

Effekt av hypoksiske forhold og lavdoserate β -bestråling på T98G humane kreftceller i kultur.

Stine Christoffersen



Oppgave for graden Master i fysikk

UNIVERSITETET I OSLO

Juni 2011

© Stine Christoffersen

2011

Effekt av hypoksiske forhold og lavdoserate β -bestråling på T98G humane kreftceller i kultur

Stine Christoffersen

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Sammendrag

Den etablerte oksygeneffekten dokumenterer at hypoksiske celler, med mindre enn normal tilgjengelighet av oksygen, er mindre strålefølsomme enn veloksygenerte celler.

Det er imidlertid oppdaget en *revers* oksygeneffekt på T-47D brystkreftceller, der hypoksiske T-47D celler var mer strålefølsomme for bestråling med en ultralav doserate. Det ble oppdaget en synergistisk effekt av lavdoseratebestråling med 0,015 Gy/time i kombinasjon med moderate hypoksiske forhold, hvor T-47D celler dyrket kontinuerlig med 4,6% O₂ i gassfasen ikke tålte behandlingen med lavdoseratebestråling. Både lavdoseratebestrålingen og de hypoksiske forholdene gav liten effekt hver for seg. Årsaken til denne synergieffekten var trolig at de bestrålte cellene hadde en forhøyet respirasjon sammenlignet med ubestrålte kontrollceller dyrket under de samme hypoksiske forholdene, som førte til strengere hypoksi og hemmet veksten til de bestrålte T-47D cellene (Pettersen et al. 2007).

I denne oppgaven har det blitt gjort en lignende studie av T98G glioblastom celler, der effekter av å dyrke cellene under moderat hypoksi (3-4% oksygen i gassfasen) og bestråling med ulike doserater (0,053 Gy/time, 0,018 Gy/time og 0,009 Gy/time) ble undersøkt. I eksperimentene ble følgende observert:

- Ubestrålte og bestrålte T98G celler dyrket under moderat hypoksi (hhv. 4% og 3,5% oksygen i gassfasen) opplevde en *syklisk hypoksi* som varierte hhv mellom ca. 3 % - under 0,1% oksygen ved en vanlig passasje fra utsåing til omsetting.
- Ved full tilgjengelighet av oksygen for cellene hadde de bestrålte (0,018 Gy/time) T98G cellene en betydelig forhøyet cellulær respirasjon, med en maksimalverdi på hele 1294 fmol/(celle·time) og en gjennomsnittsverdi på 687 fmol/(celle·time). Til sammenligning hadde de ubestrålte T98G cellene en maksimal respirasjon per celle på 793 fmol/(celle·time) og en gjennomsnittlig respirasjon på 396 fmol/(celle·time). De bestrålte cellene nær dobler sin cellulære respirasjon.
- Økningen av cellulær respirasjon for T98G cellene bestrålt med 0,018 Gy/time førte til en strengere hypoksi sammenlignet med de ubestrålte T98G cellene dyrket under hypoksiske forhold, men hindret ikke celleveksten. Effekten på de bestrålte cellenes evne til å danne kolonier ble undersøkt ved koloni-metoden og viste at

overlevelsesfraksjonen til de bestrålte cellene stabiliserte seg på ca. 40- 60%, relativt til en ubestrålt kontroll dyrket under samme hypoksiske forhold.

- De ubestrålte T98G cellene nådde like lave pericellulære oksygenkonsentrasjonsverdier, men det var da omtrent dobbelt så mange celler i celleflasken.
- Det ble gjort metabolisme-forsøk på T98G celler og T-47D celler som viste at det var forskjeller i pH-verdier og laktat-utslipp til mediet for T98G og T-47D kreftceller avhengig av om cellene ble dyrket i luft eller under moderat hypoksi med 4% O₂ i gassfasen. Cellene som ble dyrket under moderat hypoksi hadde forhøyede laktatverdier, samt lavere pH-verdier sammenlignet med T98G celler og T-47D celler dyrket i luft. Forholdet mellom daglig glukoseforbruk relativt til daglig laktatproduksjon antydte at de hypoksiske cellene var glykolytiske, dvs. glykolyse var hovedkilde til å danne ATP. Det ble samtidig vist at T-47D celler (uavhengig av hvor de ble dyrket) tømte glukoselagrene sine helt 4 dager etter forsøksstart.

Forord

Denne oppgaven er utført ved Universitetet i Oslo ved gruppen for Biofysikk og medisinsk fysikk.

Jeg vil først og fremst takke veilederne mine, Erik og Nina, som har bidratt med masse inspirasjon, kunnskap og hjelp underveis i oppgaven og ikke minst i den siste tiden. Takker også Joe for all hjelpen jeg har fått med arbeidet i hypoksiboksen og Siri som gav meg grundig og tålmodig opplæring i arbeidet med cellekulturer. Ikke minst vil jeg takke alle sammen på cellelaben for et veldig godt miljø, som har gjort at jeg har stortrives med å skrive oppgave her.

Ellers vil jeg også takke alle studentene som har gjort det til en glede å være mye på blindern! Ida fortjener en spesiell takk for super-godt samarbeid på laben, som har betydd masse for meg. Jeg vil også takke Siv for eksepsjonelt godt nabo-miljø og oppmuntrende ord i innspurten.

Jeg vil også takke pappa og Lars Tore for å ha lest korrektur på oppgaven min.

En ekstra takk til Lars Tore som har vært en helt den siste tiden og gitt meg enorme mengder støtte, motivasjon, hjelp og nød-sjokolade. Dette, samt enorme mengder kaffe, har helt klart bidratt til utformingen av min oppgave og min generelle lykke.

Blindern, juni 2011

Stine Christoffersen

Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	1
2	Teori	3
2.1	Strålingsfysikk	3
2.1.1	Ioniserende stråling	3
2.1.2	Vekselvirkningsteori	3
2.1.3	Energiavsetning.....	4
2.1.4	Radioaktivitet	5
2.1.5	Tritium.....	6
2.2	Cellebiologi	7
2.2.1	Kontrollpunkter og reguleringsmekanismer.....	8
2.2.2	Cellekinetikk	9
2.2.3	Hypoksi	10
2.2.4	Cellulære effekter av hypoksi.	11
2.2.5	Metabolisme	12
2.3	Strålingsbiologi.....	14
2.3.1	Cellulære stråleskader	14
2.3.2	Reparasjon av stråleskader	15
2.3.3	Radiobiologiske modeller for celleinaktivering.....	16
2.3.4	Variasjoner av strålefølsomhet i cellyklus	18
2.3.5	Doserate-effekter	19
2.3.6	Oksygeneffekten.....	19
2.3.7	Molekylære mekanismer bak oksygeneffekten.....	20
2.4	Flowcytometri.....	21
2.4.1	Oppbygning.....	21
2.4.2	Bestemmelse av cellestørrelse og granulasjon.....	22
2.4.3	DNA-histogram.....	22
3	Metode.....	24
3.1	Celledyrkning	24
3.1.1	Cellelinjene.....	24
3.1.2	Sterilitet og labutstyr	25
	Omsetting og mediumskifte	25

3.2	Bestråling av cellene.....	27
3.2.1	Oppsett	27
3.2.2	Strålehygiene	27
3.3	Koloniforsøk	28
3.3.1	Prosedyre	28
3.3.2	Celletelling	28
3.3.3	Beregning av PE og overlevelsesfraksjonen	29
3.4	Beregning av doblingstider.....	30
3.5	Respirasjonsmålinger i hypoksiboksen	30
3.5.1	Oppsett	30
3.5.2	Respirasjonsrate	32
3.6	Flowcytometri.....	33
3.7	Laktat- og glukose-målinger.....	34
4	Resultater og analyse.....	35
4.1	Forsøk A: Ubestrålte T98G-celler i 4% O ₂	35
4.1.1	Respirasjonsdata	35
4.1.2	Antall celler	38
4.2	Forsøk B: Celler bestrålt med 1,6 Ci/mol i 4% O ₂	40
4.2.1	Antall celler i forsøk B	41
4.2.2	Resultat fra koloniforsøket i forsøk B	43
4.3	Forsøk C: T98G-celler bestrålt med 1,6 Ci/mol i 3% O ₂ . Reoksygenering med 4% O ₂ i gassfase i 4 timer etter omsetting og mediumskift.	45
4.3.1	Resultat fra koloniforsøket i forsøk C	45
4.3.2	Resultat av flowcytometri-målinger fra forsøk C	47
4.4	Forsøk D: T98G-celler bestrålt med 0,53 Ci/mol og 0,27 Ci/mol i 3,5% O ₂	49
4.4.1	Resultat fra koloni-forsøk til forsøk D	52
4.5	Forsøk E: T98G-celler bestrålt med 0,53 Ci/mol i 3,5% O ₂	53
4.5.1	Respirasjonsdata	53
4.5.2	Antall celler	57
4.5.3	Koloni-forsøk	60
4.5.4	Resultat fra flowcytometri-målinger fra forsøk E.....	61
4.6	Forsøk F: Konfluens-forsøk på T98G-celler med 3,5% O ₂ i gassfase.....	63

4.7	Forsøk G: Metabolisme-forsøk på ubestrålte T98G og T-47D celler i 20% O ₂ og 4% O ₂	63
5	Diskusjon.....	70
5.1	Optimal oksygenkonsentrasjon i hypoksiboksen	70
5.2	Forskjeller i pericellulær oksygenkonsentrasjon (POC) og respirasjon per celle for ubestrålte og bestrålte (0,53 Ci/mol) T98G celler dyrket i syklisk hypoksi	71
5.3	Usikkerheter i respirasjonsforsøkene	73
5.4	Effekten av de ulike doseratene på overlevelsen.....	74
5.5	Usikkerhet ved bruk av koloni-metoden	77
5.6	Betydningen av konfluens	78
5.7	Hypoksi påvirker metabolismen til T-47D og T98G kreftceller	79
5.8	Usikkerheter i metabolisme-forsøkene	82
6	Konklusjon	83
	Litteraturliste	84
	Vedlegg A: Kjemikalieliste	87
	Vedlegg B: Oppskrifter	88
	Vedlegg C: Oversikt over forsøk	90
	Vedlegg C: Oksygenprofiler	91
	Vedlegg D: Koloniforsøk	94
	Vedlegg E: Metabolisme-forsøk I	103

1 Innledning

I Norge ble det i 2008 diagnostisert 26100 nye tilfeller av kreft (Kreftforeningen 2011). Kreft er en potensielt dødelig sykdom som dannes ved at mutasjoner i cellenes DNA fører til ukontrollert cellevekst (Alberts 2008). Ettersom de muterte kreftcellene deler seg, vil det dannes en svulst. Karakteristiske egenskaper ved kreftceller er deres evne til å dele seg ukontrollert og til å innta og kolonisere andre områder i kroppen. Celler fra svulsten kan løsrive seg og danne sekundærtumorer andre steder i kroppen, slike sekundærtumorer kalles metastaser. Jo mer kreften sprer seg, jo vanskeligere er den å behandle og det er ofte slike metastaser som dreper kreftpasienter (Alberts 2008).

Stråleterapi brukes utstrakt til behandling og smertelindring ved kreftsykdom. Bruk av ioniserende stråling til behandling av kreft er en balansegang mellom å levere nok stråling til kreftsvulsten slik at *alle* kreftcellene dør, samtidig som dose til normalvev og eventuelle risikoorganer i nærheten av kreftsvulsten *må* minimeres. Ulike faktorer påvirker strålefølsomheten til kreftsvulsten, og dette må tas hensyn til ved planlegging av bestrålingsregime.

Når en kreftsvulst dannes øker den i volum og kreftsvulsten trenger etter hvert mer oksygen enn det de tilgjengelige blodårene frakter. Kreftsvulsten danner da sitt eget karnettverk, og dette karnettverket er ofte preget av en ustrukturert oppbygning. På grunnlag av et slikt ustrukturert karnettverk dannes det ofte områder i svulsten med lite tilgjengelig oksygen, såkalte hypoksiske områder (Mayles et al. 2007). Kreftceller som befinner seg i hypoksiske områder representerer et problem i behandlingen av svulsten, fordi hypoksiske celler generelt er mindre strålefølsomme enn normaloksygenerte celler. Denne forskjellen i strålefølsomhet mellom hypoksiske og normaloksygenerte celler kalles *oksygeneffekten*.

Hypoksien i kreftsvulstene medfører imidlertid negative følger for pasienten av flere grunner. Det er i flere studier vist tydelige korrelasjoner mellom høy andel hypoksiske celler i tumor og høy metastaserings evne samt dårlig prognose for pasienten uansett behandlingsform. Hypoksi er dermed ikke uventet et stort forskningsfelt innen kreftforskning generelt, ikke bae i forbindelse med stråleterapi.

Det er tidligere gjort forsøk på T-47D brystkreftceller der det overraskende ble funnet en synergistisk effekt av stråling levert med ultralav doserate (0,015 Gy/time) og moderat hypoksi (Pettersen et al. 2007). Dette er motsatt av den etablerte oksygeneffekten nevnt ovenfor, der hypoksiske celler er mindre strålefølsomme enn normaloksygenerte celler. En slik kombinert behandling med stråling levert med ultralav doserate og hypoksi der hver av komponentene alene ikke har noen stor effekt, vil potensielt kunne representere en måte å selektivt drepe de hypoksiske cellene i en tumor ved å utsette svulsten for kontinuerlig lavdoseratebestråling over flere uker.

Denne oppgaven tar sikte på å studere dette fenomenet nærmere i en kreftmodell som er kjent for å være spesielt vanskelig å behandle med stråleterapi. Ved å studere responsen til T98G glioblastom celler (dvs. hjernekreft) på en kombinert behandling av bestråling med ultralav doserate og hypoksi, vil man kartlegge eventuelle synergistiske effekter på humane hjernekreftceller. Både cellenes evne til å danne kloner (dvs. nye kreftsvulster in vitro), deres respirasjonsforløp og pericellulær oksygenkonsentrasjon ble kartlagt under hypoksiske forhold uten så vel som med kontinuerlig lavdoserate-bestråling.

For å gjennomføre oppgavens problemstilling er det nødvendig å bestemme effekten av hypoksi og bestråling ved ultralave doserater alene og ved en kombinert behandling med hypoksi og bestråling. Parallelt med denne masteroppgaven ble responsen til T98G celler på bestråling med ultralave doserater under aerobe forhold studert av Ida Aspmodal i hennes masteroppgave (Aspmodal 2011), dermed muliggjøres en sammenligning med effekten av bestrålingen alene.

Hvis en synergistisk effekt kan dokumenteres også for T98G hjernekreftceller er dette et steg i riktig retning med tanke på en videre utvikling av en metode for å selektivt drepe hypoksiske tumorceller, ved for eksempel ved å undersøke om en slik effekt kan overføres til en dyremodell.

Videre har det underveis i oppgaven blitt belyst andre interessante områder i arbeidet med karakteriseringen av T98G sin respons på hypoksi. Det ble derfor et mål å studere hvordan cellene omsetter energi og hvordan dette påvirkes av cellelinje og hypoksi.

Cellene ble dyrket kontinuerlig i en hypoksiboks, der oksygenkonsentrasjonen i gassfasen kunne kontrolleres. Tilgjengelig oksygen for cellene begrenses av molekylær diffusjon av oksygen fra gassfasen, gjennom mediet og ned til flaskebunnen. Dette medfører at det oppstår en oksygenkonsentrasjon-gradient nedover gjennom mediet med høyest konsentrasjon ved overflaten og lavest ved bunnen der cellene sitter, med en helning som er proporsjonal med total respirasjon i celleflasken. Det ble brukt en oksygensensor til å måle oksygenkonsentrasjonen stegvis nedover i mediet, helt ned til flaskebunnen. Dermed kunne pericellulær oksygenkonsentrasjon monitoreres og cellulært oksygenforbruk beregnes.

Bestrålingen ble gjennomført ved å tilsette [3H]-valin i cellenes medium. Den radioaktive hydrogen-isotopen ble dermed inkorporert i cellulært protein og bestrålt innenfra. Mikrodosimetriske metoder for å kartlegge doseraten ble utviklet av Søyvik (2002) og utført av Aspmodal (2011).

2 Teori

2.1 Strålingsfysikk

2.1.1 Ioniserende stråling

Ioniserende stråling karakteriseres av strålingens evne til å ionisere og eksitere atomer. Det skilles mellom direkte og indirekte ioniserende stråling.

Direkte ioniserende stråling er raske, ladde partikler der energiavsetningen foregår ved mange små Coulomb-interaksjoner (Attix 1986).

Indirekte ioniserende stråling er uladde partikler som røntgenstråling, gammastråling og nøytroner. Disse vekselvirker sjeldnere, men kraftigere, og vil overføre energi til ladde partikler som vil avsette energi på tilsvarende måte som direkte ioniserende stråling (Attix 1986).

2.1.2 Vekselvirkningsteori

I denne oppgaven benyttes β -bestråling og derfor vil det kun fokuseres på vekselvirkninger for ladde partikler (elektroner).

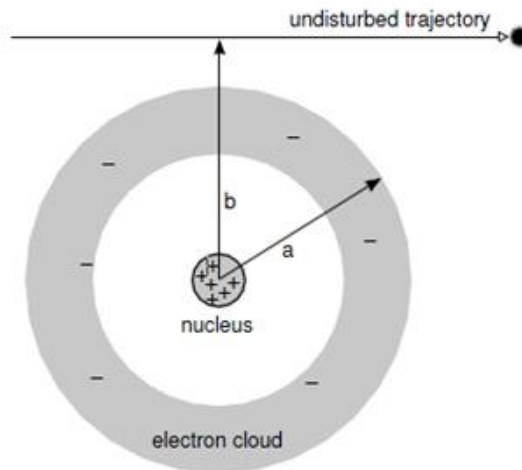
De ladde partiklene vil, på grunn av sitt Coulomb-felt, vekselvirke med nesten hvert eneste atom de passerer. Dette vil føre til en nærmest kontinuerlig nedbremsing av den ladde partikkelen. Gjennomsnittlig antall vekselvirkninger for en 1 MeV ladd partikkel er i størrelsesorden 10^5 og sannsynligheten for at det ikke vil foregå en vekselvirkning med det absorberende materialet er null (Attix 1986).

Energiavsetningen fra ladde partikler omhandles i avsnitt 2.1.3. De ulike måtene en ladd partikkel kan Coulomb-vekselvirke på beskrives ved støts-parameteren b og den atomære radiusen a (se *Figur 1*, side 4).

1. Myke kollisjoner ($b \gg a$). Når den ladde partikkelen passerer nokså langt fra atomet vil den vekselvirke med atomet i sin helhet (for eksempel ved å avbøye, ionisere eller eksitere atomet). Dette medfører en svært liten energioverføring til atomet. Det er denne prosessen som foregår oftest (Attix 1986).
2. Harde kollisjoner ($a \sim b$). Ved harde kollisjoner er det sannsynlig at den innkomne ladde partikkelen vekselvirker med et atomært elektron. Ved en slik vekselvirkning vil det atomære elektronet slås ut. Det overføres en betydelig mengde kinetisk energi til det utslåtte elektronet som kan vekselvirke videre med materien ved Coulomb-vekselvirkninger. Det utslåtte elektronet danner således sitt eget spor av

energiavsetninger og kalles en δ -ray. Når et elektron fra et indre skall blir slått ut vil dette føre at et elektron fra et ytre skall fyller dets plass. Energien som tilsvarer forskjellen i bindingsenergi mellom de to skallene sendes ut i form av røntgenstråling eller ett eller flere utsendte Auger-elektroner. Summen av den totale avsetningen av energi som overføres til materien fra harde kollisjoner er omtrent likt som det tilsvarende bidraget fra myke kollisjoner. Harde kollisjoner opptrer riktignok sjeldnere, men overfører til gjengjeld mer energi per kollisjon (Attix 1986).

Coulomb-vekselvirkninger med kjernen og kjerne-vekselvirkninger ved tunge, ladde partikler er to andre måter ladde partikler vekselvirker på. Disse vekselvirkningene vil ikke bidra nevneverdig til energiavsetning ved β -bestråling. Coulombvekselvirkninger med kjernen vil føre til avbøyning av sporet energien avsettes langs med (Attix 1986).



Figur 1: Figuren viser støtparameterne som brukes for å beskrive elektronvekselvirkningen. Figuren er modifisert og hentet fra Attix (1986)

2.1.3 Energiavsetning

Dette avsnittet er i sin helhet basert på boka *Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry* (Attix 1986).

Stopping Power

Stopping power (S) gir et mål på hvor mye energi den innkomne ladde partikkelen gir fra seg til det absorberende mediet. Stopping Power defineres som forventningsverdien til tapsraten av kinetisk energi per lengdeenhet x , for en type partikkel (Y), med en gitt kinetisk energi (T) i et gitt medium (Z). Da kan Stopping Power settes opp som følger:

$$S = \left(\frac{dT}{dx} \right)_{Z,T,Y} . \quad (1)$$

Stopping Power avhenger av hva slags ladd partikkel det er snakk om, den atomære oppbygningen til mediet partikkelen bremses ned i og hvilken kinetisk energi/hastighet partikkelen har.

Linear Energy Transfer (LET)

Man er ofte interessert i hvor mye energi som avsettes lokalt. Ved harde kollisjoner (avsnitt 2.1.2, s. 3) vil δ -rays kunne føre energien vekk fra vekselvirkningsstedet, dermed vil Stopping Power overestimere lokalt avsatt energi. I dosimetrien benyttes derfor ofte Linear Energy transfer (LET) i stedet. LET er den andelen av Stopping Power som inkluderer all energi avsatt ved myke kollisjoner og den energien fra harde kollisjoner som fører til δ -rays med energi under en gitt verdi Δ . Hvilken verdi Δ settes til vil avhenge av systemet man ser på og hva som legges i begrepet lokalt avsatt energi.

Rekkevidde \mathfrak{R} i mediet

Rekkevidden \mathfrak{R} til en type partikkel, energi og medium er definert som forventningsverdien til veilengden p som partikkelen følger fram til den stopper opp. Siden ladde partikler vekselvirker veldig ofte er det en vanlig approksimasjon å si at partiklene nedbremses kontinuerlig (CSDA). Under denne approksimasjonen defineres rekkevidden til

$$\mathfrak{R}_{CSDA} = \int_0^{T_0} \left(\frac{dT}{dx} \right)^{-1} dT, \quad (2)$$

der T_0 er partikkelens startenergi.

2.1.4 Radioaktivitet

Radioaktivitet karakteriseres ved en atomkjernes evne til å spontant desintegre. Dette foregår ved emisjon av partikler og/eller elektromagnetisk stråling (Spinks and Woods 1990). Aktiviteten til en radioaktiv nuklide har enheten becquerel (Bq) som beskriver antall desintegrasjoner per sekund.

$$1 B \equiv 1 s^{-1}$$

Desintegrasjon er en stokastisk prosess og må dermed bestemmes ved sannsynligheter. Aktiviteten er gitt som

$$A = \lambda N, \quad (3)$$

og er proporsjonal med antall kjerner N og desintegrasjonskonstanten λ . λ beskriver halveringstiden til radionukliden. Halveringstiden gir hvor lang tid det tar før halvparten av den originale nukliden har desintegert.

Rutherford og Soddy fant i 1902 følgende sammenheng eksperimentelt:

$$dN = -\lambda N dt \quad (\text{Mayles et al. 2007}) \quad (4)$$

Denne differensialligningen gir videre antall radioaktive atomer ved tiden t som

$$N = N_0 e^{-\lambda t}, \quad (5)$$

der N_0 er hvor mange radioaktive atomer en startet med. Aktiviteten, A , til en radioaktiv nuklide kan ved hjelp av ligning (3) og ligning (5) nå skrives som

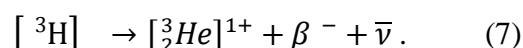
$$A = \lambda N = A_0 e^{-\lambda t}. \quad (6)$$

2.1.5 Tritium

Det har i denne oppgaven blitt benyttet en radioaktiv hydrogenisotop $[^3\text{H}]$, *tritium*, til å bestråle cellene. Tritium har 1 proton og 2 nøytroner i kjernen. Bindingsenergien mellom elementærpartiklene i kjernen er relativt lav og som følge av dette er kjernen ustabil. Halveringstiden til $[^3\text{H}]$ er $\lambda = 12,43$ år (Feinendegen 1967; Rowberg 1998).

Tritium finnes naturlig i atmosfæren, der det blir dannet tritium ved ulike kjernereaksjoner på grunn av kosmisk stråling. Tritiumioner som dannes kombineres med hydroksid-ioner og danne tritiert vann, som vil treffe jordoverflaten i form av vann eller snø (Feinendegen 1967). Dette naturlig forekommende tritiumet finnes kun i små mengder og tritium til bruk innenfor biologi, medisin og industri må derfor produseres kunstig. Dette kan gjøres på to måter, enten ved en å bruke en reaktor hvor litium bombarderes med nøytroner, eller ved å bruke en partikkelakselerator til å danne høyenergetiske nøytroner som kan produsere $[^3\text{H}]$ i kjernereaksjoner (Rowberg 1998).

Tritium henfaller til $[^3_2\text{He}]^{1+}$ ved utsendelse av et elektron og et antinøytrino. Reaksjonen blir da



Gjennomsnittsenergien til β -partikkelen er 5,6 keV og maksimumsenergien er 18,6 keV.

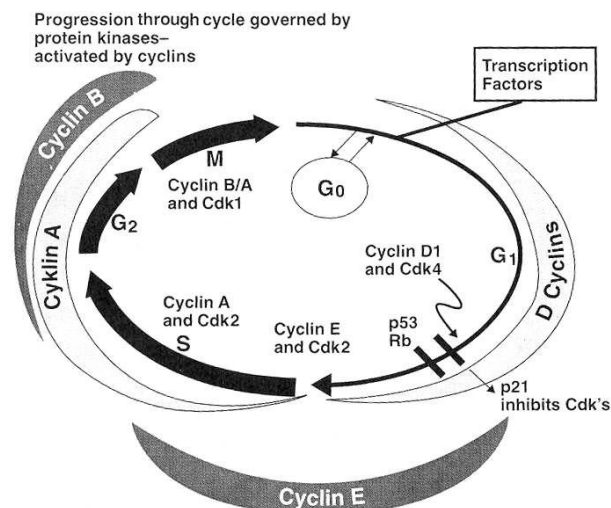
Ved studier innen cellebiologi er det av interesse å se på rekkevidden til β -strålingen i vann. Den gjennomsnittlige rekkevidden i vann er $0,56 \mu\text{m}$ og en den maksimale rekkevidden er på

6 μm (Chen 2006). På grunn av β -partikkelens lave energi samt korte rekkevidde i vann, vil ikke tritium innebære noen eksterne strålingsrisikoer.

2.2 Cellebiologi

Delkapittel 2.2.1 baserer seg i stor grad på boka *The Cell* (Alberts 2008) og *Radiobiology for the radiologist* (Hall and Giaccia 2006).

Cellene i kroppen fornyes stadig i en prosess kalt celledeling. Celledeling er en syklisk prosess der cellen først vil doble sitt innhold av protein, organeller og DNA (interfase), før selve celledelingen foregår i mitosen. Cellesyklus deles opp i fire faser, G1-, S-, G2- og M-fasen. I *Figur 2* s. 7 ser vi en syklisk fremstilling av dette.



Figur 2: Figuren viser en skisse av cellesyklus, der viktige kontrollpunkter i cellesyklus er tatt med (Hall and Giaccia).

For at cellen skal kunne dele seg må arvematerialet DNA doubles, slik at hver av de to dattercellene får overført den genetiske informasjonen som finnes i cellens DNA. Når alt DNA i kromosomene er korrekt kopiert, må arvematerialet fordeles likt mellom dattercellene. Disse to hovedprosessene i cellesyklus foregår i hhv. S-fasen (der S står for DNA-syntese) og M-fasen (mitose). Syntesen av DNA foregår ved å bruke hver av de to komplementære trådene i DNA som mal slik at det lages to nye dobbelthelikser. Denne prosessen skjer raskt og det skapes en mengde feil som kontinuerlig rettes opp av reparasjonsmekanismer i cellen.

M-fase er inndelt i to hovedfaser; mitosen og cytokinesen. I mitosen vil de to DNA-molekylene vikles fra hverandre og kondensere til par av søsterkromatider. Søsterkromatidene vil så festes til den mitotiske spindelen og plasseres på linje. Deretter trekkes

søsterkromatidene mot hver sin pol, der de pakkes inn i hver sin kjerne. I cytokinesen foregår selve celledelingen og vi får to datterceller som hver inneholder en eksakt kopi av den opprinnelige cellens DNA.

I løpet av cellesyklus må cellen doble alt sitt innhold (organeller, lipider og proteiner). Til dette trenger cellene vanligvis noe mer tid enn bare varigheten av S-fase. De har derfor vanligvis en såkalt Gap-fase før (G1) og etter (G2) S-fasen. I disse to fasene kontrolleres også mikromiljøet for om cellen skal tillates å fortsette i cellesyklus, dvs. om det er behov for flere celler. Det kontrolleres dessuten om cellesyklus skal avbrytes fordi cellen kan være skadet.

2.2.1 Kontrollpunkter og reguleringsmekanismer

Cellene er avhengige av et godt kontrollsystem for å unngå at skader i enkeltceller fikseres eller at abnorme celler mangfoldiggjøres. I løpet av cellesyklus er det flere viktige kontrollpunkter som fungerer som av/på-knapper. Her blir det avgjort om cellen skal gå videre til neste fase. Ved feil kan cellesyklus stanses for å gi tid til reparasjon; cellen kan også begå programmert celledød (apoptose).

Det første kontrollpunktet befinner seg sent i G1 (G1k). I G1k avgjøres det om DNA-replisering skal igangsettes og således om cellesyklus initieres. Hvis det ikke er behov for flere celler kan cellen sendes inn i en hvilefase, kalt G0, inntil det er behov for at cellen repliseres. Et annet hovedkontrollpunkt finnes sent i G2 (G2k), hvor det vurderes om DNA-syntesen var vellykket og om cellen er klar til å gå videre til mitose. Senere i mitosen er det et nytt kontrollpunkt, M_k, i overgangen til separering av søsterkromatidene og initiering av celledeling. Etter stråleskader er det vanlig med opphopning av celler i G2 (Maity et al. 1994).

Reguleringsystemet baserer seg i hovedsak på Syklinavhengige kinaser (Cdk) og variasjonen av sykliner gjennom cellesyklus. Cdk'ene er avhengig av å være bundet til spesifikke sykliner for å kunne fosforylere ulike substratproteiner. Syklinene syntetiseres og degraderes i løpet av cellesyklus, dermed reguleres det når de ulike Cdk'ene er aktive. Når Cdk-syklin-kompleksene fosforylerer substratproteiner trigges ulike kontrollpunkter i cellesyklus. Slik føres i hovedsak cellen gjennom syklus.

Proliferasjonsgener

For å opprettholde en sunn cellevekst er det viktig at det ikke produseres flere celler enn nødvendig. I G1 finnes det flere ulike faktorer som inhiberer CDK-syklin-komplekser og dermed hindrer cellen i å passere G1/S-kontrollpunktet. Mitogener er vekstfaktorer som trigger ulike signalveier som fører til at bremsene som inhiberer cellesyklus slås av og cellen starter cellesyklus (Alberts 2008). Disse signalveiene virker blant annet gjennom Ras og Myc. Ras og Myc ble først oppdaget ved at de kunne fremkalle kreft, og man trodde at de var et resultat av mutasjoner. De ble derfor først kategorisert som oncogener. Ras og Myc kalles nå proliferasjonsgener, fordi man har sett at de er normale gener som er nødvendig for å starte

celleproliferasjon. Hvis proliferasjonsgener overuttrykkes vil dette imidlertid kunne føre til uønsket cellevekst noe som kan være det første steget til kreftutvikling.

Tumorsupressorgener

Tumorsupressorgener virker ved å blokkere inngangen til cellyklus. Spesielt viktige tumorsupressorgener er pRb og p53.

pRb er et protein som er aktivt i defosforylert tilstand, det vil da binde et protein som er nødvendig for å øke konsentrasjonen av Cdk-syklin-komplekser. Den økte konsentrasjonen av CDK-syklin-komplekser er nødvendig for å passere kontrollpunktet sent i G1. Hvis begge kopiene av pRb er muterte vil dette kunne føre til kreftutvikling.

Ved siden av ekstracellulære mitogener vil progresjon gjennom cellyklus også avhenge av andre ekstracellulære og intracellulære mekanismer (Alberts 2008). En av disse mekanismene er skader på cellens DNA. Hvis det er skader på DNA er det viktig at DNA-syntese og mitose ikke igangsettes. Tumorsuppressoren p53 er en transkripsjonsfaktor som spiller en viktig rolle i å regulere cellyklus-arrest, DNA-reparasjon og apoptose når cellen utsettes for slike stress-stimuli, som for eksempel stråling eller hypoksi (hypoksi dekkes i delkapittel 2.2.3, s 11) (Zhao et al. 2009).

I uskadde celler blir p53 kontinuerlig ubiquitylert (merket for ødeleggelse) slik at konsentrasjonen av p53 er svært lav. Ved DNA-skader vil protein-kinasen ATM aktiveres og blant annet fosforylere p53 (Banin et al. 1998). Dette fører til at ubiquitin ikke lenger gjenkjenner p53 og at konsentrasjonen av p53 dermed øker. Den økte konsentrasjonen av p53 stimulerer transkripsjon av den CDK-hemmende kinasen p21, og cellen hindres fra å starte cellyklus.

p53 er også involvert i prosessen apoptose, som er et kontrollert cellulært selvmord. Apoptose gjennomføres hvis cellen ikke lenger fungerer eller hvis den kan være potensielt ødeleggende for organismen som helhet (Alberts 2008). p53 regnes for å være en viktig forsvars-mekanisme mot kreft og er mutert i halvparten av alle humane primære kreftsvulster (Matsumoto et al. 1994).

2.2.2 Cellekinetikk

Celler som stimuleres til å vokse uten hindringer under gode vekstforhold vil doble seg med faste intervaller. Den tiden det tar før cellen har doblet seg kalles doblingstiden, t_D (Kielberg et al. 1993).

Celletallet vil ved gode vekstforhold øke eksponentielt med tiden:

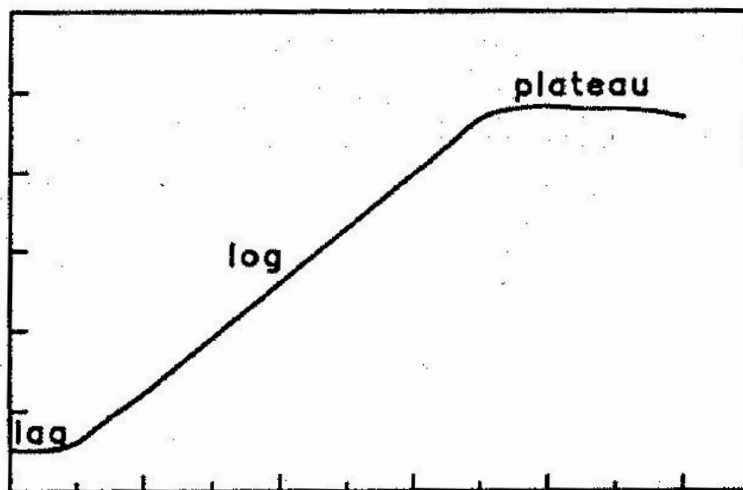
$$N(t) = N_0 e^{k \cdot t}, \quad (8)$$

der N er antallet celler, N_0 er celleantallet ved tiden $t = 0$ og k er en proporsjonalitetskonstant som kan bestemmes ved å se på doblingstiden. Videre får man da at

$$k = (\ln 2)/t_D. \quad (9)$$

Vekstkurver angis ofte i et semilogaritmisk plot, der celletallet avsettes på en logaritmisk y-akse og tid angis langs x-aksen. Ved en slik framstilling vil celler i eksponentiell vekst gi en rett linje, der parameteren k er grafens stigningstall. Et eksempel på en slik vekstkurve er gitt i Figur 3, side 10.

Som vist avviker vekstkurven ofte fra en rett linje i starten og slutten av plottet. I starten kan det være en periode med lav vekst som kalles lag-fasen. Hvor lenge denne fasen varer kan avhenge av cellype, hvor tett cellene sås ut, mediesammensetning eller andre faktorer. Den lave veksten i begynnelsen av vekstkurven kan skyldes stress som en følge av trypsinering, eller at mediet ennå ikke inneholder vekstfremmende stoffer som cellene frigjør. Vekstkurven vil flate ut når cellene fyller bunnen av celleflasken og når konfluens. Denne fasen kalles plata-fasen. Dette er et trekk som karakteriserer normale celler, mens maligne celler ofte ikke har en slik kontakt-inhibisjon. (Kielberg et al. 1993).



Figur 3: Figuren viser celleantallet på en logaritmisk y-akse med tid langs x-aksen (Kielberg et al. 1993).

2.2.3 Hypoksi

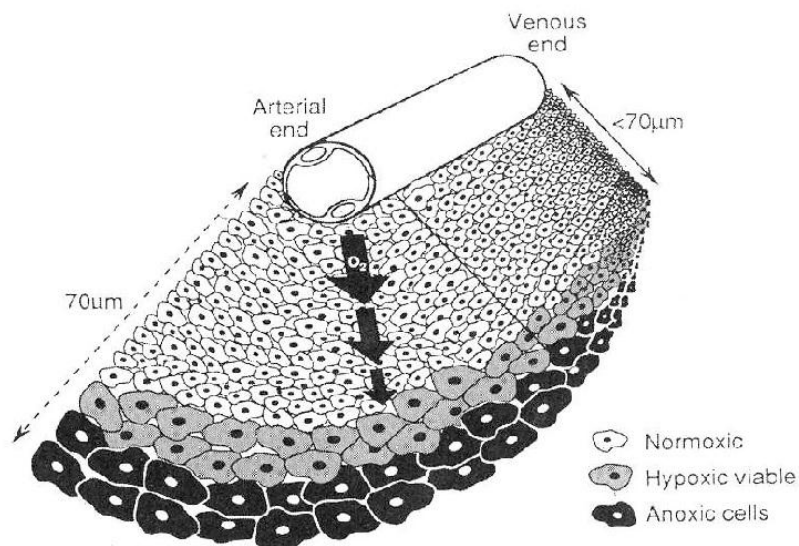
Hypoksi kan sies å være en tilstand der det er mindre enn normal tilgang på molekylært oksygen. Hypoksi kan føre til reduksjon av cellens biologiske funksjoner (Hockel and Vaupel 2001). Tilgjengeligheten av oksygen i vevet, hvilke effekter en reduksjon gir og hvordan dette påvirkes av ulike faktorer er et viktig forskningsområde innen biologi generelt og kreftforskning spesielt. Oksygennivå i vevet har en stor effekt både på strålefølsomhet, reaksjon på kjemoterapi og malign progresjon. I solide kreftsvulster er karnettverket ofte

mangelfullt og deler av svulsten hypoksisk. De molekylære mekanismene som ligger til grunn for effekten av oksygen på cellers følsomhet er forklart i delkapittel 2.3.6, s 19.

På basis av studier av mikromiljøet i kreftsvulster har det blitt vanlig å dele inn hypoksi i to underkategorier; kronisk og akutt hypoksi

Kronisk hypoksi er et resultat av begrenset diffusjon av oksygen gjennom respirerende vev (Hall and Giaccia 2006). Dette fører til at celler som ligger langt fra en blodåre har begrenset tilgang på oksygen i lengre tidsperioder. Oksygen har en diffusjonslengde på om lag $70 \mu\text{m}$. Vi tenker oss at det i en viss avstand fra en blodåre vil finnes et lag med celler som har nok oksygen til å overleve, men samtidig vil være hypoksiske og dermed bl.a. være mer resistente mot ioniserende stråling. Dette prinsippet illustreres i Figur 4, side 11.

Akutt hypoksi oppstår på grunn av perfusjonsendringer i blodårer, som for eksempel ved blokkering av en blodåre (Dewhirst et al. 1996; Hall and Giaccia 2006). Dette fører til transiente hypoksiske perioder i det omkringliggende vevet. En slik blokkering kan fort oppstå i tumorer, der karnettverket ikke er tilstrekkelig utviklet.



Figur 4: Skisse av hvordan det kan dannes et lag med hypoksiske celler i en viss avstand fra en blodåre (Hall and Giaccia 2006).

2.2.4 Cellulære effekter av hypoksi.

Hypoksi utgjør en stress-tilstand for cellene siden cellene trenger oksygen for å overleve. Celler har i midlertid utviklet en rekke forsvarsmekanismer i kroppens celler slik at de kan overleve et hypoksiske mikromiljø. Ved hypoksi endres genekspressjonen radikalt i de fleste celletyper (Cummins and Taylor 2005).

Hypoksi Indusert Faktor (HIF).

Hypoksi Indusert Faktor (HIF) er satt sammen av transkripsjonsfaktorene HIF- α og HIF- β , hvorav HIF- α er den viktigste regulatoren for hypoksisk signalering (Cummins and Taylor 2005).

Under vanlige forhold finnes ikke HIF- α stabilt i cellene, men akkumuleres når oksygenkonsentrasjonen synker. Akkumuleringen av HIF- α vil føre til endring av ekspresjonen til ulike gener og proteiner som gjør cellen i stand til å adaptere til det hypoksiske miljøet (Hall and Giaccia 2006). HIF- α kontrollerer blant annet gener som regulerer angiogenese, utvidelse av blodårer og dannelse av blodceller. Denne adapteringen til det hypoksiske miljøet tillater de hypoksiske cellene i en kreftsvulst å overleve den lave oksygen-konsentrasjonen. (Cummins and Taylor 2005).

p53.

Konsentrasjonen av tumorsupressorgenet p53 øker under hypoksiske forhold. Det er vist at moderat hypoksi (opp til 5000 ppm) induserer apoptose i MCF-7 brystkreftceller med intakt p53, men ikke celler med enten mutert p53 (T-47D) eller avskaffet p53-ekspresjon (NHIK 3026). Funksjonelt p53 kan altså spille en rolle i indusering av apoptose ved hypoksi, men er sannsynligvis ikke den eneste involverte faktoren (Amellem et al. 1997).

Malign progresjon.

Det er gjort en rekke pasientstudier på korrelasjon mellom tumor-oksygenering og pasientens utfall. Det er generelt funnet at det er mer sannsynlig med et godt utfall for pasienter med en veloksygenert tumor. Dette er vist både i studier der behandlingen ble gjort med stråleterapi, men også i studier der svulsten ble fjernet kirurgisk. Videre har det blitt funnet at svulster med lav og spesielt med variabel pO_2 oftere metastaserer. Disse studiene antyder at hypoksiske svulster er mer aggressive enn veloksygenerte svulster (Hall and Giaccia 2006).

Hypoksi fremmer genomisk ustabilitet og selekterer for celler der apoptotisk potensial er redusert og angiogenetisk potensial forhøyet. I kreftsvulster fører dette til en selektiv fordel for celler som tåler hypoksi godt, slik at flere av disse cellene overlever. Når celleantallet øker, vil det bli mindre oksygen per celle, og cellene blir mer hypoksiske. En slik seleksjonsprosess fører til økt andel av celler i svulsten som tåler det vanskelige hypoksiske miljøet og disse har økt metastatisk potensial. Dette er en ond sirkel som kan forklare korrelasjonen mellom hypoksi og malign progresjon (Hockel and Vaupel 2001).

2.2.5 Metabolisme

Kroppens celler trenger å få dannet energi for å overleve. Denne energien utvinnes fra energien som finnes i kjemiske forbindelser i maten vi spiser. Proteiner, lipider og

polysakkarider blir brutt ned til mindre bestanddeler som siden kan brukes til å danne energi til kroppens celler (Alberts 2008).

Glykolyse

Nedbryting av sukker er spesielt viktig for å danne energi (ATP). Hovedprosessen for oksidering av sukker er glykolysen, en prosess der det ikke kreves noe molekylært oksygen. Glykolysen foregår i cellenes cytosol og kan opprettholdes selv under anaerobe forhold.

I glykolysen dannes to pyrodruesyre-molekyler fra et glukose-molekyl. Glykolysen er en stegvis prosess, der netto energigevinst er 2 ATP og 2 reduserte koenzymmer per glukose-molekyl. Uten tilgang på oksygen vil det videre dannes laktat, mens de reduserte koenzymene vil oksideres og kan således brukes om igjen i glykolysen. Energimengden som dannes ved glykolysen er lav og hvis oksygen er tilgjengelig brukes stort sett pyrodruesyrene til å danne mer ATP i sitronsyresyklusen og cellenes respirasjon (Sand et al. 2006; Alberts 2008).

Cellerespirasjon

Cellerespirasjonen foregår i cellenes mitokondrier hvor det finnes store indre membraner hvor det produseres ATP. Pyrodruesyren fra glykolysen brytes først videre ned til CO₂ i sitronsyresyklusen, og alle karbonatomene fra glukosen foreligger deretter som karbondioksid. Det er dannet 12 reduserte koenzymmer netto, og i cellerespirasjonen brukes energien lagret i de reduserte koenzymene til å danne ATP. Denne prosessen kalles elektrontransportkjeden-da de reduserte koenzymene stegvis gir fra seg elektroner, og endelig mottaker er molekylært oksygen. For hver av disse reaksjonene frigis det energi. I elektrontransportkjeden kan det ved optimale forhold frigis hele 34 ATP-molekyler per glukose-molekyl (Sand et al. 2006).

Laktat som drivstoff I tumorceller

Det er funnet en korrelasjon mellom akkumulert laktat i tumorer, og metastasering, tilbakefall og dårlig prognose (Kennedy and Dewhirst 2010). Dette gjør det interessant å se nærmere på hvordan cellenes metabolisme virker under hypoksiske og ved aerobe forhold, med fokus på forbruk og utslipp av laktat.

I normale eukaryote celler er den glykolytiske fluksen nøye regulert. Mitokondriene kan ikke produsere ATP via oksidativ fosforylering hvis det ikke er oksygen tilgjengelig. Når oksygen er tilgjengelig minkes glykolyse-raten og laktat-akkumuleringen (Pasteureffekten) (Kennedy and Dewhirst 2010).

På grunn av det ustrukturerte karnettverket i en tumor vil det finnes områder der det er lite tilgjengelighet av oksygen. Cellenes metabolisme vil da adaptere seg til det nye mikromiljøet ved at glykolysen blir cellens fremste middel for å danne ATP (Dang and Semenza 1999).

Selv om glykolysen kun danner 2 ATP-molekyler per glukose-molekyl, mens cellerespirasjon kan danne hele 38 (respirasjon, glykolyse og sitronsyresyklus totalt) har det blitt vist at det totale ATP-nivået kun minsker marginalt i tumorer i forhold til normalvev (Walenta et al. 2001; Sonveaux et al. 2008).

Laktat kan i veloksygenerte tumorceller erstatte glukose til å produsere ATP. Mono Karboksylat Transporterer (MCT) regulerer import og eksport av laktat fra cellene, og det har blitt vist at inhibering av MCT1 hemmer tumorvekst i tumorceller som inneholder MCT1 i sin plasma-membran (Sonveaux et al. 2008). En fremsatt hypotese er at veloksygenerte tumorceller i nærheten av blodårer importerer laktat og oksiderer dette for å danne ATP. Det er da mer glukose tilgjengelig for de hypoksiske tumorcellene som kan brukes til å produsere ATP via glykolysen. Glykolysen produserer laktat som veloksygenerte tumorceller kan importere og bruke til energiproduksjon (Sonveaux et al. 2008).

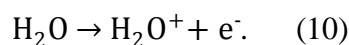
2.3 Strålingsbiologi

2.3.1 Cellulære stråleskader

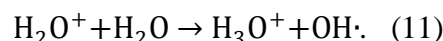
Bestråling kan gi molekylære skader i celler, og det er gjerne DNA-skader som har størst betydning. Det som er avgjørende for om cellen dør av skadene, overlever eller blir mutert er hvor omfattende DNA-skaden er og om skaden blir reparert. Skader på DNA kan skje enten ved en direkte eller indirekte effekt.

Direkte effekt foregår ved at strålingen vekselvirker direkte med et atom i cellens DNA. Denne skaden kan være en ionisering eller eksitering av atomet (Dertinger and Jung 1970).

Indirekte effekt foregår ved at strålingen vekselvirker med andre molekyler i cellen, som oftest vann, slik at det blir dannet frie radikaler¹ som igjen kan reagere med cellens DNA. Når et vannmolekyl blir ionisert får vi



H_2O^+ er høyt reaktiv og har en ekstremt kort levetid på 10^{-10} sekund. H_2O^+ vil videre reagere med vann på følgende måte



Vannradikalet hydroxyl ($\text{OH}\cdot$) er et reaktivt radikal som kan diffundere over korte avstander og således skade DNA. Hydroxyl har en levetid på om lag 10^{-9} sekunder.

Skader på cellen deles inn i ulike kategorier.

¹ Frie radikaler er et atom eller et molekyl som har et uparet elektron. Dette gjør radikalene høyt reaktive.

Letale skader er irreversible og kan ikke repareres. De er definert slik at en letal skade uten unntak medfører celledød (Hall and Giaccia 2006).

Potensielt letale skader er skader som er letale for cellen hvis de ikke blir reparert. Reparasjon av potensielt letale skader kan være vanskelig og tidkrevende. Hvis cellen ikke blir gitt tilstrekkelig med tid til reparasjon vil skaden være dødelig for cellen (Hall and Giaccia 2006)

Subletale skader er skader på cellen som i seg selv ikke er dødelige og som kan repareres raskt. Flere subletale skader kan samvirke, hvis de er nære nok i tid og sted, slik at skadene til sammen kan føre til celledød (Hall and Giaccia 2006).

En biologisk skade kan manifestere seg ulikt. Den kan føre til celledød gjennom apoptose eller mitotisk celledød. Apoptose er en gunstig måte for cellen å dø på der cellen pakker inn sine bestanddeler i membranbundne fragmenter. Cellen gjennomgår flere kjemiske forandringer slik at cellefragmentene kan tas opp av makrofager eller naboceller. Slik forhindres en inflammatorisk respons som kan skade de overlevende cellene (Alberts 2008). Mitotisk død betyr at cellen dør mens den prøver å dele seg. Dette skjer som oftest ved en prosess kalt nekrose, hvor cellen sveller opp og sprekker. Dette fører til en inflammatorisk reaksjon (Alberts 2008). En celle kan overleve en stund med skader uten å kunne dele seg, men vil da oftest fortsette å vokse. Protein og DNA-syntese fortsetter og slike celler kalles kjempeceller (speilegg). At det oppstår slike kjempeceller er karakteristisk for en bestrålt cellepopulasjon (Nias 1998). En DNA-skade som cellen overlever kan også føre til en mutasjon som i verste fall kan føre til kreft.

2.3.2 Reparasjon av stråleskader

For at cellene i kroppen vår skal kunne overleve er de helt avhengige av reparasjon av DNA-skader. Disse skadene kan skyldes stråling og annen ekstern påvirkning, men de fleste DNA-skadene oppstår av andre årsaker, blant annet feil begått under DNA replikasjon. Skadene på DNA kan variere i alvorlighet. Her presenteres noen typer skader som det er viktig å forstå for senere å kunne sette seg inn i radiobiologiske modeller for celleoverlevelse.

Single Strand Break (SSB)

Enkeltrådbrudd i DNA er en subletal skade som raskt repareres av cellen. De to DNA-trådene er komplementære og reparasjonen gjennomføres ved å bruke den intakte DNA-tråden som mal (Hall and Giaccia 2006).

Double Strand Break (DSB)

Ved et dobbeltrådbrudd er begge trådene i DNA brutt. Et DSB er en mer komplisert skade enn et SSB siden begge DNA-trådene er kuttet. Det foreligger dermed ikke noen intakt tråd i samme kromosom som kan brukes som mal. Skaden ved et DSB er potensielt letal. Et DSB grunnet ioniserende stråling kan oppstå ved at én strålingspartikkel bryter begge trådene samtidig, eller ved at det oppstår to SSB som er nær nok i tid og sted. Et DSB kan repareres på to ulike måter, enten ved homolog rekombinasjon eller ved ikke-homolog endeskjøting. Homolog rekombinasjon gir en feilfri reparasjon, men krever at det finnes en intakt kopi av kromosomet. Homolog rekombinasjon finner derfor sted i S- og G2-fasen der det finnes et søsterkromatid som kan brukes som mal i reparasjonsprosessen (Hall and Giaccia 2006). I ikke-homolog endeskjøting prosesseres de skadede endene av DNA før de limes sammen. Deler av DNA klippes bort, denne metoden medfører derfor alltid feil. Siden det bare er deler av DNA-sekvensen som koder for gener kan det allikevel være nyttig for organismen å bruke en slik reparasjonsprosess. Ikke-homolog endeskjøting foregår primært i G1, der DNA ikke er kopiert, men forekommer også i S- og G2-fasen (Hall and Giaccia 2006; Alberts 2008).

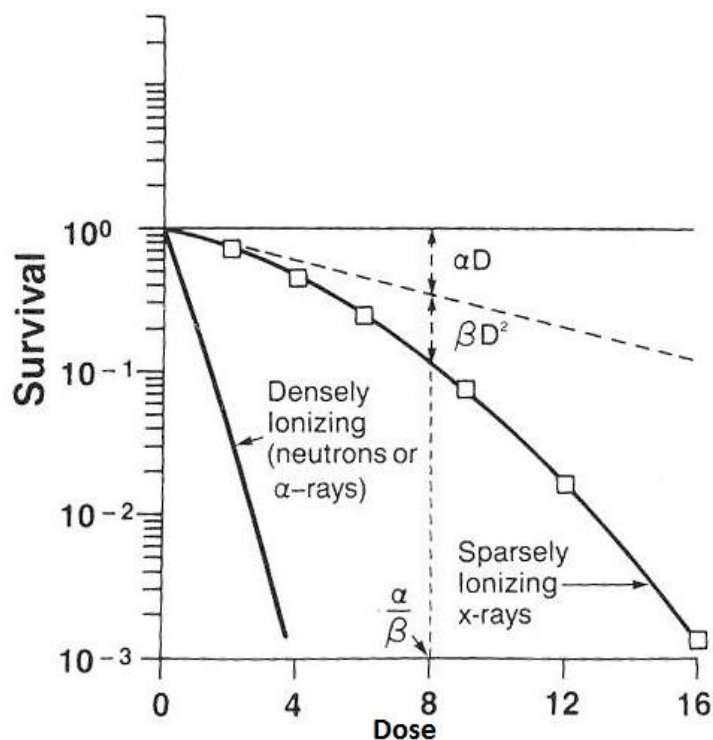
2.3.3 Radiobiologiske modeller for celleinaktivering

Overlevelseskurver presenteres ofte i et semi-logaritmisk plot med overlevelsesfraksjon på den logaritmiske y-aksen og dose langs x-aksen. I et slikt plot har kurven typisk en initiell lineær del etterfulgt av en krum del, som vist i Figur 5, side 17. Det er lansert mange modeller som forklarer disse kurvene, den som er mest brukt i dag er den lineær-kvadratiske (LQ) modellen. LQ-modellen har formen

$$S = e^{-(\alpha D + \beta D^2)}, \quad (12)$$

Der S er overlevelsesfraksjon, α og β konstanter og D dosen. I et semi-logaritmisk plot blir dette

$$\ln S = -(\alpha D + \beta D^2). \quad (13)$$

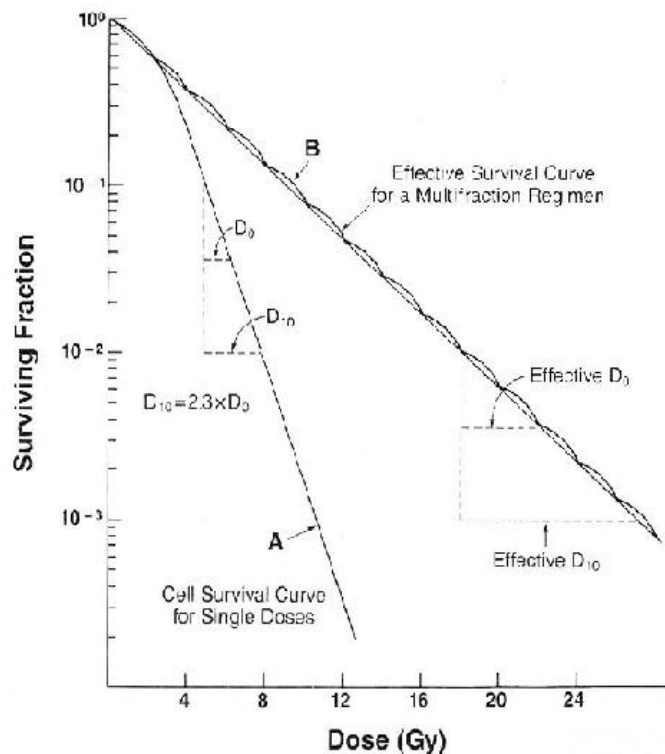


Figur 5: Figuren viser den lineær-kvadratiske (LQ) modellen (Hall and Giaccia 2006).

I 1966 ble det funnet at modellen i ligning 12 gav en god tilpasning til eksperimentelle data (Sinclair 1966), men det ble ikke gitt en utledning for formelen. I 1971 gav Kellerer og Rossi en utledning for formelen basert på eksperimentelle observasjoner av relativ biologisk effektivitet av stråling med forskjellig LET (Kellerer and Rossi 1971). I 1973 ble det videre publisert en utledning for LQ-modellen basert på en antagelse om hvilke molekylære mekanismer som inaktiverer celler (Chadwick and Leenhouts 1973). Modellen deres baserte seg på at dobbeltrådbrudd (DSB) i DNA fører til celleinaktivering og at trådbrudd kan repareres eller restitueres. De to konstantene α og β i ligning 12 representerer to ulike molekylære mekanismer for å danne et dobbeltrådbrudd. α -komponenten representerer et DSB som har oppstått ved at én strålingspartikkel bryter begge trådene i DNA-molekylet, disse skadene øker lineært med dosen. Tilsvarende representerer β -komponenten DSB som oppstår som følge av at to ulike strålingspartikler bryter hver sin tråd i DNA og at disse to opptrer nært nok i tid og rom. Antall DSB som opptrer som følge av to ulike SSB øker kvadratisk med dosen. Ved å gjøre denne betraktningen tar man hensyn til cellens evne til reparasjon, ettersom et enkeltrådbrudd raskt blir reparert. Reparasjon av trådbrudd blir tatt hensyn til i parameterne α og β som gjenspeiler at en viss fraksjon DSB og SSB vil bli reparert. Modellen tar også hensyn til at stråling kan ha forskjellig LET, for stråling med høy LET (for eksempel nøytroner) vil α -komponenten dominere (Chadwick and Leenhouts 1973).

En viktig parameter som leses ut fra LQ-modellen er α/β -forholdet. α/β -forholdet er den dosen hvor bidraget fra α -komponenten og β -komponenten er likt (se Figur 5, side 17). Dette

forholdet er ulikt for ulike typer vev. Tidlig-responderende vev og de fleste tumorvev prolifererer i stor grad og har et høyt α/β -forhold, der α -komponenten dominerer og kurven er ganske rett. Normalvev som i for eksempel lunge, hud, ryggmarg prolifererer i mindre grad og er sen-responderende vev med et lavt α/β -forhold (Mayles et al. 2007). Denne forskjellen i α/β -forholdet utnyttes i fraksjonert stråleterapi, der den totale dosen som pasienten skal få deles da opp i mindre fraksjoner og cellene gis tid til å foreta reparasjoner mellom hver fraksjon. Et slikt opplegg er vist i Figur 6, side 18. Ved at skulderen gjenvinnes mellom hver fraksjon spares normalvevet mest siden det har høyere skulder enn det tidligresponderende kreftvevet (Mayles et al. 2007).



Figur 6: Figuren illustrerer prinsippet bak fraksjonering av strålingsdoser ved stråleterapi (Hall and Giaccia 2006).

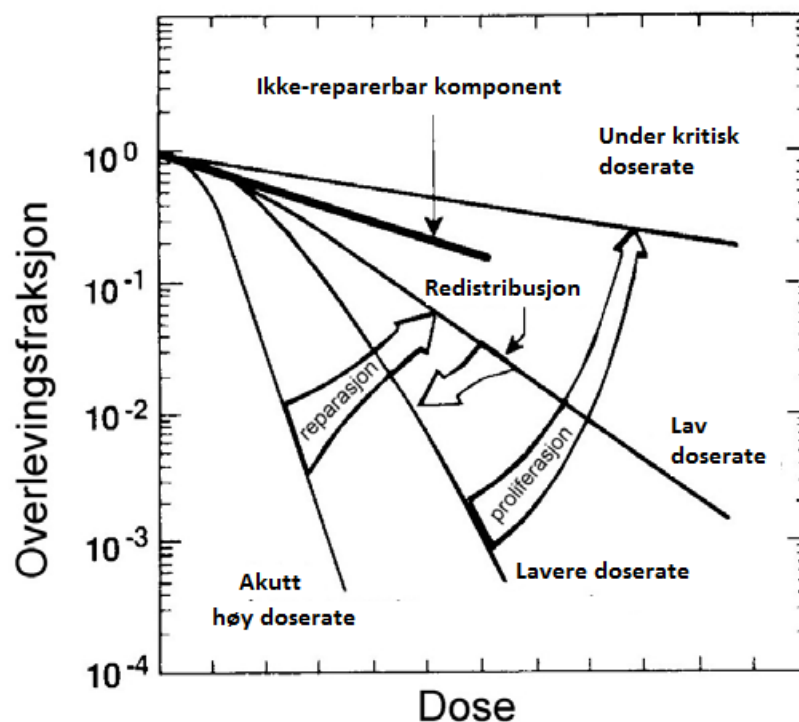
2.3.4 Variasjoner av strålefølsomhet i cellyklus

Cellenes strålefølsomhet varierer i løpet av cellyklus. Cellene er mest strålefølsomme i, eller nær mitose, og minst strålefølsomme i siste del av S-fase. Den sterke stråleresistensen i sen S-fase tenker man at skyldes økt mulighet for homolog rekombinasjon etter hvert som mer av DNA er ferdig replikert (se avsnitt 2.3.2 Reparasjon av stråleskader s.15). Hvis G1-fasen er lang nok vil det være en stråleresistent periode i starten av G1 etterfulgt av en sensitiv fase mot slutten av G1. Deretter vil stråleresistensen øke videre til slutten av S-fase. Hvis G1 er kort, ses ikke denne finstrukturen, og cellene er middels stråleresistente i G1. I G2 er cellene vanligvis svært strålefølsomme, muligens like strålefølsomme som de er i mitosen

(Hall and Giaccia 2006). Det må nevnes at dette er en generalisering, og at det er stor variasjon mellom celledinjene.

2.3.5 Doserate-effekter

Når doseraten senkes vil overlevelseskurven bli slakkere. En akutt bestråling (høy doserate) gir en initiell skulder i overlevelseskurven. Dette skyldes at subletale skader kan samvirke for å danne et DSB og slik inaktivere cellen. Ved lavere doserater vil subletale skader i stadig større grad kunne repareres underveis. Overlevelseskurven blir da slakere og får en mindre utpreget skulder. Når doseraten senkes ytterligere kan man få en invers doserateeffekt. Dette skyldes at en tilstrekkelig lav doserate medfører at cellene ikke stanses der de er i celledyklus, men fortsetter videre gjennom syklus før de blir blokkert i den strålefølsomme G2-fasen. Ved en ennå lavere doserate vil cellene kunne proliferere som vanlig og celledød grunnet stråling vil veies opp for av cellevekst (Hall and Giaccia 2006). Disse prinsippene illustreres i Figur 7, side 19.



Figur 7: Figuren viser effekten av ulike doserater på overlevingsfraksjonen (Hall and Giaccia 2006). Figuren er modifisert.

2.3.6 Oksygeneffekten

At tilstedeværen av oksygen påvirker effekten av ioniserende stråling er godt etablert i radiobiologien og har en rekke praktiske implikasjoner. Oksygen er et veldig reaktivt stoff

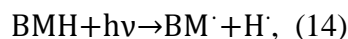
som kan reagere med biomolekylradikalene som dannes som en konsekvens av ioniserende stråling, og forhindrer reparasjon. Generelt sett vil fravær av oksygen ha en beskyttende effekt på kroppens celler, når de blir utsatt for ioniserende stråling. Dette gjelder ikke i særlig grad for tett ioniserende stråling som α -partikler, der en enkelt partikkel vil kunne danne DSB (Hall and Giaccia 2006). De molekylære effektene som ligger til grunn for oksygeneffekten vil da ha liten betydning.

OER

Begrepet Oksygen Enhancement Ratio (OER) brukes for å kvantifisere oksygeneffekten og er definert som forholdet mellom strålefølsomheten til cellene under aerobe og hypoksiske forhold.

2.3.7 Molekylære mekanismer bak oksygeneffekten

Oksygen virker sensibiliserende på celler ved å forhindre restitusjon². Når stråling treffer et intakt biomolekyl (BMH, hvor et av biomolekylets hydrogenatomer er fremhevet) dannes det radikaler. Dette er svært reaktive molekyler som har et uparet elektron (Attix 1986; Nias 1998). Fremstilt skjematisk blir dette:

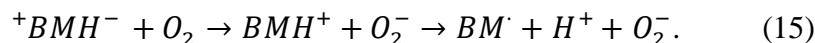


der $h\nu$ er et strålingskvant, og M^{\cdot} er radikalet etter det har mistet et hydrogen.

De videre reaksjonene der oksygen inngår, er det vanlig å dele inn i to kategorier; direkte og indirekte effekt.

Direkte effekt

Rett etter biomolekylets reaksjon med strålingen blir biomolekylet ofte midlertidig polarisert. Denne polariseringen er en reversibel prosess, slik at en spontan restitusjon av det skadede biomolekylet er mulig. Oksygen har en høy elektronaffinitet og kan derfor hindre denne restitusjonen som følgende vis



På denne måten hindrer oksygen restitusjon av de skadede biomolekylene og virker derfor sensibiliserende.

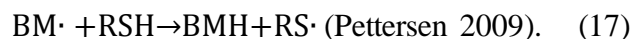
Indirekte effekt

² Spontan, kjemisk reparasjon av stråleskade.

Den indirekte oksygeneffekten går i hovedsak på to ulike prosesser. Den første går på betydningen av restitusjon for stråleskadde biomolekyler. Oksygen har en høy elektronaffinitet, hvilket fører til at det er svært reaktivt ovenfor radikaler. En reaksjon mellom oksygen og et radikal danner en stabil binding som kan settes opp som følger:

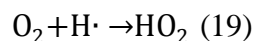
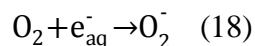


Denne prosessen forhindrer en restitusjonsprosess som cellene i stor grad benytter, hvor det skadede biomolekylet kan reagere med SH-grupper. SH-grupper finnes lett tilgjengelig i cellene, og restitusjon ved hjelp av SH-grupper foregår som følger:



Oppsummert forhindrer oksygen en restitusjonsprosess som er et av cellenes viktigste forsvar mot radikaler.

Andre faktorer som bidrar til oksygenets sensibiliserende effekt handler om konkurranse. Oksygen vil med sin høye elektronaffinitet reagere med vannradikalene e^- og $H\cdot$.



Restitusjon av et skadet biomolekyl kan foregå ved at det reagerer med et fritt elektron eller et hydrogenatom (Dertinger and Jung 1970). Begge disse reaksjonene inhiberes av oksygen, siden oksygen selv reagerer med disse (ligning 18 og 19).

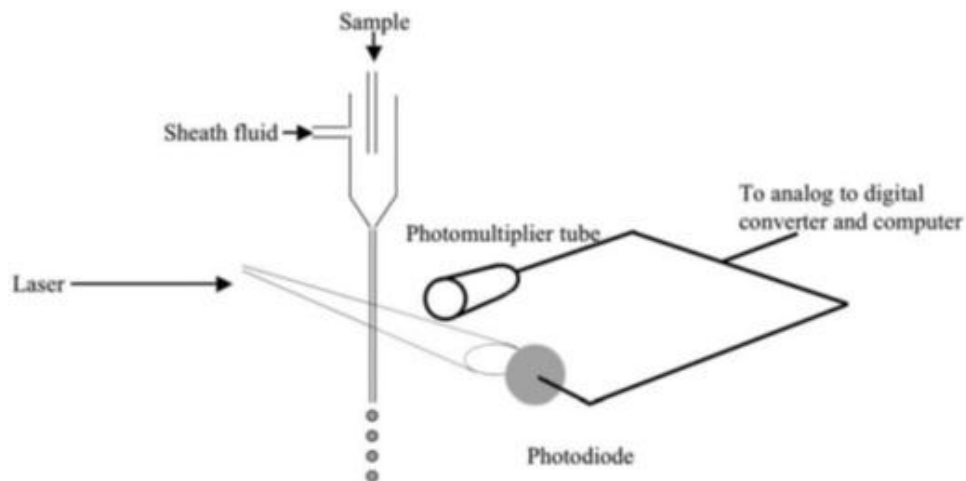
Vannradikalet $\text{OH}\cdot$ har høy elektronaffinitet, hvilket medfører at $\text{OH}\cdot$ ikke vil reagere lett med oksygen. I mange tilfeller er $\text{OH}\cdot$ det mest toksiske vannradikalet og oksygen bidrar ved reaksjonen i ligning 19 til å øke konsentrasjonen av $\text{OH}\cdot$ ved å forhindre at $\text{OH}\cdot$ restituerer tilbake til vann ved $\text{OH}\cdot + \text{H}\cdot \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ (Dertinger and Jung 1970; Pettersen 2009).

2.4 Flowcytometri

Et flowcytometeret måler lysspredning i ulike retninger når enkeltceller i suspensjon passerer en laser og kan også registrere fluorescent lys fra fargestoffer som er bundet til spesielle cellekomponenter (Macey 2007). Slik kan det trekkes ut informasjon om cellens størrelse, innhold og mengden fargestoff bundet i cellen. Mengden fargestoff kan uttrykke DNA-mengden i cellene i suspensjonen eller for eksempel ulike reseptorer på cellemembranen, avhengig av hvilke spesifikke stoffer de er bundet til.

2.4.1 Oppbygning

Et flowcytometer består av 3 hovedkomponenter. En laser-kilde som sender ut monokromatisk lys i en gitt bølgelengde³. Et hydraulisk system som kontrollerer cellenes passering forbi laseren, og en PC-programvare til å motta og analysere dataene. En skisse av komponentene i et flowcytometer er vist i Figur 8, side 22. Cellene fra cellesuspensjonen trekkes gjennom et tynt rør ved hjelp av hydraulikk og passerer enkeltvis forbi en laser. Når cellen passerer laseren vil det spres lys i alle retninger. Lysspredning registreres i retningen cellen beveger seg (forward scatter) og 90 ° på bevegelsesretningen (side scatter), og konverteres til elektriske signaler av en fotomultiplikator. Signalet prosesseres videre og sendes til en pc med et analyse-program (Macey 2007).



Figur 8: Figuren viser prinsippene for hvordan et flowcytometer er bygd opp (Macey 2007).

2.4.2 Bestemmelse av cellestørrelse og granulasjon

Det har blitt vist at det lyset som spres forover i små vinkler ($0,5^\circ - 10^\circ$) vil være proporsjonalt med celleradiusen opphøyd i annen. Det betyr at mengden forover-spredt lys er proporsjonalt med cellestørrelsen (Brunsting and Mullaney 1974). Videre vil det lyset som spres vinkelrett på cellens bevegelsesretning si noe om de indre strukturene i cellen. Dette er fordi deler av lyset vil trenge inn i cellen og bli reflektert eller refraktert når det treffer på cellekjernen eller andre av cellens organeller (Macey 2007). Et 2-D histogram av foroverrettet og side-rettet lysspredning gir god informasjon om ulike celletyper i suspensjonen og kan brukes til å skille ut dubletter og debris fra celleflasken.

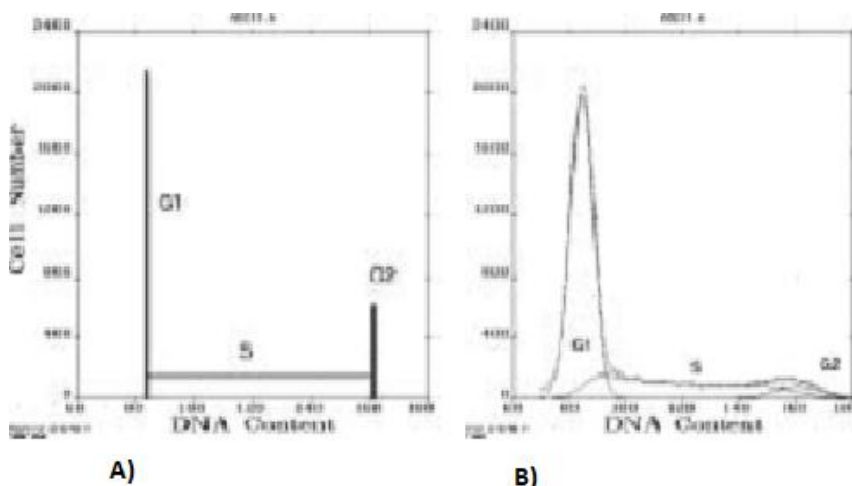
2.4.3 DNA-histogram

³ Argonlasere er mest brukt. Disse kan produsere lys med en bølgelengde på mellom 351 og 526 nm Macey, M. G. (2007). *Flow Cytometry: Principles and Applications*. Totowa, NJ, Humana Press Inc..

En av de tidligste anvendelsene av flowcytometeret var å måle DNA-innholdet i celler. Dette muliggjorde en rask identifisering av hvilken fase av cellyklus de ulike cellene i suspensjonen var i (Kielberg et al. 1993).

For å lage et slikt DNA-histogram farges cellenes DNA med et fargestoff. Mengden av dette fargestoffet er da proporsjonal med mengden av DNA i cellen. Fargestoffet eksiteres når cellen passerer laseren i flowcytometeret slik at det sender ut fluorescenslys som detekteres. Da kan det lages et histogram med fluorescens-intensitet langs x-aksen og antall celler med den gitte intensiteten langs y-aksen. Vi vet at alle cellene som befinner seg i G1 inneholder like mye DNA, og vi vet at cellene i G2 har dobbelt så mye DNA som cellene i G1. Hvis måleusikkerhet og målefeil ses bort fra vil histogrammet da vise én linje for alle de cellene som er i G1 og én linje for alle cellene som er i G2. Cellene i S-fase vil ha en DNA-mengde mellom disse to (Figur 9A, side 23). Det kan leses fra histogrammet hvor stor andel av cellene som er i de ulike fasene i cellyklus.

På grunn av måleusikkerhet, målefeil og debris i cellyklusjonen ser DNA-histogrammene en får i virkeligheten ut som i Figur 9B, side 23. Hver intensitetslinje blir spredt ut til en gauss-puls. Debris fra cellyklusjonen vil være med på histogrammet, men vil stort sett kunne skilles ut av analyse-programmer. Variasjonskoeffisienten CV er et normalisert mål på hvor mye målefeil det er i dataene, og er definert som: $CV = \text{Standard avvik} / \text{Gjennomsnitt}$ i gauss-toppen. Det finnes dedikerte programvarer som har laget matematiske modeller for å regne ut andelen av celler i G1-, S- og G2-fase og disse tar hensyn til måleusikkerhet, målefeil og debris (Rabinovitch 2002)



Figur 9: Figuren viser DNA-histogrammer med DNA-mengde langs x-aksen og antall celler langs y-aksen. Figur 3A) viser en idealisert modell uten målefeil og figur 3B) viser et eksempel på et reelt DNA-histogram (Rabinovitch 2002).

3 Metode

3.1 Celledyrkning

3.1.1 Cellelinjene

En etablert cellelinje vil kunne fortsette å dele seg i det uendelige når den dyrkes i kultur, og dette skyldes at det har foregått en genetisk forandring (Alberts 2008). Normale celler er programmert til å dele seg et visst antall ganger før de dør. Dette gjelder ikke kreftceller og celler i kultur.

Cellelinjene som ble benyttet i denne oppgaven er humane kreftceller som dyrkes i kultur. Cellene dyrkes i sterile plastflasker (Nunc, Danmark) på enten 25 eller 75 cm². Cellene ble dyrket i monolag. Det ble brukt et NaHCO₃-buffret RPMI medium som var tilsatt 10% føtalt kalveserum, 1% penicilin, 1% streptomycin, 1% L-glutamin og 0.2% insulin. For nærmere opplysninger henvises det til kjemikalielisten i vedlegg A.

De to cellelinjene som ble brukt var T98G og T-47D, med hovedfokus på T98G.

T98G

T98 er en cellelinje som er hentet fra humant glioblastom multiform tumor-vev fra en 61 år gammel mann. Glioblastom er den vanligste typen av kreft i det primære sentralnervesystemet for pasienter over 50 år, og denne maligne hjernesvulsten er svært resistent mot standard stråle- og kjemo-terapi (Louis 2007).

Deler av cellene ble fryst ned etter at cellene hadde gjennomgått 25 populasjonsdoblinger (PDL) i kultur. Parallelt ble deler av cellene dyrket videre til de hadde gjennomgått 300 PDL. Disse to cellepopulasjonene har vist seg å ha forskjellige vekstbetingelser og ulike navn på disse to er innført. Cellene som ble fryst ned etter 25 PDL fikk navnet T98 og cellene som ble fryst ned etter 300 PDL fikk navnet T98G. Vekstegenskapene til T98G, som er celletypen som er blitt benyttet i denne oppgaven, har holdt seg stabil i over 300 populasjonsdoblinger (Stein 1979). p53 er mutert i exon 7 (Matsumoto et al. 1994).

T-47D

T-47D er en etablert cellelinje som ble isolert i 1974 fra pleuraeffisjonsvæske hos en pasient med brystcarcinom (Keydar et al. 1979). T-47D har normal pRb funksjon og mutert p53 (Casey et al. 1991; Amellem et al. 1998).

3.1.2 Sterilitet og labutstyr

Når en jobber med celleforsøk er det viktig å hindre at cellene får en infeksjon. Siden mikroorganismer deler seg med en hastighet som er om lag 50 ganger raskere enn humane celler, vil disse raskt ta over og infisere cellekulturen (Kielberg et al. 1993).

For å hindre infeksjon var alt utstyr som kom i kontakt med cellene enten sterile engangspakker som kastes etter bruk, eller vasket og sterilisert lokalt. Glassflasker og plastikk-korker ble lagt i såpe-vann i minst 24 timer før de ble skyllet og tørrsterilisert (Termaks, Norge) i ca. 2 timer ved 180 °C. Utstyr av plast eller tekstil ble pakket inn i papirposer og deretter autoklavert (Webco) i 120°C i 20 minutter. Alt arbeid der cellene ble utsatt for luft foregikk i en Laminar Air Flow(LAF)-benk (OAS LAF VB 2040), der luften filtreres gjennom et High Efficient Particulate Air (HEPA)⁴ -filter. Luftstrømmen i en LAF-benk forhindrer at partikler utenfra kommer inn i benken. For å sikre sterilitet ble LAF-benken desinfisert i 70% Etanol før og etter bruk. Ved bruk av flasker med plastkorker ble disse brent med en propan-flamme før og etter bruk.

Omsetting og mediumskifte

Celler er levende organismer, og ved dyrkning av celler i kultur må en passe på at cellene har nok næringsstoffer tilgjengelig og at celletettheten er gunstig, slik at cellene har gode vekstvilkår. For lav og for høy celletetthet fører til dårlig vekst. For å sikre et godt mikromiljø for cellene ble cellene rutinemessig omsatt hver mandag og fredag, og hver onsdag fikk cellene skiftet ut gammelt medium med nytt.

Omsetting

Ved omsetting fjernes først mediet fra cellene og 1.5 ml trypsin (trypsin med EDTA fra produsent PAA fra Østerrike) tilsettes celleflasken. Trypsin fjernes igjen etter å ha vendt på flasken. Prosedyren gjentas.

Trypsin er et fordøyelsesenzym som bryter aminosyrekjedene i proteiner. Trypsin bryter bindingene mellom naboceller og bindinger mellom cellene og bunnen av flasken

Cellene inkuberes deretter til de har løsnet, dette kan observeres i mikroskopet. Man tilsetter så friskt RPMI medium som avslutter virkningen av trypsin, og resuspenderer løsningen slik at den blir en enkeltcelle-suspensjon. Videre foretas en ønsket fortynning og celledensiteten fordeles i nye flasker, der total mengde celledensitet og RPMI-medium er 5 ml i 25 cm² flasker og 15 ml i 75 cm² flasker. Flaskene settes inn i inkubatoren igjen. Korken på flasken holdes halvåpen, slik at cellene har tilgang på oksygen og 5% karbondioksid.

⁴ Slipper igjennom mindre enn 99.999% av partikler av størrelse 0.3 µm.

Mediumskifte

Når det har gått 2-3 dager siden omsetting er det nødvendig å skifte RPMI mediet. Dette er for at cellene skal ha tilstrekkelig med næringsstoffer tilgjengelig og for at riktig pH i mediet skal opprettholdes. Medieskiftet utføres ved å ta av det gamle mediet og tilsette henholdsvis 5 eller 15 ml nytt medium. Dette ble vanligvis gjort hver onsdag.

Rutiner i hypoksiboks

Cellene i denne oppgaven ble for det meste dyrket i en hypoksiboks (InVivo 400, Ruskinn, England), der oksygennivået kunne kontrolleres. Rutinene for omsetting og mediumskifte er stort sett like, men med noen forskjeller.

Siden hypoksiboksen ikke tåler å bli vasket med 70% sprit ble den rengjort med vann og sterile kluter underveis i forsøket. Å bruke sprit inne i boksen underveis i forsøket ville også påvirke oksygensensoren i boksen. Det var ekstra viktig å holde boksen så ren som mulig underveis i forsøkene og det ble alltid brukt hansker ved arbeid i boksen.

Et problem i hypoksiboksen var fordamping av RPMI-mediet over cellene. Dette forekom spesielt i den flasken hvor det ble målt oksygenprofiler. Denne flasken stod uten kork og var ekstra utsatt for fordamping. Problemet med fordamping fra profilflasken ble minimert ved å sette ut minst 4 små skåler som ble fylt med sterilt vann. Den flasken som stod med åpen kork var mer utsatt for infeksjon og dette ble det tatt hensyn til under mediumskifte. Celleflaskene som stod i boksen hadde filterkorker slik at det var fri gassutveksling med atmosfæren i hypoksiboksen, samtidig som filteret hindret uønskede mikroorganismer å slippe inn i celleflaskene.

En annen viktig faktor for å få vellykkede forsøk i hypoksiboksen var å holde alt som skulle komme i kontakt med cellene hypoksisk. Hvis dette ikke var tilfellet ville cellene få tilgang på mer oksygen, som ville ødelegge for hensikten med forsøket, nemlig å studere en eventuell synergieffekt av lav doserate-bestråling og hypoksisk mikromiljø. For å sikre at cellene ikke ble tilført ekstra oksygen fra medium og trypsin utenfra, ble disse ført inn i boksen i god tid i forveien, gjerne dagen før. Det var ikke ønskelig å sette disse inn i boksen mer enn 2 dager i forveien, da virkningen til mediet og trypsinen kunne bli ødelagt av å stå for lenge i 37 °C. Plastutstyr, som nye celleflasker og cellerør, ble satt inn i hypoksiboksen enda tidligere, på grunn av den langsomme diffusjonen av oksygen i plast. Plastutstyr ble satt inn i hypoksiboksen ca. en uke før bruk.

3.2 Bestråling av cellene

3.2.1 Oppsett

For å bestråle cellene ble det brukt tritiert valin (TRK533, 1.0 mCi/ml, Amersham, England). Valin er en essensiell aminosyre som cellene inkorporerer og bruker til å danne proteiner. [^3H] som er koblet til valin vil således inkorporeres i cellen og bestråle cellen innenfra. I denne oppgaven var det ønskelig å bestråle cellene med en ultralav doserate, derfor passet det godt å bruke tritiert valin. Ved å bruke [^3H] – valin var det mulig å få en lav nok doserate, der man kunne studere effektene av strålingen på cellene samtidig som de ble bestrålt.

For å bestråle cellene med tritium ble det tilsatt en liten mengde ^3H -valin i RPMI-mediet som ble tilsatt cellene. Den spesifikke aktiviteten som ble brukt i forsøkene i denne oppgaven var 1,67 Ci/mol, 0,53 Ci/mol og 0,267 Ci/mol. For å regne ut hvor mye tritiert valin som skulle tilsettes mediet, ble det tatt utgangspunkt i at den triterte valinen hadde konsentrasjonen 1,0 mCi/ml da den ble kjøpt inn. Siden tritium har en relativt kort halveringstid på 12.5 år, ble det korrigert for henfall siden innkjøpsdatoen. Dette ble gjort hver gang nytt radioaktivt medium skulle lages. For nøyaktige beregningsmetoder henvises det til Søvik, (2002).

For å holde den spesifikke aktiviteten konstant ble det tilsatt ekstra mye valin i mediet (dvs uten tritium, heretter kalt kaldvalin). Det ble tilsatt 1 ml valin i konsentrasjonen 82.9 mM per 100 ml medium slik at endelig konsentrasjon av valin i mediet var 1.0 mM. Det ble tilsatt valin i mediet som ble brukt på de ubestrålte kontrollcellene, slik at en kunne utelukke at observerte effekter på cellene skyldtes forhøyet konsentrasjon av valin.

3.2.2 Strålehygiene

Tritium er en lavenergisk β -emitter med en maksimal rekkevidde i vev på mindre enn 1 μm ((ICRP) 1983) Dette vil ikke trenge gjennom det ytterste laget av døde hudceller i huden. Således gir arbeid med tritium ikke eksterne strålingsrisikoer. Men siden tritium er koblet på den essensielle aminosyren valin er det viktig å hindre at personer som jobber med tritiert valin ikke tar dette opp. Derfor ble det alltid brukt hansker og labfrakk under arbeid med radioaktivt medium. Det radioaktive mediet var tydelig merket og det var også celleflaskene som inneholdt radioaktivt medium. Mengden tritium som ble benyttet i dette arbeidet var så lav at løsninger som inneholdt tritium kunne skylles ut i vasken. Gjenbruktutstyr som hadde vært i kontakt med tritium-løsninger ble nøye skylt før de vanlige rutinene ble gjennomført og utstyret ble brukt igjen. Engangsutstyr som ble brukt sammen med radioaktivt medium ble kastet i egen søppelkasse for sykehusavfall.

3.3 Koloniforsøk

Koloniforsøkene ble gjort for å undersøke om en gitt behandling endrer cellenes klonogene egenskaper. Det var spennende å se om behandlingen (her: lavdoserate-bestråling av hypoksiske celler) hadde en effekt på hvor mange av cellene som beholdt sin kolonidannende egenskap.

3.3.1 Prosedyre

Først ble mediet fjernet, før 1.5 ml trypsin ble tilsatt flasken. Trypsinen ble så fjernet, før 3 nye ml trypsin ble tilsatt. Cellene ble satt i inkubatoren til de var løsnet fra flaskebunnen og fra hverandre. Deretter ble de resuspendert til suspensjonen bestod av løsnede enkeltceller. Tilsatte 5 ml RPMI for å stoppe virkningen av trypsin. Suspensjonen ble videre overført til et cellerør og prøven ble spunnet ned i en sentrifuge (Beckman, USA). Fjernet supernatanten og tilsatte man en ønsket mengde RPMI for å fortynne løsningen. Det ble tatt ut en prøve fra den fortynnete løsningen til telling (se avsnitt 3.3.2, s. 28), slik at man kunne finne ut hvor mange celler som var i suspensjonen.

Cellenesuspensjonen ble så fortynnet videre i flere trinn, slik at den endelige løsningen inneholdt 200 celler/ml. Resuspenderte løsningen godt mellom hver fortynning med en 2 ml pipette. Videre ble cellene sådd ut i 5 plastflasker. Hver flaske inneholdt 200 celler, oppnådde dette ved å overføre 1 ml av cellesuspensjonen i flasker som inneholdt 4 ml RPMI medium.

Celleflaskene fikk så stå i om lag 14 dager i inkubatoren slik at de klonogene cellene dannet kolonier. Når koloniene var blitt store nok ble cellene vasket i PBS, fiksert i 70% etanol og farget med methylenblå. Deretter kunne koloniene telles ved å se på celleflaskene i en lupe. En koloni ble definert til å inneholde minimum 50 celler. Hvis det var usikkert om kolonien var stor nok, ble den inspisert i et mikroskop, hvor antallet celler kunne telles manuelt.

3.3.2 Celletelling

Ved utsåing til koloniforsøk er det viktig å vite hvor mange celler det er i cellesuspensjonen, slik at suspensjonen fortynnes riktig. Dette ble gjort ved å først resuspendere suspensjonen godt, og så overføre en dråpe av suspensjonen til et bürkerkammer (Hycor, USA). I bürkerkammeret er det risset inn rutenett på 3×3 ruter i plastikk og disse har kjente dimensjoner. Antall celler i 5 av kammerets ruter telles. Høyeste og laveste verdi strykes og gjennomsnittet regnes ut. I koloniforsøkene ble det telt i 3 ulike kamre og snittet fra disse ble brukt. Ved å ta høyde for dimensjonene på kammeret vet man da hvor mange celler det er per ml i cellesuspensjonen. I våre kamre har hver rute volumet 10^{-4} ml og ved å multiplisere snittet av antall celler per rute med 10^4 får man antall celler per ml i suspensjonen.

Flowcytometeret ble også brukt til å telle antall celler i suspensjonen. Dette ble gjort ved å stille inn flowcytometeret slik at det registrerte hvor mange celler det var i 200 μ l av

suspensjonen. Dette tallet ble så ganget opp med 5 for å få antall celler per ml. Det var viktig å gjøre en konsekvent gating på de innhentede dataene, hvor debris ble utelukket. Dubletter ble tatt med.

3.3.3 Beregning av PE og overlevelsesfraksjonen

I koloniforsøk vil man finne fraksjonen av overlevende (altså klonogene) celler, etter at cellene har mottatt en behandling. Det er da viktig å korrigere for at ikke alle de ubestrålte cellene som sås ut vil feste seg og lage kolonier. Andelen av de utsådde cellene i en ubehandlet celleflaske som danner kolonier kalles Plating Efficiency (PE), og dette ble beregnet i alle overlevelsesforsøkene som ble gjort.

I overlevelsesforsøkene gjort i denne oppgaven ble det sådd ut 5 flasker med 200 celler i hver. Dette ble gjort for de behandlede cellene og for kontrollcellene som var ubehandlede. PE ble beregnet ut fra antall kolonier kontrollcellene dannet. Etter at cellene var blitt fiksert ble det telt opp hvor mange av de 200 utsådde cellene som hadde dannet kolonier. Når dette var gjort ble PE beregnet ved

$$PE = \frac{N}{N_0},$$

der N er gjennomsnittet av antall telte kolonier i kontrollflaskene og N_0 er antall kolonier som ble sådd ut, her 200. For å beregne overlevelsesfraksjonen (SF), i de behandlede celleflaskene, ble det korrigert for PE.

$$SF = \frac{C}{C_0} \times \frac{1}{PE},$$

der C er gjennomsnittet av antall kolonier i de behandlede flaskene og C_0 er antallet celler sådd ut i de behandlede flaskene, altså 200. Siden det sås ut 200 celler både i de behandlede cellene og i kontrollflasken (ubehandlede celler) kan dette forkortes til

$$SF = C/N$$

Standard error til PE er gitt som

$$se_{PE} = se_N / N_0$$

Og standard error til SF er da

$$\begin{aligned}
se_{SF} &= \sqrt{\left(\frac{\partial SF}{\partial N} \cdot se_N\right)^2 + \left(\frac{\partial SF}{\partial C} \cdot se_C\right)^2} \\
&= \sqrt{\left(\frac{-N_0 \cdot C}{C_0 \cdot N^2} \cdot se_N\right)^2 + \left(\frac{N_0}{C_0 \cdot N} \cdot se_C\right)^2}
\end{aligned}$$

3.4 Beregning av doblingstider

Ved beregninger av doblingstider ble det antatt eksponentiell vekst. Deretter ble det gjort en lineær tilpasning av tid og den naturlige logaritmen til antallet celler. Dobblingstiden ble videre

beregnet fra formelen $T_D = \ln 2 \cdot \left[\frac{(t_2 - t_1)}{\ln(C_2/C_1)} \right]$, der C er antall celler og t er tiden.

3.5 Respirasjonsmålinger i hypoksiboksen

3.5.1 Oppsett

Oppsettet som ble brukt for å måle oksygengradienten i celleflaskene i denne oppgaven er kjøpt inn fra Unisense (Århus, Danmark). Oppsettet består av en oksygensensor som er montert på en mikromanipulator (se Figur 11 side 32). Mikromanipulatoren med oksygensensoren er montert på et invertert mikroskop. Hele oppsettet befinner seg inne i en hypoksiboks (Figur 10 s. 31), der oksygenkonsentrasjonen i atmosfæren er nøye kontrollert av en gass-mikser.

Oksygensensoren kan måle svært lav strøm (10^{-12} - 10^{-10} ampere) som videre sendes til et picoamperemeter (PA2000). Strømmen som måles er proporsjonal med oksygenkonsentrasjonen. Når det skulle gjøres oksygenmålinger i en celleflaske ble sensoren ført inn i flasken ved hjelp av mikromanipulatoren som kunne styres ved å bruke programvaren til Unisense. Celleflasken stod med korken åpen mens målingene ble gjort og flasken var da plassert på mikroskopet som var tilkoblet en pc med et bilde-program (Pax-It). Dette muliggjorde at det kunne tas bilder av cellene og at cellene kunne ses på in vivo. Sensoren ble ført inn i flasken med en vinkel på om lag 30° og ble stilt inn slik at den var synlig i mikroskopets Field Of View. Slik kunne man føre oksygensensoren kontrollert nedover fra overflate til bunn og måle oksygenkonsentrasjonen med jevne mellomrom fra sensoren befant seg ved mediets overflate og nedover i mediet helt ned til bunnen der cellene er festet. Kurven over oksygenkonsentrasjon som funksjon av dybde kalles en *profil* (Figur 10 B)). Etter kalibrering av oksygensensoren ble det startet opptak av profiler som beskriver oksygengradienten nedover gjennom mediet. Profilene startet 2500 μm over flaskebunnen og

målte oksygenkonsentrasjonen i steg av $100 \mu\text{m}$. Mediumnivået var på om lag 1,6 mm over flaskebunnen. Oksygenmålingene ble lagret av programvaren til Unisense i en excelfil, der også høyden over nullpunkt, signal og nøyaktig tidspunkt siden start ble lest inn.

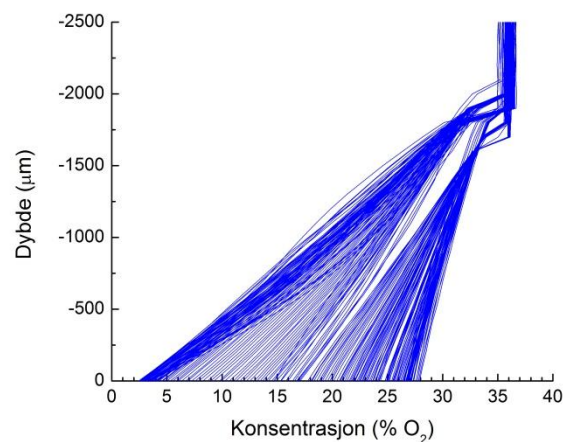
Programvaren til Unisense tillot en forhåndsinnstilling slik at det ble kjørt en ny profil ca. hvert 20 minutt, hvorpå oksygensensoren hvilte over mediumoverflaten i tiden mellom profilopptakene.

Før oppstarten av nye oksygenprofiler, altså etter omsetting av cellene eller mediumskifte, ble oksygensensoren kalibrert. Det ble foretatt en topunkts-kalibrering. Nullpunkts-avlesningen ble målt i en løsning med minimum 98 % Natrium Sulfitt (Sigma Ultra). Siden ble sensoren vasket i sterilt vann og nedsenket i 70 % etanol for at sensoren ikke skulle infisere cellekulturen. Det andre punktet ble avlest i boksens atmosfære, og siden oksygenkonsentrasjonen her var nøye kontrollert, ble dette punktet brukes til kalibrering. Programvaren til Unisense beregnet kalibreringen og oksygenprofilene ble startet.

Det var også viktig å følge med på om de to kalibreringspunktene var utsatt for elektronisk drift. Dette ble sjekket før selve kalibreringen startet ved å avlese signalet ved nullpunktet og i atmosfæren når opptak av profilene var stoppet. Ved mye elektrisk drift måtte dette korrigeres for.

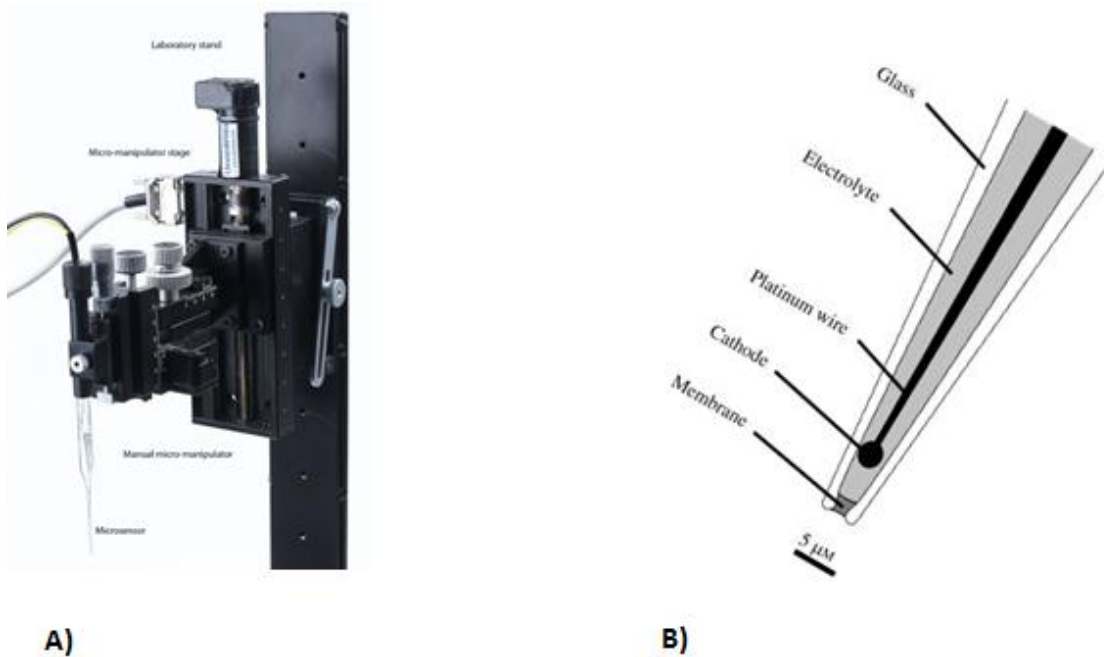


A)



B)

Figur 10: Panel A) viser hypoksiboksen: In vivo 300 hypoksia workstation fra Ruskinn der hypoksiforsøkene ble utført. Bildet er hentet fra www.ruskinn.com. Panel B) Viser en eksempelprofil fra forsøk E.



Figur 11: Figur A) viser mikromanipulatoren med proben montert på (Unisense.com) . Figur B) viser en skisse av proben (Pettersen et al. 2005).

3.5.2 Respirasjonsrate

Medium-laget som dekker cellene er på ca. 1.6 mm. Verken sensoren eller luftlaget over mediet gir opphav til sirkulasjon av væsken og siden temperaturen i hypoksiboksen holdes konstant på 37 °C, vil mediet være stillestående. I forsøkene ble det stilt inn en ventetid på 15 sekunder før hver måling nedover i mediet og således unngikk man sirkulasjon av mediet på grunnlag av bevegelse av proben. Hvis mediet ikke var stillestående kunne dette ses på profilene, som i stedet for å være rette, ville bli buede.

Cellene, som er festet til flaskebunnen, er det eneste i mediet som forbruker oksygen. Det ikke er noe bevegelse i mediet, dermed vil oksygenet som cellene trenger transporteres gjennom mediet ved molekylær diffusjon. Cellenes oksygenforbruk fører til at det dannes en lineær oksygengradient nedover i mediet. For å kvantifisere respirasjonsraten ble Ficks 1. lov anvendt. Oksygenfluksen ned til cellelaget beregnes ut fra den målte oksygengradienten ved

$$J = -D \frac{dc}{dx}, \quad (20)$$

Hvor J er oksygenfluksen ned til cellelaget, $\frac{dc}{dx}$ er helningen til oksygengradienten og D er diffusjonskonstanten i mediet. Ved likevekt vil respirasjonsraten til cellene være lik oksygenfluksen. (Pettersen et al. 2005)

Det var viktig å velge ut et representativt område av den lineære gradienten som ikke var preget av artefakter, når respirasjonsraten skulle beregnes fra de målte profildataene. Fra sensoren treffer medium-overflaten og nedover om lag 400 μm er avlesningene preget av overflatespenning, derfor brukes ikke dette området i beregningene av respirasjonsraten. De nederst 200 μm kan heller ikke brukes, da disse vil være avhengig av om sensoren er plassert rett over en celle-koloni eller i et tomt området. I de nederste 200 μm representerer målingene miljøet i umiddelbar nærhet til sensoren, som ikke nødvendigvis avspeiler miljøet til celleflasken som helhet. (Pettersen et al. 2005) I min oppgave valgte jeg å gjøre en lineær tilpasning på dataene i området 1100 til 200 μm over flaskebunnen.

Diffusjonskoeffisienten D i mediet ved 37 °C er ca. $3.37 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ (Pettersen et al. 2005). For å beregne oksygengradienten ble det antatt at løseligheten til oksygen i mediet er 200 $\mu\text{mol/l}$ (Garcia and Gordon 1992). På websiden til Unisense er det mulig å laste ned et excel-ark som utfører disse beregningene. Respirasjonsraten hadde enheten $\text{fmol O}_2/\text{h}/\text{celle}$ og denne ble funnet ved å dividere respirasjonsraten per kvadratcentimeter med antall celler per kvadratcentimeter.

3.6 Flowcytometri

Celleprøver til flowcytometri ble preparert på to ulike måter. I begge metodene ble cellene trypsinert i 3 ml trypsin slik at de løsnet fra celleflasken. Deretter ble cellene resuspendert i trypsinen med sprøyte og evt. kanyle til det var en enkeltcellesuspensjon. Cellene ble så spunnet ned i en sentrifuge (Beckman, USA) og vasket to ganger med romtemperert PBS. Siden ble en av følgende prosedyrer gjennomført:

1. Ved å bruke et "Cell Cycle Phase Determination Kit" fra Accuri.
2. 200 μl PBS ble tilsatt pelleten og deretter tilsatte man 5 ml fryserkald etanol i dråper.

Siden kunne cellene oppbevares i fryseren til prøvene var klare for å analyseres i flowcytometeret.

Når celleprøvene skulle analyseres i flowcytometeret måtte cellene klargjøres og cellulært DNA måtte farges. Først ble cellene sentrifugert i en sentrifuge (Beckman, USA). Deretter ble det brukt Propidium Jodid (PI) til å farge cellulært DNA. PI binder seg både til DNA og dobbeltrådet RNA, derfor tilsatte man også RNase, slik at PI ikke bandt seg til RNA. Det ble tilsatt 500 μl PBS med 70 $\mu\text{g/ml}$ PI og 100 $\mu\text{g/ml}$ RNase. Celleprøvene stod så 30 min mørkt mens Flowcytometeret ble kalibrert, før prøvene ble vortexet og filtrert. Deretter var prøvene klare til å analyseres.

3.7 Laktat- og glukose-målinger

I de forsøkene der laktat eller glukose skulle måles ble bestemte antall celler sådd ut. Det ble sådd ut 4 flasker hvor hver flaske inneholdt 110 000 T98G celler og 4 flasker hvor hver flaske inneholdt 530 000 T-47D celler. Disse celleantallene ble valgt for å sammenfalle med tidligere forsøk, hvor det var blitt gjort respirasjonsmålinger.

Siden ble 2 flasker med T98G celler og 2 flasker med T-47D celler plassert hhv i inkubatoren med luft (20% O₂) og i hypoksiboksen med 4% O₂. Flaskene ble holdt adskilt i alle prosesser som ble gjort slik at en kunne følge utviklingen til hver enkelt flaske.

Det ble gjort laktatmålinger hver dag med et kontrollinstrument (Powerlact, Med-TRONIK, Tyskland) og laktatstrips (Senslab, Germany) og glukosemålinger med et kontrollinstrument med tilhørende strips (Anscensia Contour, Bayer Health Care, Tyskland). Den første målingen ble gjort 6 timer etter omsettingen av cellene. På dette tidspunktet hadde de hypoksiske cellene stått i hypoksi-boksen i ca. 2 timer. Målingene ble gjort en gang om dagen i 5 dager. 2 dager etter omsettingen av cellene ble det gjort målinger og deretter ble mediet skiftet.

Forsøket ble siden gjentatt, men med et mediumskifte etter cellene hadde festet seg.

4 Resultater og analyse

Det gis en historisk fremstilling som viser den logiske utviklingen i eksperimentene og hvordan teknikken ble forbedret gjennom innledende forsøk. Oppgavens hovedforsøk presenteres i forsøk E.

4.1 Forsøk A: Ubestrålte T98G-celler i 4% O₂

I dette forsøket ble det gjort respirasjonsmålinger på ubestrålte T98G celler som ble dyrket kontinuerlig i en hypoksiboks som var innstilt slik at det var 4% oksygen i gassfasen. Hensikten var her å måle oksygengradienten nedover i mediet, betegnet profil (se 3.5 Respirasjonsmålinger i hypoksiboksen s. 30). Ved å ta bilder av cellene underveis i forsøket ble antallet celler i flasken anslått og respirasjon per celle beregnet (se 3.3.2 Celletelling s. 28).

4.1.1 Respirasjonsdata

Pericellulær oksygenkonsentrasjon(POC)

Figur 12 A, s. 37 viser pericellulær oksygenkonsentrasjon (røde prikkete linjer) som funksjon av tiden etter at cellene ble satt inn i hypoksiboksen. Der det er opphold mellom målepunktene er cellene omsatt. *Figur 13* s. 38 viser bilder av cellene i den flasken det til enhver tid ble tatt opp oksygenprofiler fra, tatt rett før omsettingstidspunktet. Den siste målingen i hver oksygenprofil ble gjort med oksygensensoren i kontakt med flaskebunnen, der cellene er festet. Mediumlaget over cellene var på ca. 1600 μm .

Som figuren viser er oksygenkonsentrasjonen som cellene faktisk utsettes for en helt annen enn den i gassfasen. Det ble funnet at oksygenkonsentrasjonen ved cellemembranen var helt nede under 0,1 % O₂ (*Figur 12 A*, s. 37). T98G celler som ble dyrket in vitro i en atmosfære med 4% oksygen opplevde dermed en *syklisk hypoksi*. Den sykliske hypoksien varierte fra ca. 3 – 4 % O₂ rett etter en omsetting eller et mediumskifte, til under 0,1 % O₂ rett før cellene ble omsatt igjen (*Figur 12 A*, s. 37). Oksygensensoren måler ikke nøyaktig under 0,1% O₂, slik at de laveste verdiene i *Figur 12 A* er usikre. Det er likevel av interesse å se på hvor lenge cellene har en oksygenkonsentrasjon under 0,1% O₂ og de laveste verdiene kan trolig sees på som en indikasjon på hvor langt ned oksygenkonsentrasjonen faktisk synker.

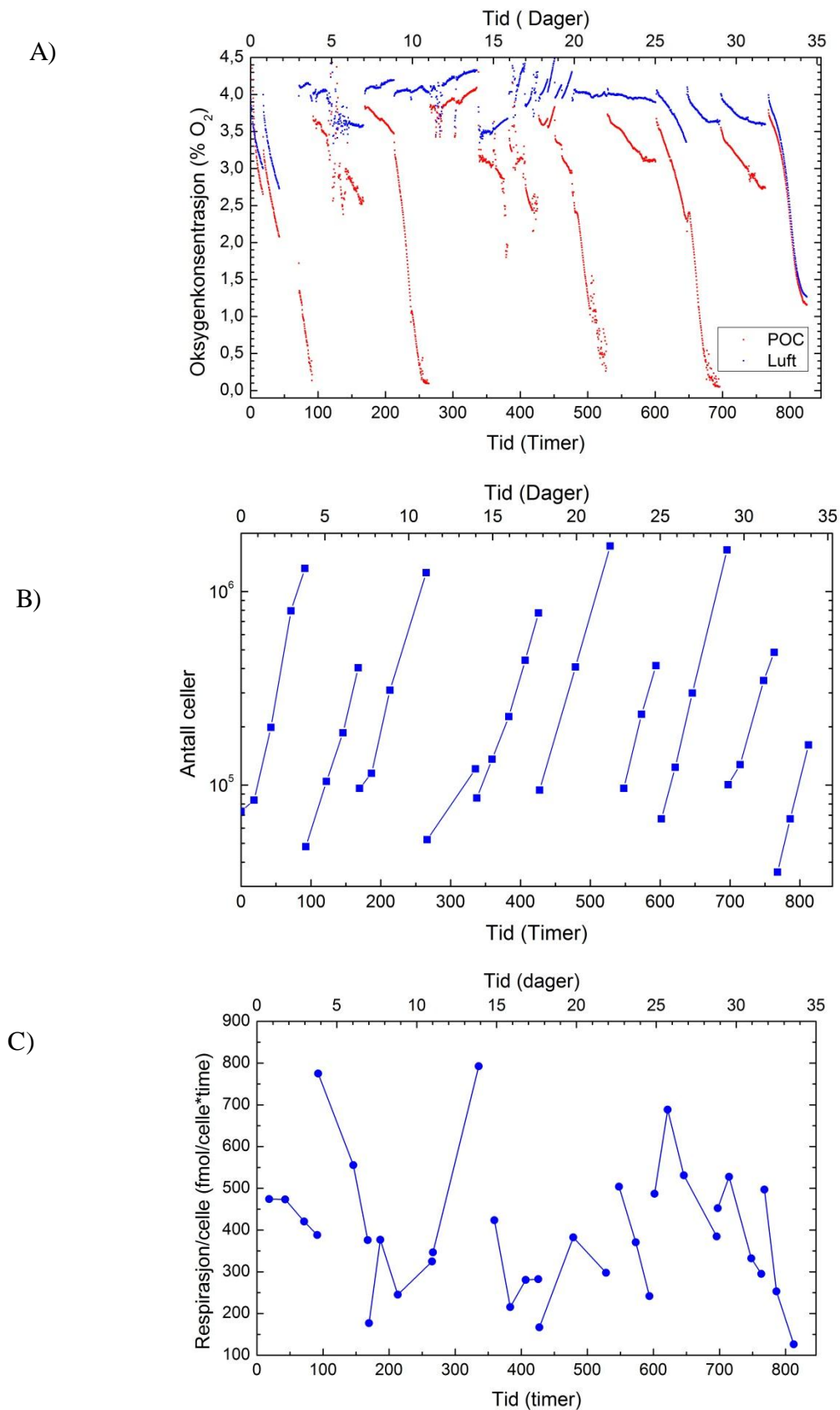
Forsøket varte i 36 dager. Som man ser i *Figur 12 A* s. 37 ligger de aller første POC-verdiene over 4% O₂. Dette skyldes at celleflasken det ble gjort oksygenmålinger på kommer fra et miljø med 20% O₂ i gassfase (cellene ble sådd ut i vanlig luft) og at første oksygenprofil ble startet 3,5 time etter at cellene ble sådd ut. Cellene hadde åpenbart ikke brukt opp det ekstra oppløste oksygenet fra luft-atmosfæren enda etter 3,5 time

Det varierte hvor langt ned POC falt, og dette var trolig avhengig av antallet celler i flasken. Det var store forskjeller i POC før omsetting avhengig av om cellene ble sådd ut på mandag (med medium-skift onsdag) eller om de ble sådd ut på fredag. På mandag og fredag ble det sådd ut 100 000 celler i flaskene med 25 cm² flaskebunn. Dette medførte at det ble mye større celletetthet i flaskene etter mandagsutsåingen, dvs. på den etterfølgende fredagen da disse skulle omsettes på nytt. Flaskene som ble sådd ut stod da i 4 dager, med et mediumskift underveis. Flaskene som ble sådd ut på fredag stod derimot i 3 dager og fikk ikke noe mediumskift. Når flaskene ble helt fulle av celler, slik at cellene dekket hele flaskebunnen rett før neste omsetting sank POC til under 0,5 % O₂ 4 ganger (dag 4, 11, 22, 26) og ved to av disse tilfellene var cellene utsatt for pericellulære oksygenkonsentrasjoner på under 0,1 % O₂ (dag 11 og dag 29) (se for eksempel *Figur 12* s. 37 og *Figur 13* s. 38 A – D). I de tilfellene der flaskebunnene ikke ble helt fylt opp med celler rett før omsetting falt ikke POC så lavt (se for eksempel *Figur 12* A s. 37 og *Figur 13* s. 38 E, G og H).

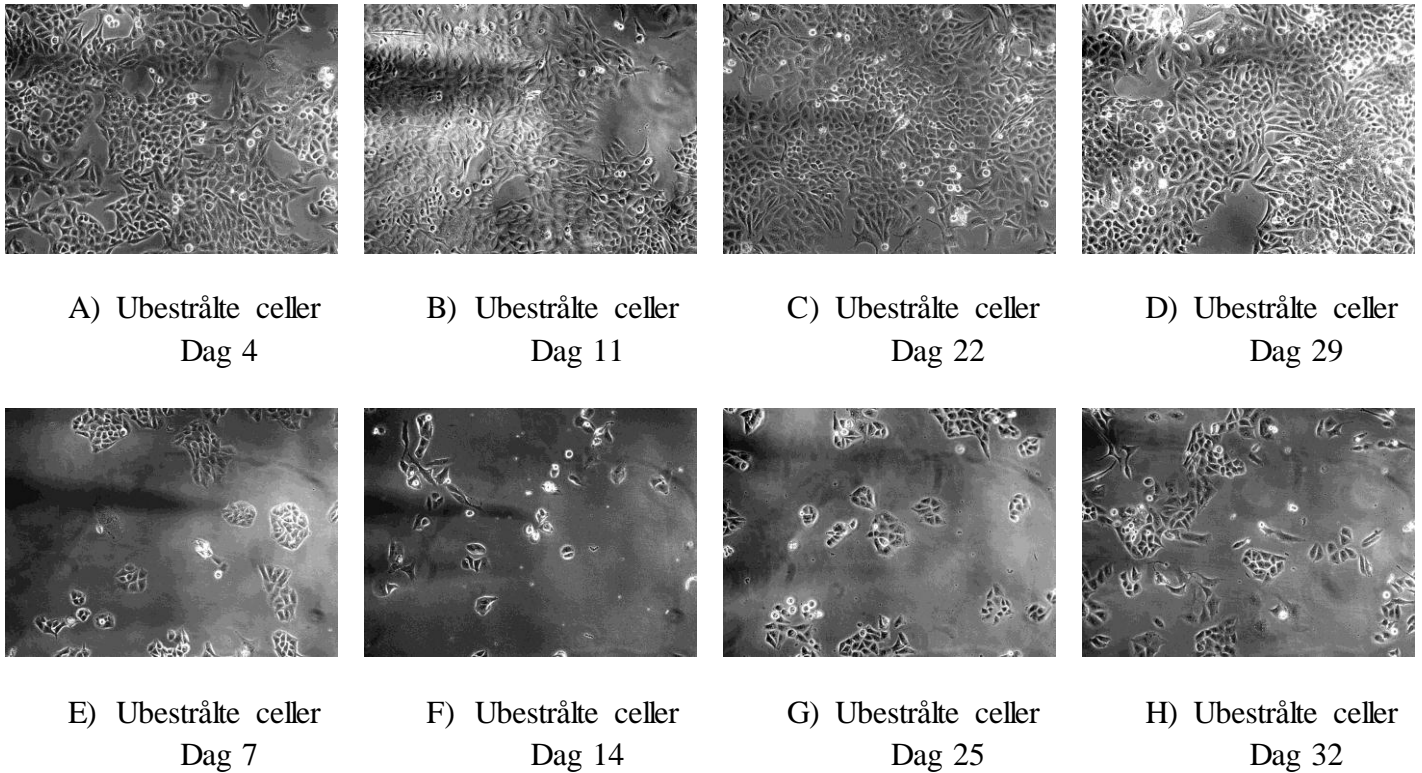
Etter omsetting av cellene og mediumskift vil det være en stabiliseringsfase, før systemet inntar likevekt fordi oksygengradienten gjennom mediet dannes av de respirerende cellene og følgelig må bygges opp igjen ved omsetting og mediumskift. Etter en omsetting kan det ta noe lengre tid enn ved mediumskift for systemet å innta likevekt siden cellene kan befinne seg i en periode med treg vekst rett etter omsettingen (lag-fasen). Likevekt i systemet gjenspeiles i lineære oksygenprofiler og i dette forsøket var likevekt stort sett oppnådd allerede da den første profilen ble tatt opp (*Figur 14* s. 38). Alle profilene finnes i vedlegg C og kun et utvalg presenteres i figur *Figur 14*. Cellene stod ofte et par timer etter omsetting og mediumskift og følgelig ble likevekt gjerne oppnådd innen profilene ble startet. T98G celler har lite lagfase og prolifererer raskt med en gjennomsnittlig doblingstid på 23,5 timer (se avsnitt 4.1.2 s. 38) og oksygenkonsentrasjonsgradienten dannes således også raskt. De første profilene som ble tatt opp dag 0 var ikke lineære og viste at cellene brukte litt ekstra tid på å opprette oksygenkonsentrasjonsgradienten denne dagen.

Konsentrasjonen av oksygen i gassfasen reguleres av hypoksiboksen, helt uavhengig av Unisense mikrosensoren. Gassfase-målingen til sensoren for hver profil kan derfor brukes som en indikasjon på sensorens stabilitet. Som man ser av den blå kurven i *Figur 12* A s. 37 var det noe variasjon/støy på avlesningene fra sensoren mens den oppholdt seg i gassfasen. Dette kan ha sammenheng med variasjon av fuktighet eller dråper som henger igjen på sensoren mens denne hviler over medium-overflaten mellom opptakene av oksygenprofiler, eller det kan skyldes noe elektronisk drift.

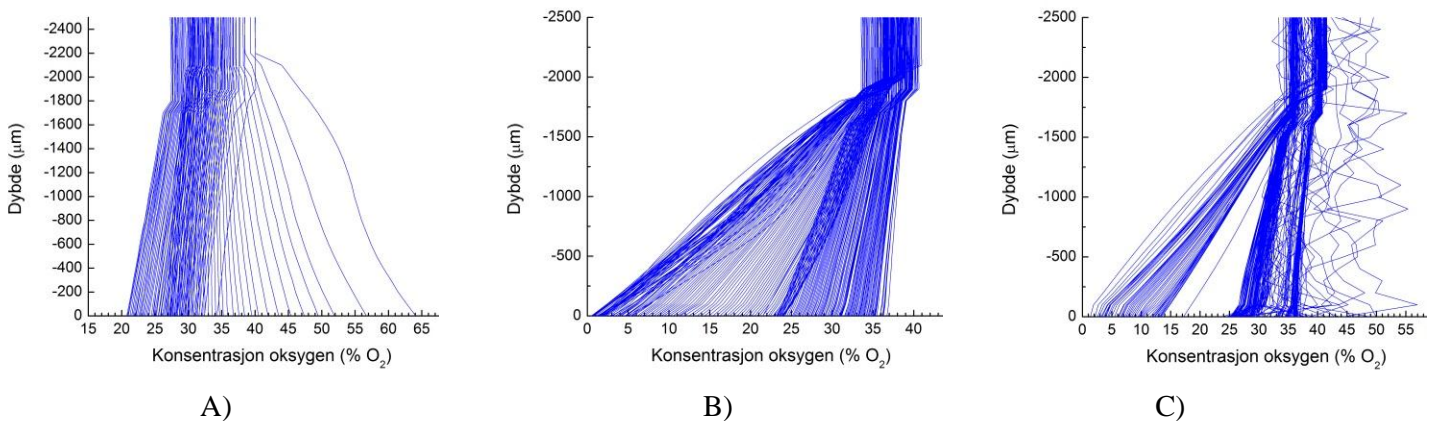
Problemer med sensor dag 5 medførte noen abnorme profiler denne dagen (*Figur 14* C s. 38). Sensor var ødelagt fra dag 11- 18, hvilket gjenspeiles i *Figur 12* A og C s. 37. Den uventede økningen i POC etter ca. 18 timer fra forsøksstart (kl. 07.40) ble også observert i den atmosfæriske oksygenkonsentrasjonen og skyldtes antagelig støy i målingene, snarere enn et reelt uhell som for eksempel en rysting eller bevegelse av flasken.



Figur 12: Figuren viser A) oksygenkonsentrasjonen rett over T98G cellene (POC), B) Antall celler som funksjon av tid og C) Respirasjon per celle. Data er hentet fra forsøk A) der ubestrålte T98G celler ble dyrket kontinuerlig i en hypoksiboks med 4% oksygen i gassfase.



Figur 13: Figuren viser celleflasken det ble målt oksygenprofiler på. Data er hentet fra forsøk A) der ubestrålte T98G celler ble dyrket kontinuerlig i en hypoksiboks med 4% oksygen i gassfase.



Figur 14: Figuren viser oksygenprofiler tatt opp for ubestrålte T98G celler dyrket med 4% oksygen i gassfasen. Panel A) viser profiler fra dag 0 -4, panel B) viser profiler fra dag 26 til 30 og panel C) viser profilene fra dag 4 til 7. Data er hentet fra forsøk A.

4.1.2 Antall celler

Antall celler i flasken ble beregnet (se 3.3.2 Celletelling s. 28). Det ble sådd ut 100 000 celler ved hver utsåing i en flaske med 25 cm² bunnflate. Dermed ble antallet celler i flasken før neste omsetting varierende avhengig av om flasken stod i 4 eller 3 dager før neste omsetting (Figur 12 B s. 37). De dagene hvor cellene fikk stå i 4 dager før neste omsetting, ble

flaskebunnen relativt tett besatt med celler (*Figur 13 A–D* s.38). De dagene cellene stod i 3 dager før neste omsetting var antallet celler lavere og det var god plass mellom cellene (*Figur 13* panel E, F og H s.38).

Det så ut som om de ubestrålte cellene som ble dyrket i en atmosfære på 4% oksygen vokste eksponentielt (*Figur 12 B*) s. 37). Antallet celler som funksjon av tid er plottet i et semi-logaritmisk plott. Doblingstidene er beregnet som beskrevet i 3.4 s. 30 og varierte usystematisk mellom 20,4 og 27,7 timer, med et gjennomsnitt på $23,5 \pm 2,8$ timer (*Tabell 1* s. 39). Dette er sammenlignbart med T98G celler som dyrkes i luft, siden T98G celler på BMF-gruppen omsettes med en ratio på ca. 1:10 som tilsvarer en doblingstid på ca. 22 timer. Således kan det trolig antas at T98G cellene ikke regulerer veksthastigheten som en respons på de hypoksiske forholdene, da doblingstiden til T98G celler dyrket i luft og med 4% oksygen i gassfasen er tilnærmet like.

Tabell 1: Doblingstider for T98G ubestrålte celler dyrket med 4% oksygen i gassfasen. Henviser til 3.4 s. 30 for detaljer om beregningen av doblingstider.

Passasje (timer)	T _D Ubeestrålte T98G celler (timer)
0 - 91	20,4
93 - 122	24,8
170 - 265	24,8
338 - 426	27,7
427 - 528	23,9
548 - 594	21,7
602 - 696	20,4
697 - 763	27,7
768 - 812	20,4

Respirasjon per celle

Ut fra oksygenmålingene ble oksygengradienten nedover i mediet beregnet. Ved likevekt i systemet kunne den totale respirasjonen til celleflasken beregnes (se 3.5.2 Respirasjonsrate s. 32). Videre ble respirasjon per celle beregnet (se 3.5.2 Respirasjonsrate s. 32) for de diskrete punktene der antallet celler per flaske var talt. Respirasjon per celle er plottet i *Figur 12 C*) s. 37.

Maksimalverdien til respirasjonen per celle som ble målt var 793 fmol/(celle·time) for disse ubestrålte cellene og gjennomsnittlig cellulær respirasjon var 396 fmol/(celle·time). Cellene startet med en respirasjon på rett under 500 fmol/(celle·time). Ettersom celleantallet økte og POC sank, falt respirasjonen per celle til ca. 400 fmol/(celle·time), trolig på grunn av begrenset tilgang på oksygen; forbruket begrenses av diffusjonshastigheten. Deretter ble cellene omsatt ved $t = 95$ timer som førte til at den cellulære respirasjonen økte betraktelig igjen (800 fmol/(celle·time)). Økning i cellulær respirasjon ved en omsetting skyldes følgelig at det da er få celler i flasken og derfor tilstrekkelig oksygen tilgjengelig for å opprettholde full respirasjon.

På dag 11 ble det motsatte av forventet observert, nemlig at respirasjonen per celle økte med tiden. Dette kan muligens forklares med at det i denne perioden var mye fordamping av medium i celleflasken. Denne fordampingen av mediet i den flasken som sensoren målte i førte til en ugunstig mediesammensetning for cellene og de fleste cellene i flasken døde (bilde fra profilflasken rett før omsetting dag 14 i *Figur 13 F s.38*). Det virker derfor rimelig at det var mer oksygen tilgjengelig for de cellene som overlevde. Dessuten fører den lave mediumhøyden til raskere diffusjon. Fra *Figur 12 A, s. 37*, som viser POC og oksygenkonsentrasjonen i gassfasen, ser man da også at POC holdt seg meget høy i perioden fra dag 11-14.

Gjennomgående viser målingene en økning i respirasjon per celle etter omsettingen. Noen dager økte respirasjonen til dagen etter (dag 18, 26, 30). Deretter sank respirasjon per celle når celletallet økte. (Målingen på dag 15 ble gjort raskt etter omsettingen og var muligens kunstig lav siden oksygengradienten ikke nødvendigvis hadde bygget seg opp ennå.)

4.2 Forsøk B: Celler bestrålt med 1,6 Ci/mol i 4% O₂

I dette forsøket ble T98G celler dyrket med eller uten 1,6 Ci/mol [³H]-merket valin i mediet og dyrket kontinuerlig i en hypoksiboks. Som i forsøk A var hypoksiboksen innstilt på 4% O₂ i gassfase.

Det ble valgt å bestråle cellene med 1,6 Ci/mol på bakgrunn av forsøk gjort på T-47D celler der 1,6 Ci/mol ble brukt. Mikrodosimetri for T98G celler ble utført av Ida Aspmo og den mikrodosimetriske metoden for å bestemme doseraten til cellekjernene er utviklet av Åste Søvik (Søvik 2002). Prosedyren for å lage kjerner fungerte ikke på T98G celler, derfor var doseraten til cellekjernen ikke beregnet på dette forsøkets tidspunkt.

Hensikten med forsøket var å undersøke om det fantes en synergieffekt mellom ioniserende stråling med ultralav doserate og hypoksi. Det var tidligere vist for T-47D celler at en slik ultralav doserate selektivt drepte de hypoksiske cellene. Det ble samtidig dyrket ubestrålte T98G celler i 4% O₂ som en kontroll på effekten av hypoksi alene. De T98G cellene som ble dyrket uten [³H]-valin hadde samme høye konsentrasjon (1mM) av valin (dvs. uten radioaktivitet) som de T98G cellene som ble bestrålt med [³H]. Det ble forsøkt gjort

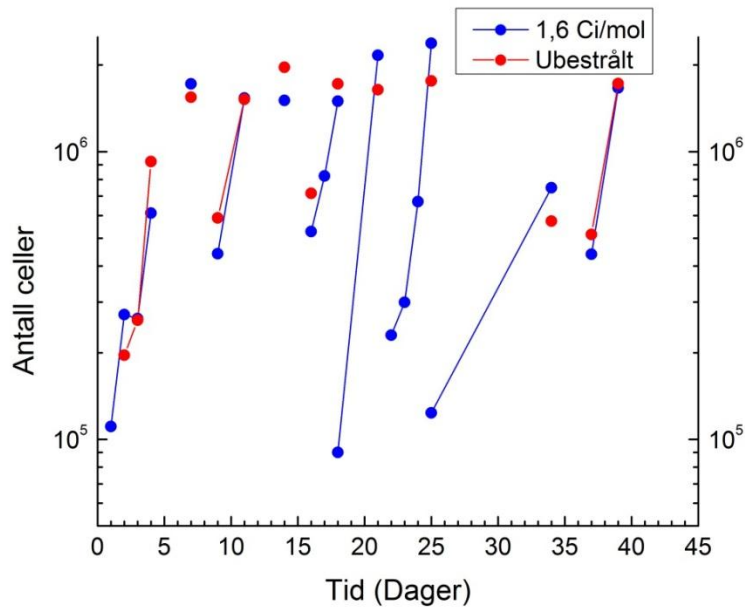
respirasjonsmålinger i dette forsøket også i de cellene som ble dyrket med [^3H]-valin, men tekniske problemer med oksygensensoren førte til at dette falt bort.

4.2.1 Antall celler i forsøk B

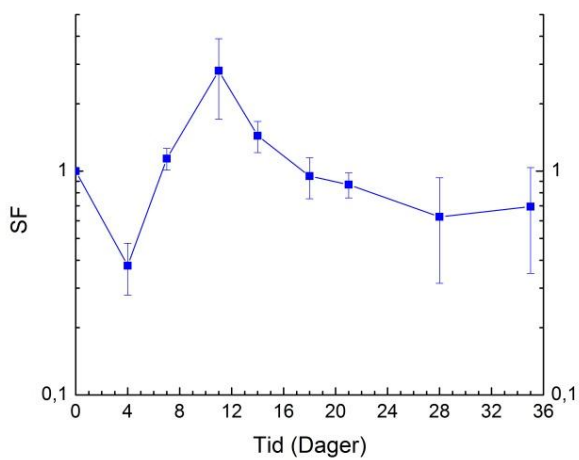
Antallet celler i celleflaskene ble beregnet ut fra bilder som ble tatt underveis i forsøket (se 3.3.2 Celletelling s.28). På grunnlag av erfaringer fra forsøk A ble antallet celler som ble sådd ut på fredagene økt til 150 000 celler per flaske mens det på mandag fortsatt ble sådd ut 100 000 celler per flaske. Antall celler ved omsetningstidspunktet ble nå mer likt fra gang til gang og antallet celler per flaske var da mellom 1 og 2 millioner ved omsetting (*Figur 15 A* s. 42). Ubestrålte og bestrålte celler ble sådd ut likt. *Figur 15 A* s. 42 viser at de ubestrålte cellene og de bestrålte cellene var nokså lik hverandre i antall ved omsetningstidspunktet. Dobblingstidene er beregnet (se 3.4 s. 30) og gjennomsnittlig dobblingstid var $25,6 \pm 5,9$ timer for de bestrålte cellene. Dobblingstider for de ulike passasjene i forsøk B finnes i *Tabell 2* s. 41. Til sammenligning ble dobblingstidene funnet for ubestrålte T98G celler som dyrkes med 4% oksygen i gassfasen i forsøk A til $23,5 \pm 2,8$ time. Dobblingstidene for de ubestrålte T98G cellene fra forsøk A og for T98G cellene bestrålt med 1,6 Ci/mol fra forsøk B er ikke signifikant forskjellig (tosidig Student's t-test gir $p=0,42$). For begge forsøkene varierer dobblingstiden i løpet av forsøket, men denne variasjonen er usystematisk.

Tabell 2: Dobblingstider til bestrålte (1,6 Ci/mol) dyrket med 4% oksygen i gassfasen. Henviser til 3.4 s. 30 for beregningsdetaljer.

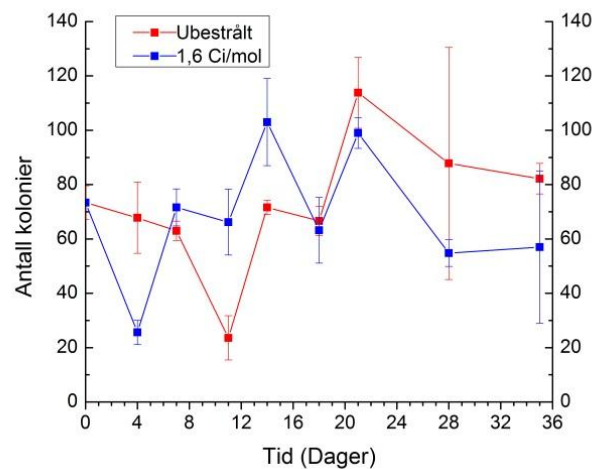
Tidsintervall (dager)	T_D 1,6 Ci/mol (timer)
1 - 4	32,7
9 - 11	26,9
16 - 18	31,9
18 - 21	15,6
22 - 25	21,3
37 - 39	25



A)



B)



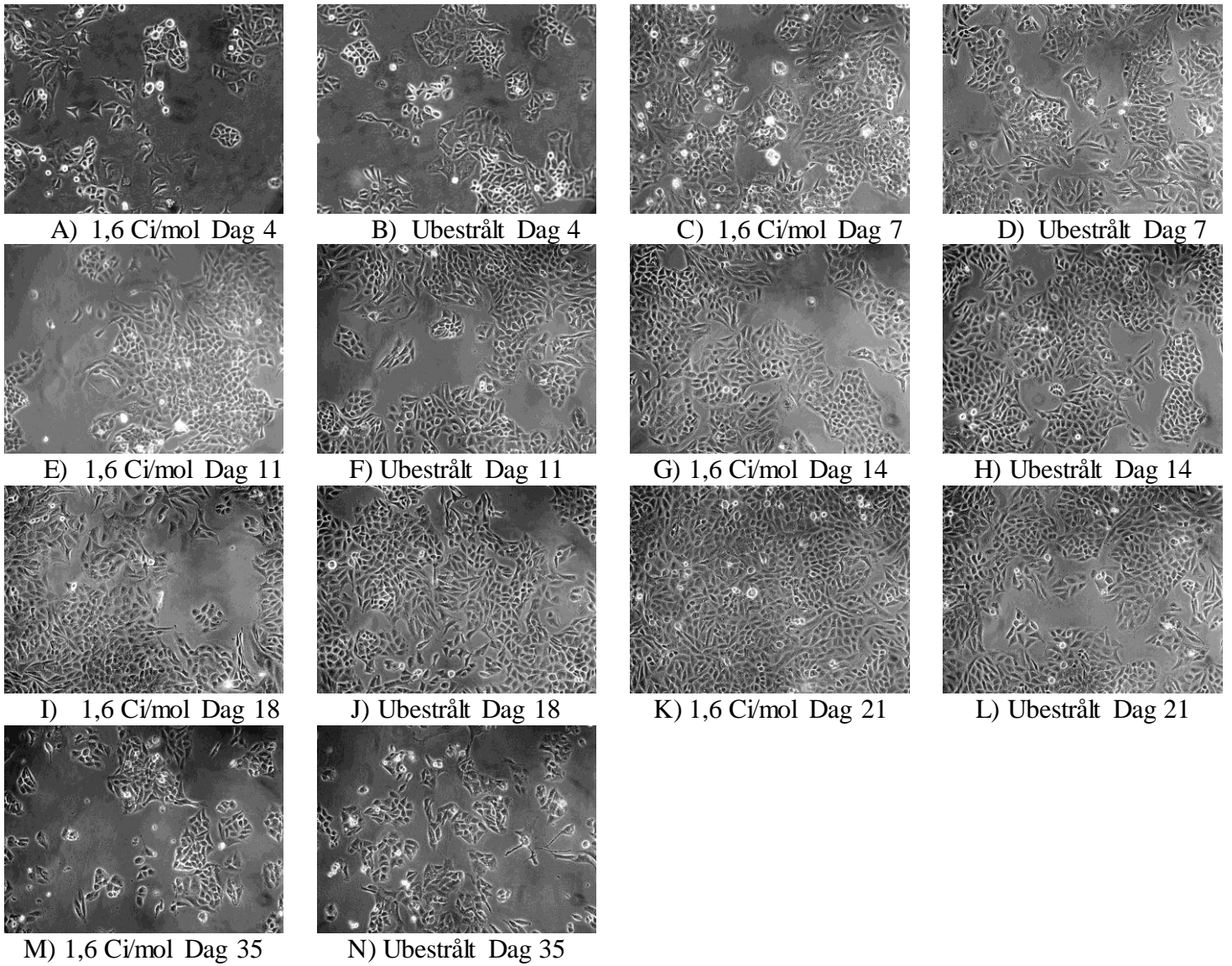
C)

Figur 15: Figuren viser A) antall T98G celler bestrålt kontinuerlig med 1,6 Ci/mol (blå) og de ubestrålte kontrollcellene (rød), B) fraksjonen av de bestrålte cellene som har beholdt sin kolonidannende egenskap og C) antall kolonier for bestrålte og ubestrålte celler. Data er hentet fra forsøk B) der T98G celler ble dyrket kontinuerlig med 4% oksygen i gassfasen.

4.2.2 Resultat fra koloniforsøket i forsøk B

Det ble gjort koloni-forsøk hver mandag og fredag, der enkeltcellers kolonidannende evne ble testet. Koloniforsøkene undersøkte om det var en synergistisk inaktiverende effekt av bestråling med ultralav dose rate og variabel hypoksi. Det ble tatt bilder av cellene før koloniforsøk, med unntak av dag 28 (*Figur 16* s. 44). For nærmere beskrivelse av koloniforsøkene henvises det til 3.3 Koloniforsøk s. 28.

Resultatene fra koloni-forsøkene viser den overlevende fraksjonen av T98G celler bestrålt med 1,6 Ci/mol under hypoksiske forhold (4% O₂ i gassfase) relativt til ubestrålte T98G celler (*Figur 15 B*) s. 42). Figuren antyder at overlevelsesfraksjonen for de bestrålte T98G cellene varierte de to første ukene, men stabiliserte seg på ca. 70 – 80 % overlevelse i forhold til den ubestrålte kontrollen etter ca. 3 uker.



Figur 16: Figuren viser bilder av T98G ubestrålte og bestrålte (1,6 Ci/mol) celler fra de dagene det ble gjort koloni-forsøk. Data er hentet fra forsøk B, der T98G celler ble dyrket kontinuerlig med 4% oksygen i gassfasen.

4.3 Forsøk C: T98G-celler bestrålt med 1,6 Ci/mol i 3% O₂ . Reoksygenering med 4% O₂ i gassfase i 4 timer etter omsetting og mediumskift.

I dette forsøket ble T98G celler bestrålt med 1,6 Ci/mol [³H]-valin i mediet ved en lavere oksygenkonsentrasjon enn tidligere forsøk.

Hypoksiboksen var nå stilt inn på 3 % O₂ i gassfase. For å sikre samme reoksygeneringsgrad som i tidligere forsøk ble cellene reoksygenert i 4 timer etter omsetting og mediumskift, med 4% O₂ i gassfase.

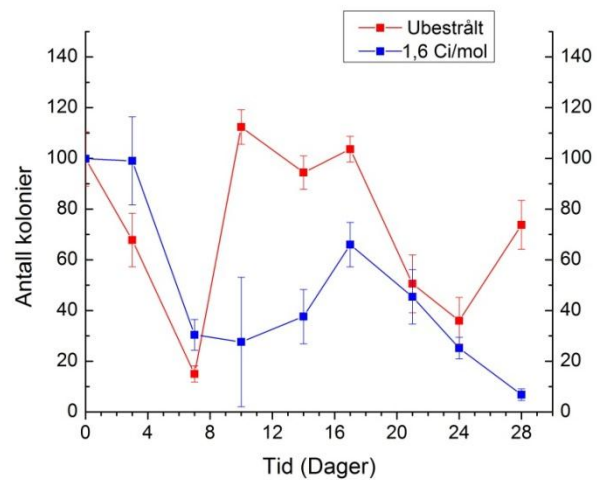
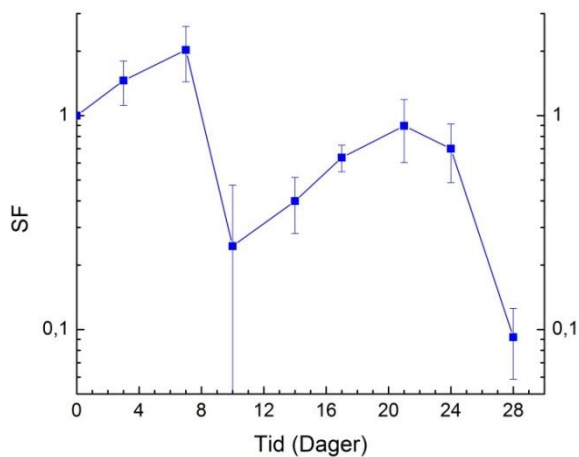
Hypoksiboksen ble satt ned til 3 % O₂ i gassfase fordi effekten som Pettersen et al (2007) tidligere har observert, der hypoksiske T-47D brystkreftceller selektivt ble drept når de ble bestrålt med en ultralav doserate, ikke ble observert for T98G hjernekreftceller i forsøk B (kapittel 4.2, s. 40). Dette kunne være fordi våre T98G celler reagerer forskjellig på den kombinerte behandlingen med ultralav doserate bestråling og hypoksi, men det kunne også skyldes at T98G cellene ikke opplevde streng nok hypoksi.

Det ble gjort koloniforsøk 1-2 ganger i uken. Cellene som hadde blitt dyrket kontinuerlig i hypoksiboksen ble preparert til flowcytometri før forsøket ble avsluttet etter 31 dager.

4.3.1 Resultat fra koloniforsøket i forsøk C

Figur 17, s. 46 viser at den overlevende fraksjonen varierte mye gjennom forsøket. Noe av denne variasjonen kan skyldes usikkerhet i metoden (se 5.5 s. 77). Det viste seg at hvor høy celletetthet celleflaskene hadde ved omsettingstidspunktet hadde en stor effekt på hvordan cellene så ut til å ha det. Det kan virke som om T98G celler selv uten bestråling ikke tålte å gro til konfluens i hypoksiske forhold. Det ble tatt bilder av cellene hver dag (*Figur 18* s. 47). De dagene de bestrålte cellene hadde en lav overlevelsesfraksjon (for eksempel dag 10, 13 og 17) observeres det at celle-laget på flaskebunnen var blitt konfluent og noen av cellene så ut til å disintegre (*Figur 18* E, G, I, for eksempel), mens kontrollcellene grodde med færre celler per flaske de samme dagene.

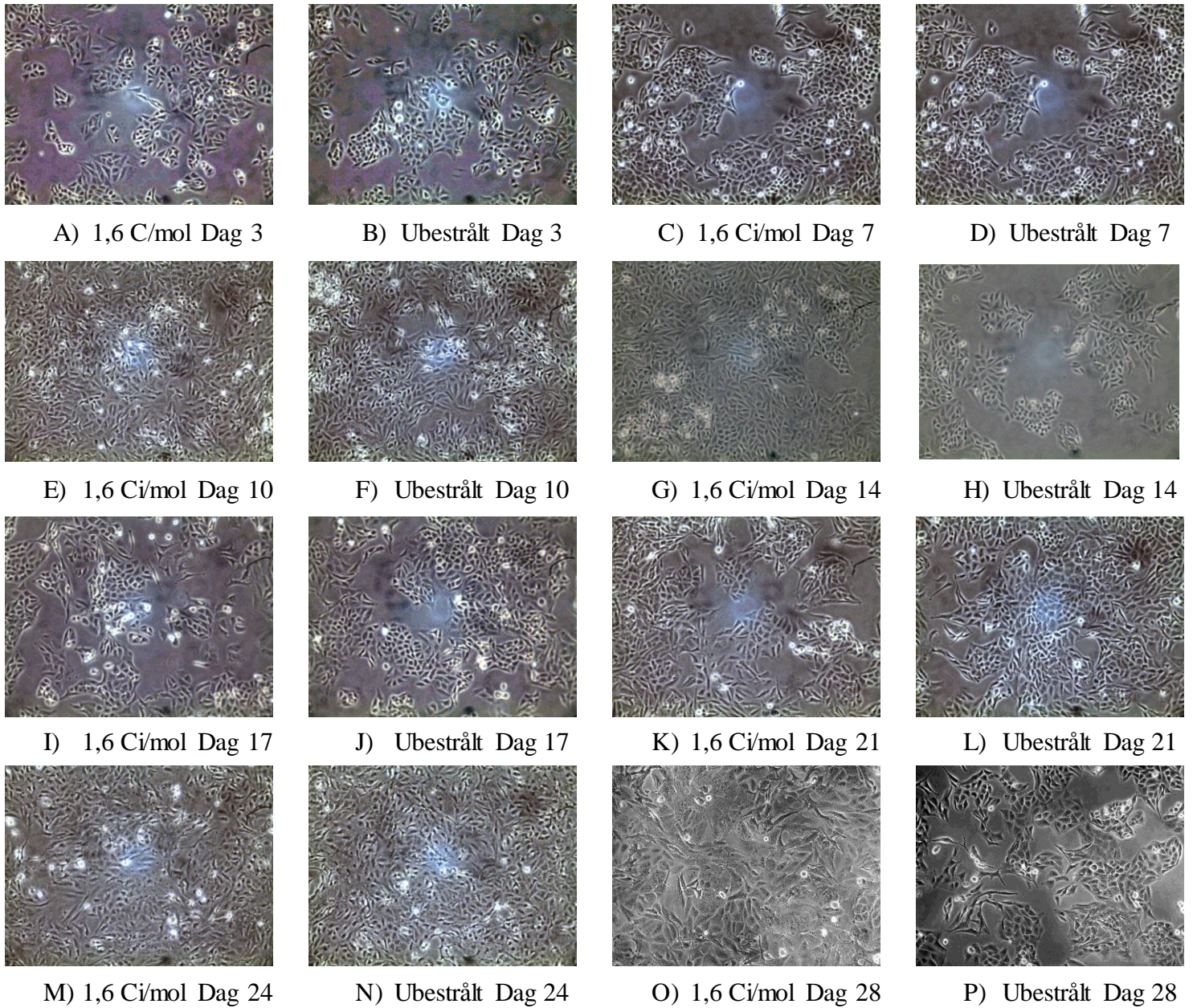
Tre ganger i løpet av forsøket ble cellene reoksygenert i mer enn 4 timer. Fra dag 7 ble boksen stående på 4% O₂ til dag 11. Fra dag 11-12 stod boksen på 4% O₂ i 13 timer. Fra dag 24 ble boksen stående på 4% O₂ i hele 20 timer. Dette førte til usikkerhet i forhold til om forskjellene i overlevelsesfraksjon skyldes celletettheten, eller om den ekstra tiden cellene ble reoksygenert har en ulik effekt på kontrollcellene og de bestrålte cellene. Det er mulig at vi her befinner oss i nærheten av grensen for hvor lav pericellulær oksygenkonsentrasjon disse cellene i det hele tatt kan tåle.



A)

B)

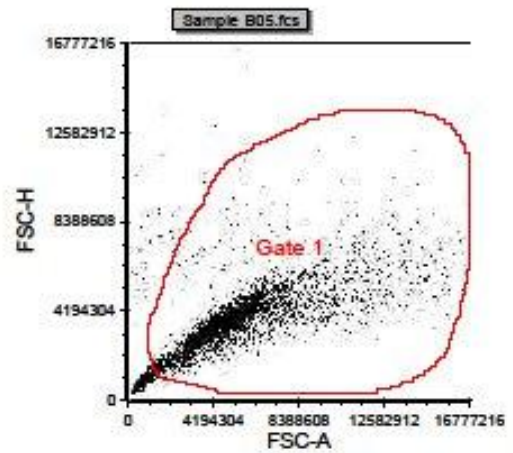
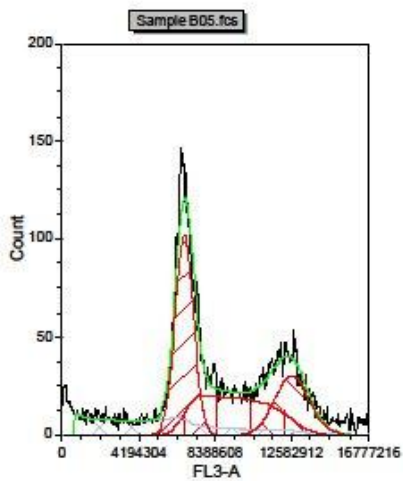
Figur 17: Panel A) viser overlevelsesfraksjon for T98G celler bestrålt med 1,6 Ci/mol relativt til ubestrålte T98G celler. Cellene ble dyrket kontinuerlig med 3% oksygen i gassfasen, med en reoksygenering i 4 timer etter omsetting og mediumskift, da det var 4% oksygen i gassfasen. Panel B) viser antall kolonier for de tilsvarende cellene. Data er hentet fra forsøk C. Det ble sådd ut 200 celler per celleflaske.



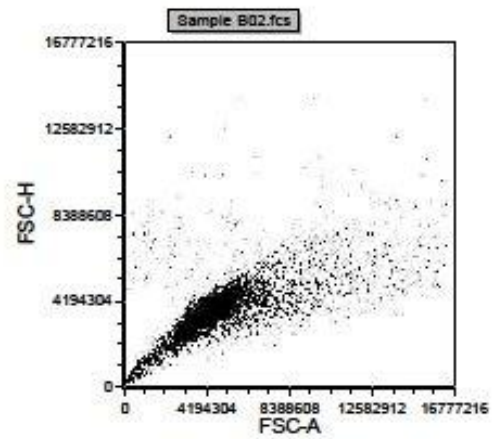
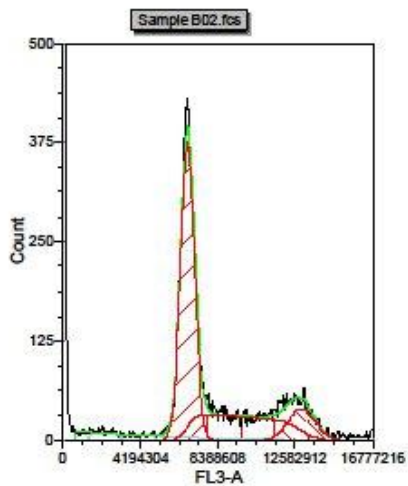
Figur 18: Figuren viser bilder av T98G ubestrålte og de bestrålte (1,6 Ci/mol) celler de dagene det ble utført koloni-forsøk. Noen av dagene mangler det bilder. Data er fra forsøk C der cellene ble dyrket kontinuerlig med 3% oksygen i gassfasen, med en reoksygenering i 4 timer etter omsetting og mediumskift, da det var 4% oksygen i gassfasen..

4.3.2 Resultat av flowcytometri-målinger fra forsøk C

DNA flowcytometri gjort på ubestrålte og bestrålte (1,6 Ci/mol) T98G celler, viser en spesifikk G2-opphopning for cellene som ble bestrålt med 1,6 Ci/mol (Figur 19, s. 48 og Tabell 3 s. 48) ved at G2-fraksjonen er mer enn doblet.



A)



B)

Figur 19: Data fra flowcytometri for T98G celler dyrket kontinuerlig i 4 % oksygen i gassfasen. A) Bestrålte T98G celler (1,6 Ci/mol). CV: 7,4 B) Ubestrålte T98G celler. CV : 5,5. Data er hentet fra forsøk C.

Tabell 3: Cellesyklusfordelingen for bestrålte(1,6 Ci/mol) og ubestrålte T98G celler. Data er hentet fra flowcytometri-resultat fra forsøk C.

	% G1	% G2	% S
Bestrålte	41,61	23,44	34,94
Ubestrålte	60,74	10,87	28,39

4.4 Forsøk D: T98G-celler bestrålt med 0,53 Ci/mol og 0,27 Ci/mol i 3,5% O₂

T98G celler ble bestrålt med 0,27 Ci/mol og 0,53 Ci/mol og de bestrålte cellene pluss en ubestrålt kontroll ble dyrket kontinuerlig i hypoksiboksen som var innstilt med 3,5% O₂ i gassfasen. Hensikten med dette forsøket var å senke doseraten til en ultralav doserate, noe vi mente var påkrevd siden forrige forsøk antydte en direkte strålingseffekt på cellyklusreguleringen ved en G2-opphoping. Cellene ble bestrålt med 1/6 og 1/3 av den tidligere brukte verdien på 1,6 Ci/mol. Dette tilsvarer 0,009 Gy/time og 0,018 Gy/time. Ved å øke oksygenkonsentrasjonen i gassfase til 3,5% O₂ håpet vi å unngå altfor sterke inaktiverende effekter av hypoksi på ubestrålte kontrollceller. Målet var å observere om det var en synergistisk effekt av stråling og hypoksi hvor hver behandling i seg selv gav liten effekt.

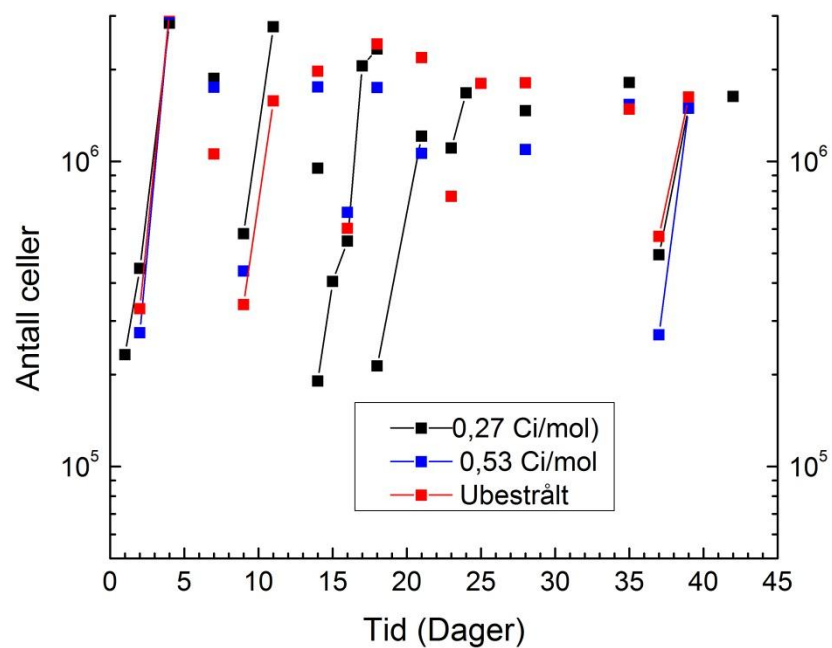
Det ble gjort respirasjonsmålinger på celler bestrålt med 0,27 Ci/mol, men mange av målingene var sterkt preget av ødelagt sensor, og kan ikke brukes.

Antall celler

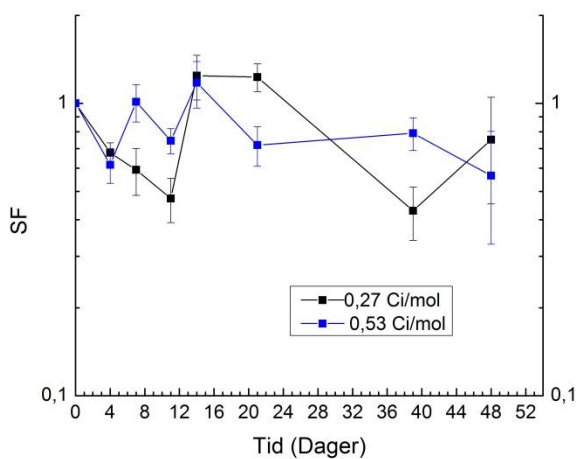
Kontrollcellene og cellene bestrålt med 0,53 Ci/mol ble fotografert ved omsetting og mediumskift, mens celleflasken bestrålt med 0,27 Ci/mol som det kontinuerlig ble gjort oksygenmålinger på, stod på mikroskopet, og ble fotografert betydelig oftere. Antallet celler i de ulike flaskene ble beregnet (se materialer og metode) og viser at flaskene stort sett ble dyrket opp til konfluens før omsetting. Noen dager var det tydelig variasjon i celledetthet mellom cellene bestrålt med 0,53 Ci/mol, cellene bestrålt med 0,27 Ci/mol og de ubestrålte cellene, men dette virker å være usystematisk. Det varierte hvilken celleflaske som ikke var helt konfluent til neste omsetting. Det virker derfor ikke sannsynlig at ulikt antall celler i flaskene skyldtes en forskjell på veksthastigheten, men heller at utsåings-metoden kan være litt upresis. Doblingstidene er beregnet for T98G celler bestrålt med 0,27 Ci/mol i mediet og dyrket med 3,5% oksygen i gassfasen (Tabell 4 s. 50). Doblingstidene gjennom forsøket varierte mellom 19,6 og 32 timer med et gjennomsnitt på $27,0 \pm 4,3$ timer. Dette er noe høyere enn den gjennomsnittlige doblingstiden funnet i forsøk A der ubestrålte T98G celler ble dyrket i med 4% O₂ i gassfasen på $23,5 \pm 2,8$ timer, men doblingstidene fra forsøk A og doblingstidene fra forsøk D (dette forsøket) er ikke signifikant forskjellige (tosidig Student's t-test gir $p=0,11$).

Tabell 4: Tabellen viser doblingstider til T98G celler bestrålt med 0,27 Ci/mol som ble dyrket med 3,5% oksygen i gassfasen. For detaljer om beregningene henvises det til 3.4 s. 30.

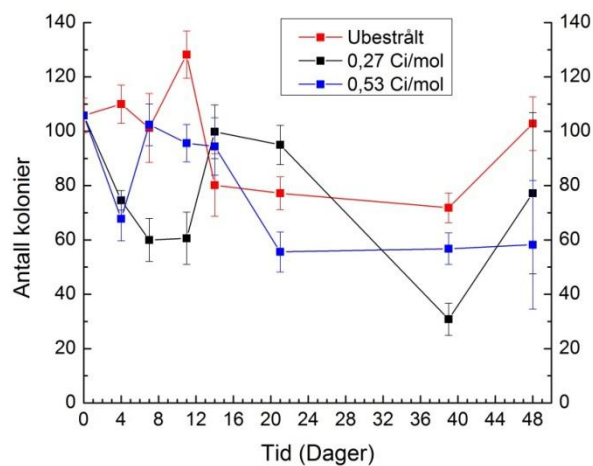
Tidsintervall (dager)	T_D 0,27 Ci/mol (timer)
1 - 4	19,6
8 - 11	32
14 - 18	25,2
18 - 21	28,7
37 - 39	29,7



A)



B)

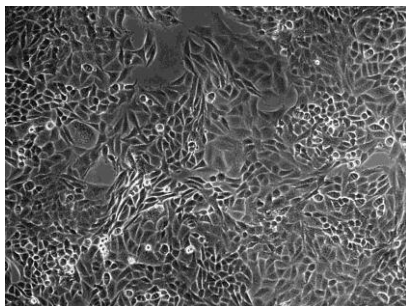


C)

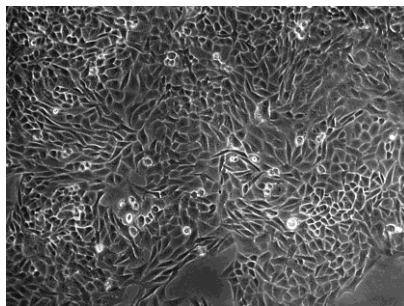
Figur 20: Figuren viser A) antall celler i celleflasken for celler bestrålt med 0,27 Ci/mol (sort), celler bestrålt med 0,53 Ci/mol (blå) og ubestrålte celler (rød), B) fraksjonen av de bestrålte cellene som har beholdt sin kolonidannende egenskap og C) antall kolonier for bestrålte og ubestrålte celler. Data er hentet fra forsøk D der T98G celler ble dyrket kontinuerlig med 3,5% oksygen i gassfase.

4.4.1 Resultat fra koloni-forsøk til forsøk D

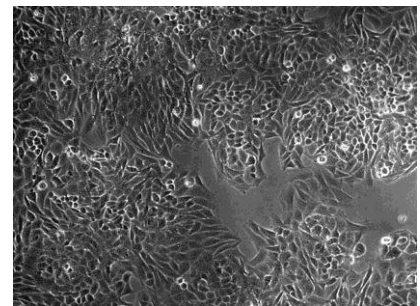
Det ble utført koloniforsøk 1-2 ganger i uken. Resultatene vises i *Figur 20 B)* og *C)* s. 51, hvor 200 celler er sådd ut per flaske. Koloniantallet per flaske for de bestrålte cellene var ofte lavere enn det for ubestrålte flasker (*Figur 20 C)*), men som i tidligere forsøk er det ingen entydig synergistisk effekt.



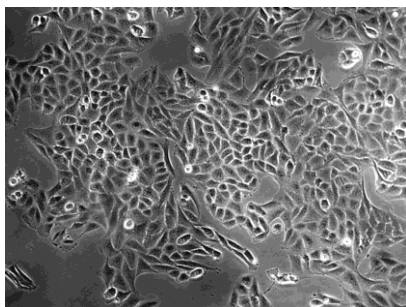
A) 0,27 Ci/mol Dag 4



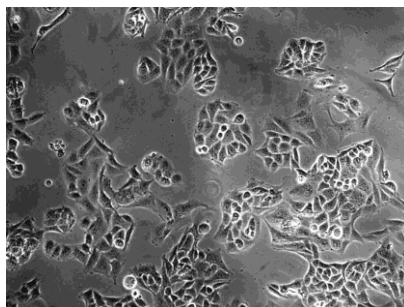
B) 0,53 Ci/mol Dag 4



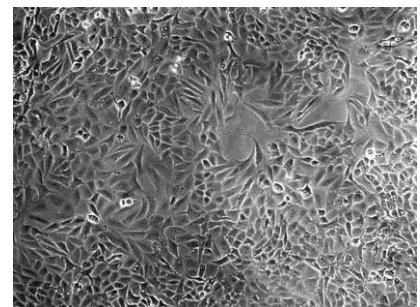
C) Ubestrålt Dag 4



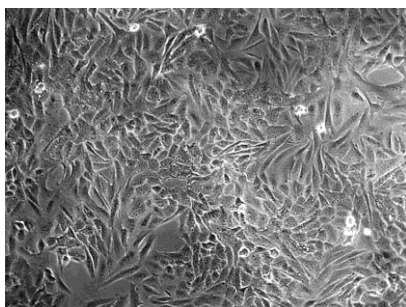
D) 0,27 Ci/mol Dag 21



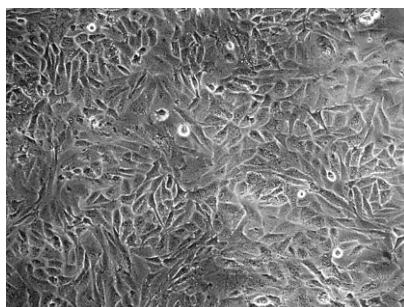
E) 0,53 Ci/mol Dag 21



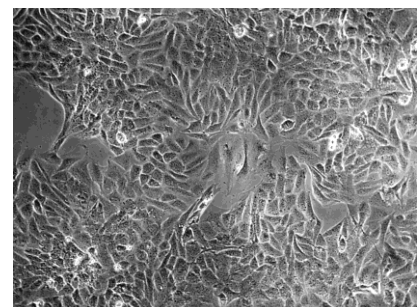
F) Ubestrålt Dag 21



G) 0,27 Ci/mol Dag 39



H) 0,53 Ci/mol Dag 39



I) Ubestrålt Dag 39

Figur 21: Figuren viser bilder av T98G celler samme dagen som det ble utført koloniforsøk.

Bildene viser T98G celler bestrålt med 0,27 Ci/mol, 0,53 Ci/mol og ubestrålte celler. Det er her valgt ut noen representative bilder fra forsøk D.

4.5 Forsøk E: T98G-celler bestrålt med 0,53 Ci/mol i 3,5% O₂

T98G celler ble bestrålt med 0,53 Ci/mol i 49 dager. Dette tilsvarte 0,018 Gy/time. Hensikten med forsøket var å få gode respirasjonsdata fra celler som ble bestrålt med en ultralav doserate i et hypoksisk mikromiljø, noe som ikke var fullt ut oppnådd i tidligere forsøk. Cellene ble dyrket kontinuerlig i en hypoksiboks med 3,5 % O₂ i gassfasen. I dette forsøket var bestrålingsdoseraten lik som i forsøk D og hypoksiboksen var stilt inn likt som i forsøk D. Reproduerbarheten til koloniforsøkene kunne derfor også testes.

Det ble valgt å gjøre respirasjonsmålinger på celler bestrålt med 0,53 Ci/mol på bakgrunn av koloni-data fra forsøk D som antyder at overlevelsesandelen til celler bestrålt med 0,53 Ci/mol falt til ca. 50%.

4.5.1 Respirasjonsdata

Pericellulær oksygenkonsentrasjon(POC) og oksygenkonsentrasjon i gassfasen

Figur 22, s. 56 viser oksygenkonsentrasjonen pericellulært(rød) og i gassfase (blå).

Første oksygenprofil ble startet litt over 4 timer etter at cellene ble sådd ut. Etter utsåing ble cellene inkubert i en CO₂-inkubator med luft i 4 timer, slik at cellene fikk festet seg til underlaget. Etter at cellene hadde festet seg, ble celleflaskene tilsatt radioaktivt medium med 0,53 Ci/mol. Både de bestrålte og de ubestålte cellene ble så satt inn i hypoksiboksen, deretter ble oksygenmålingene startet (ca. 30 min etter at cellene ble satt inn i boksen).

Resultatene fra den første profilen (*Figur 23 A s. 57*) gjenspeiler at cellene kom fra forhold med luft. Det var ennå overskuddsoksygen i mediet som fremkommer som røde punkter langs ordinat-aksen i *Figur 22 A s. 56*.

Likevekt i systemet medførte lineære oksygenprofiler. I alle dette forsøkets passasjer var likevekt i systemet oppnådd ved første opptatte oksygenprofil. Cellene fikk ofte stå noen timer fra omsetting til profiloppstart og i løpet av denne tiden inntok systemet likevekt. Noen av dette forsøkets oksygenprofiler finnes i figur *Figur 23 s. 57*, samtlige oksygenprofiler vises i vedlegg C.

Pericellulær oksygenkonsentrasjon for T98G celler bestrålt med 0,53 Ci/mol varierte *syklisk* fra mellom ca. 3 % O₂ til under 0,1 % O₂ når cellene ble dyrket med 3,5 % O₂ i gassfase. POC-kurven falt raskere etter at cellene fikk tilgang på nytt RPMI-medium, mest sannsynlig grunnet økt proliferasjon. Respirasjon per celle sank når antallet celler økte, noe som trolig skyldes lite oksygen tilgjengelig per celle på grunn av diffusjonsbegrensning av oksygen gjennom mediet.

I nesten alle passasjene hadde pericellulær oksygenkonsentrasjon en nedre terskelverdi ved 0 - 0,5 % O₂. Når den pericellulære konsentrasjonen nådde terskelverdien slakket POC-kurven ut og ble tilnærmet horisontal. Dette skjedde i mange av passasjene (*Figur 22 s. 56*) og utgjør en viss forskjell sammenlignet med forsøk A. I dette forsøket (forsøk E) ble cellene sådd ut tettere enn i forsøk A for å oppnå en konfluent celleflaske før hver omsetting. Hypoksiboksen ble også stilt inn slik at gassfasen her har 3,5 % O₂, mens den i forsøk A var innstilt på 4% O₂. Dette førte til at cellene opplevde en strengere hypoksi i dette forsøket. POC-verdiene gikk her under 0,7% O₂ hver gang og ofte lavere. Cellene opplevde denne lave oksygenkonsentrasjonen lenger enn i forsøk A).

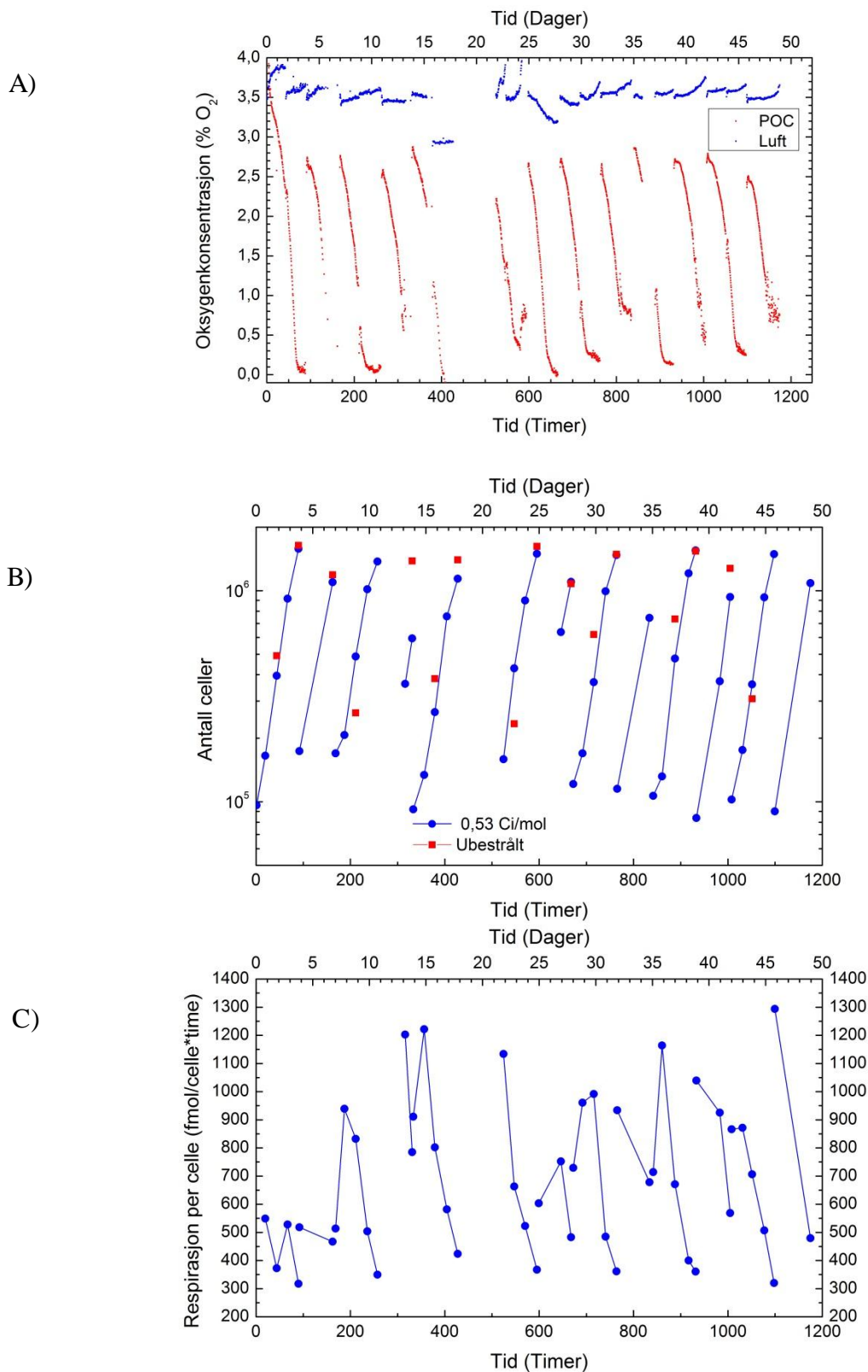
Noen data bærer preg av at det ble byttet oksygensensor underveis i forsøket. På dag 18 ble det observert at det hadde vært mye drift i null-punktet og gassfase-målingen, samt at POC-verdien hadde havnet under null (*Figur 23 B s. 57*). Det ble satt inn ny sensor. Denne brukte noen dager på å bli stabil og det ble observert drift i sensoren de første dagene. Dette kunne ses i målinger gjort over medium-overflaten, som viste oksygenkonsentrasjonen i gassfasen og i oksygenprofilene (vedlegg C). Et annet problem var at Unisense programmet noen ganger sluttet å virke slik at det ble tatt opp færre profiler enn det som var stilt inn. Dette førte til at det i to av profilene mangler mange datapunkter. Dette skjedde i forsøkene som startet dag 4 og dag 14 (*Figur 22 s. 56*).

Forsøket bekreftet tidligere observasjoner på T98G celler som dyrkes under hypoksiske forhold (med 3,5 % oksygen i gassfase) ikke tålte å gro til konfluens. Dette er videre undersøkt i forsøk F. Når celleflaskene ble konfluente begynte cellene å løsne.

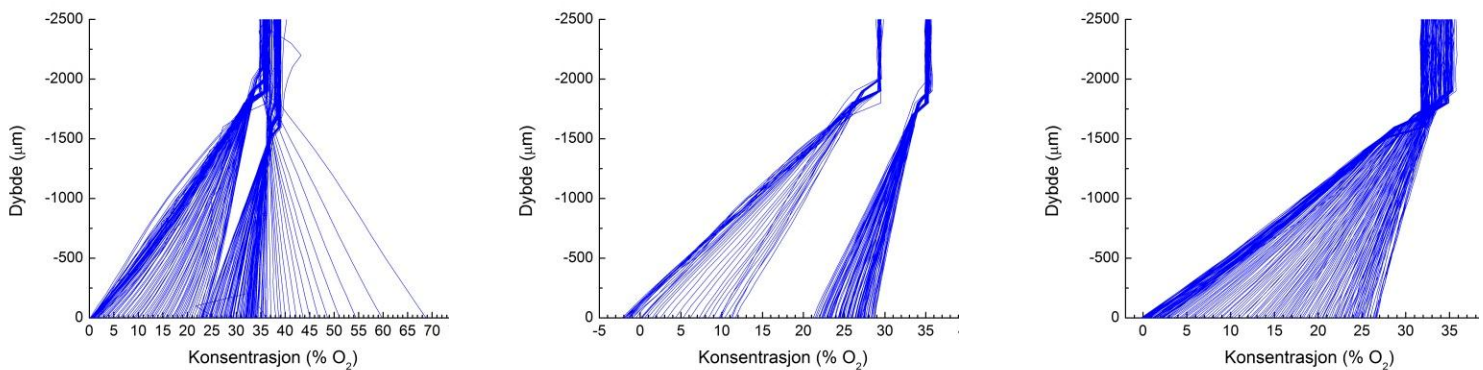
Det ble målt laktat, glukose og pH i mediet til cellene underveis i forsøket (*Tabell 5 s. 55*). En sammenligning av bilder fra den dagen det ble målt på cellene (*Figur 24 s. 60*) viser at helt konfluente celleflasker har brukt opp all tilgjengelig glukose og har en veldig lav pH. Om dette er årsaken til at cellene løsner kan ikke konkluderes ut fra dette forsøket.

Tabell 5: Tabellen viser målte verdier for glukose, laktat og pH i løpet av forsøk E, der ubestrålte T98G celler samt T98G celler bestrålt med 0,53 Ci/mol ble dyrket i et hypoksisk mikromiljø med 3,5% oksygen i gassfasen.

	Dag	Glukose	Laktat	pH
T98G 0,53 Ci/mol	4	0	13,73	6,6
T98G Ubestrålt	4	0	13,68	6,6
T98G 0,53 Ci/mol	35	0	12,98	6,6
T98G Ubestrålt	35	2,7	13,79	6,8
T98G 0,53 Ci/mol	39	0,8	13,58	6,7
T98G Ubestrålt	39	0	13,27	6,6
T98G 0,53 Ci/mol	49	0	13,53	6,6
T98G Ubestrålt	49	0	14,17	6,8



Figur 22: Figuren viser A) POC for celler bestrålt med 0,53 Ci/mol , B) Antall ubestrålte (rød) og bestrålte (blå) celler og C) Respirasjon per celle for celler bestrålt med 0,53 Ci/mol. Data er hentet fra forsøk E) der T98G celler ble dyrket i 3,5% oksygen i gassfase.



A) Dag 0 - 4

B) Dag

C)

Dag 11/3

Figur 23: Figuren viser oksygenprofiler tatt opp for T98G celler bestrålt med 0,53 Ci/mol og dyrket med 3,5% oksygen i gassfasen. Panel A) viser profiler fra dag 0 - 4, mens panel B) viser profiler fra dag 14 til 18 og panel C) viser profiler fra dag 25 til 28. Data er hentet fra forsøk E.

Respirasjon per celle

Respirasjon per celle ble beregnet for T98G celler som ble bestrålt med 0,53 Ci/mol og dyrket kontinuerlig i et hypoksisk mikromiljø (3,5% O₂ i gassfase). Det er tidligere beregnet respirasjon per celle for ubestrålte kontroll-celler som ble dyrket i et hypoksisk mikromiljø med 4% O₂ i gassfase i forsøk A.

Resultatene vises i *Figur 22 C* s. 56. Figuren viser at respirasjonen per celle økte etter at de bestrålte T98G cellene var blitt dyrket i det hypoksiske mikromiljøet (3,5% O₂) i ca. en uke. Etter en omsetting er det færre celler i flasken og mer tilgang på oksygen per celle. Dette medfører at respirasjonen per celle økte etter hver omsetting fordi den ikke ble hemmet av begrenset tilgang på oksygen. Deretter sank respirasjonen per celle (evt. etter en liten initiell øking) når celletettheten økte. Maksimalverdi for respirasjonen var hele 1294 fmol/(celle·time). Dette er 1,6 ganger høyere enn høyeste respirasjon per celle som ble målt for de ubestrålte T98G cellene som ble dyrket med 4% O₂ i gassfasen i forsøk A. Så lenge cellene hadde full tilgang på oksygen var respirasjonen kraftig forøket for celler som ble bestrålt sammenlignet med ubestrålte celler.

Gjennomsnittlig cellulær respirasjon var 687 fmol/(celle·time) og respirasjonen per celle rett før omsetting varierte mellom ca. 300 – 550 fmol/(celle·time), dvs i samme område som for ubestrålte T98G celler.

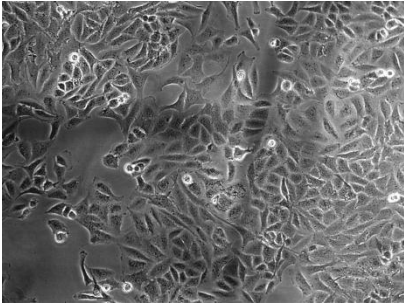
4.5.2 Antall celler

Antallet celler økte eksponentielt og celleveksten nådde en platåfase når flaskene ble tilstrekkelig konfluente. Cellene opplevde ulik varighet av lag-fasen. Doblingstidene for

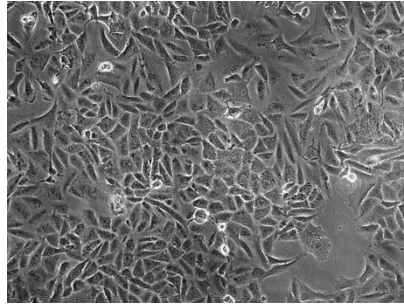
T98G celler bestrålt med 0,53 Ci/mol [³H]-valin i mediet varierte usystematisk mellom 20,4 og 26,7 timer med et gjennomsnitt på $23,1 \pm 2,2$ timer (se 3.4 s. 30). Det virker ikke som om langvarig syklisk hypoksi kombinert med lavdosestråling med 0,53 Ci/mol [³H]-valin i mediet endret veksthastigheten til T98G celler i løpet av de 49 dagene forsøket varte (*Tabell 6* s. 59). Til sammenligning var gjennomsnittlig doblingstid for ubestrålte T98G celler dyrket i 4% oksygen i gassfasen fra forsøk A $23,5 \pm 2,8$ timer. Dette er ikke signifikant forskjellig fra doblingstidene i dette forsøket, der T98G celler ble bestrålt med 0,53 ci/mol (tosidig Student's t-test gir $p = 0,73$).

Tabell 6: Tabellen viser doblingstider til T98G celler bestrålt med 0,53 Ci/mol som ble dyrket med 3,5% oksygen i gassfasen. For detaljer om beregningene henvises det til kapittel 3.4. s. 30.

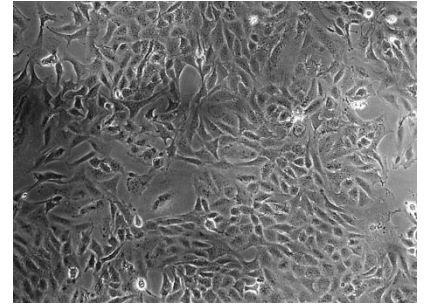
Tidsintervall (Timer)	T_D 0,53 Ci/mol
1 - 90	21
92 - 162	26,7
169 - 258	26,7
316 - 331	20,4
333 - 428	23,9
525 - 595	21,7
599 - 668	24,8
672 - 764	23,9
765 - 834	25,7
842 - 932	21,7
933 - 1005	21
1008 - 1098	22,4
1100 - 1175	21



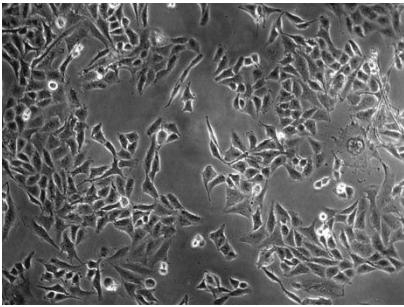
A) 0,53 Ci/mol Dag 7



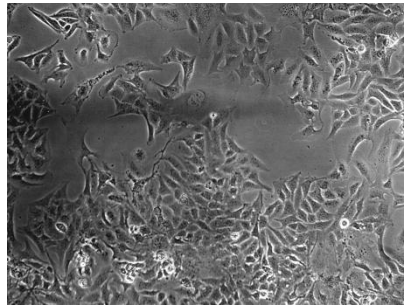
B) Ubestrålt Dag 7



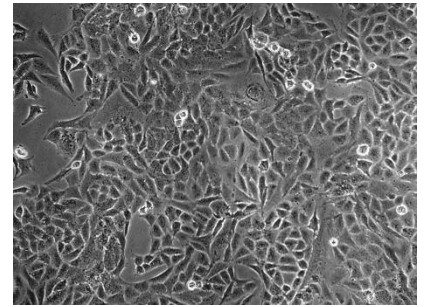
C) 0,53 Ci/mol Dag 28



D) Ubestrålt Dag 28



E) 0,53 Ci/mol Dag 49

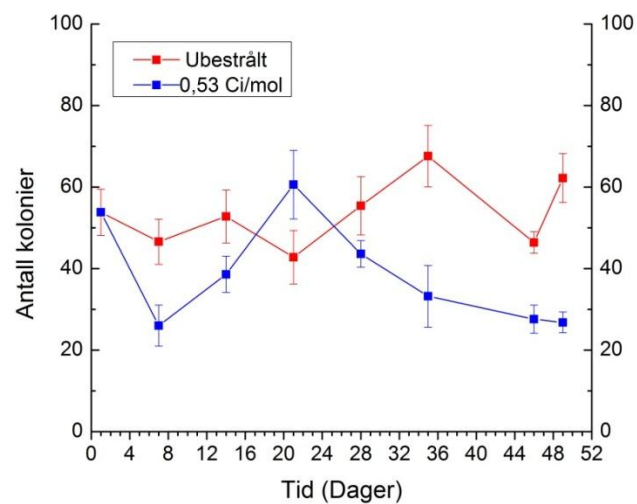
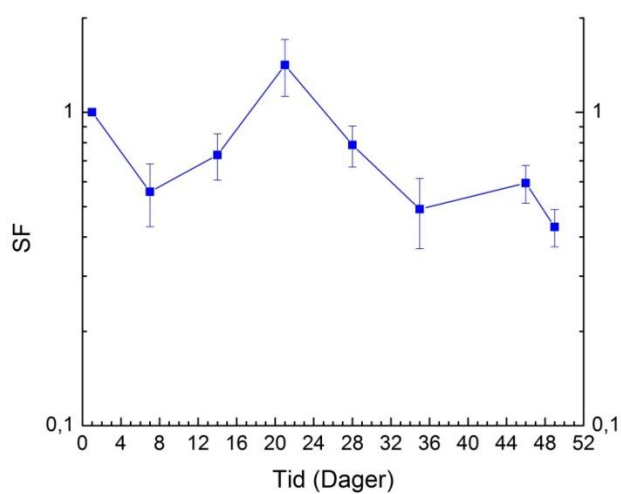


F) Ubestrålt Dag 49

Figur 24: Figuren viser bilder av ubestrålte T98G celler og T98G celler bestrålte med 0,53 Ci/mol. Cellene ble dyrket under hypoksiske forhold med 3,5% oksygen i gassfase. Bildene er tatt fra noen av dagene det er utført koloni-forsøk. Bildene er tatt fra forsøk E.

4.5.3 Koloni-forsøk

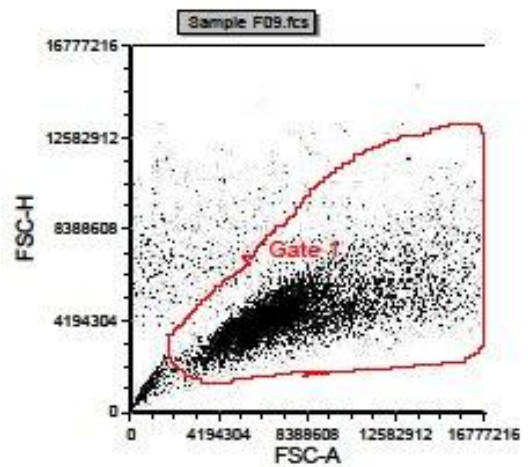
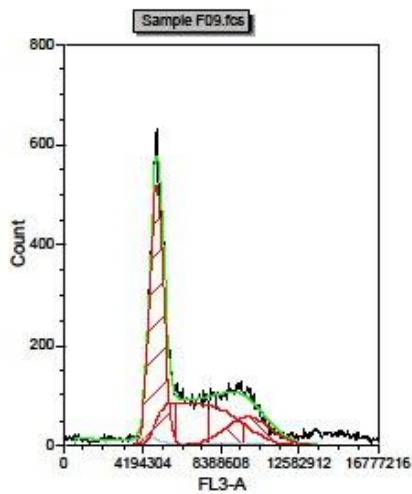
Cellene ble sådd ut til koloniforsøk en gang i uken, der 200 celler ble sådd ut per flaske. Resultatene vises i *Figur 25*, s. 61. Data i *Figur 25* representerer samme forsøksbetingelser som i *Figur 20* B) og C) s. 51 (forsøk D). En sammenligning av *Figur 25* A) og B) s. 61 og *Figur 20* B) og C) s. 51 viser at i begge forsøkene varierte overlevelsesfraksjonen mellom omkring 50-60% og opp til over 100%. I forsøk D (*Figur 20* s. 51) var overlevelsesfraksjonen 55% på dag 49, mens overlevelsesfraksjonen i forsøk E (*Figur 25*) var 45% på dag 49.



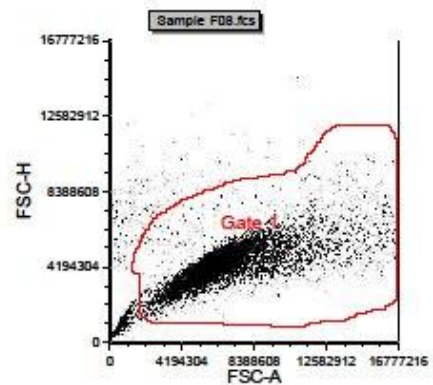
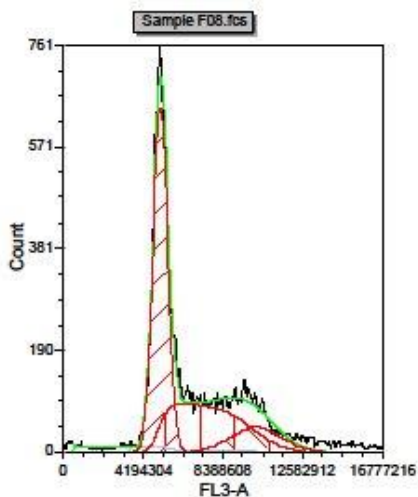
Figur 25: Panel A) viser overlevelsesfraksjonen for bestrålte relativt til ubestrålte T98G celler fra forsøk E og panel B) viser antall levedyktige kolonier i ubestrålte og bestrålte celleflasker der det ble sådd ut 200 celler per flaske. Data er hentet fra forsøk E, der både ubestrålte T98G celler samt T98G celler bestrålt med 0,53 Ci/mol ble dyrket kontinuerlig med 3,5% oksygen i gassfasen.

4.5.4 Resultat fra flowcytometri-målinger fra forsøk E

Resultatene fra flowcytometri-målinger på T98G celler viste at bestrålingen med 0,53 Ci/mol ikke så ut til påvirke cellenes fordeling i cellyklus (*Figur 26 s. 62 og Tabell 7 s. 62*).



A)



B)

Figur 26: Data fra flowcytometri for T98G celler dyrket kontinuerlig i 3,5 % i gassfasen. A) Bestrålte T98G celler (0,53 Ci/mol). CV for G1: 7,8. CV for G2: 14,5. B) Ubestrålte T98G celler. CV for G1: 7,3. CV for G2: 12,6. Data er hentet fra forsøk E.

Tabell 7: Cellesyklusfordelingen for bestrålte (0,53 Ci/mol) og ubestrålte T98G celler som ble dyrket med 3,5% oksygen i gassfasen. Data er hentet fra flowcytometri-resultat fra forsøk E.

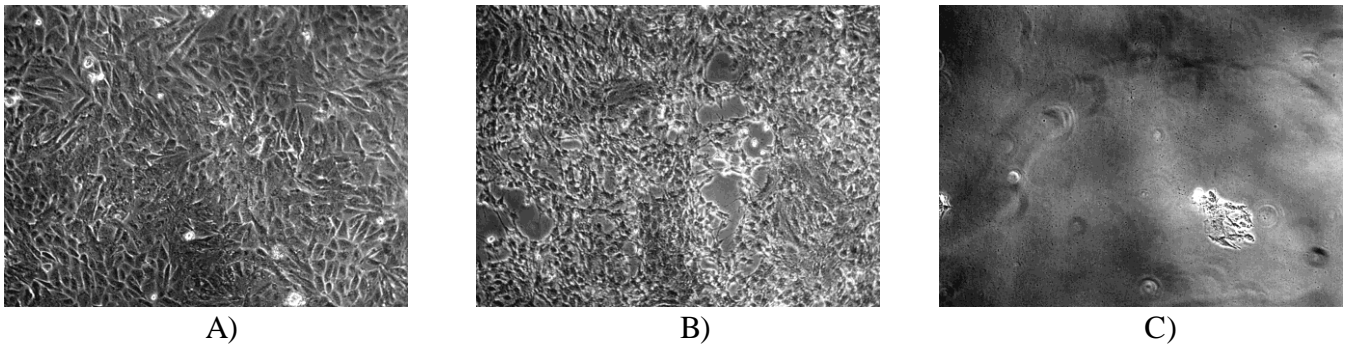
	% G1	% G2	% S
Bestrålte	45	15	40
Ubestrålte	52	12	36

4.6 Forsøk F: Konfluens-forsøk på T98G-celler med 3,5% O₂ i gassfase

Det ble gjort en undersøkelse av hva som skjer etter langvarig konfluens hvor cellene kun fikk et medium-skift istedenfor en omsetting. Dette ble gjort på ubestrålte T98G celler samt på T98G celler bestrålt med 0,27 og 0,53 Ci/mol dyrket med 3,5% O₂ i gassfasen. Cellene hadde vært dyrket i en hypoksiboks innstilt på 3,5 % O₂ i 7 uker da forsøket ble utført.

Da cellene hadde stått 2 dager etter det skulle ha vært foretatt en omsetting løsnet de fra flasken (*Figur 27* s. 63). Det var blitt sett i tidligere forsøk at cellene løsnet fra flasken hvis de ble for konfluente. Dette skjedde spesielt under hypoksiske forhold. Det var også observert at hvis en konfluent celleflaske ble satt ned i hypoksiboksen, ble cellene straks dårlige og løsnet. Det virker som om hypoksiske T98G celler ikke tålte konfluens.

I dette forsøket overførte jeg 1 ml av mediet med løsnete celler over til en ny celleflaske med 4 ml frisk RPMI. Disse flaskene ble satt i en inkubator med luft. Cellene som hadde løsnet festet seg igjen og begynte å dele seg. Dette skjedde for ubestrålte og for bestrålte celler. En mulig tolkning av dette er at cellene som løsner ikke løsner fordi de er døde, og en interessant tanke er at prosessen har sammenheng med de samme mekanismene som de som inngår i en metastaseringsprosess.

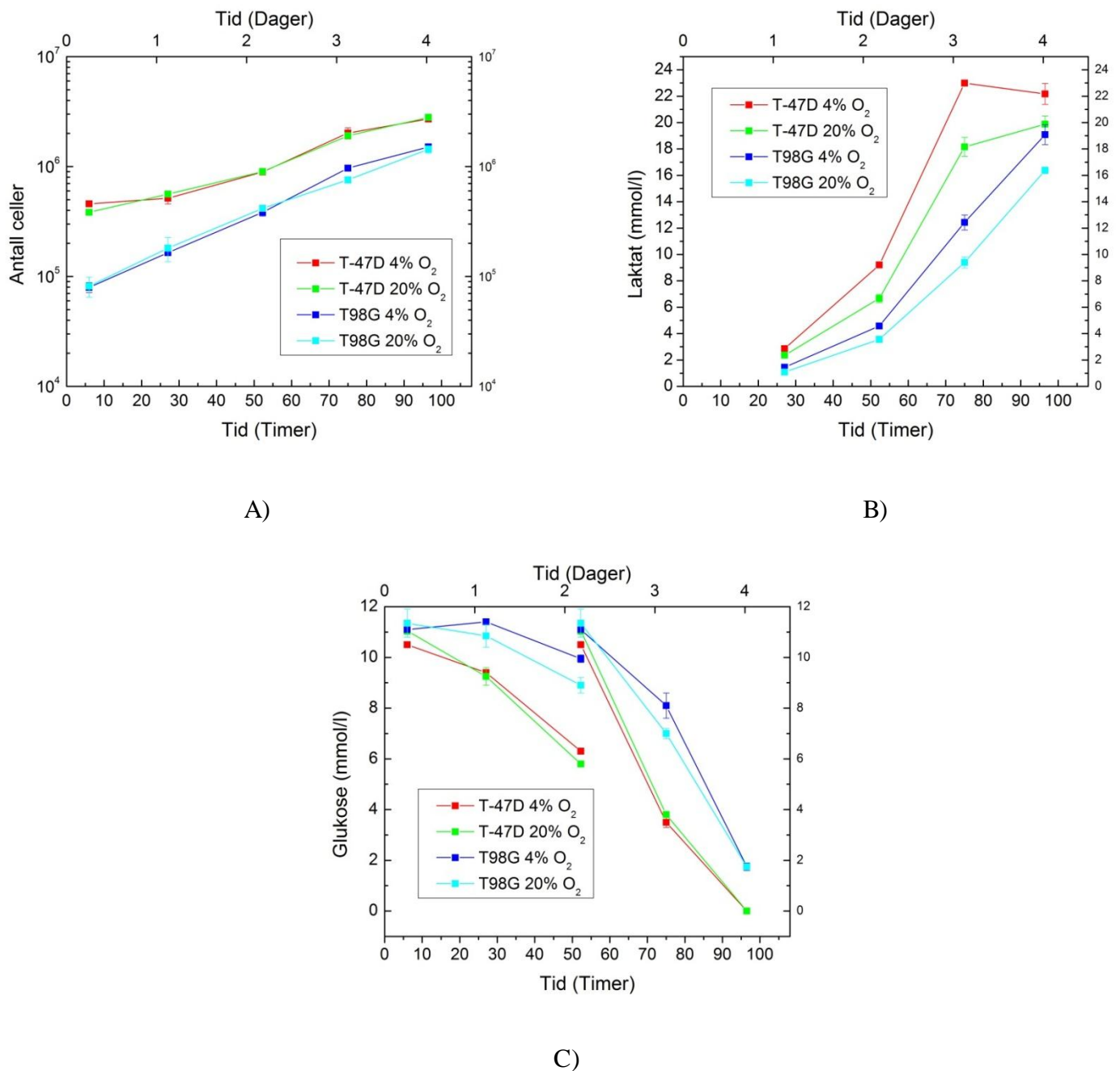


Figur 27: Figuren viser T98G celler dyrket med 3,5% oksygen i gassfasen i 7 uker. Konfluente flasker fikk et medium-skift i stedet for en omsetting. Panel A) viser cellene en dag etter omsetting skulle ha vært foretatt og panel B) viser cellene to dager etter omsetting skulle vært foretatt. Panel C) er tatt kort tid etter panel B) og cellene har løsnet. Bildene som vises er for T98G celler bestrålt med 0,27 Ci/mol, men lignende skjedde for ubestrålte kontrollceller.

4.7 Forsøk G: Metabolisme-forsøk på ubestrålte T98G og T-47D celler i 20% O₂ og 4% O₂

Det ble gjort tre forsøk hvor hensikten var å studere parametere relatert til cellenes metabolisme (navngitt G-I, G-II og G-III). Laktat, glukose og pH ble målt på to ulike celletyper, T98G og T-47D. Målingene ble gjort på celleflasker som ble oppbevart i hhv. 20%

O₂ og 4% O₂. Dette ble gjort for å studere eventuelle effekter av hypoksi på cellenes metabolisme. Forsøkene gav lignende resultater og forsøk G-II blir presentert i sin helhet. Resultatene fra forsøk G-I og G-III er oppført i vedlegg E.



Figur 28: Figuren viser resultatene fra forsøk G-II der T-47D og T98G celler ble dyrket med hhv luft (20%) og 4% oksygen i gassfasen. Panel A) viser antall celler som funksjon av tid etter forsøksstart. Panel B) viser akkumulert laktat i mediet. Akkumulert laktat beregnes ved å subtrahere laktat som allerede finnes i mediet og deretter korrigerer for mediumsift på dag 2. Panel C) viser tilgjengelig glukose i mediet, der det korrigeres for et mediumsift på dag 2.

Antall celler

Antallet celler i flasken ble estimert ut fra telling av celler på bilder som ble tatt av cellene daglig. For detaljert prosedyre henvises det til 3.3.2. Celletelling s. 28. *Figur 28 A* s. 64 viser antall celler som funksjon av tid siden forsøksstart i et semi-logaritmisk plot. Figurene viser at det ikke var noen tydelig forskjell på celleveksten ved 4% sammenlignet med 20% O_2 i gassfasen. Videre hadde ikke T98G noen lag-fase, men gikk rett i eksponentiell vekst etter omsetting. Begge celletypene hadde tendenser til en plåta-fase når celleflaskene nærmet seg konfluens. Dobblingstiden er i snitt noe lavere for de hypoksiske cellene som dyrkes i 4% O_2 enn for cellene som dyrkes i luft med 20% O_2 , men denne forskjellen er ikke signifikant forskjellig (tosidig Student's t-test gav $p=0,71$ og $p=0,40$ for hhv T-47D og T98G celler). Det er en del spredning i data, dette hvilket ses i standardavvikene for doblingstidene. Dette kan muligens skyldes usikkerheten i metoden brukt for å anslå antallet celler i flaskene.

Tabell 8: Dobblingstidene til celler av typen T-47D og T98G ble dyrket i 4 dager med enten 20% eller 4% oksygen i gassfasen. Verdiene fremkommer ved å anta eksponentiell vekst, deretter gjøres en lineær regresjon som brukes til å beregne doblingstidene (se 3.4 s. 30)

	G-I	G-II	G-III	Gjennomsnitt	Standardavvik
T-47D 4% O_2	26,0 t	28,7 t	23,8 t	26,17 t	2,00 t
T-47D 20% O_2	26,8 t	29,7 t	24,5 t	27,0 t	2,13 t
T98G 4% O_2	19,3 t	21,6 t	18,9 t	19,93 t	1,19 t
T98G 20% O_2	20,8 t	23,2 t	19,6 t	21,20 t	1,50 t

Laktatmålinger

Laktatmengden i mediet ble målt hver dag (*Figur 28 B* s. 64).

RPMI-mediet som vi bruker på cellelaben på BMF-gruppen inneholder laktat. Det var interessant å se på hvor mye laktat som ble skilt ut i mediet av cellene. Det var derfor hensiktsmessig å trekke fra laktat-verdien som allerede fantes i mediet, siden laktat som allerede fantes i mediet nødvendigvis ikke var produsert av cellene. I *Figur 28 B* er dette gjort. Cellene fikk mediumskift på dag 2 etter utsåing, og dette er korrigert for ved å legge til verdien for laktat i mediet fra dag 2 før medium-skiftet til verdiene som ble målt dag 3 og 4. Det vi ser i *Figur 28 B*) er mengden laktat som cellene har produsert og sluppet ut i mediet. Denne verdien økte relativt lineært, frem til den siste dagen, der det for T-47D celleflaskene ikke ble produsert mer laktat fra dag 3 til dag 4. Dette skyldes antagelig glukose-mangel (*Figur 28 C* s. 64). Det virker som om det i alle forsøkene er noe høyere utslipp av laktat for cellene dyrket med 4% O_2 i gassfasen i forhold til cellene dyrket luft.

Forsøk G-III (Vedlegg E) skilte seg fra forsøk G-I (Vedlegg E) og G-II. I forsøk G-III ble cellene inkubert i 4 timer slik at de fikk festet seg, før det ble gjort et mediumskift på alle celleflaskene. Dette ble startpunktet for forsøk G-III. Hensikten med dette mediumskiftet var å undersøke om prosessen der cellene fester seg til celleflasken påvirket de første målingene

mine. Det kan tenkes at en slik prosess krever ekstra energi og hvordan dette energiforbruket er, er ikke ennå fullstendig kartlagt. Ved å studere forskjellene i laktat-verdier i mediet dag 0 og dag 1, ser dette ikke ut til å ha påvirket målingene mye (Tabell 9 s. 66). Det virker ikke som om det er en systematisk forskjell i laktat-dataene, og dette gjelder spesielt når standardavvikene tas i betraktning.

Tabell 9: Laktat-verdier for dag 0 og dag 1. Data er hentet fra forsøk G-I og G-III.

	T-47D 4% O ₂		T-47D 20% O ₂		T98G 4% O ₂		T98G 20% O ₂	
Dag 0	G-I	G-III	G-I	G-III	G-I	G-III	G-I	G-III
	0,46 ±0,1	0,15 ± 0,03	0,15 ± 0,2	0,1 ± 0,08	0,32 ± 0,07	0,12 ± 0,09	0,14 ± 0,07	0,12 ± 0,05
Dag 1	G-I	G-III	G-I	G-III	G-I	G-III	G-I	G-III
	2,0 ± 0,1	2,2 ±0,3	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,2	1,4 ± 0,08	1,5 ± 0,07	1,0 ± 0,2

Glukose

Glukosekonsentrasjonen i mediet falt raskere etter hvert som cellene delte seg og flere celler brukte glukose i omsetningen av energi. T-47D cellene brukte opp all glukose som fantes tilgjengelig i mediet, uansett om det var 4% eller 20% O₂ i gassfasen. Dette kan være årsaken til at de hypoksiske T-47D-cellene i alle forsøkene har vist tendenser til å løsne på dag 4. T98G cellene hadde ikke brukt opp all den tilgjengelige glukosen, men flaskene var heller ikke helt konfluente på dag 4. Dette gjaldt også T-47D celler, men flakene inneholdt allikevel flere T47-D celler siden disse er mindre (se 5.2 s. 71 for nøyaktige tall). Det ser ikke ut til å være en forskjell mellom glukoseforbruket til cellene med 4% og 20% O₂ i gassfasen. Glukosekonsentrasjonen i mediet falt raskere for T-47D enn for T98G celler og særlig etter mediumskiftet (Figur 28 C s.64)

Forsøk G-III antydte at prosessen der cellene festet seg ikke påvirket glukose-målingene som ble gjort dag 0 og 1, ettersom en sammenligning av disse målingene fra forsøk G-II og G-III, ikke viser noen tydelig forskjell mellom glukosemålingene (dag 0 og 1) mellom de to forsøkene (Tabell 10 s. 67).

Tabell 10: Glukose-verdier for dag 0 og dag 1. Data er hentet fra forsøk G-II og G-III.

	T-47D 4% O ₂		T-47D 20% O ₂		T98G 4% O ₂		T98G 20% O ₂	
Dag 0	G-II	G-III	G-II	G-III	G-II	G-III	G-II	G-III
	10,5 ±0,1	11,7 ± 0,1	11,1 ± 0,1	11,6 ± 0,2	11,1	11,6 ± 0,2	11,4 ± 0,6	11,1 ± 0,7
Dag 1	G-II	G-III	G-II	G-III	G-II	G-III	G-II	G-III
	9,4 ± 0,2	10,5 ±0,2	9,3 ± 0,4	10,4 ± 0,1	11,4	11,5 ± 0,1	10,9 ± 0,5	10,9 ± 0,2

Endringen i laktatverdier fra dag til dag relativt til glukoseforbruk fra dag til dag er beregnet (Tabell 11 s. 67). De hypoksiske cellene produserte 2 laktatmolekyler for hvert glukosemolekyl som ble tatt opp, hvilket indikerer at cellene er glykolytiske. Den høye verdien for T98G celler dyrket med 4% O₂ i gassfasen fra dag 0 til dag 1 kommer av at det for disse cellene ikke var noe glukose-opptak fra dag 0 til dag 1, mens laktat-mengden produsert var sammenlignbar med den for T-47D dyrket i hypoksiske og aerobe forhold, samt T98G dyrket i aerobe forhold.

Tabell 11 : Tabellen viser daglig økning i laktatkonsentrasjon i mediet relativt til daglig nedgang av glukosekonsentrasjon i mediet for T-47D og T98G celler dyrket med 4% oksygen i gassfasen samt 20% oksygen i gassfasen.

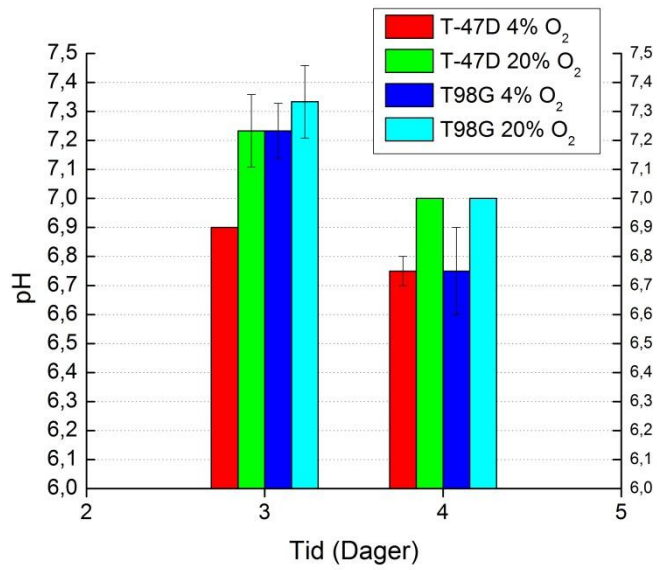
Dag	T-47D 4% O ₂	T-47D 20% O ₂	T98G 4% O ₂	T98G 20% O ₂
1	1,36 ± 0,16	1,05 ± 0,17	14,45 ± 0,85	1,66 ± 1,2
2	2,05 ± 0,15	1,25 ± 0,16	2,16 ± 0,23	1,27 ± 0,37
3	1,72 ± 0,05	1,49 ± 0,10	2,31 ± 0,38	1,30 ± 0,11
4	-0,23 ± 0,23	1,10 ± 0,25	1,05 ± 0,17	1,33 ± 0,11

pH

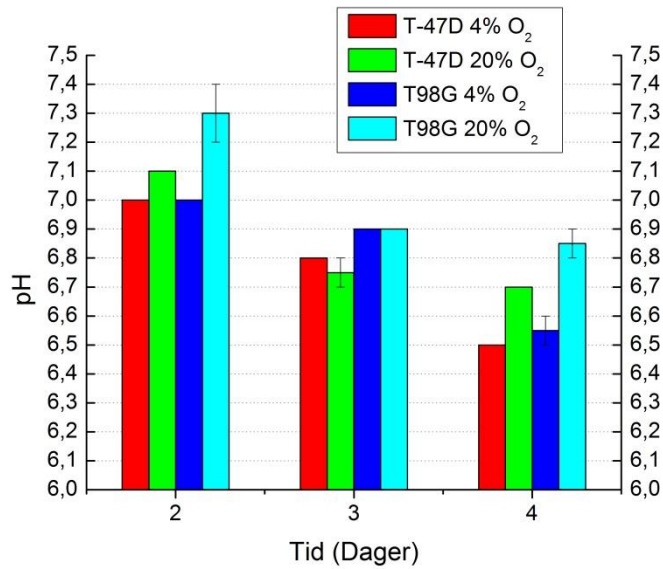
Da forsøk G-II ble gjennomført ble pH i mediet også målt. Disse målingene ble først gjennomført på dag 3, altså én dag etter mediumskift. På dette tidspunktet var cellene i eksponentiell vekst og celleantallet økte raskt. Alle de hypoksiske cellene ble utsatt for en svært lav pH (6,75) på dag 4, mens de veloksygenerte cellene hadde en pH på 7,0 på dag 4. Hypoksiske T-47D celler hadde en lav pH allerede på dag 3 (6,9) og var utsatt for lav pH

lenger enn de hypoksiske T98G cellene (*Figur 29 s. 69*). Målingene ble gjort på flere separate celleflasker og de data der usikkerhet ikke vises er dette fordi målingene som ble gjort med pH-meteret for de ulike flaskene i den gitte gruppen, var like. Usikkerheten i pH-meteret er 0,05.

I forsøk III ble pH målt rett før mediumskiftet dag 2 i tillegg til dag 3 og 4. Målingene fra dag 2 var ikke lave for noen av celletypene. Cellene dyrket med 4% O₂ i gassfasen hadde stadig lavere pH enn de dyrket i luft, men også de sistnevnte nådde lave pH-nivåer (6,85 for T98G og 6,7 for T-47D) på dag 4. Cellene dyrket med 4% O₂ i gassfasen hadde en pH på 6,5 (T-47D) og 6,55 (T98G) dag 4. Dette er en særdeles lav pH. Det observeres altså i dette forsøket at det var forskjell på pH i mediet til de cellene som ble dyrket i hypoksiboksen sammenlignet med de dyrket i luft.



A) Forsøk II. Januar 2011



B) Forsøk III. April 2011

Figur 29: pH-målinger for T-47D og T98G fra dag 2, 3 og 4. Dataene er fra A) forsøk II og B) forsøk III. Målingene ble gjort på hypoksiske og normaloksygenererte celler.

5 Diskusjon

5.1 Optimal oksygenkonsentrasjon i hypoksiboksen

Det hypoksiske mikromiljøet som skulle brukes i forsøkene måtte tilfredsstillende to betingelser; cellene måtte utsettes for en tilstrekkelig lav oksygenkonsentrasjon slik at cellulære effekter av hypoksi inntraff. Samtidig kunne ikke hypoksien være så streng at cellene ikke var levedyktige.

Når cellene ble dyrket med 4% O₂ i gassfasen var disse kravene tilfredsstillende. Dette ble vist i forsøk A (se kapittel 4.1 s. 35), der ubestrålte T98G celler ble dyrket med denne gassfasekonsentrasjonen i over 4 uker hvor cellene var levedyktige, samt opplevde en pericellulær oksygenkonsentrasjon (POC) under 0,1% O₂. Pericellulære oksygenkonsentrasjoner på under 0,1% tilsvarer oksygenkonsentrasjoner som er lavere enn hva de fleste normalvev opplever og er såpass lavt at cellulær respirasjon blir betydelig hindret (Froese 1962).

Det har blitt brukt tilsvarende oksygenkonsentrasjon (4% oksygen i gassfasen) for T-47D brystkreftceller (Pettersen et al. 2005; Pettersen et al. 2007). T-47D celler var da levedyktige, selv om oksygenkonsentrasjonen pericellulært sank til under 0,1% O₂ ved en konfluent celleflaske.

Når T98G celler ble dyrket med 4% O₂ i gassfasen samt bestrålt med 1,6 Ci/mol [³H]- valin i mediet ble det ikke tatt opp oksygenprofiler (forsøk B s. 40). Dermed var det ikke mulig å undersøke effektene på cellulær respirasjon ved en kombinert behandling med stråling og hypoksi. Det ble dog testet om behandlingen gav utslag på cellenes kolonidannende evne, hvor overlevelsesfraksjonen, etter noen uker med variasjon, stabiliserte seg på 70-80%. Upubliserte data med koloniforsøk gjort på T-47D celler for å undersøke cellenes evne til å danne kolonier viste at da disse cellene ble bestrålt med 0,015 Gy/time og dyrket kontinuerlig med 4% O₂ i gassfasen falt overlevelsen til 1% overlevende fraksjon.

Det ble dermed konkludert med at ingen synergistisk effekt ble observert på T98G cellers kolonidannende evne når disse ble dyrket med 4% O₂ i gassfasen og samtidig ble kontinuerlig bestrålt med 1,6 Ci/mol [³H]- valin i mediet. Den manglende effekten kunne ha skyldtes at cellene ikke ble utsatt for streng nok hypoksi, og derfor ble det valgt å sette ned oksygenkonsentrasjonen i gassfasen til først 3% O₂, for å siden oppjustere dette til 3,5 % O₂. Det var mulig at 3% O₂ var på grensen til hva cellene i det hele tatt kunne tåle. Det viste seg senere at 1,6 Ci/mol [³H]- valin i mediet tilsvarte en doserate på 0,053 Gy/time, som var mye høyere enn den doseraten som ble benyttet på T-47D cellene i Pettersen et Al. (2007) sitt forsøk.

Forsøk D og E (se kapittel 4.4.49 og 4.5 Forsøk E: T98G-celler bestrålt med 0,53 Ci/mol i 3,5% O₂ s. 53) viste at T98G celler tålte å bli dyrket i med 3,5% O₂ i gassfasen, selv om POC for bestrålte celler (0,53 Ci/mol) falt under 0,1% O₂ ved omtrent hver passasje.

Det ble ikke tatt opp oksygenprofiler på ubestrålte kontrollceller som ble dyrket med 3,5% O₂ i gassfasen, men PE for disse cellene holdt seg stabil, som vist i koloniforsøk fra bl.a. forsøk D (Figur 20 C s. 51). Dermed virker det rimelig at hypoksitoleransen til T98G celler i alle fall ikke er lavere enn hypoksitoleransen til T-47D celler, og mest sannsynlig tåler T98G hjernekreftceller hypoksi bedre enn T-47D brystkreftceller, dette tas opp i slutten av i avsnitt 5.4.

Studier gjort på brystkreftcellelinjen, MCF-7 celler, viste at MCF-7 celler hadde en lavere hypoksitoleranse enn T-47D og T98G celler, da oksygenkonsentrasjonen i hypoksiboksen måtte opp på 8% O₂ i gassfasen for at cellene skulle overleve. Pericellulær oksygenkonsentrasjon sank da til 0,2% O₂ (Stenersen Espe 2009).

5.2 Forskjeller i pericellulær oksygenkonsentrasjon (POC) og respirasjon per celle for ubestrålte og bestrålte (0,53 Ci/mol) T98G celler dyrket i syklisk hypoksi

Oppsettet som ble brukt for å måle oksygengradienten nedover i mediet er et enestående oppsett for å kunne observere pericellulær oksygenkonsentrasjon og samtidig monitorere cellulær respirasjon, mens cellene dyrkes kontinuerlig. Dette muliggjør et studium av cellulære effekter av moderat hypoksi i kombinasjon med lavdoserate-bestråling over flere uker. I dette studiet er oksygengradienten ned gjennom mediet og ned til flaskebunnen målt for bestrålte (0,53 Ci/mol) og ubestrålte T98G hjernekreftceller som ble dyrket under hypoksiske forhold med hhv 3,5 og 4% O₂ i gassfasen. Resultatene viste at cellene opplever en *syklisk hypoksi*, hvor POC varierte syklisk i løpet av en vanlig passasje, fra utsåing til omsetting. Dette gjaldt både ubestrålte og bestrålte T98G celler.

Diffusjon av oksygen gjennom mediet begrenset tilgangen på oksygen per celle, som medførte at POC sank når celletettheten i flasken økte. Ved helt konfluente celleflasker sank POC under 0,1 % O₂ for både bestrålte og ubestrålte celler (Figur 12 s. 37 og Figur 22 s. 56). I både forsøk A (ubestrålte T98G celler dyrket med 4% O₂ i gassfasen) og E (T98G celler bestrålt med 0,53 Ci/mol og dyrket med 3,5% O₂ i gassfasen) ble det observert at mediumskift ofte førte til at POC falt raskere. Dette skyldtes sannsynligvis at celleveksten økte hurtigere etter medium-skift, grunnet forbedrede vekstforhold i det nye mediet. Det var sannsynligvis en slik økning i cellevekst som førte til at POC sank raskere etter mediumskift.

POC sank like lavt for de ubestrålte som for de bestrålte T98G cellene, men ved tilsvarende lav POC (under 0,1 % O₂) var celletettheten nesten 2 ganger høyere for de ubestrålte i forhold

til de bestrålte T98G cellene. De bestrålte T98G cellene opplevde altså stadig lave pericellulære oksygenkonsentrasjoner over lengre tid enn de ubestrålte.

Denne forskjellen i celleantall ved tilsvarende lav POC for ubestrålte og bestrålte T98G celler indikerer at hvis både ubestrålte T98G celler og T98G celler som kontinuerlig bestråles med en lav doserate (0,018 Gy/time) dyrkes med lik oksygenkonsentrasjonen i gassfasen, så vil de bestrålte T98G cellene oppleve en strengere hypoksi enn de ubestrålte T98G cellene. Dette må skyldes økt respirasjon induisert av bestrålingen og gjenspeiles i resultatene for respirasjon per celle (*Figur 12 s. 37* og *Figur 22 s. 56*).

Respirasjonsforløpet til de ubestrålte cellene varierer mellom en maksimalverdi rett etter omsetting på 792 fmol/(celle·time) og til 100-400 fmol/(celle·time) rett før en omsetting. Gjennomsnittlig cellulær respirasjon for de ubestrålte T98G cellene ligger på 396 fmol/(celle·time). De bestrålte cellene har en tydelig forhøyet respirasjon i forhold til de ubestrålte cellene med en maksimalverdi på 1294 fmol/(celle·time) og en gjennomsnittlig verdi på 687 fmol/(celle·time). Dette er hhv. 1,6 og 1,7 ganger mer enn for de ubestrålte cellene. Den forhøyede cellulære respirasjonen antas å skyldes lavdoseratebestrålingen.

Respirasjonen per celle rett før omsetting, da cellene ikke hadde tilstrekkelig oksygen tilgjengelig til å opprettholde full cellulær respirasjon, varierte for de bestrålte T98G cellene mellom ca. 300 – 550 fmol/(celle·time), dvs i omtrent samme område som for ubestrålte T98G celler.

Ved omstendigheter der det er mye tilgjengelig oksygen, som i luft (20% O₂), vil respirasjonsraten per celle være tilnærmet konstant (Marshall et al. 1986). En synkende respirasjon per celle kan tolkes som at tilgjengelig oksygen begrenses av diffusjon. Den pericellulære oksygenkonsentrasjonen slakker ut når oksygenkonsentrasjonen blir lav nok, på grunn av den lave cellulære respirasjonen.

Oksygengradienten nedover i mediet er tidligere målt for T-47D og MCF-7 brystkreftceller der cellene ble dyrket kontinuerlig i en hypoksiboks med hhv. 4,6 og 8% O₂ i gassfasen. For T-47D celler ble det funnet at pericellulær oksygenkonsentrasjon (POC) falt raskere for celler bestrålt med en doserate på 0,015 Gy/time enn for ubestrålte celler, trolig grunnet en forhøyet cellulær respirasjon hos de bestrålte i forhold til de ubestrålte T-47D cellene. Cellulær respirasjon var forhøyet med en faktor på 2 -4 for de bestrålte i forhold til de ubestrålte cellene. De bestrålte cellene hadde en respirasjon per celle som startet på 700 fmol/(celle·time) og falt til 200 fmol/(celle·time) over måleperioden på 90 timer, mens ubestrålte celler startet med en respirasjon per celle på 200 fmol/(celle·time) som falt sakte over en tilsvarende måleperiode. POC for de ubestrålte cellene kunne være like lav som for de bestrålte cellene, men da var celletettheten 3 ganger høyere (Pettersen et al, 2007). Disse resultatene er i overensstemmelse med resultatene som er funnet i denne oppgaven.

Forsøkene gjort på MCF-7 celler viste lignende trender med forhøyet respirasjon per celle for bestrålte celler. Forsøkene, der MCF-7 celler ble dyrket i en hypoksiboks, ble gjort ved ulike oksygenkonsentrasjoner i gassfase. Ved 12% O₂ i gassfasen var respirasjon per celle relativt

konstant, og det kunne konkluderes med at det da var tilstrekkelig tilgang på oksygen for cellene. Ved 8% oksygen i atmosfæren hadde cellene et lignende respirasjonsforløp som det funnet for T98G hjernekreftceller dyrket under forhold av syklisk hypoksi. Maksimal respirasjon for celler bestrålt med 0,027 Gy/time var 812 fmol/(celle·time) og 643 fmol/(celle·time) for ubestrålte celler (Stenersen Espe 2009). Respirasjon per celle for MCF-7 celler var altså forhøyet ved lavdoserate-bestråling.

Resultatene for T98G celler dyrket i 4 og 3,5% O₂ i gassfasen, for både ubestrålte og bestrålte (0,018 Gy/time) celler er altså helt i tråd med publiserte resultater for respirasjonen per celle og pericellulær oksygenkonsentrasjon for T-47D og MCF-7 brystkreftceller. Det er dermed vist for tre ulike humane kreftcelle-linjer at kontinuerlig lavdoseratebestråling i kombinasjon med *syklisk hypoksi* fører til forhøyet cellulær respirasjon i forhold til ubestrålte kontrollceller som dyrkes under tilsvarende forhold.

Cellulær respirasjon varierer med cellestørrelse, tetthet av mitokondrier og forandringer i metabolsk tilstand⁵ (Renner et al. 2003). Cellestørrelsene til T98G (d= 19,4 μm), MCF-7 (d=17,8 μm) og T-47D (d=13,8 μm) reflekteres i verdiene for cellulær respirasjon, der cellulær respirasjon øker med cellestørrelse.

5.3 Usikkerheter i respirasjonsforsøkene

Oksygensensorene som brukes til å måle oksygenkonsentrasjonen har en spiss på kun 25μm. Dette er nødvendig for ikke å skape bevegelse i mediet, men det følger også at tuppen lett kan brette eller bli skadet, dermed vil ikke sensoren virke optimalt. Oksygensensoren er også utsatt for elektrisk drift, som korrigeres for av programvaren til Unisense hver gang cellene håndteres. Elektrisk drift på sensoren i tidsrommet mellom håndtering av cellene var individuell for proben, og ikke alltid lineær. Elektrisk drift på sensoren mellom håndteringene var alltid under 10% og ofte mindre enn dette. En slik elektrisk drift regnes derfor ikke som en stor kilde til usikkerhet, siden det korrigeres for ganske effektivt.

Ved forsøk der det ble gjort oksygenmålinger på en celleflaske, stod denne flasken uten kork mens profilene ble tatt opp, dermed var denne celleflasken utsatt for fordamping av mediet. Betydelig fordamping medførte et dårlig miljø for cellene, da mediet ble mer konsentrert. Fordamping av mediet førte også til at diffusjonslengden til oksygen gjennom mediet ble kortere. Dette problemet ble minimert ved å sette ut 4-5 glasskåler inne i boksen og fylle disse med sterilisert milliQ-vann. Betydelig fordamping av medium i profilflasken skjedde en gang i løpet av forsøk A (*Figur 13 F s.38*), da de fleste cellene i celleflasken det ble målt oksygenprofiler fra døde.

Ved forsøk i hypoksiboksen var det viktig at oksygenkonsentrasjonen i gassfasen ikke varierte. Det var viktig at det alltid var komprimert nitrogen tilgjengelig på laboratoriet, som ble brukt sammen med karbondioksid og luft til å kontrollere oksygenkonsentrasjonen i

⁵ Stimulert ATP-omsetning eller metabolsk arrest.

gassfasen. I forsøk A) førte gassmangel i et kort tidsrom til en tidvis økning av konsentrasjonen i gassfasen fra 4 til 5 % oksygen, men problemet kom raskt under kontroll. Ekstra oksygen kunne også komme i kontakt med cellene gjennom utstyret som ble brukt ved håndtering av cellene. Plastutstyr ble satt inn en uke i forveien og medium og trypsin som skulle brukes på cellene ble satt inn 1-2 dager i forveien. Cellene kunne også få tilgang på ekstra oksygen hvis mediet ikke var i likevekt med hypoksiboksens gassfase, men dette var ikke et problem i denne oppgaven.

En av betingelsene for å bruke Ficks 1. lov (ligning 20) til å beregne cellulær respirasjon er at mediet skal være stillestående. Oksygensensorene som ble brukt har en tupp på 25 μm . I tidligere publikasjoner har det blitt brukt en tynnere oksygensensor, med en tupp på 10 μm (Pettersen et al. 2005). En tykkere sensor vil føre til mer bevegelse i mediet når profilene tas opp. Det ble observert at profilene tidvis var buet, som er et tegn på sirkulasjon i mediet. Dette problemet ble løst ved å øke ventetiden til oksygenproben etter hver stegvise nedsenking i mediet før målingen ble gjennomført.

Antall celler i flasken som det tas opp profiler på ble brukt i beregningene av cellulær respirasjon. Bildet av cellene ble kun tatt i et felt, for å unngå bevegelse av mediet. Hvis dette feltet ikke representerte flasken som helhet introduseres en usikkerhet i cellulær respirasjon. Problemet ble minimert ved å fordele cellene jevnt etter omsetting.

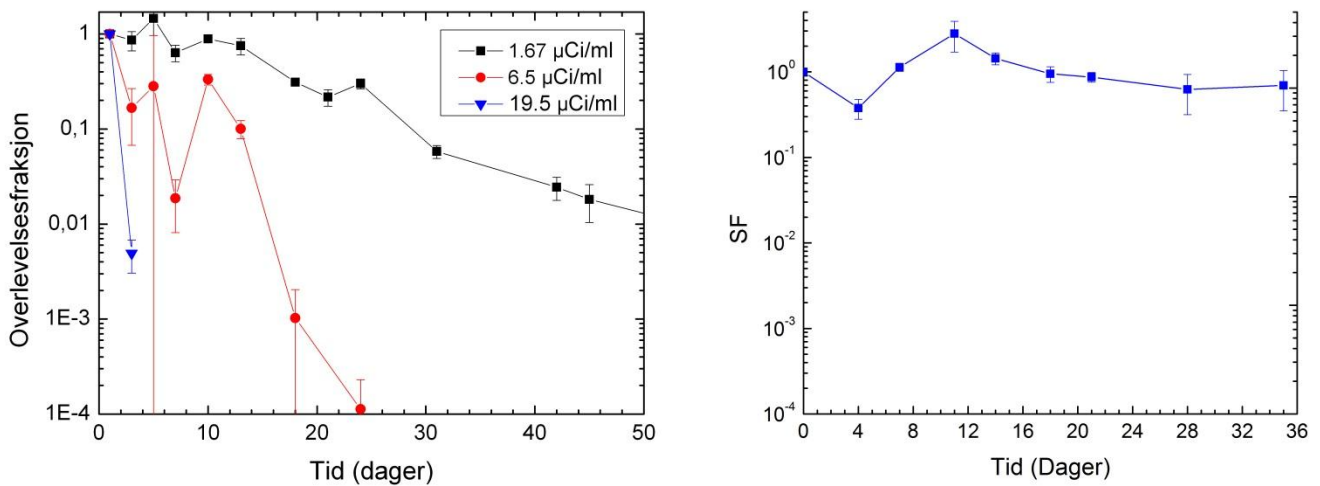
Det finnes ulike verdier for konstanten K som brukes for å beregne respirasjon i ligning 20 i litteraturen ($K=13,08 \frac{\mu\text{M}}{\%}$ (Pettersen et al. 2007), $K=10,5 \frac{\mu\text{M}}{\%}$ (Froese 1962), K rett under $10 \frac{\mu\text{M}}{\%}$ (Probst et al. 1988)). I denne oppgaven er $K=9,52 \frac{\mu\text{M}}{\%}$ blitt brukt, som er verdien for K som er publisert på nettsidene til Unisense.

5.4 Effekten av de ulike doseratene på overlevelsen

Det ble gjort koloni-forsøk for å undersøke effekten av ulike bestrålinger og ulike oksygenkonsentrasjoner (forsøk B – forsøk E). Formålet med koloni-forsøkene var å studere om lavdoserate-bestrålingen selektivt drepte hypoksiske celler. Det var da nødvendig å sammenligne med koloniforsøk utført på aerobe celler som mottok tilsvarende bestrålinger (1,6, 0,27 og 0,53 Ci/mol)(Aspmodal, 2011).

Forsøk B ble utført med 4% O_2 i gassfase, der cellene ble bestrålt med 1,6 Ci/mol. De bestrålte cellene stabiliserte seg uventet på en overlevelsesfraksjon der 70-80 % av de utsådde cellene overlevde og dannet kolonier (sett relativt til kontrollen). Overlevelsen til T98G celler dyrket i luft og bestrålt med 1,6 Ci/mol hadde en overlevelsesfraksjon på under 10% i løpet av 4 uker (Aspmodal, 2011). Denne forskjellen i overlevelsesfraksjon kan muligens forklares ved at 1,6 Ci/mol [^3H]-valin i mediet tilsvarte en doserate på 0,053 Gy/time (Aspmodal, 2011). Denne doseraten kan ha fremkalt den veldokumenterte oksygeneffekten, der hypoksiske celler er mindre strålefølsomme enn veloksygenererte celler (Gray et al. 1953). Dette understøttes av

flowcytometri-data, der T98G celler dyrket under hypoksiske forhold samt bestrålt med en doserate på 0,053 Gy/time ble opphopet i G2 (se kapittel 4.3.2 s. 47). G2-oppnopning er vanlig etter stråleskader (Maity et al. 1994). Den lave oksygenkonsentrasjonen i gassfase i dette forsøket kan dermed ha gitt en beskyttende effekt mot bestråling med 0,053 Gy/time.



- A) Koloniforsøk for T98G celler bestrålt med 1,6 Ci/mol under aerobe forhold (sort). Data skal brukes i Ida Aspmodal, masteroppgave.
- B) Koloniforsøk for T98G celler bestrålt med 1,6 Ci/mol under hypoksiske forhold med 4% i gassfasen.

Figur 30: Figuren viser data for T98G celler bestrålt med 1,6 Ci/mol i A) aerobe forhold og B) hypoksiske forhold med 4% oksygen i gassfasen.

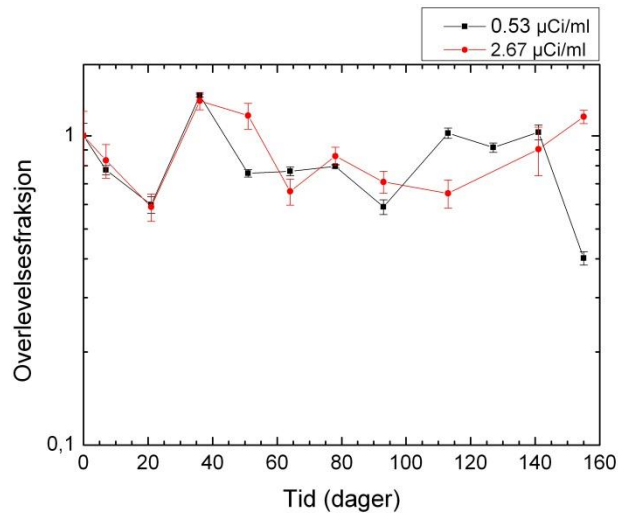
Koloni-forsøk fra forsøk C ble gjennomført med 3% oksygen i gassfasen, men med en reoksygenering i 4 timer etter hver omsetting og etter hvert mediumskift. Det er vanskelig å trekke noen konklusjoner hva angår den varierende overlevelsesfraksjonen (Figur 17 A s. 46) som ble observert i forsøk C. Cellene så dårlig ut og begynte å løsne når flaskene ble konfluente. Dette kan være en årsak til at overlevelsesfraksjonen varierer så mye, siden Plating Efficiency så ut til å synke veldig om flasken som ble brukt i koloniforsøket var grodd til konfluens (Figur 17 B s. 46). Den varierende overlevelsesfraksjonen kan også skyldes en ekstra reoksygeneringseffekt som følge av at hypoksi-boksen tre ganger ble stående med 4% O₂ i gassfasen lenger enn de 4 timene som var planlagt. Det kan tenkes at 3 % O₂ i gassfase var for lavt og at både de ubestrålte og de bestrålte cellene er på grensen til hva de kan overleve. En mulig forklaring til hvorfor overlevelsesfraksjonen varierer så mye kunne da være at de ubestrålte cellene kommer seg raskere enn de bestrålte cellene etter den forlengede reoksygeneringen. Det er for mange uklare faktorer til å kunne trekke en slik slutning. Usikkerheter i metoden tas opp i 5.5 Usikkerhet ved bruk av koloni-metoden s. 77.

Studier på T-47D brystkreftceller viste en synergieffekt ved kombinert behandling med lavdoseratestråling (0,015 Gy/time) og hypoksi. Behandlingene gav hver for seg liten effekt, slik det vises i *Figur 32* s. 78. T-47D cellene tålte å bli bestrålt med 0,015 Gy/time når de ble dyrket i luft og stabiliserte seg på en overlevelsesfraksjon på ca. 70%. Samtidig var ubestrålte T-47D celler som ble dyrket med 4,6% oksygen i gassfasen levedyktige. Men ved en kombinert behandling med lavdoserate og hypoksi, stoppet veksten opp etter 3 uker og cellene døde (Pettersen et al. 2007).

I hovedforsøket i denne oppgaven (forsøk E) ble T98G hjernekreftceller bestrålt med en ultralav doserate på 0,018 Gy/time mens de ble kontinuerlig dyrket i en hypoksiboks med 3,5% oksygen i gassfasen. Koloniforsøk og vekstkurver skulle avsløre om en synergistisk effekt av lavdoseratebestrålingen og syklisk hypoksi førte til celledød og vekst-svekkelse. Disse behandlingene gav ingen effekt hver for seg. T98G cellene tålte å bli dyrket i hypoksiske forhold (forsøk A-E) og tålte å bli bestrålt med 0,53 Ci/mol når de ble dyrket i luft. Overlevelsesfraksjonen for T98G celler som ble dyrket i luft og bestrålt med 0,53 Ci/mol stabiliserte seg på omtrent 80% (*Figur 31* s. 77). Med hensyn til den kombinerte effekten av stråling og hypoksi kan det virke som om disse resultatene er noe forskjellige fra det som ble funnet for T-47D brystkreftceller (Pettersen et al., 2007). Den laveste andelen overlevende celler for bestrålte relativt til ubestrålte T98G celler lå i overkant av 40% (*Figur 25 A* s. 61). En sammenligning vanskeliggjøres av at det ikke ble målt kolonidata for T-47D celler i det publiserte materialet (Pettersen et al. 2007), men ut fra data om celleveksten og fotografiene av cellene kan man få inntrykk av en sterkere effekt for T-47D brystkreftceller i forhold til T98G hjernekreftceller. Upubliserte data bekrefter at effekten på kolonidannende evne ved en kombinert behandling med lavdoserate stråling og hypoksi, er mye sterkere for T-47D celler, der overlevelsesfraksjonen synker til 1 %.

T98G celler har vist seg å tåle hypoksi godt, i og med at cellene var levedyktige og ikke virket til å regulere sin veksthastighet (se kapittel 4.1.2 s. 38 og 4.5.2 s. 57) da de ble kontinuerlig dyrket med hhv 4 og 3,5% oksygen i gassfasen i opp til 7 uker. Denne hypoksitoleransen kan være en mulig årsak til at cellene ikke døde ved lavdoseratebestråling over flere uker. Det kan riktignok også skyldes at denne doseraten ikke er optimal, eller at T98G hjerneceller reagerer annerledes på den kombinerte behandlingen enn T-47D celler og at en like sterk synergieffekt ikke vil fremkomme.

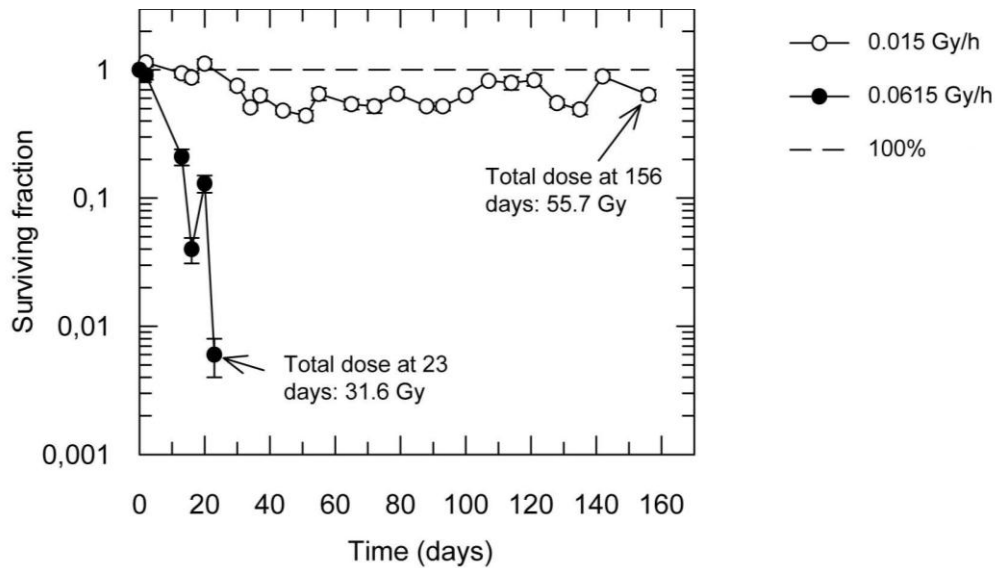
Flere punkter bør videre undersøkes. Det bør undersøkes hvor mye forhøyet respirasjonen til bestrålte celler (med 0,53 Ci/mol) er i forhold til en ubestrålt kontroll, når begge dyrkes kontinuerlig i 3,5% oksygen. Det kan videre tenkes at en annen doserate vil gi en høyere respirasjon per celle slik at en sterkere synergieffekt mellom lavdoseratebestråling og syklisk hypoksi kan fremkomme. Videre forsøk på T98G celler bør gjennomføres for å undersøke dette videre.



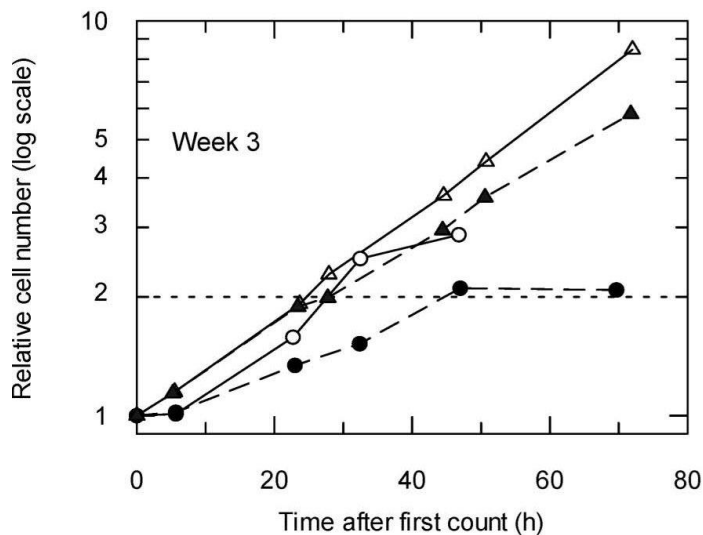
Figur 31: Kolonidata for celler bestrålt med 0,53(sort) og 0,28(rød) Ci/mol. Cellene ble dyrket i luft (20% oksygen). Data er fra Ida Aspmodal og skal brukes i hennes masteroppgave.

5.5 Usikkerhet ved bruk av koloni-metoden

Koloni-metoden er en metode som avhenger mye av nøyaktighet fra personen som utfører forsøket. Kontrollen som brukes for å korrigere PE til de bestrålte cellene har ikke gjennomgått presis den samme behandlingen. Når selve forsøket foretas tas en kontrollflaske og en bestrålt flaske opp fra hypoksiboksen, før de trypsineres, fortynnes og såes ut hver for seg. Dette fører til at metoden er spesielt utsatt for menneskelige feil. Det er særdeles viktig å behandle cellene så likt så mulig ettersom en ulik trypsinering eller en ulik fortynning vil kunne føre til en forskjell i overlevelsesandelen til cellene som ikke skyldes hypoksi- eller strålebehandlingen. Koloniforsøkene ble utført av samme person hver gang og det ble lagt mye vekt på lik behandling av flaskene. Et av koloni-forsøkene i denne oppgaven ble gjentatt (forsøk D og E), som viste at denne metoden virker til å være god nok.



A) Koloniforsøk med T-47D celler bestrålt med 0,015 Gy/time i aerobe forhold



B) Cellevekst for T-47D celler bestrålt med 0,015 Gy/time i hypoksiske forhold (4,6% oksygen i atmosfæren)

Figur 32: Data som viser at bestråling med 0,015 Gy/t dreper celler som dyrkes kontinuerlig i hypoksi, mens cellene overlever en tilsvarende bestråling (0,015 Gy/t) om de dyrkes i luft (Pettersen et Al, 2007). Figurene er modifisert.

5.6 Betydningen av konfluens

Underveis i forsøket viste det seg at betydningen av hvor konfluente celleflaskene ble hadde en stor effekt på hvordan cellene så ut til å ha det og sannsynligvis også hvor høy overlevelsesandel cellene hadde (se for eksempel 4.3 Forsøk C s. 45). Det ble derfor gjort et kort forsøk der konfluente celleflasker fikk stå to dager ekstra (med et medium-skift i stedet for omsetting). Dette forsøket viste at T98G celler som dyrkes i moderat hypoksi (3,5% oksygen i atmosfæren) ser dårlige ut (Figur 27 s. 63) og løsner fra flaskebunnen. Ved å

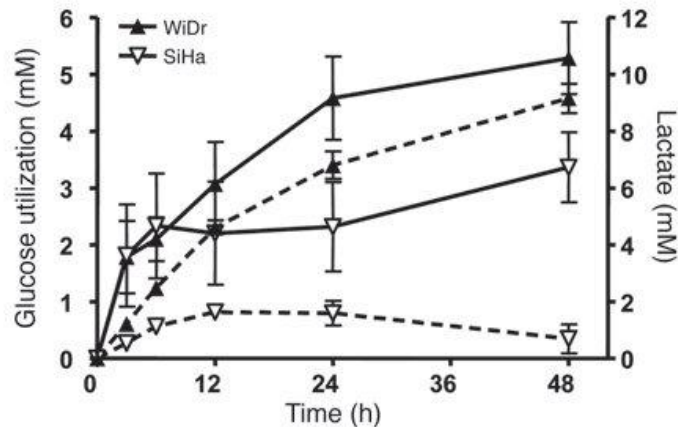
overføre 1 ml medium med løsnede celler til en ny celleflaske som ble tilsatt friskt medium og siden inkubere flasken i luft, viste det seg at de løsnede cellene festet seg i den nye celleflasken og fortsatte å dele seg som normalt. Dette frister til å spekulere i at dette er en slags metastaserings-effekt, der cellene løsner for så å feste seg igjen når cellene blir dyrket i et gunstigere cellulært miljø. Det er veldig interessant å se på hva som trigger en slik løsning av cellene. Et mulig forslag for å undersøke dette videre er å studere pH-effekter (videre diskutert i avsnitt 5.7 s. 79). Et mulig forsøk ville være å flushe celleflasker som dyrkes i luft og som ikke er helt konfluente med CO₂ slik at pH blir lav. Hvis cellene da løsner er det sannsynlig at lav pH er en del av årsaken. Det er også interessant å se om disse aerobe løsnede cellene vil feste seg igjen gitt at de får bedre vekstvilkår (nytt medium). Hva slags innvirkning hypoksi har på denne potensielle metastaserings-effekten, samt å observere endringer i respirasjon og POC for en superkonfluent flaske var ting som jeg ikke fikk tid til i oppgavens tidsrom, men som kunne være interessant å studere.

5.7 Hypoksi påvirker metabolismen til T-47D og T98G kreftceller

Laktat, glukose og pH som ble målt i prøver fra mediet til T-47D og T98G celler viste forskjeller mellom celler som dyrkes i luft (20% oksygen) og hypoksiske forhold (4% oksygen). Det var en tendens til at laktatverdien i mediet var høyere for cellene som ble dyrket i hypoksi i forhold til cellene som ble dyrket i luft. I en tumor vil det finnes veloksygenerte celler og hypoksiske celler. Det er vist at for noen celletyper finnes det et symbiotisk forhold mellom veloksygenerte og hypoksiske tumorceller der de veloksygenerte tumorcellene oksiderer laktat for å danne ATP. Hypoksiske tumorceller har da mer glukose tilgjengelig og danner energi ved glukolyse (Sonveaux et al. 2008). Økt utslipp av laktat for hypoksiske celler er i samsvar med denne teorien. Cellene som ble brukt i arbeidet til Sonveaux et al (2008) var WiDr humane colorektale adenocarcinoma og SiHa humane livmorhalskreftceller. Laktatverdiene i mediet og glukoseforbruk ble målt. De to celletypene har forskjellig metabolisme, der WiDr cellene er glykolytiske (Warburg fenotype), som kan sees ved at 2 laktatmolekyler produseres for hvert glukosemolekyl som tas opp. SiHa cellene som forbruker laktat til å danne ATP har en klokke-formet kurve for laktat-utslipp til mediet. En slik kurve observeres ikke i forsøkene gjort i denne oppgaven. Resultatene er riktignok ikke helt sammenlignbare, siden det i denne oppgaven gjøres målinger på celler i eksponentiell vekst, mens det ble brukt konfluente celleflasker i Sonveaux et al. sine eksperimenter. Cellene er avhengige av dannelsen av ATP både i eksponentiell vekst og når de er konfluente, så det kan tenkes at dette ikke utgjør noen stor forskjell.

Hypoksiske T98G og T-47D celler produserer omtrent 2 laktat- per glukosemolekyler som tas opp (Tabell 11 s. 67). Dette er karakteristisk for glykolytiske celler, der glykolyse er hovedkilde for dannelsen av ATP selv for veloksygenerte celler (Sonveaux et al. 2008). For å kunne trekke en ensidig konklusjon for hvordan metabolismen til de undersøkte cellene endres under hypoksi, må det utføres flere forsøk. En mulig måte å klargjøre dette på kunne

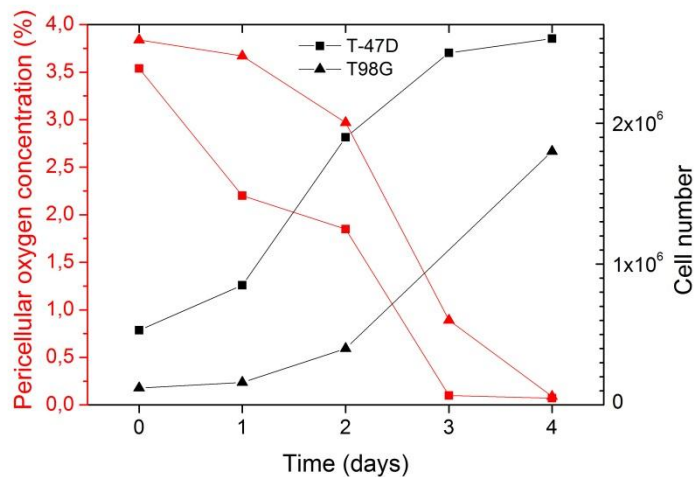
være å tilsette eksogent laktat til cellene. Glukose-konsentrasjonen i mediet må måles, og om glukoseforbruket synker når cellene får tilgang på mye laktat ville dette være en indikasjon på at cellene kan bruke laktat i sin dannelse av ATP. Dette ble observert av Sonveaux et al.



Figur 33: Glukoseforbruk vises på venstre ordinat og laktatkonsentrasjon i mediet på høyre ordinat, som funksjon av tid etter forsøksstart. Ved tid 0 mottar konfluente celler friskt medium med glukose og føtalt kalveserum. Legg merke til de ulike aksene. Målingene er gjort på SiHa celler og WiDr celler (Sonveaux et al. 2008)

Celleflaskene som ble brukt i metabolisme-forsøkene gikk tom for glukose mot slutten av forsøket. Forsøkene varte i 5 dager og cellene fikk et mediumskift to dager etter forsøksstart. Dette kan være en forklaring på hvorfor T-47D cellene begynte å løsne den 5. dagen. Cellene er etter 5 dager helt tomme for glukose og som en konsekvens av glukose-mangelen slutter cellene å produsere laktat til mediet. Et studie av laktatmengden i mediet etter at cellene er tomme for glukose, kunne muligens avsløre om cellene bytter over til å forbruke laktat i sin ATP-produksjon og om dette skjer både i hypoksiske cellene (4% O₂ i gassfasen) og cellene dyrket i luft.

T98G cellene vokser raskere (Figur 28 A s. 64) og er større enn T-47D cellene, (median diameter= 19,4 μm for T98G og median diameter = 13,8 μm for T-47D celler (Aspmoal 2011), (Bjørhovde 2006)) og T98G celler må dermed sås ut tynnere enn T-47D cellene. Det ble sådd ut 110 000 T98G celler og 530 000 T-47D celler. Dette førte til at T-47D celler nådde en høyere celletetthet tidligere og dermed opplevde T-47D cellene en strengere hypoksi i en lengre periode enn T98G (Figur 34 s. 81). Denne forskjellen i utsåingen, og dermed også i POC, er en mulig årsak til at T-47D cellene bruker opp all tilgjengelig glukose før T98G, og en sannsynlig årsak til at T-47D løsner fra flaskebunnen på dag 4.



Figur 34: Figuren viser pericellulær oksygenkonsentrasjon (rød ordinat) etter hvert som antall celler i flasken øker (sort ordinat) mellom omsetninger for T-47D og T98G celler dyrket med 4 % oksygen i gassfasen (Cheng 2011)

Da celleflaskene grodde til konfluens, var pH i mediet til de hypoksiske cellene lavere enn pH i mediet til celler dyrket i luft for både T98G celler og T-47D celler. Dette gjelder spesielt for målingene som ble gjort når mediet hadde vært på i to dager. Det er altså en forskjell i pH reguleringen til hypoksiske celler og celler dyrket i luft, hvor de hypoksiske cellene har surere pH i mediet. Denne forskjellen i pH mellom hypoksiske (4% O₂ i gassfasen) celler og celler dyrket i luft vises ikke i laktat-verdiene målt i mediet. pH reguleres ikke kun av én faktor, det er mange faktorer som kan bidra til regulering av cellulær pH. Det er også gjort studier der det er vist at lav ekstracellulær pH ikke primært kan tilskrives til laktat, og acidifisering kan foregå uten laktat fra glykolyesen (Kennedy and Dewhirst 2010). Denne forskjellen i pH mellom hypoksiske celler (4% O₂ i gassfasen) og celler dyrket i luft kan være HIF-1 α regulert. HIF-1 α er med å regulere visse enzymer (Karboanhydrase isoformer) som katalyserer en reaksjon som kan føre til økt mengde CO₂, og dermed en surere pH. Disse enzymene er ofte opp-regulert i tumorer (Kennedy and Dewhirst 2010). En annen mulig årsak til forskjell i pH for hypoksiske celler (4% oksygen i gassfasen) og celler dyrket i luft er regulering av pH gjennom NBC sammen med MTC1 som kan transportere laktat og H⁺ (Kennedy and Dewhirst 2010). MTC1 er opp-regulert i hypoksi for både T98G og T-47D (Cheng 2011).

Dag 4 løsner de hypoksiske T-47D cellene fra flasken. T-47D cellene dyrket i luft løsnet ikke og ikke T98G (hypoksiske celler og celler dyrket i luft) heller. Ingen av flaskene var helt konfluente. En mulig årsak til at hypoksiske T-47D celler (4% oksygen i gassfasen) løsnet kan være kombinasjonen av lav pH og glukose-mangel.

5.8 Usikkerheter i metabolisme-forsøkene

Antallet celler i flasken blir telt i et felt og hvis det er store variasjoner i celletetthet i celleflasken, vil antallet celler og også doblingstiden bli usikker. Dette ser imidlertid ikke ut til å være et stort problem, standardavvikene til de 2 parallelle flaskene som blir talt samtidig er ofte mindre enn symbolene som brukes i figuren (se *Figur 28* s.64). pH-meteret har en usikkerhet i målingene på 0,05. Dette virker ikke til å være et problem, resultatene i de tre separate forsøkene virker reproducerbare. pH-målingene fra forsøk II og III som ble utført på dag 3 bar preg av at det kun kunne tas ut en dråpe medium fra celleflaskene for å ikke forstyrre forsøket. Det var vanskelig å få stabile målinger med en liten mengde medium og derfor er troverdigheten til disse målingene noe svekket. Målingene fra dag 2 og dag 4 har ikke en slik usikkerhet, da større mengder medium kunne brukes disse dagene.

6 Konklusjon

I denne oppgaven er det gjort et hovedforsøk der T98G hjernekreftcellers respons på en kombinert behandling med lavdoserate β -bestråling mens cellene kontinuerlig ble dyrket i en hypoksiboks med 3,5% oksygen i gassfasen. I dette forsøket ble flere parametere studert, der det var ønsket å kartlegge hvordan cellulær respirasjon samt pericellulær oksygenkonsentrasjon endret seg ved den kombinerte behandlingen. Det ble dermed utført et tilsvarende studium av ubestrålte T98G celler dyrket under hypoksi. Cellenes evne til å danne kolonier ble undersøkt og celleveksten ble monitorert.

Det ble vist at T98G hjernekreftceller dyrket med 3,5% oksygen i gassfasen opplevde en syklisk hypoksi (se *Figur 22* s. 56), der cellene ble utsatt for svært lave oksygenkonsentrasjoner i løpet av et vanlig forløp fra utsåing til omsetting. Når T98G cellene samtidig ble kontinuerlig bestrålt med en lav doserate på 0,018 Gy/time hadde de en forhøyet cellulær respirasjon sammenlignet med ubestrålte T98G celler dyrket under lignende forhold (4% oksygen i gassfasen). Dette var i samsvar med tidligere publiserte data som omhandlet T-47D brystkreftceller som ved en slik kombinert behandling utviste forhøyet respirasjon. T-47D cellene døde av den slik kombinert behandling, trolig grunnet den forhøyede respirasjonen som medførte en strengere hypoksi.

T98G ble funnet å respondere likt på den kombinerte behandlingen hva cellulær respirasjon angår, dog ble det ikke observert en like tydelig svekkelse av T98G cellers kolonidannende evne og celleveksten ble ikke hindret. Dette forsøket ble gjennomført med 3,5% oksygen i gassfasen og en doserate på 0,018 Gy/time. Det bør gjøres flere lignende forsøk på T98G celler, der andre doserater undersøkes for at en tydelig konklusjon skal kunne trekkes. Det kan riktignok virke som om T98G celler tåler hypoksiske forhold godt og at dette kan være årsaken til den manglende effekten på kolonidannende evne ved den kombinerte behandlingen.

Samtidig ble det oppdaget flere faktorer som ble regulert ved dyrkning av T98G celler under hypoksiske forhold, som pH og laktat-utslipp i mediet. Dette bør undersøkes videre for å få en bedre forståelse av de maligne T98G hjernekreftcellenes respons på hypoksiske forhold og hvorfor de tåler denne så godt.

Litteraturliste

- (ICRP), I. C. o. R. P. (1983). Radionuclide transformations: Energy and intensity of emissions. **ICRP Publication 38, Pergamon Press New York.**
- Alberts, B. (2008). Molecular biology of the cell. New York, Garland Science.
- Amellem, O., J. A. Sandvik, et al. (1998). "The retinoblastoma protein-associated cell cycle arrest in S-phase under moderate hypoxia is disrupted in cells expressing HPV18 E7 oncoprotein." Br J Cancer **77**(6): 862-872.
- Amellem, O., T. Stokke, et al. (1997). "Hypoxia-induced apoptosis in human cells with normal p53 status and function, without any alteration in the nuclear protein level." Exp Cell Res **232**(2): 361-370.
- Aspmodal, I. (2011). Universitetet i Oslo. **Master.**
- Attix, F. H. (1986). Introduction to radiological physics and radiation dosimetry. New York, John Wiley.
- Banin, S., L. Moyal, et al. (1998). "Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage." Science **281**(5383): 1674-1677.
- Brunsting, A. and P. F. Mullaney (1974). "Differential light scattering from spherical mammalian cells." Biophys J **14**(6): 439-453.
- Casey, G., M. Lo-Hsueh, et al. (1991). "Growth suppression of human breast cancer cells by the introduction of a wild-type p53 gene." Oncogene **6**(10): 1791-1797.
- Chadwick, K. H. and H. P. Leenhouts (1973). "A molecular theory of cell survival." Phys Med Biol **18**(1): 78-87.
- Chen, J. (2006). "Radiation quality of tritium." Radiat Prot Dosimetry **122**(1-4): 546-548.
- Cheng, C., Edin, NJ et Al. (2011). "Different alterations of different MCTs after hypoxia in brain and breast tumor cells."
- Cummins, E. P. and C. T. Taylor (2005). "Hypoxia-responsive transcription factors." Pflugers Arch **450**(6): 363-371.
- Dang, C. V. and G. L. Semenza (1999). "Oncogenic alterations of metabolism." Trends Biochem Sci **24**(2): 68-72.
- Dertinger, H. and H. Jung (1970). Molecular radiation biology: the action of ionizing radiation on elementary biological objects. London, The English Universities Press c1970.
- Dewhirst, M. W., H. Kimura, et al. (1996). "Microvascular studies on the origins of perfusion-limited hypoxia." Br J Cancer Suppl **27**: S247-251.
- Feinendegen, L. E. (1967). Tritium-labeled molecules in biology and medicine. New York, Academic Press.
- Froese, G. (1962). "The respiration of ascites tumour cells at low oxygen concentrations." Biochim Biophys Acta **57**: 509-519.
- Garcia, H. E. and L. I. Gordon (1992). "Oxygen Solubility in Seawater - Better Fitting Equations." Limnology and Oceanography **37**(6): 1307-1312.
- Gray, L. H., A. D. Conger, et al. (1953). "The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy." Br J Radiol **26**(312): 638-648.
- Hall, E. J. and A. J. Giaccia (2006). Radiobiology for the radiologist. Philadelphia, Pa., Lippincott Williams & Wilkins.

- Hockel, M. and P. Vaupel (2001). "Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects." J Natl Cancer Inst **93**(4): 266-276.
- Kellerer, A. M. and H. H. Rossi (1971). "RBE and the primary mechanism of radiation action." Radiat Res **47**(1): 15-34.
- Kennedy, K. M. and M. W. Dewhirst (2010). "Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation." Future Oncol **6**(1): 127-148.
- Keydar, I., L. Chen, et al. (1979). "ESTABLISHMENT AND CHARACTERIZATION OF A CELL-LINE OF HUMAN-BREAST CARCINOMA ORIGIN." European Journal of Cancer **15**(5): 659-670.
- Kielberg, V., N. Brønner, et al. (1993). Celldyrkning: en praktisk håndbog i dyrkning af mælle celler. København, FADL.
- Kreftforeningen. (2011, 30.05.2011). from <http://www.kreftforeningen.no>.
- Louis, D. N. (2007). WHO classification of tumours of the central nervous system. Geneva, Switzerland, Distributed by WHO Press, World Health Organization.
- Macey, M. G. (2007). Flow Cytometry: Principles and Applications. Totowa, NJ, Humana Press Inc.
- Maity, A., W. G. McKenna, et al. (1994). "The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: a review." Radiother Oncol **31**(1): 1-13.
- Marshall, R. S., C. J. Koch, et al. (1986). "Measurement of low levels of oxygen and their effect on respiration in cell suspensions maintained in an open system." Radiat Res **108**(1): 91-101.
- Matsumoto, H., M. Shimura, et al. (1994). "p53 proteins accumulated by heat stress associate with heat shock proteins HSP72/HSC73 in human glioblastoma cell lines." Cancer Lett **87**(1): 39-46.
- Mayles, P., A. E. Nahum, et al. (2007). Handbook of radiotherapy physics: theory and practice. New York, Taylor & Francis.
- Nias, A. H. W. (1998). An introduction to radiobiology. Chichester, Wiley.
- Pettersen, E. O. (2009). "FYS 4720: Cellulære Strålingseffekter."
- Pettersen, E. O., I. Bjørhovde, et al. (2007). "Response of chronic hypoxic cells to low dose-rate irradiation." Int J Radiat Biol **83**(5): 331-345.
- Pettersen, E. O., L. H. Larsen, et al. (2005). "Pericellular oxygen depletion during ordinary tissue culturing, measured with oxygen microsensors." Cell Prolif **38**(4): 257-267.
- Probst, H., H. Schiffer, et al. (1988). "Oxygen dependent regulation of DNA synthesis and growth of Ehrlich ascites tumor cells in vitro and in vivo." Cancer Res **48**(8): 2053-2060.
- Rabinovitch, P. S. (2002). "Introduction to Cell Cycle Analysis." Retrieved 16/3, 2011, from <http://www.phnxflow.com/Introduction%20to%20Cell%20Cycle%20Analysis.pdf>.
- Renner, K., A. Amberger, et al. (2003). "Changes of mitochondrial respiration, mitochondrial content and cell size after induction of apoptosis in leukemia cells." Biochim Biophys Acta **1642**(1-2): 115-123.
- Rowberg, R. E. o. L., C. (1998) "97002: The Department of Energy's Tritium Production Program[online]."
- Sand, O., Ø. V. Sjaastad, et al. (2006). Menneskekroppen: fysiologi og anatomi. Oslo, Gyldendal akademisk.
- Sinclair, W. K. (1966). "The shape of radiation survival curves of mammalian cells cultured in vitro." Biophysical Aspects of Radiation Quality, (Technical Report Series No. 58, I.A.E.A., Wien): 22-43.
- Sonveaux, P., F. Vegran, et al. (2008). "Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice." J Clin Invest **118**(12): 3930-3942.

- Spinks, J. W. T. and R. J. Woods (1990). An introduction to radiation chemistry. New York, Wiley.
- Stein, G. H. (1979). "T98G: an anchorage-independent human tumor cell line that exhibits stationary phase G1 arrest in vitro." J Cell Physiol **99**(1): 43-54.
- Stenersen Espe, E. K. (2009). The effect of chronic hypoxia and low dose β -irradiation on the MCF-7 human cancer cell Universitetet i Oslo.
- Søvik, Å. (2002). Lavdoseratebestråling av humane celler i kultur. Dosimetri og effektmålinger., Universitetet i Oslo. **Master**.
- Walenta, S., S. Snyder, et al. (2001). "Tissue gradients of energy metabolites mirror oxygen tension gradients in a rat mammary carcinoma model." Int J Radiat Oncol Biol Phys **51**(3): 840-848.
- Zhao, Y., X. Q. Chen, et al. (2009). "Cellular adaptation to hypoxia and p53 transcription regulation." J Zhejiang Univ Sci B **10**(5): 404-410.

Vedlegg A: Kjemikalieliste

Nedenfor følger en alfabetisk liste over alle kjemikalier benyttet ved laboratoriearbeidet, samt tilhørende produsent eller leverandør

Kjemikalie	Produsent
EDTA (Etylenediaminetetraacetic acid)	Fluka, Sveits
Etanol, 96%	Arcus AS, Oslo
Fenolrødt	Merck, Tyskland
Føtalt kalveserum	Euroclone, England
Glukose	Sigma, USA
KCl	Merck, Tyskland
L-Glutamin	Sigma, USA
L-[³ H]-valin	Amersham, GE Healthcare, England
Metyleneblått	Merck, Tyskland
Milli-Q-vann	Millipore, USA
NaCl	Riedel de Haën, Tyskland
NaHCO ₃	Norsk Medisinaldepot, Oslo
PBS	Euroclone, England
Peniciline-Streptomycin	Euroclone, England
RPMI-pulver med L-glutamin	JHR Biosciences, USA
RPMI stamløsning	Euroclone, England
Trypsin	PAA Laboratories, Østerrike
C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂ ⁶	Ali

⁶ Dette kjemikalieliste ble kun brukt på forfatteren og kom ikke i kontakt med cellekulturer.

Vedlegg B: Oppskrifter

RPMI 1640 Medium

Stamløsning

RPMI 1640- pulver	10,43 g
NaHCO ₃	2,00 g
Milli-Q- vann	1000 ml

RPMI-medium med serum (1000 ml)

RPMI 1640 Stamløsning	880 ml
Føtalt kalveserum	100 ml
Penicilin Streptomycin	10 ml
Insulin(200 enheter/l)	2 ml
L- glutamin	10 ml

PBS (1l)

NaCl	8,000 g
KCl	0,201 g
KH ₂ PO ₄	0,204 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	2,858 g
Milli-Q- vann	10 ml

L-glutamin (35 ml)

L-glutamin 1,0227 g

RPMI stamløsning 35 ml

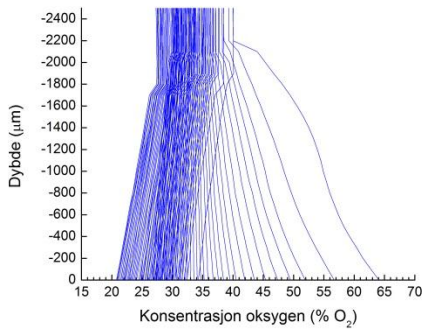
Vedlegg C: Oversikt over forsøk

Forsøk	
Forsøk A)	Ubestrålte T98G celler dyrkes med 4 % O ₂ i gassfasen.
Forsøk B)	T98G celler bestråles med 1,6 Ci/mol [³ H]-valin i mediet og dyrkes med 4% O ₂ i gassfasen
Forsøk C)	T98G celler bestråles med 1,6 Ci/mol [³ H]-valin i mediet og dyrkes med 3% O ₂ i gassfasen. Cellene reoksygeneres i 4 timer etter omsetting og mediumskift med 4% O ₂ i gassfasen
Forsøk D)	T98G celler bestråles med 0,27 og 0,53 Ci/mol [³ H]-valin i mediet og dyrkes med 3,5% O ₂ i gassfasen
Forsøk E)	T98G celler bestråles med 0,53 Ci/mol [³ H]-valin i mediet og dyrkes med 3,5% O ₂ i gassfasen
Forsøk F)	T98G konfluens-forsøk. Ubestrålte T98G celler og T98G celler bestrålt med med 0,27 og 0,53 Ci/mol [³ H]-valin i mediet og dyrkes med 3,5% O ₂ i gassfasen
Forsøk G)	Metabolisme-forsøk, der ulike parametere for T-47D og T98G celler dyrkes i luft og med 4% O ₂ i gassfasen

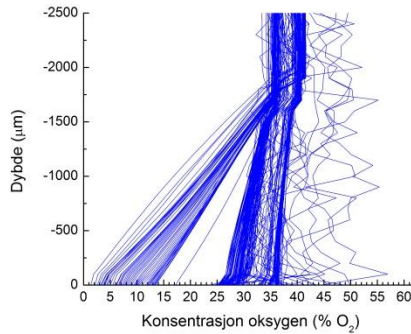
Vedlegg C: Oksygenprofiler

Forsøk A) og E) inkluderte respirasjonsforsøk som resulterte i store mengder data. Mye av data er inkludert i oppgaven og noen steder er det inkludert et utvalg (dette gjelder særlig cellebilder). Her presenteres alle de opptatte oksygenprofilene fra forsøk A og E.

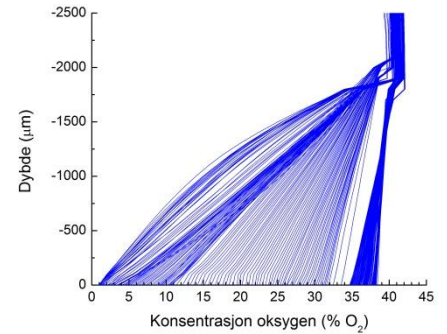
Forsøk A



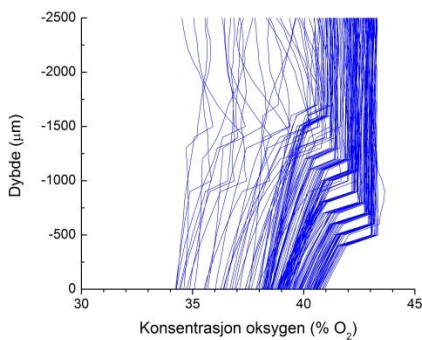
A) Dag 0 - 2



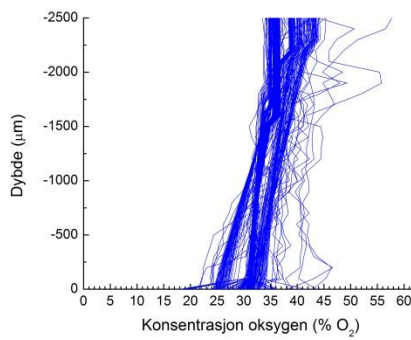
B) Dag 3 - 7



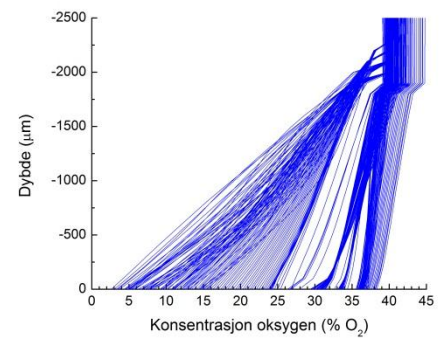
C) Dag 7 - 11



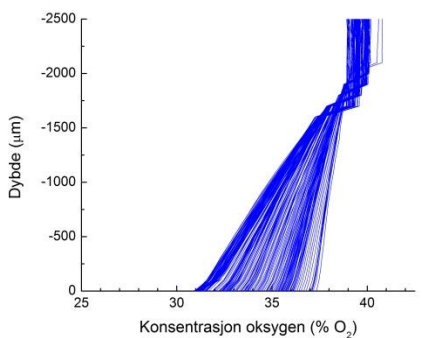
D) Dag 11 - 14



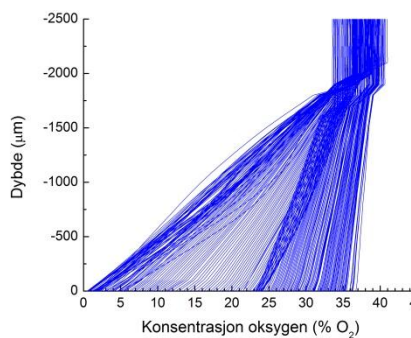
E) Dag 14 - 18



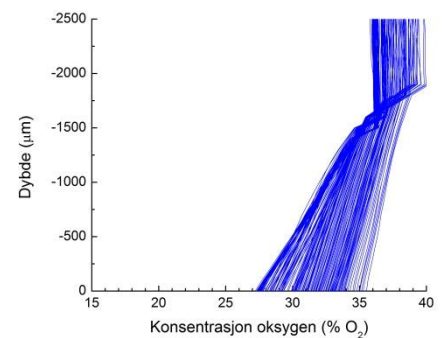
F) Dag 18 - 22



G) Dag 22 - 25

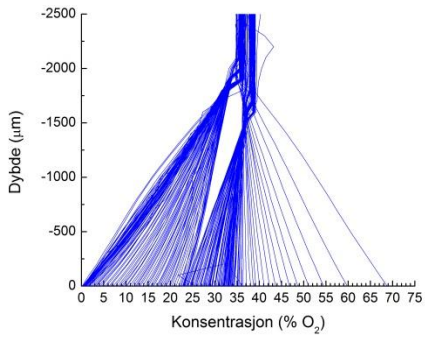


H) Dag 25 - 29

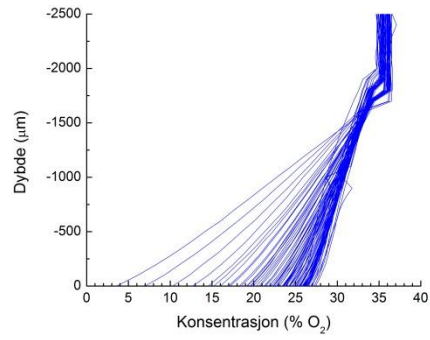


I) Dag 29 - 32

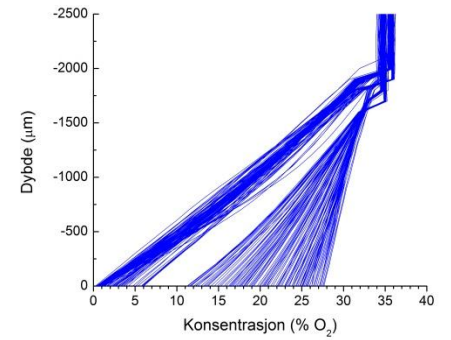
Forsøk E



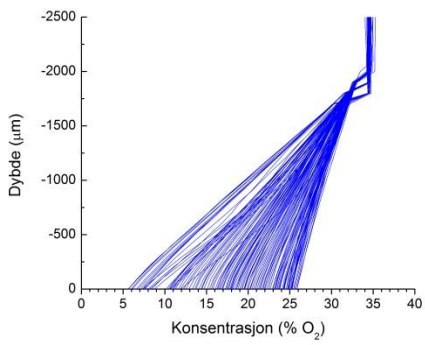
A) Dag 0 - 4



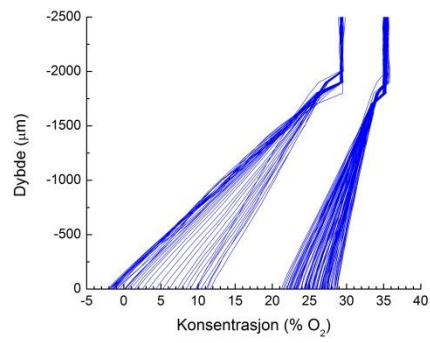
B) Dag 4-7



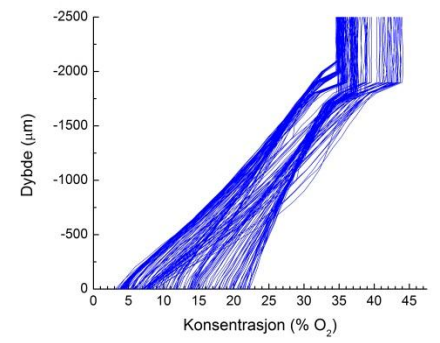
C) Dag 7 - 11



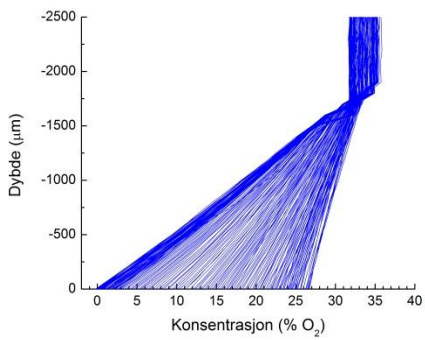
D) Dag 11 - 14



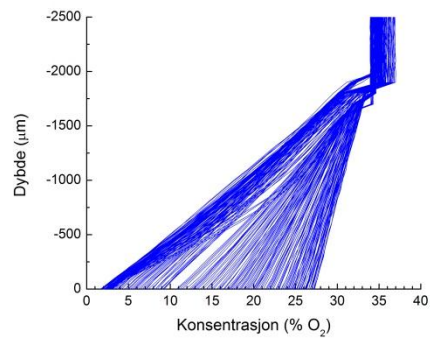
E) Dag 14 - 18



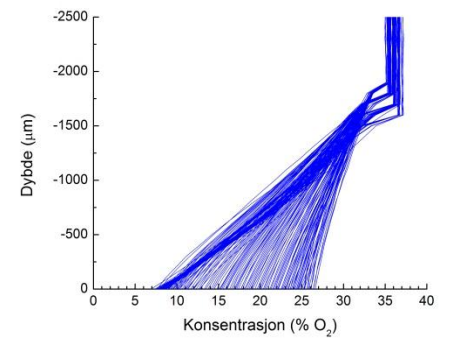
F) Dag 22 - 25



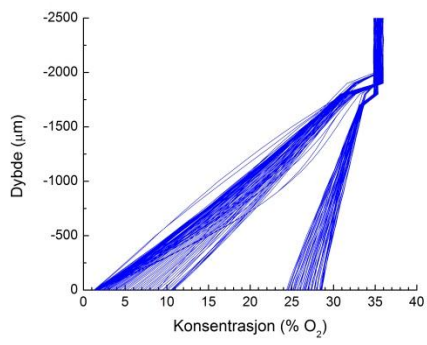
G) Dag 25 - 28



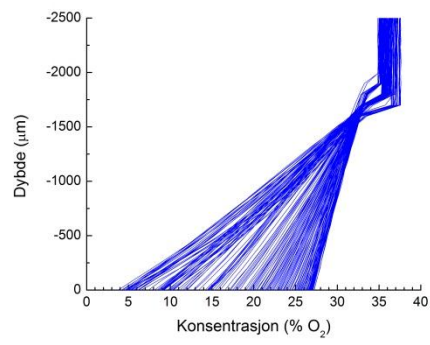
H) Dag 28 - 32



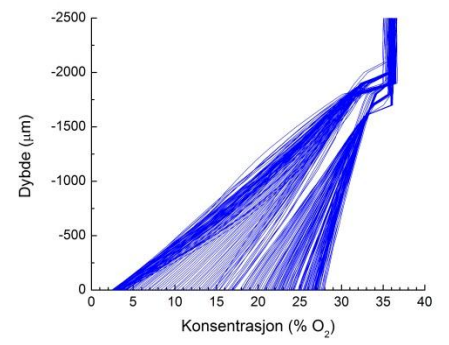
I) Dag 32 - 35



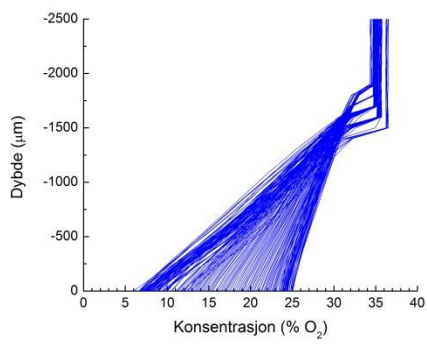
J)Dag 35 - 39



K) Dag 39 -42



L) Dag 42 - 46



M) Dag 46 - 49

Vedlegg D: Koloniforsøk

I dette vedlegget presenteres alle rådata fra koloniforsøkene. For informasjon om de ulike forsøkene henvises det til Vedlegg C: Forsøksoversikt.

Forsøk B

Forsøk: B Dag 0: PE= 0,367 Aktivitet Ubestrålt Flaske 1 76 Flaske 2 68 Flaske 3 67 Flaske 4 84 Flaske 5 72 Ant. Utsådde celler 200 Gjennomsnittlig antall kolonier per flaske: N 73,40 Sd N 6,18 Overlevelsesfraksjon: SF Sd SF	Forsøk: B Dag 4: PE= 0,339 Aktivitet Ubestrålt 1,6 Ci/mol Flaske 1 48 21 Flaske 2 59 27 Flaske 3 71 33 Flaske 4 75 21 Flaske 5 86 26 Ant. Utsådde celler 200 200 Gjennomsnittlig antall kolonier per flaske: N 67,80 25,60 Sd N 13,14 4,45 Overlevelsesfraksjon: SF 0,38 Sd SF 0,10
Forsøk: B Dag 7: PE= 0,315 Aktivitet Ubestrålt 1,6 Ci/mol Flaske 1 63 64 Flaske 2 57 80 Flaske 3 64 63 Flaske 4 63 75 Flaske 5 68 76 Ant. Utsådde celler 200 200 Gjennomsnittlig antall kolonier per flaske: N 63,00 71,60 Sd N 3,52 6,83 Overlevelsesfraksjon: SF 1,14 Sd SF 0,13	Forsøk: B Dag 11: PE= 0,118 Aktivitet Ubestrålt 1,6 Ci/mol Flaske 1 32 67 Flaske 2 25 70 Flaske 3 8 50 Flaske 4 27 86 Flaske 5 26 58 Ant. Utsådde celler 200 200 Gjennomsnittlig antall kolonier per flaske: N 23,60 66,20 Sd N 8,16 12,14 Overlevelsesfraksjon: SF 2,81 Sd SF 1,10

Forsøk: B Dag 14: PE= 0,358	Forsøk: B Dag 18: PE= 0,333
1,6	Aktivitet Ubestrålt 1,6 Ci/mol
Aktivitet Ubestrålt Ci/mol	Flaske 1 70 50
Flaske 1 67 126	Flaske 2 64 76
Flaske 2 71 76	Flaske 3 58 77
Flaske 3 74 101	Flaske 4 74 49
Flaske 4 74 107	Flaske 5 67 64
Flaske 5 72 105	Ant. Utsådde celler 200 200
Ant. Utsådde celler 200 200	Gjennomsnittlig antall
Gjennomsnittlig antall	kolonier per flaske: N 66,60 63,20
kolonier per flaske: N 71,60 103,00	Sd N 5,43 12,09
Sd N 2,58 16,01	Overlevelsesfraksjon:
Overlevelsesfraksjon: SF 1,44	SF 0,95
Sd SF 0,23	Sd SF 0,20
Forsøk: B Dag 21: PE= 0,569	Forsøk: B Dag 28: PE= 0,439
Aktivitet Ubestrålt 1,6 Ci/mol	1,6
Flaske 1 101 103	Aktivitet Ubestrålt Ci/mol
Flaske 2 123 89	Flaske 1 140 61
Flaske 3 95 97	Flaske 2 137 54
Flaske 4 126 101	Flaske 3 37 46
Flaske 5 124 105	Flaske 4 70 57
Ant. Utsådde celler 200 200	Flaske 5 55 56
Gjennomsnittlig antall	Ant. Utsådde celler 200 200
kolonier per flaske: N 113,80 99,00	Gjennomsnittlig antall
Sd N 13,08 5,66	kolonier per flaske: N 87,80 54,80
Overlevelsesfraksjon:	Sd N 42,71 4,96
SF 0,87	Overlevelsesfraksjon: SF 0,62
Sd SF 0,11	Sd SF 0,31

Forsøk: B		
Dag 35:		
PE=	0,411	
Aktivitet	Ubestrålt	1,6 Ci/mol
Flaske 1	82	72
Flaske 2	77	64
Flaske 3	93	2
Flaske 4	80	67
Flaske 5	79	80
Ant. Utsådde celler	200	200
Gjennomsnittlig antall		
kolonier per flaske: N	82,20	57,00
Sd N	5,64	28,03
Overlevelsesfraksjon: SF	0,69	
Sd SF	0,34	

Forsøk C

Forsøk: C			Forsøk: C		
Dag 0:			Dag 3:		
PE=	0,499		PE=	0,339	
Aktivitet	Ubestrålt		Aktivitet	Ubestrålt	1,6 Ci/mol
Flaske 1	96		Flaske 1	68	131
Flaske 2	85		Flaske 2	67	82
Flaske 3	114		Flaske 3	86	89
Flaske 4	110		Flaske 4	65	103
Flaske 5	94		Flaske 5	53	90
Ant. Utsådde celler	200		Ant. Utsådde celler	200	200
Gjennomsnittlig antall			Gjennomsnittlig antall		
kolonier per flaske: N	99,80		kolonier per flaske: N	67,80	99,00
Sd N	10,70		Sd N	10,57	17,38
Overlevelsesfraksjon: SF			Overlevelsesfraksjon: SF	1,46	
Sd SF			Sd SF	0,34	

<p>Forsøk: C Dag 7: PE= 0,075</p>				<p>Forsøk: C Dag 10: PE= 0,562</p>			
Aktivitet	Ubestrålt	1,6 Ci/mol		Aktivitet	Ubestrålt	1,6 Ci/mol	
Flaske 1	21	33		Flaske 1	121	74	
Flaske 2	14	25		Flaske 2	113	33	
Flaske 3	12	23		Flaske 3	117	19	
Flaske 4	15	31		Flaske 4	101	12	
Flaske 5	13	40		Flaske 5	110	0	
Ant. Utsådde celler	200	200		Ant. Utsådde celler	200	200	
Gjennomsnittlig antall				Gjennomsnittlig antall			
kolonier per flaske: N	15,00	30,40		kolonier per flaske: N	112,40	27,60	
Sd N	3,16	6,05		Sd N	6,80	25,54	
Overlevelsesfraksjon:				Overlevelsesfraksjon:			
SF	2,03			SF	0,25		
Sd SF	0,59			Sd SF	0,23		
<p>Forsøk: C Dag 14: PE= 0,472</p>				<p>Forsøk: C Dag 17: PE= 0,518</p>			
Aktivitet	Ubestrålt	1,6 Ci/mol		Aktivitet	Ubestrålt	1,6 Ci/mol	
Flaske 1	102	30		Flaske 1	101	57	
Flaske 2	95	37		Flaske 2	113	75	
Flaske 3	85	28		Flaske 3	98	70	
Flaske 4	89	58		Flaske 4	104	74	
Flaske 5	101	35		Flaske 5	102	54	
Ant. Utsådde celler	200	200		Ant. Utsådde celler	200	200	
Gjennomsnittlig antall				Gjennomsnittlig antall			
kolonier per flaske: N	94,40	37,60		kolonier per flaske: N	103,60	66,00	
Sd N	6,62	10,71		Sd N	5,08	8,79	
Overlevelsesfraksjon:				Overlevelsesfraksjon:			
SF	0,40			SF	0,64		
Sd SF	0,12			Sd SF	0,09		

<p>Forsøk: C Dag 21: PE= 0,253</p>				<p>Forsøk: C Dag 24: PE= 0,18</p>			
Aktivitet	Ubestrålt	1,6 Ci/mol		Aktivitet	Ubestrålt	1,6 Ci/mol	
Flaske 1	61	43		Flaske 1	53	19	
Flaske 2	50	46		Flaske 2	27	27	
Flaske 3	58	27		Flaske 3	35	24	
Flaske 4	55	59		Flaske 4	29	24	
Flaske 5	29	52		Flaske 5	36	32	
Ant. Utsådde celler	200	200		Ant. Utsådde celler	200	200	
Gjennomsnittlig antall				Gjennomsnittlig antall			
kolonier per flaske: N	50,60	45,40		kolonier per flaske: N	36,00	25,20	
Sd N	11,39	10,71		Sd N	9,17	4,26	
Overlevelsesfraksjon:				Overlevelsesfraksjon:			
SF	0,90			SF	0,70		
Sd SF	0,29			Sd SF	0,21		
<p>Forsøk: C Dag 28: PE= 0,369</p>							
Aktivitet	Ubestrålt	1,6 Ci/mol					
Flaske 1	57	9					
Flaske 2	86	4					
Flaske 3	75	6					
Flaske 4	79	5					
Flaske 5	72	10					
Ant. Utsådde celler	200	200					
Gjennomsnittlig antall							
kolonier per flaske: N	73,80	6,80					
Sd N	9,62	2,32					
Overlevelsesfraksjon:							
SF	0,09						
Sd SF	0,03						

Forsøk D

Forsøk: D		Forsøk: D			
Dag 0:		Dag 4:			
PE=	0,529	PE=	0,55		
Aktivitet	Ubestrålt	Aktivitet	Ubestrålt	0,27	0,53
	t		t	Ci/mol	Ci/mol
Flaske 1	110	Flaske 1	116	71	55
Flaske 2	103	Flaske 2	102	76	71
Flaske 3	116	Flaske 3	109	81	77
Flaske 4	98	Flaske 4	120	73	74
Flaske 5	102	Flaske 5	103	72	62
Ant. Utsådde celler	200	Ant. Utsådde celler	200	200	200
Gjennomsnittlig antall		Gjennomsnittlig antall			
kolonier per flaske: N	105,80	kolonier per flaske: N	110,00	74,60	67,80
Sd N	6,40	Sd N	7,07	3,61	8,13
Overlevelsesfraksjon: SF		Overlevelsesfraksjon: SF		0,68	0,62
Sd SF		Sd SF		0,05	0,08

Forsøk: D		Forsøk: D			
Dag 7:		Dag 11:			
PE=	0,506	PE=	0,641		
Aktivitet	Ubestrålt	Aktivitet	Ubestrålt	0,27	0,53
	t		t	Ci/mol	Ci/mol
Flaske 1	87	Flaske 1	116	68	96
Flaske 2	109	Flaske 2	143	75	107
Flaske 3	122	Flaske 3	125	58	97
Flaske 4	96	Flaske 4	129	53	92
Flaske 5	92	Flaske 5	128	49	86
Ant. Utsådde celler	200	Ant. Utsådde celler	200	200	200
Gjennomsnittlig antall		Gjennomsnittlig antall			
kolonier per flaske: N	101,20	kolonier per flaske: N	128,20	60,60	95,60
Sd N	12,70	Sd N	8,70	9,60	6,89
Overlevelsesfraksjon: SF		Overlevelsesfraksjon: SF		0,47	0,75
Sd SF		Sd SF		0,08	0,07

Forsøk: D Dag 14: PE= 0,401					Forsøk: D Dag 21: PE= 0,386				
		0,27	0,53			0,27	0,53		
Aktivitet	Ubestrålt	Ci/mol	Ci/mol		Aktivitet	Ubestrålt	Ci/mol	Ci/mol	
Flaske 1	76	91	97		Flaske 1	81	100	48	
Flaske 2	76	115	93		Flaske 2	76	99	66	
Flaske 3	98	91	78		Flaske 3	68	95	63	
Flaske 4	64	108	93		Flaske 4	86	81	51	
Flaske 5	87	94	111		Flaske 5	75	100	50	
Ant. Utsådde celler	200	200	200		Ant. Utsådde celler	200	200	200	
Gjennomsnittlig antall					Gjennomsnittlig antall				
kolonier per flaske: N	80,20	99,80	94,40		kolonier per flaske: N	77,20	95,00	55,60	
Sd N	11,50	9,87	10,54		Sd N	6,05	7,24	7,39	
Overlevelsesfraksjon: SF		1,24	1,18		Overlevelsesfraksjon: SF		1,23	0,72	
Sd SF		0,22	0,21		Sd SF		0,13	0,11	
Forsøk: D Dag 39: PE= 0,359					Forsøk: D Dag 48: PE= 0,514				
		0,27	0,53			0,27	0,53		
Aktivitet	Ubestrålt	Ci/mol	Ci/mol		Aktivitet	Ubestrålt	Ci/mol	Ci/mol	
Flaske 1	75	24	55		Flaske 1	95	125	54	
Flaske 2	73	34	55		Flaske 2	101	97	87	
Flaske 3	76	31	51		Flaske 3	90	61	80	
Flaske 4	61	40	68		Flaske 4	116	60	49	
Flaske 5	74	25	55		Flaske 5	112	43	21	
Ant. Utsådde celler	200	200	200		Ant. Utsådde celler	200	200	200	
Gjennomsnittlig antall					Gjennomsnittlig antall				
kolonier per flaske: N	71,80	30,80	56,80		kolonier per flaske: N	102,80	77,20	58,20	
Sd N	5,49	5,91	5,81		Sd N	9,87	29,68	23,63	
Overlevelsesfraksjon: SF		0,43	0,79		Overlevelsesfraksjon: SF		0,75	0,57	
Sd SF		0,09	0,10		Sd SF		0,30	0,24	

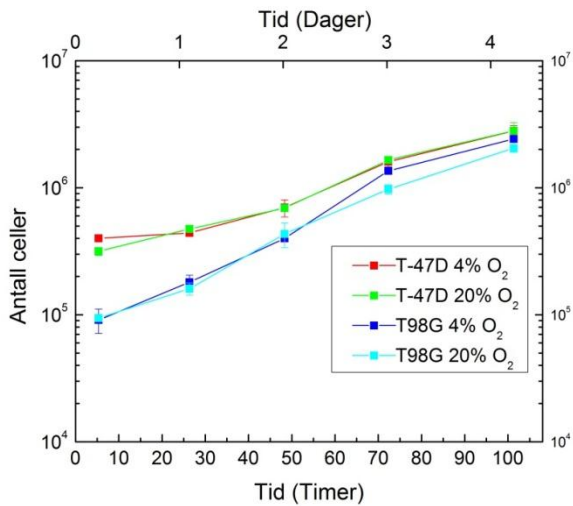
Forsøk E

<p>Forsøk: E Dag 1: PE= 0,269</p> <p>Aktivitet Ubestrålt</p> <p>Flaske 1 54</p> <p>Flaske 2 59</p> <p>Flaske 3 56</p> <p>Flaske 4 57</p> <p>Flaske 5 43</p> <p>Ant. Utsådde celler 200</p> <p>Gjennomsnittlig antall kolonier per flaske: N 53,80 Sd N 5,64</p> <p>Overlevelsesfraksjon: SF Sd SF</p>	<p>Forsøk: E Dag 7: PE= 0,233</p> <p style="text-align: right;">0,53</p> <p>Aktivitet Ubestrålt Ci/mol</p> <p>Flaske 1 57 32</p> <p>Flaske 2 42 23</p> <p>Flaske 3 45 32</p> <p>Flaske 4 42 23</p> <p>Flaske 5 47 20</p> <p>Ant. Utsådde celler 200 200</p> <p>Gjennomsnittlig antall kolonier per flaske: N 46,60 26,00 Sd N 5,54 5,02</p> <p>Overlevelsesfraksjon: SF 0,56 Sd SF 0,13</p>
<p>Forsøk: E Dag 14: PE= 0,264</p> <p style="text-align: right;">0,53</p> <p>Aktivitet Ubestrålt Ci/mol</p> <p>Flaske 1 46 40</p> <p>Flaske 2 47 44</p> <p>Flaske 3 64 35</p> <p>Flaske 4 52 42</p> <p>Flaske 5 55 32</p> <p>Ant. Utsådde celler 200 200</p> <p>Gjennomsnittlig antall kolonier per flaske: N 52,80 38,60 Sd N 6,49 4,45</p> <p>Overlevelsesfraksjon: SF 0,73 Sd SF 0,12</p>	<p>Forsøk: E Dag 21: PE= 0,214</p> <p style="text-align: right;">0,53</p> <p>Aktivitet Ubestrålt Ci/mol</p> <p>Flaske 1 36 57</p> <p>Flaske 2 39 65</p> <p>Flaske 3 53 46</p> <p>Flaske 4 48 70</p> <p>Flaske 5 38 65</p> <p>Ant. Utsådde celler 200 200</p> <p>Gjennomsnittlig antall kolonier per flaske: N 42,80 60,60 Sd N 6,55 8,40</p> <p>Overlevelsesfraksjon: SF 1,42 Sd SF 0,29</p>

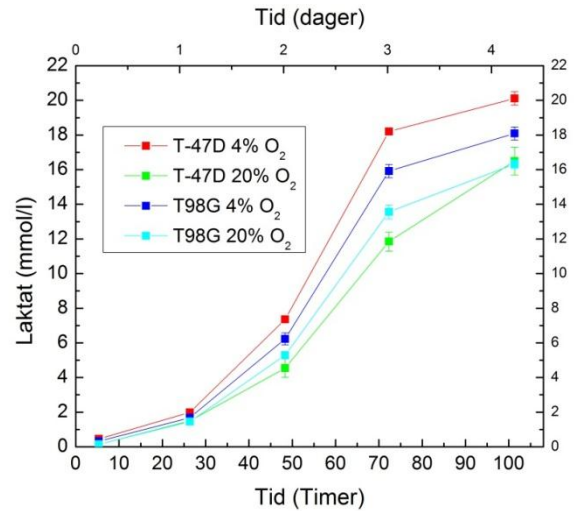
Forsøk: E				Forsøk: E			
Dag 28:				Dag 35:			
PE= 0,277				PE= 0,338			
0,53				0,53			
Aktivitet	Ubestrålt	Ci/mol		Aktivitet	Ubestrålt	Ci/mol	
Flaske 1	62	44		Flaske 1	58	28	
Flaske 2	63	44		Flaske 2	72	25	
Flaske 3	55	49		Flaske 3	70	39	
Flaske 4	54	39		Flaske 4	60	45	
Flaske 5	43	42		Flaske 5	78	29	
Ant. Utsådde celler	200	200		Ant. Utsådde celler	200	200	
Gjennomsnittlig antall				Gjennomsnittlig antall			
kolonier per flaske: N	55,40	43,60		kolonier per flaske: N	67,60	33,20	
Sd N	7,17	3,26		Sd N	7,53	7,55	
Overlevelsesfraksjon:				Overlevelsesfraksjon:			
SF		0,79		SF		0,49	
Sd SF		0,12		Sd SF		0,12	
Forsøk: E				Forsøk: E			
Dag 46:				Dag 49:			
PE= 0,232				PE= 0,311			
0,53				0,53			
Aktivitet	Ubestrålt	Ci/mol		Aktivitet	Ubestrålt	Ci/mol	
Flaske 1	49	31		Flaske 1	59	30	
Flaske 2	50	27		Flaske 2	68	23	
Flaske 3	43	23		Flaske 3	52	27	
Flaske 4	45	32		Flaske 4	67	25	
Flaske 5	45	25		Flaske 5	65	29	
Ant. Utsådde celler	200	200		Ant. Utsådde celler	200	200	
Gjennomsnittlig antall				Gjennomsnittlig antall			
kolonier per flaske: N	46,40	27,60		kolonier per flaske: N	62,20	26,80	
Sd N	2,65	3,44		Sd N	5,98	2,56	
Overlevelsesfraksjon:				Overlevelsesfraksjon:			
SF		0,59		SF		0,43	
Sd SF		0,08		Sd SF		0,06	

Vedlegg E: Metabolisme-forsøk I

Data fra forsøk I og forsøk III som ble gjort for å utforske parametere relater til metabolismen til T-47D og T98G.

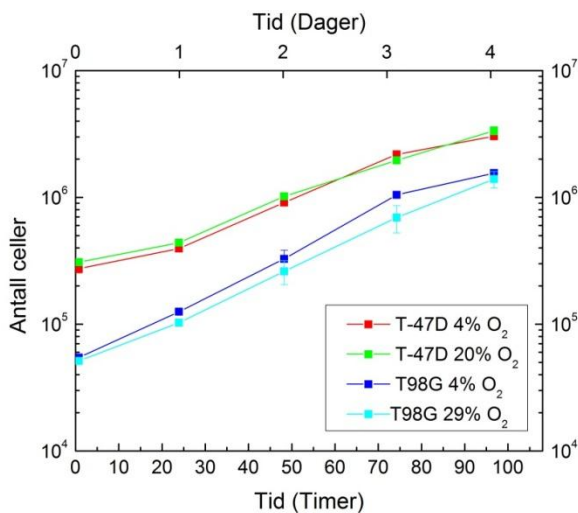


A)

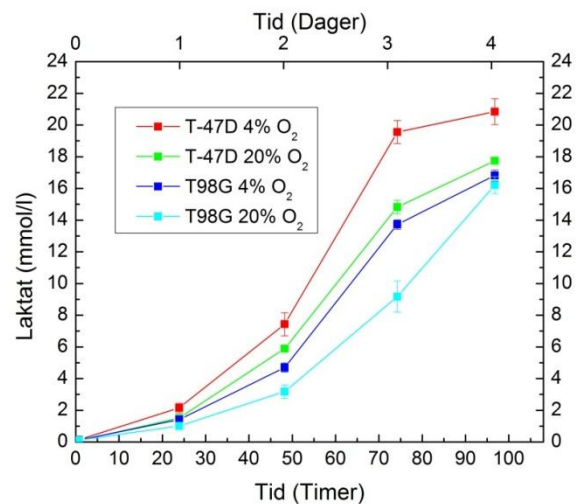


B)

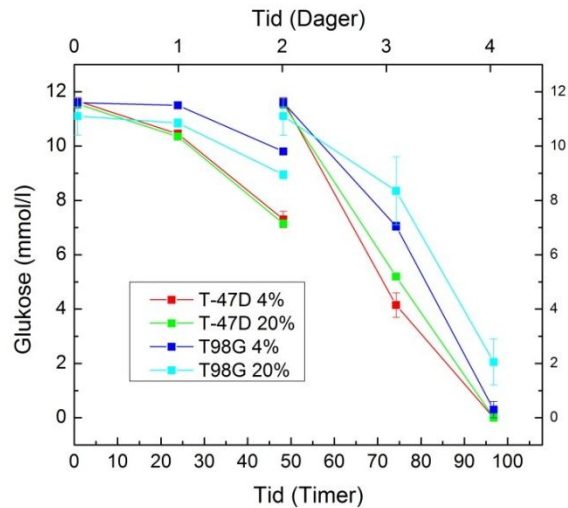
Figur 35: Panel A) viser antall T98G og T-47D celler som funksjon av tid etter forsøksstart og panel B) viser akkumulert laktat i mediet for T-47D og T98G celler som funksjon av tid etter forsøksstart. Akkumulert laktat beregnes ved å trekke fra verdien for laktat i mediet. På dag 3 og dag 4 legges laktat-verdien fra dag 2 til, slik korrigeres det for at det ble foretatt et mediumsift. Data er hentet fra forsøk G; delforsøk forsøk I, som ble gjennomført desember 2010.



A)



B)



C)

Figur 36: Panel A) viser antall T98G og T-47D celler som funksjon av tid etter forsøksstart og panel B) viser akkumulert laktat i mediet for T-47D og T98G celler som funksjon av tid etter forsøksstart. Akkumulert laktat beregnes ved å subtrahere verdien for laktat i mediet. På dag 3 og dag 4 legges laktat-verdien fra dag 2 til, slik korrigeres det for at det ble foretatt et mediumskift. Panel C) Viser glukose i mediet for T-47D og T98G celler. Dag 2 ble det foretatt et mediumskift og dette er korrigert for. Data er hentet fra forsøk G; delforsøk forsøk III, som ble gjennomført april 2011. Detaljer om forsøket finnes i avsnitt 3.7 [Laktat- og glukose-målinger](#) s. 34.