

Paracetamol og mulige nevrotoksiske effekter

*In vitro studier i kyllingkornceller og
optimalisering av studier i humane
cellelinjemodeller; SH-SY5Y og NTERA2*

Nora Houdaifi



Masteroppgave for graden Master i farmasi
45 studiepoeng

Seksjon for farmasøytisk biovitenskap
Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Juni 2020

Veiledere:

Professor Ragnhild Elisabeth Paulsen, Avdeling for farmasøytisk biovitenskap,
Universitetet i Oslo

Doktorgradsstipendiat Nils-Anders Labba, Avdeling for farmasøytisk biovitenskap,
Universitetet i Oslo

© Nora Houdaifi

Juni 2020

Paracetamol og mulige nevrotoksiske effekter

*In vitro studier i kyllingkornceller og optimalisering av studier i humane cellelinjemodeller;
SH-SY5Y og NTERA2*

Nora Houdaifi

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forord

Arbeidet i denne masteroppgaven ble utført ved Seksjon for Farmasøytisk Biovitenskap, Farmasøytisk institutt i perioden august 2019 til juni 2020. Masteroppgaven er et prosjekt innen endringsmiljøet PharmaTox. Målet til endringsmiljøet er å få ny innsikt i legemidlers effekt på nevrotoksisitet og nevroutvikling.

Jeg vil først og fremst takke mine veiledere Ragnhild Elisabeth Paulsen og Nils-Anders Labba. En stor takk til Ragnhild for tålmodighet, konstruktive tilbakemeldinger og god veiledning gjennom hele prosjektets forløp. Jeg retter også en stor takk til Nils som har gitt meg god veiledning på laboratoriet, og hele tiden vært tilgjengelig for å svare på spørsmål og gi gode tilbakemeldinger. Jeg vil også rette en takk til post doc Mussie Ghezu Hadera og ingeniør Mona Gaarder for god veiledning og opplæring på laboratoriet. I tillegg ønsker jeg å rette en takk til overingeniør Hilde Nilsen for hjelp med utførelse av labarbeid på Gydas vei.

Til slutt vil jeg takke familie og venner som har vist tålmodighet og gitt meg støtte i løpet av hele studietiden.

Sammendrag

Paracetamol er førstevalget ved behov for smertestillende og/eller febernedsettende effekt hos gravide. Legemiddelet har vært brukt i 70 år og har vært ansett som trygt å bruke under svangerskap. Nyere epidemiologiske studier har imidlertid funnet at legemiddelet både kan påvirke nevroutviklingen og være involvert i mekanismer for ADHD og ASD. I og med at epidemiologiske studier ikke kan kartlegge alle aspekter, herunder virkningsmekanismer og proteinmarkører for nevroutviklingsforstyrrelser, er det av viktighet å utføre dyre- og *in vitro* forsøk. I denne oppgaven ble nerveceller fra lillehjernen i kylling, i tillegg til to humane nevronele cellelinjer, brukt for å undersøke mulige nevrotoksiske effekter ved bruk av paracetamol.

Kyllingembryomodellen er et klassisk modellsystem for å studere nevroutvikling. Kyllingkornceller fra lillehjernen er vist å reflektere generell nervecelleutvikling og er derfor egnet til å studere mulige nevrotoksiske effekter i hjernen under utvikling. Det er dessuten vist endringer i lillehjernen ved ADHD og ASD. Videre er bruken av humane cellelinjer et godt supplement til slike studier da de gir en større overføringsverdi til menneske. I denne oppgaven ble primære kulturer av kyllingkornceller brukt til *in vitro* forsøk med paracetamol, i tillegg til at differensiering av humane SH-SY5Y- og NTERA2-cellelinjer ble optimalisert for bruk i senere paracetamolstudier.

MTT-forsøk for å undersøke celleviabilitet viste ingen signifikante endringer i 72 timers paracetamoleksponerte kyllingkornceller. Ved utførelse av immunocytokjemi ble det funnet signifikant redusert proteinuttrykk av Tuj1, DCX, β 2-spektrin og NFH etter paracetamolbehandling i konsentrasjonsområdet 200-1600 μ M. Kliniske serumkonsentrasjoner er 33-133 μ M. Tuj1, DCX, β 2-spektrin og NFH er alle involvert i nervecellers cytoskjelett og det ble derfor antatt at paracetamol kan føre til en cytoskjelettmediert toksisitet. Dette kan trolig kobles til ASD hvor cytoskjelettdynamikk og mikrotubuli- og aktinassosierte proteiner i noen studier er vist å være forstyrret.

Oppfølgingsstudier er nødvendige for å undersøke hvorvidt paracetamol påvirker andre virkningsmekanismer og proteinmarkører, og hvorvidt disse er involvert i patofysiologien til ADHD og ASD.

Forkortelser

Ad	Opp til
ADHD	Oppmerksomhets- og hyperaktivitetsforstyrrelser (Attention Deficit Hyperactivity Disorder)
AM404	<i>N</i> -arakidonoylfenolamin
ANOVA	Analysis of Variance
AraC	Cytosine- β -D-arabinofuranoside
ASD	Autisme spektrumforstyrrelser (Autism Spectrum Disorder)
BCL	B-cell lymphoma
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BSA	Bovint serumalbumin
CB ₁	Cannabinoid reseptor type 1
CNS	Det sentrale nervesystemet (central nervous system)
COX	Cyklooksxygenase
CS	Kyllingserum (chicken serum)
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DCX	Doublecortin
DIV	Dager <i>in vitro</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
VI	

DPBS	Dulbeccos Phosphate Buffered Saline
E	Embryonaldag
EEA1	Early endosome antigen 1
EGL	Ytre germinallag (external germinal layer)
FBS	Føtalt kalveserum (Fetal Bovine Serum)
GAP43	Growth associated protein 43
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GSH	Glutation
HSP60	Heat shock protein 60
IBA1	Ionized calcium binding adaptor molecule 1
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
IFP	Intermediært filamentprotein
IGL	Indre korncellelag (internal granule layer)
LAF	Laminar air flow
MAP	Mikrotubuliassosiert protein
ML	Det molekylære laget (molecular layer)
MMP9	Matrix metalloproteinase 9
MTT	3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid
MQ	Milli Q

NAPQI	N-acetyl-p-benzoquinon-imin
NCAM1	Neural cell adhesion molecule 1
NFH	Human Neurofilament Heavy Chain
NGF	Nervevekstfaktor (Nerve Growth Factor)
NMDA	N-methyl-D-aspartate
NO	Nitrogenoksid
NSAID	Ikke-steroide antiinflammatoriske midler (non-steroidal anti-inflammatory drugs)
P100	Paracetamol 100 μ M
P200	Paracetamol 200 μ M
P400	Paracetamol 400 μ M
P800	Paracetamol 800 μ M
P1600	Paracetamol 1600 μ M
Pax6	Paired box protein 6
PBS	Fosfatbufret saltvann (Phosphate Buffered Saline)
PCL	Purkinjecellelaget (purkinje cell layer)
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PDL	Poly-d-lysine
PFA	Paraformaldehyd
PG	Prostaglandiner
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
VIII	

PGHS	Prostaglandin H ₂ syntetase
PLL	Poly-L-lysine
PMSF	Phenylmethylylsulfonyl fluoride
POX	Peroksidase
PS	Penicillin-streptomycin
PSD95	Postsynaptic density protein 95
RA	Retinsyre (retinoic acid)
RT	Romtemperatur
RPM (sentrifugering)	Omdreininger per minutt (revolutions per minute)
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SD	Standardavvik (standard deviation)
SYP	Synaptophysin
TBS	Trisbufret saltvann
TBS-T	1X TBS med 0.1% Tween 20
TNF-alfa	Tumor nekrose faktor alfa
Tris	Trishydroksymetylaminometan
TrkB	Tropomyosin receptor kinase B
TRPV1	Vanilloid subtype 1 reseptor
Tween	Polyoksyetylen-sorbitan-monolaurat

Innholdsfortegnelse

1	Innledning	1
1.1	Paracetamolbruk blant gravide	1
1.2	Sikkerhetsfarmakologi for gravide	2
1.3	Paracetamols virkningsmekanismer i sentralnervesystemet	3
1.4	Metabolisme av paracetamol	5
1.5	Sentralnervesystemet i utviklingsfasen	6
1.5.1	Lillehjernen	7
1.5.2	Molekylære markører for nevronal utvikling	8
1.6	Modellsystemer	10
1.6.1	Kyllingembryomodellen	10
1.6.2	Humane cellelinjesystemer	11
1.7	Hensikten med oppgaven	12
2	Materialer og metoder	13
2.1	Oversikt over kjemikalier og biologiske produkter	13
2.2	Oversikt over utstyr og apparatur	17
2.3	Preparering av lillehjerne og korncellekultur fra kyllingembryo	19
2.3.1	Forbehandling av skåler og plater til korncellekultur	19
2.3.2	Preparering av korncellekultur fra kyllinglillehjerne	21
2.3.3	<i>In vitro</i> eksponering av kyllingkornceller	25
2.4	SH-SY5Y-celler	26
2.4.1	Splitting og utplating av SH-SY5Y-celler	26
2.4.2	Differensiering av SH-SY5Y-celler	27
2.4.3	<i>In vitro</i> eksponering av SH-SY5Y-celler	29
2.5	NTERA2-celler	30
2.5.1	Splitting og utplating av NTERA2-celler	30
2.5.2	Differensiering av NTERA2-celler	30
2.6	MTT-analyse	32
2.7	Immunofluorescens	32
2.7.1	Metanolfiksering i 96-brønnsplate	33
2.7.2	Paraformaldehydfiksering i 96-brønnsplate	33
2.7.3	Permeabilisering i 96-brønnsplate	33

2.7.4	Blokkering i 96-brønnsplate	34
2.7.5	Antistoff-inkubasjon i 96-brønnsplate	34
2.7.6	Fiksering, permeabilisering og blokkering på dekkglass.....	37
2.7.7	Antistoff-inkubasjon på dekkglass.....	37
2.7.8	Montering av dekkglass til objektglass.....	38
2.7.9	DNA-kvantifisering for normalisering av fluorescens	38
2.8	Westernblotting for proteinanalyse.....	39
2.8.1	Preparering av cellelysater fra kyllingkornceller til westernblotting.....	39
2.8.2	Proteinmåling ved bruk av "Pierce BCA protein assay kit"	40
2.8.3	Proteinmåling ved bruk av Nanodrop	41
2.8.4	Gelelektroforese	41
2.8.5	Blotting av gel til membran	42
2.8.6	Ponceaufarging	42
2.8.7	Blokkering og tilsetting av antistoffer	42
2.8.8	Stripping av membran.....	43
2.9	Statistisk fremstilling	44
3	Resultater	45
3.1	Celleviabilitet påvirkes ikke av paracetamol 72 timer etter eksponering.....	46
3.2	Ekspresjonsstudier i kyllingkorncellekultur	47
3.2.1	Titreringsstudier til immunocytokjemi	47
3.2.2	Paracetamol fører til kvantitative endringer i proteinene Tuj1, DCX, β 2-spektrin og NFH ved immunocytokjemi.....	50
3.2.3	Kyllingkornceller eksponert for paracetamol uttrykker Tuj1, DCX og Pax6 analysert ved westernblott.....	53
3.3	Testing av ulike differensieringsprotokoller for SH-SY5Y- og NTERA2-celler.....	55
3.3.1	SH-SY5Y-celler.....	55
3.3.2	NTERA2-celler.....	56
3.4	Antistoffpiloting i differensierte SH-SY5Y- og NTERA2-celler.....	57
4	Diskusjon	61
4.1	Metodebetraktninger	62
4.1.1	Valg av modellsystemer.....	62
4.1.2	Valg av eksponeringer	65
4.1.3	Optimalisering av immunocytokjemi	66

4.1.4	Westernblotting.....	67
4.2	Diskusjon av biologiske funn.....	68
4.2.1	Ingen endring i celleviabilitet ved MTT-forsøk tyder på fravær av cytotoksisitet.....	68
4.2.2	Kvantitative endringer i proteinene Tuj1, DCX, β 2-spektrin og NFH tyder på en cytoskjelettmediert toksisitet.....	68
5	Konklusjon.....	72
	Litteraturliste.....	73

1 Innledning

1.1 Paracetamolbruk blant gravide

Paracetamol er det mest brukte smertestillende legemiddelet og førstevalget ved reseptfri behandling av smerter hos gravide kvinner. Til tross for dens etablerte sikkerhetsprofil, har det i nyere epidemiologiske studier blitt vist at forbindelsen kan ha en innvirkning på nevronal utvikling i foster og være knyttet til oppmerksomhets- og hyperaktivitetsforstyrrelser (ADHD, av engelske Attention Deficit Hyperactivity Disorder) og autismespektrumsforstyrrelser (ASD, av engelske Autism Spectrum Disorders) [1].

En dansk prospektiv kohortstudie fulgte opp totalt 64 322 gravide og deres barn fra 1996-2002 for å undersøke risikoen for å utvikle ADHD-liknende problemer som følge av prenatal paracetamoleksponering. Over halvparten av de gravide kvinnene brukte paracetamol i løpet av svangerskapet, og det ble undersøkt hvorvidt legemiddelet bidro til 1) utvikling av ADHD-liknende oppførsel hos 7 år gamle barn, 2) diagnostisert hyperkinetisk forstyrrelse eller 3) bruk av legemidler mot ADHD. Prenatal paracetamoleksponering ble assosiert med en høyere risiko for 1) og 2) [2]. En svakhet ved denne studien var imidlertid at omtrent 30% av de kvalifiserte mødrene ble ekskludert fra studien da de ikke deltok på et eller flere telefonintervju. Studien inkluderte en rekke konfunderende faktorer slik som feber, inflammasjon og mental helse, men ikke andre faktorer slik som hvorfor legemiddelet ble brukt, ADHD-relaterte genetiske faktorer eller bruk av andre legemidler for eksempel [1].

I perioden 1999-2008 ble det utført en norsk prospektiv kohortstudie i regi av Folkehelseinstituttet. Studien ble utført som et subprosjekt av Mor og Barn (MoBa)-studien, og hadde som formål å undersøke hvorvidt prenatal paracetamoleksponering påvirket psykomotorisk utvikling, atferdsproblemer og temperament ved 3 års alder. Det ble brukt likekjønnede søsken hvor kun det ene barnet ble eksponert for paracetamol under svangerskap. I studien ble det benyttet spørreskjema hvor kvinnene som deltok besvarte spørsmål knyttet til egen graviditet. Dette var spørsmål om sosiodemografiske forhold, mors helse og legemiddelbruk under graviditeten. I tillegg fylte mødrene ut spørreskjema etter fødselen og 48 631 barn ble fulgt opp i 3 år. Det ble skilt mellom kortvarig (1-27 dager) og langvarig (over 28 dager) bruk av paracetamol. Både kortvarig og langvarig bruk viste seg å være assosiert med

svakket grovmotorisk funksjon, men bruk over 28 dager viste seg å i tillegg føre til forsinkelse i når barnet begynte å gå, nedsatte kommunikasjonsferdigheter, atferdsproblemer og et aktivt temperament. Blant studiens svakheter var at det ikke var mulig å skille mellom hvorvidt den langvarige bruken gjaldt kontinuerlig bruk i 28 dager eller mer, eller sporadisk bruk i løpet av hele svangerskapet. I tillegg kan andre konfunderende faktorer som ikke ble undersøkt her, urapporterte sykdommer for eksempel, ha bidratt til funnene i studien [3].

På bakgrunn av at de epidemiologiske studiene ikke er fullstendig konklusive, er det nødvendig å utføre flere epidemiologiske studier før eventuelle nye retningslinjer for paracetamolbruk under svangerskapet kan innføres. Konfunderende faktorer kan påvirke funnene og det er for eksempel vanskelig å skille mellom hvorvidt nevroutviklingseffektene skyldes legemiddelbruken eller mulig underliggende sykdom/tilstand hos mor. I tillegg til å utføre flere epidemiologiske studier er det også nødvendig å studere paracetamoleffekter ved utførelse av dyre- og *in vitro* forsøk. Slik kan cellulære mekanismer som muligens ligger til grunn for de epidemiologiske funnene avdekkes, og sikrere konklusjoner kan etterhvert trekkes. Bruken av dyremodeller bidrar dessuten til at konfunderende faktorer ikke spiller inn.

1.2 Sikkerhetsfarmakologi for gravide

Før et legemiddel kan få markedsføringstillatelse må det gjennom en rekke studier, herunder de prekliniske. Her undersøkes farmakodynamiske, farmakokinetiske og toksikologiske aspekter både *in vitro* og *in vivo* [4]. Før 1990 ble toksikologisk testing utført som en del av preklinisk legemiddelutvikling, men det viste seg at legemidler likevel kunne nå helt frem til fase tre av kliniske utprøvinger før sjeldne uønskede, og muligens letale, effekter ble oppdaget. Dette kom blant annet av at de brukte metodene ikke var tilstrekkelige for å forutsi disse effektene, samt at det kun var kroniske, toksiske doser som ble testet. På basis av dette ble sikkerhetsfarmakologi inkludert i preklinisk testing på slutten av 1900-tallet [5]. Ifølge International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) er dette studier som undersøker om en substans har potensielle uønskede farmakodynamiske effekter på fysiologiske funksjoner ved eksponering i og over det terapeutiske området. I ICH retningslinje S7A kommer det frem at de viktigste systemene å utføre sikkerhetsfarmakologiske studier i er det sentrale nervesystemet (CNS, av engelske central nervous system), det kardiovaskulære systemet og det respiratoriske systemet da disse omfatter vitale organer [6].

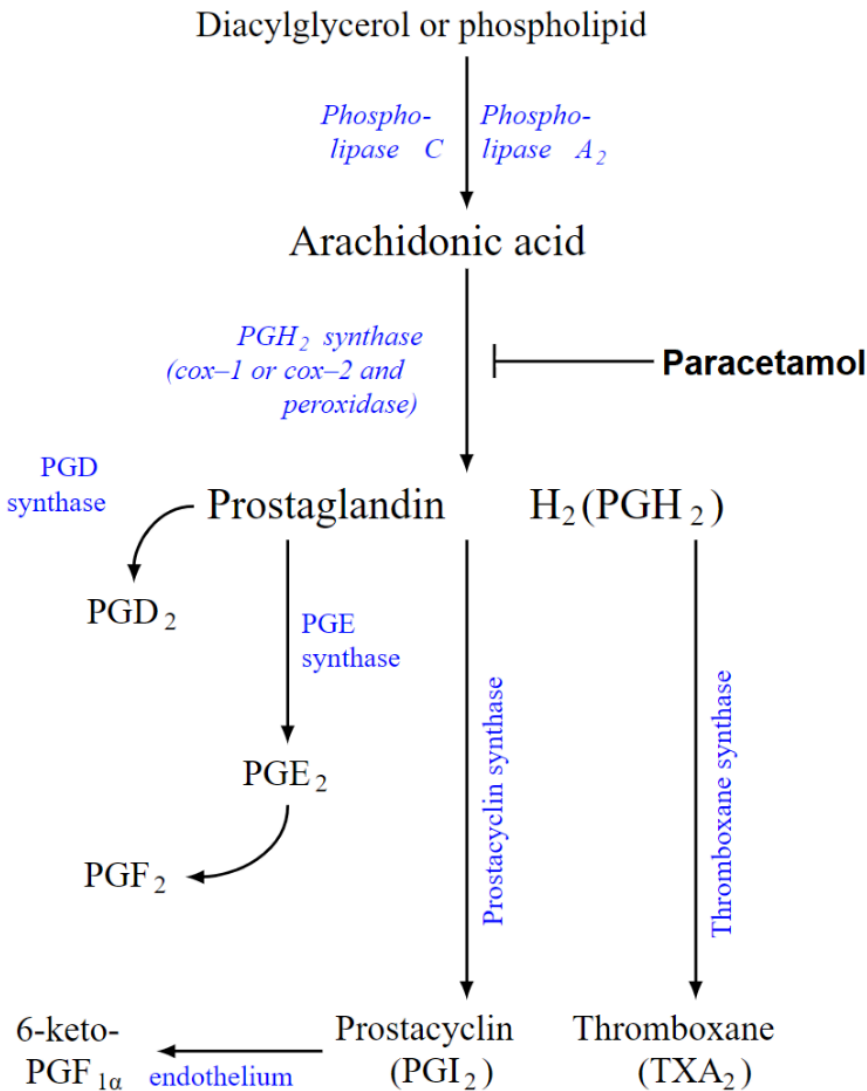
Gravide, embryo, foster og nyfødte er eksempler på pasientgrupper som er knyttet til utfordringer når det gjelder kliniske studier, og som også blir underprioritert [7]. Dette gjør at prekliniske sikkerhetsfarmakologiske studier er av høy relevans for å kunne kartlegge legemidlers effekter i embryo og slik sikre trygg legemiddelbruk. Studier av ovennevnte pasientgrupper gjennomføres som regel etter at legemiddelet har fått markedsføringstillatelse og dermed allerede er i bruk [8]. Det sentrale nervesystemet er spesielt sårbart under utvikling og eventuelle påvirkninger grunnet medikamentell behandling kan ha langvarige konsekvenser. På bakgrunn av dette er det viktig at legemidlers sikkerhetsprofil hos gravide er fullstendig kartlagt før etablert bruk [9]. De sikkerhetsfarmakologiske studiene og retningslinjene ICH har utarbeidet i forbindelse med dette kan være med på å bidra til at embryonale effekter avdekkes på et tidligere tidspunkt.

1.3 Paracetamols virkningsmekanismer i sentralnervesystemet

Paracetamol (N-acetyl-p-aminofenol) er et analgetisk og antipyretisk legemiddel som har vært brukt i 70 år. Til tross for legemiddelets langvarige bruk, er ikke alle virkningsmekanismer fullstendig kartlagt. Det har tidligere vært antatt at paracetamol på samme måte som ikke-steroid antiinflammatoriske midler (NSAIDs) virker via en cyclooxygenase (COX) signaleringsvei, men dette virker ikke å være hovedmekanismen. Dette skyldes at paracetamol krysser blod-hjerne-barrieren og i større grad virker i sentralnervesystemet, fremfor perifert slik NSAIDs gjør. På grunn av dette har paracetamol heller ikke vist like gode antiinflammatoriske effekter som NSAIDs [10].

Det er vist at en rekke mekanismer kan være involvert i paracetamols analgetiske og antipyretiske effekter. Her inngår inhibering av prostaglandin (PG) produksjon, samt effekter på blant annet serotonerge, cannabinoide og nitrogenoksid (NO) signaleringsveier [11].

Prostaglandiner er mediatorer som blant annet bidrar til å indusere smerter, feber og inflammasjon [12]. De dannes når arakidonsyre omdannes til PGH_2 via COX-enzymet, også kalt prostaglandin H_2 syntetase (PGHS) (figur 1.1). Enzymet består av to seter; COX-setet og peroksidase (POX)-setet, hvor paracetamol er antatt å virke som et reduserende cosubstrat ved sistnevnte sete [11]. Dette påvirker indirekte PGHS' aktivitet da enzymet er avhengig av å være i en oksidert form, og bidrar dermed til redusert produksjon av prostaglandiner [10].



Figur 1.1 Virkningsmekanisme for paracetamol via COX signaleringsvei. Paracetamol er antatt å virke reduserende på POX-setet i PGHS, og slik bidra til hemmet produksjon av prostaglandiner. Figuren er modifisert og hentet fra [13], og brukt under *Creative Commons license*.

Paracetamol er også antatt å ha effekter på serotonerge signaleringsveier da disse er involvert i nedstrøms smerteregulering. Dette har blitt vist da samtidig tilførsel av 5-HT₃ reseptorantagoniser med paracetamol blokkerte paracetamols analgetiske effekt i mennesker. Det antas imidlertid at denne effekten også kan være knyttet til inhibert prostaglandinsyntese da PGE₂-reseptor (EP₃) blant annet uttrykkes av serotonerge celler [14].

Det har også blitt vist at paracetamol kan utøve sine effekter via en cannabinoid signaleringsvei. I studier utført i mus har det blitt vist at paracetamol deacetyleres til p-aminofenol som igjen konjugeres med arakidonsyre og danner den aktive metabolitten *N*-arakidonoylfenolamin (AM404). Denne metabolitten har vist seg å aktivere vanilloid subtype 1 reseptor (TRPV1) og

cannabinoid reseptor type 1 (CB₁). AM404 øker aktivering av disse postsynaptiske reseptorene ved å hemme reopptak av endocannabinoidet anandamid som er ligand for både TRPV1 og CB₁ [14]. Dette bidrar til økte vevskonsentrasjoner av anandamid som har blitt vist å kunne forhindre initiering av smerte [15]. Grunnet paracetamols mulige virkningsmekanismer via serotonerge og cannabinoide signalveier, er det gjort antakelser om at legemiddelet trolig kan påvirke bevissthet og kognitive funksjoner. Dette er imidlertid et område hvor flere studier er nødvendige [11].

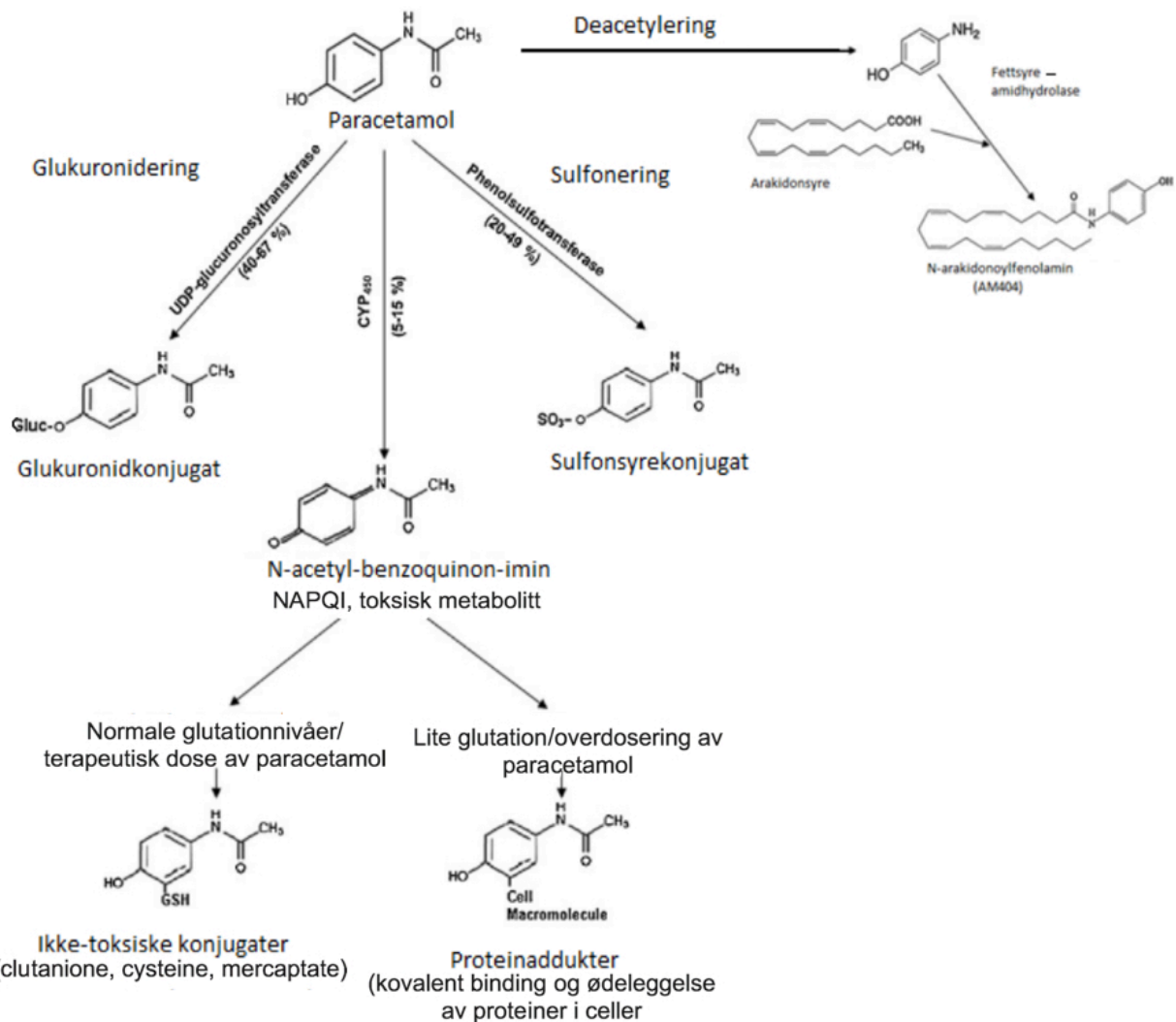
Nitrogenoksid er vist å ha ulike roller i forbindelse med smerter, og inhibering av NO-syntese er antatt å være involvert i paracetamols analgetiske effekter. Dette er imidlertid avhengig av smertestimuli og gir en antinociceptiv effekt dersom smerten skyldes kjemisk eller termal påvirkning [16]. Det er antatt at AM404 i tillegg til å hemme reopptak av anandamid også bidrar til å inhibere NO [11].

Alle ovennevnte signalveier er også uttrykt under hjerneutvikling og er viktige for denne prosessen [17-19]. Samtidig gjør dette at de også kan være involvert i mulige toksikologiske mekanismer som paracetamol kan vise seg å igangsette.

1.4 Metabolisme av paracetamol

Ved administrering av terapeutiske doser paracetamol vil omtrent 25% av dosen undergå førstepassasjemetabolisme i leveren, mens mesteparten glukuronideres og sulfoneres. En liten andel oksideres blant annet av enzymene CYP2E1, CYP1A2, CYP3A4 og CYP2A6, som bidrar til dannelsen av det toksiske intermedietet N-acetyl-p-benzoquinoneimine (NAPQI) i leveren. Hos nyfødte skjer glukuronideringen ved lav kapasitet, mens binding av paracetamol til sulfat er den viktigste utskillingsveien. CYP-systemet viser seg også å være umodent hos nyfødte, hvilket kan være årsak til hvorfor de er mindre utsatt for paracetamoltoksisitet via NAPQI [20].

NAPQI vil vanligvis nøytraliseres via glutation (GSH) som danner ikke-toksiske metabolitter eksempelvis cysteine (figur 1.2). Ved lave glutationnivåer vil det derimot dannes proteinaddukter som kan skade cellulære proteiner. Til tross for at mesteparten av metabolismen foregår i leveren, er det vist at CYP2E1 som er blant enzymene som bidrar til dannelsen av NAPQI, også er uttrykt i hjernen. Siden paracetamol krysser blod-hjernebarrieren, kan det derfor tenkes at det toksiske intermedietet også kan dannes via metabolisme i hjernecellene. Det trengs imidlertid flere studier innenfor dette området [10].



Figur 1.2 Metabolisme av paracetamol. Ulike metabolismeveier for paracetamol, deriblant metabolisering til toksisk metabolitt NAPQI. Figuren er modifisert og hentet fra [21].

1.5 Sentralnervesystemet i utviklingsfasen

Det sentrale nervesystemet (CNS, av engelske central nervous system) består av hjernen og ryggmargen og er et komplekst nettverk som styrer flere essensielle prosesser i kroppen. Utviklingsfasen strekker seg fra svangerskapsuke 4 og fortsetter frem til 20-årene. Den første hjernestrukturen som dannes er nevralkplaten. Dette skjer via en fortykning av ektoderm som er det ytterste kimplagelaget. Videre går nevralkplaten over til å bli et nevralkrø som gir opphav til ryggmargen og ulike deler av hjernen; forhjerningen, midthjerningen og bakhjerningen [22].

Utviklingen av CNS skjer via nøye regulerte prosesser hvor proliferasjon, migrasjon, differensiering, apoptose og myelinisering inngår. Embryonale stamceller fra nevralkrøret øker først i antall (proliferasjon) i ulike deler av hjernen og det er blitt vist at hjernen er mer sårbar for antimitotiske komponenter når proliferasjonen skjer aktivt, sammenliknet med når

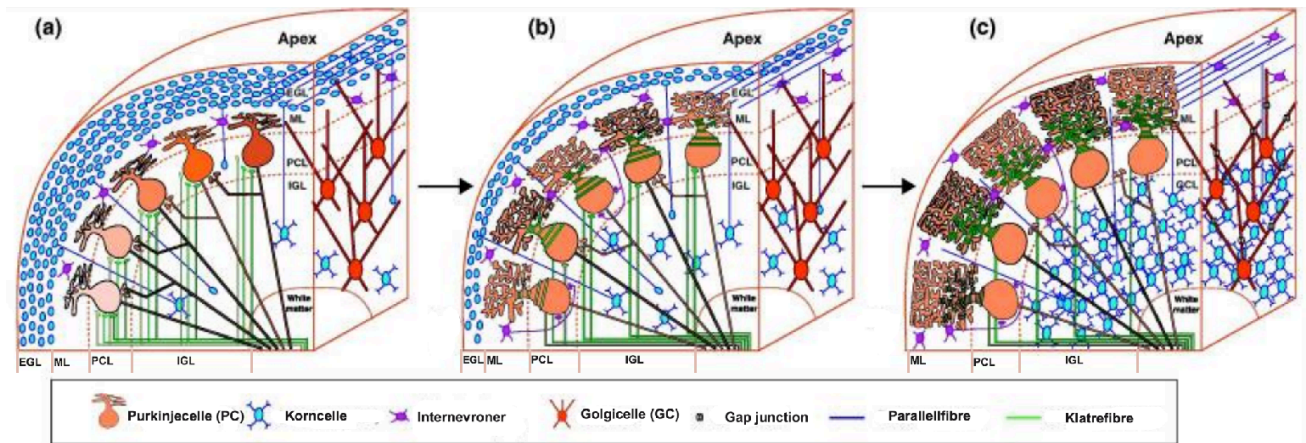
proliferasjonen avtar [23]. Videre vil stamcellene, også kalt forløperceller, migrere og differensiere til spesialiserte nevroner og gliaceller. Migrering til riktig lokasjon i hjernen og ryggmargen er av viktighet da nervecellers funksjon er avhengig av presis tilkobling til andre nevroner og deres targets [24]. Nevronene vil også sende ut utløpere, nevritter, for å etablere koblinger til andre nevroner. Nevrittene inkluderer både dendritter, som leder inntrykk inn til cellen og aksoner, som leder inntrykk ut av cellen [25]. Nevrittutvekst involverer en rekke signalerende molekyler, membranreseptorer, celleadhesjonsmolekyler og cytoskjelettkomponenter [26].

Nerveceller kan ikke regenereres i CNS, hvilket gjør sentralnervesystemet sårbart for skade [27]. Det er blitt vist at forstyrrelser i ovennevnte prosesser under utvikling kan føre til nevrotoksisitet, og at konsekvensene av dette ikke avdekkes før senere i livet [23].

1.5.1 Lillehjernen

Lillehjernen (cerebellum) er plassert under storhjernen og bak hjernestammen og er med på å styre bevegelse og balanse [28]. Dessuten har det vist seg at lillehjernen også spiller en rolle i kognisjon, følelser og motorisk læring. Unormal utvikling av lillehjernen kan blant annet føre til ADHD og ASD [29].

Lillehjernebarken er delt inn i tre lag; det molekylære laget (ML) ytterst, purkinjecellelaget (PCL) og det indre korncellelaget (IGL) (figur 1.3). I sistnevnte lag befinner korncellene seg. Dette er små nerveceller med et sfærisk soma og korte dendritter [30]. Under utvikling av lillehjernen er det imidlertid et ekstra lag til stede; det ytre germinallaget (EGL; external germinal layer på engelsk). Dette laget anses som et prolifererende område med korncelleforløpere som gir opphav til modne kornceller med en glutamerg, postmitotisk fenotype. Dette skjer ved at korncelleforløperne migrerer til og differensierer i IGL. EGL er vist å være stabilt frem til 2 måneder postnalt og forsvinner gradvis i løpet av 12 måneder [31]. Oppbyggingen av lillehjernebark er vist å være bevart på tvers av arter, hvilket gjør den til en god modell for studier av hjerneutvikling [32].



Figur 1.3 Lillehjernen under utvikling. a) Korncellene proliferer i det midlertidige germinallaget, EGL. De danner aksoner og migrerer gjennom ML og PCL. b) Korncellene har nådd IGL, hvilket gjør at EGL består av færre celler og er mindre. c) EGL er borte da alle korncellene har migrert til IGL. Figuren er modifisert og hentet fra [32].

1.5.2 Molekylære markører for nevronal utvikling

Beta tubulin III, også kalt for Tuj1, er et protein som spesifikt befinner seg i nevroner. Proteinet er en komponent i cytoskjelettet ved at det er med på å bygge opp og stabilisere mikrotubuli. Det er derfor av betydning for nevrogenese, migrering og differensiering av nevroner [33].

Et annet protein som er involvert i cytoskjelettet er *doublecortin*, DCX, som er et mikrotubuliassosiert protein (MAP). MAPer bidrar til å opprettholde mikrotubulis funksjoner, herunder cellemigrasjon, transport og mitose. DCX uttrykkes i stor grad i nevronenes aksoner og er nødvendig for nevronenes migrering til hjernebarken. Proteinet binder til mikrotubuli og fremmer slik til bevegelse, samt at det inhiberer depolymerisering av mikrotubuli. Nevronal migrasjon er vesentlig for utviklingen av CNS, og dysfunksjonell migrering er blant annet knyttet til lissencephali, en tilstand som blant annet gir hjernemisdannelse [34, 35]. Aktiner er også en viktig del av cytoskjelettet og bidrar blant annet til å vedlikeholde cellemorfologi, samt at de er av viktighet for ulike cellulære prosesser. Her inngår for eksempel cellemigrasjon, cellemotilitet og intracellulær transport. Cellemotilitet- og migrasjon er blant annet essensielle prosesser for embryonal utvikling. Det er vist at β -aktin isoformen er den som hovedsakelig driver cellemigrasjon. Polymerisering og depolymerisering av aktin bidrar til dette [36, 37].

Spektriner er sammen med korte aktinfilamenter med på å danne et plasmamembran-assosiert nettverk. Et slikt spektrin-aktin-nettverk ble først funnet i erytrocytter, men har vist seg å være

til stede også i andre celletyper, deriblant nevroner [38]. β II-spektrin er den vanligste isoformen i ikke-erytrocyttceller. Proteinet er vist å være en strukturell komponent i aksonale plasmamembraner og bidrar også til aksonal organelletransport [38, 39].

Nevrofilamenter er en familie av intermediære filamentproteiner (IFPs) og ekspresjon av disse er blant annet knyttet til differensiering av nevrogene blastceller til nevroner i embryo under utvikling [40]. I aksonene danner nevrofilamentene kryssbindinger med andre deler av cytoskjelettet, for eksempel med mikrotubuli og aktinfilamenter. Dette bidrar til organisering av andre organeller og proteiner. *Human Neurofilament Heavy Chain* (NFH) er en subenhet av nevrofilamentet og er også blant proteinene som bidrar til å danne cytoskjelettet i nevroner [41]. NFH bidrar i større grad til å stabilisere cytoskjelettet, fremfor å være en strukturell komponent [42]. Et annet intermediært filamentprotein er *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP) som befinner seg i cytoskjelettet i gliaceller. Proteinet er spesifikt for hjernevev, men frigjøres etter astrocyttedød og har derfor for eksempel vist seg å kunne være en markør for hjerneskade hos pasienter [43].

Det er blant annet vist at cytoskjelettdynamikken som er viktig for utvikling av aksoner og dendritter er forstyrret ved ASD. Dette kom frem i en studie av humane stamceller fra autistiske pasienter hvor det blant annet ble funnet at dynamikken til aktinpolymerisering var svekket [44]. En annen studie utført i autistisk-liknende mus viste abnormaliteter i cytoskjelettet og astrocytter, samt at mengden mikrotubuli- og aktinassosierte proteiner var endret i hjernen til autistiske mus [45]. Dette kan tyde på at et endret uttrykk av ovennevnte cytoskeletale proteiner kan spille en rolle ved utviklingen av autisme.

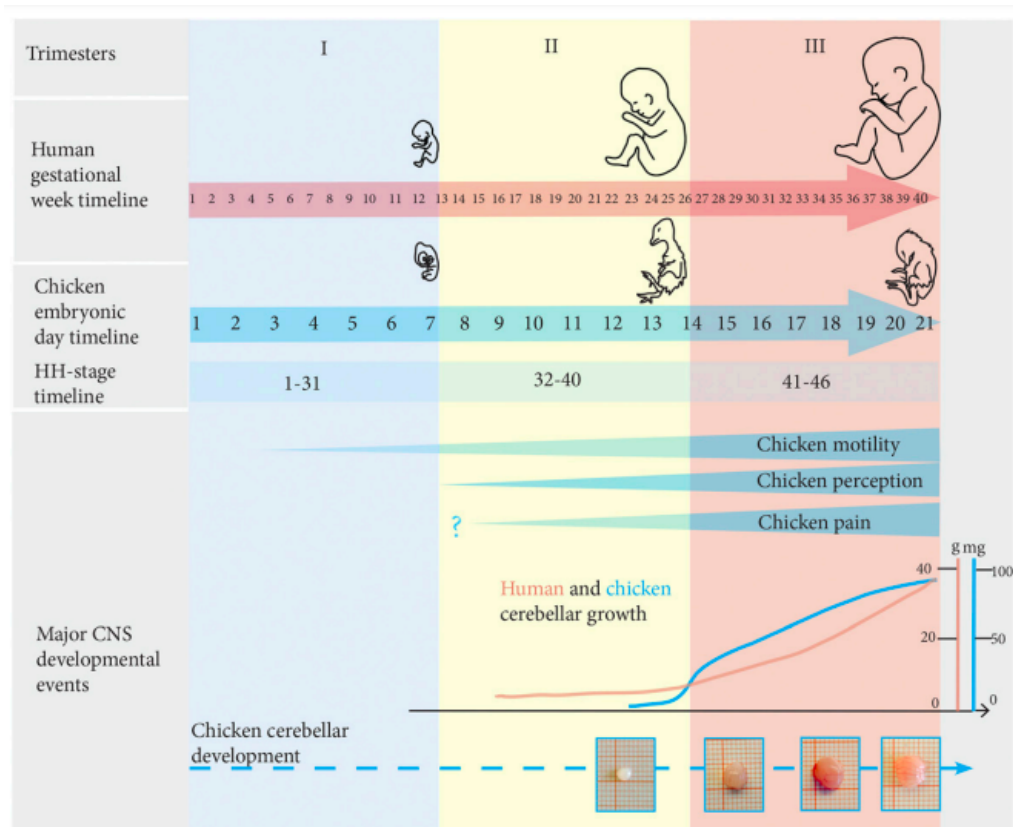
Paired box protein 6 (Pax6) er en transkripsjonsfaktor som er viktig under embryonal utvikling av CNS, øye, nese og pankreas [46]. Når det gjelder CNS, uttrykkes pax6 først i nevrallrøret, mer spesifikt i nevronale stamceller og progenitorceller. Her bidrar den blant annet til å opprettholde en balanse mellom proliferasjon og differensiering av disse cellene. I lillehjernen er proteinet essensielt da det blant annet bidrar til utvikling, overlevelse og migrering av nevroner [7, 47]. Dysfunksjonell pax6 har vist seg å kunne bidra til unormal utvikling av hjernen, og kan trolig spille en rolle i nevroutviklingsforstyrrelser slik som ASD [48].

1.6 Modellsystemer

1.6.1 Kyllingembryomodellen

Kyllingembryo er et klassisk modellsystem for å studere ulike prosesser under utviklingen av embryo. En av grunnene til dette er at kyllingembryoets morfologi er lik den i mennesker og utviklingen er også vist å være tilnærmet lik. Forsøk utført i kyllingembryo har også bidratt til å belyse mekanismer for humane genetiske sykdommer, som igjen kan bidra til å danne et grunnlag for testing av nye terapeutiske metoder [49]. Dessuten er kyllingegg lett tilgjengelige, samt at kyllingembryo kan utvikle seg utenfor kyllingmor. Dette bidrar til etterlevelse av 3R-prinsippet (Replace, Reduce, Refine) da det eksakte antallet egg som trengs kan bestilles, samt at kyllingmor kan ekskluderes fra forsøk. 3R-prinsippet er en del av retningslinjene knyttet til utførelse av dyreforsøk. Kyllingembryo utvikler seg ved 37–39°C og ved 45–55% luftfuktighet og trenger dermed ikke bruk av avanserte fasiliteter. Dessuten har de en kort inkubasjonstid på 21 dager (figur 1.4). Basert på ovennevnte faktorer har kylling som modellsystem blitt foreslått som et supplement til sikkerhetsstudier og kan bidra til å avdekke nevrotoksiske legemiddeleffekter på et tidlig preklinisk stadi [7].

Kyllingkornceller kan brukes for å studere nevronal utvikling. De er enkle å høste og kan dyrkes *in vitro*. Korncellene er i flertall i lillehjernen, cirka 90%, og gjør at tilnærmet rene primære cellekulturer kan lages [50]. Korncellene undergår alle viktige steg for nevronal utvikling og de kan dermed brukes som et modellsystem for studier av mekanismer knyttet til nevronal proliferasjon, apoptose, overlevelse, differensiering og migrering. Sistnevnte er kritisk for utvikling av lillehjernen og endringer i migrasjonen kan tyde på forstyrret nevrou utvikling. Legemiddeleksponering av korncellene kan være med på å avdekke hvorvidt et legemiddel er trygt å bruke under svangerskap, da denne celletypen reflekterer mekanismer som er viktige under utvikling av lillehjernen [7].



Figur 1.4 Embryonal og føtal utvikling i kylling og menneske. Svangerskap i mennesker foregår normalt over 40 uker, sammenliknet med utvikling av kyllingembryo som tar 21 dager. Kylling har dessuten kommet lenger i utvikling av lillehjernen ved utklekking, sammenliknet med menneske ved fødsel. Figuren er en modifisert versjon som er hentet fra [7].

1.6.2 Humane cellelinjesystemer

Bruken av *in vitro* modellsystemer har gjort det mulig å karakterisere proteinfunksjoner og molekylære mekanismer, samt undersøke sykdomspatologi og utføre preliminær legemiddeltesting [51].

SH-SY5Y og NTERA2 er eksempler på to humane cellelinjemodeller som kan være gode supplementer for studier av legemidler, for eksempel paracetamol, og effekter på nevrotutvikling. SH-SY5Y-cellene er subkloninger av SK-N-SH-cellelinjen, som først ble avledet fra en neuroblastopasient [52].

NTERA2 er en pluripotent cellelinje avledet fra humane testikulære carcinomaceller fra embryo. Den nevronale forløperen, NT2/D1, kan via retinsyre (RA, av engelske retinoic acid) differensieres til postmitotiske nevroner [53]. For noen år siden ble det vist at differensiering også kunne initieres av AraC [54].

1.7 Hensikten med oppgaven

Paracetamol er et reseptfritt legemiddel som er førstevalget ved mild smerte, også blant gravide. Til tross for dets status som et trygt legemiddel, har en rekke epidemiologiske studier (1.1) vist at prenatal paracetamoleksponering trolig kan påvirke nevrou utvikling. På bakgrunn av dette var det i denne oppgaven ønsket å undersøke hvorvidt paracetamolbruk under svangerskapet er knyttet til nevrotoksisitet.

Følgende delmål ble satt for oppgaven:

1. Undersøke hvorvidt paracetamol har en effekt på celleviabilitet 24, 48 eller 72 timer etter eksponering i kyllingkornceller.
2. Pilotere antistoffer til bruk i immunofluorescensforsøk for å undersøke hvilke intracellulære proteiner som var uttrykt og hvilke konsentrasjoner av antistoffer som kunne brukes.
3. Ved hjelp av resultater fra piloteringsforsøk, undersøke om paracetamol påvirker uttrykk av proteiner knyttet til nevrou utviklingsmekanismer ved immunocytokjemi og westernblotting.
4. Teste ulike differensieringsprotokoller for de humane cellelinjene SH-SY5Y og NTERA2, og undersøke hvorvidt disse kan brukes til videre paracetamoleksponeringsforsøk.

2 Materialer og metoder

2.1 Oversikt over kjemikalier og biologiske produkter

Tabell 2.1 Kjemikalier og biologiske produkter	
Produkt	Leverandør
2-Merkaptoetanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
5X TransBlot® Turbo™	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
10X Elfobuffer TGS (Tris/Glycin/SDS)	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Anti-β-aktin	Millipore Corporation, Billerica, USA
Anti-β2-spektrin	BD Transduction Laboratories, California, USA
Anti-BCL-2	SantaCruz Biotechnology, Texas, USA
Anti-BCL-xL	SantaCruz Biotechnology, Texas, USA
Anti-CB ₁	Abcam, Cambridge, England
Anti-cCas3	CellSignaling Technology, Massachusetts, USA
Anti-DCX	Abcam, Cambridge, England
Anti-EEA1	BD Transduction Laboratories, California, USA
Anti-GAP43	Millipore Corporation, Billerica, USA
Anti-GAPDH	Novus Biologicals, Colorado, USA
Anti-GFAP	eBioscience, Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA
Anti-HSP60	SantaCruz Biotechnology, Texas, USA
Anti-IBA1	Wako, Fujifilm laboratory Chemicals, Virginia, USA
Anti-Ki67	CellSignaling Technology, Massachusetts, USA
Anti-Lamin B1	GeneTex, California, USA

Anti-MAP2	Millipore Corporation, Billerica, USA
Anti-MMP9	Abnova, Taipei, Taiwan
Anti-NCAM1	Abcam, Cambridge, England
Anti-Nestin	Abcam, Cambridge, England
Anti-Neun	Millipore Corporation, Billerica, USA
Anti-NFH	Abcam, Cambridge, England
Anti-NGF	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti-Nitrotyrosin	Cayman, Michigan, USA
Anti-Nrf2	SantaCruz Biotechnology, Texas, USA
Anti-Nur77	CellSignaling Technology, Massachusetts, USA
Anti-Otx2	Abcam, Cambridge, England
Anti-p44/42 MAPK	CellSignaling Technology, Massachusetts, USA
Anti-Pax6	Abcam, Cambridge, England
Anti-PCNA	Dako Denmark A/S, Glostrup,
Anti-Phospho-p44/42 MAPK	CellSignaling Technology, Massachusetts, USA
Anti-PSD95	GeneTex, California, USA
Anti-Sox2	Abcam, Cambridge, England
Anti-SYP	Abcam, Cambridge, England
Anti-SYP	Millipore Corporation, Billerica, USA
Anti-TNF α	Millipore Corporation, Billerica, USA
Anti-TrkB	CellSignaling Technology, Massachusetts, USA
Anti-Tuj1	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti-Vimentin	GeneTex, California, USA
Basal Medium Eagle (BME) GIBCO	Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA
BioWhittaker's® DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Lonza, Verviers, Belgium

Bovint serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bromfenolblå	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Deoksyribonuklease I (DNase I)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dimetyl sulfoksid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dinatriumhydrogenfosfatdihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Donkey anti-goat	LI-COR, Nebraska, USA
Donkey anti-rabbit Alexa488	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, England
Donkey anti-rabbit IgG-HPR	LI-COR, Nebraska, USA
Elfo-buffer	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
Etanol	Arcus ASA, Gjelleråsen, Norge
Fenolrødt	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fenylmetansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Føtalt kalveserum (FBS)	Biowest, Frankrike
GELTREX™ LDEV-Free, hESC-Qualified, Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix	Thermo Scientific, Rockford, USA
Glukose	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Glyserol (85%)	VWR International Ltr., Randor, PA, USA
Goat-anti-mouse Alexa 594	Invitrogen Company, California, USA
Goat anti-mouse Cy5	Abcam, Cambrigde, England
Goat anti-mouse IgG-HPR	LI-COR, Nebraska, USA
Hydrogenperoksid (H_2O_2)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hydrogenklorid (HCl)	VWR International Ltr., Randor, PA, USA
Humant transferrin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Insulin I6634	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kaliumhydrogenfosfat (KH_2PO_4)	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Kaliumklorid (KCl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Kalsiumklorid (CaCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Kyllingserum (varmeinaktivert)	Biowest, Nuaille, Frankrike
Leupeptin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
L-glutamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Magnesiumsulfat (MgSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Metanol	Honeywell, Seelze, Tyskland
MTT (3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
N-2 supplement	Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA
Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO)	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Natriumhydroksid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Natriumklorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Natriumortovanadat (NaVO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumpyruvat	Gibco Life Technologies, Paisley, UK
Natriumselenitt	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Paracetamol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin-Streptomycin (10 000 U/mL - 10 mg/mL)	Invitrogen Company, California, USA
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Poly-L-lysin hydrobromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ponceau S fargeløsning	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Precision Plus Protein™All Blue Standards	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Precision Plus Protein™Dual Color Standards	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Putrescin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
SDS (natrium-dodecylsulfat)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Sterilt vann	Fresenius Kabi, Halden, Norge
TGS (Tris/Glysin/SDS), 10X	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Trans-Blot®Turbo™ 5X Transferbuffer	Bio-Rad Laboratories Inc., USA

Tris base (tris[hydroksyetyl]aminometan)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsinhemmer	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
VECTASHIELD® Vibrance™ Antifade Mounting Medium with DAPI (H-1800)	Vector Laboratories, CA, USA

2.2 Oversikt over utstyr og apparatur

Tabell 2.2 Utstyr og apparatur	
Produkt	Leverandør
2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems
Alkotip®	Medguard, Irland
Autoklav (Matachana 350 L-2)	Thune, Norge
Biosphere® Filter Tips	Sarstedt, Tyskland
Blottemaskin (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System)	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Blotteutstyr (Trans-Blot® Turbo™ RTA Transfer Kit)	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Brett, 96 brønner, gjennomsiktige (Nunc™)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Brett, 96 brønner, svarte med blank bunn	Corning Inc. NJ, USA
Cellekulturflaske 175 cm ² (Nunc™)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Cellekulturskåler (Nunc™)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Celleskraper	Corning Incorporated, NY, USA
Cellestoff 20x20 cm	Mediq Norge AS, Kløfta, Norge
CLARIOstar® plateleser	BMG Labtech, Tyskland
CO ₂ - inkubatorskap (ThermForma SteriCycle)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

Elektroforeseapparat (BioRad Power Pac 300)	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
Elektroforesekar	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
Engangsskalpell	Swann-Morton Ltd.,Sheffield, England
Engangssprøyter	B.Braun, Vestskogen, Norge
Engangssprøyter	Terumo Europe, Leuven, Belgia
Eppendorfrør	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
EssenBioScience IncuCyte S3	Sartorius AG, Tyskland
Finpipette	Thermo Scientific, Rockford, USA
Finvekt (CPA225D)	Sartorius AG, Tyskland
Finvekt (XSE)	Mettler Toledo, Columbus, USA
Grovvekt (A&D HF 200G)	A&D Instruments, Japan
Kanyler	B.Braun, Vestskogen, Norge
Kjølesentrifuge (Heraeus Fresco 21)	Thermo Scientific, Rockford, USA
LAF-benk (Holten LaminAir, modell 1.2)	Eco Holten AS, Danmark
Lysmikroskop (TMS 2.2.1)	Nikon, Japan
Magnetrører (RCT basic)	IKA®, Tyskland
Mini-PROTEAN® TGX™ Gel med 4-20 % gradient	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
MQ-vannapparat (MilliQ 5)	Merck, Darmstadt, Germany
Multipipette	Thermo Scientific, Rockford, USA
Multiply® µStrip (0.2 mL)	Sarstedt, Tyskland
Neubauer 0.100 mm Tiefe Depth Profondeur (tellekammer)	Assistant,Tyskland
Odyssey-CLx Imaging System	LI-COR, Nebraska, USA
Petriskåler	Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA
pH-meter	Methrom, Sveits
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
Pipette Boy Costar Corning	Corning Inc, NJ, USA

Pipettespisser med filter (Sarstedt)	AG & Co, Nümbrecht, Tyskland
Rugeskap (Ova Easy Advance II series)	Brinsea®, USA
Rulle (Stuart Rollermixer SRT9)	Bibby scientific Ltd., Staffordshire, UK
Sentrifuge	Beckman Coulter, Indianapolis, USA
Sentrifuge (Kubota 2010)	Kubota Corp., Japan
Sentrifugerør (Corning centristar)	Corning Inc. NJ, USA
Sterilfilter 0,2 µm	Whatman, Tyskland
Store petriskåler	VWR International Ltr., Randor, PA, USA
Tellekammer (Bürcher)	VWR International Ltr., Randor, PA, USA
Trypsineringsflaske	Bellco, USA
Vannbad (Sub Aqua 12)	Grant, England
Varmeskap	Termaks Bergen, Norge
Whirlmikser	Terumo lab AS, Sverige

2.3 Preparering av lillehjerne og korncellekultur fra kyllingembryo

Befruktede egg (*Gallus gallus*) ble anskaffet fra Nortura Samvirkekylling, Våler. Eggene ble deretter lagt i svaleskap i inntil syv dager før de ble overført til rugeskap. I rugeskabet ble eggene vendt regelmessig, annenhver time, for å etterlikne den naturlige rugeprosessen. I løpet av inkuberingsperioden var temperaturen 37-39°C og den relative luftfuktigheten 45%. De befruktede eggene ble tatt ut fra rugeskabet på embryonaldag 17 (E17). Antall egg som ble tatt ut, samt nøyaktig temperatur og luftfuktighet på dette tidspunktet, ble loggført. Normal utklekkingstid er E21. Forsøkene i oppgaven er godkjent av Mattilsynet (FOTSid 13896).

2.3.1 Forbehandling av skåler og plater til korncellekultur

Skåler eller plater som skulle brukes til eksperiment ble forbehandlet med poly-L-lysin (PLL) dagen før bruk. PLL har vist seg å være egnet til kyllingkornceller og bidrar til økt celleadhesjon

og vekst. I immunofluoresens eksperimentene ble forbehandlingen først utført med Geltrex. Deretter ble det byttet over til en kombinasjon av PLL og fibronektin.

Ved forbehandling med PLL ble 10 mL MQ-vann tilsatt 5 mg PLL for å lage en løsning med konsentrasjon 0,5 mg/mL. Løsningen ble videre fortynnet til en sluttkonsentrasjon på 0,01 mg/mL. PLL-løsningen ble pipetert over i skåler og/eller plater som skulle benyttes. Til 35mm-skåler, 60mm-skåler og 96-brønnsplater ble det pipetert henholdsvis 1 mL, 5 mL og 100 µL/brønn. PLL-løsningen ble fjernet etter 30-60 minutter, før skålene og/eller platene forble stående i LAF (laminar air flow)-benk med maksimal luftstrøm over natten. Ved forbehandling med både PLL og fibronektin, ble alt utført på samme dag. Fibronektin var på forhånd alikvotert i 6 µL stocks i MQ-vann, med en konsentrasjon på 1 mg/mL. Ved bruk til forbehandling ble 1 alikvot løst ut 1:1000 i kald PBS. Etter fjerning av PLL, ble 50 µL fibronektinløsning umiddelbart pipetert i hver brønn for å unngå aggregering. Plater med fibronektin ble inkubert ved 37°C og 5% CO₂ i 1 time, før løsningen ble pipetert ut og celler i utplatingsmedium (tabell 2.6.) ble pipetert ned i brønnene.

Ved forbehandling med geltrex ble stockløsningen løst ut 1:100 med iskald PBS (tabell 2.3) og pipetert i hver brønn i 96-brønnsplatene. Disse ble satt til inkubasjon ved 37°C og 5% CO₂ i 2 timer, før løsningen ble pipetert ut.

Tabell 2.3 Tillaging av fosfatbufret saltvann (PBS)	
Komponent	Sluttkonsentrasjon
NaCl	138 mM
KCl	2.7 mM
KH ₂ PO ₄	2 mM
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	10 mM
MQ-vann	ad 4000 mL
HCl/NaOH ble brukt for å justere pH til 7,4.	
Løsningen ble autoklavert og oppbevart ved 2-8°C.	

2.3.2 Preparering av korncellekultur fra kyllinglillehjerne

Utstyret som skulle brukes ble sterilisert og autoklavert i forkant av prepareringen. Eggene ble tatt ut av rugeskallet på E17 og antallet ble loggført. Kyllingembryoene ble bedøvet ved at eggene ble lagt på is i 7 minutter. Deretter ble hvert egg nedsunket i 70% etanol for desinfeksjon av overflaten, før eggene ble klekket på en 14 cm petriskål. Kyllingembryo ble avlivet umiddelbart ved dekapitering med steril skalpell utenfor LAF-benk.

Kyllinghodene ble deretter satt inn i LAF-benk hvor lillehjernene ble tatt ut og lagt i en steril petriskål tilsatt litt av løsning 1 (tabell 2.4 og 2.5). Når alle lillehjernene var høstet, ble hjernehinnene og eventuelle synlige blodårer fjernet ved hjelp av en steril spatel på en glatt overflate. Rensede lillehjerne ble lagt i en ny, steril petriskål med løsning 1 (tabell 2.4 og 2.5), som til slutt ble fjernet. Lillehjernene ble deretter samlet i midten av petriskålen, og kuttet med en steril skalpell i to retninger vinkelrett på hverandre. Etter dette ble 10 mL av løsning 1 tilsatt petriskålen med lillehjernene og alt ble overført til et 50 mL rør som ble sentrifugert ved 1000 rpm i 1 minutt i Kubota 2010 "swing-out" bordsentrifuge. Innholdet av Mg^{2+} i løsning 1 gjør at nevronene beskyttes mot eksitotoksisitet mens de prosesseres, noe som hovedsakelig medieres av NMDA-reseptorer hvor Mg^{2+} er en kanalblokker [55]. Mg^{2+} bidrar dessuten også til nervecelleproliferasjon- og differensiering [56].

Etter sentrifugeringen ble supernatanten fjernet og 8 mL av løsning 2 (tabell 2.4) ble tilsatt. Trypsin i løsning 2 bidrar til kløyving av proteiner og dannelsen av en nervecellesuspensjon [57]. Det ble pipettert forsiktig opp og ned for å løse opp pelleten, før cellesuspensjonen ble overført til en steril trypsineringsflaske som ble satt i vannbad ved 37°C i 15 minutter. Korken på trypsineringsflasken ble satt løst på for at cellene skulle ha tilgang til oksygen. Flasken ble rystet forsiktig jevnlig.

Cellesuspensjonen ble deretter overført fra trypsineringsflasken til et sterilt 50 mL rør som allerede var fylt med 15 mL av løsning 4 (tabell 2.4). Denne løsningen består av trypsininhibitor som skal hindre ytterligere proteinkløyving. Lyserte celler som følge av trypsin frigjør DNA som gjør at cellene klumper seg sammen. På grunn av dette består løsning 4 også av DNase 1 som forhindrer denne sammenklumpingen [58]. Røret ble fylt helt opp med løsning 4, før det ble sentrifugert ved 1000 rpm i 2 minutter. Dersom supernatanten ikke var klar, ble en liten mengde av løsning 3 (tabell 2.4) tilsatt, før løsningen ble sentrifugert på nytt.

Supernatanten ble fjernet fra røret og 3 mL av løsning 3 ble tilsatt for å løse opp pelleten. Det ble pipettert opp og ned med en steril stripette 15-20 ganger. Suspensjonen stod deretter i ro i noen minutter slik at eventuelle celleklumper kunne sedimentere. Den øverste klumpfrie delen av suspensjonen ble deretter overført til et sterilt 50 mL rør med 15 mL av løsning 5 (tabell 2.4). Dersom det var noen klumper tilstede ble 2 ml av løsning 3 tilsatt celleduspensjonen, før det ble pipettert opp og ned 15-20 ganger på nytt. Dette ble gjort frem til løsningen var klumpfri. Deretter ble den overført til røret med løsning 5 og sentrifugert ved 900 rpm i 7 minutter. Til slutt ble supernatanten fjernet og 10 mL utplatingsmedium (tabell 2.6) tilsatt for å løse opp pelleten. Celleduspensjonen ble blandet godt.

For å bestemme celledettheten ble 10 μL celleduspensjon fortynnet til 100 μL med platemedium, og 20 μL av fortynningen ble overført til et Neubauer tellekammer, og telt under mikroskop. Minst tre felt ble telt og tatt gjennomsnitt av, og celledetthet ble beregnet utfra dette. Deretter ble beregnet mengde celleduspensjon fortynnet med platemedium i et sterilt rør til ønsket celledetthet på $1,7 \cdot 10^6$ celler/mL. Celleduspensjonen ble pipettert over til skåler og/eller brett som skulle brukes i eksperiment og ble inkubert ved 37°C og 5% CO_2 . 24 timer senere ble platene og/eller skålene eksponert for behandling i ernæringsmedium (tabell 2.7).

Tabell 2.4 Tillaging av løsninger brukt til å preparere kyllingkorncellekultur

Løsning	Komponent	Mengde
Løsning 1	Bovint serumalbumin	1,5 g
	Krebs Ringer løsning 10X* (tabell 2.5)	50 mL
	MgSO ₄ (38,2 mg/ml destillert vann)	4 mL
	Destillert vann	ad 500 mL
Løsning 2	Trypsin	25 mg
	Løsning 1	100 mL
Løsning 3	Trypsinhemmer	26 mg
	DNase 1	6.2 mg
	MgSO ₄ (38,2 mg/ml destillert vann)	0.5 mL
	Løsning 1	ad 50 mL
Løsning 4	Løsning 1	100 mL
	Løsning 3	16 mL
Løsning 5	Løsning 1	40 mL
	MgSO ₄ (38,2 mg/ml destillert vann)	320 µL
	CaCl ₂ (12.0 mg/mL destillert vann)	320 µL

Løsningene ble tillagd rett før bruk og sterilfiltrert 0.2 µm i LAF-benk.
Løsning 1 ble laget i en erlenmeyerkolbe med magnetrører.
Volumene gjelder for cellekultur med opptil 80 kyllingembryolillehjerner, og kan justeres.

Tabell 2.5 10X Krebs Ringer løsning	
Komponent	Sluttkonsentrasjon
NaCl	1.21 M
Glukose	0.14 M
NaHCO ₃	0.25 M
KCl	48 mM
KH ₂ PO ₄	12 mM
Fenolrødt	0.28 mM
Destillert vann	ad 500 mL
Løsningen ble sterilfiltrert 0.2 µm og oppbevart ved 2-8°C i opptil 6 måneder.	

Tabell 2.6 Utplatingsmedium til kyllingkorncellekultur		
Komponenter	Sluttkonsentrasjon	Mengde
Basal Medium Eagle (BME)	-	500 mL
Varmeinaktivert kyllingserum, lot: S69590D0500, Biowest	7.5%	37 mL
Penicillin-Streptomycin (10 000 U/ml – 10 mg/mL)	1%	5 mL
Insulin (1 mM)	100 nM	50 µL
KCl	22 mM	825 mg
L-glutamin	2 mM	146 mg
KCl og L-glutamin ble veid i et 50 mL rør, løst opp i mediet og sterilfiltrert 0.2 µm tilbake i medieflasken.		
Mediet ble oppbevart ved 2-8°C. Ved bruk ble det varmet opp ved 37°C.		

Tabell 2.7 Definert ernæringsmedium til kyllingkorncellekultur		
Komponent	Sluttkonsentrasjon	Mengde
Basal Medium Eagle (BME)	-	500 mL
Penicillin-Streptomycin (10 000 U/ml – 10 mg/mL)	1%	5 mL
Insulin	25 µg/mL	12.5 mg løst i 6.25 mL destillert vann med pH 2.0
KCl	22 mM	825 mg
L-glutamin	2 mM	146 mg
Humant transferrin	100 µg/mL	50 mg
Putrescin	60 µM	4.8 mg
Natriumselenitt (100 µM)	30 nM	150 µL
Trijodtyronin (T ₃) (20 µg/mL)	1 nM	17 µL
Tørrstoffene ble veid inn i et 50 mL rør, løst opp i mediet og steriltfiltrert 0.2 µm tilbake i medieflasken.		
Mediet ble oppbevart ved 2-8°C. Ved bruk ble det varmet opp ved 37°C.		

2.3.3 *In vitro* eksponering av kyllingkornceller

Kyllingkornceller ble eksponert for paracetamol i ulike konsentrasjoner; 100 µM, 200 µM, 400 µM, 800 µM, 1600 µM. De ble også eksponert for 10 µM cytosin β-D-arabinofuranosid (AraC) som kan brukes som en anti-mitotisk komponent.

2.4 SH-SY5Y-celler

2.4.1 Splitting og utplating av SH-SY5Y-celler

Cellekulturen måtte først mikroskoperes for å avdekke konfluensnivå. Ved omtrent 90% konfluens, kunne splittingen utføres. Gammelt medium ble først pipettert ut, og 10 mL PBS ble brukt for å vaske 175 cm² cellekulturflasken. Deretter ble det tilsatt 5 mL trypsin og 10 mL PBS (tabell 2.3). PBS bidrar til at trypsin fordeles jevnt i cellekulturflasken. Cellene ble så inkubert ved 37°C og 5% CO₂ i 5 minutter, før de ble mikroskopert for å kontrollere at cellene hadde løsnet. Dersom noen celler fortsatt satt fast i flaskebunnen, ble det banket hardt i flaskesidene.

Den tillagde cellesuspensjonen ble deretter overført til et 15 mL rør som ble sentrifugert ved 1000 rpm i 5 minutter. Supernatanten ble kastet og cellesuspensjonen tilsatt 5 mL komplett SH-SY5Y-medium (tabell 2.8). Pelleten ble løst opp ved å pipettere opp og ned med en steril stripette, og 1 mL av cellesuspensjonen ble overført til en cellekulturflaske rett etter dette. 19 mL komplett SH-SY5Y-medium ble tilsatt. Cellekulturflasken ble vendt forsiktig frem og tilbake slik at cellene ble fordelt jevnt, før de ble satt til inkubering ved 37°C og 5% CO₂.

Ved utplating til eksperiment ble 20 µL av cellesuspensjonen overført til et Neubauer tellekammer, og celletettheten ble estimert. Beregnet mengde cellesuspensjon ble deretter fortynnet med komplett SH-SY5Y-medium i et sterilt rør til ønsket celletetthet. Cellene ble først platet ut i ulike celletettheter (5000-40.000 celler/cm²) for å finne optimal celletetthet for differensiering og videre eksperimentering. Det viste seg etterhvert at 9375 celler/cm² var optimal celletetthet for SH-SY5Y-cellene, da høyere celletetthet resulterte i at cellene vokste inn i hverandre og førte til at det ble vanskelig å skille nevritter fra soma i mikroskop. Ved lavere celletetthet enn 9375 celler/cm² laget cellene ikke en nettverksstruktur. En celletetthet på 9375 celler/cm² ble derfor brukt for videre eksperimentering. Etter utplating ble skåler og/eller plater inkubert ved 37°C og 5% CO₂.

Tabell 2.8 Komplette SH-SY5Y-medium	
Komponent	Sluttkonsentrasjon i medium
Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM)	-
Føtalt kalveserum (FBS)	10%
L-Glutamin	2 mM
Natriumpyruvat (P)	1 mM
Penicillin-Streptomycin (PS)	1%
Tilberedelsen av mediet ble utført i LAF-benk. Glutamin kan felle ut etter oppvarming. Ved utfelling, ble løsningen blandet på vortexmikser. Mediet ble oppbevart ved 2-8°C, og varmet opp ved 37°C før hvert forsøk.	

2.4.2 Differensiering av SH-SY5Y-celler

Differensieringen ble først utført ved bruk av differensieringsmedium 1 (DM1) (tabell 2.9). Dette gjaldt spesifikt i immunofluorescensforsøket utført på dekkglass (2.7.6-2.7.8), hvor NTERA2-celler også var inkludert. Til DM1 ble det tilsatt 10 µM retinsyre (RA) og 50 ng/mL "brain derived neurotrophic factor" (BDNF) daglig.

Ved videre immunofluorescensforsøk ble differensieringsmedium 1 (DM1) (tabell 2.9) tilsatt 10 µM RA fra DIV0-DIV3, før dette ble byttet ut til differensieringsmedium 2 (DM2) (tabell 2.10) tilsatt 50 ng/mL BDNF fra DIV3-DIV6.

De fleste immunofluorescensforsøkene ble imidlertid utført ved bruk av DMEM/F12-medium med N2- og B27 supplementer (tabell 2.11) da dette viste seg å være optimalt for cellekulturen og ga nevrutvekst i større grad. Til dette mediet ble det tilsatt 10 µM RA fra DIV0-6 og 100 ng/mL BDNF fra DIV3-6.

Tabell 2.9 Differensieringsmedium 1 for SH-SY5Y-celler	
Komponent	Sluttkonsentrasjon
DMEM	-
Penicillin-Streptomycin (10 000 U/mL – 10 mg/mL) (PS)	1%
Glukose	25 mM
L-Glutamin	4 mM
Pyruvat	1 mM
Tilberedelsen av mediet ble utført i LAF-benk. Mediet ble oppbevart ved 2-8°C, og ble varmet opp ved 37°C før hver bruk.	

Tabell 2.10 Differensieringsmedium 2 for SH-SY5Y-celler	
Komponent	Sluttkonsentrasjon
Neurobasal medium	-
Penicillin-Streptomycin (10 000 U/mL – 10 mg/mL) (PS)	1%
Glukose	25 mM
GMAX	2 mM
N-2 supplement	1%
Tilberedelsen av mediet ble utført i LAF-benk. Mediet ble oppbevart ved 4°C, og ble varmet opp ved 37°C før hver bruk. Det ble kun laget 50 mL av gangen da N-2 kun er stabil ved 4°C i 2 uker.	

Tabell 2.11 Endelig differensieringsmedium for SH-SY5Y-celler	
Komponent	Sluttkonsentrasjon i medium
DMEM/F12	-
Penicillin-Streptomycin (10 000 U/mL – 10 mg/mL) (PS)	1%
Glukose	25 mM
GlutaMAX/L-Gln	4 mM
Pyruvat	1 mM
N-2 supplement	1%
B-27 supplement	2%
Supplementene ble tilsatt rett i mediet og det ble oppbevart ved 4°C. Det ble kun laget 50 mL av gangen da N-2 og B-27 kun er stabile ved 4°C i 2 uker.	

2.4.3 *In vitro* eksponering av SH-SY5Y-celler

På DIV6 ble SH-SY5Y-cellene eksponert for paracetamol i ulike konsentrasjoner; 100 µM, 200 µM, 400 µM, 800 µM, 1600 µM. Til mediet ble det også tilsatt 10 µM RA og 100 ng/mL BDNF, samt at det én gang ble tilsatt 2 mM valproat som en positiv kontroll for nervecelletoksisitet.

2.5 NTERA2-celler

2.5.1 Splitting og utplating av NTERA2-celler

Splittingen ble utført slik det er beskrevet under punkt 2.4.1. Til dette ble komplett NTERA2-medium brukt som er identisk til komplett SH-SY5Y-medium (tabell 2.8).

Ved utplating til eksperiment ble 20 μL av cellesuspensjonen overført til Neubauer tellekammer, og celletettheten ble estimert. Beregnet mengde cellesuspensjon ble deretter fortynnet med NTERA2-medium i et sterilt rør til ønsket celletetthet. Til differensiering ble det brukt 200 000 celler/ cm^2 . Utplatingen ble utført slik som i punkt 2.4.1, men med egnet medium.

2.5.2 Differensiering av NTERA2-celler

NTERA2-cellene ble differensiert ved bruk av 20 μM AraC og komplett NTERA2-medium som er identisk til komplett SH-SY5Y-medium (tabell 2.8). Cellekulturen ble mikroskopert for å undersøke hvorvidt cellene var klare for differensiering. AraC-differensiering ble igangsatt enten ved splitting og utplating av celler i en konsentrasjon på 200 000 celler/ cm^2 eller to dager etter 100% konfluens, hvilket ble vurdert å være oppnådd når det ble observert at cellelaget dannet ”fjellkjede”-liknende strukturer. Nødvendig mengde NTERA2-medium med AraC ble godt blandet i et 50 mL rør. Gammelt medium ble pipettert ut og erstattet med samme mengde av den tillagde løsningen. Det ble pipettert forsiktig ned og ikke rett på cellene for å forhindre at cellene løsnet. Flaskene og/eller brettene ble inkubert ved 5% CO_2 og 37°C.

Mediumbytte ble utført dersom mediet byttet farge fra rosa til oransje. Vanligvis skjedde dette kun de første få dagene etter oppstart av differensiering når flest celler var til stede. Celleantallet gikk nemlig nedover over tid gjennom differensieringsprosedyren, hvilket gjorde at totalt mediumbytte som regel ble utført på DIV2.

Som et ledd i differensieringsoptimalisering ble det undersøkt hvorvidt AraC-differensieringen var mediert via redoksprosesser eller om det var uavhengig av dette. Det er kjent at AraC induserer oksidativt stress, samt at andre differensieringsmetoder for NTERA2-celler også involverer oksidativt stress til varierende grad. Dette gjelder for eksempel ved RA-differensiering [59, 60]. Det viste seg dessuten at differensieringsprotokollen med AraC medførte hemmet eksport av proteiner fra ER til golgiapparatet, noe som ble antatt å skyldes

økt oksidativt stress i cellene. NTERA2-cellene ble derfor eksponert for komponentene i tabell 2.12. Som oksidativ kilde ble hydrogenperoksid (H_2O_2) brukt, mens β -merkaptoetanol ble brukt som reduserende agens.

Tabell 2.12 Komponenter brukt i differensiering av NTERA2-celler		
	Komponent	Konsentrasjon
Gruppe 1	AraC	20 μ M
Gruppe 2	AraC	20 μ M
	β -merkaptoetanol	100 μ M
Gruppe 3	H_2O_2	10 μ M
Gruppe 4	H_2O_2	10 μ M
	β -merkaptoetanol	100 μ M
Gruppe 5	β -merkaptoetanol	100 μ M

2.6 MTT-analyse

MTT-analyse er en kolorimetrisk metode og brukes for å måle en celledes metabolske aktivitet. Dette gjøres ved å se på hvorvidt MTT (3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid) reduseres til det tungtløselige, lillafargede stoffet formazan. Celler som har dødd vil ikke ha evnen til å kunne redusere MTT og analysen gir derfor indirekte informasjon om cellelevbarhet [61]. Til forsøket ble kyllingkornceller eksponert for paracetamol i ulike konsentrasjoner (2.3.3) og AraC 24 timer etter utplating, mens selve MTT-analysen ble utført 24, 48 og 72 timer etter eksponering. 3 ulike kontroller var dessuten inkludert: 1 AraC-fri kontroll, 1 AraC-kontroll og 1 kontroll med utplatingsmedium (tabell 2.6). Utplating av kyllingkorncellene og MTT-analysen ble utført i transparente 96-brønnsplater.

MTT ble løst opp i PBS til en ønsket konsentrasjon på 5 mg MTT/ml PBS i LAF-benk. For å utføre analysen ble 10 μ L MTT og 90 μ L definert ernæringsmedium (tabell 2.7) tilsatt hver brønn. Totalt mediumbytte ble utført for å unngå at hverken AraC eller paracetamol kunne ha noen kjemisk reduktiv effekt på MTT. Tilstrekkelig MTT og medium ble blandet i et 50 mL rør på forhånd. 96-brønnsbrettet ble deretter inkubert ved 37°C og 5% CO₂ i 3-4 timer.

Etter angitt tid ble løsningen i brønnene pipettert ut og det ble tilsatt 100 μ L DMSO til hver brønn, før 96-brønnsbrettet ble inkubert ved 37°C og 5% CO₂ i 30 minutter. DMSO bidrar til å løse opp cellemembranen på gjenværende celler, samt løse opp vannløselig formazan. Absorbansen av formazan ble til slutt avlest på plateleser ved 570 nm.

2.7 Immunofluorescens

Immunofluorescens (IF) er en analysemetode som brukes til å detektere antigener i ulike celletyper ved bruk av antistoffer. Antigenene kan detekteres både direkte og indirekte. I oppgaven ble det brukt indirekte deteksjon som involverer et primært antistoff og et sekundært antistoff som er konjugert til en fluorescerende komponent, et fluorokrom [62]. Prosedyren ble utført i 96-brønnsplater med sort ramme og på dekkglass. Alle ovennevnte celletyper; kyllingkornceller, SH-SH5Y- og NTERA2-celler undergikk tilnærmet samme prosedyre. Det var imidlertid kun SH-SH5Y- og NTERA2-cellene som ble plattet ut på dekkglass.

2.7.1 Metanolfiksering i 96-brønnsplate

Fiksering av cellene bidrar til at deres morfologi og struktur bevares gjennom hele prosedyren. Dessuten fører fiksering til inaktivering av proteaser slik at cellulære proteiner forblir intakte. Metanol er et organisk løsemiddel som har en dehydrerende effekt ved at det erstatter vann og fører til utfelling av intracellulære proteiner, samt reduksjon i total cellediameter [62]. Celledisken blir mer permeabel. Cellene ble fiksert i -20°C metanol i 10 minutter ved 4°C. Deretter ble cellene vasket 3 ganger med TBS (tabell 2.13.) med 0.05% Tween.

Tabell 2.13 Trisbufret saltvann (TBS)	
Komponent	Sluttkonsentrasjon
Trisbase	2.45 g/L
NaCl	8.0 g/L
MQ-vann	Ad 1 L
HCl/NaOH ble brukt for å justere pH til 7.6.	

2.7.2 Paraformaldehydfiksering i 96-brønnsplate

Paraformaldehyd (PFA) er et fiksativ som kryssbinder proteiner og danner intermolekylære bindinger via frie aminogruener [62]. Til paraformaldehydfiksering av cellene ble det brukt 4% PFA i PBS med 1% bovint serumalbumin (BSA). BSA bidrar blant annet til å bevare nevrittenes struktur gjennom fikseringsprosedyren. Cellene ble fiksert i 10 minutter ved romtemperatur (RT), før de ble vasket med PBS eller TBS.

2.7.3 Permeabilisering i 96-brønnsplate

Permeabiliseringstrinnet er vesentlig for at antistoffene skal kunne nå sine intracellulære antigentargets. Ved metanolfiksering ble dette trinnet imidlertid utelatt da metanol i seg selv er et permeabiliserende agens. Ved formaldehydfiksering forblir plasmamembranen derimot intakt, og permeabilisering måtte da utføres. Cellene ble i disse tilfellene inkubert i 0.1% TBS-Triton ved RT i 15 minutter. TBS-Triton permeabiliserer alle lipidlagene, samt kjernemembranen [62]. Deretter ble cellene vasket med PBS eller TBS 3 ganger i 5 minutter hver gang. Det ble pipettert 50 µL til hver brønn for hver overføring.

2.7.4 Blokkering i 96-brønnsplate

For å unngå bakgrunnsfluorescens og falskt positive resultater, er det viktig at antistoffene bindes til deres respektive antigeners epitop. Blokkering utføres for å forhindre uspesifikk binding av antistoffene, samtidig som det ikke skal påvirke den spesifikke bindingen [62]. Etter permeabiliseringstrinnet (2.7.3) ble 50 µL av 2.5% BSA i TBS med 0.05% Tween (TBS-Tween) tilsatt hver brønn i 96-brønnsplaten. Cellene ble blokkert ved RT i 1-2 timer eller ved 4°C over natten.

2.7.5 Antistoff-inkubasjon i 96-brønnsplate

Primære og sekundære antistoffer ble brukt for indirekte deteksjon av antigener. Etter blokkering over natt, ble cellene vasket med PBS eller TBS i 5 minutter. Deretter ble 50 µL av forhåndsblandede primære antistoffløsninger tilsatt og cellene ble ved RT i 1-2 timer eller ved 4°C over natten. Det ble først utført en pilotering på kyllingkornceller uten paracetamol, men hvor halvparten av en 96-brønnsplate ble tilsatt AraC, mens den andre halvparten ikke ble det. Dette ble utført for å finne optimal antistoffkonsentrasjon, samt for å undersøke hvor stor effekten av AraC var på nevronene sammenliknet med gliacellene. Til dette ble det brukt primære antistoffer fra kanin (r) og mus (m). To sekundærantistoffer konjugert til fluorokromer med hver sin forskjellige bølgelengde, grønn (488 nm) og rød (610 nm), ble brukt som signalforsterkere. Noen av antistoffene ble også testet i differensierte SH-SY5Y-celler, disse er merket med * i tabell 2.14.

Tabell 2.14 Antistoffer til titeringsstudier og videre bruk i immunofluorescensforsøk i 96-brønnsplater

Target	Vert	Leverandør, katalognr., lotnr.	Target	Vert	Leverandør, katalognr., lotnr.
Pax6 (*)	R	Abcam, ab195045	Nestin ₁ (*)	M	Abcam, ab22035
Otx2 (*)	R	Abcam, ab183951	Nestin ₂	M	Abcam, 6142
Sox2	R	Abcam, 97959, lot GR94709-6	Sox2 (*)	M	Abcam, ab79351
MMP9	R	Abnova, PAB12714, 1004-836	PCNA	M	Dako, M0879, lot 00051080
Ki67 (*)	R	CellSignaling 9129T, lot 3	NeuN ₁ (*)	M	MilliPore, MAB377, lot LV1746157
Tuj1 (*)	R	Sigma-Aldrich, A5316-.2, lot 051M4892	NeuN ₂	M	MilliPore, MAB377, lot 2279235
NFH (*)	R	Abcam, ab8135	Vimentin (*)	M	GeneTex, GTX629744
DCX (*)	R	Abcam, ab18723	NCAM1 (*)	M	Abcam, ab9018, lot GR282528-16
PSD95 (*)	R	GeneTex, GTX133091	MAP2	M	MilliPore, MAB378, lot LV1657471
GAP43 (*)	R	MilliPore, ab5220	SYP ₁ (*)	M	Abcam, ab8049
TrkB (*)	R	CellSignaling mAb 4603, lot 3	SYP ₂	M	MilliPore, MAB368
CB1 (*)	R	Abcam, ab23703, lot	GFAP (*)	M	eBioscience, 14-9892-82,

		GR291637-16			lot E12755-102
NGF	R	Sigma-Aldrich, N6655, lot 052K9060	p44/42 MAPK	M	CellSignaling 4696S, lot 22
Phospho-p44/42 MAPK	R	CellSignaling 4370S, lot 6	β-aktin (*)	M	MilliPore, A5316-.2, lot 096M4855V
Nrf2 (*)	R	SantaCruz sc-722, lot K1612	β2-spektrin (*)	M	BD Transduction Laboratories, 612562, lot 31528
cCas3 (*)	R	CellSignaling 9661L, lot 15	Nitrotyrosin (*)	M	Cayman, 189542, lot 20784a
Nur77 (*)	R	CellSignaling 39605, lot 1	HSP60	M	SantaCruz sc-59566, lot C1011
BCL-xL (*)	R	SantaCruz sc-7195, lot B2107	BCL-2 (*)	M	SantaCruz sc-7382, lot H1208
IBA1	R	Wako, 019-19741	EEA1 (*)	M	BD Transduction Laboratories, 610456, lot 61681
TNFα	R	MilliPore, ab1837p			
Sekundær-antistoff	Vert	Leverandør, katalognr., lotnr.	Sekundær-antistoff	Vert	Leverandør, katalognr., lotnr.
Anti-rabbit Alexa488	D	Jackson ImmunoResearch 711-545-152	Anti-mouse Cy5	G	Abcam, ab6563

2.7.6 Fiksering, permeabilisering og blokkering på dekkglass

Det ble utført fiksering med paraformaldehyd på dekkglass. Til dette ble 1 mL romtemperert PBS pipettert i kolonne 1, 4 og 5 i en 24-brønnsplate. I kolonne 2 ble det pipettert 1 mL romtemperert 4% PFA i PBS med 1% BSA som skulle brukes til fiksering i cellene. For å permeabilisere cellene ble det pipettert 1 mL TBS med 0.1% Triton-X100 i kolonne 3. I den siste kolonnen, kolonne 6, ble det pipettert 1 mL TBS med 0.05% Tween 20 og 2.5% BSA for blokkering av cellene. Ett dekkglass fra hver behandling ble radvis overført med en pinsett til kolonne 1. Dekkglassene ble deretter radvis overført til kolonne 2 hvor de ble inkubert i ved RT i 15 minutter. Fra kolonne 2 ble de så overført til kolonne 3 hvor de ble inkubert ved RT i 15 minutter. Etter dette ble dekkglassene radvis overført gjennom kolonne 4 og 5. Her ble de inkubert i 3 minutter i hver brønn (vasketrinn). Til slutt ble dekkglassene overført til kolonne 6 hvor de ble inkubert ved 4°C over natten.

2.7.7 Antistoff-inkubasjon på dekkglass

Et fuktighetskammer ble laget for å forhindre at antistoffløsningene (tabell 2.15) tørket ut, noe som videre ville ført til at cellene tørket ut. Dette ville ført til endringer i cellenes morfologi og bidratt til uønsket autofluorescens. Fuktighetskammeret ble derfor laget ved å dekke overflaten i en petriskål med parafilm, og sette fuktet papir langs ”veggene” i petriskålen. De primære antistoffløsningene ble deretter fortynnet til ønsket konsentrasjon i blokkeringsløsning. Undersiden av fuktighetskammeret ble merket med tall/navn slik at dekkglassene kunne plasseres på riktig antistoffløsning. 25 µL primær antistoffløsning ble overført til tilhørende plass på parafilmen. Dekkglassene ble snudd over på antistoffdråpene, med cellesiden pekende ned mot væsken, og ble inkubert i 1 time ved RT eller over natten ved 4°C.

Tabell 2.15 Antistoffer brukt i immunofluorescenseksperiment på dekkglass		
Primært antistoff	Fortynning	Leverandør, katalognr., lot.nr.
Anti-Nrf2	1:50	SantaCruz sc-722, lot K1612
Anti-Nitrotyrosin	1:50	Cayman 189542, lot 20784a
Sekundærantistoff	Fortynning	Leverandør, katalognr., lot.nr.
Donkey-anti-rabbit Alexa488	1:1000	Jackson ImmunoResearch 711-545-152
Goat-anti-mouse Alexa594	1:1000	Invitrogen A11032, lot 1826426

2.7.8 Montering av dekkglass til objektglass

Montering er et viktig trinn ved bruk av dekkglass slik at mikroskopering kan utføres. Monteringsløsningen bidrar dessuten til at cellene ikke dehydreres og tørker ut, hvilket kan ødelegge mikroskopbildene [62]. 5 µL VECTASHIELD DAPI monteringsløsning ble avsatt dråpevis på separate objektglass for hver celletype. Innholdet av 4',6-diamidino-2-fenylindol (DAPI) i monteringsløsningen gjorde at DNA også ble farget og dermed kunne identifiseres.

2.7.9 DNA-kvantifisering for normalisering av fluorescens

DNA-kvantifisering ble utført for å normalisere fluorescensen og korrigere for ulikt antall celler. Cellene ble først refiksert ved inkubasjon i 100 µL 70% etanol i 10 minutter ved RT. Deretter stod de til lufttørking i 30 minutter ved RT, før cellene ble inkubert i 100 µL av 3 µM DAPI i 20 mM Tris-HCl med 150 mM NaCl og pH 7, i 30 minutter ved RT på Belly Button. Cellene ble så vasket 3 ganger, i 2 minutter hver gang, med 200 µL løsning 1 (tabell 2.16). Etter dette ble pH justert ved bruk av 100 µL løsning 2 (tabell 2.16), før cellene ble inkubert i 120 µL løsning 3 (tabell 2.16) i 15 minutter ved RT. Til slutt ble 100 µL av hvert eluat overført til en ny 96-brønnsplate og absorbanse ble målt ved 370/460 nm. Hvert volum gjelder per brønn i en 96-brønnsplate.

Tabell 2.16 Løsninger brukt til DNA-kvantifisering	
Løsning 1	Sluttkonsentrasjon
CuSO ₄	2 mM
NaCl	0.5 M
Citratbuffer	20 mM
Tween	0.2%
Løsning 2	
Tris-HCl	20 mM
NaCl	150 mM
Løsning 3	
SDS	2%
Tris-HCl	20 mM
Løsning 1: HCl/NaOH ble brukt for å justere pH til 5. Løsning 2: HCl/NaOH ble brukt for å justere pH til 7. Løsning 3: HCl/NaOH ble brukt for å justere pH til 7.	

2.8 Westernblotting for proteinanalyse

Westernblotting er en veletablert metode brukt for å separere proteiner basert på molekylvekt, samt detektere de av interesse [63]. Etter separering på gel, overføres proteinene til en membran hvor proteinene kan bindes av antistoffer og identifiseres, samt kvantifiseres.

2.8.1 Preparering av cellelysater fra kyllingkornceller til westernblotting

Kyllingkornceller ble inkubert i 35 mm og/eller 60 mm skåler ved 37°C og 5% CO₂ i 24 timer og deretter eksponert for 100, 200, 400, 800 og 1600 µM paracetamol i 24, 48 og 72 timer (2.3.3.). Hvert sett med paracetamoleksponerte kyllingkornceller ble høstet hver dag i tre dager.

RIPA-buffer (150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% natriumdeoxycholat, 0.1% SDS, 25 mM Tris pH 7.4) ble laget i forkant av forsøket, alikvotert og fryst ved -20°C. PBS, RIPA-buffer, proteaseinhibitorer (tabell 2.17), 1.5 mL eppendorfrør, celleskraper, 1 mL sprøyter og 30G

sprøytespisser ble satt på is på forhånd og hele prosedyren ble utført på is. Dette måtte til for å forhindre denaturering av proteinene. Én skål/brønn ble håndtert av gangen. Proteaseinhibitorerne ble tilsatt til RIPA-buffer rett før bruk. Mediet ble først helt ut og skålen ble satt på is. Deretter ble den vasket med 1 mL iskald PBS, før 250 µL (100 µL ved bruk av 30 mm skål) iskald RIPA-buffer ble pipetert ned i skålen. Cellene ble så skrapet løse med en kald celledraske og overført til et kaldt 1.5 mL eppendorfrør. Den tillagde cellesuspensjonen ble trituret 3 ganger med en 1 mL sprøyte og 30G sprøytespiss slik at den ble homogenisert. Prøvene ble deretter sentrifugert ved 20000g i 15 minutter ved 4°C. Hver supernatant ble overført til nye, kalde 1.5 mL eppendorfrør og pelletene ble kastet. Til slutt ble supernatantene kokt ved 95°C i 5 minutter, før de ble fryst ved -20°C for korttidsoppbevaring eller ved -80°C for langtidsoppbevaring.

Tabell 2.17 Proteaseinhibitorer som tilsettes RIPA lyseringsbuffer	
Stockløsning	Sluttkonsentrasjon
Leupeptin (5 mg/mL)	1 µL/mL
Pepstatin A (1 mg/mL)	5 µL/mL
PMSF (100 mM)	3 µL/mL
Na ₃ VO ₄ (10 mM)	10 µL/mL
Proteaseinhibitorerne ble tilsatt opptil RIPA lyseringsbuffer umiddelbart før bruk.	

2.8.2 Proteinmåling ved bruk av "Pierce BCA protein assay kit"

Proteinmåling ble utført i forkant av westernblotting for å bestemme mengden protein i hver prøve. Til dette ble det først brukt "PierceTM BCA protein assay kit" for noen av lysatene.

Løsning A og B i kit'et ble blandet i et forhold 1:50. Av denne blandingen ble det pipetert 200 µL i hver brønn i en blank 96-brønnsplate. 2 mg/ml BSA ble fortynnet i PBS til en 0.5 mg/mL BSA standardløsning. Den tillagde standardløsningen ble pipetert i duplikater i 14 brønner: 0 µL, 1.25 µL, 2.5 µL, 5 µL, 10 µL, 20 µL og 40 µL. Deretter ble 5 µL av hver celleprøve tilsatt i tre paralleller. Prøvene ble blandet på whirlmixer før bruk, og kokt ved 95°C i 5 minutter dersom de var seige. Etter prøveavsetting, ble 96-brønnsplaten inkubert ved 37°C i 75 minutter.

Til slutt ble absorbansen målt ved 570 nm i plateleser. Ved bruk av absorbansen til standardløsningen ble det laget en standardkurve i Excel og proteinmengden ble bestemt.

2.8.3 Proteinmåling ved bruk av Nanodrop

Relativ proteinmengde ble funnet ved hjelp av Nanodrop i alle lysatene. Prøvene ble først varmet opp ved 95°C i 5 minutter, før de ble spunnet ned ved 13000 rpm i 1 minutt. Deretter ble 2 µL av hver prøve avsatt på Nanodrop og konsentrasjon i mg/mL ble avlest.

2.8.4 Gelelektroforese

Etter proteinmålingene ble gelelektroforese utført for å separere proteinene i de tillagde lysatene. Prøvene ble først kokt ved 95°C i 5 minutter, før det ble laget proteinjusterte prøver på 75 µL. Disse ble justert til å inneholde 25 µg protein/15 µL prøveløsning, i tillegg til 25% 4X Laemellibuffer (tabell 2.18), 5% 2-merkaptoetanol og MQ-vann. Til gelelektroforesen ble det brukt ferdigstøpte 4-20% Mini-PROTEAN® TGX™ geler. Gelen ble satt i et gelelektroforesekar som ble fylt opp med 1X TGS BioRad (Tris/Glycin/SDS) fortynnet fra 10X TGS BioRad (Tris/Glycin/SDS) med MQ-vann. Deretter ble 5 µL standardløsning Precision Plus Protein™ All Blue Standards avsatt i første brønn, etterfulgt av 15 µL fra hver proteinjustert prøve i hver sin brønn. Til slutt ble strømmen koblet til karet på 150 V i cirka 45 minutter, og koblet fra når den blå bromfenollinjen hadde nådd bunnen av gelen.

Tabell 2.18 4X Laemellibuffer		
Komponent	Sluttkonsentrasjon	Mengde
20% SDS	2%	25 mL
Glyserol 87%	20%	14.7 mL
Tris-HCl, pH 6.8	300 mM	9.4 mL
MQ-vann	-	0.9 mL
Bromfenolblå	-	Noen korn
Løsningen ble oppbevart ved RT.		

2.8.5 Blotting av gel til membran

Etter gelelektroforese (2.8.4) ble proteinene overført fra gelen til en nitrocellulosemembran. Til dette ble det brukt et elektrisk felt som ble satt vinkelrett på geloverflaten slik at de negativt ladde proteinene ble overført til membranen. En nitrocellulosemembran og to stabler med filterpapir ble fuktet i 1X Trans-Blot® blottebuffer som bestod av 1 del Trans-Blot® Turbo™ 5X transfer buffer, 1 del metanol og 3 deler destillert vann. 1 stabel med seks filtre ble først lagt i kassett tilhørende blottemaskinen Trans-Blot® Turbo™ fra BioRad, etterfulgt av nitrocellulosemembranen, gelen og en ny stabel med seks filtre på toppen. En liten plastrulle ble brukt til å fjerne luftboble mellom de ulike lagene, da luftbobler kan forhindre proteinoverføringen. Gelen ble til slutt blottet over til membranen ved 25 V og 2.5 A i 10 minutter i blottemaskinen.

2.8.6 Ponceaufarging

Nitrocellulosemembranen ble lagt i et kar med Ponceau S for å få en visuell bekreftelse på at proteinoverføringen ble vellykket. Ponceau S er negativt ladd og binder til proteinenes positivt ladde aminogrupeer og upolare områder [64]. Proteinene vises som røde bånd på membranen. Etter ponceaufargingen ble membranen vasket i et kar med destillert vann, og det ble tatt bilde av membranen. Til slutt ble den lagt i et 50 mL rør fylt med TBS-T med proteinsiden vendt innover.

2.8.7 Blokking og tilsetning av antistoffer

Før tilsetning av antistoffer ble membranen blokket for å forhindre uspesifikk binding av antistoffene. Til 50 mL røret med membranen ble det tilsatt 5 mL 1X TBS blandet med LI-COR blokkebuffer i forholdet 1:1. Membranen ble blokkert på rulle i 1 time. Etter dette ble blokkeløsningen helt ut og erstattet med TBS-T blandet med LI-COR blokkebuffer i forholdet 1:1. Til denne løsningen ble primært antistoff tilsatt i riktig fortynning (tabell 2.19) og membranen ble lagt til rulling over natt ved 2-8 °C.

Dagen etter ble løsningen helt ut og membranen ble vasket på rulle 3 ganger i 5 minutter hver gang med TBS-T. Passende sekundært antistoff ble deretter tilsatt membranen i riktig fortynning i TBS-T blandet med LI-COR blokkebuffer. Membranen ble så inkubert i 1 time, før samme vaskesyklus ble gjentatt, i tillegg til en siste vask med TBS (tabell 2.13).

Tabell 2.19 Antistoffer brukt til westernblotting		
Primært antistoff	Fortynning	Leverandør, katalognr., lotnr.
Anti-Tuj1	1:5000	Sigma, A5316-.2, lot 051M4892
Anti-Pax6	1:5000	Abcam, ab195045
Anti-DCX	1:5000	Abcam, ab18723
Anti- β 2-spektrin	1:5000	BD Transduction Laboratories, 612562, lot 31528
Anti-GAPDH	1:5000 1:500	Novus Biologicals, NB300-320
Anti-Lamin B1	1:5000	GeneTex, GTX103292
Sekundærantistoff	Fortynning	Leverandør, katalognr., lotnr.
Donkey anti-rabbit IgG-HPR	1:10 000	LiCOR, 926-32213, C90806-09
Goat anti-mouse IgG-HPR	1: 10 000	LiCOR, 926-32212, C90805-13
Donkey anti-goat-IR680	1: 10 000	LiCOR, 926-68974

De primære antistoffene anti-GAPDH og anti-Lamin B1 ble tilsatt til hver sin membran for å undersøke hvorvidt en av disse kunne brukes som intern standard.

Etter tilsetting av sekundært antistoff ble membranene fremkalt i Odyssey-CLx Imaging System fra LI-COR. Her ble den lagt med proteinsiden vendt nedover og fremkallingen foregikk over cirka 4 minutter.

2.8.8 Stripping av membran

Ved deteksjon av ulike proteiner med tilnærmet lik proteinvekt er det fordelaktig å strippe membranen. Dette bidrar til at tidligere påsatte antistoffer løsner slik at proteiner som allerede er detektert ikke gir signal ved ny fremkalling.

Membranen ble først vasket på rulle 3 ganger i 5 minutter hver gang med TBS-T. Deretter ble 5 mL Restore™ Plus Western blot Stripping Buffer tilsatt og røret ble lagt til rulling ved RT i 15 minutter. Strippebufferen ble så helt av, før samme vaskesyklus ble gjentatt og prosedyren ble fullført som vanlig (2.8.7).

2.9 Statistisk fremstilling

Grafiske fremstillinger av dataene, samt bestemmelse av signifikans er utarbeidet i GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA,USA). Beregninger av gjennomsnitt og standardavvik ble utført i Microsoft Excel, før dataene ble overført til Graphpad. Dataene ble analysert ved hjelp av *One Way Analysis of Variance (ANOVA) Dunnett's multiple comparisons test*. Alle dataene er presentert som gjennomsnitt±SEM. P-verdier < 0.05 ble ansett som statistisk signifikante. Disse er merket med * i figurene det gjelder.

3 Resultater

Første delmål for oppgaven var å undersøke hvorvidt celleviabilitet i kyllingkornceller ble påvirket av 24, 48 eller 72 timers paracetamoleksponering. I tillegg ble det undersøkt hvorvidt paracetamol kunne ha en proliferasjonshemmende effekt på kyllingkorncellene. Til dette ble det utført MTT-analyse (3.1).

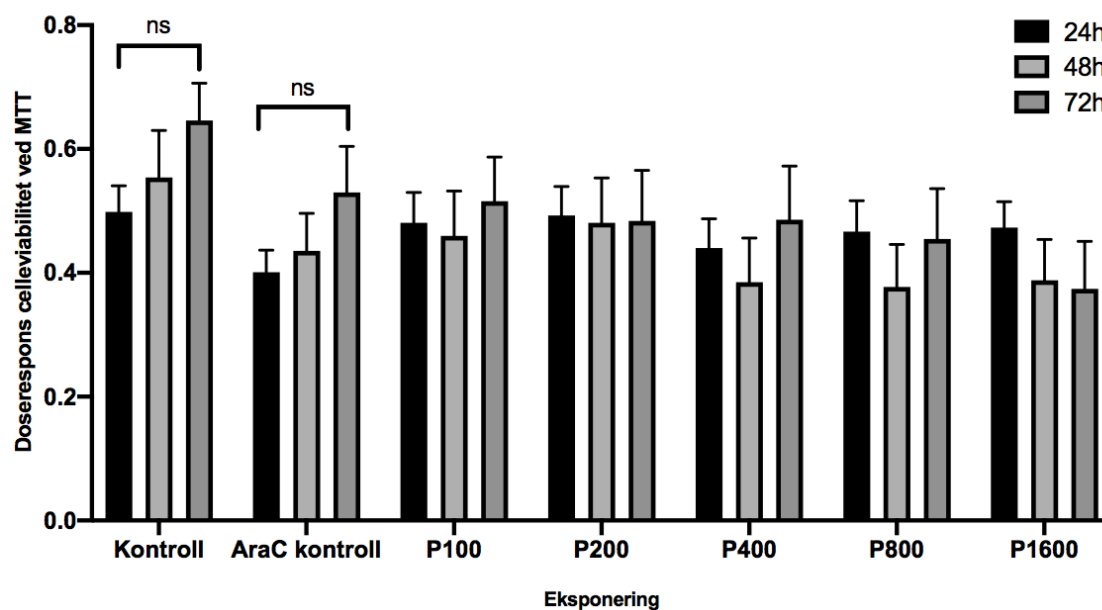
Videre ble ekspresjonsstudier utført i kyllingkornceller for å studere mulige effekter paracetamol kan ha på ulike proteiner, deriblant NeuN, Tuj1, DCX, NFH, Pax6 og GFAP. Til dette ble det utført immunocytokjemi og westernblotting (3.2).

Et annet delmål var å optimalisere differensieringsprotokoller for NTERA2- og SH-SY5Y-celler (3.3). Dette ble utført ved å teste ulike medier for cellene, samt ulike differensieringsagens. Fasekontrastbilder ble tatt med EssenBioScience IncuCyte S3.

For å kartlegge hvilke proteiner som uttrykkes i SH-SY5Y-, NTERA2- og PC12-celler ble det også utført immunocytokjemi i disse celletypene (3.4).

3.1 Celleviabilitet påvirkes ikke av paracetamol 72 timer etter eksponering

MTT-målinger ble utført for å undersøke hvorvidt celleviabilitet påvirkes i kyllingkornceller eksponert for ulike paracetamolkonsentrasjoner (100, 200, 400, 800 og 1600 μM) over en periode på 24, 48 og 72 timer. Kvalitativt så det ut til at paracetamol hadde en viss proliferasjonshemmende effekt på kyllingkornceller (figur 3.1) Dette kom frem ved at den kvalitative økningen i proliferasjon som ble vist fra 24 til 72 timer i kontroll- og AraC-kontrollcellene, ikke var til stede i de paracetamoleksponerte cellene. Statistisk sett ble det imidlertid vist at det ikke var en signifikant økning i celleviabilitet fra 24 til 72 timer i kontroll- og AraC-kontrollgruppene. Det ble heller ikke funnet en signifikant reduksjon mellom AraC kontrollgruppen og de paracetamoleksponerte gruppene (P100, P200, P400, P800 og P1600).



Figur 3.1 Celleviabilitet etter 24, 48 og 72 timers paracetamoleksponering. Kyllingkornceller ble eksponert for paracetamol i konsentrasjonene 100, 200, 400, 800 og 1600 μM , og MTT-analyse ble utført. Statistiske analyser er utført med *One Way ANOVA Dunnett's multiple comparisons test*, 4 repetisjoner per forsøk, $n = 4$. De ulike tidspunktene er sammenliknet med hverandre innad i hver gruppe. Dessuten er alle paracetamoleksponeringer innenfor samme tidspunkt sammenliknet med AraC kontroll. Dataene er presentert som $\text{gjennomsnitt} \pm \text{SEM}$.

3.2 Ekspresjonsstudier i kyllingkorncellekultur

Videre studier fokuserte på å finne mulige endringer i uttrykk av proteiner som er betydningsfulle for proliferasjon, differensiering og migrering av nevroner. Det ble derfor utført et konsentrasjonstitreringsforsøk til immunocytokjemi (3.2.1), før en rekke proteiner ble immunfarget i paracetamolbehandlede kyllingkornceller (3.2.2).

Westernblotting ble utført for å bekrefte immunofluorescensresultatene for Tuj1, Pax6 og DCX som alle er viktige proteiner for nervecelleutvikling (3.2.3). Forsøket ble utført én gang per antistoff i kyllingkornceller eksponert for ulike paracetamolkonsentrasjoner (100, 200, 400, 800 og 1600 μM) i 24, 48 og 72 timer. Alle proteinbånd er presentert uten tilhørende intern standard, da det i immunfargingen kom frem at paracetamoleksposering påvirket de vanligvis brukte intern standardene; Tuj1 og β -aktin (figur 3.2 og 3.3). Disse to ble derfor valgt bort, og det ble i stedet undersøkt hvorvidt GAPDH eller lamin-B1 kunne brukes som intern standard i kyllingkorncellene. Da de to sistnevnte antistoffene ikke ga synlige proteinbånd, er blottene presentert uten intern standard.

3.2.1 Titreringsstudier til immunocytokjemi

Titreringsstudiene ble utført for å avdekke hvorvidt de intracellulære proteinene ble synliggjort via immunfargingen, og hvilke konsentrasjoner som var nødvendige for å få til dette. Det ble i utgangspunktet brukt tre konsentrasjoner. Antistoffer som ikke ga optimal immunfarging ved noen av de tre konsentrasjonene, ble testet i høyere/lavere fortynningsgrad. Ved observasjon av svært sterk immunfarging ved alle tre konsentrasjoner, ble det testet lavere konsentrasjon, og motsatt dersom immunfargingen var svak/usynlig. For noen antistoffer ga testing av én konsentrasjon tilfredsstillende farging av target. Andre targets var imidlertid usynlige selv ved høye konsentrasjoner, dette kommer frem i tabell 3.1 Optimal antistoffkonsentrasjon ble valgt ut ifra hvorvidt den bidro til synlig farging av target, samtidig som fargingen ikke var så sterk at cellekropper og nevritter ikke var tydelige.

Tabell 3.1 Antistoffkonsentrasjoner for optimal immunfarging av proteiner i kyllingkornceller

Funksjon	Target	Vert	Optimal fortykning
Utvikling	Pax6	R	1:100
	Sox2	R	Svak ved 1:100
	Sox2	M	Svært svak opptil 1:25
	Otx2	R	Usynlig opptil 1:25
	Nestin ₁	M	Svært svak opptil 1:25
	Nestin ₂	M	Svak ved 1:100
Proliferasjon	PCNA	M	Svært svak ved 1:100
	MMP9	R	1:100
	Ki67	R	Usynlig opptil 1:400
Nevronal	NeuN ₁	M	Usynlig opptil 1:10
	NeuN ₂	M	1:100
	Tuj1	R	1:2000
	Vimentin	M	1:25
	NFH	R	1:200
	DCX	R	1:100
	NCAM1	M	Svært svak opptil 1:25
	MAP2	M	1:100
	PSD95	R	1:50
	SYP ₁	M	Usynlig opptil 1:5
	SYP ₂	M	Svak ved 1:100
	GAP43	R	1:100
Glial	GFAP	M	1:100

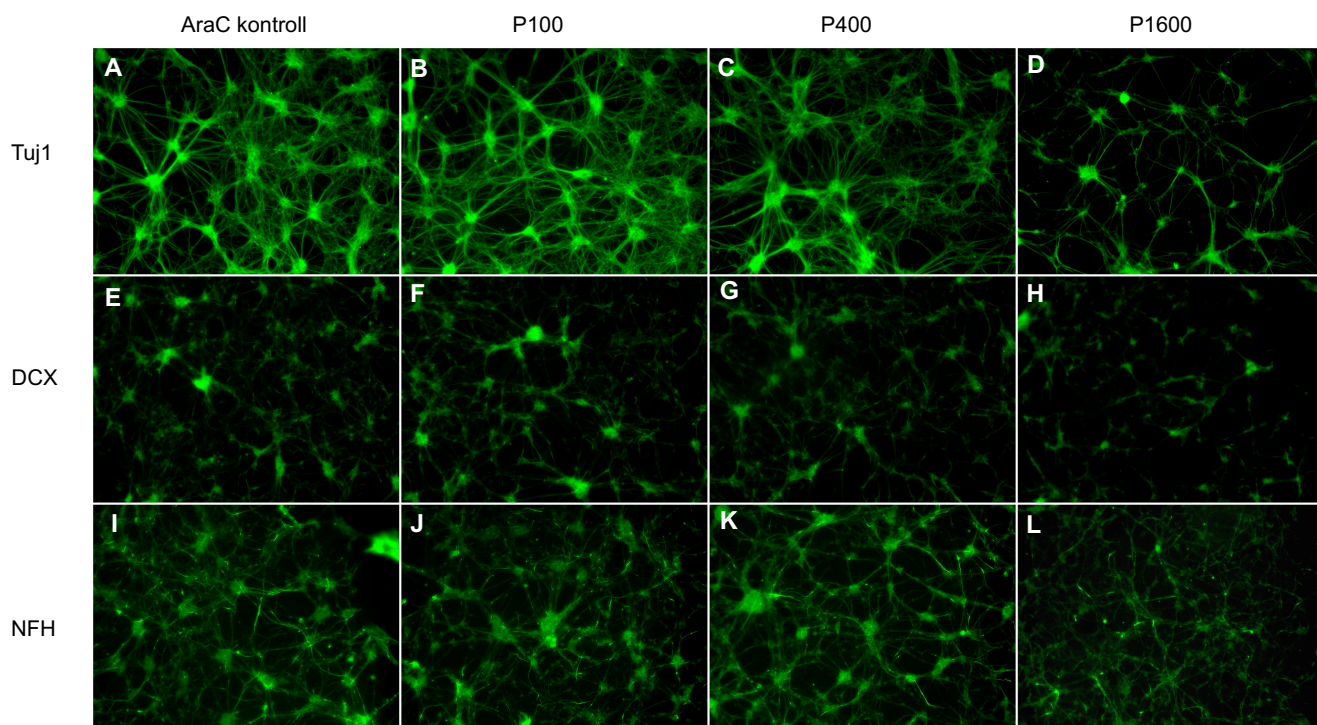
Signalerende	TrkB	R	Usynlig opptil 1:100
	CB1	R	1:25
	NGF	R	1:200
	p44/42 MAPK	M	Svært svak ved 1:100
	Phospho-p44/42 MAPK	R	Svak ved 1:100
Cytoskeletal	β -aktin	M	Svak ved 1:100
	β 2-spektrin	M	1:50
ROS/apoptose	Nrf2	R	1:25
	Nitrotyrosin	M	1:25
	HSP60	M	1:100
	cCas3	R	Svak opptil 1:100
	Nur77	R	Usynlig opptil 1:100
	BCL-xL	R	Svak opptil 1:50
	BCL-2	M	Usynlig opptil 1:50
	IBA1	R	1:100
	TNF α	R	1:100
Endosomal	EEA1	M	Usynlig opptil 1:100

3.2.2 Paracetamol fører til kvantitative endringer i proteinene Tuj1, DCX, β 2-spektrin og NFH ved immunocytokjemi

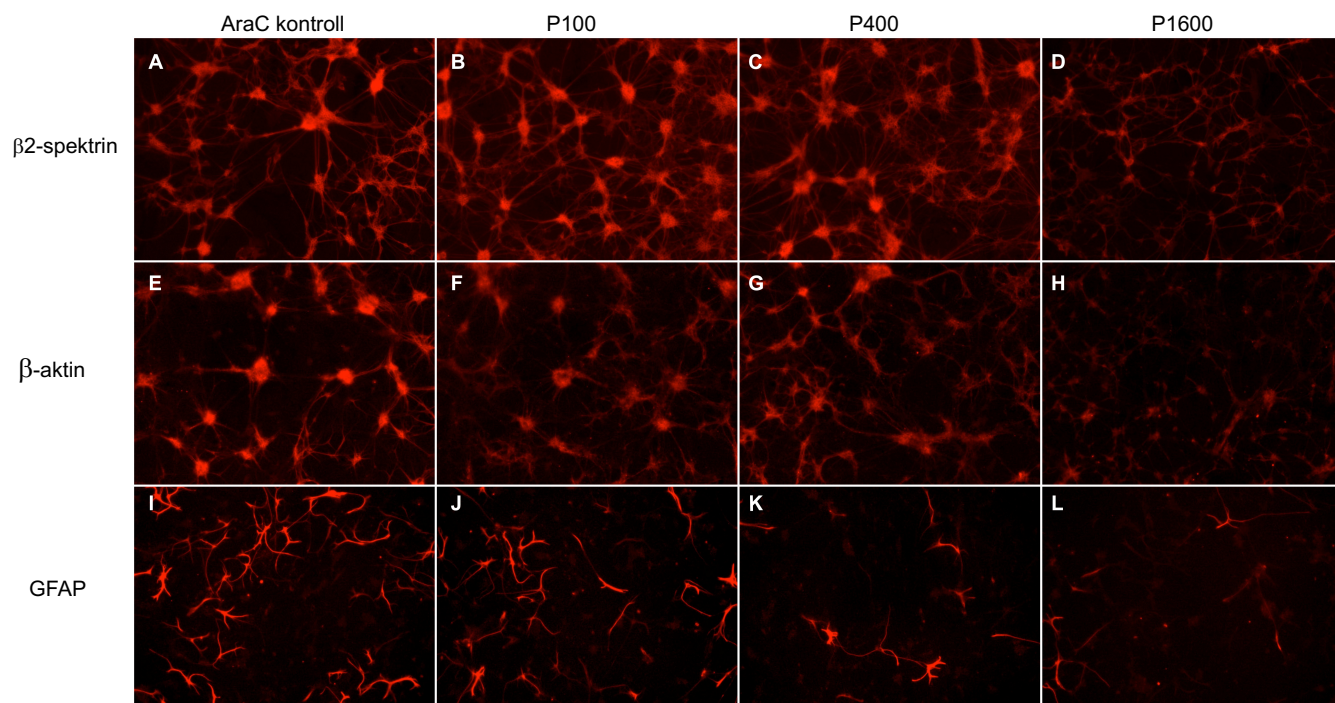
Basert på resultatene i titreringsstudiene (3.2.1) ble det valgt å gå videre med følgende markører; NeuN, DCX, NFH, PSD95, GAP43, Tuj1, MAP2, vimentin, Pax6, GFAP, β 2-spektrin og β -aktin. Immunfarging ble utført for å undersøke hvorvidt 72 timers paracetamoleksponering ville påvirke proteinuttrykk av disse. Immunofluorescensintensiteten ble kvantifisert for å avdekke hvorvidt det ble observert en signifikant reduksjon/økning i proteinekspresjon.

Immunfargingen viste en tendens til redusert uttrykk av proteinene Tuj1, DCX, NFH, β 2-spektrin, β -aktin og GFAP (3.2-3.3). For Tuj1 var dette tydeligst i immunfargingen for den høyeste paracetamolkonsentrasjonen hvor en strukturell degradering med proteinaggregering ble observert (figur 3.2). Kvantifiseringen viste imidlertid signifikant reduksjon både ved 1600 μ M, men også 800 og 200 μ M (figur 3.4). Andre nevronale proteiner hvor det både ble observert et redusert proteinuttrykk i immunfargingen og tilhørende kvantifisering, var DCX og NFH, i tillegg til det cytoskeletale β 2-spektrin. Dette gjaldt ikke for β -aktin og GFAP hvor kvantifiseringen viste en stabil proteinekspresjon, med ingen signifikante endringer sammenliknet med AraC kontroll.

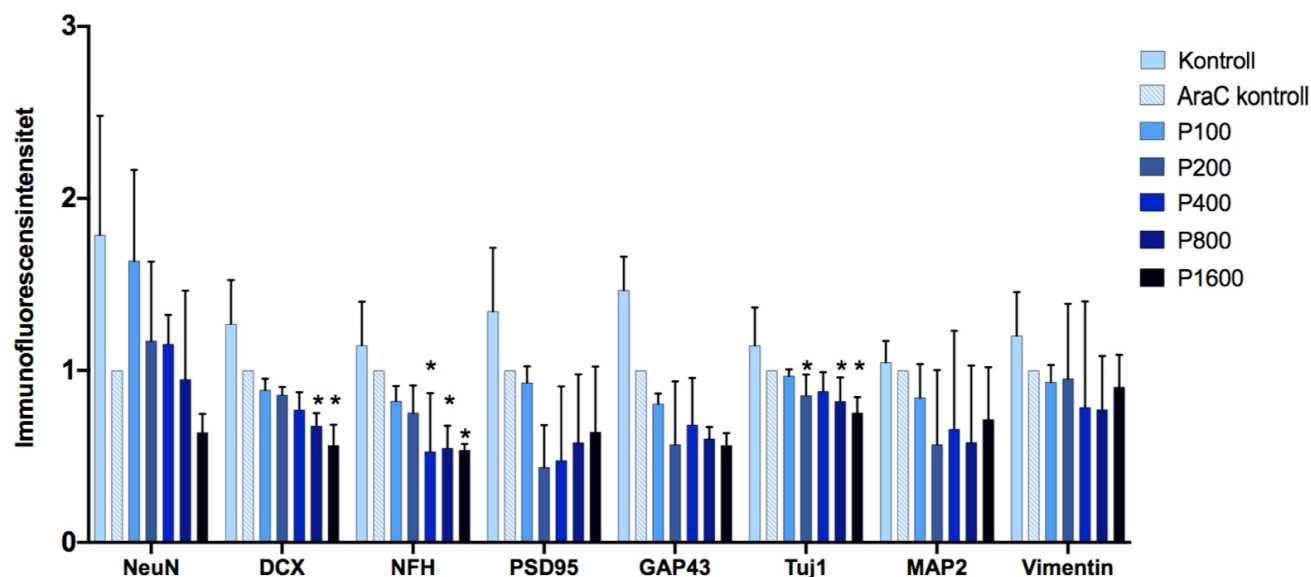
Videre kunne det også observeres tendenser til redusert proteinekspresjon av PSD95 og GAP43 i de paracetamoleksponerte cellene. For PSD95 virket det å være en økning ved økt paracetamolkonsentrasjon som samtidig var lavere enn AraC kontroll (figur 3.4). Dette ble ikke observert for GAP43. En tendens til reduksjon ble også observert for pax6, særlig ved den høyeste paracetamolkonsentrasjonen sammenliknet med AraC kontroll (figur 3.5). For proteinene NeuN og MAP2 ble det observert stabil proteinekspresjon (figur 3.4).



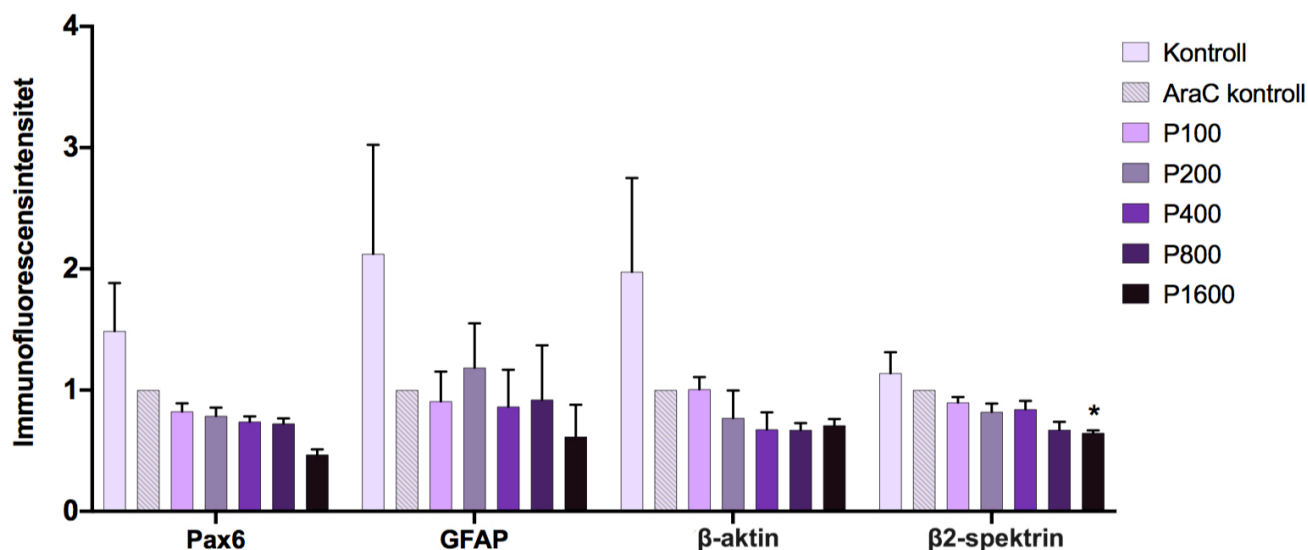
Figur 3.2 Immunfarging av de nevronale proteinene Tuj1, DCX og NFH i paracetamoleksponte kyllingkornceller. Kyllingkornceller ble eksponert for 100, 200, 400, 800 og 1600 μM paracetamol i 72 timer. Deretter ble de farget med antistoffer mot Tuj1 (A-D), DCX (E-H) og NFH (I-L). Bilder ble tatt ved bruk av grønn kanal i EssenBioScience InCuCyte S3.



Figur 3.3 Immunfarging av proteinene β 2-spektrin, β 2-aktin og GFAP i paracetamoleksponte kyllingkornceller. Kyllingkornceller ble eksponert for 100, 200, 400, 800 og 1600 μM paracetamol i 72 timer. Deretter ble de farget med antistoffer mot β 2-spektrin (A-D), β -aktin (E-H) og GFAP (I-L). Bilder ble tatt ved bruk av rød kanal i EssenBioScience InCuCyte S3.



Figur 3.4 Immunofluorescensintensitet for de nevronale markørene NeuN, DCX, NFH, PSD95, GAP43, Tuj1, MAP2 og vimentin målt i kyllingkornceller 72 timer etter paracetamoleksponering. Kyllingkorncellene ble eksponert for 100, 200, 400, 800 og 1600 μM paracetamol i 72 timer, og ble deretter immunfarget (figur 3.2). Fluorescens ble kvantifisert i en CLARIOSTAR-plateleser ved 6 ulike *orbital averaging* radiuser, hvilket resulterte i 371 *pointscans* per brønn, alle på forskjellige lokasjoner. Scanningen ble utført i triplikat og averages, og gjennomsnitt av disse ble brukt i videre beregninger. Dataene er normalisert til sine respektive AraC-kontroller og er presentert som gjennomsnitt \pm SEM.). Statistiske analyser er utført med *One Way ANOVA Dunnett's multiple comparisons test*, $n = 3$. Signifikans er vist ved p-verdi < 0.05 (*) sammenliknet med AraC-kontroll.



Figur 3.5 Immunofluorescensintensitet for Pax6, GFAP, β -aktin og β 2-spektrin i kyllingkornceller 72 timer etter paracetamoleksponering. Kyllingkorncellene ble eksponert for 100, 200, 400, 800 og 1600 μM paracetamol i 72 timer, og ble deretter immunfarget (figur 3.3). Fluorescens ble kvantifisert i en CLARIOSTAR-plateleser ved 6 ulike *orbital averaging* radiuser, hvilket resulterte i 371 *pointscans* per brønn, alle på forskjellige lokasjoner. Scanningen ble utført i triplikat og averages, og gjennomsnitt av disse ble brukt i videre beregninger. Dataene er normalisert til sine respektive AraC-kontroller og er presentert som gjennomsnitt \pm SEM.). Statistiske analyser er utført med *One Way ANOVA Dunnett's multiple comparisons test*, $n = 3$. Signifikans er vist ved p-verdi < 0.05 (*) sammenliknet med AraC-kontroll.

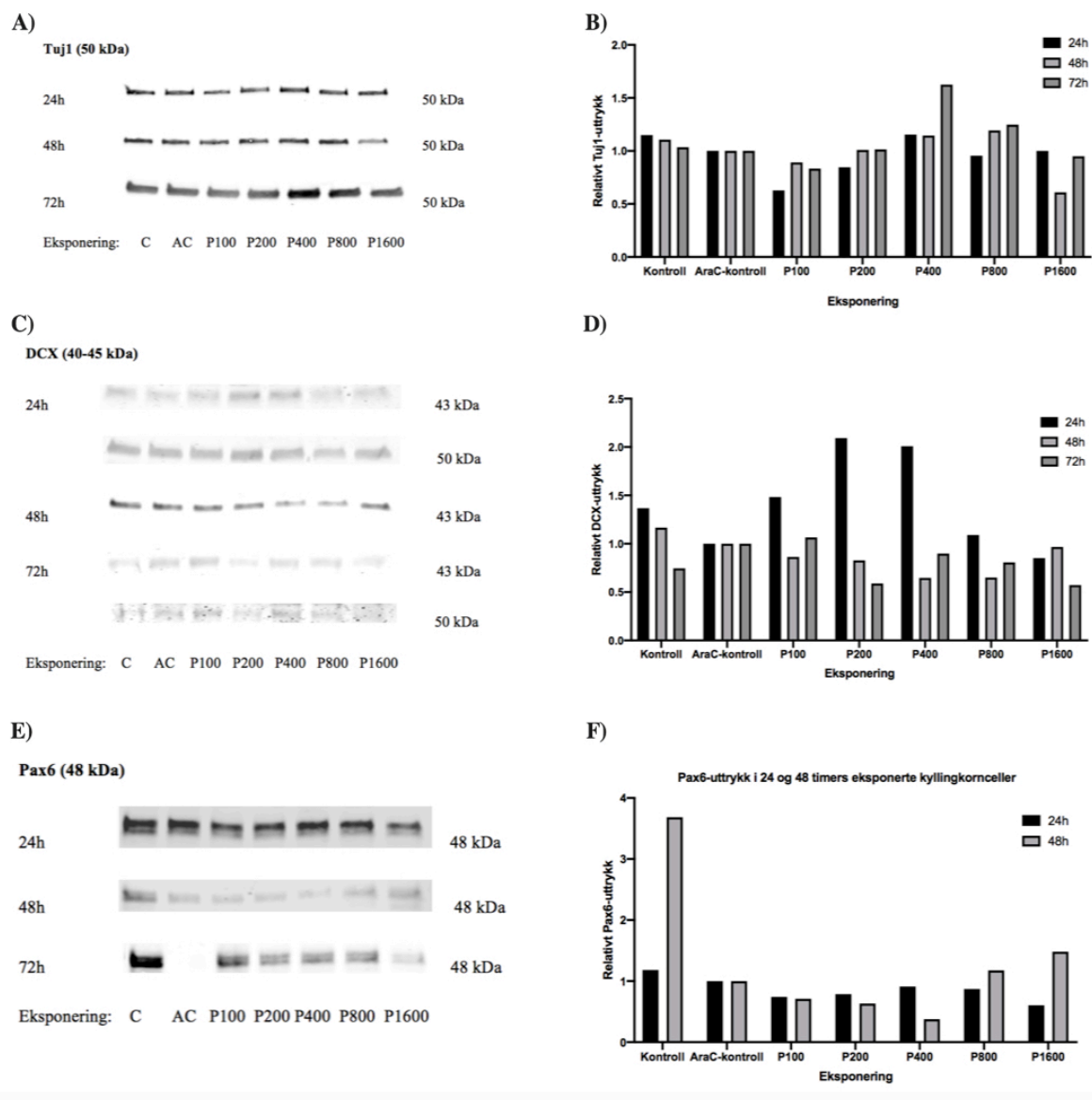
3.2.3 Kyllingkornceller eksponert for paracetamol uttrykker Tuj1, DCX og Pax6 analysert ved westernblott

Analyse av westernblott viste tydelig bånd for Tuj1 ved 50 kDa, dobbeltbånd for DCX ved 50 og 41 kDa og et tydelig bånd for Pax6 i 24-timers eksponerte kyllingkornceller, med noe svakere bånd i 48- og 72timerseksponerte kyllingkornceller.

Slik det kommer frem i figur 3.2, er Tuj1 et protein som uttrykkes i høy grad i kyllingkornceller. Dette ble bekreftet i westernblott hvor det ble detektert ett bånd spesifikt for Tuj1 ved riktig molekylvekt, 50 kDa (figur 3.6 A-B). Proteinene var uttrykt i et detekterbart nivå ved alle tidspunktene. Det var ikke store endringer i uttrykk av Tuj1 ved noen av tidspunktene etter paracetamoleksponeringen. Funnene i immunofluorescensforsøket hvor Tuj1 var redusert ved paracetamolkonsentrasjonene 200, 800 og 1600 μM ble derfor ikke bekreftet i dette ene westernblottet.

Ved fremkalling av membraner tilsatt anti-DCX, ble det detektert et dobbeltbånd; ett bånd ved riktig molekylvekt (43 kDa) og ett ved 50 kDa (figur 3.6 C-D). Dette gjaldt kun for kyllingkornceller eksponert for paracetamol i 24 og 72 timer. Ved 72 timers paracetamoleksponering så det ut som en tendens til redusert uttrykk av DCX. Funnene i immunofluorescensforsøket hvor DCX var redusert ved paracetamolkonsentrasjonene 800 og 1600 μM ble bekreftet i dette ene westernblottet.

For Pax6 ble det detektert spesifikke bånd ved riktig molekylvekt, 48 kDa, med et noe sterkere bånd etter 24 timers paracetamoleksponering, sammenliknet med 48 og 72 timers eksponering (figur 3.6 E-F). Det var kun kontrollcellene 48 timer etter eksponering som viste høyere uttrykk av Pax6. For paracetamoleksponeringene så det ikke ut til å være endringer hverken 24 eller 48 timer etter eksponering. Proteinbåndet ved 72 timer var svakt, og er slik i overensstemmelse med immunofluorescensforsøket som viste en tendens til reduksjon, men som ikke var signifikant.



Figur 3.6. Proteinuttrykk av Tuj1, DCX og pax6 i kyllingkornceller etter 24, 48 og 72 timers paracetamoleksponering. Kyllingkornceller ble eksponert for ulike paracetamolkonsentrasjoner (100, 200, 400, 800 og 1600 μ M) i 24, 48 og 72 timer, før det ble utført westernanalyse. **A)** Proteinbånd for Tuj1 ved 50 kDa med tilhørende eksponeringer i 24, 48 og 72 timer. **B)** Kvantifisering av proteinbånd ved 50 kDa. **C)** Proteinbånd for DCX ved 43 kDa med tilhørende eksponeringer 24, 48 og 72 timer. **D)** Kvantifisering av proteinbånd ved 43 kDa. **E)** Proteinbånd for Pax6 ved 48 kDa med tilhørende eksponeringer i 24, 48 og 72 timer. **F)** Kvantifisering av proteinbånd ved 48 kDa, 24 og 48 timer etter paracetamoleksponering.

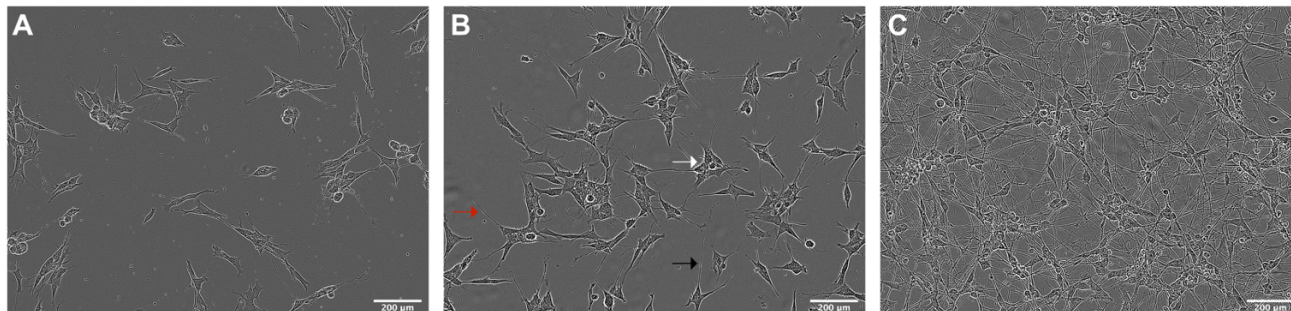
3.3 Testing av ulike differensieringsprotokoller for SH-SY5Y- og NTERA2-celler

For å etablere humane cellelinjer til senere studier av paracetamol var det ønskelig å optimalisere differensiering av cellelinjene SH-SY5Y (3.3.1) og NTERA2 (3.3.2). For å undersøke om ulike medietyper og differensieringskomponenter kunne ha en innvirkning på nevrutvekst, cellevolum og celleoverlevelse ble cellene differensiert under ulike forhold.

3.3.1 SH-SY5Y-celler

SH-SY5Y-cellene differensierer ved å sende ut utløpere og dette ble derfor observert som endepunkt. Det ble tatt fasekontrastbilder i mikroskop. Differensieringen av SH-SY5Y-cellene ble utført ved å teste ulike media og differensieringskomponenter. Det første mediet som ble testet var DM1 med daglig tilsetning av 10 μ M RA og 50 ng/mL BDNF i 6 dager. Deretter var det ønskelig å teste hvorvidt et bytte fra DM1 ved DIV0 til DM2 ved DIV3, ville gi noen endring i nevrutvekst og celleoverlevelse. DM1 ble tilsatt 10 μ M RA, mens DM2 ble tilsatt 50 ng/mL BDNF. Det ble også testet DMEM/F12-medium med supplementene N2 og B27, i tillegg til 10 μ M RA (tilsatt fra DIV0-6) og 100 ng/mL BDNF (tilsatt fra DIV3-6).

Bruken av sistnevnte differensieringsprotokoll ga mest reproducerbarhet i differensieringen av SH-SY5Y-cellene. Her ble det observert at de udifferensierte cellene hadde en flat fenotype og få nevrutter (figur 3.7 A). Ved DIV3 hadde cellene omtrent 40% flere nevrutter sammenliknet med bildeutsnittet før differensiering, men det var fortsatt ikke dannet synapser alle cellene imellom (figur 3.7 B). Ved DIV6 ble det imidlertid observert en større grad av arborisering som bidro til dannelsen av et stort nettverk av SH-SY5Y-cellene. Cellene hadde dessuten klumpet seg mer sammen, og hver celle hadde sendt ut flere utløpere (figur 3.7 C).

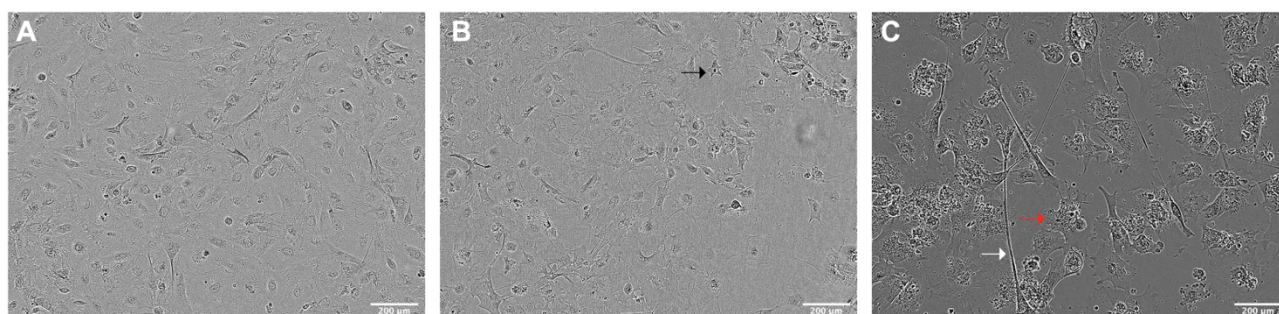


Figur 3.7 Fasekontrastbilde av SH-SY5Y-celler ved optimalisert differensieringsprosedyre. Hvit pil peker på en cellekropp, mens svart pil peker på utløper fra en annen cellekropp. Rød pil peker på utløper som ikke har dannet forbindelse med en annen nervecelle. **A)** Før differensiering i komplett SH-SY5Y-medium. **B)** DIV3 i F12-medium tilsatt 1% N2 og 2% B27, i tillegg til 10µM RA, **C)** DIV6 i F12-medium tilsatt 1% N2 og 2% B27, i tillegg til 10µM RA og 100 ng/mL BDNF.

3.3.2 NTERA2-celler

NTERA2-cellene differensierer ved å sende ut nevritter og øke cellevolum, hvilket gjorde at det spesielt var disse to endepunktene som ble observert. Differensieringen av NTERA2-cellene ble utført ved bruk av 20 µM AraC. Fasekontrastbildene i figur 3.8 ble tatt og analysert ved bruk av EssenBioScience IncuCyte S3.

NTERA2-cellene før differensiering og ved DIV3 hadde korte nevritter og små cellekropper (figur 3.8 A-B). Til sammenlikning ble det ved DIV6 observert at minst 3 celler per synsfelt hadde nevritter som var lengre enn 400 µm, og lengre enn diameter på cellekroppen de hadde opphav i. Cellekroppene var også større (figur 3.8 C). Bilderedigeringsprogrammet klarte ikke å definere noen nevritter da cellene ble så store ved differensiering at de ikke ble gjenkjent som nerveceller.



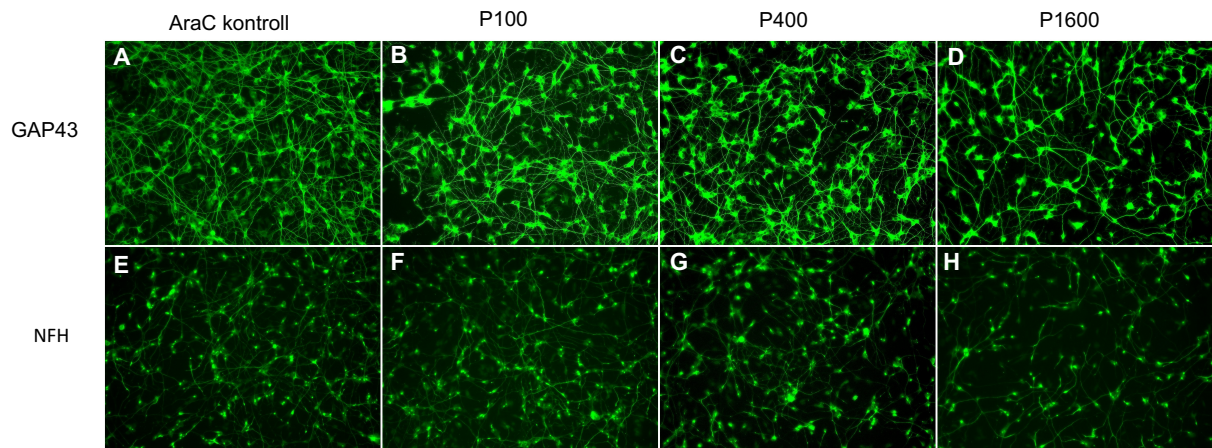
Figur 3.8 Fasekontrastbilde av NTERA2-celler ved optimalisert differensieringsprosedyre. Hvit pil peker på utløper lenger enn 400 µm. Svart pil peker på en liten cellekropp, mens rød pil peker på en større cellekropp. **A)** Før differensiering i komplett NTERA2 -medium. **B)** DIV3 i komplett NTERA2-medium med 20 µM AraC. **C)** DIV6 i komplett NTERA-2 medium med 20 µM AraC.

3.4 Antistoffpiloting i differensierte SH-SY5Y- og NTERA2-celler

Det var ønsket å kartlegge hvilke av de valgte differensieringsmarkørene som ble uttrykt i cellelinjene SH-SY5Y og NTERA2. Dette ble utført ved bruk av immunocytokjemi. En antistoffpiloting ble utført for å gi et utgangspunkt for fremtidige forsøk hvor paracetamol også kan testes på disse cellelinjene.

I SH-SY5Y-cellene ble en rekke av antistoffene som var testet i kyllingkorncellene testet (tabell 3.2) Blant likhetene var at tuj1 var synlig ved 1:2000 i begge celletyper. For NFH ga en 1:400 fortykning synlig farging i SH-SY5Y (figur 3.9), mens det i kyllingkorncellene trengtes 1:200 (figur 3.2). Sammenliknet med kyllingkorncellene observeres det også et noe redusert uttrykk av NFH i de paracetamoleksponerte SH-SY5Y-cellene. Dette gjaldt først og fremst ved den høyeste paracetamolkonsentrasjonen. Et annet nevronalt protein som ser ut til å være høyt uttrykt i SH-SY5Y-cellene er GAP43. Her ble det observert en viss tendens til reduksjon ved den høyeste paracetamolkonsentrasjon, men denne virket ikke å være stor (figur 3.9).

Siden det er kjent at AraC induserer oksidativt stress og en arrestasjon av proteiner i ER ble observert, var det interessant å undersøke om dette skyldes oksidativt stress. Dette ble utført som en del av differensieringsoptimaliseringen for NTERA2-cellene hvor det ble undersøkt hvorvidt oksidative (H_2O_2) eller reduserende (β -merkapttoetanol) komponenter hadde en innvirkning på differensieringen. Det ble ikke vist noen forskjeller i de ulike gruppene (tabell 2.12). Cellene som ble tilsatt H_2O_2 viste ingen endringer i morfologi eller nevrutvekst sammenliknet med de som kun var tilsatt AraC. Ved tilsetning av β -merkapttoetanol, både alene og i kombinasjon med AraC, differensierte cellene som vanlig. Dette ga en indikasjon på at oksidativt stress ikke var involvert i differensieringen da H_2O_2 ikke differensierte cellene, og AraC/ β -merkapttoetanol-cellene var identiske med de AraC-differensierte. Oksidativt stress var dermed trolig heller ikke det som bidro til en hemmet eksport av proteiner fra ER til golgiapparatet. I forbindelse med dette forsøket ble også anti-nrf2 og anti-nitrotyrosin testet ved immunocytokjemi. Fargingen var dessverre uspesifikk da det ikke ble observert farging i riktig cellecompartment (resultater ikke vist).



Figur 3.9 Immunfarging av de nevronale proteinene GAP43 og NFH i paracetamoleksponte SH-SY5Y-celler. SH-SY5Y-celler ble eksponert for 100, 200, 400, 800 og 1600 μM paracetamol i 72 timer, før disse ble immunfarget med antistoffer mot GAP43 og NFH. Bilder ble tatt ved bruk av grønn kanal i EssenBioScience InCuCyte S3.

Tabell 3.2 Antistoffkonsentrasjoner for optimal immunfarging av proteiner i SH-SY5Y-celler

Funksjon	Target	Vert	Optimal fortyning
Utvikling	Pax6	R	Svak ved 1:200
	Sox2	M	Usynlig opptil 1:25
	Otx2	R	Usynlig opptil 1:25
	Nestin ₁	M	Svært svak opptil 1:25
Proliferasjon	Ki67	R	Usynlig opptil 1:400
Nevronal	NeuN ₁	M	Svak ved 1:10
	Tuj1	R	1:2000
	Vimentin	M	1:50
	NFH	R	1:400
	DCX	R	Svak ved 1:200
	NCAM1	M	Svært svak opptil 1:25
	PSD95	R	1:100
	SYP ₁	M	Usynlig opptil 1:5
	GAP43	R	1:100
Glial	GFAP	M	Usynlig opptil 1:200
Signalerende	TrkB	R	Usynlig opptil 1:100
	CB1	R	1:25
Cytoskeletal	β-aktin	M	Svært svak opptil 1:100
	β2-spektrin	M	1:50
ROS/apoptose	Nrf2	R	Svak ved 1:50
	Nitrotyrosin	M	Usynlig opptil 1:50
	cCas3	R	Svak opptil 1:100
	Nur77	R	Usynlig opptil 1:100

	BCL-xL	R	Svak opptil 1:50
	BCL-2	M	Usynlig opptil 1:50
Endosomal	EEA1	M	Svært svak opptil 1:50

4 Diskusjon

Paracetamol er ansett som et legemiddel som er trygt i bruk under svangerskap, og som til og med er førstevalget ved smerter eller feber. De siste årene har det imidlertid blitt utført epidemiologiske studier som tyder på at legemiddelet blant annet kan være knyttet til økt risiko for nevroutviklingsforstyrrelser; deriblant autisme, hyperaktivitet og atferdsforstyrrelser. Dette gjelder ved langtidsbruk av legemiddelet, og ikke korte eksponeringstider [65]. Flere studier er likevel nødvendige og det er derfor viktig at gravide ikke feilinformeres om at paracetamol kan utgjøre en fare for foster. Dette kan bidra til bruk av andre smertestillende som gravide ikke anbefales å bruke, som for eksempel NSAIDs [66].

I tillegg til epidemiologiske studier er dyre- og *in vitro* forsøk viktige supplementer for å kartlegge mulig toksisitet og mekanismer for dette. Disse er en del av sikkerhetsfarmakologiske studier som skal sørge for at legemiddelet er trygt for bruk i mennesker. Sikkerhetsfarmakologi ble i slutten av 1900-tallet inkludert i preklinisk testing og ICH utarbeidet retningslinjer for utførelse av slike studier [5, 67].

Ved bruk av dyre- og *in vitro* forsøk kan perioder og intervaller som er kritiske for utviklingstoksitet undersøkes nærmere, i tillegg til at det er mulig å teste toksiske doser. Relevante markører for nevroutviklingsforstyrrelser kan dessuten testes på cellenivå, og forsøkene tar kortere tid sammenliknet med epidemiologiske studier som kan foregå over flere år. I tillegg kan konfunderende faktorer som alltid vil være tilstede i epidemiologiske studier unngås ved bruk av *in vitro* forsøk. På bakgrunn av dette var det i denne oppgaven ønsket å etablere modeller som kan være relevante for å studere paracetamoleksponering.

4.1 Metodebetraktninger

4.1.1 Valg av modellsystemer

Valget av relevante modellsystemer er av viktighet for å kunne overføre funn i dyremodeller og cellelinjer til menneske, samt oppnå vitenskapelig gyldige funn. I henhold til ICH retningslinje 7A kan dyremodeller og *in vitro* modeller brukes som testsystemer. *In vitro*-studiene kan brukes til å undersøke forbindelsens virkningsmekanismer som er observert *in vivo*. I denne oppgaven ble kornceller fra lillehjernen i kylling, i tillegg til de humane cellelinjene SH-SY5Y og NTERA2, brukt som modellsystemer [6].

Det har de siste årene blitt utført en rekke studier for å evaluere sikkerheten av paracetamol brukt under svangerskap. Paracetamol passerer placenta og blod-hjerne-barrieren og kan slik utøve sine effekter her [10, 68]. En epidemiologisk studie viste at prenatal paracetamoleksponering var assosiert med høyere grad av autismesymptomer hos menn og oppmerksomhetsrelaterte forstyrrelser hos begge kjønn [69]. Videre har dyrestudier vist at neonatal paracetamoleksponering påvirket kognitiv funksjon i voksne mus og til en viss grad interfererte med neurotransmitterprofilen i lillehjernen under utvikling i rotte [70, 71]. Basert på at lillehjernen virker å bli påvirket av paracetamoleksponering og representerer generell hjerneutvikling, ble lillehjernenonevroner fra kylling brukt som en av modellene i denne oppgaven. Endringer i for eksempel nevrou utviklingsmarkører i kylling kan være av relevans for mennesker. Kyllingembryo ble brukt da de krever færre ressurser sammenliknet med gnagere, er selvernærende og utvikler seg uavhengig av mor. Sistnevnte bidrar dessuten til at *The 3R's* i større grad følges ved at kyllingmor ikke må avlives [7]. Andre modeller som har vært aktuelle innen nevrou utvikling er zebrafisk og rundorm da disse deler nevrou utviklingsmekanismer med menneske, noe kylling også gjør. En studie utført for å undersøke paracetamoleffekter under embryonal utvikling i zebrafisk, viste blant annet at paracetamol interfererte med normal embryonal utvikling, vekst, atferd og overlevelse [72].

Primære korncellekulturer ble laget fra lillehjernen i kylling. Korncellene differensierer *in vitro* under bestemte forsøksforhold og får egenskaper som likner de i modne nevroner. De uttrykker dessuten NMDA-reseptorer, hvor NMDA i tidligere studier har blitt foreslått å være involvert i en alternativ virkningsmekanisme for paracetamol. Her har det vært antatt at paracetamols analgetiske effekt skyldes inhibering av *L-arginine-nitric oxide* (NO) signaleringsveien som

blant annet er mediert via NMDA [14]. NO har blant annet blitt vist å både ha neurobeskyttende- og toksiske effekter, slik at inhibert NO-produksjon trolig kan føre til en ubalanse i dette og føre til aktivering av den nevrotoksiske signaleringsveien [73].

Kyllingkorncellene undergår proliferasjon, differensiering, migrering, apoptose og overlevelse som alle er viktige steg for normal utvikling av CNS [7]. I tillegg bevarer celler i primære kulturer en rekke av de morfologiske, nevrokjemikalske og elektrofysiologiske egenskapene til nevroner *in situ* [74]. Det er kjent at kornceller i kultur utvikler seg fra en EGL-like fenotype ved utplating til en mer EGL-like fenotype etter noen dager i kultur [75]. En ulempe med primære cellekulturer er at de er postmitotiske og har kort levetid. De må dermed jevnlig prepareres til bruk i forsøk, hvilket øker sannsynligheten for variabilitet fra en cellekultur til en annen [76].

For å hindre videre proliferasjon av gliacellene som også finnes i lillehjernen, samt oppnå en renere nevronal korncellekultur, ble kyllingkorncellene eksponert for 10 μ M AraC. Dette er en antimitotisk komponent som inhiberer DNA-syntese i cellesyklusens S-fase. Et resultat av dette er at normal celleutvikling og celledeling stoppes opp, hvilket bidrar til den reduserte proliferasjonen av gliacellene [77]. Dette ble vist i immunocytokjemien hvor det var en tendens til redusert uttrykk av gliamarkøren GFAP i AraC-kontrollgruppen sammenliknet med kontrollgruppen (figur 3.5). Ved cellesyklusarrest kan cellene velge å undergå apoptose eller de kan differensiere [78]. Dette kan derfor tenkes å være tilfellet for nervecellene hvor de grunnet AraC enten dør eller differensierer raskere enn uten AraC fordi de tvinges ut av cellesyklusen. Det kan også være mulig at bortfallet av astrocyttene bidrar til en raskere differensiering. I immunofluorescensforsøkene kom det frem at de AraC-behandlede korncellene trolig utvikler seg ulikt kontrollcellene. Dette ble for eksempel vist for NeuN, PSD95, GAP43 og β -aktin hvor det så ut til å være en tendens til ulikt proteinuttrykk mellom AraC-kontrollgruppene og kontrollgruppene (figur 3.6). Oppfølgingsstudier er imidlertid nødvendige for å undersøke hvorvidt forskjellene i proteinuttrykk med og uten AraC er signifikante.

Konsentrasjonen av AraC som ble brukt var lik den som har vært brukt i forskningsgruppen tidligere. Paracetamoleksponering har tidligere blitt testet uten AraC, og effekten som har blitt observert på nevronal nettverkskompleksitet har vært uavhengig av AraC. Bruken av AraC var

imidlertid nødvendig i denne oppgaven da overvekst av gliaceller forstyrrer automatisert analyse av kyllingkorncellene.

I tillegg til kyllingkorncellemodellen, ble den humane NTERA2-cellelinjen brukt. Denne cellelinjen likner mest på humane stamceller og er derfor en veletablert cellelinjemodell til bruk i studier. NTERA2-deriverte nevroner har for eksempel blitt testet preklinisk som transplantasjonsmateriale i slagpasienter [79].

NTERA2-cellene kan blant annet differensieres ved bruk av 20 μ M AraC, slik det ble gjort i denne oppgaven. Denne konsentrasjonen har tidligere blitt brukt i en studie, og viste seg å være egnet for differensiering av NTERA2-celler også her. Bruken av AraC gjør at cellene differensierer til postmitotiske nevroner, som har en glutamerg/kolinerg fenotype, og kan danne funksjonelle synapser og aksjonspotensialer [54]. Den glutamerge fenotypen er felles for NTERA2-cellene og kyllingkorncellene da disse uttrykker NMDA-reseptorer, og kan være relevant for paracetamoleksponering med tanke på legemiddelets alternative virkningsmekanisme som ble beskrevet over. Når det gjelder NTERA2 sin kolinerge fenotype kan denne være relevant da studier i voksne rotter har vist at overdose paracetamol, i tillegg til reduserte dopamin- og serotoninnivåer, også førte til signifikant økning i acetylkolinesteraseaktivitet [80].

Differensiering av NTERA2-celler kan også utføres med RA, men dette ble ikke gjort i denne oppgaven. Dette skyldes at AraC-differensiering er raskere (6 dager sammenliknet med over 5 uker med RA), og bidrar til at en høyere prosentandel av cellepopulasjonen blir differensiert. I tillegg har det i andre studier blitt vist at AraC-differensiering gir en omtrent 5-fold økning i cellekroppareal sammenliknet med RA-differensieringen. Dette er en fordel dersom NTERA2-cellene i oppfølgingsstudier skal brukes til immunocytokjemi fordi fargede proteiner enklere kan skilles fra hverandre. Differensiering med RA gir imidlertid flere og lengre nevritter, men ble ikke brukt av ovennevnte årsaker [54].

SH-SY5Y var den andre humane cellelinjen som ble brukt. SH-SY5Y-cellene kan via ulike differensieringsmetoder få kolinerg, adrenerg eller dopaminerg fenotype [81]. I denne oppgaven ble disse cellene differensiert på tre forskjellige måter, hvorav protokollen hvor DMEM/F12 ble brukt viste seg å gi mest reproducerbarhet og medførte minst bruk av ukontrollerbare variabler slik som serum for eksempel.

For å indusere differensiering i SH-SY5Y-cellene ble 10 μM RA brukt fra DIV0-6, mens 100 ng/mL BDNF ble brukt i tillegg til RA fra DIV3-6. RA ble brukt da denne er kjent for å indusere differensiering. Dette gjør den ved å påvirke promoterseter i nevronale og gliale celler, både embryonalt og postnatale. Blant effektene er inhibert celleproliferasjon og økt nevrutvekst [82]. Det er blitt vist at effekter av RA kan forsterkes ved bruk av vekstfaktoren BDNF [52]. Den trofiske faktoren bidrar til økt overlevelse av nevroner og stimulerer vekst og differensiering av nye nevroner og synapser [82]. I en studie hvor det ble brukt 50 ng/mL BDNF ble det vist at cellene undergikk apoptose ved fravær av denne komponenten. Dette tydet dermed på at differensierte SH-SY5Y-celler er avhengige av trofiske faktorer, på lik linje med modne nevroner [51].

Bruken av cellelinjer gir økt reproduserbarhet da det er mulig å kontrollere forsøksbetingelsene. For eksempel kan inhibitorer tilføres for å kartlegge virkningsmekanismer, noe som ikke er mulig å utføre i mennesker. Det at de brukte cellelinjene er humane bidrar dessuten til å øke sannsynligheten for at de samme prosessene som observeres *in vitro* i cellekultur kan tilskrives mennesker, og gir slik en større overføringsverdi. Artsspesifikke forskjeller i for eksempel metabolske prosesser og patogenese kan dessuten kartlegges i større grad. Eksempler på artsspesifikke forskjeller er i genekspresjon og transkripsjonsfaktorsignalering mellom mus og mennesker [51]. På bakgrunn av ovennevnte bidrar bruken av humane cellelinjer til å styrke funnene i oppgaven.

4.1.2 Valg av eksponeringer

Kyllingkornceller og SH-SY5Y-celler ble eksponert for 100, 200, 400, 800 og 1600 μM paracetamol. I henhold til Norsk legemiddelhandbok er anbefalt enkeltdose for barn over 3 måneder 15-20 mg/kg peroralt, mens serumkonsentrasjonen er 5-20 mg/L [83, 84]. I en studie ble arteriell navlestrengsblodkonsentrasjon funnet å være 3.6 mg/L, som er noe lavere enn serumkonsentrasjonen [85]. I og med at serumkonsentrasjonen er kjent, ble imidlertid de valgte konsentrasjonene basert på denne, da det per dato ikke er mange studier som har målt navlestrengsblodkonsentrasjon. Konsentrasjonene 100, 200, 400, 800 og 1600 μM ble derfor brukt *in vitro* hvilket tilsvarer henholdsvis 15, 30, 60, 120 og 240 mg/L, og er i og over det terapeutiske doseringsområdet. Det ble ikke brukt lavere konsentrasjoner da det i tidligere MTT-forsøk utført av doktorgradsstipendiat Labba ikke ble funnet signifikante endringer fra

2.5 μM og opptil 160 μM . For andre endepunkter, slik som de cytoskeletale for eksempel, kan det likevel være interessant å undersøke hvorvidt lavere konsentrasjoner viser noen signifikante effekter.

4.1.3 Optimalisering av immunocytokjemi

Immunofluorescensforsøk består av flere trinn som må utføres nøye for å oppnå optimal immunfarging og kvantifisering av denne. Forsøkene kan utføres i plater eller på dekkglass i skåler. I denne oppgaven ble det brukt 96-brønnsplater da dette gir mulighet for å enklere kjøre flere paralleller og teste flere antistoffer samtidig. Dekkglass gir imidlertid lavere bakgrunn på immunofluorescensbildene.

96-brønnsplatene ble coatet med PLL og fibronektin da denne kombinasjonen ga minimalt tap av celler/nevritter og god celledhesjon sammenliknet med de andre forbehandlingene. Ved bruk av gelatin 0.1%, PLL, PDL, Geltrex enkeltvis eller PLL og Geltrex i kombinasjon, ble celler eller nevritter tapt ved fiksering (resultater ikke vist). Dette gjaldt ikke ved bruk av Geltrex alene, men i noen tilfeller dissosierte hele cellelaget fra underlaget (resultater ikke vist).

Fiksering av celler kan blant annet utføres med metanol eller PFA. PFA bevarer cellestruktur og nativ molekylær organisering, og forhindrer at små molekyler fjernes under fikseringsprosessen [86]. Dette var årsaken til at PFA-fiksering ble valgt for de fleste forsøkene i denne oppgaven. En ulempe er at det ved bruk av PFA ble observert stor variasjon i 96-brønnsplater. Dette kan trolig knyttes opp til at det ved fiksering med PFA kreves flere trinn, hvilket øker sjansen for ødeleggelse av strukturer i cellene. Dessuten er PFA-fikserte celler mye mer strukturelt sensitive enn metanolfikserte celler, nettopp fordi PFA bevarer cellenes native format. Eksempelvis ble det observert at PFA-fikserte celler ødelegges dersom de fryses og tines igjen, mens metanolfikserte celler ikke tar skade av dette. Et annet eksempel er at de PFA-fikserte cellene ikke kan lagres over lang tid da de degraderes og løsner på 3-7 dager, sammenliknet med metanolfikserte celler som kan lagres i PBS i 4°C i opp til 2 måneder uten å ta skade (resultater ikke vist). På en annen side kan metanol ødelegge kvartærstrukturen til aktin for eksempel. Dette gjør blant annet at metanolfikserte celler ikke blir bundet av fargestoffet phalloidin, som er avhengig av aktins kvartærstruktur [87].

Fluorescens ble kvantifisert i en CLARIOSTAR-plateleser. Avlesningene fra plateleseren ble sammenliknet med fluorescensintensitet av bildene tatt med IncuCyte, og det ble funnet at disse var i full korrespondanse med hverandre. Ettersom *beam width* på plateleseren er på 1 mm² og metoden førte til 371 *pointscans* per brønn i triplikat, kan det antas at hele brønnens areal dekkes (informasjon om *beam width* fra Dr. Wladislaw Maier, Senior Product Specialist, BMG LABTECH GmbH, Allmendgrün 8, 77799 Ortenberg Germany). Det kan dermed konkluderes med at kvantifisering utført via plateleser er en raskere, og like god metode som kvantifisering ved bruk av IncuCyte, bildeprosessering og analyse.

4.1.4 Westernblotting

Resultatene fra westernblottingen ble i oppgaven brukt for å bekrefte funn i immunocytokjemi. Funnene ble presentert uten intern standard da det ikke ble funnet en som kunne detekteres i paracetamoleksponerte kyllingkornceller. Internkontroll brukes vanligvis for å normalisere for mengde påsatt protein, og er slik en viktig del av kvantifiseringen [88]. Det finnes en rekke internkontroller som er vanlige å bruke, men det er ikke alle som er testet i kylling. Særlig er proteiner som er viktige for grunnleggende celledfunksjoner mye brukt [89]. Dette gjelder for eksempel de cytoskeletale proteinene som blant annet bidrar til organisering av cellekomponenter og bevegelse av cellen [90]. Blant disse er Tuj1 og β -aktin som brukes mye grunnet deres høye og konstitutive proteinuttrykk i de fleste modellsystemer [91]. β -aktin ble brukt av Foskaug i hennes masteroppgave, men ble valgt bort i denne masteroppgaven da den viste en mulig tendens til redusert proteinuttrykk i immunfargingen (figur 3.3) [21]. Tuj1 ble også valgt bort da den viste en signifikant reduksjon, samt strukturelle endringer i form av proteinaggregering i paracetamoleksponerte celler ved immunocytokjemi. I og med at de to cytoskeletale proteinene begge viste tendenser til, eller signifikant, reduksjon kan det tenkes at paracetamolbehandlingen førte til en toksisitet på cytoskjelettet. Dette gjorde det problematisk å finne en passende internstandard, og dermed også å kvantifisere. Det ble likevel forsøkt å teste hvorvidt GAPDH eller lamin-B1 ville være synlige i kyllingkornceller, men det ble ikke detektert proteinbånd for disse. For å sikre at lik mengde protein ble avsatt på membranen ble det utført proteinmålinger, i tillegg til ponceaufarging for å verifisere overføring av proteinene fra gel til membran.

For å kunne kvantifisere western-resultater er det nødvendig med oppfølgingsstudier hvor det totalt gjøres 3 uavhengige forsøk. Det bør også brukes en intern standard. Dersom det for

eksempel gjøres flere immunfarginger med β -aktin, kan det undersøkes hvorvidt reduksjonene som observeres i immunfargingen er signifikant, og dermed hvorvidt β -aktin likevel kan forsøkes brukt som intern standard. Eventuelt kan andre internkontroller piloteres i kyllingkorncellene.

4.2 Diskusjon av biologiske funn

4.2.1 Ingen endring i celleviabilitet ved MTT-forsøk tyder på fravær av cytotoxisitet

MTT-forsøk kan si noe om celledød, endret proliferasjon eller hvorvidt mitokondriene i cellene endrer funksjon [92]. Funnene fra MTT viste ingen signifikant redusert celleviabilitet for de ulike paracetamoleksponeringene. Det ble imidlertid observert en tendens til økt celleproliferasjon fra 24 til 72 timer for kontroll- og AraC-kontrollgruppene, som ikke vises for de paracetamoleksponerte cellene (figur 3.1). Samme tendens har blitt observert i timelapseserier utført av Labba et. al. Her ble celleantallet svært redusert sammenliknet med AraC kontroll, og det ble observert opptil 30% reduksjon av antall cellekropper ved 48 timer og opptil 80 timer etter eksponering [93]. Inhibering av proliferasjon ved paracetamoleksponering har også blitt vist i osteosarcomacellelinjen MG63, og i human leukemi cellelinje HL-60 [94, 95]. Dette bygger derfor opp under at paracetamol kan ha en proliferasjonshemmende effekt, som ikke skyldes AraC alene da redusert proliferasjon først observeres i paracetamolgruppene. Oppfølgingsstudier er imidlertid nødvendig for å undersøke hvorvidt en slik tendens i nevroner skyldes paracetamoleksponering.

4.2.2 Kvantitative endringer i proteinene Tuj1, DCX, β 2-spektrin og NFH tyder på en cytoskjelettmediert toksisitet

En rekke proteiner ble testet i immunofluorescensforsøk i både kyllingkornceller og SH-SY5Y-celler. I SH-SY5Y-cellene ble det ikke utført kvantifisering da disse cellene løsnet selv ved bruk av PLL-og fibronektinkombinasjonen. Dette bidro til at det ble for stor variasjon mellom de ulike brønnene slik at kvantifisering ikke kunne utføres. Det ble imidlertid testet hvilke konsentrasjoner som ga synlig/usynlig farging i SH-SY5Y-cellene, og mange av de samme antistoffene som ble brukt i kyllingkornceller ble testet her. Dette var fordelaktig da god immunfarging i disse cellene gjør at de i fremtidige forsøk kan være et godt supplement for å

undersøke hvorvidt endringer som ble funnet i paracetamoleksponerte kornceller også vil være relevante i humane cellelinjer. Proteinene som viste signifikant redusert uttrykk i kyllingkorncellene var Tuj1, DCX, β 2-spektrin og NFH, disse diskuteres derfor nærmere i dette avsnittet i tillegg til β -aktin, pax6 og GFAP.

Tubulin, intermediære filamenter og aktinfilamenter er alle viktige komponenter i cellenes cytoskjelett. Dette er involvert i cellebevegelse, men også i for eksempel transport av organeller, mitose og differensiering [96]. Ved utført immunocyto kjemi ble det funnet at uttrykket av en rekke proteiner involvert i cytoskjelettorganisering ble signifikant redusert eller viste tendens til reduksjon. Cytoskjelettkomponenten Tuj1 ble både signifikant redusert av paracetamol og det ble observert proteinaggregering av denne. DCX som bidrar til stabilisering av mikrotubuli og β 2-spektrin ble også funnet å være signifikant reduserte etter paracetamoleksponering [97]. Degradering av spektriner har de siste årene blitt vist å være involvert i akutte nevronale skader, og kan på denne måten være av relevans for paracetamoltoksisitet [98]. For β -aktin ble det observert tendens til reduksjon i immunfarging. En studie utført på stamceller fra ASD-pasienter viste at dynamikken knyttet til aktinpolymerisering var svekket [99]. Nevrofilamenter er intermediære filamenter og NFH er blant disse. Dette proteinet viste seg å også være signifikant redusert etter paracetamoleksponering, noe som kan ha utslag for vekst av aksoner under utvikling da dette er blant nevrofilamentenes oppgaver [100]. Kvantifisering av nevrutvekst har blitt utført av Labba et. al hvor redusert nevrutvekst som følge av paracetamoleksponering ble funnet. Dette er i korrespondanse med endringer i cytoskjelettproteiner som er funnet i denne oppgaven.

Både Tuj1 og DCX ble analysert ved ett westernblottforsøk som ikke bekreftet immunofluorescensfunnene for Tuj1, men gjorde dette for DCX. Det er imidlertid nødvendig å utføre flere forsøk før en konklusjon kan trekkes. Dersom det i oppfølgingsstudier viser seg at proteinene Tuj1, DCX, β 2-spektrin og β -aktin påvirkes av paracetamoleksponering, kan dette tyde på at legemiddelet medierer en cytoskjelettoksisitet i kyllingkornceller.

I SH-SY5Y-cellene ble det observert synlig farging av Tuj1 ved en fortykning på 1:2000, som var lik fortykningen for korncellene. Dette kan tyde på at proteinet er uttrykt i høyt nivå i begge celletypene. For DCX var fargingen svak ved 1:200 i SH-SY5Y-cellene, mens det i kyllingkorncellene ble observert sterkere farging ved 1:100. Dette kan indikere at proteinet er

uttrykt i begge celletyper. For kyllingkorncellene samsvarer dette med litteratur om at DCX blant annet uttrykkes i lillehjernen [101].

Pax6 var også blant proteinene som ble inkludert i immunocytokjemi og westernblotting. Dette skyldes at proteinet er viktig for utvikling av cerebellum og migrering av kyllingkorncellene gjennom de ulike lagene i lillehjernebarken, og at forstyrrelser i pax6-uttrykk har vist seg å være knyttet til autisme [7]. Det ble ikke funnet noen signifikante endringer i ekspresjon av pax6 ved immunocytokjemi. Ved western ble det heller ikke observert noen endringer i paracetamolgruppene, hverken 24 eller 48 timer etter eksponering. Økningen i proteinuttrykk som ble observert i kontrollcellene fra 24 til 48 timer kan være en tilfeldighet da forsøket kun ble utført en gang. I Braseths masteroppgave ble det imidlertid funnet økt uttrykk av pax6 *in vivo* i kyllinglillehjerne, mens det med unntak av én paracetamolkonsentrasjon ikke ble funnet endret proteinuttrykk *in vitro* i Fosskaug's oppgave [21, 102]. Dette tyder på at noen mekanismer kan være tapt *in vitro* og flere studier er nødvendige for å vurdere hvorvidt pax6-uttrykket endres ved paracetamoleksponering. Det kan dessuten være relevant å utføre disse ved å inkludere 72-timerseksponeringer, da dette ikke ble gjort i de tidligere masteroppgavene.

En annen celletype som vanligvis er til stede i nevronkulturer, er gliacellene som er støtteceller. De bidrar blant annet til å opprettholde blod-hjernebarrieren, samt at de har betydning for metabolisme av neurotransmittere [103]. GFAP er en viktig komponent i astrocytter, men denne var usynlig ved immunfarging av SH-SY5Y-celler (tabell 3.2). Dette skyldes at SH-SY5Y-cellene har en nevronalliknende fenotype uten andre CNS celletyper slik som gliaceller. Dette funnet samsvarte med en annen studie utført på RA- og BDNF-differensierte SH-SY5Y-celler, hvor GFAP heller ikke ble funnet ved immunocytokjemi [81]. For kyllingkorncellene gjaldt det motsatte da disse selv etter AraC-eksponering fortsatt hadde gliaceller til stede, og derfor også GFAP som var synlig ved 1:100 fortykning. I kyllingkornceller var det ingen signifikant endring i GFAP, hvilket kan tyde på at astrocytter er mer robuste enn nevroner for paracetamoleksponering (figur 3.5).

Et viktig poeng for både immunocytokjemien og westernblottingen er bruken av tidsstudier. For westernblotting ble det utført ett forsøk ved tre ulike tidspunkter, mens immunfargingen ble utført ved ett tidspunkt; 72 timer etter paracetamoleksponering. Dersom westernblottingen utføres over samme tidsperiode, men flere ganger, kan det undersøkes om de samme tendensene observeres. I tillegg kan det slik undersøkes hvorvidt paracetamol ved westernblotting gir

signifikante endringer av proteinene som har vist kvantitative endringer ved immunfarging. Dessuten kan det tenkes at immunofluorescensforsøkene også bør utføres ved tidligere tidspunkter, for eksempel 24 og 48 timer, slik at endringer over tid kan observeres. Spesielt er dette viktig da studier av ett tidspunkt kan resultere i at effekter som kan komme på et tidligere/senere tidspunkt ikke detekteres. Dette er for eksempel tilfellet i en studie hvor paracetamol ble brukt som negativ kontroll for utviklingsnevrotoksisitet da det ved 24 timer eksponering ikke ble vist noe som tydet på nevrotoksisitet. Det motsatte er imidlertid vist i denne oppgaven da funnene i både MTT og immunocytokjemi ble utført etter opptil 72 timers paracetamoleksponering. Dette gjelder også i forsøk utført av Labba et.al [93].

5 Konklusjon

Studier utført ved MTT-analyse viste ingen signifikante endringer i celleviabilitet etter 72 timers paracetamoleksponering, men viste en tendens til en proliferasjonshemmende effekt av paracetamol.

Ved å pilotere ulike antistoffer i både kyllingkornceller og humane SH-SY5Y-celler ble optimale konsentrasjoner for disse funnet. Dette bidro også til å avdekke hvilke proteiner som var uttrykt i kyllingkorncellene sammenliknet med SH-SY5Y-cellene. Disse funnene kan brukes videre for å kvantifisere immunofluorescens og sammenlikne effekten av paracetamol i kyllingkornceller og SH-SY5Y-celler.

Utførelse av immunocytokjemi på paracetamoleksponerte kyllingkornceller viste at proteinuttrykket av Tuj1, DCX, β 2-spektrin og NFH ble signifikant redusert. I og med at disse proteinene er involvert i det nevronele cytoskjelettet, kan det antas at paracetamol fører til en cytoskjelettmediert toksisitet. Flere studier er imidlertid nødvendige for å bekrefte dette, blant annet ved at flere westernblottforsøk utføres for alle de fire proteinene. I tillegg kan det være av relevans å utføre tidsstudier i immunocytokjemi, slik at mulige effekter før 72 timer også avdekkes.

Utprøvingen av ulike differensieringsprotokoller bidro til optimalisert differensiering av de humane cellelinjene SH-SY5Y og NTERA2. SH-SY5Y-cellene dannet ved differensiering store nettverk og sendte ut mange utløpere, hvilket gjør denne cellelinjen til en god modell for å studere paracetamolinduserte endringer på nevrutvekst. NTERA2-cellene fikk ved differensiering større cellekropper som kan gjøre det enklere å skille fargede proteiner fra hverandre. I tillegg kan deres fenotyp være av relevans for videre paracetamolstudier.

Litteraturliste

1. de Fays, L., et al., *Use of paracetamol during pregnancy and child neurological development*. Dev Med Child Neurol, 2015. **57**(8): p. 718-24.
2. Liew, Z., et al., *Acetaminophen Use During Pregnancy, Behavioral Problems, and Hyperkinetic Disorders*. JAMA Pediatrics, 2014. **168**(4): p. 313-320.
3. Brandlistuen, R.E., et al., *Prenatal paracetamol exposure and child neurodevelopment: a sibling-controlled cohort study*. Int J Epidemiol, 2013. **42**(6): p. 1702-13.
4. Honek, J., *Preclinical research in drug development*. Medical Writing, 2017. **26**(4): p. 5-8.
5. Pugsley, M.K., S. Authier, and M.J. Curtis, *Principles of Safety Pharmacology*. British Journal of Pharmacology, 2008. **154**(7): p. 1382-1399.
6. Agency, E.M., *ICH Topic S 7 A Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals* 2001.
7. Bjornstad, S., et al., *Cracking the Egg: Potential of the Developing Chicken as a Model System for Nonclinical Safety Studies of Pharmaceuticals*. J Pharmacol Exp Ther, 2015. **355**(3): p. 386-96.
8. Felix, R.J., et al., *Postmarketing surveillance for drug safety in pregnancy: the Organization of Teratology Information Services project*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2004. **70**(12): p. 944-7.
9. Bernocchi, G., et al., *Developing central nervous system and vulnerability to platinum compounds*. Chemother Res Pract, 2011. **2011**: p. 315418.
10. Ghanem, C.I., et al., *Acetaminophen from liver to brain: New insights into drug pharmacological action and toxicity*. Pharmacol Res, 2016. **109**: p. 119-31.
11. Sharma, C.V. and V. Mehta, *Paracetamol: mechanisms and updates*. Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain, 2013. **14**(4): p. 153-158.
12. Ricciotti, E. and G.A. FitzGerald, *Prostaglandins and inflammation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(5): p. 986-1000.
13. de Wolff, J. *Prostaglandin*. [cited 2020 03.06]; Available from: <https://en.wikipedia.org/wiki/Prostaglandin>.
14. ANDERSON, B.J., *Paracetamol (Acetaminophen): mechanisms of action*. Pediatric Anesthesia, 2008. **18**(10): p. 915-921.
15. Clapper, J.R., et al., *Anandamide suppresses pain initiation through a peripheral endocannabinoid mechanism*. Nat Neurosci, 2010. **13**(10): p. 1265-70.
16. Godfrey, L., et al., *Paracetamol inhibits nitric oxide synthesis in murine spinal cord slices*. European Journal of Pharmacology, 2007. **562**(1): p. 68-71.
17. Charnay, Y. and L. Leger, *Brain serotonergic circuitries*. Dialogues Clin Neurosci, 2010. **12**(4): p. 471-87.
18. Diaz-Alonso, J., M. Guzman, and I. Galve-Roperh, *Endocannabinoids via CB(1) receptors act as neurogenic niche cues during cortical development*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2012. **367**(1607): p. 3229-41.
19. Ergenekon, E. and K. Gucuyener, *Nitric oxide in developing brain*. Eur J Paediatr Neurol, 1998. **2**(6): p. 297-301.
20. Rygnestad, T., Spigset O., *Bruk av paracetamol til barn*. Tidsskriftet for Den norske legeforening, 2001. **6**(121): p. 708-709.
21. Fosskaug, K., *Kan prenatal paracetamoleksponering påvirke nevroutviklingen? In vivo og in vitro studier i kyllingembryo og PC12-celler for vurdering av effekter på genetiske regulatorer, nevronale utviklingsmarkører og lillehjernens morfologi*, in *Seksjon for farmasøytisk biovitenskap*. 2017, Universitetet i Oslo: DUO.

22. Silbereis, J.C., et al., *The Cellular and Molecular Landscapes of the Developing Human Central Nervous System*. Neuron, 2016. **89**(2): p. 248-68.
23. Rice, D. and S. Barone, Jr., *Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models*. Environ Health Perspect, 2000. **108 Suppl 3**: p. 511-33.
24. Purves D. et al, *Neuronal Migration*, in *Neuroscience. 2nd edition*. 2001, Sinauer Associates: Sunderland (MA).
25. *Store medisinske leksikon. nervecelle*. 2020 [cited 2020 31.05]; Available from: <https://sml.snl.no/nervecelle>.
26. Nasser, T.I.N. and G.E. Spencer, *Neurite Outgrowth*, in *Reference Module in Biomedical Sciences*. 2017, Elsevier.
27. Jansen, J., Glover, J. *nervesystemet*. 2019 [cited 2020 31.05]; Available from: <https://sml.snl.no/nervesystemet>.
28. Jansen, J. *cerebellum*. 2020 [cited 2020 22.04]; Available from: <https://sml.snl.no/cerebellum>.
29. van Essen, M.J., et al., *Deconstructing cerebellar development cell by cell*. PLoS Genet, 2020. **16**(4): p. e1008630.
30. D'Angelo E., *Cerebellar Granule Cell*, in *Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders*. 2013, Springer: Dordrecht. p. 765-791.
31. Marzban, H., et al., *Cellular commitment in the developing cerebellum*. Front Cell Neurosci, 2014. **8**: p. 450.
32. van Welie, I., I.T. Smith, and A.J. Watt, *The metamorphosis of the developing cerebellar microcircuit*. Curr Opin Neurobiol, 2011. **21**(2): p. 245-53.
33. Breuss, M.W., et al., *Tubulins and brain development – The origins of functional specification*. Molecular and Cellular Neuroscience, 2017. **84**: p. 58-67.
34. Ayanlaja, A.A., et al., *Distinct Features of Doublecortin as a Marker of Neuronal Migration and Its Implications in Cancer Cell Mobility*. Front Mol Neurosci, 2017. **10**: p. 199.
35. Norsk Helseinformatikk. *Lissencefali*. 2018 [cited 2020 22.04]; Available from: <https://nhi.no/sykdommer/sjeldne-tilstander/l/lissencefali/>.
36. Xu, K., G. Zhong, and X. Zhuang, *Actin, Spectrin, and Associated Proteins Form a Periodic Cytoskeletal Structure in Axons*. Science (New York, N.Y.), 2012. **339**.
37. Bunnell, T.M., et al., *β -Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool*. Molecular Biology of the Cell, 2011. **22**(21): p. 4047-4058.
38. Lorenzo, D.N., et al., *β II-spectrin promotes mouse brain connectivity through stabilizing axonal plasma membranes and enabling axonal organelle transport*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2019. **116**(31): p. 15686-15695.
39. Derbala, M.H., et al., *The role of betaII spectrin in cardiac health and disease*. Life Sci, 2018. **192**: p. 278-285.
40. Wick, M.R. and J.L. Hornick, *Chapter 4 - Immunohistology of Soft Tissue and Osseous Neoplasms*, in *Diagnostic Immunohistochemistry (Third Edition)*, D.J. Dabbs, Editor. 2011, W.B. Saunders: Philadelphia. p. 83-136.
41. Yuan, A., et al., *Neurofilaments and Neurofilament Proteins in Health and Disease*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2017. **9**(4).
42. Aves Labs. *ANTI-NFH (NEUROFILAMENT HEAVY CHAIN) ANTIBODY (NFH)*. [cited 2020 20.05]; Available from: <https://www.aveslabs.com/products/nf-h-neurofilament-200-kda - citations>.
43. Lei, J., et al., *Glial fibrillary acidic protein as a biomarker in severe traumatic brain injury patients: a prospective cohort study*. Crit Care, 2015. **19**: p. 362.

44. Griesi-Oliveira, K., et al., *Actin cytoskeleton dynamics in stem cells from autistic individuals*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 11138.
45. Barón-Mendoza, I., et al., *Alterations in neuronal cytoskeletal and astrocytic proteins content in the brain of the autistic-like mouse strain C58/J*. Neuroscience Letters, 2018. **682**: p. 32-38.
46. Zhang, Y., et al., *The beta subunit of voltage-gated Ca²⁺ channels interacts with and regulates the activity of a novel isoform of Pax6*. J Biol Chem, 2010. **285**(4): p. 2527-36.
47. Yeung, J., et al., *A Novel and Multivalent Role of Pax6 in Cerebellar Development*. J Neurosci, 2016. **36**(35): p. 9057-69.
48. Kikkawa, T., et al., *The role of Pax6 in brain development and its impact on pathogenesis of autism spectrum disorder*. Brain Research, 2019. **1705**: p. 95-103.
49. Mok, G.F.e.a., *Chicken as a Developmental Model*. eLS, 2015.
50. Contestabile, A., *Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro*. The Cerebellum, 2002. **1**(1): p. 41-55.
51. Shipley, M.M., C.A. Mangold, and M.L. Szpara, *Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line*. J Vis Exp, 2016(108): p. 53193.
52. Forster, J.I., et al., *Characterization of Differentiated SH-SY5Y as Neuronal Screening Model Reveals Increased Oxidative Vulnerability*. J Biomol Screen, 2016. **21**(5): p. 496-509.
53. ANDREWS, P.W., *Teratocarcinomas and human embryology: Pluripotent human EC cell lines*. APMIS, 1998. **106**(1-6): p. 158-168.
54. González-Burguera, I., et al., *Highly efficient generation of glutamatergic/cholinergic NT2-derived postmitotic human neurons by short-term treatment with the nucleoside analogue cytosine β -d-arabinofuranoside*. Stem Cell Research, 2016. **16**(2): p. 541-551.
55. Marret, S., et al., *Prevention by magnesium of excitotoxic neuronal death in the developing brain: an animal model for clinical intervention studies*. Dev Med Child Neurol, 1995. **37**(6): p. 473-84.
56. Yamanaka, R., Y. Shindo, and K. Oka, *Magnesium Is a Key Player in Neuronal Maturation and Neuropathology*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(14).
57. Simpson, R.J., *Fragmentation of protein using trypsin*. CSH Protoc, 2006. **2006**(5).
58. Sigma-Aldrich. *Common Cell Culture Problems: Cell Clumping*. [cited 2020 18.05]; Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/cell-culture-troubleshooting-cell-clumping.html>.
59. Geller, H.M., et al., *Oxidative stress mediates neuronal DNA damage and apoptosis in response to cytosine arabinoside*. Journal of Neurochemistry, 2001. **78**(2): p. 265-275.
60. De Genaro, P., et al., *Retinoic acid promotes apoptosis and differentiation in photoreceptors by activating the P38 MAP kinase pathway*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013. **54**(5): p. 3143-56.
61. Sigma-Aldrich. *Protocol Guide: MTT Assay for Cell Viability and Proliferation*. [cited 2020 05.03]; Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/roche/cell-proliferation-kit-i-mtt.html>.
62. Biologicals, N. *Immunocytochemistry (ICC) Handbook*. [cited 2020 21.03]; Available from: <https://www.novusbio.com/support/immunocytochemistry-icc-handbook>.
63. Mahmood, T. and P.C. Yang, *Western blot: technique, theory, and trouble shooting*. N Am J Med Sci, 2012. **4**(9): p. 429-34.
64. Cell Signaling Technology. *Ponceau S Staining Solution #59803*. [cited 2020 30.03]; Available from: <https://www.cellsignal.com/products/buffers-dyes/ponceau-s-staining-solution/59803>.

65. Golding, J., et al., *Associations between paracetamol (acetaminophen) intake between 18 and 32 weeks gestation and neurocognitive outcomes in the child: A longitudinal cohort study*. Paediatr Perinat Epidemiol, 2020. **34**(3): p. 257-266.
66. legemiddelhandbok, N. *Ikke-steroid antiinflammatoriske midler (NSAID)*. 2016 20.01.2017; Available from: https://www.legemiddelhandboka.no/L17.1.1/Ikke%E2%80%91steroid_antiinflammatoriske_midler_%28NSAID%29_-_Lk-17-muskl-128.
67. ICH. *History*. [cited 2020 20.05]; Available from: <https://www.ich.org/page/history>.
68. Blecharz-Klin, K., et al., *Effect of prenatal and early life paracetamol exposure on the level of neurotransmitters in rats—Focus on the spinal cord*. International Journal of Developmental Neuroscience, 2015. **47**(Part_B): p. 133-139.
69. Avella-Garcia, C.B., et al., *Acetaminophen use in pregnancy and neurodevelopment: attention function and autism spectrum symptoms*. Int J Epidemiol, 2016. **45**(6): p. 1987-1996.
70. Viberg, H., et al., *Paracetamol (acetaminophen) administration during neonatal brain development affects cognitive function and alters its analgesic and anxiolytic response in adult male mice*. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology, 2014. **138**(1): p. 139-147.
71. Blecharz-Klin, K., et al., *Cerebellar level of neurotransmitters in rats exposed to paracetamol during development*. Pharmacological Reports, 2016. **68**(6): p. 1159-1164.
72. David, A. and K. Pancharatna, *Effects of acetaminophen (paracetamol) in the embryonic development of zebrafish, Danio rerio*. J Appl Toxicol, 2009. **29**(7): p. 597-602.
73. Yui, K., et al., *Oxidative Stress and Nitric Oxide in Autism Spectrum Disorder and Other Neuropsychiatric Disorders*. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2016. **15**(5): p. 587-96.
74. 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. 361-376.
75. Manzini, M.C., et al., *The stop signal revised: immature cerebellar granule neurons in the external germinal layer arrest pontine mossy fiber growth*. J Neurosci, 2006. **26**(22): p. 6040-51.
76. Radio, N.M., et al., *Comparison of PC12 and cerebellar granule cell cultures for evaluating neurite outgrowth using high content analysis*. Neurotoxicology and Teratology, 2010. **32**(1): p. 25-35.
77. National Center for Biotechnology Information. *Cytarabine*, CID=6253. [cited 2020 27.05.20]; Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cytarabine>.
78. Gerard, C. and A. Goldbeter, *The balance between cell cycle arrest and cell proliferation: control by the extracellular matrix and by contact inhibition*. Interface Focus, 2014. **4**(3): p. 20130075.
79. Kondziolka, D., et al., *Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke*. Neurology, 2000. **55**(4): p. 565-9.
80. Essawy, A., A. Alkhuriji, and A. Soffar, *Paracetamol Overdose Induces Physiological and Pathological Aberrations in Rat Brain*. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2017. **7**: p. 185-190.
81. Kovalevich, J. and D. Langford, *Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology*. Methods Mol Biol, 2013. **1078**: p. 9-21.

82. Teppola, H., et al., *Morphological Differentiation Towards Neuronal Phenotype of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells by Estradiol, Retinoic Acid and Cholesterol*. *Neurochem Res*, 2016. **41**(4): p. 731-47.
83. Norsk legemiddelhåndbok. *Paracetamol*. 2016 21.02.18 [cited 2020 25.05]; Available from: <https://www.legemiddelhandboka.no/L20.1.1.2/Paracetamol>.
84. Felleskatalogen. *Paracet.* 2019 [cited 2020 25.05]; Available from: <https://www.felleskatalogen.no/medisin/paracet-karo-pharma-562628>.
85. Mian, P., et al., *Integration of Placental Transfer in a Fetal-Maternal Physiologically Based Pharmacokinetic Model to Characterize Acetaminophen Exposure and Metabolic Clearance in the Fetus*. *Clin Pharmacokinet*, 2020.
86. Stanly, T.A., et al., *Critical importance of appropriate fixation conditions for faithful imaging of receptor microclusters*. *Biol Open*, 2016. **5**(9): p. 1343-50.
87. Cytoskeleton. *Actin Staining Techniques*. [cited 2020 28.05]; Available from: <https://www.cytoskeleton.com/actin-staining-techniques>.
88. abcam. *Loading control guide*. [cited 2020 27.05]; Available from: <https://www.abcam.com/primary-antibodies/loading-control-guide>.
89. Johnson, M. *Loading Controls for Western Blots*. 2012 [cited 2020 27.05]; Available from: <https://www.labome.com/method/Loading-Controls-for-Western-Blots.html>.
90. Fletcher, D.A. and R.D. Mullins, *Cell mechanics and the cytoskeleton*. *Nature*, 2010. **463**(7280): p. 485-92.
91. Mohan, C., Speckmann, W., Clark, R.,. *Loading controls for western blotting*. [cited 2020 28.05]; Available from: <https://www.sigmaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/loading-controls-western-blotting.html>.
92. Rai, Y., et al., *Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition*. *Sci Rep*, 2018. **8**(1): p. 1531.
93. Labba et al., *Paracetamol reduces Pax6 expression, inhibits neurite outgrowth, and alters cytoskeletal structural features in chicken cerebellar granule neurons*. 2020.
94. Diaz-Rodriguez, L., et al., *Effect of acetaminophen (paracetamol) on human osteosarcoma cell line MG63*. *Acta Pharmacol Sin*, 2010. **31**(11): p. 1495-9.
95. Wiger, R., et al., *Paracetamol inhibits cell cycling and induces apoptosis in HL-60 cells*. *Pharmacology & toxicology*, 1998. **81**: p. 285-93.
96. Uio - Institutt for biovitenskap. *Mikrotubuli*. 2011 [cited 2020 29.05]; Available from: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/m/mikrotubuli.html>.
97. Moores, C.A., et al., *Distinct roles of doublecortin modulating the microtubule cytoskeleton*. *EMBO J*, 2006. **25**(19): p. 4448-57.
98. Yan, X.X., A. Jeromin, and A. Jeromin, *Spectrin Breakdown Products (SBDPs) as Potential Biomarkers for Neurodegenerative Diseases*. *Curr Transl Geriatr Exp Gerontol Rep*, 2012. **1**(2): p. 85-93.
99. Griesi-Oliveira, K., et al., *Actin cytoskeleton dynamics in stem cells from autistic individuals*. *Scientific Reports*, 2018. **8**(1): p. 11138.
100. Yuan, A., et al., *Neurofilaments at a glance*. *Journal of Cell Science*, 2012. **125**(14): p. 3257-3263.
101. Capes-Davis, A., et al., *Expression of doublecortin (DCX) and doublecortin-like kinase (DCLK) within the developing chick brain*. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 2005. **232**: p. 457-67.
102. Bratseth, S., *Paracetamol forstyrrer celledeling og differensiering i PC12-celler og kyllinglillehjerne*, in *Seksjon for farmasøytisk biovitenskap*. 2016, Universitetet i Oslo: DUO.

103. Jansen, J. *astrocytt.* 2018 [cited 2020 29.05]; Available from: <https://sml.snl.no/astrocytt>.