

Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Fakultet for veterinærmedisin og biovitenskap
Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

Masteroppgave 2015
60 stp

Undersøkelser av vekst- og migrasjonshemmende effekter av *Haematococcus pluvialis*-ekstrakter på HepG2 celler

Studies of growth and migration inhibitory effects of
Haematococcus pluvialis extracts on HepG2 cells

Johanna Sande Mikkelsen

**Undersøkelser av vekst- og migrasjonshemmende effekter av
Haematococcus pluvialis-ekstrakter på HepG2 celler**

Forfatter

Johanna Sande Mikkelsen

Hovedveileder

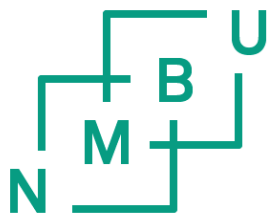
Tor Erling Lea

Tilleggsveiledere

Hanne Skomedal

&

Kari Skjånes



**Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet**



NIBIO

NORSK INSTITUTT FOR
BIOØKONOMI

Forord

Denne oppgaven ble gjennomført ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet, ved instituttet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap for Norsk institutt for bioøkonomi.

Først vil jeg takke mine veiledere professor Tor Erling Lea, Hanne Skomedal og Kari Skjånes for alle gode tilbakemeldinger på masteroppgaven og veiledning. Jeg vil igjen takke Tor Erling Lea for at jeg fikk «låne» en labplass hos dere, til Hanne Skomedal og Kari Skjånes for at dere ga meg muligheten til å være en del av dette prosjektet. En annen som fortjener en stor takk er Charlotte Kleiveland, både for den tiden du var veileder, men også for at du stilte opp i ettertid for å hjelpe til med det praktiske på laben. Andre personer som fortjener oppmerksomhet er Lars Fredrik Moen, Stine Indreid og Monica Suarez Korsnes. Takk for all den gode hjelpen, og for et godt miljø på labben.

Videre vil jeg takke mine venner her ved NMBU, hjemme og her i Oslo. Anne Kijewski; takk for at du er den du er, du er super! Takk til «lunsjgjengen» for interessante samtaler og deres smittende humør. En spesiell takk til Helge Christoffer Høgberg Hansen som har vært tidens beste labpartner! Du har vært en utrolig støtte, og du gjorde de lange dagene og helgene på lab/lesesalen betraktelig bedre. Det hadde ikke vært det samme uten deg.

Tusen takk til mor og far for at dere alltid har troen på meg, og støtter meg uansett hva det skulle gjelde. Jeg hadde ikke vært der jeg er uten dere. Sist men ikke minst, takk til min kjæreste Freddy for at du har klart å holde ut med meg det siste året. Din støtte og tålmodighet har hjulpet meg igjennom tunge dager.

Johanna Sande Mikkelsen

Sammendrag

Tidligere studier har vist at mikroalgen *Chlorella sorokiniana* har migrasjons hemmende og apoptose-induserende egenskaper på HepG2 humane hepatocellulært karsinomceller (Chung et al. 2012). Nagaraj et al. (2012) studerte også effekten av mikroalger på HepG2 celler. I studiene observerte de en proliferasjonshemmende effekt på HepG2 cellene under påvirkning av astaxanthin fra *Haematococcus pluvialis*.

I dette studiet ble *H. pluvialis* ekstrahert med ulike løsningsmidler (vann og etanol) for å studere effekten av algeekstraktene. Ekstraktene ble benyttet for å undersøke mulige vekst- og migrasjonshemmende effekter av *H. pluvialis* på HepG2 celler. I tillegg ble det utført en viabilitetstest på WI-38 lunge fibroblastceller og den SV40-transformerte varianten WI-38 VA-13 under påvirkning av ekstraktene.

Celleviabiliteten til cellelinjene eksponert for ekstrakter fra *H. pluvialis* ble analysert ved hjelp av 3-(4,5-dimetyltiazol-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT) assay. Viabiliteten ble undersøkt etter 48 timer inkubasjon. Den største effekten ble observert på HepG2 og WI-38 VA-13 inkubert med *H. pluvialis* ekstrahert med vann. Flowcytometrisk analyse ble brukt for å undersøke HepG2 cellenes proliferasjon under påvirkning av ekstrakter fra *H. pluvialis*. For cellesyklusanalysen ble inkubasjonstiden til HepG2 cellene eksponert for ekstrakter fra *H. pluvialis* studert, i tillegg til ekstraktkonsentrasjonene. Migrasjonen til HepG2 cellene ble undersøkt ved hjelp av migrasjonstesten utviklet av Erkell og Schirmacher (1988).

H. pluvialis ekstrahert med vann og etanol hadde ulik effekt på viabiliteten til HepG2, WI-38 og WI-38 VA-13. Det ble ikke observert proliferasjonshemmende eller migrasjonshemmende effekt fra *H. pluvialis* på HepG2. Resultatene fra viabilitetstesten viste en toksisk effekt på kreftcellene (HepG2 og WI-38 VA-13) som var eksponert med vannekstraktet. Videre studier er nødvendig for å kartlegge hvilke metabolittene man har i ekstraktene, og hvilken funksjon de har på hverandre og kreftcellene.

Abstract

Previous studies have shown that the microalgae *Chlorella sorokiniana* has anti-invasion and apoptosis induction activity on HepG2 human hepatocellular carcinoma cells (Chung et al. 2012). Nagaraj et al. (2012) studied the effect of microalgae on HepG2 cells. The studies showed an antiproliferative effect on HepG2 cells under the influence of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*.

In this thesis, *H. pluvialis* was extracted with various solvents (water and ethanol) to study the effects of algae extracts. The extracts were used to examine the potential growth and migration inhibitory effects of *H. pluvialis* on HepG2 cells. In addition, it was performed a viability test on WI-38 lung fibroblast cells and the SV40-transformed variant WI-38 VA-13 under the influence of the extracts.

Cell viability of the cell lines exposed to extracts from *H. pluvialis* was analyzed by 3-(4,5-dimethylthiazol-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The viability was studied after 48 hours incubation. The biggest impact was observed in HepG2 and WI-38 VA-13 incubated with *H. pluvialis* extracted with water. Flow cytometric analysis was used to examine the proliferation in HepG2 cells under the influence of extracts from *H. pluvialis*. For the cell cycle analysis, the incubation time for HepG2 cells exposed to extracts from *H. pluvialis* was studied, in addition to the extract concentrations. Migration of HepG2 cells were examined by using the migration assay developed by Erkell og Schirmacher (1988). *H. pluvialis* extracted with water and ethanol had different effects on the viability of HepG2, WI-38 and WI-38 VA-13. There was no evidence of proliferation or migration inhibitory effects of *H. pluvialis* on HepG2 cells. Results from viability tests showed a toxic effect on cancer cells (HepG2 and WI-38 VA-13) that was exposed by the water extract. Further studies are needed to identify the metabolites in the extracts, along with the functions they have on each other and on cancer cells.

Forkortelser

dH ₂ O	Destillert vann
DMSO	Dimetylsulfoxid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
THF	Tetrahydrofuran
FCS	Fetal calf serum (fötalt kalveserum)
PBS	Fosfatbufret saltvann

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag.....	II
Abstract	III
Forkortelser	IV
1 Introduksjon.....	1
1.1 Hepatocellulært karsinom.....	1
1.2 Behandling.....	2
1.2.1 Behandling av hepatocellulært karsinom	3
1.3 Kreftspredning (metastasering)	3
1.3.1 Kvantitativt <i>in vitro</i> forsøk for kreftcellemigrasjon	5
1.4 Svulstens miljø	6
1.4.1 Matrigel	7
1.4.2 Fibringel	7
1.5 Celledeling.....	8
1.6 <i>Haematococcus pluvialis</i>	9
1.6.1 Livssyklusen til <i>H. pluvialis</i>	10
1.6.2 Sekundære metabolitter i alger.....	11
1.7 Sekundærmetabolitten astaxanthin.....	12
1.7.1 Bruk av astaxanthin i kreftforskning	12
1.8 Mål for oppgaven	13
2 Materialer	14
2.1 Cellekultur.....	14
2.2 Algeekstraksjon.....	15
2.3 Ekstraksjon og analyse av astaxanthin fra algebiomasse	15
2.4 Viabilitetstest.....	15
2.5 Migrasjonstest	16
2.6 Flowcytometri	17

3 Metoder	18
3.1 Cellekultivering	18
3.1.1 Cellelinjer	18
3.2 Algeekstraksjon	19
3.2.1 <i>Haematococcus pluvialis</i>	19
3.3 Væskekromatografi	21
3.3.1 Ekstraksjon og analyse av astaxanthin fra <i>Haematococcus pluvialis</i>	21
3.4 Viabilitetstest	23
3.4.1 Oppsett for MTT assay	23
3.5 Migrasjonstest	24
3.5.1 Preparering av Nucleporefiltre	24
3.5.2 Tillaging av fibringel til migrasjonstesten	25
3.5.3 Inkubering av celler til migrasjonstesten	26
3.6 Flowcytometri	28
3.6.1 Cellepreparering	28
3.6.2 Farging av cellekjerner	29
3.7 Statistikk	29
4 Resultater	30
4.1 Utvinning fra ekstrahering av <i>Haematococcus pluvialis</i>	30
4.2 Mengden astaxanthin utvunnet fra algeekstraksjon	31
4.3 Celleviabilitet	31
4.4 Cellesyklusanalyse av HepG2 inkubert i etanol- og vannekstrakt ved forskjellige tidspunkt	33
4.4.1 Morfologiske endringer av HepG2 celler ved stimulering med algeekstrakt	34
4.5 Migrasjon av HepG2 celler under stimulering med algeekstrakt	36
4.5.1 Utarbeidelse av protokollen til migrasjonstesten	36
4.5.2 Resultater fra migrasjonstesten	38
5 Diskusjon	40
6 Konklusjon og videre arbeid	44
7 Referanser	45

Vedlegg 1 – Protokoll for ekstraksjon og analyse av astaxanthin fra algebiomasse.....	49
Vedlegg 2 – ANOVA tabeller til flowcytometri	52
Vedlegg 3 – ANOVA tabeller til migrasjonstesten.....	55
Vedlegg 4 – Diagrammer fra flowcytometri	58

1 Introduksjon

Kreft er betegnelsen på en gruppe sykdommer som kan defineres ut i fra kreftcellenes to særegne egenskaper. Disse egenskapene er: 1) kreftcellenes evne til å reprodusere seg i strid med de vanlige begrensningene som gjelder for cellevekst og deling, og 2) kreftcellenes evne til å invadere og kolonisere områder som normalt sett er forbeholdt andre celler. Denne unormale celleveksten og proliferasjonen kan gi opphav til svulstdannelse. En svulst er kun ansett som en kreft hvis den er malign. Dette innebærer at svulsten har tilegnet seg evnen til å invadere omkringliggende vev (Alberts et al. 2008).

Kreft er en viktig årsak til sykdom og dødelighet. En rapport fra World Cancer Report (2014) viser at det var omtrent 14 millioner nye krefttilfeller og 8 millioner kreftrelaterte dødsfall i 2012. I Norge var det 30 401 personer som fikk diagnosen kreft og 10 699 som døde av kreft i 2013. De siste årene har det vært en bemerkelsesverdig økning av leverkreft hos menn i Norge, og totalt var det 232 personer som døde av leverkreft i 2013 (Larsen et al. 2015). Selv om leverkreft utgjør en liten gruppe i Norge, er det et stort helseproblem globalt. På verdensbasis er hepatocellulært karsinom den 6. vanligste maligne kreftsykdommen (Gao et al. 2015). HepG2 er en cellelinje isolert fra en pasient med hepatocellulært karsinom. Denne cellelinjen er en av de som vanligvis brukes når man skal studere krefttypen *in vitro* (Bagi & Andresen 2010).

1.1 Hepatocellulært karsinom

Hepatocellulært karsinom er en aggressiv krefttype i leveren som stammer fra hepatocytter (Aucejo et al. 2013; Thorgeirsson & Grisham 2002). Sykdommen utvikler seg raskt, og pasienter rammet av denne krefttypen har ofte en dårlig prognose. Hepatocellulært karsinom er den nest hyppigste årsaken til kreftrelaterte dødsfall på verdensbasis (Gao et al. 2015; Zhang et al. 2015). Kreftsykdommen oppstår i de aller fleste tilfellene hos folk med skrumplever (levercirrhose) som kan være forårsaket av blant annet alkoholmisbruk, hepatitt B eller hepatitt C, toksiner/legemidler eller røyking (Chung et al. 2012; Liu et al. 2014; Thorgeirsson & Grisham 2002).

Hovedgrunnen til den høye dødeligheten av hepatocellulært karsinom er at krefttypen er malign¹ og oppdages sent i forløpet. En annen grunn er at hepatocellulært karsinom kan ha intrahepatisk² og systemisk metastase (Zhang et al. 2015). Det er fortsatt mye man ikke vet om de molekylære mekanismene og prinsippene bak spredningen av leverkreft (Gao et al. 2015; Gundem et al. 2015; Ramaswamy et al. 2003; Wong et al. 2014; Zhang et al. 2015). I dag er leverreseksjon den eneste kjente kurative behandlingen av hepatocellulært karsinom, men dette er kun mulig på et veldig tidlig stadium i sykdomsforløpet (Zhang et al. 2015).

1.2 Behandling

Kreft kan behandles med strålebehandling, kirurgi og kjemoterapi (Luqmani 2005). Behandling av kreft er fortsatt i stor grad basert på bruken av kirurgi kombinert med kjemoterapeutiske medikamenter. Kjemoterapi baserer seg på kjemisk fremstilte legemidler som brukes for å redusere tumorvekst, eliminere kreftceller og lindre smerter. For behandling av et bredt spekter av krefttyper kan cellegiftmedisiner brukes alene eller i ulike kombinasjoner (Cheung-Ong et al. 2013). Noen av medikamentene som blir brukt i kjemoterapi skader cellenes kontrollpunkter i cellefaseovergangene slik at kreftcellene ikke klarer å dele seg (Panetta & Adam 1995). Med dette menes det at cellegiften kan virke i de ulike cellyklusfasene, som G₁, S, G₂/M-fase (Panetta & Adam 1995). Et av de største problemene ved krefterapi er å drepe kreftceller uten å skade de normale cellene (Cheung-Ong et al. 2013). Selv under optimale betingelser virker ikke de kjemoterapeutiske medikamentene kun på kreftceller men også de normale cellene (Alexiou et al. 2000; Alexiou et al. 2006; Dar et al. 2012). Tradisjonelle kjemoterapeutiske medikamenter er cytotoksiske på celler som har rask celledeling, en viktig egenskap til de fleste kreftceller. Kjemoterapi vil derfor også skade celler som deler seg raskt under normale omstendigheter, som for eksempel celler i beinmargen, hårsekker og fordøyelsessystemet (Gerber 2008). Dette resulterer i uønskede bivirkninger som blant annet kvalme og oppkast, diare, hårtap og utmattelse hos pasienter som gjennomgår kjemoterapi. For å redusere disse toksiske bivirkningene er det viktig å finne en selektiv og målrettet cellegift (Alexiou et al. 2000; Alexiou et al. 2006). En annen utfordring ved bruk av kjemoterapi er at kreftcellene etterhvert blir resistente mot cellegiften (Luqmani 2005).

¹ Svulst som har egenskapen til å invadere nærliggende vev og spre seg (metastasere) til andre deler av kroppen (Alberts et al. 2008).

² Kreftspredning i samme organ (lever) (Hauge 2009).

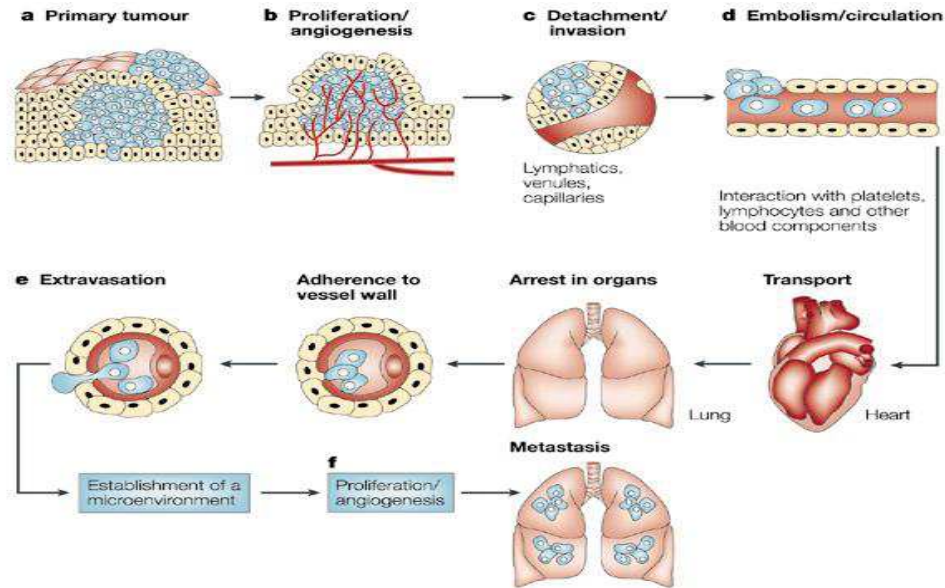
1.2.1 Behandling av hepatocellulært karsinom

Tidlig oppdagelse av hepatocellulært karsinom øker overlevelsessjansene til pasientene betraktelig. Av voksne diagnostiserte pasienter, vil 90 % dø innen 2-3 år. Kreften kan behandles ved leverreseksjon, levertransplantasjon eller lokalbehandling. Som tidligere nevnt er det kun leverreseksjon i tidlig sykdomsstadium som er kurativt. Lokalbehandling kan være strålebehandling, etanolinjeksjon eller ved å blokkere tilførselen av blod til svulsten (Gao et al. 2015; Wong et al. 2014). Disse behandlingsmetodene vil kun være symptomlindrende, og ikke kurative. Strålebehandling vil i enkelte tilfeller redusere smerter, mens etanolinjeksjon vil kunne gi en forbigående skrumpning av kreftsvulsten. Hepatocellulært karsinom kan føre til leversvikt, og påvisning av denne kreftformen vil diskvalifisere pasienter for levertransplantasjon. Om metastaser ikke er oppdaget før en eventuell leverreseksjon, er det stor sannsynlighet for tilbakefall etter kirurgisk inngrep (Wong et al. 2014). Det har vært fremgang rundt metodene for behandling av hepatocellulært karsinom, men prognosen for overlevelse er fortsatt dårlig fordi det er en stor risiko for tilbakefall (Zhang et al. 2015).

1.3 Kreftspredning (metastasering)

Begrepet metastasering kan defineres som; spredning av malign tumor fra dens opprinnelsessted til en annen del av kroppen eller et annet organ som ikke er direkte forbundet med opprinnelsesstedet (Talmadge & Fidler 2010). Metastasering skjer via blodet, lymfesystemet eller til nærliggende vev. Maligne celler som er resistente mot kreftbehandling er hovedårsaken til dødelighet hos pasienter med kreft, og metastase er årsaken til 90 % av kreftrelatert dødelighet (Alberts et al. 2008; Gudem et al. 2015; Talmadge & Fidler 2010).

Det genetiske grunnlaget for utvikling av kreft (karsinogenese) varierer mellom krefttype til krefttype. Mekanismene som kreves for invasjon og metastasering er allikevel lik for de fleste maligne kreftceller (Neal & Berry 2006). Dannelsen av metastase innebærer flere steg (se figur 1)(Fidler 2003; Wong et al. 2014). Det første steget er at det skjer en cellulær transformasjon og tumor vekst. For at svulsten skal kunne etablere i seg vevet må veksten av svulstcellene være progressiv (figur 1a). I startfasen øker svulstmassen ved at cellene får næringsstoffer ved enkel diffusjon. Syntese og sekresjon av angiogene faktorer vil føre til at det blir etablert et kapillært nettverk fra det omgivende vevet. Dette må til for at svulsten skal kunne ekspandere (figur 1b) (Alberts et al. 2008; Fidler 2003; Folkman 1986).



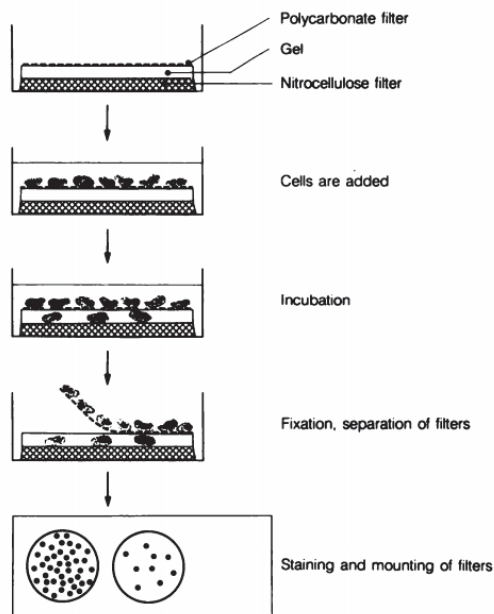
Figur 1 De ulike stegene kreftcellene går igjennom for å kunne metastasere (Fidler 2003).

Det neste steget er lokal invasjon i vertsvetet av enkelte svulstceller. En vei svulstceller bruker for å komme inn i sirkulasjonen er å trenge igjennom tynnveggede venyler, som for eksempel lymfeårer. Dette kommer av at lymfeårer og venyler gir svært lite motstand mot gjennomtrengning av svulstceller (se figur 1c)(Fidler 2003). I sirkulasjonen blir de fleste svulstcellene raskt tilintetgjort av en kombinasjon av mekaniske påkjenninger, proteolytiske ødeleggelser og fra vertens immunforsvar (Neal & Berry 2006). Svulstcellene som har overlevd kan adherere til enten kapillære endotelceller eller til subendotelial basalmembran i fjerntliggende organer (figur 1d) (Fidler 2003; Kumar & Weaver 2009). Cellene vil deretter kunne bevege seg ut fra blodårene og inn i vevet til den nye verten (organet kreftcellene har migrert til), trolig på samme måte som under invasjonen (figur 1e). Det sist steget som fullfører den metastatiske prosessen er proliferasjon av svulstcellene i organets parenkym³. Her må svulstcellene danne et vaskulært nettverk og unngå å bli drept av den nye vertens immunforsvar. Den nye vertens immunforsvar dreper kreftcellene ved hjelp av blant annet naturlige drepeceller (NK-celler), makrofager og T-celler (Finn 2012). Klarer cellene dette vil de kunne fortsette å vokse, og potensielt entre sirkulasjonene igjen og produsere flere metastaser (figur 1f) (Fidler 2003). En feil eller en mangel i et av disse stegene kan stoppe hele metastaseprosessen. Metastase er derfor avhengig av de iboende egenskapene til svulstcellene og vertens reaksjon (Fidler 2003).

³ Det vevet i et organ som utfører organets hovedfunksjoner (def. hentet fra Norsk Elektronisk Legehåndbok).

1.3.1 Kvantitativt *in vitro* forsøk for kreftcellemigrasjon

Celle migrasjon er en kompleks prosess som involverer celleadhesjon, motilitet og sekresjon av ulike typer enzymer (Erkell & Schirmacher 1988). I tillegg til disse prosessene, er det vanskelig å studere migrasjonsmekanismene *in vivo*. Erkell og Schirmacher (1988) utviklet derfor en kvantitativ metode som man kunne bruke til å studere migrasjon av kreftceller *in vitro* uten tilstedeværelse av stromalt vev. Metoden er et fleksibelt system hvor man kan se på kreftcellenes migrasjon gjennom proteingeler med ulik sammensetning, som Matrigel og fibrinigel (Erkell & Schirmacher 1988). Migrasjonstesten ble først utført med celler fra muselymfom⁴. Det ble da brukt en ikke-metastaserende variant (Eb) og to metastaserende varianter (ESb og ESb-MP) (Erkell & Schirmacher 1988). Metoden har også blitt brukt til å studere migrasjon av blant annet kreftceller isolert fra brystadenokarsinom⁵ (rotte) (Lichtner et al. 1989).



Figur 2 Prinsippet bak migrasjonstesten (Erkell & Schirmacher 1988).

Kreftceller må adherere og invadere basalmembranen for å kunne migrere, som forklart i kapittel 1.2. Det er dette prinsippet migrasjonstesten til Erkell og Schirmacher er basert på (se figur 2). Cellene må adherere til Nucleporefiltret før de kan vandre gjennom porene i filtret. For at kreftcellene skal kunne migrere til underfiltret må de invadere basalmembranen, her representert som Matrigel og fibrinigel.

⁴ Lymfom er en kreftsykdom som er utviklet fra lymfocytter og beslektede celler i lymfesystemet (Klepp 2012).

⁵ Ondartet svulst som går ut fra kjertelcellene, i dette tilfellet fra brystet (Iversen 2009).

På nitrocellulosefilteret ser man kreftcellene som har festet til underfilteret, celler som har migrert gjennom Nucleporefiltret og proteingelen. Ved å farge cellene på filtrene kan man studere antallet migrerte og adhererte celler under mikroskop (se figur 2). I studiene til Erkell og Schirmacher (1988) observerte de at ESb og ESb-MP migrerte gjennom disse to proteingelene. Metoden er en representativ måte å studere mekanismene for migrasjon av metastaserende kreftceller gjennom basalmembran, med og uten medikamenteksponering (Lichtner et al. 1989).

1.4 Svulstens miljø

Miljøet rundt en voksende kreftsvulst vil være påvirket av hypoksi (nedsatt oksygenforsyning til vev). Dette er et resultat av at oksygentilførselen fra blodet er for liten i forhold til hva kreftcellene bruker under vekst. Nedsatt oksygentilførselen vil føre til vekst av nye små blodårer (angiogenese) (se figur 1b). Dette gir svulsten tilgang på mer næringsstoffer og oksygen (Alberts et al. 2008; Wong et al. 2014).

Svulsten er omgitt av ekstracellulær matriks som består av ulike komponenter som elastin, kollagen, fibronectin, proteoglykaner og hyaluronsyre (Wong et al. 2014). Heparansulfat proteoglykaner er viktige komponenter i basalmembranen og i den ekstracellulære matriksen. Heparanase er et enzym som spalter heparansulfat proteoglykaner. Denne spaltingen av heparansulfat proteoglykaner fører til omforming av den ekstracellulære matriksen, og muliggjør at celler kan bevege seg gjennom matriksen. Spaltingen vil også føre til at det frigjøres vekstfaktorer, angiogene faktorer og kjemokiner som er fordelaktig for metastase og vekst av svulsten (Vlodavsky et al. 2002; Wong et al. 2014). For at maligne kreftceller skal kunne metastasere, må cellene kunne passere cellemembranen og ulike bindevev. Ved å bruke isolerte komponenter av basalmembranen (dette tilfellet Matrigel og fibrinogen) kan man studere kreftcellens (HepG2) metastaserende egenskaper gjennom ulike typer barrierer *in vitro*.

1.4.1 Matrigel

Matrigel er et varenavn for en gelatinlignende proteinblanding som er isolert fra sarkomceller⁶ fremstilt fra Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) mus. Selv om Matrigel er fremstilt fra tumor hentet fra mus, er det ikke artsspesifikt (Kleinman et al. 1993). Gelen ligner det komplekse ekstracellulære miljøet som finnes i mange vev fordi den inneholder mange av de samme komponentene som man finner i basalmembranen. Basalmembranens ekstracellulære matriks har kontakt med endotel, epitel, fett og glatte muskelceller. Matrigel blir brukt i studier hvor man vil undersøke kreftcellers metastaserende aktivitet *in vitro* (Kleinman & Martin 2005).

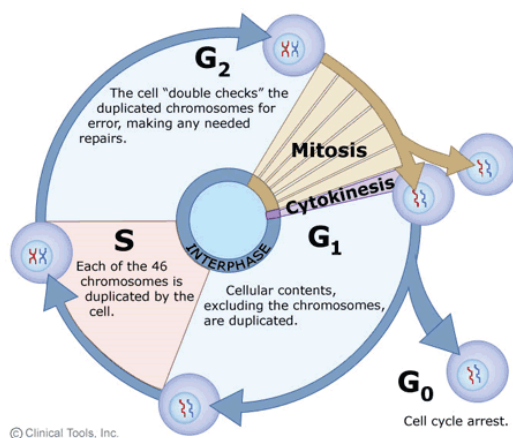
1.4.2 Fibringel

Fibrinogen er et akutfaseprotein som dannes i leveren, og man finner det oppløst i blodet. Ved hjelp av enzymet trombin, vil fibrinogen omdannes til fibrin ved blodkoagulering og dette vil forhindre blødninger og fremme sårhelbredelse (Janmey et al. 2009). Maligne svulster kan initiere inflammasjon, og fibrinogen utgjør en del av denne inflammatoriske responsen. Som ved blodkoagulering vil fibrinogen bli omdannet til fibringel. Fibringelen kan akkumuleres i svulsten og kapsle inn tumorcellene. Denne innkapslingen vil kunne fremme angiogenese til svulsten (Brown et al. 1993; Janmey et al. 2009). For å invadere karveggen må kreftcellene kunne penetrere basalmembranen, vev og endotelet. Fibrin er i tillegg hovedkomponenten i bindevevet til svulst (Erkell & Schirmacher 1988). Migrasjonen av kreftceller i fibringel og Matrigel representerer en måte man kan studere metastaseegenskapene til en kreftcelle *in vitro*. De fleste analysene av cellemigrasjon med fibringel blir utført på plast- eller glassoverflater, eller ved bruk av nitrocellulosefiltre (Brown et al. 1993). I denne oppgaven ble det brukt nitrocellulosefiltre til migrasjonstesten med både fibringel og Matrigel.

⁶ Sarkom er en ondartet svulst som har utvikler seg fra feks. bindevev, bruskvev og fettvev (Klepp 2009).

1.5 Celledeling

Celler reproducerer seg ved å gjennomføre en rekke ordnede hendelser hvor cellens innhold dupliseres og cellene deler seg i to. Cellesyklus kan deles i fire faser; G_1 , S, G_2 og M-fase (se figur 3). Hvis omstendighetene ikke er gunstig for celledeling går cellene i en hviletilstand, G_0 -fasen. I S-fasen skjer kromosomduplikasjon, DNA syntese, mens i M fasen fordeles kromosomene og man får celledeling. Både G_1 og G_2 er såkalte «gap-faser». I løpet av G_1 -fasen danner cellene en rekke proteiner som er nødvendig for DNA replikasjon. Etter S-fasen kommer G_2 -fasen hvor cellene produserer proteiner som er nødvendig under celledeling, mitosen (Alberts et al. 2008).



Figur 3 Oversikt over de forskjellige fasene under cellesyklusen (Leicester 2015).

Celler beskytter seg selv mot DNA-skader, som eksempelvis mutasjoner, ved å ha kontrollpunkter under cellesyklusen (Doucas & Berry 2006). Det er i hovedsak tre hovedkontrollpunkter; ett sent i G_1 -fasen, mellom G_2 /M-fasen og det siste er ved overgangen fra metafase til anafase. Disse kontrollpunktene gjør at cellevekst vanligvis er strengt kontrollert under de ulike fasene av cellesyklusen (Alberts et al. 2008). Det er mange veksthemmende signaler som er målrettet mot G_1 cellesyklus kontrollpunktet. Disse signalene kan føre cellene til den inaktive G_0 fasen av cellesyklusen i en kort periode eller permanent. For at kreftceller skal kunne inngå i cellesyklusen og proliferere, må de klare å unngå disse kontrollene (Doucas & Berry 2006). I tillegg til kontrollpunktene som styrer cellesyklusen har man ekstracellulære signaler som kontrollerer cellevekst, celledeling og celledød. De ekstracellulære signalene (løselige, utskilte proteiner) kan deles inn i tre hovedklasser; mitogener, vekstfaktorer og overlevelsesfaktorer (Alberts et al. 2008). Mitogener stimulerer celledeling ved at blokaden i det første kontrollpunktet inhiberes.

Den mitogene signaleveien (mitogen-aktivert proteinkinase modul) regulerer cellenes funksjon inkludert proliferasjon, genuttrykk differensiering, mitose og apoptose (Pearson et al. 2001). Vekstfaktorer fremmer cellevekst ved at proteinene aktiverer celleproliferasjon og differensiering. Til slutt vil overlevelsesfaktorer forhindre apoptose (programmert celledød) av kreftceller og normale celler (Alberts et al. 2008). Mutasjoner i mitogene signaliseringsveier sammen med mutasjoner i kontrollmekanismene til cellesyklusen, kan føre til malign transformasjon (celler får egenskaper til kreft). Skjer det mutasjoner i genene som beskytter celler mot kreft (tumor-undertrykkende gener) vil dette kunne føre til unormal aktivering av signalveiene som igjen gir ukontrollert celledeling (Yap et al. 2009).

1.6 *Haematococcus pluvialis*

Haematococcus pluvialis er en encellet grønnalge som man finner i ferskvann (Cuellar-Bermudez et al. 2015). Mikroalgen tilhører ordenen Chlamydomonadales (Tabell 1), og er utbredt over store deler av verden (Lemoine & Schoefs 2010). Det er stor kommersiell interesse rundt *H. pluvialis* på grunn av dens produksjon av astaxanthin, og at den er enkel å dyrke opp i store mengder i lukkede fotobioreaktorer (Gwak et al. 2014; Lemoine & Schoefs 2010). Algebiomassen kan brukes blant annet til helsekost, kosmetikk eller fiskefôr. *H. pluvialis* selges som tørket og knust algebiomasse i form av pulver, piller eller tablett (Guerin et al. 2003; Skjånes et al. 2013).

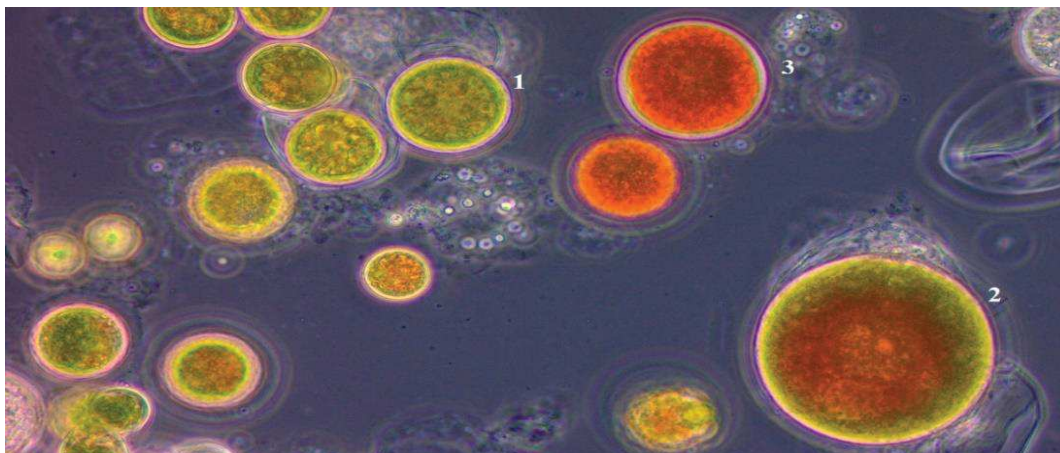
Tabell 1 Klassifisering av *H. pluvialis*

Domene	Eukaryota
Rike	Plantae
Rekke	Chlorophyta
Klasse	Chlorophyceae
Orden	Chlamydomonadales
Familie	Haematococcaceae
Slekt	Haematococcus
Art	pluvialis

1.6.1 Livssyklusen til *H. pluvialis*

Livssyklus til *H. pluvialis* består av to distinkte faser i cellyklusen; vegetativ vekstfase med bevegelige makrozooid⁷ celler, og en innkapslet sekundær karotenoid akkumuleringsfase hvor algecellen er i haematocyststadiet⁸ (Gwak et al. 2014; Sarada et al. 2006). Under den vegetative fasen er cellene grønne og algekulturen domineres av makrozooider som har to flageller (Choi et al. 2011; Gwak et al. 2014; Lemoine & Schoefs 2010).

Cellene vil gå inn i en hvile fase når det er dårlige vekstforhold. Fargen på algecellene vil da forandre seg fra å være grønn til den karakteristiske rødfargen (se figur 4) (Kobayashi et al. 1997). Dårlige vekstforhold kan være mangel på næringsstoff som for eksempel fosfat og nitrogen, saltstress, lysintensitet og temperaturforandringer. Dette vil føre til at algecellen blir sfærisk og mister sine flageller. Bevegelige makrozooider blir transformert til haematocyst (Cuellar-Bermudez et al. 2015; Gwak et al. 2014; Lemoine & Schoefs 2010). I hvilefasen stopper celledelingen, og cellene vil danne en tykk resistent cellevegg (Choi et al. 2011). Haematocystene karakteriseres ved at de akkumulerer store mengder astaxanthin isolert i cytosoliske lipidkapsler når de er under vedvarende stress (dårlige vekstforhold) (Gwak et al. 2014; Wang et al. 2004).



Figur 4 Stressede haematococcusceller. (1) De grønne cellene er i begynnelsen av hvilefasen, og har blitt haematocyster, men har ikke begynt å produsere astaxanthin. (2) Viser hvordan algecellene ser ut når de starter å akkumulere astaxanthin. (3) Haematocysten har fått sin karakteristiske rødfarge, og er nå i hvilefasen. (Foto; J.S. Mikkelsen)

⁷ Makrozooid celle er en algecelle som har evnen til å reproducere seg, og som kan bevege seg fritt i omgivelsene ved hjelp av sine flageller (Faure-Fremiet 1930).

⁸ Haematocyst celle er en ikke-bevegelig algecelle som danner to ekstra cellevegger under stress (Hagen et al. 2002).

1.6.2 Sekundære metabolitter i alger

Fotosyntetiske alger danner frie radikaler. Under normal aerobisk metabolisme vil det være en likevekt mellom generering og detoksifisering av de frie radikalene (Wang et al. 2004). Frie radikaler kan være skadelig for ulike cellulære komponenter ved at de virker som et sterkt oksidasjonsmiddel. De frie radikalene kan virke som signalmolekyler til algecellenes forsvarssystem. Cellene vil kunne forbedre sin motstand og ha mulighet til å tilpasse seg det stressende miljøet ved å syntetisere sekundære metabolitter (Wang et al. 2004). Mange av de mest verdifulle forbindelsene som produseres av mikroalger, er sekundære metabolitter. De er organiske forbindelser som ikke deltar direkte i vekst eller utvikling. Som tidligere nevnt blir sekundære metabolitter produsert under stressende forhold, og de bistår i overlevelsen av organismene som produserer metabolittene (Recht et al. 2012; Skjånes et al. 2013).

Siden det er så stor interesse rundt astaxanthin er det gjort få studier på de andre sekundærmetabolittene man finner i *H. pluvialis* (Recht et al. 2014). Ved bruk av kjemisk klassifikasjon fant Su et al. (2014) 93 kjemisk klassifiserte metabolitter fra *H. pluvialis* ekstrahert med metanol (totalt fra stressede og ustressede celler), inkludert aminosyrer, fosfat, karbohydrater og organiske syrer. Antallet metabolitter som Su et al. (2014) fant i sine studier viser mangfoldet av metabolitter man kan finne i *H. pluvialis* i tillegg til astaxanthin.

Det er identifisert bioaktive polysakkarider hos diverse *Chlorella* arter. Fra *Chlorella pyrenoidosa* har man identifisert et polysakkarid som har vist å ha en immunstimulerende og vekstnhiberende effekt på svulst (Skjånes et al. 2013). Et annet polysakkarid i *Chlorella* som man har observert er en aktiv immunstimulator er β -1,3-glukan. Dette polysakkaridet kan ha andre helsefremmende effekter som magesår, forstoppelse og en kreftnhiberende effekt (Skjånes et al. 2013). Glykoprotein fra *Chlorella vulgaris* har vist en potensiell metastasehindrende effekt på kreftceller (Hasegawa et al. 2002; Tanaka et al. 1998). For andre algearter er det få studier som har blitt utført for å identifisere lignende forbindelser med slik aktivitet (Skjånes et al. 2013). Selv om det ikke har vært studier på disse metabolittene i *H. pluvialis* kan man ikke utelukke at de er i denne grønnalgen også.

1.7 Sekundærmetabolitten astaxanthin

Astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β,β' -carotene-4,4'-dione) er en pigmentkilde som gir den naturlige rødfargen i laks, hummer, kreps og reker. Det er kun noen bakterier, sopp og mikroalger (eks *H. pluvialis*) som kan syntetisere astaxanthin *de novo*. Dyr tar opp astaxanthin enten direkte gjennom kost eller ved å omdanne andre inntatte karotenoider til astaxanthin (Miguel 2007). Kommersielt er etterspørselen stor etter astaxanthin i akvakulturnæringen til bruk i fiskefôr for å fremme rødfargen man forbinder med laksekjøtt. Det røde karotenoidet, astaxanthin, har også et potensiale til kliniske anvendelser på grunn av sin høye antioksidantaktivitet. Astaxanthin er vist å ha høyere antioksidantaktivitet enn α -karoten, β -karoten og vitamin E (Kobayashi et al. 1997; Kobayashi 2000; Machmudah et al. 2006).

For *H. pluvialis* er akkumuleringen av astaxanthin en metode for cellene å lagre energi og karbon til videre synteseformål når betingelsene er mindre stressende for algen (Choi et al. 2011; Kobayashi et al. 1997; Lemoine & Schoefs 2010). I tillegg vil denne akkumuleringen beskytte cellenes fotosystemer mot høy lysintensitet ved at astaxanthin i cytosolen absorberer lyset. Dette beskytter cellene mot den sterke strålingen (Gwak et al. 2014). Disse stressbetingelsene er næringsbegrensninger kombinert med høy lysintensitet (Kobayashi et al. 1997). Astaxanthinproduksjon beskytter cellene mot oksidativt stress som forekommer under ugunstige forhold slik at mulighetene for overlevelse øker (Choi et al. 2011; Lemoine & Schoefs 2010). Fra *H. pluvialis* har man klart å utvinne 2-3 % astaxanthin (% tørrvekt), noe som er betraktelige høyere enn det man har klart å utvinne fra andre mikroorganismer (He et al. 2007; Lemoine & Schoefs 2010).

1.7.1 Bruk av astaxanthin i kreftforskning

Kommersielt kan *H. pluvialis* dyrkes i store kvanta, og dette åpner mulighetene for å få store mengder av astaxanthin i naturlig form. Astaxanthin i bruk som kreftterapi begrenses pga. høye kostnader ved produksjon, isolering og rensing av rent astaxanthin fremstilt ved hjelp av kjemisk syntese. *H. pluvialis* er derfor en viktig kilde for tilgang på naturlig astaxanthin (Jyonouchi et al. 2000; Palozza et al. 2009; Prabhu et al. 2009). Det har ikke blitt observert noen helserisiko eller toksisitet forbundet med bruk av *H. pluvialis* astaxanthin (Guerin et al. 2003; Jyonouchi et al. 2000; Yuan et al. 2011). Astaxanthin har blant annet blitt brukt i *in vivo* studier hvor man har sett på tykktarmskreft forårsaket av dimetylhydrazin (DMH) i rotter (Prabhu et al. 2009).

I studiene til Prabhu et al. (2009) ble det vist at astaxanthin gir endringer i antioksidantenzymene forårsaket av DMH, og dette vil kunne beskytte cellene mot frie radikaler som kan fremkalle tykktarmskreft. Det er også gjort studier hvor man har sett på egenskapene til *H. pluvialis* astaxanthin *in vitro*. Nagaraj et al. (2012) studerte virkningen av astaxanthin på HepG2 celler. Det ble observert en reduksjon i HepG2 cellenes viabilitet. Videre studier viste at denne reduksjonen i HepG2 cellene var apoptose forårsaket av astaxanthin. Undersøkelsen viste at *H. pluvialis* astaxanthin kunne brukes i medikamenter som et middel mot behandling av leverkreft (Nagaraj et al. 2012).

1.8 Mål for oppgaven

Hepatocellulært karsinom utvikler seg raskt og er en sterkt malign krefttype (Gao et al. 2015). Det er få behandlingsmetoder som hindrer tilbakefall når man først har fått diagnosen. Dette kommer av at kreften ofte blir oppdaget først etter at sykdommen har spredt seg systemisk.

I tidligere studier har man sett på behandling av ulike krefttyper ved å bruke forskjellige typer alger, deriblant Chung et al. (2012). Chung et al. (2012) studerte HepG2 cellelinjen og dens påvirkning ved bruk av algen *C. sorokiniana* som kreftbehandling. De så at *C. sorokiniana* induserte apoptose og inhiberte migrasjon av HepG2 celler *in vitro*. *H. pluvialis* er en mikroalge som produserer blant annet sekundærmetabolitten astaxanthin som en reaksjon på ugunstige forhold. Det er ikke funnet noen helsefarlig effekter ved bruk av astaxanthin, og karotenoidet blir brukt til blant annet kosttilskudd og i kosmetikk. På grunn av astaxanthins høye antioksidantaktivitet har det vært foreslått bruk av karotenoidet ved behandling av kreftsykdom (Nagendraprabhu & Sudhandiran 2011). På grunn av den store interessen rundt astaxanthin, har det blitt gjort få studier på hvilke andre sekundære metabolitter man kan finne i *H. pluvialis*, og metabolittenes effekt. Dette utelukker ikke at det kan være flere metabolitter i *H. pluvialis* som påvirker kreftceller. Det var derfor interessant å se om *H. pluvialis* ekstrakter inneholdt andre bioaktive komponenter med effekt på kreftceller. I denne masteroppgaven var hensikten å se om ulike ekstrakter fra *H. pluvialis* hadde en påvirkning på HepG2 cellenes migrasjon, viabilitet og proliferasjon. Effekten av *H. pluvialis* på viabiliteten til en normal cellelinje (WI-38) og dens transformerte cellelinje (WI-38 VA-13) ble også testet.

2 Materialer

2.1 Cellekultur

Tabell 2 Cellelinjer som ble brukt i forsøket.

Cellelinjer	Karakteriska	Leverandør
WI-38	Lungefibroblast	ATTC
WI-38 VA-13 subline 2RA	Lungefibroblast (SV 40 transformert)	ATTC
HepG2	Hepatocellulært karsinom	ATTC

Tabell 3 Kjemikalier og løsning brukt ved behandling av cellelinjene. Leverandørens fulle navn: SA = Sigma-Aldrich

Kjemikalier	Leverandør/katalognummer
Fosfatbufret saltvann (PBS)	SA/D8537
Trypsin EDTA (1×)	GH/L11-004
Trypan Blue løsning (0,4 %)	Amresco/K940
Løsninger til medium med 10 % kalveserum (FCS)	
- RPMI 1640 medium med L-glutamin og NaHCO ₃ (500ml)	- SA/R8758
- Inaktivert kalveserum (10 %)	- PAA/A15-151
- Penicillin/Streptomycin (100 U penicillin, 100 µg/ml streptomycin)	- SA/P0781
- Natriumpyruvat (1mM)	- SA/S8636
- Ikke-essensielle aminosyrer (1×)	- SA/M7145
- Monothioglyserol (50µM)	SA/M6145

Tabell 4 Utstyr og instrumenter brukt i arbeidet med cellekulturene. Leverandørens fulle navn: BD = Becton Dickinson, CB = Coulter Beckman, GB = Greiner Bio-One. PP = polypropen.

Utstyr	Leverandør/katalognummer
50 mL sterile rør (PP)	GB/227 261
15 mL sterile rør (PP)	GB/188 271
FALCON cellekulturplater, 6 brønner	BD/353046
FALCON cellekulturplater, 24 brønner	BD/353047
FALCON cellekulturplater, 96 brønner	BD/353072
250 mL FALCON cellekulturflasker, 75 cm ²	BD/353136
Isoton II	CB/8448011
Instrumenter	Leverandør
Z1 Coulter partikkelteller	Coulter Electronics Ltd
Leica DMIL mikroskop	Leica Microsystems
Heraeus Megafuge 1.0	Thermo Fisher Scientific
Sterilbenk	Biowizard
Steri-Cycle CO ₂ inkubator	Thermo Scientific

2.2 Algeekstraksjon

Tabell 5 Alge, kjemikalier, utstyr og instrumenter brukt ved algeekstrahering. PP = polypropen

Alge	Leverandør / katalognummer
<i>Haematococcus pluvialis</i>	AstaReal/AstaREAL A1010
Kjemikalier	Leverandør/katalognummer
96 % Etanol	VWR International/20824.365
Dimetylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich/D2438
Utstyr	Leverandør/katalognummer
0,5 mm glasskuler	Scientific Industries/SI-BG05
1,5 ml sentrifugerør, selvstående (PP)	Sigma-Aldrich/BR780731
Instrumenter	Leverandør
Vekt AE260 deltarange	Mettler Toledo
FastPrep MP 24	MP Biomedicals
SUB Aqua Pro Water Bath (SUB6)	Grant
Bordsentrifuge	Eppendorf
Vakuumsentrifuge DNA mini	Holten
Heto FD3, Frysetørker	Heto Lab Equipment
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Ultralydbad Branson 3510	Branson

2.3 Ekstraksjon og analyse av astaxanthin fra algebiomasse

Tabell 6 Kjemikalier, instrumenter og utstyr brukt ved analyse av mengde astaxanthin.

Kjemikalier	Leverandør/katalognummer
Astaxanthin > 99,9 %	Chiron/3902.40-5MG
Trans- β -apo-8'-carotenal \geq 96 %	Sigma-Aldrich/10810-1G
Tris Ultrapure 99,9 %	Duchefa Biochemie/T1501.1000
Kolesterol esterase, 100 U	Sigma-Aldrich/C9281
HCl	Merck
Aceton	VWR International/20065.327
Acetonitril	Merck Millipore/1.00017.4004
Metanol	CTL/20834.291
NaCl	
Mg SO ₄ vannfri	
Instrumenter/utstyr	Leverandør
FastPrep MP 40	MP Biomedicals
Varmeskap/GC ovn	
HPLC DAD	
0,5 mm glasskuler	Scientific Industries/SI-BG05
25 ml målekolbe i glass	Novatech/2303A-25

2.4 Viabilitetstest

Tabell 7 Utstyr og instrumenter brukt for å utføre celleproliferasjonsassay.

Utstyr/instrument	Leverandør/katalognummer
FALCON cellekulturplater, 96 brønner	Becton Dickinson/353072
Celleproliferasjons-kit I (MTT)	Roche Diagnostics/11 465 007 001
Sunrise absorbance reader	TECAN
Magellan v. 6.6 (programvare)	TECAN

2.5 Migrasjonstest

Tabell 8 Konsentrasjoner og kjemikalier til utførelse av migrasjonsforsøk med fibringel og Matrigel. Leverandørens fulle navn: SA = Sigma-Aldrich

	Kjemikalier/konsentrasjon	Leverandør/katalognummer
Fibringel	- Kasein fra storfe (10 mg/ml, pH 7,4)	- SA/E0789
	- Fibrinogen fra humant plasma (50 mg/ml)	- SA/F4883
	- Trombin fra storfeplasma (10 U/ml)	- SA/T6634
	- Varmebehandlet serum	- PAA/A15-151
	- Minimal essential medium Eagle	- SA/M2279
Matrigel	- Kasein fra storfe (10 mg/ml, pH 7,4)	- SA/E0789
	- Fibrinogen fra humant plasma (50 mg/ml)	- SA/F4883
	- Trombin fra storfeplasma (10 U/ml)	- SA/T6634
	- Minimal essential medium Eagle	- SA/M2279
	ECM Gel fra Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma (Matrigel) (8-12 mg/ml)	SA/E1270

Tabell 9 Konsentrasjonene og kjemikaliene brukt til farging av nitrocellulosefiltre og Nucleporefiltre. Leverandørens fulle navn: SA = Sigma-Aldrich, VWR = VWR International

Kjemikalier	Konsentrasjon	Leverandør/katalognummer
Canada balsam		SA/ C1795
96 % Etanol	70 %	VWR/20824.365
Glutaraldehyd, grad II	2,5 % løst i PBS	SA/ G6257
Farging av nitrocellulosefiltre		
Harris hematoxylin løsning	1×	SA/ HHS16
Vaskeløsning («Blueing agent»)	20 g MgSO ₄ og 2 g NaHCO ₃ /1 l dH ₂ O	
Propanol 99.9 %	Alle løsningene ble fortynnet med dH ₂ O	VWR/UN1219
	- 70 % propanol med 150 µl 1M HCl	
	- 70 %, 95 % og 100 %	
Neo-Clear (Xylen-erstatte)		VWR/1.09843.5000
Farging av Nucleporefiltre		
Giemsa farging	1×	SA/48900

Tabell 10 Utstyr brukt til forberedelse av matrigel og fibringel, samt til migrasjonstesten.

Leverandørens fulle navn: BD = Becton Dickinson, GB = Greiner bio-one, MM = Merck Millipore Ltd. PP = polypropen

Utstyr til Matrigel og fibringel	Leverandør/katalognummer
5 mL Plastipak sprøyte	BD/302187
0,2 µm sterilfilter (non-pyrogenic)	Sarstedt/83.1826.001
1,5 mL eppendorfrør (PP)	GB/616201
Utstyr til migrasjonstesten	Leverandør/katalognummer
FALCON cellekulturplater, 24 brønner	BD/353047
Membranfiltre, nitrocellulose	MM/ SCWP01300
Porestørrelse 8 µm, diameter 13 mm	
Membranfiltre, Nucleporefilter	MM/ TETP01300
Porestørrelse 8 µm, diameter 13 mm	
Rottekollagen I, 1,5 mg/ml	Cultrex/3443-100-01
Bruksløsning; 1:100	
Parafilm	Bemis/PM996

2.6 Flowcytometri

Tabell 11 Instrument, kjemikalier og løsninger brukt ved utførelse av flowcytometri. Leverandørens fulle navn: SA = Sigma-Aldrich, VWR = VWR International, GE = GE Healthcare

Kjemikalier	Konsentrasjon	Leverandør/katalognummer
Fosfatbufret saltvann (PBS)		SA/D8537
Absolutt etanol	80 %	VWR/20821.310
Løsninger til Vindeløvs metode		
Løsning A	- Trizma base (0,5 mM, pH 7,6)	- SA/ T8524
	- Tri-natriumcitratdihydrat (3,4 mM)	- Heco/1.06448.1000
	- NP-40 (1 %)	- Calbiochem/492015
	- Spermintetrahydroklorid (2,5 mM)	- SA/S2876
	- Trypsin (30 µg/ml)	- GE/ L11-004
Løsning B	- Trizma base (0,5 mM, pH 7,6)	- SA/ T8524
	- Tri-natriumcitratdihydrat (3,4 mM)	- Heco/1.06448.1000
	- NP-40 (1 %)	- Calbiochem/492015
	- Spermintetrahydroklorid (2,5 mM)	- SA/S2876
	- Trypsininhibitor (0,5 mg/ml)	- SA/T6522
	- RNase (0,1 mg/ml)	- SA/ R5503
Løsning C	- Trizma base (0,5 mM, pH 7,6)	- SA/ T8524
	- Tri-natriumcitratdihydrat (3,4 mM)	Heco/1.06448.1000
	- NP-40 (1 %)	- Calbiochem/492015
	- Spermintetrahydroklorid (8,3 mM)	- SA/S2876
	- Propidium iodide (0,5 µg/ml)	- SA/ P4864
Instrument	Leverandør	
MACSQuant	Miltenyi Biotec	

3 Metoder

3.1 Cellekultivering

3.1.1 Cellelinjer

Det ble brukt flere cellelinjer i forsøkene, og cellene ble oppbevart på flytende nitrogen (-196 °C) frem til bruk. For alle cellelinjene ble det brukt samme fremgangsmåter og de samme inkubasjonsbetingelser. Cellelinjene som ble brukt i forsøket var WI-38, WI-38 VA-13 og HepG2. WI-38 cellene er en diploid cellelinje sammensatt av fibroblaster som stammer fra lungevev. WI-38 VA-13 subline 2RA er en cellelinje som er transformert fra normal WI-38 cellelinje. WI-38 VA-13 har egenskapen til en kreftcelle ved at den har ukontrollert celledeling, tilnærmet uendelig livstid. WI-38 VA-13 er transformert med Simian virus 40 (SV40), og det er dette viruset som giudødeliggjøre cellene (Garcea & Imperiale 2003).

3.1.1.1 Kulturbetingelser for cellelinjene

Alle cellelinjene ble kultivert i T75 cellekulturflaske tilsatt medium med 10 % kalveserum (FCS medium). Kulturbetingelsene for cellelinjene var 5 % CO₂ ved 37 °C. For å opprettholde logaritmisk vekst av cellekulturene og forhindre mutasjoner, stress og celledød, ble de subkultivert etter 3-4 dager ved omlag 80 % konfluens. Cellenes konfluens ble bedømt ved bruk av mikroskop.

3.1.1.2 Cellekultivering

For å starte kultivering av cellelinjen ble cellesuspensjonen tint på is og overført i hvert sitt rør med FCS medium. Cellesuspensjonen ble sentrifugert ved 340 × g i 10 min, og cellepelletten resuspendert i nytt medium. Celletall ble målt ved hjelp av partikkelteller, og cellesuspensjonen ble fordelt i en 6 brønnsplate. Mediet i brønnene ble byttet ut dagen etter for å få fjernet døde celler som ikke hadde festet seg. Deretter ble mediet byttet ut hver 2.-3. dag til cellene hadde nådd en konfluens på omtrent 80 %. Cellene ble da splittet og overført til en cellekulturflaske.

3.1.1.3 Subkultivering

Ved splitting av celler ble det gamle mediet fjernet fra cellekulturflasken, og cellene ble deretter vasket med PBS. For at cellene skulle løsne fra bunnen på cellekulturflasken ble det tilsatt trypsin-EDTA og inkubert i 10-15 min ved 5 % CO₂ ved 37 °C. Nytt medium ble tilført og blandet med de trypsinerte cellene slik at man fikk fortynnet trypsinkonsentrasjonen. Cellesuspensjonen ble overført til et rør og sentrifugert i 10 min ved 340 × g. Supernatanten ble fjernet, cellepelleten resuspendert i nytt medium, og celletallet målt ved hjelp av partikkeltelleren. Det ble overført 2×10⁴ celler/cm² tilbake til cellekulturflaska.

3.1.1.4 Viabilitetestimering

Celleviabiliteten ble kontrollert før hvert forsøk. Etter subkultivering ble det tatt ut en prøve fra cellesuspensjonen og tilsatt 0,4 % Trypan Blue løsning, til en 1:1 konsentrasjon. En del av den fargede prøven, 10 µl, ble overført til et Bürker tellekammer hvor man kunne telle døde og levende celler. Det ble gjort to prøver for hver cellesuspensjon, og dersom andelen døde celler var under 7 % ble det ønskede volumet cellesuspensjon overført til cellekulturflasken. Det ble dyrket opp nye celler hvis viabiliteten til cellene ikke ble bedre over en kort periode.

3.2 Algeekstraksjon

Ekstrakter lages ved å behandle for eksempel alger med løsningsmidler som vann eller alkohol, og løsningsmiddelet fjernes deretter ved hjelp av en form for tørking.

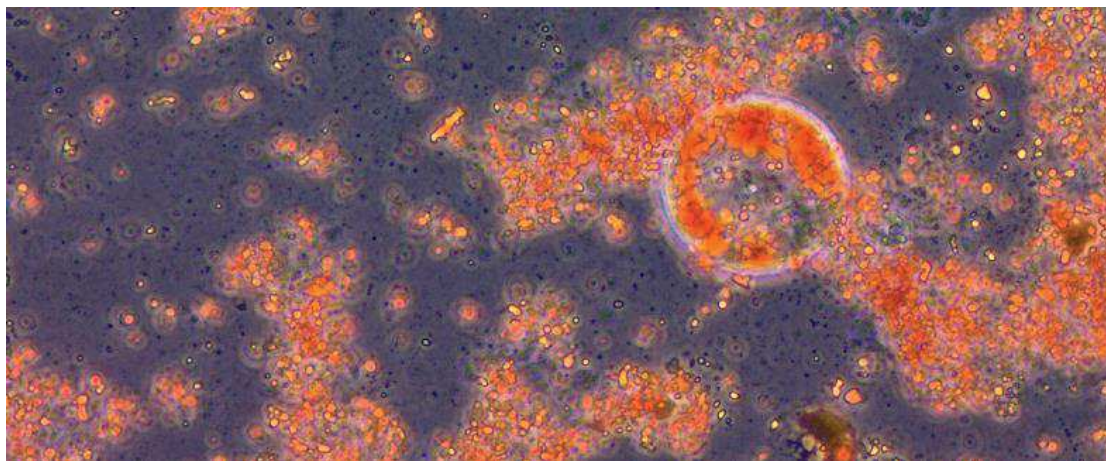
3.2.1 *Haematococcus pluvialis*

I forsøket ble det brukt tørket, pulverisert og knust algebiomasse av *H. pluvialis* bestilt fra AstaReal Co. Ltd. Innholdet av astaxanthin og andre sekundære metabolitter i alger er avhengig av spesifikke stressbetingelser under dyrkingen. Batchnummeret på algebiomassen var; ASR 336.

3.2.1.1 Ekstraksjon av *Haematococcus pluvialis*

H. pluvialis ble ekstrahert på to ulike måter, 1) ved hjelp av destillert vann (dH₂O) og 2) ved hjelp av 96 % etanol. Algebiomassen ble veid inn i to rør, en til hver av ekstraksjonsmetodene, hvor biomassen ble slemmet opp med dH₂O og 96 % etanol.

Ekstraheringen ble gjort under mørke forhold på grunn av algeekstraktens lyssensitivitet. Algebiomassen fra AstaReal skulle i utgangspunktet være ferdig knust, men under mikroskop ble det observert at knusingen var ufullstendig, fortsatt en del hele celler igjen. Det ble derfor valgt å ta et steg i prosedyren hvor man knuste de resterende hele cellene. Suspensjonene ble fordelt i sentrifugerør med 0,5 mm glasskuler, og cellene i algebiomassen ble knust (se figur 5) ved risting med Fastprep-24 i 12 min ved $6 \times g$. Dette ble gjort for å knuse alle cellene i algebiomassen for å få tilgang på mest mulig av metabolittene i algebiomassen. Etter risting ble vannekstraktet inkubert i vannbad ved $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ i en time, ristet i 4 min ved $6 \times g$ ved hjelp av Fastprep-24, og gjentatt i respektiv rekkefølge. Etanolekstraktet ble inkubert i romtemperatur, men ellers var prosedyren den samme som for vannekstraktet. Alle rørene ble deretter sentrifugert på $4700 \times g$ i 30 minutter ved $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, og supernatantene fra etanol- og vannekstraktene ble overført til nye rør. Pelletene ble ekstrahert på nytt, med hhv dH_2O og etanol, hvor de ble ristet i 4 min, inkubert, ristet igjen, og sentrifugert på $4700 \times g$ i 30 minutter ved $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatantene fra ekstraktene ble blandet med de som allerede var tatt ut, og ekstraheringsprosedyren gjentatt. Rørene med supernatantene ble sentrifugert på $4700 \times g$ i 30 minutter ved $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ to ganger. Mellom de to sentrifugeringene ble algeekstraktene tatt over i nye rør for å få bort uønsket slam og eventuelle glasskuler som kunne ha fulgt med i overføringen av supernatanten. Etter siste sentrifugering ble algeekstraktene overført i nye innveide sentrifugerør.



Figur 5 Algecelle (*H. pluvialis*) som har sprukket under risting. (Foto: J.S. Mikkelsen)

3.2.1.2 Tørrking av algeekstrakt og tilsetning av løsningsmiddel

Sentrifugerørene med vannekstraktene ble fryst ned ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ til dagen etter. De ble da tørket i rundt 29 timer ved frysetørrking. Vannekstraktene var tørre da trykket i frysetørkeren hadde stabilisert seg på $64,3 \times 10^{-3}$ mbar. Etanolekstraktene ble tørket i vakumsentrifuge ved $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ i omtrent 8 timer. Alle rørene med tørket ekstrakt ble veid og deretter resuspendert i dimetylsulfoxid (DMSO). Det ble deretter regnet ut hvor mye ekstraktutbytte man hadde fått ut som tørrvekt fra den opprinnelige algebiomassen.

Med hensyn til cellene som algeekstraktet skulle brukes på, var det ønskelig med en så lav DMSO konsentrasjon som mulig. Ekstraktene ble derfor satt på ultralydbad (40kHz) for å bryte ned store komponenter i algeekstrakt slik at det ble lettere å suspendere algeekstraktene i DMSO. For etanolekstraktene var prøvene på ultralydbad i 1 time ved $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ og deretter ved $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vannekstraktene stod i tillegg til dette en time ekstra ved $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Rørene stod deretter i romtemperatur i 24 timer for sterilisering. Alle parallellene ble de samlet i ett rør, respektivt for hvert ekstrakt. De homogene blandingene ble allokert til nye markerte rør, og oppbevart på $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ frem til bruk.

3.3 Væskekromatografi

I denne oppgaven ble det brukt en HPLC-DAD (High Pressure Liquid Chromatography Diode Array Detector). Ved hjelp av HPLC-DAD og kvantifisering med trans- β -apo-8'-carotenal (TBAC) som intern standard, vil metoden kunne bestemme summen av fritt og bundet astaxanthin i algebiomassen.

3.3.1 Ekstraksjon og analyse av astaxanthin fra *Haematococcus pluvialis*

Mengden astaxanthin ble målt for å se hvor mye av karotenoidet man hadde klart å utvinne/bevare etter ekstraksjonsprosessene. Eventuelt hvilket ekstraksjonsmiddel som var best å bruke for å få størst utbytte av astaxanthin. Ekstraksjon og analyse av astaxanthin fra *H. pluvialis* ble gjort i henhold til Norli (2015). For en mer detaljert beskrivelse av metoden henvises det til Vedlegg 1.

3.3.1.1 Tillaging av reagenser og standarder

Se Vedlegg 1 for tillaging av reagenser og standarder, og Vedlegg 1 for materialer brukt til løsningene.

3.3.1.2 Prøveopparbeidelse

Det ble gjort ett forsøk for hvert av algeekstraktene. Volumet i hvert av rørene med algeekstrakt ble målt slik at det var mulig å regne ut vekten av ekstraktets tørrvekt utfra ekstraktkonsentrasjonene. I hvert av rørene ble det tilsatt 0,5 mm glasskuler. Algeprøvene ble tilsatt aceton og prøvene ble ristet ved hjelp av MP Fast Prep 24 i 1 minutt ved $6 \times g$. Rørene ble sentrifugert i 2 minutt ved $850 \times g$, og ekstraktene ble overført til hver sin 25 ml glasskolbe. Det ble igjen tilsatt aceton i hvert av rørene, og stegene ble repetert til ekstraktene i prøverørene var fargeløse. Da ekstraksjonene til algematerialet var fargeløst, ble hver kolbe fylt med aceton slik at slutt volumet var på 25 ml i hver glasskolbe (brun).

3.3.1.3 Enzymatisk hydrolyse

Acetonekstraktene ble overført til nye rør og tilsatt en intern standard. Til de nye rørene ble det tilsatt aceton og 0,05 M Tris HCl buffer. Rørene ble ekvilibrert i 2 minutter i varmeskap/GC-ovn ved $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Enzymet kolesterol esterase ble tilsatt en konsentrasjon på 2,06 U/prøve, og prøvene ble inkubert i varmeskap i 45 minutter for hydrolysering. I løpet av inkuberingen ble prøvene ristet hvert 15. minutt. Til slutt ble det tilsatt 0,25 g NaCl og 1 g MgSO_4 til prøvene, og rørene ble ristet kraftig i 1 minutt. Prøvene ble sentrifugert ved $1800 \times g$ i 5 min, og 1 ml av acetonfasen ble overført til en glassbeholder. Prøvene var da klare for HPLC-analyse.

3.3.1.4 Analytiske parametere til HPLC.

Dette var parameterne som ble brukt ved HPLC-analysen:

Mobil fase A: Acetonitril/MilliQvann (70/30).

Mobil fase B: Metanol/Aceton (50/50)

Gradient: 0-100 % (A-B) ved 24 minutter

Kolonne: Zorbax Eclipse XDB-18, 4,6x150mm, 5 µm partikler

Kolonnetemperatur: Romtemperatur.

Deteksjon: UV 430 nm

Flow: 1,0 mL/min

Injeksjon: 10 µL

3.4 Viabilitetstest

MTT assay ble brukt for å vurdere viabiliteten til cellelinjene ved inkubasjon med algeekstraktene. Viabilitetsanalysene ble gjort i henhold til anvisning fra Roche (2005), og gjennomført likt for alle cellelinjene.

3.4.1 Oppsett for MTT assay

I hver brønn ble det tilført 1.6×10^5 celler/cm², og platene ble inkubert over natten før algeekstraktet ble tilført slik at cellene fikk festet seg. Mediet ble byttet dagen etter slik at celler som ikke hadde festet seg eller var døde, ble fjernet. Algeekstraktene, *H. pluvialis* ekstrahert med dH₂O og etanol, ble tilført i mediet og blandingen ble overført til de respektive brønnene. Platene med celler ble deretter inkubert i 48 timer. Konsentrasjonene av algeekstraktene som ble brukt i oppsettet var 15,6, 31,2, 62,5, 125,0, 250,0 og 500,0 µg/ml. For hvert forøk ble det også tatt med en kontroll, kun celler. Hver konsentrasjon ble undersøkt i triplikater og gjennomført i minimum tre forsøksduplikater for alle cellelinjene. Siden algeekstraktene var løst i DMSO, ble det gjennomført en kontroll på cellelinjene ved bruk av ulike DMSO-konsentrasjoner. Forsøket ble utført for å se om mengden DMSO i algeekstraktene var toksiske for cellelinjene.

3.5 Migrasjonstest

Migrasjonsforsøket er basert på Erkell og Schirmmacher (1988) sitt arbeid, og videreutviklet for denne oppgaven.

3.5.1 Preparering av Nucleporefiltre

Nucleporefiltrene som ble brukt i forsøket var Isopore® polykarbonat membranfilter. For hvert av migrasjonsforsøkene ble Nucleporefiltrene forhåndsbehandlet.

3.5.1.1 Etsning av Nucleporefiltre

Nucleporefiltrene som først ble brukt i migrasjonsforsøket hadde en porestørrelse på 8µm og en diameter på 14 mm. Filtrene ble stanset ut fra filterark som var forhåndsbehandlet med alfastråling. De bestrålte Nucleporefiltrene var hydrofobe, og for at cellene skulle kunne feste seg, ble de etsset slik at de ble hydrofile. Etsningen bidro til at de bestrålte områdene på filtret ble tilgjengelige for cellemigrasjon, mao. porene på filtrene ble åpnet.

Filtrene ble etsset i 30 sekunder i en løsning med metallisk natrium løst i absolutt metanol (2 mg/ml), 5 ml løsning pr 25 filtre. Nitrocellulosefiltrene ble rensset i absolutt metanol to ganger, og lagt i en steril skål med den blanke siden opp for tørking. Da filtrene var blitt tørre, ble de lagt i en ny skål over 50 µl 25 % glutaraldehyd med den blanke siden opp i en time.

Overflødig glutaraldehyd ble fjernet ved å vaske filtrene i dH₂O. Filtrene ble deretter lagt over 50 µl kaseinløsning (10 mg/ml kasein i PBS med 6 µl 0,3 M NaOH pr mg kasein) med den blanke siden opp i 1,5 timer. Kaseinløsningen ble tørket bort, og filtrene ble lagt over 50 µl 25% glutaraldehyd i 30 minutter med den blanke siden opp. Filtrene ble rensset igjen i dH₂O, og lagt i et kar med dH₂O (1 liter pr 25 filtre) over natten på skånsom rotering. Med konstant bevegelse i karet ble ikke filtrene uttørket og ble skikkelig rensset for kjemikalierester. Til slutt ble filtrene tørket, sterilisert med 70 % etanol, lagt i en skål med lokk (matte siden opp) og sikret med parafilm. Nucleporefiltrene var da klare til bruk.

3.5.1.2 Behandling av Nucleporefiltrene med kollagen

De etsede filtrene ga dårlige resultater. Det ble derfor prøvd med ferdigstansede filtre fra Merck Millipore. For å erstatte effekten av etsningen ble de nye filtrene behandlet med kollagen. Filtrene ble sterilisert i 70 % etanol, og da filtrene var tørket, ble de lagt i en 24 brønnsplate. Hvert filter i brønnene ble dekket med 1:100 kollagenløsning som de stod i omtrent 3-5 timer. Kollagenløsningen ble fjernet og filtrene stod til tork i avtrekksskapet over natten. Filtrene var da klare til bruk.

3.5.2 Tillaging av fibringel til migrasjonstesten

Bruksløsningene ble gjort klare før man kunne starte forsøket, se kapittel 2.5 for kjemikalier og konsentrasjoner. Det ble lagt en ny blanding for hver gang det ble gjort et forsøk, og alle løsningene ble sterilfiltrert før bruk.

Fibrinogen og kaseinløsningen måtte stå til risting i 5-6 timer for å få løst alt opp. Tabell 12 viser blandingsforholdene til fibringelene som ble brukt til de ulike migrasjonsforsøkene.

Tabell 12 Oversikt over blandingsforholdene til de ulike fibringelene som ble brukt i forsøkene.

Blandingsforhold for 12 filtre til forsøk med fibringel:		Blandingsforhold for 12 filtre til forsøk med Matrigel:	
Kasein (10 mg/ml, pH 7,4)	250 µl	Kasein (10 mg/ml, pH 7,4)	250 µl
Fibrinogen (50 mg/ml)	100 µl	Fibrinogen (50 mg/ml)	100 µl
Varmebehandlet serum	50 µl	Serumsfritt medium	100 µl
Serumsfritt medium	50 µl		
	450 µl		450 µl

For å teste om man fikk geldannelse, ble det tatt 45 µl av blandingen og tilsatt 5 µl trombin. Løsningen ble blandet, og hvis det forkom geldannelse etter 5 minutter, kunne man gå videre. Til den resterende løsningen ble det tilsatt 40 µl trombin og blandingen ble ristet.

For migrasjonstesten med fibringel ble nitrocellulosefiltrene lagt klare i 24 brønnplater slik at det bare var å tilføre 30 µl av fibrinogenløsningen på filtrene. Nitrocellulosefiltrene som ble brukt i forsøkene, var membranfiltre som var sammensatt av blandet cellulosemembran med en biologisk inert blanding av celluloseacetat og cellulosenitrat. De sterile nucleporefiltrene ble lagt over fibringelen slik at senteret til begge filtrene var parallelle. For de etsede filtrene var den matte siden opp. Brønnene ble forseglest med parafilm og fibringelen polymeriserte i romtemperatur i en time. Det var da klart for gjennomførelse av migrasjonstestene.

For migrasjonstesten med Matrigel ble nitrocellulosefilterets underside lagt på overflaten av fibringelblandingen og så lagt i en 24 brønnsplate og forseglet med parafilm. Gelen fikk polymerisert i en time i romtemperatur. Nitrocellulosefiltrene ble polymerisert i fibringel for at filtrene skulle være mettet slik at Matrigelen ikke trakk inn i underfiltret. Matrigel ble tint på is og til hvert nitrocellulosefilter ble det tilført 10 µl Matrigel. Nucleporefilteret ble lagt over matrigeldråpen parallelt med underfilteret, og filtret ble delvis løftet et par ganger slik at gelen ble fordelt på hele filteret. Etter at de fikk polymerisert en time i romtemperatur, var filtrene klare til bruk.

3.5.3 Inkubering av celler til migrasjonstesten

Til hvert filter ble det tilsatt en suspensjon av HepG2 celler, hvorav celletettheten var 1.3×10^4 celler/cm². Cellene ble inkubert i 20 timer ved 5 % CO₂ og 37 °C. Hver konsentrasjon av ekstraktene ble undersøkt i duplikater sammen med kontroll med kun celler.

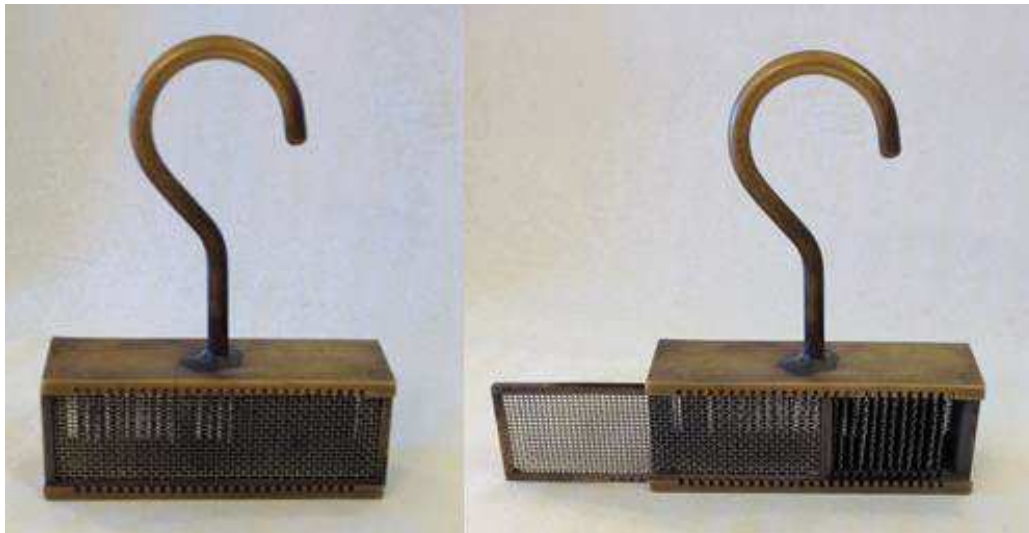
Konsentrasjonene var 62,5, 125,0, 250,0 og 500,0 µg/ml. For hvert forsøk var det også et duplikat celler i brønn uten filter for senere utregning av adhesjon. Etter 20 timer ble mediet i brønnene med filter fjernet, og cellene ble inkubert i 2,5 % glutaraldehyd i én time for fibringel og over natten for Matrigel. Filtrene ble deretter forsiktig separert og farget. Brønnene med kun celler i, ble splittet etter 20 timer som ved vanlig cellesplitting, og celletallet ble målt.

3.5.3.1 Farging av Nucleporefiltre

Nucleporefiltrene ble lagt på nummererte objektglass, og da de skulle farges ble det applisert noen dråper med 50 % etanol på hvert filter for at de skulle løsne fra objektglasset. Filtrene ble tørket for overflødig væske, farget i 30 sekunder i Giemsa, rensset i 50 % etanol, tørket, vasket i 5 sekunder i dH₂O og deretter tørket igjen. Nucleporefiltrene ble overført tilbake til det respektive nummererte objektglasset (renset imellomtiden med 70 % etanol) hvor de fikk lov til å tørke.

3.5.3.2 Farging av nitrocellulosefiltre

Nitrocellulosefiltrene ble klargjort til farging ved at de i ordnet rekke ble lagt i filterholderen, se figur 6. Filtrene ble farget ved at filterholderen ble lagt i kar hvor de fikk virke i fire minutter for hver løsning. Løsningene som ble brukt til fargeprosedyren var (i respektiv rekkefølge); haematoxylin, dH₂O, 70 % propanol m/syre, dH₂O, vaskeløsning («blueing Agent»), dH₂O, 70 % propanol, 95 % propanol, 2 × 100 % propanol, og 2 × Neu clear. Filtrene ble tatt ut av holderen og lagt på objektglasset sammen med det respektive Nucleporefilteret. Det ble lagt en dråpe Canada-balsam under og over nitrocellulosefiltrene. Til Nucleporefiltrene ble det lagt en dråpe Canada-balsam over før et dekkglass ble lagt over filtrene for å bevare dem.



Figur 6 Filterholderen hvor nitrocellulosefiltrene ble lagt i ved farging.

3.5.3.3 Bearbeidelse av data

De ferdig preparerte filtrene, Nuclepore- og nitrocellulosefiltrene, ble studert videre. Ut fra disse filtrene kunne man se hvor mange av de tilførte HepG2 cellene som hadde adherert og migrert. HepG2 cellene ble telt i mikroskop ved hjelp av telleokular. For hvert filter ble antallet celler talt på 20 tilfeldige steder ved bruk av ×10 objektiv for Nucleporefiltrene og ×40 objektiv for nitrocellulosefiltrene. Adhesjonen ble estimert ved å dividere det totale antallet celler på begge filtrene med gjennomsnittet av celler i brønnene uten filtre, og multiplisere det med faktoren på 1,5 (se formell 1).

Faktoren korrigerer for størrelsesforskjellen på filteret og selve brønnen. Migrasjonsratioen ble estimert ved å se på forholdet mellom antall celler på nitrocellulosefiltret mot det totale antallet celler på begge filtrerene.

Formel 1 Utregning av faktoren som korrigerer for størrelsesforskjellene på brønn og filter.

$$\text{Adhesjon: } \frac{\text{Celler totalt på filter}}{\text{Celler totalt i brønn}} \times \frac{1}{K}$$

$$\text{Kvotient: } \frac{\text{Areal på filter}}{\text{Areal til brønn}} = \frac{132,73}{201,06} = 0,66 \rightarrow \frac{1}{K} = \frac{1}{0,66} = 1,5$$

3.6 Flowcytometri

I forsøket ble flowcytometri brukt for å se om algeekstraktene hadde noen innvirkning på proliferasjonen til HepG2, og eventuelt hvor i cellesyklusen cellene ble påvirket. Det ble brukt Vindeløvs metode for å lysere og preparere cellekjernene til cellesyklusanalysen. Denne metoden er en direkte analyse av DNA-innholdet fra kjernen. Fordelen med Vindeløvs metode er at man kun ser på nuclear DNA og ikke mitokondrie DNA (Vindelov et al. 1983).

3.6.1 Cellepreparering

Til flowcytometri ble cellelinjen HepG2 brukt. Cellene ble fordelt i 6 brønnplater hvor de fikk feste seg over natten før nytt FCS medium med algeekstrakt ble tilsatt. Konsentrasjonene for *H. pluvialis* med dH₂O og etanol som ekstraksjonsmiddel var; 62,5, 125,0, 250,0 og 500,0 µg/ml, i tillegg til en kontrollprøve (kun celler). Cellene ble inkubert i algeekstraktene i 24, 48 og 72 timer. Cellene i brønnene ble splittet (slik som i kapittel 3.1.1.3) til sin respektive tider, og vasket fire ganger i PBS. Etter siste vask ble cellepelletten løst opp i PBS og det ble tilsatt absolutt etanol dråpevis til celsesuspensjonen, slik at sluttkonsentrasjonen på etanol var 80 %. Cellene ble fiksert i fire timer ved 20 °C.

3.6.2 Farging av cellekjerner

Etter fikseringen ble suspensjonen alligert, vasket i PBS og sentrifugert ved $500 \times g$ i 10 minutt. Pelleten ble løst opp i PBS og celleduspensjonen ble inkubert med løsning A i 10 minutt ved romtemperatur. Løsning B ble tilsatt blandingen, og inkubasjonen fortsatte i 10 minutter til. Løsning C ble til slutt tilsatt og cellene inkubert i ytterlige 40 minutt, hvorav de siste 30 minuttene var på is. Prøvene ble så analysert og bearbeidet ved hjelp av flowcytometri (MACSQuant, Miltenyi Biotec).

3.7 Statistikk

De fleste av eksperimentene ble gjentatt flere ganger ($n=1-6$), noe som gjorde det mulig å beregne gjennomsnittet. Standardfeilen ble beregnet for hvert av forsøkene. Formelen for beregning av standardfeil er; $SE = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$,

hvor σ er standardavviket, og n er antall målinger. Statistiske analyser ble gjort ved hjelp av Minitab, og presentert i ANOVA tabeller (se Vedlegg 2 og 3).

4 Resultater

4.1 Utvinning fra ekstrahering av *Haematococcus pluvialis*

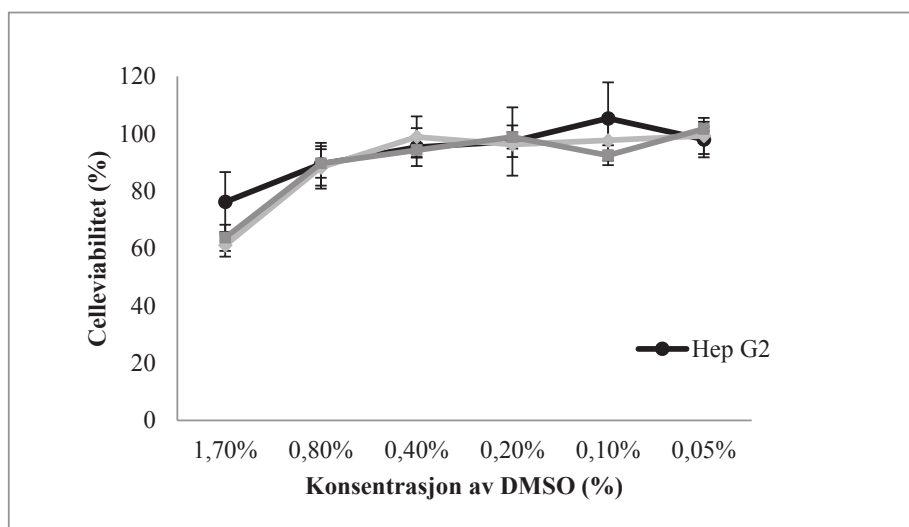
Det ble gjort flere ekstraksjoner fra *H. pluvialis*. Dette ble gjort for at bruksløsningen av algeekstraktene ikke skulle ha en sluttkonsentrasjon av DMSO som var toksisk for cellelinjene. Det var viktig å utelukke påvirkning av DMSO slik at den observerte effekten av algeekstraktene var fra ekstraktene selv, og ikke fra DMSO. Resultatene fra DMSO-testen er vist i figur 7. Nedenfor i tabell 13 kan man se den estimerte konsentrasjonen av ekstraksjonsutbyttet fra *H. pluvialis* som ble brukt i alle forsøkene.

Tabell 13 Sluttkonsentrasjonene til algeekstraktene som ble brukt i alle forsøkene.

Ekstraksjonsmiddel	Konsentrasjon
dH ₂ O	103 086,96 µg/ml
EtOH	130 608,69 µg/ml

Utregningen av konsentrasjonene i tabell 13 ble basert på forholdet mellom ekstraksjonsutbyttet som tørrvekt, og mengden tilført DMSO. For å utelukke eventuelle ulikheter i algeekstraktene som ville kunne oppstå ved å gjennomføre flere ekstraksjoner, ble det kun brukt algeekstrakt fra en omgang i alle forsøkene.

DMSO-test på cellelinjene



Figur 7 Test av viabiliteten til HepG2, WI-38 og WI-38 VA-13 under eksponering av DMSO. Cellene hadde fått festet seg og deretter stimulert i DMSO i 48 timer før MTT-løsningene ble tilsatt. Figuren representerer gjennomsnittet av resultatene ± standardfeil til minst tre forsøksstriplikater med triplikater for hver konsentrasjon. Målingene ble normalisert med hensyn på de ubehandlede cellene.

Fra figur 7 ser man at viabiliteten til cellelinjene viser en tendens til å øke lineært med den synkende DMSO mengden. For den høyeste brukskonsentrasjonen av algeekstraktet (500 µg/ml) var prosenten DMSO 0,5 % i vannekstraktet og 0,4 % i etanolekstraktet. Dette ble ansett som en akseptabel eksponeringskonsentrasjon på cellelinjene.

4.2 Mengden astaxanthin utvunnet fra algeekstraksjon

Det er i hovedsak astaxanthinets effekt det er blitt forsket på i kreftstudier, og det var derfor nærliggende å teste utbytte av astaxanthin i algeekstraktene. Mengden astaxanthin i algeekstraktene ble målt ved hjelp av HPLC-DAD. Identifiseringen av karotenoidet astaxanthin ble basert på retensjonstiden, og kvantifisering ble gjort ved utregning av absorpsjonsspekter til en kjent standard. Retensjonstiden til astaxanthin var 19 minutter. Denne målingen ble gjort for å kartlegge utbytte av astaxanthin ved ekstraheringene. Resultatet vises i tabell 14.

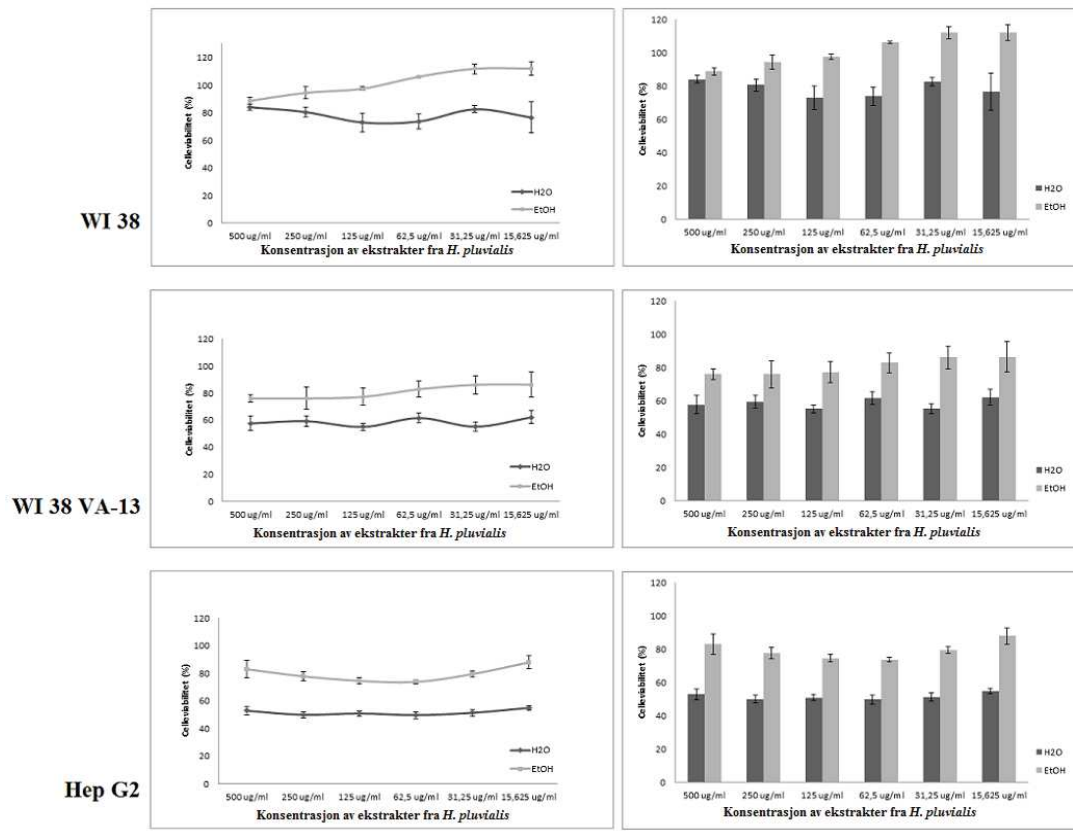
Tabell 14 Mengden astaxanthin i ekstraktene målt ved hjelp av HPLC-DAD.

Prøver	Astaxanthin per µg	Astaxanthin i 500 µg/ml
EtOH ekstrakt	0,08	40
H2O ekstrakt	0,05	25

Målingene fra HPLC-DAD analysen ble brukt for å regne tilbake til hvor mye astaxanthin det var per µg algeekstrakt. Resultatet viser at ekstrahering med etanol som løsningsmiddel var mer effektivt enn med vann. Tabell 14 viser også hvor mye astaxanthin det var i den høyeste bruksløsning til algeekstraktene (ved 500 µg/ml).

4.3 Celleviabilitet

Etter at det ble kartlagt hvilken konsentrasjon DMSO cellelinjene kunne behandles med, ble effekten av *H. pluvialis* på viabiliteten til de ulike cellelinjene testet. Effektene av *H. pluvialis* på cellelinjene ble undersøkt ved hjelp av MTT assay. Viabilitetsprosenten til cellene eksponert for algeekstrakt, ble kalkulert i forhold til celler som ikke var eksponert. Resultatene fra viabilitetstesten utført på de ulike cellelinjene er vist i figur 8.

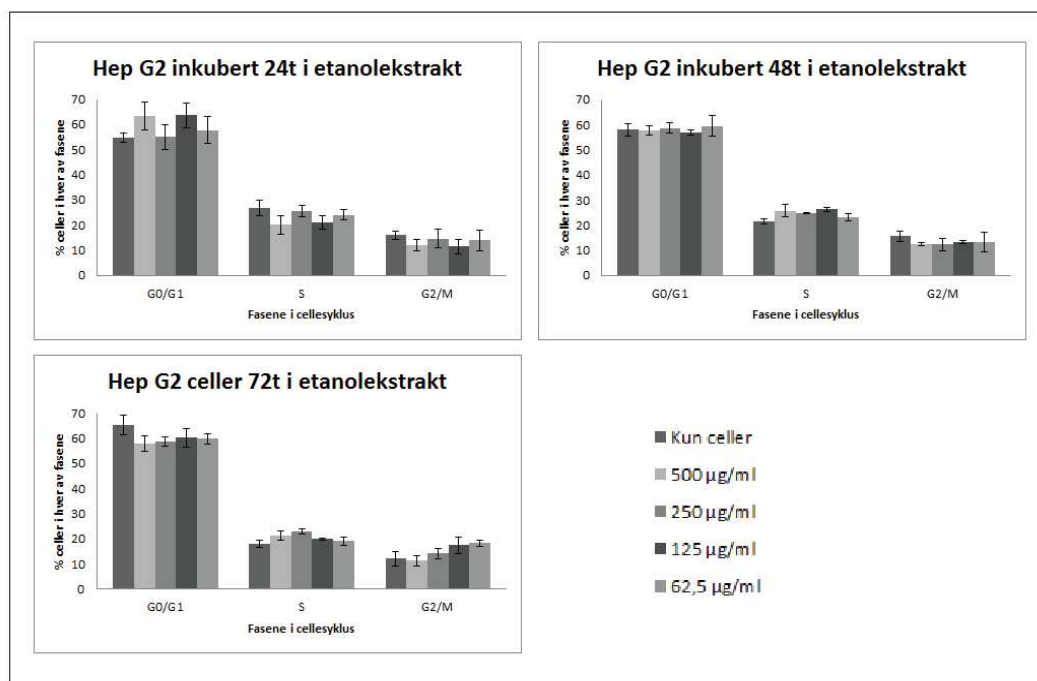


Figur 8 Celleviabiliteten til WI-38, WI-38 VA-13 og HepG2 under påvirkning av *H. pluvialis* med ulike konsentrasjoner. Cellene hadde fått festet seg og deretter stimulert i algeekstraktene i 48 timer før MTT-løsningene ble tilsatt. Konsentrasjonene av algeekstraktene var 15,6, 31,2, 62,5, 125,0, 250,0 og 500 µg/ml. Figuren representerer gjennomsnittet av resultatene ± standardfeil til minst tre forsøksreplikater med triplikater for hver konsentrasjon. Målingene ble normalisert med hensyn til de ubehandlede cellene. Utslaget til absorbenten av algeekstraktet ble ikke tatt i betraktning da den var omtrent like lav som absorbenten til kun medium.

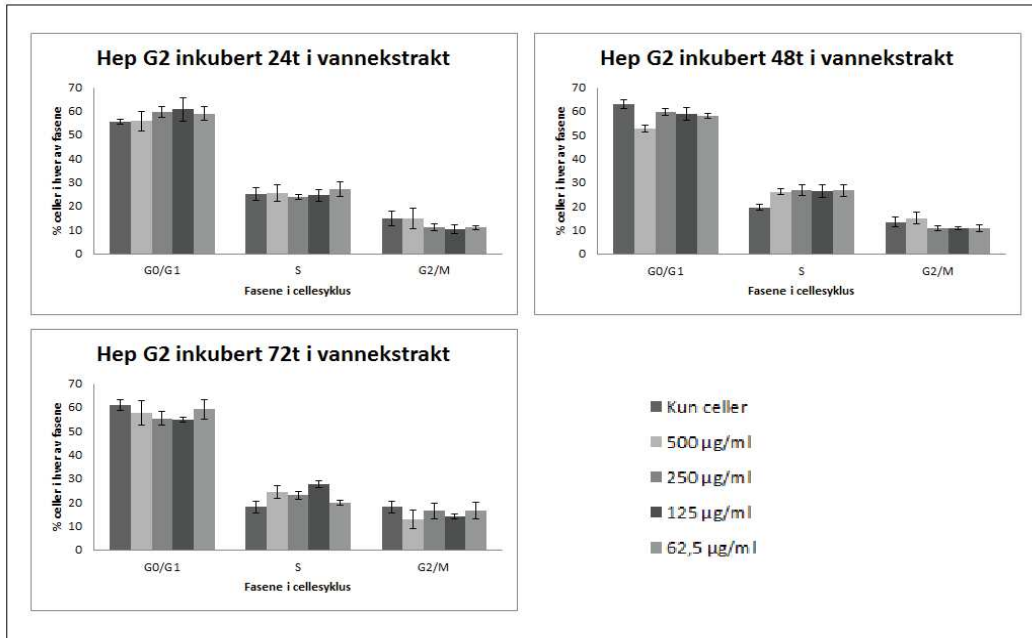
Resultatene viste at vannekstraktet har en større påvirkning på cellenes viabilitet enn hva som ble observert under eksponering med etanolekstraktet. Størst viabilitetsinhibisjon ble observert for HepG2 og WI-38 VA-13 celler under eksponering med vannekstraktet. HepG2 cellelinjen ble brukt i de videre forsøkene i denne oppgaven.

4.4 Cellesyklusanalyse av HepG2 inkubert i etanol- og vannekstrakt ved forskjellige tidspunkt

I dette forsøket ble ikke HepG2 cellenes migrasjon påvirket av stimuli påført av *H. pluvialis*. Det ble derimot observert en effekt av *H. pluvialis* på cellenes vitalitet. Flowcytometri ble brukt for å studere hvor i cellesyklusen HepG2 cellene ble påvirket av *H. pluvialis*. HepG2 cellene var inkubert med algeekstraktene i 48 timer før vitaliteten ble testet. For å se om tid var en faktor, ble HepG2 inkubert i algeekstraktene i 24, 48 og 72 timer. Analyse av data fra flowcytometri ble gjort ved å gate (markere) cellene. Første gatingen ble gjort for å fjerne døde celler. I dette plottet ble cellene gated igjen. Den andre gatingen ekskluderte dubletter, slik at man kunne analysere enkeltceller. Data fra forsøkene er fremstilt fra tre uavhengige forsøk. Resultatene fra cellesyklusanalysen med HepG2 celler behandlet i etanolekstrakt vises i figur 9, og for vannekstrakt i figur 10. Stolpene i de ulike fasene i histogrammene er gitt i rekkefølgen; 0 (kun celler), 500, 250, 125, og 62,5 µg/ml.



Figur 9 Resultater fra flowcytometrisk analyse av HepG2 celler behandlet med ulike konsentrasjoner av *H. pluvialis* ekstrahert med etanol. Cellene ble kultivert ett døgn før algeekstraktet ble tilsatt, og cellene ble eksponert i henholdsvis 24, 48 og 72 timer. Statistikken ble kalkulert ut i fra resultatene hentet fra cellesyklusanalysen. Figuren representerer gjennomsnittet av resultatene i hver cellefase ± standardfeil fra tre forsøk. Se vedlegg 4 for et utvalg av diagrammene fra flowcytometri analysen. En p-verdi <0,05 ble ansett som statistisk signifikant.

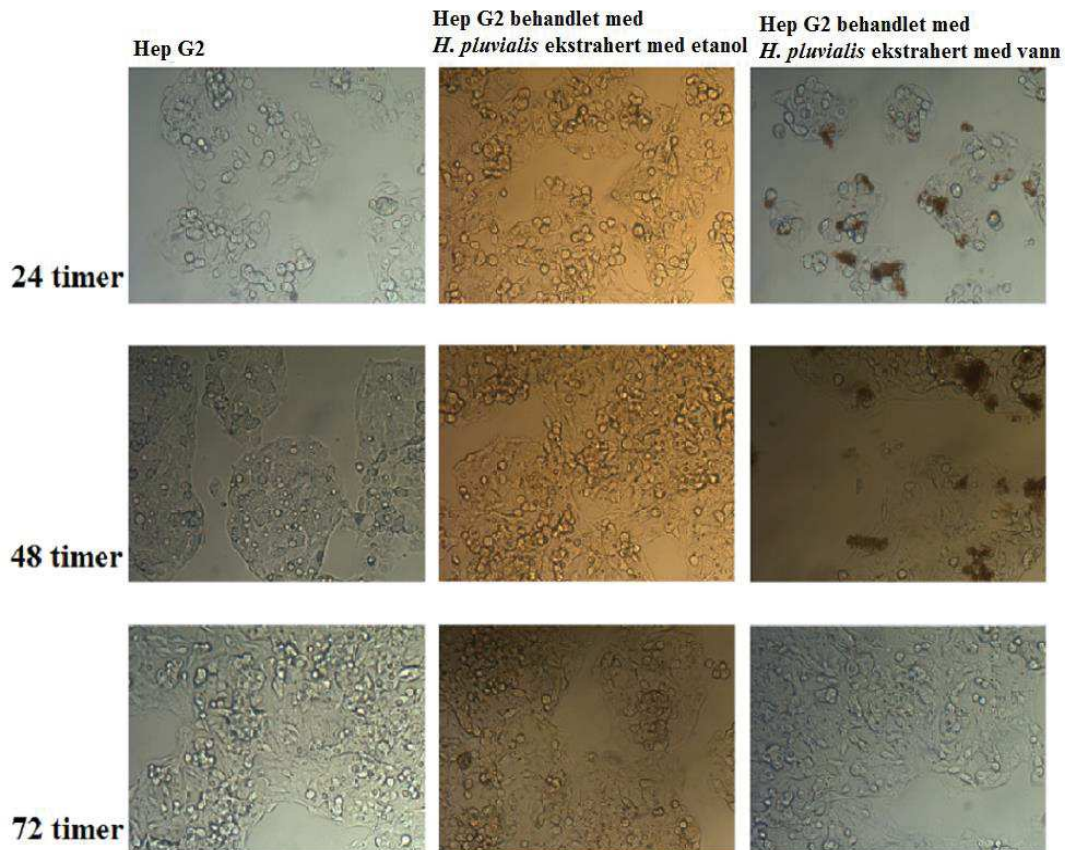


Figur 10 Resultatet fra flowcytometrisk analyse av HepG2 celler behandlet med ulike konsentrasjoner av *H. pluvialis* ekstrahert med vann. Cellene ble kultivert ett døgn før algeekstraktet ble tilsatt, og cellene ble eksponert i henholdsvis 24, 48 og 72 timer. Statistikken ble kalkulert ut i fra resultatene hentet fra cellesyklusanalysen. Figuren representerer gjennomsnittet av resultatene i hver cellefase ± standardfeil fra tre forsøk. Se vedlegg 4 for et utvalg av diagrammene fra flowcytometri analysen. En p-verdi <0,05 ble ansett som statistisk signifikant.

Hvilket algeekstrakt og hvilken konsentrasjon HepG2 cellene var eksponert med viste liten effekt på cellesyklus distribusjonen. Distribusjonen av cellene i de ulike cellesyklusfasene viste liten forandring over tid.

4.4.1 Morfologiske endringer av HepG2 celler ved stimulering med algeekstrakt

Parallelt med cellesyklusanalysen ble det undersøkt om algeekstraktet hadde noen påvirkning på cellenes morfologi. Morfologien ble observert under de samme betingelsene (konsentrasjon og tid) som det ble gjort ved cellesyklusanalysen. Resultat fra eksponering av 500 µg/ml etanol- og vannekstrakt på cellene samt ustimulerte celler til forskjellige tider, er vist i figur 11.



Figur 11 Morfologi til HepG2 med og uten tilsetning av algeekstrakt. Cellene fikk festet seg før algeekstraktet ble tilsatt og konsentrasjonen var 500 µg/ml. Morfologien ble undersøkt 24, 48 og 72 timer etter at algeekstraktene var tilført cellene. Mediet ble fjernet og nytt tilsatt slik for at den sterke fargen ikke skulle forstyrre bildekvaliteten. Bildene ble tatt med 40X objektiv.

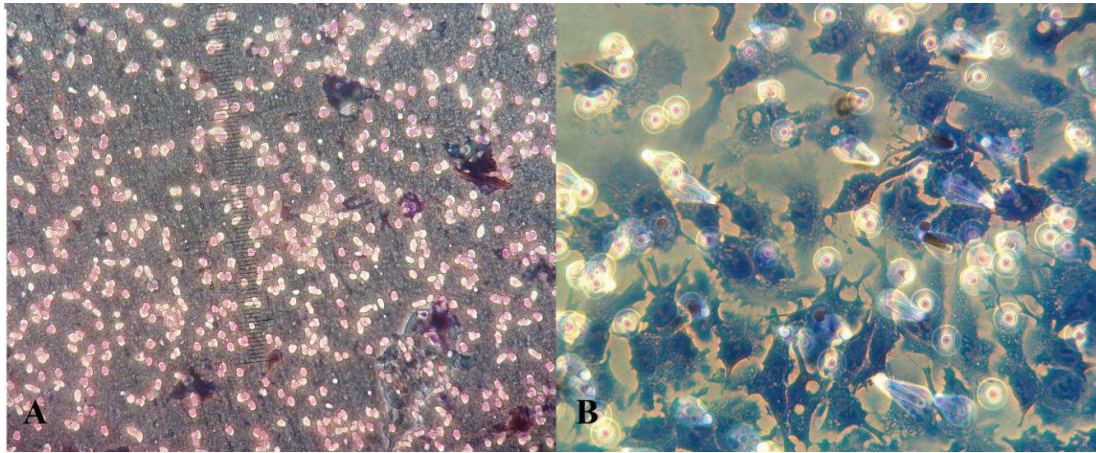
Bildene representerer kun et utdrag av cellene i brønnen. Det ble kun tatt bilder av HepG2 celler inkubert ved høyest konsentrasjon (500 µg/ml) ettersom det var der det ble observert størst morfologisk forandring. De mørke områdene på bildene var celleaggregater som delvis var adherente til underlaget. Sammenlignet med kontrollen, var det størst forandring på HepG2 cellene som var eksponert med vannekstraktet i 24 og 48 timer. *H. pluvialis* ekstrahert med etanol viste liten påvirkning på HepG2 cellene.

4.5 Migrasjon av HepG2 celler under stimulering med algeekstrakt

Inhibisjon av HepG2 metastasering er sentralt for å forhindre metastase av kreften. MTT resultatene viste at *H. pluvialis* hadde en hemmende effekt på HepG2 cellenes levedyktighet. For å undersøke om *H. pluvialis* hadde en påvirkning på migrasjonen til HepG2 cellene ble det utført migrasjonstest. Migrasjonstesten var utviklet av Erkell og Schirmacher (1988), og brukt for å studere cellemigrasjon *in vitro*.

4.5.1 Utarbeidelse av protokollen til migrasjonstesten

I Erkell og Schirmachers studier ble Nucleporefiltrene etset i metallisk natrium, se kapittel 3.5.1.1. Av de tilsatte HepG2 cellene, var det få som adhererte og migrerte ved bruk av denne metoden. Bruk av metallisk natrium etset porene sporadisk og ufullstendig. Dette resulterte i at de fleste av HepG2 satt fast i porene. Det ble derfor bestilt ferdigstansede filtre som ikke behøvde å etses. Selv om det ikke var nødvendig å etse de ferdigstansede filtrene, ble det testet for å se om man måtte erstatte denne behandlingen for å få filtrene mer hydrofile. Dette ble undersøkt ved å behandle de ferdigstansede Nucleporefiltrene med kollagen, se kapittel 3.5.1.2. Kollagenbehandlede filtre ble testet opp mot ubehandlede filtre i forhold til HepG2 cellenes evne å adherere og migrere. Det ble også gjort noen forandringer på metoden som ble brukt til dannelse av fibrinigel. Brukskonsentrasjonen av trombin ble oppregulert fra 5 U/ml til 10 U/ml. Tiden kasein- og fibrinogenløsningen stod til risting ble forlenget med 5 timer slik at proteinene ble løst opp skikkelig. Resultatene fra utarbeidelsen på behandlingsmetoden av Nucleporefiltre vises i figur 12 og tabell 15.



Figur 12 HepG2 celler adherert til etset Nucleporefilter (A) og kollagenbehandlet Nucleporefilter (B). Sirklene er 8 μm porer, og cellene ble farget med Giemsa. Bilde av cellene på filtret ble tatt med 10X (A) og 40X (B) objektiv.

Det ble observert stor morfologisk forandring på HepG2 cellenes epitel morfologi ved bruk av de ulike Nucleporefiltrene. HepG2 cellene adhererte dårligere til de etsede filtrene (figur 12A).

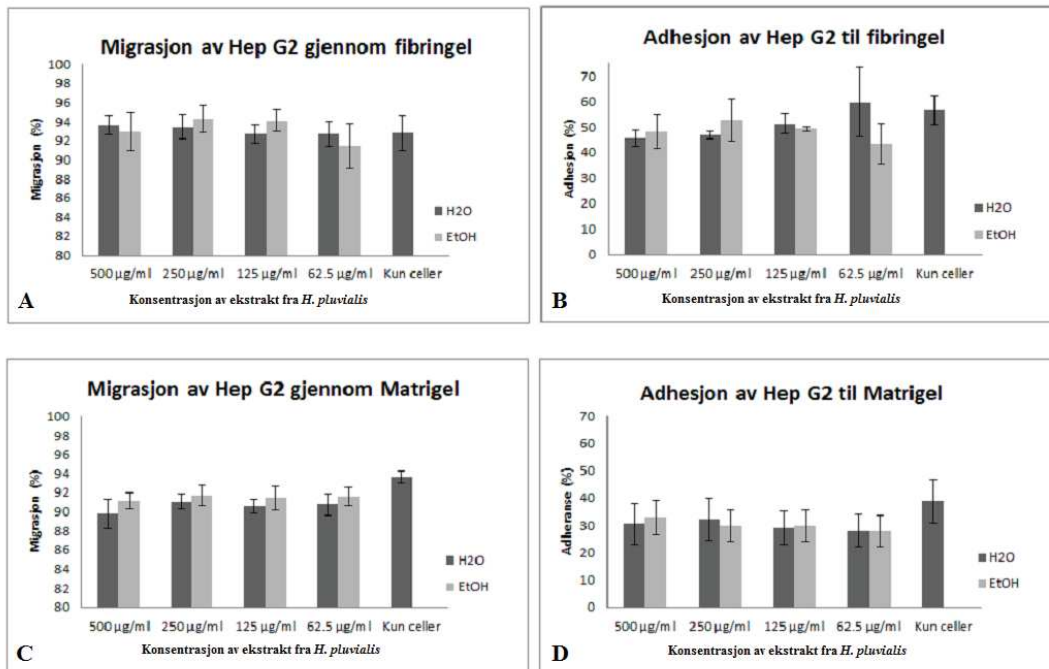
Tabell 15 Antallet adherente og migrerte HepG2 celler med og uten kollagen. Adheransen ble testet ved å se hvor mange ubehandlede celler som festet seg til Nucleporefiltrene, med og uten kollagen (\pm standardfeil). Cellemigrasjonstesten ble gjort ved å se hvor mange ubehandlede HepG2 celler som migrerte gjennom filtrene ved bruk av fibringeloppsett.

Antall adherente celler		Migrering (%)	
Uten kollagen	Med kollagen	Uten kollagen	Med kollagen
1602 \pm 770,9	7380 \pm 20,1	24,2	66,9

De ferdigstansede filtrene behandlet med kollagen ga betraktelig bedre resultater, hva angikk adhesjon, migrasjon og forventet morfologi. Det ble derfor valgt å gå videre med ferdigstansede filtre behandlet med kollagen til migrasjonstesten.

4.5.2 Resultater fra migrasjonstesten

HepG2 cellenes evne til å migrere under stimulering med algeekstraktene, ble testet ved bruk av to ulike proteingeler, Matrigel og fibringel. Tillaging av proteingelene og oppsettet for migrasjonstesten er beskrevet i kapittel 3.5.2 og 3.5.3. Figur 13 og tabell 16 viser resultatet fra migrasjonsforsøket gjort med HepG2 under stimuli av *H. pluvialis*.



Figur 13 Migrasjon og adheanse av HepG2 etter 20 timer inkubasjon til fibringel (A, B) og Matrigel (C, D) under påvirkning av *H. pluvialis*. Konsentrasjonene brukt av de algeekstraktene var 62,5, 125,0, 250,0 og 500 µg/ml. Figuren representerer gjennomsnittet av resultatene ± standardfeil til fem forsøk med duplikater for hver konsentrasjon. Data brukt til å lage diagrammene er hentet fra tabell 16, og figuren er lagt for å gi en mer visuell oversikt. En p-verdi <0,05 ble ansett som statistisk signifikant.

Figur 13 er en visuell fremstilling av data presentert i tabell 16. Den viser at algeekstraktene effekt på HepG2 cellenes adhesjon og migrasjon var tilsynelatende lik ved alle konsentrasjonene.

Tabell 16 Migrasjon av HepG2 med fibringel og Matrigel. Tabellen viser resultatene etter at cellene fikk migrere i 20 timer og inkubert i 10 % kalveserum tilsatt ulike konsentrasjoner av algeekstraktene. Konsentrasjonene var 0, 62,5, 125, 250 og 500 µg/ml. «Migrering» indikerer prosenten celler på underfilteret med hensyn til forholdet på det totale celledetallet på både over- og underfilteret. Summen av alle cellene på begge filterne som en prosentandel av det totale antallet celler i brønnen, representerer «Adheranse». Figuren representerer gjennomsnittet av målingsresultatene ± standardfeil til minst fire separate forsøk med duplikater for hver konsentrasjon. En p-verdi <0,05 ble ansett som statistisk signifikant.

Konsentrasjoner	Adheranse (%)		Migrering (%)	
	H ₂ O	EtOH	H ₂ O	EtOH
Fibringel				
500 µg/ml	45,6 ± 3,2	48,2 ± 6,6	93,6 ± 0,9	92,9 ± 1,9
250 µg/ml	46,8 ± 1,6	52,9 ± 8,4	93,5 ± 1,3	94,4 ± 1,4
125 µg/ml	51,2 ± 3,8	49,3 ± 0,9	92,7 ± 0,9	94,1 ± 1,2
62,5 µg/ml	59,8 ± 13,7	43,5 ± 7,9	92,7 ± 1,3	91,5 ± 2,4
0 µg/ml	56,7 ± 5,7	56,7 ± 5,7	92,8 ± 1,8	92,8 ± 1,8
Matrigel				
500 µg/ml	30,5 ± 7,6	32,9 ± 6,3	89,8 ± 1,5	91,1 ± 0,9
250 µg/ml	32,3 ± 7,5	29,7 ± 5,8	91,1 ± 0,8	91,7 ± 1,1
125 µg/ml	28,9 ± 6,1	29,9 ± 5,7	90,6 ± 0,8	91,4 ± 1,3
62,5 µg/ml	27,9 ± 6,0	27,8 ± 5,7	90,7 ± 1,1	91,6 ± 0,9
0 µg/ml	38,8 ± 7,9	38,8 ± 7,9	93,6 ± 0,6	93,6 ± 0,6

Data fra tabell 16 viser at HepG2 cellenes migrasjon med Matrigel og fibringel var forholdsmessig lik. HepG2 cellene viste bedre adheranse under forsøket med fibringel. Innad i forsøkene var det marginale forskjeller på effekten *H. pluvialis* (ekstrahert med vann og etanol) hadde på HepG2 cellene.

5 Diskusjon

Hensikten med denne oppgaven var å studere effekten av *H. pluvialis* ekstrakt på den metastaserende kreftcellelinjen HepG2. Modellsystemet som ble brukt for å observere cellemigrasjon *in vitro* var basert på en metode utviklet av Erkell og Schirrmacher (1988) og videre bearbeidet i denne oppgaven. Det ble også undersøkt hvilken effekt ekstraktene hadde på viabilitet og celledeling. Virkning på celleviabilitet ble også undersøkt på cellelinjene WI-38 og WI-38 VA-13. Dette ble gjort for å kunne sammenligne hvordan algeekstraktene påvirket normale celler (WI-38) kontra kreftceller (WI-38 VA-13).

Ekstraksjonen fra *H. pluvialis* (tabell 13) og astaxanthinmålingen (tabell 14) viser at etanol er et mer effektivt løsningsmiddel for å få størst mulig ekstraksjonsutbytte i tørrvekt og mengde astaxanthin. Siden astaxanthin ikke er løselig i vann (hydrofobt) var det forventet å få lavere utbytte ved bruk av vann som løsningsmiddel (Hama et al. 2012). Dette kan også være årsaken til at man fikk et større ekstraktutbytte ved bruk av etanol om løsningsmiddel. Siden ekstraktene ble løst i DMSO før tilsetning til cellekulturene, ble det innledningsvis utført viabilitetstester på cellelinjene for å undersøke mulige effekter av DMSO på cellene. På grunn av høy DMSO-konsentrasjon i bruksløsningen, ble det gjort flere ekstraksjoner. Ved bruk av ultralydbad fikk man ned mengden DMSO som måtte til for å løse opp ekstraktene. Prosenten DMSO i den høyeste brukskonsentrasjonen viste ingen cytotoxisk effekt på cellelinjene (se figur 7). Det er derfor rimelig å konkludere at eventuelle effekter på cellenes viabilitet da skyldes komponentene i algeekstraktet og ikke løsningsmiddelet DMSO.

Haematococcus pluvialis ekstraktene hadde høyere cytotoxisk effekt på kreftcellene (HepG2 og WI-38 VA-13) enn de normale (WI-38), se figur 8. Dette kan tyde på at det er noen i ekstraktene som er spesielt hemmende på kreftcellenes viabilitet. Den høyeste cytotoxiske effekten ble observert på kreftcellene som var eksponert for vannekstraktet, og viabiliteten ble redusert med ~50 %. Videre ble det vist at etanolekstraktet hadde en konsentrasjonsavhengig effekt på WI-38 cellenes viabilitet. Etanol- og vannekstraktet viste ingen konsentrasjonsavhengig effekt på HepG2 og WI-38 VA-13. Dette kan tyde på at de aktive komponentene i ekstraktene er cytotoxiske selv i lave konsentrasjoner. Nagaraj et al. (2012) studerte celleviabiliteten til HepG2 celler eksponert for astaxanthin ekstrahert fra *H. pluvialis*. Studiene viste at HepG2 celler som var behandlet med 25 µg/ml *H. pluvialis* astaxanthin i 48 timer fikk redusert sin viabilitet med 50 %.

I den høyeste konsentrasjonen av vannekstraktet (500 µg/ml) var det 25 µg/ml astaxanthin, mens for etanolekstraktet (500 µg/ml) var det 40 µg/ml astaxanthin (figur 14). For HepG2 cellene inkubert i vannekstraktet er det samsvar mellom resultatene fra oppgaven og funnene til Nagaraj et al, noe som kan tyde på at den observerte cytotoxiske effekten på kreftcellene (spesielt HepG2) kan skyldes astaxanthin. Ut i fra astaxanthinkonsentrasjonene ville man allikevel forventet at etanolekstraktet skulle ha en sterkere cytotoxiske effekt på cellene enn vannekstraktet. Dette kan tyde på at det ikke kun er astaxanthin som induserer cytotoxisitet slik som Nagaraj et al. (2012) rapporterte. En hypotese er at det kan være flere metabolitter i etanolekstraktet som delvis motvirker astaxanthinets effekt. Det kan ikke utelukkes at man har ekstrahert ut andre metabolitter i vannekstraktet som er mer toksisk på kreftcellene, enn de man har i etanolekstraktet. Siden man ikke vet hvilke metabolitter som er i ekstraktene, er det vanskelig å vite hvilken effekt man kunne forvente å se og hvilke som påvirker viabiliteten.

Viabilitetstesten (MTT) viste at *H. pluvialis* ekstrakter har cytotoxiske egenskaper på HepG2 celler *in vitro*. Det ble derfor gjort forsøk for å se om ekstraktene kunne tenkes å ha noen effekt på HepG2 cellenes cellesyklusgjennomgang (se figur 9 og 10). HepG2 cellene inkubert med etanol- og vannekstrakt viste ingen signifikante effekter sammenlignet med kontrollen (se tabell 17-22). Inkubasjonstid og ekstraktkonsentrasjon som HepG2 cellene var eksponert for hadde ingen tydelig effekt på cellenes cellesyklusgjennomgang. Resultatene tyder på at *H. pluvialis*-ekstraktene ikke hemmet HepG2 cellenes proliferasjon eller cellesyklusgjennomgang. Ved bruk av flowcytometri gater man bort døde celler, slik at HepG2 cellene som ble analysert var kun levende. Dette kan være årsaken til at man ikke har observert noen effekt på cellene. Siden HepG2 er en heterogen cellelinje (Schrader et al. 1994), kan en annen mulig årsak være at det ikke ble observert noen påvirkning. Det kan da være at noen av HepG2 cellene tåler ekstraktene bedre enn andre og at disse ikke er gjenstand for proliferasjonshemming. Palozza et al. (2009) studerte effekt på tarmkarsinomceller eksponert for *H. pluvialis* ekstrahert med tetrahydrofuran (THF). Studiene til Palozza viste at *H. pluvialis* inhiberte celleveksten ved at tarmkarsinomcellene ble arrestert i G1/G0 fasen. Effekten Palozza et al. (2009) så ved bruk av *H. pluvialis* ekstrahert med THF, kan også gi en mulig hypotese om at er noen av metabolittene som ble ekstrahert ved bruk av etanol og vann som maskerer/hemmer en effekt fra andre sekundære metabolitter.

Siden det var observert en mulig cytotoxisk effekt av ekstraktene på HepG2 cellene, ble også mulige morfologiske endringer studert under mikroskop. Under eksponering med vannekstrakt i 24 og 48 timer, mistet noen av HepG2 cellene sin evne til adhesjon mens andre dannet celleaggregater. Blant de cellene som ikke dannet celleaggregater ble det ikke observert noen morfologisk forandringer, og etter 72 timer var HepG2 cellene tilsynelatende lik kontrollen. Det ble ikke observert noen morfologiske endringer på HepG2 cellene som ble eksponert med etanolekstraktet. Denne observasjonen samsvarer med det man så under viabilitetstesten. Dette kan tyde på at effekten fra vannekstraktet ikke er permanent. Som tidligere nevnt er HepG2 cellelinjen ikke homogen, slik at effekten av vannekstraktet påvirker kun noen av HepG2 cellene. HepG2 cellene som man så etter 72 timer vil da kunne være de cellene som ikke ble påvirket av vannekstraktet.

For å teste migrasjonen til HepG2 cellene ble protokollen til Erkell og Schirmacher (1988) brukt. Etter flere forsøk så man få HepG2 celler som hadde adherert og videre migrert til nitrocellulosefilteret (underfilteret). I tillegg til at det var tidkrevende å stanse ut og etse det ønskede antallet Nucleporefiltre (underfiltre), så man at metallisk natrium ikke åpnet de bestrålte porene skikkelig. Siden det var få celler som adhererte til filtrene ble det konkludert med at etsningen med metallisk natrium ikke resulterte i at cellene adhererte vesentlig bedre. Ferdigstansede Nucleporefiltre er hydrofile polykarbonat membranfiltre som ble bestilt fra Merck Millipore. De ferdigstansede Nucleporefiltrene ble behandlet med kollagen etter å ha undersøkt migrasjonen til HepG2 uten (tabell 15). Ved kollagenbehandling fikk man en høyere migrasjon, og cellenes morfologi på Nucleporefiltrene stemte bedre overens med det som ble observert i kulturflasken (figur 12). Ferdigstansede filtre som var kollagenbehandlet ga en mer riktig fremstilling av hvordan HepG2 cellenes migrasjonsevne ville påvirkes av algeekstraktene.

Den utarbeidede migrasjonstesten til Erkell og Schirmacher ble brukt for å undersøke om *H. pluvialis* ekstraktene påvirket migrasjonsegenskapene til HepG2 cellene *in vitro*. Cellene ble inkubert med ekstraktkonsentrasjonene, som vist i figur 13 og tabell 16, i 20 timer med fibrin- og Matrigel. Uavhengig om det ble anvendt fibrin- eller Matrigel, ble det ikke observert en signifikant effekt fra vann- og etanolekstraktet på HepG2 cellenes migrasjon (se tabell 22-23 og 26-27 i vedlegg 3). Sammenlignet med kontrollen ble det ikke observert noen signifikant effekt fra ekstraktene på andelen adhererende HepG2 celler på filtrene, hverken med fibrin- eller Matrigel (se tabell 24-25 og 28 og 29 i vedlegg 3). Dette tyder på at *H. pluvialis* ekstraktene ikke har en metastaseinhiberende effekt på HepG2 cellene.

I forsøkene med fibrin- og Matrigel ble det observert en god del celler rundt kanten av underfilteret (nitrocellulosefilteret). Disse ble ikke tatt i betraktning da antallet migrerte celler ble talt. Noen av cellene kan ha migrert mellom filtrene istedenfor gjennom porene, festet seg lenger inn på underfilteret og er tatt med i utregningen. Dette kan ikke utelukkes som en potensiell feilkilde. En eventuell årsak til dette kan være at proteingelene (fibrin- og Matrigel) ikke var polymerisert tilstrekkelig før HepG2 cellene ble tilsatt. I tillegg var det så små mengder Matrigel som ble tilført hvert nitrocellulosefilter at det var vanskelig å få gelen til å dekke hele filtret.

Resultatene viste at *H. pluvialis* ekstrahert med vann og etanol hadde marginal hemmende effekt på migrasjonsevnen til HepG2 cellene gjennom proteingelene (fibrin og Matrigel). Selv om studier har vist at *H. pluvialis*, spesielt astaxanthin, skal ha en inhiberende effekt på kreftceller, ble dette ikke observert i denne oppgaven. Jyonouchi et al. (2000) studerte astaxanthins effekt på bindevevssvulst (fibrosarkom) i mus *in vivo*. Studiene viste at mus som fikk astaxanthin i kostholdet 1-3 uker før inokuleringen av en liten dose kreftceller, fikk redusert svulstveksten og størrelsen. Dette ble ikke observert i mus hvor behandlingen startet samtidig som kreftcelleinokuleringen. I mus som fikk inokulert større dose med kreftceller ble det ikke observert noen inhiberende effekt fra astaxanthin. Jyonouchi et al. konkluderte med at astaxanthin kan hindre svulstdannelse tidlig i svulstforløpet, men ikke forhindre metastase eller svulstvekst sent i kreftforløpet. Som tidligere nevnt er HepG2 isolert fra en pasient med en etablert og svært metastaserende krefttype. I tillegg til at man ikke kjenner sekundærmetabolittene i algeekstraktene, kan dette være årsaken til at man ikke har sett en klar effekt av *H. pluvialis* ekstraktene på HepG2 cellelinjen.

6 Konklusjon og videre arbeid

Haematococcus pluvialis ekstraktene hadde en høyere cytotoxisk effekt på kreftcellene (HepG2 og WI-38 VA-13) enn hva som ble observert for de normale cellene. Det var spesielt vannekstraktet som viste høyest viabilitetsinhiberende effekt. Under cellesyklusanalysen ble det ikke observert noen signifikante konsentrasjons- og tidsavhengige effekter av ekstraktene på HepG2 cellene. Migrasjonsforsøkene viste ingen migrasjonsinhiberende effekt fra ekstraktene på HepG2 cellene gjennom hverken fibrin- eller Matrigel, og ekstraktene ser derfor ikke ut til å kunne hindre migrasjon gjennom basalmembranen og stromalt vev. Hepatocellulært karsinom er en svært dødelig og aggressiv kreftsykdom når den først har spredt seg. Videre studier er derfor nødvendig på *H. pluvialis* ekstraktene før de eventuelt kan sies å inneholde noe som kan brukes i behandling av denne kreftsykdommen.

Det finnes flere kommersielle assay som man kan brukes for å studere cellemigrasjon. Disse migrasjonstestene er enklere i bruk og innebærer færre trinn. Dette vil minske sjansen for menneskelige feil og øke effektiviteten av forsøkene. Til videre arbeid med *H. pluvialis* kunne det vært av interesse å prøve et kommersielt assay for å kunne utelukke de nevnte faktorene som kan ha bidratt til feilkilder. Det ville også vært spennende å få utført cellesyklusanalyse og migrasjonsforsøk på WI-38 og WI-38 VA-13 celler under inkubasjon med *H. pluvialis* slik at man har et sammenligningsgrunnlag hva gjelder normale celler (WI-38) og kreftceller (WI-38 VA-13). Spesielt siden det ikke ble observert noen spesiell cytotoxisk effekt på den WI-38.

Ved å bruke rent astaxanthin vil man kunne sammenligne effekten fra astaxanthin på HepG2 cellene kontra effekten fra algeekstraktene. Da ville man kunne se om effektene man observerte på cellene var fra astaxanthin i ekstraktene eller fra andre metabolitter. Videre arbeid er derfor nødvendig for å kunne kartlegge hvilke andre metabolitter enn astaxanthin som ble ekstrahert fra *H. pluvialis* med vann og etanol. I forsøkene ble det observert størst effekt ved bruk av *H. pluvialis* ekstrahert med vann. Det ville derfor vært spennende og sett hvilke metabolitter man fant i vannekstraktet kontra etanolekstraktet. Det kan ikke utelukkes at det kan være komponenter i algeekstraktene som har en innvirkning på cellene, men at effekten fra dem blir maskert av andre tilstedeværende metabolitter i ekstraktet. Selv om man fant noen metabolitter som potensielt kunne være årsaken til den observerte cytotoxiske effekten, kan det hende at metabolittene ikke er kraftig nok alene.

7 Referanser

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2008). *Molecular biology of the cell*. Fifth edition utg.: Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Alexiou, C., Arnold, W., Klein, R. J., Parak, F. G., Hulin, P., Bergemann, C., Erhardt, W., Wagenpfeil, S. & Lubbe, A. S. (2000). Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting. *Cancer Research*, 60 (23): 6641-6648.
- Alexiou, C., Schmid, R. J., Jurgons, R., Kremer, M., Wanner, G., Bergemann, C., Huenges, E., Nawroth, T., Arnold, W. & Parak, F. G. (2006). Targeting cancer cells: magnetic nanoparticles as drug carriers. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 35 (5): 446-450.
- Aucejo, F., Hanouneh, I. & Carey, W. D. (2013). *Hepatocellular Carcinoma*. Cleveland Clinic. Tilgjengelig fra: <http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/hematology-oncology/hepatocellular-carcinoma/Default.htm>.
- Bagi, C. M. & Andresen, C. J. (2010). Models of hepatocellular carcinoma and biomarker strategy. *Cancers*, 2 (3): 1441-52.
- Brown, L. F., Lanir, N., McDonagh, J., Tognazzi, K., Dvorak, A. M. & Dvorak, H. F. (1993). FIBROBLAST MIGRATION IN FIBRIN GEL MATRICES. *American Journal of Pathology*, 142 (1): 273-283.
- Cheung-Ong, K., Giaever, G. & Nislow, C. (2013). DNA-Damaging Agents in Cancer Chemotherapy: Serendipity and Chemical Biology. *Chemistry & Biology*, 20 (5): 648-659.
- Choi, Y. E., Yun, Y. S., Park, J. M. & Yang, J. W. (2011). Multistage Operation of Airlift Photobioreactor for Increased Production of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21 (10): 1081-1087.
- Chung, J. G., Peng, H. Y., Chu, Y. C., Hsieh, Y. M., Wang, S. D. & Chou, S. T. (2012). Anti-invasion and apoptosis induction of chlorella (*Chlorella sorokiniana*) in Hep G2 human hepatocellular carcinoma cells. *Journal of Functional Foods*, 4 (1): 302-310.
- Cuellar-Bermudez, S. P., Aguilar-Hernandez, I., Cardenas-Chavez, D. L., Ornelas-Soto, N., Romero-Ogawa, M. A. & Parra-Saldivar, R. (2015). Extraction and purification of high-value metabolites from microalgae: essential lipids, astaxanthin and phycobiliproteins. *Microbial Biotechnology*, 8 (2): 190-209.
- Dar, A. C., Das, T. K., Shokat, K. M. & Cagan, R. L. (2012). Chemical genetic discovery of targets and anti-targets for cancer polypharmacology. *Nature*, 486 (7401): 80-84.
- Doucas, H. & Berry, D. P. (2006). Basic principles of the molecular biology of cancer I. *Surgery (Oxford)*, 24 (2): 43-47.
- Erkell, L. J. & Schirrmacher, V. (1988). Quantitative *in Vitro* Assay for Tumor Cell Invasion through Extracellular Matrix or into Protein Gels. *Cancer Research*, 48 (23): 6933-6937.
- Faure-Fremiet, E. (1930). Growth and Differentiation of the Colonies of *Zoothamnium alternans* (Clap. and Lachm.). *Biological Bulletin* Vol. 58 (1): 28-51.
- Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*, 3 (6): 453-458.
- Finn, O. J. (2012). Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. *Annals of Oncology*, 23: 6-9.
- Folkman, J. (1986). How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res.*, 46: 467-743.
- Gao, H. J., Zhao, M. C., Zhang, Y. J., Zhou, D. S., Xu, L., Li, G. B., Chen, M. S. & Liu, J. (2015). Monocarboxylate transporter 4 predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and is associated with cell proliferation and migration. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 141 (7): 1151-1162.
- Garcea, R. L. & Imperiale, M. J. (2003). Simian virus 40 infection of humans. *Journal of Virology*, 77 (9): 5039-5045.

- Gerber, D. E. (2008). Targeted therapies: A new generation of cancer treatments. *American Family Physician*, 77 (3): 311-319.
- Guerin, M., Huntley, M. E. & Olaizola, M. (2003). Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*, 21 (5): 210-216.
- Gundem, G., Van Loo, P., Kremeyer, B., Alexandrov, L. B., Tubio, J. M. C., Papaemmanuil, E., Brewer, D. S., Kallio, H. M. L., Hoegnas, G., Annala, M., et al. (2015). The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. *Nature*, 520 (7547): 353-+.
- Gwak, Y., Hwang, Y. S., Wang, B. B., Kim, M., Jeong, J., Lee, C. G., Hu, Q., Han, D. X. & Jin, E. (2014). Comparative analyses of lipidomes and transcriptomes reveal a concerted action of multiple defensive systems against photooxidative stress in *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Experimental Botany*, 65 (15): 4317-4334.
- Hagen, C., Siegmund, S. & Braune, W. (2002). Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. *European Journal of Phycology*, 37 (2): 217-226.
- Hama, S., Uenishi, S., Yamada, A., Ohgita, T., Tsuchiya, H., Yamashita, E. & Kogure, K. (2012). Scavenging of Hydroxyl Radicals in Aqueous Solution by Astaxanthin Encapsulated in Liposomes. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 35 (12): 2238-2242.
- Hasegawa, T., Matsuguchi, T., Noda, K., Tanaka, K., Kumamoto, S., Shoyama, Y. & Yoshikai, Y. (2002). Toll-like receptor 2 is at least partly involved in the antitumor activity of glycoprotein from *Chlorella vulgaris*. *International Immunopharmacology*, 2 (4): 579-589.
- Hauge, A. (2009). *Enterohepatisk kretsløp*: Store Medisinske Leksikon. Tilgjengelig fra: https://sml.snl.no/enterohepatisk_kretsl%C3%B8p.
- He, P., Duncan, J. & Barber, J. (2007). Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Effects of cultivation parameters. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49 (4): 447-451.
- Iversen, O. H. (2009). *Adenokarsinom*. Store Norske Leksikon. Tilgjengelig fra: <https://snl.no/adenokarsinom>.
- Janmey, P. A., Winer, J. P. & Weisel, J. W. (2009). Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications *The Royal Society*, Vol. 6: s. 1-10.
- Jyonouchi, H., Sun, S., Iijima, K. & Gross, M. D. (2000). Antitumor activity of astaxanthin and its mode of action. *Nutrition and Cancer-an International Journal*, 36 (1): 59-65.
- Kleinman, H. K. & Martin, G. R. (2005). Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. *Seminars in Cancer Biology*, 15 (5): 378-386.
- Kleinman, H. K. K., M. C. , Schnaper, W., Hadley, M. A., Dym, M. & Grant, D. S. (1993). *Molecular and Cellular Aspects of Basement Membranes*: Academic Press, Inc.
- Klepp, O. (2009). *Sarkom*. Store Norske Leksikon (SNL). Tilgjengelig fra: <https://snl.no/sarkom>.
- Klepp, O. (2012). *Malignt lymfom*. Store Norske Leksikon. Tilgjengelig fra: https://snl.no/malignt_lymfom.
- Kobayashi, M., Kurimura, Y., Kakizono, T., Nishio, N. & Tsuji, Y. (1997). Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84 (1): 94-97.
- Kobayashi, M. (2000). In vivo antioxidant role of astaxanthin under oxidative stress in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54 (4): 550-555.
- Kumar, S. & Weaver, V. M. (2009). Mechanics, malignancy, and metastasis: The force journey of a tumor cell. *Cancer and Metastasis Reviews*, 28 (1-2): 113-127.
- Larsen, I. K., Larønningen, S., Johannesen, T. B., Johansen, A., Møller, B., Langseth, H., Grimsrud, T. K., Martinsen, J. I., Myklebust, T. Å., Tysvær, S. E., et al. (2015). Cancer in Norway 2013 - Cancer incidence, mortality, survival and prevalence in Norway. Cancer Registry of Norway: Institute of populationbased cancer research.
- Leicester, U. o. (2015). *The cell cycle, mitosis and meiosis*. University of Leicester. Tilgjengelig fra: <http://www2.le.ac.uk/departments/genetics/vgac/schoolscolleges/topics/cellcycle-mitosis-meiosis/the-cell-cycle-mitosis-and-meiosis#the-cell-cycle>.
- Lemoine, Y. & Schoefs, B. (2010). Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. *Photosynthesis Research*, 106 (1-2): 155-177.

- Lichtner, R. B., Erkell, L. J., Schirmacher, V. & Nicolson, G. L. (1989). EFFECTS OF RA-233 TREATMENT ON THE ADHESIVE, INVASIVE AND METASTATIC PROPERTIES OF 13762NF RAT MAMMARY-TUMOR CELLS. *Clinical & Experimental Metastasis*, 7 (2): 175-186.
- Liu, T.-C., Vachharajani, N., Chapman, W. C. & Brunt, E. M. (2014). Noncirrhotic hepatocellular carcinoma: derivation from hepatocellular adenoma[quest] Clinicopathologic analysis. *Mod Pathol*, 27 (3): 420-432.
- Luqmani, Y. A. (2005). Mechanisms of Drug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Medical Principles and Practice*, 14: 35-48.
- Machmudah, S., Shotipruk, A., Goto, M., Sasaki, M. & Hirose, T. (2006). Extraction of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* using supercritical CO₂ and ethanol as entrainer. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45 (10): 3652-3657.
- Miguel, O. (2007). The Production and Health Benefits of Astaxanthin. I: Nutraceutical Science and Technology, *Marine Nutraceuticals and Functional Foods*, s. 321-344: CRC Press.
- Nagaraj, S., Rajaram, M. G., Arulmurugan, P., Baskaraboopathy, A., Karuppasamy, K., Jayappriyan, K. R., Sundararaj, R. & Rengasamy, R. (2012). Antiproliferative potential of astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* Flotow on human hepatic cancer (HepG2) cell line. *Biomedicine & Preventive Nutrition* Vol 2: 149-153.
- Nagendraprabhu, P. & Sudhandiran, G. (2011). Astaxanthin inhibits tumor invasion by decreasing extracellular matrix production and induces apoptosis in experimental rat colon carcinogenesis by modulating the expressions of ERK-2, NFκB and COX-2. *Investigational New Drugs*, 29 (2): 207-224.
- Neal, C. P. & Berry, D. P. (2006). Basic principles of the molecular biology of cancer II: angiogenesis, invasion and metastasis. *Surgery (Oxford)*, 24 (4): 120-125.
- Norli, H. R. (2015). *Ekstraksjon og analyse av Astaxanthin fra algebiomasse*. Bioforsk (red.). Metodehåndbok for Bioforsk Plantehelse, Pesticidkjemi, M103 utgave 04.
- Palozza, P., Torelli, C., Boninsegna, A., Simone, R., Catalano, A., Mele, M. C. & Picci, N. (2009). Growth-inhibitory effects of the astaxanthin-rich alga *Haematococcus pluvialis* in human colon cancer cells. *Cancer Letters*, 283 (1): 108-117.
- Panetta, J. C. & Adam, J. (1995). A MATHEMATICAL-MODEL OF CYCLE-SPECIFIC CHEMOTHERAPY. *Mathematical and Computer Modelling*, 22 (2): 67-82.
- Pearson, G., Robinson, F., Gibson, T. B., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K. & Cobb, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews*, 22 (2): 153-183.
- Prabhu, P. N., Ashokkumar, P. & Sudhandiran, G. (2009). Antioxidative and antiproliferative effects of astaxanthin during the initiation stages of 1,2-dimethyl hydrazine-induced experimental colon carcinogenesis. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 23 (2): 225-234.
- Ramaswamy, S., Ross, K. N., Lander, E. S. & Golub, T. R. (2003). A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nature Genetics*, 33 (1): 49-54.
- Recht, L., Zarka, A. & Boussiba, S. (2012). Patterns of carbohydrate and fatty acid changes under nitrogen starvation in the microalgae *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis* sp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94 (6): 1495-1503.
- Recht, L., Toepfer, N., Batushansky, A., Sikron, N., Gibon, Y., Fait, A., Nikoloski, Z., Boussiba, S. & Zarka, A. (2014). Metabolite Profiling and Integrative Modeling Reveal Metabolic Constraints for Carbon Partitioning under Nitrogen Starvation in the Green Algae *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Biological Chemistry*, 289 (44): 30387-30403.
- Roche. (2005). Cell Proliferation Kit I (MTT) Version 17.
- Sarada, R., Vidhyavathi, R., Usha, D. & Ravishankar, G. A. (2006). An efficient method for extraction of astaxanthin from green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (20): 7585-7588.
- Schrader, M., Baumgart, E., Volkl, A. & Fahimi, H. D. (1994). HETEROGENEITY OF PEROXISOMES IN HUMAN HEPATOBLASTOMA CELL-LINE HEPG2 - EVIDENCE OF DISTINCT SUBPOPULATIONS. *European Journal of Cell Biology*, 64 (2): 281-294.

- Skjånes, K., Rebours, C. & Lindblad, P. (2013). Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. *Critical Reviews in Biotechnology*, 33 (2): 172-215.
- Su, Y., Wang, J., Shi, M., Niu, X., Yu, X., Gao, L., Zhang, X., Chen, L. & Zhang, W. (2014). Metabolomic and network analysis of astaxanthin-producing *Haematococcus pluvialis* under various stress conditions. *Bioresource Technology*, 170: 522-529.
- Talmadge, J. E. & Fidler, I. J. (2010). AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. *Cancer Research*, 70 (14): 5649-5669.
- Tanaka, K., Yamada, A., Noda, K., Hasegawa, T., Okuda, M., Shoyama, Y. & Nomoto, K. (1998). A novel glycoprotein obtained from *Chlorella vulgaris* strain CK22 shows antimetastatic immunopotential. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 45 (6): 313-320.
- Thorgeirsson, S. S. & Grisham, J. W. (2002). Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nature Genetics*, 31 (4): 339-346.
- Vindelov, L. L., Christensen, I. J. & Nissen, N. I. (1983). A DETERGENT-TRYPSIN METHOD FOR THE PREPARATION OF NUCLEI FOR FLOW CYTOMETRIC DNA ANALYSIS. *Cytometry*, 3 (5): 323-327.
- Vlodavsky, I., Goldshmidt, O., Zcharia, E., Atzmon, R., Rangini-Guatta, Z., Elkikh, M., Peretz, T. & Friedmann, Y. (2002). Mammalian heparanase: involvement in cancer metastasis, angiogenesis and normal development. *Seminars in Cancer Biology*, 12 (2): 121-129.
- Wang, S. B., Chen, F., Sommerfeld, M. & Hu, Q. (2004). Proteomic analysis of molecular response to oxidative stress by the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Planta*, 220 (1): 17-29.
- Wong, C. C. L., Tse, A. P. W., Huang, Y. P., Zhu, Y. T., Chiu, D. K. C., Lai, R. K. H., Au, S. L. K., Kai, A. K. L., Lee, J. M. F., Wei, L. L., et al. (2014). Lysyl Oxidase-Like 2 Is Critical to Tumor Microenvironment and Metastatic Niche Formation in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology*, 60 (5): 1645-1658.
- World Cancer Report 2014. (2014). I: Stewart, B. W. & Wild, C. P. (red.). International Agency for Research on Cancer, WHO.
- Yap, T. A., Carden, C. P. & Kaye, S. B. (2009). Beyond chemotherapy: targeted therapies in ovarian cancer. *Nature Reviews Cancer*, 9 (3): 167-181.
- Yuan, J.-P., Peng, J., Yin, K. & Wang, J.-H. (2011). Potential health-promoting effects of astaxanthin: A high-value carotenoid mostly from microalgae. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55 (1): 150-165.
- Zhang, Y., Luo, Q., Wang, N., Hu, F., Jin, H., Ge, T., Wang, C. & Qin, W. (2015). LRG1 suppresses the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Medical Oncology*, 32 (5).

Vedlegg 1 – Protokoll for ekstraksjon og analyse av astaxanthin fra algebiomasse.

Mottatt og utviklet av Hans Ragnar Norli



Plantehelse

METODE NR:	M103	UTGAVE:	01
GYLDIG FRA:	01.02.2015	ERSTATTER:	M103 utgave 01
AKKREDITERT:	Nei		

Ekstraksjon og analyse av astaxanthin fra algebiomasse

Anvendelse

Metoden bestemmer summen av fritt og bundet astaxhantin i algebiomasse ved bruk av HPLC DAD og kvantifisering med *trans*- β -Apo-8'-carotenal (TBAC) som internstandard. Astaxhantin kan brytes ned av lyskilder. Oppbevar derfor alle løsninger ved -20 grader i fryseskap. Unngå direkte belysning under arbeid med fritt astaxhantin. Bruk helst brune målekolber til oppbevaring av ekstrakter.

Apparatur

HPLC DAD

Sentrifuge

Fast Prep MP 24 ristemaskin

Varmeskap/GC-ovn

Glasskuler 0.5 mm, Scientific Industries part no: SI BG05

Kjemikalier

Astaxhanthin, Chiron >99% 3902.40-5mg)

trans- β -Apo-8'-carotenal \geq 96% Sigma/Aldrich (10810-1G)

Tris Ultrapure 99,9 % T1501.1000, Duchefa Biochemie

HCl Merck

NaCl

Mg SO4 vannfri

Cholesterol esterase 100 units Sigma-Aldrich (C9281)

Metanol

Aceton

Acetonitril

ReagenserTillaging av kolesterol esterase 2,06 units/ prøve

Enzymløsningen lages ny for hvert prøveoppsett

Til 10 prøver innveies 5 mg av enzymet som løses i 5 ml trisbuffer, det tilsettes 0,5 ml pr prøve

Tillaging av 0,05 M Tris buffer pH=7

Til 100 mL:

$0,05 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} = 0,005 \text{ mol}$

$0,005 \text{ mol} \times 121,14 \text{ g/mol} = 0,6057 \text{ g}$

I en et 100 mL begerglass tilsettes 0,6057 g Tris. Tilsett ca. 30 ml MilliQvann og løs opp.

Juster pH til 7 ved å titrere med 1M HCl (tilsett først 4 ml og deretter 0,2 mL porsjoner til pH=7

Sjekk pH med pH papir

Overfør innholdet i begerglasset til en 100 mL målekolbe.

Skylt ut av begerglasset med MilliQ. vann og overfør til målekolben

Juster volumet til 100 mL og oppbevar på brun glassflaske.

1M HCl

Fyll ca. 25 mL MilliQvann i en 50 mL målekolbe.

Tilsett 4,1 mL konsentrert HCl (12M) og fyll opp til merket.

StandarderStandard 100 ug/mL Astaxhantin

Vei inn 5,00 mg Astaxhantin i en 50 mL brun målekolbe og fyll opp til merket med aceton.

Overfør løsningen til en brun flaske som oppbevares i fryseskap.

Stamstandarder; 1 mg/ml

Sett inn opplysninger om oppbevaring og holdbarhet. Dette gjelder for alle standardene.

Kalibreringsløsninger:

Kalibreringsløsninger lages nye for hver serie av prøver

	100 ug/mL	50 ug/ml	10 ug/ml	5 ug/ml	1 ug/mL
uL av 100 ug/ml	1000	500	100	50	10
uL aceton	0	500	900	950	990

Tilsett 50 ul (50 ug) av ISTD til hver kalibreringsstandard

Intern standard 1000 ug/ml trans- β -Apo-8'-carotenal (TBAC)

Vei inn 20 mg trans- β -Apo-8'-carotenal i en 20 mL brun målekolbe og fyll opp til merket med aceton. Overfør løsningen til en brun flaske som oppbevares i fryseskap.

Tillaging av kontrollprøver

Spesialprosedyre for Astareal 1010:

Astareal 1010 er allerede knust slik at det kan ekstraheres direkte. Vei inn 20 mg ASTAREAL 1010 i et sentrifugerør. Tilsett 1 mL MilliQvann og vortex for å løse opp aggregater (dette er viktig for å få til fullstendig avfarging av algebiomassen)

Prøveopparbeidelse

Det er viktig at ekstraksjonen gjøres til algematerialet er fargeløst

1. Prøven (20-50) mg veies direkte inn i et Fast Prep Matrix E-rør sammen med 1 mL aceton som ristes ved 6 G i 1 min på MP Fast Prep 24.
2. Sentrifuger ved 3000 rpm i 5 min og overfør ekstraktet til en 25mL målekolbe.
3. Tilsett 1-2 mL aceton og rist opp for hånd.
4. Sentrifuger ved 3000 rpm i 5 min og overfør ekstraktet til en 25 mL (brun) målekolbe
5. Repeter punkt 2 og 3 med 3-5 mL porsjoner inntil løsningen er fargeløs (VIKTIG)
6. Fyll opp til merket med aceton

Enzymatisk hydrolyse

1. 1 mL av acetonekstraktet overføres til et rør.
2. Tilsett 50 ul av ISTD (50 ug)
3. Tilsett 2 mL aceton
4. Tilsett 2 mL 0,05 M Tris HCl buffer (hvis løsningen blakkes skyldes dette oljerester, opparbeidelsen må derfor stanses og prøven renses for olje)
5. Ekvilibrer røret i 2 min på GC-ovn ved 37 grader C
6. Tilsett 500 ul av enzymløsningen og hydrolyser på GC-ovn i 45 minutter. Rist røret hvert 15. min
7. Tilsett 0,25 g NaCl og 1 g MgSO₄ og rist kraftig i ett minutt
8. Sentrifuger ved 3000 rpm i 5 min
9. Overfør 1,0 mL av acetonfasen til en injeksjonsvial

LC-analyse

Instrumentbetingelser

HPLC

Flow: 1 ml/min, injeksjonsvolum 10 ul

Gradient:

A= Acetonitril/MilliQvann 70/30

B=Metanol/Aceton 50/50

<u>Tid(min)</u>	<u>A%</u>	<u>B%</u>
0	100	0
1	100	0
25	0	100
27	100	0
30	100	0

Kolonne: Zorbax Eclipse XDB-18, 4,6x150 mm, 5um partikler
Astaxhantin detekteres ved ca. 19 min (430 nm)

Vedlegg 2 – ANOVA tabeller til flowcytometri

Tabell 17 HepG2 celler inkubert i etanolekstrakt i 24 timer.

General Linear Model: Celler (%) versus Cellesyklusfase

```
Factor Type Levels Values
Fase fixed 3 G1/G0; G2/M; S
```

Analysis of Variance for %-celler, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Kons	1	0,5	0,5	0,5	0,04	0,837
Fase	2	5698,2	5698,2	2849,1	255,92	0,000
Error	11	122,5	122,5	11,1		
Total	14	5821,1				

S = 3,33660 R-Sq = 97,90% R-Sq(adj) = 97,32%

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	32,286	1,256	25,71	0,000
Kons	-0,001028	0,004873	-0,21	0,837

Tabell 18 HepG2 celler inkubert i etanolekstrakt i 48 timer.

General Linear Model: Celler (%) versus Cellesyklusfase

```
Factor Type Levels Values
Fase_1 fixed 3 G1/G0; G2/M; S
```

Analysis of Variance for %-celler_1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Kons_1	1	0,0	0,0	0,0	0,01	0,928
Fase_1	2	5454,7	5454,7	2727,4	1159,65	0,000
Error	11	25,9	25,9	2,4		
Total	14	5480,6				

S = 1,53358 R-Sq = 99,53% R-Sq(adj) = 99,40%

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	31,9025	0,5772	55,27	0,000
Kons_1	0,000207	0,002240	0,09	0,928

Tabell 19 HepG2 celler inkubert i etanolekstrakt i 72 timer.

General Linear Model: Celler (%) versus Cellesyklusfase

Factor	Type	Levels	Values
Fase2	fixed	3	G1/G0; G2/M; S

Analysis of Variance for Celler %, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Konsentrasjon1	1	7,7	7,7	7,7	1,08	0,322
Fase2	2	6235,6	6235,6	3117,8	435,01	0,000
Error	11	78,8	78,8	7,2		
Total	14	6322,2				

S = 2,67715 R-Sq = 98,75% R-Sq(adj) = 98,41%

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	32,353	1,008	32,11	0,000
Konsentrasjo	-0,004057	0,003910	-1,04	0,322

Tabell 20 HepG2 celler inkubert i vannekstrakt i 24 timer.

General Linear Model: Celler (%) versus Cellesyklusfase

Factor	Type	Levels	Values
Fase2_1	fixed	3	G1/G0; G2/M; S

Analysis of Variance for Celler %_1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Konsentrasjon1_1	1	0,0	0,0	0,0	0,00	0,983
Fase2_1	2	5565,4	5565,4	2782,7	630,46	0,000
Error	11	48,6	48,6	4,4		
Total	14	5614,0				

S = 2,10090 R-Sq = 99,14% R-Sq(adj) = 98,90%

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	32,0515	0,7907	40,53	0,000
Konsentrasjo	0,000065	0,003069	0,02	0,983

Tabell 21 HepG2 celler inkubert i vannekstrakt i 48 timer.

General Linear Model: Celler (%) versus Cellesyklusfase

Factor	Type	Levels	Values
Fase 1	fixed	3	G1/G0; G2/M; S

Analysis of Variance for Celler-%, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Konsentrajon 2	1	0,8	0,8	0,8	0,08	0,781
Fase 1	2	5721,5	5721,5	2860,7	289,22	0,000
Error	11	108,8	108,8	9,9		
Total	14	5831,1				

S = 3,14505 R-Sq = 98,13% R-Sq(adj) = 97,63%

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	32,194	1,184	27,20	0,000
Konsentrajon	-0,001310	0,004594	-0,29	0,781

Tabell 22 HepG2 celler inkubert i vannekstrakt i 72 timer.

General Linear Model: Celler (%) versus Cellesyklusfase

Factor	Type	Levels	Values
Fase 1_1	fixed	3	G1/G0; G2/M; S

Analysis of Variance for Celler-%_1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Konsentrajon 2_1	1	0,8	0,8	0,8	0,08	0,779
Fase 1_1	2	5079,7	5079,7	2539,9	276,08	0,000
Error	11	101,2	101,2	9,2		
Total	14	5181,7				

S = 3,03309 R-Sq = 98,05% R-Sq(adj) = 97,51%

Term	Coef	SE Coef	T	P
Constant	32,171	1,142	28,18	0,000
Konsentrajon	-0,001276	0,004430	-0,29	0,779

Vedlegg 3 – ANOVA tabeller til migrasjonstesten

Tabell 22 Migrasjon av HepG2 celler inkubert i vannekstrakt med fibringel

General Linear Model: Celler (%) versus Konsentrasjon

Factor	Type	Levels	Values
Konsentrasjon_1	fixed	5	0,0; 62,5; 125,0; 250,0; 500,0

Analysis of Variance for % celler_1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Konsentrasjon_1	4	4,036	4,036	1,009	0,12	0,973
Error	20	164,877	164,877	8,244		
Total	24	168,913				

S = 2,87121 R-Sq = 2,39% R-Sq(adj) = 0,00%

Tabell 23 Migrasjon av HepG2 celler inkubert i etanolekstrakt med fibringel

General Linear Model: Celler (%) versus Konsentrasjon

Factor	Type	Levels	Values
Konsentrasjon_1_1	fixed	5	0,0; 62,5; 125,0; 250,0; 500,0

Analysis of Variance for % celler_1_1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Konsentrasjon_1_1	4	26,79	26,79	6,70	0,42	0,795
Error	20	322,15	322,15	16,11		
Total	24	348,94				

S = 4,01344 R-Sq = 7,68% R-Sq(adj) = 0,00%

Tabell 24 Adheransen til HepG2 celler inkubert i vannekstrakt med fibringel

General Linear Model: Celler (%) versus Konsentrasjon

Factor	Type	Levels	Values
Konsentrasjon_2_1	fixed	5	0,0; 62,5; 125,0; 250,0; 500,0

Analysis of Variance for % celler_2_1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Konsentrasjon_2_1	4	604,5	604,5	151,1	0,76	0,567
Error	15	2982,3	2982,3	198,8		
Total	19	3586,8				

S = 14,1004 R-Sq = 16,85% R-Sq(adj) = 0,00%

Tabell 25 Adheransen til HepG2 celler inkubert i etanolekstrakt med fibringel**General Linear Model: Celler (%) versus Konsentrasjon**

Factor	Type	Levels	Values
Konsentrasjon_2	fixed	5	0,0; 62,5; 125,0; 250,0; 500,0

Analysis of Variance for % celler_2, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Konsentrasjon_2	4	397,4	397,4	99,4	0,59	0,674
Error	15	2518,8	2518,8	167,9		
Total	19	2916,2				

S = 12,9583 R-Sq = 13,63% R-Sq(adj) = 0,00%

Tabell 26 Migrasjon av HepG2 celler inkubert i vannekstrakt med Matrigel**General Linear Model: Celler (%) versus Konsentrasjon**

Factor	Type	Levels	Values
Konsentrasjon_1_1_1	fixed	5	0,0; 62,5; 125,0; 250,0; 500,0

Analysis of Variance for % celler_1_1_1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Konsentrasjon_1_1_1	4	43,267	43,267	10,817	2,03	0,129
Error	20	106,813	106,813	5,341		
Total	24	150,080				

S = 2,31098 R-Sq = 28,83% R-Sq(adj) = 14,60%

Tabell 27 Migrasjon av HepG2 celler inkubert i etanolekstrakt med Matrigel**General Linear Model: Celler (%) versus Konsentrasjon**

Factor	Type	Levels	Values
Konsentrasjon_1_1_1_1	fixed	5	0,0; 62,5; 125,0; 250,0; 500,0

Analysis of Variance for % celler_1_1_1_1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Konsentrasjon_1_1_1_1	4	19,950	19,950	4,988	1,02	0,421
Error	20	97,794	97,794	4,890		
Total	24	117,744				

S = 2,21126 R-Sq = 16,94% R-Sq(adj) = 0,33%

Tabell 28 Adheransen til HepG2 celler inkubert i vannekstrakt med Matrigel

General Linear Model: Celler (%) versus Konsentrasjon

Factor	Type	Levels	Values
1Konsentrasjon	fixed	5	0,0; 62,5; 125,0; 250,0; 500,0

Analysis of Variance for %celler-, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
1Konsentrasjon	4	298,5	298,5	74,6	0,37	0,826
Error	15	3025,4	3025,4	201,7		
Total	19	3323,9				

S = 14,2019 R-Sq = 8,98% R-Sq(adj) = 0,00%

Tabell 29 Adheransen til HepG2 celler inkubert i etanolekstrakt med Matrigel

General Linear Model: Celler (%) versus Konsentrasjon

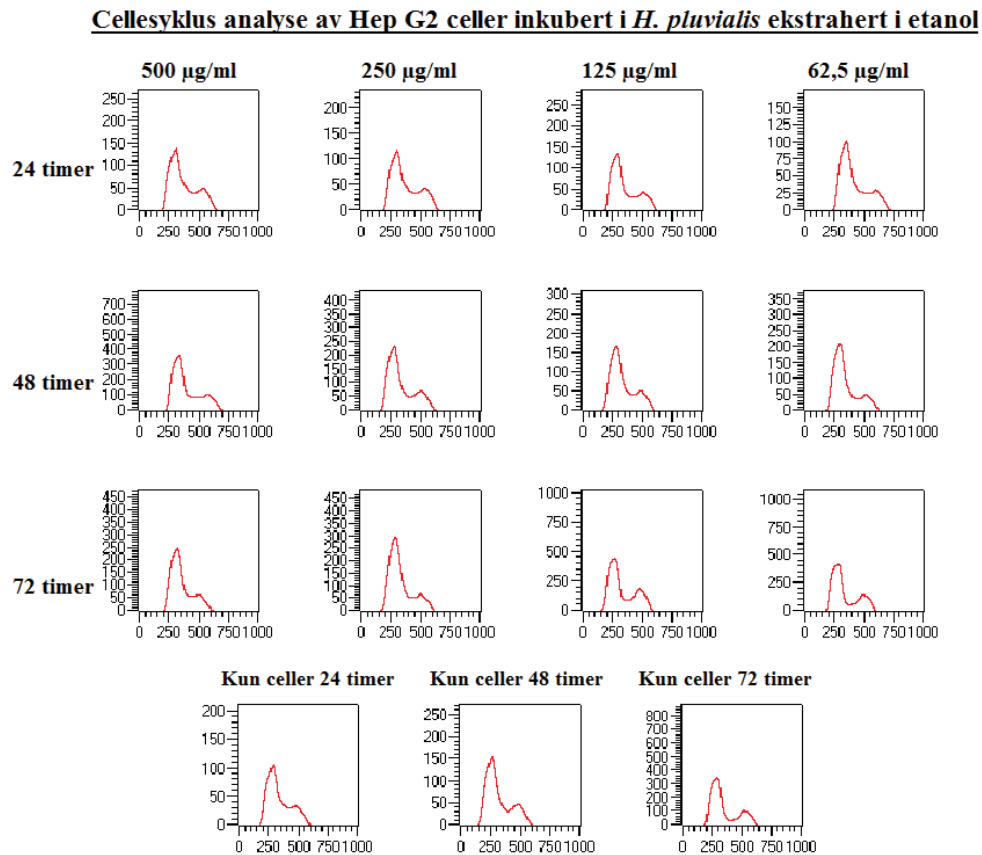
Factor	Type	Levels	Values
1Konsentrasjon_1	fixed	5	0,0; 62,5; 125,0; 250,0; 500,0

Analysis of Variance for %celler-_1, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
1Konsentrasjon_1	4	299,4	299,4	74,9	0,46	0,762
Error	15	2424,4	2424,4	161,6		
Total	19	2723,9				

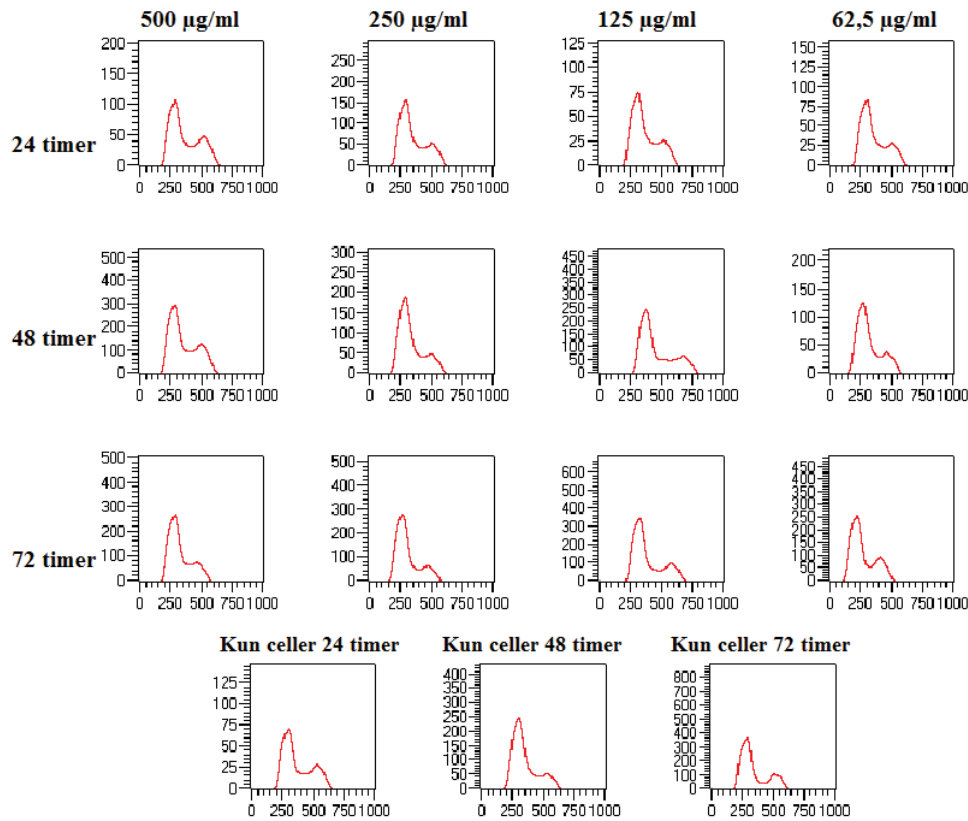
S = 12,7133 R-Sq = 10,99% R-Sq(adj) = 0,00%

Vedlegg 4 – Diagrammer fra flowcytometri



Figur 14 HepG2 celler eksponert til forskjellig tid med etanolekstrakt. Cellene ble stimulert i 24, 48 og 72 timer med følgende konsentrasjoner; 500, 250, 125 og 62,5 µg/ml samt en negativ kontroll. Resultatene var hentet fra tre ulike oppsett og analysert ved hjelp av flowcytometri. Diagrammene viser sammenhengen mellom fasene i celsesyklusen og fluorescensintensiteten. Figuren representerer kun et diagram for hver av konsentrasjonene og tidspunktene.

Cellesyklus analyse av Hep G2 inkubert i *H. pluvialis* ekstrahert i vann



Figur 15 HepG2 celler eksponert til forskjellig tid med vannekstrakt. Cellene ble stimulert i 24, 48 og 72 timer med følgende konsentrasjoner; 500, 250, 125 og 62,5 µg/ml samt en negativ kontroll. Resultatene var hentet fra tre ulike oppsett og analysert ved hjelp av flowcytometri. Diagrammene viser sammenhengen mellom fasene i cellesyklusen og fluorescensintensiteten. Figuren representerer kun et diagram for hver av konsentrasjonene og tidspunktene.



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no