



**Fysisk institutt,  
Universitetet i Oslo  
og  
Algeta ASA, Oslo**

**Cellulære effekter av  
alfapartikkelstråling fra radium-223,  
Alpharadin™**

**Helene Heier-Baardson**

**Masteroppgave  
Fysisk institutt  
Universitetet i Oslo  
Juni 2008**



# Forord

Arbeidet med denne Mastergraden i biofysikk ved Universitetet i Oslo har blitt utført ved preklinisk avdeling hos legemiddelselskapet Algeta ASA på Kjelsås i Oslo.

Jeg synes det virkelig har vært en spennende erfaring å få gjøre masteroppgaven i en legemiddelbedrift som Algeta ASA. Dette skyldes i særlig grad det faktum at denne bedriften forsket på alfapartikkelstråling og dens kliniske anvendelse. Tiden ved Algeta ASA har vært lærerik og givende, mye pga. min engasjerte hovedveileder. Jeg vil derfor først og fremst takke veilederen min Dr. Philos. John Michael Dornish for hans tålmodige, svært kreative og inspirerende veiledning. Jeg vil også takke internveileder, Dr. Philos. Erik Olai Pettersen ved fysisk institutt, for hans lærerike, engasjerende og konstruktive veiledning.

Ellers vil jeg spesielt takke alle ved preklinisk og QC-avdeling i Algeta ASA for all praktisk hjelp gjennom det eksperimentelle arbeidet.

En takk rettes også til alle de ansatte i Algeta ASA for et hyggelig miljø under masterstudiet. I tillegg vil jeg takke mine korrekturlesere Bjørn Erik Mørk og Haakon Heier-Baardson.

Sist, men ikke minst, vil jeg takke min familie og venner for deres støtte. Jeg vil spesielt min ektemann Haakon for hans evige optimisme og tro på at alt går bra til slutt.

Det skal også nevnes at denne oppgaven ikke har blitt økonomisk sponset av Algeta ASA. Forsøkene har vært gjennomført i samarbeid med forskere fra institusjonen og med bruk av Algeta ASAs utstyr, men tolkningen av resultatene har ikke hatt noen påvirkning av dette.

Oslo, mai 2008

Helene Heier-Baardson



## Sammendrag

Hovedmålet med denne oppgaven var å undersøke  $\alpha$ -emitteren, radium-223s, cellulære effekter.  $^{223}\text{Ra}$  er virkestoffet i legemiddelet Alphasar™ som for tiden utprøves i klinikk under en fase III studie. Legemiddelets alfapartikkelteknologi er basert på tidligere data funnet for  $\alpha$ -emitterende nuklider med forholdsvis lang levetid.  $^{223}\text{Ra}$  er derimot en kortlivet radionuklide med en fysisk halveringstid på 11,4 dager. Dette fører til at resultatene fra denne oppgaven også blir med i preklinisk dokumentasjon for legemiddelet Alphasar™. Tidligere forskning har vist at  $\alpha$ -partikler inducerer celledød svært effektivt, og at det dannes store og komplekse skader i DNA-molekylet som vanskelig lar seg reparere (Kassis og Adelstein, 2005). Tidligere er det blitt observert en rett overlevelseskurve og doserateuavhengighet (Hall og Giaccia, 2006). Man har også sett at  $\alpha$ -partikkelen inducerer opphopning av celler i  $G_2$ -fase svært effektivt (Lücke-Huhle, 1982), og at dens effekter på celleoverlevelse er relativt uavhengig av hvilken cellesyklusfase cellen er i under bestråling (Bird og Burki, 1975).

De cellulære effektene av alfapartikkelstråling fra  $^{223}\text{Ra}$  ble funnet ved å behandle livmorhalskreftceller fra cellelinjen NHIK 3025 med ulike mengder Alphasar™ i vekstmediet. Resultatene ble hovedsakelig funnet gjennom koloniforsøk og flowcytometri med DNA-farging. Dosene gitt i forsøkene ligger mellom 0,08 og 2,2 Gy, gitt ved doserater mellom 0,015 og 0,36 Gy/t.

Alfapartikkelstråling fra  $^{223}\text{Ra}$  viste seg å inducere celledød slik at sannsynligheten for at cellen skulle overleve falt eksponensielt med økende stråledose. Overlevelseskurven ble rett i et enkeltlogaritmisk plott og harmonerer med at  $\beta$ -leddet er null i  $\alpha\beta$ -modellen til Chadwick og Leenhouts (1973). Dette indikerer at alfapartikkelstråling er effektiv med hensyn på å inducere dobbeltrådbrudd i DNA-molekylene. Disse dobbeltrådbruddene er vanskeligere og reparere og kan ofte være dødelige for cellen (Hall og Giaccia, 2006).

Ved å bestråle cellene med flere ulike doserater ble det ikke funnet noen doserateeffekt. Med andre ord betyr dette at en lavere doserate ikke førte til noen økning i overlevelsesgrad. Dette indikerer at skadene induisert av denne type stråling ikke blir reparert under bestråling. Muligens er skadene i DNA-molekylet for store og komplekse.

Etter bestråling ble det observert en opphopning av cellene i  $G_2/M$ -fase. Denne var maksimal omtrent 24 timer etter startet behandling. Opphopningen av celler viste seg å være svært avhengig av behandlingstid og tidspunkt for analyse. Muligens er det, for doseratene brukt i våre forsøk, en doseuavhengig opphopning av celler i  $G_2/M$ -fase, med en nedre dosegrense for dette mellom 0,43 og 0,87 Gy. Opphopningen av celler i  $G_2/M$ -fase gikk litt ned 24 timer etter avsluttet behandling, mens andelen celler i  $G_1$ - og S-fase gikk tilsvarende opp. Dette kan indikere en reparasjon av DNA-skader i løpet av denne perioden. Prøver analysert 48 timer etter avsluttet behandling viste at  $G_2/M$ -oppnopningen var vedvarende for cellene som hadde fått de høyeste dosene ( $>1,7$  Gy). Videre ble også en endring i morfologien til de behandlede cellene observert. Cellene vokste og ble til "kjempeceller" med flere kjerner. Disse resultatene viser at cellene ikke dør rett etter behandling.

Forsøkene utført med synkroniserte celler viste at alfapartikkelstrålingens evne til å indukere celledød var relativt uavhengig av hvilken fase cellene ble bestrålt i. Cellene viste seg å ikke være spesielt sensitive eller resistente mot stråling i noen spesiell cellesyklusfase, slik som det er observert for annen type stråling som f.eks. røntgenstråling (Pettersen *et al.*, 1977).

Kjemoterapeutiske legemidler er ofte lite effektive med hensyn til å drepe celler som er i platåfase og dermed har redusert cellesyklusprogresjon, eller som har utviklet en multimedikamentresistens (MDR). For å vise at  $\alpha$ -partiklene fra  $^{223}\text{Ra}$  kan indukere celledød like effektivt for disse cellene som for celler uten multimedikamentresistens og i eksponensiell vekst ble noen forsøk gjort. NHIK 3025 celler i platåfase viste seg å ha samme overlevelse og  $G_2/M$ -oppnopning som de eksponensielt voksende cellene. Celler fra den multimedikamentresistente cellelinjen NHIK 3025 (dox) viste også tilsvarende resultater. Dette bekrefter at alfapartikkelstrålingen fra  $^{223}\text{Ra}$  dreper celler gjennom helt andre mekanismer enn kjemoterapeutiske midler. Følgelig kan legemiddelet Alpharadin™ være effektivt også i tilfeller der kjemoterapeutiske legemidler viser svakheter.

Resultatene fra denne oppgaven viser altså at  $\alpha$ -partiklene fra  $^{223}\text{Ra}$  stort sett gir samme cellebiologiske effekter som tidligere  $\alpha$ -emittere har vist. Dette både styrker teorien som ligger til grunn for alfapartikkelbestråling generelt, og gir legemiddelet Alpharadin™ en mer solid dokumentasjon. De sentrale forsøkene i denne oppgaven bør allikevel gjentas med celler fra en annen cellelinje, slik at man får undersøkt om resultatene funnet i denne oppgaven er uavhengig av celletype.

# INNHOLDSFORTEGNELSE

<b>FORORD</b> .....	<b>I</b>
<b>SAMMENDRAG</b> .....	<b>III</b>
<b>FORKORTELSER OG FREMMEDORD</b> .....	<b>3</b>
<b>1 INNLEDNING</b> .....	<b>9</b>
<b>2 TEORI</b> .....	<b>13</b>
2.1 UTVIKLING AV KREFTLEGGEMIDLER - STRÅLETERAPI .....	13
2.2 STRÅLINGSFYSIKK .....	15
2.2.1 Ioniserende stråling .....	15
2.2.2 Radioaktivitet .....	15
2.2.3 Vekselvirkning og energiavsetning.....	17
2.2.4 <sup>223</sup> Ra - en α-emitter .....	19
2.3 CELLEBIOLOGI .....	22
2.3.1 Cellesyklusen og kontroll av denne.....	22
2.3.2 Cellevekst.....	24
2.3.3 Beregning av prosent andel celler i ulike cellesyklusfaser ut fra en teoretisk aldersfordeling .....	25
2.4 STRÅLINGSBIOLOGI.....	26
2.4.1 Cellulære strålingseffekter.....	26
2.4.2 Celleoverlevelseskurver .....	33
2.5 DOSIMETRI OG MIKRODOSIMETRI.....	34
2.5.1 Konvensjonell dosimetri.....	35
2.5.2 Mikrodosimetri.....	35
<b>3 MATERIALER OG METODER</b> .....	<b>39</b>
3.1 CELLEDYRKNING .....	39
3.1.1 Cellelinjer .....	39
3.1.2 Sterile rutiner.....	40
3.1.3 Omsetning og utsåing.....	41
3.2 BESTRÅLING .....	42
3.2.1 Alpharadin <sup>TM</sup> (Radium-223) .....	42
3.2.2 Bestrålingsoppsett.....	42
3.2.3 Strålevern.....	44
3.2.4 Radioaktivitetsdetektorer .....	45
3.3 CELLEOVERLEVELSESFORSØK .....	46
3.3.1 Koloniforsøk for asynkrone NHIK 3025- og NHIK 3025 (dox) celler i eksponensiell vekst og NHIK 3025 platåfaseceller .....	46
3.3.2 Koloniforsøk for synkroniserte NHIK 3025 celler i eksponensiell vekst.....	46
3.3.3 Beregning av overlevelsesfraksjonen for enkeltceller.....	48
3.4 FLOWCYTOMETRI.....	49
3.4.1 Flowcytometri .....	49
3.4.2 DNA-farging .....	50
3.4.3 Analyse av flowcytometridata .....	52
3.5 NHIK 3025 CELLER-CELLULÆRT OPPTAK AV <sup>223</sup> RA.....	53
3.6 ALTERNATIVER TIL KOLONIFORSØK .....	54
<b>4 RESULTATER</b> .....	<b>55</b>
4.1 DOSEBEREGNINGER .....	55
4.2 BESTEMMELSE AV AKTIVITET INKORPORERT I CELLENE .....	55

4.3	EFFEKTSTUDIER.....	56
4.3.1	Enkeltcelleoverlevelse og cellesyklus-effekter for asynkrone NHIK 3025 celler.....	56
4.3.2	Morfologiske endringer for NHIK 3025 celler etter behandling .....	71
4.3.3	Alders-responskurve for synkroniserte NHIK 3025 celler .....	74
4.3.4	Enkeltcelleoverlevelse og cellesyklus-effekter for NHIK 3025 plåtafase- og NHIK 3025 (dox) celler .....	77
<b>5</b>	<b>DISKUSJON .....</b>	<b>81</b>
5.1	ALFA- VERSUS BETA-EMITTERE I RADIOTERAPI OG DOSIMETRI .....	81
5.2	BIOLOGISKE EFFEKTER AV ALFAPARTIKKELSTRÅLING FRA <sup>223</sup> RA .....	82
5.2.1	Celleoverlevelse etter behandling med <sup>223</sup> Ra .....	82
5.2.2	Doserateeffekter .....	83
5.2.3	Fordelingen av celler i cellesyklus etter behandling med <sup>223</sup> Ra.....	84
5.2.4	Har cellene ulik følsomhet for alfapartikkelstråling fra <sup>223</sup> Ra gjennom cellesyklus? .....	89
5.2.5	Vil legemiddelet Alpharadin™ overvinne kjemoterapeutiske legemidlers negative egenskaper? .....	91
5.3	HVORFOR OG HVORDAN DØR CELLENE? .....	92
5.4	MULIGE FEILKILDER .....	94
5.5	PRAKTISK KONSEKVENNS OG ARBEID VIDERE .....	96
<b>6</b>	<b>KONKLUSJON .....</b>	<b>99</b>
	<b>REFERANSER .....</b>	<b>101</b>
	<b>VEDLEGG A: DOSEBEREGNINGER, RÅDATA CELLEOVERLEVELSE OG INNLEDENDE OVERLEVELSESFORSØK .....</b>	<b>- 1 -</b>
A.1	DOSEBEREGNINGER .....	- 1 -
A.2	RÅDATA CELLEOVERLEVELSE.....	- 2 -
A.3	INNLEDENDE CELLEOVERLEVELSESFORSØK.....	- 10 -
	<b>VEDLEGG B: DNA-HISTOGRAMMER OG FORDELING AV CELLER I CELLESYKLUS...- 11 -</b>	
B.1	DNA-HISTOGRAMMER .....	- 11 -
B.2	PROSENTVIS FORDELING AV CELLER I CELLESYKLUS – RÅDATA OG ALLE DATAPUNKTER FOR FIGURENE 4.6, 4.7 OG 4.8 .....	- 18 -
	<b>VEDLEGG C: DNA-HISTOGRAMMER OG RÅDATA FOR ALDERS-RESPONSFORSØK....- 27 -</b>	
C.1	DNA-HISTOGRAMMER .....	- 27 -
C.2	RÅDATA FOR ALDERS-RESPONSKURVE.....	- 29 -
	<b>VEDLEGG D: ALTERNATIVER TIL KOLONIFORSØK.....- 33 -</b>	
D.1	FREMGANGSMÅTE .....	- 33 -
D.1.1	ATP-nivå i celler .....	- 33 -
D.1.2	Live/Dead.....	- 34 -
D.2	RÅDATA FOR ATP-MÅLINGER AV BEHANDLEDE CELLER .....	- 35 -
D.3	RESULTATER.....	- 36 -
	<b>VEDLEGG E: KJEMIKALIELISTE.....- 37 -</b>	
	<b>VEDLEGG F: OPPSKRIFTER .....</b>	<b>- 39 -</b>
	<b>VEDLEGG G: RADIOAKTIVITET OG BEREGNING AV DOSE .....</b>	<b>- 41 -</b>



## Forkortelser og fremmedord

Nedenfor følger en alfabetisk liste over fremmedord og forkortelser brukt i denne masteroppgaven.

**Adaptasjon:** Eller tilpasning, som her blir brukt som uttrykk for fenomenet hvor celler slipper ut av G<sub>2</sub>-arresten selv om DNA-skadene ikke er fullstendig reparert (Syljuåsen *et al.*, 2006)

**A-generator:** A for actinium, en løsning av <sup>227</sup>Ac, som lagres for innvekst av thorium-227 (Salberg, 2006b).

**Alpharadin™-løsning:** Betegner her selve legemiddelet Alpharadin™ som er i væskeform. Uttrykket omfatter både ”Drug Substance” og ”Drug Product”, som henholdsvis ble produsert hos Algeta ASA og Institutt for energiteknikk (IFE).

**Alpharadin™-medium:** Brukes her som et uttrykk for den løsningen cellene blir behandlet med, nemlig Alpharadin™-løsningen med <sup>223</sup>Ra i ulike aktivitetskonsentrasjoner tilsatt vekstmediet.

**Antistoff:** Eller immunglobuliner, som er proteiner som dannes av de hvite blodlegemene i en organisme for å motstå skadelige fremmedstoffer, såkalte antigener (Hall og Giaccia, 2006).

**Apoptose:** Eller programmert celledød, som er en selvdestruksjonsmekanisme som kan foregå i celler. Den skiller seg fra nabocellene mens cellen krymper og deler seg i små fragmenter (*apoptotic bodies*). Disse fragmentene holdes sammen av en cellemembran slik at ikke cellerestene lekker ut til omgivelsene. Fragmentene blir spist opp (fagocyttert) av nabocellene (Hall og Giaccia, 2006).

**ATM:** Står for *ataxia-telangiectasia mutated*, og er et gen som koder for en kinase som representerer rask respons på DNA-skader av typen dobbeltråddbrudd (Pettersen, 2006).

**ATP:** Står for adenosintrifosfat, som er et stoff som cellene bruker som små, korttids energilagre. Mange energibrukende prosesser i cellene bruker ATP (Pettersen, 2006).

**Autofagi:** Er en av cellens selvdestruksjonsmekanismer. Denne dødsmekanismen oppstår ved at en del av cytoplasma eller noen av celleorganene avsettes i autofagiske vesikler, og deretter fordøyes i cellens egne lysosomer, nedbrytningssystem (Bröker *et al.*, 2005).

**Bystander effekt:** Er en mekanisme som går ut på at celler som ikke blir direkte truffet av en strålingspartikkel, men som er i nærheten celler som blir truffet, også vil få en biologisk effekt (Hall og Giaccia, 2006).

**Cdk:** Står for *cyclin-dependent kinase*, som er syklin-avhengige proteinkinaser som regulerer cellesyklus (Hall og Giaccia, 2006).

**Coulombkraft:** Er en elektromagnetisk kraft, hvor det oppstår frastøtning mellom like ladninger og tiltrekning mellom ulike (Attix, 2004).

**Decay:** Eller radioaktiv desintegrasjon, som er en spontan transformasjon av en nuklide til en annen nuklide eller til en annen energitilstand av samme nuklide. Den overflødig energien blir ofte sendt ut som en  $\alpha$ - eller  $\beta$ -partikkel, eller som  $\gamma$ -stråling (Hall og Giaccia, 2006).

**DNA-molekyl:** Står for deoksiribonukleinsyre, og er arvestoffet i cellene. DNA-molekylet er bygd opp av to sukkerfosfatkjeder med hydrogenbundne basepar imellom (Hall og Giaccia, 2006).

**Dosimetri:** (her) En studie av strålingens energiavsettelse i vev. Dosen sier noe om mengden energi fra strålingspartikkelen som avsettes i mediet som blir bestrålt. Enheten er  $J/kg = Gy$  (gray) (Attix, 2004).

**Dox:** Er en forkortelse for cellegiften doxorubicin (Dyrlie, 1995).

**DSB:** Står for *double strand break*, og som derfor er en forkortelse for dobbeltråddbrudd i DNA-tråden (Hall og Giaccia, 2006).

**EDTA:** Som er en forkortelse for *ethylenediaminetetraacetic acid*. Dette er et kjemisk stoff som ofte er tilsatt trypsin for å forsterke dets virkning ved å binde  $Ca^{2+}$ -ioner, som er nødvendig for cellenes feste til bunnen av flasken (Alberts *et al.*, 2002).

**Elektroninnfangning:** Eller *electron capture*, EC, som er en prosess som kan skje hvis en ustabil kjerne omdanner et proton til et nøytron og dermed tar opp et elektron fra de indre skallene (Attix, 2004).

**Eukaryote celler:** Er celler med cellekjerner og andre membranbundne vesikler (Hall og Giaccia, 2006).

**Fibroblaster:** Er celler som er forløpere til i fibret bindevev, ofte relativt enkel å dyrke i cellekultur (Hall og Giaccia, 2006).

**Fluens:**  $\Phi$ , er definert som antall partikler som krysser et gitt areal (Attix, 2004).

**Fosfataser:** Er et enzym som fjerner fosfatgrupper fra molekyler (Pettersen, 2006).

**Frie radikaler:** Er atomer eller molekyler som har uparede elektroner i en ellers åpen skallkonfigurasjon. Dette gjør dem svært reaktive og fører til at radikaler har lett for å inngå i kjemiske reaksjoner (Hall og Giaccia, 2006).

**HR:** *Homologous recombination*, som er et uttrykk for homolog rekombinasjons-reparasjon av dobbeltrådbrudd i DNA-molekylet. En reparasjonsmekanisme som tar i bruk det identiske kromatidet som finnes i G<sub>2</sub>-fase for å reparere DNA-skaden (Hall og Giaccia, 2006).

**Hypoksi:** Er et uttrykk for redusert oksygenkonsentrasjon (Hall og Giaccia, 2006).

**In vitro:** (latin: i glass) Refererer til teknikken hvor man gjør et eksperiment i et kontrollert miljø utenfor en levende organisme (Hall og Giaccia, 2006).

**In vivo:** (latin: i det levende) Refererer til teknikken hvor eksperimentene blir gjort i en levende organisme (Hall og Giaccia, 2006).

**In situ:** Innenfor biologi: En mellomting mellom *in vivo* og *in vitro*, hvor et fenomen blir undersøkt i et miljø hvor det forekommer (f.eks. organ utenfor kroppen). Innenfor onkologi: Betyr dette at det finnes ondartede celler i en svulst, men at cellene ikke har spredt seg til andre deler av kroppen, metastasert (Wikipedia, 2008).

**Ionisasjonspotensialet:** Energien som trengs for å løsne et elektron fra sin laveste energitilstand i et atom eller molekyl (Attix, 2004).

**Karakteristisk røntgenstråling:** Røntgenstråling produsert etter ionisasjon av elektroner i indre skall, med en energi som tilsvarer energiforskjellene mellom ulike skall i atomstrukturen (Hall og Giaccia, 2006).

**Kinase:** Er et enzym som setter fosfatgrupper inn i ulike molekyler. Ved å fosforylere ulike proteiner virker disse kinasene inn og regulerer cellesyklus (Pettersen, 2006).

**Klonogenisk død:** Cellen dør en slik død i den forstand at den ikke lenger klarer å dele seg (Hall og Giaccia, 2006).

**Kontrollprøve:** (her) Celleprøve som ikke har fått noen behandling med radioaktivt materiale, behandles ellers på samme måte som de radioaktivitetsbehandlede prøvene.

**Konvolusjon:** Er en matematisk operator som tar to funksjoner  $f$  og  $g$  og produserer en tredje funksjon som typisk er en modifisert versjon av en av de originale funksjonene (Wikipedia, 2008).

**Kromatid:** Er et av de to identiske kopiene av DNA-molekylet (kromosom) som er festet ved centromeren ved celledeling (Hall og Giaccia, 2006).

**Kromosom:** Er et DNA-molekyl som er kveilet opp på mange små proteinkuler. Strukturen varierer gjennom cellesyklus, den finnes i både enkel og dobbel (to kopier) form (Hall og Giaccia, 2006).

**LET:** Står for *linear energy transfer*, som er et uttrykk for den gjennomsnittlige energien som blir overført av en strålingspartikkel til mediet per lengdeenhet (Hall og Giaccia, 2006).

**Letal skade:** Betegner en dødelig skade i cellen (Hall og Giaccia, 2006).

**Liposomer:** Er sfæriske vesikler med dobbeltmembran av fosforlipider og kolesterol (Alberts *et al.*, 2002).

**MDS:** Står for *multiply damaged sites*, som er et uttrykk for komplekse DNA-skader hvor det gjerne er ett dobbeltrådbrudd i tillegg til andre skader som f.eks. baseskader eller enkelttrådbrudd (Kassis og Adelstein, 2005).

**Median cellesyklusetid:** Tiden  $t$ , til en cellepopulasjon er definert slik at 50 % av cellene har en kortere cellesyklusetid enn  $t$  (Pettersen *et al.*, 1977).

**Metastaser:** Er små tumorer/enkeltceller som har løsrevet seg fra hovedtumor og spredt seg til en annen del av kroppen (Hall og Giaccia, 2006).

**Mikrodosimetri:** Er en studie av hvordan strålingsenergi blir avsatt i mikroskopiske volum. De mikroskopiske volumene kan gå fra diameteren av et DNA-molekyl (2 nm) til diameteren på en celle (typisk 20  $\mu\text{m}$ ). Mikrodosimetri introduserer strålingens stokastiske effekt som i vanlig dosimetri blir neglisjerbar (Humm *et al.*, 1993).

**MIRD:** *Medical Internal Radiation Dosimetry* komiteen (Bardiès og Pihet, 2000).

**Mitotisk høstning:** Er en synkroniseringsmetode brukt for å få en cellepopulasjon med mitotiske celler (Hall og Giaccia, 2006).

**Monoklonale antistoffer:** Er et svært spesifikt antistoff som blir produsert av en enkelt klonet celle. Antistoffene blir derfor alle like og reagerer på en spesiell type molekyler (Hall og Giaccia, 2006).

**Morfologi:** Er en studie av form, struktur, farge og mønster (Wikipedia, 2008).

**Nekrose:** Er en dødsmekanisme for cellen, hvor den sveller og sprekker i en prosess kalt nekrose. Innholdet i cellen blir da spredt rundt i det ekstracellulære miljøet til nabocellene, noe som fører til en inflammatorisk reaksjon (Hall og Giaccia, 2006).

**NHEJ:** Står for *nonhomologous end joining*, som på norske er et uttrykk for nonhomolog endeskjøting. En reparasjonsmekanisme som skjører dobbeltrådbrudd i DNA-molekylet ukritisk sammen (Hall og Giaccia, 2006).

**Nuklide:** Er et atom med et gitt antall nøytroner, protoner og energiinnhold (Hall og Giaccia, 2006).

**Nøytrino:** Er en energirik partikkel som sendes ut ved  $\beta^+$ -decay, anti-nøytrino ved  $\beta^-$ -decay. Den er masseløs og uten ladning og vekselvirker nesten ikke med materialet (Hall og Giaccia, 2006).

**OER:** Står for *oxygen enhancement ratio*, som sier noe forholdet mellom dosene gitt under hypoksiske (uten oksygen) og aerobe (med oksygen) forhold som gir samme biologiske effekt (Hall og Giaccia, 2006).

**$\alpha$ -Partikkel:** Består av 2 protoner og 2 nøytroner, en positivt ladd heliumkjerne, som gjerne sendes ut når tyngre ustabile nuklider decayer (Hall og Giaccia, 2006).

**$\beta$ -Partikkel:** Er et negativt ladd elektron som sendes ut ved  $\beta$ -decay av nøytronrike kjerner (Hall og Giaccia, 2006).

**PBS:** Står for fosfatbufret fysiologisk saltvannsoppløsning.

**PE:** Står for *plating efficiency*, andelen celler sådd ut *in vitro* som danner kolonier (Hall og Giaccia, 2006).

**PI:** Står for propidiumjodid, som er et DNA-fargestoff (Furre *et al.*, 1999).

**Potensielt letal skade:** Er en skade som normalt sett fører til celledød, men som kan bli reparert (Hall og Giaccia, 2006).

**Proliferasjonsgener:** Er gener som er med i kroppens interne cellesyklus kontroll, disse virker som gasspedaler for celledelingen (Pettersen, 2006).

<sup>223</sup>**Ra:** Står for radium-223.

**Radioimmunoterapi (RIT):** I radioimmunoterapi utnytter man kroppens eget immunforsvar til å frakte radionuklider til kreftceller ved å benytte antistoffer som bærere. Det sendes ut stråling som kan treffe omkringliggende celler og cellen antistoffet sitter fast på (Brechbiel, 2007).

**Radionuklide:** Er en nuklide med ustabil kjerne. Kjernen vil ofte sende ut strålingspartikler for å oppnå stabilitet (Hall og Giaccia, 2006).

**$\delta$ -Ray:** Er et elektron som løsriver etter en vekselvirkning/hard kollisjon og som har nok energi til å ionisere nye atomer (Attix, 2004).

**RBE:** Står for relativ biologisk effekt, som er et uttrykk for forholdet mellom dosen med røntgenstråler og dosen med f.eks. tett ioniserende stråling som gir samme biologiske effekt (Hall og Giaccia, 2006).

**SE:** Står for *standard error*, som er standardfeilen i målingene (Wikipedia, 2008).

**SF:** Står for *surviving fraction*, som på norsk blir overlevelsesfraksjon (Hall og Giaccia, 2006).

**SSB:** Står for *single strand break*, som er et uttrykk for enkeltrådbrudd i DNA-tråden (Hall og Giaccia, 2006).

**Stokastisk modell:** Er en modell basert på sannsynlighet (Wikipedia, 2008).

**Stopping power:** Er forventningsverdien til energitapsraten per rekkevidde av en bestemt type partikkel med en kinetisk energi i et bestemt medium. Det kan sies å være mediets bremsevne for en bestemt partikkel (Attix, 2004).

**$\gamma$ -Stråling:** Er elektromagnetisk stråling som oppstår pga. en ustabil kjernes overskudd av energi (Hall og Giaccia, 2006).

**Subletal skade:** Er en skade som i seg selv ikke er dødelig for cellen selv om den ikke repareres (Hall og Giaccia, 2006).

**Syklin:** Er en proteingruppe som er med på å kontrollere cellesyklus sammen med cdk-kinasene (Hall og Giaccia, 2006).

**T-generator:** T for thorium, en løsning av  $^{227}\text{Th}$  som lagres for innvekst av  $^{223}\text{Ra}$  (Salberg, 2006a).

**Tumorsuppressorgen:** Er et gen som koder for proteiner som virker som bremsepedaler i cellesyklus, eksempler er p53- og pRb-genet (Pettersen, 2006).

# 1 Innledning

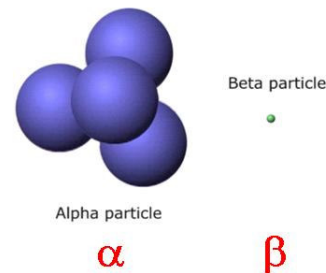
Ioniserende stråling blir i dag brukt i økende grad i medisinsk sammenheng. Strålingen brukes innenfor både diagnostikk og terapi. Innenfor diagnostikken øker bruken i takt med de nye og forbedrede billeddannende teknikkene som f.eks. computertomografi (CT) og positronemisjonstomografi (PET). Bruk av stråling i terapisammenheng er gjerne knyttet til kreftsykdommer. Til nå er hovedsakelig ekstern stråleterapi og intern lokal stråling via brachyterapi de viktigste hovedteknikkene. Stråleterapi har som hensikt å drepe kreftcellene ved å gi cytotoksiske doser med ioniserende stråling til kreftvevet samtidig som normalvevet skjermes mest mulig, noe som er en vanskelig oppgave. Ulike teknikker har blitt utviklet for å oppnå dette, men ikke alle typer kreft har vist seg å kunne behandles ved hjelp av disse metodene. Der hvor kreften ikke kan kureres ved hjelp av stråling blir ioniserende stråling ofte brukt palliativt (smertestillende). I stråleterapien har hittil hovedsakelig  $\gamma$ - og  $\beta$ -stråling blitt brukt, pga. deres gjennomtrengende evne. Som alternativ til disse behandlingsmetodene er såkalt målrettet intern stråling (targeted, internal irradiation) blitt brukt i økende grad. Her er prinsippet at strålekilden settes i nærheten av, eller er bundet til kreftsvulsten, som f.eks. ved radioimmunoterapi. Stråling fra en slik kilde vil da treffe kreftcellene i nærheten av kilden. Men rekkevidden av strålingen blir her veldig viktig.  $\beta$ - og  $\gamma$ -stråling har en relativt lang rekkevidde i vev, mens alfapartikelstråling har en mye kortere rekkevidde (se tabell 1.1). For å oppnå en mer målrettet terapiform, hvor mindre andeler av normalvevet påvirkes, forsøkes det på muligheten for å ta i bruk alfapartikelstråling (Henriksen, 2002).

Den mest brukte terapimetode for behandling av kreft er medikamentbehandling, kalt kjemoterapi. Virkningsmekanismen til mange cellegifter er at de dreper celler som deler seg. Celledeling er også noe normale celler i kroppen gjør som f.eks. hår-, tarmepitel- og benmargceller. Faktisk kan disse normale celler dele seg hurtigere enn mange typer kreftceller, noe som kan forklare de store bivirkninger som ulike cellegifter kan føre til (Dyrlie, 1995).

I stråleterapien er strålingsfeltet ofte et begrenset område i pasienten. Meningen med stråleterapi er å treffe svulsten og drepe kreftcellene. Imidlertid vil ikke stråleterapi, særlig ekstern stråleterapi, nødvendigvis treffe alle kreftceller. Hos de fleste kreftformer som prostata-, bryst-, lunge- og hudkreft kan det hende at en del kreftceller fjerner seg fra hovedsvulsten i en prosess som kalles metastasering. I stråleterapien er metastasering et stort problem da tilstedeværelse av enkelte kreftceller eller mikro- og makrometastaser på steder fjernt fra strålingsfeltet vil bidra til gjenvekst av kreften. Metastasering er en flertrinnsprosess hvor kreftceller løsriver seg fra hovedsvulsten og finner et annet sted i kroppen hvor de kan vokse. Dette fører til en spredt lokasjon av kreftvevet, slik at en komplett fjerning av kreftvevet uten å drepe for mye normalvev blir vanskeligere å oppnå (Feinendegen og McClure, 1997). Kreftceller har også andre mekanismer for å unngå å bli påvirket av ulike behandlingsmetoder. Innenfor kjemoterapien er kreftcellenes evne til å gå ut av en aktiv cellyklus og inn i en hvilende platåfase også et problem. Disse cellene deler seg ikke og vil derfor ikke bli drept av de ulike cellegiftene som ofte har DNA-syntese som sitt hovedmål. Cellene har også en evne til å utvikle multimedikament-

resistens (*multidrug resistance*, MDR). Celler som blir behandlet med et kjemoterapeutisk middel kan utvikle en resistens mot både dette og andre midler slik at neste behandling blir mindre effektiv (Hofsli, 1992). Resistensutvikling mot ioniserende stråling er også kjent. Denne mekanismen forklares ut fra at graden av DNA-reparasjon øker ved behandling med ioniserende stråling (Joiner *et al.*, 1999).

Det er altså behov for nye målrettede behandlingsmetoder som kan drepe både kreftceller i en svulst, celler som har metastasert, utviklet resistens eller er i en ikke-aktiv cellesyklus.  $\alpha$ -Partikler, positivt ladde helium kjerner, er omtrent 7000 ganger tyngre enn  $\beta$ -partikler, elektroner (se figur 1.1). Som tabell 1.1 viser er  $\alpha$ -partikkelens rekkevidde i vev mye kortere enn en  $\beta$ -partikkels rekkevidde.  $\alpha$ -Partikkelen vil mest sannsynlig avsette sin energi innen bare 2-10 cellediametere, noe som gjør at den har mulighet til å avsette energien i mikrometastaser uten å skade for mye av normalvevet rundt. For å inaktivere en celle er det kun behov for 1-5  $\alpha$ -partikkel-treff i DNA-molekylet sammenlignet med 100-1000 treff som en  $\beta$ -partikkel vil behøve (Feinendegen og McClure, 1997; Henriksen *et al.*, 2003; Kassis og Adelstein, 2005).  $\alpha$ -Partikler produserer nemlig baner med tett ionisasjon, som resulterer i komplekse DNA-skader pga. klynger av skader i DNA-molekylet. Disse blir ofte ikke reparert eller de blir feilreparert (Kassis og Adelstein, 2005; Radford, 2002; Rydberg *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2003). Det er derfor generelt behov for en lavere dose av tett ioniserende alfapartikkelstråling enn  $\gamma$ - og  $\beta$ -stråling for å indusere samme biologiske effekt (Smith *et al.*, 2003). Som kilde til denne alfapartikkelstrålingen brukes radionuklider som er  $\alpha$ -emittere. Denne type terapi kalles derfor radionuklideterapi.



**Figur 1.1:** Relativ størrelse av en  $\alpha$ - versus en  $\beta$ -partikkel.

**Tabell 1.1:** Sammenligning av egenskaper for  $\alpha$ - og  $\beta$ -partikler.

	<b>Alfa</b>	<b>Beta</b>
Relativ partikkelmasse	7000	1
Initial energi (MeV)	3-8	0.01-2.5
Rekkevidde i vev ( $\mu\text{m}$ )	40-90	50-5000
LET (keV/ $\mu\text{m}$ )	60-230	0.015-0.4
Ladning	+2	-1
Ionepar/ $\mu\text{m}$	2000-7000	5-20
DNA-hit for å drepe en celle	1-5	100-1000

Stråleterapi med  $\gamma$ - og  $\beta$ -stråling kan bli svekket av faktorer som alfapartikkelstråling er helt uavhengig av. Tidligere forskning har vist at alfapartikkelstråling induserer celledød slik at sannsynligheten for at en celle skal overleve faller eksponensielt med økende doser. Cytotoksisiteten induert av denne typen stråling har også vist seg å være dose-rate-uavhengig. Dvs. enkeltcelleoverlevelsen vil ikke endre seg avhengig av om cellene får en bestemt dose over en kort eller lang behandlingstid (Chadwick og Leenhouts, 1973; Hall og Giaccia, 2006). Alfapartikkelstråling har også en innvirkning på cellenes fordeling i



cellesyklus. Blant annet ved at denne typen stråling induserer en mer effektiv opphopning av celler i G<sub>2</sub>-fase enn annen mindre tett ioniserende stråling (Lücke-Huhle, 1982; Palayoor, 1993). Det er ikke blitt observert noen særlig stor avhengighet av hvor cellen eventuelt er i cellyklus under bestråling (Bird og Burki, 1975), og alfapartikelstråling har også vist seg å være relativt uavhengig av oksygenkonsentrasjonen i cellene (Hall og Giaccia, 2006; Pettersen, 2006).

De biologiske egenskapene av  $\alpha$ -emittere er stort sett kjent fra referanser hvor kilden har vært americium-241 ( $t_{1/2}$  432.2 y), plutonium-238 ( $t_{1/2}$  87.8 y), radium-226 ( $t_{1/2}$  1600 y) og thorium-232 ( $t_{1/2}$   $14 \times 10^9$  y). Dette er isotoper med lang levetid og de er derfor lite egnet i målsøkende stråleterapi. Nå utvikles et legemiddel basert på kortlivet radium-223, med en fysisk halveringstid på 11.4 dager.  $^{223}\text{Ra}$  er en  $\alpha$ -emitter og en mulig kandidat innenfor radionuklideterapien. Denne isotopens cellebiologiske egenskaper er ikke tidligere blitt undersøkt. Og spørsmålet som oppstår er, vil  $\alpha$ -partikkelen fra  $^{223}\text{Ra}$  gi de samme biologiske effekter som  $\alpha$ -partiklene fra isotopene med de lengre fysiske halveringstidene? Radium vil naturlig søke å binde seg til benmineraler uten å trenge noen bærere, og vil derfor være mulig å bruke i behandling av kreftformer hvor det er sannsynlighet for benmetastaser (Nilsson *et al.*, 2005). Decaykjeden for  $^{223}\text{Ra}$  viser at fire  $\alpha$ -partikler, to  $\beta$ -partikler og noe lavenergetisk  $\gamma$ -stråling blir produsert før den ender i stabilt bly-207.  $\alpha$ -Partiklene står for over 93 % av energien som sendes ut (Fisher og Sgouros, 1999).  $^{223}\text{Ra}$  og døtrenes korte fysiske halveringstid fører til at en relativt høy strålingsdose kan bli gitt en eventuell tumor (Henriksen *et al.*, 2003).

Ved Algeta ASA blir  $^{223}\text{Ra}$  utviklet som et kreftlegemiddel og forsøk i klinikk utføres.  $^{223}\text{Ra}$  er den aktive komponenten i Alpharadin™, et nytt radiofarmaka, som tenkes og benyttes i behandling av skjelettmetastaser fra hormonresistent prostatakreft. Det er derfor et behov for å bygge opp dokumentasjon av radium-223s virkning på biologiske systemer. Spørsmålet blir om disse tidligere funnene hva gjelder alfapartikelstrålingens cellulære effekter gjelder for en  $\alpha$ -emitter som  $^{223}\text{Ra}$ . Denne oppgaven vil derfor kaste lys over følgende forskningsspørsmål:

### **Hva slags effekt har alfapartikelstrålingen fra $^{223}\text{Ra}$ på celler?**

- Hvordan blir overlevelseskurven, rett eller krum?
- Hva er doserateeffekten?
- Hvordan blir fordelingen av celler i cellyklus?
- Hvordan varierer strålefølsomheten til cellene gjennom cellyklus?

### **Behøver cellene å gå i cellyklus for at alfapartikelstrålingen fra $^{223}\text{Ra}$ skal ha en effekt?**

- Kan celler som er i platåfase og har redusert cellyklusprogresjon drepes av alfapartikelstråling?
- Vil platåfaseceller oppnå en lik fordeling i cellyklus som celler i eksponensiell vekst etter behandling?

**Vil alfapartikelstråling fra  $^{223}\text{Ra}$  gi en effekt for celler som er resistente mot ulike cellegifter?**

-Vil multimedikamentresistente (MDR) celler drepes av alfapartikelstråling?

-Vil MDR-celler oppnå en lik fordeling i cellesyklus som celler uten medikamentresistens?

Oppgaven har til hensikt å belyse alfapartikkelenstrålingens effekt på biologiske systemer i tillegg til at den vil bidra som et ledd i den prekliniske dokumentasjon for Alphasar™.

## 2 Teori

### 2.1 Utvikling av kreftlegemidler - Stråleterapi

Kreft er en samlebetegnelse for sykdommer hvor en del celler blir aggressive (vokser og deler seg utenfor de normale grensene), invasive (invaderer og ødelegger nærliggende vev) og noen ganger metastatiske (sprer seg til andre steder i kroppen). Å finne en enkelt kur for kreft har vært et mål siden sykdommen ble oppdaget. Dette har imidlertid vist seg å være vanskelig siden de ulike kreftsykdommene stammer fra ulike celletyper og derfor har svært ulike egenskaper (Alberts *et al.*, 2002). En fellesnevner for kreftsykdommene er at de transformerte cellene ofte har unormalt genetisk materiale. De vanligste behandlingsmetodene når det ikke er mulig å fjerne svulsten kirurgisk er stråleterapi og kjemoterapi. I stråleterapi brukes ioniserende stråling for å ødelegge det genetiske materialet, og dermed gjøre det umulig for kreftcellene å dele seg videre. Dette kan gjøres ved ekstern stråleterapi eller ved å plassere en strålekilde inne i eller i nærheten av svulsten, såkalt brachyterapi. Omkringliggende normalvev vil ofte få skader fra både ekstern og intern stråling. Kjemoterapi innebærer bruk av ulike medikamenter som angriper forskjellige vekst- og metabolske mekanismer hos kreftceller. Noen av disse medikamentene er spesielt egnet til å drepe celler i kroppen som deler seg hurtig, og vil derfor heller ikke være spesifikk for kreftvevet. Kirurgi, stråling og kjemoterapi redder mange, men selv om hovedtumor blir fjernet kommer ofte kreften tilbake i form av mikrometastaser. Disse mikrometastasene krever en målrettet terapiform for at ikke normalvevet skal ødelegges (Feinendegen og McClure, 1997; Henriksen, 2002; Tannock og Hill, 1988).

Intern radionuklideterapi har vist seg å kunne gi resultater i dette tilfellet. Radionuklideterapi innebærer bruk av radioaktive nuklider internt i kroppen enten direkte eller indirekte rettet mot målcellen. Ved direkte bruk av radionuklider utnyttes selve stoffets kjemiske egenskaper, mens ved indirekte bruk av radionuklider brukes en bærer, dvs. et annet stoff som retter seg mot målcellen. Metastaser i skjelettet forekommer ofte i senere stadier av kreftformer som prostata- og brystkreft. Hittil har bl.a. bensøkende  $\beta$ -emittere (radionuklider som sender ut elektroner) blitt brukt, som strontium-89 (Metastron), ved behandling av benmetastaser. Dette medikamentet har vist seg å bare kunne gis i doser som gir en smertestillende effekt (Bouchet *et al.*, 2000). En  $\beta$ -partikkel vil ha en viss rekkevidde, og vil derfor skade benmargen for mye ved høye doser (Feinendegen og McClure, 1997; Henriksen, 2002). Dette er også en strålingstype som gir en relativ lav biologisk effekt med hensyn til celleoverlevelse. Som et resultat av dette foregår det undersøkelser for å finne andre strålekilder, som har en mer egnet energi og rekkevidde. Alfapartikkelstråling vil gi en relativ høy biologisk effekt, dvs. den dreper celler svært effektivt. Den har kort rekkevidde ( $<100 \mu\text{m}$ ) og vil avsette store energimengder over korte avstander (Feinendegen og McClure, 1997; Henriksen *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2003). Alfapartikkelstråling blir derfor undersøkt som potensiell strålekilde til kreftbehandling.

Radium-223 er en  $\alpha$ -emitter og en mulig kandidat for  $\alpha$ -partikkelterapi. Siden radium er et alkalijordelement lik kalsium vil  $^{223}\text{Ra}$  naturlig gå til benminerale uten å ha behov for noen bærer (Feinendegen og McClure, 1997; Nilsson *et al.*, 2005). Den har en passende fysisk halveringstid ( $t_{1/2} = 11,4$  d) og dens døtre har så korte fysiske halveringstider at decaykjeden sender ut 75 % av sine  $\alpha$ -partikler innen noen få sekunder.  $^{223}\text{Ra}$  og døtrenes korte fysiske halveringstid fører til at en relativt høy strålingsdose kan bli gitt der hvor radium binder seg, f.eks. i benmetastaser (Henriksen *et al.*, 2003).

Innenfor den indirekte radioterapien finnes det ulike stoffer som benyttes som bærere av radionuklidene. I radioimmunoterapi benyttes gjerne antistoffer som bærere. Her utnyttes antistoffets evne til å frakte radionuklider og binde seg til kreftceller. Monoklonale antistoffer blir ofte brukt til dette siden de er svært spesifikke. De blir produsert av en enkelt klonet celle, og blir derfor alle like og reagerer med og binder seg til spesielle molekyler (epitoper) på kreftcellen. En radioaktiv nuklide kan knyttes til dette antistoffet. Når den ustabile nukliden sender ut stråling vil den treffe omkringliggende celler og cellen antistoffet er festet på. Det er derfor avgjørende at disse cellene er kreftceller og ikke normale celler. Siden det er vanskelig å oppnå en slik spesifikk binding til kun kreftceller, må metoden optimaliseres for å oppnå best mulig terapeutisk effekt (Feinendegen og McClure, 1997). I tillegg er det hittil ikke påvist noen metode for å binde noen av de viktigste  $\alpha$ -partikkel emitterende nuklidene, som actinium og radium, til slike monoklonale antistoffer. En annen løsning er å knytte radionuklidene til små peptider som kan binde seg til cellens reseptorer. Strålingen fra nukliden vil kunne drepe cellene i nærheten av bindingsstedet (Feinendegen og McClure, 1997). En tredje mulighet er å bruke liposomer som bærere. Disse kan bære en radionuklide, og ha ulike reseptorer som er spesifikke for kreftceller på utsiden (Henriksen, 2002; Henriksen *et al.*, 2004). Det er en høy forskningsaktivitet innenfor målrettet radioterapi. Og denne terapiformen er i økende grad i klinisk bruk mot forskjellige kreftformer. For å få en vellykket radioterapiform er man helt avhengig av kunnskap om dosimetrien til den aktuelle strålingspartikkelen. Strålingsdosimetri er studie av strålingens energiavsettelse i vev. Innenfor stråleterapi brukes dosimetri til å gi en kvantitativ sammenheng mellom mengde av strålingsenergi lokalt absorbert i vev, og de biologiske effektene som denne energiavsetningen skaper. Den kan altså brukes til å evaluere effektiviteten av terapeutiske behandlinger. Siden  $\alpha$ -partikler gir stråling med en kort rekkevidde som treffer enkeltceller involverer dette mikrodosimetri, som er en stokastisk modell (Bardiès og Pihet, 2000).

Algeta ASA er et norsk legemiddelfirma som fokuserer på utvikling og bruk av  $\alpha$ -emitterende nuklider mot ulike kreftsykdommer. De fokuserer først og fremst på kreft som har metastasert seg og andre utbredte krefttyper som hittil ikke har noen behandlingsmetode. Deres hovedprodukt, Alpharadin<sup>TM</sup>, inneholder  $^{223}\text{Ra}$ . Dette er som tidligere nevnt en  $\alpha$ -emitter som søker og binder seg til benminerale. Det er estimert at 1,5 mill pasienter verden over har skjelettmetastaser og det kommer tilnærmet 300 000 nye tilfeller hvert år. Prostata- og brystkreft-pasienter tilsvarer 80 % av tilfellene, og det finnes få medikamenter for denne gruppen. Etter en vellykket fase II studie som viste at Alpharadin<sup>TM</sup> forsinket utviklingen av prostatakreft og reduserte utbredelsen av metastaser, vil Algeta ASA i 2008 gå inn i en fase III studie (Algeta ASA, 2007).

## 2.2 Strålingsfysikk

### 2.2.1 Ioniserende stråling

Ioniserende stråling er stråling med nok energi til å eksitere og ionisere et atom. Denne type stråling kan deles opp i direkte og indirekte ioniserende stråling. Direkte ioniserende stråling består av ladde partikler som for eksempel elektroner, protoner eller  $\alpha$ -partikler. Strålingen kan kalles direkte ioniserende fordi den avsetter sin energi direkte i materialet via mange små coulombkraft vekselvirkninger. Indirekte ioniserende stråling består av uladde partikler som nøytroner, røntgen- og  $\gamma$ -fotoner. Disse partiklene overfører først sin energi til ladde partikler i materialet gjennom få og store energioverføringer. Disse ladde partiklene avsetter videre energien til materialet (Attix, 2004).

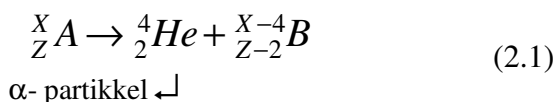
I denne oppgaven er det hovedsakelig alfapartikkelstråling og dens cellulære effekter som undersøkes. Derfor vil det legges mest vekt på dens fysiske egenskaper og vekselvirkningsmekanismer. Alfapartikkelstråling kan dannes ved at naturlig forekommende tyngre radioaktive kjerner decayer, eller ved hjelp av partikkelakseleratorer.

### 2.2.2 Radioaktivitet

(Denne delen er hentet fra Lieser, 2001)

Radioaktivitet er spontan emisjon av energi fra en ustabil nuklide. Det er bare når partikkelen kommer fra forvandleringsprosesser i atomkjernen at det kalles det radioaktiv stråling. En slik emisjon kalles i denne sammenhengen en desintegrasjon eller decay. Det sendes ut enten en partikkel eller elektromagnetisk stråling. De tre mest vanlige er  $\alpha$ - og  $\beta$ -partikler og  $\gamma$ -stråler.

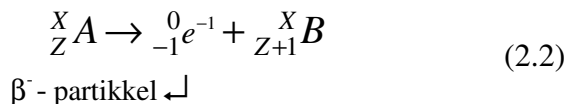
$\alpha$ -Partikkelen består av to protoner og to nøytroner, et  ${}^4\text{He}$ -ion. Prosessen er som følger:



Kjernen blir altså fire atomiske masseenheter lettere og mister to protoner slik at det blir et atom med andre kjemiske egenskaper enn det opprinnelige.  $\alpha$ -Partiklene har to positive ladninger, er monoenergetiske og har ofte energier mellom 2-7 MeV. Partikkelen har kort rekkevidde, og vil ta opp to elektroner slik at det blir et nøytralt He-atom. Denne type stråling avsetter derfor sin energi svært lokalt og vil kunne gi store stråleskader. LET (*Linear energy transfer*) er et uttrykk for energi overført til mediet per lengdeenhet. Alfapartikkelstråling vil være tett ioniserende og derfor ha høy LET (rundt 100 keV/ $\mu\text{m}$ ). Rekkevidden vil være rundt 3,5 cm i luft, men kortere i vandig miljøer og i vev.

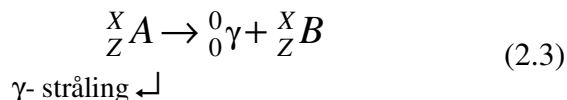
$\beta$ -Decay kan foregå på tre ulike måter:  $\beta^-$ ,  $\beta^+$ -utsendelse og elektroninnfangning.  $\beta^-$ -Partikkelen er et energirikt elektron med negativ ladning som sendes ut fra nøytronrike kjerner.  $\beta^+$ -Partikkelen er et positron og er elektronets antipartikkel. Denne sendes ut

sammen med et nøytrino når protonrike kjerner decayer og gjør om et proton til et nøytron. Ved elektroninnfagning vil også et proton bli forvandlet til et nøytron men i stedet for å sende ut overskuddsladningen som et positron fanges et elektron inn fra de indre skallene. Ved utsendelse av en  $\beta^-$ -partikkel vil følgende reaksjon foregå:



Her blir et nøytron omgjort til et proton mens et elektron sendes ut. Denne reaksjonen ender også i et produkt som har andre kjemiske egenskaper enn den opprinnelige nukliden. Elektronet er ikke monoenergetisk, men har energier mellom 0 og  $E_{\beta, \text{maks}}$ , den maksimale energien det er mulig å sende ut. I tillegg til at et elektron sendes ut, så sendes det ut et anti-nøytrino med rundt 2/3 av energien i reaksjonen. Denne partikkelen er masseløs, uten ladning og den vekselvirker nesten ikke med materialet. Det er elektronet sendt ut i denne desintegrasjonsprosessen som omtales som  $\beta^-$ -partikkel i denne oppgaven.

$\gamma$ -Stråling er ikke en partikkelstråling, men elektromagnetisk stråling som oppstår pga. kjernens overskudd av energi etter en av de tidligere nevnte decayene. Kjernen har veldefinerte energinivåer slik at overskuddsenergien som sendes ut er monoenergetisk. Det er ingen forandring i nøytron- og protonantall. Reaksjonen kan skrives som følger:



$\gamma$ -Stråling vil alltid være ledsaget av konversjonselektroner. Her overfører kjernen energi til K-skall (indre skall) elektroner og sender de ut. Dette fører til et hull i elektronstrukturen som fylles med elektroner fra ytre skall under utsendelse av karakteristisk røntgenstråling.

Decayprosessen er en statistisk prosess, og man ser derfor kun på sannsynligheter for at en kjerne har decayet. Aktiviteten til et radioaktivt materiale er definert som antall decay per tid. Ethvert radioaktivt materiale har en unik fysisk halveringstid,  $t_{1/2}$ , som er tiden det tar før mest sannsynlig halvparten av materialet har decayet og aktiviteten er halvert. Denne kan beregnes ut fra følgende sammenheng:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{\lambda} \quad (2.4)$$

hvor  $\lambda$  er en decaykonstant som er karakteristisk for hver ustabile nuklide og viser sannsynligheten for decay per tid. For å finne aktiviteten til en prøve benyttes følgende decay-lov:

$$A = A_0 e^{-\lambda t} \quad (2.5)$$

hvor  $A_0$  er aktiviteten ved  $t = 0$ . Denne enkle formelen kan brukes for å finne aktiviteten ved decay fra et stoff til et annet, men ofte er ikke virkeligheten like enkel. I naturen finnes det radioaktive serier hvor et stoff går gjennom mange decayer før det blir et stabilt materiale. I disse tilfellene må mor-datter forholdene undersøkes, hvor en mornuklide kan ha mange datternuklider som også er ustabile. Matematikken blir mer komplisert, men tre hovedtilfeller kan trekkes ut:

1. Kort mor, lang datter.  $t_{1/2}(\text{mor}) \ll t_{1/2}(\text{datter})$ . Fører ikke til noen radioaktiv likevekt.
2. Lang mor, kortere datter.  $t_{1/2}(\text{mor}) > t_{1/2}(\text{datter})$ . Fører til en midlertidig likevekt (transient equilibrium), hvor datteraktiviteten reduseres med samme hastighet som mornukliden.
3. Veldig lang mor, kort datter.  $t_{1/2}(\text{mor}) \gg t_{1/2}(\text{datter})$ . Fører til langvarig likevekt (secular equilibrium), hvor datternuklidens aktivitet blir tilnærmet lik mornuklidens aktivitet etter en viss tid.

### 2.2.3 Vekselvirkning og energiavsetning

Avhengig av stråletype finnes det mange ulike vekselvirkningsmekanismer. Elektromagnetisk ioniserende stråling som røntgen- og  $\gamma$ -fotoner vekselvirker med materie gjennom tre hovedprosesser: Compton effekt, fotoelektrisk effekt og par produksjon. Gjennom disse tre prosessene avgir strålingen sin energi til elektronene i materialet som videre avsetter den gjennom mange coulombvekselvirkninger. Disse uladde "partiklene" som f.eks.  $\gamma$ -fotoner kan gå gjennom materialet uten noen vekselvirkninger eller miste sin energi gjennom få vekselvirkninger, men med store energioverførsler. Det relative bidraget til de tre prosessene avhenger både av fotonets energi og materialets atomiske nummer (Attix, 2004).

Den andre hovedtypen vekselvirkninger er ladde partiklers vekselvirkninger. Disse partiklene er omgitt av coulombfeltet og vekselvirker lett. De overfører sin energi gjennom mange og små energioverføringer. Disse partiklene vil derfor ha en viss rekkevidde. Ladde partikler vekselvirker inelastisk med coulombfeltet på to forskjellige måter. Myke kollisjoner (Soft eller glancing) og harde kollisjoner (hard eller knock-on). Ved myke kollisjoner passerer den ladde partikkelen et stykke fra atomet. Den ladde partikkelens coulombfelt vekselvirker med atomet som et hele og overfører litt energi for hver vekselvirkning. Ved harde kollisjoner vil partikkelen vekselvirke med et atomisk elektron direkte. Partikkelen kan eksitere atomet, ionisere det eller danne en  $\delta$ -ray, som er et elektron som har nok energi til å ionisere nye atomer.  $\alpha$ -Partikkelen er en tung ladd partikkel. En  $\alpha$ -partikkel vil i hovedsak vekselvirke gjennom harde kollisjoner og danne mange ionisasjoner og  $\delta$ -rayer langs sin bane (Attix, 2004).

#### ***Stopping power og LET***

Stopping power er forventningsverdien til energitapsraten per rekkevidde av en bestemt type partikkel med en kinetisk energi i et bestemt medium. Det kan sies å være mediets

bremseevne for en bestemt partikkel. Stopping poweren for tunge partikler kan beskrives ved følgende Bethe-Block formel (Pettersen, 2006):

$$-\frac{dE}{dx} = \frac{4\pi e^2 (ze)^2}{m_e v^2} nZ \left[ \ln \frac{2m_e v^2}{I} - \ln(1-\beta^2) - \beta^2 \right] \quad (2.6)$$

hvor:

$I$  = ionisasjonspotensialet.

$(nZ)$  = midlere antall elektroner per  $\text{cm}^3$  i det bestrålte materialet.

$ze$  = partikkelens ladning ( $e$  er elektronladningen).

$v$  = partikkelens hastighet.

$m_e$  = elektronets hvilemasse.

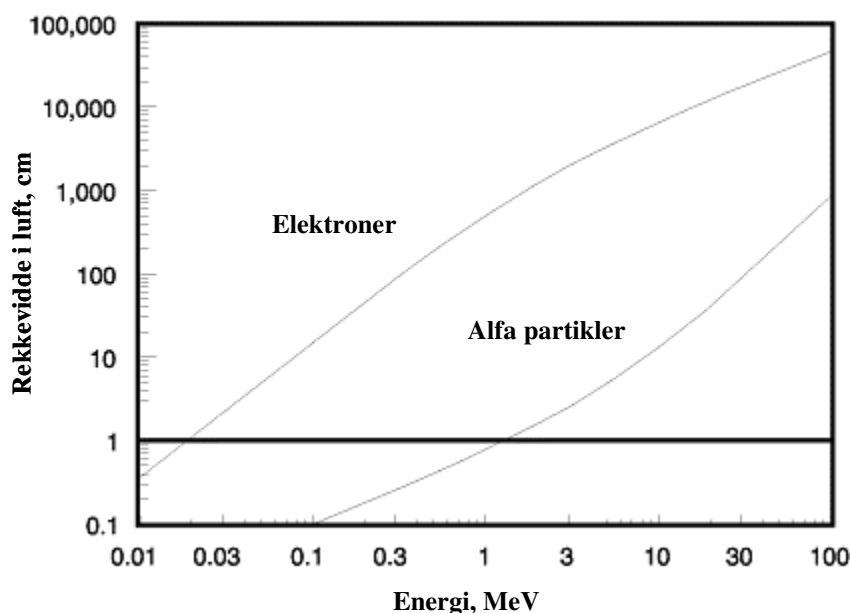
Stopping poweren avhenger av mediet. Den synker når  $Z$ , protonantallet, øker siden det da vil bli en lavere elektrontetthet og derfor færre elektroner å kolliderer med. I tillegg vil en økende  $Z$  føre til høyere ionisasjonspotensial som også fører til redusert stopping power. Stopping poweren avhenger også av partikkelens fart, og vil øke når farten reduseres. Den avhenger av partikkelens ladning og øker med antall ladninger. En  $\alpha$ -partikkel vil dermed ha en ganske høy stopping power pga. sin doble ladning. Stopping power tar ikke hensyn til de energirike  $\delta$ -elektronene, som kan frakte energien langt fra primær ionisasjonen, og vil derfor overestimere energiavsetningen (Attix, 2004). *Linear energy transfer* (LET) tar hensyn til dette og måles i  $\text{keV}/\mu\text{m}$ . LET gir et uttrykk for den gjennomsnittlige energien som er overført til mediet per lengdeenhet. Som tabell 2.1 viser har ulike partikler veldig ulike LET verdier, og for en gitt partikkeltype synker tettheten av ionisasjoner og dermed LET verdien når energien øker (Hall og Giaccia, 2006).

**Tabell 2.1:** Typiske LET verdier for ulike typer ioniserende stråling med ulik energi (hentet fra Hall og Giaccia, 2006, tabellen er modifisert).

Strålingstype	Linear Energy Transfer, $\text{keV}/\mu\text{m}$
$^{60}\text{Co}$ $\gamma$ -foton 1,17 og 1,33 MeV	0,2
10 MeV protoner	4,7
150 MeV protoner	0,5
14 MeV nøytroner	100
2,5 MeV $\alpha$ -partikler	166

Utrykket lav LET stråling omfatter stråling som  $\gamma$ - og røntgenstråling, mens høy LET stråling er  $\alpha$ -partikler, nøytroner og andre tyngre ioner (Smith *et al.*, 2003). En  $\alpha$ -partikkel vil ha en bestemt rekkevidde. Som figur 2.1 viser har  $\alpha$ -partikler generelt en kortere rekkevidde enn elektroner med lavere LET. Figuren viser også at rekkevidden øker med økende energi.





**Figur 2.1:** Rekkevidden til elektroner og  $\alpha$ -partikler i luft ( $\rho = 1,205 \cdot 10^{-3} \text{ g/cm}^3$ ), som funksjon av partikkelenergien. Figuren viser at rekkevidden til  $\alpha$ -partikler er mye kortere enn elektroners rekkevidde (hentet fra Canberra technical literature, 2007, figuren er modifisert).

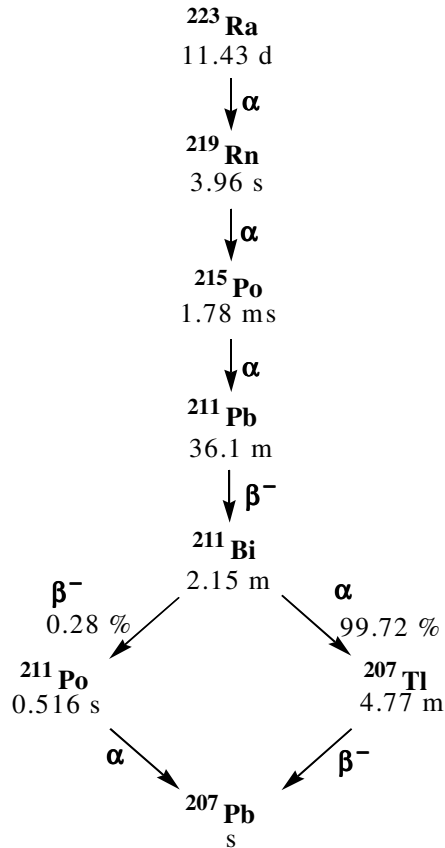
### Indirekte og direkte effekt

Energiabsorpsjonen kan skje både direkte og indirekte i mediet som bestråles. Ved direkte effekt ioniserer partikkelen målmolekylet direkte, mens ved indirekte effekt vil strålingen ionisere et annet molekyl og det kan dannes frie radikaler som kan diffundere større avstander og igjen skade målmolekylet. Biologisk materiale består av 70-90 % vann noe som fører til at strålingskjemien i vann vil være viktig. De tre vanligste frie radikalene som dannes ved bestråling av vann er:  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{H}^\cdot$  og  $\text{e}^-_{\text{aq}}$  (hydratisert elektron). Disse er svært reaksjonsvillige og fører til skader på DNA-molekylet. For lav LET stråling dominerer den indirekte effekten. Mens for høy LET ( $100\text{keV}/\mu\text{m}$ ) stråling, som  $\alpha$ -partikler, dominerer den direkte effekten (Spinks og Woods, 1990). Dette har blitt forklart med at høy LET stråling danner en så høy konsentrasjon av vannradikaler langs sin strålegang at radikalene rekombinerer til  $\text{H}_2$  og  $\text{H}_2\text{O}_2$  (disse er toksiske, men vil bli tatt hånd om av enzymer i kroppen vår). Dette vil redusere den indirekte effekten (Pettersen, 2006).

#### 2.2.4 $^{223}\text{Ra}$ - en $\alpha$ -emitter

I denne oppgaven blir legemiddelet Alpharadin<sup>TM</sup> brukt for å undersøke cellulære effekter av  $^{223}\text{Ra}$ . Dette er en kortlivet  $\alpha$ -emitter, som har mange fordelaktige egenskaper i forhold til mange  $\beta$ -emittere som i dag blir brukt innenfor radionuklideterapi av kreft (Henriksen *et al.*, 2003).  $^{223}\text{Ra}$  har en fysisk halveringstid på 11,4 dager, og dens døtre har også korte

halveringstider. Decaykjeden sender ut fire  $\alpha$ -partikler, to  $\beta$ -partikler og noe lavenergetisk  $\gamma$ -stråling før den ender i stabilt bly-207.  $\alpha$ -Partiklene står for over 93 % av energien som sendes ut. Se decaykjeden under i figur 2.2.



**Figur 2.2:** Decaykjede for Ra-223. Figuren viser fysisk halveringstid for de ulike datternuklidene, emittert partikkel og sannsynlighetsforhold. Kjeden deler seg i to før siste  $\alpha$ -partikkel sendes ut, 99,72 % går i midlertidig veien om thallium-207 (hentet fra Henriksen et al., 2002)

Fordeler med  $\alpha$ -emittere kontra  $\beta$ -emittere generelt er:

- dens høye LET og effektivitet mhp. å indukere celledød.
- dens ideelle rekkevidde for behandling av mikrometastaser og for sparing av normalt vev.
- effektivitet under hypoksi.
- uavhengighet av doserate.
- tilgjengelighet av høye spesifikke aktiviteter.

De generelle ulemper er:

- begrenset tilgjengelighet.
- høye produksjonskostnader.
- vanskelig kjemi.
- lange decaykjeder med langlivede døtre.

De hovedsaklige fordelene med  $^{223}\text{Ra}$  som  $\alpha$ -emitter er dens relativt enkle produksjon og passende fysiske halveringstid.  $^{223}\text{Ra}$  kan produseres i relativt store mengder fra et thorium-227 generator system.  $^{227}\text{Th}$  er et produkt av et  $\beta$ -decay av actinium-227.  $^{227}\text{Ac}$  kan produseres ved nøytron-bestråling av radium-226, som er et radioaktivt avfallsmateriale. Radioaktivt avfall kan dermed gjøres om til medisinsk nyttige preparater. Det endelige produktet er  $^{223}\text{Ra}$ -klorid, som kan injiseres inn i blodbanen til pasienten. Med denne halveringstiden er det mulig å produsere, merke, kvalitetskontrollere og administrere  $^{223}\text{Ra}$  videre til pasienter før radionukliden mister sin aktivitet. Den sender ut  $\gamma$ -stråling som hjelper til ved avbildning og doseberegninger (Fisher og Sgouros, 1999). Og den sender ut en høy energi per decay som gjør den effektiv som celledreper. En  $\alpha$ -partikkel vil trolig bare behøve 1-5 treff i DNA-molekylet for å inaktivere en celle, sammenlignet med 100-1000 treff som en  $\beta$ -partikkel vil behøve.  $\alpha$ -Partikkelen har en rekkevidde på bare 2-10 cellediametere (<100nm), noe som gjør at den har mulighet til å avsette energien i mikrometastaser uten å skade for mye av normalvevet rundt (Feinendegen og McClure, 1997; Henriksen *et al.*, 2003; Kassis og Adelstein, 2005). Dette er spesielt viktig i forhold til det kritiske organet benmarg, ved behandling av mikrometastaser i skjelettet.

Alfapartikkelstråling fra  $^{223}\text{Ra}$  har vist seg å kunne gi en lavere benmargdose enn andre  $\beta$ -emitterende nuklider (Henriksen *et al.*, 2003). Den korte rekkevidden gjør også at preparatet er enklere å håndtere i strålevernssammenheng. Ulemper med denne  $^{223}\text{Ra}$  er dens forholdsvis lange decaykjede og den ganske langlivede tredje datteren bly-211 (36 min).  $^{223}\text{Ra}$  har en naturlig affinitet for ben og en stor del vil derfor gå til steder hvor det er høy metabolisme i skjelettet. Dette gjør den til en gunstig radionuklide å bruke mot metastaser som har spredd seg til skjelettet (Fisher og Sgouros, 1999). Den raske  $\alpha$ -partikkel-kaskaden som kommer fra  $^{223}\text{Ra}$  vil også kunne ha et potensial til å levere en høy strålingsdose til tumoren (Henriksen *et al.*, 2003). Noe  $^{223}\text{Ra}$  vil også bli tatt opp av bløtvev som nyrer og milt, men forsøk har vist at innholdet av radium i disse vev reduseres raskt (Henriksen *et al.*, 2003; upublisert data). Pga. den høye og lokaliserte dosen som benoverflaten får, vil det være mulighet for å gi en terapeutisk relevant dose uten at dette går utover annet vev (Henriksen *et al.*, 2003). Studier har også vist at kun veldig små mengder av  $^{223}\text{Ra}$  datternuklider forsvinner fra benvevet hvor  $^{223}\text{Ra}$  decayer (Henriksen *et al.*, 2003). En av døtrene i radium-223s decaykjede som vanligvis skaper problemer er radongassen. Men radium-223s første datter,  $^{219}\text{Rn}$ , har derimot en så kort fysisk halveringstid (3.9 s) at den ikke vil få anledning til å diffundere langt fra  $^{223}\text{Ra}$  sitt decay område. Den siste  $\alpha$ -emitteren i radium-223s decaykjede, bismut-211 ( $t_{1/2} = 2.15$  m), følger decayet av  $\beta$ -emitteren  $^{211}\text{Pb}$  som har en lengre fysisk halveringstid ( $t_{1/2} = 36.1$  m). Noe redistribusjon fra de siste døtrene vil derfor være forventet. Det har allikevel ikke vist seg å gi store utslag siden  $^{211}\text{Pb}$  kan bli fanget i benmatriksen, noe som fører til at  $\alpha$ -partikkelen fra  $^{211}\text{Bi}$  vil bestråle benoverflaten. *In vivo* forsøk i mus viste at selv tre dager etter injeksjonene av  $^{223}\text{Ra}$  ble den ikke-bundne aktiviteten estimert til å være mindre enn 1 % av det totale beninnholdet av  $^{211}\text{Pb}$  og  $^{211}\text{Bi}$  (Henriksen *et al.*, 2003).

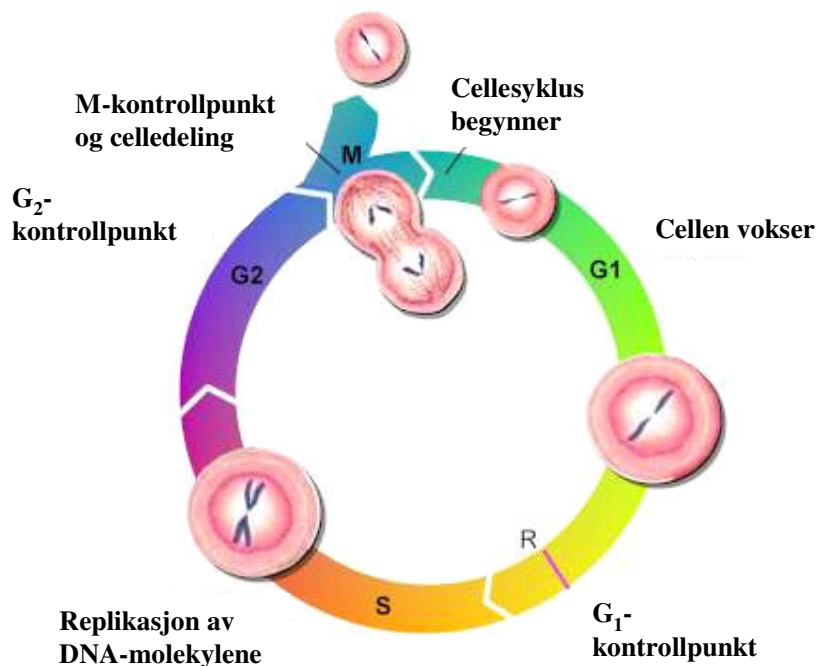
## 2.3 Cellebiologi

Mennesker består av eukaryote celler, dvs. cellene har en kjerne som inneholder alle kromosomene. Cellen er som en komplisert fabrikk bestående av mange organeller med ulike oppgaver. Cellene våre må produsere alle de nødvendige komponentene som kroppen trenger for å fungere normalt. Noen av det viktigste cellene produserer er: nye celler, proteiner og energibærere (ATP).

### 2.3.1 Cellesyklusen og kontroll av denne

(Denne delen er hentet fra Alberts *et al.*, 2002; Pettersen, 2006)

Cellen går gjennom en cellesyklus som resulterer i to helt like datterceller. Denne syklusen ble opprinnelig delt opp i to faser, interfase og M-fase, på bakgrunn av observasjoner i mikroskop. Senere er det funnet at flere faser inngår i denne syklusen. Interfase er den lengste fasen av cellesyklus, og her inngår to gap-faser ( $G_1$  og  $G_2$ ) og en syntesefase (S). Som figur 2.3 viser, er cellesyklus delt inn i fire faser:  $G_1$ , S,  $G_2$  og M.



**Figur 2.3:** Cellesyklus og dens viktigste kontrollpunkter. Cellesyklus består av fire faser:  $G_1$ , S,  $G_2$  og M (hentet fra *Headstart in biology*, 2007, figuren er modifisert).

$G_1$ - og  $G_2$ -fase gir cellen tid til å vokse og doble sin masse av proteiner og organeller. Her overvåker også cellen det interne og eksterne miljøet for å forsikre seg om at forholdene er passende og prosessene er riktig gjennomført før den går videre til neste fase.  $G_1$ -fasens lengde kan variere. Hvis ikke forholdene er riktige vil cellen kunne gå inn i en hvilefase,  $G_0$ , hvor den kan være i lang tid før den igjen går inn i cellesyklus. I syntesefasen (S) foregår hele DNA-replikasjonen slik at alt DNA i cellen blir fordoblet. M-fasen er en kort fase (rundt 1 time) til tross for at det er her de dramatiske endringene skjer. M-fase deles i to hoveddeler, mitosen hvor cellekjernene deler seg og cytokinese,

der selve cellen deler seg. Mitosen er igjen inndelt i fem underfaser. Den begynner med profase hvor cellens dupliserte DNA-tråder blir kondensert til større og synlige kromosomer. I prometafasen bryter kjernemembranen sammen og den mitotiske spindelen festes til kromosomene. Videre går cellen inn i metafasen hvor kromosomene trekkes mot ekvator av den mitotiske spindelen i midten av cellen. I den påfølgende anafasen trekkes kromosomene fra hverandre mot hver sin pol. Til slutt, i telofasen, reetableres cellekjernemembranen rundt hver gruppe kromosomer slik at to nye datterkjerner dannes. Cytokinesen kommer deretter hvor selve cellen deles i to med nøyaktig likt DNA-innhold. En celle har blitt til to.

For å oppnå en suksessfull cellyklus er cellen avhengig av å ha flere kontrollsystemer. Et av disse kontrollsystemer som overvåker cellyklusen er basert på to proteingrupper, syklin og syklinavhengige kinaser (Cdk). Cdk-konsentrasjonen er konstant gjennom cellyklus. De er imidlertid avhengig av å være koblet til et syklin for å være aktivert. Syklinene syntetiseres og degraderes ved ulike punkter i cellyklus. Cdk-syklin kompleksene aktiverer og deaktivere ulike enzymer ved hovedkontrollpunktene i cellyklus slik at cellyklusprosessen settes i gang. De overvåker det eksterne og interne miljøet slik at alt skjer til rett tid. Syntese og degradering av proteiner ligger til grunn for denne kontrollen, men en annen mer effektiv metode for denne reguleringen skjer vha. kinaser og fosfataser. En kinase er et enzym som setter fosfatgruppene inn i molekylene, mens en fosfatase er et enzym som fjerner fosfatgruppene fra molekylene. Disse enzymene gjør at proteiner kan produseres i løpet av cellyklus, hvor de aktiveres og deaktiveres når det er nødvendig. Hovedkontrollpunktene vises i figur 2.3, og ligger ved G<sub>1</sub>-, G<sub>2</sub>- og M-fase. I G<sub>1</sub>-kontrollpunktet sjekker cellen om DNA-molekylene er uskadet og om forholdene ligger til rette slik at DNA-syntesen i S-fasen kan starte. Hvis cellen er skadet kan den her holdes tilbake til den blir reparert eller velger å gå i apoptose (programmert celledød). Her kan cellen også sendes til hvilefasen, G<sub>0</sub>. I kontrollpunktet i G<sub>2</sub>-fase bestemmer cellen om DNA-replikasjonen var vellykket før den slippes videre til mitose. M-kontrollpunktet sjekker om kromosomene er festet til den mitotiske spindelen og setter i gang mitosen. I tillegg finnes det et viktig kontrollpunkt i G<sub>0</sub>-fase, hvor cellen sjekker om det er nok vekstfaktorer til stede slik at cellen kan gå inn i cellyklus.

### ***Vekstfaktorer og proliferasjonsgener***

Vekstfaktorene er kroppens ekstracellulære cellykluskontroll. Det er signalstoffer som gir signaler fra kroppen til cellen om at de bør begynne å dele seg. De kan komme fra et annet sted i kroppen og binde seg til reseptorer på cellemembranen. Etter binding av vekstfaktorer aktiveres proliferasjonsgener inne i cellen. Dette er kroppens interne cellykluskontroll og disse virker som gasspedaler for celledelingen. De tidlig responderende genene bringer cellene inn i cellyklus og reduserer proteindegraderingen mens den øker syntesen. De senresponderende genene er de som skal kontrollere cellyklus, nemlig som nevnt Cdk-syklin kompleksene. En mutasjon i dette viktige kontrollsystemet kan føre til at proteinene som proliferasjonsgenene koder for blir produsert uten at genet har blitt aktivert av en vekstfaktor. Dette er typisk for kreftceller, og proliferasjonsgenene blir ofte kalt oncogener. Humane celler har to kopier av alle gener i cellekjernen, men kun en mutasjon i den ene kopien vil være første steg til kreft.

### ***Tumorsuppressorgener***

Tumorsuppressorgener virker motsatt av proliferasjonsgenene, de virker som bremsepedaler for celledelingen. Hvis disse genene ikke uttrykkes har en celle mulighet for å bli en kreftcelle. Her må imidlertid begge kopiene av genet bli endret for at tumorsuppressorgenet ikke skal uttrykkes. De to mest kjente er pRb- og p53-genet. Proteinene disse genene koder for opererer hovedsakelig i G<sub>1</sub>-fase og hindrer cellen i å passere G<sub>1</sub>-kontrollpunktet hvis forholdene er dårlige. I omtrent halvparten av alle krefttilfeller er p53-genet mutert. Når cellene er i en normal tilstand vil p53-proteinet finnes i svært lav konsentrasjon. Men hvis cellene blir utsatt for en spesielle forhold som ved lav oksygenkonsentrasjon eller ioniserende stråling øker konsentrasjonen. Dette proteinet gjenkjenner DNA-skader og hjelper cellen på flere måter. Det vil blant annet stoppe cellyklus for å gi tid til reparasjon. Hvis skadene ikke blir reparert eller er for omfattende vil p53-proteinet sende cellen i apoptose (programmert celledød). Proteinene hindrer altså cellen å bli mutert slik at det får en genetisk ustabilitet som kan føre til kreft.

### **2.3.2 Cellevekst**

Celler i kultur vokser eksponensielt når forholdene er ideelle. En cellepopulasjon vil ha en midlere cellyklusetid,  $t_c$ , med en tilfeldig variasjon rundt denne fra celle til celle. Et uttrykk for cellens eksponensielle vekst kan være som følger:

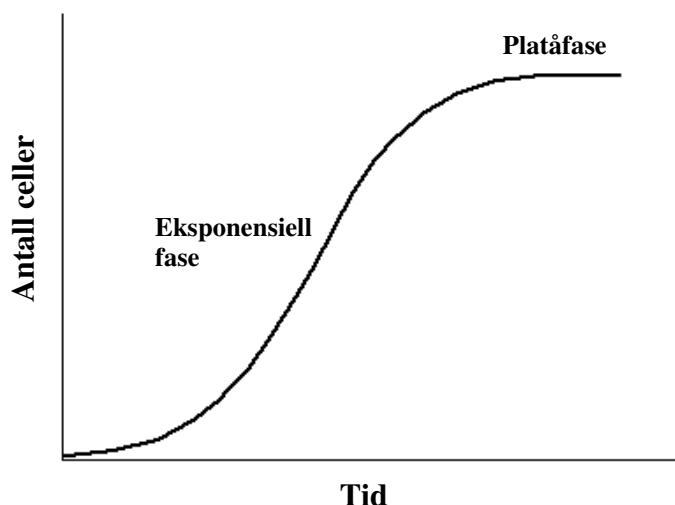
$$N = N_0 e^{kt} \quad (2.7)$$

hvor  $N_0$  er celleantallet ved  $t = 0$ , og  $k$  er en vekstkonstant. I løpet av  $t_c$ , vil hver celle ha delt seg til to og antallet av celler vil være fordoblet. Doblingsiden vil da i prinsippet tilsvare midlere cellyklusetid  $t_c$ , som er gitt ved:

$$t_c = \frac{\ln(2)}{k} \quad (2.8)$$

En vekstkurve er en grafisk fremstilling av celleantallet som funksjon av tiden. Den kurven fremstilles ofte i et enkeltlogaritmisk plott hvor en får en rett linje hvis cellepopulasjonene vokser eksponensielt (Pettersen, 2006). Figur 2.4 viser en slik vekstkurve.

I begynnelsen og enden av vekstkurven vil ofte kurven avvike fra den rette linjen. Ved utsåing av en cellekultur vil det i begynnelsen være en periode hvor cellene deler seg langsomt. Dette fordi cellene ofte trenger tid til å reetablere en normal cellyklusetid da de har vært utsatt for påvirkninger som temperatur endringer, effekter av proteaser som trypsin eller har fått nytt medium som ikke inneholder tilstrekkelig mengde av de vekstfremmende stoffene som cellene ellers gir fra seg til mediet. Etter perioden med den ideelle eksponensielle veksten vil cellyklusetiden øke og veksten synke. Dette kalles platåfasen, hvor celledøden øker til samme rate som celleproduksjonen. Dette skjer når cellene har nådd konfluens hvor cellene dekker hele vekstflaten. En annen årsak kan være at næringsstoffene i mediet er brukt opp eller at det har blitt en opphopning av avfallstoffer (Tannock og Hill, 1988).



**Figur 2.4:** Vekstkurve for celler i kultur, som viser relativ økning i antall celler som funksjon av tid. Under den eksponensielle fasen vokser cellene, mens de har en minimal cellevekst i platåfasen (hentet fra Benson, 1996, figuren er modifisert).

### **Asynkron og synkron vekst**

En cellekultur med asynkron vekst vil inneholde celler i alle ulike faser av cellyklus. Denne type vekst er vanlig i kroppens vev hvor noen celler ligger i hvilefase ( $G_0$ ) mens andre er i syntesefase (S) og andre cellyklusfaser. Synkron vekst i en cellekultur vil derimot innebære at alle cellene vil være i samme fase av cellyklus. Dette kan brukes til å undersøke strålingssensitiviteten til cellene i ulike faser av cellyklus. Det finnes flere teknikker for å danne synkroniserte populasjoner av celler. Den ene kalles "mitotisk høstning", som kun er mulig for celler som gror i monolag, hvor cellene gror fast i bunnen av en celleflaske. Ved mitose vil disse cellene bli runde å være lett bundet til groflaten. Da vil flasken kunne ristes og disse mitotiske cellene løsner. Hvis dette mediet med mitoseceller fjernes og såes ut på nytt, vil en kultur bestående av nesten bare mitotiske celler som går synkront gjennom cellyklus dannes (Pettersen *et al.*, 1977). Den andre metoden gjør bruk av metabolske hemmere som tymidin eller kjemiske hemmere som aphidicolin, nocodazol eller hydroxyurea (Jackman og O'Connor, 1998). Hydroxyurea-middelet dreper alle cellene i S-fase, og danner en blokkering i slutten av  $G_1$ -fase. De cellene som da er i  $G_2$ -, M- og  $G_1$ -fase vil gå gjennom syklusen helt frem til de blir stoppet av blokkeringen. Etter en viss tid fjernes medikamentet, og cellene vil slippe forbi blokkeringen å gå synkront gjennom cellyklus (Hall og Giaccia, 2006).

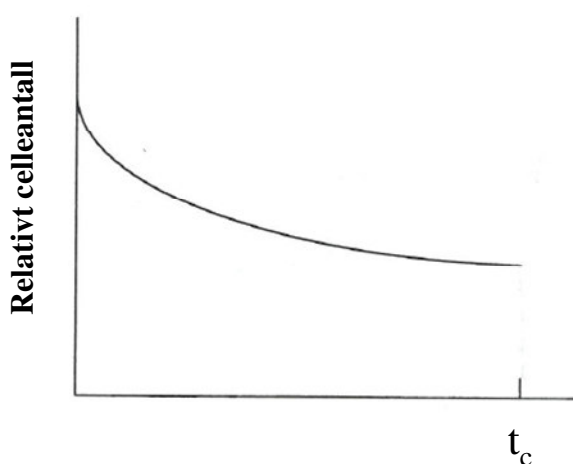
### **2.3.3 Beregning av prosent andel celler i ulike cellyklusfaser ut fra en teoretisk aldersfordeling**

En cellepopulasjon som vokser eksponensielt (se kapittel 2.3.2) har en aldersfordeling som vist under i figur 2.5. For å få en eksponensiell økning i antall celler må en eksponensiell økning også finne sted i det antallet av celler som til enhver tid faktisk deler seg i to. Antall celler som er i mitose må altså øke eksponensielt med tiden. Antallet av celler som kommer til mitose per tidsenhet er fastlagt for en tidsperiode  $t_c$ , midlere

cellesyklus, siden fordelingen av celler i cellyklus er gitt. Hvis veksten er eksponensiell vil derfor denne fordelingen også være eksponensiell. Fordelingen av celler i cellyklus regnet bakover fra delingstidspunkt vil derfor øke eksponensielt som vist i figur 2.5. Formelen for den normaliserte aldersfordelingen i figur 2.5 kan skrives slik:

$$p(t) = \frac{2 \ln(2)}{t_c} e^{-\ln(2) \frac{t}{t_c}} \quad (2.9)$$

hvor  $p(t)$  er sannsynligheten for at en celle har alderen  $t$ . Ved å integrere funksjon 2.9 over en fase av cellyklus kan det bestemmes hvor stor andel av cellene som etter teorien skal befinne seg i denne fasen (Pettersen, 2006).



**Figur 2.5:** Aldersfordelingen for en eksponensielt voksende cellepopulasjon, som viser relativt celleantall mot midlere cellyklusetid,  $t_c$ . Cellene vandrer mot høyre med økende tid og deler seg når de når tidspunkt  $t_c$  (hentet fra Pettersen, 2006, figuren er modifisert).

## 2.4 Strålingsbiologi

Strålingsbiologi omhandler blant annet studie av cellulære effekter av ioniserende stråling. I strålingsbiologi er det viktig å forstå hva som er den mest strålefølsomme delen i cellen, og hva som defineres som en død celle.

### 2.4.1 Cellulære strålingseffekter

Ioniserende stråling gir mange ulike effekter i en celle avhengig av celletype og dens genuttrykkelse, strålingstype og ytre miljø. Gjennom ulike studier har det vært påvist at DNA-molekylet er det mest strålefølsomme elementet i cellen. En død celle defineres ofte som en celle som har mistet sin reproduserende evne (Hall og Giaccia, 2006).



### **Skader og Reparasjon**

Som tidligere nevnt er det DNA-molekylet som anses som det strålefølsomme materialet i en celle (Kassis og Adelstein, 2005). En skade her kan føre til celledød, kreftutvikling og mutasjoner. DNA-molekylet er som kjent bygd opp av to sukkerfosfatkjeder med hydrogenbundne basepar imellom. Ioniserende stråling gir hovedsakelig skader i form av brudd på DNA-tråden (sukkerfosfatkjeden). Den kan gi enkeltrådbrudd (*single strand break*, SSD) og dobbeltrådbrudd (*double strand break*, DSB). I tillegg kan baseskader også oppstå, og multiple skader (*multiply damaged site*, MDS) involverer mer enn en av disse skadene samtidig. Etter en slik skade vil cellen ha en stress-respons hvor den produserer mange proteiner som er nødvendig for reparasjon og cellyklusarrest (Pfeiffer *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 2003). Enkeltrådbrudd har gjerne liten biologisk konsekvens siden de ofte blir effektivt reparert. Hvis bare den ene tråden er skadet vil den andre fungere som mal når tråden repareres av spesielle enzymer. Slår reparasjonen feil vil allikevel denne skaden kunne føre til en mutasjon. Dobbelttrådbrudd blir sett på som den viktigste skaden fra stråling. Her vil begge DNA-trådene være brutt over innenfor et område på noen få basepar, og disse skadene vil være vanskeligere å reparere siden det ikke finnes en intakt tråd som kan kopieres (Hall og Giaccia, 2006). DNA-molekylet vil være brutt i to med uparrede baser ved endene. Konsekvensene av dette kan være:

- Bruddet bindes sammen igjen til det originale molekylet og ingen skade har skjedd.
- Bruddet bindes ikke, og fører til et tap av en del av DNA-molekylet ved neste mitose.
- De brutte endene bindes sammen med brutte ender fra et annet DNA-molekyl eller feil ende i sitt eget molekyl. Dette fører til unormale DNA-molekyler i neste mitose.

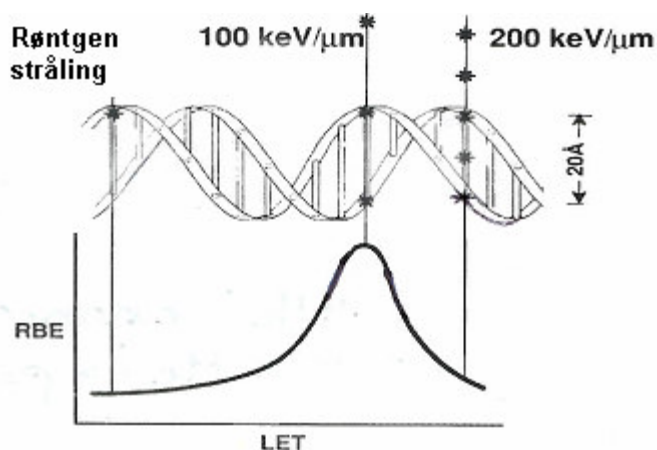
Dobbelttrådbruddene kan være dødelige (letale) eller føre til mutasjoner, genetisk ustabilitet og kreft (Hall og Giaccia, 2006). DSB kan repareres ved hjelp av homolog rekombinasjonsreparasjon (*homologous recombination repair*, HRR) og nonhomolog endeskjøting (*nonhomologous end joining*, NHEJ). Homolog rekombinasjonsreparasjon trenger en uskadet DNA-tråd som mal for å reparere en skade. Denne reparasjonsmekanismen foregår derfor i sen S/G<sub>2</sub>-fase hvor en uskadet kopi er tilgjengelig. Nonhomolog endeskjøting binder de brutte endene ukritisk sammen, uten å sjekke om baseparene passer sammen. Dette fører ofte til feilreparasjon og er en nødløsning som opptrer ofte i mammalske celler (Rothkamm *et al.*, 2003). Frekvensen av denne feilreparasjonen har blitt antydnet å øke med høyere LET stråling. Som følge av de mange og komplekse dobbelttrådbruddene denne type stråling kan gi (Rydberg *et al.*, 2005). Nonhomolog endeskjøting finner sted i alle faser men er kanskje viktigst i G<sub>1</sub>-fase, hvor ingen kopi av DNA-tråden er til stede (Hall og Giaccia, 2006; Rothkamm *et al.*, 2003). Strålingsskader på celler kan deles opp i tre grupper:

1. letale skader.
2. potensielt letale skader.
3. subletale skader.

Letale skader er irreversible og ureparerbare, og slike skader fører alltid til celledød. Potensielt letale skader vil normalt føre til celledød, men skaden kan bli reparert hvis for eksempel vekstvilkårene blir dårligere etter bestråling. Dette vil kunne gi tid til reparasjon før mitose (Hall og Giaccia, 2006). Subletale skader er ikke dødelige selv om de ikke repareres (Pettersen, 2006). Skaden kan repareres på noen timer. Men kommer en ny subletal skade nært i tid og rom vil disse sammen kunne danne en letal skade. Denne skadetypen er den som forklarer hvorfor en dose gitt i fraksjoner atskilt i tid gir høyere overlevelse (Hall og Giaccia, 2006).

Strålingstype har mye å si for hvordan skaden er og hva slags biologisk effekt den gir. For å sammenligne høy LET stråling mot lav LET stråling hva gjelder biologisk effekt kan forholdet relativ biologisk effekt (RBE) brukes. RBE er forholdet mellom dosen med røntgenstråler og dosen med f.eks. tett ioniserende stråling som gir samme biologiske effekt (Smith *et al.*, 2003). RBE-verdien for endepunktet celledød for  $\alpha$ -partikler har generelt vist seg å ligge mellom 10-20. Dette er basert på tidligere *in vitro* data, og for *in vivo* tilfeller har den vist seg å være lavere (Behr *et al.*, 1999). Det trengs altså en lavere dose av høy LET stråling enn lav LET for å indusere samme biologiske effekt (Smith *et al.*, 2003). Dette kan forklares ut fra hvordan de ulike strålingstypene avsetter sine skader. Røntgen- og  $\gamma$ -stråler gir fra seg energien i spredt distribuerte klynger, og skader DNA-molekylet hovedsakelig gjennom hydroksylradikaler som blir skapt ved at elektroner skytes ut av vannatomer.  $\alpha$ -Partikler derimot produserer baner med tett ionisasjon, som resulterer i komplekse DNA-skader pga. klynger av skader i DNA-molekylet som ofte ikke blir reparerte eller blir feilreparert (Hall og Giaccia, 2006; Pfeiffer *et al.*, 1996; Ritter *et al.*, 1977). Figur 2.6 viser hvordan relativ biologisk effekt varierer med hensyn på LET verdier. Effekten av stråling viser seg å være størst ved LET verdier på rundt 100 keV/ $\mu\text{m}$ . Dette forklares ut fra at det ved denne ionisasjonstettheten er en gjennomsnittlig separasjon mellom ionisasjonene som sammenfaller med diameteren til dobbelheliksen i DNA-molekylet (20 Å, eller 2 nm). Stråling med denne LET verdien vil derfor ha størst sannsynlighet for å gi et dobbeltråddbrudd ved hjelp av bare en strålingspartikkel (Hall og Giaccia, 2006).

Den vanlige oppfatningen er at høy LET stråling gir dobbeltråddbrudd og at disse ofte viser seg å være potensielt letale for cellen. Mens lav LET stråling gir mange enkelttråddbrudd (subletale skader) som er enklere å reparere. Radford antyder derimot i sin artikkel at enkle dobbeltråddbrudd ikke vil indusere letale skader. Men at det er de komplekse dobbeltråddbruddene som fører til at cellen dør (Radford, 2002). Komplekse dobbeltråddbrudd vil si dobbeltråddbrudd hvor det i tillegg er brudd på en eller begge tråder. Det er også blitt vist at ikke bare mengden av komplekse dobbeltråddbrudd men også kompleksiteten øker med høyere LET stråling (Goodhead, 2006).



**Figur 2.6:** RBE som funksjon av LET. Figuren illustrerer hvorfor det kan tenkes at stråling med LET verdier på rundt  $100 \text{ keV}/\mu\text{m}$  er mer effektive med hensyn på dobbelttråddbrudd og dermed celledød (hentet fra Hall og Giaccia, 2006, figuren er modifisert).

### Ulike veier til celledød

Celler kan dø gjennom flere ulike mekanismer. Etter stråling vil cellene ofte dø en mitotisk død. Her dør cellen mens den deler seg pga. skadede kromosomer. Cellen sveller og sprekker i en prosess kalt nekrose. Innholdet i cellen blir da spredt rundt i det ekstracellulære miljøet til nabocellene, noe som fører til en inflammatorisk reaksjon (Dewey *et al.*, 1995; Hall og Giaccia, 2006). Noen celler dør også gjennom apoptose, programmert celledød. Her setter cellen i gang en selvdestruksjon. Den skiller seg fra nabocellene, mens cellen krymper og deler seg i små fragmenter (*apoptotic bodies*). Disse fragmentene blir holdt sammen av en cellemembran slik at ikke cellerestene lekker ut til omgivelsene. Fragmentene blir spist opp (fagocyttert) av nabocellene. Slik blir næringsstoffene bevart og giftstoffene slippes ikke ut i det ekstracellulære miljøet, noe som gjør at en inflammatorisk reaksjon unngås (Dewey *et al.*, 1995; Hall og Giaccia, 2006). En annen mulighet som kan nevnes er autofagi. Denne dødsmechanismen oppstår ved at en del av cytoplasma eller noen av celleorganene avsettes i autofagiske vesikler, og deretter fordøyes i cellens egne lysosomer (Bröker *et al.*, 2005).

Bystander effekt er en mekanisme som har kommet frem i litteraturen de senere årene. Mekanismen går ut på at celler som ikke blir direkte truffet av strålingspartikkelen, men som er i nærheten celler som blir truffet, også vil få en biologisk effekt som f.eks. en dødelig skade. Denne effekten har blitt vist å forekomme ved to ulike tilfeller. Det ene tilfellet er ved åpne celleforbindelser (*gap-junction*) mellom cellene, mens det andre forekommer ved at et signalmolekyl skilt ut av cellen i mediet (Hall og Giaccia, 2006; Little *et al.*, 2002).

### Variasjon i strålefølsomhet, Alders-responskurver.

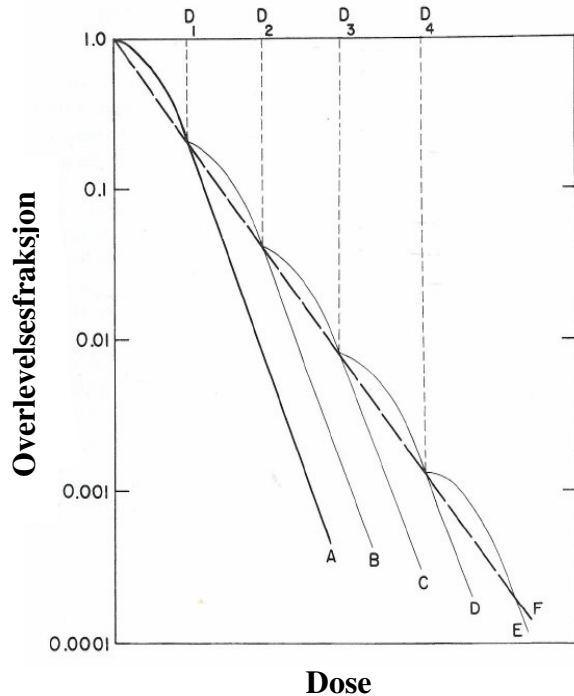
Ulike celler har ulik strålefølsomhet. Stamcellers hovedoppgave er å dele seg å danne nye celler, noe som fører til at denne cellypen er svært strålefølsom. Et høyere DNA-innhold i en celle vil gjøre den mer strålefølsom (Pettersen, 2006). Ulik type stråling vil

også gi forskjellige effekter selv om dosen er lik. Studier av synkroniserte celler som har blitt bestrålt med lav LET stråling i forskjellige faser av cellesyklus viser at det også er en variasjon i strålefølsomheten gjennom syklusen. Celler viser seg å være spesielt sensitive i G<sub>2</sub>- og M-fase. I sen S-fase er cellen gjerne mer resistent mot stråling. Noe som kan harmonere med at det er her den homologe rekombinasjonsreparasjonen kan foregå. Hvis G<sub>1</sub>-fase er lang har det blitt observert at cellene er mer resistente i en periode i begynnelsen av G<sub>1</sub>-fase, men mer sensitive i en periode mot slutten av fasen. Dette vil variere fra cellelinje til cellelinje (Hall og Giaccia, 2006). Lav LET stråling og høy LET stråling gir kvalitativt den samme variasjonen av strålingsfølsomhet gjennom cellesyklus. Men kvantitativt er det store forskjeller. Når LET øker vil variasjonen i strålingsfølsomhet gjennom cellesyklus bli mindre. Alders-responskurven blir nærmest flat (Bird og Burki, 1975). Andre studier viser at ved å synkronisere cellepopulasjonen to ganger vil en mer tydelig variasjon i strålefølsomhet kunne observeres også for høy LET stråling (grunnet en bedre synkronisert cellepopulasjon). Variasjonen er allikevel lavere enn variasjonene for lav LET stråling (Raju *et al.*, 1975). Dette fører til at det i stråleterapi-sammenheng kanskje ikke er behov for å ta like mye hensyn til denne variasjonen ved bruk av høy LET stråling, og at høy LET stråling har lettere for å drepe de cellene som er i en resistent del av cellesyklus (Bird og Burki, 1971).

### ***Dosefraksjonering og doserateeffekter***

Dosefraksjonering innebærer at en enkeltdose blir delt opp i flere fraksjoner og gitt med et passende tidsintervall mellom. Hvis en cellelinje har en overlevelseskurve med en bred skulder vil dosefraksjonering føre til høyere overlevelse. Dette fordi skulderen vil bli repetert for hver fraksjon, som vist i figur 2.7. Størrelsen på skulderen sier noe om mengden subletale skader, og en økt overlevelse ved fraksjonering forteller at disse skadene blir reparert mellom hver fraksjon slik at færre letale skader blir dannet.

Skulderen på overlevelseskurvene avhenger også av strålingskvalitet. Lav LET stråling vil gi en bred skulder mens høy LET stråling gir en liten/ingen skulder. Ut fra dette kan en se at fraksjonering ikke vil gi stor effekt for høy LET stråling. For lav LET stråling er doserate en av de viktigste faktorene som bestemmer den biologiske effekten av en absorbert dose. Doserate kan sies å være uendelig mange små fraksjoner. Når doseraten reduseres øker overlevelsen fordi cellen får nok tid til å reparere de subletale skadene. Ved svært lave doserater vil også reparasjon av de potensielt letale stråleskadene kunne føre til økt overlevelse og dermed en doserateeffekt. For noen celler er det blitt vist en invers doserateeffekt, hvor det å redusere doseraten resulterer i økt celledød. Dette er blitt forklart med at cellene ved lave doserater vil kunne gå videre i cellesyklus helt til de blir stoppet i G<sub>2</sub>-fase, hvor cellene er mer strålingssensitive (Furre *et al.*, 1999; Hall og Giaccia, 2006). Både lav og høy LET stråling gir dobbeltråddbrudd og mange av disse bruddene skjøtes som nevnt feil sammen i en nonhomolog endeskjøtingsprosess. En studie av Kühne *et al.* viser at fraksjonering med lav LET røntgenstråling har vist seg å redusere frekvensen på denne gale endeskjøtingen, noe som indikerer at det å separere DSB i tid og rom reduserer feilreparasjoner. Fraksjonering av høy LET alfapartikkelstråling viser derimot ingen endring av frekvensen av feil endeskjøting, noe som indikerer at det her skjer en feil endeskjøting mellom DSB som er produsert nær hverandre i samme partikkelbane (Kühne *et al.*, 2002).



**Figur 2.7:** Overlevelsesfraksjon som funksjon av stråledose. Kurven viser en effekt av idealisert fraksjonering. Kurve A er overlevelseskurven for en enkelt akutt dose av røntgenstråler. Kurve F er overlevelseskurven hvis dosen er gitt i små fraksjoner av størrelse  $D_1$  med et tidsintervall mellom dosene som gir tid til reparasjon av subletale skader (hentet fra Hall og Giaccia, 2006, figuren er modifisert).

### Oksygeneffekten

Oksygen har stor betydning for den biologiske effekten av stråling på celler. Fravær av oksygen fører til en høyere overlevelse. "Oxygen enhancement ratio" (OER) sier noe forholdet mellom dosene gitt under hypoksiske (reduisert oksygenkonsentrasjon) og aerobe (normal oksygenkonsentrasjon) forhold som gir samme biologiske effekt. Oksygeneffekten er størst for lav LET stråling og blir fraværende for høy LET stråling. Dette kan forklares ved at oksygenet reagerer på radikal nivå. Som tidligere nevnt er den indirekte effekten, radikal-dannelsen, av strålingen den dominerende effekten for lav LET stråling. Her vil oksygenet blant annet fikser skadene ved at det reagerer med biomolekylradikalene og forhindrer en naturlig reparasjon. Ved høy LET stråling er det derimot den direkte effekten som dominerer og det vil ikke oppstå noen oksygeneffekt (Hall og Giaccia, 2006; Pettersen, 2006).

### Strålings virkning på kontroll av cellyklus

Cellyklus blir som nevnt tidligere kontinuerlig overvåket gjennom de ulike kontrollpunktene. Cdk-syklusene bli aktivert og deaktivert av ulike proteiner og trigger ulike cellyklushendelser. Ioniserende stråling induserer arrest i  $G_1$ -, S- og  $G_2$ -fase av cellyklus (Xu *et al.*, 2002). Disse kontrollpunktene forhindrer vekst av potensielt genetisk ustabile celler og støtter DNA-reparasjon (Syljuåsen *et al.*, 2006). Flere genprodukter har blitt identifisert og vist å kontrollere disse sjekkpunktene. Et

genprodukt som kan nevnes er ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) proteinkinase, som viser seg å være kritisk for alle disse kontrollpunktene (Xu *et al.*, 2002).

Tumorsuppressorgenet p53 er avhengig av ATM proteinkinase, og er som nevnt med og kontrollerer G<sub>1</sub>-arrestpunktet i cellyklus ved strålingskader. Ved bestråling vil den normale degenereringen av p53-proteinet reduseres og konsentrasjonen av aktive p53-proteinet vil øke. Hvis skadene på DNA-molekylet etter en bestråling ikke er for omfattende, vil p53-proteinet hindre cellen å gå inn i en S-fase slik at den får tid til å reparere skaden først. Er skadene ikke mulig å reparere vil p53-proteinet sende cellen i apoptose (Alberts *et al.*, 2002). p53-proteinet fungerer ved å binde seg til DNA-molekylet og induserer transkripsjonen av p21 (regulasjonsgen). Videre binder dette proteinet seg til G<sub>1</sub>/S-Cdk og S-Cdk komplekser som trengs for å komme inn i S-fase. Ved å blokkere denne kinaseaktiviteten hindrer p21-proteinet cellen å komme inn i S-fasen. Cellen får ikke mulighet til å replisere sitt skadede DNA-molekyl. Andre reparasjonsmekanismer får tid til å trå i kraft, og p53-proteinet vil dermed øke cellens reparasjonsmuligheter (Alberts *et al.*, 2002).

Lav LET stråling har vist seg å gi G<sub>1</sub>-, S- og G<sub>2</sub>-arrest. Mens høy LET stråling, som for eksempel  $\alpha$ -partikler, har gitt lengre forsinkelser i G<sub>2</sub>- og S-fase. G<sub>1</sub>-arrest har derimot vært vanskeligere å påvise ved høy LET stråling, men den er blitt observert om enn i liten størrelse hos humane fibroblaster eksponert for  $\alpha$ -partikler (Gadbois *et al.*, 1996). Senere er det blitt vist at G<sub>1</sub>-arrest finner sted for både høy og lav fluens av  $\alpha$ -partikler i humane diploide fibroblaster, og at denne arresten er avhengig av p53-aktivering på samme måte som lav LET stråling (Azzam *et al.*, 2000). G<sub>2</sub>-forsinkelsens lengde og utbredelse er variabel avhengig av cellelinje, dosen, doserate, strålingskvalitet, cellyklusfase og tid ved eksponering. Høy LET stråling har vist seg å være mer effektiv enn lav LET stråling med hensyn på å indusere en G<sub>2</sub>-arrest (Lücke-Huhle, 1982; Palayoor, 1993). En studie av Raju *et al.* har vist at forsinkelsen i G<sub>2</sub>-fasen er doseavhengig for både lav og høy LET stråling. S-fase forsinkelse ble også observert for både lav og høy LET stråling, men forsinkelsen var lengst for alfapartikkelstråling ved en gitt overlevelsesdose. Den maksimalt akkumulerte fraksjonen av celler i G<sub>2</sub>-arrest etter bestråling av røntgen- og alfapartikkelstråler var lik, men cellene eksponert for  $\alpha$ -partikler hadde behov for lenger tid for å få en maksimal blokkering i G<sub>2</sub>-fase. Dette forklares med at  $\alpha$ -partiklene i dette tilfellet gav en lengre S-fase forsinkelse. Raju *et al.* foreslår også at de cellene som blir satt i arrest er reproducerbart døde (Raju *et al.*, 1980).

Studier har vist at det finnes to ulike G<sub>2</sub>/M-kontrollpunkter som blir induert av ioniserende stråling. Det ene kontrollpunktet observeres tidlig etter strålingsbehandling og er forbigående, ATM avhengig og doseuavhengig mellom 1-10 Gy. Denne arresten reflekterer de cellene som er i G<sub>2</sub>-fase under bestråling og som blir holdt tilbake fra å gå i mitose. Det andre kontrollpunktet observeres flere timer etter behandling (typisk 24t), er ATM uavhengig og doseavhengig. Denne akkumuleringen reflekterer alle de cellene som var i andre tidligere faser ved bestråling. Celler som ikke har ATM funksjonen i orden vil mangle det strålingsinduserte S-fase kontrollpunktet og ha en forlenget G<sub>2</sub>/M-akkumulering (Xu *et al.*, 2002). En annen mekanisme som er sett hos humane celler er tilpasning eller adaptasjon til det strålingsinduserte kontrollpunktet i G<sub>2</sub>-fase.

Kontrollpunkt-tilpasning innebærer at cellene klarer å slippe løs fra arresten og dele seg i mitosen og cytokinesen før skaden er reparert. Dette fører ofte til genetisk ustabilitet (Syljuåsen *et al.*, 2006).

### 2.4.2 Celleoverlevelseskurver

En celleoverlevelseskurve beskriver forholdet mellom strålingsdose og hvor mange celler som overlever ved at de klarer å danne kolonier. Formen på celleoverlevelseskurvene er avhengig av mange ulike faktorer. Mange ulike biofysiske modeller og teorier har blitt foreslått, men få kan gi en sammenhengende forklaring på ulike biologiske effekter observert eksperimentelt. De to mest kjente modellene er multitarget modellen og den lineær-kvadratiske modellen. Multitarget modellen var den foretrukne modellen lenge, men senere ble det vist at den ikke kunne forklare den eksperimentelle kurveformen. Den lineær-kvadratiske modellen (LQ-modellen) kunne derimot forklare formen med en enkel matematisk formel, og er nå kanskje den modellen som er mest brukt. Med LQ-modellen eller  $\alpha\beta$ -modellen menes gjerne Chadwick og Leenhouts utgave av denne modellen som kom i 1973. Denne modellen knytter celleoverlevelsen opp mot dobbeltrådbrudd i DNA-molekylet og kurven kalles gjerne  $\alpha\beta$ -kurven (Chadwick og Leenhouts, 1973; Pettersen, 2006).

#### *LQ-modellen*

Denne modellen forutsetter følgende:

1. Cellen inneholder noen kritiske molekyler som avgjør om cellen har en reproduserbar evne.
2. Disse kritiske molekylerne er DNA-molekylerne og den kritiske skaden anses å være dobbeltrådbrudd.
3. Strålingens primære effekt på cellene er å gi molekylerne tråd brudd i DNA-molekylet.
4. De ulike strålingsbiologiske effektene funnet hos en celle under bestråling viser ulik grad av reparasjon.
5. Reparasjonsprosessene omfatter alle typer av reparasjons- og restitusjonsprosesser.

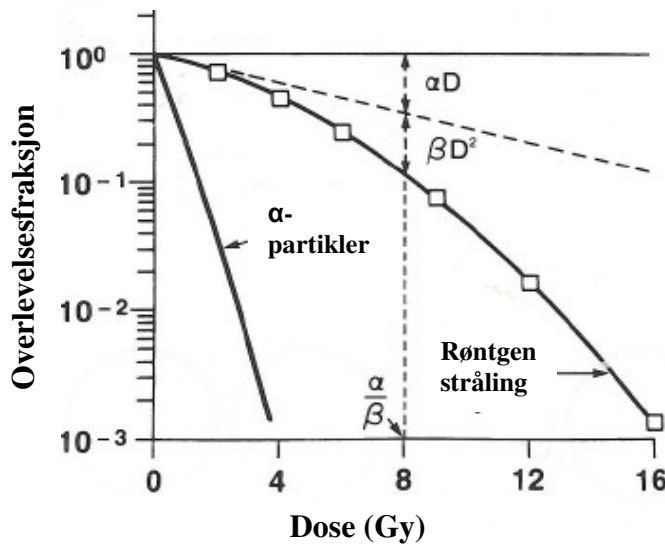
Modellen går ut fra at DNA-molekylet kan bli brutt på to ulike måter:

1. Begge trådene blir brutt av en strålingspartikkel
2. Hver tråd blir brutt uavhengig av hverandre av to forskjellige strålingspartikler.

For at DNA-molekylet skal bli brutt gjennom den andre prosessen må de to strålingspartiklene gi to enkeltrådbrudd nært i tid og rom på DNA-molekylet (Chadwick og Leenhouts, 1973). Er det tid nok vil et enkeltrådbrudd repareres før neste brudd kommer. Og er avstanden mellom bruddene stor nok vil ikke hydrogenbindingene mellom basene i mellomrommet mellom de to bruddene ryke. Det vil altså ikke blir dannet noe dobbeltrådbrudd (Pettersen, 2006). Matematisk kan formelen som viser celleoverlevelsen og dens kurve skrives slik:

$$S = e^{-\alpha D - \beta D^2} \quad (2.10)$$

hvor  $\alpha$ -leddet er en faktor som står for den første prosessen hvor begge trådene blir brutt av en partikkel, og  $\beta$ -leddet står for den andre prosessen. Ved svært lave doser og ved høy LET stråling vil det første leddet dominere ( $\alpha D$ ) og en vil få en eksponensiell overlevelseskurve. Ved høyere doser av lav LET stråling vil det kvadratiske leddet dominere ( $\beta D^2$ ), noe som fører til en krum overlevelseskurve (Chadwick og Leenhouts, 1973). Figur 2.8 viser et eksempel for kurveforløpet ved høy og lav LET stråling.



**Figur 2.8:** Kurver som viser overlevelsesfraksjon mot avgitt stråledose for røntgen- og alfapartikkelstråling. Her inngår to komponenter av celledød. En er proporsjonal til dosen ( $\alpha D$ ), og den andre er proporsjonal til kvadratet av dosen ( $\beta D^2$ ). Dosen hvor de lineære og kvadratiske komponentene er like er ved forholdet  $\alpha/\beta$  (hentet fra Hall og Giaccia, 2006, figuren er modifisert).

## 2.5 Dosimetri og mikrodosimetri

Strålingsdosimetri er en studie av strålingens energiavsettelse i vev. I stråleterapi-sammenheng brukes dosimetri til å kontrollere effektiviteten av terapeutiske behandlinger. Ekstern stråleterapi bruker konvensjonell dosimetri, mens intern bestråling i målrettet stråleterapi ofte trenger en mer detaljert mikrodosimetri. Hovedhensikten med dosimetri er å gi en kvantitativ sammenheng mellom mengde av strålingsenergi lokalt absorbert i vev og de biologiske effektene som denne energiavsetningen skaper (Bardiès og Pihet, 2000). Sammenhengen mellom mikrodosimetri og konvensjonell dosimetri er som følger: Mikrodosimetri involverer små volumer med liten masse hvor strålingen avsetter sin energi i tilfeldige treff, en stokastisk modell. Absorbert dose i konvensjonell dosimetri sier derimot noe om gjennomsnittet av de stokastiske verdiene, og utgjør derfor en ikke-stokastisk modell (Bardiès og Pihet, 2000).



### 2.5.1 Konvensjonell dosimetri

Strålingsdose i konvensjonell dosimetri beregnes i makroskopisk skala. Targetvolumene er mye større enn de små cellulære delene som bygger opp vevet (Humm *et al.*, 1993). Energien som blir avgitt til dette targetvolumet,  $\epsilon$  (energy imparted) er en stokastisk størrelse. Dens gjennomsnittsverdi kan fremstilles slik:

$$\bar{\epsilon} = \sum R_{inn} - \sum R_{ut} + \sum Q \quad (2.11)$$

hvor  $R_{inn}$  og  $R_{ut}$  er summen av strålingsenergiene til ladde og uladde partikler som går inn og ut av volumet ( $Q$  ekskluderer forandringer av hvileenergien) (Bardiès og Pihet, 2000). Dosen til et makroskopisk volum finnes ved og dele total avsatt strålingsenergi i volumet, gjennomsnittet av  $\epsilon$ , på massen av dette volumet (Humm *et al.*, 1993).

$$D = \frac{\bar{\epsilon}}{m} \quad (2.12)$$

Dette er også definisjonen på doseenheten gray (Gy):

$$1 \text{ Gy} = 1 \frac{\text{J}}{\text{kg}} \quad (2.13)$$

For å gi et estimat for hvor biologisk skadelig ulik type og energier av stråling er, benyttes en kvalitetsfaktor,  $Q$ . Dette er en dimensjonsløs variabel som blir bestemt ut fra eksperimentelle verdier av RBE. Kvalitetsfaktoren indikerer at høy LET stråling er mer biologisk skadelig per enhet dose enn lav LET stråling. Doseekvivalent,  $H$ , er produktet av absorbert dose og alle modifierende faktorer.

$$H = DQN \quad (2.14)$$

hvor  $D$  er absorbert dose,  $Q$  er kvalitetsfaktoren og  $N$  er produktet av alle andre modifierende faktorer. Denne størrelsen blir også gitt som J/kg, men enheten kalles sievert (Sv) når den blir brukt om doseekvivalent (Attix, 2004).

### 2.5.2 Mikrodosimetri

Mikrodosimetri er derimot studie av hvordan strålingsenergi blir avsatt i mikroskopiske volum. De mikroskopiske volumene er i størrelsesorden fra diameteren av et DNA-molekyl (2nm) til diameteren på en celle (typisk 20  $\mu\text{m}$ ). Pga. disse små targetvolumene vil mikrodosimetri introdusere strålingens stokastiske effekt som i konvensjonell dosimetri blir neglisjerbar. Størrelsen og viktigheten av disse stokastiske fluktuasjonene avhenger av targetdiameteren, energien og LET verdien til strålingspartiklene. For å bestemme nødvendigheten av å bruke mikrodosimetri benyttes følgende prinsipp: Hvis det relative avviket i lokal dose i target avviker mer enn 20 % fra gjennomsnittet bør de

stokastiske fluktuasjonene tas hensyn til. Dette fører til at man ved alfapartikkelstråling nesten alltid er avhengig av å bruke mikrodosimetri for å få eksakte doseberegninger (Humm *et al.*, 1993). Dette fordi target f.eks. cellekjernen er av samme dimensjon som rekkevidden på strålingspartiklene. Cellekjernene vil ikke få samme dose, noen vil få mange treff mens andre får ingen (Roeske og Stinchcomb, 1997). LET er en viktig parameter i dosimetri, men den er en ikke-stokastisk enhet. Allikevel er den relevant for mikrodosimetrien siden den beskriver variasjonen av ionisasjonstettheten langs banen til den ladde partikkelen når den stopper opp i et medium (Bardiès og Pihet, 2000).

Den mest fundamentale stokastiske parameteren i mikrodosimetri er energiavsetningen,  $\epsilon_1$ , fra en enkelt strålingspartikkel i targetvolumet. For en gitt bestrålingsgeometri, partikkeltype, targetstørrelse og form vil man ha en sannsynlighetsdistribusjon for energiavsetningen,  $f(\epsilon_1)$ . Summen av alle disse energiavsetningene i volumet er som tidligere nevnt definert som overført energi,  $\epsilon$  (energy imparted), og er også en stokastisk enhet. En mer brukt parameter er spesifikk energi  $z$ . Parameteren  $z$  er definert som energiavsetningen  $\epsilon$  delt på massen av targetvolumet,  $m$  (Bardiès og Pihet, 2000; Humm *et al.*, 1993).

$$z = \frac{\epsilon}{m} \quad (2.15)$$

Den spesifikke energien,  $z$ , er den stokastiske utgaven av absorbert dose (Bardiès og Pihet, 2000). I mikrodosimetri er det distribusjonen av den spesifikke energien,  $f(z)$ , som undersøkes. For selv om to ulike distribusjoner av spesifikk energi har samme gjennomsnittlige dose, vil de kunne resultere i to helt forskjellige grader av for eksempel celledød (Roeske og Stinchcomb, 1997). Å finne denne distribusjonen krever mange utregninger, og det finnes hovedsaklig to metoder for å bestemme de mikrodosimetriske spektra:

1. analytiske Fourier transformasjoner.
2. computer baserte Monte Carlo simuleringer.

Rossi *et al.* gjorde bruk av analytiske beregninger for å beregne mikrodosimetriske spektra for eksterne strålefelt. Deres metode baserte seg på å finne  $f(\epsilon_1)$ , energiavsetningsspektrumet for en enkelt strålingspartikkel i targetvolumet (*single event spectrum*). For å finne spektrumet for to partiklers-energiavsettelse (*two event spectrum*) konvuleres dette enkeltpartikkelspektrumet (*single event spectrum*). Og for å finne tre partiklers-energiavsettelsesspektrum (*three event spectrum*) konvuleres spektrumet for de to partiklens-energiavsettelse (*two event spectrum*) med spektrumet for enkelt partikkelens-energiavsettelse (*single event spectrum*) osv. Ved å summere flere (*multiple*) konvulsjoner ble energiavsetningsspektrumet for multiple partikler funnet. Roesch videreutviklet denne teorien for interne emittere. Han fant ut at Monte Carlo metoder kunne bli brukt til å finne energiavsetningsspektrumet for en enkelt vekselvirkning, for så å bruke Fourier eller Laplace transformasjoner til å kombinere disse spektraene. Slik kunne man finne spesifikke energispektra for mange ulike geometrier (Humm *et al.*, 1993).

Humm *et al.* fant de mikrodosimetriske spektra ved å bruke full Monte Carlo simulasjon (1993). Monte Carlo programmet simulerer stokastiske prosesser. Ved hjelp av sannsynlighetsberegninger følges en og en strålingspartikkels vekselvirkninger, og dens mest sannsynlig bane blir kalkulert. Kalkulasjonene spesifiserer hver ionisasjon og eksitasjonsprosess, dens romlige koordinater, mengde energi overført og emisjonen av nye partikler. For å få god nok statistisk informasjon er det behov for mange simuleringer, noe som fører til en lang beregningstid. Monte Carlo metoden har allikevel en stor fordel ved at den i større grad enn analytiske metoder kan tilpasses vanskelig geometri.

Som et alternativ til den omfattende mikrodosimetrien har Medical Internal Radiation Dosimetry (MIRD) komiteen laget et skjema som på en enklere måte kan regne ut absorbert dose på cellulært nivå. Formalismen er basert på at en energifraksjon sendt ut fra en kilde er absorbert av et target volum et stykke unna. Cellulære S-verdier er et hovedbegrep som forteller noe om absorbert dose per enhet kumulert aktivitet. Dosen kan beregnes ut fra følgende uttrykk:

$$\bar{D}(r_k \leftarrow r_h) = \tilde{A}_h S(r_k \leftarrow r_h) \quad \text{hvor} \quad S(r_k \leftarrow r_h) = \sum_i \frac{\Delta_i \Phi_i(r_k \leftarrow r_h)}{m_k} \quad (2.16)$$

hvor  $r_k$  er target regionen og  $r_h$  er kilde regionen. Og  $A_h$  er kumulert aktivitet i kilde regionen.  $\Delta_i$  er gjennomsnittlig energi sendt ut per nukleære overgang, og  $\Phi_i$  er fraksjonen av energi emmitert fra kilderegionen som er absorbert i targetregionen. S-verdiene er tabulert for ulike radionuklider og geometrier. MIRD systemet kan beregne en gjennomsnittlig dose til en cellekjerne og kan derfor være et alternativ til mikrodosimetrien for høye doser av  $\alpha$ -partikler (Goddu *et al.*, 1997; Roeske og Stinchcomb, 1997).

Mange har prøvd å kombinere disse ulike metodene for å beregne korrekt dose til et targetvolum. Roeske og Stinchcomb gjorde i 1997 en kombinasjon av den enkle beregningsmetoden utviklet av MIRD og ekstra informasjon fra mikrodosimetrien. Dette førte til en formalisme som kunne brukes for raskt å finne gjennomsnittlig absorbert dose for  $\alpha$ -emittere, standardavvik og antall celler som ikke fikk noen treff. Disse enklere formalismene kan allikevel bare brukes for visse geometrier (Roeske og Stinchcomb, 1997).



## 3 Materialer og metoder

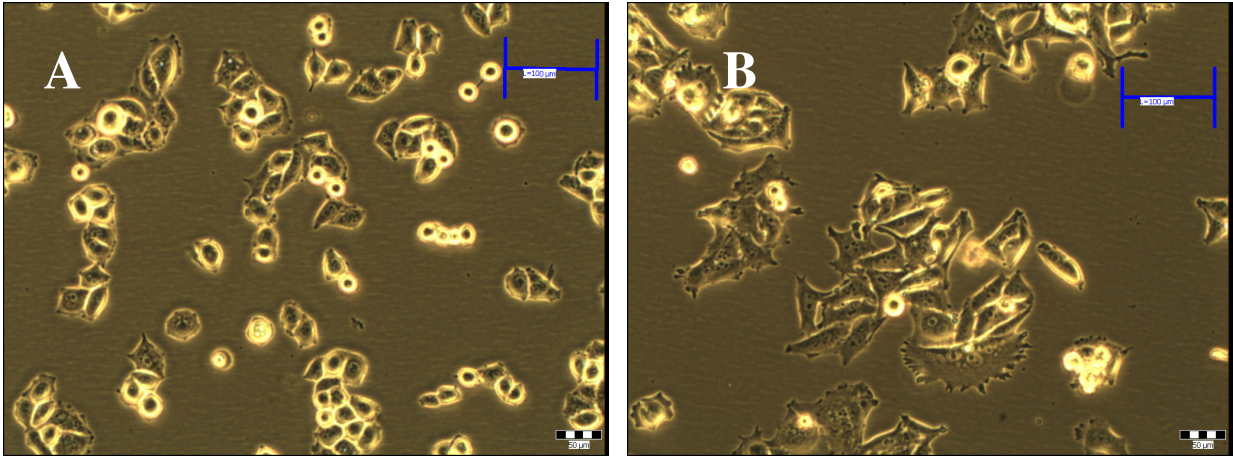
### 3.1 Celledyrkning

#### 3.1.1 Cellelinjer

En etablert cellelinje er en cellepopulasjon, hvor cellene har gått gjennom en genetisk endring som har medført tap av cellens aldringsmekanisme. Slik kan cellene dermed dele seg uendelig mange ganger i kultur (Alberts *et al.*, 2002). I denne oppgaven ble hovedsakelig celler fra cellelinjen NHIK 3025 brukt. I tillegg ble celler fra cellelinjen NHIK 3025 (dox) brukt i noen forsøk.

Cellelinjen NHIK 3025 ble etablert fra en biopsi fra et cervixkarsinom (livmorhalskreft) *in situ* ved Det Norske Radiumhospital i 1967 av Nordbye og Oftebro (Nordbye og Oftebro, 1969). Disse cellene uttrykker ikke funksjonell p53 eller pRb, to viktige genprodukt i cellykluskontroll. Dette er fordi celler fra denne cellelinjen har integrert humant papilloma virus 18 (HPV18). Dette viruset produserer to protein E6 og E7 som binder seg til og inaktiverer p53- og pRb-proteinene (Åmellen *et al.*, 1997 og 1998). Pettersen *et al.* viste i 1977 at den mediane cellyklusliden for deres dyrkningsmetode var 18 t. G<sub>1</sub>-fase varte ca 6,5 t, S-fase varte i 8 t, G<sub>2</sub>-fase varte i 2,5 t og M-fasen varte 1 t. Det ble også vist at den mediane cellyklusliden og fasetidene var uavhengige av om det var en synkronisert eller asynkron cellepopulasjon (Pettersen *et al.*, 1977). Figur 3.1A viser en fotomikrografi tatt i mikroskop av NHIK 3025 celler.

Cellelinjen NHIK 3025 (dox) er en multimedikamentresistent cellelinje. Utviklingen av resistens ble utført ved å kontinuerlig eksponere celler fra cellelinjen NHIK 3025 for gradvis økende konsentrasjoner av cellegiften doxorubicin (Dyrlie, 1995). Tidligere studier har vist at P-glykoprotein er ansvarlig for cellelinjens resistens. P-glykoproteinet er vist å være et ATP-avhengig pumpeprotein som finnes i cellens plasmamembran. Ved hjelp av ATP-hydrolyse pumper P-glykoprotein de ulike substratene ut av cellen, ved aktiv transport mot konsentrasjonsgradienten. Dette vil hindre akkumuleringen av cytotoxiske substanser som cellegift inne i cellen, noe som vil føre til en lavere effekt av cellegiften (Hofsli, 1992; Kartner og Ling, 1989) Cellene viste seg å være resistent mot P-glykoproteinsubstrater som doxorubicin, vinkristin og etoposid. I tillegg ble de vist å være resistent mot medikamentene cisplatin og cytosar (ikke P-glykoproteinsubstrater). Morfologien til de resistente cellene ble endret i forhold til NHIK 3025 celler og cellyklusliden økte til 23 t (Dyrlie, 1995). Figur 3.1B viser en fotomikrografi av NHIK 3025 (dox) celler.



**Figur 3.1:** *A) Fotomikrografi av ubehandlede NHIK 3025 celler. B) Fotomikrografi av ubehandlede NHIK 3025 (dox) celler, legg merke til cellenes endrede morfologi. Blå målestrek øverst i høyre hjørne = 100 µm.*

### 3.1.2 Sterile rutiner

Sterilitet er en nødvendig forutsetning for celledyrkning, dette for å unngå bakterievekst og soppinfeksjoner. Ved celledyrking er det derfor sterile rutiner for alt arbeid med celler. Arbeidet med celler som ikke innebar behandling med radioaktivt materiale ble utført i en steril LAF-benk (LAF = Laminar Flow, modell HH 1.2 pluss, Heto-Holten AS, Danmark). Denne benken ble vasket med destillert vann før og etter bruk og desinfisert med 70 % etanol før bruk. Arbeid som innebar behandling med radioaktive løsninger ble utført i en LAF-benk beregnet på dette (modell 1.8, Heto-Holten AS). Ved arbeid med celler og sterile løsninger ble sterilt engangsutstyr av plast brukt. Alt som ble tatt inn i sterilbenken ble spritert, og alle tuter til flasker og rør ble brent av ved å bruke en gassflamme fra Flameboy (IBS Integra Biosciences, Tyskland). Laboratoriefrakk og spritede engangshansker ble brukt for å ikke kontaminere cellene. Cellekulturproduktene som ble brukt var 0,25 % Trypsin (2,5 g/L) med EDTA (0,38 g/L), Hanks' buffer-HBSS, vekstmedium av typen Advanced MEM og MEM with Earle's salts. Advanced MEM ble tilsatt 10 % varmeinaktivert føtalt kalveserum (FCS), 1 % L-glutamin, 1 % penicillin (5000 units/ml) og streptomycin (5000 µg/ml). MEM with Earle's salts tilsettes 10 % FCS, 1 % Non-Essential Amino Acids, 1 % penicillin og streptomycin. Mediet inneholder næringsstoffene, vitaminene og de uorganiske saltene som cellene trenger, mens kalveserumet tilfører mediet de vekstfaktorene som er nødvendige for celleproliferasjon. Penicillin og streptomycin er antibiotika som skal forhindre bakterievekst i mediet. Det føtale kalveserumet ble varmeinaktivert ved 56 °C i 20 min, dette inaktiverer komplement. Trypsin og vekstmedium ble oppbevart i kjøleskap ved 4 °C, og oppvarmet i vannbad til 37 °C før bruk. Hanks' buffer ble oppbevart i romtemperatur. Cellene ble dyrket i sterile plastflasker (Nunclon, Danmark). Den vanligste størrelsen var T75 flasker (75 cm<sup>2</sup> vekstflate), men T25 (25 cm<sup>2</sup>) og T175 (175 cm<sup>2</sup>) ble også brukt. Ved koloniforsøk ble det brukt sterile seksbrønnsbrett (Corning Incorporated Costar, USA, 9,5 cm<sup>2</sup>).

Ved synkroniseringsforsøk ble det brukt trippelbunnsflasker (Nunc, Danmark, 500 cm<sup>2</sup>).

#### 3.1.3 Omsetning og utsåing

Prolifererende celler trenger hele tiden tilførsel av vekstfaktorer og næringsstoffer samtidig som deres avfallstoffer må fjernes. For å oppnå en cellekultur som vokser eksponensielt, dvs. at celleantallet øker eksponensielt med tiden, er det også viktig at celletettheten i flasken ikke er for stor eller for liten. Ved omsetning ble først det gamle mediet fjernet før celleflasken ble skylt en gang med Hanks' buffer (10 ml for T75 flaske, 3 ml for T25 flaske). Deretter ble trypsin tilsatt flaskene før de ble inkubert til cellene hadde løsnet fra underlaget (3 ml for T75 og 2 ml for T25 flasker). Trypsin er et proteolytisk enzym som spalter visse peptidbindinger, og bryter derfor bindingene mellom naboceller og mellom cellene og underlaget. EDTA forsterker trypsinets virkning ved å binde Ca<sup>2+</sup>-ioner som er nødvendig for cellenes feste til bunnen av flasken (Alberts *et al.*, 2002). Flaskebunnen ble deretter spylt med trypsinløsningen og cellene ble resuspendert til en celleduspensjon med enkeltceller. Denne ble overført til et 15 ml sentrifugerør som inneholdt rundt 7 ml medium for å stoppe trypsinets virkning. Røret ble sentrifugert (Eppendorfcentrifuge 5810R, Tyskland) i 5 min ved 300×g. Etter sentrifugering ble supernatanten fjernet mens pelleten ble resuspendert i en passende mengde medium. En passende mengde celleduspensjon ble deretter overført til nye flasker med friskt medium (15 ml for T75 og 5 ml for T25 flasker). Flaskene fikk filterkorker på og ble overført til inkubatorskap (ThermoForma Series 2 Water Jacketed CO<sub>2</sub> Incubator with HEPA filter, modell 3111, USA) ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub> mellom omsetningene. Avhengig av behov for celler ble cellene satt om i nye T25, T75 eller T175 flasker. NHIK 3025 celler har høy mitotisk aktivitet (Nordbye og Oftebro, 1969) og vokser best ved en lav celletetthet. Dette fører til at disse cellene ble omsatt mandag, onsdag og fredag hver uke. Splitteraten varierte etter behov, men var som oftest på 1:4 eller 1:5. Cellelinjen NHIK 3025 (dox) viste seg å ha lavere mitotisk aktivitet enn NHIK 3025 celler. Disse ble derfor omsatt med en lavere splitterate som 1:2 eller 1:3 avhengig av behov. I noen tilfeller fikk de kun skift av medium. Ved hver omsetning/mediumskift fikk celleflaskene tilført doxorubicin tilsvarende en konsentrasjon på 0,24 µg/ml. Ved behov ble NHIK 3025 cellene dyrket slik at de gikk i platåfase. Dette ble gjort ved å la cellene gå i rundt 7-10 dager i en celleflaske (T25) uten at de ble omsatt. Cellene fikk i midlertidig mediumskift hver dag. Slik nådde cellene konfluens slik at de dekket hele vekstflaten i flasken og dermed gikk i platåfase.

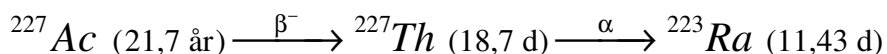
Ved mange forsøk var det nødvendig å så ut et forhåndsbestemt antall celler. I disse tilfellene ble celleantallet i 10<sup>-4</sup> ml telt i et Bürkerkammer før eller etter sentrifugering. Dette kammeret har to rutenett hvor hvert av de inneholder 3\*3 ruter. Antallet på celler per rute ble bestemt i minst fem ruter. Den høyeste og laveste verdien ble forkastet, og gjennomsnittet ble beregnet ut fra de tre gjenværende tallene. Når dekkglasset er lagt over kammeret har hver rute et volum på 10<sup>-4</sup> ml. Ved å multiplisere det gjennomsnittlige antall celler per rute med 10<sup>4</sup> får en antall celler per ml i suspensjonen en talte fra. Etter telling ble ulike celleløsninger laget med kjente konsentrasjoner. Disse celleløsningene

ble porsjonert ut alt etter hvor mange celler en ville så ut. Avhengig av type forsøk ble cellene sådd ut i sterile plastflasker eller sterile seksbrønnsbrett. I seksbrønnsbrettene ble det tilført medium slik at hver brønn inneholdt 3 ml væske til sammen.

## 3.2 Bestråling

### 3.2.1 Alpharadin™ (radium-223)

I det eksperimentelle arbeidet ble legemiddelet Alpharadin™, produsert med hensyn på kliniske utprøvnings, brukt. Dette legemiddelet kommer i væskeform (radium-klorid) og inneholder radium-223 i likevekt med sine døtre (se figur 2.3).  $^{223}\text{Ra}$  fremstilles gjennom ulike prosesser fra actinium-227 (se decaykjede under).



Ved Algeta ASA produseres såkalt ”*Drug Substance*” som er  $^{223}\text{Ra}$  i en citratbuffer. Utgangspunktet er en A-generator (A for actinium), en løsning av  $^{227}\text{Ac}$ , som lagres for innvekst av thorium-227. Fra denne generatoren separeres  $^{227}\text{Th}$  ved hjelp av anionbytterkromatografi. Dette blir videre til en T-generator (T for thorium), som lagres for innvekst av  $^{223}\text{Ra}$ . Fra denne kan dermed  $^{223}\text{Ra}$  separeres ved anionbytterkromatografi. ”*Drug Substance*” sendes deretter til Institutt for energiteknikk (IFE) på Kjeller hvor det ferdigstilles til det endelige ”*Drug Product*” som er samme løsning, men i steril og isoton form (Salberg, 2006a og 2006b). Siden det til tider var behov for ganske store mengder Alpharadin™ ble både ”*Drug Substance*” og ”*Drug Product*” brukt til forsøkene i denne oppgaven. I tillegg ble ulike batcher (produksjoner) blandet, men den radioaktive konsentrasjonen av  $^{223}\text{Ra}$  i Alpharadin™-løsningen ble alltid bestemt ved hjelp av Capintec dosekalibrator i hvert enkelt forsøk (Radioisotop Dose Calibrator CRC-15R, Capintec, USA).

### 3.2.2 Bestrålingsoppsett

Siden  $^{223}\text{Ra}$  decayer videre til døtre som igjen gir fra seg  $\alpha$ - og  $\beta$ -partikler ble dosimetrien for denne kilden ganske kompleks. Gjennom hele decaykjeden blir det sendt ut fire  $\alpha$ -partikler over ganske kort tid, i tillegg til noen  $\beta$ -partikler og  $\gamma$ -stråler. Siden det var  $\alpha$ -partiklenes biologiske effekt som skulle undersøkes ble ulike forenklinger med hensyn på doseberegninger gjort. For å unngå mikrodosimetri, ble området som det var ønskelig å finne dosen til utvidet fra det cellulære nivå til vekstmediet. For å finne dosen til mediet måtte først antall decayer av  $^{223}\text{Ra}$  beregnes. Alpharadin™ er en løsning av  $^{223}\text{Ra}$ -klorid i (secular) likevekt med sine døtre (se kapittel 2.2.2). Døtrene hadde derfor lik aktivitet som  $^{223}\text{Ra}$ . For å finne antall decay som inntraff i vekstmediet ble ligning 2.5 integrert over behandlingstiden:



$$x = \int_0^t A_0 e^{-\lambda t} dt \quad (3.1)$$

$$x = \left[ -\frac{A_0}{\lambda} e^{-\lambda t} \right]_0^t$$

hvor  $x$  er antallet kjerner som decayer per ml. Videre måtte en vite hvor mye energi som ble sendt ut per decay av  $^{223}\text{Ra}$ . Pga.  $^{223}\text{Ra}$ -kjedens korte fysiske halveringstid og faktumet at tre av  $\alpha$ -partiklene sendes ut innen noen få sekunder (se decaykjede i figur 2.2), ble det antatt at alle døtrene i decaykjeden fantes i mediet også over den korteste behandlingstiden på 1 time. Denne antagelsen førte til at man kunne anta at det var decaykjedens totale energiutsendelse på 28,2 MeV som ble sendt ut per decay av  $^{223}\text{Ra}$ . Denne verdien inneholder all type strålingsenergi ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) som blir sendt ut ved full decay av  $^{223}\text{Ra}$  til stabilt bly-207 (Fisher og Sgouros, 1999). Siden det her sendes ut strålingspartikler med en viss rekkevidde vil noe av strålingsenergien forsvinne fra mediet, og dermed ikke bidra til den absorberte dosen. Det måtte derfor tas hensyn til hvor mye av denne energien som forsvant fra systemet gjennom både  $\alpha$ - og  $\beta$ -partiklene og  $\gamma$ -strålene. For all enkelthets skyld ble dette tapet satt til å være 10 % av energien. Antagelsene som lå til grunn for denne verdien var flere. Systemet ville her si en enkelt brønn som inneholdt et sylindervolum på 3 cm<sup>3</sup> med Alpharadin<sup>TM</sup>-medium. Radiusen i dette volumet var 1,74 cm og høyden på mediet var 3,16 mm.  $\beta$ -partiklene og  $\gamma$ -strålene står for kun 7 % av den totale energien på 28,2 MeV som sendes ut per fulle decay. De to  $\beta$ -partiklene som sendes ut i denne kjeden har en energi på omtrent 400 og 500 keV, med en rekkevidde på henholdsvis 1,5 og 2 mm i organisk materiale ( $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$ ). Disse partiklene sto altså for omtrent halvparten av energien som sendtes ut ved  $\beta$ -partikler og  $\gamma$ -stråler. Med hensyn på  $\beta$ -partiklenes relativt korte rekkevidde og systemets dimensjoner kunne det antas at energien fra disse partiklene ble absorbert i mediet, mens  $\gamma$ -strålene med en mye lengre rekkevidde forsvant fra systemet. Omtrent 3,5 % av den utsendte energien antas altså å forsvinne med  $\gamma$ -strålene. Videre ville også en del av energien fra  $\alpha$ -partiklene gå tapt i randsonene. Disse partiklene har en omtrentlig rekkevidde på 50  $\mu\text{m}$ . Enkle geometriske betraktninger viste at omtrent 25 % av alfapartikkelenergien forsvant i randsonen. Hvis man antok at denne andelen energi ble tapt innen 50  $\mu\text{m}$  fra kanten, ville dette tilsvare 0,93 % av den totale energimengden. En annen faktor som måtte undersøkes i dette henseende var hvor mye av aktiviteten i mediet som ble redusert over behandlingstiden. For den lengste behandlingstiden på 24 timer utgjorde dette 6 % av den opprinnelige aktiviteten. For kortere behandlingstider ville denne faktoren utgjøre enda mindre. Doseraten ble dermed ganske konstant gjennom behandlingstiden. Omtrent 90 % av den totalt utsendte energien ble altså antatt å bli avsatt i mediet hvor cellene befant seg. Dosen til mediet ble derfor bestemt av følgende uttrykk:

$$D = 0,9 \cdot \frac{E}{m} \cdot x \quad (3.2)$$

hvor  $E$  er den frigitte energien per kjerne som decayer målt i SI-enheten Joule, og  $m$  er massen til 1 ml angitt i SI-enheten kg. Dette gir ikke en fullverdig doseberegning, men gir

en indikasjon på hva slags dose mediet mottar. Doseområdet gikk fra 0-3,4 Gy i disse forsøkene.

Radioaktiv konsentrasjon av  $^{223}\text{Ra}$  i Alpharadin™-løsningen ble kontrollert ved hjelp av en dosekalibrator før forsøk. For å bestråle cellene ble ulike aktivitetskonsentrasjoner av  $^{223}\text{Ra}$  blandet med vekstmedium. Avhengig av forsøk ble det brukt ulike aktivitetskonsentrasjoner og ulik eksponeringstid. Konsentrasjonene som ble brukt lå i området fra 1000-120 000 Bq/ml. Eksponeringstiden lå mellom 1-24 t. Dette resulterte i doserater mellom 0,015-1,7 Gy/t. Cellene som ble behandlet med radioaktivt medium ble inkubert i en egen inkubator beregnet for dette (Forma Scientific CO<sub>2</sub> water Jacketed inkubator, modell 3111, USA). For å avslutte behandlingen ble cellene vasket tre ganger med 3 ml Hanks' buffer, før de ble tilført 3 ml friskt medium.

#### 3.2.3 Strålevern

Siden  $^{223}\text{Ra}$  decayer som den gjør (se 2.2.4), vil man i strålevernssammenheng hovedsakelig prøve å beskytte seg mot  $\alpha$ -partiklene ( $\beta$ - og  $\gamma$ -partikler står kun ca.7 % av energien sendt ut).  $\alpha$ -Partiklenes korte rekkevidde gjør denne oppgaven overkommelig. Den har omtrentlig en rekkevidde på 3.5 cm i luft og vil ikke penetrere det ytre døde laget av hud (stratum corneum). Faren med  $\alpha$ -partikler er derimot det å få de inn i kroppen, siden de kan gi en høy svært lokalisert dose (Biggin, 2007). Det var derfor viktig med kontinuerlig sjekk av området hvor  $^{223}\text{Ra}$  ble brukt slik at ikke radioaktiviteten ble spredt til andre områder. I alle forsøk hvor celler ble behandlet med  $^{223}\text{Ra}$  ble en  $\alpha$ -probe brukt (Electra, Saint-Gobain Crystals and Detectors, UK). Denne har et display som viser tellinger per sekund, og den gir samtidig fra seg en lyd ved deteksjon av en  $\alpha$ -partikkel.  $\alpha$ -Proben ble brukt til å undersøke flater for kontaminering før og etter arbeid, sjekk av alt utstyr og hansker brukt gjennom forsøket. Ved arbeid med radioaktivitet ble LAF-benken benyttet. Denne benken er godkjent av Statens strålevern for bruk av 25 MBq av  $^{223}\text{Ra}$ . Ved arbeid inne i denne benken ble lange plastermer og to lag med hansker brukt i tillegg til laboratoriefrakk. Alt arbeid med radioaktivitet inne i benken foregikk på en plastplate dekket av trekkpapir med en gummiert underside (Versi-Dry Lab-Soakers, Nalgene, USA). Dette trekkpapiret ble skiftet mellom hvert forsøk eller ved behov. Alle radioaktive løsninger ble merket med plasttape med symbolet for radioaktivitet. De ble i tillegg skjermet med en blyblokk ved lengre oppbevaring i benken. Alt som ble tatt inn i benken ble behandlet som radioaktivt avfall og sjekket. Løsninger ble samlet i 50 ml rør og kastet sammen med pipetter og annet avfall i zip-posere som var merket type radioaktive nuklide, dato og initialer. Alle disse posene ble etter et forsøk samlet i en tykk avfallspose merket med type radioaktive nuklide, antatt aktivitet, dato og initialer. Disse posene ble oppbevart i spesielle avfallsskap. Siden  $^{223}\text{Ra}$  er en kortlivet  $\alpha$ -emitter ( $t_{1/2}=11,4$  døgn) ble dette avfallet oppbevart i 6 måneder før det ble målt og eventuelt kastet hvis aktiviteten var lav nok. Arbeidet med radioaktivt materiale ble i denne oppgaven utført i C-laboratoriet. Dette er en klassifisering av laboratoriet som sier at en kan jobbe med aktiviteter som er 10 ganger unntaksgrensen i et slikt laboratorium. Unntaksgrensen er en aktivitetsgrense satt for hver radioaktive nuklide. Ved arbeid med aktiviteter under denne grensen gjelder ikke lenger reguleringene i forhold til strålevern.

For  $^{223}\text{Ra}$  er unntaksgrensen på  $10^5$  Bq, og man kan derfor jobbe med 1 MBq i en C-lab. Ved noen tilfeller ble det nødvendig å ta celleprøver som var behandlet med  $^{223}\text{Ra}$  ut av C-labben for å f.eks. kjøre flowcytometri. I slike tilfeller ble celledelene målt på germaniumdetektoren (HPGe GEM 15 Ortec Solid-State Photon Detector, PerkinElmer, USA) for å se at aktiviteten igjen i prøven var under  $10^5$  Bq. Som en ekstra sikkerhet undersøkes alle som går ut fra C-labben av en hånd- og fot-monitor (Sirius 4AB, Canberra, Australia). Dette for å hindre kontaminasjon av ikke-klassifiserte områder. Ellers ble alt arbeid i C-lab utført i henhold til gjeldende regler i "Standard Operation Procedures" hos Algeta ASA.

#### 3.2.4 Radioaktivitetsdetektorer

##### *Dosekalibrator - Capintec*

Denne kalibratoren ble brukt ved hvert forsøk for å finne aktivitetskonsentrasjonen til  $^{223}\text{Ra}$  i Alpharadin™-løsningen. Dosekalibratoren er et ionekammer. Et ionekammer inneholder to eller flere elektroder. Disse elektrodene samler ladningen som blir produsert av den radioaktive strålingen i kammeret. Den radioaktive strålingen vekselvirker nemlig med gassen i kammeret eller kammerveggene. Ionene som blir produsert setter opp et elektrisk felt og en strøm vil gå. Antall ioner produsert pga. denne strålingen blir detektert og er direkte proporsjonal med energien avsatt i kammeret. For radionuklider med kjent kalibreringsnummer kan denne energien da regnes om til aktivitet i Becquerel. Capintec dosekalibrator er kalibrert ved hjelp av en  $^{226}\text{Ra}$ -kilde (Radioisotope Dose Calibrator CRC-15R owner's manual).

##### *Germaniumdetektor - HPGe GEM50 og GEM15*

Disse detektorene ble brukt ved ulike forsøk, og ved kontroll for aktiviteten i prøver en ønsket å ta ut av klassifisert område. Denne type detektor gjør bruk av halvleder-materialet germanium for å detektere stråling i form av ladde partikler eller fotoner. Strålingen blir målt ut fra antall ladninger som oppstår i detektoren. Ioniserende stråling produserer frie elektroner og hull (fravær av elektron) i materialet. Antall elektron-hull par er proporsjonal til energien overført fra strålingen til halvledermaterialet. Under innflytelse av et elektrisk felt fører disse ladningene en strøm som blir detektert. Siden energimengden som trengs for å skape et slikt elektron-hull par er kjent, kan energien til strålingen bestemmes. Energien som skal til for å lage et elektron-hull par er svært liten i forhold til energien som trengs for å produsere et ion i en gassdetektor som f.eks. et ionekammer. Instrumentene er derfor svært sensitive og kan gi totalaktiviteter for svært svake prøver (Knoll, 1999). GEM50 og GEM15 detekterer ulike fotoner fra en radioaktiv prøve og skiller mellom de ulike gammaene fra de ulike døtrene. Dette fører til at en får opp et helt gammaspekter for prøven, og ved hjelp av disse instrumentenes nuklidebibliotek kan en identifisere  $^{223}\text{Ra}$  og dets døtre.

### 3.3 Celleoverlevelsesforsøk

#### 3.3.1 Koloniforsøk for asynkrone NHIK 3025- og NHIK 3025 (dox) celler i eksponensiell vekst og NHIK 3025 platåfaseceller

For å måle celleoverlevelse er koloniforsøk fremdeles ”gullstandarden”. Denne metoden måler reproducerbar overlevelse ut fra teorien om at det bare er de cellene som ikke har mistet sin reproducerbare evne (evnen til å danne kolonier) som kan sies å overleve en type behandling (Hall og Giaccia, 2006). I koloniforsøkene med celler fra cellelinjene NHIK 3025 og NHIK 3025 (dox) ble disse sådd ut i seksbrønnsbrett, ett brett for hver dose/aktivitet, i passende celleantall slik at en ville få rundt 100 kolonier i hver brønn. For behandling med doseratene 0,015-0,073 Gy/t ble det sådd ut seks brønner for hver dose, inkludert kontrollen, mao. 6 replikater per dose. For behandling med de høyere doseratene, 0,15-0,36 Gy/t, ble det sådd ut 3 replikater per dose. Etter utsåing ble brettene med celler i plassert i inkubatoren i omtrent 3 timer slik at cellene ble festet til bunnen av brønnen. I løpet av denne tiden ble aktivitetskonsentrasjonen av  $^{223}\text{Ra}$  kontrollert og Alpharadin<sup>TM</sup>-mediet ble gjort klart. Etter at cellene var festet ble det skiftet friskt medium på kontrollene og tilført radioaktivt medium til de andre brettene. Deretter ble cellene inkubert med dette i en forhåndsbestemt tid avhengig av type forsøk. Behandlingen ble stoppet etter denne tiden ved at cellene ble vasket tre ganger med 3 ml Hanks’ buffer i hver brønn. Cellene fikk deretter tilført 3 ml friskt medium i hver brønn. Etter en uke fikk cellene mediumskift, og etter ytterligere en uke ble koloniene fiksert og farget. Hver brønn ble vasket med 0,9 % natriumklorid (NaCl i H<sub>2</sub>O) to ganger og deretter fiksert i 100 % etanol (Absolut alkohol prima, Arcus, Norge) i 4 min. Til slutt ble koloniene farget med metylenblått og talt. Kolonier med 40 celler eller mer ble talt. I de tilfellene det var vanskelig å vurdere dette ble det benyttet et mikroskop for å telle antallet av celler i kolonien. I noen forsøk ble mediet etter en ukes inkubering analysert for å finne aktiviteten i dette. Til dette ble det brukt en gammateller (Wizard 3 1480 Automatic Gamma Counter, PerkinElmer, UK).

For koloniforsøket med NHIK 3025 platåfaseceller ble prosedyren litt annerledes. Her ble platåfasecellene behandlet med Alpharadin<sup>TM</sup>-medium i celleflaskene med en eksponeringstid på 24 t, før disse flaskene ble vasket tre ganger med Hanks’ buffer og trypsinert. Cellesuspensjonen ble deretter fortynnet og celleantallet bestemt, før et gitt antall celler ble sådd ut i seksbrønnsbrett. Disse ble inkubert og fikk videre samme behandling som nevnt ovenfor.

#### 3.3.2 Koloniforsøk for synkroniserte NHIK 3025 celler i eksponensiell vekst

I disse forsøkene ønsket vi å undersøke strålingssensitiviteten for cellene i de ulike fasene av cellesyklus. Dette ble gjort gjennom koloniforsøk hvor vi så på celleoverlevelsen og om denne endret seg når cellene ble behandlet i en bestemt tid med Alpharadin<sup>TM</sup>-medium i de ulike cellesyklusfasene. For å få cellene til å gå synkront gjennom cellesyklus ble metoden ”mitotisk høstning” tatt i bruk (se kapittel 2.3.2). Denne metoden går som tidligere nevnt ut på å riste løs mitosene slik at en får et medium med nesten bare

mitotiske celler som såes ut. Cellenes gang gjennom de ulike fasene og cellesyklusiden er avhengig av stabile temperaturer rundt 37 °. Derfor utføres gjerne slike forsøk i store inkubatorrom som har en temperatur på 37 °. I vårt tilfelle ble forsøket gjort i romtemperatur pga. mangel på et slikt rom. For at forsøket skulle være mulig å gjennomføre under disse omstendighetene ble all behandling av cellene i romtemperatur gjort så raskt som mulig. Alt materiale som skulle i kontakt med cellene som f.eks. plast og medium ble varmet opp til 37 °, og i tillegg ble en varmeblokk (Eppendorf Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Tyskland) som holdt temperaturen 37 ° brukt til å holde varmen i brettene mens de ble behandlet. Dagen før forsøket startet ble cellene sådd ut i fire trippelbunnsflasker. Disse ble dagen etter ristet ved å ta i bruk en resiprok ristemaskin (IKA HS 260 basic, Tyskland, frekvens 300 1/min og amplitude 20 mm). For å fjerne løse interfase-celler og døde celler fikk flaskene to innledende rist med mediumskift (60 ml/flaske) mellom hvert rist før det endelige ristet ble gjort. Ristene hadde en varighet på ett minutt, og mellom de to første ristene var det en ventetid på 15 minutter hvor cellene sto i inkubatoren (Pettersen *et al.*, 1977). Det endelige ristet på ett minutt ble tatt etter en ytterligere ventetid på 45 min hvor cellene var i inkubatoren. Mediet som nå ble fjernet fra flasken inneholdt de mitosene som ble brukt videre. 10 ml av dette mediet med mitoser ble sentrifugert i 5 minutter. I mellomtiden ble rundt 10 T75 flasker fylt med 20 ml medium med mitoser i hver flaske. Disse flaskene ble plassert i inkubator for at de senere skulle være en kontroll for hvor cellene befant seg i cellesyklus. Cellepelleten fra sentrifugerøret ble resuspendert i 1 ml rent medium slik at mediet med mitoser ble oppkonsentrert ti ganger. Denne løsningen ble talt i Bürkerkammer, og ut fra dette ble passende cellesuspensjoner med kjent konsentrasjon laget fra mediet med mitosene. Mitosene ble deretter sådd ut i fem av brønnene i et seksbrønnsbrett til koloniforsøk, mao. 5 replikater. Kontrollbrettene inneholdt 150 celler per brønn, mens de behandlede brettene inneholdt 500 celler per brønn. Brettene ble rett etter utsåing plassert i inkubator. Videre ble cellene i brettene tilsatt  $^{223}\text{Ra}$  fra Alpharadin™-medium med en aktivitetskonsentrasjon på 55 kBq/ml av  $^{223}\text{Ra}$  i en time. Ett og ett cellebrett ble behandlet ved ulike tider etter ristingen slik at cellene fikk behandlingen i ulike deler av cellesyklus. De ulike brettene ble behandlet ved 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16.5, 18, 20 og 22 timer. Brett med kontrollceller fantes for 2, 6, 10 og 14 timer gamle celler. Behandlingen ble avsluttet som vanlig med vask av cellene tre ganger med 3 ml oppvarmet Hanks' buffer før cellene i brettene ble tilsatt rent medium igjen. Kontrollcellene fikk samme behandling, men uten noen aktivitet i mediet. Når cellebrettene var utenfor inkubatoren ble de hele tiden holdt på varmeblokken slik at temperaturen ikke skulle synke. Cellene i seksbrønnsbrettene ble inkubert i syv dager før de fikk et mediumskift, og syv nye dager før de resulterende koloniene ble fiksert. For å kontrollere at cellene befant seg i den rette fasen under behandling, ble T75 flaskene brukt som kontroll under forsøket. Disse ble trypsinert og farget med et DNA-fargestoff propidiumjodid (PI, se kapittel 3.4). Prøvene ble kjørt på et flowcytometer som viste hvor celleprøven var i cellesyklus ved hjelp av DNA-histogrammer (se kapittel 3.4). Prøver ble kjørt ved tidene 6, 8, 10, 12, 14, 16.5, 18, 20 og 22 timer. For å forberede forsøk som dette ble testsynkroniseringer utført, hvor en kartla cellesyklusens lengde og lengden av de ulike fasene. Forsøk med behandling ble utført fire ganger, men kun to av forsøkene ble gjennomført da cellene ikke alltid viste seg å gå gjennom cellesyklus på riktig måte.

### 3.3.3 Beregning av overlevelsesfraksjonen for enkeltceller

Selv uten behandling vil antall kolonier som vokser opp sjelden være lik antall utsådde celler. Dette fordi det kan være feil og usikkerheter i telling og utsåing. I tillegg er det en påkjenning med trypsinering og utsåing for cellene (Hall og Giaccia, 2006). Dette tas det hensyn til ved å alltid ha med en prøve hvor cellene ikke blir behandlet med det effektgivende stoffet man ønsker å undersøke (kontroll). Slik kan vi måle andelen av de ubehandlede cellene som overlever i det systemet som er satt opp for forsøket. Denne andelen kalles ”*plating efficiency*” (PE), og denne faktoren brukes til å justere overlevelsesfraksjonen for de behandlede cellene. *Plating efficiency* finnes fra følgende forhold (Hall og Giaccia, 2006):

$$PE = \frac{N_K}{N_{K0}} \quad (3.3)$$

hvor  $N_K$  er midlere antall kolonier per brønn i kontrollgruppen og  $N_{K0}$  er antallet celler sådd per brønn i kontrollgruppen. Overlevelsesfraksjonen, ”*surviving fraction*” (SF), for hver gruppe som har fått samme behandling blir derfor (Hall og Giaccia, 2006):

$$SF = \frac{N}{N_0 \cdot PE} \quad (3.4)$$

hvor  $N$  er midlere antall kolonier per brønn ved behandling, og  $N_0$  er antallet celler sådd ut per brønn ved behandling. Standardfeilen (*standard error*,  $SE$ ) til  $N$  og  $N_K$  kan beregnes ut fra følgende generelle formel:

$$SE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - X_m)^2}{n(n-1)}} \quad (3.5)$$

hvor  $n$  er antall brønner,  $X_i$  er antallet kolonier i brønn  $i$ , og  $X_m$  er midlere antall kolonier per brønn for denne gruppen. Standardfeilen for overlevelsesfraksjonen blir derfor:

$$SE_{SF} = \sqrt{\left( \left( \frac{\delta SF}{\delta N_K} SE_{N_K} \right)^2 + \left( \frac{\delta SF}{\delta N} SE_N \right)^2 \right)} = \sqrt{\left( \left( \frac{-N \cdot N_{K0}}{N_0 \cdot N_K^2} SE_{N_K} \right)^2 + \left( \frac{N_{K0}}{N_0 \cdot N_K} SE_N \right)^2 \right)} \quad (3.6)$$

hvor  $SE_{N_K}$  er standardfeilen i midlere overlevelsesfraksjon i kontrollgruppa, og  $SE_N$  er standardfeilen i midlere overlevelsesfraksjon ved behandling. Celleoverlevelsesforsøkene ble gjentatt flere ganger, og de endelige overlevelsesfraksjonene for hver doserate,  $\overline{SF}_{vektet}$  ble beregnet som middelverdien av overlevelsesfraksjonene ved de enkelte forsøkene, vektet etter størrelsen på standardfeilen for de ulike fraksjonene:

$$\overline{SF}_{vektet} = \frac{\sum SF_i / SE_{SF_i}^2}{\sum 1 / SE_{SF_i}^2} \quad (3.7)$$

hvor  $SF_i$  er overlevelsesfraksjonen ved forsøk  $i$  for en bestemt doserate, og  $SE_{SF_i}$  er standardfeilen for overlevelsesfraksjonen ved forsøk  $i$  for en bestemt doserate. Usikkerheten i det vektete middelet av overlevelsesfraksjonen ble funnet ved å bruke formel 3.5 for standardfeil. Disse verdiene for midlet overlevelse med standardfeil ble plottet opp mot de ulike dosene ved hjelp av programmet "GraFit 5" (Versjon 5.0.11, Erithaus Software, Ltd., UK). Dette programmet ble også brukt til å gjøre en ikke-lineær kurvetilpasning til dataene. Her ble overlevelsesfraksjonene fra hvert enkelt forsøk tatt hensyn til, samtidig som tilpasningen ble vektet til standardfeilen for hver enkelt overlevelsesfraksjon.

For koloniforsøk utført med asynkrone celler ble overlevelsesfraksjonen ikke korrigert for multiplisitet. Dette fordi vi antok at cellene ble sådd ut som enkeltceller. I tillegg startet behandlingen kun 3 timer etter utsåing, slik at NHIK 3025 cellene med en median cellesyklusetid på rundt 20 timer ikke ville få nok tid til å dele seg og dermed gi opphav til en stor andel dubletter. For koloniforsøket som skulle gi en alders-responskurve ble det derimot nødvendig å korrigere for multiplisitet. Dette fordi en her gjorde bruk av metoden "mitotisk høstning" for å få en synkronisert cellepopulasjon. Denne metoden resulterer i at en sår ut dubletter av celler i stedet for enkeltceller som vanligvis blir sådd ut. Overlevelsesfraksjonene ble derfor korrigert for en multiplisitet på to ved hjelp av følgende formel:

$$SF = 1 - (1 - SF_{korrigert})^m \quad (3.8)$$

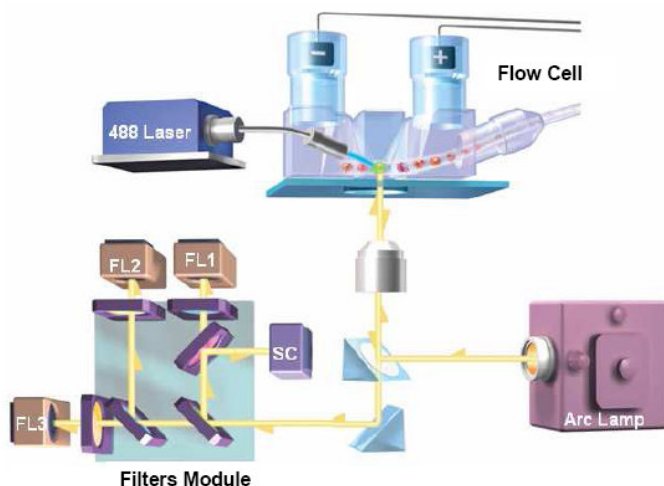
hvor  $SF$  står for den observerte overlevelsesfraksjonen, mens  $SF_{korrigert}$  står for den korrigerte fraksjonen av overlevende enkeltceller. Siden multiplisiteten her er to blir  $m = 2$  og formelen løses for  $SF_{korrigert}$  ved hjelp av en annengradsligning (Pettersen, 2006; Rockwell, 1985). Standardfeilen korrigeres for multiplisitet på samme måte.

## 3.4 Flowcytometri

### 3.4.1 Flowcytometri

Flowcytometri er en teknikk hvor en måler fluorescens og spredt lys fra en løsning av enkeltpartikler som for eksempel celler eller cellekjerner. Disse cellene kan være farget med et fluoriserende fargestoff som binder seg til den komponenten i cellen det er ønskelig å undersøke. I denne oppgaven ble Quanta SC MPL systemet brukt (Beckman Coulter) som vist i figur 3.2. Dette flowcytometeret har to uavhengige eksitasjonslyskilder, en 488 nm laser og en UV lampe. Det kan måle elektroniske volum (EV) som gir størrelse, spredt lys (SC) som forteller granulariteten, tre fluoriserende farger (FL1, FL2, FL3) og cellekonsentrasjon samtidig (Beckman Coulter training guide, 2006). Prøven av celler som skal analyseres ligger i en saltvannsløsning. Cellene føres av en

væskestrøm enkeltvis gjennom "flow cellen" og dens optiske målefokus. Dette punktet ligger mellom to elektroder som har en svak strøm mellom seg. Når cellen passerer dette punktet vil cellen oppta plass og den ledende løsningen blir forflyttet. Dette fører til et brudd i strømmen som går mellom elektrodene og resistansen endres. Som resultat oppstår det en spenningspuls med en amplitude som er direkte proporsjonal med cellevolumet. Denne pulsen er gitt ved det elektroniske volumet (EV). Laser og UV lampen er rettet mot det optiske målefokus og eksiterer de fluoriserende merkestoffene som cellene er merket med. Det emitterte lyset reflekteres til et speil og videre til filtre som igjen retter lyset inn til tre fotomultiplikatorer. Disse fotomultiplikatorene genererer spenningspulser proporsjonalt til mengden fluorescens. Hvis laseren er på vil laserlyset bli spredt når cellene går gjennom flowcellen. Lyset som spres i en rett vinkel går inn i spredningsdetektoren (SC). Denne detektoren gir også en spenningspuls proporsjonalt til mengden lys. Alle disse pulsene blir forsterket, digitalisert og analysert for pulshøyde. Denne pulshøyden brukes til å lage plottene som kommer opp på hovedskjermen. Hvis det fluoriserende stoffet binder seg til bare en bestanddel i cellen er intensiteten av dette fluorescenslyset et mål for cellens innhold av denne bestanddelen. Det finnes mange ulike fargestoffer som binder seg til ulike deler av cellen, og flowcytometri gir derfor mange analysemuligheter (Beckman Coulter training guide, 2006).



**Figur 3.2:** Skisse av optikken i Quanta SC MPL flowcytometeret med laser og UV lampe (hentet fra Beckman Coulter training guide, 2006).

### 3.4.2 DNA-farging

Cellene brukt til flowcytometri var behandlet med  $^{223}\text{Ra}$  i ulike konsentrasjoner og ved ulike eksponeringstider. Det var ønskelig å undersøke fordelingen av celler i cellesyklus etter denne behandlingen og kontrollere dette opp mot en ubehandlet prøve. For å undersøke dette ble DNA-prepareringsreagenser brukt på hele celler, ikke cellekjerner. Prepareringen besto av to ferdiglagde reagenser: DNA-prep LPR, som permeabiliserer cellemembranen slik at neste reagens slipper inn i cellen, og DNA-prep Stain som inneholder det fluoriserende fargestoffet propidiumjodid (PI). Dette stoffet binder seg til



DNA-molekylene (og dobbelttrådig RNA) og fluoriserer med en lysintensitet som er direkte proporsjonal med DNA-innholdet. For å unngå binding til RNA-molekylet inneholder denne løsningen i midlertidig RNase. Det kan derfor observeres hvor cellen er i cellesyklus avhengig av hvor mye DNA den inneholder. Denne metoden ble brukt på eksponensielt voksende NHIK 3025 celler og NHIK 3025 (dox) celler i tillegg til NHIK 3025 celler i platåfase.

Ved forsøk med eksponensielt voksende celler ble omkring  $10^6$  celler sådd ut i T25 flasker. Disse celleflaskene ble tilført ulike konsentrasjoner av  $^{223}\text{Ra}$  i Alpharadin™-medium over ulike behandlingstider. I noen forsøk ble i tillegg flere flasker behandlet med samme konsentrasjon av  $^{223}\text{Ra}$  og samme behandlingstid. Slik kunne en undersøke hvordan responsen på stråledosen endret seg ved ulike tider etter avsluttet behandling. Ved behandlingstidens slutt ble cellene vasket med Hanks' buffer og trypsinert som beskrevet i kapittel 3.1.3. Cellepelletten ble tilført 50 µl Hanks' buffer og lett ristet, noe som resulterte i en cellesuspensjon på omtrent 100 µl. Suspensjonen ble deretter tilsatt 200 µl LPR og kjørt på vortexmikseren (MS1 Minishaker, IKA, Brasil) i noen sekunder. Videre ble 2 ml DNA-Prep Stain tilsatt og dette ble også kjørt i vortexmikseren noen sekunder. Prøven ble deretter inkubert mørkt (dekket av aluminiumsfolie) i minst en time.

Ved forsøk med celler i platåfase ble koloni og flowcytometriforsøk utført samtidig. Her ble cellene som tidligere nevnt i kapittel 3.3.1 behandlet i celleflaskene hvor cellene var i platåfase. Behandlingen ble avsluttet og cellene trypsinert og talt. Noen av cellene ble her sådd ut til koloniforsøk, mens omtrent  $10^6$  celler ble tatt ut av denne cellesuspensjonen og overført til et sentrifugerør. Cellene ble sentrifugert ned til en pellet, merket med PI og inkubert mørkt en time. Disse prøvene ble deretter kjørt på flowcytometeret. For å undersøke cellenes respons på behandlingen 24 t etter endt behandling ble i tillegg  $10^6$  behandlede celler sådd ut tynt i T25 flasker, slik at de fikk muligheten til å vokse og gå i cellesyklus ett døgn. Flaskene ble inkubert til neste dag, trypsinert og merket med PI på samme måte.

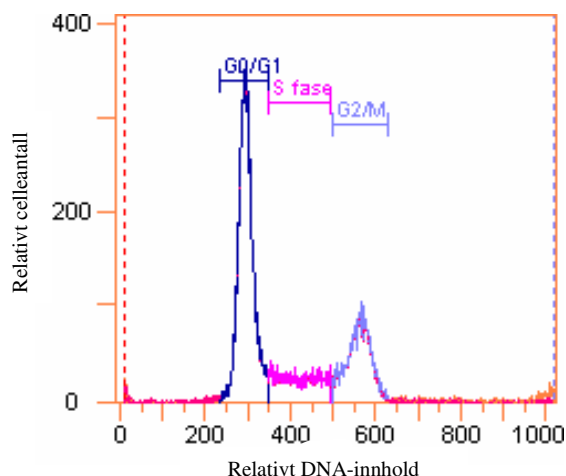
Prøvene fra alle disse ulike forsøkene ble etter inkuberingstiden overført til små kopper (Vi-Cell 4 ml sample vials, Beckman Coulter USA) beregnet for flowcytometeret. For å ha en rask kvalitetskontroll av apparatet ble Flow-Check™ Fluorospheres (Beckman Coulter, USA) kjørt før prøvene. I tillegg ble røde blodceller fra ørret (DNA-Reference Calibrator, NPE Systems USA) kjørt for å se at alle innstillingene var riktige for celleprøver også. Ørretcellene ble også tilsatt prøvene i ulik mengde for å ha en intern standard. Denne toppen ble satt på kanalnummer 100 ved å justere spenningen på fotomultiplikatoren som mottar fluoriserende lys fra PI. Videre ble kontrollen kjørt for å finstille forsterkningen og det elektroniske volumet slik at riktig del av skalaen kom frem. Deretter ble de behandlede prøvene kjørt uten å endre noen innstillinger annet enn flowhastigheten som ble holdt på rundt 100-150 event/sekund. Omtrent 25 000 tellinger ble tatt opp fra hver celleprøve for å få en god statistikk.

### 3.4.3 Analyse av flowcytometridata

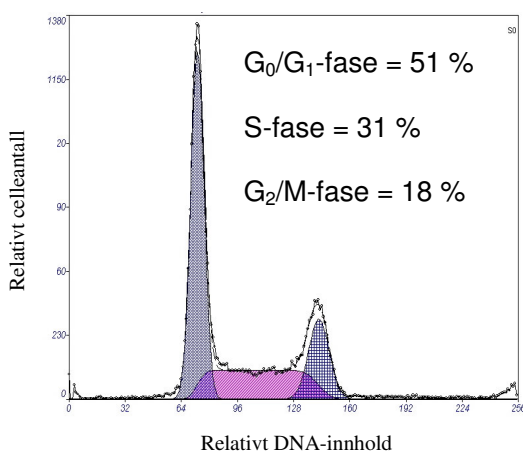
Et typisk DNA-histogram av NHIK 3025 celler er vist i figur 3.3. DNA-histogrammene viser relativt celleantall som funksjon av cellenes relative DNA-mengde. Cellesyklus er som nevnt i kapittel 2.3.1 delt opp i ulike faser. I DNA-histogrammet representerer toppen i kanalnummer 300 i figur 3.3 celler som er i  $G_0/G_1$ -fase. Mens toppen i kanalnummer 570 representerer celler som har dobbelt så mye DNA og derfor er i  $G_2/M$ -fase. Pga. farging av hele celler og ikke cellekjerner får man i denne metoden ikke skilt mellom celler i  $G_2$ - og  $M$ -fase. Celleandelen observert i toppen ved kanalnummer 570 blir derfor omtalt som celler i  $G_2/M$ -fase i denne oppgaven. Området mellom de to toppene inneholder celler som er i ulike stadier av  $S$ -fase. Med et perfekt flowcytometer ville en fått to linjer. En kanal med alle cellene i  $G_1$ -fase og en kanal med alle cellene i  $G_2/M$ -fase. Dette er ikke mulig med et vanlig flowcytometer pga. ulike instrumentelle feil i cytometeret, og i tillegg den biologiske variasjonen i DNA-fargestoffets binding. I virkeligheten vil det være de brede kurvene som er vist i figur 3.3 som analysene viser. Programmet oppgir en CV ”*Coefficient of Variation*” og denne størrelsen beskriver bredden på kurven. CV er et normalisert standardavvik definert som:

$$CV = \frac{\text{Standardavvik}}{\text{Gj.snitt. av topp}} \cdot 100 \quad (3.9)$$

Som figur 3.3 viser, blir ikke  $G_2/M$ -toppen liggende ved et kanalnummer som er dobbelt så stort som  $G_1$ -toppens kanalnummer. Dette kan muligens forklares ut fra at apparatet ikke er kalibrert helt riktig, noe som er vanskelig å få til for denne typen flowcytometer. Skillelinjene som ses på figuren settes manuelt og programmet regner ut prosentvis andel av celler i hver fase. For å få en mer kvantitativ beregning for den relative andelen av celler i de ulike fasene ble et matematisk analyseprogram brukt (Multicycle DNA-Content and Cell Cycle Analysis Software, Phoenix Flow Systems, USA). Dette programmet tar alle data fra flowcytometer-filen og gjør en automatisert eller halv-automatisert  $G_1/G_2$ -topp evaluering. Analyse-algoritmen er basert på Dean and Jetts Polynome  $S$ -fase algoritme hvor den ikke-lineære minste kvadraters metode blir brukt. Seks forskjellige cellesyklusmodeller blir kalkulert samtidig, og programmet evaluerer hvor godt hver modell passer dataene fra flowcytometeret (Rabinovitch, 2002). Figur 3.4 viser et eksempel på hvordan et plott fra flowcytometeret som figur 3.3 vil bli etter analysen i Multicycle programmet. Disse figurene viser hvordan fordelingen av celler i cellesyklus er eksperimentelt. Ved å sammenligne disse resultatene med den teoretiske fordelingen, funnet ved å integrere formel 2.9 i kapittel 2.3.3, vil det kanskje være mulig å få et visst begrep om cellene er i eksponensiell vekst eller ikke.



**Figur 3.3:** DNA-histogram av ubehandlede NHIK 3025 celler, hvor relativt celleantall er vist som funksjon av relativt DNA-innhold. Slik vises resultatet av analysen fra flowcytometeret. Markørene for  $G_0/G_1$ -, S- og  $G_2/M$ -fase er satt manuelt.



**Figur 3.4:** DNA-histogram av ubehandlede NHIK 3025 celler, hvor relativt celleantall er vist som funksjon av relativt DNA-innhold. Prosentvis fordeling av celler i de ulike fasene er funnet ved hjelp av programmet Multicycle.

### 3.5 NHIK 3025 celler-Cellulært opptak av $^{223}\text{Ra}$

Hensikten med dette forsøket var å kontrollere om cellene tok opp  $^{223}\text{Ra}$ , som de ble behandlet med. Celler ble sådd ut i flasker og behandlet med en dose på omtrent 1,5 Gy over 24 timer. Behandlingen ble som vanlig avsluttet med vask av flaskebunnen med Hanks' buffer tre ganger. Flaskene ble trypsinert og cellene telt. Fra både kontrollen og de behandlede flaskene ble omtrent  $10^7$  celler tatt ut i noen sentrifugerør. Cellene ble vasket tre ganger ved å tilsette PBS 5 mM EDTA, resuspendere dette, sentrifugere og tilsette igjen. Dette for å hindre at cellenes utside skulle være radioaktiv. Disse pellettene ble tilslutt analysert på germaniumsdetektoren (HPGe GEM50) i 12 timer.

#### 3.6 Alternativer til koloniforsøk

Siden koloniforsøk er en veldig tidkrevende forsøkstype ble det prøvd å finne alternative og raskere metoder for å måle sannsynligheten for celleoverlevelse. Alternative metoder benytter ofte markørsubstanser i cellene som f.eks. ATP eller cellenes evne til å ekskludere et fargestoff f.eks. PI eller Live/Dead-markøren. Levende celler produserer som tidligere nevnt energibærere, ATP (kap 2.3). Utgangspunktet for forsøket var antagelsen at celledød som følge av alfapartikkelbestråling fra  $^{223}\text{Ra}$  ville virke inn på cellens ATP-innhold, og at disse endringene ville være målbare. Det ble brukt en plateleser (Wallac EnVision™ 2103 Multilabel Reader, PerkinElmer, Finland) som kunne måle signaler fra et ATP-merkestoff. Vi prøvde også å bruke et Live/Dead kit sammen med flowcytometeret. Live/Dead-merkestoffene gir en tofarget fluorescens som kan brukes i analyse av celleoverlevelse. Disse stoffene ble benyttet for å prøve å se hvordan celleoverlevelsen ble etter ulike doser av  $^{223}\text{Ra}$ . Ingen av disse forsøkene gav i midlertidig resultater siden celler som dør av stråleskader dør en klonogenisk død. De mister kun sin evne til å dele seg, og vil derfor bli registrert som "levende" av disse merkestoffene en ganske lang tid etter behandling. Koloniforsøkene viser seg nok derfor å fremdeles være "gullstandarden" med hensyn på å måle sannsynligheten for celleoverlevelse etter strålingsskader. Fremgangsmåten og resultatbeskrivelsene for disse forsøkene ligger derfor i vedlegg D.

## 4 Resultater

### 4.1 Doseberegninger

I denne oppgaven ble dose til mediet kalkulert ut fra informasjonen som ligger i decaykjeden for radium-223 (figur 2.2), i tillegg til informasjonen om energien til de ulike utsendte partiklene funnet i en artikkel av Fisher og Sgouros (1999). Når man vet hvor mange becquerel som ble tilsatt mediet, behandlingstiden og decay-energien så kan dosen i gray beregnes. Som nevnt i kapittel 2.5 innebærer det å finne dosen avgitt til enkeltceller mikrodosimetri. Ønsket var å komme frem til en slik mikrodosimetri i denne oppgaven, men tiden strakk ikke til. Dosimetrien ble derfor som nevnt i kapittel 3.2.2 forenklet. Doseberegningene ble begrenset til å finne gjennomsnittlig absorbert dose til vekstmediet. Siden cellene ble bestrålt ved bruk av radioaktivitet, og aktivitetsinnholdet er proporsjonalt med doseraten, ble aktivitet (Bq) brukt som et relativt mål for dose. For å få uttrykt dette i doseenheten gray ble formlene 3.1 og 3.2 brukt. Dosene gitt i dette arbeidet ligger mellom 0,08-3,4 Gy. Behandlingstidene ble variert mellom 1-24 timer. En oversikt over de mest brukte dosene med deres tilhørende aktivitetskonsentrasjon, behandlingstid og doserate finnes i vedlegg A.1. Vedlegg G viser et eksempel på hvordan Alpharadin™-mediene ble laget og hvordan dosene ble beregnet.

### 4.2 Bestemmelse av aktivitet inkorporert i cellene

Det var av interesse å bestemme om  $^{223}\text{Ra}$  ble tatt opp av cellene. Slik informasjon er viktig fra et strålevernssynspunkt (mulighet til å transportere eller flytte behandlede celler til et annet sted i laboratoriet), og fra et strålebiologisk hensyn da intracellulær radioaktivitet ville kunne forårsake vedværende stråleskader i cellene etter avsluttet behandling. Et opptak av det radioaktive stoffet i cellene ville i tillegg komplisert dosimetrien ytterligere. Et slikt opptak av tungmetallet  $^{223}\text{Ra}$  er ikke å forvente. For å bekrefte dette ble ulike målinger gjort. Kapittel 3.5 beskrev blant annet et forsøk utført for å eventuelt utelukke dette. Disse målingene ble utført med en High Performance germaniumdetektor (HPGe) GEM50. Tabell 4.1 viser resultatene. Alle prøvene har trukket fra bakgrunnsmålingene. Tre behandlede prøver ble analysert. De to første prøvene fikk en dose på omtrent 1,5 Gy over 24 timer, mens den siste fikk en dose på 1,9 Gy over samme tid. De ulike dosene kommer av at siste prøve ble behandlet med nytt Alpharadin™-medium som ikke hadde samme aktivitetskonsentrasjon av  $^{223}\text{Ra}$  som den forrige løsningen. I tillegg inneholdt den tredje prøven ikke fullt så mange celler som de foregående. Av den grunn vises derfor aktiviteten per celle i siste kolonne i tabell 4.1. Disse målingene peker uansett i samme retning, nemlig at cellene ikke inneholdt noen nevneverdig aktivitet. Forsøket har vært gjentatt, men med kortere telletid og med germaniumdetektoren GEM15, noe som førte til mer usikre målinger. Disse målingene viste allikevel liknende resultat. I tillegg til dette konkrete forsøket ble ofte cellepelletter med celler som var behandlet med radioaktivt medium ved ulike forsøk undersøkt. Videre ble det rene mediet som cellene vokste i en uke etter behandling ved koloniforsøk målt. Dette for å undersøke om den eventuelt inkorporerte nukliden ble utskilt i mediet i løpet av uken. Disse målingene viste heller ikke noen nevneverdig aktivitet.

**Tabell 4.1:** Intracellulært innhold av  $^{223}\text{Ra}$  i ubehandlede (kontroll) og behandlede NHIK 3025 celler. Viser målt aktivitet for ulike prøver. Aktiviteten (Bequerel) gis per cellepellet med tilhørende usikkerhet i denne målingen. I tillegg vises målt aktivitet per celle (Bq/ml).

	Målt aktivitet av $^{223}\text{Ra}$ per cellepellet (Bq)	Usikkerhet i målingene (+/-)	Målt aktivitet av $^{223}\text{Ra}$ per celle (Bq/celle)
Kontrollprøve	1,2	0	$1,2 \cdot 10^{-7}$
Prøve 1: 1,5 Gy (10 <sup>7</sup> celler)	9,0	1,1	$9,0 \cdot 10^{-7}$
Prøve 2: 1,5 Gy (10 <sup>7</sup> celler)	18,7	1,22	$18,7 \cdot 10^{-7}$
Prøve 3: 1,9 Gy (8 $\cdot 10^6$ celler)	8,4	1,0	$11 \cdot 10^{-7}$

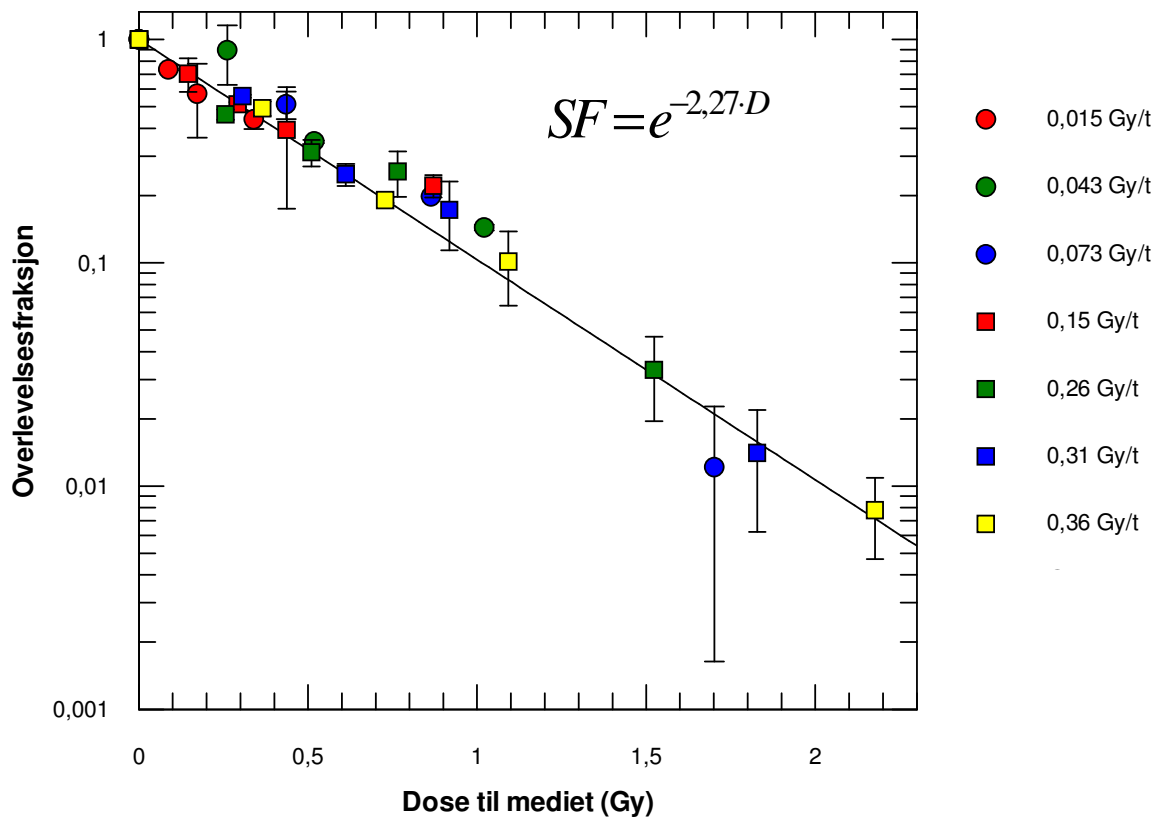
## 4.3 Effektstudier

### 4.3.1 Enkeltcelleoverlevelse og cellesyklus effekter for asynkrone NHIK 3025 celler

Enkeltcelleoverlevelse ble som nevnt i kapittel 3.3 undersøkt ved å måle cellens evne til å danne makroskopiske kolonier etter behandling. I den første fasen av undersøkelsene var det av interesse å kartlegge dose-respons for  $^{223}\text{Ra}$ , hvor dosen ikke ble omregnet som en doserate. Forsøkene ble gjort uten å tenke på doserateeffekter. Dette ble gjort for å holde forsøkene enkle da målet var å generere preliminare data om overlevelsesfraksjon og utsåingstetthet. Behandlingstiden ble satt til 24 timer og dosen ble variert ved å endre aktivitetskonsentrasjonen. Det ble brukt ganske lave aktivitetskonsentrasjoner (opp mot 7000 Bq/ml), som tilsvarer en dose på rundt 2,4 Gy over en behandlingstid på 24 t. Doseratene i disse innledende forsøkene ble derfor også svært lave, rundt 0,015-0,1 Gy/t. Resultatene fra noen av disse innledende forsøkene er vist i vedlegg A.3. Resultatene er fremstilt i en dose-responskurve selv om disse kurvene ikke står for en enkelt doserate. Hver kurve viser et enkelt forsøk, dvs. tre ulike forsøk blir vist i figur A.3. En antydning til en krumning på kurven kan observeres. Denne krumningen viste seg å muligens være en effekt av den resulterende fordelingen av celler i cellesyklus som oppstår under bestråling. Dette har vi prøvd å vise ved hjelp av DNA-histogrammene i nedre del av figuren, som viser en økende andel celler i G<sub>2</sub>/M-fase ved høyere doser.

Disse innledende forsøkene ga grunnlag for en mer korrekt fremstilling av en dose-responskurve. Kurven i figur 4.1 viser en overlevelseskurve tilpasset datapunktene for NHIK 3025 celler i eksponensiell vekst behandlet med ulike doserater. Hvert symbol representerer datapunkt med samme doserate, men med dosenivåer bestemt av behandlingstid. To uavhengige forsøk med doserater mellom 0,015-0,073 Gy/t ble utført. Behandlingstidene var 6, 12 og 24 timer. To uavhengige forsøk med doserater mellom 0,15-0,36 Gy/t ble også utført. Behandlingstiden her var 1, 2, 3 og 6 timer. Punktene viser

et vektet gjennomsnitt av flere forsøk med standardfeil angitt som stolper over og under symbolet (se kapittel 3.3.3). Alle punktene har opphav i to uavhengige forsøk mens noen punkter har opphav i tre forsøk. I tillegg kan kurven bekreftes ut fra flere innledende forsøk. Rådataene fra celleoverlevelsesforsøkene ligger i vedlegg A.2. Datapunktene viser seg å ligge langs en ganske rett linje uavhengig av doserate. Punktene ble plottet ved hjelp av programmet "Grafitt 5" (Erithacus Software Limited, UK), og ved hjelp av dette programmet ble det også utført en ikke-lineær kurvetilpasning. Denne tilpasningen brukte hver enkelt overlevelsesfraksjon med tilhørende standardfeil funnet i de ulike forsøkene (se figur A.2 og tabell A.2.9 og 10 i vedlegg A.2). Vektingen mot standardfeil ble valgt, da dette viste seg å gi den beste tilpasningen til datapunktene. Tilpasningen ble gjort til en eksponensiell funksjon, og resulterte i et  $\alpha$ -ledd på  $2,27 \pm 0,04$ . Siden dette er et enkeltlogaritmisk plott (y-aksen logaritmisk, x-aksen lineær), vil den eksponensielle kurven bli en rett linje. Dette harmonerer med den lineære delen av den lineær-kvadratiske modellen omtalt i kapittel 2.4.2, med  $\alpha$ -leddet lik  $2,27$  og  $\beta$ -leddet lik  $0$ .

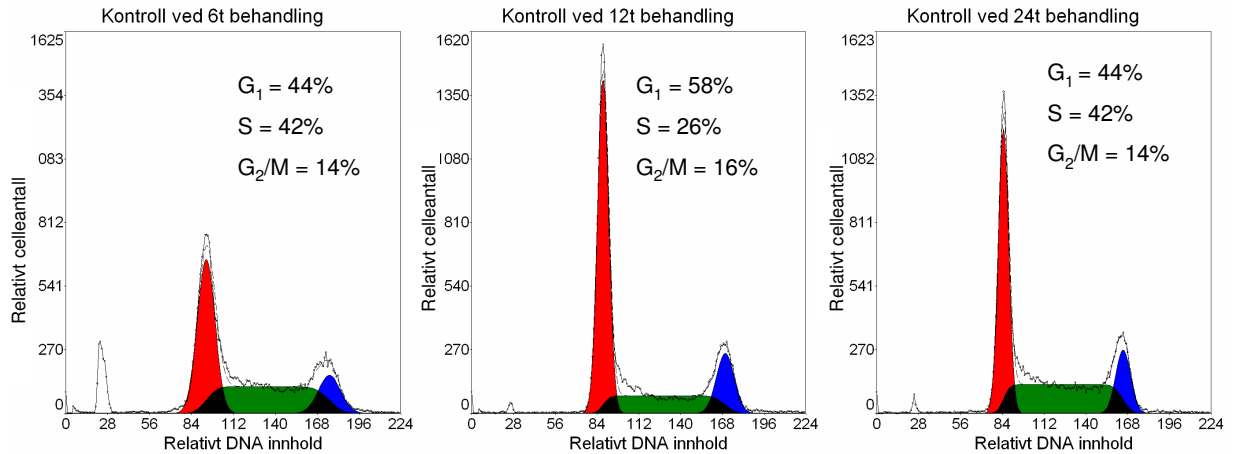


**Figur 4.1:** Fraksjon overlevende NHIK 3025 celler som funksjon av dose gitt til mediet. Cellene er behandlet med  $^{223}\text{Ra}$  fra Alpharadin<sup>TM</sup>. Doserater er angitt ved symbolene på siden. Behandlingstidene lå mellom 1-24 timer. Punktene viser et vektet gjennomsnitt fra 2-3 forsøk med standardfeil markert som stolper over og under datapunktet. En eksponensiell kurve, som her vises som rett i et enkeltlogaritmisk plott, ble tilpasset datapunktene,  $SF = e^{-2,27 \cdot D}$  vha. programmet "Grafitt 5".

***Dose-responskurver med DNA-histogrammer for 0,015-0,073 Gy/t***

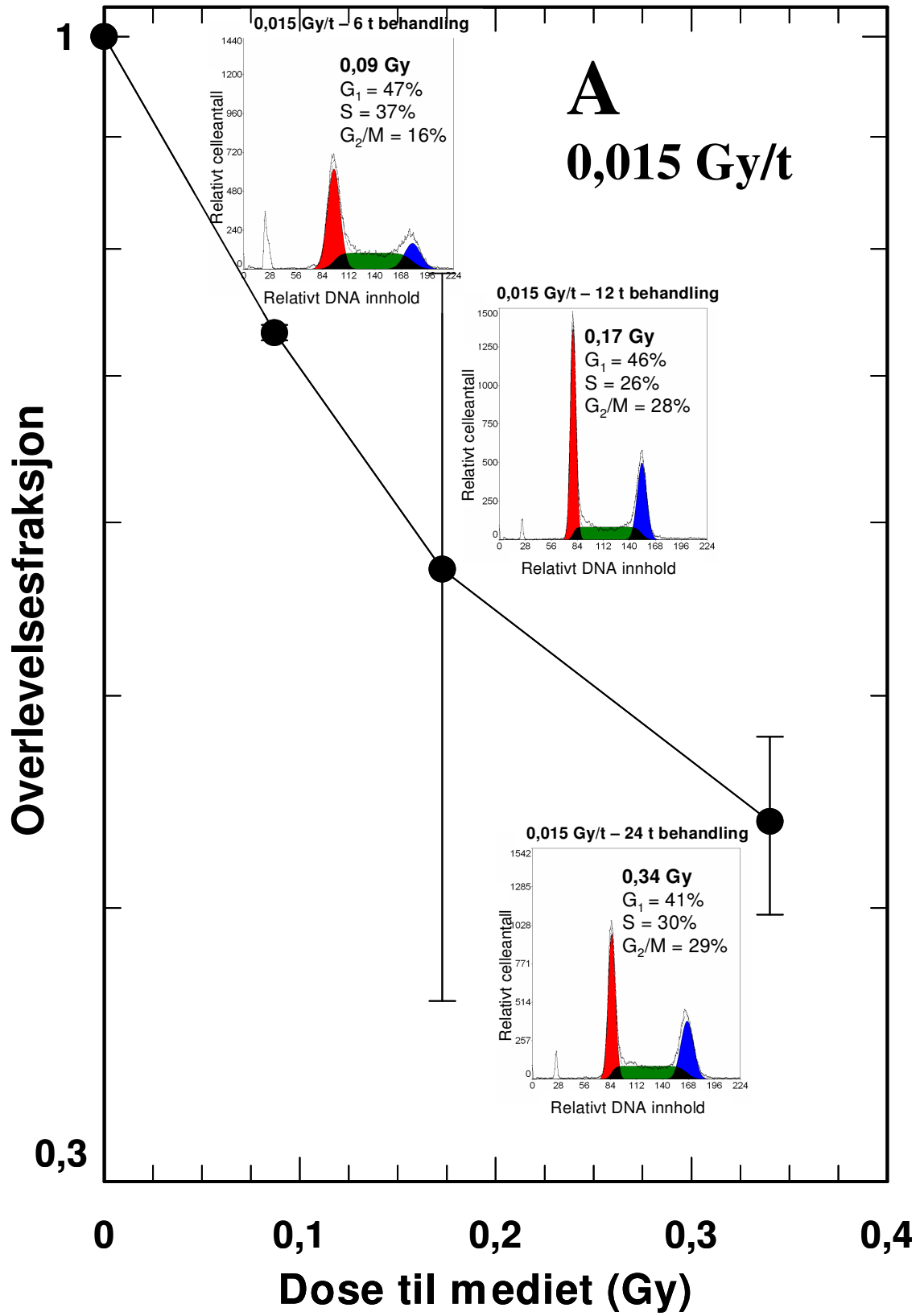
I tillegg til overlevelsesforsøk ble det også undersøkt hvordan fordelingen av celler i cellesyklus, for en eksponensielt voksende populasjon av NHIK 3025 celler, ble etter behandling med ulike doser av  $^{223}\text{Ra}$ . Dette ble gjort ved hjelp av flowcytometri etter farging av DNA-molekylene med propidiumjodid (PI) (se kapittel 3.4). Flowcytometri ble ofte kjørt parallelt med overlevelsesforsøkene, og DNA-histogrammer ble registrert for hver eneste dose og behandlingstid ved at prøver ble analysert både rett etter og 24 timer etter behandling. Nedenfor vises kurvene for tre ulike doserater: 0,015, 0,043 og 0,073 Gy/t. I hvert kurveplott vises tilhørende DNA-histogram for det enkelte datapunktet. DNA-histogrammet er funnet ved å analysere prøven rett etter behandling. Disse DNA-histogrammene viser derfor omtrent hva slags fordeling cellene hadde og oppnådde i cellesyklus under behandling. Fordelingene er beregnet ved hjelp av Multicycle (Phoenix Flow Systems, USA), som tilpasser en kurve (se tynn svart stippet strek i figurene) til det eksperimentelle DNA-histogrammet. Her representerer rød, grønn og blå topp henholdsvis  $G_1$ -, S- og  $G_2/M$ -fase. DNA-histogrammene fra kun ett enkelt forsøk er vist, men forsøket har vært gjentatt for alle punkter minst en gang og resultert i samme fordeling av celler i cellesyklus. Behandlingstidene var her 6, 12 og 24 timer. DNA-histogrammene som viser fordelingen av cellene i cellesyklus 24 timer etter behandling ligger i vedlegg B.1, siden disse dataene blir fremstilt på en annen måte senere i dette kapittelet. Kurvene i figur 4.3 er sammensatt av to til tre uavhengige forsøk med standardfeil vist som stolper (se kapittel 3.3.3). Figur 4.1 viste at doseratekurvene generelt sett er relativt rette. Her undersøkes hver enkelt kurve for å undersøke om det er noen sammenheng mellom kurveform og cellenes fordeling i cellesyklus. I figur 4.2 kan man observere hvordan DNA-histogrammet for kontrollcellene er. Disse viser en viss variasjon i fordeling av celler i de ulike fasene, noe som blir nærmere diskutert i kapittel 5.4. Figur 4.3A, B og C viser ved hjelp av DNA-histogrammene at det er en økende prosentandel celler i  $G_2/M$ -fase ved økende doser for de enkelte kurvene. Den laveste doseraten (0,015 Gy/t) i figur 4.3A har en relativt liten  $G_2/M$ -opphopning av celler på rundt 30 %, mens den øker mot rundt 90 % for de høyeste dosene i figur 4.3C (0,073 Gy/t). Ved denne høyeste doseraten (figur 4.3C) krummer kurven samtidig som nesten alle cellene befinner seg i  $G_2/M$ -fasen ved den høyeste dosen. Generelt sett ser ikke disse doseratekurvene like rette ut som ved høyere doserater.

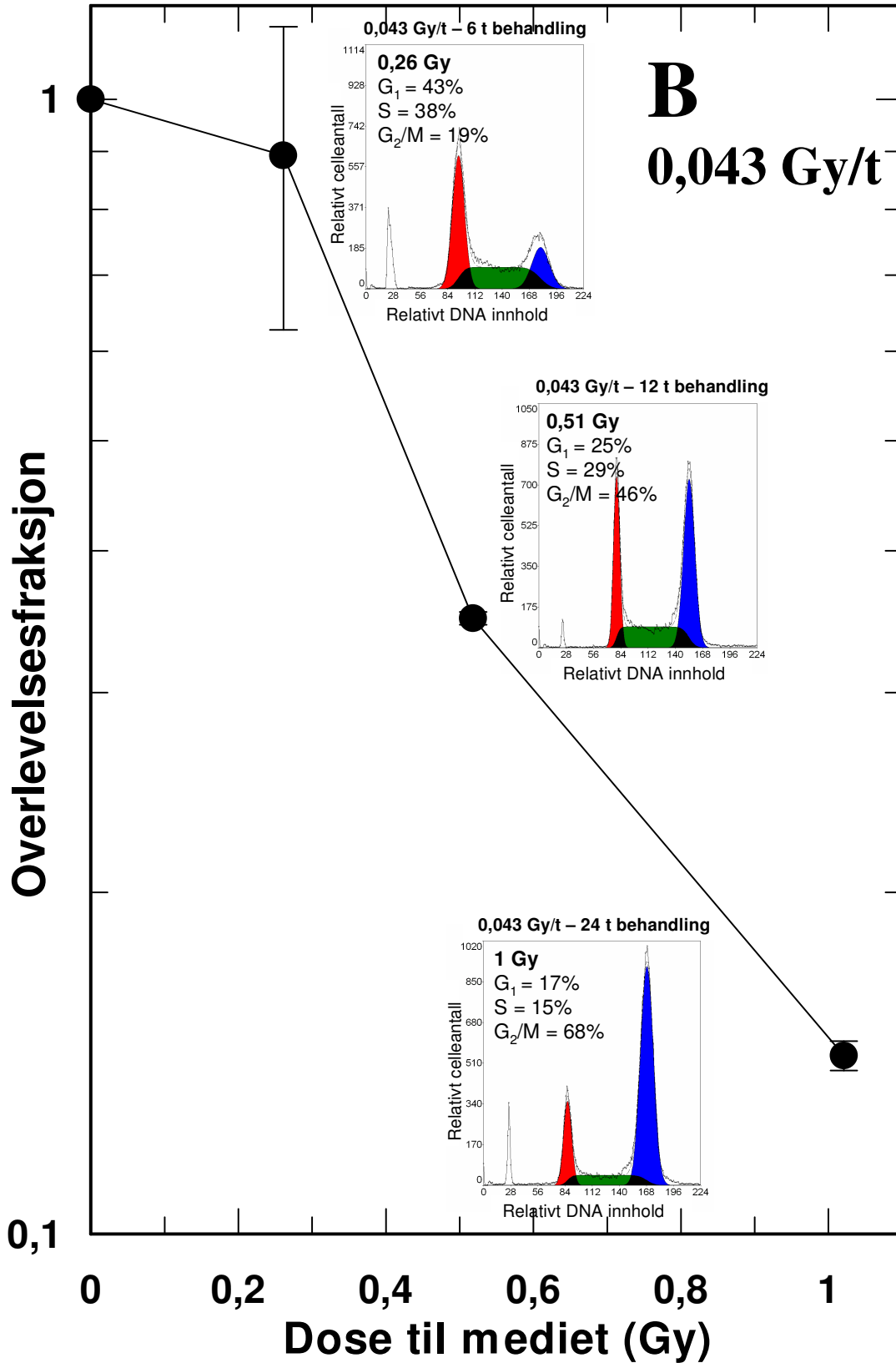


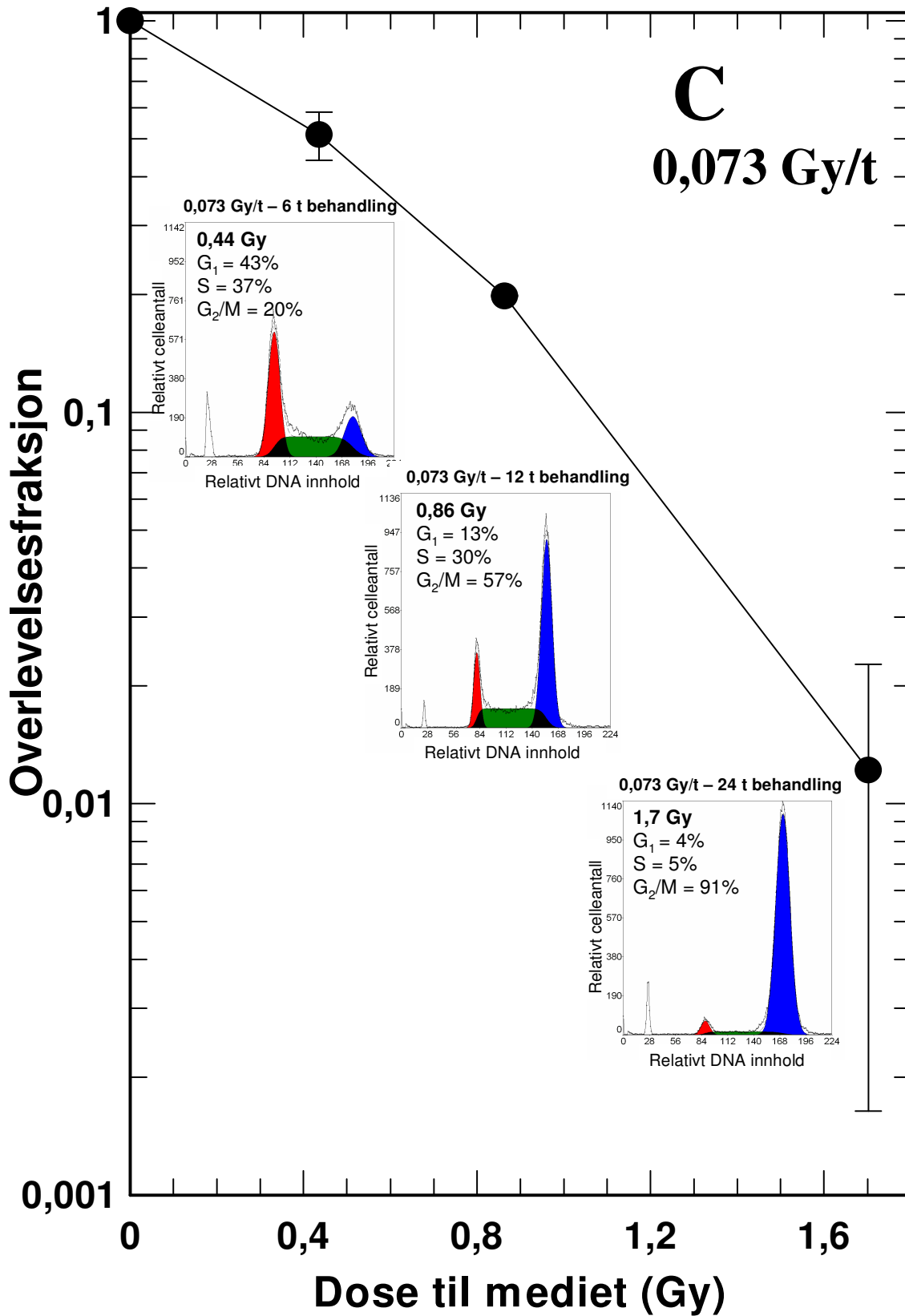


**Figur 4.2:** DNA-histogram for ubehandlede NHIK 3025 celler ved 6, 12 og 24 timer. X-aksen viser relativt DNA-innhold, mens y-aksen viser relativt celleantall. Fordelingen av celler i cellesyklus er funnet ved hjelp av Multicycle, og her representerer rød, grønn og blå topp henholdsvis G<sub>1</sub>-, S- og G<sub>2</sub>/M-fase. Vi ser at det er omtrent 14-16 % celler i G<sub>2</sub>/M-fase under normale omstendigheter.

**Figur 4.3:** Dose-responskurver for celleoverlevelse, doserater 0,015-0,073 Gy/t, med DNA-histogrammer inkludert i figurene. Viser fraksjon overlevende NHIK 3025 celler mot dose til mediet avgitt fra <sup>223</sup>Ra. Behandlingstiden var 6, 12 og 24 timer. DNA-histogrammene er funnet ved hjelp av flowcytometri rett etter avsluttet behandling med <sup>223</sup>Ra. Alle datapunktene viser et vektet gjennomsnitt av 2-3 forsøk med standardfeil angitt som stolper over og under symbolet (se kapittel 3.3.3). **A)** 0,015 Gy/t. En liten økning i G<sub>2</sub>/M-fase celler, opp mot 29 %. **B)** 0,043 Gy/t. En større økning i G<sub>2</sub>/M-fase celler, opp mot 68 %, samtidig som kurven muligens får en svak krumning. **C)** 0,073 Gy/t. En stor økning i G<sub>2</sub>/M-fase celler, opp mot 91 %, samtidig som kurven krummer.

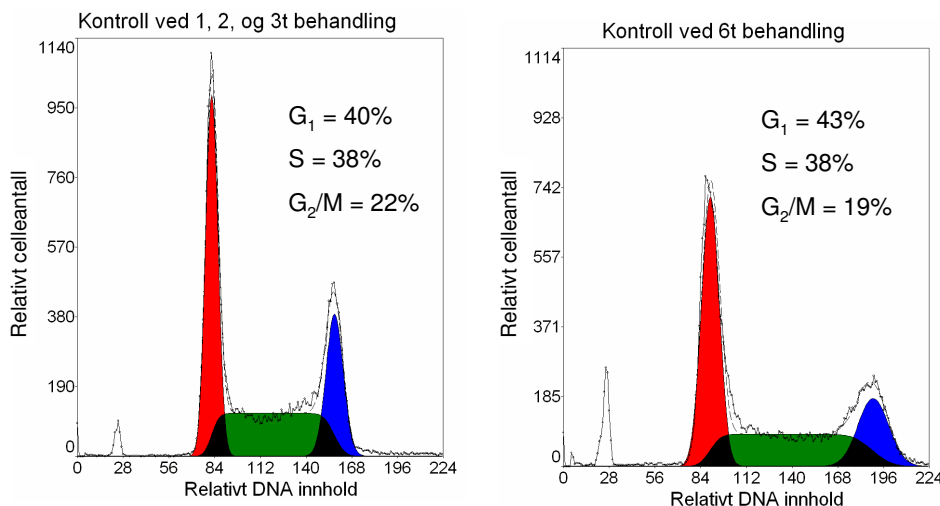






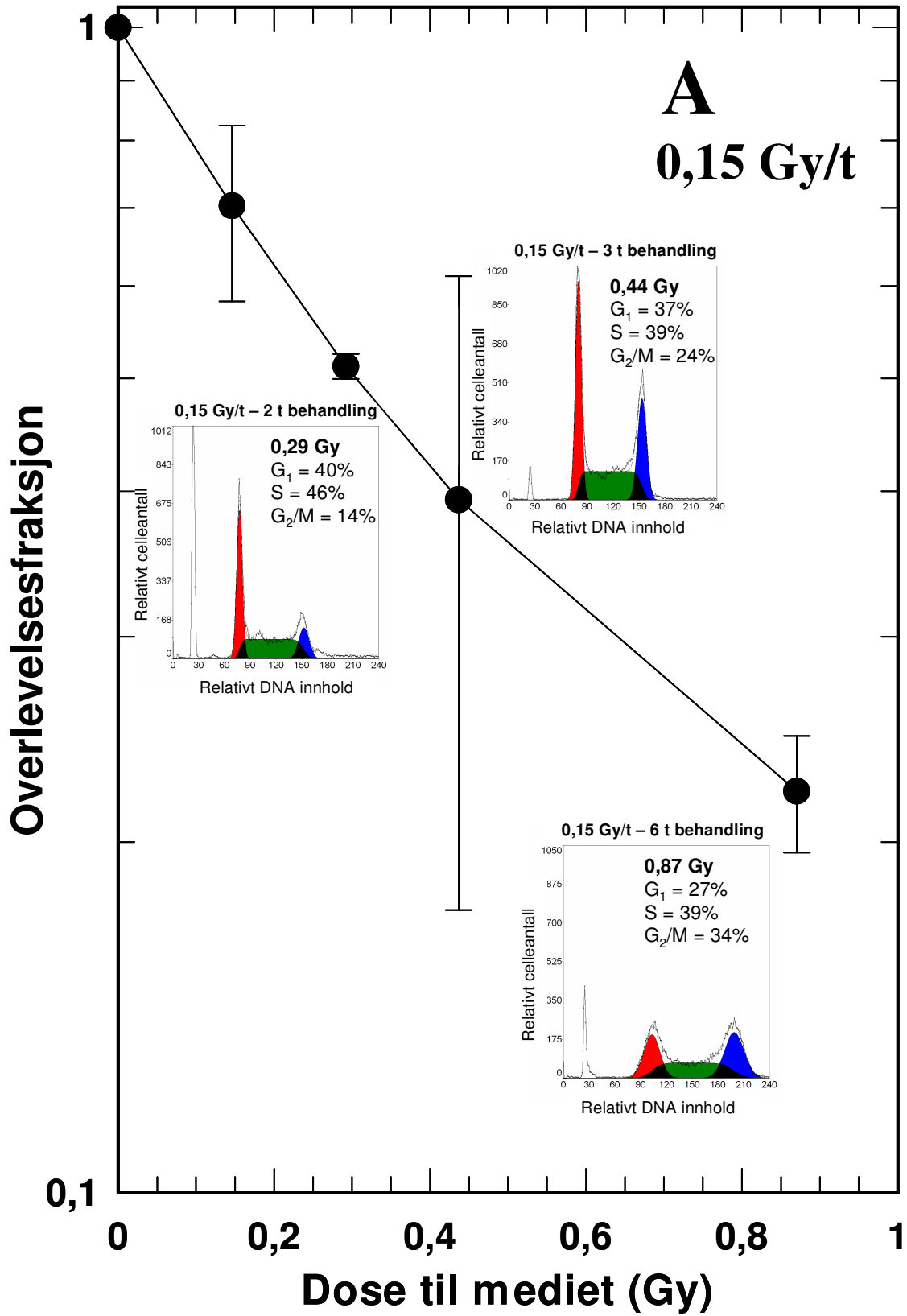
### *Dose-responskurver med flowcytometri for 0,15-0,36 Gy/t*

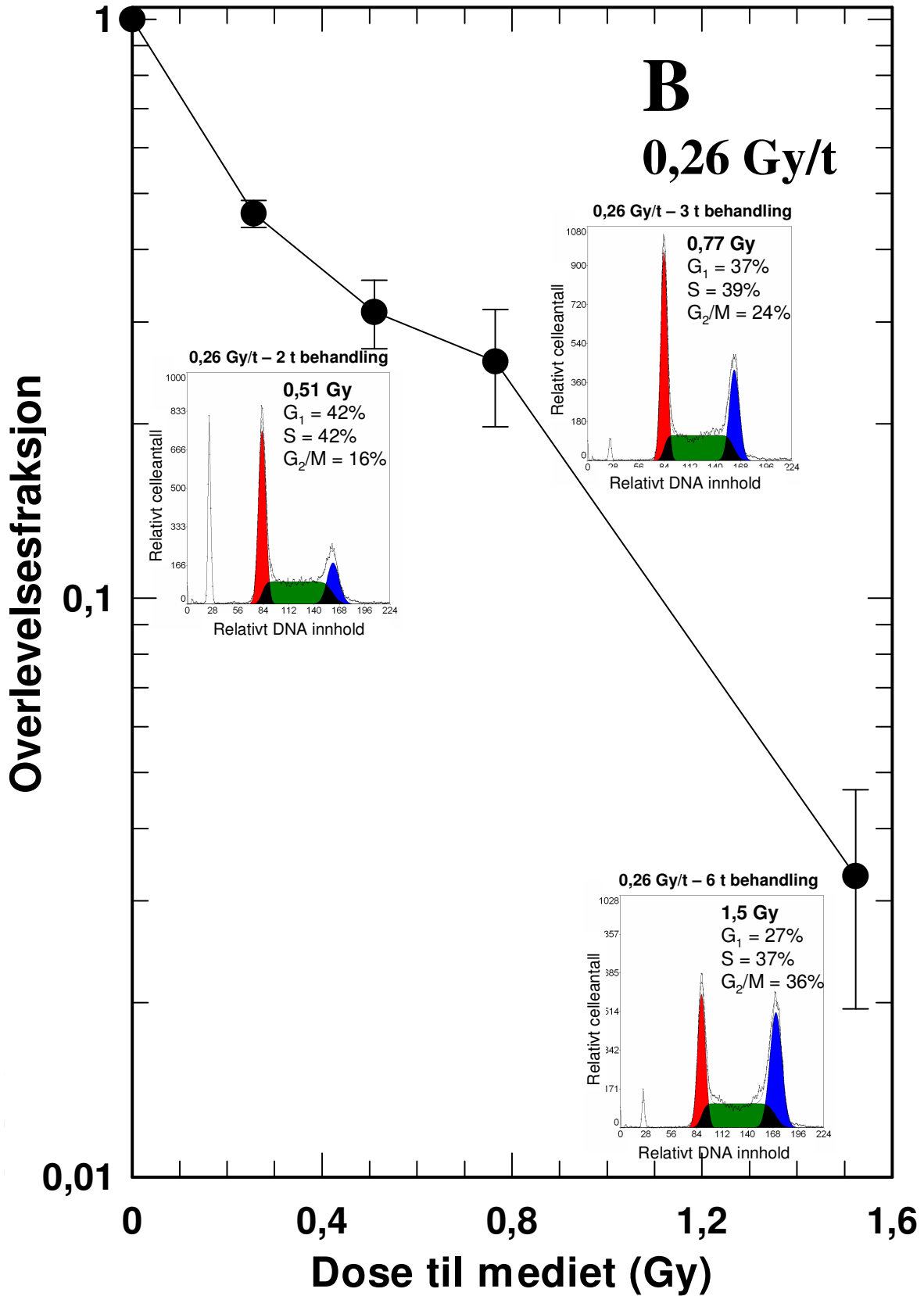
Nedenfor blir samme type forsøk som omtalt over vist, men med høyere doserater. I disse forsøkene ble totalt fire doserater brukt: 0,15, 0,26, 0,31 og 0,36 Gy/t. Behandlingstiden var 1, 2, 3 og 6 timer. DNA-histogrammene fra 1 timers prøven er utelatt både pga. plassmangel og lite informasjon i figurene. Også her ble flowcytometri utført rett etter behandling og 24 timer etter behandling for alle de ulike dosene. Resultatene fra doseraten 0,31 Gy/t og 24 timers DNA-histogrammene ligger i vedlegg B.1. For disse forsøkene ble det tatt en felles kontrollprøve for celler behandlet over 1-3 timer, da disse prøvene ble analysert samtidig. Denne ble trypsinert og farget med PI 1,5 timer etter denne kontrollens startede "behandling", dvs. mediumskift. I figur 4.4 vises DNA-histogrammene til ubehandlede kontrollceller. En sammenligning med kontrollene vist i figur 4.2 viser at fordelingen av celler i cellesyklus varierer ganske mye også for ubehandlede celleprøver, dette er nærmere diskutert i kapittel 5.4. Figur 4.5 viser at dose-responskurvene for disse høyere doseratene er rettere. DNA-histogrammene viser at det er en økende prosentandel celler i  $G_2/M$ -fase ved økende doser for de enkelte kurvene, men det er derimot ingen økning i  $G_2/M$ -oppbygning av celler fra doserate til doserate.  $G_2/M$ -oppbygningen er heller ikke like fremtredende rett etter behandling for disse doseratene og behandlingstidene.

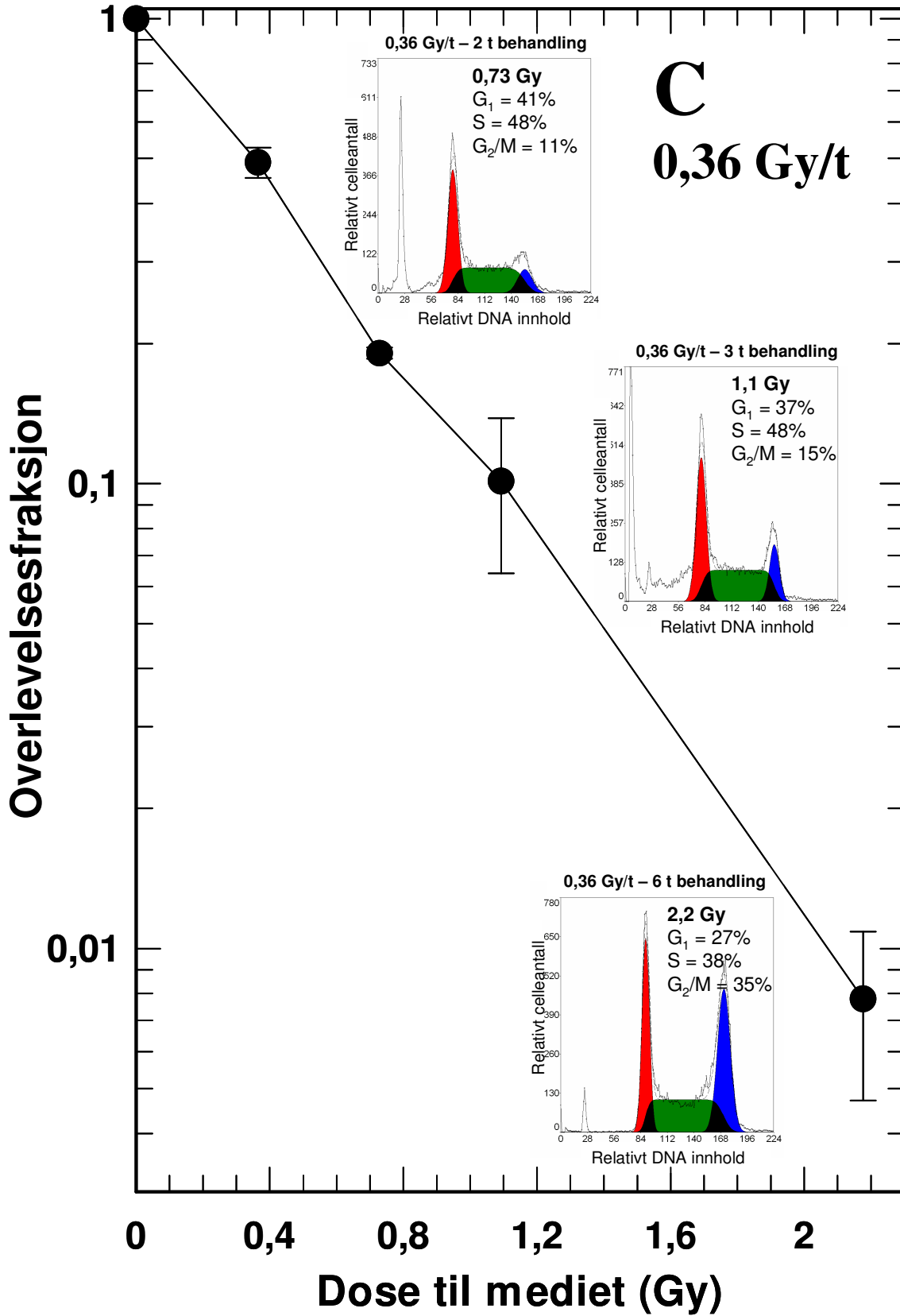


**Figur 4.4:** DNA-histogrammer for ubehandlede kontrollceller ved 1-3 og 6 timers behandling, hvor relativt celleantall er plottet mot relativt DNA-innhold. Fordelingen av celler i cellesyklus er beregnet ved hjelp av Multicycle, og her representerer rød, grønn og blå topp henholdsvis  $G_1$ -, S- og  $G_2/M$ -fase. Det er rundt 19-22 % celler i  $G_2/M$ -fase.

**Figur 4.5:** Dose-responskurver for celleoverlevelse, doserater 0,15-0,36 Gy/t, med DNA-histogrammer inkludert i figurene. Viser fraksjon overlevende NHIK 3025 celler mot dose til mediet avgitt fra  $^{223}\text{Ra}$ . DNA-histogrammene er funnet ved hjelp av flowcytometri rett etter avsluttet behandling med  $^{223}\text{Ra}$ . Alle datapunktene viser et vektet gjennomsnitt av 2-3 forsøk med standardfeil angitt som stolper over og under symbolet (se kapittel 3.3.3). **A)** 0,15 Gy/t. En liten økning i  $G_2/M$ -fase celler, opp mot 34 %. **B)** 0,26 Gy/t. En liten økning i  $G_2/M$ -fase celler, opp mot 36 %. **C)** 0,36 Gy/t. En liten økning i  $G_2/M$ -fase celler, opp mot 35 %. Alle overlevelseskurvene er relativt rette.









### ***Prosentvis fordeling av celler i cellesyklus***

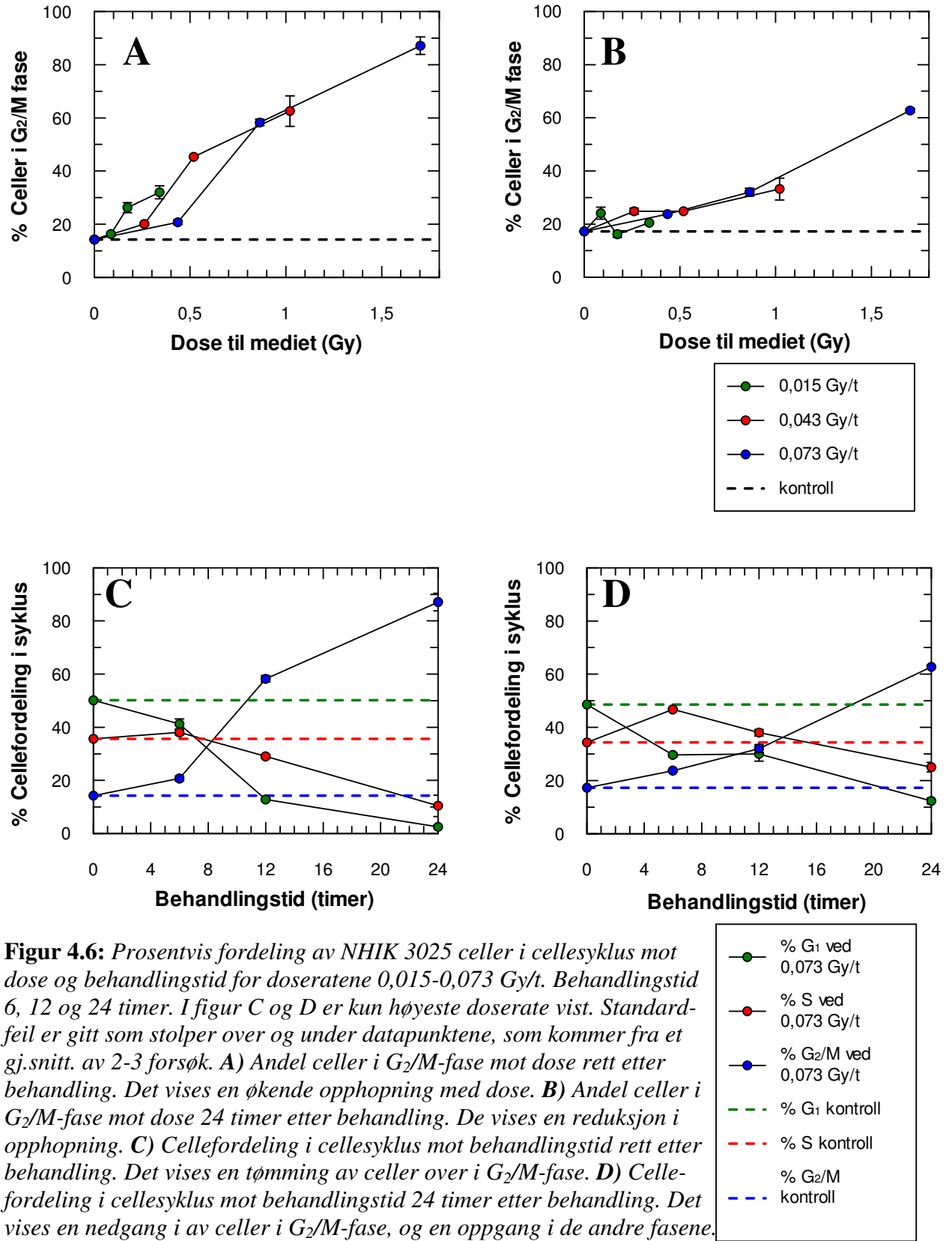
I figur 4.6 og 4.7 er resultatene fra DNA-histogrammene funnet ved hjelp av flow-cytometri samlet og vist på en litt annen måte enn tidligere. For å finne den prosentvise fordelingen i cellesyklus ble analyseprogrammet Multicycle brukt. Dataene kommer fra 1-3 uavhengige forsøk. Alle DNA-histogrammene ble analysert og et gjennomsnitt ble beregnet for de med felles dose og behandlingstid. Standardfeil er vist som stolper på datapunktene. Rådataene for disse figurene ligger i vedlegg B.2. Figur 4.6 inneholder dataene for doseratene fra 0,015-0,073 Gy/t med behandlingstid 6, 12 og 24 timer. Figur A viser prosentvis andel G<sub>2</sub>/M-fase celler i cellesyklus rett etter behandling (T=0) mot dose. Disse kurvene viser at rett etter behandling øker G<sub>2</sub>/M-opphopningen av celler med økende dose for alle de ulike doseratene, og opphopningen går opp mot 90 %. Figur B viser også cellene i G<sub>2</sub>/M-fase mot dose til mediet, men disse dataene kommer fra prøver analysert 24 timer etter avsluttet behandling. Her er G<sub>2</sub>/M-opphopningen av celler redusert hos de ulike prøvene i forhold til opphopningen sett rett etter behandling. Det er kun de høyeste dosene som holder G<sub>2</sub>/M-opphopningen av celler oppe i et relativt høyt nivå (60 %). Figur B.1.6 i vedlegg B.1 viser at denne opphopningen for doser på 1,7 Gy (0,073 Gy/t) holder seg så lenge som 48 timer etter avsluttet behandling (48 %). Samme figur viser at G<sub>2</sub>/M-opphopningen blir enda større og langvarig ved doser på 3,4 Gy (0,15 Gy/t). Fra figur B.1.7 ser man at opphopningen også vil holde seg for doserater som 1,7 Gy/t med en totaldose på 1,7 Gy 48 timer etter avsluttet behandling.

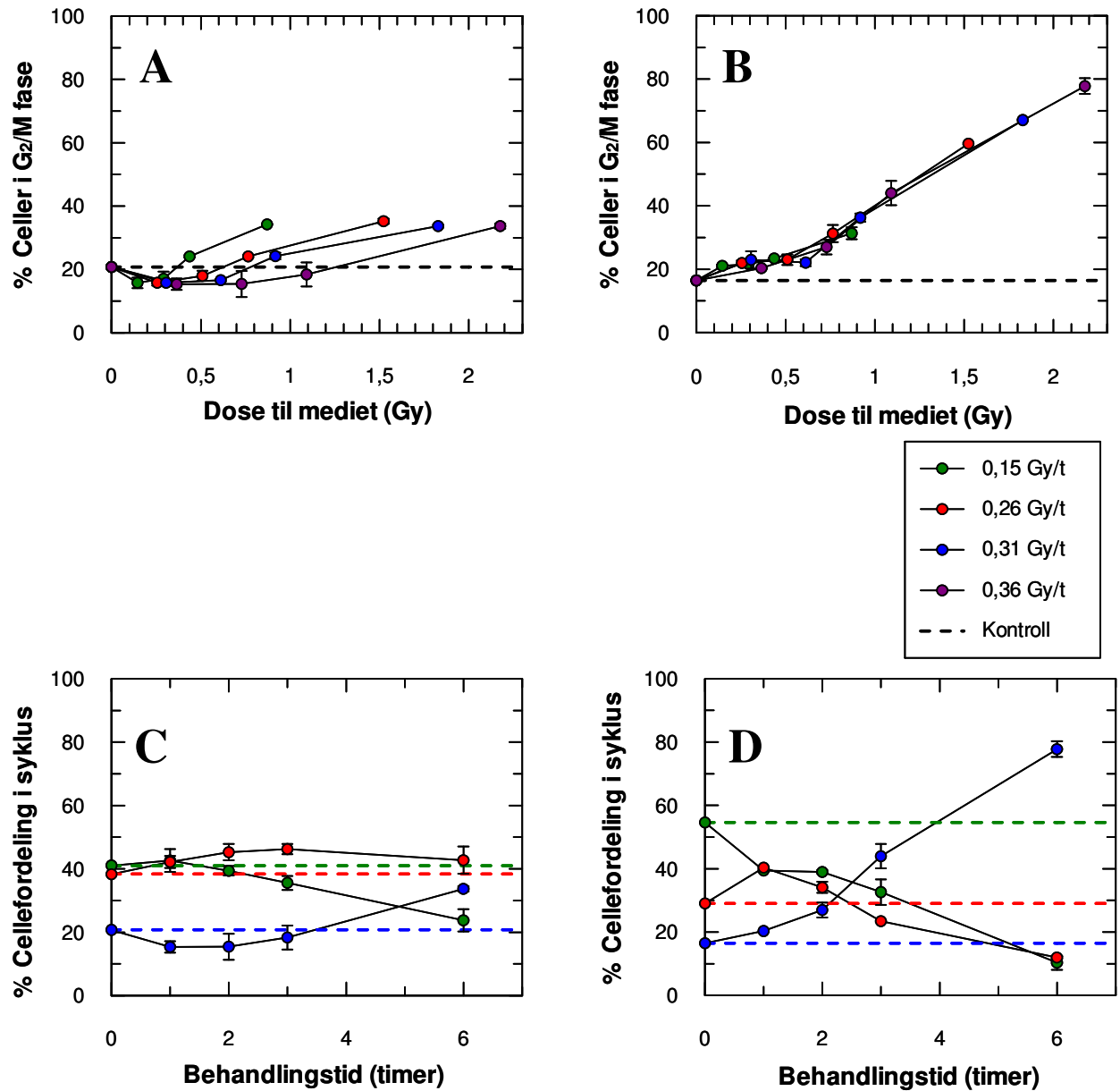
Figur 4.6C viser prosentvis fordeling av celler i alle faser av cellesyklus mot behandlingstid rett etter behandling. Figur D viser det samme, men 24 timer etter behandling. Disse figurene viser kun fordelingen for den høyeste doseraten, 0,073 Gy/t. Figurene viser de samme trendene som nevnt over, men de viser også hvordan G<sub>1</sub>- og S-fase fordelingen er. Disse plottene viser at når prosent andel celler i G<sub>2</sub>/M-fase går opp synker prosent andel celler i G<sub>1</sub>- og S-fase. Dette kan fortelle oss at muligens ingen celler stopper i G<sub>1</sub>- eller S-fase, men fortsetter å bevege seg gjennom G<sub>1</sub>- og S-fase og inn i G<sub>2</sub>/M-fase hvor de stopper. I vedlegg B.2 vises cellefordelingen i alle faser for alle doserater. I figur B.2A og B, hvor prosent celler i de ulike fasene plottes mot behandlingstid, ser vi at prosent andel celler i de ulike fasene varierer svært mye fra doserate til doserate både rett etter behandling og 24 timer etter. Dette observeres også i figur 4.6A og B hvor de datapunktene som tilsvarende samme behandlingstid høyere enn 6 timer, ikke ligger på samme nivå når det gjelder andelen celler i G<sub>2</sub>/M-fase.

Videre viser figur 4.7 resultatene fra doseratene 0,15-0,36 Gy/t på samme måte. Her var behandlingstidene som tidligere nevnt 1, 2, 3 og 6 timer. I figur A observeres prosent andel celler i G<sub>2</sub>/M-fase for disse doseratene mot dose rett etter behandling. Her går G<sub>2</sub>/M-andelen ned før den går opp igjen ved økende doser. Dette kan muligens forklares ut fra trypsinets effekt på cellene, noe som er diskutert nærmere i kapittel 5.4. Et annet trekk som er verdt å merke seg er at alle de ulike doseratene fører til en G<sub>2</sub>/M-opphopning av celler som er like stor uavhengig av dosen. De ender opp på samme nivå. Figur B viser prosent andel celler i G<sub>2</sub>/M-fase etter 24 timer. Her ser vi at alle doseratene fører til en betydelig opphopning av celler i G<sub>2</sub>/M-fase. Ved plottene som viser prosentvis cellefordeling i cellesyklus som funksjon av behandlingstid observeres de samme trendene. Og også her går cellesyklus sin gang med en tømning av celler fra de andre

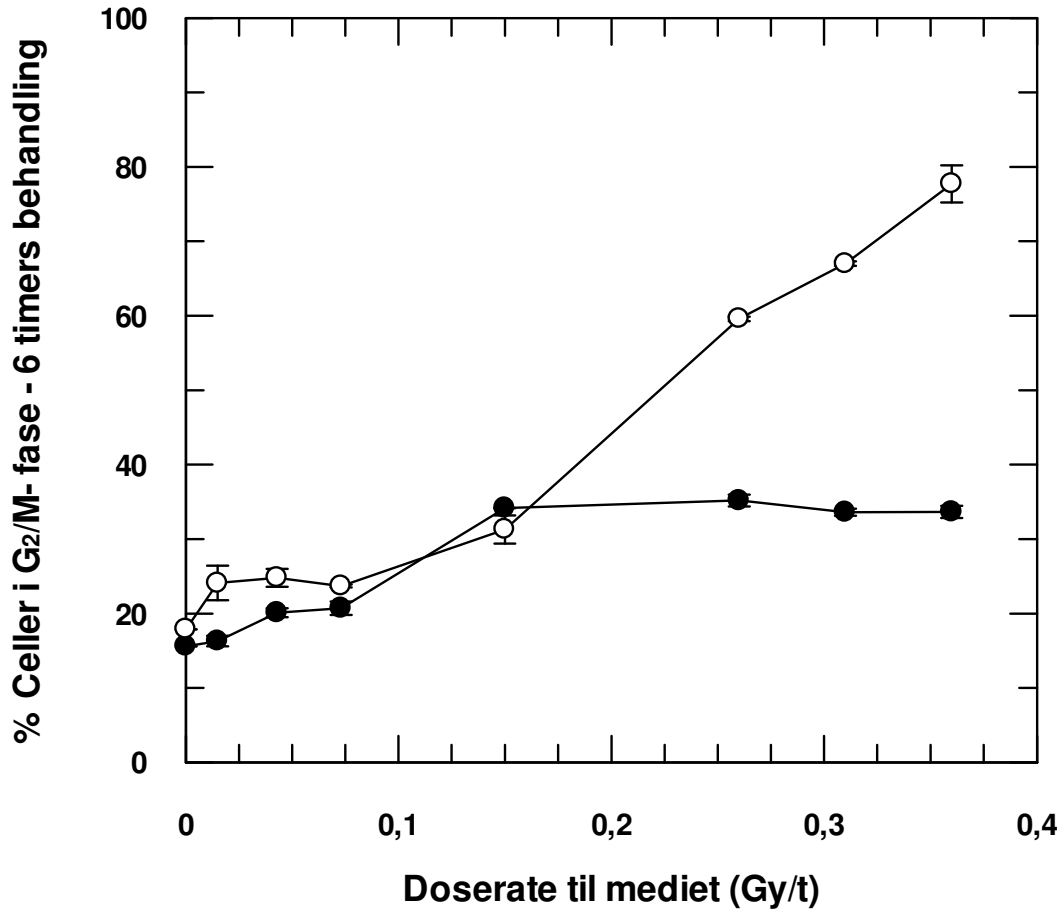
fasene over i  $G_2/M$ -fase. I figur B.2 C og B i vedlegg B.2, hvor prosent celler i de ulike fasene plottes mot behandlingstid, kan det observeres at andel celler i de ulike fasene rett etter behandling ikke varierer fra doserate til doserate, mens det igjen varierer 24 timer etter behandling. Dette kan igjen observeres i figur 4.7A og B hvor cellene rett etter behandling som nevnt ligger på samme nivå i  $G_2/M$ -fase, mens de i figur B ikke ligger på samme nivå.

Figur 4.8 viser prosent andel celler i  $G_2/M$ -fase mot doserate til mediet. Figuren sammenligner kun datapunktene fra de tidligere figurene som representerer en behandling på 6 timer. Dosene gitt ligger mellom 0,087-2,2 Gy. De svarte og hvite sirklene representerer prosent andel celler i  $G_2/M$ -fase, henholdsvis rett etter avsluttet behandling og 24 timer etter avsluttet behandling. Figuren viser at de laveste doseratene (0,015-0,073 Gy/t) har en liten  $G_2/M$ -oppnopning av celler både rett etter og 24 timer etter avsluttet behandling. For de høyere doseratene (0,15-0,36 Gy/t) er det en oppnopning av celler i  $G_2/M$ -fase opp til samme nivå (rundt 35 %) uavhengig av doserate rett etter behandling. Mens det 24 timer etter behandling viser seg å være en økende  $G_2/M$ -oppnopning for økende doserater opp til omtrent 77 % for de høyeste dosene. Disse dataene viser muligens en doseavhengig og doseuavhengig  $G_2/M$ -oppnopning av celler for de ulike doserateområdene. I tillegg kan dataene indikere en reparasjon av stråleskader som blir mindre fremtredende ved høyere doser. Dette diskuteres mer inngående i kapittel 5.2.3.





**Figur 4.7:** Prosentvis fordeling av NHIK 3025 celler i cellesyklus mot dose og behandlingstid for doserate 0,15-0,36 Gy/t. Behandlingstid 1, 2, 3 og 6 timer. I figur C og D er kun høyeste doserate vist. Standardfeil er gitt som stolper over og under datapunktene, som kommer fra et gj.snitt. av 2-3 forsøk. **A)** Andel celler i G<sub>2</sub>/M-fase mot dose rett etter behandling. Figuren viser en opphopning opp til samme nivå for alle doserater. **B)** Andel celler i G<sub>2</sub>/M-fase mot dose 24 timer etter behandling. Figuren viser en økende opphopning med økende dose. **C)** Prosent cellefordeling i cellesyklus mot behandlingstid rett etter behandling. Figuren viser en relativt liten tømning av celler over i G<sub>2</sub>/M-fase. **D)** Prosent cellefordeling i cellesyklus mot behandlingstid 24 timer etter behandling. Figuren viser en større tømning av celler over i G<sub>2</sub>/M-fase.



**Figur 4.8:** Prosent andel NHIK 3025 celler i G<sub>2</sub>/M-fase mot doserate til mediet. Alle celleprøvene har fått en behandling med <sup>223</sup>Ra gitt over 6 timer. (●) Tilsvarende prosent andel celler i G<sub>2</sub>/M-fase rett etter avsluttet behandling, mens (○) tilsvarende prosent andel celler i G<sub>2</sub>/M-fase 24 timer etter avsluttet behandling. Avgitte doser ligger mellom 0,087-2,2 Gy. Standardfeil er gitt som stolper over og under datapunktene, som kommer fra et gj.snitt. av 2-3 forsøk. Figuren viser hvordan G<sub>2</sub>/M-opphopningen av celler varierer med doserate når behandlingstiden er lik. De laveste doseratene (0,015-0,073 Gy/t) viser en liten G<sub>2</sub>/M-opphopning mens de høyere doseratene (0,15-0,36 Gy/t) gir en større opphopning både rett etter og 24 timer etter behandlingen. Cellene behandlet med de høyere doseratene får en opphopning rett etter behandling på samme nivå uavhengig av doserate. 24 timer etter behandling får cellene en høyere opphopning i G<sub>2</sub>/M-fase ved høyere doserate.

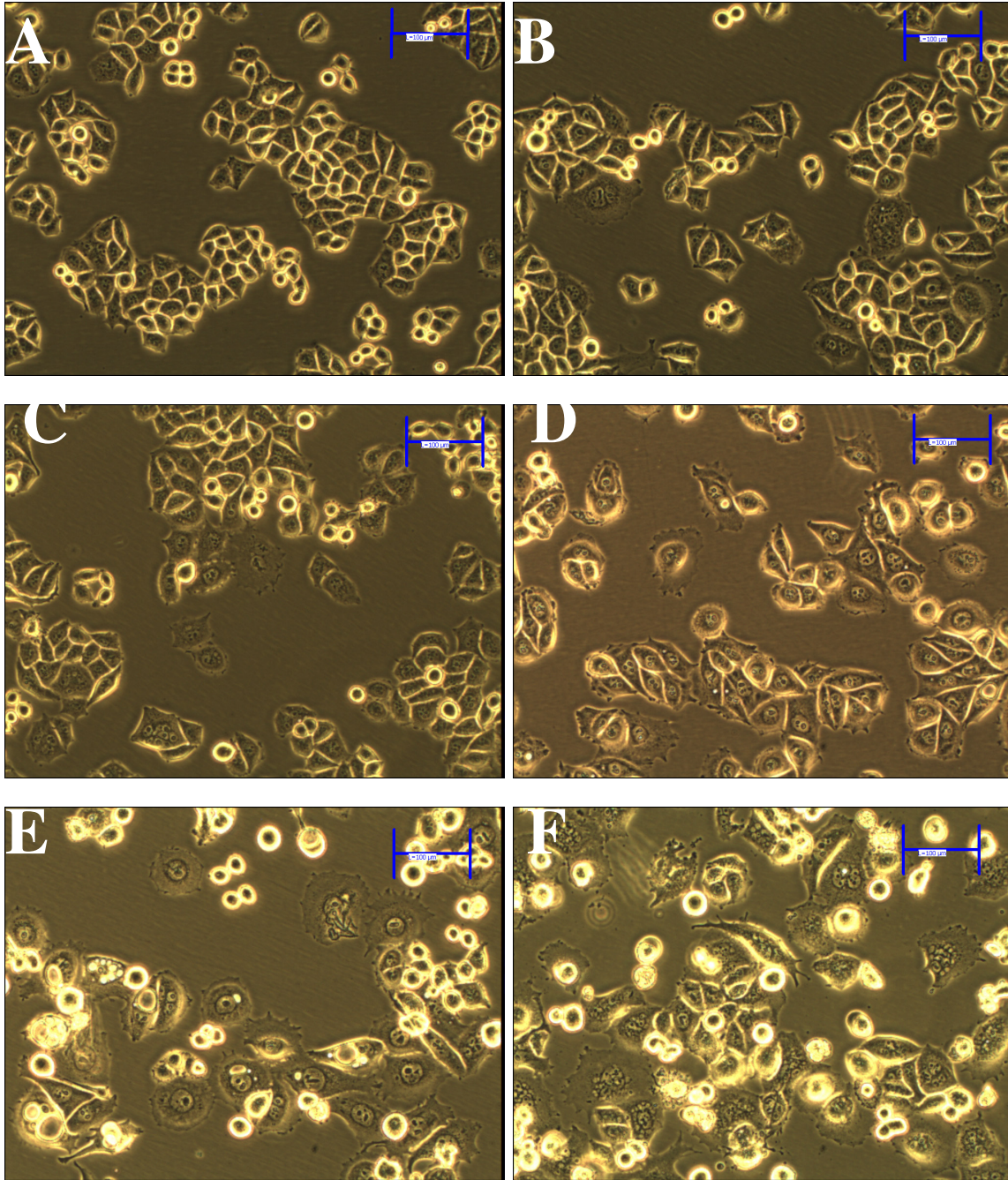
#### 4.3.2 Morfologiske endringer for NHIK 3025 celler etter behandling

Behandling med cytotoksiske stoffer eller stoffer som påvirke cellens evne til å gå igjennom cellesyklus kan ofte også påvirke cellens utseende (morfologi). Figur 4.9 viser noen fotomikrografier av NHIK 3025 cellene tatt ved ulike tider etter behandling med en doserate på 0,073 Gy/t. Figur A viser hvordan en ubehandlet cellepopulasjon ser ut. Disse ser vi er flatet ut og har en svært regelmessig og avgrenset form. De runde cellene er

celler som er i mitose. Figur B viser celler som har fått en behandling over 6 timer med en totaldose på 0,43 Gy. Disse virker ikke særlig forskjellig i utseende i forhold til kontrollcellepopulasjonen, selv om noen "kjempeceller" kan observeres. Disse er mest sannsynlig celler som er arrestert i G<sub>2</sub>/M-fase og som ikke klarer å dele seg. De vokser og får en mindre avgrenset og "frynsete" overflate. Figur C viser celler etter en behandling med 0,86 Gy over 12 timer. Her kan noen flere "kjempeceller" observeres. I figur D kan man se celler som har fått en behandling med 1,7 Gy over 24 timer. Her ser alle cellene større ut, til sammenligning er målestreken i hver fotomikrografi 100 µm. Ved denne dosen er det som tidligere nevnt en svært omfattende G<sub>2</sub>/M-opphopning av celler (90 %). Her vil cellene ha vokst til dobbel størrelse samtidig som de ikke klarer å gjennomføre en deling. I figur E ser vi de samme cellene som har fått samme behandling som i figur D men her 24 timer etter behandlingen. Her ser vi at mange av cellene blir "frynsete kjempeceller", mens noen har rundet opp. Disse lysende runde cellene er mest sannsynlig døde celler, eller celler som er på vei til å dø av store stråleskader. I figur F ser vi de samme cellene 48 timer etter behandling. Disse cellene ser enda mer medtatt ut og mange er døende. Fra flowcytometrianalysene hvor cellenes gjennomsnittlige volum blir registrert får en støttende data for disse observasjonene. Som vist i tabell 4.2 blir cellene i G<sub>2</sub>/M-fase dobbelt så store som kontrollcellene i volum etter 24 timers behandling med 1,7 Gy, og de blir opp mot tredobbel så store ved 24 og 48 timer etter denne behandlingen. Cellene viser seg heller ikke å dø rett etter behandling.

**Tabell 4.2:** Gjennomsnittlig cellulært volum, "mean cellular volume", (MCV) i µm<sup>3</sup> i de ulike cellesyklusfasene for NHIK 3025 cellene avbildet i figur 4.9. Cellene ble behandlet med <sup>223</sup>Ra. **A** tilsvare cellene avbildet i figur 4.9A, nemlig kontrollceller. **B** tilsvare celler behandlet med 0,43 Gy gitt over 6 timer analysert 24 t etter avsluttet behandling (4.9B). **C** tilsvare celler behandlet med 0,86 Gy gitt over 12 timer analysert 24 t etter avsluttet behandling med (4.9C). **D** tilsvare celler rett etter avsluttet behandling med 1,7 Gy gitt over 24 timer (4.9D). **E** tilsvare celler 24 t etter avsluttet behandling med 1,7 Gy gitt over 24 timer (4.9E). Og **F** tilsvare celler 48 t etter avsluttet behandling med 1,7 Gy gitt over 24 timer (4.9F).

	MCV for G <sub>1</sub> -celler (µm <sup>3</sup> )	MCV for S-celler (µm <sup>3</sup> )	MCV for G <sub>2</sub> /M-celler (µm <sup>3</sup> )
<b>A</b>	534	714	887
<b>B</b>	657	853	1159
<b>C</b>	723	963	1376
<b>D</b>	1010	1041	1714
<b>E</b>	1145	2080	3150
<b>F</b>	959	1892	2819



**Figur 4.9:** Fotomikrografier av NHIK 3025 celler, ubehandlede (kontroll) og behandlede celler (0,073 Gy/t), ved ulike tider etter behandling med  $^{223}\text{Ra}$ . Blå målestrek øverst i høyre hjørne = 100  $\mu\text{m}$ . **A)** Kontroll. **B)** Celler 24 t etter avsluttet behandling med 0,43 Gy gitt over 6 timer. Figuren viser noen få "kjempeceller". **C)** Celler 24 t etter avsluttet behandling med 0,86 Gy gitt over 12 timer. Figuren viser noen flere "kjempeceller". **D)** Celler rett etter avsluttet behandling med 1,7 Gy gitt over 24 timer. Figuren viser flere "kjempeceller" i tillegg til omtrent dobbelt så store celler generelt. **E)** Celler 24 t etter avsluttet behandling med 1,7 Gy gitt over 24 timer. **F)** Celler 48 t etter avsluttet behandling med 1,7 Gy gitt over 24 timer. Figur E og F viser flere lysende/døende celler og mange "kjempeceller".

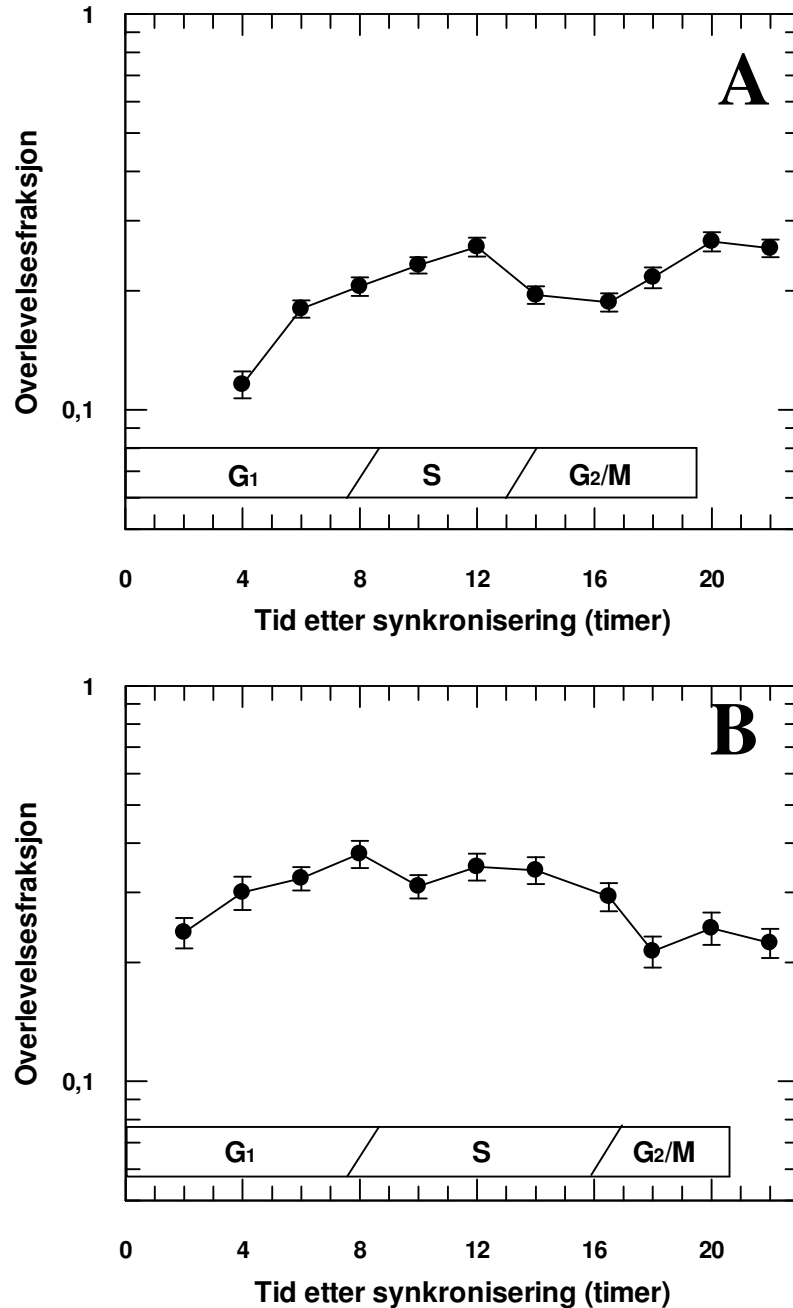
### 4.3.3 Alders-responskurve for synkroniserte NHIK 3025 celler

Innledende forsøk viste variasjon i median cellesyklusetid, noe som kan tilskrives cellens generelle helse, men også at deler av forsøk pågikk i romtemperatur. Det er kjent at temperatur spiller en stor rolle for hvor fort celler går gjennom cellesyklusen. I figur 4.10 fremstilles resultatene fra alders-responsforsøkene. Disse forsøkene ble utført som beskrevet i kapittel 3.3.2. Før behandlingsforsøk ble en testsynkronisering gjort (figur C.1.1 i vedlegg C). Denne viste at den mediane cellesyklusetiden lå på rundt 19,5 t. To synkroniseringsforsøk med behandling ble deretter gjennomført hvor cellene ble sådd ut omtrent 24 timer før de ble ristet. Cellene fikk dermed tid til å komme seg etter trypsineringen, og etter synkronisering gikk cellene gjennom cellesyklus i den hastigheten de skulle. Dette ble kontrollert ved hjelp av flowcytometri av celleprøver ved ulike tider etter synkronisering. Figur 4.11 viser hvordan cellene gikk gjennom cellesyklus i forsøk 1, mens tilsvarende figur finnes i vedlegg C.1 for forsøk 2. I figur 4.10A og B ser vi at de to kurvene fra de to gjennomførte forsøkene ikke nødvendigvis er helt like. Hvert datapunkt er i midlertidig et resultat av 5 replikater som det er funnet gjennomsnitt av og standardfeil. Variasjonene i disse to forsøkene kan kanskje forklares ut fra den ulike mediane cellesyklusetiden ved de to ulike forsøkene og den ulike lengden av cellesyklusfasene (se tabell 4.3). Vi ser at den mediane cellesyklusetiden er på 19,5 og 20,5 timer i henholdsvis forsøk 1 og 2. Den største forskjellen er nok allikevel S-fasens lengde på henholdsvis 5,5 og 8,5 timer i forsøk 1 og 2. Datapunktene som representerer 2 og 4 timers prøvene er ganske usikre, da cellene muligens ikke var helt festet før behandlingen ble startet. Variasjonen i celleoverlevelse ligger på omtrent 0,15 for begge forsøkene. Ut fra kun disse to forsøkene er det vanskelig å se noen likhet i en eventuelt varierende strålingsfølsomhet gjennom cellesyklus. Variasjonene som observeres er i midlertidig små og det virker som om alfapartikkelbestråling kan sies å drepe celler uavhengig av hvor cellen er i cellesyklus. Rådataene for disse kurvene og kurvene som ble brukt for å beregne cellefasenes lengde finnes i vedlegg C.2. Disse dataene er korrigert for en multiplisitet på 2 ved hjelp av formel 3.8, siden alle cellene blir sådd ut som mitoser som raskt blir dubletter. For å bestemme tidspunktet for overgangen fra  $G_1$ - til S-fase ble tiden der 50 % av cellene var i  $G_1$ -fase, og 50 % av cellene var i S-fase funnet. Tilsvarende ble overgangen fra S- til  $G_2$ -fase funnet. For å finne den mediane cellesyklusetiden bestemte vi tidspunktet hvor 66 % av cellene befant seg i  $G_1$ -fase. Dette fordi cellene går fra en til to i mitosen og cytokinesen. Fra denne syklusetiden ble det trukket en halv time. Siden cellene ble synkronisert som mitoser ville omtrent halvparten av dem ha delt seg en halv time etter synkroniseringsprosessen slutt. Vi regner derfor at  $G_1$ -fase starter en halv time etter siste synkroniseringsrist, og denne tiden må derfor trekkes fra cellesyklusetiden. Disse beregningene førte til fasetidene vist i tabell 4.3 under.

**Tabell 4.3:** Lengden (timer) av de ulike cellesyklusfasene og den mediane cellesyklusetiden for de to alders-responsforsøkene.

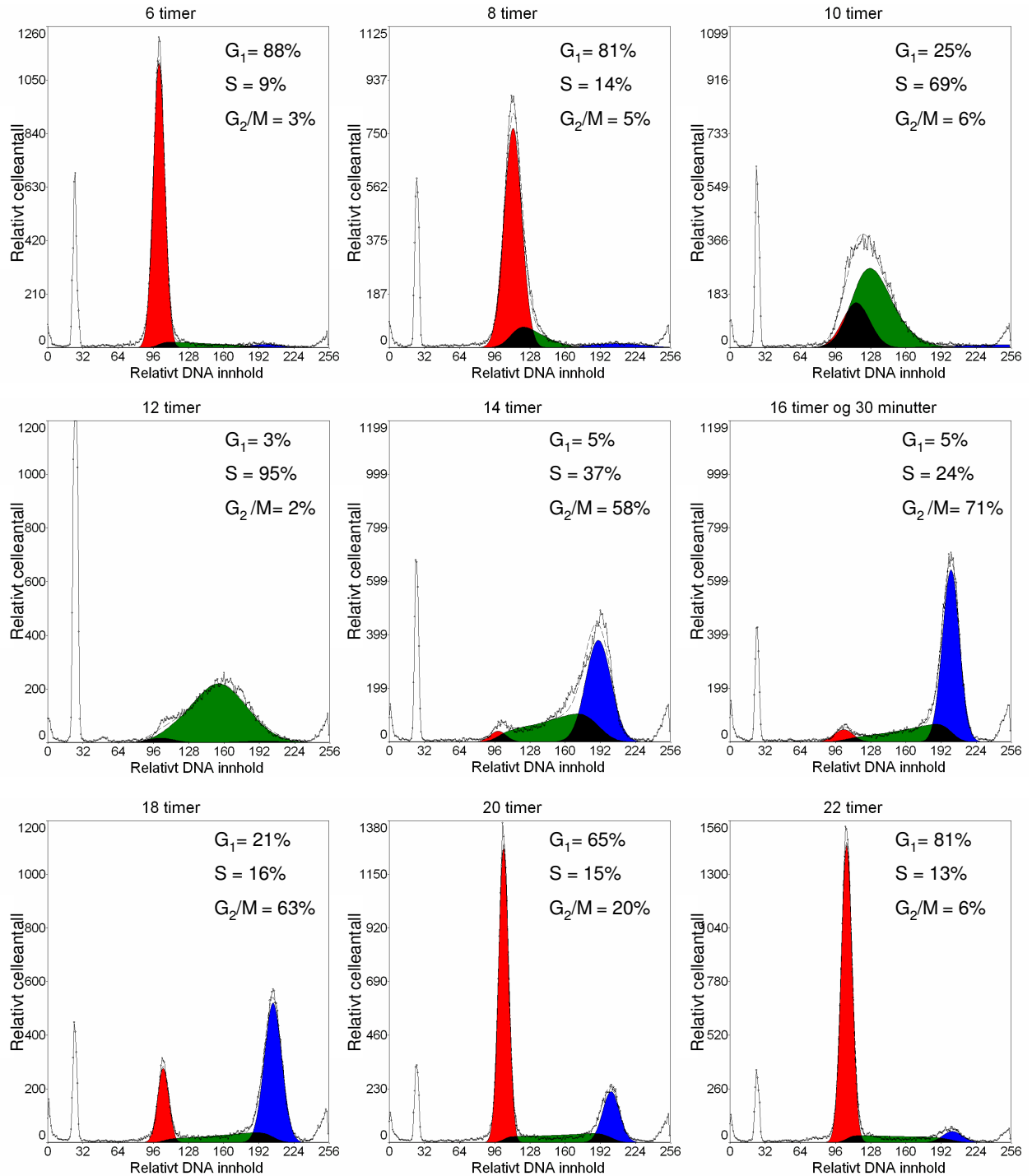
	$G_1$ -fase (t)	S-fase (t)	$G_2$ /M-fase (t)	Median cellesyklusetid (t)
<b>Forsøk 1</b>	8,5	5,5	5,5	19,5
<b>Forsøk 2</b>	8,5	8,5	3,5	20,5





**Figur 4.10:** Alders-responskurver for synkroniserte NHIK 3025 celler behandlet med  $^{223}\text{Ra}$  i ulike deler av cellesyklus. Viser overlevelsesfraksjonen som funksjon av tiden etter synkroniseringen (cellenes alder). De første datapunktene, 2 og 4 timer, er usikre pga. dårlig festing kort tid etter utsåing. Overlevelsesfraksjonene er korrigert for multiplisitet,  $M=2$ . Standardfeil er gitt som stolper over og under datapunktene, som kommer fra ett enkelt forsøk med 5 replikater. Nederst i hver figur vises en bar som viser cellesyklusfasenes lengde. Varigheten av disse fasene ble bestemt vha. DNA-histogrammer fra flowcytometri. **A)** Figuren viser alders-responskurven fra forsøk 1. Den mediane cellesykluslengden er her 19,5 timer. **B)** Figuren viser alders-responskurven fra forsøk 2. Den mediane cellesykluslengden er her 20,5 timer.

## 4 Resultater



**Figur 4.11:** DNA-histogrammer av synkroniserte NHIK 3025 celler fra forsøk 1, funnet ved forskjellige tidspunkt etter synkronisering. Disse histogrammene viser hvordan cellene gikk gjennom cellyklus under forsøket. Figuren viser også hvordan cellene er fordelt i cellyklus i prosent. Disse verdiene er funnet ved hjelp av programmet Multicycle. Første prøve ble tatt 6 timer etter synkronisering og den siste ble tatt 22 timer etter. Den mediane cellyklusliden viste seg å være rundt 19,5 timer.

#### 4.3.4 Enkeltcelleoverlevelse og cellesyklus-effekter for NHIK 3025 plåtafase- og NHIK 3025 (dox) celler

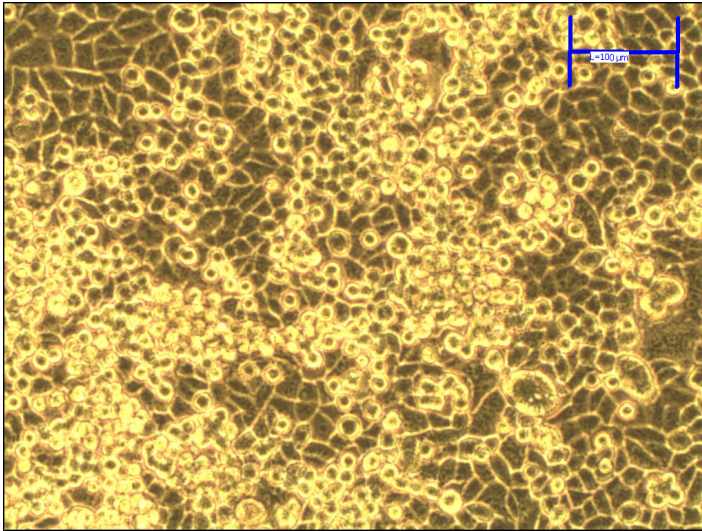
Det påstås at alfapartikelstråling kan inaktivere celler som er ikke går gjennom cellesyklus, såkalte plåtafaseceller. Forsøk ble utført for å teste denne påstanden og vise at alfapartikelstråling fra  $^{223}\text{Ra}$  kan inaktivere slike celler. I tillegg ble det undersøkt om alfapartikelstråling dreper multimedikamentresistente NHIK 3025 (dox) celler like effektivt som normale ikke-resistente NHIK 3025 celler. I disse forsøkene ble doserater mellom 0,015-0,073 Gy/t brukt med en behandlingstid på 24 timer. Forsøkene ble her utført etter prosedyren beskrevet i kapittel 3.3.1. Tabell 4.4 viser en sammenligning mellom overlevelsesfraksjonen for NHIK 3025 eksponensiell vekst, NHIK 3025 plåtafase og NHIK 3025 (dox) ved de ulike dosene. Her ser vi at overlevelsesfraksjonen stort sett viser seg å være lik for de ulike cellene ved lik dose. Rådataene for denne tabellen ligger i vedlegg A.2.

**Tabell 4.4:** Sammenligning av overlevelsesfraksjon for NHIK 3025 i eksponensiell vekst og plåtafase og NHIK 3025 (dox) i eksponensiell vekst behandlet med  $^{223}\text{Ra}$  i 24 timer. Overlevelsen viser seg å være tilnærmet lik for de ulike celletypene ved samme dose.

	Absorbent dose i mediet (Gy)	Overlevelse (SF)	Standardfeil (SE)
NHIK 3025 (eksponensiell vekst)	0,34	0,438	± 0,041
NHIK 3025 (dox)	0,34	0,378	± 0,106
NHIK 3025 (eksponensiell vekst)	0,68	0,224	± 0,036
NHIK 3025 (plåta)	0,68	0,207	± 0,023
NHIK 3025 (eksponensiell vekst)	1,02	0,144	± 0,004
NHIK 3025 (dox)	1,02	0,053	± 0,030
NHIK 3025 (eksponensiell vekst)	1,70	0,012	± 0,011
NHIK 3025 (plåta)	1,70	0,021	± 0,006
NHIK 3025 (dox)	1,70	0,0100	± 0,0004

I tillegg ønsket vi å undersøke om NHIK 3025 plåtafaseceller og NHIK 3025 (dox) celler viser den samme opphopningen av celler i  $G_2/M$ -fase som normale eksponensielt voksende NHIK 3025 celler. Dette kan vi se av DNA-histogrammene med beregnet fordeling av celler i cellesyklus i figur 4.13 for NHIK 3025 plåtafaseceller og figur 4.14 for NHIK 3025 (dox) multimedikamentresistente celler. Forsøkene ble her utført etter prosedyren beskrevet i kapittel 3.4.2. Det må nevnes at NHIK 3025 cellenes plåtafase er annerledes enn andre celletypers plåtafase, noe kontrollen i figur 4.13A viser. Et DNA-histogram av en typisk cellepopulasjon i plåtafase ville vise en  $G_0/G_1$ -topp. Dette fordi mange celletyper går inn i hvilefasen  $G_0$  når cellene kommer i plåtafasen. Men figur

4.13A viser et DNA-histogram for NHIK 3025 celler som indikerer en cellepopulasjon i eksponensiell vekst. Dette kan forklares ut fra at NHIK 3025 cellene stopper i sin celledyklusfase, de "fryser" i celledyklus og får en redusert celledyklusprogresjon i stedet for å gå inn i en hvilende  $G_0$ -fase (Pettersen *et al.*, 1978). Figur 4.12 viser en fotomikrografi av NHIK 3025 celler i platåfase.

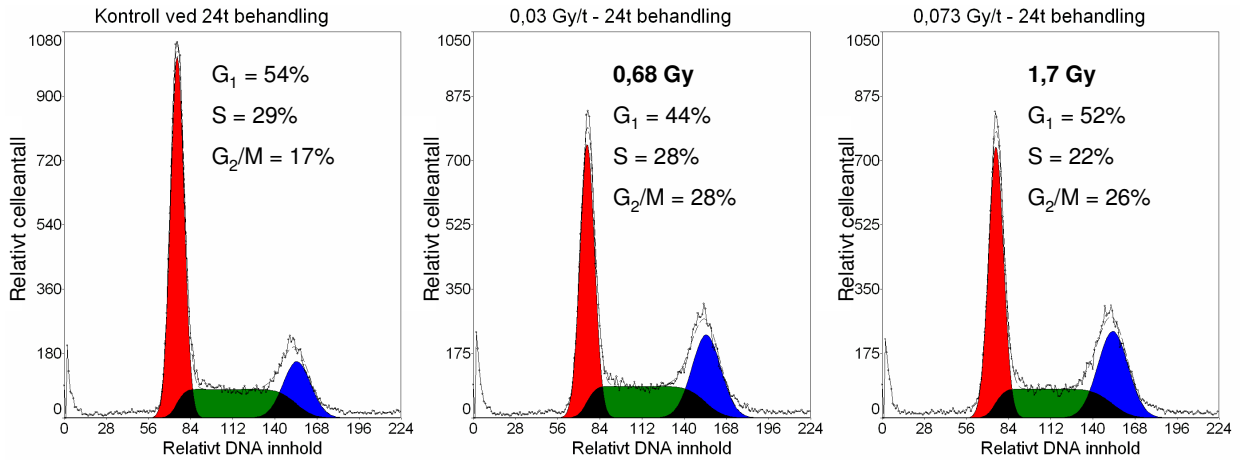


**Figur 4.12:** Fotomikrografi av NHIK 3025 celler i platåfase før behandling. Bunnen i celleflasken er helt tett av celler. Blå målestrek øverst i høyre hjørne = 100  $\mu\text{m}$ .

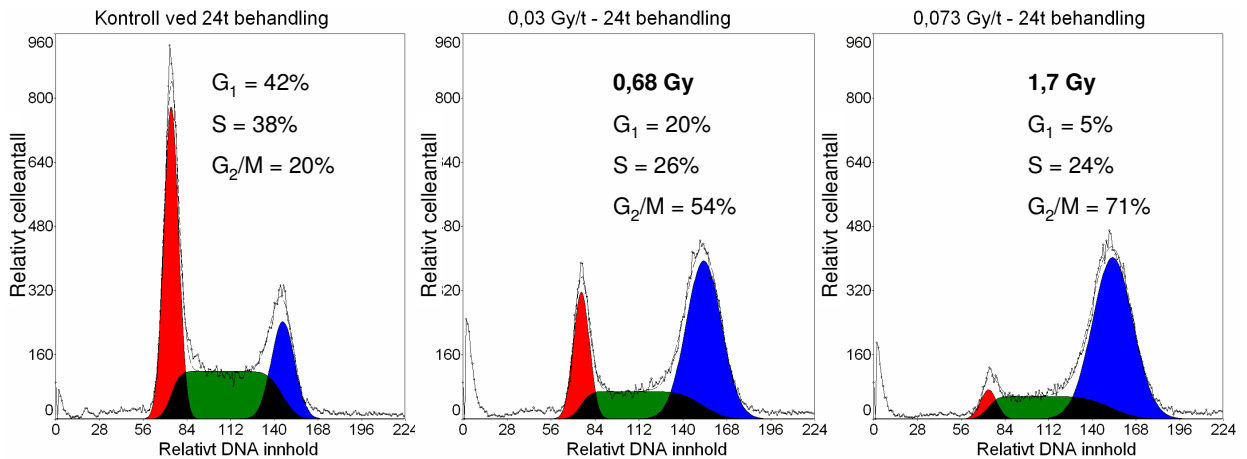
De normale eksponensielt voksende NHIK 3025 cellene viste en stor opphopning i  $G_2/M$ -fase etter behandling med doseratene brukt i disse forsøkene og 24 timers behandlingstid. Figur 4.13A viser DNA-histogrammene til platåfasecellene etter behandling i 24 timer. Disse histogrammene viser ingen særlig  $G_2/M$ -oppnopning av celler, noe som er forventet siden cellene ikke går i celledyklus. En liten andel celler går kanskje allikevel i celledyklus, og dermed gir opphav til den beskjedne oppnopningen som kan observeres (26-28 % celler i  $G_2/M$ -fase). For å kunne observere den "virkelige" oppnopningen av celler i  $G_2/M$ -fase ble de behandlede platåfasecellene trypsinert og sådd ut tynt. Slik at de fikk muligheten til å gå i celledyklus igjen og eventuelt stoppe i celledyklus. Resultatet kan observeres i figur 4.13B. Her har cellene fått mulighet til å gå i celledyklus 24 timer etter avsluttet behandling. Og igjen kan en observere en tilsvarende en oppnopning av celler i  $G_2/M$ -fase som de eksponensielt voksende NHIK 3025 cellene viste.

Videre ser vi i figur 4.14A en opphopning i  $G_2/M$ -fase etter 24 timers behandlingstid for NHIK 3025 (dox) celler. Og 24 timer etter avsluttet behandling viser figur 4.14B en opphopning som varer kun for de høyeste dosene tilsvarende slik vi observerte for de eksponensielt voksende NHIK 3025 cellene. Celleskadene og alfapartikelstrålingens evne til å påføre disse virker altså ikke å være avhengig av om cellene er multimedikamentresistente eller i platåfase.

## A: Celleprøver analysert rett etter avsluttet behandling

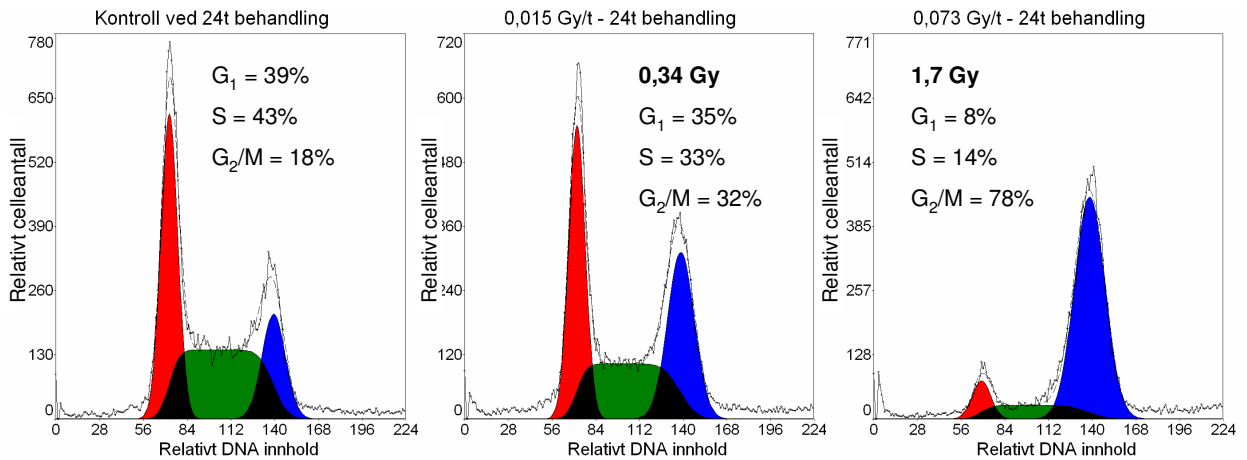


## B: Celleprøver analysert 24 timer etter avsluttet behandling

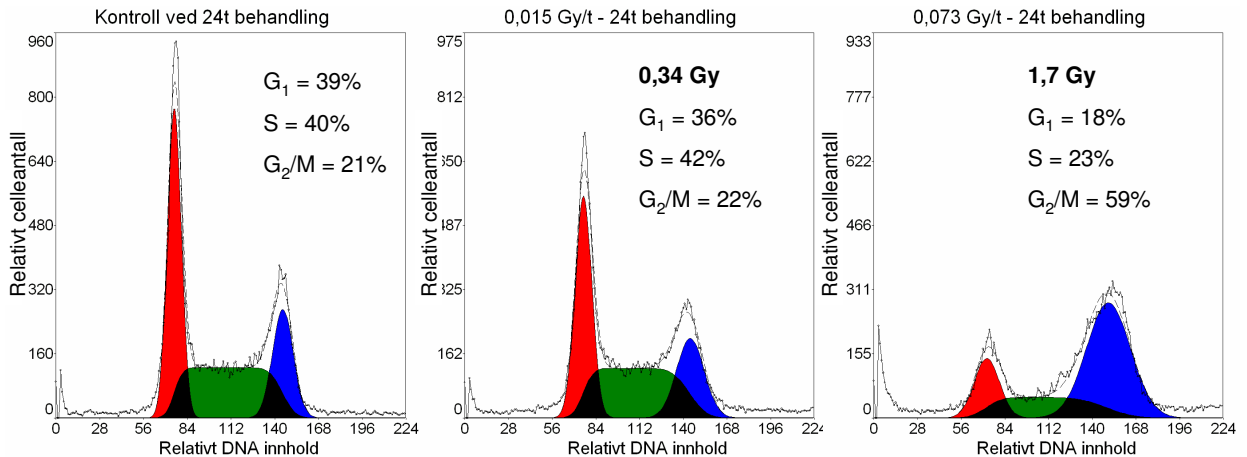


**Figur 4.13:** DNA-histogrammer for ubehandlede (kontroll) og behandlede NHIK 3025 platåfaseceller behandlet med  $^{223}\text{Ra}$ . Doserater var 0,03 og 0,073 Gy/t gitt over 24 timers behandlingstid. Relativt celleantall vises som funksjon av relativt DNA-innhold. **A)** Prøvene analysert rett etter behandling. Cellene er fremdeles i en platåfase. Siden de har redusert cellesyklusprogresjon observeres ingen særlig opphopning av celler i  $G_2/M$ -fase i forhold til kontrollen (første figur). **B)** Prøvene analysert 24 timer etter avsluttet behandling. Cellene har blitt sådd ut tynt, slik at de får muligheten til å gå i cellesyklus igjen å dele seg i 24 timer. En sammenligning med kontrollen (første figur) viser igjen en opphopning av celler i  $G_2/M$ -fase.

## A: Celleprøver analysert rett etter avsluttet behandling



## B: Celleprøver analysert 24 timer etter avsluttet behandling



**Figur 4.14:** DNA-histogrammer for ubehandlede (kontroll) og behandlede eksponensielt voksende NHIK 3025 (dox) celler, behandlet med <sup>223</sup>Ra. Doserater var 0,015 og 0,073 Gy/t gitt over 24 timers behandlingstid. Relativt celleantall vises som funksjon av relativt DNA-innhold. **A)** Celleprøvene analysert rett etter behandling. En sammenligning med kontrollen (første figur) viser at det er en økende G<sub>2</sub>/M-opphopning av celler med økende dose. **B)** Celleprøvene analysert 24 timer etter avsluttet behandling. Sammenligner man her med kontrollen (første figur) viser det seg fremdeles å være en opphopning av celler i G<sub>2</sub>/M-fase. Men i forhold til figur A ser man at G<sub>2</sub>/M-opphopningen har sunket 24 timer etter avsluttet behandling.

## 5 Diskusjon

### 5.1 Alfa- versus beta-emittere i radioterapi og dosimetri

Man kan spørre om hvorfor intern radionuklideterapi ikke er mer utbredt. Det er bare to legemidler på legemiddelmarkedet som er godkjent for bruk i behandling av benkreft – Metastron ( $^{89}\text{Sr}$ ) og Quadramet ( $^{153}\text{Sm}$ ). Disse to legemidlene er basert på  $\beta$ -emitterende nuklider som har vist seg å gi store og uønskede effekter på benmargen (Henriksen *et al.* 2003). Både  $\alpha$ - og  $\beta$ -partikler har en viss rekkevidde i vev, noe som fører til at de begge kan være potensielle kilder for intern bestråling ved kreftbehandling. Men  $\beta$ -partikler har en lavere energi (0,01-2.5 MeV) og lengre rekkevidde (50-5000  $\mu\text{m}$  i vev) enn  $\alpha$ -partikler. Til nå har man derfor sett at normalvevsbelastningen blir for stor etter behandling med  $\beta$ -emittere.  $\beta$ -Emittere blir derfor først og fremst brukt som smertestillende midler ved f. eks. benmetastaser (Bouchet *et al.*, 2000; Brechbiel, 2007; Henriksen *et al.*, 2002). Alfapartikelstråling blir derimot sendt ut med en energi mellom 3-8 MeV med rekkevidder mellom 40-90  $\mu\text{m}$ . Den korte rekkevidden fører til at  $\alpha$ -emitterende nuklider hovedsakelig kan bli brukt ved små tumorer, mikrometastaser (Brechbiel, 2007). Radium-223 er den første  $\alpha$ -emitter i utvikling og klinisk utprøving. Riktig nok er bl.a.  $\alpha$ -emitterne astat-225, arsen-211, bly-212 og noen flere i forsøksfasen, men ingen har kommet så langt som  $^{223}\text{Ra}$ . Kliniske resultater viser god effekt i pasienter med skjelettmetastaser for prostata- og brystkreft (Nilsson *et al.*, 2005 og 2007). Men det finnes lite eller ingen data på biologiske og prekliniske effekter av  $\alpha$ -partikler fra  $^{223}\text{Ra}$ . Denne oppgaven er derfor et viktig steg i retning av en generell dokumentasjon av  $\alpha$ -partikler i medisinsk sammenheng, og spesielt om radium-223s cellulære effekter.

I denne oppgaven var det behov for å sammenligne effekter av ulik type stråling. Derfor er dosimetri, strålingens energiavsettelse i et medium, et helt nødvendig begrep å ha informasjon om. Dosimetri kan hjelpe til med å gi en kvantitativ sammenheng mellom mengde av strålingsenergi lokalt absorbert i vev, og de biologiske effektene som denne energiavsetningen skaper (Bardiès og Pihet, 2000). Når vi her skulle undersøke cellulære effekter av  $^{223}\text{Ra}$  ble det derfor helt nødvendig å ha et begrep om den omtrentlige dosen som ble gitt cellene.

For å gi en strålingsdose i det eksperimentelle arbeidet ble legemiddelet Alpharadin<sup>TM</sup> brukt. Dette legemiddelet er et radioaktivt legemiddel som inneholder virkestoffet  $^{223}\text{Ra}$ .  $^{223}\text{Ra}$  er som kjent en  $\alpha$ -emitter, med et ganske komplisert strålingsspekter bestående av  $\alpha$ - og  $\beta$ -partikler og  $\gamma$ -stråler (Fisher og Sgouros, 1999). Det hadde vært ønskelig å finne dosen til enkeltceller i dette arbeidet. Dette involverer som nevnt i kapittel 2.5 mikrodosimetri, et omfattende studie som ville gått ut over denne oppgavens tidsfrist. For å unngå den stokastiske mikrodosimetrien ble området vi ønsket å finne dosen i utvidet fra det cellulære nivå til vekstmediet. Dosene funnet i denne oppgaven beskriver altså den absorberte dosen til vekstmediet. Hvordan dosen til mediet ble beregnet og antagelsene som ligger til grunn for dette finnes i kapittel 3.2.2 og 4.1. I tillegg vises et eksempel for doseberegninger i vedlegg G. Siden cellene vokser som et monolag i dette mediet under behandlingstiden ville cellene muligens motta omtrent samme dose som mediet. Dette er

en sterk forenkling og korreksjoner må gjøres. En viktig faktor som fører til at dette utsagnet ikke blir helt korrekt er randsoneproblemet som oppstår i bunnen av brønnen hvor cellene sitter. Ovenfra er fluensen av strålingspartikler relativ homogen pga. høyden på mediet. Men nedenfra vil mye av energien fra strålingspartiklene antas å forsvinne fra systemet. Cellene får altså en homogen bestråling ovenfra, mens nedenfra vil cellene få en mindre bestråling pga. sannsynligheten for tapet av strålingspartikler ut gjennom bunnen. Enkle geometriske betraktninger ble gjort som antydte et tap av alfapartikkelenergi gjennom bunnen i størrelsesorden 25 %. Her må allikevel flere beregninger gjøres for å kunne si noe med sikkerhet. Dosimetrien hadde blitt komplisert ytterligere hvis cellene tok opp  $^{223}\text{Ra}$ . Noen få forsøk med hensyn på å undersøke dette ble derfor gjort, og resultatene kan observeres i tabell 4.1. Disse forsøkene pekte mot at cellene ikke tok opp  $^{223}\text{Ra}$ , da cellene ikke viste seg å inneholde noen aktivitet etter vask av cellenes ytterside.

Denne dosimetrien ga oss et begrep om hvilken dose systemet mottok, og dermed fikk vi et grunnlag for å enklere kunne sammenligne våre resultater med tidligere data. De biologiske dataene som til nå finnes for  $\alpha$ -emittere er begrenset til radioaktive isotoper med lang fysisk halveringstid. Radionukliden  $^{223}\text{Ra}$  har en kort fysisk halveringstid, og det er lite biologiske, og særlig cellebiologiske, data tilgjengelig om radium-223s effekter som  $\alpha$ -emitter. Denne oppgaven har prøvd å fylle dette hullet og skape en preklinisk dokumentasjon for en spennende radionuklide og et mulig legemiddel mot kreft.

## 5.2 Biologiske effekter av alfapartikkelstråling fra $^{223}\text{Ra}$

### 5.2.1 Celleoverlevelse etter behandling med $^{223}\text{Ra}$

Som det første leddet i undersøkelsene var det nødvendig å finne ut noe om  $\alpha$ -partiklenes evne til å inaktivere celler, dvs. den cytotoxiske effekt. Det var også av interesse å bekrefte at  $\alpha\beta$ -modellen til Chadwick and Leenhouts (1973) stemte for  $\alpha$ -partikler fra  $^{223}\text{Ra}$  med et  $\beta$ -ledd lik null. Siden denne overlevelseskurven ikke var kjent fra før ble det som nevnt i kapittel 4.3.1 en del prøving og feiling. Vi måtte finne riktig forsøksmetode og også riktig dose mot riktig utsådd celleantall. Siden disse forsøkene er ganske tidkrevende, i form av at resultatene fra forsøkene først kan undersøkes etter omtrent 14 dager, tok disse forsøkene en anseelig tid av den dedikerte forsøksperioden. Den resulterende overlevelseskurven med alle doserater vist i figur 4.1 er svært nær hva teorien forutsier. Figur 4.1 viser en rett doseresponskurve vist i et enkeltlogaritmisk plott. Kurvens form harmonerer med Chadwick og Leenhouts (1973) lineær-kvadratiske celleoverlevelsesmodell. Denne sier at ved høy LET stråling, som alfapartikkelstråling, vil det lineære leddet dominere ( $\alpha D$ ) og fremstillingen av kurven i et enkeltlogaritmisk plott vil vise en rett kurve (*ibid*). Det at kurven ble rett viser også at denne type alfapartikkelstråling ikke induserer subletale skader som kan repareres under bestråling, men heller dobbeltrådbrudd forårsaket av en enkelt strålingspartikkel som er vanskeligere å reparere. Den ikke-lineære kurvetilpasningen til en eksponensiell kurve som er gjort viser at  $\alpha$ -leddet har en verdi på 2,27. Denne verdien forteller noe om strålingssensitiviteten for akkurat denne type stråling og celletypen brukt i disse



forsøkene. Furre *et al.* (1999) har i sine studier av strålingseffekter også brukt cellelinjen NHIK 3025. I en av hans studier ble en asynkron populasjon av disse cellene bestrålt ved hjelp av en kobolt-60-kilde. Denne kilden sender ut to  $\gamma$ -stråler på hhv. 1,17 og 1,33 MeV under sitt  $\beta$ -decay til stabil nikkel-60. Overlevelseskurven for denne lav LET strålingen viste seg å gi et  $\alpha$ -ledd på 0,49 for doser opp mot 7 Gy og et  $\alpha$ -ledd på 1 for doser høyere enn dette, doseraten var i begge tilfeller 0,33 Gy/t (*ibid*). I våre forsøk ble doserater opp mot 0,36 Gy/t brukt som resulterte i et  $\alpha$ -ledd på 2,27, noe som viser at NHIK 3025 cellene er mer sensitive for alfapartikkelstråling.

I kapittel 2.4.1 ble definisjonen av relativ biologisk effekt (RBE) gitt. Denne faktoren er til hjelp når vi ønsker å sammenligne ulike stråletypers effekt. Da er det viktig at vi sammenligner resultater ved samme biologiske endepunkt, noe som her blir celleoverlevelse. Figur 4.1 viser at en dose på 2 Gy fra  $^{223}\text{Ra}$  gir en overlevelse på omtrent 1 % mens det for Furre *et al.* var behov for 8 Gy fra en  $^{60}\text{Co}$ -kilde, her med henholdsvis 0,36 og 0,33 Gy/t i doserate. RBE-verdien blir altså 4 ved en overlevelse på 1 %. Ved en overlevelse på 37 % blir RBE-verdien for de to forsøkene 5,6 (1999). Alfapartikkelstråling er i dette tilfellet mye mer effektiv enn  $^{60}\text{Co}$ -stråling hva gjelder å inducere klonogenisk celledød. Høy LET stråling er altså mer effektiv med hensyn på å gi celledød enn lav LET stråling. Dette er også blitt vist i flere studier bl.a. hos Hall *et al.* (1972), som viser en overlevelseskurve for asynkron kinesiske hamster celler behandlet med røntgen- og alfapartikkelstråling. Dette resulterer i henholdsvis en krum og en rett overlevelseskurve, med RBE-verdier på 4,5 og 8 ved henholdsvis 1 % og 37 % overlevelse (Hall *et al.*, 1972; Raju *et al.*, 1980). Generelt øker RBE-verdien for økende overlevelse.

### 5.2.2 Doserateeffekter

Alfapartikkelstrålingens effektivitet kan forklares ut fra hvordan den skader DNA-molekylet. Alfapartikkelstrålingen er som tidligere nevnt tett ioniserende og danner hovedsakelig dobbelttrådbrudd og komplekse dobbelttrådbrudd (kapittel 2.4.1). Litteraturen viser at det er de komplekse dobbelttrådbruddene som gir celledød, og at høy LET stråling inducerer disse mer effektivt (Radford, 2002; Rydberg *et al.*, 2005). Dobbelttrådbrudd sies å være vanskeligere å reparere, og det dannes få subletale skader fra høy LET stråling. Krumningen på en lav LET overlevelseskurve viser graden av subletale skader. Disse skadene blir normalt sett reparert hvis behandlingstiden øker. Dersom dosen gis i fraksjoner eller ved en lav doserate vil overlevelsen bli høyere. Dette danner grunnlaget for hvorfor lav LET stråling har en doserateeffekt (Hall og Giaccia, 2006). Ved alfapartikkelstråling fra  $^{223}\text{Ra}$  ble ingen doserateeffekt sett, noe som er naturlig siden overlevelseskurven i figur 4.1 er rett. Figur 4.1 viser at alle de ulike overlevelseskurvene for ulike doserater ligger over hverandre. Dette bekrefter at alfapartikkelstråling fra  $^{223}\text{Ra}$  gir store stråleskader av en annen art enn subletale skader. Doseratene benyttet i disse forsøkene er i tillegg svært lave (0,015-0,073 Gy/t). Det at man ikke ser noen doserateeffekt for disse lave doseratene, forteller noe om at de potensielt letale stråleskadene som blir indusert heller ikke blir reparert i noen særlig stor grad. Som tidligere nevnt i kapittel 2.4.1 viste Kühne *et al.* i en studie at fraksjonering og

dermed en senking av doseratene, ikke gav færre skader ved behandling med alfapartikkelstråling (Kuhne *et al.*, 2002). Dette harmonerer med resultatene funnet her.

### 5.2.3 Fordelingen av celler i cellesyklus etter behandling med $^{223}\text{Ra}$

Tidligere studier av bl.a. Lücke-Huhle (1982) viser at alfapartikkelstråling inducerer arrest av celler i  $G_2$ -fase svært effektivt (Palayoor, 1993). Det var derfor ønskelig å undersøke om alfapartikkelstråling fra  $^{223}\text{Ra}$  ga den samme effekten. I tillegg er stans eller opphold av celler i  $G_1$ - og S-fase vanlig å få induisert etter bestråling med ioniserende stråling. Disse arrestpunktene er også tidligere registrert for alfapartikkelstråling (Gadbois *et al.*, 1996; Raju *et al.*, 1980). Siden cellene, NHIK 3025, brukt i denne oppgaven verken har funksjonelle p53- eller pRb-proteiner (Åmellen *et al.*, 1997 og 1998) var det ikke forventet å se noen  $G_1$ -arrest for disse cellene. Årsaken til dette er at disse proteinene er nødvendig for en effektiv arrest av celler i  $G_1$ -fase (kapittel 2.3.1 og 2.4.1). Undersøkelser for å belyse effekten av alfapartikkelstråling fra  $^{223}\text{Ra}$  ble som tidligere nevnt gjort ved hjelp av flowcytometri etter merking av DNA-molekyler med fargestoffet PI (kapittel 3.4).

Metoden for merking av DNA-molekyler med PI innebar farging av hele celler, ikke cellekjerner, og ga derfor ikke mulighet for å skille mellom celler i  $G_2$ - og M-fase. Dette fører til at opphopningen som registreres i  $G_2$ /M-området i denne oppgaven omtales som en  $G_2$ /M-oppnopning av celler eller en arrest av celler i  $G_2$ /M-fasen. Vi forventer allikevel at opphopningen av cellene finner sted i  $G_2$ -fase, og at det som observeres er en reell  $G_2$ -arrest. Dette kan forsvares både ut fra teori og eksperimentelle observasjoner. Teorien sier at man får en arrest i  $G_2$ -fase som hindrer cellene å gå videre inn i mitose ved DNA-skade (Alberts *et al.*, 2002). Fotomikrografier og nylig utført time-lapse filming viser det er få eller ingen avrundede celler i mitose, men heller "kjempeceller" som ikke klarer å gjennomføre en celledeling etter behandling med  $^{223}\text{Ra}$ . Det arbeides videre med å bekrefte at det virkelig bare er  $G_2$ -celler tilstede i opphopningen, ved å benytte andre metoder som skiller mellom interfase-celler og celler i mitose. Flowcytometri-deteksjon av Phospho-Histone H3 (Ser10) er en av disse metodene. Fosforilyring ved aminosyren serin 10 i histon H3 er forbundet med kromosomkondensasjonen som foregår i mitose. Når cellene merkes med et antistoff som binder seg til dette området i histone H3, og DNA-molekylene deretter farges med PI, kan man detektere interfase- og mitoseceller skilt fra hverandre. Forsøk med en slik merkemethode ble utført med de behandlede cellene som viste en stor opphopning av celler i  $G_2$ /M-fase. Disse celleprøvene viste en liten andel celler i mitosefase og mange celler i  $G_2$ -fase (data ikke vist). Resultatene er allikevel utelatt fra denne oppgaven, da metoden ennå ikke er optimalisert. Metoden utbedres fremdeles og flere forsøk er planlagt.

#### ***Fordeling av celler i cellesyklus rett etter avsluttet behandling***

Figur 4.6A viser at prosent andel celler i  $G_2$ /M-fase øker med økende dose for doseratene 0,015-0,073 Gy/t rett etter behandling. Her ble behandlingen gitt over 6, 12 og 24 timer, og opphopningen av celler virker å være doseavhengig. Av figur 4.7A ser vi at prosent andel celler i  $G_2$ /M-fase først synker under kontrollnivået, før den igjen øker med økende

dose for hver enkelt doserate mellom 0,15-0,36 Gy/t. Her ble behandlingen gitt over 1, 2, 3 og 6 timer. Nedgangen for de laveste dosene i G<sub>2</sub>/M-celler i forhold til kontroll diskuteres nærmere i kapittel 5.4. Det bemerkelsesverdige er at alle de ulike doseratene fører til en opphopning av celler i G<sub>2</sub>/M-fase som ligger på samme nivå, uavhengig av akkumulert dose rett etter behandling, noe som virker å være motsatt av det som skjer ved lavere doserater.

Den prosentvise opphopningen av celler i G<sub>2</sub>/M-fase for alle doserater undersøkt, viser seg å være svært tidsavhengig. Som tidligere nevnt blir dosen til cellene gitt med ulike doserater og ulike behandlingstider, noe som kompliserer sammenligningen av resultatene. NHIK 3025 cellene hadde ved disse forsøkene oppstart en median cellesyklusetid på rundt 17,5 timer, og det tok derfor omtrent 13,5 timer før en celle som fikk en skade i begynnelsen av G<sub>1</sub>-fase rakk frem til G<sub>2</sub>/M-fasen. Tidspunktet for analysen av celleprøvene og behandlingstiden bestemmer derfor når vi kan forvente å se en maksimal G<sub>2</sub>/M-opp hopning. Her kan vi derfor forvente å se en maksimal G<sub>2</sub>/M-opp hopning for 12 og 24 timers prøvene analysert rett etter behandling, mens 1-6 timers prøvene først vil vise sin maksimale opphopning senere. Siden resultatene nevnt her viser et øyeblikksbilde av hvordan fordelingen av celler er i cellesyklus rett etter avsluttet behandling, vil det være vanskelig å eventuelt konkludere med at opphopningen for de lavere doseratene er doseavhengig, mens de høyere doseratene viser en doseuavhengighet. Noen spekulasjoner kan allikevel gjøres.

Figur 4.7A viser en doseuavhengighet hva gjelder G<sub>2</sub>/M-opp hopning av celler. Ved den høyeste dosen gitt for hver doserate (6 timers behandling) viser alle celleprøvene en opphopning på rundt 35 % i G<sub>2</sub>/M-fase. Dette forteller kanskje at vi ved disse doseratene vil ha en "metning" av stråleskader. Dvs. at alle celler vil ha fått en eller annen skade i løpet av den korte behandlingstiden, som fører til at de cellene som når fram til G<sub>2</sub>/M-fasen stopper der. Få celler rekker å gå ut av G<sub>2</sub>/M-fase og inn i G<sub>1</sub>-fase før de får en stråleskade. Ved denne behandlingstiden vil det kun være celler som fikk en skade i S-fase, som vil rekke å komme frem til G<sub>2</sub>/M-fasen før prøvene blir analysert. Noen beregninger ble gjort for å undersøke om en opphopning på 35 % er det man kan forvente av maksimal opphopning av celler ved en metning av skader og full stopp i G<sub>2</sub>/M-fasen. Dette ble gjort ved å integrere ligning 2.9 for aldersfordelingen over behandlingstiden 6 timer, regnet tilbake fra G<sub>2</sub>-fasens start. Antar vi at ingen celler slipper gjennom mitosen fra første bestrålingsminutt, vil maksimal opphopning i G<sub>2</sub>/M-fasen være 48,6 %. Integreres samme ligning fra M-fasens slutt og 6 timer tilbake, finner vi hvor mange celler som maksimalt ville slippe ut av M-fasen i løpet av behandlingstiden hvis det ikke oppstod noen arrest. Dette tilsvarer 26,8 %. Antar vi en mellomting mellom disse to ytterlighetene, nemlig at maksimalt antall celler slipper inn i G<sub>2</sub>/M-fasen (48,6 %) mens omtrent halvparten av cellene slipper ut av M-fase (13,4 %) under bestrålingen, vil den resulterende opphopningen ligge på 35,2 %. Noe som er svært likt vårt eksperimentelle resultat. Dette kan forsterke forslaget om at vi her har en metning av skader og en doseuavhengig G<sub>2</sub>/M-opp hopning av celler.

Furre *et al.* (1999) har rapportert noe av det samme. NHIK 3025 celler var bestrålt med en kobolt-60-kilde som produserer lav LET stråling. Hans data viser en doseuavhengig

$G_2/M$ -oppnopning av celler for noen lignende doserater (0,33 Gy/t og 0,86 Gy/t) (*ibid*). Hvis de høyere doseratene (0,15-0,36 Gy/t) oppnår en metning av skader, skulle man også forvente at de lavere doseratene (0,015-0,073 Gy/t) som gir samme samlede dose oppnår den samme metningen. Slik ser det allikevel ikke ut til å gjøre fra figur 4.6A, som indikerer en doseavhengig  $G_2/M$ -oppnopning av celler. Muligens kan dette øyeblikksbildet mislede oss. Kanskje er det også her en metning av skader, men at det pga. den lange behandlingstiden vil foregå en reparasjon av stråleskader hos de cellene som har fått lavere doser. Dette harmonerer i midlertid ikke med det man så fra overlevelseskurven. Her observerte vi ingen doserateeffekt og dermed ingen særlig reparasjon av stråleskader under behandlingstiden. En annen mer sannsynlig forklaring er at cellene ved disse doseratene mottar dosen over en så lang tid at flere celler slipper gjennom  $G_2/M$ -fase før de blir skadet. Lavere doserater fører til enda færre skader per tidsenhet, og dermed enda flere celler som slipper unna  $G_2$ -kontrollpunktet før de får en skade. Dette fører til at man ikke får sett det reelle skadeomfanget rett etter behandling for disse doseratene siden mange av de skadede cellene blir skadet slik at de ikke blir stoppet i  $G_2/M$ -fasen. Dataene vist for disse doseratene indikerer kanskje derfor ikke en doseavhengig  $G_2/M$ -oppnopning som først antatt. Muligens er det også her en doseuavhengig oppnopning av celler i  $G_2/M$ -fase. Spekulasjonene angående dette harmonerer allikevel ikke med annen tidligere publisert data. Studier som er gjort med  $\alpha$ -emitteren americium-241 (21 Gy/t) viste at antall celler arrestert i  $G_2$ -fasen er en funksjon av dosen. Her ble det også funnet en direkte sammenheng mellom antall celler med kromosom skader og antall celler i  $G_2$ -arrest (Hieber og Lücke-Huhle, 1983). Den samme doseavhengige  $G_2/M$ -oppnopningen ble vist i en annen studie av Raju *et al.*, hvor celler ble behandlet med røntgen- og alfapartikelstråling fra plutonium-238 (216 Gy/t (1980)). I begge disse studiene ble det brukt mye høyere doserater enn det som ble brukt i våre studier. Man skulle kanskje forvente å se en tilsvarende metning av skader for høyere doserater, men det ble ikke vist i studiene nevnt over. Disse tidligere studiene tok i midlertidig i bruk kinesiske hamster celler (V79), mens vi derimot brukte humane livmorhalskreftceller. Det kan derfor tenkes at resultatene funnet her er spesifikke for en spesiell celletype. Resultatene må derfor undersøkes nærmere før noen slutninger kan trekkes.

Figur 4.8 viser prosent andel celler i  $G_2/M$ -fase mot alle doseratene brukt ved en behandlingstid på 6 timer. Vi ser at doseratene 0,015-0,073 Gy/t ikke gir samme oppnopning av celler i  $G_2/M$ -fase, som de høyere doseratene mellom 0,15-0,36 Gy/t. De lavere doseratene gir ikke nok skader i løpet av bare 6 timers behandling, slik at det oppstår en nevneverdig oppnopning av celler i  $G_2/M$ -fase. Hvis det virkelig er en metning av skader ved de høyere doseratene, vil dette indikere at det finnes en dosegrense hvor cellene over denne får en metning av skader og dermed full arrest av alle celler som når  $G_2/M$ -fasen i løpet av 6 timer. Denne må i tilfelle ligge mellom 0,43-0,87 Gy. Den foreslåtte  $G_2/M$ -oppnopningens doseuavhengighet har altså kanskje en nedre grense.

Uavhengig av disse spekulasjonene kan vi uansett se at alfapartikelstråling fra  $^{223}\text{Ra}$  gir en effektiv arrest av celler i  $G_2/M$ -fase. I studien til Furre *et al.* ble det vist tilsvarende  $G_2$ -oppnopninger for NHIK 3025 celler (80 %), etter en behandling med lav LET stråling. Dosene som ble brukt for å oppnå dette, 7 og 17 Gy med henholdsvis 0,33 og 0,86 Gy/t

(Furre *et al.*, 1999), er mye høyere enn det vi brukte i våre studier for å oppnå samme effekt, 1,5 og 2,2 Gy med henholdsvis 0,073 og 0,36 Gy/t. RBE-verdien med G<sub>2</sub>/M-opphopning av celler som endepunkt vil altså ligge på 4,7. Dette viser igjen at høy LET stråling, som alfapartikkelstråling, kan vise seg og være mer effektiv med hensyn på å indusere G<sub>2</sub>/M-arrest. Noe som harmonerer med hva andre studier også har vist (Lücke-Huhle, 1982; Palayoor, 1993)

#### ***Fordeling av celler i cellesyklus 24 timer etter avsluttet behandling***

Cellenes fordeling i cellesyklus ble også undersøkt 24 timer etter avsluttet behandling. Celleprøvene hadde fått samme behandling som de nevnt over, men de ble først analysert etter 24 timers eventuell vekst i rent medium. Figur 4.6B viser G<sub>2</sub>/M-opphopningen av NHIK 3025 cellene for doseratene 0,015-0,073 Gy/t. Her har opphopningen i G<sub>2</sub>/M-fase sunket for de ulike prøvene i løpet av de 24 timene, mens andelen celler i G<sub>1</sub>- og S-fase har økt tilsvarende. Figur 4.7B viser G<sub>2</sub>/M-opphopningen for prøvene behandlet med doseratene 0,15-0,36 Gy/t. Her ser vi derimot en oppgang i G<sub>2</sub>/M-opphopningen av cellene for alle doserater, og en tilsvarende nedgang for cellene i G<sub>1</sub>- og S-fase.

Økningen av celler i G<sub>2</sub>/M-fase for de høyere doseratene kan forklares ut fra tidsavhengigheten. Rett etter behandling så vi en beskjeden G<sub>2</sub>/M-opphopning hos disse prøvene, siden behandlingstiden var så kort. I løpet av de 24 timene etter avsluttet behandling vil derimot alle de skadede cellene ha rukket å komme frem til G<sub>2</sub>/M-fasen, og bli arrestert der. Figur 4.7B viser allikevel ikke en doseuavhengig G<sub>2</sub>/M-opphopning av celler 24 timer etter avsluttet behandling. Dette ville man kanskje ha forventet hvis det var en slik metning av skader som ble antydnet tidligere. En mulig forklaring på dette kan være at cellene som mottok lavere doser slipper løs fra G<sub>2</sub>/M-arresten, mens cellene som har fått høyere doser ikke slipper like effektivt ut av arresten. Nedgangen i G<sub>2</sub>/M-opphopning for de lavere doseratene (figur 4.6B) indikerer også at noen celler kan ha sluppet løs fra arresten og gått inn i G<sub>1</sub>- og S-fase. For disse doseratene så vi allerede en maksimal G<sub>2</sub>/M-opphopning av celler rett etter behandling. Nedgangen i G<sub>2</sub>/M-opphopningen kan muligens forklares ut fra følgende:

- Reparasjon av mindre komplekse skader
- Nonhomolog endeskjøting av dobbeltrådbrudd
- Adaptasjon

Ved alle disse dosene er det funnet en viss overlevelse ved koloniforsøkene. Dette kan indikere at noen av de skadede cellene kan ha klart å reparere sine skader.

*Reparasjon av mindre komplekse skader* i cellen kan være en årsak til at cellene slipper løs fra G<sub>2</sub>/M-arresten. Enhver skade i cellen kan muligens føre til en arrest i G<sub>2</sub>/M-fase. Kanskje kan cellene som slipper ut av arresten ha fått mindre skader som f.eks. singeltrådbrudd, som er enklere å reparere. Et treff av en  $\alpha$ -partikkel i cellens cytoplasma eller cellemembran, har ikke vist seg å gi noen celledød i tidligere studier (Søyland, 2000). Denne skaden kan kanskje allikevel føre til en arrest i G<sub>2</sub>/M-fasen. Hvis dette er tilfellet kan det tenkes at det er slike skader som repareres og fører til en løsrivelse fra arresten.

*Nonhomolog endeskjøting av dobbeltrådbrudd* kan være en annen mulighet for cellens løsrivelse fra G<sub>2</sub>/M-arresten (kapittel 2.4.1). NHEJ skjøtes som tidligere nevnt DNA-bruddene sammen ukritisk. Dette kan føre til skader siden deler av DNA-molekylet kan mistes, men det kan også ofte være vellykket. Dette fordi cellens DNA-molekyler inneholder mange sekvenser som ikke er nødvendig for cellens proliferasjon. En slik reparasjon kan derfor ofte føre til at cellen overlever.

*Adaptasjon*, tilpasning, er en siste mulighet som må nevnes i denne sammenheng. Tidligere studier indikerer at en kontrollpunkt-adaptasjon kan forekomme hos G<sub>2</sub>-arresterte celler som har vært utsatt for bestråling. Cellene kan altså klare å slippe ut av arresten uten å ha fått sine skader reparert (Syljuåsen *et al.*, 2006). Denne effekten kan føre til at noen celler klarer å gjennomføre noen få celledelinger, før de dør en klonogenisk død. Dette kan støttes av observasjoner som er gjort ved koloniforsøkene, hvor små kolonier med noen få store celler er observert.

I en studie gjort av Palayoor *et al.* (1993) det observert en doseavhengig G<sub>2</sub>/M-arrest etter behandling med  $\alpha$ -partikler, og en løsrivelse fra denne arresten 18-24 timer etter for dosene 0,2 og 0,5 Gy. Ved doser over 2 Gy ble ingen slik løsrivelse sett 24 timer etter behandling (*ibid*). En annen studie at Lücke-Huhle viste også tilsvarende løsrivelse av celler fra G<sub>2</sub>-arrest ved behandling med  $\alpha$ -partikler for lavere doser (<0,5 Gy). Ved høyere doser ble ingen slik løsrivelse sett. Disse funnene sies å indikere at G<sub>2</sub>-arresten er en fase for reparasjon av skader, også for celler behandlet med  $\alpha$ -partikler (Lücke-Huhle, 1982). I en studie nevnt tidligere av Hieber og Lücke-Huhle ble det funnet at alfapartikkelstråling gir to typer kromosomabberasjoner, hvor den ene er mer kompleks enn den andre. Det ble her vist at det foregikk en viss reparasjon av de mest komplekse skadene til mindre komplekse skader, ved at det ble observert en bedret kondensasjon under G<sub>2</sub>-arresten. Man så allikevel at cellene ikke klarte å reparere skadene fullstendig slik at de slapp ut av G<sub>2</sub>-arresten og inn i mitosen (Hieber og Lücke-Huhle, 1983). Nedgang i G<sub>2</sub>/M-opphopning av celler og en viss reparasjon av stråleskader har altså blitt observert i noen tidligere studier. Våre studier kan verken bekrefte eller avkrefte dette, men kun gi indikasjoner på hva som kan være tilfellet. Flere spesifikke undersøkelser må gjøres for å bestemme dette.

### ***Arrest i andre faser av cellesyklus?***

I våre forsøk ble det kun sett en G<sub>2</sub>/M-opphopning av celler. Både lav og høy LET stråling har tidligere vist å kunne arrestere celler i G<sub>1</sub>-, S- og G<sub>2</sub>-fase. I en tidligere studie utført med normale humane fibroblaster, som hadde en vill-type p53 status, ble det observert en G<sub>1</sub>-arrest etter alfapartikkelstråling fra plutonium-238. En økning av p53 proteinet ble dessuten sett i disse cellene som viste G<sub>1</sub>-arrest etter behandling med  $\alpha$ -partikler (Gadbois *et al.*, 1996). Cellene brukt i denne oppgaven, NHIK 3025, uttrykker ikke funksjonelt p53-protein. Dette kan kanskje være med å forklare hvorfor ikke vi ser noen G<sub>1</sub>-opphopning av celler i våre studier. Den store opphopningen av celler i G<sub>2</sub>/M-fase, som observeres ved 24 timers behandling med 0,073 Gy/t (91 %), samsvarer derimot med den ene G<sub>2</sub>/M-opphopningen som har blitt vist i en tidligere studie av Xu *et al.* Her ble det observert to ulike G<sub>2</sub>/M-opphopninger av celler etter bestråling. Ett

observeres 1 time etter behandling og er ATM avhengig, flyktig og doseuavhengig, mens det andre observeres etter 24 timer og er ATM uavhengig, langvarig og doseavhengig. Denne siste opphopningen kan samsvare med opphopningen av celler sett i våre undersøkelser. Denne ble vist å være stor pga. manglende uttrykt ATM-gen. Dette fordi celler uten denne funksjonen mangler kontrollpunktet i S-fase (Xu *et al.*, 2002). Muligens har NHIK 3025 cellene heller ikke funksjonelt ATM-gen, noe som kan forklare det manglende stoppet av celler i S-fase og den enorme G<sub>2</sub>/M-oppnopningen.

### ***Sammenheng mellom overlevelseskurver og DNA-histogrammer***

I figur 4.3 kan DNA-histogrammene analysert rett etter behandling undersøkes i sammenheng med kurveformen på overlevelseskurven for doseratene 0,015 Gy/t (figur 4.3A), 0,043 Gy/t (figur 4.3B) og 0,073 Gy/t (figur 4.3C) gitt med en behandlingstid 6, 12 og 24 timer. Ved behandling av cellene med en doserate på 0,073 Gy/t viser overlevelseskurven en tilsynelatende skulder eller krumning. Den store G<sub>2</sub>/M-oppnopningen av cellene sett for denne doseraten kan forklare krumningen på kurven i figur 4.3C. Strålingen ble gitt til en asynkron cellepopulasjon, og behandlingen gitt over 24 timer førte til at cellene nærmest ble synkronisert i G<sub>2</sub>/M-fase, en fase hvor cellene generelt er mer strålingssensitive. At celler som er i normal G<sub>2</sub>-fase eller i G<sub>2</sub>-arrest er like sensitive for stråling ble vist i en studie av Furre *et al.* (1999). Sensibiliseringen gjennom redistribusjon av cellene i cellesyklus kan ikke observeres like tydelig for de lavere doseratene (0,015 og 0,043 Gy/t), kanskje fordi disse cellene ikke får tilført samme høye dose og dermed samme store opphopning av celler i G<sub>2</sub>/M-fase.

I figur 4.5 er DNA-histogrammene analysert rett etter behandling satt i sammenheng med kurveformen på overlevelseskurven for doseratene 0,15-0,36 Gy/t gitt med en behandlingstid på 1, 2, 3 og 6 timer. Disse figurene beskriver en tilnærmet eksponensiell dose-responskurve. Dette harmonerer med at vi her fikk en lavere G<sub>2</sub>/M-oppnopning av celler pga. den korte behandlingstiden. Overlevelseskurvene ble derfor tilnærmet rette.

### **5.2.4 Har cellene ulik følsomhet for alfapartikkelstråling fra <sup>223</sup>Ra gjennom cellesyklus?**

Litteraturen viser at cellene kan ha forskjellige følsomhet for stråling avhengig av hvor de er i cellesyklusen. For eksempel er celler ofte mer resistente i en sen S-fase ved røntgenstråling (Hall og Giaccia, 2006). Men tidligere litteratur viser også at variasjonene i sensitivitet reduseres med økende LET (Bird og Burki, 1971 og 1975; Hall *et al.*, 1972). Derfor var det av interesse å undersøke om cellenes sensitivitet for alfapartikkelstråling fra <sup>223</sup>Ra er cellesyklusavhengig. Forsøkene ble utført som beskrevet i kapittel 3.3.2. For de to forsøkene som ble gjennomført viste resultatene seg å være noe varierende. Det var også ulik median cellesyklustid i de to forsøkene, noe som gjør det vanskeligere å sammenligne resultatene. Overlevelsesfraksjonene for 2 og 4 timers prøvene viste for begge forsøkene en lavere overlevelse enn forventet. Dette kan komme av cellenes dårlige festevevne etter utsåing. Ved behandling opp til 4 timer etter utsåing kan man forvente at noen celler skylles bort under behandling. Disse punktene er derfor ganske usikre. I figur 4.10A vises resultatet fra det første forsøket. Her er den mediane

cellesyklusperioden på 19,5 timer. Denne kurven viser ikke noe datapunkt for 2 timers prøven, siden vi for dette punktet ikke observerte noen overlevende kolonier. Årsaken til dette kan være ufestede celler som ble skylt bort under behandling eller behandling av et seksbrønnsbrett tomt for celler. Figur 4.10B viser resultatene fra det andre forsøket. Her er den mediane cellyklusperioden 20,5 timer og det er en litt annen lengde på cellyklusfasene. Kurveforløpene i disse to forsøkene er ganske forskjellige, og det kan ikke observeres at cellene er spesielt resistente eller sensitive i ulike deler av cellyklus. Noen variasjoner i strålingssensitivitet observeres for alfapartikkelstråling, men disse variasjonene er ikke store.

For lav LET stråling er det funnet en ganske stor forskjell i strålingssensitivitet for cellene i de ulike fasene. Celler i G<sub>2</sub>- og M-fase er generelt sett mest sensitive for stråling, mens celler i sen S-fase er mer resistente. Hvis G<sub>1</sub>-fase er relativt lang vil cellene være mer resistente i begynnelsen av fasen og mer sensitive mot slutten. Dette forløpet kan allikevel variere en del for ulike cellelinjer (Hall og Giaccia, 2006). Bird og Burki har tidligere bestrålt synkroniserte kinesiske hamster celler med stråling fra tunge ioner med LET verdi som varierer fra 19-2000 keV/μm. Resultatene fra disse forsøkene viser at variasjonen i strålingssensitivitet for cellene synker med økende LET verdi for strålingen. For LET verdier mellom 48-190 keV/μm ble en liten variasjon i sensitivitet for cellene gjennom cellyklus observert, mens det for LET verdier høyere enn 190 keV/μm kun ble sett en flat alders-responskurve og dermed ingen variasjon (Bird og Burki, 1971 og 1975). Den samme reduksjonen i variasjon med økende LET verdi er vist for α-partikler og samme celletype av Hall *et al.* (Hall *et al.*, 1972). Disse forsøkene ble gjort med kinesiske hamster celler, mens det i våre undersøkelser ble brukt humane livmorhalskreft celler.

I en studie av Pettersen *et al.* ble synkroniserte NHIK 3025 celler, den samme cellelinje brukt i denne oppgaven, behandlet med 5 Gy røntgenstråling gjennom cellyklus. Resultatene viser en variasjon på en faktor 5 mellom den høyeste og laveste overlevelsesfraksjonen gjennom cellyklus. Celler i G<sub>1</sub>-fase viser seg å være mer resistente, mens celler i G<sub>2</sub>-fase er mer sensitive. Resistensen øker i midlertidig litt for celler i M-fase (Pettersen *et al.*, 1977). Våre resultater viser ikke nødvendigvis et helt likt kurveforløp, men antydningen til likhet kan observeres. Variasjonene i overlevelsesfraksjon for undersøkelser gjort i denne oppgaven er på en faktor 2,3 og 1,7, for henholdsvis det første og det andre forsøket. Så variasjonen er lavere for alfapartikkelstråling. Sammenligner vi med Furre *et al.* og deres alders-responskurve for NHIK 3025 celler, kan vi se en liknende trend. I disse forsøkene ble det brukt røntgenstråling og faktoren for variasjonen mellom den høyeste og laveste overlevelsesfraksjonen gjennom cellyklus lå på omtrent 6 (Furre *et al.*, 1999). Igjen en mye større variasjon observert for lav LET stråling i forhold til høy LET stråling brukt i våre studier. Alfapartikkelstrålingen fra <sup>223</sup>Ra viser seg å gi en relativt lik overlevelse uavhengig av hvilken fase cellen blir bestrålt i.



### 5.2.5 Vil legemiddelet Alpharadin™ overvinne kjemoterapeutiske legemidlers negative egenskaper?

Den klinisk bruk av Alpharadin™ er i første rekke for behandling av skjelettmetastaser fra prostatakrefte. Skjelettmetastaser er vanskelig å detektere (før de er store) og vanskelig å behandle, pga. deres spredte lokasjon. Kjemoterapeutiske legemidler kommer inn som en behandlingsmetode ved metastasering, noe som fører til at disse legemidlene blir en av Alpharadins™ største konkurrenter. I dag brukes cellegiften Taxotere (docetaxel) i mange land for behandling av hormonresistente prostatakrefte-pasienter med spredning til skjelettet. Et problem med cellegiftene er at de ikke klarer å skille mellom normale celler og kreftceller. De dreper generelt celler som deler seg og er i cellesyklus. Dette fører til at mange normale celler også vil dø, og det gir en dosebegrensende faktor. Et annet problem knyttet til dette er at kreftceller som er i en platåfase med redusert cellesyklusprogresjon heller ikke vil bli drept av disse cellegiftene, siden de ikke deler seg. I tillegg kan celler utvikle resistens mot ulike kjemoterapeutiske legemidler. Noen ganger vil en slik resistens virke for flere ulike legemidler som ikke var opphavet for resistensen i utgangspunktet. Dette kalles multimedikamentresistens (MDR), og karakteriseres gjerne av at P-glykoprotein, som er et ATP-avhengig pumpeprotein som finnes i cellemembranen. Dette proteinet minsker akkumuleringen av cytotoxiske substanser inne i celler ved at de pumpes ut, og effekten av legemiddelet dermed blir lavere (Hofslis, 1992). For å utelukke at cellene kan være resistente mot Alpharadin™, enten ved å være i platåfase eller ved å ha en multimedikamentresistens ble noen forsøk med NHIK 3025 i platåfase og multimedikamentresistente NHIK 3025 (dox) celler utført. Rent strålingsbiologisk var utfallet av disse forsøkene meget forutsigbare. All teori peker fram mot at alfapartikelstråling dreper celler gjennom mekanismer som er helt uavhengig av en kjemisk legemiddelresistens og om cellen deler seg eller ikke. Disse forsøkene ble allikevel gjort for å bekrefte dette, og for å ha en relativt komplett dokumentasjon av radium-223s virkning på celler av ulik art.

#### ***Behøver cellene å gå gjennom cellesyklus for at alfapartikelstråling fra <sup>223</sup>Ra skal ha en effekt?***

Som nevnt i kapittel 4.3.4 har NHIK 3025 cellene en litt unormal platåfase, hvor cellene "fryser" i cellesyklus og får en redusert cellesyklusprogresjon i stedet for å gå inn i en hvilende platåfase (G<sub>0</sub>-fase) (Pettersen *et al.*, 1978). Det ble derfor litt vanskelig å se at cellene var i platåfase ut fra flowcytomtri. At cellene faktisk befant seg i platåfase ble i midlertidig fastslått gjennom fotomikrografier og bekreftende resultater. Ut fra tabell 4.4 kan vi se at enkeltcelleoverlevelsen er tilnærmet lik for NHIK 3025 i eksponensiell vekst og NHIK 3025 i platåfase ved samme dose. For å undersøke om disse cellene også fikk samme fordeling i cellesyklus etter behandling med  $\alpha$ -partikler ble flowcytomtri også utført. Figur 4.13A viser at platåfasecellene rett etter behandling ikke har noen stor G<sub>2</sub>/M-opphopning. Dette er som forventet siden cellene har en redusert cellesyklusprogresjon, og de skadede cellene dermed ikke vil komme fram til en G<sub>2</sub>/M-fase og stoppes der. En beskjedent opphopning av celler i G<sub>2</sub>/M-fase blir allikevel sett (26-28 %), noe som kan komme av en liten andel celler som går i cellesyklus. For å få se den reelle G<sub>2</sub>/M-opphopningen ble de behandlede cellene sådd ut tynt slik at de fikk muligheten til å gå gjennom cellesyklus. Cellene i figur 4.13B viser derfor den reelle G<sub>2</sub>/M-opphopningen av

cellene som tilsvarende den sett hos eksponensielt voksende celler. Det at overlevelsen og fordelingen i cellyklus blir lik for eksponensielt voksende og platåfaseceller ved tilsvarende doser, forteller noe om at mekanismene for celleoverlevelse mest sannsynlig er helt like i de ulike tilfellene. Det understøtter altså teorien om at alfapartikelstråling dreper celler ved helt andre mekanismer enn kjemoterapeutiske legemidler gjør. Og dermed kan legemiddelet Alfaradin™ være effektivt med hensyn på å drepe platåfaseceller.

### ***Vil alfapartikelstråling fra <sup>223</sup>Ra drepe celler som er resistente mot cellegift?***

NHIK 3025 (dox) er en multimedikamentresistent cellelinje (kapittel 3.1.1) tidligere utviklet ved å tilsette passende konsentrasjoner av cellegiften doxorubicin. Ut fra tabell 4.4 vises det at enkeltcelleoverlevelsen er tilnærmet lik for NHIK 3025 i eksponensiell vekst og NHIK 3025 (dox) ved samme dose. For å undersøke om disse cellene også fikk samme fordeling i cellyklus etter behandling med  $\alpha$ -partikler ble flowcytomtri også utført her. Figur 4.14A viser hvordan NHIK 3025 (dox) cellene får en G<sub>2</sub>/M-opphopning etter en 24 timers behandling. Og figur 4.14B viser hvordan G<sub>2</sub>/M-opphopningen synker 24 timer etter avsluttet behandling. Dette er helt tilsvarende det vi observerte for NHIK 3025 cellene ved samme doser. Det at cellykluseffektene viser seg å være like for de ulike celletypene forteller noe om at mekanismene for celleoverlevelse mest sannsynlig er helt like også her. Dette understøtter også teorien om at alfapartikelstråling dreper celler ved helt andre mekanismer enn kjemoterapeutiske legemidler gjør. Og dermed kan legemiddelet Alfaradin™ være effektivt med hensyn på å drepe multimedikamentresistente celler.

## **5.3 Hvorfor og hvordan dør cellene?**

Ut fra forsøkene som er gjennomført i denne oppgaven kan vi ikke nødvendigvis svare på dette spørsmålet. Men resultatene fra forsøkene kan indikere hva som kan være en mulighet. Som vi har sett viser tidligere forskning av alfapartikelstråling hovedsakelig inducerer dobbeltrådbrudd i DNA-tråden. Disse bruddene sies generelt sett å være vanskeligere å reparere enn andre skader av ioniserende stråling. Og det er disse skadene som blir sett på som potensielt letale (Kassis og Adelstein, 2005; Okayasu *et al.*, 2006; Pastwa *et al.*, 2003; Ritter *et al.*, 1977; Smith *et al.*, 2003). Dette harmonerer med resultater funnet i denne studien, hvor vi har funnet en rett overlevelseskurve og en kurve som er lik for alle doserater. Noe som kan indikere få subletale skader og lite reparasjon av de potensielt letale skadene under bestråling. For å undersøke skadene fra alfapartikelstråling mer spesifikt kan man gjøre studier med COMET assayer (Collins *et al.*, 1997), PCC (premature chromosome condensation) teknikk (Kawata *et al.*, 2004) og  $\gamma$ -H2A.X teknikken (Cucinotta *et al.*, 2008). Her er den siste metoden under utprøving ved preklinisk avdeling hos Algeta ASA i skrivende stund.

Celler har vist seg å dø pga. komplekse skader og da særlig dobbeltrådbrudd i DNA-molekylet etter bestråling (Radford, 2002). Cellene dør en klonogenisk død i form av at de ikke lenger klarer å dele seg (Hall og Giaccia, 2006). Forsøkene utført ved hjelp av flowcytometri har bekreftet dette, noe vi kan se av bl.a. figurene B.1.6 i vedlegg B.1 som viser DNA-histogrammer tatt opp til 48 timer etter behandling. Figur B.1.6 viser at for

høye doser som 1,7 og 3,4 Gy gitt over 24 timer vil G<sub>2</sub>/M-opphopningen holde seg på henholdsvis 48 % og 80 % 48 timer etter avsluttet behandling. Dette sier noe om at cellene etter en behandling med  $\alpha$ -partikler ikke vil dø umiddelbart, men heller oppholde seg i G<sub>2</sub>/M-fasen. Den mediane cellyklusstiden for de normale ubehandlede cellene var ved dette tidspunktet mest sannsynlig rundt 17-18 timer, og det er derfor sannsynlig at cellene i G<sub>2</sub>/M-toppen representerer en cellepopulasjon av arresterte celler med store stråleskader.

Cellen kan dø gjennom flere ulike mekanismer etter bestråling (se kapittel 2.4.1). Her kan det nevnes bl.a. nekrose, apoptose og autofagi. Siden 48 timer var den lengste tiden etter behandling som ble undersøkt, fikk vi ikke sett hvilke mekanismer cellene faktisk døde av. Hadde apoptose (programmert celledød) inntruffet innen 48 timer etter behandling ville vi oppdaget dette ut fra DNA-histogrammene. Dette ville nemlig kommet fram som en ekstra topp til venstre for G<sub>1</sub>-toppen. Siden NHIK 3025 cellene ikke uttrykker funksjonelt p53, som er et viktig protein for apoptose, forventet vi heller ikke å se denne mekanismen. Tidligere studier har i midlertidig vist at apoptose kan forekomme uavhengig av p53-proteinet. I tillegg viser samme artikkel at apoptose kan forekomme ulike tider etter behandling både under interfase, etter en eventuell G<sub>2</sub>-arrest og etter flere gjennomførte celledelinger (Radford, 2002). Ved hjelp av mikroskopet og fotomikrografier tatt av cellene før og etter behandling i ulike forsøk ble derimot en endring i cellenes morfologi observert. Denne vises i figur 4.9 for ulike doser og tidspunkt etter avsluttet behandling. Disse fotomikrografiene viser at cellene fortsetter å vokse når de blir utsatt for stråling. De blir arrestert i G<sub>2</sub>/M-fase og vokser til såkalte "kjempeceller" som gjerne har flere kjerner. En slik endring i morfologien har vært observert for både gamma-,  $\alpha$ - og karbon-bestrålte celler tidligere (Oishi *et al.*, 2008; Palayoor *et al.*, 1993). En studie av Oishi *et al.* har vist at cellene som blir til kjempeceller etter bestråling inneholder mange vakuoler, svullete mitokondrier, flere store kjerner med unaturlig form og en generell økning av cellulære organeller som cytoskjelettet og sekundære lysosomer. Det ble også foreslått at disse cellene ikke hadde noe prolifererende egenskaper. I denne studien ble det heller ikke sett noen apoptose under de 4 dagene cellene ble undersøkt. Det ble forklart at dette kunne ha noe å gjøre med celletypen. Glioblastom cellene som ble brukt har nemlig et maksimum av apoptose først dag 10 etter bestråling (Oishi *et al.*, 2008). Noe lignende kan være tilfelle for NHIK 3025 celler, men ut fra våre begrensede observasjoner er det vanskelig å si hva som skjer videre med disse "kjempecellene". Fotomikrografiene i figur 4.9E og F viser i midlertid en økning i lysende runde celler 24 timer og 48 timer etter behandling. Disse er mest sannsynligvis døde celler eller døende celler. Dette blir for tiden undersøkt visuelt ved hjelp av time-lapse filming av disse alfapartikkelbehandlede cellene. Her blir en fotomikrografi tatt av cellene gjennom mikroskop hver halvtime, over en lengre tid etter bestråling. Disse fotomikrografiene blir deretter samlet til en film og analysert. Filmene har hittil vist at cellene etter behandling vokser til "kjempeceller" for deretter å kollapse og prøve seg på en celledeling. I noen tilfeller lykkes cellen med dette, mens i andre tilfeller klarer cellen kun å dele kjernen før cellene igjen fusjonerer og danner en ny kjempecelle med flere kjerner. Dette kan forklare hvorfor vi i denne oppgaven observert "kjempeceller" med flere cellekjerner. Etter flere slike påbegynte og

halvferdige mitoser ser vi at kjempecellen kollapser og dør. Filmene bør allikevel analyseres grundigere før noen konklusjoner kan trekkes.

## 5.4 Mulige feilkilder

I forsøkene i denne oppgaven var det flere felles potensielle feilkilder.

- Variasjon i PE
- Dosimetri
- Avslutning av behandling
- Celleutsåing
- Cellenes festeevne
- Infeksjon
- Temperatur
- Prøvepreparering
- Kun en cellelinje

*Variasjon i PE eller plating efficiency* ble observert i våre forsøk. Årsaken til denne variasjonen har ikke blitt funnet, men noen parametere som kan påvirke registrert overlevelse er nevnt nedenfor som f.eks. feil i celleutsåing og cellenes festeevne. PE-verdien har stor innvirkning på beregnet overlevelsesfraksjon (SF). Variasjoner i denne fører derfor til store variasjoner i overlevelse. Man har allikevel antatt at PE-verdien representerer en riktig korreksjon for antall overlevende kolonier uten behandling med radioaktivitet.

*Dosimetrien og den beregnede aktivitetskonsentrasjonen* kan være en potensiell kilde til feil. Som nevnt i kapittel 3.2.2 avhenger dosimetrien av flere antagelser. Dosimetrien er i tillegg svært forenklet, og disse forholdene kan føre til at konklusjoner som trekkes i forhold til dosen kan være usikre. Det være seg f. eks. overlevelseskurvens forløp og RBE betraktninger. I tillegg må det nevnes at det kan ha vært et visst avvik i aktivitetskonsentrasjonen  $^{223}\text{Ra}$  i de ulike Alpharadin<sup>TM</sup>-mediene brukt i forsøkene. Ved tillaging av et Alpharadin<sup>TM</sup>-medium med en forhåndsbestemt aktivitetskonsentrasjon av  $^{223}\text{Ra}$  ble selve kilden kalibrert før den beregnede mengden av Alpharadin<sup>TM</sup> ble overført til vekstmediet. Den endelige aktivitetskonsentrasjonen i Alpharadin<sup>TM</sup>-mediet ble ikke sjekket i noen kalibrator før bruk. Dette kan ha ført til en behandling med en liten tilfeldig variasjon i aktivitet og dermed dose i de ulike forsøkene.

*For å avslutte behandlingen* ble som tidligere nevnt cellene vasket tre ganger med Hanks' buffer ved å skylle brønnene eller celleflaskene med denne løsningen. Det er en mulighet for at dette ikke er tilstrekkelig for å fjerne all aktivitet. Man vet heller ikke helt sikkert om  $^{223}\text{Ra}$  binder seg til noe i brønnene eller celleflaskene. Men mest sannsynlig blir det meste av aktiviteten fjernet. Man kunne ha vasket flere ganger eller med mer effektive løsninger, men dette ville vært en for stor belastning for cellene.

*Feil i celleutsåing* er en annen potensiell feilkilde. Her kan gal telling av celler og tillaging av celsuspensjoner ha ført til feil utsåing i de ulike forsøkene. I tillegg kan

selve tellingen av overlevende kolonier gi usikkerheter, da noen kolonier ligger på grensen for hva man regner for overlevende koloni. Dette kan føre til feil registrering av overlevelse.

*Cellenes festeevne* viste seg også å være varierende fra forsøk til forsøk. Selv om dette ble forsøkt kontrollert kan det allikevel ha ført til at celler forsvant under behandling og vask av cellene. Dette gjelder særlig de første punktene behandlet under aldersresponsforsøkene. Her viste 2 og 4 timers punktene et ganske stort avvik i overlevelse. Noe som kan forklares ut fra at ufestede celler ble skylt bort under behandling. Dette vil føre til en feil observasjon av overlevelse.

*Infeksjon* kan også være en mulig feilkilde. Noen få infeksjoner ble funnet gjennom forsøkene. Disse var fordelt i ulike forsøk og ved ulike doser. Infeksjonene kan ha påvirket de andre brønnene uten at dette var mulig å observere. Dette kan ha ført til en feil registrering av overlevelse.

*Temperatur* er en viktig faktor for cellenes overlevelse og gang gjennom cellesyklus. Variasjoner i temperatur kan skade cellene, i tillegg til at cellene kan stoppe i cellesyklus eller få en forlenget cellesyklus. Dette var en feilkilde spesielt ved aldersresponsforsøkene. Som nevnt i kapittel 3.3.2 ble forsøket utført i romtemperatur pga. mangel på inkubatorrom. Siden cellenes gang gjennom cellesyklus er svært avhengig av temperatur ble dette et kritisk punkt i forsøkene. Alt ble allikevel lagt til rette for at temperaturene skulle holde seg så stabile som mulig rundt 37 ° (se kapittel 3.3.2). Og siden den mediane cellesyklustiden holdt seg ganske normal under forsøkene vitner dette om at temperauren ikke varierte for mye.

*Prepareringen av prøvene* til flowcytometri kan være en mulig feilkilde. Feil merking av cellene er ofte det som går galt under slike forsøk. Dette gir fører ofte ikke til noen stor usikkerhet i resultatene da disse feilene ofte oppdages under kjøring av prøven, og resultatene fra disse dermed forkastes.

*Kun en cellelinje* ble brukt i disse forsøkene. Cellene som ble brukt hadde ikke funksjonelle p53- og pRb-proteiner. Dette kan føre til at det er visse strålingsbiologiske effekter som ikke ble sett i våre forsøk, som f.eks. G<sub>1</sub>-arrest og apoptose. I tillegg kan vi ikke konkludere med at resultatene observert i disse undersøkelsene ikke er spesifikke for en spesiell cellelinje. Forsøkene bør derfor gjentas med flere celler fra andre cellelinjer slik at man kan utelukke denne faktoren. Dette arbeidet er allerede i gang ved preklinisk avdeling i Algeta ASA.

### ***Kontrollprøvenes variasjon i fordeling av celler i cellesyklus***

Kontrollprøvene ved flowcytometriforsøkene viste en variasjon i fordeling av celler i cellesyklus (se figur 4.2, 4.4 og vedlegg B.1). Denne variasjonen kan observeres hos stort sett alle kontrollprøvene, både de analysert rett etter behandling og 24 timer etter. Disse kontrollprøvene reflekterer de behandlede cellenes fordeling i cellesyklus ved det aktuelle tidspunktet. Ved å beregne den teoretisk fordelingen av ubehandlede celler i cellesyklus (se kapittel 2.3 4) kan man få et sammenligningsgrunnlag for de eksperimentelle dataene.

Under forsøksperioden som ligger til grunn for resultatene i kapittel 4.3.1 viste cellene å ha en omtrentlig median cellesyklusetid på 17,5 timer. G<sub>1</sub>-fase varte i 7,5 timer med en normal andel celler på 51,4 %. S-fase varte i 6 timer med en normal andel celler på 31,4 %. Mens G<sub>2</sub>/M-fase varte i 4 timer med en andel på 17,2 %. Disse fordelingene ble funnet ved å integrere ligning 2.9 over de ulike cellesyklusfasene. Fordelingen hos de eksperimentelle dataene er i midlertidig ikke lik den teoretiske. Dette kan ha flere årsaker. Muligens reflekterer denne variasjonen *cellenes status* i det øyeblikket cellene ble farget. Kanskje er det normalt for NHIK 3025 celler å vise en slik variasjon. En annen mulighet kan være at *PI-fargen* i celleprøvene ikke hadde rukket å komme i likevekt. Prøvene ble analysert etter en times merking, da vi trodde dette var tilstrekkelig. En tredje mulighet kan være *trypsinets virkning*. Trypsinering er som kjent en påkjenning for cellene. Pga. den korte behandlingstiden som ble brukt i noen av forsøkene (1-6 t) kan det tenkes at cellene ikke rakk å oppnå en eksponensiell vekst mellom trypsineringene. Figur 4.7A og nedgangen i celler i G<sub>2</sub>/M-fase ved lave doser sett her, viser at også kanskje de behandlede prøvene blir påvirket av dette. De behandlede cellene blir også trypsinert med kort mellomrom, og er enda svakere etter behandling og dermed spesielt følsomme for dette. Dette kan kanskje forklare den initiale nedgangen av celler i G<sub>2</sub>/M-fase. En fjerde mulighet kan være at *celleflaskene ble tette* ved de lange behandlingstidene 12 og 24, og ikke lenger hadde en eksponensiell vekst 24 timer etter behandling. En femte mulighet kan være en *feil beregning i programmet Multicycle* av fordelingen av celler i cellesyklus. Vi kan se av DNA-histogrammene at programmet ikke alltid har klart å tilpasse sine beregninger til de eksperimentelle data, noe som kan gi visse variasjoner i beregningene.

Hva som er en normal cellesyklusetid for NHIK 3025 cellene er heller ikke nødvendigvis helt klart. Under forsøksperioden ble flere tester gjort hvor cellene viste en endring i cellesykluslengde og en endring i lengden av de ulike fasene. Dette kan komme som et resultat av serumet brukt i vekstmediet. Våre humane celler får *vekstfaktorer fra føtalt kalveserum*, altså ikke humane vekstfaktorer. I tillegg vil ulike batcher alltid ha et litt ulikt innhold av vekstfaktorer. Dette kan føre til en endring i median cellesyklusetid og de ulike cellesyklusfasenes lengde. Noe som igjen endrer hva som er normal teoretisk fordeling av celler i cellesyklus.

## 5.5 Praktisk konsekvens og arbeid videre

Dataene funnet i denne oppgaven kan ha en stor praktisk konsekvens innenfor stråleterapien, hvor alfapartikelstrålingens karakteristiske egenskaper kan utnyttes. Resultatene viser en doserateuavhengig celleinaktivering, en G<sub>2</sub>/M-opphopning, liten variasjon i overlevelse gjennom cellesyklus og ingen endring i overlevelse og cellesykluseffekter ved bestråling av multimedikamentresistente og platåfaseceller med  $\alpha$ -partikler fra <sup>223</sup>Ra. Dette er med på å vise at <sup>223</sup>Ra er en svært effektiv cytotoxisk strålingskilde. Pga. den rette og doserateuavhengige overlevelseskurven kan man si at cellene mest sannsynlig får store og komplekse DNA-skader som ikke er subletale skader som kan repareres under behandlingstiden. Cellesyklusarresten vi får i G<sub>2</sub>/M-fasen viser også hvor effektiv strålingen er til å indusere skader. Alders-responskurven viser hvor uavhengig alfapartikelstrålingen er av hvor cellen befinner seg i cellesyklus. Og det virker som om alfapartikelstråling fra <sup>223</sup>Ra kan drepe celler like effektivt i alle

cellesyklusfaser. Det at alfapartikkelstrålingen induserer samme effektivitet hva gjelder å indusere celledød og skader også ved multimedikamentresistente celler og platåfaseceller, viser denne strålemodalitetens fordeler i forhold til kjemoterapeutiske legemidler. At våre resultater hittil har vist seg å være i overensstemmelse med teorien er av stor betydning for legemiddelet Alpharadin™.

Dette legemiddelet ble utviklet hos Algeta ASA under forutsetning at teorien for høy LET stråling også gjaldt  $\alpha$ -partikler fra  $^{223}\text{Ra}$ . *In vivo* forsøk med dyr ble gjort og utprøvinger i klinikk er i full gang. Nå kan legemiddelets effekt bedre forstås og dokumenteres ut fra *in vitro* forsøk. I tillegg understøtter disse resultatene tidligere studier, og dermed kan teoriene brukes med en enda større sikkerhet innenfor stråleterapi generelt. Høy LET stråling blir brukt hyppigere innenfor stråleterapien pga. mange av dens fordelaktige egenskaper. Den kan gi en høyere terapeutisk effekt siden den har en relativt høy biologisk effekt i forhold til lavere LET stråling. Ved planlegging av behandling kan man også se bort fra doserateeffekter og variasjon av strålingsfølsomhet for cellen gjennom cellyklus.  $G_2/M$ -opphopningen av cellene som kan observeres etter relativt lave doser av alfapartikkelstråling kan kanskje også utnyttes i stråleterapisammenheng. Innen f.eks. RIT (radioimmunoterapi), hvor et tumor-selektivt antistoff festes til en  $\alpha$ -emitter, er det ofte sett at tettheten av terapeutiske  $\alpha$ -emittere over tumor volumet er lav og heterogen. Ved bestråling oppstår  $G_2/M$ -opphopningen som fører til at en større del av cellepopulasjonen blir mer strålingssensitive i denne fasen av cellyklus. Hvis man brukte flere behandlinger med riktig dose og riktig tid mellom behandlingene ville kanskje dette gi en bedre terapeutisk effekt (Palayoor *et al.*, 1993).

For videre utvikling av et legemiddel må flere prekliniske, biologiske resultater og effekter kartlegges og dokumenteres for å anslå hvilken kliniske effekter man kan forvente. Prekliniske data er også nødvendig for å utforme en antagelse om virkningsmekanisme(er) av et legemiddel. Dette er spesielt viktig for radioaktive legemidler hvor ofte det er ikke den kjemiske mengde av et stoff som utøver effekten men heller selve strålingen. Fremover er det behov for å gjøre enda flere undersøkelser med  $\alpha$ -emittere. I forsøk beskrevet i denne oppgaven ble cellene bare fulgt opp 48 timer etter avsluttet behandling, og da bare gjennom fotomikrografier og flowcytometri. Ut fra dette klarer vi ikke å se ved hvilken mekanisme cellene dør. Som tidligere nevnt gjøres det nå eksperimenter med  $\alpha$ -partikkelbehandlede NHIK 3025 celler som blir filmet ved hjelp av en "time-lapse" teknikk. Resultatene er spennende, men flere filmer må tas og grundigere analyser bør gjøres før noen konklusjoner kan trekkes. I tillegg bør det muligens utføres noen flere forsøk hvor en undersøker type DNA-skader som oppstår etter alfapartikkelbestråling og om mengden skader korrelerer med mengde  $G_2/M$ -opphopning av celler. Sammen med dette hadde det vært interessant å undersøke om man kan se noen tegn til reparasjon av disse skadene, og det er noen tendens til at celler utvikler resistens mot alfapartikkelstråling. Videre kan det være spennende å undersøke DNA-histogrammer for celler behandlet med enda høyere doserater enn de brukt i denne oppgaven. Dette for å se nærmere på denne mulige metningen av skader som ble observert i doserateområdet 0,15-0,36 Gy/t. Man bør da prøve å gi strålingsdosene over en lik behandlingstid, slik at denne viktige faktoren ikke kompliserer resultatene. I tillegg bør nok noen sentrale forsøk gjentas med en annen cellelinje slik at en ser at det vi her

har funnet, ikke er egenskaper knyttet til en spesiell cellelinje. Det bør kanskje da benyttes en cellelinje som har et funksjonelt p53-gen, noe som allerede er påbegynt.

Alfapartikkelstrålingens cellulære effekter sies å være uavhengig av cellens oksygenkonsentrasjon, og dette er en av de siste fremtredende egenskapene som bør undersøkes for radium-223s alfapartikkelstråling. For å gjøre dokumentasjonen for alfapartikkelstrålingen fra legemiddelet Alpharadin™ komplett bør det undersøkes om radium-223 vil ha samme effekt i fravær av oksygen (hypoksi) som vi her har funnet under nærvær av oksygen. Dette er også planlagt å gjøres under et EU-finansiert prosjekt hvor bl.a. Universitetet i Oslo og Algeta ASA skal være med.



## 6 Konklusjon

I begynnelsen av denne studien ble det stilt en serie med spørsmål om  $\alpha$ -emitteren radium-223s effekt på cellulære biologiske systemer. Dette ble gjort både for å belyse alfapartikkelstrålingens generelle cellulære effekter og for å gi en preklinisk dokumentasjon av legemiddelet Alpharadin™. Forsøksmetodene som ble brukt var hovedsaklig koloniforsøk og flowcytometri med DNA-farging. Celler fra cellelinjene NHIK 3025 og NHIK 3025 (dox) ble brukt. Både asynkrone og synkroniserte cellepopulasjoner ble bestrålt, i eksponensiell vekst og i plåtafase. Oppgaven viser at  $\alpha$ -emitteren  $^{223}\text{Ra}$  inducerer cellebiologiske effekter i tråd med teorien for  $\alpha$ -emittere generelt. Tidligere forskning har vist at alfapartikkelstråling inducerer celledød slik at sannsynligheten for at en celle skal overleve faller eksponensielt med økende doser, og at dette har vist seg å være doserateuavhengig. (Chadwick og Leenhouts, 1973; Hall og Giaccia, 2006). Alfapartikkelstråling har vist seg å inducere en mer effektiv opphopning av celler i  $G_2$ -fase enn annen, mindre tett ioniserende stråling (Lücke-Huhle, 1982; Palayoor, 1993), samtidig som det ikke er blitt observert noen særlig stor avhengighet av hvor cellen eventuelt er i cellyklus under bestråling (Bird og Burki, 1975; Hall *et al.*, 1972). Resultatene i denne oppgaven viser at alfapartikkelstråling fra  $^{223}\text{Ra}$  gir en rent eksponensiell overlevelseskurve som kun er avhengig av  $\alpha$ -leddet i Chadwick og Leenhouts (1973) lineær-kvadratiske celleoverlevelsesmodell. Ved undersøkelser gjort med doserater mellom 0,015-0,36 Gy/t viser cellenes overlevelsesgrad heller ingen doserateavhengighet. Etter bestråling med  $\alpha$ -partikler ble det observert en endring av den normale fordelingen av celler i cellyklus. Vi observerte i dette tilfellet ingen forsinkelse eller arrest av celler i  $G_1$ - eller S-fase, men derimot en stor opphopning av celler i  $G_2$ /M-fase. Denne opphopningen var svært avhengig av behandlingstid og tidspunkt for analyse. Muligens er det, for doseratene brukt i våre forsøk, en doseuavhengig opphopning av celler i  $G_2$ /M-fase, med en nedre dosegrense for dette mellom 0,43 og 0,87 Gy. Ved bestråling av en synkronisert cellepopulasjon viste effekten av  $^{223}\text{Ra}$  seg å være relativt uavhengig av hvilken fase cellene ble bestrålt i. Det ble i tillegg observert en lik overlevelse og lik fordeling av celler i cellyklus ved bestråling av multimedikamentresistente og plåtafaseceller. Siden alfapartikkelstrålingen ser ut til å virke like effektivt på multimedikamentresistente celler og plåtafaseceller som på eksponensielt voksende celler, kan man muligens anta at cellene dør via samme mekanismer. Disse dataene viser også Alpharadins™ potensielle fordeler i forhold til kjemoterapeutiske legemidler.

Høy LET stråling som alfapartikkelstråling sies å gi dobbelttrådbrudd i DNA-molekylet og mer komplekse skader (Radford, 2002; Rydberg *et al.*, 2005). Disse sies generelt sett å være vanskeligere å reparere (Radford, 2002; Rydberg *et al.*, 2005). Studier viser også at det under den karakteristiske  $G_2$ -arresten finner sted en viss form for reparasjon av disse skadene (Hieber og Lücke-Huhle, 1983; Lücke-Huhle, 1982). Samtidig som en andel av celler som har mottatt små doser slipper løs fra  $G_2$ -arresten viser studier at det virker som om celler som har mottatt større doser ikke slipper løs fra arresten og er reproducerbart døde (Hieber og Lücke-Huhle, 1983; Lücke-Huhle, 1982). Resultatene fra denne oppgaven er ikke tilstrekkelig til at vi kan konkludere eller si noe sikkert om type DNA-skader, eventuell reparasjon av disse, hvilke skader som fører til celledød og hvordan cellen dør. Noen indikasjoner kan vi allikevel få. Den rette overlevelseskurven forteller at

det ikke indueres subletale skader som kan repareres under bestråling. Dette kan indikere at vi får dobbeltrådbrudd i DNA-tråden. Doserateuavhengigheten sett for svært lave doserater kan også vise at det stort sett ikke foregår noen reparasjon av disse potensielt letale stråleskadene under bestråling. Den store opphopningen vi får av celler i G<sub>2</sub>/M-fasen viser også hvor effektiv strålingen er til å induere skader. Nedgangen vi ser i G<sub>2</sub>/M-opphopning av celler 24 timer etter avsluttet behandling kan muligens indikere en reparasjon av stråleskadene, eller en adaptasjon/tilpasning som førte til at cellene slapp løs fra G<sub>2</sub>/M-arresten med DNA-skader. Filming og fotomikrografier tatt av behandlede celler indikerer at cellene vokser til "kjempeceller" og prøver å dele seg flere ganger før de til slutt ser ut til å kollapse. Dette er med på å underbygge slutningen om at alfapartikelstråling er en svært effektiv strålemodalitet med hensyn på å induere celledød. Det er imidlertid nødvendig å undersøke disse indikasjonene nærmere med mer spesifikke metoder som COMET assayer, PCC- og  $\gamma$ -H2A.X teknikken.

Generelt sett viser denne oppgaven av alfapartikelstrålingen fra <sup>223</sup>Ra gir de samme cellulære effektene som tidligere undersøkte  $\alpha$ -emittere har vist å gi, men med en radionuklide som kan benyttes i medisinsk sammenheng. Dette understøtter legemiddelet Alphasar™ videre utvikling.

## Referanser

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K og Walter P (2002) Molecular biology of the cell, *Garland Science*, New York, 1463 sider.

Algeta ASA, Technology [internett] Norge. Tilgjengelig fra: <http://www.algeta.com> [hentet 20. sept. 2007].

Attix FH (2004) Introduction to radiological physics and radiation dosimetry, *Wiley-VCH*, Weinheim, 607 sider.

Azzam EI, de Toledo SM, Waker AJ og Little JB (2000) High and low fluences of  $\alpha$ -particles induce a G<sub>1</sub> checkpoint in human diploid fibroblast, *Cancer Research*, vol. 60, s. 2623-2631.

Bardiès M og Pihet P (2000) Dosimetry and microdosimetry of targeted radiotherapy, *Current Pharmaceutical Design*, vol. 6, s. 1469-1502.

Beckman Coulter (2006) Quanta™ SC MPL training guide, *Beckman Coulter*, USA, s. 9-15.

Behr TM, Béhé M, Stabin MG, Wehrmann E, Apostolidis C, Molinet R, Strutz F, Fayyazi A, Wieland E, Gratz S, Koch L, Goldenberg DM og Becker W (1999) High-linear energy transfer (LET)  $\alpha$  versus low-LET  $\beta$  emitters in radioimmunotherapy of solid tumors: Therapeutic efficacy and dose-limiting toxicity of <sup>213</sup>Bi- versus <sup>90</sup>Y-labeled CO17-1A Fab' fragments in a human colonic cancer model. *Cancer Research*, vol. 59, s. 2635-2643.

Benzon W (1996) Culture as an evolutionary arena, *Journal of Social and Evolutionary Systems*, vol. 4, s. 321-362.

Biggin C (2007) Standard operating procedure: Training in radiation protection, *Algetas arkiv* HM 150003, 19 sider.

Bird R og Burki J (1971) Inactivation of mammalian cells at different stages of the cell cycle as a function of radiation linear energy transfer, i: Biophysical aspects of radiation quality, *IAEA*, Vienna, s. 241-250.

Bird R og Burki J (1975) Survival of synchronized chinese hamster cells exposed to radiation of different linear-energy transfer, *International Journal of Radiation Biology*, vol. 27, s.105-120.

Bouchet LG, Bolch WE, Goddu SM, Howell RW og Rao DV (2000) Considerations in the selection of radiopharmaceuticals for palliation of bone pain from metastatic osseous lesions, *The Journal of Nuclear Medicine*, vol. 41, s. 682-687.

Brechbiel MW (2007) Targeted  $\alpha$ -therapy: past, present, future? *Dalton Transactions*, vol. 43, s. 4918-4928.

Bröker LE, Kruyt FAE og Giaccone G (2005) Cell death independent of caspases: A review, *Clinical Cancer Research*, vol. 11, s. 3155-3162.

Canberra, technical literature, The continuous air monitoring (CAM) PIPS detector-properties and applications [internett]. Tilgjengelig fra: <http://www.canberra.com/literature/946.asp> [Hentet 19.des. 2007]

Chadwick KH og Leenhouts HP (1973) A molecular theory of cell survival, *Physics in Medicine and Biology*, vol. 18, s. 78-87.

Collins AR, Dobson VL, Dušinská, Kennedy G og Štětina R (1997) The comet assay: What can it really tell us? *Mutation Research*, vol. 375, s. 183-193.

Cucinotta FA, Pluth JM, Anderson JA, Harper JV og O'Neill P (2008) Biochemical kinetics model of DSB repair and induction of  $\gamma$ -H2AX foci by non-homologous end joining, *Radiation Research*, vol. 169, s. 214-222.

Dewey WC, Ling CC og Meyn RE (1995) Radiation-induced apoptosis: Relevance to radiotherapy, *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, vol. 33, s. 781-796.

Dyrlie HM (1995) Etablering av multiresistente cellelinjer og effekten av zilascorb ( $^2\text{H}$ ) og andre proteinsyntesehemmere på disse cellene, Cand.scient oppgave i biokjemi, *Universitetet i Oslo*, 84 sider.

Feinendegen LE og McClure JJ (1997) Alpha-emitters for medical therapy – workshop of the United States Department of Energy, *Radiation Research*, vol. 148, s. 195-201.

Fisher DR og Sgouros G (1999) Dosimetry of radium-223 and progeny, i: Proceedings of Sixth International Radiopharmaceutical Dosimetry Symposium, Schlafke-Stelson AT, Watson EE (eds.). *Oak Ridge Institute for Science and Education*, Tennessee, s. 375-391.

Furre T, Koritzinsky M, Olsen DR og Pettersen EO (1999) Inverse dose-rate effect due to pre-mitotic accumulation during continuous low dose-rate irradiation of cervix carcinoma cells, *International Journal of Radiation Biology*, vol. 75, s. 699-707.

Gadbois DM, Crissman HA, Nastasi A, Habbersett R, Wang S, Chen D og Lehnert BE (1996) Alterations in the progression of cells through the cell cycle after exposure to alpha particles or gamma rays, *Radiation Research*, vol. 146, s. 414-424.

Goddu SM, Howell RW, Bouchet LG, Bolch WE og Rao DV (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, *Society of Nuclear Medicine*, Reston, 183 sider.

Goodhead DT (2006) Energy deposition stochastics and track structure: What about the target? *Radiation Protection Dosimetry*, vol. 122, s. 3-15.

Hall EJ, Gross W, Dvorak RF, Kellerer AM og Rossi HH (1972) Survival curves and age response functions for chinese hamster cells exposed to x-rays or high LET alpha-particles, *Radiation Research*, vol. 52, s. 88-98.

Hall EJ og Giaccia AJ (2006) Radiobiology for the radiologist – 6th ed., *Lippincott Williams & Wilkins*, Philadelphia, 546 sider.

Headstart in biology (2001) Cell cycle [internett] Learninglab UK. Tilgjengelig fra: <http://learninglab.co.uk/headstart/cycle3.htm> [Hentet 19.des. 2007]

Henriksen G (2002)  $\alpha$ -Particle emitting radionuclides in targeted radiotherapy of cancer, dr.gradsoppgave, *Universitetet i Oslo*, 77 sider.

Henriksen G, Breistøl K, Bruland ØS, Fodstad Ø og Larsen RH (2002) Significant antitumor effect from bone-seeking,  $\alpha$ -particle-emitting  $^{223}\text{Ra}$  demonstrated in an experimental skeletal metastases model, *Cancer Research*, vol. 62, s. 3120-3125.

Henriksen G, Fisher DR, Roeske JC, Bruland ØS og Larsen RH (2003) Targeting of osseous sites with  $\alpha$ -emitting  $^{223}\text{Ra}$ : Comparison with the  $\beta$ -emitter  $^{89}\text{Sr}$  in mice, *The Journal of Nuclear Medicine*, vol. 44, s. 252-259.

Henriksen G, Schoultz BW, Michaelsen TE, Bruland ØS og Larsen RH (2004) Sterically stabilized liposomes as a carrier for  $\alpha$ -emitting radium and actinium radionuclides, *Nuclear Medicine and Biology*, vol. 31, s. 441-449.

Hieber L og Lücke-Huhle C (1983) PCC technique reveals severe chromatin lesions and repair in G2-arrested cells after alpha irradiation, *Experimental Cell Research*, vol. 144, s. 57-62.

Hofslie E (1992) Multimedikamentresistens -teoretiske og kliniske aspekter, *Tidsskrift for den Norske Lægeforening*, vol. 112, s. 472-474.

Humm JL, Roeske JC, Fisher DR og Chen GT (1993) Microdosimetric concepts in radioimmunotherapy, *Medical Physics*, vol. 20, s. 535-541.

Jackman J og O'Conner PM (1998) Current protocols in cell biology, *Wiley & Sons*, USA, 4400 sider.

Joiner MC, Lambin P og Marples B (1999) Adaptive response and induced resistance, *Life Sciences*, vol. 322, s. 167-175.

Kartner N og Ling V (1989) Multidrug resistance in cancer, *Scientific American*, vol. 3, s.110-117.

Kassis AI og Adelstein SJ (2005) Radiobiologic principles in radionuclide therapy, *The Journal of Nuclear Medicine*, vol. 46, s. 4S-12S.

Kawata T, Ito H, Uno T, Saito M, Yamamoto S, Furusawa Y, Durante M, George K, Wu H og Cucinotta FA (2004) G2 chromatid damage and repair kinetics in normal human fibroblast cells exposed to low- or high-LET radiation, *Cytogenetic and Genome Research*, vol. 104, s. 211-215.

Knoll GF (1999) Radiation detection and measurement, 3rd. edition, *Wiley*, USA, s. 365.

Kühne M, Rothkamm K og Löbrich M (2002) Physical and biological parameters affecting DNA double strand break misrejoining in mammalian cells. *Radiation Protection Dosimetry*, vol. 99, s.129-132.

Lieser KH (2001) Nuclear and radiochemistry: fundamentals and applications -2nd ed., *Wiley-VCH*, Berlin, kap 4 og 5.

Little JB, Azzam EI, de Toledo SM og Nagasawa H (2002) Bystander effects: Intercellular transmission of radiation damage signals, *Radiation Protection Dosimetry*, vol. 99, s. 159-62.

Lücke-Huhle C (1982) Alpha-irradiation-induced G2 delay: A period of cell recovery, *Radiation Research*, vol. 89, s. 298-308.

Nilsson S, Larsen RH, Fosså SD, Balteskard L, Borch KW, Westlin JE, Salberg G og Bruland ØS (2005) First clinical experience with  $\alpha$ -emitting radium-223 in the treatment of skeletal metastases. *Clinical Cancer Research*, vol.11, s. 4451-4459.

Nilsson S, Franzén L, Parker C, Tyrrell C, Blom R, Tennvall J, Lennernäs B, Petersson U, Johannessen DC, Sokal M, Pigott K, Yachnin J, Garkavij M, Strang P, Harmenberg J, Bolstad B og Bruland ØS (2007) Bone-targeted radium-223 in symptomatic, hormone-refractory prostate cancer: a randomised, multicentre, placebo-controlled phase II study, *Lancet Oncology*, vol. 8, s. 587-594.

Nordbye K og Oftebro R (1969) Establishment of four new cell strains from human uterine cervix, II. *Experimental Cell Research*, vol. 58, s. 459-460.

Oishi T, Sasaki A, Hamada N, Ishiuchi S, Funayama T, Sakashita T, Kobayashi Y, Nakano T, og Nakazato Y (2008) Proliferation and cell death of human glioblastoma cells after carbon-ion beam exposure: Morphologic and morphometric analyses, *Neuropathology : Official journal of the Japanese Society of Neuropathology*, vol. 28, s.1-9.

Okayasu R, Okada M, Okabe A, Noguchi M, Takakura K og Takahasi (2006) Repair of DNA damage induced by accelerated heavy ions in mammalian cells proficient and deficient in the non-homologous end-joining pathway, *Radiation Research*, vol. 165, s. 59-67.

Palayoor ST, Humm JL, Atcher RW, Hines JJ og Macklis RM (1993) G2M arrest and apoptosis in murine T lymphoma cells following exposure to <sup>212</sup>Bi alpha particle irradiation, *Nuclear Medicine and Biology*, vol. 20, s. 795-805.

Pastwa E, Neumann RD, Mezhevaya K og Winters TA (2003) Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks is dependent upon radiation quality and the structural complexity of double-strand breaks, *Radiation Research*, vol. 159, s. 251-261.

Pettersen EO, Bakke O, Lindmo T og Oftebro R (1977) Cell cycle characteristics of synchronized and asynchronous populations of human cells and effect of cooling of selected mitotic cells, *Cell Tissue Kinetics.*, vol. 10 s. 511-522.

Pettersen EO, Christensen T, Bakke O og Oftebro R (1977) A change in the oxygen effect throughout the cell-cycle of human cells of the line NHIK 3025 cultivated *in vitro*, *International Journal of Radiation Biology*, vol. 31, s. 171-184.

Pettersen EO og Lindmo T (1978) Effects of different growth conditions on survival after irradiation in hypoxia of human cells (NHIK 3025) *in vitro*, *Acta Radiologica Oncology*, vol. 17, s. 319-330.

Pettersen EO (2006) Cellulær radiobiologi, Kompendie for FYS4720 -Cellulær Radiobiologi, Fysisk Institutt, *Universitetet i Oslo*, 169 sider.

Pfeiffer P, Göttlich B, Reichenberger S, Feldmann E, Daza P, Ward JF, Milligan JR, Mullenders LHF og Natarajan AT (1996) DNA lesions and repair, *Mutation Research*, vol. 366, s. 69-80.

Rabinovitch PS (2002) Multicycle DNA-content and cell cycle analysis software manual, *Phoenix Flow Systems Inc*, USA.

Radford IR (2002) DNA-lesion complexity and induction of apoptosis by ionizing radiation, *International Journal of Radiation Biology*, vol. 78, s. 457-466.

Radioisotope dose calibrator *CRC-15R* owner's manual, appendix 1 principle of the calibrator, *Capintec Inc*, USA.

Raju MR, Tobey RA, Jett JH og Walters RA (1975) Age response for line CHO chinese hamster cells exposed to x-irradiation and alpha particles from Plutonium, *Radiation Research*, vol. 63, s. 422-433.

Raju MR, Johnson TS, Tokita N, Carpenter S og Jett JH (1980) Differences in cell-cycle progression delays after exposure to  $^{238}\text{Pu}$   $\alpha$  particles compared to x rays, *Radiation Research*, vol. 84, s.16-24.

Ritter MA, Cleaver JE og Tobias CA (1977) High-LET radiations induce a large proportion of non-rejoining DNA breaks, *Nature*, vol. 266, s. 653-655.

Rockwell S (1985) Effects of clumps and clusters on survival measurements with clonogenic assays, *Cancer Research*, vol. 45, s. 1601-1607.

Roeske JC og Stinchcomb TG (1997) Dosimetric framework for therapeutic alpha-particle emitters, *The Journal of Nuclear Medicine*, vol. 38, s. 1923-1929.

Rothkamm K, Krüger I, Thompson LH og Löbrich M (2003) Pathways of DNA-double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Molecular and Cellular Biology*, vol. 23, s. 5706-5715.

Rydberg B, Cooper B, Cooper PK, Holley WR og Chatterjee A. (2005) Dose-dependent misrejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in human fibroblasts: Experimental and theoretical study for high and low LET radiation. *Radiation Research*, vol. 163, s. 526-534.

Salberg G (2006a) Standard operating procedure: Rensing av radium-223 og ferdigstilling av drug substance, *Algetas arkiv* PR 303003, 8 sider.

Salberg G (2006b) Standard operating procedure: Separasjon av thorium-227 fra actinium-227. Produksjon av T-generator, *Algetas arkiv* PR 303002, 5 sider.

Smith LE, Nagar S, Kim GJ og Morgan WF (2003) Radiation-induced genomic instability: Radiation quality and dose response, *Health Physics Society*, vol. 85, s. 23-29.

Spinks JWT og Woods RJ (1990) An introduction to radiation chemistry, *Wiley-VCH*, New York, kap 2 og 7.

Syljuåsen RG, Jensen S, Bartek J og Lukas J (2006) Adaptation to the ionizing radiation-induced G<sub>2</sub> checkpoint occurs in human cells and depends on checkpoint kinase 1 and polo-like kinase 1 kinases, *Cancer Research*, vol. 66, s. 10253-10257.



Søyland C (2000) Development of a novel method for radiobiological experiments featuring absolute  $\alpha$ -particle hit determination and individual cell  $\alpha$ -particle dosimetry, *Dr. Scient oppgave*, Universitetet i Oslo, 115 sider.

Tannock IF og Hill RP (1988) The basic science of oncology, *Pergamon press*, New York, 398 sider.

Wikipedia, the free encyclopedia [internett]. Tilgjengelig fra:  
<http://www.wikipedia.org> [hentet 20. mai 2008].

Xu B, Kim S-T, Lim D-S og Kastan MB (2002) Two molecularly distinct G<sub>2</sub>/M checkpoints are induced by ionizing irradiation, *Molecular and Cellular Biology*, vol. 22, s.1049-1059.

Åmellem Ø, Stokke T, Sandvik JA, Smedshammer L og Pettersen EO (1997) Hypoxia-induced apoptosis in human cells with normal p53 status and function, without any alteration in the nuclear protein level, *Experimental Cell Research*, vol. 232, s. 361-370.

Åmellem Ø, Sandvik JA, Stokke T og Pettersen EO (1998) The retinoblastoma protein-associated cell cycle arrest in S-phase under moderate hypoxia is disrupted in cells expressing HPV18 E7 oncoprotein, *The British Journal of Cancer*, vol. 77, s. 862-872.



## Vedlegg A: Doseberegninger, rådata celleoverlevelse og innledende overlevelsesforsøk

### A.1 Doseberegninger

Tabell A.1 under viser de mest brukte dosene og deres tilhørende behandlingstid, aktivitetskonsentrasjon og doserate. Beregningene ble gjort ved hjelp av formel 3.1 og 3.2 vist i kapittel 3.2.2. Et eksempel på en beregning av dose er vist i vedlegg G.

**Tabell A.1:** Beregnede verdier for dosen til mediet ved ulike behandlingstider, dens tilhørende aktivitetskonsentrasjon og doserate.

Dose til mediet (Gy)	Behandlingstid (timer)	Aktivitetskonsentrasjon (Bq/ml)	Doserate (Gy/t)
0,087	6	1000	0,015
0,173	12	1000	0,014
0,340	24	1000	0,014
0,681	24	2000	0,028
0,261	6	3000	0,044
0,518	12	3000	0,043
1,021	24	3000	0,043
0,435	6	5000	0,073
0,864	12	5000	0,072
1,702	24	5000	0,071
2,383	24	7000	0,099
0,146	1	10000	0,146
0,292	2	10000	0,146
0,437	3	10000	0,146
0,871	6	10000	0,145
3,404	24	10000	0,142
0,256	1	17500	0,256
0,510	2	17500	0,255
0,765	3	17500	0,255
1,523	6	17500	0,254
0,307	1	21000	0,307
0,612	2	21000	0,306
0,918	3	21000	0,306
1,828	6	21000	0,305
0,365	1	25000	0,365
0,729	2	25000	0,365
1,092	3	25000	0,364
2,176	6	25000	0,363
0,803	1	55000	0,803
1,051	1	72000	1,051
1,752	1	120000	1,752

## A.2 Rådata celleoverlevelse

Følgende tabeller, tabell A.2.1-7, viser rådata fra celleoverlevelsesforsøkene. De viser antall kolonier talt i de ulike brønnene og deres gjennomsnitt med standardfeil. De viser også den beregnede "plating efficiency" (PE) og "surviving fraction" (SF) med standardfeil (SE). Der hvor det er utført repetisjoner av de enkelte forsøkene blir overlevelsesfraksjonen fra hver enkelt forsøk vektet i forhold til standardfeilen ved å bruke formel 3.7 vist i kapittel 3.3.3. Disse vektete verdiene ligger i tabell A.2.8-10. Det er disse verdiene som blir brukt i dose-responskurvene og overlevelsestabellen vist i kapittel 4.3.1 og 4.3.4. I figur A.2 vises alle datapunktene som ligger til grunn for den ikke-lineære kurvetilpasningen gjort i programmet "Grafit 5". Disse verdiene hentet fra tabell A.2.9 og 10 sammen med deres tilhørende standardfeil ligger til grunn for tilpasningen til en eksponensiell kurve. Kurven vises i et enkeltlogaritmisk plott i figur A.2 og er derfor rett. I noen brønner ble infeksjoner funnet, disse er markert som "Inf." i skjemaene for rådata.

**Tabell A.2.1:** Koloniantall, beregnet SF og SE fra tre innledende celleoverlevelsesforsøk med NHIK 3025 celler. Her ble alle cellene behandlet med  $^{223}\text{Ra}$  i 24 timer med ulike doser. Doserater gikk fra 0,015-0,1 Gy/t.

Forsøk 1, 24t beh	1	2	3	4	5	6	celler utsådd	Gjennomsnittlig celleantall	PE	SE_ Gjsnittcelleantall	SF	+/- SE_SF
Kontroller	155	115	72	113	86	189	150	121,7	0,811	17,8		
Dose: 0,17 Gy	140	102	93	134	120	119	200	118,0		7,4	0,727	0,116
Dose: 0,34 Gy	135	123	129	100	127	105	400	119,8		5,7	0,369	0,057
Dose: 0,68 Gy	139	163	115	128	165	164	800	145,7		8,8	0,224	0,036
Dose: 1,7 Gy	43	59	66	45	40	51	5000	50,7		4,1	0,012	0,002
Forsøk 2, 24t beh	1	2	3	4	5	6	celler utsådd	Gjennomsnittlig celleantall	PE	SE_ Gjsnittcelleantall	SF	+/- SE_SF
Kontroller	69	59	73	62	112	169	150	90,7	0,604	17,5		
Dose: 0,17 Gy	98	108	59	72	Inf.	73	200	82,0		9,1	0,678	0,151
Dose: 0,51 Gy	160	119	85	89	132	176	500	126,8		15,0	0,420	0,095
Dose: 1,0 Gy	177	205	197	168	191	173	2000	185,2		6,0	0,153	0,030
Dose: 1,4 Gy	Inf.	166	132	150	174	169	4000	158,2		7,7	0,065	0,013
Forsøk 3, 24t beh	1	2	3	4	5	6	celler utsådd	Gjennomsnittlig celleantall	PE	SE_ Gjsnittcelleantall	SF	+/- SE_SF
Kontroller	125	82	145	120	105	100	150	112,8	0,752	9,0		
Dose: 0,34 Gy	129	118	118	154	137	154	400	135,0		6,7	0,449	0,042
Dose: 0,85 Gy	116	106	98	98	127	127	1000	112,0		5,5	0,149	0,014
Dose: 1,7 Gy	43	29	42	44	51	44	6000	42,2		2,9	0,009	0,001
Dose: 2,4 Gy	12	17	24	20	23	15	25000	18,5		1,9	0,001	0,0001

**Tabell A.2.2:** Koloniantall, beregnet SF og SE fra to celleoverlevelsesforsøk med NHIK 3025 (dox) celler. Cellene ble behandlet i 24 timer med ulike doser <sup>223</sup>Ra. Doserater lå mellom 0,015-0,073 Gy/t.

3025 (dox) 1, 24t beh	1	2	3	4	5	6	celler utsådd	Gjennomsnittlig celleantall	PE	SE	Gjsnittcelleantall	SF	+/- SE_SF
Kontroller	47	22	59	37	33	60	150	43,0	0,287		6,2		
Dose: 0,34 Gy	29	33	44	29	46	32	400	35,5			3,1	0,310	0,052
Dose: 1,0 Gy	14	9	13	10	8	10	1000	10,7			1,0	0,037	0,006
Dose: 1,7 Gy	32	18	46	12	41	37	10000	31,0			5,5	0,011	0,002
3025 (dox) 2, 24t beh	1	2	3	4	5	6	celler utsådd	Gjennomsnittlig celleantall	PE	SE	Gjsnittcelleantall	SF	+/- SE_SF
Kontroller	45	55	41	48	35	58	150	47,0	0,313		3,5		
Dose: 0,34 Gy	54	32	76	65	74	84	400	64,2			7,7	0,513	0,072
Dose: 1,0 Gy	27	33	29	28	37	21	1000	29,2			2,2	0,093	0,010
Dose: 1,7 Gy	31	29	27	35	36	34	10000	32,0			1,5	0,010	0,001

**Tabell A.2.3:** Koloniantall, beregnet SF og SE fra fire celleoverlevelsesforsøk med NHIK 3025 celler i platåfase. Cellene ble behandlet i 24 timer med ulike doser <sup>223</sup>Ra. Doserater lå mellom 0,028-0,073 Gy/t. \*Plåtaforsøk 1 og 2 ble utført samtidig. Det ble bare sådd ut ett Brett med kontrollceller og PE er derfor lik for forsøk 1 og 2.

3025 platå 1, 24t beh	1	2	3	4	5	6	celler utsådd	Gjennomsnittlig celleantall	PE	SE	Gjsnittcelleantall	SF	+/- SE_SF
Kontroller *	107	114	87	118	90	130	150	107,7	0,718		6,8		
Dose: 0,68 Gy	71	55	49	59	62	39	300	55,8			4,5	0,259	0,027
Dose: 1,7 Gy	72	59	66	67	73	64	5000	66,8			2,1	0,019	0,001
3025 platå 2, 24t beh	1	2	3	4	5	6	celler utsådd	Gjennomsnittlig celleantall	PE	SE	Gjsnittcelleantall	SF	+/- SE_SF
Kontroller *	107	114	87	118	90	130	150	107,7	0,718		6,8		
Dose: 0,68 Gy	85	104	78	90	85	92	600	89,0			3,6	0,207	0,015
Dose: 1,7 Gy	134	126	149	135	147	132	10000	137,2			3,7	0,019	0,001
3025 platå 3, 24t beh	1	2	3	4	5	6	celler utsådd	Gjennomsnittlig celleantall	PE	SE	Gjsnittcelleantall	SF	+/- SE_SF
Kontroller	140	102	176	148	119	128	150	135,5	0,903		10,4		
Dose: 0,68 Gy	48	50	48	46	43	55	300	48,3			1,6	0,178	0,015
Dose: 1,7 Gy	114	117	116	109	137	132	5000	120,8			4,5	0,027	0,002
3025 platå 4, 24t beh	1	2	3	4	5	6	celler utsådd	Gjennomsnittlig celleantall	PE	SE	Gjsnittcelleantall	SF	+/- SE_SF
Kontroller	170	125	166	117	140	132	150	141,7	0,944		8,9		
Dose: 0,68 Gy	53	66	69	61	60	70	300	63,2			2,6	0,223	0,017
Dose: 1,7 Gy	128	111	138	129	122	132	5000	126,7			3,8	0,027	0,002

**Tabell A.2.4:** Koloniantall, beregnet SF og SE fra et celleoverlevelsesforsøk med NHIK 3025 celler. Cellene ble behandlet i 1, 2, 3 og 6 timer med ulike doser <sup>223</sup>Ra. Doserater gikk fra 0,15-0,36 Gy/t.

0,15-0,36 Gy/t 1t beh.	1	2	3	celler utsådd	Gjennomsnittlig celleantall	PE	SE_Gjsnittcelleantall	SF	+/- SE_SF
Kontroller	79	105	112	150	98,7	0,658	10,0		
Dose: 0,15 Gy	112	144	88	200	114,7		16,2	0,872	0,152
Dose: 0,26 Gy	83	78	84	250	81,7		1,9	0,497	0,052
Dose: 0,31 Gy	121	110	93	300	108,0		8,1	0,547	0,069
Dose: 0,36 Gy	111	104	89	350	101,3		6,5	0,440	0,053
Dose: 0,80 Gy	142	133	112	1250	129,0		8,9	0,157	0,019
0,15-0,36 Gy/t 2t beh.	1	2	3	celler utsådd	Gjennomsnittlig celleantall	PE	SE_Gjsnittcelleantall	SF	+/- SE_SF
Kontroller	125	127	113	150	121,7	0,811	4,4		
Dose: 0,29 Gy	128	111	130	300	123,0		6,0	0,506	0,031
Dose: 0,51 Gy	119	121	125	500	121,7		1,8	0,300	0,012
Dose: 0,61 Gy	120	101	116	600	112,3		5,8	0,231	0,014
Dose: 0,73 Gy	151	161	144	1000	152,0		4,9	0,187	0,009
0,15-0,36 Gy/t 3t beh.	1	2	3	celler utsådd	Gjennomsnittlig celleantall	PE	SE_Gjsnittcelleantall	SF	+/- SE_SF
Kontroller	95	78	93	150	88,7	0,591	5,4		
Dose: 0,44 Gy	86	100	82	400	89,3		5,5	0,378	0,032
Dose: 0,77 Gy	185	195	178	1250	186,0		4,9	0,252	0,017
Dose: 0,92 Gy	177	184	179	1800	180,0		2,1	0,169	0,010
Dose: 1,1 Gy	156	147	133	2500	145,3		6,7	0,098	0,007
0,15-0,36 Gy/t 6t beh.	1	2	3	celler utsådd	Gjennomsnittlig celleantall	PE	SE_Gjsnittcelleantall	SF	+/- SE_SF
Kontroller	89	105	102	150	98,7	0,658	4,9		
Dose: 0,87 Gy	211	181	232	1500	208,0		14,8	0,211	0,018
Dose: 1,5 Gy	212	176	216	10000	201,3		12,7	0,031	0,002
Dose: 1,8 Gy	183	176	181	20000	180,0		2,1	0,014	0,001
Dose: 2,2 Gy	154	143	151	30000	149,3		3,3	0,008	0,0004

**Tabell A.2.5:** Koloniantall, beregnet SF og SE fra repetisjon av celleoverlevelsesforsøk med NHIK 3025 celler. Cellene ble behandlet i 1, 2, 3 og 6 timer med ulike doser  $^{223}\text{Ra}$ . Doserater gikk fra 0,15-0,36 Gy/t.

0,15-0,36 Gy/t 1t beh.	1	2	3	celler utsådd	Gjennomsnittlig celleantall	PE	SE_Gjsnittcelleantall	SF	+/- SE_SF
Kontroller	142	126	146	150	138,0	0,920	6,1		
Dose: 0,15 Gy	118	144	110	200	124,0		10,3	0,674	0,063
Dose: 0,26 Gy	104	104	107	250	105,0		1,0	0,457	0,021
Dose: 0,31 Gy	151	177	138	300	155,3		11,5	0,563	0,048
Dose: 0,36 Gy	155	168	162	350	161,7		3,8	0,502	0,025
Dose: 0,80 Gy	183	165	164	1000	170,7		6,2	0,186	0,011
0,15-0,36 Gy/t 2t beh.	1	2	3	celler utsådd	Gjennomsnittlig celleantall	PE	SE_Gjsnittcelleantall	SF	+/- SE_SF
Kontroller	130	136	159	150	141,7	0,944	8,8		
Dose: 0,29 Gy	164	130	155	300	149,7		10,2	0,529	0,049
Dose: 0,51 Gy	167	173	185	500	175,0		5,3	0,371	0,026
Dose: 0,61 Gy	151	170	163	600	161,3		5,5	0,285	0,020
Dose: 0,73 Gy	192	184	183	1000	186,3		2,8	0,197	0,013
0,15-0,36 Gy/t 3t beh.	1	2	3	celler utsådd	Gjennomsnittlig celleantall	PE	SE_Gjsnittcelleantall	SF	+/- SE_SF
Kontroller	127	64	82	150	91,0	0,607	18,7		
Dose: 0,44 Gy	166	176	169	400	170,3		3,0	0,701	0,145
Dose: 0,77 Gy	170	153	171	800	164,7		5,8	0,339	0,071
Dose: 0,92 Gy	195	167	195	1200	185,7		9,3	0,255	0,054
Dose: 1,1 Gy	142	148	129	1500	139,7		5,6	0,153	0,032
0,15-0,36 Gy/t 6t beh.	1	2	3	celler utsådd	Gjennomsnittlig celleantall	PE	SE_Gjsnittcelleantall	SF	+/- SE_SF
Kontroller	125	132	85	150	114,0	0,760	14,6		
Dose: 0,87 Gy	151	140	146	750	145,7		3,2	0,256	0,033
Dose: 1,5 Gy	203	193	Inf.	5000	198,0		5,0	0,052	0,007
Dose: 1,8 Gy	213	163	197	10000	191,0		14,7	0,025	0,004
Dose: 2,2 Gy	149	128	Inf.	15000	138,5		10,5	0,012	0,0

**Tabell A.2.6:** Koloniantall, beregnet SF og SE fra celleoverlevelsesforsøk med NHIK 3025 celler. Cellene ble behandlet i 6, 12 og 24 timer med ulike doser <sup>223</sup>Ra. Doserater gikk fra 0,015-0,073 Gy/t.

0,015-0,073 Gy/t 6t behandling	1	2	3	4	5	6	celler utsådd	Gjennomsnittlig celleantall	PE	SE_Gjsnittcelleantall	SF	+/- SE_SF
Kontroller	79	112	74	105	77	93	150	90,0	0,600	6,5		
Dose: 0,087 Gy	85	50	63	83	46	70	150	66,2		6,7	0,736	0,091
Dose: 0,26 Gy	132	151	119	121	134	106	250	127,2		6,3	0,848	0,074
Dose: 0,44 Gy	83	85	166	88	103	151	400	112,7		14,9	0,470	0,071
0,015-0,073 Gy/t 12t behandling	1	2	3	4	5	6	celler utsådd	Gjennomsnittlig celleantall	PE	SE_Gjsnittcelleantall	SF	+/- SE_SF
Kontroller	126	131	144	153	138	137	150	138,2	0,921	3,9		
Dose: 0,17 Gy	148	143	157	205	168	126	200	157,8		11,0	0,857	0,065
Dose: 0,52 Gy	186	135	153	173	195	139	500	163,5		10,2	0,355	0,024
Dose: 0,86 Gy	148	189	150	205	194	216	1000	183,7		11,6	0,199	0,014
0,015-0,073 Gy/t 24t behandling	1	2	3	4	5	6	celler utsådd	Gjennomsnittlig celleantall	PE	SE_Gjsnittcelleantall	SF	+/- SE_SF
Kontroller	105	110	129	105	110		150	111,8	0,745	4,4		
Dose: 1,0 Gy	163	152	171	173	132	178	1500	161,5		7,0	0,145	0,008

**Tabell A.2.7** Koloniantall, beregnet SF og SE fra repetisjon av celleoverlevelsesforsøk med NHIK 3025 celler. Cellene ble behandlet i 6, 12 og 24 timer med ulike doser <sup>223</sup>Ra. Doserater gikk fra 0,015-0,073 Gy/t.

0,015-0,073 Gy/t 6t behandling	1	2	3	4	5	6	celler utsådd	Gjennomsnittlig celleantall	PE	SE_Gjsnittcelleantall	SF	+/- SE_SF
Kontroller	36	24	22	54	40	31	150	34,5	0,230	4,8		
Dose: 0,087 Gy	24	13	15	27	30	41	150	25,0		4,2	0,725	0,158
Dose: 0,26 Gy	87	Inf.	57	86	79	55	250	72,8		7,0	1,266	0,214
Dose: 0,44 Gy	52	36	47	65	75	59	400	55,7		5,6	0,605	0,104
0,015-0,073 Gy/t 12t behandling	1	2	3	4	5	6	celler utsådd	Gjennomsnittlig celleantall	PE	SE_Gjsnittcelleantall	SF	+/- SE_SF
kontroller	158	135	140	156	146	144	150	146,5	0,977	3,7		
Dose: 0,17 Gy	86	79	114	101	91	113	200	97,3		5,9	0,498	0,033
Dose: 0,52 Gy	162	153	172	186	171	173	500	169,5		4,6	0,347	0,013
Dose: 0,86 Gy	151	163	146	128	123	158	750	144,8		6,6	0,198	0,010
0,015-0,073 Gy/t 24t behandling	1	2	3	4	5	6	celler utsådd	Gjennomsnittlig celleantall	PE	SE_Gjsnittcelleantall	SF	+/- SE_SF
Kontroller	52	72	53	76	73	74	150	66,7	0,444	4,5		
Dose: 0,34 Gy	64	101	55	71	73	44	300	68,0		7,9	0,511	0,069
Dose: 1,0 Gy	72	64	67	104	80	77	1250	77,3		5,9	0,139	0,014
Dose: 1,7 Gy	94	70	73	93	90	80	7000	83,3		4,3	0,027	0,002



**Tabell A.2.8:** Vektet overlevelsesfraksjon (SF) og standardfeil (SE) for forsøkene med NHIK 3025 eksponensielt voksende celler, (dox) celler og platåfase celler.

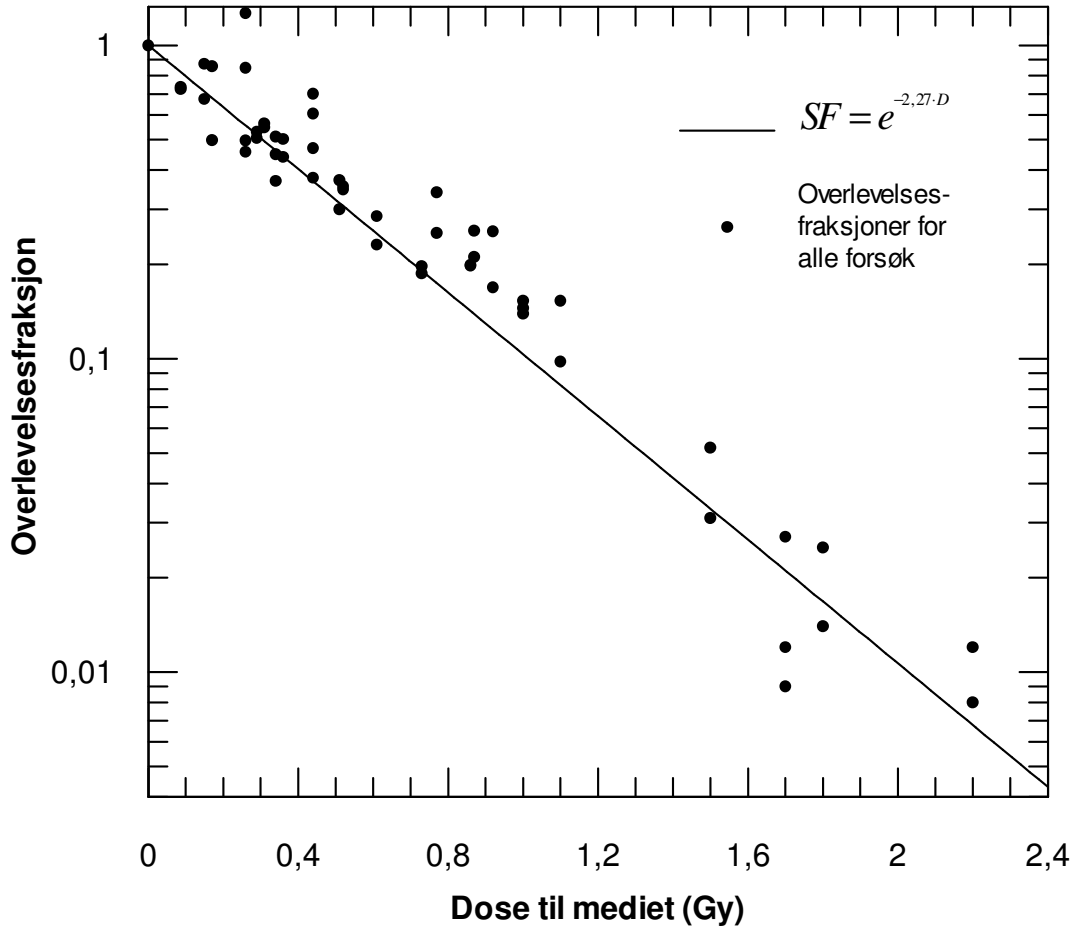
	Forsøk 1		Forsøk 2		Forsøk 3		Forsøk 4		Vektet SF og SE	
	SF	+/-SE	SF	+/-SE	SF	+/-SE	SF	+/-SE	SF	+/-SE
3025 (eksponensiell vekst) 24t beh.										
Dose: 0,34 Gy			0,511	0,069	0,369	0,057	0,449	0,042	<b>0,438</b>	<b>0,041</b>
Dose: 0,68 Gy	0,224	0,036								
Dose: 1,0 Gy	0,145	0,008	0,139	0,014	0,153	0,030			<b>0,144</b>	<b>0,004</b>
Dose: 1,7 Gy			0,027	0,002	0,012	0,002	0,009	0,001	<b>0,012</b>	<b>0,011</b>
3025 (dox) 24t beh.										
Dose: 0,34 Gy	0,310	0,052	0,513	0,072					<b>0,378</b>	<b>0,106</b>
Dose: 1,0 Gy	0,037	0,006	0,093	0,010					<b>0,053</b>	<b>0,030</b>
Dose: 1,7 Gy	0,011	0,002	0,010	0,001					<b>0,0100</b>	<b>0,0004</b>
3025 (platå) 24t beh.										
Dose: 0,68 Gy	0,259	0,027	0,178	0,015	0,223	0,017	0,207	0,015	<b>0,207</b>	<b>0,023</b>
Dose: 1,7 Gy	0,019	0,001	0,027	0,002	0,027	0,002	0,019	0,001	<b>0,021</b>	<b>0,006</b>

**Tabell A.2.9:** Vektet overlevelsesfraksjon (SF) og standardfeil (SE) for koloniforsøkene med NHIK 3025 eksponensiell vekst, med doserater 0,015-0,073 Gy/t.

	Forsøk 1		Forsøk 2		Forsøk 3 (innledende)				Vektet SF og SE	
	SF	+/-SE	SF	+/-SE	SF	+/-SE	SF	+/-SE	SF	+/-SE
0,015-0,073 Gy/t 6t behandling										
Dose: 0,087 Gy	0,736	0,091	0,725	0,158					<b>0,733</b>	<b>0,006</b>
Dose: 0,26 Gy	0,848	0,074	1,266	0,214					<b>0,893</b>	<b>0,266</b>
Dose: 0,44 Gy	0,470	0,071	0,605	0,104					<b>0,512</b>	<b>0,072</b>
0,015-0,073 Gy/t 12t behandling										
Dose: 0,17 Gy	0,857	0,065	0,498	0,033					<b>0,571</b>	<b>0,208</b>
Dose: 0,52 Gy	0,355	0,024	0,347	0,013					<b>0,349</b>	<b>0,005</b>
Dose: 0,86 Gy	0,199	0,014	0,198	0,010					<b>0,198</b>	<b>0,001</b>
0,015-0,073 Gy/t 24t behandling										
Dose: 0,34 Gy			0,511	0,069	0,369	0,057	0,449	0,042	<b>0,438</b>	<b>0,041</b>
Dose: 1,0 Gy	0,145	0,008	0,139	0,014	0,153	0,030			<b>0,144</b>	<b>0,004</b>
Dose: 1,7 Gy			0,027	0,002	0,012	0,002	0,009	0,001	<b>0,012</b>	<b>0,011</b>

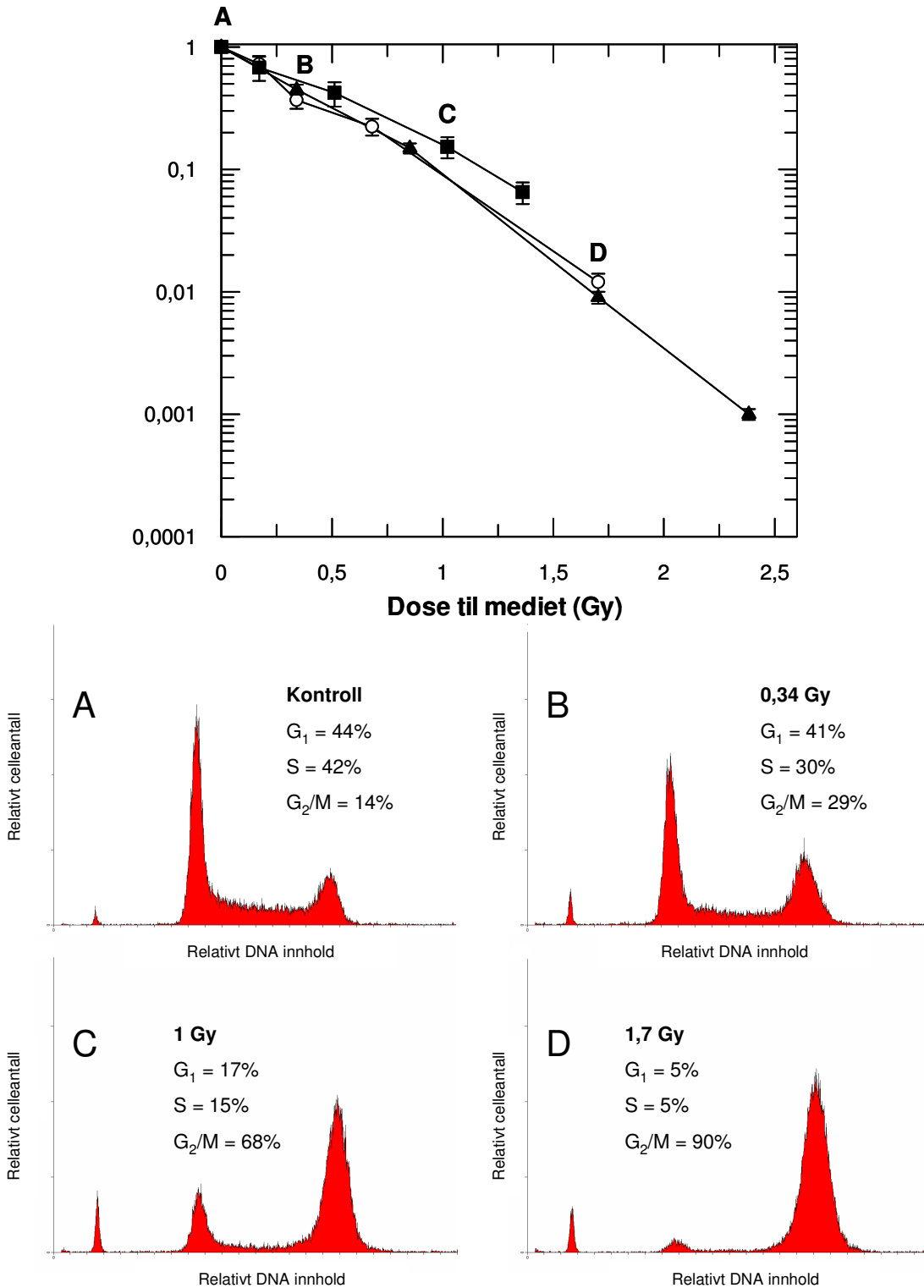
**Tabell A.2.10:** Vektet overlevelsesfraksjon (SF) og standardfeil (SE) for koloniforsøkene med NHIK 3025 eksponensiell vekst, med doserater 0,15-0,36 Gy/t.

	Forsøk 1		Forsøk 2		Vektet SF og SE	
	SF	+/-SE	SF	+/-SE	SF	+/-SE
0,15-0,36 Gy/t 1t beh.						
Dose: 0,15 Gy	0,872	0,152	0,674	0,063	<b>0,703</b>	<b>0,121</b>
Dose: 0,26 Gy	0,497	0,052	0,457	0,021	<b>0,462</b>	<b>0,025</b>
Dose: 0,31 Gy	0,547	0,069	0,563	0,048	<b>0,558</b>	<b>0,008</b>
Dose: 0,36 Gy	0,440	0,053	0,502	0,025	<b>0,491</b>	<b>0,037</b>
0,15-0,36 Gy/t 2t beh.						
Dose: 0,29 Gy	0,506	0,031	0,529	0,049	<b>0,512</b>	<b>0,012</b>
Dose: 0,51 Gy	0,300	0,012	0,371	0,026	<b>0,312</b>	<b>0,042</b>
Dose: 0,61 Gy	0,231	0,014	0,285	0,020	<b>0,249</b>	<b>0,028</b>
Dose: 0,73 Gy	0,187	0,009	0,197	0,013	<b>0,191</b>	<b>0,005</b>
0,15-0,36 Gy/t 3t beh.						
Dose: 0,44 Gy	0,378	0,032	0,701	0,145	<b>0,393</b>	<b>0,219</b>
Dose: 0,77 Gy	0,252	0,017	0,339	0,071	<b>0,256</b>	<b>0,059</b>
Dose: 0,92 Gy	0,169	0,010	0,255	0,054	<b>0,172</b>	<b>0,059</b>
Dose: 1,1 Gy	0,098	0,007	0,153	0,032	<b>0,101</b>	<b>0,037</b>
0,15-0,36 Gy/t 6t beh.						
Dose: 0,87 Gy	0,211	0,018	0,256	0,033	<b>0,221</b>	<b>0,025</b>
Dose: 1,5 Gy	0,031	0,002	0,052	0,007	<b>0,033</b>	<b>0,014</b>
Dose: 1,8 Gy	0,014	0,001	0,025	0,004	<b>0,014</b>	<b>0,008</b>
Dose: 2,2 Gy	0,008	0,0004	0,012	0,0018	<b>0,008</b>	<b>0,003</b>



**Figur A.2:** Viser fraksjon overlevende NHIK 3025 celler mot dose til mediet gitt fra  $^{223}\text{Ra}$ . Her er alle overlevelsesfraksjonene fra forsøkene i tabell A.2.9 og 10 vist. Disse verdiene sammen med deres standardfeil ligger til grunn for den ikke-lineære kurvetilpasningen som er gjort i programmet "Grafit 5". Standardfeilen for de enkelte datapunktene er ikke vist da disse virket forstyrrende for figuren. Standardfeilen til de ulike datapunktene er derimot vist i tabell A.2.9 og 10. Kurven er eksponensiell men vises rett i et enkeltlogaritmisk plott.  $\alpha$ -Leddets ble beregnet til  $2,27 \pm 0,04$ .

### A.3 Innledende celleoverlevelsesforsøk

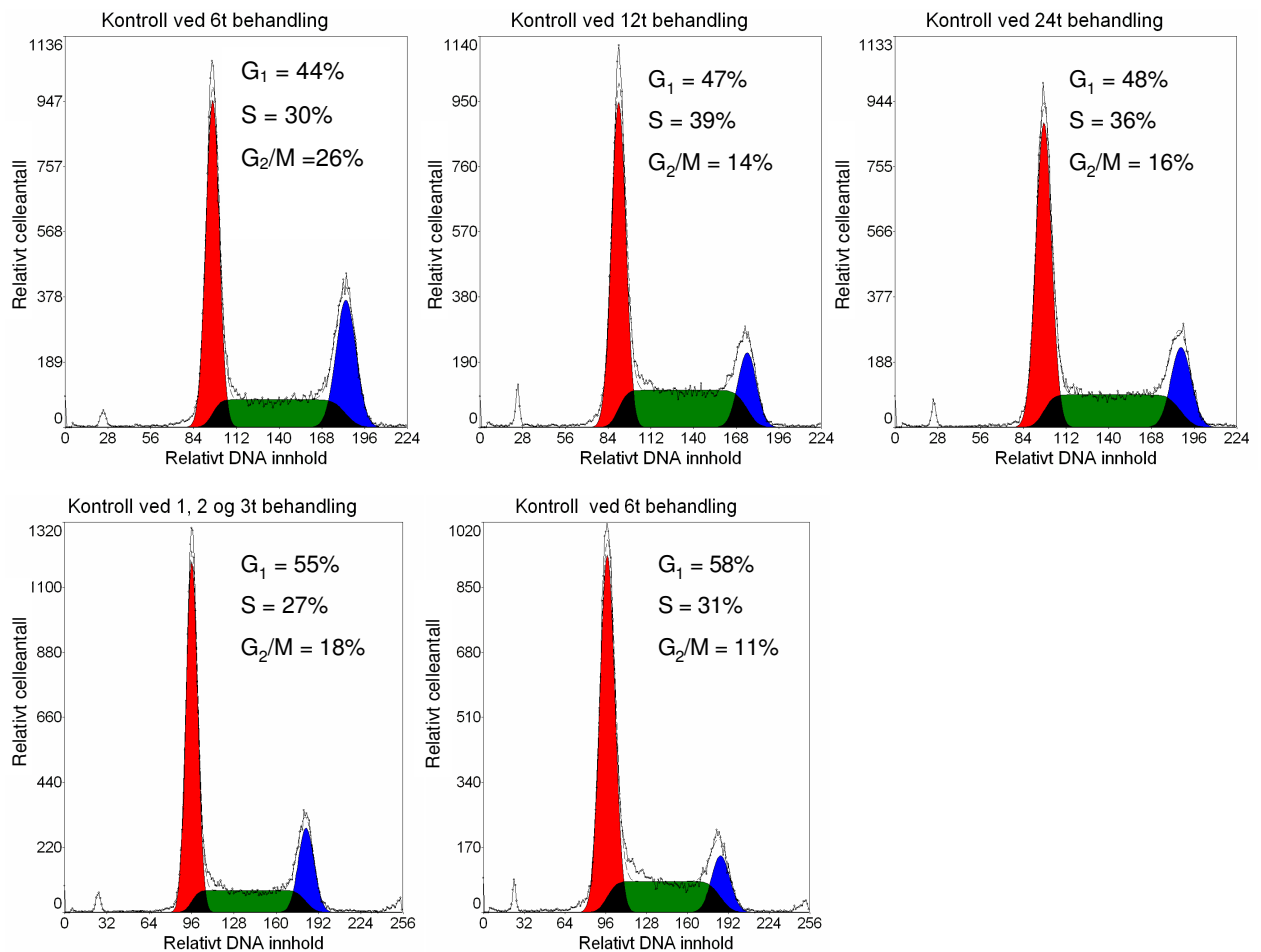


**Figur A.3:** Fremstilling av de innledende celleoverlevelsesforsøkene med NHIK 3025. (○) forsøk 1, (■) forsøk 2, (▲) forsøk 3. Rådata kan sees i tabell A.2.1. DNA-histogrammene A-D viser fordelingen av celler i celledyklus ved ulike punkter på overlevelseskurvene.

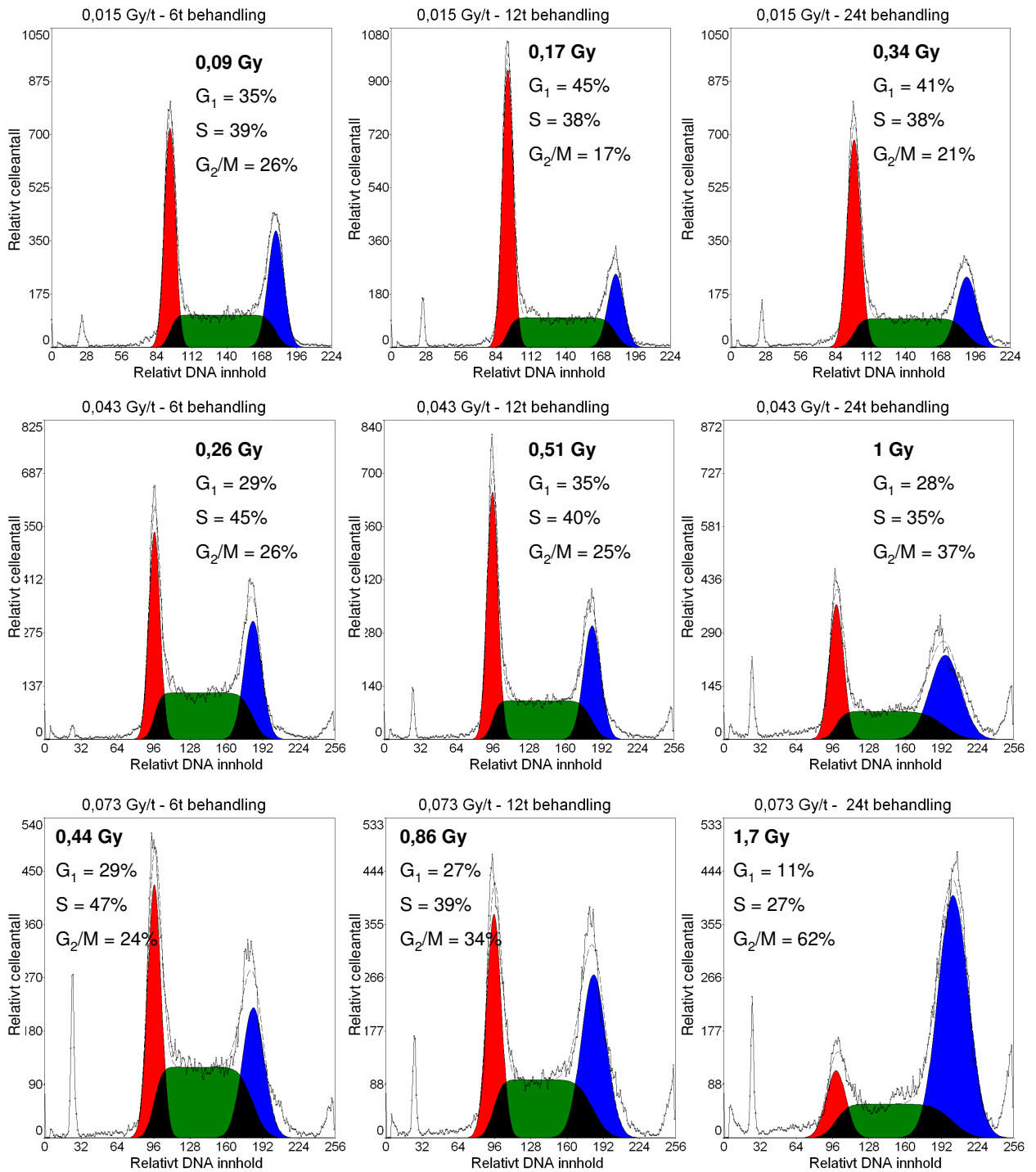
## Vedlegg B: DNA-histogrammer og fordeling av celler i cellyklus

### B.1 DNA-histogrammer

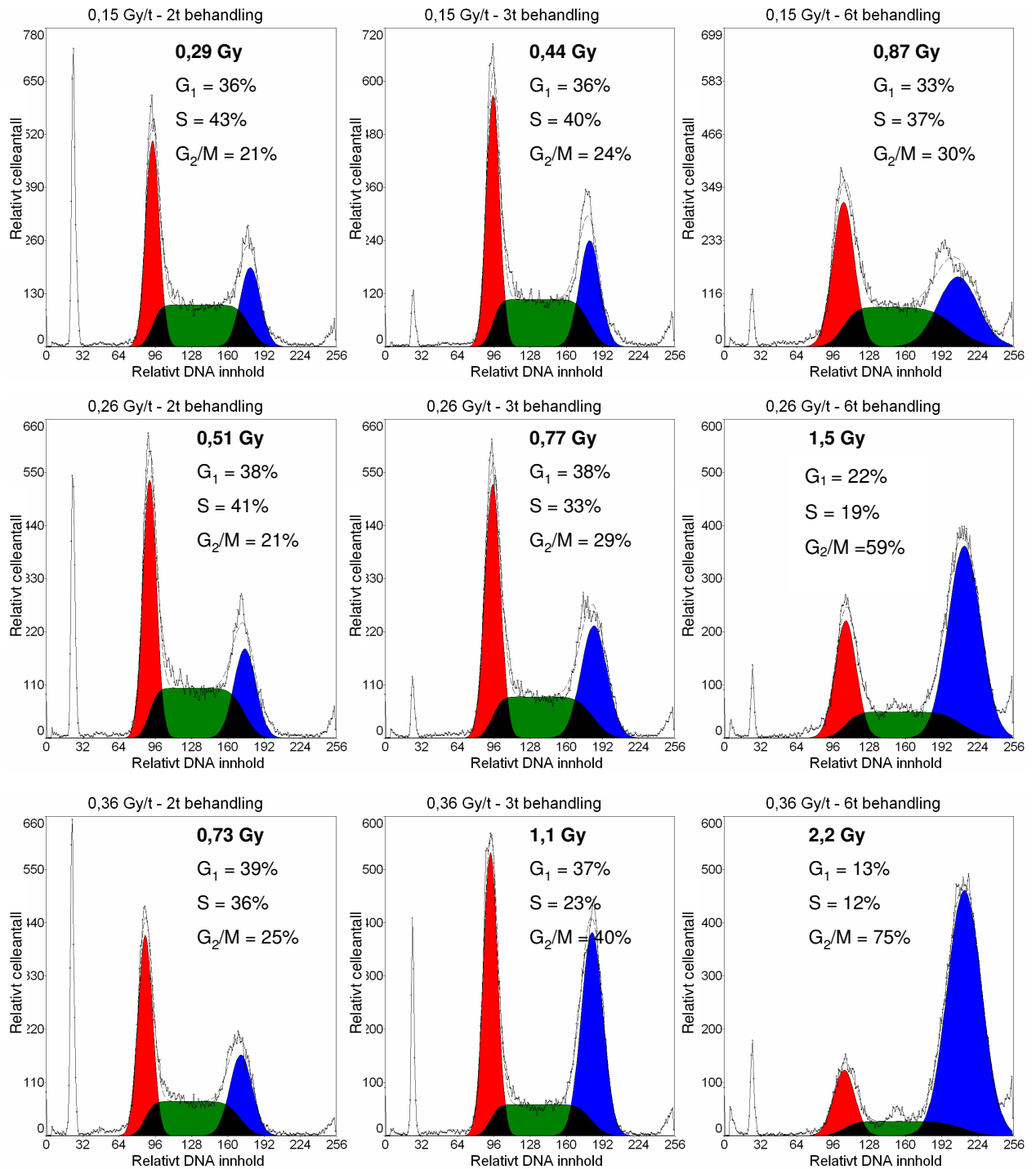
Her blir de resterende DNA-histogrammene vist. I figur B.1.1 vises DNA-histogrammene for kontrollprøver analysert 24 timer etter avsluttet behandling. Omtrent hver behandlingstid hadde et eget kontrollhistogram. I figur B.1.2 vises DNA-histogrammene for doseratene 0,015-0,073 Gy/t analysert 24 timer etter behandling. I figur B.1.3 vises DNA-histogrammene for doseratene 0,15-0,36 Gy/t også analysert 24 timer etter behandling. Videre vises det i figur B.1.4 en overlevelseskurve for doseraten 0,31 Gy/t. Denne figuren viser også DNA-histogrammer for prøvene analysert rett etter behandling. Figur B.1.5 viser DNA-histogrammene for samme doserate 24 timer etter behandling. Figur B.1.6 viser DNA-histogrammer analysert 48 timer etter behandling for doseratene 0,073 og 0,15 Gy/t med doser opp mot 3,4 Gy. Figur B.1.7 viser også DNA-histogrammer analysert 48 timer etter behandling med doserater opp mot 1,7 Gy/t.



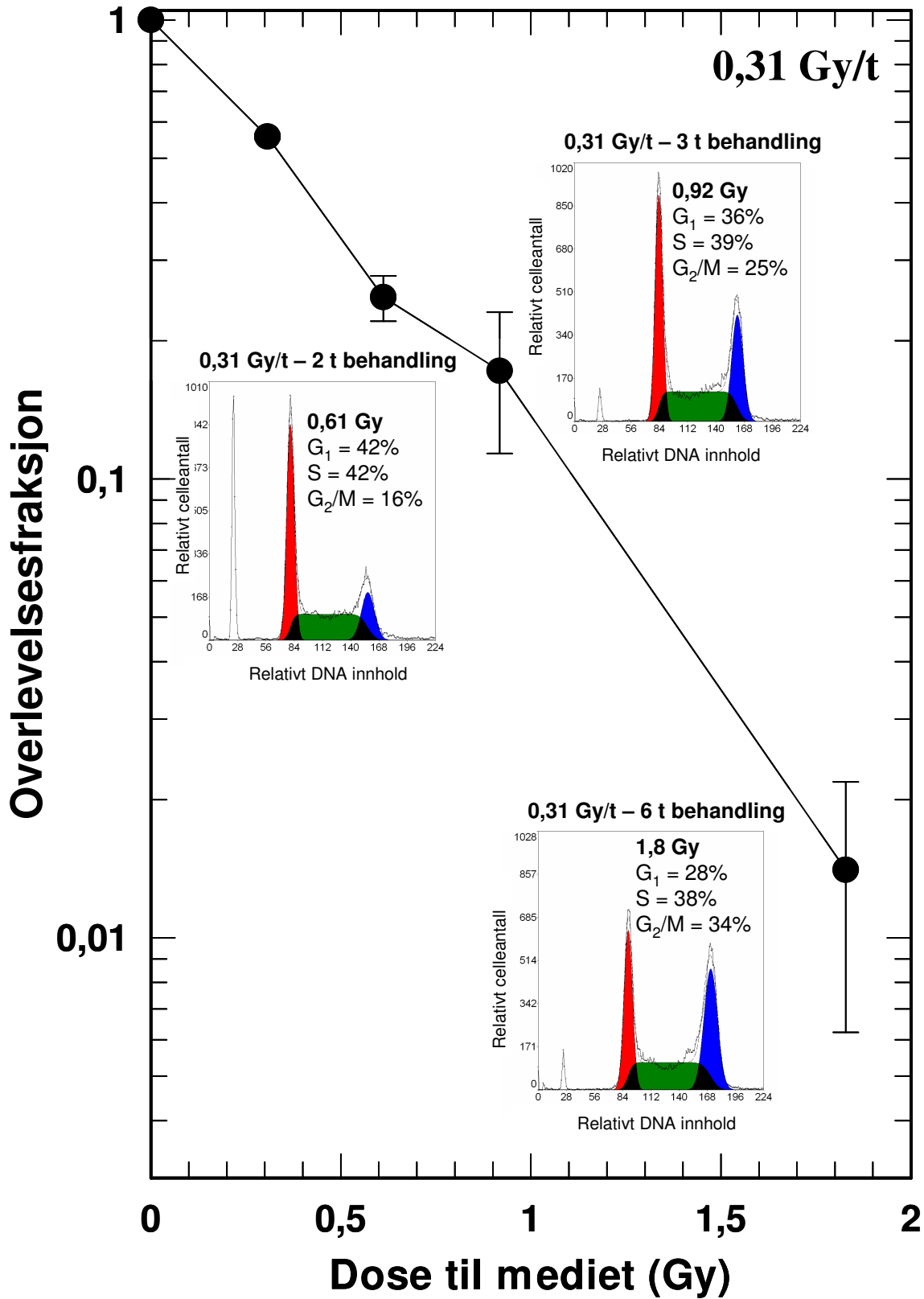
**Figur B.1.1:** DNA-histogrammer for ubehandlede (kontroll) NHIK 3025 celler analysert 24 timer etter avsluttet behandling. Relativt celleantall plottes mot relativt DNA-innhold.



**Figur B.1.2:** DNA-histogrammer for behandlede NHIK 3025 celler analysert 24 timer etter avsluttet behandling. Relativt celleantall er plottet mot relativt DNA-innhold. Doserater går fra 0,015-0,073 Gy/t. Hver rad tilsvarer en doserate med DNA-histogrammer for 6, 12 og 24 timers behandling med <sup>223</sup>Ra. Histogrammene viser prosentvis fordeling av celler i celledyklus funnet vha. programmet Multicycle. Her representerer rød, grønn og blå topp henholdsvis G<sub>1</sub>-, S- og G<sub>2</sub>/M-fase. Opphopningen viser seg å være større for celler behandlet med høyere dose.

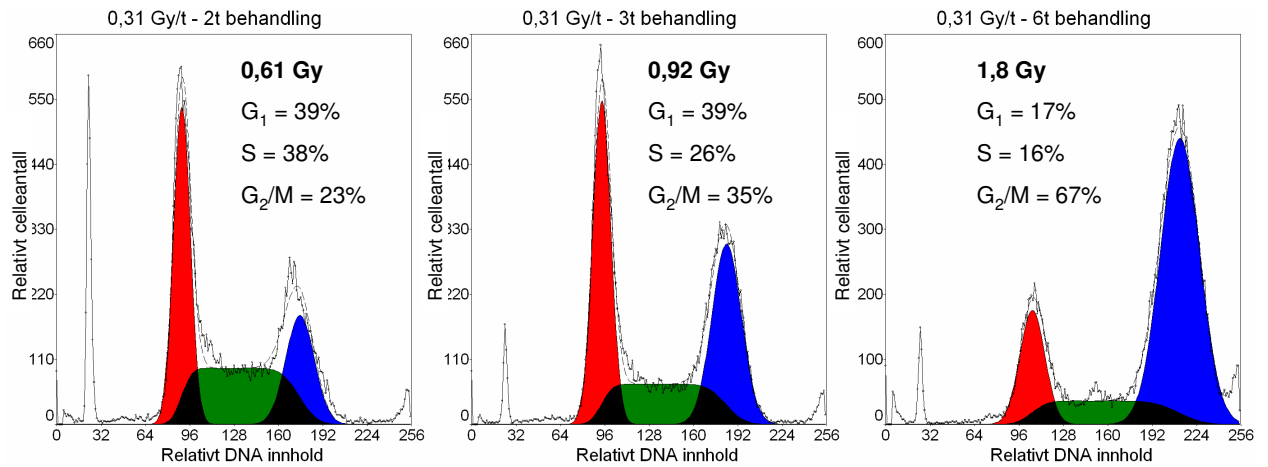


**Figur B.1.3:** DNA-histogrammer for behandlede NHIK 3025 celler analysert 24 timer etter avsluttet behandling. Relativt celleantall er plottet mot relativt DNA-innhold. Doserater går fra 0,15-0,36 Gy/t. Hver rad tilsvarende en doserate med DNA-histogrammer for 2, 3 og 6 timers behandling med  $^{223}\text{Ra}$ . Histogrammene viser prosentvis fordeling av celler i cellesyklus funnet vha. programmet Multicycle. Her representerer rød, grønn og blå topp henholdsvis  $G_1$ -, S- og  $G_2/M$ -fase. En økning i  $G_2/M$ -oppbygning observeres ved økende doser.

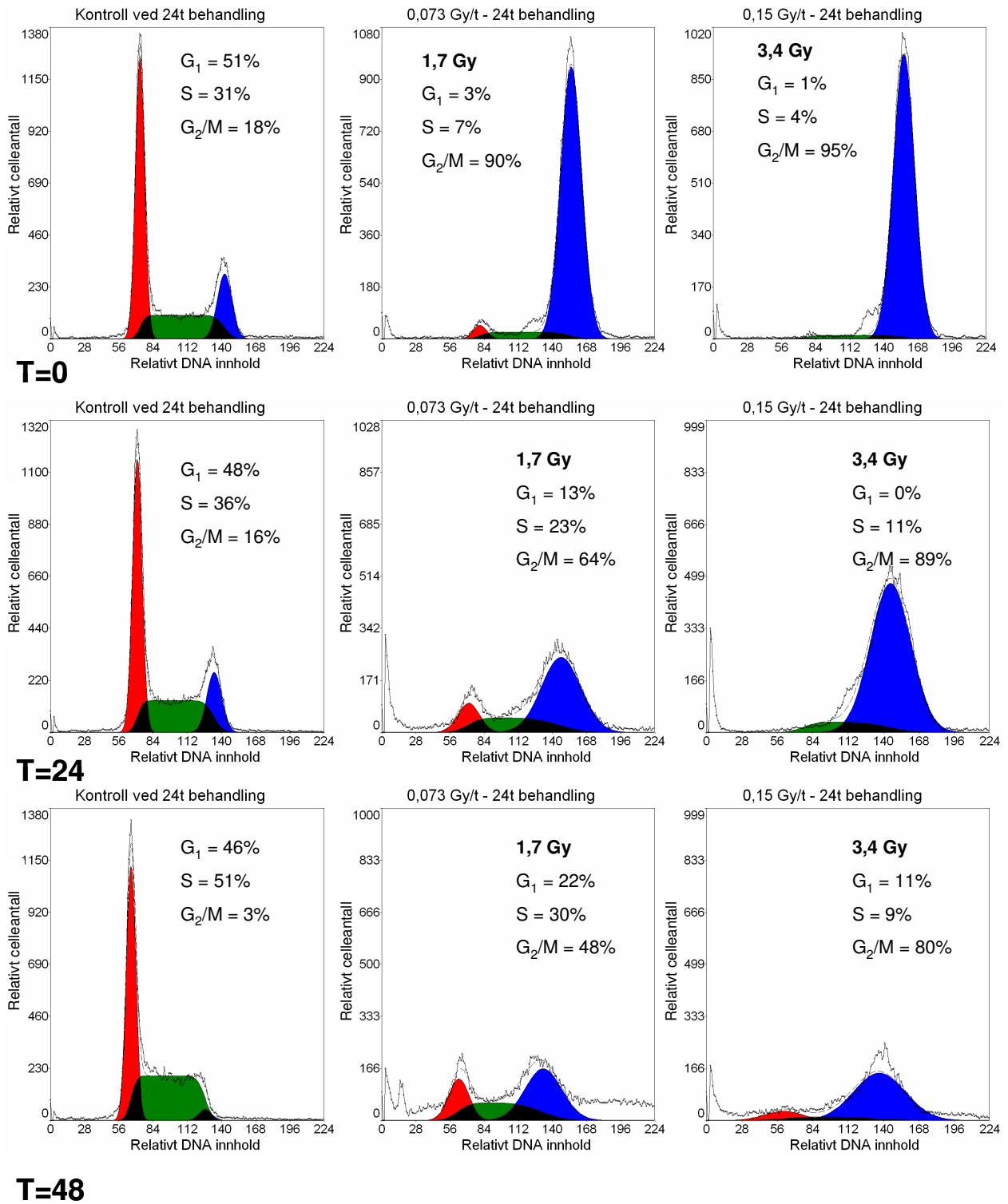


**Figur B.1.4:** Overlevelsesfraksjon av NHIK 3025 celler som funksjon av dosen til mediet for doseraten 0,31 Gy/t gitt fra  $^{223}\text{Ra}$ , med DNA-histogrammer for datapunktene analysert rett etter behandling. En relativt rett overlevelseskurve.

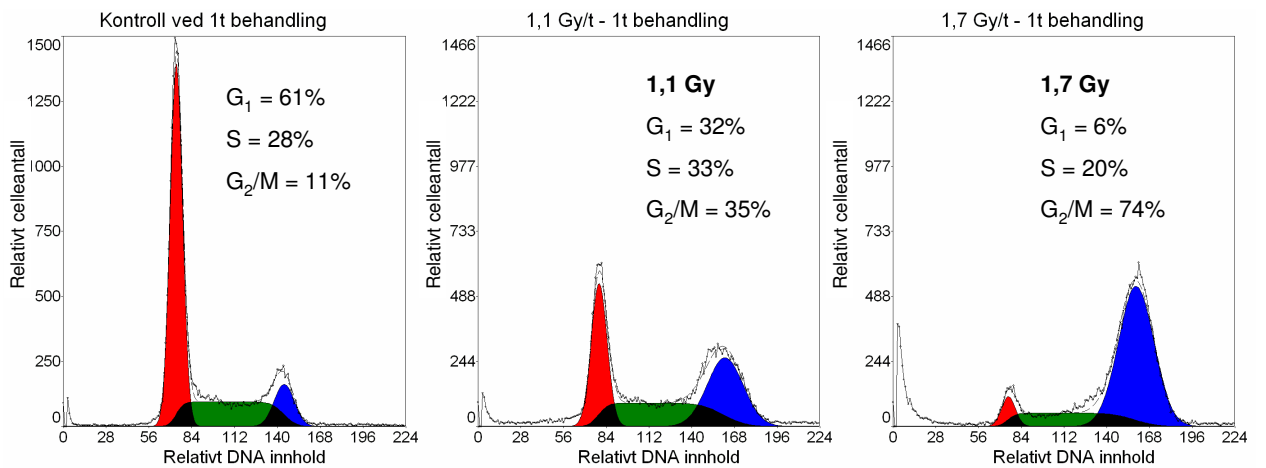
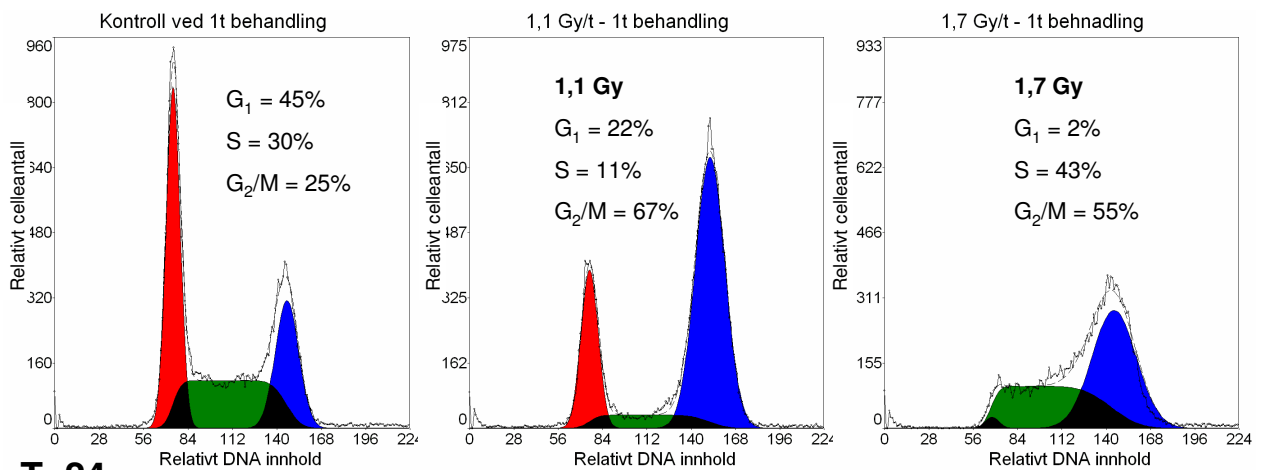
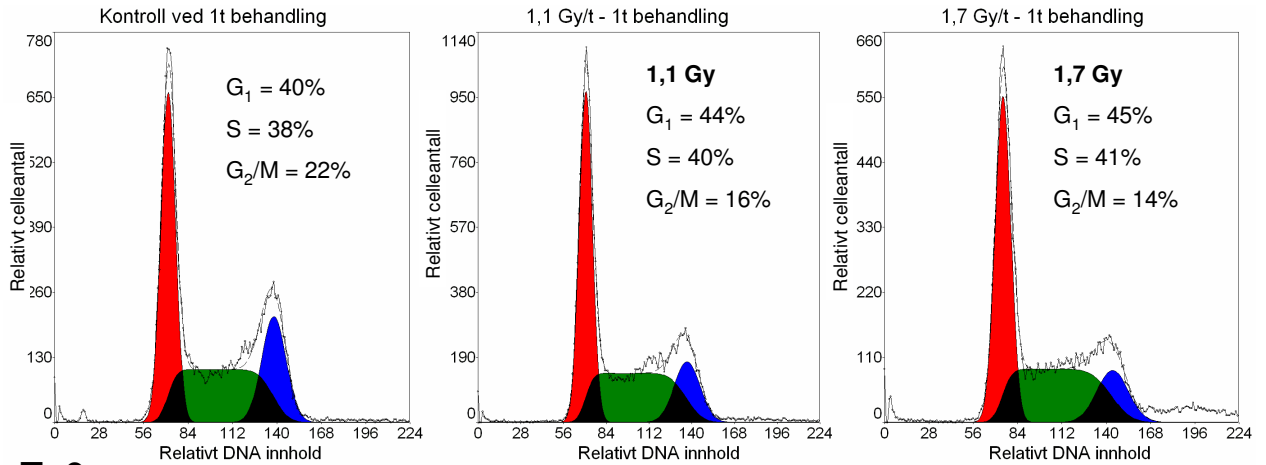




**Figur B.1.5:** DNA-histogrammer for NHIK 3025 celler behandlet med doseraten 0,31 Gy/t, analysert 24 timer etter avsluttet behandling. Relativt celleantall er plottet mot relativt DNA-innhold. Behandlingstiden var 2, 3 og 6 timer med  $^{223}\text{Ra}$ . Her observeres en økende G<sub>2</sub>/M-opphopning av celler med økende doser.



**Figur B.1.6:** DNA-histogrammer for ubehandlede og behandlede NHK 3025 celler. Doseratene gitt er 0,073 og 0,15 Gy/t, med henholdsvis 1,7 og 3,4 Gy i totaldose fra  $^{223}\text{Ra}$ . Behandlingstiden var på 24 timer. Prøvene er analysert rett etter ( $T=0$ ), 24 timer etter ( $T=24$ ) og 48 timer etter ( $T=48$ ) avsluttet behandling. Opphopningen av celler i  $G_2/M$ -fase holder seg relativt høyt oppe for de høyeste dosene.



**Figur B.1.7:** DNA-histogrammer for ubehandlede og behandlede NHIK 3025 celler. Doseratene er 1 og 1,7 Gy/t, med henholdsvis 1,1 og 1,7 Gy i totaldose fra  $^{223}\text{Ra}$ . Behandlingstiden var 1 time. Prøvene er analysert rett etter ( $T=0$ ), 24 timer etter ( $T=24$ ) og 48 timer etter ( $T=48$ ) avsluttet behandling.

## B.2 Prosentvis fordeling av celler i cellesyklus – rådata og alle datapunkter for figurene 4.6, 4.7 og 4.8

Her vises rådata for figurene 4.6-8 i resultatkapittelet. Dataene viser fordelingen rett etter avsluttet behandling og 24 timer etter avsluttet behandling. Figur B.2 viser fordelingen av celler i alle de ulike cellesyklusfasene mot dose og behandlingstid rett etter behandling og 24 timer etter avsluttet behandling for alle de ulike doseratene.

**Tabell B.2.1:** Prosentvis fordeling av NHIK 3025 celler i cellesyklus. Data for figur 4.6 og 4.8. Doserater mellom 0,015-0,073 Gy/t gitt fra  $^{223}\text{Ra}$ . Dataene viser fordeling av celler i cellesyklus rett etter behandling.

T=0	kontroll 6t		kontroll 12t		kontroll 24t		Gj.snitt							
	1	2	1	2	1	2								
<b>G1</b>	43,9	47,8	57,5	57,6	44,3	49,7	<b>50,1</b>							
<b>S</b>	42,4	38,0	26,4	29,7	41,4	35,9	<b>35,6</b>							
<b>G2/M</b>	13,7	14,2	16,2	12,7	14,2	14,4	<b>14,2</b>							
0,015 Gy/t	0,087 Gy 6t beh.		Gj.snitt +/-SE		0,17 Gy 12t beh.		Gj.snitt +/-SE		0,34 Gy 24t beh.			Gj.snitt +/-SE		
	1	2			1	2			1	2	3			
<b>G1</b>	47,0	44,4	<b>45,7</b>	<b>1,3</b>	45,7	48,3	<b>47,0</b>	<b>1,3</b>	40,7	32,8	32,2	<b>35,2</b>	<b>2,8</b>	
<b>S</b>	37,4	38,6	<b>38,0</b>	<b>0,6</b>	26,2	27,4	<b>26,8</b>	<b>0,6</b>	30,4	30,6	37,3	<b>32,8</b>	<b>2,3</b>	
<b>G2/M</b>	15,7	17,0	<b>16,3</b>	<b>0,7</b>	28,1	24,4	<b>26,2</b>	<b>1,9</b>	28,8	36,6	30,5	<b>32,0</b>	<b>2,4</b>	
0,043 Gy/t	0,26 Gy 6t beh.		Gj.snitt +/-SE		0,52 Gy 12t beh.		Gj.snitt +/-SE		1,0 Gy 24t beh.			Gj.snitt +/-SE		
	1	2			1	2			1	2				
<b>G1</b>	42,9	39,9	<b>41,4</b>	<b>1,5</b>	25,6	26,3	<b>26,0</b>	<b>0,4</b>	16,5	24,1		<b>20,3</b>	<b>3,8</b>	
<b>S</b>	37,6	39,5	<b>38,5</b>	<b>0,9</b>	28,8	28,5	<b>28,7</b>	<b>0,2</b>	15,3	19,1		<b>17,2</b>	<b>1,9</b>	
<b>G2/M</b>	19,5	20,6	<b>20,1</b>	<b>0,6</b>	45,6	45,1	<b>45,3</b>	<b>0,2</b>	68,2	56,8		<b>62,5</b>	<b>5,7</b>	
0,073 Gy/t	0,44 Gy 6t beh.		Gj.snitt +/-SE		0,86 Gy 12t beh.		Gj.snitt +/-SE		1,7 Gy 24t beh.			Gj.snitt +/-SE		
	1	2			1	2			1	2	3			
<b>G1</b>	43,1	39,4	<b>41,2</b>	<b>1,9</b>	13,2	12,4	<b>12,8</b>	<b>0,4</b>	3,4	2,9	1,2	<b>2,5</b>	<b>0,7</b>	
<b>S</b>	37,0	39,1	<b>38,0</b>	<b>1,0</b>	29,8	28,2	<b>29,0</b>	<b>0,8</b>	5,4	7,4	18,3	<b>10,4</b>	<b>4,0</b>	
<b>G2/M</b>	19,9	21,6	<b>20,7</b>	<b>0,9</b>	57,0	59,5	<b>58,2</b>	<b>1,2</b>	91,2	89,7	80,5	<b>87,1</b>	<b>3,3</b>	

**Tabell B.2.2:** Prosentvis fordeling av NHIK 3025 celler i cellesyklus. Data for figur 4.6 og 4.8. Doserater mellom 0,015-0,073 Gy/t gitt fra <sup>223</sup>Ra. Dataene viser fordeling av celler i cellesyklus 24 timer etter avsluttet behandling.

<b>T=24</b>	kontroll 6t		kontroll 12t		kontroll 24t		<b>Gj.snitt</b>						
	1	2	1	2	1	2							
<b>G1</b>	44,6	48,8	47,2	51,0	48,3	51,0	<b>48,5</b>						
<b>S</b>	29,6	31,8	38,8	36,1	35,6	34,0	<b>34,3</b>						
<b>G2/M</b>	25,8	19,5	14,0	12,9	16,1	15,0	<b>17,2</b>						
0,015 Gy/t	0,087 Gy 6t beh.		<b>Gj.snitt</b>	<b>+/-SE</b>	0,17 Gy 12t beh.		<b>Gj.snitt</b>	<b>+/-SE</b>	0,34 Gy 24t beh.			<b>Gj.snitt</b>	<b>+/-SE</b>
	1	2			1	2			1	2	1		
<b>G1</b>	34,5	43,2	<b>38,9</b>	<b>4,4</b>	44,9	51,4	<b>48,2</b>	<b>3,3</b>	41,7			<b>41,7</b>	<b>0,0</b>
<b>S</b>	39,1	35,0	<b>37,1</b>	<b>2,0</b>	37,7	33,6	<b>35,7</b>	<b>2,1</b>	37,8			<b>37,8</b>	<b>0,0</b>
<b>G2/M</b>	26,4	21,8	<b>24,1</b>	<b>2,3</b>	17,4	15,0	<b>16,2</b>	<b>1,2</b>	20,5			<b>20,5</b>	<b>0,0</b>
0,043 Gy/t	0,26 Gy 6t beh.		<b>Gj.snitt</b>	<b>+/-SE</b>	0,52 Gy 12t beh.		<b>Gj.snitt</b>	<b>+/-SE</b>	1,0 Gy 24t beh.			<b>Gj.snitt</b>	<b>+/-SE</b>
	1	2			1	2			1	2	1		
<b>G1</b>	28,9	34,4	<b>31,7</b>	<b>2,7</b>	35,2	41,0	<b>38,1</b>	<b>2,9</b>	28,0	33,7		<b>30,8</b>	<b>2,9</b>
<b>S</b>	45,1	42,1	<b>43,6</b>	<b>1,5</b>	39,7	34,5	<b>37,1</b>	<b>2,6</b>	34,8	37,2		<b>36,0</b>	<b>1,2</b>
<b>G2/M</b>	26,0	23,5	<b>24,8</b>	<b>1,2</b>	25,0	24,5	<b>24,8</b>	<b>0,3</b>	37,3	29,1		<b>33,2</b>	<b>4,1</b>
0,073 Gy/t	0,44 Gy 6t beh.		<b>Gj.snitt</b>	<b>+/-SE</b>	0,86 Gy 12t beh.		<b>Gj.snitt</b>	<b>+/-SE</b>	1,7 Gy 24t beh.			<b>Gj.snitt</b>	<b>+/-SE</b>
	1	2			1	2			1	2	1		
<b>G1</b>	28,9	30,3	<b>29,6</b>	<b>0,7</b>	27,4	32,7	<b>30,0</b>	<b>2,7</b>	11,2	13,5		<b>12,3</b>	<b>1,1</b>
<b>S</b>	47,2	46,2	<b>46,7</b>	<b>0,5</b>	39,2	36,8	<b>38,0</b>	<b>1,2</b>	26,7	23,2		<b>25,0</b>	<b>1,8</b>
<b>G2/M</b>	24,0	23,5	<b>23,7</b>	<b>0,2</b>	33,5	30,5	<b>32,0</b>	<b>1,5</b>	62,0	63,4		<b>62,7</b>	<b>0,7</b>

**Tabell B.2.3:** Prosentvis fordeling av NHIK 3025 celler i cellesyklus. Data for figur 4.7 og 4.8. Doserater mellom 0,15-0,36 Gy/t gitt fra <sup>223</sup>Ra. Dataene viser fordeling av celler i cellesyklus rett etter behandling.

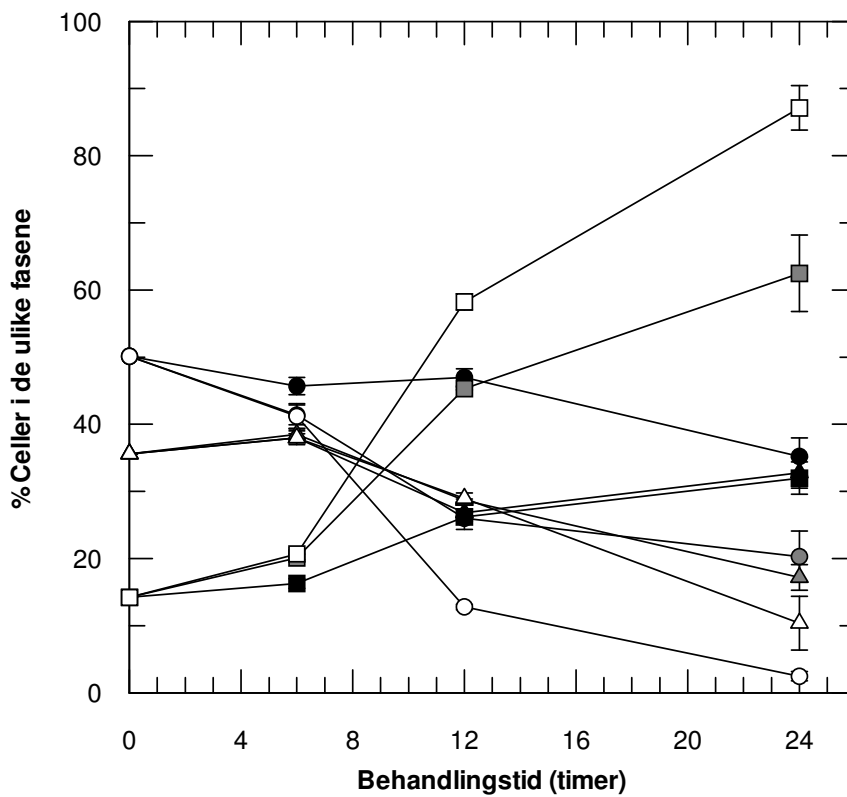
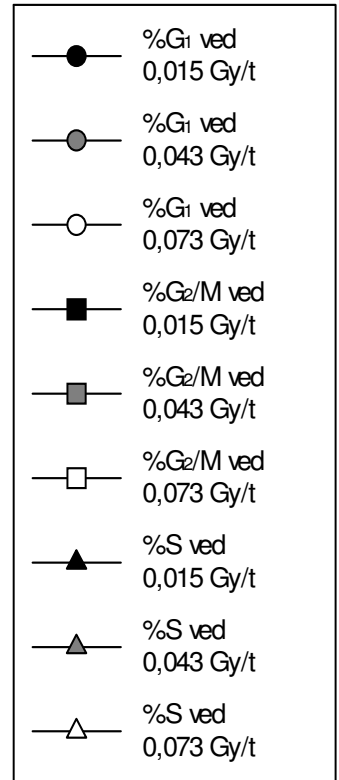
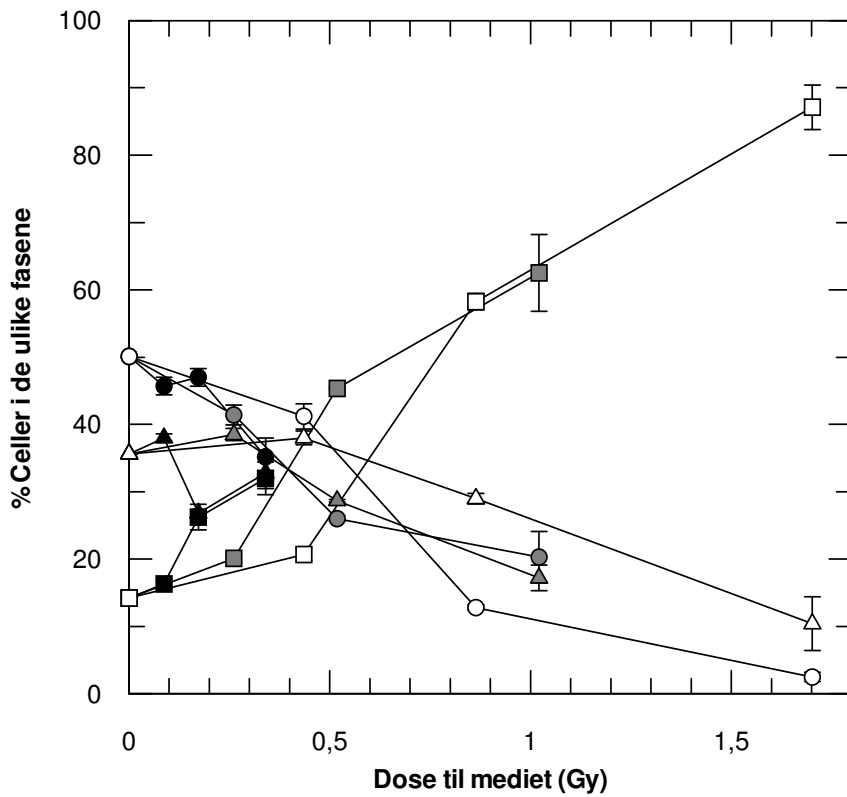
T=0	Kontroll 1, 2 og 3 t		Kontroll 6 t		Gj.snitt											
	1	2	1	2												
<b>G1</b>	39,7	39,9	43,2		<b>40,9</b>											
<b>S</b>	39,1	38,0	37,8		<b>38,3</b>											
<b>G2/M</b>	21,2	22,1	18,9		<b>20,7</b>											
0,15 Gy/t	0,15 Gy 1t beh.		Gj. snitt	+/- SE	0,29 Gy 2t beh.		Gj. snitt	+/- SE	0,44 Gy 3t beh.		Gj. snitt	+/- SE	0,87 Gy 6t beh.		Gj. snitt	+/- SE
	1	2			1	2			1	2			1	2		
<b>G1</b>	39,6	43,8	<b>41,7</b>	<b>2,1</b>	37,3	39,2	<b>38,2</b>	<b>1,0</b>	35,3	36,2	<b>35,8</b>	<b>0,5</b>	27,2		<b>27,2</b>	<b>19,2</b>
<b>S</b>	43,0	42,3	<b>42,6</b>	<b>0,4</b>	43,5	45,9	<b>44,7</b>	<b>1,2</b>	41,0	39,3	<b>40,2</b>	<b>0,8</b>	38,7		<b>38,7</b>	<b>27,3</b>
<b>G2/M</b>	17,4	13,9	<b>15,7</b>	<b>1,7</b>	19,2	14,8	<b>17,0</b>	<b>2,2</b>	23,7	24,5	<b>24,1</b>	<b>0,4</b>	34,2		<b>34,2</b>	<b>24,2</b>
0,26 Gy/t	0,26 Gy 1t beh.		Gj. snitt	+/- SE	0,51 Gy 2t beh.		Gj. snitt	+/- SE	0,77 Gy 3t beh.		Gj. snitt	+/- SE	1,5 Gy 6t beh.		Gj. snitt	+/- SE
	1	2			1	2			1	2			1	2		
<b>G1</b>	40,0	44,6	<b>42,3</b>	<b>2,3</b>	37,3	41,8	<b>39,5</b>	<b>2,2</b>	34,4	36,9	<b>35,6</b>	<b>1,3</b>	25,7	26,7	<b>26,2</b>	<b>0,5</b>
<b>S</b>	43,3	40,6	<b>42,0</b>	<b>1,4</b>	43,2	41,8	<b>42,5</b>	<b>0,7</b>	41,9	38,7	<b>40,3</b>	<b>1,6</b>	40,0	37,3	<b>38,6</b>	<b>1,3</b>
<b>G2/M</b>	16,7	14,8	<b>15,8</b>	<b>0,9</b>	19,5	16,4	<b>18,0</b>	<b>1,6</b>	23,7	24,5	<b>24,1</b>	<b>0,4</b>	34,3	36,0	<b>35,2</b>	<b>0,8</b>
0,31 Gy/t	0,31 Gy 1t beh.		Gj. snitt	+/- SE	0,61 Gy 2t beh.		Gj. snitt	+/- SE	0,92 Gy 3t beh.		Gj. snitt	+/- SE	1,8 Gy 6t beh.		Gj. snitt	+/- SE
	1	2			1	2			1	2			1	2		
<b>G1</b>	39,8	44,2	<b>42,0</b>	<b>2,2</b>	34,8	41,9	<b>38,3</b>	<b>3,5</b>	31,7	35,5	<b>33,6</b>	<b>1,9</b>	22,8	28,0	<b>25,4</b>	<b>2,6</b>
<b>S</b>	43,5	41,0	<b>42,3</b>	<b>1,2</b>	48,3	41,9	<b>45,1</b>	<b>3,2</b>	45,1	39,4	<b>42,2</b>	<b>2,8</b>	44,1	37,9	<b>41,0</b>	<b>3,1</b>
<b>G2/M</b>	16,7	14,8	<b>15,7</b>	<b>1,0</b>	16,9	16,2	<b>16,6</b>	<b>0,4</b>	23,2	25,1	<b>24,2</b>	<b>1,0</b>	33,1	34,1	<b>33,6</b>	<b>0,5</b>
0,36 Gy/t	0,36 Gy 1t beh.		Gj. snitt	+/- SE	0,73 Gy 2t beh.		Gj. snitt	+/- SE	1,1 Gy 3t beh.		Gj. snitt	+/- SE	2,2 Gy 6t beh.		Gj. snitt	+/- SE
	1	2			1	2			1	2			1	2		
<b>G1</b>	39,0	46,2	<b>42,6</b>	<b>3,6</b>	37,9	40,9	<b>39,4</b>	<b>1,5</b>	33,2	37,7	<b>35,5</b>	<b>2,2</b>	20,1	27,2	<b>23,7</b>	<b>3,5</b>
<b>S</b>	44,0	40,3	<b>42,1</b>	<b>1,9</b>	42,6	47,9	<b>45,2</b>	<b>2,6</b>	44,7	47,8	<b>46,2</b>	<b>1,6</b>	47,0	38,4	<b>42,7</b>	<b>4,3</b>
<b>G2/M</b>	17,0	13,5	<b>15,3</b>	<b>1,8</b>	19,5	11,3	<b>15,4</b>	<b>4,1</b>	22,1	14,6	<b>18,3</b>	<b>3,8</b>	32,9	34,5	<b>33,7</b>	<b>0,8</b>

**Tabell B.2.4:** Prosentvis fordeling av NHIK 3025 celler i cellesyklus. Data for figur 4.7 og 4.8. Doserater mellom 0,15-0,36 Gy/t gitt fra <sup>223</sup>Ra. Dataene viser fordeling av celler i cellesyklus 24 timer etter avsluttet behandling.

T=24	Kontroll 1, 2 og 3 t		Kontroll 6 t		Gj.snitt											
	1	2	1	2												
<b>G1</b>	49,4	54,7	56,2	58,1	<b>54,6</b>											
<b>S</b>	29,1	27,3	29,0	30,7	<b>29,0</b>											
<b>G2/M</b>	21,5	18,0	14,8	11,3	<b>16,4</b>											
0,15 Gy/t	0,15 Gy 1t beh.		Gj. snitt	+/- SE	0,29 Gy 2t beh.		Gj. snitt	+/- SE	0,44 Gy 3t beh.		Gj. snitt	+/- SE	0,87 Gy 6t beh.		Gj. snitt	+/- SE
	1	2			1	2			1	2			1	2		
<b>G1</b>	37,9	39,0	<b>38,4</b>	<b>0,6</b>	35,7	36,7	<b>36,2</b>	<b>0,5</b>	34,4	36,4	<b>35,4</b>	<b>1,0</b>	31,9	33,1	<b>32,5</b>	<b>0,6</b>
<b>S</b>	40,7	40,5	<b>40,6</b>	<b>0,1</b>	42,1	42,5	<b>42,3</b>	<b>0,2</b>	42,7	39,9	<b>41,3</b>	<b>1,4</b>	35,0	37,5	<b>36,2</b>	<b>1,3</b>
<b>G2/M</b>	21,5	20,5	<b>21,0</b>	<b>0,5</b>	22,2	20,8	<b>21,5</b>	<b>0,7</b>	23,0	23,8	<b>23,4</b>	<b>0,4</b>	33,2	29,4	<b>31,3</b>	<b>1,9</b>
0,26 Gy/t	0,26 Gy 1t beh.		Gj. snitt	+/- SE	0,51 Gy 2t beh.		Gj. snitt	+/- SE	0,77 Gy 3t beh.		Gj. snitt	+/- SE	1,5 Gy 6t beh.		Gj. snitt	+/- SE
	1	2			1	2			1	2			1	2		
<b>G1</b>	38,0	37,8	<b>37,9</b>	<b>0,1</b>	38,8	38,0	<b>38,4</b>	<b>0,4</b>	35,6	38,7	<b>37,2</b>	<b>1,6</b>	18,2	22,3	<b>20,2</b>	<b>2,1</b>
<b>S</b>	40,9	39,5	<b>40,2</b>	<b>0,7</b>	36,5	40,8	<b>38,6</b>	<b>2,1</b>	30,5	32,7	<b>31,6</b>	<b>1,1</b>	21,9	18,5	<b>20,2</b>	<b>1,7</b>
<b>G2/M</b>	21,1	22,7	<b>21,9</b>	<b>0,8</b>	24,7	21,3	<b>23,0</b>	<b>1,7</b>	33,9	28,6	<b>31,2</b>	<b>2,7</b>	59,9	59,3	<b>59,6</b>	<b>0,3</b>
0,31 Gy/t	0,31 Gy 1t beh.		Gj. snitt	+/- SE	0,61 Gy 2t beh.		Gj. snitt	+/- SE	0,92 Gy 3t beh.		Gj. snitt	+/- SE	1,8 Gy 6t beh.		Gj. snitt	+/- SE
	1	2			1	2			1	2			1	2		
<b>G1</b>	38,7	36,9	<b>37,8</b>	<b>0,9</b>	38,5	38,7	<b>38,6</b>	<b>0,1</b>	36,5	38,7	<b>37,6</b>	<b>1,1</b>	18,5	16,9	<b>17,7</b>	<b>0,8</b>
<b>S</b>	35,8	42,8	<b>39,3</b>	<b>3,5</b>	40,6	38,2	<b>39,4</b>	<b>1,2</b>	26,0	26,3	<b>26,2</b>	<b>0,1</b>	14,2	16,4	<b>15,3</b>	<b>1,1</b>
<b>G2/M</b>	25,6	20,2	<b>22,9</b>	<b>2,7</b>	20,9	23,1	<b>22,0</b>	<b>1,1</b>	37,5	35,0	<b>36,2</b>	<b>1,3</b>	67,3	66,7	<b>67,0</b>	<b>0,3</b>
0,36 Gy/t	0,36 Gy 1t beh.		Gj. snitt	+/- SE	0,73 Gy 2t beh.		Gj. snitt	+/- SE	1,1 Gy 3t beh.		Gj. snitt	+/- SE	2,2 Gy 6t beh.		Gj. snitt	+/- SE
	1	2			1	2			1	2			1	2		
<b>G1</b>	39,0	39,8	<b>39,4</b>	<b>0,4</b>	38,4	39,5	<b>39,0</b>	<b>0,6</b>	28,6	36,6	<b>32,6</b>	<b>4,0</b>	8,1	12,5	<b>10,3</b>	<b>2,2</b>
<b>S</b>	40,5	40,1	<b>40,3</b>	<b>0,2</b>	32,3	35,8	<b>34,1</b>	<b>1,8</b>	23,6	23,2	<b>23,4</b>	<b>0,2</b>	11,6	12,3	<b>11,9</b>	<b>0,3</b>
<b>G2/M</b>	20,5	20,1	<b>20,3</b>	<b>0,2</b>	29,2	24,6	<b>26,9</b>	<b>2,3</b>	47,8	40,2	<b>44,0</b>	<b>3,8</b>	80,3	75,2	<b>77,7</b>	<b>2,5</b>

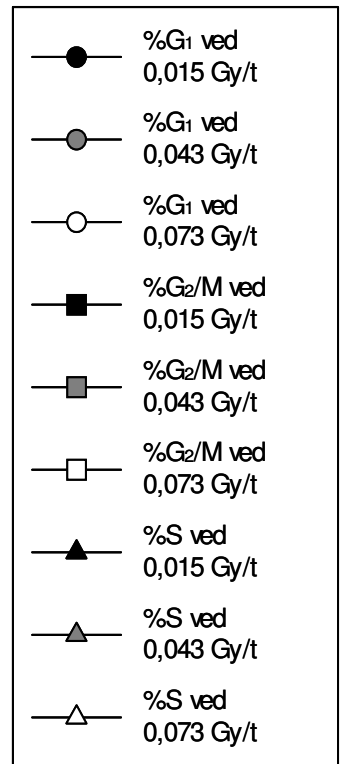
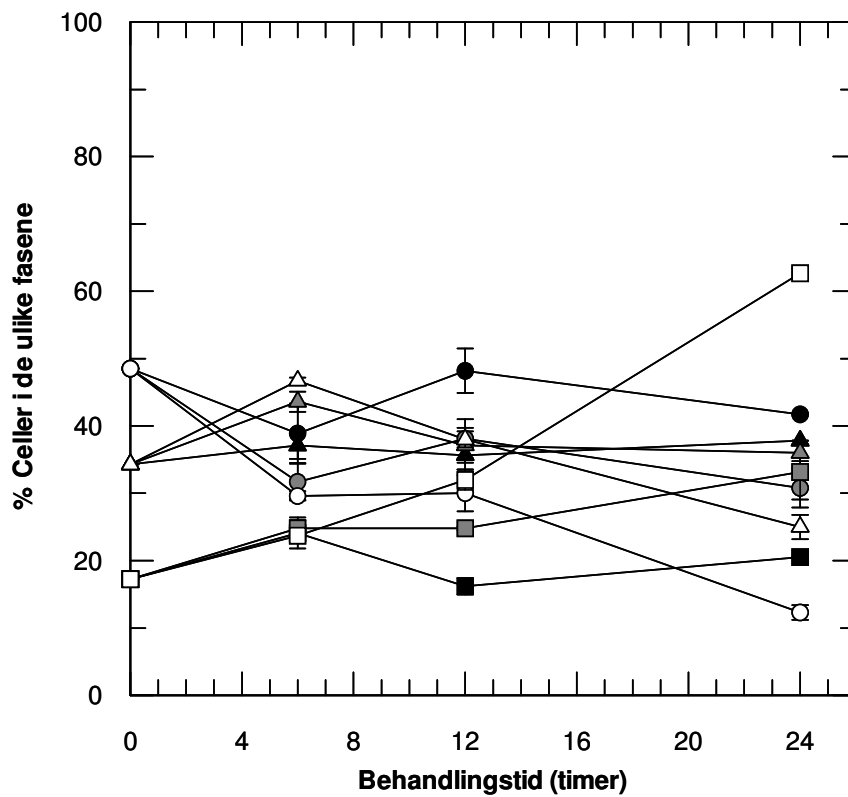
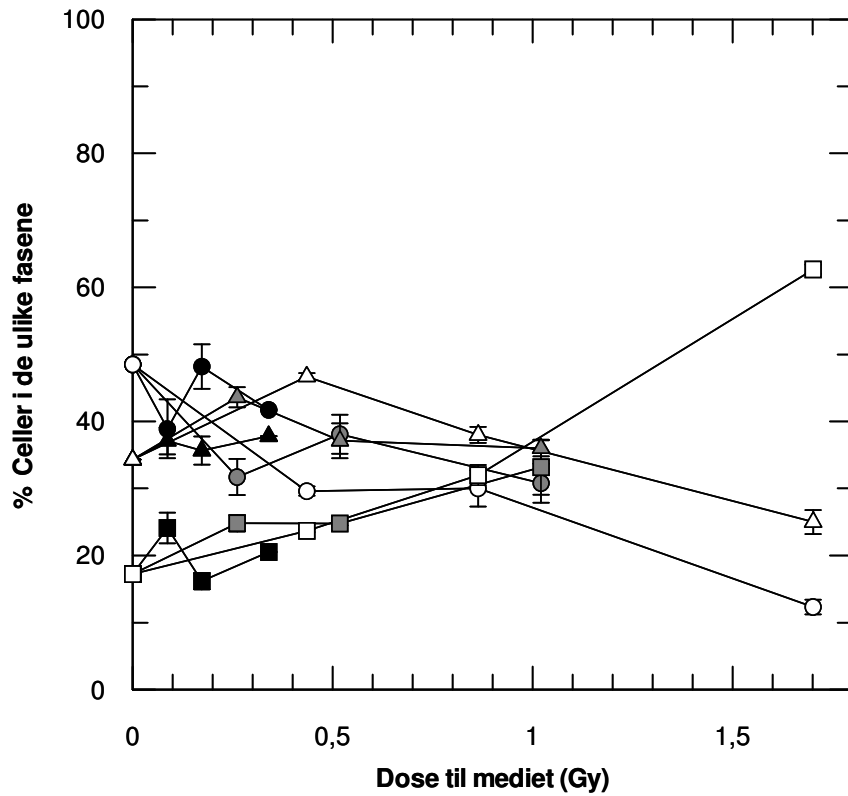
**Figur B.2:** Her vises prosentvis fordeling av NHIK 3025 celler i cellesyklus, rett etter behandling og 24 timer etter behandling for alle brukte doserater og alle cellesyklusfaser, som funksjon av dose og behandlingstid. Cellene ble behandlet med <sup>223</sup>Ra A) Fordelingen av celler i cellesyklus rett etter behandling mot tid og dose for doseratene 0,015-0,073 Gy/t. B) Fordelingen av celler i cellesyklus 24 timer etter avsluttet behandling mot tid og dose for doseratene 0,015-0,073 Gy/t. C) Fordelingen av celler i cellesyklus rett etter behandling mot tid og dose for doseratene 0,15-0,36 Gy/t. D) Fordelingen av celler i cellesyklus 24 timer etter avsluttet behandling mot tid og dose for doseratene 0,15-0,36 Gy/t.

**A**

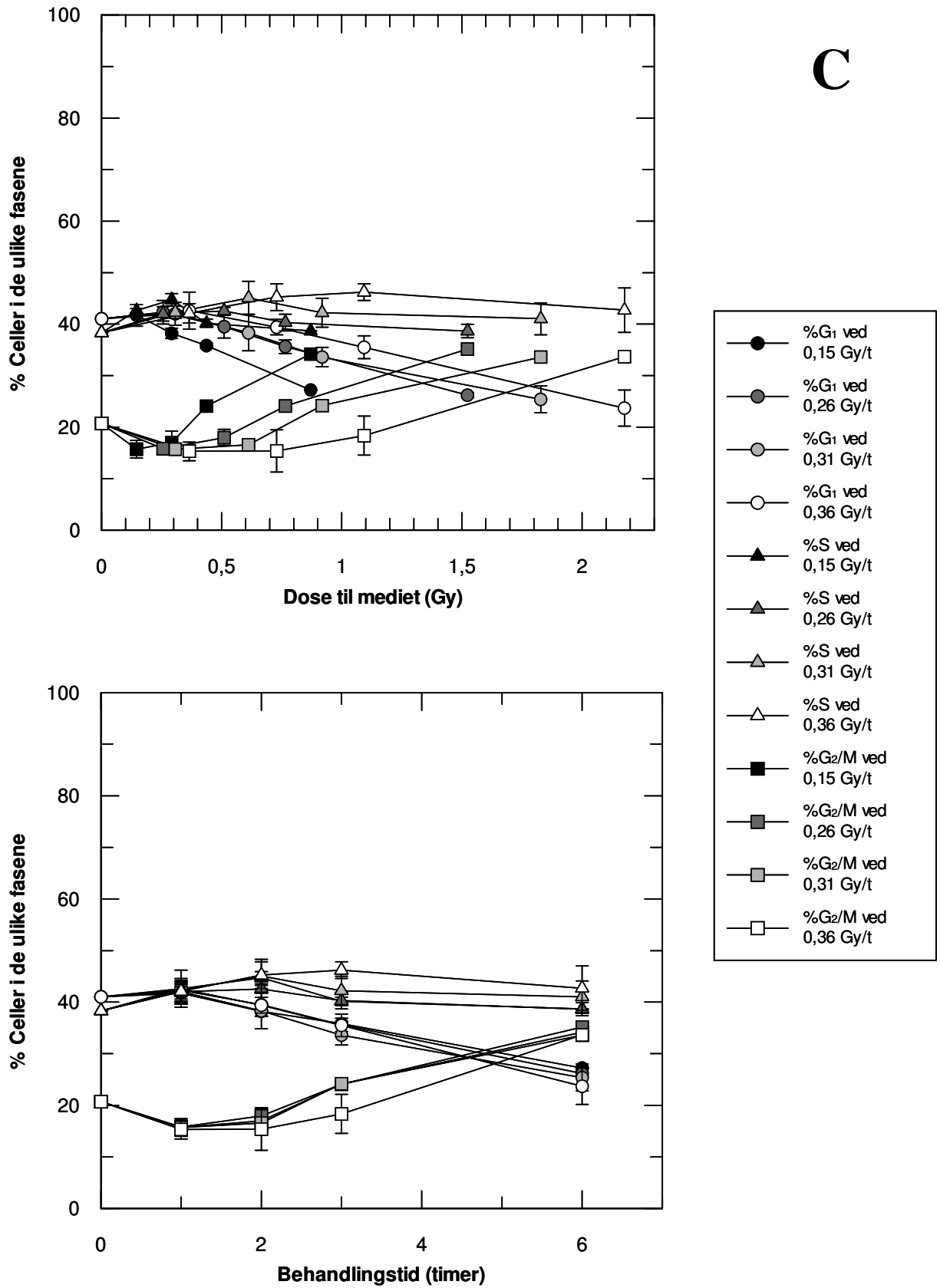




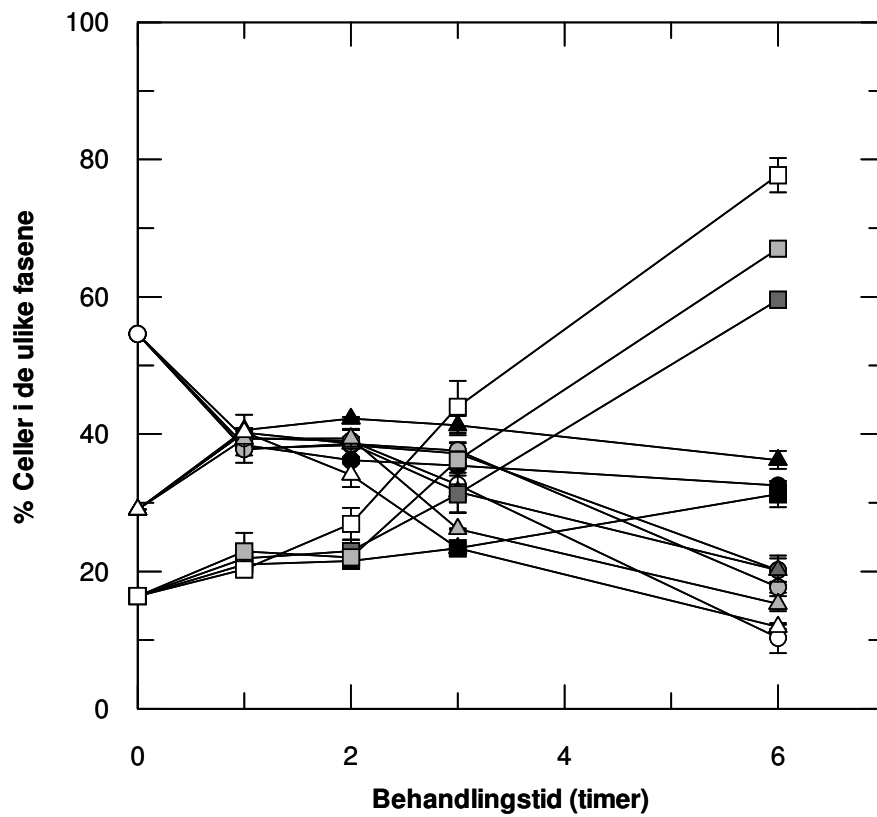
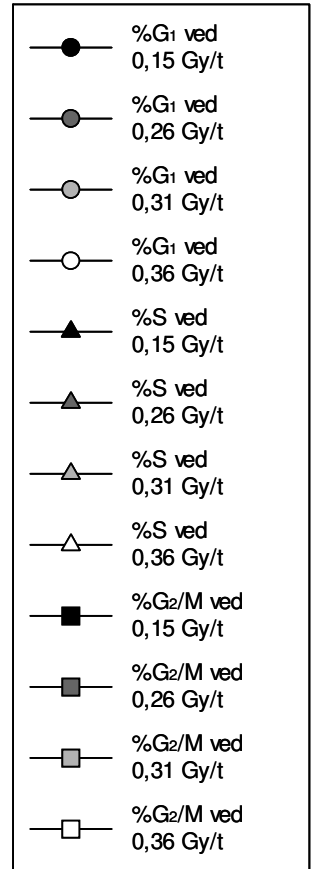
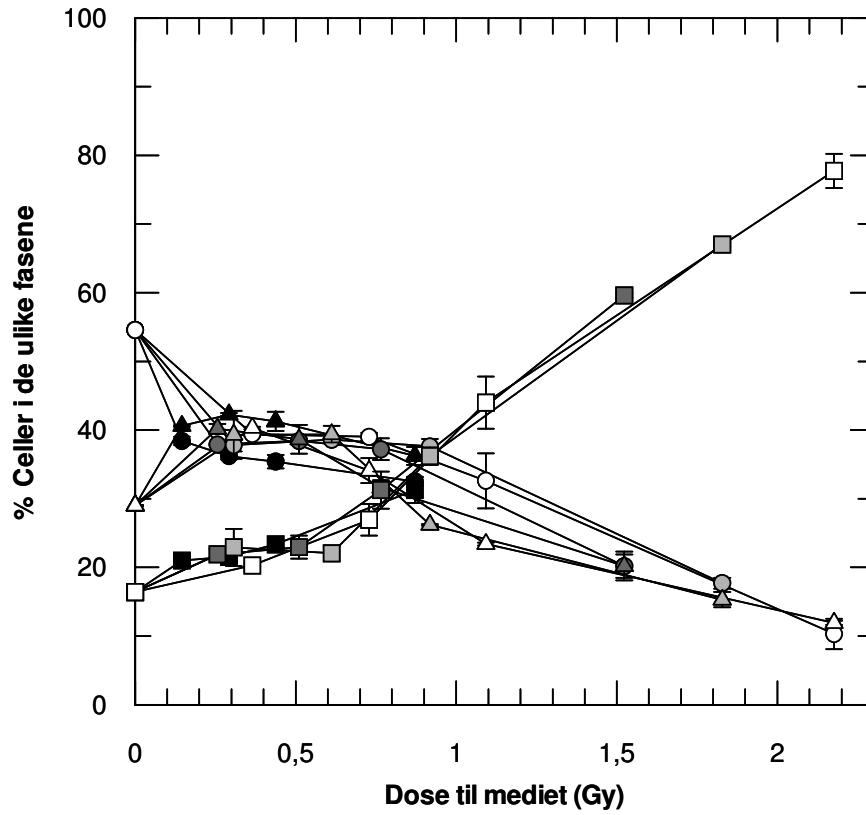
**B**



C



**D**

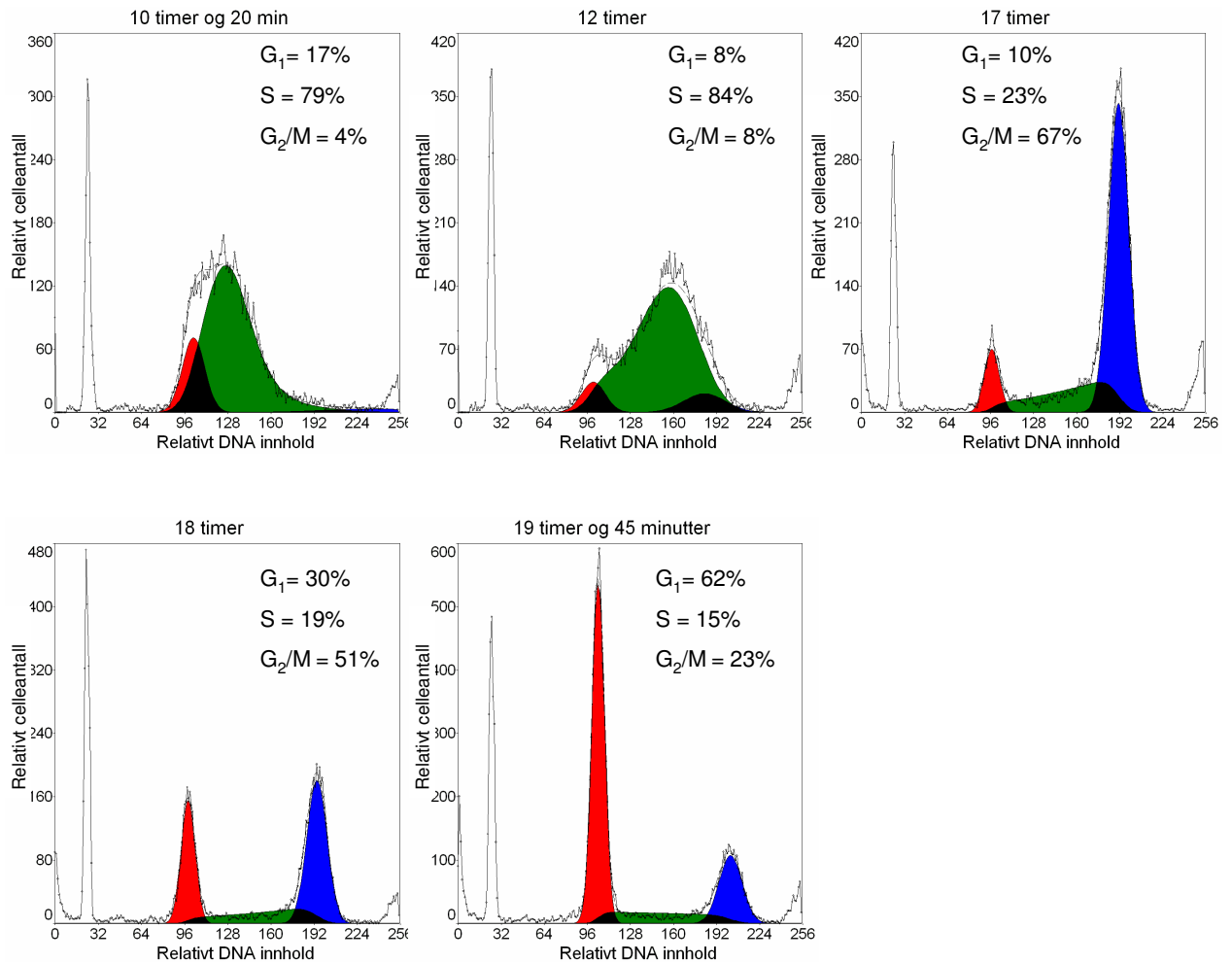




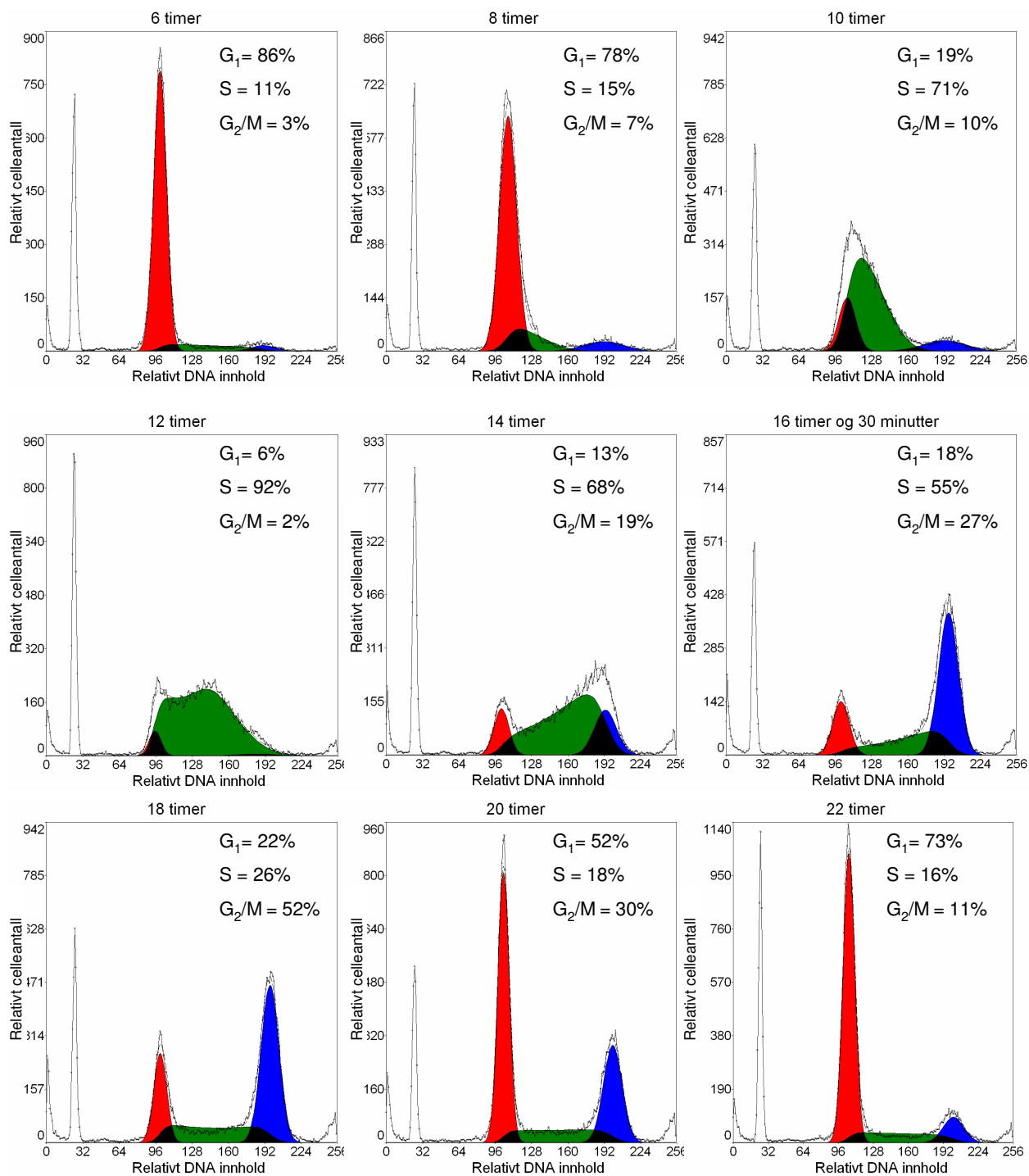
## Vedlegg C: DNA-histogrammer og rådata for alders-responsforsøk

### C.1 DNA-histogrammer

Her blir de resterende DNA-histogrammene fra synkroniseringsforsøkene vist. Figur C.1.1 viser DNA-histogrammene fra en testsynkronisering som ble utført for å finne den omtrentlige mediane cellesyklusliden. Figur C.1.2 viser DNA-histogrammene fra gjentagelsen av alders-respons forsøket som ble presentert i kapittel 4.3.3.



**Figur C.1.1:** DNA-histogrammer for testsynkronisering av NHIK 3025 celler. Histogrammene viser fordelingen av celler i cellesyklus ved tidspunktene 10 t 20 min, 12 t, 17 t, 18 t, 19 t 45 min etter synkronisering. Den mediane cellesyklusliden antas ut fra dette å være 19,5 timer.



**Figur C.1.2:** DNA-histogrammer for synkroniserte NHIK 3025 celler fra kontrollflaskene i alders-respons forsøk nr. 2. Histogrammene viser cellenes gang gjennom cellesyklus ved det ulike tidene etter synkronisering. Den mediane cellesyklusetid antas ut fra dette å være 20,5 timer.

## C.2 Rådata for alders-responskurve

Under, i tabell C.2.1 og C.2.2, vises rådataene fra koloniforsøkene knyttet til alders-responskurven. Overlevelsesfraksjonen og standardfeilen er korrigert for multiplisitet lik 2. I figur C.2A vises den prosentvise fordelingen av cellene i cellesyklus mot de ulike tidspunktene etter synkronisering for forsøk 1. I figur C.2B vises lignende fremstilling men for forsøk 2. Disse fremstillingene ble brukt for å finne cellenes mediane cellesyklusetid og lengden av de ulike fasene i de to uavhengige forsøkene. \*At overlevelsen er null i forsøk 1 ved 2,5 timer er mest sannsynligvis ikke reelt (se kapittel 5.2.4). Det er den gjennomsnittlige overlevelsesfraksjonen for kontrollprøvene som blir brukt som PE-korreksjon for de behandlede prøvene (fet skrift i tabell C.2.1 og C.2.2).

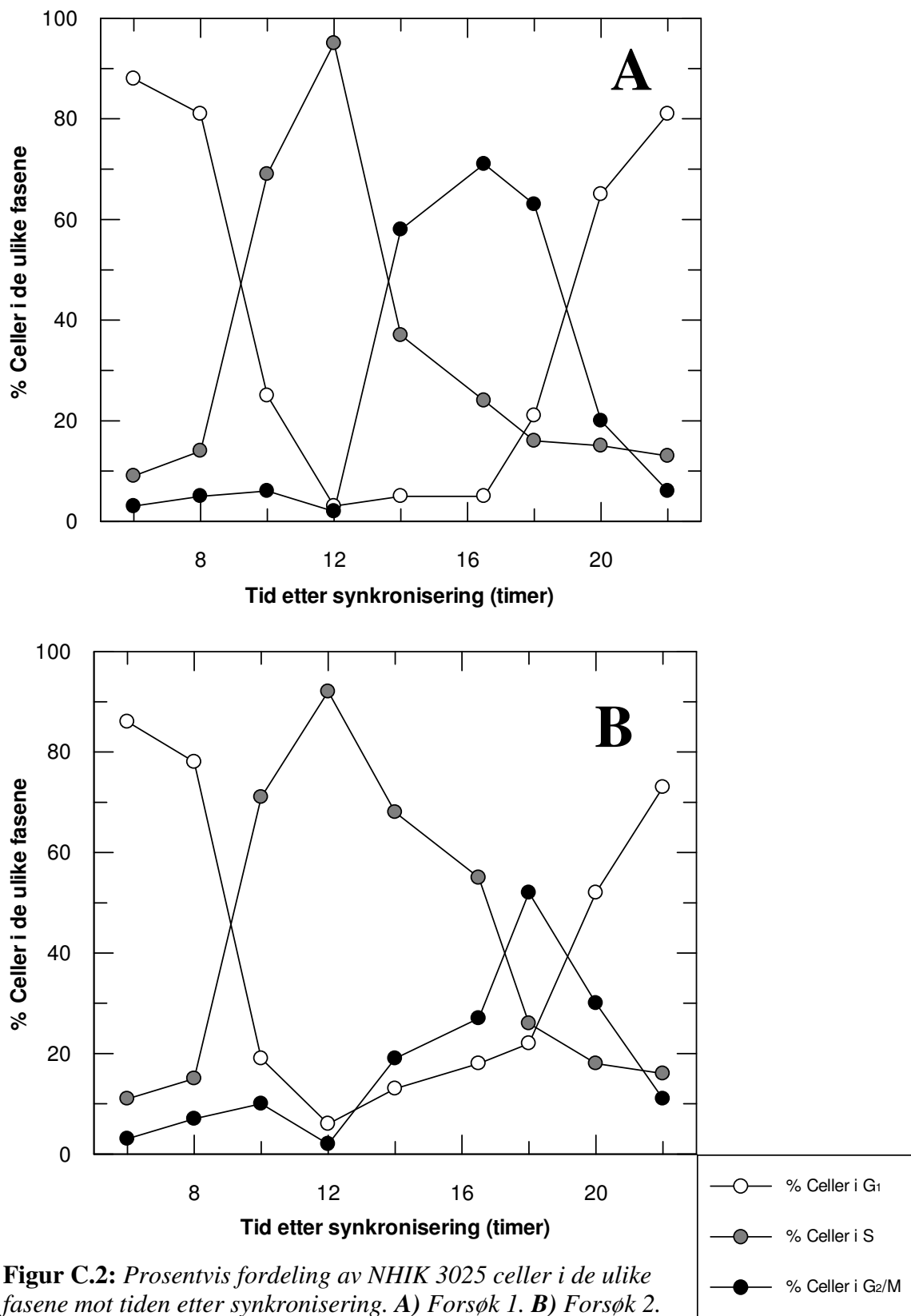
**Tabell C.2.1:** Koloniantall og beregnet SF og SE for alders-responskurven i figur 4.10A. Synkroniserte NHIK 3025 celler ble behandlet med <sup>223</sup>Ra ulike tider etter synkronisering.

Alders-respons 1	1	2	3	4	5	celler utsådd	Gj.snitt. celleantall	PE	SE_Gjnsnitt celleantall	SF	+/- SE SF	Korrigert SF	Korrigert +/-SE
Kontroll 2,5t	119	124	108	131	106	150	117,6	0,784	4,7				
Kontroll 6t	109	120	154	115	115	150	122,6	0,817	8,0				
Kontroll 10t	127	128	125	103	125	150	121,6	0,811	4,7				
Kontroll 14t	113	125	146	109	112	150	121,0	0,807	6,8				
<b>Gjennomsnitt kontroll</b>						<b>150</b>	<b>120,7</b>	<b>0,805</b>	<b>6,1</b>				
Dose: 0,8 Gy 2,5t *	0	0	0	0	0	500	0,0		0,0	0,000	0,000	0	0
Dose: 0,8 Gy 4t	104	89	97	79	70	500	87,8		6,1	0,218	0,019	0,116	0,009
Dose: 0,8 Gy 6t	120	134	134	140	132	500	132,0		3,3	0,328	0,018	0,180	0,009
Dose: 0,8 Gy 8t	147	159	142	132	160	500	148,0		5,3	0,368	0,023	0,205	0,011
Dose: 0,8 Gy 10t	167	176	168	153	161	500	165,0		3,8	0,410	0,023	0,232	0,011
Dose: 0,8 Gy 12t	159	178	190	181	198	500	181,2		6,6	0,450	0,028	0,258	0,014
Dose: 0,8 Gy 14t	136	141	148	130	153	500	141,6		4,1	0,352	0,020	0,195	0,010
Dose: 0,8 Gy 16,5t	128	134	142	131	146	500	136,2		3,4	0,339	0,019	0,187	0,010
Dose: 0,8 Gy 18t	150	154	182	151	139	500	155,2		7,2	0,386	0,026	0,216	0,013
Dose: 0,8 Gy 20t	170	186	208	168	195	500	185,4		7,6	0,461	0,030	0,266	0,015
Dose: 0,8 Gy 22t	180	195	178	163	182	500	179,6		5,1	0,446	0,026	0,256	0,013

**Tabell C.2.2:** Koloniantall og beregnet SF og SE for alders-responskurven i figur 4.10B. Synkroniserte NHIK 3025 celler ble behandlet med <sup>223</sup>Ra ulike tider etter synkronisering.

Alders-respons 2	1	2	3	4	5	celler utsådd	Gj.snitt. celle antall	PE	SE_Gjsnitt celleantall	SF	+/- SE SF	Korrigert SF	Korrigert +/-SE
Kontroll 2t	68	37	66	48	49	150	53,6	0,357	5,9				
Kontroll 6t	83	115	78	89	106	150	94,2	0,628	7,0				
Kontroll 10t	78	69	89	112	71	150	83,8	0,559	7,9				
Kontroll 14t	94	104	114	119	97	150	105,6	0,704	4,8				
<b>Gjennomsnitt kontroll</b>						<b>150</b>	<b>84,3</b>	<b>0,562</b>	<b>6,4</b>				
Dose: 0,8 Gy 2t	134	104	134	116	100	500	117,6		7,2	0,419	0,041	0,238	0,021
Dose: 0,8 Gy 4t	170	126	160	155	106	500	143,4		11,9	0,510	0,057	0,300	0,029
Dose: 0,8 Gy 6t	152	155	150	144	166	500	153,4		3,6	0,546	0,043	0,326	0,022
Dose: 0,8 Gy 8t	205	156	178	142	177	500	171,6		10,7	0,611	0,060	0,376	0,030
Dose: 0,8 Gy 10t	154	150	150	139	144	500	147,4		2,6	0,525	0,041	0,311	0,021
Dose: 0,8 Gy 12t	139	149	174	162	185	500	161,8		8,3	0,576	0,053	0,349	0,027
Dose: 0,8 Gy 14t	165	159	191	142	140	500	159,4		9,2	0,567	0,054	0,342	0,027
Dose: 0,8 Gy 16,5t	132	139	156	161	115	500	140,6		8,3	0,500	0,048	0,293	0,024
Dose: 0,8 Gy 18t	101	102	126	117	89	500	107,0		6,5	0,381	0,037	0,213	0,019
Dose: 0,8 Gy 20t	124	118	138	134	89	500	120,6		8,7	0,429	0,045	0,244	0,023
Dose: 0,8 Gy 22t	111	96	100	130	122	500	111,8		6,4	0,398	0,038	0,224	0,019







## Vedlegg D: Alternativer til koloniforsøk

### D.1 Fremgangsmåte

#### D.1.1 ATP-nivå i celler

Levende celler produserer som tidligere nevnt energibærere, ATP (kap 2.3). Utgangspunktet for forsøket var antagelsen at celledød som følge av alfapartikkelstråling fra  $^{223}\text{Ra}$  ville virke inn på cellens ATP-innhold, og at disse endringene ville være målbare. I dette forsøket ble ATPlite 1step (ATPlite 1step kit, PerkinElmer, Boston) brukt. Dette systemet er basert på at det produseres lys når ATP-molekylene i de levende cellene reagerer kjemisk med de tilførte stoffene luciferase og D-luciferin. Det utsendte lyset er proporsjonalt med ATP-konsentrasjonen i prøven. Lyset ble i dette forsøket detektert av en mikroplateleser (Wallac EnVision™ 2103 Multilabel Reader, PerkinElmer, Finland). Dette er en plattform for kvantitativ deteksjon av lysemitterende og lysabsorberende merkestoffer. For vårt forsøk ble apparatet bruk i luminescens modus. Her samles emisjonslyset som kommer fra prøven av optikken og blir rettet gjennom en spalte i speilmodulen. Dette reduserer effektivt overlapp av emittert lys fra de forskjellige brønnene. Filteroptikken guider lyset videre til fotokatoden og inn i fotomultiplikatoren. Fotonene blir talt i en bestemt tid og signalet blir lagret. For å etablere metoden ble noen innledende forsøk uten behandling utført. Dette fordi det var ønskelig å finne et celleantall som ville gi et godt signal. I tillegg var to typer plater tilgjengelig, svart og hvit. Vi ønsket å undersøke hvilken plate som ville gi oss best linearitet i signalet. Ulike celleantall ble sådd ut i et 96 brønns brett, og tilført vekstmedium slik at hver brønn inneholdt omtrent 200  $\mu\text{l}$  væske. Disse ble inkubert i to timer for festing. Videre ble mediet fjernet og vekstflaten vasket med PBS (fosfatbufret fysiologisk saltvannsoppløsning). ATPlite 1step systemet inneholdt to preparater. Det ble tilført 10 ml buffer til substratet og dette ble blandet i 5 min. 100  $\mu\text{l}$  av denne løsningen ble deretter tilført hver brønn. Videre ble platen ristet på en platerister med hastigheten 700 rpm i 2 min. Etter dette ble platen overført til plateleseren og analysert.

I behandlingsforsøkene ble et konstant antall celler sådd ut (25000) i en svart 96-brønnsplate. Disse ble inkubert til festing i to timer. Kilden ble i mellomtiden kalibrert, og et reservoar med Alpharadin™-medium ble gjort klart. Deretter ble ulike mengder av dette mediet tilført de ulike brønnrekkene slik at det ble fem ulike aktivitetskonsentrasjoner, 300 Bq/ml-5000Bq/ml. I tillegg var en rekke kontroll og en annen rekke blank, brønner uten celler og medium. Brønnrekkene inneholdt fem repetisjoner. Platen ble tilslutt satt i inkubatoren i 24 t. Etter denne tiden ble behandlingen avsluttet ved å fjerne mediet og vaske vekstflaten med 100  $\mu\text{l}$  PBS tre ganger. Deretter ble brønnene tilført 100  $\mu\text{l}$  av løsningen med buffer og substrat og ristet på plateristeren som beskrevet over. Brettet ble kjørt i plateleseren og signalstyrken ble plottet mot dosen i programmet "GraFit 5".

### D.1.2 Live/Dead

Live/Dead (Live/Dead viability cytotoxicity kit, Invitrogen, USA) merkestoffene gir en tofarget fluorescens som kan brukes i analyse av celleoverlevelse. I dette forsøket prøvde vi å bruke disse stoffene sammen med flowcytometeret for å se hvordan celleoverlevelsen er etter ulike doser av  $^{223}\text{Ra}$ . Det ene merkestoffene calcein AM tas opp av levende celler, og omdannes til calcein pga. esterase aktiviteten i disse cellene. Calcein gir en intens uniform grønn fluorescens, og levende celler kan derfor lett detekteres i et flowcytometer. Det andre merkestoffet ethidium homodimer-1 går inn i celler med ødelagte membraner, binder seg til nukleærstyrer og produserer rød fluorescens i døde celler. Levende celler vil ikke ha denne fluorescensen siden deres intakte cellemembran holder stoffet ute. For å innstille apparatet ble det først gjort innledende forsøk hvor vi farget døde celler (metanolfiksert) og levende celler. Levende celler ble plottet i et punktdiagram mot døde celler. Flowcytometeret ble forsøkt innstilt slik at vi fikk to separate populasjoner i punktdiagrammet. Videre ble et forsøk med behandlede celler utført. Her ble syv flasker (T25) med  $10^6$  celler i hver flaske sådd ut. Et Alphasarin<sup>TM</sup>-medium med en  $^{223}\text{Ra}$  konsentrasjon på 3000 Bq/ml ble tilført celleflaskene etter festing, og cellene ble inkubert med dette mediet i 24 t. Etter 24 t ble behandlingen av alle flaskene avsluttet ved vask av vekstflaten med Hanks' buffer. En behandlet flaske og en kontroll ble deretter trypsinert, mens de andre flaskene ble tilført rent medium og inkubert videre. Cellene ble sentrifugert og det ble laget en 80 gangers fortykning av calcein AM med DMSO (Dimethylsulfoxid, Fluka Chemika, Sveits). De to pelletene ble tilsatt noen ml PBS og resuspendert. Cellesuspensjonene ble deretter tilført 2  $\mu\text{l}$  av 50  $\mu\text{M}$  calcein AM løsningen og 4  $\mu\text{l}$  av 2 mM ethidium homodimer-1 per ml celsuspensjon. Dette ble kjørt på vortexmikseren noen sekunder og inkubert mørkt i 20 min. Etter inkubasjonstiden ble celleprøvene kjørt på flowcytometeret og ulike punktdiagram ble analysert. Behandlede flasker og tilhørende kontroller ble trypsinert og analysert på samme måte 24, 43,5 og 120 timer etter behandling.

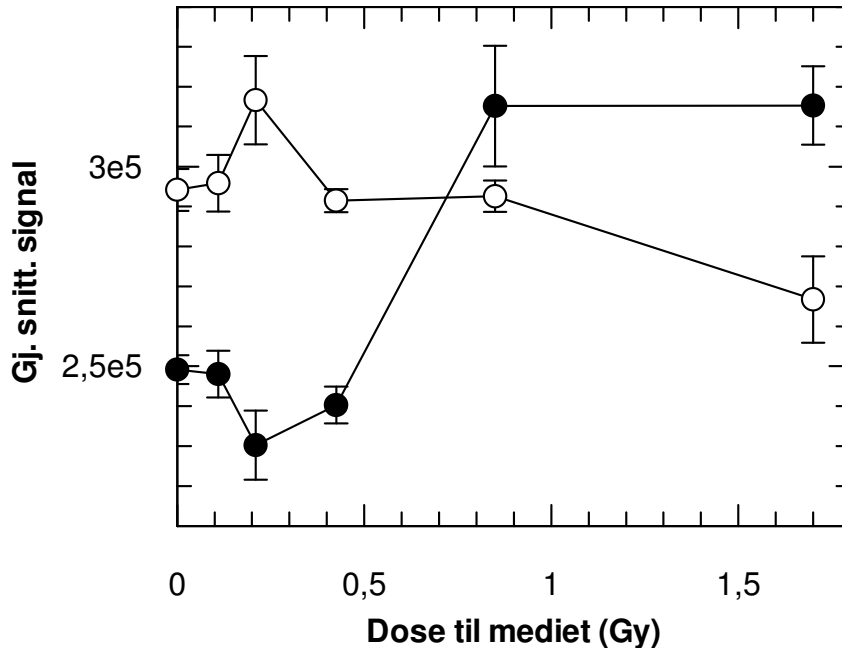
## D.2 Rådata for ATP-målinger av behandlede celler

**Tabell D.1:** ATP-signalverdier for figur D.1. Data fra to uavhengige forsøk. Alle verdier er fratrukket blank-verdien (kolonne 1, tom brønn).

<b>Forsøk 1</b>							
Dose (Gy)	0	0	0,11	0,21	0,43	0,85	1,7
Antall celler	0	25000	25000	25000	25000	25000	25000
SIGNAL (svart plate)	1	2	3	4	5	6	7
A	-308	261652	271124	219200	234344	268416	292960
B	196	244672	240336	250128	244352	330564	328684
C	196	241760	244184	227856	246240	328884	319316
D	76	245072	240872	248892	250956	353808	342596
E	-160	252684	243660	205216	225528	293980	292924
<b>Gjennomsnitt</b>	<b>0,0</b>	<b>249168,0</b>	<b>248035,2</b>	<b>230258,4</b>	<b>240284,0</b>	<b>315130,4</b>	<b>315296,0</b>
<b>Standardfeil</b>	<b>201,5</b>	<b>3606,1</b>	<b>5820,9</b>	<b>8652,1</b>	<b>4576,8</b>	<b>15087,9</b>	<b>9849,1</b>
<b>Forsøk 2</b>							
Dose (Gy)	0	0	0,11	0,21	0,43	0,85	1,7
Antall celler	0	25000	25000	25000	25000	25000	25000
SIGNAL (svart plate)	1	2	3	4	5	6	7
A	-479	291773	310649	325621	288513	300657	242565
B	221	308117	306197	349453	301137	295153	255629
C	313	304465	304781	323985	294213	283857	262985
D	189	283221	281509	291489	284153	282825	265461
E	-243	283077	276061	292565	289441	300441	306921
<b>Gjennomsnitt</b>	<b>0,0</b>	<b>294130,6</b>	<b>295839,4</b>	<b>316622,6</b>	<b>291491,4</b>	<b>292586,6</b>	<b>266712,2</b>
<b>Standardfeil</b>	<b>153,5</b>	<b>5240,1</b>	<b>7082,0</b>	<b>11007,9</b>	<b>2892,9</b>	<b>3904,5</b>	<b>10812,3</b>

### D.3 Resultater

I disse forsøkene ble det som nevnt i kapittel 3.6 prøvd ut noen potensielt raskere og enklere metoder for å måle celleoverlevelse av eksponensielt voksende NHIK 3025 celler. I første omgang prøvde vi å måle ATP-innholdet i et bestemt antall behandlede celler. Vi antok at mengden ATP i hver prøve kanskje ville reduseres ved økende dose pga. økt celledød som resultat av alfapartikkelstrålingen. Resultatene fra to uavhengige forsøk med standardfeil er vist i figur D.1. Prøvene er målt rett etter en behandling med doser rundt 0,1-1,7 Gy over 24 timer. Rådata ligger i vedlegg D.2.



**Figur D.1:** Gjennomsnittlig signal som er proporsjonalt med ATP-innholdet i NHIK 3025 cellene mot dose til mediet fra  $^{223}\text{Ra}$ . Hver kurve representerer ett enkelt forsøk med ulike doser gitt over 24 timer. (●) tilvarer forsøk 1, mens (○) tilsvare forsøk 2.

Det gjennomsnittlige signalet er proporsjonalt med ATP-innholdet i hver enkelt målt prøve. Disse kurvene viser ingen særlig sterk tendens til nedgang i ATP-innhold med høyere dose. Kanskje de derimot viser det helt motsatte, nemlig en økning i ATP-innholdet. Dette kan harmonere med det vi har sett ut fra DNA-histogrammene hvor vi ser at cellene ikke dør men heller arresteres i  $G_2/M$ -fasen hvor de blir til "kjempeceller" som ikke klarer å dele seg. En annen metode vi prøvde ut var Live/Dead farging og flowcytometri (se kapittel D.1.2). Her ble cellene behandlet med 1 Gy over 24 timer og undersøkt ved ulike tidspunkter etter denne behandlingen. Dette førte ikke noe særlig fram og vi endte opp med å konkludere at cellene ikke viste seg å dø selv 120 timer etter avsluttet behandling. Uansett viser disse to metodene at cellene ikke dør med det første, noe som også er observert i andre forsøk. En vet også fra teorien at celler som følge av DNA-skader dør en klonogenisk død, det vil si de mister evnen til å dele seg å danne kolonier. Koloniforsøkene viser seg nok derfor å fremdeles være "gullstandarden" med hensyn på å måle overlevelse etter strålingsskader.

## Vedlegg E: Kjemikalieliste

Nedenfor følger en alfabetisk liste over kjemikaliene benyttet i det eksperimentell arbeidet i denne masteroppgaven, med tilhørende produsent eller leverandør.

<b>Kjemikalie</b>	<b>Produsent/leverandør</b>
Advanced MEM	Invitrogen™, GIBCO (Storbritannia)
Alpharadin™ "Drug Product"	Institutt for energiteknikk (Norge)
Alpharadin™ "Drug Substance"	Algeta ASA (Norge)
ATP merkestoff, ATPlite 1step kit	PerkinElmer (USA)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Fluka Chemika (Sveits)
EDTA	Sigma-Aldrich (Tyskland)
Etanol Absolut 100 %	Arcus (Norge)
FCS (føtalt kalveserum)	Invitrogen™, GIBCO (Storbritannia)
Flow-Check™ Fluorospheres	Beckman Coulter (USA)
Hanks' buffer-HBSS	Invitrogen™, GIBCO (Storbritannia)
Hanks' buffer-HBSS	PAA (Tyskland)
L-glutamin	Invitrogen™, GIBCO (Storbritannia)
Live/Dead viability cytotoxicity kit	Invitrogen™ (USA)
MEM with Earle's salts	PAA (Tyskland)
Metylenblått	CROMA (Tyskland)
NaCl	Sigma-Aldrich (Tyskland)
Non-Essential Amino Acids	PAA (Tyskland)
PBS (fosfatbufret fysiologisk saltvannsoppløsning) (10×)	Invitrogen™, GIBCO (Storbritannia)
Penicillin (5000 units/ml) og Streptomycin (5000 µg/ml)	Invitrogen™, GIBCO (Storbritannia)
PI (propidiumjodid) Coulter DNA-prep Reagents Kit	Beckman Coulter (USA)
Røde blodceller fra ørret, DNA-Reference Calibrator	NPE Systems (USA)
Trypsin (2,5 g/L) med EDTA (0,38 g/L)	Invitrogen™, GIBCO (Storbritannia)





## Vedlegg F: Oppskrifter

### MEM Advanced

Per 570 ml MEM:

FCS	57 ml
Penicillin/Streptomycin	5,7 ml
L-glutamin	5,7 ml

### MEM Earles' salts

Per 570 ml MEM:

FCS	57 ml
Penicillin/Streptomycin	5,7 ml
Non essential amino-acids	5,7 ml

### 0,9 % NaCl-løsning i H<sub>2</sub>O

Per 500 ml løsning:

NaCl	4,5 g
Distiller van (H <sub>2</sub> O)	500 ml

Sterilfiltrert gjennom 0,22 µ-sterilfilter, Millipore.

### PBS (1×) fortynning

Per 500 ml løsning:

PBS (10×)	50 ml
Destillert vann (H <sub>2</sub> O)	450 ml

Sterilfiltrert gjennom 0,22 µ-sterilfilter, Millipore.

### PBS med 5 mM EDTA

Per 100 ml løsning:

EDTA-pulver	0,186 g
PBS (1×)	100 ml



## Vedlegg G: Radioaktivitet og beregning av dose

I det eksperimentelle arbeidet utført i denne masteroppgaven ble legemiddelet Alpharadin™ med det radioaktive virkestoffet radium-223 benyttet. Pga. denne ustabile nuklidens korte fysiske halveringstid (11,4 d) ble flere ulike batcher/produksjoner av dette legemiddelet benyttet gjennom oppgaven. Ulike mengder av Alpharadin™-løsning ble overført til MEM vekstmedium som cellene ble behandlet med. Flere ulike aktivitetskonsentrasjoner ble benyttet for å få en behandling med ulike doserater. Pga. radium-223s korte fysiske halveringstid ble Alpharadin™-mediene laget samme dag som cellene skulle behandles. For å illustrere hvordan Alpharadin™-mediene med ulike aktivitetskonsentrasjoner ble laget legges et eksempel frem her:

Kilden, Alpharadin™-løsningen, blir kalibrert til 1 MBq/ml i Capintec dosekalibrator.

Ønsker å lage 50 ml Alpharadin™-medium med aktivitetskonsentrasjonen 5000 Bq/ml.

Mengde Alpharadin™-løsning nødvendig:

$$\frac{\text{Ønsket aktivitetskonsentrasjon (Bq/ml)} \times \text{Ønsket mengde(ml)}}{\text{Alpharadin™-løsningen aktivitetskonsentrasjon (Bq/ml)}} = \frac{5000 \text{ Bq/ml} \times 50 \text{ ml}}{1000000 \text{ Bq/ml}} = 0,25 \text{ ml}$$

Derfor:

**50 ml med 5000Bq/ml: 0,25 ml Alpharadin™-løsningen + 49,75 ml MEM-medium.**

Etter tilsvarende oppskrift ble andre Alpharadin™-medium med andre aktivitetskonsentrasjoner laget.

For å beregne dosen i gray fra aktivitetsmengde gitt til systemet over behandlingstiden ble ligning 3.1 og 3.2 i kapittel 3.2.2 brukt. Resultatene fra doseberegningene ligger i tabell A.1 i vedlegg A. Et eksempel for beregningene som ble gjort følger. Vi antar at systemet får tilført Alpharadin™-medium med aktivitetskonsentrasjonen 5000 Bq/ml over 24 timer.

Antall decay over denne behandlingstiden:

$$\begin{aligned}
 x &= \int_0^{24} A_0 e^{-\lambda t} dt \\
 &= \left[ -\frac{A_0}{\lambda} e^{-\lambda t} \right]_0^{24} \quad \lambda = \frac{\ln(2)}{11,4d \cdot 24t \cdot 3600s} \\
 &= -\frac{5000}{7,04 \cdot 10^{-7}} e^{-7,04 \cdot 10^{-7} \cdot (24 \cdot 3600)} + \frac{5000}{7,04 \cdot 10^{-7}} \\
 &= 4,2 \cdot 10^8
 \end{aligned}$$

Dosen blir da:

$$\begin{aligned}
 D &= 0,9 \cdot \frac{E}{m} \cdot x \\
 &= 0,9 \cdot \frac{(28,2 \cdot 10^6) eV \cdot (1,6 \cdot 10^{-19} J / eV)}{0,001g} \cdot 4,2 \cdot 10^8 \\
 &= 1,7 \text{ Gy}
 \end{aligned}$$

Tilsvarende beregninger ble gjort for alle andre aktivitetskonsentrasjoner.



