



**Áhrif n-3 fitusýra í æti á cAMP framleiðslu  
eftir örvun beta adrenergra viðtaka í  
HEK293 frumum**

Sunna Björnsdóttir



**Raunvísindadeild  
Háskóli Íslands  
2015**



# Áhrif n-3 fitusýra í æti á cAMP framleiðslu eftir örvun beta adrenergra viðtaka í HEK293 frumum

Sunna Björnsdóttir

15 eininga ritgerð sem er hluti af  
*Baccalaureus Scientiarum* gráðu í lífefna- og sameindalíffræði

Leiðbeinandi  
Valgerður Edda Benediktsdóttir

Meðleiðbeinandi  
Bjarni Ásgeirsson

Raunvísindadeild  
Verkfræði- og náttúruvísindasvið  
Háskóli Íslands  
Reykjavík, maí 2015

Áhrif n-3 fitusýra í æti á cAMP framleiðslu eftir örvun beta adrenergra viðtaka í HEK293 frumum.

Áhrif n-3 fitusýra á beta adrenerga viðtaka.

15 eininga ritgerð sem er hluti af *Baccalaureus Scientiarum* gráðu í lífefna- og sameindalíffræði

Höfundarréttur © 2015 Sunna Björnsdóttir

Öll réttindi áskilin

Raunvísindadeild

Verkfræði- og náttúruvísindasvið

Háskóli Íslands

VRÍI, Hjarðarhaga 4-6

107 Reykjavík

Sími: 525 4000

Skráningarupplýsingar:

Sunna Björnsdóttir, 2015, *Áhrif n-3 fitusýra í æti á cAMP framleiðslu eftir örvun beta adrenergra viðtaka í HEK293 frumum*, BS ritgerð, raunvísindadeild, Háskóli Íslands, 55 bls.

Prentun: Háskólaprent

Reykjavík, maí 2015

# Útdráttur

Fjöldi rannsókna hefur gefið til kynna jákvæð áhrif fjölómettaðra fitusýra á hjartað, sérstaklega omega-3 fitusýra. Komið hefur í ljós að omega-3 fitusýrur fækka marktækt dauðsföllum í kjölfar hjartaáfalls, meðal annars með verndandi áhrifum gegn hjartsláttartruflunum.  $\beta$ -adrenergir viðtakar eru G-prótein tengdir og stjórna meðal annars hraða hjartsláttar og samdrætti hjartavöðva í kjölfar virkjunar með katekólamínnum. Fer sú stjórn fram í gegnum boðferli sem meðal annars valda myndun á cAMP í umfrymi. Í hjartasjúkdómum eykst magn katekólamína í blóðvökva og jafnframt binding þeirra við  $\beta$ -adrenerga viðtaka. Ef örvunin er viðvarandi bregðast viðtakarnir við með afnæmingu sem minnkar svörun þeirra við tenglum sínum og dregur úr afköstum hjartans við álag. Markmið verkefnisins var að athuga áhrif omega-3 fitusýra á  $\beta$ -adrenerga viðtaka með notkun HEK293 frumulínunnar, sem hefur slíka viðtaka. HEK293 frumur voru ræktaðar ýmist með eða án dókósaheksaensýru í æti.  $\beta_2$ -adrenergir viðtakar þeirra voru örvaðir með mismunandi styrkjum af ísópróterenóli og cAMP framleiðsla mæld með ELISA aðferð með tilbúnu mæliefni. Munur á cAMP framleiðslu  $\beta$ -adrenergra viðtaka í frumuhópnum tveimur var metinn með samanburði á mettunarkúrfum þar sem styrkur cAMP var fall af lógariþmanum af ísópróterenólstyrk. Þar sem mestur tími verkefnisins fór í aðferðaþróun tókst aðeins að gera þrjár heppnaðar tilraunir. Þrátt fyrir að fyrri tvær tilraunirnar megi túlka á mismunandi vegu gefur þriðja tilraunin skýrt til kynna að enginn munur sé á frumuhópnum og því er að öllum líkindum ekki marktækur munur á cAMP framleiðslu í frumum með og án DHA í æti. Það fæst þó ekki staðfest nema með fleiri tilraunum.



# Abstract

Multiple studies have indicated beneficial effects of polyunsaturated fatty acids on the heart, especially omega-3 fatty acids, which have been shown to decrease mortality in patients surviving myocardial infarction, partly due to their protective effects against arrhythmias.  $\beta$ -adrenergic receptors are responsible for regulation of cardiac rate and contractility in response to their activation by catecholamines. This regulation takes place through a signaling pathway which leads to cAMP production. Heart failure leads to an increase of catecholamines in plasma, followed by persistent activation of  $\beta$ -adrenergic receptors, to which they respond by desensitization. This makes them less susceptible to ligands and decreases cardiac output during stress. The goal of this project was to examine the connection between omega-3 fatty acids and  $\beta$ -adrenergic receptors, using the HEK293 cell line. Cells were grown with or without docosahexaenoic acid in the growth medium. Their  $\beta_2$ -adrenergic receptors were stimulated with different concentrations of isoproterenol and cAMP production was measured with an ELISA cAMP assay kit. The difference in  $\beta$ -adrenergic cAMP production was estimated by comparing saturation curves from the two cell groups, where cAMP concentration was a function of the logarithm of isoproterenol concentration. Since large amount of time was spent on validation of methods, only three experiments were successful. Even though the results of the first two experiments can be interpreted differently, the third one clearly demonstrates that there is most likely no significant difference in cAMP production in cells with or without DHA in growth medium. However, it cannot be confirmed without further research.





*Hér með lýsi ég því yfir að riterð þessi er samin af mér og að hún hefur hvorki  
að hluta né í heild verið lögð fram áður til hærri prófgráðu.*

---

**Sunna Björnsdóttir, kt. 181192-3489**



# Efnisyfirlit

Abstract .....	v
Myndir .....	x
Töflur .....	xi
Skýringar .....	xii
Þakkir .....	xiii
<b>1. Inngangur .....</b>	<b>15</b>
1.1 Formáli .....	15
1.2 Fjölómattaðar fitusýrur .....	16
1.2.1 Uppbygging .....	16
1.2.2 Áhrif á heilsu hjartans .....	17
1.2.3 Mögulegar ástæður gagnsemi $\omega$ -3 fitusýra .....	19
1.2.4 Ósamræmi í áhrifum $\omega$ -3 fitusýra á hjartað .....	19
1.3 $\beta$ -adrenergir viðtakar .....	20
1.3.1 G-prótein tengdir viðtakar (GPCRs) .....	20
1.3.2 Adrenergir viðtakar .....	21
1.3.3 Hlutverk $\beta$ -adrenergra viðtaka í hjarta .....	23
1.4 Tengsl omega-3 fitusýra og adrenergra viðtaka .....	23
1.5 HEK frumur og frumuræktun .....	24
1.6 Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA .....	26
<b>2. Efni og aðferðir .....</b>	<b>29</b>
2.1 Frumur og frumuræktun .....	29
2.2 Fitusýrur .....	29
2.3 Örvun .....	30
2.4 Mæling á styrk cAMP með ELISA .....	30
<b>3. Niðurstöður .....</b>	<b>33</b>
3.1 Aðferðaprófanir .....	33
3.2 cAMP mælingar í frumum ræktuðum með og án DHA í æti .....	35
<b>4. Umræður .....</b>	<b>41</b>
Heimildir .....	45
Viðauki .....	49

# Myndir

Mynd 1: Fitusýrur.....	16
Mynd 2: Áhrif omega-6 fitusýrunnar arakíðonsýru og omega-3 fitusýranna EPA og DHA á bólgur, blóðstorknun, hjartslátt og æðavídd og samskipti þeirra á milli.....	18
Mynd 3: Virkjun G-prótein tengds viðtaka með bindingu tengils.....	21
Mynd 4: Virkjun, boðferli og afnæming $\beta$ -adrenergra viðtaka. ....	22
Mynd 5: ELISA. ....	26
Mynd 6: Dæmi um staðallínu gleypni út frá styrk staðlaðra lausn af cAMP. ....	31
Mynd 7: Tilraun 1. cAMP framleiðsla (nM) í frumuvökva úr frumum sem ræktaðar voru með 50 $\mu$ M DHA í æti (DHA) og frumum sem ræktaðar voru án fitusýru í æti (control).....	36
Mynd 8: Tilraun 2. cAMP framleiðsla (nM) í frumuvökva úr frumum sem ræktaðar voru með 50 $\mu$ M DHA í æti (DHA) og frumum sem ræktaðar voru án fitusýru í æti (control).....	37
Mynd 9: Samanburður á metnunarkúrfum cAMP framleiðslu úr tilraun 1 (græn) og tilraun 2 (rauð) fyrir HEK293 frumur sem ræktaðar voru með 50 $\mu$ M DHA í æti sínu. ....	37
Mynd 10: Samanburður á metnunarkúrfum cAMP framleiðslu úr tilraun 1 (græn) og tilraun 2 (rauð) fyrir HEK293 frumur sem ræktaðar voru án DHA í æti sínu.....	38
Mynd 11: Tilraun 1 og 2. cAMP framleiðsla (nM) sem hlutfall af hámarksframleiðslu í frumuvökva úr frumum sem ræktaðar voru með 50 $\mu$ M DHA í æti (DHA) og án (control). ....	38

# Töflur

Tafla 1: Fyrsta prófun.....	33
Tafla 2: Önnur prófun.....	34
Tafla 3: Þriðja prófun. ....	34
Tafla 4: Tilraun 3.....	39
Tafla 5: Tilraun 1, gleypni staðallausna cAMP.....	49
Tafla 6: Tilraun 1, viðmiðunarfrumur. ....	50
Tafla 7: Tilraun 1, frumur með DHA í æti. ....	51
Tafla 8: Tilraun 2, gleypni staðallausna cAMP.....	51
Tafla 9: Tilraun 2, viðmiðunarfrumur. ....	52
Tafla 10: Tilraun 2, frumur með DHA í æti. ....	53
Tafla 11: Tilraun 3, gleypni staðallausna cAMP.....	54
Tafla 12: Tilraun 3, viðmiðunarfrumur. ....	54
Tafla 13: Tilraun 3, frumur með DHA í æti. ....	55

# Skýringar

$\beta$ -ARK – Beta Adrenergic viðtaka kínasi ( $\beta$ -adrenergic receptor kinase)

Ad5 – Sheared adenovirus 5

BSA – Bovine Serum Albumin

cAMP – Cyclic Adenosín mónófosfat (Cyclic adenosine monophosphate)

COX – Cýclóoxýgenasi (Cyclooxygenase)

DHA – Dókósaheksaensýra (Docosahexaenoic acid)

ELISA – Enzyme Linked Immunosorbent Assay

EPA – Eikósapentaensýra (Eicosapentaenoic acid)

FÓFS – Fjölómattaðar fitusýrur

GDP – Gúanósín-5'-dífosfat (Guanosine-5'-diphosphate)

GPCRs – G-prótein tengdir viðtakar (G-protein coupled receptors)

GRK – G-prótein tengds viðtaka kínasi (G-protein coupled receptor kinase)

GTP – Gúanósín-5'-trífosfat (Guanosine-5'-triphosphate)

HDL – High Density Lipoprotein

HEK – Human Embryonic Kidney

HRP – Peroxídasi úr piparrót (Horse Radish Peroxidase)

IBMX – 3-ísóbútýl-1-metýlxanthín

LA – Línólsýra (Linoleic acid)

LDL – Low Density Lipoprotein

LNA –  $\alpha$ -línólen sýra ( $\alpha$ -linolenic acid)

LOX – Lípóoxýgenasi (Lipoxygenase)

mRNA – Messenger ríbósa kjarnsýra (Messenger ribose nucleic acid)

PBS – Fosfat búffer saltlausn (Phosphate Buffered Saline)

PDE – Fosfódíesterasi (Phosphodiesterase)

PKA – Prótein kínasi A (Protein kinase A)

PMSF - Fenýlmetansúlfónýlflúoríð

Rb - Retinoblastoma

TERT – Telomerase Reverse Transcriptase

# Þakkir

Fyrst og fremst vil ég þakka Valgerði Eddu Benediktsdóttur fyrir að veita mér tækifæri til að vinna að þessu verkefni, frábæra reynslu, leiðsögn og samstarf. Ég þakka rannsóknarstofu í krabbameinsfræðum í lækna­garði fyrir aðgang að frumuræktunaraðstöðu og starfsfólkinu þar fyrir að vera velvildin og almennilegheitin uppmáluð og alltaf tilbúið til aðstoðar. Einnig þakka ég Sigurði Rúnari Guðmundssyni fyrir kennslu á frumuræktunaraðferðum sem og aðra veitta hjálp og áhuga á verkefninu og Bjarna Ásgeirssyni fyrir yfirferð á verkefninu sem og frábæra kennslu í náminu. Kærasti minn, Barði Benediktsson, fær þakkir fyrir samfylgd og félagsskap í náminu og fyrir að passa að ég eigi mér líf handan við skólabækurnar! Síðast en ekki síst fá foreldrar mínir þakkir, pabbi fyrir að kenna mér allt sem ég kann um ritsmíð og mamma fyrir að berja það inn í mig að nýta ávallt tímann!





# 1. Inngangur

## 1.1 Formáli

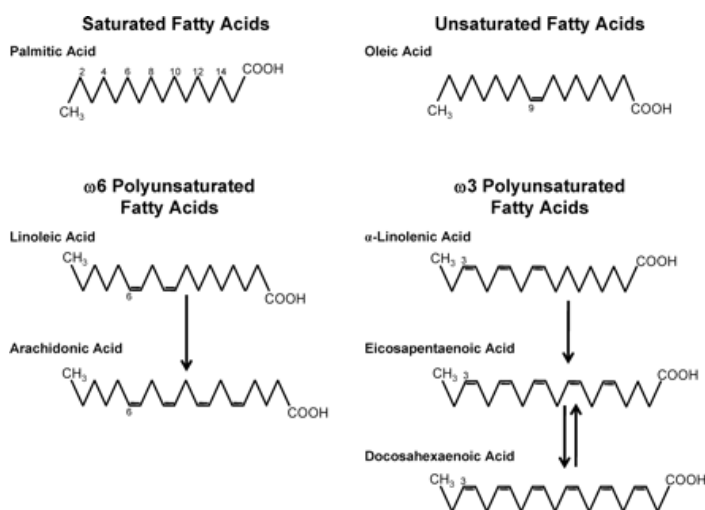
Flestir Íslendingar ættu að kannast við lýsi. Sumir fá sér skeið af þessum undarlega vökva á hverjum morgni, aðrir geta ekki hugsað sér það. Þeir sem hafa tamið sér neyslu þess hafa væntanlega í huga þau fjölmörgu heilsusamlegu áhrif sem talað er um að lýsið hafi. Ekki aðeins hefur það að geyma ofgnótt af D-vítamíni, sem kemur sér sérstaklega vel í skammdeginu á Íslandi, heldur inniheldur það omega-3 fitusýrur, sem hafa víst margvísleg áhrif eins og að draga úr einkennum bólgu- og ónæmissjúkdóma eins og liðagigt og efla hjartað. En eru þetta eitthvað annað en innantómar upplýsingar? Hvernig vitum við hvort þetta sé satt og rétt? Fjölmíðlar eru á hverjum degi stútfullir af alls kyns fréttum um heilsu, mataræði sem eykur brennslu og bætir þol, efni sem draga úr bólgum og liðverkjum eða lækka blóðþrýstinginn og reynslusögum fólks sem snúið hefur lífi sínu til hins betra með neyslu á hinum og þessum efnum. Eru þetta oftast en ekki ómarktækar sölubrellur. Hví ætti hið sama ekki að gilda um lýsi? Þessar upplýsingar dynja á fólki en flestir eiga erfitt með að sigta staðreyndir frá blekkingum. Að baki líkamlegra áhrifa liggja ávallt ástæður sem felast í breytingum á boðferlum eða öðrum efnahvörfum á sameindafræðilegum grunni sem fæstir hafa góða þekkingu á. Til að sýna fram á slík áhrif er nauðsynlegt að víðtækar og nákvæmar rannsóknir liggi að baki. Lýsi og omega-3 fitusýrur hafa verið rannsökuð í þaula og þúsundir ritrýndra vísindagreina hafa verið birtar um áhrif þeirra. Meirihluti þeirra sýnir að omega-3 fitusýrur séu nauðsynleg næringarefni og hafi áhrif á heilsu, sérstaklega á hjartað. Ætti þessi ritgerð að veita innsýn í þessi áhrif og lífefna- og sameindafræðilegan grunn þeirra sem og niðurstöður eldri tilrauna í þessum efnum. Einnig lýsir hún tilraun til að renna styrkum stoðum undir eldri kenningar og gefa nýja sýn á áður þekkta hluti.

Næst þegar þú opnar ísskápinn og rekur augun í lýsisflöskuna skaltu hugsa þig tvisvar um. Þótt bragðið sé undarlegt, er kannski ekki svo galið að fá sér eina skeið.

## 1.2 Fjölómattaðar fitusýrur

### 1.2.1 Uppbygging

Fitusýrur eru karboxýlsýrur með kolvetniskæðjur úr 4-36 kolefnum. Sumar þeirra eru án tvítengja og því fullmettaðar en aðrar innihalda eitt eða fleiri tvítengi og eru þar með ómettaðar. Fjölómattaðar fitusýrur (FÓFS) innihalda fleiri en tvö tvítengi. Staða fyrsta tvítengis ef talið er frá metýl-enda sýrunnar skiptir mestu máli fyrir lífeðlisfræðilega virkni þeirra. Í karboxýlsýrum er kolefnið næst karboxýlhópnum jafnan kallað  $\alpha$ -kolefnið og kolefni metýlendahópsins kallað  $\omega$ -kolefnið, eftir fyrsta og síðasta staf gríska stafrófsins, alfa og omega. FÓFS sem hafa fyrsta tvítengi á milli þriðja og fjórða kolefnisatóms ef talið er frá  $\omega$ -enda kallast þar með  $\omega$ -3 eða n-3 fitusýrur og þær sem hafa fyrsta tvítengi á milli sjötta og sjöunda kolefnisatóms ef talið er frá  $\omega$ -enda kallast þar með  $\omega$ -6 eða n-6 fitusýrur. Línólsýra (LA) er  $\omega$ -6 FÓFS og  $\alpha$ -línólen sýra (LNA) er  $\omega$ -3 FÓFS. Þær eru forverar lengri og virkari fitusýra sem kallast arakídónsýra ( $\omega$ -6, mynduð úr LA) og eikósapentaensýra (EPA) og dókósaheksaensýra (DHA) ( $\omega$ -3, myndaðar úr LNA) (mynd 1). Þessar fitusýrur þurfa menn að fá úr fæði, þar sem þeir hafa ekki desatúrasa ensím sem nauðsynleg eru til að mynda tvítengi milli kolefnisatóma sem eru handan við níunda kolefni frá  $\alpha$ -enda. Fást LA og LNA helst úr jurtaolím, fræjum og hnetum (1). Þótt arakídónsýra, EPA og DHA séu myndaðar úr LA og LNA í líkamanum er umdeilt hvort sú umbreyting geti uppfyllt þarfir okkar fyrir EPA og DHA. Því er mönnum ráðlagt að fá EPA og DHA einnig beint úr fæði, úr fiskiolím og feitum fiski (2, 3).



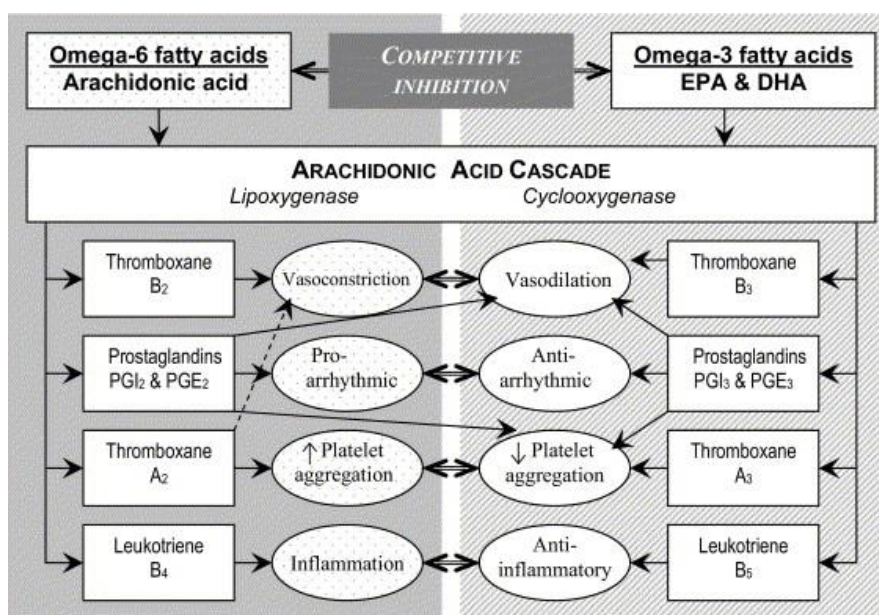
**Mynd 1: Fitusýrur.** Efst eru mettaða fitusýran palmitínsýra og ómettaða fitusýran óleínsýra og neðar eru lífsnauðsynlegu fitusýrurnar línólsýra ( $\omega$ -6) og  $\alpha$ -línólensýra ( $\omega$ -3) og afleiður þeirra (4).

### 1.2.2 Áhrif á heilsu hjartans

Hjarta- og æðasjúkdómar hrjá milljónir manna um allan heim og eru þeir algengasta dánarorsök einstaklinga í hinum vestræna heimi. Breyttur lífstíll mannsins síðustu áratuginna hefur sett mark sitt á tíðni slíkra sjúkdóma. Til að mynda hefur aukin neysla fitu, sérstaklega mettaðrar, verið tengd aukinni tíðni dauðsfalla vegna hjartasjúkdóma. Rannsóknir hafa sýnt að fitusýrur í fæði geta haft áhrif á áhættu á hjarta- og æðasjúkdómum (5). Skiptir þá máli hvers konar fitusýrur um er að ræða. Fjöldi rannsókna hefur gefið til kynna jákvæð áhrif FÓFS á hjartað, sérstaklega omega-3 fitusýra. Í samfélögum þar sem neysla fitu er mikil er samt sem áður lág tíðni hjarta- og æðasjúkdóma ef megnið af fitunni er fenginn úr fiskiafurðum og plöntum, þ.e. helstu uppsprettum omega-3 fitusýra. Nærtækasta dæmið eru eskimóar, en fæða þeirra samanstendur aðallega af sjávarfangi. Rannsóknir sýna sterk og stöðug tengsl milli neyslu omega-3 fitusýra og hjarta- og æðasjúkdóma og bendir flest til þess að omega-3 í fæði dragi úr hættu á slíkum sjúkdómum. Flestar þessara rannsókna byggjast á neyslu fisks og fiskiolíu, en einhverjar á omega-3 úr plöntum (6). Í einni þessara rannsókna kom í ljós að mánaðarleg inntaka af 5,5 g af omega-3 fitusýrum, eða það sem samsvarar einni máltíð af feitum fiski á viku, dró úr hættu á hjartastoppi um 50% miðað við viðmiðunarhóp sem fékk ekki omega-3 fitusýrur (7). Hefur American Heart Association nýtt sér niðurstöður rannsókna af þessu tagi til að gefa út viðmið um neyslu á fiski og fitusýrum (8).

Algengasta dánarorsök einstaklinga sem lifað hafa af hjartaáfall er skyndidauði. Stærsta klíníska tilraun til þessa sem tengist forvörnum eftir hjartaáfall (secondary prevention) var framkvæmd af GISSI hópnum frá Ítalíu. Þar voru 11.123 sjúklingar sem lifað höfðu af hjartaáfall meðhöndlaðir með omega-3 FÓFS. Dauðsföllum vegna skyndidauða fækkaði um 53% og dauðsföllum í heild fækkaði um 41% við þessa meðhöndlun. Áhrifin fóru að koma í ljós innan 90 daga frá því meðhöndlun hófst (9). Í kjölfarið varð neysla omega-3 fitusýra að ráðlagðri meðferð eftir hjartaáfall (10). Niðurstöður annarrar yfirgripsmikillar rannsóknar gáfu til kynna að áhætta á skyndidauða hjá mönnum með háan styrk langra omega-3 fitusýra í blóði var aðeins 10% af samsvarandi áhættu hjá mönnum með lágan styrk (12). Skyndidauði á sér oftast stað í kjölfarið á hjartsláttartruflunum og því er almennt talið að omega-3 fitusýrur miðli sínum hjartaverndandi áhrifum með því að hindra þær (11). Talið er að hlutfall omega-3 og omega-6 fitusýra spili stærsta þáttinn í hjartaverndandi áhrifum (13). Eins og áður hefur komið fram er  $\omega$ -6 fitusýran arakíðonsýra mynduð með lengingu og afmettun línólsýru en  $\omega$ -3 fitusýrurnar DHA og EPA myndaðar með lengingu og afmettun  $\alpha$ -línólen sýru. Línólsýra er algengasta FÓFS í vestrænu fæði (5) og því eru omega-6 fitusýrur í miklum meirihluta

fjölómettaðra fitusýra í fæði vestrænna ríkja. Til að mynda er hlutfall  $\omega$ -6/ $\omega$ -3  $\geq$  15:1 í Bandaríkjunum, þegar betra hlutfall væri nær 1:1. Ástæðan fyrir því að jafnvægi í inntöku þessara fitusýra er æskilegt, er að þær keppa um sama ensímkerfið sem myndar lengri, ómettaðri og virkari fitusýrur. Þær keppa einnig um cyclooxygenasa (COX) og lípóoxýgenasa (LOX) sem taka þátt í myndun prostaglandína og leukótríena sem miðla ýmiss konar frumuvirkni sem er mikilvæg fyrir virkni hjarta- og æðakerfisins. Þar má nefna víkkun og herpingu æða, bólgusvörun og blóðstorknun. Þessi samkeppni ákvarðar því hvaða lífeðlisfræðilegu áhrif verða ríkjandi. Omega-6 fitusýrur valda breytingum á magni lípíða og lípópróteina í blóði, meðal annars með lækkun á hlutfalli „vonda kólesterólsins“ (LDL) miðað við „góða kólesterólið“ (HDL), á meðan omega-3 fitusýrur hafa verndandi áhrif gegn hjartsláttartruflunum. Eikósanóíð afleidd af omega-6 fitusýrunni arakídónsýru valda bólgusvörun og blóðkekkjamyndun. Omega-3 fitusýruafleiður hindra eða draga úr þessum viðbrögðum með samkeppni við omega-6 fitusýrur (6) (mynd 2).



*Mynd 2: Áhrif omega-6 fitusýrunnar arakídónsýru og omega-3 fitusýranna EPA og DHA á bólgur, blóðstorknun, hjartslátt og æðavídd og samskipti þeirra á milli (13).*

### 1.2.3 Mögulegar ástæður gagnsemi $\omega$ -3 fitusýra

Ýmsar mögulegar skýringar hafa verið settar fram á verndandi áhrifum omega-3 fitusýra gagnvart hjartsláttartruflunum. Tengjast þær meðal annars byggingareiginleikum, efnaskiptum, ósjálfráða taugakerfinu og rafeðlisfræði. Bygging omega-3 fitusýra líkist byggingu annarra sameinda sem hafa verndandi áhrif gegn hjartsláttartruflunum. Fitusýrur eru einnig helsti orkugjafi hjartans og eru omega-3 fitusýrur bundnar við geymslutríglýseríð á slíkan hátt að auðveldara er fyrir lípasa að losa þær en aðrar gerðir fitusýra og svar við þörf verður þar af leiðandi fljótara en ella (10). Auk þessa hafa rannsóknir sýnt fram á bein áhrif omega-3 fitusýra á spennustýrð natríumgöng sem og L-kalsíumgöng, sem stjórna samdrætti í hjarta (14). Hluti áhrifanna felst líklega í því að omega-3 fitusýrur komast almennt inn í himnur og geta einnig breytt hlutfalli fitusýra í himnuflekum, til dæmis í brjóstakrabbameinsfrumum (15), T-eitilfrumum (16) og hjarta (17).

Almennt er talið að verndandi áhrif omega-3 fitusýra gegn hjartasjúkdómum eigi sér stað annað hvort með breytingum á samsetningu fituefna í plasma og/eða æðavef eða með beinum áhrifum á rafeðlisfræði hjartavöðvafrumnanna. Rannsóknir á lifandi dýrum sem fá ákveðið fæði styðja fyrri útskýringuna en rannsóknir á einangruðum dýrahjörtum og fósturhjartafrumum í rækt styðja þá seinni. Sennilega eru báðir þessir þættir að verki (5). Virðist vera sem fitusýrur þurfi að komast inn í frumuhimnur svo að svörun fái við meðferðum með fiskiolú. Því tekur tíma fyrir áhrifin að koma fram og niðurstöður rannsókna sem taka of stuttan tíma eða notast við of lítið magn fiskiolú þar með gjarnan ómarktækar. Líklegt þykir að áhrif hjartsláttartruflana séu sterkari þegar þær eru af völdum virknibreytinga, þar sem boðferli breytir rafeiginleikum frumunnar og/eða ósjálfráðri stjórn hennar, fremur en af völdum beinna líkamlegra breytinga eða áverka (10).

### 1.2.4 Ósamræmi í áhrifum $\omega$ -3 fitusýra á hjartað

Eins og áður hefur komið fram hafa fjölmargar rannsóknir gefið til kynna hagstæð áhrif omega-3 fitusýra og neyslu á feitum fiski. Nægir þar að nefna jákvæð áhrif þeirra á lífslíkur sjúklinga sem fengið hafa hjartaáfall. Hins vegar hafa komið fram rannsóknir sem benda til þveröfugra áhrifa. Omega-3 fitusýrur virðast auka dánartíðni og hjartsláttartruflanir hjá sjúklingum með suma hjartasjúkdóma (11). Rannsókn á 3114 karlmönnum sem þjáðust af hjartaöng í Suður Wales leiddi til dæmis í ljós auknar líkur á skyndidauða hjá þeim sem fengu feitan fisk miðað við samanburðarhóp (18). Rannsóknir á lyfjum gegn hjartsláttartruflunum hafa einnig gefið misvísandi niðurstöður. Helsta ástæða þess er að lyf sem bæla eina gerð hjartsláttartruflana geta örvað aðra. Þarf einnig að skoða áhrif omega-3 fitusýra á hjartað með

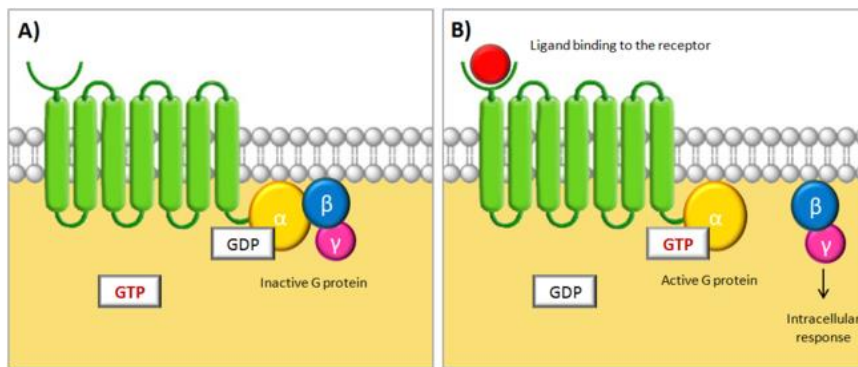
tilliti til þess (11). Oft liggja mismunandi ferlar að baki hjartsláttartruflunum. Er þeim venjulega skipt í tvo flokka, annars vegar galla í umskautun sem trufla virknispennu í rafkerfi hjartans og hins vegar rafboð sem eru síendurtekin í stað þess að stöðvast. Hjartsláttartruflanir í hjartabilun eru af völdum fyrri flokksins en hjartsláttartruflanir vegna blóðþurrðar í hjarta (myocardial ischemia) vegna þess seinni. Því gæti aðferð sem miðar að því að hindra hjartsláttartruflanir í sjúklingi með hjartabilun haft þveröfug áhrif í sjúklingi með blóðþurrð í hjarta. Gildir þetta einnig um omega-3 fitusýrur. Raunar benda rannsóknir til þess að þær hafi góð áhrif á fyrri flokkinn (truflaða virknispennu) en slæm á þann seinni (síendurtekin rafboð) (11). Við rannsóknir á hagstæðum áhrif omega-3 fitusýra á heilsu hjartans og ráðgjöf á inntöku þeirra skal hafa í huga mismunandi ferla sem liggja að baki heilsufarskvillum mismunandi sjúklinga og skoða meðferðir á móti bakgrunni þessa mismunandi ferla og viðeigandi breyta (11).

## 1.3 $\beta$ -adrenergir viðtakar

### 1.3.1 G-prótein tengdir viðtakar (GPCRs)

G-prótein tengdir viðtakar (GPCRs) mynda stærstu fjölskyldu frumuyfirborðsviðtaka og eru til staðar í öllum heilkjörnungum. Þeir miðla flestum viðbrögðum frumunnar við utanaðkomandi merkjum, svo sem hormónum og taugaboðefnum. Eru þeir ábyrgir fyrir sjón-, bragð- og lyktarskyni. Um helmingur lyfja með þekkta virkni verka gegnum GPCRs eða boðferlana sem þeir virkja. Þrátt fyrir mjög víðtæka virkni hafa allir GPCRs svipaða byggingu. Samanstanda þeir af einni fjölpeptíðkeðju sem þræðir sig sjö sinnum fram og aftur í gegnum frumuhimnuna.

Eins og nafnið gefur til kynna miðla allir GPCRs virkni sinni gegnum GTP-bindiprótein, eða G-prótein, sem bundin eru umfrymishlið frumuhimnunnar. Eru þau gerð úr þremur undireiningum,  $\alpha$ ,  $\beta$  og  $\gamma$ . Í óörvuðu ástandi er  $\alpha$ -einingin bundin GDP og G-próteinið óvirkt. Ef boðsameind binst GPCR virkjast hann og hvetur  $\alpha$ -eininguna til að sleppa GDP svo GTP getur bundist í staðinn. Við bindingu GTP verður mikil byggingarleg breyting (conformational change) í G-próteininu svo það virkjast.  $\alpha$ -einingin losnar frá  $\beta\gamma$ -einingunni og miðlar boðum með áhrifum á virkni innanfrumusameinda, eins og adenýlýl cýclasa, fosfólípasa og jónagöng (mynd 3). Virkni þeirra stjórnar svo myndun 2. stigs boðsameinda sem hvata frumuviðbrögð með því að virkja mismunandi boðferla. Eitt dæmi um slíka sameind er cAMP.



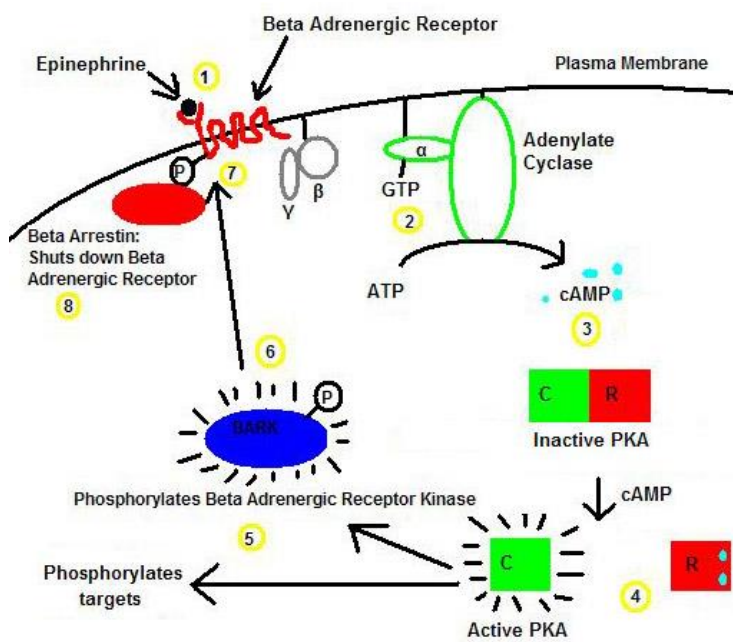
**Mynd 3: Virkjun G-prótein tengds viðtaka með bindingu tengils (19).** (A) G-próteinið sem tengist viðtakanum skiptist í þrjár undireiningar,  $\alpha$ ,  $\beta$  og  $\gamma$ . Í óörvuðu ástandi er  $\alpha$ -einingin bundin GDP og G-próteinið óvirkt. (B) Þegar boðsameind binst viðtakanum virkjust hann,  $\alpha$ -einingin sleppir GDP og binst GTP í staðinn, losnar frá og hvatar boðferli með áhrifum á innanfrumusameindir.

### 1.3.2 Adrenergir viðtakar

Adrenergir viðtakar eru G-prótein tengdir viðtakar. Þeir skiptast í tvo aðalhöpa, þ.e.  $\alpha$ - og  $\beta$ -adrenergir viðtaka.  $\alpha$ -adrenergir viðtakar skiptast í tvo undirflokka (1 og 2) og  $\beta$  í þrjá undirflokka (1,2 og 3). Þessar mismunandi gerðir tengjast mismunandi gerðum G-próteina. Í heilbrigðum hjartavöðva í manni er hlutfall  $\beta$ - og  $\alpha$ -adrenergir viðtaka 10:1 og enn fremur er  $\beta_1$ -undirgerðin 75-80% af heildarfjölda  $\beta$ -adrenergir viðtaka (20).  $\beta_1$ -adrenergir viðtakar eru ráðandi í hjartavöðva og heilaberki en  $\beta_2$ -viðtakar í lungum og hnykli (21). Helsta hlutverk  $\beta$ -adrenergir viðtaka í hjarta er stjórn á hraða hjartsláttar og samdrætti hjartavöðva í kjölfar bindingar noradrenalíns og adrenalíns við viðtakana. Við bindingu kúpla viðtakarnir við svokallað örvandi G-prótein, eða  $G_s$ , sem virkjar adenýlýl cýclasa. Adenýlýl cýclasi hvatar myndun 2. stigs boðfnisins cAMP úr ATP sem virkjar loks prótein kínasa A (PKA). PKA fosfórýlerar ýmis frumuprótein, sem leiðir loks til aukins styrk á fríu  $Ca^{2+}$  inni í frumunni og hefur þar með mikil áhrif á samdrátt hjartavöðva. Meðal helstu marksameinda PKA fosfórýleringar í hjartavöðvanum eru L-type kalsíumgöng, sem auka flæði  $Ca^{2+}$  inn í umfrymið, og phospholamban (PLB). Fosfórýlering PKA á PLB kemur í veg fyrir hindrun þess á  $Ca^{2+}$ -ATPasa sem sér um að pumpa  $Ca^{2+}$  inn í frymisnetið. Þar með flýtir PKA fyrir endurupptöku  $Ca^{2+}$  af frymisnetinu eftir samdrátt og eykur birgðir  $Ca^{2+}$  í frymisneti fyrir næsta samdrátt. Þannig styttist slökunartími hjartavöðvans og samdráttartíðni eykst (22).

Auk frumupróteina fosfórýlerar PKA einnig  $\beta$ -adrenergir viðtakann sjálfan. Með því er dregið úr virkni viðtakans með svokallaðri afnæmingu. Felur hún ýmist í sér frákúplun frá viðkomandi G-próteinum eða innfrumun og fækkun viðtakanna. Er þetta nauðsynlegt stjórnferli til að takmarka styrk GPCR merkja og koma frumunni aftur í óvirkjað ástand.

Mætti líkja þessu við neikvæða afturvirkni (negative feedback) (23). Fosfórýling á  $\beta$ -adrenergum viðtökum af PKA er blendin (heterologous), eða viðtakaörva-ósértæk (non-agonist-specific), þ.e. hún getur átt sér stað jafnvel þótt viðtakinn sé ekki bundinn örva (agonist). Afnámingu er einnig gjarnan miðlað af meðlimum GPCR kínasa (GRK) fjölskyldunnar. GRK fosfórýlera aðeins GPCRs sem tengdir eru viðtakaörva. Helsti GRK sem verkar í hjarta er  $\beta$ -ARK1 (GRK2). Fosfórýling GRK á GPCR tengdum viðtakaörva eykur sækni viðtakans í samskipti við umfrymisprótein sem kallast  $\beta$ -arrestin. Þau bindast viðtakanum, hindra frekari G-prótein kúplun og stöðva þar með boðferlið (mynd 4) (20). Auk þess draga þau að fosfódíesterasa (PDE) ensím sem brjóta niður cAMP (24). Auk frákúplunar má bæla svar GPCR með fækkun viðtaka á frumuyfirborði (downregulation), sem lýsir sér með minnkaðri nýmyndun viðtaka, innfrumun þeirra eða afstöðgun á mRNA þeirra. Tekur slík stjórnun mun lengri tíma en frákúplun, eða nokkrar klukkustundir (20).



**Mynd 4: Virkjun, boðferli og afnáming  $\beta$ -adrenergra viðtaka.** (1) Adrenalín (epinephrine) binst  $\beta$ -adrenergum viðtaka. (2) Bindingin virkjar G-prótein og  $\alpha$ -eining þess losnar frá og virkjar adenýlýl cýclasa. (3) Virkjun adenýlýl cýclasa veldur myndun cAMP úr ATP. (4) cAMP rýfur hvötunareiningu PKA (C) frá stjórneiningunni (R) og virkjar þar með kínasann. (5) PKA fosfórýlarar ýmsar marksameindir. (6) Ein marksameinda PKA er  $\beta$ -adrenergic receptor kinase, eða  $\beta$ -ARK. (7)  $\beta$ -ARK fosfórýlarar G-prótein tengda viðtakann sem örvaður var í upphafi. (8)  $\beta$ -Arrestín fær sækni í fosfórýleraðan GPCR, binst honum og afnáemir hann, þ.e. slekkur á virkni hans. (25)



### 1.3.3 Hlutverk $\beta$ -adrenergra viðtaka í hjarta

Virgni  $\beta$ -adrenergra viðtaka kemur mjög við sögu í starfsemi hjartans þar sem sympatíska taugakerfið hefur margvísleg áhrif á hana. Meðal annars eykur það tíðni og kraft samdráttá hjartans og miðlar þessum áhrifum meðal annars með losun katekólamína, eins og adrenalíns og noradrenalíns. Eins og komið hefur fram bindast katekólamín  $\beta$ -adrenergum viðtökum og örva með því innanfrumiferli sem eykur afköst hjartans. Sympatíska taugakerfið er því virkast við áreynslu. Bilað hjarta hefur mjög skerta samdráttarhæfni og dælir ekki nægu blóði um líkamann. Í von um að bæta ástandið eykur sympatíska taugakerfið virkni sína. Eykst þá magn katekólamína í blóði og jafnframt binding þeirra við  $\beta$ -adrenerga viðtaka. Kemur örvunin af stað boðum sem miðla bættum afköstum hjartans (26). Sé ofvirkni sympatíska taugakerfisins hins vegar viðvarandi bregðast viðtakarnir við með afnæmingu svo þeim fækkar. Eitt helsta einkenni krónískra hjartasjúkdóma er þar með minnkuð svörun  $\beta$ -adrenergra viðtaka við tenglum sínum. Tjáning  $\beta_1$ -adrenergra viðtaka á mRNA- og próteinstigi minnkar markvisst en tjáning  $\beta$ -ARK eykst. Virkni PKA breytist þó ekki, þar sem hún er ekki háð bindingu viðtakaörva eins og katekólamína við viðtakana (23). Með þessum varnarviðbrögðum hjartans verður ástandið því enn verra en áður.

Vel þekkt og áhrifarík meðferð gegn hjartasjúkdómum og háum blóðþrýstingi er notkun lyfja sem kallast  $\beta$ -blokkarar. Slík lyf bindast  $\beta$ -adrenergum viðtökum án þess að örva þá en hindra þess í stað aðkomu katekólamína og annarra tengla (20). Notkun  $\beta$ -blokkara gæti þótt mótsagnakennd í meðhöndlun hjartasjúkdóma, þar sem  $\beta$ -adrenergir viðtakar eru nauðsynlegir hjartanu, sérstaklega við álag. Raunin er sú að með því að koma í veg fyrir örvun  $\beta$ -adrenergra viðtaka koma  $\beta$ -blokkarar jafnframt í veg fyrir afnæmingu og fækkun viðtakanna. Í hjartasjúkdómum gerir afnæming viðtakanna það að verkum að þegar kerfið þarf að láta til sín taka, eins og við stress eða álag, eru ekki nógu margir viðtakar til staðar til að örva og er þá voðinn vís. Með notkun  $\beta$ -blokkara helst kerfið í jafnvægi og þrátt fyrir að örvun viðtakanna sé torveldari þá eru þeir til staðar og katekólamínörvun er möguleg í neyðaraðstæðum (20).

## 1.4 Tengsl omega-3 fitusýra og adrenergra viðtaka

Þar sem  $\beta$ -adrenergir viðtakar eru einir helstu áhrifavaldarnir í heilsu hjartans og  $\omega$ -3 fitusýrur eru þekktar fyrir góð áhrif sín á hjartað er eðlilegt að upp vakni spurningar um hvort  $\omega$ -3 fitusýrur miðli einhverjum af sínum heilsuþætti áhrifum í gegnum  $\beta$ -adrenerga viðtaka.

Lengi hefur verið vitað að adrenergir viðtakar hafa áhrif á lípíðsamsetningu frumunnar. Til dæmis hefur komið í ljós að endurtekin örvun þeirra með adrenalíni í hjartavöðvafrumum í rottum dregur úr magni línólsýru en eykur magn arakíðonsýru í fosfatídýlkólíni og magn DHA í fosfatídýletanolamíni (27). Einnig hefur komið í ljós að DHA í æti er innlimað í frumuhimnur stjarnfrumna úr rottuheila og eykur fjölda  $\beta$ -adrenergra viðtaka miðað við ómeðhöndlaðar samanburðarfrumur. Örvun viðtakanna með ísópróteneróli hvatar aukna sérhæfingu og þroskun stjarnfrumnanna (28). Ennfremur hefur komið í ljós að DHA og EPA hindra hvötunareiningu PKA *in vitro*. Omega-6 fitusýrur hindra hana einnig, en ekki eins mikið. Virðist vera sem omega-3 tengið sé lykilatriði í hindrun PKA (29). Aftur á móti bendir önnur rannsókn til þess að  $\omega$ -3 fitusýrur í fæði hafi einungis áhrif á samdráttarkraft hjartavöðvans (inotropy) í gegnum  $\alpha$ -adrenergra viðtaka en ekki  $\beta$ -adrenergra viðtaka (30).

Ljóst er að  $\omega$ -3 fitusýrur og  $\beta$ -adrenergir viðtakar taka þátt í mikilvægum ferlum er tengjast hjartanu og heilsu þess. Til er aragrúi rannsókna sem fjalla um annan hvorn þessara þátta en lítið hefur verið fjallað um tengsl þessara þátta. Heimildaleit skilar litlu meira en þeim fáu rannsóknum sem fjallað er um hér fyrir ofan. Er vonandi að úr þessum tengslum verði bætt á komandi árum, því möguleikarnir eru margir.

## 1.5 HEK frumur og frumuræktun

Fyrsta ákvörðun sem taka þarf þegar vinna á með frumur er hvort notast skuli við ferskar frumur eða frumulínur. Ferskar frumur eru nýjar, þær eru einangraðar beint úr vefjabút með hefðbundnum aðferðum. Ræktunartími þeirra er takmarkaður. Aðeins er hægt að umsá þeim 5-10 sinnum áður en þær hætta að vaxa en skýrist það af styttingu telómera, eða litningaenda. Styttast þeir um 100-300 bp í hverri frumuskiptingu og valda of stuttir litningaendar stýrðum frumudauða. Til að leysa þetta vandamál og framlengja ræktunartíma má mynda frumulínur. Þær má útbúa á ýmsan máta. Upphaflega aðferðin felst í því að einangra frumurnar einfaldlega úr krabbameinsæxli sjúklings. Einnig er hægt að nota *hybridoma* tæknina sem venjulega er notuð í framleiðslu einstofna mótefna, þar sem mótefnisfrumu er sprautað saman við æxlisfrumu og blendingarnir ræktaðir upp. Auk þess er hægt að slökkva á frumuhingspróteinum eins og p53 eða Rb eða jafnvel kveikja beint á TERT, hvötunareiningu telómerasa, með retroveiruinnskoti á genið. Með þessum hætti má fá frumulínur sem fjölga sér og eru ræktaðar í langan tíma, jafnvel mörg ár eða áratugi. Vegna stökkbreytinganna sem gera frumulínur ódauðlegar og lengdar ræktunartíma er lífeðlisfræði þeirra gjarnan langt frá uppruninum og ólík frumum *in vivo*. Hins vegar fást mun einsleitari niðurstöður með frumulínunum en ferskum frumum þar sem ferskar frumur úr tveimur sjúklingum geta hagað sér

á mismunandi hátt í rækt eftir erfðum og aldri einstaklinganna, auk þess sem einkenni þeirra breytast mjög með hverri umsáningu. Því er mun einfaldara að gera samanburðarrannsóknir með frumulínum en ferskum frumum. Sama frumulínan á að virka alveg eins, óháð rannsóknarstofu. Frumulínur eru þægilegar í notkun og fjölga sér afar hratt og eru því kjörnar til rannsókna á almennum boðferlum. Til eru hundruð mismunandi frumulína úr mönnum og öðrum dýrum.

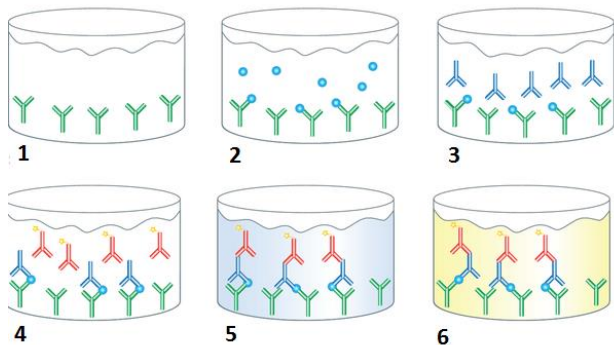
HEK293 (Human Embryonic Kidney) frumur eru notaðar í þessu verkefni. Þær voru upphaflega nýrnafrumur úr fóstri sem voru einangraðar og ræktaðar. Voru frumurnar gerðar ódauðlegar með ummyndun þar sem 4,5 kB bútur úr genamengi skerts (sheared) adenóvírus 5 (Ad5) var innlimaður í litning 19 í HEK frumunum. Línan var ræktuð af vísindamönnum Alex Van der Eb og Frank Graham við háskólann í Leiden, Hollandi, snemma á áttunda áratugnum (31).

Rannsóknir hafa leitt í ljós að HEK293 frumurnar bera ekki nafn með rentu. Svipar þeim mjög til taugafrumna, hvað varðar mRNA og próteintjáningu. Hvernig getur mögulega staðið á því? Ein tilgáta er sú að Ad5 hafi frekar tilhneigingu til að ummynda taugafrumur en aðrar frumur líkamans (32). Til stuðnings þessum rökum má benda á að upprunaleg ummyndun HEK frumna með skertum Ad5 var afar árangurslítill. Tókst aðeins að mynda tvær ummyndaðar kólóníur í yfir 150 tilraunum (33). Aðrar tilraunir hafa leitt í ljós að ummyndun taugafrumna með adenóvírus getur orðið 100 sinnum áhrifaríkari en ummyndun HEK frumna. Eins og rannsóknir á blendingum hænu og kornhænu hafa sýnt þá ferðast taugakambsfrumur (neural crest cells) um allt fóstrið í þroskun og enda meðal annars í nýrunum. Sýnt hefur verið fram á að þessar frumur verði að undirflokki bandvefsfrumna (stromal cells) í rottufóstri sem hafa eiginleika taugafrumna, en deyi síðar í þroskun með apoptósu. Þær eru því horfnar eða sjaldgæfar í þroskuðum nýrum (32). Bendir því ýmislegt til þess að ummyndun Frank Graham á HEK frumunum hafi einungis virkað á taugafrumur fóstursins og því sé HEK293 frumulínan svo undarleg sem raun ber vitni.

HEK293 frumur eru nytsamlegar til ýmiss konar rannsókna. Ekki aðeins vaxa þær mjög hratt og veita áreiðanlegar niðurstöður heldur tjá þær alls kyns prótein og viðtaka, sem kjörið er fyrir rannsóknir á boðferlum. Til dæmis tjá þær bæði  $\alpha_2$ - og  $\beta_2$ -adrenerga viðtaka (34), sem er grundvöllur þessa verkefnis.

## 1.6 Enzyme Linked Immunosorbent Assay – ELISA

ELISA er mikil notuð aðferð í margvíslegum tilgangi, til að mynda gæðastjórnun, sjúkdómsgreiningum og til auðkenninga og magngreininga á mótefnum eða mótefnavökum í vísindarannsóknum. Aðferðin nýtir sértæka bindingu mótefna við mótefnisvaka til að greina afar lítið magn af próteinum, peptíðum, hormónum eða mótefnum í sýnisvökva. Sameindin í sýnisvökvanum sem greina á er kyrrsett, yfirleitt á 96 brunna plötu, ýmist sértækt eða ósértækt. Þegar sameindin hefur bundist í brunnana er mótefni bætt við sem þekkir sameindina og binst henni sértækt. Ýmist er þetta mótefni tengt ensími eða numið sjálf með öðru mótefni sem tengt er ensími. Loks er litmyndandi (chromogenic) hvarfefni fyrir ensímið bætt við en ensímið binst því og hvarar litarbreytingu sem hægt er að mæla í ljósmæli. Magn sameindar sem greina skal í sýnisvökva er hægt að reikna beint út frá gleypni í sýninu. Til að hindra ósértæka bindingu er ELISA platan þvegin á milli skrefa. Ferlið er útskýrt á mynd 5 (35).



**Mynd 5: ELISA.** (1) Mótefni sem þekkir mótefnisvakann sem greina skal er látið festast á botni brunns á mæliplötu. (2) Sýnisvökva er bætt ofan í brunninn og binding fer fram milli mótefnis í brunninum og mótefnisvakans í sýninu sem greina skal. (3) Óbundnir mótefnisvakar eru þvegnir af plötunni og annars stigs mótefni er bætt við, sem þekkir og binst mótefnisvakanum. (4) Óbundin annars stigs mótefni eru þvegin í burtu og ensímtengdu mótefni sem þekkir annars stigs mótefnið er bætt við. (5) Óbundin ensímtengd mótefni eru þvegin í burtu og litmyndandi hvarfefni (chromogen) er bætt við sem hvarfast við ensímið. (6) Hvarfið er stöðvað og gleypni er mæld. Gleypni er í réttu hlutfalli við magn mótefnisvaka í sýninu (36).

Til eru nokkrar gerðir af ELISA en sú sem notuð er í þessu verkefni kallast samkeppnis ELISA. Algengt er að nota þessa aðferð þegar sameindin sem greina skal er lítil og hefur

aðeins einn bindistað fyrir mótefni sitt. Byggist aðferðin ýmist á samkeppni mótefnisvaka í sýni og sama mótefnisvaka sem kyrrsettur er í brunna á mæliplötu við sértækt ensímtengt mótefni, eða á samkeppni mótefnisvaka í sýni og samskonar ensímtengds mótefnisvaka um bindingu við kyrrsett mótefni. Í seinna tilvikinu, sem notað er í þessu verkefni, er ensímtengda mótefnisvakanum blandað við sýnisvökvann og samkeppni um bindingu við kyrrsetta mótefnið leyft að eiga sér stað í nokkurn tíma. Því meira sem er af mótefnisvakanum í sýninu, því minna af ensímtengda mótefnisvakanum getur bundist við kyrrsetta mótefnið. Að inkúberingu lokinni eru brunnarnir þvegnir vel svo óbundnir mótefnisvakar fara í burtu. Þegar hvarfefni fyrir ensímið sem tengt er samkeppnis mótefnisvakanum er bætt við verður litarbreytingin í öfugu hlutfalli við magn mótefnisvaka í sýninu. Því meira sem er af mótefnisvakanum í sýninu, því minna er til staðar af ensími til að hvata litarbreytingu hvarfefnisins, og því verður minni litarbreyting en ella. Niðurstöður verða því öfugsúnar en þó afar nákvæmar (35, 37).



## 2. Efni og aðferðir

### 2.1 Frumur og frumuræktun

Öll vinna við frumurækt fór fram við sterílar aðstæður. HEK293 frumur frá ATCC, Manassas, Virginíu, voru fengnar hjá læknadeild Háskóla Íslands og ræktaðar í DMEM æti frá Gibco með 10% FBS frá Life Technologies í ræktunarflöskum frá Nunc með 25 cm<sup>2</sup> ræktunarfleti og filter. Á tveggja til þriggja daga fresti, þegar frumurnar voru orðnar þéttar á ræktunarfletinum, var þeim skipt upp, eða umsáð. Ætið var tekið ofan af frumunum og þær skolaðar með PBS. Frumurnar voru næst losaðar af yfirborðinu með því að inkúbera þær í þrjár mínútur við 37°C með 1 mL af trypsíni (0,25%, sterílfiltrað frá Sigma). Þá var 5 mL af æti bætt ofan í flöskuna og frumurnar spunnar niður í skilvindu við 2000g í 3 mínútur. Ætið var tekið ofan af og 5 mL af nýju æti settir saman við til að stöðva trypsínvirknina. Frumunum var blandað saman við ætið með því að sjúga upp og niður með pípettu. 0,5 mL af þessari lausn var blandað við 4,5 mL af æti í nýrri ræktunarflösku sem sett var í hitaskáp.

Þremur dögum fyrir mælingu var frumunum sáð í Poly-D-lýsín húðaða 96 holu bakka, frá Sigma. Þá var frumunum skipt upp með hefðbundnum hætti og 20 µL af frumulausninni blandað við 30 µL af PBS og 50 µL af 0,4% tryphan blue frá Sigma. Þessari lausn var komið fyrir á talningargleri frá Fuchs-Rosenthal (0,200 mm að dýpt, 0,0625 mm<sup>2</sup>) og frumurnar taldar í smásjá. Út frá þeirri talningu var reiknað hversu margar frumur væru í hverjum µL af frumulausn. Magn frumulausnar sem samsvaraði 10.000 frumum var sett í hverja holu á 96 holu bakkanum og fyllt upp að 200 µL með æti.

### 2.2 Fitusýrur

Dókósaheksaensýra (DHA, Sigma, ≥98%) var leyst upp í 98% etanóli svo styrkurinn varð 0,1 M. Fitusýran var í glerampúlu sem var brotin og etanólinu bætt beint ofan í. Glösunum var haldið lokuðum með parafilmu á meðan verið var að leysa upp. Fitusýrulausninni var skipt niður í lítil Eppendorf glös, 24 µL í hvert. Blásið var yfir hvert glas með nitri til að forðast oxun og glösin svo vafin með parafilm og geymd við -20°C.

Low endotoxin BSA (Bovine Serum Albumin) (Sigma, ≥96%) var leyst upp í PBS (lokastyrkur 10%, 100 mg/mL) við 37°C í 21 klukkustund. Þessi lausn var inkúberuð með hverri fitusýru fyrir sig í hlutföllunum 1:3, þ.e. 8 µL af 10% BSA og 24 µL af fitusýrulausn,

svo eitt glas af 0,1 M fitusýrulausn var notað í hvert skipti. Hin nýja fitusýrulausn var 75 mM. Daginn eftir að frumunum var sáð í 96 holu bakka, var þessari lausn blandað saman við frumuæti svo lokastyrkur fitusýra var 50  $\mu$ M. Venjulega ætið var tekið ofan af frumunum í 96 holu bakkanum og 200  $\mu$ L af fitusýruæti settir í hvern brunn í staðinn. Fitusýruætið var látið liggja á frumunum í tvo sólarhringa. Viðmiðunarfrumur fengu æti með eins blöndu þar sem fitusýruna vantaði.

## 2.3 Örvun

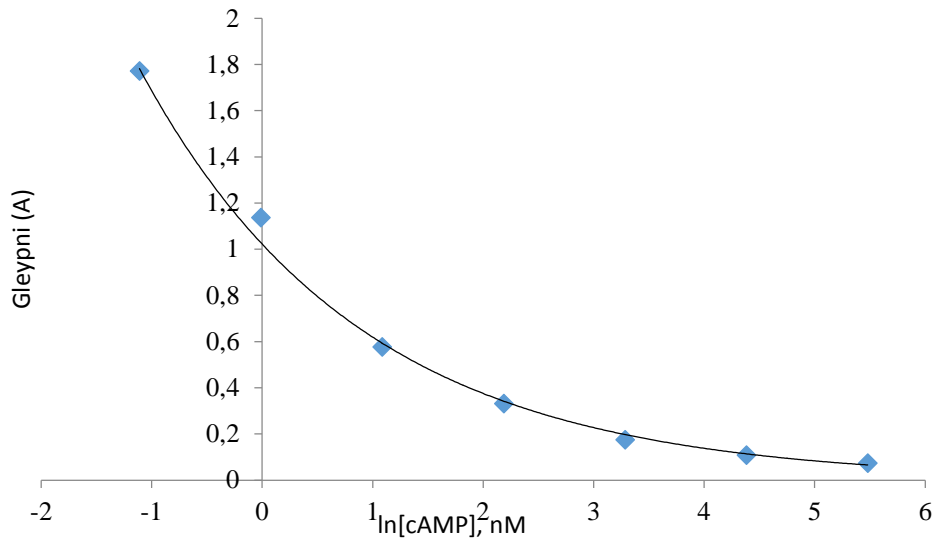
Viðkomandi æti var tekið rólega af frumunum og æti (DMEM) án sermis með 0,5 mM IBMX (3-ísóbútyl-1-metýlxanthín, Sigma,  $\geq 99\%$ ) sett varlega á í staðinn og inkúberað í 30 mínútur. Því næst var örvað í 5 mínútur með DL-isoproterenol hydrochloride frá Sigma. Að því loknu var ætið tekið ofan af hægt og rólega og frumurnar sprengdar með 100  $\mu$ L í hvern brunn af *Cell Lysis Buffer* (frumurofsbúffer) úr *Cyclic AMP XP® Assay Kit* (Cell Signaling, nr. 4339). Búið var að þynna Cell lysis buffer úr 10x í 1x með Milli-Q vatni auk þess sem 10  $\mu$ M PMSF var bætt út í. 96 holu bakkinn var settur á ís í 10-15 mínútur.

## 2.4 Mæling á styrk cAMP með ELISA

Undirbúningur og mæling sýna og staðallausna fór fram samkvæmt leiðbeiningum í bæklingi sem fylgdi *Cyclic AMP XP® Assay Kit* frá Cell Signaling. Í stuttu máli sagt fór fyrst fram samkeppni milli cAMP í sýnisvökva og *HRP-tengds cAMP* um bindingu við brunna í þrjár klukkustundir. Næst voru óbundnar cAMP sameindir skolaðar burtu með *Wash buffer*. Þá var *TMB súbstrati* bætt við til hvarfs við *HRP-tengt cAMP*. Eftir þrjátíu mínútur var hvarfið stöðvað með STOP lausn svo gulur litur myndaðist. Gleypni var mæld í hverjum brunni í ljósmæli við 450 nm.

Útbúið var graf þar sem gleypni staðallausna var fall af náttúrulega logranum af styrk þeirra í nM. Aðfallslína, eða staðallína, var dregin að þessum punktum og jafna hennar nýtt til útreikninga á styrk cAMP í mælilausnum. Mynd 6 sýnir slíka staðallínu. Jafna línunnar er  $y = 1,0219e^{-0,501x}$  þar sem  $y =$  gleypni og  $x = \ln([cAMP])$ . Styrk cAMP í mælilausnum má reikna með því að setja gleypni þeirra inn fyrir  $y$  og leysa fyrir  $x$ . Þá er  $[cAMP] = e^x$ .





**Mynd 6: Dæmi um staðallínu gleypni út frá styrk staðlaðra lausn af cAMP. Gleypni staðallausna er fall af náttúrulega logranum af styrk þeirra í nM. Jafna línunnar er**

$$y = 1,0219e^{-0,501x} \text{ og því er } [\text{cAMP}] = e^{\frac{\ln(\frac{A}{1,0219})}{-0,501}}$$

Úrvinnsla mælinga fór fram í Microsoft Excel og myndir voru búnar til í forritinu GraphPad Prism frá GraphPad Software, Inc.



## 3. Niðurstöður

### 3.1 Aðferðaprófanir

Þar sem mismunandi aðferðir og aðstæður voru prófaðar eru þær tilgreindar fyrir hverja prófun. Í kafla 2.2-2.4 er aðferðum lýst að prófunum loknum.

Í prófun 1 var 50.000 frumum sáð í hvern brunn á venjulegri 96 brunna plötu. Daginn eftir voru sýnin inkúberuð með 1,0 mM IBMX æti eftir að brunnarnir voru skolaðir með PBS og í kjölfarið voru sýnin örvuð með ýmist 1, 5 eða 10  $\mu\text{M}$  ísópróterenóli. Áður en frumurnar voru sprengdar með *Cell lysis buffer* voru brunnarnir aftur skolaðir tvisvar með PBS. Skolanir með PBS voru í samræmi við aðferðarlýsingu sem fylgdi með cAMP assay kittinu. ELISA mæling fór fram eins og lýst er í kafla 2.4 en í frumuvökva sem var geymdur í ísskáp yfir nótt. Niðurstöður fyrstu prófunar má sjá í töflu 1. Þrátt fyrir nokkurn breytileika mældist ágætis virkni og var því haldið áfram með sömu aðferð.

**Tafla 1: Fyrsta prófun.** Gleygni (A) og útreiknaður styrkur cAMP (sjá kafla 2.4) í frumuvökva úr HEK293 frumum eftir örvun  $\beta_2$ -adrenergra viðtaka með ísópróterenóli í mismunandi styrk ( $C_{\text{ísó}}$ ).

$C_{\text{ísó}}$ [ $\mu\text{M}$ ]	A	[cAMP] [nM]
10,0	0,613	2,77
10,0	0,239	18,2
10,0	0,361	7,98
5,00	0,284	12,9
5,00	0,380	7,20
1,00	0,458	4,96
1,00	0,411	6,16
1,00	1,176	0,756

Í prófun 2 fór fram samanburður á því að sá 30.000 eða 50.000 frumum í hvern ræktunarbrunn. Líkt og tafla 2 sýnir mældist mun hærri styrkur cAMP þegar 50.000 frumum var sáð en þó ekki eins mikill og í fyrstu prófun. Auk þess virtist ekkert samræmi milli ísópróterenólstyrks og cAMP styrks. Haldið var áfram með sömu aðferð en reynt var að vanda betur til framkvæmdar til að forðast breytileika í niðurstöðum.

**Tafla 2: Önnur prófun.** Gleypni (A) og útreiknaður styrkur cAMP (sjá kafla 2.4) í frumuvökva úr HEK293 frumum eftir örvun  $\beta_2$ -adrenergra viðtaka með ísópróterenóli í mismunandi styrk ( $C_{isó}$ ). 30.000 frumum var sáð í helming brunnanna og 50.000 frumum í hinn helminginn.

$C_{isó}$ [ $\mu$ M]	A – 50.000 frumur	A – 30.000 frumur	[cAMP] [nM] – 50.000 frumur	[cAMP] [nM] – 30.000 frumur
0,99	0,556	2,727	3,37	0,141
1,48	0,603	1,682	2,87	0,370
1,96	1,059	1,283	0,931	0,635
2,44	0,894	2,232	1,31	0,210
4,76	0,709	1,882	2,07	0,296
6,98	0,762	2,616	1,80	0,153
9,90	0,958	2,616	1,14	0,153
16,7	0,826	2,834	1,53	0,131

Niðurstöður þriðju prófunar má sjá í töflu 3. Voru þær afar slæmar og í kjölfar hennar fóru fram fleiri mælingar þar cAMP framleiðsla mældist lítil sem engin.

**Tafla 3: Þriðja prófun.** Gleypni (A) og útreiknaður styrkur cAMP (sjá kafla 2.4) í frumuvökva úr HEK293 frumum eftir örvun  $\beta_2$ -adrenergra viðtaka með ísópróterenóli í mismunandi styrk ( $C_{isó}$ ).

$C_{isó}$	A	[cAMP] [nM]
0,00	2,523	0,215
0,00	2,458	0,226
0,00	2,491	0,220
0,00	2,555	0,210
0,99	2,445	0,228
0,99	2,218	0,273
0,99	1,043	1,10
2,44	2,459	0,226
2,44	2,395	0,237
2,44	1,605	0,496
5,21	1,609	0,494
5,21	1,644	0,475
5,21	2,06	0,313
9,90	1,902	0,363
9,90	1,399	0,640
9,90	0,886	1,49

Fyrst var talið að frumurnar breyttust með endurteknum skiptingum og misstu getu til að framleiða cAMP. Í prófun 4 voru nýjar frumur teknar upp og örvaðar en styrkur cAMP mældist ekki hærrí.

Í prófun 5 og 6 voru venjulegar HEK293 frumur prófaðar en styrkur cAMP mældist enn lágur. Ákveðið var að nota 0,5 mM IBMX í stað 1,0 mM og miða ísópróterenólstyrk út frá 1  $\mu\text{M}$  í stað 10  $\mu\text{M}$ , í samræmi við mælingar annarra.

Í prófun 7 voru frumurnar skoðaðar í smásjá fyrir og eftir inkúberingu með IBMX. Reyndust frumurnar mjög strjálur í brunnunum. Leiddi þetta til hugmynda um áhrif ætisskipta og skolana á frumurnar.

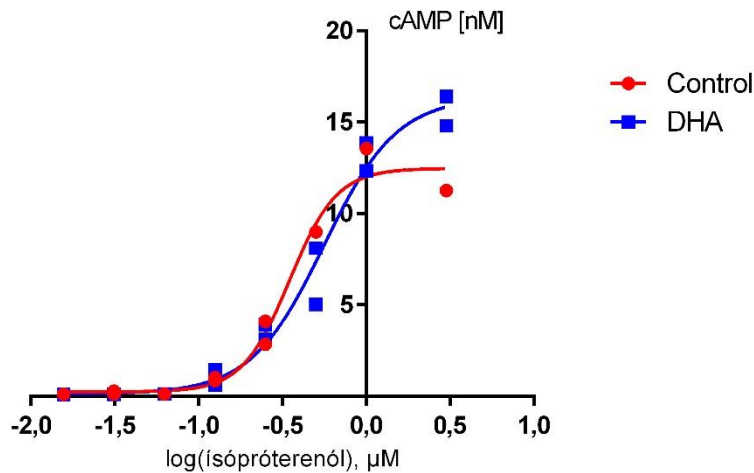
Í prófun 8 voru ýmsar útfærslur á æti og skolunum, hröðum og hægum prófaðar og frumurnar skoðaðar í smásjá eftir hvert skref. Frumurnar virtust losna mjög auðveldlega af ræktunarfletinum, óháð aðferð. Talið var til bóta að sá færri frumum í einu í hvern brunn og jafnvel nota stærri brunna, því of þéttar frumur reiða sig hver á aðra til festingar og losna frekar af yfirborðinu. Kom í ljós að frumurnar festust betur ef færri var sáð og þær fengu að vaxa yfir tvær eða þrjár nætur. Einnig fengust áreiðanlegri cAMP mælingar þegar PBS skolunum var sleppt. Virtist vera sem PBS losaði frumurnar frá botni brunnanna og því var engin furða að cAMP framleiðsla mældist svo lítil sem raun ber vitni.

Eitt ráð til að festa HEK293 frumur betur í ræktunarbrunnum er að húða þá með poly-D-lýsín. Plötur með slíkum brunnum voru notaðar í prófun 9 og gáfu loksins niðurstöður mælinga á styrk cAMP í frumuvökva eins og vonast hafði verið eftir. Var þá hægt að hefja fitusýrutilraunirnar sem fjallað er um í þessu verkefni. Af þeim sökum vannst ekki mikill tími til að eyða í hið raunverulega verkefni og niðurstöður því rýrar.

### **3.2 cAMP mælingar í frumum ræktuðum með og án DHA í æti**

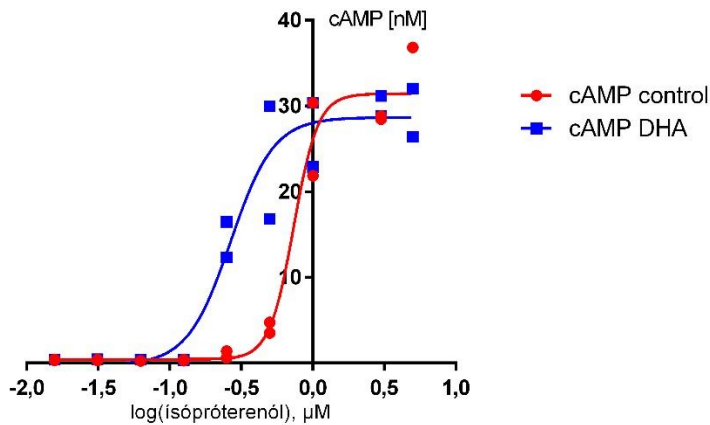
Framleiðsla cAMP eftir örvun með ísópróterenóli var skoðuð í HEK293 frumum sem ræktaðar voru með og án DHA í æti. Í tilraun 1 voru  $\beta_2$ -adrenergir viðtakar þeirra örvaðir með átta mismunandi styrkjum af ísópróterenóli, frá 0,016  $\mu\text{M}$  upp í 3,0  $\mu\text{M}$ , auk þess sem tvö sýni voru óörvuð. Fyrir hvern styrk voru örvaðar frumur í tveimur brunnum á ræktunarplötu nema 0,125  $\mu\text{M}$  en þar voru frumur í þremur brunnum örvaðar. Styrkur á cAMP í frumulausnunum var reiknaður út frá staðalkúrfu samkvæmt kafla 2.4 og metnunarkúrfa útbúin með styrkinn sem fall af logranum af styrk ísópróterenóls. Niðurstöður gleypnimælinga sem voru forsenda þessa útreikninga má sjá í viðauka. Samanburð á metnunarkúrfum frumna sem ræktaðar voru með og án DHA í æti má sjá á mynd 7, þar sem öllum heppnuðum mælipunktum er haldið inni. Útreiknaðan styrk cAMP í frumunum án

örvunar með ísópróterenóli hefði í raun átt að draga frá útreiknuðum styrkjum í örvuðum frumunum til að leiðrétta fyrir grunnvirkni adrenergu viðtakanna. Þar sem grunnstyrkur reyndist afar lítill og niðurstöður voru einungis notaðar til samanburðar á metnunarkúrfum hefðu slíkir útreikningar engu breytt og var því sleppt.



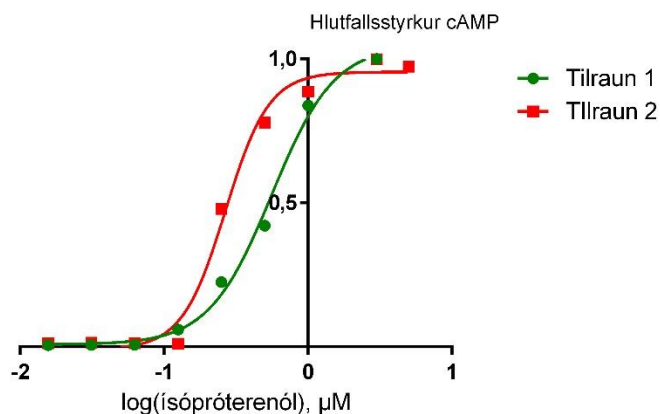
**Mynd 7: Tilraun 1. cAMP framleiðsla (nM) í frumuvökva úr frumum sem ræktaðar voru með 50  $\mu\text{M}$  DHA í æti (DHA) og frumum sem ræktaðar voru án fitusýru í æti (control). Útreiknaður styrkur cAMP (sjá kafla 2.4) er sýndur sem fall af logranum af styrk ísópróterenóls ( $\mu\text{M}$ ) sem notað var til að örva  $\beta_2$ -adrenerga viðtaka í frumunum.**

Mynd 7 gefur til kynna að mögulega hafi frumur sem ræktaðar voru með DHA í æti ekki náð fullri metnun. Í tilraun 2 var því notast við 10 mismunandi styrki af ísópróterenóli, frá 0,0156  $\mu\text{M}$  upp í 10,0  $\mu\text{M}$ , auk óörvaðra sýna. Fyrir hvern ísópróterenólstyrk var örvað í tveimur brunnnum á ræktunarplötu, bæði hjá frumum sem ræktaðar voru með og án DHA í æti. Samanburð á cAMP framleiðslu frumna sem ræktaðar voru með og án DHA í æti má sjá á mynd 8, þar sem öllum heppnuðum mælipunktum er haldið inni. Mæling fyrir 10  $\mu\text{M}$  kom undarlega út og var sleppt. Hæsta mælingin er því við 5,0  $\mu\text{M}$  ísópróterenól.

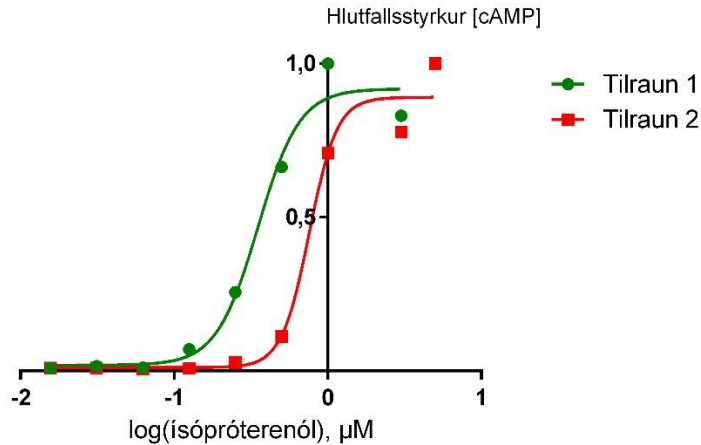


**Mynd 8: Tilraun 2. cAMP framleiðsla (nM) í frumuvökva úr frumum sem ræktaðar voru með 50 μM DHA í æti (DHA) og frumum sem ræktaðar voru án fitusýru í æti (control). Útreiknaður styrkur cAMP (sjá kafla 2.4) er sýndur sem fall af logranum af styrk ísópróterenóls (μM) sem notað var til að örva β<sub>2</sub>-adrenerga viðtaka í frumunum.**

Þar sem fjöldi frumna í ræktunarbrunnnum og þar með hámarksstyrkur cAMP getur aldrei verið nákvæmlega sá sami í tveimur tilraunum er mögulegt að fá betra samræmi þeirra á milli með því að deila í allar mæliniðurstöður með hæsta mælda styrk í hverri tilraun. Samanburð milli tilrauna 1 og 2 á hlutfallsmettunarkúrfum fyrir frumur sem ræktaðar voru með DHA í æti má sjá á mynd 9 og samsvarandi samanburð fyrir viðmiðunarfrumur má sjá á mynd 10.

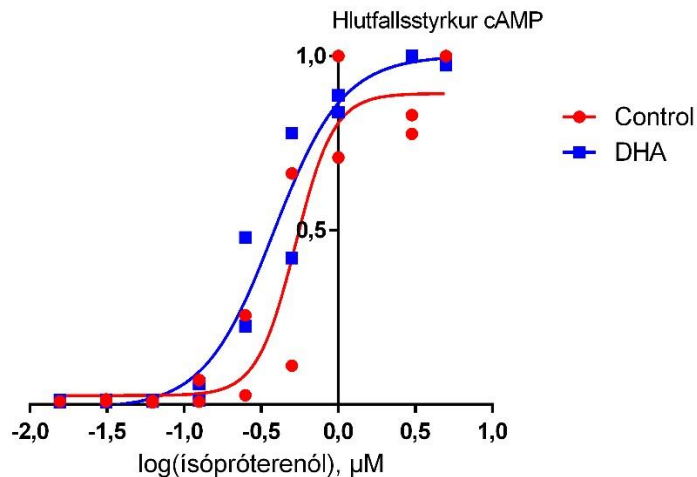


**Mynd 9: Samanburður á mettunarkúrfum cAMP framleiðslu úr tilraun 1 (græn) og tilraun 2 (rauð) fyrir HEK293 frumur sem ræktaðar voru með 50 μM DHA í æti sínu. Hlutfall af hámarks útreiknuðum styrk cAMP (nM) (sjá kafla 2.4) er fall af logranum af styrk ísópróterenóls (μM) sem notað var til að örva β<sub>2</sub>-adrenerga viðtaka frumnanna til framleiðslunnar. Hver punktur er meðaltal tveggja til þriggja mælinga.**



**Mynd 10: Samanburður á mettunarkúrfum cAMP framleiðslu úr tilraun 1 (græn) og tilraun 2 (rauð) fyrir HEK293 frumur sem ræktaðar voru án DHA í æti sínu. Hlutfall af hámarks útreiknuðum styrk cAMP (nM) (sjá kafla 2.4) er fall af logranum af styrk ísópróterenóls ( $\mu\text{M}$ ) sem notað var til að örva  $\beta_2$ -adrenerga viðtaka frumnanna til framleiðslunnar. Hver punktur er meðaltal tveggja til þriggja mælinga.**

Til að samræma niðurstöður tilrauna 1 og 2 er mögulegt að taka saman meðaltalsgildi á hlutfallsstyrk cAMP úr hvorri tilraun fyrir sig og setja saman í graf. Slíkt graf má sjá á mynd 11.



**Mynd 11: Tilraun 1 og 2. cAMP framleiðsla (nM) sem hlutfall af hámarksframleiðslu í frumuvökva úr frumum sem ræktaðar voru með 50  $\mu\text{M}$  DHA í æti (DHA) og án (control). Hlutfall af hámarks útreiknuðum styrk cAMP (nM) (sjá kafla 2.4) er fall af logranum af styrk ísópróterenóls ( $\mu\text{M}$ ) sem notað var til að örva  $\beta_2$ -adrenerga viðtaka frumnanna til framleiðslunnar. Hver punktur er meðaltal mæligilda úr hvorri tilraun fyrir sig.**



Líkt og sjá má á mynd 8 var talsverður breytileiki á styrk cAMP milli frumuhópa við styrkina 0,25  $\mu\text{M}$  og 0,5  $\mu\text{M}$  af ísópróterenóli ( $\log(\text{ísópróterenól})$ ,  $\mu\text{M} = -0,60$  og  $-0,30$  í þessari röð) í tilraun 2. Þriðja tilraunin var því framkvæmd þar sem þessir styrkir voru einungis skoðaðir. Mæld voru fimm sýni með 0,25  $\mu\text{M}$  ísópróterenóli og fjögur með 0,50  $\mu\text{M}$  ísópróterenóli fyrir frumur ræktaðar með DHA í æti annars vegar og án DHA hins vegar. Tafla 4 sýnir meðaltal og staðalfrávik þessara mælinga, ásamt p-gildum sem fengin eru með t-prófi.

**Tafla 4: Tilraun 3.** Meðaltal og staðalfrávik cAMP framleiðslu í HEK293 frumum, ýmist í rækt með eða án DHA, eftir örvun adrenergra viðtaka þeirra með ísópróterenóli. Í aftasta dálkinum má finna p-gildi mælinga fyrir hvorn ísópróterenólstyrk, en það er reiknað með t-prófi.

Ísópróterenólstyrkur [ $\mu\text{M}$ ]	[cAMP] <sub>DHA</sub> [nM]	[cAMP] <sub>viðmiðunarfrumur</sub> [nM]	p-gildi
0,25	20,3 $\pm$ 4,1 (n =5)	19,1 $\pm$ 6,5 (n =5)	0,733
0,50	49,0 $\pm$ 4,6 (n =4)	53,9 $\pm$ 5,4 (n = 4)	0,216

Miðað er við að marktækur munur sé á mælingum ef  $p < 0,05$ . Samkvæmt töflu 1 eru p-gildin fyrir mælingar með 0,25  $\mu\text{M}$  ísópróterenóli sem og 0,50  $\mu\text{M}$  ísópróterenóli mun stærri en 0,05 sem merkir að munur á styrkjum cAMP í frumum án og með DHA við örvun með þessum styrkjum ísóproterenóls er ekki marktækur.



## 4. Umræður

Þegar hefja á nýjar rannsóknir er sjaldnast hægt að ganga beint til verks. Enginn getur séð fyrir alla þá óvæntu hluti og undarlegu niðurstöður sem bíða handan við hornið. Vísindamenn eyða jafnan ómældum tíma í að þróa og bæta aðferðir til að fá sem nothæfastar niðurstöður. Fer gjarnan drýgsti tími rannsókna í slíka vinnu og er þetta verkefni engin undantekning. Oft á tíðum leit út fyrir að ekkert myndi ganga upp en með þolinmæði og þrautseigju tókst að yfirstíga hindranir sem urðu á veginum. Þar sem mestur tími verkefnisins fór í þróun aðferða gafst einungis tími til að gera þrjár almennilegar tilraunir. Því er erfitt að staðfesta nokkuð en þó er hægt að velta vöngum yfir þeim niðurstöðum sem til staðar eru og jafnvel nýta til áframhaldandi rannsókna.

Niðurstöður fyrstu tilraunarinnar sem líta má á mynd 7 benda til þess að lítill munur sé á frumum með eða án DHA við lága styrki ísópróterenóls en við hærri styrki sé framleiðsla cAMP ívið meiri í frumum sem ræktaðar eru með DHA. Án mælikvarða á frumufjölda er ekki hægt að útiloka að sá munur sé vegna þess að DHA auki vöxt frumnanna. Mynd 7 mætti ennfremur túlka sem framleiðsla cAMP í frumum sem ræktaðar eru með DHA sé enn að aukast við hæsta mælda styrk ísópróterenóls en erfitt er að segja til um það án þess að hafa mælingar við hærri styrki ísópróterenóls til viðmiðunar.

Niðurstöður annarrar tilraunarinnar má líta á mynd 8. Þær eru mjög ólíkar niðurstöðum fyrstu tilraunarinnar. Sést þar að hámarksframleiðsla cAMP er nokkurn veginn sú sama með og án DHA í æti en framleiðsla cAMP fer af stað við lægri styrk ísópróterenóls í frumum með DHA í æti en viðmiðunarfrumum. Á myndum 7 og 8 sést að styrkur cAMP mælist mun hærri í annarri en fyrstu tilraun. Að öllum líkindum skýrist þessi munur af mismiklum þéttleika og fjölda frumna.

Jafnvel þótt niðurstöður tilrauna 1 og 2 séu ekki studdar með fleiri samsvarandi niðurstöðum er áhugavert að velta upp þeim túlkunarmöguleikum sem þær bjóða upp á. Ef mettun cAMP framleiðslu næðist við lægri styrki ísópróterenóls í viðmiðunarfrumum en í frumum ræktuðum með DHA í æti, líkt og niðurstöður tilraunar 1 benda til, mætti leiða líkur að því að DHA valdi auknu þoli adrenergra viðtaka gagnvart örvun og þar með minni afnæmingu, sem gæti skýrt jákvæð áhrif omega-3 fitusýra á lífslíkur hjartasjúklinga. Færi framleiðsla cAMP af stað við lægri styrk ísópróterenóls í frumum ræktuðum með DHA í æti en viðmiðunarfrumum, líkt og niðurstöður tilraunar 2 gefa til kynna, mætti leiða líkur að því

að sækni tengla í adrenerga viðtaka aukist í frumum sem ræktaðar eru með DHA í æti en hámarks bindigeta sé sú sama og í viðmiðunarfrumum. Aukin sækni gæti gert það að verkum að frumurnar komist af með færri viðtaka en ella sem kæmi sér vel þegar afnæming er mikil af völdum hjartasjúkdóma. Þrátt fyrir að velta megi vöngum yfir því sem hugsast getur er alls ekki hægt að draga slíkar ályktanir nema í kjölfar fleiri samsvarandi og nákvæmari tilrauna.

Hinn mikli munur á niðurstöðum fyrstu og annarrar tilraunar kemur skýrt fram með samanburði á metnunarkúrfum þessara tveggja tilrauna út frá hlutfallsstyrk fyrir frumur sem fengu DHA í æti annars vegar og viðmiðunarfrumur hins vegar, eins og gert er á myndum 9 og 10. Þar sést vel að í frumum sem ræktaðar voru með DHA í æti (mynd 9) eykst cAMP framleiðslan við lægri styrki ísópróterenóls í tilraun 2 en tilraun 1. Í viðmiðunarfrumum (mynd 10) eykst cAMP framleiðslan hins vegar við lægri styrki í tilraun 1 en tilraun 2. Eðlilegt er að metnunarkúrfur tveggja samskonar tilrauna hliðrist en óvenjulegt er að metnunarkúrfurnar sem verið er að bera saman hliðrist hvor í sína áttina. Bendir það til þess að skekkjur milli tilrauna séu ekki kerfisbundnar. Athyglisvert er að skoða mynd 11, þar sem niðurstöðum beggja tilrauna hefur verið skeytt saman með meðaltali hlutfallsstyrkja cAMP. Kemur þar í ljós að þrátt fyrir ólíkar niðurstöður úr tilraunum 1 og 2 virðist vera hverfandi munur á cAMP framleiðslu í frumum ræktuðum með og án DHA í æti þegar meðaltal af niðurstöðum tilraunanna er tekið til greina. Líklegt er að misræmi í niðurstöðum tilrauna 1 og 2 skýrist bæði af náttúrulegum breytileika í frumuræktun sem og breytileika í framkvæmd. Með fleiri tilraunum má ætla að breytileikinn jafnist út og heilsteypari niðurstöður fáiast.

Í tilraun 2 var mestur munur á framleiðslu cAMP í frumum ræktuðum með og án DHA við örvun með 0,25  $\mu\text{M}$  og 0,50  $\mu\text{M}$  ísópróterenóli. Því lá beinast við að skoða þessa tvo styrki sérstaklega í þriðju tilrauninni, til að staðfesta eða hrekja þennan mikla mun. Mæld voru 4-5 sýni fyrir hvorn styrk og ættu því niðurstöðurnar að vera nokkuð markverðar. Líkt og tafla 4 gefur til kynna mældist enginn marktækur munur á framleiðslu cAMP í DHA frumum og samanburðarfrumum við þessa styrki. Miðað við það má ætla að niðurstöður úr tilraun 2 séu síður markverðar en niðurstöður úr tilraun 1. Er líklegast að DHA hafi í raun ekki marktæk áhrif á virkni  $\beta_2$ -adrenergra viðtaka í HEK293 frumum.

Ein skýring á ómarktækum niðurstöðum í tilraun 2 gæti verið ónákvæmni í örvunartíma frumnanna. Unnið var með mörg sýni sem þurfti öll að örva og aförva með ákveðnu millibili til að fá sem nákvæmastar niðurstöður. Allt fór fram handvirkt og því lítið rúm til mistaka. Líkt og kemur fram í kafla 2.3 var ákveðnu magni af ísópróterenóli sprautað í hvern brunn, platan inkúberuð í fimm mínútur og ætið síðan tekið upp úr hverjum brunni til að stöðva örvunina áður en frumurnar voru sprengdar með *Cell lysis buffer*. Í fyrri tveimur tilraunum

voru öll sýni með viðmiðunarfrumum örvuð á undan sýnum með frumum sem fengið höfðu DHA. Hugsanlegt er að í tilraun 2 hafi tekið lengri tíma að taka ætið af eftir inkúberingu en að örva frumurnar, og því hafi frumurnar sem ræktaðar voru með DHA í æti verið örvaðar í aðeins lengri tíma en viðmiðunarfrumurnar. Lengri örvunartími gæti lýst sér með aukinni mældri cAMP framleiðslu við lága örvunarstyrki og aukið líkur á afnæmingu við hærri styrki. Þetta gæti skýrt mun á mettunarkúrfum fyrir frumur ræktaðar með og án DHA í æti á mynd 8 þar sem framleiðsla cAMP mældist hærri í frumum sem ræktaðar voru með DHA í æti við lága styrki ísópróterenóls. Auk þess er útlit fyrir að cAMP framleiðsla nái mettun við lægri styrki ísópróterenóls í frumum ræktaðum með DHA í æti en viðmiðunarfrumum.

Í tilraun 1 var mun minni munur á cAMP framleiðslu frumuhópanna tveggja við lága styrki en í tilraun 2. Líklega hefur framkvæmdin verið nákvæmari í það skiptið, enda var unnið með færri sýni. Í þriðju tilrauninni var annar háttur hafður á við örvun til að gera örvunartíma sambærilegri milli hópa. Sýni sem fengu sama styrk ísópróterenóls voru örvuð hvert á eftir öðru í frumuhópnum tveimur, þ.e. fyrst voru öll sýni sem fengu 0,25  $\mu\text{M}$  ísópróterenól örvuð, bæði frumur sem ræktaðar voru með og án DHA í æti, og svo voru öll sýni sem fengu 0,50  $\mu\text{M}$  ísópróterenól örvuð, í báðum frumuhópum. Þetta auðveldar samanburð á framleiðslu cAMP í frumuhópnum við sama örvunarstyrk og hefur líklega skilað svo litlum breytileika í mæligildum í tilraun 3 sem raun ber vitni.

Þrátt fyrir talsverða galla má nýta niðurstöður þessara þriggja tilrauna í fleira en vangaveltur. Helstu not þeirra felast raunar í vísbendingum sem þær gefa um mögulega uppsetningu og framkvæmd áframhaldandi tilrauna í átt að betri og marktækari niðurstöðum. Fengist meiri tími til mælinga þyrfti í fyrsta lagi að gera fleiri samsvarandi tilraunir. Hver tilraun þyrfti að vera framkvæmd 3-4 sinnum til að fá marktækar niðurstöður. Einnig þyrfti helst að gera minnst þrjár mælingar fyrir hvern ísópróterenólstyrk í hverri tilraun. Komi tvær mælingar mjög ólíkt út er ómögulegt að segja til um hvor mælingin sé réttari. Þá er gott að hafa þriðju mælinguna til úrskurðar. Mætti gera fleiri tilraunir með sama eða svipuðu styrkbili ísópróterenóls og í tilraun 2, þar sem þrjú sýni væru örvuð með hverjum styrk. Kæmu athyglisverðar niðurstöður fyrir ákveðið styrkbil væri hægt að gera nákvæmari mælingar þar eins og í tilraun 3. Mælingar við háa styrki ísópróterenóls eru ekki mjög áreiðanlegar í tilraunum 1 og 2. Væri því athyglisvert að gera nánari mælingar við svo háa styrki, líkt og gert var fyrir lægri styrki í tilraun 3. Í tilraunum framtíðar væri líklega best að örva frumuhópana samhliða eins og í tilraun 3, þ.e. örva sýni beggja frumuhópa með sama ísópróterenólstyrk áður en byrjað er á næsta styrk. Ef einhver munur reyndist vera á virkni adrenergra viðtaka í frumum sem ræktaðar eru með og án DHA í æti væri áhugavert að skoða hvort slíkur munur

fengist einnig með omega-6 fitusýru, eins og arakíðonsýru, eða annarri omega-3 fitusýru, eins og EPA. Jafnvel væri hægt að athuga áhrif mettaðrar fitusýru. Loks væri hægt að koma í veg fyrir skekkjur af völdum breytileika í magni frumna í sýnum og auka samræmi í niðurstöðum með því að mæla magn próteina í hverju sýni og reikna virkni viðtakanna út frá styrk cAMP á massa frumupróteina í stað þess að reikna með að sami frumufjöldi haldist í ræktunarbrunnum miðað við fjölda sem sáð var. Auk þess væri vonandi hægt að draga úr breytileika milli tilrauna og fá markverðari niðurstöður með aukinni þjálfun í aðferðum.

Nú eru niðurstöður og vangaveltur miðaðar við adrenerga viðtaka í hjarta manna. Hafa ber í huga að í þessum tilraunum er notast við HEK293 frumur, frumulínu sem er mjög ólík hjartavöðvafrumum manna og raunar öllum frumum sem gætu talist eðlilegar. Auk þess eru hér aðeins örvaðir  $\beta_2$ -adrenergir viðtakar en í hjarta er blanda  $\beta_1$  og  $\beta_2$  og raunar meira af  $\beta_1$ , líkt og kom fram í inngangi. Því er ekki víst að niðurstöður rannsókna á adrenergum viðtökum í HEK293 frumum endurspegli virkni viðtakanna í dýrum, hvað þá mönnum. Þrátt fyrir ólíkt umhverfi eru  $\beta_2$ -adrenergu viðtakarnir þó eins og því eru HEK293 frumur vissulega nothæft og einfalt tæki til rannsókna á þeim. Til að fá niðurstöðurnar nær manninum þarf hins vegar að prófa tilraunirnar á ferskum dýrafrumum. Slíkar rannsóknir eru þó enn flóknari og erfiðari en rannsóknir á HEK293 og því er afar gott að nýta frumulínur eins og HEK293 til undirbúnings og mögulega afstýra mikilli tímaeyðslu í gagnslitlar tilraunir.

Auðvelt er að velta vöngum yfir niðurstöðum tilrauna 1 og 2 og jafnvel koma með hugsanlegar skýringar á þeim út frá vitneskju um lífeðlisfræði hjartans. Slíkt býður þó hættunni heim eins og kemur í ljós þegar sá munur á cAMP framleiðslu í frumum ræktuðum með og án DHA sem sést í tilraun 2 er hrakinn í tilraun 3. Þrátt fyrir skýrar og afdráttarlausar niðurstöður tilraunar 3 er ekki hægt að nota þær til staðfestingar nema að fleiri tilraunir með sömu niðurstöðum komi til. Vísindi snúast að miklu leyti um endurtekningar. Niðurstöður rannsókna eru alla jafna ekki birtar nema að fjölmörgum prófunum og margendurteknum tilraunum loknum. Niðurstöður þessa verkefnis benda til þess omega-3 fitusýrur hafi ekki áhrif á cAMP framleiðslu eftir örvun  $\beta$ -adrenergra viðtaka í HEK293 frumum. Hugsanlega er það rétt en þrátt fyrir það verður ekki úr því skorið nema með frekari tilraunum.

# Heimildir

1. London, B., Albert, C., Anderson, M. E., Giles, W. R., Van Wagoner, D. R., Balk, E., Billman, G. E., Chung, M., Lands, W., Leaf, A., McAnulty, J., Martens, J. R., Costello, R. B. og Lathrop, D. A. (2007). Omega-3 Fatty Acids and Cardiac Arrhythmias: Prior Studies and Recommendations for Future Research: A report from the National Heart, Lung and Blood Institute and Office Of Dietary Supplements Omega-3 Fatty Acids and their Role in Cardiac Arrhythmogenesis Workshop. *Circulation*, 116(10), 320-335. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.712984
2. Barceló-Coblijn, G. og Murphy, E. J. (2009). Alpha-linolenic acid and its conversion to longer chain n-3 fatty acids: Benefits for human health and a role in maintaining tissue n-3 fatty acid levels. *Prog Lipid Res*, 48(6), 355-374. doi: 10.1016/j.plipres.2009.07.002
3. Kris-Etherton, P. M., Grieger, J. A og Etherton, T. D. (2009). Dietary reference intakes for DHA and EPA. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 81(2-3), 99-104. doi: 10.1016/j.plefa.2009.05.011
4. Rennison, J. H. og Van Wagoner, D. R. (2009). Impact of dietary fatty acids on cardiac arrhythmogenesis. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2(4), 460-469. doi: 10.1161/CIRCEP.109.880773
5. Nair, S. S. D., Leitch, J. W., Falconer, J. og Garg, M. L. (1997). Prevention of Cardiac Arrhythmia by Dietary (n-3) Polyunsaturated Fatty Acids and Their Mechanism of Action. *J Nutr*, 127(3), 383-393. Sótt á <http://jn.nutrition.org/content/127/3/383.full.pdf+html>
6. Psota, T. L., Gebauer, S. K., og Kris-Etherton, P. (2006). Dietary omega-3 fatty acid intake and cardiovascular risk. *Am J Cardiol*, 98(4), 3-18. doi: 10.1016/j.amjcard.2005.12.022
7. Siscovick, D. S., Raghunathan, T. E., King, I., Weinmann, S., Wicklund, K. G., Albright, J., Bovbjerg, V., Arbogast, P., Smith, H., Kushi, L. H., Cobb, L. A., Copass, M. K., Psaty, B. M., Lemaitre, R., Retzlaff, B., Childs, M. og Knopp, R. H. (1995). Dietary intake and cell membrane levels of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac arrest. *JAMA*, 274(17), 1363-1367. doi: 10.1001/jama.1995.03530170043030

8. Kris-Etherton, P. M., Harris, W. S. og Appel, L. J. (2002). AHA Scientific Statement. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Circulation*, 106(21), 2747-2757. doi: 10.1161/01.CIR.0000038493.65177.94
9. Marchioli, R., Barzi, F., Bomba, E., Chieffo, C., Di Gregorio, D., Di Mascio, R., Franzosi, M. G., Geraci, E., Levantesi, G., Maggioni, A. P., Mantini, L., Marfisi, R. M., Mastrogiuseppe, G., Mininni, N., Nicolosi, G. L., Santini, M., Schweiger, C., Tavazzi, L., Tognoni, G., Tucci, C. og Valagussa, F. (2002). Early protection against sudden death by n-3 polyunsaturated fatty acids after myocardial infarction: Time-course analysis of the results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico (GISSI)-Prevenzione. *Circulation*, 105(16), 1897-1903. doi: 10.1161/01.CIR.0000014682.14181.F2
10. Reiffel, J. A. og McDonald, A. (2006). Antiarrhythmic Effects of Omega-3 Fatty Acids. *Am J Cardiol*, 98(4), 50-60. doi: 10.1016/j.amjcard.2005.12.027
11. Den Ruijter, H. M., Berecki, G., Opthof, T., Verkerk, A. O., Zock, P. L. og Coronel, R. (2007). Pro- and antiarrhythmic properties of a diet rich in fish oil. *Cardiovasc Res*, 73(2), 316-325. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.06.014>
12. Albert, C. M., Campos, H., Stampfer, M. J., Ridker, P. M., Manson, J. E., Willett, W. C. og Ma, J. (2002). Blood Levels of Long-Chain n-3 Fatty Acids and the Risk of Sudden Death. *N Engl J Med*, 346, 1113-1118. doi: 10.1056/NEJMoa012918
13. Robinson, J. G. og Stone, N. J. (2006). Antiatherosclerotic and Antithrombotic Effects of Omega-3 Fatty Acids. *Am J Cardiol*, 98(4A), 39i-49i. doi: 10.1016/j.amjcard.2005.12.026
14. Verkerk, A. O., van Ginneken, A. C. G., Berecki, G., Ruijter, H. M., Schumacher, C. A., Veldkamp, M. W., Baartscheer, A., Casini, S., Opthof, T., Hovenier, R., Fiolet, J. W. T., Zock, P. L. og Coronel, R. (2006). Incorporated sarcolemmal fish oil fatty acids shorten pig ventricular action potentials. *Cardiovasc Res*, 70(3), 509-520. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.02.022>
15. Schley, P. D., Brindley, D. N. og Field, C. J. (2007). (n-3) PUFA alter raft lipid composition and decrease epidermal growth factor receptor levels in lipid rafts of human breast cancer cells. *J Nutr*, 137(3), 548-553. Sótt á <http://jn.nutrition.org/content/137/3/548.long>
16. Li, Q., Tan, L., Wang, C., Li, N., Li, Y., Xu, G. og Li, J. (2005). Polyunsaturated eicosapentaenoic acid changes lipid composition in lipid rafts. *Eur J Nutr*, 45(3), 144-151. doi: 10.1007/s00394-005-0574-7



17. Sigurðsson, J. O. (2012). *The effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on lipid composition and location of protein in rat heart lipid rafts*. Meistaraprófsritgerð, raunvísindadeild, Háskóli Íslands. Sótt á <http://hdl.handle.net/1946/10816>
18. Burr, M. L., Ashfield-Watt, P. A., Dunstan, F. D., Fehily, A. M., Breay, P., Ashton, T., Zotos, P. C., Haboubi, N. A. og Elwood, P. C. (2003). Lack of benefit of dietary advice to men with angina: results of a controlled trial. *Eur J Clin Nutr*, 57(2), 193-200. doi: 10.1038/sj.ejcn.1601539
19. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Ra, M., Roberts, K. og Walter, P. (2008). *Molecular Biology of the Cell 5th ed*. New York, NY: Garland Science.
20. Rockman, H. A., Koch, W. J. og Lefkowitz, R. J. (2002). Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature*, 415, 206-212. doi: 10.1038/415206a
21. Kuhar, M. J., Couceyro, P. R. og Lambert, P. D. (1999).  $\alpha$ - and  $\beta$ -Adrenergic Receptors. Í G.J. Siegel, B. W. Agranoff, R. W. Albers, S. K. Fisher og M. D. Uhler (Ritstjórar), *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. Sótt á <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28138/>
22. Lymperopoulos, A., Rengo, G. og Koch, W. J. (2013). Adrenergic Nervous System in Heart Failure: Pathophysiology and Therapy. *Circ Res*, 113(6), 739-753. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.300308
23. Wallukat, G. (2002). The  $\beta$ -Adrenergic Receptors. *Herz*, 27(7), 683-690. doi: 10.1007/s0059-002-2434-z
24. Perry, S. J., Baillie, G. S., Kohout, T. A., McPhee, I., Magiera, M. M., Ang, K. L., Miller, W. E., McLean, A. J., Conti, M., Houslay, M. D. og Lefkowitz, R. J. (2002). Targeting of Cyclic AMP Degradation to  $\beta_2$ -Adrenergic Receptors by  $\beta$ -Arrestins. *Science*, 298(5594), 834-836. doi: 10.1126/science.1074683
25. Canavesio, Y. M. (2014, 31.01.). *Beta adrenergic receptor kinase 1 and heart failure*. Sótt 18. mars, 2015, á <http://flipper.diff.org/app/items/6227>
26. Triposkiadis, F., Karayannis, G., Giamouzis, G., Skoularigis, J., Louridas, G. og Butler, J. (2009). The Sympathetic Nervous System in Heart Failure: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Implications. *J Am Coll Cardiol*, 54(19), 1747-1762. doi: 10.1016/j.jacc.2009.05.015
27. Guðbjarnarson, S. og Benediktsdóttir, V. E. (1995). Coregulation of adrenoceptors and the lipid environment in heart muscle during repeated adrenergic stimulation. *J Mol Cell Cardiol*, 27(1), 243-251. doi: 10.1016/S0022-2828(08)80023-5

28. Joardar, A., Sen, A. K. og Das, S. (2005). Docosahexaenoic acid facilitates cell maturation and  $\beta$ -adrenergic transmission in astrocytes. *J Lipid Res*, 47(3), 573-581. doi: 10.1194/jlr.M500415-JLR200
29. Mirnikjoo, B., Brown, S. E., Kim, H. F., Marangell, L. B., Sweatt, J. D. og Weeber, E. J. (2001). Protein Kinase Inhibition by  $\omega$ -3 Fatty Acids. *J Biol Chem*, 276(14), 10888-10896. doi: 10.1074/jbc.M008150200
30. Reibel, D. K., Holahan, M. A. og Hock, C. E. (1988). Effects of dietary fish oil on cardiac responsiveness to adrenoceptor stimulation, *Am J Physiol*, 254(3), 494-499. Sótt á: <http://ajpheart.physiology.org/content/254/3/H494>
31. Van der Eb, A. (2001, 16.05.). *USA FDA Center for biologics evaluation and research: Vaccines and related biological products advisory committee meeting*. Línur 14–22, bls. 81. Sótt á [http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/transcripts/3750t1\\_01.pdf](http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/transcripts/3750t1_01.pdf)
32. Shaw, G., Morse, S., Ararat, M. og Graham, F. L. (2002). Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J*, 16(8), 869-871. doi: 10.1096/fj.01-0995fje
33. Graham, F. L og Smiley, J. (1977). Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J Gen Virol*, 36, 59-74. doi: 10.1099/0022-1317-36-1-59
34. Sumi, Y., Woehrle, T., Chen, Y., Yao, Y., Li, A. og Junger, W. G. (2010). Adrenergic receptor activation involves ATP release and feedback through purinergic receptors. *Am J Physiol Cell Physiol*, 299(5), 1118-1126. doi: 10.1152/ajpcell.00122.2010
35. Gan, S. D. og Patel, K. R. (2013). Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Invest Dermatol*, 133(9), e12. doi: 10.1038/jid.2013.287
36. STAR ELISA Kits. (2015). Sótt 13. maí, 2015 á [https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/STAR-ELISA-Kits,MM\\_NF-C77254](https://www.merckmillipore.com/INTL/en/product/STAR-ELISA-Kits,MM_NF-C77254)
37. *Overview of ELISA*. (2015). Sótt 6. apríl, 2015 á <https://www.lifetechnologies.com/is/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html>

# Viðauki

## Gleypnimælingar tilrauna í niðurstöðukafla

### Tilraun 1

*Tafla 5: Tilraun 1, gleypni staðallausna cAMP.*

[cAMP] <sub>staðall</sub> [nM]	A
240	0,082
80,0	0,085
26,7	0,111
8,89	0,154
2,96	0,32
0,988	0,781
0,329	1,655
0,00	2,328

Jafna staðallínu:  $y = 0,6725e^{-0,469x}$

R-gildi: 0,9181

**Tafla 6: Tilraun 1, viðmiðunarfrumur. Gleyfni (A) og útreiknaður styrkur cAMP (sjá kafla 2.4) í frumuvökva úr HEK293 frumum sem ræktaðar voru án DHA í æti eftir örvun  $\beta_2$ -adrenergra viðtaka með ísópróterenóli í mismunandi styrk ( $C_{\text{ísó}}$ ). Auk þess er útreiknað hlutfall af hámarksstyrk cAMP út frá meðalstyrk cAMP við hvern ísópróterenólstyrk.**

$C_{\text{ísó}}$ [ $\mu\text{M}$ ]	A	log(ísó)	cAMP [nM]	Hlutfall af hámarksstyrk cAMP - meðaltal
0,00	2,051	#NUM!	0,0928	
0,00	1,625	#NUM!	0,152	0,00904
0,0156	1,898	-1,806	0,109	
0,0156	1,737	-1,806	0,132	0,00891
0,0313	1,202	-1,505	0,290	
0,0313	1,752	-1,505	0,130	0,0155
0,0625	1,749	-1,204	0,130	
0,0625	1,61	-1,204	0,155	0,0105
0,125	0,719	-0,903	0,867	
0,125	0,666	-0,903	1,02	
0,125	0,682	-0,903	0,971	0,0703
0,250	0,347	-0,602	4,10	
0,250	0,411	-0,602	2,86	0,257
0,500	0,24	-0,301	9,00	
0,500	1,368	-0,301	0,220*	0,664
1,00	0,157	0,00	22,2*	
1,00	0,198	0,00	13,6	1,00
3,00	0,313	0,477	5,11*	
3,00	0,216	0,477	11,3	0,831

\*Sýnum sleppt í úrvinnslu. Talið var að láðst hefði að örva sýnið með 0,5  $\mu\text{M}$  ísópróterenóli en 1,0  $\mu\text{M}$  sýnið verið örvað tvisvar í staðinn.

**Tafla 7: Tilraun 1, frumur með DHA í æti.** Gleypni (A) og útreiknaður styrkur cAMP (sjá kafla 2.4) í frumuvökva úr HEK293 frumum sem ræktaðar voru með DHA í æti eftir örvun  $\beta_2$ -adrenergra viðtaka með ísópróterenóli í mismunandi styrk ( $C_{\text{ísó}}$ ). Auk þess er útreiknað hlutfall af hámarksstyrk cAMP út frá meðalstyrk cAMP við hvern ísópróterenólstyrk.

$C_{\text{ísó}}$ [ $\mu\text{M}$ ]	A	log(ísó)	cAMP [nM]	Hlutfall af hámarksstyrk cAMP - meðaltal
0,00	2,12	#NUM!	0,0865	
0,00	1,984	#NUM!	0,0996	0,00596
0,0156	1,999	-1,806	0,0980	
0,0156	1,958	-1,806	0,102	0,00641
0,0313	1,839	-1,505	0,117	
0,0313	1,958	-1,505	0,102	0,00703
0,0625	1,785	-1,204	0,125	
0,0625	1,723	-1,204	0,135	0,00830
0,125	0,828	-0,903	0,642	
0,125	0,566	-0,903	1,44	
0,125	0,772	-0,903	0,745	0,0604
0,250	0,395	-0,602	3,11	
0,250	0,354	-0,602	3,93	0,225
0,500	0,315	-0,301	5,04	
0,500	0,252	-0,301	8,11	0,421
1,00	0,207	0,00	12,3	
1,00	0,196	0,00	13,9	0,839
3,00	0,19	0,477	14,8	
3,00	0,181	0,477	16,4	1,00

## Tilraun 2

**Tafla 8: Tilraun 2, gleypni staðallausna cAMP.**

$[\text{cAMP}]_{\text{staðall}}$ [nM]	A
0,00	1,663
0,329	1,384
0,988	0,905
2,96	0,493
8,89	0,292
26,7	0,131
80,0	0,091
240	0,068

Jafna staðallínu:  $y = 0,8195e^{-0,486x}$

R-gildi: 0,9874

**Tafla 9: Tilraun 2, viðmiðunarfrumur.** Gleyfni (A) og útreiknaður styrkur cAMP (sjá kafla 2.4) í frumuvökva úr HEK293 frumum sem ræktaðar voru án DHA í æti eftir örvun  $\beta_2$ -adrenergra viðtaka með ísópróterenóli í mismunandi styrk ( $C_{\text{ísó}}$ ). Auk þess er útreiknað hlutfall af hámarksstyrk cAMP út frá meðalstyrk cAMP við hvern ísópróterenólstyrk.

$C_{\text{ísó}}$ [ $\mu\text{M}$ ]	$\log(\text{ísó})$	A	cAMP [nM]	Hlutfall af hámarksstyrk cAMP - meðaltal
10,0	1,00	0,163	27,7*	
10,0	1,00	0,153	31,6*	
5,00	0,699	0,142	36,8	1,00
5,00	0,699	0,737	1,24*	
3,00	0,477	0,161	28,5	
3,00	0,477	0,16	28,8	0,777
1,00	0,00	0,183	21,9	
1,00	0,00	0,156	30,4	0,709
0,500	-0,301	0,445	3,51	
0,500	-0,301	0,385	4,73	0,112
0,250	-0,602	0,701	1,38	
0,250	-0,602	1,039	0,614	0,0270
0,125	-0,903	1,327	0,371	
0,125	-0,903	1,566	0,264	0,009
0,0625	-1,204	1,606	0,251	
0,0625	-1,204	1,69	0,226	0,006
0,0313	-1,505	1,498	0,289	
0,0313	-1,505	1,299	0,388	0,009
0,0156	-1,806	1,293	0,391	
0,0156	-1,806	1,436	0,315	0,010
0,00	#NUM!	1,632	0,242	0,007

\* Sýnum sleppt í úrvinnslu.

**Tafla 10: Tilraun 2, frumur með DHA í æti. Gleygni (A) og útreiknaður styrkur cAMP (sjá kafla 2.4) í frumuvökva úr HEK293 frumum sem ræktaðar voru með DHA í æti eftir örvun  $\beta_2$ -adrenergra viðtaka með ísópróterenóli í mismunandi styrk ( $C_{\text{ísó}}$ ). Auk þess er útreiknað hlutfall af hámarksstyrk cAMP út frá meðalstyrk cAMP við hvern ísópróterenólstyrk.**

$C_{\text{ísó}}$ [ $\mu\text{M}$ ]	$\log(\text{ísó})$	A	cAMP [nM]	Hlutfall af hámarksstyrk cAMP - meðaltal
10,0	1,00	0,11	62,3*	
10,0	1,00	0,226	14,2*	
5,00	0,699	0,152	32,0	
5,00	0,699	0,167	26,4	0,974
3,00	0,477	0,154	31,2	
3,00	0,477	0,16	28,8	1,00
1,00	0,00	0,156	30,4	
1,00	0,00	0,179	22,9	0,887
0,500	-0,301	0,208	16,8	
0,500	-0,301	0,157	30,0	0,779
0,250	-0,602	0,21	16,5	
0,250	-0,602	0,242	12,3	0,480
0,125	-0,903	1,4	0,332	
0,125	-0,903	1,336	0,366	0,0116
0,0625	-1,204	1,297	0,389	
0,0625	-1,204	1,322	0,374	0,0127
0,0313	-1,505	1,232	0,432	
0,0313	-1,505	1,242	0,425	0,0143
0,0156	-1,806	1,313	0,379	
0,0156	-1,806	1,266	0,409	0,0131
0,00	#NUM!	1,39	0,337	0,011

\*Sýnum sleppt í úrvinnslu.

### Tilraun 3

**Tafla 11: Tilraun 3, gleypni staðallausna cAMP.**

[cAMP] <sub>staðall</sub> [nM]	A
0,00	2,422
0,329	1,79
0,988	1,101
2,96	0,565
8,89	0,331
26,7	0,147
80,0	0,128
240	0,082

Jafna staðallínu:  $y = 0,9909e^{-0,484x}$

R-gildi: 0,9816

**Tafla 12: Tilraun 3, viðmiðunarfrumur. Gleypni (A) og útreiknaður styrkur cAMP (sjá kafla 2.4) í frumuvökva úr HEK293 frumum sem ræktaðar voru án DHA í æti eftir örvun  $\beta_2$ -adrenergra viðtaka með ísópróterenóli í mismunandi styrk ( $C_{\text{ísó}}$ ).**

$C_{\text{ísó}}$ [ $\mu\text{M}$ ]	log(ísó)	A	cAMP [nM]
0,00	#NUM!	1,599	0,372
0,00	#NUM!	1,635	0,355
0,250	-0,602	0,307	11,3
0,250	-0,602	0,246	17,8
0,250	-0,602	0,264	15,4
0,250	-0,602	0,198	27,9
0,250	-0,602	0,216	23,3
0,500	-0,301	0,141	56,2
0,500	-0,301	0,143	54,6
0,500	-0,301	0,138	58,7
0,500	-0,301	0,155	46,2



**Tafla 13: Tilraun 3, frumur með DHA í æti. Gleypni (A) og útreiknaður styrkur cAMP (sjá kafla 2.4) í frumuvökva úr HEK293 frumum sem ræktaðar voru með DHA í æti eftir örvun  $\beta_2$ -adrenergra viðtaka með ísópróterenóli í mismunandi styrk ( $C_{\text{ísó}}$ ).**

$C_{\text{ísó}}$ [ $\mu\text{M}$ ]	$\log(\text{ísó})$	A - DHA	[cAMP] [nM]
0,00	#NUM!	1,62	0,362
0,00	#NUM!	1,427	0,471
0,250	-0,602	0,24	18,7
0,250	-0,602	0,255	16,5
0,250	-0,602	0,2	27,3
0,250	-0,602	0,232	20,1
0,250	-0,602	0,238	19,0
0,500	-0,301	0,158	44,4
0,500	-0,301	0,143	54,6
0,500	-0,301	0,148	50,8
0,500	-0,301	0,155	46,2