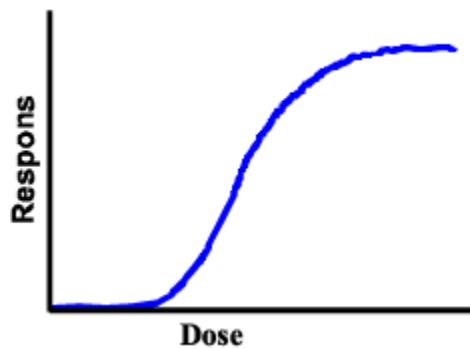


Et eksperimentelt studium av kreftceller fra livmorhals

- Strålesensitivitet, effektutvikling og cGMP nivåer

Mastergradsoppgave i farmakologi

av
Marit Livik



Institutt for medisinsk biologi
Farmakologisk avdeling
Universitetet i Tromsø

2008

FORORD

Dette mastergradsarbeidet ble utført ved Farmakologisk avdeling, Institutt for Medisinsk Biologi ved Universitetet i Tromsø i tidsrommet januar 2007 til juni 2008.

Jeg må begynne med å takke veilederen min Georg Sager for enestående veiledning! Alltid hjelpsom og veldig tollmodig, særlig når gjærsoppen vokste som tettest. Godt å få høre et og annet visdomsord om at det er i motgang det går oppover og så videre!

Jeg vil også takke Ragnhild Jæger for all hjelpen jeg har fått på laboratoriet! Og for advarselen jeg fikk før jeg startet opp arbeidet (om at celledyrkning kan by på problemer..).

Takk til Bjarne Johansen og Elin Ørvoll for gode råd og hjelp med celledyrkningen!

Takk til Bjørn Greve Moe for kjøringen av prøvene mine på flowcytometeret. Sporty gjort å stille opp, til og med på 2. pinsedag!

Takk til Turid Hellevik og Oddvar Spanne på stråleavdelingen for strålende arbeid og stort engasjement!

Takker også mamma Sigrun, pappa Bjørn og mine 3 søsken, Grete, Gunnar og Ingrid, for all støtte og oppmuntring under hele studiet!

I løpet av årene som student har jeg ikke bare fått mye kunnskap, mange studiepoeng og mye studielån, men også mange gode venner! Det er vel best å si ingen nevnt, ingen glemt. Men jeg vil gi en spesiell takk til ei spesiell venninne, nemlig ”tvillingsøstra mi”, ho Maja! Så får vi se om det blir noe av firmaet vårt, Livik & Linchhausen, en gang i framtiden!

Til slutt sendes en stor takk sørover til en ingeniør på Fosen Mek. som gjør meg veldig glad!

SAMMENDRAG

I denne oppgaven ble strålesensitiviteten til cellelinjen C4-I undersøkt. Cellene ble bestrålt med dosene 2, 4, 8 og 12 Gy. Effektene av stråling på celletetthet, cellyklus, celledød og ekstracellulære konsentrasjoner av cGMP ble studert 1, 3 og 6 døgn etter behandling. Man fant at det var konsentrasjonsavhengige og tidsavhengige effekter av stråling på cellene. Den inhibitoriske dosen som gir en reduksjon i celletetthet på 50 %, ID_{50} verdien, ble også bestemt. Det syntes som at denne verdien stabiliserte seg etter 3 døgn ($ID_{50} = 2,8$), og etter 6 døgn ($ID_{50} = 3,2$) var den fortsatt på samme nivå. I andre studier har cGMP blitt studert som en mulig prognostisk markør i behandling av kreftceller fra livmorhals. Man ville i denne oppgaven se om den ekstracellulære konsentrasjonen av cGMP endrer seg i en akutt fase (kort tid etter strålebehandling). Man fant en økning av cGMP i denne fasen når konsentrasjonen ble relatert til celletall.

FORKORTELSESLISTE

Cdk - cyclin avhengig kinase

MAPK - mitogen assosiert protein kinase

Rb - retinoblastom protein

ATM - ataxia telangiectasia mutasjon

TNF - tumor nekrotisk faktor

MPT - mitochondrial permeability transition

PS - fosfatidilserine

ROS - reaktive oksygen radikaler

JC-1 - JC-1(5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'- tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide

HPV - humant papilloma virus

VEGF – vaskulær endotel vekstfaktor

EBRT – external- beam radiotherapy

DSB - double-strand break

GC - guanylat cyclase

ANP - atrielt natriuretisk polypeptid

PKA - cAMP avhengig protein kinase

PKG - cGMP avhengig protein kinase

PDE - fosfodiesterase

ABC - ATP- binding cassette

MRP – multidrug resistance protein

iNOS - induserbar nitrogen monoksid syntase

FCM - flowcytometri

FSC - forward scatter

SSC - side scatter

RIA - radioimmunoassay

ID₅₀ - inhibitorisk dose som gir 50 % reduksjon i celletetthet

PI - propidiumiodid

TCA – trikloreddiksyre

FORORD	1
SAMMENDRAG	2
FORKORTELSESLISTE	3
1. INTRODUKSJON	9
1.1. Bakgrunn.....	9
1.2. Hypotese	9
1.3. Problemstilling.....	9
1.4. Regulering av vekst	10
1.4.1. Cellesyklus.....	11
1.4.2. Celledød.....	14
Apoptose	14
Nekrose	16
1.5. Kreftcellers egenskaper i forhold til normale celler	18
1.6. Utvikling av kreft – karsinogenese.....	19
1.7. Livmorhalskreft.....	23
1.7.1. Vekst og spredning	23
1.7.2. Stadieninndeling	24
1.7.3. Utbredelse og prognose	25
1.7.4. Behandling	26
1.8. Stråling	26
1.8.1. Strålefysikk	26
1.8.2. Biologiske effekter av stråling.....	27
1.8.3. Strålebehandling	28
1.8.4. Strålebehandling av cervix cancer ved UNN (Universitetssykehuset Nord Norge)	29
1.8.5. Fraksjonert strålebehandling.....	30

1.9. Signalmolekylet cGMP og dets virkninger	31
1.10. Transport av cGMP	34
1.11. Utskillelse av cGMP i urin	34
1.12. Behandlingsresistens	36
2. MATERIALE OG METODER.....	38
2.1. Teoretisk metodebakgrunn.....	38
2.1.1. Dyrking av celler i kultur.....	38
Dyrkningsforhold.....	38
Cellevekst og grafisk framstilling i vekstkurver	39
Matematisk framstilling av cellevekst	40
Trypsinering av celler	41
2.1.2. Flowcytometri (FCM).....	41
Fluorescens	42
Lysspredning.....	42
2.1.3. Måling av cellulært DNA	43
2.1.4. Måling av apoptose.....	45
2.1.5. Måling av cGMP.....	47
2.1.6. ID ₅₀ verdi.....	48
2.2. Anvendt materiale og metoder	49
2.2.1. Reagenser og kommersielle kit.....	49
2.2.2. Medium.....	49
2.2.3. Celledyrkningsutstyr.....	50
2.2.4. Buffer.....	50
2.2.5. Cellelinjen.....	51
2.2.6. Metodeproblematikk	51
Vekst av gjærsopp i cellekultur.....	51
2.2.7. Deskriptiv statistikk	54
2.2.8. Måling av ekstracellulær konsentrasjon av cGMP.....	55
Prosedyre for [³ H]-cGMP assay.....	55
2.2.9. Måling av DNA innhold	56
Prosedyre for PI-farging av DNA og Cycle Test	56

2.2.10. Måling av apoptose.....	57
Prosedyre for JC-1 farging og måling av mitokondrielt transmembran potensial.....	57
2.2.11. Celledyrking (vekstegenskap-forsøk).....	57
2.2.12. Celletelling.....	59
2.2.13. Tillaging av vekstkurvene.....	59
2.2.14. Utregning av doblingstiden t_2	60
2.2.15. Celledyrkning (stråleforsøk).....	60
2.2.16. Transport mellom celledyrkningslaboratorium og stråleavdeling.....	61
2.2.17. Stråling.....	62
2.2.18. Morfologi.....	62
2.2.19. Syklisk GMP.....	62
2.2.20. Trypsinering.....	63
2.2.21. Høsting.....	63
2.3. Protokoller	64
2.3.1. PROTOKOLL RIA.....	64
2.3.2. PROTOKOLL Cycle Test	65
2.3.3. PROTOKOLL JC-1	66
3. RESULTATER.....	67
3.1. Cellelinjens vekstegenskaper	67
Vekstkurver for C4-I celler	69
3.2. Strålebehandling av kreftcellene	69
3.2.1. Tidskurver etter stråling.....	71
3.2.2. Dose-respons.....	74
3.2.3. ID ₅₀ verdi	74
3.2.4. Apoptose etter stråling	76
3.2.5. Cellesyklus etter stråling.....	77
3.2.6. Cellekonsentrasjoner etter stråling.....	81
3.2.7. Cellemorfologi etter stråling.....	82
3.2.8. Syklisk GMP etter stråling.....	85
4. DISKUSJON	87
4.1. Cellelinjens egenskaper	87

Veksthastighet.....	87
Kromosominnhold	87
4.2. Strålingseffekter	88
4.2.1. Effekter av stråling på cellevekst.....	88
4.2.2. Effekter av stråling på cellesyklus.....	90
4.2.3. Effekter av stråling på cellenes kromosominnhold.....	91
4.2.4. Effekter av stråling på celledød	92
4.2.5. Cellemorfologi.....	93
4.2.6. Effekt av stråling på den ekstracellulære konsentrasjonen av cGMP	94
4.3. Forskjell på stråling av cellekulturer in vitro og klinisk strålebehandling av pasienter	95
4.4. Konklusjon	96
4.5. Framtidige studier	97
REFERANSER	98

1. INTRODUKSJON

1.1. Bakgrunn

Livmorhalskreft (cancer cervicis uteri) er en gynekologisk krefttype, og utgår fra cellelag i livmormunnen eller livmorhalskanalen. Man skiller mellom to typer karsinom, avhengig av hvilke type celler tumor stammer fra. Plateepitelkarsinom og adenokarsinom fra henholdsvis plateepitelceller og kjertelceller i livmorhals. Denne sykdommen behandles med kirurgi, stråling og cellegift (cytostatika). Hvilken type behandling som blir gitt bestemmes av blant annet hvor langt kreftsykdommen har utviklet seg (hvilket stadium), alder på pasient og fertilitet. Som med alle andre former for kreft så er tidlig diagnose og god behandling helt avgjørende for overlevelse.

1.2. Hypotese

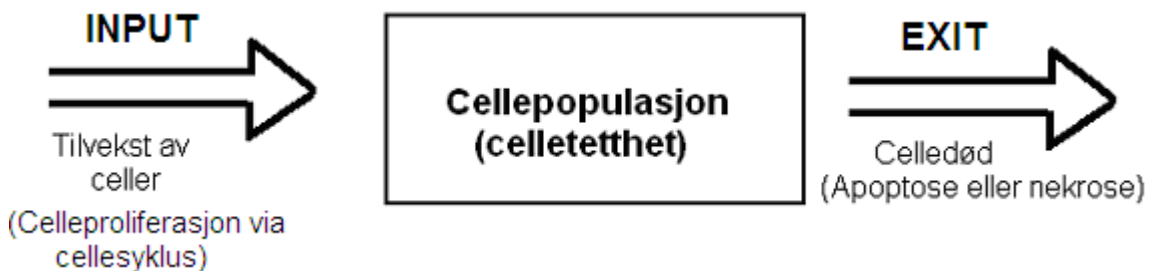
Hypotesen i denne oppgaven er at stråling gir en doseavhengig og tidsavhengig celletetthetsreduksjon, og at dette kan påvirke konsentrasjonen av cGMP i ekstracellulærvæske.

1.3. Problemstilling

Kreftceller skal bestråles med ulike doser gammastråling, og effektene av stråling på flere ulike parametere skal studeres. Cellene som skal benyttes i forsøkene er cancer celler fra et plateepitelkarsinom fra cervix fra ei hvit kvinne. Cellelinjen heter C4-I og har en gjennomsnittelig doblingshastighet på 38 til 47 timer, avhengig av hvilken celletetthet de sås ut med [1]. Effekten av stråling på celleoverlevelse skal undersøkes. Det sier noe om cellenes strålesensitivitet, og i denne oppgaven skal det uttrykkes i dose-responskurver for å se hvordan cellekonsentrasjonen endrer seg med stråledosene. Antall overlevende

celler, cellekonsentrasjonen, skal telles ved å bruke tellekammer og trypanblå. Tidsperspektivet er også viktig i denne sammenhengen for å se på eventuelle effekter som strålingen har på cellene til ulike tidspunkt etter strålebehandlingen. Det er fordi at effekten av stråling på kreftceller ikke inntreffer med det samme. Celleoverlevelsen blir derfor undersøkt dag 1, 3 og 6 etter behandling. Celler som stråles med ioniserende stråling kan enten fortsette å dele seg, de kan dø på forskjellige måter, eller de kan miste muligheten til å kunne fortsette å dele seg. For å få et mer helhetlig bilde av cellenes strålesensitivitet skal celledød og distribusjon av celler i de forskjellige fasene av cellesyklus også studeres, i tillegg til celleoverlevelse. I denne oppgaven skal det også karakteriseres hvordan ulike stråledoser påvirker den ekstracellulære konsentrasjonen av cGMP per celle kort tid etter stråling for å finne en eventuell akutt effekt. Cellenes morfologi etter stråling skal også undersøkes.

1.4. Regulering av vekst



Figur 1: To variabler som påvirker celletetthet. Celleproliferasjon via cellesyklus står for input til cellepopulasjonen mens celledød står for exit ut av cellepopulasjonen.

Regulering av celletetthet i vev, så vel som i kultursystem, endres ved at det skjer en variasjon i hvor mange celler som kommer inn i systemet og hvor mange celler som går ut av systemet. Dette kan beskrives med følgende ligning: $[C_T] = [C_{inn}] - [C_{ut}]$ der $[C_T]$ står for den totale celletettheten, $[C_{inn}]$ står for tilvekst av celler og $[C_{ut}]$ står for celledød. Dette er et dynamisk system der celler enten er levende, er døde, eller er

levende men ikke i stand til å dele seg. Ut i fra ligningen kan den totale celletettheten defineres som det totale antallet levende celler, ettersom døde celler blir beskrevet som celler som forlater systemet. Dette modellsystemet har 3 ulike utfall for hvordan antall celler kan endres.

- 1) Økning i antall celler i de tilfeller der tilvekst av celler er større enn celledød.
- 2) Reduksjon i antall celler i de tilfeller der tilvekst av celler er mindre enn celledød.
- 3) Konstant antall celler i de tilfeller der tilvekst er lik celledød.

1.4.1. Cellesyklus

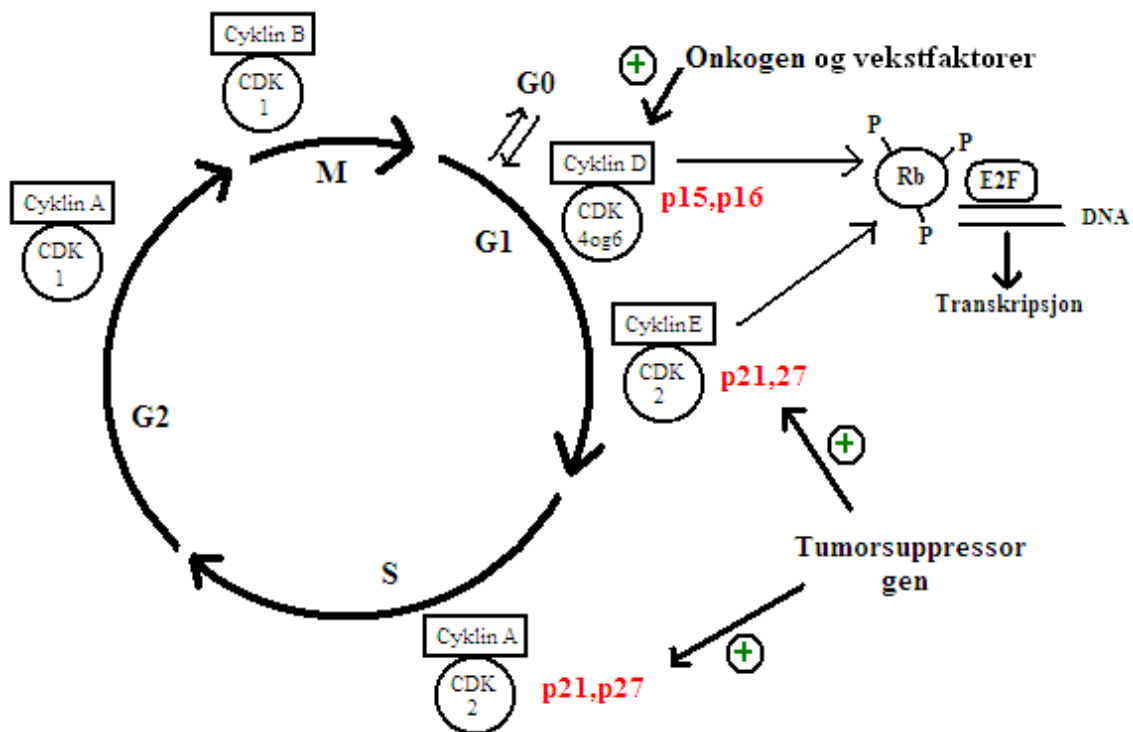
Ei celle sin delingssyklus består av fire ulike faser. En fase der DNA molekylet replikeres (DNA syntese), S-fasen, en fase der cella deler seg ved mitose, M-fasen, og to faser som ligger mellom disse der cella klargjøres for DNA syntese og mitose, henholdsvis G1 og G2 fasen. Reguleringen og framdriften til cellesyklusen avhenger av aktiviteten til en gruppe proteiner som kalles cdk (cyclin avhengige kinaser), mengden av koenzymet cyclin og cdk-inhibitorer. I cellene skjer det en syklisk syntese og degradering av cyclin, og det varierende nivået av cyclin regulerer aktiviteten til cdk. Dette er med på å drive cellesyklusen framover. Cyclin er et aktiverende koenzym som binder cdk. Disse cdk-cyklinkompleksene stimulerer cellene til å passere forskjellige sjekkpunkter (kontrollposter) i cellesyklusen og dermed blir resultatet cellevekst. Det som regulerer celleveksten er feedback fra cellas indre og ytre miljø, der alle typer stimuliformer tilslutt resulterer i en aktivering av enten fosfataser eller kinaser. Denne vekstkontrollen kan grovt deles inn i faktorer som bidrar til økt celledeling, onkogener og vekstfaktorer, og faktorer som bidrar til redusert cellevekst, celledød (apoptose) og tumorsuppressor gener. Sjekkpunktene i cellesyklusen skal normalt hindre celler i å dele seg hvis ikke omstendighetene ligger til rette for det. Dette innebærer at celledødsfaktorer, næring, vekstfaktorer og DNA ødeleggelse må sjekkes og klareres før cellen får fullføre syklusen. Hvis det blir funnet feil i kontrollpostene vil cella gå i arrest, en fase der det ikke foregår noen deling. Denne stoppen i cellesyklusen gir cellene tid til eventuell reparasjon av skader på DNA molekylet, eller cella må avvente i arresten til det blir

tilstrekkelig ytre stimulering fra vekstfaktorer. En annen viktig oppgave som sjekkpunktene har er at de skal sørge for at cella får avsluttet en fase fullstendig før den går over til neste. Det er to hovedsjekkpunkt i cellesyklusen, og de befinner seg i slutten av G1 og G2 fasen.

Vekstfaktorer er ekstracellulære signalproteiner som er med på å regulere celledeling. I normalsituasjon må det være vekstfaktorer til stedet for at cella skal kunne passere fra G1 til S fasen i syklusen. Signaltransduksjonen starter med at en vekstfaktor binder på utsiden av cella til en tyrosin-kinase reseptor. Dette fører til en fosforylering av reseptorens tyrosinresidu, som befinner seg på innsiden av cellemembran, og resultatet blir at G-proteinet Ras, som i inaktiv tilstand er bundet til GDP, binder til GTP. Ras-GTP komplekset binder og aktiverer proteinkinase Raf. Raf fosforylerer MEK, og fosforylert MEK fosforylerer MAPK (mitogen assosiert protein kinase). Denne aktiverte kinasen går deretter inn i cellas kjerne og fosforylerer transkripsjonsfaktorer. Resultatet blir at gener som er nødvendig for celleproliferasjon blir uttrykt.

Det finnes ulike cdk molekyler i de forskjellige fasene av cellesyklusen, og de binder til ulike cyklinenzymmer. For at cellen skal kunne gå inn i G1 fasen må cyklin D binde til Cdk 4 og 6. Forutsetningen for at cyklin D skal kunne binde er at det må være vekstfaktorstimulering til stedet. Onkogenstimulering av cellevekst skjer også i dette trinnet. Overgangen fra G1 til S fasen stimuleres av at cyklin E binder til cdk 2. I G1 fasen er også cdk inhibitorer viktig, og som navnet beskriver så hemmer de altså cdk molekylerne. Cdk 4 og 6 molekylerne hemmes av blant annet p15, p16 og p19. Mens cdk 2 hemmes av p21 og p27. Tumorsuppressor proteinet Rb (retinoblastom) er avgjørende for om cella kan entre S fasen eller ikke. I aktiv form hindrer den cella i å forlate G1 fasen, men hvis forholdene ligger til rette for at cella kan syntetisere DNA blir Rb inaktivert (fosforylert) av begge cdk-cyklinkompleksene. Fosforyleringen gjør at bindingen mellom Rb og transkripsjonsfaktoren E2F brytes, og E2F binder i stedet DNA og dermed settes transkripsjon av gener i gang. Cella blir på denne måten klargjort til å gå inn i S fasen. Tumorsuppressor proteinet p53 virker også som en bremse som skal hindre at celler går videre i cellesyklus før de er klare for det. Dette proteinet virker ved at det stimulerer cdk

inhibitoren p21, og dermed hemmes cdk-cyklinkomplekset og syklusen stopper opp. I S fasen er cdk 2 bundet til cyklin A, og denne bindingen fører til syklusprogresjon. Cdk 2 blir, også her, hemmet av p21 og p27, og p53 stimulerer denne inhiberingen. I G2 fasen finnes komplekset cdk 1-cyklin A, og et aktivt kompleks lar cellene passere sjekkpunktet i denne fasen. Cdk-cyklin komplekset kan inhiberes via et protein som kalles ATM (ataxia telangiectasia mutasjon). Hvis ATM stimuleres, ved for eksempel DNA skade, så dannes ikke G2 komplekset, og cella får ikke lov til å dele seg. Resultatet kan enten bli apoptose eller celledarrest. M fasen styres av cdk 1-cyklin B [2].



Figur 2: Cellesyklus og regulerende faktorer. Figuren er inspirert av [2]. Forklaring av figuren står i avsnittet over.

Det finnes målemetoder for å studere cellesyklus. Se teori om flowcytometri og cycle test.

1.4.2. Celledød

Apoptose

Det er helt avgjørende at antall celler i en organisme blir nøye regulert. Dette kan oppnås både ved å kontrollere celledeling men også celledød. I et ferdigvokst og ferdigutviklet vev så balanserer celledøden celledelingen. Hvis ikke dette er tilfelle vil vevet enten vokse seg større eller bli mindre. Celler kan dø på flere ulike måter, og disse prosessene kan være ukontrollerte eller mer eller mindre kontrollerte. Apoptose er en form for kontrollert eller programmert celledød. Andre former for programmert celledød kan være mitotisk celledød og autofagi (les mer under ”biologiske effekter av stråling”). Signalet om at cellen skal dø kan enten komme fra cellens utside eller innside. Felles for de forskjellige signalmekanismene er at en gruppe proteiner blir aktivert, og at disse proteinene utfører proteolytisk degradering i cella som fører til karakteristiske morfologiske endringer. Cella krymper, det dannes bobler på membranen (blebbing), DNA molekylet fragmenteres og det blir en kondensering av kjernen [3]. Etter hvert blir cella omdannet til vesikler, som blir fagocyttert av naboceller eller makrofager. Fagocytteringen forhindrer at den døde cellens innhold frigjøres, og det blir derfor ingen inflammatorisk respons i omkringliggende område eller skade på naboceller. Proteinene som aktiveres i dødsprosessen kalles caspaser. Caspaser er cystein proteaser, som er proteolytiske enzymer med cystein i det aktive setet, og som kløyver substratene spesifikt ved aminosyren asparginsyre. Caspasene syntetiseres som inaktive procaspaser inne i cella og er derfor avhengig av å bli aktivert. Som nevnt ovenfor kan aktiveringssignalet enten komme fra utsiden eller innsiden av cella, henholdsvis extrinsic og intrinsic pathway. Ute på cellemembranen sitter det dødsreseptorer (TNF og Fas) som overfører signal fra ligander som binder. Reseptorene aktiverer adapter molekyler inne i cella, som i sin tur aktiverer procaspasene. Når signalet om å dø kommer fra cellens innside er det ofte på grunn av skade på for eksempel DNA molekylet. I intrinsic pathway står mitokondriene sentralt. Resultatet er at permeabiliteten til den indre

mitokondriemembranen endres, og cytokrom c frigjøres ut i cytosol. Det er cytokrom c som aktiverer adapter molekylet som Apaf-1. Apaf-1 binder og aktiverer caspaser. De aktive caspasene kløyver andre procaspaser, og det settes i gang en proteolytisk kaskade.

Andre proteiner som er viktig for regulering og utførelse av apoptose er Bcl-2. Dette er en gruppe proteiner som enten kan være positive eller negative regulatorer av apoptose. Bcl-X_L og Bcl-2 er anti-apoptotiske proteiner mens Bax, Bak, Bad og Bid er eksempler på pro-apoptotiske proteiner [4]. Det er foreslått at apoptose kan hemmes ved at anti-apoptotiske proteiner hindrer frigjøring av cytokrom c fra mitokondriet [5], eller at Bcl-X_L binder til Apaf-1 og dermed forhindrer dette adapter molekylet i å aktivere og sette i gang caspase kaskaden [4]. Noen pro-apoptotiske proteiner virker ved at de stimulerer mitokondriene til frigjøring av cytokrom c [5].

Apoptoseprosessen krever energi i form av ATP. Etter at cytokrom c er frigjort fra mitokondriene binder det til Apaf-1, men for at dette molekylet skal kunne aktiveres må også ATP binde. Det må dannes et apoptosom, som består av Apaf-1, ATP og cytokrom c. Apoptosomet binder dermed procaspasen og kløyver det til en aktiv caspase, og på denne måten blir den proteolytiske kaskaden satt i gang. Ved lite ATP til stedet vil ikke cellen kunne gjennomgå apoptose, men i stedet nekrose.

Når ei celle blir skadet på en eller annen måte kan en av to ting skje. Enten kan skaden repareres eller, hvis skaden er tilstrekkelig stor så gis det signal om at cellen må dø. Dette er en indre signalvei som har noen fellessteg uansett hvilken skjebne cellen tilslutt får.

Ved skade på mitokondriene åpnes porer som går gjennom både den ytre og den indre mitokondriemembranen. Resultatet av denne åpningen er at mitokondriene får økt permeabilitet over den indre membranen, en tilstand som kalles MPT (mitochondrial permeability transition). Dette fører til at protoner strømmer inn i matrix og dermed reduseres membranpotensialet ($\Delta\psi$). Ved en slik depolarisering av den indre mitokondriemembranen hemmes syntesen av ATP, som er avhengig av membranpotensialet, og nivået av ATP i mitokondriene går ned. Skjebnen til cella avhenger av hvor mange av mitokondriene i cella som har MPT. Hvis bare noen få

mitokondrier har endret membranpermeabiliteten blir det gitt signal om autofagi av organellene. Hvis flere mitokondrier er endret vil cella dø ved apoptose, men hvis alle mitokondriene har MPT vil cella dø ved nekrose. Hovedårsaken til dette er at apoptoseprosessen krever ATP for å aktivere caspasene (med apoptosomet), og hvis tilstrekkelig mange mitokondrier i ei celle har redusert produksjon av ATP vil ikke cella kunne gjennomgå apoptose, og må i stedet gjennomgå nekrose. Både MPT og frigjøringen av cytochrom c er kontrollert av proteinfamilien Bcl-2. Henvisning for hele avsnittet [6].

Apoptose deles ofte inn i tidlig og sen apoptose. Hvilket stadie cella er på avgjøres i hovedsak av størrelsen på membranpotensialet ($\Delta\psi$), mengden DNA i kjerna og mitokondriemassen, da disse faktorene endres i løpet av apoptoseprosessen. Typiske markører for tidlig apoptose er at phosphatidilserine (PS) eksponeres på celleoverflaten, mitokondriemassen blir mindre og det blir et tap av $\Delta\psi$. PS er et anion-fosfolipid som translokteres fra innsiden av cellemembranen til utsiden av membranen ved tidlig apoptose. Makrofager gjenkjenner PS som uttrykkes på cellene, og dette gjør at disse skadede cellene blir fjernet før de lyserer [7]. Dette uttrykket er altså viktig for å hindre inflammatorisk respons.

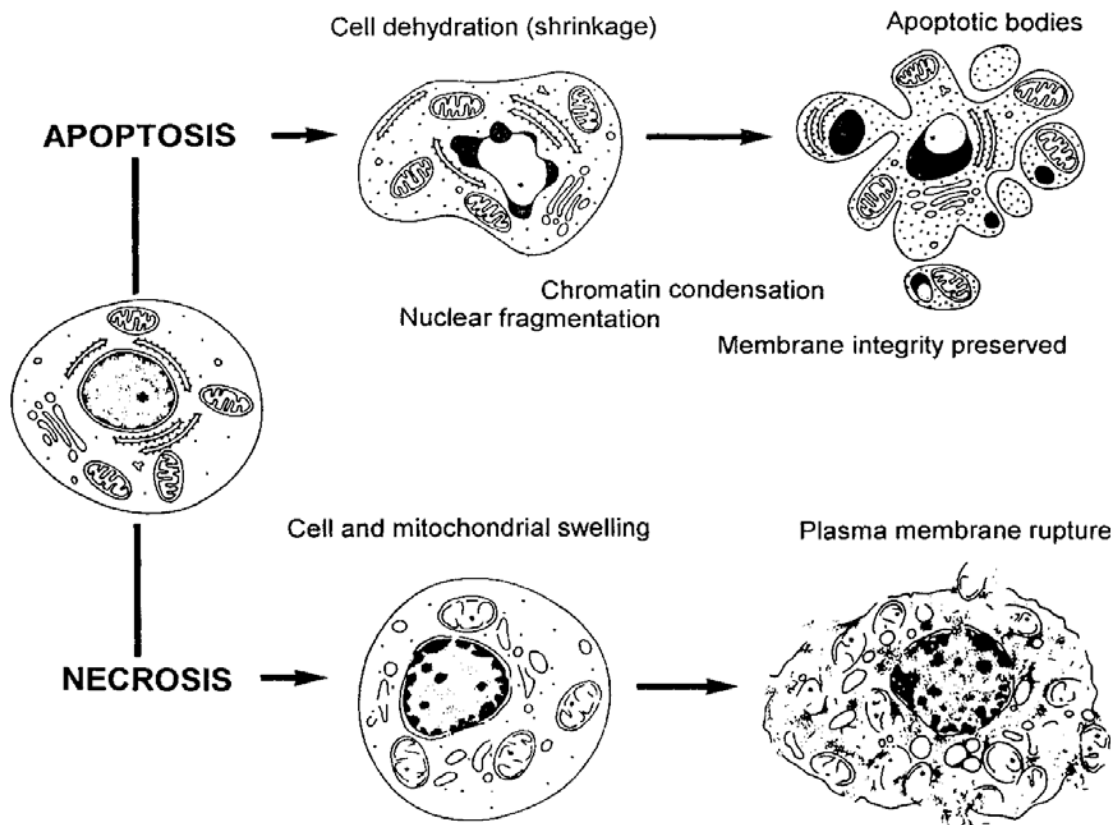
Nekrose

Nekrose er en form for celledød, og i alle fall tidligere har nekrose blitt karakterisert som en ukontrollert måte for cellene å dø på. Morfologien endrer seg i løpet av dødsprosessen. Først begynner cellene å svulle, deretter går organellene i oppløsning og cellemembranen revner. Det hele ender med en lysing av cellene. I motsetning til apoptose så er ikke nekrose avhengig av caspase-enzymene. Kalsium og ROS (reaktive oksygen radikaler) er derimot avgjørende for utviklingen og gjennomføringen av nekrose. Det som skjer, og som til slutt resulterer i de morfologiske endringene, er at DNA, proteiner og lipider blir skadet enten direkte eller indirekte av ROS og Ca^{2+} . Når de nekrotiske cellene lyserer frigjøres celleinnholdet og inflammatoriske cytokiner ut i de ekstracellulære omgivelsene. Dette gir en inflammatorisk respons, noe som unngås hvis cellene dør ved apoptose. Ved

utvikling av nekrose blir den indre mitokondriemembranen mer permeabel (MPT). Det blir en influx av H^+ og det elektriske membranpotensialet reduseres. Som en følge av dette går produksjonen av ATP ned. Cellene får dermed ikke nok energi til å kunne gjennomgå apoptose.

Reaktive oksygen radikaler produseres hele tiden i cellene, og en måte dette kan skje på er ved at elektroner som forlater enzymkomplekser i elektrontransportkjeden reagerer med molekylært oksygen. Når O_2 reagerer med et elektron blir det kun delvis redusert, og det dannes derfor et oksygenradikal ($\cdot O_2^-$) som er veldig reaktivt. Forsvarsmekanismen som cellene har mot ROS er antioksidanter. Det som er skadelig for celler, og som kan føre til celledød, er ikke at ROS blir produsert men at cellen opplever oksidativt stress. Oksidativt stress er en tilstand der det er en ubalanse mellom mengden oksygenradikaler som blir dannet og mengden antioksidanter som er til stede for å uskadeliggjøre radikalene. Reaktive oksygen radikaler fører til at energinivået i cellene går ned [8], noe som igjen fører til blant annet forstyrrelse i den aktive transporten av ioner, en økt permeabilitet over cellemembranen og en endring av fordelingen av ioner (Ca^{2+} , Na^+ og K^+) [9]. Det blir en økt konsentrasjon av kalsium inne i cytoplasma og deretter inn i mitokondriene. Det kan se ut til at økt konsentrasjon av Ca^{2+} i mitokondriene påvirker åpningen av porer i membranene som er med på å ødelegge det elektriske, transmembrane potensialet [8]. Det er som nevnt tidligere på grunn av at det gjennom disse porene er en influx av protoner, og dette reduserer protongradienten som er helt avgjørende for produksjonen av ATP. Økt Ca^{2+} i mitokondriene gjør også at det blir en økt stimulering av elektrontransportkjeden, og resultatet blir en overproduksjon av ROS. Kalsium stimulerer i tillegg enzymet NOS til å produsere NO. Nitrogen oksid kan bidra til nekrose ved å blant annet hemme caspase-3 enzymet, som er viktig i gjennomføring av apoptose [10]. Nitrogen oksid kan reagere med reaktive oksygenradikal, og produktet ($OON\cdot O^-$) stimulerer til MPT, altså den indre mitokondrie membranen blir mer permeabel. NO hemmer også elektrontransportkjeden ved å inhibere kompleks I og IV. Reaktive oksygen radikaler og Ca^{2+} kan påvirke utviklingen og utføringen av nekrose mer direkte ved at de enten kan interagere med proteiner, organeller eller membraner, eller at de kan aktivere enzymer som bryter ned strukturer i cella. Reaktive oksygen

radikaler kan aktivere lipoxygenase og Ca^{2+} kan aktivere phospholipaser og proteaser [8].



Figur 3: Morfologiske endringer som finner sted når ei celle enten dør ved apoptose eller nekrose [11].

Det finnes målemetoder for å studere celledød. Se teori om flowcytometri og JC-1.

1.5. Kreftcellers egenskaper i forhold til normale celler

- Kan ignorere både indre og ytre signaler som regulerer cellevekst.
- Kan unngå selvmord (apoptose).
- Kan unngå programmerte begrensninger til cellevekst, differensiering og unnslipe replikerende aldring.
- De er genetisk ustabile.

- De kan forlate sitt opprinnelige vev, de er invasive.
- De kan overleve og vokse i fremmed vev på nye steder i kroppen, de er metastaserende.

Genetisk ustabile celler kalles aneuploide celler. Disse cellene har en unormal kromosommengde i kjernen, større eller mindre enn $2n$, noe som vil si at de enten kan mangle noen gener eller ha for mange kopier av et eller flere gen. Kreftceller er som oftest aneuploide [12]. Det er imidlertid ikke klart om aneuploide celler er en årsak til utvikling av kreft eller en konsekvens av den. Aneuploide celler dannes enten ved at det skjer feil i mitosen eller etter brudd i DNA tråden, slik at strukturen i kromosomene omorganiseres [13].

1.6. Utvikling av kreft – karsinogenese

Utviklingen av kreft, der celler går fra å være normale til å vokse ukontrollert og å få flere eller alle av de karakteristiske egenskapene til ei kreftcelle kalles karsinogenese. Karsinogener er stoffer som helt eller delvis bidrar til karsinogenese. Dette kan både være kjemikalier (organiske, uorganiske og naturlige stoffer), stråling (UV, ioniserende), radon, endogene stoffer (som for eksempel frie oksygenradikaler) og virale stoffer som HPV (human papilloma virus), EBV (Epstein-Barr virus), HBV (Hepatitt-B virus) og HCV (Hepatitt-C virus). Karsinogenese er en prosess som går over flere stadier. Det er vanlig å dele utviklingen inn i tre hovedtrinn; initiering, ”promotion” og progressjon [2].

Initiering (”initiation”) er starten på utviklingen av ei normal celle til ei kreftcelle, og i denne fasen skjer det irreversible endringer i genomet. Det oppstår DNA mutasjoner i somatiske celler. Feilen i DNA molekylet kan enten føre til at cella blir stoppet opp i cellesyklus og blir forsøkt reparert, eller så settes dødsprosessen i gang og cellen med det skadede genomet går til grunne, eller så får cella dele seg og dermed føre mutasjonen videre. De initierte cellene kalles preneoplastiske celler. Mutasjoner er altså det første steget i utvikling av kreft. Mutasjoner kan oppstå på grunn av feil i replikasjon,

eksponering til stråling, DNA ødeleggende kjemikalier, mutante gener kan introduseres til celler via virus. Mutasjonene kan også oppstå spontant. Mutasjoner som setter i gang karsinogenesen skjer ofte i gener som er viktige for regulering av cellyklusen. Dette omfatter to hovedgrupper gener, onkogener og tumor suppressor gener, der aktivering av den førstnevnte og inaktivering av sistnevnte gruppen er farlig.

”Promotion” er det andre steget i karsinogenesen, og i motsetning til både initiering og progressjon er dette et reversibelt steg. Her skjer det en økt cellevekst av preneoplastiske celler, men ikke av normale celler. De initierte cellene får en selektiv vekstfordel på grunn av at de har mutert DNA og dermed ikke har normal cellykluskontroll. Vekstfordeler innebærer også at det skjer en hemming av differensiering og apoptose. I denne fasen skjer det altså en økning i antall celler som bærer de nødvendige mutasjonene for at karsinogenesen skal kunne finne sted [14]. Dermed øker promotion sjansen for at den andre mutasjonsrunden, progressjon, skal kunne starte. Promotion er avhengig av at cellene blir eksponert for promotorer, som både kan være kjemikalier og endogene stoffer (hormoner, vekstfaktorer), repeterte ganger [14]. Tumor promotorer betegnes ofte som non mutagenic, ettersom disse stoffene ikke fører til DNA mutasjoner. Hvis promoterne fjernes fra cellene stopper veksten opp og går tilbake. I denne fasen dannes det benigne (”godartet”) tumorer, også kalt papilloma.

Progressjon (”progression”) er det siste steget i karsinogenesen, og endringer som skjer her er irreversible. I denne fasen skjer det en ny mutasjonsrunde i de initierte og genetisk ustabile cellene, og det skjer en forandring i cellenes fenotype [15]. Tumor utvikler seg til å bli malign, ondartet. For at svulsten skal bli potensiell malign så må det skje mutasjoner i gener som er viktige for angiogenese, invasjon av basalmembran og metastase [15]. En tumor med en diameter opptil 1-2 millimeter mottar næringen hovedsakelig via diffusjon. Men for at tumor skal kunne fortsette å vokse seg større er den avhengig av vekst av nye og flere blodkar, angiogenese. Angiogenesefaktorer stimulerer til denne veksten ved at de påvirker endotelceller i kapillærveggen. Prosesser som er viktige er proteolyse, bevegelse og vekst [2]. Det må først skje en proteolyse/nedbrytning av basalmembranen som ligger utenfor endotelcellene. Deretter må endotelceller kunne migrere og bevege seg ut til det

perivaskulære stroma. Tilslutt må det kunne skje en proliferasjon av endotelcellene her ute slik at det blir dannet et nytt kapillærnett i forlengelse av/utvidelse av det opprinnelige. Det som kreves av kreftceller for at de skal kunne utføre invasjon og metastase er, i likhet med endotelceller i angiogenese, at de må ha proteolytisk effekt, migrerende effekt og prolifererende effekt. Hendelsesforløpet i spredningen av kreftceller: [2]

- 1) Celler frigjøres fra primær tumor fordi de har utviklet den egenskapen at de kan bryte celle-celle kontakt.
- 2) De invaderer basalmembranen og går i gjennom den. Kreftcellene kommer da inn til den extracellulære matrix.
- 3) Det skjer en migrasjon gjennom denne matrixen.
- 4) Cellene krysser basalmembran og endotelceller i blodkarveggen, og entrer dermed sirkulasjonssystemet (intravasation).
- 5) Sirkulasjon i blod eller lymfe helt til tumorcellene fester seg til basalmembranen i et kar.
- 6) Cellene forlater sirkulasjonen og slår seg ned i et nytt vev i kroppen (extravasation).

Mutasjoner i onkogen: Mutasjoner som fører til en aktivering av proto-onkogen til aktive onkogen kan føre til utvikling av kreft fordi onkogen påvirker flere steg i vekstfaktor-signalveien.

- Vekstfaktorer. Det blir produsert vekstfaktorer, uten at det ytre miljøet tilsier det/gir signal/stimuli til det.
- Reseptorer. De kan bli modifisert slik at de er aktive hele tiden, det kan altså bli tyrosinkinase aktivitet selv om det ikke binder en ligand.
- Plasmamembran G-proteiner (Ras). Det kan bli dannet mutant Ras protein som kontinuerlig er bundet til GTP, og som dermed stimulerer signalveien videre.
- Proteinkinaser (Raf). Det kan produseres mutant Raf som hele tiden stimulerer den fosforylerende kaskaden.
- Transkripsjonsfaktorer. Det kan bli syntetisert transkripsjonsfaktorer som starter uttrykket av gener som trengs i celledelingsprosessen.

- Cdk-cyklin. Det kan bli en overproduksjon av cdk-cyklinkomplekser slik at celler stimuleres til å passere sjekkpunktene i vekstsyklusen.

Mutasjon i tumorsuppressor gen: Tumorsuppressor gen virker som bremse i cellers vekstsyklus, og derfor kan en inaktivering av disse genene føre til karsinogenese. Eksempel på tumorsuppressor gener er p53, Rb, BRCA 1 og PTEN. Rb genet koder for Rb proteinet. Normalt så hindrer Rb proteinet cellene å gå fra G1 fase til S fase hvis stimulering fra vekstfaktorer mangler. En inaktivering av denne bremsa vil føre til ukontrollert celledeling. I normal tilstand er Rb proteinet hypofosforylert og aktivt, da er det bundet til E2F. E2F er en transkripsjonsfaktor som aktiverer transkripsjon av gener som koder for proteiner som trengs i DNA replikasjon. Men så lenge at Rb er bundet til E2F blir det ingen gentranskripsjon, og cellene kan ikke gå inn i S fasen. Når Rb proteinet blir hyperfosforylert av cdk-cyklin kompleksene i G1 fasen brytes bindingen mellom Rb og E2F, og dermed kan E2F binde DNA molekylet i stedet og føre til transkripsjon av gener. Dette gir klarsignal til cellene om at de kan gå fra G1 til S fasen [5]. En mutert utgave av retinoblastoma proteinet kan være kontinuerlig fosforylert, uavhengig av fosforyleringen forårsaket av G1 kompleksene, og på denne måten vil det skje en ukontrollert overgang av celler til S fasen. p53 genet koder for p53 proteinet, som er et protein som skal beskytte celler mot effektene av DNA skade. Skade på genomet kan stimulere dette tumorsuppressor proteinet slik at resultatet til slutt blir at cella dør ved apoptose. DNA skade kan enten aktivere p53 proteinet eller ATM, som er en kinase og et kontrollpostprotein [16]. p53 er viktigst i sjekkpunktet i G1 fasen, mens ATM er viktigst i G2. Ved denne type respons blir p53 fosforylert, og cella kan enten stimuleres til apoptose eller, via cdk inhibitoren p21 føre til cellesyklusarrest. ATM kan i noen tilfeller være den kinasen som fosforylerer p53. Aktivering av ATM kan også føre til hemming av et protein, cdc 25, som normalt sett skal interagere med et cdk-cyklin kompleks i G2-fasen slik at cellen går inn i mitosefasen [2].

1.7. Livmorhalskreft

1.7.1. Vekst og spredning

Kreft i livmorhalsen kan ofte relateres til en HPV infeksjon. HPV (human papillomavirus) er et lite DNA virus som gir infeksjon i epitelceller, og da særlig i hud og slimepitel. Det finnes over 90 forskjellige typer av dette viruset, noen av disse gir vekst av vorter, både kjønnsvorter og vorter på hender og føtter, mens noen typer har onkogenet potensial. I 99,7 % av alle cervix cancer tilfeller finner man HPV (høyrisiko typene HPV 16, 18 og 31) [17]. HPV uttrykker onkoproteinene E6 og E7. Disse proteinene gjør at cellenes normale delingsprosess ødelegges. E6 virker vekstfremmende på cellevekst ved å inaktivere tumorsupressorgenet p53, mens E7 reagerer med Rb (retinablastoma protein) og inaktiverer det. Dette fører til at den normale inhiberingen av E2F transkripsjonen opphører, og E2F genet blir produsert. Resultatet av E2F sin virkning er at cellene får lov til å gå videre i cellesyklusen, de får fortsette inn i S-fasen.

En tumor kan vokse seg større i det opprinnelige organet, føre til invasjon av omkringliggende vev eller danne fjernmetastaser. Metastaser er spredning av kreftceller til andre steder i kroppen med blodbanen eller lymfesirkulasjonen, og fører til dannelse av en ny tumor. For at en svulst skal kunne vokse seg større er den avhengig av økt angiogenese (vekst av nye blodkar) slik at alle cellene i svulsten skal få tilstrekkelig tilførsel av oksygen og næring, og at avfallsstoffer blir fjernet. Angiogenese er også essensiell for utvikling av metastaser. Vaskulær endotel vekstfaktor (VEGF) induserer angiogenese [18]. VEGF er oppregulert i karsinom fra livmorhals, men man er fremdeles usikker på hvordan uttrykkningen er regulert. Pasienter med økt VEGF har økt risiko for å dø. Denne faktoren bidrar til vekst av endotelceller i karveggen ved at den binder til tyrosin kinasereseptorer, som uttrykkes i disse cellene. Noen resultater viser at HPV 18 E6 onkoprotein bidrar til tumorangiogenese ved å stimulere til transkripsjon av VEGF. Noen finner at det ikke er sammenheng mellom blodkartetthet og pasientoverlevelse [19], mens andre finner at økt blodkartetthet har negativ korrelasjon med pasientoverlevelse

[20]. Peter Birner et. al., [21] fant at økt lymfekartetthet i pasienter ga økt overlevelse. Man ville kanskje tro at flere lymfekar økte spredningsmuligheten for kreftcellene via disse, men dette resultatet har mest sannsynlig i stedet en immunologisk forklaring. Metastasedannelse er en viktig prognostisk faktor i livmorhalskreft [22]. Når kreftceller metastaserer synker overlevelsen til pasienten. Metastasering fra livmorhalskreft er relativt vanlig på grunn av at dette organet er rikt vaskularisert, og området har mange lymfeknuter og lymfekar. I behandling av denne sykdommen er fjerning av lymfeknuter viktig. Dette øker overlevelsen. Behandlingsmetoden der alle lymfeknutene i bekkenet fjernes kalles Wertheims operasjon. Fra tumor i livmorhals kan kreftceller spre seg til primære lymfeknuter (vaktpostlymfeknuter) eller til vaskulære kanaler, som nevnt ovenfor. Kreftceller i primære lymfeknuter blir imidlertid regnet som lokal sykdom, ikke metastase. Men hvis cellene sprer seg videre til sekundære lymfeknuter er det blitt dannet lymfeknutemetastase. Risikofaktorer for metastaser er tumorstørrelse (økt størrelse gir økt risiko), dyp cervical invasjon (vekst dypt inn i epitellaget) og LVSI (lymphovascular space invasion), altså om tumor har vokst seg inn i lymfekarområdet.

1.7.2. Stadieinndeling

Behandling av livmorhalskreft, med tanke på valg av operasjon, stråling og stråledoser, bestemmes i stor grad av hvor langt sykdommen har utviklet seg, på hvilket stadium den er kommet. De ulike sykdomsstadiene kan bli beskrevet og klassifisert ved hjelp av FIGO klassifisering (Federation of Obstetricians and Gynaecologists). Inndelingen går fra stadium 0 til og med IV. Dette er hentet fra FIGO, 1994. På tidlige stadier er behandlingen kurativ, på sene stadier med metastaser er det i større grad snakk om palliativ behandling.

- Stadium 0: Preinvasivt karsinom
- Stadium I: Tumor er begrenset til cervix
- Stadium IA: Tumor er kun mikroskopisk påvisbar
- Stadium IA1: Infiltrasjonsdybde ≤ 3 mm, horisontal utbredelse ≤ 7 mm
- Stadium IA2: Infiltrasjonsdybde > 3 mm og ≤ 5 mm, horisontal utbredelse ≤ 7 mm

- Stadium IB: Tumor er makroskopisk påvisbar eller mikroskopisk større enn kriteriene for IA
- Stadium IB1: Største tumordiameter \leq 4 cm
- Stadium IB2: Største tumordiameter $>$ 4 cm
- Stadium II: Tumor utenfor cervix, men når ikke bekkenveggen eller ytre 1/3 av vagina
- Stadium IIA: Ikke infiltrasjon i parametriere, men i vagina
- Stadium IIB: Infiltrasjon i parametriere
- Stadium III: Tumor ut til ytre 1/3 av vagina, ut til bekkenveggen, eller tilfeller med hydronefrose eller ikke-fungerende nyre
- Stadium IIIA: Ikke infiltrasjon til bekkenvegg, men til ytre 1/3 av vagina
- Stadium IIIB: Infiltrasjon til bekkenvegg og/eller hydronefrose/ikke-fungerende nyre
- Stadium IV: Infiltrasjon i blære- eller rectum-mucosa eller direkte tumorvekst utenfor bekkenet eller fjernmetastaser
- Stadium IVA: Infiltrasjon i nabo-organer
- Stadium IVB: Fjernmetastaser

1.7.3. Utbredelse og prognose

I Norge er insidensen av livmorhalskreft 292 og prevalensen 6722 (tall hentet fra kreftregisteret i 2005). Plateepitelkarsinom utgjør 85-90 % av alle tilfellene mens adenokarsinom utgjør 10-15 %. Prognosen for sykdommer blir ofte oppgitt i hvor mange som er i livet 5 år etter at diagnosen ble stilt. 5-års overlevelse for denne kreftformen er 89,0 % for pasienter i stadium I, 60,1 % for stadium II, 34,4 % for stadium III og 17,9 % for stadium IV (tall er hentet fra kreftregisteret for pasienter diagnostisert i perioden 1993-1997).

1.7.4. Behandling

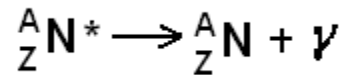
Det er ulike behandlingsstrategier for pasienter med cervix cancer. For pasienter med lokalisert sykdom, stadium I, kan kirurgisk behandling og strålebehandling anses likeverdig med tanke på overlevelse. Strålebehandling kan gis både pre- og postoperativt, og den kan enten være ekstern eller intern, henholdsvis external-beam radiotherapy (EBRT) og BRACHY terapi. Pasienter kan få en kombinasjon av disse to strålebehandlingsmetodene. Ekstern strålebehandling betyr at strålekilden er på utsiden av kroppen, og denne behandlingsmetoden gjør det vanskeligere å skille mellom normalt vev og tumor vev sammenlignet med BRACHY terapi. I BRACHY terapi blir den radioaktive kilden ført inn i kroppen, i tilfeller med livmorhalskreft føres den inn i skjeden og videre inn i livmorhalsen. Fordelen med BRACHY terapi er at det er kort avstand mellom strålekilden og tumor vevet, og det er et meget bratt dosefall rundt kilden. Dette gjør at normalt vev/ risiko-organer i større grad blir skånet, og derfor kan det gis høyere doser i denne behandlingsformen sammenlignet med EBRT. Når det gjelder gynekologiske kreftpasienter er blære og tarm spesielt utsatte organer ved strålebehandling. Det er forskjell på kurativ og smertelindrende behandling både med tanke på størrelsen på dosene og på antall behandlinger (nærmere beskrivelse av strålebehandling og doser kommer lengre bak i introduksjonskapitlet, under ”strålebehandling” og ”strålebehandling av cervix cancer ved UNN”).

1.8. Stråling

1.8.1. Strålefysikk

I dette forsøket skal kreftceller strålebehandles med gammastråling. Gammastråling (γ) er fotoner med veldig høy energi (keV eller MeV). Denne formen for stråling defineres som elektromagnetisk stråling, og fotonene frigjøres som følge av en nukleær prosess. Når det er snakk om emittering av lys er det som følge av at et atom er eksitert, og at det vil frigjøre et foton når det re-eksiteres. Gammastråling er et resultat av at atomets kjerne

befinner seg i eksitert tilstand og emitterer foton når den går tilbake til grunntilstanden. Røntgen er også elektromagnetisk stråling (fotoner) men skiller seg fra γ -stråling ved at fotonet som sendes ut ikke produseres i en kjerneprosess men ved at et elektron interagerer med et atom. Gammastråling kan uttrykkes som:



der N^* betyr at kjernen er på eksitert form, A betyr kjernens massetall (antall protoner + antall nøytroner) og Z betyr antall protoner. Kjernen forblir uladet etter emitteringen av fotonet. Enheten som beskriver energien til fotonet (lyskvanten) som sendes ut er elektronvolt, eV. Definisjonen på 1 eV er den kinetiske energien et elektron får når det faller fritt i en elektrisk potensialforskjell på 1 volt (V). Gammastråling har en energi på mellom 1 000 og 1 000 000 eV, henholdsvis keV og MeV.

Elektromagnetisk stråling er indirekte ioniserende. Det vil si at det ikke er det utsendte fotonene i seg selv som fører til skade. Absorpsjonen av gammastråling, strålingens energiavsetning i materie, kan skje på ulike måter. Men alle prosessene fører til slutt til dannelse av det som kalles hurtige elektroner. Hendelsesforløpet fra strålingen absorberes og til det skjer en biologisk endring kan beskrives på følgende måte: fotonet treffer et atom eller molekyl og det hurtige elektronet frigjøres, som igjen støter bort i et nytt elektron og gir ionisering av et nytt atom eller molekyl. Et ionisert radikal kan i sin tur reagere med et molekyl og dannet et fritt radikal, som er en partikkel med et uparet elektron i det ytterste atomskallet men som ikke er elektrisk ladet. Frie radikaler er veldig kjemisk reaktive partikler. Det er som oftest frie radikaler som forårsaker skade ved å for eksempel binde til DNA molekylet i cellen. Enheten for stråledose er gray (Gy). Det er et mål på den avgitte energien per masseenheter, og måles i joule/ kg. $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/ kg}$. Gammastråling går lett gjennom bløtvev, og hindres best av betong.

1.8.2. Biologiske effekter av stråling

Den kanskje mest vanlige effekten av stråling på celler er double-strand break (DSB) i

DNA molekylet [23]. Normalt blir ATM aktivert ved skade på DNA og utfallet kan bli at celler enten dør ved apoptose eller blir arrestert og til slutt reparert. Stråling av kreftceller er noe annerledes fordi disse cellene ofte har mutasjoner i viktige steg i både apoptosekaskaden og reparasjonssystem. En inaktivering av apoptosesignalveien gjør at apoptose kanskje ikke er den viktigste tumorresponsen til ødeleggelse av DNA molekylet [24]. Andre måter å dø på kan være viktigere. Det er foreslått at mitotisk celledød er en vanlig respons til stråleskader [25]. Celler dør på grunn av at det går feil i celledelingsprosessen. Det kan være at de ikke har klart å reparere skader, og deler seg med disse, og at sjekkpunktene ikke fungerer slik de skal, noe som fører til at de skadde cellene får mulighet til å gjennomgå mitose. Det kan oppstå feil når fordelingen av kromosominnholdet på to nye datterceller skal finne sted, og hvis cytokinesen ikke fungerer kan cellen få dobbelt opp med arvestoff og kjerner. Mitotisk celledød kan være apoptose, men da ikke via den normale signalveien, det kan skje uavhengig av p53. Resultatet kan også være at cellene dør ved nekrose. Andre former for celledød kan være autofagi, som er at cellene kontrollert fordøyer seg selv, eller senescence, som er celler som fremdeles er metabolsk aktive men som ikke er i stand til å dele seg [25]. Senescence kan også kalles aldring av celler. Slike celler har ofte en forstørret cellestørrelse, og de kan til slutt dø ved p53-uavhengig apoptose.

1.8.3. Strålebehandling

Ved strålebehandling blir både kreftceller og friske, normale celler skadet. Målet med stråleterapi er derfor å maksimere stråleskadene på kreftceller og minimalisere skadene på normale celler. Dette oppnås ved å behandle i fraksjoner. Pasientene får en stråledose hver dag over en periode på flere uker. Forutsetningen for at stråling kan brukes i behandling, både helbredende (kurativ) og palliativ (smertelindrende), er cellenes evne til å reparere seg etter skader. Dette favoriserer normale celler framfor kreftceller på to måter: stråling gir økt dødelig effekt i celler som deler seg raskere enn for de som deler seg langsommere. De langsomme cellene får bedre tid til å reparere skaden før de skal dele seg igjen. Dette er helt avgjørende for at normale, saktevoksende celler ikke er like

mottakelig for strålingens dødelige effekt fordi det er mindre sannsynlig at de vil dele seg med alvorlige kromosomskader. Det andre viktige poenget er at kreftceller som oftest har reparasjonssystem som ikke fungerer, og det gjør at de ikke har samme mulighet som normale celler til å reparere stråleskadene. I tillegg så har normale celler økt dosetoleranse i motsetning til tumorceller som ikke viser dosetoleranse. Det som er avgjørende for hvilke doser som kan gis en tumor er hvor strålesensitiv normalvevet i nærheten er, risiko-organet/organene. Når stråledoser skal regnes ut må det tas hensyn til det faktum at tumorvev og normalvev har ulik strålefølsomhet.

1.8.4. Strålebehandling av cervix cancer ved UNN (Universitetssykehuset Nord Norge)

Ved UNN bruker de den radioaktive strålekilden ^{192}Ir (iridium). Denne isotopen har en halveringstid på 74,2 dager, og gir en fotonenergi på omtrent 380 keV. Den mest typiske fraksjonsdosen er på 2 Gy, og ofte kan det bli gitt 5 fraksjoner i uka. En typisk ekstern strålebehandling av cervix cancer pasienter kan gis som $2 \text{ Gy} \times 25 = 50 \text{ Gy}$. Deretter kan det gis en slags økt påfyllingsdose ved hjelp av BRACHY terapi, som foreksempel kan være $4,2 \text{ Gy} \times 5 = 21 \text{ Gy}$. Ettersom tumorvev og normalvev har ulik strålefølsomhet må det tas med en faktor, α/β , i beregningene for å se hva denne fysiske stråledosen faktisk gir tumorvevet og hva den gir normalvevet. Faktoren bestemmes ut i fra en overlevelseskurve, og sier noe om strålesensitiviteten til det aktuelle vevet. Grovt sett kan man si at α/β for tumorvev er 10 mens den for normalvev er 3. I dette tilfellet med en fysisk dose på 21 Gy vil tumorvevet få en dose på 25 Gy og normalvevet vil få en dose på $\sim 30 \text{ Gy}$. Totalt blir det da gitt $50 \text{ Gy} + 25 \text{ Gy} = 75 \text{ Gy}$ til tumorvevet og $50 \text{ Gy} + 30 \text{ Gy} = 80 \text{ Gy}$ til normalvevet. Til sammenligning får prostata pasienter 74 eller 78 Gy, mens øre-nese-hals pasienter får 70 Gy. Ved smertelindrende strålebehandling gis det normalt færre fraksjoner, for eksempel $4 \text{ Gy} \times 5$, $3 \text{ Gy} \times 10$ eller $8 \text{ Gy} \times 1$. (Tallmaterialet og informasjonen om strålebehandling ved UNN kommer fra Turid Hellevik, medisinsk fysiker ved stråleavdelingen på UNN).

1.8.5. Fraksjonert strålebehandling

Ved fraksjonert strålebehandling er det snakk om de 5 R' ene, som er viktig for hvordan effekten av den langvarige tumorstrålingen blir [23]. Reassortment, reoxygenation, repopulation, recovery og radiosensitivity. Reassortment og reoxygenation øker den dødelige virkningen av stråling mens repopulation og recovery reduserer denne effekten. Radiosensitivity er avgjørende for alle de andre faktorene.

- Reassortment: Cellenes sensitivitet for stråling endrer seg gjennom de ulike fasene av cellyklus. Celler som deler seg, som er i M fasen, og celler som befinner seg i G2 fasen er mest sensitiv, mens celler i S fasen er minst sensitiv for stråling. Ved gjentatte strålebehandlinger vil det være noe progresjon mellom hver gang slik at celler forflytter seg til andre stadier av cellyklusen. Når celler går til stadier der de er mer sensitiv for strålingen vil dette medføre at det blir økt celledreping sammenlignet med bare en behandling, eller ved gjentatte behandlinger av celler som ikke hadde vist progresjon.
- Reoxygenation: I en tumor vil noen celler være hypoksiske, de har for liten tilgang på oksygen. Hypoksi reduserer den dødelige effekten av stråling fordi mye av skaden skyldes at radikaler binder og ødelegger DNA molekylet. Hvis det er mindre oksygen til stedet blir det dannet færre frie oksygenradikaler og dermed reduseres skadeomfanget. De hypoksiske cellene overlever stråling. Ved gjentatte strålinger vil flere og flere celler i tumor dø og det fører til at det blir bedre oksygentilførsel til de gjenlevende cellene. Celler som først var hypoksiske blir nå reoksigenert og dermed mer mottakelig for den dødelige stråleeffekten.
- Repopulation: Når strålebehandling foregår over flere uker er det noen kreftceller som kan fortsette å dele seg i løpet av denne perioden. Resultatet er at det blir flere kreftceller som må drepes. Langvarig strålebehandling kan til og med akselerere denne celledelingen av ulike årsaker. Stråling kan påvirke bl.a. vekstfaktorer, reseptorer eller signalveier i cellene som er viktig i regulering av vekst. Stråling kan mutere gener som skal uttrykke vekstregulerende proteiner. Santin et. al., [26] viste at stråling av HPV-16 positive cervix cancer celler førte til økt uttrykk av onkogenene E6 og E7. Stråling var altså fordelaktig for

- kreftcellene som overlevde behandlingen. Vekst ble fremmet i de stråleresistente cellene.
- Recovery: Celler som overlever strålingen kan reparere stråleskadene. Det er snakk om reparasjon av potensielt letale skader (PLDR) og subletale skader (SLDR) på grunn av at behandlingen er langvarig, fraksjonert eller at cellene blir holdt i et ikke-prolifererende stadium av cellesyklus. Dette fører til at drepingen av kreftceller reduseres. Det er mer reparasjon i celler med lengre syklustid/doblingstid sammenlignet med celler som har kortere cellesyklustid.
 - Radiosensitivity: Dette beskriver celler og vevs følsomhet for skadene som stråling gir. Strålingssensitiviteten varierer mellom ulike celletyper, mellom individer og til og med mellom celler i en og samme svulst. Denne følsomheten er direkte proporsjonal med celledelingshastigheten og omvendt proporsjonal med cellenes grad av differensiering [27]. Celler som er mest sensitive har høy delingsrate, høy metabolsk rate, de er lite spesialisert og har god tilgang på næring. Følsomheten overfor stråleskader avhenger av flere faktorer, bl.a. cellenes evne til å reparere DNA skader, cellers apoptotiske potensialer og aktiviteten i sjekkpunktene i cellesyklus.

1.9. Signalmolekylet cGMP og dets virkninger

Syklisk guanosin monofosfat (cGMP) er et syklisk nukleotid som ofte fungerer som en sekundær budbringer i cellene. Dette molekylet syntetiseres fra GTP (guanosin trifosfat), og denne prosessen katalyseres av enzymet guanylat cyclase. Det finnes to typer guanylat cyclase, enten membranbundet (pGC) eller løst (sGC). NO (nitrogen monoksid) stimulerer sGC til å syntetisere cGMP ved at det binder til ei prostetisk gruppe (hem-gruppe) på enzymet [28], mens peptidhormoner som ANP kan stimulere den membranbundne utgaven av guanylat cyclase ([29], [30]). Syklisk GMP kan virke inn på flere forskjellige celletyper, virke via ulike mekanismer og gi flere former for effekt. Det er et vekstregulerende molekyl som kan påvirke både glatte muskelceller, endotelceller

og tumorceller. Effektene som cGMP har er uavklart, og det som gjør det spesielt vanskelig er at dette molekylet trolig har ulik virkning avhengig av vevstypen. I tillegg så virker cGMP inn på blant annet apoptose, ionekanaler og i fototransduksjon i retina i øyet. NO påvirker celler via cGMP, men kan også gi sin virkning uten at cGMP er sekundær budbringer. Signalveien videre fra cGMP kan variere, og dette faktum er nok en mulig årsak til at cGMP både kan gi veksthemmende og vekstfremmende effekt på celler. Det er gjort forsøk som viser at effekten av cGMP varierer avhengig av den intracellulære konsentrasjonen av dette molekylet. De viktigste faktorene som er med på å bestemme den intracellulære konsentrasjonen av cGMP er balansen mellom syntesen og nedbrytingen av nukleotidet, som blir styrt av henholdsvis NO eller peptidhormoner og fosfodiesterase. Enzymet fosfodiesterase hydrolyserer cGMP til GMP (guanosin monofosfat). Syklisk GMP kan føre signaler videre via protein kinaser, ved at det binder og dermed aktiverer disse kinasene slik at de kan fosforylere sine substratmolekyler. Dette sykliske nukleotidet kan både aktivere PKG (cGMP avhengig protein kinase) og PKA (cAMP avhengig protein kinase).

I vaskulær glattmuskulatur gir NO, via cGMP og PKG en reduksjon i Ca^{2+} konsentrasjon, og dermed en relakserende effekt, noe som fører til vasodilatasjon ([31], [32]). Det er gjort forsøk som viser at cGMP stimulerer til vekst i VSMC, og dette var i tilfeller hvor det var lav konsentrasjon av NO og cGMP i cellene [33]. Høye konsentrasjoner av cGMP har vist seg å ha en inhiberende effekt på glattmuskelceller, og en foreslått signalvei er at NO og cGMP virker via PKA og ikke via PKG [34]. Ved høye konsentrasjoner kan det være at PKA blir aktivert men ikke PKG, og i tillegg kan PKA nedregulere PKG. Syklisk AMP avhengig protein kinase fører til en økning i konsentrasjonen av cAMP, og det er cAMP som dermed fører til den anti-proliferative effekten som har vist seg å oppstå når PKA blir aktivert [35]. En annen mulig årsak til at det blir en økt konsentrasjon av cAMP er at høy konsentrasjon av cGMP kan hemme fosfodiesterasen til cAMP [36]. Syklisk AMP påvirker trolig tidlig i G1 fasen i cellyklus, i MAPK/ERK signalveien [35]. Den veksthemmende effekten kan skyldes at cAMP fungerer som en antagonist til aktiveringen av Raf ved at den fosforylere dette molekylet. En fosforylering av Raf gjør at G-proteinet Ras ikke blir i stand til å aktivere Raf og dette påvirker ERK og

aktivering av MAPK. Resultatet blir en nedstrøms inhibering av protein kinasene MEK, MAPK og ERK. Som nevnt ovenfor kan cGMP gi vekststimulerende effekt når det er snakk om lave konsentrasjoner av molekylet, og i disse tilfellene blir trolig signalet sendt videre via PKG, altså her har PKG en proliferativ effekt. Koyama et al., [35] viste imidlertid også at PKG kan føre til fosforylering av Raf og dermed gi en anti-proliferativ effekt. Syklisk GMP avhengig protein kinase kan altså stimulere til vekst men også hemme vekst. Den anti-proliferative effekten så ut til å opptre når det var et overuttrykk av PKG. Når cGMP forekommer i høye konsentrasjoner blir uttrykket av denne kinasen nedregulert, men da er det kanskje PKA som står for den anti-proliferative effekten som observeres. Men det er fremdeles usikkerhet rundt virkningsmekanismene til cGMP når det gjelder regulering av cellevekst.

I endotelceller er det gjort forsøk som viser at cGMP, i høye konsentrasjoner, hemmer vekst ([37], [38], [39]). Denne inhiberingen ser ut til å være forårsaket av at apoptose blir induert når det blir en økning av cGMP konsentrasjon. Økningen av cGMP skyldtes enten at cGMP-PDE ble hemmet eller redusert, eller at det ble en stimulering av produksjonen ved hjelp av ANP.

Det er gjort mindre forskning på cGMP sine vekstregulerende effekter på tumorceller. En solid tumor består av både vaskulære celler, immunceller og tumorceller, og ettersom at vekst i vaskulære celler er avgjørende for både tumorvekst og metastasering så er det likevel viktig å se på cGMP sin virkning på disse cellene. Fraser et al., [40] har imidlertid sett på cGMP sin virkning på ovarie kreftceller. De har vist at et basalnivå av sGC og cGMP er avgjørende for ovariecellers levedyktighet. Resultatene fra forsøkene som ble gjort kunne tyde på at en reduksjon i sGC og cGMP førte til indusering av apoptose via en oppregulering av p53. Moon et al., [41] har gjort forsøk på leukemiceller, og det de fant ut var at en økt konsentrasjon av cGMP så ut til å kunne indusere apoptose via økt mengde p53 protein. De så også at en økt konsentrasjon av cGMP kunne hemme vekst ved å arrestere cellene i G₂-M fasen i celledyklusen. En lav konsentrasjon av cGMP i kreftcellelinjer fra ovariene tenderer til å indusere apoptose, mens det i leukemiceller og endotelceller ser ut til å være høye konsentrasjoner av cGMP som induserer apoptose.

1.10. Transport av cGMP

Transporten av cGMP ut av cellene skjer via noen membranpumper som hører til under superfamilien ABC transportere (ATP-binding cassette) [42]. Felles for disse transporterne er at de transporterer forbindelser aktivt, ved å hydrolysere ATP, ut av cella mot substratens konsentrasjonsgradient. Multidrug resistance proteins (MRP) er en gruppe membranproteiner som hører til under ABC transportere. Disse transporterer både endogene og eksogene forbindelser, deriblant xenobiotika, deres metabolitter, glutathion-konjugater og sykliske nukleotider. Det finnes flere forskjellige medlemmer av MRP familien, men det er trolig MRP5 og MRP4 som i hovedsak står for efflux av cGMP [43]. MRP4 og MRP5 er organiske aniontransportere [44]. MRP5 kan transportere både cGMP og cAMP [45]. MRP5 består av 1437 aminosyrer [46] og har 12 transmembrane segmenter. Disse danner 6 ekstracellulære looper. MRP5 har to bindingsdomener for nukleotider (NBD) der ATP binder og dermed aktiverer. Både den N-terminale og C-terminale enden av proteinet befinner seg på innsiden av cellemembranen, i cytoplasma. Grovt sett så er den tredimensjonale strukturen til MRP5 lik MRP4, og begge transporterne ser ut til å kunne transportere både cGMP og cAMP, men nærmere studier ser ut til å vise at MRP4 har høyest bindingsspesifisitet for cAMP mens MRP5 har høyest spesifisitet for cGMP [47]. Enkelte kreftceller har et overuttrykk av multidrug resistance proteiner [48]. Dette er viktig i forhold til utvikling av behandlingsresistens, og at noen typer kreftceller responderer dårlig på cytostatika. Man vet ennå ikke hva som bestemmer uttrykket av transporterne i celler.

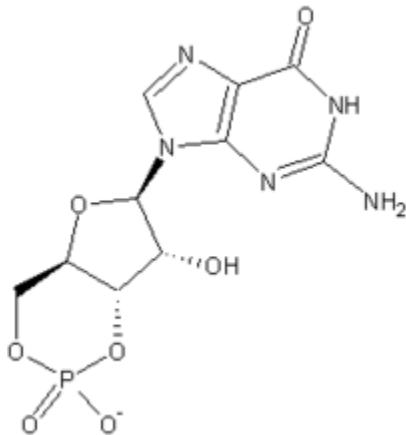
1.11. Utskillelse av cGMP i urin

Når den intracellulære konsentrasjonen av cGMP øker så øker også utpumpingen av dette sykliske nukleotidet. Når cGMP skilles ut til ekstracellulærvæske kan konsentrasjonen av dette molekylet måles både i blodet og i urinen fordi ekskresjonen også kan skje via

nyrene ([49], [50]). Det er vist at personer med gynekologiske kreftformer har økt mengde cGMP i urinen, men etter vellykket behandling så går nivået av cGMP ned ([51], [52], [53]). I studier som ble gjort på pasienter med livmorhalskreft ble det foretatt målinger i urinen før behandling og 3 måneder etter behandling. Resultatene viste at pasienter som fikk økt [cGMP] i urinen fikk tilbakefall av sykdommen ([54], [55]). Det har også vist seg at når livmorhalsceller vokser, at det blir økt celletetthet, så øker mengden cGMP ekstracellulært [56]. En mulig forklaring på denne økningen kan være at utpumpingen av cGMP øker, men det kan også muligens forklares med at syntesen av cGMP øker eller at nedbrytingen avtar på grunn av endringer i enzymaktivitet inne i cellene. Dette har gjort at cGMP er et interessant molekyl som kan sees på som en mulig prognostisk faktor.

Økt [cGMP] i urinen kan kobles til at noen typer kreftcelletyper har en økt intracellulær konsentrasjon av NO (som er en uorganisk forbindelse og et fritt radikal), som et resultat av en økt syntese. Enzymet NOS (NO syntase) syntetiserer NO ved å oksidere aminosyren L-arginin. Thomsen et al., [57] gjorde forsøk som viste at det var høyere aktivitet av iNOS (induserbar NO syntase) i malignt, gynekologisk vev sammenlignet med normalt gynekologisk vev. iNOS er en isoform av NOS som finnes og er overuttrykt i flere typer tumorer ([58], [59], [60]). I motsetning til de andre isoformene av NOS (eNOS og nNOS), som er til stede hele tiden og som står for den konstitutive produksjonen av NO, så blir iNOS induert av produkter fra bakterier, og fra cytokiner som frigjøres i inflammatoriske reaksjoner [61]. Cianchi et al., [62] så en tendens til at det er høyere nivå av iNOS og cGMP i tumorvev sammenlignet med normalt vev. Og at nivået av disse to øker med sykdomsutviklingen, det er høyere nivå i senere stadier sammenlignet med tidligere stadier. NO viser en doseavhengig virkning på cellers vekst og på angiogenese. NO kan bidra til tumorprogresjon både ved å påvirke angiogenesen og å påvirke vekst av tumorceller. Det kan se ut som at høye konsentrasjoner av NO inni celler gir cytotoxisk effekt, mens lave konsentrasjoner stimulerer til vekst av tumor [63]. Den cytotoxiske effekten kommer trolig av en oppregulering av p53 proteinet og aktivering av caspase-enzymmer, mens NO sin vekststimulerende effekt på tumor skyldes blant annet inhibering av apoptose og caspaseaktivitet ([64], [65]). Påvirkningen som NO

har på angiogenese kan virke via blant annet den endotele vekstfaktoren VEGF [66]. Lave konsentrasjoner av NO ute i blodet har vist seg å stimulere angiogenese mens høye konsentrasjoner hemmer angiogenese [67]. Sett i sammenheng med cGMP så fører økt intracellulær konsentrasjon av NO til økt produksjon av dette sykliske nukleotidet. Og økt [cGMP] i kreftcellene kan føre til økt utpumping via MRP transporterne. Som igjen kan bidra til økning av dette molekylet, som observert, i urin.



Figur 4: Kjemisk strukturformel av syklisk guanosin -3', 5'-monofosfat (cGMP).

1.12. Behandlingsresistens

Et problem i forbindelse med stråle- og cytostatika behandling er at tumorcellene kan utvikle resistens. I denne sammenheng er utvikling av behandlingsresistens viktig. Et eksempel på det er MRP (multidrug resistance protein) som er et transportmolekyl som sitter i cellemembranen og pumper sykliske nukleotider, nukleotidanaloger og organiske anioner ut av cellene. Det er snakk om både endogene og eksogene forbindelser, som blant annet det vekstregulerende molekylet cGMP og noen former for cytostatika. Cervix cancer celler har økt uttrykk av MRP av ukjente årsaker, og disse cellene kan derfor pumpe ut mer cGMP. Som nevnt ovenfor har cGMP en veksthemmende effekt i høye

konsentrasjoner, så man kan tenke seg at den økte utpumpingen av dette molekylet er en forsvarsmekanisme til kreftcellene for at de skal kunne fortsette å vokse.

Utpumpingen av cytotoxiske medikamenter favoriserer også kreftcellenes vekst. Det har vist seg at cellelinjer som har uttrykt MRP4 er resistent mot noen cytotoxiske medikamenter [68]. Multidrug resistance protein 5 (MRP5) har imidlertid også relevans til behandlingsresistens fordi flere anti-neoplastiske medikamenter pumpes ut av cellene ved hjelp av dette proteinet [69]. I behandling vil det derfor være viktig å få redusert pumpeaktiviteten til transportproteinene slik at veksten til tumor hemmes.

2. MATERIALE OG METODER

2.1. Teoretisk metodebakgrunn

2.1.1. Dyrking av celler i kultur

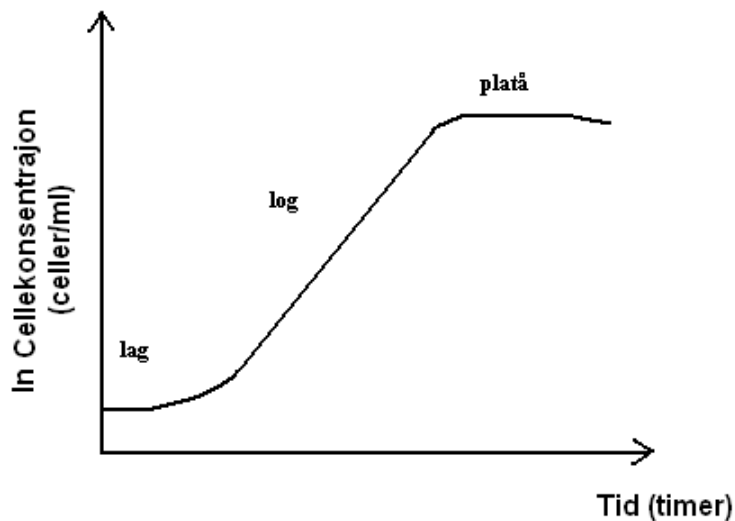
Dyrkningsforhold

Enkelte celletyper kan dyrkes i kultur (in vitro) i laboratorier. Forutsetningen for å kunne gjøre det er at cellene må få gode vekstvilkår, noe som innebærer næring, vekstfaktorer, riktig pH og temperatur. Celler dyrkes i vekstmedium, som enten er tilsatt serum eller som er serumfritt. Det kan være både forlemper og ulemper med å bruke serum i celledyrkning. Serum består av mange ulike proteiner, mineraler, lipider og hormoner. Årsaken til at serum blir brukt i noen vekstmedier er at det inneholder vekstfaktorer, som bidrar til celledeling. Det kan blant annet være fibroblast vekstfaktor (FGF), epidermal vekstfaktor (EGF), vaskulær endotel vekstfaktor (VEGF) og insulinlik vekstfaktor (IGF). Serum inneholder også adhesjonsfaktorer, som gjør det mulig for cellene å feste seg til bunnen av kulturflaskene. En annen viktig egenskap til serumet er at det har antitrypsineffekt. Det vil si at det er noen proteiner til stedet som avslutter enzymaktiviteten til trypsin etter at cellene er blitt trypsinert. Denne effekten bidrar også til at cellene kan vokse adherent. Hormoner som ofte er til stedet i serum er insulin og hydrokortison. En fordel med å benytte serum i vekstmedium er at noen av serumproteinene har en beskyttende og detoksifiserende effekt. Noen ulemper med serum er imidlertid at det kan være variasjoner mellom ulike parti serum som blir bestilt, og som brukes. Serum er kostbart, og ettersom serum inneholder mye næring kan det forekomme kontaminanter som kan ødelegge for celleforsøkene. Fysiologisk variabilitet i serum gjør det også vanskeligere å få identiske vekstforhold for cellene i ulike forsøk. Bruk av serum gjør det vanskeligere å rense eventuelle kulturprodukter som skal benyttes i videre

analyser. Tilgjengelighet av serum er også en faktor. Alternativet er å bruke et medium uten serum, men at man da i stedet tilsetter blant annet vekstfaktorer og hormoner. Fordeler med å ha et serumfritt medium er at da kan det produseres et medium som er selektivt for den bestemte celletypen som brukes. Og det blir også mulig å variere mellom å ha et medium som fremmer vekst eller differensiering ved å endre konsentrasjon og type vekstfaktor. Ulemper med å bruke serumfritt medium er at veksthastigheten ofte reduseres hvis serum ikke er til stedet. Å supplere vekstmedium med vekstfaktorer og hormoner kan være likeså kostbart som å kjøpe serum. Serumfritt medium er ofte spesifikt til ulike typer cellelinjer, og derfor kan det ikke alltid benyttes til alle de ulike cellelinjene som det jobbes med [70].

Cellevekst og grafisk framstilling i vekstkurver

Celler i kultur vokser som regel gjennom 3 ulike vekstfaser (se figur 5). Lagfase, logfase og platåfase. Lag fasen er den første delen av vekstkurven der det er lite eller ingen deling av cellene. Lengden på denne perioden varierer fra celletype til celletype, men den varer som regel i noen få dager. Grunnen til minimal vekst kan være tilvending til de nye omgivelsene, at adherente celler fester seg til bunnen av cellekulturflasken eller at cellene nylig har blitt utsatt for trypsinering. Etter lagfasen kommer logfasen der antall celler øker eksponentielt. Denne veksten kommer av at nesten alle cellene deler seg. Det er ut i fra denne fasen at cellenes doblingstid, t_2 , kan bestemmes. Platåfasen inntreffer når veksten avtar og celledetallet blir konstant eller begynner å gå ned. Cellene har da dekket hele bunnen av kulturflasken og de har sluttet å dele seg, de har nådd konfluens. Mitotisk aktivitet opphører her fordi det skjer kontaktinhibering. Det betyr at celleveksten hemmes på grunn av fysisk kontakt mellom naboceller, celle-celle kontakt. En av egenskapene som karakteriserer mange kreftceller (in vivo) er at de har defekt kontaktinhibering. Veksten bremses ikke opp selv når celledettheten blir mye større enn i normalt vev. Dette fører til at kreftceller danner en tumor ("svulst") som avviker fra normal vevsoverflate/organform.



Figur 5: Vekstkurve. Figuren viser tid langs en lineær X-akse og cellekonsentrasjon langs en logaritmisk Y-akse, og de tre ulike vekstfasene. En vekstkurve er en grafisk framstilling av den matematiske formelen for cellevekst.

Matematisk framstilling av cellevekst

Ekspontsiell cellevekst kan uttrykkes som cellekonsentrasjon N som funksjon av t i formelen:

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

der N_0 er cellekonsentrasjonen ved tiden 0 og b er en parameter som sier noe om cellenes veksthastighet. En vekstkurve, som vist i figur 1, er en grafisk framstilling av denne formelen om cellekonsentrasjon som funksjon av tid. Vekstkurver uttrykkes ofte som semilogaritmiske grafer, der X-aksen er lineær mens Y-aksen er logaritmisk. Det er fordi

celler som vokser eksponentielt vil i et slikt diagram gi en rett linje. Denne linjen har et stigningstall b , og kan brukes i formelen for utregningen av cellenes doblingstid t_2 :

$$t_2 = \frac{\ln 2}{b}$$

Dobblingstid er den tiden det tar før cellekonsentrasjonen dobler seg.

Trypsinering av celler

Celler som vokser adherent må løsne fra flaskebunnen før cellene kan tas ut til telling (høsting). Enzymet trypsin bryter ned proteinene på celleoverflaten som er festete til flaskeoverflaten, og cellesuspensjon dannes. Trypsin er et enzym som bryter ned proteiner til mindre peptider og aminosyrer ved at det katalyserer hydrolysereaksjonen av peptidbindinger. Trypsin klassifiseres som en endopeptidase, den kløyver inne i polypeptidene og ikke på terminalene. pH optimum er 8 og temperaturoptimum er på 37 grader C. Dette enzymet må imidlertid oppbevares i fryser med -20 grader C eller enda lavere temperatur for å forhindre autolyse. Trypsin er en serinprotease, det vil si at den har aminosyra serin i det aktive setet. Serin blir aktivert (gjort mer nukleofil) i katalyseringsprosessen.

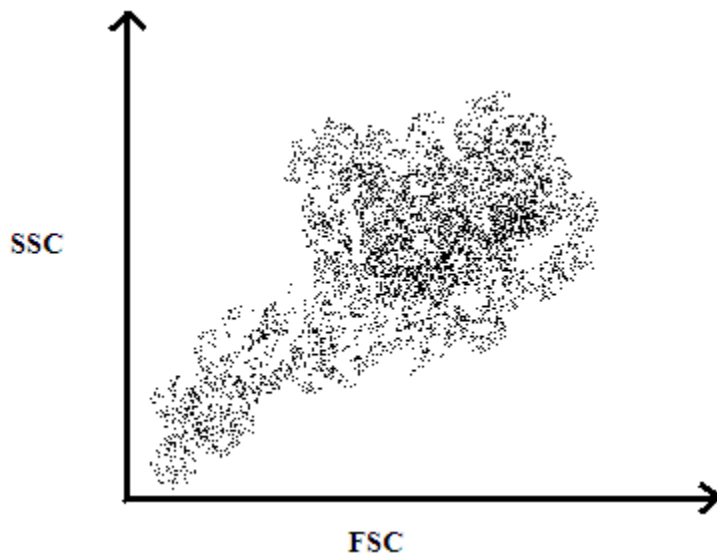
2.1.2. Flowcytometri (FCM)

Flowcytometri er en metode for å studere lysspredning og fluorescens fra celler eller mikroskopiske partikler som befinner seg i en væskestråle. Cellene eller partiklene passerer enkeltvis en laserstråle fra en lyskilde, og spredningen eller fluorescensen detekteres av detektorer. Flowcytometri kan brukes til måling av mange ulike parametere, blant annet beskrivelse av celleoverflaten, cytoplasma og kjerneinnhold, identifisere og kvantifisere forskjellige cellepopulasjoner, måle enzymaktivitet, foreta cellesortering og studere apoptose.

Fluorescens

Prinsippet bak fluorescens er at det som skal måles blir farget med et fluorescerende molekyl (fluorokrom) som binder til den komponenten i cellen som man ønsker å undersøke. Cellene blir plassert inne i måleinstrumentet, og der passerer én og én celle i en væskestrøm forbi en laserstråle med en bestemt bølgelengde. Laserlyset tilfører det fluorescerende fargestoffet energi, det eksiteres, og når den eksiterte forbindelsen går tilbake til den energetiske grunntilstanden frigjøres energiforskjellen i form av fotoner, emisjon. Det emitterte lyset blir fokusert ved hjelp av avansert optikk og sendt videre til en detektor (fotomultiplikator). Detektoren omdanner lyssignalet til et elektrisk signal som er proporsjonal med mengden fargestoff i cella. Det kan analyseres flere parametere i en og samme prøve ved å benytte ulike fluorokromer og laserlys av ulike bølgelengder.

Lysspredning



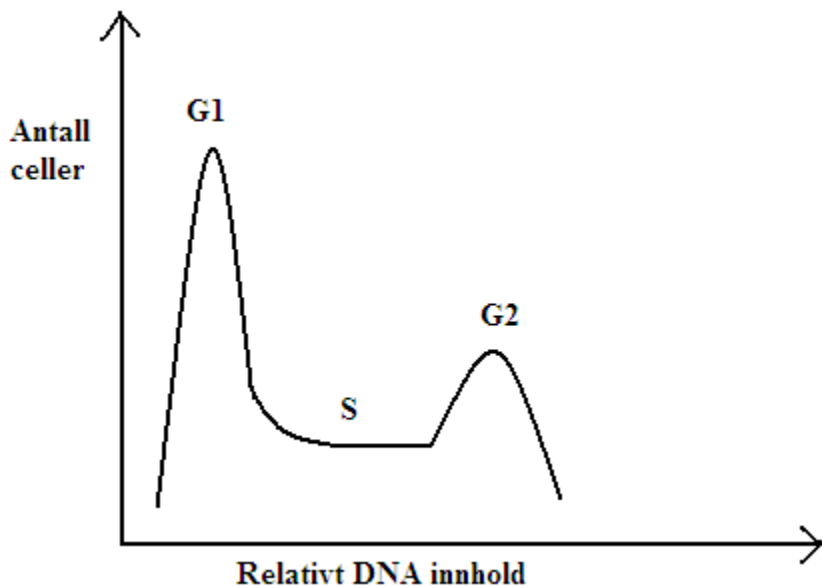
Figur 6: Figuren viser et dot-plot cytogram, der forward scatter (FSC) uttrykkes langs x-aksen og side scatter (SSC) uttrykkes langs y-aksen. Prikkene i grafen er celler som er målt av et flowcytometer, og som har plassert seg på ulike steder avhengig av størrelse og celleinnhold.

I et flowcytometer kan laserlyset som sendes ut fra lyskilden spres både i lengderetning (forward scatter, FSC) og til siden (side scatter, SSC). Det spredde lyset blir målt henholdsvis av en forward scatter detektor og side scatter detektor. Når lyset fra lyskilden sendes mot en celle blir det lyset som passere cellen i lengderetning registrert av forward scatter detektoren [71]. FSC er et mål på den relative cellestørrelsen. Noe av lyset som treffer cellen blir imidlertid brutt. Lysbrytningen skjer på grunn av at mediet som lysstrålen kom fra har en annen brytningsindeks (n) enn det mediet (celleinholdet) som lyset treffer. Dette brutte lyset detekteres, og SSC er et mål på cellens innhold og kompleksitet [71]. Et FSC-SSC plot (se figur 6) sier noe om både størrelse og innhold til cellene som kjøres igjennom flowcytometeret. Celler som havner langt ned og til venstre i dette plottet har liten størrelse (døde og fragmenterte celler). Celler som havner langt til høyre og lengre opp i plottet har større cellestørrelse og mer innhold (viable celler). Ei celle som er tetraploid vil befinne seg høyere oppe og lengre til høyre i forhold til normale, diploide celler. Det er fordi tetraploide celler har to cellekjerner og har en forstørret cellestørrelse [72].

Flowcytometri kan benyttes til måling av både cellulært DNA innhold og apoptose.

2.1.3. Måling av cellulært DNA

Mengde DNA i cellekjernen kan måles ved bruk av flowcytometri, og ut i fra slike analyser kan man bestemme fordelingen av celler i de forskjellige fasene av cellesyklus. DNA innholdet i en celle gir en direkte informasjon om hvilken fase av cellesyklus cellen befinner seg i [73]. I en cellepopulasjon som vokser eksponentielt vil det bli en fordeling av celler i de ulike fasene med tanke på ulik mengde DNA (se figur 7). Det dannes et histogram der den første toppen er celler i G1 fasen, deretter kommer et lavt og flatt område der S-faseceller er. Den andre toppen representerer celler som befinner seg i G2 og M fasen av cellesyklus. Histogrammet uttrykker relativ fluorescens (lysintensitet) langs X-aksen, som er proporsjonal med mengde DNA, og antall talte celler langs Y-aksen (se figur).



Figur 7: Et cellesyklus-histogram. Viser fordeling av celler i en populasjon i de ulike fasene av cellesyklus. Langs x-aksen er det relativ fluorescens, noe som uttrykker den relative mengden DNA i cellene. Langs y-aksen er det antall talte celler.

I G_1 fasen inneholder cellekjernen i en somatisk celle 23 kromosompar ($2n$), og en DNA mengde på omtrent 7 pikogram/celle [74]. DNA innholdet øker gradvis i S fasen fra $2n$ til nesten $4n$ ved at mer DNA syntetiseres. Mengden blir til slutt doblet, og da er cellene kommet inn i G_2 fasen av syklusen. Celler i G_2 fasen inneholder dobbelt så mye DNA ($4n$) som celler som befinner seg i G_1 fasen. Celler som er i den samme fasen av cellesyklus har den samme mengden DNA i kjernen. Derfor burde det teoretisk sett bli detektert kun en fluorescensintensitet for celler fra henholdsvis G_1 og G_2 fasen. Men i stedet blir det en normalfordelt fluorescens fordeling. Årsaken til denne normalfordelingen er instrumentelle feil og biologiske variasjoner i hvordan fargestoffet binder DNA molekylet. Bredere histogramtopper gjenspeiler større variasjon i målingene. Når høyden på en topp øker så betyr det at flere av cellene i prøven befinner seg i denne bestemte fasen av cellesyklus. Hvis det blir en økning i G_1 toppen kan det bety en G_1/G_0 arrest, mens en økning i G_2 toppen kan bety en G_2/M arrest.

Celler som inneholder en unormal mengde kromosomer kalles aneuploide celler. En cellekultur kan i noen tilfeller inneholde både celler som er normale, diploide ($2n$), og

aneuploide celler ($2n \pm$). En slik heterogen cellekultur vil få et histogram med 2 G1 toppe og 2 G2/M toppe. Tetraploide celler ($4n$) er celler med dobbelt så mye DNA i kjernen i forhold til normale celler. De inneholder to kjerner på grunn av gjennomføring av abnormale celledelinger (mitoser). I et histogram kan slike celler detekteres ved at det blir dannet en topp langt til høyre, rundt $8n$, som da er disse cellenes G2 topp.

2.1.4. Måling av apoptose

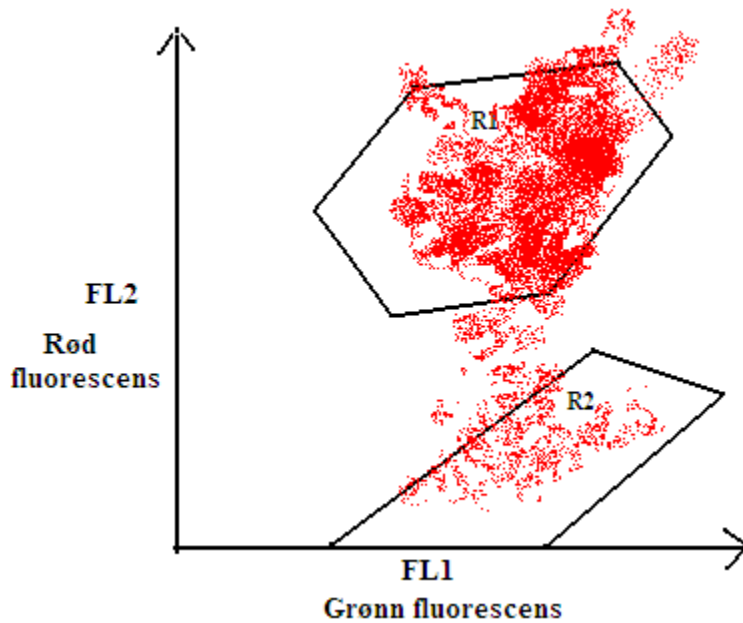
JC-1 er en metode som benyttes for å måle apoptose ved hjelp av flowcytometri. Når celler dør ved apoptose skjer det en endring i mitokondrienes membranpotensiale ($\Delta\Psi$, delta psi), og det er denne endringen som bestemmes. Cellene blir farget med det fluoriserende fargestoffet JC-1(5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) for at delta psi skal kunne detekteres [75]. Prinsippet bak målemetoden er at når delta psi endres så endres også bølglengden på lyset som emitteres fra JC-1. På denne måten blir det mulig å skille mellom viable og apoptotiske celler.

JC-1 er et kationisk fargestoff som kan transporteres inn i cellenes mitokondrier. Fargestoffet har den egenskapen at det kan forekomme som både monomerer og aggregater avhengig av hvor polarisert mitokondriemembranen er, altså hvor høy eller lav delta psi er. Det som gjør det mulig å detektere cellenes $\Delta\Psi$, og dermed avgjøre om cellen er levende eller apoptotisk, er at JC-1 monomerer og JC-1 aggregat emitterer lys med to ulike bølglengder når de eksiteres av argonlaseren i flowcytometeret (laserlys med en bølglengde på 488 nm).

Et av kjennetegnene på tidlig apoptose er at den elektrokjemiske gradienten over membranen i mitokondriene reduseres, membranpotensialet blir depolarisert. Denne reduksjonen i $\Delta\Psi$ er forårsaket av at permeabiliteten i mitokondriemembranen øker. Membranpotensialet i normale celler er polarisert, innsiden er negativt ladet i forhold til utsiden. JC-1 transporteres inn i mitokondriene i levende celler med normal $\Delta\Psi$ på grunn av motsatt ladning. Fargestoffet går inn i matrix og akkumulerer der, og det blir dannet

JC-1 aggregater. JC-1 aggregater emitterer rød/orange lys (emisjonsmaksimum på 590 nm) etter at de er blitt eksitert av laserlyset i flowcytometeret. I apoptotiske celler er membranpotensialet ødelagt og dermed eksisterer ikke ladningsforskjellen som skal til for at JC-1 kan tas opp i mitokondriematrix. JC-1 forblir ute i cytoplasma, og forekommer her som monomerer. JC-1 monomerer forårsaker grønn fluorescens (emisjonsmaksimum på 527 nm). Levende celler har noe av fargestoffet ute i cytoplasma i tillegg til inni mitokondriene, og det emitteres både grønt og rødt lys. Celledød karakteriseres ved at det blir mindre rød fluorescens og mer grønn fluorescens. Det som egentlig måles av flowcytometeret er forholdet mellom rød og grønn fluorescens. Denne ratioen (rød/grønn) reduseres i døde og apoptotiske celler sammenlignet med levende celler. Måleresultatet uttrykkes som prosent apoptotiske celler, JC-1 positive celler.

Flowcytometeret har ulike kanaler (FL1 og FL2) for å kunne filtrere emittert lys med ulike bølgelengder. Det emitteres lys i enten den ene eller den andre kanalen avhengig av cellenes delta psi verdi [76]. Lav $\Delta\Psi$ gir JC-1 monomerer, og fluorescensen fra disse detekteres FL1. Høy $\Delta\Psi$ gir JC-1 aggregat, og fluorescensen fra disse detekteres i FL2.



Figur 8: FL1-FL2 plot, der FL1 er langs x-aksen og FL2 er langs y-aksen. Begge aksene har logaritmisk skala. FL1 og FL2 er to kanaler i flowcytometeret som måler fluorescens med ulike bølgelengder. Grønne JC-1 monomerer i apoptotiske celler blir detektert i FL1. Mitokondrier med røde JC-1 aggregat, i levende celler, detekteres i FL2. Det er inntegnet to kvadranter i plottet, R1 og R2. Levende celler havner i R1 kvadranten, mens døde celler havner i R2. Apoptotiske celler emitterer mindre rød fluorescens, altså de får en lavere y-verdi.

2.1.5. Måling av cGMP

I denne oppgaven skulle mengden ekstracellulær cGMP bestemmes for å kunne si noe om hvordan stråling påvirker transporten av dette nukleotidet ut av cellene. Resultatene kan gi en indikasjon på hvordan uttrykket av membrantransportproteinene eventuelt påvirkes, eller hvordan evne deres til å pumpe ut sykliske nukleotider endrer seg. cGMP måles ved å bruke teknikken Radioimmunoassay (RIA). Prinsippet bak denne metoden er at man har en kjent mengde radioaktivt antigen som binder et antistoff. Den ukjente mengden antigen som skal bestemmes, i dette tilfellet cGMP, binder også dette antistoffet. Det blir en konkurranse mellom radioaktivt merket antigen og umerket, ”kaldt”, antigen. Det radioaktive antigenet var i dette tilfellet tritium-merket cGMP ($[^3\text{H}]$ -

cGMP). Tritium er en radioaktiv isotop av hydrogen som har ett proton og to nøytroner i kjernen. Radioaktivt antigen blir utkonkurrert av cGMP når konsentrasjonen av dette ”kalde” antigenet øker. Det er en omvendt sammenheng mellom mengden radioaktivt cGMP bundet til antistoffet og mengden cGMP til stede i prøven. Det er mengde radioaktivt antigen bundet til antistoff som måles i en tellemaskin for radioaktivitet.

Mengden [³H]-cGMP blir målt og beregnet som enten cpm (counts per min.) eller dpm (disintegrasjoner per min.). Når radioaktive stoffer disintegrerer, brytes ned, blir det sendt ut radioaktiv stråling (1 disintegrasjon/sek er 1Bq). Denne energien som frigjøres fra isotopen eksiterer scintillerende stoffer som finnes i tellervæsken. Disse stoffene har den egenskapen at de gir fra seg et lysglimt når de blir truffet av stråling. Lysglimtene registreres av en fotomultiplikator inne i tellemaskinen.

2.1.6. ID₅₀ verdi

I farmakologien er dose-respons et velkjent begrep. Det å studere sammenhengen mellom endring i dose og dermed endring i respons. Å se på hvordan responsen endrer seg ved forskjellige doser. Når celleoverlevelse og celledød skal undersøkes benyttes ofte ID₅₀ verdien. Denne verdien beskriver den inhibitoriske dosen som gir 50 % reduksjon i celletetthet. Dosen beregnes ut i fra en semilogaritmisk dose-respons kurve, med % respons langs y-aksen og log dose langs x-aksen. Linjen i grafen skal bli tilnærmet lik rett, og da kan ID₅₀ verdien avleses.

2.2. Anvendt materiale og metoder

2.2.1. Reagenser og kommerzielle kit

Reagenser og kit	Firma
Trypanblå	Sigma, St. Louis, USA
Trypsin (0,25 %)	Biochrom AG, Berlin, Tyskland
JC-1 ; Mitochondrial potential sensors	Molecular probes, Eugene, USA
Cycle TEST PLUS DNA reagent kit	Becton Dickinson, San Jose, USA
Cyclic GMP [³ H] Assay System	GE Healthcare, Norge

2.2.2. Medium

Medium	Firma
RPMI 1640 u/fenolrødt (1x) liquid med L-glutamin (300 mg/L) og natriumbikarbonat (pH: 7,2)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Streptomycin (100 mg/l)	
Penicillin (66 mg/l)	

2.2.3. Celledyrkningsutstyr

Celledyrkningsutstyr**Firma**

Sterile cellekulturflasker
m/filter (25 cm² og 80 cm²)

NUNC™, Danmark

Sterile pipetter
(2, 5, 10 og 25 ml)

Becton Dickinson, New Jersey, USA

Falcon rør, flowcytometri
(5 ml)

Becton Dickinson, New Jersey, USA

Filter, flowcytometri
(50 µm)

Becton Dickinson, New Jersey, USA

Sterile sentrifugerør
(15 ml)

NUNC™, Danmark

Eppendorf rør
(1,5 ml)

Sarstedt, Tyskland

Sterile glasspipetter

2.2.4. Buffer

Buffer**Innhold**

PBS (pH: 7)	137 mM NaCl
	2,7 mM KCl
	8,3 mM Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM KH ₂ PO ₄

2.2.5. Cellelinjen

En etablert cellelinje er en cellepopulasjon som har gjennomgått en genetisk endring (transformasjon) og som dermed er i stand til å dele seg i det uendelige i kultur [77]. I denne oppgaven ble det brukt celler fra cellelinjen C4-I. Denne cellelinjen ble etablert i 1961 av Auersperg og Hawryluk [78]. C4-I er humane celler fra et invasivt plateepitelkarsinom fra livmorhalsen fra ei hvit kvinne, stadium II (FIGO klassifisering). Som nevnt tidligere har denne cellelinjen, ved gunstige vekstvilkår, en gjennomsnittelig doblingstid på 38 til 47 timer [1]. Dette er adherente celler som vokser i monolag, noe som vil si at de ikke vokser i suspensjon men fester seg på bunnen av dyrkningsflasken. Disse kreftcellene inneholder integrert HPV-18 DNA. Virus DNAet uttrykker to onkoproteiner som binder, og dermed inaktiverer, Rb og tumorsuppressorgenet p53. Reguleringen av celledelingsprosessen blir ødelagt og cellene får dele seg ukontrollert.

2.2.6. Metodeproblematikk

Vekst av gjærsopp i cellekultur

Dyrking av celler innebærer alltid en risiko for kontaminering. En vanlig kontaminant er gjærsopp. Gjærsopp er encellede organismer, i motsetning til bl.a. muggsopp. De gjenkjennes enkelt i mikroskop: de har en oval form, de er omtrent 1/3 av størrelsen av ei celle og de sitter ofte i kjeder på 4-7. Soppsporene formerer seg ved knoppskyting

(”budding”), og det er derfor de oftest forekommer slike lenker med flere sporer etter hverandre. Gjærsopp er vanlig å finne i lokaler der det oppholder seg mennesker, og sporene kan spres gjennom luften. Gode hygieniske tiltak og å jobbe sterilt er avgjørende for å unngå dette problemet.

Det praktiske arbeidet ble preget av soppvekst i cellekulturen. Det ble konstatert at det var gjærsopp etter analyser på mikrobiologisk avdeling på UNN. En viktig del av oppgavens praktiske del ble derfor arbeidet med å løse dette problemet. I prosessen med å finne årsaken til at det gikk galt måtte mulige kontamineringskilder kartlegges. Deretter måtte en etter en kilde elimineres ved å gjøre endringer i forsøksoppsettet. Mulige kilder til kontaminering er alt som kommer i kontakt med cellekulturen. Dyrkningsmedium, serum og pipetter er i direkte kontakt med cellene inne i kulturflaskene mens mennesker og luften rundt kulturflaskene kan bidra til kontaminering når korkene er tatt av flaskene. Kulturflasker som har korker med filter kan også kontamineres når korkene er skrudd på hvis filteret på en eller annen måte er ødelagt. Hvis filteret blir vått kan kontaminanter trekke inn i flasken.

Våren 2007 ble det dyrket celler i forbindelse med at vekstkurver til cellene skulle lages. Det ble laget 3 vekstkurver, og hvert celleforsøk ble holdt gående i over 16 dager. Det var aldri noe tegn til gjærsopp. Høsten 2007 skulle pilotforsøk kjøres. Cellene skulle dyrkes opp, stråles og deretter skulle forsøkene holdes i gang i enda flere dager. For hver gang ble det kontaminering av gjærsopp. Soppen dukket opp til ulike tidspunkt etter oppstart, og den kom noen ganger allerede før stråling og andre ganger etter at strålingen var unnagjort. Dyrkningsskapet ble spritvasket, men ettersom ingen andre som dyrket celler på det samme cellelaboratoriet hadde fått kontaminering måtte utstyr som kun ble brukt i disse forsøkene undersøkes. Dyrkningsmediet, serumet, elektrisk ”pipette boy” og personen som utførte forsøkene. Medium og serum ble satt i varmeskap for å se om det ble oppvekst av gjærsopp her. Det ble benyttet medium og serum fra ulike beholdninger (”batcher”) på høsten i forhold til de forsøkene som ble kjørt på våren, så derfor måtte disse undersøkes for å utelukke at celledyrkningsmediet var årsaken. Resultatet var at det ikke kom gjærsopp i mediumsflaskene eller i serumsflaskene når de sto i dyrkningsskapet

i omkring 14 dager.

Pipette boy ble byttet ut til fordel for den som ble benyttet av de andre som jobbet på cellelaboratoriet, og som ikke fikk noen kontamineringer. Selv etter at disse endringene var utført fortsatte soppen å dukke opp.

I den første runden med stråling inneholdt kulturflaskene 35 ml væske under transporten over til stråleavdelingen, og i ett døgn etterpå. Dette var for å oppnå en stråledybde (et lag med væske over cellene) på 15 millimeter. For mye væske gjorde at filtrene i korkene ble våte, og det ble søl av vekstmedium og serum på utsiden av flaskene. Mengde væske i flaskene og måten flaskene ble transportert på ble endret, og disse endringene gjorde at korkene forble tørre og kunne fungere optimalt som filter mot kontaminanter. Kontamineringen fortsatte tross de nye endringene.

Det neste som ble testet ut var om det likevel kunne være vekstmediet. Det ble tilsatt vekstmedium til en annen type celler i noen andres celleforsøk. Dette resulterte i at også disse cellene ble kontaminert av gjærsopp. Dermed antok man at kilden til kontaminering var avdekket. Konklusjonen var at det nye tørrstoffet som høstens medium ble laget av var kontaminert, og at det tørrstoffet som vårens medium var laget av ikke var kontaminert, og dermed gikk alle forsøkene på våren uten problemer. Det ble bestilt nytt vekstmedium. Gjærsoppen kontaminerte også forsøket med nytt vekstmedium. For å utelukke at årsaken var en systematisk feil som ble begått ved behandling av cellene ble det kjørt to parallelle forsøk der to ulike personer dyrket opp celler fra samme batch. Hvis det kun ble kontaminering i forsøket til den personen som hadde jobbet med disse celleforsøkene var det nok en systematisk feil som ble begått i arbeidet med cellene. Men hvis det ble kontaminering i begge personenes celleforsøk måtte kontamineringen ligge i de nedfrysede cellebeholdningene. Det ble oppvekst av gjærsopp i begge forsøkene.

Grunnen til at de nedfrysede cellene ikke hadde blitt undersøkt som en mulig kontamineringskilde tidligere var at dette virket som en lite sannsynlig årsak. Det hadde blitt tatt opp celler fra flere ulike nedfrysninger fra forskjellige år, og i tillegg så hadde

det gått bra med de cellene som ble tatt opp og dyrket på våren. Cellene som ble benyttet på våren var hentet fra de aller gamleste nedfrysningene, og disse inneholdt tydeligvis ikke noen soppsporer. Men alle de ampullaene av nyere dato som var frosset ned inneholdt sopp. En mulig forklaring er at selv om cellene var frosset ned til ulike tidspunkt kunne alle disse stamme fra en og samme hovednedfrysning, som hadde vært kontaminert. En grunn til at gjærsoppen dukket opp til ulike tidspunkt etter opptining (alt fra 2- 11 døgn) kan være at det var ulik konsentrasjon av soppsporer i de nedfrosste cellebeholdningene. Det ble bestilt nye celler fra England, og når celledyrkningen med disse cellene ikke ble kontaminert av gjærsopp var dette en bekreftelse på at det var cellene fra den gamle beholdningene som inneholdt kontamineringen. Vi erfarte altså at både mediet og cellebeholdningen inneholdt soppsporer som ga soppinfeksjon.

2.2.7. Deskriptiv statistikk

Variasjon i målinger forekommer alltid, og det kan skyldes både biologiske variasjoner og måleusikkerhet. Når tallmaterialer skal tolkes og presenteres må det tas hensyn til variasjonen. Dette gjøres ved å beskrive spredningen til resultatverdiene. I denne oppgaven skal følgende statistiske faktorer beregnes:

- Gjennomsnitt- middelerdi for alle målingene
- Standardavvik (SD)- gjennomsnittelig avstand fra gjennomsnittet (middelerdien)

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}$$

Figur 9: Formel for standardavvik, her betegnet som S. Standardavviket er kvadratrotten av variansen. N er antall observasjoner, X_i er verdien av en enkelt observasjon, mens \bar{X} er gjennomsnittsverdien av alle observasjonene. Summasjonstegnet viser at det er en summering av de kvadrerte avvikene fra gjennomsnittet.

2.2.8. Måling av ekstracellulær konsentrasjon av cGMP

Prosedyre for [³H]-cGMP assay

Den ekstracellulære konsentrasjonen av cGMP ble målt ved å bruke et RIA kit. Antigenet som ble benyttet var merket med den radioaktive isotopen tritium.

Væsken i kulturflaskene inneholder ekstracellulært cGMP, men også døde celler som har løsnet fra flaskeveggen. Døde celler er en kilde til ”falsk” cGMP, og for å eliminere denne kilden blir væsken sentrifugert, og supernatanten tatt av og brukt i assayet. Før prøvene kan benyttes i cGMP assayet må proteinene felles ut. Dette gjøres ved å tilsette 5 % TCA (trikloreddiksyre). Tilsetting av denne syra danner et surt miljø som må nøytraliseres, til dette brukes kalsiumkarbonat (CaCO₃). Prøvene blir deretter blandet med antistoff (antiserum) og radioaktivmerkede cGMP. Antistoffet binder både merket og umerket cGMP, og det blir en konkurranse om bindingen. Før prøvene skal kjøres i scintillasjonstelleren (Packard 1900 TR) blir iskaldt ammonium sulfat ((NH₄)₂SO₄) tilsatt for å felle ut fritt cGMP. Iskaldt ammonium sulfat gjør det mulig å felle ut uten at bindinger i forbindelsene brytes. Det er ønskelig å separere cGMP som er bundet til antistoff fra fritt cGMP på grunn av at det kun er radioaktivt cGMP bundet til antistoff som skal måles i maskinen, ikke fritt radioaktivt cGMP. Prøvene sentrifugeres og fritt cGMP havner i supernatanten, og suges av. Destillert vann tilsettes pelleten. Det siste som gjøres før prøvene settes inn i scintillasjonstelleren er at tellevæske (Ultima Gold XR) tilsettes.

For å kunne regne ut den ukjente konsentrasjonen av cGMP (antigen) blir det laget en lineær standardkurve, med forholdet mellom C₀ ([³H]-cGMP bundet til antistoff uten ”kaldt” antigen til stede) og C_x ([³H]-cGMP bundet til antistoff med ”kaldt” antigen til stede) som funksjon av kjente konsentrasjoner av ”kaldt” antigen (standardprøver). Forholdet mellom C₀/C_x øker med økt mengde standardantigen til stede. Når prøvene er analysert og mengde bundet [³H]-cGMP er målt brukes denne verdien til å gå inn i standardkurven for å se hvilken konsentrasjon av cGMP den tilsvarer.

Resultatene får benevnningen pikomol cGMP per ml. Det er i tillegg ønskelig å oppgi resultatene som konsentrasjon av cGMP per celle. Pikomol cGMP per ml ble dividert på celledallet (10^4 celler/ml), og den nye benevnningen blir pikomol cGMP per 10^4 celler.

2.2.9. Måling av DNA innhold

Prosedyre for PI-farging av DNA og Cycle Test

I dette forsøket ble Cycle testTM Plus DNA Reagent Kit fra Becton & Dickenson brukt for å bestemme distribusjonen av celler i de ulike fasene av cellyklus. DNA molekylet farges med det fluoriserende stoffet propidiumiodid (PI) og kjøres deretter gjennom flowcytometret (FACScan Flowcytometer). PI (3,8-diamino-5-(3-diethylaminopropyl)-6-phenylphenanthridinium iodide methiodide) er et lipofilt og kationisk fargestoff som binder støkiometrisk til DNA molekylet, det vil si at det er et lineært forhold mellom mengde fargestoff og mengde DNA. Cella treffes av lys fra en argonlaser, som har en bølgelengde på 488 nm. Det blir emittert en mengde fluorescerende lys, med et emisjonsmaksimum på 639 nm, som vil være proporsjonal med mengden DNA i cella [73]. Som forklart ovenfor så endres DNA innholdet i cellekjernen i løpet av en cellyklus, og derfor kan det måles hvor mange celler som befinner seg i de ulike fasene av syklusen. Dette er en metode som gir et statisk bilde av cellyklus, den sier ingenting om kinetikken, om cellene har stoppet opp i noen faser eller er på vei ut eller inn av cellyklusen. For å få et mer dynamisk bilde av cellyklusen kan bromodeoxyuridin- (BrdUrd) metoden benyttes. Før cellene kjøres gjennom flowcytometeret må de prepareres og farges. For at fargestoffet skal kunne tas opp i cellen og binde til DNA molekylet må cellemembranen gjøres permeabel. Cellemembranen løses opp med en ikke-ionisk detergens. Cytoskjelettet og nukleære proteiner blir eliminert med trypsin (B. D beskrivelsen). Kromatinet i kjerna blir stabilisert med spermin. Spermin er et polyamin som reagerer med nukleinsyrer og som kan stabilisere helixstruktur. Alt dette gjøres for å få isolert kjernen fordi det er denne som skal farges med PI. Propidiumiodid binder ikke DNA molekylet spesifikt men binder mellom baseparene i dobbelttrådig nukleinsyrer,

noe som betyr at den også binder dobbeltrådig RNA molekyler. Ettersom det kun er DNA innholdet i kjerna som skal måles må prøvene i forkant behandles med RNase for å få splittet dobbeltrådig RNA slik at dette ikke farges.

2.2.10. Måling av apoptose

Prosedyre for JC-1 farging og måling av mitokondrielt transmembran potensial

Cellene blir farget med JC-1. Fargestoffet eksiteres av laserlyset i FCM, og emisjonen fra JC-1 endrer seg når det transmembrane potensialet i cellenes mitokondrier endrer seg. Mitokondriene i levende celler har høy delta psi, og JC-1 emitterer rødt lys. Mitokondriene i døde celler har lav delta psi, og JC-1 emitterer grønt lys.

Resultatet som kommer ut av målingene er prosent apoptotiske celler, JC-1 positive celler. Altså hvor stor prosentandel av den totale mengden celler som kjøres gjennom måleinstrumentet som er apoptotiske. I denne oppgaven ble også levende og døde celler detektert ved å farge cellene med trypanblå og deretter telle de i bürkerkammer under mikroskop. Trypanblåmetoden gir en konsentrasjon av levende celler. JC-1 er både en kvantitativ og kvalitativ metode, der det påvises om det er apoptotiske celler til stede ved å se om det blir fargeendring eller ikke, og så forteller fluorescensintensiteten noe om hvor mange celler som er apoptotiske, angitt som prosentandel. Konsentrasjonen av apoptotiske celler kan beregnes når man vet hvor mange celler som er kjørt gjennom FCM. Men dette ble ikke kalkulert i denne oppgaven.

2.2.11. Celledyrking (vekstegenskap-forsøk)

Cellene ble dyrket i sterile kulturflasker (nunc, 25 cm²) som inneholdt 10 ml av vekstmediet RPMI- 1640 som var tilsatt 10 % serum (fetal bovine serum). Flaskene ble

satt i et inkubasjonsskap med en temperatur på 37°C og en CO₂ fuktighet på 5 %. RPMI-1640 inneholder næring i form av blant annet L-glutamin, uorganiske salt i form av NaHCO₃, og antibiotika penicillin og streptomycin. Dette vekstmediet er ikke tilsatt fenolrødt. Fenolrødt er en pH-indikator som endrer farge ved endring i pH mellom 6,8 og 8,4. Fargen går fra å være rød i alkalisk miljø til å bli gul ved dannelse av syre. Fenolrødt er et stoff som til en viss grad mimikerer østrogen [79], og kan derfor øke cellevekst til celler som har uttrykt østrogenreseptorer. Celler i brystvev og fra ulike vev i det kvinnelige reproduksjonsorgan har ofte steroidreseptorer. Tidligere ble det derfor ikke brukt fenolrødt til slike cellelinjer. Det ble imidlertid vist at C4-I cellene mangler kjernereseptorer for progesteron og østrogen [1]. Man kunne derfor uten problem ha benyttet et vekstmedium med fenolrødt, men bruken av vekstmedium uten fenolrødt til C4-I celler er en innført prosedyre på vårt laboratorium. RPMI-1640 inneholder ikke vekstfaktorer og må derfor suppleres med serum. Medium ble skiftet hver dag for å fjerne avfallsstoffer slik at vekstvilkårene kunne opprettholdes. For å oppnå fysiologisk pH på omkring 7,4 i vekstmiljøet til cellene er bikarbonatbufferen i mediet og CO₂ konsentrasjonen i luften avgjørende. Kulturflaskene som benyttes har korker med filter. De tillater gassutveksling, som er viktig for buffersystemet, hindrer at kontaminanter kommer inn og at medium renner ut.

Det første som ble gjort var å sette opp en vekstkurve for å undersøke cellelinjens doblingstid. Det var viktig å få bestemt om disse cellene fortsatt hadde de opprinnelige vekstegenskapene med tanke på doblingstid. Vekstkurven gikk over 10 døgn og det ble brukt 3 paralleller. Cellene ble sådd ut med en celletetthet på omtrent 4×10^4 celler/ml fordi det er ved denne cellekonsentrasjonen at C4-I cellene vokser best. Høsting av celler ble gjort daglig. For å kunne ta ut cellesuspensjon til telling måtte de først løsne fra flaskeveggen. Mediet ble sugd av og deretter ble trypsin (0,25 % i PBS med 0,05 % Na₂EDTA) tilsatt. Trypsin er et enzym med proteolytisk effekt som ødelegger bindingen mellom cellene og flasken ved å bryte ned proteiner på celleoverflatene. Trypsinet fikk stå og virke i 10 minutter i varmeskap med en temperatur på 37°C. På denne tiden løsnet cellene, og for å avslutte enzymreaksjonen ble medium med serum tilsatt. Dette ble blandet godt før cellesuspensjon ble tatt ut til telling. Lik mengde suspensjon og

trypanblå ble blandet i et sentrifugerør. Trypanblå brukes for å se på celleoverlevelsen når man skal telle antall levende celler. Blåfargen trekker inn i alle cellene, men de levende cellene pumper fargen ut igjen. Celler med jevn, rund form, og lys farge er levende celler.

2.2.12. Celletelling

Celletellingen foregikk ved bruk av Bürkerkammer og et mikroskop (Nikon TMS) (10 x forstørrelse). Et dekkglass ble festet til tellekammeret og en dråpe cellesuspensjon ble tilsatt forsiktig på siden av dekkglasset. Dråpen trekkes inn under dekkglasset. Tellekammeret har 3x 3 ruter. Hvis celletettheten var stor ble 3 ruter diagonalt talt, mens ved lav celletetthet måtte alle 9 rutene telles. For å finne cellekonsentrasjonen (celler/ml) ble antall talte celler (N) dividert på antall talte ruter (NR). Volumet per rute i tellekammeret er 0,1µl.

$$\text{Cellekonsentrasjonen blir: } \frac{N}{(NR * 0,1\mu\text{l})} = \frac{N * 10^4}{NR \text{ ml}}$$

Den cellekonsentrasjonen som kalkuleres har derfor benevnningen 10^4 celler/ml.

Dette tallet ble deretter multiplisert med 2 for å kompensere for fortynningen (1:1) med trypanblå.

2.2.13. Tillaging av vekstkurvene

Cellekonsentrasjonen ved hvert tidspunkt ble dividert på konsentrasjonen ved starten av tellingen for å finne det relative celledetallet, som deretter skulle plottes som funksjon av tid. Denne vekstkurven var ikke semilogaritmisk, men hadde to lineære akser.

2.2.14. Utregning av doblingstiden t_2

Punktene i logfasen av vekstkurven ble framstilt i en semilogaritmisk graf, der X-aksen (tid) er lineær og Y-aksen (cellekonsentrasjon) er logaritmisk. Disse punktene danner en relativt rett linje hvis det er en eksponentiell vekst her. Formelen for den eksponentielle linjen er $y = a e^{bx}$, der a og b blir bestemt. Man kan dermed finne doblingstiden ved formelen $t_2 = \ln 2/b$.

2.2.15. Celledyrkning (stråleforsøk)

Cellene ble sådd ut på 48 flasker (små kulturflasker med filter) med en konsentrasjon på omtrent 4×10^4 celler/ml. På forhånd hadde cellekonsentrasjonen blitt telt, og justert til 40×10^4 celler/ml. Det var fordi celsuspensjonen etterpå skulle fortynnes 10 ganger ved å tilsette 1 ml celsuspensjon til 9 ml medium i hver kulturflaske. Det var 3 paralleller (a,b,c) for hver stråledose (dose 0, 1, 2, 3, 4), og for hver stråledose var det 3 sett med flasker fordi det skulle gjøres målinger på 3 forskjellige dager etter strålingen (dag 1, 3, og 6). I tillegg ble det gjort målinger på kontrollflasker (dose 0) på selve stråledagen (dag 0). Etter utsåing vokste cellene i 4 døgn før de ble bestrålt. Grunnen til det var at cellene skulle være i log-fasen av vekstkurven ved strålingen, de skulle vokse eksponentielt. Og i henhold til vekstkurvene som ble laget for disse cellene så vokser de i den eksponentielle fasen av kurven etter 4 dager. Det var ønskelig å la cellene vokse en god del dager etter stråling for å på en bedre måte kunne studere effektene av behandlingen. Det er fordi cellenes respons ikke inntreffer umiddelbart etter strålebehandling. I tillegg var det interessant å se på hvordan responsen endrer seg med tiden. Lengden på forsøket etter strålingen ble 6 døgn. Årsaken til at forsøket ikke ble kjørt i flere døgn var både på grunn av problemer med konfluens og kontaminering. Ut fra vekstkurvene var det tydelig at cellene etter 10 døgn (etter utsåing) hadde nådd konfluens. Da stagnerer veksten, eller den begynner å avta. Det er mindre korrekt/vanskeligere/ikke ønskelig å se på hvordan stråling reduserer veksten til celler, når celleveksten allikevel avtar på grunn av andre

årsaker, som konfluens. For å redusere risikoen for kontaminering av celleforsøket var det gunstig å ikke holde på lengre enn 10 døgn etter utsåing, av den enkle grunn at desto lengre et celleforsøk holdes i gang desto større er risikoen for en eller annen form for kontaminering. At akkurat dag 1, 3, og 6 etter stråling ble valgt som måledager var mest på grunn av praktiske hensyn. Helgedager måtte unngås ettersom utføring av stråling og målinger på flowcytometeret var avhengig av arbeidstakere på både sykehuset og universitetet.

2.2.16. Transport mellom celledyrkningslaboratorium og stråleavdeling

Før cellene skulle transporteres fra cellelaboratoriet på universitetet over til stråleavdelingen på sykehuset ble mediet sugd av flaskene og deretter ble det tilsatt 20 ml medium i stede for 10 ml. Det ble gjort på grunn av stråledybden. 20 ml væske i kulturflaskene tilsvarer et 10 millimeter tykt lag oppå cellene som vokser fast i bunnen av flaskene. Stråledybden skulle være 10 millimeter, og cellene ble strålt ovenfra og ned. 20 ml i kulturflaskene gjør at det nesten kommer væske opp i korkene. Det er ugunstig at væske væter filteret i korkene, det øker sjansen for kontaminering. For å unngå dette under transporten ble flaskene stilt i oppreist posisjon mens de ble båret til sykehuset. På denne måten ble cellene uten vekstmedium en kort stund, men det hadde trolig liten påvirkning på celleveksten. Når det arbeides med mange kulturflasker samtidig i sterilbenken så forekommer det at flaskene står oppreist, og at cellene ikke har tilgang på medium, i like lang tid. For å redusere eventuelle påvirkninger som transporten hadde på cellene (reduert tilgang på næring, endring i temperatur og luftfuktighet i forhold til de optimale dyrkningsforholdene), var også kontrollflaskene med på turen slik at de skulle ha vært igjennom de samme forholdene som resten av prøveflaskene. Flaskene ble plassert i en isoporeske med lokk, og båret til stråleavdelingen.

2.2.17. Stråling

Cellene ble bestrålt med gammastråler (fotoner), med en energi på 6MV og med en stråledybde på 10 millimeter. Dosene som ble benyttet var 2, 4, 8, og 12 Gy, henholdsvis dose 1, 2, 3, og 4. Etter at cellene var ferdigbehandlet og tilbake på cellelaboratoriet ble det ekstra mediet, 10 ml, sugd av flaskene. Deretter ble kulturflaskene satt tilbake i dyrkningsskapet. (bytting av medium annenhver dag).

2.2.18. Morfologi

Cellenes morfologi ble studert dag 0, 1, 3 og 6. Dette ble gjort ved å fotografere prøveflaskene mens cellene fortsatt er adherente. Det ble tatt bilde av en kontroll og en flaske som var bestrålt med dose 3. Hensikten var å se effekten av strålingen, og å kunne kvalitativt bestemme om celler dør ved enten apoptose eller nekrose ved å studere morfologi. Forskjellen på kontrollen og behandlede celler kommer godt fram ved bruk av dose 3. Denne dosen er stor nok for å være sikker på å få sett mange døde celler. Dose 4 ble ikke valgt fordi stråledosen er så høy at det som skjer med cellene ikke godt nok kan representere det som skjer med cellene som bestråles med lavere doser.

Det ble benyttet et lysmikroskop (Leica, Leitz DM IRB) som hadde tilkoblet et kamera (Leica DFC 420). Mikroskopet ble stilt inn på 40x forstørrelse, og for å ta og å redigere bildene av cellene ble fotoprogrammet Photoshop brukt.

2.2.19. Syklisk GMP

Syklisk GMP-målinger ble gjort senere. På forsøksdagene ble prøver derfor frosset ned og samlet opp slik at det kunne kjøres RIA på alle samtidig etter at de andre forsøkene var unnagjort. Dette ble gjort av praktiske og tidsmessige årsaker. Før prøveflaskene ble trypsinert ble mediet sugd av med 10 ml pipetter. Dette ble hatt over i 50 ml, usterile

sentrifugerør. Prøvene ble sentrifugert på 2200 rpm i 13 minutter. Deretter ble 5 ml av supernatanten sugd av hvert rør og overført til nye rør (Greiner-rør). Disse rørene ble korket og satt i fryser (-20 grader C).

2.2.20. Trypsinering

Cellene i monolayer ble trypsinert med 3 ml trypsin, og satt i varmeskap (37 grader C) i 10 minutter. Deretter ble det tilsatt 7 ml medium (med 10 % serum) for å stoppe enzymreaksjonen.

2.2.21. Høsting

I to av de tre forsøksrundene som ble gjennomført ble det kjørt cycle test. Det ble høstet 8 ml av de 10 millimeterne som var i prøveflaskene. Til utføringen av JC-1 forsøket trengtes det en cellekonsentrasjon på 1×10^6 celler/ml. Det ble tatt ut ulike volum fra de forskjellige flaskene for å justere cellekonsentrasjonen for å få tilstrekkelig med celler. Flaskenes cellekonsentrasjon ble på forhånd bestemt ved å telle cellesuspensjon i tellekammer.

Det ble også høstet celler fra prøveflaskene til celledelling. Dette kunne først skje etter at det andre forsøket (cycle test eller JC-1) var ferdiggjort. I mellomtiden ble flaskene satt på is.

2.3. Protokoller

2.3.1. PROTOKOLL RIA

(Modifikasjon av Amersham Cyclic GMP [^3H] assay)

1. Overfør 1,8 ml fra hvert prøveglass til nye rør (TT-rør).
2. Tilsett 200 μl 5 % TCA.
3. Antiserum lages ved å tilsette 7,5 ml destillert vann til flaske. Bland forsiktig, ikke rist!
4. [^3H] cGMP lages ved å tilsette 10 ml destillert vann til flaske. Blandes godt.
5. Syklisk GMP standard lages ved å tilsette 5 ml RPMI-1640 med 0,5 % TCA. Dette gir en konsentrasjon på 8 pmol. Blandes godt. Ønsker endelige konsentrasjoner på 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 i tillegg til 8,0 pmol. Fortynningsrekken lages ved å ta ut 0,5 ml fra standarden på 8,0 pmol og blande den med 0,5 ml RPMI-1640 med 0,5 % TCA noe som gir en konsentrasjon på 4 pmol. Dette gjentas for å få 2, 1 og 0,5 pmol. 0-prøve inneholder kun RPMI-1640 med 0,5 % TCA.
6. Blank- løsning lages ved å tilsette 2 ml RPMI-1640 med 0,5 % TCA.
7. Ammonium sulfat lages ved å blande pulveret med 150 ml iskaldt destillert vann.
8. Det overføres 800 μl fra alle prøvene, både de ukjente, standardene og 0 prøven til nye rør som inneholder CaCO_3 .
9. Standarder og prøver skal være i duplikat!
10. Alle rørene settes på isvann.
11. Tilsett 50 μl isotop
12. Tilsett 100 μl standard og ukjente.
13. Tilsett 50 μl antiserum.
14. La prøvene stå kjølig i 2 timer.
15. Tilsett 1 ml iskald ammonium sulfat. La prøvene stå 5 min etter at det er tilsatt i den siste prøven.
16. Sentrifuger prøvene i en kjølesentrifuge på 5200 rpm i 30 minutter.

17. Sug av supernatanten.
18. Tilsett 1 ml destillert vann til alle prøverørene.
19. Tilsett cirka 2,3 ml tellevæske.

Da er prøveglassene klare for å kjøres i tellemaskinen. Tellemaskinen som brukes i dette forsøket teller dpm. Disintegrasjon per minutt for assayet bestemmes ved å bruke målt dpm for blank. Null-prøvene brukes for å bestemme C_0 , altså mengden bundet ^3H - cGMP til antistoffet uten "kaldt" cGMP til stede. Dette gjøres ved å ta målt dpm for 0-prøvene og trekke fra dpm fra blank. C_x , altså mengden bundet ^3H - cGMP til antistoffet med cGMP til stede, bestemmes ved å ta målt dpm for standarder og ukjente, og trekke fra dpm fra blank. Standardkurven lages ved å plote C_0/C_x som funksjon av de 5 ulike konsentrasjonene av cGMP (standardprøvene). C_0/C_x for de ukjente regnes ut, og dermed kan konsentrasjonen av cGMP som disse verdiene tilsvarer, leses av standardkurven.

2.3.2. PROTOKOLL Cycle Test

1. Overfør celsesuspensjon til passende rør.
2. Sentrifuger i 5 minutter på 300g i romtemperatur.
3. Sug av supernatanten, men la det være igjen omtrent 50 μl slik at ikke cellepelletten blir ødelagt.
4. Tilsett 1 ml bufferløsning. Bland forsiktig.
5. Sentrifuger i 5 minutter på 300g i romtemperatur.
6. Sug av supernatanten, men la det være igjen omtrent 50 μl slik at ikke cellepelletten blir ødelagt.
7. Tilsett 1 ml bufferløsning. Bland forsiktig.
8. Sentrifuger i 5 minutter på 300g i romtemperatur.
9. Sug av supernatanten, men la det være igjen omtrent 50 μl slik at ikke cellepelletten blir ødelagt.
10. Tilsett 1 ml bufferløsning. Bland forsiktig.
11. Tell cellene i tellekammer og juster cellekonsentrasjonen til 1×10^6 celler/ml.

- Nå er cellene preparert og klare for fargingsprosedyren.
12. Sentrifuger 5×10^5 celler (i 1,5 ml eppendorf-rør) i 5 minutter på 400g i romtemperatur.
 13. Hell forsiktig av supernatanten.
 14. Tilsett 250 μ l av løsning A (trypsinbuffer). Bland forsiktig. Ikke vortex!
 15. Inkuber i 10 minutter i romtemperatur. Ikke fjern løsning A.
 16. Tilsett 200 μ l av løsning B (trypsininhibitor og RNase-buffer). Bland forsiktig. Ikke vortex!
 17. Inkuber i 10 minutter i romtemperatur. Ikke fjern løsning B.
 18. Tilsett 200 μ l av kald løsning C (propidium iodid løsning). Bland forsiktig.
 19. Ha blandingen over i flowcytometri-rør. Bruk filter for å unngå klumper i prøvene.
 20. Inkuber i 10 minutter på is i mørket.
- Nå er prøvene klare for å bli analysert av et flowcytometer.

Fra hver prøve som kjøres i flowcytometeret måles det på 20 000 celler.

2.3.3. PROTOKOLL JC-1

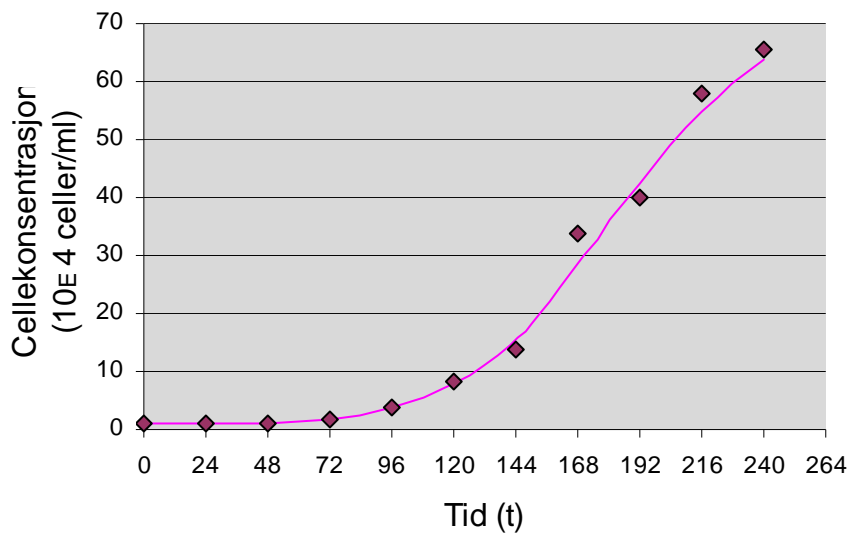
1. Høst celler (1×10^6 celler/ml) fra prøvene.
 2. Farg cellesuspensjonen med 2,5 μ l JC-1/ml. Rist røret med cellesuspensjon slik at fargestoffet blir løst opp og jevnt fordelt. Kan også bruke vortex.
 3. La prøvene stå på en mørkt sted med romtemperatur i 20 minutter.
 4. Vask prøvene ved å tilsette 1 ml PBS. Sentrifugere i 5 minutter på 500g. Repeter dette steget.
 5. Resuspender i 0,5 ml PBS.
- Nå er prøvene klare for å bli analysert av et flowcytometer.

3. RESULTATER

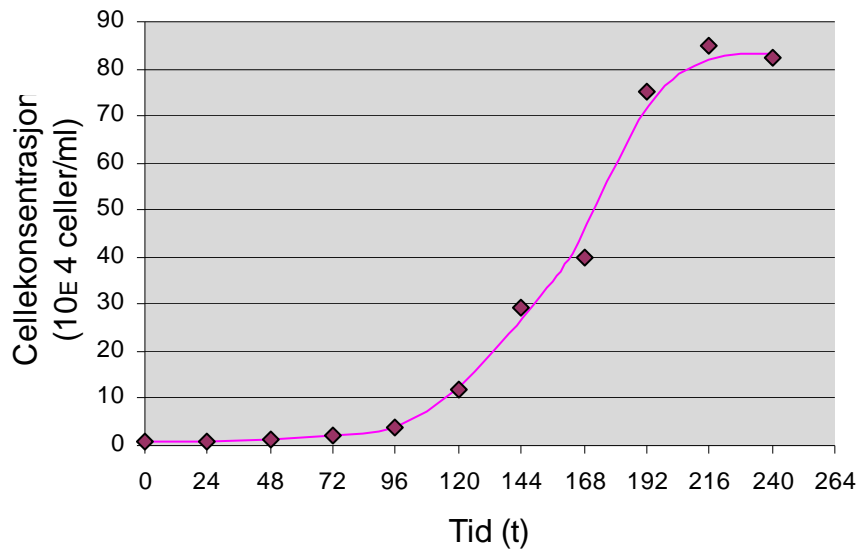
3.1. Cellelinjens vekstegenskaper

Celleveksten til C4-I cellene ble studert. Cellene ble dyrket i 10 døgn i RPMI 1640 u/fenolrødt i celledyrkningsflasker a 25 cm². Det ble gjort 3 tidsuavhengige forsøk (A, B og C). En vekstkurve viser gjennomsnittet av tre tellinger i samme serie hver dag.

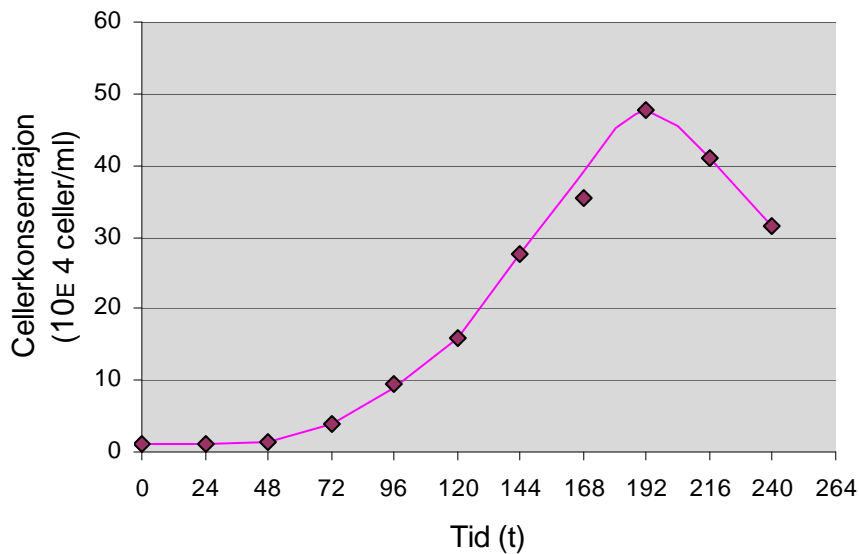
Vekstkurve A



Vekstkurve B



Vekstkurve C



Figur 10: Vekstkurver for C4-I celler med cellekonsentrasjon som funksjon av tid. I løpet av 10 døgn går disse cellene gjennom lag-fase og log-fase. Doblingstiden beregnes ut i fra vekstkurvens eksponentielle område (log-fasen). Figur A, B og C representerer separate forsøk, hver med 3 paralleller. Utsåingskonsentrasjonene var 3.8 , 4.5 og $4.6 \cdot 10^4$ celler/ml for henholdsvis forsøk A, B

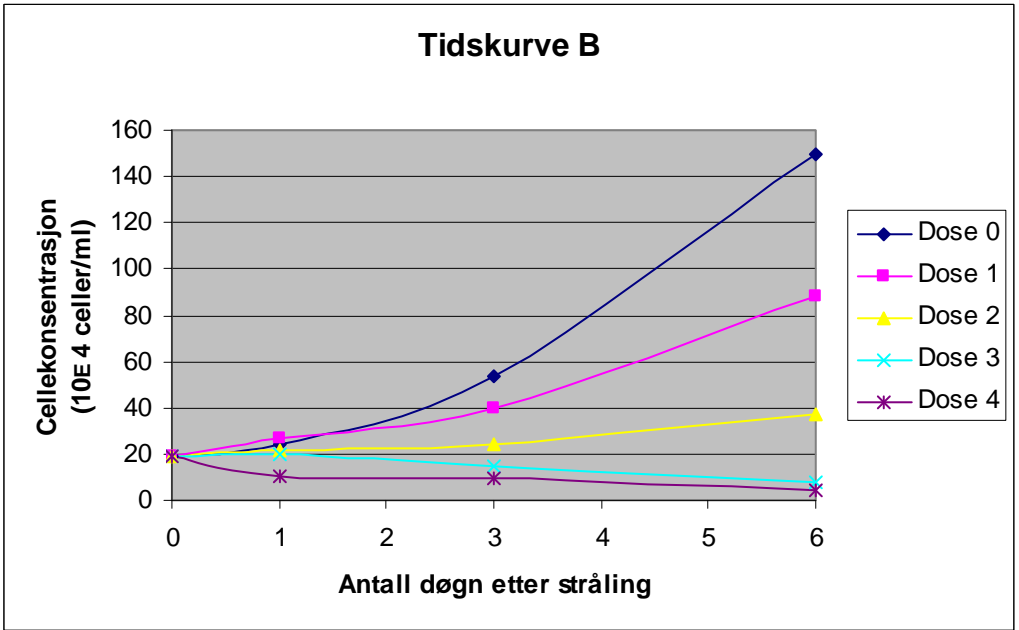
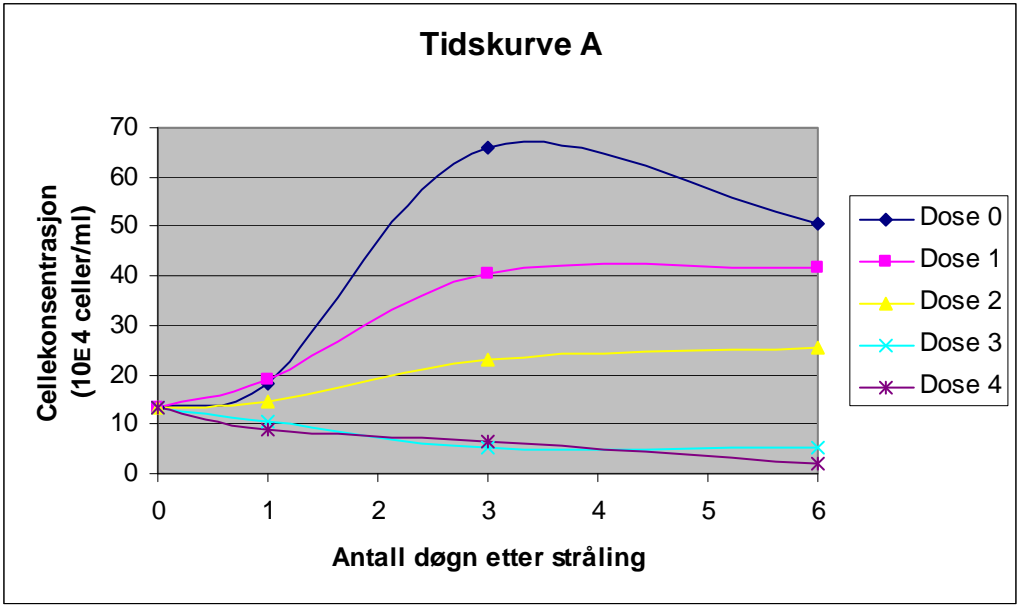
og C. Etter log-fasen viser de tre forsøkene ulike karaktertrekk. Forsøk A har ikke nådd platå etter 240 timer, forsøk B når platå etter omkring 216 timer mens forsøk C når platå etter 192 timer men begynner deretter å falle i konsentrasjon.

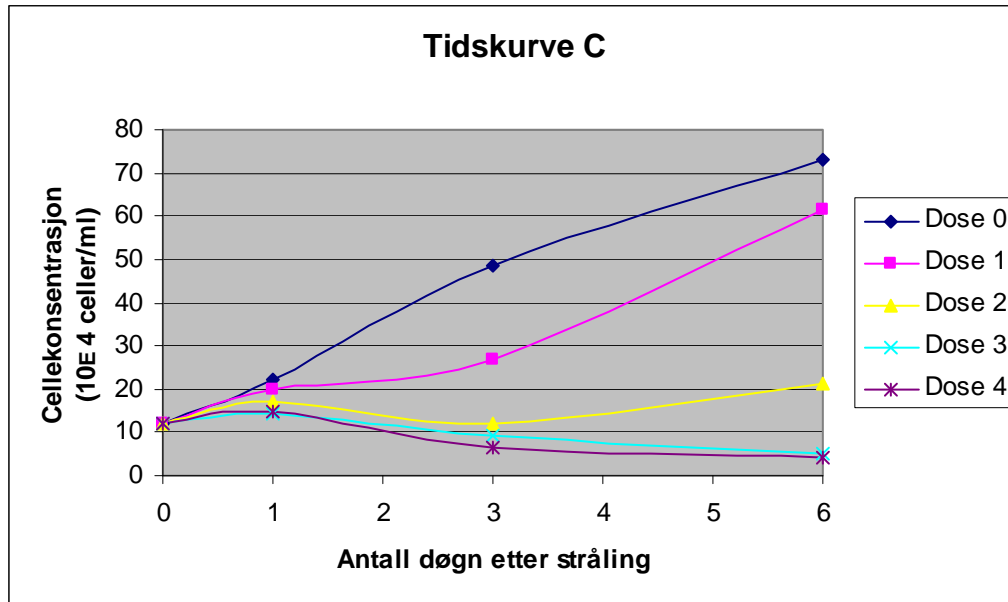
Vekstkurver for C4-I celler

Doblingstiden (t_2) for disse C4-I cellene ble beregnet til å være $36,5 \pm 4,2$ timer ($n=3$). Cellene var i lag-fase i 72-96 timer før de nådde log-fase. Cellene i forsøk A så ikke ut til å nå konfluens i løpet av de 10 døgnene etter utsåing. I forsøk B nådde cellene konfluens etter omkring 9 døgn (216 timer). Deretter ble det en liten nedgang i cellekonsentrasjonen. Cellene i forsøk C var i lag-fase i omkring 72 timer, og nådd konfluens 8 døgn (192 timer) etter utsåing. Etter dette gikk cellekonsentrasjonen ned. Variasjon i tiden i lag-fasen kan skyldes variasjon i utsåingskonsentrasjon (fra $3,8$ til $4,6 \cdot 10^4$ celler/ml), da dette påvirker hvor raskt cellene kommer i gang å vokse. Det kan også skyldes biologiske variasjoner. Det så imidlertid ut til at cellene i alle forsøkene befant seg i log-fasen i like lang tid, omkring 5 døgn.

3.2. Strålebehandling av kreftcellene

Cellene ble behandlet med 4 ulike doser gammastråling. Deretter ble cellenes responser til strålingen undersøkt 1, 3 og 6 døgn etter behandling.





Figur 11: Tidskurvene uttrykker cellekonsentrasjon som funksjon av antall døgn etter stråling. De viser hvordan cellekonsentrasjonen endres med tiden etter strålebehandling. Dose 0=kontroll, dose 1= 2 Gy, dose 2= 4 Gy, dose 3= 8 Gy, dose 4= 12 Gy. Figur A, B og C representerer separate forsøk, hver med 3 paralleller. Forsøkene er tidsuavhengige.

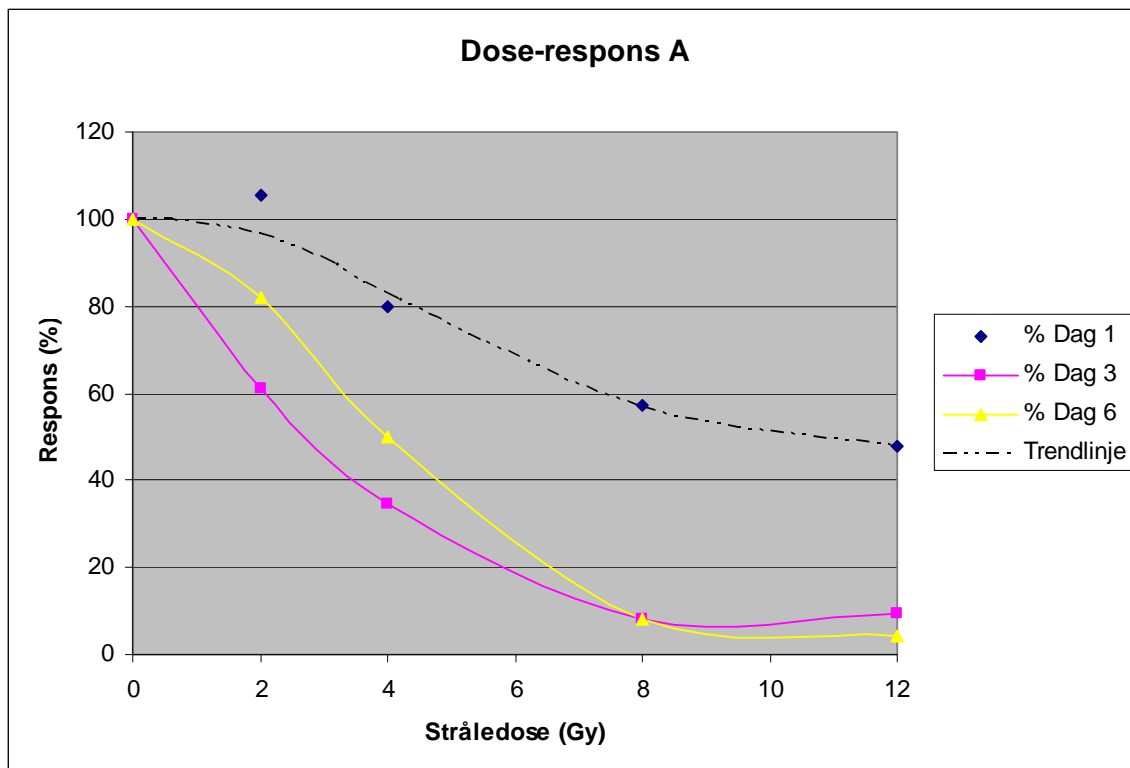
3.2.1. Tidskurver etter stråling

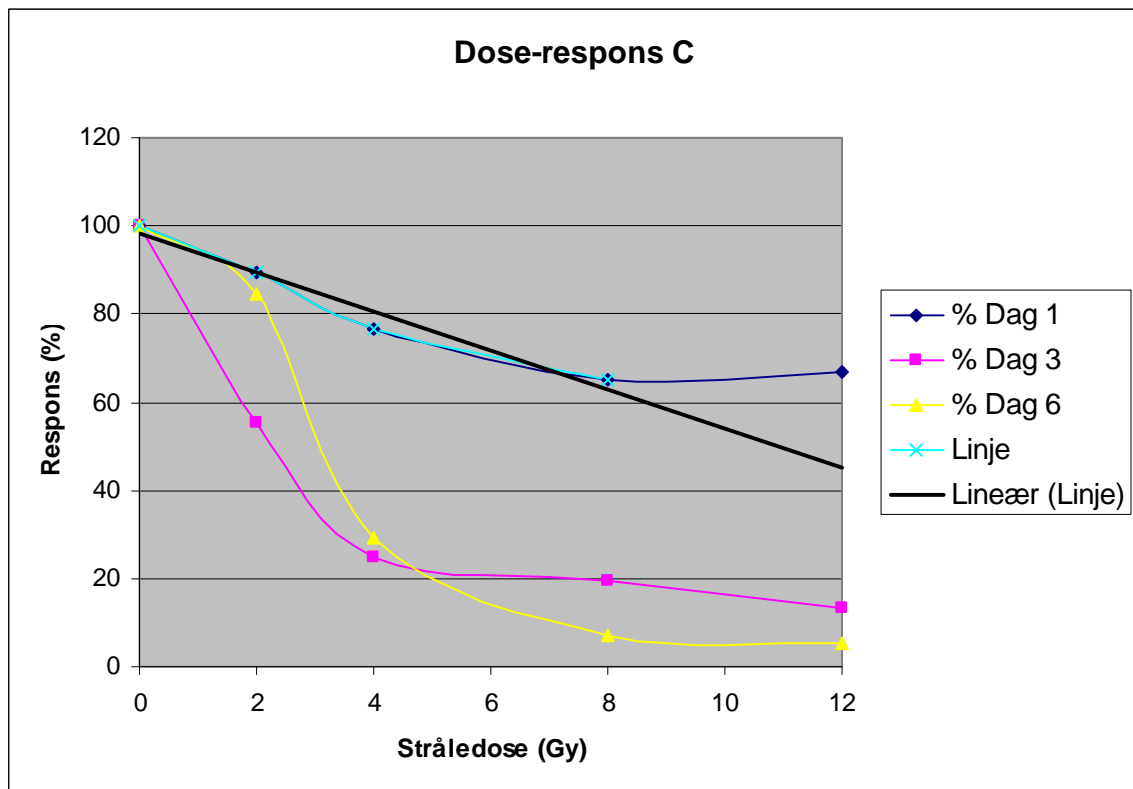
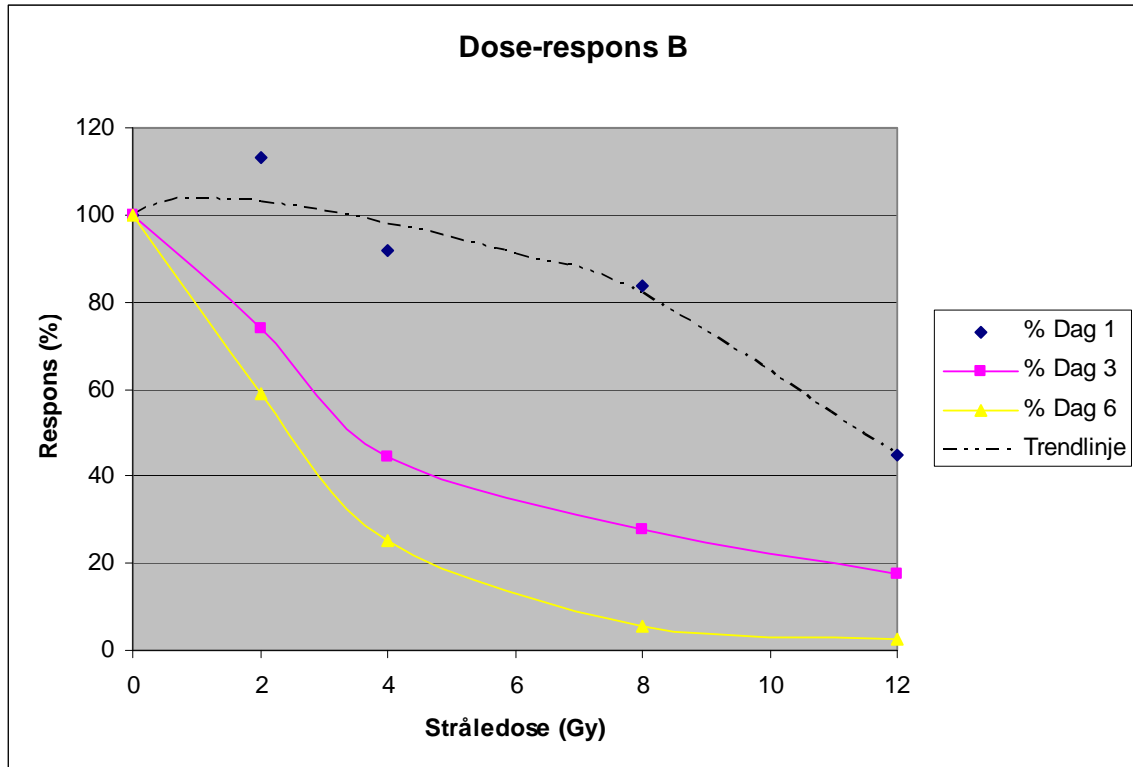
De to laveste dosene, dose 1 og 2, gir fortsatt økning i celletetthet etter stråling, men tettheten reduseres i større og mindre grad i forhold til kontrollen. De to høyeste dosene, dose 3 og 4, derimot forårsaker en nedgang i celletetthet i forhold til utgangskonsentrasjonen. Denne nedgangen i forhold til utgangskonsentrasjonen skyldes celledød.

Ett døgn etter stråling er det lite endringer i cellekonsentrasjonene, noe som gjelder alle de ulike stråledosene og kontrollen. Det er imidlertid en tendens til økning i celletetthet i kontroll og dose 1, mens det er en liten nedgang i dose 3 og 4. Celler bestrålt med dose 2 har nesten uforandret cellekonsentrasjon 1 døgn etter strålebehandling.

Tre døgn etter stråling fortsetter trendene som viste seg etter 1 døgn.

Seks døgn etter stråling er det kun celler bestrålt med de to høyeste dosene som har lavere cellekonsentrasjon enn utgangskonsentrasjonen. Celler som ble behandlet med dose 1 har økt tetthet, men ikke fullt så stor celledensitet som de ubestrålte cellene. Det er imidlertid vanskelig å si hvor stor del av denne reduksjonen i cellekonsentrasjon i forhold til kontrollen som skyldes en redusert celledeling (intro) og hvor mye som skyldes økt celledød (exit). Det ser ut til å være en ganske stor forskjell på hvordan cellers vekst og overlevelse påvirkes av dose 1 og 2. Celler som har fått dose 2 viser kun en liten økning i tetthet i forhold til før stråling. Det er en kraftig reduksjon i forhold til kontrollen, og en moderat reduksjon sammenlignet med dose 1.





Figur 12: Dose-responskurvene uttrykker respons som funksjon av stråledose, og de beskriver hvordan responsen (endring i celletetthet) varierer med de ulike dosene. Kurvene viser en klar

nedgang i celletetthet ved økning i stråledose, da 100 % respons er et mål på celletettheten til den ubestrålte kontrollen. Figur A, B og C representerer separate forsøk, hver med 3 paralleller. Forsøkene er tidsuavhengige. Responsen til 12 Gy, 1 døgn etter stråling, i forsøk C var tydelig avvikende i forhold til de andre punktene. Punktet ($x = 12$, $y = 66.7$) er utelatt, og det ble gjort lineær regresjon for den nye linjen.

3.2.2. Dose-respons

Kurvene illustrerer på en måte mye av det samme som tidskurvene gjør. Økning i stråledose ser ut til å gi en nedgang i celletetthet i forhold til kontrollen, da 100 % respons er et mål for celletettheten til kontrollen. I to av tre forsøksrunder, A og B, er cellekonsentrasjonen til celler bestrålt med 2 Gy høyere enn cellekonsentrasjonen til de ubestrålte kontrollcellene 1 døgn etter strålebehandling. Det kan virke som at den laveste stråledosen gir økt cellevekst i forhold til kontrollen det første døgnet etter at de er blitt strålebehandlet. Responsen som de ulike stråledosene gir endrer seg, og endringen ser ut til å være størst i mellom 2 Gy og 4 Gy. Det kan se ut som at endringen i responsen som 8 og 12 Gy gir er minst, mens forskjellen i responsen til 4 og 8 Gy er større enn mellom dosene 8 og 12 Gy men mindre enn mellom 2 og 4 Gy.

3.2.3. ID₅₀ verdi

På dag 1 i den ene forsøksserien (C) var det ikke så mye som 50 % nedgang i cellekonsentrasjon. Den inhibitoriske dosen, ID₅₀, for dag 1 forsøk C ble likevel bestemt. Dose-responskurve C ble brukt (figur 12C). På denne grafen var ett punkt avvikende i forhold til de andre (responsen til 12 Gy, 1 døgn etter stråling), og dette punktet ble utelatt. Det ble gjort lineær regresjon for den nye linjen til dag 1, og ut fra ligningen til linjen ble skjæringspunktet med $y = 50$ kalkulert. Ved 50 % respons ($y = 50$) på dag 1 er stråledosen, $x = 10,95$ Gy.

Tabell 1: Tabellen viser ID_{50} verdier til de ulike tidspunktene etter stråling. Standardavviket er også vist. Antall forsøk er uttrykt som n. Den inhibitoriske dosen er høyest 1 døgn etter strålebehandling.

Dag	ID_{50} (Gy)	SD	n
1	11,9	2,0	3
3	2,8	1,0	3
6	3,2	0,9	3

ID_{25} ble også kalkulert, hvilken dose som gir en nedgang i cellekonsentrasjon på 25 %. Denne verdien ble regnet ut for alle forsøkene, dag 1 (se tabell 2).

Tabell 2: Tabellen viser ID_{25} verdien for ett døgn etter stråling. Grunnen til at denne verdien ble regnet ut for dette tidspunktet var at i det ene forsøket var ikke den høyeste stråledosen, 12 Gy, stor nok til å gi en reduksjon i celletetthet på 50 %. Standardavviket er også vist. Antall forsøk er uttrykt som n.

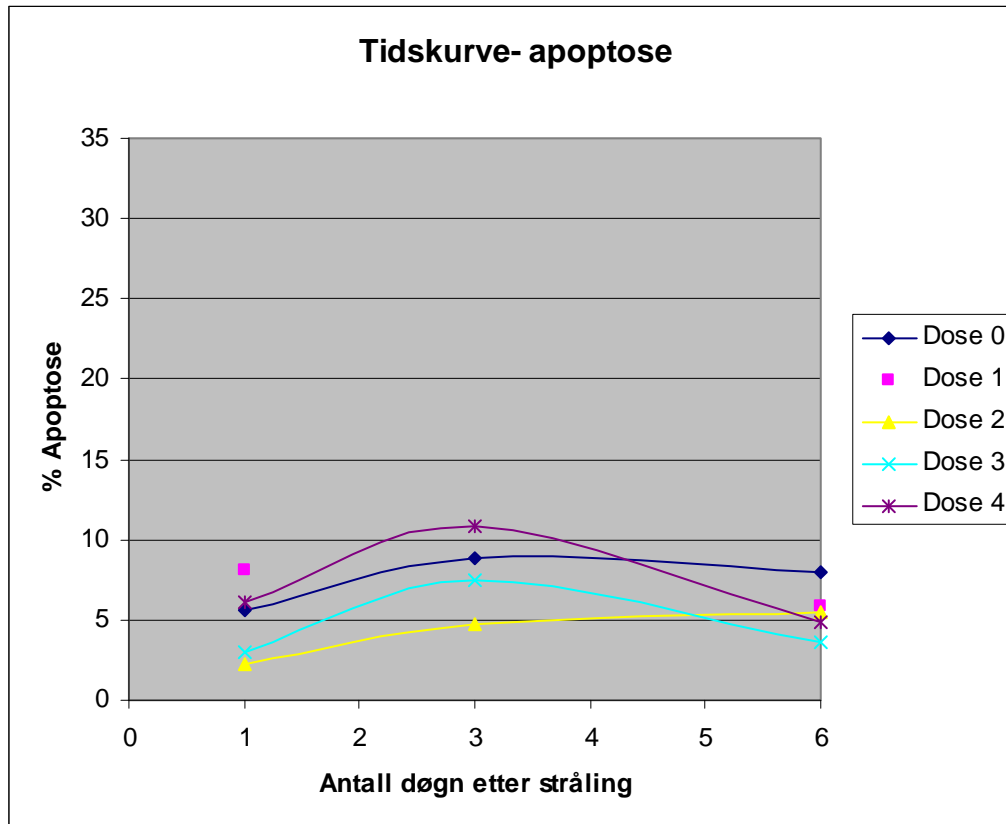
Dag	ID_{25} (Gy)	SD	n
1	5,6	1,0	3

Ettersom denne utregningsmetoden ga en ID_{50} verdi som lå i samme område som de to andre ID_{50} verdien kan verdien for dag 1, forsøk C, regnes for å være sannsynlig og pålitelig

Ut i fra disse resultatene kan det se ut til at den inhibitoriske dosen avtar med tiden. Det må en mye høyere dose til for å gi 50 % nedgang i cellekonsentrasjon allerede 1 døgn etter strålebehandling sammenlignet med 3 og 6 døgn etter behandling. Det kan se ut som det ikke er så stor forskjell på hvilke doser som gir 50 % reduksjon i celletall 3 og 6 døgn etter stråling.

Det ser ut som at den dosen som gir 50 % effekt (celledød) hos disse kreftcellene ligger rundt 3 Gy. Og at det tar noen dager før maksimal effekt inntreffer. Dette kan tolkes ut i

fra resultatene som viser at etter 3 og 6 døgn etter stråling er omkring 3 Gy tilstrekkelig for å gi en nedgang i celledetthet på 50 %.



Figur 13: Tidskurven viser hvordan mengden apoptotiske celler varierer med tiden etter strålebehandlingen. Grafen uttrykker prosent apoptotiske celler som funksjon av antall døgn etter stråling. Dose 0=kontroll, dose 1= 2 Gy, dose 2= 4 Gy, dose 3= 8 Gy, dose 4= 12 Gy. Dose 1 ga nesten 30 % apoptotiske celler 3 døgn etter behandling. Denne verdien stakk seg veldig ut i forhold til de andre resultatene. Det er vanskelig å avgjøre om verdien er pålitelig eller ikke på grunn av lite tallmateriale. Punktet (x= 3, y= 29,02) er ikke vist i grafen. Det avvek så mye fra trenden at det ble utelatt.

3.2.4. Apoptose etter stråling

Ut fra disse resultatene kan de virke som om strålebehandlingen forårsaker lite celledød etter at 6 døgn er gått. Prosent apoptotiske celler er forholdsvis lav, nesten uten unntak ligger den i underkant av 10, noe som gjelder både kontrollcellene og celler bestrålt med

alle de ulike dosene. Det er også lite økning i antall døde celler utover i forsøket. Det kan se ut som det verken er noen korrelasjon mellom stråledose og apoptose eller tiden etter behandling og apoptose.

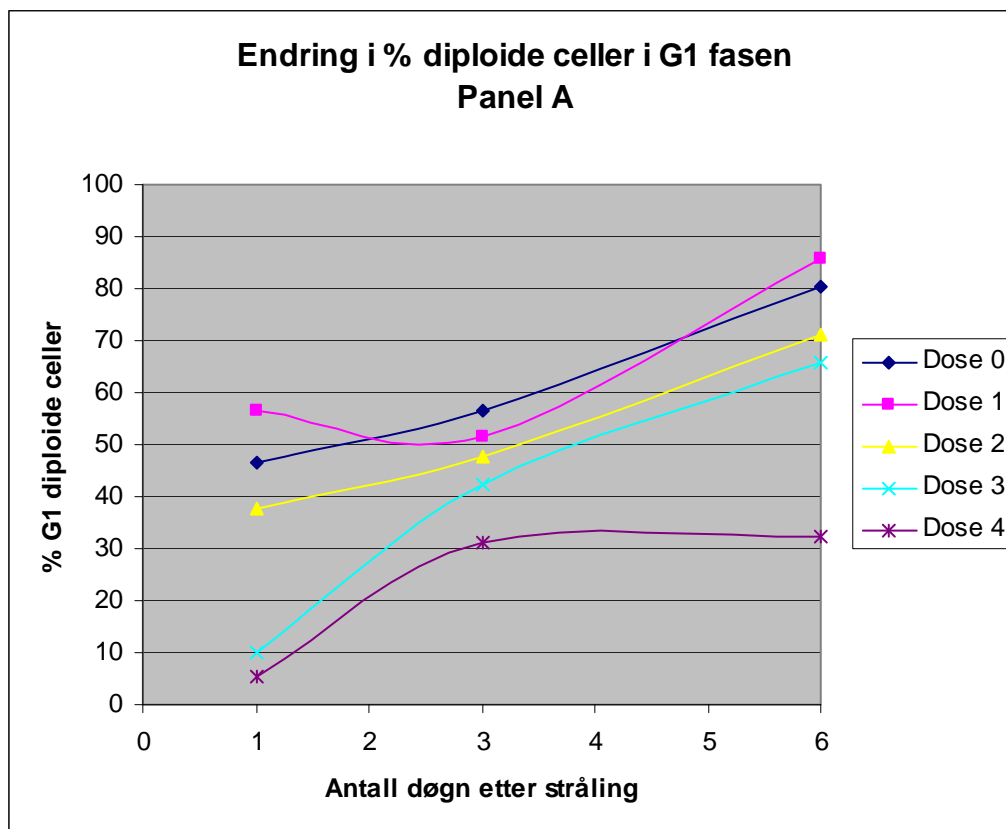
Tendensen i resultatene er at 4 og 8 Gy muligens er de dosene som gir færrest døde celler, og at den laveste dosen, 2 Gy, forårsaker mest celledød. Men det er liten forskjell på prosent apoptotiske celler når det gjelder alle stråledosene og kontrollen. Det eneste resultatet som skilte seg ut var 2 Gy sin effekt på celledød, 3 døgn etter behandling. Det ble en markant økning i antall døde celler, mengden apoptotiske celler var her i underkant av 30 %. Men ved neste måling, 6 døgn etter strålingen, gikk celledøden i denne populasjonen ned igjen til omkring 5 %, på samme nivå som de andre stråledosene og kontrollen.

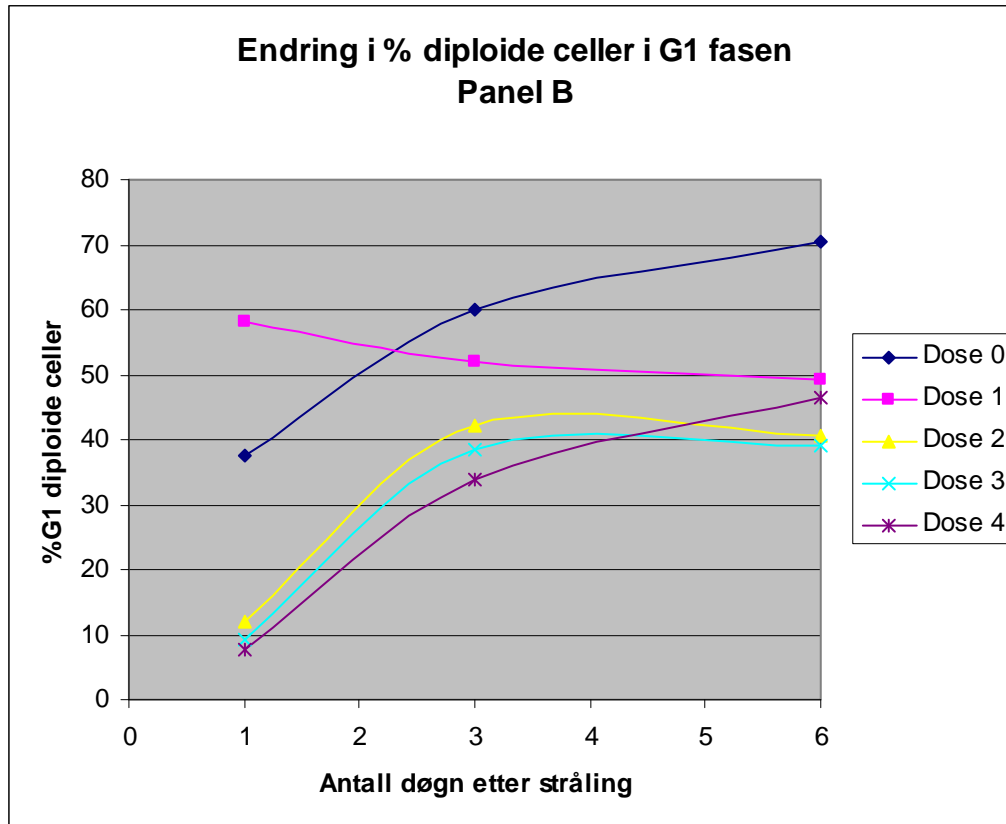
Kontrollen hadde omtrent like stor andel apoptotiske celler sammenlignet med de bestrålte cellene. Denne cellepopulasjonen hadde til ingen tidspunkt minst døde celler. Seks døgn etter at de andre cellene ble behandlet var det kontrollen som hadde størst prosent døde celler.

3.2.5. Cellesyklus etter stråling

Etter at disse kreftcellene var blitt bestrålt skulle distribusjonen i de ulike fasene av cellesyklus bestemmes ved å bruke cycle test. Det viste seg å være problematisk. For det første ble det klart at denne cellekulturen var heterogen med tanke på kromosominnhold. Noen celler var normale, diploide, mens andre var aneuploide, med en unormal mengde kromosomer, og i tillegg var det stor spredning i tallmaterialet. Det er til tider store variasjoner innenfor en og samme parallell. Dette gjør det vanskelig, lite nøyaktig og lite illustrativt å bruke alle prosenttallene for å uttrykke resultatene. Noe av årsaken til dette er at det er vanskelig å skille toppene til diploide og aneuploide celler i cellesyklus-histogram. Og innenfor en parallell kunne det være en homogen kultur med kun diploide celler, en heterogen kultur med en diploid og en aneuploid cellepopulasjon og en heterogen kultur med en diploide og flere aneuploide cellepopulasjoner. Histogram til en

cellekultur med aneuploide celler har to G1 topper og to G2 topper, og disse kan være vanskelig å skille. I tillegg var det også tetraploide celler i noen av populasjonene. Tetraploide celler har sin G1 topp ($4n$) på samme sted som G2 toppen ($4n$) til diploide celler. Det blir umulig for flowcytometeret å avgjøre hvor stor del av denne toppen som er diploide celler i G2 fasen, eller hvor stor del som er tetraploide celler som befinner seg i G1 fasen av cellesyklus. G2 toppen til diploide celler er viktig for å avgjøre en eventuell arrest i denne delen av syklusen. Ettersom G2 toppen blir vanskelig å bruke ble G1 toppen til de diploide cellene brukt i stede. Denne toppen er ikke direkte sammenfallende med noen andre topper og blir derfor mer korrekt å benytte. En nedgang i antall celler i G1 fasen av cellesyklus kan si noe om hvor mange celler som er i G2 fasen. Når celler forsvinner fra G1 fasen, og det er observert lite celledød, er det stor sannsynlighet for at mange av disse cellene har forflyttet seg til G2 fasen. Derfor ble nedgangen i diploide celler i G1 fasen brukt som et mål på G2 arrest. En nedgang i % celler i G1 gir en indikasjon på at det er en økt G2 arrest.



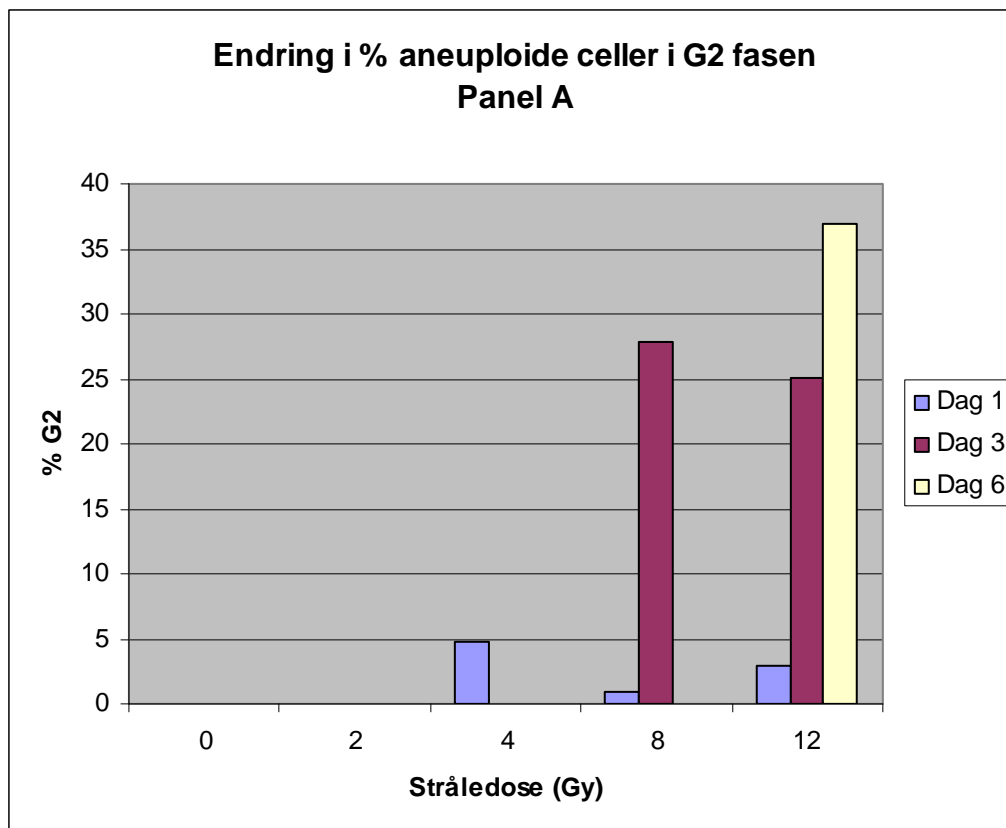


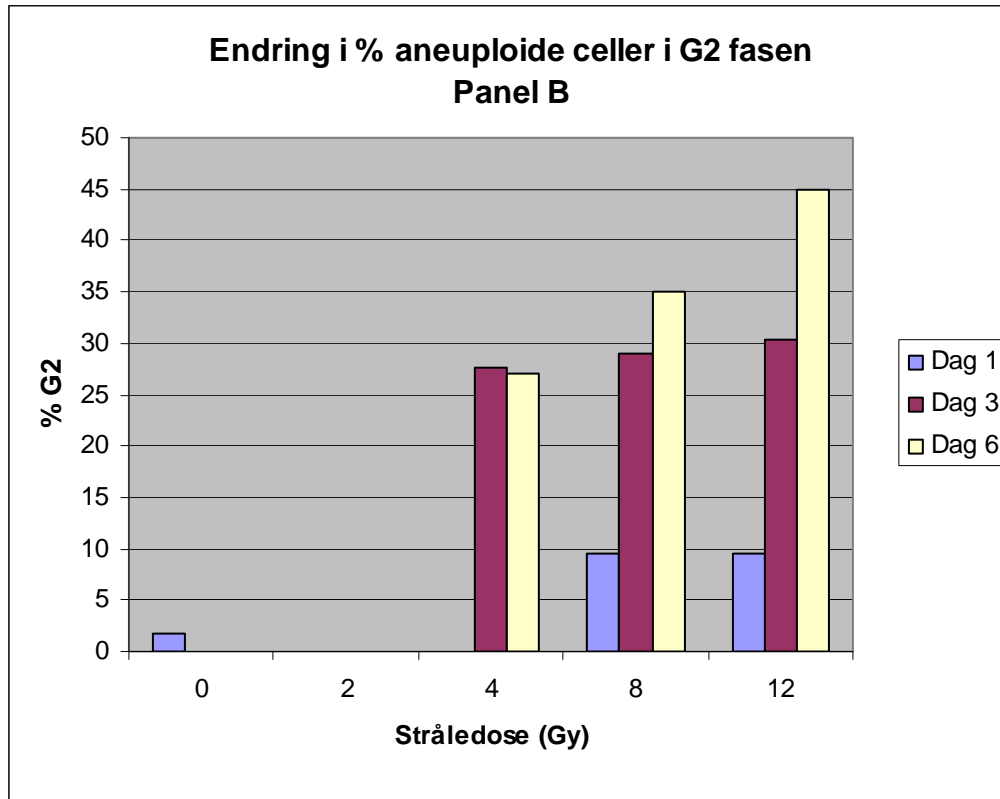
Figur 14: Grafene gir en indikasjon på celledistribusjon i G2 fasen. De uttrykker prosent diploide celler som befinner seg i G1 fasen. Lite celler i G1 fasen av celledistribusjon betyr en økning av celler i G2 fasen, noe som tyder på en arrest. Dose 0=kontroll, dose 1= 2 Gy, dose 2= 4 Gy, dose 3= 8 Gy, dose 4= 12 Gy. Forsøk A og B representerer separate forsøk, hver med 3 paralleller. Forsøkene er tidsuavhengige.

Kurvene med endring i % diploide celler i G1 fasen viser at de 3 høyeste dosene forårsaker en reduksjon i antall celler i G1 fasen 1 døgn etter behandling, i forhold til kontrollen, noe som betyr at disse dosene gir en G2 arrest. Det kan virke som den laveste dosen imidlertid gjør at det blir en økning i celler i G1 fasen ett døgn etter stråling i forhold til kontrollen, altså det tyder på at 2 Gy her gir lite G2 arrest.

Når tiden etter behandling går så øker celledistribusjonen til G1 fasen, noe som gjelder de 3 høyeste dosene og kontrollen. Seks døgn etter stråling har kontrollen fortsatt å øke, mens de bestrålte cellene enten viser en liten økning eller stagnering i forhold til dag 3. Flere celler i G1 tyder på at det er færre celler i G2.

Polyploiditet: Tetraploide celler har en G1 topp som vil være sammenfallende med G2 toppen til diploide celler. Disse toppene blir umulig å skille og derfor blir det vanskelig å bruke G1 toppen som et mål på hvor mange celler i populasjonen som er tetraploide. Celler som har dobbelt så mye kromosominnhold i forhold til normale celler vil ha en G2 topp rundt 8n. Denne toppen blir ikke overlappet av andre, og egner seg av derfor bedre til å illustrere forekomsten av tetraploide celler. Tallmaterialet som disse grafene er basert på er % celler i G2 fasen for tetraploide celler. G2 toppen rundt 8n vil både vise at det er tetraploide celler til stede i cellekulturen, og hvor stor andel av disse som er distribuert i G2 fasen av syklusen.





Figur 15: Grafene illustrerer mengden tetraploide celler ved de ulike stråledosene. De uttrykker prosent aneuploide celler (som har dobbelt så mye kromosominnhold i kjerna i forhold til normale, diploide celler) som befinner seg i G2 fasen i cellesyklusen som funksjon av stråledosene. De ulike stolpene viser hvor stor del av cellepopulasjonen som er tetraploid 1, 3, og 6 døgn etter behandling.

Grafene med endring i % aneuploide celler i G2 fase av cellesyklus viser en klar trend på at en økning i stråledose gir en økt forekomst av tetraploide celler. Stråledosene 4, 8 og 12 Gy ser ut til å gjøre disse kreftcellene mer tetraploide. Kontrollcellene og celler bestrålt med 2 Gy har omtrent ingen celler med dobbelt så mye kromosominnhold. Det kan også se ut som denne effekten av strålingen øker med tiden etter behandling. Nesten uten unntak er det flest tetraploide celler i G2 fasen 6 døgn etter stråling.

3.2.6. Cellekonsentrasjoner etter stråling

Cellekonsentrasjonen ble bestemt mikroskopisk. Det var også mulig å få et kvalitativt

inntrykk av celledød, blå celler, og hvordan cellene så ut. En økning og en reduksjon i celletetthet skyldes forholdet mellom vekst og celledød, derfor beskriver ikke en endring i celletetthet kun en endring i vekst. Men når man fikk et inntrykk av mengden celledød ble det enklere å si noe om veksten.

Celletettheten til de bestrålte cellene ble mer og mer redusert ettersom tiden gikk. Og reduksjonen så ut til å være størst for de største dosene. Men det så ut som det generelt var lite celledød. Ettersom det kanskje var lite celledød skyldes nok en del av denne nedgangen i celletetthet at veksten ble mindre. Når det gjaldt celledød var tendensen likevel at det var mer celledød 6 døgn etter stråling sammenlignet med 1 døgn etter. Observerte lave cellekonsentrasjoner på dag 1 skyldes kanskje i større grad en liten vekst, og lave cellekonsentrasjoner på dag 6 skyldes kanskje i større grad celledød.

I to av forsøkene hadde celler som var bestrålt med 2 Gy en større celletetthet dag 1 sammenlignet med kontrollen.

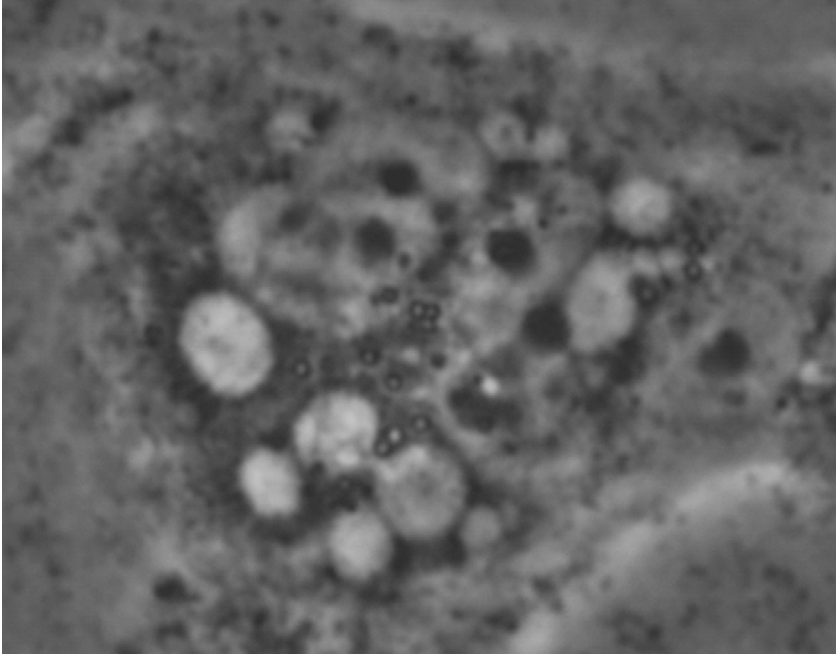
3.2.7. Cellemorfologi etter stråling

Som nevnt ovenfor ble det endringer i cellekonsentrasjonene utover i forsøket, og endringer i forhold til de ulike dosene. En annen observasjon som ble gjort var at også størrelsen på cellene forandret seg. Noen celler svulmet opp, men de var ikke blå og var derfor fortsatt viable. Disse store cellene ble derfor telt som levende. Forekomsten av store celler ble sett 3 døgn etter stråling, og det var celler som var bestrålt med 8 og 12 Gy. Det samme kunne observeres 6 døgn etter stråling, og da i enda større grad. Bildet (se figur 16) illustrerer hvor stor disse cellene var i forhold til normale celler.

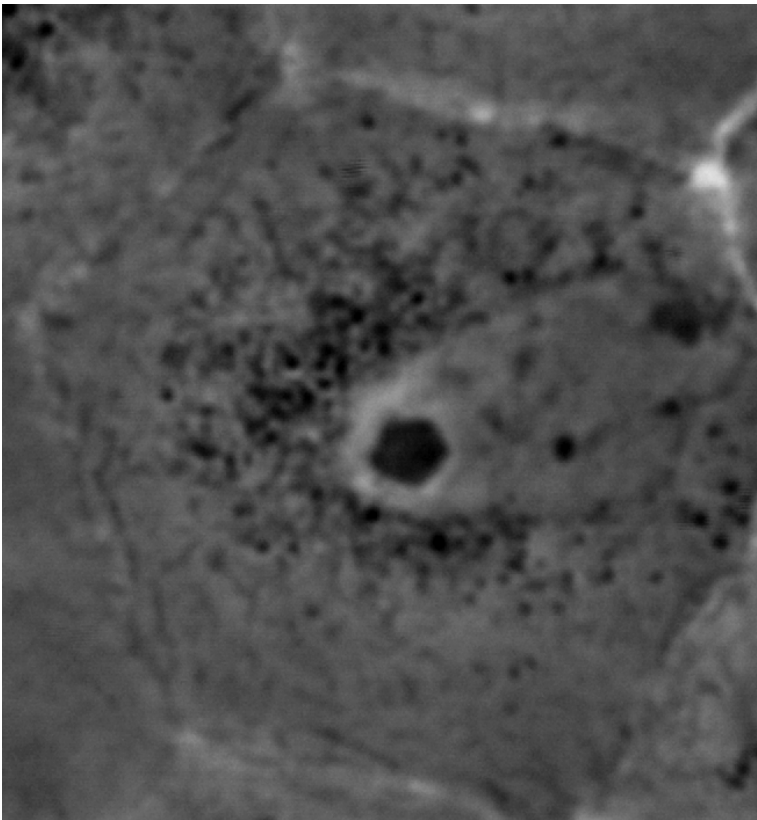


Figur 16: Bildet er tatt gjennom et mikroskop på 10x forstørrelse og viser to celler som ligger i tellekammeret. Disse cellene er blitt behandlet med en stråledose på 8 Gy, og bildet ble tatt 6 døgn etter strålebehandlingen. Cellen til venstre har normal størrelse mens cellen til høyre har svulmet opp.

Fotograferingen av cellene (kontrollceller og celler bestrålt med dose 3), som ble gjort mens cellene ennå var adherente i kulturflaskene, viste det samme som de andre resultatene, at det var større celledetthet i kontrollen i forhold til bestrålte celler. Det viste også at 6 døgn etter behandling så var kontrollflasken blitt konfluente. Det var ikke mulig å si så mye om hvor mye celledød det var, verken i kontrollen eller i bestrålte celler, men det ble påvist kvalitativt en forekomst av både apoptotiske og nekrotiske celler (se figur 17A og B).



Figur 17A: Bildet er tatt gjennom et mikroskop på 40x forstørrelse og viser en apoptotisk celle. Cellen vesikulerer, noe som vises som små blærer. Disse kalles apoptotic bodies (se figur 3). Bildet er tatt av celler som har blitt behandlet med en stråledose på 8 Gy.

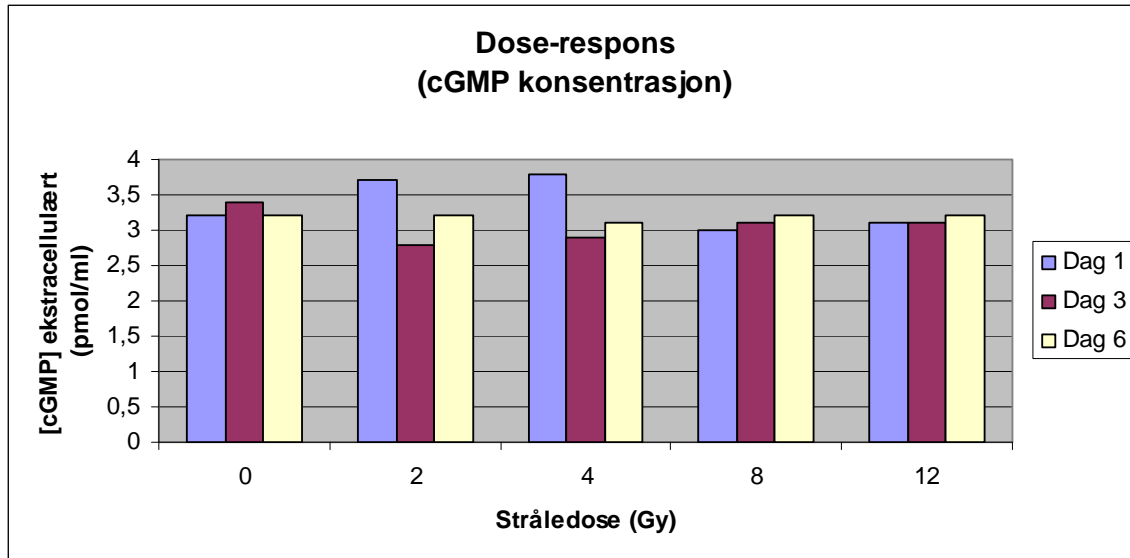


Figur 17B: Bildet er tatt gjennom et mikroskop på 40x forstørrelse og viser en nekrotisk celle. Cellemembranen har revnet. Cellearkitekturen er blitt borte, og det virker som strukturene er i ferd med å gå i oppløsning. Bildet er tatt av celler som har blitt behandlet med en stråledose på 8 Gy.

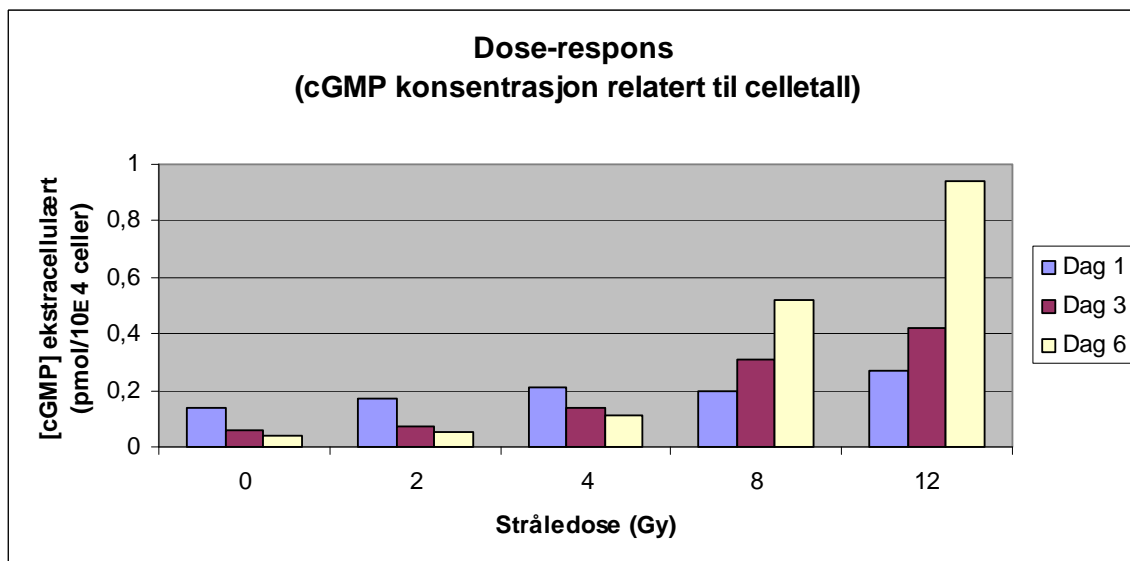
3.2.8. Syklisk GMP etter stråling

Figur 18A viser at den ekstracellulære konsentrasjonen av cGMP per milliliter endres lite etter strålebehandling. Det er heller ikke noen forskjell på konsentrasjonen for de ulike stråledosene eller til de forskjellige tidspunktene etter behandling. Å illustrere en eventuell endring i transport av cGMP ut av cellen etter strålebehandling på denne måten blir derfor ikke så illustrativt ettersom det ikke tas hensyn til at også mengden celler endrer seg (reduseres) etter stråling. Det kommer ikke frem hvor mange celler som bidrar til den gitte mengden av cGMP i den ekstracellulære væsken.

Figur 18B viser imidlertid at den ekstracellulære konsentrasjonen av cGMP per celledall øker etter stråling, og denne observerte effekten øker med økt stråledose. De to laveste stråledosene ga størst ekstracellulær cGMP konsentrasjon 1 døgn etter stråling, mens de to høyeste dosene ga størst konsentrasjon 6 døgn etter strålebehandlingen. Økningen som sees betyr at konsentrasjonen av cGMP rundt hver enkelt celle øker.



Figur 18A: Grafen viser den ekstracellulære konsentrasjonen av cGMP (pikomol/ml) for de ulike stråledosene, cGMP konsentrasjon som funksjon av stråledose. De ulike stolpene viser konsentrasjonen ved de ulike tidspunktene etter strålebehandlingen.



Figur 18B: Grafen viser hvordan den ekstracellulære konsentrasjonen av cGMP relatert til celledetall (pikomol/10E 4 celler), endrer seg med de ulike stråledosene. De ulike stolpene viser konsentrasjonen ved de ulike tidspunktene etter strålebehandlingen.

4. DISKUSJON

4.1. Cellelinjens egenskaper

Veksthastighet

Doblingstiden til C4-I cellene ble kalkulert til 36,5 timer. Doblingstiden for denne cellelinjen er omtrent 38-47 timer i serumtilsatt medium [1], så resultatene fra våre forsøk tyder på at cellene fortsatt har de opprinnelige vekstegenskapene.

Kromosominnhold

Auersperg og Hawryluk [78] viste at denne cellelinjen er aneuploid, og cellene er hypodiploide (de har mindre kromosominnhold enn $2n$). I denne oppgaven viste resultatene fra cycle test (for de ubestrålte kontrollcellene) at det var aneuploide celler til stede i cellepopulasjonen, noe som stemmer overens med tidligere observasjoner. Det var et fåtall av cellepopulasjonene som besto av kun normale, diploide celler. Resultatene viste imidlertid at de aneuploide cellene hadde et kromosominnhold som var større enn $2n$ (hyperdiploid). Dette kunne sees ut fra cellesyklusdiagrammene, som viste en G1 topp som representerte celler med et kjerneinnhold på $2n$, og en annen G1 topp bestående av celler med litt mer kjerneinnhold ($> 2n$). Hvorfor cellene i våre forsøk så ut til å være hyperdiploid og ikke hypodiploid er uvisst. En årsak kan være at cellene har endret egenskaper siden etableringen av cellelinjen i 1962.

4.2. Strålingseffekter

4.2.1. Effekter av stråling på cellevekst

Livmorhalskreft (cancer cervicis uteri) er en krefttype som utgår fra cellelag i livmormunnen eller livmorhalskanalen. Denne sykdommen behandles med kirurgi, cytostatika og stråling. I våre forsøk ble det gjort makro-observasjoner på cancer celler fra livmorhals etter at de var blitt strålebehandlet ved å studere celletetthet, cellesyklus og apoptose. På grunn av at undersøkelsene vi gjorde var av makroskopisk karakter kan vi ikke si noe om responsen til stråling med tanke på endringer i signalveier. Det vi kan si noe om er respons i celletetthetsutvikling.

Celler som behandles med gammastråling får redusert vekst sammenlignet med celler som ikke bestråles. Alle de ulike stråledosene som ble brukt i denne oppgaven (2, 4, 8 og 12 Gy) viste en vekstreduksjon. Vekstreduksjonen økte med økende stråledose, og denne effekten på cellevekst økte også med tiden etter strålebehandling. Effekten av stråling på kreftcellene var altså både konsentrasjonsavhengig og tidsavhengig.

Seks døgn etter strålebehandling har cellepopulasjoner bestrålt med 8 og 12 Gy en lavere cellekonsentrasjon sammenlignet med utgangskonsentrasjonen, mens celler bestrålt med 2 og 4 Gy har en høyere cellekonsentrasjon enn utgangskonsentrasjonen. Det var lite celledød så tidlig som 6 døgn etter stråling, og ettersom celletettheten i alle de bestrålte kulturene ble redusert i forhold til de ubestrålte kontrollcellene i dette tidsrommet er denne reduksjonen i stor grad forårsaket av at celleveksten går ned. Stråling av celler gir en nedgang i vekst på grunn av at stråleskadene resulterer i at cellene går inn i cellesyklusarrest eller at de mister evnen til å kunne dele seg. Det blir antatt at den vanligste stråleskaden, som er mest kritisk i forhold til dødelig effekt, er doble strand break (DSB) [23]. Normalt sett vil celler som er blitt reparert kunne fortsette å dele seg, mens celler med varige skader forblir i arrest og kan tilslutt dø ved at apoptosekaskaden settes i gang. Cellealdring (senescence) kan også være et utfall, der cellene fortsatt er

metabolsk aktive, men har mistet evnen til å kunne dele seg. Kreftceller responderer ikke på samme måte som normale celler på stråling. For å bli maligne tumorceller har de fleste mistet evnen til å sette i gang apoptose når DNA molekylet i cella skades, eller at det oppstår andre alvorlige skader. Reparasjonssystemer er også ofte satt ut av drift, og det samme gjelder sjekkpunkter som skal forhindre at celler med alvorlige skader får dele seg. Vanlige mutasjoner i kreftcellene fører altså til at de har muligheten til å fortsette å dele seg selv med skader, og at de i mye mindre grad blir eliminert ved hjelp av apoptose. Det er nok dette som observeres her, når celleveksten går ned men at cellene fortsatt er i live (lite celledød).

Stråling gir en tidsavhengig effektutvikling. Strålebehandlingen ga liten effekt på cellevekst etter 1 døgn. Tre døgn etter stråling begynte imidlertid celletettheten å endre seg i forhold til kontrollen. Det kan tyde på at det tar noen dager før stråleskadene setter i gang responser i cellenes tetthetsutvikling. Et avvik fra dette er celler som ble bestrålt med 2 Gy. Ett døgn etter stråling hadde de en større celletetthet sammenlignet med kontrollcellene. Denne dosen har muligens en svak proliferativ effekt 1 døgn etter stråling.

Den inhibitoriske dosen som gir en reduksjon på 50 % i celletetthet, ID_{50} verdien, sier noe om hvordan doser påvirker nedgangen i celletetthet. Ett døgn etter strålebehandling var denne verdien nesten 12 Gy, men etter 3 og 6 døgn var den rundt 3 Gy. Dette gjenspeiler at det sannsynligvis tar litt tid før effektene av stråling gjør seg gjeldene, og at ID_{50} verdien er høy 1 døgn etter behandling. Man kan tenke seg at når endringer på grunn av stråleskader først har skjedd, og responser har blitt satt i gang, så stabiliserer ID_{50} verdien seg.

Tidskurvene, figur 11A, B og C, viser endring i cellekonsentrasjon ved de ulike tidspunktene etter stråling. Disse tre kurvene ser forskjellig ut, selv om de i de store trekkene viser de samme trendene. Kurve A skiller seg fra kurve B og C. Forsøk A var det første forsøket som ble gjort, og ettersom man er mer utrent i forhold til forsøksoppsettet ved første gjennomkjøring kan det ha gitt seg utslag i en kurve som er

litt forskjellig i forhold til de to andre.

4.2.2. Effekter av stråling på cellesyklus

Celletetthet er en funksjon av input og exit, der cellesyklus står for inputen. Gammastråling av disse kreftcellene gir en G2/M arrest 1 døgn etter stråling, men arresten er forbigående. Tre døgn etter behandling er det lite tegn til en G2/M arrest. Andelen celler i arrest ser ut til å øke med økt stråledose (med unntak av 2 Gy, som ikke ga noen arrest). Ved mange andre former for stresstimuli går celler inn i G1 arrest, mens ioniserende stråling ser ut til å gi G2/M arrest. Dette er forenelig med andre forsøk som er gjort på stråling av kreftceller. Concin et al., [80] gjorde forsøk på 4 cellelinjer fra ovariene, og viste at gammastråling gir en dose-avhengig arrest i G2/M fasen. Kim et al., [81] bestrålte brystkreftceller med gammastråler (2 og 5 Gy), og fant en G2/M arrest etter 12-24 timer. Det ble deretter en nedgang i arrest etter 24-48 timer. Geldof et al., [82] fant det samme når kreftceller fra prostata ble bestrålt med 4 og 8 Gy. Strålingen induserte en forbigående G2/M arrest, med en maksimal arrest etter 16 timer. Banàth et al., [83] strålebehandlet 6 ulike cellelinjer fra cervix carsinom med 2, 5 og 10 Gy. Ett døgn etter stråling ble det en økning i antall celler distribuert til G2 fasen av cellesyklus. Denne arresten økte med økt stråledose. Årsaken til at stråleskader fører til cellesyklusarrest er, som nevnt tidligere i oppgaven, at skader på DNA molekylet (som oftest DSB) stimulerer til arrest via aktivering av ATM. Grunnen til at mengden celler i G2 fasen reduseres igjen etter den markante økningen ved 1 døgn er at de frigjøres fra arresten [84]. En forbigående arrest tyder på at celler med stråleskader får fortsette å dele seg. Årsaken er sannsynligvis, som nevnt tidligere, at kreftceller både kan ha defekte reparasjonssystem og sjekkpunkt. Abbott et al., [85] viste at kinasene MEK1 (mitogen-aktivert protein kinase kinase 1) og MEK2 (mitogen-aktivert protein kinase kinase 2) blir aktivert av ioniserende stråling, og at MEK2 er med på å øke cellenes muligheter til å unnsnippe G2/M arrest.

Grunnen til at 2 Gy ikke ga noen G2/M arrest i forsøkene våre kan ha flere forklaringer. Det er flere andre som viser at 2 Gy gir en G2/M arrest i ulike tumorceller, men det kan

være at 2 Gy faktisk ikke gir en arrest i C4-I cellelinjen. Kreftcellelinjer har ulike karakteristika og forskjeller når det gjelder respons i cellesyklus er noe man må kunne forvente.

Det ble vanskelig å måle cellenes distribusjon til de ulike fasene av cellesyklus i dette forsøket ved bruk av cycle test. Grunnen til det var i hovedsak at cellepopulasjonen var heterogen og ikke homogen. Det var både diploide og aneuploide celler til stede. Dette gjorde at det ble stor grad av overlapp for noen av histogramtoppene, og det var umulig å skille de. Denne metoden er kanskje ikke så egnelig å bruke hvis det er en heterogen cellekultur som skal undersøkes.

4.2.3. Effekter av stråling på cellenes kromosominnhold

Strålebehandling av kreftceller gir polyploide cellekjerner, kromosominnholdet blir større enn $2n$. Resultatene fra denne oppgaven viste tydelig at 8 og 12 Gy, men også 4 Gy til en viss grad, ga en økning i tetraploide celler. Det kunne observeres tetraploide celler allerede 1 døgn etter stråling, men det var først 3 og 6 døgn etter behandling at økningen ble markant. Mengden tetraploide celler økte med økt stråledose. Det er gjort flere forsøk som samsvarer med disse funnene. Avtandilov et al., [86] at stråling forårsaket polyploide cellekjerner i rektal adenokarsinom. Eriksson et al., [84] strålte HeLa celler med doser fra 2,5 og til 10 Gy, og resultatet ble en doseavhengig økning i polyploide celler. Kim et al., [81] viste at stråling gir polyploide celler, og at celler bestrålt med 5 Gy gir flere polyploide celler sammenlignet med celler bestrålt med 2 Gy. Forsøkene var gjort på brystkreftceller. De foreslo at det er en sammenheng mellom celler som blir frigjort fra G2/M arrest og polyploiditet. I forsøket deres ble arresten observert rundt 12-24 timer etter strålebehandling, med en påfølgende nedgang 24-48 timer etter. Økningen i polyploide celler ble observert fra 48 timer og utover. Dette er forenelig med funnene i denne oppgaven. Ei forklaring på hvorfor kreftceller blir tetraploide etter stråling kan være at mammalske celler mangler sjekkpunkt for tetraploiditet og økt celledørrelse [87]. Ei tetraploid celle er genomisk ustabil, der den opprinnelige cella ikke ble kløyd i mitose så resultatet ble ei celle med to kjerner og en forstørret størrelse. Castedo et al.,

[88] mener at tetraploide celler har redusert mulighet til å gjennomgå apoptose. Hau et al., [72] mener at polyploiditet øker sensitiviteten til forbindelser som skader DNA molekylet i mammalske celler.

Mitotisk katastrofe (mitotisk celledød) er en form for celledød som inntreffer etter at celler er behandlet med DNA ødeleggende forbindelser [25]. Det er et resultat av feil i celledelingsprosessen, som for eksempel at kromosominnholdet i morcella ikke blir fordelt korrekt på de to nye dattercellene. Celler som gjennomgår mitotisk katastrofe sees ofte som celler med flere kjerner og med en økt cellestørrelse. Disse cellene kan til slutt dø ved apoptose [89]. I forsøket til Eriksson [84] viste de at polyploide celler gikk over i mitotisk katastrofe, og noen av disse cellene døde av apoptose 5 til 7 dager etter stråling. De store cellene som ble observert i denne oppgaven 3 og 6 døgn etter strålebehandling, med de to høyeste dosene (8 og 12 Gy), kunne være tetraploide celler. De var fortsatt levende, men kan ha vært på vei til å dø ved apoptose. Eller så kunne det være et resultat av cellealdring, der også cellene kan svulme opp i tillegg til at de mister evnen til å kunne dele seg. Men ettersom det ble påvist en økning i tetraploide celler i cycle testen, i det gitte tidsrommet og for de gitte stråledosene er nok muligheten størst for at disse observerte cellene var tetraploide celler.

Ut i fra grafene som viser mengden tetraploide celler etter stråling, figur 15A og B, så vi at det ble en økning i % aneuploide celler med $8n$. Som nevnt ovenfor betyr dette at det er flere tetraploide celler til stede. I tillegg så tyder denne økningen av tetraploide celler i G2 fasen på at det blir en økning i G2/M arrest etter stråling, også for tetraploide celler.

4.2.4. Effekter av stråling på celledød

Stråling av kreftceller gir liten effekt på celledød 6 døgn etter behandling. Det var lite apoptotiske celler i alle kulturene, uavhengig av stråledose, både 1, 3 og 6 døgn etter behandling (unntaket var 2 Gy som forårsaket omtrent 30 % apoptose 3 døgn etter stråling). Disse funnene er i samsvar med andre forsøk. Kim et al., [81] fant at det var lite korrelasjon mellom stråledose og apoptose. Celler bestrålt med 5 Gy ga ikke mer

celledød enn celler bestrålt med 2 Gy. Men de viste imidlertid en økning i mengden apoptotiske celler allerede etter 1 og 2 døgn, og at det var 2 Gy som tidligst førte til apoptoseøkning.

Det forventes lite apoptose etter stråling på grunn av at apoptose kanskje ikke er den viktigste formen for celledød etter strålebehandling, det er ikke den vanligste dødsresponsen til stråling [24]. Dette kan forklares med at kreftceller ofte har mutasjoner som gjør at apoptose ikke settes i gang når den normalt sett skal, som ved skader på DNA eller andre viktige cellekomponenter. Det er en del av kreftcellenes egenskaper som gjør at de skiller seg fra celler med normal cellevekst. Tumorcellers respons til stråling er derimot i større grad andre former for celledød, som mitotisk katastrofe [25]. Celler som gjennomgår mitotisk katastrofe kan til slutt dø ved apoptose [89]. Apoptotisk celledød sekundært til mitotisk katastrofe skjer sannsynligvis først etter at det har gått 6 døgn. Dette kan antas fordi det ikke ble noen økning i antall døde celler i løpet av de 6 første døgnene etter behandling. Eriksson et al., [84] viste at stråling førte til mitotisk katastrofe i kreftceller, og at denne mitotiske katastrofen resulterte i en forsinket apoptose, 5-7 dager etter stråling. Dette er forenelig med observasjonene i denne oppgaven.

I en forsøksrunde med 3 paralleller ga dosen 2 Gy en markant høyere andel apoptotiske celler sammenlignet med de andre dosene og kontrollen 3 døgn etter stråling. Men denne effekten gikk tilbake når 6 døgn var gått. Muligheten for at resultatet ikke er representativt er tilstede. Hvis 2 Gy hadde forårsaket en så mye høyere andel apoptotiske celler sammenlignet med de andre stråledosene ville det ha vist seg på dose-responskurve 12B (det var i denne forsøksrunden at JC-1 metoden ble gjennomført). Trolig ville det da vært en spesiell stor nedgang i % respons fra dag 1 (blå linje) til dag 3 (rosa linje) for 2 Gy. Men slik er det ikke.

4.2.5. Celle morfologi

Bildene som ble tatt av både ubestrålte og bestrålte cellekulturer påviste kvalitativt at det var døde celler til stede. Døde celler endrer morfologi, og ut i fra de karakteristiske

trekkene til apoptotiske og nekrotiske celler kunne det konkluderes med at begge celletypene var representert i begge cellekulturene. Det var ikke mulig å si noe bestemt om mengden døde celler i de ulike cellekulturene ved bruk av disse bildene.

4.2.6. Effekt av stråling på den ekstracellulære konsentrasjonen av cGMP

Hypotesen i denne oppgaven er at effekter etter stråling kan påvirke konsentrasjonen av cGMP i ekstracellulærvæske. For å kunne si noe om dette ble den ekstracellulære konsentrasjonen av cGMP i en akutt fase (kort tid etter stråling) undersøkt. Stråling av disse kreftcellene førte til en økning av cGMP rundt hver celle. Den ekstracellulære konsentrasjonen av cGMP per celle økte med økt stråledose. Kliniske funn, 3 måneder etter behandling, har vist en nedgang av cGMP i urin ([55], [56]). Denne effekten kan ikke påvises akutt. Det er ikke å forvente at det blir en reduksjon av cGMP så tidlig etter stråling. Årsaken til at vi ser en økning av cGMP kan være at stråling stresser cellene på flere måter. Selve strålingen kan aktivere masse signalveier og sette i gang signalkaskader. Enzymet iNOS(induserbar NO syntase) induseres trolig av stråling, og via denne aktiveringen blir det økt produksjon av cGMP. Induserbar NOS fører til syntese av NO, og NO gir produksjon av cGMP. Hvis celler revner og celleinnhold tømmes ut i det ekstracellulære vil også dette bidra til den observerte økningen av cGMP. Når situasjonen etter stråling har stabilisert seg kan man imidlertid forvente å se andre effekter enn de i den akutte fasen. Ved et senere tidspunkt etter strålebehandling vil den ekstracellulære konsentrasjonen av cGMP trolig gå ned. En nedgang i cGMP konsentrasjon kan relateres til en nedgang i kreftcelletall etter stråling.

4.3. Forskjell på stråling av cellekulturer in vitro og klinisk strålebehandling av pasienter

Effektene av stråling som sees på cellene i denne oppgaven kan ikke direkte sammenlignes med effekter som celler i en tumor in vivo vil ha på stråling. Det er for det første brukt doser i denne oppgaven som ikke er å regne som terapeutiske stråledoser. Den mest vanlige terapeutiske dosen er 2 Gy, mens 8 og 12 Gy blir sjelden eller aldri gitt. For det andre blir det stor forskjell på å stråle celler en gang, og på å stråle celler mange ganger (fraksjonert behandling).

4.4. Konklusjon

- Cellelinjen C4-I er heterogene med tanke på kromosominnhold i kjernen.
- Cellelinjen viste en dose- og tidsavhengig reduksjon i celletetthet i forhold til kontrollcellene etter stråling.
- Økte stråledoser ga økte ekstracellulære konsentrasjoner av cGMP rundt hver celle.
- Det var lite apoptotiske celler 6 døgn etter strålebehandling, og det var lite korrelasjon mellom stråledose og apoptose. Apoptose ser ikke ut til å være den viktigste tumorresponsen til stråling.
- Stråling førte til en forbigående G2 arrest 1 døgn etter behandling.
- De høyeste stråledosene forårsaket en økning av tetraploide celler, og mengden tetraploide celler økte når dosen økte.

4.5. Framtidige studier

- Utføre flere forsøksserier for å sikre statistisk signifikans.
- Forsøkene kunne bli utvidet tidsmessig for å undersøke når det blir mer økning i celledød. Om det er mulig å se hvor lang tid det tar før cellene, som eventuelt har gjennomgått mitotisk katastrofe, dør ved blant annet apoptose. Hvis det måles apoptose vil man kanskje kunne forvente at det blir en økning av JC-1 positive celler etter at det har gått enda flere dager. Mikroskopisk kan man undersøke om de store cellene, som ble observert i populasjoner behandlet med de høyeste stråledosene, etter hvert blir blå av trypanblå. Slik kan man studere om den økte celledødsraten er et forstadium til celledød.
- Studere intracellulære signalveier for å se hva som aktiveres og hva som hemmes etter stråling. Dette kan bidra til en bedre forståelse av de effektene som observeres etter strålebehandling, både med tanke på celledød, celledødsrate og nivåer av cGMP.
- For bedre å kunne studere fasedistribusjonen til kreftceller etter strålebehandling (ved hjelp av cycle test) kunne kanskje en cellelinje fra cervix som i utgangspunktet var homogen diploide vært benyttet. Da hadde man unngått problemet med overlappende histogramtopper.
- I framtidige studier kunne man kjøre clonogenic assay (klonogent assay). Assayet kan brukes for å studere strålesensitivitet og celleoverlevelse. Clonogenic assay uttrykker overlevelsesfraksjon som funksjon av stråledose, og kan brukes til kartlegging av strålesensitivitet til ulike vev.

REFERANSER

- [1] Ørbo, A., Jæger, R., Kjørstad, K.E., Sager, G., 1995. Progesterone and beta-estradiol influence the cell density-dependent distribution of cyclic nucleotides across the cell membrane of human C4-I cells (squamous carcinoma of the uterine cervix) by a non-genomic mechanism. *Anticancer Res.* 15, 1905-1909.
- [2] McKinnell, R.G., Parchment, R.E., Perantoni, A.O., Damjanov, I., Pierce, G.B., 2006. *The biological basis of cancer.* Cambridge: Cambridge university press.
- [3] Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257.
- [4] Dragovich, T., Rudin, C.M., Thompson, C.B., 1998. Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death. *Oncogene* 17, 3207-3213
- [5] Becker, W.M., Kleinsmith, L.J., Hardin, J., 2003. *The world of the cell.* San Francisco: Benjamin cummings.
- [6] Klaassen, C.D., Watkins III, J.B., 2003. *Casarett and Doulls essentials of toxicology.* USA: The McGraw-Hill companies.
- [7] Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., Henson, P.M., 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophags. *J. Immunol.* 148, 2207-2216.
- [8] Festjens, N., Berghe, T.V., Vandenabeele, P., 2006. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochem. Biophys. Acta* 1757, 1371-1387.
- [9] Waring, P., 2005. Redox active calcium ion channels and cell death. *Arch. Biochem. Biophys.* 434, 33-42.
- [10] Mannick, J.B., Hausladen, A., Liu, L., Hess, D.T., Zeng, M., Miao, Q.X., Kane, L.S., Gow, A.J., Stamler, J.S., 1999. Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* 284,

651–654.

[11] Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T., Traganos, F., 1997. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 27, 1-20.

[12] Li, R., Sonik, A., Stindl, R., Rasnick, D., Duesberg, P., 2000. Aneuploidy versus gene mutation hypothesis: recent study claims mutation, but is found to support aneuploidy. *Proceedings of the national academy of sciences (USA)* 97, 3236-3241.

[13] Pellman, D., 2007. Aneuploidy and cancer. *Nature* 446, 38-39.

[14] Ladik, J., Förner, W., 1994. The beginnings of cancer in the cell an interdisciplinary approach. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

[15] Grunicke, H.H., 1995. Signal transduction mechanisms in cancer. Heidelberg: Springer-Verlag.

[16] Meyn, M.S., 1997. Chromosome instability syndromes: lessons for carcinogenesis. I: Kastan, M.B. (red). *Genetic instability and tumorigenesis* (71-148). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

[17] Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V., Snijders, P.J., Peto, J., Meijer, C.J., Muñoz, N., 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 189, 12-19.

[18] Clere, N., Bermont, L., Fauconnet, S., Lascombe, I., Saunier, M., Vettoretti, L., Plissonnier, M.L., Mougín, C., 2007. The human papillomavirus type 18 E6 oncoprotein induces vascular endothelial growth factor 121 (VEGF₁₂₁) transcription from the promoter through a p53-independent mechanism. *Experimental Cell Res.* 313, 3239-3250.

[19] Bremer, G.L, Tiebosch, A.T.M.G., van der Putten, H.W.H.M., Schouten, H.J.A., de

Haan, J., Arends, J.H., 1996. Tumor angiogenesis: an independent prognostic parameter in cervical cancer. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 174, 126-131.

[20] Gaffney, D.K., Haslam, D., Tsodikov, A., Hammond, E., Seaman, J., Holden, J., Lee, J., Zempolich, K., Dodson, M., 2003. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and vascular endothelial growth factor (VEGF) negatively affect overall survival in carcinoma of the cervix treated with radiotherapy. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 56, 922-928.

[21] Birner, P., Schindl, M., Obermair, A., Breitenecker, G., Kowalski, H., Oberhuber, G., 2001. Lymphatic microvessel density as a novel prognostic factor in early-stage invasive cervical cancer. *Int. J. Cancer* 95, 29-33.

[22] Sakuragi, N., 2007. Up-to-date management of lymph node metastasis and the role of tailored lymphadenectomy in cervical cancer. *Int. J. Clin. Oncol.* 12, 165-175.

[23]

Bomford, C.K., Kunkler, I.H., Walter, J., Miller, H., 2003. *Walter and Miller's textbook of radiotherapy: radiation physics, therapy and oncology.* Edinburgh: Churchill Livingstone

[24] Gudkov, A.V., Komarova, E.A., 2003. The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nature Rev. Cancer* 3, 117-129.

[25] Brown, J.M., Attardi, L.D., 2005. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat. Rev. Cancer* 5, 231-237.

[26] Santin, A.D., Hermonat, P.L, Ravaggi, A., Chiriva-Internati, M., Pecorelli, S., Parham, G.P., 1998. Radiation-enhanced expression of E6/E7 transforming oncogenes of human papillomavirus-16 in human cervical carcinoma. *Cancer* 83, 2346-2352.

[27] Rubin, P., Casarett, G.W., 1968. Clinical radiation pathology as applied to curative radiotherapy. *Cancer* 22, 767-778.

[28]

Waldman, S.A., Murad, F., 1987. Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol. Rev.* 39, 163-196.

[29] Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A., 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 109-142.

[30] Garthwaite, J., 1995. Neural nitric oxide signalling. *Trends Neurosci.* 18, 51-52.

[31] Hofmann, F., Ammendola, A., Schlossmann, J., 2000. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J. Cell Sci.* 113, 1671-1676.

[32] Feil, R., Lohmann, S.M., de Jonge, H., Walter, U., Hofmann, F., 2003. Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice. *Circ. Res.* 93, 907-916.

[33] Wolfsgruber, W., Feil, S., Bummer, S., Kuppinger, O., Hofmann, F., Feil, R., 2003. A proatherogenic role for cGMP-dependent kinase in vascular smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 13519-13524.

[34] Feil, R., Feil, S., Hofmann, F., 2005. A heretical view on the role of NO and cGMP in vascular proliferative diseases. *Trends Mol. Med.* 11, 71-75.

[35] Koyama, H., Bornfeldt, K.E., Fukumoto, S., Nishizawa, Y., 2001. Molecular pathways of cyclic nucleotide-induced inhibition of arterial smooth muscle cell proliferation. *J. Cell Physiol.* 186, 1-10.

- [36] Aizawa, T., Wei, H., Miano, J.M., Abe, J., Berk, B.C., Yan, C., 2003. Role of phosphodiesterase 3 in NO/cGMP-mediated anti-inflammatory effects in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 93, 406-413.
- [37] Wu, C.F., Bishopric, N.H., Pratt, R.E., 1997. Atrial natriuretic peptide induces apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 272, 14860-14866.
- [38] Thompson, W.J., Piazza, G.A., Li, H., Liu, L., Fetter, J., Zhu, B., Sperl, G., Ahnen, D., Pamukcu, R., 2000. Exisulind induction of apoptosis involves guanosine 3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase inhibition, protein kinase G activation, and attenuated β -catenin. *Cancer Res.* 60, 3338-3342.
- [39] Zhu, B., Vemavarapu, L., Thompson, W.J., Strada, S.J., 2005. Suppression of cyclic GMP-specific phosphodiesterase 5 promotes apoptosis and inhibits growth in HT29 cells. *J. Cell Biochem.* 94, 336-350.
- [40] Fraser, M., Chan, S.L., Chan, S.S.L., Fiscus, R.R., Tsang, B.K., 2006. Regulation of p53 and suppression of apoptosis by the soluble guanylyl cyclase/cGMP pathway in human ovarian cancer cells. *Oncogene* 25, 2203-2212.
- [41] Moon, E.Y., Lerner, A., 2002. Benzylamide sulindac analogues induce changes in cell shape, loss of microtubules and G₂-M arrest in a chronic lymphocytic leukaemia (CLL) cell line and apoptosis in primary CLL cells. *Cancer Res.* 62, 5711-5719.
- [42] Borst, P., Elferink, R.O., 2002. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 537-592.
- [43] Adachi, M., Sampath, J., Lan, L.B., Sun, D., Hargrove, P., Flatley, R., Tatum, A.,

Edwards, M.Z., Wezeman, M., Matherly, L., Drake, R., Schuetz, J., 2002. Expression of MRP4 confers resistance to ganciclovir and compromises bystander cell killing. *J. Biol. Chem.* 277, 38998-39004.

[44] Ritter, C.A., Jedlitschky, G., zu Schwabedissen, H.M., Grube, M., Köck, K., Kroemer, H.K., 2005. Cellular export of drugs and signalling molecules by the ATP-binding cassette transporters MRP4 (ABCC4) and MRP5 (ABCC5). *Drug Metabolism Reviews* 1, 253-278.

[45] Jedlitschky, G., Burchell, B., Keppler, D., 2000. The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *J. Biol. Chem.* 275, 30069-30074.

[46] Schinkel, A.H., Jonker, J.W., 2003. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 3-29.

[47] Andric, S.A., Kostic, T.S., Stojilkovic, S.S., 2006. Contribution of Multidrug Resistance Protein MRP5 in control of cyclic guanosine 5'-monophosphate intracellular signaling in anterior pituitary cells. *Endocrinology* 147, 3435-3445.

[48] Kool, M., de Haas, M., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., van Eijk, M.J., Juijn, J.A., Baas, F., Borst, P., 1997. Analysis of expression of cMOAT (MRP2), MRP3, MRP4, and MRP5, homologues of the multidrug resistance-associated protein gene (MRP1), in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 57, 3537-3547.

[49] Broadus, A.E., Kaminsky, N.I., Hardman, J.G., Sutherland, E.W., Liddle, G.W., 1970. Kinetic parameters and renal clearances of plasma adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in man. *J. Clin. Invest.* 49, 2222-2236.

[50] Wehmann, R.E., Blonde, L., Steiner, A.L., 1974. Sources of cyclic nucleotides in plasma. *J. Clin. Invest.* 53, 173-179.

[51] Turner, G.A., Ellis, R.D., Guthrie, D., Latner, A.L., Monaghan, J.M., Ross, W.M., Skillen, A.W., Wilson, R.G., 1982. Urine cyclic nucleotide concentrations in cancer and other conditions; cyclic GMP: a potential marker for cancer treatment. *J. Clin. Pathol.* 35, 800-806.

[52] Luesley, D.M., Blackledge, G.R., Chan, K.K., Newton, J.R., 1986. Random urinary cyclic 3',5' guanosine monophosphate in epithelial ovarian cancer: relation to other prognostic variables and to survival. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 93, 380-385.

[53] Luesley, D.M., Chan K.K., Newton, J.R., Blackledge, G.R., 1987. Serial urinary cyclic guanosine monophosphate measurements in the assessment of response to treatment in epithelial ovarian cancer. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 94, 461-466.

[54] Ørbo, A., Jaeger, R., Sager, G., 1998. Urinary levels of cyclic guanosine monophosphate (cGMP) in patients with cancer of the uterine cervix: a valuable prognostic factor of clinical outcome? *Eur. J. Cancer* 34, 1460-1462.

[55] Ørbo, A., Hanevik, M., Jaeger, R., van Heusden, S., Sager, G., 2007. Urinary cyclic GMP after treatment of gynecological cancer. A prognostic marker of clinical outcome. *Anticancer Res.* 27, 2591-2596.

[56] Ørbo, A., Jaeger, R., Sager, G., 1994. Cell density dependence of cAMP and cGMP levels in four human cell lines derived from carcinomas of the uterine cervix. *Gynecol. Oncol.* 52, 320-325.

[57] Thomsen, L.L., Lawton, F.G., Knowles, R.G., Beesley, J.E., Riveros-Moreno, V., Moncada, S., 1994. Nitric oxide activity in human gynaecological cancer. *Cancer Res.* 54, 1352-1354.

[58] Thomsen, L.L., Miles, D.W., Happerfield, L., Bobrow, L.G., Knowles, R.G., Moncada, S., 1995. Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. *Br. J. Cancer* 72, 41-44.

[59] Gallo, O., Masini, E., Morbidelli, L., Franchi, A., Fini-Strochi, I., Vergari, W.A., Ziche, M., 1998. Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 587-596.

[60] Franchi, A., Gallo, O., Paglierani, M., Sardi, I., Magnelli, L., Masini, E., Santucci, M., 2002. Inducible nitric oxide synthase expression in laryngeal neoplasia: Correlation with angiogenesis. *Head Neck* 24, 16-23.

[61] Jadeski, L.C., Chakraborty, C., Lala, P.K., 2003. Nitric oxide-mediated promotion of mammary tumour cell migration requires sequential activation of nitric oxide synthase, guanylate cyclase and mitogen-activated protein kinase. *Int. J. Cancer* 106, 496-504.

[62] Cianchi, F., Cortesini, C., Fantappiè, O., Messerini, L., Schiavone, N., Vannacci, A., Nistri, S., Sardi, I., Baroni, G., Marzocca, C., Perna, F., Mazzanti, R., Bechi, P., Masini, E., 2003. Inducible nitric oxide synthase expression in human colorectal cancer: Correlation with tumor angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 162, 793-801.

[63] Ridnour, L.A., Thomas, D.D., Donzelli, S., Espey, M.G., Roberts, D.D., Wink, D.A., Isenberg, J.S., 2006. The biphasic nature of nitric oxide responses in tumor biology. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 1329-1337.

[64] Brune, B., von Knethen, K., Sandau, K.B., 1998. Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur. J. Pharm.* 351, 261-272.

[65] Goodman, J., Hofseth, L.J., Hussain, S.P., Harris, C.C., 2004. Nitric oxide and p53 in cancer-prone chronic inflammation and oxyradical overload disease. *Environ. Mol. Mutagen* 44, 3-9.

[66] Ziche, M., Morbidelli, L., Choudhuri, R., Zhang, H.T., Donnini, S., Granger, H.J., Bicknell, R., 1997. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 99, 2625-2634.

[67] Jones, M.K., Tsugawa, K., Tarnawski, A.S., Baatar, D., 2004. Dual actions of nitric oxide on angiogenesis: Possible roles of PKC, ERK, and AP-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318, 520-528.

[68] Chen, Z.S., Lee, K., Walther, S., Raftogianis, R.B., Kuwano, M., Zeng, H., Kruh, G.D., 2002. Analysis of Methotrexate and Folate Transport by Multidrug Resistance Protein 4 (ABCC4). *Cancer Res.* 62, 3144-3150.

[69] Borst, P., de Wolf, C., van de Wetering, K., 2007. Multidrug resistance-associated proteins 3, 4, and 5. *Eur. J. Physiol.* 453, 661-673.

[70] Freshney, R.I., 2005. *Culture of animal cells a manual of basic technique*. New Jersey: John Wiley & sons.

[71] Shapiro, H.M., 1995. *Practical flow cytometry*. USA: Wiley-Liss.

[72] Hau, P.M., Siu, W.Y., Wong, N., Lai, P.B., Poon, R.Y., 2006. Polyploidization

increases the sensitivity to DNA-damaging agents in mammalian cells. FEBS Lett. 580, 4727-4736.

[73] Ormerod, M.G., 1994. Flow cytometry A practical approach. New York: Oxford university press.

[74] Rabinovitch, P.S., 1994. DNA content histogram and cell-cycle analysis. I: Darzynkiewicz, Z., Robinson, J.P., Crissman, H.A. (red). *Methods in cell biology flow cytometry* (263-296). San Diego: Academic press.

[75] Cossarizza, A., Baccarani-Conti, M., Kalashnikova, G., Franceschi, C., 1993. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J- aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1). Biochem. Biophys. Res. Commun. 197, 40-45.

[76] Lugli, E., Troiano, L., Ferraresi, R., Roat, E., Prada, N., Nasi, M., Pinti, M., Cooper, E.L., Cossarizza, A., 2005. Characterization of cells with different mitochondrial membrane potential during apoptosis. Cytometry 68A, 28-35.

[77] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. Molecular biology of the cell. New York: Garland Science.

[78] Auersperg, N., Hawryluk, A.P., 1962. Chromosome observations on three epithelial-cell cultures derived from carcinomas of the human cervix. J. Natl. Cancer Inst. 28, 605-627.

[79] Berthois, Y., Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S., 1986. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 2496-2500.

[80] Concin, N., Stimpfl, M., Zeillinger, C., Wolff, U., Hefler, L., Sedlak, J., Leodolter, S., Zeillinger, R., 2003. Role of p53 in G2/M cell cycle arrest and apoptosis in response to gamma-irradiation in ovarian carcinoma cell lines. *Int. J. Oncol.* 22, 51-57.

[81] Kim, J.Y., Kim, C.H., Stratford, I.J., Patterson, A.V., Hendry, J.H., 2004. The bioreductive agent RH1 and gamma-irradiation both cause G2/M cell cycle phase arrest and polyploidy in a p53-mutated human breast cancer cell line. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 58, 376-385.

[82] Geldof, A.A., Plaizier, M.A., Duivenvoorden, I., Ringelberg, M., Versteegh, R.T., Newling, D.W., Teule, G.J., 2003. Cell cycle perturbations and radiosensitization effects in a human prostate cancer cell line. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 129, 175-182.

[83] Banàth, J.P., MacPhail, S.H., Olive, P.L., 2004. Radiation sensitivity, H2AX phosphorylation, and kinetics of repair of DNA strand breaks in irradiated cervical cancer cell lines. *Cancer Res.* 64, 7144-7149.

[84] Eriksson, D., Löfroth, P.O., Johansson, L., Riklund, K.A., Stigbrand, T., 2007. Cell cycle disturbances and mitotic catastrophes in HeLa Hep2 cells following 2.5 to 10 Gy of ionizing radiation. *Clin. Cancer Res.* 13, 5501-5508.

[85] Abbott, D.W., Holt, J.T., 1999. Mitogen-activated protein kinase kinase 2 activation is essential for progression through the G2/M checkpoint arrest in cells exposed to ionizing radiation. *J. Biol. Chem.* 274, 2732-2742.

[86] Avtandilov, G.G., Zagrebín, V.M., 1983. Changes of the DNA content of cell nuclei in mucosa and carcinoma of the rectum after replication of different methods of the preoperative irradiation. *Zentralbl. Allg. Pathol.* 128, 399-403.

[87] Wong, C., Stearns, T., 2005. Mammalian cells lack checkpoints for tetraploidy, aberrant centrosome number, and cytokinesis failure. *BMC Cell Biology* 6, 1-12.

[88] Castedo, M., Coquelle, A., Vitale, I., Vivet, S., Mouhamad, S., Viaud, S., Zitvogel, L., Kroemer, G., 2006. Selective resistance of tetraploid cancer cells against DNA damage-induced apoptosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1090, 35-49.

[89] Chu, K., Teele, N., Dewey, M.W., Albright, N., Dewey, W.C., 2004. Computerized video time lapse study of cell cycle delay and arrest, mitotic catastrophe, apoptosis and clonogenic survival in irradiated 14-3-3 σ and CDKN1A (p21) knockout cell lines. *Radiat. Res.* 162, 270-286.