

Valproat øker nevronal viabilitet og uttrykk av PAX6 i klinisk relevante konsentrasjoner

*Studier i kyllingkornceller,
SH-SY5Y- og PC12-celler*

Oda Kristine Søltnæs Rosseland



Masteroppgave i farmasi
45 studiepoeng

Farmasøytisk Institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

November 2021

Veiledere:

Professor Ragnhild Elisabeth Heimtun Paulsen, Seksjon for farmakologi og farmasøytisk biovitenskap, Universitetet i Oslo

Doktorgradsstipendiat Denis Zosen, Seksjon for farmakologi og farmasøytisk biovitenskap, Universitetet i Oslo

Postdoktor Dhaksshaginy Rajalingam, Seksjon for farmakologi og farmasøytisk biovitenskap, Universitetet i Oslo

© Oda Kristine Søltnæs Rosseland

November 2021

Valproat øker nevronal viabilitet og uttrykk av PAX6 i klinisk relevante konsentrasjoner

Studier i kyllingkornceller, SH-SY5Y- og PC12-celler

Oda Kristine Søltnæs Rosseland

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

Forord

Arbeidet med masteroppgaven ble gjennomført i perioden august 2020 til november 2021 ved Seksjon for farmakologi og farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo. Masteroppgaven er et prosjekt for forskningsgruppen PharmaTox hvor målet er å øke kunnskapen om hvordan nevroutviklingen påvirkes av legemidler.

Tusen takk til mine dyktige veiledere, professor Ragnhild Elisabeth Heimtun Paulsen, doktorgradsstipendiat Denis Zosen og postdoktor Dhaksshaginy Rajalingam. Dere har vist smittende engasjement og delt raust av deres kunnskap, og jeg er dypt takknemlig for den gode veiledningen jeg har fått av dere. Denis, takk for en morsom og lærerik tid på lab, og for at du alltid har tid til meg. Takk, Dhaksshaginy for at du motiverer og bidrar til faglig påfyll. En ekstra takk til deg, Ragnhild, for dine inspirerende og konstruktive tilbakemeldinger, og for at du får meg til å se arbeidet mitt med en forskers øyne.

Jeg vil også rette en stor takk til resten av forskningsgruppen på ZEB for hjelp og oppmuntrende samtaler. Takk til overingeniør Mona Gaarder for bidrag til oppgaven min, og en ekstra takk til doktorgradsstipendiat Nils Anders Labba for at du alltid er åpen for å svare på spørsmål og gi tips til arbeidet på lab.

Ingliv Gjetmundsen, min trofaste labpartner, tusen takk for en minnerik tid! Det har betydd så mye å få dele både glede og frustrasjon med deg det siste året og ellers i studieforløpet. Takk for gode samtaler og godt samarbeid. Jeg må så klart også takke resten av Bestegjengen for at vi sammen har kommet oss gjennom fem fine og frustrerende år – studiene og livet hadde ikke vært det samme uten dere!

Til slutt vil jeg takke familien min. Takk for at dere motiverer og støtter meg, og engasjerer dere i det jeg driver med. Særlig takk til familien i Oslo og Drammen for at dere tar så godt vare på meg her! Og til resten av familien hjemme, takk for at dere titter innom livet mitt på FaceTime – ser frem til mer tid med dere «live» fremover!

Oslo, november 2021

Oda Kristine Søltnæs Rosseland

Sammendrag

I Norge er det årlig 300–400 kvinner med epilepsi som gjennomfører svangerskap. Med god oppfølging før, under og etter svangerskapet, kan de fleste ha en ukomplisert graviditet. Epileptiske anfall kan forebygges med antiepileptika, men det er knyttet risiko for teratogenisitet ved bruk av disse under svangerskapet. Valproat (VPA) er et eldre antiepileptikum med god effekt mot de fleste former for epilepsi. VPA er kontraindisert ved graviditet da det er forbundet med nevralkrøstdefekter og nedsatte kognitive funksjoner i barnet. Lamotrigin (LTG) er et nyere bredspektret antiepileptikum, som er regnet som et tryggere alternativ ved behandling av epilepsi under svangerskapet, og det er usikkert om prenatal eksponering medfører teratogenisitet. Fosterets hjerne er under utvikling og er derfor ekstra sensitiv for unormal påvirkning. Det må derfor vurderes nytte/risiko for antiepileptisk behandling opp mot eventuelle konsekvenser av et epileptisk anfall i mor. På bakgrunn av dette ble det ønsket å undersøke effekter av VPA og LTG under nevroutviklingen.

Det ble utført viabilitetsstudier i kornceller isolert fra lillehjernen i kyllingembryo, samt i de nevronliknende cellelinjene SH-SY5Y- og PC12-celler. Dette skulle avdekke legemidlenes eventuelle endringer i viabilitet i celler eksponert *in vitro*. I tillegg ble det studert kalsiuminfluks i kyllingkornceller eksponert på dag *in vitro* 3 (DIV3) eller DIV4, ettersom kalsium blant annet medierer migrering av nevroner; en viktig prosess under nevroutviklingen. Kyllingkornceller ble også undersøkt for endringer i proteinuttrykk, enten etter eksponering *in vitro* eller etter eksponering av kyllingembryo *in ovo*.

Det ble sett at VPA øker viabilitet i kyllingkornceller og udifferensierte SH-SY5Y-celler ved eksponering for kliniske konsentrasjoner *in vitro*. LTG i kliniske konsentrasjoner ga ingen endring i viabilitet i de undersøkte celletypene, og andre eventuelle effekter av LTG må derfor undersøkes videre. Det var varierende sensitivitet i de ulike celletypene ved eksponering for LTG i konsentrasjoner over det terapeutiske området. Ved eksponering av kyllingembryo for VPA *in vivo*, ble det sett økt uttrykk av PAX6 på DIV1, som sammen med ingen endring i PCNA-uttrykk er forenlig med nevroprotektiv effekt av VPA. I videre studier er det interessant å finne mekanismer bak den beskyttende effekten til VPA. For å forbedre dyrevelferd ved bruk av kyllingembryo som modellsystem, bør det undersøkes om korncellene har tilsvarende respons ved eksponering *in vitro* og *in vivo* slik at eksponeringen kan utføres uten å eksponere levende embryo.

Forkortelser

A	Ampere
AB	Antistoff
Ach	Acetylkolin
ADHD	Hyperkinetisk forstyrrelse (engelsk: Attention Deficit/Hyperactivity Disorder)
ASD	Autismespekterforstyrrelser (engelsk: autism spectrum disorders)
BBB	Blod-hjerne-barrieren (engelsk: blood-brain barrier)
BCA	Bicinkoninsyre
BME	Basal Medium Eagle
BPB	Blod-placenta-barrieren
BSA	Bovint serumalbumin
C	Celcius
CaCl ₂	Kalsiumklorid
CAM	Chorionallanotishinnen
C _{max}	Maksimal konsentrasjon
CNS	Sentralnervesystemet (engelsk: central nervous system)
DA	Dopamin
dH ₂ O	Destillert vann
DIV	Dag <i>in vitro</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre (engelsk: deoxyribonucleic acid)
DNAse	Deoksyribonklease
E	Embryonaldag
ECM	Ekstracellulær matriks (engelsk: extracellular matrix)
EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre
EGL	Ytre germinallag (engelsk: external germinal layer)
Enveis ANOVA	Variansanalyse (engelsk: one-way analysis of variance)
EtOH	Etanol
FDA	Fluorescein diacetat
FOTS	Forsøksdyrforvatningen tilsyns- og søknadssystem

Fura-2 AM	Fura-2 acetoksymetylester
GABA	Gamma-aminobutansyre (engelsk: gamma aminobutyric acid)
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GTK	Generaliserte tonisk-kloniske anfall
H ₂ O ₂	Hydrogenperoksid
HCl	Hydrogenklorid
HDAC	Histon deacetylase
HO342	Hoechst 33342
ICC	Immunocytokjemi (engelsk: immunocytochemistry)
IGL	Indre germinallag
LTG	Lamotrigin
M	Mol/liter
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MK-801	Dizocilipin
ML	Molekylærlag
mM	Millimol/liter
MQ-vann	Milli-Q-vann (ultrarent vann)
MTT	3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbormid
NA	Noradrenalin
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumfosfat
Na ₂ SeO ₃	Natriumselenitt
Na ₃ VO ₄	Natriumorovandat (engelsk: sodium orthovanadate)
NaCl	Natriumklorid
NaH ₂ PO ₄	Mononatriumfosfat
NaOH	Natriumhydroksid
NGF	Nervevekstfaktor (engelsk: nerve growth factor)
NMDA	<i>N</i> -metyl- <i>D</i> -aspertat
NMDA-R	<i>N</i> -metyl- <i>D</i> -aspertat-reseptor
PAX6	Paired box 6
PBS	Fosfatbufret saltvann
PC12	Pheocromocytoma Cell Line 12
PCL	Purkinjecellelag
PCNA	Proliferation cell nuclear antigen

Pen.strep.	Penicillin-streptomycin
PI	Propodiumjodid
PLL	Poly- <i>L</i> -lysin
PMSF	Fenylmetylsulfonylfluorid (engelsk: phenylmethysulfonyl fluoride)
RA	Retinsyre (engelsk: retinoic acid)
RIPA	Lyseringsbuffer (engelsk: radioimmunoprecipitation assay buffer)
rpm	Omdreining per minutt (engelsk: rounds per minute)
RT	Romtemperatur (18-25 °C)
RZ	Resazurin
SD	Standardavvik (engelsk: standard deviation)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engelsk: sodium dodecyl sulfate)
SH-SY5Y	Human nevroblastoma-cellelinje
T3	Trijodotyronin
TBS	Trisbufret saltvann
TBS-T	1x TBS med 0,1 % Tween 20
Tris-HCl	Tris(hydroksymetyl)aminometanhydrokloride
Tween 20	Polysorbat 20
UGT	Difosfat-glukuronsyltransferaser
V	Volt
VPA	Valproat
WB	Western blot
AARS	Anti-Adherence Rinsing Solution
μ	Mikro
μM	Mikromol/liter

Innholdsfortegnelse

FORORD	V
SAMMENDRAG	VII
FORKORTELSER	IX
1 INNLEDNING	1
1.1 EPILEPSI	1
1.1.1 <i>Epilepsi i svangerskapet</i>	2
1.2 FOSTERUTVIKLINGEN	3
1.3 SENTRALNERVESYSTEMET I UTVIKLINGSFASEN	3
1.4 LILLEHJERNEN	6
1.5 HOVEDPROSESSER I NEVRROUTVIKLINGEN	7
1.6 ANTIEPILEPTIKA	9
1.6.1 <i>Valproat</i>	9
1.6.2 <i>Lamotrigin</i>	10
1.7 MODELLSYSTEMER	11
1.7.1 <i>Kyllingembryo</i>	11
1.7.2 <i>SH-SY5Y-celler</i>	13
1.7.3 <i>PC12-celler</i>	14
1.8 HENSIKT MED STUDIEN	14
2 MATERIALER OG METODER	16
2.1 PRODUKT- OG UTSTYRSLISTE	16
2.2 BEHANDLING AV BRETT	21
2.2.1 <i>Forbehandling av 96- og 6-brønnsbrett med PLL</i>	21
2.2.2 <i>Behandling av 96- og 6-brønnsbrett med ECM</i>	21
2.2.3 <i>Behandling av 96-brønnsbrett med AARS</i>	21
2.3 PREPARERING OG UTPLATING AV CELLEKULTURER	22
2.3.1 <i>Kyllingkornceller</i>	22
2.3.2 <i>Preparering av kyllingkornceller</i>	22
2.4 SH-SY5Y- OG PC12-CELLER	23
2.4.1 <i>Splitting av SH-SY5Y- og PC12-celler</i>	23
2.5 LEGEMIDDELEKSPONERING	24
2.5.1 <i>Legemiddeleksponering in ovo: injisering av egg på E16</i>	24
2.5.2 <i>Legemiddeleksponering in vitro: eksponering i 96-brønnsbrett til studier av viabilitet og immunocytokjemi</i>	24
2.6 VIABILITETSSTUDIER	25
2.6.1 <i>Viabilitetsstudier med MTT</i>	25
2.6.2 <i>Viabilitetsstudier med RZ</i>	25
2.6.3 <i>Viabilitetsstudier med FDA/PI i SH-SY5Y-celler og med PI i PC12-celler</i>	26
2.6.4 <i>DNA-kvantifisering med Hoechst 33342 i kyllingkornceller</i>	26
2.7 KALSIMUMINFLUKS-STUDIER MED FURA-2 AM I KYLLINGKORNCCELLER	27
2.8 WESTERN BLOT	27
2.8.1 <i>Høsting av kyllingkornceller eksponert in vivo</i>	28
2.8.2 <i>Proteinmåling med BCA</i>	28
2.8.3 <i>Koking av prøver</i>	29
2.8.4 <i>Gelelektroforese</i>	29
2.8.5 <i>Blotting av gel</i>	29
2.8.6 <i>Ponceau S-farging og blokking av membran</i>	29
2.8.7 <i>Inkubering med antistoffer og fremkalling av membran</i>	30
2.8.8 <i>Stripping av membran</i>	30
2.9 IMMUNOCYTOKJEMI I KYLLINGKORNCCELLER	30
2.10 STATISTISKE METODER	30
3 RESULTATER	32
3.1 VIABILITETSSTUDIER MED MTT OG RZ I KYLLINGKORNCCELLER	32
3.2 DNA-KVANTIFISERING MED HOECHST 33342 I KYLLINGKORNCCELLER	35
3.3 VIABILITETSSTUDIER MED MTT OG RZ I SH-SY5Y-CELLER	38

3.4	VIABILITETSSTUDIER MED FDA/PI I UDIFFERENSIERTE SH-SY5Y-CELLER	41
3.5	VIABILITETSSTUDIER MED RZ I DIFFERENSIERTE SH-SY5Y-CELLER	46
3.6	VIABILITETSSTUDIER MED RZ I AGGREGERTE SH-SY5Y-CELLER	48
3.7	VIABILITETSSTUDIER MED MTT OG RZ I UDIFFERENSIERTE PC12-CELLER	50
3.8	VIABILITETSSTUDIER MED PI I UDIFFERENSIERTE PC12-CELLER	53
3.9	VIABILITETSSTUDIER MED RZ I DIFFERENSIERTE PC12-CELLER	56
3.10	TEST AV BRETT	59
3.11	KALSIMUMFLUKS-STUDIER I KYLLINGKORNCCELLER	61
3.12	WESTERN BLOT	65
3.13	IMMUNOCYTOKJEMI	69
4	DISKUSJON	73
4.1	DISKUSJON AV METODEVALG	73
4.1.1	<i>Valg av modellsystemer</i>	<i>73</i>
4.1.2	<i>Valg av eksponering</i>	<i>76</i>
4.1.3	<i>Viabilitetsstudier</i>	<i>78</i>
4.1.4	<i>Kalsiuminfluks-studier</i>	<i>80</i>
4.1.5	<i>Immunmerking</i>	<i>81</i>
4.2	DISKUSJON AV RESULTATER	82
4.2.1	<i>Økt viabilitet i kyllingkornceller, SH-SY5Y og PC12-celler etter eksponering for VPA in vitro ...</i>	<i>82</i>
4.2.2	<i>Økt uttrykk av PAX6 i kyllingkornceller på DIV1 eksponert for VPA in vivo</i>	<i>83</i>
4.2.3	<i>Tendens til reduksjon av kalsiuminfluks ved eksponering av kyllingkornceller for klinisk relevante konsentrasjoner av VPA eller LTG in vitro</i>	<i>84</i>
4.2.4	<i>Effekter på tvers av celletyper</i>	<i>85</i>
4.2.5	<i>Veien videre</i>	<i>86</i>
5	KONKLUSJON	87
6	LITTERATURLISTE	88
7	VEDLEGG 1 – OPPSKRIFTER	98
8	VEDLEGG 2 – PROTOKOLLER	108
8.1	FORBEHANDLING AV BRETT	108
8.1.1	<i>Forbehandling av 96- og 6-brønnsbrett med PLL</i>	<i>108</i>
8.1.2	<i>Behandling av 96- og 6-brønnsbrett med ECM</i>	<i>108</i>
8.1.3	<i>Behandling av 96-brønnsbrett med AARS</i>	<i>109</i>
8.2	PREPARERING OG UTPLATING AV CELLEKULTURER	109
8.2.1	<i>Preparering av kyllingkornceller</i>	<i>109</i>
8.2.2	<i>Utplating av kyllingkornceller i 96- og 6-brønnsbrett</i>	<i>110</i>
8.2.3	<i>Splitting av SH-SY5Y- og PC12-celler i dyrkningsflaske</i>	<i>111</i>
8.2.4	<i>Preparering av udifferensierte eller differensierte SH-SY5Y- og PC12-celler til utplating</i>	<i>111</i>
8.2.5	<i>Preparering av aggregerte SH-SY5Y-celler til vekst på petriskål</i>	<i>112</i>
8.2.6	<i>Preparering av aggregerte SH-SY5Y-celler til utplating og legemiddeleksponering</i>	<i>112</i>
8.3	LEGEMIDDELEKSPONERING	112
8.3.1	<i>Legemiddeleksponering in ovo: injisering av egg på E16</i>	<i>112</i>
8.3.2	<i>Legemiddeleksponering in vitro: eksponering i 96-brønnsbrett til studier av viabilitet og immunocytokjemi</i>	<i>113</i>
8.4	VIABILITETSSTUDIER	113
8.4.1	<i>Viabilitetsstudier med MTT</i>	<i>113</i>
8.4.2	<i>Viabilitetsstudier med RZ</i>	<i>113</i>
8.4.3	<i>Viabilitetsstudier med FDA/PI i SH-SY5Y-celler</i>	<i>114</i>
8.4.4	<i>Viabilitetsstudier med PI i PC12-celler</i>	<i>114</i>
8.4.5	<i>DNA-kvantifisering med Hoechst 33342 i kyllingkornceller</i>	<i>114</i>
8.5	KALSIMUMFLUKS-STUDIER MED FURA-2 AM I KYLLINGKORNCCELLER	115
8.6	WESTERN BLOT	116
8.6.1	<i>Høsting av kyllingkornceller eksponert in vivo</i>	<i>116</i>
8.6.2	<i>Proteinmåling med BCA</i>	<i>116</i>
8.6.3	<i>Koking av prøver</i>	<i>117</i>
8.6.4	<i>Gelelektroforese</i>	<i>117</i>
8.6.5	<i>Blotting av gel</i>	<i>118</i>
8.6.6	<i>Ponceau S-farging og blokkering av membran</i>	<i>118</i>

8.6.7	<i>Inkubering med antistoffer og fremkalling av membran</i>	118
8.6.8	<i>Stripping av membran</i>	119
8.7	IMMUNOCYTOKJEMI I KYLLINGKORNCCELLER	119

1 INNLEDNING

I Norge blir det årlig født 50–60 000 barn (1). I en norsk kohortstudie fra 2004–2006 om legemiddelbruk i mødre og fedre i forbindelse med svangerskap, kom det fram at 83 % av mødrene hadde fått resept på ett eller flere legemidler over en periode fra tre måneder før befruktning til tre måneder etter fødsel (2). Under selve graviditeten hadde 57 % av kvinnene fått forskrevet ett eller flere legemidler. De fleste av reseptene var på antimikrobielle legemidler til systemisk bruk, og legemidler for respirasjonssystemet (2).

Det er få legemidler med markedsføringstillatelse som har tilstrekkelig data til å anbefale bruk under svangerskapet (3). Ved behov for legemiddelbehandling under graviditet, er det opp til legen å vurdere nytte/risiko med tanke på mors og fosterets sikkerhet. I mange tilfeller har kvinnen behov for å bruke legemidlet også under svangerskapet ettersom sykdommen behandlingen er rettet mot, i seg selv utgjør risiko for skadelige effekter i mor og/eller foster. Kliniske studier ved legemiddelbruk under graviditet er begrenset grunnet etiske og juridiske hensyn. Det kan derfor ta lang tid før det er samlet inn tilstrekkelig informasjon fra observasjonsstudier til å kunne hevde noe om sikkerheten ved bruk av legemidler i forbindelse med graviditet (3). Gravide kvinner er underrepresentert i kliniske studier, og det er stort behov for mer informasjon om effekter av legemiddelbruk under svangerskapet (4).

1.1 Epilepsi

Epilepsi er en samlebetegnelse for nevrologiske sykdommer som medfører periodevise anfall (5). Epilepsi deles inn etter hvor anfallet starter, og hva slags symptomer som oppstår. Et fokalt anfall starter i én hjernehalvdel, mens generaliserte anfall starter i begge hjernehalvdelen. Et fokalt anfall kan gå over i et generalisert anfall. Anfallet kan også ha ukjent opphav (6). Anfallstypene deles videre inn i grupper etter symptomer (**figur 1.1**). Mekanismen bak epilepsi er ikke fullstendig klarlagt, men anfall skyldes en forbigående hjernefunksjonsforstyrrelse (7). Denne forstyrrelsen skyldes en ekstrem form for synkron aktivering av en gruppe nevroner (8, 9). Epileptiske anfall kan blant annet oppstå ved nedsatt transmisjon av gamma-aminobutansyre (GABA-erg transmisjon, engelsk: gamma aminobutyric acid) (10).

Fokal anfallsstart		Generalisert anfallsstart	Ukjent anfallsstart
Bevart bevissthet	Redusert bevissthet	Motorisk Tonisk-klonisk Klonisk Tonisk Myoklonisk Myoklonisk-tonisk-klonisk Myoklonisk-atonisk Atonisk Epileptiske spasmer Ikke-motorisk (absenser) Typisk Atypisk Myoklonisk Øyelokksmyoklonier	Motorisk Tonisk-klonisk Epileptiske spasmer Ikke-motorisk Atferdsstans
Motorisk Automatismer Atonisk Klonisk Epileptiske spasmer Hypermotorisk Myoklonisk Tonisk Ikke-motorisk Autonom Atferdsstans Kognitiv Emosjonell Sensorisk			Uklassifisert
Fokal til bilateral tonisk-klonisk			

Figur 1.1 Klassifisering av epileptiske anfall.

Anfallet kan starte i én hjernehalvdel (fokalt) eller i begge hjernehalvdeler (generalisert), eller ha ukjent opphav (6). Figuren er hentet fra (6).

1.1.1 Epilepsi i svangerskapet

I Norge er det årlig 300–400 kvinner med epilepsi som gjennomfører svangerskap. Av kvinnene med epilepsi er det antatt at opptil 70 % vil ha uendret anfallsfrekvens under svangerskapet, og at opptil 60 % vil holde seg anfallsfrie. Med god oppfølging før, under og etter svangerskapet, kan de fleste ha en ukomplisert graviditet (11, 12). Enkelte kvinner opplever økt anfallsfrekvens ved hormonendringer, slik som ved ulike stadier i menstruasjonssyklus. Dette kalles katamenial epilepsi (13). Rundt 1/3 av kvinner med epilepsi, har denne avarten, og i noen studier er det sett at disse kvinnene har bedre anfallskontroll under graviditeten (14, 15).

Fosterets hjerne er under utvikling og er derfor ekstra sensitiv for unormal påvirkning (16). Særlig første trimester er kritisk for teratogenese (2), men ulike legemidler kan ha varierende

påvirkning i ulike stadier av graviditeten (17). Under et epileptisk anfall i mor, er det flere fysiologiske endringer som kan påvirke fosterutviklingen. Særlig er det knyttet risiko til enkelte typer generaliserte anfall (16); fosteret kan blant annet utsettes for skade hvis mor taper bevisstheten og faller. Det er kjent at generaliserte tonisk-kloniske anfall (GTK) fører til endringer i blodtrykk, oksygenering og elektrolyttbalanse (16). I dyremodeller er det sett at slike endringer kan gi manglende motorisk koordinasjon og økt immobilitet i foster. I tillegg er det sett endringer i fosterets hjerterytme når mor gjennomgår slike anfall (16). Det er derfor viktig med god kontroll av den epileptiske tilstanden, og en vurdering av nytte/risiko ved legemiddelbehandling, må settes opp mot eventuelle konsekvenser av et epileptisk anfall.

1.2 Fosterutviklingen

Befruktningen skjer på embryonaldag 0 (E0), og et normalt svangerskap i mennesker varer rundt 38 uker (etter befruktning) (18). Ettersom det er ikke mulig å vite akkurat hvilken dag befruktningen fant sted, tar man utgangspunkt i første dag i siste menstruasjonssyklus for å regne antall svangerskapsuker. Det er derfor vanlig å definere et svangerskap til å vare i 40 svangerskapsuker (19).

Fosterutviklingen kan deles inn i tre hovedperioder (18):

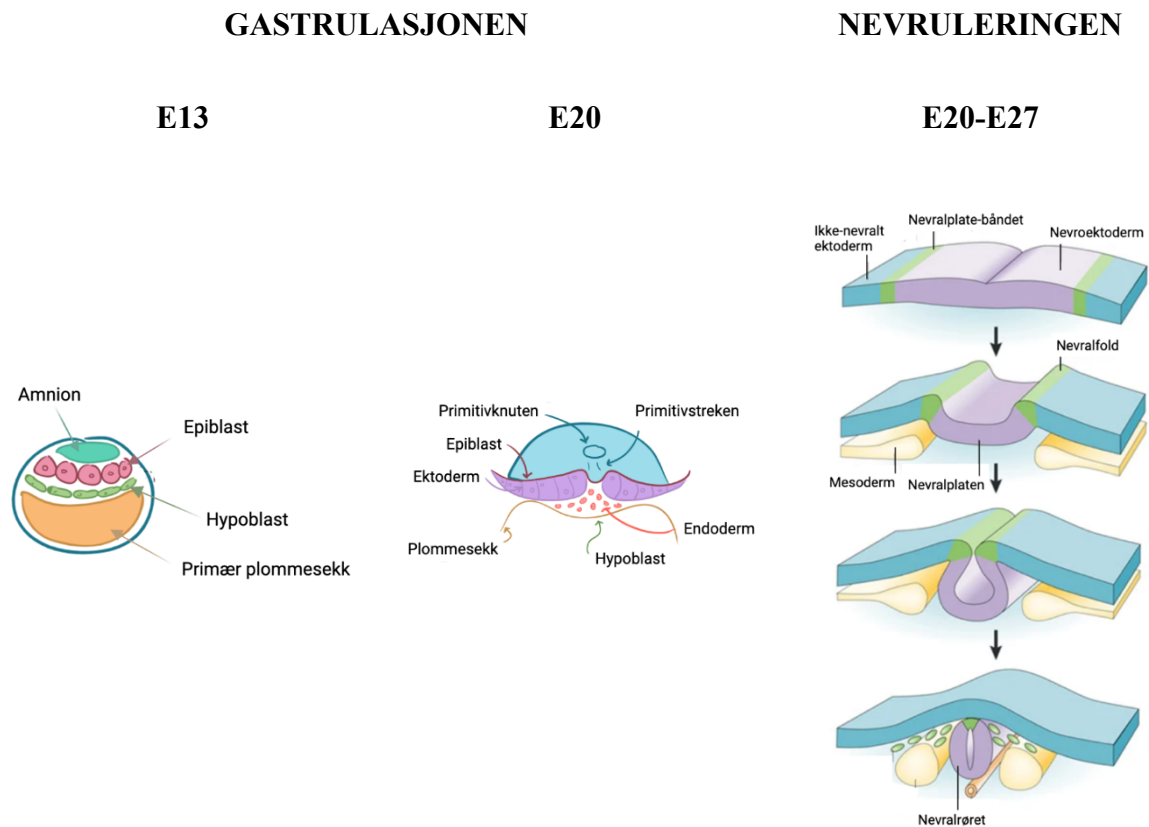
1. Celledelingsperioden: første uke etter befruktning
2. Embryonalperioden: fra to til og med åtte uker etter befruktning
3. Fosterperioden: fra ni uker etter befruktning til og med fødsel (ca. uke 38)

1.3 Sentralnervesystemet i utviklingsfasen

Utviklingen av hjernen og sentralnervesystemet (CNS, engelsk: central nervous system) består av komplekse biologiske kaskader. Prosessene er nøye regulert og består av blant annet fornyelse av stamceller, dannelse av nerveceller (nevrogenese), nevronal migrering og differensiering, og apoptose (20, 21).

Embryoet består av to lag primitive celletyper rundt E13 (**figur 1.2**). Det øvre laget består av epiblaster, mens det nedre laget er dannet av hypoblaster. Gastrulasjonen foregår mellom E13 og E20. Dette omfatter en transformasjon av de to celletypene og dannelse av en struktur bestående av tre lag. Hypoblastene danner ekstraembryonalt vev, slik som navlestreng og fosterdelen av placenta (morkaken). De tre cellelagene som dannes kalles kimblader og består av ektoderm, mesoderm og endoderm. Kimbladene er opphavet til alle organene i kroppen

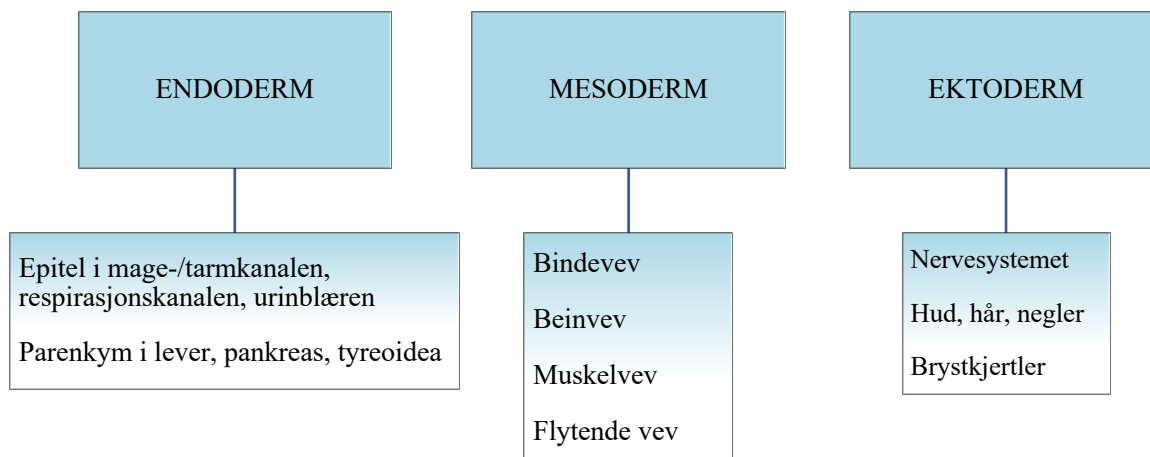
(**figur 1.3**). Cellene i ektoderm omgjøres til to typer ektodermale stamceller, blant disse nevroektodermale stamceller. Dette er nevrale progenitorceller (NPC), opphavet til alle cellene i CNS (20).



Figur 1.2 Gastrulasjon og nevrulering.

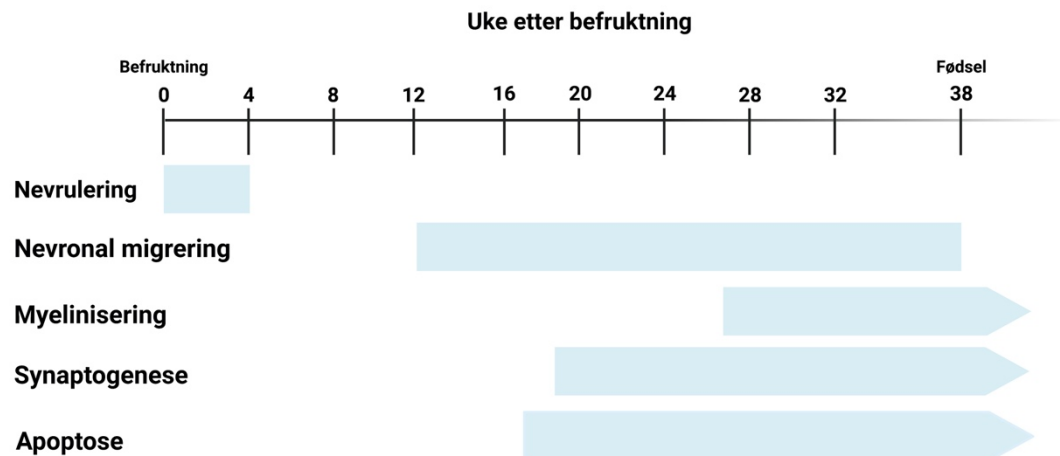
Embryoet består av to lag primitive celletyper rundt E13; epiblaster og hypoblaster. Gastrulasjonen foregår mellom E13 og E20. Dette omfatter en transformasjon av de to celletypene og dannelse av en struktur bestående av tre lag; endoderm, mesoderm (ikke vist) og ektoderm (20). De nevrale progenitorcellene fra ektoderm prolifererer og danner neuralplaten (22). Videre skjer nevruleringen hvor neuralplaten omdannes til nevrالرøret mellom E20 og E27 (21). Figurene er hentet fra (23) og (24) og modifisert.

NPC fra ektoderm prolifererer og danner neuralplaten (22), som omdannes videre til nevrالرøret fra E20 til E27 (21). Lukking av nevrالرøret setter i gang utvikling av de tre primære hjernevesiklene (prosencephalon, mesencephalon og rhombencephalon). Hjernevesiklene er opphavet til dannelse av ulike deler av CNS. Ufullstendig lukking av nevrالرøret kan føre til misdannelser slik som ryggmargsbrokk; ufullstendig lukking av den nederste delen av nevrالرøret (25, 26). Mangelfull utvikling av nervesystemet kan også føre til motoriske, sensoriske, og kognitive nedsettelse (25).



Figur 1.3 Oversikt over enkelte av organsystemene de ulike kimbladene er opphavet til (22, 26). De tre kimbladene har fullført det meste av sin differensiering og dannet organer innen 8 uker etter befruktning (22).

Nevrogenesen starter på E42, og den er tilnærmet fullført i midten av svangerskapet (20). Dette gjelder derimot ikke for kornceller i blant annet lillehjernen og hippocampus, hvor nevrogenesen fortsetter også en stund etter fødsel (27) (**figur 1.4**). Etter at nye nevroner er dannet, vil disse migrere til ulike områder i hjernen. Her vil de lage forbindelser (synapser) med andre nevroner. Signalene mellom cellene genereres av et aksjonspotensial (depolarisering av cellen) som hovedsakelig fører til frigivelse av neurotransmittere (kjemisk synapse), eller i noen tilfeller en bølge av ioner (elektrisk synapse) (28). Disse nettverkene av forbindelser gjør det mulig for hjernen å prosessere informasjon som gjør at mennesker har tanker, følelser, og kan utføre handlinger (20). Det meste av migreringen skjer mellom svangerskapsuke 12 og 20, og er i stor grad fullført ved uke 26–29 (29). En stor andel av nevronene vil gjennomgå apoptose som del av den naturlige nevroutviklingen (26). En moden hjerne består av mer enn 100 milliarder nevroner. Hvert nevron kan ha kontakt med over 1000 andre nevroner, noe som gir mulighet for over 60 billioner kontakter (20, 30). Hjerneutviklingen fortsetter også en stund postnatalt. I størrelse øker hjernen fire ganger i barnehagealder, og hos seksåringer er hjernens volum rundt 90 % av voksen størrelse (20). Modningen av hjernen etter fødsel innebærer myelinisering, dendrittvekst og synapsedannelse (26).



*Figur 1.4 Hovedprosesser i nevronal utvikling.
Figuren er laget i BioRender med insiprasjon fra (29, 31, 32).*

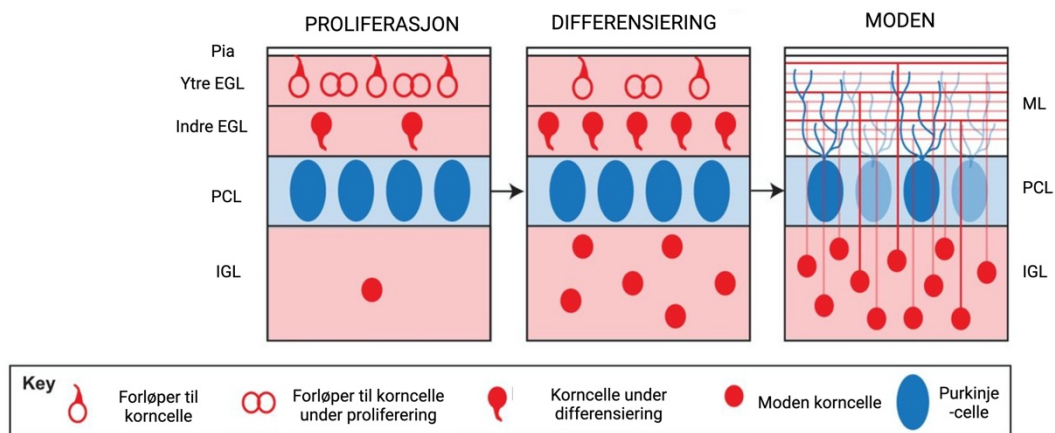
1.4 Lillehjernen

Lillehjernen er en del av metencephalon (bakhjernen) (33), og ligger på undersiden bak bakhodelappen av telencephalon (storhjernen) (34). Lillehjernen har som hovedfunksjon å kontrollere og justere kroppsbevegelser (26), og er i tillegg forbundet med kognisjon og følelser (35).

Rundt 45 milliarder av de 100 milliarder nevronene en moden hjerne består av, er kornceller produsert under utviklingen av lillehjernen (36). Kornceller er den typen nevroner i hjernen med høyest forekomst (37). Under utviklingen består lillehjernen av et ytre germinallag (EGL, engelsk: external granular layer), et Purkinje-cellelag (PCL), og et indre germinallag (IGL, engelsk: internal granule layer). Forløperne til korncellene migrerer og danner det ytre germinallaget (EGL). Migreringen skjer før cellene har fullført siste fase i mitosen, som er en unik egenskap for disse cellene. Etter akkumulering i EGL, gjennomgår cellene celledeling og det dannes post-mitotiske (celler som ikke kan gjennomgå celledeling) kornceller.

Korncellene migrerer videre inn i lillehjernebarken hvor de danner det indre germinallaget (IGL) (36). EGL forsvinner etter at alle korncellene har migrert til IGL (**figur 1.5**). I mennesker blir EGL borte i løpet av de to første leveårene (38).

Korncellene har aksoner i molekyllærlaget (ML) hvor de danner glutaminerge (eksitatoriske) synapser med dendritter fra Purkinje-celler. Purkinje-celler er GABAerge (inhibitoriske) nevroner som ligger i lillehjernebarken (39).



Figur 1.5 Migrering og differensiering av kornceller.

Forløperne til korncellene migrerer og danner EGL. Migreringen skjer før cellene har fullført siste fase i mitosen, som er en unik egenskap for disse cellene. Etter akkumulering i EGL, gjennomgår cellene celledeling og det dannes post-mitotiske kornceller. Korncellene migrerer videre inn i lillehjernebarken hvor de danner det indre germinallaget (36). EGL forsvinner etter at alle korncellene har migrert til IGL. I mennesker blir EGL borte i løpet av de to første leveårene (38). Pia: pia mater (årehinnen); EGL: ytre germinallag; IGL: indre germinallag; ML: molekylærlaget; PCL: Purkinjecelle-laget. Figuren er hentet fra (39) og modifisert.

1.5 Hovedprosesser i nevrou utviklingen

Nevrogenese (dannelse av nye nevroner) innebærer proliferering og differensiering av NPC (40). Før en celle kan proliferere (dele seg), er det en rekke forberedende prosesser cellen må gjennomgå. Disse stadiene beskrives som cellyklus, som består av en G₁-fase (forberedelse til DNA-syntese og DNA-replikasjon), S-fase (syntese og duplisering av DNA), G₂-fase (forberedelse til mitose), og M-fase (mitose; celledelingen foregår) (41). PCNA (engelsk: proliferating cell nuclear antigen) bidrar på flere måter til proliferasjon, blant annet ved dannelse og reparering av DNA (42). PCNA finnes i cellekjernen til celler som kan gjennomgå celledeling (42). I DNA-syntese bidrar PCNA til at DNA-polymeraser forankres til DNA-templatet, samtidig som det bidrar til at syntesen blir rask og effektiv (43, 44). Uttrykket av PCNA avhenger av cellens stadium, og vil øke i G₁- og S-fase (45).

Balansen mellom nevrogenese og selv-fornyelse av NPC, er nøye regulert (46). PAX6 (engelsk: paired box 6) er en transkripsjonsfaktor som regulerer uttrykk av gener som blant annet er avgjørende for utviklingen av store deler av CNS – deriblant ryggmargen og

hjernebarken (46). Økte nivåer av PAX6 fører til nevrogenese og det blir da en reduksjon i fornyelse av NPC, samtidig kan lave nivåer av PAX6 også redusere selv-fornyelse, så det er viktig med en optimal balanse i disse nivåene (46, 47). Det er antatt at mutasjoner i *PAX6* har sammenheng med autisme og kognitiv nedsettelse (48). I tillegg har PAX6 innvirkning på migrering av kornceller (49). Migrering under nevrouviklingen innebærer at nydannede nevroner migrerer mot det området de skal fungere i. Migreringen medieres av kalsiuminfluks, og flere typer kalsiumkanaler bidrar til dette. Deriblant spenningsstyrte kalsiumkanaler og *N*-metyl-*D*-aspartat-reseptorer (NMDA-R) (50). Økt intracellulært kalsium er også knyttet til initiering av apoptose (51, 52). Som om del av den naturlige hjerneutviklingen, gjennomgår et stort antall nerveceller apoptose under siste halvdel av fosterperioden (26). Antall nerveceller i hjernen er størst ved svangerskapsuke 28, og over halvparten av nevronene dannet under nevrogenesen har gjennomgått apoptose ved slutten av ungdomstiden (29).

Cytoskjelettet består av mikrotubuli, mikrofilamenter (for eksempel aktin) og intermediære filamentproteiner. Mikrotubuli er satt sammen av proteinene α - og β -tubulin (53). TUJ1 er en type β -tubulin (klasse III), og uttrykkes både i CNS og det perifere nervesystemet (54). Mikrotubuli bidrar i nevrogenesen blant annet ved å danne mitotisk spindel og separere kromosompar som del av celledelingen (53). Mikrotubuli inngår også i flere av prosessene ved nevronal migrering og differensiering (21), og er viktig ved lukking av nevrallrøret (55). I tillegg til å opprettholde cytoskjelettet, er intermediære filamentproteiner forbundet med differensiering av nevronale blastceller (opphavet til epiblast og hypoblast) til modne nevroner under embryoutviklingen. Blant intermediære filamentproteiner finnes GFAP (engelsk: glial fibrillary acidic protein). GFAP er en markør for astrocytter. Astrocytter er spesialiserte gliaceller og er til stede i hele CNS. Antallet astrocytter utgjør over fire ganger så mange celler som nevroner, og har flere essensielle funksjoner i CNS. Deriblant opprettholdelse av homeostase og tilføring av næring til nevronene (56). I tillegg bidrar de i reguleringen av synaptisk aktivitet, synaptogenese og nevrogenese (56). Dysfunksjonelle astrocytter kan bidra til patofysiologiske endringer i CNS, slik som svekkelse av blod-hjernebarrieren (BBB) eller redusert regenerering av aksoner (57, 58). For opprettholdelse av cellens morfologi og membranintegritet, er også spektriner viktig (59). Spektriner er proteiner som deltar i flere prosesser i cellen i tillegg til å bidra til at cellen klarer å tilpasse seg

endringer i miljøet rundt (60). Spektriner består av en α - og en β -subenhet, og β 2-SPEKTRIN er blant annet viktig for stabilisering av aksoner og for aksonvekst (60).

1.6 Antiepileptika

Epileptiske anfall kan forebygges ved å dempe nervecellenes evne til å utløse eller videresende nerveimpulser. Antiepileptika kan virke ved å inhibere spenningsstyrte natrium- eller kalsiumkanaler. Andre mekanismer går ut på å hemme effekten av glutamat, eller øke effekten av GABA (61). De fleste legemidler som brukes i behandling av absensanfall virker ved å blokkere T-type (lavspenningsstyrte) kalsiumkanaler. Legemidler til behandling av andre typer epilepsi virker hovedsakelig ved å blokkere natriumkanaler eller øke GABA-mediert inhibering (9).

Det er knyttet økt risiko for medfødte misdannelser i barn eksponert for antiepileptika under embryonal- og fosterutviklingen, deriblant nevrallrørsdefekter (62, 63). Det er også økt risiko for nevroutviklings sykdommer, slik som hyperkinetiske forstyrrelser (ADHD, engelsk: attention deficit/hyperactivity disorder), autismespekterforstyrrelser (ASD, engelsk: autism spectrum disorders), og nedsatt mental og/eller motorisk funksjon (62).

1.6.1 Valproat

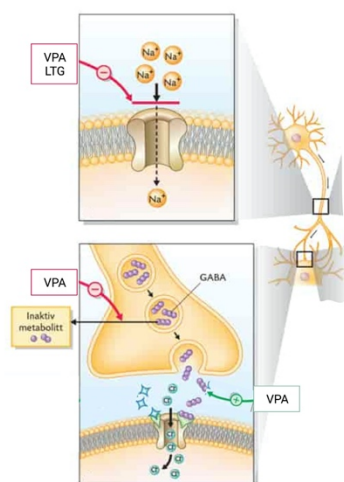
Valproat er i Norge markedsført som fettsyrederivatet valproinsyre (VPA, engelsk: valproic acid) under preparatnavnet Orfiril, og finnes i flere ulike formuleringer (64, 65), slik som depottabletter, mikstur og injeksjonsvæske (65). VPA har også indikasjon maniske episoder ved bipolar lidelse, migrene, og angstsykdommer (66). Virkningsmekanismene til VPA er ikke fullstendig klarlagt, men det er kjent at det virker på flere måter (**figur 1.6**). Blant annet fører VPA til økning i GABA-innholdet i hjernen (67). Det antas at VPA virker postsynaptisk og øker virkningen til GABA, men det er ikke klart om dette skyldes inhibering av synaptiske responser. VPA har inhiberende virkning på natriumkanaler, men i mindre grad enn andre antiepileptika. I tillegg er VPA inhibitor for T-type kalsiumkanaler (67). T-type kalsiumkanaler er viktige i avslutning av rytmisk utladning fra talamiske nevroner som er assoisert med absensanfall (67). VPA inhiberer histon deacetylase (HDAC), som er viktig i pakking av DNA. I tillegg er det antatt at VPA har beskyttende effekt i nevroner mot excitotoksisitet (68, 69).

Terapeutisk referanseområde for VPA er i følge laboratorietjenesten Først 300–700 μM (70). Det er antatt at VPA transporteres aktivt over blod-placenta-barrieren via flere ulike transportører (71). Dersom mor behandles med VPA under svangerskapet, vil også fosteret eksponeres. Eksponering for VPA under svangerskapet er forbundet med økt risiko for nevrالرrørdefekter (72), og har i større grad vist nedsettelse i kognitive funksjoner i barnet, sammenliknet med andre antiepileptika (73, 74).

1.6.2 Lamotrigin

Lamotrigin (LTG) regnes som et nyere antiepileptikum (67) og har bredspektret antiepileptisk virkning (75). I Norge er LTG markedsført som Lamictal dispergerbare tabletter/tyggetabletter. LTG har indikasjon ved de fleste former for epilepsi, i tillegg til forebygging av depressive perioder ved bipolar lidelse (76). Lamotrigin virker på spenningsstyrte natriumkanaler og binder hovedsakelig til kanalene i inaktivert tilstand, og forhindrer dem i å gjenoppnå hvilestadium (**figur 1.6**). På den måten reduseres antall funksjonelle kanaler som er tilgjengelige for å generere aksjonspotensial (67). Det er også antatt at LTG reduserer glutamatfrigjøring (72) og inhiberer kalsiumkanaler (77).

Terapeutisk referanseområde for LTG er 10–50 μM (78). LTG passerer enkelt og raskt blod-placenta-barrieren, slik at mors behandling med LTG vil føre til betydelig eksponering av foster (67, 79). Det er usikkert om LTG har teratogene effekter, og LTG er regnet som et tryggere alternativ ved antiepileptisk behandling under svangerskapet (72, 80, 81).



Figur 1.6 Virkningsmekanismer til VPA og LTG

VPA og LTG inhiberer natriumkanaler (67). Det antas også at VPA virker postsynaptisk og øker virkningen til GABA (67). Figuren er hentet fra (61, 82) og modifisert.

1.7 Modellsystemer

Den nasjonale forskningsetiske komité la i 2001 frem retningslinjer for inkludering av kvinner i medisinsk forskning. Der la de blant annet frem at dersom gravide kvinner skal delta i slike studier, skal det være av terapeutisk nytte for kvinnen og/eller fosteret, og risiko for fosterskade skal utelukkes i størst mulig grad. Det er også krav om at det skal foreligge tilstrekkelig preklinisk og/eller klinisk dokumentasjon på ikke-gravide før det startes studier på gravide (83). Det er derfor et stort behov for grunnforskning på teratogenisitet. Resultater ved forsøk i dyremodeller kan til en viss grad indikere tilsvarende effekter i mennesker. Bruk av dyr i forsøk innebærer mange etiske problemstillinger, og krever i mange tilfeller store ressurser. For å unngå disse utfordringene, kan man benytte cellelinjer. Dette er celler som for eksempel har opphav i en svulst i dyr eller menneske. Cellelinjene gjør det mulig å ha celler tilgjengelig over en lang tidsperiode, og er dermed lett tilgjengelig for forsøk. Cellelinjer består ofte av en homogen populasjon, og det er dermed enklere å undersøke spesifikke effekter (84). Det er en fordel å bruke flere modellsystemer ettersom tilsvarende funn i flere celletyper i større grad gjør resultatene overførbare til mennesker.

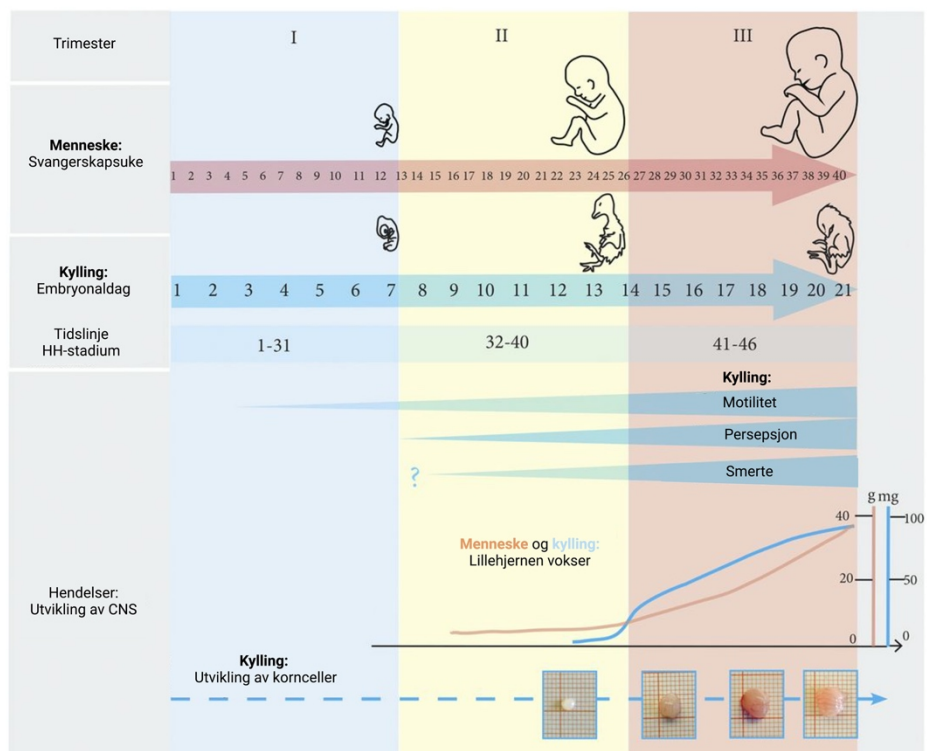
1.7.1 Kyllingembryo

Det er flere fordeler med bruk av kyllingembryo som modell for farmakologiske og toksikologiske studier. Eggene er lette å håndtere og krever lite stell da de er selvforsynt med næring. Gode vekstvilkår er mulig å oppnå uten å drive en hel dyreanstalt ettersom eggene

klarer seg i rugeskap ved 37–39 °C med 45–55 % luftfuktighet (85). Prenatal eksponering for antiepileptika er forbundet med endret kognitiv adferd (62, 86). Lillehjernen er et interessant målorgan i studier av nevroutviklingen da den spiller en rolle i slike funksjoner (35). Fra kyllingembryoene er det mulig å isolere lillehjernen og lage kultur av kyllingkornceller. Legemiddeleksponering av embryoet kan utføres *in ovo*, blant annet ved injisering i allantoishulrommet. Ellers kan korncellene eksponeres *in vitro* (85).

Lillehjernen er ansett som en god modell for hva som skjer under utviklingen av CNS (85, 87). Mennesker går gravide i ni måneder, mens kylling klekkes etter rundt 21 dager inkubering. I kyllingembryo har lillehjernen en vekstspurt på E13–E17, mens den i menneskefoster har en eksponentiell vekst mot slutten av svangerskapet (**figur 1.7**). Lillehjernen har altså ulik modenhet ved fødsel i menneske og kylling (85), men ettersom lillehjernen er antatt å være godt konserverert mellom arter (85, 87), er den likevel interessant å studere. I lillehjernen ligger kornceller – den celletypen som utgjør den største andelen av alle nevroner i hjernen (88). Korncellene gjennomgår alle stadier for nevronal utvikling, og er derfor en god modell for å undersøke mekanismer som nevronal proliferasjon, differensiering, migrering, apoptose og overlevelse (85). Cellene er lette å dyrke *in vitro*, og vil over tid differensiere og få fenotype som modne nevroner (85). Kornceller uttrykker NMDA-R, og kan utvikle exitotoxicitet (85).

«The 3Rs» (de tre R-ene) Replace, Reduce, Refine skal vurderes nøye før igangsetting av forsøk i dyr. Dette prinsippet går ut på at man skal prøve å erstatte dyreforsøk med andre modeller så langt det er mulig. Man skal redusere antall dyr som trengs i forsøket, til kun det som er nødvendig for å gi reproducerbare resultater, og dyrets velferd skal settes i fokus (89). Dersom eksponering av cellekulturer *in vitro* reflekterer det som skjer *in vivo*, kan det være en fordel for dyrevelferden å eksponere cellekulturene i stedet for levende embryo.



Figur 1.7 Hendelser under utviklingen av menneske og kylling.

HH: Hamburger-Hamilton-klassifisering – beskriver stadiene for kyllingembryo/-foster basert på morfologiske hendelser i stedet for kronologisk alder. Figuren er hentet fra (85) og modifisert.

1.7.2 SH-SY5Y-celler

SH-SY5Y-cellelinjen har opphav i en human neuroblastoma-cellelinje som stammer fra en biopsi av en metastatisk beinsvulst. SH-SY5Y-celler har flere fordeler som gjør dem egnet til neurobiologiske studier *in vitro*. Doblingstiden er rundt 27 timer, og cellene kan dyrkes både flytende og festet til skål. Cellene syntetiserer blant annet noradrenalin (NA), og i mindre grad dopamin (DA). I tillegg har cellene flere typer spenningsstyrte og ligandstyrte kanaler, blant annet spenningsstyrte kalsium- og natriumkanaler (90, 91). Udifferensierte celler er morfologisk like neuroblaster, men med begrensede cellulære prosesser. Cellene prolifererer, uttrykker umodne nevronale markører, og uttrykker ingen modne markører. Udifferensierte SH-SY5Y-celler regnes å likne umodne katekolaminerge nevroner (92). Ved differensiering av SH-SY5Y-celler blir celledelingen delvis inhibert, og cellene likner i større grad på primære nevroner (93). Avhengig av differensieringsmedium som brukes, kan cellene påvirkes til å differensiere i ulike retninger, deriblant kan de få kolinerg, adrenerg, eller dopamierg fenotype. SH-SY5Y-celler kan blant annet differensieres med retinsyre (RA, engelsk: retinoic acid). Ettersom cellene har humant opphav, uttrykker de human-spesifikke proteiner, til forskjell fra celler som stammer fra andre arter (92).

1.7.3 PC12-celler

Adrenal feokromocytoma (PC12)-cellelinjen stammer fra en tumor i binyremargen i rotte (94). PC12-celler er mye brukt i studier innen nevrobiologi (95). Cellene fester seg til plastikk, men løsner lett ved mekanisk påvirkning, og har en doblingstid på mellom 48 og 96 timer. Dette gjør dem raskt tilgjengelige for utføring av forsøk. PC12-celler kan syntetisere katekolaminer, deriblant DA, og i mindre grad NA (94, 96). Cellene kan også syntetisere, lagre og friggi acetylkolin (ACh), og har både nikotinerge og muskarinerge ACh-reseptorer. Disse reseptorene har stor likhet med tilsvarende reseptorer i sympatiske nevroner. Cellene har ionekanaler, deriblant spenningsstyrte natriumkanaler, spenningsstyrte kalsiumkanaler, og spenningsstyrte kaliumkanaler. Ionekanalene bidrar til aksjonspotensial, i tillegg til å regulere frigjøring av neurotransmittere. Ved behandling med nervevekstfaktor (NGF, engelsk: nerve growth factor) slutter cellene å dele seg, og de starter å differensiere. Ved differensiering vil PC12-cellene i større grad etterlikne nevroner (96).

1.8 Hensikt med studien

Det er knyttet økt risiko for medfødte misdannelser etter prenatal eksponering for antiepileptika, slik som nevrالرrørsdefekter, ADHD, ASD, og nedsatt mental og/eller motorisk funksjon (62, 63). VPA er et eldre antiepileptikum med kjente teratogene effekter, og er kontraindisert ved graviditet (65, 72-74). LTG er et nyere antiepileptikum, og er regnet som et tryggere alternativ ved behandling av epilepsi under svangerskapet (72, 80, 81). Da gravide kvinner er underrepresentert i kliniske studier av etiske og juridiske årsaker, er det begrenset informasjon om teratogene effekter som følge av legemiddelbehandling under svangerskapet. Legen som skal vurdere nytte/risiko med tanke på mors og fosterets sikkerhet, har altså et svakt vurderingsgrunnlag. Det er derfor stort behov for grunnforskning med overordnet mål å gi godt nok grunnlag for slike vurderinger.

Ettersom det er sett endringer i nevrou utviklingen ved prenatal eksponering for antiepileptika, var det interessant å undersøke dette nærmere. Det ble derfor utført forsøk i kornceller høstet fra lillehjernen til kyllingembryo da disse cellene gjennomgår alle stadier for nevronal utvikling (85). For å redusere bruk av forsøksdyr, ble det også undersøkt effekter i de nevronale cellelinjene SH-SY5Y- og PC12-celler. Ved tilsvarende funn i flere modellsystemer vil resultatene i større grad kunne overføres til mennesker, noe som gir bedre bakgrunnskunnskap før eventuelle kliniske studier.

Delmål:

1. Undersøke om VPA og LTG påvirker viabilitet i kyllingkornceller, SH-SY5Y- og PC12-celler, samt undersøke om eventuell påvirkning endrer seg over tid, og om de ulike celletypene responderer forskjellig.
2. Undersøke om VPA og LTG påvirker kalsiuminfluks i kyllingkornceller, og se om legemidlene utøver forskjellig effekt på DIV3 og DIV4.
3. Undersøke om VPA og LTG påvirker uttrykk av PAX6, PCNA, β 2-SPEKTRIN, TUJ1 og GFAP i korncellekultur høstet fra lillehjernen til kyllingembryo etter eksponering *in vitro* eller *in vivo*. Videre undersøke om det er forskjell i uttrykk ved de to eksponeringsformene, og se om proteinuttrykket har sammenheng med eventuelle endringer sett i viabilitetsstudiene.

2 MATERIALER OG METODER

2.1 Produkt- og utstyrsliste

Tabell 2.1 Oversikt over kjemikalier og biologiske produkter	
Produkt	Leverandør
2-Merkaptoetanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Albumin Standard	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Anti-Adherence Rinsing Solution	Stemcell Technologies, Vancouver, Canada
Antistoffer – se tabell 2.2	-
AraC	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Basal Medium Eagle (BME), Gibco™	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
BioWhittaker's® DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Lonza Bioscience, Basel, Sveits
Blokkebuffer, Intercept™	Li-COR Bioscience, Lincoln, USA
Bromfenolblått	Merck KGaA Darmstadt, Tyskland
BSA, HyClone™, fraksjon V	GE Healthcare Life Sciences, Utah, USA
Deoksyribonuklease I fra kalvepankreas Type IV, lyofilisert pulver	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
ECM, Cultrex® Stem Cell Qualified, Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix	Bio-Techne, Minneapolis, USA
EDTA	VWR Life Science, Radnor, USA
Elfobuffer TGS (Tris/Glycin/SDS) 10x	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Etanol (absolutt alkohol)	Antibac, Oslo, Norge
Føtalt kalveserum, Gibco™	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Glukose	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
H-transferrin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hesteserum, Gibco™	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Hoechst 33342	Invitrogen, Carlsbad, USA
Hydrogenklorid (HCl)	VWR Life Science, Radnor, USA
Insulin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kaliumklorid (KCl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Kalsiumklorid dihydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kyllingserum, Gibco™	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
<i>L</i> -Glutamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
LTG i DMSO: Lamotrigine, L3791	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
LTG i H ₂ O: Lamotrigine isethionate, SML1082	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MgSO ₄	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Na ₂ SeO ₃	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NaCl	VWR Life Science, Radnor, USA
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Natriumdeoksylat monohydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumpyruvat	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
NGF	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Carlsbad, USA
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PMSF	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Poly- <i>L</i> -lysin hydrobromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ponceau S solution	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Precision Plus Protein™ All Blue Standard	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Putrecin dihydroklorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Resazurin natriumsalt	Alfa Aesar (Thermo Fischer Scientific, UK)
SDS	Shelton Scientific (Sigma-Aldrich, USA)
Sitronsyre (AnalaR)	BDH Chemicals l.td., Poole, UK
Strippebuffer (NewBlot™ Nitro)	Li-COR Biosciences, Lincoln, USA
Trans-Blota® Turbo™ 5x	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Tri-jodid- <i>L</i> -tyronin-natriumsalt (T3)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris base	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tris-HCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin inhibitor (soybean)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Tween® 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Valproic sodium salt, P4543	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabell 2.2 Oversikt over antistoff			
Western blot			
1AB	β-AKTIN (Ms)	1:10 000	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
	PAX6 (Rb)	1:5000	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
	PCNA (Ms)	1:1000	Dako, Berlin, Tyskland
	β2-SPEKTRIN (Ms)	1:1000	BD Transduction Laboratories
2AB	Donkey, anti-Mouse IgG-HPR	1:10 000	Li-COR Biosciences, Lincoln, USA
	Donkey, anti-Rabbit IgG-HPR	1:10 000	Li-COR Biosciences, Lincoln, USA
Immunocytokjemi			
1AB	TUJ1 (Rb)	1:2000	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
	PAX6 (Rb)	1:200	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
	GFAP (Ms)	1:500	Cell Signal Technology
	β2-SPEKTRIN (Ms)	1:100	BD Transduction Laboratories
	PCNA (Ms)	1:25	Dako, Berlin, Tyskland
2AB	Donkey anti-rabbit Alexa 488	1:1000	Invitrogen, Carlsbad, USA
	Donkey anti-mouse Alexa 594	1:1000	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>Rb = produsert i kanin, Ms = produsert i mus.</i>			

Tabell 2.3 Oversikt over utstyr og instrumenter	
Produkt	Leverandør
96-brønnsbrett, svarte med glassbunn	Corning Inc., Corning, USA
Alcohol Pads	B. Braun Medical, Melsungen, 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 glassbunn	Corning Inc., Corning, USA
Cellekulturskåler (Nunc™)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Elektroforeseapparat (BioRad Power Pac 300)	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Elektroforesekar	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Engangsskalpell	Swann-Morton Ltd., Sheffield, England
Engangssprøyter	B. Braun Medical, Melsungen, Tyskland
Eppendorfrør	Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland
IncuCyte S3	Sartorius, Biohit, Finland
Kanyler (sterile)	B. Braun Medical, Melsungen, Tyskland
Kjølesentrifuge (Heraeus Fresco 21)	Thermo Fischer Scientific, Rockford, USA
LAF-benk (Holten LaminAir, modell 1.2)	Eco Holten AS, Danmark
Magnetrorer (RCT basic)	IKA®, Staufen, Tyskland
Mikroskop (Leica DM LS)	Leica, Wetzlar, Tyskland
Mikroskop (Nikon Inverted Microscope Eclipse TE300)	Nikon Corporation, Tokyo, Japan
Mini-PROTEAN® TGXTM Gels med 4-20 % gradient, 15 brønner	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Odyssey-CLx Imaging System	Li-COR Biosciences, Lincoln, USA
Pasteurpipette	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Petriskåler (polysteren)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pierce® BCA Protein Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
Pipetter (sterile)	Corning Inc., Corning, USA
Pipettespisser	Sartorius Biohit, Finland

Plateleser (CLARIOstar®)	BMG Labtech, Ortenberg, Tyskland
Rugeskap (OvaEasy 380 Advance EXII)	Brinsea, Weston-super-Mare, UK
Rullebrett (Stuart Rollermixer SRT9)	VWR Life Science, Radnor, USA
Sterilfilter (0,2 µm)	Whatman, Maidstone, UK
Tellekammer (Neubauer 0.100 mm Tiefe Depth Profondeur)	Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen, Tyskland
Vannbad (Sub Aqua 12)	Grant Instruments, Royston, UK
Vekt: finvekt (CP225D)	Sartorius AG, Tyskland
Vekt: grovvekt (Valor 3000 XtremeW)	Ohaus, Sveits
Whirlmikser	Terumo Lab AS, Leuven, Belgia

2.2 BEHANDLING AV BRETT

2.2.1 Forbehandling av 96- og 6-brønnsbrett med PLL

For å redusere tap av celler ved bytting av medium før legemiddeleksponering eller vasketrinn i noen av metodene, ble brett behandlet med poly-*L*-lysin (PLL). PLL er en positivt ladet aminosyrepolymer, og øker elektrostatiske interaksjoner mellom den negativt ladede cellemembranen og brettets overflate slik at cellene får økt adhesjon (97).

Det ble tilsatt 100 µL og 1,5 mL PLL-løsning til hver brønn i henholdsvis 96- og 6-brønnsbrett. Løsningen ble fjernet etter ca. en time. Brett til studier av kyllingkornceller, og studier med FDA og PI i SH-SY5Y-celler, ble forbehandlet med PLL. *Detaljert protokoll finnes i vedlegg 2 avsnitt 8.1.1.*

2.2.2 Behandling av 96- og 6-brønnsbrett med ECM

I enkelte forsøk ble brett også behandlet med ekstracellulær matriks (ECM, engelsk: extracellular matrix). Dette ble gjort i tilfeller hvor det var sett at mange celler falt av ved utføring av metoder med mange vasketrinn. Polymerisering av ECM aktiveres ved 20-40 °C og vil blant annet øke cellenes adhesjon til brettets overflate. ECM-gelen er sensitiv for temperaturendringer, og polymeriseringen vil skje i løpet av 5-10 minutter når denne temperaturen nås. For å unngå at dette skjer for tidlig, må utstyr som benyttes til håndtering av ECM-løsningen være kjølig, og brettene som behandles må stå på is (98).

Behandling av 96-brønnsbrett med ECM ble gjort ved forsøk med kalsiuminfluks i kyllingkornceller og forsøk med FDA/PI i SH-SY5Y-celler, samt ved utplating av kyllingkornceller i 6-brønnsbrett for høsting til Western blot (WB). *Detaljert protokoll finnes i vedlegg 2 avsnitt 8.1.2.*

2.2.3 Behandling av 96-brønnsbrett med AARS

For utplating av aggregerte SH-SY5Y-celler i 96-brønnsbrett, ble brettene forbehandlet med AntiAdherence Rinsing Solution (AARS). AARS er en surfaktant og fører til redusert overflatespenning. Forbehandling med AARS ble gjort for å unngå at cellene skulle feste seg til skålen slik at de opprettholdt sin flytende, aggregerte tilstand i mediet (99). *Detaljert protokoll finnes i vedlegg 2 avsnitt 8.1.3.*

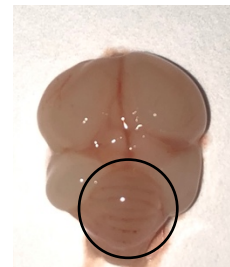
2.3 PREPARERING OG UTPLATING AV CELLEKULTURER

2.3.1 Kyllingkornceller

Lillehjerner ble høstet fra befruktete hønseegg av arten *Gallus gallus domesticus* av stammen Ross 308. Eggene ble levert av Nortura Samvirkekylling (Våler, Norge). For å etterlikne virkelig rugning, ble eggene plassert i pappbrett i hyller med regelmessig bevegelse slik at eggene vendte frem og tilbake. Rugingen ble utført i OvaEasy 380 Advance EXII inkubator ved 37,5 ° C og 45 % luftfuktighet. Kyllingembryo er etter E14 definert som dyr, og omfattes av lov om dyrevelferd og EU direktivet 2010/63/EU. Alle prosedyrer ble gjort i samsvar med gjeldende regelverk. Prosjektet er godkjent av mattilsynet med FOTS-ID: 13896. Det ble ikke utført kjønnsbestemmelse av embryoene, og eventuelle forskjeller mellom kjønn er det derfor ikke tatt høyde for. Etter gjennomlysning av egg, ble egg ansett som ubefruktede fryst ned ved -20 °C for å sikre at disse ikke var levende. Disse ble videre destruert.

2.3.2 Preparering av kyllingkornceller

Eggene ble dekket med is i 7 min for å bedøve embryoene før avliving ved dekapitering. Eggene ble desinfisert i etanol (EtOH) [70 %] før klekking for å unngå kontaminasjon av embryoene før overføring til LAF-benk. Dekapiteringen ble utført med steril skalpell ved å kutte over nedre del av halsen. For å få ut lillehjernen ble bakre del av hodeskallen åpnet med saks, og brettet over fremre del. Ved å legge et lett press med pinsetten på oversiden av hodet, poppet lillehjernen fram. Lillehjernen var lett gjenkjennelig ved at den har et stort nettverk av synlige blodårer som skiller den utseendemessig fra de andre hjernedelene (**figur 2.1**). Etter høsting ble lillehjernen rensset for hjernehinner og blod.



Figur 2.1 Lillehjerne fra kyllingembryo på E17. Lillehjernen er omringet.

Det ble benyttet definerte løsninger for de ulike trinnene fra høsting av lillehjerne til ferdiglaget korncellesuspensjon. Ulike salter tilføres for å bevare riktig osmolaritet og for å justere pH. Trypsin tilsettes for å bryte opp bindinger mellom cellene, slik at suspensjonen hovedsakelig består av enkeltceller og er uten celleklumper. Trypsin har optimal aktivitet ved 37 °C, og røret med cellesuspensjon ble derfor satt i vannbad med denne temperaturen.

Rørene ble vendt regelmessig for at trypsin skulle komme til overalt. Ved for lang trypsinering, vil også cellenes overflateproteiner degraderes og cellene vil dø (100). For å unngå dette ble det derfor tilsatt trypsininhibitor for å inaktivere trypsin.

Prosessen med å dissosiere vevet fra lillehjernen til en suspensjon av enkeltceller vil alltid medføre ødeleggelse og lysing av noen celler. Fra disse cellene vil DNA lekke ut og føre til at cellene klumper seg (101). Det ble derfor tilsatt deoksyribonuklease (DNAse) I for å bryte ned slikt DNA. Cytosine β -D-arabinofuranosid (AraC) ble tilsatt i cellesuspensjonen til en sluttkonsentrasjon på 5 μ M. AraC inhiberer proliferasjon av ikke-nevronale celler, slik som gliaceller, og gir en cellekultur hovedsakelig bestående av kornceller (102). Gliaceller kan påvirkes av legemiddeleksponering på annen måte enn nevroner, noe som kan føre til misvisende resultater for nevronal viabilitet ved viabilitetsstudier (103). AraC ble ikke tilsatt til cellesuspensjonene fra injiserte egg til Western blot (WB), eller for immunocytokjemi (ICC). *Detaljerte protokoller for håndtering av kyllingkornceller finnes i vedlegg 2 avsnitt 8.2.1 og 8.2.2.*

2.4 SH-SY5Y- og PC12-CELLER

SH-SY5Y- og PC12-celler er etablerte cellelinjer for studier innen neurobiologi. SH-SY5Y-celler stammer opprinnelig fra en human neuroblastoma (92). PC12-celler har sitt opphav i en feokromocytoma fra binyremargen i rotte (104).

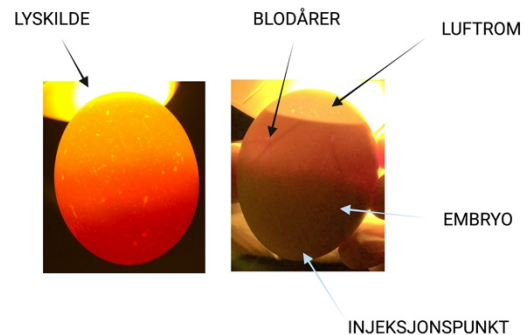
2.4.1 Splitting av SH-SY5Y- og PC12-celler

Cellene ble splittet to ganger ukentlig ved omtrent 80 % konfluens. Cellene ble dyrket i dyrkningsflasker, og omtrent 15 % av cellene ble overført til nye flasker ved hver splitting. Etter fjerning av medium, ble flasken vasket forsiktig med PBS. Mediet som cellene ble dyrket i inneholder serum, som inhiberer virkningen til trypsin. Vasketrinnet ble derfor utført for å fjerne mest mulig av gjenværende serum. Trypsinløsning ble tilsatt for at cellene skulle løsne fra overflaten og bryte bindinger mellom cellene for å få en suspensjon med enkeltceller. Videre ble det tilsatt serumholdig medium for å inaktivere trypsin. For SH-SY5Y- eller PC12-celler til differensiering ble henholdsvis RA eller NGF tilsatt i medium med lavt innhold av serum. *Detaljerte protokoller for behandling av SH-SY5Y- og PC12-celler finnes i vedlegg 2 avsnitt 8.2.3 til og med 8.2.6.*

2.5 LEGEMIDDELEKSPONERING

2.5.1 Legemiddeleksponering *in ovo*: injisering av egg på E16

Befruktede egg med vekt 53–59 g ble benyttet til injisering. Injiseringen ble utført i allantoishulrommet på motsatt side av eggets luftrom (**figur 2.2**). Eggene ble eksponert for VPA, LTG, eller kontroll-løsning. Legemiddelløsningene hadde konsentrasjon VPA 500 mM og LTG 20 mM. Disse var løst i fysiologisk saltvann tilsvarende kontroll-løsningen. Det ble injisert 60 µL; et volum som tilsvarer ca. 1 µL løsning per gram egg. Dette tilsvarer en dose på VPA 83,1 mg/kg egg og LTG 7,6 mg/kg egg. *Detaljert protokoll finnes i vedlegg 2 avsnitt 8.3.1.*

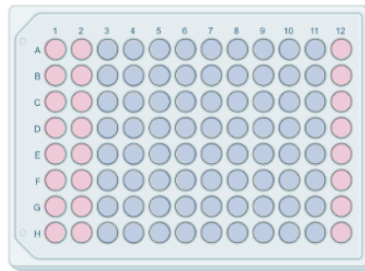


Figur 2.2 Bilde av ubefruktet (t.v.) og befruktet egg (t.h). Egget injiseres i allantoishulrommet, som er på motsatt side av eggets luftrom. Skallet desinfiseres før det lages et injeksjonshull med en syl; injeksjonspunktet velges et sted uten synlige blodårer. Deretter injiseres 60 µL injeksjonsløsning forsiktig.

2.5.2 Legemiddeleksponering *in vitro*: eksponering i 96-brønnsbrett til studier av viabilitet og immunocytokjemi

Eksponeringsløsningene besto av enten VPA eller LTG i ulike konsentrasjoner blandet i medium, eller kontroll-løsning bestående av tilsvarende medium (**figur 2.3**). Det ble i noen forsøk lagt til kontroller av legemidlenes løsningsmidler: H₂O eller DMSO. Det ble da tilsatt samme volum H₂O eller DMSO tilsvarende volumet til den høyeste legemiddelkonsentrasjonen. Denne løsningsmiddelkontrollen ble alltid lagt til i forsøk hvor det ble benyttet LTG i DMSO. I noen forsøk ble det lagt til en positiv kontroll med H₂O₂ for å sjekke om cellene responderte på toksisk påvirkning.

Kyllingkornceller og udifferensierte SH-SY5Y- og PC12-celler ble eksponert dagen etter utplating med 100 µL eksponeringsløsning. Legemiddeleksponeringen av aggregerte SH-SY5Y-celler ble utført i forbindelse med utplatingen. Etter tilsetting av 90 µL celleduspensjon til hver brønn, ble det da tilsatt 10 µL eksponeringsløsning. For SH-SY5Y- og PC12-celler til differensiering over én, tre eller syv dager, ble eksponeringen utført henholdsvis én, tre eller syv dager etter utplating. *Detaljert protokoll finnes i vedlegg 2 avsnitt 8.3.2.*



Figur 2.3 Eksponering av celler i 96-brønnsbrett.

Alle brønner eksponert for samme løsning, på samme brett, regnes som tekniske replikater.

Blå: eksponeringsløsninger, rosa: ubehandlede celler i samme medium som eksponeringsløsningene er løst i.

Her: 1: blank, 2+12: kontroll, 2-11: eksponeringsløsninger (ulike konsentrasjoner av VPA eller LTG, H₂O, DMSO eller H₂O₂). Figuren er laget i BioRender.

2.6 VIABILITETSSTUDIER

Det ble utført ulike metoder for å undersøke hvordan legemidlene påvirket viabiliteten i kyllingkornceller, SH-SY5Y- og PC12-celler. Endringer i viabilitetsstudiene kan tyde på forandring av cellenes metabolismekapasitet eller skyldes endring i antall viable celler. I denne oppgaven blir endringer fra kontroll i viabilitetsstudiene omtalt som endring av viabilitet, men andre studier må utføres for å si noe mer om hva som er årsaken til eventuelle endringer sett i viabilitetsstudiene.

2.6.1 Viabilitetsstudier med MTT

Det gule tetrazoliumsaltet MTT (3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid) omdannes av metabolsk aktive celler til lilla formazan-krystaller. MTT er positivt ladet og penetrerer viable celler. Metabolismen skyldes at disse cellene har NAD(P)H-avhengige oksidoreduktase-enzymmer som reduserer MTT til formazan. Ettersom formazan-krystallene er uløselige i vann og dermed fanges inni cellene, må de løses i et organisk løsningsmiddel før måling av absorbans. Dette er en kolorimetrisk metode hvor løsningen vil få mørkere farge jo flere viable, metabolsk aktive celler som er til stede. Absorbansen leses av på plateleser ved 570 nm (105, 106). *Detaljert protokoll finnes i vedlegg 2 avsnitt 8.4.1.*

2.6.2 Viabilitetsstudier med RZ

Reazurin (RZ), også kalt Alamar Blue, reduseres til resorufin av viable celler med aktiv metabolisme. RZ har en blå farge, men avgir ikke fluorescens. Resorufin er rosa og

fluorescerer. Fluorescensen måles ved ex 560 nm/em 590 nm og gir en indikasjon på forekomsten av aktive celler (106). *Detaljert protokoll finnes i vedlegg 2 avsnitt 8.4.2.*

2.6.3 Viabilitetssudier med FDA/PI i SH-SY5Y-celler og med PI i PC12-celler

Eventuell reduksjon i viabilitet observert i viabilitetsstudiene kan ha andre årsaker enn celledød. En årsak kan være endring i cellenes metabolismekapasitet. For å bekrefte eller avkrefte at slike endringer skyldes endret viabilitet ble det utført farging med propidiumjodid (PI, engelsk: propidium iodide) og fluorescein diacetat (FDA). PI er et rødt fluorokrom som bindes til nukleinsyrer, og vil derfor farge DNA og RNA. PI trenger ikke gjennom cellemembraner, og vil derfor kun farge celler uten intakt cellemembran. FDA er cellepermeabelt, og kan omdannes til det grønne fluorokromet fluorescein av esteraser i viable celler. Fluorescein vil da fanges i cellene. Ved å dobbeltfarge cellene med PI og FDA, er det mulig å evaluere både døde og viable celler (103, 107, 108). *Detaljert protokoll finnes i vedlegg 2 avsnitt 8.4.3 (SH-SY5Y-celler) og 8.4.4 (PC12-celler).*

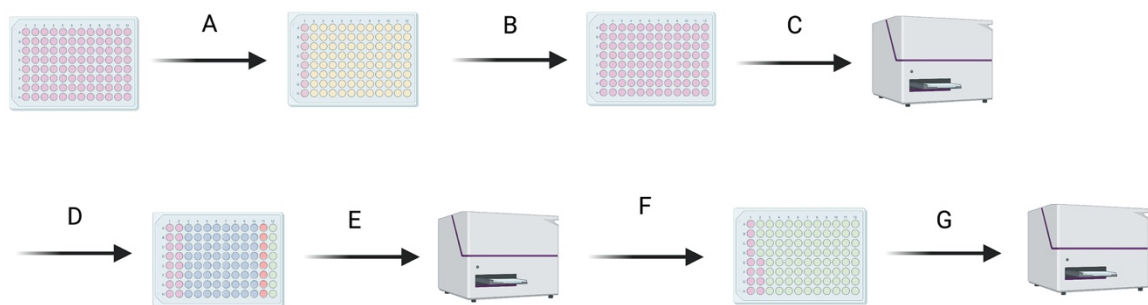
2.6.4 DNA-kvantifisering med Hoechst 33342 i kyllingkornceller

Hoechst 33342 (HO342) er et fluorokrom som binder til DNA i områder med adenin-tymin-basepar. HO342 eksiteres av UV-stråling og avgir blå fluorescens ved 460–490 nm. Ved binding til DNA vil styrken på fluorescens-signalet øke (109). Fluorescensen vil være sterkest ved binding til DNA som er kondensert (tett sammenpakket) i kromatinet (110).

Etter HO342-farging (løsning 1, **tabell 7.12**) ble cellene vasket for å fjerne overflødig fargestoff (løsning 2, **tabell 7.12**). Vaskeløsningen inneholdt kobbersulfat som bidrar til stabilisering av cellene, og forhindrer lysering ved inkubering i detergenten natriumdodecylsulfat (SDS, engelsk: sodium dodecyl sulfate) i videre trinn. pH er avgjørende for å oppnå optimal intensitet av HO342-signalet, og pH ble derfor justert til 7. Til slutt ble det tilsatt elueringsbuffer (løsning 4, **tabell 7.12**) hvor HO342 bundet til DNA, elueres. Ved elueringen trekkes fargestoffet ut og inngår i miceller dannet av SDS. I tillegg til at micellene er viktige for elueringen, antas det at de også bidrar til å øke fluorescens-signalet ved å beskytte fargestoffet mot degradering (111). *Detaljert protokoll finnes i vedlegg 2 avsnitt 8.4.5.*

2.7 Kalsiuminfluks-studier med Fura-2 AM i kyllingkornceller

Kalsiuminfluks-studier med Fura-2 acetoksymetyler (Fura-2 AM) er en metode for å monitorere endringer i fritt intracellulært kalsium. Cellemembraner er permeable for Fura-2 AM, som raskt vil de-estrikeres til kalsium-chelatoren Fura-2 av esteraser i cytoplasma. Fura-2 er selektiv, har høy affinitet for Ca^{2+} og vil avgi fluorescens. Når fritt Ca^{2+} i cytoplasma binder til Fura-2, vil eksitasjonstoppens bølgelengde endres fra 380 til 340 nm. Samtidig vil emisjonstoppen på 505 nm forbli uendret. Metoden er en ratiometrisk måling og forholdet mellom signalstyrken fra de to eksitasjonstoppe gir et mål på kalsiumnivået i cellen. For å etablere en grunnlinje hvor det er minimalt med kalsium inni cellen, tilsettes Mg^{2+} -buffer som inhibitor av kalsiuminfluks (112, 113). Cellene eksponeres for legemiddel som del av metoden (**figur 2.4**). *Detaljert protokoll finnes i vedlegg 2 avsnitt 8.5.*



Figur 2.4 Illustrasjon av kalsiuminfluks-studier med Fura-2.

A: Inkubering med Fura-2 AM, unntatt kolonne til blank (her: rosa). **B:** Vasketrinn og inkubering med Mg^{2+} -buffer. **C:** Avlesning av grunnlinje på plateleser. **D:** Vasketrinn og tilsetning av eksponeringsløsninger (her: rosa = blank eller kontroll, blå = legemidler, rød = inhibitor, grønn = aktivator). **E:** Avlesning på plateleser hvert 5.-15. min. i 5-90 min. **F:** Inkubering med stimulerende buffer, unntatt blank og halve kontroll (her: rosa = uten stimulerende buffer, grønn = med stimulerende buffer). **G:** Avlesning på plateleser. Figuren er laget i BioRender.

2.8 WESTERN BLOT

WB er en metode for å identifisere spesifikke proteiner i en blanding av mange proteiner. Proteinene separeres basert på molekylvekt ved gelelektroforese, og overføres til en membran. Membranen blir deretter inkubert med antistoff som spesifikt binder det proteinet man ønsker å detektere. Dette er primærantistoffet (1AB). Ved indirekte deteksjon er det nødvendig å benytte et sekundærantistoff (2AB) som bindes til 1AB. 2AB er merket med fluorokrom og vil avgi fluorescens (114). (115, 116).

2.8.1 Høsting av kyllingkornceller eksponert *in vivo*

Lillehjernen fra kyllingembryo eksponert for VPA, LTG eller kontroll-løsning *in ovo*, ble høstet på E17 og preparert til kultur av kyllingkornceller som ble platet ut i 6-brønnsbrett. Utplating av cellene ble gjort i sammenheng med at brettene ble behandlet med ECM.

For å undersøke eventuelle endringer i proteinuttrykk som følge av legemiddeleksponering *in ovo*, må proteinene først ekstraheres fra cellene. RIPA-buffer egner seg til lysing av celler for ekstraksjon av cytoplasmiske proteiner, membranproteiner og kjerneproteiner før utføring av SDS-denaturering for polyakrylamid gelelektroforese (117). RIPA-buffer inneholder blant annet Triton X-100 som er en ikke-ionisk surfaktant og emulgator (118, 119).

Natriumdeoksyholat og SDS er ioniske surfaktanter. Surfaktantene er tilsatt for å lysere cellene slik at proteinene kan ekstraheres (120). Etylendiamintetraacetat (EDTA) har blant annet inhiberende effekt på proteaser i tillegg til å beskytte mot oksidative ødeleggelser. Tris-HCl brukes for å justere pH og forhindre denaturering av proteinene. Proteaseinhibitorer (leupeptin, pepstatin A og PMSF) og fosfataseinhibitor (Na_3VO_4) ble tilsatt for å hindre at proteinene ble degradert av henholdsvis proteaser og fosfataser i cellene. Prøvene ble hele tiden holdt på is for å unngå denaturering av proteinene (121-124). *Detaljert protokoll finnes i vedlegg 2 avsnitt 8.6.1*

2.8.2 Proteinmåling med BCA

Proteinmengden ble målt for å ha kontroll på hvor mye protein som ble satt på gelen ved gelelektroforese (**avsnitt 2.8.4**). Pierce™ BCA Protein Assay Kit ble brukt. Proteiner inneholder amidester og vil i alkalisk løsning redusere Cu^{2+} til Cu^{1+} . Reagens B inneholder kobber(II)sulfat som vil gjennomgå reduksjon i nærvær av protein, og det vil da dannes et lyseblått kompleks. Reagens A inneholder bichikoninsyre (BCA, engelsk: bicinchoninic acid) som videre vil danne chelat med Cu^{1+} , noe som resulterer i et vannløselig kompleks med absorbans ved 562 nm. Absorbansen viser sterk linearitet med økende proteinkonsentrasjon. Ved etablering av en standardkurve fra ulike konsentrasjoner av bovint serumalbumin (BSA), er det mulig å beregne proteinkonsentrasjonen i prøven (125). *Detaljert protokoll finnes i vedlegg 2 avsnitt 8.6.2.*

2.8.3 Koking av prøver

Prøvene ble varmebehandlet ved 95 °C etter utblanding 1:3 i Laemmli-buffer [x4]. Laemmli-buffer inneholder Tris-HCl, SDS, glyserol, 2-merkapoetanol og bromfenolblått. Glyserol gir prøvene tyngde slik at de synker til bunns i brønnene i gelen etter påsetting. Behandling med SDS gjør at proteinene i prøvene får negativ ladning, og derfor vil vandre mot positiv pol ved gelelektroforese (126). For å gjøre det mulig å ha kontroll på hvor langt separasjonsprosessen har kommet til enhver tid, er det tilsatt bromfenolblått som er et blått fargestoff. Dette er viktig for at ikke prøvene kjøres ut av gelen (114). *Detaljert protokoll finnes i vedlegg 2 avsnitt 8.6.3.*

2.8.4 Gelelektroforese

Ved gelelektroforese separeres proteinene basert på molekylvekt, hvor de letteste proteinene vandrer lengst nedover i gelen. For å ha kontroll på molekylvekt, settes det på en proteinstandard (114). Proteinstandarden Precision Plus Protein™ All Blue Standards ble brukt. Det ble benyttet ferdigstøpte geler fra Bio-Rad. Gelene var av typen Mini-PROTEAN® TGX™ med 4-20 % gradient. Det ble tilsatt 40 µL per brønn tilsvarende 15 eller 10,5 µg protein. Gelen ble kjørt på 150 V i ca. 1 time i et gelelektroforesekar fylt med Elfbuffer. *Detaljert protokoll finnes i vedlegg 2 avsnitt 8.6.4.*

2.8.5 Blotting av gel

Etter at proteinene er separert, skal de overføres til en nitrocellulosemembran. Membranen legges over gelen, innbakt i en «sandwich» med filterpapir på hver side. Sandwichen fuktes med transferbuffer og legges i blottemaskinen. Fuktingen utføres for at proteinene skal overføres fullstendig til membranen i tillegg til å beskytte gelen og membranen under blottingen (114). Blottingen ble utført i Trans-Blot® Turbo™ Transfer System fra Bio-Rad. Overføringen av proteinene fra gelen over til membranen skjer når det igangsettes et elektrisk felt satt vinkelrett på overflaten av gelen. Blottingen ble utført ved 25 V og 2,5 A i 15 minutter. *Detaljert protokoll finnes i vedlegg 2 avsnitt 8.6.5.*

2.8.6 Ponceau S-farging og blokking av membran

Membranen legges i Ponceau S-løsning for å farge proteinene. Det ble benyttet Ponceau S-løsning fra Sigma-Aldrich. For å unngå uspesifikk binding (binding til epitoper som ikke tilhører målproteinene) mellom antistoffene og membranen, må membranen blokkkes. Dette vil

redusere bakgrunnsstøy i tillegg til å fjerne falske positive resultater (127). Det ble benyttet blokkebuffer fra Li-COR. *Detaljert protokoll finnes i vedlegg 2 avsnitt 8.6.6.*

2.8.7 Inkubering med antistoffer og fremkalling av membran

Som 1AB ble det benyttet β -AKTIN, PCNA og β 2-SPEKTRIN produsert i kanin (Rb, engelsk: rabbit), og PCNA produsert i mus (Ms). Det ble videre benyttet anti-Rb og anti-Ms produsert i esel som 2AB. Fremkallingen ble utført på Odyssey-CLx Imaging system og kvantifisering av båndstyrke ble utført i ImageJ. Membranen ble plassert med proteinsiden ned mot scanneren. *Detaljert protokoll finnes i vedlegg 2 avsnitt 8.6.7.*

2.8.8 Stripping av membran

Ved stripping av membranen fjernes antistoffene. Samme membran kan derfor brukes om igjen til deteksjon av andre proteiner ved påsetting av nye antistoffer. Strippingen ble utført med NewBlot™ Nitro Stripping buffer etterfulgt av omfattende vasketrinn med PBS og TBS-T. *Detaljert protokoll finnes i vedlegg 2 avsnitt 8.6.8.*

2.9 Immunocytokjemi i kyllingkornceller

Det er også mulig å detektere proteiner i celler etter legemiddeksponering *in vitro*. Til dette formålet ble det utført ICC. Cellene må permeabiliseres for at antistoffene skal komme i kontakt med sitt målprotein. Metanol (MeOH) er et organisk løsningsmiddel som fjerner lipider og fører til at cellene blir dehydrert. I tillegg blir cellulære komponenter denaturert og utfelt. Ved fiksering med MeOH er det ikke nødvendig å tilsette en detergent, ettersom MeOH også permeabiliserer cellene. Etter fiksering og permeabilisering må det tilsettes blokkebuffer for å redusere uspesifikk binding. Etter blokkering tilsettes antistoffene (115, 116). Som blokkebuffer ble det benyttet BSA [1 %] og geiteserum [1 %]. Det ble utført indirekte immunofluorescens-farging med samme prinsipp som for WB. Som 1AB ble det benyttet TUJ (Rb), PAX6 (Rb), GFAP (Ms) og β 2-SPEKTRIN (Ms). Som 2AB ble det benyttet anti-Rb Alexa 488 og anti-Ms Alexa 594 produsert i esel. *Detaljert protokoll finnes i vedlegg 2 avsnitt 8.7.*

2.10 Statistiske metoder

Resultatene ble analysert i GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc). Alle resultatene viste normalitet. Blankverdier ble trukket fra for å fjerne bakgrunnsstøy. Det ble kjørt One-Way ANOVA (enveis ANOVA, engelsk: one-way analysis of variance) etterfulgt av Dunnett's

post hoc-test. I forsøk basert på kun ett biologisk replikat, ble den statistiske analysen kjørt på de tekniske replikatene ($n = 6-16$). I forsøk med flere biologiske replikater ble dette gjort på gjennomsnittlige verdier fra hvert biologiske replikat, normalisert mot kontroll ($n = 2-7$). Signifikans ble definert ved $p < 0,05$ og angitt med stjerner (*) hvor *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$. Uteliggere ble fjernet ved ROUT (engelsk: Robust regression and Outlier removal) med $Q = 1\%$ (dersom det er en uteligger til stede, vil denne detekteres med en rate på falske uteliggere under 1%).

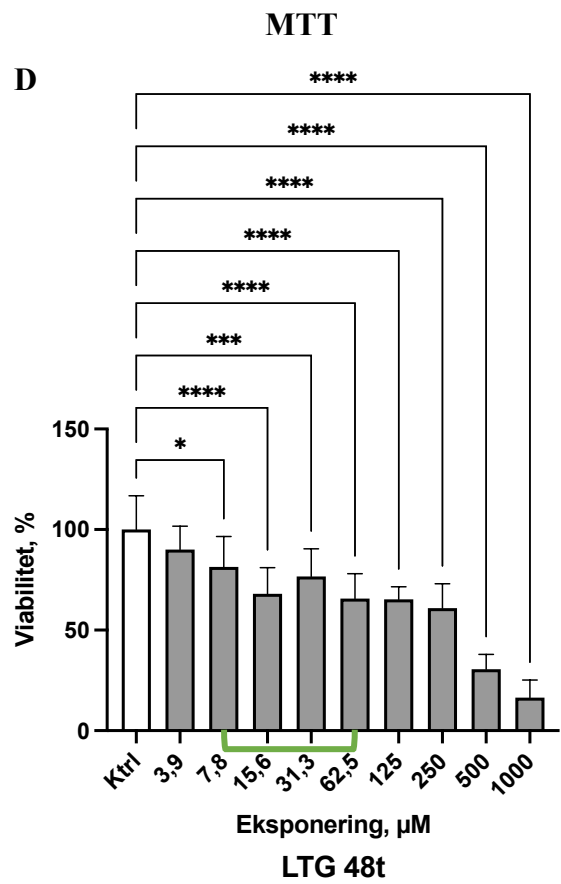
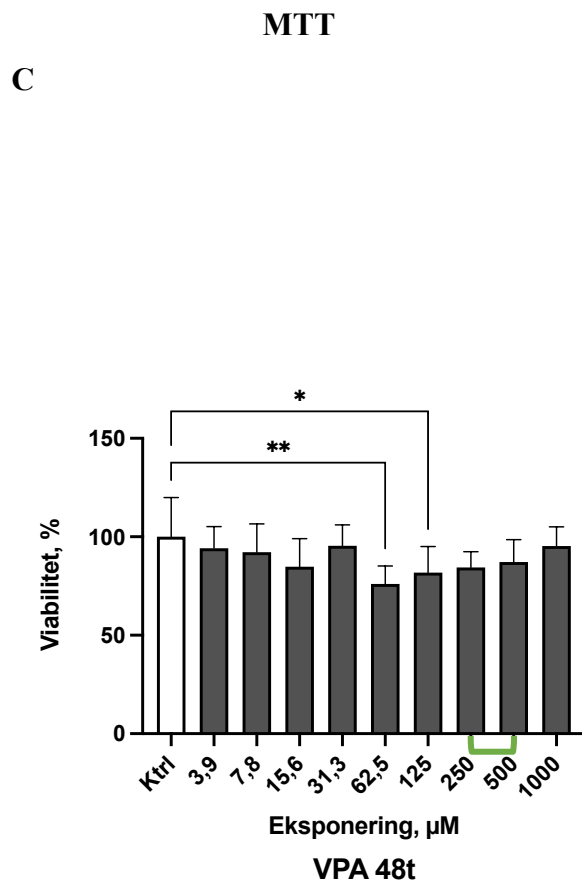
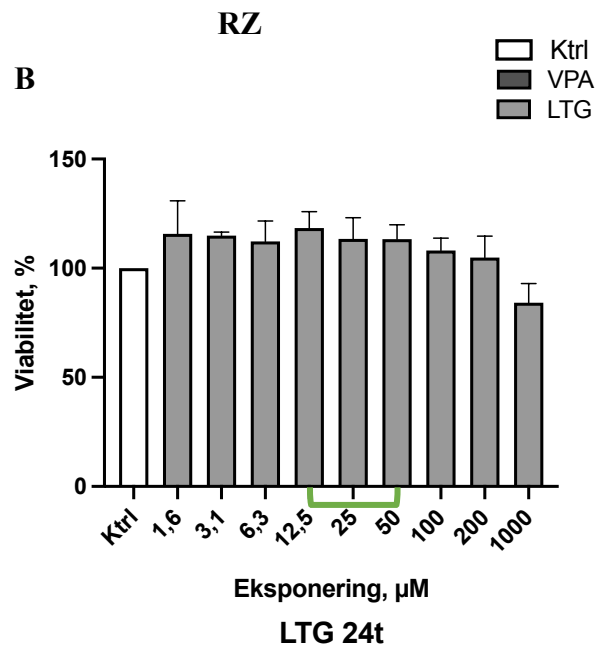
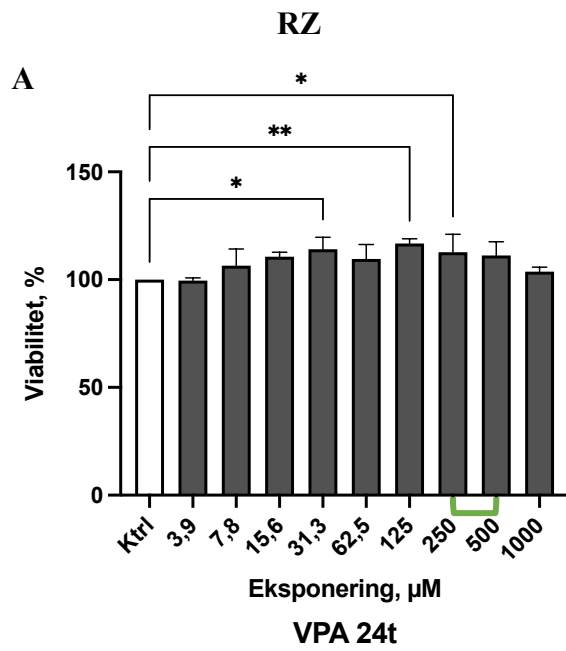
3 RESULTATER

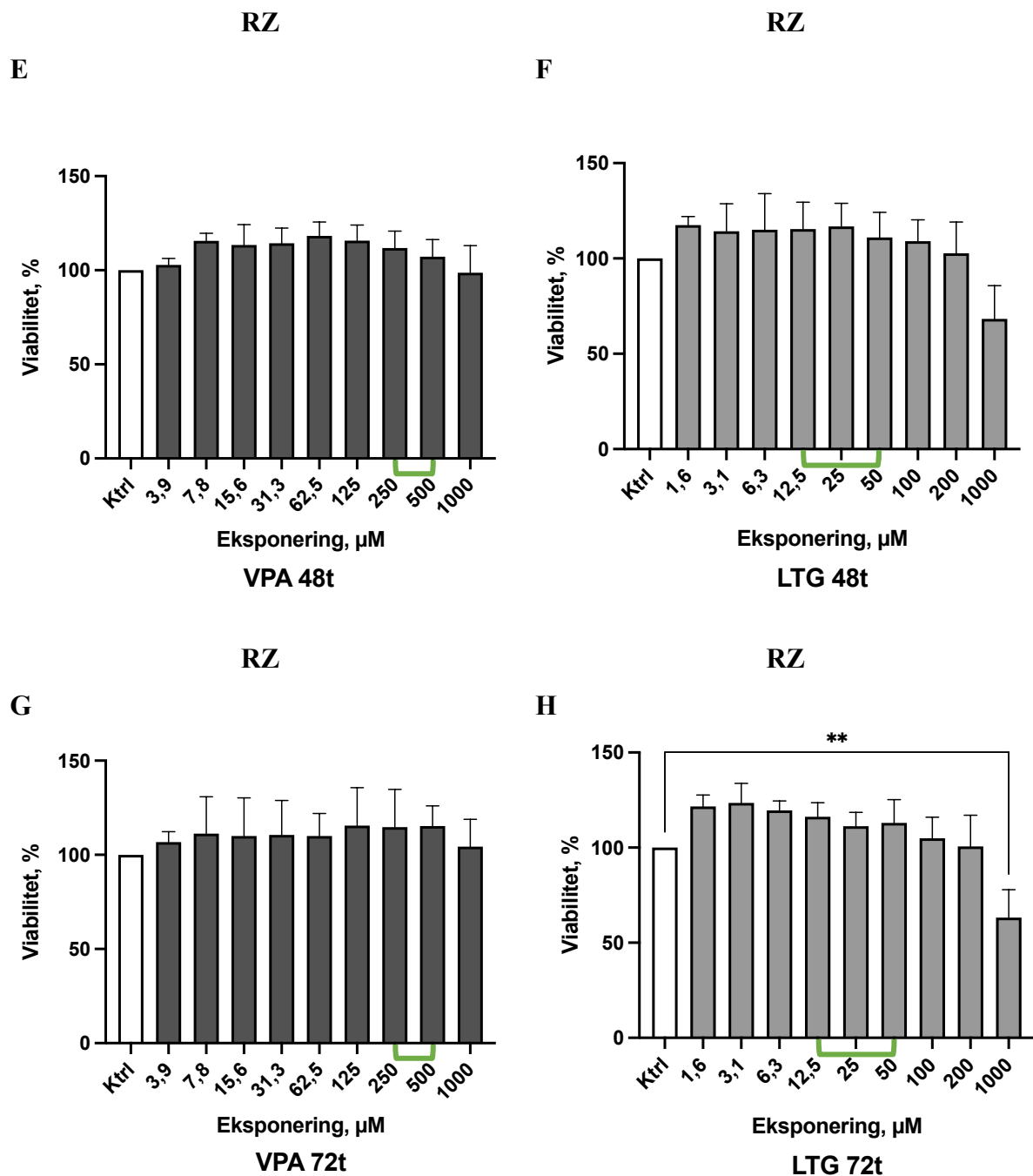
3.1 Viabilitetsstudier med MTT og RZ i kyllingkornceller

Ettersom MTT-analyse har flere ulemper knyttet til metoden (slik som frafall av celler og at det er cytotoxisk), ble det hovedsakelig utført viabilitetstester ved RZ-analyse. Dette var en relativt ny metode i forskningsgruppen.

Kyllingkornceller ble eksponert for VPA [3,9–1000 μM], LTG [1,6–1000 μM], eller kontroll-løsning før viabiliteten ble undersøkt ved MTT- eller RZ-analyse. Terapeutiske konsentrasjoner ved behandling med VPA eller LTG i menneske er henholdsvis 300–700 μM og 10–50 μM (70, 78). MTT ble tilsatt 48 timer etter eksponering og cellene ble deretter inkubert i tre timer ved 37 °C før avlesning av absorbans på plateleser ved 570 nm. Analysen ble utført på ett biologisk replikat, med 8–16 tekniske replikater per eksponeringsløsning. RZ ble tilsatt 24, 48, eller 72 timer etter eksponering og cellene ble deretter inkubert i fire timer ved 37 °C før avlesning av fluorescens på plateleser ved ex 560 nm/em 590 nm. RZ ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 440 μM . Analysen ble utført på fem biologiske replikater, med 8–16 tekniske replikater per eksponeringsløsning. Brett hvor blankverdier var høyere enn avlesningen av resorufin ble ekskludert grunnet negative verdier.

Det ble sett en signifikant økning i viabilitet fra kontroll ved eksponering for VPA 31,3 (*), 125 (**), og 250 (*) μM målt ved RZ-analyse (**figur 3.1 A**). Det var her en økning på 13–17 % fra kontroll. Det var liknende funn ved eksponering i 48 eller 72 timer målt ved RZ-analyse (**figur 3.1 E og G**), men endringen var her ikke signifikant. Ved eksponering for LTG 1000 μM var det en reduksjon i viabilitet. Denne var signifikant (**) etter eksponering i 72 timer (**figur 3.1 H**). Måling av viabilitet etter eksponering i 48 timer ved MTT-analyse, viste signifikant reduksjon ved eksponering for VPA 62,5 (**) og 125 (*) μM (**figur 3.1 C**). Ved eksponering for LTG var det signifikant reduksjon for alle konsentrasjoner, med viabilitet på 31 % og 16 % av kontroll ved eksponering for henholdsvis LTG 500 (****) og 1000 μM (****).





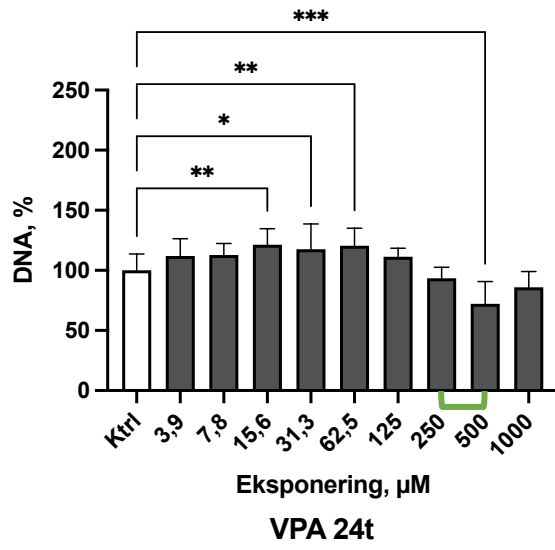
Figur 3.1 Viabiliteten til kyllingkornceller eksponert for VPA eller LTG, målt ved MTT- eller RZ-analyse. Kyllingkornceller ble eksponert for VPA [3,9–1000 μM] eller LTG [1,6–1000 μM] dagen etter utplating. Etter 24, 48, eller 72 timer eksponering ble det utført MTT- eller RZ-analyse. Ved MTT-analyse ble absorbansen avlest på plateleser ved 570 nm. Fluorescens ble avlest på plateleser ved ex 560 nm/em 590 nm som del av RZ-analyse. Ubehandlede celler ble brukt som kontroll. Gjennomsnittlige blankverdier ble trukket fra. Resultatene baserer seg på gjennomsnittet av tekniske replikater ($n = 6\text{--}16$) fra ett (C og D) eller tre (A, B, E-H) biologiske replikater. Gjennomsnittet av de tekniske replikatene er normalisert mot kontroll \pm SD normalisert mot kontroll. Uteliggere ble fjernet fra E (2) og H (7) ved ROUT ($Q = 1\%$). Statistiske analyser ble utført med One Way ANOVA. * angir signifikant forskjell fra kontroll (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$). Grønn klamme indikerer terapeutiske serumkonsentrasjoner ved legemiddelbehandling i menneske.

3.2 DNA-kvantifisering med Hoechst 33342 i kyllingkornceller

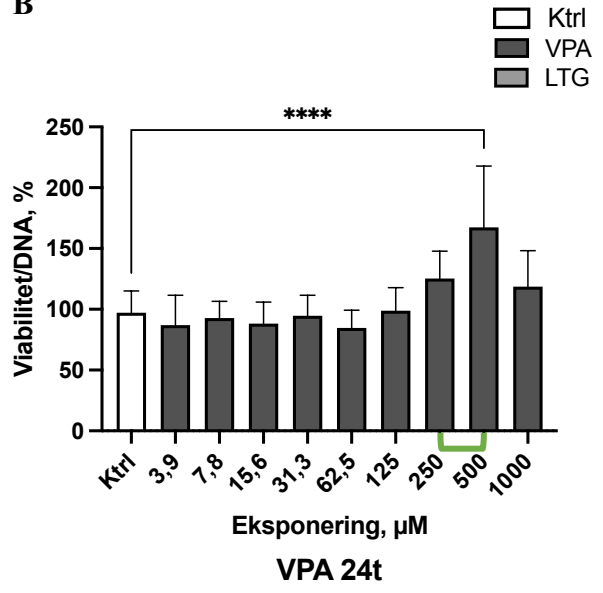
Enkelte brett benyttet til RZ-analyse ble fiksert i EtOH [70 %] og fryst ned ved -20 °C. Det ble senere utført DNA-kvantifisering med Hoechst i disse brettene. Cellene ble farget med Hoechst 33342, før fargestoffet ble eluert fra cellene og overført til et nytt, blankt 96-brønnsbrett. Deretter ble fluorescens avlest på plateleser ved ex 370/em 460. Metoden ble utført for å se om eventuelle endringer i viabilitetsstudiene hadde sammenheng med ulikt celleantall av kontrollceller og eksponerte celler.

Det ble sett en liten signifikant (*/**) økning i DNA-mengde sammenliknet med kontroll etter eksponering for VPA [15,6–62,5 µM] i 24 timer (**figur 3.2 A**). Ved eksponering for VPA 500 µM i 24 timer ble det sett en signifikant (***) lavere DNA-mengde enn i kontroll. Det var her en DNA-mengde på 72 % av kontroll. For tilsvarende eksponering ble det sett en signifikant (****) økning i viabilitet/DNA-mengde på 67 % fra kontroll (**figur 3.2 B**). Disse resultatene (**figur 3.2 A og B**) er basert på ett biologisk replikat. Etter 48 eller 72 timer eksponering med VPA ble det ikke sett signifikant endring fra kontroll i DNA-mengde eller viabilitet/DNA-mengde, med unntak av en liten økning i DNA-mengde ved eksponering for VPA 2,9 (*) eller 15,6 µM (*) i 72 timer (**figur 3.2 E**). Her var økningen på ca. 12 % fra kontroll. Ved eksponering for LTG [6,3–50 µM] i 24 timer ble det sett signifikant (*/**) lavere DNA-mengde enn i kontroll (**figur 3.2 G**). Tilsvarende eksponeringer viste signifikant (*/**) økning i viabilitet/DNA-mengde (**figur 3.2 H**). Her var økningen 50–70 % fra kontroll. Etter eksponering for LTG 1000 µM i 48 timer ble det sett signifikant (*) lavere DNA-mengde enn i kontroll, med 64 % av kontroll (**figur 3.2 I**). For tilsvarende eksponering var det signifikant (*) økt viabilitet/DNA-mengde, 40 % høyere enn kontroll (**figur 3.2 J**). Tilsvarende økning i viabilitet/DNA-mengde ble også sett for LTG 25, 50, og 200 µM etter 48 timer. Disse resultatene (**figur 3.2 I og J**) er basert på ett biologisk replikat.

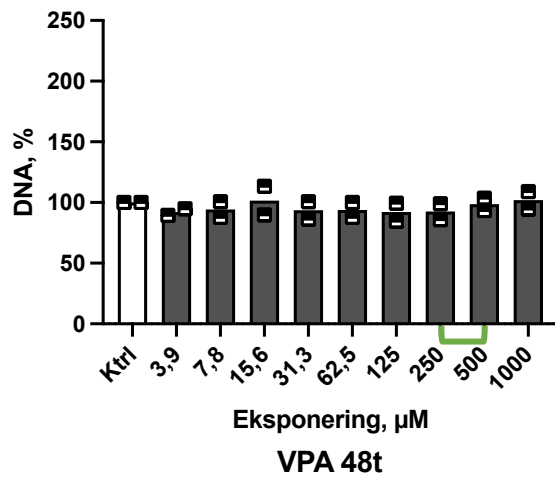
A



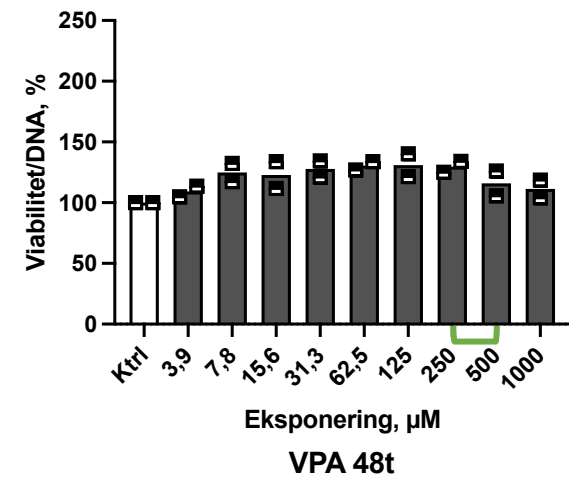
B



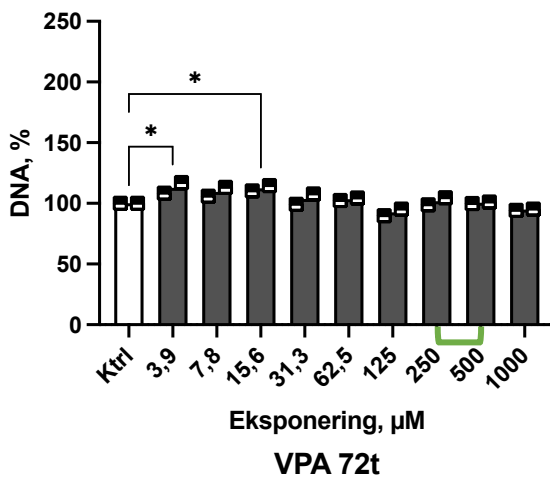
C



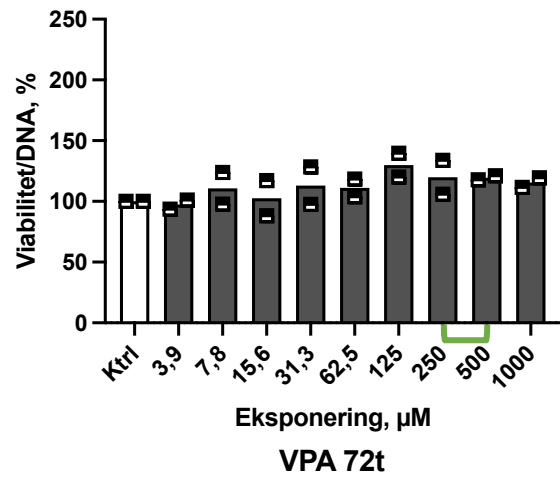
D

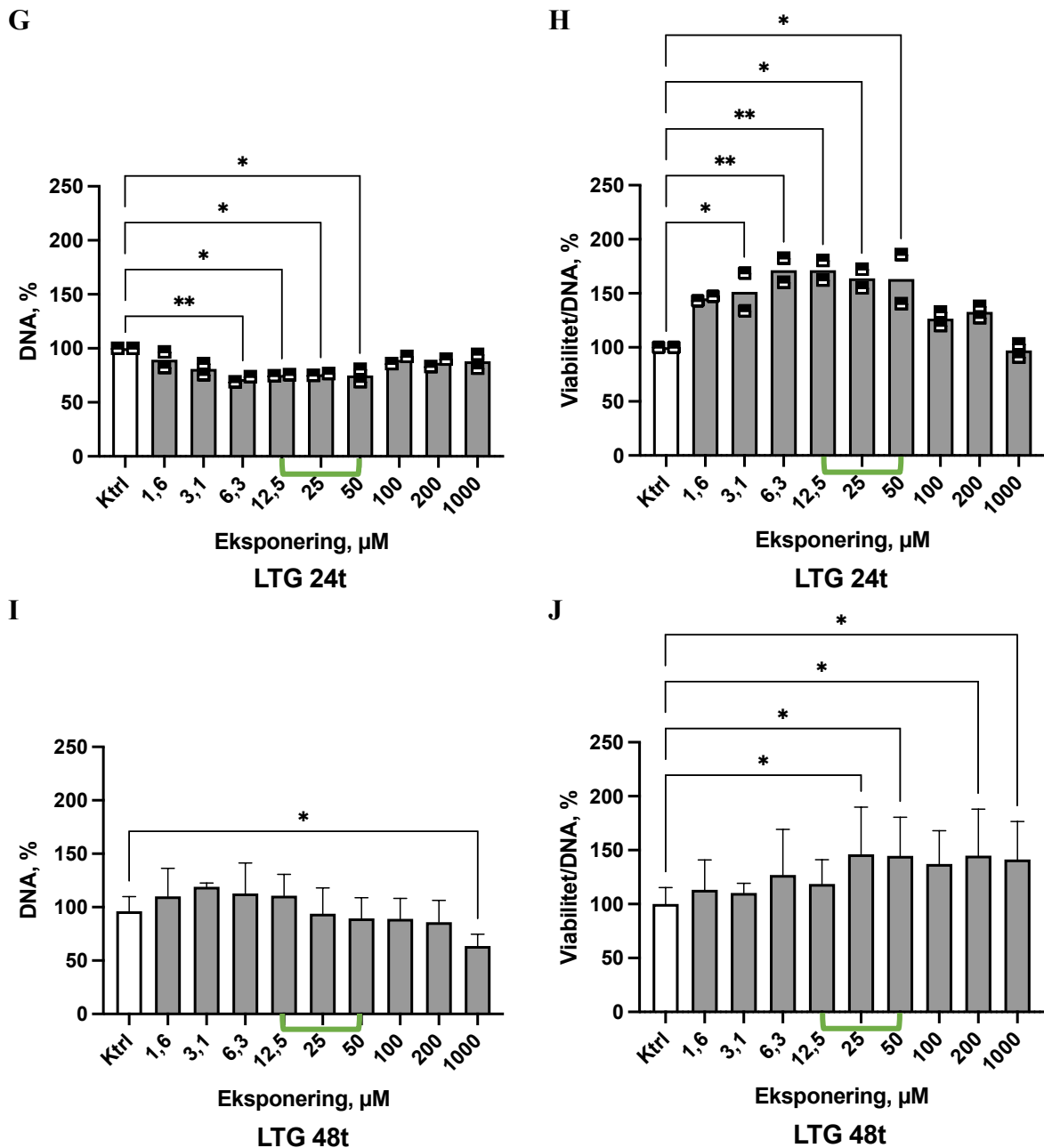


E



F



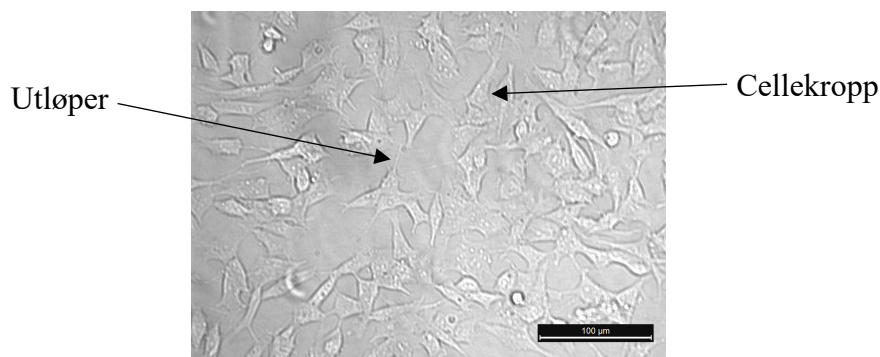


Figur 3.2 DNA-quantifisering med Hoechst 33342 i kyllingkornceller etter viabilitetsanalyse med RZ. Etter utføring av RZ-analyse ble cellene fiksert i EtOH [70 %] og deretter oppbevart ved -20 °C inntil DNA-quantifisering ble utført. Cellene ble da farget med Hoechst 33342, før fargestoffet ble eluert fra cellene og overført til et nytt, blankt 96-brønnsbrett. Fluorescens ble avlest på plateleser ved ex 370/em 460 nm. Ubehandlede celler ble brukt som kontroll. Gjennomsnittlige blankverdier ble trukket fra. Resultatene er basert på gjennomsnittet av tekniske replikater ($n = 6-16$) fra ett (A, B, I, J) eller to (C-H) biologiske replikater. Gjennomsnittet av de tekniske replikatene er normalisert mot kontroll. Ved ett biologisk replikat er $\pm SD$ presentert for de tekniske replikatene. Uteliggere ble fjernet fra A-B (1), C-D (3), E-F (10), G-H (7) og I-J (4) ved ROUT ($Q = 1\%$). Statistiske analyser ble utført med One Way ANOVA, $n = 6-16$ (ett biologisk replikat), $n = 2$ (to biologiske replikater). * angir signifikant forskjell fra kontroll (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$). Grønn klamme indikerer terapeutiske serumkonsentrasjoner ved legemiddelbehandling i menneske. ■ Angir gjennomsnittlig verdi av de tekniske replikatene, fra ett biologisk replikat.

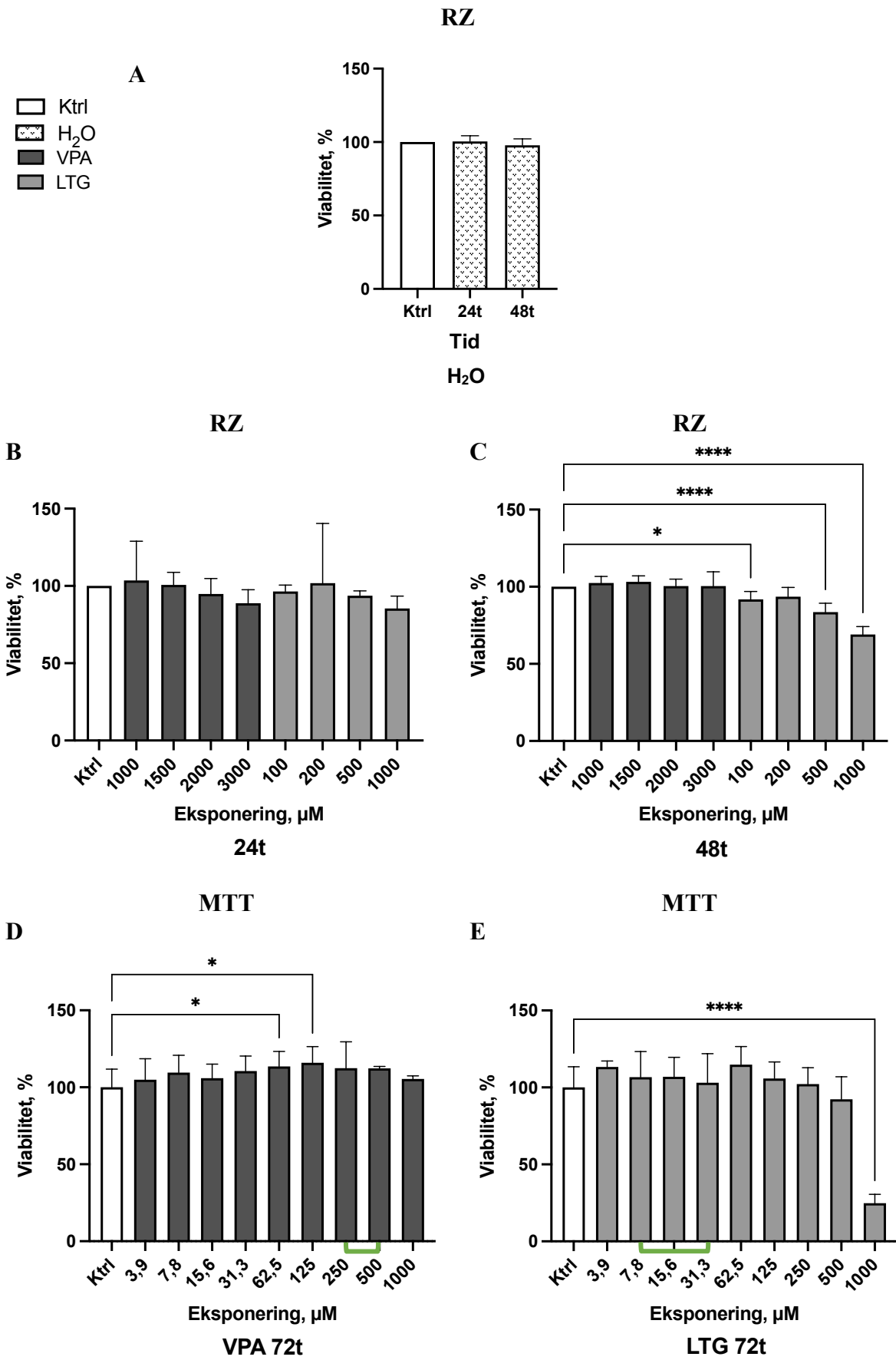
3.3 Viabilitetsstudier med MTT og RZ i SH-SY5Y-celler

Udifferensierte SH-SY5Y-celler (**figur 3.3**) ble eksponert for VPA [3,9–3000 μM], LTG [1,6–1000 μM], eller kontroll-løsning før viabiliteten ble undersøkt ved MTT- eller RZ-analyse. I tillegg ble det utført en løsningsmiddel-kontroll ettersom legemidlene var løst i H_2O ved RZ-analyse. MTT eller RZ ble tilsatt 24, 48 eller 72 timer etter eksponering. Cellene ble inkubert med MTT i tre timer ved 37 °C før avlesning av absorbanse på plateleser ved 570 nm. Analysen ble utført på ett biologisk replikat, med 6–16 tekniske replikater per eksponeringsløsning. Cellene ble inkubert med RZ i fire timer ved 37 °C før avlesning av fluorescens på plateleser ved ex 560 nm/em 590 nm. RZ ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 44 eller 440 μM . Analysen ble utført på tre (24 timer) og syv (48 timer) biologiske replikater med 7–32 tekniske replikater. Brett hvor blankverdier var høyere enn avlesningen av tetrazolium eller resorufin ble ekskludert grunnet negative verdier.

Det ble ikke sett noen forskjell i viabilitet for SH-SY5Y-celler eksponert for kontroll-løsning eller H_2O i 24 eller 48 timer målt ved RZ-analyse (**figur 3.4 A**). Det ble sett en liten dose-respons-endring i viabiliteten ved eksponering for både VPA og LTG i 24 timer. Ved eksponering i 48 timer ble denne responsen kun sett ved eksponering for LTG, med en signifikant reduksjon i viabilitet for konsentrasjonene 500 (****) og 1000 (****) μM . Viabiliteten var her henholdsvis 84 % og 69 % av kontroll. Eksponering for VPA i 72 timer ga signifikant økning i viabilitet ved konsentrasjonene 62,5 (*) og 125 (*) μM målt ved MTT-analyse (**figur 3.4 D**). Dette var en 15 % økning fra kontroll. Det ble sett en redusert viabilitet ved eksponering for LTG 1000 (****) μM i 72 timer målt ved MTT-analyse (**figur 3.4 E**). Her var viabiliteten 25 % av kontroll.



Figur 3.3 Udifferensierte SH-SY5Y-celler.
Objektiv: x20. Målestokk: 100 μm .



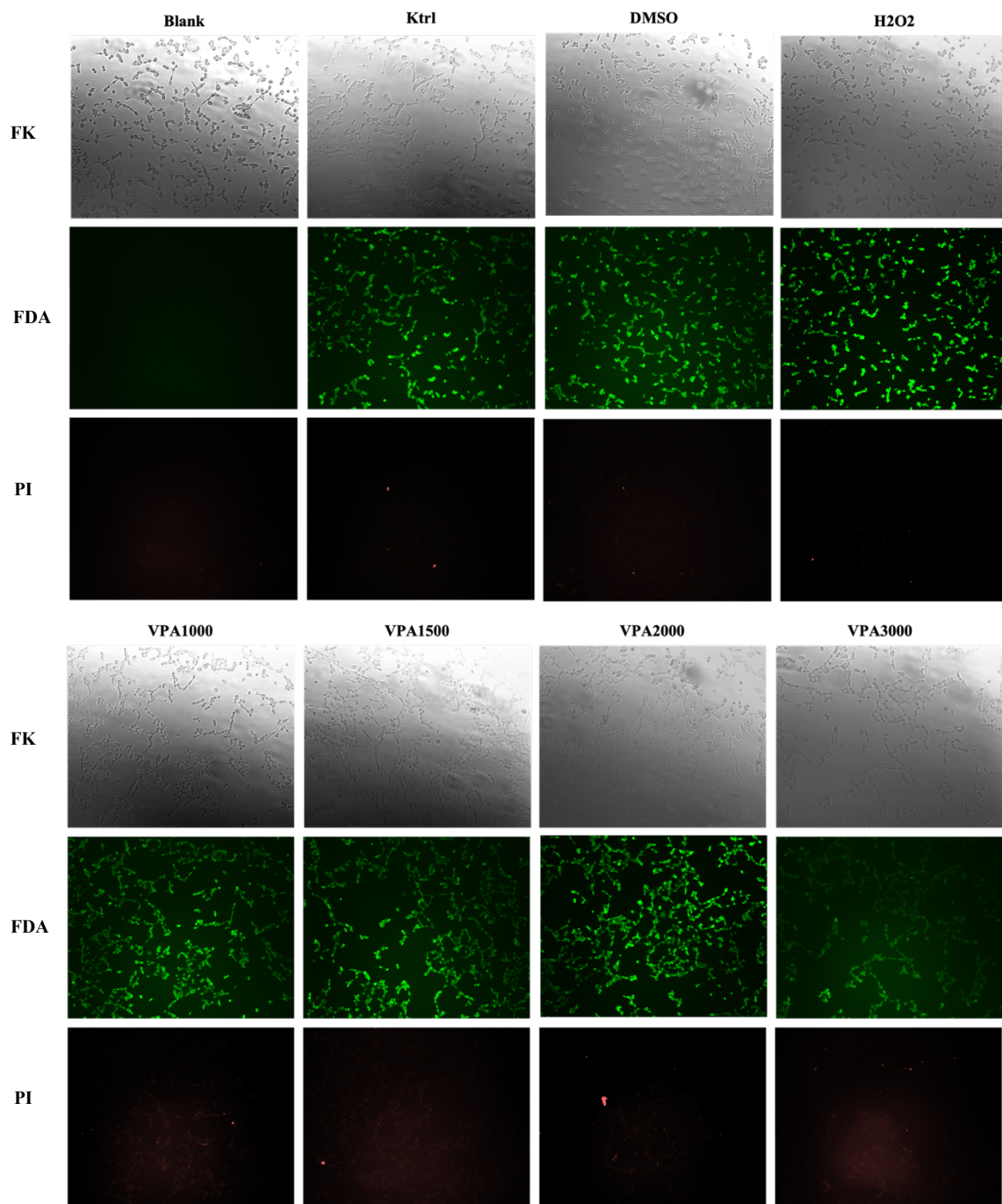
Figur 3.4 Viabiliteten til udifferensierte SH-SY5Y-celler etter eksponering for VPA eller LTG, målt ved MTT- eller RZ-analyse.

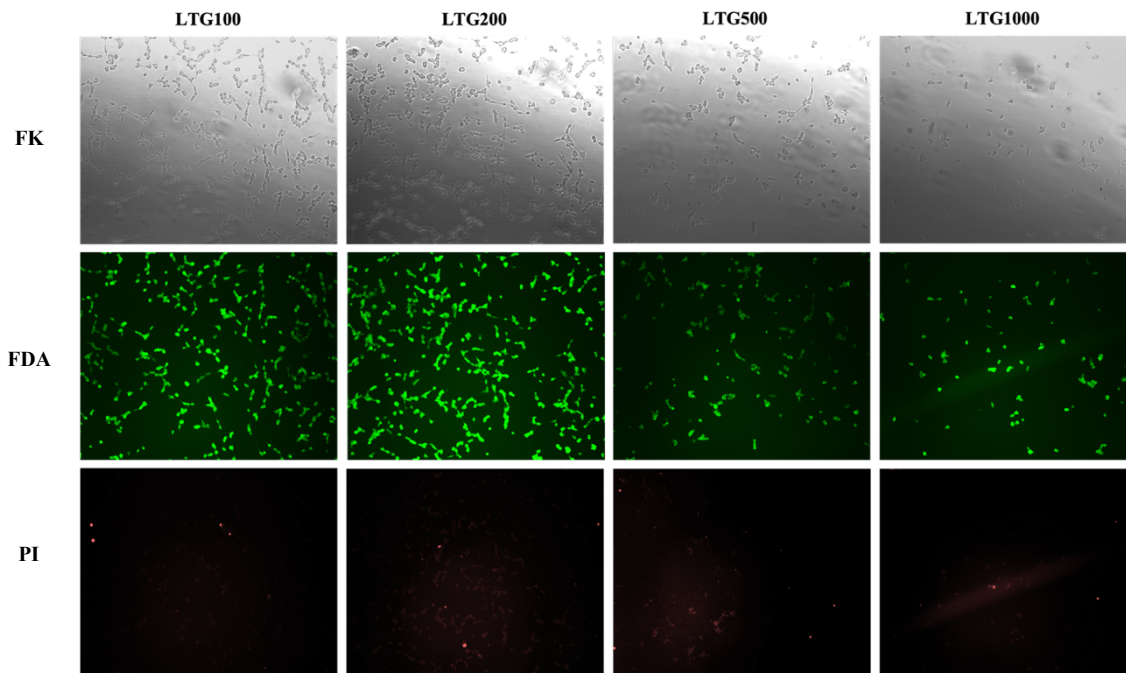
Udifferensierte SH-SY5Y-celler ble eksponert for VPA [3,9–3000 μM], LTG [3,9–1000 μM], eller kontroll-løsning én eller to dager etter utplating. Det ble også lagt til en kontroll av løsningsmiddel ettersom legemidlene var løst i H_2O . Etter 24, 48, eller 72 timer ble viabiliteten målt ved MTT- eller RZ-analyse. Ubehandlede celler ble brukt som kontroll. Gjennomsnittlige blankverdier ble trukket fra. For MTT-analysen er resultatene basert på gjennomsnittet av tekniske replikater ($n = 6-16$) fra ett biologisk replikat. For RZ er resultatene basert på gjennomsnittet av tekniske replikater (7–32) fra tre (**B**) eller syv (**C**) biologiske replikater. Gjennomsnittet av de tekniske replikatene er normalisert mot kontroll \pm SD normalisert mot kontroll. Uteliggere ble fjernet **B** (1), **C** (2), **D** (4), **E** (3) ved ROUT ($Q = 1\%$). Statistiske analyser ble utført med One Way ANOVA, $n = 3$ (**B**), 7 (**C**), og 8-16 (**E** og **F**). * angir signifikant forskjell fra kontroll (*: $p < 0,05$; ****: $p < 0,0001$). Grønn klamme indikerer terapeutiske serumkonsentrasjoner ved legemiddelbehandling i menneske.

3.4 Viabilitetsstudier med FDA/PI i udifferensierte SH-SY5Y-celler

Udifferensierte SH-SY5Y-celler ble eksponert for VPA [3,9–1000 μM], LTG [1,6–1000 μM], eller kontroll-løsning. I tillegg ble det utført en løsningsmiddel-kontroll ettersom det ble benyttet LTG i DMSO. Det ble også lagt til en positiv kontroll med H_2O_2 100 μM . Cellene ble merket med FDA/PI 48 eller 72 timer etter legemiddeleksponering. Cellene ble inkubert med PI i totalt 15 minutter og med FDA i 3 minutter. FDA- og PI-merkingen ble utført i to tekniske replikater, i tillegg til at det ble utført ett teknisk replikat hvor cellene ble merket med kun PI eller kun FDA. Det ble tatt to bilder av hvert tekniske replikat ved fluorescensmikroskopering. FDA- og PI-merkede celler på bildene ble telt manuelt. **Figur 3.5** viser et representativt utvalg av FDA- og PI-merkede celler etter 48 timer legemiddeleksponering.

Det ble telt rundt 700 FDA-merkede celler ved 24 og 72 timer (**figur 3.6 A**). Det ble sett en signifikant reduksjon i viabilitet i forhold til kontroll ved eksponering for LTG 500 (***) eller 1000 μM (***/****), i 48 eller 72 timer (**figur 3.6 E og G**). Viabiliteten var her på 30–50 % av kontroll. Ved eksponering for VPA 1000 (****) eller 1500 μM (***) i 72 timer, ble det sett en signifikant økning i viabilitet fra kontroll (**figur 3.6 G**). Økningen var her på henholdsvis 80 % og 54 % fra kontroll. Det ble telt rundt 20 PI-merkede celler (**figur 3.6 B**). Det var her ingen signifikante endringer fra kontroll.

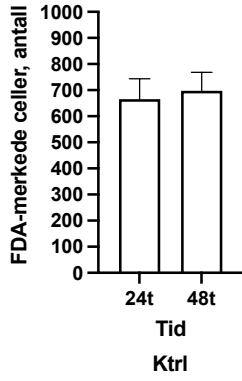




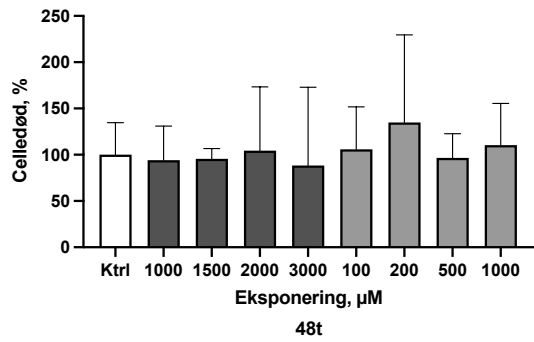
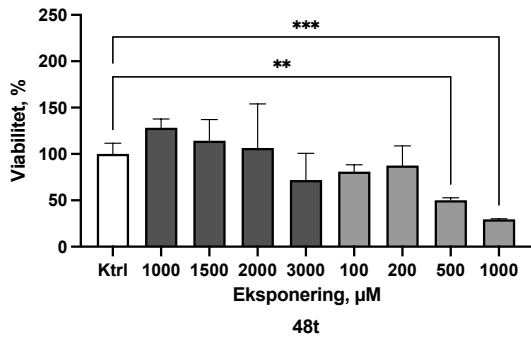
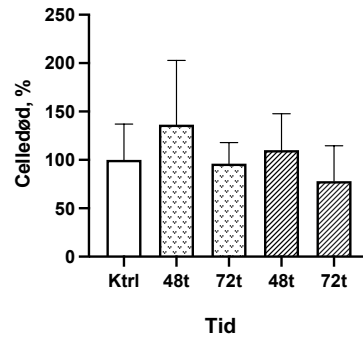
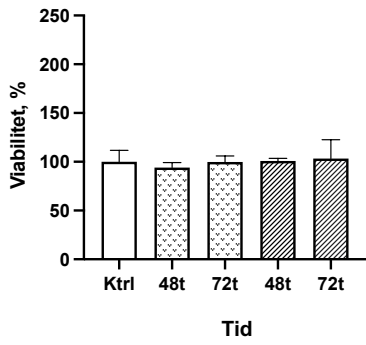
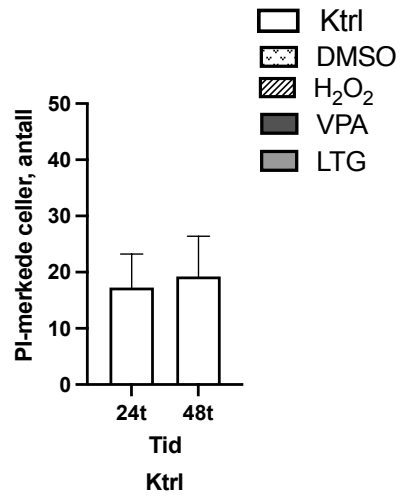
Figur 3.5 Udifferensierte SH-SY5Y-celler farget med FDA og PI etter 48 timer eksponering med VPA eller LTG.

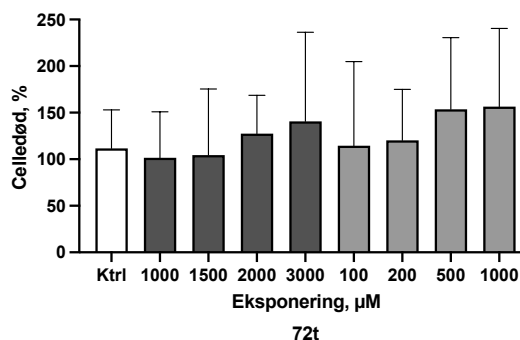
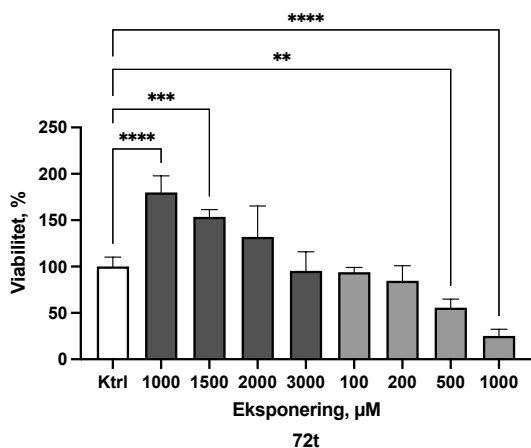
Udifferensierte SH-SY5Y-celler ble eksponert for VPA [3,9–1000 μM], LTG [1,6–1000 μM], eller kontroll-løsning dagen etter utplating. I tillegg ble det utført en løsningsmiddel-kontroll ettersom det ble benyttet LTG i DMSO. Det ble også lagt til en positiv kontroll med H_2O_2 100 μM . Cellene ble merket med PI og FDA 48 eller 72 timer etter legemiddeleksponering. Cellene ble inkubert med PI i totalt 15 minutter og med FDA i 3 minutter. Bildene representerer legemiddeleksponering i 48 timer. Bildene er redigert for å få fram tilsvarende farge som ved fluorescensmikroskopering. FK: fasekontrast. Objektiv x10.

FDA



PI





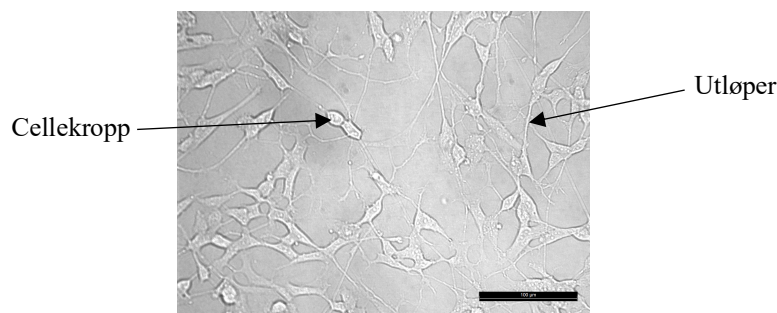
3.6 Udifferensierte SH-SY5Y-celler merket med PI og FDA etter eksponering for VPA eller LTG, i 48 eller 72 timer.

Udifferensierte SH-SY5Y-celler ble eksponert for VPA [3,9–1000 µM], LTG [1,6–1000 µM], eller kontroll-løsning dagen etter utplating. I tillegg ble det utført en løsningsmiddel-kontroll ettersom det ble benyttet LTG i DMSO. Det ble også lagt til en positiv kontroll med H₂O₂ 100 µM. Cellene ble merket med PI og FDA 48 eller 72 timer etter legemiddeleksponering. Cellene ble inkubert med PI i totalt 15 minutter og med FDA i 3 minutter. Dobbelmerkingen ble utført i to tekniske replikater. Det ble tatt to bilder av hvert tekniske replikat ved fluorescensmikroskopering. PI- og FDA-merkede celler på bildene ble telt manuelt, og gjennomsnittlige verdier av de tekniske replikatene er normalisert mot kontroll ±SD normalisert mot kontroll. Statistiske analyser ble utført med One Way ANOVA, n = 4. * angir signifikant forskjell fra kontroll (*: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001; ****: p < 0,0001). Konsentrasjonene er høyere enn terapeutiske serumkonsentrasjoner ved legemiddelbehandling i menneske.

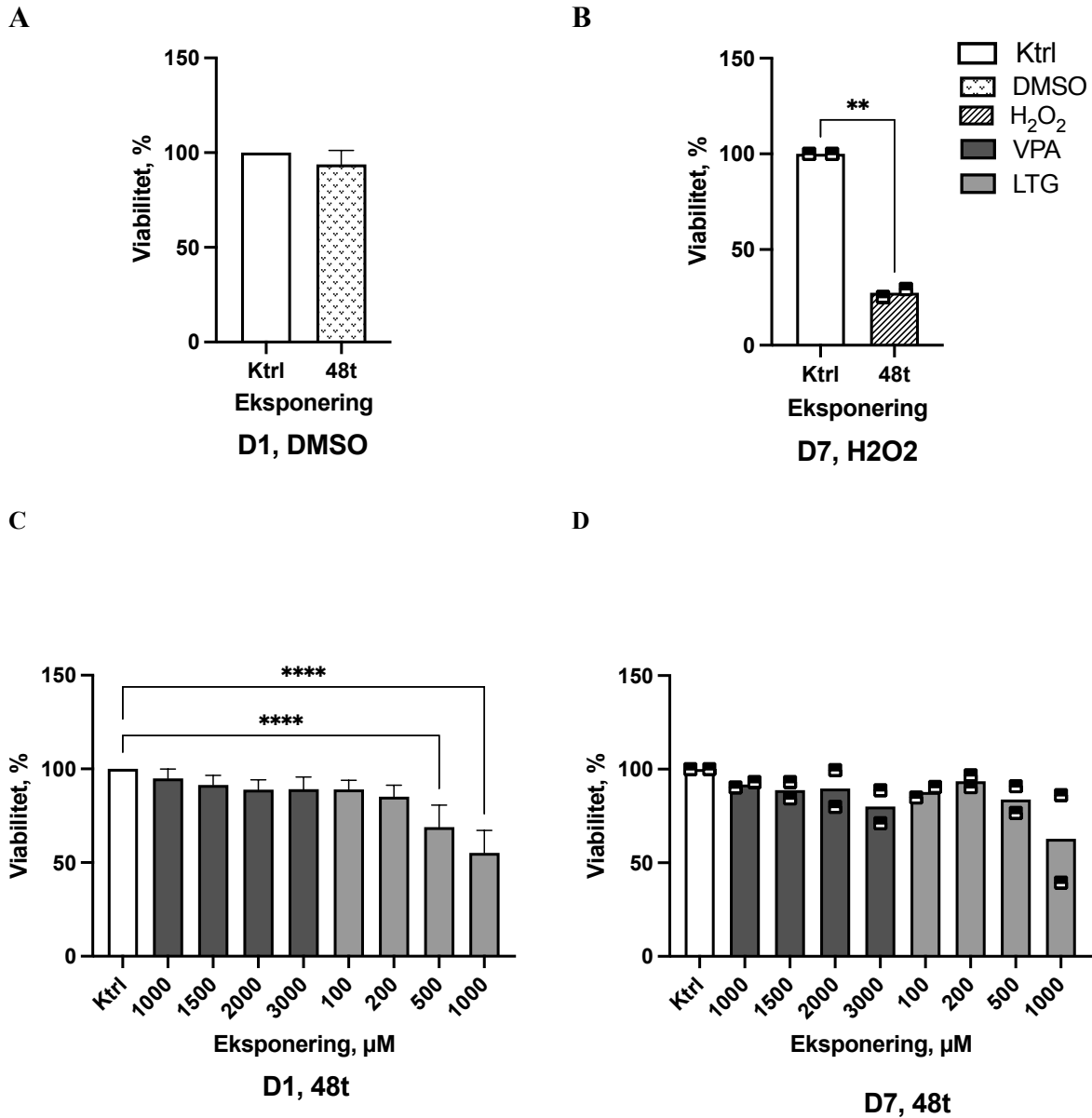
3.5 Viabilitetsstudier med RZ i differensierte SH-SY5Y-celler

For å undersøke om legemidlene har ulik påvirkning i udifferensierte og differensierte celler, ble SH-SY5Y-celler differensiert i én (D1), tre (D3) (**figur 3.7**), eller syv dager (D7). Cellene ble differensiert med RA 10 μM . Etter ønsket differensieringstid ble cellene eksponert for VPA [1000–3000 μM], LTG [100–1000 μM], eller kontroll-løsning. Det ble også lagt til en kontroll av løsningsmiddel i de tilfellene LTG i DMSO ble brukt. I tillegg ble det lagt til en positiv kontroll med H_2O_2 10 000 μM for å undersøke om cellene responderte på toksisk påvirkning. RZ ble tilsatt 24 eller 48 timer etter eksponering før cellene ble inkubert i fire timer ved 37 °C før avlesning av fluorescens på plateleser ved ex 560 nm/em 590 nm. RZ ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 44 μM . Brett hvor blankverdier var høyere enn avlesningen av resorufin ble ekskludert grunnet negative verdier, resultatene fra D3 er derfor ikke presentert.

Det ble ikke sett noen endring i viabilitet for D1 eksponert for DMSO i forhold til kontroll (**figur 3.8 A**). Eksponering for H_2O_2 i 48 timer ga signifikant (**) reduksjon av viabilitet i D7 (**figur 3.8 B**). Ved eksponering for LTG 500 og 1000 μM i 48 timer ble sett en viabilitet på henholdsvis 69 % og 55 % av kontroll i D1. Denne reduksjonen var signifikant (****). I D7 ble det sett at viabiliteten særlig ble redusert ved eksponering for VPA 3000 μM og LTG 1000 μM i 48 timer (**figur 3.8 D**).



Figur 3.7 SH-SY5Y-celler differensiert med RA i tre dager.
Objektiv: x20. Målestokk: 100 μm .



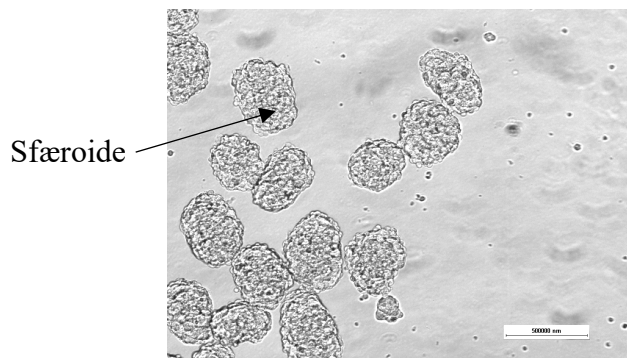
Figur 3.8 Viabiliteten til SH-SY5Y-celler differensiert i én eller syv dager reduseres ved eksponering for LTG 1000 μM i 48 timer målt ved RZ-analyse.

SH-SY5Y-celler ble differensiert med RA i én eller syv dager før eksponering for VPA [1000–3000 μM], LTG [100–1000 μM], eller kontroll-løsning. Det ble også lagt til en kontroll av løsningsmiddel i de tilfelle LTG i DMSO ble brukt, samt en positiv kontroll med H₂O₂ 10 000 μM. 48 timer etter eksponering ble fluorescens avlest på plateleser ved ex 560 nm/em 590 nm som del RZ-analyse. Ubehandlede celler ble brukt som kontroll. Gjennomsnittlige blankverdier ble trukket fra. Resultatene baserer seg på gjennomsnittet av tekniske replikater (n = 7–16) fra fire (C) eller to (D) biologiske replikater. Gjennomsnittet av de tekniske replikatene er normalisert mot kontroll ± SD normalisert mot kontroll. Uteliggere ble fjernet fra C (1) ved ROUT (Q = 1 %). Statistiske analyser ble utført med One Way ANOVA, n = 4 eller 2. * angir signifikant forskjell fra kontroll (**: p < 0,01; ****: p < 0,0001). Konsentrasjonene er høyere enn terapeutiske serumkonsentrasjoner ved legemiddelbehandling i menneske.

3.6 Viabilitetsstudier med RZ i aggregerte SH-SY5Y-celler

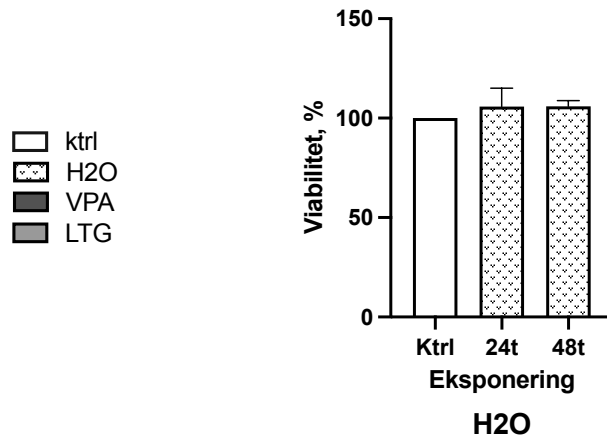
Aggregerte SH-SY5Y-celler (**figur 3.9**) ble eksponert for VPA [1000–3000 μM], LTG [100–1000 μM], eller kontroll-løsning i forbindelse med utplating. I tillegg ble det lagt til en løsningsmiddel-kontroll med H_2O ettersom det ble benyttet VPA og LTG i H_2O . Viabiliteten ble målt etter 24 eller 48 timer eksponering som del av RZ-analyse. Cellene ble inkubert med RZ i fire timer ved 37 °C før avlesning av fluorescens på plateleser ved ex 560 nm/em 590 nm. RZ ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 440 μM . Brett hvor blankverdier var høyere enn avlesningen av resorufin ble ekskludert grunnet negative verdier.

Det ble ikke sett noen endring i viabilitet fra kontroll ved eksponering for H_2O (**figur 3.10 A**). Ved eksponering for LTG 100 μM i 24 timer ble det sett en signifikant (*) reduksjon i viabilitet, på 85 % av kontroll (**figur 3.10 B**).

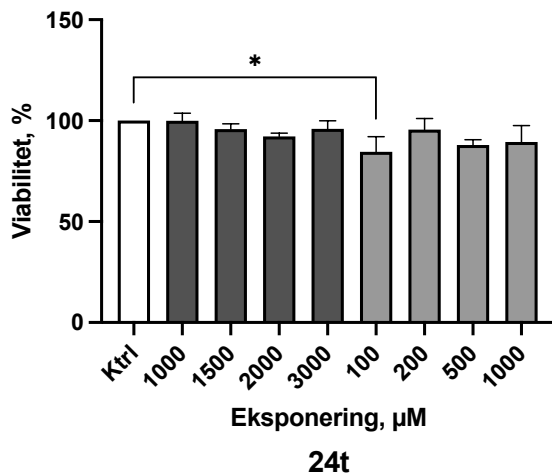


Figur 3.9 Aggregerte SH-SY5Y-celler.
Objektiv: $\times 10$. Målestokk: 500 μm .

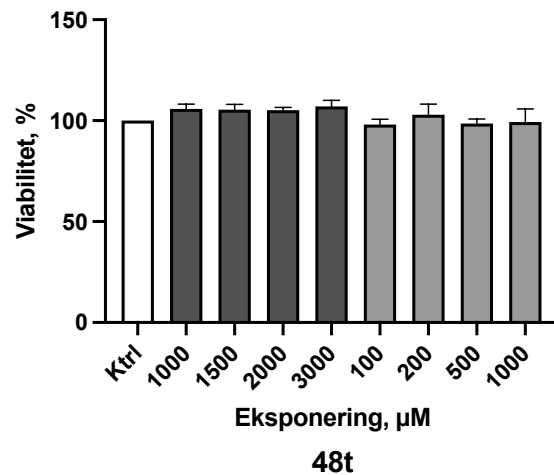
A



B



C



Figur 3.10 Viabiliteten til aggregerte SH-SY5Y-celler etter eksponering for VPA eller LTG, i 24 eller 48 timer.

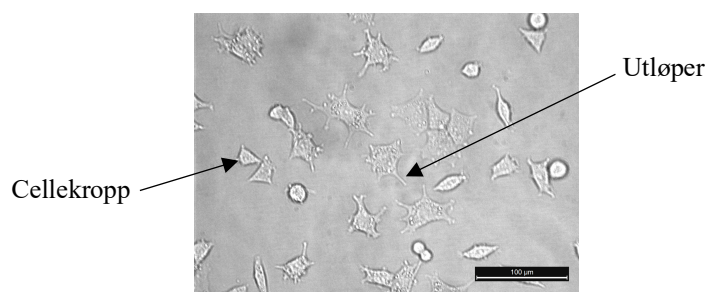
Aggregerte SH-SY5Y-celler ble eksponert for VPA [1000–3000 µM], LTG [100–1000 µM], eller kontroll-løsning i forbindelse med utplating. I tillegg ble det lagt til en løsningsmiddel-kontroll med H₂O ettersom det ble benyttet VPA og LTG i H₂O. Etter 24 eller 48 timer ble fluorescens avlest på plateleser ved ex 560 nm/em 590 nm som del av RZ-analyse. Ubehandlete celler ble brukt som kontroll. Gjennomsnittlige blankverdier ble trukket fra. Resultatene er basert på tekniske replikater (n = 8–16) fra tre biologiske replikater. Gjennomsnittet av de tekniske replikatene er normalisert mot kontroll ± SD normalisert mot kontroll. Ingen uteliggere ble funnet ved ROUT (Q = 1 %). Statistiske analyser ble utført med One Way ANOVA, n = 3.

* angir signifikant forskjell fra kontroll (*: p < 0,05). Konsentrasjonene er høyere enn terapeutiske serumkonsentrasjoner ved legemiddelbehandling i menneske.

3.7 Viabilitetsstudier med MTT og RZ i udifferensierte PC12-celler

Udifferensierte PC12-celler (**figur 3.11**) ble eksponert for VPA [3,9–1000 μM], LTG [1,6–1000 μM], eller kontroll-løsning før viabiliteten ble undersøkt ved MTT- eller RZ-analyse. I tillegg ble det utført en løsningsmiddel-kontroll i de tilfellene det ble benyttet LTG i DMSO. Det ble også lagt til en positiv kontroll med H_2O_2 100 μM ved RZ-analyse. MTT eller RZ ble tilsatt 24, 48 eller 72 timer etter eksponering. Cellene ble inkubert med MTT i tre timer ved 37 °C før avlesning av absorbans på plateleser ved 570 nm. Analysen ble utført på ett biologisk replikat, med 6-16 tekniske replikater per eksponeringsløsning. Cellene ble inkubert med RZ i fire timer ved 37 °C før avlesning av fluorescens på plateleser ved ex 560 nm/em 590 nm. RZ ble tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 44 μM . Brett hvor blankverdier var høyere enn avlesningen av tetrazolium eller resorufin ble ekskludert grunnet negative verdier.

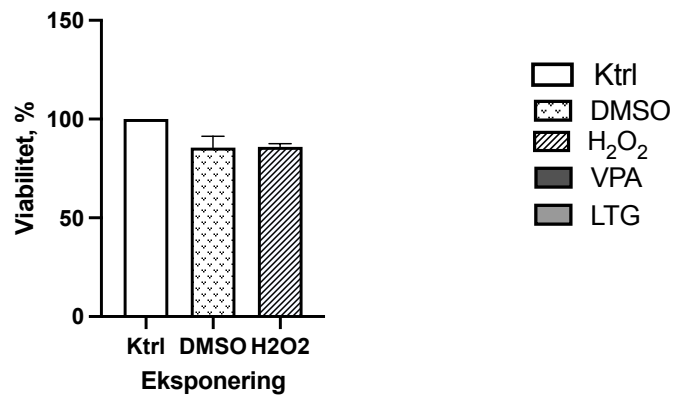
Det ble sett en liten reduksjon i viabilitet ved eksponering for DMSO eller H_2O_2 i 24 timer. Denne endringen fra kontroll var ikke signifikant (**figur 3.12 A**). Det ble sett en signifikant reduksjon i viabilitet ved eksponering for VPA [7,8–62,5 μM] i 48 timer målt ved MTT-analyse (**figur 3.12 D**). Ved RZ-analyse ble det sett økning i viabilitet fra kontroll ved eksponering for VPA 1500 (**) og 3000 (**) μM i 48 timer (**figur 3.12 C**). Det var her en økning på rundt 5 %. Det ble sett en doseavhengig reduksjon i viabilitet ved eksponering for LTG [100–1000 μM] i 24 eller 48 timer målt ved RZ-analyse (**figur 3.12 B og C**). Denne reduksjonen var signifikant, og viabiliteten var her 65–96 % av kontroll. Etter eksponering for LTG 1000 μM i 48 timer var det en signifikant reduksjon i viabilitet (*) på 56 % av kontroll (**figur 3.12 E**).



Figur 3.11 Udifferensierte PC12-celler.
Objektiv: x20. Målestokk: 100 μm .

RZ

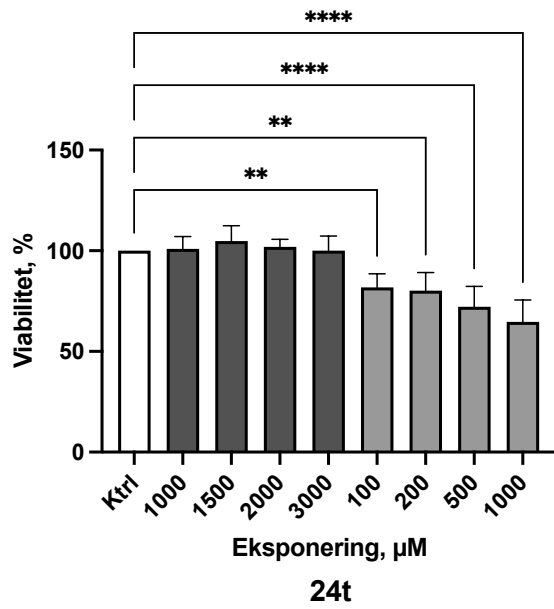
A



24t

RZ

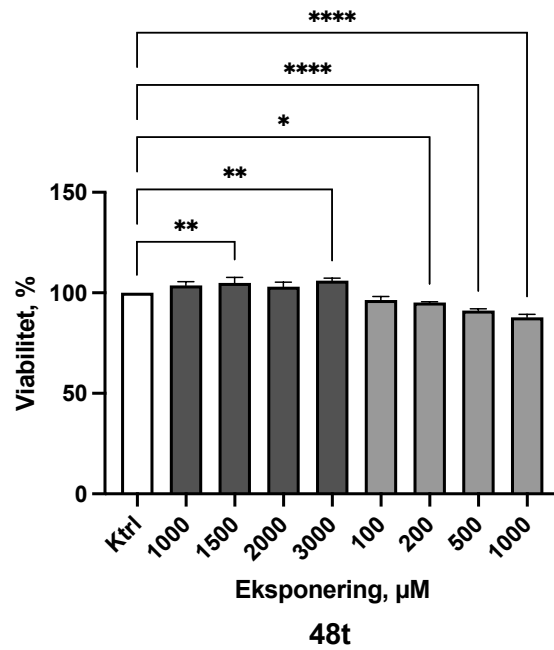
B



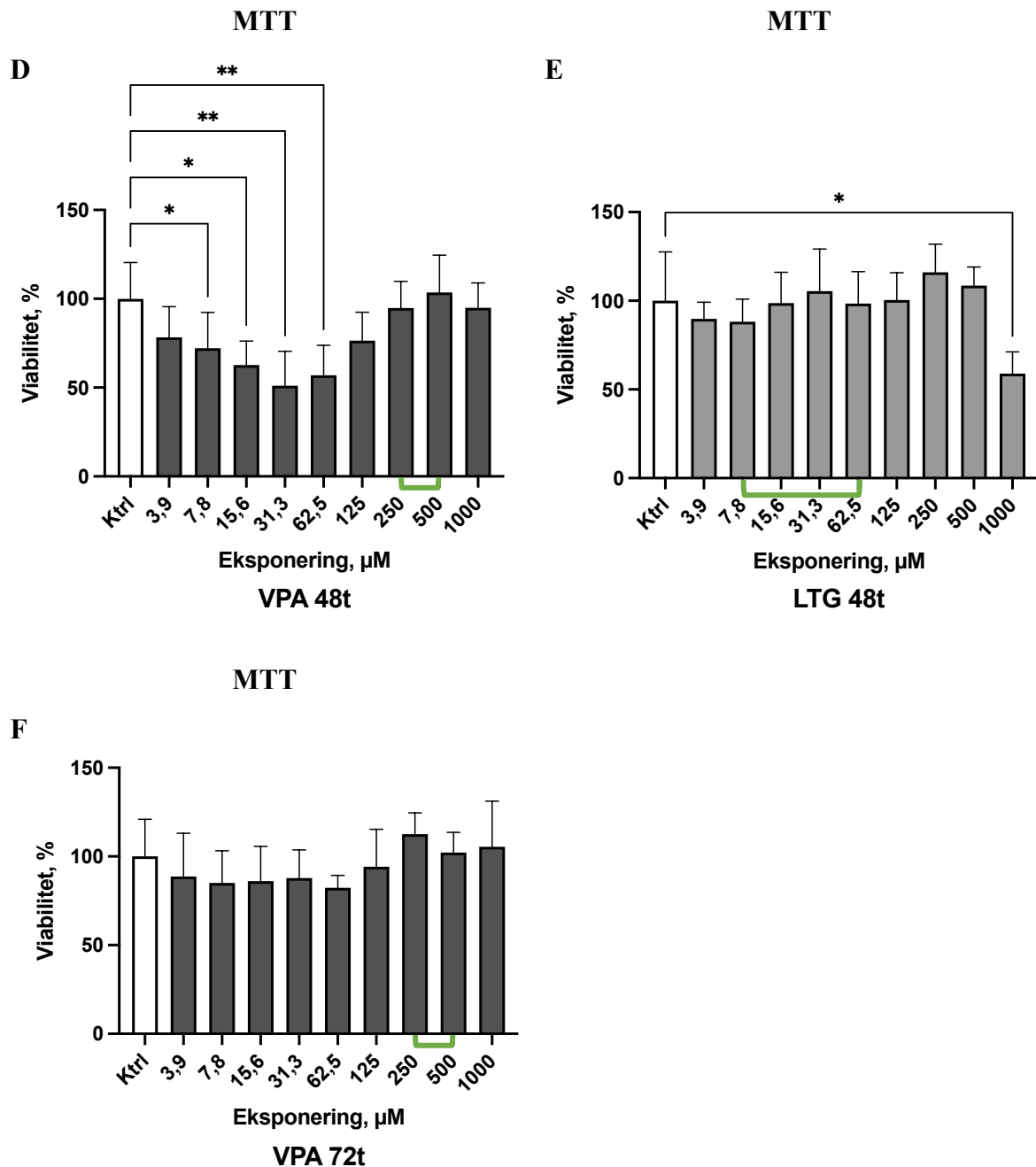
24t

RZ

C



48t



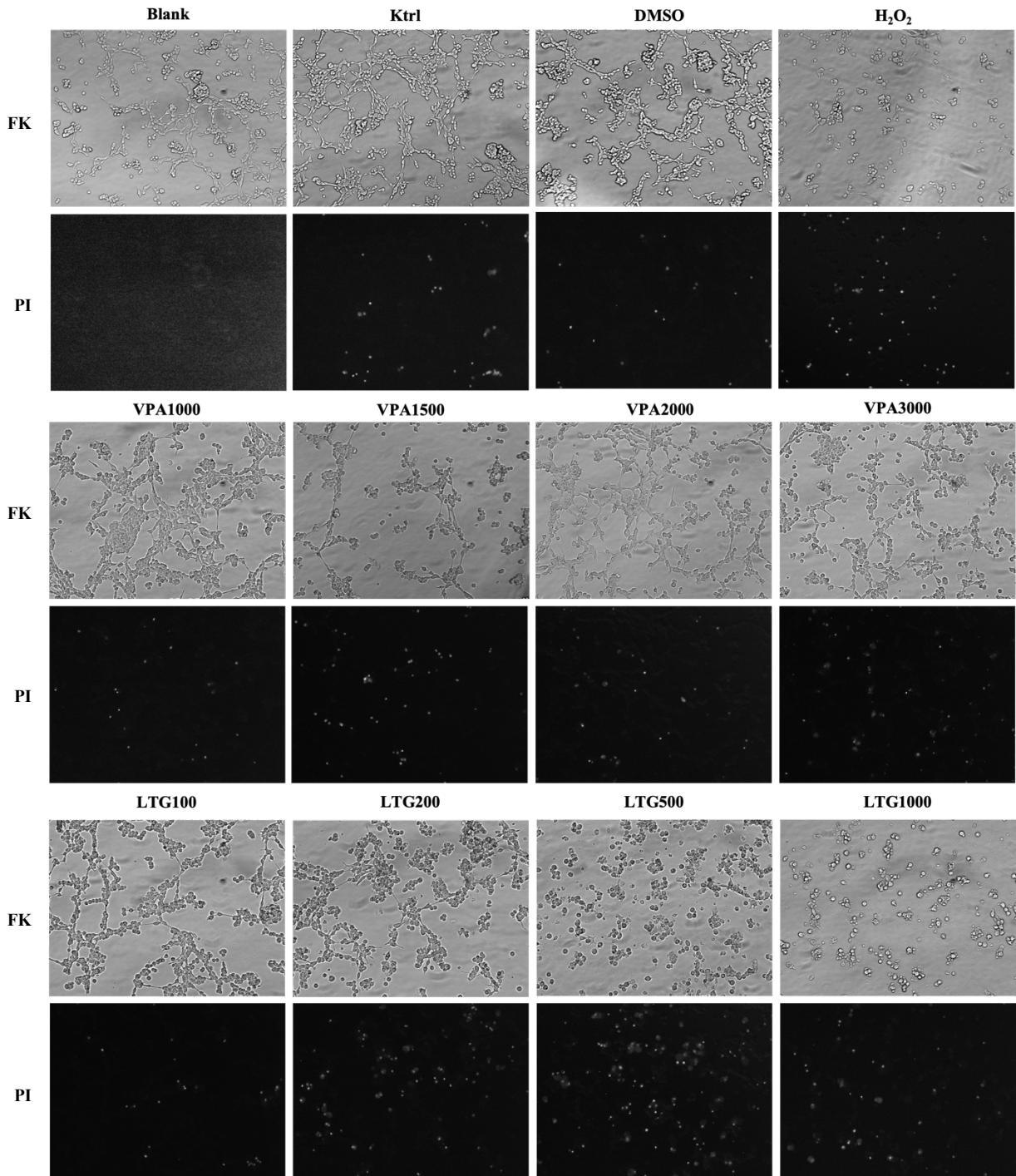
Figur 3.12 Viabiliteten til udifferensierte PC12-celler etter eksponering for VPA eller LTG, målt ved MTT- eller RZ-analyse.

Udifferensierte PC12-celler ble eksponert for VPA [3,9–3000 μM], LTG [3,9–1000 μM], eller kontroll-løsning dagen etter utplating. Det ble også lagt til en kontroll av løsningsmiddel i de tilfellene LTG i DMSO ble brukt, samt en positiv kontroll med H_2O_2 100 μM ved RZ-analyse. Viabiliteten ble målt ved MTT- eller RZ-analyse 24, 48 eller 72 timer etter eksponering. Ved MTT-analyse ble absorbansen avlest på plateleser ved 570 nm. Fluorescens ble avlest på plateleser ved ex 560 nm/em 590 nm som del av RZ-analyse. Ubehandlede celler ble brukt som kontroll. Gjennomsnittlige blankverdier ble trukket fra. For MTT er resultatene basert på gjennomsnittet av tekniske replikater ($n = 6-16$) fra ett biologisk replikat. For RZ baserer resultatene seg på gjennomsnittet av tekniske replikater ($n = 6-32$) fra fem (B) eller tre (C) biologiske replikater. Gjennomsnittet av de tekniske replikatene er normalisert mot kontroll \pm SD normalisert mot kontroll. Uteliggere ble fjernet fra C (3) og F (1) ved ROUT ($Q = 1\%$). Statistiske analyser ble utført med One Way ANOVA, $n = 6-16$ (MTT), $n = 5$ (RZ 24t), $n=3$ (RZ 48t). * angir signifikant forskjell fra kontroll (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$). Grønn klamme indikerer terapeutiske serumkonsentrasjoner ved legemiddelbehandling i menneske.

3.8 Viabilitetsstudier med PI i udifferensierte PC12-celler

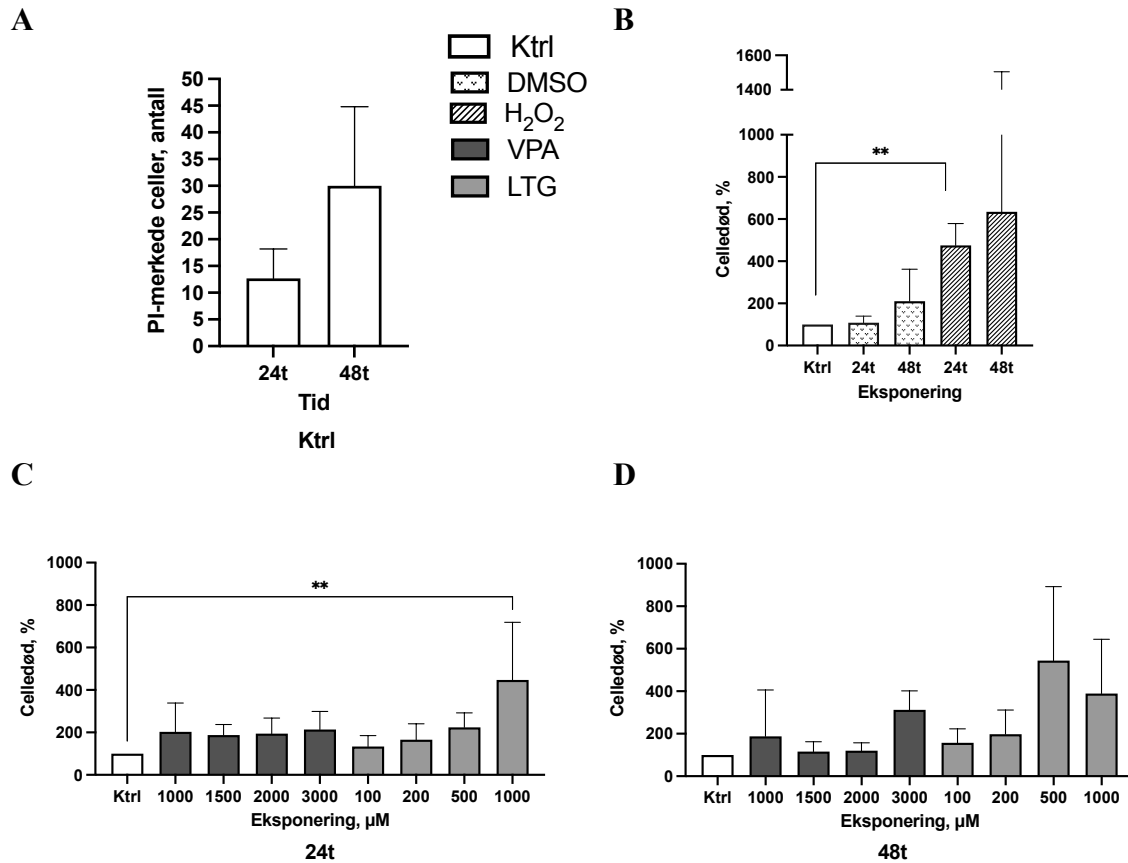
For å undersøke om eventuell reduksjon ved MTT- og RZ-analyse skyldtes celledød, ble det utført PI-analyse. Udifferensierte PC12-celler ble eksponert for VPA [1000-300 μM], LTG [100-1000 μM], eller kontroll-løsning. Det ble også lagt til en løsningsmiddelkontroll med DMSO ettersom det ble benyttet LTG i DMSO. I tillegg ble det lagt til en positiv kontroll med H_2O_2 100 μM . PI ble tilsatt 24 eller 48 timer etter eksponering og cellene ble deretter inkubert i 20 minutter ved 37 °C før fluorescensen ble undersøkt i fluorescensmikroskop. Analysen ble utført på tre biologiske replikater per tidspunkt. Det ble tatt ett bilde for hver eksponeringsløsning for hvert biologiske replikat. **Figur 3.13** viser et representativt utvalg bilder av PI-merkede celler etter 48 timer legemiddeleksponering.

Antall PI-merkede celler i kontroll var rundt 13 ved 24 timer, og 30 ved 48 timer. Celler eksponert for H_2O_2 i 24 eller 48 timer viste en økning i antall PI-merkede celler på 400–500 % fra kontroll (**figur 3.14 B**). Celler eksponert for DMSO i 48 timer viste en økning på ca. 100 %, men denne endringen fra kontroll var ikke signifikant. Eksponering for LTG 1000 μM ga omtrent 300 % flere PI-merkede celler enn kontroll (**figur 3.14 C**).



Figur 3.13 Bilder fra fluorescensmikroskop etter PI-merking av udifferensierte PC12-celler etter eksponering for VPA eller LTG i 48 timer.

PI-analyse ble utført i tre biologiske replikater etter 24 eller 48 timer eksponering for VPA [1000–3000 μ M], LTG [100–1000 μ M], eller kontroll-løsning. Ettersom LTG var løst i DMSO, ble det også lagt til en løsningsmiddelkontroll med DMSO, samt en positiv kontroll med H₂O₂ 100 μ M. PI ble tilsatt 24 eller 48 timer etter eksponering og cellene ble deretter inkubert i 20 minutter ved 37 °C før undersøkning i fluorescensmikroskop og billedtakning. PI-merkede celler på bildene ble kvantifisert ved manuell telling. Et representativt utvalg av bilder fra ett biologisk replikat etter 48 timer eksponering er presentert. FK: fasekontrast. Objektiv: x10.



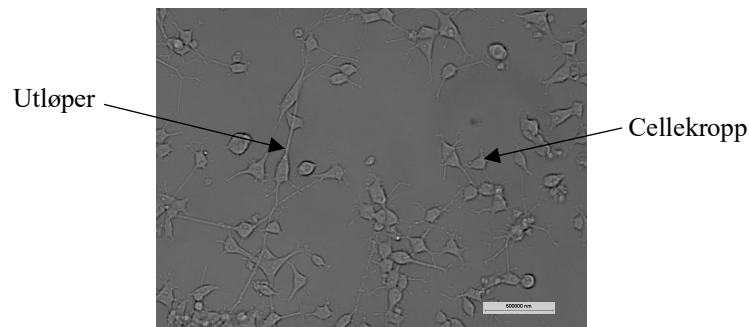
Figur 3.14 Udifferensierte PC12-celler merket med PI etter eksponering for VPA eller LTG, i 24 eller 48 timer.

Udifferensierte PC12-celler ble eksponert for VPA [3,9–3000 μM], LTG [3,9–1000 μM], eller kontroll-løsning dagen etter utplating. Det ble også lagt til en løsningsmiddelkontroll med DMSO, samt en positiv kontroll med H_2O_2 100 μM . Ubehandlede celler ble brukt som kontroll. Etter 24 eller 48 timer eksponering ble fluorescens studert i fluorescensmikroskop og det ble tatt bilder til manuell kvantifisering av celledød. Resultatene er basert på gjennomsnittet og ett teknisk replikat fra tre biologiske replikater. Gjennomsnittet av de tekniske replikatene er normalisert mot kontroll \pm SD normalisert mot kontroll. Ingen uteliggere ble funnet ved ROUT ($Q = 1\%$). Statistiske analyser ble utført med One Way ANOVA, $n = 3$. * angir signifikant forskjell fra kontroll (**: $p < 0,01$). Konsentrasjonene er høyere enn terapeutiske serumkonsentrasjoner ved legemiddelbehandling i menneske.

3.9 Viabilitetsstudier med RZ i differensierte PC12-celler

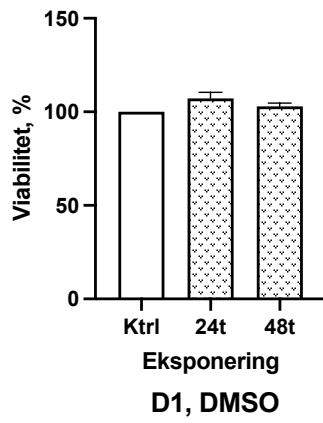
PC12-celler ble differensiert i én (D1), tre (D3), eller syv dager (D7). Cellene ble differensiert med NGF 50 ng/mL. **Figur 3.15** viser PC12-celler differensiert i fem dager. Etter ønsket differensieringstid ble cellene eksponert for VPA [1000–3000 μ M], LTG [100–1000 μ M], eller kontroll-løsning. Det ble også lagt til en kontroll av løsningsmiddel i de tilfellene LTG i DMSO ble brukt. I tillegg ble det lagt til en positiv kontroll med H₂O₂ 100 μ M. RZ-analyse ble utført etter 24 eller 48 timer eksponering på tilsvarende måte som for udifferensierte. Brett hvor blankverdier var høyere enn avlesningen av resorufin ble ekskludert grunnet negative verdier.

Det ble ikke sett noen endring i viabilitet for D1 eksponert for DMSO i forhold til kontroll (**figur 3.16 A**). Eksponering for H₂O₂ i 48 timer viste en signifikant (****) reduksjon i viabilitet, med viabilitet på 71 % av kontroll (**figur 3.16 B**). Det ble ikke sett store endringer i viabilitet for D1 eller D3 eksponert i 24 eller 48 timer (**figur 3.16 C-F**). For D7 ble det sett en signifikant økning i viabilitet ved eksponering for VPA 1000 μ M (**) i 48 timer, med 19 % økning fra kontroll (**figur 3.16 G**). Det ble her også sett en signifikant reduksjon ved eksponering for LTG 1000 μ M (**), med en viabilitet på 80 % av kontroll.

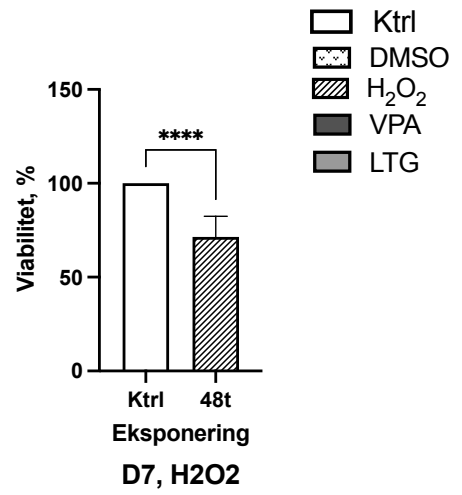


Figur 3.15 PC12-celler differensiert med NGF i fem dager.
Objektiv: x20. Målestokk: 500 μ m.

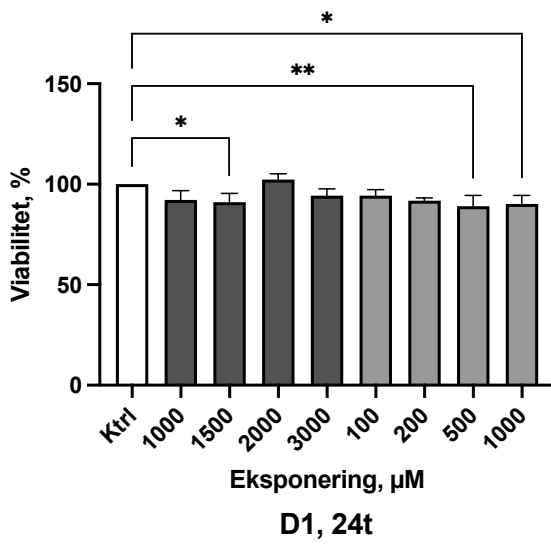
A



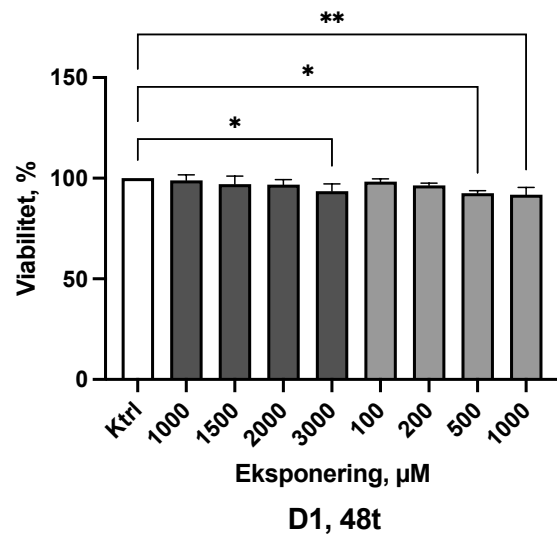
B

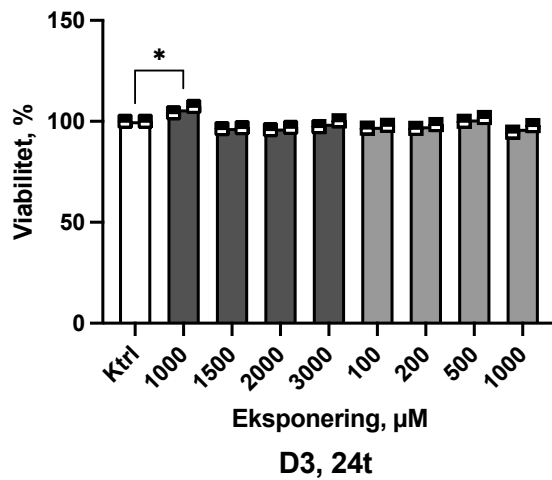
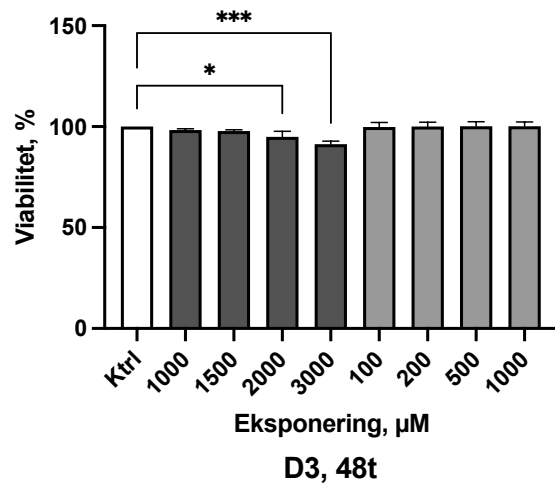
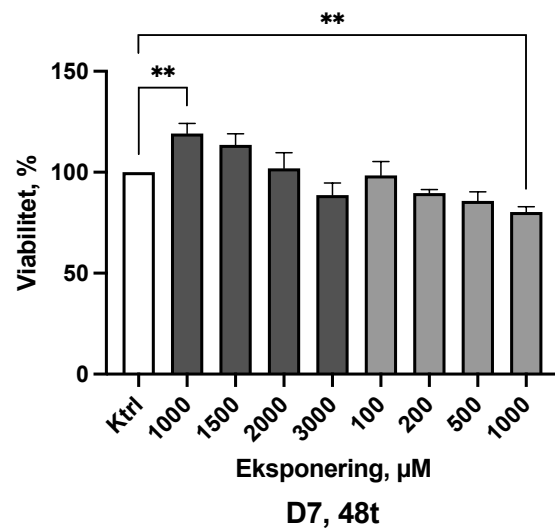


C



D



E**F****G**

Figur 3.16 Viabiliteten til differensierte PC12-celler etter eksponering for VPA eller LTG, målt ved RZ-analyse.

PC12-celler differensiert med NGF i én (D1), tre (D3), eller syv dager (D7) ble eksponert for VPA [1000–3000 µM], LTG [100–1000 µM], eller kontroll-løsning. Det ble også lagt til en kontroll av løsningsmiddel i de tilfellene LTG i DMSO ble brukt, samt en positiv kontroll med H₂O₂ 100 µM. Etter 24 eller 48 timer eksponering ble fluorescens avlest på plateleser ved ex 560 nm/em 590 nm som del av RZ-analyse. Ubehandlede celler ble brukt som kontroll. Gjennomsnittlige blankverdier ble trukket fra. Resultatene er basert på gjennomsnittet av tekniske replikater (n = 5–42) fra tre (C, D, F, G) to (E) biologiske replikater. Gjennomsnittet av de tekniske replikatene er normalisert mot kontroll. Ved tre biologiske replikater er det presentert ± SD normalisert mot kontroll. Uteliggere ble fjernet fra C (1), D (3), E (2), F (2), og G (3) ved ROUT (Q = 1 %). Statistiske analyser ble utført med One Way ANOVA, n = 3 (C, D, F, G), eller n = 16–48 (E). * angir signifikant forskjell fra kontroll (*: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001; ****: p < 0,0001). Konsentrasjonene er høyere enn terapeutiske serumkonsentrasjoner ved legemiddelbehandling i menneske. Angir gjennomsnittlig verdi av de tekniske replikatene normalisert mot kontroll, fra ett biologisk replikat.

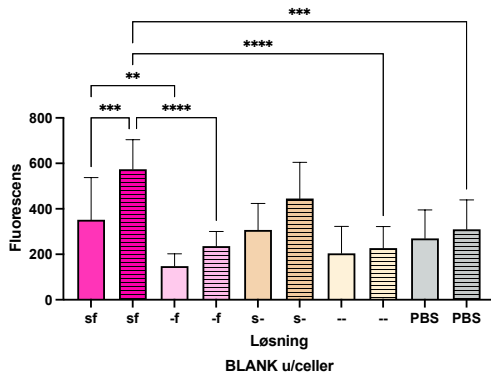
3.10 Test av brett

I viabilitetsstudiene var det flere brett som måtte ekskluderes grunnet negative verdier etter at bakgrunnsmålingene (blank) var trukket fra. Det ble benyttet blanke 96-brønnsbrett for MTT-, RZ-, og PI-analyse (i PC12-celler). Viabilitetsstudiene i udifferensierte SH-SY5Y- og PC12-celler ble utført i *serumholdig medium med farge*, mens det for celler til differensiering ble benyttet *medium med farge med lavt innhold av serum*. Det ble derfor undersøkt om det var forskjell mellom blanke og svarte brett ved RZ-analyse, og om konsentrasjonen av RZ hadde betydning. I tillegg ble ulike typer medium testet for å se om serum eller fargestoff hadde innvirkning på målingene.

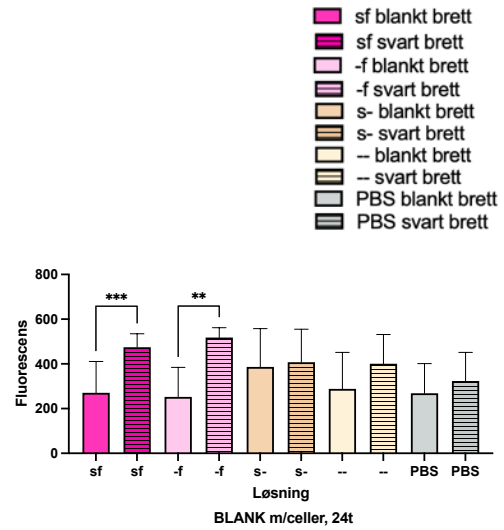
Udifferensierte PC12-celler ble platet ut i *serumholdig medium med farge*. Utplatingen ble gjort i blanke brett av plast, eller svarte brett med glassbunn. Etter 24 timer ble mediet byttet ut med *serumholdig medium med* eller *uten farge*, *serumfritt medium med* eller *uten farge*, eller *PBS*. Deretter ble RZ tilsatt til en sluttkonsentrasjon på 44 eller 440 μM . Tilsvarende ble gjort i brett uten celler. Cellene ble inkubert med RZ i fire timer ved 37 °C før avlesning av fluorescens på plateleser ved ex 560 nm/em 590 nm. Brønner til blank ble ikke tilsatt RZ (**figur 3.17**). Brett med RZ er ikke presentert.

Det var høyere blankverdier for *serumholdig medium med farge* i brett uten celler enn for brett med celler. I brett både uten og med celler var det signifikant høyere bakgrunn i svarte brett enn i blanke brett når det gjaldt *serumholdig medium med farge*. Dette gjaldt også for *serumfritt medium med farge* i brett med celler. I brett med celler ble det ikke sett andre signifikante forskjeller mellom mediumtypene, og heller ikke mellom blanke og svarte brett.

A



B



Figur 3.17 Test av medium i blanke eller svarte brett, uten eller med udifferensierte PC12-celler. Udifferensierte PC12-celler ble platet ut i serumholdig medium med farge. Utplatingen ble gjort i blanke brett av plast, eller svarte brett med glassbunn. Etter 24 timer ble mediet byttet ut med serumholdig medium med eller uten farge, serumfritt medium med eller uten farge, eller PBS. Tilsvarende ble da også tilsatt i brett uten celler. Fluorescens ble avlest på plateleser ved ex 560 nm/em 590 nm (slik som for RZ-analyse). Resultatene er basert på gjennomsnittet av 8–16 tekniske replikater fra ett biologisk replikat. Gjennomsnittet av de tekniske replikatene er normalisert mot kontroll \pm SD normalisert mot kontroll. Ingen uteliggere ble fjernet ved ROUT ($Q = 1\%$). Statistiske analyser ble utført med One Way ANOVA, $n = 8-16$. * angir signifikant forskjell kontroll (**: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$). s = serumholdig medium; f = medium med farge.

3.11 Kalsiuminfluks-studier i kyllingkornceller

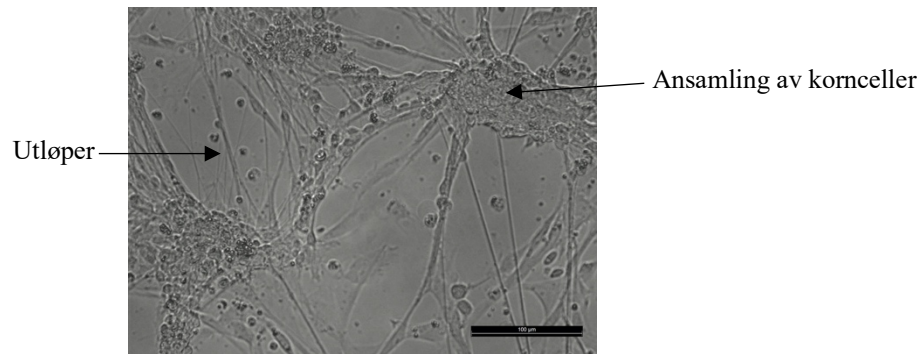
Det ble utført kalsiuminfluks-studier i kyllingkornceller i svarte 96-brønnsbrett ved DIV3 og DIV4 (**figur 3.18**). Grunnlinjen ble målt på plateleser etter inkubering med Mg^{2+} -buffer. Etter vasketrinn ble cellene eksponert for VPA [50–3000 μM], LTG [5–1000 μM], eller kontroll-løsning. Enkelte brønner ble i stedet eksponert for aktivator eller inhibitor av kalsiuminfluks. Fluorescens ble avlest på plateleser ved ex 335 og 380/em 510 nm etter 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75 og 90 minutter. I DIV4 ble det tilsatt stimulerende buffer som et eget metodetrinn etter 90 minutter. Flere ulike stimulerende buffere ble testet; det er her presentert med NMDA 200 μM /glysin 100 μM . Grunnlinjen ga i noen forsøk høyere verdier enn ved måling av kalsiumnivå etter eksponering. Grunnlinjen er derfor ikke trukket fra resultatene. Kalsiumnivået i kontroll holdt seg jevnt over tid (**figur 3.19 A og B**), og tilsetning av stimulerende buffer ga økt kalsiuminfluks i kontroll (**figur 3.19 B**).

Ulike aktivatorer og inhibitorer av kalsiuminfluks ble testet ut (**figur 3.19 C-F**). Inhibitoren MK801 10 μM ga ingen reduksjon i kalsiuminfluks ved DIV3, men ved DIV4 førte den til en signifikant reduksjon av kalsiumnivå ved 5–30 minutter (her presentert ved 10 minutter). Reduksjonen var derimot ikke signifikant ved målinger etter dette (her presentert ved 60 minutter).

Ulike konsentrasjoner av glutamat/glysin ble testet ut ved DIV4 (**figur 3.19 D og F**). Glutamat 100 μM /glysin 100 μM ga signifikant økning i kalsiumnivå ved de fleste tidspunkter (her presentert ved 10 og 60 minutter). NMDA 200 μM /glysin 100 μM ga en økning av kalsiumnivå som funksjon av tid, og ved DIV3 var denne økningen signifikant ved alle tidspunkter (**figur 3.19 G og H**). Ved DIV4 økte kalsiumnivået ytterligere også ved tilsetning av stimulerende buffer (**figur 3.19 K**).

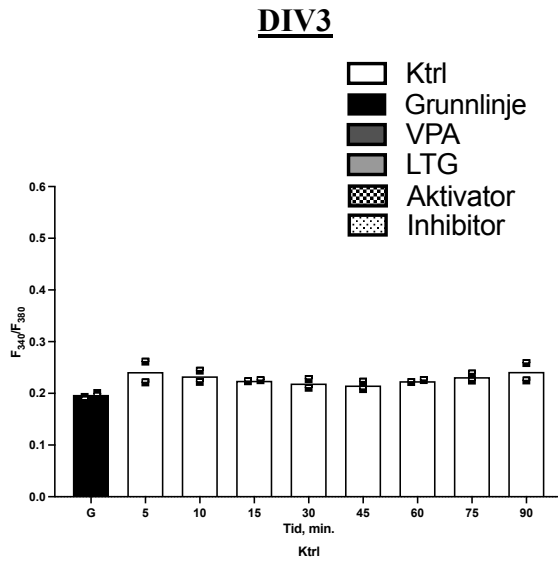
Ved DIV4 ble det sett en signifikant reduksjon i kalsiumnivå etter eksponering for LTG 1000 μM (**) i 5 (ikke presentert) og 10 minutter (**figur 3.19 J**). Nivået var her rundt 77 % av kontroll. Det ble sett en signifikant reduksjon ved eksponering for LTG 100 μM (*) i 45 minutter (ikke presentert). Det ble ellers sett en tendens til reduksjon i kalsiuminfluks for flere av konsentrasjonene ved de tidligste tidspunktene (her presentert ved 10 minutter) ved DIV4, men denne endringen fra kontroll var ikke signifikant. Ved tilsetning av stimulerende buffer (**figur 3.19 K**) ble det ved alle legemiddelkonsentrasjonene sett en økning i kalsiumnivå fra

kontroll uten stimulering. Ved eksponering for legemiddel i kombinasjon med MK801 ble det sett reduksjon i kalsiumnivå i forhold til kontroll, men det var ingen forskjell mellom legemiddel i kombinasjon med MK801 og MK801 alene (ikke presentert).

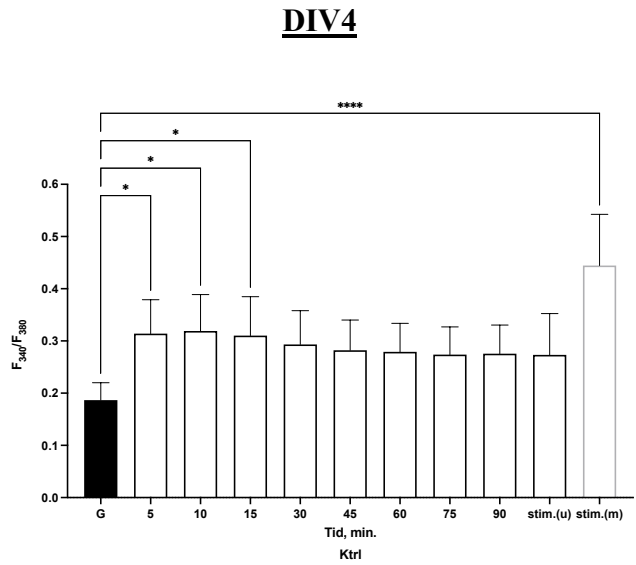


Figur 3.18 Kyllingkornceller på DIV4.
Objektiv: x20. Målestokk: 100 μm.

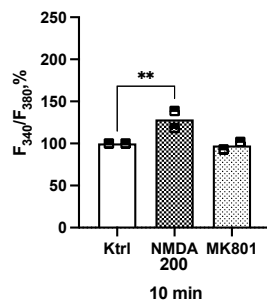
A



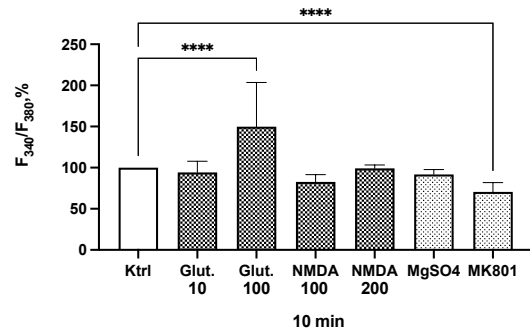
B



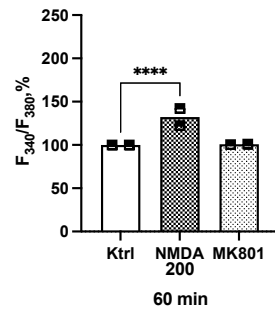
C



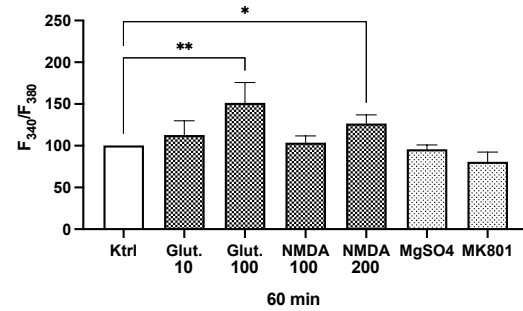
D



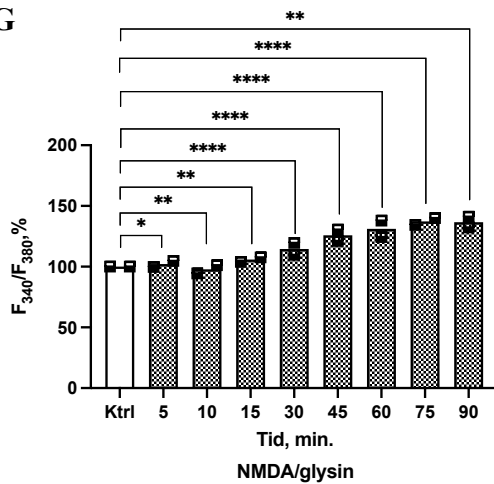
E



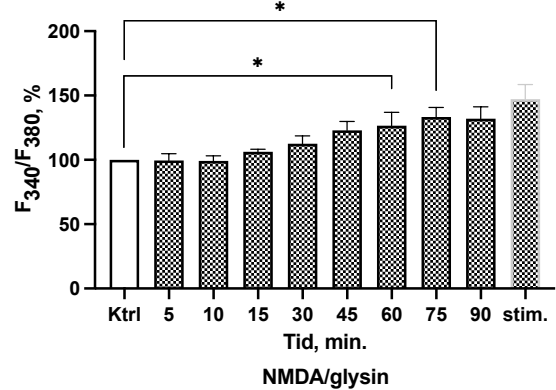
F

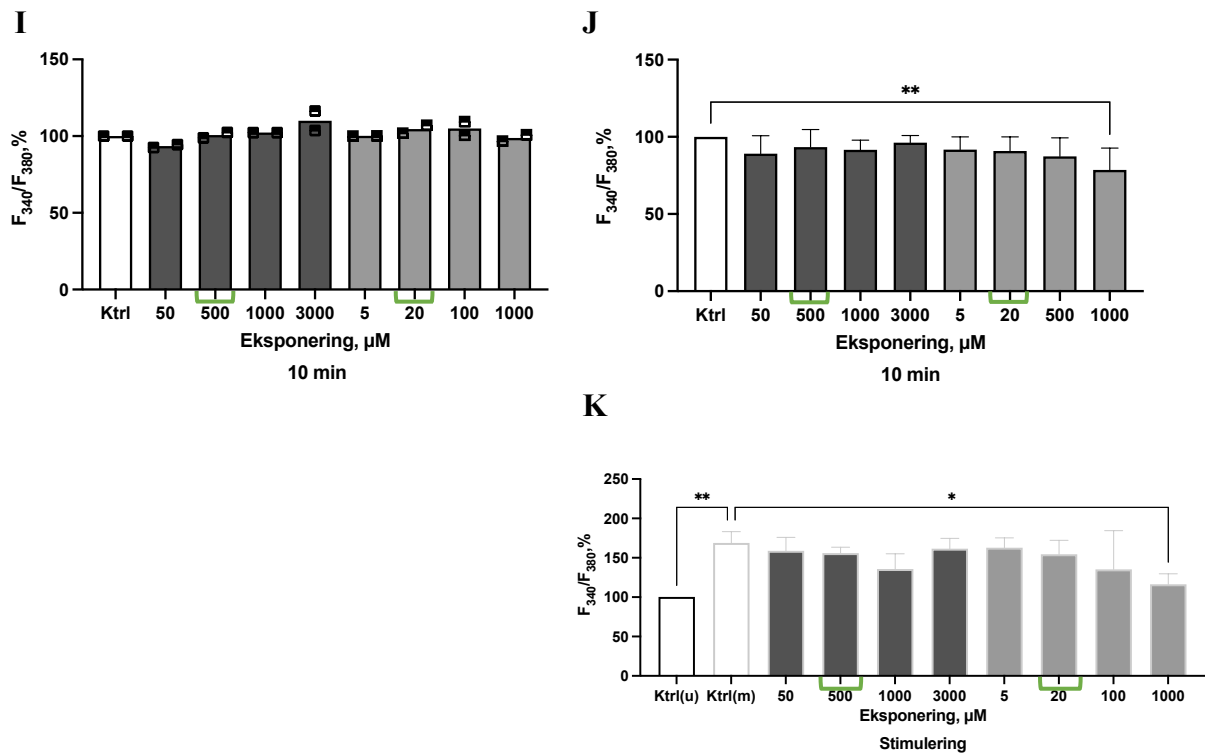


G



H





Figur 3.19 Kalsiuminfluks-studier i kyllingkornceller ved DIV3 og DIV4.

Kyllingkornceller ble inkubert med Fura-2 AM ved DIV3 [$2 \mu\text{M}$] og DIV4 [$4 \mu\text{M}$] i 30 min. ved 37°C . Etter vasketrinn ble cellene inkubert i Mg^{2+} -buffer [1 mM] i 10 min. ved RT, før grunnlinjen ble målt (A og B). Etter nye vasketrinn ble eksponeringsløsningene tilsatt. Cellene ble da eksponert for VPA [$50\text{--}3000 \mu\text{M}$] eller LTG [$5\text{--}1000 \mu\text{M}$] med eller uten inhibitor, eller kalsiuminfluksinhibitor eller kalsiuminfluksaktivator alene. Fluorescens ble avlest på plateleser ved ex 335 og 380/em 510 nm i 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75 og 90 min. etter eksponering. Til slutt ble stimulerende buffer tilsatt i alle brønner. Grått omriss på søylene indikerer tilsatt stimulerende buffer. I noen av brønnene til kontroll ble det i stedet tilsatt N-buffer. Resultatene for DIV3 er samlet fra to biologiske replikater, med 4–8 tekniske replikater per eksponeringsløsning. Det ble her fjernet seks uteliggere ved ROUT ($Q = 1\%$). For DIV4 er resultatene for 5–90 min. samlet fra fem biologiske replikater, med 4–8 tekniske replikater per eksponeringsløsning. Det ble her fjernet 15 uteliggere ved ROUT ($Q = 1\%$). For tre av de biologiske replikatene ved DIV4 ble det benyttet NMDA/glysin [$200/100 \mu\text{M}$] som stimulerende buffer; disse tre er presentert. Fura-2 AM og eksponeringsløsningene ble tilsatt i N-buffer (DIV3) eller serumfritt medium (DIV4). Grønn klamme indikerer terapeutiske serumkonsentrasjoner ved legemiddelbehandling i menneske. Glut 10. = glutamat $10 \mu\text{M}$ /glysin $1 \mu\text{M}$; Glut. 100 = glutamat $100 \mu\text{M}$ /glysin $100 \mu\text{M}$; NMDA 100 = NMDA $100 \mu\text{M}$ /glysin $100 \mu\text{M}$; NMDA 200 = NMDA $200 \mu\text{M}$ /glysin $100 \mu\text{M}$. $\text{MgSO}_4 = \text{MgSO}_4 50 \mu\text{M}$; MK801 = MK801 $10 \mu\text{M}$; stimulering = stimulerende buffer NMDA $200 \mu\text{M}$ /glysin $100 \mu\text{M}$; u/m = uten/med stimulerende buffer; F = fluorescens. ■ Angir gjennomsnittlig verdi av de tekniske replikatene normalisert mot kontroll, fra ett biologisk replikat.

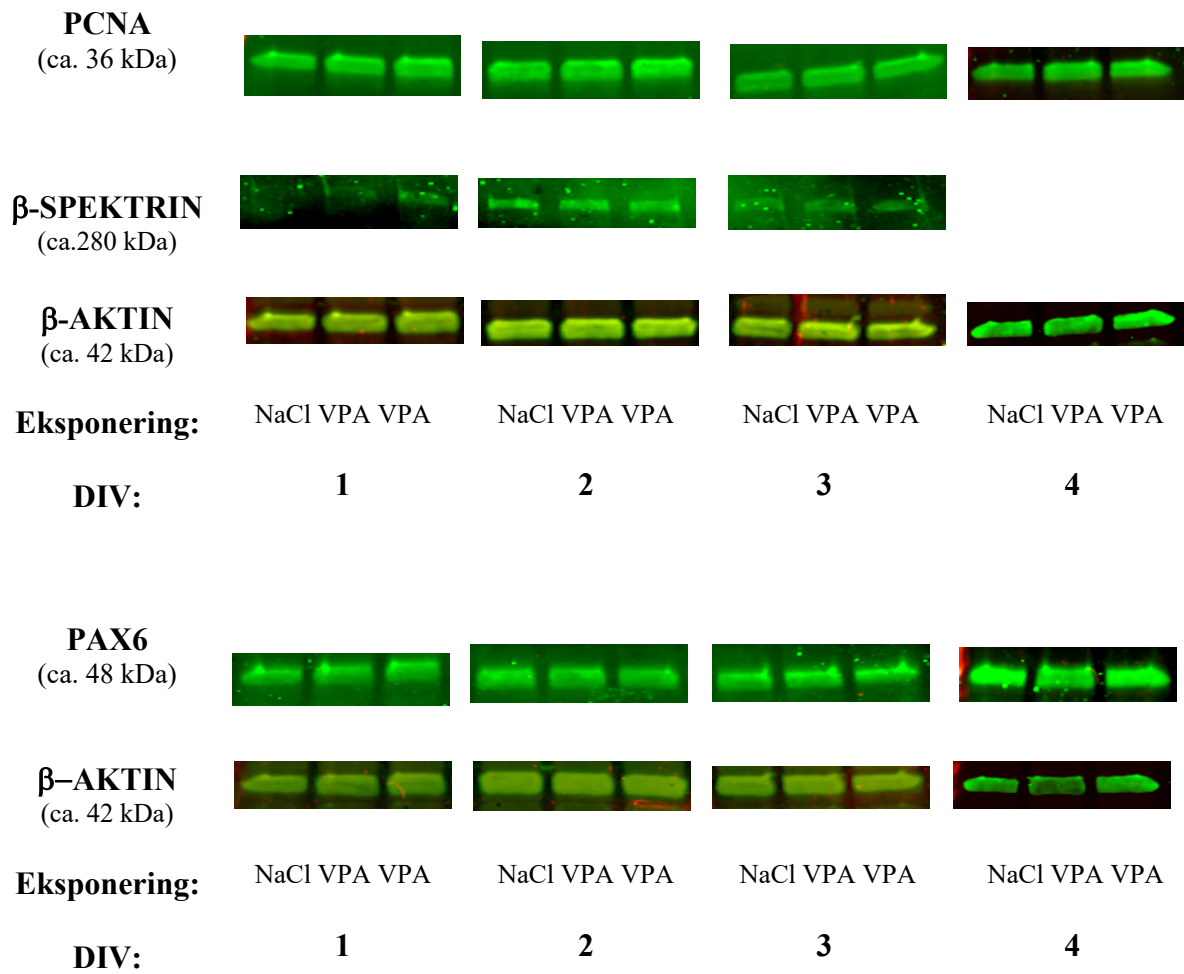
3.12 Western blot

Kyllingembryo ble eksponert for VPA 83,1 mg/kg eller LTG 7,6 mg/kg løst i NaCl [0,9 %], eller kontroll-løsning med tilsvarende volum NaCl [0,9 %], *in ovo* på E16. Lillehjernene ble høstet på E17, og korncellekulturer ble platet ut i 6-brønnsbrett. Proteiner ble ekstrahert fra cellene på DIV1-4. Deretter ble WB-analyse utført. For resultatene som er presentert ble selve WB-analysen utført av overingeniør Mona Gaarder. Det ble satt 15 µg protein på gelen for prøver fra VPA-injiserte egg, og tilsvarende for tilhørende kontroll. For LTG-injiserte egg og tilhørende kontroll ble det satt på 10 µg protein. Det ble undersøkt proteinuttrykk av PCNA, β2-SPEKTRIN og PAX6 (**figur 3.20** og **3.21**). Som referanseprotein ble β-AKTIN benyttet. Resultatene fra hver kontroll består av ett teknisk replikat, mens prøvene fra legemiddelinjiserte egg består av to tekniske replikater.

Ved eksponering for VPA var det ingen endring i uttrykk av PCNA sammenliknet med kontroll (**figur 3.22 A**). Ved eksponering for LTG ble det sett en økning i PCNA ved økende DIV (**figur 3.22 D**). Denne endringen var derimot ikke signifikant.

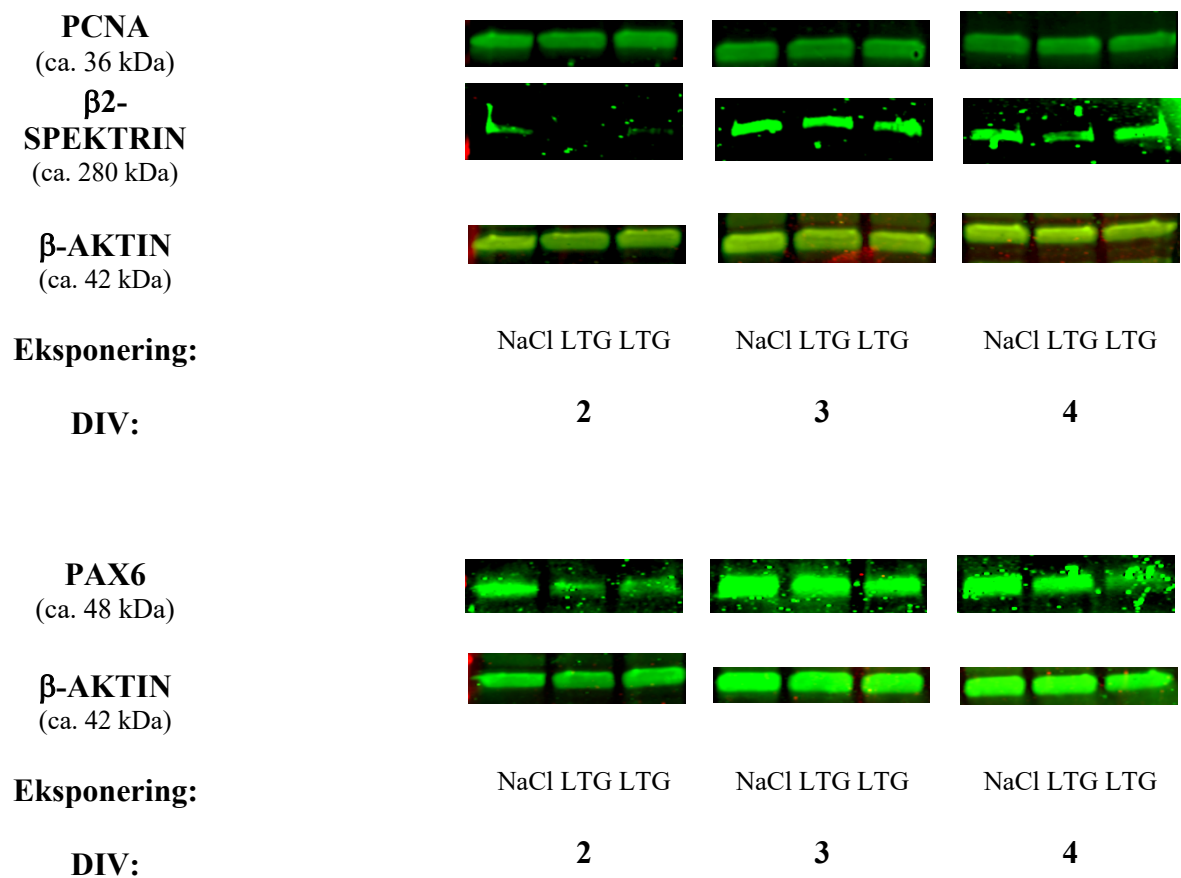
Båndene til β-SPEKTRIN var svake i VPA-prøvene og tilhørende NaCl-prøve ved DIV1 og DIV3 (**figur 3.20**). For DIV1 så det ut til at båndet for NaCl-prøven nærmest manglet. For DIV2 var det tydelige bånd, og det ble her sett en reduksjon i uttrykk av β-SPEKTRIN i VPA-prøvene i forhold til kontroll. For LTG-prøvene var båndene for dette proteinet sterkest ved DIV3 og DIV4, og det ble her sett en reduksjon i proteinuttrykket (**figur 3.22 D**).

PAX6 ga tydelige bånd (**figur 3.20** og **3.21**). Etter eksponering for VPA ble det sett signifikant (*) økning i uttrykket av PAX6 ved DIV1 (**figur 3.22 A**). Denne økningen ble ikke sett ved DIV2–DIV4. Ved eksponering for LTG ble det sett reduksjon i PAX6 for DIV2–DIV4, hvor reduksjonen avtok ved økende DIV (**figur 3.22 F**).



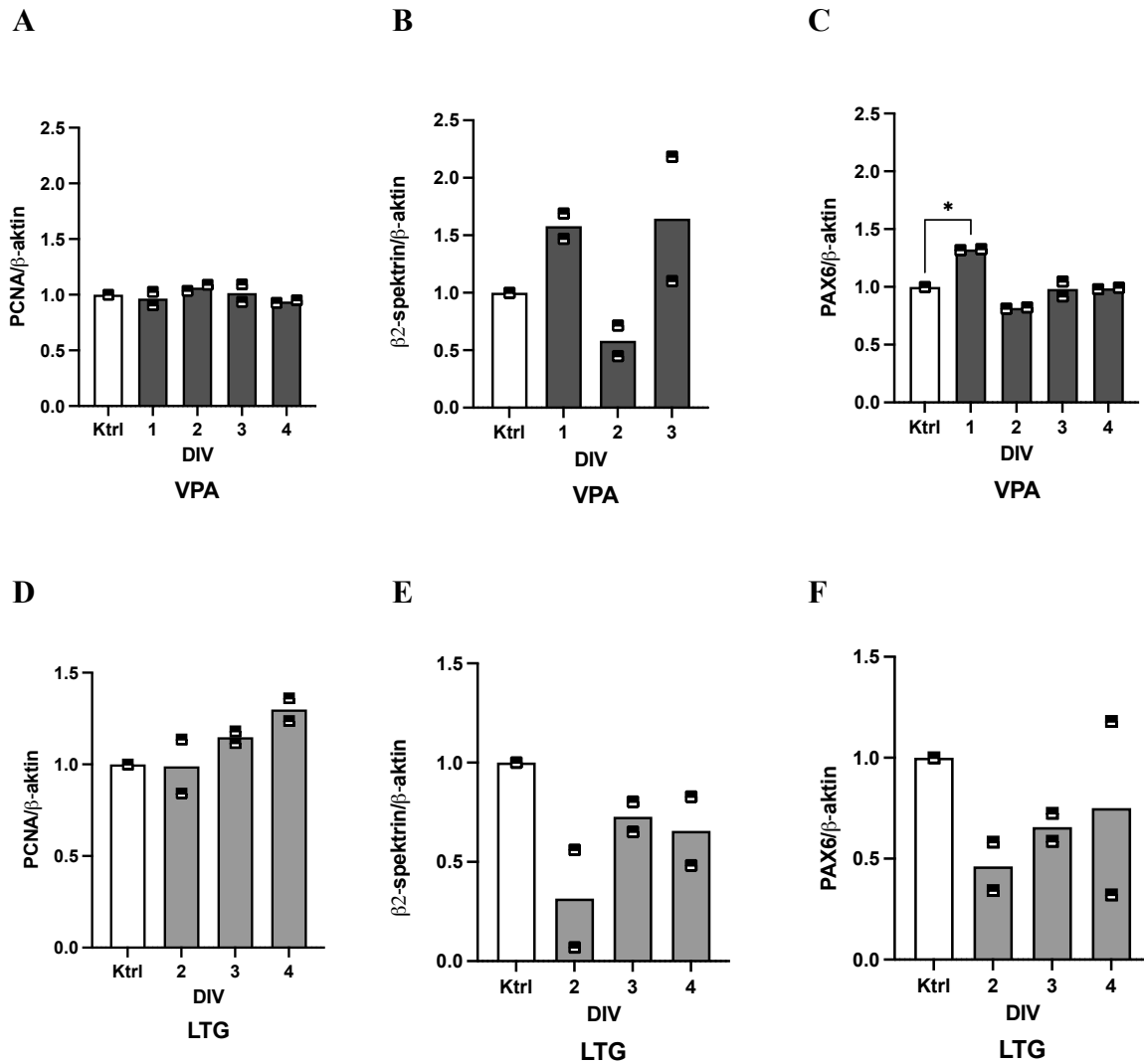
Figur 3.20 Proteinuttrykk i kyllingkornceller målt ved WB-analyse etter eksponering for VPA [82,1 mg/kg], in ovo på E16.

Kyllingembryo eksponert for VPA 82,1 mg/kg og tilsvarende volum NaCl [0,9 %], in ovo på E16. Cellekultur ble laget etter høsting av lillehjernen på E17. Proteiner ble ekstrahert ved DIV1-4 og det ble utført Western blot-analyse på prøvene. På gelen ble det satt på prøver tilsvarende 15 μ g protein. Hver NaCl-prøve består av ett teknisk replikat, og hver LTG-prøve består av to tekniske replikater.



Figur 3.21 Proteinuttrykk i kyllingkornceller målt ved WB-analyse etter eksponering for LTG [7,6 mg/kg], *in ovo* på E16.

Kyllingembryo ble eksponert for LTG 7,6 mg/kg og tilsvarende volum NaCl [0,9 %], *in ovo* på E16. Cellekultur ble laget etter høsting av lillehjernen på E17. Proteiner ble ekstrahert ved DIV2-4 og det ble utført Western blot-analyse på prøvene. På gelen ble det satt på prøver tilsvarende 10,5 µg protein. Hver NaCl-prøve består av ett teknisk replikat, og hver LTG-prøve består av to tekniske replikater.



Figur 3.22 Kvantifisering av proteinuttrykk i kyllingkornceller etter eksponering for VPA eller LTG, in ovo på E16.

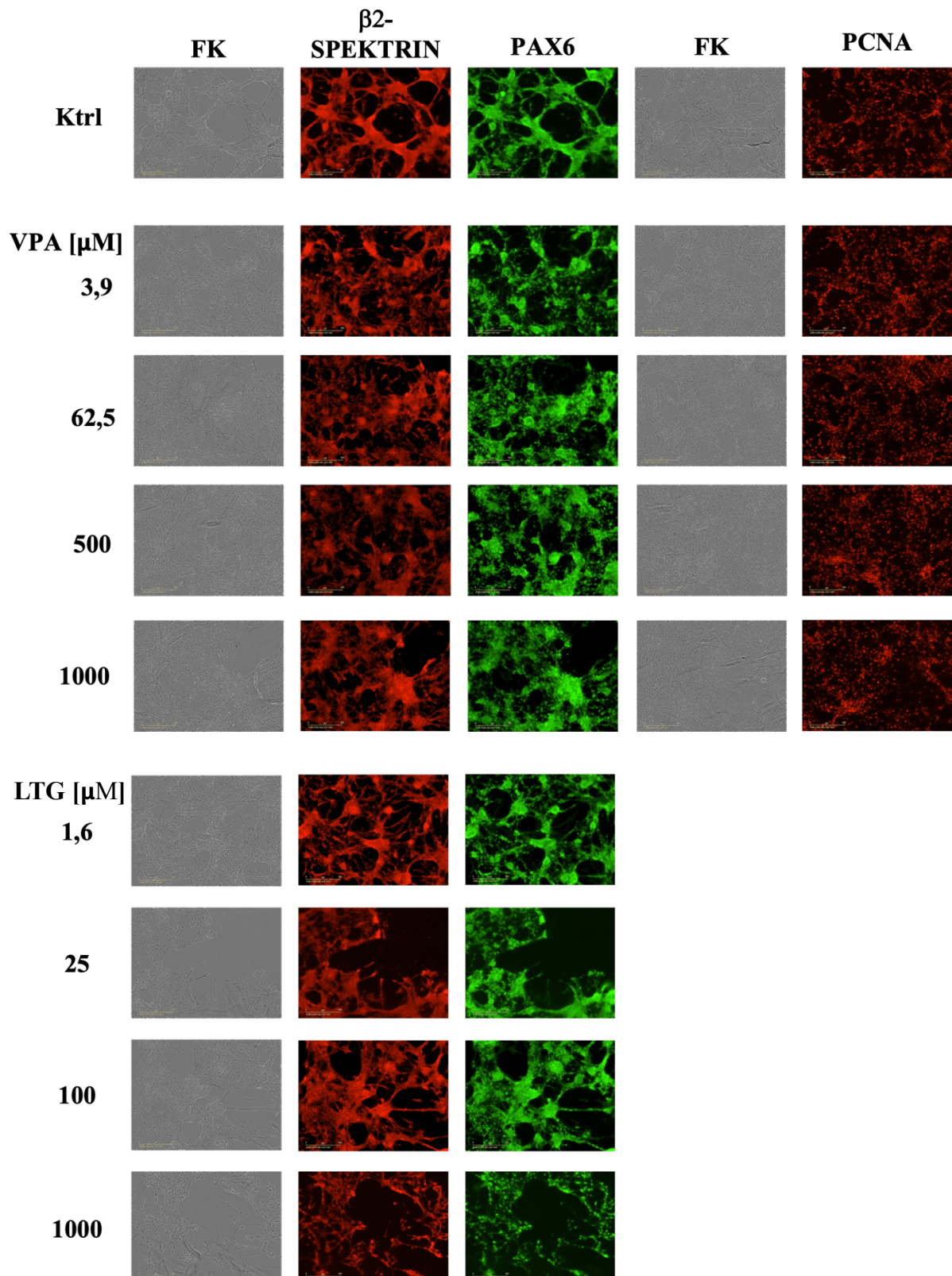
Kyllingembryo ble eksponert for VPA 83,1 mg/kg eller LTG 7,6 mg/kg løst i NaCl [0,9 %], eller kontroll-løsning med tilsvarende volum NaCl [0,9 %], in ovo på E16. Lillehjernen ble høstet på E17, og korncellekulturer ble platet ut i 6-brønnsbrett. Proteiner ble ekstrahert fra cellene på DIV1-4. Deretter ble Western blot-analyse utført. Det ble satt på 15 μ g protein på gelen for prøver fra VPA-injiserte egg, og tilsvarende for tilhørende kontroll. For LTG-injiserte egg og tilhørende kontroll ble det satt på 10 μ g protein. Båndstyrke ble kvantifisert i ImageJ. Hvert proteinuttrykk er normalisert mot β -AKTIN på samme membran.

■ Angir faktisk verdi av de tekniske replikatene normalisert mot kontroll, fra ett biologisk replikat.

3.13 Immunocytokjemi

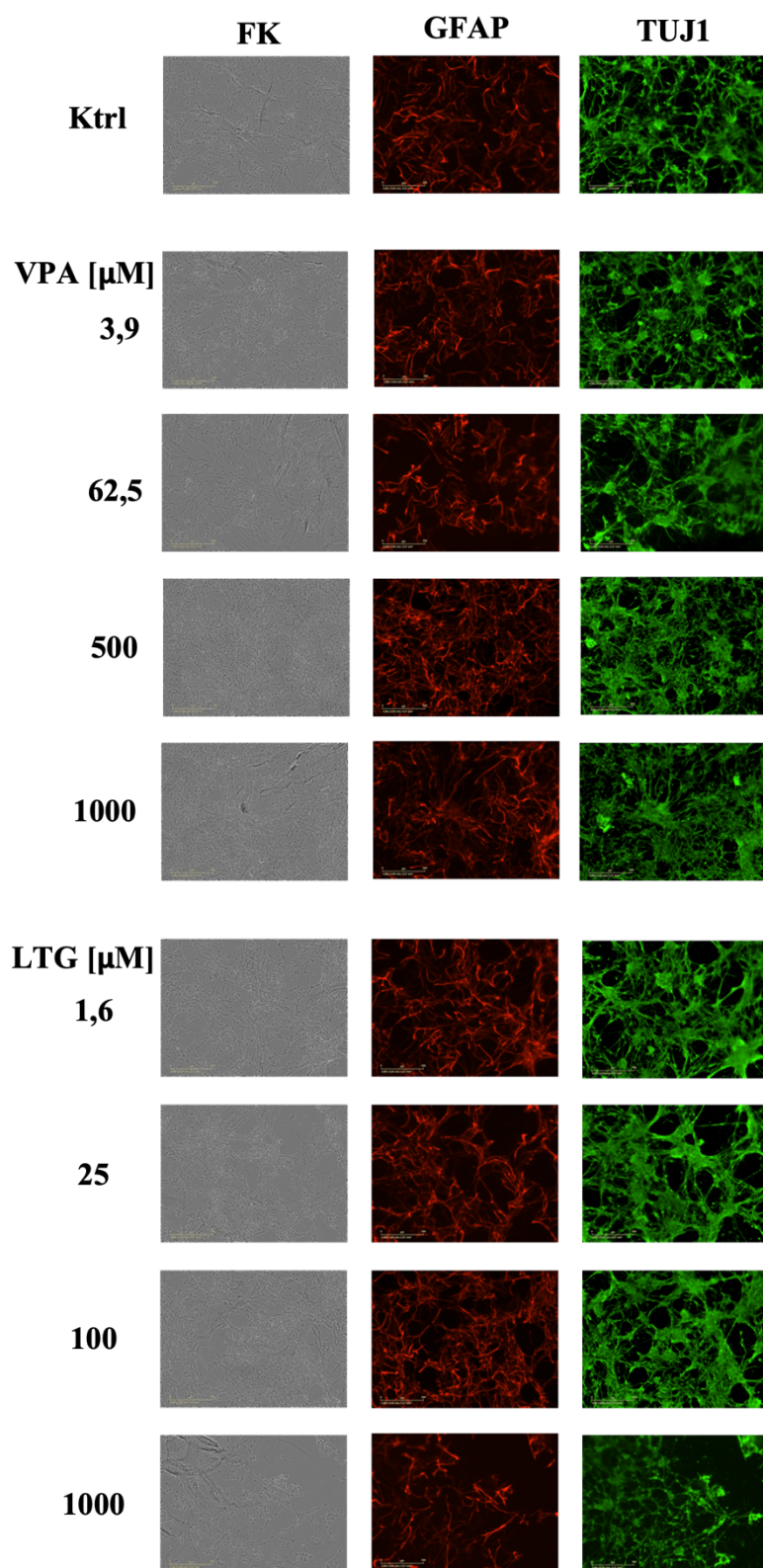
Kyllingkornceller platet ut i svarte 96-brønnsbrett ble eksponert for VPA [3,9–1000 μM], LTG [1,6–1000 μM], eller kontroll-løsning. Etter 48 timer eksponering ble cellene fiksert i MeOH [70 %] og oppbevart ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ før utføring av ICC. Uttrykket av ulike proteiner ble undersøkt på bilder tatt i IncuCyte (**figur 3.23** og **3.24**). Det ble tatt ett bilde per brønn. Hvert bilde ble kvantifisert ved hjelp av ImageJ, hvor lysintensitet (integret tetthet) ble målt tre steder på bildet, hvert med areal 16 cm^2 . Bildene ble kvantifisert i ImageJ dersom det var tilstrekkelig celletetthet til å dekke tre separate områder for kvantifisering.

Ved eksponering for LTG $1000\text{ }\mu\text{M}$ (*) ble det sett en signifikant reduksjon i uttrykk av TUJ1 (**figur 3.25 C**). Det ble ikke sett noen endring fra kontroll for uttrykk av PCNA etter eksponering for VPA (**figur 3.25 E**). Det ble sett en tendens til økt PAX6 etter eksponering for de tre høyeste konsentrasjonene av VPA (**figur 3.25 B**).



Figur 3.23 Bilder av kyllingkornceller eksponert for VPA eller LTG i 48 timer, merket med β 2-SPEKTRIN, PAX6, eller PCNA.

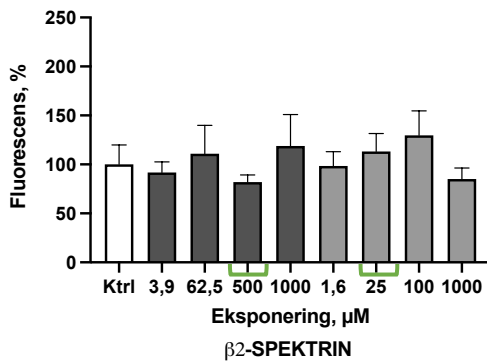
Kyllingkornceller ble eksponert for VPA [3,9–1000 μ M], LTG [1,6–1000 μ M], eller kontroll-løsning i 48 timer før fiksering i MeOH [70 %] og oppbevaring ved -20 °C inntil utføring av ICC. Ubehandlede celler ble brukt som kontroll. Bildene er tatt i InCuCyte. Fasekontrastbildene (FK) tilhører påfølgende bilde(r) til høyre.



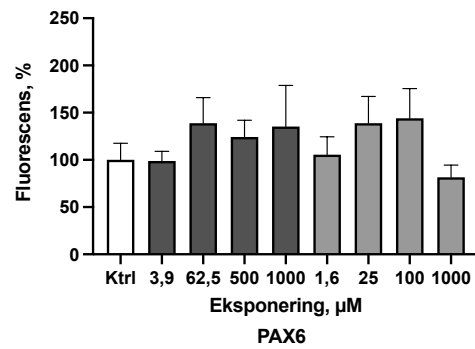
Figur 3.24 Bilder av kyllingkornceller eksponert for VPA eller LTG i 48 timer, merket med GFAP eller TUJ1.

Kyllingkornceller ble eksponert for VPA [3,9–1000 μM], LTG [1,6–1000 μM], eller kontroll-løsning i 48 timer før fiksering i MeOH [70 %] og oppbevaring ved -20 °C inntil utføring av ICC. Ubehandlede celler ble brukt som kontroll. Bildene er tatt i IncuCyte. Fasekontrastbildene (FK) tilhører påfølgende bilde(r) til høyre.

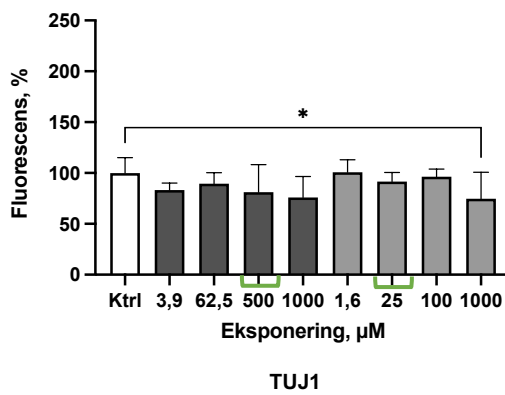
A



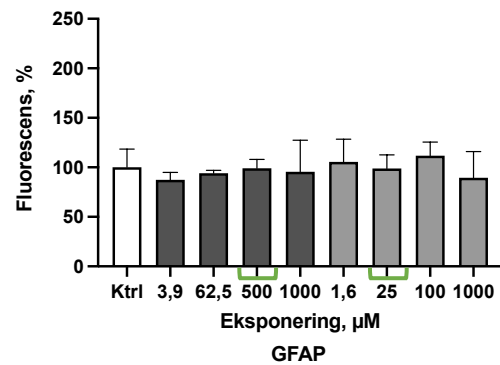
B



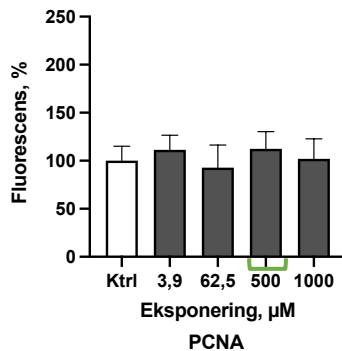
C



D



E



Figur 3.25 Proteinuttrykk i kyllingkornceller målt ved ICC etter eksponering for VPA eller LTG i 48 timer, *in vitro*.

Proteinuttrykk ble undersøkt i kyllingkornceller etter eksponering for VPA [3,9–1000 μM] eller LTG [1,6–1000 μM] 48 timer *in vitro*. Ubehandlede celler ble brukt som kontroll. Proteinuttrykk ble målt fra bilder tatt i IncuCyte. Det ble tatt ett bilde per brønn. Hvert bilde ble kvantifisert ved hjelp av ImageJ hvor lysintensitet (integret tetthet) ble målt tre steder på bildet, hvert med areal 16 cm^2 . Bildene ble kvantifisert i ImageJ dersom det var tilstrekkelig celletetthet til å dekke tre separate områder for kvantifisering. Resultatene er basert på 3–11 slike områder. Statistiske analyser ble utført med One Way ANOVA $n = 3–11$. * angir signifikant forskjell fra kontroll (*: $p < 0,05$). Grønn klamme indikerer terapeutiske serumkonsentrasjoner ved legemiddelbehandling i menneske.

4 DISKUSJON

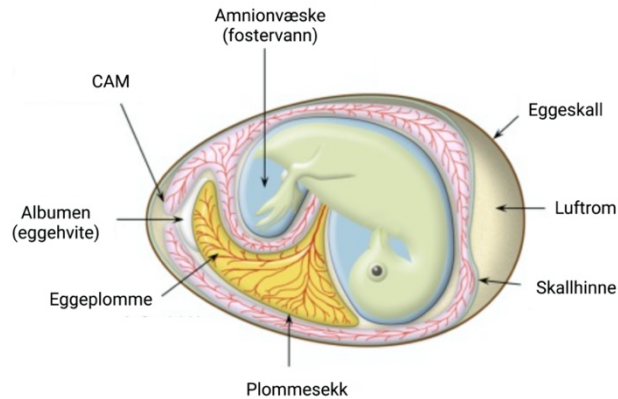
4.1 Diskusjon av metodevalg

4.1.1 Valg av modellsystemer

Kyllingembryo er av flere grunner attraktiv som modellsystem. Tiden fra befruktning til klekking av egg er rundt 21 dager. Den relativt korte inkuberingstiden gjør det mulig å planlegge og utføre forsøk over en kort tidsperiode. I tillegg er det til enhver tid god oversikt over hvor mange dyr som er involvert, og embryoene kan erverves uten å avlive mordyret. Dette forbedrer «3R»-prinsippet om å redusere antall dyr involvert. Eggene kommer fra ulike mødre noe som gir genetisk variasjon og statistisk uavhengighet. Eggene er selvforsynt med næring og trenger lite stell. Vekstvilkårene kan oppnås i en rugeinkubator ved 37–39 °C og 44–55 % luftfuktighet (85), og det er derfor ikke behov for tilrettelegging av en dyreanstalt. I tillegg er eggene lett håndterlige, og injeksjon kan utføres med minimal stresspåvirkning for dyret. Injiseringen av egget kan gjøres i ulike kompartments (som i det farmakokinetiske begrepet "compartments") (128).

Både kyllingembryo og humant foster ligger i amnionvæsken (fostervæsken) omringet av amnion (vannhinnen), som fungerer som beskyttelse mot mekanisk og fysiologisk påvirkning (**figur 4.1**). Fugler har en plommesekk som ligger rundt eggeplommen, og plommesekken tilfører kyllingembryoet næring. I menneskefoster er plommesekken av mindre betydning, men har en viktig funksjon for overlevelse av tidlig embryo. Allantois er en utposning av plommesekken, og er viktig i kyllingembryo for å oppbevare avfallsstoffer (slik som urin og avfall fra fordøyelse) (129). Gassutvekslingen i egget skjer ved at allantoiske arterier frakter deoksygenert blod til den chorionallantoiske membranen (CAM). Gassene overføres da gjennom skallet, og allantoiske vener fører oksygenert blod tilbake til embryo (130). Hulrommet i allantois vil i pattedyr tilbakedannes under svangerskapet, og veggen vokser sammen med chorion. Veggen inngår videre i dannelsen av morkaken og navlestrengen (26).

I denne oppgaven ble det valgt å injisere eggene i allantoishulrommet ettersom CAM er i kontakt med embryoets sirkulasjonssystem (128), og på denne måten kan frakte legemidlene til hjernen.



Figur 4.1. Illustrasjon av kyllingembryo ved E16.

Kyllingembryo ligger i amnionvæsken (fostervæsken) omringet av amnion (vannhinnen), som fungerer som beskyttelse mot mekanisk og fysiologisk påvirkning. Eggeplommen tilfører egget næring (129). Gassutvekslingen i egget skjer ved at allantoiske arterier frakter deoksygenert blod til den chorionallantoiske membranen (CAM). Gassene overføres da gjennom skallet, og allantoiske vener fører oksygenert blod tilbake til embryo (130). Figuren er hentet fra (131) og modifisert.

I pattedyr sørger morkaken for overføring av næringsstoffer og oksygen fra mor til foster, og transporterer av avfallsstoffer fra foster til mor (132). Morkaken fungerer også som en viktig barriere som kan hindre fosteret i å bli eksponert for xenobiotika i mors blod (133). Barrieren er derimot ikke impermeabel, og det er vist at omtrent alle legemidler tatt under svangerskapet til en viss grad overføres til foster via passiv diffusjon (134). Legemidler kan også overføres til foster ved hjelp av aktive transportører, eller pumpes ut ved efflukspumper (134). Det finnes også ulike enzymer i morkaken som bidrar til metabolisme av legemidler, men hovedmetabolismen av legemidler skjer i mors (og etter hvert i fosterets) lever (134).

Utvikling av kyllingembryo innebærer ikke en morkake, og som modellsystem vil det derfor være enkelte prosesser som ikke er direkte overførbare til mennesker. Skallet beskytter egget fra omgivelsene, men i det et legemiddel er injisert i egget, vil det ikke være en tilsvarende blod-placenta-barriere som i mennesker (130). Det er i tillegg artsforskjeller med hensyn til farmakokinetikk, deriblant for ulike enzymer i metabolisme av legemidler (135).

Fosterutvikling i fugler og pattedyr skiller seg også fra hverandre ved at egg er et lukket system, hvor avfallsstoffer ikke vil fjernes før klekking. Ved enkeltinjeksjon i kyllingembryo vil det derfor kunne oppstå effekter som følge av akkumulering av legemidlet; dette vil ikke skje i samme grad i mennesker. Akkumulering kan imidlertid være en fordel ettersom man da kan opprettholde plasmakonsentrasjonen uten å injisere flere ganger.

Av andre modellsystemer finnes rotte og mus (136, 137). Dette er pattedyr, og forsøk i disse vil være en fordel med hensyn til pattedyrs spesifikke egenskaper, slik som prosesser knyttet til morkaken. Bruk av murine modeller krever derimot flere ressurser ved oppfostring og avl, og mordyret må avlives for å få tilgang til embryoene. Det finnes også alternative dyremodeller til studier av nevrouviklingen, blant dem er sebrafisk (138). Det at kylling er i nærmere slektskap med mennesker enn fisk, er noe som styrker valget av kyllingembryo som modellsystem (85).

Prenatal eksponering for antiepileptika er forbundet med endret kognitiv adferd (62, 86), og lillehjernen er derfor et interessant målorgan ettersom den spiller en rolle i slike funksjoner (35). Lillehjernen er godt konserverv mellom arter (139), og inneholder kornceller som er den celletypen som utgjør den største andelen av alle nevroner i hjernen (88). Kornceller gjennomgår alle stadier for nevrouvikling, og er derfor en god modell for å studere utviklingen av CNS (85). Kyllingkorncellene er primærceller og har begrenset levetid ved dyrking *in vitro*. I tillegg kreves det nye dyr for hver gang en cellekultur skal lages. Disse problemene unngås ved bruk av cellelinjer. Det er mulig å holde liv i en cellelinje over lang tid ved å splitte cellene jevnlig til nye passasjer. Cellelinjer kan også fryses ned og tines ved behov. De er dermed lett tilgjengelige, og i tillegg krever de ofte lite stell for å overleve. Det ble benyttet SH-SY5Y- og PC12-celler som originalt stammer fra svulst i henholdsvis menneske og rotte (92, 94). Cellene ble undersøkt både på udifferensiert og differensiert form. Ved differensiering får cellene en fenotype som i større grad likner nevroner (92, 94). SH-SY5Y-celler ble i tillegg dyrket slik at de aggregerte og dannet sfæroider. Hver sfæroide besto av en samling av celler som fløyt i mediet. Tanken var at ettersom sfæroider ikke er festet til overflaten av skålen, likner de mer på hvordan nerveceller vokser *in vivo* (140, 141). Det var derfor interessant å undersøke om cellene responderte annerledes enn celler festet til bunnen.

Cellelinjer kan miste vevsspesifikke funksjoner (slike som primærkulturen den stammer fra, har) og kan selv utvikle andre og ulike egenskaper enn tilsvarende celletype *in vivo* (142). I tillegg kan det oppstå fenotypisk variabilitet innad i cellelinjen ved økende passasjennummer (84). Denne variabiliteten kan føre til at celler fra forskjellige passasjer responderer ulikt på samme påvirkning (84). Det ble benyttet passasjennummer 9–19 og 2–12 for henholdsvis SH-SY5Y- og PC12-celler. Ved tilsvarende observasjoner i flere arter og cellelinjer kan man

med større sannsynlighet overføre resultatene til mennesker. Det er derfor interessant å benytte flere ulike modeller i studier av teratogenisitet under nevrou utviklingen.

4.1.2 Valg av eksponering

Transport over BBB kan skje ved passiv diffusjon av lipofile molekyler eller ved hjelp av transportmekanismer. BBB i en moden hjerne består av celler som sitter tett – «tight junctions» – som hindrer fri passasje av molekyler over barrieren (143). I foster er BBB under utvikling, og andelen «tight junctions» øker gradvis gjennom hjerneutviklingen (143). Det kan derfor være forskjeller i hva slags legemidler, og i hvilken konsentrasjon, som når fram til hjernen i et foster sammenliknet med et voksent menneske. Det var ønskelig å eksponere kyllingembryoene for konsentrasjoner sett i menneskefoster ved legemiddelbehandling av mor under svangerskapet. Konsentrasjoner i mor og i navlestreng ved fødsel er målt til å være henholdsvis 5–60 µg/mL og 5–72 µg/mL for VPA, og 0,3–8 µg/mL og 1–6 µg/mL for LTG (144, 145). Det er derimot ikke oppgitt hvor stor andel av dette som nådde barnets hjerne da måling av slike konsentrasjoner ikke er praktisk mulig uten inngripende blodprøvetaking. Det kan likevel antas at nivået hos det nyfødte barnet vil ligge litt under de angitte konsentrasjonene i navlestrengen avhengig av hvor mye av legemidlet som passerer BBB. Distribusjonen av VPA og LTG i kyllingembryo ble undersøkt i en tidligere studie (144). Der ble det sett at maksimal plasmakonsentrasjon (C_{max}) i hjernen ved injisering på E16 nådde 39 % for VPA og 12 % for LTG av teoretisk konsentrasjon, med antakelse om jevn distribusjon i egget. Disse konsentrasjonene ble nådd etter 0,5 time for VPA og 1 time for LTG (144). Det ble derfor valgt å injisere en løsning med VPA 500 mM og LTG 20 mM, tilsvarende en dose på henholdsvis 83,1 mg/kg egg og 7,6 mg/kg egg. Hjernen ble da eksponert for VPA 32,4 µg/mL og LTG 0,92 µg/mL med utgangspunkt i at biotilgjengeligheten funnet i den nevnte studien (144) også gjelder for andre konsentrasjoner for begge legemidlene (noe som blir foreslått i artikkelen (144)).

Dersom det vurderes at en kvinne med epilepsi skal behandles med antiepileptika også under graviditeten, er fosteret utsatt for effekter av legemidlene under hele svangerskapet.

Kyllingembryo ved E16 tilsvarer menneskefoster i tredje trimester (85), og BBB er mer modent ved dette stadiet enn for eksempel ved E13 (144). Det kunne derfor vært interessant å studere effekter ved eksponering av kyllingembryo også ved tidligere stadier ettersom

teratogene effekter av legemidler særlig er knyttet til prenatal eksponering i første trimester (2, 146).

Hensikten med å dyrke cellene *in vitro* etter eksponering *in vivo* (i stedet for å studere hele lillehjernen) er å undersøke hvordan cellene responderer ved videre kultivering. Dersom det viser seg at tilsvarende effekter oppstår i korncellene ved begge eksponeringsformene, gir dette grunnlag for i større grad å gå over til eksponering *in vitro*. Eksponering *in vitro* er mindre belastende for kyllingembryo ved at det slipper påvirkning av selve eksponeringen og eventuelle effekter av legemidlene. Dette følger «3R»-prinsippet om å forbedre dyrevelferden. Ved eksponering *in vitro* unngår man at legemidlene metaboliseres før de når målstedet (som her er cellene), og man har dermed større mulighet til å knytte konsentrasjon av legemiddel opp mot en eventuell effekt i cellene. Legemiddelkonsentrasjonene til eksponering av cellekulturene er basert på terapeutiske serumkonsentrasjoner i mennesker; 300–700 μM for VPA og 10–50 μM for LTG (70, 78). Det ble i tillegg lagt til konsentrasjoner utenfor dette området, både i øvre og nedre del. Ved behandling av mor vil legemidlet til en viss grad gjennomgå metabolisme og eliminasjon før det når fosterets blod. Konsentrasjoner under det terapeutiske området er derfor klinisk relevant ettersom fosteret kan eksponeres for lavere konsentrasjon enn i mors blod. I tillegg er det interessant å se om det finnes en dose-respons ved økende konsentrasjon, og om det eventuelt er en terskel hvor legemidlet plutselig endrer effekt. Det ble derfor også lagt til konsentrasjoner over det terapeutiske vinduet.

Det ble ikke utført kjønnsbestemmelse av kyllingembryoene før tilbereding av korncellekulturer. Det er derfor ikke kjent hvilken kjønnsfordeling forsøkene er basert på. Med utgangspunkt i at det er lik sannsynlighet for begge kjønn, vil resultatene representere en gjennomsnittlig effekt. Det er antatt at det kan være forskjeller i nevroutvikling mellom kjønn (147, 148), men dette ble ikke videre tatt hensyn til i forsøkene i kyllingkornceller.

Det ble benyttet natriumsaltet av VPA løst i vann, og LTG isethionat løst i vann eller LTG løst i DMSO. For MTT-analyse ble de tre typene cellekulturer eksponert for samme konsentrasjoner. Ettersom cellelinjer ofte er mer robuste enn primærceller (149), ble det videre avgjort at SH-SY5Y- og PC12-cellene skulle eksponeres for høyere konsentrasjoner enn kyllingkorncellene. Denne forskjellen i sensitivitet kan gjøre at eventuelle toksiske effekter av legemidlene ikke oppstår i cellelinjene ved terapeutiske konsentrasjoner, og disse ble derfor eksponert for konsentrasjoner over dette området.

4.1.3 Viabilitetsstudier

MTT-analyse er en metode som er mye brukt i studier av cellers viabilitet (106, 150). Metoden gir et mål på cellenes metabolismekapasitet ettersom MTT reduseres til formazan av metabolsk aktive celler (151), men metoden har flere svakheter. Ettersom formazan ikke er vannløselig, må det tilsettes et organisk løsningsmiddel for å løse opp krystallene slik at absorbansen kan leses av. Når man bytter fra medium til løsningsmiddel i brønnene, er det fare for at celler løsner og pipetteres ut. I brønner hvor celler har falt av, vil det bli målt lavere absorbans. Dette gir en falsk indikasjon på at det er redusert viabilitet. Siden et eventuelt frafall av celler vil variere fra brønn til brønn, vil ikke dette bli kompensert for når resultatene normaliseres mot kontroll. Resultatene fra MTT-analysene kan derfor være misvisende. MTT var den første metoden som ble utført av forsøkene i denne oppgaven, og begrenset erfaring med pipettering kan også være årsak til feilaktige resultater. På grunn av de ulike utfordringene knyttet til MTT-analyse som her er nevnt, ble det videre valgt å utføre viabilitetsstudier med RZ. RZ-metoden krever ikke fjerning av innholdet i brønnen, og dermed bevares cellene under hele metoden. I tillegg regnes RZ som ikke-toksisk (152), til sammenlikning med MTT som er cytotoxisk (151) – selv om enkelte studier viser at RZ endrer metabolsk aktivitet i noen celletyper (153). Til forskjell fra MTT kan celler brukt i RZ-analyse benyttes i videre studier. Det var derfor mulig å utføre DNA-kvantifisering etter RZ-analyse, og dermed sammenlikne resultatene for celler i samme brønner. RZ er også en tryggere metode av hensyn til helse, miljø, og sikkerhet (HMS).

I starten av forsøkene ble det benyttet en ferdiglaget stockløsning med RZ 4400 μM slik at det ble en sluttkonsentrasjon på 440 μM i brønnene. Det ble etter hvert vurdert at det videre skulle benyttes sluttkonsentrasjon på RZ 44 μM , da dette ble sett i flere prosedyrer (152, 154). I andre prosedyrer er det brukt mellom RZ 80–100 μM , og inkuberingstiden varierer fra 4–24 timer (155-157). Det ble ikke tatt høyde for eventuelle forskjeller i metabolismekapasitet mellom celletyper, og prosedyren ble utført på tilsvarende måte i alle celletypene. I studien av brett og RZ-konsentrasjon utført i denne oppgaven, ble det sett at bruk av RZ 440 μM ga sterkere fluorescens-signal enn RZ 44 μM (ikke presentert). Dette er forventet fordi cellene da vil ha mer RZ tilgjengelig for å metabolisere til resorufin. Det er derimot ikke funnet hva slags konsentrasjon av RZ som metter enzymkapasiteten. Dette ble ikke videre undersøkt. Ved sammenlikning av resultatene normalisert mot kontroll ved bruk av RZ 44 og 440 μM som sluttkonsentrasjon, ble det sett liknende tendenser for endringer i viabilitet, og det ble

derfor vurdert at resultatene kunne slås sammen. Siden RZ er ansett som ikke-toksisk (154), ble det antatt at den høye konsentrasjonen i tidlige forsøk ikke hadde innvirkning på cellenes viabilitet. RZ-metoden er relativt lite brukt i forskningsgruppen, og det kan derfor være behov for å optimalisere konsentrasjon og inkuberingstid til den enkelte celletype.

Det ble i flere tilfeller sett at brønner uten tilsatt RZ (blank) var høyere enn målingene av resorufin. Dette gjaldt særlig for SH-SY5Y-celler. Brett hvor resultatene ga negative verdier etter fratrukket blank, ble ekskludert. Ettersom RZ-analyse baserer seg på måling av fluorescens, ble det vurdert om typen brett kunne ha betydning for resultatene. I kalsiuminfluks-studier (som også måler fluorescens) ble det benyttet svarte brett med glassbunn. RZ-metoden ble utført i blanke brett tilsvarende brett benyttet til MTT-analyse. Blanke brett er rimelige og har bunn av plast. De svarte brettene er derimot mer kostbare, og må ved oppbevaring stå på en separat plastplate for å unngå riper i bunnen. Det var derfor ønskelig å benytte blanke brett også ved utføring av RZ-analyse. Betydningen av type brett ble følgelig undersøkt i en egen studie i etterkant, men ettersom det da ble sett høyere bakgrunn i svarte brett, ble det antatt at de negative resultatene ikke var avhengig av type brett.

Både MTT- og RZ-analyse er sensitive for små endringer i metabolsk aktivitet, og nedgang i viabilitet kan ha andre årsaker enn direkte celledød (150). RZ omdannes til resorufin som avgir fluorescens, og resorufin kan videre omdannes til hydroresorufin, et produkt som er ikke-fluorescerende. Dette kan resultere i lavere fluorescens-signal og misvisende resultater som indikerer redusert viabilitet eller nedsatt metabolisme. Eksponeringstiden må derfor tilpasses, og det bør undersøkes i hvilken grad celletypen omdanner resorufin til hydroresorufin. På grunn av dette var det interessant å undersøke viabilitet ved andre metoder. Ved DNA-kvantifisering med Hoechst er det mulig å estimere det totale celleantallet da HO342 farger både viable og døde celler (109, 111). Ved å dividere RZ-resultatet på resultatet fra DNA-kvantifiseringen vil man få et mål på metabolismekapasitet per celle. Dette kan si noe om eventuelle endringer sett i viabilitetsstudiene har sammenheng med økt antall celler. Økt forhold i eksponerte celler enn i kontroll kan indikere proliferasjon eller økt metabolismekapasitet i eksponerte celler. Ettersom metoden med DNA-kvantifisering innebærer mange vasketrinn, er det fare for at celler har falt av under metoden og dermed gir misvisende resultater. Dersom man antar at det vil mistes omtrent like mange celler fra hver brønn (ved bruk av samme teknikk og utstyr i alle brønner), er det grunn til å tro at prosentvis

endring fra kontroll likevel vil være tilnærmet lik selv om celler har falt av. Denne antakelsen stemmer derimot ikke helt ettersom det er mulig at de døde cellene ikke er festet like godt til underlaget som de levende.

Det ble også testet ut farging med PI og dobbelfarging med PI/FDA for å undersøke viabilitet. Ulike konsentrasjoner og inkuberingstider ble testet ut. Det var ønskelig å finne en konsentrasjon som var synlig i fluorescensmikroskop og det tilhørende kameraet, uten at det ble overlapp mellom kanaler. For å sjekke dette ble derfor enkelte brønner bare eksponert for enten PI eller FDA. Ved billedtaking er det bare mulig å dekke en liten del av brønnen på hvert bilde. Hvilken del av brønnen som blir objekt kan påvirkes dersom bildetakeren er kjent med hva hver brønn er eksponert for. Dette gjaldt særlig for PI-forsøkene i PC12-celler. Legemiddeleksponeringen av SH-SY5Y-cellene for PI/FDA-merking ble utført av postdoktor Dhakshaginy Rajalingam. Hennes oppsett for eksponeringen ble først avslørt etter at tellingen var utført. Dette var altså en blindet studie med mål om å redusere forventningsskjevhet (bias), hvorpå tellingen ikke skulle påvirkes av en eventuell forventning knyttet til den aktuelle eksponeringen.

Det var tenkt at de fargede cellene skulle telles ved bruk av ImageJ eller annet bildeanalyseringsverktøy. Fordi enkelte av bildene hadde skygge (muligens på grunn av kantene i brønnen), klarte ikke dataprogrammet å oppfatte alle cellene. Dette førte til at antallet generert fra dataprogrammet ikke stemte overens med den manuelle tellingen. Det ble derfor besluttet å utføre tellingen manuelt. Det ble ikke funnet en optimal konsentrasjon av FDA som var synlig i blå kanal, uten å gi overlapp i grønn kanal. Det var derfor vanskelig å skille mellom hvilke celler som var PI-merket og hvilke som var FDA-merket. I tillegg lå cellene tett, og de var vanskelig å skille fra hverandre. Tellingene var tidkrevende og ble derfor utført over flere dager. Variasjon i «tellemåte» fra dag til dag samt justering av kontrast på hvert bilde for å fremskaffe signaler, gjør metoden lite reproducerbar.

4.1.4 Kalsiuminfluks-studier

Ettersom VPA og LTG har inhiberende virkning på kalsiumkanaler (9), var det interessant å undersøke kalsiuminfluks i kyllingkornceller eksponert *in vitro*. Legemidlene inhiberer også natriumkanaler (9), og slike kanaler er viktig for depolarisering av cellene, som er en viktig faktor for åpning av NMDA-R (158). NMDA-R regulerer også kalsiuminfluks, og det er vist at kornceller uttrykker slike reseptorer (159). Tidlig i utviklingen av CNS er det mange

NMDA-R, og aktiviteten er høy (160). Dette er blant annet fordi NMDA-R er viktige i modning av nevroner og utvikling av synaptisk plastisitet (viktig for læring og hukommelse), i tillegg til at de bidrar til migrering av nevroner (160). Kalsium er viktig for migrering i tillegg til at økt intracellulært kalsium kan mediere apoptose – to prosesser som er viktige under nevrou utviklingen (26, 50-52, 67). Kalsiumnivået i kyllingkorncellene ble målt jevnlig fra 5–90 minutter etter eksponering *in vitro*. Det var interessant å se om legemidlene hadde noen umiddelbar effekt, og det ble derfor valgt ut et kort tidsrom. Ved anti-epileptisk behandling av mor under svangerskapet vil derimot fosteret kontinuerlig være eksponert for legemiddel. I videre studier bør det derfor undersøkes om VPA eller LTG påvirker kalsiuminfluks ved lengre eksponeringstid, og eventuelt også om det er tilsvarende effekter ved eksponering *in vivo*.

Siden forsøket hadde til hensikt å se på endring i kalsiumnivå i cellene, og ikke kvantifisere kalsiummengden, ble det vurdert at grunnlinjen ikke skulle trekkes fra resultatene da dette i noen forsøk ga negative verdier. I videre forsøk bør det derfor undersøkes om cellene må inkuberes med Mg^{2+} -buffer i lengre tid for å få en optimal grunnlinje.

4.1.5 Immunmerking

WB og ICC er metoder for å detektere proteinuttrykk. For ICC ble kyllingkorncellene eksponert for legemidler *in vitro*, mens embryo ble eksponert *in ovo* før høsting av kornceller til WB. Korncellekulturene ble ikke eksponert for AraC, så kulturene bestod derfor også av blant annet gliaceller. Ettersom gliaceller er viktige hjelpeceller i hjerneutviklingen (og i en moden hjerne) (56), var det ønskelig å se på eventuelle endringer i proteinuttrykk ved eksponering av en blanding av disse cellene.

Det var interessant å undersøke om det var samsvar mellom endringer i proteinuttrykk ved de to nevnte eksponeringsformene. Dersom de to metodene viser seg å gi tilsvarende resultater, vil det av hensyn til dyrevelferd være gunstig å gå over til eksponering av kyllingkornceller *in vitro* i større grad. Det er antatt at kyllingembryo kan føle smerte fra og med E7 og at smertesensibiliteten øker gradvis gjennom utviklingen inntil embryoet har en fungerende hjerne og er ved fullstendig bevissthet et par dager før klekking (161). Det kan derfor antas at injisering *in ovo* kan ha påvirkning på kyllingembryo. Til ICC ble det benyttet kyllingkornceller eksponert 48 timer *in vitro*. Ved analysing tilsvarte dette DIV3. Til forskjell hadde det gått 96 timer (fire dager) etter eksponering *in ovo* før måling av

proteinuttrykk med WB på DIV3. Resultatene fra WB på DIV1 tilsvarer eksponering av legemiddel i 48 timer før høsting av celler, og er det tidspunktet som i størst grad er sammenliknbart med 48 timer eksponering *in vitro*, med hensyn til eksponeringstid. Resultatene er basert på et fåtall av tekniske replikater, og det er derfor behov for å repetere forsøkene for å få statistisk pålitelige resultater.

4.2 Diskusjon av resultater

4.2.1 Økt viabilitet i kyllingkornceller, SH-SY5Y og PC12-celler etter eksponering for VPA *in vitro*

Det ble sett økt viabilitet ved eksponering for VPA i kyllingkornceller, SH-SY5Y- og PC12-celler. Denne effekten ble sett for flere konsentrasjoner og eksponeringstider. Økningen lå på 5–19 % fra kontroll. Det er i flere andre studier sett at eksponering av udifferensierte SH-SY5Y-celler for VPA [200–1000 μM] gir økt viabilitet i forhold til kontroll (162, 163). Det ble der sett at økningen i eksponerte celler ikke skyldtes økt proliferasjon, men hadde sammenheng med at VPA beskytter mot celledød i eksponerte celler (163). I studier av eksponering av NPC for VPA er det derimot sett økt proliferasjon. Dette kan være årsaken til anatomiske endringer (blant annet makrocefali (stort hode)) sett i mennesker og dyremodeller eksponert for VPA under embryonalperioden (164, 165). Slike endringer er sett i forbindelse med ASD (164, 165). Ved DNA-kvantifisering presentert i denne oppgaven kom det ikke klart frem hva økningen skyldtes, men det var en tendens til at det var likt antall eksponerte celler som kontrollceller. Dette kan tyde på at økningen i viabilitet skyldes redusert celledød eller økt metabolismekapasitet i eksponerte celler.

Nevroprotektive effekter av VPA i primære nevroner fra storhjernebarken (CCN, engelsk: cultured cortical neurons) fra rotte ble undersøkt i en studie (68): CCN gjennomgikk spontan celledød ved økende antall dager i kultur, og det ble sett at VPA [100–1000 μM] utøvde nevroprotektiv effekt og reduksjon av apoptotiske markører sammenliknet med ubehandlede celler. Det ble der antatt at inhibering av HDAC var involvert i den beskyttende effekten (68). Valpromid (VPM), et antiepileptikum (uten markedsføringstillatelse i Norge) som har strukturell likhet med VPA, har ikke inhiberende effekt på HDAC og viste ikke nevroprotektiv effekt på CCN (68). VPM har i dyremodeller ikke vist teratogen effekt, og det er blant annet derfor antatt at VPA utøver teratogenisitet på grunn av inhibering av HDAC (166). VPM er ikke nødvendigvis et tryggere alternativ under graviditet siden det

metaboliseres til VPA i mennesker (167). VPM kan derimot være et nyttig verktøy videre for å finne ut mer om sammenhengen mellom inhibering av HDAC og teratogenisitet mediert av VPA.

Om økningen sett i viabilitetsstudiene i denne oppgaven skyldes inhibering av HDAC og nevroprotektiv effekt mediert av VPA, ble ikke undersøkt. Det ble derimot undersøkt uttrykk av proliferasjonsmarkøren PCNA etter 48 timer eksponering *in vitro* ved ICC. Her ble det ikke sett noen endring i uttrykk ved eksponering for VPA. Det ble heller ikke sett noen forskjell i uttrykk av PCNA fra kontroll målt ved WB på DIV1–DIV4 etter eksponering av kyllingembryo *in ovo*. Dette kan tyde på at økt viabilitet sett i viabilitetsstudiene i kyllingkornceller ikke skyldes økt grad av proliferasjon i de eksponerte cellene, men heller at cellene eksponert for VPA i større grad er beskyttet mot celledød enn det kontrollcellene er. Dette støttes av funnene fra DNA-kvantifiseringen. Dersom slike sammenhenger blir sett, kan det bety at VPA har teratogene effekter også i konsentrasjoner under terapeutisk område. Det kan hende at PCNA-uttrykket har vært endret på tidligere tidspunkter enn det som her ble undersøkt. En tidsstudie av PCNA-uttrykket hadde derfor vært interessant, samt studere uttrykk også i de andre celletypene.

4.2.2 Økt uttrykk av PAX6 i kyllingkornceller på DIV1 eksponert for VPA *in vivo*

Det ble sett signifikant økt uttrykk av PAX6 i kyllingkornceller på DIV1 etter eksponering av kyllingembryo for VPA *in ovo*. Med utgangspunkt i farmakokinetikken diskutert i **avsnitt 4.1.2** ble hjernen da eksponert for VPA 195 μM . Ved eksponering av kyllingkornceller for VPA [62,5–1000 μM] *in vitro* i 48 timer var det en tendens til økt uttrykk av PAX6, men denne økningen var ikke signifikant. Resultatene kan tyde på at kyllingkorncellene endrer uttrykk av PAX6 ved 48 timer eksponering, uavhengig av eksponeringsform. I senere studier kan det derfor være interessant å utføre flere tilsvarende forsøk for å styrke en eventuell sammenheng, samt undersøke om det er tilsvarende korrelasjon i eksponeringsform ved andre eksponeringstider.

PAX6 er viktig for å kontrollere at det er et tilstrekkelig lager med NPC som kan differensiere til nevroner, og bidrar til balansen mellom selv-fornyelse av NPC og nevrogenese (47, 136). PAX6 er også forbundet med glutaminerg nevronal differensiering av NPC (136). Endringer i forholdet mellom glutaminerg og GABA-erg nevronal differensiering kan føre til ubalanse i

eksitatoriske og inhibitoriske signaler i hjernen, noe som er forbundet med ASD (136, 168). ASD er en nevrou utviklings sykdom som karakteriseres ved adferdssymptomene: manglende sosial forståelse, kommunikasjonsvansker, ensporethet og repeterende adferd (136). Ved prenatal eksponering for VPA er det sett økt glutaminerg og unormal kolinerg nevronal utvikling i NPC fra rotte, og at dette har sammenheng med kognitiv nedsettelse med liknende symptomer som ved ASD (136, 169). Ved prenatal eksponering for VPA i kombinasjon med acetylkolinesterasehemmer, ble det i dyremodeller sett forbedring av kognitive funksjoner i form av forbedret sosial adferd og fravær av repetitiv oppførsel (169).

Resultatene fra eksponering *in vivo* og *in vitro* består av et fåtall tekniske replikater fra ett biologisk replikat, og det er derfor nødvendig med flere forsøk for å få statistisk pålitelige resultater. Dersom disse endringene viser seg ved repetisjon av forsøk, kan det tyde på at VPA har påvirkning på genuttrykket både i konsentrasjoner i og under det terapeutiske området. Ettersom foster kan eksponeres for lavere konsentrasjon enn i mors blod, kan slike funn ha stor klinisk betydning for nevrou utviklingen.

4.2.3 Tendens til reduksjon av kalsiuminfluks ved eksponering av kyllingkornceller for klinisk relevante konsentrasjoner av VPA eller LTG *in vitro*

Aktivering av NMDA-R med NMDA/glysin ga tidsavhengig økning i kalsiuminfluks i kyllingkornceller på DIV3 og DIV4. Dette tyder på at kyllingkornceller er en god modell for studier av kalsiuminfluks, noe som også tidligere ble sett i en doktorgradsavhandling fra forskningsgruppen (170).

For klinisk relevante konsentrasjoner av VPA og LTG ble det sett en tendens til reduksjon i kalsiumnivået i eksponerte celler sammenliknet med kontrollceller på DIV4. Denne endringen var derimot ikke signifikant, og gjaldt hovedsakelig for tidlige tidspunkt. Både VPA og LTG virker inhiberende på kalsiumkanaler (9), så en reduksjon er en forventet respons. Ettersom NMDA-R er avhengig av depolarisering for å aktiveres, kunne det tenkes at VPA eller LTG påvirket NMDA-R indirekte ved inhibering av natriumkanaler. Ved stimulering av cellene med NMDA/glysin 90 minutter etter eksponering for VPA eller LTG, ble det ikke sett noen signifikant forskjell fra stimulerede kontrollceller. Det kan derfor antas at den eventuelt inhiberende effekten av legemidlene sett i kalsiuminfluks-studien ikke påvirker aktivering av NMDA-R. Dersom dette er tilfellet, kan det tyde på at NMDA-R fremdeles kan aktiveres og mediere kalsiuminfluks, og at NMDA-R-avhengig migrering ikke påvirkes. Det kunne derfor

vært interessant å undersøke migrering i levende kornceller eksponert for VPA eller LTG, alene eller i kombinasjon med stimulering av NMDA-R. Til dette formålet kan «live cell-imaging»-verktøy, slik som IncuCyte, være nyttig. PAX6 er også forbundet med migrering av flere typer nevroner (171-173), noe som særlig øker behovet for å undersøke effekten VPA har på migrering.

4.2.4 Effekter på tvers av celletyper

Eksponering for LTG 1000 μM viste signifikant reduksjon i viabilitet for de fleste celletypene, men ved tilsvarende eksponering for aggregerte SH-SY5Y-celler var det ingen endring fra kontroll. I aggregerte SH-SY5Y-celler ble det heller ikke sett signifikant økt viabilitet fra kontroll ved eksponering for VPA, slik som sett ved noen konsentrasjoner i kyllingkornceller, udifferensierte SH-SY5Y-celler, og PC12-celler både på udifferensiert form og differensiert i syv dager. Hjernevev består av komplekse nettverk av nevroner og andre celler som er organisert i en tredimensjonal struktur, og denne strukturen er viktig for cellenes samspill – men dette får man frem ved dyrking av celler på overflater (174). LTG 1000 μM er langt over det terapeutiske vinduet; funnene er derfor av mindre klinisk betydning, men eksponeringen kan likevel være nyttig for å se på forskjell i sensitivitet mellom celletypene. I viabilitetsstudien i aggregerte SH-SY5Y-celler, tyder observasjonene på at disse cellene var mindre tilgjengelige for påvirkning av legemidlene. Disse resultatene besto kun av tre biologiske replikater, og det er derfor behov for å utføre flere forsøk for å bekrefte dette funnet. Det ble også sett at udifferensierte PC12-celler hadde en dose-respons-avhengig reduksjon i viabilitet ved eksponering for LTG [100–1000 μM], mens det ved tilsvarende eksponering av PC12-celler differensiert i én eller tre dager ikke ble sett endret viabilitet fra kontroll. Årsaken til endringene i viabilitet burde undersøkes nærmere for å avklare om reduksjonen skyldes celledød, eller redusert metabolismekapasitet eller proliferasjon i eksponerte celler.

I en studie av kortikale nevroner fra rotte, ble det sett at umodne og modne nevroner gjennomgikk apoptose gjennom ulike mekanismer (175). Modne nevroner er post-mitotiske med begrensede muligheter for å regenerere (176). Modne nevroner skal «vare livet ut», og det er derfor antatt at disse i større grad har mekanismer som inhiberer apoptose, og at umodne og modne nevroner derfor har ulik sensitivitet for toksisk påvirkning (176). Apoptose er en naturlig del av nevroutviklingen, og umodne nevroner er derfor tilgjengelige for slike

prosesser (26, 176). Nedsatt apoptose under nevroutviklingen er forbundet med embryonal død og cerebrale misdannelser (175, 177). Ettersom LTG viste redusert viabilitet i udifferensierte SH-SY5Y- og PC12-celler, men ikke viste samme tendenser i celler på differensiert form, kan det tenkes at de udifferensierte cellene er mer sensitive for toksiske effekter av LTG. Disse endringene var derimot sett i konsentrasjoner langt over det terapeutiske vinduet, så det er usikkert om disse funnene er av klinisk relevans.

4.2.5 Veien videre

For å undersøke hva som skyldes endringer i viabilitetsstudiene, kan det være nyttig å undersøke proteinuttrykk av for eksempel proliferasjonsmarkøren Ki67, eller utføre analyse med BrdU (5-bromo-2'-deoksyuridin) som er markør for cellyklus og proliferasjon. For å studere eventuelle effekter VPA medierer gjennom inhibering av HDAC, kan det være nyttig å sammenlikne effekter av VPM da denne har strukturell likhet med VPA, men uten å inhibere HDAC.

Med mål om å erstatte eksponering av kyllingembryo *in ovo* før studering av effekt i kyllingkornceller, og heller utføre eksponeringen *in vitro*, er det behov for flere studier som sier noe om hvorvidt de to eksponeringsformene har liknende påvirkning i kyllingkorncellene.

Det er også behov for å undersøke eventuelle effekter VPA eller LTG har på migrering, og dette kan for eksempel utføres ved studier av levende kyllingkornceller med «live cell-imaging»-verktøy slik som InCuCyte.

5 KONKLUSJON

Det ble sett økt viabilitet i kyllingkornceller, SH-SY5Y- og PC12-celler etter eksponering for VPA i ulike konsentrasjoner og eksponeringstider. Ettersom kyllingkorncellene viste tendens til eller signifikant økning i viabilitet for alle tidspunkter som ble testet, også i konsentrasjoner under det terapeutiske vinduet, er disse cellene særlig egnet for videre studier av slike effekter av VPA. Det ble ikke sett endring i uttrykk av PCNA som kan knyttes opp mot endringen i viabilitet i kyllingkorncellene, og det kan derfor ikke konkluderes med at økt viabilitet skyldes økt proliferasjon. I andre studier er det sett at VPA har nevroprotektiv effekt, og at eksponerte celler gjennomgår apoptose i mindre grad enn kontrollceller. Ettersom det er viktig med riktig balanse mellom apoptose og proliferasjon under nevrouviklingen, bør dette undersøkes videre.

Det ble sett økt uttrykk av PAX6 etter eksponering for VPA, og tendens til reduksjon i kalsiuminfluks ved eksponering for VPA eller LTG. Disse endringene kan blant annet ha betydning for migrering. Endringer i migrering kan få konsekvenser for nevrouviklingen, og det er derfor viktig å undersøke nærmere legemidlenes effekt på dette. PAX6 er også knyttet til nevrogenese og glutaminerg nevronal differensiering, hvilket gjør dette proteinet aktuelt også for videre studier. Studiene av PAX6-uttrykk etter eksponering for VPA viste tendens til at det er liknende effekter ved eksponering av kyllingembryo *in ovo* som etter tilsvarende eksponeringstid av kyllingkornceller *in vitro*. Videre studier av disse eksponeringsformene er interessant da tilsvarende funn i de to metodene vil gi grunnlag for å utføre eksponeringen *in vitro* og dermed forbedre dyrevelferden ved å unngå eksponering av kyllingembryo i live.

Eksponering av de ulike celletypene for LTG i klinisk relevante konsentrasjoner viste ingen store endringer i hverken viabilitetsstudier eller proteinuttrykk i kyllingkornceller. I cellelinjene var det heller ingen endring i viabilitet i konsentrasjoner over dette. Det er antatt at LTG er et tryggere alternativ som antiepileptisk behandling under svangerskapet, og liknende funn som tilsier ingen endring fra kontroll i flere modellsystemer, kan derfor styrke denne antakelsen. Det er derimot mange prosesser som kan påvirkes under nevrouviklingen enn det som er studert i denne oppgaven, og videre studier på LTG vil også av denne grunn være viktig.

6 LITTERATURLISTE

1. Folkehelseinstituttet. Medisinsk fødselsregister - statistikkbank [21.09.2021]. Available from: <http://statistikkbank.fhi.no/mfr/>.
2. Engeland A, Bramness JG, Daltveit AK, Rønning M, Skurtveit S, Furu K. Prescription drug use among fathers and mothers before and during pregnancy. A population-based cohort study of 106 000 pregnancies in Norway 2004–2006. *Br J Clin Pharmacol*. 2008;65(5):653-60.
3. Briggs GGBF, Polifka JEP, Wisner KLMD, Gervais E, Miller RKP, Berard AP, et al. Should pregnant women be included in phase IV clinical drug trials? *Am J Obstet Gynecol*. 2015;213(6):810-5.
4. Scaffidi J, Mol BW, Keelan JA. The pregnant women as a drug orphan: a global survey of registered clinical trials of pharmacological interventions in pregnancy. *BJOG*. 2017;124(1):132-40.
5. Thijs RD, Surges R, O'Brien TJ, Sander JW. Epilepsy in adults. *Lancet*. 2019;393(10172):689-701.
6. Henning O, Nakken KO. Ny klassifikasjon av epileptiske anfall. *Tidsskrift for den Norske Lægeforening*. 2017;137(21).
7. Gjerstad L, Taubøll E. Hva er epilepsi? *Tidsskrift for den Norske Lægeforening*. 2003;123(10):1359-61.
8. Current opinion in neurology. *Current opinion in neurology*. 1993.
9. Henderson G, Flower RJ, Ritter JM, Dale MM, Rang HP. Rang and Dale's pharmacology. 8th ed. ed. Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone; 2016.
10. G. S, S. F, C. S, S. P. Recent Advances in Epilepsy Research. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, Boston, MA.2004.
11. Danielsson K, Bjørk M-H, Sveberg L, Borthen I, Holmøy T, Nordeng H, et al. Nevrologiske sykdommer i svangerskapet Den norske legeförening - Norsk gynekologisk forening [Internet]. 2020 [05.10.2021]. Available from: <https://www.legeföreningen.no/foreningsledd/fagmed/norsk-gynekologisk-forening/veiledere/veileder-i-fodsels hjelp/nevrologiske-sykdommer-i-svangerskapet/>.
12. Thomas SV, Syam U, Devi JS. Predictors of seizures during pregnancy in women with epilepsy. *Epilepsia*. 2012;53(5):e85-e8.
13. Joshi S, Sun H, Rajasekaran K, Williamson J, Perez-Reyes E, Kapur J. A novel therapeutic approach for treatment of catamenial epilepsy. *Neurobiol Dis*. 2018;111:127-37.
14. Pack AM. Having Catamenial Epilepsy Equals Fewer Seizures in Pregnancy: Catamenial epilepsy and pregnancy. *Epilepsy currents*. 2015;15(3):124-5.
15. Cagnetti C, Lattanzi S, Foschi N, Provinciali L, Silvestrini M. Seizure course during pregnancy in catamenial epilepsy. *Neurology*. 2014;83(4):339-44.
16. Sveberg L, Svalheim S, Taubøll E. The impact of seizures on pregnancy and delivery. *Seizure*. 2015;28:35-8.
17. Običan S, Scialli AR. Teratogenic exposures. *Am J Med Genet*. 2011;157C(3):150-69.
18. NHI. Fosterutvikling Norsk Helseinformatikk [Internet]. 2017 [21.09.2021]. Available from: <https://nhi.no/kroppen-var/fosterets-utvikling-embryologi/fosterutvikling/>.
19. NHI. Graviditet. Norsk Helseinformatikk [Internet]. 2020 [21.09.2021]. Available from: <https://nhi.no/familie/graviditet/svangerskap-og-fodsels livsstil/svangerskap-gode-rad/svangerskap/>.
20. Stiles J, Jernigan TL. The Basics of Brain Development. *Neuropsychology Review*. 2010;20(4):327-48.

21. Breuss MW, Leca I, Gstrein T, Hansen AH, Keays DA. Tubulins and brain development – The origins of functional specification. *Mol Cell Neurosci.* 2017;84:58-67.
22. Keefe DL, Winkler N. Chapter 1 - Embryology. p. 1-20.
23. Academy K. Human embryogenesis2021 [05.10.2021]. Available from: <https://www.khanacademy.org/test-prep/mcat/cells/embryology/a/human-embryogenesis>.
24. Gammill LS, Bronner-Fraser M. Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat Rev Neurosci.* 2003;4(10):795-805.
25. Arslan OE. Chapter 3 - Computational Basis of Neural Elements. Elsevier Inc; 2016. p. 29-82.
26. Sand O, Sjaastad ØV, Haug E, Toverud KC. *Menneskets fysiologi.* 2. utg., s. 133, 150, 809, 810 ed. Oslo: Gyldendal akademisk; 2014.
27. de Graaf-Peters VB, Hadders-Algra M. Ontogeny of the human central nervous system: What is happening when? *Early Hum Dev.* 2006;82(4):257-66.
28. Hyman SE. Neurotransmitters. *Curr Biol.* 2005;15(5):R154-R8.
29. Tau GZ, Peterson BS. Normal Development of Brain Circuits. *Neuropsychopharmacology.* 2010;35(1):147-68.
30. Pakkenberg B, Gundersen HJG. Neocortical neuron number in humans: Effect of sex and age. *J Comp Neurol.* 1997;384(2):312-20.
31. Keeney JG, Davis JM, Siegenthaler J, Post MD, Nielsen BS, Hopkins WD, et al. DUF1220 protein domains drive proliferation in human neural stem cells and are associated with increased cortical volume in anthropoid primates. *Brain Struct Funct.* 2014;220(5):3053-60.
32. Howdeshell KL. A Model of the Development of the Brain as a Construct of the Thyroid System. *Environ Health Perspect.* 2002;110(3):337-48.
33. Jansen JKS. Metencefalon Store medisinske leksikon [Internet]. 2021 [24.10.2021] [09.2021]. Available from: <https://sml.snl.no/metencefalon>.
34. Jansen JKS, Holck P. Lillehjernen 2021 [24.10.2021]. Available from: <https://sml.snl.no/lillehjernen>.
35. Schmahmann JD. The cerebellum and cognition. *Neurosci Lett.* 2019;688:62-75.
36. Wingate RJT. The rhombic lip and early cerebellar development. *Curr Opin Neurobiol.* 2001;11(1):82-8.
37. Nakashima K, Umeshima H, Kengaku M. Cerebellar granule cells are predominantly generated by terminal symmetric divisions of granule cell precursors. *Dev Dyn.* 2015;244(6):748-58.
38. External Granular Layer (EGL). 2008. p. 1078-9.
39. Butts T, Green MJ, Wingate RJT. Development of the cerebellum: Simple steps to make a 'little brain'. *Development.* 2014;141(21):4031-41.
40. Ohnuma S-i, Harris WA. Neurogenesis and the Cell Cycle. *Neuron.* 2003;40(2):199-208.
41. Aarnes H. Cellesyklus 2020 [20.10.2021]. Available from: <https://snl.no/cellesyklus>.
42. Strzalka W, Ziemienowicz A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Ann Bot.* 2011;107(7):1127-40.
43. Boehm EM, Gildenberg MS, Washington MT. The Many Roles of PCNA in Eukaryotic DNA Replication. *Enzymes.* 2016;39:231-54.
44. Bruck I, O'Donnell M. The ring-type polymerase sliding clamp family. *Genome Biol.* 2001;2(1):REVIEWS3001-REVIEWS.
45. Zhang J, Jiao J. Molecular Biomarkers for Embryonic and Adult Neural Stem Cell and Neurogenesis. *Biomed Res Int.* 2015;2015:727542-14.

46. Sansom SN, Griffiths DS, Faedo A, Kleinjan D-J, Ruan Y, Smith J, et al. The level of the transcription factor Pax6 is essential for controlling the balance between neural stem cell self-renewal and neurogenesis. *PLoS Genet.* 2009;5(6):e1000511-e.
47. Kallur T, Gisler R, Lindvall O, Kokaia Z. Pax6 promotes neurogenesis in human neural stem cells. *Mol Cell Neurosci.* 2008;38(4):616-28.
48. Yamamoto T, Togawa M, Shimada S, Sangu N, Shimojima K, Okamoto N. Narrowing of the responsible region for severe developmental delay and autistic behaviors in WAGR syndrome down to 1.6 Mb including PAX6, WT1, and PRRG4. *Am J Med Genet.* 2014;164A(3):634-8.
49. Chung S-H, Kim C-T, Jung Y-H, Lee N-S, Jeong Y-G. Early cerebellar granule cell migration in the mouse embryonic development. *Anat Cell Biol.* 2010;43(1):86-95.
50. Horigane S-I, Ozawa Y, Yamada H, Takemoto-Kimura S. Calcium signalling: a key regulator of neuronal migration. *J Biochem.* 2019;165(5):401-9.
51. Savitskaya MA, Onishchenko GE. Mechanisms of apoptosis. *Biochemistry (Mosc).* 2015;80(11):1393-405.
52. Lipton SA, Nicotera P. Calcium, free radicals and excitotoxins in neuronal apoptosis. *Cell Calcium.* 1998;23(2):165-71.
53. Fossum S. Mikrotubuli 2019 [05.10.2021]. Available from: <https://sml.sn�.no/mikrotubuli>.
54. Lee S, Choi K, Ahn H, Song K, Choe J, Lee I. TuJ1 (class III β -tubulin) expression suggests dynamic redistribution of follicular dendritic cells in lymphoid tissue. *Eur J Cell Biol.* 2005;84(2):453-9.
55. Cearns MD, Escuin S, Alexandre P, Greene NDE, Copp AJ. Microtubules, polarity and vertebrate neural tube morphogenesis. *J Anat.* 2016;229(1):63-74.
56. Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* 2003;26(10):523-30.
57. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2009;119(1):7-35.
58. Ezan P, André P, Cisternino S, Saubaméa B, Boulay A-C, Doutremer S, et al. Deletion of Astroglial Connexins Weakens the Blood–Brain Barrier. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012;32(8):1457-67.
59. Machnicka B, Grochowalska R, Bogusławska DM, Sikorski AF. The role of spectrin in cell adhesion and cell–cell contact. *Exp Biol Med (Maywood).* 2019;244(15):1303-12.
60. Lorenzo DN, Badea A, Zhou R, Mohler PJ, Zhuang X, Bennett V. β II-spectrin promotes mouse brain connectivity through stabilizing axonal plasma membranes and enabling axonal organelle transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(31):15686-95.
61. Reiter L, Gjerstad L. Antiepileptika Store medisinske leksikon [Internet]. 2021 [05.11.2021]. Available from: <https://sml.sn�.no/antiepileptika>.
62. Coste J, Blotiere P-O, Miranda S, Mikaeloff Y, Peyre H, Ramus F, et al. Risk of early neurodevelopmental disorders associated with in utero exposure to valproate and other antiepileptic drugs: a nationwide cohort study in France. *Sci Rep.* 2020;10(1):17362.
63. Cummings C, Stewart M, Stevenson M, Morrow J, Nelson J. Neurodevelopment of children exposed in utero to lamotrigine, sodium valproate and carbamazepine. *Arch Dis Child.* 2011;96(7):643-7.
64. Felleskatalogen. ATC-register N03A G01 2021 [01.10.2021]. Available from: <https://www.felleskatalogen.no/medisin/atc-register/N03A%20G01>.
65. Felleskatalogen. Orfiril 2021 [30.08.2021]. Available from: <https://www.felleskatalogen.no/medisin/orfiril-orfiril-retard-orfiril-long-desitin-562472#legemiddelfoto>.

66. M R, H. N. Valproic Acid. StatPearls [Internet] [Internet]. 2021 11.2021]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559112/>.
67. Ritter JM, Flowwe RJ, Henderson G, Loke YK, MacEwan D, Rang HP. Rang&Dale's Pharmacology. 8. ed2016.
68. Jeong MR, Hashimoto R, Senatorov VV, Fujimaki K, Ren M, Lee MS, et al. Valproic acid, a mood stabilizer and anticonvulsant, protects rat cerebral cortical neurons from spontaneous cell death: a role of histone deacetylase inhibition. *FEBS Lett.* 2003;542(1):74-8.
69. Shao L, Young LT, Wang J-F. Chronic Treatment with Mood Stabilizers Lithium and Valproate Prevents Excitotoxicity by Inhibiting Oxidative Stress in Rat Cerebral Cortical Cells. *Biol Psychiatry.* 2005;58(11):879-84.
70. Først Medisinsk laboratorium S-Valproat [30.08.2020]. Available from: <https://www.furst.no/analyse-og-klinikk/analyser/valproat/>.
71. Ushigome F, Takanaga H, Matsuo H, Tsukimori K, Nakano H, Ohtani H, et al. Uptake mechanism of valproic acid in human placental choriocarcinoma cell line (BeWo). *Eur J Pharmacol.* 2001;417(3):169-76.
72. Ornoy A. Neuroteratogens in man: An overview with special emphasis on the teratogenicity of antiepileptic drugs in pregnancy. *Reprod Toxicol.* 2006;22(2):214-26.
73. Bobo WV, Davis RL, Toh S, Li D-K, Andrade SE, Cheetham TC, et al. Trends in the Use of Antiepileptic Drugs among Pregnant Women in the US, 2001-2007: A Medication Exposure in Pregnancy Risk Evaluation Program Study. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2012;26(6):578-88.
74. Meador KJ, Baker GA, Browning N, Clayton-Smith J, Combs-Cantrell DT, Cohen M, et al. Cognitive Function at 3 Years of Age after Fetal Exposure to Antiepileptic Drugs. *N Engl J Med.* 2009;360(16):1597-605.
75. L6.1.5.5 Lamotrigin [Internet]. Available from: <https://www.legemiddelhandboka.no/L6.1.5.5/Lamotrigin>.
76. Felleskatalogen. Lamictal 2021 [05.10.2021]. Available from: <https://www.felleskatalogen.no/medisin/lamictal-glaxosmithkline-560748>.
77. Stefani A, Spadoni F, Siniscalchi A, Bernardi G. Lamotrigine inhibits Ca²⁺ currents in cortical neurons: Functional implications. *Eur J Pharmacol.* 1996;307(1):113-6.
78. Først medisinsk laboratorium S-Lamotrigin [30.08.2020]. Available from: <https://www.felleskatalogen.no/medisin/lamictal-glaxosmithkline-560748>.
79. Myllynen PK, Pienimäki PK, Vähäkangas KH. Transplacental passage of lamotrigine in a human placental perfusion system in vitro and in maternal and cord blood in vivo. *Eur J Clin Pharmacol.* 2003;58(10):677-82.
80. Baker GA, Bromley RL, Briggs M, Cheyne CP, Cohen MJ, García-Fiñana M, et al. IQ at 6 years after in utero exposure to antiepileptic drugs: A controlled cohort study. *Neurology.* 2015;84(4):382-90.
81. Tomson T, Battino D, Perucca E. Teratogenicity of antiepileptic drugs. *Curr Opin Neurol.* 2019;32(2):246-52.
82. Nordeng HME, Spigset O, Maizels D. Legemidler og bruken av dem. 3. utgave. ed. Oslo: Gyldendal; 2018.
83. komiteene Dnf. Retningslinjer for inklusjon av kvinner i medisinsk forskning. 2019.
84. Radio NM, Mundy WR. Developmental neurotoxicity testing in vitro: Models for assessing chemical effects on neurite outgrowth. *Neurotoxicology.* 2008;29(3):361-76.
85. Bjørnstad S, Austdal LPE, Roald B, Glover JC, Paulsen RE. 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):386-96.

86. Bech LF, Polcwiartek C, Kragholm K, Andersen MP, Rohde C, Torp-Pedersen C, et al. In utero exposure to antiepileptic drugs is associated with learning disabilities among offspring. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2018;89(12):1324-31.
87. Rueda-Alaña E, García-Moreno F. Time in Neurogenesis: Conservation of the Developmental Formation of the Cerebellar Circuitry. *Brain, behavior and evolution*. 2021:1-15.
88. Roussel MF, Hatten ME. Cerebellum: Development and Medulloblastoma. *Curr Top Dev Biol*. 2011;94(C):235-82.
89. Kirk RGW. Recovering The Principles of Humane Experimental Technique: The 3Rs and the Human Essence of Animal Research. *Sci Technol Human Values*. 2018;43(4):622-48.
90. Vaughan PFT, Peers C, Walker JH. The use of the human neuroblastoma SH-SY5Y to study the effect of second messengers on noradrenaline release. *Gen Pharmacol*. 1995;26(6):1191-201.
91. Vetter I, Mozar CA, Durek T, Wingerd JS, Alewood PF, Christie MJ, et al. Characterisation of Nav types endogenously expressed in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Biochemical pharmacology*. 2012;83(11):1562-71.
92. Kovalevich J, Langford D. Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. *Methods Mol Biol*. 2013;1078:9-21.
93. Pålman S, Ruusala A-I, Abrahamsson L, Mattsson MEK, Esscher T. Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differ*. 1984;14(2):135-44.
94. Westerink RHS, Ewing AG. The PC12 cell as model for neurosecretion: PC12 cells as model for neurosecretion. *Acta Physiologica*. 2008;192(2):273-85.
95. Wiatrak B, Kubis-Kubiak A, Piwowar A, Barg E. PC12 Cell Line: Cell Types, Coating of Culture Vessels, Differentiation and Other Culture Conditions. *Cells*. 2020;9(4):958.
96. Fujita K, Lazarovici P, Guroff G. Regulation of the Differentiation of PC12 Pheochromocytoma Cells. *Environ Health Perspect*. 1989;80:127-42.
97. Sigma-Aldrich. P2636 Poly-L-lysine hydrobromide [21.09.2021]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/product/sigma/p2636?context=product>.
98. Sigma-Aldrich. ECM Gel Matrix: Protocols Using EHS Basement Membrane Extracts [21.09.2021]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/3d-cell-culture/ecm-gel-product-protocols>.
99. Stemcell Technologies. Anti-Adherence Rinsing Solution [22.09.2021]. Available from: <https://www.stemcell.com/aggrewell-rinsing-solution.html>.
100. Sigma-Aldrich. Cell Dissociation Protocol with Trypsin [21.09.2021]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/cell-dissociation-with-trypsin>.
101. Sigma-Aldrich. DNase I from bovine pancreas [21.09.2021]. Available from: https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/144/912/112_84932001bul.pdf.
102. Schwieger J, Esser K-H, Lenarz T, Scheper V. Establishment of a long-term spiral ganglion neuron culture with reduced glial cell number: Effects of AraC on cell composition and neurons. *J Neurosci Methods*. 2016;268:106-16.
103. Jiajia L, Shinghung M, Jiacheng Z, Jialing W, Dilin X, Shengquan H, et al. Assessment of Neuronal Viability Using Fluorescein Diacetate-Propidium Iodide Double Staining in Cerebellar Granule Neuron Culture. *J Vis Exp*. 2017;2017(123).

104. Hu R, Cao Q, Sun Z, Chen J, Zheng Q, Xiao F. A novel method of neural differentiation of PC12 cells by using Opti-MEM as a basic induction medium. *International journal of molecular medicine*. 2018;41(1):195-201.
105. Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res*. 1991;51(10):2515-20.
106. Gilbert DF, Friedrich O. *Cell Viability Assays : Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York : Imprint: Humana; 2017.
107. Boyd V, Cholewa OM, Papas KK. Limitations in the Use of Fluorescein Diacetate/Propidium Iodide (FDA/PI) and Cell Permeable Nucleic Acid Stains for Viability Measurements of Isolated Islets of Langerhans. *Curr Trends Biotechnol Pharm*. 2008;2(2):66-84.
108. ThermoFisher. P1304MP Propidium Iodide [04.10.2021]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/P1304MP#/P1304MP>.
109. ThermoFisher. Hoechst 33342 Solution (20 mM) [05.10.2021]. Available from: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/62249?gclid=CjwKCAjw7--KBhAMEiwAxfpkWJcFpzmEB7aS7Gt1UyIY_jBMbbpNuqhxRJ4Sce0xAqGRrhges90zxhoC FB8QAvD_BwE&ef_id=CjwKCAjw7--KBhAMEiwAxfpkWJcFpzmEB7aS7Gt1UyIY_jBMbbpNuqhxRJ4Sce0xAqGRrhges90zxhoC FB8QAvD_BwE:G:s&s_kwid=AL!3652!3!447292198733!b!!g!!&cid=bid_pca_iva_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_pur_con#/62249?gclid=CjwKCAjw7--KBhAMEiwAxfpkWJcFpzmEB7aS7Gt1UyIY_jBMbbpNuqhxRJ4Sce0xAqGRrhges90zxhoC FB8QAvD_BwE&ef_id=CjwKCAjw7--KBhAMEiwAxfpkWJcFpzmEB7aS7Gt1UyIY_jBMbbpNuqhxRJ4Sce0xAqGRrhges90zxhoC FB8QAvD_BwE:G:s&s_kwid=AL!3652!3!447292198733!b!!g!!&cid=bid_pca_iva_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_pur_con.
110. ThermoFisher. V23201 Chromatin Condensation & Membrane Permeability Dead Cell Apoptosis Kit with Hoechst 33342, YO-PRO™-1, and PI dyes, for flow cytometry [05.10.2021]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V23201#/V23201>.
111. Ligasová A, Koberna K. Quantification of fixed adherent cells using a strong enhancer of the fluorescence of DNA dyes. *Sci Rep*. 2019;9(1):8701-12.
112. Tinning PW, Franssen AJPM, Hridi SU, Bushell TJ, McConnell G. A 340/380 nm light-emitting diode illuminator for Fura-2 AM ratiometric Ca²⁺ imaging of live cells with better than 5 nM precision: A 340/380 NM LIGHT-EMITTING DIODE ILLUMINATOR. *Journal of microscopy (Oxford)*. 2018;269(3):212-20.
113. Sigma-Aldrich. 47989 Fura 2-AM 2021 [21.09.2021]. Available from: https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/product/sigma/47989?gclid=Cj0KCOjwssyJBhDXARI sAK98ITRPF3teWB5eSXXUwHEZxQiRQt1_g6qsQgOK1ahppVwua1v6ClOZer4aAqInEALw_wcB.
114. Mahmood T, Yang P-C. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*. 2012;4(9):429-34.
115. Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol*. 2018;1897:299-311.
116. Sigma-Aldrich. Immunofluorescence Labeling of Cells 2021 [04.10.2021]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/imaging-analysis-and-live-cell-imaging/immunofluorescence-labeling>.
117. Scientific TF. Cell Lysis Solutions [19.09.2021]. Available from: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology->

[learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/cell-lysis-solutions.html.](https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/89904?gclid=Cj0KCCQjwv5uKBhD6ARIsAGv9a-wbKrgGxSNqvWuARsUFluYo3szZF4nPFRAM4U9KQXQuhE8UCz_IR04aAgn5EALw_wcB&ef_id=Cj0KCCQjwv5uKBhD6ARIsAGv9a-wbKrgGxSNqvWuARsUFluYo3szZF4nPFRAM4U9KQXQuhE8UCz_IR04aAgn5EALw_wcB:B:G:s&s_kwcid=AL13652!3!386244973888!b!!g!!&cid=bid_pca_ppf_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_pur_con#/89904?gclid=Cj0KCCQjwv5uKBhD6ARIsAGv9a-wbKrgGxSNqvWuARsUFluYo3szZF4nPFRAM4U9KQXQuhE8UCz_IR04aAgn5EALw_wcB&ef_id=Cj0KCCQjwv5uKBhD6ARIsAGv9a-wbKrgGxSNqvWuARsUFluYo3szZF4nPFRAM4U9KQXQuhE8UCz_IR04aAgn5EALw_wcB:B:G:s&s_kwcid=AL13652!3!386244973888!b!!g!!&cid=bid_pca_ppf_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_pur_con)

118. ThermoFisher. Cell Lysis Solutions 2021 [21.09.2021]. Available from: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/cell-lysis-solutions.html>.

119. Sigma-Aldrich. X100 Triton X-100 2021 [21.09.2021]. Available from: https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/product/sial/x100?gclid=Cj0KCCQjwv5uKBhD6ARIsAGv9a-yrGcBZfSICZWDihF2Zfeg1N-9gc4aggy8IJZxNc_N3FXSlv_QXcaAj-nEALw_wcB.

120. ThermoFisher. 89904 Sodium Deoxycholate Detergent 2021 [21.09.2021]. Available from: [https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/89904?gclid=Cj0KCCQjwv5uKBhD6ARIsAGv9a-wbKrgGxSNqvWuARsUFluYo3szZF4nPFRAM4U9KQXQuhE8UCz_IR04aAgn5EALw_wcB&ef_id=Cj0KCCQjwv5uKBhD6ARIsAGv9a-wbKrgGxSNqvWuARsUFluYo3szZF4nPFRAM4U9KQXQuhE8UCz_IR04aAgn5EALw_wcB](https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/89904?gclid=Cj0KCCQjwv5uKBhD6ARIsAGv9a-wbKrgGxSNqvWuARsUFluYo3szZF4nPFRAM4U9KQXQuhE8UCz_IR04aAgn5EALw_wcB&ef_id=Cj0KCCQjwv5uKBhD6ARIsAGv9a-wbKrgGxSNqvWuARsUFluYo3szZF4nPFRAM4U9KQXQuhE8UCz_IR04aAgn5EALw_wcB:B:G:s&s_kwcid=AL13652!3!386244973888!b!!g!!&cid=bid_pca_ppf_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_pur_con#/89904?gclid=Cj0KCCQjwv5uKBhD6ARIsAGv9a-wbKrgGxSNqvWuARsUFluYo3szZF4nPFRAM4U9KQXQuhE8UCz_IR04aAgn5EALw_wcB&ef_id=Cj0KCCQjwv5uKBhD6ARIsAGv9a-wbKrgGxSNqvWuARsUFluYo3szZF4nPFRAM4U9KQXQuhE8UCz_IR04aAgn5EALw_wcB:B:G:s&s_kwcid=AL13652!3!386244973888!b!!g!!&cid=bid_pca_ppf_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_pur_con)

[B&ef_id=Cj0KCCQjwv5uKBhD6ARIsAGv9a-wbKrgGxSNqvWuARsUFluYo3szZF4nPFRAM4U9KQXQuhE8UCz_IR04aAgn5EALw_wcB](https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/89904?gclid=Cj0KCCQjwv5uKBhD6ARIsAGv9a-wbKrgGxSNqvWuARsUFluYo3szZF4nPFRAM4U9KQXQuhE8UCz_IR04aAgn5EALw_wcB&ef_id=Cj0KCCQjwv5uKBhD6ARIsAGv9a-wbKrgGxSNqvWuARsUFluYo3szZF4nPFRAM4U9KQXQuhE8UCz_IR04aAgn5EALw_wcB:B:G:s&s_kwcid=AL13652!3!386244973888!b!!g!!&cid=bid_pca_ppf_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_pur_con#/89904?gclid=Cj0KCCQjwv5uKBhD6ARIsAGv9a-wbKrgGxSNqvWuARsUFluYo3szZF4nPFRAM4U9KQXQuhE8UCz_IR04aAgn5EALw_wcB&ef_id=Cj0KCCQjwv5uKBhD6ARIsAGv9a-wbKrgGxSNqvWuARsUFluYo3szZF4nPFRAM4U9KQXQuhE8UCz_IR04aAgn5EALw_wcB:B:G:s&s_kwcid=AL13652!3!386244973888!b!!g!!&cid=bid_pca_ppf_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_pur_con)
[B:B:G:s&s_kwcid=AL13652!3!386244973888!b!!g!!&cid=bid_pca_ppf_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_pur_con](https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/89904?gclid=Cj0KCCQjwv5uKBhD6ARIsAGv9a-wbKrgGxSNqvWuARsUFluYo3szZF4nPFRAM4U9KQXQuhE8UCz_IR04aAgn5EALw_wcB&ef_id=Cj0KCCQjwv5uKBhD6ARIsAGv9a-wbKrgGxSNqvWuARsUFluYo3szZF4nPFRAM4U9KQXQuhE8UCz_IR04aAgn5EALw_wcB:B:G:s&s_kwcid=AL13652!3!386244973888!b!!g!!&cid=bid_pca_ppf_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_pur_con#/89904?gclid=Cj0KCCQjwv5uKBhD6ARIsAGv9a-wbKrgGxSNqvWuARsUFluYo3szZF4nPFRAM4U9KQXQuhE8UCz_IR04aAgn5EALw_wcB&ef_id=Cj0KCCQjwv5uKBhD6ARIsAGv9a-wbKrgGxSNqvWuARsUFluYo3szZF4nPFRAM4U9KQXQuhE8UCz_IR04aAgn5EALw_wcB:B:G:s&s_kwcid=AL13652!3!386244973888!b!!g!!&cid=bid_pca_ppf_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_pur_con)
[B:B:G:s&s_kwcid=AL13652!3!386244973888!b!!g!!&cid=bid_pca_ppf_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_pur_con](https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/89904?gclid=Cj0KCCQjwv5uKBhD6ARIsAGv9a-wbKrgGxSNqvWuARsUFluYo3szZF4nPFRAM4U9KQXQuhE8UCz_IR04aAgn5EALw_wcB&ef_id=Cj0KCCQjwv5uKBhD6ARIsAGv9a-wbKrgGxSNqvWuARsUFluYo3szZF4nPFRAM4U9KQXQuhE8UCz_IR04aAgn5EALw_wcB:B:G:s&s_kwcid=AL13652!3!386244973888!b!!g!!&cid=bid_pca_ppf_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_pur_con#/89904?gclid=Cj0KCCQjwv5uKBhD6ARIsAGv9a-wbKrgGxSNqvWuARsUFluYo3szZF4nPFRAM4U9KQXQuhE8UCz_IR04aAgn5EALw_wcB&ef_id=Cj0KCCQjwv5uKBhD6ARIsAGv9a-wbKrgGxSNqvWuARsUFluYo3szZF4nPFRAM4U9KQXQuhE8UCz_IR04aAgn5EALw_wcB:B:G:s&s_kwcid=AL13652!3!386244973888!b!!g!!&cid=bid_pca_ppf_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_pur_con)

121. Sigma-Aldrich. EI8 Leupeptin [21.09.2021]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/product/mm/ei8>.

122. Sigma-Aldrich. P5318 Pepstatin A [21.09.2021]. Available from: https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/product/sigma/p5318?gclid=Cj0KCCQjwv5uKBhD6ARIsAGv9a-wWdRljSFzy_I6uBKMYRfVNrj58PA44IszyaV4g-DjA2YyEvabfhC8aAr0dEALw_wcB.

123. Sigma-Aldrich. P7626 Phenylmethanesulfonyl fluoride [21.09.2021]. Available from: https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/product/sigma/p7626?gclid=Cj0KCCQjwv5uKBhD6ARIsAGv9a-zb9DO4p1OZ2p3IT-zwJbIfslGcAx4STdgl_TPQdWMR7jT06VZJQZMaAoHyEALw_wcB.

124. Sigma-Aldrich. 450243 Sodium orthovanadate [21.09.2021]. Available from: https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/product/aldrich/450243?gclid=Cj0KCCQjwv5uKBhD6ARIsAGv9a-yri3N7ibYeCStzRT-vBGiZglFvUodC3EydgkWNdwvbDq9Azxrni1oaAqVIEALw_wcB.

125. ThermoFisher. 23225 Pierce™ BCA Protein Assay Kit 2021 [21.09.2021]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23225#/23225>.

126. George AJT, Urch CE. Diagnostic and Therapeutic Antibodies; SDS-PAGE and Western Blotting. Totowa: Totowa: Humana Press; 2000.

127. Jensen EC. The Basics of Western Blotting. *Anat Rec.* 2012;295(3):369-71.

128. Vargas A, Zeisser-Labouèbe M, Lange N, Gurny R, Delie F. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(11):1162-76.

129. Nesheim B-I, Holck P. Allantois 2021 [05.10.2021]. Available from: <https://sml.snl.no/allantois>.

130. Mohammed R, Cavallaro G, Kessels CGA, Villamor E. Functional differences between the arteries perfusing gas exchange and nutritional membranes in the late chicken embryo. *J Comp Physiol B.* 2015;185(7):783-96.

131. Dombre C, Guyot N, Moreau T, Monget P, Da Silva M, Gautron J, et al. Egg serpins: The chicken and/or the egg dilemma. *Semin Cell Dev Biol.* 2017;62:120-32.
132. Nesheim B-I. Morkaken 2021 [05.10.2021]. Available from: <https://sml.snl.no/morkaken>.
133. Aengenheister L, Keevend K, Muoth C, Schönenberger R, Diener L, Wick P, et al. An advanced human in vitro co-culture model for translocation studies across the placental barrier. *Sci Rep.* 2018;8(1):5388-12.
134. Syme MR, Paxton JW, Keelan JA. Drug Transfer and Metabolism by the Human Placenta. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43(8):487-514.
135. Martignoni M, Groothuis GMM, de Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2006;2(6):875-94.
136. Kim KC, Lee D-K, Go HS, Kim P, Choi CS, Kim J-W, et al. Pax6-Dependent Cortical Glutamatergic Neuronal Differentiation Regulates Autism-Like Behavior in Prenatally Valproic Acid-Exposed Rat Offspring. *Mol Neurobiol.* 2013;49(1):512-28.
137. Harlan De Crescenzo A, Panoutsopoulos AA, Tat L, Schaaf Z, Racherla S, Henderson L, et al. Deficient or Excess Folic Acid Supply During Pregnancy Alter Cortical Neurodevelopment in Mouse Offspring. *Cereb Cortex.* 2021;31(1):635-49.
138. Stewart AM, Braubach O, Spitsbergen J, Gerlai R, Kalueff AV. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside. *Trends Neurosci.* 2014;37(5):264-78.
139. W. H. Evolution of Cerebellum. In: M.D. B, N. H, U. W, editors. *Encyclopedia of Neuroscience* Springer, Berlin, Heidelberg. 2009.
140. Innala M, Riebe I, Kuzmenko V, Sundberg J, Gatenholm P, Hanse E, et al. 3D Culturing and differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells on bacterial nanocellulose scaffolds. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2014;42(5):302-8.
141. Marrazzo P, Angeloni C, Hrelia S. Combined treatment with three natural antioxidants enhances neuroprotection in a SH-SY5Y 3D culture model. *Antioxidants.* 2019;8(10):420.
142. Pan C, Kumar C, Bohl S, Klingmueller U, Mann M. Comparative Proteomic Phenotyping of Cell Lines and Primary Cells to Assess Preservation of Cell Type-specific Functions. *Mol Cell Proteomics.* 2009;8(3):443-50.
143. Engelhardt B. Development of the blood-brain barrier. *Cell and Tissue Research.* 2003;314(1):119-29.
144. Zosen D, Hadera MG, Lumor JS, Andersen JM, Paulsen RE. Chicken embryo as animal model to study drug distribution to the developing brain. *Journal of pharmacological and toxicological methods.* 2021;112:107105-.
145. Paulzen M, Stingl JC, Augustin M, Saßmannshausen H, Franz C, Gründer G, et al. Comprehensive Measurements of Intrauterine and Postnatal Exposure to Lamotrigine. *Clin Pharmacokinet.* 2018;58(4):535-43.
146. Ruedy J. Teratogenic risk of drugs used in early pregnancy. *Can Fam Physician.* 1984;30:2133-6.
147. De Bellis MD, Keshavan MS, Beers SR, Hall J, Frustaci K, Masalehdan A, et al. Sex Differences in Brain Maturation during Childhood and Adolescence. *Cereb Cortex.* 2001;11(6):552-7.
148. Zagni E, Simoni L, Colombo D. Sex and Gender Differences in Central Nervous System-Related Disorders. *Neuroscience journal.* 2016;2016:1-13.
149. Welser J. Primary Cells Versus Cell Lines 2019 [10.10.2021]. Available from: <https://sciencellonline.com/blog/primary-cells-versus-cell-lines/>.
150. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harb Protoc.* 2018;2018(6):469-71.

151. Mazloum-Ardakani M, Barazesh B, Moshtaghioun SM, Sheikhha MH. Designing and optimization of an electrochemical substitute for the MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) cell viability assay. *Sci Rep.* 2019;9(1):14966-8.
152. Anoopkumar-Dukie S, Carey JB, Conere T, Osullivan E, van Pelt FN, Allshire A. Resazurin assay of radiation response in cultured cells. *Br J Radiol.* 2005;78(934):945-7.
153. Erikstein BS, Hagland HR, Nikolaisen J, Kulawiec M, Singh KK, Gjertsen BT, et al. Cellular stress induced by resazurin leads to autophagy and cell death via production of reactive oxygen species and mitochondrial impairment. *J Cell Biochem.* 2010;111(3):574-84.
154. Perrot S, Dutertre-Catella H, Martin C, Warnet JM, Rat P. A new nondestructive cytometric assay based on resazurin metabolism and an organ culture model for the assessment of corneal viability. *Cytometry A.* 2003;55A(1):7-14.
155. Parrado-Fernández C, Sandebring-Matton A, Rodriguez-Rodriguez P, Aarsland D, Cedazo-Mínguez A. Anthocyanins protect from complex I inhibition and APPswe mutation through modulation of the mitochondrial fission/fusion pathways. *Biochimica et biophysica acta Molecular basis of disease.* 2016;1862(11):2110-8.
156. Kysenius K, Brunello CA, Huttunen HJ. Mitochondria and NMDA receptor-dependent toxicity of berberine sensitizes neurons to glutamate and rotenone injury. *PLoS One.* 2014;9(9):e107129.
157. Min TGDUGRoK. Detection of ethanol released from aged radish (*Raphanus sativus* L.) seeds using resazurin. *Horticulture, environment and biotechnology.* 2012;53(1):66-71.
158. Tajima N, Karakas E, Grant T, Simorowski N, Diaz-Avalos R, Grigorieff N, et al. Activation of NMDA receptors and the mechanism of inhibition by ifenprodil. *Nature.* 2016;534(7605):63-8.
159. Yacubova E, Komuro H. Cellular and molecular mechanisms of cerebellar granule cell migration. *Cell Biochem Biophys.* 2003;37(3):213-34.
160. Waters KA, Machaalani R. NMDA Receptors in the Developing Brain and Effects of Noxious Insults. *Neurosignals.* 2004;13(4):162-74.
161. Aleksandrowicz E, Herr I. Ethical euthanasia and short-term anesthesia of the chick embryo. *ALTEX.* 2015;32(2):143-7.
162. Hu T-M, Chung H-S, Ping L-Y, Hsu S-H, Tsai H-Y, Chen S-J, et al. Differential expression of multiple disease-related protein groups induced by valproic acid in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Brain sciences.* 2020;10(8):1-14.
163. Daniel ED, Mudge AW, Maycox PR. Comparative analysis of the effects of four mood stabilizers in SH-SY5Y cells and in primary neurons. *Bipolar Disord.* 2005;7(1):33-41.
164. Go HS, Kim KC, Choi CS, Jeon SJ, Kwon KJ, Han S-H, et al. Prenatal exposure to valproic acid increases the neural progenitor cell pool and induces macrocephaly in rat brain via a mechanism involving the GSK-3 β / β -catenin pathway. *Neuropharmacology.* 2012;63(6):1028-41.
165. Kozma C. Valproic acid embryopathy: Report of two siblings with further expansion of the phenotypic abnormalities and a review of the literature. *Am J Med Genet.* 2001;98(2):168-75.
166. Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone Deacetylase Is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen. *J Biol Chem.* 2001;276(39):36734-41.
167. Bialer M, Rubinstein A, Raz I, Abramsky O. Pharmacokinetics of valpromide after oral administration of a solution and a tablet to healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* 1984;27(4):501-3.
168. El-Ansary A, Al-Ayadhi L. GABAergic/glutamatergic imbalance relative to excessive neuroinflammation in autism spectrum disorders. *J Neuroinflammation.* 2014;11(1):189-.

169. Kim J-W, Seung H, Kwon KJ, Ko MJ, Lee EJ, Oh HA, et al. Subchronic treatment of donepezil rescues impaired social, hyperactive, and stereotypic behavior in valproic acid-induced animal model of autism. *PLoS One*. 2014;9(8):e104927.
170. Fjellidal MF, Universitetet i Oslo Farmasøytisk i, Universitetet i Oslo Det matematisk-naturvitenskapelige f. Properties of glutamate receptor subunit GluN2B antagonists and effects of prenatal opioid exposure : studies in chicken and rat. Oslo: Department of Pharmacy, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Oslo; 2019.
171. Chapouton P, Gartner A, Gotz M. The role of Pax6 in restricting cell migration between developing cortex and basal ganglia. *Development*. 1999;126(24):5569-79.
172. Yamasaki T, Kawaji K, Ono K, Bito H, Hirano T, Osumi N, et al. Pax6 regulates granule cell polarization during parallel fiber formation in the developing cerebellum. *Development*. 2001;128(16):3133-44.
173. Arocena M, Rajnicek AM, Collinson JM. Requirement of Pax6 for the integration of guidance cues in cell migration. *R Soc Open Sci*. 2017;4(10):170625-.
174. Hanson Shepherd JN, Parker ST, Shepherd RF, Gillette MU, Lewis JA, Nuzzo RG. 3D Microperiodic Hydrogel Scaffolds for Robust Neuronal Cultures. *Adv Funct Mater*. 2011;21,10(1,6):47-54.
175. Lesuisse C, Martin LJ. Immature and Mature Cortical Neurons Engage Different Apoptotic Mechanisms Involving Caspase-3 and the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002;22(8):935-50.
176. Kole AJ, Annis RP, Deshmukh M. Mature neurons: equipped for survival. *Cell Death Dis*. 2013;4(6):e689-e.
177. Hakem R, Hakem A, Duncan GS, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, et al. Differential Requirement for Caspase 9 in Apoptotic Pathways In Vivo. *Cell*. 1998;94(3):339-52.

7 VEDLEGG 1 – OPPSKRIFTER

Tabell 7.1 PLL-løsning til forbehandling av 96-brønnsbrett		
Komponent	Mengde til 100 mL	Sluttkonsentrasjon
PLL [10 mg/mL]	100 µL	0,01 mg/mL
MQ-vann	100 mL	-

Tabell 7.2 PLL-løsning til forbehandling av 6-brønnsbrett		
Komponent	Mengde til 100 mL	Sluttkonsentrasjon
PLL [10 mg/mL]	200 µL	0,02 mg/mL
MQ-vann	100 mL	-

Tabell 7.3 Løsninger til preparering av kyllingkornceller

Løsning	Komponent	Mengde per mL løsning
Løsning 1*	Bovine Serum Albumin	0,003 g
	Krebs Ringer Solution 10x	0,1 mL
	MgSO ₄ [38,2 mg/mL] i dH ₂ O	0,008 mL
	Destillert vann	Til 1 mL
Løsning 2	Trypsin	0,25 mg
	Løsning 1	1 mL
Løsning 3	Trypsininhibitor	0,52 mg
	DNase 1	0,124 mg
	MgSO ₄ [38,2 mg/mL] i dH ₂ O	0,01 mL
	Løsning 1	Til 1 mL
Løsning 4	Løsning 1	0,862 mL
	Løsning 3	0,138 mL
Løsning 5	Løsning 1	0,984 mL
	MgSO ₄ [38,2 mg/mL] i dH ₂ O	7,87 µL
	CaCl ₂ [12,0 mg/mL] i dH ₂ O	7,87 µL

**Løsning 1 lages i erlenmeyerkolbe med magnetrører.*

Løsningene lages samme dag som prosedyren utføres. Løsningene må sterilfiltreres (0,2 µm) før bruk.

Tabell 7.4 Serumholdig medium til utplating av kyllingkornceller

Komponent	Mengde til 500 mL	Sluttkonsentrasjon
BME (GIBCO)	500 mL	-
Kyllingserum	37,5 mL	7,5 %
KCl*	825 mg	22 mM
Glutamin	146 mg	2 mM
Pen.strep.	5 mL	1 %
Insulin [1 mM]	50 µL	100 nM

**BME inneholder 3 mM KCl, sluttkonsentrasjon KCl skal være 25 mM.
Komponentene må sterilfiltreres før overføring til BME-flasken.*

Tabell 7.5 Serumfritt medium til kyllingkornceller

Komponent	Mengde til 500 mL	Sluttkonsentrasjon
BME (GIBCO)	500 mL	-
KCl*	825 mg	22 mM*
Glutamin	146 mg	2 mM
Pen.strep.	5 mL	1 %
h-transferrin	50 mg	100 µg/mL
Putrescin	4,8 mg	60 µM
Insulin [2 mg/mL]	6,25 mL	25 µg/mL
T3 [20 µg/mL]	17 µL	1 nM
Na ₂ SeO ₃ [100 µM]	150 µL	30 nM

**BME inneholder 3 mM KCl, sluttkonsentrasjon KCl skal være 25 mM.
Komponentene må sterilfiltreres (0,2 µm) før overføring til BME-flasken.*

Tabell 7.6 Serumholdig medium med farge til SH-SY5Y-celler

Komponent	Mengde til 500 mL	Sluttkonsentrasjon
DMEM med farge	500 mL	-
Føtalt kalveserum	50 mL	10 %
Pyruvat	5 mL	-
Pen.strep. [10 mg/mL]	5 mL	-

Tabell 7.7 Serumholdig medium med farge til PC12-celler

Komponent	Mengde til 500 mL	Sluttkonsentrasjon
DMEM med farge	500 mL	-
Føtalt kalveserum	50 mL	10 %
Hesteserum	25 mL	5 %
Pyruvat	5 mL	-
Pen.strep. [10 mg/mL]	5 mL	-

Tabell 7.8 Serumholdig medium uten farge* til PC12-celler

Komponent	Mengde til 500 mL	Sluttkonsentrasjon
DMEM uten farge	500 mL	-
Føtalt kalveserum	50 mL	10 %
Hesteserum	25 mL	5 %
Pyruvat	5 mL	-
Pen.strep. [10 mg/mL]	5 mL	-

*Kun benyttet til test av brett og medium.

Tabell 7.9 Serumfritt medium med farge til SH-SY5Y- og PC12-celler*		
Komponent	Mengde til 500 mL	Sluttkonsentrasjon
DMEM med farge	500 mL	-
Pyruvat	5 mL	-
Pen.strep. [10 mg/mL]	5 mL	-
<i>*Kun til test av brett og medium, samt til tillaging av medium for differensiering av SH-SY5Y- og PC12-celler (tabell 7.11). Denne tabellen blir derfor ikke referert til i vedlegg 1.</i>		

Tabell 7.10 Serumfritt medium uten farge* til PC12-celler		
Komponent	Mengde til 500 mL	Sluttkonsentrasjon
DMEM uten farge	500 mL	-
Pyruvat	5 mL	-
Pen.strep. [10 mg/mL]	5 mL	-
<i>*Kun benyttet til test av brett og medium.</i>		

Tabell 7.11 Medium til differensiering av SH-SY5Y- og PC12-celler		
Komponent	Mengde til 100 mL	Sluttkonsentrasjon
Serumholdig medium til SH-SY5Y (tabell 7.1.6) eller PC12-celler (tabell 7.1.7)	90 mL	90 %
Serumfritt medium til SH-SY5Y- og PC12-celler (tabell 7.1.9)	10 mL	10 %
<i>Differensiering av SH-SY5Y-celler: RA til en sluttkonsentrasjon på 10 µM. Differensiering av PC12-celler: NGF til en sluttkonsentrasjon på 50 ng/mL.</i>		

Tabell 7.12 Løsninger til DNA-kvantifisering med Hoechst 33342

Løsning	Komponent	Mengde per mL løsning	Sluttkonsentrasjon
Løsning 1 (pH 7,0)	Tris-HCl	2,43 mg	20 mM
	NaCl	8,77 mg	150 mM
	Hoechst 33342*		2 µM
Løsning 2 (pH 7,0)	Sitronsyre	4,20 mg	20 mM
	CuSO ₄ + 5H ₂ O	0,50 mg	2 mM
	NaCl	29,22 mg	0,5 M
	Tween 20		0,2 %
Løsning 3 (pH 7,0)	Na ₂ HPO ₄	3,56 mg	20 mM
	NaH ₂ PO ₄	2,76 mg	20 mM
	NaCl	8,766 mg	150 mM
Løsning 4 (pH 7,0)	Na ₂ HPO ₄	3,56 mg	20 mM
	NaH ₂ PO ₄	2,76 mg	20 mM
	SDS		2 %

**Hoechst 33342 er lyssensitiv og må tilsettes dagen prosedyren utføres.
Juster pH med HCl eller NaOH.*

Tabell 7.13 Løsninger til kalsiuminfluks-studier

Løsning	Komponent	Mengde per 100 mL løsning	Sluttkonsentrasjon
N-buffer	NaCl [5 M]	2,8 mL	140 mM
	KCl [1 M]	0,35 mL	3,5 mM
	Tris-HCl [1M] pH 7,0	1,5 mL	15 mM
	Na ₂ HPO ₄ x NaH ₂ PO ₄ [0,1 M] pH 7,4	1,2 mL	1,2 mM
	Glukose [1 M]	500 µL	5 mM
	CaCl ₂ [1M]	200 µL	2 mM
	MQ-vann	Opp til 100 mL	-
Mg²⁺-buffer	N-buffer	100 mL	-
	MgSO ₄ [1 M]	100 µL	1 mM

Tabell 7.14 RIPA lyseringsbuffer med protease- og fosfataseinhibitorer

Løsning	Komponent	Mengde til 10 mL	Sluttkonsentrasjon
RIPA-buffer	NaCl [5 M]	300 µL	150 mM
	EDTA [0,5 M] pH 8,0	100 µL	5 mM
	Tris-HCl [1 M] pH 8,0	500 µL	50 mM
	Triton-X100	100 µL	1 %
	Natriumdeoksykolat monohydrat [10 %]	500 µL	0,5 %
	SDS [10 %]	100 µL	0,1 %
	dH ₂ O	Opp til 10 mL	-
Protease- fosfataseinhibitorer*	Leupeptin [5 mg/mL]	10 µL	5 µg/mL
	Pepstatin A [1 mg/mL]	50 µL	1 µg/mL
	PMSF [100 mM]	30 µL	0,3 mM
	Na ₃ VO ₄	100 µL	0,1 mM
<p><i>*Protease- og fosfataseinhibitorerne tilsettes RIPA-bufferen på bruksdagen. Holdes på is. RIPA-buffer kan alikvoteres og fryses ned ved -20 °C.</i></p>			

Tabell 7.15 Standardløsninger til proteinmåling			
	BSA, stock-konsentrasjon ($\mu\text{g/mL}$)	BSA (μL)	Fortynningsvæske* (μL)
A	2000	225	–
B	1500	75A	25
C	1000	50A	50
D	750	50B	50
E	500	50C	50
F	250	50E	50
G	125	50F	50
H	25	20G	80
I	5	20H	80
NULL	0	–	100

**RIPA lysesbuffer med protease- og fosfataseinhibitorer benyttes som fortynningsvæske dersom lysatet består av denne bufferen.*

Tabell 7.16 Laemmli-buffer [4x]	
Komponent	Sluttkonsentrasjon
SDS	2 %
Glyserol	20 %
2-merkaeptanol	5 %
Tris-HCl pH 6,8	300 mM
Bromfenolblått	Noen korn
MQ-vann	-

Tabell 7.17 Løsninger til immunocytokjemi

Løsning	Komponent	Mengde per 10 mL løsning	Sluttkonsentrasjon
Blokkebuffer	PBS [1x]	10 mL	-
	BSA 1 %	100 mg	1 %
	Tween-20	5 µL	0,05 %
	Geitserum	100 µL	1 %

Tabell 7.18 PBS (fosfatbufret saltvann)

Komponent	Mengde til 100 mL	Sluttkonsentrasjon
NaCl	8 g	137 mM
KCl	0,2 g	27 mM
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	1,78 g	0,1 mM
KH ₂ PO ₄	0,24 g	1,8 mM
MQ-vann	1 L	-

Juster pH til 7,4 med HCl.

Tabell 7.19 TBS med 0,1 % Tween (TBS-T) (trisbufret saltvann med Tween)

Komponent	Mengde til 100 mL	Sluttkonsentrasjon
Tri-HCl	-	2,45 g/L
NaCl	-	8,0 g/L
Tween 20	-	0,1 %
MQ-vann	Opptil 100 mL	-

Juster pH til 7,6 med HCl eller NaOH.

8 VEDLEGG 2 – PROTOKOLLER

- *Ved test av ulike medium ble det benyttet serumholdig medium med farge (tabell 7.7), serumholdig medium uten farge (tabell 7.8) *, serumfritt medium med farge (tabell 7.9), og serumfritt medium uten farge (tabell 7.10) *.*
** Ble bare benyttet til test av brett og er ikke henvist til i vedlegg 2.*
- *PBS (tabell 7.18) og TBS-T (tabell 7.19) ble benyttet i flere av protokollene og vedlegg 2 henviser derfor ikke videre til disse.*

8.1 FORBEHANDLING AV BRETT

8.1.1 Forbehandling av 96- og 6-brønnsbrett med PLL

1. Overfør PLL-løsning til hver brønn
 - 96-brønnsbrett: 100 µL/brønn (tabell 7.1)
 - 6-brønnsbrett: 1,5 mL/brønn (tabell 7.2)
2. Inkuber i 30-60 min. ved romtemperatur (RT)
3. Fjern innholdet i brønnene
4. La brønnene tørke i minst 2 timer før videre bruk

8.1.2 Behandling av 96- og 6-brønnsbrett med ECM

Ved utplating av SH-SY5Y-celler forbehandles brettene med ECM-løsning (enkel konsentrasjon), og denne fjernes før utplating av celler.

1. Overfør ECM-løsning (dobbel konsentrasjon) til hver brønn med halvt sluttvolum
 - 96-brønnsbrett: 50 µL med konsentrasjon 1:2000
 - 6-brønnsbrett: 1 mL med konsentrasjon 1:200
2. Inkuber i 30-60 min. ved 37 °C
3. Tilsett cellesuspensjon med dobbel konsentrasjon uten å fjerne ECM-løsningen, til et sluttvolum på:
 - 96-brønnsbrett: 100 µL
 - 6-brønnsbrett: 2 mL
4. Inkuber cellene ved 37 °C og 5 % CO₂

8.1.3 Behandling av 96-brønnsbrett med AARS

1. Tilsett 100 μ L AARS i hver brønn
2. Fjern AARS
3. Vask med 100 μ L PBS
4. Fjern PBS og la brønnene tørke

8.2 PREPARERING OG UTPLATING AV CELLEKULTURER

8.2.1 Preparering av kyllingkornceller

1. Ta eggene ut av inkubator E17
2. Velg ut et passelig antall (5-7) egg av gangen og tildekk disse med is i 7 min.
3. Desinfiser eggene ved å dyppe dem i EtOH [70 %] før klekking; ett egg av gangen
4. Klekkingen utføres ved å dunke egget i en hard kant
5. Avliv embryoene ved dekapitering med steril skalpell
6. Isoler hver lillehjerne i LAF-benk ved bruk av steril saks og pinsett, og overfør til en liten petriskål med litt løsning 1 (**tabell 7.3**)
7. Rens lillehjernen for hjernehinne og blod ved bruk av pinsetten, og plasser i en i ny, liten petriskål med litt løsning 1
8. Fjern løsning 1 fra skålen
9. Legg lillehjernen i midten av skålen og kutt dem på kryss og tvers ved bruk av en steril skalpell
10. Tilsett 10 mL løsning 1
11. Overfør suspensjonen til et sterilt 50 mL-rør eller en trypsineringsflaske og sentrifuger i 1 min. på 1000 rpm.
12. Fjern supernatanten
13. Tilsett 8 mL løsning 2 (**tabell 7.3**) og pipetter godt for å dispergere pelleten
14. Sett røret i vannbad ved 37 °C i 15 min. med løs kork. Vend røret forsiktig innimellom; da med fast kork
15. Fyll opp røret med løsning 4 (**tabell 7.3**)
16. Sentrifuger i 2 min. ved 1000 rpm.
17. Dersom supernatanten ikke er klar: fjern litt av supernatanten og tilsett deretter et tilsvarende volum løsning 3 (**tabell 7.3**) og gjenta sentrifugeringen
18. Fjern supernatanten
19. Tilsett 3 mL løsning 3 til pelleten, og pipetter opp og ned 15-20 ganger

20. La suspensjonen stå i ro slik at klumper kan legge seg i bunn
21. Overfør den klumpfrie supernatanten til et sterilt 50 mL-rør og tilsett 15 mL løsning 5 (tabell 7.3)
22. Tilsett 2 mL løsning 3 til røret med cellesuspensjonen
23. Gjenta trinn 19-22 for røret med cellesuspensjon inntil supernatanten er fri for synlige klumper
24. Overfør alt til 50 mL-røret
25. Sentrifuger på 900 rpm. i 7 min.
26. Fjern supernatanten
27. Tilsett 10 mL serumholdig medium (tabell 7.4) og bland godt
28. Ta ut cellesuspensjon til telling
 - Ta ut 10 μ L cellesuspensjon og fortynn til 100 μ L serumholdig medium før celledelling (1:10)
 - Overfør 10 μ L av den fortyndede cellesuspensjonen til et tellekammer og tell cellene. Ta gjennomsnittet av antallet i 3-6 kvadrater. Gjennomsnittet tilsvarer en tetthet på $\times 10^4$ celler/mL i den fortyndede (1:10) cellesuspensjonen.
29. Fortynn cellesuspensjonen med serumholdig medium til en celledetthet på $1,7-2,0 \times 10^6$ celler/mL for 96-brønnsbrett og $2,5 \times 10^6$ celler/mL i 6-brønnsbrett (avsnitt 8.1.2).
Tilsett eventuelt AraC til en sluttkonsentrasjon på 5 μ M før utplating i 96-brønnsbrett.

8.2.2 Utplating av kyllingkornceller i 96- og 6-brønnsbrett

1. Plat ut cellene i serumholdig medium (tabell 7.4)
 - 96-brønnsbrett: tilsett 100 μ L cellesuspensjon med celledetthet $1,7-2,0 \times 10^6$ celler/mL til hver brønn. Ved utplating i ECM tilsettes i stedet 50 μ L med dobbel celledetthet 30-60 min. etter inkubering med 50 μ L ECM i dobbel konsentrasjon (avsnitt 8.1.2)
 - 6-brønnsbrett: tilsett 2 mL cellesuspensjon med celledetthet $2,5 \times 10^6$ celler/mL til hver brønn. Ved utplating i ECM tilsettes i stedet 1 mL med dobbel celledetthet 30-60 min. etter inkubering med 1 mL ECM i dobbel konsentrasjon
2. Inkuber ved 37 °C og 5 % CO₂ over natten
3. Fjern medium og tilsett serumfritt medium (tabell 7.5) med eller uten eksponeringsløsninger avhengig av hvilket forsøk som skal utføres

8.2.3 Splitting av SH-SY5Y- og PC12-celler i dyrkningsflaske

1. Fjern mediet
2. Vask forsiktig med PBS
3. SH-SY5Y-celler: inkuber med 4 mL trypsinløsning ved 37 °C i 3-4 min. på roterende plate før tilsetning av 5 mL serumholdig medium (**tabell 7.6**)
PC12-celler: tilsett 10 mL serumholdig medium (**tabell 7.7**) og dunk flasken så cellene løsner
4. Pipetter godt opp og ned for å dele opp celleklumper
5. Overfør 1,5 mL av cellesuspensjonen til en ny flaske med 20 mL serumholdig medium for spesifikk celletype
6. Inkuber ved 37 °C med 5 % CO₂

8.2.4 Preparering av udifferensierte eller differensierte SH-SY5Y- og PC12-celler til utplating

1. Utfør trinn 1–4 i **avsnitt 8.2.3**
2. Overfør cellesuspensjonen til et 50 mL-rør
3. Skyll flasken med PBS x2 og overfør til røret
4. Fyll opp røret med PBS til 50 mL
5. Bland godt og ta ut 10 µL til celletelling
6. Sentrifuger røret i 5 min. ved 1000 rpm.
7. Fjern supernatanten
8. Tilsett 10 mL serumholdig medium for spesifikk celletype (**tabell 7.6** eller **7.7**)
9. Fortynn cellesuspensjonen i medium til en celletetthet på 7×10^4 celler/mL
 - Udifferensierte celler: utfør fortynningen i serumholdig medium til spesifikk celletype
 - Celler til differensiering: utfør fortynningen i medium til differensiering av SH-SY5Y- eller PC12-celler (**tabell 7.11**)
10. Plat ut cellene i 96-brønnsbrett til et sluttvolum på 100 µL per brønn
11. Inkuber ved 37 °C og 5 % CO₂

8.2.5 Preparering av aggregerte SH-SY5Y-celler til vekst på petriskål

1. Preparer SH-SY5Y-celler på tilsvarende måte som udifferensierte celler (**trinn 1–8 avsnitt 8.2.4**)
2. Overfør 10 mL cellesuspensjon til antiadhesive skåler til en celletetthet på $10\text{--}15 \times 10^6$ celler/mL
3. Inkuber skålene ved $37\text{ }^\circ\text{C}$ og 5% CO_2 på roterende plate i 2–3 dager inntil cellene har laget sfæroider

8.2.6 Preparering av aggregerte SH-SY5Y-celler til utplating og legemiddeleksponering

1. Forbehandle 96-brønnsbrett med AARS (**avsnitt 8.1.3**)
2. Benytt skåler med aggregerte SH-SY5Y-celler (**avsnitt 8.2.5**)
3. Sett skålen på skrå slik at sfæroidene synker til kanten og overfør disse til et 50 mL-rør. Benytt pipettespisser hvor $\frac{1}{2}$ cm av tuppen er klippet av
4. Skyll skålen med serumholdig medium (**tabell 7.6**) og overfør til røret for å få med alle sfæroidene
5. La røret stå i 5 min. slik at sfæroidene synker til bunn
6. Fjern supernatanten forsiktig slik at ingen sfæroider fjernes
7. Tilsett 20 mL serumholdig medium
8. Bruk pipettespiss med avklippet tupp og suspender pelleten
9. Tilsett $90\text{ }\mu\text{L}$ cellesuspensjon til hver brønn
10. Utfør eksponering av sfæroidene ved å tilsette $10\text{ }\mu\text{L}$ eksponeringsløsning i serumholdig medium til ønsket sluttkonsentrasjon

8.3 LEGEMIDDELEKSPONERING

8.3.1 Legemiddeleksponering *in ovo*: injisering av egg på E16

1. Gjennomlys eggene
2. Fjern ubefruktede egg og frys disse ned ved $-20\text{ }^\circ\text{C}$
3. Vei eggene og noter vekten med blyant på skallet
4. Velg ut egg med omtrent samme vekt
5. Gjennomlys eggene og marker med blyant et område uten synlige blodårer, på motsatt side av luftrommet (se **figur 2.2** i **avsnitt 2.5.1**)
6. Desinfiser sylen med Alkotip®. Desinfiser også eggene på injeksjonsstedet

7. Trekk opp 60 mL eksponeringsløsning i sprøyten og fjern luftbobler
8. Stikk sylen forsiktig ca. ½ cm inn på markert sted hvor injiseringen skal utføres
9. Injiser egget forsiktig og la egget stå opp-ned så ikke løsningen renner ut. Teip eventuelt over injiseringshullet
10. Plasser eggene riktig vei og sett tilbake i inkubator

8.3.2 Legemiddeleksponering *in vitro*: eksponering i 96-brønnsbrett til studier av viabilitet og immunocytokjemi

1. Fjern medium
2. Tilsett 100 µL eksponeringsløsning (i medium for spesifikk celletype) til hver brønn
 - Aggregerte SH-SY5Y-celler: 10 µL eksponeringsløsning tilsettes etter utplating av 90 µL cellesuspensjon
3. Inkuber ved 37 °C og 5 % CO₂

8.4 VIABILITETSSTUDIER

8.4.1 Viabilitetsstudier med MTT

Ble utført i blanke 96-brønnsbrett, forbehandlet med PLL (kyllingkornceller).

1. Tilsett MTT i PBS til hver brønn til en sluttkonsentrasjon på 0,45 mg/mL
 - Blank: tilsett tilsvarende volum PBS uten MTT
2. Inkuber ved 37 °C og 5 % CO₂ i 3 timer
3. Fjern mediet
4. Tilsett 100 µL DMSO i hver brønn
5. Inkuber ved 37 °C i 30 min.
6. La brettet stå ved RT i 5-10 min.
7. Avles absorbans på plateleser ved 570 nm

8.4.2 Viabilitetsstudier med RZ

Ble utført i blanke 96-brønnsbrett, forbehandlet med PLL (kyllingkornceller)

Ved test av blanke og svarte brett ble det byttet til test-medium rett før tilsetning av RZ.

1. Tilsett 10 µL RZ i PBS i hver brønn til en sluttkonsentrasjon på 44 eller 440 µM
 - Blank: tilsett tilsvarende volum PBS uten RZ
2. Inkuber ved 37 °C og 5 % CO₂ i 4 timer
3. Mål fluorescens på plateleser ved ex 570 nm/em 590 nm

8.4.3 Viabilitetsstudier med FDA/PI i SH-SY5Y-celler

Ble utført i svarte 96-brønnsbrett med glassbunn, forbehandlet med PLL og ECM.

1. Tilsett 50 μL PI i PBS til en sluttkonsentrasjon på 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, uten å fjerne mediet
 - Blank: tilsett tilsvarende volum PBS uten PI
 - Brønner med bare FDA: tilsett tilsvarende volum PBS uten PI
2. Inkuber i 12 min. ved RT, beskyttet mot lys
3. Tilsett videre 50 μL FDA i PBS til en sluttkonsentrasjon på 0,19 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 - Blank: tilsett tilsvarende volum PBS uten FDA
 - Brønner med bare PI: tilsett tilsvarende volum PBS uten FDA
4. Inkuber i 3 min. ved RT, beskyttet mot lys
5. Fjern innholdet i brønnene
6. Vask forsiktig med 200 μL PBS x1-2
7. Tilsett 100 μL PBS
8. Ta bilder i fluorescensmikroskop med grønn (PI) og blå (FDA) kanal

8.4.4 Viabilitetsstudier med PI i PC12-celler

Ble utført i blanke 96-brønnsbrett.

1. Fjern mediet
2. Tilsett 100 μL PI i PBS i hver brønn til en sluttkonsentrasjon på 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
 - Blank: tilsett tilsvarende volum PBS uten PI
3. Inkuber i 20 min. ved 37 °C
4. Fjern PI-løsningen
5. Tilsett 100 μL PBS
6. Ta bilder i fluorescensmikroskop med grønn kanal

8.4.5 DNA-kvantifisering med Hoechst 33342 i kyllingkornceller

Ble utført i brett med celler benyttet til RZ-analyse. Ble overført til nytt blankt 96-brønnsbrett ved eluering.

1. Fikser cellene med EtOH [70 %] og inkuber i 10 min. ved RT
2. Fjern EtOH og la brønnene lufttørke i 30 min. ved RT
3. Tilsett 100 μL løsning 1 (**tabell 7.12**) til hver brønn og la stå på roterende plate i 30 min. ved RT, beskyttet mot lys
 - Blank: tilsett tilsvarende volum av løsning 1 uten Hoechst 33342

4. Vask hver brønn med 100 μL løsning 2 (**tabell 7.12**). Gjenta x2
5. Vask hver brønn med 100 μL løsning 3 (**tabell 7.12**)
6. Tilsett forsiktig 120 μL løsning 4 (**tabell 7.12**) til hver brønn uten å lage bobler
7. Overfør forsiktig 100 μL fra hver brønn til et nytt 96-brønnsbrett uten å lage bobler
8. Analyser på plateleser ved ex 370/em 460

8.5 Kalsiuminfluks-studier med Fura-2 AM i kyllingkornceller

Ble utført i svarte 96-brønnsbrett med glassbunn, forbehandlet med PLL og platet ut i ECM.

1. Fjern mediet
2. Tilsett 100 μL Fura-2 AM til en sluttkonsentrasjon på 2-4 μM i serumfritt medium (**tabell 7.5**) eller N-buffer (**tabell 7.13**)
 - Blank: tilsett tilsvarende volum serumfritt medium eller N-buffer uten Fura-2 AM
3. Inkuber i 30 min. ved 37 °C og 5 % CO_2
4. Fjern mediet
5. Tilsett 100 μL Mg^{2+} -buffer (**tabell 7.13**)
6. Inkuber i 10 min. ved RT, beskyttet mot lys
7. Mål grunnlinjen på plateleser ved ex 335 og 380/em 510 nm
8. Fjern Mg^{2+} -bufferen
9. Vask med 200 μL N-buffer
10. Tilsett 100 μL serumfritt medium eller N-buffer med tilsatt legemiddel, inhibitor eller aktivator
 - Blank: tilsett tilsvarende volum medium eller N-buffer uten tilsetning
 - Kontroll: tilsett tilsvarende volum medium eller N-buffer uten tilsetning
11. Avles fluorescens på plateleser ved ex 335 og 380/em 510 nm etter 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75 og 90 min.
12. Tilsett 25 μL stimulerende buffer i hver brønn
 - Blank: tilsett tilsvarende volum medium eller N-buffer uten stimulering
 - Kontroll: tilsett tilsvarende volum medium eller N-buffer uten stimulering i halvparten av brønnene for kontroll
13. Avles fluorescens på plateleser ved ex 335 og 380/em 510 nm etter 5 min.

8.6 WESTERN BLOT

8.6.1 Høsting av kyllingkornceller eksponert *in vivo*

Ble utført i blanke 6-brønnsbrett. Det ble byttet til serumfritt medium på DIV1.

1. Marker eppendorfrør slik at hvert rør har individuell nummerering
2. Fjern mediet
3. Vask forsiktig med 1 mL iskald PBS. Fjern PBS
4. Inkuber med 500 μ L trypsinløsning i 5 min. ved 37 °C på roterende plate
5. Overfør innholdet fra hver brønn til sitt respektive eppendorfrør og la rørene stå på is
6. Vask brønnene med 500 μ L iskald PBS og overfør til tilsvarende eppendorfrør som i trinn 5
7. Sentrifuger i 4 min. ved 1xg og 4 °C
8. Fjern supernatanten
9. Tilsett 200 μ L iskald RIPA lyseringsbuffer med protease- og fosfataseinhibitorer (**tabell 7.14**) til hvert rør og bland godt
10. Legg eppendorfrørene inni et 50 mL-rør og legg på rullebrett i 1-2 timer ved 4 °C
11. Fortsett på trinn 12 eller frys ned rørene ved -20 °C for å fortsette ved et annet tidspunkt
12. Sett rørene på vortexmikser og deretter sett dem i ultralydbad i maks. 3 sek., før de settes tilbake på is i 1 min. Gjenta x2
13. Sentrifuger i 5 min. ved 13 000 g og 4 °C
14. Marker nye eppendorfrør med identisk nummerering
15. Overfør supernatanten (lysatet) til de nye rørene
16. Utfør proteinmåling med BCA (**avsnitt 8.6.2**) og koking av prøver (**8.6.3**), eller frys ned rørene ved -20 °C for å utføre dette på et senere tidspunkt

8.6.2 Proteinmåling med BCA

1. Overfør 2x 5 μ L (duplikat) fra hvert eppendorfrør med lysat (trinn 15 **avsnitt 8.6.1**) til hver sin brønn i et blankt 96-brønnsbrett. La brettet stå på is
2. Overfør 2x 5 μ L (duplikat) av standardløsningene A-I (**tabell 7.15**) til hver sin brønn
3. Overfør 2x 5 μ L (duplikat) iskald RIPA lyseringsbuffer med protease- og fosfataseinhibitorer (**tabell 7.14**) som blank
4. Tilbered AB-reagens fra Pierce™ BCA Protein Assay Kit ved å blande reagens A med reagens B (50:1 reagens A:B)

5. Tilsett 100 μL AB-reagens (50:1) i hver brønn
6. Inkuber i 30 min. ved 37 °C
7. La brettet stå ved RT i 10 min.
8. Mål absorbans på plateleser ved 570 nm
9. Lag standardkurve og regn ut proteinmengden i hvert lysat

8.6.3 Koking av prøver

1. Ta ut beregnet mengde lysat og fortynn med dH_2O til ønsket volum slik at det fortyndede lysatet inneholder ønsket mengde protein
2. Tilsett Laemmli-buffer [4x] (**tabell 7.16**) til lysatet i forholdet 1:3. Utføres i avtrekksskap
3. Bland på vortexmikser og sett på kokeapparat i 5 min ved 95 °C. Bland igjen på vortexmikser når halvparten av tiden har gått
4. Sett på is i 10 min.
5. Utfør WB (avsnitt **8.6.4-8.6.8**) eller frys ned ved -20 °C for å utføre dette ved en senere anledning

8.6.4 Gelelektroforese

1. Lag Elfobuffer (1x Tris-HCl/Glycin/SDS) ved å fortynne 10x Tris/Glycin/SDS fra Bio-Rad i dH_2O
2. Ta gelplaten ut av emballasjen, fjern den grønne teipen, og korriger ved behov toppen av brønnene med en kanyle
3. Sett sammen gelelektroforesekaret
4. Fyll karet opp med Elfobuffer slik at elektrodene og brønnene dekkes. Fjern eventuell luft under gelen med en kanyle
5. Tilsett 5 μL av proteinstandarden Precision Plus Protein™ All Blue Standards i den første brønnen på hver gel
6. Tilsett 40 μL prøve i de resterende brønnene
7. Koble på elektrodene og kjør elektroforese ved 150 V i ca. 1 time.
8. Avlutt elektroforesen når linjen farget av bromfenolblått har nådd bunnen av gelen

8.6.5 Blotting av gel

1. Hell av Elfobufferen og ta ut gelplaten
2. Lag Trans-Blot-transfer-buffer ved å fortynne 1 del Trans-Blot® Turbo™ Transfer Buffer [5x] med 3 deler dH₂O og 1 del EtOH (absolutt alkohol)
3. Skyll gelplaten med vann og ta av gelen
4. Lag «sandwich» til blottingen ved å legge komponentene i denne rekkefølgen: en bunke med 6 filterpapir, nitrocellulosemembran, gelen, bunke med 6 filterpapir
5. Sandwichen fuktes med Trans-Blot-transfer-buffer
6. Fjern eventuelle luftbobler mellom gelen og membranen ved å rulle forsiktig med en plastrulle
7. Legg sandwichen i kassetten i blottemaskinen, og sett på 25 V og 2,5 A i 15 min.

8.6.6 Ponceau S-farging og blokking av membran

1. Legg membranen i et traue med Ponceau S-løsning i 2-3 min.
2. Skyll membranen i et traue med dH₂O
3. Legg membranen på en glassplate og ta bilde
4. Klipp av kantene på membranen ved behov
5. Rull membranen forsiktig sammen og legg den i et 50 mL-rør, med proteinene vendt innover
6. Vask membranen i TBS-T 2x 5 min. på roterende plate ved RT
7. Legg membranen i ca. 5 mL blokkebuffer fra LI-COR
8. La stå i blokkebuffer i 1 time på roterende plate ved RT

8.6.7 Inkubering med antistoffer og fremkalling av membran

1. Legg membranen over i et rør med 1AB (**avsnitt 2.1 tabell 2.2**)
2. Inkuber over natten på rullebrett ved 4 °C, beskyttet mot lys
3. Fjern 1AB-løsningen
4. Vask membranen 3x 10 min. med TBS-T på rullebrett ved RT
5. Fjern TBS-T
6. Legg membranen i rør med 2AB (**avsnitt 2.1 tabell 2.2**) og inkuber i 1 time ved RT på rullebrett
7. Vask membranen 5x 5 min. med TBS-T på rullebrett ved RT
8. Ta ut membranen og tørk den på whatmanpapir i ca. 10 min.

9. Oppbevar membranen ved 4 °C i en lystett boks inntil fremkalling utføres
10. Fremkall membranen på Odyssey-CLx Imaging system, med membranen plassert med proteinsiden ned mot scanneren
11. Kvantifiser båndstyrke i ImageJ

8.6.8 Stripping av membran

1. Vask membranen i PBS flere ganger
2. Lag stripebuffer ved å fortynne NewBlot™ Nitro Stripping Buffer [5x] i dH₂O i forholdet 1:4
3. La membranen ligge i stripebuffer i 7-10 min. på rullebrett ved RT
4. Vask membranen i PBS 7x 3-5 min.
5. Vask membranen i TBS-T 3x 3-5 min.
6. Membranen kan videre blokkes (fra trinn 7 **avsnitt 8.6.6**) og nye antistoffer kan påsettes (**avsnitt 8.6.7**)

8.7 Immunocytokjemi i kyllingkornceller

Ble utført i svarte 96-brønnsbrett, forbehandlet med PLL og platet ut i ECM.

1. Fikser celler i MeOH [70 %] og oppbevar ved -20 °C inntil analysen skal utføres
2. Fjern MeOH
3. Tilsett 100 µL iskald PBS
4. Fjern PBS og tilsett nye 100 µL
5. Fjern PBS
6. Tilsett 100 µL blokkebuffer (**tabell 7.17**)
7. Inkuber over natten ved 4 °C eller i minst 2 timer ved RT
8. Fjern blokkebufferen
9. Tilsett 50 µL 1AB-løsning (**avsnitt 2.1 tabell 2.2**) i NaAzid [0,02 %] i hver brønn
 - Blank: tilsett tilsvarende volum NaAzid [0,02 %]
 - Ta noen få brønner av gangen slik at ingen brønner blir stående tomme i flere min.
10. Inkuber over natten ved 4 °C eller i 1 time ved RT beskyttet mot lys
11. Fjern 1AB-løsningen
 - 1AB-løsning kan spares og gjenbrukes. Før gjenbruk må 20 % nytt 1AB fylles på.

12. Vask brønnene med 150 μ L PBS 3x 5 min.
13. Tilsett 100 μ L 2AB-løsning (**avsnitt 2.1 tabell 2.2**) i NaAzid [0,02 %] i hver brønn
14. Inkuber i 1-2 timer ved RT beskyttet mot lys
15. Fjern 2AB-løsningen
 - Ta noen få brønner av gangen slik at ingen brønner blir stående tomme i flere minutter
16. Vask med 150 μ L PBS 5x 2-5 min.
17. Tilsett 100 μ L NaAzid [0,02 %]
18. Undersøk fluorescens i mikroskop eller IncuCyte, og avles på plateleser ved ex 488/em 535 og ex 594/em 630 (ved bruk av Alexa Fluor 488 og Alexa Fluor 594)