



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2017 60 stp
Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM)

Effekten av eggeskallmembranpulver og dens derivater på fibroblastaktivitet som er viktig for sårheling

The Effect of Eggshell Membrane Powder and its
Derivatives on Fibroblast Activity Important for
Wound Healing

Kristiane Brathagen
Master i bioteknologi, biokjemi

Forord

Arbeidet med denne oppgaven ble utført fra august 2016 til august 2017 ved Nofima AS, avdeling råvare og prosess. Veiledere ved Nofima har vært Mona E. Pedersen og Tram Thu Vuong, mens Vincent Eijsink har vært veileder ved NMBU. Arbeidet er et samarbeid mellom Nofima og Biovotec AS og har mottatt økonomisk støtte fra forskningsrådet (NFR 235545).

Jeg er veldig takknemlig for muligheten til å jobbe med et så spennende prosjekt et helt år. Dette har vært en til tider krevende prosess hvor jeg har blitt utfordret både personlig og faglig, men aller mest har det vært interessant og veldig lærerikt.

Først på takkelisten er mine to veiledere ved Nofima. Jeg vil takke Tram for tålmodig opplæring på lab, for opplæring i utregningsmetoder, for tilbakemeldinger på innholdet i masteroppgaven, og for alltid å være tilgjengelig for mine spørsmål. Jeg vil takke Mona for supergod veiledning gjennom hele skriveprosessen av masteroppgaven og for at også hun er tilgjengelig til å svare på spørsmål. I tillegg vil jeg takke Ragnhild Stenberg Berg for alltid å svare på det jeg måtte lure på, og for trivelig timer sammen på cellelaboratoriet. Jeg vil også takke Henri-Pierre Suso for innføring i prosessen om veien fra kun en ide til industriell produksjon av eggeskallmembran og produksjon av et sårhelingsprodukt.

Jeg vil takke gode venner som har gjort mange lange dager på lesesalen til en trivelig og festlig affære. Takk til kjæresten min for god støtte og tålmodighet, ikke bare gjennom masteroppgaven, men under hele studietiden. Til slutt vil jeg takke mine fantastiske foreldre og søster for støttende telefonsamtaler, gode ord og oppmuntringer. Tusen takk for hotellvirksomhet når jeg er hjemme, takk for at dere holder munn når jeg trenger arbeidsro og aller viktigst; takk for at dere alltid har tro på meg.

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet

Ås, 15. august 2017

Kristiane Brathagen

Sammendrag

Sår som ikke vil gro er en av de største økonomiske utgiftene innen medisin i dag, og med en økning av den eldre befolkningen er det forventet at det vil skje en økning i pasienter med kroniske sår. Eggeskallmembranen som er et overflødig biprodukt fra eggeindustrien, har i flere hundre år blitt benyttet som en naturlig bandasje inne kinesisk medisin. Nylig er det også vitenskapelig bevist at eggeskallmembranen har fremmede effekt på sårhelingsprosessen. På grunnlag av dette er det ønskelig å utvikle nye og effektive sårhelingsprodukter som er basert på eggeskallmembran for å imøtekomme samfunnets behov. Hovedmålet med denne oppgaven er å forstå mekanismen og undersøke om industrielt oppskalert eggeskallmembranpulver (PEP) har en positiv virkning på fibroblastaktivitet som er viktig i en sårhelingsprosess. Effekten av derivater av eggeskallmembran, hydrolysert eggeskallmembranpulver (Hydrol) og karbohydrater fra eggeskallmembranpulver (Carb), med ulike sammensetninger og egenskaper ble også studert for å kunne skape et mest mulig effektivt sårhelingsprodukt.

Humane dermale fibroblaster ble sådd ut i brønner hvor de etter et døgn ble stimulert med PEP, Hydrol og Carb i enten tre eller ti dager. Cellene ble deretter høstet, og ved hjelp av flere analysemetoder ble det sjekket om de ulike eggeskallmembranfraksjonene hadde påvirkning på ulike prosesser av fibroblastaktivitet. Prøvene ble analysert ved hjelp av real-time PCR, western blotting, zymografi, celleviabilitetsforsøk, proliferasjonsforsøk og fluorescens immuncytokjemi.

Resultatene viser at tilsetning av PEP til cellekultur stimulerer økt grad av proliferasjon og sen differensiering av fibroblaster. PEP gir også en tidlig reorganisering av cellulære aktinfilamenter og reduksjon av cellefestepunkter, og dette tyder på effekt på migrering av fibroblaster. I tillegg gir PEP en økt aktivering av matriks degraderingsenzymet MMP-2, som spiller en viktig rolle i cellemigrering, uten å ha noen signifikant påvirkning på proteinnivå av enzymet og dens regulatorer, MMP-14 og TIMP-2. I likhet med PEP gir Hydrol en økt stimulering av proliferasjon og differensiering av fibroblaster, samt en økt aktivering av MMP-2. Til forskjell fra PEP økte også Hydrol proteinekspressjon av MMP-2 og TIMP-2. Carb har generell liten eller ingen påvirkning på disse prosessene. Carb har derimot i likhet med Hydrol, og i motsetning til PEP, en stimulerende effekt på økt produksjon av ekstracellulære matrikskomponenter.

Resultatene fra denne masteroppgaven viser at eggeskallmembranpulver har en positiv effekt på fibroblastaktivitet som er viktig for sårheling, og at ESM-fraksjoner påvirker fibroblastaktiviteten forskjellig, trolig på grunn av ulike egenskaper.

Abstract

Delayed wound healing is one of the biggest economic expenses in medicine today, and with an increase of the elderly population, is it expected that there will be an increase in patients with chronic wounds. The eggshell membrane, a by-product of the egg industry, has been used for a hundred years as an alternative natural bandage in Chinese medicine. It has recently been scientifically demonstrated that the eggshell membrane has a beneficial effect on the wound healing process. Based on this, it is highly warranted to develop new and effective wound healing products based on eggshell membranes to meet the needs of the society. The aim of this thesis is to reveal whether industrial separated eggshell membrane powder (PEP) intended for industrial production of a low cost wound healing product, has a positive effect on fibroblast activities important in wound healing process. The effect of derivatives of eggshell membranes, hydrolysed eggshell membrane powder (Hydrol) and carbohydrates from eggshell membrane powder (Carb), were also studied, in order for it to be able to reveal the most effective wound healing ingredient.

Human dermal fibroblasts were seeded in culture wells and stimulated with PEP, Hydrol and Carb for either three or ten days. The cells were then harvested and investigated by different analytical and molecular methods whether the different eggshell membrane fractions affected fibroblast activities. Samples were analysed by real-time PCR, western blotting, zymografi, cell viability assay, proliferation assay and fluorescent immuncytochemistry.

The results show that the supplement of PEP to fibroblast culture stimulates an increased rate of proliferation and late differentiation. PEP triggered also an early reorganization of cellular actin filaments and reduction of cellular attachment points, indicating an effect on fibroblast migration. In addition, PEP provides increased activation of the matrix degradation enzyme MMP-2, which is important for cell migration, without having any significant effect on the protein level of the enzyme and its regulators, MMP-14 and TIMP-2. Hydrol provides increased stimulation of proliferation and differentiation of fibroblasts, similar to PEP. Hydrol also stimulated an increased activation of MMP-2. Unlike PEP, Hydrol also increased the protein expression of MMP-2 and TIMP-2. Carb has generally little or no impact on these processes. Carb, on the other hand, like Hydrol, and unlike PEP, stimulate the increased production of extracellular matrix components.

The results of this master thesis shows that PEP has a positive effect on fibroblast activity that is important for wound healing, and that ESM derived fractions affect the fibroblast activity differently, probably because of their different properties.

Forkortelser

| | |
|-------------------|--|
| α -SMA | Alfa-glatt muskelaktin |
| AEBSF | 4-(2-aminoetyl) benzensulfonylfluoridhydroklorid |
| CaCl ₂ | Kalsiumklorid |
| Carb | Karbohydrater av eggeskallmembranpulver |
| dH ₂ O | Destillert vann |
| DDR | Dicodin domenereseptor |
| DMEM | Dulbecco Modified Eagle Medium |
| DPBS | Dulbeccoss fosfatbufret salin |
| DTT | Dithiothreitol |
| ED-A | Ekstradomene A |
| ELISA | Enzyme linked immunosorbent assay |
| ECM | Ekstracellulær matriks |
| ESM | Eggeskallmembran |
| FA | Fokale adhesjoner |
| FBS | Føtalt bovint serum |
| GAG | Glykosaminglykaner |
| HA | Hyaluronsyre |
| HCl | Hydrogenklorid |
| Hydrol | Hydrolysert eggeskallmembranpulver |
| MgCl | Magnesiumklorid |
| MMP | Matriks metalloproteinase |
| MT-MMP | Membrantype matriks metalloproteinase |
| NaCl | Natriumklorid |
| NaF | Natriumfluorid |
| PEP | Eggeskallmembranpulver |
| RIPA | Radioimmunutfallsprøvebuffer (Radioimmunoprecipitation assay buffer) |
| Real-time PCR | Real-time polymerase chain reaction |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SEM | Standardavvik av gjennomsnittet (Standard error of the mean) |
| TBS-T | Trisbufferet salin med Tween 20 |

| | |
|----------------|--|
| TGF- β 1 | Transformerende vekstfaktor beta 1 (Transforming Growth Factor- β 1) |
| TIMP | Vevshemmer av metalloproteinase (tissue inhibitor of metalloproteinase) |
| WB | Western blotting |

Innholdsfortegnelse

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Introduksjon | 1 |
| 1.1 | Hudens anatomi | 1 |
| 1.1.1 | Inflammasjon..... | 3 |
| 1.1.2 | Proliferasjon | 4 |
| 1.1.3 | Remodelering | 4 |
| 1.2 | Fibroblaster og myofibroblaster | 4 |
| 1.2.1 | Aktiviteten til fibroblaster og myofibroblaster..... | 7 |
| 1.3 | Rollen til ekstracellulære komponenter i sårheling | 8 |
| 1.3.1 | Kollagen type I..... | 9 |
| 1.3.2 | Dekorin..... | 10 |
| 1.3.3 | Biglykan | 10 |
| 1.3.4 | Syndekan-4..... | 10 |
| 1.3.5 | Samsillet mellom ECM og vekstfaktorer med fokus på TGF- β | 11 |
| 1.4 | MMPer og TIMPer | 13 |
| 1.4.1 | Regulering av MMP-aktivitet..... | 13 |
| 1.4.2 | MMP-aktivitet i sårheling | 15 |
| 1.4 | Komposisjon av eggeskallmembran..... | 15 |
| 2 | Målet med studien | 18 |
| 3 | Materialer og metoder | 19 |
| 3.1 | Fibroblaster og eggeskallmembran-fraksjoner | 19 |
| 3.1.1 | Medium for celledyrking..... | 19 |
| 3.1.2 | Tining og dyrking av celler | 20 |
| 3.1.3 | Splitting av celler | 21 |
| 3.1.4 | Utsåing av celler i 12-brønnersbrett..... | 22 |
| 3.1.5 | Høsting av celler til real-time PCR og WB..... | 23 |
| 3.2 | Kvantitering av mRNA..... | 25 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.2.1 | Isolering av RNA | 25 |
| 3.2.2 | Tillaging av cDNA | 27 |
| 3.2.3 | Real-time PCR..... | 28 |
| 3.2.4 | Kalkulering av relativ mRNA-ekspressjon..... | 29 |
| 3.3 | SDS-gelelektroforese og western blotting..... | 29 |
| 3.3.1 | Preparering av prøve | 30 |
| 3.3.2 | SDS-gelelektroforese | 31 |
| 3.3.3 | Blotting..... | 31 |
| 3.3.4 | Farging av membraner | 32 |
| 3.3.5 | Fremkalling | 33 |
| 3.4 | Zymografi | 33 |
| 3.5 | Celleviabilitet..... | 36 |
| 3.5.1 | Utrekning av prosent viabilitet..... | 37 |
| 3.6 | Proliferasjon..... | 38 |
| 3.6.1 | Celleoppsett i 96-brønners proliferasjonsplater | 38 |
| 3.6.2 | Lysering av celler | 38 |
| 3.7 | ELISA..... | 39 |
| 3.7.1 | Forberedelser av plate | 39 |
| 3.7.2 | Analyseprosedyren | 40 |
| 3.8 | Fluorescens immuncytokjemi..... | 41 |
| 3.8.1 | Farging av celler..... | 41 |
| 3.8.2 | Analysering i fluorescensmikroskop | 43 |
| 3.9 | Statistikk | 43 |
| 4 | Resultater..... | 44 |
| 4.1 | ESM-fraksjoners effekt på proliferasjon og ekstracellulær matriksproduksjon hos fibroblaster | 44 |
| 4.2 | ESM-fraksjoners effekten på fibroblastdifferensiering og migrering | 47 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.2.1 | Effekten på α -SMA-ekspressjon..... | 47 |
| 4.2.2 | Effekten av PEP på cellemigrasjon | 49 |
| 4.3 | ESM-fraksjoners effekt på MMP-2, og dens regulatorer | 53 |
| 4.3.1 | Effekten på MMP-2..... | 53 |
| 4.3.2 | Effekten på regulatorer av MMP-2-aktivitet (MMP-14 og TIMP-2)..... | 55 |
| 5 | Diskusjon..... | 58 |
| 5.1 | Effekten av PEP på fibroblastaktivitet..... | 58 |
| 5.1.1 | Effekt av PEP på proliferasjon og ekstracellulær matriksproduksjon..... | 58 |
| 5.1.2 | Effekt av PEP på fibroblastdifferensiering og migrering..... | 59 |
| 5.1.3 | Effekten av PEP på MMP-2 og dens regulatorer | 61 |
| 5.2 | Effekten av Hydrol og Carb på fibroblastaktivitet | 62 |
| 5.2.1 | Effekten av Hydrol og Carb på proliferasjon og ekstracellulær matriksproduksjon..... | 62 |
| 5.2.2 | Effekten av Hydrol og Carb på fibroblastdifferensiering..... | 64 |
| 5.2.3 | Effekten av Hydrol og Carb på MMP-2 og dens regulatorer..... | 64 |
| 5.3 | Metodiske betraktninger | 65 |
| 6 | Konklusjon | 66 |
| 7 | Videre arbeid | 68 |
| 8 | Referanser..... | 69 |
| 9 | Vedlegg | i |

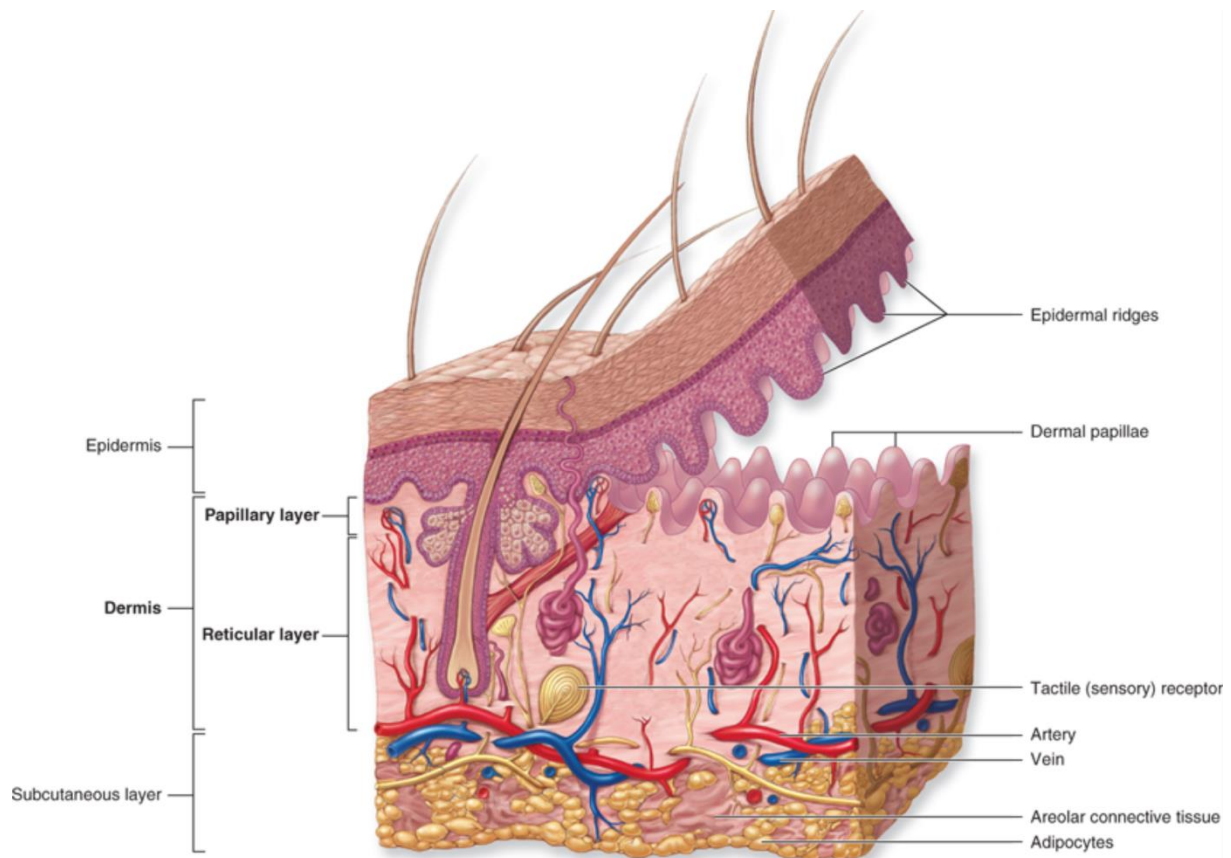
1 Introduksjon

Sår som ikke vil gro er årsak til en av de største økonomiske utgiftene innen medisin i dag. Rundt 1 % av Europas befolkning er plaget med kroniske sår, og nesten 2 % av helsebudsjettet brukes for å behandle kroniske sår (Schreml et al. 2010). I Norge i dag har mer enn 50 000 mennesker kroniske sår, ca. 15 000 av disse har aktive sår og får behandling for disse (Micaelsen et al. 2017). Gjennom en studie gjort i 2012 ble det fastslått at kostnadene for behandling av kroniske leggsår av en pasient koster i gjennomsnitt 103 532 kroner per år. Med ca. 6000 leggsårpasienter bare i Norge, vil kostnadene for behandling ligge på ca. 60 millioner per år (Rønse 2012).

Personer med kroniske sår har en betydelig redusert livskvalitet da de ofte lever med konstante smerter og frykt for å måtte amputere. Gjennomsnittsalderen for sårpasienter er 75 år, og med en økning av den eldre befolkningen forventer man også en økning i pasienter med kroniske sår (Micaelsen et al. 2017). Det er derfor viktig å utvikle nye og effektive lavkostnadsprodukter for å behandle kroniske sår.

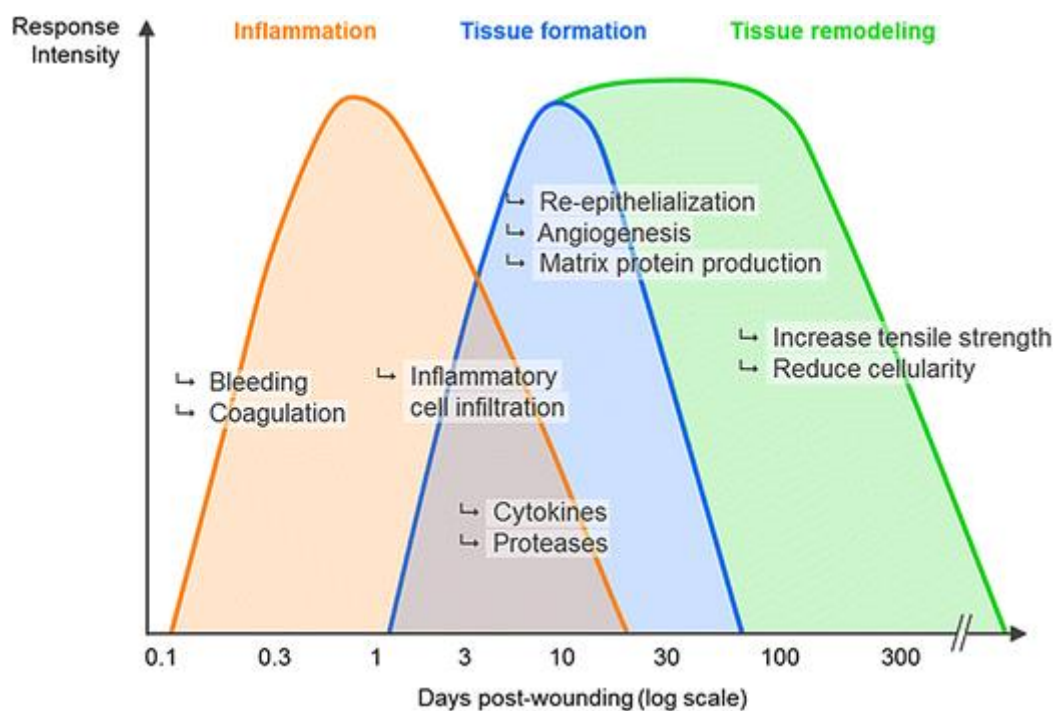
1.1 Hudens anatomi

Sårheling er en kompleks prosess som krever samarbeid mellom ulike celler i huden (Martin 1997). Huden hos mennesker består av tre lag (Rittié 2016). Det ytterste laget er kalt epidermis eller overhuden, og fungerer som en barriere mot ytre påvirkninger (Bielefeld et al. 2013). Dette laget består av epitelceller og epitelvev utgjør en av de fire forskjellige vevssortene som finnes hos mennesker (Holck 2016; Rittié 2016). Laget under epidermis er kalt dermis eller lærhuden og er det laget som utgjør mesteparten av huden. Fibrene i lærhuden er kollagene fibrer og elastiske fibrer (Langeland 2009). Kollagen og elastin sørger for de mekaniske egenskapene som er nødvendig i huden. Dermis er igjen delt opp i papillære dermis og retikulære dermis, hvor det papillære laget ligger øverst og har knotter som sørger for en stor kontaktflate med epidermis. Underhuden (subcutis) ligger under dermis og består av fett og bindevev. Vev består altså av ulike celler og ekstracellulær matriks (ECM), som består av proteiner og polysakkarider. (Bielefeld et al. 2013; Langeland 2009). En oversikt over lagene i huden, samt flere komponenter som er til stede i huden, er vist i Figur 1.



Figur 1: De tre hovedlagene i huden. Huden består av tre hovedlag; overhuden (epidermis), lærhuden (dermis) og underhuden (subcutis). Overhuden består av epitelceller. Lærhuden består av to lag: den øvre delen som er kalt papillære dermis, mens laget under er kalt retikulær dermis. Papillære dermis har en overflate som er formet som totter (papiller) som gjør at kontaktflaten mellom lærhuden og overhuden er betydelig større enn om den hadde vært flat. Underhuden består av fett- og bindevev. I de tre hovedlagene av hud finnes det talg- og svettekjertler, hårsekker, blodkar, nervefibre og spesialiserte føleorganer (Langeland 2009). Figuren er hentet fra (Mescher 2016).

Når det dannes sår i huden, blir huden reparert gjennom koordinerte biologiske hendelser, hvor det først skapes en hudbarriere som reduserer risikoen for infeksjoner (Bielefeld et al. 2013; Hu et al. 2014). Under sårheling er barrieren og mekaniske egenskaper i huden gjenopprettet ved hjelp av flere ulike celler og ekstracellulære komponenter (Bielefeld et al. 2013). Resultatet av dette er et nytt hudlag som kun er 80 % så sterkt som det opprinnelige vevet. Sårheling er en prosess som skjer over tid i tre overlappende faser: Inflammasjon, celleproliferasjon og remodelering (Hu et al. 2014). En oversikt over de tre fasene i sårhelingsprosessen er vist i Figur 2.



Figur 2: De tre overlappende fasene i en sårhelingsprosess, inflammasjon, proliferasjon/formering av vev og remodelering. Y-aksen viser responsintensiteten til de ulike fasene, og x-aksen viser hvor mange dager fasene strekker seg over. Varigheten til en remodeleringsfase varierer fra sår til sår og kan ta flere år. En del av prosessene som skjer i en sårhelingsprosess skjer ved overlappingen mellom to faser (Rittié 2016).

1.1.1 Inflammasjon

Når det dannes sår, skjer det en inflammatorisk respons, ved en rekruttering av ulike celletyper til såret (Hu et al. 2014). Først skjer det en vaskulær innsnevring og aggregering av fibrin (Guo & DiPietro 2010). Dette skjer ved hemostase hvor blodet koagulerer slik at blødningene stanser. Deretter skjer det en blodplateaggregering og degranulering, som til slutt danner en fibrinklump. Denne klumpen fungerer som en foreløpig matrise for migrering av inflammatoriske celler til såret (Bielefeld et al. 2013). Nøytrofiler og monocytter er inflammatoriske celler som kommer inn i såret ved hjelp av cytokiner. Det kan for eksempel være transformerende vekstfaktor beta-1 (TGF- β 1), blodplateavledet vekstfaktor, tumornekrosefaktor- α og interleukin-1 (Hu et al. 2014). Disse cytokinene er frigitt av blodplater. Nøytrofiler bryter ned bakterier og andre objekter i såret som ikke hører til der, samt at de sender ut cytokiner som oppregulerer ekspresjonene av ulike adhesjonsmolekyler på celleoverflaten. Etter dette differensierer monocytter til makrofager hvor de fortærer uønskede organismer, partikler og døde nøytrofiler. De frigir også TGF- β og andre cytokiner som stimulerer migreringen av fibroblaster og epitelceller inn i såret (Bielefeld et al. 2013).

1.1.2 Proliferasjon

I det andre steget i sårhelingsprosessen skjer det en celleproliferasjon med reepitelisering av epidermis og reparering av dermis (Bielefeld et al. 2013). Det oppstår nye kapillærer som sørger for næring til såret og bidrar til økt antall fibroblaster, som skal produsere ny ECM (Darby et al. 2014). Fibroblaster migrerer inn i såret ved hjelp av matriks metalloproteinase (MMPer), som er enzymer fibroblastene selv sekreterer. MMPer kløyver ECM og gjør det mulig for fibroblastene å migrere inn i såret (Nagase et al. 2006). Når fibroblastene er migrert inn i såret, produserer de vekstfaktorer som for eksempel TGF- β , og umodent ECM. Gjennom denne prosessen produserer de ny ECM bestående av umodne ECM-varianter, hvor en av disse er kollagen (Bielefeld et al. 2013).

Det å få lukket det åpne rommet i epitellaget er viktig for å klare å opprettholde en barriere mot omgivelsene. Gjenopprettelsen av denne barrieren skjer ved en kombinasjon av migrering, proliferasjon og differensiering av keratinocytter (overhudsceller) (Bielefeld et al. 2013).

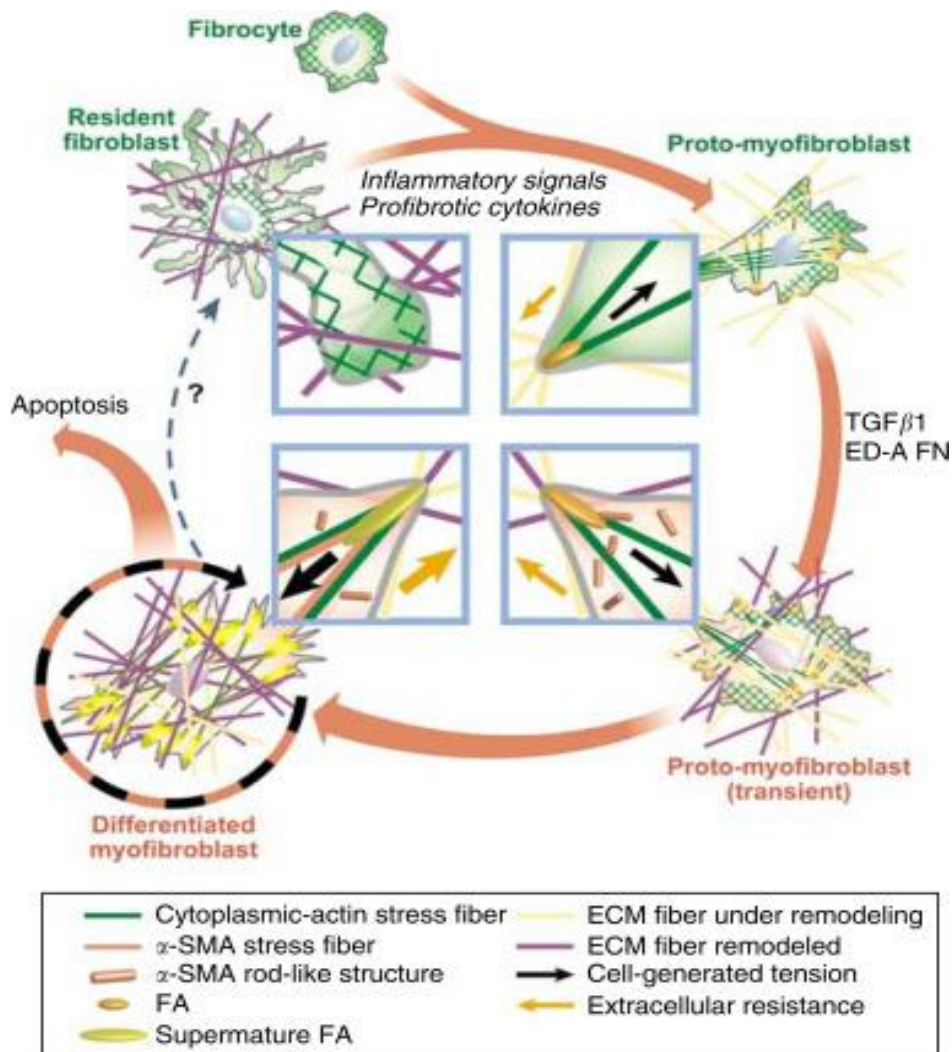
1.1.3 Remodelering

Etter at det har blitt avsatt ECM og det har skjedd en lukking av såret, skjer det en remodelering av såret med en nedbryting og erstatning av ECM (Bielefeld et al. 2013). Her er det viktig at ny ECM er så lik som mulig ECM-komponentene i normalt vev (Guo & DiPietro 2010). EDA-fibronektin og type III kollagen erstattes med kollagen type I, samt at det skjer en apoptose (celledød) av ulike celletyper. Resultatene av ECM-erstatning er dannelse av arrvev. Denne typen vev vil aldri bli like sterkt som det opprinnelige vevet. (Bielefeld et al. 2013). Det skjer også en regresjon av de nylig dannede kapillærene, slik at den normale vaskulære tettheten gjenopprettes. Lengden på remodeleringsfasen varierer mye og kan vare i opptil flere år (Guo & DiPietro 2010).

1.2 Fibroblaster og myofibroblaster

I løpet av en sårhelingsprosess er sammentrekning av et sår viktig. Dette skjer under proliferasjonsfasen, hvor det skjer en formering av granuleringsvev. I denne prosessen spiller fibroblaster og differensieringen av fibroblaster til myofibroblaster, samt deres samspill, en viktig rolle. Under den tidlige fasen ved dannelse av granuleringsvev differensierer fibroblastene som er i kontakt med såret til myofibroblaster (Li & Wang 2011). Fibroblaster som befinner seg i vev som ikke er skadet, differensierer ikke til myofibroblaster, da de ikke får kontraktile egenskaper og adhesjon mellom celler og matriks, ved hjelp av ekstracellulær matriks (Hinz 2007). Fibroblaster er spindelformede celler som spiller en viktig rolle i

produksjon av ECM, som for eksempel collagen og glykoproteiner. I tillegg sekreterer de MMPer og TIMPer (Vedrenne et al. 2012). Under sårhelingsprosessene migrerer fibroblaster inn i såret, prolifererer, syntetiserer ECM-komponenter og differensierer til myofibroblaster (Vedrenne et al. 2012). Overgangen fra fibroblaster til myofibroblaster skjer via dannelse av protomyofibroblaster. Etter sår dannelse i huden aktiverer inflammasjonssignalene fibroblastene, som responderer med å migrer inn i såret. Det skjer en formering av små fokale adhesjoner (FA) og stressfiber, som karakteriserer protomyofibroblaster. (Darby et al. 2014; Gabbiani 2003; Hinz 2007). Fokale adhesjoner er gruppering av integriner og tilhørende proteiner som medierer celleadhesjon og signalisering (Smilenov et al. 1999). Ved stimulering med vekstfaktorer og interaksjon med ECM-komponenter differensierer protomyofibroblaster til myofibroblaster (Gabbiani 2003). TGF- β 1 og ekstradomene A (ED-A) fibronektin stimulerer ekspresjon av alfa-glatt muskelaktin (α -SMA) i protomyofibroblaster, som deretter organiserer seg i en stavlignende struktur. Endring i strukturen av ECM gir en større overflate for adhesjonsformering, noe som gir sterke stressfibre og genererer sterkere sammentrekningskrefter. Dette fører til en supermoden fokal adhesjon, som gir en veldig høy intracellulær spenning. Ved denne prosessen blir α -SMA inkorporert i stressfibrene, og disse får en mye høyere styrke. Det skjer en sammentrekning av ECM og videre modning av fokal adhesjon (Hinz 2007). Stegene ved differensiering av fibroblaster til myofibroblaster er vist i Figur 3. Differensieringen til myofibroblaster er karakterisert ved uttrykkningen av α -SMA, da dette kun er produsert av myofibroblaster (Gabbiani 2003; Li & Wang 2011).



Figur 3: *Stegene involvert i differensieringen av fibroblaster til myofibroblaster.* Når fibroblaster ikke er aktive, fungerer de som bindevevsceller og kalles da fibrocytter (Holck 2014). Etter sårdannelse i huden aktiverer inflammasjonssignalene fibroblastene, som responderer med å migrere inn i såret. Det skjer en formering av små fokale adhesjoner og stressfiber, som karakteriserer protomyofibroblaster. TGF-β1 og ekstradomene A fibronectin (ED-A FN) stimulerer ekspresjon av α-SMA i protomyofibroblaster, som deretter organiserer seg i stavlignende struktur. Endring i strukturen av ECM gir en større overflate for adhesjonsformering, noe som gir sterke stressfibre og genererer sterkere sammentrekningskrefter. Dette fører til en supermoden fokal adhesjon som gir en veldig høy intracellulær spenning. Ved denne prosessen blir α-SMA er inkorporert i stressfibrene og disse får en mye høyere styrke. Det skjer en sammentrekning av ECM og videre modning av fokal adhesjon. Dette kjennetegner dannelsen av myofibroblaster (Hinz 2007). Under normale forhold undergår myofibroblastene apoptosis når vevsintegriteten er gjenopprettet, men de kan også differensiere til fibroblaster ved en rask etablering av celle-cellekontakt (Darby et al. 2014; Masur et al. 1996). Figuren er hentet fra (Hinz 2007).

Differensieringen av fibroblaster til myofibroblaster er en kompleks prosess som består av tre forskjellige prosesser: mekanisk spenning, TGF-β og ekstradomene A cellulær fibronectin (Gabbiani 2003). TGF-β er en viktig cytokin i sårhelingsprosessen ved at det induserer differensieringen av fibroblaster til myofibroblaster, og det er den mest aksepterte stimulatoren for differensieringen av fibroblaster til myofibroblaster (Desmoulière et al. 2005; Gabbiani 2003; Rahimi & Leof 2007).

Myofibroblaster er en type mellomceller uttrykt mellom fibroblaster og glatte muskelceller. De har en ultrastruktur som skiller dem fra fibroblastene, som inkluderer omfattende

cellematriksadhesjoner, intercellulære adherens og gap junction og bunter av kontraktile cytoplasmiske mikrofiler. Dette er assosiert med proteiner som er viktig for sammentrekning (Li & Wang 2011). Det er flest myofibroblaster under proliferasjonsfasen, men denne mengden minker under de senere stegene av sårhelingen. Aktiviteten til myofibroblaster minker og avsluttes helt når vevet i såret er reparert. Deretter minker mengden α -SMA i myofibroblastene (Hinz 2007) og de gjennomgår apoptose. (Darby et al. 2014; Li & Wang 2011).

1.2.1 Aktiviteten til fibroblaster og myofibroblaster

Det å produsere ECM er en av de viktigste jobbene til myofibroblaster. ECM-komponentene myofibroblaster produserer er kollagentypene I-IV og XVIII, samt glykoproteiner (peptidkjede med olisakkarider bundet til kjeden) og proteoglykaner (proteiner hvor en eller flere glykosaminokjeder kovalent bundet til kjeden) (Hardingham & Fosang 1992; Kornfeld & Kornfeld 1980; Li & Wang 2011). I tillegg produserer de andre matrisemolekyler som er en viktig del av sårhelingsprosessen, som glykosaminoglykaner (GAGer) (lineære polysakkarider som består av gjentatte disakkaridenheter av et aminosukker), hyaluronsyre (HA) og matrisemodifiserende proteiner som MMPer og vevshemmere av metalloproteinase (TIMPer) (Li & Wang 2011; Taylor & Gallo 2006).

En annen viktig rolle for myofibroblastene er å produsere sammentrekningskraft som fører til at kantene på såret trekker seg sammen. Også fibroblaster bidrar til denne sammentrekningskraften, og denne kraften oppstår ved at begge cellene produserer intracellulær spenning ved glidning av aktin- og myosinfilamenter ved hjelp av ATP (adenosin-5'-trifosfat) (Li & Wang 2011). Spenningen som oppstår er overført til ECM via fokal adhesjon, som er lokalisert i begge endene av stressfibre. Som et resultat av dette blir det produsert spenning som trekker sammen celler og matris (Gabbiani 2003; Li & Wang 2011).

α -SMA er en viktig komponent for å skape sammentrekningskraft hos myofibroblaster både *in vivo* og *in vitro*. I denne prosessen påvirker TGF- β 1 uttrykkningen av α -SMA direkte (Gabbiani 2003; Hinz et al. 2001; Li & Wang 2011). Reguleringen av α -SMA ved hjelp av TGF- β 1 hos myofibroblaster skjer ved en signaliseringsvei kalt Smad. Uttrykkningen av α -SMA er med på å forbedre sammentrekningskraften ved modifisering av stressfibre (Li & Wang 2011). Når myofibroblaster produserer α -SMA, får cellene en mye sterkere sammentrekningskraft enn protomyofibroblaster (Desmoulière et al. 2005). Det er vist ved en tydelig økt aktivitet til sammentrekningen av et sår ved økt mengde α -SMA. Dette gir en god

indikasjon på at det er direkte sammenheng mellom uttrykkningen av α -SMA og sammentrekningskraften til fibroblastene (Hinz et al. 2001).

Myofibroblaster er karakterisert av supermodne fokaladhesjoner (FA). Disse adhesjonene er lengre enn fokaladhesjonene hos fibroblaster som ikke produserer α -SMA. Ved differensiering av fibroblaster til myofibroblaster vil lengden på modent FA øke og endres til supermodent FA. Tilsetning av α -SMA til stressfibre gir en økt modning av FA og det er med på å stabilisere dette (Hinz et al. 2003). Dette gjør det ved å opprettholde en høy intracellulær kontraktile aktivitet og minke proteinomsetningen. Styrken på adhesjon for fibroblaster korrelerer med uttrykkningen av α -SMA. α -SMA er altså med på å øke adhesjonen for fibroblastene ved at det blir uttrykt mer supermodent FA. For å kunne danne supermodent FA i myofibroblaster er det nødvendig med høy spenning, og α -SMA er med på å skape denne spenningen. α -SMA øker sammentrekningen av stressfibre og dette er med på å øke den mekaniske styrken til FA (Hinz et al. 2003). Selv om myofibroblaster er karakterisert ved lange fokaladhesjoner, er α -SMA den beste markøren for myofibroblaster, da det er kun myofibroblaster som produserer dette (Desmoulière et al. 2005).

En av de viktigste funksjonene til sammentrekningskraften som skapes, er at fibroblaster og myofibroblaster kan migrere inn i såret, samt at det deformerer nettverket av ECM, noe som skaper stress. Stresset gjør at cellulære funksjoner moduleres og det opprettholder cellulære strekkfunksjoner (Li & Wang 2011).

1.3 Rollen til ekstracellulære komponenter i sårheling

ECM er den ikke-cellulære bestanddelen i et vev. Den består av kollagener, elastiske fibre, glykoproteiner og proteoglykaner, og danner til sammen et tredimensjonalt nettverk som omslutter celler (Li & Wang 2011; Taylor & Gallo 2006). Sammensetningen av ECM-komponenter og strukturen til disse varierer fra vev til vev. Forskjeller i dette påvirker biokjemiske egenskaper til det formede nettverket, samt signalene som overføres til cellene, og er dermed med på å modellere cellenes respons (Theocharis et al. 2016). ECM var lenge sett på som komponenter som kun utfylte rollen som et scaffold i et sår, men etter flere ulike studier er det vist at ECM er aktive komponenter i vevet som kan påvirke overlevelsen til celler, proliferasjon, differensiering, migrering og apoptose.

De fleste ECM-komponentene er konstant til stede i normal hud eller hud som er gjenopprettet etter sår dannelse. I et sår er det fibroblastene som produserer de fleste ECM-komponentene, og disse er igjen med på å påvirke funksjonene til fibroblaster etter at det har

blitt produsert (Tracy et al. 2016). ECM blir syntetisert og deponert på utsiden av cellene og skjer i respons til vekstfaktorer, cytokiner og mekaniske signaler via reseptorer på overflaten av celler (Schultz & Wysocki 2009).

De ekstracellulære komponentene i huden kan bli delt opp i fire hovedklasser; fiberformede strukturmolekyler, multidomene adhesiv glycoproteins, ikke-fiber strukturmolekyler og matricellulære proteiner (Schultz & Wysocki 2009; Tracy et al. 2016). Den første delen av ECM-komponenter, fiberformerene strukturmolekyler, er viktig for strukturen av alle ECM-komponentene i et sår. Den lager et komplekst tredimensjonalt scaffold av proteiner, og et eksempel på en slik komponent er kollagen (Tracy et al. 2016). Eksempler på den andre delen ECM er fibronectin, vitronectin og laminin. Disse spiller en rolle i interaksjoner mellom celler og ECM, og i celle-celleinteraksjoner. Den tredje delen av ECM består for det meste av proteoglykaner og GAGer. Disse komponentene omringer andre ECM-komponenter som for eksempel kollagen (Schultz & Wysocki 2009). Eksempler på noen proteoglykaner og GAGer som vi finner i sår er dekorin, hyaluronsyre, versican og dermatopontin. Matricellulære proteiner, som osteopontin, sekreterte proteiner og fibulin (med flere), har ingen strukturell funksjon, men er i kontakt med celleoverflate reseptorer, ECM, vekstfaktorer og proteaser (Schultz & Wysocki 2009; Tracy et al. 2016). I denne masteroppgaven har jeg sett på uttrykket til kollagen type I, dekorin, biglykan og syndekan-4, da de alle er viktige komponenter i sårhelingsfasen (Tracy et al. 2016).

1.3.1 Kollagen type I

En av hovedkomponentene av ECM i vev er kollagen (Midwood et al. 2004). Hele 30 % av den totale mengden protein i kroppen hos mennesker består av kollagen (Theocharis et al. 2016). Kollagen kan bli delt i to grupper: Fiberformerende kollagen og ikke-fiberformerende kollagen, og hele 28 ulike typer er definert. Kollagen type I hører til den første gruppen. Styrken til denne typen kollagen gjør den utrolig viktig og er derfor til stede i hele kroppen. 90 % av all kollagen i hud er kollagen type I, mens det er kun 10 % kollagen type III (Tracy et al. 2016).

Under sårhelingsprosessen danner kollagen, sammen med fibrin og fibronectin, et strukturelt nettverk som tillater adhesjon og migrering av celler, ved at de har ulik orientering (Midwood et al. 2004; Tracy et al. 2016). Tilstedeværelsen, fraværet eller mengden kollagen til stede er med på å påvirke funksjonene til fibroblaster. Fibroblaster er med på å produsere den tidlige spenningen til stede i ECM, men er også påvirket av dette (Tracy et al. 2016). Når såret er blitt lukket og cellene undergår apoptose er det kollagenrikt vev igjen der såret har vært.

Dette blir sakte remodelert i løpet av noen måneder, avhengig av hvor stort såret var i utgangspunktet (Midwood et al. 2004).

1.3.2 Dekorin

Dekorin er et ekstracellulært proteoglykan som tilhører proteoglykanfamilien (Järveläinen et al. 2006; Theocharis et al. 2016), og er det proteoglykanet det er mest av i huden til voksne mennesker. Gjennom klinisk praksis hvor kroniske sår har blitt behandlet med dekorin og andre ECM-komponenter, har behandlingen blitt vellykket (Järveläinen et al. 2006). Dekorin spiller en viktig rolle i kollagen fibrillogenese og kollagen degradering (Ferdous et al. 2010). Flere studier viser at dekorin er viktig for celleadhesjon, migrering og proliferasjon. Dette skjer gjennom binding til andre ECM-komponenter, regulering av aktivitet for flere ulike vekstfaktorer og binding av vekstfaktorreseptorer. Dekorin kan også påvirke reparasjon av celler og hemme apoptose. På grunnlag av alt dette kan dekorin påvirke og re-modellere skadet vev i en sårhelingsprosess (Järveläinen et al. 2006; Reed & Iozzo 2002). Dekorin kan binde til flere ulike typer kollagen, samt TGF- β 1 og andre proteiner (Reed & Iozzo 2002). Til TGF- β binder dekorin seg direkte og hemmer cellevekst (Theocharis et al. 2016). Interaksjonene mellom TGF- β og dekorin er kompleks, og det eksisterer to klasser av bindingssete med ulik affinitet (Hildebrande et al. 1992). Interaksjonen mellom dekorin og flere ulike komponenter viser at dekorin har en viktig rolle i sammenstillingen av ECM (Järveläinen et al. 2006), samt påvirke hemming i vekst hos ulike celletyper (Tracy et al. 2016).

1.3.3 Biglykan

Biglykan er i likhet med dekorin et ekstracellulær proteoglykan som det er mye av i huden (Theocharis et al. 2016; Tracy et al. 2016). Makrofager og fibroblaster uttrykker og skiller ut biglykan, som består av GAGer som er festet til N-terminalregionen. Denne ECM-komponenten er til stede i flere typer vev, og er for det meste lokalisert i nærheten av celler (Hildebrande et al. 1992; Zanotti et al. 2005). Biglykan kan blokkere bindingen mellom dekorin og TGF- β (Hildebrande et al. 1992), mens TGF- β øker ekspresjonen til biglykan (Kähäri et al. 1991). Biglykan er også et pro-inflammatorisk molekyl som påvirker inflammasjonsprosessen (Theocharis et al. 2016).

1.3.4 Syndekan-4

Syndekan-4 er til stede i væsken i dermale sår og er en viktig komponent i sårhelning (Alexopoulou et al. 2007; Woods & Couchman 2001). Syndekan-4 er type I membranproteoglykaner og er hovedtypen syndekan som er til stede i epitelceller. På et

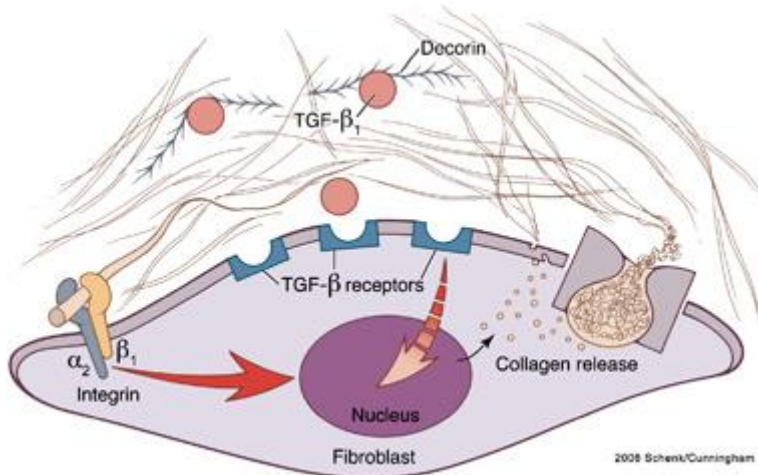
cellulært nivå er syndekan involvert i celle-celle- og celle-matriksinteraksjoner, migrering, proliferasjon og celledifferensiering. Syndekan-4 kan samhandle med ligander, og noen av disse ligandene kan være vekstfaktorer eller andre ECM-komponenter, som for eksempel kollagen, hvor syndekan-4 deltar i celleadhesjon. Syndekan-4 er den eneste av syndekanene som er til stede i fokale adhesjoner (Alexopoulou et al. 2007). Fokale adhesjoner er signaliserende komplekser med kontaktpunkter mellom celler og ECM. Signaler fra disse fokale adhesjonene påvirker celleadhesjon, genuttrykking, apoptose og cellyklus. Fokale adhesjoner er formet av celler i respons til adhesjon av ECM-ligander. Interaksjoner mellom ekstracellulær matriks og cyoskjelettet til aktin, og stressfibre til mikrofilamenter, gjør at kraften på ECM sørger for formering av matriks og lukking av sår (Woods & Couchman 2001). Celler kan for eksempel binde seg til fibronectin, men de lager ingen stressfibre eller fokal adhesjon med mindre et heparinbinde (HepII) domene i fibronectin er til stede, og i denne prosessen er syndekan-4 viktig (Alexopoulou et al. 2007).

1.3.5 Samspillet mellom ECM og vekstfaktorer med fokus på TGF- β

I akutte sår som leges normalt skjer samhandlingen mellom ECM og vekstfaktorer problemfritt, og overgangen til de ulike fasene foregår problemfritt. I kroniske sår er det derimot observert en forstyrrelse i samhandlingen mellom vekstfaktorer og ECM.

Under alle fasene i en sårhelingsprosess er interaksjonen mellom ECM, vekstfaktorer og celler viktig. Disse komponentene samhandler i en serie hendelser som er omtalt som dynamisk gjensidighet. ECM kan binde eller friggi bestemte vekstfaktorer, og er på denne måten med på å kontrollere aktiviteten til vekstfaktorene direkte. Gjennom denne prosessen er ECM med på å lagre vekstfaktorer i nærhet til cellene og sørger for at de ikke blir degradert. Lagring og frigivelsen av vekstfaktorer påvirker flere prosesser, som at det forlenger aktiviteten til vekstfaktorer og det skaper en variasjon av intensiteten til vekstfaktorene. Bindingene mellom ECM-komponenter og vekstfaktorer kan skje gjennom to forskjellige måter, enten direkte eller indirekte. I de direkte bindingene er det en fysisk interaksjon mellom ECM og vekstfaktorer. Et eksempel på dette er interaksjon mellom ECM, som for eksempel dekorin og biglykan, og vekstfaktoren TGF- β 1. Normal aktivitet av TGF- β 1 induserer aktiviteten til dekorin og biglykan, men hvis TGF- β 1 bindes til biglykan eller dekorin skjer det en hemming av aktiviteten til TGF- β 1. Dette er vist i Figur 4, hvor TGF- β 1c ikke kan binde seg til TGF- β reseptorer når det er bundet til dekorin. Ved en indirekte binding fester ECM seg til celler via integriner. Dette er reseptorer på overflaten til cellene, som ved

binding til ECM sørger for at cellene kan respondere til vekstfaktorer og kan indukere ekspresjon av vekstfaktorer (Schultz & Wysocki 2009).



Figur 4: *Mekanismen for TGF- β s påvirkning av ECM-regulering.* Så lenge decorin er bundet til TGF- β hemmer den aktiviteten til TGF- β , ved å forhindre at TGF- β binder seg til TGF- β -reseptoren. Bindingen av TGF- β til reseptoren stimulerer syntese av kollagen. (Schultz & Wysocki 2009).

Som skrevet over har ECM-komponenter en stor påvirkning på aktiviteten til vekstfaktorer, men vekstfaktorer påvirker også reguleringen av ECM. Dette gjør de ved å stimulere celler slik at de øker sin produksjon av ECM-komponenter, eller sørger for høyere produksjon av MMP, slik at de bryter ned ECM. TGF- β stimulerer syntesen av kollagen og fibronectin, samt mange andre ECM-komponenter. I tillegg reduserer det proteolytiske degraderingen ved å redusere syntese av proteaser og stimulerer syntese av proteasehemmere. I tillegg øker TGF- β ekspresjonen av integriner som binder kollagen, fibronectin og vitronektin.

TGF- β er et polypeptid og er en del av TGF- β -superfamilie. Når TGF- β er sekretert er det bundet til ulike proteiner som gjør at det har en inaktiv form. For at disse skal bli aktive blir de aktivert via proteaser eller integriner som utfører konformasjonsendringer. TGF- β er viktig i flere prosesser av en sårheling, ved at det spiller en rolle i inflammatoriske cellers infiltrasjon i såret, på effekten til fibroblaster, som for eksempel proliferasjon av fibroblaster og lukking av selve såret. Også ved oppregulering av vekstfaktorer for bindevev er TGF- β viktig, hvor signaler fra TGF- β i fibroblaster gjør at disse faktorene blir oppregulert (Bielefeld et al. 2013). TGF- β er også med på å syntetisere α -SMA og stimulere produksjonen av kollagen type I (Gabbiani 2003). Signaliseringen til TGF- β gjennom sårhelingsprosessen er en kompleks prosess som involverer samarbeid mellom dermis og epidermis, som påvirker sluttresultatet av sårhelingen (Bielefeld et al. 2013).

1.1 MMPer og TIMPer

MMPer er nødvendige enzymer for helingsprosessen i et sår (Tregrove et al. 1999). Ved kutan sårhelig skjer det, som nevnt over, en rekke migrerende og remodelerende hendelser som krever aktivitet fra MMPer og deres naturlige hemmere; TIMP (Madlener et al. 1998). MMPer blir uttrykt i normalt vev, med MMP-2 som den mest vanlige uttrykte formen for MMP, og har en viktig rolle i sårheling (Parsons et al. 1997). Sårheling er en veldig kompleks prosess som krever den rette temporale og romlige uttrykkingen av signalmolekyler og deres reseptorer, cellulære adhesjonsmolekyler og ECM-proteiner. MMPer og deres hemmere kan prosessere mange av disse signalmolekylene og ECM-proteiner, og er derfor sannsynligvis involvert i kontrollen av alle aspekter i sårheling (Gill & Parks 2008). Kontroll på nedbrytning av ECM ved hjelp av MMPer spiller en viktig rolle for at fibroblastene skal kunne migrere inn i såret (Bielefeld et al. 2013; Kähäri & Saarialho-Kere 1997).

MMPer er en familie av proteolytiske enzymer, som i all hovedsak kan degradere alle ECM-komponenter i et sår. MMPer er en familie av sinkavhengige endopeptidaser. Generelt består MMPer av et enkelt peptid med et katalytisk domene som inneholder et høyt konserverte sinkbindende sete, samt et hengselområde og hemopeksinlignende område. (Kähäri & Saarialho-Kere 1997). Det er funnet 25 distinkte MMPer, og 24 av disse er funnet i pattedyr (Martins et al. 2013). De samme MMPene kan ha ulike roller ved ulike forhold (Page-McCaw et al. 2007). MMPene bli delt inn i ulike undergrupper og MMPene undersøkt i denne studien, MMP-2 og MMP-14, tilhører undergruppene gelatinase og membrantype MMPer (MT-MMPer) respektivt. (Kähäri & Saarialho-Kere 1997; Nagase et al. 2006). MMP-2 kalles også gelatinase-A eller 72 kDa gelatinase, mens MMP-14 også kalles MT-1-MMP (Kähäri & Saarialho-Kere 1997).

1.1.1 Regulering av MMP-aktivitet

Regulering og aktivering av MMPer er et kritisk steg, da en forstyrrelse i reguleringen av MMPer kan føre til en overproduksjon av MMPer. En overproduksjon kan føre til for høy grad av degradering av ECM og ødeleggelse av vev som igjen kan være en årsak til dannelse av kroniske sår (Tregrove et al. 1999). Aktiviteten til MMP-2 er regulert ved tre forskjellige mekanismer; transkripsjonell regulering, zymogen aktivering og hemming av proteolytisk aktivitet ved hjelp av TIMPer (Kähäri & Saarialho-Kere 1997; Morgunova et al. 1999). Regulering av MMPer skjer ved tett kontrollert prosesser i forhold til både sekresjon og aktivitet for å opprettholde normal vevsfunksjon (Martins et al. 2013; Parsons et al. 1997). I normale vev er aktiviteten til MMP veldig lav eller ikke-eksisterende, men aktiveringen og uttrykkingen av MMPer øker kjapt når det er nødvendig med aktiv remodelering av vev

(Martins et al. 2013). Alle MMPer er utskilt i en inaktiv pro-form (med unntak av MT-MMPer som er bundet til membranen), og disse krever aktivering for å kunne ha noen form for påvirkning av den ekstracellulære matriksen (Kähäri & Saarialho-Kere 1997). For at pro-MMPer skal bli aktive må de kløyves (Nagase et al. 2006). Dette representerer en viktig mekanisme for kontroll av MMPer.

MMPer er induisert på et transkripsjonsnivå ved en rekke cytokiner og vekstfaktorer, og en av vekstfaktorene som er med på å stimulere denne transkripsjonen er TGF- β .

En annen mekanisme er at medlemmer av metalloproteinasefamilien kan aktivere hverandre. Ved at MMPer kan aktivere hverandre skaper det et komplekst nettverk av proteaser i det ekstracellulære rommet (Kähäri & Saarialho-Kere 1997). Denne aktiveringen gjelder spesielt for MMP-2 og MMP-14, hvor MMP-14 aktiverer MMP-2. I det komplekse nettverket av proteaser skjer det i utgangspunktet en formering mellom proMMP-2 og TIMP-2, og i dette stadiet er MMP-2 inaktiv. Interaksjonene mellom proMMP-2 og TIMP-2 skjer gjennom interaksjoner mellom hemopexindomenet i MMP-2 og den ikke-hemmende C-terminusen i TIMP-2. MMP-14 kommer til og binder seg til den frie N-terminalen i TIMP-2, hvor TIMP-2 orienterer proMMP-2et til et annet nærliggende aktivt MMP-14. Disse to MMP-14 molekylene interagerer med hverandre og danner sammen med MMP-2-TIMP-2-komplekset et tetramerisk kvarternært kompleks. Ved at begge MMP-14 molekylene er bundet til komplekset med MMP-2 og TIMP-2, fungerer det ene MMP-14 molekylet som en reseptor for komplekset, mens det andre fungerer som en aktivator for MMP-2 (Nagase et al. 2006). MMP-14 kløyver MMP-2 ved et spesifikt sete, og dette fører til en aktivering av MMP-2 (Morgunova et al. 1999).

En tredje regulatorisk metode av MMP-aktivitet er hemming av MMP, hvor det er to hovedtyper hemming. Den ene er med α_2 -makroglobulin, som er et plasmaglykoprotein. Det hemmer de fleste proteinaser ved å fange de i makroglobulinen, slik at reseptorer kan «rydde dem ut av veien» (Nagase et al. 2006). Aktiviteten til MMPer er derimot mer spesifikt regulert av TIMPer (Kähäri & Saarialho-Kere 1997). Siden aktiviteten til MMPer spiller en viktig rolle i sårheling, og TIMPer er med på å regulere aktiviteten til MMPer, er balansen mellom disse to komponentene viktig (Nagase et al. 2006). Det er fire medlemmer av TIMP-familien; TIMP-1, -2, -3 og -4 (Gill & Parks 2008). TIMP-2 hemmer aktiviteten til MMP-2 (Vaalamo et al. 1999) ved å binde til en 1:1 molar ratio, og danner tette ikke-kovalente komplekser mellom N-terminaldomenet på TIMP-molekylet og det aktive setet på MMP-2. TIMP koordinerer det katalytiske setet Zn^{2+} og binder seg til det aktive området i MMP-2 (Gill &

Parks 2008). En annen måte TIMP hemmer aktiviteten til MMP-2 på, er ved å binde seg til det aktiverende MMP-14-molekylet i proMMP-2-aktiveringskompleks, og forhindrer at MMP-14 aktiverer MMP-2 (Nagase et al. 2006).

1.1.2 MMP-aktivitet i sårheling

Gjennom forskning har det blitt påvist og akseptert at ekstracellulær proteolyse ved hjelp av MMP ikke bare er en mekanisme hvor strukturer og informasjon blir ødelagt, men at MMPer også er med på å friggi vekstfaktorer som er bundet til ECM eller cellemembranen, i tillegg til at det aktiverer andre MMPer (Gill & Parks 2008; Page-McCaw et al. 2007). Proteolysen fører til aktivering av latente proteiner og generering av nye bioaktive molekyler (Page-McCaw et al. 2007).

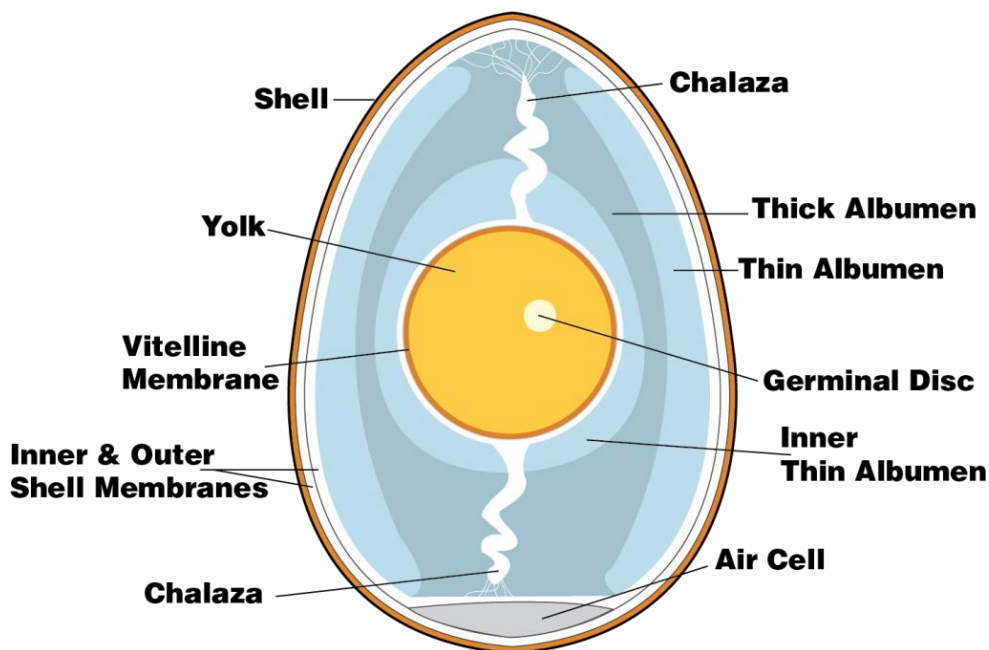
MMP-2 fordøyer ECM-molekyler, innbefattende type IV, V og XI av kollagener. Mens MMP-14 har kollagenolytisk aktivitet på kollagen type I, II og III. MMP-14 kan som beskrevet over altså aktivere proMMP-2 på overflaten, men det kan også degradere kollagen og andre ECM komponenter. Denne aktiviteten skjer ofte ved fronten av cellene når de migrerer gjennom ECM (Nagase et al. 2006).

1.4 Komposisjon av eggeskallmembran

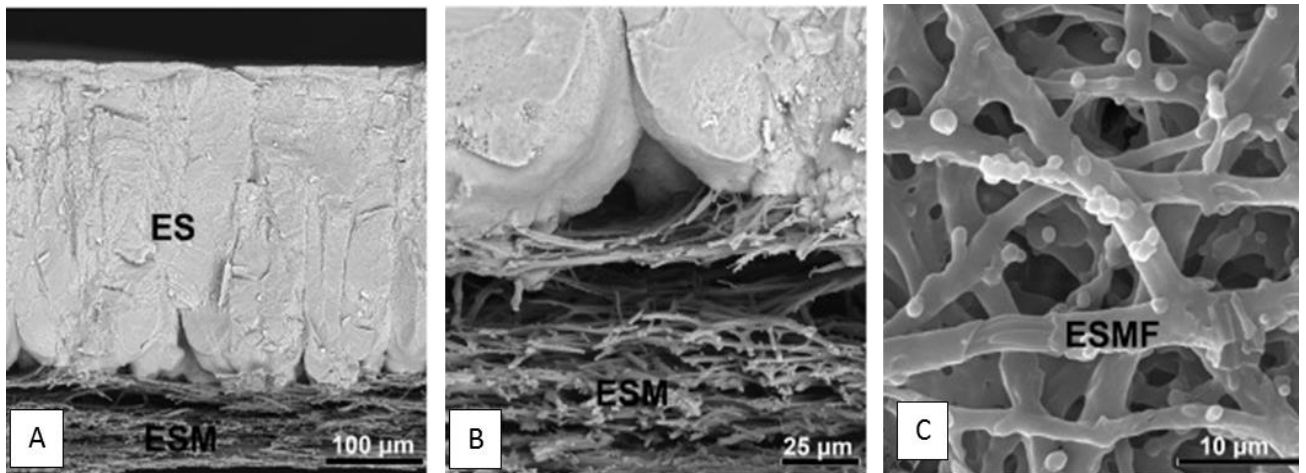
I flere hundre år har eggeskallmembran (ESM) blitt benyttet som naturlig bandasje innen kinesisk medisin (Sah & Rath 2016). I tillegg har sår tilsatt ESM, vist seg å vokse 21 % raskere i den tidlige fasen av sårheling enn sår som ikke er tilsatt ESM (Guarderas et al. 2016). Ved tidlige studier er det vist at kroniske sår tilsatt ESM kan begynne å gro eller sår som gror sakte kan begynne å hele raskere (Maeda & Sasaki 1982). Man vet derimot ikke så mye om den molekylære mekanismen som forårsaker at sårene gror raskere. ESM løses ikke opp i vann, og derfor er tidligere studier omhandlende ESM blitt utført med hydrolysert ESM, som er løselig i vann. Dette har vist at hydrolysert eggeskallmembran sørger for et ekstracellulært matriksmiljø for fibroblastene (Ohto-Fujita et al. 2011). Det er også blitt utført studier på karbohydratene til ESM som viser seg å ha antiinflammatoriske egenskaper (Vuong et al. 2017). Med grunnlag i at ESM i mange hundre år har blitt benyttet som en naturlig bandasje for sår har Biovotec, Nortura og Nofima startet utvinning og forskning på ESM for å kunne produsere et effektivt sårhelingsprodukt basert på ESM (Seehusen 2017).

ESM fra høner er et bioaktivt materiale som fungerer som et nettverk for biomineralisering ved fremstilling av eggeskallet (Liu et al. 2014). ESM ligger mellom eggeskallet og eggehviten, som vist i Figur 5. ESM består av en ytre og en indre membran med et fiberbasert nettverk (Ahmed et al. 2017). Strukturen til dette fiberbaserte nettverket er vist i Figur 6.

Tykkelsen på ESM er gjennomsnittlig 70 μm . Denne membranen er med på å beskytte eggehvite og eggeplomme mot bakterier. ESM har en porøs struktur, og har mange unike egenskaper som er en fordel ved bruk i sårhelingsprodukt. Det er lett tilgjengelig, biokompatibelt, ikke forurenset, og det er et grønt materiale som er overskudd av (Sah & Rath 2016). ESM består for det meste av proteiner, hele 251 proteiner er indentifisert, og ca. 10 % av alle proteiner i membranen består av ulike typer kollagen. I tillegg består membranen av små mengder av karbohydrater og lipider (Ahmed et al. 2017). Den kjemiske sammensetningen i den indre og ytre membranen varierer, og det samme gjør morfologien. Den ytre eggeskallmembranen inneholder for det meste kun kollagen type I, mens i den indre membranen er det både type I og V kolagen (Sah & Rath 2016). I det strukturelle nettverket er det karbohydrater, som for eksempel GAGer (Liu et al. 2014), og det har blitt påvist ulike strukturer av GAGer i rått ESM. Disse er interessante da det er vist at de spiller en rolle i både pro- og antiinflammatoriske prosesser (Taylor & Gallo 2006).



Figur 5: Anatomi til et egg. Ytterst ligger eggeskallet, med den indre og ytre eggeskallmembranen innenfor skallet. Mellom eggeplommen og eggeskallmembranen ligger eggehviten. Det er to typer av eggehviten; den indre og ytre tynne eggehviten som for det meste består av vann og proteiner, og den tykkere. (Albumen er proteinene i eggehviten.) I midten av egget ligger eggeplommen med en plommemembran ytterst, og et embryo inne i plommen. Mellom den indre membranen og eggeplommen er det festet en plommestreng (Anatomy egg 2017).



Figur 6: **Eggeskall og fiberstruktur til eggeskallmembran.** Skannende elektronmikrografi som i A) viser forholdet mellom eggeskallmembran (ESM) og forkalket eggeskall (ES). Bilde B) og C) viser det fiberbaserte nettverket som er til stede i eggeskallmembranen (Ahmed et al. 2017).

2 Målet med studien

For å kunne skape et effektivt sårhelingsprodukt basert på ESM, og for å redusere produksjonskostnadene, er det viktig å skjønne mekanismen for hvorfor sår tilsatt ESM gror raskere enn sår som ikke er tilsatt ESM. Det er ønskelig å kunne produsere et effektivt lavkostnadsprodukt for sårheling som er basert på ESM. Fra studier gjort tidligere vet man at ESM er et bioaktivt materiale (Yi et al. 2003). Man vet også at eggeskallmembranpulver (PEP) har antiinflammatoriske egenskaper, mens karbohydrater av PEP (Carb) har både pro- og antiinflammatoriske egenskaper (Vuong et al. 2017). Derfor har målet med denne oppgaven vært å studere sårhelingseffekten av industrielt oppskalert PEP og vannløselige derivater (Hydrol og karbohydrater av PEP), med fokus på fibroblastaktivitet. Det har blitt studert om de ulike ESM-fraksjonene gir en ulik grad av påvirkning av fibroblastaktiviteten, for å få en indikasjon på hvilken ESM-fraksjon det er som er best egnet i et sårhelingsprodukt. Det er fokusert på fibroblastaktivitet, da dette er en viktig prosess i sårheling ved at det produserer MMPer, TGF- β og ECM (Bielefeld et al. 2013). Differensiering av fibroblaster til myofibroblaster er også en viktig del av fibroblastaktiviteten (Li & Wang 2011). PEP-fraksjonen er billigst å produsere da den kun består av ESM i pulverform, mens Hydrol og Carb derimot er blitt produsert gjennom flere ulike prosesser, som gir en økning i både produksjonskostnad og tid (Vuong et al. 2017). Hovedhypotesene for denne oppgaven har vært:

- PEP har en positiv påvirkning på fibroblastaktivitet som er viktig for sårheling.
- ESM-fraksjonene påvirker fibroblastaktiviteten ulikt på grunn av ulike egenskaper.

Få å teste om PEP, Hydrol og Carb påvirker fibroblastaktiviteten er det benyttet tre delmål gjennom studien:

- i. Studere effekten av PEP og derivatene på fibroblastproliferasjon og viabilitet. Samt studere effekten på produksjonen av ulike ECM-komponenter.
- ii. Studere effekten av PEP og dens derivater på differensiering og migrering av fibroblaster.
- iii. Studere effekten av PEP og dens derivater på aktiviteten til MMPer.

3 Materialer og metoder

Alt av materialer og kjemikalier benyttet i denne oppgaven er notert i Tabell A-I som ligger i vedlegget.

3.1 Fibroblaster og eggeskallmembran-fraksjoner

I dette forsøket er det benyttet primære humane dermale fibroblaster, som kommer fra vevstypen hud fra voksne mennesker. Alle forsøk med fibroblaster ble utført i et sterilt avtrekkskap som ble vasket med 70 % etanol før bruk. Alt utstyr ble nøye vasket med 70 % etanol og tørket før det ble plassert i avtrekkskapet. I tillegg ble det benyttet hansker under alle forsøkene, for å unngå kontaminering av prøvene.

Ved alle de utførte forsøkene ble fibroblastene behandlet med ulike ESM-fraksjoner for å se om de ulike fraksjonene hadde ulik påvirkning av aktiviteten til fibroblastene. De ulike ESM-fraksjonene benyttet i denne masteroppgaven var: PEP, Hydrol og Carb. I tillegg ble det benyttet TGF- β 1 som positiv kontroll. Eggeskallmembranene benyttet i forsøkene i denne oppgaven var fra Nortura og kom fra godkjente hønseegg brukt i matproduksjon (Ahmed et al. 2017). Eggeskallet ble behandlet og pulveret ble produsert gjennom en patentert prosess som Biovotec eier (patentnummer: WO 2015/058790 A1). PEP består av kollagen, glykoproteiner, antibakterielle proteiner og karbohydrater, og har en fiberlignende struktur. Hyaluronsyre er hovedtypen GAG som er til stede i PEP, mens de resterende GAGene er kondroitinsulfat (Vuong et al. 2017). Hydrol-fraksjonen er PEP som er hydrolysert ved hjelp av natriumhydroksid. Hydrolyseringen sørger for at proteinene i ESM blir kuttet opp i mindre peptider, og derfor kan denne fraksjonen inneholde andre peptider enn i PEP-fraksjonen (Ahmed et al. 2017). Carb, derimot, består kun av karbohydratene som er til stede i ESM, og ingen proteiner. Carb inneholder sulfaterte og usulfaterte GAGer og andre typer glykaner med molekylervekt større enn 6 000 Da. Fraksjonene har ulike fysiske og kjemiske egenskaper. PEP er ikke løselig og opprettholder sin opprinnelige fibrillære struktur ved fortykning i medium, mens Hydrol og Carb derimot er løselig (Vuong et al. 2017).

Pulveret av de ulike fraksjonene ble fortennet i medium før de ble tilsatt fibroblastene. De ulike konsentrasjonene benyttet for fraksjonene er 1mg/ml PEP, 1mg/ml Hydrol, 0,01 mg/ml Carb og 10 ng/ml TGF- β 1.

3.1.1 Medium for celledyrking

For å effektivt kunne vokse fibroblaster *in vitro* må cellene bli introdusert til et miljø som er så likt som mulig miljøet *in vivo*. Dette er også viktig for at prosessen skal være mest mulig

lik det som skjer *in vivo*. Cellene må ha tilstrekkelig tilgang på rett næring gjennom hele perioden for cellevekst og differensieringsperioden. I tillegg er rette atmosfæriske betingelser (5 % CO₂) og temperatur (37° C) nødvendig. Mediet inneholder ulike antibiotika (Pen-Strep) for å hemme vekst av uønskede bakterier, samt Fungizone/Amphotericin som sørger for at det ikke vokser sopp.

Føtalt bovint serum (FBS) er en næringskilde som tilsettes mediet for optimal cellevekst. Dette er en kompleks blanding som inneholder flere ulike komponenter, som for eksempel vekstfaktorer, proteiner, vitaminer, sporelementer og hormoner. Disse er essensielle for vekst og opprettholdelse av cellene (van der Valk et al. 2010). FBS er blod uten celler, blodplater og koagulasjonsfaktorer og er hentet fra fosteret til kuer som er sendt til slaktning (Jochems et al. 2002).

Prosedyre:

- Pen-Strep, Fungizone/Amphotericin og FBS ble satt i vannbad for tining. For å få medium med 10 % FBS ble blandingsforholdene som vist i Tabell 1 benyttet. FBS, Pen Strep og Fungizone/Amphotericin ble tilsatt DMEM (1x) og blandet godt ved å vende på flasken flere ganger. Det ble også laget 2 % serum og serumfritt medium. Det ble da benyttet de samme mengdeforholdene av Pen Strep, Fungizone/Amphotericin og DMEM (1x) som vist i Tabell 1, men mengden FBS ble justert ned til volumet tilsvarende 2 %.

Tabell 1: De ulike komponentene og volumene som benyttes for å lage 10 % FBS medium. De samme komponentene ble benyttet for å lage 2 % FBS medium, men med et mindre volum av FBS, tilsvarende 2%. For å få serumfritt medium sløyfes FBS, men med samme volum av de andre komponentene.

| Reagenser og medium | Volum |
|------------------------|--------|
| DMEM (1x) | 500 ml |
| FBS | 50 ml |
| Fungizone/Amphotericin | 500 µl |
| Pen Strep | 500 µl |

3.1.2 Tining og dyrking av celler

Fibroblastene ble lagret i ampuller i nitrogentank med -210°C. Cellene må lagres så kaldt for å kunne bli gjenopplivet og gjennomgå flere dyrkningspassasjer. I hver ampulle var det 1 ml medium med 1 mill. celler.

Prosedyre:

- 30 ml 10 % FBS medium ble forvarmet i vannbadet ved 37 °C.
- En eller flere celleampuller ble tatt opp fra nitrogentanken. Cellene ble satt på is og tatt med til cellelaboratoriet.
- Deretter ble cellene tint opp i vannbadet ved å holde ampullen halvveis nede i vannet med en pinsett. Da det bare var en liten isklump igjen i ampullen, ble den tatt opp fra vannbadet, tørket godt, spritet og tørket godt igjen, før den ble satt i sterilbenken.
- Cellene i ampullen ble blandet godt ved å pipettere forsiktig opp og ned fem til seks ganger med en 1 ml pipette.
- Cellene ble deretter overført til et 15 ml sentrifugerør med 9 ml ferskt medium. Dette ble sentrifugert i 4 min ved 550xg.
- Mediet ble helt forsiktig av, slik at alle cellene ble liggende i bunnen av røret.
- Cellene ble resuspendert i 2 ml medium, og alt ble overført til en T75-flaske med 18 ml ferdig oppvarmet cellemedium.
- Deretter ble cellene satt i varmeskap. De stod i varmeskapet i to til tre dager før mediet ble sugd av og tilsatt nye 20 ml 10 % FBS medium for at cellene skulle ha tilstrekkelig med næring.

3.1.3 Splitting av celler

Fibroblaster som vokser i en flaske kan ikke bli for tett da dette er ugunstig for cellene. Ved for tett cellevekst vil fibroblastene kunne differensiere og forlate proliferasjonsstadiet. For å få nok antall celler til et forsøk ble cellene splittet for overføring til nye flasker. Dette ble gjort da cellene var 70-90 % konfluente. Grad av konfluens ble observert ved mikroskopering. Hvor ofte de ble splittet avhenger av hvor mange celler det var som ble sådd ut i flasken, og dager mellom splitting varierte fra to til fire dager. Hvis cellene hadde en ruglete ytterkant og hadde skrumpet inn, tydet det på ikke optimale forhold eller at de var døende (apoptotiske). Slike celler ble ikke benyttet videre i forsøkene. I alle forsøkene ble det benyttet celler som var i passasje 4-8. Det var viktig å ha kontroll på passasjene da fenotypen til cellene kan endre seg ved for høy passasje.

Prosedyre:

- Mediet i celleflasken ble sugd av og kastet.
- Cellene ble vasket en gang med 10 ml DPBS (1x). DPBS ble fjernet etter at det var blitt ristet forsiktig på flasken.

- Deretter ble 2 ml trypsin tilsatt i T75-flasken før den ble satt i inkubatorskapet ved 37 °C i 3 min. Trypsin kutter adhesjonsproteiner som forankrer cellene til underlaget.
- Etter 3 min ble cellene sjekket i mikroskopet. Hvis ikke alle cellene var blitt runde og løsnet fra underlaget, måtte de stå 1 min ekstra i inkubatorskapet før de på ny ble sjekket i mikroskopet. Var cellene runde og hadde løsnet fra underlaget, ble neste steg utført.
- Så ble 8 ml medium ble tilsatt T75-flasken. Dette ble fordelt godt i flasken, slik at alle cellene var med da alt ble ført over til et 15 ml sentrifugerør.
- Sentrifugerøret ble sentrifugert i 4 min ved 550 xg.
- Mediet ble helt av og cellene ble resuspendert i 2 ml ferskt medium. Dette ble blandet godt ved å pipettere forsiktig opp og ned.
- Så ble 10 µl cellesuspensjon blandet med 10 µl trypanblått, og blandet godt ved å pipettere forsiktig opp og ned. 10 µl av denne blandingen ble deretter plassert på et objektglass spesifikt for celletelling.
- Det ble regnet ut hvor mye celler det var som skulle bli overført til en T75-flaske. I en flaske skulle det være 5 000 celler for hver cm² i flasken. I en T75-flaske hvor det er 75 cm² ble det dermed 375 000 celler per flaske. Mengden levende celler registrert i cellesuspensjonen ble delt på 375 000, og dette resultatet utgjorde hvor mye av cellesuspensjonen som ble overført til en T75-flaske.
- Rett mengde cellesuspensjon ble overført til en T75-flaske med 20 ml 10 % FBS medium.
- Cellene ble satt i inkubatorskap med 37 °C til de ble splittet igjen etter to til fire dager.

3.1.4 Utsåing av celler i 12-brønnersbrett

Utsåing av celler i 12-brønnersbrett og inkubering ved tre og ti dager ble gjort for bruk i forsøk hvor det ble benyttet analysemetodene real-time PCR (real-time polymerase chain reaction), zymografi og western blotting (WB). Det ble utført litt ulike prosedyrer ved brettene som hadde ulik inkuberingstid.

Prosedyre:

- Konfluente celler ble splittet og celler i cellesuspensjonen ble benyttet til utsåing i 12-brønnersbrettene.
- Brett som ble inkubert i tre dager, ble sådd ut i 12-brønnersbrett. I hver brønn ble det tilsatt 200 000 celler i 2 ml 10 % FBS medium. Brønnene i brettene som ble inkubert i

ti dager inneholdt kun 100 000 celler blandet ut i 2 ml 10 % FBS medium. Dette for å unngå at cellene skulle bli for tette. Ved ferdig utsåing av celler ble brettene plassert i varmeskap ved 37 °C i ca. 24 timer. Dette ble gjort for at cellene skulle ha god nok tid til å feste seg til underlaget i brønnen.

- Etter ca. 24 timer inkubasjon ble mediet fjernet fra brønnene, og det ble tilsatt 1 ml serumfritt medium til cellene som skulle inkubere i tre dager. Brettene ble satt i varmeskap og inkubert i fire nye timer. Dette steget ble droppet for cellene som skulle inkubere i ti dager.
- Deretter ble eggeskallmembranfraksjonene fortynnet i medium. Fraksjonene som ble benyttet til tre dager inkubasjon ble fortynnet i serumfritt medium, mens fraksjonene som ble benyttet i ti dager inkubasjon ble fortynnet i 2 % FBS medium. Mediet i 12-brønnersbrettene ble fjernet fire timer etter tilsetning til brønnene, og 1 ml av hver fraksjon ble tilsatt hver sin brønn med celler. Deretter ble brettene satt til inkubering.
- Da cellene som skulle inkubere i tre dager hadde inkubert i 72 timer ble de høstet. Hvordan dette ble gjort er beskrevet i punkt 2.3.1.
- For cellene som ble inkubert i ti dager ble mediet i brønnen fjernet fem dager etter at fraksjonene ble tilsatt. Deretter ble det på nytt tilsatt fraksjoner blandet i 2 % FBS medium til brønnene. Her var det viktig at samme fraksjoner med samme konsentrasjon som tidligere ble tilsatt de aktuelle brønnene. Dette ble gjort for at fraksjonene skal klare å ha en effekt på differensieringen av cellene i hele ti dager. Deretter ble brettet igjen satt til inkubasjon ved 37 °C.
- Ni dager etter tilsetning av de første fraksjonene ble mediet fjernet fra brønnen og det ble tilsatt 1 ml serumfritt medium til alle brønnene, og igjen satt til inkubasjon ved 37 °C. Tilsetning av serumfritt medium ble gjort for å unngå at komponentene i det føtale bovine serumet (FBS) påvirket resultatet. FBS inneholder MMP, og hvis dette ikke ble fjernet kunne det gi høye MMP-verdier enn den reelle MMP-mengden som ble sekretert fra cellene. En annen grunn er at det skal analyseres hvor mye av ulike komponenter cellene sekreterer på et døgn etter ca. ti dager inkubasjon, istedenfor å se på hvor mye som blir sekretert til sammen over flere dager.
- 24 timer etter tilsetning av det serumfrie mediet ble cellene høstet.

3.1.5 Høsting av celler til real-time PCR og WB

Cellene fra 12-brønnersbrett ble benyttet i to ulike analyser; real-time PCR og WB blotting, mens cellemediet ble benyttet til zymografi. Høsting av celler for real-time PCR og WB skjer

med to ulike buffere. Det var viktig å oppbevare alle cellemedieprøver og celleprøver på is etter høsting for å unngå mest mulig degradering av RNaser eller proteaser.

Prosedyre:

- Cellemedium med de ulike fraksjonene ble samlet i hvert sitt eppendorfrør. Deretter ble eppendorfrørene sentrifugert ved 13 000 rpm i 5 min ved 4 °C. For å unngå at cellemediet skulle inneholde celler eller de ulike fraksjonene av eggskallmembran ble supernatanten overført til nye merkede eppendorfrør og fryst ved -20 °C.
- Cellelaget i bunnen av brønnen ble deretter lysert. Cellen som ble brukt i real-time PCR analyse ble lysert med 350 µl RLT-buffer (RNeasy kit, Quiagen), mens cellen for WB ble lysert med 200 µl RIPA-buffer. Reagensene i Tabell 2 ble benyttet for å lage RIPA-buffer. RIPA-buffer ble videre benyttet til å lage RIPA-lyseringsbuffer, som ble laget ferdig rett før lyseringen skulle skje. Blandingsforholdene for 1 ml RIPA-lyseringsbuffer er vist i Tabell 3.

Tabell 2: De ulike reagensene og tilhørende volum nødvendig for å lage 50 ml RIPA-buffer. 1 ml av denne bufferen blandes med reagensene i Tabell 3 for å lage RIPA-lyseringsbuffer.

| Reagenser | Blandingsforhold |
|--|------------------|
| NaCl | 150 mM |
| Natrium deoksykolat | 0,5 % |
| SDS | 0,1 % |
| Tris-HCl | 50 mM |
| Triton X-100 | 1 % |
| dH ₂ O til et sluttvolum på 50 ml | |

Tabell 3: Blandingsforholdet for de ulike komponentene for å lage RIPA-lyseringsbuffer. Reagensene som benyttes for å lage RIPA-buffer er beskrevet i Tabell 2. AEBSF er en blanding av flere typer proteasehemmere.

| Reagenser | Volum |
|-----------------|-------|
| AEBSF | 5 µl |
| Fosfatasehemmer | 10 µl |
| RIPA-buffer | 1 ml |

- Etter å ha tilsatt de ulike lyserings-bufferene ble det skrapet godt i bunnen av brønnen med en pipettespiss for å sørge for at alle cellene løsnet fra bunnen, før alt i brønnen ble ført over til et eppendorfrør. Dette ble gjort likt for alle brønnene.

- Celler lysert ved hjelp av RLT-buffer ble fryst ved -80 °C, og celler lysert med RIPA-lyseringsbuffer ble fryst ved -20 °C. Cellene ble lagret her til de ble benyttet videre i de ulike analysemetodene.

3.2 Kvantitering av mRNA

Real-time polymerase chain reaction (Real-Time PCR) ble benyttet for å kvantifisere relativ mRNA-ekspresjon. Denne metoden sørger for at cDNA blir amplifisert mange tusen til millioner ganger ved å bruke spesifikke oligonukleotider, varmestabil DNA-polymerase og termiske sykluser. Det er tre hovedsteg i real-time PCR. Ved det første steget skjer det en denaturering hvor det blir produsert singeltrådet DNA fra dobbeltrådet DNA under høy temperatur. Deretter skjer det en annealing hvor komplementære sekvenser har mulighet til å hybridisere, og det blir dannet cDNA. Til slutt skjer det en forlengelse av primeren med en hastighet på opptil 100 baser per sekund. Dette skjer ved hjelp av DNA-polymerase som har en optimal aktivitet ved 70-72° C. Ved å bruke en sekvensspesifisert primer er antallet kopier av en spesiell RNA-sekvens bestemt. Disse stegene utgjorde en syklus som ble utført 40 ganger. Real-time PCR-produktet ble målt kontinuerlig under real-time PCR-prosessen ved hver syklus ved hjelp av fluorescerende fargestoffer. Disse gir et fluorescenssignal som er direkte proporsjonal med mengden PCR-molekyler som er generert. Fluorescenssignalet kom fra en fluorescerende reporter som har bundet seg til en probe som hybridiserer med PCR-produkter under amplifisering. Før PCR-prosessen begynner er proben intakt og har en grad av fleksibilitet. Dette gjør at proben og quenchen, som er festet i hver sin ende av proben, er nær hverandre, og dermed fører til fluorescensresonans energioverføring (FRET). Dette går ut på at quencheren absorberer energien reporteren sender ut, og PCR-maskinen registrerer ingen fluorescenssignaler. DNA-polymerase forlenger så primeren oppstrøms for proben, og dette fører til at proben blir kløvet. Reporter og quencher er dermed ikke tilknyttet hverandre, og PCR-maskinen registrerer fluorescenssignalene reporteren sender ut (ThermoFisher Scientific 2016).

3.2.1 Isolering av RNA

Det er viktig at prøvene alltid stod på is for å unngå RNase-aktivitet i periodene de ikke ble sentrifugert. All sentrifugering skjer ved 4 °C. I prosessen for isolering av RNA ble kittene RNeasy[®] Mini Kit (50) og RNase-Free DNase Set (50) benyttet.

Prosedyre:

- Prøvene ble sentrifugert ved 13 000 rpm i 3 min ved 4 °C. Denne temperaturen ble benyttet i sentrifugen gjennom hele prosessen for isolering av RNA. Supernatanten ble overført til nye merkede rør.
- Deretter ble 350 µl 70 % etanol tilsatt de ulike prøvene (supernatanten) og blandet godt ved å pipettere opp og ned.
- Så ble 700 µl av prøven overført til en RNeasy spinkolonne og plassert i et 2 ml oppsamlingsrør. Dette ble sentrifugert i 15 sek ved 10 000 rpm, og eluatet ble kastet.
- Det ble tilsatt 350 µl RW1 buffer fra kittet til spinkolonnen, og prøvene ble sentrifugert ved 10 000 rpm i 15 sek.
- Deretter ble det tilsatt 80 µl DNase mix direkte på spinkolonnen, og inkubert ved romtemperatur i 15 min.
 - Før å få DNase mix ble det først laget DNase stockløsning ved å løse opp DNase i 550 µl RNase-fritt vann. Deretter ble 10 µl DNase stockløsning og 70 µl RDD buffer blandet for hver prøve.
- Så ble 350 µl RW1 buffer tilsatt spinkolonnen og sentrifugert i 15 sek ved 10 000 rpm. Eluatet ble kastet.
- Deretter ble 500 µl RPE buffer tilsatt spinkolonnen, og sentrifugert i 15 sek ved 10 000 rpm. Eluatet ble kastet.
- Nye 500 µl RPE buffer ble tilsatt spinkolonnen, og dette ble sentrifugert i 2 min ved 10 000 rpm. Etter dette steget ble både eluatet og oppsamlingsrøret kastet, og spinkolonnen ble plassert i et nytt 2 ml oppsamlingsrør.
- Spinkolonnen ble sentrifugert i 1 min ved 10 000 rpm, og oppsamlingsrøret kastet. Spinkolonnen ble plassert i nytt 1,5 ml oppsamlingsrør med lokk.
- Deretter ble det tilsatt 30 µl RNase-fritt vann direkte på membranen i spinkolonnen, før spinkolonnen ble sentrifugert i 1 min for å eluere RNA.
- For å øke utbyttet av RNA ble eluatet på nytt plassert på membranen i spinkolonnen. Deretter ble det sentrifugert en siste gang i 1 min ved 10 000 rpm.
- Utbyttet ble målt ved hjelp av Nano-drop. Her ble RNase-fritt vann benyttet som blank-prøve, og det ble benyttet 1 µl av hver prøve. Nano-drop er en metode som sørger for en kjapp kvantifisering av nukleinsyrener i en prøve. Nano-drop er et spektrofotometer som sender ut UV-lys med bølgelengder som nukleinsyrene absorberer. Nano-dropmaskinen registrerer mengden lys som ikke blir absorbert, og

ved hjelp av dette blir det bestemt hvor mye DNA eller RNA det er til stede i prøvene. I dette forsøket ble mengde RNA kalkulert.

3.2.2 Tillaging av cDNA

I real-time PCR er cDNA enkelttrådet DNA-molekyl som er komplementært til en singeltrådet RNA. Det er syntetisert av enzymet revers transkriptase ved å bruke mRNA som templat (Børresen-Dale 2016). Alt arbeid i denne prosessen foregikk på is. I prosessen for tillaging av cDNA ble TaqMan[®] Reverse Transcription Reagents benyttet.

Prosedyre:

- Det ble laget en Mastermix med alle reagensene for syntetisering av cDNA. Reagensene fra TaqMan[®] Reverse Transcription Reagents ble benyttet. Blandingsforholdet til de ulike reagensene, for en prøve, er vist i Tabell 4. Volumet til de ulike prøvene ble ganget opp med antall prøver som skulle bli analysert.

Tabell 4: Komponentene som er nødvendig for tillaging av Mastermix benyttet for syntese av cDNA til en prøve, samt deres volum. Volumet til de ulike komponentene ble ganget opp med antall prøver, hvor cDNA skulle bli syntetisert.

| Reagenser | Volum (µl) |
|-----------------------------------|------------|
| 10 mM dNTP mix | 4,0 |
| 10x RT buffer | 2,0 |
| 25 mM MgCl ₂ | 1,0 |
| 50 µM Random Hexamer | 1,0 |
| MultiScribe Reverse Transcriptase | 1,0 |
| RNase inhibitor | 1,0 |

- Rett mengde av hver prøve ble overført til et cDNA PCR-rør. Denne mengden ble regnet ut ved hjelp av Nano-dropmålingene. Rett mengde prøve ble regnet ut som følger: 400/Nano-dropverdien for den aktuelle prøven. Deretter ble rett mengde RNase-fritt vann tilsatt. Totalvolumet til vann og RNA var 10 µl. Målet med dette var at hver prøve skulle inneholde 400 ng RNA.
- Deretter ble det tilsatt 10 µl Mastermix til hver prøve og blandet godt ved å pipettere opp og ned.
- cDNA reaksjonsrørene med de ferdigblandede prøvene ble satt i et GeneAmp PCR apparat, og innstillingene som ble brukt var: 25 °C i 10 min, 48 °C i 30 min., 95 °C i 5 min og til slutt 4 °C til. Når programmet nådde 4 °C var prosessen ferdig og rørene ble

fjernet fra GeneAmp-maskinen. Prøvene ble tilsatt 60 µl dH₂O for å fortynne de. Deretter ble prøvene fryst ved -20 °C eller med en gang benyttet videre til real-time PCR.

3.2.3 Real-time PCR

Alle stegene i denne delen ble utført på is fram til 96-brønnersplaten ble sentrifugert.

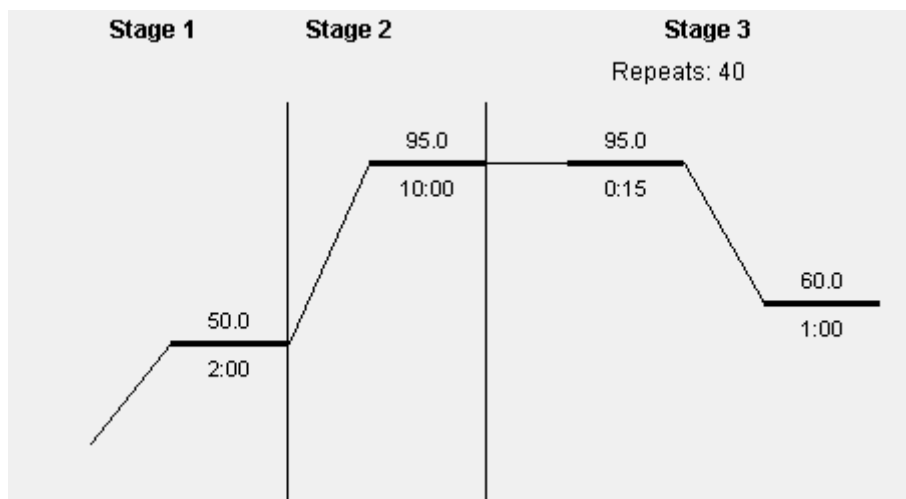
Prosedyre:

- Løsningene med de ulike primerene og en buffer blandet ferdig til en Mastermikse. Blandingsforholdet for de ulike komponentene er vist i Tabell 5, samt mengden cDNA som blandes med Mastermikse. De ulike primere som ble benyttet i real-time PCR forsøkene er listet opp i Tabell E i vedlegget.

Tabell 5: De tre første komponentene i tabellen utgjør Mastermiksen som benyttes for en prøve i real-time PCR kjøring. Disse tre blandes sammen før det tilsettes cDNAet som allerede er fordelt i en PCR-plate.

| Reagenser | Volum (µl) |
|---|------------|
| 20x TaqMan Gene Expression Assay (primer) | 1,0 |
| 2x TaqMan Gene Expression Master Mix (buffer) | 10,0 |
| RNase-fritt vann | 5,0 |
| cDNA | 4,0 |

- De ulike mastermiksene ble blandet godt med en pipette før 16 µl ble tilsatt de ulike brønnene i en 96-brønners PCR-plate (96 PCR-Platte Halbrand), hvor 4 µl cDNA fra de ulike prøvene allerede var fordelt i brønnene.
- Når brettet var ferdig preparert ble brønnene dekket til med en plastfilm, og brettene ble sentrifugert i 2 min ved 2 500 rpm.
- Etter sentrifugeringen ble det lagt en gummimatte på brettet for varmebeskyttelse, og brettet ble plassert i real-time PCR-maskinen.
- Den termiske profilen er vist i Figur 7.



Figur 7: Den termiske profilen benyttet ved real-time PCR kjøring. Tallene over streken ved de ulike stegene er temperaturen, mens tallet under streken viser hvor lenge stegene varer i min. eller sek. Disse tre stegene ble repetert 40 ganger.

3.2.4 Kalkulering av relativ mRNA-ekspressjon

Utregningsmetoden for kalkulering av relativ mRNA-ekspressjon er hentet fra artikkelen «Analyzing real-time PCR by the comparative C_T method» (Schmittgen & Livak 2008).

- C_T -verdier ble eksportert fra programmet SDS 2.2 til Microsoft Excel 2016.
- ΔC_T -verdiene for hver prøve ble kalkulert ved å subtrahere C_T -verdien til referansegnet fra C_T -verdien til de ulike primerene.
- Deretter ble $\Delta\Delta C_T$ regnet ut for alle prøvene ved å bruke $2^{-\Delta C_T}$.
- Gjennomsnittet til kontrollprøvene for de ulike behandlingene ble kalkulert separat for tre dager og ti dager. Disse verdiene ble benyttet videre for utregning av mengde mRNA relativt til referansegene for alle prøvene, ved å ta $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Dette regnes ut med formelen:

$$2^{-(\Delta C_T\text{-verdi til den aktuelle behandlingen} - \Delta C_T\text{-verdi til kontrollprøven})}$$

- Gjennomsnittet for de ulike behandlingene og genene kalkulert, og disse resultatene ble presentert i oversiktlige diagrammer.
- Statistiske analyser ble utført som parvis t-test i Microsoft Excel, hvor forsøksbetingelser ble sammenlignet med kalibratoren, ved hjelp av to-tailed fordeling og antagelse av samme varians.

3.3 SDS-gelelektroforese og western blotting

WB er en metode som blir benyttet for å påvise og karakterisere en rekke proteiner (Kurien & Scofield 2003). Denne metoden benytter spesifisiteten til antistoff for å detektere proteiner i prøver (Copeland 2013). WB er en prosess som ble utført gjennom flere ulike steg. Først ble

det gjennomført en SDS-gelelektroforese, etterfulgt av en WB. Deretter ble membranen blokkert og tilsatt primære og sekundære antistoffer, som til slutt ble fremkalt. Det ble tilsatt DTT til alle prøvene, som deretter ble varmet opp før de blir tilsatt en SDS-PAGE gel. Denne prosessen førte til at proteinet i prøven foldet seg ut, og DTT hjelper til å kløyve disulfidbåndene i proteinet. Dette gjør at proteinene ikke lenger inneholder noen form for tertiær eller kvarternær struktur. Det ble benyttet SDS-buffer som dannet et kompleks med proteinene, og sørget for at alle proteinene fikk en negativ ladning. Dette førte til at proteinene beveget seg gjennom gelen mot en positiv ladet elektrode. Dermed ble proteinene separert i henhold til deres masse ved kjøring av elektroforese. Etter elektroforesen ble proteinet overført fra gelen til en nitrocellulosemembran (ThermoFisher Scientific 2014). En vellykket WB er avhengig av en god overføring av proteiner fra gel til membranen (Copeland 2013). Det blottede proteinet på membranen er en nøyaktig kopi av gelen (Kurien & Scofield 2003). En tørr elektroforetisk overføring av proteiner til membranen er en meget effektiv metode. Etter blottingen er det viktig at stedene på membranen som ikke har reagert blir blokkert for å redusere mengden av uspesifikke bindinger av proteiner under de påfølgende trinnene i analysen. Blokkering forbereder sensitiviteten av analysen ved å redusere bakgrunnsstøy (ThermoFisher Scientific 2014). Primært antistoff som er spesifikt for proteinet vi er ute etter er tilsatt membranen. Dette fester seg til overflaten av proteinet hvis det er til stede (Copeland 2013). Sekundært antistoff blir tilsatt membranen og binder seg til det primære antistoffet, og dette gir en økt følsomhet gjennom signalforsterkningen som oppstår når flere sekundære antistoffer binder seg til et enkelt primært antistoff (ThermoFisher Scientific 2014).

3.3.1 Preparering av prøve

Prosedyre:

- Prøvene ble tint i romtemperatur.
- Alle prøvene ble overført til hvert sitt «QIAshredder Mini Spin Column» og sentrifugert i 1 min ved 13 000 rpm. Supernatanten ble deretter overført til et eppendorfrør.
- 1 M DTT ble tilsatt 4x Laemmeli prøvebuffer og blandet godt. Blandingsforholdet for dette er 40 µl DDT per ml Laemmeli prøvebuffer. Komponentene og volumet som ble benyttet for tillaging av 4x Laemmeli prøvebuffer er vist i Tabell 6.
- Deretter ble 1 volum 4x Laemmeli prøvebuffer og DTT, tilsatt 3 volum av prøven.
- Etter tilsetting av Laemmeli prøvebuffer til prøvene ble det blandet med en kort vortex.

- Prøvene ble så varmet på varmeblokk i 10 min ved 70 °C.

Tabell 6: De ulike reagensene og deres volum som ble benyttet for å lage 4x Laemmeli prøvebuffer.

| Reagenser | Volum |
|---------------------|---------|
| 1 M Tris-HCl pH 6,8 | 2,5 ml |
| 20 % SDS-løsning | 4 ml |
| Bromfenolblå | ~2,5 mg |
| Glyserol | 4 ml |

3.3.2 SDS-gelelektroforese

Prosedyre:

- Ved utførelsen av gelelektroforese ble det benyttet NuPAGE 12 % Bis-Tris Gel. ECL PlexFluorescent Rainbow ble benyttet som standard, og 2 µl av dette ble tilsatt den første brønnen i gelen, mens det ble tilsatt 25 µl av prøvene.
- Før kjøring av gelen ble det benyttet 500 ml 1x NuPAGE-MOPS SDS Running-buffer. For å få dette blandes 50 ml NuPAGE-MOPS SDS Running-buffer og 950 ml dH₂O.
- Gelene ble kjørt ved 200 V i 1 time og 20 min, helt til det minste proteinet i ECL PlexFluorescent Rainbow har nådd bunnen av gelen.

3.3.3 Blotting

Prosedyre:

For blottingen ble kittet iBlot Gel Transfer Stacks Nitrocellulose, Regular benyttet.

- Etter gelelektroforesen ble gelen plassert i en kar med dH₂O.
- Anode Stack, bottom ble åpnet og lagt på overflaten i blottingmaskinen iBlot[®].
- Gelen ble plassert på Anode Stack, bottom, og en Blotting Roller ble dyppet i dH₂O og rullet forsiktig over gelen for å sørge for at alle luftbobler mellom gelen og underlaget forsvant.
- En iBlot Filter Paper ble dynket i dH₂O og lagt på gelen. Også her ble Blotting Roller rullet over for å få ut alle luftbobler.
- Cathode Stack, top ble lagt over gelen, og etter dette steget ble også Blotting Roller rullet over for å bli kvitt bobler. Her ble det benyttet litt mer kraft enn i de tidligere stegene.

- Til slutt ble svampen i kittet plassert i lokket av blottingmaskinen med metallplaten i svampen i kontakt med metallplaten i lokket av maskinen.
- Lokket ble lukket, og blottingprosedyren ble startet. Program 2 med 6 min standard kjøringstid og 23 V ble benyttet.

3.3.4 Farging av membraner

Prosedyre:

- Membranen ble klippet for å få bort delene utenfor blottingområdet.
- Membranen ble inkubert i en blokk-løsning med 2 % ECL Prime blocking agent, som var fortynnet i TBS-T, i 1 time på en vippemaskin. Blandingsforholdene for 10x TBS er vist i Tabell 7. For å få TBS-T ble 900 ml dH₂O blandet med 100 ml 10x TBS og 1 ml Tween 20.
- Blokkingsløsningen ble fjernet og primært antistoff ble tilsatt. Antistoffene som ble benyttet og blandingsforholdet er vist i Tabell 8. Det primære antistoffet ble laget ved å tilsette rett mengde antistoff i 1 % ECL Prime blocking agent som var fortynnet i TBS-T. Membranen ble inkubert over natten ved 4 °C mens det stod på vippemaskin.
- Neste dag ble løsningen med primært antistoff fjernet, og vasket tre ganger à 5 min med TBS-T før det ble tilsatt sekundært antistoff fortynnet i 1 % ECL Prime blocking med TBS-T. Hvilke primære og sekundære antistoffer som er komplementære er vist i Tabell 8. Membranen ble inkubert i 1 time på en vippemaskin, og var tildekket med aluminiumsfolie da de sekundære antistoffene ikke tåler lys.
- Etter en time ble det sekundære antistoffet fjernet og membranen ble igjen vasket tre ganger à 5 min med TBS-T.
- Membranen ble til slutt lufttørket i mørke omgivelser fram til fremkallingen.

Tabell 7: De ulike komponentene nødvendig for å lage 10x TBS. Tris base og NaCl blir løst opp i 900 ml dH₂O. Deretter ble det tilsatt HCl til det ble etablert en pH på 7,6. Når rett grad av pH var dannet ble det tilsatt dH₂O til et sluttvolum på 1 l.

| Komponenter | Volum |
|-------------------|-------------------------------------|
| dH ₂ O | 1 l |
| HCl | Nødvendig mengde for å oppnå pH 7,6 |
| NaCl | 88 g |
| Tris base | 24 g |

Tabell 8: De ulike primære antistoffene og deres blandingsforhold benyttet i western blotting-forsøkene. De primære og sekundære antistoffene ble blandet ut i 1 % ECL Prime blocking agent fortynnet i TBS-T, før de ble tilsatt membranen.

| Primært antistoff | Blandingsforhold | Tilhørende sekundært antistoff | Blandingsforhold |
|--------------------------|------------------|--------------------------------|------------------|
| MMP-14, kanin | 1: 200 | CY5, geit-anti-kanin | 1:3000 |
| α -SMA, mus | 1:200 | CY3, geit-anti-mus | 1:3000 |
| α -tubulin, kanin | 1:10 000 | CY3, geit-anti-mus | 1:3000 |

3.3.5 Fremkalling

Prosedyre:

- Apparatet Ettan DIGE Imager ble benyttet for å fremkalle bilder av proteinbåndene på membranen.
- Proteinsiden på membranen ble lagt ned i kassetten, som deretter ble plassert i apparatet.
- Programvaren Ettan DIGE Imager 1.0 ble benyttet, og det aktuelle sekundære antistoffet valgt. I boksen 595/25 ble parameterne 0,02 eller 0,04 benyttet.
- Programmet ImageJ ble benyttet for å justere kontrastene i bildet for å lettere kunne se forskjellen på tykkelsen til proteinbåndene. ImageJ ble i tillegg benyttet for relativ kvantitering WB-båndene.

3.4 Zymografi

Zymografi ble benyttet for å detektere og karakterisere proteolytiske enzymer ved hjelp av elektroforese av proteaseholdige prøver (Pan et al. 2011). Denne teknikken identifiserer MMP-aktivitet ved dens molekylvekt, og ved nedbrytning av deres substrater (Kupai et al. 2010). MMPer er endopeptidase som inneholder sink, og de degraderer proteiner ved å kløyve ved spesifikke peptidsekvenser (Hu & Beeton 2010). MMPer aktiveres ved kutting av pro-peptider, og derfor vil aktive MMPer ha en mindre molekylvekt enn pro-MMP (Nagase et al. 2006). Andelen aktiv MMP detekteres etter gelelektroforese. Dette gjør zymografi til en ofte benyttet teknikk for å studere ekstracellulære matriksdegraderende enzymer som MMPer (Kupai et al. 2010). Prøvene ble tilsatt prøvebuffer som gjør at molekylene denaturerer. Deretter ble prøvene tilsatt brønnene i gelen, og denne mengden er sensitiv. For liten mengde forhindrer deteksjon av prøven, mens for mye vil føre til en metning, da det er kun en viss mengde substrat en protease kan fordøye i området for båndet. Etter tilsetning av prøvene til gelen gjør den elektriske ladingen i systemet at det skapes konstant migrasjonsforhold. Distansen prøven migrerer er omvendt korrelert med molekylærvekten til proteinet. Etter

elektroforesen ble gelen lagt i en renatureringsbuffer, slik at proteinene igjen skulle få tertiær struktur, noe som er nødvendig for enzymaktiviteten. Deretter ble gelen lagt i en inkubasjonsbuffer slik at proteinene kunne fordøye substratet i gelen. Inkubasjonsbufferen sørget også for at ikke-proteolytiske pro-MMPer ble aktive. Deretter ble gelen farget og områder hvor MMPene har hatt proteolytisk aktivitet forble blanke, mens resten av gelen var blå. Dess mer klarere og tykkere båndet var, dess mer protease var det i den aktuelle prøven (Hu & Beeton 2010).

Prosedyre:

- Under dette forsøket stod prøvene på is fram til de ble tilsatt gelen.
- Prøvene ble tint i kjøleskap før bruk.
- Etter tining ble prøvene vortexet, og 20 µl ble overført til hvert sitt eppendorfrør.
- Det ble tilsatt 10 µl prøvebuffer til alle prøvene. Blandingsforholdene for prøvebufferen er vist i Tabell 9.
- Eppendorfrørene ble vortexet og spunnet ned før rett mengde av prøvene ble tilsatt hver brønn i Novex 10 % Zymogram (Gelatin) Gel. Denne mengden varierte fra 8 µl til 15 µl, da det var vanskelig å avgjøre hva som er den optimale mengden, og ulike mengder ble prøvd ut. Det ble benyttet Bench Marker Protein Ladder som standard, og 10 µl av denne ble tilsatt den første brønnen i gelen.
- Gelen ble satt i et elektroforesekar og tilsatt 10x elektroforesebuffer. Oppskriften på 10x elektroforesebuffer er vist i
- Tabell 10. For elektroforesekjøringen ble det benyttet 1x elektroforesebuffer, så 100 ml 10x elektroforesebuffer ble blandet med 900 ml dH₂O før det ble benyttet i elektroforesen.
- Det ble kjørt gelelektroforese i ca. tre timer med en konstant volt på 125.
- Deretter ble gelen inkubert to ganger 15 min i renatureringsbuffer. I Tabell 11 er det oversikt over hva som er nødvendig for å lage renatureringsbuffer, og for hver gel ble det benytte så mye løsning at gelen ble dekket helt, ca. 50 ml.
- Renatureringsbufferen ble fjernet og gelen ble inkubert i inkubasjonsbuffer i 15 min på vippemaskin. Bufferen ble fjernet og ny tilsatt. Gelen ble deretter inkubert over natten i 37 °C. Blandingsforholdene for 10x inkubasjonsbuffer er vist i Tabell 12. I denne delen ble det benyttet 1x inkubasjonsbuffer, så 100 ml 10x inkubasjonsbuffer ble blandet med 900 ml dH₂O.

- Dagen etter ble inkubasjonsbufferen fjernet og gelen ble inkubert i 30 min i fargeløsning. Komponentene og blandingsforholdene benyttet i fargeløsningene er vist i Tabell 13.
- Fargeløsningen ble fjernet og avfargingsløsning ble tilsatt og inkubert i 15 min på vippemaskin. Dette ble fjernet og ny avfargingsløsning ble tilsatt. De nødvendige komponentene for avfargingsløsningen finnes i Tabell 14. Dette ble inkubert fram til tydelige blanke bånd ble synlig på gelen. Da ble avfargingsløsningen igjen fjernet og gelen ble lagt i dH₂O.
- Deretter ble gelen skannet ved bruk av apparatet Epson Perfection 4990 Photo, mens programmet Epsonskan ble benyttet for å ta bildet av gelen. Kontraster ble justert med programmet ImageJ.

Tabell 9: Reagenser og volumene som var nødvendig for tillaging av prøvebuffer. Dette ble tilsatt prøvene før det ble utført en gelelektroforese. Reagensene ble blandet sammen ved hjelp av en magnet og magnetrører, før det ble tilsatt vann slik at prøvebufferen nådde et totalvolum på 10 ml.

| Reagenser | Volum |
|--------------------------------|--------|
| 0,1 % Bromfenolblått | 0,5 ml |
| 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 | 2,5 ml |
| 10 % SDS | 4 ml |
| 85 % Glycerol | 2,3 ml |
| Juster opp til 10 ml med vann. | |

Tabell 10: De ulike komponentene som var nødvendig for tillaging av 10x elektroforesebuffer ved bruk av zymografigel. Det ble målt opp 800 ml vann i en 1 l målesylinder, og rett volum av de ulike reagensene ble tilsatt og blandet godt ved hjelp av magnet og magnetrører. Deretter ble det tilsatt vann slik at sluttvolumet for løsningen ble 1 l. Dette ble oppbevart i romtemperatur, i maksimum seks måneder.

| Reagenser | Volum |
|-------------------|--------|
| Glysin | 144 g |
| SDS | 10 g |
| Trisma Base | 30,3 g |
| dH ₂ O | 1 l |

Tabell 11: Komponentene nødvendig for tillaging av renatureringsbuffer. 1 l vann ble målt opp og deretter tilsatt Triton X-100. Dette ble blandet godt ved hjelp av en magnet og magnetrører. Løsningen ble oppbevart i kjøleskapet.

| Reagenser | Volum |
|-------------------|-------|
| dH ₂ O | 1 l |

| | |
|--------------|-------|
| Triton X-100 | 25 ml |
|--------------|-------|

Tabell 12: Komponentene nødvendig for 10x inkubasjonsbuffer. Ved inkubering av zymografigelen ble det benyttet 1x inkubasjonsbuffer. Dette ble oppbevart ved 4 °C. Det ble til sammen laget en 1 l av løsningen.

| Reagenser | Volum |
|-------------------------|---------|
| 50 mM Tris-Base, pH 8,0 | 6,06 g |
| 5mM CaCl ₂ | 0,735 g |
| dH ₂ O | 1 l |

Tabell 13: Komponentene benyttet for å lage fargeløsning som ble brukt i zymografiforsøket. Det var viktig at syren blir tilsatt etter vannet. Løsningen ble oppbevart i romtemperatur.

| Reagenser | Volum |
|---------------------------------|---------|
| Coomassie brilliant blue R-2500 | 0,1 ml |
| dH ₂ O | 42,9 ml |
| Eddiksyre | 7 ml |
| Metanol | 50 ml |

Tabell 14: De ulike komponentene som var nødvendig for å lage avfargingsløsning. Det var viktig å tilsette eddiksyre etter vannet for å unngå uheldig reaksjoner. Komponentene ble blandet godt ved hjelp av en magnet og magnetrører. Løsningen ble oppbevart i romtemperatur.

| Reagenser | Volum |
|-------------------|----------------|
| dH ₂ O | 73 ml |
| Eddiksyre | 7 ml eddiksyre |
| Metanol | 20 ml vann |

3.5 Celleviabilitet

Det ble utført et viabilitetsforsøk på fibroblastene etter at de var tilsatt ulike eggeskallmembranfraksjoner. Ved utførelsen av dette forsøket ble CellTiter-Glo[®] Luminiscent Cell Viability Assay (Promega) benyttet. Denne metoden ble benyttet for å bestemme antall levedyktige celler i en kultur basert på kvantifiseringen av mengden ATP som var til stede i prøvene (Promega Corporation 2001-2015). Denne analysemetoden er basert på at det blir produsert et luminiserende signal. Når enzymet luciferase produserer oxyluciferin, frigir det energi i form av luminisens. Dette skjer når luciferase virker på luciferin ved tilstedeværelse av Mg²⁺ og ATP. Siden denne reaksjonen krever ATP, vil

mengden luminisens som blir produsert være proporsjonal med mengden ATP til stede i prøven (Hannah et al. 2001). Mengden ATP er direkte proporsjonal med antallet celler som er til stede i kulturen (Promega Corporation 2001-2015).

I dette forsøket ble det benyttet Celltiter-Glo[®] Luminiscent Cell Viability Assay.

Prosedyre:

- Det ble benyttet en hvit 96-brønnersplate for viabilitetstest for utsåing av celler.
- Det ble sådd ut 5000 celler per brønn som var fortynnet i 200 µl 10 % FBS medium. Det ble sådd ut tre paralleller med celler, samt en rad uten celler for negativ kontroll. Dette ble inkubert i 37 °C i ca. 24 timer.
- Etter 24 timer ble mediet i brønnen fjernet, og 200 µl PEP, derivater av PEP og TGF-β1 løst opp i 2 % FBS medium, ble tilsatt brønnene. Dette ble inkubert i 24 timer ved 37 °C.
- Etter ca. 24 timer med inkubasjon ble CellTiter-Glo[®] Reagent gjort klart for bruk i forsøket. For å få dette ble CellTiter-Glo[®] Buffer og CellTiter-Glo[®] Substrate fra kittet CellTiter-Glo[®] tinet og romtemperert. Bufferen ble ført over til flasken med substratet og blandet godt ved å vende flasken opp og ned. Dette utgjør CellTiter-Glo[®] Reagentet.
- 100 µl fra løsningen i hver brønn ble fjernet for å få mer plass i brønnen. Deretter ble 100 µl CellTiter-Glo[®] Reagent tilsatt hver brønn.
- Platen ble plassert på vippemaskinen i 2 min for å indusere lysing av cellene.
- Platen ble deretter inkubert i et mørkt rom i 10 min ved romtemperatur for å stabilisere luminescenssignalet.
- Etter 10 min inkubasjon ble luminescensen lest av på GloMax[™] 96 Microplate Luminometer.

3.5.1 Utregning av prosent viabilitet

Prosent viabilitet ble regnet ut ved å finne de normaliserte verdien for de ulike prøvene i forhold til kontrollprøven.

Prosedyre:

- Gjennomsnittet for alle kontrollprøvene ble først regnet ut.
- De normaliserte verdiene for alle prøvene ble regnet ut ved å dividere den enkelte verdien for en prøve med gjennomsnittet for kontrollprøvene, og deretter gange det

med 100 for å få svaret i prosent. Dette ble gjort for alle verdiene for hver enkelt prøve med de ulike fraksjonene.

- Gjennomsnittet og standardavviket for gjennomsnittet (SEM) for hver prøve ble deretter regnet ut og presentert i et søylediagram.

3.6 Proliferasjon

Ved å se på proliferasjon fastsettes tettheten av celler i en kultur. I dette forsøket ble det benyttet CyQUANT[®] Cell Proliferation Assay Kit for å se på proliferasjon av fibroblastene ved tilsetning av de ulike eggeskallmembranfraksjonene, da dette er ideelt for celleproliferasjonsstudier. Celler ble tint opp og lysert ved å tilsette buffer med CyQUANT[®] GR fargestoff. Når det grønne fargestoffet binder seg til cellulære nukleinsyrer frigir det en sterk fluorescens (Invitrogen 2006). Fluorescenssignalet ble målt ved hjelp av standard fluorescens eksitasjons- og emisjonsbølgelengde. Fluorescenssignalet som kommer fra komplekset mellom fargestoffet og nukleinsyren korrelerer lineært med celledetallet (Jones et al. 2001).

I dette forsøket ble kittet CyQUANT[®] Ancillary Reagent Kit 2 (5 Plate).

3.6.1 Celleoppsett i 96-brønners proliferasjonsplater

Prosedyre:

- I en svart proliferasjonsplate med 96 brønner ble 5000 celler i 200 µl 2 % FBS medium sådd ut i hver brønn. For hvert forsøk ble et oppsett med tre paralleller og en negativ kontroll uten celler til stede, satt opp. Dette ble inkubert i ca. 24 timer ved 37 °C.
- Etter ferdig inkubasjonstid hadde cellene festet seg til bunnen av brønnen, og mediet ble fjernet. Eggeskallmembranfraksjonene og TGF-β1 løst opp i 200 µl 2 % FBS medium ble tilsatt brønnen. Dette ble inkubert i 37 °C i ca. tre dager.
- Etter ferdig inkubasjonstid ble mediet i brønnene fjernet, og platene med cellene ble fryst i -80 °C, eller benyttet med en gang videre i forsøket.

3.6.2 Lysering av celler

Prosedyre:

- Først ble 20x cellelyseringsbuffer ble fortynnet til 1x cellelyseringsbuffer med Milli-Q vann.

- Cellelyseringsbufferen ble tilsatt CyQUANT[®] GR reagent. CyQUANT[®] GR reagent hadde en konsentrasjon på 400x og ble tilsatt rett mengde for å fortynne den til 100x da det ble tilsatt bufferen.
- Deretter ble 200 µl cellelyseringsbuffer ble tilsatt hver brønn i proliferasjonsbrettet og inkubert mørkt i romtemperatur i 5. min.
- Etter 5 min ble resultatet målt ved hjelp av en fluorescens mikroplateleser, FLUOstar OPTIMA – BMG labtech, og programvaren FLUOstar OPTIMA.

3.7 ELISA

ELISA er en ofte benyttet teknikk for å måle konsentrasjonen av en analytt i en løsning (Bio-Rad u.å.). I dette forsøket ble det benyttet DuoSet[®] Ancillary Reagent Kit 2 (5 Plate). Prøven med en ukjent mengde antigen ble immobilisert ikke-spesifikt på en mikrotiterplate.

Deteksjonsstoffet ble tilsatt og dette danner et kompleks med antigenet. Antistoffet ble kovalent bundet til et enzym. Mellom hvert trinn ble platen med prøvene vasket for å fjerne eventuelle proteiner eller antistoffer som ikke er spesifikt bundet (Sino Biological Inc 2004-2017). Trinnene i ELISA resulterte i et farget sluttprodukt som korrelerer med mengden analytt som er tilstede i den opprinnelige prøven (Bio-Rad u.å.).

I dette forsøket ble det benyttet cellemedium fra celleforsøk. ELISA ble benyttet for å se på innholdet av MMP-2 og TIMP-2 i cellemedium fra fibroblastforsøk som ble inkubert i tre dager. Det ble benyttet DuoSet[®] Ancillary Reagent Kit 2 (5 Plate) for utføringen av dette forsøket.

3.7.1 Forberedelser av plate

Prosedyre:

- Første dag av forsøket coates en 96-brønners Maxi Sorp plate.
- Capture Antibody ble fortynnet til arbeidskonsentrasjonen med Elisa Plate Coating Buffer. Det ble laget to forskjellige løsninger, en for MMP-2 og en for TIMP-2.
- Deretter ble 100 µl fortynnet Capture Antibody tilsatt hver brønn i Maxi Sorp platen.
- Platen ble dekket med en plastfilm og inkubert i romtemperatur over natten.
- Etter inkubering ble alle brønnene vasket med en Wash buffer ved hjelp av platevaskeren Wellwash Microplate washer. 25x Wash Buffer ble fortynnet med Milli-Q vann til 1x Wash Buffer. Platene ble vasket tre ganger med 300 µl Wash Buffer ved hvert vaskesteg under hele forsøket. All væske ble fjernet ved å slå platen forsiktig mot et papir.

- 10x Reagent Diluent ble fortynnet til 1x med Milli-Q vann. Deretter ble platen blokkert ved å tilsette 300 µl 1x Reagent Diluent til hver brønn, og deretter inkubert i romtemperatur i 1 time.
- Etter inkuberingen ble vaskesteget repetert.

3.7.2 Analyseprosedyren

Prosedyre:

- Cellemediet for de ulike prøvene ble fortynnet til rett konsentrasjon med Reagent Diluent. Det ble benyttet 5 µl prøver per brønn for MMP-2 og 2,5 µl prøve per brønn for TIMP-2. 100 µl ferdig fortynnet prøve ble tilsatt brønnene i et bestemt oppsett. Prøvene stod på is under hele denne prosessen.
- Det ble laget en fortynningsrekke med standard MMP-2 og TIMP-2. Fortynningen som ble benyttet for MMP-2 var: 20 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml, 2,5 ng/ml, 1,25 ng/ml, 0,625 ng/ml og 0,3125 ng/ml. Fortynningsrekken for TIMP-2 var: 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml og 31,3 pg/ml. 100 µl av hver konsentrasjon i fortynningsrekken ble tilsatt hver sin brønn. Etter tilsetting av både standarder og prøver til brettet ble det inkubert 2 timer i romtemperatur.
- Etter inkubering ble vaskesteget gjentatt.
- 100 µl fortynnet Detection Antibody ble tilsatt hver brønn. Detection Antibody for MMP-2 og TIMP-2 ble fortynnet i Reagent Diluent. Brettet ble inkubert i romtemperatur i 2 timer.
- Vaskesteget ble gjentatt.
- 200x Streptavidin-HRP ble fortynnet til 1x med Reagent Diluent, før 100 µl ble tilsatt hver brønn. Dette ble inkubert mørkt i romtemperatur i 20 min.
- Vaskesteget ble gjentatt.
- Color Reagent A og B ble blandet med like stort volum av hver reagens, og utgjorde Substrate Solution. 100 µl Substrate Solution ble tilsatt hver brønn før det ble inkubert mørk i 20 min i romtemperatur.
- Etter inkubasjon ble 50 µl Stop Solution forsiktig tilsatt alle brønnene.
- Resultatet ble målt i et fotospektrometer (SPECTROstar Nano) ved hjelp av programmet Spectrostar Nano.

3.8 Fluorescens immuncytokjemi

Formålet med dette forsøket var å visuelt kunne studere utviklingen av organiseringen av proteinene vinkulin og aktin i fibroblaster, etter at det var tilsatt eggeskallmembranfraksjoner. Dette ble gjort ved hjelp av et fluorescensmikroskop. For å kunne gjøre dette ble det benyttet indirekte fluorescens med primære og sekundære antistoff. Det primære antistoffet gjenkjenner proteinet som skal studeres, og binder seg til dette. Deretter ble det tilsatt et sekundært antistoff som gjenkjenner det primære antistoffet og fester seg til dette. Det sekundære antistoffet inneholder et fluoreserende stoff og gir en amplifisering av signalet ved å øke antall fluoroforemolekyler per antigen i prøven (Fritschy & Härtig 2001).

Prosedyre:

- For dette forsøket ble det benyttet «Chamber slides» for utsåing og inkubering av celler. 10 000 celler fortynnet i 300 µl 10 % FBS medium ble sådd ut i hver brønn. Cellen ble deretter inkubert i 37 °C i ca. 24 timer.
- Etter inkubasjonen ble mediet fjernet og 300 µl av de ulike PEP-fraksjoner fortynnet i 2 % FBS medium ble tilsatt kamrene i et forhåndsbestemt mønster. Deretter ble cellene inkubert i 37 °C i enten 72 timer eller 10 dager.
- Cellen som skulle inkuberes i kun tre dager ble fiksert etter 72 timer inkubasjon. For cellene som ble inkubert i 10 dager ble mediet fjernet etter syv dager inkubasjon og nye tilsvarende fraksjoner fortynnet i 2 % FBS, ble tilsatt kamrene.
- Celle ble fiksert ved å først fjerne mediet. Deretter ble hvert kammer vasket tre ganger med 300 µl DPBS. Det ble tilsatt 300 µl 4 % formaldehyd til kamrene, og objektglassene ble inkubert i 15 min i romtemperatur. Formaldehyden ble fjernet og kamrene ble vasket med 300 µl DPBS. Deretter ble 300 µl DPBS tilsatt kamrene og plassert i kjøleskapet fram til videre analysering.

3.8.1 Farging av celler

Prosedyre:

- DPBS ble fjernet fra kamrene og de ble vasket tre ganger med PBS-T (DPBS + 0,01 % Tween 20). Det ble benyttet 300 µl i hvert kammer.
- Deretter ble cellene permeabilisert med 200 µl 0,5 % Triton X-100 i PBS buffer i 10 min.
- Cellene ble deretter vasket en gang med PBS-T.

- Det ble utført en blokkering med 5 % melk i PBS-T i 30-60 min. i romtemperatur for å hindre uspesifikke bindinger av antistoffer. 100 µl ble tilsatt hver kammer.
- Blokkeringsvæsken ble fjernet og 100 µl primært antistoff fortynnet i 2 % melk i PBS-T ble tilsatt hvert kammer. Antistoffene og blandingsforholdene som ble benyttet er vist i Tabell 15. Dette ble inkubert i 30-60 min i romtemperatur.
- Cellene ble deretter vasket tre x 10 min med PBS-T.
- Etter vasking ble 100 µl sekundært antistoff tilsatt brønnene. Det bestod av det sekundære antistoffet vist i Tabell 15 og Hoechst fortynnet i 2 % melk i PBS-t. Det ble laget to løsninger av dette hvor den ene også ble tilsatt Phalloidin, et fargestoff som binder deg til aktinfilamenter. Blandingsforholdet til Hoechst var 1:1000. Dette ble inkubert i 30-60 minutter mørkt i romtemperatur.
- Etter inkubering ble cellene vasket tre x 10 min med PBS-T.
- Deretter ble de utført en montering. Veggene til kamrene i chamber slidsene ble fjernet, og objektglassene med cellene ble dyppet i dH₂O og veldig forsiktig tørket på papir. Det var viktig å holde dekkglassene så lenge som mulig mørkt for å unngå å ødelegge fargens om er tilsatt cellene.
- En dråpe Dako Fluorescens monteringsmedium ble tilsatt hvert celleområde på objektglassene.
- Et dekkglass ble lagt over objektglasset og tettet rundt med neglelakk for å hindre at det kom luft til.
- Objektglassene ble tørket mørkt i romtemperatur over natten og videre lagret under samme betingelser til de ble analysert i mikroskop.

Tabell 15: Primære og sekundære antistoffer benyttet for immunfarging av celler. α -SMA og vinkulin ble blandet ut i hver sin 2 % melkeløsning, og tilsatt ulike kammer. Phalloidin og Alexa Fluor ble blandet og tilsatt samme kammer som vinkulin-løsningen var tilsatt, mens det ble tilsatt kun Alexa Fluor til kamrene som var tilsatt α -SMA.

| Primært antistoff | Blandingsforhold | Sekundært antistoff | Blandingsforhold |
|--------------------|------------------|----------------------------------|------------------|
| α -SMA, mus | 1:100 | Alexa Fluor 546 geit-anti-mus | 1:400 |
| Vinkulin, mus | 1:1000 | | |
| Phalloidin | 1:200 | | |

3.8.2 Analysering i fluorescensmikroskop

Prosedyre:

- Det ble benyttet et fluorescensmikroskop for analysering og bildetaing av cellene, samt programvaren ZEN pro 2012.
- Objektiv 25x ble benyttet og en dråpe objektivolje ble plassert på objektivet.
- Det ble benyttet DAPI (blå), PI (rødt) og EGPF (grønt) for å se på mengden α -SMA, vinkulin og phalloidin i cellene.

3.9 Statistikk

For resultater presentert i søylediagram ble gjennomsnittets standardavvik regnet ut og presentert i feilsøyler. Signifikant endring i forhold til kontrollprøven ble utført som parvis t-test i Microsoft Excel, hvor forsøksbetingelser ble sammenlignet med kalibratoren, ved hjelp av to-tailed fordeling og antagelse av samme varians.

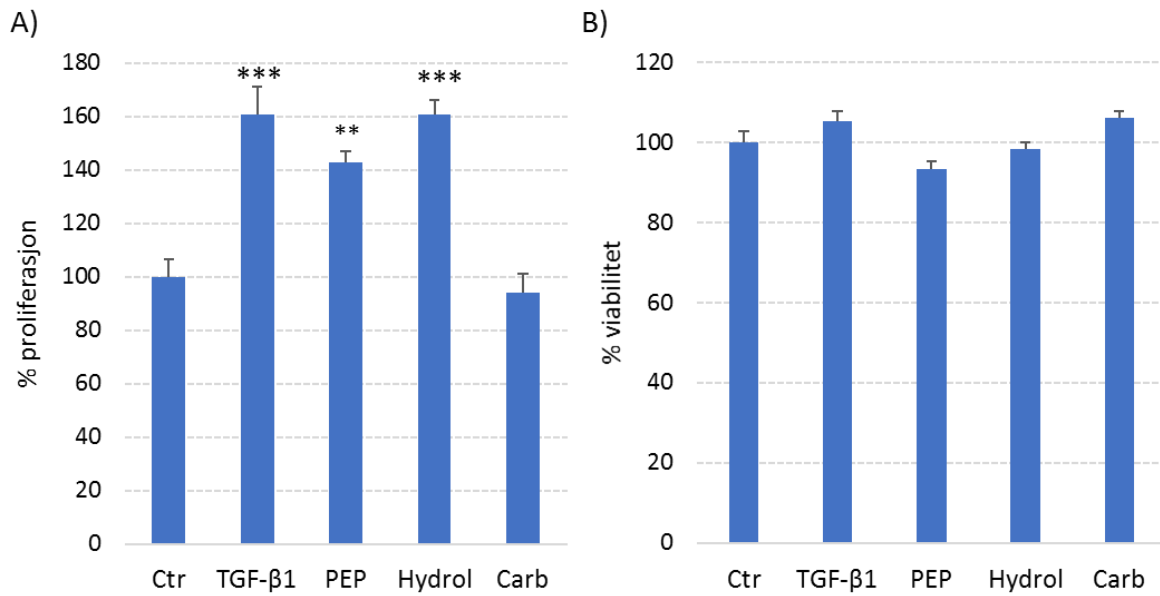
4 Resultater

I alle forsøkene ble det benyttet en kontrollprøve hvor cellene kun ble inkubert i medium, uten at noen av ESM-fraksjonene ble tilsatt. TGF- β 1 er en vekstfaktor som stimulerer fibroblast-til-myofibroblastdifferensiering og matriksproduksjon, og ble benyttet som en positiv kontroll i alle forsøkene (Gabbiani 2003; Li & Wang 2011).

4.1 ESM-fraksjoners effekt på proliferasjon og ekstracellulær matriksproduksjon hos fibroblaster

Fibroblaster er de viktigste cellene i huden da disse cellene gir strekkstyrke og elastisitet gjennom produksjon og utskillelse av forskjellige komponenter i ECM, inkludert collagen, elastin, glykoproteiner og proteoglykaner (Vedrenne et al. 2012). Under sårheling blir cellene aktivert av lokale faktorer, som TGF- β 1, og begynner å proliferere og lage ny matriks til såret (Gabbiani 2003; Schultz & Wysocki 2009). Effekten av PEP og dens derivater (Hydrol og Carb) på fibroblaster ble testet for å se om de ulike fraksjonene påvirker proliferasjon og viabilitet til cellene, i tillegg til matriksproduksjonen.

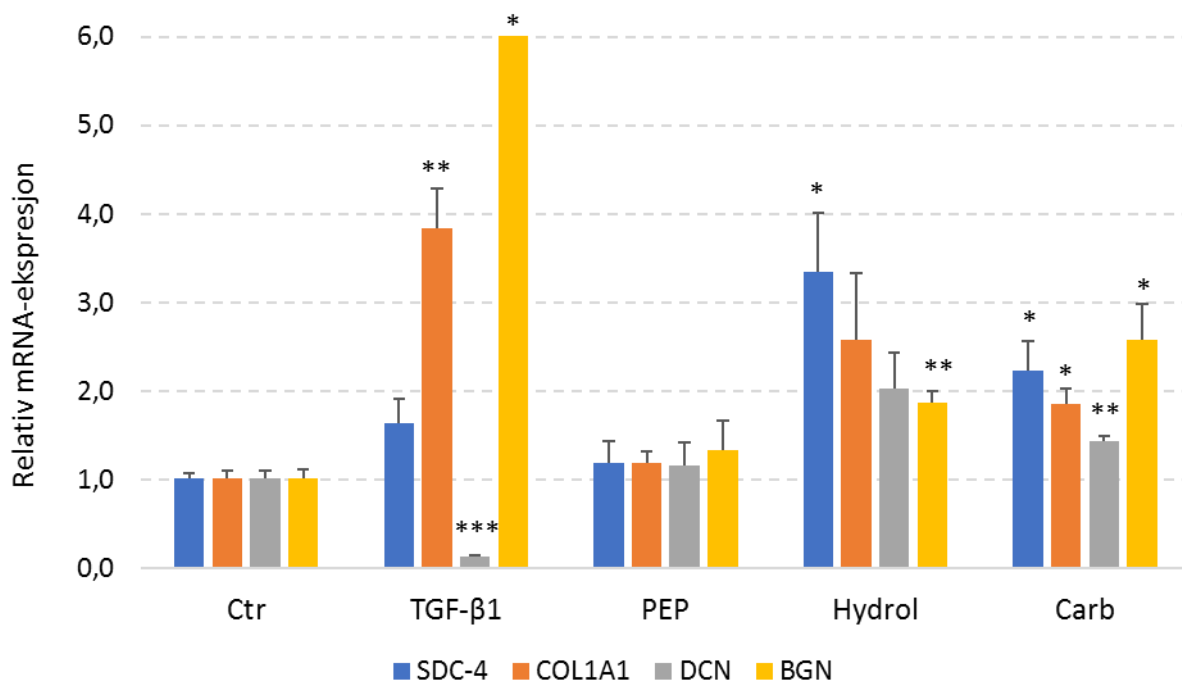
Figur 9 viser verdiene fra proliferasjons- (A) og viabilitetsforsøk (B). Etter tre dager inkubasjon er det en signifikant økning i prosent proliferasjon hos fibroblastene tilsatt PEP, Hydrol og TGF- β 1 i forhold til kontrollprøven. Hydrol og TGF- β 1 gir lik grad av økning i prosent proliferasjon, og er det som gir høyest økning. Ved tilsetning av Carb er det derimot ingen signifikant endring i proliferasjon. Viabilitetsresultatene, hvor fibroblastene ble stimulert i en dag, viser derimot en helt motsatt tendens. Ved stimulering av fibroblastene med Carb er det en svak økning i prosent viabilitet, og en svak nedgang ved bruk av PEP og Hydrol, sammenlignet med kontrollprøven, men ingen av disse endringene er signifikante.



Figur 8: Effekten av ESM-fraksjoner på proliferasjon og viabilitet hos fibroblaster. Proliferasjon i prosent (A) hos fibroblaster stimulert i tre dager, og viabilitet i prosent (B) hos fibroblaster stimulert i en dag med eggeskallmembranpulver (PEP), hydrolysert PEP (Hydrol), karbohydrater av PEP (Carb) og transformerende vekstfaktor beta 1 (TGF-β1). TGF-β1 ble benyttet som en positiv kontroll. Resultatene for begge figurene er gjennomsnittet av tre uavhengige celleforsøk, og feilsøylene indikerer gjennomsnittets standardfeil. Signifikant forskjell for hver prøve i forhold til kontrollprøven er markert med stjerne ($p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).*

Kollagen type I, syndekan-4, biglykan (BGN) og dekorin (DCN) er alle viktige komponenter i ECM og spiller en viktig rolle i sårhelingsprosessen.

Det ble undersøkt om ESM-fraksjonene ved tre dager stimulering har ulik effekt på mRNA-ekspressjonen av matrikskomponenter til fibroblaster (Figur 9). Stimulering av fibroblaster med PEP har ingen effekt på mRNA-ekspressjonen til noen av de fire matrikskomponenten, syndekan-4, kollagen type I, biglykan og dekorin. Det ble derimot observert en økning i mRNA-ekspressjonen hos alle de fire ECM-komponentene ved stimulering av fibroblaster med Hydrol og Carb, men i motsetning til Carb er ikke økningen av kollagen type I og dekorin ved stimulering med Hydrol signifikant. Det ble også observert en signifikant økning i produksjonen av syndekan-4, kollagen type I og biglykan ved tilsetning av TGF- β 1 (stimulator for fibrose og matriksproduksjon). For dekorin var det derimot en signifikant reduksjon ved stimulering med TGF- β 1. Det er en ulik effekt på mRNA-ekspressjon av syndekan-4, hvor både Hydrol og Carb stimulerte til en signifikant økning i mRNA-ekspressjonen, mens TGF- β 1 kun gir en liten økning som ikke er signifikant.



Figur 9: Effekten av ESM-fraksjoner på produksjon av ECM-komponenter. mRNA-ekspressjon for ulike ekstracellulære matrikskomponenter i fibroblaster stimulert med eggskallemembranpulver (PEP), hydrolysert PEP (Hydrol), karbohydrater av PEP (Carb) og transformerende vekstfaktor beta 1 (TGF- β 1) i tre dager. TGF- β 1 ble benyttet som positiv kontroll. De fire ECM-komponentene som ble studert er SDC-4 (syndekan-4), COL1A1 (kollagen type I), DCN (dekorin) og BGN (biglykan). På grunn av veldig høye mRNA-verdier av biglykan stimulert med TGF- β 1, er denne søylen kuttet. Den rette mRNA-verdien for TGF- β 1 er 15,83, med en feilsøyle med verdi 4,4. Resultatene i denne figuren representerer gjennomsnittet av tre uavhengige celleforsøk, og feilsøylene indikerer gjennomsnittets standardfeil. Signifikant forskjell for hver prøve sammenlignet med kontrollprøven er markert med stjerne (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

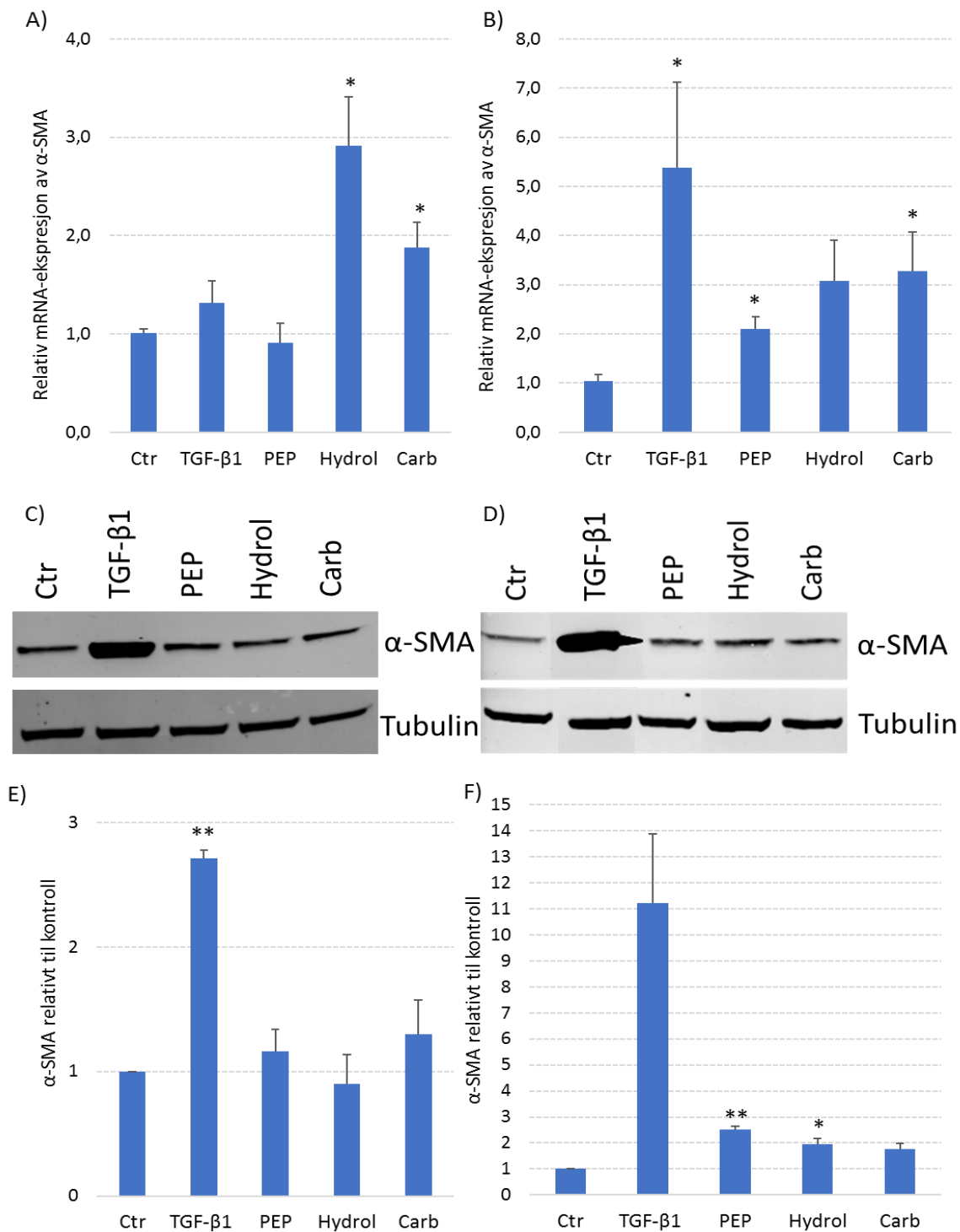
4.2 ESM-fraksjoners effekten på fibroblastdifferensiering og migrering

4.2.1 Effekten på α -SMA-ekspresjon

Etter at fibroblastene har proliferert, starter de differensieringen ved produksjonen av α -SMA. Differensieringen av fibroblaster til myofibroblaster er karakterisert ved uttrykkningen av α -SMA da dette er kun produsert av myofibroblaster (Gabbiani 2003; Li & Wang 2011). Dette gjør at mengden α -SMA tilstede i en prøve gir en indikasjon på graden av differensieringen. Det var derfor ønskelig å studere om de ulike fraksjonene hadde en betydning for denne differensieringen ved kortere (tre dager) og lengere (ti dager) stimuleringsstid. Dette ble undersøkt på både mRNA-nivå ved real-time PCR, og proteinnivå ved WB.

Figur 10 viser ekspresjon av α -SMA på mRNA-nivå (A og B) og proteinnivå (C og D). Både Hydrol og Carb gir en signifikant økning i uttrykk av mRNA etter tre og ti dager inkubasjon i forhold til kontrollprøven. Etter tre dager inkubasjon er det Hydrol som gir høyest mRNA-ekspresjon, mens ved ti dager inkubasjon er det Carb som gir størst økning av disse to fraksjonene. PEP gir tilnærmet ingen effekt på mRNA-nivået ved tre dager inkubasjon, og har ingen signifikant endring. Ved ti dager inkubasjon er det en tendens til økning av mRNA-ekspresjonen ved bruk av PEP, og denne økningen er signifikant. TGF- β gir ingen signifikant økning av mRNA-ekspresjonen ved tre dager inkubasjon, men ved ti dager inkubasjon er det en høy signifikant økning ved stimulering med TGF- β 1.

Figur 10 C og D viser α -SMA båndene fra et WB-forsøk som gjenspeiler trenden fra til sammen tre WB-forsøk. Det ble utført en kvantitering av α -SMA-båndene fra de tre ulike WB-forsøkene, og dette er vist i Figur 10 E og F. Disse resultatene viser at det ved tre dager stimulering gir en liten økning av α -SMA ved bruk av PEP og Carb sammenlignet med kontrollprøven, men ingen av disse økningene er signifikante. Hydrol gir ingen økning i proteinuttrykket, mens derimot TGF- β 1 gir en stor signifikant økning. Ved ti dager stimulering av fibroblaster gir både PEP og Hydrol en signifikant økning av α -SMA-ekspresjonen, mens Carb gir en liten økning av α -SMA som ikke er signifikant. TGF- β 1 gir en stor økning av α -SMA sammenlignet med kontrollprøven, og heller ikke denne er signifikant.

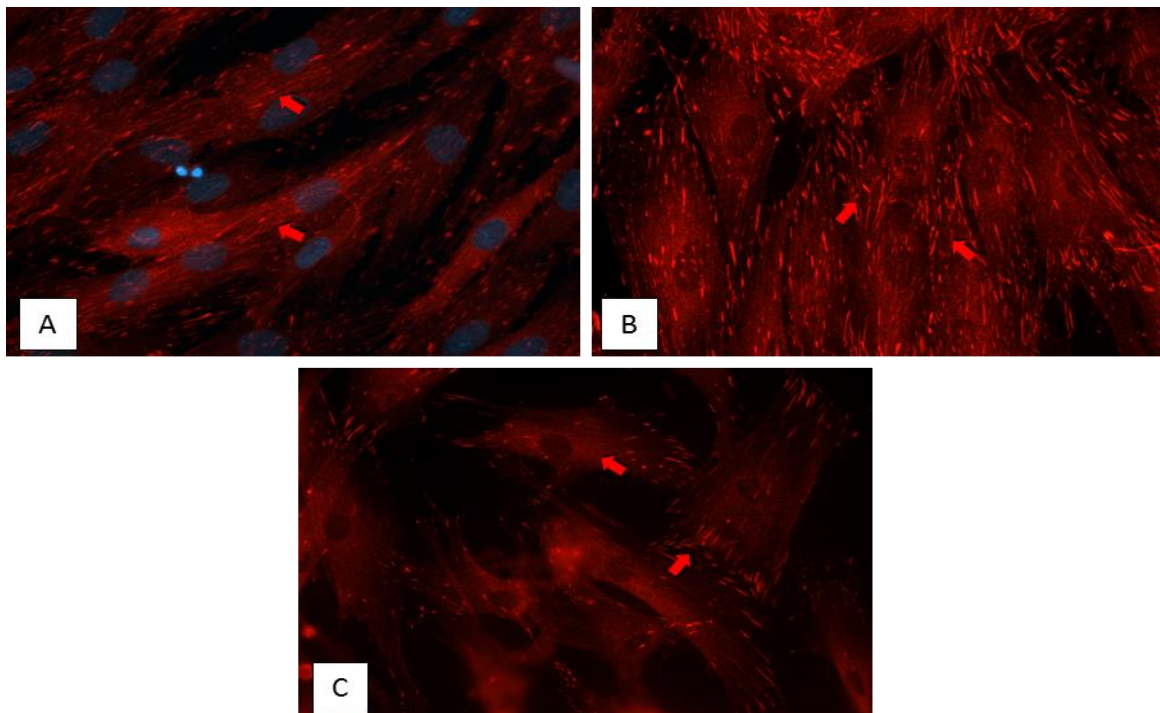


Figur 10: Effekten av ESM-fraksjoner på uttrykkningen av α -SMA i fibroblaster. Relativ mRNA-ekspressjon for alfa-glatt muskelaktin (α -SMA) etter tre (A) og ti dager (B) inkubasjon, og nivået av proteinekspressjon til α -SMA i fibroblaster etter tre (C) og ti dager (D) inkubasjon. Figur E) og F) viser kvantiteringsverdiene til de ulike α -SMA-båndene, ved tre og ti dager stimulering, respektivt. Verdiene er relatert til kontrollprøven. Fibroblastene er blitt behandlet med eggeskallmembranpulver (PEP), hydrolysert PEP (Hydrol), karbohydrater av PEP (Carb) og transformerende vekstfaktor beta 1 (TGF- β 1). TGF- β 1 ble benyttet som en positiv kontroll. Resultatene i A) og B) representerer gjennomsnittet av tre uavhengige celleforsøk, og feilsøylene indikerer gjennomsnittets standardfeil. Signifikant forskjell for hver prøve i forhold til kontrollprøven er markert med stjerne (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Tykkelsen på båndene i C) og D) indikerer mengde α -SMA og tubulin uttrykt i de forskjellige prøvene i forhold til kontrollprøven. Resultatet er fra et forsøk og gjenspeiler trenden fra tre uavhengige celleforsøk som ble gjennomført under like betingelser. Resultatene i E) og F) viser gjennomsnittet av tre uavhengige WB-forsøk, og feilsøylene indikerer gjennomsnittets standardfeil. Signifikant forskjell for hver prøve i forhold til kontrollprøven er markert med stjerne (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4.2.2 Effekten av PEP på cellemigrasjon

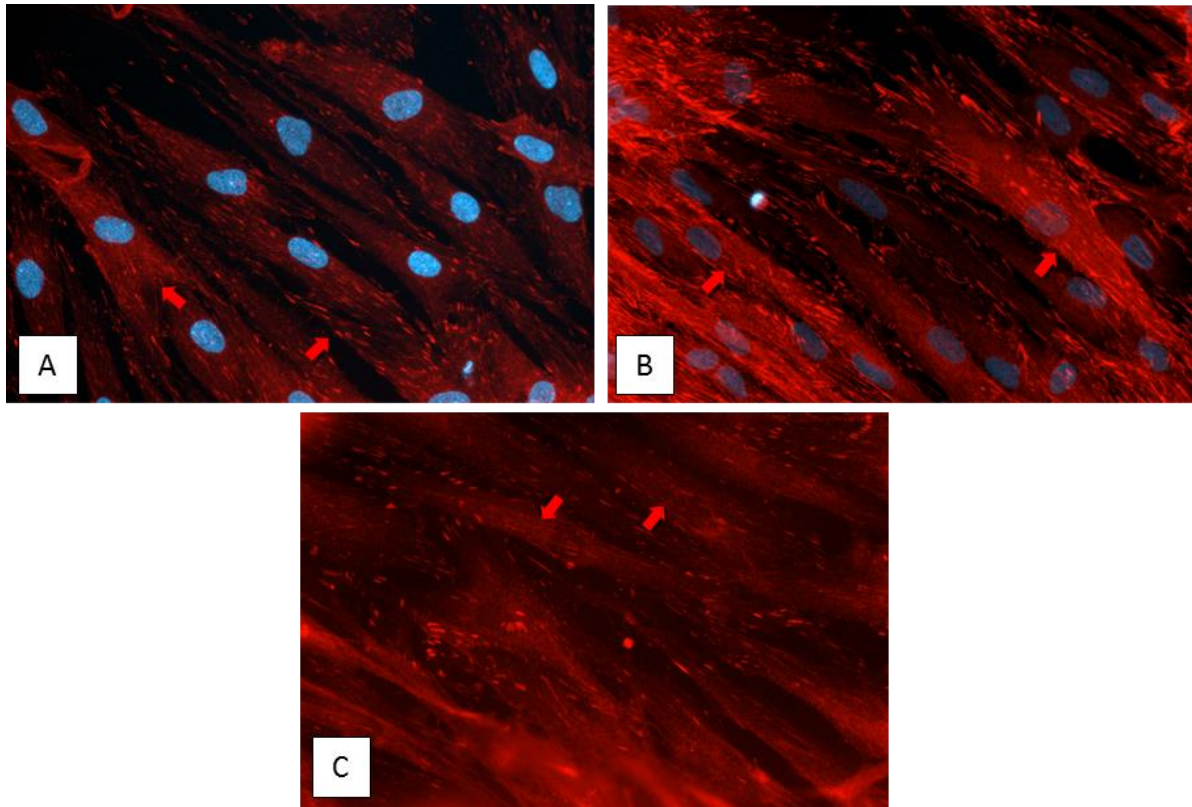
Vinkulin er en komponent som er til stede i FA, som er signaliserende komplekser som sørger for å regulere oppførselen til celler som cellemigrering (Wozniak et al. 2004). Phalloidin er et toksin fra soppen *Amanita phalloides* som binder og stabiliserer F-aktin (Cooper 1987), og det ble benyttet for å visualisere aktinfilamenter i fibroblastene. For å se om det var en endring i adhesjonspunktene og aktincytoskjelettet til fibroblastene ved stimulering med PEP ble det benyttet fluorescens immuncytokjemi for å se på farging av vinkulin. Det ble også utført forsøk hvor cellen ble stimulert med Hydrol og Carb, men disse resultatene ga ingen tydelig trend, og derfor er ikke disse resultatene tatt med i denne delen. Bilde av fibroblaster stimulert med Hydrol og Carb er vist i Figur A i vedlegget.

I kontrollprøven hvor fibroblastene har blitt inkubert i tre dager (Figur 11 A), er det FA (visualisert ved vinkulinfarging) jevnt fordelt i alle fibroblastene. Fibroblaster stimulert med PEP (Figur 11 C) har mye mindre FA, spesielt de som er lokalisert inne celler, sammenlignet med fibroblastene i kontrollprøven. I tillegg har det skjedd en endring i morfologi av fibroblastene, da disse er kortere og tykkere sammenlignet med cellene i kontrollprøven. Ved stimulering med TGF- β 1 (Figur 11 B) har antallet FA økt i fibroblastene.



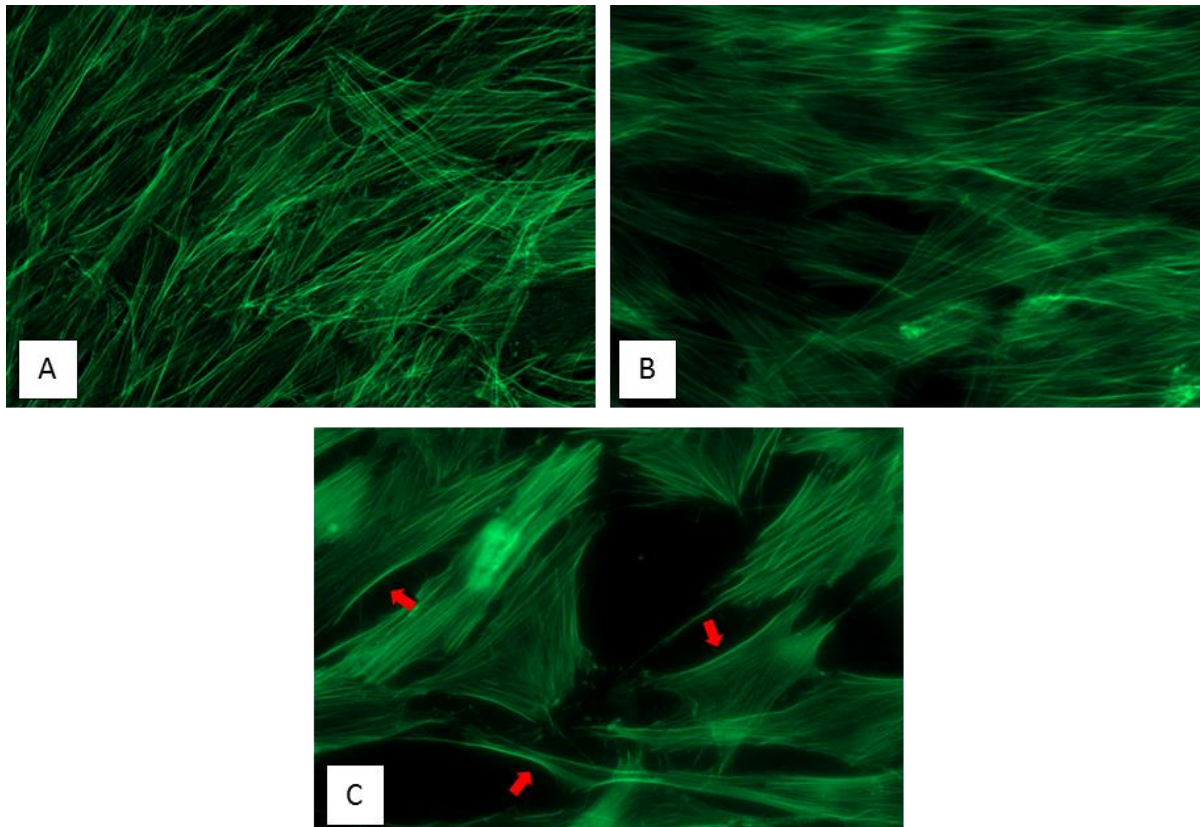
Figur 11: Effekten av stimulering med PEP og TGF- β 1 på fokale adhesjoner. Analyse ved fluorescens immuncytokjemi av fokale adhesjonsproteiner ved å studere mengde vinkulin, da dette er en komponent som er til stede i fokale adhesjoner. Fibroblastene ble stimulert i tre dager med transformerende vekstfaktor beta 1 (TGF- β 1) (B) og eggeskallmembranpulver (PEP) (C). Bilde A representerer kontrollprøven. TGF- β 1 ble benyttet som positiv kontroll. Bildene er fra samme forsøk og gjenspeiler trenden fra tre uavhengige celleforsøk som ble gjennomført under like betingelser. De røde pilene viser områdene i fibroblastene som gjenspeiler trenden fra de tre uavhengige celleforsøkene.

Ved ti dager inkubasjon er det fortsatt en jevn fordeling av FA i fibroblastene, som er blitt tykkere, i fibroblastene i kontrollprøven (Figur 12 A). I motsetning til fibroblaster som ble inkubert i tre dager med PEP, har fibroblaster stimulert i ti dager fått en jevn fordeling av FA (Figur 12 C), og ser mer lik ut som kontrollcellene. Fibroblaster stimulert med TGF- β 1 (Figur 12 B) har en økt mengde og tykkere FA sammenlignet med kontrollprøven.



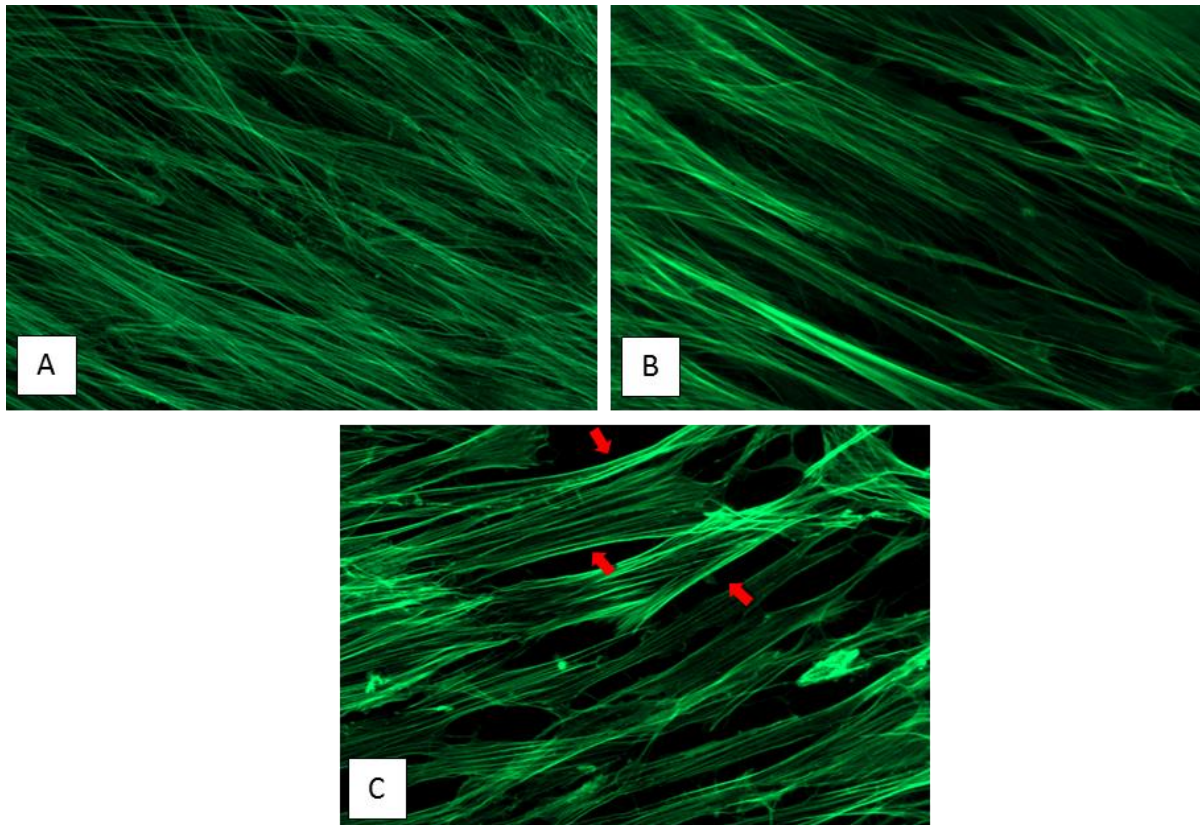
Figur 12: Effekten av stimulering med PEP og TGF- β 1 på fokale adhesjoner. Analyse ved fluorescens immuncytokjemi av fokale adhesjonsproteiner ved å studere mengde vinkulin, da dette er en komponent som er til stede i fokale adhesjoner. Fibroblastene ble stimulert i ti dager med transformerende vekstfaktor beta 1 (TGF- β 1) (B) og eggskallmembranpulver (PEP) (C). Bilde A representerer kontrollprøven. TGF- β 1 ble benyttet som positiv kontroll. Bildene er fra samme forsøk og gjenspeiler trenden fra tre uavhengige celleforsøk som ble gjennomført under like betingelser. De røde pilene viser områdene i fibroblastene som gjenspeiler trenden fra de tre uavhengige celleforsøkene.

I kontrollprøven (Figur 13 A) er det F-aktin (visualisert ved phalloidin) til stede både intracellulært og i ytterkanten av fibroblastene som er inkubert i tre dager. De samme resultatene ble observert i fibroblaster stimulert med TGF- β 1 (Figur 13 B). Hos fibroblastene stimulert med PEP (Figur 13 C) er det derimot en tendens til redusert mengden intracellulært F-aktin. I tillegg er det en tendens til at aktinfilamenter er mer lokalisert til ytterkantene av fibroblastene.



Figur 13: Effekten av PEP på cytoskjelett aktinfilamenter. Analyse ved fluorescens immuncytokjemi av aktinfilamenter hos fibroblaster stimulert i tre dager med transformerende vekstfaktor beta 1 (TGF- β 1) (B) og eggeskallmembranpulver (PEP) (C). Det ble benyttet phalloidin-farging for å se på uttrykkene av aktin da phalloidin binder seg til aktinet i fibroblastene. Bilde A representerer kontrollprøven. TGF- β 1 ble benyttet som positiv kontroll. Bildene er fra samme forsøk, men gjenspeiler trenden fra tre uavhengige celleforsøk som ble gjennomført under like betingelser. De røde pilene viser områdene i fibroblastene som gjenspeiler trenden fra de tre uavhengige celleforsøkene.

I kontrollprøven hvor fibroblastene ble inkubert i ti dager (Figur 14 A) er det en jevn fordeling av aktinfilamenter i alle fibroblastene. Fibroblaster stimulert med PEP i ti dager (Figur 14 C) har i motsetning til tre dager en sterkere phalloidin-farging både i ytterkantene og intracellulært, noe som er markert med røde piler. Dette antyder derfor til en økt mengde og tykkere aktinfilamenter i disse cellene. Resultatene for fibroblaster stimulert med viser de samme forholdene for aktinfilamenter i celler stimulert med TGF- β 1 (Figur 14 B).



Figur 14: Effekten av PEP på cytoskjelett aktinfilamenter. Analyse ved fluorescens immuncytokjemi av phalloidin hos fibroblaster stimulert i ti dager med transformerende vekstfaktor beta 1 (TGF- β 1) (B) og eggeskallmembranpulver (PEP) (C). Det ble benyttet phalloidin-farging for å se på uttrykkene av aktin da phalloidin binder seg til aktinet i fibroblastene. Bilde A representerer kontrollprøven. TGF- β 1 ble benyttet som positiv kontroll. Bildene er fra samme forsøk, men gjenspeiler trenden fra tre uavhengige celleforsøk som ble gjennomført under like betingelser. De røde pilene viser områdene i fibroblastene som gjenspeiler trenden fra de tre uavhengige celleforsøkene.

4.3 ESM-fraksjoners effekt på MMP-2, og dens regulatorer

4.3.1 Effekten på MMP-2

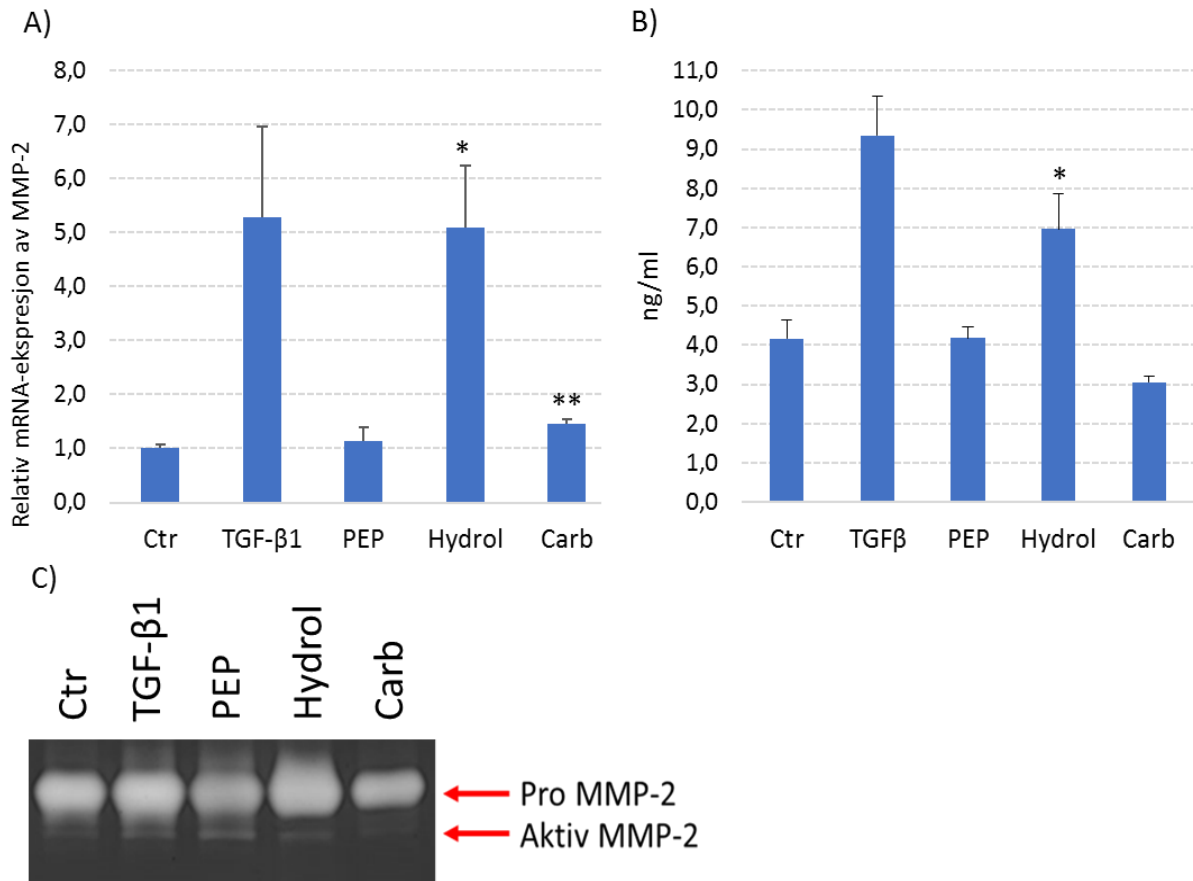
MMP-er er nødvendige enzymer i en sårhelingsprosess (Tregrove et al. 1999), og derfor ble det utført forsøk for å se hvordan ESM-fraksjonene påvirket aktiviteten til MMP-2. Det ble benyttet real-time PCR for å studere hvilken effekt ESM-fraksjonene har på ekspresjon av MMP-2-mRNA. I tillegg ble det benyttet ELISA for å se hvilken påvirkning ESM-fraksjonene hadde på mengde MMP-2 på proteinnivå, mens zymografi ble benyttet for å studere hvilken effekt det hadde på mengden aktiv MMP-2.

Etter stimulering av fibroblaster i tre dager med Hydrol, er det en signifikant økning av mRNA-ekspresjonen av MMP-2 (Figur 15 A). Også Carb gir en signifikant økning, men ikke like stor som ved bruk av Hydrol. PEP, derimot, gir ingen signifikant økning av mRNA-ekspresjonen. TGF- β 1 gir i likhet med Hydrol en stor økning i MMP-2-ekspresjonen, men økningen ved bruk av TGF- β 1 er ikke signifikant.

Figur 15 B viser resultatene fra ELISA-forsøket, hvor fibroblastene ble stimulert i tre dager med de ulike ESM-fraksjonene. Disse resultatene viser total mengde MMP-2 til stede i de ulike prøvene, mRNA- og proteinekspresjon samsvarer med unntak for Carb-fraksjonen. PEP gir ingen økning av MMP-2-ekspresjon, mens Hydrol gir en signifikant økning av MMP-2 sammenlignet med kontrollprøven. Carb derimot gir en reduksjon av MMP-2, men denne endringen er ikke signifikant. TGF- β 1 gir en økning av den totale mengden MMP-2, men heller ikke denne er signifikant.

Tykkelsen på de øverste båndene i zymografigelene gir en semi-kvantitativ indikasjon på hvor mye MMP-2 det er til stede i de ulike prøvene i forhold til hverandre (Figur 15 C).

Fibroblastene som ble stimulert i tre dager (Figur 15 C) gir en god indikasjon på at PEP stimulerer til økt mengde aktiv MMP-2 sammenlignet med kontrollprøven. Resultatene fra det samme blottet tilsier at Hydrol også gir en økning av aktiv MMP-2, men ikke i like stor grad som PEP. Carb derimot gir ingen økning i mengde aktive MMP-2. TGF- β 1 gir også en økning av aktiv MMP-2.



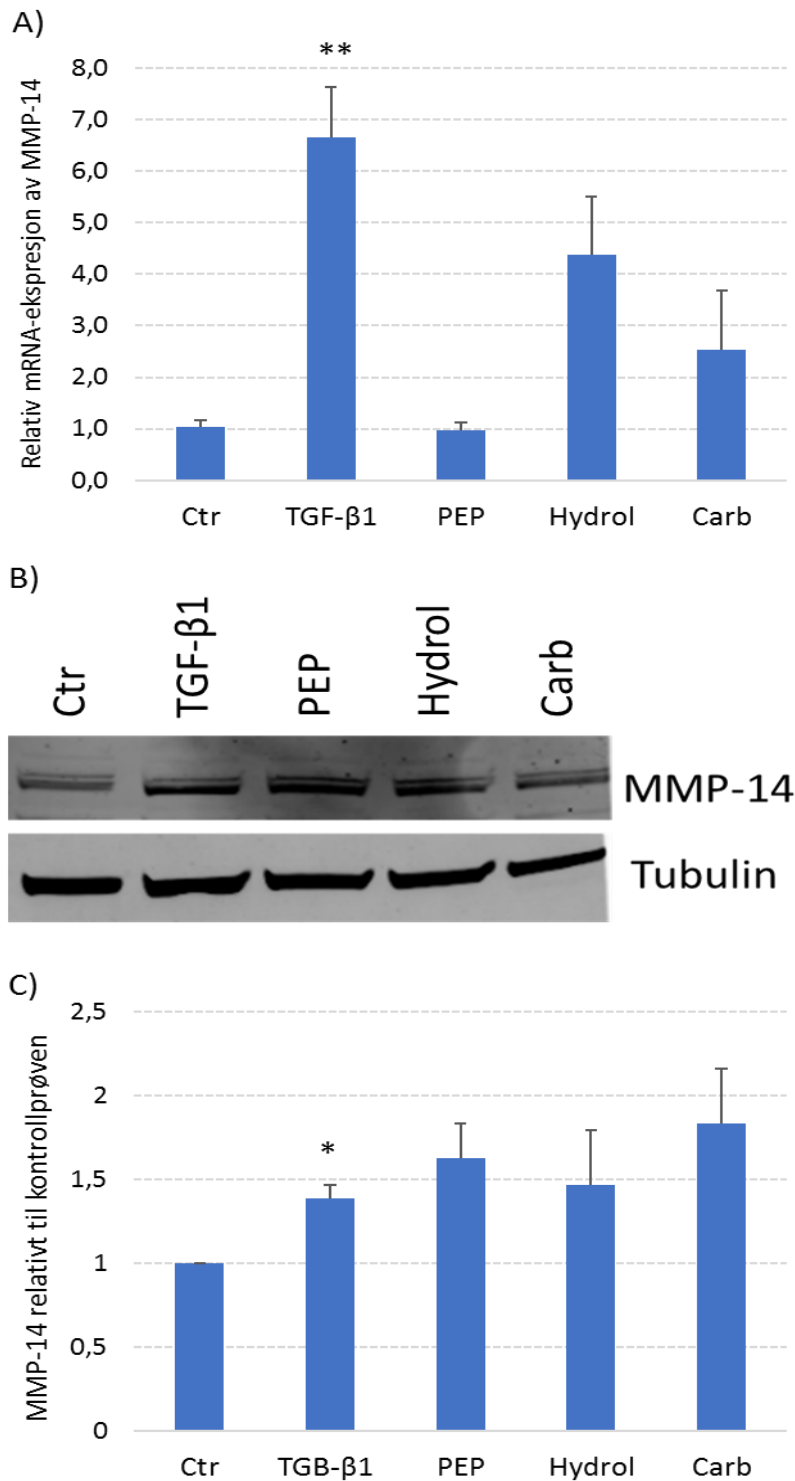
Figur 15: Effekten av ESM-fraksjoner på MMP-2. mRNA-ekspressjon (A) av MMP-2 i fibroblaster og total mengde MMP-2 (B) i prøvene stimulert i tre dager med eggeskallmembranpulver (PEP), hydrolysert PEP (Hydrol), karbohydrater av PEP (Carb) og transformerende vekstfaktor beta 1 (TGF- β 1). TGF- β 1 ble benyttet som positiv kontroll. Aktivering av MMP-2 ved tre dager stimulering (C) ved in-situ zymografi. Resultatene i A) representerer gjennomsnittet av tre uavhengige celleforsøk og i B) representerer de gjennomsnittet av tre celleforsøk fra samme cellebatch. Feilsøylene indikerer gjennomsnittets standardfeil. Signifikant forskjell for hver prøve i forhold til kontrollprøven er markert med stjerne (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Tykkelsen på båndene i C) indikerer mengde MMP-2 uttrykt i de forskjellige prøvene i forhold til kontrollprøven. Resultatet er fra et forsøk og gjenspeiler trenden fra tre uavhengige celleforsøk, som ble gjennomført under like betingelser.

4.3.2 Effekten på regulatorer av MMP-2-aktivitet (MMP-14 og TIMP-2)

MMP-14 påvirker reguleringen av MMP-2 ved at det aktiverer det, mens TIMP-2 er en naturlig hemmer av MMP-2-aktivitet. Derfor er disse viktige komponenter i reguleringen av MMP-aktivitet (Nagase et al. 2006; Vaalamo et al. 1999). Det var derfor ønskelig å studere hvilken effekt ESM-fraksjoner hadde på disse komponentene. Det ble benyttet real-time PCR og WB for å se på effekten av ESM-fraksjoner på MMP-14, mens det ble benyttet real-time PCR og ELISA for TIMP-2.

Fibroblastene som ble stimulert med PEP i tre dager (Figur 16 A) viser at det er ingen økning i mRNA-ekspresjon for MMP-14 sammenlignet med kontrollprøven. Derimot viser resultatene fra stimulering av Hydro og Carb at det er en tendens til økning av mRNA-ekspresjonen for MMP-14, hvor Hydrol gir den største økningen, men ingen av disse økningene er signifikante. TGF- β stimulerer derimot til en signifikant økning av mRNA-ekspresjonen av MMP-14.

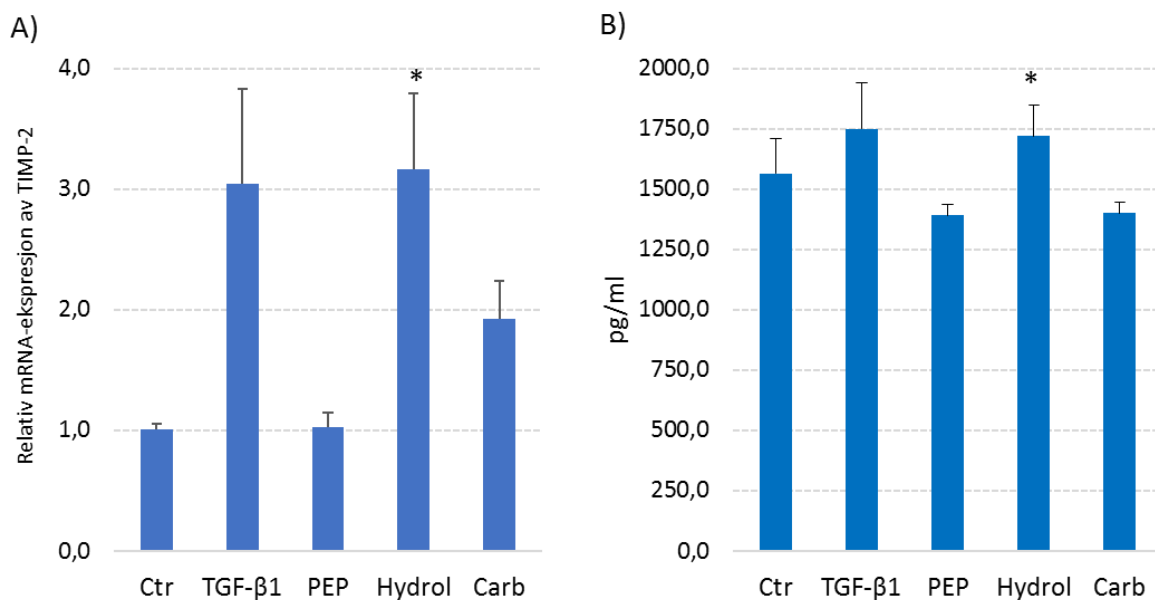
Figur 16 B viser MMP-14 båndene fra et WB-forsøk som gjenspeiler trenden fra til sammen tre WB-forsøk. Det ble utført en kvantitering av MMP-14-båndene fra de tre ulike WB-forsøkene, og dette er vist i Figur 16 C. Ved kvantitering av WB-båndene viser det en trend for økning av MMP-14 ved bruk av alle ESM-fraksjonene sammenlignet med kontrollprøven. Det er derimot kun økning av MMP-14 ved stimulering av TGF- β 1 som er signifikant.



Figur 16: **Effekten av ESM-fraksjoner på MMP-14.** Relative mRNA-ekspressjon (A) av MMP-14 etter tre dager inkubasjon, og nivået av proteinekspressjon (B) av MMP-14 i fibroblaster etter tre dager inkubasjon. Figur C) viser kvantiteringsverdiene til de ulike α -SMA-båndene, hvor fibroblastene ble stimulert i tre dager. Verdiene er relatert til kontrollprøven. Fibroblastene er blitt behandlet med eggeskallmembranpulver (PEP), hydrolysert PEP (Hydrol), karbohydrater av PEP (Carb) og transformerende vekstfaktor beta 1 (TGF- β 1). TGF- β 1 ble benyttet som en positiv kontroll. Feilsøylene figur i A) indikerer gjennomsnittets standardfeil. Signifikant forskjell for hver prøve i forhold til kontrollprøven er markert med stjerne (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Dette gjelder også verdiene i C). Resultatene i A) representerer gjennomsnittet av tre uavhengige celleforsøk, mens tykkelsen på båndene i B) indikerer mengde MMP-14 uttrykt i de forskjellige prøvene i forhold til kontrollprøven. Resultatet er fra et forsøk og gjenspeiler trenden fra tre uavhengige celleforsøk, som ble gjennomført under like forhold. Resultatene i C) viser gjennomsnittet av tre uavhengige WB-forsøk, og feilsøylene indikerer gjennomsnittets standardfeil.

Resultatene fra real-time PCR-forsøkene (Figur 17 A), hvor fibroblastene ble stimulert i tre dager, viser ingen økning av mRNA-ekspressjon ved bruk av PEP i forhold til kontrollprøven. Ved bruk av Hydrol er det en signifikant økning av mRNA-ekspressjon for TIMP-2. Også ved stimulering av fibroblaster med Carb er det en økning av mRNA-ekspressjonen, men denne økningen er derimot ikke signifikant, og heller ikke så stor som ved bruk av Hydrol. TGF- β 1 gir i likhet med Hydrol en økning i mRNA-ekspressjon av TIMP-2, men denne økningen er ikke signifikant.

Resultatene fra ELISA-forsøket (Figur 17 B) viser at Hydrol gir en signifikant økning i den totale mengde TIMP-2 i prøven sammenlignet med kontrollprøven. PEP og Carb gir derimot en liten nedgang i mengde TIMP-2 sammenlignet med kontrollprøven, men disse endringene er ikke signifikante. TGF- β 1 gir en liten økning av den total mengden TIMP-2, men heller ikke denne økningen er signifikant.



Figur 17: Effekten av ESM-fraksjoner på TIMP-2. mRNA-ekspressjon (A) av TIMP-2 i fibroblaster og total mengde TIMP-2 (B) fra fibroblaster stimulert i tre dager med eggeskallmembranpulver (PEP), hydrolysert PEP (Hydrol), karbohydrater av PEP (Carb) og transformerende vekstfaktor beta 1 (TGF- β 1). TGF- β 1 ble benyttet som positiv kontroll. Resultatene i A) representerer gjennomsnittet av tre forsøk, mens resultatene i B) representerer gjennomsnittet av tre paralleller fra samme cellebatch. Feilsøylene indikerer gjennomsnittets standardfeil. Signifikant forskjell for hver prøve i forhold til kontrollprøven er markert med stjerne (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

5 Diskusjon

I dagens samfunn er sår som gror sakte, og de sårene som ikke vil gro i det hele tatt, et stort problem. Behandling av disse sårene koster samfunnet mange millioner kroner hvert år. Kroniske sår påvirker livskvaliteten til de som har dem, og i verste fall vil det i enkelte tilfeller føre til amputasjon (Micaelsen et al. 2017; Rønse 2012). På grunnlag av dette er det nødvendig med utvikling av nye sårhelingsprodukter som er effektive, i tillegg til at de er kostnadseffektive. Gjennom flere hundre år er ESM blitt benyttet som en naturlig bandasje i Kina, hvor det har ført til positive resultater for sårhelingsprosessen (Sah & Rath 2016). Fram til nå har man ikke visst hvorfor ESM gjør at vanskelige sår gror raskere. For å kunne produsere et effektivt lavkostnads sårhelingsprodukt basert på ESM, er det viktig å teste om det industrielle produktet har sårhelende egenskaper som påvist for intakt ESM, og betydning for bioaktivitet ved prosessering. I tillegg må ulike fraksjoner av ESM sammenlignes for å studere om en av fraksjonene er mer effektive enn de andre, for å kunne få et mest mulig effektivt sårhelingsprodukt. Siden fibroblaster spiller en stor og viktig rolle i sårhelingsprosessen er det i denne masteroppgaven studert nærmere hvilken påvirkning ESM-fraksjoner har på ulike deler av fibroblastaktivitet.

5.1 Effekten av PEP på fibroblastaktivitet

5.1.1 Effekt av PEP på proliferasjon og ekstracellulær matriksproduksjon

Ved stimulering av fibroblaster med PEP er det en signifikant økning av proliferasjon hos fibroblastene sammenlignet med kontrollprøven (Figur 8 A). Ved viabilitetsforsøket (Figur 8 B) er det derimot en liten nedgang i prosent viabilitet av fibroblaster stimulert med PEP, men denne reduksjonen er så liten at den ikke er reell. Dette viser at PEP ikke har toksisk effekt på fibroblastene. Det er vist ved flere studier at HA, som er hovedtypen GAG til stede i PEP (Vuong et al. 2017), er en modulator av proliferasjon av fibroblaster (Greco et al. 1998; Price et al. 2007). HA er derfor en interessant komponent i PEP som kan være en av faktorene som gir en positiv effekt på proliferasjon av fibroblaster. TGF- β 1 er en viktig komponent for påvirkning av fibroblaster i en sårhelingsprosess. En av prosessene det påvirker er proliferasjon (Bielefeld et al. 2013), noe resultatene i Figur 8 A støtter.

I en sårhelingsprosess migrerer fibroblaster inn i et sår, prolifererer, produserer ECM og differensierer til myofibroblaster (Vedrenne et al. 2012). Ved stimulering av fibroblastene med PEP-fraksjonen er det ingen signifikant økning av de fire ECM-komponentene, syndekan-4, kollagen type I, dekorin og biglykan, sammenlignet med kontrollprøven (Figur

9). Produksjon av ECM er en kompleks prosess og derfor kan fraværet av økt ECM-produksjon ved bruk av PEP i disse forsøkene være et resultat av flere prosesser. Resultatene fra ECM-forsøkene gir en indikasjon på at to av grunnene kan være: 1) Komponentene i PEP-fraksjonen er ikke nok tilgjengelig for fibroblastene, slik at de er med på å påvirke økt produksjon av ECM. Syntetisering og deponering av ECM på utsiden av cellene skjer i respons til vekstfaktorer, cytokiner og mekaniske signaler via overflateresptorer (Schultz & Wysocki 2009). Siden PEP ikke er løselig og opprettholder den fiberliknende strukturen (Vuong et al. 2017), kan dette tenkes å være en grunn til at faktorene nødvendig for produksjon av ekstracellulære komponenter ikke er tilgjengelig nok for fibroblastene (Ohto-Fujita et al. 2011). En av faktorene som kan tyde på at de ikke får påvirket produksjonen av ECM-komponenter ved bruk av PEP er TGF- β 1. TGF- β 1 er en faktor som stimulerer produksjon av kollagen type I (Gabbiani 2003) og biglykan (Kähäri et al. 1991), noe som også TGF- β 1-resultatene i Figur 9 gjenspeiler. 2) PEP-fraksjonen kan gi en ulik stimulering av fibroblaster enn de to andre ESM-fraksjonene, slik at fibroblastene fra de ulike prøvene kan befinne seg i forskjellige stadier av sårhelingsprosessen. Differensiering av myofibroblaster er assosiert med en signifikant oppregulering av ECM-komponenter (Sandbo & Dulin 2011). På grunnlag av dette kan resultatene i Figur 9 derfor også skyldes at PEP stimulerer fibroblastene ulikt fra de andre ESM-fraksjonene. Det kan tyde på at PEP har en tregere reaksjonsmekanisme for differensiering av fibroblaster til myofibroblaster sammenlignet med de to andre ESM-fraksjonene.

5.1.2 Effekt av PEP på fibroblastdifferensiering og migrering

5.1.2.1 Effekten på α -SMA-ekspressjon

TGF- β 1 er en stimulator for ekspresjon av α -SMA, som er viktig for sammentrekningskraft av ECM og lukking av sår (Hinz 2007). Siden det kun er myofibroblaster som uttrykker α -SMA, er α -SMA en indikator på at fibroblastene er differensiert til myofibroblaster (Gabbiani 2003; Li & Wang 2011). Ved tre dager stimulering med PEP er det ingen økning i mRNA-ekspressjon av α -SMA (Figur 10 A). Ved ti dager stimulering er det derimot en signifikant økning av α -SMA sammenlignet med kontrollprøven (Figur 10 B). Ved å se på kvantiteringsverdiene til proteinuttrykket av α -SMA (Figur 10 E og F) viser resultatene ved stimulering med PEP en lik trend som uttrykkningen av mRNA-ekspressjon av α -SMA. Ved tre dager stimulering er det ingen signifikant økning av α -SMA-ekspressjonen, men det er det derimot ved ti dager stimulering. Da ekspresjonen av α -SMA kun er signifikant ved ti dager, tyder det på at PEP har en langtidseffekt på ekspresjon av α -SMA. Dette støttes opp av

resultatene fra produksjonen av ECM-komponenter hvor PEP sitt fravær av økt produksjon av ECM-komponenter gir en indikasjon på at PEP bruker lang tid på differensiering av fibroblaster til myofibroblaster. Ved stimulering av fibroblaster med TGF- β 1 i tre dager (Figur 10 A), er det ingen signifikant økning av mRNA-ekspresjonen av α -SMA, men det er det derimot ved ti dager stimulering (Figur 10 B). Proteinnivået av α -SMA viser en signifikant økning ved stimulering med TGF- β 1 i tre dager sammenlignet med kontrollprøven (Figur 10 E). Også ved ti dager stimulering med TGF- β 1 er det en økning av α -SMA (Figur 10 F). Denne økningen er ikke signifikant, men økningen er såpass høy at den likevel er reell. Ved at mRNA-ekspresjonene av α -SMA ved stimulering med TGF- β 1 ikke på langt nær øker like mye som proteinekspressjonen av α -SMA, kan det tyde på at det er ulike reguleringsmekanismer for uttrykkning av α -SMA på mRNA-nivå og proteiner av α -SMA. Disse indikasjonene er støttet av flere studier som viser at det kan være en uoverensstemmelse mellom den relative mengden mRNA og proteinekspressjon, og grunnen til dette kan være at en rekke regulatoriske prosesser oppstår etter at mRNA er laget, altså at det er en post-transkripsjonell regulering (Vogel & Marcotte 2012; Wellington et al. 2002). Det er vanlig i celler fra pattedyr at mengden mRNA produsert er mye lavere enn mengden proteiner, da det som regel er produsert to kopier proteiner av et gitt mRNA per time (Vogel & Marcotte 2012).

5.1.2.2 Effekten av PEP på cellemigrasjon

Ved sårdannelse skapes det et åpent rom i epitellaget. For å lukke dette og gjenopprette en barriere mot omgivelsene er migrasjon av fibroblaster inn i såret en viktig prosess (Bielefeld et al. 2013). Vinkulin er en viktig komponent i og en markør for FA. FA linker ECM til aktincytoskjelettet, og skaper et signaliserende kompleks som er med på å regulere oppførselen til celler. Denne koblingen er med på å formidle blant annet celleadhesjon og migrering (Case et al. 2015; Wozniak et al. 2004). For å se om PEP har effekt på migrering av celler ble effekten av PEP på FA i fibroblastene studert. Ved tre dager stimulering med PEP av fibroblaster (Figur 11 C) er det en betydelig reduksjon av intracellulær vinkulinfarging sammenlignet med kontrollprøven, samt at det er reduserte vinkulinpunkter i ytterkantene av fibroblastene. Dette betyr at det er en reduksjon av FA-komplekser i fibroblastene. I tillegg har det skjedd en endring i morfologi av fibroblaster stimulert med PEP. Sammenlignet med kontrollcellene har fibroblastene blitt kortere og tykkere. Dette er også vist i tidligere studier hvor en reduksjon av vinkulin til stede i fibroblaster har gitt en rundere fenotype (Rodríguez Fernández et al. 1993). Dette indikerer en mindre adhesiv og migrerende fenotype av

fibroblaster. Videre er det ved tre dager stimulering av fibroblaster med PEP (Figur 13 C) en tendens til redusert mengde intracellulære aktinfilamenter med en økt mengde i ytterkantene av fibroblastene. Migrering er en koordinert prosess som er avhengig av polymerisering av aktinfilamenter og remodelering (Qian et al. 2004). Ved en uttrykking av mer aktinfilamenter i ytterkanten av fibroblastene som det er ved tre dager stimulering med PEP, kan det være en indikasjon på at fibroblastene er i stadium for migrering.

Ved ti dager stimulering av fibroblaster med PEP (Figur 12 C) er endringen i cellemorfologi og FA-punkter mindre endret sammenlignet med kontrollcellene, men det er flere og tykkere stressfiber intracellulært i fibroblastene. Dette kan tyde på at fibroblastene har mindre migrerende fenotype sammenlignet med fibroblastene ved tre dager stimulering. Da fibroblastene migrerer mindre kan det være en indikasjon på at de er kommet lengre i differensieringsprosessen. Dette støttes opp av resultatene til ekspresjon av α -SMA og dannelse av tykkere stressfiber i fibroblaster ved ti dager, som indikerer at PEP har en sen påvirkning av differensiering av fibroblaster til myofibroblaster (Acharya et al. 2008).

I samsvar med dette, er det ved både tre og ti dager stimulering med TGF- β 1 (Figur 11 B og Figur 12 B) en økning av FA-punkter, og lengden på FA-punktene er blitt lengere sammenlignet med kontrollprøven. Dette er en naturlig reaksjon da TGF- β 1 stimulerer ekspresjon av α -SMA og differensiering av myofibroblaster (Hinz 2007). Ved en differensiering av fibroblaster til myofibroblaster vil lengden på FA øke da α -SMA er med på å danne mer supermodent FA (Hinz et al. 2003).

Syndekan-4 er en komponent som deltar i celle-celle- og celle-matriksinteraksjoner, og som er med på å modulere adhesjon og migrering av mange celletyper. Syndekan-4 samarbeider med adhesjonsmolekyler og binder komponenter relevant for cellemigrering. Da en overekspressjon av syndekan-4 resulterer i signifikant hemming av cellemigrasjon (Rodríguez-Manzaneque et al. 2009), er det naturlig at PEP ved tre dager stimulering ikke gir en økning av mRNA-ekspressjonen til syndekan-4. Dette da flere forsøk i denne masteroppgaven indikerer at PEP ikke før ved sen stimulering påvirker differensieringen av fibroblaster til myofibroblaster, og at det ved en tidlig stimulering påvirker migreringen av fibroblaster.

5.1.3 Effekten av PEP på MMP-2 og dens regulatorer

I en sårhelingsprosess er det en rekke remodelerende hendelser som krever aktivitet av MMPer og dens naturlige hemmere (Madlener et al. 1998), da MMPer er med på å frigi vekstfaktorer som er bundet til ECM eller cellemembranen. I tillegg er det med på å aktivere

andre MMPer og fordøyer ECM-komponenter (Gill & Parks 2008; Nagase et al. 2006; Page-McCaw et al. 2007). mRNA-ekspressjon av MMP-2 har ingen økning ved stimulering med PEP i tre dager sammenlignet med kontrollprøven (Figur 15 A). Det samme resultatet er vist for den totale mengden MMP-2 målt ved hjelp av ELISA (Figur 15 B). Ved å se på resultatene fra zymografiforsøkene er det derimot en annen trend for bruk av PEP (Figur 15 C). Her er det en tydelig økning av aktiv MMP-2 sammenlignet med kontrollprøven. Dette viser dermed at PEP ikke stimulerer til økt produksjon av MMP-2, men er med på å stimulere til økt mengde aktiv MMP-2. Hvilke komponenter det er som stimulerer aktiviteten til MMP-2 er ukjent, men det er vist at ekstracellulære proteaser påvirker og aktiverer hverandre i et komplekst nettverk (He et al. 1989; Shamamian et al. 2001; Zhu et al. 2001). Proteomiske studier utført viser at PEP inneholder enzymer (Ahmed et al. 2017), og derfor kan det tyde på at dette kan være en faktor som spiller inn på å øke mengden aktiv MMP-2.

Regulering og aktivering av MMPer er et kritisk steg da en forstyrrelse av dette kan føre til overproduksjon av MMPer og for høy grad av ECM-degradering (Tregrove et al. 1999). MMP-14 er en komponent som kan aktivere MMP-2 (Nagase et al. 2006), mens TIMP-2 hemmer aktiviteten til MMP-2 (Vaalamo et al. 1999). Ved tre dager stimulering av fibroblaster med PEP er det ingen økning i mRNA-ekspressjon av MMP-14 sammenlignet med kontrollprøven (Figur 16 A). Ved stimulering med PEP i tre dager er det en liten økning i proteinnivået av MMP-14, men denne økningen er ikke signifikant (Figur 16 C). Da disse resultatene viser at det ikke er signifikant økning av MMP-14 ved bruk av PEP, tyder det på at MMP-14 ikke kan være årsaken til en økning i aktiv MMP-1 ved bruk av PEP, og at det er andre faktorer som spiller inn som henvist til i forrige avsnitt.

Ved stimulering av fibroblaster med PEP i tre dager er det ingen økt produksjon av TIMP-2, verken på mRNA- eller proteinnivå sammenlignet med kontrollprøvene (Figur 17 A og B). TIMP-2-resultatene samsvarer med resultatene i MMP-2-forsøket. Siden PEP ikke er med på å øke produksjonen av TIMP-2 vil ikke det gir en økt hemming av MMP-2, og dette er derfor gunstig for aktiveringen av MMP-2 som er økt ved bruk av PEP (Figur 15 C).

5.2 Effekten av Hydrol og Carb på fibroblastaktivitet

5.2.1 Effekten av Hydrol og Carb på proliferasjon og ekstracellulær matriksproduksjon

Fibroblaster stimulert med Hydrol gir i likhet med PEP en signifikant økning av proliferasjon hos fibroblaster (Figur 8 A). Fibroblaster stimulert med Carb gir derimot ingen økning av

proliferasjon (Figur 8 A). I likhet med PEP-fraksjonen består også Carb av store mengder HA (Vuong et al. 2017), som skal ha en positiv effekt på proliferasjon av fibroblaster (Greco et al. 1998; Price et al. 2007). På grunnlag av at Carb-fraksjonen som kun inneholder karbohydrater (Vuong et al. 2017), ikke gir økt proliferasjon, og at både Hydrol og PEP som inneholder proteiner (Ahmed et al. 2017), gir en økning i proliferasjon, kan dette tyde på at proteiner spiller en viktig rolle for proliferasjon, og at HA alene ikke kan påvirke proliferasjonen av fibroblaster. At hydrolyserte proteiner har en positiv påvirkning på proliferasjon er allerede vist ved studier hvor hydrolyserte fiskeproteiner har promotert celleproliferasjon (Girón-Calle et al. 2010). Resultatene fra viabilitetsforsøket (Figur 8 B) viser at Hydrol og Carb ikke har toksisk effekt på fibroblaster, da disse fraksjonene ikke gir reduksjon av fibroblaster.

Både Hydrol og Carb gir økning av de ECM-komponentene, syndekan-4, kollagen type I, dekorin og biglykan, men økningen av kollagen type I og dekorin ved stimulering av Hydrol er ikke signifikant (Figur 9). Som nevnt i avsnitt 5.1 skjer syntetisering og avsetning av ECM på utsiden av cellene som respons på vekstfaktorer, cytokiner og mekaniske signaler via overflateresponser (Schultz & Wysocki 2009). Siden Hydrol gir en økt produksjon av de aktuelle ECM-komponentene er det mye som tyder på små peptider sammenlignet med større proteinmolekyler som er til stede i PEP-fraksjonen, er mer gunstig for produksjonen av ECM-komponenter. En av de viktigste vekstfaktorene for produksjon av ECM-komponenter er TGF- β 1, og det er spesielt en viktig stimulator for kollagen type I (Vedrenne et al. 2012) og biglykan (Kähäri et al. 1991). Dette er gjenspeilet i resultatene i Figur 9 hvor TGF- β 1 har gitt en stor økning i produksjon av kollagen type I og biglykan. Det som er litt interessante resultater er at det i denne studien ikke er stor forskjell på ekspresjonen av dekorin og biglykan ved bruk av Hydrol. Dette fordi at det ved en tidligere studie er vist at det er en økning av dekorin-ekspresjon ved bruk av hydrolysert ESM, men ikke for biglykan, som har som kan tyde på at det er ulike reguleringsmekanismer for ekspresjon av dekorin og biglykan (Ohto-Fujita et al. 2011). Siden Carb-fraksjonen stimulerer produksjonene av ECM, tyder det på at TGF- β og andre proteiner alene ikke er ansvarlig for syntetisering av ECM, men at karbohydrater også er viktig i denne prosessen. Det at både Hydrol og Carb stimulerer til økt produksjon av syndekan-4 og kollagen type I er en fordel for sårhelingsprosessen da interaksjoner mellom kollagen type I og syndekan-4 er til stede i FA (Alexopoulou et al. 2007). Kollagen danner sammen med fibrin og fibronektin et strukturelt nettverk som tillater adhesjon og migrering av celler ved at de har ulik orientering (Midwood et al. 2004; Tracy et al. 2016). Oppregulering av dekorin er en viktig faktor for celleadhesjon, migrering og

proliferasjon gjennom dens binding av ECM-komponenter, regulering av aktivitet for ulike vekstfaktorer og binding av vekstfaktorreseptorer (Järveläinen et al. 2006; Reed & Iozzo 2002). Biglykan er viktig da det kan blokkere bindingen mellom dekorin og TGF- β (Hildebrande et al. 1992).

5.2.2 Effekten av Hydrol og Carb på fibroblastdifferensiering

Både Hydrol og Carb gir en økning av ekspresjonen av α -SMA ved tre og ti dager stimulering, men ved ti dager er ikke økningen ved bruk av Hydrol signifikant (Figur 10 A og B). Sammenlignet med PEP-fraksjonen gir Hydrol en mye høyere økning av mRNA-ekspresjonen av α -SMA, både ved tre og ti dager stimulering. Dette kan gi en indikasjon på at peptidene som blir dannet under hydrolysering av PEP er viktig for en rask stimulering av fibroblaster og dermed kjappere differensiering av fibroblaster til myofibroblaster. ED-A cellulær fibronektin er et viktig protein for differensieringen av fibroblaster til myofibroblaster (Kohan et al. 2010), og dette proteinet er tilstede i ESM (Ahmed et al. 2017). Også Carb-fraksjonen gir signifikant økning av mRNA-ekspresjonen av α -SMA ved både tre og ti dager stimulering, og dette viser at også karbohydratene i ESM er viktige komponenter i differensieringsprosessen fra fibroblaster til myofibroblaster. Dette er også vist ved tidligere studier som viser at HA og proteoglykaner er involvert i differensielle prosesser (Toole 1991). Ved bruk av Hydrol og Carb er det ulike resultater for mRNA-ekspresjonene og proteinnivået. Ved tre dager stimulering av fibroblastene er det ingen signifikant økning i proteinnivået av α -SMA sammenlignet med kontrollprøven, noe det derimot er på mRNA-nivå ved stimulering med Hydrol og Carb. Dette tyder på at det også her er ulike reguleringsmekanismer for ekspresjon av α -SMA på mRNA- og proteinnivå.

5.2.3 Effekten av Hydrol og Carb på MMP-2 og dens regulatorer

Stimulering av fibroblaster i tre dager med Hydrol gir i motsetning til PEP-fraksjonen, en høy signifikant økning i mRNA-ekspresjon av MMP-2 sammenlignet med kontrollprøven (Figur 15 A). Det samme gjelder resultatene fra ELISA-forsøket (Figur 15 B). PEP gir ikke økt uttrykk av MMP-2, mens Hydrol derimot gir en signifikant økning i uttrykket av MMP-2. Dette tyder på at PEP og Hydrol har forskjellig reguleringsmekanisme for regulering av MMP-2. Det at proteinene i Hydrol-fraksjonen er kuttet opp i mindre peptider kan tyde på at disse peptidene i større grad kan stimulere til økt produksjon av MMP-2. At hydrolysert ESM har MMP-regulerende egenskaper er også vist i en tidligere studie hvor det er en høyere ekspresjon av MMP-2 ved behandling med hydrolysert ESM (Ohto-Fujita et al. 2011). Ved stimulering av fibroblast i tre dager med Carb er det en signifikant økning i mRNA-

ekspresjonen av MMP-2, men denne økningen er veldig liten (Figur 15 A). Ved tre dager stimulering med Carb er det verken økning av MMP-2 på proteinnivå (Figur 15 B) og økning av aktiv MMP-2 sammenlignet med kontrollprøven (Figur 15 C). Det er påvist at kondroitinsulfat som er til stede i Carb (Vuong et al. 2017) kan binde til pro-MMP-2 og sørge for aktivering av MMP-2 (Iida et al. 2007), men det er såpass lite kondroitinsulfat til stede i Carb at det kan være grunnen til at Carb-fraksjonen ikke stimulerer til økt aktivitet av MMP-2.

Carb gir ingen signifikant økning ved tre dager stimulering verken når det kommer til ekspresjon av MMP-14 eller TIMP-2 på mRNA-nivå (Figur 16 A og Figur 17 A). Heller ikke på proteinnivå er det økt produksjon av MMP-14 og TIMP-2 (Figur 16 B og Figur 17 B). Dette viser at proteinene er viktige komponenter for stimulering av MMP-14 og TIMP-2. Den eneste av ESM-fraksjonene som gir en signifikant økning av både mRNA- og proteinekspressjonen av TIMP-2, er Hydrol (Figur 17 A og B). Dette er et interessant resultat da det viser at peptider er viktige for ekspresjonen av TIMP-2.

5.3 Metodiske betraktninger

For å studere effekten av ESM-fraksjoner på uttrykkningen av FA ble det benyttet fluorescens immuncytokjemi. Dette er en effektiv metode for å studere lokalisering og mengde av enkelte komponenter til stede i celler, men i gjennomføringen av denne masteroppgaven var det noen utfordringer ved bruk av denne metoden. PEP-fraksjonen er ikke løselig, og fester seg derfor til fibroblastene og ble liggende som et lag over disse. Siden de var festet til fibroblastene var det vanskelig å fjerne dette pulveret ved fikseringen av cellene, uten at cellene også forsvant. Ved mikroskopiering og bildetaging var det derfor vanskelig å finne fibroblaster som ikke var dekket av PEP, og dette førte til at det ble en begrenset kvalitet på disse bildene. Det var også en utfordring å ta bilder av fibroblastene som var stimulert med TGF- β 1. Dette fordi prøvene inneholdt store mengder fibroblaster som lå lagvis, og da det var ønskelig å ta bilder av kun ett cellelag for lettere å kunne se hvor mye FA og aktinfilamenter det var til stede i de enkelte cellene.

På tross av at real-time PCR er en av de mest sensitive, effektive og reproduerbare metodene for å måle genekspresjon (Wong & Medrano 2005), ga verdiene fra de parallelle forsøkene utført i denne oppgaven, store sprik i resultatene for de forskjellige fraksjonene, og standardavvikene var ganske høye for enkelte forsøk.

6 Konklusjon

Denne studien har gitt ny innsikt til en del av den molekylære mekanismen som ligger til grunn for hvorfor ESM har en positiv effekt på fibroblastaktiviteten i en sårhelingsprosess. Både PEP og Hydrol ga en signifikant økning av fibroblastproliferasjon, noe derimot ikke Carb-fraksjonene gjorde. Dette kan tyde på at proteiner eller peptidsekvenser er viktige stimulatorer for celleproliferasjon. Ved å utføre en viabilitetstest var det ingen av ESM-fraksjonene som var toksiske for fibroblaster. Resultatene fra ECM-produksjon viser en tydelig trend for at PEP ikke gir en økt produksjon av de fire ECM-komponentene, syndekan-4, kollagen type I, dekorin og biglykan ved en tidlig stimulering, mens både Hydrol og Carb ga en økt stimulering av disse komponentene. Dette kan tyde på at Hydrol- og Carb-fraksjonen er mer tilgjengelige for cellene og stimulering av ECM-produksjon, og at det er spesifikke komponenter av peptider og karbohydrater som kan stimulere denne prosessen.

Effekten på α -SMA, FA-punkter og aktinfilamenter ble studert for å analysere effekten av ESM-fraksjoner på differensiering og migrering av celler. Ved en tidlig stimulering gir ikke PEP økt produksjon av α -SMA, men det gjør den derimot ved en sen stimulering er økning av α -SMA med bruk av PEP signifikant. Dette gir en indikasjon på at PEP stimulerer til en økt differensiering av fibroblaster. På mRNA-nivå gir både Hydrol og Carb en økt ekspresjon av α -SMA, både ved tidlig og sen stimulering, men på proteinnivå har ikke Hydrol og Carb like stor påvirkning på α -SMA produksjonen. Dette kan tyde på ulike reguleringsmekanismer, men at alle ESM-fraksjonene gir en økt stimulering av differensiering av fibroblaster til myofibroblaster ved ti dager stimulering. Studier av effekten av PEP på FA og aktinfilamenter støtter opp om endring av morfologi mot en differensiert fenotype. Hos fibroblastene simulert med PEP i tre dager er det derimot en tendens til redusert mengde intracellulær aktinfilamenter. I tillegg er det en tendens til at det er mer aktinn i ytterkantene av fibroblastene, rundere morfologi og redusert FA. Dette tyder på at PEP kan påvirke migrasjonen av fibroblaster ved et tidlig stadium.

Det er Hydrol som gir størst økning av MMP-2-ekspresjonen, mens PEP og Hydrol stimulerer til økt aktiv MMP-2. Verken PEP, Hydrol eller Carb gir signifikant økning av uttrykkningen til MMP-14. Ved uttrykkningen av TIMP-2 er det kun Hydrol som gir en signifikant økning. Dette viser at Carb har liten eller ingen påvirkning på stimulering av MMP-2, MMP-14 og TIMP-2. Dette kan tyde på at spesifikke proteiner eller peptidsekvenser er mer viktigere i reguleringen av MMP-aktivitet til cellene.

Resultatene fra denne masteroppgaven viser derfor at PEP har en positiv effekt på fibroblastaktivitet som er viktig for sårheling, og at ESM-fraksjoner påvirke fibroblastaktiviteten forskjellig, torlig på grunn av ulike egenskaper. Det kreves videre studier for å økt forståelse av hvilke mekanismer som er involvert.

7 Videre arbeid

Det neste steget relatert til dette arbeidet vil være å gjøre flere WB-forsøk hvor man ser på uttrykkningen av MMP-2, MMP-14 og TIMP-2, for deretter å kvantitere båndene. Dette for å sammenligne resultatene fra WB-forsøkene allerede utført i dette forsøket, for å se om flere forsøk kunne resultere i signifikans. I tillegg hadde det vært interessant å se om ESM-fraksjonen har større effekt på uttrykkningen av MMP-2, MMP-14 og TIMP-2 ved ti dager stimulering, da det i denne masteroppgaven bare ble fokusert på tidlig stimulering av disse faktorene. Det hadde også vært interessant å studere effekten av ESM-fraksjoner på sen stimulering av ECM-produksjon.

Det hadde også vært interessant å utføre flere fluorescens immuncytokjemiforsøk med fokus på effekten av Hydrol og Carb på FA og aktinfilamenter, for å se om disse to ESM-fraksjonene har en tydelig trend for påvirkning av dette.

Etter at resultatene fra denne oppgaven viser at PEP, Hydrol og Carb har positiv effekt på flere prosesser som er viktig i en sårhelingsprosess er det naturlig å teste om de også har effekt *in vivo* og ikke bare *in vitro*. Dette ved å teste om det har positiv effekt på sår hos dyr.

8 Referanser

- Acharya, P. S., Majumdar, S., Jacob, M., Hayden, J., Mrass, P., Weninger, W., Assoian, R. K. & Puré, E. (2008). Fibroblast migration is mediated by CD44-dependent TGF β activation. *Journal of cell science*, 121 (9): 1393-1402.
- Ahmed, T. A., Suso, H.-P. & Hincke, M. T. (2017). In-depth comparative analysis of the chicken eggshell membrane proteome. *Journal of Proteomics*, 155: 49-62.
- Alexopoulou, A. N., Multhaupt, H. A. B. & Couchman, J. R. (2007). Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39 (3): 505-528.
- Anatomy egg. (2017). *Anatomy of an egg*. Tilgjengelig fra: <http://blog2.thermoworks.com/2017/03/easter-hard-boiled-eggs/> (lest 07.08.17).
- Bielefeld, K. A., Amini-Nik, S. & Alman, B. A. (2013). Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70 (12): 2059-2081.
- Bio-Rad. (u.å.). *An Introduction to ELISA. What is ELISA, procedures, types of ELISA, detection options and results.*: Bio-Rad. Tilgjengelig fra: <https://www.bio-rad-antibodies.com/an-introduction-to-elisa.html> (lest 12.02.17).
- Børresen-Dale, A.-L. (2016). *cDNA*: Store medisinske leksikon. Tilgjengelig fra: <https://sml.sn1.no/cDNA> (lest 10.04.17).
- Case, L. B., Baird, M. A., Shtengel, G., Campbell, S. L., Hess, H. F., Davidson, M. W. & Waterman, C. M. (2015). Molecular mechanism of vinculin activation and nano-scale spatial organization in focal adhesions. *Nature cell biology*, 17 (7): 880-892.
- Cooper, J. A. (1987). Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *The Journal of cell biology*, 105 (4): 1473-1478.
- Copeland, R. A. (2013). *Methods for Protein Analysis: A Practical Guide for Laboratory Protocols*: Springer Science & Business Media.
- Darby, I. A., Laverdet, B., Bonté, F. & Desmoulière, A. (2014). Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*, 7: 301-311.
- Desmoulière, A., Chaponnier, C. & Gabbiani, G. (2005). Perspective Article: Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Repair and Regeneration*, 13 (1): 7-12.
- Ferdous, Z., Peterson, S. B., Tseng, H., Anderson, D. K., Iozzo, R. V. & Grande-Allen, K. J. (2010). A role for decorin in controlling proliferation, adhesion, and migration of

- murine embryonic fibroblasts. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 93A (2): 419-428.
- Fritschy, J.-M. & Härtig, W. (2001). *Immunofluorescence*: John Wiley & Sons, Ltd.
- Gabbiani, G. (2003). The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *The Journal of Pathology*, 200 (4): 500-503.
- Gill, S. E. & Parks, W. C. (2008). Metalloproteinases and their inhibitors: Regulators of wound healing. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40 (6-7): 1334-1347.
- Girón-Calle, J., Alaiz, M. & Vioque, J. (2010). Effect of chickpea protein hydrolysates on cell proliferation and in vitro bioavailability. *Food Research International*, 43 (5): 1365-1370.
- Greco, R. M., Iocono, J. A. & Ehrlich, H. P. (1998). Hyaluronic acid stimulates human fibroblast proliferation within a collagen matrix. *Journal of Cellular Physiology*, 177 (3): 465-473.
- Guarderas, F., Leavell, Y., Sengupta, T., Zhukova, M. & Megraw, T. L. (2016). Assessment of Chicken-Egg Membrane as a Dressing for Wound Healing. *Advances in skin & wound care*, 29 (3): 131-134.
- Guo, S. & DiPietro, L. A. (2010). Factors Affecting Wound Healing. *Journal of Dental Research*, 89 (3): 219-229.
- Hannah, R., Beck, M., Moravec, R. & Riss, T. (2001). CellTiter-Glo™ Luminescent cell viability assay: a sensitive and rapid method for determining cell viability. *Promega Cell Notes*, 2: 11-13.
- Hardingham, T. & Fosang, A. (1992). Proteoglycans: many forms and many functions. *The FASEB Journal*, 6 (3): 861-870.
- He, C., Wilhelm, S. M., Pentland, A. P., Marmer, B. L., Grant, G. A., Eisen, A. Z. & Goldberg, G. I. (1989). Tissue cooperation in a proteolytic cascade activating human interstitial collagenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86 (8): 2632-2636.
- Hildebrande, A., Romaris, M., Rasussen, L., Heinegård, D., Twardzik, D., Borders, W. & Ruoslahti, E. (1992). Interactions of small interstitial proteoglycans biglycan decorin and fibromodulin with transforming growth factor. *Biochemical Journal*, 302: 527-534.

- Hinz, B., Celetta, G., Tomasek, J. J., Gabbiani, G. & Chaponnier, C. (2001). Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Molecular biology of the cell*, 12 (9): 2730-2741.
- Hinz, B., Dugina, V., Ballestrem, C., Wehrle-Haller, B. & Chaponnier, C. (2003). α -Smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts. *Molecular biology of the cell*, 14 (6): 2508-2519.
- Hinz, B. (2007). Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair. *Journal of Investigative Dermatology*, 127 (3): 526-537.
- Holck, P. (2014). *Fibroblast*: Store medisinske leksikon Tilgjengelig fra: <https://sml.sn�.no/fibroblast> (lest 31.05.17).
- Holck, P. (2016). *Vev*: Store medisinske leksikon. Tilgjengelig fra: <https://sml.sn�.no/vev> (lest 29.05.17).
- Hu, M. S., Maan, Z. N., Wu, J.-C., Rennert, R. C., Hong, W. X., Lai, T. S., Cheung, A. T. M., Walmsley, G. G., Chung, M. T., McArdle, A., et al. (2014). Tissue Engineering and Regenerative Repair in Wound Healing. *Annals of Biomedical Engineering*, 42 (7): 1494-1507.
- Hu, X. & Beeton, C. (2010). Detection of Functional Matrix Metalloproteinases by Zymography. *Journal of visualized experiments* (45).
- Iida, J., Wilhelmson, K. L., Ng, J., Lee, P., Morrison, C., Tam, E., Overall, C. M. & McCarthy, J. B. (2007). Cell surface chondroitin sulfate glycosaminoglycan in melanoma: role in the activation of pro-MMP-2 (pro-gelatinase A). *Biochemical Journal*, 403 (3): 553-563.
- Invitrogen. (2006). *CyQUANT® Cell Proliferation Assay Kit*. Tilgjengelig fra: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/mp07026.pdf> (lest 20.04.17).
- Jochems, C. E. A., van der Valk, J. B. F., Stafleu, F. R. & Baumans, V. (2002). The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem?
- Jones, L. J., Gray, M., Yue, S. T., Haugland, R. P. & Singer, V. L. (2001). Sensitive determination of cell number using the CyQUANT® cell proliferation assay. *Journal of Immunological Methods*, 254 (1–2): 85-98.
- Järveläinen, H., Puolakkainen, P., Pakkanen, S., Brown, E. L., Höök, M., Iozzo, R. V., Sage, E. H. & Wight, T. N. (2006). A role for decorin in cutaneous wound healing and angiogenesis. *Wound Repair and Regeneration*, 14 (4): 443-452.

- Kohan, M., Muro, A. F., White, E. S. & Berkman, N. (2010). EDA-containing cellular fibronectin induces fibroblast differentiation through binding to $\alpha 4\beta 7$ integrin receptor and MAPK/Erk 1/2-dependent signaling. *The FASEB Journal*, 24 (11): 4503-4512.
- Kornfeld, R. & Kornfeld, S. (1980). Structure of glycoproteins and their oligosaccharide units. I: *The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans*, s. 1-34: Springer.
- Kupai, K., Szucs, G., Cseh, S., Hajdu, I., Csonka, C., Csont, T. & Ferdinandy, P. (2010). Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 61 (2): 205-209.
- Kurien, B. T. & Scofield, R. H. (2003). Protein blotting: a review. *Journal of Immunological Methods*, 274 (1-2): 1-15.
- Kähäri, V.-M. & Saarialho-Kere, U. (1997). Matrix metalloproteinases in skin. *Experimental Dermatology*, 6 (5): 199-213.
- Kähäri, V., Larjava, H. & Uitto, J. (1991). Differential regulation of extracellular matrix proteoglycan (PG) gene expression. Transforming growth factor-beta 1 up-regulates biglycan (PGI), and versican (large fibroblast PG) but down-regulates decorin (PGII) mRNA levels in human fibroblasts in culture. *Journal of Biological Chemistry*, 266 (16): 10608-10615.
- Langeland, T. (2009). *Huden: Store medisinske leksikon Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/huden>* (lest 29.05.17).
- Li, B. & Wang, J. H. C. (2011). Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: Force generation and measurement. *Journal of Tissue Viability*, 20 (4): 108-120.
- Liu, Z., Zhang, F., Li, L., Li, G., He, W. & Linhardt, R. J. (2014). Compositional analysis and structural elucidation of glycosaminoglycans in chicken eggs. *Glycoconjugate journal*, 31 (8): 593-602.
- Madlener, M., Parks, W. C. & Werner, S. (1998). Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Their Physiological Inhibitors (TIMPs) Are Differentially Expressed during Excisional Skin Wound Repair. *Experimental Cell Research*, 242 (1): 201-210.
- Maeda, K. & Sasaki, Y. (1982). An experience of hen-egg membrane as a biological dressing. *Burns*, 8 (5): 313-316.
- Martin, P. (1997). Wound Healing--Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science*, 276 (5309): 75-81.
- Martins, V. L., Caley, M. & O'Toole, E. A. (2013). Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. *Cell and tissue research*, 351 (2): 255-268.

- Masur, S. K., Dewal, H. S., Dinh, T. T., Erenburg, I. & Petridou, S. (1996). Myofibroblasts differentiate from fibroblasts when plated at low density. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93 (9): 4219-4223.
- Mescher, A. L. (2016). *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*. 14. utg.: McGraw-Hill Education.
- Micaelsen, T., Grung, R., Knutsen, T. K., Ruiter, F. d., Kjerkol, I. & Toppe, K. (2017). *Representantforslag 91 S (2016-2017)*: Stortinget. Tilgjengelig fra: <https://www.stortinget.no/no/Saker-og-publikasjoner/Publikasjoner/Representantforslag/2016-2017/dok8-201617-091s/?m=0> (lest 04.06.17).
- Midwood, K. S., Williams, L. V. & Schwarzbauer, J. E. (2004). Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36 (6): 1031-1037.
- Morgunova, E., Tuuttila, A., Bergmann, U., Isupov, M., Lindqvist, Y., Schneider, G. & Tryggvason, K. (1999). Structure of Human Pro-Matrix Metalloproteinase-2: Activation Mechanism Revealed. *Science*, 284 (5420): 1667-1670.
- Nagase, H., Visse, R. & Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research*, 69 (3): 562-573.
- Ohto-Fujita, E., Konno, T., Shimizu, M., Ishihara, K., Sugitate, T., Miyake, J., Yoshimura, K., Taniwaki, K., Sakurai, T. & Hasebe, Y. (2011). Hydrolyzed eggshell membrane immobilized on phosphorylcholine polymer supplies extracellular matrix environment for human dermal fibroblasts. *Cell and tissue research*, 345 (1): 177-190.
- Page-McCaw, A., Ewald, A. J. & Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (3): 221-233.
- Pan, D., Hill, A. P., Kashou, A., Wilson, K. A. & Tan-Wilson, A. (2011). Electrophoretic transfer protein zymography. *Analytical Biochemistry*, 411 (2): 277-283.
- Parsons, S., Watson, S., Brown, P., Collins, H. & Steele, R. (1997). Matrix metalloproteinases. *British Journal of Surgery*, 84 (2): 160-166.
- Price, R. D., Berry, M. G. & Navsaria, H. A. (2007). Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 60 (10): 1110-1119.
- Promega Corporation. (2001-2015). *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay*. Tilgjengelig fra: <https://no.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-glo-luminescent-cell-viability-assay-protocol.pdf> (lest 12.04.17).

- Qian, Y., Corum, L., Meng, Q., Blenis, J., Zheng, J. Z., Shi, X., Flynn, D. C. & Jiang, B.-H. (2004). PI3K induced actin filament remodeling through Akt and p70S6K1: implication of essential role in cell migration. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 286 (1): C153-C163.
- Rahimi, R. A. & Leof, E. B. (2007). TGF- β signaling: A tale of two responses. *Journal of Cellular Biochemistry*, 102 (3): 593-608.
- Reed, C. C. & Iozzo, R. V. (2002). The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. *Glycoconjugate Journal*, 19 (4): 249-255.
- Rittié, L. (2016). Cellular mechanisms of skin repair in humans and other mammals. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 10 (2): 103-120.
- Rodríguez-Manzanares, J. C., Carpizo, D., del Carmen Plaza-Calonge, M., Torres-Collado, A. X., Thai, S. N.-M., Simons, M., Horowitz, A. & Iruela-Arispe, M. L. (2009). Cleavage of syndecan-4 by ADAMTS1 provokes defects in adhesion. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41 (4): 800-810.
- Rodríguez Fernández, J., Geiger, B., Salomon, D. & Ben-Ze'ev, A. (1993). Suppression of vinculin expression by antisense transfection confers changes in cell morphology, motility, and anchorage-dependent growth of 3T3 cells. *The Journal of Cell Biology*, 122 (6): 1285-1294.
- Rønse, J. H. (2012). *Kostnader for behandling av kroniske sår i hjemmesykepleien*: Universitetet i Oslo, DUO vitenarkiv. Tilgjengelig fra: <https://www.duo.uio.no/handle/10852/34211> (lest 04.06.17).
- Sah, M. K. & Rath, S. N. (2016). Soluble eggshell membrane: A natural protein to improve the properties of biomaterials used for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*, 67: 807-821.
- Sandbo, N. & Dulin, N. (2011). Actin cytoskeleton in myofibroblast differentiation: ultrastructure defining form and driving function. *Translational Research*, 158 (4): 181-196.
- Schmittgen, T. D. & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*, 3 (6): 1101-1108.
- Schreml, S., Szeimies, R.-M., Prantl, L., Landthaler, M. & Babilas, P. (2010). Wound healing in the 21st century. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 63 (5): 866-881.
- Schultz, G. S. & Wysocki, A. (2009). Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound repair and regeneration*, 17 (2): 153-162.

- Seehusen, J. (2017). *Et nytt plaster basert på eggeskall kan få sårene til å gro i løpet av tre uker*: Teknisk Ukeblad. Tilgjengelig fra: <https://www.tu.no/artikler/et-nytt-plaster-basert-pa-eggeskall-kan-fa-sarene-til-a-gro-i-lopet-av-tre-uker/379759> (lest 04.06.17).
- Shamamian, P., Schwartz, J. D., Pockock, B. J., Monea, S., Whiting, D., Marcus, S. G. & Mignatti, P. (2001). Activation of progelatinase A (MMP-2) by neutrophil elastase, cathepsin G, and proteinase-3: A role for inflammatory cells in tumor invasion and angiogenesis. *Journal of cellular physiology*, 189 (2): 197-206.
- Sino Biological Inc. (2004-2017). *What is ELISA? Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. Tilgjengelig fra: <http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction> (lest 19.04.17).
- Smilenov, L. B., Mikhailov, A., Pelham, R. J., Marcantonio, E. E. & Gundersen, G. G. (1999). Focal Adhesion Motility Revealed in Stationary Fibroblasts. *Science*, 286 (5442): 1172-1174.
- Taylor, K. R. & Gallo, R. L. (2006). Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *The FASEB Journal*, 20 (1): 9-22.
- Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C. & Karamanos, N. K. (2016). Extracellular matrix structure. *Advanced drug delivery reviews*, 97: 4-27.
- ThermoFisher Scientific. (2014). *Pierce Western Blotting Handbook and Troubleshooting Guide*. Tilgjengelig fra: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1602761-Western-Blotting-Handbook.pdf> (lest 19.06.17).
- ThermoFisher Scientific. (2016). *Real-time PCR handbook*: ThermoFisher Scientific. Tilgjengelig fra: <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PJ1503-PJ9169-CO019861-Update-qPCR-Handbook-branding-Americas-FHR.pdf> (lest 19.06.17).
- Toole, B. P. (1991). Proteoglycans and Hyaluronan in Morphogenesis and Differentiation. I: Hay, E. D. (red.) *Cell Biology of Extracellular Matrix: Second Edition*, s. 305-341. Boston, MA: Springer US.
- Tracy, L. E., Minasian, R. A. & Caterson, E. (2016). Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound. *Advances in wound care*, 5 (3): 119-136.
- Trengove, N. J., Stacey, M. C., Macauley, S., Bennett, N., Gibson, J., Burslem, F., Murphy, G. & Schultz, G. (1999). Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Repair and Regeneration*, 7 (6): 442-452.

- Vaalamo, M., Leivo, T. & Saarialho-Kere, U. (1999). Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, -2, -3, and -4) in normal and aberrant wound healing. *Human Pathology*, 30 (7): 795-802.
- van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Fex Svenningsen, Å., Honegger, P., Knudsen, L. E., Lindl, T., Noraberg, J., Price, A., Scarino, M. L., et al. (2010). Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in Vitro*, 24 (4): 1053-1063.
- Vedrenne, N., Coulomb, B., Danigo, A., Bonté, F. & Desmouliere, A. (2012). The complex dialogue between (myo) fibroblasts and the extracellular matrix during skin repair processes and ageing. *Pathologie Biologie*, 60 (1): 20-27.
- Vogel, C. & Marcotte, E. M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature reviews. Genetics*, 13 (4): 227.
- Vuong, T., Rønning, S. B., Suso, H. P., Schmidt, R., Prydz, K., Lundström, M., Moen, A. & Pedersen, M. E. (2017). The extracellular matrix of eggshell displays anti-inflammatory activities through NF- κ B in LPS-triggered human immune cells. *Journal of Inflammation Research*, 2017:10: 83-96.
- Wellington, C. L., Walker, E. K., Suarez, A., Kwok, A., Bissada, N., Singaraja, R., Yu-Zhou, Y., Lin-Hua, Z., James, E. & Wilson, J. E. (2002). ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation. *Laboratory investigation*, 82 (3): 273-283.
- Wong, M. L. & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39 (1): 75-88.
- Woods, A. & Couchman, J. R. (2001). Syndecan-4 and focal adhesion function. *Current Opinion in Cell Biology*, 13 (5): 578-583.
- Wozniak, M. A., Modzelewska, K., Kwong, L. & Keely, P. J. (2004). Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1692 (2): 103-119.
- Yi, F., Yu, J., Guo, Z.-X., Zhang, L.-X. & Li, Q. (2003). Natural Bioactive Material: A Preparation of Soluble Eggshell Membrane Protein. *Macromolecular Bioscience*, 3 (5): 234-237.
- Zanotti, S., Negri, T., Cappelletti, C., Bernasconi, P., Canioni, E., Di Blasi, C., Pegoraro, E., Angelini, C., Ciscato, P., Prella, A., et al. (2005). Decorin and biglycan expression is differentially altered in several muscular dystrophies. *Brain*, 128 (11): 2546-2555.

Zhu, Y., Liu, X., Sköld, C., Umino, T., Wang, H., Spurzem, J., Kohyama, T., Ertl, R. & Rennard, S. (2001). Synergistic neutrophil elastase-cytokine interaction degrades collagen in three-dimensional culture. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 281 (4): L868-L878.

9 Vedlegg

Tabell A: Generelt laboratoriestyr som ble benyttet i gjennomføringen av de ulike forsøkene.

| Produkter | Leverandør |
|--|-----------------------------------|
| Nunc™ F96 MicroWell™ White Polystyrene Plate | ThermoFisher Scientific |
| 96F NUNCLON DELTA A BLACK MICROWELL SI | ThermoFisher Scientific |
| 96 PCR-Platte Halbrand | SARSTEDT |
| Absolutt alkohol prima (etanol 99,9 %) | Kremtyl |
| Countess™ cell counting chamber slides | Invitogen |
| Disposable Glass Pasteur Pipettes 230 mm | VWR |
| Flat 8 Cap Strips | Thermo Scientific |
| Lab-Tek® Chamber Slide™ System 154534m 8 Well Glass Slide | ThermoFisher Scientific |
| Micro-Centrifuge Tubes for high G-force (1,5 ml) | VWR |
| Multiply® -µStrip 0,2 ml chain | SARSTEDT |
| Nitrile hansker | VWR |
| Novex™ 10 % Zymogram (Gelatin) Gel | Invitrogen, Life technologies |
| NuPAGE™ 12 % Bis-Tris Gel (Novex) | Invitrogen, Life technologies |
| Pipetter | Thermo Scientific |
| Pipettespisser | SARSTEDT, ThermoFisher Scientific |
| Screw Cap Tube Conical Base 50 ml (sentrifugerør) | SARSTEDT |
| Serological pipette, DNase free (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml) | SARSTEDT |
| TC Flask T75 (T75-flaske) | SARSTEDT |

| | |
|-------------------------------|----------|
| TC Plate 12 Well, Standard, F | SARSTEDT |
| Tube 15 ml (sentrifugerør) | SARSTEDT |

Tabell B: Instrumenter som ble benyttet i gjennomføringen av de ulike forsøkene.

| Produkter | Leverandør og Katalognummer/Referansenummer |
|--|---|
| ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System | Applied Biosystems |
| Centrifuge 5430 | Eppendorf |
| Countess™ automated cell counter | Invitrogen |
| Digital Heatblock | VWR |
| Epson Perfection 4990 Photo | Epson |
| Ettan™ DIGE Imager | GE Healthcare |
| Fluorescensmikroskop | Carl Zeiss AS |
| FLUOstar OPTIMA | BMG LABTECH |
| Galaxy® 170 R CO ₂ Incubator | New Brunswick an Eppendorf company |
| GenAmp® PCR System 9700 | Applied Biosystems |
| GloMax™ 96 Microplate Luminometer | Promega Corporation |
| Heraeus Megafuge 8 Centrifuge | ThermoFisher Scientific |
| iBlot™ | Invitrogen by life technologies |
| Leica DM IL LED (Mikroskop) | Leica |
| Mettler MT5 (Mikrovekt) | Bergman |
| NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer | Saveen Werner |
| Power Ease 500 (elektroforese) | Invitrogen by life technologies |
| See-saw rockers – SSM4, SSL4 (vippemaskin) | Cole-Palmer |
| SPECTROstar Nano | BMG LABTECH |
| SW22 Shaking Water Bath | Julabo |
| Vacunsafe + vacuboy | Integra |
| Wellwash Microplate washer | ThermoFisher Scientific |

Tabell C: Programvarer som ble benyttet i gjennomføringen av de ulike forsøkene.

| Programvarer | Leverandør |
|------------------------------------|-------------------------|
| Epson Scan – Epson Perfection 4990 | Epson |
| Ettan™ DIGE Imager 1.0 | GE Healthcare |
| FLUOstar OPTIMA 1.32 R2 | BMG LABTECH |
| GloMax™ 96 | Promega Corporation |
| ImageJ k 1.45 | Java |
| Microsoft Excel | Microsoft |
| NanoDrop-1000 V3.8.1 | ThermoFisher Scientific |
| SDS 2.2 | Applied BioSystems |
| SPECTROstar Nano 2.10 | BMG LABTECH |
| ZEN pro 2012 | Zeiss |

Tabell D: Kjemikalier og reagenser som ble benyttet i gjennomføringen av de ulike forsøkene.

| Kjemikalier og reagenser | Leverandør |
|--|---------------------------------|
| 0,05 % Trypsin-EDTA (1X) | Gibco® by life technologies™ |
| 2X TaqMan® Gene Expression Master Mix (buffer) | Applied Biosystems |
| Aceticacid (glacial) 100 % (eddiksyre) | Merck |
| AEBSF (4- (2-aminoetyl) benzensulfonylfluoridhydroklorid) - proteasehemmer | Sigma-Aldrich |
| BenchMarker™ Protein Ladder | ThermoFisher Scientific |
| Bromophenol blue indicator | Merck |
| Coomassie brilliant blue R-250 | VWR |
| Dako Fluorescent Mounting Madium | Dako |
| Dithiothreitol (DTT) | ThermoFisher Scientific |
| DMEM (1x) + GlutaMAX™-1 Dubecco's Modified Eagle Medium <ul style="list-style-type: none"> • [+]1g/L D-Glucose • [+] Pyruvate | Gibco® by life technologies™ |
| DPBS (1X) | Gibco® by life technologies™ |
| Dulbecco's Phosphate Buffered Saline | Invitrogen |
| ECL Prime™ blocking agent | GE Healthcare |

| | |
|---|---|
| ECL TM PlexFluorescent Rainbow TM Marker, Full Range | GE Healthcare |
| EMSURE [®] ACS, ISO, Reag. Ph Eur Hydrochloric acid fuming 37 % (HCl) | Merck |
| Fetal Bovine Serum, qualified, E.U.-approved, South America origin (FBS) | ThermoFisher Scientific |
| Formaldehyd 4 % buffered Q Path [®] | VWR |
| Phosphatase Inhibitor Coctail 2 (Fosfatasehemmer) | Sigma-Aldrich |
| Gibco TM Amphotericin B (Fungizone/Amphotericin) | ThermoFisher Scientific |
| Glycine (98,5 %) | Duchefa Biochemie |
| Glyserol 85 % | Merck KGaA Katalognummer: #1610302 |
| Kalsiumkloriddihydrat (CaCl ₂) | Merck |
| Methanol | Merck KGaA |
| Natrium deoksykolat | ThermoFisher Scientific |
| Natriumklorid (NaCl) | Merck |
| NuPAGE [®] -MOPS SDS Running Buffer (20x) | GE Healthcare |
| Penicillin Streptomycin (Pen Strep) <ul style="list-style-type: none"> • [+] 10 000 Units/ml Penicillin • [+] 10 000 µl/ml Streptomycin | Gibco [®] by life technologies TM |
| RNase-fritt vann | Sigma-Aldrich |
| SDS Electrophoresis purity reagent (natirum dodecylsulfat) | Bio-Rad |
| Transforming Growth Factor-β1 human | Sigma-Aldrich |
| Tris hydroklorid | Sigma-Aldrich |
| Triton TM X-100 | Sigma-Aldrich |
| Trizma [®] base | Sigma-Aldrich |
| Trypan Blue stain 0,4 % | Life Technologies |
| Tween [®] 20 | Sigma-Aldrich |
| Tørrmelk | Ukjent |

Tabell E: Primere benyttet i real-time-PCR-forsøkene.

| Primere | Katalognummer | Leverandør |
|----------|-------------------|--------------------|
| Biglykan | Hs00959141_g1 BGN | Applied Biosystems |
| Dekorin | Hs00370384_m1 DCN | Applied Biosystems |

| | | |
|----------------------|---------------------|--------------------|
| Kollagen type I | Hs1028970_m1 COL1A2 | Applied Biosystems |
| MMP-14 | Hs01037002_g1 MMP14 | Applied Biosystems |
| MMP-2 | Hs01548727_m1 MMP2 | Applied Biosystems |
| Referansegen (RPL32) | Hs00851655_g1 RPL32 | Applied Biosystems |
| Syndecan-4 | Hs00161617_m1 SDC4 | Applied Biosystems |
| TIMP-1 | Hs171558_m1 TIMP1 | Applied Biosystems |
| TIMP-2 | Hs00234278_m1 TIMP2 | Applied Biosystems |
| α -SMA | Hs00909449_m1 ACTA2 | Applied Biosystems |

Tabell F: Antistoff som ble benyttet i western blott-forsøkene.

| Antistoff | Produktnummer | Leverandør |
|---|---------------|--------------------------|
| ECL TM Plex goat- α -mouse IgG, Cy TM 3 | PA43010V | GE Healthcare |
| ECL TM Plex goat- α -rabbit IgG, Cy TM 5 | PA45011V | GE Healthcare |
| Hoechst | Ukjent | Ukjent |
| Ms mAb to alpha smooth muscle Actin [1A4] (α -SMA) | Ab7817 | Abcam |
| MT-MMP-1 Antibody (H72): sc-30074 rabbit polyclonal IgG (MMP-14) | Sc-30074 | Santa Cruz Biotechnology |
| Monoclonal Anti- α -Tubulin antibody produced in mouse | T5168 | Sigma-Aldrich |

Tabell G: Antistoff som ble benyttet i fluorescens immuncytokjemiforsøkene.

| Antistoff | Produktnummer | Leverandør |
|--|---------------|-------------------------|
| Alexa Fluor [®] 546 goat anti-mouse IgG | REF: A11030 | ThermoFisher Scientific |
| Alexa Fluor TM 488 Phalloidin | A12379 | ThermoFisher Scientific |
| Monoclonal Anti-Vinculin antibody produced in mouse (vinkulin) | V9131 | Sigma-Aldrich |
| Ms mAb to alpha smooth muscle Actin [1A4] (α -SMA) | Ab7817 | abcam |

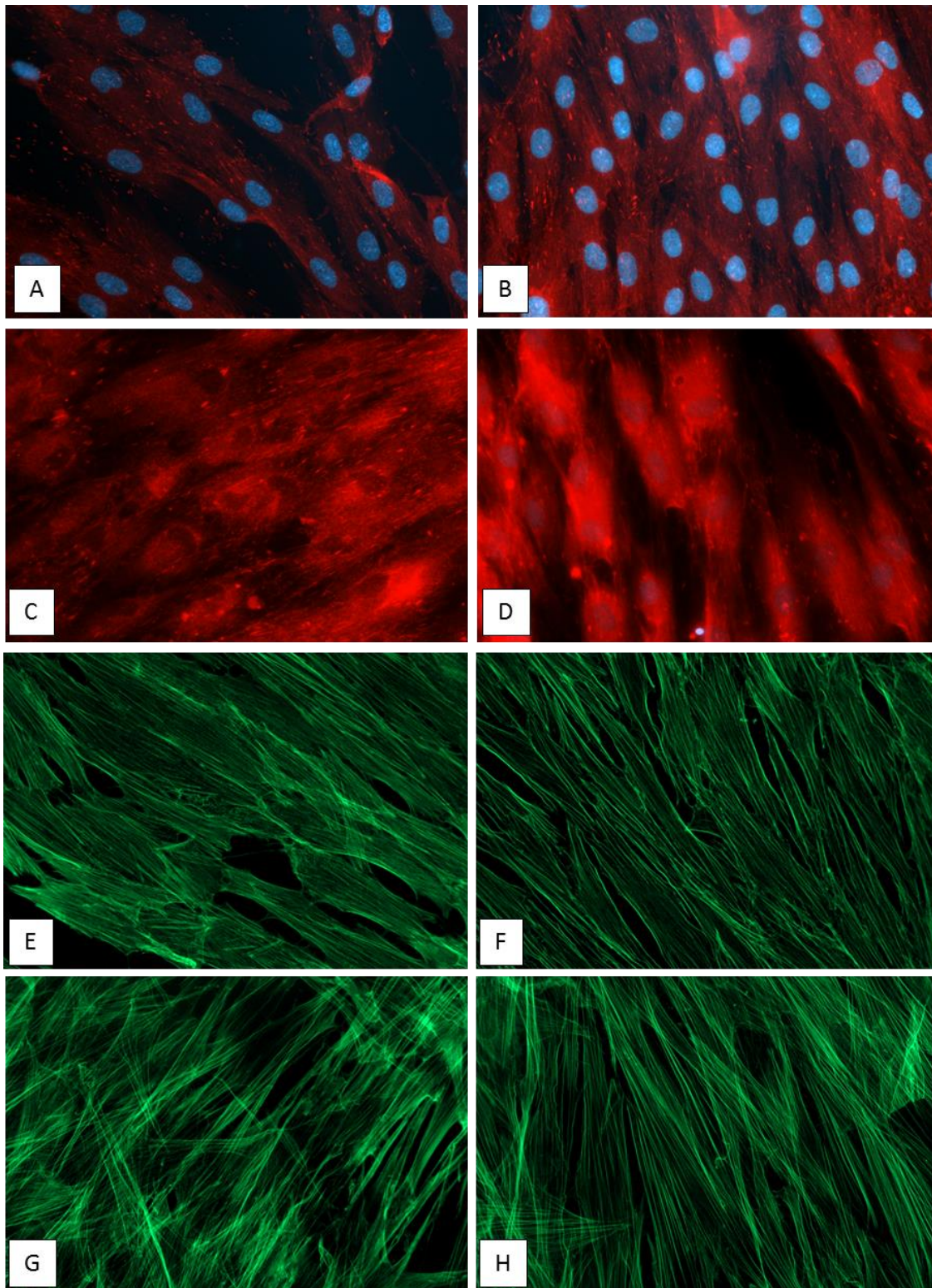
Tabell H: Kitt som ble benyttet til ulike forsøk i masteroppgaven.

| Kit | Innhold | Leverandør |
|--|---|-------------------------------|
| CellTiter-Glo [®] Luminiscent Cell Viability Assay | CellTiter-Glo [®] Buffer CellTiter-Glo [®] Substrate | Promega Corporation |
| CyQUANT [®] Cell Proliferation Assay Kit | CyQUANT [®] GR reagent Cell-lysis buffer | ThermoFisher Scientific |
| DuoSet [®] Ancillary Reagent Kit 2 (5 Plate) | Maxi Sorp – 96 brønnersplate Capture Antibody (Human MMP-2 og Human TIMP-2) ELISA Plate Coating Buffer Wash Buffer 25x concentrate Reagent Diluent concentrate 2 (10x) Detection Antibody (Human MMP-2 og Human TIMP-2) Streptavidin – HRP Color Reagent A Stabilized Peroxide Solution Color Reagent B Stop Solution Human TIMP-2 STANDARD Human MMP-2 STANDARD | R&D Systems a biotechne brand |
| iBlot [®] Gel Transfer Stacks Nitrocellulose, Regular | iBlot [®] NC Anode Stack BOTTOM Regular iBlot [®] Cathode Stack TOP Regular iBlot [®] Filter Paper Regular iBlot [®] Disposable Spong Blotting Roller | ThermoFisher Scientific |
| QIAshredder (250) | QIAshredder Mini Spin Column Lids for QIAshredder [™] 250 | QIAGEN |
| RNase-Free DNase Set (50) | DNase RNase-fritt vann | QIAGEN |

| | | |
|--|--|--------------------|
| | RDD-buffer | |
| RNeasy® Mini Kit (50) | RNeasy Mini Spin Columns Collection Tubes (1,5 ml) 50 Collection Tubes (2 ml) 50 Buffer RLT 45 ml Lysis buffer Buffer RW1 45 ml Wash buffer Buffer RPE (konsentrert) 11 ml Wash buffer RNase-Free Water 10 ml | QIAGEN |
| TaqMan® Reverse Transcription Reagents | 10X RT Buffer 25 mM MgCl ₂ 10 mM dNTP Mix RNase Inhibitor MultiScribe™ Reverse Transcriptase 50 uU Random hexamer | Applied Biosystems |

Tabell I: Fibroblastene og eggeskallmembranfraksjonene som ble benyttet i alle forsøkene i masteroppgaven.

| | |
|--|--|
| Primary Dermal Fibroblasts; Normal, Human, Adult | ATCC® |
| Karbohydrater av eggeskallmembranpulver (Carb) | Tillaget på Nofima fra PEP fra Nortura |
| Hydrolysert eggeskallmembranpulver (Hydrol) | Tillaget på Nofima fra PEP fra Nortura |
| Eggeskallmembranpulver (PEP) | Nortura |



Figur J: Analyse ved fluorescens immuncytokjemi av fokale adhesjonsproteiner og aktinfilamenter ved å studere mengde vinkulin da dette er enkomponenter som er til stede i fokale adhesjoner, og phalloidin farging da denne fargen binder seg aktinfilamenter. Figur A viser vinkulin farging av fibroblaster stimulert med hydrolysert eggeskallmembranpulver (Hydrol) i tre dager. Figur B viser vinkulin farging av fibroblaster stimulert med karbohydrater av eggeskallmembranpulver (Carb) i tre dager. Figur C viser vinkulin farging av fibroblaster stimulert med Hydrol i ti dager. Figur D viser vinkulin farging av fibroblaster stimulert med Carb i ti dager. Figur E viser phalloidin fargin av aktinfilamenter hos fibroblaster stimulert med Hydrol i tre dager. Figur F viser phalloidin fargin av aktinfilamenter hos fibroblaster stimulert med Carb i tre dager. Figur G viser phalloidin fargin av aktinfilamenter hos fibroblaster stimulert med Hydrol i ti dager. Figur H viser phalloidin farging av aktinfilamenter hos fibroblaster stimulert med Carb i ti dager. Bildene gjenspeiler trenden fra tre uavhengige celleforsøk som ble gjennomført under like betingelser.



Norges miljø- og biovitenskapelig universitet
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway