

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

Ida Aspmodal



Masteroppgave i fysikk

Fysisk Institutt
UNIVERSITETET I OSLO

September 2011

© Ida Aspmodal

2011

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

Ida Aspmodal

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Forord

Arbeidet med denne oppgaven ble utført ved gruppen for Biofysikk og medisinsk fysikk ved Universitetet i Oslo.

Jeg ønsker først og fremst å takke mine veiledere, dr. philos. Erik Olai Pettersen og dr. scient. Nina F. J. Edin, for et inspirerende arbeidsmiljø, og for entusiastiske og konstruktive tilbakemeldinger under hele skriveprosessen. Takker også Siri Fenne for god opplæring i labrutinene, og Joe A. Sandvik for hans ekspertise på alle felt. Ønsker også å takke Stine Christoffersen for godt samarbeid, både på cellelaben og ellers. Jeg har trivdes svært godt på cellelaben, og det er deres fortjeneste!

En stor takk rettes til alle på gruppa for biofysikk, både studenter og ansatte, for stor faglig kunnskap, godt miljø og lange lunsjer. Spesielt fortjener Siv en takk for både moralsk støtte og utenomsnakk.

Sist, men ikke minst, vil jeg takke Lars for all støtte og oppmuntring underveis og for hjelp til å koble av fra det faglige når jeg trengte det. Jeg gleder meg til alt det spennende som venter oss!

Blindern, september 2011

Ida Aspmodal

Sammendrag

Humane cellers respons på stråling er avhengig av doseraten som strålingen leveres med. I denne oppgaven har en human cellelinje, T98G, blitt bestrålt med lave doserater for å finne effekten av strålingen ved bestrålingstider på flere uker.

Strålingen ble levert ved at en viss mengde av den radioaktive isotopen [^3H] (tritium) ble bundet til den essensielle aminosyren valin og inkorporert i cellenes protein. Dosimetri- og effektforsøk ble først utført med spesifikk aktivitet på $1.67 \mu\text{Ci/ml}$ i mediet. Celle- og kjernediametrene til cellene ble funnet ved hjelp av fasekontrastmikroskopiske undersøkelser. Den gjennomsnittlige cellediameteren ble funnet til å være $20.66 \pm 0.622 \mu\text{m}$, med tilhørende kjernediameter på $11.11 \pm 0.182 \mu\text{m}$. Doseraten til cellekjernen ble beregnet ut fra en modell for cellulær tritiumdosimetri utviklet av Goddu et al. (Goddu, Howell et al. 1997), og ble funnet å være $0.0525 \pm 0.01 \text{ Gy/time}$.

Doblingstiden til cellene ble deretter bestemt for celler som vokste på medium med forskjellig spesifikk aktivitet av [^3H]-valin ($0.27, 0.53, 1.67, 6.5$ og $19.5 \mu\text{Ci/ml}$) og for ubestrålte kontrollceller som vokste på medium tilsatt ikke-radioaktiv valin. Det ble utført forsøk for å finne doblingstiden den første uken etter inkorporeringen av [^3H]-valin, i tillegg til at det for cellene som hadde vokst på radioaktivt medium med spesifikk aktivitet på $6.5 \mu\text{Ci/ml}$ ble utført forsøk for å finne doblingstiden også etter 7 dager på radioaktivt medium. Doblingstidene for de to laveste doseratene så ut til å være noe kortere enn for den ubestrålte kontrollen, mens det for cellene som vokste på radioaktivt medium på $6.5 \mu\text{Ci/ml}$ så ut til å ha en noe lengre doblingstid. Imidlertid var ingen av disse forskjellene i doblingstid signifikante. Den høyeste doseraten, svarende til en spesifikk aktivitet på $19.5 \mu\text{Ci/ml}$, resulterte i en kraftig økning i doblingstid etter 4 dager på radioaktivt medium, og etter 7 dager på radioaktivt medium var doblingstiden mer enn doblet i forhold til den ubestrålte kontrollen.

Cellesyklusfordelingen til de bestrålte cellene ved to ulike tidspunkter i bestrålingsperioden ble funnet ved hjelp av flowcytometri. For de tre laveste doseratene ble det ikke observert noen tydelig endring i celsesyklusfordelingen i forhold til den ubestrålte kontrollen. Cellene som vokste på radioaktivt medium med spesifikk aktivitet på $6.5 \mu\text{Ci/ml}$ viste en akkumulering av celler i G_2 -fasen etter 11 dager, da fraksjonen av celler i G_2 -fasen var omtrent doblet i forhold til den ubestrålte kontrollen. Endringen i celsesyklusfordelingen var enda mer tydelig for cellene som vokste på radioaktivt medium med spesifikk aktivitet på $19.5 \mu\text{Ci/ml}$, hvor fraksjonen av celler i G_2 -fasen etter 7 dager var omtrent firedoblet i forhold til den ubestrålte kontrollen.

Det ble utført celleoverlevelsesforsøk for bestrålingstider opp til 45 uker for celler som vokste på [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på $0.27, 0.53, 1.67, 6.5$ og $19.5 \mu\text{Ci/ml}$. Celleoverlevelsesforsøkene viste at cellene tolererte bestrålingen med de to laveste doseratene gjennom hele bestrålingsperioden. For cellene som vokste på radioaktivt medium med spesifikk aktivitet på 6.5 og $19.5 \mu\text{Ci/ml}$ ble det observert en stor endring i celleoverlevelse, og overlevelsesfraksjonen sank til under 0.1% etter hhv. 3 og 18 dager. Cellene som vokste på [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på $1.67 \mu\text{Ci/ml}$ opplevde et kraftig fall i overlevelsesfraksjon, før overlevelsesfraksjonen steg igjen og stabiliserte seg på $50-60 \%$ relativt til en ubestrålt kontroll. Denne overraskende utviklingen kunne tyde på en adaptasjon til lavdosebestrålingen, muligens grunnet en seleksjonsprosess. Flowcytometriforsøk utført på disse

cellene viste at de hadde endret sin ploiditet, ved at de hadde et lavere DNA-innhold enn villtypen av T98G-cellene.

Det ble videre utført akuttbestrålingsforsøk på disse cellene. Etter at cellene hadde vokst på [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 11 måneder, ble de gitt akutte stråledoser ved bruk av 220 kV røntgenstråling. Doseraten som ble levert ved røntgenbestrålingen ble, ved hjelp av ESR-dosimetri, funnet å være 0.272 ± 0.005 Gy/min, og cellene ble gitt doser på 0.11, 0.54, 1.09, 2.72, 4.89 og 6.52 Gy. For villtypen av T98G-cellene kunne det for de aller laveste dosene observeres en antydning til hypersensitivitet ved den laveste dosen som ikke kunne ses hos cellene som hadde gått på [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml forut for akuttbestrålingen. Det så i tillegg ut til at overlevelsesfraksjonen for de lavdoseratebestrålte cellene lå noe høyere enn for villtypen. Imidlertid tyder p-verdiene på at det ikke er noen signifikant forskjell i celleoverlevelse for kontrollcellene og cellene som hadde blitt lavdoseratebestrålt i 10 måneder før akuttbestrålingen.

Abstract

The response of human cells to radiation is dependent on the dose rate at which the radiation is delivered. In the present study, the T98G human glioblastoma cell line was exposed to low dose-rate irradiation with the purpose of determining the effect of the irradiation after exposure times of several weeks.

The radiation dose was delivered to the cells by adding a fraction of the radioactive isotope [^3H] (tritium) to the growth medium of the cells. [^3H] was bound to the essential amino acid valine, which was incorporated into the cellular proteins. The dose rate to the nucleus was calculated using a model for cellular tritium micro dosimetry, developed by Goddu et al (Goddu, Howell et al. 1997). The cell and nucleus diameter was found using phase-contrast microscopic techniques. The calculated mean cell diameter was found to be $20.66 \pm 0.622 \mu\text{m}$, with a mean nucleus diameter of $11.11 \pm 0.182 \mu\text{m}$. An initial medium specific activity of $1.67 \mu\text{Ci/ml}$ resulted in a dose-rate to the T98G-nucleus of $0.0525 \pm 0.01 \text{ Gy/h}$.

The mean doubling time was determined for unirradiated cells growing in medium containing non-radioactive valine and for cells growing on radioactive medium with different specific activities of [^3H]-valine (0.27, 0.53, 1.67, 6.5 and $19.5 \mu\text{Ci/ml}$). An experiment was performed to determine the doubling time for the irradiated cells the first week after the incorporation of [^3H]-valine, and for the cells growing in medium with the highest specific activity ($19.5 \mu\text{Ci/ml}$), was also performed an experiment to determine the doubling time 7 days after the incorporation of [^3H]-valine. The calculated mean doubling time for the irradiated cells growing in medium giving the two lowest dose rates (with specific activities of 0.28 and $0.53 \mu\text{Ci/ml}$) appeared to be slightly shorter than the doubling time for the unirradiated cells, although not significant, whereas for cells growing in [^3H]-medium with a specific activity of $1.67 \mu\text{Ci/ml}$ there did not seem to be any difference in doubling time. The highest dose rate, delivered by [^3H]-medium with a specific activity of $19.5 \mu\text{Ci/ml}$, resulted in a significant increase in the mean doubling time 4 days after the incorporation of [^3H]-valine, and 7 days after the incorporation of [^3H]-valine, the mean doubling time was twice as high as the mean doubling time for the unirradiated cells.

The cell cycle distribution was found for unirradiated cells growing in medium containing non-radioactive valine and cells growing in radioactive medium with different specific activities of [^3H]-valine (0.27, 0.53, 1.67, 6.5 and $19.5 \mu\text{Ci/ml}$) using flow cytometry. For the cells growing in medium giving the three lowest dose rates (with specific activities of 0.28, 0.53 and $1.67 \mu\text{Ci/ml}$), no changes in cell cycle distribution were observed. The cells growing in [^3H]-medium with specific activity of $6.5 \mu\text{Ci/ml}$ showed an accumulation of cells in the G_2 -phase of the cell cycle after 11 days, at which time the fraction of cells in the G_2 -phase was almost doubled compared to the unirradiated cells. The change in cell cycle distribution was even more pronounced for cells growing in [^3H]-medium with specific activity of $19.5 \mu\text{Ci/ml}$, where the fraction of cells in the G_2 -phase was 4 times as large as for the unirradiated cells.

In the cellular survival experiments performed in this work, the survival of cells irradiated with the use of different [³H]-medium specific activities (0.27, 0.53, 1.67, 6.5 and 19.5 μCi/ml) for irradiation times up to 45 weeks was measured. The cell survival experiments showed that the cells tolerated the two lowest dose rates throughout the irradiation period. For cells growing in [³H]-medium with a specific activity of 6.5 and 19.5 μCi/ml, the surviving fraction changed dramatically, and dropped below 0.1 % after 3 and 18 days, respectively. The cells growing in [³H]-medium with a specific activity of 1.67 μCi/ml experienced an initial rather dramatic decline in cell survival, before the surviving fraction increased and stabilized at 50-60 % compared to the unirradiated cells. This rather surprising development with a steep decline in clonogenic ability followed by a more radioresistant phase suggests an adaptation to the low dose rate irradiation, possibly due to a selection process. Flowcytometric experiments performed on these cells showed that they had an altered ploidy with a lower DNA content compared to the unirradiated T98G cells.

After an irradiation period of 11 months (with the use of [³H]-medium with specific activity of 1.67 μCi/ml), the cells were given acute radiation doses using 220 kV X-rays. The dose rate was found to be 0.272 ± 0.005 Gy/min using EPR-spectroscopy, and the cells were given doses of 0.11, 0.54, 1.09, 2.72, 4.89 and 6.52 Gy. For the lowest dose given, the wildtype T98G cells demonstrated low dose hyper radiosensitivity. This increased radiosensitivity was not observed for the cells growing in [³H]-medium with specific activity of 1.67 μCi/ml for 11 months prior to the experiment. It appears that the surviving fraction of the cells given continuous low dose radiation for 11 months prior to the acute irradiation is slightly higher than that of normal T98G cells. However, the p-values indicated no significant difference.

Innholdsfortegnelse

Forord	V
Sammendrag	VII
Abstract	IX
Innholdsfortegnelse	XI
1 Innledning	1
2 Teori	3
2.1 Strålingsfysikk	3
2.1.1 Ioniserende stråling	3
2.1.2 Radioaktivitet	3
2.1.3 Tritium	4
2.1.4 Strålingens vekselvirkning med materie	5
2.2 Cellebiologi	8
2.2.1 Cellesyklus	8
2.2.2 Regulering av cellesyklus	9
2.2.3 Proliferasjons- og tumorsupressorgener	9
2.2.4 Cellevekst	10
2.3 Strålingsbiologi	11
2.3.1 Cellulær strålerespons	11
2.3.2 Overlevelseskurver	13
2.3.3 Bestråling ved lave doserater	15
2.4 Dosimetri	16
2.4.1 Klassisk dosekalkulering	16
2.4.2 Problemer i forbindelse med cellulær tritiumdosimetri	16
2.4.3 Cellulær tritiumdosimetri	17
2.4.4 ESR-dosimetri	19
2.5 Væskescintillasjonstelling	21
2.6 Flowcytometri	22
2.7 Noen statistiske betraktninger	23
2.7.1 Usikkerhetsberegninger	23
2.7.2 Testing av signifikans	24
3 Metoder	25

3.1	Celledyrkning	25
3.1.1	Cellelinjen	25
3.1.2	Utstyr og sterile rutiner	25
3.1.3	Omsetting	26
3.2	Bestråling	27
3.2.1	Inkorporering av tritium	27
3.2.2	Ekstern bestråling	27
3.2.3	Strålehygiene	28
3.3	Celletelling	28
3.3.1	Telling i Bürkerkammer	28
3.3.2	Telling ved bruk av flowcytometer	28
3.4	Bestemmelse av doblingstider	29
3.4.1	Behandling av cellene	29
3.4.2	Beregning av doblingsrate	30
3.5	Celleoverlevelsesforsøk	30
3.5.1	Behandling av cellene	30
3.5.2	Beregning av overlevelsesfraksjon	31
3.5.3	Korreksjon for multiplisitet	31
3.6	Bestemmelse av celle- og kjernestørrelse	33
3.6.1	Preparering av cellene	33
3.6.2	Mikroskopering og bildeopptak	33
3.6.3	Bildebehandling og –analyse	34
3.7	Dosimetri	35
3.7.1	Væskescintillasjonstelling	35
3.7.2	Preparering av celler og kjerner for scintillasjonstelling	35
3.8	Flowcytometri	36
3.8.1	Preparering av cellene	36
3.8.2	Presentasjon av data	37
4	Resultater	39
4.1	Celle- og kjernestørrelsesmålinger	39
4.2	Cellulær tritiumdosimetri	40
4.2.1	Cellulære S-verdier	40
4.2.2	Cellulær og nukleær aktivitet	40

4.2.3	Bestemmelse av f-verdier	40
4.2.4	Doserate til kjernen	41
4.2.5	Måling av spesifikk aktivitet i medium	42
4.3	Alaninosimetri	42
4.4	Doblingstid	43
4.5	Celleoverlevelsesforsøk	45
4.6	Cellenes aldersfordeling	48
4.7	Doseresponskurver	54
4.8	Degradering av radioaktivitet	56
5	Diskusjon	59
5.1	Cellekultivering og vedlikehold	59
5.2	Dosimetri	59
5.2.1	Celle- og kjernestørrelsesmåling	59
5.2.2	Dosimetrisk beregninger	61
5.3	Alaninosimetri	63
5.4	Doblingstid	64
5.5	Celleoverlevelse	65
5.6	Cellesyklusfordeling	68
5.7	Effektforsøk etter akuttbestråling	68
5.8	Forslag til videre arbeid	69
6	Konklusjon	71
	Litteraturliste	73
	Vedlegg A:	77
	Vedlegg B:	81
	Vedlegg C:	83
	Vedlegg D:	85
	Vedlegg E:	87
	Vedlegg F:	95
	Vedlegg G:	105
	Vedlegg H:	111
	Vedlegg I	115

1 Innledning

Alle mennesker eksponeres for stråling gjennom hele livet. Det er radioaktive isotoper i kroppen vår, i husene våre, i luft, vann og i bakken, og vi utsettes alle for kosmisk stråling fra verdensrommet. For en gjennomsnittsnordmann utgjør denne strålingen en årlig dose på omtrent 2 mGy (Henriksen and Henriksen 1998).

Kroppen vår består av celler som reproduseres ved celledeling og er organisert i ulike vev, og normalt er det balanse mellom tilvekst av celler og celledød. Når denne balansen forstyrres, kan man få kreft. Kreftceller karakteriseres av to arvelige egenskaper; de mangler den normale vekstkontrollen og deler seg derfor ukontrollert, og de invaderer og koloniserer områder som normalt er reservert for andre celler (Alberts 2008). Kreft er, sammen med hjerte- og karsykdommer, den sykdommen som dreper flest mennesker. I 2009 ble det diagnostisert 27 520 nye tilfeller av kreft i Norge (Kreftforeningen 2011). Faktorer som kjemikaler (for eksempel fra røyking eller usunt kosthold), bakterier, virus og ioniserende stråling kan øke risikoen for å utvikle kreft.

Selv om ioniserende stråling kan øke risikoen for kreft, brukes stråling både til behandling og smertelindring ved kreft. Stråleterapi er, etter kirurgi, den vanligste behandlingsformen for kreft, og minst 50 % av alle kreftpasienter kan ha nytte av strålebehandling i én eller flere faser i sykdomsforløpet (SNL 2011). Etersom en kreftcelle kun er farlig så lenge den deler seg (prolifererer), kan man helbrede kreft ved å påvirke cellens evne til å proliferere. Ioniserende stråling kan skade cellens DNA, slik at cellen slutter å vokse, skrumper inn og dør. Man vil ved strålebehandling alltid gi en viss dose til normalvevet rundt kreftsvulsten. Målet med behandlingen er at man skal levere nok stråling til kreftsvulsten slik at alle kreftcellene dør, samtidig som de friske cellene i nærheten av kreftsvulsten ikke skades.

Mens doseraten fra den naturlige bakgrunnsstrålingen som nevnt ovenfor er lav, er doseratene som leveres ved stråleterapi generelt høye, typisk på flere Gy/min ved ekstern stråleterapi og typisk mellom 0.3 og 1 Gy/time ved brachyterapi, hvor de radioaktive strålekildene plasseres inne i pasientens kropp (Heller 1993). Strålefølsomheten til humane celler varierer med varierende doserate. Dersom doseraten reduseres og behandlingstiden forlenges, reduseres den biologiske effekten av den gitte dosen. Dette skyldes at cellene ved avtagende doserate får lengre tid til å reparere subletale skader slik at disse ikke rekker å samvirke om å danne letale stråleskader. Samtidig vil repopulasjon under bestrålingen bidra til at tapet på grunn av celledød blir mindre for hurtigprolifererende cellelinjer, dermed reduseres cellepopulasjonens totale strålefølsomhet (Hall and Giaccia 2006). Ved stråledoser under ~ 0.5 Gy observeres ofte en større strålefølsomhet enn det man hadde regnet med for enkelte cellyper, fulgt av en økning i celleoverlevelse ved høyere doserater, typisk ved doserater over ~ 0.7 Gy. Disse fenomenene kalles lavdose hypersensitivitet (HRS) og induert stråleresistans. HRS er funnet hos mange cellelinjer, blant annet viser T98G-celler en drastisk reduksjon i celleoverlevelse for doser under 0.3 Gy (Short, Mayes et al. 1999; Joiner, Marples et al. 2001).

Ved stråleterapi er målet å avgrense dosen til et målområde som defineres av kreftsvulsten, slik at de store dosene leveres til dette området. Dosen vil avta med avstanden fra strålefeltet, og cellene i det perifere området av kreftsvulsten vil typisk få en mye lavere dose enn den delen av kreftsvulsten som

befinner seg midt i strålefeltet. Man vil også få en viss doseavsetning i det omkringliggende normalvevet. Det er ikke fullstendig kjent hvordan tumorceller og normalvev reagerer på denne lavdoseratebestrålingen, og det er derfor viktig å undersøke hvilken effekt lavdoseratebestrålingen har.

T-47D-cellers respons på lavdoseratebestråling ble undersøkt ved bestråling med doseratene 0.041 og 0.010 Gy/time, levert til cellekjernen ved hjelp av [³H] (tritium) inkorporert i cellenes protein. Ved den laveste doseraten, 0.010 Gy/time, ble det ikke observert noen signifikante endringer, verken i doblingstid eller celleoverlevelse, mens det ved den høyeste doseraten ble vist en økning i doblingstid og en reduksjon i celleoverlevelse i løpet av den andre bestrålingsuka (Søvik 2002). Ingunn Bjørhovde videreførte de innledende forsøkene som ble utført av Søvik ved å bestråle den samme celletypen, T-47D, med den laveste doseraten, 0.010 Gy/time, over flere uker, i tillegg til at celler fra cellelinjen NHIK 3025 ble bestrålt. T-47D- og NHIK 3025-cellene ble bestrålt med en doserate på hhv. 0.015 Gy/time og 0.013 Gy/time. Celleoverlevelsesforsøk ble gjort for bestrålingstider opp til 20 uker, og det ble funnet at både T-47D- og NHIK 3025-cellene tolererte bestrålingen gjennom hele bestrålingsperioden, etter et fall i overlevelse ned til omtrent 60 – 80 % etter et par ukers bestråling. Det ble ikke observert noen tydelig endring i cellesyklusfordelingen for noen av cellelinjene, men doblingstiden for de bestrålte cellene viste seg utover i bestrålingsforløpet å være lenger enn for kontrollcellene (Bjørhovde 2006).

Hensikten med denne oppgaven var å videreføre de innledende forsøkene gjort av Søvik (Søvik 2002) og Bjørhovde (Bjørhovde 2006), ved å studere responsen til T98G glioblastomceller på lavdoseratebestråling levert av [³H]-valin inkorporert i cellenes protein. Dette er en krefttype som er relativt resistent mot kjemoterapi, og umulig å operere uten å berøre nærliggende normalvev (Davis 1989). Brachyterapi er den behandlingsmetoden som er mest brukt (Heller 1993), og det er derfor interessant å undersøke cellenes respons på lavdoseratebestråling. Vi ønsket å bruke samme doserate som i de tidligere forsøkene, og en del av oppgaven ble dermed å kartlegge dosimetrien for denne celletypen. Stråleresponsen ble så målt i form av endring i doblingstid og cellesyklusfordeling, i tillegg til at cellenes kolonidannende evne ble målt som funksjon av både totaldose og tid.

2 Teori

2.1 Strålingsfysikk

2.1.1 Ioniserende stråling

Ioniserende stråling er definert som stråling som har tilstrekkelig energi til å kunne ionisere atomer i mediet den brer seg i. Energien som trengs for å slå løs et valenselektron fra et atom er i størrelsesorden 4-25 eV, og strålingen må dermed ha en energi over dette for å kunne kalles ioniserende (Attix 2004).

Det er vanlig å dele ioniserende stråling inn i to hovedgrupper basert på hvordan strålingen avsetter sin energi i mediet; direkte og indirekte ioniserende. Direkte ioniserende stråling består av ladde partikler, for eksempel elektroner, protoner og ladde kjerner, og avsetter energien direkte i mediet gjennom coulombvekselvirkninger langs sporet til partikkelen. Indirekte ioniserende stråling består av fotoner og uladde partikler, som for eksempel nøytroner, og avsetter sin energi til ladde partikler i mediet, som så avsetter energien som for direkte ioniserende stråling (Attix 2004).

Det finnes to ulike typer fotoner, γ -fotoner og røntgenfotoner, som skilles fra hverandre gjennom måten de produseres på. γ -stråling dannes ved at en atomkjerne desintegrerer og sender ut et foton, mens røntgenstråling dannes ved at elektroner sendes mot et target og vekselvirker med atomene i dette. I target dannes røntgenstråling på to måter. Når det innkommende elektronet slår ut et atomært elektron, fylles den tomme plassen av et annet atom og et foton sendes ut. Dette kalles karakteristisk stråling, fordi energien til strålingen er avhengig av targetmaterialet. Når elektroner bremses opp ved vekselvirkning med en atomkjerne, mister de energi og det sendes ut fotoner som kalles bremsestråling (Kiefer 1990).

2.1.2 Radioaktivitet

Radioaktivitet er en prosess hvor en atomkjerne spontant desintegrerer ved å avgi stråling i form av partikler, elektromagnetisk stråling eller begge deler. Radioaktivitet er et stokastisk fenomen, og antallet atomer som vil desintegrere i løpet av et gitt tidsintervall kan kun bestemmes ved sannsynligheter (Khan 2010). Aktiviteten til en radioaktiv nuklide er gitt ved:

$$A = \frac{dN}{dt}, \quad (1)$$

hvor dN forteller hvor mange kjerner som forventes å desintegrere i løpet av tidsintervallet dt (Mayles, Nahum et al. 2007).

Aktiviteten til en radioaktiv nuklide har enheten bequerel (Bq) som angir antall desintegrasjoner per sekund:

$$1 \text{ Bq} = 1 \text{ s}^{-1}$$

Rutherford og Soddy etablerte i 1902 en lov angående radioaktivt henfall:

$$dN = -\lambda N dt \quad (2)$$

I følge dette uttrykket er antallet desintegrasjoner som inntreffer proporsjonalt med antall kjerner ved starttidspunktet, N , tidsintervallet dt og desintegrasjonskonstanten λ . Desintegrasjonskonstanten beskriver sannsynligheten for at nukliden vil desintegrere i løpet av tiden dt (Mayles, Nahum et al. 2007).

Ut fra uttrykket ovenfor finner man at antallet atomer ved tiden t er gitt ved:

$$N_t = N_0 e^{-\lambda t}, \quad (3)$$

hvor N_0 er antall radioaktive atomer ved starttidspunktet.

Fra definisjonen ovenfor har man at aktiviteten, A , også kan gis ved:

$$A = \lambda N, \quad (4)$$

noe som resulterer i følgende uttrykk for aktiviteten ved tid t :

$$A_t = A_0 e^{-\lambda t} \quad (5)$$

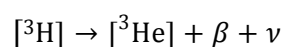
Halveringstiden er definert som tiden det tar før halvparten av nuklidene har desintegrert, og følgelig også før aktiviteten er redusert til halvparten av den initielle verdien. Halveringstiden, $t_{1/2}$, er gitt ved:

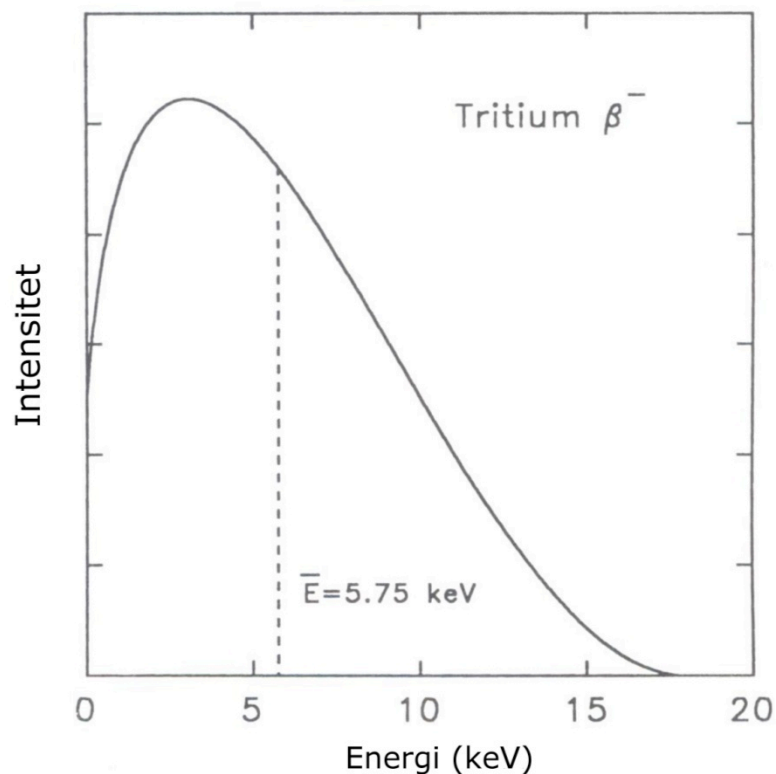
$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda} \quad (6)$$

2.1.3 Tritium

Tritium, [^3H], er en radioaktiv hydrogenisotop, og har en kjerne bestående av et proton og to nøytroner. Tritium emitterer lavenergetiske β -partikler, og har en halveringstid på 12.26 år (Chen 2006).

Bindingsenergien mellom de tre kjernepartiklene i tritium er lav, og som følge av dette er kjernen ustabil. Tritium desintegrerer til den stabile heliumisotopen [^3He] ved emisjon av et elektron (en β -partikkel) og et nøytrino:





Figur 1: Energispekteret til β -strålingen fra tritium (Morstin, Kopec et al. 1993). Figuren er modifisert.

Energispekteret til de emitterte elektronene er kontinuerlig, siden energien fordeles mellom elektronet og nøytrinoet, og er gitt i Figur 1. Gjennomsnittsenergien som frigis ved tritiumdesintegrasjon er 5.6 keV, og den maksimale energien er 18.6 keV. Ved dosimetrisk formål regner man celler som vannekvivalente, og det er dermed mest interessant å se på rekkeviddene i vann (Nikjoo, Goodhead et al. 1991). Gjennomsnitts- og maksimalenergien gitt ovenfor gir en gjennomsnittlig rekkevidde i vann på $0.56 \mu\text{m}$ og en maksimal rekkevidde på $6 \mu\text{m}$. På grunn av den lave energien og den korte rekkevidden i vann, utgjør ikke tritium noen ekstern strålerisiko (Chen 2006).

2.1.4 Strålingens vekselvirkning med materie

Fotoner vekselvirker med materie gjennom tre ulike spredningsprosesser; fotoelektrisk effekt, comptonspredning og pardannelse. De tre prosessene dominerer i ulike regioner av fotonenergispekteret. I biologisk vev dominerer den fotoelektriske effekten ved fotonenergier under 100 keV, pardannelse ved fotonenergier over 10 MeV og comptoneffekten i området mellom disse verdiene, og comptoneffekten er dermed den viktigste spredningsprosessen ved det energiområdet for røntgenstråling som er benyttet i denne oppgaven.

Ved fotoelektrisk effekt eksiteres et orbitalelektron ved absorpsjon av et foton. All energien til fotonet, bortsett fra energien som trengs for å løsrive elektronet, overføres først til atomet og deretter til elektronet som sparkes løs. Elektronet etterlater en ledig plass i atomskallet, som fylles av et elektron fra et ytre skall. Dette fører til frigjøring av energi i form av karakteristisk stråling eller utsendelse av løst bundne elektroner, Auger-elektroner. Ved comptonspredning vekselvirker fotonet med et fritt

elektron og overfører deler av sin energi til dette. Elektronet ses på som fritt dersom bindingsenergien til elektronet er mye lavere enn fotonenergien. Det innkommende fotonet fortsetter videre med redusert energi og endret bevegelsesretning. Ved pardannelse vekselvirker fotonet med det elektriske Coloumb-feltet til en atomkjerne og all energien brukes til dannelse av et elektron-positronpar. Denne prosessen inntreffer kun dersom energien til fotonet er over 1.022 MeV, som er energien som kreves for å danne positron-elektronparet, og restenergien deles mellom de to partiklene (Khan 2010)

Mens indirekte ioniserende fotoner vekselvirker sporadisk med materie i hendelser hvor det taper store deler av sin energi, er ladde partikler omgitt av et elektrisk Coloumb-felt, og vil vekselvirke med omtrent alle atomer de passerer. Dette vil føre til at partikkelen gradvis mister sin kinetiske energi, en såkalt continuous slowing-down approximation (CSDA). Sannsynligheten for at en ladd partikkel passerer gjennom et medium uten å vekselvirke med dette er null, og en partikkel med en energi på 1 – 10 MeV vil typisk gjennomgå rundt 10^5 vekselvirkninger før den har mistet all sin energi (Attix 2004).

Energioverføringen mellom en ladd partikkel og et atom kan foregå på flere måter, avhengig av avstanden mellom de to. Når avstanden mellom den ladde partikkelen og atomet er stor, vil partikkelens Coloumb-felt påvirke hele atomet og vi får en såkalt myk (soft/glancing) kollisjon. Dette kan føre til at atomet avbøyes, eksiteres eller ioniseres. Denne vekselvirkningsprosessen er den mest sannsynlige, men energien som overføres i hver prosess er liten (Attix 2004).

Når avstanden mellom den ladde partikkelen og atomet er liten, er det mer sannsynlig at partikkelen heller vekselvirker direkte med et atomelektron som sparkes løs fra atomet med en betydelig kinetisk energi og kalles et δ -elektron. Dette elektronet har høy nok energi til selv å ionisere andre atomer og molekyler, og vil avsette sin energi langs et spor separat fra sporet til primærpartikkelen. Dersom elektronet som sendes ut er fra et indre atomskall, vil det sendes ut røntgenstråler og/eller Auger-elektroner¹. Energien som overføres ved disse såkalte harde (hard/knock-on) kollisjonene er større enn ved myke kollisjoner, men de opptrer sjeldnere. Begge kollisjonstypene vil dermed bidra omtrent like mye til den totale mengden energi som avsettes ved disse vekselvirkningsprosessene (Attix 2004).

Det er også mulig for den ladde partikkelen å vekselvirke direkte med atomkjernen. 97-98 % av disse vekselvirkningene vil resultere i en elastisk spredning av den innkommende partikkelen. Dette er en viktig mekanisme for avbøyning av partikkelen, men vil ikke avsette mye energi til mediet. Ved de resterende 2-3 % av vekselvirkningene inntreffer en inelastisk spredningsprosess, hvor et foton mottar det meste (opp til 100 %) av energien til den innkommende partikkelen og emitteres. Dette resulterer i utsendelse av bremsestråling² (Attix 2004).

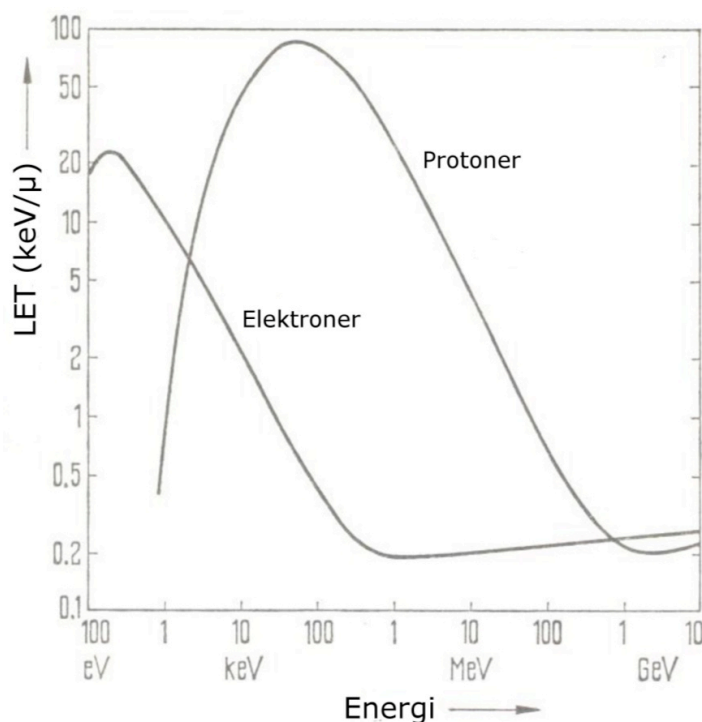
Den ladde partikkelens bremseevne, stopping power, gir et mål på partikkelens energiavsetning i mediet. For en ladd partikkel med kinetisk energi T i et gitt medium, er bremseevnen, dT/dx , definert som forventningsverdien til energitapet per lengdeenhet x i mediet (Attix 2004).

Bremseevnen gir et uttrykk for den gjennomsnittlige energien som tapes via både myke og harde kollisjoner. δ -strålene som dannes ved harde kollisjoner kan ha nok energi til å transportere den avsatte

¹ Oppstår dersom røntgenfotonet vekselvirker med et atomelektron og sparker dette løs fra atomet.

² Elektromagnetisk stråling som produseres når ladde partikler bremses ned ved vekselvirkning med andre ladde partikler, gir et kontinuerlig spekter.

energien langt bort fra sporet til primærpartikkelen. Partikkelens bremseevne tar ikke hensyn til dette, og bruken av stopping power vil dermed overestimere dosen som avsettes av den ladde partikkelen. Det er derfor hensiktsmessig å innføre en ny, avgrenset bremseevne, som kalles linear energy transfer, LET (Attix 2004). LET inkluderer alle de myke kollisjonene i tillegg til de harde kollisjonene som resulterer i et δ -elektron med energi lavere enn en grenseverdi, Δ . LET måles ofte i kiloelektronvolt per mikrometer, keV/ μm , og gir et mål på gjennomsnittlig energimengde som absorberes per lengdeenhet. LET-verdien avhenger av strålingsenergien, som vist i Figur 2. Tabell 1 viser LET-verdier for ulike typer stråling. Elektroner og fotoner er et eksempel på lav LET-stråling, mens større partikler som protoner og nøytroner er eksempler på stråling med høy LET-verdi (Hall and Giaccia 2006). De lavenergetiske β -partiklene fra tritium har en LET-verdi på 2-10 keV/ μm (ICRP 1964).



Figur 2: LET som funksjon av partikkelenergi for elektroner og protoner (Dertinger and Jung 1970). Figuren er modifisert.

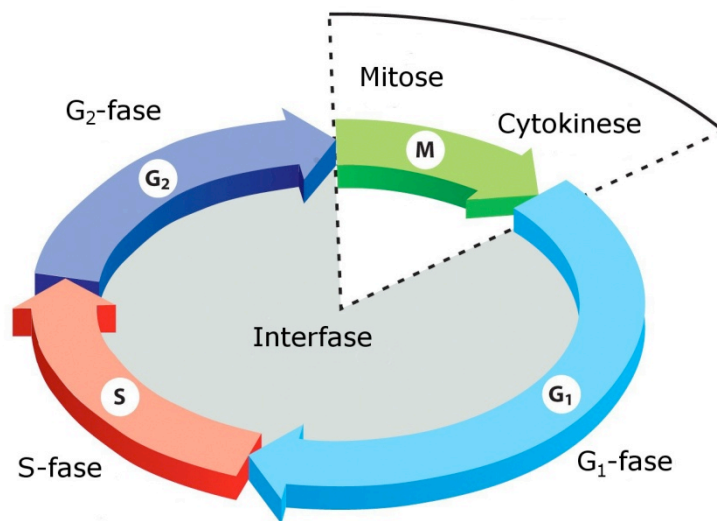
Tabell 1: LET-verdier for ulike typer stråling (Dertinger and Jung 1970). Tabellen er modifisert.

Strålingstype	LET (keV/ μm)
8 MeV γ -stråling	0,2
^{60}Co γ -stråling	0,3
200 keV røntgenstråling	2,5
2 MeV protoner	17
340 MeV protoner	0,3
5 MeV α -partikler	90
27 MeV α -partikler	25

2.2 Cellebiologi

2.2.1 Cellesyklus

Alle levende celler reproducerer seg selv ved å gjennomgå en fast sekvens av hendelser som ender med at cellens innhold dobles og cellen deles i to. Denne sekvensen kalles cellesyklus, og deles inn i 4 deler; G_1 -fasen, S-fasen, G_2 -fasen og M-fasen (se Figur 3). Man bruker ofte interfase som et samlebegrep om fasene G_1 , S og G_2 . I en typisk human celle okkuperer interfase omtrent 23 timer i en 24-timers syklus, mens mitosen varer 1 time (Alberts 2008).



Figur 3: Illustrasjon av inndelingen i cellesyklus (Alberts 2008). Figuren er modifisert.

Cellens mest grunnleggende funksjon er dens evne til å doble sitt DNA og dele seg i to genetisk identiske datterceller. Disse prosessene definerer de to hoveddelene i cellesyklus. I S-fasen, hvor S står for syntese, dupliserer cellen alt sitt DNA. Etter S-fasen inntreffer selve celledelingen i M-fasen, eller mitosen. Mitosen starter med at hvert kromosom pakkes tettere, samtidig som kjernemembranen demonteres og et omfattende system av tynne tråder, mikrotubuli, strekkes mellom cellens to poler. Alle kromosomene, som består av 2 søsterkromatider, fanges opp av dette spindelapparatet, og plasseres på rekke og rad midt i cellen. Når alle kromosomene er på plass, skilles kromatidene fra hverandre, og trekkes mot hver sin side av cellen. Kromosomene pakkes så ut igjen, og hvert søsterkromatid omslutes av en ny kjernemembran. Mitosen avsluttes så ved cytokinesen, hvor cellen deles i to nye datterceller. De to nye cellene er identiske kopier av morcellen (Alberts 2008).

For å få tid til å doble antallet proteiner og organeller som cellene trenger for å duplisere DNA og dele seg, har cellesyklus i tillegg en fase mellom M-fase og S-fase, G_1 , og en fase mellom S-fase og M, G_2 . I disse to fasene får cellen tid til å vokse, i tillegg til at fasene inneholder viktige sjekkpunkter som sjekker at alt ligger til rette for celledeling. Dersom de ekstracellulære forholdene ikke ligger til rette for celledeling, kan cellene bli sendt til en spesialisert hvilefase kalt G_0 , hvor de kan forbli i dager, uker eller år til de gjenopptar proliferasjonen igjen (Alberts 2008).

2.2.2 Regulering av cellesyklus

Cellesyklus reguleres nøye i kontrollpunkter mellom de ulike fasene i syklusen. Kontrollpunktene reguleres først og fremst av en spesiell type proteiner kalt syklin-avhengige kinaser (Cdk), som opererer ved å fosforylere ulike proteiner som virker i de ulike fasene i cellesyklus. De syklin-avhengige kinasene er, som navnet sier, avhengig av proteinet syklin for å være aktive. Syklin syntetiseres og degraderes periodisk gjennom hver cellesyklus, avhengig av om en cellesyklushendelse skal startes eller avsluttes. På denne måten unngår cellen at en hendelse skjer på feil tidspunkt i syklusen, eller at den skjer flere ganger. Aktiviteten til Cdk-syklin-komplekset vil dermed også variere gjennom cellesyklus, noe som igjen fører til sykliske endringer i fosforyleringen av intracellulære proteiner som starter eller regulerer de viktige hendelsene i cellesyklus. Dersom Cdk ikke bindes til sitt respektive syklin, aktiveres ikke Cdk, og cellen holdes igjen i kontrollpunkt i cellesyklus. Cellen har 4 viktige kontrollpunkt; G_0k , G_1k , G_2k og Mk (Alberts 2008).

Kontrollpunktene G_1k og G_2k finnes i slutten av henholdsvis G_1 - og G_2 -fasen, hvor cellen sjekker at ytre og indre miljø tillater start av DNA-replikasjon og celledeling. Kontrollpunktet Mk aktiveres ved overgangen mellom metafase og anafase, og kontrollerer at kromosomene er riktig plassert på den mitotiske spindelen. Dersom kontrollsystemet oppdager feil underveis i cellesyklus, blokkeres cellens videre progresjon i syklusen. På denne måten kan cellen få tid til å reparere eventuelle skader før den deler seg, og på denne måten hindre mutasjoner. G_1k kan initiere apoptose, programmert celledød, i tillegg til å sende cellene til hvilefasen, G_0 . Kontrollpunktet i G_0 , G_0k , sender cellen tilbake i cellesyklus dersom antall ekstracellulære vekstfaktorer til stede er tilstrekkelig. I tillegg er det i dag vanlig å se på hele S-fasen som et eget kontrollpunkt, siden DNA-syntesen kan stoppes ved å deaktivere et liknende proteinkompleks som det som styrer de andre kontrollpunktene (Alberts 2008).

2.2.3 Proliferasjons- og tumorsuppressorgener

Mutasjoner i de genene som regulerer progresjonen i cellesyklus og rekruttering av celler fra G_0 og inn i cellesyklus igjen, kan føre til økt kreftutvikling. Disse genene kan deles inn i to grupper, proliferasjonsgener og tumor-supressor-gener. Proliferasjonsgenene, som for eksempel Ras og Myc, aktiveres ved at ekstracellulære vekstfaktorer bindes til celleoverflaten, og koder for proteiner som kan bringe cellen forbi kontrollpunktet og inn i cellesyklus igjen. Proliferasjonsgenene er normalt ikke aktivert hos celler i G_0 , men en mutasjon kan endre reguleringen av genet slik at proteinene produseres uten at genet er aktivert av en vekstfaktor. Dette fører til at cellene deler seg selv om kroppen ikke gir signaler om det, og kan være det første steget mot kreftutvikling (Alberts 2008).

Tumor-suppressor-genene blokkerer inngangen til cellesyklus, og virker dermed motsatt av proliferasjonsgenene. Disse genene koder for proteiner som hindrer cellevekst, og avverger på den måten at cellen deler seg uregulert og utvikler seg til en kreftcelle (Karp 2010). Tumor-suppressor-genene finnes i alle celler, og en mutasjon i et gen av denne typen fører ofte til kreftutvikling. Viktige tumor-suppressor-gener er p53 og Rb (Alberts 2008). Hos T98G-celler fungerer Rb normalt (Mendoza-Maldonado, Paolinelli et al. 2010), mens p53-genet har en mutasjon i ekson 7 (Matsumoto, Shimura et al. 1994).

2.2.4 Cellevekst

Celler i kultur vil normalt dele seg med faste intervaller, så lenge de ekstracellulære forholdene er gunstige. For celler med gode vekstvilkår fordobles celleantallet med bestemte intervaller, og tiden det tar før celleantallet har doblet seg kalles doblingstiden. Antallet celler N som funksjon av tiden t for celler i eksponentiell vekst, altså celler som deler seg eksponentielt, kan finnes fra uttrykket:

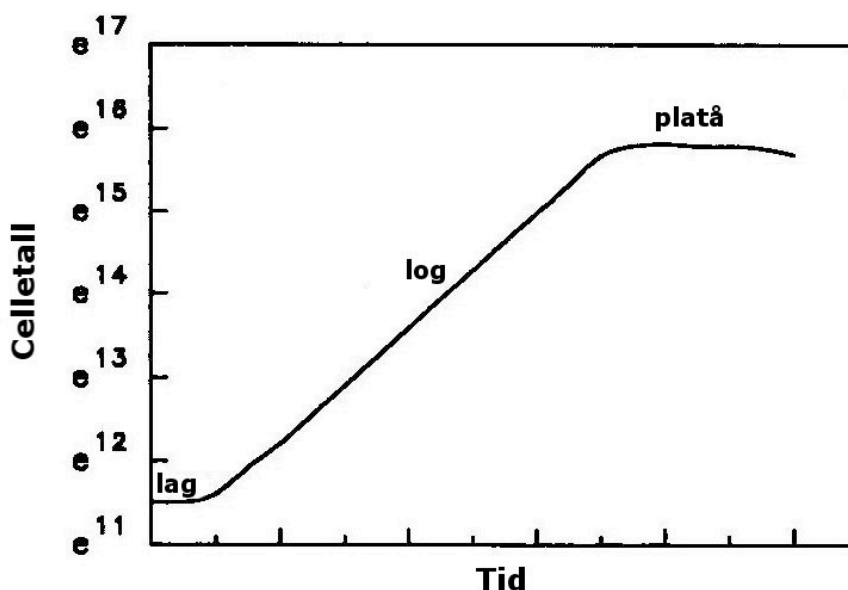
$$N(t) = N_0 e^{bt} \quad (7)$$

hvor N_0 er celleantallet ved tid $t = 0$ og b er en konstant som representerer veksthastigheten til cellene.

Doblingstiden til cellene er gitt ved:

$$t_2 = \frac{\ln 2}{b} \quad (8)$$

Figuren viser en fremstilling av celleantallet som funksjon av tiden, og kalles en vekstkurve. Vekstkurven er fremstilt i et semilogaritmisk koordinatsystem, med tiden langs en lineær x-akse og celleantallet langs en logaritmisk y-akse, se Figur 4 for eksempel. For celler i eksponentiell vekst vil dette resultere i en rett linje med stigningstall b (Kielberg, Brünner et al. 2001).



Figur 4: Vekstkurve for celler i kultur (Kielberg, Brünner et al. 2001). Figuren er modifisert.

Når cellene deler seg med faste intervaller som svarer til rettlinjete vekst i et semilogaritmisk koordinatsystem, sies cellene å være i log-fase. Ofte vil vekstkurven avvike fra en ren eksponentiell kurve i starten og slutten av kurven. I starten av kurven kan man ha en periode med ingen eller langsom vekst, som kalles lag-fasen. Denne langsomme veksten kan skyldes at cellene ikke har kommet seg etter trypsineringen, eller at de har fått tilført nytt medium som enda ikke inneholder de vekstfremkallende stoffene som cellene avgir til mediet og trenger for å dele seg. Etter en viss tid vil så godt som alle cellene ha kommet seg etter behandlingen og dele seg som normalt, og vekstkurven blir rettlinjete. Sent i forløpet flater vekstkurven ut til den såkalte platåfasen. Dette kan skyldes at cellene er

konfluente, altså at de dekker hele bunnen på flasken og slutter å dele seg, at celleantallet er så høyt at det ikke blir tilført nok medium til å holde veksten i gang, eller en opphopning av veksthemmende stoffer i mediet (Kielberg, Brünner et al. 2001).

2.3 Strålingsbiologi

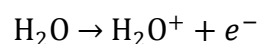
2.3.1 Cellulær strålerespons

Stråling påfører skader på cellene våre, og den biologiske effekten av strålingen, inkludert celledød, karsinogenese³ og mutasjon, stammer hovedsakelig fra skader på cellenes genetiske materiale, DNA (Hall and Giaccia 2006).

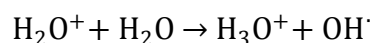
Absorpsjon av strålingsenergi i DNA kan skje på to ulike måter. Dersom absorpsjonen av strålingen skjer i samme molekyl som stråleskaden oppstår, får man det som kalles en direkte effekt av strålingen (Dertinger and Jung 1970). Strålingen kan ionisere eller eksitere et atom i molekylet, hvor det utslåtte elektronet så kan vekselvirke med DNA og skade dette. Den direkte strålingseffekten er den dominante prosessen ved høy LET-stråling (Hall and Giaccia 2006).

Ved indirekte effekt skjer absorpsjonen av strålingsenergi og responsen på denne energiabsorpsjonen i forskjellige molekyler (Dertinger and Jung 1970). Den indirekte effekten foregår ved at strålingen vekselvirker med andre atomer eller molekyler i cellen og danner frie radikaler⁴ som kan diffundere over store avstander, for senere å indusere skader i målmolekylet (Hall and Giaccia 2006). For molekyler oppløst i vann, har den indirekte effekten ofte større betydning for inaktivering enn den direkte effekten, fordi mange av primærionisasjonene i dette tilfellet ikke vil skje med biomolekyler, men med vannmolekyler. Den indirekte effekten er spesielt viktig i biologisk materiale, siden en celle består av 80 % vann (Hall and Giaccia 2006).

Når et vannmolekyl blir ionisert, får vi reaksjonen:



H_2O^+ er et ionradikal med en svært kort levetid på 10^{-10} sekunder (Hall and Giaccia 2006). Radikalet kan videre vekselvirke med vann, og danne det svært reaktive radikalet hydroxyl, OH^\cdot :



Hydroxyl har en levetid på 10^{-9} sekunder, og kan diffundere over korte avstander for å nå et kritisk område i en celle, for eksempel DNA. Det er estimert at omtrent 2/3 av alle stråleskader på DNA i mammalske celler forårsakes av hydroxyl-radikalet (Hall and Giaccia 2006).

³ Utvikling av kreft

⁴ Et fritt radikal er et atom eller molekyl som har et uparet elektron i sitt ytre skall, og som dermed er svært reaktivt

Ioniserende stråling kan påføre en celle ulike skader, men trådbrudd i DNA betraktes som den viktigste skaden. Det produseres hovedsakelig to typer skader i DNA; brudd i den ene DNA-tråden, enkelttrådbrudd (SSB), eller dobbeltrådbrudd (DSB), hvor begge trådene brytes. DSB kan oppstå på to ulike måter; direkte, ved at en partikkel bryter begge trådene, eller indirekte, ved at to SSB oppstår på begge tråder i nærheten av hverandre. Dersom disse SSB oppstår nær hverandre i tid, klarer ikke hydrogenbindingene mellom baseparene i DNA lenger å holde de to trådene sammen, og et DSB oppstår (Hall and Giaccia 2006).

Et SSB er en subletal skade som cellen normalt reparerer fortløpende ved å bruke den ene av cellens to komplementære DNA-tråder som mal, og har derfor liten betydning for celleoverlevelsen. DSB er vanskeligere å reparere fordi man ikke har en intakt DNA-tråd å kopiere. Reparasjon av DSB skjer hovedsakelig ved to ulike mekanismer; homolog rekombinasjon (HR) og ikke-homolog endeskjøting (NHEJ). NHEJ er den enkleste formen for reparasjon, hvor de løse endene av DNA-trådene limes sammen, vanligvis uten at de tapte basene erstattes. Dette vil dermed alltid føre til feil, men siden små deler av DNA faktisk koder for gener er dette en reparasjonsprosess som likevel ofte gir et akseptabelt resultat. Ved HR brukes søsterkromatidet som templat for å reparere DNA. Ettersom dette krever at et uskadd søsterkromatid er til stede, forekommer denne typen reparasjon kun under og etter DNA-replikasjonen, i S- og G₂-fasen (Alberts 2008).

Stråleskader kan videre deles inn i tre hovedgrupper: letale skader, potensielt letale skader og subletale skader. Letale skader er skader som er irreversible og ureparable, og som fører til celledød i alle tilfeller. Enkelte stråleskader fører til celledød dersom de ikke repareres i tide, men kan modifiseres av miljømessige forandringer som gjøres etter bestråling. Disse stråleskadene sies å være potensielt letale. Subletale skader kan under normale forhold repareres på få timer, og er dermed ikke dødelige for cellen. Imidlertid kan to subletale skader som inntreffer nær hverandre i tid og rom samvirke om å danne en letal stråleskade (Hall and Giaccia 2006).

En celles strålefølsomhet varierer etter hvor i cellyklus cellen befinner seg. Celler er mest sensitive i G₂- og M-fasen, mens celler i sen S-fase er de mest stråleresistente. For celler med lang G₁-fase, og dermed lang cellyklus, er det en stråleresistent periode i starten av G₁, før følsomheten øker mot slutten av fasen. For celler med kort G₁-fase vil man ikke se denne effekten, og cellene vil ha middels strålefølsomhet gjennom hele fasen (Hall and Giaccia 2006).

En biologisk skade kan føre til celledød. De fleste cellene dør mens de prøver å dele seg, en såkalt mitotisk død. Dette skjer oftest ved prosessen nekrose, hvor cellen sveller opp og sprekker. Cellesprekkingen fører til at innholdet i cellen blir spredt blant nabocellene, og fremkaller en inflammatorisk reaksjon (Alberts 2008). For noen celler er apoptose, en form for programmert celledød, den viktige mekanismen for celledød (Hall and Giaccia 2006). Ved apoptose gjennomgår cellen en rekke reaksjoner, som starter med at cellen og cellekjernen krymper, slutter å kommunisere med nabocellene og løsner (Karp and Geer 2005). Cellen deles så opp i mindre membranbundne deler, som hindrer at cellerester lekker ut i omgivelsene. Disse celledelene brytes så ned av makrofager eller naboceller ved fagocytose⁵. På denne måten hindrer man at det oppstår betennelsesreaksjoner, og

⁵ Prosess hvor uønskede celler spises av spesialiserte celler

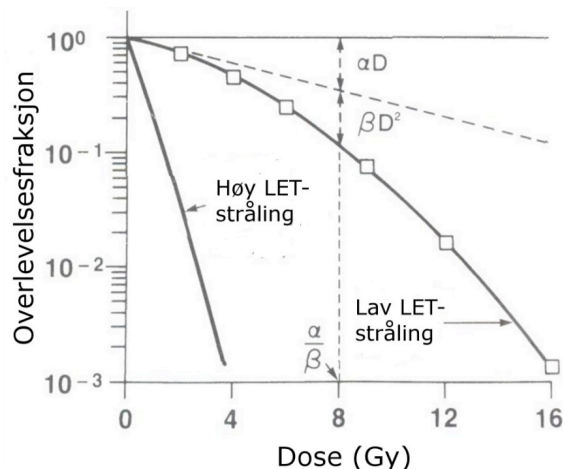
apoptose er dermed en bedre måte for cellen å dø på. Apoptose skjer ikke bare blant skadde celler, men også for å eliminere overflødige celler (Alberts 2008).

Enkelte celler kan ofte fortsette å vokse en stund selv om de har mistet evnen til å dele seg. Cellene fortsetter å øke sitt innhold selv om cellen ikke deler seg, noe som resulterer i celler med økt volum i forhold til normale celler. Dette kalles kjempeceller, og er karakteristisk for bestrålte cellepopulasjoner (Nias 1998).

2.3.2 Overlevelseskurver

En celleoverlevelseskurve beskriver forholdet mellom stråledose og antallet overlevende celler. I dette tilfellet sier man at en celle overlever dersom den beholder sin reproduktive evne, altså evnen til å danne kolonier. For ikke-prolifererende celler representerer inaktivering tap av en spesifikk funksjon (Hall and Giaccia 2006).

Det er vanlig å fremstille celleoverlevelse i et semilogaritmisk plott, med dosen langs en lineær x-akse og overlevelsesfraksjonen langs en logaritmisk y-akse. Figur 5 viser et eksempel på en kurve av denne typen. For høy LET-stråling, som for eksempel nøytroner eller α -stråler, er celleoverlevelseskurven en rett linje fra (0,0), altså er overlevelsen en eksponentiell funksjon av dosen. For røntgenstråling og annen lav LET-stråling har overlevelseskurven en initiell rett linje som følges av en krumming av kurven, en skulder. Ved høyere doser rettes kurven ofte ut igjen (Hall and Giaccia 2006).



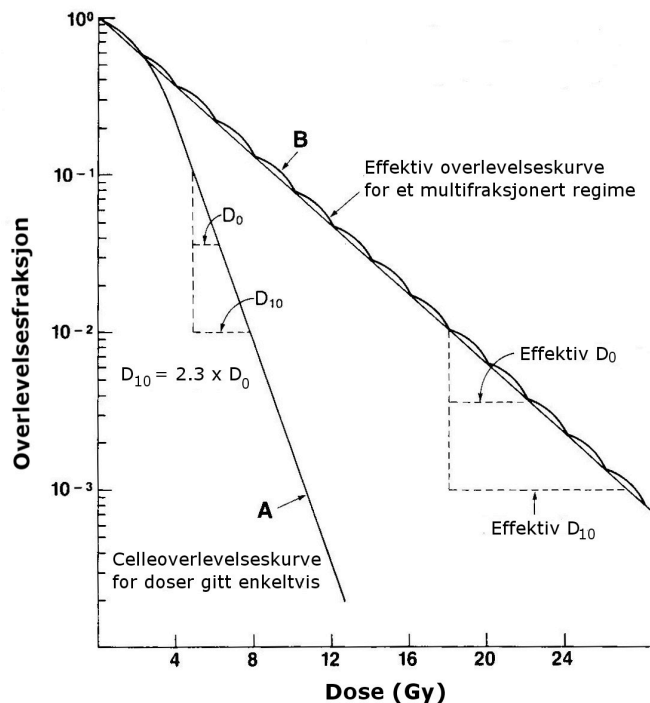
Figur 5: Celleoverlevelseskurve for mammalske celler som utsettes for stråling (Hall and Giaccia 2006). Figuren er modifisert.

Den lineær-kvadratiske modellen (LQ-modellen), først beskrevet av Sinclair i 1966, har tatt over som den vanligste modellen for å beskrive overlevelseskurver. I denne modellen antar man at det er to komponenter som bidrar til celledrap ved bestråling, en komponent, α , som er proporsjonal med dosen, og en komponent, β , som er proporsjonal med kvadratet av dosen. Overlevelsesfraksjonen, S , er gitt ved:

$$S = e^{-\alpha D - \beta D^2} \quad (9)$$

hvor D er dosen og α og β er konstanter (Hall and Giaccia 2006). Den viktigste utledningen av denne modellen ble utviklet av Chadwick og Leenhouts, hvor de antok at DNA er det kritiske molekylet med hensyn til inaktivering, og at den kritiske skaden er et dobbeltrådbrudd (DSB) i DNA (Chadwick and Leenhouts 1973). DSB kan oppstå som resultat av to ulike hendelser; konstanten α representerer tilfeller hvor begge DNA-trådene brytes av en enkelt strålingspartikkel, mens β representerer tilfeller hvor to ulike partikler skaper to enkelttrådbrudd (SSB) som er nær nok i tid og rom til å skape et DSB. Modellen tar hensyn til strålingens LET; ved høy LET-stråling dominerer α -komponenten, og størstedelen av celleinaktivering skjer dermed ved at én strålingspartikkel bryter begge DNA-trådene (Mayles, Nahum et al. 2007).

Forholdet mellom de to komponentene i modellen for celleoverlevelse, α/β , definerer forholdet mellom det spesifikke vevets strålefølsomhet og den potensielle reparasjonskapasiteten. Dette forholdet er forskjellig for forskjellige typer vev, og generelt kan man si at de fleste sen-responderende normalvev har et lavt α/β -forhold, med verdier mellom 0,5 og 6 Gy. Tidlig-responderende vev og de fleste tumorer har et høyere α/β -forhold, typisk i området 5 til 20 Gy. Ettersom høyere verdier av β impliserer en større sannsynlighet for at det inntreffer reparable stråleskader, følger det at vev med lavere α/β -forhold viser en større sparende effekt ved endring av doserate enn vev med høyere α/β -forhold (Dale 1996). Denne forskjellen utnyttes i fraksjonering, hvor den totale dosen deles inn i et antall fraksjoner som alle gis i løpet av et tidsintervall (illustrert i Figur 6). Dersom den totale behandlingstiden er lang nok, vil man oppnå en sparende effekt på normalvev, på grunn av at det gis tid til reparasjon av subletale skader mellom hver fraksjon (Hall and Giaccia 2006).



Figur 6: Teoretiske overlevelseskurver for samme celler ved dose gitt enkeltvis og ved fraksjonert behandling (Hall and Giaccia 2006). Figuren er modifisert.

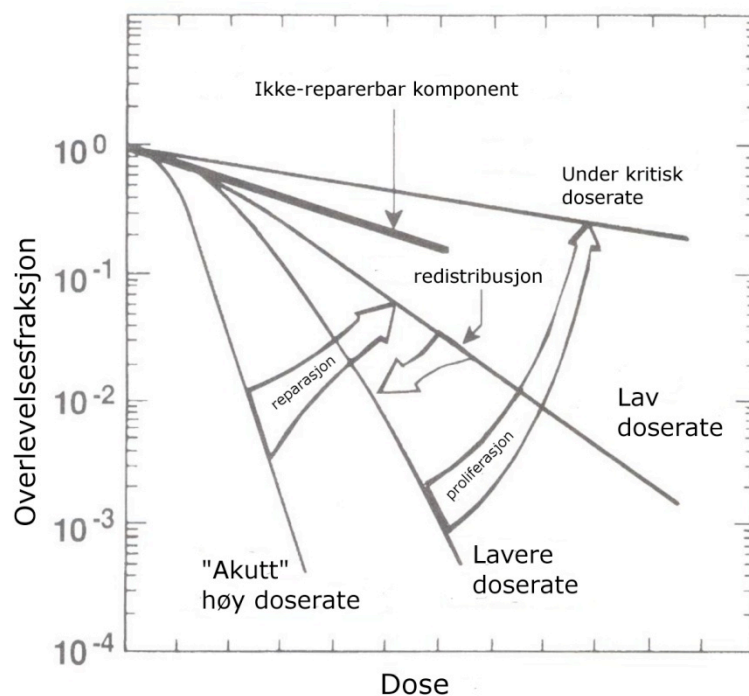
Ved bestråling med lave doser på under 1 Gy er det for flere cellelinjer observert en overlevelseskurve som avviker fra det som gis ut fra LQ-modellen. Disse cellene viser en høyere strålefølsomhet for

doser under ~ 0.5 Gy, et fenomen som kalles lavdose hypersensitivitet (low dose hyper-radiosensitivity, HRS). Dette doseområdet følges så av et område med høyere stråleresistens for doser over ~ 0.7 Gy (Short, Mayes et al. 1999; Joiner, Marples et al. 2001). Hypersensitivitet er funnet for over 40 ulike humane cellelinjer etter røntgenbestråling (Marples 2004), deriblant hos T98G.

2.3.3 Bestråling ved lave doserater

Dersom doseraten, altså dosen som gis per tidsenhet, senkes samtidig som behandlingstiden forlenges, reduseres den biologiske effekten av en gitt dose. Dette kalles doserateeffekten, og oppstår på grunn av reparasjon av subletale skader i løpet av den lange eksponeringstiden, i hovedsak reparasjon og sammenføring av DSB før de rekker å samvirke om å skape letale skader. Doserateeffekten som skyldes reparasjon av subletale skader er mest dramatisk mellom 0.01 og 1 Gy/min (Hall and Giaccia 2006).

Figur 7 gir et sammendrag av doserateeffekten. En høy doserate gir en bratt overlevelseskurve og har en bred initiell skulder. Dersom doseraten senkes og behandlingstiden forlenges, kan mer og mer av de subletale skadene repareres underveis i strålebehandling. Følgelig flater overlevelseskurven ut, og skulderen blir mindre uttalt (Hall and Giaccia 2006).



Figur 7: Doserateeffekten (Hall and Giaccia 2006), inspirert av Dr. Joel Bedford. Figuren er modifisert.

Dersom doseraten reduseres ytterligere, vil man i enkelte cellelinjer observere en invers doserateeffekt, hvor en senkning i doserate resulterer i nedsatt celleoverlevelse. Denne effekten kan skyldes at den lave doseraten fører til at cellene fortsetter gjennom cellyklus og akkumuleres i G_2 , som er en strålefølsom fase. Ved en doserate som er så lav at cellene kan passere kontrollpunktet i G_2 og dele

seg, vil man få proliferasjon også under bestrålingen. Dersom doseraten er lav nok og eksponeringstiden lang sammenliknet med cellesyklusliden, vil proliferasjonen føre til en økning i celleoverlevelse som vil balansere celledøden som skyldes bestrålingen (Hall and Giaccia 2006).

En annen forklaring på den inverse doserateeffekten er at reparasjonsprosessene ikke settes i gang ved de laveste doseratene. Dette er grunnen til at den inverse doserateeffekten finnes hos celler som viser HRS ved bestråling med lave akutt-doser (Mitchell, Folkard et al. 2002).

2.4 Dosimetri

2.4.1 Klassisk dosekalkulering

Den absorberte dosen, D , defineres som forventningsverdien til energien som avsettes per masseenhed i et punkt P i mediet:

$$D = \frac{d\epsilon}{dm}, \quad (10)$$

hvor $d\epsilon$ er forventningsverdien til den avsatte energien for et gitt tidsintervall i et infinitesimalt volum dv med masse dm i punktet P . Enheten for absorbert dose er gray (Gy), som er definert som 1 J kg^{-1} (Attix 2004).

Doseraten, \dot{D} , i et punkt P ved tiden t er gitt ved:

$$\dot{D} = \frac{dD}{dt} = \frac{d}{dt} \left(\frac{d\epsilon}{dm} \right) \quad (11)$$

Absorbert dose er et mål på mengden energi som forblir i mediet per masseenhed i punktet P , og som dermed kan gi opphav til strålingseffekter i mediet. Dersom ingen energi avsettes, det vil si at $D = 0$, vil man heller ikke ha noen effekt av strålingen. Absorbert dose er dermed en av de viktigste størrelsene innen strålingsfysikken (Attix 2004).

2.4.2 Problemer i forbindelse med cellulær tritiumdosimetri

Det kritiske målområdet i en celle er cellens arvemateriale, DNA (se kap. 2.3.1), og det er derfor svært viktig å kunne beregne dosen til cellekjernen for å kunne si noe om strålingens betydning i cellen. Som nevnt tidligere har elektronene som blir frigitt ved tritiumdesintegrasjon kort rekkevidde, og bestrålingen skjer ved inkorporering av tritium i cellens proteiner.

Dersom man antar at cellens sammensetning og tetthet er homogen, at radioaktiviteten er uniformt fordelt og at det ikke er noen ytre elektriske eller magnetiske felter som forstyrrer banen til de ladde partiklene, er forutsetningene for strålingslikevekt oppfylt (Attix 2004). Strålingslikevekt betyr at det er like mye strålingsenergi som forlater volumet til en hver tid som det er strålingsenergi som kommer

inn i volumet. Dosen, D , er da lik netto restmasse som konverteres til energi per masseenhet i interessepunktet:

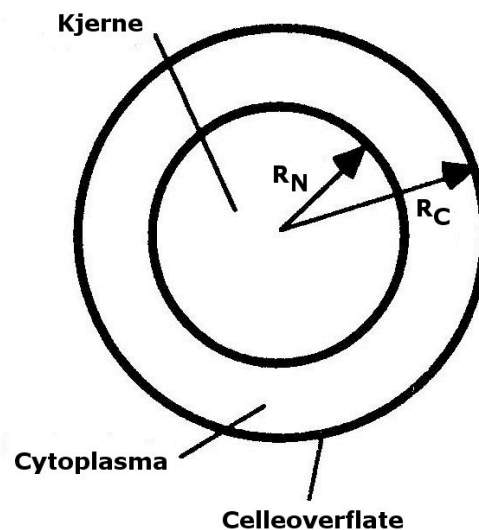
$$D = \frac{d(\overline{\Sigma Q})}{dm}, \quad (12)$$

hvor $\overline{\Sigma Q}$ er energien som avsettes i volumet (Attix 2004). Dosen er altså lik forventningsverdien til energien som frigis av det radioaktive materialet per masseenhet i volumet vi ser på.

I en celle kan man imidlertid ikke uten videre anta at forutsetningene for strålingslikevekt er oppfylt. Rekkevidden til β -elektronene er kort i forhold til størrelsen på cellen. De radioaktive molekylene vil ikke nødvendigvis være jevnt fordelt mellom de ulike delene av cellen og dens omgivelser, og i tillegg kan området rundt cellekjernen være mindre enn den maksimale rekkevidden til de frigitte elektronene. Som nevnt i kapittel 2.3.1, er DNA det kritiske målområdet i en celle. I tillegg til å være inkorporert i cellekjernen, vil tritium også være inkorporert i cellens cytoplasma. Elektroner med opphav både fra cellekjernen og fra cytoplasma kan bidra til dosen som avsettes i kjernen, men elektronene kan også avsette sin energi utenfor cellen eller cellekjernen. Dette bidrar til en mer komplisert dosimetri for et cellulært system enn dersom forutsetningene for strålingslikevekt hadde vært oppfylt.

2.4.3 Cellulær tritiumdosimetri

Modellen for cellulær tritiumdosimetri er utviklet av Åste Søvik (Søvik 2002), og er opprinnelig hentet fra boken *MIRD cellular S-values* (Goddu, Howell et al. 1997).



Figur 8: Cellulær modell for beregning av doserate som leveres til cellekjernen, bestående av to konsentriske kuler som utgjør cellens cytoplasma og cellekjerne (Goddu, Howell et al. 1997). Figuren er modifisert.

Den cellulære modellen består av to homogene konsentriske kuler, som utgjør cellens kjerne og cytoplasma (illustrert i Figur 8). Cellekjernens radius betegnes med R_C og cellekjernens radius betegnes med R_N . Den cellulære radioaktiviteten antas å være uniformt fordelt innen cellens kjerne og cytoplasma.

Den gjennomsnittlige absorberte dosen fra en kilderegion r_h til en målregion r_k er gitt ved uttrykket:

$$\bar{D}(r_k \leftarrow r_h) = \tilde{A}_h S(r_k \leftarrow r_h) \quad (13)$$

hvor \tilde{A}_h er den kumulerte aktiviteten i kilderegionen r_h og S-verdien er dosen til målregionen r_k per enhet kumulert aktivitet i kilderegionen r_h . S-verdien er definert som:

$$S(r_k \leftarrow r_h) = \sum_i \frac{\Delta_i \phi_i(r_k \leftarrow r_h)}{m_k} \quad (14)$$

Parameteren m_k er massen til målregionen r_k , Δ_i er gjennomsnittlig energi emittert per kjerneovergang og den absorberte fraksjonen $\phi_i(r_k \leftarrow r_h)$ er fraksjonen av energi emittert fra kilderegionen r_h som absorberes i målregionen r_k (Goddu, Howell et al. 1997).

Den absorberte fraksjonen for partikkelstråling kan estimeres fra uttrykket:

$$\phi_i(r_k \leftarrow r_h) = \int_0^\infty \Psi_{r_k \leftarrow r_h}(x) \frac{1}{E} \left(\frac{dE}{dX} \right)_{X(E)-x} dx \quad (15)$$

hvor E er den initielle energien til den emitterte partikkelen, $\Psi_{r_k \leftarrow r_h}(x)$ er den geometriske reduksjonsfaktoren og $\left. \frac{dE}{dX} \right|_{X(E)-x}$ er bremsevnen evaluert i punktet $X(E)-x$, residualrekkevidden til partikkelen etter at den har passert en distanse x i mediet (Goddu, Howell et al. 1997).

Den geometriske reduksjonsfaktoren $\Psi_{r_k \leftarrow r_h}(x)$ er den gjennomsnittlige sannsynligheten for at en tilfeldig orientert vektor med lengde x som starter fra et tilfeldig punkt innen kilderegionen r_h ender i målregionen r_k . Verdien til faktoren er avhengig av lengden til vektoren x og geometrien og dimensjonen til kilde- og målregionene. De geometriske reduksjonsfaktorene som funksjon av variablene x , R_C og R_N er gitt i vedlegg A.

Bremsevnen til elektronene er ikke konstant, men er avhengig av strekningen elektronet har tilbakelagt. Sammenhengen mellom elektronets energi og rekkevidde som inngår i beregningen av de cellulære S-verdiene er også gitt i vedlegg A.

De cellulære S-verdiene er kalkulert for to ulike målområder – hele cellen og cellekjernen. S-verdiene som funksjon av cellens og kjernens radius er gitt i vedlegg B (Goddu, Howell et al. 1997).

Den gjennomsnittlige doseraten til cellekjernen, \dot{D}_N , er gitt ved uttrykket:

$$\dot{D}_N = A_C [f_N S(R_N \leftarrow R_N) + f_{Cy} S(R_N \leftarrow R_{Cy})], \quad (16)$$

der A_C er den intracellulære aktiviteten, $S(R_N \leftarrow R_N)$ er dosen til cellekjernen per enhet aktivitet i cellekjernen, $S(R_N \leftarrow R_{Cy})$ er dosen til cellekjernen per enhet aktivitet i cellens cytoplasma, og f_N og f_{Cy} er fraksjonen av den intracellulære aktiviteten i hhv. cellekjernen og cytoplasma.

Midlere absorbert totaldose til cellekjernen, D , er gitt ved uttrykket:

$$D_N = \bar{A}_C [f_N S(R_N \leftarrow R_N) + f_{Cy} S(R_N \leftarrow R_{Cy})], \quad (17)$$

der \bar{A}_C er aktiviteten integrert over bestrålingsperioden, altså antall desintegrasjoner som har funnet sted i løpet av bestrålingen. De øvrige faktorene er de samme som i forrige likning.

Standardavviket til doseraten er gitt ved:

$$se_{\dot{D}} = \sqrt{\left(\frac{\delta \dot{D}}{\delta A_C} \cdot se_{A_C}\right)^2 + \left(\frac{\delta \dot{D}}{\delta f_N} \cdot se_{f_N}\right)^2 + \left(\frac{\delta \dot{D}}{\delta f_{Cy}} \cdot se_{f_{Cy}}\right)^2} \quad (18)$$

$$= \sqrt{\left(f_N S(R_N \leftarrow R_N) + f_{Cy} S(R_N \leftarrow R_{Cy})\right)^2 se_{A_C}^2 + \left(A_C S(R_N \leftarrow R_N)\right)^2 se_{f_N}^2 + \left(A_C S(R_N \leftarrow R_{Cy})\right)^2 se_{f_{Cy}}^2} \quad (19)$$

og standardavviket til den midlere absorberte totaldosen er gitt ved:

$$se_D = \sqrt{\left(\frac{\delta D}{\delta \bar{A}_C} \cdot se_{A_C}\right)^2 + \left(\frac{\delta D}{\delta f_N} \cdot se_{f_N}\right)^2 + \left(\frac{\delta D}{\delta f_{Cy}} \cdot se_{f_{Cy}}\right)^2} \quad (20)$$

Fraksjonen av radioaktivitet lokalisert i cellekjernen, f_N , kan finnes fra uttrykket:

$$f_N = \frac{A_N}{A_C} = \frac{\text{aktivitet/kjerne}}{\text{aktivitet/celle}} \quad (21)$$

Usikkerheten i fraksjonen av radioaktivitet i cellekjernen er gitt ved:

$$se_{f_N} = \sqrt{\left(\frac{\delta f_N}{\delta A_N} \cdot se_{A_N}\right)^2 + \left(\frac{\delta f_N}{\delta A_C} \cdot se_{A_C}\right)^2} = \sqrt{\left(\frac{1}{A_C} \cdot se_{A_N}\right)^2 + \left(-\frac{A_N}{A_C^2} \cdot se_{A_C}\right)^2} \quad (22)$$

Fraksjonen av radioaktivitet i cellens cytoplasma, f_{Cy} , kan finnes fra uttrykket:

$$f_{Cy} = \frac{A_{Cy}}{A_C} = \frac{A_C - A_N}{A_C} = 1 - f_N \quad (23)$$

Usikkerheten i fraksjonen av radioaktivitet i cytoplasma er gitt ved:

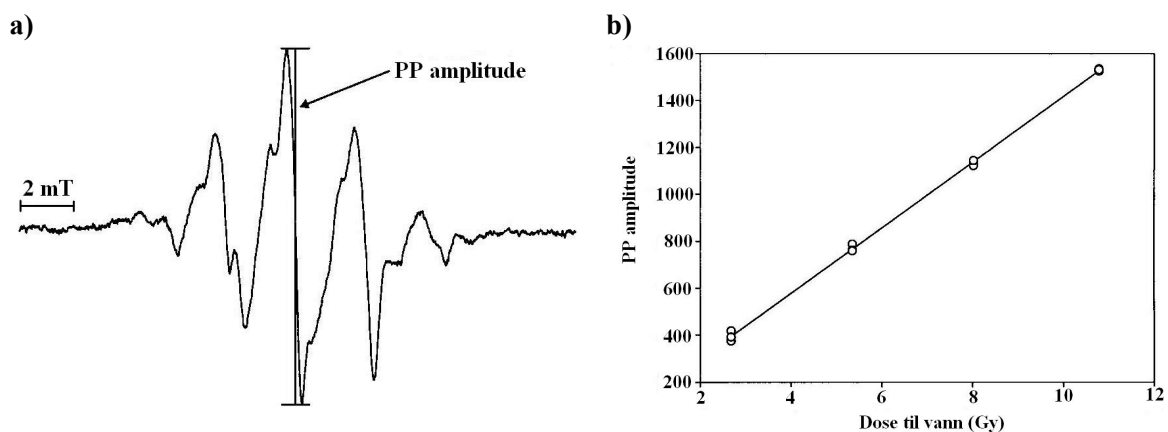
$$se_{f_{Cy}} = \sqrt{\left(\frac{\delta f_{Cy}}{\delta f_N} \cdot se_{f_N}\right)^2} = se_{f_N} \quad (24)$$

2.4.4 ESR-dosimetri

Dette delkapitlet er i sin helhet basert på kapittel 1 og kapittel 9 i boken «Electron Paramagnetic Resonance. A Practitioner's toolkit» (Brustolon and Giamello 2009).

Som beskrevet i kapittel 2.3.1 (Cellulær strålerespons), kan stråling vekselvirke med atomer eller molekyler i en celle og danne frie radikaler, som kan indusere skader langt fra det stedet hvor de oppsto. ESR-spektroskopi er en metode for å detektere radikalene som dannes under bestrålingen.

ESR (Elektron spinn resonans) baseres på absorpsjon av elektromagnetisk stråling i en paramagnetisk⁶ prøve plassert i et magnetfelt. Elektroner har en egenskap, spinn, karakterisert ved at elektronet roterer om sin egen akse og skaper et magnetisk felt. Via dette magnetfeltet kan elektronene vekselvirke med et eksternt magnetfelt. Spinnet kan være i to ulike tilstander, ofte betegnet α og β (eller opp og ned). I et magnetfelt vil elektronspinnene rette seg hhv. parallelt eller antiparallelt med feltet, hvor hver retning har en egen energi. De to energinivåene er assosiert med α - og β -tilstanden, hvor β -tilstanden har lavest energi. I en prøve som inneholder mange radikaler vil spinnene okkupere begge energinivåer, men på grunn av energiforskjellen vil det være et overskudd av elektroner i β -tilstanden. Overganger mellom de to ulike tilstandene kan induseres ved absorpsjon eller emisjon av elektromagnetisk stråling med frekvens som svarer til energiforskjellen mellom energitilstandene, også kalt resonans. Ettersom det vil være overskudd av elektroner i β -tilstanden, vil det være en netto absorpsjon av stråling i systemet. Ved å plote absorpsjonen mot den magnetiske feltstørrelsen, fås et ESR-spekter.



Figur 9: a) ESR-spekteret til et alanindosimeter som er gitt en dose på omtrent 10 Gy ved bruk av ^{60}Co γ -stråling. PP amplituden til sentrallinjen i spekteret, som brukes til å finne absorbert dose, er indikert. b) Typisk kalibreringskurve, i form av PP amplitude som funksjon av absorbert dose for 12 alanindosimetre (3 ved hvert dosepunkt), bestrålt med ^{60}Co γ -stråling (Brustolon and Giamello 2009).

Arealet under ESR-spekteret er proporsjonalt med antall frie radikaler (spinn) i prøven, og dermed også med strålingsenergien som er absorbert i prøven. Strålingsdosen kan følgelig bestemmes ved å måle konsentrasjonen av de strålingsinduserte frie radikalene i et gitt materiale ved å bruke ESR-spektroskopi. I praksis brukes høyden, eller peak-peak (PP) amplituden, av hovedlinjen i ESR-spekteret som mål på radikalkonsentrasjonen. PP amplituden er avhengig av dosen og prøvens masse, i tillegg til andre eksperimentelle forhold, som fuktighet, prøvens posisjon i ESR-kaviteten, hvilke spektrometerparametre som brukes og stabiliteten til spektrometeret.

⁶ En prøve som inneholder atomer eller molekyler med uparede elektroner, og som dermed oppviser et permanent magnetisk felt

Dosen til en prøve som har fått en ukjent stråledose kan finnes ved å sammenlikne prøvens PP amplitude med en kalibreringskurve som fås ved å bestråle identiske dosimetre med kjente doser. Normalt brukes ^{60}Co γ -stråling som referansestråling. En typisk kalibreringskurve er vist i Figur 9 b).

ESR-dosimetri har den fordelen at den er ikke-destruktiv, altså at dosimeteret ikke påvirkes av selve dosimeteravlesningen. Dette betyr at dosimeteret kan avleses flere ganger uten at informasjon tapes. Dosimetrene er små og relativt robuste, og er i tillegg ledningsløse slik at de ikke krever bruk av elektronikk eller annet utstyr under bestråling.

Aminosyren alanin er ofte brukt som dosimetermateriale. Sammensetningen av alanin er svært vevsekvivalent (med atomnummer $Z = 6.78$ mot $Z = 7.51$ for vann), og radikalene i alanin er svært stabile over tid, noe som gir mulighet for meget presise dosebestemmelser. For doser under 4-5 Gy har alanin imidlertid for lav sensitivitet til å gi presise dosebestemmelser. ESR-spekteret til et alanindosimeter er vist i Figur 9 a).

2.5 Væskescintillasjonstelling

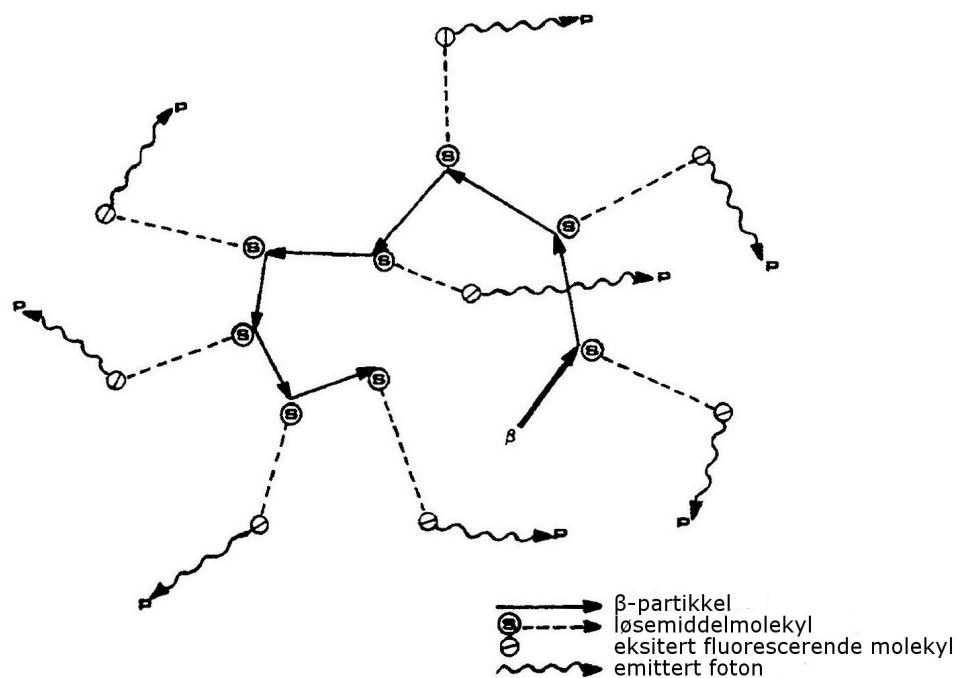
Væskescintillasjonstelling er en metode som brukes til å detektere og kvantifisere radioaktiviteten som resulterer fra inkorporeringen av tritium.

Den radioaktive prøven løses i en scintillasjonsvæske (Emulsifier-Safe) som består av et løsemiddel og et fluorescerende stoff. Løsningen tilsettes i et transparent plastrør som plasseres i en metallholder og kjøres gjennom scintillasjonstellersen. Innstillingene som ble brukt ved gjennomføringen av scintillasjonstellingene i denne oppgaven var programmert av Åste Søvik (Søvik 2002).

Tritiumdesintegrasjonen resulterer i frigjøring av en β -partikkel som vekselvirker med og overfører energi til molekylene i løsemiddelet. Disse molekylene vil igjen reagere med de fluorescerende molekylene og eksitere disse, og når molekylene deeksiteres sendes det ut stråling i form av et foton. Dermed vil en enkelt β -partikkel vekselvirke med flere løsemiddel-molekyler, som igjen vil gi opphav til flere eksiterte fluorescerende molekyler. Det totale antallet fotoner fra de eksiterte fluorescerende molekylene utgjør scintillasjonen, og intensiteten til lyset i scintillasjonen er proporsjonal med den initiale energien til β -partikkelen. Denne prosessen er illustrert i Figur 10.

For å effektivt kunne detektere de emitterte fotonene, forsterkes signalet gjennom en fotomultiplikatorrør (PMT). Prøven plasseres mellom to fotomultiplikatorrør i scintillasjonstellersen, og fotonene fra deeksitasjonen til de fluorescerende molekylene absorberes av de lysfølsomme overflatene på røret, fotokatodene. Fotokatodene emitterer fotoelektroner som akselereres over en serie elektroder, som oftest 12. Hver elektrode har et større positivt potensial enn den forrige, og for hver kollisjon mellom fotoelektron og elektrode produseres det flere elektroner. Signalforsterkningen er lineær, og den endelige elektronpuls er proporsjonal med den initiale fotonintensiteten. Signalene fra de to rørene legges sammen, og en gjennomsnittlig signalintensitet beregnes. Signalet digitaliseres så i en analog-til-digital-omformer (ADC) og lagres i en datamaskin.

Denne måleteknikken har en del begrensninger. Fotomultiplikatorrørene vil kunne produsere små pulser selv om det ikke er lys til stede. For å eliminere disse støypulsene er det derfor satt et krav om at et signal må nå begge detektorer innenfor et visst tidsrom for å bli registrert. Dette betyr at β -partikkelen må ha nok energi til å produsere to fotoner som begge må vekselvirke med hvert sitt PMT, noe som begrenser hvor lave elektronenergier som kan detekteres. Fotomultiplikatorrørene er i tillegg følsomme for termiske endringer i omgivelsene, og resultatet påvirkes også av bakgrunnsstrålingen i rommet hvor scintillasjonstilleren er plassert. Ved bruk av scintillasjonstilleren må dermed parametre som talletid, antall repetisjoner og nuklidetype gis som input, slik at programvaren i scintillasjonstilleren kan korrigere for artefaktene som inntreffer.



Figur 10: En illustrasjon av væskescintillasjonsprosessen (Packard 1995). En enkelt β -partikkel vekselvirker med flere løsemiddelmolekyler, som igjen gir opphav til flere eksiterte fluorescerende molekyler. Det totale antallet eksiterte fluorescerende molekyler utgjør scintillasjonen, og lysintensiteten er proporsjonal med den initielle energien til β -partikkelen. Figuren er modifisert.

Scintillasjonstilleren beregner aktiviteten til den radioaktive prøven, altså antall desintegrasjoner per tidsenhet, i tillegg til antall registrerte tellinger i samme tidsrom (Packard 1995).

2.6 Flowcytometri

Flowcytometri er et viktig verktøy for å undersøke cellers genuttrykk og karakteristik, og baserer seg på lysspredning og fluorescens fra celler eller mikroskopiske partikler som befinner seg i en væskestråle. Flowcytometri kan brukes til måling av mange ulike parametre, blant annet til differensiering av ulike celletyper, forekomst av membranreseptorer og antigener på celleoverflaten, membranpotensial, pH, enzymaktivitet og DNA-innhold (Macey 2007).

En væskestråle fører cellene enkeltvis forbi en laserstråle med en bestemt bølgelengde, og detektorer vil måle lyset som spres etter hvert som cellene passerer gjennom laserstrålen. De fleste apparater måler lysspredningen i to ulike vinkler. Det fremoverspredte lyset, forward scatter (FSC), gir et mål på cellenes størrelse, mens det vinkelspredte lyset, side scatter (SSC), er relatert til cellens karakteristik, som cellens struktur og innhold (Sun 2008; Ormerod 2009).

Ofte merkes cellene som analyseres også med et fluorescerende fargestoff, et fluorokrom, som binder seg til den komponenten man ønsker å undersøke. De fluorokrom-merkede cellene vil absorbere det innkommende laserlyset slik at fargestoffene eksiteres, noe som resulterer i fluorescens. Intensiteten til lypulsen er proporsjonal med mengden av det fargede molekylet, og dermed også med mengden av den cellulære komponenten som er farget (Sun 2008). Denne analyseringsmetoden kan brukes til å måle cellenes DNA-innhold, for å bestemme hvilken cellesyklusfase de ulike cellene befinner seg i. Fluorescensintensiteten, som gir et mål på DNA-innholdet i cellen, fremstilles langs x-aksen i et histogram, med antall celler med den gitte intensiteten langs y-aksen.

2.7 Noen statistiske betraktninger

2.7.1 Usikkerhetsberegninger

Alle målinger med usikkerhet er i denne oppgaven gitt på formen $\bar{x} \pm se_{\bar{x}}$, hvor \bar{x} er gjennomsnittsverdien og $se_{\bar{x}}$ er standardavviket til gjennomsnittsverdien.

Det aritmetiske middeltallet (gjennomsnittet) til et datasett er gitt ved uttrykket:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}, \quad (25)$$

hvor x_i er de individuelle dataverdiene og n er det totale antall data i datasettet.

Standardavviket til datasettet (standard deviation) er gitt ved uttrykket:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n - 1}} \quad (26)$$

Standardavviket til gjennomsnittsverdien (standard error) er gitt ved (Boas 2006):

$$se_{\bar{x}} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n(n - 1)}} \quad (27)$$

I denne oppgaven brukes målinger ofte som variable i videre beregninger, og det er derfor viktig å kunne estimere hvordan usikkerhetene i disse målingene påvirker standardavviket til resultatet. En gitt funksjon Z består av en kombinasjon av m variable, $Z = (x_1, x_2, \dots, x_m)$. Funksjonens standardavvik er gitt ved:

$$se_Z \approx \sqrt{\sum_{j=1}^m \left[\left(\frac{\partial Z}{\partial x_j} \right) se_{x_j} \right]^2}, \quad (28)$$

hvor $\frac{\partial Z}{\partial x_j}$ er den partiellderiverte av funksjonen Z med hensyn på x_j og se_{x_j} er standardavviket til x_j .

2.7.2 Testing av signifikans

Dette delkapitlet er i sin helhet basert på kapittel 11 i boken «Mathematical Statistics and data analysis» (Rice 1995).

For å fastslå om det er en signifikant forskjell mellom to ulike sett med målinger, for eksempel når det gjelder celleoverlevelse for en bestrålt og en ubestrålt cellepopulasjon, benyttes i denne oppgaven en tosidig Student t-test.

Nullhypotesen, H_0 , antar at middelveiene til de to datasettene vi ønsker å teste mot hverandre er like. Dersom sannsynligheten for å forkaste en hypotese som er sann er under 0.05, sier man at nullhypotesen er signifikant holdbar. En tosidig Student t-test avgjør mulig signifikant forskjell mellom to ulike sett målinger x_1 og x_2 , hvor t representerer sannsynligheten for å forkaste den riktige hypotesen:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{se_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}, \quad (29)$$

hvor \bar{x}_1 og \bar{x}_2 er middelveiene til de to datasettene. se_p er standardavviket til forskjellen mellom gjennomsnittsverdiene til de to datasettene, og er gitt ved:

$$se_p = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)se_1^2 + (n_2 - 1)se_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}, \quad (30)$$

hvor n_1 og n_2 representerer antall målinger i datasettene x_1 og x_2 , se_1 og se_2 er standardavviket til de respektive datasettene, $n_1 - 1$ og $n_2 - 1$ er antall frihetsgrader for de to datasettene, og $n_1 + n_2 - 2$ er totalt antall frihetsgrader.

Bruken av t-testen forutsetter at datasettene er normalfordelte, noe som kun vil være en grov tilnærming i målingene som er gjort i denne oppgaven.

All signifikanstesting i denne oppgaven er utført i programmet Excel.

3 Metoder

3.1 Celledyrkning

3.1.1 Cellelinjen

Normale celler kan kun dele seg et begrenset antall ganger før de eldes og dør. I vevsstudier er det derfor vanlig å bruke celler som har gjennomgått genetiske endringer som gjør dem i stand til å dele seg ubegrenset. Celler av denne typen kalles en etablert cellelinje. Humane cellelinjer isoleres typisk fra humane tumorer eller fra celler som er behandlet med kreftfremkallende virus eller kjemikalier (Karp 2010), men det finnes noen få etablerte cellelinjer med opprinnelse fra normalt vev.

I denne oppgaven ble det hovedsakelig benyttet celler fra cellelinjen T98G. Cellene ble opprinnelig isolert fra humant glioblastom tumorvev fra en 61 år gammel mann, og gitt navnet T98. Prøver fra denne celletypen ble fryst ned etter 25 populasjonsdoblinger. Samtidig ble deler av cellene dyrket videre til de hadde gjennomgått 300 populasjonsdoblinger. Disse to cellepopulasjonene viste seg å ha ulike vekstbetingelser, og for å kunne skille de to ulike cellepopulasjonene fra hverandre fikk cellene som ble fryst ned etter 300 populasjonsdoblinger et eget navn, T98G (Stein 1979). Glioblastom er den mest vanlige krefttypen i sentralnervesystemet hos voksne, og til tross for mange forsøk på å utvikle mer effektive kliniske behandlingsstrategier, er forventet levetid for en pasient med denne hjernesvulsten omtrent et år. Den korte levetiden skyldes hovedsakelig at mange glioma er relativt resistente mot kjemoterapi (Park, Park et al. 2006; Louis, Ohgaki et al. 2007).

T-47D er en etablert cellelinje som ble isolert i november 1974 fra væske tatt fra en pleural effusjon⁷ hos en pasient med brystcarcinom (Keydar, Chen et al. 1979). Cellene har epitel morfologi og danner monolag i kultur, og immunohistologiske studier bekrefter at cellene er fra brystkjertelepitel. T-47D-cellene har normal Rb-funksjon (Åmellem, Sandvik et al. 1998), men har et mutert p53-gen og mangler normal p53-funksjon (Casey, Lo Hsueh et al. 1991). T47D-cellene viser hypersensitivitet og indusert stråleresistens ved doser under 1 Gy (Edin 2003), og tidligere studier har vist at T47D-celler under gunstige vekstbetingelser vokser eksponentielt med en doblingstid på 37.2 ± 2 timer (Stokke, Erikstein et al. 1993).

3.1.2 Utstyr og sterile rutiner

Mikroorganismer som bakterier, virus, sopp og mycoplasma deler seg omtrent 50 ganger raskere enn humane celler, og vil derfor raskt vokse over i en cellekultur (Kielberg, Brünner et al. 2001). Det er derfor viktig å opprettholde et sterilt miljø for å unngå infeksjoner. Alt arbeid hvor cellene eller løsningene som ble benyttet kom i kontakt med luft ble utført i en *Laminar air flow*-benk (LAF) på en overflate som ble sterilisert med 70 % etanol (Kemetyl Norge AS) både før og etter bruk. LAF-benken

⁷En økt mengde væske i pleurahulen (brysthinnen), vanligvis forårsaket av lungebetennelse og enkelte typer kreft

som ble brukt i denne oppgaven var av typen OAS LAF VB 2040 (Simonsen AS, Oslo). Utstyr og kjemikalier som kom i kontakt med cellene ble sterilisert før bruk. Plastkorker og glassflaskeåpninger ble alltid svidd av med en propanflamme (Flameboy eco, Integra Bioscience, Sveits) umiddelbart før bruk og etter at arbeidet var avsluttet.

Til alle oppgaver ble det benyttet sterile engangspipetter (Sarstedt, Tyskland) som ble kastet etter bruk. Alt annet utstyr som kom i kontakt med cellene ble vasket og sterilisert på laboratoriet. Glassflasker og plastkorker ble lagt i såpevann (Decon 90, Decon Laboratories Limited, England) i minst 24 timer, før de ble skylt; korker ble skylt tre ganger i oppvaskmaskin, mens glassflaskene ble skylt 4 ganger med Milli-Ro-vann. Glass- og metallutstyr ble pakket inn i aluminiumsfolie og tørrsterilisert i en varmeovn (Termaks, Bergen) ved 180 °C i omtrent 3 timer. Plastkorker, gummi- og tøyutstyr ble pakket i autoklavposer som ble forseglet med steriltape, og deretter autoklavert (Webco) ved 120 °C i 25 minutter.

Cellene ble dyrket i sterile kulturflasker (Nunc, Danmark), i RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 vekstmedium, tilsatt 10 % føtalt kalveserum, 1 % penicillin (5000 IU/ml), 1 % streptomycin, 1 % L-glutamin og 0,2 % insulin. Mediet inneholder alle næringsstoffer, vitaminer og salter cellene trenger for å overleve, kalveserum og insulin tilfører de vekstfaktorene som er nødvendige for proliferasjon, og penicillin og streptomycin er antibiotika som forhindrer bakterievekst i mediet. (Optimal pH for cellevekst er 7,2 – 7,5 (Kielberg, Brüner et al. 2001), og for lettere å kunne følge med på pH-utviklingen tilsettes mediet pH-indikatoren fenolrødt. Denne gir mediet en gul farge ved lav pH.)

Alle kjemikalier og oppskifter benyttet i denne oppgaven er oppgitt i vedlegg C og D.

3.1.3 Omsetting

Celler i vekst trenger regelmessig tilførsel av næringsstoffer og vekstfaktorer for å opprettholde en jevn vekst, samtidig som cellulære avfallsstoffer må fjernes fra cellens omgivelser. For å sikre optimal proliferasjon er det viktig å kontrollere celletettheten, ettersom både for høy og for lav celletetthet hemmer celleveksten. Som følge av dette ble cellene omsatt to ganger i uka, på mandager og fredager, i tillegg til at de fikk tilført nytt medium hver onsdag.

Ved omsetting ble det gamle mediet fjernet, før cellene ble skylt to ganger med 1,5 ml trypsin. Trypsinen ble så fjernet, og flaskene ble satt i inkubatorskap i noen minutter til cellene hadde løsnet fra underlaget. Trypsin er et proteolytisk enzym som bryter proteinbindinger mellom naboceller og mellom cellene og bunnen av flasken, og ble brukt til å løsne cellene fra underlaget ved rekultivering av cellene. Trypsinen som ble brukt på cellene (PAA Laboratories, Østerrike) var tilsatt EDTA, som hjelper til med å løse opp bindingene mellom cellene ved at den binder seg til Ca^{2+} som cellene er avhengige av for å kunne opprettholde de intracellulære bindingene.

Når cellene hadde løsnet ble det tilsatt nytt vekstmedium for å oppheve trypsinets virkning. Cellesuspensjonen ble pumpet forsiktig med en pipette for å løsne cellene fra hverandre, slik at det var flest mulig enkeltceller i suspensjonen. Dette ble kontrollert i mikroskop (Nikon TMS, Japan). Ønsket

mengde av celsuspensjonen ble så overført til en eller flere flasker med ferskt medium, og cellene ble så satt i en CO₂-inkubator der de ble oppbevart mellom omsetningene.

Ved mediumskift ble det gamle mediet fjernet og nytt tilsatt, før flaskene ble satt tilbake i inkubatorskapet.

Både medium og trypsin som ble brukt under omsetningen ble varmet i vannbad til 37 °C for at cellene skulle holde så stabil temperatur som mulig.

3.2 Bestråling

3.2.1 Inkorporering av tritium

Cellene ble gitt en kontinuerlig lavdoseratebestråling ved hjelp av den radioaktive isotopen tritium, [³H], som inkorporeres i cellenes protein ved hjelp av aminosyren valin. Valin er en essensiell aminosyre som humane celler ikke er i stand til å syntetisere selv (Alberts 2008), cellene må dermed tilføres valin gjennom vekstmediet.

For å kunne studere effekter av ulike doserater ble det i denne oppgaven benyttet medium med 5 ulike konsentrasjoner av tritiert valin, som svarer til ulik spesifikk aktivitet i mediet. Den spesifikke aktiviteten som ble brukt i forsøkene i denne oppgaven var 19.5 µCi/ml, 6.5 µCi/ml, 1.67 µCi/ml, 0.53 µCi/ml og 0.267 µCi/ml. Den spesifikke aktiviteten ble holdt konstant ved hjelp av en høy konsentrasjon av ikke-radioaktiv valin, såkalt kald valin, 1.0 mM, i mediet. Alle forsøkene i oppgaven ble utført på en eller flere bestrålte cellegrupper i tillegg til en kontrollgruppe som ikke ble bestrålt. Kontrollgruppen ble dyrket på medium tilsatt 1.0 mM kald valin, for å være sikker på at observerte effekter skyldtes radioaktiviteten og ikke bare inkorporeringen av valin.

3.2.2 Ekstern bestråling

Røntgenbestråling ble utført med BMF-gruppens røntgenkilde (Pantak HF225) som var innstilt på 220 kV og 10 mA. Under bestrålingen var cellene plassert i et stålkammer med indre diameter 25.5 cm og lokk med tykkelse på 1 mm som var forvarmet til 37 °C. For å holde stålkammeret og cellene varme under bestrålingen var stålkammeret plassert på en varmeplate tilkoblet et forvarmet vannbad (Ecoline, Iauda, Tyskland). Strålingen ble filtrert gjennom et 0.5 mm kobberfilter, og doseraten ble i denne oppgaven beregnet til å være 0.27 Gy/minutt (se kapittel 4.3 Alanindosimetri).

Før akuttbestrålingen ble cellene sådd ut i flasker, på samme måte som for koloniforsøkene beskrevet i kapittel 3.5.1. Cellene ble bestrålt med 6 ulike doser (0.11, 0.54, 1.09, 2.72, 4.89 og 6.52 Gy), og antallet celler som ble sådd ut ble bestemt ut fra hvor høy dose som ble gitt. Det ble sådd ut 5 flasker for hver dose. Det ble også sådd ut 10 kontrollflasker som ikke ble bestrålt. I tillegg ble det sådd ut 5000 celler i en enkeltflaske, som ble brukt til å korrigere for multiplisitet ved utsåingen til forsøket. Denne flasken ble fiksert underveis i bestrålingen av de andre cellene.

Cellene ble sådd ut på ettermiddagen, og bestrålingen ble utført tidlig på morgenen den påfølgende dagen. Celleflaskene ble pakket inn i et sterilt laken for å holde varmen før de ble fraktet til rommet hvor røntgenapparatet sto. Alle cellene ble oppbevart på et inkubatorrom som hele tiden holdt 37 °C, og cellene som skulle bestråles ble så plassert i det varme stålkammeret (37 °C) og fraktet ut av rommet. Kontrollene ble oppbevart på inkubatorrommet under hele bestrålingsperioden.

Etter bestråling ble cellene oppbevart i en CO₂-inkubator i 10-14 dager. Når koloniene var store nok, ble de fiksert på samme måte som for celleoverlevelsesforsøkene beskrevet i kapittel 3.5.1.

3.2.3 Strålehygiene

Tritium representerer ingen ekstern strålefare, ettersom β -partiklene som frigjøres ved tritiumdesintegrasjon har en rekkevidde i vev på under 1 μm og er dermed ute av stand til å trenge gjennom det ytre laget av døde hudceller (Hill and Johnson 1993). Derimot kan tritium inkorporeres i biologiske molekyler, og det er derfor viktig med god strålehygiene for personalet som jobber med tritium, for å unngå at dette tas opp i kroppen. Det ble derfor alltid benyttet labfrakk og engangshansker av plast når man arbeidet med løsninger som inneholdt tritiert valin., og mediumflaskene som inneholdt tritiert valin var tydelig merket. Mengden tritium som ble benyttet var lav, og dermed kunne løsninger som inneholdt tritium helles ut i vasken og gjenbruksutstyr som hadde vært i kontakt med tritiert valin ble skylt i vasken før sterilisering. Alt engangsutstyr som hadde vært i kontakt med tritiert valin ble kastet i en egen søppelkasse for (sykehus-) spesialavfall, og deretter levert til teknisk avdeling for riktig behandling og destruksjon.

3.3 Celletelling

3.3.1 Telling i Bürkerkammer

Det ble utført tellinger på suspensjoner av celler og cellekjerner for å finne konsentrasjonen av celler eller kjerner i suspensjonen. Bürkerkammeret (Kova, se Figur 11) består av to separate rutenett, der hvert rutenett består av 3×3 ruter. Antallet celler per rute ble bestemt i 5 av rutene i hvert rutenett. Høyeste og laveste verdi ble strøket, og gjennomsnittsverdien for antallet celler ble så beregnet. Hver rute har et volum på 10⁻⁴ ml. Ved å multiplisere celleantallet per rute med 10⁴, får man antallet celler per ml i suspensjonen det ble talt på. En fordel med å bruke Bürkerkammer er at en ser cellene og får anledning til å vurdere hva en teller.

3.3.2 Telling ved bruk av flowcytometer

Mot slutten av oppgaven ble det innført bruk av flowcytometer til celletellinger. Cellene ble løsnet fra flasken på samme måte som tidligere, se kap. 3.1.3. Etter trypsinering og evt. fortykning ble 0,5 ml av prøven filtrert over i et flowrør. Det er viktig med en jevn fordeling av cellene i prøven for å få et nøyaktig resultat av celletellingen, og prøven ble derfor blandet godt før den ble satt på flowcytometeret. Flowcytometeret var på forhånd programmert til å ta inn 200 μl av prøven, og

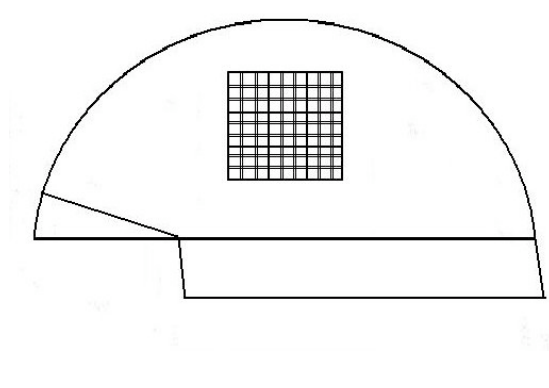
analysen ble startet så snart prøven var på plass. For å analysere resultatet, ble det satt opp diagram som viste plot av FSC-A (forward scatter areal) mot FSC-H (forward scatter height). Enkeltceller som passerer laseren i flowcytometeret vil ha FSC-A- og FSC-H-signaler som korrelerer lineært, og vil dermed falle langs en tilnærmet rett linje i plottet av FSC-A mot FSC-H. Celleklumper, fragmenter av celler og andre fremmedlegemer vil falle utenom denne linjen, og for å få et resultat som kun teller antall celler i løsningen gater alt annet bort. Flowcytometeret gir altså antall celler i 200 μ l, og resultatet multipliseres med 5 for å få antall celler per ml suspensjon det ble talt på.

For mer informasjon om hvordan flowcytometeret brukes, se kapittel 3.8.

a)



b)



Figur 11: Illustrasjon av Kova kammer for celletelling. **a)** er lånt fra <http://www.vitaldiagnostics.com>, **b)** er en egen figur.

3.4 Bestemmelse av doblingstider

3.4.1 Behandling av cellene

For å finne cellenes doblingstid, ble det tatt såkalte *time-lapse* bilder av cellene for å følge med på cellenes utvikling. Doblingstiden ble bestemt for de 5 ulike spesifikke aktivitetene som ble benyttet i denne oppgaven, i tillegg til de ubestrålte kontrollcellene som gikk på medium tilsatt kald valin. Cellene ble omsatt på vanlig måte, og sådd ut i spesielle celleflasker med vekstareal på 25 cm². Celleflaskene ble så plassert på et mikroskop (Nikon) med motorisert kryssbord (Merzhauer), som beveges ved hjelp av en joystick (IKT) eller et kommandoprogram (WinPos). Bildetakingen ble gjort av et kamera (PaxCam) tilkoblet mikroskopet, som ble styrt av et bildeprogram på datamaskinen (PaxIt). Mikroskopet var plassert på et inkubatorrom som hele tiden holdt en temperatur på 37 °C. T98G-celler trenger 2-3 timer for å feste seg i bunnen av flasken etter omsetting, og celleflaskene ble derfor plassert på mikroskopet minst 3 timer før bildetakingen ble startet.

Selve bildetakingen ble gjort ved at det ble programmert et bevegelsesforløp for kryssbordet ved hjelp av kommandoprogrammet. På denne måten ble det tatt bilder i 6 ulike posisjoner, fordelt på 2 celleflasker. Posisjonene var nøye utvalgt, med tanke på at alle posisjonene skulle ha tilfredsstillende celletetthet. Kryssbordet ble programmert til å holde hver posisjon i 30 minutter, før det kunne

forflytte seg videre til neste posisjon. Kameraet ble satt til å ta bilder hvert 14. minutt, og det ble dermed tatt 2 bilder i hver posisjon før kryssbordet flyttet seg. Etter at det hadde blitt tatt bilder i alle 6 posisjoner ble sekvensen repetert, slik at det ble tatt nye bilder i hver posisjon hver 3. time. Bildetakingen varte i 5 dager, fra mandag til fredag. For å unngå skifte av medium midt i uken, ble celleflaskene tilsatt dobbel mengde medium i forhold til vanlig, slik at de klarte seg hele uken uten mediumsift. Etter at bildetakingen var avsluttet, ble bildene åpnet og celleantallet talt på alle bildene.

3.4.2 Beregning av doblingsrate

Celleantallet ved hvert tidspunkt ble delt på antallet celler starttidspunktet for time-lapse bildetakingen, slik at man fikk et mål på celleantallet relativt til celleantallet ved tiden $t = 0$. De relative celleantallene ble plottet som funksjon av tiden. Celleantallene ble så tilpasset formelen $y = ae^{bx}$ ved hjelp av ikke-lineær regresjon i programmet Origin, og parametrene a og b ble bestemt. Dobblingstiden kunne så finnes ut fra uttrykket:

$$t_2 = \frac{\ln 2}{b} \quad (31)$$

3.5 Celleoverlevelsesforsøk

3.5.1 Behandling av cellene

For alle cellekulturene det ble gjort forsøk på ble det utført koloniforsøk for å finne celleoverlevelsen. Ved disse eksperimentene ble det benyttet en eller flere grupper med celler som ble kontinuerlig bestrålt, i tillegg til en kontrollgruppe med celler som vokste på medium med kald valin. Første eksperiment ble utført på starttidspunktet for forsøket, før inkorporering av radioaktivt medium. Koloniforsøkene ble så gjentatt til faste tider, med intervaller på 2-14 dager, alt etter hvor høy doserate som ble benyttet. En høyere doserate gir større effekt på cellene, og dermed er det viktigere med kortere intervaller mellom forsøkene for å få nok data.

Forsøket ble utført ved at cellene ble trypsinert og tilsatt vanlig medium. Cellene ble talt i mikroskop, og det ble så sådd ut 5 flasker med 200 celler per skål. Flaskene ble så inkubert i 10-14 dager, til koloniene var så store at de var godt synlige uten mikroskop. Mediet ble så fjernet, og cellene ble vasket med PBS (Euroclone, Storbritannia). Deretter ble koloniene fiksert med 96 % etanol i omtrent 5 minutter, før de ble farget med metylenblått (Merck, Tyskland) i omtrent 5 minutter før flaskene ble vasket med lunket vann.

Cellekoloniene som besto av 50 eller fler celler ble talt med hjelp av en koloniteller med lupe (Gerber Instruments, Tyskland). Dersom det var vanskelig å avgjøre om koloniene besto av 50 celler eller færre ble det benyttet mikroskop (TMS Nikon, Japan) for å kontrollere om koloniene var store nok til å regnes med.

3.5.2 Beregning av overlevelsesfraksjon

Antall kolonier i hver flaske ble funnet, og gjennomsnittet for hver gruppe ble beregnet. Antall koloner i kontrollflaskene med ubestrålte celler gir cellenes plating efficiency, PE . PE er gitt ved:

$$PE = \frac{K}{K_0}, \quad (32)$$

hvor K_0 er antallet celler som ble sådd ut per flaske, i de fleste tilfeller 200, og K er gjennomsnittlig antall kolonier per flaske i kontrollgruppa.

Overlevelsesfraksjonen, SF^8 , for hver bestrålingsgruppe ble funnet ved:

$$SF = \frac{N}{N_0 \cdot PE}, \quad (33)$$

hvor N_0 er antall celler sådd ut per flaske, i de fleste tilfeller 200, og N er gjennomsnittlig antall kolonier.

Standardfeilen for den gjennomsnittlige overlevelsesfraksjonen er gitt ved:

$$se_N = \sqrt{\left(\frac{1}{n(n-1)} \left(\sum_{i=1}^n X_i - X_m \right)^2 \right)}, \quad (34)$$

hvor n er antall flasker i gruppen, X_i er antall kolonier i flaske i og X_m er midlere antall kolonier per flaske i denne gruppen. Overlevelsesfraksjonen, SF , er en funksjon av variablene N og N_0 . Standardfeilen for overlevelsesfraksjonen er dermed gitt som:

$$se_{SF} = \sqrt{\left(\frac{\delta SF}{\delta N_0} se_{N_0} \right)^2 + \left(\frac{\delta SF}{\delta N} se_N \right)^2} \quad (35)$$

3.5.3 Korreksjon for multiplisitet

Ved utsåing vil det ikke alltid bli kun enkeltceller, ettersom varigheten av trypsineringen må begrenses for ikke å skade cellene. Det er også mulig at noen få celler deler seg mellom utsåing og bestråling, særlig dersom tiden mellom utsåing og bestråling er lang. Kolonidannende enheter som består av flere celler har større sjanse for å danne kolonier, siden alle cellene i denne kolonidannende enheten må inaktiveres for ikke å danne en koloni. Det gjennomsnittlige antall celler i hver kolonidannende enhet kalles multiplisiteten, og det ble sådd ut en ekstra flaske for å korrigere for denne multiplisiteten ved alle akuttbestrålingsforsøkene som ble utført. I denne flasken ble det talt antall kolonidannende enheter som besto av en, to, tre eller fire celler.

⁸ Surviving fraction

Andelen overlevende celler er f , og andelen celler som ikke danner kolonier er dermed $(1 - f)$. Sannsynligheten for at en celleenhet med m celler ikke danner en koloni er $(1 - f)^m$, noe som betyr at overlevelseshfraksjonen SF for en celleenhet bestående av m celler er:

$$SF = 1 - (1 - f)^m \quad (36)$$

En populasjon av multicelleenheter som består av 1 til m celler har en overlevelseshfraksjon gitt ved:

$$SF = \sum_{i=1}^m x_i (1 - (1 - f)^i) \quad (37)$$

Multiplisiteten er gjennomsnittlig antall celler i celleenhetene. Multiplisiteten M for en flaske andelen x_i av hver multicelleenhet med i celler er gitt ved uttrykket:

$$M = \sum_{i=1}^m x_i \cdot i \quad (38)$$

Dersom man kun hadde hatt singletter og dubletter, ville multiplisiteten blitt:

$$M = x_1 + 2x_2,$$

hvor $x_1 + x_2 = 1$.

Ut fra disse likningene kan man finne et uttrykk for x_1 og x_2 som kan settes inn i uttrykket for multiplisiteten. Dersom dette uttrykket løses for f , får man følgende uttrykk:

$$f = \frac{M - \sqrt{M^2 - 4(M - 1)F}}{2(M - 1)} \quad (39)$$

For å finne usikkerheten i multiplisiteten, se_M , ble noen av flaskene telt flere ganger og i flere posisjoner, ettersom multiplisiteten kan være avhengig av hvor i flasken man teller og av ulik tolkning av det man ser fra gang til gang. se_M ble i denne oppgaven funnet til å være 0.003.

Standardfeilen i den korrigerede overlevelsen er gitt ved:

$$se_f = \sqrt{\left(\left(\frac{\delta f}{\delta F} \cdot se_F\right)^2 + \left(\frac{\delta f}{\delta M} \cdot se_M\right)^2\right)}, \quad (40)$$

hvor

$$\frac{\delta f}{\delta F} = \frac{1}{\sqrt{M^2 - 4(M - 1)F}} \quad (41)$$

og

$$\frac{\delta f}{\delta M} = \frac{-1 + \frac{M + 2F - 2FM}{\sqrt{M^2 - 4(M-1)F}}}{2(M-1)^2} \quad (42)$$

Dette gir følgende uttrykk for standardfeilen:

$$se_f = \sqrt{\left(\left(\frac{\delta f}{\delta F} \cdot \Delta F\right)^2 + \left(\frac{\delta f}{\delta M} \cdot \Delta M\right)^2\right)} \quad (43)$$

$$= \sqrt{\left(\left(\frac{\Delta F}{\sqrt{M^2 - 4(M-1)F}}\right)^2 + \left(\frac{-1 + \frac{M + 2F - 2FM}{\sqrt{M^2 - 4(M-1)F}}}{2(M-1)^2} \cdot \Delta M\right)^2\right)}$$

3.6 Bestemmelse av celle- og kjernestørrelse

Det var nødvendig å finne celle- og kjernestørrelsen for å kunne beregne dosen ved hjelp av modellen for tritiumdosimetri (se kapittel 2.4.2). Dette ble gjort for ubestrålte celler, da man går ut fra at størrelsen ikke endres signifikant under bestråling.

3.6.1 Preparering av cellene

For å måle cellestørrelsen, ble det brukt en flaske med ubehandlede celler. Celler fra en celleflaske med vekstflateareal på 25 cm² ble trypsinert løs som skildret i kapittel 3.1.3. Trypsinen fikk virke til cellesuspensjonen besto av flest mulig enkeltceller, siden bare enkeltceller kan brukes til å finne cellediameteren. Cellesuspensjonen ble deretter overført til et plastrør, og trypsinen ble nøytralisert ved tilsetning av en like stor mengde medium som trypsin. Cellesuspensjonen ble så, ved hjelp av en liten pipette, tilsatt et Bürkerkammer, og det ble tatt bilder av Bürkerkammeret med samme utstyr som beskrevet i kapittel 3.4.1 for å bruke til bestemmelse av mikroskopets oppløsning og cellestørrelsen.

For å måle kjernestørrelsen, ble det tatt ut en prøve på 0.5 ml etter at prosedyren for preparering av kjerner var gjennomført (se kapittel 3.7.2). Denne kjernesuspensjonen ble så overført til et Bürkerkammer, på samme måte som for de hele cellene.

3.6.2 Mikroskopering og bildeopptak

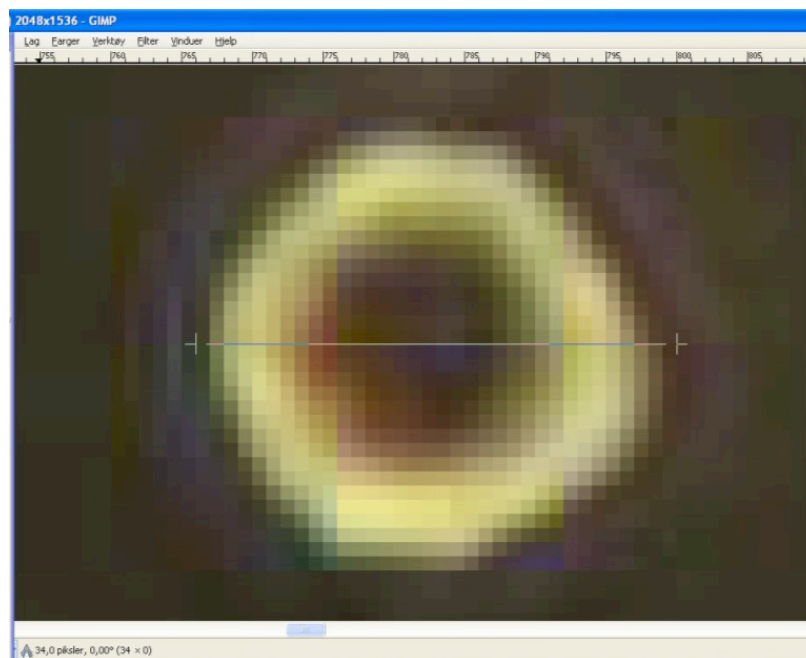
For å kunne bruke mikroskopbilder til å bestemme cellestørrelse, må den nøyaktige oppløsningen til mikroskopet finnes. Prinsippet bak beregningen av oppløsningen var å ta bilde av en gjenstand med kjent størrelse, og dermed bestemme oppløsningen, som gis i µm/pixel, ut fra dette. Det ble derfor tatt bilder av standard Bürkerkammer, som brukes ved celletelling. Dimensjonen til dette kammeret er

kjent, og hvert kammer har bredde 0.33 mm. Bildene ble åpnet i programmet GIMP (versjon 2.6.11, Gnu Image Manipulation Program, Kimbal, Mattis and the GIMP Development Team). GIMP har et måleverktøy som kan brukes til å måle avstander i et bilde, og avstanden gis i enheten pixler. Ved hjelp av dette verktøyet ble bredden av kammerene målt gjentatte ganger, og en gjennomsnittsverdi for bredden ble funnet. Deretter var det mulig å finne oppløsningen til mikroskopet ved å derivere bredden til kammeret i μm med den gjennomsnittlige bredden i pixler.

Prosessen beskrevet ovenfor ble repetert hver gang oppsettet av mikroskopet og kameraet ble endret. I denne oppgaven er det derfor benyttet tre ulike verdier for mikroskopets oppløsning.

3.6.3 Bildebehandling og –analyse

Det ble tatt bilder av kjerne- og celleprøver som beskrevet ovenfor, og bildene ble behandlet i programmet GIMP. Ved hjelp av måleverktøyet i GIMP kunne diameteren til cellekjerne og hele celler i antall piksler finnes. Det ble zoomet inn på hver enkelt celle, og diameteren ble målt fra ytterkant av cellemembranen (den svarte ringen rundt cellen på figur 3.2). T98G-cellene og -kjernene varierer veldig mye i størrelse og fasong, og for å få et godt estimat på diameteren ble det funnet 4 verdier for hver celle og cellekjerne – en måling horisontalt gjennom cellen/kjernen, en måling vertikalt gjennom cellen/kjernen og to målinger på skrå gjennom cellen/kjernen, 45° hhv. til høyre og venstre for den vertikale akse (se Figur 3.2 for illustrasjon). Det ble så beregnet en gjennomsnittsverdi for diameteren til cellen og cellekjernen.



Figur 12: Illustrasjon av fremgangsmåte for bestemmelse av celle- og kjernediameter. Figuren viser et cellebilde åpnet i programmet Gimp, hvor det er zoomet inn på en enkelt celle. De små firkantene i bildet viser bildets piksler. Den horisontale streken tvers over bildet måler cellens diameter i antall piksler. Den gjennomsnittlige cellediameteren ble funnet ved å beregne gjennomsnittet av 4 målinger av cellediameteren. Kjernediameteren ble målt på samme måte.

3.7 Dosimetri

3.7.1 Væskescintillasjonstelling

For å bestemme doseraten og totaldosen ved en gitt bestrålingstid, må aktiviteten per celle og cellekjerne finnes ved hjelp av væskescintillasjonstelling.

For å kunne beregne doseraten og dosen ved hjelp av modellen for tritiumdosimetri gitt i kapittel 2.4.2 var det nødvendig å finne fordelingen av radioaktivitet mellom cellekjernen og cytoplasma. Inkorporeringen av tritium startet ved at cellene ble sådd ut i små eller store flasker med radioaktivt medium, med vekstareal på hhv. 25 og 75 cm². Under prosessen for å få isolert cellekjerne (se kapittel 3.7.2) sentrifugeres cellene gjentatte ganger, og det er stor sannsynlighet for at man mister kjerner underveis. De store flaskene ble derfor benyttet for å sikre at celleantallet, og dermed aktiviteten, i prøvene var høy nok ved telling i disse tilfellene. Cellene gikk så på det radioaktive mediet i minst 5 dager før væskescintillasjonstillingen ble gjennomført, dette for å sikre at aktiviteten i cellene hadde nådd et konstant nivå. Flaskene ble omsatt som vanlig på mandager og fredager, og mediet ble skiftet på onsdager.

3.7.2 Preparering av celler og kjerner for scintillasjonstelling

Hele celler

Det gamle mediet ble fjernet fra cellene i den lille celleflaska, og for å løsne cellene ble trypsin tilsatt. Dette ble gjort i 2 omganger - først ble det tilsatt 2 ml som ble fjernet, og deretter ble det tilsatt 3 ml trypsin som fikk være på cellene til de hadde løsnet fra flaskebunnen. Det ble benyttet en pipette til å resuspendere cellesuspensjonen, slik at cellene løsnet fra hverandre. Deretter ble suspensjonen overført til et plastrør med 3 ml medium. Celleflasken ble skylt med 5 ml medium som også ble overført til plastrøret, for å sikre at alle cellene ble med.

Resten av prosedyren ble gjort enten på is eller i en sentrifuge (Labofuge 400R, Heraeus Instruments, Tyskland) på 4 °C.

Røret med cellesuspensjonen ble sentrifugert med 1200 omdreininger per minutt, RPM, i 5 minutter. Etter sentrifugeringen lå alle cellene som en pellet helt i bunnen av plastrøret, og supernatanten, altså den gamle løsningen som besto av trypsin og medium, ble fjernet ved hjelp av en væskesuger. Cellene ble vasket 2 ganger ved å tilsette 3 ml kaldt, fosfatbufret saltvann, PBS, blande suspensjonen ved bruk av en vortexer (IKA MS 3 digital vortexer, IKA Works Inc., USA) ved 300 Hz, og deretter sentrifugere røret igjen. PBS ble så fjernet, og cellene ble fiksert med 3 ml 10 % perklorosyre, PCA. PCA fjerner den syreløselige aktiviteten i prøven, mens radioaktiviteten til proteinene i cellene beholdes. Etter 15 minutter ble PCA fjernet, og cellene ble vasket og sentrifugert 3 ganger med 3 ml 2 % PCA. Før den siste sentrifugeringen ble det tatt ut 0.5 ml av cellesuspensjonen til bestemmelse av celleantallet i løsningen (se kap. 3.3), og de resterende cellene ble sentrifugert en siste gang. PCA ble

fjernet og røret ble tilsatt 2 ml 0.4 % natrium deoksyholin, NaDOC (Sigma, USA), og inkubert i inkubatorskap ved 37 °C i 30 minutter. Deretter ble 1 ml av prøven overført til et tellerør med 7 ml scintillasjonsvæske og blandet godt ved hjelp av vortexing. Det ble tatt to parallelle prøver til scintillasjonstilling fra hver celleflaske. Prøvene ble så kjørt gjennom scintillasjonstilleren for å måle den totale aktiviteten, og tellingen ble utført ved hjelp av en protokoll i scintillasjonstilleren som er definert av Åste Søvik (2000).

Se kapittel 2.4 for teori om scintillasjonstilling.

Kjerner

Cellene i den store celleflaske ble trypsinert løs på samme måte som ved preparering av celler for scintillasjonstilling. Resten av arbeidet med cellene foregikk enten på is eller i sentrifugen på 4 °C. Plastrøret med cellene ble spunnet ned i sentrifugen med 1200 RPM i 5 minutter, før blandingen av trypsin og medium ble fjernet med en væskesuger. Cellene ble vasket og sentrifugert 2 ganger med 5 ml kald PBS. Deretter ble det tilsatt 2,5 ml Buffer A blandet med en proteaseinhibitor, en proteaseinhibitorcocktailtablett (Roche Diagnostics, Tyskland) blandet med 20 ml Buffer A, for å lysere⁹ cellene og dermed isolere cellekjernene. Cellene sto på is med Buffer A i 20 minutter, og celleduspensjonen ble resuspendert forsiktig med en liten pipette og smokk hvert 3. minutt. Cellene ble så sentrifugert med 800 RPM i 5 minutter, før Buffer A ble fjernet fra cellene. Resten av prosedyren for preparering av kjerner forløp på samme måte som prepareringen av hele celler, med fiksering med 10 % PCA, vasking med 2 % PCA 3 ganger, tilsetting av NaDOC og deretter separasjon til 2 parallelle prøver for scintillasjonstilling.

3.8 Flowcytometri

Flowcytometri kan brukes til å måle DNA-innholdet i cellene, og kan dermed brukes til å finne fraksjonen av celler i de ulike fasene i celledyklus. Det relative celleantallet plottes mot det relative DNA-innholdet i et DNA-histogram, se figur.

3.8.1 Preparering av cellene

Det ble gjort flowcytometriforsøk flere ganger gjennom hele bestrålingsperioden, og forsøkene ble i tillegg gjort på de ubestrålte cellene som en kontroll. Det ble sådd ut en ekstra liten celleflaske de gangene det skulle gjennomføres flowcytometriforsøk. Cellene ble trypsinert løs fra flasken som beskrevet i kapittel 3.1.3. Celleprøvene ble deretter sentrifugert med 1200 RPM i 5 minutter, før blandingen av trypsin og medium ble fjernet med en væskesuger og cellene vasket 2 ganger med 5 ml kald PBS. Etter vaskingen ble PBS fjernet, og pelleten ble resuspendert i 200 µl romtemperert PBS. Løsningen ble blandet godt med en vortexer, og det ble så tilsatt 5 ml fryserkald 70 % etanol dråpevis mens røret ble holdt på skrå. Prøvene oppbevares 24-48 timer i kjøleskap eller fryses ned ved -20 °C.

⁹ Bryter ned cellene ved å ødelegge cellemembranen

Ved gjennomføring av flowcytometriforsøkene ble prøvene tatt ut fra kjøleskapet eller fryseren og vasket en gang med 5 ml PBS. Prøvene ble sentrifugert med 1200 RPM i 5 minutter, deretter ble supernatanten fjernet. Pelleten ble så resuspendert i 500 µl PBS med 70 µg/ml propidium jodid, PI, og 100 µg/ml ribonuklease, RNase. PI er et fluorescerende molekyl som bindes spesifikt til nukleinsyrer, som finnes i både DNA og dobbeltrådet RNA. RNase tilsettes for å bryte ned alt RNA som cellen inneholder, dermed er den fluorescerende emisjonen fra prøven proporsjonal med DNA-innholdet i cellen. Prøvene ble oppbevart mørkt i 30 minutter etter tilsetningen av PI før selve flowcytometrimålingene ble gjennomført.

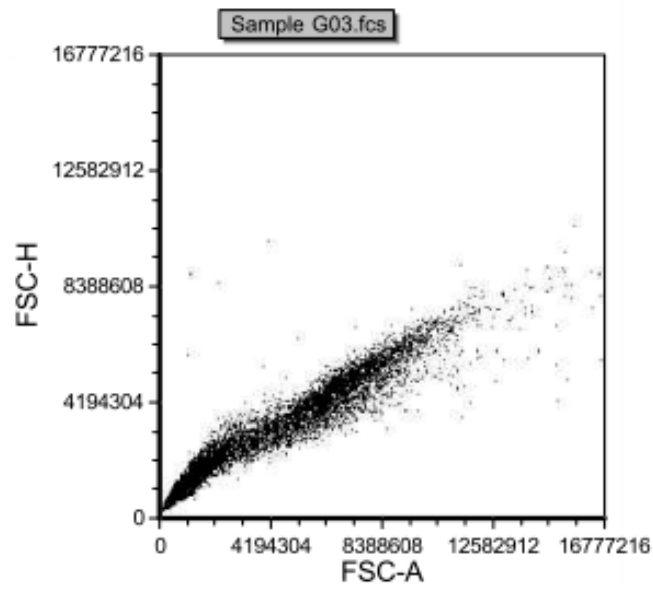
Til flowcytometrimålingene ble det brukt et C6 Flow Cytometer (Accuri Cytometers Inc., USA).

3.8.2 Presentasjon av data

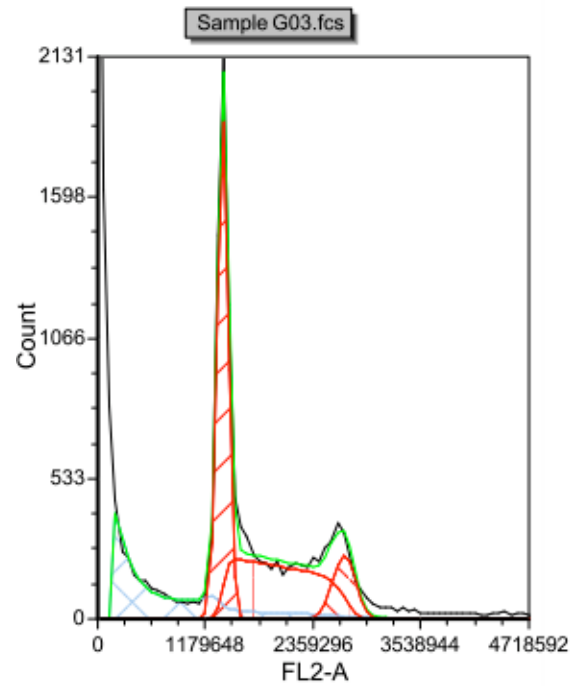
Analysen av flowcytometridataene ble gjort med programmet FCS Express V3 (De Novo Software, USA) og presentert ved hjelp av dot-plot og frekvenshistogrammer. Et dot-plot viser fluorescensintensiteten til to parametre, hvor hver prikk i plottet representerer en celle som har passert gjennom instrumentet. I vårt tilfelle har vi plottet vinkelspredt lys mot fremoverrettet lys. Ettersom fremoverrettet lys gir et mål på cellenes størrelse og vinkelspredt lys gir et mål på cellenes struktur, kan et plot av vinkelspredt lys mot fremoverrettet lys brukes til å differensiere ulike celletyper fra hverandre dersom man har en heterogen cellepopulasjon. Det er på denne måten mulig å sortere ut hvilke celler man ønsker å gjøre en analyse på. Et dot-plot for en homogen cellepopulasjon er vist i Figur 13 a). Man er i hovedsak interessert i å analysere enkeltcellene i populasjonen. Disse er ganske like i størrelse og form, og vil derfor ligge spredt rundt en tilnærmet rett linje i plottet. Dubletter og klumper av flere celler vil ligge til høyre for enkeltcellene i plottet, siden disse vil være større og ha en annen struktur enn de enkle cellene. I en prøve vil det også være fragmenter av celler, fordi noen av cellene ikke har tålt behandlingen de har fått. Disse fragmentene er mindre enn en enkeltcelle, og kan sees helt til venstre i plottet. Det er på denne måten mulig å plukke ut kun enkeltcellene i populasjonen for å jobbe videre med dem.

Et frekvenshistogram, som vist i Figur 13 b), viser relativt celleantall som funksjon av cellenes DNA-innhold, og gir cellenes fordeling i cellesyklus. Den høye toppen til venstre i plottet viser antall celler i G₁-fasen, mens den høye toppen til høyre i plottet gir antall celler i G₂- og M-fasen. Dette er celler som har fullført DNA-syntesen, og har dermed dobbelt så stor DNA-mengde som cellene i G₁. Området mellom de to toppene representerer celler som befinner seg i ulike stadier av S-fasen, hvor DNA-mengden er avhengig av hvor langt i S-fasen cellene har kommet.

a)



b)

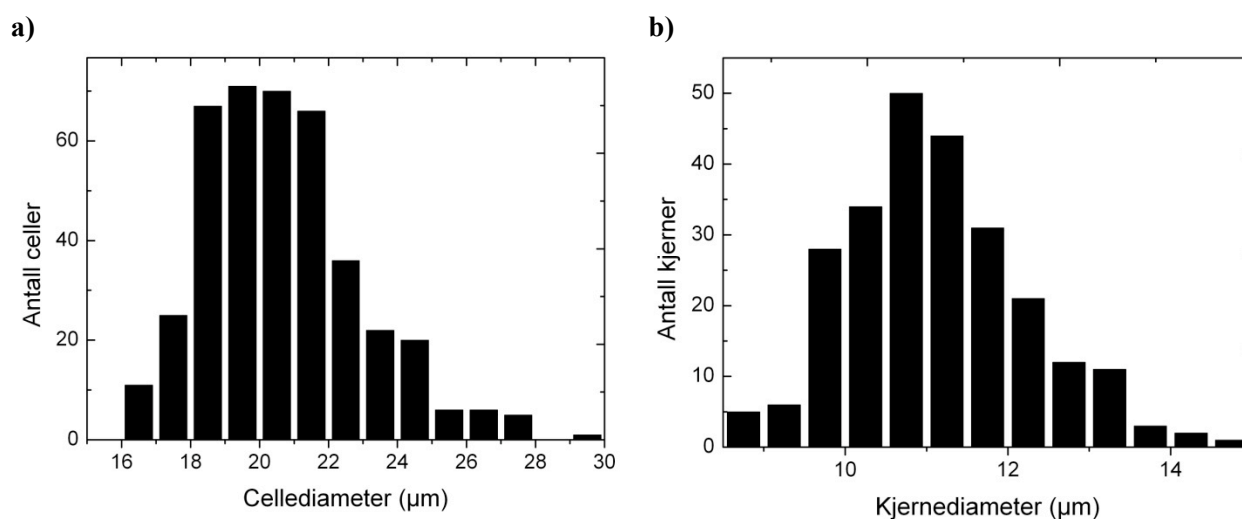


Figur 13: Analyse av flowcytometri-data. **a)** Dot plot, med arealet av fluorescens-signalet langs x-aksen og høyden til signalet på y-aksen. **b)** DNA-histogram, med DNA-mengde langs x-aksen og relativt celleantall langs y-aksen.

4 Resultater

4.1 Celle- og kjernestørrelsesmålinger

For å kunne beregne dosen ved hjelp av modellen for tritiumdosimetri beskrevet i kapittel 2.4.2, var det nødvendig å finne celle- og kjernestørrelsen. 406 celler og 247 kjerner ble målt som beskrevet i kapittel 3.6, og Figur 14 viser histogram over celle- og kjernediameterne som ble funnet i oppgaven. Tabell 2 gir den gjennomsnittlige celle- og kjernediameteren med usikkerhet.



Figur 14: Histogram over de a) 406 cellediameterne og b) 247 kjernediameterne som ble funnet i denne oppgaven.

Tabell 2: Gjennomsnittlig celle- og kjernediameter for T98G-celler funnet i oppgaven.

	Diameter (µm)	Volumestimering (µm ³)
Celle	20.66 ± 0.622	(46.19 ± 4.17) × 10 ²
Kjerne	11.11 ± 0.182	(7.178 ± 0.35) × 10 ²

Dersom man antar at cellene og kjernene er kuleformede, kan volumet estimeres ut fra størrelsene som er funnet ovenfor. Volumet er gitt ved uttrykket:

$$V = \frac{4}{3} \pi R^3, \quad (44)$$

hvor R er cellens og kjernens radius. Volumets standard error, som representerer biologisk variasjon i målingene (se kapittel 5.2.1 Celle- og kjernestørrelsesmåling), er gitt ved:

$$se_V = 4\pi R^2 \cdot se_R, \quad (45)$$

hvor se_R er standard error til celle- og kjerneradiusen.

Estimatene for cellens og kjernens volum kan også finnes i Tabell 2.

4.2 Cellulær tritiumdosimetri

For å kunne beregne doserater og totaldose ut fra likningene, var det nødvendig å bestemme hvordan den intracellulære radioaktiviteten fordeler seg mellom cellekjernen og cellens cytoplasma. Det ble derfor gjort scintillasjonstillinger på cellekjerner i tillegg til hele celler.

4.2.1 Cellulære S-verdier

De cellulære S-verdiene for ulike kombinasjoner av celle- og kjerneradier er vist i vedlegg B (se kapittel 3.7 for teori). S-verdiene er gitt for radier i hele μm , derfor er radiene i denne oppgaven rundet av til nærmeste hele μm . Dette gir T98G-cellene en celleradius på 10 μm og en kjerneradius på 6 μm . De korresponderende S-verdiene er vist i Tabell 3.

Tabell 3: Cellulære S-verdier for celle- og kjerneradius på hhv. 10 og 6 μm , hentet fra vedlegg B

$S(R_N \leftarrow R_N)$ (Gy/Bq·s)	$S(R_N \leftarrow R_{Cy})$ (Gy/Bq·s)
8.61×10^{-4}	5.10×10^{-5}

4.2.2 Cellulær og nukleær aktivitet

Det ble i denne oppgaven benyttet medium med 5 ulike konsentrasjoner av [^3H], som svarte til spesifikk aktivitet på 19.5, 6.5, 1.67, 0.53 og 0.27 $\mu\text{Ci/ml}$. Doseraten ble kun funnet for den ene av disse spesifikke aktivitetene, 1.67 $\mu\text{Ci/ml}$. Det ble totalt utført 4 vellykkede forsøk for å finne cellulær og nukleær aktivitet. Alle forsøkene ble utført minst 120 timer (5 dager) etter at cellene først ble utsatt for stråling, for at den cellulære aktiviteten skulle ha nådd et stabilt nivå. Verdiene for cellulær og nukleær aktivitet er gitt i Tabell 4 og Tabell 5.

4.2.3 Bestemmelse av f-verdier

For å beregne doseraten til kjernen, var det nødvendig å bestemme hvordan radioaktiviteten fordeler seg i cellen. Fraksjonen av radioaktivitet lokalisert i hhv. cellekjernen og cytoplasma, f_N og f_{Cy} , ble funnet ut fra likning 21 og 23.

Fraksjonen av den cellulære aktiviteten som befant seg i cellekjernen og cytoplasma er gitt i Tabell 6.

Tabell 4: Målt cellulær aktivitet, A_C , for [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på $1.67 \mu\text{Ci/ml}$, funnet 120 timer etter at cellene først ble utsatt for stråling.

	A_C (Bq/celle)
Forsøk 1	$(3.87 \pm 0.47) \times 10^{-2}$
Forsøk 2	$(3.71 \pm 0.11) \times 10^{-2}$
Gjennomsnitt	$(3.79 \pm 0.34) \times 10^{-2}$

Tabell 5: Målt nukleær aktivitet, A_N , for [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på $1.67 \mu\text{Ci/ml}$, funnet 120 timer etter at cellene ble utsatt for stråling.

	A_N (Bq/kjerne)
Forsøk 3	$(1.77 \pm 0.30) \times 10^{-2}$
Forsøk 4	$(1.36 \pm 0.14) \times 10^{-2}$
Gjennomsnitt	$(1.56 \pm 0.24) \times 10^{-2}$

Tabell 6: Fraksjon av cellulær aktivitet som befant seg i cellekjernen og cellens cytoplasma for celler som har gått på [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på $1.67 \mu\text{Ci/ml}$ i 120 timer.

f_N	f_{cy}
0.412 ± 0.073	0.588 ± 0.073

4.2.4 Doserate til kjernen

Doseraten til cellekjernen kan beregnes ut fra teorien presentert i kapittel 2.4.3 (Cellulær tritiumdosimetri). Doseraten til cellekjernen med tilhørende usikkerhet beregnes ut fra likning 16 og 18.

Tabell 7: Den beregnede doseraten til kjernen for celler som har gått på [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på $1.67 \mu\text{Ci/ml}$ i 120 timer.

Spesifikk aktivitet i mediet ($\mu\text{Ci/ml}$)	Doserate til kjernen (Gy/time)
1.67	$(5.25 \pm 0.98) \times 10^{-2}$

Tabell 7 viser doseraten til cellekjernen med usikkerhet for celler som har gått på [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 μCi/ml.

4.2.5 Måling av spesifikk aktivitet i medium

Den spesifikke aktiviteten til mediet som ble brukt (1.67 μCi/ml), ble sjekket ved at en prøve av det radioaktive mediet ble målt i scintillasjonstelleren. Ved alle fire forsøk ble to prøver med 1 ml [³H]-medium fortynnet 1:1000 med vanlig RPMI blandet med 7 ml scintillasjonsvæske, og deretter kjørt gjennom scintillasjonstelleren. Resultatene fra scintillasjonstillingen er vist i Tabell 8. De målte aktivitetene viser godt samsvar med den beregnede verdien.

Tabell 8: Målt spesifikk aktivitet for mediet brukt i denne oppgaven

Prøve nr.	A_{RPMI}^S (Bq/ml)	Målt spesifikk aktivitet (μCi/ml)
1	6.244×10^4	1.6876
2	6.108×10^4	1.6507
3	6.189×10^4	1.6727
4	6.197×10^4	1.6748
Snitt:	$(6.184 \pm 0.04) \times 10^4$	1.6715 ± 0.011

4.3 Alanindosimetri

Det var nødvendig å finne doseraten som ble levert ved akutt røntgenbestråling. Dette ble utført ved hjelp av ESR-dosimetri, med alanin som dosimetermateriale.

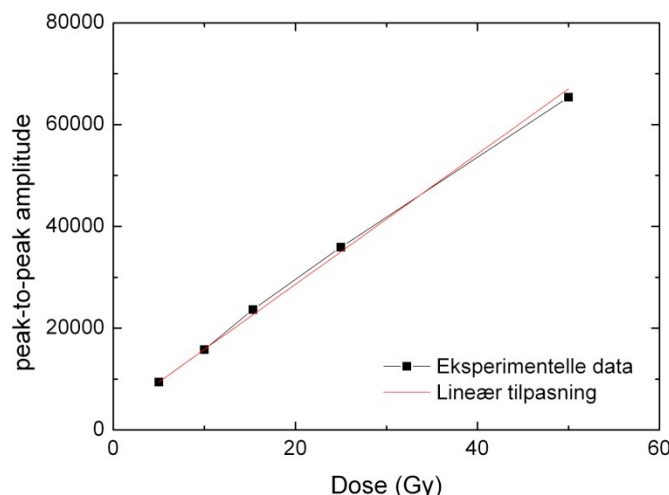
For å finne nøyaktig dose levert av røntgenkilden, ble det laget en kalibreringskurve ved at 20 alanindosimetre ble bestrålt med 5 ulike doser ved bruk av ⁶⁰Co γ-stråling. Dosene som ble brukt var 5, 10, 15.34, 25 og 50 Gy. Det ble beregnet en gjennomsnittsverdi for peak-peak amplituden funnet ved ESR-dosimetri for hver av de 4 dosene som ble brukt. Disse gjennomsnittsverdiene ble så plottet som funksjon av dose, som vist i Figur 15.

Ved hjelp av programmet Origin ble det foretatt en lineær tilpasning til de eksperimentelle dataene som ble funnet ved ESR-dosimetri, som gav et uttrykk for peak-peak amplituden som funksjon av dose. Den lineære tilpasningen var på formen:

$$y = a + bx,$$

hvor $a = 3011.50 \pm 180.01$ og $b = 1280 \pm 25.47$.

Denne tilpasningen ble så brukt for å finne doseraten som ble gitt ved røntgenbestrålingen. Totalt 8 alanintabletter ble bestrålt ved bruk av røntgenkilden; 4 av tablettene ble bestrålt i 12 minutter, mens de siste 4 tablettene ble bestrålt i 24 minutter. Gjennomsnittet av peak-peak amplituden ble beregnet for begge bestrålingsoppsettene, og doseraten som ble gitt ved begge tilfeller ble beregnet. De beregnede doseratene i tillegg til den gjennomsnittlige doseraten er vist i Tabell 9.



Figur 15: Kalibreringskurve for dosebestemmelse, funnet ved å plote peak-peak amplituden som funksjon av dose for alanintabletter bestrålt med ^{60}Co γ -stråling.

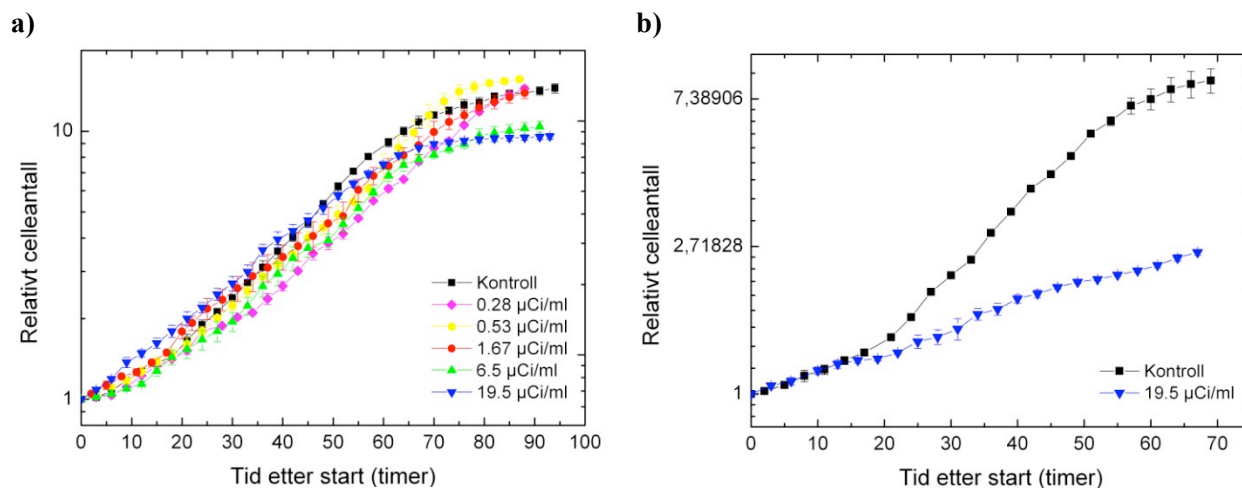
Tabell 9: Beregnet gjennomsnittlig doserate for alanindosimetri utført på røntgenkilde, hvor totalt 8 alanintabletter (4 ved hvert bestrålingsoppsett) ble bestrålt i hhv. 12 og 24 minutter.

Bestrålingstid (min.)	PP amplitude	Dose (Gy)	Doserate (Gy/min)
12	7137.42 ± 126.37	3.222 ± 0.17	0.269 ± 0.014
24	11459.19 ± 114.20	6.598 ± 0.10	0.275 ± 0.004
Gjennomsnitt:			0.272 ± 0.005

4.4 Doblingstid

Det ble totalt utført 8 forsøk for å finne doblingstiden til T98G-cellene, slik som beskrevet i kapittel 3.4 (Bestemmelse av doblingstider). Cellene ble kontinuerlig bestrålt ved bruk av $[^3\text{H}]$ -medium med spesifikk aktivitet på 0.27, 0.53, 1.67, 6.5 og 19.5 $\mu\text{Ci/ml}$. 5 av forsøkene ble utført for å bestemme doblingstiden de første 5 dagene etter at cellene ble bestrålt, samtidig som det ble utført et forsøk for å finne doblingstiden for cellene bestrålt med den høyeste doseraten (ved bruk av $[^3\text{H}]$ -medium med spesifikk aktivitet på 19.5 $\mu\text{Ci/ml}$) fra dag 4 til dag 7 i bestrålingsforløpet. For de ubestrålte T98G-cellene ble det utført 2 forsøk for å finne doblingstiden, og en gjennomsnittlig doblingstid ble beregnet. Vekstkurvene er fremstilt med det relative celleantallet langs en logaritmisk y-akse og tiden etter første telling i timer langs x-aksen.

For hvert bestrålingsoppsett ble relativt celleantall som funksjon av tiden i 3 posisjoner funnet, og gjennomsnittlig celleantall for alle posisjonene ble beregnet. Det gjennomsnittlige relative celleantallet ble så plottet som funksjon av tiden. Figur 16 a) viser vekstkurven for de første fem dagene (dag 0 til dag 4) for T98G-celler som hadde gått på $[^3\text{H}]$ -medium med spesifikk aktivitet på 0.27, 0.53, 1.67, 6.5 og 19.5 $\mu\text{Ci/ml}$, i tillegg til vekstkurven for ubestrålte T98G-celler. Summen av dosen til cellekjernene hadde ved slutten av forsøket nådd hhv. 0.84, 1.68, 4.99, 20.02 og 59.15 Gy.



Figur 16: Vekstkurver for T98G-celler **a)** 0-4 dager etter bestrålingsstart for ubestrålte celler og celler som hadde gått på $[^3\text{H}]$ -medium med spesifikk aktivitet på hhv. 0.28, 0.53, 1.67, 6.5 og 19.5 $\mu\text{Ci/ml}$ og **b)** 4-7 dager etter bestrålingsstart for ubestrålte celler og celler som hadde gått på $[^3\text{H}]$ -medium med spesifikk aktivitet på 19.5 $\mu\text{Ci/ml}$. Kurvene viser relativt celleantall langs en logaritmisk x-akse som funksjon av tiden etter første telling langs en lineær x-akse.

Figur 16 b) viser vekstkurven for dag 4 til dag 7 for T98G-celler som hadde gått på $[^3\text{H}]$ -medium med spesifikk aktivitet på 19.5 $\mu\text{Ci/ml}$, i tillegg til vekstkurven for ubestrålte T98G-celler. Ved slutten av forsøket hadde summen av dosen til cellekjernene nådd 103.52 Gy.

For celler i eksponentiell vekst skal relativt celleantall som funksjon av tid gi en rett linje i et enkeltlogaritmisk plott, med stigningskoeffisient lik $t_2 = \frac{\ln 2}{b}$ (se kapittel 2.2.4). Det ble gjort en lineær tilpasning til formelen $y = ae^{bx}$ av det relative celleantallet som funksjon av tiden. Doblingstiden ble så beregnet etter formelen gitt ovenfor. Tabell 10 gir doblingstidene for ubestrålte T98G-celler og bestrålte T98G-celler 4 dager og 7 dager ut i bestrålingsforløpet.

Tabell 10 viser at doblingstiden for de bestrålte T98G-cellene er noe endret i forhold til de ubestrålte T98G-cellene. Cellene som er bestrålt med de laveste doseratene viser en noe kortere doblingstid enn det som er tilfellet for de ubestrålte T98G-cellene 4 dager etter bestrålingsstart. Dette kan skyldes at de bestrålte cellene speeder opp celledelingen som respons på strålebehandlingen, eller det kan skyldes variasjon i doblingstid på grunn av ulik behandling av cellene. Den aller høyeste doseraten gir imidlertid en ganske kraftig endring i doblingstid, og 7 dager etter bestrålingsstart er doblingstiden doblet i forhold til de ubestrålte T98G-cellene. En t-test viste at det ikke var noen signifikant forskjell mellom doblingstidene den første uken i bestrålingsforløpet (med p-verdier på hhv. 0.23, 0.18, 0.69 og 0.25) for celler bestrålt ved bruk av $[^3\text{H}]$ -medium med spesifikk aktivitet på 0.28, 0.53, 1.67 og 6.5 $\mu\text{Ci/ml}$ i forhold til de ubestrålte T98G-cellene, mens forskjellen i doblingstid for celler bestrålt ved

bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 19.5 µCi/ml viste en signifikant forskjell (p-verdi på 0.01). Forskjellen i doblingstid fra dag 4 til dag 7 for cellene bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 19.5 µCi/ml sammenliknet med de ubestrålte T98G-cellene var veldig signifikant (p-verdi på 3.62×10^{-5}).

Tabell 10: Gjennomsnittlige doblingstider for bestrålte og ubestrålte T98G-celler. **a)** gir doblingstiden for ubestrålte T98G-celler og celler som hadde vokst på [³H]-medium med spesifikk aktivitet på hhv. 0.28, 0.53, 1.67, 6.5 og 19.5 µCi/ml 4 dager etter bestrålingsstart og **b)** gir doblingstiden for ubestrålte T98G-celler og celler som hadde gått på [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 19.5 µCi/ml 7 dager etter bestrålingsstart.

a)		b)	
Dose (µCi/ml)	Doblingstid (timer)	Dose (µCi/ml)	Doblingstid (timer)
Kontroll	24.42 ± 1.70	Kontroll	24.42 ± 1.70
0.27	20.24 ± 0.78	19.5	48.13 ± 0.95
0.53	20.67 ± 0.76		
1.67	23.35 ± 0.73		
6.5	28.01 ± 2.16		
19.5	35.23 ± 0.26		

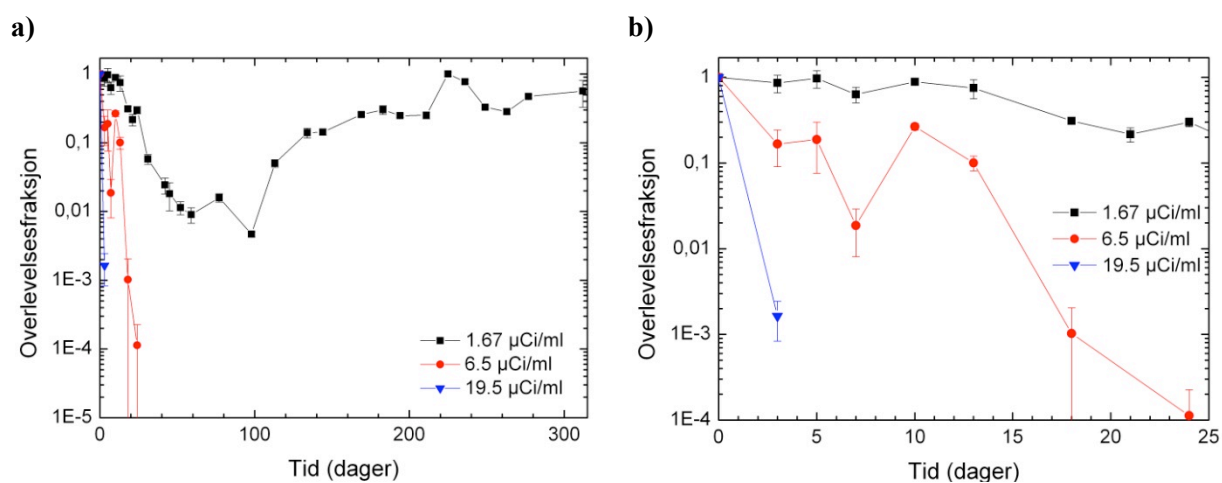
4.5 Celleoverlevelsesforsøk

Det ble utført 2 celleoverlevelsesforsøk i henhold til prosedyren beskrevet i kapittel 3.5.1. Det ene forsøket ble utført på celler bestrålt med [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67, 6.5 og 19.5 µCi/ml, og forsøket strakte seg totalt over 312 dager. Det andre forsøket, som hadde en varighet på 155 dager, ble utført på celler bestrålt med [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 0.27 og 0.53 µCi/ml. I begge forsøkene ble det samtidig utført celleoverlevelsesforsøk på ubestrålte T98G-celler. Beregningene fra celleoverlevelsesforsøkene er vist i vedlegg F.

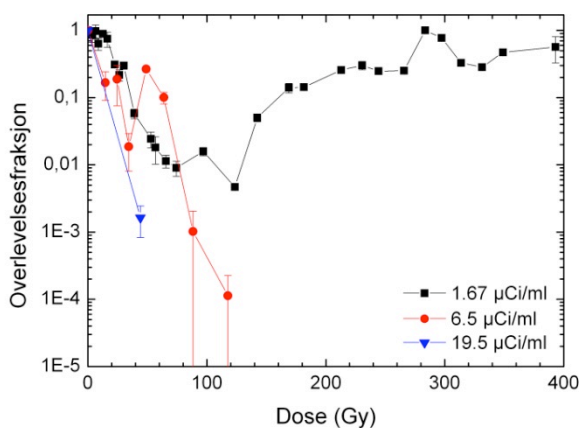
Figur 17 a) viser overlevelsesfraksjonen som funksjon av tid for celler bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67, 6.5 og 19.5 µCi/ml relativt til en ubestrålt kontroll. Det ble i starten utført koloniforsøk 2-3 ganger i uka, for at det skulle være mulig å fange endringene i overlevelse for cellene som ble bestrålt med de høyeste doseratene. Det ble tatt bilder av cellene underveis i forsøket, disse er vist i vedlegg E.

Figur 17 b) viser overlevelsesfraksjonen som funksjon av tid for celler bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67, 6.5 og 19.5 µCi/ml de første 25 dagene av forsøket. Dette for å bedre kunne vise utviklingen til cellene bestrålt med de to høyeste dosene. Resultatene av koloniforsøkene viser at overlevelsesfraksjonen for cellene som ble bestrålt med [³H]-medium med

spesifikk aktivitet på 19.5 $\mu\text{Ci/ml}$ sank til under 0.1 % allerede etter 3 dager relativt til de ubestrålte cellene. For cellene som ble bestrålt med [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på 6.5 $\mu\text{Ci/ml}$ tok det 18 dager før overlevelsesfraksjonen var på under 0.1 %. Overlevelsesfraksjonen for cellene bestrålt med [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 $\mu\text{Ci/ml}$ sank også sakte, men sikkert fram til 98 dager etter forsøksstart, hvor overlevelsesfraksjonen var nede på omtrent 0.4 %. Cellene hadde fram til dette hatt en lengre periode med lite vekst, hvor svært få av cellene var i stand til å dele seg, og overlevelsesfraksjonen lå på rundt 1 % fra 45 dager ut i forsøket. Etter den lave verdien for celleoverlevelse som ble funnet ved dag 98 i forsøket ble det observert en endring i cellene, og overlevelsen steg plutselig til rundt 20 %. Overlevelsesfraksjonen fortsatte å stige, og stabiliserte seg etter hvert på en verdi på rundt 50-60 % relativt til de ubestrålte T98G-cellene.



Figur 17: Overlevelsesfraksjon som funksjon av tid for T98G-celler bestrålt med bruk av [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på hhv. 1.67, 6.5 og 19.5 $\mu\text{Ci/ml}$ relativt til ubestrålte T98G-celler. **a)** viser hele forsøkets varighet, mens **b)** viser de første 25 dagene av forsøket.

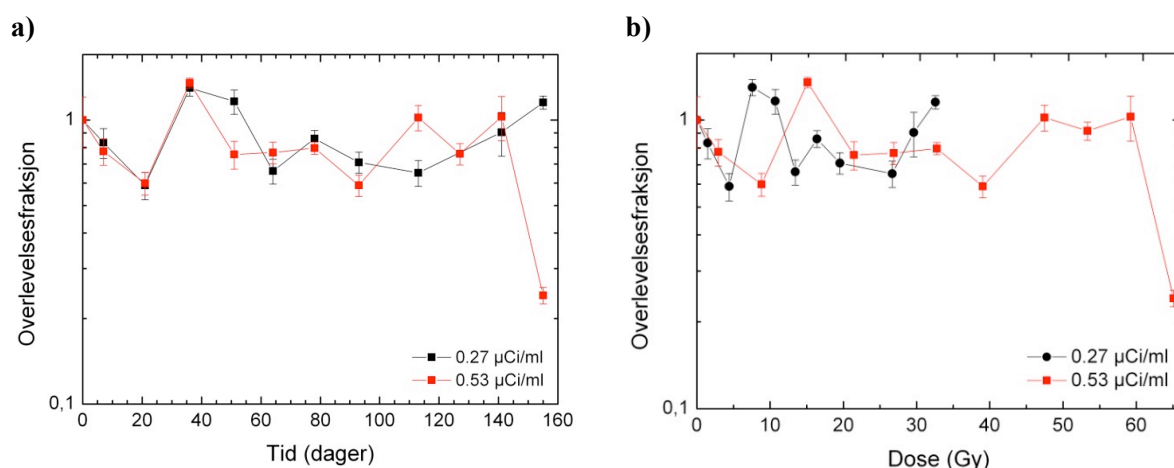


Figur 18: Overlevelsesfraksjon som funksjon av dose for T98G-celler bestrålt ved bruk av [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67, 6.5 og 19.5 $\mu\text{Ci/ml}$ relativt til ubestrålte T98G-celler.

I kapittel 4.2.4 ble doseraten til kjernen ved bestråling ved bruk av [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 $\mu\text{Ci/ml}$ beregnet til 0.0525 ± 0.098 Gy/time. Denne doseraten ble så brukt til å regne ut den totale dosen de ulike cellekjernene har fått i løpet av celleoverlevelsesforsøkene. Figur 18 viser overlevelsesfraksjonen som funksjon av dose for T98G-celler bestrålt med [^3H]-medium med spesifikk

aktivitet på 1.67, 6.5 og 19.5 $\mu\text{Ci/ml}$ relativt til en ubestrålt kontroll. Overlevelsesfraksjonen faller forholdsvis jevnt for de bestrålte cellene sammenliknet med de ubestrålte kontrollcellene. For cellene som ble bestrålt med [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på 19.5 $\mu\text{Ci/ml}$ var overlevelsesfraksjonen lavest etter at summen av totaldosen til cellekjernene hadde nådd 44.1 Gy, overlevelsesfraksjonen var da på 0.1 %. Cellene som ble bestrålt med [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på 6.5 $\mu\text{Ci/ml}$ nådde sin laveste overlevelsesfraksjon, på 0.01%, etter at summen av dosen til cellekjernene hadde nådd 117.7 Gy. Overlevelsesfraksjonen til cellene som ble bestrålt med en spesifikk aktivitet på 1.67 $\mu\text{Ci/ml}$ hadde lavest overlevelsesfraksjon, på 0.4 %, etter at summen av dosen til cellekjernene hadde nådd 123.5 Gy. Etter dette steg overlevelsesfraksjonen igjen, og ved forsøkets slutt hadde summen av dosen til cellekjernene nådd 393 Gy.

Figur 19 a) viser overlevelsesfraksjonen som funksjon av tid for celler bestrålt ved bruk av [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på 0.27 og 0.53 $\mu\text{Ci/ml}$ relativt til en ubestrålt kontroll. Koloniforsøkene ble utført en gang hver 14. dag. For cellene bestrålt med [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på 0.27 $\mu\text{Ci/ml}$ mangler det data fra den ene dagen, dag 122, da alle cellene fra denne dagen døde, sannsynligvis grunnet en infeksjon. Resultatene fra koloniforsøkene viser at overlevelsesfraksjonen varierte gjennom hele forsøket, med 58.9 % og 129.8 % som hhv. laveste og høyeste verdi for cellene bestrålt med [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på 0.27 $\mu\text{Ci/ml}$ og 24.1 % og 135 % som hhv. laveste og høyeste verdi for cellene bestrålt med [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på 0.53 $\mu\text{Ci/ml}$. Det siste koloniforsøket som ble utført for cellene bestrålt med [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på 0.53 $\mu\text{Ci/ml}$ viser at overlevelsesfraksjonen plutselig falt til omtrent 24 % sammenliknet med den ubestrålte kontrollen. Cellene ble på denne tiden sannsynligvis rammet av en infeksjon, som førte til at de aller fleste cellene i løpet av kort tid døde. Bildene av cellene i vedlegg E viser denne utviklingen. Celleoverlevelsesforsøket for celler bestrålt ved bruk av [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på 0.27 og 0.53 $\mu\text{Ci/ml}$ ble derfor avsluttet etter 155 dager.



Figur 19: Overlevelsesfraksjon som funksjon av a) tid og b) dose for T98G-celler bestrålt ved bruk av [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på hhv. 0.27 og 0.53 $\mu\text{Ci/ml}$ sammenliknet med ubestrålte T98G-celler.

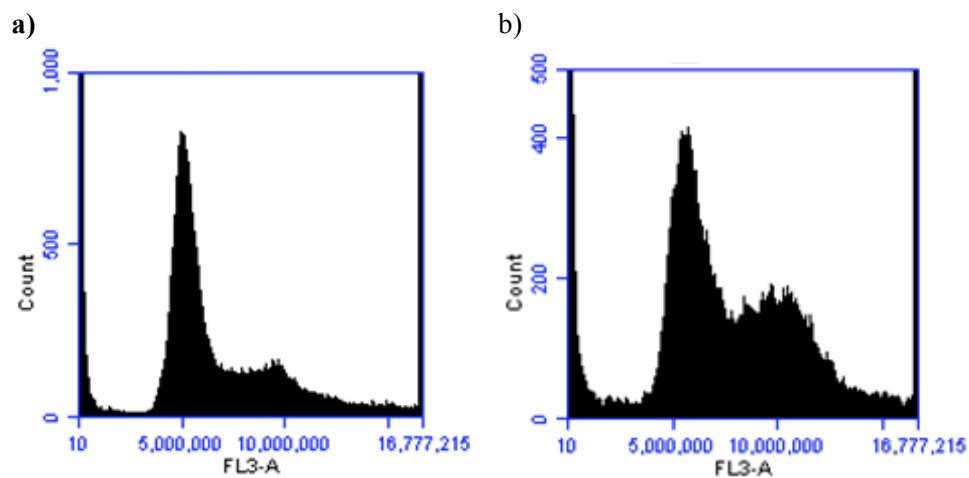
Figur 19 b) viser overlevelsesfraksjonen som funksjon av dose for celler bestrålt ved bruk av [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på 0.27 og 0.53 $\mu\text{Ci/ml}$ sammenliknet med en ubestrålt kontroll. Overlevelsesfraksjonen varierer gjennom hele forsøket, men det ser ikke ut til å være noe mønster i

variasjonen. Overlevelsesfraksjonen ligger, bortsett fra det siste punktet for cellene bestrålt med [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 0.53 µCi/ml, mellom 60 % og 130 % i forhold til den ubestrålte kontrollen, men dersom man ser hele forsøket under ett er det ikke mulig å se at strålingen har noen effekt på cellenes overlevelsesfraksjon. Summen av dosen til cellekjernene nådde ved slutten av forsøket 32.55 Gy for cellene bestrålt med [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 0.27 µCi/ml, og 65.1 Gy for cellene bestrålt med [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 0.53 µCi/ml.

4.6 Cellenes aldersfordeling

Det ble utført forsøk for å bestemme cellyklusfordelingen etter at cellene hadde vokst på [³H]-medium i 4 dager og i 11 dager. For cellene som hadde vokst på det radioaktive mediet med høyest spesifikk aktivitet (19.5 µCi/ml), ble det utført forsøk etter 4 og 7 dager.

Analysen av flowcytometridataene ble gjort med programmet FCS Express V3, og dot-plot og frekvenshistogrammer som ble brukt i analysen er lagt med i vedlegg G. Det er ikke benyttet noen form for gating på dot-plotene, så alle data er tatt med i analysen. Programvaren utfører automatisk 6 ulike variasjoner av analysen av cellyklusfordelingen. Modell 6, CV's fixed, ble konsekvent benyttet for alle forsøkene som ble utført i denne oppgaven.

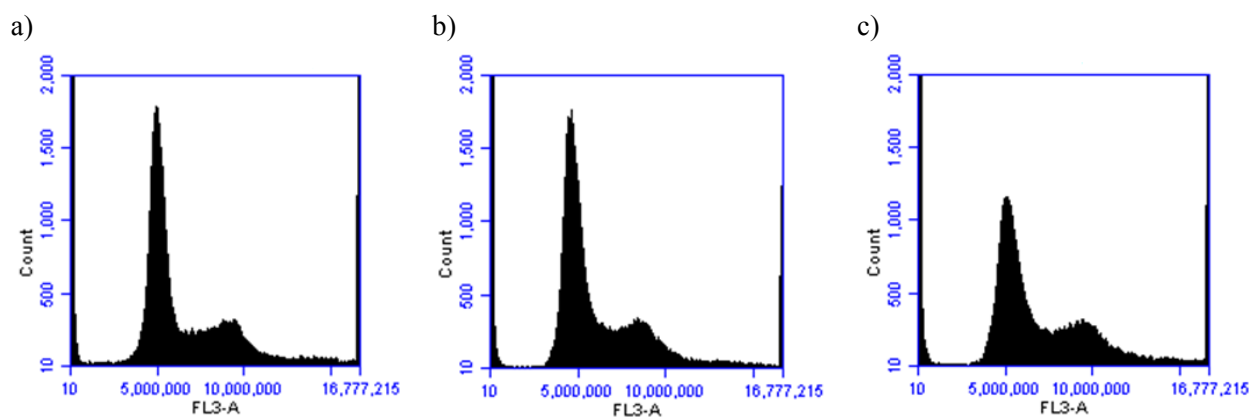


Figur 20: DNA-histogrammer for a) ubestrålte T98G-celler og b) T98G-celler bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 19.5 µCi/ml, 4 dager ut i bestrålingsforløpet. DNA-histogrammene viser DNA-mengde langs x-aksen og relativt celleantall langs y-aksen.

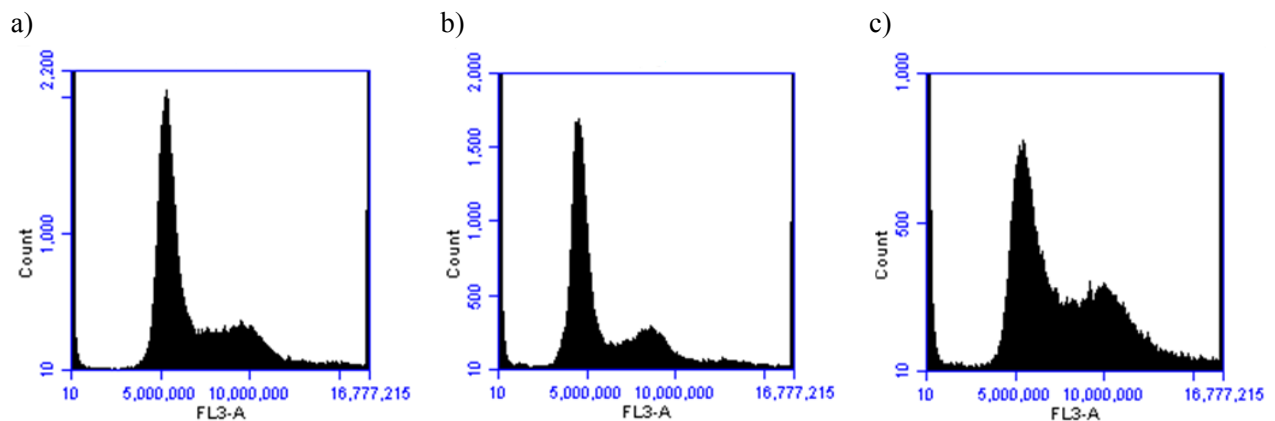
Figur 20 viser DNA-histogrammer for T98G-celler som hadde vokst på [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 19.5 µCi/ml i 4 dager, i tillegg til DNA-histogrammer for ubestrålte T98G-celler. Fraksjonene av celler i de ulike delene av cellyklus for de ubestrålte kontrollcellene og cellene som hadde vokst på [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 19.5 µCi/ml i hhv. 4 og 7 dager er vist i Tabell 11. For de bestrålte cellene hadde summen av dosen til cellekjernene nådd 59 Gy og 103 Gy etter hhv. 4 og 7 dager. De bestrålte cellene viser en økt fraksjon av celler i S-fase etter 4 dager i forhold til den ubestrålte kontrollen. Etter 7 dager er det en tydelig opphopning av celler i G₂-fasen for de bestrålte cellene, noe som kan sees ved at fraksjonen i G₂-fasen etter 7 dager for de bestrålte cellene er omtrent 4 ganger så stor som for de ubestrålte kontrollcellene.

Tabell 11: Cellesyklusfordelingene for ubestrålte kontrollceller og celler bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 19.5 µCi/ml hhv. **a)** 4 dager og **b)** 7 dager ut i bestrålingsforløpet.

a)				b)			
Dose (µCi/ml)	% G ₁	% S	% G ₂	Dose (µCi/ml)	% G ₁	% S	% G ₂
Kontroll	49.30	45.53	5.17	Kontroll	45.11	50.23	4.67
19.5	34.99	58.87	6.14	19.5	51.58	30.22	18.20



Figur 21: DNA-histogrammer for a) ubestrålte T98G-celler, b) T98G-celler bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml og c) T98G-celler bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 6.5 µCi/ml, 4 dager ut i bestrålingsforløpet. DNA-histogrammene viser DNA-mengde langs x-aksen og relativt celleantall langs y-aksen.



Figur 22: DNA-histogrammer for a) ubestrålte T98G-celler, b) T98G-celler bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml og c) T98G-celler bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 6.5 µCi/ml, 11 dager ut i bestrålingsforløpet. DNA-histogrammene viser DNA-mengde langs x-aksen og relativt celleantall langs y-aksen.

Figur 21 og Figur 22 viser DNA-histogrammer for T98G-celler som hadde vokst på [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 og 6.5 µCi/ml i hhv. 4 og 11 dager, i tillegg til DNA-histogrammer for ubestrålte T98G-celler. Fraksjonene av celler i de ulike delene av cellesyklus for de ubestrålte kontrollcellene og cellene som hadde vokst på [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 og 6.5

$\mu\text{Ci/ml}$ i hhv. 4 og 11 dager er vist i Tabell 12. For cellene som hadde vokst på [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på $1.67 \mu\text{Ci/ml}$ hadde summen av dosen til cellekjernene nådd 5 Gy og 14 Gy etter hhv. 4 og 11 dager, mens summen av dosen til cellekjernene for cellene som hadde vokst på [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på $6.5 \mu\text{Ci/ml}$ hadde nådd 20 Gy og 54 Gy etter hhv. 4 og 11 dager. Cellene som er bestrålt med den laveste doseraten viser ingen stor endring i cellyklusfordelingen i forhold til den ubestrålte kontrollen. For cellene som er bestrålt ved bruk av [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på $6.5 \mu\text{Ci/ml}$ ses en endring i cellyklusfordelingen i forhold til den ubestrålte kontrollen, ved at fraksjonen av celler i S-fase er økt og ved en opphopning av celler i G_2 -fasen for de bestrålte cellene. Fraksjonen av celler i G_2 -fasen etter 7 dager er nesten doblet for cellene som er bestrålt med den høyeste doseraten i forhold til de ubestrålte kontrollcellene.

Tabell 12: Cellyklusfordelingene for ubestrålte T98G-celler og T98G-celler bestrålt ved bruk av [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 og $6.5 \mu\text{Ci/ml}$ hhv. a) 4 dager og b) 11 dager ut i bestrålingsforløpet.

a)				b)			
Dose ($\mu\text{Ci/ml}$)	% G_1	% S	% G_2	Dose ($\mu\text{Ci/ml}$)	% G_1	% S	% G_2
Kontroll	50.51	45.82	3.67	Kontroll	50.69	44.50	3.81
1.67	50.97	46.32	2.71	1.67	56.91	38.18	4.91
6.5	44.11	52.12	3.78	.5	34.99	57.4	7.37

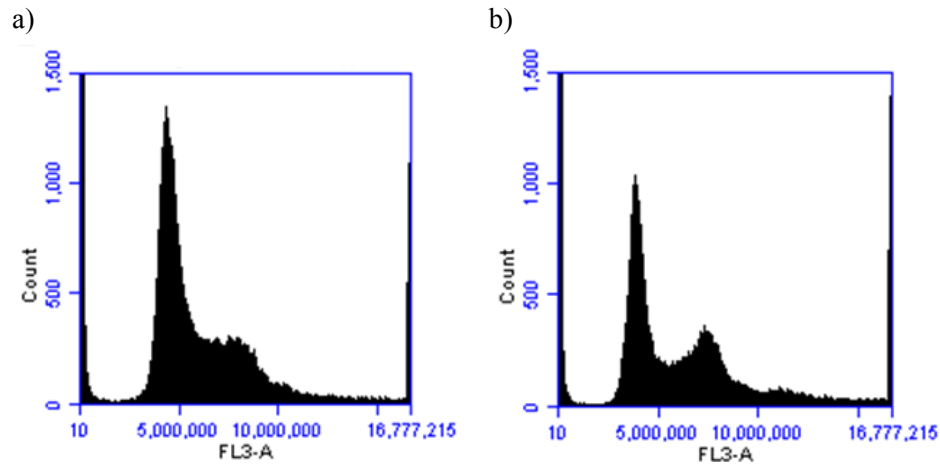
Tabell 13: Cellyklusfordelingen for ubestrålte T98G-celler og T98G-celler bestrålt ved bruk av [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på $1.67 \mu\text{Ci/ml}$ 195 dager ut i bestrålingsforløpet.

Dose ($\mu\text{Ci/ml}$)	% G_1	% S	% G_2
Kontroll	44.12	51.45	4.44
1.67	45.53	38.69	17.78

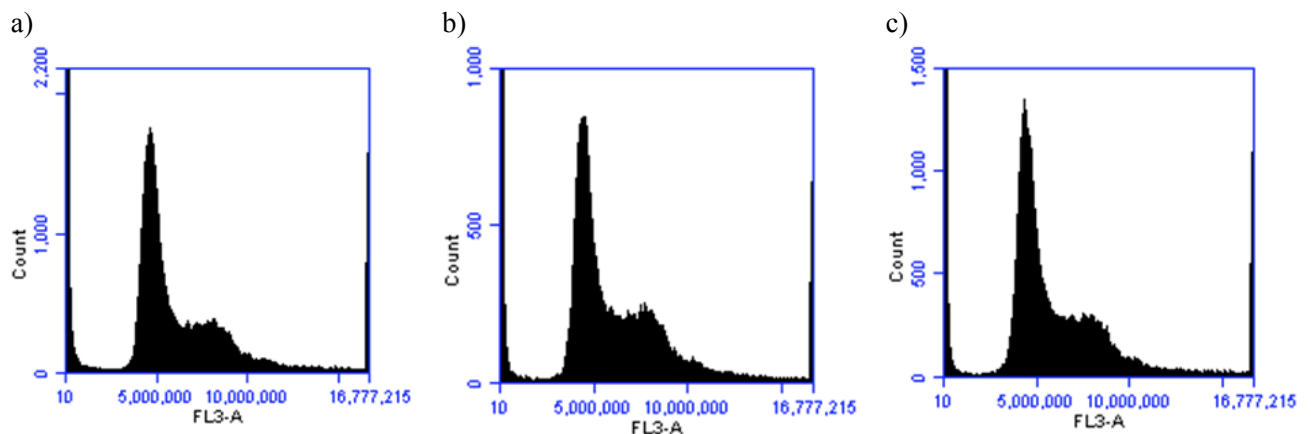
Figur 23 viser DNA-histogrammer for ubestrålte T98G-celler og T98G-celler som hadde vokst på [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på $1.67 \mu\text{Ci/ml}$ i 195 dager. Fraksjonen av celler i de ulike delene av cellyklus for de ubestrålte T98G-cellene og cellene som hadde vokst på [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på $1.67 \mu\text{Ci/ml}$ i 195 dager er vist Tabell 13. For de bestrålte cellene hadde summen av dosen til cellekjernene nådd omtrent 246 Gy ved gjennomføring av forsøket. De bestrålte cellene viser en tydelig endring i cellyklusfordelingen i forhold til de ubestrålte cellene, ved at fraksjonen av celler i G_2 -fasen for de bestrålte T98G-cellene er omtrent 4 ganger så stor som for de ubestrålte T98G-cellene.

Figur 24 viser DNA-histogrammer for T98G-celler som hadde vokst på [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på 0.28 og $0.53 \mu\text{Ci/ml}$ i 4 dager, i tillegg til DNA-histogrammer for ubestrålte T98G-celler. Fraksjonene av celler i de ulike delene av cellyklus for de ubestrålte kontrollcellene og cellene som

hadde vokst på $[^3\text{H}]$ -medium med spesifikk aktivitet på 0.28 og 0.53 $\mu\text{Ci/ml}$ er vist i Tabell 14. For de bestrålte cellene hadde summen av dosen til cellekjernene ved gjennomføring av forsøket nådd omtrent 0.84 Gy og 1.68 Gy. De bestrålte T98G-cellene viser ingen særlig endring i cellyklusfordelingen i forhold til de ubestrålte T98G-cellene.



Figur 23: DNA-histogrammer for a) ubestrålte T98G-celler og b) T98G-celler bestrålt ved bruk av $[^3\text{H}]$ -medium med spesifikk aktivitet på 1.67 $\mu\text{Ci/ml}$, 195 dager ut i bestrålingsforløpet. DNA-histogrammene viser DNA-mengde langs x-aksen og relativt celleantall langs y-aksen.



Figur 24: DNA-histogrammer for a) ubestrålte T87G-celler, b) T98G-celler bestrålt ved bruk av $[^3\text{H}]$ -medium med spesifikk aktivitet på 0.28 $\mu\text{Ci/ml}$ og c) T98G-celler bestrålt ved bruk av $[^3\text{H}]$ -medium med spesifikk aktivitet på 0.53 $\mu\text{Ci/ml}$, 4 dager ut i bestrålingsforløpet. DNA-histogrammene viser DNA-mengde langs x-aksen og relativt celleantall langs y-aksen.

Det ble i tillegg utført flowcytometrimålinger på cellekjerner preparert ved bruk av Vindelövs metode, etablert og utført av Celal Ceyhan (Ceyhan 2011). Analysen av flowcytometridataene ble gjort med programmet FCS Express V3. Det er ikke benyttet noen form for gating på dot-plotene, så alle data er tatt med i analysen. Flowcytometrimålingene ble utført på vanlige T98G-celler og T-47D-celler, i tillegg til T98G-celler som hadde vokst på $[^3\text{H}]$ -medium med spesifikk aktivitet på 1.67 $\mu\text{Ci/ml}$ i 10 måneder. Koloniforsøk utført på cellene som var lavdoseratebestrålt ved bruk av $[^3\text{H}]$ -medium med spesifikk aktivitet på 1.67 $\mu\text{Ci/ml}$ viste at overlevelsesfraksjonen, etter å ha vært nede på rundt 0.4 % etter omtrent 100 dager, steg og stabiliserte seg på rundt 50-60 % relativt til ubestrålte T98G-celler

mot slutten av forsøket (se kapittel 4.5). Det var derfor interessant å undersøke om disse cellene viste en endring i cellesyklusfordelingen i forhold til ubestrålte T98G-celler.

Tabell 14: Cellesyklusfordelingene for ubestrålte T98G-celler og T98G-celler bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 0.28 og 0.53 µCi/ml 4 dager ut i bestrålingsforløpet.

Dose (µCi/ml)	% G ₁	% S	% G ₂
Kontroll	45.95	50.15	3.90
0.28	39.05	56.93	4.02
0.53	41.63	55.82	2.55

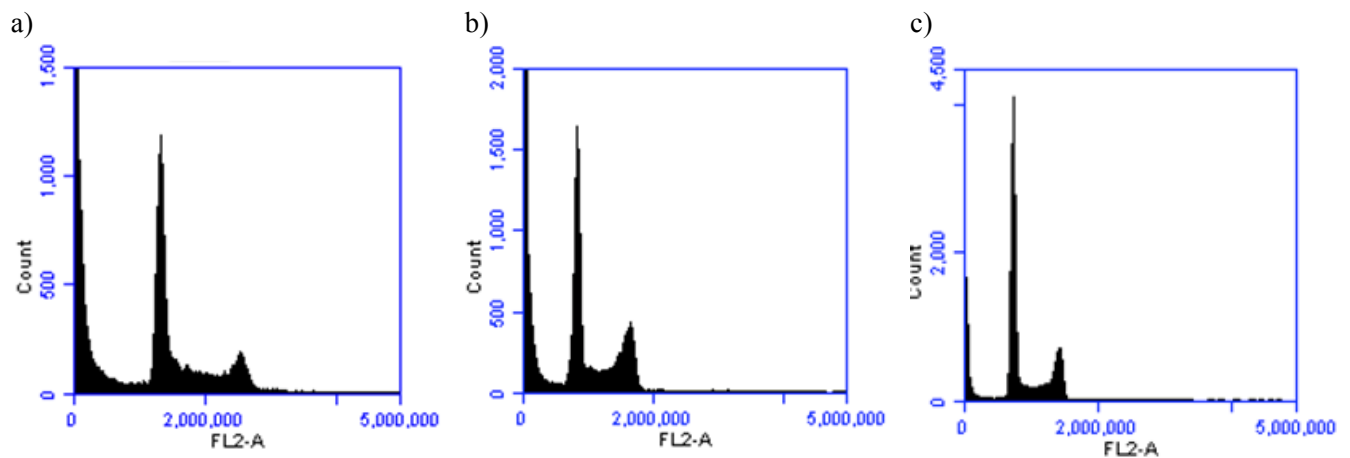
Tabell 15 viser den gjennomsnittlige fraksjonen av cellekjerner i hver av fasene i cellesyklus for hhv. T98G-celler, T98G-celler som hadde vokst på [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 10 måneder og T-47D-celler. T98G-cellene som hadde vokst på [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 10 måneder skiller seg noe fra de to andre celletypene ved at fraksjonen av cellekjerner i S-fasen er høyere. Andelen cellekjerner i G₂-fasen er omtrent lik for de tre celletypene.

Tabell 15: Cellesyklusfordelingene for T98G-celler, T98G-celler som hadde vokst på [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 10 måneder og T-47D-celler, etter flowcytometriforsøk utført på cellekjerner preparert ved bruk av Vindelövs metode.

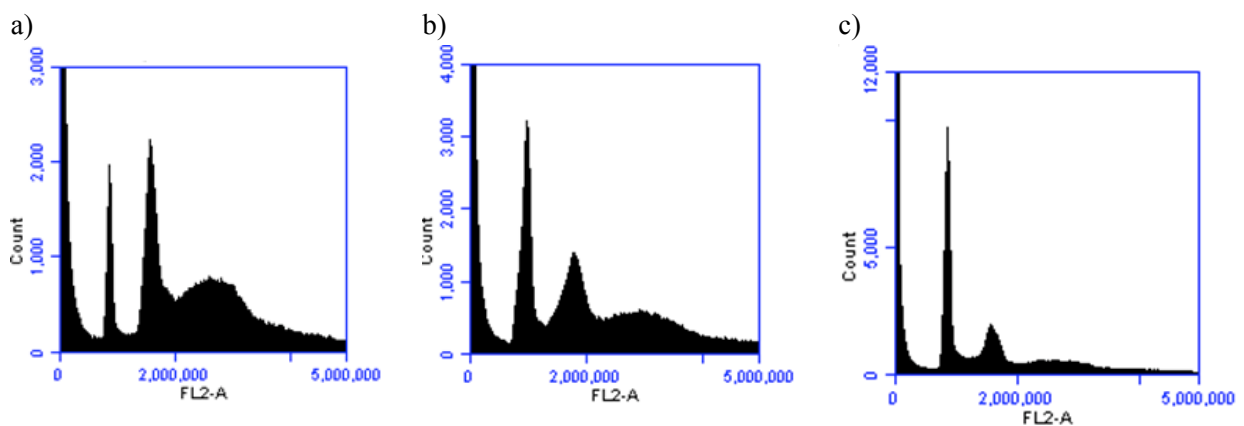
Celletype	% G ₁	% S	% G ₂
T98G	49.21 ± 2.74	38.16 ± 4.03	12.63 ± 1.39
T98G lavdoseratebestrålt	33.52 ± 0.08	53.58 ± 1.02	13.00 ± 0.94
T-47D	55.56 ± 0.90	30.99 ± 0.79	13.45 ± 0.11

Figur 25 a) - c) viser DNA-histogrammer for hhv. T98G-kjerner, kjerner fra T98G-celler som hadde vokst på [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 10 måneder og T-47D-kjerner. Det er en forskjell i fluorescensintensiteten hos T98G-kjernene sammenliknet med T-47D-kjernene, som skyldes ulikt DNA-innhold i cellekjernen hos T98G- og T-47D-celler. G₁-toppen i DNA-histogrammet for T-47D-kjernene kommer lenger til venstre på x-aksen enn for T98G-kjernene, noe som kan tyde på et lavere DNA-innhold for T-47D enn for T98G. Figur 25 b) viser at det også er en forskjell i fluorescensintensiteten for vanlige T98G-kjerner og kjernene fra T98G-cellene som hadde vokst på [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 10 måneder før flowcytometriforsøkene ble gjennomført. Det ser ut til at DNA-innholdet i kjernen til de lavdoseratebestrålte T98G-cellene er lavere enn for de ubestrålte T98G-cellene. Forskjellen i fluorescensintensitet kan tyde på en forskjell i DNA-innhold hos de forskjellige celletypene, men kan også indikere forskjell i DNA-fargingen ved inkorporering av PI. Det ble derfor utført et flowcytometriforsøk på celleprøver som besto av

ubestrålte T98G-kjerner og kjerner fra T98G-celler som hadde vokst på $[^3\text{H}]$ -medium med spesifikk aktivitet på $1.67 \mu\text{Ci/ml}$ i 10 måneder, blandet sammen.



Figur 25: DNA-histogrammer for a) T98G-kjerner, b) kjerner fra T98G-celler som hadde vokst på $[^3\text{H}]$ -medium med spesifikk aktivitet på $1.67 \mu\text{Ci/ml}$ i 10 måneder og c) T-47D-kjerner. DNA-histogrammene viser DNA-mengde langs x-aksen og relativt kjerneantall langs y-aksen.



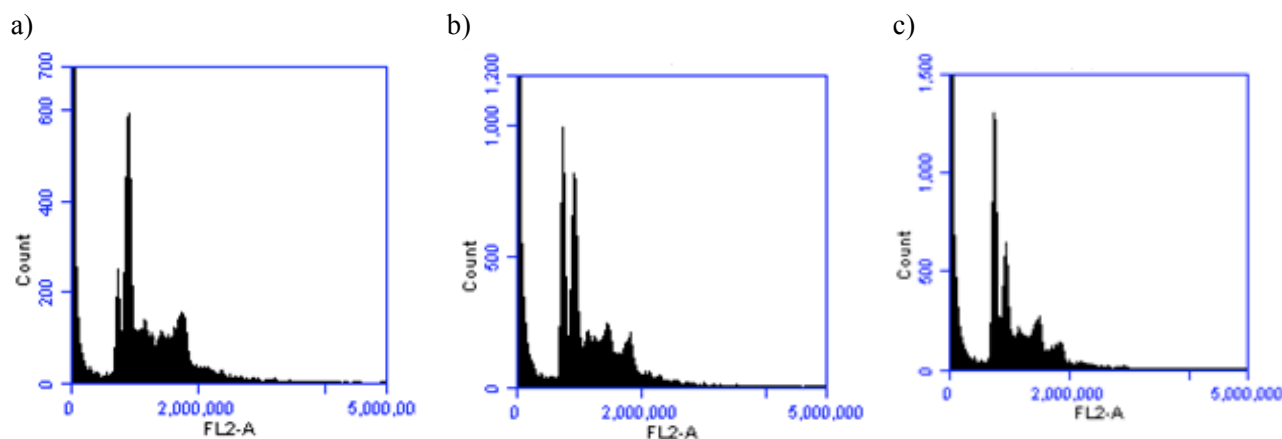
Figur 26: DNA-histogrammer for prøver som består av a) 90 % ubestrålte T98G-kjerner og 10 % T98G-kjerner som hadde vokst på $[^3\text{H}]$ -medium med spesifikk aktivitet på $1.67 \mu\text{Ci/ml}$ i 10 måneder, b) 70 % ubestrålte T98G-kjerner og 30 % T98G-kjerner som hadde vokst på $[^3\text{H}]$ -medium med spesifikk aktivitet på $1.67 \mu\text{Ci/ml}$ i 10 måneder og c) 50 % ubestrålte T98G-kjerner og 50 % T98G-kjerner som hadde vokst på $[^3\text{H}]$ -medium med spesifikk aktivitet på $1.67 \mu\text{Ci/ml}$ i 10 måneder. DNA-histogrammene viser DNA-mengde langs x-aksen og relativt kjerneantall langs y-aksen.

Figur 26 viser DNA-histogrammer for flowcytometriforsøk utført på prøver som besto av både ubestrålte T98G-kjerner og kjerner fra T98G-celler som hadde vokst på $[^3\text{H}]$ -medium med spesifikk aktivitet på $1.67 \mu\text{Ci/ml}$ i 10 måneder, blandet sammen. Figur 26 a), b) og c) viser DNA-histogrammet for en prøve som inneholdt hhv. 90 % T98G-kjerner og 10 % T98G-kjerner som hadde vokst på $[^3\text{H}]$ -medium med spesifikk aktivitet på $1.67 \mu\text{Ci/ml}$ i 10 måneder, 70 % T98G-kjerner og 30 % T98G-kjerner som hadde vokst på $[^3\text{H}]$ -medium med spesifikk aktivitet på $1.67 \mu\text{Ci/ml}$ i 10 måneder, og 50 % T98G-kjerner og 50 % T98G-kjerner som hadde vokst på $[^3\text{H}]$ -medium med spesifikk aktivitet på $1.67 \mu\text{Ci/ml}$ i 10 måneder. Alle prøvene ble preparert samtidig og på samme måte, og det skal derfor ikke være noen forskjell i DNA-fargingen. Forskjellen i fluorescensintensitet tyder dermed på at DNA-

innholdet i kjernen er forskjellig for de ubestrålte T98G-cellene og T98G-cellene som hadde vokst på [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 10 måneder.

Det lavere DNA-innholdet i kjernen til de lavdoseratebestrålte T98G-cellene gav en mistanke om at det en gang i løpet av bestrålingsforløpet hadde skjedd en forurensning av celleprøvene, slik at T-47D-celler hadde blitt blandet sammen med de lavdoseratebestrålte T98G-cellene. For å utelukke at dette hadde skjedd, ble det utført et flowcytometriforsøk på celleprøver som besto av både T47D-celler og T98G-celler som hadde vokst på [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 10 måneder for å sammenlikne DNA-innholdet til de to celletypene.

Figur 27 viser DNA-histogrammer for flowcytometriforsøk utført på prøver som besto av både T-47D-celler og T98G-celler som hadde vokst på [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 10 måneder blandet sammen. Figur 27 a), b) og c) viser DNA-histogrammet for en prøve som inneholdt hhv. 10 % T-47D-kjerner og 90 % T98G-kjerner som hadde vokst på [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 10 måneder, 30 % T-47D-kjerner og 70 % T98G-kjerner som hadde vokst på [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 10 måneder og 50 % T-47D-kjerner og 50 % T98G-kjerner som hadde vokst på [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 10 måneder. Det er en tydelig forskjell mellom G₁ - og G₂ - toppene til de to ulike celletypene, noe som igjen betyr at DNA-innholdet i cellekjernen for de to celletypene er ulikt.



Figur 27: DNA-histogrammer for prøver som består av **a)** 10 % T-47D-kjerner og 90 % T98G-kjerner som hadde vokst på [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 10 måneder, **b)** 30 % T-47D-kjerner og 70 % T98G-kjerner som hadde vokst på [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 10 måneder og **c)** 50 % T-47D-kjerner og 50 % T98G-kjerner som hadde vokst på [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 10 måneder. DNA-histogrammene viser DNA-mengde langs x-aksen og relativt kjerneantall langs y-aksen.

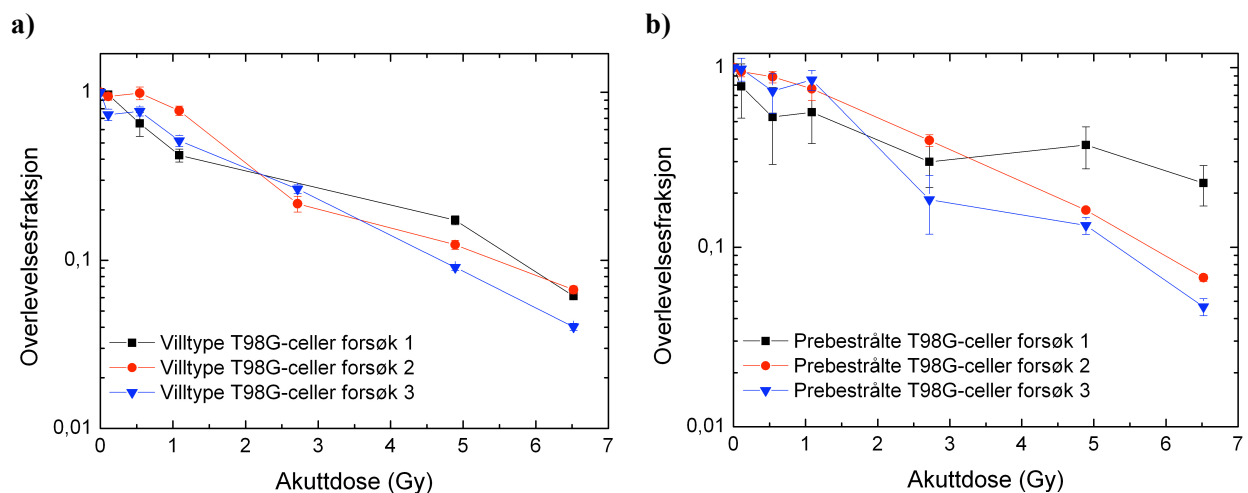
4.7 Doseresponskurver

Det ble totalt utført 6 forsøk med singeldosebestrålinger, som beskrevet i kapittel 3.2.2 (Ekstern bestråling). 3 av forsøkene ble utført på ubestrålte T98G-celler som hadde blitt dyrket på kaldvalin-medium, mens de resterende 3 forsøkene ble utført på T98G-celler som hadde blitt kontinuerlig bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i totalt 319 (forsøk 1) og 333

dager (forsøk 2 og 3) ved gjennomføring av forsøket. Stråledosene som ble benyttet lå i doseområdet 0 – 7 Gy. Beregningene fra celleoverlevelsesforsøkene er vist i vedlegg H.

Koloniforsøk utført på T98G-cellene som var lavdoseratebestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml viste at overlevelsesfraksjonen, etter å ha vært nede på rundt 0.4 % etter omtrent 100 dager, steg og stabiliserte seg på rundt 50-60 % relativt til en ubestrålte T98G-celler mot slutten av forsøket (se kapittel 4.5). Det var derfor interessant å undersøke om disse cellene også viste endret respons på akuttbestråling.

Figur 28 a) viser doseresponskurvene for villtypen av T98G-cellene som er bestrålt med akutte doser på hhv. 0.11, 0.54, 1.09, 2.72, 4.89 og 6.52 Gy. For den laveste dosen ses en antydning av hypersensitivitet, noe som samsvarer med tidligere forsøk utført på T98G-celler (Short, Mayes et al. 1999). Det er noe variasjon i overlevelsesfraksjonen for de tre forsøkene som ble gjennomført, dette gjelder særlig det første forsøket. Overlevelsesfraksjonen for de tre forsøkene var på hhv. 6.1, 6.7 og 4.0 % ved den høyeste dosen som ble gitt, 6.52 Gy.

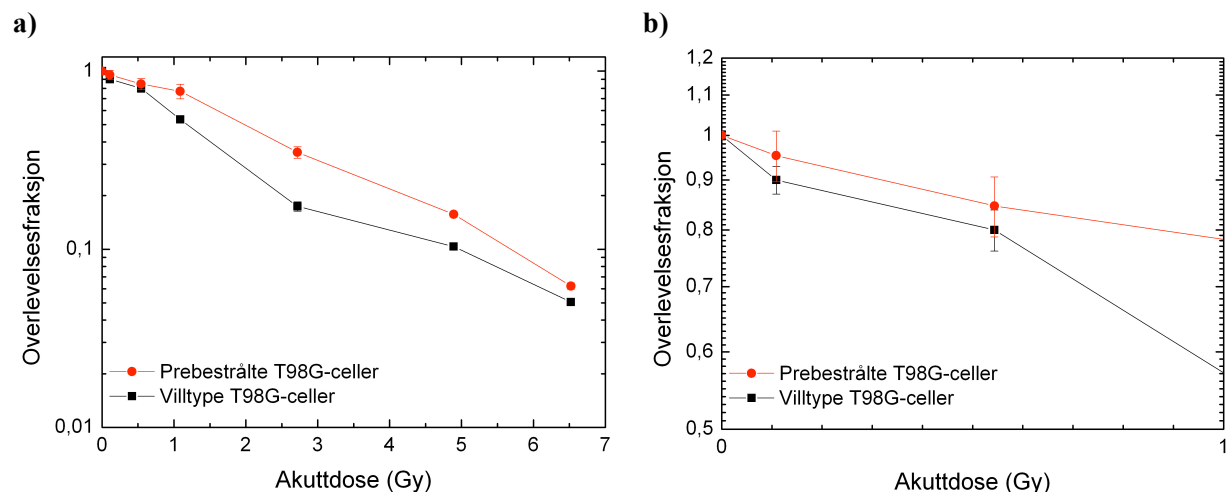


Figur 28: Doserespanskurver etter røntgenbestråling av a) villtypen av T98G-celler og b) T98G-celler som har gått 11 måneder på [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml, bestrålt med 0.11, 0.54, 1.09, 2.72, 4.89 og 6.52 Gy.

Figur 28 b) viser doseresponskurvene for T98G-celler som hadde blitt prebestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 11 måneder, som er bestrålt med akutte doser på hhv. 0.11, 0.54, 1.09, 2.72, 4.89 og 6.52 Gy. Det ser ut til at de prebestrålte T98G-cellene ikke viser samme hypersensitivitet ved den laveste dosen som det som kunne observeres hos villtypen av T98G-cellene. Det er noe større variasjon i overlevelsesfraksjonene enn for T98G-cellene, dette gjelder særlig forsøk 1. Overlevelsesfraksjonen ser ut til å ligge høyere enn for T98G-cellene ved alle dosene som ble gitt, og overlevelsesfraksjonen ved den høyeste dosen som ble gitt, 6.52 Gy, var på hhv. 18.3, 6.8 og 4.7 % for de tre forsøkene som ble utført.

Figur 29 a) og b) viser den gjennomsnittlige overlevelsesfraksjonen for villtypen av T98G-cellene og T98G-celler som hadde blitt prebestrålt 11 måneder med [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml. Den gjennomsnittlige overlevelsesfraksjonen ble beregnet ved å vekte overlevelsesfraksjonen i de tre forsøkene i forhold til usikkerheten i overlevelsesfraksjonen, slik at overlevelsesfraksjonen med

lavest usikkerhet vektes høyest. Man kan for villtypen av T98G-cellene observere en hypersensitivitet ved den aller laveste dosen som ble gitt, som ikke er like tydelig hos de prebestrålte T98G-cellene. Det ser samtidig ut som det er en tendens til at overlevelsesfraksjonen for de prebestrålte T98G-cellene jevnt over ligger litt høyere enn overlevelsen for villtypen av T98G-cellene.



Figur 29: Doseresponskurver som viser den gjennomsnittlige overlevelsesfraksjonen etter røntgenbestråling av villtypen av T98G-cellene og T98G-celler som har blitt prebestrålt i 11 måneder med $[^3\text{H}]$ -medium med spesifikk aktivitet på 1.67 $\mu\text{Ci/ml}$, bestrålt med akutte doser på hhv. 0.11, 0.54, 1.09, 2.72, 4.89 og 6.52 Gy. **a)** viser overlevelsesfraksjonen ved alle dosene som ble gitt, mens **b)** viser overlevelsesfraksjonen opp til 1 Gy.

For å undersøke om det var en signifikant forskjell mellom overlevelsesfraksjonen for villtypen av T98G-cellene og de prebestrålte T98G-cellene ble det utført en t-test. De gjeldende p-verdiene er vist i Tabell 16. P-verdiene, som alle er over 0.05, forteller at forskjellen i overlevelsesfraksjon for villtypen av T98G-cellene og de prebestrålte T98G-cellene ikke er signifikant for noen av dosene som ble brukt i forsøket.

Tabell 16: T-test for å undersøke om det er signifikant forskjell i overlevelsesfraksjonen for villtypen av T98G-cellene og T98G-celler som hadde blitt prebestrålt med $[^3\text{H}]$ -medium med spesifikk aktivitet på 1.67 $\mu\text{Ci/ml}$ i 11 måneder.

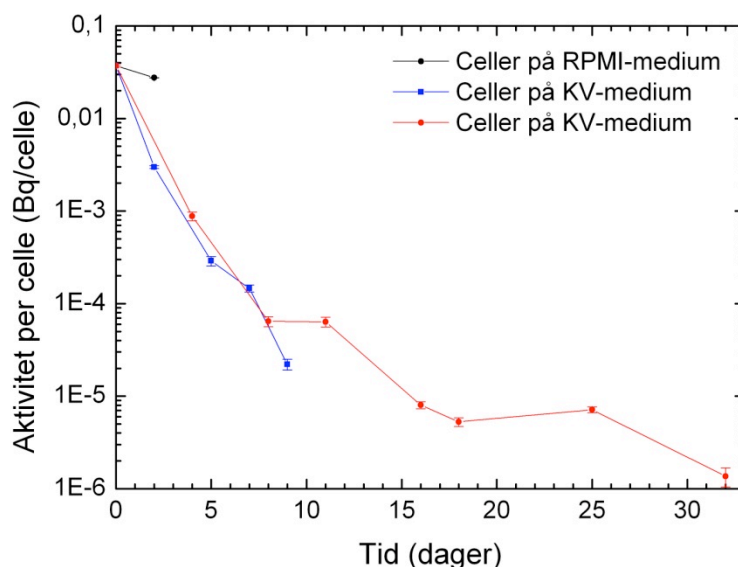
Dose (Gy)	P-verdi
0.10868	0.688
0.5434	0.517
1.0868	0.502
2.717	0.685
4.8906	0.298
6.5208	0.376

4.8 Degradering av radioaktivitet

Før innfrysing av T98G-cellene som hadde vokst på $[^3\text{H}]$ -medium med spesifikk aktivitet på 1.67 $\mu\text{Ci/ml}$ i 11 måneder var det ønskelig å finne ut hvordan aktiviteten per celle endret seg i prøven når det radioaktive mediet ble fjernet. Man kan ikke fryse ned celler med inkorporert radioaktivitet siden

stråleskader da vil akkumuleres under hele fryseperioden. Det ble derfor foretatt scintillasjonstillinger for å finne aktiviteten med jevne mellomrom etter at det radioaktive mediet ble fjernet fra cellene. Det ble utført et forsøk på celler som ble tilsatt RPMI-medium, hvor det ble foretatt en scintillasjonstilling etter 2 dager. Det ble i tillegg utført 2 forsøk på celler som ble tilsatt kaldvalin-medium (KV-medium). Ved det ene forsøket ble det foretatt scintillasjonstillinger etter 2, 5, 7 og 9 dager, mens det ved det andre forsøket ble foretatt scintillasjonstillinger etter 4, 8, 11, 16, 18, 25 og 32 dager. Aktiviteten per celle ved de ulike tidspunktene for de tre forsøkene er vist i vedlegg I.

Figur 30 viser aktiviteten per celle som funksjon av tiden for alle de tre forsøkene som ble utført. De svarte punktene gir aktiviteten per celle for celler som ble dyrket på RPMI-medium, mens de blå og røde punktene gir aktiviteten per celle for cellene som ble dyrket på KV-medium. Aktiviteten per celle avtar sakte for cellene som ble dyrket på RPMI-medium, mens den avtar raskere for cellene som ble dyrket på KV-medium. Aktiviteten avtar forholdsvis likt i de to prøvene som ble dyrket på KV-medium.



Figur 30: Aktivitet per celle som funksjon av tiden for T98G-celler som hadde vokst på [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 μCi/ml i 11 måneder, etter at det radioaktive mediet ble fjernet fra prøven. De svarte punktene viser målinger som ble foretatt for celler som ble dyrket på RPMI-medium, mens de blå og røde punktene viser to forsøk som ble gjort for å finne aktiviteten i prøver av celler som ble dyrket på KV-medium.

5 Diskusjon

5.1 Cellekultivering og vedlikehold

Alle forsøk som ble utført i denne oppgaven var avhengig av stor nøyaktighet og gode rutiner når det gjaldt arbeid på laboratoriet. Dette er viktig for å minimere sjansen for infeksjoner, forurensning mellom ulike cellekulturer og lav celleoverlevelse. Det ble i denne oppgaven kun gjort forsøk på en type celler, T98G, så sannsynligheten for forurensning av andre celletyper underveis i forsøkene er liten. Det ble imidlertid benyttet samme kjemiske løsninger, som for eksempel trypsin og RPMI-medium, av alle personer som jobbet på laboratoriet, og som også dyrket andre celletyper, og nøyaktige rutiner når det kom til rekultivering av cellene var derfor svært viktig. Det har i tillegg blitt benyttet radioaktivt medium med 5 ulike spesifikke aktiviteter, det var derfor særlig viktig å unngå bruk av feil medium og forurensning mellom de ulike typene medium, da dette ville kunne gi opphav til falske resultater.

5.2 Dosimetri

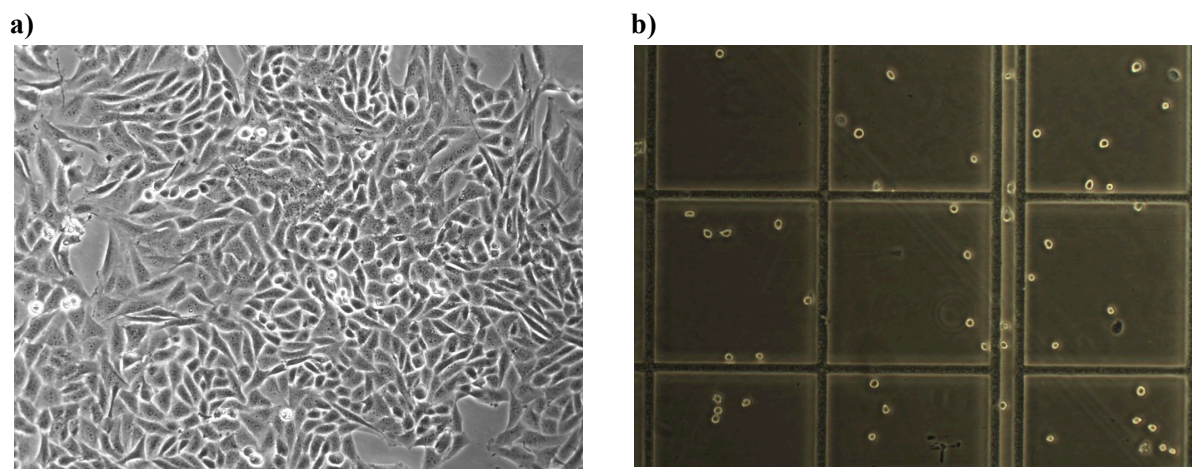
5.2.1 Celle- og kjernestørrelsesmåling

Celle- og kjernestørrelsene ble bestemt ut fra metoden beskrevet i kapittel 3.6 (Bestemmelse av celle- og kjernestørrelse). Flere hundre celler og cellekjerner ble fotografert og målt, og gjennomsnittsdiameteren ble beregnet (i kapittel 4.1 Celle- og kjernestørrelsesmålinger). Ettersom celle- og kjernestørrelsen brukes til å beregne dosen som leveres til cellene, er det av stor viktighet at størrelsesberegningene er nøyaktige.

Størrelsesberegningene var basert på å måle levende celler i suspensjon, noe som har den fordel at cellekjernens form og størrelse ikke endres som følge av fiksering. Det antas at cellene og cellekjernene ikke ble påvirket av behandlingen de fikk underveis, for eksempel at trypsin, som brukes for å løsne cellene fra underlaget og hverandre, og andre kjemikalier brukt i prepareringen ikke endret cellenes og kjernenes størrelse. Som beskrevet i kapittel 5.2.2 (Dosimetriske beregninger), viste prosessen for preparering av celler og særlig cellekjerner seg å by på problemer, ved at kjernene klumpet seg sammen. Det så ut til at denne klumpingen ble forsterket av tilsetningen av TCA. I tillegg viste bilder tatt underveis i prosedyren en tendens til at både cellene og kjernene krymper etter tilsetning av TCA. Det ble derfor tatt ut en prøve for å bruke til størrelsesbestemmelse så tidlig i prosessen som mulig, før TCA ble tilsatt.

Beregningene er basert på at både cellene og cellekjernene var sirkulære i suspensjon, og bildene som ble tatt av celler og cellekjerner viste at denne antakelsen stemte ganske godt. Det ble likevel både for celler og cellekjerner beregnet en gjennomsnittsdiameter basert på 4 ulike diametermålinger. Størrelsesberegningene er basert på målinger av mange celler og cellekjerner, og verdiene varierer naturlig nok en del. For å unngå målefeil, ble kun størrelsen til enkeltceller målt. Histogrammene i

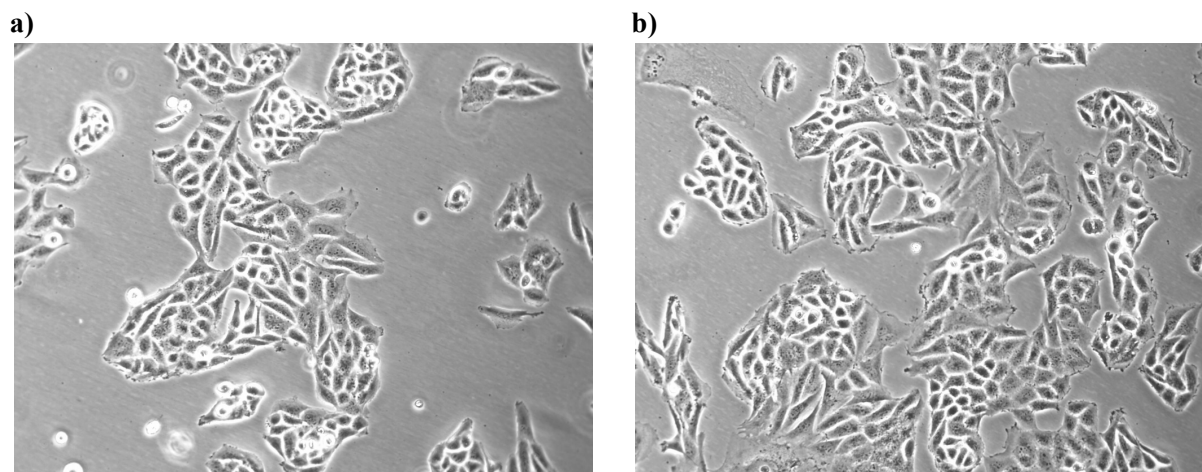
Figur 14 viser at toppen i histogrammet over celle- og kjernediameterne er forskjøvet noe til venstre, med en liten hale i den øvre delen av x-aksen. Dette tyder på at det var flere celler og cellekjerne som var veldig store i forhold til gjennomsnittsverdien enn celler og cellekjerne som var små. For enkelhets skyld ble det likevel antatt at celle- og kjernediameterne fulgte en normalfordeling, og standard error for fordelingen, hhv. 3 % og 1.6 % for den estimerte celle- og kjernediameteren, ble beregnet fra likning 27. Cellene som ble benyttet til størrelsesbestemmelsen var usynkroniserte, de befant seg altså alle i ulike deler av cellesyklus. I løpet av cellesyklus endrer cellen og cellekjernen sitt volum, og umiddelbart før celledelingen er cellevolumet dobbelt så stort som hos dattercellen, noe som betyr at cellediameteren i løpet av cellesyklus øker med omtrent 26 %. Standard error for fordelingen som fremgår fra beregningene representerer dermed først og fremst denne biologiske variasjonen. Mulige systematiske feil som stammer fra målemetoden er vanskeligere å kvantifisere.



Figur 31: Bilder av T98G-celler som viser cellene **a)** voksende i kultur på bunnen av en celleflaske og **b)** i suspensjon. Forstørrelsen er ikke lik for de to bildene, og bildene kan dermed kun ses på som en illustrasjon av størrelsesvariasjoner internt i cellepopulasjonen, og ikke som en illustrasjon på forskjell i størrelse mellom celler i kultur og i suspensjon.

Figur 31 a) og b) viser bilder tatt av T98G-celler slik de vokser i kultur på bunnen av en celleflaske og i suspensjon. Figur 31 a) viser at variasjonen i størrelse for celler som vokser i kultur er stor sammenliknet med størrelsesvariasjonen for celler i suspensjon. Celler i kultur har en størrelse som varierer veldig fra celle til celle, og de er langt fra sirkulære. Dette tyder på det er en viss fare for at målingene som er gjort på celler i suspensjon underestimerer den faktiske størrelsen til cellene. Dette vil igjen føre til en overestimering av doserate, ettersom S-verdiene som inngår i uttrykket for doseraten minker med økende celle- og kjernestørrelse.

Det ble benyttet ubestrålte celler til å bestemme celle- og kjernediameterne. Figur 32 a) og b) viser bilder tatt av ubestrålte T98G-celler og T98G-celler bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 μCi/ml i 5 dager. Det ble ikke observert endringer i morfologien til de bestrålte cellene sammenliknet med de ubestrålte cellene. I tillegg viser Tabell 12 a) og b), Figur 21 og Figur 22 at det ikke ble observert noen endring i cellesyklusfordelingen til de bestrålte cellene etter så lite som 120 timer, og det antas derfor at diameterne som ble funnet i denne oppgaven er representative også for bestrålte celler.



Figur 32: Bilder av T98G-celler som viser **a)** ubestrålte celler og **b)** celler bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 5 dager.

5.2.2 Dosimetriske beregninger

Strålingen i denne oppgaven ble levert ved at en viss mengde [³H]-valin ble tilsatt cellenes vekstmedium. Ved gjennomføring av denne oppgaven ble det tatt utgangspunkt i en spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml, da det tidligere har blitt utført liknende studier med samme spesifikke aktivitet på andre cellyper (Søvik 2002; Bjørhovde 2006; Storhaug 2008; Espe 2009). Det var derfor interessant å undersøke hvilken doserate den samme spesifikke aktiviteten ville resultere i for T98G-celler. Det ble i tillegg utført forsøk med spesifikk aktivitet på 0.27, 0.53, 6.5 og 19.5 µCi/ml.

Den spesifikke aktiviteten til mediet som ble brukt i forsøkene for dosebestemmelse ble målt eksperimentelt, som beskrevet i kapittel 4.2.5 (Måling av spesifikk aktivitet i medium), og funnet å være 1.6715 ± 0.011 µCi/ml. Dette er i svært god overensstemmelse med den teoretiske verdien.

Doseraten til cellekjernen ble beregnet ut fra en modell for cellulær tritiumdosimetri, utviklet av Goddu et al. (Goddu, Howell et al. 1997). Denne modellen er veletablert for flere ulike cellyper (Søvik 2002; Bjørhovde 2006; Espe 2009), men viste seg dessverre å by på problemer ved beregning av doserate for T98G-celler. Problemene oppsto i hovedsak ved preparering av kjerner ved bruk av buffer A, som lyser cellene slik at cellekjernene isoleres. Det er viktig at cellene står i buffer A lenge nok til at alle cellene lyseres, ettersom man har behov for å finne aktiviteten i cellekjernen, men for lang eksponering for buffer A vil føre til at også kjernemembranene sprekker slik at cellenes DNA lekker ut i celleløsningen. Dette kan føre til at kjernene klistrer seg til DNA og til hverandre, slik at man får store klumper av kjerner i løsningen som gjør telling vanskelig. Det ble gjort mange forsøk på preparering av kjerner, uten at den optimale prepareringsprosessen ble funnet. Imidlertid lyktes prosessen noen ganger, slik at det var mulig å finne et estimat for dosen som ble levert til cellekjernen.

Modellen for cellulær tritiumdosimetri har i prinsippet flere problemer. For det første inkluderer ikke modellen effekten til δ-elektroner, altså sekundære elektroner som får en stor andel av den initielle energien og frakter denne langt bort fra hovedsporet. I tillegg kan energien som kommer fra potensielle

ekstracellulære kilder øke dosen til cellen. For tritium, som er en lavenergetisk β -emitter, er disse effektene imidlertid neglisjerbare (Goddu, Howell et al. 1997).

Modellen for cellulær tritiumdosimetri er en forenkling som baserer seg på at cellen består av to konsentriske kuler som utgjør cellen og cellekjernen (se Figur 8). Antakelsen om at cellene er sfæriske stemmer ganske godt mens cellene er i suspensjon, men når cellene fester seg til flaskebunnen flater de ut (se Figur 31). Dette, i tillegg til at formen til celler som vokser i kultur også påvirkes av formen til nabocellene, fører til en stor endring i cellegeometri. De cellulære S-verdiene for celler og kjerner med diameter på hhv. 10 og 6 μm er vist i Tabell 3. $S(R_N \leftarrow R_N)$ er mer enn 16 ganger større enn $S(R_N \leftarrow R_{Cy})$, dermed er dosebidraget til kjernen fra cytoplasma bare omtrent 5.9 % av dosebidraget til kjernen fra kjernen selv. Feilen som oppstår grunnet de forenklede geometriske antakelsene vil dermed ikke utgjøre noen stor feilkilde i dette tilfellet.

Selve scintillasjonstellersprosessen er en nøyaktig metode, og aktiviteten som måles av scintillasjonstellersen kan antas å være forholdsvis korrekt. Imidlertid er man avhengig av et nøyaktig celle- og kjerneantall for å kunne beregne cellulær og nukleær aktivitet. Feil i celle- og kjerneantall vil dermed kunne gi feil cellulær og nukleær aktivitet, og dermed også feil doserate. Prosessen for preparering av celler og kjerner er en omstendelig prosess som består av flere sentrifugeringer, som beskrevet i kapittel 3.7.2 (Preparering av celler og kjerner for scintillasjonstilling). For hvert ledd i prosessen risikerer man å miste celler og cellekjerner, særlig gjelder dette kjernene som er lette og dermed lett kan tapes, for eksempel ved fjerning av supernatanten etter sentrifugering. Til telling av antall celler og kjerner ble det derfor tatt ut en prøve så sent som mulig i prosessen. Det er særlig viktig at det ikke tapes kjerner i den siste sentrifugeringen, ettersom dette vil føre til en overestimering i spesifikk aktivitet. Det var også viktig å overføre korrekt mengde av celle- og kjerneløsningen til scintillasjonsvæsken før scintillasjonstillingen, ettersom det beregnede celle- og kjerneantallet er basert på tettheten av celler/kjerner i suspensjonen.

Tabell 7 viser at usikkerheten i den beregnede doseraten er ganske stor, omtrent 19 %. Denne usikkerheten stammer fra den store spredningen i målt cellulær og nukleær aktivitet, som skyldes varierende celle- og kjerneantall i prøvene som ble analysert. Da prepareringsprosedyren viste seg å by på problemer ble det dessverre utført få forsøk. Flere forsøk ville gitt en bedret statistikk og reduserte usikkerheter i de beregnede verdiene.

Scintillasjonsmålingene ble alltid utført umiddelbart etter prepareringsprosessen, for å unngå problemer med degradering av aktiviteten i scintillasjonsprøvene som funksjon av tiden.

Tabell 17 viser en sammenlikning av celle- og kjernediameter, fraksjonen av aktivitet i cellekjernen og i cytoplasma og beregnede doserater for tidligere studier utført på T-47D-, NHIK 3025- og MCF-7-celler (Bjørhovde 2006; Espe 2009) og de verdiene som ble funnet i denne oppgaven. Bestrålingen ble i alle tilfeller levert ved bruk av [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 $\mu\text{Ci/ml}$.

Tabell 17: En sammenlikning av celle- og kjernestørrelse, fraksjonen av aktiviteten i cellekjernen og i cytoplasma (f_N og f_{Cy}) og beregnet doserate til kjernen for cellelinjene T-47D, MCF-7, NHIK 3025 og T98G. Den spesifikke aktiviteten til det radioaktive mediet som ble brukt var for alle cellelinjer 1.67 $\mu\text{Ci/ml}$.

Cellelinje	T-47D	NHIK 3025	MCF-7	T98G
Celldiameter (μm)	14 ± 1	17 ± 1	17.82 ± 0.13	20.66 ± 0.622
Kjernediameter (μm)	11 ± 1	13 ± 1	10.84 ± 0.12	11.11 ± 0.182
f_N	0.60 ± 0.05	0.607 ± 0.001	0.65 ± 0.073	0.412 ± 0.073
f_{Cy}	0.40 ± 0.05	0.393 ± 0.001	0.35 ± 0.073	0.588 ± 0.073
Doserate (Gy/time)	0.015 ± 0.004	0.013 ± 0.004	0.027 ± 0.003	0.0525 ± 0.01

For alle forsøkene ble samme dosimetrisk metode benyttet, og Tabell 17 viser at det er stor forskjell mellom doseratene som ble beregnet for de ulike cellelinjene. Doseraten som ble funnet for T98G er mye høyere enn doseraten som ble funnet for de andre cellelinjene, hhv. 3.5, 4 og 1.9 ganger så høy som for T-47D, NHIK 3025 og MCF-7. Mens kjernediameteren til T98G ikke er veldig forskjellig fra kjernediameteren til de andre cellelinjene, er cellediameteren mye større. Dette resulterer i at en høyere fraksjon av den totale aktiviteten er lokalisert i cytoplasma for T98G enn for de andre cellelinjene, ettersom cellevolumet i forhold til kjernevolumet vil være mye større for T98G enn for de andre cellelinjene.

5.3 Alanindosimetri

Doseraten som ble levert ved akutt røntgenbestråling ble funnet ved å bruke ESR-dosimetri, med alanin som dosimetermateriale. Alanin brukes ofte som dosimetermateriale grunnet sin vevsekvivalente sammensetning, men har for doser under 4-5 Gy for lav sensitivitet til å gi presise dosebestemmelser. For å finne doseraten ved røntgenbestrålingen ble 8 alanintabletter gitt to ulike doser. Alanintablettene ble plassert på samme måte i røntgenapparatet som ved bestråling av cellene; 4 tabletter ble lagt i hver sin plastflaske og plassert midt i et stålkammer, som igjen ble plassert midt i røntgenapparatet, midt under røntgenrøret. De ukjente dosene som ble levert ved røntgenbestrålingen ble funnet ved å sammenlikne peak-peak amplituden for prøvene med en kalibreringskurve som ble laget ved at 20 alanindosimetre ble bestrålt med 5 ulike doser (5, 10, 15.34, 25 og 50 Gy) ved bruk av ^{60}Co γ -stråling. Dosene som ble brukt var så høye at det ikke bød på problemer i forhold til sensitiviteten ved dosebestemmelsen. Ved bestrålingen ble imidlertid de 4 prøvene plassert på 4 ulike plasser i strålefeltet, noe som påvirker nøyaktigheten til kalibreringskurven. Usikkerheten i peak-peak amplitudene som ble funnet var likevel liten, rundt 1 %, for alle dosene som ble benyttet. Man kan derfor anta at plasseringen til alanintablettene i strålefeltet ikke har hatt noen stor betydning for den beregnede doseraten.

Tabell 9 viser den beregnede doseraten for de to bestrålingsoppsettene som ble brukt i denne oppgaven, hvor totalt 8 alanintabletter ble bestrålt i hhv. 12 og 24 minutter. Det er liten forskjell i den beregnede doseraten for de to bestrålingsoppsettene, noe som resulterer i liten usikkerheten i den beregnede gjennomsnittlige doseraten, omtrent 1.8 %.

5.4 Doblingstid

Det ble utført 8 forsøk for å finne doblingstiden til cellene mens de ble kontinuerlig bestrålt, som beskrevet i kapittel 3.4 (Bestemmelse av doblingstider).

Tabell 10 a) viser doblingstiden for ubestrålte T98G-celler og T98G-celler som hadde blitt bestrålt i 4 dager ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 0.27, 0.53, 1.67, 6.5 og 19.5 µCi/ml, mens Tabell 10 b) viser doblingstiden for ubestrålte T98G-celler og T98G-celler som hadde blitt bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 19.5 µCi/ml i 7 dager. Den gjennomsnittlige doblingstiden til de ubestrålte T98G-cellene ble i de to forsøkene beregnet til å være 24.42 ± 1.70 timer. Det er vanlig med en viss variasjon i doblingstid fra uke til uke, noe som sannsynligvis skyldes forskjeller i måten cellene ble behandlet på i forsøkene som ble utført. Det varierte hvor lang tid cellene måtte utsettes for trypsin for at de skulle løsne fra flaskebunnen, dette kan gi opphav til forskjeller i doblingshastigheten.

Data fra doblingstidsforsøkene kan se ut til å indikere en liten, men ikke signifikant, endring i doblingstid for cellene som ble bestrålt med de 4 laveste doseratene i 4 dager sammenliknet med den ubestrålte kontrollen. For cellene som hadde blitt bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 0.27 og 0.53 µCi/ml, ses en reduksjon i doblingstid i forhold til de ubestrålte cellene. Denne reduksjonen i doblingstid kan forklares ved at cellene, ved å redusere doblingstiden, reduserer dosebelastningen per generasjon (Hall and Giaccia 2006), og kan dermed ses på som en cellulær mekanisme for å redusere effekten av bestrålingen. For cellene som hadde blitt bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 6.5 µCi/ml, observeres det en økning i doblingstid.

Cellene bestrålt med den høyeste dosen, 19.5 µCi/ml, viste en tydelig, og høyst signifikant, økning i doblingstid sammenliknet med den ubestrålte kontrollen. Samtidig viste disse cellene store endringer i morfologi, ved at det utover i bestrålingsforløpet ble observert flere kjempeceller og større uregelmessigheter i cellegeometri. Andelen celler som ikke delte seg var også betydelig større for cellene bestrålt ved bruk av medium med spesifikk aktivitet på 19.5 µCi/ml. Dette tyder på at strålingen har skadet cellenes DNA, slik at cellene bruker lengre tid på å passere gjennom cellesyklus. Bildene som ble tatt av cellene under bestrålingen viste at noen av koloniene var i stand til å dele seg med tilnærmet normal hastighet. Det er dermed også mulig at en fraksjon av cellene dør av strålingen i hver generasjon, slik at den reduserte doblingshastigheten er et resultat av en kraftig redusert doblingshastighet i noen av de bestrålte cellekoloniene.

Tabell 18 viser data fra tilsvarende doblingstidsforsøk gjort med T-47D- (Søvik 2002; Bjørhovde 2006) og NHIK 3025-celler (Bjørhovde 2006), sammenliknet med verdiene funnet for T98G. Den korte doblingstiden for T98G-celler på omtrent 24 timer kan tyde på en større sparende effekt for

T98G-celler ved lavdoseratebestråling sammenliknet med de andre cellelinjene, på grunn av økt progresjon i cellesyklus under bestrålingen og dermed økt tilvekst av nye celler.

Tabell 18: Gjennomsnittlige doblingstider for ubestrålte T-47D-, NHIK 3025- og T98G-celler

Cellelinje	Doblingstid (timer)
T-47D (Søvik 2002)	36 ± 2
T-47D (Bjørhovde 2006)	31 ± 3
NHIK 3025	25.7 ± 0.6
T98G	24.42 ± 1.7

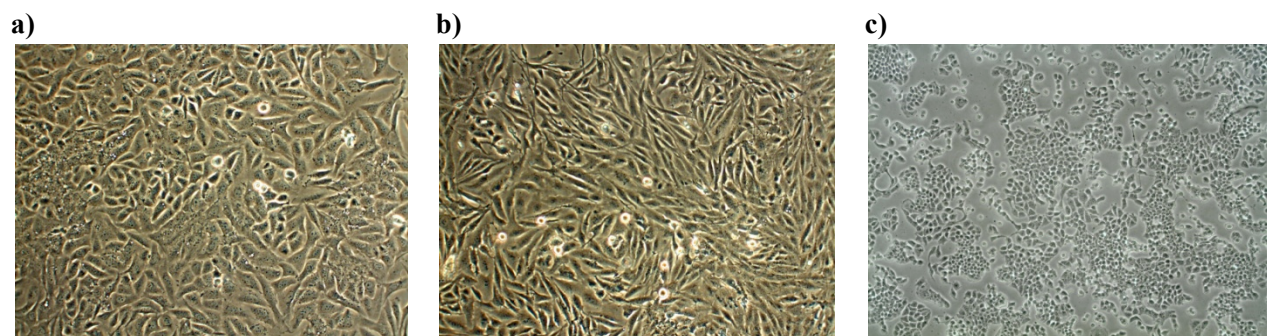
5.5 Celleoverlevelse

Det ble utført koloniforsøk for å undersøke effekten av ulike doserater på T98G-cellers overlevelsesfraksjon. Figur 19 a) og b) viser overlevelsesfraksjonen for de to laveste doseratene som ble benyttet i denne oppgaven som funksjon av hhv. tid og dose. Fraksjonen av celler med evne til å danne kolonier som funksjon av dose funnet i denne oppgaven viser at cellene tolererer de to laveste doseratene gjennom hele bestrålingsperioden uten at cellene dør ut. Overlevelsesfraksjonen holder seg forholdsvis stabil gjennom hele forsøket, men varierer mellom 60 % og 130 % i forhold til ubestrålte T98G-celler. Det ser ikke ut til å være noen forskjell i overlevelsesfraksjon for de to doseratene. Som vist i forsøkene for å finne doblingstiden, ble ikke de bestrålte cellene stoppet i cellesyklus, men fortsatte å dele seg som vanlig. Denne repopulasjonen fører dermed til at nye celler kommer til og kompensere for celledøden, selv om en del av cellene dør av bestrålingen.

Figur 17 a) og Figur 18 viser overlevelsesfraksjonen for de tre høyeste doseratene som ble benyttet i denne oppgaven som funksjon av hhv. tid og dose. Ved de to høyeste doseratene synker overlevelsesfraksjonen fort, til under 0.1 % etter hhv. 3 og 18 dager. Det var da så få gjenlevende celler at det ikke var mulig å fortsette forsøkene. Overlevelsesfraksjonen for cellene bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml sank også jevnt fram til 98 dager etter forsøksstart, hvor overlevelsesfraksjonen var nede på omtrent 0.4 %. Cellene (eller genomet) hadde da mottatt en totaldose på omtrent 123.5 Gy. Overlevelsesfraksjonen begynte så plutselig å stige igjen, og stabiliserte seg etter hvert på en verdi på rundt 50 – 60 % relativt til ubestrålte T98G-celler. Grunnen til denne plutselige stigningen er uklar. Muligens skyldes det at bestrålingen hos noen av cellene har ført til en mutasjon som gjør cellene mer motstandsdyktige mot bestrålingen, og som dermed gjør at flere av cellene med denne mutasjonen overlever bestrålingen og klarer å dele seg.

Stigningen i overlevelsesfraksjon som ble observert for cellene bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml var svært overraskende, og det ble derfor utført flowcytometriforsøk for å undersøke om fordelingen i cellesyklus var endret for disse cellene sammenliknet med de ubestrålte T98G-cellene. Flowcytometriforsøkene som ble utført på cellekjerner preparert ved bruk av

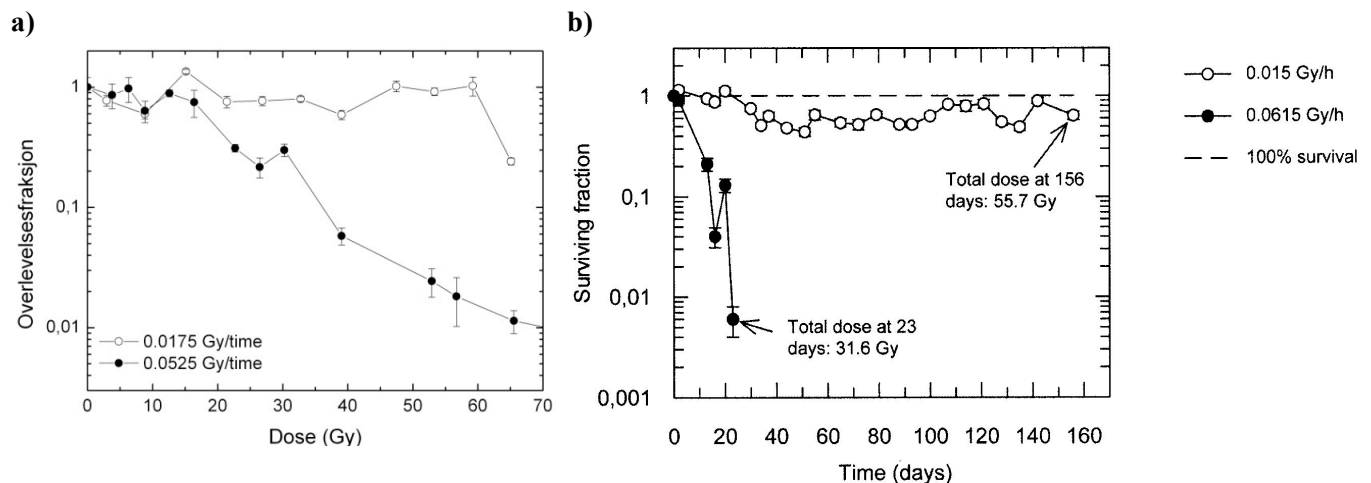
Vindelövs metode, etablert og utført av Celal Ceyhan (Ceyhan 2011), viste at T98G-cellene som hadde blitt bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 10 måneder før flowcytometriforsøkene ble gjennomført, hadde et lavere DNA-innhold enn villtypen av T98G-cellene. For å utelukke at det lavere DNA-innholdet skyldtes at cellene hadde blitt blandet med andre celletyper, ble det utført flowcytometriforsøk på prøver som inneholdt både T98G- kjerner og kjerner fra T98G-celler som hadde blitt bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 10 måneder og T-47D-kjerner og kjerner fra T98G-celler som hadde blitt bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 10 måneder for å se hvordan fluorescensintensiteten varierte for begge typer kjerner i prøven (se Figur 26 og Figur 27). Cellene ble blandet før fargingen med PI, slik at det ikke skulle kunne oppstå forskjell i fluorescensintensitet på grunn av preparering av prøvene. Disse forsøkene viste at DNA-innholdet hos T98G-celler som hadde blitt bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 10 måneder virkelig er lavere DNA enn hos villtypen av T98G-cellene (Figur 26), og at DNA-innholdet også skiller seg fra det som er tilfellet hos T-47D-cellene (Figur 27). Figur 33 viser bilder tatt av T98G-celler, T98G-celler som hadde blitt bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 10 måneder og T-47D-celler. Morfologien til T98G-cellene som hadde blitt bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 10 måneder er veldig lik villtypen av T98G-cellene, dette bekrefter dermed at T98G-cellene som hadde blitt bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 10 måneder faktisk stammer fra T98G, og ikke fra T-47D.



Figur 33: Bilder tatt av **a)** T98G-celler, **b)** T98G-celler bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 10 måneder og **c)** T-47D-celler.

Det er umulig å si noe om hvordan det har gått til at DNA-innholdet hos cellene som er lavdoseratebestrålt ved bruk [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 10 måneder er endret i forhold til DNA-innholdet hos ubestrålte T98G-celler. Muligens har strålingen ført til en DNA-skade hos en eller flere av cellene, som så har kvittet seg med de skadde delene av DNA i et forsøk på å overleve. Dette har så vist seg å gi større motstandsdyktighet mot bestrålingen, slik at disse muterte cellene har fortsatt med å dele seg og etter hvert utkonkurrert cellene uten denne mutasjonen, som dermed er mer følsomme for strålingen. Det at DNA-histogrammet for T98G-cellene som hadde blitt bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 10 måneder i Figur 25 b) kun har én G₁- og G₂-topp viser at samtlige celler i prøven har samme DNA-innhold. Dette stemmer i så fall godt med koloniforsøkene som ble gjort på disse cellene, som viste at overlevelseshastigheten, etter å ha vært så lav som 0.4 %, steg og stabiliserte seg på 50 – 60 % i forhold til den ubestrålte kontrollen (se kapittel 4.5 Celleoverlevelsesforsøk).

Det er for alle celleoverlevelsesforsøkene som ble utført en viss spredning i overlevelsen fra uke til uke. Dette kan komme av at usikkerheten knyttet til utsåing av cellene er forholdsvis stor. De bestrålte og de ubestrålte cellene trypsineres, fortynnes og såes ut hver for seg, og metoden er dermed svært følsom for menneskelige feil underveis i prosessen. Det er svært viktig at cellene behandles så likt som mulig, ettersom ulik trypsinering eller fortynning vil kunne føre til en forskjell i cellenes overlevelsesfraksjon som ikke skyldes bestrålingen. Cellene ble i alle forsøk talt og sådd ut manuelt (som beskrevet i kapittel 3.3.1, Telling i Bürkerkammer), noe som stiller store krav til nøyaktigheten. Celleantallet man får ved manuell telling er avhengig av god resuspantering, slik at cellene er jevnt fordelt i suspensjonen. Variasjonen i resultatene kan tyde på at antallet utsådde celler varierte gjennom forsøket, selv om det ble fokusert på å utføre dette så nøyaktig som mulig. Det ble underveis i gjennomføringen av oppgaven etablert en metode for celledtelling ved bruk av flowcytometri. Denne metoden ble brukt til alle dosimetrieforsøk, men ikke ved utsåing til koloniforsøk. En overgang til denne metoden også ved utføring av koloniforsøk kunne sannsynligvis redusert variasjonen i celleoverlevelse som skyldtes celledtelling.



Figur 34: Overlevelsesfraksjon som funksjon av dose for **a)** T98G-celler bestrålt med 0.0175 og 0.0525 Gy/time, funnet i denne oppgaven og for **b)** T-47D-celler bestrålt med 0.015 og 0.062 Gy/time (Pettersen, Bjorhovde et al. 2007)

Doseraten for T98G-celler som ble bestrålt med [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml ble i denne oppgaven beregnet å være 0.0525 ± 0.0098 Gy/time (kapittel 4.2.4). Dette betyr at doseraten for T98G-celler som ble bestrålt med [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 0.53 Gy/time var på 0.0175 Gy/time. Figur 34 a) viser overlevelsesfraksjonen for T98G-celler bestrålt med hhv. 0.0175 og 0.0525 Gy/time, mens overlevelsesfraksjonen for T-47D-celler bestrålt med hhv. 0.015 og 0.0615 Gy/time (Pettersen, Bjorhovde et al. 2007) er vist i Figur 34 b). Vi ser at den laveste doseraten, hhv. 0.015 og 0.0175 Gy/time, tolereres for begge cellelinjene, uten drastisk endring i celleoverlevelse. Overlevelsesfraksjonen ved en doserate på 0.0175 Gy/time svinger rundt 100 % for T98G-cellene, mens T-47D-cellene viser en reduksjon i overlevelsesfraksjon til omtrent 60-70 % i forhold til ubestrålte celler. For den høyeste doseraten, hhv. 0.0615 og 0.0525 Gy/time, ser vi en kraftig reduksjon i overlevelsesfraksjon for begge cellelinjer. For T-47D-celler som ble gitt en doserate på 0.062 Gy/time sank overlevelsesfraksjonen til under 1 % etter 20 dager, mens overlevelsesfraksjonen sank til under 1 % etter 59 dager for T98G-celler som ble gitt en doserate på 0.0525 Gy/time. Med

tanke på at doseratene som er benyttet ikke er helt identiske, ser det ut til å være godt samsvar mellom overlevelsesfraksjonen for de to cellelinjene.

5.6 Cellesyklusfordeling

Flowcytometriforsøkene som ble utført i denne oppgaven viste at cellene ved de tre laveste doseratene som ble brukt, levert av [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på hhv. 0.27, 0.53 og 1.67 $\mu\text{Ci/ml}$, ikke viste noen endringer i cellesyklusfordelingen etter to ukers bestråling. Cellene fortsatte altså som vanlig gjennom cellesyklus ved disse dosene, uten å bli stoppet ved noen av kontrollpunktene. Dette bekreftes av doblingstidsforsøkene som ble utført. De to høyeste doseratene som ble benyttet, levert av [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på hhv. 6.5 og 19.5 $\mu\text{Ci/ml}$, førte til en tydelig akkumulasjon av celler i G_2 -fasen, noe som er vanlig ved stråleskader (Maity, McKenna et al. 1994). Denne G_2 -arresten stopper celler som var i S-fasen under bestrålingen og hindrer celler som har blitt bestrålt i G_2 å fortsette videre til mitosen. På denne måten gis cellene økt tid til å reparere stråleskader før de eventuelt fortsetter gjennom cellesyklus (Fernet, Megnin-Chanet et al. 2010).

5.7 Effektforsøk etter akuttbestråling

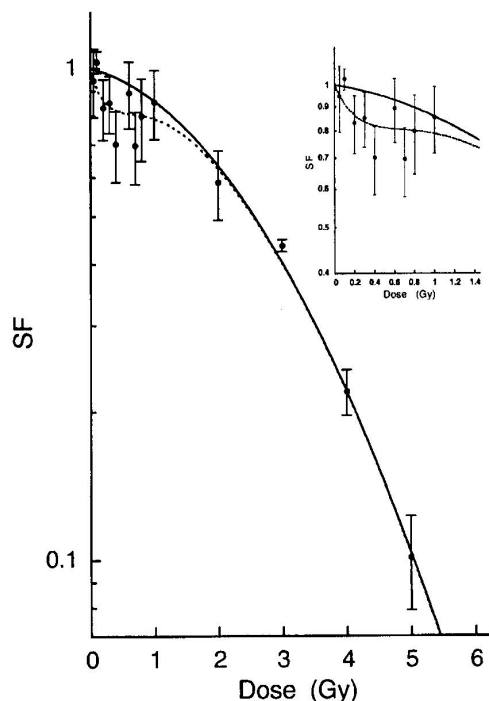
Det ble utført 6 forsøk med akutte singeldosebestrålinger med 220 kV røntgenstråling for å undersøke om cellene som hadde blitt kontinuerlig bestrålt ved bruk av [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 $\mu\text{Ci/ml}$ i 11 måneder viste endret respons på akuttbestråling i forhold til villtypen av T98G-celler.

T98G-celler antyder hypersensitivitet ved doser under 0.5 Gy, fulgt av et område med større stråleresistens for doser mellom 0.5 og 1 Gy (Short, Mayes et al. 1999). Tendensen til hypersensitivitet ved den laveste dosen som ble brukt i denne oppgaven (0.11 Gy) samsvarer med tidligere forsøk utført på samme celletype (Short, Mayes et al. 1999).

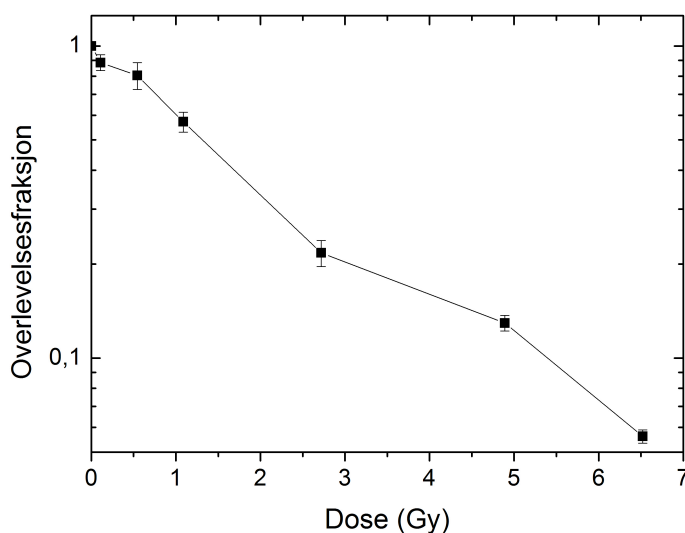
Figur 29 a) og b) viser den gjennomsnittlige overlevelsesfraksjonen for villtypen av T98G-celler og T98G-celler som hadde blitt prebestrålt ved bruk av [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 $\mu\text{Ci/ml}$ i 11 måneder. Data fra akuttbestrålingsforsøkene ser ut til å indikere en økt overlevelsesfraksjon for de lavdosebestrålte T98G-cellene sammenliknet med villtypen av T98G-celler, selv om p-verdiene i Tabell 16 viser at denne forskjellen ikke er signifikant. Det ser i tillegg ut til at T98G-cellene som hadde blitt bestrålt ved bruk av [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 $\mu\text{Ci/ml}$ i 11 måneder har en endret respons på akutte stråledoser under 0.5 Gy, ved at cellene ikke viser samme hypersensitivitet som villtypen av T98G-celler. Disse forsøkene tyder på at cellene som hadde blitt kontinuerlig bestrålt ved bruk av [^3H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 $\mu\text{Ci/ml}$ i 11 måneder viser endret respons på akuttbestråling i forhold til vanlige T98G-celler. Dette vil kunne medføre store konsekvenser ved strålebehandling av denne type hjernesvulst, dersom lavdosebestrålingen av cellene kan føre til at cellenes DNA endres og gjør cellene mer motstandsdyktige mot strålingen. Som nevnt innledningsvis, er glioblastom en type kreft som er vanskelig å behandle. Brachyterapi er den behandlingsmetoden som er mest brukt, uten at dette har vist noen signifikant endring i overlevelse på lang sikt (Heller 1993). Glioblastiomcellers evne til å

reparere subletale skader har vært sett på som hovedårsaken til at stråleterapi, og da hovedsakelig brachyterapi, ikke har hatt ønsket effekt (Davis 1989). Dersom det er slik at T98G-celler har evnen til adaptasjon til lavdoseratebestråling og på den måten kan øke sin resistans mot videre strålebehandling, vil dette også kunne forklare stråleresistensen til denne typen kreft.

a)



b)



Figur 35: a) Overlevelsesfraksjonen til T98G-celler bestrålt ved bruk av 240 kV røntgenstråling (Short, Mayes et al. 1999). Den lille grafen viser overlevelsesfraksjonen ved doser under 1.4 Gy. b) Overlevelsesfraksjonen til T98G-celler bestrålt ved bruk av 220 kV røntgenstråling, funnet i denne oppgaven.

5.8 Forslag til videre arbeid

Denne oppgaven har, ved hjelp av inkorporering av radioaktivitet i cellulære proteiner, tatt for seg både dosimetriske og effektmessige aspekter ved bestråling.

De fleste av forsøkene som ble utført i denne oppgaven ble, grunnet tidsbegrensninger, utført kun få ganger. Flere forsøk hadde gitt mer korrekte resultater og bedret statistikk. Særlig hadde det vært interessant å utføre forsøk for å finne doblingstiden og cellyklusfordelingen også senere i bestrålingsforløpet for alle doseratene som ble benyttet i oppgaven.

Modellen for cellulær tritiumdosimetri viste seg å være vanskelig å gjennomføre for T98G-celler. Det bør derfor utarbeides en metode som fungerer tilfredsstillende, også for denne cellytten.

Usikkerheten til doseraten som ble funnet i denne oppgaven var forholdsvis høy, flere forsøk for å finne doseraten ville dermed gitt et mer nøyaktig resultat.

De mest spennende resultatene i denne oppgaven er knyttet til responsen til cellene som ble kontinuerlig bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 11 måneder. Disse cellene viste effekter av strålingen som ikke var forventet, det er derfor synd at det ikke ble utført flere forsøk for å finne doblingstid og cellesyklusfordeling underveis i forsøket. Dette kunne ha bidratt til en større forståelse for hva som førte til endringene som oppsto underveis. Vindelövs metode for preparering av kjerner til flowcytometriforsøk, etablert av Celal Ceyhan (Ceyhan 2011), gir svært gode DNA-histogrammer. Denne metoden var dessverre ikke etablert før mot slutten av arbeidet med denne oppgaven.

En videreføring av dette arbeidet bør inkludere flere effektforsøk for å undersøke cellenes respons på ulike former for bestråling. Det hadde også vært naturlig å gjennomføre en karyotyping av cellene, for å finne ut hvordan disse cellenes DNA skiller seg fra vanlige T98G-cellers DNA.

6 Konklusjon

I denne oppgaven har effekten til den humane cellelinjen T98G på lavdoseratebestråling blitt undersøkt. De to laveste doseratene, levert av [³H]- medium med spesifikk aktivitet på 0.28 og 0.53 µCi/ml, førte ikke til noen signifikante endringer i verken doblingstid, cellesyklusfordeling eller overlevelsesfraksjon. De to høyeste doseratene, levert av [³H]- medium med spesifikk aktivitet på 6.5 og 19.5 µCi/ml, resulterte begge i en reduksjon i celleoverlevelse til under 1 % i forhold til ubestrålte T98G-celler etter hhv. 18 og 3 dager. Flowcytometriforsøk viste en akkumulering av celler i G₂-fasen for begge doseratene, og det ble observert en signifikant økning i doblingstid for cellene bestrålt med [³H]- medium med spesifikk aktivitet på 19.5 µCi/ml.

T98G-celler som ble bestrålt ved bruk av [³H]- medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml viste den mest interessante responsen på bestrålingen. Det ble ikke observert noen tydelig endring i cellenes doblingstid og fordeling i cellesyklus tidlig i bestrålingsforløpet. Koloniforsøk utført på cellene viste at overlevelsesfraksjonen sank jevnt fram til 98 dager etter forsøksstart, hvor overlevelsesfraksjonen var nede på omtrent 0.4 %. Summen av dosen til cellekjernene hadde da nådd omtrent 123.5 Gy. Overlevelsesfraksjonen begynte så å stige igjen, og stabiliserte seg etter hvert på en verdi på rundt 50 – 60 % relativt til en ubestrålt kontroll. Flowcytometriforsøk som ble utført på disse cellene etter en bestrålingsperiode på omtrent 10 måneder viste et lavere DNA-innhold for cellene som hadde blitt lavdoseratebestrålt over lang tid i forhold til villtypen av T98G-celler. Etter at cellene hadde blitt lavdoseratebestrålt i overkant av 300 dager ble det gjennomført akuttbestrålingsforsøk på cellene ved bruk av 220 kV røntgenstråling med en doserate på 0.27 Gy/min. De lavdoseratebestrålte cellene, i tillegg til ubestrålte T98G-celler, ble gitt akutte stråledoser på 0.11, 0.54, 1.09, 2.72, 4.89 og 6.52 Gy. Man kunne for villtypen av T98G-cellene se en antydning til hypersensitivitet for den laveste dosen, som ikke kunne ses hos cellene som hadde gått på [³H]- medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml over lengre tid. I tillegg så det ut til at overlevelsesfraksjonen jevnt over lå høyere for de lavdoseratebestrålte cellene enn for villtypen av T98G-cellene. Det ser dermed ut til å ha skjedd en endring i ploiditet hos de lavdoseratebestrålte cellene, ved at disse cellene har et lavere DNA-innhold enn villtypen av T98G-cellene, og som har ført til en endret respons på bestråling i forhold til villtypen av T98G-celler.

Litteraturliste

- Alberts, B. (2008). Molecular biology of the cell. New York, Garland Science.
- Attix, F. H. (2004). Introduction to radiological physics and radiation dosimetry. New York, Wiley-VCH.
- Bjørhovde, I. (2006). Undersøkingar av celler sin respons på intern bestråling med lågenergetiske elektron ved ultralåge doseratar. Oslo, I. Bjørhovde.
- Brustolon, M. and G. Giamello (2009). Electron paramagnetic resonance: a practitioner's toolkit. Hoboken, N.J., Wiley.
- 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.
- Ceyhan, C. (2011). Masteroppgave.
- 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.
- Dale, R. G. (1996). "Dose-rate effects in targeted radiotherapy." Phys Med Biol **41**(10): 1871-1884.
- Davis, L. W. (1989). "Malignant glioma--a nemesis which requires clinical and basic investigation in radiation oncology." Int J Radiat Oncol Biol Phys **16**(6): 1355-1365.
- Dertinger, H. and H. Jung (1970). Molecular radiation biology: the action of ionizing radiation on elementary biological objects. London, The English Universities Press c1970.
- Edin, N. F. J. (2003). Hyper-radiosensitivity and induced radioresistance (HRS/IRR): the effect of using different dose-rates for pre-exposure on the hyper-radiosensitivity in T-47D cells. Oslo, N.F.J. Edin: v, 93 s.
- Espe, E. K. S. (2009). The effect of chronic hypoxia and low dose-rate B-irradiation on the MCF-7 human cancer cell: by in vitro cellular incorporation of ³H-valine in 8% O₂. Oslo, E.K.S. Espe: xv, 251 s.
- Fernet, M., F. Megnin-Chanet, et al. (2010). "Control of the G2/M checkpoints after exposure to low doses of ionising radiation: implications for hyper-radiosensitivity." DNA Repair (Amst) **9**(1): 48-57.
- Goddu, S. M., R. W. Howell, et al. (1997). MIRD Cellular S. Values: Self-Absorbed Dose Per Unit Cumulated Activity for Selected Radionuclides and Monoenergetic Electron and Alpha Particle Emitters Incorporated into different cell compartments. S. o. N. Medicine: 183.
- Hall, E. J. and A. J. Giaccia (2006). Radiobiology for the radiologist. Philadelphia, Pa., Lippincott Williams & Wilkins.

- Heller, D. P. R., G. Peter (1993). "Low Dose-Rate Irradiation of Human Glioma Cells and Thermoradiosensitization by Mild Hyperthermia." Radiation Oncology Investigations(1): 218-226.
- Henriksen, E. K. and T. Henriksen (1998). Vår strålende verden: radioaktivitet, røntgenstråling og helse. Oslo, Fysisk institutt, Universitetet i Oslo.
- Hill, R. L. and J. R. Johnson (1993). "Metabolism and dosimetry of tritium." Health Phys **65**(6): 628-647.
- ICRP (1964). Recommendations of the International Commission on Radiological Protection: report of Committee IV (1953-1959) on protection against electromagnetic radiation above 3MeV and electrons, neutrons and protons : (adopted 1962, with revisions adopted in 1963). Oxford, Published for the International Commission on Radiological Protection by Pergamon Press.
- Joiner, M. C., B. Marples, et al. (2001). "Low-dose hypersensitivity: current status and possible mechanisms." Int J Radiat Oncol Biol Phys **49**(2): 379-389.
- Karp, G. (2010). Cell biology. Hoboken, N.J., Wiley.
- Karp, G. and P. v. d. Geer (2005). Cell and molecular biology: concepts and experiments. Hoboken, John Wiley.
- 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.
- Khan, F. M. (2010). The physics of radiation therapy. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Kiefer, J. (1990). Biological radiation effects. Berlin, Springer.
- Kielberg, V., N. Brünner, et al. (2001). Celledyrkning: en praktisk håndbog i dyrkning af mæmme celler. København, Gads Forlag.
- Kreftforeningen. (2011). Retrieved 14.08.2011, 2011.
- Louis, D. N., H. Ohgaki, et al. (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." Acta Neuropathol **114**(2): 97-109.
- 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.
- Marples, B. (2004). "Is low-dose hyper-radiosensitivity a measure of G2-phase cell radiosensitivity?" Cancer Metastasis Rev **23**(3-4): 197-207.
- 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.
- Mendoza-Maldonado, R., R. Paolinelli, et al. (2010). "Interaction of the retinoblastoma protein with Orc1 and its recruitment to human origins of DNA replication." PLoS One **5**(11): e13720.
- Mitchell, C. R., M. Folkard, et al. (2002). "Effects of exposure to low-dose-rate (60)co gamma rays on human tumor cells in vitro." Radiat Res **158**(3): 311-318.
- Morstin, K., M. Kopec, et al. (1993). "Microdosimetry of tritium." Health Phys **65**(6): 648-656.
- Nias, A. H. W. (1998). An introduction to radiobiology. Chichester, Wiley.
- Nikjoo, H., D. T. Goodhead, et al. (1991). "Energy deposition in small cylindrical targets by monoenergetic electrons." Int J Radiat Biol **60**(5): 739-756.
- Ormerod, M. G. (2009). Flow Cytometry: A Basic Introduction.
- Packard (1995). Tri-Carb® Liquid Scintillation Analyzers Models 2100TR/2300TR Operation Manual. U. Packard Instrument Company, Packard Instrument Company.
- Park, C. M., M. J. Park, et al. (2006). "Induction of p53-mediated apoptosis and recovery of chemosensitivity through p53 transduction in human glioblastoma cells by cisplatin." Int J Oncol **28**(1): 119-125.
- Pettersen, E. O., I. Bjorhovde, et al. (2007). "Response of chronic hypoxic cells to low dose-rate irradiation." Int J Radiat Biol **83**(5): 331-345.
- Short, S., C. Mayes, et al. (1999). "Low dose hypersensitivity in the T98G human glioblastoma cell line." Int J Radiat Biol **75**(7): 847-855.
- SNL. (2011). "Strålebehandling." Retrieved 19.09.2011, 2011, from http://snl.no/sml_artikkel/str%C3%A5lebehandling.
- 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.
- Stokke, T., B. K. Erikstein, et al. (1993). "The retinoblastoma gene product is bound in the nucleus in early G1 phase." Experimental cell research **204**(1): 147-155.
- Storhaug, G. (2008). Undersøkelse av kronisk hypoksiske cellers respons på lavdoseratebestråling. Oslo, G. Storhaug: iii, 96 s.
- Sun, T. (2008). Flow cytometry and immunohistochemistry for hematologic neoplasms. Philadelphia, Wolters Kluwer/Lippincott William & Wilkins.
- Søvik, Å. (2002). Lavdoseratebestråling av humane celler i kultur: dosimetri og effektmålinger. Oslo, Å. Søvik: 115 s.

Åmellem, 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." British Journal of Cancer **77**(6): 862-872.

Vedlegg A:

Geometriske reduksjonsfaktorer og elektronrekkevidder

A.1 Geometriske reduksjonsfaktorer

De geometriske reduksjonsfaktorene hentet fra boken *MIRD cellular S-values* (Goddu, Howell et al. 1997). Cellens og kjernens radius betegnes med hhv. R_C og R_N , og x er lengden til vektoren.

$$\Psi_{R_N \leftarrow R_C}(x) = Qx^2 \left(R_N^2 - \frac{1}{12}x^2 \right)$$

når $R_C \leq 3R_N$ og $0 \leq R_C - R_N$ eller når $R_C \geq 3R_N$ og $0 \leq x \leq 2R_N$.

$$\Psi_{R_N \leftarrow R_C}(x) = Q \left[\frac{1}{2}(R_C^2 - R_N^2)(R_N^2 - x^2) + \frac{2x}{3}(R_C^2 - R_N^3) - \frac{1}{4}(R_C^4 - R_N^4) \right]$$

når $R_C \leq 3R_N$ og $R_C - R_N \leq x \leq 2R_N$.

$$\Psi_{R_N \leftarrow R_C}(x) = \frac{R_N^3}{R_C^3 - R_N^3}$$

når $R_C \geq 3R_N$.

$$\Psi_{R_N \leftarrow R_C}(x) = \frac{Q}{12} [x^4 - 3(R_C^4 + R_N^4) + 6(R_C^2 R_N^2 - x^2 R_N^2 - x^2 R_C^2) + (R_C^3 + R_N^3)]$$

når $R_C \leq 3R_N$ og $2R_N \leq x \leq R_C + R_N$ eller når $R_C \geq 3R_N$ og $R_C - R_N \leq x \leq R_C + R_N$.

Ellers:

$$\Psi_{R_N \leftarrow R_C}(x) = 0$$

$$Q = \frac{3}{4x(R_C^3 - R_N^3)}$$

$$\Psi_{R_N \leftarrow R_N}(x) = 1 - \frac{3}{4} \left(\frac{x}{R_N} \right) + \frac{1}{16} \left(\frac{x}{R_N} \right)^3$$

når $0 \leq x \leq 2R_N$.

$$\Psi_{R_N \leftarrow R_N}(x) = 0$$

når $x > 2R_N$.

$$\Psi_{R_N \leftarrow R_C}(x) = \begin{cases} Qx^2 \left(R_N^2 - \frac{1}{12}x^2 \right) & \text{når } R_C \leq 3R_N \text{ og } 0 \leq R_C - R_N \\ \text{eller når } R_C \geq 3R_N \text{ og } 0 \leq x \leq 2R_N \\ Q \left[\begin{array}{l} \frac{1}{2}(R_C^2 - R_N^2)(R_N^2 - x^2) + \\ \frac{2x}{3}(R_C^2 - R_N^3) - \frac{1}{4}(R_C^4 - R_N^4) \end{array} \right] & \text{når } R_C \leq 3R_N \text{ og } R_C - R_N \leq x \leq 2R_N \\ \frac{R_N^3}{R_C^3 - R_N^3} & \text{når } R_C \geq 3R_N \\ \frac{Q}{12} \left[\begin{array}{l} x^4 - 3(R_C^4 + R_N^4) + \\ 6(R_C^2 R_N^2 - x^2 R_N^2 - x^2 R_C^2) + (R_C^3 + R_N^3) \end{array} \right] & \text{når } R_C \leq 3R_N \text{ og } 2R_N \leq x \leq R_C + R_N \\ \text{eller når } R_C \geq 3R_N \text{ og} \\ R_C - R_N \leq x \leq R_C + R_N \\ 0 & \text{ellers} \end{cases}$$

der

$$Q = \frac{3}{4x(R_C^3 - R_N^3)}$$

$$\Psi_{R_N \leftarrow R_N}(x) = \begin{cases} 1 - \frac{3}{4} \left(\frac{x}{R_N} \right) + \frac{1}{16} \left(\frac{x}{R_N} \right)^3 & \text{når } 0 \leq x \leq 2R_N \\ 0 & \text{når } x > 2R_N \end{cases}$$

A.2 Elektronrekkevidder som funksjon av energi

Sammenhengen mellom elektronets energi E (gitt i keV) og elektronets rekkevidde X (gitt i μm) i medier med tetthet på 1 g/cm^3 er gitt ved uttrykkene som følger nedenfor (Goddu, Howell et al. 1997).

For 0.4 keV – 20 keV

$$E(X) = 5.9(X + 0.007)^{0.565} + 0.00413X^{1.33} - 0.367$$

$$\frac{dE}{dX} = 3.333(X + 0.007)^{-0.435} + 0.0055X^{0.33}$$

For 0.06 keV – 0.4 keV

$$X = 1.524 \times 10^{-3} + 3.815 \times 10^{-2}E - 7.018 \times 10^{-4}E^2 + 3.628 \times 10^{-2}E^3$$
$$\frac{dE}{dX} = 29.5 - 666.7X$$

For 0 keV – 0.06 keV

$$X = 0.0123E + 2.25E^2 - 23.33E^3$$
$$\frac{dE}{dX} = 10.5 + 1.126 \times 10^3 X - 9.251 \times 10^5 X^2 + 2.593 \times 10^8 X^3 + 4.964 \times 10^{10} X^4$$

Vedlegg B:

Cellulære S-verdier

I tabell B.1 er de cellulære S-verdiene, $S(R_N \leftarrow R_N)$ og $S(R_N \leftarrow R_{Cy})$, for tritium gitt for ulike kombinasjoner av celle- og kjerneradier. Verdiene er hentet fra boken *MIRD cellular S-values* (Goddu, Howell et al. 1997).

$S(R_N \leftarrow R_N)$ er doseandelen fra kjernen som avsettes i kjernen selv, per enhet aktivitet innen kjernen. $S(R_N \leftarrow R_{Cy})$ er doseandelen fra cytoplasma som avsettes i kjernen, per enhet aktivitet i cytoplasma.

Tabell B.19: Cellulære S-verdier

R_C (μm)	R_N (μm)	$S(R_N \leftarrow R_N)$ (Gy/Bq·s)	$S(R_N \leftarrow R_{Cy})$ (Gy/Bq·s)
3	2	1.56×10^{-2}	2.99×10^{-3}
3	1	8.16×10^{-2}	4.25×10^{-3}
4	3	5.58×10^{-3}	1.20×10^{-3}
4	2	1.56×10^{-2}	1.46×10^{-3}
5	4	2.61×10^{-3}	5.84×10^{-4}
5	3	5.58×10^{-3}	6.36×10^{-4}
5	2	1.56×10^{-2}	8.01×10^{-4}
6	5	1.43×10^{-3}	3.25×10^{-4}
6	4	2.61×10^{-3}	3.26×10^{-4}
6	3	5.58×10^{-3}	3.74×10^{-4}
7	6	8.61×10^{-4}	1.99×10^{-4}
7	5	1.43×10^{-3}	1.87×10^{-4}
7	4	2.61×10^{-3}	1.99×10^{-4}
7	3	5.58×10^{-3}	2.35×10^{-4}
8	7	5.58×10^{-4}	1.30×10^{-4}
8	6	8.61×10^{-4}	1.17×10^{-4}
8	5	1.43×10^{-3}	1.18×10^{-4}
8	4	2.61×10^{-3}	1.30×10^{-4}
9	8	3.82×10^{-4}	8.97×10^{-5}
9	7	5.58×10^{-4}	7.77×10^{-5}
9	6	8.61×10^{-4}	7.51×10^{-5}
9	5	1.43×10^{-3}	7.86×10^{-5}
10	9	2.73×10^{-4}	6.44×10^{-5}
10	8	3.82×10^{-4}	5.42×10^{-5}
10	7	5.58×10^{-4}	5.07×10^{-5}
10	6	8.61×10^{-4}	5.10×10^{-5}
10	5	1.43×10^{-3}	5.50×10^{-5}

Vedlegg C:

Kjemikalieliste

Nedenfor er alle kjemikalier som ble brukt i denne oppgaven listet opp i alfabetisk rekkefølge, med tilhørende produsent eller leverandør.

Kjemikalie	Produsent/leverandør
DTT ((dithiothreiol)	Sigma (USA)
EDTA (Etylenediaminetetraacetic acid)	Fluka (Sveits)
Emulsifier-Safe® scintillasjonsvæske	Packard BioScience (Nederland)
Etanol, 96 %	Arcus AS (Oslo)
Føtalt kalveserum	Euroclone (England)
Glycerolfosfat	Sigma (USA)
Hepes	Sigma (USA)
Insulin	Sigma (USA)
KCl	Merck (Tyskland)
L-valin (C ₅ H ₁₁ NO ₂)	Sigma (USA)
L-[3H]-valin	Amersham, GE Healthcare (England)
Metylenblått	Merck (Tyskland)
MgCl ₂	Merck (Tyskland)
Milli-Q-vann	Millipore (USA)
NaCl	Riedel de Haën (Tyskland)
NaDOC (C ₂₄ H ₃₉ O ₄ Na)	Sigma (USA)
NaHCO ₃	Norsk Medisinaldepot (Oslo)
NaOH	Merck (Tyskland)

NaVO ₃	Sigma (USA)
PBS	Euroclone (England)
Penicillin-Streptomycin	Euroclone (England)
RPMI-pulver med L-Glutamin	JHR Biosciences (USA)
TCA (Trichloric acid)	Merck (Tyskland)
Triton X-100	Bio-rad (USA)
Trypsin	PAA Laboratories (Østerrike)

Vedlegg D:

Oppskrifter

Buffer A (10 ml):

Hepes 1 M pH 7.9	0.1 ml
NaVO ₃	0.0012 g
DTT	0.001 g
Triton X-100	10 µl
MgCl ₂	0.003 g
KCl	0.0075 g
Glycerolfosfat	0.02 g
Milli-Q-vann	10 ml

pH justeres til 7.9 med ren HCl eller 40 % NaOH, og sterilfiltreres.

Kald valin (82.9 M løsning):

L-valin-pulver	1.00 g
RPMI stamløsning	103 ml

NaDOC (50 ml):

Milli-Q-vann	50 ml
NaDOC	0.2 g
NaOH	0.2 g

Røres med magnetrør

RPMI 1640 medium

Per liter stamløsning:

RPMI 1640-pulver med L-Glutamin	10.43 g
NaHCO ₃	2.00 g
Milli-Q-vann	1000 ml

Per liter fullmedium (med serum):

RPMI stamløsning	880 ml
Føtalt kalveserum (10 %)	100 ml
Penicillin-Streptomycin	10 ml
Insulin (200 enheter/liter)	2 ml

TCA, 70 % (100 ml):

Milli-Q-vann	100 ml
TCA (Trichloric acid)	70 g

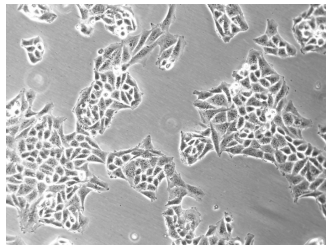
TCA, 10 % (200 ml):

TCA, 70 %	28.4 ml
Milli-Q-vann	171.6 ml

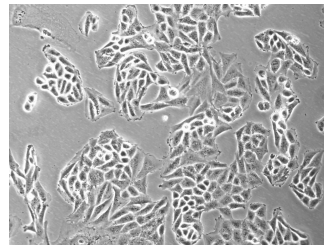
Vedlegg E:

Cellebilder

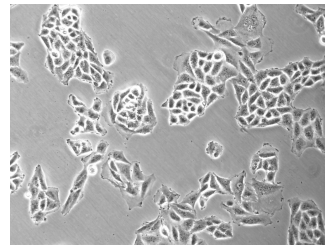
Nedenfor følger bilder av T98G-celler bestrålt ved bruk av [³H]- medium med spesifikk aktivitet på 1.67, 6.5 og 19.5 µCi/ml i tillegg til bilder av ubestrålte T98G-celler de dagene det ble gjennomført koloniforsøk. Det ble tatt flere bilder hver dag, her vises et bilde av hver celleflaske for hver dag.



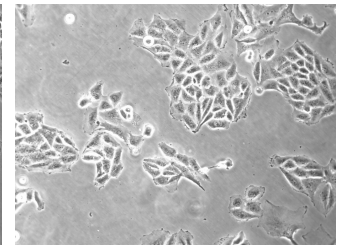
Kontroll dag 3



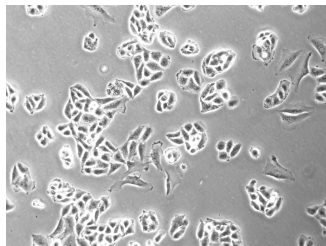
1.67 µCi/ml dag 3



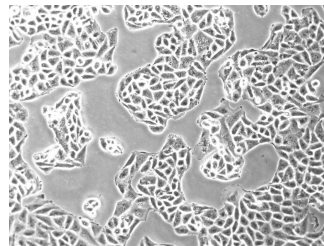
6.5 µCi/ml dag 3



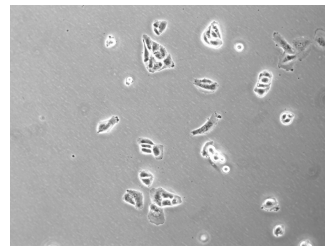
19.5 µCi/ml dag 3



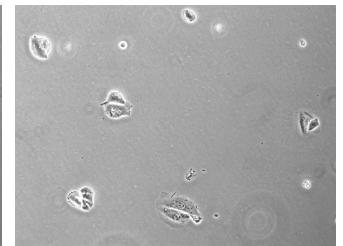
Kontroll dag 5



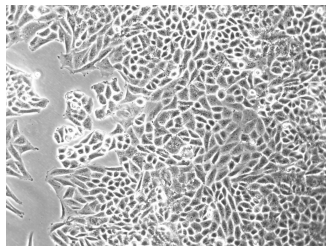
1.67 µCi/ml dag 5



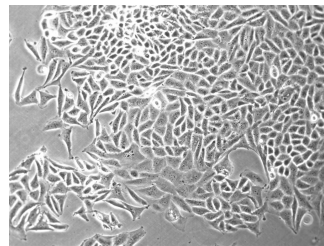
6.5 µCi/ml dag 5



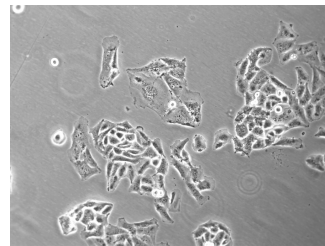
19.5 µCi/ml dag 5



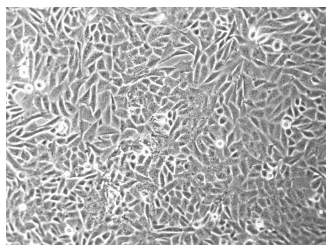
Kontroll dag 7



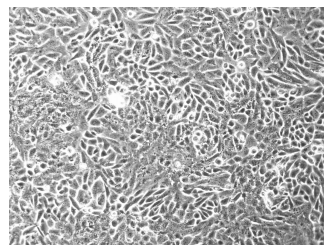
1.67 µCi/ml dag 7



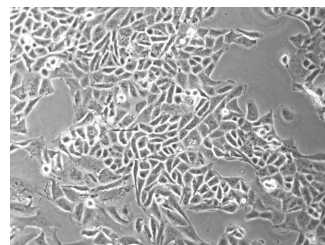
6.5 µCi/ml dag 7



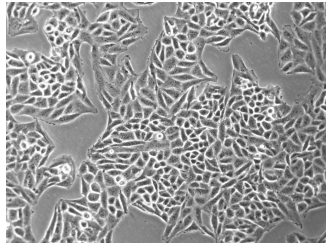
Kontroll dag 10



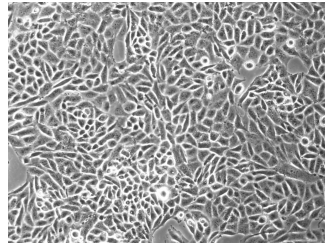
1.67 µCi/ml dag 10



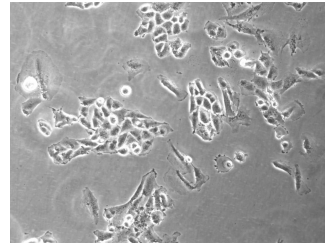
6.5 µCi/ml dag 10



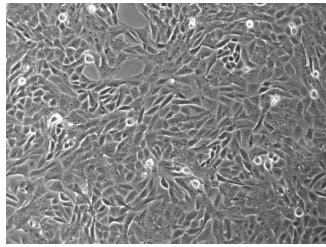
Kontroll dag 13



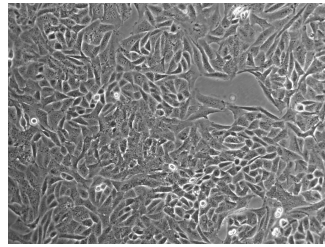
1.67 µCi/ml dag 13



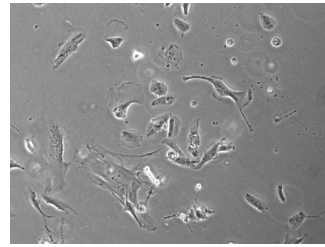
6.5 µCi/ml dag 13



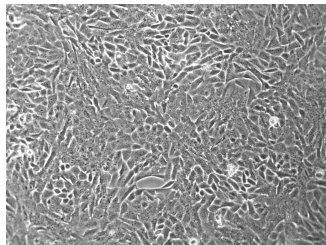
Kontroll dag 18



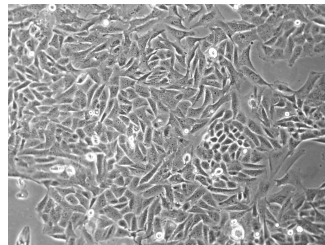
1.67 µCi/ml dag 18



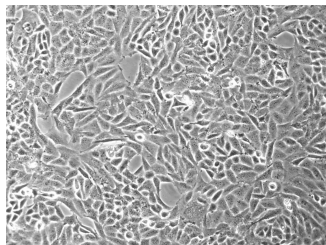
6.5 µCi/ml dag 18



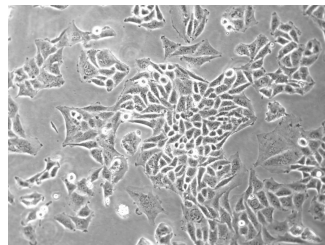
Kontroll dag 21



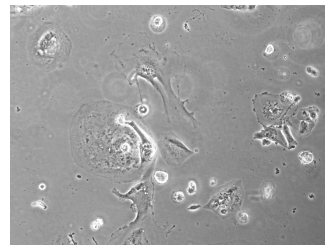
1.67 µCi/ml dag 21



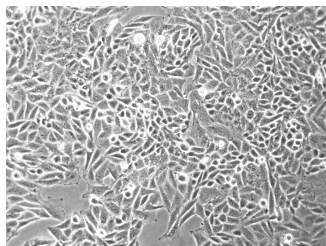
Kontroll dag 24



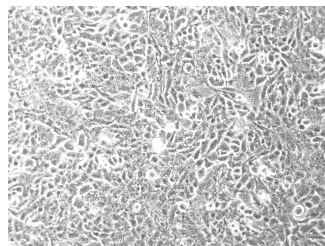
1.67 µCi/ml dag 24



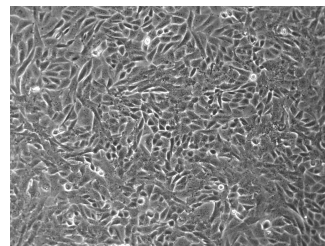
6.5 µCi/ml dag 24



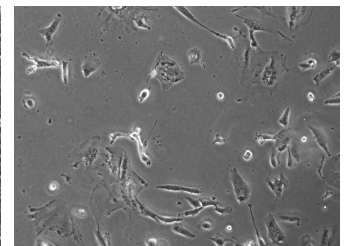
Kontroll dag 31



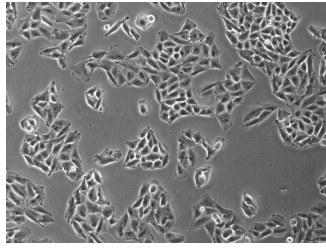
1.67 µCi/ml dag 31



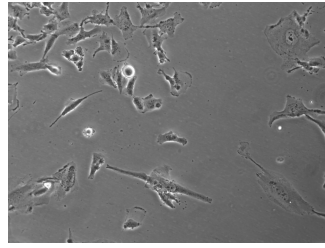
Kontroll dag 42



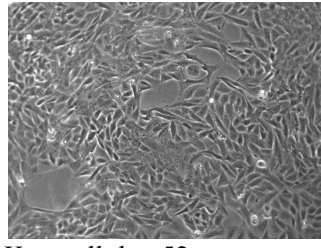
1.67 µCi/ml dag 42



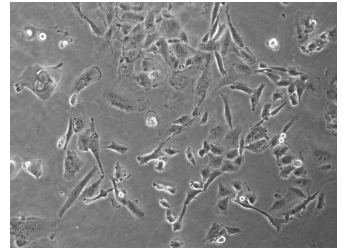
Kontroll dag 45



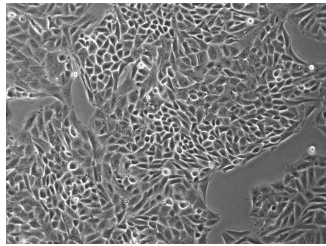
1.67 µCi/ml dag 45



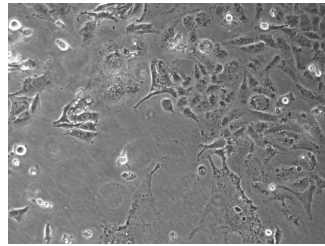
Kontroll dag 52



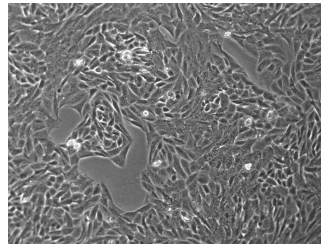
1.67 µCi/ml dag 52



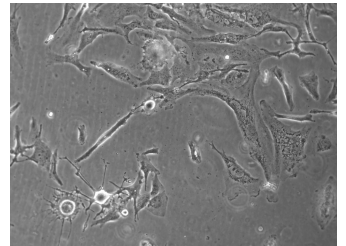
Kontroll dag 59



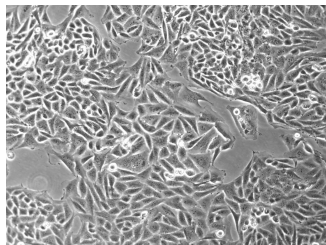
1.67 µCi/ml dag 59



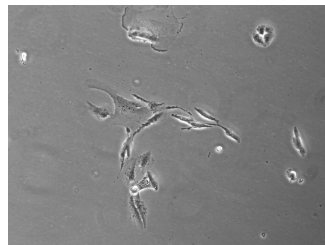
Kontroll dag 77



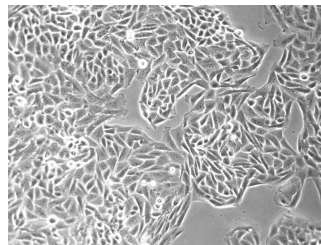
1.67 µCi/ml dag 77



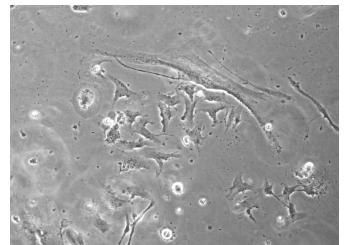
Kontroll dag 98



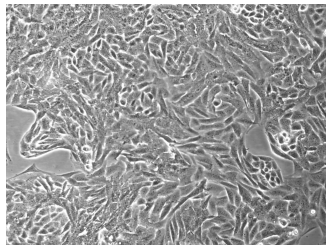
1.67 µCi/ml dag 98



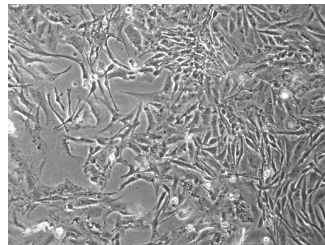
Kontroll dag 113



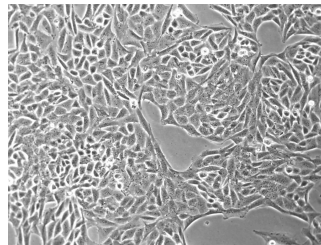
1.67 µCi/ml dag 113



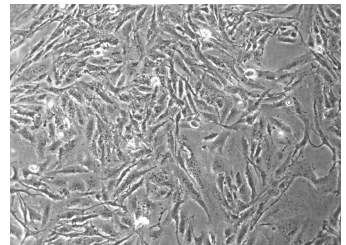
Kontroll dag 134



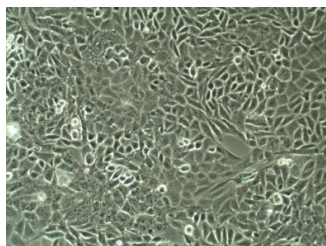
1.67 µCi/ml dag 134



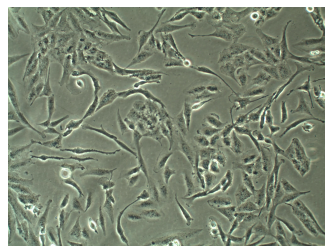
Kontroll dag 144



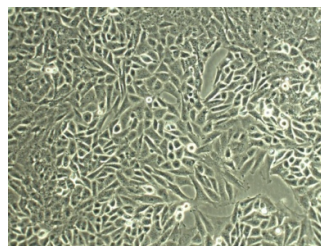
1.67 µCi/ml dag 144



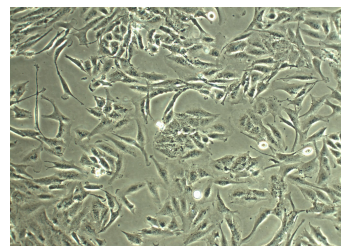
Kontroll dag 169



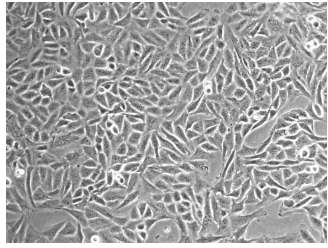
1.67 µCi/ml dag 169



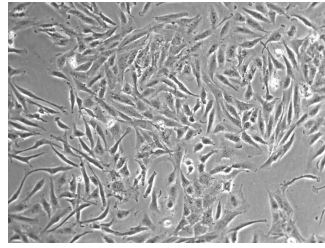
Kontroll dag 183



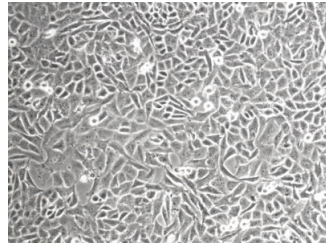
1.67 µCi/ml dag 183



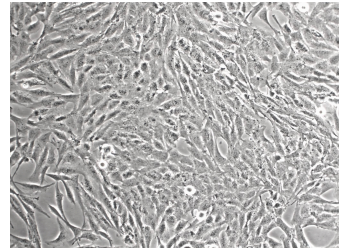
Kontroll dag 194



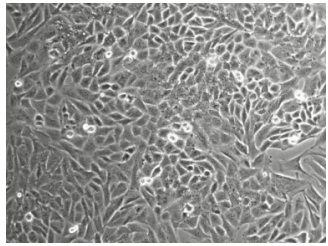
1.67 µCi/ml dag 194



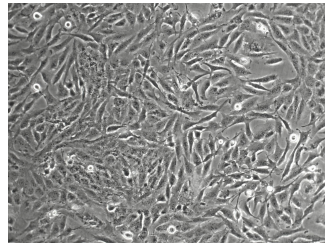
Kontroll dag 211



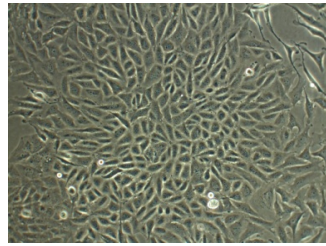
1.67 µCi/ml dag 211



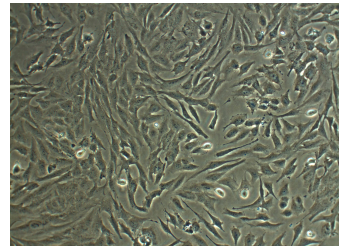
Kontroll dag 225



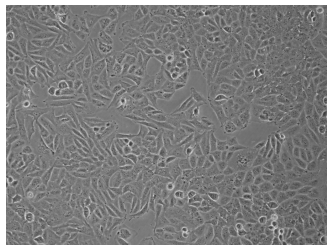
1.67 µCi/ml dag 225



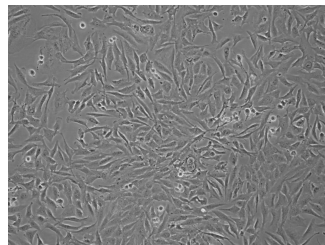
Kontroll dag 236



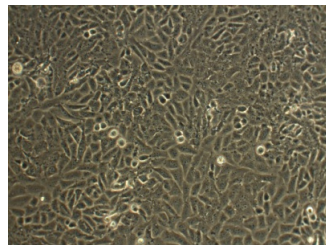
1.67 µCi/ml dag 236



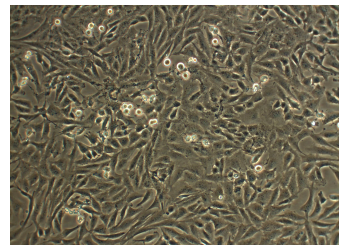
Kontroll dag 249



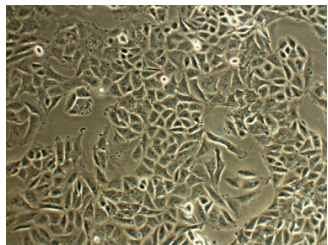
1.67 µCi/ml dag 249



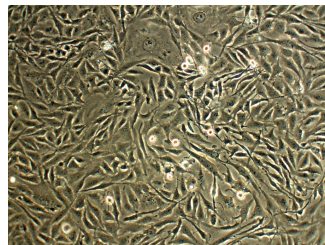
Kontroll dag 263



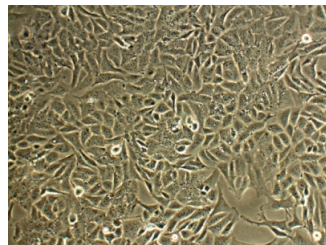
1.67 µCi/ml dag 263



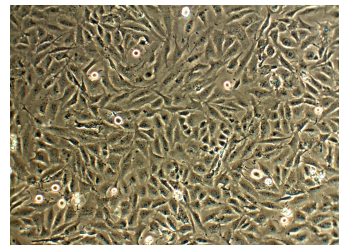
Kontroll dag 277



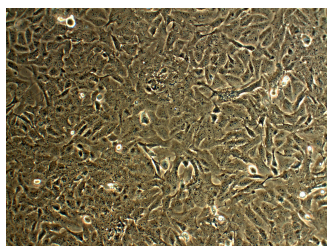
1.67 µCi/ml dag 277



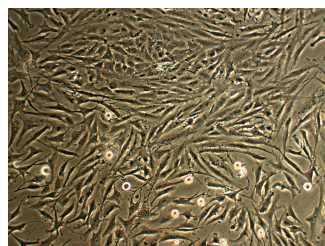
Kontroll dag 312



1.67 µCi/ml dag 312

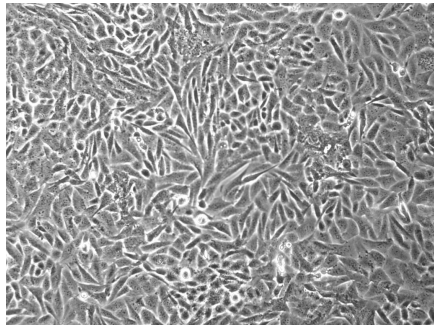


Kontroll dag 342

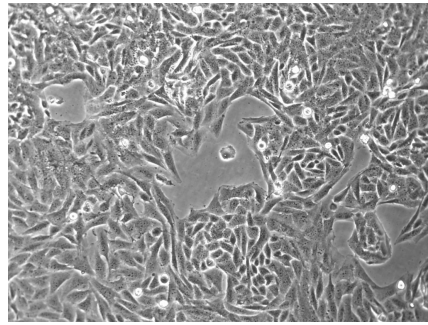


1.67 µCi/ml dag 342

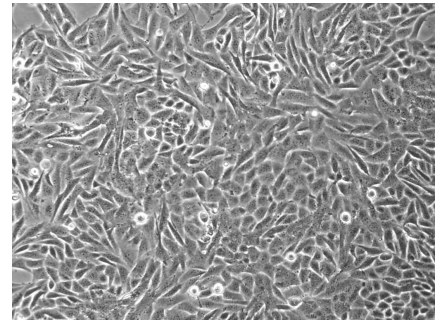
Nedenfor følger bilder av T98G-celler bestrålt ved bruk av [³H]- medium med spesifikk aktivitet på 0.28 og 0.53 µCi/ml i tillegg til bilder av ubestrålte T98G-celler de dagene det ble gjennomført koloniforsøk. Det ble tatt flere bilder hver dag, her vises et bilde av hver celleflaske for hver dag.



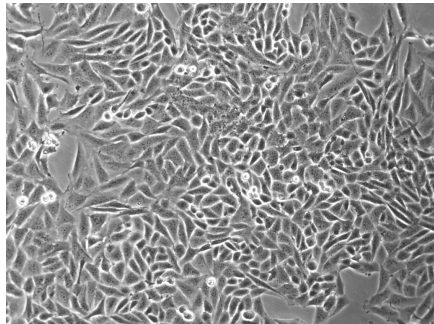
Kontroll dag 7



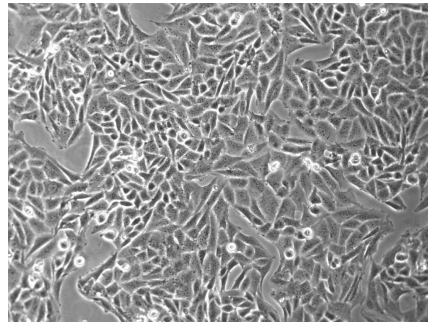
0.28 µCi/ml dag 7



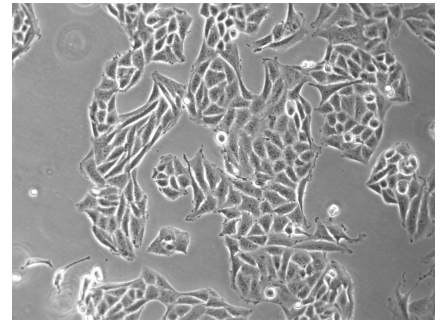
0.53 µCi/ml dag 7



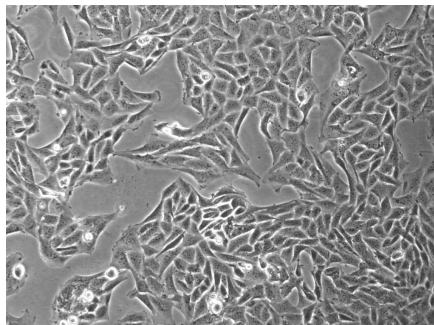
Kontroll dag 21



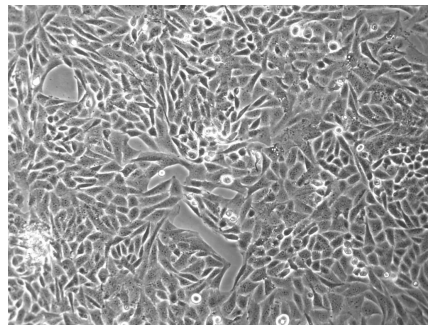
0.28 µCi/ml dag 21



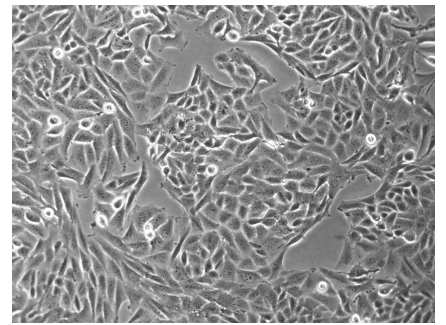
0.53 µCi/ml dag 21



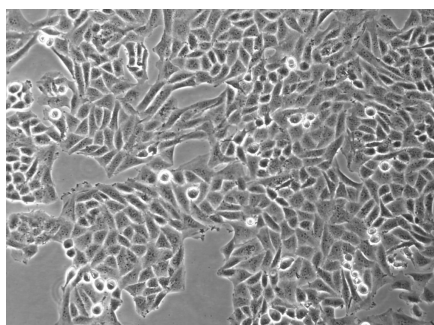
Kontroll dag 36



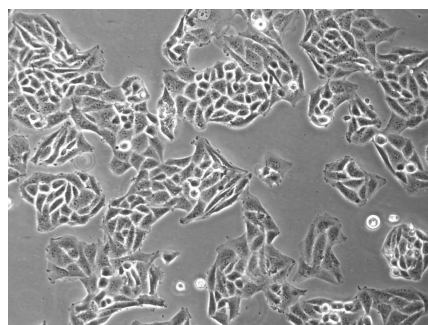
0.28 µCi/ml dag 36



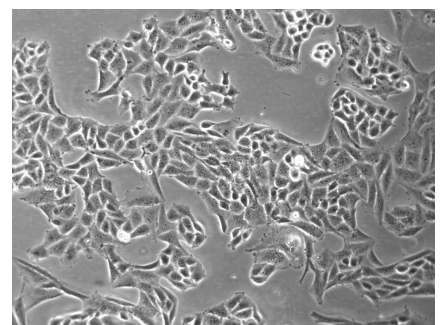
0.53 µCi/ml dag 36



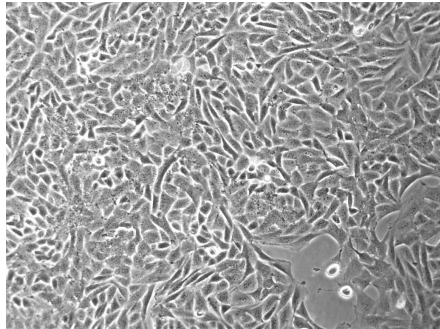
Kontroll dag 51



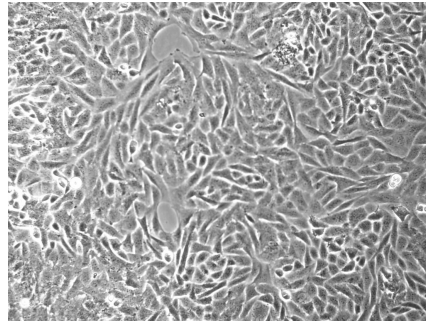
0.28 µCi/ml dag 51



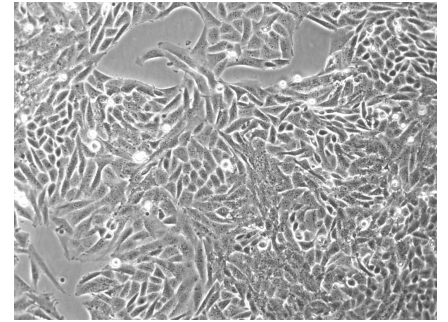
0.53 µCi/ml dag 51



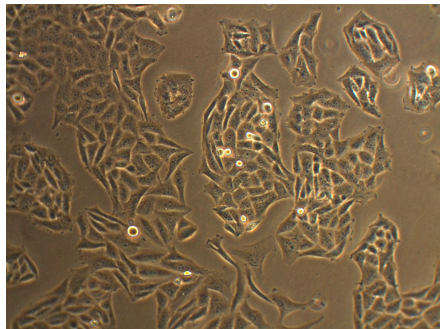
Kontroll dag 64



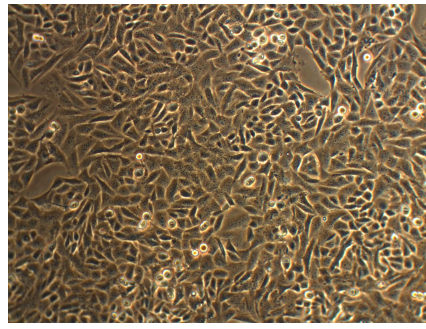
0.28 µCi/ml dag 64



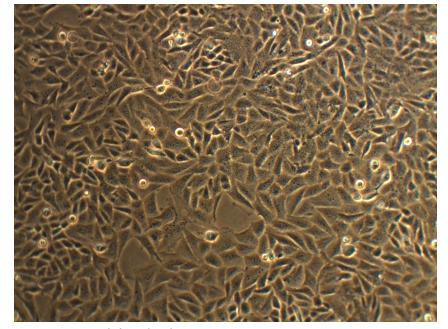
0.53 µCi/ml dag 64



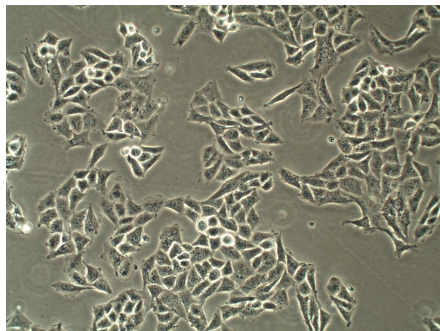
Kontroll dag 78



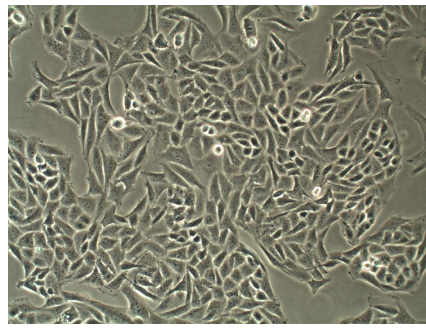
0.28 µCi/ml dag 78



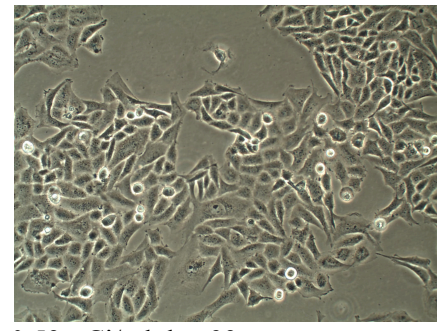
0.53 µCi/ml dag 78



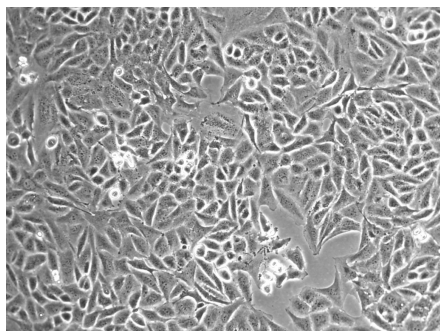
Kontroll dag 93



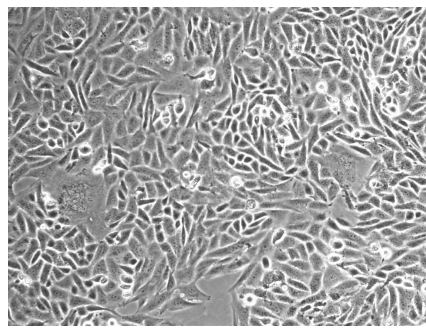
0.28 µCi/ml dag 93



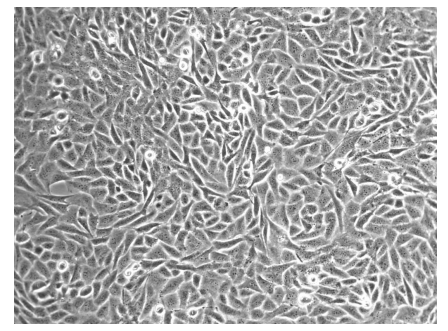
0.53 µCi/ml dag 93



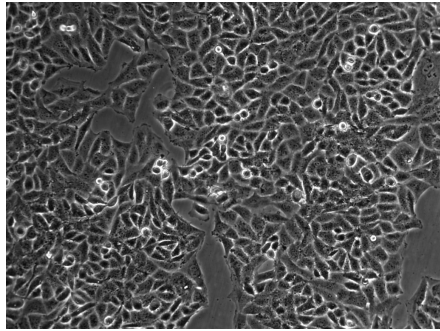
Kontroll dag 113



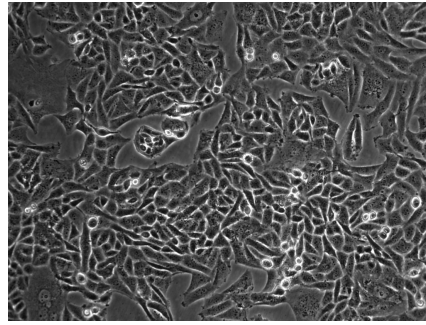
0.28 µCi/ml dag 113



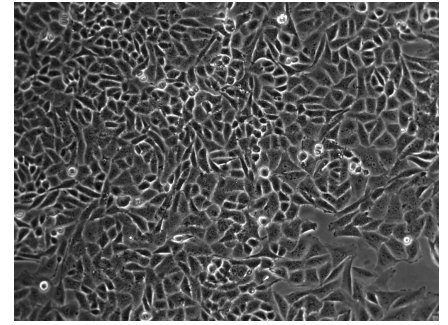
0.53 µCi/ml dag 113



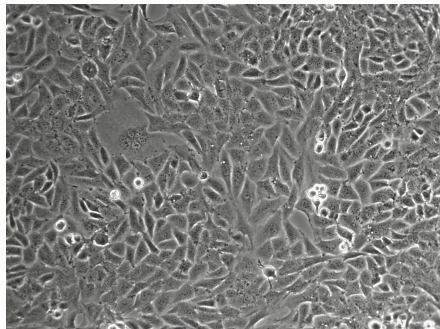
Kontroll dag 127



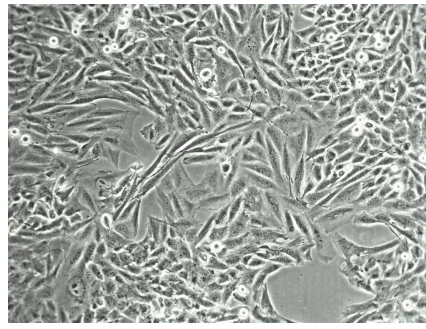
0.28 µCi/ml dag 127



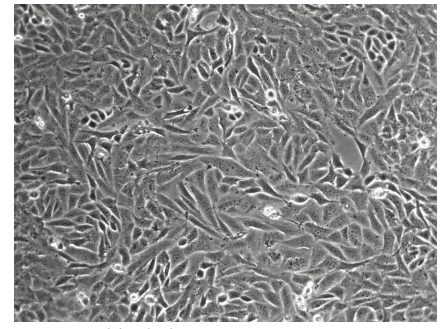
0.53 µCi/ml dag 127



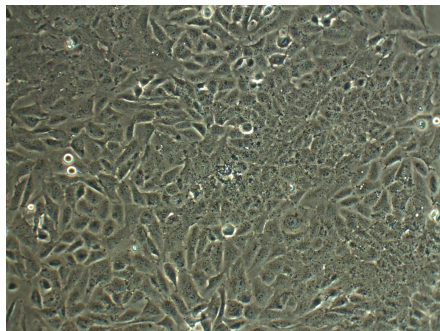
Kontroll dag 141



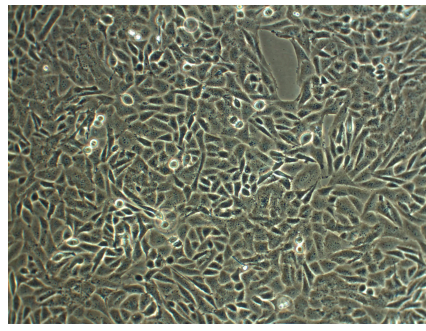
0.28 µCi/ml dag 141



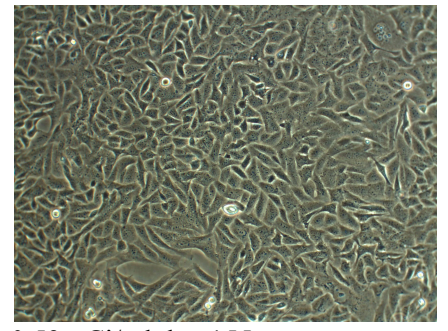
0.53 µCi/ml dag 141



Kontroll dag 155



0.28 µCi/ml dag 155



0.53 µCi/ml dag 155

Vedlegg F:

Koloniforsøk

Rådata fra celleoverlevelsesforsøk utført på T98G-celler bestrålt ved bruk av [³H]- medium med spesifikk aktivitet på 1.67, 6.5 og 19.5 µCi/ml:

Dato	30.08.2010			
Dag etter forsøksstart	3			
Aktivitet (µCi/ml)	Kontroll	1,67	6,5	19,5
Dose (Gy)		3,78	14,71257485	44,13772455
Flaske 1	117	104	44	2
Flaske 2	170	124	25	0
Flaske 3	146	71	30	0
Flaske 4	56	140	3	2
Flaske 5	0	87	0	1
Ant. utsådde celler per flaske	200	200	200	1000
Gjennomsnittlig ant. kolonier per flaske, N	122,25	105,2	20,4	1
se _N	24,59801821	12,38305294	8,334266614	0,447213595
Antall celler sådd ut ganget med PE, N ₀		122,25	122,25	611,25
se _{N0}		24,59801821	24,59801821	122,9900911
Overlevelsesfraksjon, SF		0,860531697	0,166871166	0,001635992
se _{SF}		0,200600507	0,075993784	0,00080228

Dato	01.09.2010			
Dag etter forsøksstart	5			
Aktivitet (µCi/ml)	Kontroll	1,67	6,5	19,5
Dose (Gy)		6,3	24,52095808	73,56287425
Flaske 1	64	86	25	0
Flaske 2	89	57	42	0
Flaske 3	0	104	2	0
Flaske 4	0	51	2	0
Flaske 5	0	0	1	0
Ant. utsådde celler per flaske	200	200	200	2000
Gjennomsnittlig ant. kolonier per flaske, N	76,5	74,5	14,4	0
se _N	12,5	12,4532459	8,249848483	0
Antall celler sådd ut ganget med PE, N ₀		76,5	76,5	765
se _{N0}		12,5	12,5	125
Overlevelsesfraksjon, SF		0,973856209	0,188235294	0
se _{SF}		0,227642544	0,112141575	0

Dato	03.09.2010		
Dag etter forsøksstart	7		
Aktivitet ($\mu\text{Ci/ml}$)	Kontroll	1,67	6,5
Dose (Gy)		8,82	34,32934132
Flaske 1	126	28	0
Flaske 2	98	102	1
Flaske 3	119	98	2
Flaske 4	129	94	1
Flaske 5	0	53	7
Ant. utsådde celler per flaske	200	200	200
Gjennomsnittlig ant. kolonier per flaske, N	118	75	2,2
se_N	6,988085098	14,68332387	1,240967365
Antall celler sådd ut ganget med PE, N₀		118	118
se_{N0}		6,988085098	6,988085098
Overlevelsesfraksjon, SF		0,63559322	0,018644068
se_{SF}		0,130003323	0,010574473

Dato	06.09.2010		
Dag etter forsøksstart	10		
Aktivitet ($\mu\text{Ci/ml}$)	Kontroll	1,67	6,5
Dose (Gy)		12,6	49,04191617
Flaske 1	122	116	39
Flaske 2	104	119	25
Flaske 3	125	94	26
Flaske 4	121	94	32
Flaske 5	0	102	35
Ant. utsådde celler per flaske	200	200	200
Gjennomsnittlig ant. kolonier per flaske, N	118	105	31,4
se_N	4,74341649	5,329165038	2,657066051
Antall celler sådd ut ganget med PE, N₀		118	118
se_{N0}		4,74341649	4,74341649
Overlevelsesfraksjon, SF		0,889830508	0,266101695
se_{SF}		0,057611827	0,024929126

Dato	09.09.2010		
Dag etter forsøksstart	13		
Aktivitet ($\mu\text{Ci/ml}$)	Kontroll	1,67	6,5
Dose (Gy)		16,38	63,75449102
Flaske 1	58	28	13
Flaske 2	126	76	7
Flaske 3	145	123	12
Flaske 4	124	99	13
Flaske 5	1	99	12
Ant. utsådde celler per flaske	200	200	200
Gjennomsnittlig ant. kolonier per flaske, N	113,25	85	11,4
se_N	19,01479687	16,07171428	1,122497216
Antall celler sådd ut ganget med PE, N₀		113,25	113,25
se_{N0}		19,01479687	19,01479687
Overlevelsesfraksjon, SF		0,750551876	0,100662252
se_{SF}		0,189789678	0,019593245

Dato	14.09.2010		
Dag etter forsøksstart	18		
Aktivitet ($\mu\text{Ci/ml}$)	Kontroll	1,67	6,5
Dose (Gy)		22,68	88,2754491
Flaske 1	217	54	0
Flaske 2	187	70	0
Flaske 3	219	54	0
Flaske 4	185	61	0
Flaske 5	169	65	1
Ant. utsådde celler per flaske	200	200	200
Gjennomsnittlig ant. kolonier per flaske, N	195,4	60,8	0,2
se_N	9,744742172	3,120897307	0,2
Antall celler sådd ut ganget med PE, N₀		195,4	195,4
se_{N0}		9,744742172	9,744742172
Overlevelsesfraksjon, SF		0,311156602	0,001023541
se_{SF}		0,022268719	0,001024813

Dato	17.09.2010	
Dag etter forsøksstart	21	
Aktivitet ($\mu\text{Ci/ml}$)	Kontroll	1,67
Dose (Gy)		26,46
Flaske 1	161	31
Flaske 2	106	36
Flaske 3	134	10
Flaske 4	96	30
Flaske 5	121	27
Ant. utsådde celler per flaske	200	200
Gjennomsnittlig ant. kolonier per flaske, N	123,6	26,8
se_N	11,36925679	4,442971978
Antall celler sådd ut ganget med PE, N₀		123,6
se_{N0}		11,36925679
Overlevelsesfraksjon, SF		0,216828479
se_{SF}		0,041108848

Dato	20.09.2010		
Dag etter forsøksstart	24		
Aktivitet ($\mu\text{Ci/ml}$)	Kontroll	1,67	6,5
Dose (Gy)		30,24	117,7005988
Flaske 1	184	53	1
Flaske 2	175	50	0
Flaske 3	182	72	0
Flaske 4	202	37	0
Flaske 5	143	54	0
Ant. utsådde celler per flaske	200	200	2000
Gjennomsnittlig ant. kolonier per flaske, N	177,2	53,2	0,2
se_N	9,640539404	5,598214001	0,2
Antall celler sådd ut ganget med PE, N₀		177,2	1772
se_{N0}		9,640539404	96,40539404
Overlevelsesfraksjon, SF		0,300225734	0,000112867
se_{SF}		0,035565224	0,000113034

Dato	27.09.2010		08.10.2010	
Dag etter forsøksstart	31		42	
Aktivitet ($\mu\text{Ci/ml}$)	Kontroll	1,67	Kontroll	1,67
Dose (Gy)		39,06		52,92
Flaske 1	94	6	123	5
Flaske 2	102	6	102	3
Flaske 3	135	9	97	2
Flaske 4	146	5	101	1
Flaske 5	144	10	110	2
Ant. utsådde celler per flaske	200	200	200	200
Gjennomsnittlig ant. kolonier per flaske, N	124,2	7,2	106,6	2,6
se_N	10,92886087	0,969535971	4,610856753	0,678232998
Antall celler sådd ut ganget med PE, N_0		124,2		106,6
se_{N_0}		10,92886087		4,610856753
Overlevelsesfraksjon, SF		0,057971014		0,024390244
se_{SF}		0,009325169		0,006449282

Dato	11.10.2010		18.10.2010	
Dag etter forsøksstart	45		52	
Aktivitet ($\mu\text{Ci/ml}$)	Kontroll	1,67	Kontroll	1,67
Dose (Gy)		56,7		65,52
Flaske 1	103	1	177	2
Flaske 2	100	2	166	2
Flaske 3	89	4	138	3
Flaske 4	96	1	143	1
Flaske 5	52	0	166	1
Ant. utsådde celler per flaske	200	200	200	200
Gjennomsnittlig ant. kolonier per flaske, N	88	1,6	158	1,8
se_N	9,300537619	0,678232998	7,463243263	0,374165739
Antall celler sådd ut ganget med PE, N_0		88		158
se_{N_0}		9,300537619		7,463243263
Overlevelsesfraksjon, SF		0,018181818		0,011392405
se_{SF}		0,007943133		0,002428509

Dato	25.10.2010		12.11.2010	
Dag etter forsøksstart	59		77	
Aktivitet ($\mu\text{Ci/ml}$)	Kontroll	1,67	Kontroll	1,67
Dose (Gy)		74,34		97,02
Flaske 1	95	20	85	13
Flaske 2	122	11	65	24
Flaske 3	91	24	79	26
Flaske 4	158	5	97	15
Flaske 5	7	19	89	21
Ant. utsådde celler per flaske	200	3000	200	3000
Gjennomsnittlig ant. kolonier per flaske, N	116,5	15,8	83	19,8
se_N	15,45153714	3,42636834	5,366563146	2,517935662
Antall celler sådd ut ganget med PE, N_0		1747,5		1245
se_{N_0}		231,7730571		80,49844719
Overlevelsesfraksjon, SF		0,009041488		0,015903614
se_{SF}		0,002298366		0,002268839

Dato	03.12.2010		17.12.2010	
Dag etter forsøksstart	98		113	
Aktivitet ($\mu\text{Ci/ml}$)	Kontroll	1,67	Kontroll	1,67
Dose (Gy)		123,48		142,38
Flaske 1	154	38	55	230
Flaske 2	131	40	99	227
Flaske 3	135	34	105	211
Flaske 4	190	32	92	210
Flaske 5	147	33	0	227
Ant. utsådde celler per flaske	200	10000	200	10000
Gjennomsnittlig ant. kolonier per flaske, N	151,4	35,4	87,75	221
se_N	10,49094848	1,53622915	11,23517542	4,324349662
Antall celler sådd ut ganget med PE, N_0		7570		4387,5
se_{N_0}		524,547424		561,7587709
Overlevelsesfraksjon, SF		0,004676354		0,05037037
se_{SF}		0,00038234		0,006524108

Dato	07.01.2011		17.01.2011	
Dag etter forsøksstart	134		144	
Aktivitet ($\mu\text{Ci/ml}$)	Kontroll	1,67	Kontroll	1,67
Dose (Gy)		168,84		181,44
Flaske 1	73	147	76	121
Flaske 2	70	152	109	142
Flaske 3	93	141	98	130
Flaske 4	125	137	84	154
Flaske 5	157	148	6	110
Ant. utsådde celler per flaske	200	2000	200	2000
Gjennomsnittlig ant. kolonier per flaske, N	103,6	145	91,75	131,4
se_N	16,56381599	2,664582519	7,33001819	7,717512553
Antall celler sådd ut ganget med PE, N_0		1036		917,5
se_{N_0}		165,6381599		73,3001819
Overlevelsesfraksjon, SF		0,13996139		0,143215259
se_{SF}		0,022524686		0,014200836

Dato	11.02.2011		25.02.2011	
Dag etter forsøksstart	169		183	
Aktivitet ($\mu\text{Ci/ml}$)	Kontroll	1,67	Kontroll	1,67
Dose (Gy)		212,94		230,58
Flaske 1	94	232	41	34
Flaske 2	100	234	40	32
Flaske 3	73	245	27	28
Flaske 4	103	210	48	35
Flaske 5	82	237	37	17
Ant. utsådde celler per flaske	200	2000	200	500
Gjennomsnittlig ant. kolonier per flaske, N	90,4	231,6	38,6	29,2
se_N	5,644466317	5,836094585	3,414674216	3,277193922
Antall celler sådd ut ganget med PE, N_0		904		96,5
se_{N_0}		56,44466317		8,536685539
Overlevelsesfraksjon, SF		0,25619469		0,302590674
se_{SF}		0,017250091		0,043241769

Dato	08.03.2011		25.03.2011	
Dag etter forsøksstart	194		211	
Aktivitet ($\mu\text{Ci/ml}$)	Kontroll	1,67	Kontroll	1,67
Dose (Gy)		244,44		265,86
Flaske 1	122	156	119	149
Flaske 2	151	188	92	107
Flaske 3	135	171	114	104
Flaske 4	134	191	71	123
Flaske 5	166	173	96	136
Ant. utsådde celler per flaske	200	1000	200	1000
Gjennomsnittlig ant. kolonier per flaske, N	141,6	175,8	98,4	123,8
se_N	7,645913941	6,335613625	8,559205571	8,540491789
Antall celler sådd ut ganget med PE, N_0		708		492
se_{N_0}		38,22956971		42,79602785
Overlevelsesfraksjon, SF		0,248305085		0,251626016
se_{SF}		0,016119612		0,027935335

Dato	08.04.2011		19.04.2011	
Dag etter forsøksstart	225		236	
Aktivitet ($\mu\text{Ci/ml}$)	Kontroll	1,67	Kontroll	1,67
Dose (Gy)		283,5		297,36
Flaske 1	54	283	67	111
Flaske 2	61	274	64	119
Flaske 3	45	233	75	147
Flaske 4	54	273	70	122
Flaske 5	0	279	57	145
Ant. utsådde celler per flaske	200	1000	200	500
Gjennomsnittlig ant. kolonier per flaske, N	53,5	268,4	66,6	128,8
se_N	3,278719262	9,031057524	3,009983389	7,255342859
Antall celler sådd ut ganget med PE, N_0		267,5		166,5
se_{N_0}		16,39359631		7,524958472
Overlevelsesfraksjon, SF		1,003364486		0,773573574
se_{SF}		0,070149157		0,055867256

Dato	02.05.2011		16.05.2011	
Dag etter forsøksstart	249		263	
Aktivitet ($\mu\text{Ci/ml}$)	Kontroll	1,67	Kontroll	1,67
Dose (Gy)		313,74		331,38
Flaske 1	128	97	123	53
Flaske 2	113	106	141	76
Flaske 3	126	107	109	67
Flaske 4	135	98	121	78
Flaske 5	117	21	121	74
Ant. utsådde celler per flaske	200	500	200	400
Gjennomsnittlig ant. kolonier per flaske, N	123,8	102	123	69,6
se_N	3,942080669	2,614064524	5,138093031	4,545327271
Antall celler sådd ut ganget med PE, N_0		309,5		246
se_{N_0}		9,855201672		10,27618606
Overlevelsesfraksjon, SF		0,329563813		0,282926829
se_{SF}		0,013470788		0,021933532

Dato	30.05.2011		04.07.2011	
	277		312	
Dag etter forsøksstart				
Aktivitet ($\mu\text{Ci/ml}$)	Kontroll	1,67	Kontroll	1,67
Dose (Gy)	349,02		393,12	
Flaske 1	115	117	50	99
Flaske 2	124	126	65	107
Flaske 3	114	111	52	129
Flaske 4	111	110	70	0
Flaske 5	121	88	58	0
Ant. utsådde celler per flaske	200	400	200	400
Gjennomsnittlig ant. kolonier per flaske, N	117	110,4	59	67
se _N	2,387467277	6,28171951	3,794733192	27,79028607
Antall celler sådd ut ganget med PE, N ₀		234		118
se _{N0}		4,774934555		7,589466384
Overlevelsesfraksjon, SF		0,471794872		0,56779661
se _{SF}		0,028519058		0,238325492

Rådata fra celleoverlevelsesforsøk utført på T98G-celler bestrålt ved bruk av [³H]- medium med spesifikk aktivitet på 0.28 og 0.53 µCi/ml:

Dato	15.11.2010			22.11.2010		
	0			7		
	Kontroll	0,28	0,56	Kontroll	0,28	0,56
Dag etter forsøksstart						
Aktivitet (µCi/ml)						
Dose (Gy)		0	0		1,47	2,94
Flaske 1	130	130	130	114	102	87
Flaske 2	104	104	104	135	52	59
Flaske 3	121	121	121	130	80	66
Flaske 4	195	195	195	137	96	91
Flaske 5	98	98	98	0	100	97
Ant. utsådde celler per flaske	200	200	200	200	200	200
Gjennomsnittlig ant. kolonier per flaske, N	137,5	137,5	137,5	103,2	86	80
se _N	19,91021513	19,91021513	19,91021513	5,212165257	9,338094024	7,402702209
Antall celler sådd ut ganget med PE, N ₀		137,5	137,5		103,2	103,2
se _{N0}		19,91021513	19,91021513		5,212165257	5,212165257
Overlevelsesfraksjon, SF		1	1		0,833333333	0,775193798
se _{SF}		0,204780337	0,204780337		0,09979479	0,081720661

Dato	06.12.2010			20.12.2010		
	21			36		
	Kontroll	0,28	0,56	Kontroll	0,28	0,56
Dag etter forsøksstart						
Aktivitet (µCi/ml)						
Dose (Gy)		4,41	8,82		7,56	15,12
Flaske 1	112	50	63	74	94	93
Flaske 2	111	59	66	70	108	97
Flaske 3	106	49	49	79	100	99
Flaske 4	94	75	55	66	86	100
Flaske 5	73	59	64	2	81	99
Ant. utsådde celler per flaske	200	200	200	200	200	200
Gjennomsnittlig ant. kolonier per flaske, N	99,2	58,4	59,4	72,25	93,8	97,6
se _N	7,289718787	4,664761516	3,203123476	2,780137886	4,820788317	1,2489996
Antall celler sådd ut ganget med PE, N ₀		99,2	99,2		72,25	72,25
se _{N0}		7,289718787	7,289718787		2,780137886	2,780137886
Overlevelsesfraksjon, SF		0,588709677	0,598790323		1,298269896	1,350865052
se _{SF}		0,063896671	0,054578422		0,083353001	0,054779735

Dato	04.01.2011			17.01.2011		
	51			64		
Dag etter forsøksstart						
Aktivitet ($\mu\text{Ci/ml}$)	Kontroll	0,28	0,56	Kontroll	0,28	0,56
Dose (Gy)		10,71	21,42		13,44	26,88
Flaske 1	53	53	38	62	47	69
Flaske 2	37	59	41	83	43	56
Flaske 3	47	56	38	92	60	58
Flaske 4	38	57	28	72	51	60
Flaske 5	59	47	32	71	0	49
Ant. utsådde celler per flaske	200	200	200	200	200	200
Gjennomsnittlig ant. kolonier per flaske, N	46,8	54,4	35,4	76	50,25	58,4
se_N	4,247352116	2,088061302	2,357965225	5,205766034	3,63719214	3,234192326
Antall celler sådd ut ganget med PE, N_0		46,8	46,8		76	76
se_{N_0}		4,247352116	4,247352116		5,205766034	5,205766034
Overlevelsesfraksjon, SF		1,162393162	0,756410256		0,661184211	0,768421053
se_{SF}		0,114540454	0,085153535		0,065889826	0,067685522

Dato	31.01.2011			15.02.2011		
	78			93		
Dag etter forsøksstart						
Aktivitet ($\mu\text{Ci/ml}$)	Kontroll	0,28	0,56	Kontroll	0,28	0,56
Dose (Gy)		16,38	32,76		19,53	39,06
Flaske 1	72	64	66	118	67	59
Flaske 2	81	56	53	90	78	72
Flaske 3	70	60	59	118	79	49
Flaske 4	76	74	55	90	59	60
Flaske 5	70	3	61	97	81	62
Ant. utsådde celler per flaske	200	200	200	200	200	200
Gjennomsnittlig ant. kolonier per flaske, N	73,8	63,5	58,8	102,6	72,8	60,4
se_N	2,107130751	3,862210075	2,289104628	6,415605973	4,223742416	3,668787266
Antall celler sådd ut ganget med PE, N_0		73,8	73,8		102,6	102,6
se_{N_0}		2,107130751	2,107130751		6,415605973	6,415605973
Overlevelsesfraksjon, SF		0,860433604	0,796747967		0,709551657	0,588693957
se_{SF}		0,057812893	0,03846555		0,060525107	0,051319685

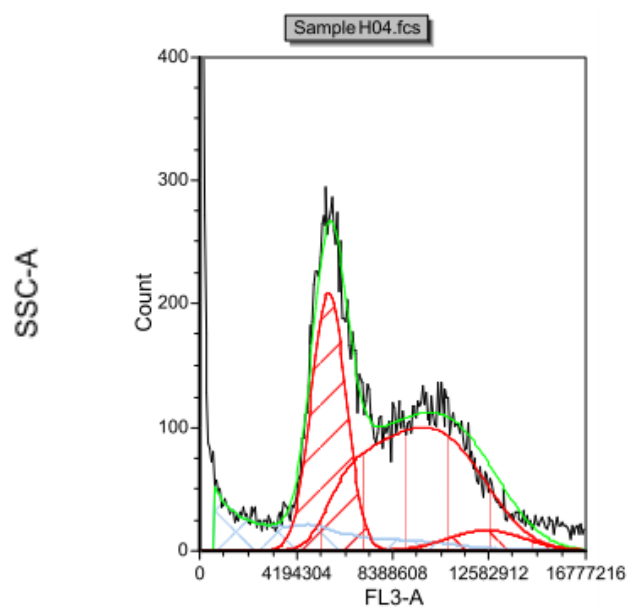
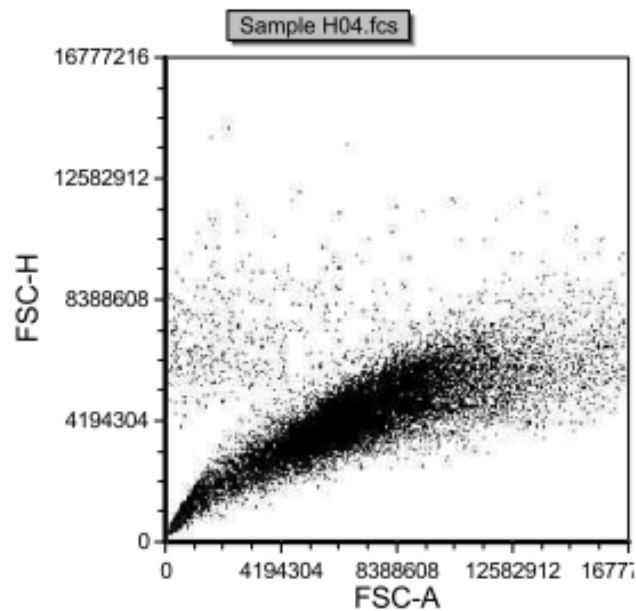
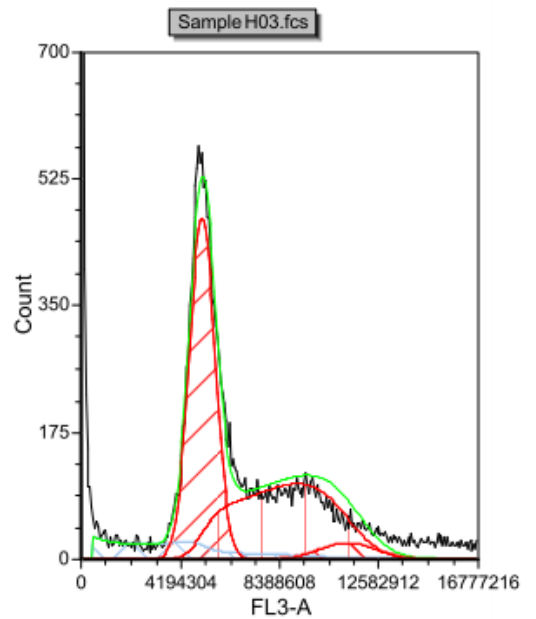
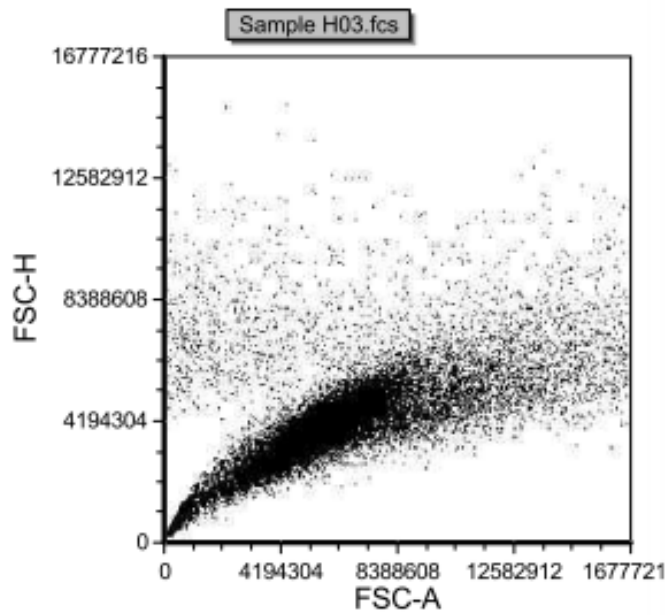
Dato	07.03.2011			21.03.2011	
	113			127	
Dag etter forsøksstart					
Aktivitet ($\mu\text{Ci/ml}$)	Kontroll	0,28	0,56	Kontroll	0,56
Dose (Gy)		23,73	47,46		53,34
Flaske 1	95	62	110	94	54
Flaske 2	97	72	80	89	78
Flaske 3	74	68	87	75	53
Flaske 4	112	52	109	82	63
Flaske 5	30	54	96	73	66
Ant. utsådde celler per flaske	200	200	200	200	200
Gjennomsnittlig ant. kolonier per flaske, N	94,5	61,6	96,4	82,6	62,8
se_N	7,815582725	3,867815921	5,921148537	4,007492982	4,554119015
Antall celler sådd ut ganget med PE, N_0		94,5	94,5		82,6
se_{N_0}		7,815582725	7,815582725		4,007492982
Overlevelsesfraksjon, SF		0,651851852	1,02010582		0,760290557
se_{SF}		0,067687631	0,105089695		0,066336038

Dato	04.04.2011			18.04.2011		
	141			155		
Dag etter forsøksstart						
Aktivitet ($\mu\text{Ci/ml}$)	Kontroll	0,28	0,56	Kontroll	0,28	0,56
Dose (Gy)		29,61	59,22		32,55	65,1
Flaske 1	52	62	70	94	89	40
Flaske 2	62	55	76	89	97	32
Flaske 3	54	56	55	75	101	35
Flaske 4	55	60	75	82	94	29
Flaske 5	112	70	68	73	95	30
Ant. utsådde celler per flaske	200	200	200	200	200	200
Gjennomsnittlig ant. kolonier per flaske, N	67	60,6	68,8	82,6	95,2	33,2
se_N	11,37541208	2,675817632	3,760319135	4,007492982	1,959591794	1,984943324
Antall celler sådd ut ganget med PE, N_0		67	67		82,6	137,5
se_{N_0}		11,37541208	11,37541208		4,007492982	4,007492982
Overlevelsesfraksjon, SF		0,904477612	1,026865672		1,152542373	0,241454545
se_{SF}		0,158672596	0,1831546		0,060742209	0,016059892

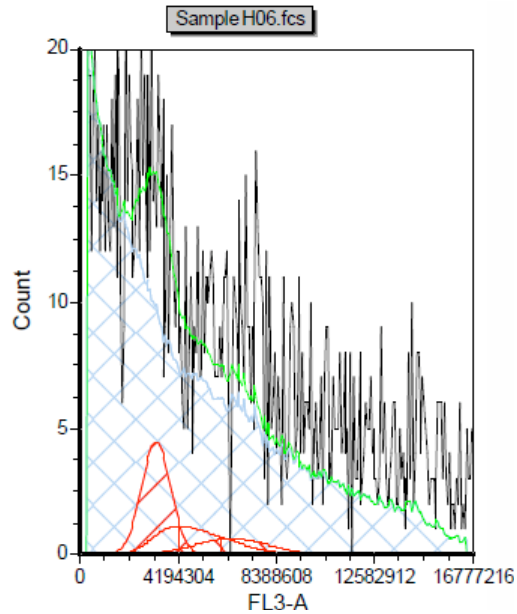
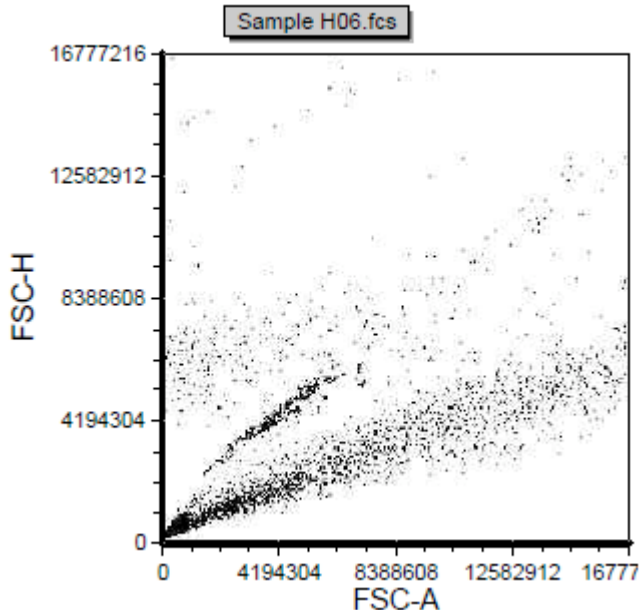
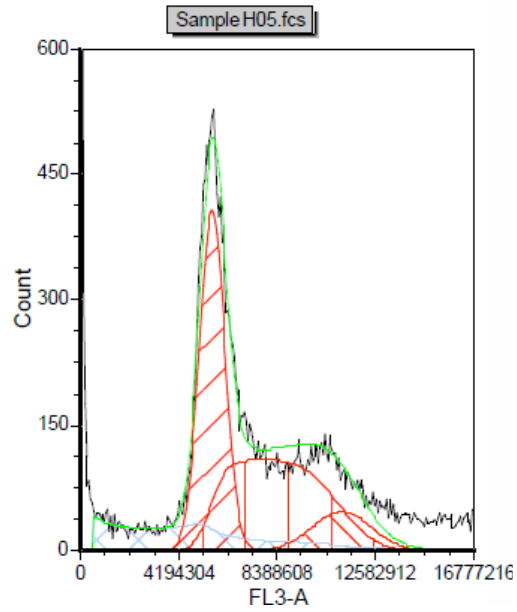
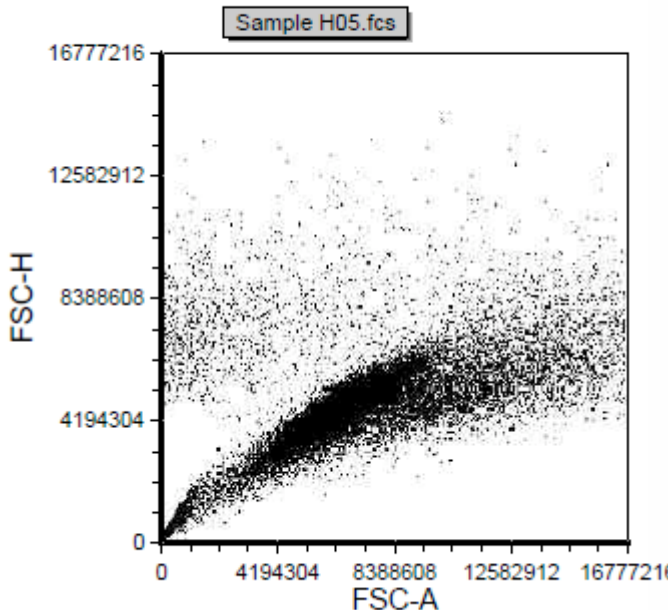
Vedlegg G:

Flowcytometridata

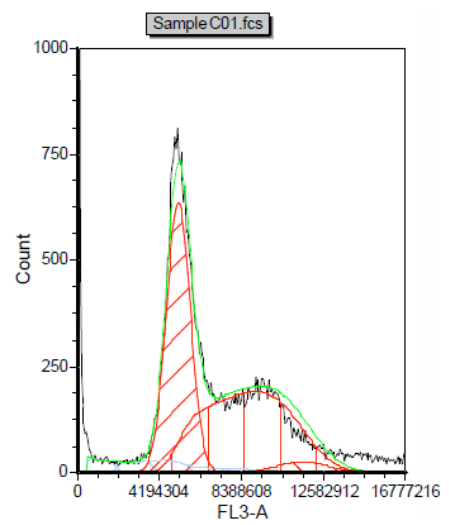
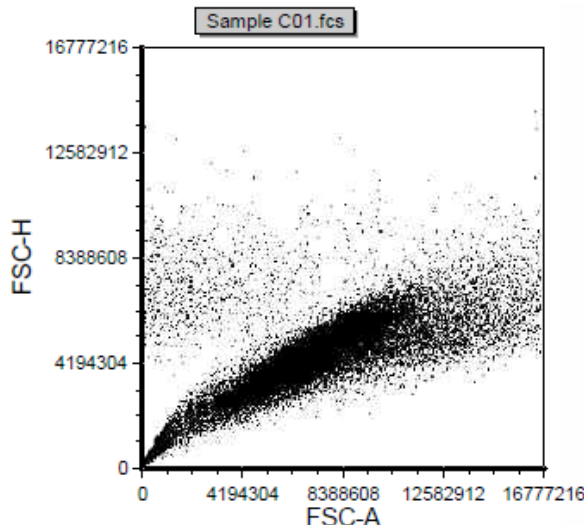
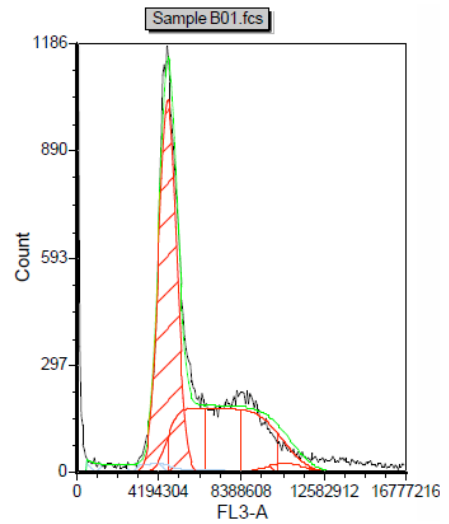
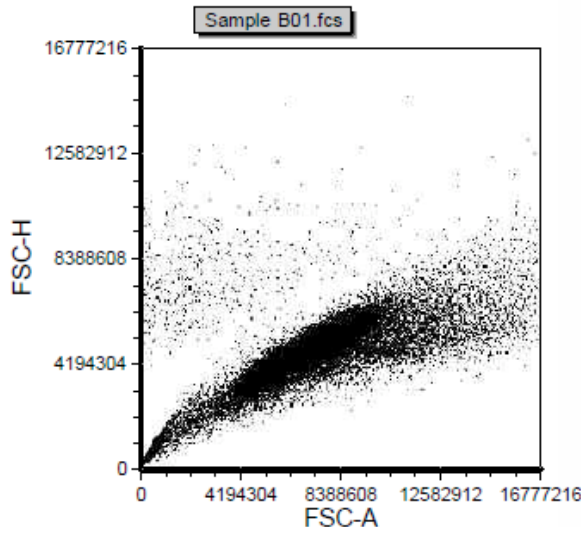
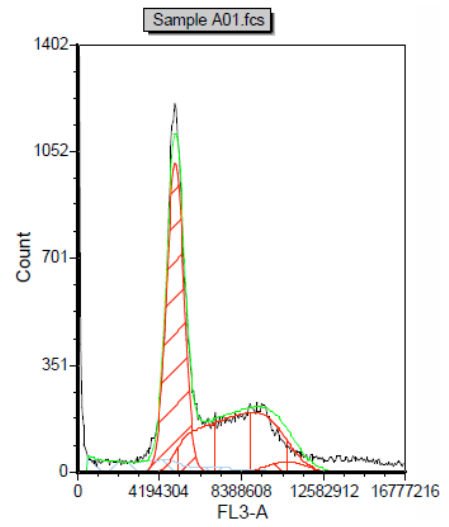
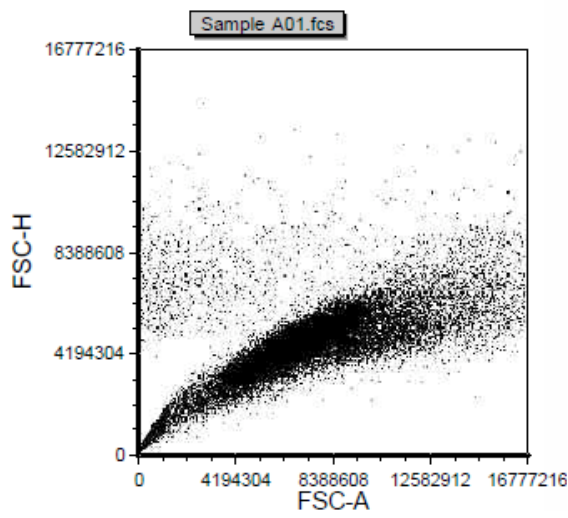
Dot-plot og DNA-histogrammer for ubestrålte T98G-celler og T98G-celler bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 19.5 µCi/ml i 4 dager:



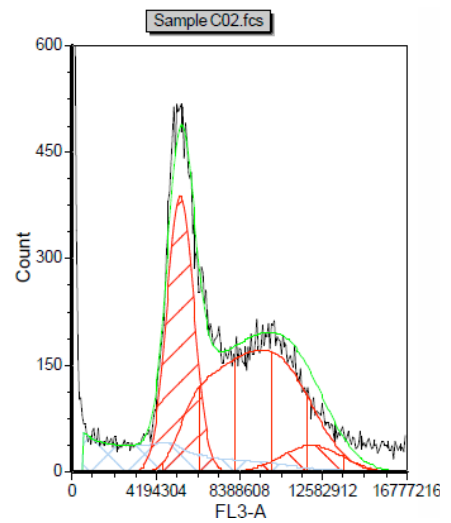
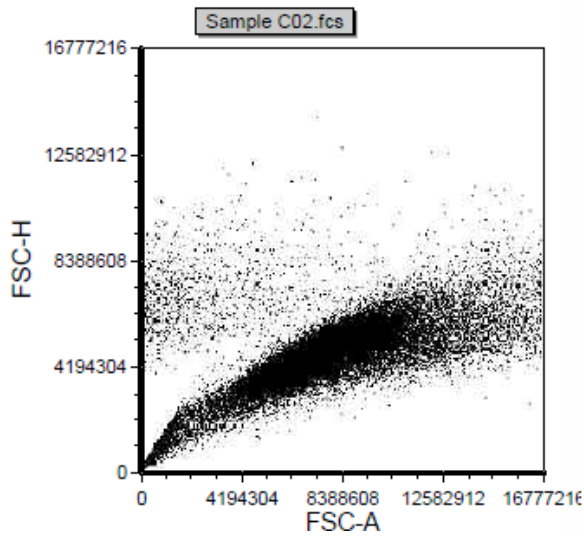
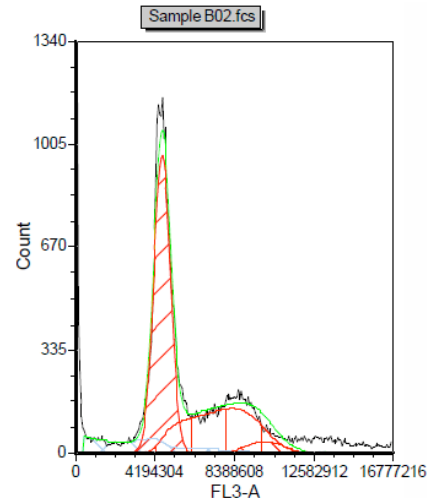
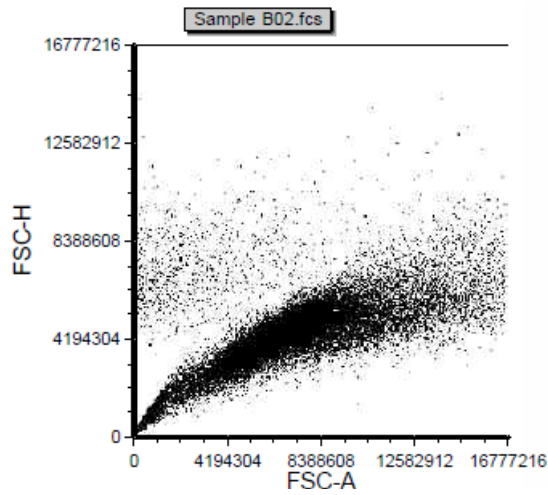
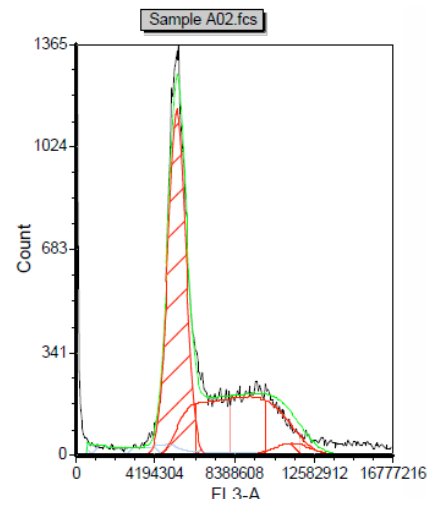
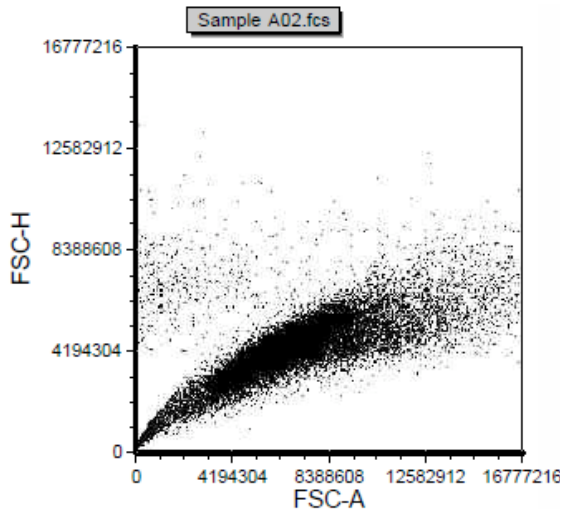
Dot-plot og DNA-histogrammer for ubestrålte T98G-celler og T98G-celler bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 19.5 µCi/ml i 7 dager:



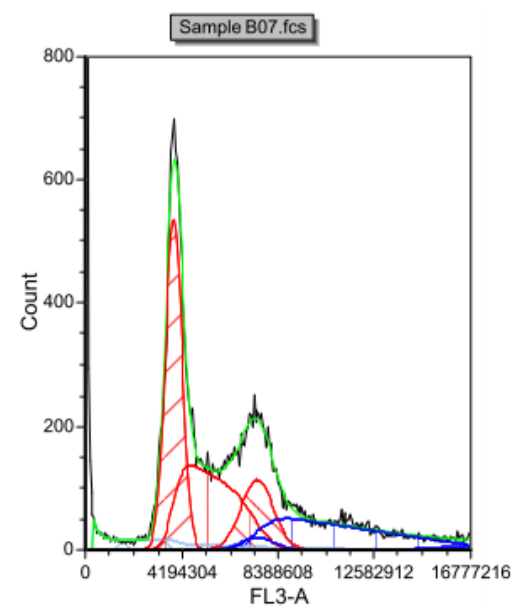
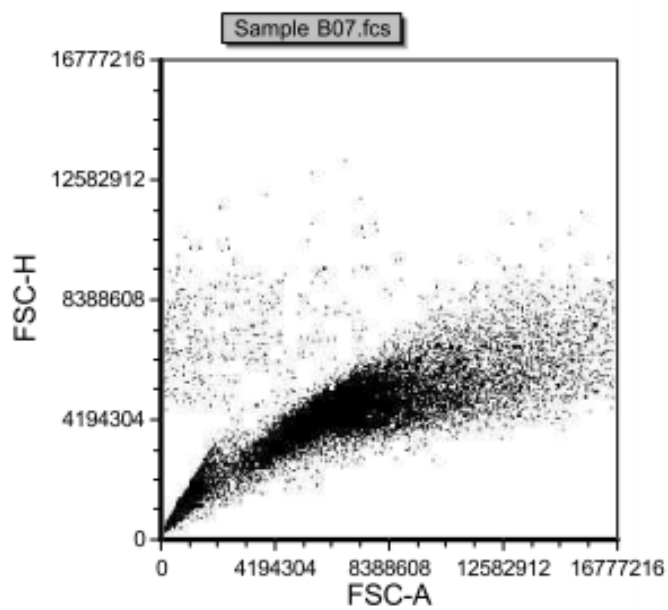
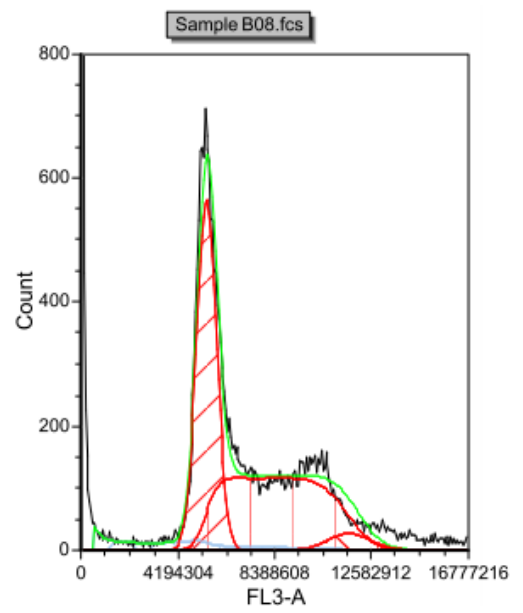
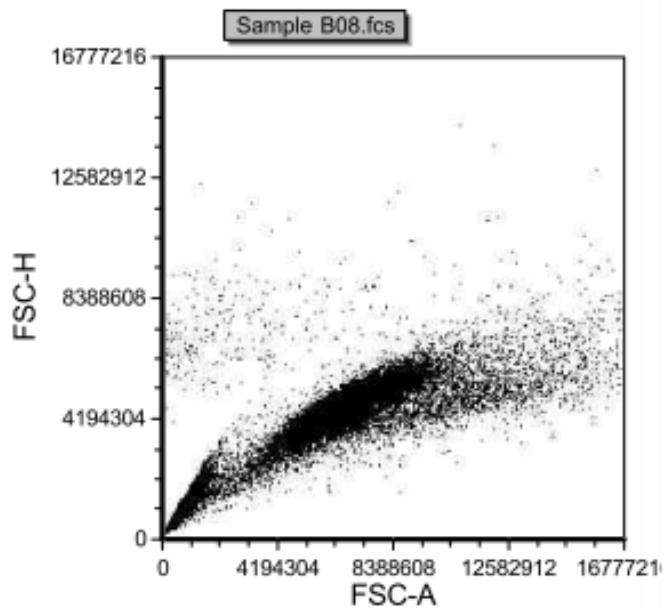
Dot-plot og DNA-histogrammer for ubestrålte T98G-celler og T98G-celler bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på hhv. 1.67 og 6.5 µCi/ml i 4 dager:



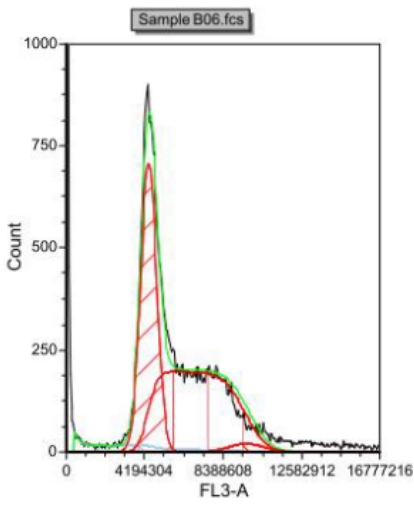
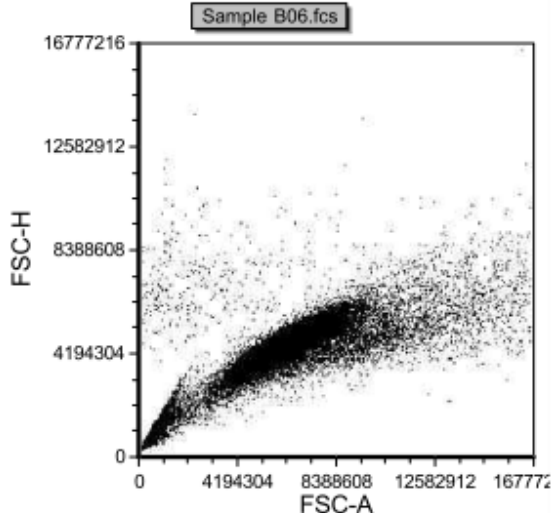
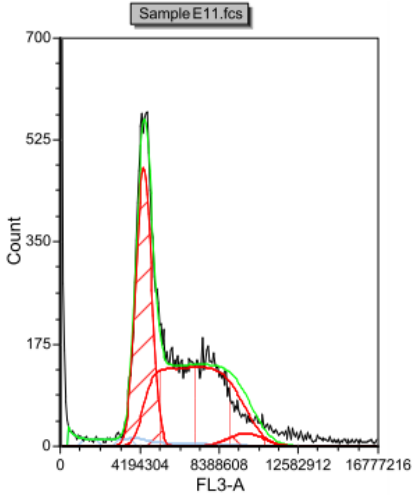
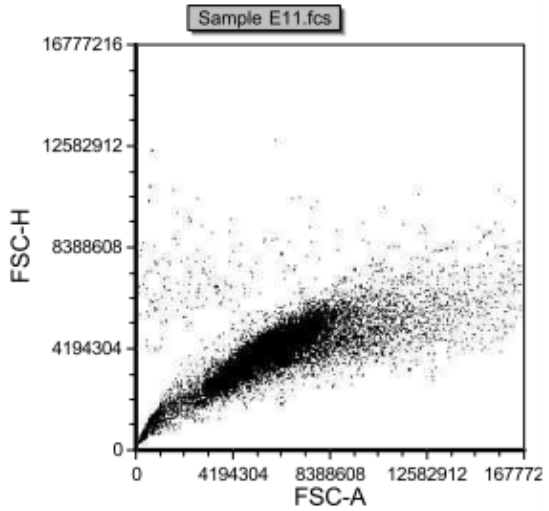
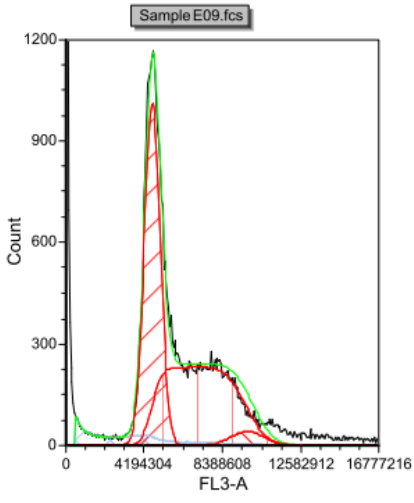
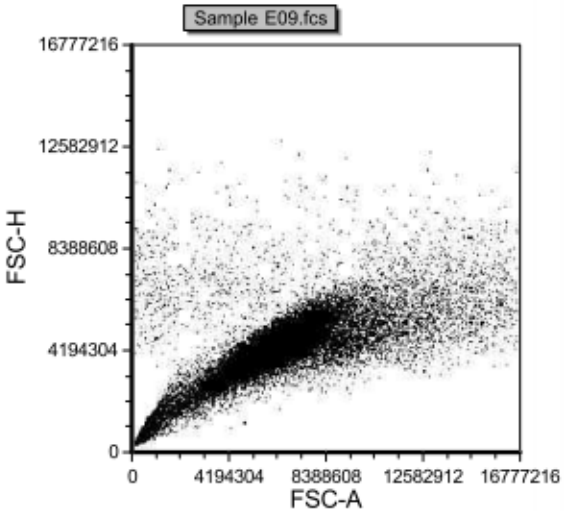
Dot-plot og DNA-histogrammer for ubestrålte T98G-celler og T98G-celler bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på hhv. 1.67 og 6.5 µCi/ml i 11 dager:



Dot-plot og DNA-histogrammer for ubestrålte T98G-celler og T98G-celler bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 195 dager:



Dot-plot og DNA-histogrammer for ubestrålte T98G-celler og T98G-celler bestrålt ved bruk av [³H]-medium med spesifikk aktivitet på hhv. 0.28 og 0.53 μCi/ml i 4 dager:



Vedlegg H:

Akuttbestrålingsforsøk

Det ble utført 3 akuttbestrålingsforsøk på T98G-celler (kontroll). Beregningen av overlevelsesfraksjonen for disse 3 forsøkene følger nedenfor:

Dato: 23. mai 2011

Multiplisitet, M: 1,06372549

Plating efficiency, PE: 0,445714286

Dose (Gy)	Kontroll	0,11	0,54	1,09	2,72	4,89	6,54
Flaske 1	89	86	26	42	5	272	725
Flaske 2	99	90	76	36	2	295	756
Flaske 3	81	90	60	0	0	241	696
Flaske 4	77	89	62	0	0	321	748
Flaske 5	82	78	74	0	0	297	697
Flaske 6	100						
Flaske 7	96						
Flaske 8	0						
Flaske 9	0						
Flaske 10	0						
Ant. utsådde celler per flaske	200	200	200	200	200	3500	25000
Gjennomsnittlig ant. kolonier per flaske, N	89,14285714	86,6	59,6	39	3,5	285,2	724,4
se _N	3,541781711	2,271563338	8,975522269	3	1,5	13,49962962	12,47637768
Antall celler sådd ut ganget med PE, N ₀	89,14285714	89,14285714	89,14285714	89,14285714	89,14285714	1560	11142,85714
se _{N0}		3,541781711	3,541781711	3,541781711	3,541781711	61,98117994	442,7227139
Overlevelsesfraksjon, SF		0,971474359	0,668589744	0,4375	0,039262821	0,182820513	0,065010256
se _{SF}		0,046251102	0,104132188	0,037877885	0,016899078	0,01129809	0,002815198
Singelcelleoverlevelse, f	1	0,969595742	0,654173084	0,421956763	0,036992651	0,173675135	0,061341049
se _f	0	0,049195473	0,106219346	0,037504836	0,015957419	0,01084696	0,00266614

Dato: 10. juni 2011

Multiplisitet, M: 1,035087719

Plating efficiency, PE: 0,6915

Dose (Gy)	Kontroll	0,11	0,54	1,09	2,72	4,89	6,52
Flaske 1	134	129	105	97	228	321	466
Flaske 2	131	127	158	97	158	313	444
Flaske 3	149	131	126	120	207	289	470
Flaske 4	89	141	145	114	197	273	478
Flaske 5	133	128	151	114	5	349	527
Flaske 6	149						
Flaske 7	150						
Flaske 8	136						
Flaske 9	155						
Flaske 10	157						
Ant. utsådde celler per flaske	200	200	200	200	800	3500	10000
Gjennomsnittlig ant. kolonier per flaske, N	138,3	131,2	137	108,4	197,5	309	477
se _N	6,26285345	2,537715508	9,6072889	4,781213235	14,66571967	13,14534138	13,7113092
Antall celler sådd ut ganget med PE, N ₀	138,3	138,3	138,3	138,3	553,2	2420,25	6915
se _{N0}		6,26285345	6,26285345	6,26285345	25,0514138	109,5999354	313,1426725
Overlevelsesfraksjon, SF		0,948662328	0,990600145	0,783803326	0,357013738	0,127672761	0,068980477
se _{SF}		0,046714438	0,082692117	0,049548087	0,031051503	0,007932656	0,003699926
Singelcelleoverlevelse, f	1	0,946898043	0,99026178	0,777738007	0,349041405	0,123864957	0,066793388
se _f	0	0,048226894	0,085638452	0,050532995	0,030726004	0,007728655	0,003590765

Dato: 14. juni 2011

Multiplisitet, M: 1,318627451

Plating efficiency, PE: 0,8455

Dose (Gy)	Kontroll	0,11	0,54	1,09	2,72	4,89	6,52
Flaske 1	152	151	126	87	233	360	473
Flaske 2	180	114	140	101	240	345	471
Flaske 3	181	144	139	112	186	345	402
Flaske 4	190	140	152	112	222	332	440
Flaske 5	194	127	142	91	228	353	438
Flaske 6	142						
Flaske 7	186						
Flaske 8	152						
Flaske 9	144						
Flaske 10	170						
Ant. utsådde celler per flaske	200	200	200	200	800	3500	10000
Gjennomsnittlig ant. kolonier per flaske, N	169,1	135,2	139,8	100,6	221,8	347	444,8
se _N	6,28304597	6,583312236	4,152107898	5,182663408	9,425497334	4,679743583	13,0053835
Antall celler sådd ut ganget med PE, N ₀	169,1	169,1	169,1	169,1	676,4	2959,25	8455
se _{N0}		6,28304597	6,28304597	6,28304597	25,13218388	109,9533045	314,1522985
Overlevelsesfraksjon, SF		0,799526907	0,826729746	0,594914252	0,327912478	0,117259441	0,052607924
se _{SF}		0,048971106	0,03932544	0,037788105	0,018510127	0,004634988	0,002487335
Singelcelleoverlevelse, f	1	0,737903789	0,770363391	0,515332292	0,26574102	0,090922974	0,04028818
se _f	0	0,057722084	0,047511156	0,038160961	0,01610581	0,00367656	0,001923762

Det ble utført 3 akuttbestrålingsforsøk på T98G-celler bestrålt ved bruk av [³H]- medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 11 måneder. Beregningen av overlevelsesfraksjonen for disse 3 forsøkene følger nedenfor:

Dato: 11. juli 2011

Multiplisitet, M: 1,025974026

Plating efficiency, PE: 0,036875

Dose (Gy)	Kontroll	0,11	0,54	1,09	2,72	4,89	6,52
Flaske 1	27	10	3	1	10	48	65
Flaske 2	26	16	3	7	11	62	51
Flaske 3	11	11	5	9	18	47	68
Flaske 4	9	6	16	9	19	76	83
Flaske 5	8	4	5	8	9	47	78
Flaske 6	16						
Flaske 7	11						
Flaske 8	10						
Flaske 9	0						
Flaske 10	1						
Ant. utsådde celler per flaske	400	400	400	400	1600	5000	10000
Gjennomsnittlig ant. kolonier per flaske, N	14,75	12,33333333	6,4	6,8	13,4	56	69
se _N	6,493506494	1,855921454	2,441311123	1,496662955	2,111871208	5,753259945	5,558776844
Antall celler sådd ut ganget med PE, N ₀	14,75	14,75	14,75	14,75	59	184,375	368,75
se _{N0}		6,493506494	6,493506494	6,493506494	25,97402597	81,16883117	162,3376623
Overlevelsesfraksjon, SF		0,836158192	0,433898305	0,461016949	0,227118644	0,303728814	0,187118644
se _{SF}		0,389018969	0,252749793	0,226908479	0,10620019	0,137305616	0,083744633
Singelcelleoverlevelse, f	1	0,832536914	0,42754117	0,454577033	0,22262352	0,298292088	0,183231432
se _f	0	0,395857263	0,251801986	0,226374319	0,10469167	0,135881802	0,082388882

Dato: 25. juli 2011

Multiplisitet, M: 1,05982906

Plating efficiency, PE: 0,194

Dose (Gy)	Kontroll	0,11	0,54	1,09	2,72	4,89	6,52
Flaske 1	74	85	58	81	140	164	141
Flaske 2	70	72	67	57	124	164	148
Flaske 3	61	68	66	58	142	166	143
Flaske 4	80	71	83	44	97	162	132
Flaske 5	72	0	73	0	130	0	128
Flaske 6	82						
Flaske 7	81						
Flaske 8	78						
Flaske 9	86						
Flaske 10	92						
Ant. utsådde celler per flaske	400	400	400	400	1600	5000	10000
Gjennomsnittlig ant. kolonier per flaske, N	77,6	74	69,4	60	126,6	164	138,4
se _N	2,773685875	3,763863264	4,154515616	7,691987173	8,096912992	0,816496581	3,668787266
Antall celler sådd ut ganget med PE, N ₀	77,6	77,6	77,6	77,6	310,4	970	1940
se _{N0}		2,773685875	2,773685875	2,773685875	11,0947435	34,67107344	69,34214688
Overlevelsesfraksjon, SF		0,953608247	0,894329897	0,773195876	0,407860825	0,169072165	0,071340206
se _{SF}		0,059282193	0,062354794	0,102904134	0,02988271	0,006101551	0,003174674
Singelcelleoverlevelse, f	1	0,950810023	0,888398027	0,762356708	0,393581123	0,160990885	0,067570683
se _f	0	0,062662395	0,065393978	0,106239316	0,029506972	0,005863689	0,003018487

Dato: 25. juli 2011

Multiplisitet, M: 1,084033613

Plating efficiency, PE: 0,1121875

Dose (Gy)	Kontroll	0,11	0,54	1,09	2,72	4,89	6,52
Flaske 1	57	45	44	36	47	85	48
Flaske 2	51	53	49	27	48	74	61
Flaske 3	29	44	25	46	11	0	65
Flaske 4	46	52	18	42	0	0	52
Flaske 5	45	27	5	43	0	2	2
Flaske 6	46						
Flaske 7	55						
Flaske 8	30						
Flaske 9	4						
Flaske 10	0						
Ant. utsådde celler per flaske	400	400	400	400	1600	5000	10000
Gjennomsnittlig ant. kolonier per flaske, N	44,875	44,2	34	38,8	35,33333333	79,5	56,5
se _N	3,690903393	4,662617291	7,427426652	3,367491648	12,17009084	5,5	3,92640633
Antall celler sådd ut ganget med PE, N ₀	44,875	44,875	44,875	44,875	179,5	560,9375	1121,875
se _{N0}		3,690903393	3,690903393	3,690903393	14,76361357	46,13629241	92,27258483
Overlevelsesfraksjon, SF		0,984958217	0,757660167	0,864623955	0,196843083	0,141727019	0,050362117
se _{SF}		0,131751807	0,176856212	0,103384965	0,069706176	0,015232211	0,005422816
Singelcelleoverlevelse, f	1	0,983602904	0,741555027	0,854155566	0,184214549	0,132093031	0,046626607
se _f	0	0,143407667	0,18433995	0,109928099	0,066193098	0,014345202	0,005038868

Vedlegg I

Degradering av radioaktivitet

Forsøk 1, som viser aktiviteten per celle for T98G-celler som hadde vokst på [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 11 måneder som funksjon av tiden etter at cellene ble tilsatt RPMI-medium:

Ant. dager etter mediumskift	Aktivitet per celle (Bq/celle)
0	$(3.71 \pm 0.11) \times 10^{-2}$
2	$(2.76 \pm 0.20) \times 10^{-2}$

Forsøk 2, som viser aktiviteten per celle for T98G-celler som hadde vokst på [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 11 måneder som funksjon av tiden etter at cellene ble tilsatt KV-medium:

Ant. dager etter mediumskift	Aktivitet per celle (Bq/celle)
0	$(3.71 \pm 0.11) \times 10^{-2}$
2	$(2.99 \pm 0.10) \times 10^{-3}$
5	$(2.89 \pm 0.37) \times 10^{-4}$
7	$(1.46 \pm 0.13) \times 10^{-4}$
9	$(2.21 \pm 0.29) \times 10^{-5}$

Forsøk 3, som viser aktiviteten per celle for T98G-celler som hadde vokst på [³H]-medium med spesifikk aktivitet på 1.67 µCi/ml i 11 måneder som funksjon av tiden etter at cellene ble tilsatt KV-medium:

Ant. dager etter mediumskift	Aktivitet per celle (Bq/celle)
0	$(3.71 \pm 0.11) \times 10^{-2}$
4	$(8.80 \pm 0.95) \times 10^{-4}$
8	$(6.35 \pm 0.81) \times 10^{-5}$
11	$(6.43 \pm 0.76) \times 10^{-5}$
16	$(8.00 \pm 0.68) \times 10^{-6}$
18	$(5.29 \pm 0.57) \times 10^{-6}$
25	$(7.14 \pm 0.51) \times 10^{-6}$
32	$(1.36 \pm 0.32) \times 10^{-6}$