

# Sikkerhetsfarmakologiske studier av SSRI-er – mulige effekter på nevronkulturer

Marte Rodum



Masteroppgave for graden Master i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2013



# Sikkerhetsfarmakologiske studier av SSRI-er – mulige effekter på nevronkulturer

Masteroppgave for graden Master i farmasi

**Marte Rodum**



Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

## **Veiledere:**

Professor Ragnhild Elisabeth Paulsen

Post doc Gro Haarklou Mathisen

Stipendiat Lars Peter Austdal

Copyright Marte Rodum

2013

Sikkerhetsfarmakologiske studier av SSRI-er – mulige effekter på nevronkulturer

Marte Rodum

<http://www.duo.uio.no>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

IV

# Forord

Denne oppgaven ble utført ved Farmasøytisk Institutt, Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Universitetet i Oslo. Arbeidet ble påbegynt i mars 2012 og avsluttet mai 2013.

Jeg vil gjerne rette en stor takk til mine veiledere professor Ragnhild Elisabeth Paulsen, post doc Gro Haarklou Mathisen og stipendiat Lars Peter Austdal for at de på hver sin måte har gitt meg god hjelp under hele arbeidet med masteroppgaven. De har bidratt til at det siste året har vært utrolig lærerikt og et minne for livet. Takk til Ragnhild for å ha bidratt med solid og imponerende kunnskap, og inspirasjon til skriveprosessen. Takk til Gro for å ha kommet med praktiske og faglige bemerkninger på en pedagogisk måte. Dette har vært svært nyttig for framdriften i arbeidet. En spesiell takk til Lars for at han alltid har vært tilgjengelig for faglige diskusjoner og hjelp på laben.

Jeg vil også takke avdelingsingeniør Mona Gaarder for opplæring, hjelp og hyggelige samtaler på laben. Takk også til Ida Scheel og Eva Skovlund for statistiske innspill. Videre vil jeg få takke resten av forskningsgruppa og alle dere andre som holder til på ZEB for å ha vært imøtekommende og hjelpsomme uansett hva det måtte være.

Stor takk til medstudent Sissel Evensen for å ha vært en fantastisk støtte under uendelig mange timer på laben og på kontoret. Takk også til resten av kontoret på ZEB for mange hyggelige samtaler det siste året.

Takk til venner og familie, og en spesiell takk til mamma og pappa for å ha hatt troen på meg og støttet meg. Til slutt vil jeg takke Lars Andreas for at han alltid stiller opp for meg. Det setter jeg utrolig stor pris på.

Oslo, mai 2013.

Marte Rodum



# Sammendrag

Prosesser som celleproliferasjon, nevruttvekst, migrasjon og apoptose er avgjørende for funksjon av nervesystemet, og her spiller nervevekstfaktorer en viktig rolle. Bruk av *in vitro*-studier for å undersøke om legemidler kan påvirke disse prosessene og gi uønskede effekter på nervesystemet i utvikling har fått økende interesse. Antidepressiva brukes av gravide i økende grad og utøver sin effekt delvis gjennom vekstfaktorer. Disse legemidlene er spesielt interessante i forbindelse med sikkerhetsfarmakologiske studier, da det fortsatt er uenighet i fagmiljøene om i hvor stor grad disse er fosterskadelige eller ikke.

I denne oppgaven har PC12-celler og korncellekulturer fra lillehjerne blitt brukt. Begge celletypene er foreslåtte *in vitro*-modeller for screening av legemidler i forbindelse med toksisitet på nervesystemet under utvikling. For å studere effekter på nevronal utvikling ble endringer i nevruttvekst i PC12-celler valgt som mål. PC12-celler ble eksponert for nevronal vekstfaktor (NGF) og resultatene fra morfometrisk analyse ble brukt for å vurdere hvilke endepunkt som er velegnet for å beskrive endringer i nevruttvekst. PC12-celler ble eksponert for escitalopram og venlafaksin, to typer antidepressiva, i tillegg til vekstfaktorer og ulike hemmere (anti-BDNF og caspase-3-hemmer) med mål om å undersøke nevruttvekst og mekanismene bak. Prøver fra korncellekulturer ble brukt til mikroskopi og westernblotting. Westernblotting, sammen med immunfarging ble utført for å teste disse metodene i forbindelse med studier på nevruttvekst.

Vekstfaktorene NGF og BDNF (hjernederivert vekstfaktor) ga en signifikant økning i nevruttvekst. Escitalopram hadde en tendens til å redusere nevruttlengden og øke andelen lange nevrutter, men så ikke ut til å endre NGF-indusert nevruttvekst. Venlafaksin hadde derimot en tendens til å øke nevruttveksten og så ut til å ha en effekt på NGF-indusert nevruttvekst. Resultatene tyder på at caspase-3 kan være involvert i mekanismen bak nevruttvekst induert av NGF, BDNF og venlafaksin. BDNF kan være involvert i nevruttvekst induert av NGF og venlafaksin. Nevronkulturene består av flere typer celler, og manuell deteksjon og kvantifisering av disse cellene var derfor krevende.

Korncellekulturer fra lillehjerne kan brukes til å studere proliferasjon, migrering og differensiering av funksjonelle nevroner. Lillehjernen representerer derfor et unikt system som er spennende i sikkerhetsfarmakologiske studier. Immunfarging og westernblotting fremstår som interessante alternativ til mikroskopi for å studere nevruttvekst.

# Forkortelser

Ad	Opp til
ANOVA	Analysis of Variance
APS	Ammoniumpersulfat
BDNF	Hjernerivert vekstfaktor
BME	Basal Medium Eagle
BSA	Bovint serumalbumin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetylsulfoksid
GAP-43	Vekst-assosiert protein 43 (Growth associated protein 43)
HRP	Pepperrotperoksidase
5-HT	5-hydroksytryptamin
ICH	International Conference of Harmonisation
MAPK	Mitogen-aktivert proteinkinase
MQ	Milli Q
NCAM	Nevronal celleadhesjons-molekyl (Neuronal cell adhesion molecule)
NeuN	Neuronal Nuclei
NGF	Nervevekstfaktor
PBS	Fosfatbufret saltvann
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Pentametansulfonylfluorid
P75NTR	P75 nevrotrofin reseptor
SDS	Natriumlaurylsulfat (Natrium Dodecyl Sulfat)
SE	Standardfeil
SNRI	Selektive serotonin- og noradrenalinreopptakshemmere
SSRI	Selektive serotoninreopptakshemmere
TBS	Trisbufret saltvann
TEMED	N, N, N', N'-tetrametyletyldiamin
TG	Tris-Glycinbuffer
TGS	Tris-Glycin-SDS-buffer
Tris	Trishydroksymetylaminoetan



Trk	Tropomyosin-reseptor-kinase
Tween	Polyoksyetylen sorbitanmonolaurat
z-DEVD-cmk	z-aspartat-glutamat-valin-aspartat-klormetylketon
Ubh	Ubehandlet

# Innholdsfortegnelse

<b>1</b>	<b>Innledning .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1</b>	<b>Sikkerhetsfarmakologi og sikkerhetsfarmakologiske studier .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2</b>	<b>Sentralnervesystemet under utvikling .....</b>	<b>3</b>
1.2.1	Celleproliferasjon .....	3
1.2.2	Nervevekstfaktorer og deres rolle i differensiering.....	4
1.2.3	Nevrittutvekst .....	5
1.2.4	Migrering av kornceller i lillehjernen .....	7
1.2.5	Caspaser .....	8
<b>1.3</b>	<b>Antidepressiva og bruk av disse under graviditet .....</b>	<b>9</b>
1.3.1	SSRI og SNRI .....	9
1.3.2	Bruk av antidepressiva under graviditet.....	9
<b>1.4</b>	<b>Effekter av antidepressiva på nevronal utvikling.....</b>	<b>10</b>
1.4.1	Antidepressiva øker uttrykk av BDNF.....	10
1.4.2	Serotonin og nevirtutvekst .....	11
<b>1.5</b>	<b>Nevrobiologiske modeller innen sikkerhetsfarmakologi.....</b>	<b>11</b>
1.5.1	PC12-celler.....	12
1.5.2	Kornceller fra lillehjerne hos kylling .....	12
<b>1.6</b>	<b>Mål for oppgaven.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>Materialer og metoder.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Materialer .....</b>	<b>14</b>
<b>2.2</b>	<b>PC12-celler .....</b>	<b>17</b>
2.2.1	Splitting av PC12-celler til flaske .....	17
2.2.2	Splitting av PC12-celler til skåler .....	17
2.2.3	Eksposering av PC12-celler.....	19
<b>2.3</b>	<b>Korncellekulturer .....</b>	<b>20</b>
2.3.1	Korncellekulturer .....	20
2.3.2	Coating av skåler med poly-L-lysin .....	20
2.3.3	Preparering av korncellekulturer .....	21
	Prosedyre for preparering av korncellekulturer .....	21
2.3.4	Eksposering av kornceller fra kylling .....	25

---

2.3.5	Eksponering av kornceller fra rotte .....	26
<b>2.4</b>	<b>Morfometrisk analyse i mikroskop .....</b>	<b>26</b>
<b>2.5</b>	<b>Deteksjon av celledød .....</b>	<b>28</b>
	Prosedyre for farging med trypanblå .....	28
<b>2.6</b>	<b>Immunfarging .....</b>	<b>29</b>
	Prosedyre for immunfarging .....	30
<b>2.7</b>	<b>Immunoblotting (Western blotting) .....</b>	<b>32</b>
2.7.1	Høsting av celler til westernblotting .....	32
2.7.2	Proteinmåling .....	33
2.7.3	Proteinjustering av prøver .....	34
2.7.4	Støping av gel .....	35
2.7.5	Gelelektroforese .....	37
2.7.6	Blotting av gel .....	38
2.7.7	Farging med Ponceau og blokking av membran .....	39
2.7.8	Tilsetning av primære og sekundære antistoff .....	40
2.7.9	Fremkalling .....	41
	Prosedyre fremkalling .....	42
2.7.10	Stripping av membran .....	42
2.7.11	Måling av westernbåndstyrke .....	43
<b>2.8</b>	<b>Statistiske analyser .....</b>	<b>43</b>
<b>3</b>	<b>Resultater .....</b>	<b>44</b>
<b>3.1</b>	<b>Valg av morfometriske endepunkt .....</b>	<b>45</b>
<b>3.2</b>	<b>Nevrittutvekst i PC12-celler .....</b>	<b>47</b>
3.2.1	Effekt av BDNF på nevrutvekst .....	47
3.2.2	Effekter av BDNF-antistoff .....	49
3.2.3	Effekter av caspasehemmeren z-DEVD-cmk .....	51
3.2.4	Effekter av escitalopram på nevrutvekst .....	54
3.2.5	Effekter av venlafaksin på nevrutvekst .....	56
3.2.6	Effekter av escitalopram i NGF-differensierende PC12-celler .....	57
3.2.7	Effekt av venlafaksin i NGF-differensierende PC12-celler .....	59
3.2.8	Effekter av BDNF-antistoff og caspase-3-hemmer på nevrutvekst i PC12-celler eksponert for venlafaksin .....	60
<b>3.3</b>	<b>Celledød i PC12-celler .....</b>	<b>63</b>

---

<b>3.4</b>	<b>Immunfarging med antistoff mot <math>\beta</math>-tubulin III og GAP-43.....</b>	<b>64</b>
<b>3.5</b>	<b>Nevrittutvekst i korncellekulturer .....</b>	<b>66</b>
3.5.1	Kornceller fra lillehjerne hos kylling .....	66
3.5.2	Kornceller fra lillehjerne hos rotte .....	68
<b>3.6</b>	<b>Westernblott ved bruk av utviklingsmarkører .....</b>	<b>70</b>
3.6.1	Deteksjon og kvantifisering av utviklingsmarkører i PC12-celler.....	70
3.6.2	Deteksjon og kvantifisering av utviklingsmarkører i korncellekulturer .....	74
<b>4</b>	<b>Diskusjon .....</b>	<b>77</b>
<b>4.1</b>	<b>Diskusjon av metoder .....</b>	<b>77</b>
4.1.1	Valg av cellemodeller.....	77
4.1.2	Morfometrisk analyse av nevruttutvekst.....	78
4.1.3	Valg av eksponering.....	79
4.1.4	Immunfarging.....	80
4.1.5	Westernblotting .....	81
<b>4.2</b>	<b>Diskusjon av biologiske funn .....</b>	<b>82</b>
4.2.1	Effekt av NGF og BDNF på nevruttutvekst.....	82
4.2.2	Robuste endepunkt for nevruttutvekst .....	83
4.2.3	Effekter av escitalopram og venlafaksin på nevruttutvekst .....	84
4.2.4	Effekt av BDNF-antistoff på nevruttutvekst.....	86
4.2.5	Caspasers rolle i nevruttutvekst .....	86
4.2.6	Andre mulige mekanismer bak nevruttutvekst og forslag til ytterligere studier...87	
<b>5</b>	<b>Konklusjon .....</b>	<b>89</b>
	<b>Litteraturliste .....</b>	<b>90</b>

# 1 Innledning

Under utviklingen av et nytt legemiddel er det alltid knyttet en usikkerhet til om den kjemiske substansen kan anvendes terapeutisk. Utviklingen tar lang tid og koster mye. Bruk av *in vitro*-studier på et tidlig trinn i legemiddelutviklingen vil kunne gi viktig informasjon om potensielle uønskede egenskaper ved substansen (kap. 1.1). Sentralnervesystemet er spesielt sårbart for uønskede effekter av legemidler. Nervecellenes dannelse av nevritter er viktig for synaptisk transmisjon og kommunikasjon. Nervevekstfaktorer spiller en viktig rolle i mediering av differensiering, aksonal vekst og overlevelse av spesifikke nevroner (kap. 1.2). For å undersøke potensielle uønskede egenskaper på nervesystemet under utvikling er *in vitro*-studier egnet. Antidepressiva er en legemiddelgruppe som utøver sin effekt delvis gjennom nervevekstfaktorer. Samtidig bruker stadig flere kvinner antidepressiva under graviditeten, og det er fortsatt ikke full enighet i fagmiljøet om hvorvidt disse legemidlene er fosterskadelige eller ikke (kap. 1.3). Mulige effekter av antidepressiva på nevronal utvikling diskuteres (kap. 1.4). Nevrittutvekst kan brukes som et mål på effekt av legemiddel når man ønsker å studere hvordan utviklingen av nervesystemet påvirkes. Cellelinjer eller nevronkulturer kan brukes som modellsystem for slike undersøkelser (kap. 1.5).

## 1.1 Sikkehetsfarmakologi og sikkerhetsfarmakologiske studier

Sikkerhetsfarmakologi defineres som studier som undersøker potensielle uønskede farmakodynamiske effekter av et legemiddel på fysiologiske funksjoner ved eksponering i det terapeutiske området og oppover [1]. Målet med disse studiene er å karakterisere legemiddelets uønskede farmakodynamiske og farmakokinetiske effekter [2]. Dette er viktig fordi alvorlige bivirkninger på sentralnervesystemet, på det kardiovaskulære system og på lever står for en stor andel av årsakene til at legemidler trekkes fra markedet [3]. For å harmonisere farmasøytisk virksomhet i EU, Japan og USA ble det utarbeidet ICH-retningslinjer. ICH-retningslinje S7A, som ble implementert i EU i 2000, omhandler sikkerhetsfarmakologiske studier for humane legemidler [1]. Implementeringen av denne retningslinjen har medført nye utfordringer for industrien, og har stor innvirkning på utviklingen av nye legemidler. Det er derfor foreslått bruk av *in vitro*-teknikker på tidlige trinn i den sikkerhetsfarmakologiske evalueringen. Slik kan uønskede effekter identifiseres før de kliniske studiene starter. Spesielt de vitale organsystemene som sentralnervesystemet,

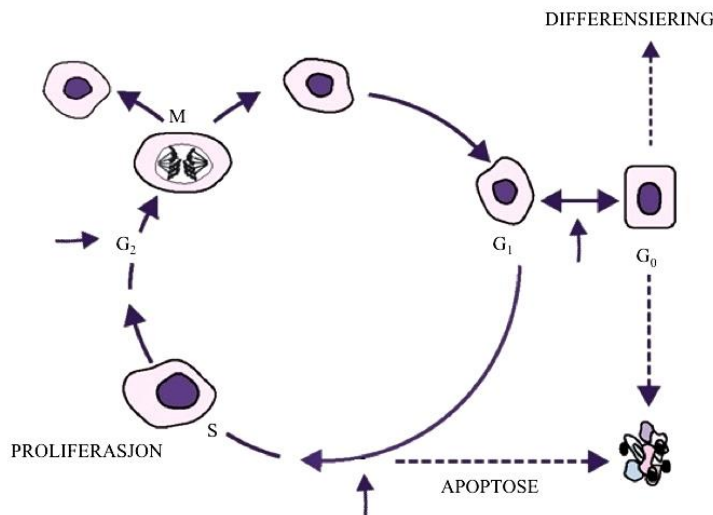
respirasjonssystemet og det kardiovaskulære system skal studeres ved hjelp av disse testene [4]. Så langt har størsteparten av testsystemene for nevrotoksisitet vært begrenset til cytotoksiske målinger, og ikke inkludert endepunkter som representerer nevrotoksisitet mer spesifikt [5].

## 1.2 Sentralnervesystemet under utvikling

For at sentralnervesystemet skal fungere optimalt er man avhengig av god intercellulær kommunikasjon mellom nevronene. Celleproliferasjon, nevrutvekst og migrasjon er prosesser i nervesystemet som er avgjørende for dette. Dersom kommunikasjonen mellom nevronene ikke utvikler seg optimalt og bearbeidingen av informasjon er mangelfull kan det føre til at utviklingen forstyrres [6].

### 1.2.1 Celleproliferasjon

Når celler skal proliferere gjennomgår de en rekke prosesser som samlet kalles cellyklus. Vanligvis deles cellyklus inn i de fire hovedfasene  $G_1$ , S,  $G_2$ , og M, i tillegg til  $G_0$ -fasen (se figur 1.1). En ny cellyklus starter i S-fasen hvor DNA syntetiseres og kromosomer replikeres. I fase  $G_2$  øker produksjonen av de andre bestanddelene i cellen slik at det blir nok til to celler. Da kan cellen gå inn i M-fasen, og selve celledelingen, mitosen, starter. Når celledelingen er fullstendig går cellene inn i  $G_1$ . I denne fasen avgjøres det om cellen skal gå inn i en ny cellyklus (S-fase), eller om den skal gå inn i  $G_0$ , altså ut av cellyklus (gjennomgått i: [7]). Her kan også cellen gå i apoptose og undergå programmert celledød. Rundt halvparten av nevronene som dannes under embryogenesen dør under normal utvikling av nervesystemet så apoptose er en naturlig prosess som er viktig blant annet for fosterutviklingen [8]. Samspillet mellom nervevekstfaktorer og apoptose spiller en viktig rolle i denne sammenhengen [9]. Cellyklus er underlagt streng kontroll, og spesielt  $G_1$ , S- og  $G_0$ -fasen er viktige kontrollposter. Cyklin-avhengige kinaser (CDK), som aktiveres av cyklin, spiller en avgjørende rolle i denne reguleringen (gjennomgått i: [7]).



**Figur 1.1 Skjematisert fremstilling av celledyklusen.** Figuren viser de fire hovedfasene G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> og M. Cellens alternative skjebner apoptose, differensiering og proliferasjon er også skissert. De viktige kontrollpostene G<sub>1</sub>, S og G<sub>0</sub> er markert med pil. Figuren er en modifisert versjon fra cytostatikaboken [10].

## 1.2.2 Nervevekstfaktorer og deres rolle i differensiering

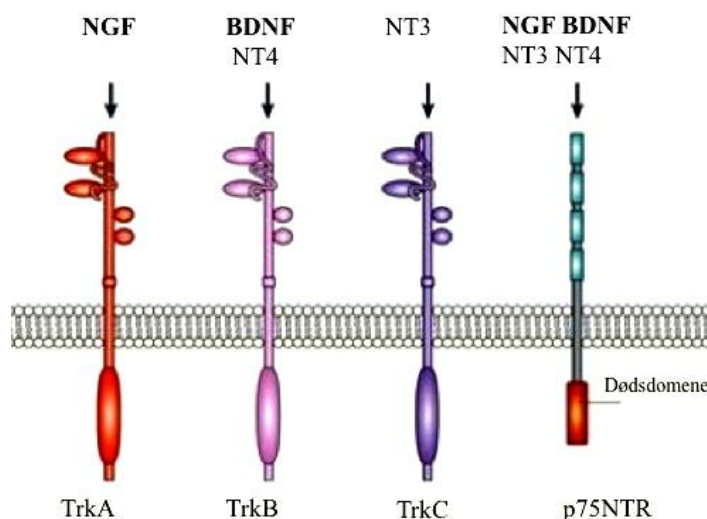
Nervevekstfaktorer medierer differensiering, aksonal vekst og overlevelse av spesifikke nevroner gjennom aktivering av reseptorer. Det finnes flere familier av nervevekstfaktorer, og nevrotrofinene er en av dem. Denne familien består av nervevekstfaktor (NGF), hjernederivert vekstfaktor (BDNF), nevrotrofin 3 og nevrotrofin 4 (gjennomgått i: [11]).

Nevrotrofinene regulerer nevronene gjennom overflatereseptorer. De binder hver sin tropomyosin-reseptor-kinase (Trk) og en felles p75 nevrotrofin reseptor (p75NTR) (se figur 1.2). Disse reseptorene regulerer overlevelse og apoptose av nevroner på flere nivå. Trk signalerer hovedsakelig gjennom to ulike veier, begge aktivert av Ras. Den ene går gjennom PI-3K/Akt og gir suppresjon av proapoptotiske proteiner og stimulerer til nevronal overlevelse. Den andre veien går gjennom MEK/MAPK som aktiverer antiapoptotiske proteiner. Det stimulerer også til nevronal overlevelse [12]. p75NTR er en reseptor som tilhører superfamilien tumor nekrose reseptor og aktivering av denne gir apoptose. Den interagerer med en rekke proteiner som overfører signaler som er viktige for å regulere nevronal overlevelse, differensiering og synaptisk plastisitet (gjennomgått i: [13]).

Den første nevronale vekstfaktoren som ble identifisert var NGF. NGF er et nevrotrofin som bindes med høy affinitet til TrkA og med lav affinitet til p75NTR. NGF sekreses i begrenset mengde. Dette fører til at nevroner som taper kampen om NGF undergår celledød, mens de

som vinner får dannet funksjonelle forbindelser og overlever. NGF regulerer altså nevronal overlevelse, i tillegg til å ha en viktig rolle i differensiering gjennom regulering av aksonale og dendrittiske prosesser. I sentralnervesystemet er NGF viktig for å opprettholde integriteten til afferente kolinerge nevroner fra basal forhjerne. I tillegg er nociceptiske fibre, en subpopulasjon av sensoriske nevroner, avhengige av NGF for å overleve i tidlig utvikling [14].

Hjernerivert neurotrofisk faktor (BDNF) er en annen vekstfaktor i neurotrofinfamilien. BDNF bindes med høy affinitet til TrkB og med lav affinitet til p75NTR. BDNF uttrykkes overalt i hjernen og støtter overlevelse av nevroner i sentralnervesystemet. I tillegg til dette er BDNF også viktig for funksjon av gliaceller og interaksjoner mellom nevroner og glia [14].



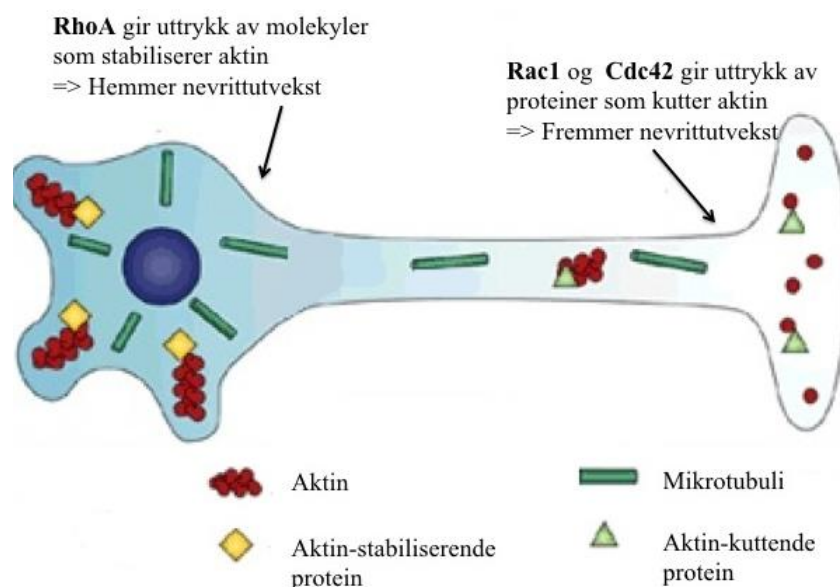
**Figur 1.2 Neurotrofinene og deres reseptorer.** Figuren viser de fire forskjellige neurotrofinreseptorene og hvilke neurotrofiner som aktiverer dem. Figuren er en modifisert versjon fra artikkelen "Neurotrophins and their receptors: A convergence point for many signalling pathways" [15].

### 1.2.3 Nevrittutvekst

Nerveceller skiller seg fra andre levende celler ved at de danner utløpere [16] som sørger for intercellulær kontakt gjennom synaptisk transmisjon [17]. Disse utløperne kan være aksoner (leder nerveimpulser fra en celle) eller dendritter (mottar signaler fra en celle). Begrepet nevrutt brukes når det er vanskelig å skille mellom disse, noe som først og fremst gjelder nevroner under utvikling. Det første trinnet i nevruttutvekst kalles "budding" og drives av cytoskjelettproteinene aktin. Dette fører til dannelsen av "growth cone" som består av en kjerneregion med membranorganeller og mikrotubuli, og et perifert område dannet av lamellipodia og filopodia, som begge er aktinbaserte proteiner (gjennomgått i: ([18])). Videre



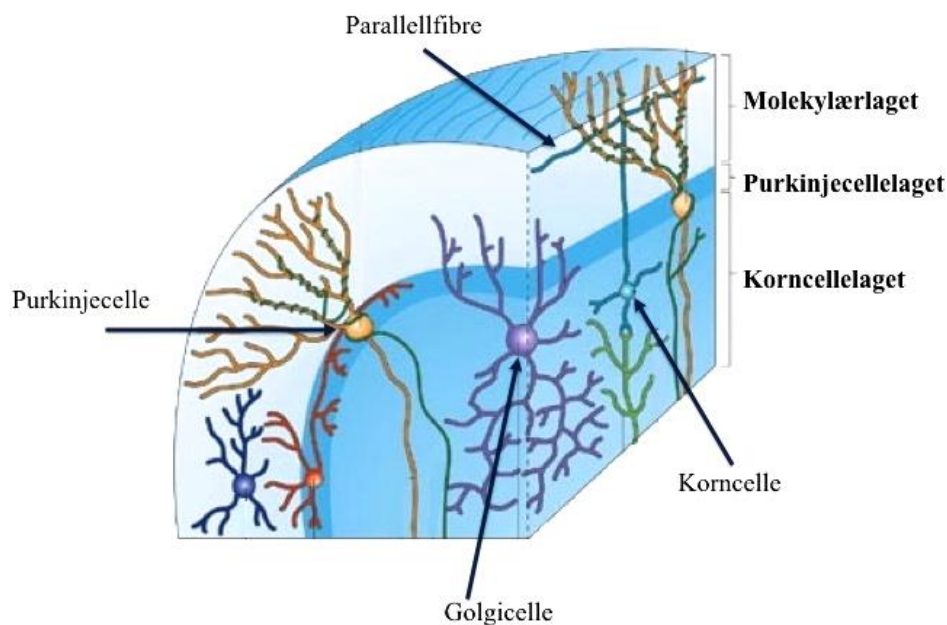
vekst er avhengig av mikrotubulidynamikk, og spesielt mikrotubuliassosiert protein 1B (MAP1B) ser ut til å være viktig [19]. Rho GTPaser, som aktiveres av en rekke ekstracellulære faktorer, spiller blant annet en viktig rolle i kontrollen av aktincytoskjelettet. Det finnes flere forskjellige Rho GTPaser, og RhoA, Rac1 og Cdc42 er blant de viktigste for nevruttvekst. De har til dels motsatte effekter (figur 1.3). De stimulerer eller hindrer nevruttvekst gjennom regulering av gentranskripsjon og membran- og mikrotubulidynamikk. RhoA gir uttrykk av molekyler som stabiliserer aktin. Dette resulterer i at nevruttveksten hemmes. Rac1 og Cdc42 gir uttrykk av proteiner som kutter aktin, og de er dermed positive regulatorer av nevruttvekst slik at nevruttvekst fremmes (gjennomgått i: [18]). Studier har vist at mutasjoner som endrer Rho-signaleren resulterer i unormal nevronal kommunikasjon og mangelfull kognitiv funksjon [6, 20]. Det er derfor viktig å finne ut hvilke ekstracellulære signaler som er koblet til hvilke Rho-proteiner, og hvordan disse igjen er koblet opp mot aktincytoskjelettet. Slik kan man finne ut hvilken relevans dette har for nevronal morfologi, plastisitet og funksjon [6]. Rho GTPaser og regulering av cytoskjelettet ser også ut til å spille en viktig rolle i apoptose. Caspaser og caspase-mediert kløyving gir opphav til denne signaleringen gjennom Rho [21]. Kap. 1.2.5 omhandler caspaser i detalj.



**Figur 1.3 Rho GTPaser er involvert i nevruttvekst.** Figuren viser hvordan Rho GTPasene har motsatte effekter på nevruttvekst. Figuren er en modifisert versjon hentet fra artikkelen "Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neurogenesis." [18].

### 1.2.4 Migrering av kornceller i lillehjernen

Migrasjon er en sentral prosess som er viktig for normal funksjon av nervesystemet. Kornceller fra lillehjernen er mye brukt for å studere hvordan nevroner migrerer [22]. Migrering fører til etablering av de ulike nevronale lagene (se figur 1.4) [23]. Mellom embryonisk dag 9 og dag 18 (E9 og E18) utvikler lillehjernen de horisontale nevronlagene [24]. Det indre laget gir opphav til purkinjeceller og golgiceller, mens det ytre laget danner forløpere til blant annet kornceller. I tidlig embryonisk fase (E11-E13) etableres det ytre korncellelaget som resultat av cellemigrasjon fra ”rombic lip”. Da er det indre korncellelaget allerede dannet (gjennomgått i: [23]). Når de umodne korncellene er i det ytre korncellelaget har de form som små riskorn [25]. Korncellene, som er den mest tallrike nevrontypen i lillehjernen [26], sender på E14 ut parallellfibre som blir en del av det molekylære laget [23]. Migrasjon fra det ytre korncellelaget til det molekylære laget skjer med høy hastighet. Videre migrerer de med redusert hastighet gjennom purkinjecellelaget. Deretter øker migrasjonshastigheten igjen og korncellene når det indre korncellelaget. Her fullføres modningen og korncellene får en mer globulær form [25]. Cellekroppen blir da en del av det indre korncellelaget, og det ytre korncellelaget forsvinner etter hvert. Vanligvis skjer det rundt 2-årsalderen hos mennesker (gjennomgått i: [23, 24]).



**Figur 1.4 Nevronale lag i lillehjernebarken.** Figuren viser de ulike nevronale lagene i lillehjernen og noen av celletypene som er til stede. Bildet er en modifisert versjon hentet fra artikkelen ”Anatomical and physiological foundations of cerebellar information processing” [27].

### 1.2.5 Caspaser

Caspaser er en familie av cystein-proteaser som har sentrale funksjoner i signalleringen under apoptose (gjennomgått i: [28]). Caspaser deles inn i to grupper, initiatorcaspaser og effektorcaspaser. Initiatorcaspaser kløyver nedstrømscaspaser og er involvert i oppstarten av den apoptotiske kaskaden. Effektorcaspaser står for kløyvingen av cellulære proteiner [29]. Caspaser aktiveres av ulike ”pro-death” signaler, og det blir dannet aktive komplekser med adaptorproteiner. De aktiverte caspasene kan da kløyve både andre caspaser og spesifikke cellulære substrater. Resultatet er cellulær destruksjon gjennom apoptose (gjennomgått i: [30]).

Det er økende bevis på at caspaser også har roller i nervesystemet, både under utvikling og hos voksne (gjennomgått i: [30]). Flere studier har vist at caspaser spiller en viktig rolle i blant annet kontroll av cellesyklus, celleproliferasjon, differensiering og cellemigrasjon. Caspase-8 ser ut til å ha en viktig rolle i proliferasjon av immunceller, og mangel på caspase-8 gir mangelfull aktivering av T-, B- og NK-celler. Dette gir økt infeksjonsfare (gjennomgått i: [28]). Caspase-3 er involvert i differensiering av flere ulike celletyper, blant annet erytrocytter, skjelettmuskelceller, osteoblaster, keratinocytter og T-lymfocytter [31]. Både caspase-9 og caspase-8 er koblet til migrering av celler og mangel på disse er vist å hemme migreringen. Her er aktivering av Rac foreslått som en mulig modell for denne effekten av caspase-8. Kløyving av flere ulike adhesjonsproteiner og proteiner involvert i bevegelighet av celler ser også ut til å spille en rolle i reguleringen av cellemigrasjon (gjennomgått i: [28]). Studier i mus viste at mangel på caspase-9 under utviklingen fører til defekter i dannelsen av aksoner og synapser. Caspase-3 ser ut til å være viktig for synaptiske endringer som ligger bak hukommelse. Alle disse effektene av caspaser på nervesystemet er noe av årsaken til økende interesse for caspaser som potensielle terapeutiske targets innenfor blant annet neurodegenerative sykdommer (gjennomgått i: [30]). Ikke-apoptotiske effekter av caspase-3 har også blitt undersøkt i PC12-celler. Caspaseaktivering og kløyving av det cytoskjelettassosierte proteinet tau ble funnet å være nødvendig for riktig cellemorfologi [32].

## 1.3 Antidepressiva og bruk av disse under graviditet

Monoaminhypotesen, som er den biokjemiske hovedteorien bak depresjon, sier at depresjon skyldes mangel på serotonin og noradrenalin i enkelte deler av hjernen [33]. Med bakgrunn i denne hypotesen er det utviklet legemidler som virker gjennom å øke mengden tilgjengelig serotonin, og i noen tilfeller også noradrenalin, i synapsespalten.

### 1.3.1 SSRI og SNRI

Selektive serotoninreopptakshemmere (SSRI) og selektive serotonin- og noradrenalinreopptakshemmere (SNRI) er to grupper antidepressiva som er mye brukt. SSRI hemmer selektivt reopptak av serotonin gjennom å blokkere høy-affinitets-transportøren SERT [33]. Escitalopram er et eksempel på legemiddel i denne gruppen. SNRI skiller seg fra SSRI ved at de også hemmer reopptak av noradrenalin [34]. Venlafaksin er et eksempel på et SNRI.

### 1.3.2 Bruk av antidepressiva under graviditet

Den generelle behandlingspolitikken hos gravide, uansett sykdom, er at man bør være tilbakeholden med legemiddelbruk, spesielt i første trimester. Allikevel er det alltid en balansegang mellom skade som følge av sykdom hos mor, og skade hos foster som følge av legemiddelbruk. Sykdom kan medføre en fare for både mor og foster som overstiger en mulig risiko for fosterskadelig effekt av legemiddelet. I en stor retrospektiv studie fra Danmark ble det funnet at sannsynligheten for at barna til kvinner som brukte SSRI under svangerskapet skulle få misdannelser av hjertet var like stor som sannsynligheten til at barn av deprimerte kvinner som ikke brukte SSRI under svangerskapet skulle få misdannelser av hjertet [35]. I den studien er ikke normale, friske kvinner inkludert, så det er ikke mulig å si noe om sjansen for misdannelser er større hos deprimerte kvinner versus friske kvinner. Det er tidligere vist at kvinner med depresjon under svangerskapet har økt risiko for tidlig fødsel og lav fødselsvekt på barnet [36]. Stress hos mor kan også påvirke fosteret og fødselsforløp gjennom aktivering av hypotalamus-hypofyse-binyre-aksen. Peptider frigjort derfra, som for eksempel adrenokortikotrop hormon (ACTH) og  $\beta$ -endorfin er med på å mediere disse effektene [37].

SSRI anses som førstevalg når det er behov for legemiddelbehandling av depresjon under svangerskapet. Bruken er økende, og 2-3 % av alle gravide i Europa og 8-10 % av alle

gravide i USA bruker SSRI i deler eller hele graviditeten (gjennomgått i: [38]). Etter at US Food and Drug Administration (FDA) i 2005 oppdaget at eksponering for paroksetin, i første trimester kunne øke risikoen for hjertemisdannelser [39] har et stort antall epidemiologiske studier blitt publisert. Paroksetin er en selektiv hemmer av serotoninreopptak, men har i tillegg en moderat affinitet til noradrenalin- og dopaminreseptorer [40, 41]. Blant studiene som ble publisert i etterkant er det flere studier som konkluderer med en negativ assosiasjon mellom bruk av SSRI og forekomst av misdannelser av hjertet (gjennomgått i [42]). En meta-analyse gjort i 2010 viste økt risiko for misdannelser av hjertet ved bruk av paroksetin [43], og dette har ført til en generell tilbakeholdenhet [34]. Det er få prospektive studier av gravide som har brukt SNRI, men de som foreligger har ikke gitt holdepunkter for teratogen effekt eller mentale utviklingsforstyrrelser [34].

I fagmiljøene er det fortsatt ikke full enighet om disse legemidlene er fosterskadelige eller ikke, selv om det synes å være enighet om at SSRI ikke er det man kaller ”major teratogens”. Den absolutte risikoen vil være lav. Med begrepet ”major teratogens” menes legemidler som med sikkerhet eller stor sannsynlighet er fosterskadelige. Det er viktig at det gjøres en grundig nytte-/risikovurdering i hvert enkelt tilfelle og at alvorlig maternal sykdom behandles optimalt (gjennomgått i: [38]).

## **1.4 Effekter av antidepressiva på nevronal utvikling**

### **1.4.1 Antidepressiva øker uttrykk av BDNF**

Antidepressiva virker ved å øke serotonin, en viktig neurotransmitter i sentralnervesystemet. Serotonin kontrollerer blant annet appetitt, søvn og humør. Det skjer gjennom effekter i ryggmarg, hypothalamus, det limbiske system og lillehjernen [33]. Aktiviteten av serotonin reguleres først og fremst ved korrigering av mengde serotonin tilgjengelig i synapsespalten, og her spiller SERT (serotonintransportør) en viktig rolle [44]. SSRI og SNRI er vist å øke uttrykket av BDNF. Foreslått mekanisme for denne effekten er at økt nivå av serotonin induserer økt uttrykk av vekstfaktorer, for eksempel BDNF. Antidepressiva medierer på den måten beskyttende endringer som følge av økt BDNF (gjennomgått i: [45]). BDNF ser videre ut til å mediere aktivering av kortikal plastisitet som kan være nyttig i flere nevrologiske og nevropsykiatriske tilstander [46].

### 1.4.2 Serotonin og nevruttvekst

Studier indikerer at det under utviklingen av nervesystemet er perioder hvor nervesystemet er spesielt utsatt for endringer i serotonininnivå, og hvor endret serotonininnivå vil ha permanente påvirkninger på nervesystemet. Hvilke molekulære mekanismer som ligger bak disse påvirkningene undersøkes fortsatt. Stadig flere studier indikerer at tidlige endringer i signalering gjennom serotonin bidrar til blant annet forstyrrelser i nervesystemet og nevropsykiatriske lidelser. Kunnskap om hvordan serotonin påvirker nevronal morfologi og plastisitet er derfor viktig (gjennomgått i: [47]).

Flere *in vitro*-studier har vist at serotonin er involvert i reguleringen av nevruttvekst i sentralnervesystemet hos pattedyr, og at effektene kan variere. Serotonin er vist både å undertrykke nevruttvekst og å fremme nevruttvekst. Serotonin virker på flere ulike reseptorsubtyper og i flere ulike nevronale celler. Dette kan bidra til det som ser ut som motsatte effekter. Studier på transgene mus og på modeller med knockout av reseptorer har derimot ikke avdekket store forstyrrelser i aksonal vekst under utvikling (gjennomgått i: [48]). Det er også utført studier i PC12-celler som viser at serotonin påvirker nevruttvekst [49, 50]. En av disse studiene indikerte at serotonin øker intracellulær  $Ca^{2+}$  gjennom påvirkning på 5-HT<sub>3</sub>-reseptoren og L-type  $Ca^{2+}$ kanaler. Det førte til en forsterkning av NGF-indusert nevruttvekst [50]. Den effekten serotonin har på tettheten av dendritter, synaptogenese og etablering av nevronale nettverk kan være avhengig av serotoninens effekter på nevruttvekst (gjennomgått i: [48]). Når det gjelder noradrenalin, som også er involvert i depresjon og virkningen av antidepressiva, så er noradrenalin vist å ha en viktig rolle i differensiering, hvor nevruttvekst er en viktig parameter. Noradrenalin økte antallet nevrutter per celle, og GAP-43, som er et viktig protein i aksonal vekst, var også økt etter eksponering [51].

## 1.5 Neurobiologiske modeller innen sikkerhetsfarmakologi

For å studere effekter av legemidler trengs det *in vitro*-modeller som beskriver observerte endringer på en reell og reproduserbar måte. Både PC12-celler og kornceller fra lillehjernen er foreslåtte modeller for sikkerhetsfarmakologiske studier [52].

### 1.5.1 PC12-celler

Cellelinjer er en populasjon av celler som ofte kommer fra én enkelt forløpercelle, og de er det man kaller en klonal cellelinje. Cellelinjer har flere fordeler som gjør at de egner seg som *in vitro*-modeller, og de er nyttige når man ønsker å forstå de biologiske prosessene som er involvert i nevronal differensiering. Fordi man kan kontrollere differensieringen så presist, er cellelinjer gode *in vitro*-modeller når man ønsker å screene for kjemiske effekter på nevruttvekst [53]. PC12-celler er en slik cellelinje. Den har sin opprinnelse fra feokromocytom i rotte, som er en svulst i binyremargen. Disse cellene syntetiserer og lagrer katekolaminene dopamin og noradrenalin [54]. Når disse cellene eksponeres for NGF endrer de fenotype og får en rekke egenskaper som ligner det man ser i sympatiske nevroner. Det innebærer at de stopper å dele seg, de blir elektrisk eksiterbare, de danner utløpere og de danner kontakter med andre celler gjennom synapser [55].

### 1.5.2 Kornceller fra lillehjerne hos kylling

Primærkulturer er en av de mest lovende *in vitro*-modellene for å studere nevrotoksisitet under utvikling (gjennomgått i: [52]). Lillehjernen er et unikt system for å studere sentralnervesystemet under utvikling. Studier av morfogenetisk bevegelse, dannelse av gangliostrukturer og etablering av nevronale lag kan gjøres med modeller som benytter lillehjernen [56]. Korncellene fra lillehjernen er den største og mest homogene nevronpopulasjonen i hjernen hos pattedyr. Kulturene har en relativt høy renhet, i tillegg til at sentralnervesystemet modnes postnatalt [26]. Lillehjernebarken hos rotter er velstudert, og bruk av nevroner fra lillehjernen hos rotter er en mye brukt modell. Den er godt egnet til å identifisere faktorer viktige for kontroll av nevronal differensiering og apoptose [57]. Blant annet er serotonin til stede tidlig i embryoutviklingen [58] og kan undersøkes nærmere med hensyn på nevruttvekst. BDNF er viktig for overlevelsen av nevroner i lillehjernen [59], og tilstedeværelsen av BDNF i lillehjernen muliggjør nærmere undersøkelser av hvilken rolle vekstfaktoren har i nervesystemet under utvikling. Bruk av nevroner fra lillehjerne hos kylling er et godt alternativ fordi nevronene har relativt like karakteristika som rottenevronene [60]. Kornceller fra lillehjerne hos kylling isolert på E18 (embryonisk dag 18) skal gi kornceller som tilsvarer kornceller isolert fra rotte på P7 (postnatal dag 7) [24].

## 1.6 Mål for oppgaven

Hovedmålet med denne oppgaven har vært å etablere PC12-celler som nevrobiologisk modell innen sikkerhetsfarmakologi, og bruke denne modellen til å studere effekter av antidepressiva på nevronal utvikling ved å måle nevruttvekst.

Delmålene har vært:

1. Etablere PC12-celler som en nevrobiologisk modell for å undersøke nevruttvekst gjennom å eksponere cellene for NGF og undersøke ved lysmikroskopi hvilke morfometriske endepunkter som best reflekterer endringer i nevruttvekst.
2. Undersøke om BDNF gir økt nevruttvekst.
3. Studere effekter av escitalopram og venlafaksin på nevruttvekst.
4. Studere mekanismene bak nevruttvekst nærmere, derunder:
  - I. Undersøke om antistoff mot BDNF kan redusere induert nevruttvekst.
  - II. Undersøke om caspase-3 er involvert i nevruttvekst.
5. Teste om nevroner fra lillehjerne er egnet for studier på nevruttvekst.
6. Teste westernblotting og immunfarging som en metode for å se på nevruttvekst.



## 2 Materialer og metoder

### 2.1 Materialer

**Tabell 2.1** Kjemikalier og biologiske produkter

Produkt	Leverandør
Acrylamide/BIS solution, 30 %	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
APS	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Basal Medium Eagle	Life Technologies™ Gibco, USA
BCA Protein Assay Kit, Pierce®	Thermo Scientific Rockford, USA
BDNF-antistoff (AB1513P)	Millipore, Temecula, USA
BDNF (B3795)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Bovint serumalbumin (A9418)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Bromfenolblå	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland
CaCl <sub>2</sub> (kalsiumklorid)	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland
Caspasehemmer (z-DEVD-cmk) (N1580)	Bachem AG, Bubendorf, Sveits
DMEM	Life Technologies™ Gibco, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
DNase 1 (D5025)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Escitalopram oksalat (E4786)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Eselserum (tørrserum) (017-000-121)	Jackson Immuno Research, USA
Etanol (absolutt alkohol)	Kemetyl Norge AS
Fenolrødt	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Føtalt kalveserum	Lonza Group, Sveits
GAP-43	Millipore, Temecula, USA
Glukose	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Glyserol 100%	VWR International Ltd., England
HCl (hydrogenklorid)	VWR International Ltd., England
Hesteserum	Life Technologies™ Gibco, USA
Hoechst	Termo Fischer Scientific, USA

---

Insulin (bovin) (I1882)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Isopropanol prima	Kemetyl Norge AS
KCl (kaliumklorid)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (kaliumdihydrogenfosfat)	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland
Leupeptin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Luminata™ forte Western HRP Substrate	Millipore, Temecula, USA
2-merkaptoetanol	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Metanol	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
MgSO <sub>4</sub> (magnesiumsulfat)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
NaCl (natriumklorid)	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O (dinatriumhydrogenfosfatdihydrat)	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland
NaOH	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland
Natriumpyruvat	Life Technologies™ Gibco, USA
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (natrium orthovanadate)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
NGF (N6009)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Paraformaldehyd	Chemi-Teknik AS, Oslo
Penicillin-Streptomycin (10 000 U/ml-10 mg/ml)	Life Technologies™ Gibco, USA
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
PMSF	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Poly-L-lysin	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Ponceaus S solution	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Precision Plus Protein™ All Blue Standards	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific Rockford, USA
SDS	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Supersignal™ West Pico	Thermo Scientific Rockford, USA
TEMED	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Tris-base (tris[hydroksymetyl]aminometan)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Tris/glycin, 10X	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Tris/glycin/SDS, 10X	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Triton	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Trypanblå	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Trypsin (bovin) (T9201)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA

Trypsinhemmer (soyabønne) (T9003)	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
Tørrmelk	Normilk AS, Norge
Venlafaksin	Tocris Bioscience, USA

**Tabell 2.2 Utstyr**

<b>Utstyr</b>	<b>Leverandør</b>
Brett, 96-brønner	Nunc <sup>TM</sup> , Thermo Scientific, USA
Cellekulturflasker 175 cm <sup>2</sup>	Nunc <sup>TM</sup> , Thermo Scientific, USA
Cellekulturskåler	Nunc <sup>TM</sup> , Thermo Scientific, USA
Cellekulturskåler (glass)	MatTek Corporation, Ashland, MA, USA
Celleskrape	Corning Incorporated Corning, USA
CO <sub>2</sub> -inkubatorskap	Thermo Scientific Rockford, USA
Elektroforeseapparat	Power Pac 300, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Finnpipette	Thermo Scientific Rockford, USA
Fremkallingsmaskin	Chemi Genius <sup>2</sup> Bio Imaging Systems, Syngene Frederick, USA
Gassbrenner	Fireboy eco, Integra Biosciences Zizers, Sveits
Inkubatorskap	Termaks Bergen, Norge
Kamera til lysmikroskop	Digital Sight DS-QiMC, Nikon Melville, USA
Kokeapparat	Grant-Boekel, Grant Instruments (Cambridge) Ltd., England
Konfokalmikroskop	Nikon TE2000-E m/C1 Nikon konfokalenhet, USA
LAF-benk	Holten Safe 2000, modell 1.2, Thermo Scientific, USA
Lysmikroskop	Nikon Eclipse TE 300, USA
Minishaker	Ika <sup>®</sup> Works inc., USA
Pipetboy	Integra Biosciences Zizers, Sveits
Pipetter (sterile)	Corning Incorporated Corning, USA
Plateleser	HTS 7000 Plus Bio Assay Reader, Perkin-Elmer Massachusetts, USA
Vannbad	Grand-Boekel, Grants Instruments Ltd, England
Vekt	Mettler Toledo, Sveits

## 2.2 PC12-celler

PC12-celler er en cellelinje fra feokromocytom i rotte [54]. Cellelinjen brukes som modell for å studere nevronale egenskaper [61].

### 2.2.1 Splitting av PC12-celler til flaske

PC12-cellene dyrkes i cellekulturflasker på 75 cm<sup>2</sup>. De inkuberes i inkubatorskap ved 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub>. Cellene splittes til nye flasker hver tredje eller fjerde dag.

1. Cellekulturflasken ses på i mikroskop for å kontrollere at cellene er konfluente.
2. Gammelt medium helles av, og 10 ml nytt PC12-medium (tabell 2.3) tilsettes flasken.
3. Flasken bankes lett på sidene slik at cellene løsner fra bunnen. Dette kontrolleres ved å se på dem i mikroskop.
4. Cellesuspensjonen pipetteres opp og ned til celleaggregatene er brutt opp. Ved behov brukes en innsnevret pasteurpipette.
5. 1,5 ml av cellesuspensjonen overføres til en ny flaske som er tilsatt 20 ml nytt PC12-medium (tabell 2.3). Flasken beveges for å få en jevn fordeling av celler i flasken.
6. Flasken settes i inkubatorskap ved 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub>.

### 2.2.2 Splitting av PC12-celler til skåler

1. Cellene splittes som beskrevet ovenfor i punkt 1 – 4.
2. En liten prøve av cellesuspensjonen tas ut til telling i et Bürcher tellekammer for å bestemme celledettheten. Dette gjøres i et lysmikroskop.
3. 2 rutenett (4 × 4 ruter) telles, ett på hver side av midten av tellekammeret. Gjennomsnittet beregnes og brukes videre.

4. Vanligvis er ønsket celletetthet  $7,0 \times 10^4$  celler/ml, men  $3,5 \times 10^4$  kan også brukes.

Formelen nedenfor brukes til å regne ut mengden cellesuspensjon som trengs:

$$X \text{ (ml)} = \frac{\text{antall ml per skål} \times \text{antall skåler} \times \text{ønsket celletetthet per ml}}{\text{antall celler per ml}}$$

5. Hvor mye ekstra medium som trengs regnes ut ved å bruke følgende formel:

$$Y \text{ (ml)} = (\text{antall ml per skål} \times \text{antall skåler}) - X \text{ (ml)}$$

6. Beregnet mengde cellesuspensjon og PC12-medium (tabell 2.3) blandes godt i en erlenmeyerkolbe og overføres til sterile skåler. Dersom det skal utføres immunfarging bør man bruke skåler med glassbunn, som MatTek-skåler. Hvor mye cellesuspensjon som trengs per skål er angitt i tabell 2.4.

7. Skålene inkuberes ved  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  i  $5 \%$   $\text{CO}_2$ .

**Tabell 2.3 PC12-medium med serum**

Komponenter	Mengde
Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM)	500 ml
Føtalt kalveserum (DE14-801F)	50 ml
Hesteserum (16050)	25 ml
Natriumpyruvat (100 mM)	5 ml
Penicillin-Streptomycin (10 000 U/ml-10 mg/ml)	5 ml

- Komponentene tilsettes i LAF-benk
- Oppbevares ved  $2\text{-}8 \text{ }^\circ\text{C}$

**Tabell 2.4 Mengde cellesuspensjon per skål**

Skål	Størrelse	Mengde
Liten	$8,8 \text{ cm}^2$	1 ml
Medium	$21,5 \text{ cm}^2$	3,3 ml
Stor	$66,5 \text{ cm}^2$	10 ml

- I liten skål tilsettes i tillegg 1 ml ekstra medium

### 2.2.3 Eksponering av PC12-celler

Tre forsøksoppsett ble satt opp (tabell 2.5). Behandlingen startet 24 timer etter utplating og varte i 72 timer. Da ble mikroskopi (2.4), deteksjon av celledød (2.5), fiksering av celler (2.6) og høsting (2.7) utført.

**Tabell 2.5 Eksponering av PC12-celler: 3 forsøksoppsett**

<b>Forsøksoppsett nr. 1</b> - <b>Morfometrisk analyse</b>	<b>Forsøksoppsett nr. 2</b> - <b>Morfometrisk analyse</b> - <b>Deteksjon av celledød</b> - <b>Høsting</b>
Ubehandlet NGF 50 ng/ml DMSO 0,027 µl DMSO 0,027 µl + NGF 50 ng/ml Venlafaksin 5 nM Venlafaksin 2 µM Venlafaksin 5 µM Venlafaksin 10 µM Venlafaksin 5 nM + NGF 50 ng/ml Venlafaksin 2 µM + NGF 50 ng/ml Venlafaksin 5 µM + NGF 50 ng/ml Venlafaksin 10 µM + NGF 50 ng/ml Escitalopram 1 nM Escitalopram 100 nM Escitalopram 500 nM Escitalopram 1 µM Escitalopram 1 nM + NGF 50 ng/ml Escitalopram 100 nM + NGF 50 ng/ml Escitalopram 500 nM + NGF 50 ng/ml Escitalopram 1 µM + NGF 50 ng/ml	Ubehandlet NGF 50 ng/ml DMSO 3 µl BDNF 100 ng/ml BDNF 100 ng/ml + anti-BDNF 3,33 µg/ml Anti-BDNF 3,33 µg/ml Anti-BDNF 3,33 µg/ml + NGF 50 ng/ml z-DEVD-cmk 1µM z-DEVD-cmk 1µM + NGF 50 ng/ml z-DEVD-cmk 1µM + BDNF 100 ng/ml Venlafaksin 2 µM Venlafaksin 10 µM Escitalopram 500 nM Venlafaksin 2 µM + anti-BDNF 3,33 µg/ml Venlafaksin 10 µM + anti-BDNF 3,33 µg/ml Escitalopram 500 nM + anti-BDNF 3,33 µg/ml Venlafaksin 2 µM + z-DEVD-cmk 1µM Venlafaksin 10 µM + z- DEVD-cmk 1µM Escitalopram 500 nM + z-DEVD-cmk 1µM

---

**Forsøksoppsett nr. 3****- Immunfarging**

---

Ubehandlet

NGF 50 ng/ml

Escitalpram 500 nM

Venlafaksin 2  $\mu$ MVenlafaksin 10  $\mu$ M

---

## 2.3 Korncellekulturer

### 2.3.1 Korncellekulturer

Korncellekulturer fra lillehjernen er en *in vitro*-modell for å studere nevronal utvikling [59], og er brukt til screening av legemidler for toksiske effekter [62].

### 2.3.2 Coating av skåler med poly-L-lysin

Dagen før korncellekulturene prepareres behandles skålene med poly-L-lysin. Dette gjøres for å bedre celleadhesjon til skålen og for å bedre vekst av cellene.

1. 10 ml MQ-vann tilsettes en flaske med 5 mg poly-L-lysin. Blandes godt.
2. Løsningen overføres til en steril erlenmeyerkolbe og fortynnes til 0,01 mg/ml i 500 ml MQ-vann. Blandes godt til all poly-L-lysin er løst.
3. 1 ml poly-L-lysin tilsettes små skåler (8,8 cm<sup>3</sup>), 2 ml tilsettes medium skåler (21,5 cm<sup>3</sup>) og MatTek-skåler, og 5 ml tilsettes store skåler (66,5 cm<sup>3</sup>). Sørg for at hele overflaten er dekket ved å bevege skålene rundt.
4. Etter 30-60 minutters henstand pipetteres poly-L-lysin-løsningen av. Skålene tørkes over natt i LAF-benk med luftstrøm på maksimal styrke.

### 2.3.3 Preparering av korncellekulturer

Befruktede kyllingegg, *Gallus gallus*, fås fra Samvirkekylling, Våler, Norge. Disse ligger kaldt i maksimalt 7 dager før de legges i rugemaskin som holder 37 °C. Luftfuktigheten holdes på et tilfredsstillende nivå ved hjelp av et vannkammer og en vifte. På dag 17-18 i rugeprosessen blir kyllingpreparasjonen utført. Før dekapitering legges eggene 7 minutter i isvann for å bedøve fostrene. Eggene vaskes i 70 % etanol før de knekkes i sterile petriskåler. Rottene er av arten *Rattus norvegicus* og er hannrotter fra stammene Harlan eller Wistar fra Charles River. Disse fås fra Folkehelseinstituttet ferdig dekapitert. Prosedyren for preparering av korncellekulturene er lik for kylling og rotte, med unntak av hvilket medium som brukes ved utsåing.

#### Prosedyre for preparering av korncellekulturer

1. Fostrene avlives med en steril skalpell ved rask dekapitering.
2. Hodene fraktes til LAF-benken hvor lillehjernen (cerebellum) dissekeres ut ved hjelp av en steril saks og pinsett. Legges i en skål med løsning 1 (tabell 2.6).
3. Hjernehinne fjernes forsiktig ved hjelp av to pinsetter og lillehjernen overføres til en ny stor petriskål som er fylt med løsning 1 (tabell 2.6).
4. Løsning 1 suges forsiktig av, og lillehjernen samles i en haug på midten av skålen. Lillehjernen kuttes i mindre biter med en skalpell, og det kuttes i to retninger vinkelrett på hverandre.
5. 10 ml av løsning 1 tilsettes i skålen og bitene overføres til et sterilt 50 ml rør med nye 10 ml av løsning 1. Røret sentrifugeres ved 1000 rpm i 1 minutt.
6. Supernatanten fjernes, og pelleten tilsettes 8-15 ml løsning 2 (tabell 2.6). Det pipetteres forsiktig opp og ned til pelleten er løst opp.
7. Cellesuspensjonen overføres til en steril trypsineringsflaske og settes på vannbad ved 37 °C i 15 minutter. Begge korkene skrues halvveis på, og flasken ristes forsiktig med jevne mellomrom.



8. Løsningen med cellebitene overføres til et 50 ml rør med 15 ml løsning 4 (tabell 2.6). Røret fylles opp med løsning 4 og sentrifugeres ved 1000 rpm i 2 minutter. Hvis supernatanten ikke er klar etter sentrifugering er det for mye DNA, og en liten mengde løsning 3 (tabell 2.6) tilsettes røret og sentrifugeringen gjentas.
9. Supernatanten fjernes og røret tilsettes 3 ml løsning 3 (tabell 2.6).
10. Cellesuspensjonen homogeniseres ved å pipettere pelleten forsiktig opp og ned først med en 10 ml pipette, så en 5 ml pipette og deretter en steril pasteurpipette som er smalnet i tuppen ved brenning. Løsningen pipetteres opp og ned et tilstrekkelig antall ganger til løsningen blir blakket.
11. Suspensjonen får stå i ro i noen minutter slik at eventuelle celleklumper synker til bunns. Den klumpefrie delen av suspensjonen overføres til et sterilt 50 ml rør og tilsettes 15 ml løsning 5 (tabell 2.6).
12. Dersom det var celleklumper som sank til bunns tilsettes 2 ml løsning 3 dette røret. Punkt 10-11 gjentas helt til alle celleklumpene har løst seg. Løsningen overføres til røret med løsning 5.
13. Cellesuspensjonen sentrifugeres ved 900 rpm i 7 minutter.
14. Pelleten løses opp i egnet medium for cellekultur (se tabell 2.8 og 2.9). Mengden platemedium er halvparten av totalmengden beregnet ut fra antall preparerte hjerner. Det beregnes 15-20 ml medium per kyllinghjerne og 10 ml medium per rottehjerne. Ved utplating og dyrking av cellekulturer brukes det medium som inneholder serum. Serum varmeinaktiveres på vannbad ved 56 °C i 30 minutter. Kun utprøvd serum må benyttes (se tabell 2.10).
15. En liten prøve av cellesuspensjonen tas ut til telling i et Bürcher tellekammer. Cellesuspensjonen fortynnes ytterligere i platemedium til ønsket tetthet. Vanlig tetthet er  $1,7 \times 10^6$  celler/ml medium for kylling og  $1,2 \times 10^6$  celler/ml for rotter. Mengde platemedium beregnes ut fra følgende formel:

$$X \text{ (ml)} = \frac{\text{antall ml celleduspensjon} \times \text{celletetthet per ml celleduspensjon}}{\text{antall celler per ml}}$$

16. Celleduspensjonen overføres til skåler som er coatet med poly-L-lysin dagen før.

Mengde celleduspensjon per skål er angitt i tabell 2.4.

17. Skålene inkuberes i inkubatorskap ved 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub>.

**Tabell 2.6 Løsninger til preparering av korncellekulturer**

Løsning	Komponenter	Mengde
Løsning 1	Bovint serumalbumin (BSA)	1,50 g
	Krebs-Ringer-løsning (10X) (tabell 2.7)	50 ml
	MgSO <sub>4</sub> (38,2 mg/ml destillert vann)	4,0 ml
	Destillert vann	ad 500 ml
Løsning 2	Trypsin	25 mg
	Løsning 1	100 ml
Løsning 3	Trypsinhemmer	26,0 mg
	DNase1	6,25 mg
	MgSO <sub>4</sub> (38,2 mg/ml destillert vann)	0,50 ml
	Løsning 1	ad 50 ml
Løsning 4	Løsning 1	100 ml
	Løsning 3	16 ml
Løsning 5	Løsning 1	40 ml
	MgSO <sub>4</sub> (38,2 mg/ml destillert vann)	320 µl
	CaCl <sub>2</sub> (12,0 mg/ml destillert vann)	320 µl
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Løsning 2-5 sterilfiltreres (0,2 µm)</li> <li>• Mengdene er tilpasset 80 hjerner</li> </ul>		

**Tabell 2.7 10X Krebs-Ringer-løsning**

Komponenter	Mengde	Konsentrasjon
NaCl	35,35 g	1,21 M
Glukose	12,85 g	0,14 M
NaHCO <sub>3</sub>	10,70 g	0,25 M
KCl	1,80 g	48 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,83 g	12 mM
Fenolrødt	50 mg	0,28 mM
Destillert vann	ad 500 ml	

- Sterilfiltreres (0,2 µm)
- Oppbevares ved 2-8 °C i inntil 5-6 måneder

**Tabell 2.8 Platemedium til korncellekultur fra kylling**

Komponenter	Mengde	Konsentrasjon
Basal Medium Eagle (BME)	500 ml	
Varmeinaktivert hesteserum	50 ml	10 %
Penicillin-Streptomycin (10 000 U/ml-10 mg/ml)	5 ml	100 U/ml-0,1 mg/ml
Insulin (1 mM)	50 µl	100 nM
KCl	825 mg	22 mM
L-Glutamin	146 mg	2 mM

- Sterilfiltreres (0,2 µm)
- Komponentene tilsettes i LAF-benk

**Tabell 2.9** Platemedium til korncellekultur fra rotte

Komponenter	Mengde	Konsentrasjon
Basal Medium Eagle (BME)	500 ml	
Varmeinaktivert føtalt kalveserum	50 ml	10 %
Penicillin-Streptomycin (10 000 U/ml- 10mg/ml)	5 ml	100 U/ml-0,1 mg/ml
KCl	825 mg	22 mM
L-Glutamin	146 mg	2 mM
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sterilfiltreres (0,2 µm)</li> <li>• Komponentene tilsettes i LAF-benk</li> </ul>		

**Tabell 2.10** Oversikt over brukte serum

Medium	Leverandør	Lot.nr
Hesteserum (16050)	Gibco	8189719
Føtalt kalveserum (DE14-801F)	Lonza	9SB029

### 2.3.4 Eksponering av kornceller fra kylling

Et forsøksoppsett ble satt opp (tabell 2.11). Cellene ble eksponert 2 timer etter utplating. Mikroskopi ble utført 24 og 48 timer etter eksponering, og høsting ble utført 24 timer etter eksponering.

**Tabell 2.11** Forsøksoppsett

Forsøksoppsett
- Mikroskopi
- Høsting
Ubehandlet
Escitalopram 500 nM
Escitalopram 1 µM
Venlafaksin 10 µM

### 2.3.5 Eksponering av kornceller fra rotte

Et forsøksoppsett ble satt opp (tabell 2.12). Cellene ble eksponert for behandlingen rett etter utplating. Mikroskopi ble utført 24 og 96 timer etter eksponering.

**Tabell 2.12 Forsøksoppsett**

Forsøksoppsett
- Mikroskopi
Ubehandlet
Escitalopram 500 nM
Escitalopram 1 $\mu$ M
Venlafaksin 10 $\mu$ M

## 2.4 Morfometrisk analyse i mikroskop

Morfometrisk analyse innebærer at man bruker eksakte målinger som er gjort etter fastlagte retningslinjer for å beskrive morfologien til cellene. PC12-celler og korncellekulturer ble plattet ut i medium skåler (21,5 m<sup>2</sup>) og inkubert ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub> i 24 timer før behandling. PC12-cellene ble mikroskopert og tatt bilde av etter 72 timer. Korncellekulturene fra kylling ble mikroskopert og tatt bilde av etter 24 og 48 timer, mens korncellene fra rotte ble mikroskopert og tatt bilde av etter 24 og 96 timer. Mikroskopet som ble brukt til å studere og kvantifisere cellene var et Nikon Eclipse TE 300. Bildene ble tatt under fasekontrast på 40x forstørrelse ved hjelp av Nikon Digital Sight DS-U2 kamera som er koblet til mikroskopet. Senere ble bildene av PC12-cellene analysert manuelt ved hjelp av bildeprogrammet NIS-elements BR fra Nikon (figur 2.1).

Det ble valgt ut 3-4 tilfeldige områder i skålen for kvantifisering. Bildene ble tatt i områder med spredt fordeling av celler. Områder der cellene lå veldig tett ble unngått for å gjøre kvantifiseringen pålitelig. All behandling ble blindet før kvantifisering. Dette ble gjort ved at en kollega nummererte skålene. Både mikroskopi og morfometrisk analyse ble utført før nummer på skålen ble koblet sammen med hvilken behandling cellene hadde fått. Valg av endepunkt ble gjort med utgangspunkt i en tidligere masteroppgave [63]. Dette ble kvantifisert:

1. Totalt antall celler

Totalt antall celler per synsfelt telles. Celler som overlapper og som ligger samlet i en klump telles som en. Celler som bare delvis er med i bildet telles også.

2. Antall celler med nevritter

Totalt antall celler med nevritter telles. Gjennomsnittlig andel celler med nevritter, av totalt antall celler, beregnes. En nevrutt er definert ved at den er lengre enn den er bred.

3. Antall nevrutter per celle

Totalt antall nevrutter per celle telles. Videre beregnes gjennomsnittlig antall nevrutter per celle totalt antall celler. Hele nevrutten må være i synsfeltet for å telles.

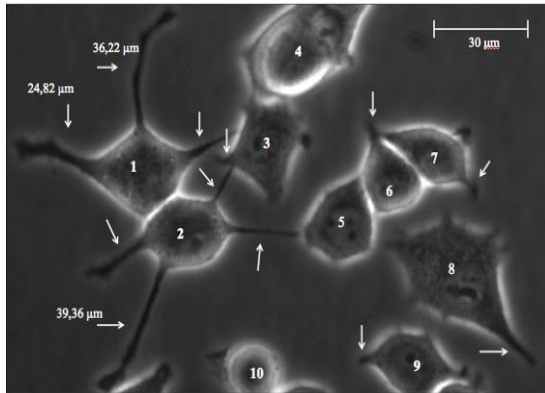
4. Antall lange nevrutter

Antall lange nevrutter per synsfelt telles. Deretter beregnes andel lange nevrutter av totalt antall nevrutter. En nevrutt klassifiseres som lang når den er lenger enn cellediameteren på cellen den kommer fra. Hele nevruttlengden må være synlig i synsfeltet for å bli talt.

5. Nevrittlengde per celle

Alle lange nevrutter per synsfelt måles og gjennomsnittet for hver skål (3 synsfelt) regnes ut. Dette deles så på gjennomsnittlig totalantall av celler i skålen (3 synsfelt) slik at man får endepunktet nevruttlengde per celle. I tillegg normaliseres den gjennomsnittlige nevruttlengden i forhold til den gjennomsnittlige nevruttlengden for ubehandlede celler samme dag. Dette er omtalt i oppgaven som endepunktet nevruttlengde. Nevruitter som går inn i hverandre og hvor man ikke kan se hvilken celle nevrutten kommer fra måles ikke.

A



B

Celleantall	Antall celler med nevritter	Antall nevritter per celle	Antall lange nevritter	Nevrittelengde per celle
10	7/10	12/10	3/12	$(36,22 \mu\text{m} + 24,82 \mu\text{m} + 39,36 \mu\text{m})/10$

**Figur 2.1 Morfometrisk analyse av PC12-celler i mikroskopi.** PC12-celler ble analysert i mikroskopi ved 40X forstørrelse. Totalt antall celler per synsfelt, antall celler med nevritter, antall nevritter per celle, antall lange nevritter per synsfelt og nevrittelengde per celle ble kvantifisert. (A) Illustrasjon av den morfometriske analysen. Celle 4, 5 og 10 har ingen nevritter. Celle 1, 2, 3, 6, 7, 8 og 9 telles som celler med nevritter. Nevrittene er markert med hvite piler. Nevrittene som er lengre en cellediameteren til cellen den kommer ut fra er en lang nevritt. De lange nevrittene er markert med antall  $\mu\text{m}$ . (B) Tilhørende skjema som viser morfometrisk analyse av PC12-celler i mikroskop.

## 2.5 Deteksjon av celledød

Trypanblå er et fargestoff som brukes for å farge døde celler. Siden levende celler har intakt cellemembran vil ikke fargen tas opp i disse cellene. Hos de døde cellene vil fargestoffet gå gjennom membranen. Dersom man teller både blå celler (døde celler) og celler som ikke har tatt opp fargestoff (levende) kan man beregne prosent celledød.

### Prosedyre for farging med trypanblå

- 2 % trypanblå fargeløsning (tabell 2.13) blandes med 1,8 % NaCl-stockløsning (tabell 2.13) i forholdet 1:1.
- Mediet i skålene justeres til 1 ml.
- 250  $\mu\text{l}$  nylaget fargeløsning tilsettes hver skål. Skålene beveges forsiktig rundt slik at fargeløsningen blandes jevnt i mediet.

4. Skålene inkuberes ved 37 °C i 5 % CO<sub>2</sub> i 30 minutter.
5. Fargeløsningen i skålen som skal telles suges av. Antall blå celler (døde) og totalt antall celler (både levende og døde) telles slik at andel døde celler, av totalt antall celler, kan beregnes.

**Tabell 2.13 Løsninger til farging med trypanblå**

Løsning	Komponent	Mengde
Trypanblå-stockløsning 2 %	Trypanblå	1 g
	MQ-vann	50 ml
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Komponentene blandes og varmes opp til kokepunktet under avtrekk. Avkjøles i romtemperatur og filtreres.</li> <li>• Oppbevares i romtemperatur</li> </ul>	
NaCl-stockløsning 1,8 %	NaCl	1,8 g
	MQ-vann	100 ml
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oppbevares i romtemperatur</li> </ul>	

## 2.6 Immunfarging

Immunfarging er en teknikk hvor man får visualisert et spesifikt protein gjennom å tilsette et primærantistoff og deretter detektere dette med et sekundærantistoff som fluorescerer.

Gjennom fluorescensmikroskop eller konfokalmikroskop kan man da se det proteinet man har detektert [64]. I denne oppgaven ble det brukt et konfokalmikroskop til å detektere det fluorescerende proteinet. Konfokalmikroskop skiller seg fra vanlig lysmikroskopi ved at man har mulighet for optisk snitting. Mikroskopet skanner preparatet punkt for punkt og samler all pikselinformasjonen til et bilde. Dette skjer gjennom punktbelysning, og bruk av et ”pinhole” som filtrerer bort lys som ikke er i fokus. Resultatet er økt optisk oppløsning og kontrast i bildet. En sterk lyskilde med faste bølgelengder er fordelaktig, og derfor brukes ofte laser. [65]. Konfokalmikroskopet vi har brukt heter Nikon TE2000-E og bruker laser som lyskilde.



## Prosedyre for immunfarging

1. Mediet i skålen pipetteres av og cellene vaskes 2 ganger med 1-2 ml PBS (tabell 2.14).
2. Cellene fikseres med 2 ml 4 % PFA-løsning (tabell 2.15) i 4 minutter.
3. Cellene vaskes 3 ganger med 1-2 ml PBS.
4. 2 ml 0,1 % triton i PBS (tabell 2.16) tilsettes skålen for å permeabilisere cellemembranen. La stå i 4 minutter.
5. Cellene vaskes 2 ganger med 1-2 ml PBS.
6. 2 ml PBS med 5 % serum og 0,02 % Tween 20 (tabell 2.17) tilsettes skålen for å blokkere for uspesifikke bindinger. La stå 1 time.
7. Blokkeløsningen pipetteres av.
8. Primærantistoff i 2 ml PBS med 5 % serum og 0,02 % Tween 20 tilsettes skålen. Skålen settes på et fuktig papir og dekkes med aluminiumsfolie og settes på kjølerom over natt. Hvilke primærantistoff som er brukt er vist i tabell 2.18.
9. Skålen vaskes 3 ganger 15 minutt med 1-2 ml PBS. Dette gjøres på ristebord.
10. Sekundærantistoff i PBS med 5 % serum og 0,02 % Tween 20 tilsettes. La stå i 1 time. Det er viktig å dekke til skålene med aluminiumsfolie for å hindre at sekundærantistoffet svekkes for mye i nærvær av lys. Hvilke sekundærantistoff som er brukt er vist i tabell 2.19.
11. Vask 3 ganger med 1-2 ml PBS. Her kan man eventuelt farge med Hoechst, 1:1000, i den første vaskeløsningen.

**Tabell 2.14 Fosfatbuffret saltvann (PBS)**

Komponenter	Mengde	Konsentrasjon
NaCl	32,0 g	137 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	7,12 g	10,0 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,08 g	2,0 mM
KCl	0,8 g	2,7 mM
MQ-vann	ad 4000 ml	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• pH justeres til 7,4 med HCl/NaOH</li> <li>• Autoklaveres</li> <li>• Oppbevares ved 2-8 °C</li> </ul>		

**Tabell 2.15 4% PFA i PBS**

Komponenter	Mengde
PBS (tabell 2.14)	30 ml
Paraformaldehyd 16 %	10 ml
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Holdbarhet: 2 uker ved 4 °C, eventuelt ved -20 °C over noe lenger tid.</li> </ul>	

**Tabell 2.16 0,1 % Triton i PBS**

Komponenter	Mengde
PBS (tabell 2.14)	40 ml
Triton	40 µl

**Tabell 2.17 PBS med 5 % serum og 0,02 % Tween 20**

Komponenter	Mengde
PBS (tabell 2.12)	114 ml
Serum (esel) (lot.nr:109168)	6 ml
Tween 20	24 µl

**Tabell 2.18 Primærantistoff brukt til immunfarging**

Primærantistoff	Fortynning	Lot.nr.	Leverandør
B-tubulin III (T2200)	1:1000	090M4775	Sigma
GAP-43 (AB5220)	1:1000	2048775	Millipore

**Tabell 2.19 Sekundærantistoff brukt til immunfarging**

Sekundærantistoff	Fortynning	Lot.nr.	Leverandør
Mouse anti-rabbit (cy3) (211-165-109)	1:800	50583	Jackson ImmunoResearch

## 2.7 Immunoblotting (Western blotting)

Immunoblotting er en teknikk som brukes for å detektere og kvantifisere spesifikke proteiner ved hjelp av gelelektroforese og påfølgende påsetting av antistoff [66]. I SDS-polyakrylamid gelelektroforese migrerer proteinene som respons på et elektrisk felt og de separeres etter størrelse [67]. Etter elektroforesen (2.7.5) overføres proteinene til en membran ved hjelp av et elektrisk felt (2.7.6). Det er dette som kalles western blotting [68].

For å sjekke om proteinene er blottet over på membranen brukes rød Ponceau S fargeløsning for å farge proteinene (2.7.7). En løsning av 5 % tørrmelk i 0,1 % Tween blokkerer frie bindingssteder på membranen og brukes for å redusere uspesifikk binding av antistoffet. Sekundærantistoff brukes for å detektere det primærantistoffet og er ofte konjugert med enzymet pepperrot peroksidase (HRP) (2.7.8). Dette enzymet oksiderer luminol i nærvær av hydrogenperoksid, og resultatet er generering av lys [66]. Lyset som genereres kan man detektere som et bånd på membranen ved hjelp av fremkallingsmaskin (2.7.9). Dette båndet kan deretter kvantifiseres.

### 2.7.1 Høsting av celler til westernblotting

1. 2 % SDS-løsning med fosfatase- og proteasehemmere lages (tabell 2.20).
2. Mediet helles av skålene, og rester pipetteres av.

3. Skålene vaskes så 2 ganger med 3 ml kald PBS (tabell 2.14). Rester etter siste vasking pipetteres av.
4. 100 µl 2 % SDS tilsatt fosfatase- og proteasehemmere pipetteres over i skålen (stor skål). Cellene skrapes løs med en celleskrape som føres over hele skålen i en retning. Deretter skrapes det over hele skålen vinkelrett på første skraping.
5. Cellesuspensjonen overføres til et eppendorfrør som settes på is.
6. Prøvene kokes ved 95 °C i 2 minutter og fryses ved -20 °C eller -70 °C frem til bruk.

**Tabell 2.20 2 % SDS-løsning i PBS med fosfatase- og proteasehemmere**

Komponenter	Mengde	Konsentrasjon
Leupeptin (5 mg/ml)	1 µl	5 µg/ml
PMSF (100 mM)	3 µl	0,3 mM
Pepstatin A (1 mg/ml)	5 µl	5 µg/ml
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (10 mM)	10 µl	0,1 mM
20 % SDS	100 µl	2%
PBS (tabell 2.14)	ad 1 ml	

### 2.7.2 Proteinmåling

Før man kan utføre westernblotting, må proteinkonsentrasjonen i hver celleprøve måles og justeres. Proteininnholdet i hver celleprøve bestemmes ved hjelp av Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit. Utstyrspakken består av reagens A, reagens B og bovint serumalbumin standard (2 mg/ml).

#### Prosedyre for måling av relativ proteinmengde

1. Working reagent (tabell 2.21) og fortynnet standardløsning (tabell 2.21) lages.
2. Fortynnet standardløsning tilsettes 12 brønner i et blankt 96-brønners brett. Mengde standardløsning som tilsettes er 1,25, 2,5, 5, 10, 20 og 40 µl, til sluttmengder på henholdsvis 0, 0,83, 1,66, 3,33, 6,66, 13,33 og 26,66 µg.

3. Celleprøver hentes fra fryseren og tines. Prøvene blandes godt på en vortex mikser.
4. 5 µl celleprøve tilsettes etter standardprøvene. Hver celleprøve tilsettes tre brønner. Hvor mye celleprøve som tilsettes avhenger av celletettheten ved høsting, men vanligvis brukes 2 µl eller 5 µl.
5. 200 µl working reagent tilsettes alle brønnene som skal brukes ved hjelp av en multipipette.
6. Brettet inkuberes ved 37 °C i 1 time.
7. Absorbansen måles ved 590 nm i en plateleser.
8. Relativ proteinmengde i hver celleprøve regnes ut fra standardkurven man får ved plotting av absorbans.

**Tabell 2.21 Løsninger til proteinmåling**

Løsning	Komponenter	Mengde
Standardløsning	Bovint serumalbumin (BSA) 2 mg/ml	50 µl
	PBS (tabell 2.14)	100 µl
Working reagent	Reagent A	50 deler
	Reagent B	1 del

### 2.7.3 Proteinjustering av prøver

I en 1,5 mm gel med 10 brønner setter man på 50 µg prøve, mens man i en 15-brønners gel setter på 15-25 µg. Det gjøres for å unngå at båndene flyter over hverandre. Volumet justeres til 50 µl eller 15 µl ved bruk av 4X Laemmlibuffer (tabell 2.22) og MQ-vann slik at mengden protein som settes på gelen er lik for hver prøve. 4X Laemmlibuffer må fortynnes i forholdet 1:3 i den endelige prøven.

Tabell 2.22 4X Laemmlibuffer

Komponenter	Mengde	Sluttkonsentrasjon i den ferdigfortynnete prøven
SDS (20 %)	4,0 ml	2 %
Glyserol (85 %)	2,35 ml	5 %
2-mercaptoetanol	2,0 ml	5 %
MQ-vann	0,9 ml	
Tris-HCl (4 M) pH 6,8	0,75 ml	75 mM
Noen korn bromfenolblått		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2-mercaptoetanol og bromfenolblått tilsettes løsningen i avtrekk</li> </ul>		

### 2.7.4 Støping av gel

1. Vi bruker Mini Protean fra BioRad. Ytterglass og dekkglass vaskes med 70 % etanol for å fjerne eventuelle fettrester. Gummilisten legges på det grønne stativet, som er støpeformen. De to glassene legges sammen og plasseres i støpeformen.
2. MQ-vann helles i formen for å teste om den er tett.
3. Komponenter til separerende gel (tabell 2.23-2.24) blandes, og helles i spalten mellom glassplatene. Konsentrasjon på polyakrylamidgelen bestemmes ut i fra molekylvekten til proteinene som blir forsøkt detektert (tabell 2.25).
4. 1 ml isopropanol tilsettes på toppen av separerende gel for å sikre at gelen får en jevn overflate.
5. La gelen stå i minst 40 minutter for at gelen skal polymerisere.
6. Isopropanol helles av, og rester suges av med et cellepapir.
7. Komponenter til stacking gel (tabell 2.23) blandes, og helles over separerende gel.
8. En kam, med tilpasset antall tagger i forhold til antall prøver som skal påsettes, settes forsiktig ned i gelen.

9. La gelen stå i 30 minutter for polymerisering.

**Tabell 2.23 Gelløsninger**

<b>Gelløsning</b>	<b>Komponenter</b>	<b>Mengde</b>
Separerende gel	MQ-vann	4,6 ml
- Polyakrylamidgel 8 %	Nedre gelbuffer (tabell 2.24)	2,5 ml
	Akrylamid (30 %)	2,7 ml
	APS (10 %)	100 µl
	TEMED	6 µl
Separerende gel	MQ-vann	3,0 ml
- Polyakrylamidgel 10 %	Nedre gelbuffer (tabell 2.24)	1,8 ml
	Akrylamid (30 %)	2,4 ml
	APS (10 %)	36 µl
	TEMED	3,6 µl
Separerende gel	MQ-vann	3,3 ml
- Polyakrylamidgel 12 %	Nedre gelbuffer (tabell 2.24)	2,6 ml
	Akrylamid (30 %)	4 ml
	APS (10 %)	100 µl
	TEMED	4 µl
Stacking gel	MQ-vann	2,4 ml
	Øvre gelbuffer (tabell 2.24)	1,0 ml
	Akrylamid (30 %)	0,6 ml
	APS (10 %)	20 µl
	TEMED	4 µl

- Gelstøping utføres i avtrekk med vernebriller, hansker og labfrakk
- TEMED tilsettes gelløsningen sist

**Tabell 2.24 Løsninger til bruk ved støping av gel**

Løsning	Komponenter	Mengde
Øvre gelbuffer	Tris-base	6,06 g
	SDS (20 %)	2,0 ml
	MQ-vann	ad 100 ml
	• Justeres til pH 6,8 med HCl/NaOH	
Nedre gelbuffer	Tris-base	18,17 g
	SDS (20 %)	2,0 ml
	MQ-vann	ad 100 ml
	• Justeres til pH 8,8 med HCl/NaOH	

**Tabell 2.25 Valg av polyakrylamidkonsentrasjon i gelen**

Proteinets størrelse (kDa)	% Polyakrylamidgel
4-40	20
12-45	15
10-70	12,5
15-100	10
25-200	8

### 2.7.5 Gelelektroforese

1. Glassplatene fjernes fra støpeformen, og vaskes på utsiden med vann for å fjerne eventuelt søl og størknet gel. Kammen tas forsiktig ut av gelen.
2. Glassplatene plasseres i et kar for gelkjøring, med den tynne glassplaten vendt inn mot midten. Både det ytre og det indre rommet i karet fylles med elektroforesebuffer (tabell 2.26). Eventuelle luftbobler fjernes ved hjelp av en bøyd kanyle.
3. En påføringsapplikator settes over gelen, og 5 µl standard (Precision Plus Protein<sup>TM</sup> All Blue Standards) tilsettes i første brønn.
4. De proteinjusterte prøvene kokes i 5 minutter ved 95 °C.



5. 45 µl prøve tilsettes i brønnene når man har en 10-brønners gel, og 15 µl prøve tilsettes brønnene når man har en 15-brønners gel.
6. Karet kobles til strøm, og prøvene kjøres først gjennom stacking gel på 90 V i 15 minutter, og deretter gjennom separerende gel på 150 V i ca 1 time.

**Tabell 2.26 Elfobuffer**

Komponenter	Mengde	Konsentrasjon
10X TGS	100 ml	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (v/v) SDS
Destillert vann	900 ml	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• pH 8,3</li> </ul>		

### 2.7.6 Blotting av gel

1. Èn membran, to skrubber og to filterpapir fuktes i en blottebuffer (tabell 2.27).
2. En plastspatel brukes til å løsne gelen forsiktig fra den tykke glassplaten. Stacking gel skjæres av og hives.
3. Gelen overføres fra den tynne glassplaten til et fuktet filterpapir ved hjelp av plastspatelen.
4. Gelen pakkes i følgende rekkefølge:
  - Gelbeholderens sorte side
  - Skrubber
  - Filterpapir
  - Gel
  - Membran
  - Filterpapir
  - Skrubber
  - Gelbeholderens hvite side

Luftbobler mellom gel og membran fjernes ved hjelp av en stor plastspiss, som rulles fra midten av membranen og i alle retninger.

5. Gelbeholderen lukkes og settes i et blottekar med gelbeholderens sorte side vendt inn mot den sorte siden i karet.
6. Magnetrører og iskassett plasseres i blottekaret, og blotteoppsatsen settes på en magnetrører i et kjølerom.
7. Blottekaret fylles opp med så mye blottebuffer at gelpakken dekkes, og blottes ved 50 mA over natt eller ved 400 mA i 1 ½ time.

**Tabell 2.27 Blottebuffer**

Komponenter	Mengde	Konsentrasjon
10X TG	100 ml	25 mM Tris, 192 mM Glycin
Metanol	200 ml	20 % metanol
Destillert vann	700 ml	

- pH 8,3
- Oppbevares ved 2-8 °C

### 2.7.7 Farging med Ponceau og blokking av membran

1. Membranen farges med Ponceau S fargeløsning i 1 minutt. Dette farger proteinene og sikrer at proteinene er overført fra gel til membran på en tilfredsstillende måte.
2. Membranen vaskes tre ganger i destillert vann for å fjerne overflødig fargeløsning.
3. Membranen legges i en plastlomme og tas bilde av i en kopimaskin.
4. Membranen legges i et 50 ml plastrør med proteinsiden inn mot midten.
5. 5 ml blokkeløsning (tabell 2.28) tilsettes røret, og det legges til rulling i romtemperatur i 1 time eller ved 2-8 °C over natt.

**Tabell 2.28 Blokkeløsning**

Komponenter	Mengde
Tørrmelk	2,5 g
1X TBS med 0,1 % Tween (tabell 2.29)	50 ml

- Oppbevares ved 2-8 °C

**Tabell 2.29 Trisbuffret saltvann med Tween**

Løsning	Komponenter	Mengde
10X TBS med 1 % Tween	Tris base	24,2 g
	NaCl	80 g
	Tween 20	10 ml
	MQ-vann	ad 1000 ml
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Justeres til pH 7,6 med HCl/NaOH</li> <li>• Oppbevares ved 2-8 °C</li> </ul>	
1X TBS med 0,1 % Tween	10X TBS med 1 % Tween (tabell 2.29)	1 del
	Destillert vann	9 deler
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oppbevares ved 2-8 °C</li> </ul>	

### 2.7.8 Tilsetning av primære og sekundære antistoff

1. Blokkeløsning helles av, og 3 ml ny blokkeløsning (tabell 2.28) tilsettes røret.
2. Primærantistoff tilsettes i røret. Hvilket blandingsforhold man velger avhenger av type antistoff (tabell 2.30). Røret legges til rulling ved 2-8 °C til neste dag.
3. Blokkeløsningen med primærantistoff helles av, og kan brukes igjen til neste membran. Denne løsningen må brukes i løpet av ca en uke. Membranen vaskes 3×15 minutt med 5 ml 1X TBS med 0,1 % Tween (tabell 2.29) på rulle i romtemperatur.
4. 3 ml blokkeløsning tilsettes røret.

5. Sekundærantistoff tilsettes røret. Hvilket blandingsforhold man velger avhenger av type antistoff (tabell 2.31). Røret legges til rulling i romtemperatur i 1-2 timer eller ved 2-8 °C over natt.
6. Blokkeløsningen med sekundærantistoff helles av, og membranen vaskes 3×10 minutt med 5 ml 1X TBS med 0,1 % Tween i romtemperatur.

**Tabell 2.30 Primærantistoffer brukt til westernblotting**

Primærantistoff	Fortynning	Lot.nr.	Leverandør
Lamin A/C (ALX-804-672)	1:2000	L22914	Alexis Biochemicals, USA
B-tubulin III (T2200)	1:5000	090M4775	Sigma-Aldrich, USA
PCNA (M 0879)	1:200	59333	Dako, Danmark
B-spektrin II (612562)	1:1000	91528	BD Transduction Laboratories™, USA
GAP-43 (AB5220)	1:500	2048775	Millipore, USA

**Tabell 2.31 Sekundærantistoffer brukt til westernblotting**

Sekundærantistoff	Fortynning	Lot.nr.	Leverandør
Donkey anti-rabbit (sc-2313)	1:10000	H0712	Santa Cruz Biotechnology, USA
Goat anti-mouse (170-6516)	1:5000	310007185	Bio-Rad Laboratories, USA

### 2.7.9 Fremkalling

Til fremkalling brukes ulike fremkallingsvæsker, alt etter hva som er funnet best.

Supersignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate ble brukt i forsøk med  $\beta$ -tubulin III og  $\beta$ -spektrin II. Denne væsken består av reagens A og reagens B, som blandes 1:1. Luminata™ forte Western HRP Substrate ble brukt i forsøk med Lamin A/C og PCNA. Når det gjaldt GAP-43 ble begge fremkallingsvæskene forsøkt. Supersignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate er den minst følsomme av disse to fremkallingsvæskene.

### **Prosedyre fremkalling**

1. Membranen tas ut av plastrøret, og overflødig væske får renne av på cellepapir.
2. Membranen legges på en glassplate med proteinsiden opp, og 2 ml fremkallingsvæske pipetteres over membranen. La virke i 5 minutter.
3. Overflødig fremkallingsvæske får renne av, og membranen legges i en plastlomme. Luftbobler fjernes ved å gni forsiktig på plastlommen.
4. Membranen fremkalles i Chemi Genius<sup>2</sup> fra Bio Imaging System, som er en fremkallingsmaskin. Fremkallingsprogrammet er fra SynGene og heter GeneSnap.
5. Etter framkalling oppbevares membranen i 1X TBS med 0,1 % Tween (tabell 2.29) ved 2-8 °C, frem til eventuell stripping og påføring av nytt antistoff.

#### **2.7.10 Stripping av membran**

1. 1X TBS med Tween (tabell 2.29) helles av og membranen vaskes 3 × 5min med 5 ml 1X TBS med 0,1 % Tween.
2. Plastrøret tilsettes 5 ml Restore<sup>TM</sup> Western Blot Stripping Buffer og legges til rulling i romtemperatur i 15 minutter.
3. Strippebufferen helles av, og membranen vaskes 3×15 minutter med 5 ml 1X TBS med 0,1 % Tween i romtemperatur.
4. 5 ml blokkeløsning (tabell 2.28) tilsettes røret, og membranen blokkes i 1-2 timer i romtemperatur, eller over natt ved 2-8 °C.
5. Tilsetting av nytt primærantistoff utføres som tidligere beskrevet i kapittel 2.7.8.

### **2.7.11 Måling av westernbåndstyrke**

Når membranen er fremkalt kan styrken til proteinbåndene måles i antall piksler. Dette gjøres ved hjelp av bildebehandlingsprogrammet ImageJ. Antall piksler måles manuelt ved å tegne en ramme rundt hvert enkelt bånd. Bakgrunnen måles under båndene. Kvantifisering av styrken på hvert enkelt bånd ble gjort ved å trekke bakgrunnen fra gjennomsnittlig antall piksler. Det er viktig at det er en lineær sammenheng mellom proteinkonsentrasjonen og antall piksler. Et testforsøk med ulike fortyninger bør derfor utføres for å finne den målemetoden som gir den beste lineære sammenhengen.

## **2.8 Statistiske analyser**

Resultatene er fremstilt ved hjelp av Microsoft<sup>®</sup> Excel<sup>®</sup> 2011 for Mac. Figurene er basert på gjennomsnittet av flere uavhengige forsøk med standardfeil (SE). Der antall forsøk er 2 er spredningen oppgitt som forskjellen mellom høyeste verdi og gjennomsnittsverdien, også kalt gjennomsnittsavvik eller absolutt avvik. Resultatene ble analysert ved hjelp av programmet SigmaStat 3.5 fra SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA. T-test er brukt til parvis sammenligning av normalfordelte data, og Mann-Whitney Rank Sum Test er benyttet til å sammenligne to ikke-normalfordelte datasett. For sammenligning av flere grupper hvor dataene var normalfordelte ble ANOVA brukt. Kruskal-Wallis enveis ANOVA ble brukt ved ikke-normalfordelte datasett. P-verdi <0,05 ble ansett som signifikant.

## 3 Resultater

Effekter av NGF på nevruttvekst ble studert ved morfometrisk analyse på 5 endepunkter. Disse endepunktene ble sammenlignet og vurdert med mål om å finne de endepunktene som er mest egnet til studier på nevruttvekst (3.1).

PC12-celler ble eksponert for BDNF for å undersøke en eventuell effekt av denne på nevruttvekst. Caspasehemmeren z-DEVD-cmk og anti-BDNF ble tilsatt for å undersøke den molekylære mekanismen bak nevruttveksten. Escitalopram og venlafaksin ble undersøkt for effekt på nevruttvekst, både med og uten NGF, z-DEVD-cmk og anti-BDNF (3.2).

Immunfarging ble utført for å undersøke om metoden har noen fordeler versus vanlig lysmikroskopi ved morfometrisk analyse (3.3).

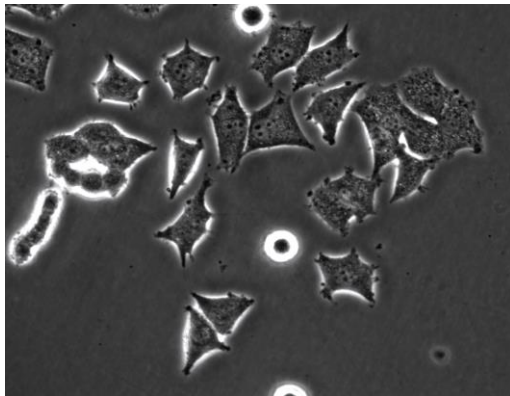
Det ble utført en pilot på kornceller for å teste muligheten for morfometrisk analyse i disse cellene (3.4).

Westernblotting ble utført for å undersøke om nevruttvekst kan vises ved bruk av antistoff og deteksjon av spesifikke proteiner (3.5).

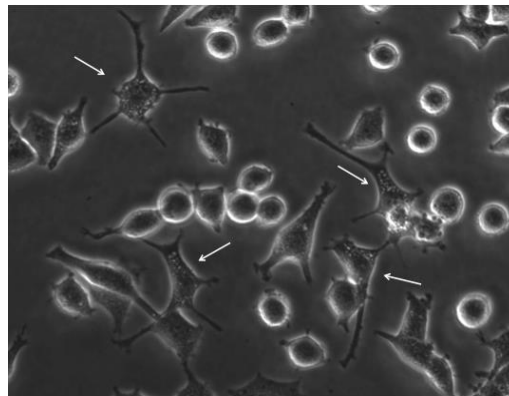
### 3.1 Valg av morfometriske endepunkt

For å kunne bruke morfometrisk analyse i sikkerhetsfarmakologisk vurdering av legemidler er det ønskelig å vite hvilke endepunkter som best beskriver endringer i nevruttvekst. Det er per i dag ikke godt kjent hvilket endepunkt som egner seg mest, og flere ulike endepunkter har vært brukt tidligere [53, 69]. PC12-celler ble valgt som modell for å undersøke de aktuelle endepunktene nærmere. PC12-celler uttrykker både TrkA og p75NTR [70], som er henholdsvis høy- og lavaffinitetsbindingsreseptor for NGF. NGF kan derfor brukes som en positiv kontroll (figur 3.1). Ubehandlete celler og celler behandlet med NGF ble derfor sammenlignet. De fem endepunktene andel celler med nevritter, antall nevritter per celle, nevrittelengde per celle, nevrittelengde og andel lange nevritter ble nærmere undersøkt. Resultatene (figur 3.2) viser at de tre endepunktene nevrittelengde per celle, nevrittelengde og andel lange nevritter ga en signifikant økning i nevruttvekst etter eksponering for NGF sammenlignet med ubehandlet kontroll. Endepunktene nevrittelengde (markert med grå farge) og andel lange nevritter (markert med grå striper) utmerket seg som de mest robuste endepunktene. De viste en prosentvis større økning i nevruttvekst etter eksponering for NGF sammenlignet med endepunktet nevrittelengde per celle. De videre analysene ble utført på disse to endepunktene.

Ubehandlet

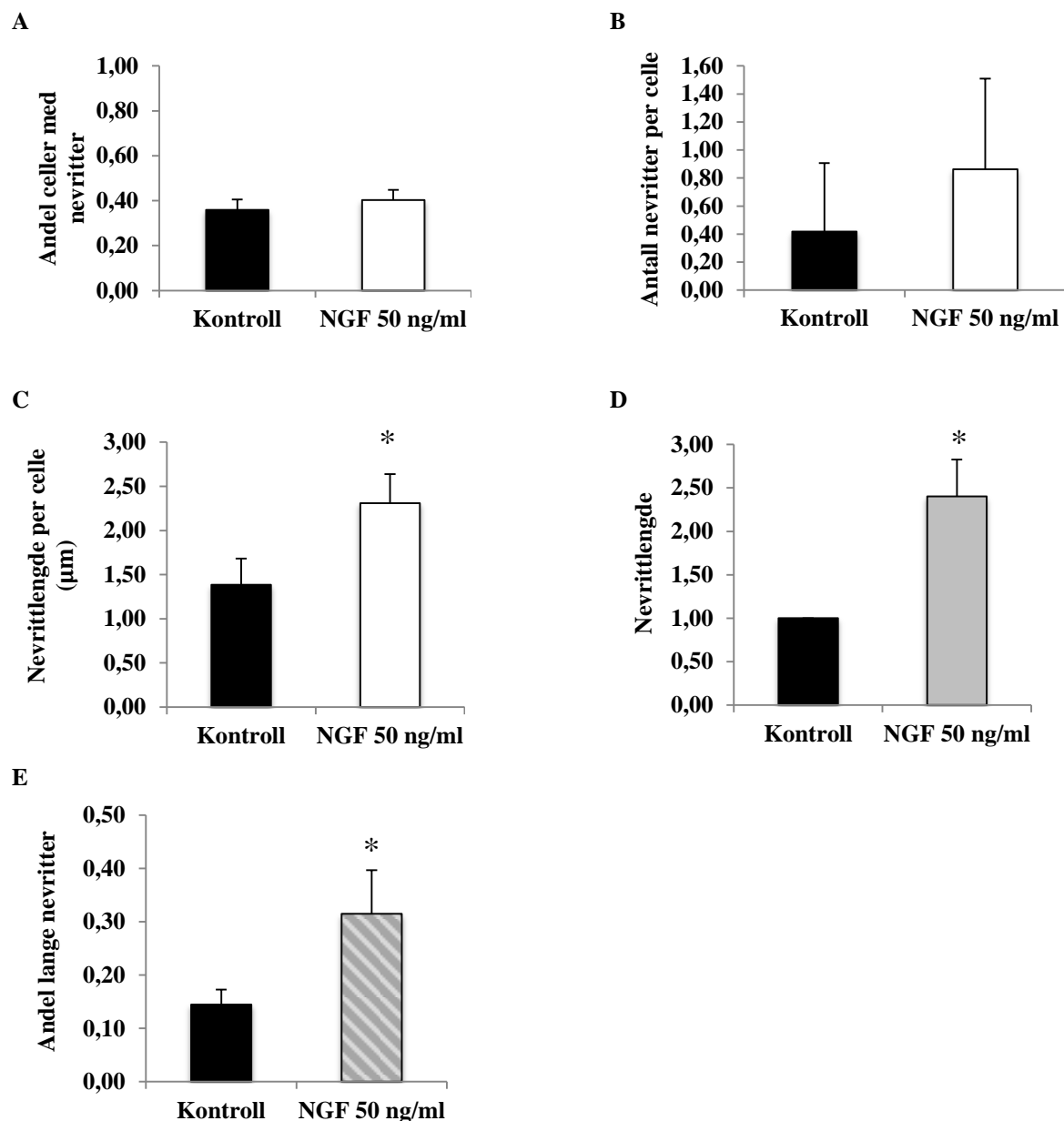


NGF 50 ng/ml



**Figur 3.1** Bruk av NGF som positiv kontroll i PC12-celler. PC12-celler ble eksponert 24 timer etter utplating og tatt bilde av 72 timer etter eksponering. Bildene er tatt ved 40X forstørrelse under fasekontrast. Hvite piler viser eksempler på celler med lange nevritter.





**Figur 3.2 NGF gir økt nevruttvekst i PC12-celler.** PC12-celler ble eksponert for 50 ng/ml NGF 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Kontrollen er ubehandlede celler. (A) Andel celler med nevritter,  $n = 18$ . (B) Antall nevritter per celle,  $n = 18$ . (C) Nevrittlengde per celle ( $\mu\text{m}$ ),  $n = 18$ . \* $p < 0,05$ , Mann-Whitney Rank Sum Test. (D) Nevrittlengde (gjennomsnittlig nevrithengde normalisert i forhold til gjennomsnittlig nevrithengde til ubehandlet i samme forsøk),  $n = 17$ . \* $p < 0,001$ , Mann-Whitney Rank Sum Test. (E) Andel lange nevritter (av totalt antall nevritter),  $n = 18$ . \* $p < 0,05$ , Mann-Whitney Rank Sum Test. Y-aksen går opp til 0,5, ikke til 0,3 som de fleste andre figurene som viser andel lange nevritter gjør. Deler av datamaterialet som ligger bak disse resultatene er felles med masterstudent Sissel Evensen.

**Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.2**

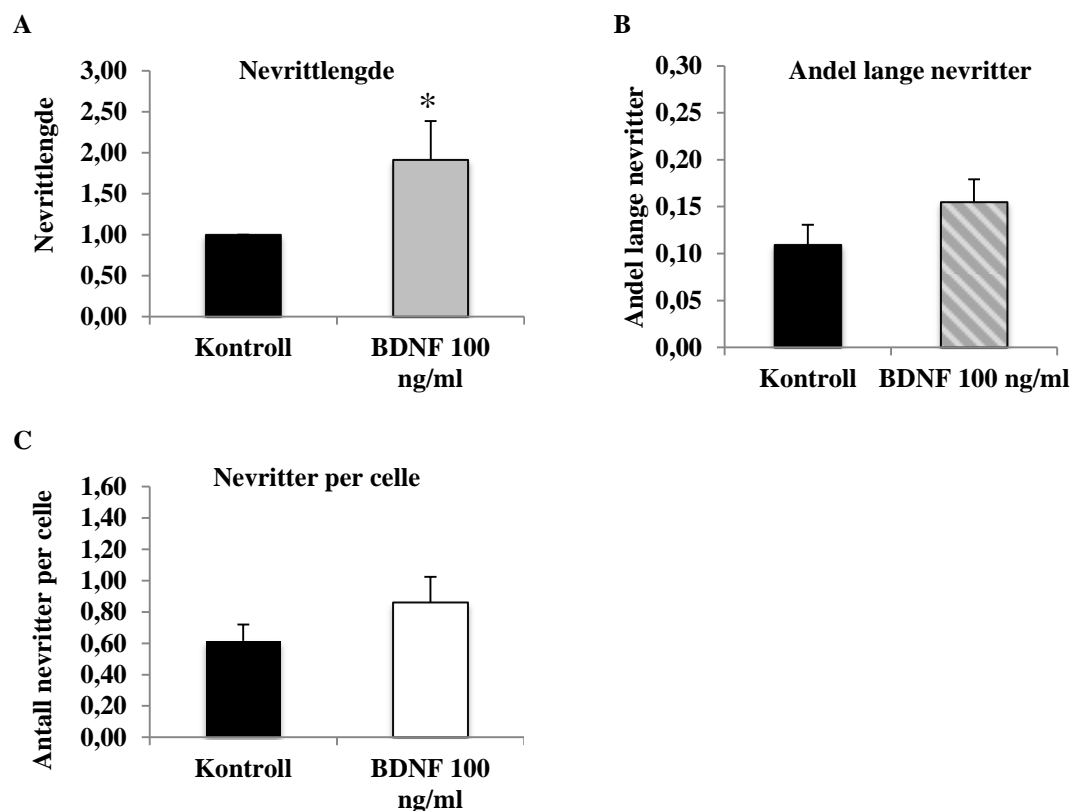
	Eksponering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
<b>3.2 A</b>	NT	0,359	0,046	18
	NGF 50 ng/ml	0,403	0,045	18
<b>3.2 B</b>	NT	0,784	0,145	18
	NGF 50 ng/ml	0,814	0,120	18
<b>3.2 C</b>	NT	1,384	0,299	18
	NGF 50 ng/ml	2,309	0,330	18
<b>3.2 D</b>	NT	1,000	0,000	17
	NGF 50 ng/ml	2,402	0,426	17
<b>3.2 E</b>	NT	0,145	0,028	18
	NGF 50 ng/ml	0,315	0,082	18

Endepunktet nevrittlengde har én parallell mindre enn de andre endepunktene fordi nevrittlengden i ubehandlede PC12-celler var 0 en av dagene.

## 3.2 Nevritutvekst i PC12-celler

### 3.2.1 Effekt av BDNF på nevritutvekst

NGF ga en økning i nevritutvekst i PC12-celler (figur 3.2). BDNF er en annen vekstfaktor i samme gruppe som NGF. Cellene ble eksponert for BDNF for å se om denne vekstfaktoren også påvirker nevritutveksten. Eksponering for BDNF ga en signifikant økning i nevrittlengde (figur 3.3 A), men denne økningen er kvantitativt mindre enn den man så ved eksponering for NGF (figur 3.2 D). Andel lange nevritter viste samme trend og BDNF ga en tendens til økning (figur 3.3 B). Denne økningen er også kvantitativt mindre enn den man så ved eksponering for NGF (figur 3.2 E). BDNF er vist å øke antall nevritter per celle [71]. Dette endepunktet er derfor inkludert. BDNF hadde en tendens til å øke antall nevritter per celle (figur 3.3 C).



**Figur 3.3 BDNF gir økt nevrithengde i PC12-celler.** PC12-celler ble eksponert for 100 ng/ml BDNF, 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Kontrollen er ubehandlede celler. (A) Nevrittlengde (gjennomsnittlig nevrithengde normalisert i forhold til gjennomsnittlig nevrithengde til ubehandlet i samme forsøk),  $n = 8$ . \* $p < 0,001$ , Mann-Whitney Rank Sum Test. (B) Andel lange nevritter (av totalt antall nevritter),  $n = 9$ . (C) Antall nevritter per celle.  $n = 9$ . Deler av datamaterialet som ligger bak disse resultatene er felles med masterstudent Sissel Evensen.

#### Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.3:

	Eksponering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
<b>3.3 A</b>	Ubehandlet	1,000	0,000	8
	BDNF 100 ng/ml	1,915	0,473	8
<b>3.3 B</b>	Ubehandlet	0,109	0,021	9
	BDNF 100 ng/ml	0,155	0,024	9
<b>3.3 C</b>	Ubehandlet	0,616	0,104	9
	BDNF 100 ng/ml	0,861	0,163	9

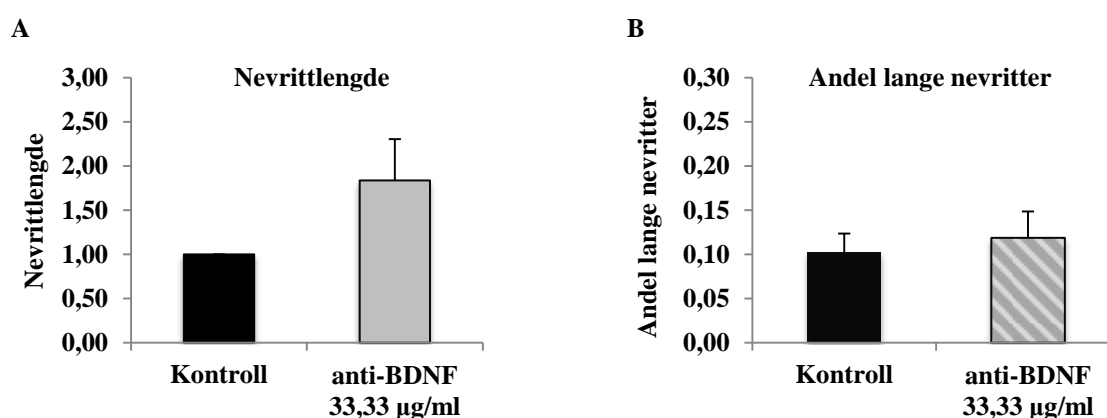
Endepunktet nevrithengde har én parallell mindre enn de andre endepunktene fordi nevrithengden i ubehandlede PC12-celler var 0 en av dagene.

### 3.2.2 Effekter av BDNF-antistoff

For å undersøke om antistoff mot BDNF kan påvirke nevruttveksten ble PC12-celler eksponert for dette antistoffet. Figur 3.4 viser resultater fra celler behandlet med BDNF-antistoff sammenlignet med ubehandlet kontroll. Eksponering for BDNF-antistoff hadde en tendens til å øke nevrittelengden i ubehandlede PC12-celler. Andel lange nevritter ser også ut til å være økt litt, men i mye mindre grad enn nevrittelengden.

PC12-cellene ble videre eksponert for NGF og BDNF, med og uten BDNF-antistoff. Resultatene viser at eksponering for BDNF-antistoff hadde en tendens til å redusere nevrittelengden (figur 3.5 A) og andelen lange nevritter (figur 3.5 B) i celler eksponert for NGF. Dersom man ser bort fra den nevruttveksten man har i ubehandlede celler og den nevruttveksten som kan knyttes til egeneffekt av antistoffet (figur 3.4) ser man at reduksjonen etter eksponering for BDNF-antistoff er ytterligere økt.

Eksponering for BDNF antistoff hadde en tendens til å gi en liten økning i nevrittelengde i celler eksponert for BDNF (figur 3.6 A), mens andel lange nevritter hadde en tendens til å bli redusert (figur 3.6 B). Dersom man har ser bort fra den nevruttveksten man har i ubehandlede celler og den nevruttveksten man kan knytte til egeneffekt av antistoffet (figur 3.4) ser man at reduksjonen etter eksponering for BDNF-antistoff er ytterligere økt. Nevrittlengden ser også da ut til å bli redusert av antistoffet.

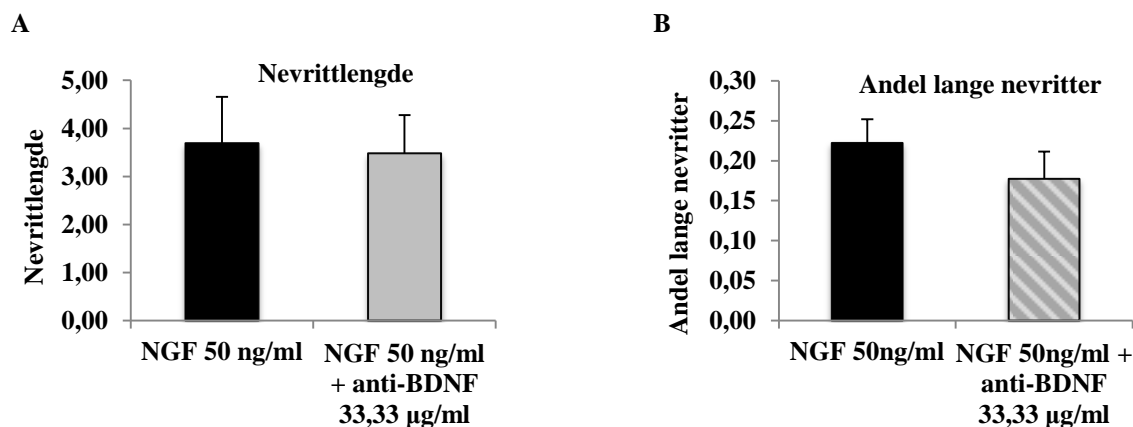


**Figur 3.4 BDNF-antistoff har en tendens til å øke nevruttvekst i P12-celler.** PC12-celler ble eksponert for 33,33 µg/ml BDNF-antistoff 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Kontroll er ubehandlede celler. (A) Nevrittlengde (gjennomsnittlig nevrittelengde normalisert i forhold til gjennomsnittlig nevrittelengde til ubehandlet i samme forsøk), n=8. (B) Andel lange nevritter (av totalt antall nevritter), n = 9. Deler av datamaterialet som ligger bak disse resultatene er felles med masterstudent Sissel Evensen.

## Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.4:

	Eksposering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.4 A	Ubehandlet	1,000	0,000	8
	BDNF-antistoff 33,33 µg/ml	1,837	0,468	8
3.4 B	Ubehandlet	0,102	0,021	9
	BDNF-antistoff 33,33 µg/ml	0,119	0,030	9

Endepunktet nevrittlengde har én parallell mindre enn det andre endepunktet fordi nevrittlengden i ubehandlede PC12-celler var 0 en av dagene.

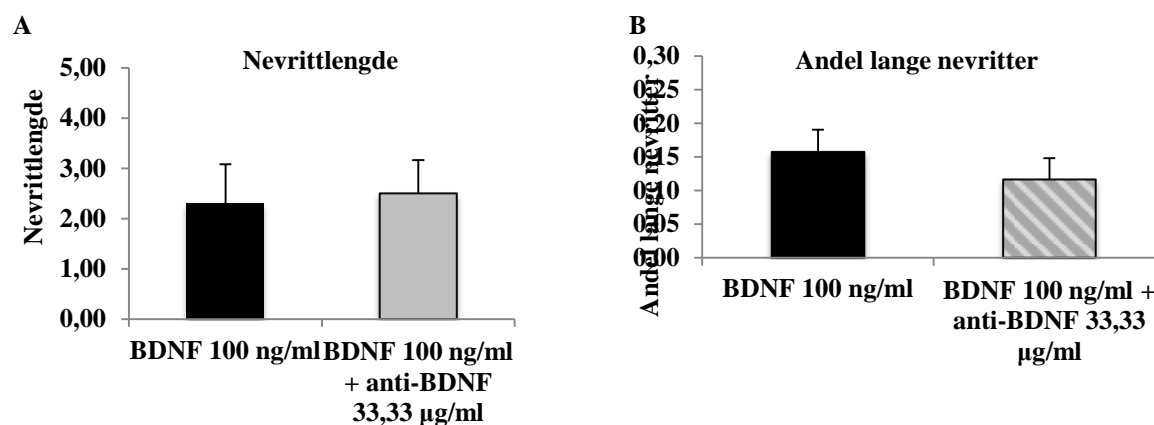


**Figur 3.5 BDNF-antistoff har en tendens til å redusere nevritutveksten i PC12-celler eksponert for NGF.** PC12-celler ble eksponert 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. (A) Nevrittlengde (gjennomsnittlig nevrittlengde normalisert i forhold til gjennomsnittlig nevrittlengde til ubehandlet i samme forsøk). Eksponert for 50 ng/ml NGF, med og uten 33,33 µg/ml BDNF-antistoff, n = 6. Y-aksen går opp til 5, ikke til 3 som de fleste andre figurene som viser nevrittlengde gjør. (B) Andel lange nevritter (av totalt antall nevritter). Eksponert for 50 ng/ml NGF, med og uten 33,33 µg/ml BDNF-antistoff n = 7. Deler av datamaterialet som ligger bak disse resultatene er felles med masterstudent Sissel Evensen.

## Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.5:

	Eksposering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
3.5 A	NGF 50 ng/ml	3,691	0,968	6
	NGF 50 ng/ml + BDNF-antistoff 33,33 µg/ml	3,480	0,800	6
3.5 B	NGF 50 ng/ml	0,222	0,030	7
	NGF 50 ng/ml + BDNF-antistoff 33,33 µg/ml	0,177	0,034	7

Endepunktet nevrittlengde har én parallell mindre enn det andre endepunktet fordi nevrittlengden i ubehandlede PC12-celler var 0 en av dagene.



**Figur 3.6** BDNF-antistoff har en tendens til å redusere andel lange nevritter i PC12-celler eksponert for BDNF. PC12-celler ble eksponert 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. (A) Nevrittllengde (gjennomsnittlig nevruttllengde normalisert i forhold til gjennomsnittlig nevruttllengde til ubehandlet i samme forsøk). Eksponert for 100 ng/ml BDNF, med og uten 33,33 µg/ml anti-BDNF, n=5. Y-aksen går opp til 5, ikke til 3 som de fleste andre figurene som viser nevruttllengde gjør. (B) Andel lange nevritter (av totalt antall nevritter). Eksponert for 100 ng/ml BDNF, med og uten 33,33 µg/ml anti-BDNF, n=6. Deler av datamaterialet som ligger bak disse resultatene er felles med masterstudent Sissel Evensen.

#### Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.6:

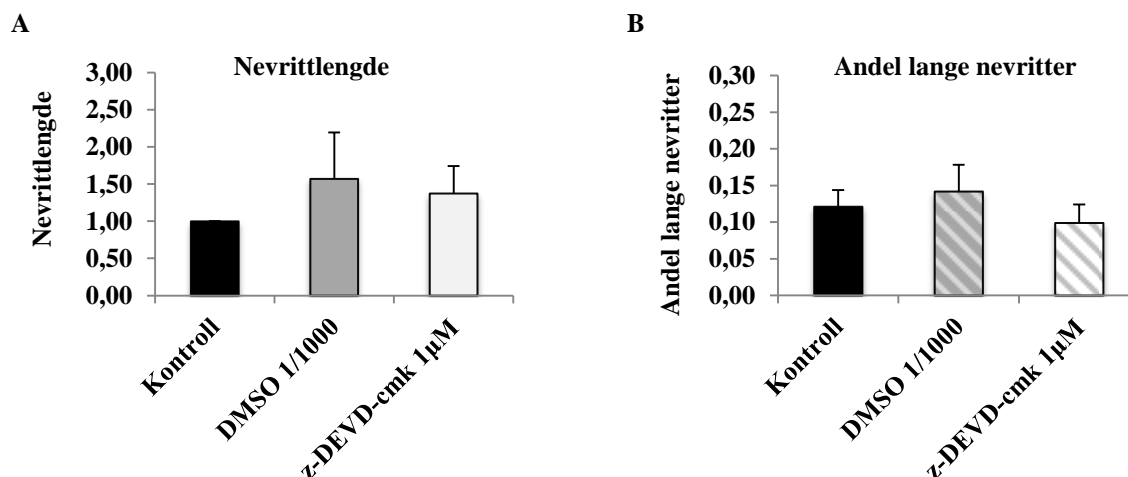
	Eksposering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
<b>3.6 A</b>	BDNF 100 ng/ml	2,305	0,776	5
	BDNF 100 ng/ml + BDNF-antistoff 33,33 µg/ml	2,501	0,662	5
<b>3.6 B</b>	BDNF 100 ng/ml	0,158	0,033	6
	BDNF 100 ng/ml + BDNF-antistoff 33,33 µg/ml	0,117	0,032	6

Endepunktet nevruttllengde har én parallell mindre enn det andre endepunktet fordi nevruttllengden i ubehandlede PC12-celler var 0 en av dagene.

### 3.2.3 Effekter av caspasehemmeren z-DEVD-cmk

For å undersøke om nevruttveksten er avhengig av caspase-3 ble PC12-cellene eksponert for caspase-3-hemmeren z-DEVD-cmk. Z-DEVD-cmk er løst og fortynnet i DMSO, og figur 3.7 viser z-DEVD-cmk sammenlignet med ubehandlet kontroll og DMSO kontroll. DMSO hadde en tendens til å gi en økning i både nevruttllengde og andel lange nevrutter sammenlignet med ubehandlet kontroll. Z-DEVD-cmk så ut til å gi en økning i nevruttllengde og en reduksjon i andel lange nevrutter sammenlignet med ubehandlet kontroll. Z-DEVD-cmk hadde en tendens til å gi kortere nevruttllengde og en lavere andel lange nevrutter sammenlignet med DMSO. PC12-cellene ble videre eksponert for NGF og BDNF, med og uten z-DEVD-cmk. Resultatene viser at z-DEVD-cmk hadde en tendens til å redusere nevruttllengden og andel lange nevrutter i celler eksponert for NGF (figur 3.8). I BDNF-eksponerte celler var nevruttllengden uendret etter tilsetning av z-DEVD-cmk, mens andelen lange nevrutter så ut å ha en tendens til reduksjon (figur 3.9). Dersom man har ser bort fra den

andelen lange nevritter man har i ubehandlede celler og den andelen lange nevritter man kan knytte til egen effekt av z-DEVD-cmk (figur 3.7 B) så ser andelen lange nevritter i celler eksponert for BDNF ut til å være ytterligere redusert av z-DEVD-cmk.

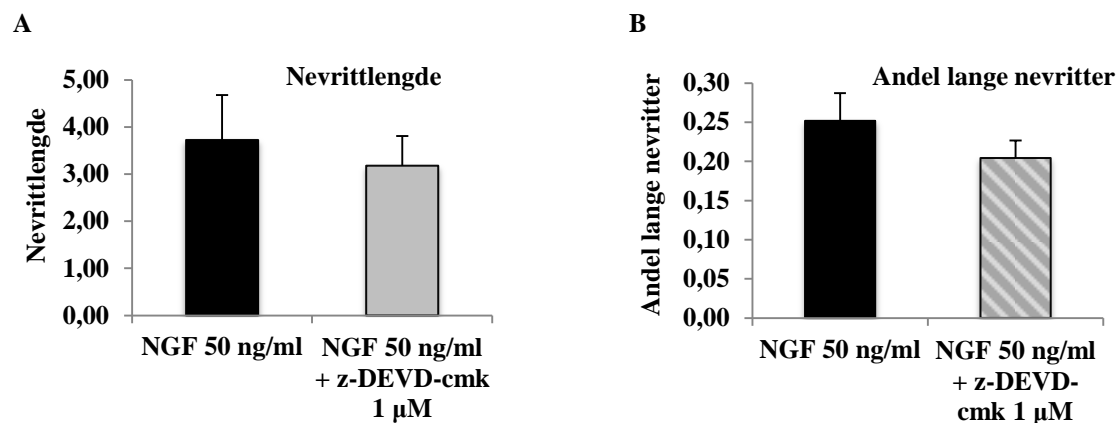


**Figur 3.7 DMSO og z-DEVD-cmk har ingen signifikant effekt på nevrittutvekst.** PC12-celler ble eksponert for DMSO 1:1000 og z-DEVD-cmk 1  $\mu$ M 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. (A) Nevritt lengde (gjennomsnittlig nevritt lengde normalisert i forhold til gjennomsnittlig nevritt lengde til ubehandlet i samme forsøk), n=10. (B) Andel lange nevritter (av totalt antall nevritter), n=11. Deler av datamaterialet som ligger bak disse resultatene er felles med masterstudent Sissel Evensen.

#### Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.7:

	Eksponering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
<b>3.7 A</b>	Ubehandlet	1,000	0,000	10
	DMSO 1:1000*	1,571	0,623	10
	z-DEVD-cmk 1 $\mu$ M	1,375	0,370	10
<b>3.7 B</b>	Ubehandlet	0,121	0,023	11
	DMSO 1:1000*	0,142	0,036	11
	z-DEVD-cmk 1 $\mu$ M	0,099	0,025	11

Endepunktet nevritt lengde har én parallell mindre enn det andre endepunktet fordi nevritt lengden i ubehandlede PC12-celler var 0 en av dagene. \*En parallell er tatt bort da resultatet hadde stort avvik i forhold til de andre resultatene.

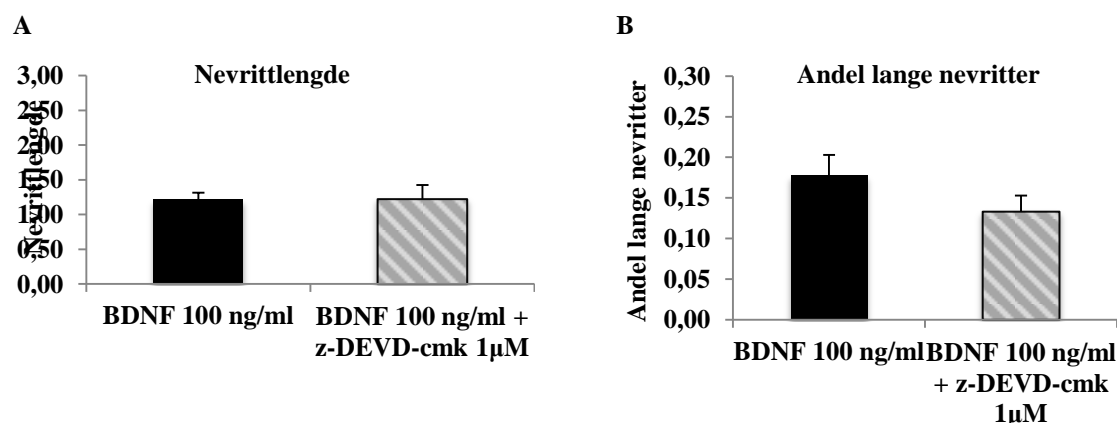


**Figur 3.8 Z-DEVD-cmk har en tendens til å redusere nevruttvekst i PC12-celler eksponert for NGF.** PC12-celler ble eksponert 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. (A) Nevrittlengde (gjennomsnittlig nevrittelengde normalisert i forhold til gjennomsnittlig nevrittelengde til ubehandlet i samme forsøk). Eksponert for 50 ng/ml NGF, med og uten 1  $\mu$ M z-DEVD-cmk, n=6. Y-aksen går opp til 5, ikke til 3 som de fleste andre figurene som viser nevrittelengde gjør. (B) Andel lange nevritter (av totalt antall nevritter). Eksponert for 50 ng/ml NGF, med og uten 1  $\mu$ M z-DEVD-cmk, n=7. Deler av datamaterialet som ligger bak disse resultatene er felles med masterstudent Sissel Evensen.

#### Tallmateriale som ligger bak figur 3.8:

	Eksposering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
<b>3.8 A</b>	NGF 50 ng/ml	3,723	0,954	6
	NGF 50 ng/ml + z-DEVD-cmk 1 $\mu$ M	3,177	0,632	6
<b>3.8 B</b>	NGF 50 ng/ml	0,252	0,035	7
	NGF 50 ng/ml + z-DEVD-cmk 1 $\mu$ M	0,204	0,022	7

Endepunktet nevrittelengde har én parallell mindre enn det andre endepunktet fordi nevrittelengden i ubehandlede PC12-celler var 0 en av dagene.



**Figur 3.9 z-DEVD-cmk har en tendens til å redusere andel lange nevritter i PC12-celler eksponert for BDNF.** PC12-celler ble eksponert 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. (A) Nevrittlengde (gjennomsnittlig nevrittelengde normalisert i forhold til gjennomsnittlig nevrittelengde til ubehandlet i samme forsøk). Eksponert for 100 ng/ml BDNF, med og uten 1  $\mu$ M z-DEVD-cmk, n=6. (B) Andel lange nevritter (av totalt antall nevritter). Eksponert for 100 ng/ml BDNF, med og uten 1  $\mu$ M z-DEVD-cmk, n=6. Deler av datamaterialet som ligger bak disse resultatene er felles med masterstudent Sissel Evensen.

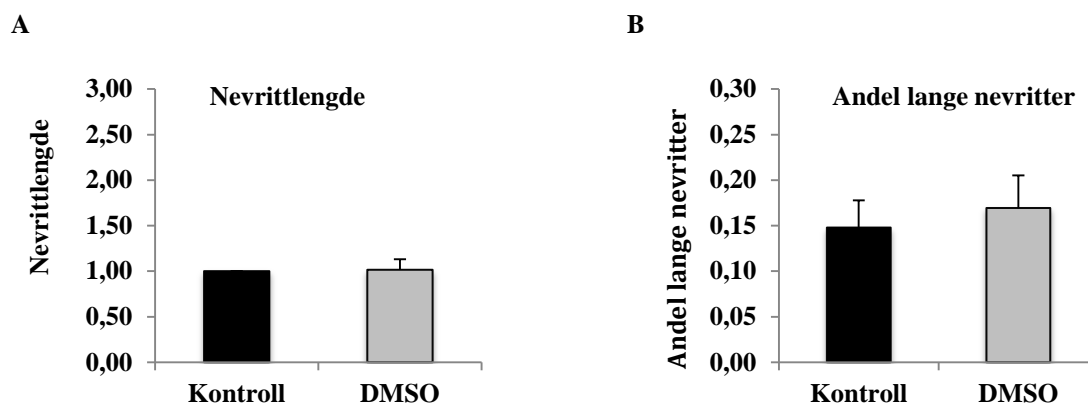


## Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.9:

	Eksposering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
<b>3.9 A</b>	BDNF 100 ng/ml	1,217	0,096	6
	BDNF 100 ng/ml + z-DEVD-cmk 1 $\mu$ M	1,223	0,204	6
<b>3.9 B</b>	BDNF 100 ng/ml	0,178	0,025	6
	BDNF 100 ng/ml + z-DEVD-cmk 1 $\mu$ M	0,133	0,020	6

## 3.2.4 Effekter av escitalopram på nevruttvekst

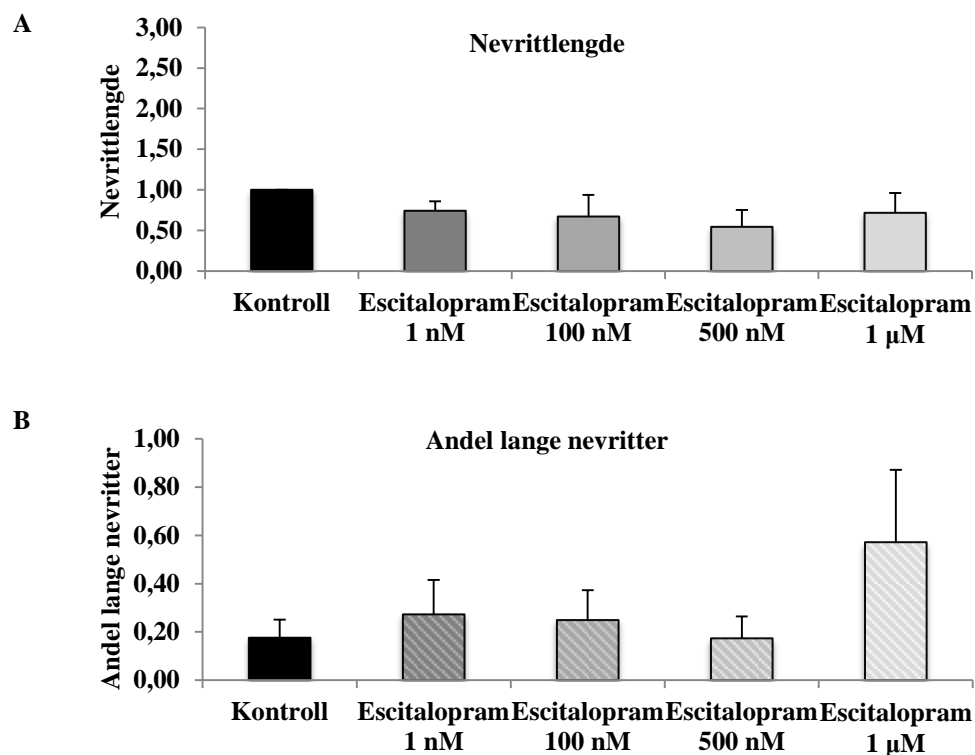
PC12-celler ble eksponert for escitalopram i fire ulike konsentrasjoner. Escitalopram er løst i DMSO, og maksimal mengde DMSO som tilsettes som følge av dette er 0,829  $\mu$ l. Figur 3.10 viser DMSO sammenlignet med ubehandlet kontroll. DMSO ga ingen signifikant økning i nevruttvekst. Escitalopram hadde en tendens til å gi reduksjon i nevruttlengde (figur 3.11 A), mens det for andel lange nevrutter var en tendens til økning etter eksponering for escitalopram 1 nM, 100 nM og 1  $\mu$ M. 500 nM escitalopram så ut til å gi en liten reduksjon i andelen lange nevrutter (figur 3.11 B).



**Figur 3.10 DMSO gir ingen signifikant endring i nevruttvekst i PC12-celler.** PC12-celler ble eksponert for DMSO 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Mengde DMSO: 0,027-3  $\mu$ l. Figuren viser gjennomsnittet av 3 ulike konsentrasjoner DMSO. (A) Nevruttlengde (gjennomsnittlig nevruttlengde normalisert i forhold til gjennomsnittlig nevruttlengde til ubehandlet i samme forsøk), n=16 for kontroll, n=15 for DMSO. (B) Andel lange nevrutter (av totalt antall nevrutter), n=17 for kontroll, n=16 for DMSO.

## Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.10:

	Eksposering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
<b>3.10 A</b>	Ubehandlet	1,000	0,000	16
	DMSO	1,015	0,117	15
<b>3.10 B</b>	Ubehandlet	0,148	0,030	17
	DMSO	0,169	0,036	16



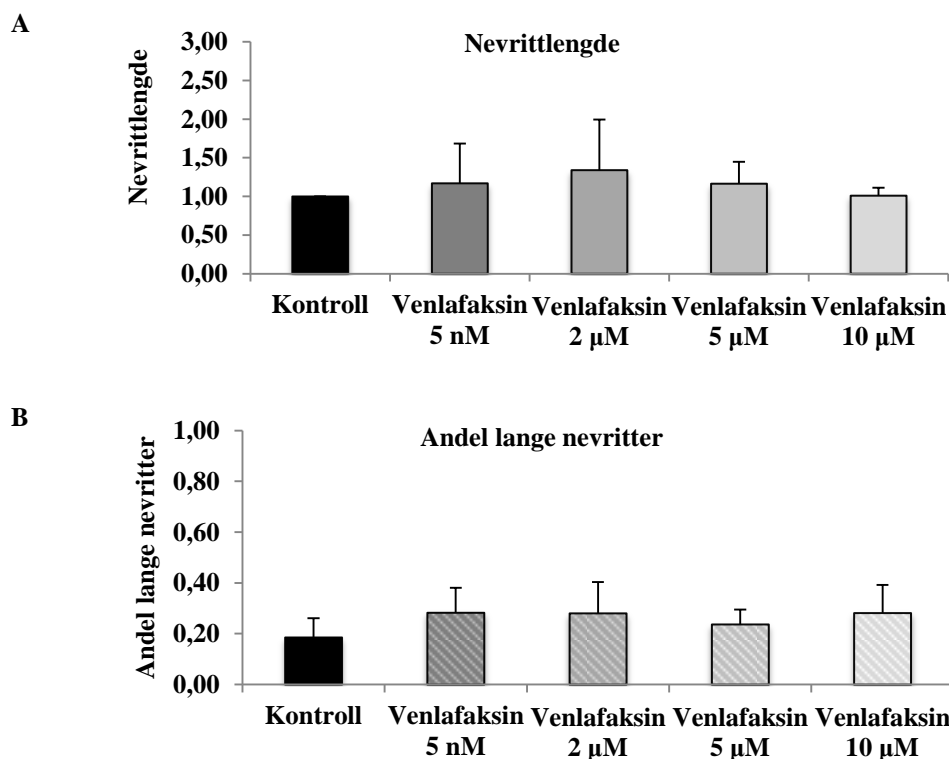
**Figur 3.11** Escitalopram har en tendens til å redusere nevrittelengde og øke andel lange nevritter i PC12-celler. PC12-celler ble eksponert for henholdsvis 1 nM, 100 nM, 500 nM og 1 µM escitalopram, 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Kontroll er ubehandlede PC12-celler. (A) Nevritt lengde (gjennomsnittlig nevrittelengde normalisert i forhold til gjennomsnittlig nevrittelengde til ubehandlet i samme forsøk), n = 6. (B) Andel lange nevritter (av totalt antall nevritter), n = 6. Y-aksen går opp til 1 og ikke til 0,3 som de fleste andre figurene som viser andel lange nevritter gjør.

**Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.11:**

	Eksposering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
<b>3.11 A</b>	Ubehandlet	1,000	0,000	6
	Escitalopram 1 nM	0,742	0,119	6
	Escitalopram 100 nM	0,671	0,264	6
	Escitalopram 500 nM	0,544	0,206	6
	Escitalopram 1 µM	0,716	0,245	6
<b>3.11 B</b>	Ubehandlet	0,176	0,075	6
	Escitalopram 1 nM	0,272	0,144	6
	Escitalopram 100 nM	0,249	0,124	6
	Escitalopram 500 nM	0,173	0,091	6
	Escitalopram 1 µM	0,572	0,300	6

### 3.2.5 Effekter av venlafaksin på nevruttvekst

PC12-celler ble eksponert for venlafaksin 5 nM, 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M og 10  $\mu$ M. Alle konsentrasjonene hadde en tendens til å gi økt nevruttlengde og økt andel lange nevrutter sammenlignet med kontroll (figur 3.12).



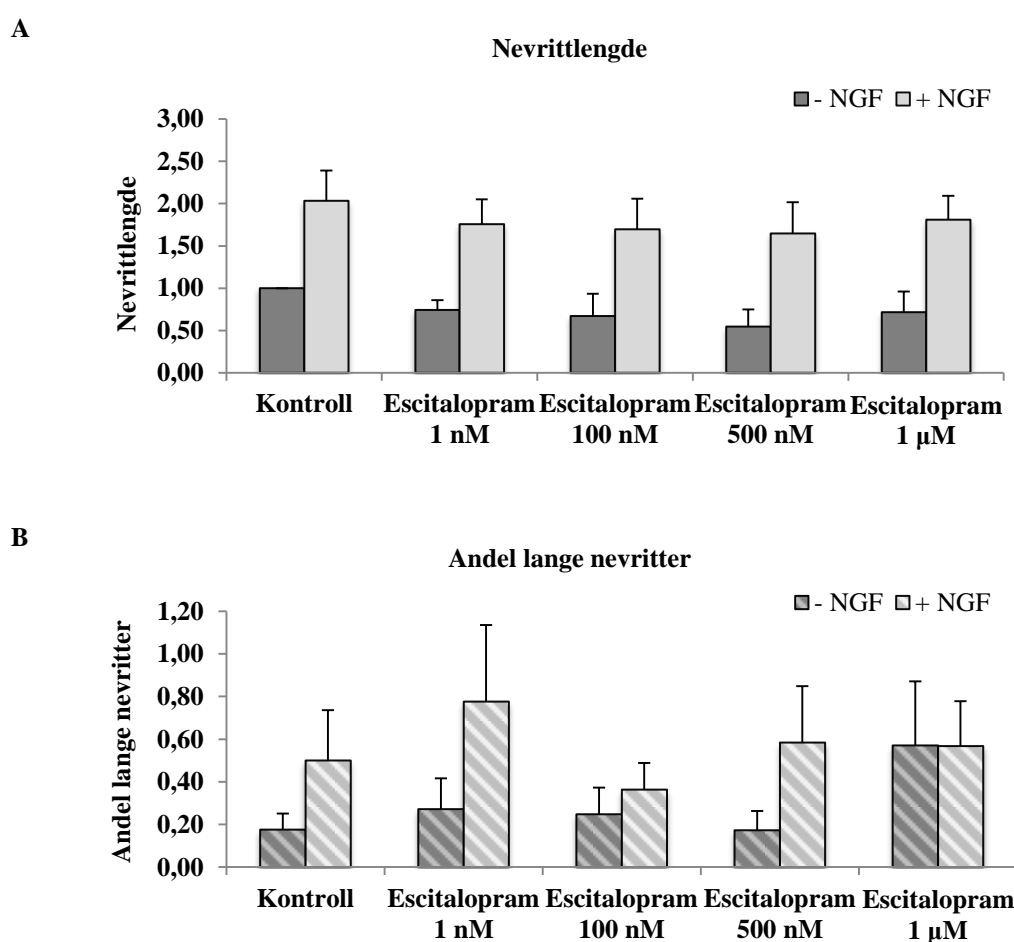
**Figur 3.12 Venlafaksin har en tendens til å øke nevruttveksten i PC12-celler.** PC12-celler ble eksponert for henholdsvis 5 nM, 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M og 10  $\mu$ M venlafaksin, 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Kontroll er ubehandlede PC12-celler. (A) Nevritt lengde (gjennomsnittlig nevruttlengde normalisert i forhold til gjennomsnittlig nevruttlengde til ubehandlet i samme forsøk), n = 6. (B) Andel lange nevrutter (av totalt antall nevrutter), n=6. Y-aksen går opp til 1, ikke til 0,3 som de fleste andre figurene som viser andel lange nevrutter gjør.

#### Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.12:

	Eksponering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
<b>3.12 A</b>	Ubehandlet	1,000	0,000	6
	Venlafaksin 5 nM	1,170	0,513	6
	Venlafaksin 2 $\mu$ M	1,340	0,655	6
	Venlafaksin 5 $\mu$ M	1,165	0,283	6
	Venlafaksin 10 $\mu$ M	1,010	0,102	6
<b>3.12 B</b>	Ubehandlet	0,186	0,075	6
	Venlafaksin 5 nM	0,283	0,097	6
	Venlafaksin 2 $\mu$ M	0,281	0,123	6
	Venlafaksin 5 $\mu$ M	0,237	0,058	6
	Venlafaksin 10 $\mu$ M	0,282	0,111	6

### 3.2.6 Effekter av escitalopram i NGF-differensierende PC12-celler

Ved eksponering for NGF starter PC12-celler å differensiere og utvikle seg til det som ligner sympatiske nevroner [55]. Det var derfor av interesse å se om legemidlene påvirker nevruttveksten i en slik cellemodell som i større grad ligner sentralnervesystemet i utvikling. PC12-celler ble eksponert for escitalopram i de samme konsentrasjonene som ble brukt i forsøk uten nærvær av NGF. Resultatene viser at escitalopram hadde en tendens til å redusere nevruttlengden i PC12-celler eksponert for NGF (figur 3.13 A). Escitalopram 1 nM, 500 nM og 1 µM hadde en tendens til å øke andelen lange nevrutter, mens escitalopram 100 nM hadde en tendens til å redusere andelen lange nevrutter i NGF-eksponerte PC12-celler.



**Figur 3.13 Escitalopram har en tendens til å redusere nevruttlengden og øke andelen lange nevrutter i PC12-celler eksponert for NGF.** PC12-cellene ble eksponert for henholdsvis 1 nM, 100 nM, 500 nM og 1 µM escitalopram, med og uten 50 ng/ml NGF, 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. (A) Nevritt lengde (gjennomsnittlig nevruttlengde normalisert i forhold til gjennomsnittlig nevruttlengde til ubehandlet i samme forsøk), n = 6. (B) Andel lange nevrutter (av totalt antall nevrutter), n=6. Y-aksen går opp til 1,2, ikke til 0,3 som de fleste andre figurene som viser andel lange nevrutter gjør.

**Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.13:**

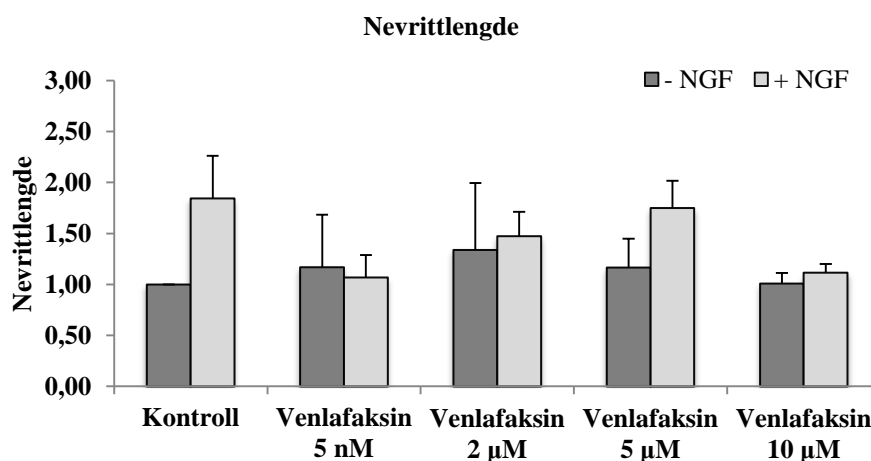
Se tallmateriale til figur 3.11 for escitalopram 1 nM, 100 nM, 500 nM og 1  $\mu$ M.

<b>3.13 A</b>	<b>Eksponering</b>	<b>Gjennomsnitt</b>	<b>SE</b>	<b>Antall forsøk</b>
	Ubehandlet	1,000	0,000	6
	NGF 50 ng/ml	2,028	0,361	6
	Escitalopram 1 nM + NGF 50 ng/ml	1,755	0,297	6
	Escitalopram 100 nM + NGF 50 ng/ml	1,694	0,366	6
	Escitalopram 500 nM + NGF 50 ng/ml	1,644	0,371	6
	Escitalopram 1 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	1,807	0,283	6
<b>3.13 B</b>	Ubehandlet	0,176	0,075	6
	NGF 50 ng/ml	0,500	0,236	6
	Escitalopram 1 nM + NGF 50 ng/ml	0,777	0,358	6
	Escitalopram 100 nM + NGF 50 ng/ml	0,363	0,125	6
	Escitalopram 500 nM + NGF 50 ng/ml	0,584	0,265	6
	Escitalopram 1 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	0,568	0,210	6

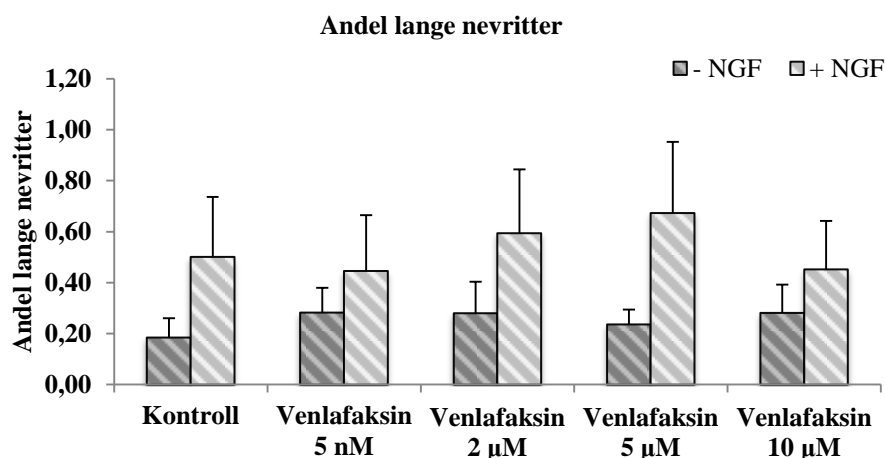
### 3.2.7 Effekt av venlafaksin i NGF-differensierende PC12-celler

Venlafaksin i alle konsentrasjoner hadde en tendens til å redusere nevrittelengden i PC12-celler eksponert for NGF (figur 3.14 A). Venlafaksin 5 nM og 10  $\mu$ M så ikke ut til å endre andel lange nevritter, mens venlafaksin 2  $\mu$ M og 5  $\mu$ M hadde en tendens til å øke andelen lange nevritter i NGF-eksponerte celler (figur 3.14 B).

A



B



**Figur 3.14 Venlafaksin har en tendens til å redusere nevrittelengden og øke andelen lange nevritter i PC12-celler eksponert for NGF.** PC12-celler ble eksponert for henholdsvis 5 nM, 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M og 10  $\mu$ M venlafaksin, med og uten 50 ng/ml NGF, 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Kontroll er ubehandlede PC12-celler. (A) Nevritt lengde (gjennomsnittlig nevrittelengde normalisert i forhold til gjennomsnittlig nevrittelengde til ubehandlet i samme forsøk), n = 6. (B) Andel lange nevritter (av totalt antall nevritter), n=6. Y-aksen går opp til 1,2, ikke til 0,3 som de fleste andre figurene som viser andel lange nevritter gjør.

**Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.14:**

Se tallmateriale til figur 3.12 for venlafaksin 5 nM, 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M og 10  $\mu$ M.

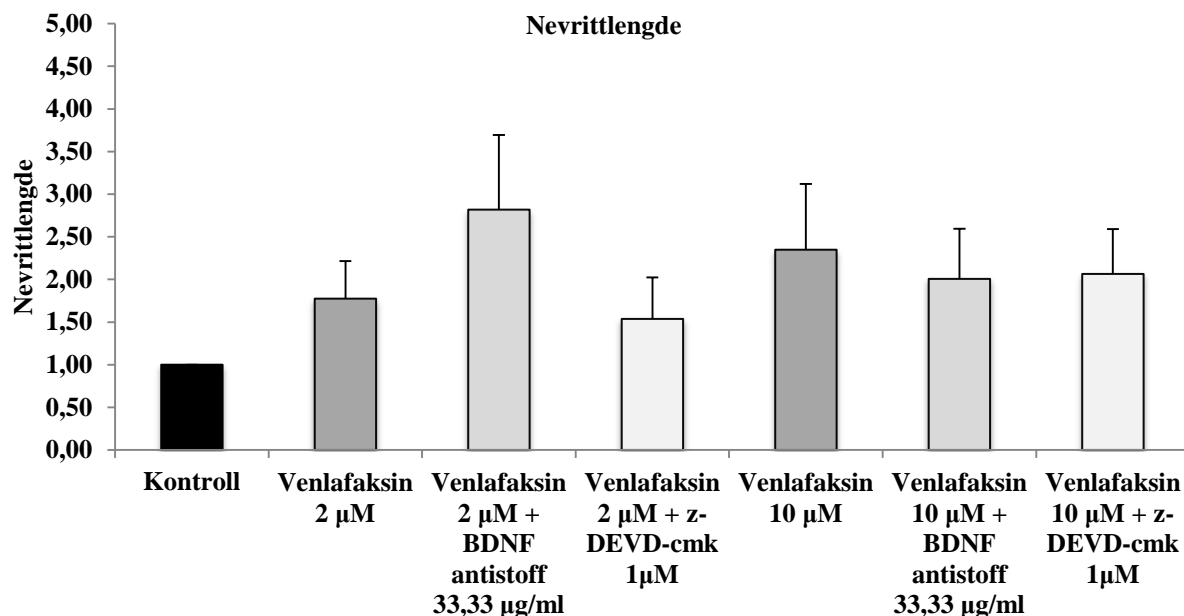
	<b>Eksposering</b>	<b>Gjennomsnitt</b>	<b>SE</b>	<b>Antall forsøk</b>
<b>3.14 A</b>	Ubehandlet	1,000	0,000	6
	NGF 50 ng/ml	1,844	0,420	6
	Venlafaksin 5 nM + NGF 50 ng/ml	1,070	0,218	6
	Venlafaksin 2 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	1,473	0,240	6
	Venlafaksin 5 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	1,752	0,265	6
	Venlafaksin 10 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	1,116	0,084	6
<b>3.14 B</b>	Ubehandlet	0,186	0,075	6
	NGF 50 ng/ml	0,501	0,235	6
	Venlafaksin 5 nM + NGF 50 ng/ml	0,446	0,219	6
	Venlafaksin 2 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	0,595	0,251	6
	Venlafaksin 5 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	0,674	0,278	6
	Venlafaksin 10 $\mu$ M + NGF 50 ng/ml	0,453	0,190	6

### **3.2.8 Effekter av BDNF-antistoff og caspase-3-hemmer på nevruttvekst i PC12-celler eksponert for venlafaksin**

Resultatene tydet på at venlafaksin økte nevruttlengden og andelen lange nevrutter i PC12-celler (figur 3.12). Venlafaksin hadde også en tendens til å redusere nevruttlengden og øke andelen lange nevrutter i PC12-celler eksponert for NGF (figur 3.14). Det var derfor ønskelig å undersøke mekanismene bak denne mulige påvirkningen, og cellene ble eksponert for BDNF-antistoff i en konsentrasjon på 33,33  $\mu$ g/ml og z-DEVD-cmk i en konsentrasjon på 1  $\mu$ M sammen med venlafaksin 2  $\mu$ M og 10  $\mu$ M.

BDNF-antistoff hadde en tendens til å øke nevruttlengden (figur 3.15), men redusere andelen lange nevrutter (figur 3.16) i PC12-celler eksponert for venlafaksin 2  $\mu$ M. Når det gjelder venlafaksin 10  $\mu$ M var det en tendens til at antistoffet reduserte både nevruttlengden (figur 3.15) og andelen lange nevrutter (figur 3.16).

Z-DEVD-cmk hadde en tendens til å redusere både nevruttlengde (figur 3.15) og andel lange nevrutter etter eksponering for begge konsentrasjonene venlafaksin (figur 3.16).



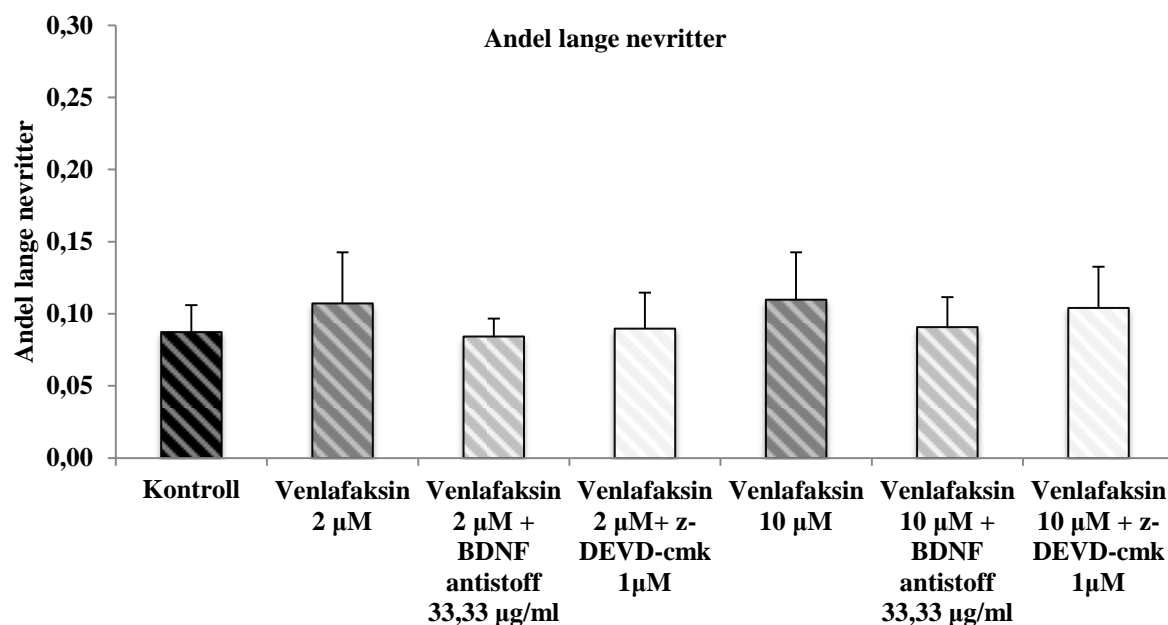
**Figur 3.15** BDNF-antistoff har en tendens til å øke nevritt lengden i PC12-celler eksponert for venlafaksin 2 µM, men reduserer nevritt lengden i celler eksponert for venlafaksin 10 µM. Z -DEVD-cmk har en tendens til å redusere nevritt lengde etter eksponering for begge konsentrasjonene venlafaksin. PC12-celler ble eksponert for 2 µM og 10 µM venlafaksin, med og uten 33,33 µg/ml BDNF antistoff og 1 µM z-DEVD-cmk, 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Nevritt lengde (gjennomsnittlig nevritt lengde normalisert i forhold til gjennomsnittlig nevritt lengde til ubehandlet i samme forsøk), n = 6. Y-aksen går opp til 5, ikke til 3 som de fleste andre figurene som viser nevritt lengde gjør.

**Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.15:**

Eksposering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
Ubehandlet	1,000	0,000	6
Venlafaksin 2 µM	1,775	0,442	6
Venlafaksin 2 µM + BDNF antistoff 33,33 µg/ml	2,819	0,876	6
Venlafaksin 2 µM + z-DEVD-cmk 1 µM	1,537	0,487	6
Venlafaksin 10 µM	2,349	0,770	6
Venlafaksin 10 µM + BDNF antistoff 33,33 µg/ml	2,006	0,588	6
Venlafaksin 10 µM + z-DEVD-cmk 1 µM	2,065	0,524	6

Endepunktet nevritt lengde har én parallell mindre enn det andre endepunktet fordi nevritt lengden i ubehandlede PC12-celler var 0 en av dagene.





**Figur 3.16** BDNF-antistoff og caspasehemmeren z-DEVD-cmk ser ut til å redusere andel lange nevritter i PC12-celler eksponert for venlafaksin 2 og 10 µM. PC12-cellene ble eksponert for 2 og 10 µM venlafaksin, med og uten 33,33 µg/ml BDNF antistoff og 1 µM z-DEVD-cmk, 24 timer etter utplating. Cellene ble studert i mikroskop 72 timer etter eksponering. Andel lange nevritter (av totalt antall nevritter), n = 7.

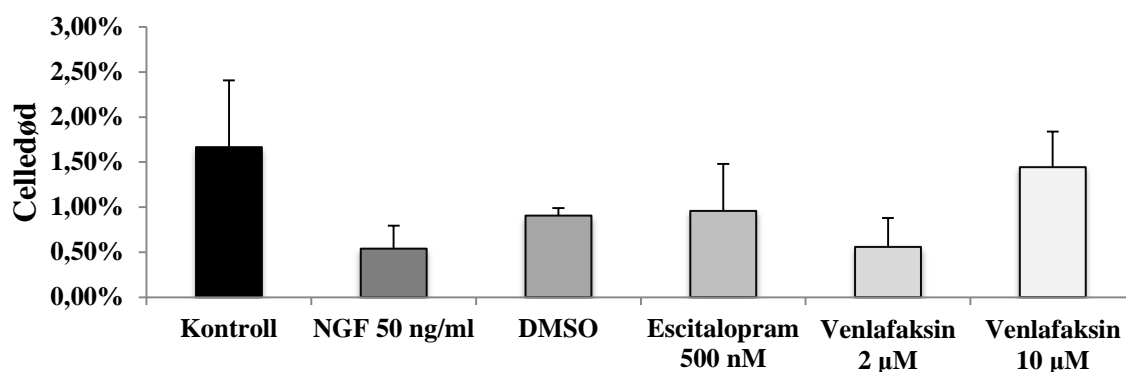
#### Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.16:

Eksposering	Gjennomsnitt	SE	Antall forsøk
Ubehandlet	0,087	0,019	7
Venlafaksin 2 µM	0,107	0,035	7
Venlafaksin 2 µM + BDNF antistoff 33,33 µg/ml	0,084	0,012	7
Venlafaksin 2 µM + z-DEVD-cmk 1 µM	0,090	0,025	7
Venlafaksin 10 µM	0,110	0,033	7
Venlafaksin 10 µM + BDNF antistoff 33,33 µg/ml	0,091	0,021	7
Venlafaksin 10 µM + z-DEVD-cmk 1 µM	0,104	0,029	7

Endepunktet nevrittelengde har én parallell mindre enn det andre endepunktet fordi nevrittelengden i ubehandlede PC12-celler var 0 en av dagene.

### 3.3 Celledød i PC12-celler

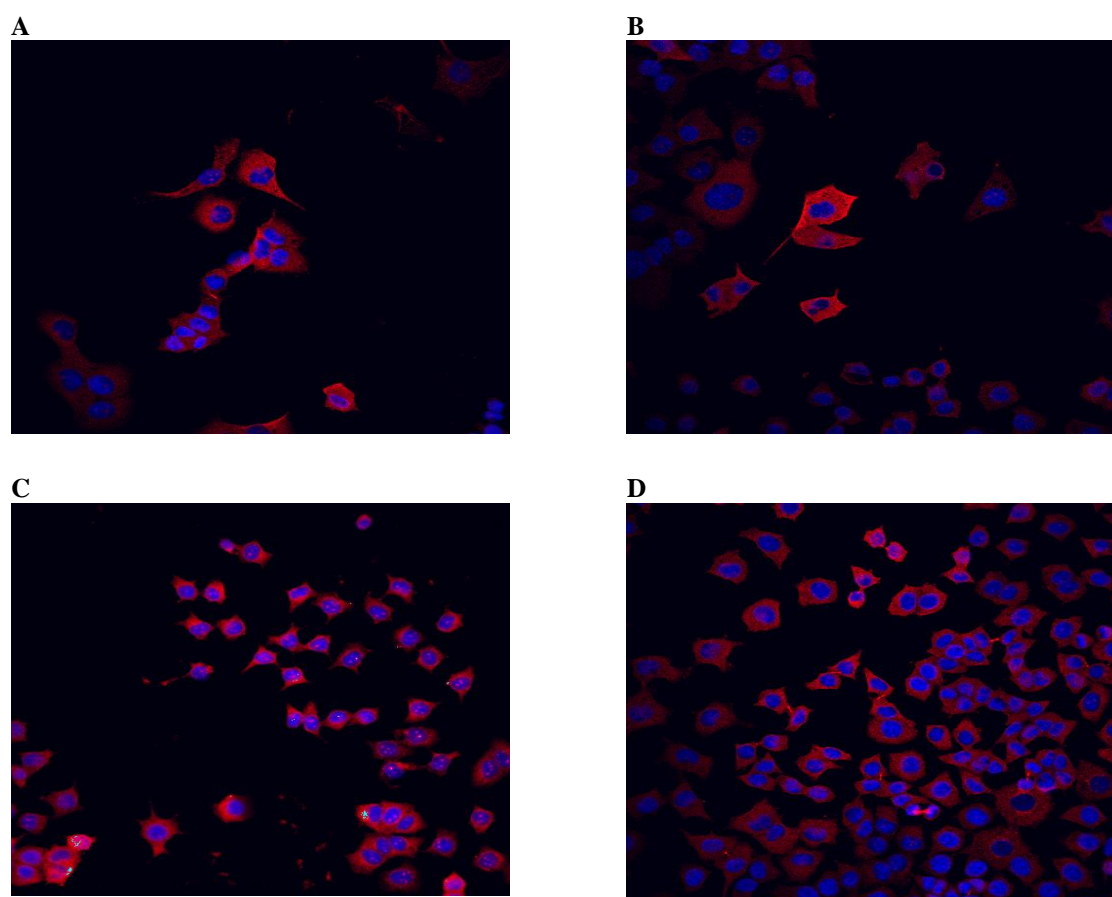
For å vite om dosene som er brukt til eksponering av PC12-celler for morfometrisk analyse er utenfor toksisk område, ble det farget med trypanblå og talt døde celler. Dette ble gjennomført for forsøksoppsett nummer 2. Prosentvis andel døde celler ble beregnet. Resultatene viser at eksponeringene ikke ga en signifikant økt celledød sammenlignet med ubehandlet kontroll. Et utvalg av resultatene er vist i figur 3.17.



**Figur 3.17 Eksponering av PC12-celler gir ikke signifikant økt celledød sammenlignet med ubehandlet kontroll.** Celledød i PC12-celler er talt 72 timer etter eksponering for henholdsvis NGF 50 ng/ml, DMSO 3 µl, escitalopram 500 nM, venlafaksin 2 µM og venlafaksin 10 µM. Ubehandlede celler er brukt som kontroll. Figuren viser gjennomsnittlig celledød i prosent i forhold til totalt antall celler fra uavhengige forsøk, n=3.

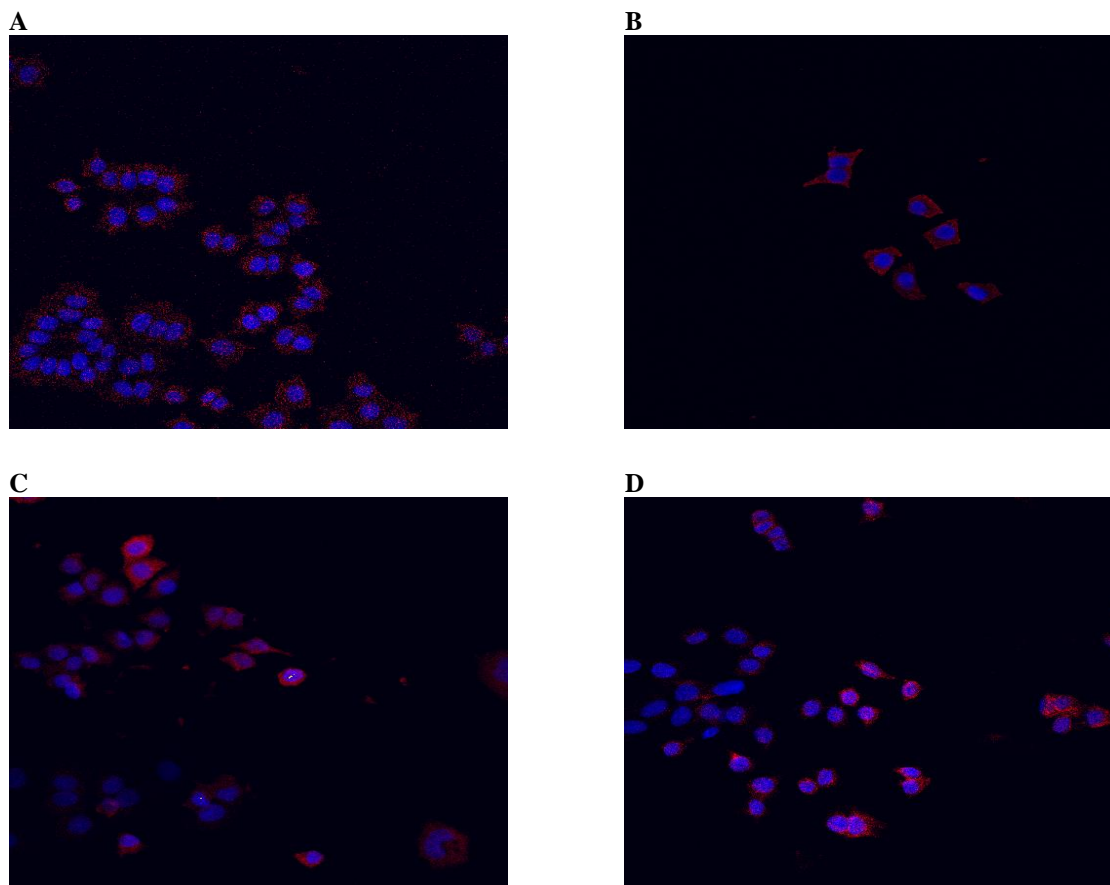
### 3.4 Immunfarging med antistoff mot $\beta$ -tubulin III og GAP-43

Immunfarging ble utført for å se om metoden kan egne seg til studier på nevruttvekst. Kjernene ble farget med Hoechst, et fargestoff som farger DNA. Det ble tilsatt et antistoff mot  $\beta$ -tubulin III som er et mikrotubuliprotein. Dette proteinet viste seg å være jevnt distribuert i hele cellen, med unntak av kjernen (figur 3.18). Selve fikseringsprosessen så ut til å gi kortere utløpere, da cellene etter fikseringen så ut til å ha kortere utløpere enn før fikseringen.



**Figur 3.18 Immunfarging med anti- $\beta$ -tubulin III.** Eksponering av PC12-celler. (A) Ubehandlede PC12-celler. (B) PC12-celler eksponert for NGF 50 ng/ml. (C) PC12-celler eksponert for escitalpram 500 nM. (D) PC12-celler eksponert for venlafaksin 10  $\mu$ M. Bildene er tatt på 40X forstørrelse i konfokalmikroskop. Cy3 (mus anti-kanin) 1:800 er brukt som sekundærantistoff for deteksjon av anti- $\beta$ -tubulin III. Kjernene er farget med hoechst 1:1000. Fikseringen og immunfargingen ble gjort 72 timer etter eksponeringsstart.

Antistoff mot GAP-43 ble deretter forsøkt. GAP-43 er et protein assosiert med vekst av nevritter. GAP-43 var også jevnt distribuert i hele cellen, og ga dermed heller ingen tilleggsinformasjon om nevruttveksten i cellene (figur 3.19). Det så også her ut som om fikseringen ga kortere utløpere.



**Figur 3.19 Immunfarging med anti-GAP-43.** Eksponering av PC12-celler. (A) Ubehandlet. (B) NGF 50 ng/ml. (C) Escitalopram 500 nM. (D) Venlafaksin 10 µM. Bildene er tatt på 40X forstørrelse i konfokalmikroskop. Cy3 (mus anti-kanin) 1:800 er brukt som sekundærantistoff for deteksjon av anti-GAP-43. Kjernene er farget med hoechst 1:1000. Fikseringen og immunfargingen ble gjort 72 timer etter eksponeringsstart.

Det ble i tillegg utført en pilot på immunfarging av ubehandlede kornceller fra lillehjerne hos rotte. De ble fiksert på dag 7 etter utplating. Under mikroskopi var det ingen celler igjen på skålen, og det så ut til at de hadde falt av under fikseringen. Det er derfor ingen bilder fra denne immunfargingen.

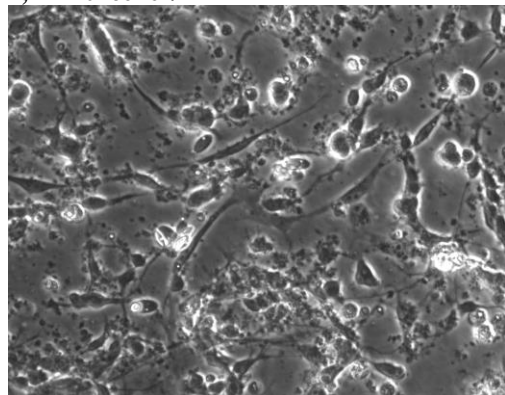
### 3.5 Nevrittutvekst i korncellekulturer

PC12-celler er ikke nevroner, men kreftceller som har en rekke egenskaper som ligner det man ser i sympatiske nevroner [53]. Det var derfor ønskelig å se på muligheten for å bruke kornceller, en stor og homogen nevronpopulasjon, til morfometrisk analyse.

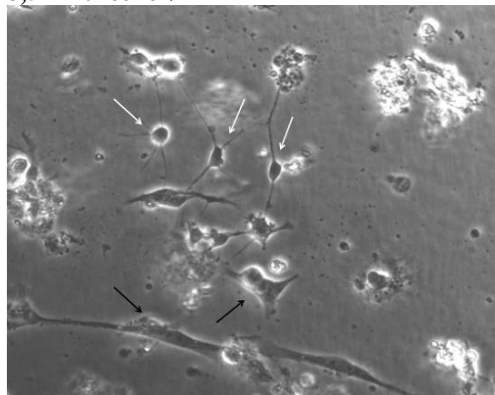
#### 3.5.1 Kornceller fra lillehjerne hos kylling

Kornceller ble plattet ut på to ulike tettheter,  $1,7 \times 10^6$  og  $8,5 \times 10^5$  celler/ml, og mikroskopert 24 timer etter utplating. Skålene med en celletetthet på  $1,7 \times 10^6$  celler/ml (vanlig tetthet) viste seg å være veldig tette og vanskelig å gjøre morfometrisk analyse på (figur 3.20). Celletetthet  $8,5 \times 10^5$  celler/ml ble derfor valgt for de videre forsøkene.

$1,7 \times 10^6$  celler/ml

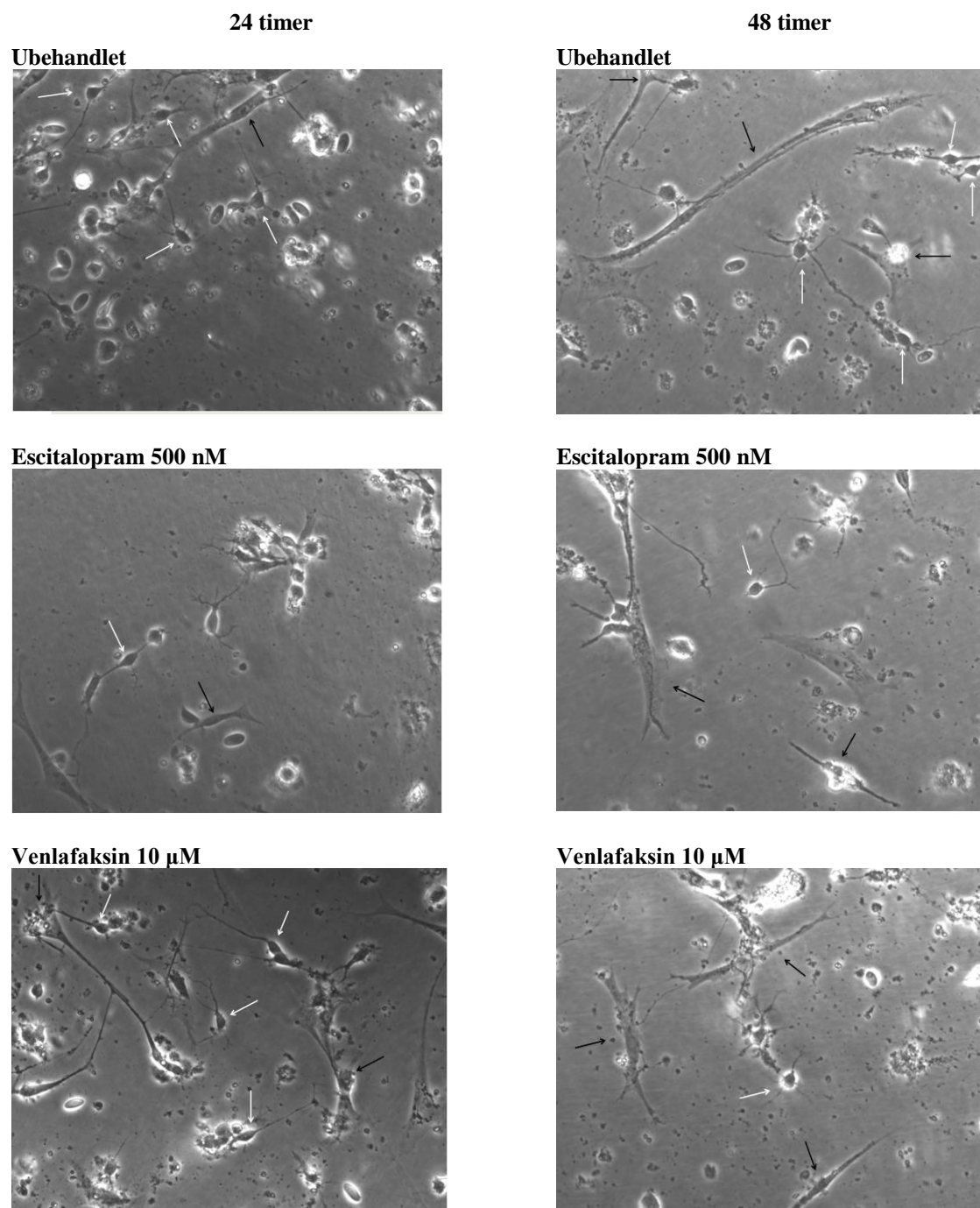


$8,5 \times 10^5$  celler/ml



**Figur 3.20** Mikroskopibilder av kornceller fra lillehjerne hos kylling. Bildene viser ubehandlede kornceller. Bildene er tatt ved 40X forstørrelse under fasekontrast, 24 timer etter utplating. Hvite piler viser eksempler på små, runde celler som har korncellelignende morfologi. Svarte piler markerer eksempler på celler med annen morfologi.

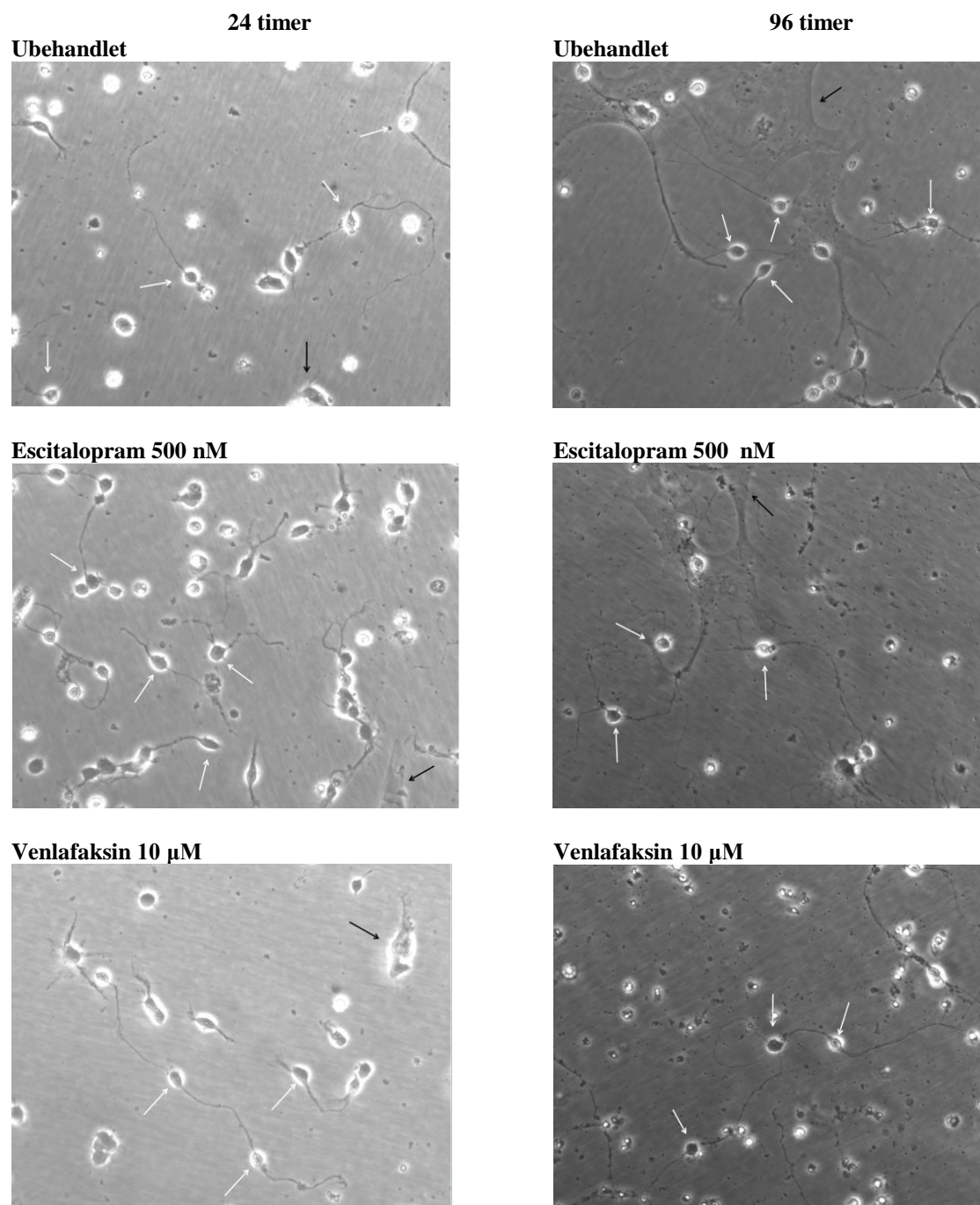
Korncellene ble videre eksponert for escitalopram 500 nM, escitalopram 1  $\mu$ M og venlafaksin 10  $\mu$ M. I tillegg var det en ubehandlet skål for kontroll. Cellene ble eksponert 2 timer etter utplating, og mikroskopi ble utført etter 24 og 48 timer. Et lite utvalg av bildene er vist i figur 3.21. Til tross for en relativt høy renhet [26], er ikke disse kulturene like rene som en cellelinje. Det viste seg å være vanskelig å skille kornceller fra andre typer celler som var til stede i skålen. Morfometrisk analyse ble derfor ikke utført på korncellekulturene. Ved sammenligning av bildene tatt 24 timer etter eksponering med bildene tatt 48 timer etter eksponering ser man noen forskjeller. De andre celletypene i skålen ser ut til å ha vokst seg større og tar dermed mer plass, og antallet kornceller ser ut til å ha gått ned. Det ser også ut til at cellene dør etter 48 timer ved denne tettheten. Det er ikke mulig å se om nevrundene har økt i lengde på disse 24 timene.



**Figur 3.21** Mikroskopibilder av korncellekultur fra lillehjerne hos kylling. Bildene viser kornceller eksponert for escitalopram 500 nM og venlafaksin 10 µM. Bildene er tatt ved 40X forstørrelse under fasekontrast. Ubehandlede celler er brukt som kontroll. Celletettheten er  $8,5 \times 10^5$  celler/ml. Hvite piler viser eksempler på små, runde celler som har korncellelignende morfologi. Svarte piler markerer eksempler på celler med annen morfologi.

### 3.5.2 Kornceller fra lillehjerne hos rotte

Det var ønskelig å kjøre en pilot i rotte for å se om celler fra rotte er egnet til morfometrisk analyse. Cellene ble eksponert rett etter utplating (da de hadde festet seg), og mikroskopi ble utført etter 24 og 96 timer. Cellene ble eksponert for escitalopram 500 nM, escitalopram 1  $\mu$ M, og venlafaksin 10  $\mu$ M. I tillegg var det en ubehandlet skål for kontroll. Et lite utvalg av bildene er vist i figur 3.22. Nevronene i korncellekulturene fra lillehjerne hos rotte var enklere å finne, og det virket også som om det var flere celler med utløpere sammenlignet med korncellene fra kylling. Spesielt eksponering for escitalopram og venlafaksin ga lange utløpere. Ved sammenligning av bildene tatt 24 timer etter eksponering med bildene tatt 96 timer etter eksponering ser man at antallet kornceller ser ut til å gå ned. Det ser ut som cellene dør etter 96 timer ved denne tettheten. Det gjelder spesielt cellene som er eksponert for legemiddel. Det er ikke mulig å se om nevrundene har økt i lengde på disse 72 timene. Det ble valgt ikke å gjøre morfometrisk analyse på disse cellene.



**Figur 3.22** Mikroskopibilder av korncellekulturer fra lillehjerne hos rotte. Bildene viser kornceller eksponert for escitalopram 500 nM og venlafaksin 10 µM. Ubehandlede celler er brukt som kontroll. Bildene er tatt ved 40X forstørrelse under fasekontrast. Celletettheten er  $6 \times 10^5$  celler/ml (halv tetthet). Hvite piler viser eksempler på små, runde celler som har korncellelignende morfologi. Svarte piler markerer eksempler på celler med annen morfologi.

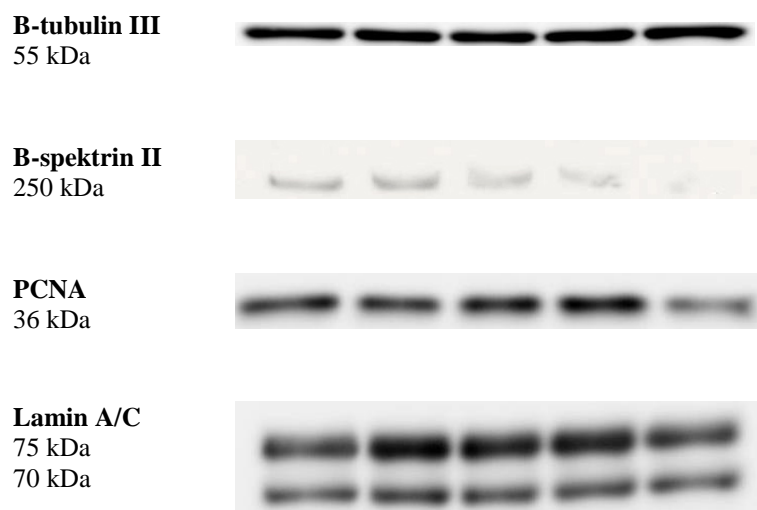


## 3.6 Westernblott ved bruk av utviklingsmarkører

NGF viste seg i morfometrisk undersøkelse av PC12-celler å gi økt nevruttvekst sammenlignet med ubehandlet. Det var ønskelig å se om resultatene fra morfometrisk analyse av nevruttvekst (3.1 og 3.2) kunne reproduseres ved bruk av westernblotting. Det ble utført 2 pilotstudier, én med høstede PC12-celler og én med høstede kornceller fra lillehjerne hos kylling.

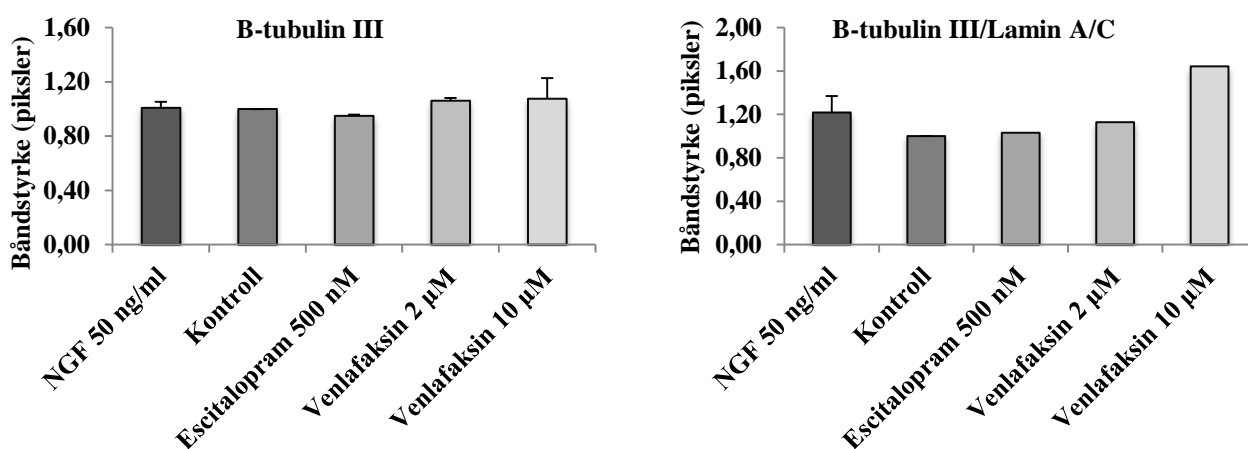
### 3.6.1 Deteksjon og kvantifisering av utviklingsmarkører i PC12-celler

PC12-celler ble testet i den første piloten og resultatet fra den ene membranen er vist i figur 3.23. Cellene som ble brukt til westernblottingen ble eksponert for NGF 50 ng/ml, escitalopram 500 nM, venlafaksin 2  $\mu$ M og venlafaksin 10  $\mu$ M. De ble høstet 72 timer etter eksponeringsstart. Ubehandlede PC12-celler ble brukt som kontroll. Lamin A/C er en kjernemarkør og fungerer som internkontroll (figur 3.27). Internkontrollen bruker man for å kontrollere og korrigere for proteinmengden i de ulike prøvene. B-tubulin III er et cytoskjelettprotein. Antistoff mot dette proteinet viste at det var relativt lik mengde av  $\beta$ -tubulin III i de fleste prøvene (3.23), men NGF og venlafaksin 10  $\mu$ M så ut til å gi litt økt  $\beta$ -tubulin III i forhold til de andre (figur 3.24). Caspaser kan være involvert i flere mekanismer, og det var ønskelig å teste om caspaser kunne være involvert. Det ble tilsatt et antistoff mot  $\beta$ -spektrin II, som er et protein viktig for morfologi og plasmamembranstabilitet [72]. Resultatet er vist i figur 3.23, og viser et svakt bånd ved 250 kDa. Dette tilsvarer protein i full lengde. Ved tilstedeværelse av caspaser skal det komme et bånd for kløyvingsproduktet i tillegg til båndet for proteinet i full lengde. Mengden  $\beta$ -spektrin II var høyest i NGF-eksponerte PC12-celler (figur 3.25). PCNA er markør for cellesyklus i PC12-celler, og resultatene etter tilsetning av antistoff til PCNA er vist i figur 3.23. Etter eksponering for venlafaksin 10  $\mu$ M ser mengden PCNA ut til å gå ned i forhold til ubehandlet kontroll. NGF, escitalopram 500 nM og venlafaksin 2  $\mu$ M ser ut til å øke mengden PCNA (figur 3.26). Vi testet også et antistoff som skal være mer spesifikt for nevruttvekst, anti-GAP-43. GAP-43 er et protein som er viktig for nevronal vekst. Dette proteinet viste seg å være vanskelig å detektere ved bruk av western. GAP-43 er et lite molekyl på 23,6 kDa, og små proteiner kan være vanskelige å detektere med denne metoden. Dette er erfart tidligere i forskningsgruppen. Resultat for GAP-43 er ikke vist.



**Eksponering**            NGF    Kontroll    E500    V2    V10

**Figur 3.23 Westernblott av høstede PC12-celler.** PC12-celler ble eksponert for NGF 50 ng/ml, escitalopram 500 nM, venlafaksin 2  $\mu$ M og venlafaksin 10  $\mu$ M, 24 timer etter utplating. Cellene ble høstet 72 timer etter eksponering. Figuren viser proteinbånd for  $\beta$ -tubulin III,  $\beta$ -spektrin II, PCNA og lamin A/C. Alle proteinbåndene er fra samme membran.

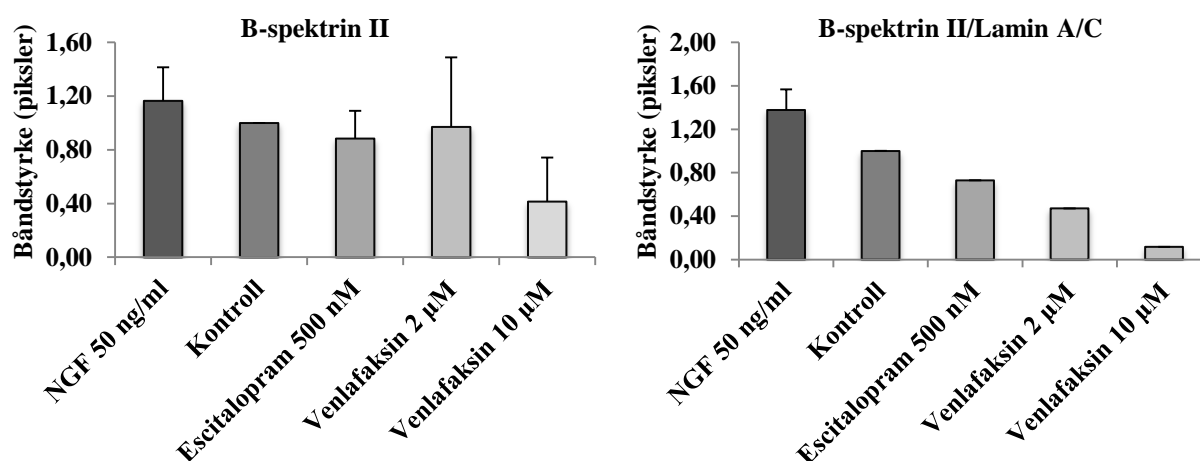


**Figur 3.24 Mengden  $\beta$ -tubulin III er relativt lik for de ulike eksponeringene.** Figuren viser kvantifisering av westernblottet fremstilt grafisk. Resultatet er vist som båndstyrken til  $\beta$ -tubulin III etter at bakgrunn er trukket fra, og som forholdet mellom båndstyrken til  $\beta$ -tubulin III og lamin A/C (intern standard). Båndstyrken er vist i antall piksler. n=2 for  $\beta$ -tubulin III, n=1-2 for lamin A/C.

**Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.24:**

Tallmateriale for gjennomsnitt-bakgrunn for lamin finnes i figur 3.27.

Eksposering	Gjennomsnitt - bakgrunn	Spredning	Antall forsøk
NGF 50 ng/ml	4002909	629444	2
Kontroll	3949430	446566	2
Escitalopram 500 nM	3753296	462751	2
Venlafaksin 2 $\mu$ M	4198915	551147	2
Venlafaksin 10 $\mu$ M	4315895	1085109	2

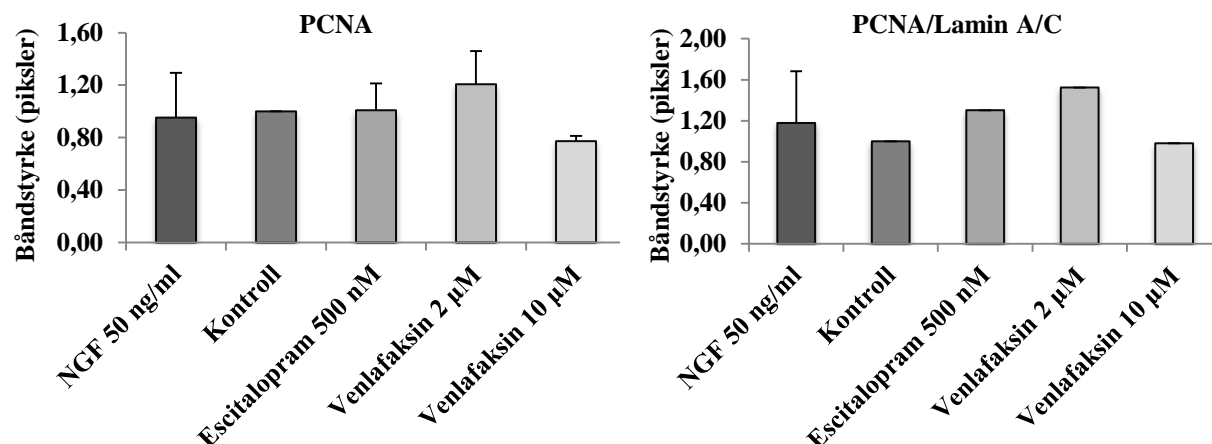


**Figur 3.25** Mengden  $\beta$ -spektrin II er høyest i NGF-eksponerte PC12-celler. Figuren viser kvantifisering av westernblottet fremstilt grafisk. Resultatet er vist som båndstyrken til  $\beta$ -spektrin II etter at bakgrunn er trukket fra, og som forholdet mellom båndstyrken til  $\beta$ -spektrin II og lamin A/C (intern standard). Båndstyrken er målt i antall pikslar.  $n=2$  for  $\beta$ -spektrin II,  $n=1-2$  for lamin A/C.

**Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.25:**

Tallmateriale for gjennomsnitt-bakgrunn for lamin finnes i figur 3.27.

Eksposering	Gjennomsnitt - bakgrunn	Spredning	Antall forsøk
NGF 50 ng/ml	62483	29898	2
Kontroll	61921	38872	2
Escitalopram 500 nM	46775	21664	2
Venlafaksin 2 $\mu$ M	39947	5609	2
Venlafaksin 10 $\mu$ M	12969	4129	2

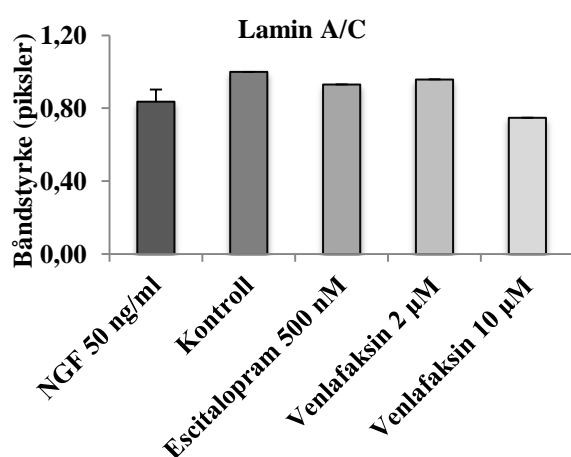


**Figur 3.26** NGF 50 ng/ml, escitalopram 500 nM og venlafaksin 2 µM ser ut til å øke mengden PCNA i PC12-celler. Figuren viser kvantifisering av westernblottet fremstilt grafisk. Resultatet er vist som båndstyrken til PCNA etter at bakgrunn er trukket fra, og som forholdet mellom båndstyrken til PCNA og lamin A/C (intern standard). Båndstyrken er målt i antall pikslar. n=2 for PCNA, n=1-2 for lamin A/C.

#### Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.26:

Tallmateriale for gjennomsnitt-bakgrunn for lamin finnes i figur 3.27.

Eksposering	Gjennomsnitt - bakgrunn	Spredning	Antall forsøk
NGF 50 ng/ml	1314014	456944	2
Kontroll	1385894	18323	2
Escitalopram 500 nM	1394074	264425	2
Venlafaksin 2 µM	1668074	329387	2
Venlafaksin 10 µM	1071941	68795	2



**Figur 3.27** NGF, escitalopram og venlafaksin ser ikke ut til å påvirke nivået av lamin A/C. Figuren viser kvantifiseringen av westernblottet fremstilt grafisk. Resultatet er vist som båndstyrken til lamin etter at bakgrunn er trukket fra. Båndstyrken er målt i antall pikslar. n=1-2.

**Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.27:**

<b>Eksponering</b>	<b>Gjennomsnitt - bakgrunn</b>	<b>Spredning</b>	<b>Antall forsøk</b>
NGF 50 ng/ml	1459009	763473	2
Kontroll	1828017	1057471	2
Escitalopram 500 nM	2685334	-	1
Venlafaksin 2 $\mu$ M	2764445	-	1
Venlafaksin 10 $\mu$ M	2158294	-	1

### 3.6.2 Deteksjon og kvantifisering av utviklingsmarkører i korncellekulturer

Videre ble det undersøkt om antistoffer mot lamin A/C,  $\beta$ -tubulin III og PCNA også kunne brukes i kornceller fra kylling. Antistoff mot lamin A/C fungerte ikke godt i kylling, og det ble ingen bånd. Det er derfor heller ingen intern standard å relatere disse resultatene til, noe som gjør at resultatene må tolkes med forsiktighet. B-tubulin III og PCNA ga bånd i prøvene fra korncellekulturer fra kylling og resultatet er vist i figur 3.28. B-tubulin III ser ut til å være økt etter eksponering for escitalopram 1  $\mu$ M, mens venlafaksin 10  $\mu$ M ser ut til å gi redusert mengde  $\beta$ -tubulin III (figur 3.29). PCNA ser ut til å være redusert for celler eksponert for escitalopram 500 nM og økt for celler eksponert for escitalopram 1  $\mu$ M.

**B-tubulin III**  
55 kDa

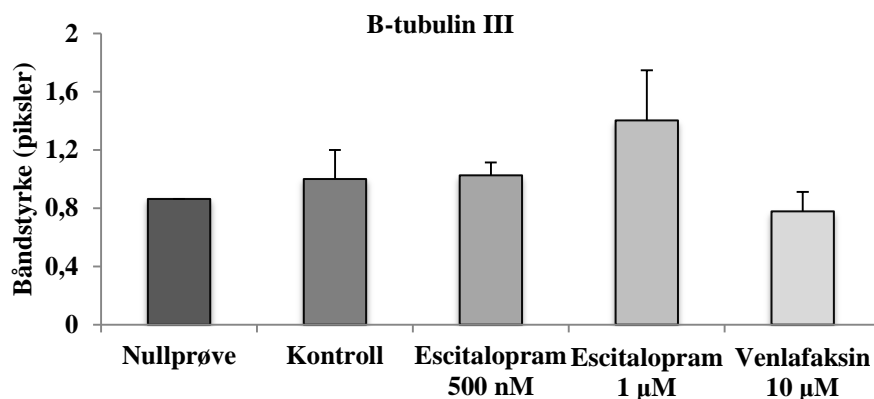


**PCNA**  
36 kDa



**Eksponering:** Ubh<sub>0</sub> Ubh Ubh Ubh E500 E500 E500 E1 E1 E1 V10 V10 V10

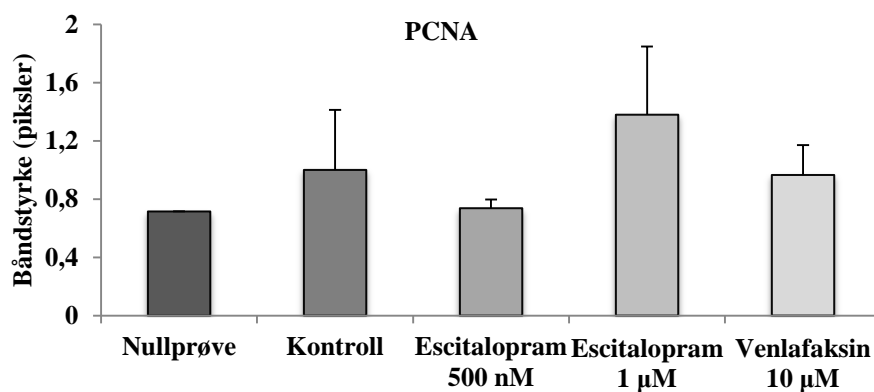
**Figur 3.28 Westernblott av høstede korncellekulturer.** Korncellekulturene ble eksponert for escitalopram 500 nM, escitalopram 1  $\mu$ M og venlafaksin 10  $\mu$ M 2 timer etter utplating. Prøvene er høstet 24 timer etter eksponeringsstart. Blottene er fra samme membran. Ubh<sub>0</sub> = ubehandlet nullprøve, ubh = ubehandlet, E500 = escitalopram 500 nM. E1 = escitalopram 1  $\mu$ M, V10 = venlafaksin 10  $\mu$ M.



**Figur 3.29 Escitalopram 1 µM ser ut til å gi økt mengde β-tubulin III.** Figuren viser westernblottet fremstilt grafisk. Resultatet for β-tubulin III er vist som båndstyrken til β-tubulin III etter at bakgrunn er trukket ifra. Båndstyrken er målt i antall pikslar. n=1-3.

Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.29:

Eksposering	Gjennomsnitt - bakgrunn	SE	Antall forsøk
Nullprøve	230524	-	1
Kontroll	322492	133304,65	3
Escitalopram 500 nM	237704	19728,94	3
Escitalopram 1 µM	444746	151128,31	3
Venlafaksin 10 µM	311283	66565,78	3



**Figur 3.30 Escitalopram 500 nM ser ut til å redusere mengden PCNA, mens escitalopram 1 µM ser ut til å gi økt mengde PCNA.** Figuren viser westernblottet fremstilt grafisk. Resultatet for PCNA er vist som båndstyrken til PCNA etter at bakgrunn er trukket ifra. Båndstyrken er målt i antall pikslar. n=1-3.

**Tallmateriale som ligger til grunn for figur 3.30:**

<b>Eksposering</b>	<b>Gjennomsnitt - bakgrunn</b>	<b>SE</b>	<b>Antall forsøk</b>
Nullprøve	667984,00	-	1
Kontroll	773905,00	154697,89	3
Escitalopram 500 nM	793476,67	68353,16	3
Escitalopram 1 µM	1085332,67	265717,76	3
Venlafaksin 10 µM	602028,67	102948,03	3

## 4 Diskusjon

### 4.1 Diskusjon av metoder

#### 4.1.1 Valg av cellemodeller

For å studere legemidlers effekt på nevrutvekst har en PC12-cellelinje blitt benyttet. Denne *in vitro*-modellen er omfattende karakterisert og brukes i forbindelse med utviklingstoksikologiske undersøkelser i nervesystemet (gjennomgått i: [62]). Cellelinjer er vanligvis klonet og stammer fra én enkelt forløpercelle. Fordelen med cellelinjer er at de gir en homogen populasjon av celler og mer reproduerbare resultater. Differensieringen kan også kontrolleres mer presist [53]. PC12-cellene er kreftceller, og dermed ikke normale nevroner [54]. Det spesielle med PC12-cellene er at de ved eksponering for NGF differensierer slik at de starter å ligne sympatiske nevroner både morfologisk og funksjonelt. De utvikler ikke distinkte aksoner og dendritter [73], men i respons til NGF stopper de å dele seg, de blir elektrisk eksiterbare og lager synapser [55]. I tillegg syntetiserer, lagrer og frigjør de dopamin, noradrenalin og acetylkolin. PC12-cellene har også  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  og  $\text{Ca}^{2+}$  kanaler, og membranreseptorer [74]. PC12-cellene uttrykker både TrkA og p75NTR [70], som er henholdsvis høy- og lavaffinitetsbindingsreseptor for NGF. NGF-differensierende PC12-celler kan derfor brukes som modellsystem for nevroner under utvikling. PC12-celler ble benyttet i denne masteroppgaven fordi de er enkle å jobbe med, de gir reproduerbare resultater og de er godt egnet til studier på nevrutvekst. I tillegg er de også tidligere brukt til screening [62, 75].

En av de mest lovende *in vitro*-modellene for å studere nevrotoksisitet under utvikling er primærkulturer [52]. Et eksempel kan være korncellekulturer. Det ble derfor brukt korncellekulturer fra lillehjerne hos rotte og kylling i tillegg til PC12-celler. Bruk av flere modeller er viktig for med større sikkerhet å kunne anslå behandlingens effekt på nevronal utvikling. Det kan gi innblikk i om resultatene kun finnes i en bestemt modell eller om de er et mer generelt fenomen. Korncellers nevrogenese foregår hovedsakelig postnatalt, noe som gjør at de utvikler seg etter utplating til kultur [59]. Det åpner for å studere blant annet celleproliferasjon, migrering og morfologisk/funksjonell differensiering, samtidig som både nevronale celler og gliaceller kan opprettholde sin funksjonelle kapasitet (gjennomgått i:



[52]). Bruk av korncellekulturer fra lillehjernebarken hos rotter er en modell som er velstudert og mye brukt, også til screening [62]. Modellen har sine ulemper i at den er kostbar, krever depolariserende kulturforhold og dyrestall [60]. Kornceller krever depolariserende forhold, altså et forhøyet  $K^+$ -nivå, for å overleve. Det depolariserende miljøet etterligner den normal nevronale aktiviteten som vanligvis er til stede i lillehjernen [76]. Korncellekulturer fra lillehjernen hos kylling krever ikke nødvendigvis depolariserende kulturforhold, selv om det er brukt i denne oppgaven. Det er heller ikke krav om dyrestall, og kornceller fra kylling modnes raskere enn kornceller fra rotter. Kylling er derfor et godt alternativ til rotter. Bruk av kornceller fra lillehjernen til kylling representerer en nyere modell, og man har derfor mindre kunnskap om den, både når det gjelder hvilke antistoffer som fungerer og hvordan de differensierer i kultur [60].

#### 4.1.2 Morfometrisk analyse av nevruttvekst

Nevruttvekst er et av de mest undersøkte endepunktene for å studere utviklingstoksikologi i nervesystemet (gjennomgått i: [62]). Tidligere resultater har vist at dette er et velegnet endepunkt for kjemisk screening av substanser. Nevruttvekst har vist seg å være et mer sensitivt endepunkt enn cellenes levedyktighet. Det gjelder både i cellelinjer og i primærcellekulturer fra lillehjerne [75]. Andre typer tester som er foreslått i forbindelse med screening for toksisitet på nervesystemet er studier av nevronal celleproliferasjon, eksocytose og QSAR-studier. QSAR-studier baserer seg på struktur-aktivitet forhold (gjennomgått i: [77]). Det er gjort studier som indikerer at lav-molekylære forbindelser etterligner effekter av nevrotrofiske faktorer, og at de dermed kan virke beskyttende på nervesystemet og gi induksjon av nevruttvekst [78, 79].

For å få den informasjonen som er nødvendig for å forutsi hvilke toksiske *in vivo*-effekter man får på nervesystemet under utvikling er det sannsynlig at man trenger en kombinasjon av endepunkter og modeller (gjennomgått i: [62]). Det er derfor behov for å finne de mest robuste endepunktene. Et robust morfometrisk endepunkt gir resultater som reflekterer de endringene man ser i nevruttvekst. Valg av morfometriske endepunkt ble gjort med utgangspunkt i en tidligere masteroppgave fra denne forskningsgruppen [63], i tillegg til andre studier [53, 75, 80]. De morfometriske analysene kan utføres manuelt eller ved bruk av automatisert programvare [81]. Det ble i denne oppgaven brukt manuell telling og måling av cellene og nevruttene. Manuell kvantifisering er krevende både i forhold til tid og

nøyaktighet, i tillegg til at subjektive undersøkelser alltid innebærer en viss usikkerhet. For å redusere denne feilkilden ble alle forsøk blindet. Dette ble gjort ved at en medstudent nummererte alle skålene. Det var derfor ikke mulig å vite hva cellene hadde blitt eksponert for da mikroskopi og kvantifisering ble utført.

Et alternativ til manuell måling som kunne vært aktuelt å prøve er semi-automatisk eller full-automatisk måling ved hjelp av avansert bildeprogram. Fordelen med automatiserte målinger er at de er tidsbesparende og i enkelte tilfeller har de en sensitivitet som er god nok til å detektere selv en moderat økning i nevruttvekst [81]. Likevel kan flere av disse programmene være vanskelige å bruke, og det har blant annet vært problemer med å skille nevruttene fra bakgrunnen [53]. Fluorescens er mye brukt i disse automatiserte målingene. Fluorescerende forbindelser kan blekne som følge av lyseksponering [82]. Det kan gjøre deteksjonen og målingene utfordrende. Når det gjelder bruk av *in vitro*-metoder for screening er det et kritisk behov for å automatisere disse studiene og målingene slik at man oppnår ”medium- eller high throughput”. Det innebærer at man kan screene tusenvis av kjemikalier per uke (gjennomgått i: [62]).

Kvantifisering av nevruttene i korncellekulturene fra lillehjerne hos kylling ble ikke gjennomført. Det viste seg å være vanskelig å skille nevrone celler fra andre celler i en slik ikke-homogen kultur. I dette tilfellet hadde det vært mulig å bruke et monoklonalt antistoff mot cellekjerner, for eksempel NeuN, som er et protein spesifikt for differensierende nevrone [83]. Et annet alternativ hadde vært å teste en automatisert målemetode på disse cellene. NeuriteTracer kunne vært aktuelt. NeuriteTracer er en plugin til ImageJ, et gratis program for bilderedigering. Cellene farges med kjernefargen Hoechst og anti- $\beta$ -tubulin III. Programmet prosesserer bildene parvis slik at man får et bilde hvor cellekroppen er tatt bort og bare nevruttene er igjen. Total nevruttlengde blir deretter målt [81].

### 4.1.3 Valg av eksponering

Antidepressiva er en legemiddelgruppe som brukes av mange gravide, og det er derfor viktig at man får mer kunnskap om effekter på det utviklende nervesystemet gjennom sikkerhetsfarmakologisk screening. SSRI og SNRI har litt ulike virkningsmekanismer, og valget falt derfor på et SSRI og et SNRI, escitalopram og venlafaksin. Det er verdt å merke seg at det er en glidende overgang i selektivitet for hemming av noradrenalinreopptaket.

Escitalopram er en av de mest selektive hemmerne av serotonnreopptaket. Paroksetin og sertralin er begge SSRI og har en høy affinitet til serotonintransportøren, i tillegg til en moderat affinitet for transportører av noradrenalin og dopamin. Venlafaksin er klassifisert som et SNRI og har en hemmende effekt på reopptaket til noradrenalin i tillegg til serotonin. Selektiviteten relativt sett er høyere for serotoninreopptaket [41]. Konsentrasjonsområdet ble valgt med utgangspunkt i Fürst sine referanseområder for terapeutisk område [84, 85], i tillegg til informasjon om at begge legemidlene er oppkonsentrerte i hjernen [86-88]. Valg av eksponeringstidspunkt for PC12-celler er basert på en tidligere masteroppgave [63]. Korncellekulturer i kylling ble eksponert 2 timer etter utplating, mens korncellene fra rotte ble eksponert rett etter utplating. Dette er basert på når cellene fester seg til skålen.

#### 4.1.4 Immunfarging

Immunfarging ble utført for å undersøke om denne metoden var aktuell for å se på nevruttvekst. Bruk av antistoff viste en jevn fordeling av cytoskjelettproteinet  $\beta$ -tubulin III og det vekst-assosierte proteinet GAP-43 i cellene. For  $\beta$ -tubulin III er ikke dette et overraskende funn, i og med at dette proteinet finnes i hele cellen. Antistoff til  $\beta$ -tubulin III er tidligere brukt til immunfarging, men da ble de kvantitative analysene utført ved hjelp av et automatisert dataprogram. Programmet utførte noe som de kalte "skeletonisering" slik at det ble mulig å trekke fra fargen i cellekroppen slik at det kun var fargen til utløperne som ble detektert [81].

Når det gjelder GAP-43 så forventes det en mer spesifikk lokalisering i nevrittene. GAP-43 er foreslått som en mulig statusindikator for PC12-celledifferensiering [69]. Det var grunnen til at immunfarging ble utført i PC12-celler. GAP-43 er tidligere brukt til visualisering av aksoner [89] og er vist å øke proporsjonalt med nevruttvekst i mus [90]. Det er mulig at immunfarging med anti-GAP-43 av den grunn hadde fungert bedre i korncellekulturene.

Det var et problem at fluorescensen bleknet raskt slik at det ble vanskelig å ta gode bilder. Dette er et vanlig problem for metoder med immunofluorescens [91]. Det finnes reagenser som kan brukes for å beskytte det fluorescerende stoffet fra å blekne, blant annet ProLong® Gold Antifade Reagent fra Invitrogen Life Technologies. Når det gjelder immunfarging som metode for å detektere og kvantifisere nevruttvekst har den ingen klare fordeler sammenlignet med vanlig lysmikroskopi. Dette gjelder vel og merke dersom man ikke har

tilgjengelig programvare som kan automatisere metoden. Utløperne så ut til å falle av under fikseringen, og de utløperne som ble sett før fikseringen så ut til å være delvis forsvunnet da fluorescensmikroskopi ble utført. Forskningsgruppen har lang erfaring med immunfarging, og det har vist seg at det er stor variasjon i hvor godt cellene sitter fast på MatTek-skåler fra ulike produksjonsparti. Produksjonspartiet med MatTek-skåler kan derfor ha vært en mulig årsak til at cellene falt av under fikseringen. Forsøkene som ble gjort med immunfarging bør gjentas og optimaliseres. Til tross for dette fremstår immunfarging som et interessant alternativ til lysmikroskopi dersom man finner antistoffer som er utløperspesifikke og man får immunfargingen til å vare lenger.

#### 4.1.5 Westernblotting

Westernblotting er en semi-kvantitativ metode for måling av proteiner. Det var ønskelig å undersøke muligheten for å bruke denne metoden til å detektere endringer i nevruttvekst. Lamin A/C ble brukt som internstandard for å verifisere lik mengde protein i prøvene. Lamin er et protein i intermediat filament-familien og har mange viktige funksjoner i kjernen [92]. Deteksjon av lamin fungerte godt i PC12-celleprøvene, men ikke i kylling. I stedet for lamin hadde det vært mulig å bruke  $\alpha$ -tubulin eller  $\beta$ -aktin, som er de mest brukte internstandardene i westernblotting [93]. Begge disse proteinene er bestanddeler i cellens cytoskjelett og er viktig for nevruttvekst [94]. I korncellekulturene er det også astrocytter til stede. Astrocytter vil kunne bidra til at mengden lamin,  $\alpha$ -tubulin eller  $\beta$ -aktin øker. Det kan skje som følge av at astrocyttene øker i antall. Dette kan videre føre til en underestimering av nivået av andre proteiner.

I denne oppgaven ble  $\beta$ -tubulin III,  $\beta$ -spektrin II og PCNA detektert og kvantifisert.  $\beta$ -tubulin III er et cytoskjelettprotein. Det var ikke mulig å se en forskjell i proteinmengde for PC12-celler behandlet med NGF og de som var ubehandlet.  $\beta$ -tubulin III ser av den grunn ikke ut til å være egnet for å studere nevruttvekst. Den mengden  $\beta$ -tubulin III som nevruttene bidrar med forsvinner helt i forhold til bidraget fra cellekroppen. PCNA er et kjerneprotein som uttrykkes når cellene er i cellesyklus, S-fase [95]. Kvantifisering av PCNA etter eksponering vil kunne gi informasjon om cellene har startet differensieringen eller om de fortsatt prolifererer. Ved redusert mengde PCNA kan det antas at cellene har gått ut av cellesyklus og startet differensieringen. For nevroner kan man da forvente økte nevruttlengder. Proteinene NeuN og Pax 6 har tidligere vært brukt for å studere nevronal utvikling induert av deksametason [63]. Pax 6 uttrykkes ikke i PC12-celler, så det er i korncellekulturene det er

aktuelt å måle dette proteinet. Bruk av disse proteinene som markører for differensiering hadde vært spennende også for antidepressiva.

Kvantifiseringen av blottene ble utført ved hjelp av bildeprogrammet ImageJ, med gjennomsnittlig antall piksler som mål på båndstyrken. Dette samsvarte godt med hva blottene viste visuelt. I utgangspunktet bør det utføres et testforsøk for å sikre lineær sammenheng mellom proteinmengden og antall piksler. Det ble ikke gjort fordi det ble tatt utgangspunkt i en tidligere masteroppgave hvor dette ble gjort [63]. For deteksjon av små proteiner, som for eksempel BDNF og GAP-43, kan ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) være et godt alternativ. Denne metoden baserer seg på samme prinsipp som western, binding av antistoff til protein. Metoden er enkel å bruke, men er dyrere enn westernblotting, og var ikke etablert i forskningsgruppen.

## 4.2 Diskusjon av biologiske funn

### 4.2.1 Effekt av NGF og BDNF på nevruttvekst

Eksponering for NGF ga en signifikant økning i nevruttlengde per celle, nevruttlengde (gjennomsnittlig nevruttlengde behandlet/gjennomsnittlig nevruttlengde ubehandlet) og andel lange nevrutter i PC12-celler (3.1). PC12-celler uttrykker TrkA og p75NTR som er reseptorer for NGF [70], i tillegg til at cellene skal respondere på NGF [54]. Den observerte effekten var derfor forventet, til tross for at p75NTR ser ut til å hemme TrkA-mediert vekst av nevrutter [12]. BDNF ga også en signifikant økning i nevruttlengde, i tillegg til en ikke-signifikant økning i andel lange nevrutter (3.2). Det er usikkert om PC12-celler har reseptor for TrkB da noen studier tyder på at de har TrkB [96, 97], mens andre studier tyder på det motsatte [55, 98]. Det er også vist at TrkB kreves for å mediere nevruttvekst av BDNF [71]. Den økte nevruttlengden og den økte andelen lange nevrutter som ble observert etter eksponering for BDNF må derfor antas å komme fra TrkB-signalling. Det må videre bety at TrkB uttrykkes i PC12-celler. Det er mulig å eksponere PC12-celler for en TrkB-hemmer med og uten BDNF, for deretter å utføre en morfometrisk analyse av nevruttveksten. Det vil kunne gi informasjon om involveringen av TrkB i BDNF-indusert nevruttvekst.

Antidepressiva øker mengden serotonin, som igjen er vist å inducere økt uttrykk av vekstfaktorer, for eksempel BDNF [45]. BDNF er viktig for nevruttvekst, men også for

funksjon av gliaceller og for interaksjoner mellom nevroner og glia [14]. Ved alvorlig depresjon er det funksjonelle endringer i synapsene. Antidepressiva er vist å kunne påvirke synaptogenesen og dermed omforme de nevronale nettverkene. Dersom antidepressiva endrer de nevronale nettverkene også når det ikke er funksjonelle endringer i synapsene som følge av depresjon vil dette være interessant i forbindelse med bruk under graviditet. Det er fortsatt uklart hvilken virkningsmekanisme som ligger bak denne egenskapen, men det er indikasjoner på at de gjør det gjennom aktivering av gliaceller/astrocytter [99, 100]. Det er ikke utenkelig at den økningen som sees i BDNF ved behandling med antidepressiva spiller en rolle i denne effekten.

#### **4.2.2 Robuste endepunkt for nevruttvekst**

Resultatene etter eksponering for NGF ble brukt for å vurdere hvilke endepunkt som var mest robuste. Andel lange nevrutter og nevruttlengde (nevruttlengde behandling/nevruttlengde ubehandlet) ga den kvantitativt største økningen i nevruttvekst sammenlignet med ubehandlet kontroll. Disse endepunktene ble derfor brukt i de videre forsøkene. Det er verdt å nevne at man ved bruk av gjennomsnittverdier mister en del informasjon. I andre studier har total lengde av nevrutter vært brukt som et mål på nevruttvekst [53, 75, 80]. Dette endepunktet har sine fordeler, og det er mulig dette endepunktet skulle vært inkludert. Likevel er det slik at det mest sannsynlig trengs flere endepunkt for å få nødvendig informasjon om toksiske effekter [62]. Endepunktene som er brukt i denne oppgaven, nevruttlengde og andel lange nevrutter, sier begge noe om nevruttvekst, men de representerer ulike endringer. Dersom andel lange nevrutter øker og nevruttlengden forblir uendret, vil dette muligens bety at de lange utløperne har blitt kortere og at det har blitt flere mellomlange utløpere. Dersom nevruttlengden øker, mens andelen lange nevrutter er uendret, kan dette bety at de lange utløperne har blitt lengre, men ikke flere. På mange måter vil derfor disse to endepunktene komplementere hverandre og gi mer informasjon når de brukes sammen.

### 4.2.3 Effekter av escitalopram og venlafaksin på nevruttvekst

Ut fra det man vet om bruk av antidepressiva hos gravide ser det ikke ut til at escitalopram gir økt risiko for alvorlige misdannelser [101], men det er fortsatt uenighet om i hvilken grad antidepressiva er fosterskadelige eller ikke (gjennomgått i: [38]). Resultatene fra min studie viser at escitalopram hadde en tendens til å redusere nevruttlengden og øke andelen lange nevrutter (3.2.4) i PC12-celler. Det samme ble sett i celler eksponert for NGF (3.2.6), noe som tyder på at escitalopram ikke har noen innvirkning på nevruttvekst i NGF-differensierende PC12-celler. Dette tyder videre på at escitalopram ikke påvirker nevroner under utvikling. Det at escitalopram ser ut til å redusere nevruttlengden og samtidig øke andelen lange nevrutter tyder på at det har blitt flere mellomlange nevrutter. Resultatene har en del spredning og det ble derfor forsøk å normalisere til ubehandlet uten at det utgjorde noen forskjell.

Escitalopram 1  $\mu\text{M}$  ga en ikke-signifikant økning i andel lange nevrutter (figur 3.11), og under westernblotting av høstede korncellekulturer ble det funnet en ikke-signifikant økning i  $\beta$ -tubulin III (figur 3.29). Til sammen kan det tyde på at det kan være en økning i nevruttvekst etter eksponering av escitalopram ved denne konsentrasjonen. PCNA var derimot økt (figur 3.30), noe som tyder på at cellene fortsatt er i cellesyklus. Dette samsvarer ikke med økt nevruttvekst. Samlet kan resultatene tyde på at escitalopram får flere nevrutter til å vokse seg moderat lange, og at denne påvirkningen skjer i en tidlig fase av nevruttveksten.

Det er ikke like mange studier på venlafaksin under graviditet som på escitalopram, men ut fra de tilgjengelige studiene som er funnet er det heller ikke her holdepunkter for at det er risiko for alvorlige misdannelser [34]. Venlafaksin hadde en tendens til å øke både nevruttlengden og andel lange nevrutter i PC12-celler (3.2.5). I NGF-differensierende celler hadde venlafaksin en tendens til å redusere NGF-indusert nevruttvekst. Andelen lange nevrutter så ut til å øke etter eksponering for enkelte konsentrasjoner venlafaksin og minke for andre (3.2.7). Venlafaksin ser derfor ut til å ha en innvirkning på nevruttvekst induert av NGF. Det tyder videre på at venlafaksin kan ha en effekt på nevroner under utvikling.

Venlafaksin 10  $\mu\text{M}$  hadde en tendens til å øke andel lange nevrutter i forhold til kontroll i PC12-celler. Under westernblotting av høstede PC12-celler var det økt mengde  $\beta$ -tubulin III og redusert PCNA. Til sammen tyder disse resultatene på en økt nevruttvekst. I korncellekulturene derimot var  $\beta$ -tubulin III og PCNA lik kontrollen. Eksponering etter

venlafaksin 10  $\mu\text{M}$  ble også studert morfologisk i korncellekulturene, og i korncellekulturene fra rotte kan man klart se at det er mange og lange utløpere, men uten kvantifisering så er det vanskelig å se om det er noen forskjeller i lengder mellom celler eksponert for venlafaksin og kontrollen. Samlet kan resultatene tyde på at venlafaksin øker lengden på nevrundene, og at denne effekten også kan ses i nevroner under utvikling.

Det er ikke funnet publiserte studier på escitalopram eller venlafaksin når det gjelder effekt på nevrundtvekst, men det er gjort studier på andre SSRI. Fluvoksamin, sertralin og paroksetin er blant de som er undersøkt [102, 103]. Fluvoksamin potensierte effekten av NGF i PC12-celler [103]. Paroksetin, som er vist å kunne gi økt risiko for hjertemisdannelser hos foster [39], og sertralin potensierte ikke effekten av NGF [102]. Det er uklart om en endring i nevrundlengde er positiv eller negativ, da det er begrenset med dokumentasjon på dette feltet. Den generelle holdningen på dette området er likevel konservativ, og det innebærer at alt som avviker fra normaltstanden er uønsket.

Både escitalopram og venlafaksin hadde en tendens til å endre nevrundtveksten i PC12-celler. Om denne effekten skyldes serotonin, noradrenalin eller noe helt annet er derfor interessant å finne ut av. Det hadde vært mulig å eksponere PC12-celler for serotonin og noradrenalin for videre å gjøre en morfometrisk analyse av nevrundtveksten. Både serotonin og noradrenalin har en effekt i behandlingen av depresjon, og det er derfor ikke utenkelig at disse to systemene er koblet sammen. Det er vist at citalopram, et SSRI, modulerer sentral noradrenerg nevrotransmisjon gjennom å aktivere 5-HT<sub>3</sub>-reseptoren i locus coeruleus og prefrontal cortex [104]. 5-HT<sub>3</sub>-reseptoren og påfølgende åpning av L-type Ca<sup>2+</sup>-kanaler er sett å være involvert i serotonin sin effekt på NGF-indusert nevrundtvekst [50], det til tross for at NGF-indusert nevrundtvekst ser ut til å være uavhengig av L-type Ca<sup>2+</sup>-kanaler [105]. 5-HT<sub>3</sub>-reseptoren ser derfor ut til å være involvert i effekten av SSRI-er ved depresjon, og i tillegg ha en rolle i nevrundtvekst, selv om mekanismen bak dette er ufullstendig klarlagt. Det ble ikke funnet studier som viser at PC12-celler uttrykker 5-HT<sub>3</sub>-reseptoren, men det ble funnet en artikkel hvor det ble vist at en 5-HT<sub>3</sub>-antagonist blokkerte for kalsiuminfluks induert av serotonin [106]. Det hadde vært interessant å måle uttrykk av 5-HT<sub>3</sub>-reseptoren i PC12-celler. Dersom PC12-cellene uttrykker denne reseptoren hadde bruk av en blokker, med og uten SSRI, gitt ytterligere svar på hvordan denne reseptoren er involvert i nevrundtvekst.



#### 4.2.4 Effekt av BDNF-antistoff på nevruttvekst

PC12-celler ble eksponert for BDNF-antistoff for å få informasjon om BDNF sin rolle i nevruttvekst. BDNF-antistoff hadde en tendens til å redusere andel lange nevritter i PC12-celler eksponert for NGF og BDNF. Antistoffet hadde også en tendens til å redusere nevrittelengden i PC12-celler eksponert for NGF (3.2.2). Det er verdt å merke seg at antistoffet så ut til å gi økt nevrittelengde sammenlignet med kontroll, noe som ikke er forventet. En mulig forklaring på dette kan være at anti-BDNF trigger en feedbackmekanisme som frigjør NGF eller BDNF. Antistoffet er ifølge produsenten spesifikt for BDNF, men forsøkene viser at effekten ser ut til å være større på NGF-indusert nevruttvekst. Det kan tyde på at antistoffet er uspesifikt. BDNF-konsentrasjonen kan også være så høy at antistoffet ikke får bundet opp all BDNF som er til stede. Hvorvidt BDNF kan binde og aktivere TrkB selv med antistoff bundet til seg er også noe å tenke på. Hvorfor effekten av antistoffet synes å ha en god effekt i PC12-celler eksponert for NGF kan kanskje forklares gjennom at differensierende celler starter å uttrykke BDNF. Det er kjent at det foregår "crosstalk" mellom TrkA og p75NTR [107] og det kan derfor tenkes at det samme skjer mellom de andre nevrofinreseptorene.

#### 4.2.5 Caspasers rolle i nevruttvekst

For å undersøke mekanismen bak nevruttveksten nærmere ble PC12-celler eksponert for en caspase-3-hemmer. Caspase-3-hemmeren hadde en tendens til å redusere nevruttveksten i PC12-celler eksponert for NGF, BDNF og venlafaksin. Ut i fra disse resultatene ser det ut til at caspase-3 er involvert i nevruttvekst.

Tilstedeværelsen av caspaser ble også undersøkt med westernblotting og tilsetning av et antistoff mot  $\beta$ -spektrin II. Bakgrunnen for å tilsette dette antistoffet var en studie som viste at NCAM (nevrontalt celle-adhesjonsmolekyl), som finnes på den nevronele overflaten, regulerer aktiviteten av caspase-8 som videre kløyver og aktiverer caspase-3. Det fører til en omorganisering av spektrinnettverket i cytoskjelettet. I samme studie ble det også vist at ved bruk av caspase-8- og caspase-3-hemmere ble NCAM-indusert nevruttvekst blokkert [108]. Ved westernblotting ble det bare et bånd. Det svarer til fullengde av  $\beta$ -spektrin II. Ved tilstedeværelse av caspaser skulle det også blitt et bånd for det kløyvde produktet. Dette båndet var ikke til stede, noe som indikerer at caspaser ikke er involvert. Westernblottingen var pilotforsøk, så flere forsøk trengs for å bekrefte eller avkrefte dette. Involveringen av

NCAM og spektrinnettverket i nevruttvekst støttes av studier som viser at NCAM har en viktig rolle i å fremme aksonal vekst [109] og at nevruttvekst krever omorganisering av cytoskjelettet [110]. Det er også sett at NCAM regulerer aktincytoskjelettet gjennom forbindelser med GAP-43 [111].

#### **4.2.6 Andre mulige mekanismer bak nevruttvekst og forslag til ytterligere studier**

I en studie gjort i TrkB-transfektete PC12-celler ble det sett nærmere på mekanismene bak nevruttvekst. PC12-celler ble eksponert for BDNF og morfologien til cellene ble deretter undersøkt. Det ble vist at Dock3 danner et kompleks med Elmo og RhoG når BDNF binder TrkB. Dette fører til at Rac1, et protein i RhoGTPase-familien, aktiveres og nevruttvekst fremmes [71]. Dette bekrefter at Rho GTPaser spiller viktige roller i reguleringen av cytoskjelettet og nevruttvekst. Når det gjelder antidepressiva og effekt på Rho GTPaser er det ikke gjort mange studier. Det er gjort enkelte studier i andre celletyper som indikerer at både serotonin og SSRI kan påvirke signalveier gjennom Rho GTPaser [112-114].

I en tidligere studie potensierte fluvoksamin NGF-indusert nevruttvekst i PC12-celler. Denne effekten ble blokkert av sigma-1-reseptorantagonister [102]. Sigma-1-reseptorer er proteiner på endoplasmatisk retikulum som finnes i høye konsentrasjoner på ”growth cones”. Affiniteten til disse reseptorene ble undersøkt for flere SSRI-er. Resultatet viste at fluvoksamin hadde høyest affinitet av de undersøkte. Her var også citalopram undersøkt. Citalopram skiller seg fra escitalopram ved at det er et racemat, altså blanding av S- og R-form. Det vil forventes lignende effekter av escitalopram og citalopram. Citalopram hadde lavere affinitet til sigma-1-reseptoren enn fluvoksamin, men høyere enn paroksetin som er vist å kunne gi økt risiko for hjertemisdannelser hos foster [39]. Det ble ikke funnet en korrelasjon mellom affiniteten til sigma-1 og styrken på hemming av serotoninreopptaket [115].

I en nylig publisert studie er det funnet en assosiasjon mellom høyt uttrykk av sigma-1-reseptoren i hjertevev og SSRI-ers hjertebeskyttende effekt ved hypertrofi. Sigma-1-reseptoren ble funnet å være et direkte target for SSRI. Foreslått mekanisme bak denne beskyttende effekten er oppregulering av sigma-1-reseptoren, som er nedregulert ved hypertrofi og hjertesvikt [116]. Selv om det i denne studien var snakk om en beskyttende

effekt, kan oppregulering av sigma-1-reseptoren være en mulig mekanisme for påvirkningene man ser på hjerte hos foster ved bruk av enkelte SSRI-er. Sigma-1-reseptoren er ikke bare forbundet med hjertet. Reseptoren er også assosiert med nevrologiske sykdommer og flere funksjoner i hjernen. Den er vist å påvirke alle trinn i nevronal transmisjon gjennom flere ulike signalveier. Aktivering av TrkB er en av disse signalveiene [117]. Måling av reseptoruttrykk ved ulike tidspunkt i den nevronale utviklingen, med og uten et SSRI, kan være en mulig strategi for å undersøke dette nærmere.

Ved screening av legemidler må man inkludere mange targets for å få fanget opp en mulig påvirkning på utviklingen av nervesystemet. Det er kjent at SSRI-er påvirker BDNF, men det kan være andre effekter som også påvirker utviklingen i like stor grad. Disse mekanismene trenger ikke å være åpenbare ut fra virkningsmekanismen. Koblingen mellom SSRI og sigma-1 er interessant. I forbindelse med vurdering av antidepressiva i et sikkerhetsfarmakologisk perspektiv vil det være aktuelt å studere denne koblingen nærmere i framtiden.

## 5 Konklusjon

- Endepunktene nevrittelengde (gjennomsnittlig nevrittelengde behandlet normalisert i forhold til gjennomsnittlig nevrittelengde ubehandlet) og andel lange nevritter er velegnede endepunkt for nevruttvekst.
- NGF og BDNF ga en signifikant økning i nevruttvekst i PC12-celler.
- Escitalopram ga en tendens til reduksjon i nevrittelengde og en tendens til økning i andel lange nevritter i PC12-celler. Det samme ble sett i NGF-differensierende PC12-celler.
- Venlafaksin ga en tendens til økning i nevruttvekst i PC12-celler. Venlafaksin så ut til å påvirke NGF-indusert nevruttvekst. Dette kan indikere en effekt på nevroner under utvikling.
- Caspase-3 kan være involvert i nevruttvekst induert av NGF, BDNF og venlafaksin.
- Bruk av antistoff mot BDNF ga indikasjoner på at BDNF kan være involvert i mekanismen bak nevruttvekst induert av NGF og venlafaksin.
- Korncellekulturer fra lillehjerne kan være en egnet metode for studere nevruttvekst fordi den postnatale modningen muliggjør studier på proliferasjon, differensiering og migrering av funksjonelle nevroner. Metoden trenger optimalisering for å kunne brukes til studier på nevruttvekst.
- Westernblotting og immunfarging er interessante alternativer til mikroskopi fordi de kan utfylle de morfometriske ved å gi en annen type resultater i studier på nevruttvekst.
- NGF-differensierende PC12-celler og korncellekulturer fra lillehjerne kan være modeller for nevroner under utvikling. Resultatene tydet på at venlafaksin hadde en effekt på nevroner under utvikling. Slike modeller kan brukes i sikkerhetsfarmakologiske studier for å detektere eventuelle fosterskadelige effekter.

# Litteraturliste

1. ICH-S7A. 2000 20.02.13]; Available from:  
[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Safety/S7A/Step4/S7A\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S7A/Step4/S7A_Guideline.pdf).
2. Pugsley, M.K., S. Authier, and M.J. Curtis, *Principles of safety pharmacology*. Br J Pharmacol, 2008. **154**(7): p. 1382-99.
3. Valentin, J.P. and T. Hammond, *Safety and secondary pharmacology: successes, threats, challenges and opportunities*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2008. **58**(2): p. 77-87.
4. Wakefield, I.D., et al., *The application of in vitro methods to safety pharmacology*. Fundam Clin Pharmacol, 2002. **16**(3): p. 209-18.
5. Harry, G.J. and E. Tiffany-Castiglioni, *Evaluation of neurotoxic potential by use of in vitro systems*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2005. **1**(4): p. 701-13.
6. Ramakers, G.J., *Rho proteins, mental retardation and the cellular basis of cognition*. Trends Neurosci, 2002. **25**(4): p. 191-9.
7. Vermeulen, K., D.R. Van Bockstaele, and Z.N. Berneman, *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer*. Cell Prolif, 2003. **36**(3): p. 131-49.
8. *apoptose*. 2013 28.02.2013 08.05.13]; Available from:  
[http://snl.no/.sml\\_artikkel/apoptose](http://snl.no/.sml_artikkel/apoptose).
9. Brady, S., Alberts, Price, *Basic Neurochemistry - Principles of molecular, cellular and medical neurobiology*. Eight ed. 2012.

10. *Cytostatikaboken, medikamentell kreftbehandling.*, in *Generell del*, G.L. Olav Dahl, Ingebjørg Baksaas, Stein Kvaløy, Thoralf Christoffersen, Editor 2009, Farmakologisk institutt, Det medisinske fakultet, Universitetet i Oslo.
11. Alsina, F.C., F. Ledda, and G. Paratcha, *New insights into the control of neurotrophic growth factor receptor signaling: implications for nervous system development and repair*. J Neurochem, 2012. **123**(5): p. 652-61.
12. Kaplan, D.R. and F.D. Miller, *Neurotrophin signal transduction in the nervous system*. Curr Opin Neurobiol, 2000. **10**(3): p. 381-91.
13. Reichardt, L.F., *Neurotrophin-regulated signalling pathways*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2006. **361**(1473): p. 1545-64.
14. Brady, S., Alberts, Price, *Basic Neurochemistry - Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology*. 2012. p. 546-557.
15. Chao, M.V., *Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways*. Nat Rev Neurosci, 2003. **4**(4): p. 299-309.
16. *Nervecelle*. 2013 23.04.13]; Available from: <http://snl.no/nervecelle>.
17. Ascoli, G.A., *Mobilizing the base of neuroscience data: the case of neuronal morphologies*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(4): p. 318-24.
18. da Silva, J.S. and C.G. Dotti, *Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis*. Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(9): p. 694-704.
19. Gonzalez-Billault, C., et al., *Microtubule-associated protein 1B function during normal development, regeneration, and pathological conditions in the nervous system*. J Neurobiol, 2004. **58**(1): p. 48-59.
20. von Bohlen Und Halbach, O., *Dendritic spine abnormalities in mental retardation*. Cell Tissue Res, 2010. **342**(3): p. 317-23.

21. Coleman, M.L. and M.F. Olson, *Rho GTPase signalling pathways in the morphological changes associated with apoptosis*. Cell Death Differ, 2002. **9**(5): p. 493-504.
22. Komuro, H. and E. Yacubova, *Recent advances in cerebellar granule cell migration*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(6): p. 1084-98.
23. Hatten, M.E., *Central nervous system neuronal migration*. Annu Rev Neurosci, 1999. **22**: p. 511-39.
24. Chuong, C.M., K.L. Crossin, and G.M. Edelman, *Sequential expression and differential function of multiple adhesion molecules during the formation of cerebellar cortical layers*. J Cell Biol, 1987. **104**(2): p. 331-42.
25. Komuro, H. and P. Rakic, *Distinct modes of neuronal migration in different domains of developing cerebellar cortex*. J Neurosci, 1998. **18**(4): p. 1478-90.
26. Kramer, D. and L. Minichiello, *Cell culture of primary cerebellar granule cells*. Methods Mol Biol, 2010. **633**: p. 233-9.
27. Apps, R. and M. Garwicz, *Anatomical and physiological foundations of cerebellar information processing*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(4): p. 297-311.
28. Lamkanfi, M., et al., *Caspases in cell survival, proliferation and differentiation*. Cell Death Differ, 2007. **14**(1): p. 44-55.
29. Alenzi, F.Q., M. Lotfy, and R. Wyse, *Swords of cell death: caspase activation and regulation*. Asian Pac J Cancer Prev, 2010. **11**(2): p. 271-80.
30. Hyman, B.T. and J. Yuan, *Apoptotic and non-apoptotic roles of caspases in neuronal physiology and pathophysiology*. Nat Rev Neurosci, 2012. **13**(6): p. 395-406.
31. Oomman, S., et al., *Bergmann glia utilize active caspase-3 for differentiation*. Brain Res, 2006. **1078**(1): p. 19-34.

32. Rohn, T.T., et al., *Caspase activation independent of cell death is required for proper cell dispersal and correct morphology in PC12 cells*. *Exp Cell Res*, 2004. **295**(1): p. 215-25.
33. Rang H.P, D.M.M., Ritter J.M, Flower R.J, *Pharmacology*. 2007: Elsevier.
34. Legemiddelhåndbok, N. *Selektive noradrenalin- og serotoninreopptakshemmere (SNRI)*. 2013 13.03.13]; Available from:  
<http://legemiddelhandboka.no/Legemidler/s%C3%B8ker/+%2Bvenlafaksin/54012>.
35. Jimenez-Solem, E., et al., *Exposure to selective serotonin reuptake inhibitors and the risk of congenital malformations: a nationwide cohort study*. *BMJ Open*, 2012. **2**(3).
36. Grote, N.K., et al., *A meta-analysis of depression during pregnancy and the risk of preterm birth, low birth weight, and intrauterine growth restriction*. *Arch Gen Psychiatry*, 2010. **67**(10): p. 1012-24.
37. Sandman, C.A., et al., *Psychobiological influences of stress and HPA regulation on the human fetus and infant birth outcomes*. *Ann N Y Acad Sci*, 1994. **739**: p. 198-210.
38. RELIS SSRI og graviditet – hva er status ved årsskiftet 2012/-13? 2013.
39. *Public Health Advisory: Paroxetine 12/08/2005*, U.F.a.D. Administration, Editor 2005.
40. Mattson, R.J., et al., *Conformationally restricted homotryptamines. 2. Indole cyclopropylmethylamines as selective serotonin reuptake inhibitors*. *J Med Chem*, 2005. **48**(19): p. 6023-34.



41. Owens, M.J., *Selectivity of antidepressants: from the monoamine hypothesis of depression to the SSRI revolution and beyond*. J Clin Psychiatry, 2004. **65 Suppl 4**: p. 5-10.
42. Koren, G. and H. Nordeng, *Antidepressant use during pregnancy: the benefit-risk ratio*. Am J Obstet Gynecol, 2012. **207**(3): p. 157-63.
43. Wurst, K.E., et al., *First trimester paroxetine use and the prevalence of congenital, specifically cardiac, defects: a meta-analysis of epidemiological studies*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2010. **88**(3): p. 159-70.
44. Brady, S., Alberts, Price, *Basic Neurochemistry - Principles of molecular, cellular and medical neurobiology*. Eight ed. 2012. 300-321.
45. Cowen, D.S., *Serotonin and neuronal growth factors - a convergence of signaling pathways*. J Neurochem, 2007. **101**(5): p. 1161-71.
46. Castren, E. and T. Rantamaki, *The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity*. Dev Neurobiol, 2010. **70**(5): p. 289-97.
47. Daubert, E.A. and B.G. Condron, *Serotonin: a regulator of neuronal morphology and circuitry*. Trends Neurosci, 2010. **33**(9): p. 424-34.
48. Trakhtenberg, E.F. and J.L. Goldberg, *The role of serotonin in axon and dendrite growth*. Int Rev Neurobiol, 2012. **106**: p. 105-26.
49. Solem, M., T. McMahon, and R.O. Messing, *Depolarization-induced neurite outgrowth in PC12 cells requires permissive, low level NGF receptor stimulation and activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase*. J Neurosci, 1995. **15**(9): p. 5966-75.

50. Homma, K., et al., *Serotonin induces the increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> that enhances neurite outgrowth in PC12 cells via activation of 5-HT<sub>3</sub> receptors and voltage-gated calcium channels*. J Neurosci Res, 2006. **84**(2): p. 316-25.
51. Laifenfeld, D., E. Klein, and D. Ben-Shachar, *Norepinephrine alters the expression of genes involved in neuronal sprouting and differentiation: relevance for major depression and antidepressant mechanisms*. J Neurochem, 2002. **83**(5): p. 1054-64.
52. Bal-Price, A.K., et al., *In vitro developmental neurotoxicity (DNT) testing: relevant models and endpoints*. Neurotoxicology, 2010. **31**(5): p. 545-54.
53. Radio, N.M. and W.R. Mundy, *Developmental neurotoxicity testing in vitro: models for assessing chemical effects on neurite outgrowth*. Neurotoxicology, 2008. **29**(3): p. 361-76.
54. Greene, L.A. and A.S. Tischler, *Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(7): p. 2424-8.
55. Fujita, K., P. Lazarovici, and G. Guroff, *Regulation of the differentiation of PC12 pheochromocytoma cells*. Environ Health Perspect, 1989. **80**: p. 127-42.
56. Hatten, M.E. and N. Heintz, *Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum*. Annu Rev Neurosci, 1995. **18**: p. 385-408.
57. Vaudry, D., et al., *Regulators of cerebellar granule cell development act through specific signaling pathways*. Science, 2003. **300**(5625): p. 1532-4.
58. Fukumoto, T., I.P. Kema, and M. Levin, *Serotonin signaling is a very early step in patterning of the left-right axis in chick and frog embryos*. Curr Biol, 2005. **15**(9): p. 794-803.

- 
59. Contestabile, A., *Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro*. *Cerebellum*, 2002. **1**(1): p. 41-55.
60. Jacobs, C.M., et al., *Chicken cerebellar granule neurons rapidly develop excitotoxicity in culture*. *J Neurosci Methods*, 2006. **156**(1-2): p. 129-35.
61. O'Lague, P.H. and S.L. Huttner, *Physiological and morphological studies of rat pheochromocytoma cells (PC12) chemically fused and grown in culture*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1980. **77**(3): p. 1701-5.
62. Bal-Price, A.K., et al., *Advancing the science of developmental neurotoxicity (DNT): testing for better safety evaluation*. *ALTEX*, 2012. **29**(2): p. 202-15.
63. Bekkevold, R.-M.S., *Sikkerhetsfarmakologi og nevronal utvikling: PC12-celler og kyllingkornceller som modeller*, in *Farmasøytisk Institutt 2011*, Universitetet i Oslo.
64. ProtocolOnline. *Immunofluorescence*. 02.04.13]; Available from: <http://www.protocol-online.org/prot/Immunology/Immunofluorescence/>.
65. Dailey, M., et al., *Concepts in imaging and microscopy. Exploring biological structure and function with confocal microscopy*. *Biol Bull*, 1999. **197**(2): p. 115-22.
66. Blancher, C. and R.M. Cormick, *Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide denaturing gel electrophoresis and Western blotting techniques*. *Methods Mol Biol*, 2012. **878**: p. 89-110.
67. Gallagher, S.R., *One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins*. *Curr Protoc Protein Sci*, 2012. **Chapter 10**: p. Unit 10 1 1-44.

68. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
69. Das, K.P., T.M. Freudenrich, and W.R. Mundy, *Assessment of PC12 cell differentiation and neurite growth: a comparison of morphological and neurochemical measures*. Neurotoxicol Teratol, 2004. **26**(3): p. 397-406.
70. Hartman, D.S., et al., *Multiple trkA proteins in PC12 cells bind NGF with a slow association rate*. J Biol Chem, 1992. **267**(34): p. 24516-22.
71. Namekata, K., et al., *Dock3 regulates BDNF-TrkB signaling for neurite outgrowth by forming a ternary complex with Elmo and RhoG*. Genes Cells, 2012. **17**(8): p. 688-97.
72. Machnicka, B., et al., *Spectrin-based skeleton as an actor in cell signaling*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(2): p. 191-201.
73. Banker, G., *Types of Nerve Cell cultures, Their Advantages and Limitations*, in *Culturing nerve cells*. 1998, Cambridge, Mass. MIT Press.
74. Shafer, T.J. and W.D. Atchison, *Transmitter, ion channel and receptor properties of pheochromocytoma (PC12) cells: a model for neurotoxicological studies*. Neurotoxicology, 1991. **12**(3): p. 473-92.
75. Radio, N.M., et al., *Comparison of PC12 and cerebellar granule cell cultures for evaluating neurite outgrowth using high content analysis*. Neurotoxicol Teratol, 2010. **32**(1): p. 25-35.
76. Gallo, V., et al., *The role of depolarization in the survival and differentiation of cerebellar granule cells in culture*. J Neurosci, 1987. **7**(7): p. 2203-13.

- 
77. Bal-Price, A.K., et al., *Application of in vitro neurotoxicity testing for regulatory purposes: Symposium III summary and research needs*. Neurotoxicology, 2008. **29**(3): p. 520-31.
78. Maruoka, H., et al., *Low-molecular-weight compounds having neurotrophic activity in cultured PC12 cells and neurons*. J Biochem, 2011. **150**(5): p. 473-5.
79. Williams, B. and D.S. Dwyer, *Structure-based discovery of low molecular weight compounds that stimulate neurite outgrowth and substitute for nerve growth factor*. J Neurochem, 2009. **110**(6): p. 1876-84.
80. Ronn, L.C., et al., *A simple procedure for quantification of neurite outgrowth based on stereological principles*. J Neurosci Methods, 2000. **100**(1-2): p. 25-32.
81. Pool, M., et al., *NeuriteTracer: a novel ImageJ plugin for automated quantification of neurite outgrowth*. J Neurosci Methods, 2008. **168**(1): p. 134-9.
82. *fluorescens*. 2013 28.02.13 08.05.13]; Available from: <http://snl.no/fluorescens>.
83. Mullen, R.J., C.R. Buck, and A.M. Smith, *NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates*. Development, 1992. **116**(1): p. 201-11.
84. Laboratorium, F.M. *S-Escitalopram*. 25.04.13]; Available from: <http://www.furst.no/analyse-og-klinikk/analyser/escitalopram/>.
85. Laboratorium, F.M. *S-Venlafaksin total*. 25.04.13]; Available from: <http://www.furst.no/analyse-og-klinikk/analyser/venlafaksin-total/>.
86. Wikell, C., et al., *Sustained administration of the antidepressant venlafaxine in rats: pharmacokinetic and pharmacodynamic findings*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2001. **363**(4): p. 448-55.
87. Karson, C.N., et al., *Human brain fluoxetine concentrations*. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 1993. **5**(3): p. 322-9.

88. Bundgaard, C., M. Jorgensen, and F. Larsen, *Pharmacokinetic modelling of blood-brain barrier transport of escitalopram in rats*. *Biopharm Drug Dispos*, 2007. **28**(7): p. 349-60.
89. Goslin, K., et al., *Development of neuronal polarity: GAP-43 distinguishes axonal from dendritic growth cones*. *Nature*, 1988. **336**(6200): p. 672-4.
90. Kim, Y.G. and Y.I. Lee, *Differential Expressions of Synaptogenic Markers between Primary Cultured Cortical and Hippocampal Neurons*. *Exp Neurobiol*, 2012. **21**(2): p. 61-7.
91. Bock, G., et al., *Photometric analysis of antifading reagents for immunofluorescence with laser and conventional illumination sources*. *J Histochem Cytochem*, 1985. **33**(7): p. 699-705.
92. Dechat, T., et al., *Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin*. *Genes Dev*, 2008. **22**(7): p. 832-53.
93. Liu, N.K. and X.M. Xu, *beta-tubulin is a more suitable internal control than beta-actin in western blot analysis of spinal cord tissues after traumatic injury*. *J Neurotrauma*, 2006. **23**(12): p. 1794-801.
94. Dent, E.W. and F.B. Gertler, *Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance*. *Neuron*, 2003. **40**(2): p. 209-27.
95. Paunesku, T., et al., *Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome*. *Int J Radiat Biol*, 2001. **77**(10): p. 1007-21.
96. Nakano, M., et al., *Fluvoxamine and sigma-1 receptor agonists dehydroepiandrosterone (DHEA)-sulfate induces the Ser473-phosphorylation of Akt-1 in PC12 cells*. *Life Sci*, 2010. **86**(9-10): p. 309-14.

- 
97. Kondo, Y., et al., *Expression and Role of the BDNF Receptor-TrkB in Rat Adrenal Gland under Acute Immobilization Stress*. Acta Histochem Cytochem, 2010. **43**(6): p. 139-47.
  98. Kelly-Spratt, K.S., et al., *A TrkB/insulin receptor-related receptor chimeric receptor induces PC12 cell differentiation and exhibits prolonged activation of mitogen-activated protein kinase*. Cell Growth Differ, 1999. **10**(12): p. 805-12.
  99. Di Benedetto, B., R. Rupprecht, and B. Czeh, *Talking to the synapse: how antidepressants can target glial cells to reshape brain circuits*. Curr Drug Targets, 2013.
  100. Czeh, B. and B. Di Benedetto, *Antidepressants act directly on astrocytes: evidences and functional consequences*. Eur Neuropsychopharmacol, 2013. **23**(3): p. 171-85.
  101. Bellantuono, C., et al., *The safety of escitalopram during pregnancy and breastfeeding: a comprehensive review*. Hum Psychopharmacol, 2012. **27**(6): p. 534-9.
  102. Nishimura, T., et al., *Potentiation of nerve growth factor-induced neurite outgrowth by fluvoxamine: role of sigma-1 receptors, IP3 receptors and cellular signaling pathways*. PLoS One, 2008. **3**(7): p. e2558.
  103. Takebayashi, M., T. Hayashi, and T.P. Su, *Nerve growth factor-induced neurite sprouting in PC12 cells involves sigma-1 receptors: implications for antidepressants*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **303**(3): p. 1227-37.
  104. Fernandez-Pastor, B., J.E. Ortega, and J.J. Meana, *Involvement of serotonin 5-HT receptors in the modulation of noradrenergic transmission by serotonin reuptake inhibitors: a microdialysis study in rat brain*. Psychopharmacology (Berl), 2013.

105. Lichvarova, L., K. Jaskova, and L. Lacinova, *NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells is independent of calcium entry through L-type calcium channels*. Gen Physiol Biophys, 2012. **31**(4): p. 473-8.
106. Takenouchi, T. and E. Munekata, *Serotonin increases cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> concentration in PC12h cells: effect of tachykinin peptides*. Neurosci Lett, 1998. **246**(3): p. 141-4.
107. Bilderback, T.R., V.R. Gazula, and R.T. Dobrowsky, *Phosphoinositide 3-kinase regulates crosstalk between Trk A tyrosine kinase and p75(NTR)-dependent sphingolipid signaling pathways*. J Neurochem, 2001. **76**(5): p. 1540-51.
108. Westphal, D., et al., *Clustering of the neural cell adhesion molecule (NCAM) at the neuronal cell surface induces caspase-8- and -3-dependent changes of the spectrin meshwork required for NCAM-mediated neurite outgrowth*. J Biol Chem, 2010. **285**(53): p. 42046-57.
109. Skaper, S.D., *Neuronal growth-promoting and inhibitory cues in neuroprotection and neuroregeneration*. Methods Mol Biol, 2012. **846**: p. 13-22.
110. Schaefer, A.W., et al., *Coordination of actin filament and microtubule dynamics during neurite outgrowth*. Dev Cell, 2008. **15**(1): p. 146-62.
111. Korshunova, I. and M. Mosevitsky, *Role of the growth-associated protein GAP-43 in NCAM-mediated neurite outgrowth*. Adv Exp Med Biol, 2010. **663**: p. 169-82.
112. Matsusaka, S. and I. Wakabayashi, *5-Hydroxytryptamine as a potent migration enhancer of human aortic endothelial cells*. FEBS Lett, 2005. **579**(30): p. 6721-5.
113. Wang, H.M., et al., *Fluoxetine inhibits monocrotaline-induced pulmonary arterial remodeling involved in inhibition of RhoA-Rho kinase and Akt signalling pathways in rats*. Can J Physiol Pharmacol, 2012. **90**(11): p. 1506-15.



114. Liu, Y., et al., *Serotonin induces Rho/ROCK-dependent activation of Smads 1/5/8 in pulmonary artery smooth muscle cells*. FASEB J, 2009. **23**(7): p. 2299-306.
115. Narita, N., et al., *Interactions of selective serotonin reuptake inhibitors with subtypes of sigma receptors in rat brain*. Eur J Pharmacol, 1996. **307**(1): p. 117-9.
116. Bhuiyan, M.S., H. Tagashira, and K. Fukunaga, *Crucial interactions between selective serotonin uptake inhibitors and sigma-1 receptor in heart failure*. J Pharmacol Sci, 2013. **121**(3): p. 177-84.
117. Kourrich, S., et al., *The sigma-1 receptor: roles in neuronal plasticity and disease*. Trends Neurosci, 2012. **35**(12): p. 762-71.