

	Háskólinn á Akureyri
	Viðskipta- og raunvísindasvið
Námskeið:	LOK1126 og 1226
Heiti verkefnis:	Áhrif fiskpeptíða á upptöku kalsíum í Caco-2 frumumódeli
Verktími:	September 2018 - Apríl 2019
Nemandi:	Sesselja Sigurðardóttir
Leiðbeinandi:	Hólmfríður Sveinsdóttir
Tengiliður:	Margrét Auður Sigurbjörnsdóttir
Upplag:	2 eintök
Blaðsíðufjöldi:	52
Fjöldi viðauka:	0
Útgáfu og notkunarréttur:	Verkefni er opið Verkefnið má ekki fjölfalda, hvorki að hluta til né í heild, nema með skriflegu leyfi höfundar



Yfirlýsingar

„Ég lýsi því yfir að ég ein er höfundur þessa verkefnis og að það er afrakstur eigin rannsókna“

Sesselja Sigurðardóttir

„Það staðfestist að verkefni þetta fullnægir að mínum dómi kröfum til prófs í námskeiðinu
LOK1126 og *LOK1226*“

Hólmfríður Sveinsdóttir

Abstract

The aim of the project was to examine and see if certain fishpeptides influence the uptake of calcium in the human body and was carried out in cooperation with the biotechnology company PROTIS ehf, located in Sauðárkrúkur.

The deficiency of various nutritive elements, such as calcium, is spreading around the world and particularly in recent years. Isolated fishprotein is widely used in making of food substances and fishprotein hydrolases have shown the capability of binding calcium from ingested food. The production of biological compounds from marine organisms has increased due to them often producing more specific and potent molecules than those who live on land. The production is mostly from by-products by biotechnological methods and research has shown that the consumption of protein has a positive influence on the uptake of ingested calcium from food. The main objective of this study was to learn if certain fishpeptides, obtained from PROTIS ehf, would help increase the uptake of calcium. Three fishprotein hydrolysates were used in the study along with Caco-2 cell model.

The results of the study indicated that the fishprotein hydrolysates possess binding capabilities and the composition of the hydrolysates is important. The fishprotein hydrolysates also possessed some reducing powers but the study indicated their ability for metal chelating to be greater and that the composition of the hydrolysates was also important. Exceptional findings were not accountable and some of the essays could have been repeated to get significant results. The Caco-2 cell model was easy to work with and showed great viability. TEER values also turned out good, both before and after the Lucifer Yellow assay as well as before and after the calcium assay. It can be estimated from this study that the fishprotein hydrolysates that PROTIS ehf is working with obtain great potentials and they can be used for further studies and in the end, hopefully, for production and human nutrition.

Keywords: Caco-2 cell model, fishprotein hydrolyse, calcium, antioxidant

Þakkarorð

Ég vil þakka Hólfríði Sveinsdóttur, leiðbeinanda mínum og fyrrverandi framkvæmdastjóra IceProtein og PROTIS ehf, fyrir ómetanlega hjálp og aðstoð og fyrir það að hafa verið minn leiðbeinandi þrátt fyrir ýmsar hindranir sem á vegi okkar urðu. Ég vil einnig þakka Lydiu Tobias, starfsmanni PROTIS, hjartanlega fyrir alla hjálpinu við framkvæmd á verklegu þáttum verkefnisins sem og hjálp með úrvinnslu á niðurstöðum. Án hennar hefði þessi ritgerð aldrei orðið að veruleika.

Að lokum vil ég þakka vinnuveitendum mínum þeim Berglindi og Agli, eigendum Sportver á Akureyri, fyrir endalausa þolinmæði og sveigjanleika við skrif.

Akureyri, 14.04.2019

Sesselja Sigurðardóttir

Útdráttur

Þetta verkefni fjallar um hvort að fiskpeptíð hafi áhrif á upptöku kalsíum í meltingarvegi og er verkefnið unnið í samstarfi við líftæknifyrirtækið PROTIS ehf á Sauðárkróki.

Skortur á inntöku ýmissa næringarefna, líkt og kalsíum, fer vaxandi í heiminum og þá einkum á undanförunum árum. Einangrað fiskprótein er vinsælt fæðubótarefni og hafa þar einkum fiskprótein hýdrólýsöt sýnt fram á virkni til bindingar á kalsíum úr fæðu. Vinnsla lífvirkra efna úr sjávarlífverum hefur aukist þar sem þær framleiða oft sérhæfðari og áhrifaríkari sameindir en þær lífverur sem lifa á landi. Einkum er þetta vinnsla úr hliðarafurðum með líftæknilegum aðferðum og hafa rannsóknir sýnt að neysla próteins hafi jákvæð áhrif á upptöku kalks í meltingarvegi. Megin markmið þessarar rannsóknar var að athuga ef aukning yrði á upptöku kalsíum í frumumódeli að viðbættum ákveðnum fiskpeptíðum sem fengin voru frá PROTIS ehf. Í verkefninu voru þrjár fiskpróteinafleiður rannsakaðar og Caco-2 frumumódel notað til athugunar á gegndræpi þeirra með og án kalsíum.

Helstu niðurstöður tilraunarinnar sýna að afleiður fiskpróteinanna búa yfir bindivirkni og að samsetning þeirra skiptir þar máli. Þær bjuggu einnig yfir talsverðri andoxandi virkni en mældist þó hæfileiki þeirra til járnbindingar meiri og skipti þar samsetning afleiðanna einnig máli. Stakar niðurstöður reyndust þó ekki marktækar og hefði mátt endurtaka ákveðnar prófanir til að ná fram marktækum gildum. Caco-2 frumurnar voru þægilegar í ræktun og sýndu háan lífvænleika í öllum prófunum. TEER gildi komu einnig vel út, bæði við mælingar fyrir og eftir Lucifer Yellow próf og fyrir og eftir kalsíum próf. Höfundur áætlar að þær fiskpróteinafleiður sem PROTIS ehf er að vinna með búi yfir miklum möguleikum og að nota megi þær til áframhaldandi rannsókna og að lokum til framleiðslu og manneldis.

Lykilorð: Caco-2 frumumódel, fiskpróteinafleiður, kalsíum, andoxun

Efnisyfirlit

Töfluskra	V
Myndaskra	VI
1 Inngangur	1
1.1 Lífvirk efni.....	1
1.1.1 Prótein hýdrólýsöt úr sjávarlífverum	2
1.1.2 Næringarefnið kalsíum.....	2
1.1.3 Bindivirkni vatnsrofina próteinafleiða og frásog kalsíums úr meltingarvegi	3
1.1.4 Aðferðir til að meta bindivirkni og andoxandi virkni próteinafleiða.....	3
1.1.5 Aðferðir til að meta frásog kalsíums í frumumódeli	4
1.1.6 TEER mælingar	5
1.2 Lífvænleiki frumna	5
1.3 Stærðargreining á próteinum vatnsrofsafleiða.....	6
2 Tilgangur rannsókna	6
3 Efni og framkvæmd	7
3.1 Efni	7
3.2 Efni og æti notuð við frumuræktun	7
3.3 Tæki og tól.....	8
3.4 Dúar.....	8
3.5 Undirbúningur sýna.....	9
3.6 Efnagreiningar sýna.....	9
3.6.1 Stærðargreining peptíða í sýnum með SDS-PAGE rafdrætti.....	9
3.6.2 Undirbúningur sýna fyrir SDS rafdrátt	10
3.6.3 Framkvæmd SDS rafdráttar	10
3.6.4 Litun gelja eftir SDS rafdráttarmælingu	11
3.6.5 Afoxunargreining með Ferric Ion Reducing Power	11
3.6.6 Andoxunargreining með DPPH aðferð	12
3.6.7 Greining á hæfileika peptíðanna til járnbindingar	14
3.7 Frumurækt	15
3.8 Viðhald frumuræktar	15
3.8.1 Skipting ætis í T-75 flöskum og 12 brunna plötum	15
3.8.2 Skipting á Caco-2 frumurækt	15
3.8.3 Greining á lífvænleika frumuræktar.....	16
3.9 Gegndræpi Caco-2 frumulags gagnvart Lucifer Yellow	17
3.9.1 Uppsetning rannsókna.....	17
3.9.2 Uppsetning fyrir greiningu	18

3.9.3	Tölfræðileg greining	18
3.10	Gegndræpi Caco-2 frumulags gagnvart kalsíum	18
3.10.1	Kalsíumgreining.....	19
4	Niðurstöður efnagreininga	21
4.1	Stærðargreining peptíða með SDS-PAGE rafdrætti	21
4.1.1	Niðurstöður afoxunarhæfnigreiningar	21
4.1.2	Niðurstöður andoxunarhæfnigreiningar með DPPH.....	23
4.1.3	Niðurstöður á hæfileika peptíðanna til járnbindingar	25
5	Niðurstöður frumugreininga	26
5.1	Niðurstöður á lífvænleika frumuræktar.....	26
5.2	Niðurstöður á gegndræpi Caco-2 frumulags gagnvart Lucifer Yellow	28
5.3	Niðurstöður á gegndræpi Caco-2 frumulags gagnvart kalsíum	31
6	Umræður	35
6.1	Rafdráttur í SDS-PAGE.....	35
6.2	Afoxunarhæfni peptíðlausna	35
6.3	Andoxunarhæfni peptíðlausna	35
6.4	Járnbindi hæfnipróf.....	36
6.5	Gegndræpi Caco-2 frumulags gagnvart Lucifer Yellow	36
6.5.1	TEER mælingar	37
6.6	Niðurstöður á gegndræpi Caco-2 frumulagsins gagnvart kalsíum.....	38
7	Lokaorð	39
8	Heimildir	40

Töfluskrá

Tafla 2:	Öll efni notuð við framkvæmd þeirra rannsókna sem gerðar voru í þessu verkefni.....	7
Tafla 3:	Öll efni og efnasambönd notuð við ræktun á Caco-2 frumulínu	7
Tafla 4:	Öll tæki og tól notuð við framkvæmd allra rannsókna í þessu verkefni	8
Tafla 5:	Allir dúar sem voru notaðir við framkvæmd þessa verkefnis	8
Tafla 6:	Uppsetning peptíðsýna og stiga í gel fyrir rafdrátt	10
Tafla 7:	Uppsetning 96-brunna plötu fyrir afoxunargreiningu peptíðanna með FeCl ₃ fyrir ljósgleypnimælingu	12
Tafla 8:	"Mastermix" fyrir hvert sýni, kontrólsýni, blank og kontrólblank.....	13
Tafla 9:	Uppsetning 96 brunna plötu fyrir andoxunargreiningu peptíðanna með DPPH fyrir ljósgleypnimælingu	13
Tafla 10:	"Mastermix" hvers sýnis, kontrólsýnis, blanka, kontról blanka og jákvæðs kontróls til notkunar.....	14
Tafla 11:	Uppsetning 96 brunna plötu fyrir járnbindigreiningu peptíðanna með FerroZine fyrir ljósgleypnimælingu	14
Tafla 12:	Uppsetning 96 brunna plötu fyrir athugun á lífvænleika Caco-2 frumuræktarinnar.....	16

Tafla 13: Uppsetning 96 brunna plötu fyrir athugun á gegndræpi Caco-2 gagnvart Lucifer Yellow, fyrir ljósgleypnimælingu	18
Tafla 14: Uppsetning 12-brunna ræktunarplötu fyrir athugun á gegndræpi Caco-2 gagnvart kalsíum	19
Tafla 15: Uppsetning 96 brunna plötu fyrir athugun á gegndræpi Caco-2 gagnvart kalsíum, fyrir ljósgleypnimælingu	20
Tafla 16: Meðaltal staðalreikninga afoxunarhæfni með L-Ascorbic Acid	22
Tafla 17: Meðaltal andoxunarhæfni L-Ascorbic Acid staðalsins	24
Tafla 18: Taflan sýnir gildi allra peptíðsýna eftir ljósgleypnimælingu að loknum frádrátti kontrólsýnis	25
Tafla 19: Yfirlit yfir dánartíðni (%) peptíðsýna í mismunandi þynningum	26
Tafla 20: Meðaltal ljósgleypnimælinga á Lucifer Yellow staðli	28
Tafla 21: Meðaltal ljósgleypnimælinga á kalsíum staðli	31

Myndaskrá

Mynd 1: Uppsetning á 12-brunna ræktunarplötum fyrir Caco-2 frumurækt	5
Mynd 2: Staðsetning nema Ohm-mælisins í 12-brunna ræktunarplötu á meðan að TEER mælingar standa yfir	17
Mynd 3: Rafdráttargel sem sýnir próteinsamsetningu eftir vatnsrof. Í brunnum 1 og 8 eru tveir mismunandi próteinstaðlar og í brunnum 2-7 eru sýni í þynningum 50 mg/mL og 100 mg/mL.....	21
Mynd 4: Rafdráttargel sem sýnir próteinsamsetningu eftir vatnsrof. Í brunnum 1 og 8 eru tveir mismunandi próteinstaðlar og í brunnum 2 -7 eru sýni í þynningum 50 mg/mL og 100 mg/mL.....	21
Mynd 5: Staðalkúrva ljósgleypnimælinga á L-Ascorbic Acid staðli við athugun á afoxunarhæfni peptíðsýnanna	22
Mynd 6: Stöplarit sem sýnir meðaltalið á afoxunarhæfni peptíðanna í mismunandi þynningum við OD _{700nm}	23
Mynd 7: Hlutfallslegt staðalfrávik á reiknaðri afoxunarhæfni peptíða í mismunandi þynningum við OD _{700nm}	23
Mynd 8: Staðalkúrva andoxunarhæfni (%) L-Ascorbic Acid staðli við athugun á andoxunarhæfni paptíðsýnanna.....	24
Mynd 9: Stöplarit sem sýnir meðaltalið á andoxunarhæfni (%) peptíðanna í mismunandi þynningum ásamt hlutfallslegu staðalfrávik allra sýna	25
Mynd 10: Reiknað meðaltal peptíðsýna ALC, AX og N til járnbindingar (%)	26
Mynd 11: Stöplarit sem sýni lífvænleika (%) peptíðsýna í mismunandi þynningum ásamt hlutfallslegu staðalfrávik fyrir hvert peptíðsýni.....	27
Mynd 12: Staðalkúrva Lucifer Yellow staðals eftir ljósgleypnimælingu	28
Mynd 13: TEER mælingar allra brunna fyrir og eftir sýnatöku	29
Mynd 14: Meðaltal dQ/dt gilda eftir ljósgleypnimælingu	29
Mynd 15: Grafið sýnir hlutfallslegt staðalfrávik allra dQ/dt útreikninga á hverri tímaeiningu	30
Mynd 16: Meðaltal P _{app} gildar eftir ljósgleypnimælingu.....	30
Mynd 17: Staðalkúrva kalsíumstaðals eftir ljósgleypnimælingu.....	31
Mynd 18: Meðaltal dQ/dt gilda eftir ljósgleypnimælingu	32

1 Inngangur

Skortur á inntöku ýmissa næringarefna, líkt og kalsíums, hefur aukist á undanförunum árum. Þennan skort má rekja til of lítillar neyslu kalsíum ásamt minnkaðrar leysni þess sökum annarra þátta í matarræði líkt og fýtata, fitu og sellulósa (D. Chen o.fl., 2014). Núverandi nálganir á matarræði og inntöku næringarefna eru byrjaðar að hafa áhrif á það hvernig við skilgreinum og skiljum hvað er heilsusamlegt og hvað ekki og álit okkar á mikilvægi matarræðis er einnig að breytast með auknum skilning á mikilvægi þess, bæði gagnvart erfðafræðilegum þáttum og öðrum sem varða sameindauppbyggingu okkar (Kim & Wijesekara, 2010).

Fæðubótarefni hafa verið mikið notuð til heilsuþætingar og er einangrað fiskprótein (e. Fish Protein Concentrate, FPC) eitt ódýrasta fæðubótarefnið á markaðnum en rannsóknir á því hvernig má nýta það til að sporna gegn næringar- og matarskorti í heiminum hófust á sjötta áratug síðustu aldar. Vatnsrofnar fiskpróteinafleiður eða prótein hýdrólýsöt (e. Fish protein hydrolysate, FPH) hafa háa leysni og búa yfir eiginleikum sem ráðast af styrk þeirra í lausn. Samsetning þeirra er í kringum 1-8% vatn, 81-93% prótein, 0-5% fita og 3-8% aska (Khora, 2013).

Hægt er að hafa áhrif á virkni prótein hýdrólýsatanna með notkun á sérhæfðum ensímum til vatnsrofs og þar á meðal er hægt að hafa áhrif á virkni þeirra til bindingar á kalsíum. Fiskprótein hýdrólýsöt hafa einnig sýnt fram á marga heilsuþættandi eiginleika og hafa þau, ásamt því að vera notuð í kalsíumbætt fæðubótarefni, verið nýtt í spornun gegn offitu, sykursýki og krabbameins meinvörpum. Inntaka þeirra hefur einnig sýnt fram á aukna framleiðslu kalsítóníns og mögulega notkun próteinanna sem andoxarar innan lífverunnar („in vivo“) (Khora, 2013).

Markmið rannsóknarinnar var að kanna áhrif vatnsrofinna fiskprótein hýdrólýsata á upptöku kalsíum í Caco-2 frumumódeli. Notast var við þrjár mismunandi próteinafleiður frá nýsköpunarfyrirtækinu PROTIS sem allar höfðu verið rofnar með mismunandi ensímum.

1.1 Lífvirk efni

Lífvirk efni má skilgreina sem öll efni sem finna má í náttúrunni (vítamín og fjölliður) sem hluta af fæðukeðjunni og hafa áhrif á heilsu manna með líffræðilegri virkni í lifandi frumum og vefjum (Biesalski o.fl., 2009). Lífvirk efni eru að mestu leyti unnin úr lífverum sem lifa á landi en vinnsla þeirra úr sjávarlífverum hefur aukist til muna á undanförunum árum og má það einkum rekja til þess að þau lífvirku efni sem unnin hafa verið úr sjávarlífverum hafa reynst vera öðruvísi uppbyggð en þau sem finna má úr lífverum á landi (Kim & Wijesekara, 2010). Það er einkum vegna þeirra öfgafullu aðstæða sem sjávarlífverur búa við og krefjast þess af þeim af þær séu verulega sérhæfðar og framleiði því sérhæfðari og áhrifaríkari virkar sameindir sem ekki er að finna annars staðar (Hamed, Özogul, Özogul, & Regenstein, 2015).

1.1.1 Prótein hýdrólýsöt úr sjávarlífverum

Neysla á sjávarafurðum hefur talsverð jákvæð áhrif á heilsu og hefur aukning mannglegra sjúkdóma, líkt og krabbameina, örverusýkingar og bólgumyndandi ferla, orðið til þess að mikil aukning hefur orðið í rannsóknum á lífvirkum efnum úr sjó (Hamed o.fl., 2015). Mörg peptíð unnin úr fiskum og þangi búa yfir margskonar lífvirkri starfsemi þar á meðal storkuvörnum, vörnum gegn krabbameinum, vörnum gegn hækkun á kólesteróli (Hamed o.fl., 2015) og andoxandi hæfni (Kim & Wijesekara, 2010).

Nýting á fiski í hefðbundinni vinnslu til manneðis er oft á tíðum í kringum 40%, þar sem flökin eru í flestum tilfellum nýtt til manneðis. Restin, eða 60%, eru svo kallaðar hliðarafurðir og eru oft á tíðum ódýrt hráefni fyrir vinnslu á dýrafóðri. Hliðarafurðir samanstanda af haus, hrygg, roði, afskurði og fleiru. Magn hliðarafurða sem ekki er nýtt til manneðis fer þó eftir fisktegund og er bæði haus og hryggur af bolfiski nýtt til manneðis. Líftæknilegar aðferðir hafa gert mönnum kleyft að nýta þessar afurðir í framleiðslu og vinnu á ýmsum vörum, svo sem fiskpróteinum, og ýmis próteinkljúfandi ensím eru síðar notuð til vatnsrofs á próteinunum til peptíðmyndunar (Chalamaiah, Dinesh kumar, Hemalatha, & Jyothirmayi, 2012).

Notkun á dökkum próteinríkum fiskvöðvum er takmörkuð í manneði sökum mikillar hæfni þeirra til oxunar og undarlegs bragðs og eru þeir því að mestu leyti framleiddir yfir í ódýrari vörur. Af þessum orsökum getur ummyndum þeirra yfir í vatnsrofnar próteinafleiður leitt til mikillar verðmætasköpunar (Chalamaiah o.fl., 2012). Á meðal þessara verðmæta eru kalsíumbindandi-peptíð en þau binda sig við kalsíum og auðvelda þannig upptöku þess í meltingarvegi sem og lífvirkni (Hou o.fl., 2018).

1.1.2 Næringarefnið kalsíum

Sem næringarefni er kalsíum aðallega að finna í byggingu beina en yfir 99% af því kalsíum sem er að finna í mannlíkamanum má finna í tönnum og beinum á forminu „*calcium hydroxyapatite*“ ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$) (Ross, Yaktine, & Valle, 2011). Það kalsíum sem er að finna á ferð um líkamann gegnir mikilvægu hlutverki í vöðvavirkni, taugaboðum, seytingu hormóna, boðferlum frumna og við herpingu og víkkun æða (Peng, Hou, Zhang, & Li, 2017). Í fæðu er kalsíum einkum að finna í mjólkurvörum á borð við mjólk, jógúrt og osta. Í Bandaríkjunum er áætlað að um 72% kalsíum í næringu fólks komi úr mjólkurvörum, 7% úr grænmeti, 5% úr kornvörum og afgangurinn úr baunum, ávöxtum, eggjum ásamt kjöt og fisk. Kalsíum er tekið upp í gegnum frumuhimnur meltingarvegsins með virkum flutning eða óvirku flæði (Ross o.fl., 2011) en erfitt getur reynst að taka upp nægilegt kalsíum í gegnum fæðu sökum útfellingu á óleysanlegu kalsíum salti sem myndast í smáþörmunum (Peng o.fl., 2017).

Til eru nokkrar tegundir kalsíumblandna í formi fæðubótarefna sem ætlað er að sporna og jafnvel hindra kalsíumskort í mönnum, þar á meðal eru kalsíum karbónat, kalsíum laktat og kalsíum glúkanat. Þessar kalsíumblöndur hafa þó lága virkni við framkvæmd rannsókna sem rekja má til lágrar lífvirkni og lítils styrk kalsíum í blöndunni (D. Chen o.fl., 2014).

1.1.3 Bindivirkni vatnsrofinna próteinafleiða og frásog kalsíums úr meltingarvegi

Rannsóknir hafa sýnt fram á að sumar fæðutegundir, þar á meðal prótein, hafi jákvæð áhrif á upptöku kalks í meltingarvegi og nýlega hefur verið sýnt fram á að peptíð úr ákveðnum próteinum hafi bindivirkni (e. Chelating activity) eiginleika sem auðveldar frásog kalsíums úr meltingarvegi. Bindivirkni eiginleiki próteinafleiða er vegna amínósýruhópa með mismunandi hlaðna hliðarhópa ásamt því að lögun þeirra eykur bindivirkni (Eckert, Bamdad, & Chen, 2014). Þessi bindieiginleiki próteinafleiða gefur þeim líka andoxandi virkni sem einnig veldur betra frásogi, sérstakega hjá tvíhliðnum jónum eins og kalsíum (Baakdah & Tsopmo, 2016).

Oxun er efnahvarf sem getur hindrað frásog jóna á borð við kalsíum með því að losa sig við rafeind frá súrefninu og þar með hækkað rafhleðslu efnisins (Biology Online, 2008). Áhugi á því að geta nýtt náttúrulega andoxara hefur aukist, einkum vegna þess að þar opnast möguleikar á því að þróa náttúrulega andoxara til beytingar gegn þeim oxunarferlum sem lífrænar sameindir geta myndað (Senevirathne & Kim, 2012, bls. 32). Rannsóknir hafa sýnt fram á að vatnsrofnar próteinafleiður hafi góða hæfileika til hlutleysingar á sameindum ásamt því að búa yfir góðum andoxunarhæfileikum. Ásamt því hefur orðið þróun á aðferðum til þess að auka leysni kalsíumsameinda í því skyni að auka kalsíumupptöku í líffræðilegum ferlum og hafa rannsóknir sýnt fram á að peptíðin fengin úr fiskpróteinum hjálpi til við og hraði á upptöku kalsíum (Senevirathne & Kim, 2012) og járn. Binding steinefna (líkt og kalsíum) getur hjálpað til við upptöku þeirra í gegnum meltingarveginn (Khora, 2013). Til þess að meta virkni próteinafleiða í að auðvelda frásog kalks úr meltingarvegi má nota andoxunarpróf á borð við afoxandi hæfni (e. Reducing Power) og hæfni til að binda járn (e. Metal chelating). Bæði þessi próf ásamt DPPH (e. 1,1diphenyl-2-picryl hydrazyl) virkniprófi voru notuð í verkefninu.

1.1.4 Aðferðir til að meta bindivirkni og andoxandi virkni próteinafleiða

Í verkefninu voru notuð tvö mismunandi andoxunarpróf til þess að meta virkni próteinafleiðanna í að auðvelda frásog kalks úr meltingarvegi, ásamt járnbindiprófi. Binding málmsameinda eða fjarlægging þeirra er mikilvægt skref í því að skilja upptöku þeirra og lífvirkni. Járnbindipróf byggja á samkeppnisbindingu vatnsrofinna próteinafleiða við þekktar sameindir og járnbindipróf ásamt litrófsgreiningu til greiningar á niðurstöðum (Walters, Esfandi, & Tsopmo, 2018). Járn klóríð (e. Ferrous Chloride (FeCl_2)) var notað til samkeppnisbindingar í þessu verkefni.

Andoxunarprófin sem notuð voru kallast „*Ferric Ion Reducing Power (FRAP)*“ og „*DPPH Scavenging Activity*“. Bæði prófin mæla minnkaða virkni oxarans og sýna fram á minnkaða virkni með litabreytingum sem hægt er að mæla með litrófsgreiningu (Liu, Xing, Fu, Zhou, & Zhang, 2016). FRAP prófunin er einföld leið til þess að meta andoxunarhæfni. Afoxun þrígildrar járnsameindar niður í tvígilda við lágt pH gildi veldur litabreytingum sem hægt er að mæla með ljósgleypni. Breytingar á ljósgleypninni eru línulegar miðað við mismunandi þynningar efnisins sem verið er að rannsaka (Benzie & Strain, 1996). DPPH prófið er eitt algengasta andoxunarpróf í heiminum í dag. DPPH er stöðugt sindurefni sem býr yfir sterkum fjólubláum lit og sterkri gleypni við 517 nm. Litabreyting frá fjólubláum yfir í fölgulan verður eftir að DPPH hefur gefið frá sér rafeind og orðið stöðugri en þessi litabreyting ákvarðar andoxunarvirknina (Akar, Küçük, & Doğan, 2017).

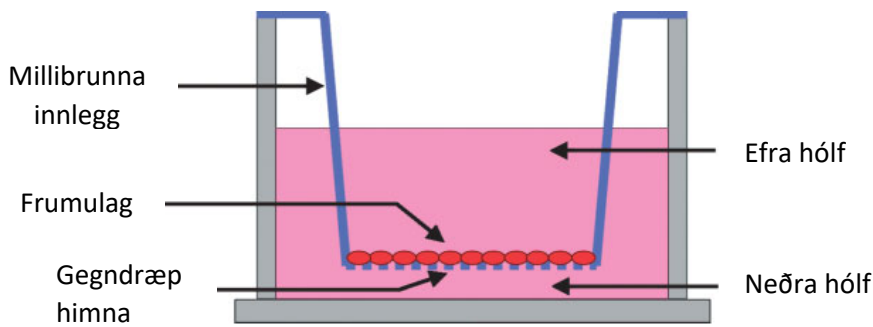
1.1.5 Aðferðir til að meta frásog kalsíums í frumumódeli

Til athugunar á upptöku og lífvirkni kalsíum, járns og fleiri næringarefnum er oft notuð Caco-2 frumulína úr þekjuvef sem finna má í þörmum manna. Þegar Caco-2 frumulínan sérhæfist er hún einstaklega lík jaðri skeifugarnarinnar og hentar því vel í rannsóknar gerðar „*in vitro*“ (á tilraunastofu) á meðan að rottur eru notaðar í rannsóknir gerðar „*in vivo*“ (innan lífverunnar). (Walters o.fl., 2018)

1.1.5.1 Caco-2 frumulínan

Caco-2 frumur voru uppgötvaðar við rannsóknir á krabbameinsfrumum og voru þar eina frumulínan sem gat sérhæfst fyrirvaralaust yfir í frumur sem hafa sömu eiginleika og þarmafrumur (Lea, 2015). Til þess að ná að sérhæfast mynda þær þétt tengi sín á milli (Breemen & Li, 2005) um leið og þéttu frumulagi er náð ásamt því að mynda þarmatítulur (Tallkvist & Tjälve, 1998). Frumulagið sem þær mynda svipar mjög til innra þekjulags smáþarmanna, bæði í byggingu og hlutverki (Hilgers, Conradi, & Burton, 1990), og hefur Caco-2 frumulínan því verið mikið notuð við rannsóknir á upptöku næringarefna í gegn um meltingarveginn ásamt rannsóknum á gegndræpi næringarefna (Hubatsch, Ragnarsson, & Artursson, 2007).

Við ræktun er frumulínan látin vaxa á sérstakri gegndræpri himnu (e. Permeable membrane) sem oftast er gerð úr pólýester eða pólýkarbónati. Smáholurnar í himnunni geta verið frá 0,4 til 0,8 μm í þvermál en þar sem 0,4 μm er ráðlögð stærð í rannsóknum sem þessari (Lea, 2015) voru ræktunarbrunnar með 0,4 μm innri brunni notaðir í þessari rannsókn. Á mynd 1 má sjá uppsetningu á slíkum ræktunarbrunni.



Mynd 1: Uppsetning á 12-brunna ræktunarplötum fyrir Caco-2 frumurækt

1.1.6 TEER mælingar

„*Trans epithelial electrical resistance*“ (TEER) mælingar eru nokkurs konar gæðapróf sem gerð eru á frumurækt fyrir og eftir rannsóknir til þess að athuga heilleika og virkni þéttu tengjanna sem myndast í frumuræktinni og eru bæði notaðar til athugunar á tengjum í þekjuvef og innri þekjuvef (Srinivasan o.fl., 2015). Mælingarnar má gera á frumurækt á meðan á rannsókn stendur og á mismundi stöðum í ræktunarferli frumurækta og við skiptingu þar sem mælingin hefur engin eyðileggjandi áhrif á frumuræktina. Þó geta þættir líkt og æti, hitastig og ræktunarstig (þ.e. fjöldi skiptinga) frumuræktarinnar haft áhrif á TEER gildin (Srinivasan o.fl., 2015). Sýnt hefur verið fram á að mælingar á Caco-2 frumulögum eru háðar hitastigi og ættu því helst að vera framkvæmdar í hitaskáp við 37°C. Rannsóknir hafa sýnt fram á að TEER gildi geta breyst á milli ræktunarnúmera og geta farið frá því að vera 475-700 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (ræktunarstig 35-47) yfir í það að vera 1100-1500 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (ræktunarstig 87-112) (Srinivasan o.fl., 2015).

1.2 Lífvænleiki frumna

Mælingar á lífvænleika frumna eru mikið notaðar til að skoða heilbrigði frumnanna og möguleg áhrif efna á heilbrigði þeirra og lífvænleika. Þessar mælingar gefa mikilvæg gögn um frumuræktina áður en rannsóknir eru framkvæmdar hvort sem það er „*in vivo*“ eða „*in vitro*“ (Xu, McCanna, & Sivak, 2015). Efnasamband sem kallast PrestoBlue er notað til þess að mæla dauða frumna með því að gera lífvænleikapróf á frumuræktinni. Efnasambandið umbreytist þegar það kemst í snertinu við frumurnar og verður rautt að lit en liturinn verður meiri eftir því sem lífvænleiki frumuræktarinnar er meiri. Við þessa breytingu verður efnasambandið flúrljómandi og hægt er að mæla litabreytinguna með flúrmælingum eða ljósgleypnimælingum (ThermoFisher, e.d.-c). PrestoBlue efnasambandið er einnig vatnsleysanlegt, hefur engin eituráhrif á frumur (Xu o.fl., 2015) og hefur stuttan virknitíma (allt niður í 10 mínútur) (ThermoFisher, e.d.-c) og var því notað til lífvænleikagreiningar í þessari rannsókn.

1.3 Stærðargreining á próteinum vatnsrofsafleiða

SDS-PAGE eða „*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*“, er vel þekkt aðferð til að flokka og aðgreina prótein eftir stærð. Rafdráttur er sendur í gegnum pólýakrýlamíð gel sem innihalda net eða möskva sem öll próteinin þurfa að ferðast í gegn um. Minni prótein ferðast hraðar í gegn en þau sem eru stærri ferðast hægar. Áður en sýnum er hlaðið á gelinu eru þau viðbætt með litarbættum hleðsludúa svo próteinin verði sýnileg í gelinu á meðan á rafdrætti stendur (Cleveland, Fischer, Kirschner, & Laemmli, 1977). Að rafdrætti loknum eru gelin lituð sem gerir próteinböndin í gelinu sýnileg og hefur svokölluð „*coomassie*“ litun verið mest notuð. Coomassie litur binst við vatnsfælna og basíska parta próteina við súrar aðstæður og breytist við það úr brúnrauðum lit yfir í bláan, litinn má endurnota allt að þrisvar sinnum („*Protein Gel Staining and Imaging - IS*“, e.d.).

Til stærðarviðmiðunar er stiga (e. protein ladder) komið fyrir í brunnnum á báðum endum gelsins fyrir rafdrátt til þess að auðveldara sé að meta stærð próteinanna eftir rafdrátt. Ávallt eru valdir þeir stigar sem taldir eru henta best en til eru stigar af mismunandi stærðum allt frá 1,4 – 250 kDa („*Molecular Weight Markers*“, e.d.).

Til eru margar tegundir SDS-PAGE gelja til að greina mismunandi stærðarflokka af prótein mólíkúlum. Við þessa rannsókn var hefðbundið „*Novex 16% Tricine*“ próteingel notað, sem hentar vel fyrir aðgreiningu á próteinum og peptíðum með lágan mólþunga (ThermoFisher, e.d.-a), og „*NuPAGE 10 % BisTris*“ próteingel sem hentar vel í rannsóknum þar sem heilleiki próteinsameinda er mikilvægur. BisTris próteingelin eru frábrugðin hefðbundnu Tricine gelunum að því leyti að þau hafa hlutlaust pH gildi sem dregur úr breytingum á próteinafleiðunum (ThermoFisher, e.d.-b).

2 Tilgangur rannsóknar

Markmið rannsóknarinnar var að skoða hvort fiskpróteinafleiður unnar úr afskurði frá flakavinnslu á þorski gætu auðvelað frásog kalsíums úr meltingarvegi í Caco-2 frumumódeli. Athugað var hvort fiskpróteinafleiðurnar byggju yfir bindivirkni og andoxandi eiginleikum. Einnig var skoðað hvort mismunandi samsetta fiskpróteinafleiður, þ.e. próteinafleiður af mismunandi stærð hefðu mismunandi áhrif á frásog kalsíums sem og bindivirkni og andoxandi afleiðanna.

1. Búa fiskpróteinafleiður yfir bindivirkni?
 - a. Hefur samsetning fiskpróteinafleiða áhrif á bindivirkni þeirra
2. Búa fiskpróteinafleiður yfir andoxandi virkni?
 - a. Hefur samsetning fiskpróteinafleiða áhrif á andoxandi virkni þeirra?
3. Hafa fiskpróteinafleiður áhrif á frásog kalsíums í Caco-2 frumumódeli?
 - a. Hefur samsetning fiskpróteinafleiða áhrif á frásog kalsíums í frumumódeli?

3 Efni og framkvæmd

3.1 Efni

Tafla 1: Öll efni notuð við framkvæmd þeirra rannsóknar sem gerðar voru í þessu verkefni

Efni/Efnasamband	Framleiðandi
3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenyl-sulfonic acid)-1,2,4-triazine (Ferro Zine™) 5 mM	Sigma-Aldrich 160601
1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH)	Sigma-Aldrich D9132
Lucifer Yellow CH potassium salt (LY)	Molecular Probes L1177
8-hydroxyguinoline (8-HQ)	Sigma-Aldrich 252565
B-Glycerophosphate (β-GP)	Sigma-Aldrich G9422
Bis-Tris Protein Gel 10%; 1.0 mm, 10-brunna	NuPage™ NP0301BOX
Calcium Dihydrate (CaCl ₂)	Merck 23820500
D-Glucose	Sigma-Aldrich G7021
Ethanolamine	Sigma-Aldrich 398136
Ferrous Chloride (FeCl ₂)	Sigma-Aldrich 372870
Hydrochloric Acid (HCl)	Sigma-Aldrich 30721
HEPES Sodium Salt	Sigma-Aldrich H3784
Potassium Carbonate (K ₂ CO ₃)	Sigma-Aldrich ATH
Potassium Chloride (KCl)	Sigma-Aldrich P5405
Potassium Phosphate Monobasic (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich P5655
L-Ascorbic Acid (L-AA)	Sigma-Aldrich A5960
Levamisol Hydrochloride	Sigma-Aldrich 31742
Methanol (CH ₃ OH) – HPLC grade >99.9%	Sigma-Aldrich 34860
Magnesium Chloride (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich M8266
Sodium Phosphate Dibasic Dihydrate (Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O)	Sigma-Aldrich 71643
Sodium Chloride (NaCl)	Sigma-Aldrich S7653
Sodium Azide (NaN ₃)	Sigma-Aldrich S2002
O-Cresalphthlein Complexone (o-CPC)	Sigma-Aldrich P5631
Potassium ferricyanide (K ₃ Fe(CN) ₆)	Sigma-Aldrich 244023
Presto Blue®	Thermo Fisher A132262
Próteinafleiddur (ALC, AX and N)	Icelandic Cod
Sodium Pyruvate (C ₃ H ₃ NaO ₃)	Sigma-Aldrich P5280
Trichloroacetic Acid (TCA)	Sigma-Aldrich T0699
Tricine Protein Gel 16%; 1.0 mm, 12-brunna	Novex™ EC66952BOX
Xylidyl Blue 1 (Magonsulfonate)	Sigma-Aldrich 248266
Low Range Próteinstaðall	Thermo Fisher 26628
Page Ruler Prestained Próteinstaðall	Thermo Fisher 26616

3.2 Efni og æti notuð við frumuræktun

Tafla 2: Öll efni og efnasambönd notuð við ræktun á Caco-2 frumulínu

Æti og efni/efnasambönd	Framleiðandi
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) +D-Glucose, L-Glutamine + Pyruvate	Gibco 41966-029
Fetal Bovine Serum – Qualified Heat Inactivated (FBS)	Gibco 10500-064
Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)	Sigma-Aldrich ED455
Ethylene-bis(oxyethylenenitrilo)tetraacetic Acid (EGTA)	Sigma-Aldrich E4378
Insulin Transferrin Selenium (ITS)	Gibco 41400-045

<i>Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep)</i>	Sigma Aldrich P4333
<i>Peptone (from animal tissue)</i>	Sigma-Aldrich P5905
<i>Trypsin – EDTA solution</i>	Sigma-Aldrich T4049

3.3 Tæki og tól

Tafla 3: Öll tæki og tól notuð við framkvæmd allra rannsókna í þessu verkefni

Tæki og tól	Framleiðandi
12-brunna ræktunarplata	Falcon® 353503
Sóttthreinsibekkur	Thermo Fisher KS18
Countess™ Automated Frumteljari	Invitrogen
Eppendorf Túba (1,5 mL)	Sarstedt AG&Co 72.690.001
Glær 96 brunna plata	Falcon® 353072
Grammavog	ADAM AFA-120LC
HeraCell 240i CO ² Hitaskápur	Thermo Fisher
Hitaplata (Stuart)	Bibby
Hitaskápur fyrir frumurækt	Nuve EN400
Hristiplata	IKA®KS 130 Basic (Sigma-Aldrich Z341800)
Innra hólf 12-brunna ræktunarplötu (0,4 µm)	Falcon® 353180
Ljósgleypnivél (Cytation 5 Imaging Reader)	BioTek
Læknissprautur (1 mL)	Braun 9161406V
Millicell ERS-2 Voltohm-meter	Sigma-Aldrich MER S00002
Míkróplata	Thermo NUNC 269620
Nál í læknissprautu (Hypodermic)	Braun
Orion™ Triode™ 3 in 1 pH/ATC Probe	Thermo Fisher 9157BN
pH Benchtop meter	Thermo Fisher 13-644-928
Pípettu stjórnæki	Corning® Stripettor Ultra
Pípettur og oddar	Gilson F161670, F161930,
PowerEase™ 90W Power Supply	Thermo Fisher PS0091
Rafdráttartankur fyrir gel (Mini Gel Tank)	Thermo Fisher A25977
Serological Pípettur	Falcon®
Sía fyrir læknissprautu	Whatman™ 10462100
Skilvinda - MiniSpin®plus	Eppendorf 5453000011
Skilvinda 5702	Eppendorf
Smásjá	EVOS XL Core
Sog pípetta	Gilson® Safe Aspiration Station
Svört 96 brunna plata	Costar 3915
Svört 96 brunna plata (glær botn)	Falcon® 353948
T-75 cell frumuræktunarflöskur	Falcon® 353136
Túba í skilvindu (15 mL)	Sarstedt AG&Co 62.554.502
Túbur (50 mL)	Sarstedt 62.547.254
Vog	OHAUS AX124
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Örbylgjuofn	Samsung ME82V

3.4 Dúar

Tafla 4: Allir dúar sem voru notaðir við framkvæmd þessa verkefnis

Dúi	Innihald / Framleiðandi
Colour Reagent for Calcium Assay	o-CPC 0,2 mM

	8-HQ	20 mM
<i>Colour Reagent for Magnesium Quantification</i>	TRIS Buffer EGTA K ₂ CO ₃ NaN ₃	200 mM, pH 11-12 w. NaOH 0,05 mM 77 mM 0,05% in TRIS Buffer
<i>Hank's Balanced Salt Solution HBSS (Calcium Free) Buffer, pH 7.4</i>	NaCl KCl HEPES D-Glucose KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄	1380 mM 53 mM 100 mM 55 mM 4,1 mM 3,4 mM
<i>Novex™ Tricine SDS Running Buffer, 200 mM NuPage™ MES SDS Running Buffer (20x) Phosphate-buffered saline (PBS)</i>	Thermo Fisher LC1675 Thermo Fisher NP0002 NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄	137 mM 2,7 mM 10 mM 1,8 mM
<i>Reaction Buffer for Calcium Assay, pH 10.6</i>	Ethanolamine dH ₂ O HCl	1 M For pH adjustment
<i>Sodium Phosphate Buffer, pH 6.6</i>	NaH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄	0,2 M 0,2 M
<i>TRIS Buffer</i>	Trizma®base, Sigma Aldrich T1503	

3.5 Undirbúningur sýna

Sýnin sem notuð voru til rannsóknar í þessari rannsókn voru fengin tilbúin til notkunar frá líftæknifyrirtækinu PROTIS ehf. á Sauðárkróki. Sýnin eru unnin úr vöðva af Atlantshafsporski (e. *Gadus morhua*) og eru samsett úr mismunandi blöndum peptíða sem gefur þeim mismunandi lífvirkni eiginleika. Rannsakandi gaf sýnunum nöfnin ALC, AX og N og verða þau nöfn notuð til aðgreiningar í gegnum þessa rannsókn.

Við framkvæmdar hvers efnaprófs voru nýjar peptíðblönduþynningar undirbúnar með því að þynna hvert sýni fyrir sig í eimuðu vatni í þynningunni 1:10. Blandan var hrist vel saman og látin liggja á hristiplötu undir meðalháum hristing í að minnsta kosti 60 mínútur til þessa að tryggja það að peptíðin væru uppleyst í vatninu. Allar blöndurnar voru settar í skilvindu í 5 mínútur á 4000 rpm (e. round per minute), botnfallinu var hent og flotið fært yfir í ný tilraunaglös og blandan geymd í kæli fram að notkun.

3.6 Efnagreiningar sýna

3.6.1 Stærðargreining peptíða í sýnum með SDS-PAGE rafdrætti

“Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis” (SDS-PAGE) rafdráttur var framkvæmdur til stærðargreiningar á peptíðunum. Til þess að geta skoðað betur mismunandi

stærðir peptíðanna voru notuð tvö mismunandi rafdráttargel við stærðargreininguna. Gelin eru samsett á mismunandi hátt sem hjálpar til við aðgreiningu á peptíðunum og stærðargreiningin varð nákvæmari. Notast var við forsteypt 10% Bis-Tris gel annars vegar og forsteypt 16% Tricine gel hins vegar. Bis-Tris gelið getur sýnt stærðir á peptíðum í skala frá 1,5 – 300 kDa eftir því hvaða stigi er valinn. Tricine gelið sýnir eingöngu stærðir á peptíðum frá 2-10 kDa og hentar því betur fyrir stærðargreiningu peptíða með lítinn mólmassa.

3.6.2 Undirbúningur sýna fyrir SDS rafdrátt

Peptíðblöndurnar voru þynntar með eimuðu vatni í 50 mg/mL og 100 mg/mL fyrir greiningu. Mismunandi "Mastermix" eða efnablanda var útbúin fyrir hvort gel um sig með því að setja 13 µL af hvorri þynningu í tvísýni í eppendorglös ásamt 5 µL af viðeigandi sýnadúa (NuPage™ MES SDS Running Buffer (20x)) og 2 µL af afoxara fyrir Bis-Tris gelið og 10 µL af viðeigandi sýnadúa (Novex™ Tricine SDS Running Buffer, 200 mM) og 2 µL af afoxara fyrir Tricine gelið.

Mastermixin voru spunnin í borðskilvindu í 5 sekúndur til blöndunar, hituð í vatnsbaði við 85°C til að aðskilja þær agnir sem voru í blöndunni og settar á ís til að halda ögnunum stöðugum á meðan að rafdráttarbúrið var undirbúið.

3.6.3 Framkvæmd SDS rafdráttar

Notaðir voru tveir próteinstaðlar til greiningar, „Spectra Multicolour Low Range“ próteinstaðall og „Page Ruler Pre-Stained“ próteinstaðall. Rafdráttargelum var komið fyrir í rafdráttarbúri ásamt viðeigandi keyrsludúa (viðeigandi sýnardúar voru notaðir í þessu tilfalli) sem hellt var á milli geljanna og búrinu komið fyrir í boxi með ísvatni. Próteinstöðlum var hlaðið í brunna 1 og 8 og sýnum var hlaðið í eftirstandandi brunna. Uppsetningu má sjá í töflu 6.

Tafla 5: Uppsetning peptíðsýna og stiga í gel fyrir rafdrátt

Brunnur	Sýni / Próteinstaðall
1	5 µL - Low Range próteinstaðall
2	10 µL - 50 mg/mL AX
3	10 µL – 100 mg/mL AX
4	10 µL – 50 mg/mL ALC
5	10 µL – 100 mg/mL ALC
6	10 µL – 50 mg/mL N
7	10 µL – 100 mg/mL N
8	5 µL – Pre-Stained próteinstaðall

Hræristaut var komið fyrir í búrinu, lokið sett á og búrið tengt. Bæði gel voru rafdregin við 125 V og 200 mA í 90 mínútur. Eftir rafdrátt voru gelin skoluð með eimuðu vatni og þeim komið fyrir í plastboxum með loki.

3.6.4 Litun gelja eftir SDS rafdráttarmælingu

Gelin voru hituð í örbylgjuofni í 40 sekúndur við 700 W eða þar til að vatnið var orðið vel heitt án þess að sjóða. Gelin voru sett á hristiplötu í 30 sekúndur við vægan hristing. Þetta ferli var endurtekið í þrígang fyrir hvort gel með endurnýjun á eimuðu vatni í hvert sinn. Að þessu loknu var litarupplausn hellt yfir gelin í boxunum og ferlið endurtekið. Gelin voru látin liggja í litarupplausninni í kælskáp yfir nótt, skoluð með eimuðu vatni og mynduð daginn eftir.

3.6.5 Afoxunargreining með Ferric Ion Reducing Power

Útbúnir voru 500 mL af 0,2 M sódíum fosfat greiningardúa með því að búa til 500 mL af 0,2 M NaH_2PO_4 lausn og 500 mL af 0,2 M Na_2HPO_4 lausn sem síðan var blandað saman í dúa með sýrustig 6,6 (pH 6,6). Ný peptíðsýni voru undirbúin samkvæmt kafla 3.5 og hvert sýni var þynnt í eimuðu vatni í 1 mg/mL, 0,5 mg/mL og 0,1 mg/mL. Aðrar efnablöndur sem þurfti til greiningarinnar voru 1% $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (e. Potassium ferricyanide) í eimuðu vatni, 10% TCA (e. Trichloroacetic acid) í eimuðu vatni og 0,1% FeCl_3 (e. Ferric chloride) í eimuðu vatni. L-Ascorbic sýra í þynningum 200-100-50-25-12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ var notuð sem staðall í greiningunni.

Þrjúhundruð μL af greiningardúanum var pípettað í eppendorfglas ásamt 300 μL af $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ lausn og 60 μL af staðli, eimuðu vatni eða sýni. Hver blanda var gerð í einsýni og því 15 eppendorfglös notuð í heildina. Eppendorfglösin voru sett í hitaskáp við 50°C í 30 mínútur, 300 μL af TCA var því næst bætt í hvert glas og þau sett í skilvindu í 3 mínútur við 3000 rpm. Teknir voru 200 μL af lausninni efst í hverju glasi og settir í 96 brunna míkroplötu í fjórsýni (sýni og eimað vatn) og í þrísýni fyrir hverja þynningu af staðlinum. Því næst var 40 μL af FeCl_3 bætt við í hvern brunn og ljósgleypnin (e. Optical density; OD) lesin við 700 nm. Uppsetningu míkroplötunnar má finna í töflu 7.

Tafla 6: Uppsetning 96-brunna plötu fyrir afoxunargreiningu peptíðanna með FeCl₃ fyrir ljósgleypnimælingu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	200 µg/mL											
B	100 µg/mL	ALC - 1 mg/mL	ALC - 0,5 mg/mL	ALC - 0,1 mg/mL	AX - 1 mg/mL	AX - 0,5 mg/mL	AX - 0,1 mg/mL	N - 1 mg/mL	N - 0,5 mg/mL	N - 0,1 mg/mL		
C	50 µg/mL											
D	25 µg/mL											
E	12,5 µg/mL											
F	NÚLLSÝNI											
G												
H												

3.6.5.1 Tölfræðileg greining

Allar niðurstöður eru settar fram sem meðaltal ± staðalfrávik af fjórföldun sýna og staðli í þrísýni ásamt hlutfallslegu staðalfrávik (e. relative standard deviation; RSD) sem er sett fram sem prósentuhlutfall á milli staðalfráviks og meðaltals. Staðalkúrva staðalsins er sett upp á línulegu formi ásamt hallatölu til frekari útreikninga. Eftirfarandi jafna var notuð til að finna afoxunarhæfni peptíðanna

$$\text{Afoxunarhæfni} = \frac{\left(\frac{OD \text{ sýni}}{\text{hallatala}}\right)}{\text{magn efnis í brunni að lokinni gleypnimælingu} \left(\frac{mg}{mL}\right)}$$

3.6.6 Andoxunargreining með DPPH aðferð

Ný peptíðsýni voru undirbúin samkvæmt kafla 3.5 og hvert sýni var þynnt í eimuðu vatni (dH₂O) 100 mg/mL, 10 mg/mL og 1 mg/mL. Undirbúin var 2 mM lausn af DPPH í eimuðu vatni og hún þynnt 1:10 til að ná fram 0,2 mM lausn sem notuð var við framkvæmd þessarar greiningar. L-Ascorbic sýra var notuð sem staðall í eftirfarandi þynningum; 5-10-15-20-25 µM. Gerðir voru 500 µL af hverri staðalþynningu.

Hvert peptíðsýni, staðalþynning og eimað vatn voru pípettuð í brunna á 96 brunna míkroplötu ásamt metanóli (MeOH) og DPPH í viðeigandi brunna, uppsetningu míkroplötunnar og yfirlit yfir innihald hvers brunns má finna í töflu 8.

Tafla 7: "Mastermix" fyrir hvert sýni, kontrólsýni, blank og kontrólblank

Sýni Mastermix	
Sýni	150 µL sýni + 50 µL DPPH
Kontról sýni	150 µL sýni + 50 µL MeOH
Núllsýni	150 µL MeOH + 50 µL DPPH
Kontról núllsýni	150 µL dH ₂ O + 50 µL MeOH

Brunnar merktir sem núllsýni (bæði núllsýni og kontról núllsýni) fylltir með annaðhvort MeOH eða DPPH munu ekki láta í ljós neina andoxunarvirkni þar sem að í þá vantar peptíðsýni, þetta gildir einnig um þá brunna sem innihalda peptíðsýni og MeOH. Þeir brunnar sem innihalda peptíðsýni ásamt DPPH ættu að sýna fram á andoxunarvirkni peptíðsýnanna.

Platan var hulin með álpappír og skilin eftir í myrkri við herbergishita í 30 mínútur og gleypnin síðan lesin við 520 nm.

Tafla 8: Uppsetning 96 brunna plötu fyrir andoxunargreiningu peptíðanna með DPPH fyrir ljósgleypnimælingu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	KONTRÓL NÚLLSÝNI											
B	NÚLLSÝNI											
C	5 µM	ALC – 100 mg/mL	ALC – 10 mg/mL	ALC – 1 mg/mL	AX – 100 mg/mL	AX – 10 mg/mL	AX – 1 mg/mL	N – 100 mg/mL	N – 10 mg/mL	N – 1 mg/mL		
D	10 µM											
E	15 µM											
F	20 µM	ALC – 100 mg/mL	ALC – 10 mg/mL	ALC – 1 mg/mL	AX – 100 mg/mL	AX – 10 mg/mL	AX – 1 mg/mL	N – 100 mg/mL	N – 10 mg/mL	N – 1 mg/mL		
G	25 µM											
H	30 µM											

3.6.6.1 Tölfræðileg greining

Allar niðurstöður eru settar fram sem meðaltal ± staðalfrávik af fjórföldun sýna og staðli í þrísýni ásamt hlutfallslegu staðalfrávikum sem er sett fram sem prósentuhlutfall á milli staðalfráviks og meðaltals. Eftirfarandi jafna var notuð til að finna afoxunarhæfni staðalsins, sem var settur upp sem staðalkúrva, og peptíðanna.

$$\% \text{ andoxunarvirkni} = \frac{(A_{\text{blank}} - A_{\text{ctrl blank}}) - (A_{\text{sýni}} - A_{\text{ctrl}})}{A_{\text{blank}} - A_{\text{ctrl blank}}} \cdot 100$$

3.6.7 Greining á hæfileika peptíðanna til járnbindingar

Ný peptíðsýni voru undirbúin samkvæmt kafla 3.5 og hvert sýni var þynnt í eimuðu vatni í 10 mg/mL. Þær efnablöndur sem þurfti við framkvæmd voru undirbúna. Tvö mM af FeCl₂ (e. Ferrous chloride) í eimuðu vatni, 5 mM FerroZine í eimuðu vatni og 10 mg/mL EDTA (e. Ethylenediaminetetraacetic acid) í eimuðu vatni en EDTA var notað sem jákvæður viðmiðunarstaðall í þessari greiningu. Mastermix fyrir hvern staðal eða peptíðsýni voru undirbúin í eppendorfglös samkvæmt töflu 10.

Tafla 9: "Mastermix" hvers sýnis, kontrólsýnis, blanka, kontról blanka og jákvæðs kontróls til notkunar

Kontról núllsýni	Núllsýni	++ Kontróll	Sýni	Kontról sýni
100 µL dH ₂ O	100 µL dH ₂ O	100 µL EDTA	100 µL Sýni	100 µL Sýni
50 µL FeCl ₂	50 µL FeCl ₂	50 µL FeCl ₂	50 µL FeCl ₂	50 µL FeCl ₂
100 µL dH ₂ O	100 µL Ferro Zine	100 µL Ferro Zine	100 µL Ferro Zine	100 µL dH ₂ O

Öll mastermix voru pípettuð í 96 brunna míkróplötu, þau sem innihéldu peptíðsýni í þrísýni og önnur sexfalt. Plötunni var komið fyrir undir álpappír á hristiplötu og var þar á vægum hristingi við herbergishita í 30 mínútur og ljósgleypnin síðan lesin við 562 nm. Uppsetningu plötunnar má finna í töflu 11.

Tafla 10: Uppsetning 96 brunna plötu fyrir járnbindigreiningu peptíðanna með FerroZine fyrir ljósgleypnimælingu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	KONTRÓL NÚLLSÝNI						ALC			ALC – KTRL		
B	NÚLLSÝNI						AX			AX – KTRL		
C	++ KONTRÓLL						N			N - KTRL		
D												
E												
F												
G												
H												

3.6.7.1 Tölfræðileg greining

Allar niðurstöður eru settar fram sem meðaltal ± staðalfrávik af fjórföldun sýna og staðli í þrítili ásamt hlutfallslegu staðalfrávik (e. Relative standard deviation; RSD) sem er sett fram sem prósentuhlutfall á milli staðalfráviks og meðaltals. Staðalkúrva staðalsins er sett upp á línulegu formi ásamt hallatölu til frekari útreikninga. Eftirfarandi jafna var notuð til að finna járnbindingarhæfileika peptíðanna

$$\text{járnbinding (\%)} = \frac{(A_{\text{blank}} - A_{\text{ctrl blank}}) - (A_{\text{sýni}} - A_{\text{ctrl sýni}})}{(A_{\text{blank}} - A_{\text{ctrl blank}})} \cdot 100$$

3.7 Frumurækt

Caco-2 frumuræktin var fengin frá MATÍS og ræktuð upp frá rækt 4 og rannsökuð á milli rækta 22 og 28. Frumuræktinni hafði þegar verið sáð í tvær T-75 ræktunarflöskur til viðhalds þegar þessi rannsókn hófst og fékk rannsakandi einnig tilbúna frumurækt í 12 brunna ræktunarplötum til notkunar við framkvæmd á greiningu á kalsíumfrásogi með áður nefndum peptíðum. Viðhald frumuræktarinnar átti sér stað í T-75 flöskum allan þann tíma sem þessi rannsókn stóð yfir.

3.8 Viðhald frumuræktar

3.8.1 Skipting ætis í T-75 flöskum og 12 brunna plötum

Frumurnar voru ræktaðar við 37°C í röku umhverfi við 5% koltvísýring og 95% súrefni. Æti á Caco-2 frumunum var skipt út áður en ræktin náði 80% samþéttni en frumunum var aldrei skipt fyr en að ræktin hafði náð að koma sér fyrir og byrjuð að vaxa. Ræktinni var alltaf sáð aftur í hæfilegum þéttleika ($0,8 \cdot 10^6$) svo að ekki þyrfti að skipta henni oft en einu sinni í viku. Ræktinni þurfti að skipta áður en þéttleiki hennar hafði náð 80% til þess að koma í veg fyrir að frumurnar hæfu sérhæfingu á meðan á viðhaldi ræktarinnar stóð.

Notað var 12 mL af DMEM (e. Dulbecco's Modified Eagle's Medium) æti til útskiptingar á mánudögum og miðvikudögum fyrir hvora flösku og 15 mL á föstudögum. Notast var við alla 12 brunna á ræktunarplötunni. Á mánudögum og miðvikudögum voru 0,5 mL af DMEM æti settir í efra hólfið og 0,7 mL í neðra hólfið en á föstudögum voru 0,7 mL settir í efra hólfið og 1,3 mL í það neðra þar sem lengri tími leið á milli útskiptinga.

3.8.2 Skipting á Caco-2 frumurækt

Báðar T-75 flöskurnar voru skoðaðar undir smásjá áður en skipting á frumuræktunum átti sér stað. Þetta var gert til þess að tryggja að frumuræktinni yrði skipt áður en 80% samþéttni væri náð. Ætið var fjarlægt, 5 mL af PBS (e. Phosphate-buffered saline) dúa var bætt í hvora flösku, frumuræktirnar skolaðar og PBS dúi fjarlægður. Fjórum og hálfum mL af trypsíni var bætt í hvora flösku, passað að það þekti alla frumuræktina og flöskurnar hristar gætilega og bankað á hliðar til að freista þess að losa frumuræktina frá innra yfirborði flöskunnar. Báðar flöskur voru settar í hitaskáp við 37°C í 3 mínútur eða eins stutt og hægt var. Þegar allar frumur höfðu losað sig frá flöskunum var 5,5 mL af PBS bætt við trypsínið og frumurnar skolaðar vel upp og niður. Heildarlausn (um 10 mL) hvorrar flösku var flutt yfir í sitt hvort 10 mL tilraunaglasíð og þau sett í skilvindu í 3 mínútur við 2000 rpm. Flotinu var hellt af og botnfall hvors glass þynnt upp í 1-2 mL með PBS, lífvænlegra botnfallið

var valið og pípettað hægt og rólega yfir í nýja T-75 ræktunarflösku ásamt 12 mL af nýju DMEM æti. Frumuræktinni var komið fyrir í hitaskáp við 37°C.

3.8.3 Greining á lífvænleika frumuræktar

Frumunum var sáð í svarta 96 brunna míkróplötu með gegnsæjum botni ásamt 100 µL af æti (DMEM + 10% FBS (e. Fetal Bovine Serum)). Frumunum var leyft að vaxa í 48 klukkutíma og á meðan voru ný peptíðsýni undirbúin samkvæmt kafla 3.5 og þau þynnt í 1 – 0,5 – 0,1 – 0,01 mg/mL. Eftir 48 klukkustundir var skipt um æti í öllum brunnum á hverjum degi þar til lífvænleikagreining átti sér stað og að auki á sama degi. Hverri þynningu af hverju peptíðsýni var bætt í fjóra brunna á míkróplötunni svo að heildarrúmmálið varð 100 µL, eimað vatn var sett í þá brunna sem ekki innihéldu sýni og platan sett í hitaskáp við 37°C í 48 klukkutíma. Eftir þann tíma var öllum lausnum úr míkróplötunni (sýni og eimað vatn) skipt út fyrir 10% Presto Blue sem hafði verið þynnt í DMEM (10% FBS) æti. Platan var sett í hitaskáp við 37°C í 90 mínútur og ljósgleypnin lesin við 570 nm. Uppsetningu plötunnar má sjá í töflu 12.

Tafla 11: Uppsetning 96 brunna plötu fyrir athugun á lífvænleika Caco-2 frumuræktarinnar

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	ALC – 1 mg/mL				NÚLLSÝNI	NÚLLSÝNI	AX – 0,1 mg/mL				-
C	-	ALC - 0,5 mg/mL						AX – 0,01 mg/mL				-
D	-	ALC – 0,1 mg/mL						N – 1 mg/mL				-
E	-	ALC – 0,01 mg/mL						N – 0,5 mg/mL				-
F	-	AX – 1 mg/mL						N – 0,1 mg/mL				-
G	-	AX – 0,5 mg/mL						N – 0,01 mg/mL				-
H	-	-	-	-	-			-	-	-	-	-

3.8.3.1 Tölfræðileg greining

Allar niðurstöður eru settar fram sem meðaltal ± staðalfrávik af fjórsýni ásamt hlutfallslegu staðalfrávik sem er sett fram sem prósentuhlutfall á milli staðalfráviks og meðaltals. Eftirfarandi jöfnur voru notaðar til þess að finna lífvænleika og dánartíðni frumuræktunarinnar

$$\% \text{ lífvænleiki} = \frac{\text{meðaltal flúrljóma í frumum með peptíðsýnis}}{\text{meðaltal flúrljóma í frumum án peptíðsýnis}} \cdot 100$$

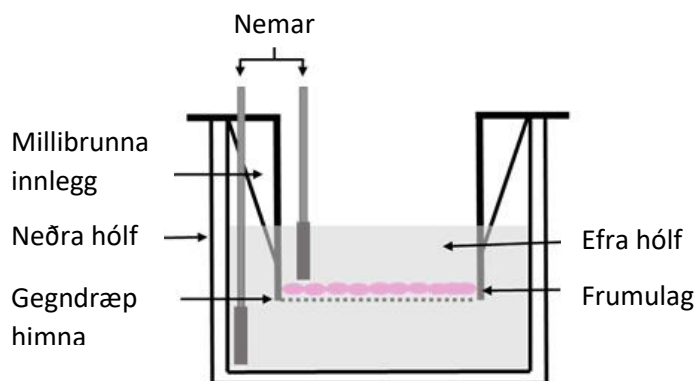
$$\% \text{ dánartíðni} = 100 - \% \text{ lífvænleiki}$$

3.9 Gegndræpi Caco-2 frumulags gagnvart Lucifer Yellow

3.9.1 Uppsetning rannsóknar

Skript var um æti á frumuræktinni í 12 brunna ræktunarplötunni. HBSS (e. Hank's Balanced Salt Solution) dúi án viðbættis kalsíum var undirbúinn og ávallt hitaður fyrir notkun. Gerðir voru 200 mL af tífoldum HBSS dúa og sýrustig hans aðlagð í 7,4 (pH 7,4) áður en hann var síaður til sótthreinsunar og þynntur í einfaldan HBSS dúa fyrir notkun.

Eppendorfglös voru undirbúin og merkt. Sex mM LY (e. Lucifer Yellow, LY) hvarfalaun var notuð til þess að athuga gegndræpi Caco-2 frumanna og voru 3 brunnar úr 12-brunna plötunum valdir af handahófi til athugunar. Ný 12-brunna ræktunarplata var undirbúin með 1,5 mL HBSS í neðra hólfinu á þrem brunnnum. Æti frá efra hólfi brunnana, sem valdir höfðu verið af handahófi, var fjarlæggt, því komið fyrir í nýju ræktunarplötunni og efra hólfið fyllt með 500 μ L af einföldu HBSS. Plötunni var komið fyrir á hristiplötu sem staðsett hafði verið inni í hitaskápnunum við 37°C og höfð þar við vægan hristing í 10 mínútur. Skript var um HBSS í báðum hólfunum til þess að ganga úr skugga um að ekkert æti væri eftir á frumuræktinni. Plötunni var komið fyrir í hitaskápnunum við 37°C og höfð þar við vægan hristing í 10 mínútur. Ný 12-brunna ræktunarplata var undirbúin með 1,2 mL HBSS í neðra hólfinu. Platan var tekin úr hitaskápnunum og TEER mælingar framkvæmdar við herbergishita. Staðsetningar á rafskautum Ohm mælisins á meðan að mælingar stóðu yfir má sjá á mynd 2.



Mynd 2: Staðsetning nema (e. Electrode) Ohm-mælisins í 12-brunna ræktunarplötu á meðan að TEER mælingar standa yfir

Sýni voru tekin úr neðra hólfinu á 20 mínútna fresti yfir 60 mínútna tímabil (600 μ L) eða á mínútum 0, 20, 40 og 60. Sýni voru einnig tekin úr efra hólfinu (50 μ L) á mínútu 0 (T_0) og mínútu 60 (T_{60}). HBSS var komið fyrir í hólfunum í stað tekinna sýna og öll sýni voru geymd í myrkri fram að notkun. Eftir að síðasta sýnið hafið verið tekið var HBSS dúinn fjarlægður úr efra hólfinu og því komið fyrir á nýju 12 brunna plötunni sem áður hafði verið undirbúin og 400 μ L af 6 mM LY þynntu í HBSS var bætt í efra hólfið. Allir brunnarir voru þvegnir þrisvar sinnum með HBSS og sýnin því næst geymd í HBSS í hitaskáp við 37°C í 60 mínútur. Seinni TEER mælingar voru framkvæmdar við

herbergishita og HBSS þar næst skipt út fyrir venjulegt æti (10% FBS) og frumunum komið fyrir í hitaskáp við 37°C til viðhalds.

3.9.2 Uppsetning fyrir greiningu

Staðallinn var undirbúinn með því að þynna T_0 LY sýnið tekið úr efra hólfinu í 0,05-0,1-0,5-1,0-5,0-10-50 μ M. Sýni T_{60} var þynnt 1:1000 og 150 μ L af öllum sýnum og staðli var síðan komið fyrir í svartri 96 brunna plötu og ljósgleypni mæld við 480 nm. Uppsetningu plötunnar má sjá í töflu 13.

Tafla 12: Uppsetning 96 brunna plötu fyrir athugun á gegndræpi Caco-2 gagnvart Lucifer Yellow, fyrir ljósgleypnimælingu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0 μ M		Mínúta 0									
B	0,05 μ M		Mínúta 20									
C	0,1 μ M		Mínúta 40									
D	0,5 μ M		Mínúta 60									
E	1,0 μ M		Efra hólf - mínúta 60									
F	5,0 μ M		NÚLLSÝNI									
G	10 μ M											
H	50 μ M											

3.9.3 Tölfræðileg greining

Allar niðurstöður eru settar fram sem meðaltal \pm staðalfrávik af níu brunnum fyrir hvert sýni og staðli í þríriti ásamt hlutfallslegu staðalfrávikum sem er sett fram sem prósentuhlutfall á milli staðalfráviks og meðaltals. Staðalkúrva staðalsins er sett upp á línulegu formi ásamt hallatölu til frekari útreikninga. Eftirfarandi jafna var notuð til þess að finna gegndræpistuðul (P_{app}) frumulagsins gagnvart LY

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \cdot \frac{1}{A \cdot C_0}$$

A stendur fyrir flatarmál filtersins í efra hólfinu, C_0 stendur fyrir styrk LY í neðra hólfinu og dQ/dt er flæði á tímaeininu. Þessi jafna verður einnig notuð til útreikninga í kafla 5.2.

3.10 Gegndræpi Caco-2 frumulags gagnvart kalsíum

Undirbúningur fyrir þessa rannsókn var framkvæmdur á sama hátt og í kafla 3.9.1 fram að og með fyrstu TEER mælingum að undanskildu því að notast var við 10 brunna úr einni 12-brunna plötu við framkvæmd og forhitaða HBSS notað í framkvæmdinni var viðbætt með kalsíum og notað til greiningar í þessari rannsókn. Ný peptíðsýni voru undirbúin samkvæmt kafla 3.5 og hvert sýni þynnt 1:10 í HBSS dúanum.

Ný 12-brunna ræktunarplata var undirbúin með því að bæta við 1,5 mL af kalsíumbættum HBSS dúa í neðra hólf 10 brunna. Kalsíumbættum HBSS dúa ásamt peptíðsýni (400 μ L) var bætt við í

efra hólf 2 brunna fyrir hvert paptíðsýni og kalsíumbættum HBSS dúa án peptíðsýnis (400 µL) var bætt í efra hólf fjögurra brunna. Sýnataka hófst um leið og þessu var lokið. Sýni voru tekin úr neðra hólfinu á 20 mínútna fresti yfir 60 mínútna tímabil (600 µL) eða á mínútum 0, 20, 40 og 60 og HBSS dúa án kalsíum komið fyrir í neðra hólfinu í staðinn. Sýni voru einnig tekin úr efra hólfinu (50 µL) á mínútu 0 (T₀) og mínútu 60 (T₆₀). Uppsetningu á 12- brunna plötunni má sjá í töflu 14.

Tafla 13: Uppsetning 12-brunna ræktunarplötu fyrir athugun á gegndræpi Caco-2 gagnvart kalsíum

	Með sýni		Án sýnis	
ALC	1	2	3	4
AX	5	6	7	8
N	9	10		

Eftir að síðasta sýnið hafið verið tekið var HBSS dúinn var fjarlægður úr efra hólfu allra brunna, því komið fyrir í nýju 12 brunna plötunni sem áður hafði verið undirbúin og 500 µL kalsíumbættum HBSS dúa var bætt í efra hólfu. Allir sex brunnarnir voru þvegnir þrisvar sinnum með HBSS og seinni TEER mælingar voru framkvæmdar við herbergishita. HBSS þar næst skipt út fyrir venjulegt æti (10% FBS) og frumunum komið fyrir í hitaskáp við 37°C til viðhalds.

3.10.1 Kalsíumgreining

Staðallinn var undirbúinn með því að þynna T₀ sýnið tekið úr efra hólfinu við framkvæmd í kafla 2.10 með eimuðu vatni. Einn mL af hverjum staðli í þynningum 0-0,4-0,8-1,2-1,6-2 µg/brunn var undirbúinn. Sýni T₆₀ var þynnt 1:100 í eimuðu vatni og ný peptíðsýni voru undirbúin samkvæmt kafla 3.5 og þynnt 1:10 í eimuðu vatni. Hvarfadúi var undirbúinn með því að blanda 1M Ethanolamine við eimað vatn og sýrustigið stillt í 10,6 pH með HCl (e. Hydrochloric acid, Saltsýra). Dúinn var ávallt notaður við herbergishita en geymdur í kæli þangað til framkvæmd hófst. Litadúi var undirbúinn með því að blanda 0,2 mM o-CPC (e. O-Cresolphthlein Complexone) og 20 mM 8-HQ (e. 8-Hydroxyguinoline) við eimað vatn. Litadúinn var þynntur 1:10 í HCl fyrir notkun og geymdur í kæli þangað til framkvæmd hófst en ávallt notaður við herbergishita.

Fimmtíu µL af hverju peptíðsýni eða staðli voru pípettaðir í glæra 96 brunna míkroplötu. Níutíu míkrolítrar af litadúa voru pípettaðir í hvern brunn og að síðustu 60 µL af hvarfadúa. Plötunni var komið fyrir á hristiplötu undir álpappír við vægan hristing og höfð þar í 5-10 mínútur við herbergishita. Ljósgeypnin var því næst lesin við 575 nm. Uppsetningu plötunnar má sjá í töflu 15.

Tafla 14: Uppsetning 96 brunna plötu fyrir athugun á gegndræpi Caco-2 gagnvart kalsíum, fyrir ljósgleypnimælingu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NÚLLSÝNI	ALC – 0	AX – 0	N – 0								
B		ALC – 20	AX – 20	N – 20								
C	2 µg/brunn	ALC – 40	AX – 40	N – 40	Neikv. kontróll							
D	1,6 µg/ brunn	ALC – 60	AX – 60	N – 60	- T 60							
E	1,2 µg/ brunn	ALC – T 0	AX – T 0	N – Top 0	Neikv. kontróll							
F	0,8 µg/ brunn	ALC – T 60	AX – T 60	N – Top 60	- T 0							
G	0,4 µg/ brunn	Neikv. kontróll - 0	Neikv. kontróll - 20	Neikv. kontróll - 40	Neikv. kontróll - 60							
H	0 µg/ brunn											

3.10.1.1 Tölfræðileg greining

Allar niðurstöður eru settar fram sem meðaltal ± staðalfrávik í tvíriti fyrir hvert sýni og staðal ásamt neikvæðum kontról í fjórriti. Hlutfallslegt staðalfrávik er einnig sett fram sem prósentuhlutfall á milli staðalfráviks og meðaltals. Eftirfarandi jafna var notuð til þess að finna gegndræpistuðul (P_{app}) frumulagsins gagnvart kalsíum

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \cdot \frac{1}{A \cdot C_0}$$

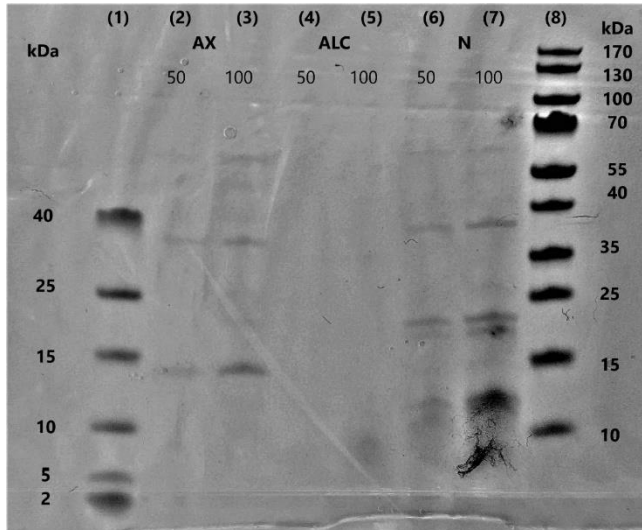
A stendur fyrir flatarmál filtersins í efra hólfinu, C_0 stendur fyrir styrk LY í neðra hólfinu og dQ/dt er flæði á tímaeininu. Þessi jafna verður einnig notuð til útreikninga í kafla 5.3.

4 Niðurstöður efnagreininga

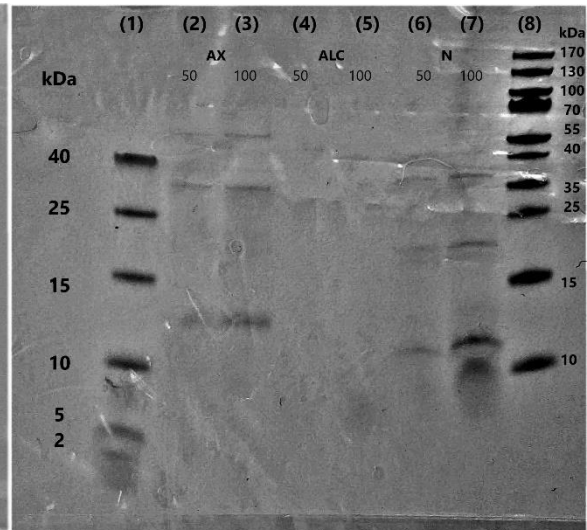
4.1 Stærðargreining peptíða með SDS-PAGE rafdrætti

SDS-PAGE rafdráttur var notaður til þess að greina peptíðsamsetningu próteinafleiðu sýnanna.

Á myndum 4 og 5 má sjá stærð þeirra peptíða sem sýni ALC, AX og N innihalda.



Mynd 4: Rafdráttargel sem sýnir próteinsamsetningu eftir vatnsrof. Í brunnum 1 og 8 eru tveir mismunandi próteinstaðlar og í brunnum 2-7 eru sýni í þynningum 50 mg/mL og 100 mg/mL



Mynd 3: Rafdráttargel sem sýnir próteinsamsetningu eftir vatnsrof. Í brunnum 1 og 8 eru tveir mismunandi próteinstaðlar og í brunnum 2-7 eru sýni í þynningum 50 mg/mL og 100 mg/mL.

Mynd 4 sýnir Bis-Tris gelið og þar má sjá sýni AX og N gefa skýr próteinbönd í stærðum 15 kDa, 40 kDa og 70 kDa í báðum þynningum. Sýni N gaf einnig skýrt próteinband í stærð 25 kDa í báðum þynningum en sýni ALC gaf engin sjáanleg próteinbönd. Mynd 5 sýnir Tricine gelið og þar má sjá sýni AX og N gefa skýr próteinbönd í stærð 40 kDa í báðum þynningum. Sýni AX gaf einnig bönd í stærð 15 kDa ásamt böndum í stærð 60-65 kDa í báðum þynningum. Sýni N gaf einnig bönd í stærð 25 kDa í báðum þynningum en bandið í þynningu 100 mg/mL var sýnilegra. Sýni ALC gaf engin sjáanleg próteinbönd í hvorugri þynningu (50 mg/mL og 100 mg/mL) í hvorugu gelinu.

Mynd 4 sýnir kám í neðra hægra horninu sem ekki varð sýnilegt fyr en að myndatöku lokinni. Það hafði ekki áhrif á niðurstöður þessarar greiningar.

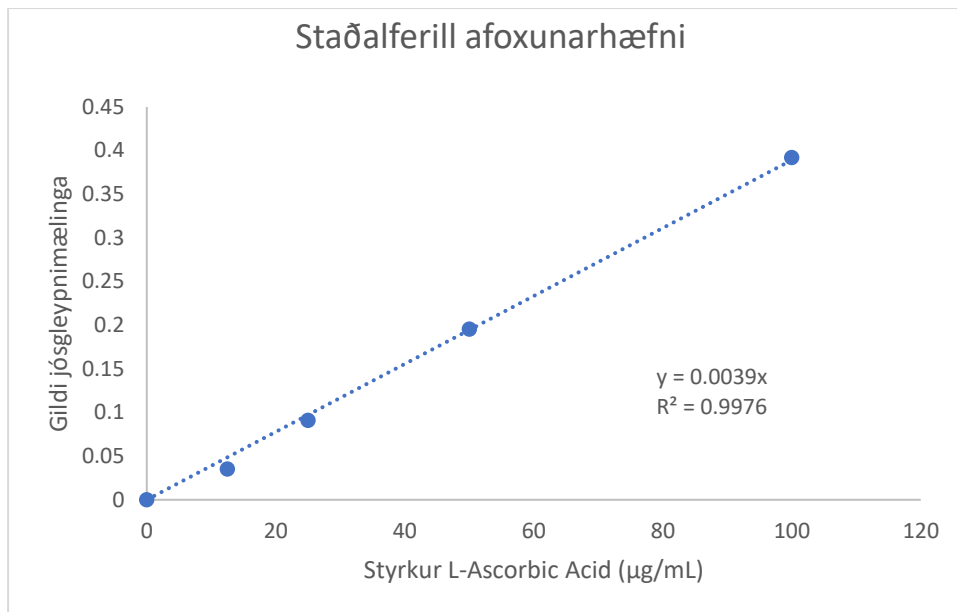
4.1.1 Niðurstöður afoxunarhæfnigreiningar

Meðaltal ljósgleypnimælinga fyrir L-Ascorbic Acid staðalinn ásamt staðalfrávikni má sjá í töflu 16. Þessar mælingar voru notaðar til útreikninga á staðalkúrvu sem síðar var notuð til útreikninga á afoxunarhæfni allra peptíðsýna við mismunandi þynningar. Útreiknað RSD gildi fyrir staðalinn í hæsta styrk (200 µg/mL) var 10,8% en það gildi var talsvert hærra en í öðrum þynningum staðalsins og var hann því ekki notaður með til útreikninga á staðalkúrvunni. Útreiknað meðaltal gilda

staðalkúrvunnar hækkar eftir því sem styrkur lausnarinnar verður meiri sem bendir til þess að línulegt samband sé á staðlinum í þessari rannsókn.

Tafla 15: Meðaltal staðalreikninga afoxunarhæfni með L-Ascorbic Acid

Staðall (µg / mL)	Meðaltal
0	0
12,5	1,136 ± 0.128
25	0,392 ± 0.006
50	0,195 ± 0.005
100	0,091 ± 0.004
200	0,035 ± 0.001

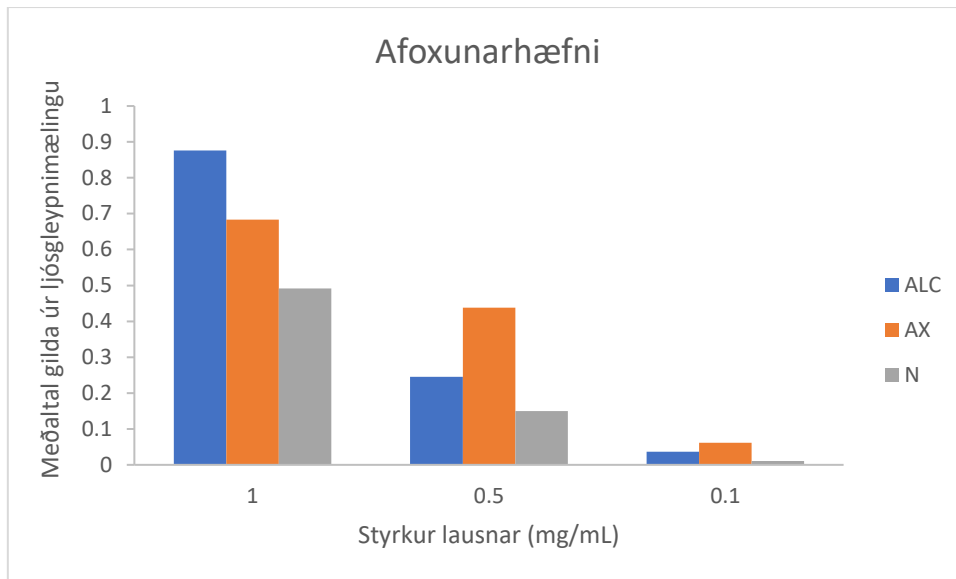


Mynd 5: Staðalkúrva ljósgleypnimælinga á L-Ascorbic Acid staðli við athugun á afoxunarhæfni peptíðsýnanna

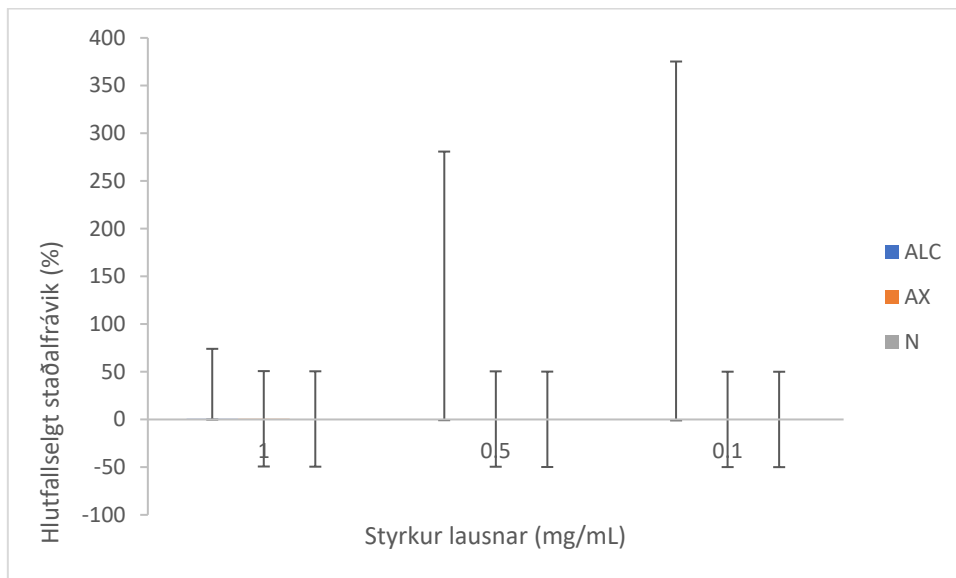
Mynd 5 sýnir útreikninga á staðalkúrvu sem gaf eftirfarandi jöfnu sem síðar var notuð til útreikninga á afoxunarhæfni (%) peptíðsýnanna (ALC, AX og N)

$$y = 0,0039x$$

Staðalkúrva staðalsins hafði $R^2 = 0.9976$ sem gefur til kynna jákvætt línulegt samband á milli gagnanna í þessari rannsókn og rannsakandi áætla því að L-Ascorbic Acid henti vel í rannsóknir á afoxunarhæfni peptíða.



Mynd 6: Stöplarit sem sýnir meðaltalið á afoxunarhæfni peptíðanna í mismunandi þynningum við OD_{700nm}



Mynd 7: Hlutfallslegt staðalfrávik á reiknaðri afoxunarhæfni peptíða í mismunandi þynningum við OD_{700nm}

Mynd 6 sýnir útreiknað meðaltal á afoxunarhæfni allra peptíðsýna við mismunandi þynningar. Peptíðsýni ALC mældist með hæsta afoxunarhæfni við styrk 1 mg/mL eða um 0,88. AX kom þar á eftir með 0,68 og N með 0,49. Peptíðsýni AX mældist með hæsta afoxunarhæfni við styrk 0,5 mg/mL eða um 0,44, ALC kom þar á eftir með 0,25 og N með 0,15. Peptíðsýni AX mældist áfram með hæsta afoxunarhæfni við styrk 0,1 mg/mL eða um 0,18, ALC kom þar á eftir með 0,14 og N 0,10. Mynd 7 sýnir hlutfallsleg staðalfrávik á reiknaðri afoxunarhæfni.

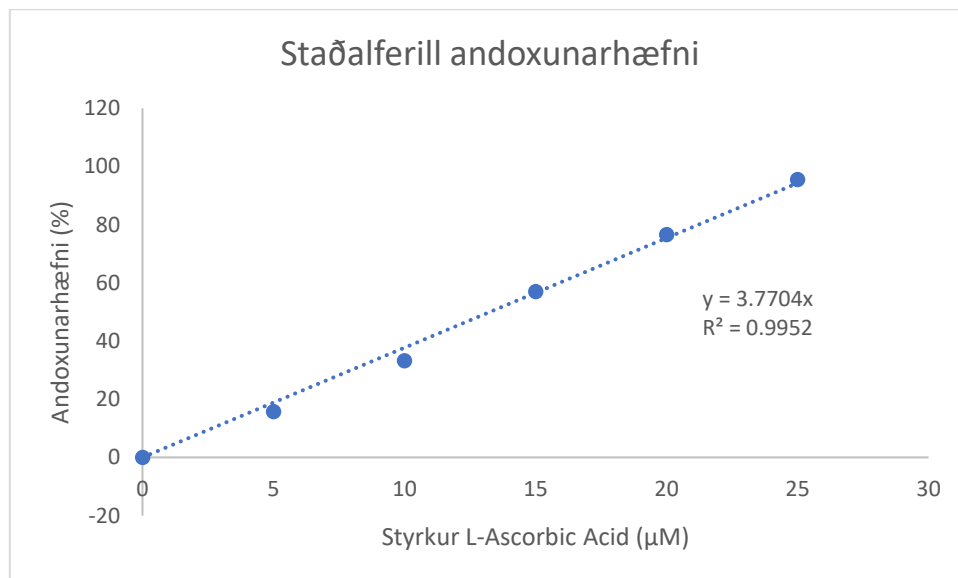
4.1.2 Niðurstöður andoxunarhæfnigreiningar með DPPH

Meðaltal ljósgleypnimælinga fyrir L-Ascorbic Acid staðalinn ásamt staðalfrávikni má sjá í töflu 17. Meðaltal staðalsins í hverri þynningu var notað til útreikninga á andoxunarhæfni staðalsins við

mismunandi þynningar sem síðar var notaður til útreikninga á hallatölu og staðalferli staðalsins. Staðallinn í hæsta styrknum (30 μM) var ekki notaður með til útreikninga á staðalkúrvu vegna þess að munurinn á milli hans og styrksins fyrir neðan (25 μM) er ekki línulegur. Meðaltal staðalsins lækkar eftir því sem styrkur lausnarinnar verður meiri sem bendir til þess að línulegt samband sé á L-Ascorbic Acid staðlinum í þessari rannsókn þegar gildi mesta styrksins hefur verið fjarlægð.

Tafla 16: Meðaltal andoxunarhæfni L-Ascorbic Acid staðalsins

Staðall (μM)	Meðaltal
0	0,204 \pm 0,0000
5	0,210 \pm 0,0006
10	0,175 \pm 0,0015
15	0,126 \pm 0,0031
20	0,086 \pm 0,0021
25	0,048 \pm 0,0012
30	0,046 \pm 0,0010

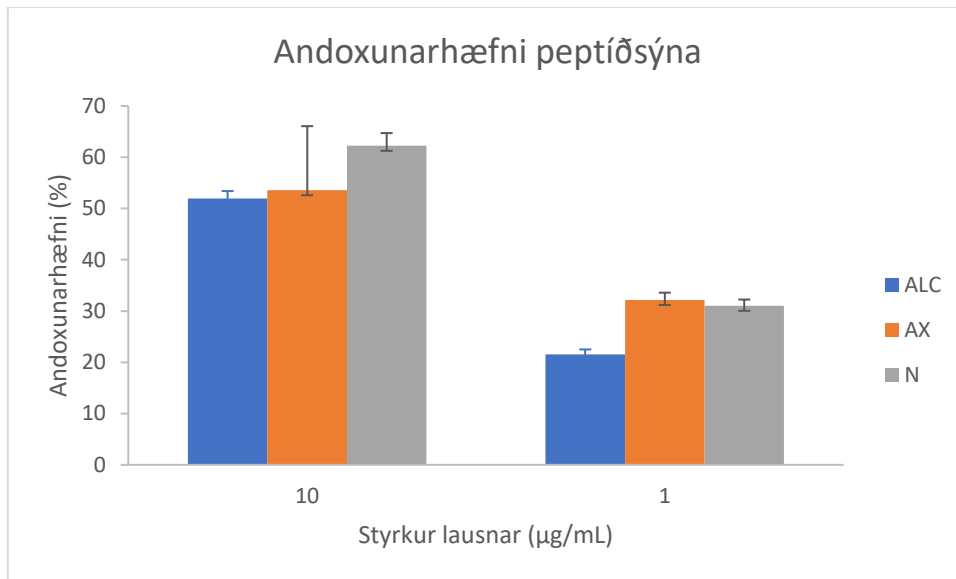


Mynd 8: Staðalkúrvu andoxunarhæfni (%) L-Ascorbic Acid staðli við athugun á andoxunarhæfni peptíðsýnanna

Við útreikninga á staðalferli fékkst eftirfarandi jafna sem notuð var til frekari útreikninga á andoxunarhæfni (%) peptíðsýnanna (ALC, AX og N)

$$y = 3,7704x$$

Staðalkúrvu staðalsins hafði $R^2 = 0.9952$ sem gefur til kynna jákvætt línulegt samband á milli gagnanna í þessari rannsókn og rannsakandi áætla því að L-Ascorbic Acid henti vel í rannsóknir á andoxunarhæfni peptíða.



Mynd 9: Stöplarit sem sýnir meðaltalið á andoxunarhæfni (%) peptíðanna í mismunandi þynningum ásamt hlutfallslegu staðalfráviki allra sýna

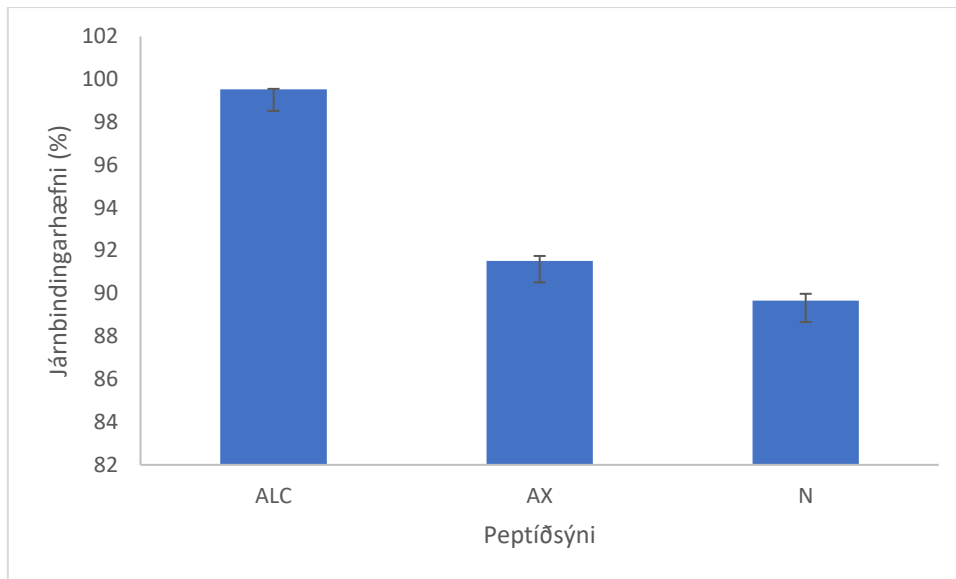
Mynd 9 sýnir útreiknað meðaltal á andoxunarhæfni allra peptíðsýna við mismunandi þynningar. Peptíðsýni N mældist með hæsta andoxunarhæfni við styrk 10 µg/mL eða um 62,3%. AX kom þar á eftir með 53,6% og ALC með 52,0%. Peptíðsýni AX mældist með hæsta afoxunarhæfni við styrk 1 µg/mL eða um 32,2%. N kom þar á eftir með 31,0% og ALC með 21,6%.

4.1.3 Niðurstöður á hæfileika peptíðanna til járnbindingar

Reiknað meðaltal á gildum jákvæða kontrólsins er 0,088. Eftir ljósgleypnimælingar reyndust gildi peptíðsýni AX og N vera hærri en meðaltal jákvæða kontrólsins. Peptíðsýni AX og N sýna því ekki réttan hæfileika peptíðanna til járnbindingar en eru engu að síður sýnd til samanburðar á mynd 8. Öll gildi má sjá á töflu 18.

Tafla 17: Taflan sýnir gildi allra peptíðsýna eftir ljósgleypnimælingu að loknum frádrátti kontrólsýnis

ALC	0,019	0,019	0,017
AX	0,329	0,325	0,341
N	0,395	0,399	0,416



Mynd 10: Reiknað meðaltal peptíðsýna ALC, AX og N til járnbindingar (%) ásamt reiknuðu hlutfallslegu staðalfráviki

Reiknað meðaltal á hæfileikum peptíðanna til járnbindingar (%) má sjá á mynd 10. Hæfileiki peptíðanna til járnbindingar var reiknaður með jöfnu sem gefin var upp í kafla 3.6.7. Peptíðsýni ALC var eina sýnið sem sýndi gildan hæfileika til járnbindingar en það mældist í 99,5%. Peptíðsýni AX mældist hafa 91,5% hæfileika til járnbindingar og sýni N mældist hafa 89,7% hæfileika til járnbindingar en þær niðurstöður eru ekki marktækar líkt og kom fram hér að ofan..

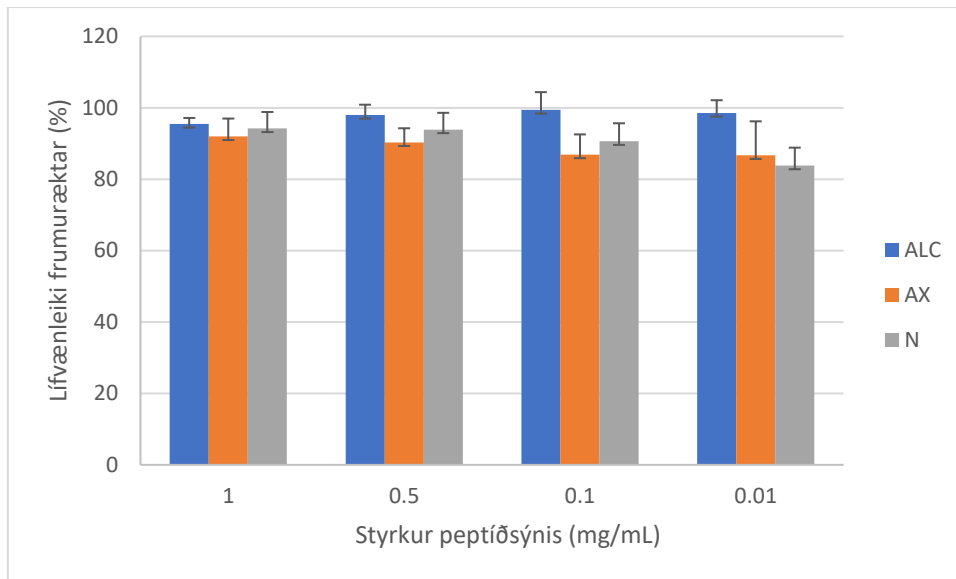
5 Niðurstöður frumugreininga

5.1 Niðurstöður á lífvænleika frumuræktar

Bæði lífvænleiki og dánartíðni frumuræktarinnar er sett fram sem prósentu. Tafla 19 sýnir dánartíðni frumuræktarinnar í mismunandi þynningum. Sýni N í þynningu 0,01 hefur hæstu dánartíðnina af sýnunum og sýni AX í þynningum 0,1 og 0,01 eru með hæstu dánartíðnina þar á eftir. Sýni ALC mældist með lægstu dánartíðnina í öllum þynningum og í heild.

Tafla 18: Yfirlit yfir dánartíðni (%) peptíðsýna í mismunandi þynningum

% Mortality	ALC	AX	N
1	4.6	8.0	5.8
0.5	2.0	9.7	6.1
0.1	0.6	13.1	9.4
0.01	1.4	13.3	16.2



Mynd 11: Stöplarit sem sýni lífvænleika (%) peptíðsýna í mismunandi þynningum ásamt hlutfallslegu staðalfrávikum fyrir hvert peptíðsýni

Mynd 11 sýnir lífvænleika frumuræktarinnar fyrir öll sýni í mismunandi þynningum. Frumurrækt í sýni AX sýnir lægstan lífvænleika í öllum þynningum fyrir utan þynningu 0,01 mg/mL. Frumurækt í sýni ALC hafa hæstan lífvænleika samkvæmt þessari greiningu og gildir það um allar þynningar. Í þynningu 0,01 mg/mL sýndi frumuræktin talsvert meiri lífvænleika í sýni ALC eða 98,6% (einungis 1,4% dánartíðni) á meðan að dánartíðnin nemur 13,3% í AX og 16,2% í N. Í þynningu 0,1 mg/mL sýndi frumuræktin í sýni ALC ennþá talsvert betri lífvænleika (99,4%) heldur en frumuræktin í hinum tveimur sýnunum og er þetta einnig frumuræktin með hæsta lífvænleikann yfir allar þynningar og sýnagerðir. Frumurrækt í sýni AX sýndi örlítið lægri dánartíðni (13,1%) heldur en í þynningu 0,01 mg/mL en frumuræktin í sýni N sýndi talsvert hærri lífvænleika eða 90,6%.

Í þynningu 0,5 mg/mL lækkaði lífvænleika frumuræktarinnar í sýni ALC örlítið og var um 97,96% en sú frumurækt hafði þó ennþá lægstu dánartíðnina en það munaði um 4% á þeim og frumuræktinni í sýni N sem nú hafði lífvænleika upp á 93,9%. Frumuræktin í sýni AX hafði þó hækkað í lífvænleika og var nú 90,3%. Í þynningu 1 mg/mL hélt dánartíðni ALC frumuræktarinnar áfram að hækka og var nú um 4,6% (95,4% lífvænleiki) en þær höfðu þó áfram lægstu dánartíðnina. Frumuræktin í sýni AX hækkaði í lífvænleika og var nú 92% en það gerði frumuræktin í sýni N einnig og var nú 94,2%.

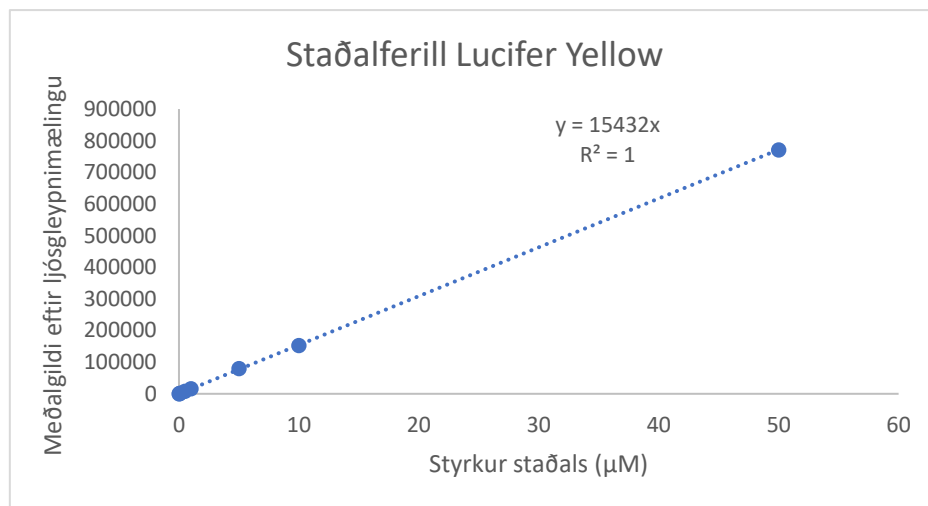
Ályktun rannsakanda er sú að ALC peptíðblandan sé sú blanda sem henti þessari frumutegund best og sé þá þynning 0,1 mg/mL ákjósanlegust. Ef nota á peptíðblöndu AX til frumuræktunar sé þynning 1 mg/mL ákjósanlegust og það sama gildir um peptíðblöndu N.

5.2 Niðurstöður á gegndræpi Caco-2 frumulags gagnvart Lucifer Yellow

Meðaltal ljósgleypnimælinga fyrir Lucifer Yellow staðalinn ásamt staðalfráviki má sjá í töflu 20 ásamt staðalfráviki fyrir hverja þynningu. Þessar mælingar voru notaðar til útreikninga á gegndræpi staðalsins við mismunandi þynningar sem síðar var notaður til útreikninga á hallatölu og staðalferli standardsins. Allar mælingar staðalsins voru notaðar við útreikninga þar sem línulegt samband var á milli gildanna.

Tafla 19: Meðaltal ljósgleypnimælinga á Lucifer Yellow staðli

Staðall (μM)	Meðaltal
0	$27,77 \pm 1,53$
0,05	$919,44 \pm 8,74$
0,1	$1799,11 \pm 6,56$
0,5	$8051,77 \pm 130,08$
1	$16475,77 \pm 116,03$
5	$80225,44 \pm 274,58$
10	$153200,11 \pm 1076,16$
50	$771477,77 \pm 1202,73$

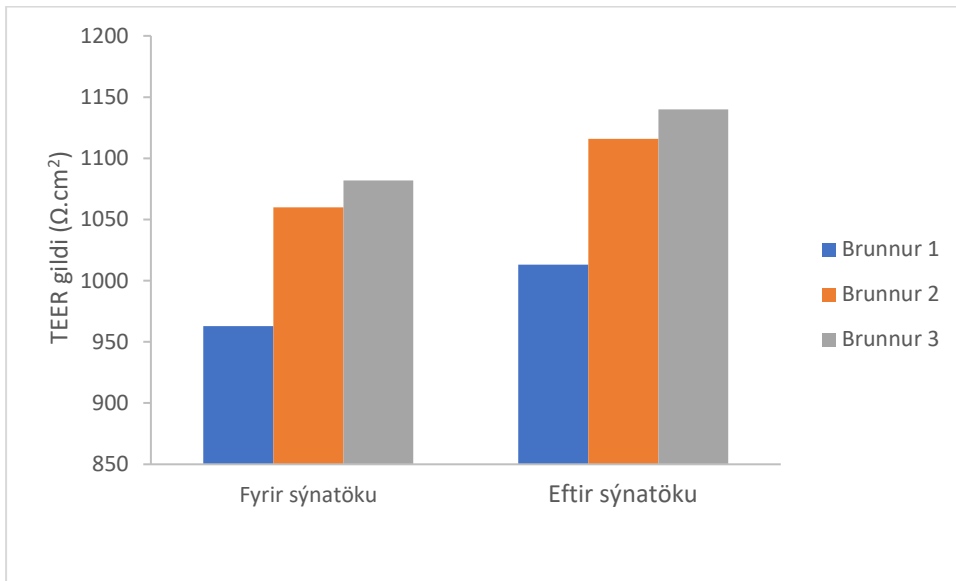


Mynd 12: Staðalkúrva Lucifer Yellow staðals eftir ljósgleypnimælingu

Við útreikninga á staðalferli fékkst eftirfarandi jafna sem notuð var til frekari útreikninga á gegndræpi Caco-2 frumuræktarinnar gagnvart LY

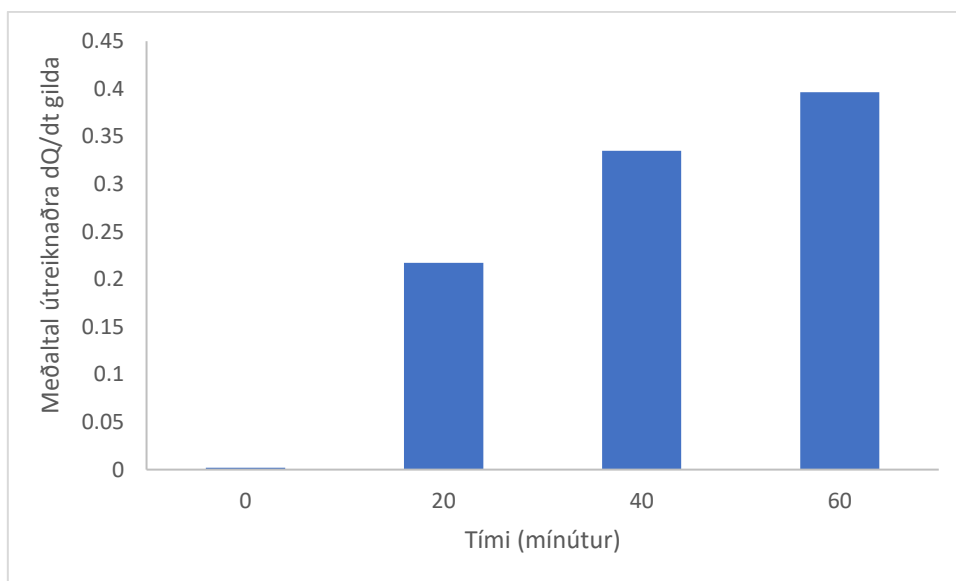
$$y = 15432x$$

Staðalkúrva staðalsins hafði $R^2 = 1$ sem gefur til kynna fullkomið jákvætt línulegt samband á milli gagnanna í þessari rannsókn og rannsakandi áætla því að Lucifer Yellow henti fullkomlega sem staðall við rannsóknir á gegndræpi Caco-2 frumna.



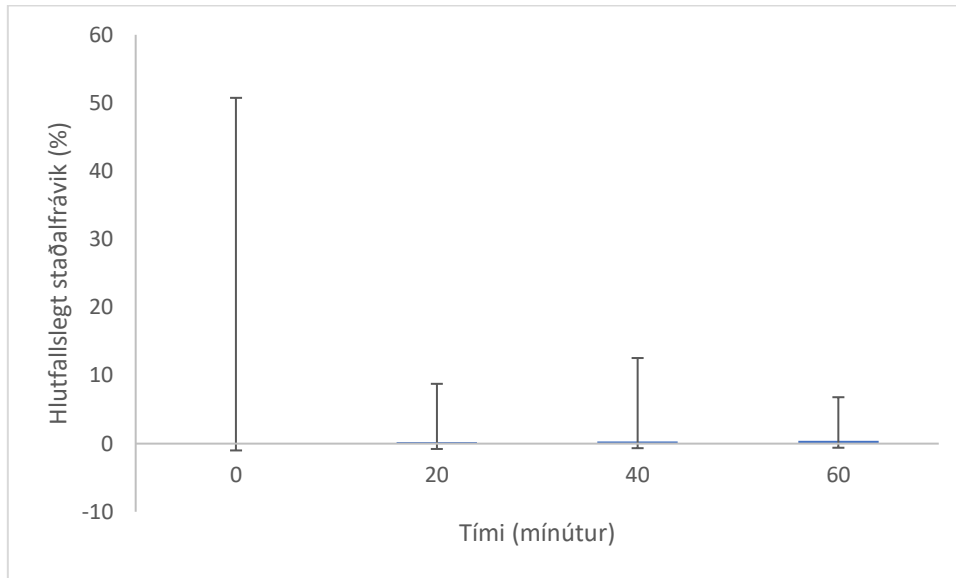
Mynd 13: TEER mælingar allra brunna fyrir og eftir sýnatöku

Allar TEER mælingar sem gerðar voru fyrir sýnatöku gáfu gildi fyrir ofan 950 $\Omega\cdot\text{cm}^2$ þar sem að meðaltalið var 1035 $\Omega\cdot\text{cm}^2$. Allar TEER mælingar sem gerðar voru eftir sýnatöku gáfu hærri gildi en meðaltal þeirra var 1090 $\Omega\cdot\text{cm}^2$. Eins og sést á mynd 13 hækkaði gildi allra brunna eftir að sýnatöku var lokið og brunnarnir höfðu verið þvegnir vandlega með HBSS til þess að tryggja að engar leyfar af LY væru eftir í brunnum. Gegndræpnistuðull frumulagsins var reiknaður samkvæmt formúlu sem finna má í kafla 2.9.3. Reiknuð gildi á flæði á tímæiningu (dQ/dt) er að finna á mynd 14 er þar sést greinilega aukning á flæði LY í gegn um frumulagið eftir því sem tíminn eykst, mesta aukningin er frá mínútu 0 að mínútu 20.



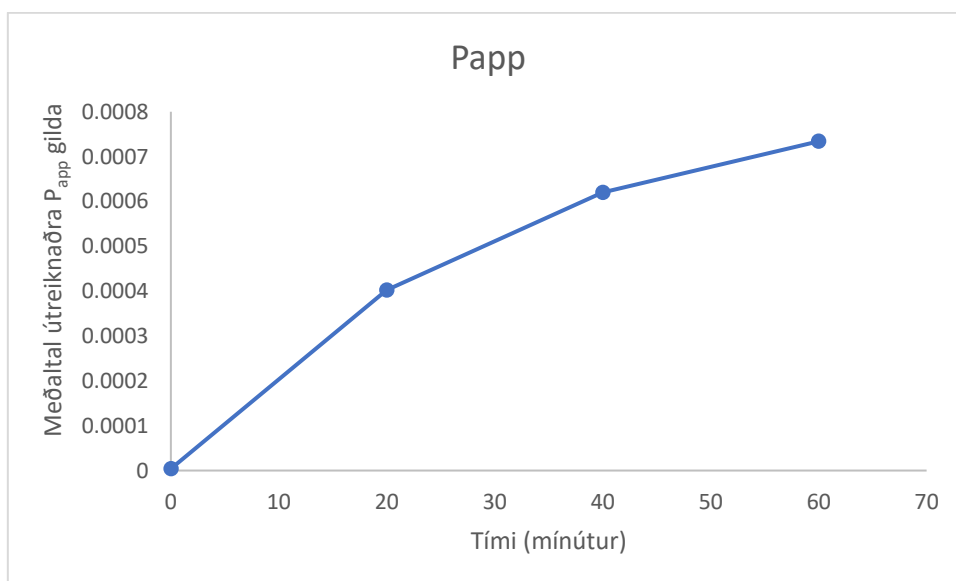
Mynd 14: Meðaltal dQ/dt gilda eftir ljósgleypnimælingu

Grafið á mynd 15 sýnir hlutfallslegt staðalfrávik allra dQ/dt útreikningar á hverri tímaeiningu fyrir sig. Á grafinu sést greinilega að hlutfallslegt staðalfrávik á mínútu núll, eða um leið og LY hafði verið sett út á frumurnar í fyrsta skipti, er mjög hátt eða um 50%. Þetta gefur í skyn að mælingar hafi verið ónákvæmar og gildin því talsvert dreifð. Hlutfallslegt staðalfrávik fyrir næstu þrjár sýnatökur var 6-12% sem gefur til kynna að mælingar þar hafi verið talsvert nákvæmari og gildin í mælingum ekki jafn dreifð. Mælingar hefðu þó getað verið nákvæmari.



Mynd 15: Hlutfallslegt staðalfrávik allra dQ/dt útreikninga á gegndræpi Caco-2 frumumóðels gagnvart LY

Á mynd 16 má sjá graf yfir meðaltal gilda fyrir reiknaðan gegndræpnistuðul (P_{app}) á öllum brunnum en þegar mynd 16 er borin saman við mynd 14 sést að línulegt samband er á milli flæði á tímaeiningu og gegndræpistuðuls frumnanna með LY. Þetta bendir til þess að frumuræktin sé í góðum þéttleika til athugunar á gegndræpi hennar.



Mynd 16: Meðaltal P_{app} gilda eftir ljósgleypnimælingu

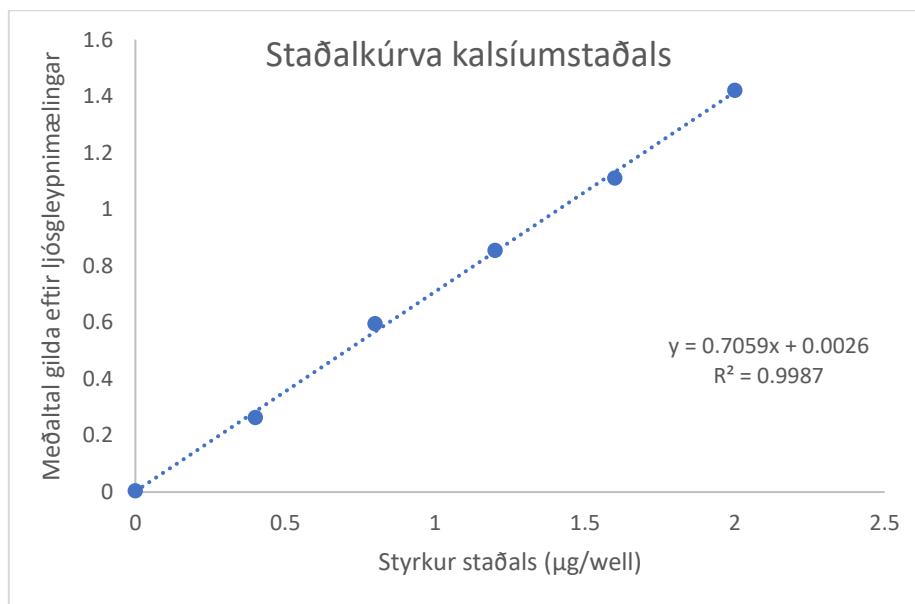
5.3 Niðurstöður á gegndræpi Caco-2 frumulags gagnvart kalsíum

Meðaltal ljósgleypnimælinga fyrir kalsíum staðalinn ásamt staðalfráviki má sjá í töflu 21.

Þessar mælingar voru notaðar til útreikninga á gegndræpi staðalsins við mismunandi þynningar sem síðar var notaður til útreikninga á hallatölu og staðalferli standardsins. Þynningar voru settar fram sem μg á brunn.

Tafla 20: Meðaltal ljósgleypnimælinga á kalsíum staðli

$\mu\text{g}/\text{brunn}$	Meðaltal
0	$0,0045 \pm 0,001$
0,4	$0,2635 \pm 0,001$
0,8	$0,5962 \pm 0,04$
1,2	$0,8548 \pm 0,03$
1,6	$1,1108 \pm 0,02$
2	$1,4208 \pm 0,03$

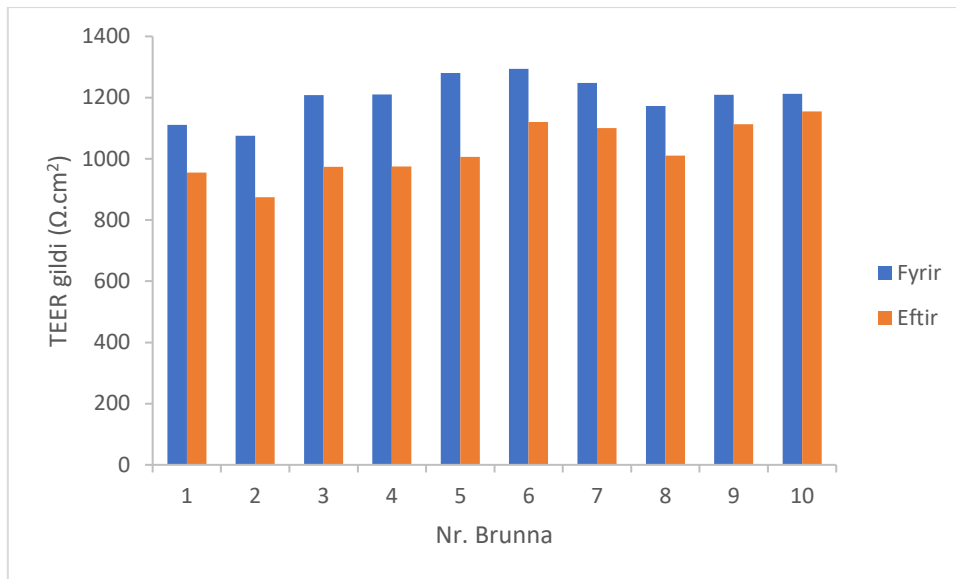


Mynd 17: Staðalkúrva kalsíumstaðals eftir ljósgleypnimælingu

Við útreikninga á staðalferli fékkst eftirfarandi jafna sem notuð var til frekari útreikninga á gegndræpi Caco-2 frumuræktarinnar gagnvart kalsíum, staðalkúrvuna má sjá á mynd 17

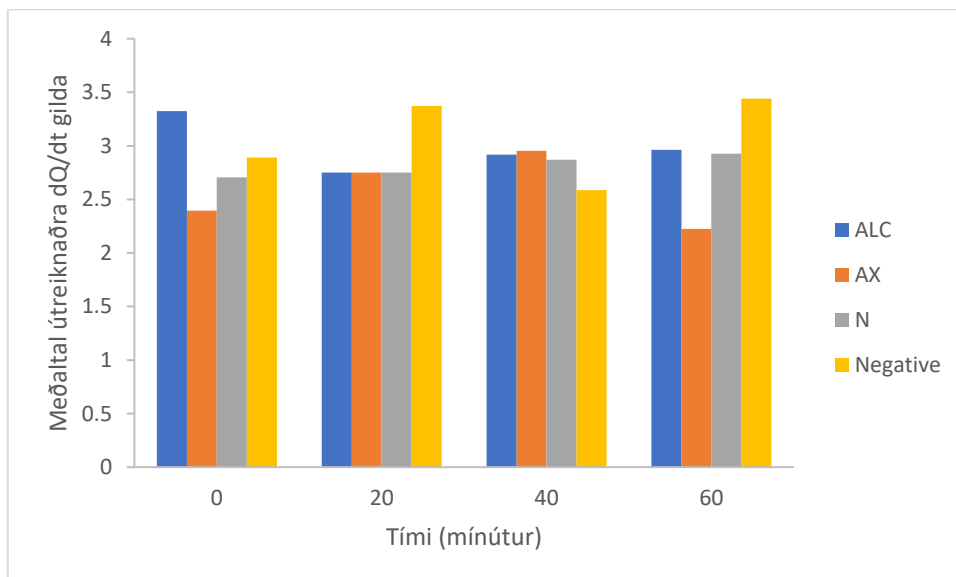
$$y = 0,7059x + 0,0026$$

Staðalkúrva staðalsins hafði $R^2 = 0,9987$ sem gefur til kynna að jákvætt línulegt samband sé á milli gildanna í staðalsins í þessari rannsókn



Mynd 18: TEER mælingar allra brunna fyrir og eftir sýnatöku

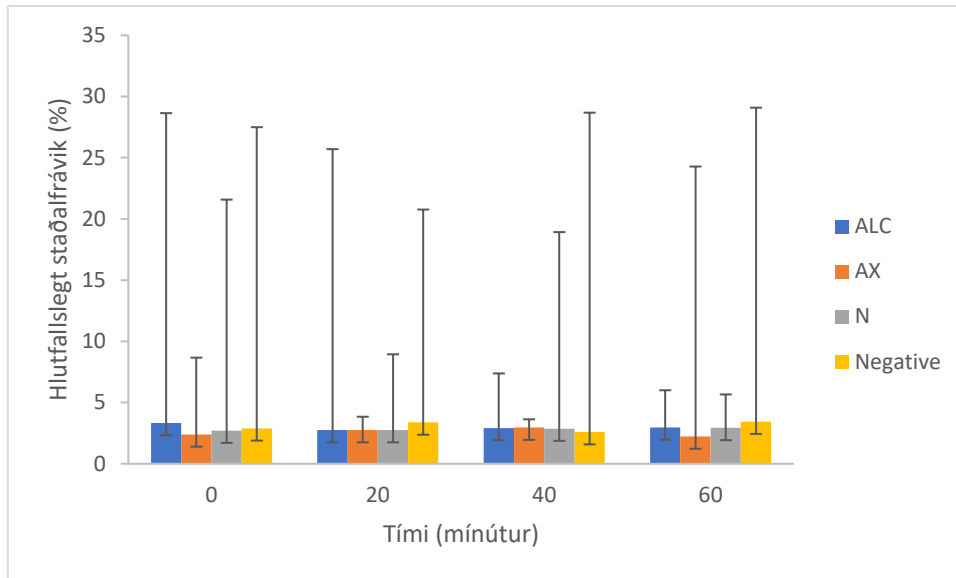
Flestar TEER mælingar sem gerðar voru fyrir sýnatöku gáfu gildi um og yfir 1200 $\Omega\cdot\text{cm}^2$ þar sem að meðaltalið var 1202 $\Omega\cdot\text{cm}^2$. Allar TEER mælingar sem gerðar voru eftir sýnatöku gáfu lægra gildi en meðaltal þeirra var 1028 $\Omega\cdot\text{cm}^2$. Eins og sést á mynd 18 lækkaði gildi allra brunna eftir að sýnatöku var lokið og brunnarnir höfðu verið þvegnir vandlega með HBSS til þess að tryggja að engar leyfar af LY væru eftir í brunnunum. Gegndræpnistuðull frumulagsins gagnvært kalsíumbættu peptíðblöndunum var reiknaður samkvæmt formúlu sem finna má í kafla 2.9.3. Reiknuð gildi á flæði á tímaeiningu (dQ/dt) er að finna á mynd 18 en þar sést ekki mikil aukning á flæði kalsíum í gegn um frumulagið og er flæðið nokkuð jafnt sama hvaða peptíðblanda er skoðuð.



Mynd 19: Meðaltal dQ/dt gilda eftir ljósgleypnimælingu

Grafið á mynd 20 sýni hlutfallslegt staðalfrávik allra dQ/dt útreikninga á hverri tímaeiningu fyrir sig. Á grafinu sést að hlutfallslega staðalfrávik fer hæst í 26%. Hlutfallslegt staðalfrávik er ívið

hærra en rannsakandi hafði vonast eftir og bendir til þess að mælingar hafi verið ónákvæmar. Þetta á helst við um sýnatökur á ALC á mínútum 0 og 20 ásamt sýnatöku á N á mínútu 60. Sýnataka á peptíði AX á mínútum 40 er eingöngu 0,6% og má því áætla að þær sýnatökur séu marktækastar í þessari rannsókn.

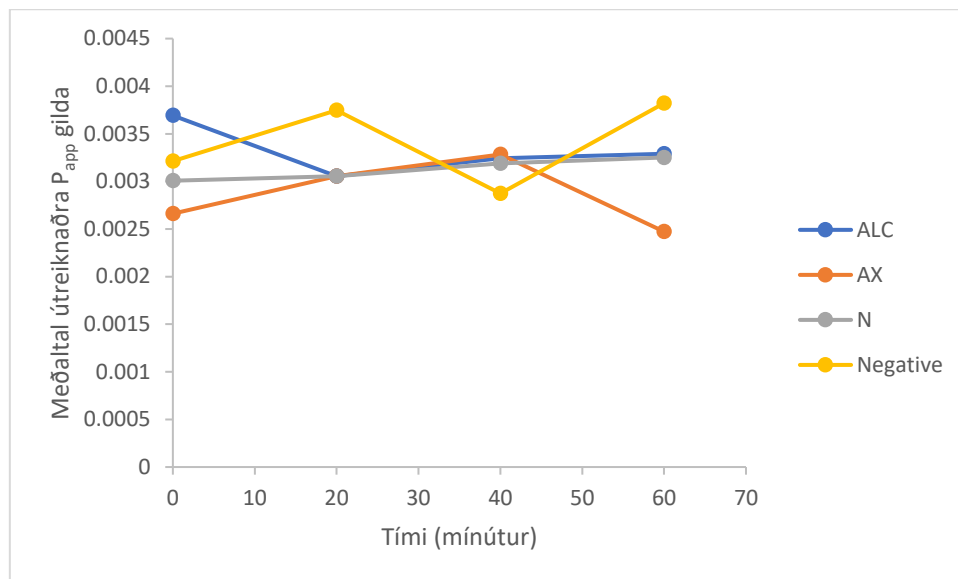


Mynd 20: Hlutfallslegt staðalfrávik dQ/dt útreikninga fyrir gegndræpi Caco-2 frumumóðels gagnvart kalsíum

Á mynd 21 má sjá graf yfir meðaltal gilda fyrir reiknaðan gegndræpistuðul (P_{app}) á öllum brunnum en eins og sést, þegar mynd 20 er borin saman við mynd 18, er línulegt samband á milli flæði á tímaeiningu og gegndræpistuðuls frumnanna með kalsíum.

Caco-2 frumurnar sýna minnkun á gegndræpi frá mínútu 0 til 20 eftir að peptíðsýni ALC hafði verið bætt á frumurnar. Þær tóku við sér á mínútu 20 og jókst gegndræpistuðullinn nokkuð línulega að mínútu 60. Frumurnar sýndu talsverða línulega aukningu í gegndræpi með peptíðsýni AX frá mínútu 0 að 40 en eftir mínútu 40 fór gegndræpi frumnanna hratt niður á við. Frumurnar sýndu einnig

aukningu á gegndræpi með peptíðsýni N frá mínútu 0 allt að mínútu 60. Sú aukning var ekki jafn ör en í ágætu línulegu samhengi.



Mynd 21: Meðaltal P_{app} gilda eftir ljósgleypnimælingu

6 Umræður

6.1 Rafdráttur í SDS-PAGE

Ágætlega tókst til við rafdrátt í báðum gelum og fengust sjáanleg bönd í peptíðsýnum AX og N. Peptíðsýni ALC sýndi engin bönd, hvorki í styrk 50 mg/mL eða 100 mg/mL. Rannsakandi telur hugsanlega orsök fyrir því vera að sýni ALC innihaldi mikið niðurbrotin prótein sem ferðist hratt í gegnum gelin og sjáist því ekki á rafdrætti. Einnig gæti líka verið að rafdrátturinn hafi verið hafður á of lengi fyrir peptíðsýni ALC og rafdráttinn mætti endurtaka fyrir sýnið, þá hafa hann styttri og jafnvel styrk peptíðsins í lausninni meiri (Müller o.fl., 2010).

Önnur ástæða fyrir engum sýnilegum böndum í peptíðsýni ALC gæti verið að gelin voru litum um leið og þau höfðu verið þvegin eftir rafdráttinn en betra hefði verið að festa próteinin í gelinu með t.d. metanól-asetat lausn. Það kemur í veg fyrir dreifingu á próteinunum í gelinu ásamt því að halda próteinböndunum skýrum og rétt uppleystum. Það skolar einnig í burtu allan hleðsludúa sem gæti verið eftir á gelinu og haft áhrif á litun gelsins („SDS-PAGE Gel Fixing Solution“, e.d.).

6.2 Afoxunarhæfni peptíðlausna

Athugun á afoxunarhæfni peptíðanna tókst ekki jafn vel til og höfundur hefði viljað. Höfundur áætlaði gæti verið að stórum hluta vegna mannglegrar skekkju en rannsóknin var framkvæmd þrisvar sinnum án sýnilegra breytinga á niðurstöðum. Öll reiknuð staðalfrávik í þessari rannsókn sýndu mjög há gildi sem kom þó höfundi ekki á óvart þar sem að öll gildi peptíðsýna í öllum þynningum voru mjög lág og sum hver voru lægri heldur en meðaltal blank gildisins.

Niðurstöður rannsóknarinnar gefa til kynna að höfundur sé á réttri leið í athugunum sínum en mætti næst prófa hærri styrk á öllum peptíðlausnunum. R^2 gildið fyrir þessa rannsókn var þó mjög nálægt 1 eða 0,9976 sem segir okkur að öll gildi í niðurstöðum séu nálægt áætlaðri jöfnu rannsóknarinnar og eru því í góðu línulegu sambandi við hvort annað þó svo að öll gildi staðalfráviks hafi verið mjög há.

6.3 Andoxunarhæfni peptíðlausna

Rannsókn á andoxunarhæfni peptíðanna tókst ágætlega til og var framkvæmd tvisvar sinnum til þess að geta betur áætlað áreiðanleika rannsóknarinnar. Hæsti styrkur staðalsins (30 μ M) var tekinn út þar sem að ekkert línulegt gildi var á milli hans og staðalsins þar á eftir, því gat höfundur gert ráð fyrir því að gildi rannsóknarinnar muni ekki hækka með hækkun á styrk staðalsins umfram 25 μ M. Andoxunarhæfni peptíða AX og N jókst eftir því sem að styrkur þeirra í lausninni varð meiri en fyrir peptíðsýni ALC var engan mun að finna á milli 10 mg/mL þynningar og 100 mg/mL. Mesta muninn var að finna á sýni N bæði á milli þynninga 1 mg/mL og 10 mg/mL og einnig á milli 10 mg/mL og 100 mg/mL. Höfundur áætlaði því að hærri styrk þurfi fyrir sýni ALC til að ná fram meiri

andoxunarhæfni en fyrir hin tvö sýnin. Peptíðsýni N sýndi mestu hækkun á styrk gilda eftir því sem að styrkur peptíðsins í lausninni jókst. Þynning 100 mg/mL er ekki látin fylgja með sem hluti af niðurstöðum í þessari rannsókn þar sem að gildi ALC voru fyrir utan það bil sem staðallinn náði yfir og eru því ekki marktækar ásamt því að lítil munur var á gildunum fyrir þynningu 10 mg/mL og 100 mg/mL.

6.4 Járnbindi hæfnipróf

Framkvæmd járnbindingarprófsins gekk vel og því tók höfundur ákvörðun um að endurtaka prófið ekki. Til þess að fá áreiðanlegri niðurstöður mælir höfundur þó með endurtekningu á þessu prófi. Ekki var notaður staðall í mismunandi þynningum fyrir þessa rannsókn heldur jákvætt kontról sýni sem sýndi 99,96% járnbindingu að framkvæmd lokinni. Eftir að niðurstöður ljósgleypnimælinga voru ljósar voru rétt gildi fyrir hvert sýni reiknuð og kom í ljós að allar þynningar sýna AX og N reyndust vera of háar miðað við jákvæða kontrólinn. Þær mælingar reyndust því ekki vera marktækar en voru þó hafðar með til samanburðar í þessari rannsókn. Sýni ALC var því eina sýnið sem leiddi af sér marktækar niðurstöður eftir framkvæmd og endaði það í 99,5% járnbindingu. Höfundur áætla því að sýni ALC búi yfir járnbindandi hæfileikum og henti vel til framleiðslu fæðibótarefna sem eiga að binda kalsíum í meltingarvegi vegna þess hversu nálægt járnbinding þess er jákvæða kontrólum. Endurtaka mætti þessa rannsókn með þynningum á sýnum en rannsóknir hafa sýnt að þynningar 1 til 10 mg/mL hafi reynst vel (Wong o.fl., 2014).

6.5 Gegndræpi Caco-2 frumulags gagnvart Lucifer Yellow

Athugun á gegndræpi Caco-2 frumulagsins gagnvart Lucifer Yellow var framkvæmd í tvígang. Upphaflega átti bara að framkvæmd þennan hluta rannsóknarinnar einu sinni en þar sem að allar frumur í þeim brunnum sem notaðir voru við framkvæmdin dóu eftir á var ákveðið að endurtaka rannsóknina. Ekki er vitað af hverju frumurnar í brunnum dóu en höfundur telur að það gæti hafa verið vegna mannglegrar skekkju. Þá annaðhvort að frumlagið hafi verið rofið, frumurnar skildar eftir án ætis í of langan tíma, frumurnar skildar eftir í Lucifer Yellow í of langan tíma eða þá að nema Ohm mælisins notaðir við TEER mælingarnar hafi ekki verið nógu vel sótthreinsaðir fyrir notkun og smit komist með þeim í frumulögin. Einnig getur komið til greina að útfjólublátt ljós hafi átt þátt í dauða þeirra (Hanani, 2012) en rannsakandi fann engar rannsóknir sem bentu til þess að Lucifer Yellow bæri ábyrgð á dauða þeirra. Hlutfallslegt staðalfrávik fyrir Lucifer Yellow staðallinn var innan við 2% fyrir allar þynningar og fullkomin línuleg nálgun var á milli þynninga staðalsins ($R^2 = 1$) svo að höfundur áætla að þessi staðall hefði átt að henta fullkomlega við mælingu á gegndræpi frumulagsins.

Hlutfallslegt staðalfrávik fyrir gegndræpi frumulagsins var mjög dreift. Á mínútu 0 fékkst hlutfallslegt staðalfrávik upp á 50,8%, gildin þar eru því mjög dreifð og talsvert langt frá meðaltali. Á mínútu 40 fékkst einnig hátt hlutfallslegt staðalfrávik eða upp á 12,2%, það er þó ívið minna en fyrir mínútu 0 og því gæti hafa verið um mannleg mistök að ræða við fyrstu sýnatöku. Hlutfallslegt staðalfrávik fyrir mínútur 20 og 60 eru einnig hærri en höfundur hefði viljað en þó undir 10%. Ekki öll gildi mínútna 20, 40 og 60 voru tekin með þegar dQ/dt og P_{app} útreikningar voru gerðir sökum mikilla dreifni í úrtaki en hlutfallslegt staðalfrávik hefði staðið í 20-28% fyrir þau gildi hefði allt úrtakið verið haft með. Mikil ónákvæmni er á meðal gilda í þessari rannsókn og höfundur áætlað því hana ekki vera áreiðanlega til þess að meta gegndræpistuðul frumulagsins.

6.5.1 TEER mælingar

Framkvæmdar voru TEER mælingar á öllum brunnnum bæði fyrir og eftir LY framkvæmd og kalsíum framkvæmd. Tilraun gerð á þekjufrumum þar sem TEER mælingar voru gerðar leiddi í ljós að gildin voru mjög fjölbreytt eða frá 0 – 2270 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ og við nánari skoðun reyndust þéttustu frumulögin hafa gildi sem náði frá 500 – 1100 $\Omega \cdot \text{cm}^2$. (S. Chen, Einspanier, & Schoen, 2015)

Önnur tilraun sýndi fram á að TEER mælingar á Caco-2 frumulagi reyndust vera allt frá 110 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ upp í það að vera 1400 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ eftir því hvernig frumulagið er ræktað. Tilraunin var gerð með blöndum af Caco-2 og HT29-MTX frumuræktun og voru TEER mælingar ávallt hærri þegar hlutfall HT29-MTX í frumuræktinni var hærri, þá sérstaklega hjá sameindum sem studdust við óvirkan flutning í gegn um frumulagið. Við flutning fituleysanlegra sameinda og sameinda sem hafa háa gegndræpieiginleika var munurinn talsvert minni (Hilgendorf o.fl., 2000). Lucifer Yellow tilraunin var framkvæmd tvisvar. Í fyrri skiptið sýndi frumulagið góðar TEER mælingar áður en framkvæmd hófst og var það meðaltal 1124 $\Omega \cdot \text{cm}^2$. Síðari mælingar sýndu þó eingöngu meðaltal upp á 158 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ og þegar að frumuræktin var skoðuð nánar kom í ljós að öll frumurækt, í þeim 6 brunnnum sem notaðir voru í fyrri skiptið, hafði dáið. TEER mælingar framkvæmdar eftir þá LY rannsókn voru því ónothæfar og ákvörðun tekin um að endurtaka LY rannsóknina. Rannsakandi veit ekki af hverju frumuræktin dó eftir fyrri framkvæmd en telur að mestar líkur séu á að mannleg mistök hafi verið gerð við framkvæmd sem ölli dauða frumulagsins. Síðari endurtekning var framkvæmd með nákvæmlega sömu efnum og tækjum og sú fyrri en heppnaðist ívið betur og frumuræktin sýndi góðar seinni TEER mælingar sem voru örlítið hærri en þær fyrri. Þær mælingar gáfu í skyn að Caco-2 frumulagið sem höfundur hafði ræktað væri gott og með góðan þéttleika miðað við niðurstöður í þeim rannsóknum sem höfundur skoðaði til samanburðar (Srinivasan o.fl., 2015) (Blume, Denker, Kunze, & Gieseler, 2010).

Höfundur fann einnig rannsókn sem vildi meina að TEER mælingar væru ekki áreiðanlegar þegar framkvæmdar á meðan að rannsókn á gegndræpi efna í gegn um Caco-2 frumulag stæði yfir.

Þessi rannsókn er síðan árið 2004 og leiddi í ljós að TEER gildi lækkuðu talsvert frá upphafsgildum þegar mismunandi bætiefni voru sett út á frumulögin. Flest frumulögin höfðu náð sömu TEER gildum 24 klukkustundum eftir framkvæmd jafnvel þó að lífvænleiki frumulagsins hefði lækkað talsvert (Mukherjee, Squillante, Gillespie, & Shao, 2004). Í þessu verkefni voru TEER mælingar þó ekki gerðar á meðan að framkvæmd gegndræpis stóð yfir og ekki þurfti því að hafa áhyggjur af þessum sveiflum gildanna.

6.6 Niðurstöður á gegndræpi Caco-2 frumulagsins gagnvart kalsíum

Framkvæmd til athugunar á gegndræpi Caco-2 frumulagsins gagnvart kalsíum tókst vel og var eingöngu framkvæmd einu sinni. Hlutfallslegt staðalfrávik fyrir staðalinn í þessari rannsókn voru öll 3% eða undir fyrir utan staðalinn sem innihélt 0,8 µg á hvern brunn en þar var hlutfallslegt staðalfrávik í 6%. Sjáanleg skekkja var á einu gildinu og ef það var fjarlæggt úr útreikningum lækkaði RSD þessa staðals niður í 2,5%. Langflest gildi staðalsins eru því nálægt meðaltal og ásamt því var staðalkúrva og línulegt samband ($R^2 = 0,9987$) gildanna ásætlanlegt.

Sjá má hlutfallsleg staðalfrávik gildanna í rannsókninni á mynd 20. Þar sést að RSD gildin eru frekar sveiflukennd sem bendir til óstöðugleika í sýnatöku á meðan á rannsókninni stóð. Sýni AX kom best út að mati höfundar og fór ekki yfir 3,5% RSD nema á mínútu 60 þar sem það fór upp í 10%. Sýni ALC kom verst út og þá sérstaklega á mínútum 0 og 20. Höfundur telur að þetta ósamræmi sé komið til af misræmi í sýnatöku og þá ósamræmi í tímasetningu á sýnatökunni sjálfri eða misræmi í pípettun. Höfundur telur að þetta mætti laga með meiri æfingu í að pípetta og einnig að þessa framkvæmd hefði mátt endurtaka að minnsta kosti einu sinni til viðbótar til samanburðar.

Lítill breyting varð á gildum gegndræpistuðuls á milli mínútna í þessari rannsókn og því áætlað höfundur að eina sýnataka á ákveðinni mínútu hefði verið nóg til þess að fá fram sömu niðurstöður og fengust við gerð þessarar rannsóknar. Ekkert línulegt jafnvægi var á milli tekinna sýna frá mínútum 0 – 60 en rannsóknir sýna fram á línulegt gildi við sýnatöku á 10 mínútna fresti (Blais, Aymard, & Lacour, 1997). Ennfremur hefði mátt keyra í gegn mismunandi þynningar fyrir próteinafleiðurnar en þær voru þynntar 1:10 vegna of hárra gilda í fyrstu ljósgleypnimælingum. Þynning hefði einnig mátt vera 1:2 og jafnvel 1:3 þar sem öll gildi voru vel innan marka staðalsins.

7 Lokaorð

Eftirfarandi rannsóknarspurningum var svarað út frá niðurstöðum verkefnisins

1. Búa fiskpróteinafleiður yfir bindivirkni?
 - a. Hefur samsetning fiskpróteinafleiða áhrif á bindivirkni þeirra
2. Búa fiskpróteinafleiður yfir andoxandi virkni?
 - a. Hefur samsetning fiskpróteinafleiða áhrif á andoxandi virkni þeirra?
3. Hafa fiskpróteinafleiður áhrif á frásog kalsíums í Caco-2 frumumódeli?
 - a. Hefur samsetning fiskpróteinafleiða áhrif á frásog kalsíums í frumumódeli?

Niðurstöður rannsóknarinnar sýndu að afleiður fiskpróteina búa yfir bindivirkni og þar skiptir einnig máli hvernig afleiðurnar eru samansettar. Nokkur skekkja var á gildum allra prófana við framkvæmd og telur höfundur það einkum tengjast nákvæmni höfundar í pípetun sýna á milli brunna og túba. Járnbindingar hefði þurft að gera aftur þar sem einungis próteinafleiða ALC sýndi marktækar niðurstöður en þær voru mjög jákvæðar og bentu til mikillar bindivirkni. Niðurstöður AX og N bentu til bindivirkni í kring um 90% en eru ekki marktækar sökum hærri gilda heldur en hæsta gildi staðals.

Niðurstöður rannsóknarinnar sýndu einnig fram á að afleiður fiskpróteina búa yfir andoxandi virkni og þar skiptir samsetning próteinafleiðanna einnig máli. Mjög mikil skekkja var á gildum afoxunar rannsóknarinnar en þar reyndist ALC próteinafleiðan einnig búa yfir mestu afoxandi virkninni af afleiðunum þrem þegar styrkur 1 mg/mL í lausn var notaður en sá styrkur reyndist virka best fyrir allar þrjár próteinafleiðurnar. Þar sem mikil skekkja var á gildum og hlutfallslegt staðalfrávik er gríðarlega hátt telur höfundur þessa rannsókn ekki marktæka og að ekki skuli farið eftir gildum hennar til hliðsjónar í öðrum sambærilegum rannsóknum. Lítil skekkja var hins vegar á gildum DPPH rannsóknarinnar. Þar reyndist próteinafleiða N með hæst gildi en mest var það í 70% við styrk 100 µg/mL. Gildi ALC voru hér lægst sem bendir enn frekar til þess að niðurstöður Reducing Power rannsóknarinnar séu ekki marktækar.

Miðað við niðurstöður járnbindi- og andoxunarprófana telur höfundur fiskpróteinafleiðurnar hafa betri hæfileika til járnbindingar en andoxunar en það er þó ekki víst sökum mikillar skekku í andoxunar prófum.

Niðurstöður á áhrif fiskpróteina á frásog kalsíums í Caco-2 frumumódeli reyndust ekki búa yfir nægilegum breytum gilda á milli mínútna að mati höfundar til þess að niðurstöður væru nothæfar í frekari rannsóknir. Próteinafleiður ALC og N sýna línulega virkni allt að mínútu 60 en styrkur AX fellur talsvert eftir mínútu 40. Allar fiskpróteinafleiðurnar sýndu góða línulega virkni á milli mínútna 20 og 40 sem segir höfundi að nóg hefði verið að taka sýni á mínútu 40 til athugunar og útreikninga á gegndræpnistuðli Caco-2 frumumódelisins.

8 Heimildir

- Akar, Z., Küçük, M., & Doğan, H. (2017). A new colorimetric DPPH• scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 640–647.
<https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1284068>
- Baakdah, M. M., & Tsopmo, A. (2016). Identification of peptides, metal binding and lipid peroxidation activities of HPLC fractions of hydrolyzed oat bran proteins. *Journal of Food Science and Technology*, 53(9), 3593–3601. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2341-6>
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of „antioxidant power“: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76.
<https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Biesalski, H.-K., Dragsted, L. O., Elmadfa, I., Grossklaus, R., Müller, M., Schrenk, D., ... Weber, P. (2009). Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition*, 25(11–12), 1202–1205. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.04.023>
- Biology Online. (2008). Oxidation - Biology-Online Dictionary. Sótt 3. apríl 2019, af <https://www.biology-online.org/dictionary/Oxidation>
- Blais, A., Aymard, P., & Lacour, B. (1997). Paracellular calcium transport across Caco-2 and HT29 cell monolayers. *Pflügers Archiv*, 434(3), 300–305. <https://doi.org/10.1007/s004240050400>
- Blume, L.-F., Denker, M., Kunze, T., & Gieseler, F. (2010). *Temperature corrected transepithelial electrical resistance (TEER) measurement to quantify rapid changes in paracellular permeability*. (1), 19–24. <https://doi.org/10.1691/ph.2010.9665>
- Breemen, R. B. van, & Li, Y. (2005). Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 1(2), 175–185.
<https://doi.org/10.1517/17425255.1.2.175>
- Chalamaiah, M., Dinesh kumar, B., Hemalatha, R., & Jyothirmayi, T. (2012). Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A

- review. *Food Chemistry*, 135(4), 3020–3038.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.06.100>
- Chen, D., Mu, X., Huang, H., Nie, R., Liu, Z., & Zeng, M. (2014). Isolation of a calcium-binding peptide from tilapia scale protein hydrolysate and its calcium bioavailability in rats. *Journal of Functional Foods*, 6, 575–584. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.12.001>
- Chen, S., Einspanier, R., & Schoen, J. (2015). Transepithelial electrical resistance (TEER): a functional parameter to monitor the quality of oviduct epithelial cells cultured on filter supports. *Histochemistry and Cell Biology*, 144(5), 509–515. <https://doi.org/10.1007/s00418-015-1351-1>
- Cleveland, D. W., Fischer, S. G., Kirschner, M. W., & Laemmli, U. K. (1977). Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*, 252(3), 1102–1106.
- Eckert, E., Bamdad, F., & Chen, L. (2014). Metal solubility enhancing peptides derived from barley protein. *Food Chemistry*, 159, 498–506. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.061>
- Hamed, I., Özogul, F., Özogul, Y., & Regenstein, J. M. (2015). Marine Bioactive Compounds and Their Health Benefits: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(4), 446–465. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12136>
- Hanani, M. (2012). Lucifer yellow – an angel rather than the devil. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(1), 22–31. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01378.x>
- Hilgendorf, C., Spahn-Langguth, H., Regårdh, C. G., Lipka, E., Amidon, G. L., & Langguth, P. (2000). Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX Co-cultured Cell Lines: Permeabilities Via Diffusion, Inside- and Outside-Directed Carrier-Mediated Transport. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89(1), 63–75. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6017\(200001\)89:1<63::AID-JPS7>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6017(200001)89:1<63::AID-JPS7>3.0.CO;2-6)
- Hilgers, A. R., Conradi, R. A., & Burton, P. S. (1990). Caco-2 Cell Monolayers as a Model for Drug Transport Across the Intestinal Mucosa. *Pharmaceutical Research*, 7(9), 902–910.
<https://doi.org/10.1023/A:1015937605100>

- Hou, H., Wang, S., Zhu, X., Li, Q., Fan, Y., Cheng, D., & Li, B. (2018). A novel calcium-binding peptide from Antarctic krill protein hydrolysates and identification of binding sites of calcium-peptide complex. *Food Chemistry*, *243*, 389–395.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.152>
- Hubatsch, I., Ragnarsson, E. G. E., & Artursson, P. (2007). Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nature Protocols*, *2*(9), 2111–2119.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.303>
- Khora, S. S. (2013). *Marine fish-derived bioactive peptides and proteins for human therapeutics* (B. 5).
- Kim, S.-K., & Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods*, *2*(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.jff.2010.01.003>
- Lea, T. (2015). Caco-2 Cell Line. Í K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, ... H. Wichers (Ritstj.), *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models* (bls. 103–111). https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_10
- Liu, R., Xing, L., Fu, Q., Zhou, G., & Zhang, W. (2016). A Review of Antioxidant Peptides Derived from Meat Muscle and By-Products. *Antioxidants*, *5*(3). <https://doi.org/10.3390/antiox5030032>
- Molecular Weight Markers. (e.d.). Sótt 3. apríl 2019, af Sigma-Aldrich website:
<https://www.sigmaaldrich.com/life-science/proteomics/protein-electrophoresis/molecular-weight-markers.html>
- Mukherjee, T., Squillante, E., Gillespie, M., & Shao, J. (2004). Transepithelial Electrical Resistance is Not a Reliable Measurement of the Caco-2 Monolayer Integrity in Transwell. *Drug Delivery*, *11*(1), 11–18. <https://doi.org/10.1080/10717540490280345>
- Müller, S. A., Kohajda, T., Findeiß, S., Stadler, P. F., Washietl, S., Kellis, M., ... Kalkhof, S. (2010). Optimization of parameters for coverage of low molecular weight proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *398*(7–8), 2867. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4093-x>

Peng, Z., Hou, H., Zhang, K., & Li, B. (2017). Effect of calcium-binding peptide from Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) bone on calcium bioavailability in rats. *Food Chemistry*, 221, 373–378.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.078>

Protein Gel Staining and Imaging - IS. (e.d.). Sótt 3. apríl 2019, af

<https://www.thermofisher.com/tr/en/home/life-science/protein-biology/protein-gel-electrophoresis/protein-gel-staining-imaging.html>

Ross, A. C., Yaktine, A. L., & Valle, H. B. D. (2011). 2, Overview of Calcium. Í *Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium*. Sótt af <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56060/>

SDS-PAGE Gel Fixing Solution. (e.d.). Sótt 5. apríl 2019, af <https://www.gbiosciences.com/SDS-PAGE-Gel-Fixing-Solution>

Senevirathne, M., & Kim, S.-K. (2012). Chapter 32 - Utilization of Seafood Processing By-products: Medicinal Applications. Í S.-K. Kim (Ritstj.), *Advances in Food and Nutrition Research* (bls. 495–512). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416003-3.00032-9>

Srinivasan, B., Kolli, A. R., Esch, M. B., Abaci, H. E., Shuler, M. L., & Hickman, J. J. (2015). TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *Journal of laboratory automation*, 20(2), 107–126. <https://doi.org/10.1177/2211068214561025>

Tallkvist, J., & Tjälve, H. (1998). Transport of Nickel across Monolayers of Human Intestinal Caco-2 Cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 151(1), 117–122.

<https://doi.org/10.1006/taap.1998.8453>

ThermoFisher. (e.d.-a). Novex 16% Tricine Protein Gels, 1.0 mm, 12-well - Thermo Fisher Scientific.

Sótt 11. mars 2019, af <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EC66952BOX>

ThermoFisher. (e.d.-b). NuPAGE 10% Bis-Tris Protein Gels, 1.0 mm, 10-well - Thermo Fisher Scientific.

Sótt 11. mars 2019, af <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/NP0301BOX>

ThermoFisher. (e.d.-c). PrestoBlue Cell Viability Reagent. Sótt 24. mars 2019, af

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A13261>

Walters, M. E., Esfandi, R., & Tsopmo, A. (2018). Potential of Food Hydrolyzed Proteins and Peptides to Chelate Iron or Calcium and Enhance their Absorption. *Foods*, 7(10).

<https://doi.org/10.3390/foods7100172>

Wong, F.-C., Yong, A.-L., Ting, E. P.-S., Khoo, S.-C., Ong, H.-C., & Chai, T.-T. (2014). Antioxidant, Metal Chelating, Anti-glucosidase Activities and Phytochemical Analysis of Selected Tropical Medicinal Plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, 13(4), 1409–1415.

Xu, M., McCanna, D. J., & Sivak, J. G. (2015). Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 71, 1–7.

<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2014.11.003>