i *Salmonella typhimurium* testene. Mange mutagene stoffer er også kreftfremkallende i dyreforsøk. I senere studier er det blitt vist at HA kan gi kreft i mange ulike vev i mus og rotter. En av disse, 2-amino-1-metyl-6-fenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) forårsaker svulster i tykktarm, prostata og bryst hos rotter. 20 ulike heterosykliske aminer er identifisert fra stekt eller grillet kjøtt og fisk (Reistad, 1999).



Figur 5. Kjemisk struktur av fem heterosykliske aminene som man mener kan utgjøre størst kreftrisiko (Berner, 1995).

1.4.1 Effekter på mennesker

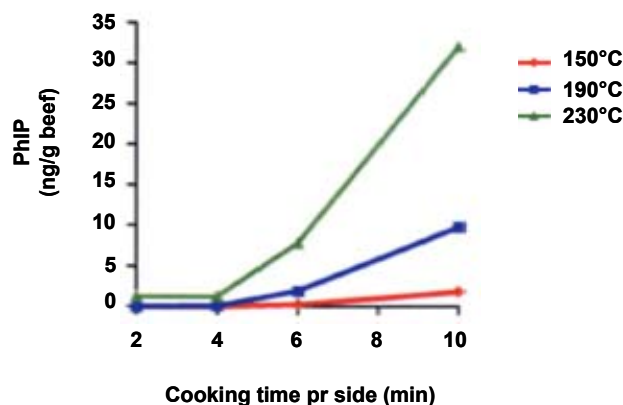
Epidemiologiske studier viser en sammenheng mellom høyt inntak av rødt kjøtt, steking og kreft i tykktarm, bryst og prostata. HA kan være en medvirkende årsak (Reistad, 1999).

I 1995 fikk en gruppe forskere i oppgave av ”National Cattlemen`s Beef Association” å regne ut risikoen for at en gjennomsnittlig amerikaner skal få kreft i løpet av levetiden grunnet inntak av HA. Risikoen ble estimert til å være 0,01 %, altså 1 av 10.000. Dette estimatet blir ansett som relativt lavt, men ikke ubetydelig (Berner, 1995). Hvor stor risikoen kan være er fortsatt ikke avklart.

1.4.2 Dannelse av HA

Heterosykliske aminer dannes i små mengder når mat varmebehandles ved temperatur over 150 °C (Reistad, 1999). Steketiden og steketemperaturen har størst betydning for konsentrasjonen av heterosykliske aminer i stekt kjøtt og fisk (Reistad, 1999).

Tilberedningsmåte og type kjøtt påvirker også konsentrasjonen. Kontakt med varmekilden, som for eksempel grilling eller steking i stekepanne, vil gi større konsentrasjon av HA enn ved koking og ovnssteking.



Figur 6. Viser sammenhengen mellom tid/temperatur og dannelse av PhIP (Berner, 1995).

Nivå av HA stiger med økende temperatur og tid (Figur 6). Mat tilberedt ved temperaturer under 150°C har generelt lavt innhold av HA. Dannelse av heterosykliske aminer øker progressivt når temperaturen øker. Dannelse av HA øker også med steketiden, altså jo lengre tid maten blir tilberedt ved temperaturer over 150-160 °C, desto mer HA blir dannet.

HA kan dannes på to ulike måter. Den viktigste veien er reaksjon mellom enkelte aminosyrer, sukker og kreatin eller kreatinin under høye temperaturer. Kreatin finnes i muskelvev, og finnes følgelig i kjøtt fra storfe, gris, kylling og fisk. Kreatin er en forbindelse som kan binde energi som fosfat og inngår i energi-metabolismen i musklene. Kreatinin er et nedbrytningsprodukt fra kreatin i musklene og skilles ut i urin (Berner, 1995). HA kan også dannes når proteiner eller enkelte aminosyrer utsettes for høye temperaturer. All proteinholdig mat kan derfor potensielt inneholde HA. Til slik dannelse trengs det betydelig høyere temperatur enn det som vanligvis brukes ved matlaging.

Ved kort oppvarming i mikrobølgeovnen avgir kjøttet vandig væske som inneholder aminosyrer og kreatin. Ved å fjerne denne væsken eliminerer man en del av kreatinet. Når kjøttet så stekes viser det seg å inneholde signifikant lavere mengde av HA. Tilsetting av kreatin fører derimot til mer HA. Dette tyder på at kreatin er den begrensende faktoren under dannelsen av HA (Weisburger, 2002).

En rekke studier, tyder det på at maillard-reaksjonen og fri-radikal reaksjoner er involvert i dannelsen av HA (Skog, 2003). Tilsetting av antioksidanter under steking kan derfor redusere mengden av HA (Goldman and Shields, 2003).

Tabell I En oversikt over mengde PhIP i ulike kjøtt og fiske produkter (Berner, 1995).

Matvare	PhIP (ng/g produkt)
Hamburger, stekt	0-32
Biff, stekt	0,6-48,5
Kyllingbryst, stekt	12-70
Kyllingbryst, grillet	27-480
Fisk, stekt	1,7-69
Fast food hamburgere	0,1-0,6
Fast food kyllingbryst (sandwich)	0
Fast food fisk (sandwich)	0

Vi ser at grillet kylling inneholder høyest konsentrasjon av PhIP. ”Fast food” generelt har derimot lavt PhIP-innhold. Dette kan skyldes kort tilberedningstid og/eller moderate temperaturer.

1.4.3 Metabolisering

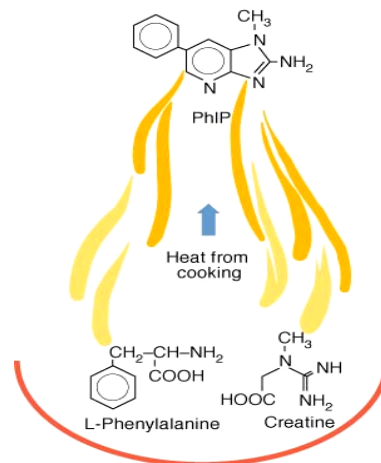
De heterosykliske aminene er ikke mutagene i seg selv, men bioaktiveres i kroppen. HA bioaktiveres hovedsakelig i leveren. Det første trinnet i bioaktivering er hydroksilering, av den eksosykliske aminogruppen. Hydroksileringen blir primært katalysert av CYP1A2, men også andre CYP-enzymmer kan være involvert. N-hydroksi derivatene er vanligvis ikke så reaktive at de binder seg til DNA. De aktiveres derfor gjennom esterifisering av hydroksaminet, hyppigst ved acetylering eller sulfatering. Disse reaksjonene katalyseres av N-acetyl transferaser og sulfotransferaser. Enzymene finnes i flere varianter og de er polymorfe, det vil si de kan variere mellom enkeltindivider. Bare bestemte N-acetyl- og sulfotransferaser katalyserer disse reaksjonene. N-hydroksiesterne er lite stabile og kan dekomponere til reaktive nitreniumioner som man mener er den ultimate reaktive metabolitten som binder seg til baser i DNA og danner såkalte addukter. N-hydroksi-forbindelsene har i de fleste tilfeller vist seg å være direkte mutagener i Salmonella testen uten tilsats av bioaktiveringsenzymmer fra lever. Dette skyldes at Salmonella inneholder N-acetyltransferase som svært effektivt acetylerer N-hydroksiforbindelsene.

Hydroksilering av karbonatomene som sitter i ringstrukturen til de heterosykliske aminene fører til en detoksifisering av HA. Disse kan igjen konjugeres til glukuronsyre eller sulfat av transferaser. Igjen er det bestemte transferaser som har høyest aktivitet. Nitrogrupper i ringstrukturen kan konjugeres direkte til glukuronsyre. Små mengder umetabolisert HA eller metabolitter kan skilles ut i urin (Weisburger, 2002); (Goldman and Shields, 2003).

Aktiviteten av CYP1A2 kan variere fra person til person. Høy aktivitet av CYP1A2 og høy aktivitet av N-acetyl- og sulfotransferase kombinert med høyt inntak av HA-holdig mat kan gi økt kreftrisiko (Eaton et al., 1995).

1.4.4 PhIP (2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine)

PhIP er det heterosykliske aminet som dannes i størst mengde, og har vist seg og gi kreft i tykktarm, prostata og bryst hos rotter. Disse kreftformene er de man forbinder med et vestlig kosthold. Hos mennesker gir PhIP-DNA addukter i flere ulike vev, blant annet i tarmen (Turteltaub et al., 1999; Steffensen et al., 2001).



Figur 7. Dannelse av PhIP

PhIP dannes ved en reaksjon mellom aminosyren L-fenylalanine og kreatin (figur 7) med tilstedeværelse av glukose. Glukose konsentrasjonen er av betydning for dannelsen av PhIP, og glukose kan både hemme eller fremme dannelsen av PhIP. Ved større mengder glukose, vil kreatinet bli maskert/dekket, slik at det ikke kan reagere med aminosyren (Murkovic, 2004).

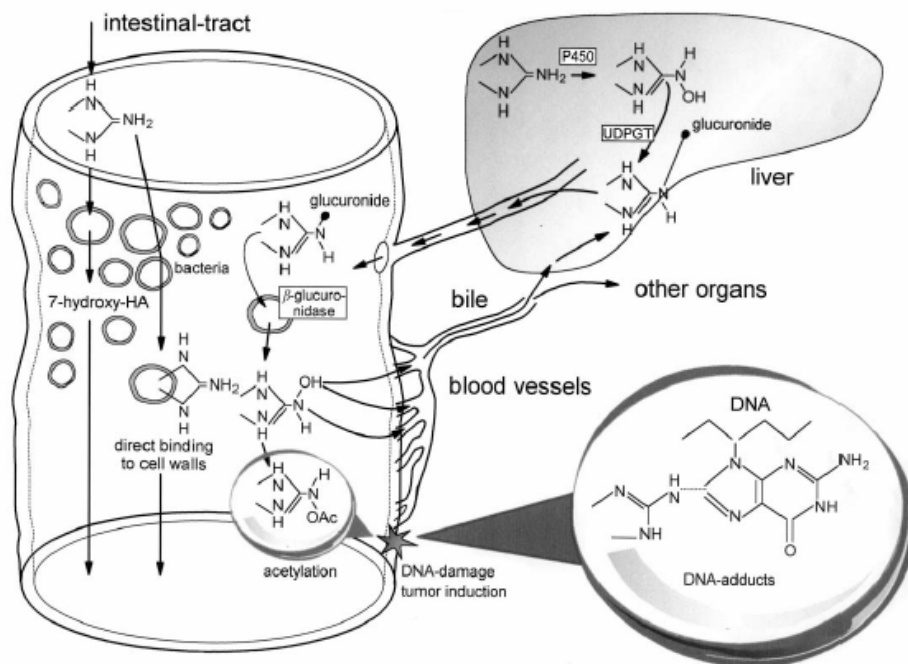
Bioaktiveringen av PhIP er avhengig av CYP1A2 i leveren som gir N-hydroksilering til 2-hydroksiamino-1-metyl-6-fenylimidazo[4,5]pyridine (2-hydroksiamino-PhIP). 2-hydroksiamino-PhIP er direkte virkende genotoksisk for pattedyrceller (Alexander et al., 1991). Denne metabolitten blir metabolisert videre av fase II sulfotransferaser og/eller acetyltransferaser som gir elektrofile O-sulfonyl- eller O-acetyl estere. Disse esterene er som nevnt i stand til heterolytisk spaltning for å generere det reaktive nitrenium ionet som er ansett som den ultimate karsinogene forbindelsen (Malfatti et al., 2005).

UDP-glukuronosyltransferase mediert glukuronidering av 2-hydroksiamino-PhIP kan konkurrere med aktiveringsveien ved å gi opphav til de mindre reaktive forbindelsene N-

hydroksi-PhIP-N²-glukoronid og N-hydroksey-PhIP-N³-glukoronid. UDP-glukuronosyltransferase mediert glukuronidering er en dominant metaboliserings vei for PhIP. UDP-glukuronosyl-transferaser er en superfamilie av membranbundne enzymer som katalyserer glukuronideringen av mange endogene og xenobiotiske forbindelser. Glukuronideringen er en spesielt viktig detoksifiserings vei for reaktive mellomprodukter fra metabolske reaksjoner, som ellers kunne blitt biotransformert til enda mer reaktive cytotoksiske eller karsinogene forbindelser. (Malfatti et al., 2005)

De glukuroniderte forbindelsene kan bli utskilt gjennom urin eller galle. Det dannes to ulike glukuronider, N² – og N³- glukuronid av 2-hydroksiamino-PhIP. Disse har en molekylvekt på 434 daltons noe som vil tilsi at disse metabolittene fortrinnsvis vil bli utskilt med galle fremfor i urin. (Alexander et al., 1991)

Ved utskillelse med gallen, når disse forbindelsene tarmen, hvor særlig N³- glukuronidet kan bli dekonjugert av bakterie β-glukuronidase, noe som fører til regenerering av 2-hydroksiamino-PhIP (Malfatti et al., 2005). Både tarmfloraen til mennesker og rotter katalyserer denne hydrolysen (Alexander et al., 1991). Enkelte bakterier har evnen til å direkte binde heterosykliske aminer til celleveggen, og på denne måten uskadeliggjøre dem.



Figur 8. En oversikt over interaksjoner mellom tarmfloraen og heterosykliske aminer (Knasmuller et al., 2001).

1.5 Tynntarm

Tynntarmen er stedet hvor praktisk talt alle næringsstoffer blir absorbert til blodet.

Tynntarmen blir delt inn i tre deler: duodenum, jejunum og ileum. Epitelet i tynntarmen består av fire hovedtyper celler: enterocytter, enteroendokrine celler, goblet celler og paneth celler.

Tarmen har stor overflate, dette skyldes tarmtotter og mikrovilli som dekker epitelcellene.

Tarmtottene er utvekster inn i lumen og er dekket hovedsakelig av modne absorptive enterocytter, men også noen få goblet celler. Enterocyttene utgjør 90-95% av antall celler, mens de tre andre celletypene utgjør bare en liten del. Rundt tarmtottene er det vollegrav lignende innsynkninger av epitelet, dette kalles "Krypts av Lieberkûhn".

Stamcellene er lokalisert like over krypt basen. Disse cellene deler seg kontinuerlig og er kilden til alle epitelcellene i krypten og tarmtotten. Hovedparten av dattercellene vandrer oppover tarmtotten og differensieres til enterocytter, enteroendokrine og goblet celler.

Vandringen tar 2-5 dager. På toppen av tarmtotten blir disse cellene fjernet enten ved apoptose og/eller eksfoliasjon. En liten del av dattercellene vandrer nedover til bunnen av krypten, hvor de modnes til paneth celler (Fenoglio-Preiser, 1999).

Enterocyttene tar opp og leverer næringsstoffer til blodet. Disse cellene er polariserte med to strukturelt og funksjonelt ulike plasmamembran områder: den apikale membranen og den basolaterale membranen. Enterocytter har mikrovilli, som varierer i lengde avhengig alderen til cellen (Fenoglio-Preiser, 1999).

Enteroendokrine celler finnes i mage og tynntarm, og har som funksjon å produsere hormoner som blir skilt ut i blodet. Det finnes mer enn 20 ulike undergrupper av enteroendokrine celler, og sammen danner de et diffust enteroendokrint organ (Fenoglio-Preiser, 1999).

Hovedfunksjonen til goblet celler er å sekretere slim, en viskøs væske bestående hovedsakelig av glykosylerte proteiner kalt "mucins" løst i en løsning av elektrolytter. Sekresjon av slim skjer ved eksocytose fra sekretoriske vesikler. Slimet har mange funksjoner, inkludert beskyttelse mot stress og kjemisk ødeleggelse. Goblet celler øker i antall utover i tarmen, med flest antall i ileum (Fenoglio-Preiser, 1999).

1.5.1 Paneth celler

I de fleste pattedyr, inkludert mennesker og gnagere, er paneth cellene lokalisert i tynntarmen til basen av krypten (Mathan et al., 1987). Kryptene i tykktarmen inneholder ikke paneth celler. Hver krypt inneholder 30-50 modne paneth celler, som lever i 18-23 dager før de blir fagocyttert av naboceller. Paneth cellene finnes i økende antall fra duodenum til ileum. (Fenoglio-Preiser, 1999).

Paneth cellene stimuleres til å skille ut defensiner når de blir eksponert for bakterier eller bakterielle produkter som lipopolysakkarider, ”muramyl” dipeptid og lipid A (Ouellette and Bevins, 2001). Paneth celler i både mennesker og gnagere produserer lysozym, fosfolipase A2 (sPLA2) og α -defensiner, som alle har antimikrobiell aktivitet (Ouellette and Selsted, 1996). Humane paneth celler koder for to α -defensiner; HD-5 og HD-6, mens mus uttrykker flere ulike α -defensiner, som blir kalt for kryptdiner.

De antimikrobielle peptidene som skilles ut av paneth celler har hydrofobe og positivt-ladete områder som kan reagere med fosfolipider i cellemembranen. Denne strukturen tillater peptidene å feste seg på membranen, hvor de kan danne porer som forstyrrer membranfunksjonen, og som videre fører til celledød. På grunn av høyere konsentrasjon av negativt-ladete fosfolipider i bakteriemembraner enn i vertebratmembraner, binder peptidene seg først og fremst til bakteriemembraner (Ganz, 1999).

Defensinene blir skilt ut som uaktiverede peptider. Disse prodefensinene aktiveres ved spaltning av matrilysin, som er en type matriks metalloproteinase og blir produsert av paneth cellene i tynntarmen hos mus. En studie viste at eksponering for bakterier, induverte og aktiverte matrilysin i paneth cellene (Lopez-Boado et al., 2000).

Tilgjengelig litteratur indikerer også at produkter fra paneth cellene påvirker sammensetningen av tarmfloraen og antall bakterier som koloniserer tynntarmen (Ouellette and Bevins, 2001).

Den umodne tarmen hos nyfødte mus mangler differensierte paneth celler, men det finnes celler i epitelet som uttrykker kryptdin gener og akkumulerer peptidene (Bry et al., 1994).

1.5.2 Tarmflora

Tarmen er steril ved fødsel, koloniseringen begynner vanligvis noen få timer etter fødselen (Fenoglio-Preiser, 1999). Mageregionen har et lavt bakterieantall. De få bakteriene som finnes der er fakultativt anaerobe, som for eksempel laktobasiller, streptokokker og gjærsopper.

Bakterietettheten anslås til å være på rundt 100 CFU/ml (CFU= Colony Forming Units). Det lave bakterieantallet skyldes hovedsakelig lav pH i dette området. Tynntarmen har et høyere bakterieantall, hvor sammensetningen består av fakultativt anaerobe som laktobasiller, streptokokker og enterobakterier og obligat anaerobe som *Bifidobakterium* spp., *Bacteroides* spp. og clostridia. Her er bakterietettheten på rundt 10^4 - 10^8 CFU/ml.

Tykkertarmen er den delen av tarmen som har høyest bakterieantall. Her er bakterietettheten oppe i 10^{11} - 10^{12} CFU/ml (Rastall, 2004). Bakteriene i tykkertarmen er hovedsakelig obligat anaerobe, men man finner også fakultativt anaerobe. Blant de obligat anaerobe dominerer *Bacteroides* spp., clostridia og *Bifidobakterium* spp. Fakultativt anaerobe bakterier forekommer i 1000 ganger lavere tall, blant disse dominerer laktobasiller, enterokokker, streptokokker og *Enterobacteriaceae*. Gjærsopp finnes bare i lavt antall, 10^2 - 10^4 CFU/ml. (Gibson and Roberfroid, 1995).

Epidemiologiske studier og risiko vurderinger indikerer at tarmfloraen øker risikoen for kreft (Gorbach and Goldin, 1990). Sammenligning mellom bakteriefri og konvensjonelle dyr viser at tilstedeværelse av tarmflora er assosiert med økt dannelse av svulster i tykkertarm etter karsinogen behandling. Tarmfloraen kan også bidra til kreftutvikling ved å spalte konjugerte mutagene forbindelser, som har blitt inaktivert og skilt ut i gallen, og på denne måten får man en enterohepatisk sirkulering av forbindelsen (Hirayama et al., 2000).

Forskjeller mellom tarmfloraen til gnagere og mennesker har ikke blitt godt karakterisert. Men flere viktige musepatogener kan ikke kolonisere hos mennesker, for eksempel *Helicobacter hepaticus* og *Citrobacter rodentium*. Disse er begge to forbundet med enterokolitt, intestinal hyperplasi og svulstdannelse, og kan gi tarmkreft i flere dyremodeller (Solnick and Schauer, 2001).

1.6 Dyremodeller

I denne oppgaven har vi krysset to ulike dyremodeller, Min-mus og Paneth-mus.

1.6.1 Min-mus (Multiple intestinal neoplasia)

Min-musen har en nedarvet heterozygot mutasjon i kodon 850 i *Apc*, som fører til spontan utvikling av adenomer hovedsakelig i tynntarmen, men også i tykktarmen. Denne mutasjon er analog til den sett i mennesker med familiær adenomatøs polyposis (FAP) (Moser et al., 1993). Gjennomsnittlig levealder til Min-musen er 119 dager (Dietrich et al., 1993). I human sporadisk tarmkreft og arvelig tarmkreft er svulstene lokalisert til tykktarmen, i motsetning til svulstutviklingen hos Min-mus (Huycke and Gaskins, 2004).

Min-mus har lite inflammasjon i tarmen, likevel har forsøk vist at bakteriefri mus har opptil 50 % reduksjon i antall adenomer i tynntarmen (Dove et al., 1997).

1.6.2 Paneth-mus

Dette er transgene mus som har fått satt inn et svekket difteritoksin A fragment koblet til genet for humant vekst hormon (hGH) og nukleotidene -6500 til +34 av muse kryptdin-2 genet (CR2) i genomet (Garabedian et al., 1997). Kryptdin-2 genet uttrykkes bare i Paneth cellene i tarmen, og funksjonen av difteritoksinet vil bare gjøre seg gjeldende i disse cellene så lenge kryptdin-2 produseres. Dette vil føre til en forsinket utvikling av paneth celler. Mus som har fått overført konstruktet vil også ha hGH genet i alle celler i kroppen.

Fragment A fra difteritoksin (DT-A) ADP-ribosylerer og inaktiverer forlengelsesfaktor 2, noe som forårsaker hemming av proteinsyntesen og celledød (Garabedian et al., 1997). For å hindre at andre celletyper blir affektert, blir det brukt et svekket difteritoksin A fragment, med gly128 → Asp substitusjon, noe som reduserer toksinets styrke med 15-30 ganger (Maxwell et al., 1987). Dette svekkede toksinet ble valgt fordi det er lite sannsynlig at det vil gi celledød hvis det blir uttrykt i små mengder i ikke-målceller (Breitman et al., 1990).

1.7 Dyreforsøk og etikk

Dyreforsøk har til hensikt å finne svar på biologiske og medisinske spørsmål relatert til menneskers og dyrs helse (Hem et al., 2001).

Norske dyreforsøk reguleres av Dyrevernloven gitt av Landbruksdepartementet. I tillegg kommer bestemmelser i egen Forskrift om forsøk med dyr. Loven sier at forsøk på dyr ikke kan utføres uten tillatelse fra Forsøksdyrutvalget eller personer som har fått delegert myndighet fra dette (Smith, 1999).

De antatte lidelsene må oppveies mot de sannsynlige gevinstene i hvert eneste forsøk. Alternativer må alltid vurderes, og graden av smerte må minimaliseres. Alle dyr som har store lidelser som ikke kan lindres, må avlives straks (Hem et al., 2001).

Tabell II De tre R'ene skissert av Russel og Burch i 1959 gir en rettesnor for hvordan man skal ivareta forsøksdyrenes interesser (Hem et al., 2001).

Reduction	Reduksjon av antall dyreforsøk og antall dyr i hvert forsøk. (Bruke færrest mulig dyr, men likevel så mange at man får troverdige resultater).
Refinement	Forbedring av nødvendige forsøk, som innbefatter standardisering av dyremateriale og miljøfaktorer, samt reduksjon av smerte og stress hos forsøksdyrene. (Er dyret og dets miljø så godt kalibrert som mulig, og er forsøket godt planlagt? Har vi sørget for anestesi, smertelindring og korrekte teknikker?)
Replacement	Erstatning av dyr med andre metoder. (Må virkelig bruke forsøksdyr? Har vi vurdert alternativer? Kan vi bruke celleforsøk eller datastimulering?)

Det er kun lov til å drive dyreforsøk hvis man har de nødvendige tillatelsene: Godkjente lokaler, godkjent ansvarshavende og godkjente prosjektbeskrivelser (Hem et al., 2001). Ved Folkehelseinstituttet er disse kriteriene oppfylt. Dette forsøket ville aldri kunne la seg gjennomføre uten bruk av forsøksdyr, ettersom cellekulturer ikke vil kunne erstatte levende

tarmvev og dette vevets sammensetning av forskjellige celler. Av etiske grunner er denne type forskning også umulig å utføre på mennesker.

1.8 Problemstilling

Paneth celler er sekretoriske celler som skiller ut en rekke antimikrobielle peptider, som er med på å påvirke sammensetningen av tarmfloraen. Ved Avdeling for Næringsmiddel- toksikologi på Folkehelseinstituttet er det tidligere vist at Min-mus har endret sekresjon fra paneth cellene i tarmen (Husoy et al., 2004). Vi vet ikke om denne endringen i sekresjon kan påvirke svulstutviklingen i Min-mus. Vi ville derfor se om reduksjon i antall paneth celler i tarmen har betydning for utvikling av tarmkreft hos Wt- og Min-mus.

En eventuell endring i sammensetning av tarmfloraen kan påvirke metabolismen av stoffer i tarmen, og muligens også endre bioaktivering av toksiske stoffer. Det er tidligere vist at bioaktivering av HA øker ved tilstedeværelse av bakterier i tarmen. Vi tror at endret metabolisme av PhIP som følge av reduksjon i antall paneth celler kan føre til ytterligere økning i svulstdannelse hos Min-mus som følge av PhIP eksponering.

Første hypotese:

Forsinket utvikling av paneth celler i villtype mus og Min-mus vil føre til endring av svulstutviklingen i tarmen.

Andre hypotese:

Effekten av PhIP på svulstutvikling i tarmen hos villtype og Min-mus vil endres som følge av forsinket utvikling av paneth celler.

Hypotesene ble testet ved å krysse Paneth-mus med Min-mus, og eksponere avkommet for PhIP.

2.0 MATERIAL OG METODE

2.1 Avl av Min-mus

Multiple intestinal neoplasia musene (C57BL/6J^{Min/+}, kalt Min-mus) som ble benyttet i forsøket, ble avlet ved Nasjonalt folkehelseinstitutt. Musene kom opprinnelig fra The Jackson Laboratory i USA.

Bestanden av Min-mus ble opprettholdt ved å krysse C57BL/6J^{+/+} (villtype, Wt = genetisk normale mus, uten mutasjon i *Apc*) hunner med Min-hanner. Min-hunner er sjelden friske nok til å bære frem avkom fordi anemi og tarmsvulster virker inn på drektighet. Derfor ble Wt-hunner benyttet til å bære frem avkom.

2.2 Avl av Paneth-mus

Tilbakekryssing av CR2-tox176 FVB/N (Paneth) mus på C57BL/6J ble startet 07.03.03. CR2-tox176 C57BL/6J vil heretter bli kalt Paneth-mus. Tilbakekryssingen ble gjort over 8 generasjoner, dette var nødvendig for at musene skulle bli regnet som innavlede, og har lik genetisk bakgrunn som Min-musene. Avkom av mus med ulik genetisk bakgrunn vil være mer motstandsdyktige mot utvikling av tarmkreft, og sensitiviteten i forsøket vårt ville dermed blitt svekket.

CR2-tox176 FVB/N musene var en gave fra Prof. Jeffery Gordon ved Avdeling for Molekylærbiologi og Farmakologi ved Universitetet i Washington. Paneth-musene har fått satt inn et svekket difteritoksin A fragment koblet til genet for humant vekst hormon (hGH) og nukleotidene -6500 til +34 av muse kryptdin-2 genet (CR2) i genomet. Mus som har fått overført konstruktet vil også ha hGH genet i alle celler i kroppen (Bry et al., 1994). Dette brukes til å type dyrene.

Paneth-hanner (hGH+ hanner med innsatt difteritoksin og redusert antall paneth celler), ble parret med Wt hunner. Paneth-hunner ble brukt videre i forsøket. Paneth-hanner og Wt-hunner ble brukt til å opprettholde avlen av Paneth-mus.

2.3 Forsøket

Min-hanner ble parret med Paneth-hunner. I forsøket var det 28 bur med en Paneth-hunn i hver. Vi hadde færre Min-hanner, så disse ble flyttet rundt. Hannen stod 5-8 dager i ett bur, før de ble flyttet til et annet.

Ved parring av Min-mus med Paneth-mus kan avkommene ha fire mulige genotyper: Wt/Wt (C57BL/6J^{+/+}, villtype), Min/Wt (C57BL/6J^{Min/+}, mus med mutasjon i *Apc*), Wt/Paneth (CR2-tox176 C57BL/6J, mus med innsatt svekket difteritoksin A fragment), Min/Paneth (CR2-tox176 C57BL/6J^{Min/+}, mus med mutasjon i *Apc* og innsatt svekket difteritoksin A fragment).

Dyrene var plassert i bur av plast, med et lag trespon i bunnen. Bur og spon ble byttet ukentlig. Burene var plassert i skap med kontrollert luftfuktighet og temperatur, og det var en 12 timers lys/mørke syklus i rommet. Musene hadde fri tilgang på vann og fôr. Avlsburene hadde opprinnelig avlsfôret: Avlsfôr for mus og rotter fra Special Diets Service Ltd., Essex, U.K., SDS RM3, men på grunn av lite fettinnhold (4,3 %) ble det i uke 20 byttet til: Avlsfôr for mus og rotter fra Harlan Holding, Inc, Wilmington, DE, USA, Harlan Teklad 2018 (Extruded). Dette fôret har 6 % fett, som er det anbefalte nivået. Avkommet fikk et annet for når de ble skilt fra moren: Vedlikeholdsfor for mus og rotter fra Special Diets Service Ltd., Essex, U.K., SDS RM1 (Extruded).

Avkommene ble skilt fra moren når de var 3,5 – 4 uke gamle, og hanner og hunner ble satt i hvert sitt bur. Samtidig ble musene øremerket, for å kunne skille dem fra hverandre.

Underveis i avlen hadde vi problemer med spising av kullene. Ungespising kan skyldes stress som for eksempel følge av støy eller ommøblering av dyr (Hem et al., 2001). Avlen av kullene til forsøket tok lengre tid enn forventet. Derfor er denne masteroppgaven bare basert på deler av et større forsøk.

2.3.1 Eksperimentell behandling av dyrene

Burene ble delt inn i PhIP og kontroll bur, hvor avkommene fra PhIP burene fikk en subkutan injeksjon av PhIP (2-amino-1-metyl-6-fenylimidazo[4,5-b]pyridin) på 50 mg/kg kroppsvekt

3-6 dager etter fødsel. Avkommene fra kontroll burene fikk subkutan injeksjon med NaCl 3-6 dager etter fødsel.

PhIP (med >98 % renhet) var kjøpt fra Toronto Research Chemicals Inc. (North York, Ontario, Canada). PhIP som var i pulverform, ble løst i konsentrert HCl, som deretter ble dampet av. PhIP-HCl ble løst i 0,9 % NaCl, og justert til pH 3,5 med NaOH.

2.3.2 Uttak av biologiske prøver

Musene ble avlivet med gass og nakkestrekk da de var 8 uker gamle. Dette er en metode som gir umiddelbart bevissthetstap dersom den er utført riktig, og den er i tråd med lov om dyrevern og lov om biologiske forsøk med dyr.

Vekt ved avlivning ble registrert. Hele tarmen, fra magesekk til endetarm, ble tatt ut, og det ble tatt avføringsprøver fra hver mus, fra tynntarm, blindtarm og tykktarm, som ble lagt direkte på tørris. Senere ble avføringsprøvene oppbevart i fryser på -70°C . Avføringsprøvene brukes videre i prosjektet, men er ikke en del av denne mastergradsoppgaven. Tynn- og tykktarm ble skylt i kald (ca 4°C) fosfatbuffret saltløsning (PBS) ($1,14\text{mM NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $5053\text{mM Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $0,14\text{M NaCl}$, pH 7,4) og klippet opp på langs. Tynntarmen ble kuttet opp i tre like store deler. Blindtarmen ble fjernet og kastet. Tarmene ble så lagt mellom to nummererte filterpapir som var fuktet i buffer, stiftet sammen og lagt til fiksering i nøytralbufret 10 % formalinløsning i 48 timer. Preparatene ble deretter farget i 5 sekunder i 0,2% filtrert metylenblå i 10 % formalinløsning, skylt i nøytralbufret 10 % formalinløsning, og lagret på sterile plastrør som igjen var fylt med nøytralbufret 10 % formalinløsning.

2.3.3 Analyse av genotype ved hjelp av PCR og gelelektroforese

Genotypeanalysen ble utført av Ewa Andruchow ved Nasjonalt folkehelseinstitutt. Min-mus og Paneth-mus genet ble identifisert ved hjelp av en allelspesifikk polymerase chain reaction (PCR) da musene var 3-4 uker gamle. PCR er en teknikk der man kopierer et bestemt område av DNA-molekylet. Den eneste forutsetningen er at man kjenner sekvensen til det genet og mutasjonen(e) man vil kopierer. Sekvensområdet med mutasjonen blir kopiert ved hjelp av PCR, der man benytter spesifikke primere. Dermed kan man produsere store mengder av gensekvensen man ønsker å studere ut i fra små mengder startmateriale. Min-mus identifiseres ved at de har mutasjonen i *mApc*, mens Paneth-musene types på bakgrunn av om de har hGH genet.

Musene ble øremerket for å kunne skilles fra hverandre. Brusken som ble klippet av øret ble benyttet til genotypingen, og DNA ble isolert fra dette vevet. Dersom prøvene ikke skulle benyttes med en gang, ble de oppbevart på $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ inntil de skulle brukes.

Røret ble merket, og ørebrusken ble tatt ut med en pinsett og overført til et mikrosentrifugerør. Pinsetten ble satt i destillert vann mellom hver prøve. Dette ble gjennomført på alt utstyr som ble brukt til uttak av brusk. $60\text{ }\mu\text{l}$ TE med $0,05\%$ SDS (sodium dodecyl sulfate) ble tilsatt hver prøve. Brusken var hele tiden under væskeoverflaten. Prøvene ble deretter varmet i 10 min. ved $95\text{ }^{\circ}\text{C}$. Så ble prøvene tilsatt $1/10$ volum med Proteinase K ($6\text{ }\mu\text{l}$) og inkubert ved $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ (helst natten over, minimum 3 timer). Proteinase bryter ned alle proteiner, slik at kun DNA blir intakt i løsningen. Dersom dette ikke gjøres kan proteinene bryte ned DNA over lengre tid. Til slutt ble prøvene varmet ved $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 10 min. for å inaktivere Proteinase K. Dette gjøres for at enzymene som benyttes ved PCR ikke skal brytes ned av proteinase. Det ble så laget en $1:50$ fortykning av prøvene i destillert vann. En slik fortykning av DNA kan lagres i opptil 3 måneder ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ inntil de skal brukes i PCR.

For å kunne utføre PCR på DNA som er opparbeidet, trenger man en løsning som inneholder alle ingrediensene som kreves. Denne blandingen kalles Master Mix. Alle ingrediensene til Master Mix ble oppbevart ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ til de skulle benyttes.

For å unngå forurensning av uønsket DNA i prøvene ble pipettespissene kastet mellom hver ingrediens og det ble brukt hansker hele tiden, også for å beskytte hendene mot farlige stoffer. Hver prøve ble tilsatt $5,00\text{ }\mu\text{l}$ DNA til $5,00\text{ }\mu\text{l}$ mastermix slik at totalvolumet for hver prøve var $10,0\text{ }\mu\text{l}$. Den allelsesifikke PCR-reaksjonen ble utført på BIORAD ICYCLER, versjon 3.032 for Min-typing og på Eppendorf, MASTERCYCLER GRADIENT S221, versjon 2.12.31 for Paneth-typing.

Tabell III. Master Mix for typing av Min-mus

Løsninger	Volum, µl: 1 stk.	Volum, µl: 12 stk.	Sluttkonsentrasjon
10x PCR buffer II	1,000	12,00	1x
2 mM dNTPmix	1,000	12,00	0,2 mM
25 mM MgCl ₂	1,000	12,00	2,50 µM
Sterilt H ₂ O	0,467	5,604	1x
MAPC-9, 2,0 µM	0,500	6,000	0,10 µM
MAPC-MT, 32,2 µM	0,500	6,000	1,61 µM
MAPC-15, 16,0 µM	0,500	6,000	0,80 µM
GoTAQ, 5 µ/µl	0,033	0,396	0,0165 µ
Totalvolum	5,000	60,00	

Tabell IV. Master Mix for typing av Paneth-mus:

Løsninger	Volum, µl: 1 stk.	Volum, µl: 12 stk.	Sluttkonsentrasjon
10x PCR buffer II	1,000	12,00	1x
2 mM dNTPmix	1,000	12,00	0,2 mM
10 µM hGh 1 (F)	0,200	2,40	0,2 µM
10 µM hGh 2 (R)	0,200	2,40	0,2 µM
10 µM aa 1 (F)	0,200	2,40	
10 µM aa 1 (R)	0,200	2,40	
25 mM MgCl ₂	1,000	12,00	2,0 µM
5 µ/µl taq	0,033	0,396	0,0165 µ
Sterilt H ₂ O	1,350	16,20	1x
Totalvolum	5,000	60,00	

PCR-reaksjonen kan deles inn i tre stadier som repeteres ett visst antall ganger. Det første stadiet er **denaturering**. Under denatureringen separeres den doble DNA-heliksen. Under stadie to, **annealing**, fester primerne seg på de spesifikke plassene på DNA-tråden. Under **syntesen** som er stadiet tre, skjer selve kopieringen. Når alle disse tre stadiene er ferdig, starter en ny syklus. For hver syklus dobles antall kopier av gensekvensen. PCR-reaksjonen for genotyping av Min-mus fant sted under følgende betingelser: Prøven ble varmet opp til 94 °C i 2 minutter. Deretter ble den kjørt i 36 sykluser ved følgende betingelser: 94 °C i 15 sek. (denaturering), 54,5 °C i 15 sek. (annealing) og 72 °C i 20 sek. (syntese). Til slutt ble den

kjørt ved 72 °C i 5 minutter som avslutning og avkjølt ved 4 °C inntil prøven ble tatt ut maskinen.

PCR-reaksjonen for genotyping av Paneth-mus fant sted under følgende betingelser: Prøven ble varmet opp til 94 °C i 2 minutter. Deretter ble den kjørt i 30 sykluser ved følgende betingelser: 94 °C i 20 sek. (denaturering), 54 °C i 20 sek. (annealing) og 72 °C i 30 sek. (syntese). Til slutt ble den kjørt ved 72 °C i 7 minutter som avslutning og avkjølt ved 4 °C inntil prøven ble tatt ut maskinen.

PCR-produktene ble separert ved gelelektroforese på en 2 % agarosegel. Gelen ble deretter farget i et vippende fargebad med Sybr®Green i 30 minutter for å gjøre DNA-båndene synlige i UV-lys. Ett synlig bånd indikerte at prøven var fra en Wt-mus (600 basepar). En Min-positiv prøve gav to synlige bånd på gelen ved 600bp og 300bp. En hGH-positiv prøve gav bånd ved 333bp.

2.3.4 Telling av svulster

Svulstene ble telt og målt ved hjelp av et lysmikroskop. Tarmen ble lagt på en petriskål med litt nøytralbufret formalinløsning, for å beskytte tarmene mot uttørking. Petriskålen var inndelt i merkede seksjoner på 1 cm, som tilsvarer ett synsfelt ved en forstørrelse på 20x. Tynntarmen ble vurdert fra proksimal og mot distal (duodenum og mot ileum).

Antall, diameter og lokalisering av svulstene ble registrert på et registreringsskjema, ett for hver mus. Skjemaene er utformet som et rutenett. Første kolonne markerer nummeret på synsfeltet, mens i radene ble det registrert diameteren på hver svulst for hvert synsfelt.

Diameteren ble målt ved forstørrelsen 20x med en okularlinjal. Siden både registreringsskjemaet og petriskålen var inndelt i synsfelt fikk man også informasjon om svulstenes lokalisering i tarmen. Antall, diameter og fordeling av svulster langs tarmen hos dyrene i de ulike gruppene kunne deretter sammenlignes.

Resultater fra telling av svulster i tykktarm er ikke med i denne oppgaven.

2.4 Preparater

Noen kull ble brukt til å lage preparater. Disse musene ble da øremerket og genotypet 1,5 uke gamle. Musene ble fordelt etter ulik genotype og kjønn og avlivet ved 2, 4, 6 og 8 uker.

Musene som ble avlivet ved 2, 4 og 6 uker var ubehandlet, mens musene som ble avlivet ved 8 uker var behandlet med PhIP eller NaCl.

Musene ble avlivet på samme måte som i forsøket og tarmen tatt ut, men tynntarmen ble ikke delt. Etter 48 timer i nøytralbufret 10 % formalinløsning, ble tynntarm og tykktarm rullet til en rull, og deretter lagt i sterile plastrør fylt med nøytralbufret 10 % formalinløsning. Disse ble levert på Patologisk avdeling, Ullevål Universitets Sykehus, hvor de ble støpt i parafin og så snittet med mikrotom. Demaskering av epitopene ble gjort i mikrobølgeovn i 12 minutter i Tris/EDTA løsning med pH 9,1. Preparatene ble farget med anti-lysozym ved hjelp av Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Lysozym uttrykkes bare i Panethceller i tynntarmen og kan brukes som en spesifikk farging av disse cellene. Snittene ble brukt til å sammenligne antall paneth celler i genotypene Paneth- og Wt-mus.

2.4.1 Telling av panethceller

Det ble tatt bilde med 10x forstørrelse av preparatene der det var flest paneth celler. En del av bildet ble forstørret og antall paneth celler i ti krypter ble telt for hver mus. Disse verdiene ble brukt til å regne ut gjennomsnittet for antall paneth celler per krypt for Wt og Paneth for 2, 4, 6 og 8 uker. Preparater fra mus avlivet ved 8 uker ble også gruppert i henhold til behandling. Det er bare med resultater fra mus avlivet etter 2, 4 og 6 uker i denne oppgaven.

2.5 Statistisk analyse

Til analyse av dataene ble det brukt statistikkprogrammet SigmaStat software. Alle grafer er laget med programmet Sigma Plot fra samme leverandør. Der data har vært normalfordelt og hatt lik varians, er den parametriske testen, Two Way Analysis of Variance (2WayAnova) benyttet. 2WayAnova er en analyse som generaliserer t-testen for to utvalg slik at det blir mulig å teste hypoteser om forskjeller mellom to ulike x-variabler på flere enn to gruppegjennomsnitt samtidig. Der data ikke har vært normalfordelt, er den ikke-parametriske z-testen benyttet.

P-verdier mindre enn 0,05 ble sett på som signifikant. Ved p-verdier på 0,1 og mindre, er dette angitt som tendens. Ved bearbeiding og fremstilling av resultatene er det tatt utgangspunkt i gjennomsnittsverdier (Mean)±Standardfeilen til gjennomsnittet (SEM).

3.0 RESULTATER

3.1 Avlsregnskap

Det ble til sammen brukt 91 mus i forsøket (se oversikt i Tabell V). Fordelingen mellom Min- og Wt-mus var henholdsvis 37 % (34 stk) og 63 % (57 stk). Det høye prosenten av Wt-mus skyldes at en av Min-hannene som ble brukt til parring i forsøket var typet feil, og var egentlig Wt. Erfaringsmessig er også overlevelsen høyere i Wt genotypen. Fordelingen mellom Wt- og Paneth-mus var henholdsvis 51 % (46 stk) og 49 % (45 stk). Fravær av paneth celler ser derved ikke ut til å påvirke overlevelsen. Fordelingen mellom kjønnene var på 56 % hanner (51 stk) og 44 % hunner (40 stk). Erfaringsmessig blir det født flere hanner enn hunner.

Tabell V. Antall dyr per gruppe.

Genotype	Behandling	♂	♀	Antall dyr totalt
Wt/Wt	Kontroll	4	5	9
Wt/Wt	PhIP	14	6	20
Wt/Paneth	Kontroll	5	4	9
Wt/Paneth	PhIP	9	10	19
Min/Wt	Kontroll	5	5	10
Min/Wt	PhIP	4	3	7
Min/Paneth	Kontroll	4	5	9
Min/Paneth	PhIP	6	2	8
Sum				91

3.2 Vekt ved avlivning

Musene ble veid ved avlivning. Hos genotypene Wt/Wt, Wt/Paneth og Min/Wt var det en signifikant forskjell mellom hann og hunn. Tendensen var også tilstede hos musene med genotypen Min/Paneth (Tabell VI).

Det var ingen statistisk signifikant forskjell på vekten mellom de fire ulike genotypene. Det var ingen signifikant forskjell mellom Wt og Min-musene når det ikke ble tatt hensyn til genotypen Paneth, og det var heller ikke signifikant forskjell mellom Wt og Paneth, når det ikke ble tatt hensyn til genotypen Min. PhIP behandlingen gav ingen statistisk signifikant endring i vekten hos de ulike genotypene.

Tabell VI. Vekt ved avlivning

Genotype	Kjønn	Vekt, g Mean±SEM	Hann vs. Hunn (p-verdi)
Wt/Wt	♂	22,4±0,37	
Wt/Wt	♀	18,7±0,39	<0,001
Wt/Paneth	♂	22,4±0,43	
Wt/Paneth	♀	20,4±0,54	<0,001
Min/Wt	♂	21,0±0,54	
Min/Wt	♀	18,1±0,62	0,005
Min/Paneth	♂	21,4±0,51	
Min/Paneth	♀	19,7±0,68	0,077*

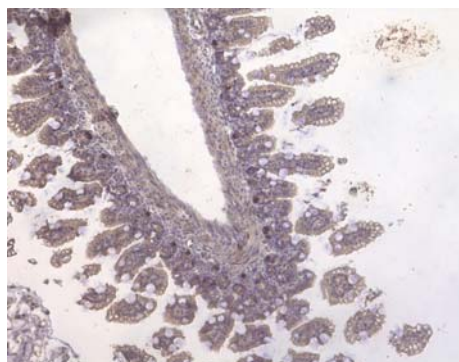
*ns, ikke statistisk signifikant (p>0,05)

3.3 Antall Panethceller per krypt

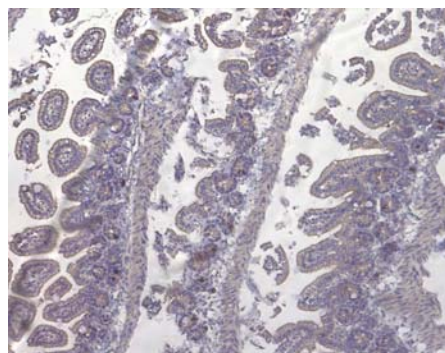
Innsettelse av svekket difteritoksin A fragment koblet til genet for humant vekst hormon (hGH) og nukleotidene -6500 til +34 av muse kryptdin-2 genet (CR2) i genomet (Paneth), førte til reduksjon i antall paneth celler per krypt i forhold til mus med normal utvikling av paneth celler (se Tabell VII). Hos mus avlivet ved 2 uker, gav innsettelse av svekket difteritoksin A fragment en redusert utvikling av paneth celler på 43 %, fra 1,6 paneth celler per krypt hos Wt-mus til 0,9 paneth celler per krypt hos Paneth-mus. Ved 4 uker var det en 10 % reduksjon i paneth celle utviklingen, fra 2,0 paneth celler per krypt hos Wt-mus til 1,8 paneth celler per krypt hos Paneth-mus. Hos mus avlivet ved 6 uker ble det ikke påvist noen reduksjon i antall paneth celler per krypt mellom Wt-mus og Paneth-mus.

Tabell VII. Gjennomsnittlig antall paneth celler per krypt for mus avlivet ved 2, 4 og 6 uker.

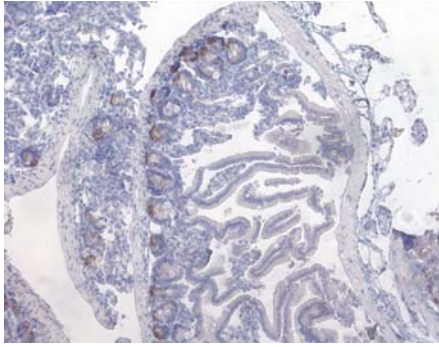
Paneth+/-	Antall uker	Antall Panethceller per krypt	Differanse	Reduksjon (%)
Wt	2	1,6		
Paneth	2	0,9	0,7	43
Wt	4	2,0		
Paneth	4	1,8	0,2	10
Wt	6	3,6		
Paneth	6	3,6	0	0



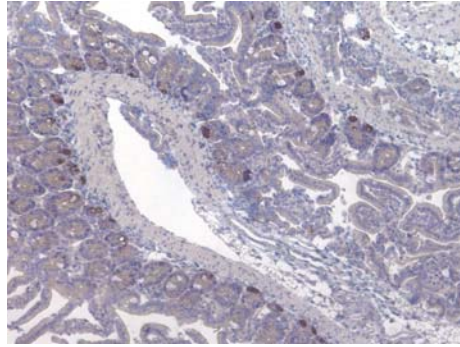
Bilde 1 Tynntarmen hos en 2 uker gammel Wt-mus. Preparatet er farget med lysozym.



Bilde 2 Tynntarmen hos en 2 uker gammel Paneth-mus. Preparatet er farget med lysozym.



Bilde 3 Tynntarmen hos en 4 uker gammel Wt-mus. Preparatet er farget med lysozym.



Bilde 4 Tynntarmen hos en 4 uker gammel Paneth-mus. Preparatet er farget med lysozym.

3.4 Effekt av PhIP og paneth celler i Wt-mus

Wt-musene som var behandlet med PhIP, hadde få svulster i tarmen, og kontroll musene hadde ingen svulster. Vi fikk ingen signifikant forskjell i antall svulster mellom ubehandlede og PhIP behandlede Wt-mus.

Det var ingen effekt av reduksjon i antall paneth celler hos Wt-musene, hverken på antall svulster eller størrelsen av svulstene.

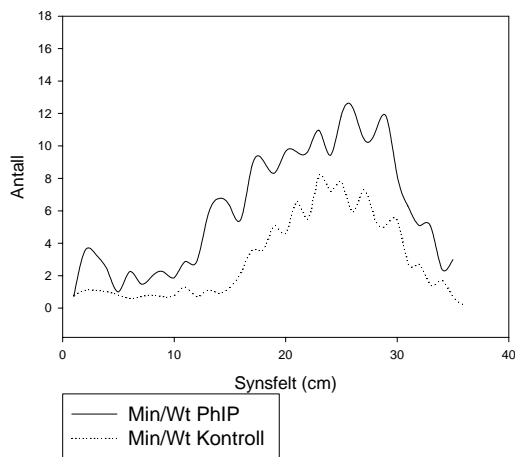
3.5 Effekt av PhIP på Min-mus

3.5.1 Antall svulster

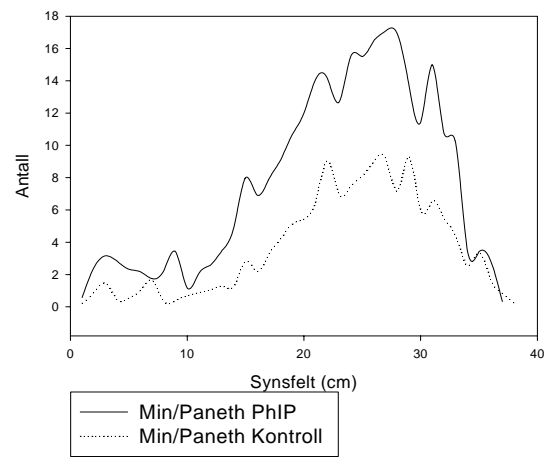
PhIP-behandlingen førte til en økning i svulstantallet i tynntarmen hos Min-mus (Tabell VIII). Det var også en statistisk signifikant effekt av PhIP i hanner og hunner hver for seg, men det var ingen signifikant forskjell mellom kjønnene. Hanner og hunner blir derfor vurdert samlet. Min/Wt, som er Min-mus med vanlig utvikling av paneth celler, fikk en gjennomsnittelig økning fra 106 svulster per ubehandlede dyr til 212 per PhIP-behandlede dyr. Min/Paneth, med forsinket utvikling av paneth celler, fikk en gjennomsnittelig økning fra 138 svulster per dyr i ubehandlede Min-mus til 264 per dyr i PhIP behandlede Min-mus.

Tabell VIII. Effekt av PhIP på svulstutvikling i Min-mus – Antall svulster

Genotype	Behandling	Antall/dyr Mean±SEM	PhIP vs. Kontroll (p-verdi)
Min/Wt	Kontroll	106±18	
Min/Wt	PhIP	212±21	<0.001
Min/Paneth	Kontroll	150±20	
Min/Paneth	PhIP	264±20	<0.001



Figur 9. Fordeling av svulster langs Tynntarm hos mus med genotypen *Min/Wt*



Figur 10. Fordeling av svulster langs tynntarm hos mus med genotypen *Min/Paneth*

Figur 9 og 10 viser fordeling av antall svulster i hvert synsfelt langs tynntarmen hos Min-mus. Av figurene ser vi at gruppene som har blitt behandlet med PhIP har et høyere antall svulster langs hele tynntarmen. Økningen i antall svulster etter PhIP behandling er størst distalt i tarmen, i det samme området som har størst spontan svulstutvikling.

3.5.2 Gjennomsnittlig svulststørrelse

Hos Min-mus gav PhIP-behandlingen en statistisk signifikant økning i gjennomsnittlig svulststørrelse, målt som diameter i mm, hos både *Min/Wt* mus og *Min/Paneth* mus (Tabell IX).

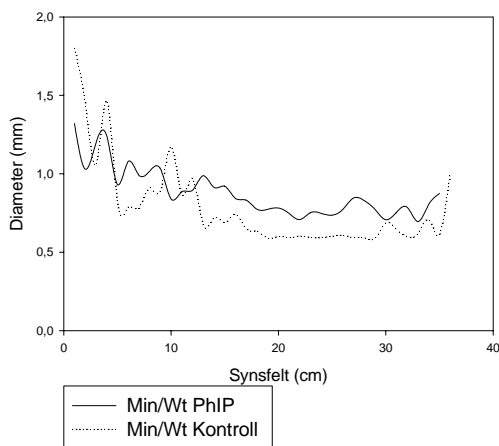
Hos gruppen *Min/Paneth* fikk vi ikke en statistisk signifikant økning med hunner og hanner hver for seg, men det var ingen signifikant forskjell mellom kjønnene, så hanner og hunner

blir behandlet sammen. I gruppen Min/Wt fikk vi ikke en signifikant økning i gjennomsnittlig svulststørrelse innen hunner ($p=0,056$), mens det var en signifikant økning hos hannene i denne gruppen ($p=0,008$). Det var ingen signifikant forskjell mellom kjønnene, så hanner og hunner blir behandlet sammen.

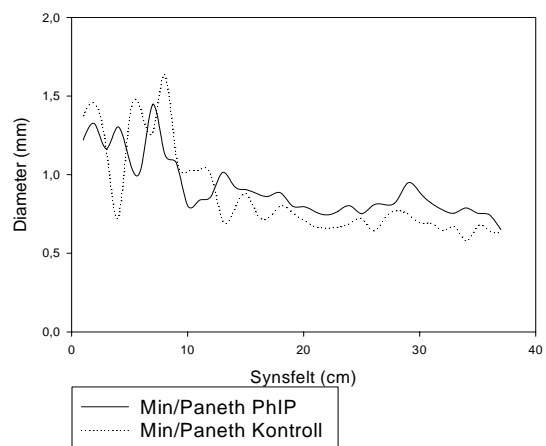
I gruppen Min/Wt medførte PhIP behandlingen en økning i den gjennomsnittlige tumorstørrelsen fra 0,66 mm til 0,81 mm. PhIP behandlingen ga en økning i tumorstørrelse fra 0,74 mm til 0,88 mm i gruppen Min/Paneth.

Tabell IX. Effekt av PhIP på svulstutvikling i Min-mus – Gjennomsnittlig svulststørrelse

Genotype	Behandling	Svulststørrelse, mm	PhIP vs. Kontroll
		Mean±SEM	(p-verdi)
Min/Wt	Kontroll	0,66±0,038	
Min/Wt	PhIP	0,81±0,045	0,015
Min/Paneth	Kontroll	0,74±0,042	
Min/Paneth	PhIP	0,88±0,042	0,022



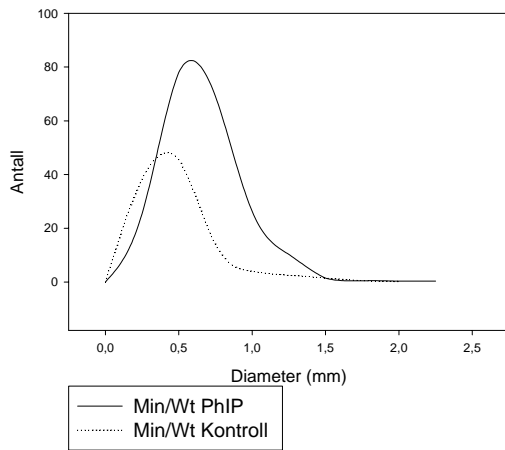
Figur 11. Gjennomsnittlig tumorstørrelse langs tynntarmen hos Min/Wt.



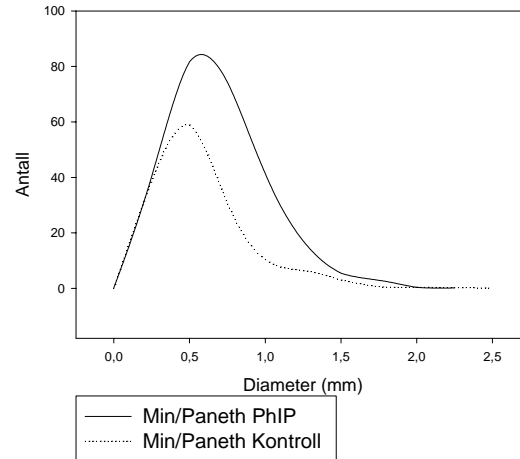
Figur 12. Gjennomsnittlig tumorstørrelse langs tynntarmen hos Min/Paneth.

Figur 11 og 12 viser gjennomsnittlig tumorstørrelse, målt som diameter i mm, langs tynntarmen hos henholdsvis Min/Wt og Min/Paneth. Både i ubehandlede og behandlede Min-

mus er svulstene størst proksimalt i tarmen med synkende størrelse mot distal tynntarm. Hos begge genotypene ser vi at PhIP behandlingen gir en økning i gjennomsnittlig tumorstørrelse fra svnsfelt 12 og mot den distale delen av tarmen.



Figur 13. Størrelsesfordeling over svulstene i tynntarmen hos Min/Wt.



Figur 14. Størrelsesfordeling over svulstene i tynntarmen hos Min/Paneth.

Figur 13 og 14 viser størrelsesfordelingen av svulstene i tynntarmen hos henholdsvis Min/Wt og Min/Paneth. Svulstene ble delt inn grupper med intervall på 0,25 mm. Av figurene kan vi se at PhIP behandlingene har en effekt på svulstutviklingen på svulster som er 0,25 mm i diameter og større, og denne effekten er signifikant.

3.6 Effekt av Panethceller på svulstutvikling i Min-mus

3.6.1 Antall svulster

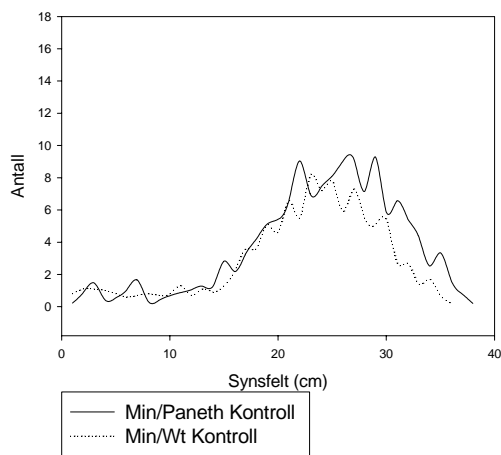
Det er en statistisk signifikant høyere antall tynntarmssvulster i Min-musene med forsinket utvikling av paneth celler (Min/Paneth) i forhold til Min-mus med normal utvikling av paneth celler (Min/Wt), når man ikke tar hensyn til behandling ($p=0,020$).

Når det ble tatt hensyn til behandling (se Tabell X), fikk vi ikke påvist en statistisk signifikant forskjell mellom Min/Paneth og Min/Wt gruppene. Likevel kunne vi se en sterk tendens som viste at både ubehandlede og PhIP behandlede Min-mus utviklet flere svulster når utviklingen av paneth celler var forsinket (Min/Paneth).

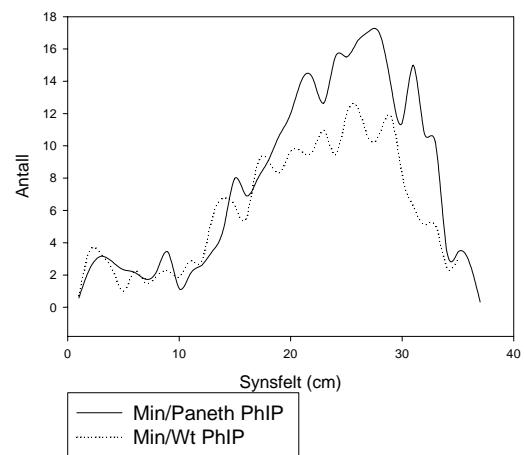
Tabell X Effekt av Panethceller på svulstutvikling i Min-mus – Antall svulster

Genotype	Behandling	Antall svulster/dyr	Paneth+ vs. Paneth-
		Mean±SEM	(p-verdi)
Min/Wt	Kontroll	106±18	
Min/Paneth	Kontroll	150±20	0,110*
Min/Wt	PhIP	212±21	
Min/Paneth	PhIP	264±20	0,080*

*ns, ikke statistisk signifikant ($p>0,05$)

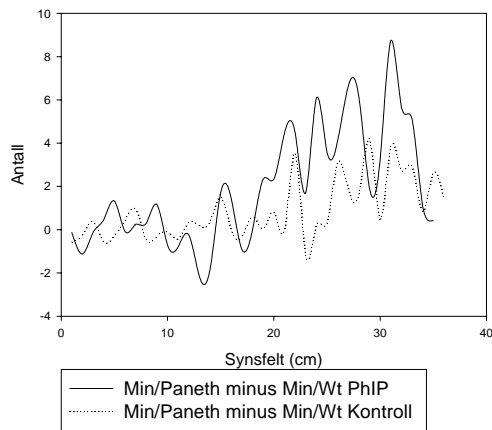


Figur 15 Effekt av paneth celler på svulstutvikling i Min-mus. Fordeling av svulster langs tynntarmen hos mus med genotypene Min/Wt og Min/Paneth uten behandling.



Figur 16 Effekt av paneth celler på Min-mus. Fordeling av svulster langs tynntarmen hos mus med genotypene Min/Wt og Min/Paneth med PhIP eksponering.

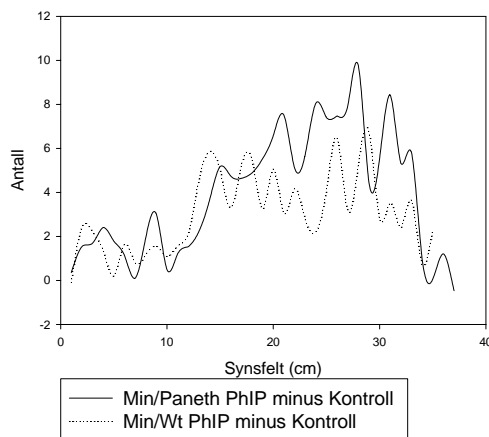
Figur 15 og 16 viser fordelingen av antall tynntarmssvulster fra proksimal mot distal tynntarm hos Min/Wt og Min/Paneth mus og gir et mål på effekten av paneth celler på svulstutvikling i tynntarmen i Min-mus. Vi ser at de ubehandlede og PhIP eksponerte Min-musene som har forsinket utvikling av paneth celler, har et høyere antall svulster fra cirka synsfelt 20 og utover (distalt) i tarmen. Forskjellen på antall svulster er størst mellom Min/Paneth og Min/Wt hos de PhIP eksponerte Min-musene. Forskjellene når ikke statistisk signifikans.



Figur 17 Effekt av paneth celler

I figur 17 er antall svulster i Min/Wt mus trukket fra svulsttallet i Min/Paneth mus både for ubehandlede og behandlede mus for å se på svulstøkning forårsaket av redusert antall paneth celler.

I figur 16 ser vi at Min/Paneth musene som har blitt behandlet med PhIP har større økning i antall svulster enn Min/Paneth musene som er ubehandlet. Fravær av paneth cellene påvirker effekten av PhIP.



Figur 18 Antall svulster langs tarmen hos PhIP behandlede Min/Wt og Min/Paneth når antall svulster i ubehandlede mus er trukket i fra verdien i hvert synsfelt.

I figur 18 er antall svulster i ubehandlede dyr trukket fra svulsttallet i behandlede dyr for å se på svulstøkningen forårsaket av PhIP.

Ved sammenligning av de to genotypene; Min/Wt og Min/Paneth, ser vi at PhIP induserer flere svulster, hos musene med genotypen Min/Paneth enn hos mus med normal utvikling av Paneth celler (Min/Wt).

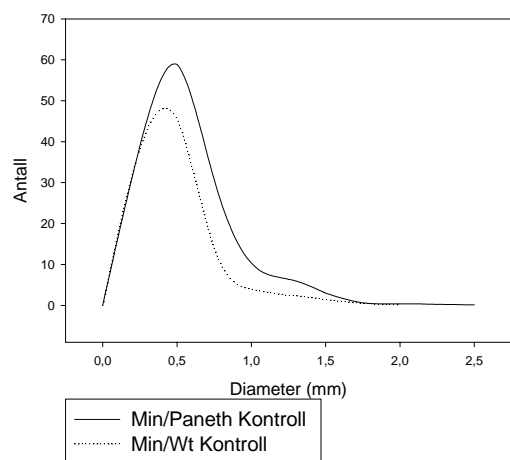
3.6.2 Gjennomsnittlig tumorstørrelse

Det var ingen statistisk signifikant effekt av paneth celler på den gjennomsnittlige tumorstørrelsen, verken hos de PhIP behandlede eller ubehandlede mus (se tabell XI). Når det ikke tas hensyn til behandling, er det en mulig tendens ($p=0,109$) til at Min/Paneth musene har større gjennomsnittlig tumorstørrelse enn Min/Wt musene.

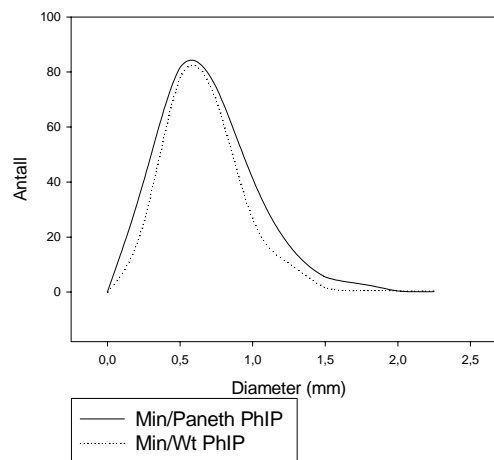
Tabell XI. Effekt av paneth celler på svulstutvikling i Min-mus – Gjennomsnittlig tumorstørrelse

Genotype	Behandling	Svulststørrelse Mean±SEM	Paneth+ vs. Paneth- (p-verdi)
Min/Wt	Kontroll	13,2±0,75	
Min/Paneth	Kontroll	14,7±0,84	0,203*
Min/Wt	PhIP	16,3±0,90	0,302*
Min/Paneth	PhIP	17,6±0,84	

*ns, ikke statistisk signifikant ($p>0,05$)



Figur 19 Størrelsesfordeling over svulstene i tynntarmen hos ubehandlede Min/Wt og Min/Paneth mus.



Figur 20 Størrelsesfordeling over svulstene i tynntarmen hos PhIP behandlede Min/Wt og Min/Paneth mus.

Figur 19 og 20 viser størrelsesfordelingen av svulstene i tynntarmen hos henholdsvis ubehandlede Min/Wt og Min/Paneth mus og PhIP behandlede Min/Wt og Min/Paneth mus. Av figurene ser vi at paneth cellene har liten effekt på størrelsesfordelingen av svulstene.

4.0 DISKUSJON

I denne oppgaven ble det valgt å teste effekten av stekemutagenet PhIP på Min- og Wt mus med både normal utvikling av paneth celler og forsinket utvikling av paneth celler. Testen inkluderer da også effekten av kjemisk induisert karsinogenese i tillegg til spontan arvelig karsinogenese.

4.1 Effekt av PhIP

PhIP behandlingen gav økt antall svulster hos Min-mus i forhold til Wt-mus. Mekanismen for PhIP induksjon av tarmsvulster er inaktivering av det gjenværende villtype *Apc* allelet, enten ved å forårsake tap av hele allelet (Loss of Heterozygosity (LOH)) eller ved mutasjoner i allelet (Andreassen et al., 2002). Tynntarmssvulster induisert av PhIP viste en akkumulering i siste tredjedel av tarmen, som er i samsvar med tidligere studier (Paulsen et al., 1999). Dette er det samme området som også har størst spontan svulstutvikling. PhIP behandling ga ingen signifikant økning i svulstantallet i Wt-mus, hverken i normale mus eller i mus med forsinket utvikling av paneth celler. Dette tyder på at celler med en heterozygot skade i *Apc* er mer sensitive for PhIP enn celler hvor begge *Apc* allelene er intakt. Dette skyldes at når det ene allelet er skadet, vil det andre allelet være ekstra utsatt for ytterligere skade (Kinzler and Vogelstein, 1996).

PhIP behandlingen gav også en signifikant økning i størrelsen på tynntarmssvulstene, med størst effekt på svulster med 0,25 mm diameter og større. De største svulstene blir trolig dannet tidligst, og størrelsen på svulstene sier derfor noe om når i livsstadiet de ble induisert. Tidligere har størrelsesfordelingen mellom PhIP induserte svulster og spontant induserte svulster blitt sammenlignet. Konklusjonen var at den spontane induksjonen antagelig starter *in utero* og at hovedparten av de spontane svulstene blir dannet den første uka etter fødsel (Steffensen et al, 2001).

Min-mus er mest følsomme for PhIP induserte svulster i tynntarmen mellom 3-12 dager etter fødsel (Steffensen et al., 2001). Det er mulig at dette kan ha sammenheng med at svulstene utvikles på et tidlig stadium (se ovenfor), og at Min-musene er mer følsomme i denne perioden. Vi valgte derfor å behandle musene med PhIP 3-6 dager etter fødsel. Det er tidligere

vist at når Min-musene ble eksponert for PhIP ved dag 36 etter fødsel, hadde PhIP ingen effekt på svulstantallet og svulstørrelsen i tarmen. Forskjeller i aktivitet av fase I og II enzymer involvert i bioaktivering av PhIP, er en av årsakene til den ulike følsomheten mellom nyfødt og voksne Min-mus (Steffensen et al., 2001).

Siden det ikke er mulig å gi PhIP i fôret til mus som fremdeles ammer valgte vi å injisere PhIP subkutan. Alternativet hadde vært å administrere PhIP gjennom sonde i stedet for subkutan injeksjon, men sonde-fôring hadde vært problematisk fordi museungene er for små.

Vi mener at subkutan injeksjon er en god erstatning for oral opptaksvei. Bioaktivering av PhIP i rotte skjer hovedsakelig i lever, mens konjugeringsreaksjonene kan foregå både i lever og tarmen (Malfatti et al., 1996). PhIP vil bli tatt opp og transportert til leveren både ved oral administrasjon og ved subkutan injeksjon, for så videre bli skilt ut gjennom galle og urin. Det er vist at rotte skiller ut den største andelen av PhIP via galle (Watkins et al., 1991). Store deler av PhIP som injiseres subkutan vil derfor likevel nå tarmen. Den viste økningen av svulster i tarmen hos Min-mus etter subkutan injeksjon av PhIP støtter disse synspunktene.

4.2 Effekt av paneth celler på svulstutvikling

Vi fant statistisk signifikant høyere antall tyntarmssvulster i Min-mus med forsinket utvikling av paneth celler (Min/Paneth) i forhold til Min-mus med normal utvikling av paneth celler (Min/Wt), når man ikke tar hensyn til behandling. Når kontroll gruppe og PhIP behandlet gruppe ble vurdert hver for seg, fikk vi ikke påvist en statistisk signifikant forskjell. Likevel kunne vi se en sterk tendens som viste at både ubehandlede og PhIP behandlede Min-mus med forsinket utvikling av paneth celler utviklet flere svulster.

En av årsakene til at vi ikke oppnådde statistisk signifikant forskjell kan skyldes stor spredning i resultatene. Min-musene har normalt stor individuell variasjon i utvikling av antall tarm svulster. Resultatene fra denne oppgaven er en del av et større forsøk og med flere dyr i de ulike gruppene er det mulig at vi vil oppnå signifikant resultat.

Endringer i sammensetning av tarmfloraen som følge av redusert sekresjon av antibakterielle peptider kan være en årsak til økningen i tarmsvulster i Min-mus med forsinket utvikling av

paneth celler. Paneth celle produktene som har antimikrobiell aktivitet, påvirker sammensetningen av tarmfloraen og antall bakterier som koloniserer tynntarmen (Ouellette and Bevins, 2001). Det har blitt vist at bakteriefri Min-mus har opptil 50 % reduksjon i antall adenomer i tynntarmen, noe som indikerer at tarmfloraen også i denne modellen har potensial til å føre til økt svulstdannelse (Dove et al., 1997).

Det kan tenkes at reduksjon i antall paneth celler vil gjøre det lettere for patogene bakterier å kolonisere i tarmen. Det ble nylig vist at nyfødte rotter som ble behandlet med dithizone, som selektivt ødelegger paneth celler, ble lettere infisert med den patogene bakterien *Escherichia coli* (Sherman et al., 2005). Musepatogener som eks: *Helicobacter hepaticus* og *Citrobacter rodentium* er begge to forbundet med enterokolitt, intestinal hyperplasi og svulstdannelse, og kan gi tarmkreft i flere dyremodeller (Solnick and Schauer, 2001).

4.3 Effekt av panethceller på metabolisme av PhIP

Resultatene viste også at forskjellen på antall svulster er størst mellom Min/Wt og Min/Paneth hos de PhIP eksponerte Min-musene. Dette indikerer at reduksjon i antall paneth celler kan påvirke effekten av PhIP.

Tarmfloraen kan interagere med HA og deres metabolitter på flere ulike måter. De fleste studiene på dette området er blitt gjort på IQ. En studie viser at tarmfloraen spiller en stor rolle for genotoksisiteten av IQ (Kassie et al., 2001). Det er derfor sannsynlig at tarmfloraen også er viktig for genotoksisiteten av PhIP.

Enkelte bakterier kan omdanne heterosykliske aminer til direkte agerende genotoksiske forbindelser. Ved blanding av IQ med anaerobe bakterier fra human tarmflora, ble IQ omdannet til 2-amino-3,6-dihydro-3-metyl-7H-imidazo[4,5-f]quinoline-7-one (7-OHIQ) (Carman et al., 1988). Denne metabolitten dannes blant annet av *Eubacterium* og *Clostridium spp.* 7-OHIQ er en veldig potent direkte agerende mutagen forbindelse i *Salmonella* framshift strain TA98. Senere har det vist seg at 7-OHIQ ikke er genotoksisk for pattedyrceller (Knasmuller et al., 2001). Vi har ikke funnet noe litteratur som viser om PhIP kan omdannes til genotoksiske forbindelse av bakterier.

Flere ulike hydrolytiske og reduserende bakterielle enzymer er involvert i produksjon eller detoksifisering av mutagene eller genotoksiske metabolitter. Dette gjelder blant annet β -glukosidase, arylsulfatase, azoreduktase, nitroreduktase og β -glukuronidase, hvorav de to sistnevnte kan reagere med metabolitter av heterosykliske aminer (McBain and Macfarlane, 1998).

β -glukuronidase kan spalte glukuronid-konjugerte PhIP metabolitter, noe som regenerer 2-hydroksyamino-PhIP. Denne metabolitten kan bli metabolisert videre av fase II sulfotransferaser og/eller acetyltransferaser som gir elektrofile *O*-sulfonyl- eller *O*-acetyl estere som finnes i tarmen. Disse esterene er i stand til heterolytisk spalting for å generere det reaktive nitrenium ionet som er ansett som den ultimate karsinogene forbindelsen. *Bacillus fragilis*, *B. bulgatos* og *Bifidobacterium pseudolongum* produserer store mengder av β -glukuronidase (McBain and Macfarlane, 1998). En økning av disse bakterietypene i tarmen vil kunne resultere i økt PhIP-DNA addukt dannelse, som igjen fører til økt svulstdannelse.

Nitroreduktase kan redusere den genotoksiske metabolitten 2-hydroksyamino-PhIP, som resulterer i regenerering av PhIP (Alexander et al., 1991). *Clostridium spp.* og *Escherichia coli* produserer nitroreduktase (McBain and Macfarlane, 1998). PhIP er ikke genotoksiske, og dette vil derfor være en detoksifiserings vei.

Tarmfloraen kan binde heterosykliske aminer og på den måten redusere den mutagene effekten. Laktobasiller (melkesyrebakterier) er blitt rapportert til å ha antimutagen/antikarsinogen virkning in vivo og in vitro. En mulig mekanisme for dette er binding av de mutagene forbindelsene til bakteriene. Ved testing av ulike stammer av laktobasiller, viste det seg at cirka 50 % av PhIP ble bundet (Orrhage et al., 1994).

Den økte effekten av PhIP kan skyldes forstyrrelse i balansen mellom de ulike bakterietypene i tarmen. En økning av bakterier som produserer β -glukuronidase vil føre til økt bioaktivering av PhIP, noe som vil gi økt svulstutvikling. En reduksjon av laktobasiller og bakterier som produserer nitroreduktase kan også muligens øke bioaktiveringen av PhIP.

Paneth cellene påvirket ikke den gjennomsnittlige svulststørrelsen og størrelsesfordelingen av svulstene. Paneth cellene har derfor trolig liten innvirkning på tidspunktet hvor svulstene ble indusert.

4.4 Antall paneth celler per krypt

I den opprinnelige Paneth musen på FVB/N bakgrunn ble det vist at panethcellene gradvis økte til normalt nivå etter åtte uker (Bry et al., 1994). Dette kan ha sammenheng med produksjon av kryptdin 2. Hvis produksjon av kryptdin 2 reduseres med dyrenes alder, vil vi få dannelse av panethceller igjen. Vi valgte derfor å avlive dyrene etter 8 uker for å få mest mulig effekt av reduksjonen i antall paneth celler.

Vi viste en reduksjon på 43 % hos 2 uker gamle Paneth-mus og en reduksjon på 10 % hos 4 uker gamle Paneth-mus når de var krysset tilbake på C57/Bl 6 bakgrunn. Hos 6 uker gamle Paneth-mus, kunne vi ikke påvise noen reduksjon i antall paneth celler. Det kan hende at kryptdin 2 produksjon i C57/Bl 6 stammen er forskjellig fra FVB/N stammen, noe som kan være årsak til den observerte forskjellen.

Det knyttes imidlertid en viss usikkerhet til våre resultater på antall paneth celler ettersom det var vanskelig å orientere seg i preparatene og vi ikke kunne være fullstendig sikre på at vi var på samme sted i tarmen. Det ble konsekvent tatt bilde av det området med flest paneth celler på hvert snitt.

5.0 KONKLUSJON

Vi har vist at Paneth-musene (CR2-tox176 C57BL/6J) har reduksjon i paneth celler til og med 4 uke gamle, men det kunne ikke påvises noen reduksjon ved 6 uker.

Første hypotese: *Forsinket utvikling av paneth celler i Wt-mus og Min-mus vil føre til endring i svulstutviklingen i tarmen.*

Resultatene viser at forsinket utvikling av paneth celler øker svulstutviklingen i tarmen hos Min-mus, men ikke i Wt-mus. Redusert antall paneth celler påvirket ikke svulststørrelsen.

Andre hypotese: *Effekten av PhIP på svulstutvikling i tarmen hos Wt-mus og Min-mus vil endres som følge av forsinket utvikling av paneth celler.*

PhIP behandling gav økning både i svulsantallet og svulststørrelsen hos Min-mus. Hos Wt-mus ble det ikke påvist noen effekt av PhIP. Forsinket utvikling av paneth celler øker effekten av PhIP på svulstantallet i Min-mus, men dette resultatet nådde ikke statistisk signifikans.

5.1 Videre arbeid

Videre vil det være interessant å telle svulstene i tykktarmen for å undersøke om forsinket utvikling av paneth celler også har innvirkning på svulstutviklingen i tykktarmen. Det vil bli kjørt PCR på avføringsprøvene tatt fra forsøksdyrene, for å undersøke mulige endringer i sammensetningen av tarmfloraen ved forsinket utvikling av paneth celler.

6.0 REFERANSELISTE

Alberts,B. (2002). Molecular biology of THE CELL. (New York: Garland Science).

Alexander,J., Wallin,H., Rosslund,O.J., Solberg,K.E., Holme,J.A., Becher,G., Andersson,R., and Grivas,S. (1991). Formation of a glutathione conjugate and a semistable transportable glucuronide conjugate of N2-oxidized species of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in rat liver. *Carcinogenesis*. *12*, 2239-2245.

Andreassen,A., Mollersen,L., Vikse,R., Steffensen,I.L., Mikalsen,A., Paulsen,J.E., and Alexander,J. (2002). One dose of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) or 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) induces tumours in Min/+ mice by truncation mutations or LOH in the Apc gene. *Mutat. Res* *517*, 157-166.

Behrens,J. and Lustig,B. (2004). The Wnt connection to tumorigenesis. *Int J Dev. Biol* *48*, 477-487.

Berlau,J., Gleib,M., and Pool-Zobel,B.L. (2004). Colon cancer risk factors from nutrition. *Anal. Bioanal. Chem.* *378*, 737-743.

Berner,L.A. (1995). Heterocyclic Amines In Foods And Their Implications To Health. Research Departement, National Cattlemen`s Beef Association.

Breitman,M.L., Rombola,H., Maxwell,I.H., Klintworth,G.K., and Bernstein,A. (1990). Genetic ablation in transgenic mice with an attenuated diphtheria toxin A gene. *Mol Cell Biol* *10*, 474-479.

Bry,L., Falk,P., Huttner,K., Ouellette,A., Midtvedt,T., and Gordon,J.I. (1994). Paneth cell differentiation in the developing intestine of normal and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* *91*, 10335-10339.

Carman,R.J., Van Tassell,R.L., Kingston,D.G., Bashir,M., and Wilkins,T.D. (1988). Conversion of IQ, a dietary pyrolysis carcinogen to a direct-acting mutagen by normal intestinal bacteria of humans. *Mutat. Res* *206*, 335-342.

Dietrich,W.F., Lander,E.S., Smith,J.S., Moser,A.R., Gould,K.A., Luongo,C., Borenstein,N., and Dove,W. (1993). Genetic identification of Mom-1, a major modifier locus affecting Min-induced intestinal neoplasia in the mouse. *Cell* 75, 631-639.

Dove,W.F., Clipson,L., Gould,K.A., Luongo,C., Marshall,D.J., Moser,A.R., Newton,M.A., and Jacoby,R.F. (1997). Intestinal neoplasia in the ApcMin mouse: independence from the microbial and natural killer (beige locus) status. *Cancer Res* 57, 812-814.

Eaton,D.L., Gallagher,E.P., Bammler,T.K., and Kunze,K.L. (1995). Role of cytochrome P4501A2 in chemical carcinogenesis: implications for human variability in expression and enzyme activity. *Pharmacogenetics* 5, 259-274.

Fenoglio-Preiser,C.M. (1999). *GASTROINTESTINAL PATHOLOGY - AN ATLAS AND TEXT*. Lippincott-Raven).

Fodde,R., Kuipers,J., Rosenberg,C., Smits,R., Kielman,M., Gaspar,C., van Es,J.H., Breukel,C., Wiegant,J., Giles,R.H., and Clevers,H. (2001). Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol* 3, 433-438.

Ganz,T. (1999). Defensins and host defense. *Science* 286, 420-421.

Garabedian,E.M., Roberts,L.J., McNevin,M.S., and Gordon,J.I. (1997). Examining the role of Paneth cells in the small intestine by lineage ablation in transgenic mice. *J Biol. Chem.* 272, 23729-23740.

Gibson,G.R. and Roberfroid,M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125, 1401-1412.

Goldman,R. and Shields,P.G. (2003). Food mutagens. *J Nutr* 133 Suppl 3, 965S-973S.

Gorbach,S.L. and Goldin,B.R. (1990). The intestinal microflora and the colon cancer connection. *Rev. Infect Dis* 12 Suppl 2, S252-S261.

Green,R.A. and Kaplan,K.B. (2003). Chromosome instability in colorectal tumor cells is associated with defects in microtubule plus-end attachments caused by a dominant mutation in APC. *J Cell Biol* 163, 949-961.

HELSE BERGEN,H.U. (2003). Ny brosjyre om arvelig tykktarmskreft. www.helse-bergen.no/avd/medgen/diagnose/tarmkreft.htm.

Hem,A.L., Eide,D.M., Engh,E., and Smith,A. (2001). Kompendium i forsøksdyrelære. Norges Veterinærhøgskole.

Hirayama,K., Baranczewski,P., Akerlund,J.E., Midtvedt,T., Moller,L., and Rafter,J. (2000). Effects of human intestinal flora on mutagenicity of and DNA adduct formation from food and environmental mutagens. *Carcinogenesis*. 21, 2105-2111.

Husoy,T., Cruciani,V., Knutsen,H.K., Mikalsen,S.O., Olstorn,H.B., and Alexander,J. (2003). Cells heterozygous for the ApcMin mutation have decreased gap junctional intercellular communication and connexin43 level, and reduced microtubule polymerization. *Carcinogenesis* 24, 643-650.

Husoy,T., Olstorn,H.B., Knutsen,H.K., Loberg,E.M., Cruciani,V., Mikalsen,S.O., Goverud,I.L., and Alexander,J. (2004). Truncated mouse adenomatous polyposis coli reduces connexin32 content and increases matrilysin secretion from Paneth cells. *Eur J Cancer* 40, 1599-1603.

Huycke,M.M. and Gaskins,H.R. (2004). Commensal bacteria, redox stress, and colorectal cancer: mechanisms and models. *Exp Biol Med (Maywood.)* 229, 586-597.

Kaplan,K.B., Burds,A.A., Swedlow,J.R., Bekir,S.S., Sorger,P.K., and Nathke,I.S. (2001). A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. *Nat Cell Biol* 3, 429-432.

Kassie,F., Rabot,S., Kundi,M., Chabicovsky,M., Qin,H.M., and Knasmuller,S. (2001). Intestinal microflora plays a crucial role in the genotoxicity of the cooked food mutagen 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f]quinoline. *Carcinogenesis* 22, 1721-1725.

Kinzler,K.W. and Vogelstein,B. (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159-170.

Knasmuller,S., Steinkellner,H., Hirschl,A.M., Rabot,S., Nobis,E.C., and Kassie,F. (2001). Impact of bacteria in dairy products and of the intestinal microflora on the genotoxic and carcinogenic effects of heterocyclic aromatic amines. *Mutat. Res* 480-481, 129-138.

- Kreftregisteret,i.f.p.k. (2001). Kreft i Norge 2001. www.kreftregisteret.no/ramme.htm?forekomst_og_overlevelse_2001/oversikt.htm.
- Kreftregisteret,i.f.p.k. (2002). Kreft i Norge 2002. www.kreftregisteret.no/ramme.htm.
- Lopez-Boado,Y.S., Wilson,C.L., Hooper,L.V., Gordon,J.I., Hultgren,S.J., and Parks,W.C. (2000). Bacterial exposure induces and activates matrilysin in mucosal epithelial cells. *J Cell Biol.* *148*, 1305-1315.
- Malfatti,M.A., Connors,M.S., Mauthe,R.J., and Felton,J.S. (1996). The capability of rat colon tissue slices to metabolize the cooked-food carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Cancer Res* *56*, 2550-2555.
- Malfatti,M.A., Ubick,E.A., and Felton,J.S. (2005). The Impact of glucuronidation on the bioactivation and DNA adduction of the cooked-food carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in vivo. *Carcinogenesis*.
- Mathan,M., Hughes,J., and Whitehead,R. (1987). The morphogenesis of the human Paneth cell. An immunocytochemical ultrastructural study. *Histochemistry* *87*, 91-96.
- Maxwell,F., Maxwell,I.H., and Glode,L.M. (1987). Cloning, sequence determination, and expression in transfected cells of the coding sequence for the tox 176 attenuated diphtheria toxin A chain. *Mol Cell Biol* *7*, 1576-1579.
- McBain,A.J. and Macfarlane,G.T. (1998). Ecological and physiological studies on large intestinal bacteria in relation to production of hydrolytic and reductive enzymes involved in formation of genotoxic metabolites. *J Med Microbiol* *47*, 407-416.
- Miyoshi,Y., Nagase,H., Ando,H., Horii,A., Ichii,S., Nakatsuru,S., Aoki,T., Miki,Y., Mori,T., and Nakamura,Y. (1992). Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet* *1*, 229-233.
- Moser,A.R., Mattes,E.M., Dove,W.F., Lindstrom,M.J., Haag,J.D., and Gould,M.N. (1993). ApcMin, a mutation in the murine Apc gene, predisposes to mammary carcinomas and focal alveolar hyperplasias. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* *90*, 8977-8981.
- Murkovic,M. (2004). Formation of heterocyclic aromatic amines in model systems. *J Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci* *802*, 3-10.

- Narayan,S. and Roy,D. (2003). Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Mol Cancer* 2, 41.
- Orrhage,K., Sillerstrom,E., Gustafsson,J.A., Nord,C.E., and Rafter,J. (1994). Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. *Mutat. Res* 311, 239-248.
- Ouellette,A.J. and Bevins,C.L. (2001). Paneth cell defensins and innate immunity of the small bowel. *Inflamm. Bowel. Dis* 7, 43-50.
- Ouellette,A.J. and Selsted,M.E. (1996). Paneth cell defensins: endogenous peptide components of intestinal host defense. *FASEB J* 10, 1280-1289.
- Paulsen,J.E., Steffensen,I.L., Andreassen,A., Vikse,R., and Alexander,J. (1999). Neonatal exposure to the food mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine via breast milk or directly induces intestinal tumors in multiple intestinal neoplasia mice. *Carcinogenesis* 20, 1277-1282.
- Powell,S.M., Zilz,N., Beazer-Barclay,Y., Bryan,T.M., Hamilton,S.R., Thibodeau,S.N., Vogelstein,B., and Kinzler,K.W. (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359, 235-237.
- Rastall,R.A. (2004). Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance. *J Nutr* 134, 2022S-2026S.
- Reistad,V.R. (1999). Heterosykliske aminer i stekt kjøtt. *Norske Lægeforening* 119, 45-49.
- Sherman,M.P., Bennett,S.H., Hwang,F.F., Sherman,J., and Bevins,C.L. (2005). Paneth cells and antibacterial host defense in neonatal small intestine. *Infect Immun.* 73, 6143-6146.
- Shih,I.M., Wang,T.L., Traverso,G., Romans,K., Hamilton,S.R., Ben Sasson,S., Kinzler,K.W., and Vogelstein,B. (2001). Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *Proc Natl. Acad. Sci U. S A* 98, 2640-2645.
- Skog,K. (2003). Effects of different cooking methods on the formation of food mutagens in meat. *International Journal of Food Science and Technology* 38, 313.
- Smith,A. (1999). Regulering av dyreforsøk i Norge:

en introduksjon. Forsøksdyravdelingen, Norges veterinærhøgskole
<http://oslovet.veths.no/booklet/Hefte.pdf>.

Solnick, J.V. and Schauer, D.B. (2001). Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clin Microbiol Rev* *14*, 59-97.

Steffensen, I.L., Schut, H.A., Paulsen, J.E., Andreassen, A., and Alexander, J. (2001). Intestinal tumorigenesis in multiple intestinal neoplasia mice induced by the food mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine: perinatal susceptibility, regional variation, and correlation with DNA adducts. *Cancer Res* *61*, 8689-8696.

Turteltaub, K.W., Dingley, K.H., Curtis, K.D., Malfatti, M.A., Turesky, R.J., Garner, R.C., Felton, J.S., and Lang, N.P. (1999). Macromolecular adduct formation and metabolism of heterocyclic amines in humans and rodents at low doses. *Cancer Lett.* *143*, 149-155.

Varesco, L. (2004). Familial adenomatous polyposis: genetics and epidemiology. *Tech Coloproctol.* *8 Suppl 2*, s305-s308.

Watkins, B.E., Suzuki, M., Wallin, H., Wakabayashi, K., Alexander, J., Vanderlaan, M., Sugimura, T., and Esumi, H. (1991). The effect of dose and enzyme inducers on the metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in rats. *Carcinogenesis* *12*, 2291-2295.

Weisburger, J.H. (2002). Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health. *Mutat. Res* *506-507*, 9-20.

Willett, W.C. (2000). Diet and cancer. *Oncologist.* *5*, 393-404.

World Health Organization (2003a). Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a joint WHO/FAO expert consultation.

World Health Organization (2003b). The World Cancer Report. www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr27/en/print.html.