
Temperaturindusert celledød i
blærekreftcellelinjen AY-27 og effekter av
kombinert hypertermi og fotodynamisk
behandling

Temperature induced cell death in the
bladder cancer cell line AY-27 and effects
of combined hyperthermia and
photodynamic treatment

Kristine Feness

INSTITUTT FOR FYSIKK
AVDELING FOR BIOFYSIKK OG MEDISINSK FYSIKK
NTNU 2009

Sammendrag

Denne oppgaven ser på effekten av *in vitro* varmebehandling på kreftcellerlinjen AY-27, som kommer fra blærekreft hos rotter. Dette ble gjort ved å merke cellene med enten Annexin og propidiumjodid, eller YO-PRO og propidiumjodid, og deretter studere dem i konfokalmikroskop og/eller i flowcytometer. Konfokalmikroskopi viste seg å være en veldig tidkrevende måte å studere celledød kvantitativt. Siden det også viste seg å gi om lag samme resultater som ved bruk av flowcytometeret, ble det besluttet å konsentrere seg om flowcytometriundersøkelser.

Celledød ved apoptose fører, i motsetning til nekrose, ikke til inflammasjon i vevet og er derfor ønskelig i en behandlingssituasjon. Oppgaven prøver å finne svar på om apoptosen er temperaturavhengig hos AY-27 cellene, og videre om man kan finne en bestemt temperatur som maksimerer apoptosen. AY-27-cellene viste liten apoptose uansett temperaturbehandling, med bare små forskjeller mellom temperaturene. Cellene viste seg å være lite varmesensitive, med en overlevelse på rundt 90% i nesten alle forsøk med temperaturer under 46 °C . Dette er samme verdi som i kontrollforsøket med 37 °C .

Andre del av oppgaven ser på varmebehandling kombinert med fotodynamisk terapi (PDT). Det ser ut til at den kombinerte behandlingen har større effekt enn de to behandlingsformene hver for seg. En får altså en synergieffekt av å kombinere de to behandlingsformene.

Abstract

This thesis studies the *in vitro* effect of hyperthermia on the bladder cancer cell line AY-27, derived from rats. This was done by either labelling the cells with Annexin and Propidium iodide, or YO-PRO and Propidium iodide, and then studying the cells with a confocal laser scanning microscope and/or a flow cytometer. Confocal laser scanning microscopy turned out to be a time consuming way of doing quantitative measurements on the cells. It also gave about the same results as the flow cytometer studies. Because of this further studies focused on the flow cytometry method.

The thesis tries to figure out if apoptosis in the AY-27 cells is temperature dependent and whether one can find a temperature that maximizes apoptosis. Contrary to cell death by necrosis, apoptosis does not lead to inflammation of the tissue and is thus more desirable in clinical applications. The AY-27 cell line showed little apoptosis whichever temperature was applied, with only small differences between the temperatures. The cells showed little sensitivity to heat treatment, with a survival level of around 90% in almost all experiments done with temperatures below 46 °C . This is the same value as for the control experiment at 37 °C .

The second part of the thesis looks at the effect of combining hyperthermia with photodynamic therapy (PDT). It seems that the combined treatment is more effective than the two treatments done separately, indicating a synergy effect.

Forord

Denne oppgaven utgjør masteroppgaven min utført våren 2009. Arbeidet er utført ved Institutt for fysikk ved NTNU, avdeling for biofysikk og medisinsk teknologi. Temaet har vært temperatur- og PDT-behandling på kreftceller linjen AY-27. I den anledning vil jeg takke mine veiledere professor Anders Johnsson og professor Thor Bernt Melø. Jeg vil også takke forsker Odrun Gederaas og stipendiat Linda Helander ved St. Olavs Hospital for interessante møter, Ingvild Kinn Ekroll for selskap og to hjelpende hender på laben og Gard Spreemann for gjennomlesning, generell datahjelp og kunstnerisk bistand. I tillegg vil jeg gi en ekstra takk Kristin G. Sæterbø som har vært spesielt viktig i planlegging av forsøk i de perioder der Johnsson var sykemeldt. Takk for veiledning, opplæring i praktisk labarbeid og for ikke å bli for irritert når vi rotet til og ødela ting på laben.

Trondheim, 6. juli 2009

Innhold

1	Innledning	1
2	Kreft	3
2.1	Celleinaktivering – apoptose, nekrose og onkose	3
2.2	Cellevekst og kreft	5
2.3	Kreftbehandling	7
2.4	Cellevekst og hypertermi	7
2.5	Blærekreft	9
3	Fotodynamisk terapi (PDT)	11
3.1	Historien bak fotodynamisk terapi	11
3.2	Fluorescens	12
3.3	Mekanismene bak PDT	13
3.4	5-aminolevulinsyre (ALA)	17
4	Instrumenter	21
4.1	Konfokalt laserskanningmikroskop	21
4.2	Flowcytometri	21
5	Metode og utstyr	25
5.1	Dyrking og medium	25
5.2	Annexin, PI og YO-PRO-1	26
5.3	Annexin- og propidiumjodidløsning	26
5.4	Temperaturforsøk med Annexin og propidiumjodid	29
5.5	Temperaturforsøk med YO-PRO og propidiumjodid	30
5.6	Kombinert PDT- og temperaturbehandling	30
6	Målinger og resultat	33
6.1	Temperaturforsøk med Annexin/PI-løsning	33

6.2	Temperaturforsøk med Annexin/PI-løsning studert i konfokal- mikroskop	36
6.3	Temperaturforsøk med YO-PRO/PI-løsning	36
6.4	Kombinert PDT og varmebehandling	45
7	Diskusjon	53
7.1	Temperaturforsøk med Annexin/PI-løsning	53
7.2	Konfokalmikroskopi vs. flowcytometri	54
7.3	Temperaturforsøk med YO-PRO/PI-løsning	55
7.4	Farging med YO-PRO vs. Annexin	56
7.5	Kombinert PDT- og varmebehandling	56
8	Konklusjon	59
	Referanser	61
A	Instrumentinnstillinger for Annexin/PI-forsøk	65
B	Instrumentinnstillinger for YO-PRO/PI forsøk	67
C	Dyrking av AY-27	69
D	Overlevelse, apoptose og nekrose etter Annexin/PI -forsøk med ulike inkubasjonstider	71
E	Overlevelse etter HAL-PDT-behandling som funksjon av dose	79

Kapittel 1

Innledning

Kreft er en av de største folkesykdommene globalt sett. I 2006 døde 10 440 av sykdommen i Norge, og kreft var den hyppigste dødsårsaken blant personer under 80 år^[1].

I første del av oppgaven vil vi se på hypertermi (temperaturbehandling) av blærekreftceller fra rotte (cellelinje AY-27) med den hensikt å drepe dem. Blærekreft er den femte vanligste kreftformen i Norge. De fleste som diagnostiseres er over 65 år og menn er oftere rammet enn kvinner.

Celledød kan skje ved den kontrollerte og energikrevende formen apoptose, eller den ukontrollerte formen nekrose. Nekrose fører til inflammasjon i vevet, og celledød ved apoptose er dermed mer ønskelig i en behandlingssituasjon. I forsøkene ble fargestoffene Annexin, YO-PRO og propidiumjodid brukt for å kunne skille mellom levende og døde celler. Videre ble to ulike metoder for å detektere cellene testet: flowcytometri og konfokalmikroskopi. Oppgaven ser både på effekten av temperaturbehandling med hensyn på overlevelse, og på om enkelte temperaturer induserer mer apoptose enn andre.

Hypertermi er ikke ansett for å være effektiv nok til alene å kurere kreft. Den andre delen av oppgaven vil ta for seg hypertermi i kombinasjon med fotodynamisk terapi.

Fotodynamisk terapi (PDT) er en behandlingsform for kreft som går ut på å tilsette et stoff, i dette tilfellet Hexyl-aminolevulinsyre (HAL), som bruker kroppens heme-syntese til å lage Protoporfyrin IX (PpIX), noe som gjør cellene sensitive for lys. Belysning av cellene med rødt lys fører da til celledød. Normale celler har større evne til å reparere skadene etter PDT-behandling i forhold til kreftceller. I tillegg vil det fotosensitiserende stoffet opphøpe seg spesifikt i noen typer kreftsvulster. Dette fører til stor celledød i kreftvev i forhold til normalt vev. Fordelene med PDT-behandling fremfor

konvensjonelle behandlingsformer som strålebehandling og cytostatika er at det fotosensitiserende stoffet allerede finnes naturlig i kroppen og er dermed lite toksisk. Behandlingen fører kun til en opphopning av stoffet i en begrenset periode, før kroppen selv kvitter seg med overproduksjonen. En annen fordel er at det kun er et fotosensitiserende stoff som produseres, som vil si at bare celler som blir belyst, vil produsere toksiske radikaler som fører til celledød. Resten av kroppen vil være upåvirket av behandlingen.^[2]

En annen fordel med PDT-behandling, eller kombinert temperatur- og PDT-behandling, som kan være et behandlingsalternativ i seg selv, også lett lar seg kombinere med andre konvensjonelle behandlingsformer.

Kapittel 2

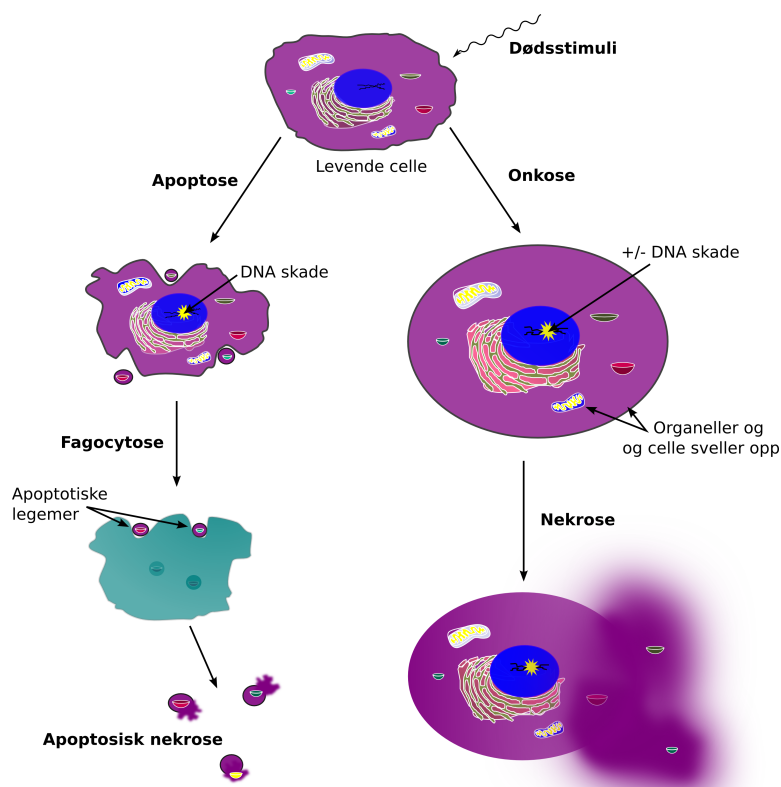
Kreft

I menneskekroppen produseres det hele tiden nye celler, og samtidig dør celler ved mekanismer som *apoptose* og *nekrose*. På denne måten vil antall celler i kroppen holdes på et noenlunde konstant nivå. De nye cellene som dannes kommer fra stamceller. Disse cellene har evnen til å dele seg ubegrenset mange ganger. Når cellen har delt seg kan dattercellen enten forbli en stamcelle eller spesialisere seg. For eksempel kan stamceller i beinmargen bli til alle mulige typer celler som finnes i blodet. Når cellen har spesialisert seg vil den vanligvis miste evnen til å dele seg. Ved at den ene dattercellen forblir en stamcelle mens den andre spesialiserer seg vil en hele tiden produsere nye celler til å erstatte gamle celler i kroppen som dør. Hvis balansen mellom celler som kan dele seg og celler som spesialiserer seg forstyrres kan en få ukontrollert cellevekst og få dannet kreftsvulster.^[3]

2.1 Celleinaktivering – apoptose, nekrose og onkose

Tidligere ble celledød delt inn i to kategorier: apoptose og nekrose (se fig. 2.1). Nekrose som oppstår på grunn av skade kan skyldes toksiner, infeksjoner, mangel på blod eller at cellen utsettes for stress. Dette fører til at cellen ikke greier å opprettholde homeostase, hvorpå den sveller opp og brister. Innholdet i cellen slippes ut i vevet rundt, som fører til en akutt betennelsesreaksjon der de hvite blodlegemene kommer til og fjerner restene av den nekrotiske cellen og det døde vevet erstattes (ofte av bindevev).

Apoptose er en kontrollert, energikrevende form for celledød og er den måten kroppen kvitter seg med gamle celler, men kan også oppstå som en reaksjon på patogener. En menneskekropp kvitter seg hvert sekund med millioner



Figur 2.1: **Celleinaktivering.** Cellen kan inaktiveres på ulike måter. Ved apoptose vil cellen reagere på et dødsignal ved å aktivere en kaskade av kaspaser. DNA og organeller vil da pakkes inn i små vesikler før cellen oppløses. Disse apoptotiske legemene vil opptas av fagocytter og dermed vil det ikke ligge cellerester igjen i vevet. Cellen kan også inaktiveres ved onkose. Organellene og cellen som helhet vil da svulle opp før den brister. Cellelegemene vil flyte ut i vevet og forårsake inflammasjon. Dette kalles nekrose. Hvis cellen dør via apoptose og det ikke finnes tilstrekkelig med fagocytter til å spise de apoptotiske legemene vil disse til slutt bryte. En får da apoptotisk nekrose. Ved visuell inspeksjon av vevet er det umulig å se forskjell på apoptotisk nekrose og vanlig nekrose. Figur basert på arbeid under Creative Commons Attribution ShareAlike 2.5^[4].

av celler på denne måten. I starten av apoptosen translokeres fosfolipidet fosfatidylserin i cellemembranen fra å vende inn mot cytoplasma til å vende ut mot ekstracellulær matriks. Proteinet Annexin V har stor affinitet for dette fosfolipidet, og kan dermed brukes til å detektere apoptose. Fosfatidylserin antas å være et signal til makrofager som spiser cellen og bryter den ned (fagocytose).

Etter dette degraderes DNA-et i kjernen. Først deles kromosomene i store deler på 50-300 kilobasepar. Deretter kutter Ca^{+2} -og Mg^{+2} -avhengige endonukleaser kromatinet i DNA linker regionene som holder sammen nukleosomene. Deretter deles cellen i biter som destrueres av makrofager. Signalene som setter i gang apoptose er vanligvis at cellen mottar et dødssignal fra lymfocytter som fører til at en kaskade av kaspaser aktiveres.

En celle vil også starte apoptose ved mangel på overlevelsesfaktorer. I ytre del av mitokondriemembranen er det en rekke anti-apoptotiske proteiner som inaktiverer pro-apoptotiske proteiner som finnes i cytosol. Når overlevelsesfaktorer uteblir akkumuleres de pro-apoptotiske proteinene i mitokondriemembranen. Dette danner porer i membranen og cytokrom c lekker ut i cytosol, som igjen trigger kalsiumfrigjøring fra mitokondrier og endoplasmatiske retikulum. I tillegg aktiveres prokaspase og deretter kaspaser som setter i gang apoptose.

I fravær av fagocytter, slik som ved dyrkning *in vitro*, kan de apoptotiske legemene etter hvert miste sin membranintegritet og dermed ende som et nekrotisk legeme, selv om cellen opprinnelig døde apoptotisk. Det som vanligvis avgjør om en kaller en celle for nekrotisk er det morfologiske utseendet av cellen. Altså beskriver ikke nekrose hvordan cellen har dødd, men hvordan den ser ut når den er død. For å få et klarere skille mellom apoptotisk og ikke-apoptotisk dødsvei har flere forskere innført begrepet *onkose*. *Onkos* betyr oppsvulming og er definert som de preletale signalveiene som fører til celledød ved cellulær- og organelleoppulming. Vesikler/blemmer dannes på membranen og den får økt membranpermeabilitet. Hvis cellen har omfattende DNA-skade kan reparasjonsarbeidet kreve så mye energi at cellens energilager blir tømt. Gift som forstyrrer ATP-genereringen i cellen kan også føre til onkose. Det samme kan forandringer i kalsiumkonsentrasjon intracellulært, noe som fører til nedbrytning av plasmamembranen.^[5,6,7,8]

2.2 Cellevekst og kreft

Normale celler vokser festet til ekstracellulær matriks. Hvis en ved hjelp av kjemikalier hindrer cellene i å feste seg vil de vanligvis miste evnen til å dele seg, og en del eliminerer seg selv ved hjelp av apoptose. På denne måten hindres normale celler fra å flyte vekk og begynne å gro utenfor sitt

normale vev. Kreftceller vil derimot ikke stoppe å dele seg om de mister festet i ekstracellulær matriks.^[3]

Friske celler vil normalt kun dele seg hvis de mottar ytre signaler om å dele seg. Disse signalstoffene kalles vekstfaktorer og binder seg til reseptorer på cellens overflate, som igjen aktiverer signalveier inni cellen som til slutt vil få den til å dele seg. Denne signalveien er defekt i krefceller, noe som gjør at de konstant kan dele seg. Selv om vekstfaktorer er nødvendig for at friske celler skal dele seg, er det ikke den eneste mekanismen som kontrollerer cellevekst. Friske celler vil heller ikke dele seg under suboptimale forhold, som for eksempel når lite næringstoffer er tilgjengelig eller ved høy celletetthet i nærmiljøet.^[3]

Foruten eksterne forhold vil krefceller i liten grad reagere på interne forhold. DNA-feil vil normalt aktivere signalveier som fører til apoptose mens krefceller kan ha feil i disse signalveiene, og kan dermed unngå celledød. En siste viktig særegenhet ved krefceller er lengden på telomerene. Telomerer er korte DNA-sekvenser bestående av baseparene TTAGGG repetert mellom 100 og 1500 ganger. Disse baseparene befinner seg ytterst på kromosomene og er ikke-kodende sekvenser som beskytter det kodende DNA-et under celledelingen. Ved deling mister nemlig kromosomet litt av telomeren. Når telomeren er blitt kuttet av kan ikke lenger telomerisk capping protein binde seg til telomeren og dette induserer apoptose. Dette vil altså bestemme hvor mange ganger cellen kan dele seg. Stamceller og krefceller produserer enzymet telomerase som kan forlenge telomersekvensen og dette fører til at cellen kan dele seg i det uendelige.^[3]

Svulster som resultat av ukontrollert cellevekst kan være benigne eller maligne. En godartet svulst vokser langsomt og skyver på det omliggende vevet uten å vokse inn i det. Dette kan være alvorlig hvis den f.eks presser på vev med begrenset plass som inni hjerneskallen men omtales ikke som en krefsvulst.^[9]

En krefsvulst er en ondartet svulst som vil infiltrere nærliggende vev og som kan spre seg gjennom blod eller lymfesystemet og danne nye svulster andre steder i kroppen^[9].

Ukontrollert cellevekst oppstår altså som en kombinasjon av feil i signalveier, mangel på cellesyklus-kontroll og mangel på indusert apoptose. Dette skyldes forskjellige mutasjoner i DNA-et. Minst 80% av kreftilfellene skyldes kjemiske karsinogener som finnes i bl.a. røyk, arsenikk, nikkel og asbest. Foruten dette er det antatt at virus kan føre til krefformer som blodkreft og livmorhalskreft. Andre karsinogener er ioniserende stråling som kroppen utsettes for ved soling (UV-stråling), røntgenundersøkelse og eksponering for radongass.^[9]

2.3 Kreftbehandling

Å oppdage en svulst på et tidlig tidspunkt er essensielt for å kunne kurere kreften. En kreftsvulst vil vanligvis bestå av mer en milliard celler før den kan detekteres med røntgen, CT eller MRI^[10]. De vanligste behandlingsmetodene for kreft er i dag kirurgi, cytostatika, strålebehandling og kombinasjoner av disse. Hvis kreften oppdages på et tidlig stadium kan kirurgi være nok til å til å fjerne hele kreftsvulsten og helbrede pasienten. Cytostatika er cellegift som kan inntas i kapselform, injiseres i blodårene eller innsprøytes i kroppens hulrom. Dette kan være nok til å drepe kreften, men denne behandlingsformen går også hardt utover de friske cellene i kroppen. Bivirkninger inkluderer kvalme og brekninger, slapphet, hårfall, feber, sårhet i munn og svelg. I tillegg vil en være mer mottakelig for infeksjoner på grunn av et senket antall hvite blodlegemer i en til to uker etter behandling.^[11]

Strålebehandling kan føre til slapphet. Hårtap kan forekomme hvis hodet bestråles og kvalme og brekninger er vanlig ved behandling i mage, tarm eller bekken.

På grunn av bedre behandlingsmetoder er dødeligheten for stort sett alle kreftformer gått ned de siste årene, men fortsatt er kreftbehandlingen lite spesifikk for kreftceller, og skaden på normalt friskt vev setter begrensninger for behandlingen.

Fotodynamisk terapi (PDT) er en forholdsvis ny form for kreftbehandling. Den tar utgangspunktet i et fotosensitiserende stoff som opphoper seg mer i kreftvev enn i vanlig vev. Det fotosensitiserende stoffet er ikke toksisk i seg selv, men når det eksiteres ved hjelp av lys vil stoffet reagere med andre stoffer og produsere radikaler som til slutt dreper cellen. Fordelen med denne terapien er at den fører til lite arrdannelse, vil bare drepe celler i det belyste området og at den er delvis spesifikk for kreftceller. I det lys ikke penetrerer langt inn i vevet, vil metoden bare kunne brukes på overfladiske svulster (noen millimeter til en centimeter inn i vevet). I tillegg må en lyskilde være til stede. Dette fører til at det i praksis er hudkreft og kreft i indre hulrom som lunger og blære som kan behandles med denne metoden.

Hypertermi kan også brukes i kreftbehandling, men da helst i kombinasjon med annen behandling, fordi den ikke alene vil greie å kurere kreften.

2.4 Cellevekst og hypertermi

Hypertermi er varmebehandling. Klinisk nyttige temperaturer for mennesker ligger i området 39–45 °C . Dette fører til denaturering av proteiner som deretter aggregerer.

Hypertermi er ikke effektiv nok til å alene være en behandlingskur mot kreft men kan være med å hjelpe til å gjøre andre behandlingsformer mer effektiv.

Temperaturøkning i cellene trigger produksjon av varmesjokkproteiner. Varmesjokkproteiner er vanligvis bundet til varmesjokktranskripsjonsfaktoren, men ved forhøyet temperatur vil disse frigjøres fra proteinet og transkripsjonsfaktoren går inn i kjernen der den binder seg til enhancer-regionen til *HSP*-genet og fører til økt transkripsjon.

Varmesjokkproteiner hører til molekylgruppen chaperoner. Vanligvis er chaperoner involvert i proteinfolding og situasjoner der protein må være i sin ufoldete form som for eksempel ved transport over membraner. Når cellen stresses, som ved varmebehandling, vil varmesjokkproteinene binde seg til denaturerte proteiner, slik at de kan aggregere på en kontrollert måte. Etter at stressfaktoren er fjernet, vil proteinene brytes ned eller reaktiveres til sine aktive former.

Temperaturer i området 48 – 60 °C fører vanligvis til irreversibel denaturering av proteiner. Proteiner utsatt for hypertermi aggregerer men dette er reversibel reaksjon hvis chaperoner, som heat shock protein 70, er tilgjengelig i cellen.

I kreftbehandling er hypertermi nyttig på to måter. Den kan drepe kreften, men den kan også gjøre cellene mer sensitive for andre typer behandling, som strålingsterapi eller kjemoterapi.

I cellekjernen er det en høy konsentrasjon proteiner, 3–6 ganger så mye vekt proteiner som DNA i kjernen. Nukleær matriks er en struktur inni cellekjernen som organiserer kjernen inn i områder med DNA og støtter transkripsjon og replikasjon av DNA-et. Deformerte proteiner som binder seg til matriksen vil kunne ha store implikasjoner for replikasjon og transkripsjon av DNA-et. Derfor er S-fasen i celledelingen spesielt sårbar for varmesjokk. Varme forstyrrer tidspunktet for overgangen innen de forskjellige delfasene av S-fasen. Hvis cellen blir hindret i å forsette syntetiseringen av DNA i en periode etter varmeinduksjonen (fra 2 timer og utover, avhengig av varmedosen) vil cellen kunne reparere seg selv. Dersom ikke disse potensielt dødelige skadene repareres vil cellen kunne dø.

Hypertermi kan også forandre proteindistribusjon i plasma- og mitokondriemembranen. Dette fører til endring i potensialet over membranen og til økt permeabilitet.

Selv om varme som oftest vil føre til aggregering av store proteinkomplekser i kjernen, kan det også føre til løsere binding av kjerneproteiner, slik at disse kan forlate kjernen og drive ut i cytoplasma. DNA-reperasjonsprotein Mre11 er et slikt protein. Ved temperaturer over 41 °C vil Mre11 forlate kjernen, og dermed gjøre cellen mer sårbar for andre behandlinger som for

eksempel ioniserende stråling.^[12,13]

Hypertermi i kreftbehandling kan oppnås ved laser eller ved å tilføre varm væske til behandlingsstedet.

2.5 Blærekreft

Denne oppgaven vil ta for seg egenskaper til blærekreftceller. Cellelinjen som brukes er AY-27, og kommer fra en malign svulstform som dannes i epitelvevet i blæren på rotter.

Blærekreft er den femte mest vanlige kreftformen i Norge. Den forekommer hos 16 av 100 000 mennesker hvert år og tre av fire av de som rammes er menn^[14]. 3/4 av dem som blir diagnostisert er over 65 år. Røyking ansees som den viktigste årsaken til utvikling av sykdommen, men aromatiske aminer som 2-naftylamin^[15] og benzidin^[16], tidligere brukt i produksjon av fargestoffer, er karsinogener som kan føre til blærekreft. I tillegg kan kroniske infeksjoner av parasitten *Schistosoma*, en vanlig parasitt i ferskvann i u-land, føre til blærekreft^[17].

70% av alle blærekreftsvulster er det som kalles overfladisk. Det vil si at svulsten sitter i epitellaget og ikke har rukket å vokse ned i muskulaturen. Disse behandles ved å skjære vekk svulsten ved transuretral reseksjon, for så å skylle blæren med cellegift for å minske sjansen for tilbakefall. Fem års relativ overlevelse er over 80% for denne typen svulster.

Ved dyptvoksende blærekreft må man fjerne urinblæren og konstruere en ny urinvei eller lage en ny urinblære ved hjelp av tarmen. For enkelte pasienter med små svulster kan strålebehandling være et alternativ. Hvis kreften har spredd seg vil man kunne benytte både kirurgi, strålebehandling og kjemoterapi, men relativ overlevelse etter 5 år er da kun 4%.^{[18][19]}

Kapittel 3

Fotodynamisk terapi (PDT)

3.1 Historien bak fotodynamisk terapi

Fotodynamisk terapi er en behandlingsform som bruker lys til å aktivere et påført stoff slik at det lager radikaler som dreper celler. Begrepet ble først introdusert av Hermann von Tappier. Dette delkapittelet er skrevet på bakgrunn av artikkelen “The History of Photodetection and Photodynamic Therapy” av Roger Ackroyd *et. al.*^[20]

Bruk av lys til å kurere sykdommer har vært brukt i tusenvis av år. I gamle Egypt, India og Kina ble lys brukt til å kurere forskjellige hudsykdommer som vitiligo, psoriasis og kreft så vel som sykdommer som engelsk syke og psykose. Siden har lys blitt brukt til å kurere sykdommer i det antikke Hellas og i Frankrike på 1700- og 1800-tallet. Dansken Niels Ryberg Finsen fant ut at han kunne behandle kopper ved hjelp av rødt lys og brukte videre ultrafiolett lys til å behandle hudtuberkulose, noe han i fikk Nobelprisen i medisin for i 1903.

At lys og kjemikalier i kombinasjon kan indusere celledød ble oppdaget av Oscar Raab som brukte acedin på en type *protozo* (en mikroorganisme) som fører til malaria. Dette ble oppdaget ved en tilfeldighet da forsøket ble gjennomført når det lynte. Etterpå viste han at kombinasjonen lys og acedin hadde større effekt enn lys og acedin hver for seg, og også større effekt enn acedin utsatt for lys og deretter tilført protozo. Han postulerte at kjemikaliet fikk overført energi fra lyset og det var dette som førte til den bedre effekten.

Første behandling av mennesker ble gjort av Tappenheimer og Jesionek med eosin for å behandle hudkreft. Denne behandlingen startet etter at en fransk nevrolog prøvde å behandle epilepsi ved å tilføre eosin oralt til

en pasient. Dette førte til inflammasjon i de områdene av huden som var eksponert for sollys. I 1911 ble det rapportert at hematoporphyrin hadde fotosensitiserende egenskaper. For å finne ut om hematoporphyrin hadde samme fotosensitiserende egenskaper på mennesker som var observert på musehud, injiserte Friedrich Meyer-Betz 200 mg hematoporphyrin i seg selv og opplevde langtrukken smerte og svelling i de lyseksponerte områdene. Siden ble det rapportert fra Frankrike at rødt fluorescerende hematoporphyrin var observert i rotte-sarkom. I 1948 gjorde Figge og Weiland et forsøk der de injiserte forskjellige former for porphyriner i 240 mus med kreftsvulster samt 50 friske mus. Fluorescensen ble stort sett bare observert i kreftvev men også observert i omentum (bukhinnefold), morkakevev, fostervev og lymfeknuter.

Etter Tappenheimer og Jesionek, gikk det nesten 70 år til kombinasjonen lys og porphyrin ble sett på som en mulig behandling av kreft. Diamond et al. viste at hverken hematoporphyrin eller lys alene affekterte kreftcellene men at kombinasjonen førte til celledød. Første kurative behandling med PDT ble gjort i 1975 på mus og i 1978 viste forsøk på mennesker at kreft som var resistent mot konvensjonell behandling kunne kureres ved PDT.

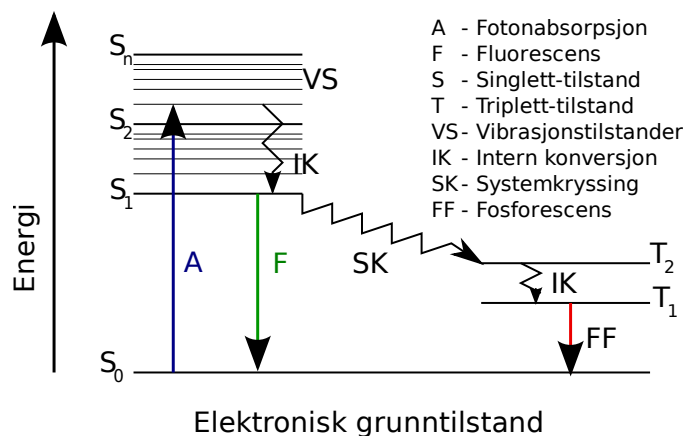
Etter dette kom flere forsøk som bekreftet virkningen av PDT. Forskjellige fotosensitive stoffer er funnet og PDT er brukt i behandling av flere former for kreft.

3.2 Fluorescens

Ved fluorescensmikroskopi detekteres fluorescensen til molekyler. Noen molekyler har en naturlig egenfluorescens, mens ikke-fluorescerende molekyler kan studeres ved at de merkes med fluorescerende fargestoff. På denne måten kan en finne ut hvor de fluorescerende molekylerne befinner seg i en celle, og styrken på fluorescensen er proporsjonal med mengden fluorescerende molekyler som er tilstede i prøven.

Når et foton treffer et molekyl, vil det svakest bundne elektronet gå over i en orbital med høyere energi hvis energien til det innkommende fotonet tilsvarer energiforskjellen mellom de aktuelle elektronorbitalene. Organiske molekyler vil eksiteres av fotoner med bølgelengder i området 250-600 nm. Molekylet kan deretter relaxeres tilbake til grunntilstanden ved flere prosesser. Hvis relaxasjonen skjer ved deeksitasjon mellom to orbitaler med samme spinnkvantetall, og et foton sendes ut, kalles det fluorescens. Dette er en tillatt overgang, og dermed en meget hurtig prosess hvor den eksiterte tilstanden har en levetid på $10^{-9} - 10^{-8}$ sekund. Dersom et foton sendes ut ved overgang mellom to orbitaler med forskjellig spinn, kalles prosessen fosforescens. Levetiden til den eksiterte tilstanden ved deeksitasjon gjennom fosforescens er på 0,1-1 sekund og fluorescens vil derfor vanligvis være den

dominerende prosessen. I forsøkene brukes fluorescens til å detektere apoptose og nekrose, sannsynligheten for at et innkommende foton resulterer i nettopp fluorescens kalles kvanteutbytte. De ulike prosessene er illustrert i Jablonski-diagrammet i fig. 3.1.

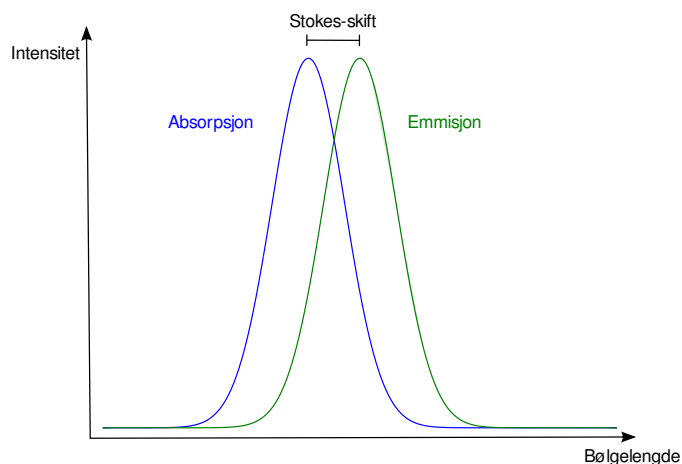


Figur 3.1: **Jablonski-diagram.** Etter eksitasjon vil flere ulike relaksasjonsprosesser kunne skje. Hvis elektronet relakseres ned til laveste singlett-nivå og deretter går til grunntilstanden vil differansen i energi komme ut som lys.

I tillegg til fluorescens skjer også flere strålingsløse prosesser, der intern konversjon (internal conversion), vibrasjonsrelaksasjon og systemkryssing (intersystem crossing) er de viktigste. Disse prosessene er vesentlig hurtigere enn fluorescens og skjer derfor før utsendelsen av foton. Tilstanden eksitert av foton-absorpsjon deeksiteres dermed noe ved disse prosessene før fluorescens finner sted. Dermed har det utsendte fotonet mindre energi og lengre bølgelengde enn det innkommende fotonet. Dette kalles Stokes' skift (fig. 3.2).

3.3 Mekanismene bak PDT

Ved bruk av PDT i behandling leveres det fotosensitiserende stoffet vanligvis gjennom intravenøs injeksjon. Stoffet vil i større grad samle seg i tumorvev enn normalt vev. Etter en viss tid blir tumorområdet belyst, for eksempel med laserlys, med bølgelengde tilpasset ønsket eksitasjon i det fotosensitiserende stoffet. Lyset som brukes må ha nok energi til å eksitere det fotosensitiserende stoffet, men for å få drept alle kreftcellene er det også nødvendig at lyset trenger et visst stykke inn i vevet. Høyenergetisk lys blir raskt stoppet i materie, mens lys med lengre bølgelengde kan trenge dypere inn i vevet. Et kompromiss mellom de to kravene er å bruke lys med bølgelengde på 600–800 nm, som ofte brukes i klinisk behandling.

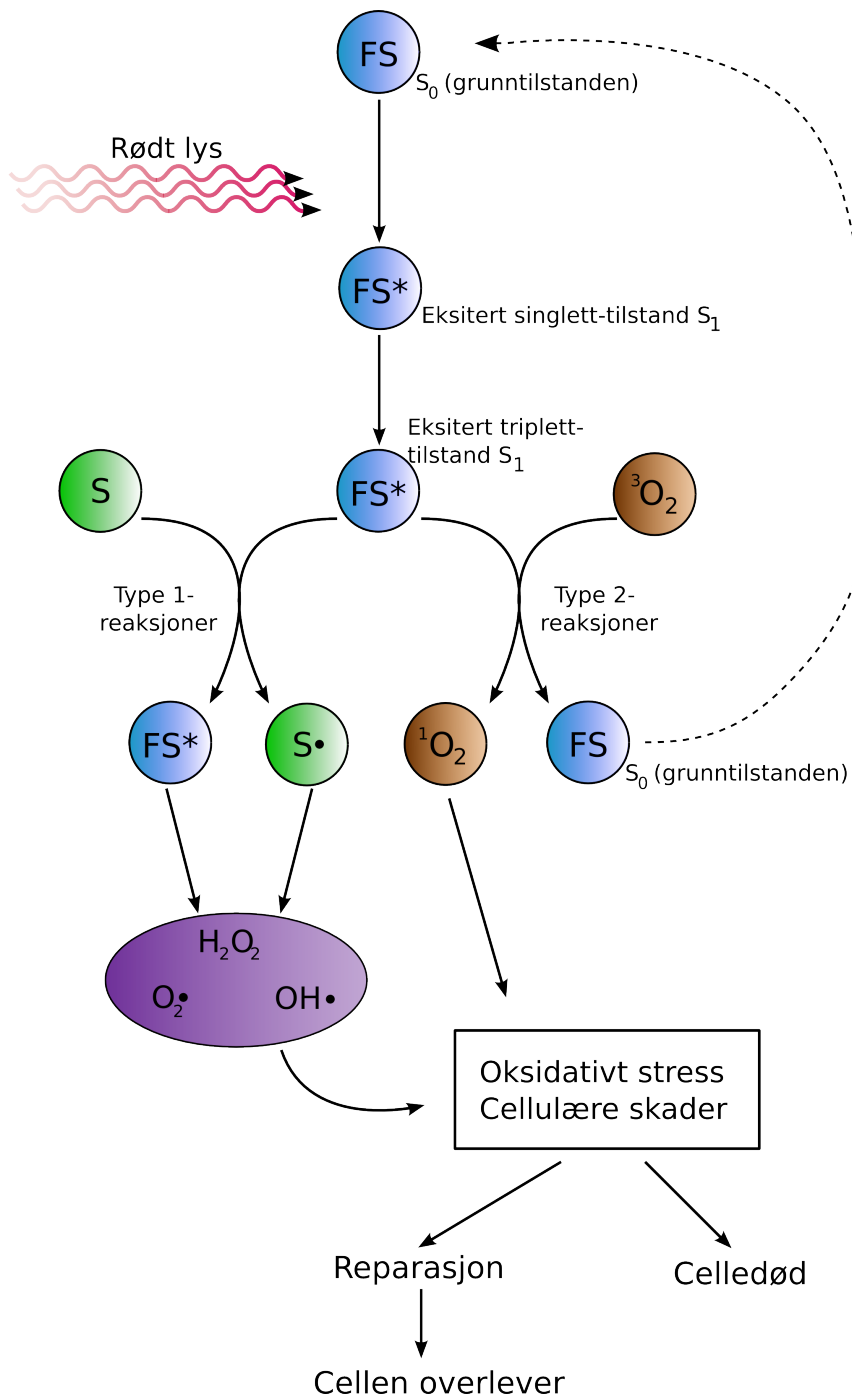


Figur 3.2: **Stokes skift.** På grunn av strålingsløse relaksasjonsprosesser som skjer før fluorescensutsendelsen, taper elektronet energi og bølgelengden til det utsendte lyset vil dermed være lengre enn det innsendte lyset.

Ved PDT trengs tre elementer: et fotosensitiserende stoff, lys og oksygen. Virkningsmekanismene bak PDT er illustrert i fig. 3.3. Et molekyl kan ha flere forskjellige elektronkonfigurasjoner. Grunntilstanden tilsvarer de molekylære orbitalene med lavest energi. Grunntilstanden vil for de fleste molekyler være en tilstand der elektronene er paret, like mange med spinn opp som ned. Dette gir spinnkvantetall null ($S = 0$) og spinnmultiplisitet $2S + 1 = 1$, altså en singlettilstand. Ved spinn 1 vil en få en triplett-tilstand. Man har singlett- og tripletttilstander med ulik energi der økende energi angis med økende nummerering. For eksempel angir S0, S1, S2 osv. singletttilstander med økende energi, mens T0, T1, T2 osv. angir tripletttilstander med økende energi.

Når det fotosensitiserende stoffet *protoporfyrin IX injiseres (PpIX)*, befinner det seg i grunntilstanden, en singlettilstand (S0). Eksitert PpIX relakseres vanligvis til S1 eller S2. Ved S2-eksitasjon vil molekylet som oftest relaksere ned til S1. Fra S1 vil 83% av molekylene ved systemkryssing gå over til tripletttilstanden T1, som er en relativt langlivet tilstand^[21]. Relaksasjonen ned til grunntilstanden kan foregå ved fosforescens, som en strålingsløs overgang eller ved å overføre energien til et annet molekyl.

Et *radikal* er i vid forstand definert som et atom eller molekyl med uparede elektroner. O₂ er et av de få molekylene som har en tripletttilstand som grunntilstand. Molekylet har to uparede elektroner med samme spinn, lokalisert i hver sin antibindene π^* -orbital. Hvis O₂ skal oksidere et annet atom eller molekyl ved å motta et par elektroner, må disse gå inn i hver sin π^* -orbital. Paulis eksklusjonsprinsipp forbyr to elektroner med samme



Figur 3.3: **Virkningsmekanismene bak PDT.** For PDT-behandling trengs det et fotosensitiserende stoff (FS), lys og oksygen (O_2). Når det fotosensitiserende stoffet blir utsatt for lys, eksiteres det fra grunntilstanden S_0 til den eksiterte tilstanden S_1 . Ved systemkryssing havner FS i eksitert triplett-tilstand. FS kan nå reagere med biologiske substrater (S) eller oksygen. Dette generer reaktive oksygenforbindelser som skader cellen, og vil føre til celledød hvis skadene ikke repareres.

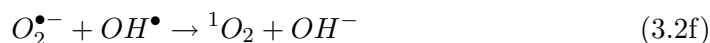
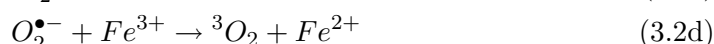
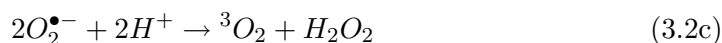
spinn å befinne seg i samme romlige tilstand (orbital). Dermed må de nye elektronene ha parallelt spinn som er antiparallell det til elektronene i O_2 . Kun andre radikaler kan ha to uparede elektroner med et slikt spinn, noe som gjør at reaksjoner med ikke-radikaler vil gå sakte fordi oksygenmolekylet da må akseptere ett og ett elektron av gangen.^[22]

Eksitert PpIX kan igangsette skade ved to forskjellige prosesser. Type 1-reaksjoner, som igjen kan deles opp i to underliggende reaksjoner kalt 1_i og 1_{ii} og type 2-reaksjoner.

Type 1_i skjer når et substrat overfører et elektron til PpIX^[22]. Det skapes da to radikaler: et negativt ladet PpIX og et positivt ladet substrat gjennom reaksjonen



De fleste av disse radikalene reagerer instantant med oksygen og fører til rekke en reaktive oksygen-radikaler gjennom følgende reaksjoner:

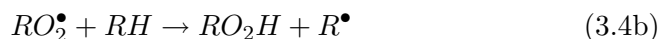


Disse fører til oksideringsskader på fettsyrer og andre lipider.^[22,21]

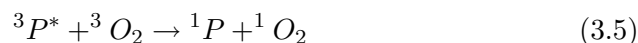
Ved type 1_{ii} reaksjoner overføres et hydrogenatom fra et molekyl til protoporfyrin IX:



Dette fører til frie radikaler som vil reagere med oksygen og skape reaktive oksygen radikaler som vil kunne skade og til slutt drepe cellen (lign.(3.4)).



Ved type 2-reaksjoner eksiterer protoporfyrin O_2 fra grunntilstanden T1 til den svært reaktive singlettilstanden 1O_2 :



Det har tidligere vært antatt at 1O_2 har en reaksjonsradius på 20 nm (og levetid på 40 ns), men de siste årene har en levetid på 6 μ s og reaksjonsradius

på 300 nm blitt foreslått. Reaktive oksygenradikaler kan reagere med en rekke biomolekyler som proteiner, umettede fettsyter og nukleinsyrer, da spesielt guanosin og guanin. Dette kan ødelegge potensialet over cellemembranen og inaktivere enzymer, med celledød som sluttresultat (lign. (3.6)).^[21]



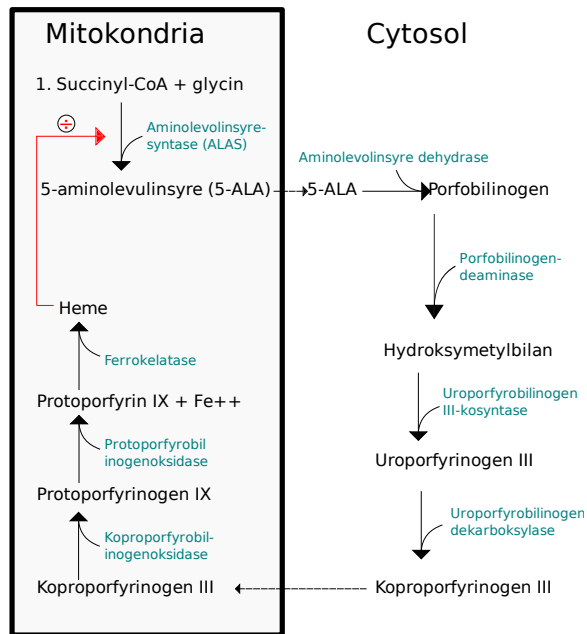
Man antar at det hovedsaklig er type 2-reaksjoner som er ansvarlig for cellulær skade ved PDT og at celler *in vivo* vil være delvis beskyttet fra skadene ved denne reaksjonen på grunn av singlett-oksygen scavenger, som histidin, som fjerner det skadelige oksygenet. At noen hudceller er delvis resistente mot PDT i mangel på O_2 styrker denne teorien.^[21,23]

3.4 5-aminolevulinsyre (ALA)

Denne seksjonen følger i stor grad artikler av Josefsen *et. al.*^[21] og Peng *et. al.*^[24].

5-aminolevulinsyre (ALA) er et mellomprodukt i heme-syntesen (fig. 3.4). Heme er en viktig komponent av hemoglobin og produseres av alle energi-produserende celler i kroppen. Ved å tilsette ALAs hexylester *Hexyl-aminolevulinsyre (HAL)* i kroppen, vil denne inngå i syntesen slik ALA normalt gjør.

Det første steget i heme-syntesen er syntetiseringen av 5-aminolevulinsyre fra glysin og succinyl-CoA. Dette fasiliteres av enzymet ALA-syntase (ALAS) som befinner seg på innsiden av mitokondriemembranen. Siden konsentrasjonen av glysin, succinyl-CoA og mellomprodukter vanligvis er mindre enn enzymenes kapasitet vil tilgjengeligheten av disse stoffene være den begrensende faktor i syntesen. Ved å tilsette ALA vil enzymene bli en begrensende faktor. ALA-syntase er det enzymet i syntesen som har lavest aktivitet og blir dermed det begrensende leddet. ALAS inhiberes av heme, direkte og ved å hemme transkripsjon, translasjon og transporten av enzymet inn i mitokondria. Neste steg i syntesen foregår i cytosol der ALA-dehydrase får to ALA-molekyler til å binde seg sammen og danne porfobilinogen og utskille to vannmolekyl. Fire porfobilinogen brukes til å lage uroporfyrinogen III ved hjelp av porfobilinogen-deaminase som er det enzymet med nest lavest aktivitet i syntesen. Deretter skjer en dekarboksylering før molekyler igjen beveger seg inn i mitokondria der det skjer videre dekarboksylering og oksideringer før jern settes inn i molekylet ved hjelp av ferrokelatase. Ferrokelatase er det tredje og siste begrensende enzymet i syntesen. Ved å tilsette 5-aminolevulinsyre kan den negative tilbakekoblingen med heme forvikobles. Dette skjer



Figur 3.4: **Heme-syntesen.** Heme-syntesen starter i mitokondria der succinyl-CoA og glycin omdannes til 5-ALA ved hjelp av ALAS. 5-ALA går ut i cytosol og der dannes en rekke stoffer som ender med Koproporfyrinogen III som går inn igjen i mitokondria. Her produseres det fotosensitiserende stoffet protoporfyrin IX. Protoporfyrin IX viderdannes til heme ved hjelp av ferrokelatase. En faktor som vil begrense syntetiseringen av heme er mangel på succinyl-CoA og glycin og et annet er at heme inhiberer ALAS. Dette omgås i PDT-behandlingen ved å tilsette 5-ALA. I tillegg har enzymet porfobilinogen-deaminase vist seg å ha høyere aktivitet i noen krefttyper mens ferrokelatase har vist seg å ha lavere aktivitet. Dette vil føre til en selektiv opphoping av PpIX i kreftvev.

fordi protoporfyrin vil akkumuleres raskere enn ferrokelatase kan omdanne det til heme og inhibere syntesen.

Det begrensende leddet i heme-syntesen er syntetiseringen av 5-aminolevulinsyre fra glysin og succinyl-CoA. Dette leddet kontrolleres av at heme virker som en inhibitor på dette stedet. Denne negative tilbakekoblingen kan imidlertid forbigås ved å tilsette 5-aminolevulinsyre i kroppen. Protoporfyrin vil da akkumuleres fordi protoporfyrin produseres fortere enn ferrokelatase kan omdanne det til heme.

Et godt fotosensitiserende stoff vil spesifikt hope seg opp i kreftceller i forhold til friskt vev. Det er to trinn i heme-syntesen som bidrar til dette. Det første steget er dannelsen av hydroksymetylbilan fra porfobilinogen ved hjelp av enzymet porfobilinogen-deaminase. Dette enzymet har vist seg å ha høyere aktivitet i noen tumorer. Ferrokelatase-aktivitet, som ble nevnt i forrige avsnitt, har også vist seg å være celleavhengig og har lavere aktivitet i noen tumorer. Dette fører til at protoporfyrin i en viss grad opphoper seg selektivt i kreftvev.

5-aminolevulinsyre er hydrofil og vil derfor ha problemer med å komme gjennom huden eller celleveggen på intakte celler. For å få ALA til å gå dypere inn i tumoren ser en derfor på mer lipofile esterderivater.

ALA hopper seg ikke opp i kroppen fordi den fjernes av esterase.

Kapittel 4

Instrumenter

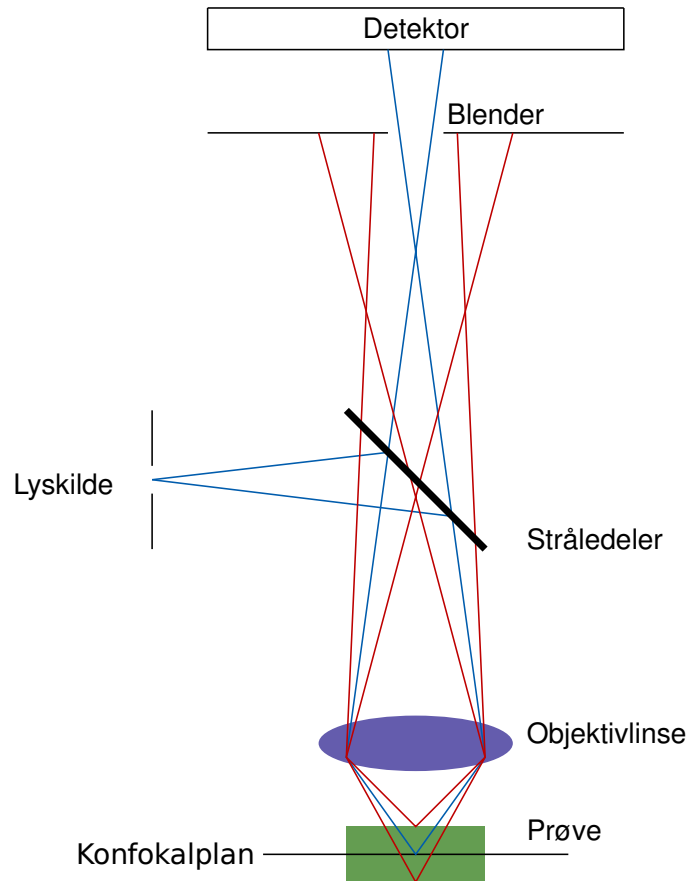
4.1 Konfokalt laserskanningmikroskop

Konfokalt laserskanningmikroskop er et mikroskop som sørger for at kun fluorescens fra fokalplanet når detektoren. En skisse av et slikt mikroskop er vist i fig. 4.1. En laser treffer en stråledeler (beamsplitter) som reflekterer den ønskede bølgelengden, før lyset sendes ned på en objektivlinse som fokuserer lyset ned på prøven. De fluorescerende molekylerne eksiteres og sender deretter ut lys med en lengre bølgelengde enn det innkommende lyset. Fluorescenssignalet reflekteres ikke av stråledeleren og går rett opp på blender, der bare lys fra konfokalplanet kommer gjennom blenderåpningen og treffer detektor. Dette lyset er illustrert med blå strålegang i figuren. Laseren skanner over hvert punkt i prøven helt til en har fått et bilde av hele prøven.

4.2 Flowcytometri

Flowcytometri er en metode for å gjøre kvantitative undersøkelser av mikroskopiske legemer i løsning. Teknikken går ut på å merke den ønskede subpopulasjonen med fluorescerende molekyler for deretter å belyse hver enkelt celle med laser og detektere fluorescens, i tillegg til foroverspredning og sidespredning av laserlyset. Oppbygningen av et flowcytometer er vist i figur 4.2.

Før cellene plasseres i flowcytometeret må de merkes med ønskede fluorekromer. I denne oppgaven er apoptotiske celler merket med Annexin-V-fluorecin som emitterer grønt lys etter belysning med laserlys på 488 nm. Nekrotiske

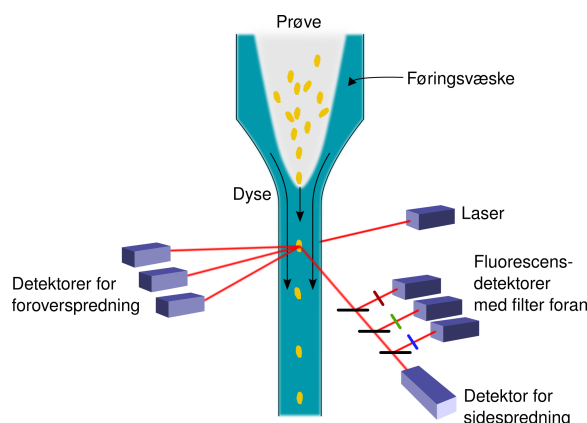


Figur 4.1: **Lysgangen i et konfokalmikroskop.** Laserlyset som sendes inn på beamsplitteren har en kort bølgelengde og reflekteres ned på prøven. Det fluorescerende lyset fra prøven vil ha en lengre bølgelengde som slippes gjennom stråledeleren og går opp mot detektor. Blenderen sørger for at det bare er lys fra fokalplanet (blå strålegang) som når detektoren.

celler er merket med både Annexin og propidiumjodid og emitterer både grønt og rødt lys. For nærmere forklaring av merkingen, se kapittel 5.2.

I flowcytometeret omslutes celledøsningen av en føringsvæske slik at cellene blir sentrert midt i strålen og bare en celle belyses av gangen og på en lik måte. Denne fokuseringen er viktig for at alle cellene belyses like mye. Utsendt fluorescens sorteres av dikromatiske speil og filtre før den treffer detektor. Detektoren inneholder fotomultiplikatorrør som forsterker signalet til et detekterbart nivå før videresending til pc. Ulike detektorer fanger altså opp lys med ulike bølgelengder, så grønt og rødt lys fra Annexin og propidiumjodid måles i hver sin detektor. Mengde fluorescens detektert vil være proporsjonal med antall fluorekromer bundet til eller i cellen.

Som tidligere nevnt vil flowcytometeret detektere foroverspredning og sidespredning av laserlyset i tillegg til fluorescens. Det foroverspredte lyset sier noe om cellens størrelse, mens lys spredd 90° sier noe om den indre strukturen til cellen^[25].



Figur 4.2: **Flowcytometer.** Prøven med celler sentreres av ved hjelp av formen på apparatet i kombinasjon med føringsvæsken. Dette gjør at bare en og en celle sendes videre igjennom apparatet og at hver celle blir sentrert og får lik belysning av laseren. Det meste av laserlyset spres ikke særlig av cellen og detekteres av detektorer for foroverspredning. Denne spredningen gir informasjon om cellens størrelse. Fluorescens fra de merkede cellene vil emitteres i alle retninger. Dette lyset sorteres på bakgrunn av ulike bølgelengder ved hjelp av dikromatiske speil og filtre før de avleses på detektorer. Spredd laserlys vil ikke reflekteres av de dikromatiske speilene og avleses på en egen detektor.

Kapittel 5

Metode og utstyr

I denne oppgaven sees det på hvordan varme fører til celledød i form av både apoptose og nekrose. Målet var opprinnelig å finne ut ved hvilken temperatur en fikk mest apoptose. Apoptose er ønskelig i kreftbehandling siden de døde cellene blir fjernet av kroppen uten å skape inflammasjon, som nevnt i seksjon 2.1. Etter å ha funnet apoptosetoppen var planen å bruke varmebehandlingen i kombinasjon med PDT-behandling. PDT-behandling utvikler i seg selv varme noe som kan være ubehagelig for pasienten. Derfor kjøles gjerne behandlingsstedet ned slik at det kan brukes høyere lysdose. Varmebehandling er som nevnt i seg selv ikke effektivt nok til alene å drepe kreften. Dog, hvis kombinert PDT/varmebehandling viser seg å være en effektiv måte å drepe kreften på kan det hende denne metoden bør vurderes i forhold til hvor effektivt det er med nedkjøling av behandlingsstedet og høyere lysdose.

I de første forsøkene ble cellene varmebehandlet, farget og studert med flowcytometer. For å kontrollere resultatene fra flowcytometeret ble cellene også studert i konfokalmikroskop. Da dette viste seg å være en ineffektiv måte å studere celledød på, ble metoden forlatt. Samtidig var det usikkert om Annexin var en god nok måte å detektere apoptose på og et nytt fargekit, som inneholdt fargestoffet YO-PRO-1, ble forsøkt. For begrunnelse og nærmere diskusjon av valgene som ble tatt, henvises det til diskusjonen i kap. 7

5.1 Dyrking og medium

Cellene som er brukt i forsøkene er fra linjen AY-27 og kommer fra professor Steven Selman ved Medical College of Ohio, Toledo. Cellene ble dyrket i Nunc 75 cm² nunclonTM Δ -flasker i inkubatorskap ved 37 °C og 5% CO₂. To

ganger i uken ble to millioner celler sådd ut med et skifte av medium mellom de to utsåingene. Dyrkingsmediumet var 500 mL flaske med RPMI-1640 tilsatt 2 mL L-glutamin og 50 mL føtalt bovint serum (FBS). For detaljer om dyrkingen, se appendiks C.

5.2 Annexin, PI og YO-PRO-1

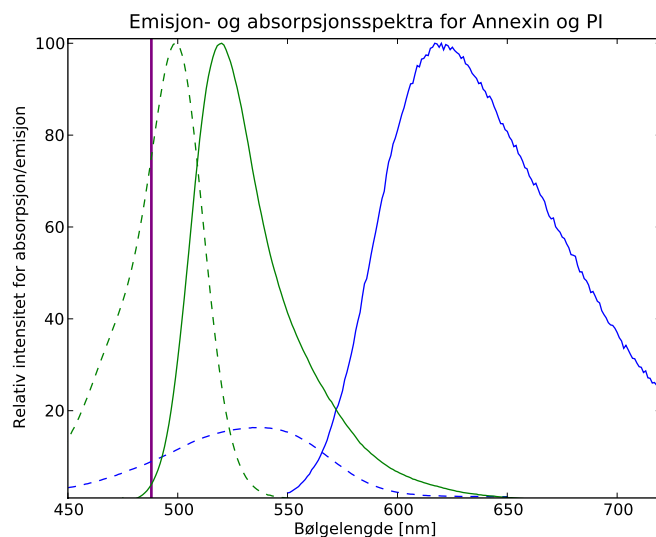
Når en celle gjennomgår apoptose, skjer det mange forandringer i cellen. En av dem gjelder fosfolipidet fosfatidylserin som vanligvis befinner seg på innsiden av cellemembranen. Under apoptose uttrykkes fosfatidylserin på utsiden av cellen for å signalisere til makrofager at cellen bør fjernes. *Annexin-V* (*Ax*) er et protein som binder seg til fosfatidylserin. Imidlertid kan det ikke penetrere cellemembranen, og derfor vil ikke Annexin-V kunne feste seg til levende celler. I nekrotiske celler er cellemembranen ødelagt og Annexin-V vil derfor kunne binde seg til fosfatidylserin som befinner seg på innsiden av cellemembranen. Annexin-V brukt i denne oppgaven er bundet til fluorescein. Når Annexin-V er bundet til fosfatidylserin har fluorescinet et eksitasjonsmaksimum på 494 nm og emisjonsmaksimum på 518 nm (grønn fluorescens), som vist i fig. 5.1.^[26,27]

Propidiumjodid (*PI*) er et fluorescerende fargestoff som legger seg mellom baseparene i dobbeltrådet DNA eller RNA. Propidiumjodid kan ikke penetrere gjennom cellemembranen, og derfor vil bare nekrotiske celler merkes, da disse mangler intakt cellemembran. Stoffet er fluoriserende i seg selv, men når det binder seg til kjernesyrer vil fluorescensen bli 20-30 ganger så sterk og eksitasjonsmaksima rødforskjøvet med ca. 30-40 nm til 535 nm og emisjonsmaksima bli blåforskjøvet med ca. 15 nm til 617 nm (rødfarget emisjon). Se fig. 5.1.^[28]

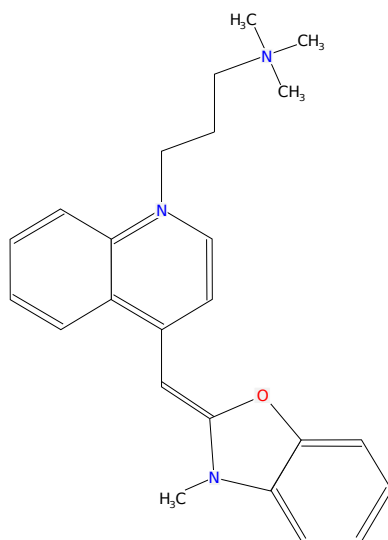
Yo-pro-1, se fig. 5.2, er et fluoriserende stoff som binder seg til DNA. Ved apoptose blir cellemembranen mer permeabel og YO-PRO kan trenge gjennom membranen mens denne fortsatt er ugjennomtrengelig for PI. Emisjonsmaksimum er 509 nm (fig. 5.3), og dermed vil apoptotiske celler lyse grønt. Nekrotiske cellemembraner vil også være permeable for PI, og disse cellene vil dermed lyse både grønt og rødt når fargestoffene blir eksitert. Eksitasjonsmaksima for YO-PRO er 491 nm.^[29]

5.3 Annexin- og propidiumjodidløsning

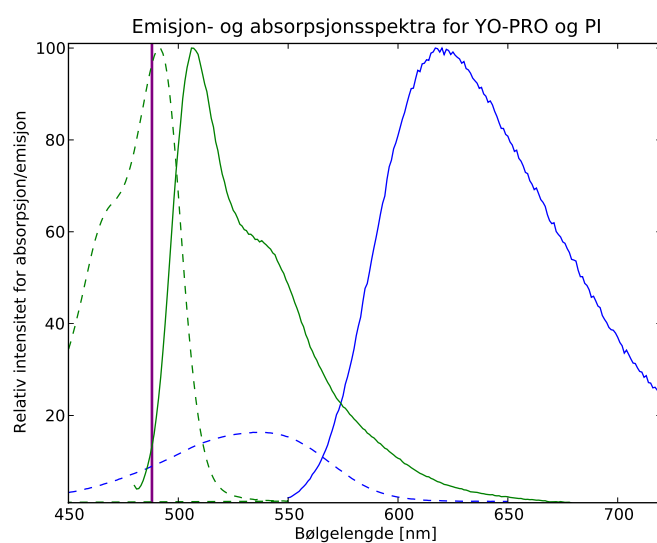
Annexin/PI- og PI-løsning ble laget før hvert forsøk. Ax/PI-løsningen besto av 10 μ L Annexin (Annexin-V-FLUOS, Roche), 0,5 mL HEPES-buffer og 10 μ L PI (50 μ g/mL).



Figur 5.1: **Absorpsjons- og emisjonsspektra for Annexin-V fluorescein og propidiumjodid bundet til hhv fosfatidylserin og DNA.** Spektret for Annexin-V fluorescein er markert med grønt og spektrum for propidiumjodid med blått. Absorpsjon er vist med stiplet linje mens emisjon er vist med heltrukken linje. Argon-laseren som brukes til å eksitere de to stoffene har en bølgelengde på 488 nm.



Figur 5.2: Strukturformel for YO-PRO (Quinolinium). Figur laget på bakgrunn av [30].



Figur 5.3: **Absorpsjons- og emisjonsspektra for YO-PRO-1 og propidiumjodid, begge bundet til DNA.** Spektrum for YO-PRO-1 er markert med grønt mens spektrum for propidiumjodid med blått. Absorpsjon er vist med stiplet linje mens emisjon er vist med heltrukken linje. Argonlaseren som brukes til å eksitere de to stoffene har en bølgelengde på 488 nm.

PI-løsningen besto av 80 μL PI i 4 mL HEPES-buffer.

HEPES-buffer ble laget ved å løse opp 0,4 g NaOH og 2,38 g HEPES (Sigma, H4034) i 200 mL elix (sterilt) vann. Justere pHen til 7,4 og tilsatte deretter 0,55 g CaCl_2 og 8,18 g NaCl. Ytterligere elixvann ble fylt på til et totalt volum på 1 liter ble oppnådd. Konsentrasjoner av de forskjellige komponentene ble da 10 mM HEPES, 5 mM CaCl_2 , 140 mM NaCl og 10 mM NaOH.

5.4 Temperaturforsøk med Annexin og propidiumjodid

I forsøket ble celledød undersøkt etter forskjellige tider og temperaturer. Temperaturene som ble brukt var 37 °C , 40 °C , 43 °C og 46 °C . Etter varmebehandlingen ble to flasker fra alle temperatureneforsøkene løsnet, farget og fordelt i to slik at en kunne studere dem samtidig i konfokalmikroskop og flowcytometer. De andre cellene ble satt i inkubatorskap i enten 2 timer og 40 minutter, 3,5 timer eller 5,5 timer. Celler fra to flasker fra hver av de fire temperaturforsøkene ble deretter merket, delt i to, og undersøkt på konfokalmikroskop og flowcytometer.

32 flasker med 0,5 millioner celler ble sådd ut i Nunc 25 cm² nunclonTM Δ -flasker to dager før forsøket. I begynnelsen ble 5 mL vekstmedium brukt ved utsåing av cellene mens 3 mL vekstmedium ble tilsatt i hver flaske for deretter å bli inkubert i 5 minutter i inkubatorskap før forsøket startet. Siden dette viste seg å være svært upraktisk ble det siden tilsatt 8 mL vekstmedium ved utsåing av cellene.

Parafilm ble trukket over korkene til flaskene for å holde CO₂ -konsentrasjonen på et nivå mest mulig lik naturlig vevskonsentrasjon på 5%. Deretter ble flaskene lagt i vannbad på 40 °C , 43 °C og 46 °C mens kontrollflakene ble lagt på varmerom som holdt 37 °C . Etter inkubering i inkubatorskap ble flaskene vasket med 4mL PBS og tilsatt 3,3mL AccutaseTM (Innovative Cell Technologies Inc.).

Deretter ble de holdt på 37 °C til cellene hadde løsnet fra bunnen. Prosessen tok vanligvis mellom 12 og 14 minutter.

1 mL av cellesuspensjonen ble tatt ut og sentrifugert på 1300 runder per minutt (opm) i 3 minutter. Supernatanten ble sugd av og cellene resuspendert i 100 μL Annexinløsning. Dette sto i 10 minutter i romtemperatur før 400 mL PI løsning ble tilsatt. Fra hver av prøvene ble det tatt ut 600 μL som ble lagt i to brønner. Disse ble studert på konfokalmikroskopet. Resten av celleløsningen ble filtrert og kjørt på flowcytometer.

Fra cellene ble tatt ut av inkubatorskapet etter varmebehandling tok det mellom 1 time og 7 minutter, og 1 time og 15 minutter før de ble sett på i konfokal mikroskop og undersøkt med BD LSR flowcytometer. Instrumentinnstillinger for flowcytometeret er oppgitt i appendiks A.

5.5 Temperaturforsøk med YO-PRO og propidiumjodid

Dette forsøket er nesten identisk med Temperaturforsøk med Annexin og propidiumjodid men Annexin er byttet ut med YO-PRO-1 (Vybrant Apoptosis Kit #4, Molecular Probes).

0,5 milliner celler ble sådd ut i Nunc 25 cm² nunclonTMΔ-vekstflasker med 8 mL vekstmedium. Korkene ble pakket inn i parafilm før 30 minutter varmebehandling. Temperaturene som ble brukt var 37, 40, 42, 43, 44, 45, 46 og 50 °C . Parafilmen ble deretter fjernet og flaskene inkubert i 1 eller 3 timer i inkubatorskap. De ble deretter vasket i varm PBS og tilsatt Accutase. Etter ca. 14 min på varmerom var cellene løst og cellesuspensjonen ble overført til sentrifugerør og sentrifugert i 3 minutter på 1300 opm. Supernatanten ble sugd av og fargeløsning ble tilsatt hvert rør. Fargeløsningen besto av: 1μ YO-PRO-1 (100μ M løsning i DMSO) + 1μ PI (1 mg/mL (0,5mM) i destillert H₂O, Vybrant Apoptosis Kit #4, Molecular Probes) + 1mL kald PBS. Ved bruk av brønner ble samme konsentrasjon av fargeløsning brukt men bare 200mL fargeløsning ble tilsatt i hver i brønn.

Cellesuspensjonen settes på is i 30 minutter før cellene undersøkes på konfokalmikroskop eller ved BD LSR flowcytometer. For instrumentinnstillinger for flowcytometeret se appendiks B.

5.6 Kombinert PDT- og temperaturbehandling

Forsøket ble gjennomført ved å inkubere cellene med det pre-fotosensitiserende stoffet HAL. Dette stoffet var en gave fra Photocure ASA, Oslo. Deretter ble cellene vasket og PBS tilsatt. Cellene ble lagt i vannbad i 10 min for å oppnå ønsket behandlingstemperatur, deretter gitt PDT-behandling og før en ny varmebehandling på 30 min startet. Etter dette fikk cellene tilsatt vekstmedium og inkubert før farging og kjøring på flowcytometer.

Lampen som ble benyttet emitterte rødt lys med en topp på 631-632 nm og hadde i gjennomsnitt en irradians på 20 mW/cm² i det området der flaskene lå. For oppsett se fig. 5.4.



Figur 5.4: **Oppsett under lysforsøk.** Flaskene med cellene er plassert på en glassplate over lyskilden. Lyskilden har en emisjonstopp på 631-632 nm og lysstyrken på oversiden av glassplaten er i gjennomsnitt på 20 mW/cm².

Utenom den 4,5 minutter lange behandlingen i det røde lyset, ble HAL-løsning og celler tilsatt HAL-løsning alltid oppbevart og behandlet i mørke. Alle væsker som ble tilsatt cellene hadde en temperatur på 37 °C .

Prosedyren for forsøket var som følger:

1. HAL-løsning: HAL-løsning med en konsentrasjon på 10mM ble laget ved å tilsette 1 mL PBS med pH6 per 2,52 mg HAL-pulver.
2. Sterilfiltrerte løsningen med filter som hadde en porestørrelse på 0,2 μm .
3. Fortynnet løsningen til 10 μM ved å tilsette vekstmedium uten FBS. Serumfritt vekstmedium ble benyttet for å forhindre at porfyrinet trekkes ut av cellene.
4. Varmet opp løsningen til 37 °C .
5. Skylte cellene med PBS.
6. Tilsatte 3mL HAL-løsning til hver petriskål eller flaske.
7. Inkuberte i 3,5 timer.
8. Vasket 2x med PBS.
9. Tilsatte 8 mL PBS til cellene og lot dem stå 5 min i inkubatorskap for å oppnå en CO₂ konsentrasjon på 5%.

10. Pakket korkene på flaskene inn i parafilm og satt på vannbad i 10 min.
11. Belyste cellene i 4,5 min, ved 631-632 nm med 20 mW/cm².
12. Satt på vannbad i 30 min.
13. Tilsatte 8 mL vekstmedium.
14. Inkuberte i 1 time.
15. Laget PI og Annexin/PI-løsning som beskrevet i seksjon 5.3.¹
16. Vasket cellene i PBS.
17. Tilsatte 3,3mL Accutase og lot cellene stå i 20 min på varmerom med 37 °C .
18. Overførte celleløsningen til rør og sentrifuger i 3 min med 1300 runder per min.
19. Tok av supernatanten og tilsatte 200µL Annexin/PI-løsning.
20. Lot stå i 10 min i romtemperatur før 0,8mL PI-løsning ble tilsatt.
21. Filterte og kjørte cellene på BD LSR flowcytometer med instrumentinnstillinger som oppgitt i appendiks B .

¹Dette utføres parallelt med forrige punkt. I tillegg var dette et naturlig tidspunkt å starte flowcytometeret.

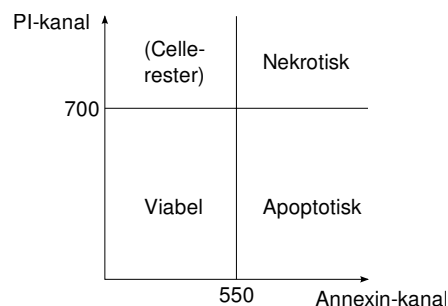
Kapittel 6

Målinger og resultat

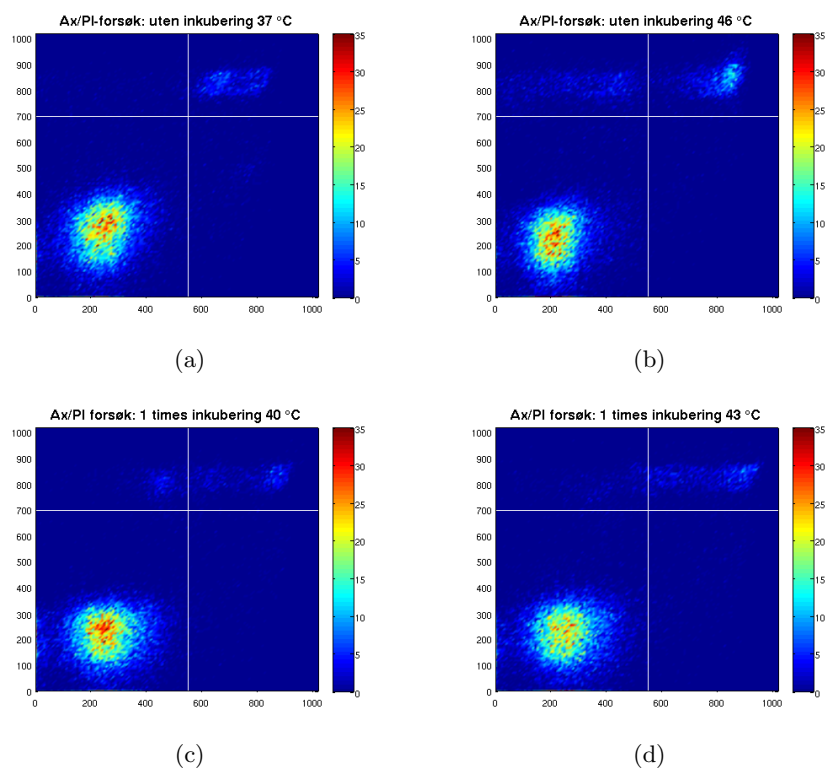
6.1 Temperaturforsøk med Annexin/PI-løsning

Forsøket ble først gjennomført med inkuberingstider på 0, 1,5, 3,5 og 5,5 timer. Ved gjentakelse av forsøket ble det brukt inkuberingstider på 1 og 3 timer.

For å definere levende, apoptotiske og nekrotiske celler ble terskelverdier satt ut fra hvilken kanal de ble registrert i på flowcytometeret. Høyere kanalverdi viser til sterkere fluorescens. Terskelverdien ble satt til kanalnummer 550 for Annexin og 700 for PI. Celler med fluorescens under terskelverdien på både for Annexin og PI ble beregnet som levende, se fig. 6.1. Celler som viste en lik eller sterkere fluorescens enn terskelverdien for Annexin, men ikke for PI ble beregnet som apoptotiske. Celler med fluorescens over eller lik terskelverdien for Annexin og over terskelverdien for PI telles som nekrotiske.



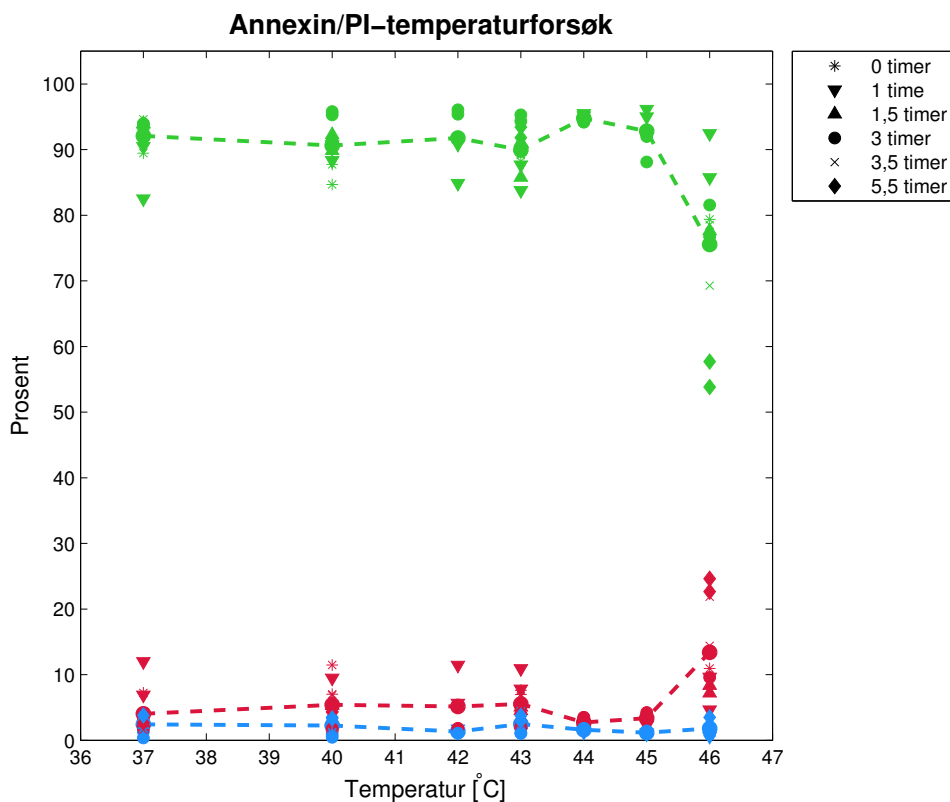
Figur 6.1: Skisse av inndeling av apoptotiske, nekrotiske og viable celler etter måling på flowcytometer, der cellene var merket med Ax/PI.



Figur 6.2: **Flowcytometerresultat.** Konturplottene viser fordelingen av viable, apoptotiske og nekrotiske celler merket med Ax/PI etter varmebehandling. De hvite linjene markerer terskelverdiene som skiller de forskjellige populasjonene, slik illustrert i fig. 6.1.

Som vist i fig 6.3 ligger overlevelsesevnen på rundt 90% uavhengig av temperaturen ved varmebehandlingen utenom ved 46 °C som er eneste temperaturen der varmebehandlingen ser ut til å kunne ha merkbar effekt. Der sees en økning i nekrose for de fleste inkuberingstidene med et stort utslag på 5,5 timer. Derimot er overlevelsen etter 5,5 timer ved 37, 40 og 43 °C som gjennomsnittlig. En kan her ikke finne noen økt dødelighet ved lang inkuberingstid.

Apoptosen ligger stort sett rundt 0-5%. Det er noe variasjon mellom de forskjellige temperaturene men denne er liten i forhold til variasjonen innenfor hver temperatur. Det er ingen klar apoptosetopp ved noen av temperaturene..



Figur 6.3: **Temperaturforsøk med Annexin og PI.** Grønne punkter markerer viable celler, blå punkter apoptotiske celler og røde punkter nekrotiske celler. Punktene har forskjellig form etter hvor lang inkuberingstid som ble brukt etter varmebehandlingen. Den stiplede linjen viser gjennomsnittet av de ulike målingene. For alle temperaturforsøk opp til 45 °C ligger overlevelsen på rundt 90% mens nekrosen og apoptosen er stabilt lav. Ved 46 °C sees en økning i nekrosen og overlevelsen synker noe.

For en klarere oversikt over overlevelse, apoptose og nekrose innenfor hver

inkuberingstid se appendiks D.

På bildene ser det ikke ut til at endring av terskelverdien ikke vil ha så mye å si for apoptosen ved mindre man setter terskelkrysset så høyt oppe og langt til venstre at man helt tydelig tar med viable og nekrotiske celler. For å se om dette stemmer er det i figur 6.4 tatt utgangspunktet i seks forskjellige inkuberingstider og behandlingstemperaturer og sett hva som skjer med apoptosen. Hvert plott viser gjennomsnittet av to målepunkter, et fra hver av to flasker som fikk samme behandling. Terskelverdien flyttes fra 400 til 700 for Annexinkanalen, i steg på 50 kanaler, mens terskelverdien for PI går fra 650 til 750 i steg på 10 kanaler.

Ved å flytte terskelverdien for Annexin oppover mot kanalnummer 700 skjer det liten endring av apoptosen. Hvis terskelverdien flyttes nedover øker apoptosen og ved en terskel på 400 er apoptosen ganske høy forutenom på plott 6.4(d). Ved å sammenligne med figur 6.2 ser en at en ved denne terskelverdien ser ut til å ha kommet inn i den viable cellepopulasjonen.

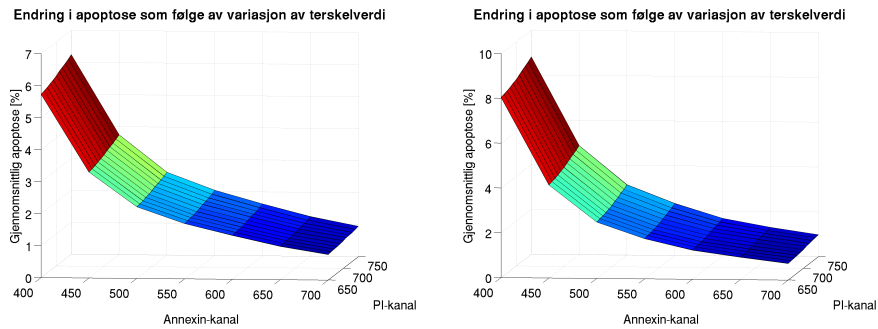
Flytting av terskelverdien på PI aksene fra kanalnummer 650 til kanalnummer 750 er det ikke mulig å se en endring i apoptose.

6.2 Temperaturforsøk med Annexin/PI-løsning studert i konfokalmikroskop

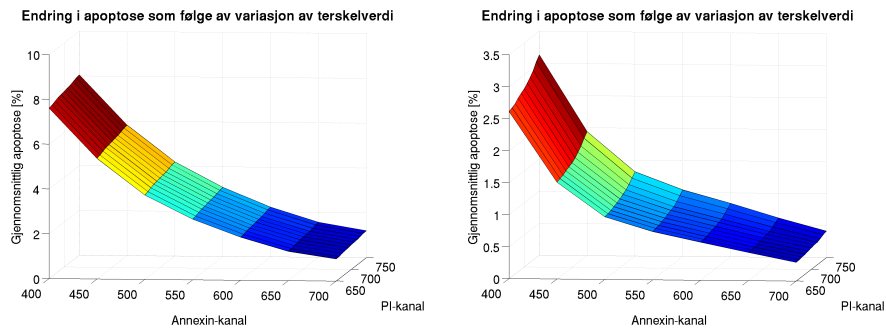
I forsøket nevnt i 6.1 med inkubasjonstider på 0, 1,5, 3,5 og 5,5 timer ble cellene også studert i konfokalmikroskop. For hver tid og temperatur ble det tatt fire konfokalbilder og deretter ble cellene talt for hånd. For å finne prosentandel apoptotiske og nekrotiske celler ble de fluorescerende cellene på alle de fire bildene telt sammen og deretter delt på det totale antall celler på de fire bildene. Hvert konfokalbilde inneholdt mellom 39 og 174 celler med et gjennomsnitt på 90 celler og median på 86. Eksempelbilder er vist i fig. 6.6 Resultatene av konfokalstudien er vist i fig. 6.5 ved siden av resultatene fra flowcytometeret.

6.3 Temperaturforsøk med YO-PRO/PI-løsning

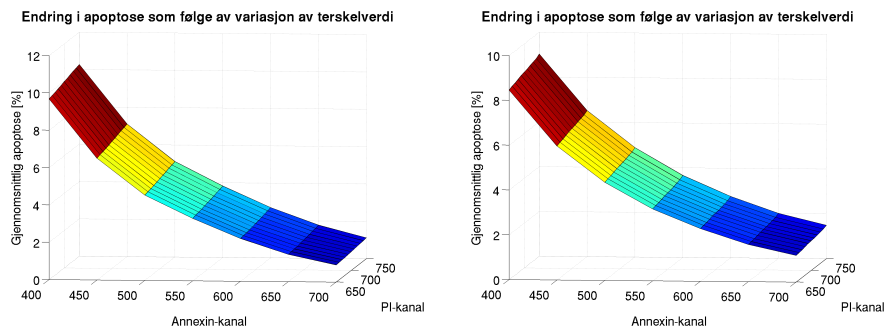
Temperaturforsøket ble gjentatt med et annet fargekit: YO-PRO og Annexin. Cellene deles inn i levende, apoptotiske og nekrotiske celler etter fluorescens men terskelverdiene for hva som ansees å tilhøre de forskjellige populasjonene gjøres manuelt. Terskelverdier for 6.9, 6.10 og 6.11 er vist i tabell 6.1 og illustrert i fig. 6.7.



(a) Behandlet på 37 °C uten inkubasjon. (b) Behandlet på 37 °C og 1t inkubasjon.



(c) Behandlet på 43 °C og 1,5t inkubasjon. (d) Behandlet på 43 °C og 3t inkubasjon.



(e) Behandlet på 46 °C og 3,5t inkubasjon. (f) Behandlet på 46 °C og 5,5t inkubasjon.

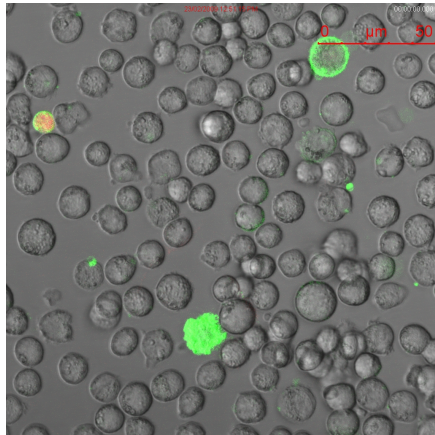
Figur 6.4: **Endring i apoptose ved å flytte terskelverdiene.** Plottene viser hvor mange prosentpoeng apoptose en får ved å flytte terskelverdien til forskjellige Annexin- og PI-kanaler for tilfeldig valgte bilder, der hvert plott viser gjennomsnittet av begge flaskene som gjennomgikk behandlingen på den bestemte temperatur og inkubasjonstid. Terskelverdien for Annexin går fra kanalnummer 400 til 700 i steg på 50 kanaler, mens terskelverdien for PI går fra 650 til 750 i steg på 10 kanaler. Foruten plott d) sees en ganske stor apoptose ved en terskel på 400. Tidligere i oppgaven (fig. 6.3) er terskelverdien satt til kanalnr. 550 for Annexin og 700 for PI.

Inkubasjon/ $^{\circ}$ C	Apoptotisk			Nekrotisk		
	Konfokal	Flow	Differanse	Konfokal	Flow	Differanse
37 $^{\circ}$ C						
0t	2.2%	1.8%	0.4%	4.8%	5.2%	-0.39%
1,5t	0.8%	2.9%	-2.1%	1.8%	2.8%	-1.01%
3,5t	1.4%	3.7%	-2.3%	2.3%	1.6%	0.67%
5,5t	0.5%	3.4%	-2.9%	2.3%	3.0%	-0.73%
40 $^{\circ}$ C						
0t	0.6%	1.3%	-0.7%	8.5%	9.2%	-0.75%
1,5t	0.7%	3.1%	-2.4%	4.1%	4.2%	-0.14%
3,5t	1.2%	3.7%	-2.5%	3.4%	5.9%	-2.50%
5,5t	1.9%	3.3%	-1.4%	3.9%	4.3%	-0.45%
43 $^{\circ}$ C						
0t	0.7%	1.0%	-0.3%	7.3%	7.6%	-0.25%
1,5t	0.9%	3.2%	-2.3%	4.2%	4.8%	-0.56%
3,5t	1.6%	4.3%	-2.7%	5.1%	6.7%	-1.62%
5,5t	0.7%	3.3%	-2.6%	4.4%	3.6%	0.77%
46 $^{\circ}$ C						
0t	2.1%	0.8%	1.3%	18.1%	12.2%	5.95%
1,5t	1.2%	2.0%	-0.8%	14.4%	7.8%	6.61%
3,5t	2.4%	3.1%	-0.7%	21.9%	18.1%	3.82%
5,5t	1.2%	2.9%	-1.7%	32.4%	23.6%	8.77%

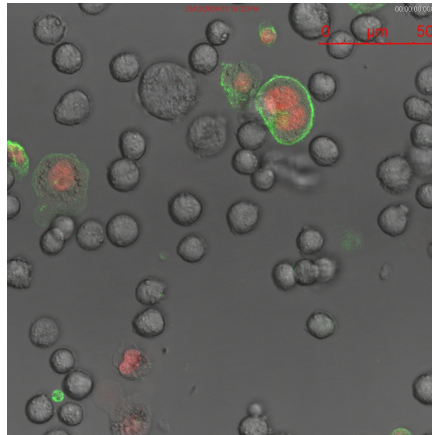
Figur 6.5: **Sammenligning av målingene gjort i konfokalmikroskop og flow-cytometer.** Resultatene for konfokalmikroskopet ble funnet ved å telle alle apoptotiske eller nekrotiske cellene på hver av de fire bildene som hadde samme temperatur og inkuberingstid og dele på det totale antall celler.

Tabell 6.1: Terskelverdier for inndeling i viable, apoptotiske og nekrotiske celler.

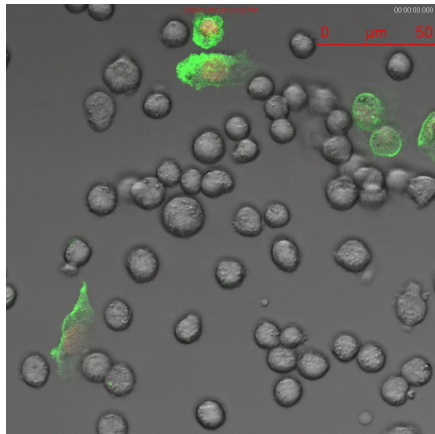
	YO-PRO-kanal (x)	PI-kanal (y)
Levende	< 590	< 630
Apoptotisk	> 590	< 630 + 0,415(x - 590)
Nekrotisk	< 590	> 630
Nekrotisk	> 590	> 630 + 0,415(x - 590)



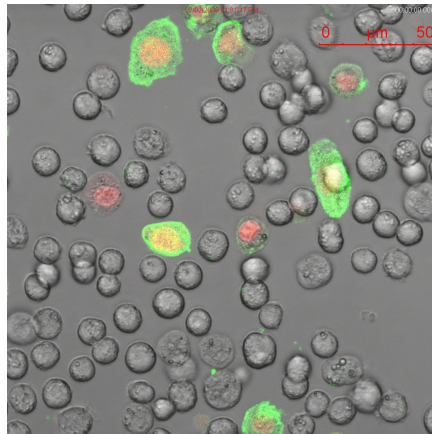
(a) 37°C ingen inkubering



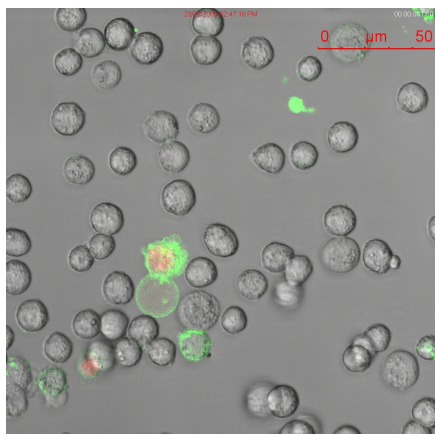
(b) 40°C uten inkubering



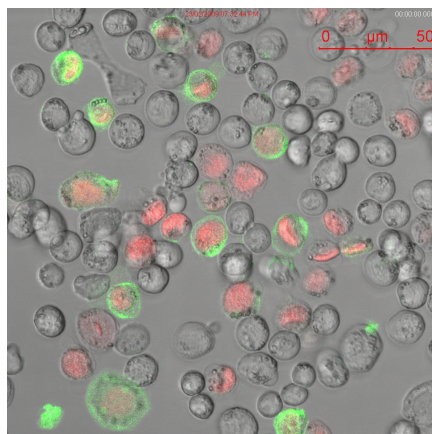
(c) 40°C 3,5t inkubering



(d) 43°C uten inkubering

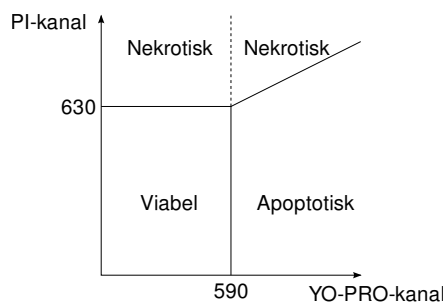


(e) 43°C 1,5t inkubering



(f) 46°C 5,5t inkubering

Figur 6.6: **Konfokalmikroskopbilder av celler merket med Annexin og PI.** Inkuberingstid og temperatur under varmebehandling vises under hvert bilde.



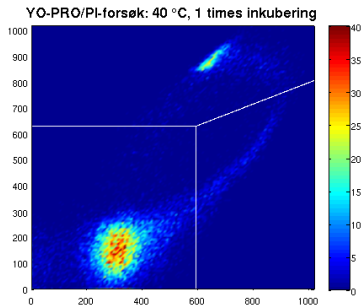
Figur 6.7: Skisse av inndeling av apoptotiske, nekrotiske og viable celler etter måling på flowcytometer, der cellene var merket med YO-PRO/PI.

Ved inkubasjonstid på 1 time etter varmebehandling ligger overlevelse på rundt 90% opptil en temperatur på 43 °C (fig. 6.9). Ved 43 °C er overlevelsen i underkant av 80% hvor den holder seg til 46 °C der den går ned til rundt 50%. Ved 3 timers inkubering (fig. 6.10) ligger overlevelsen rundt 90% mellom 37 og 45 °C med unntak av ved 44 °C der overlevelsen går ned til rundt 80%. Ved 46 °C er det en stor nedgang til ca. 50% overlevelse som deretter går litt opp ved 50 °C.

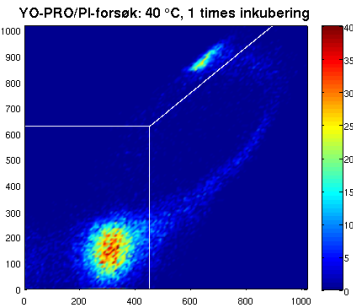
Apoptosen ligger på rundt 5%, men går litt opp rundt 44 °C etter 1 times inkubering. Ved 3 timers inkubering ligger den på rundt 3-5%, men har en liten lokal topp på 44 °C der en finner 8,5% apoptose. I tillegg er det stor spredning i målingene ved 46 °C hvor apoptosen varierer fra 4,6-15,7%.

Ved en times inkubering ligger nekrosen ligger på rundt 8% for 37 og 40 °C. Deretter går den ned før den stiger opp til i overkant av 16% i området 44-46 °C. Ved 50 °C ligger gjennomsnittlig nekrose på 46,9%. Ved 3 timers inkubering er det rundt 6% nekrose for 37 og 40 °C. Deretter er det som ved 1 time en liten nedgang før den på 44°C ligger på 13,6%. Ved 45% synker apoptosen til 7,3% før den ved 46 °C stiger til 41,5%. Ved 50 °C synker den til 35,4%.

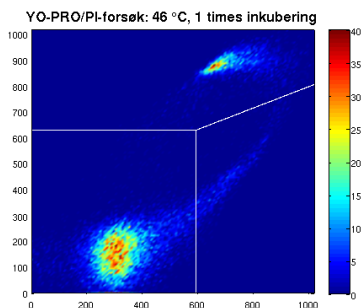
Ved sammenligning av de to tidene fig. 6.11 ser en at det er veldig godt samsvar mellom resultatene for de apoptotiske cellene etter 1 og 3 timer. Eneste avviket er ved 46 °C der to av målingene ved 3 timer ligger på henholdsvis 10,0% og 15,7%, mens resten ligger i intervallet 4-6%. Når en ser på de nekrotiske cellene er det godt samsvar mellom de to tidene med opp til 45 °C. Ved 45 °C en del spredning i resultatet. Ved 46 °C er det stor forskjell mellom de to tidene. Nekrosen er på mellom 16-21% ved 1 times inkubering og 36-48% ved 3 timers inkubering. Ved 50 °C er det også stor spredning innenfor målinger som er blitt behandlet samtidig, og selv om det etter 1 og 3 timer er stor forskjell på nekrosen, overlapper de målingene for de to inkuberingstidene.



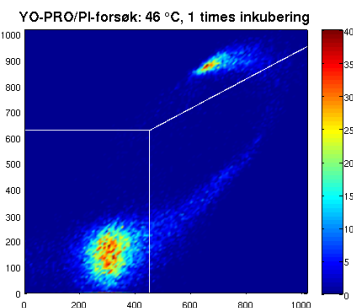
(a) Standard terskelverdi, 37 °C og 1t inkubering



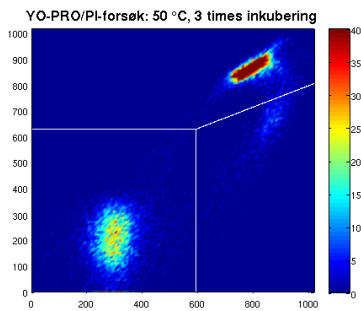
(b) Ny terskelverdi, 37 °C og 1t inkubering



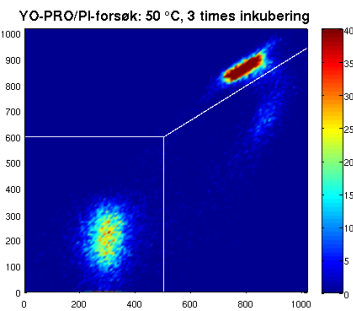
(c) Standard terskelverdi, 46 °C og 1t inkubering



(d) Ny terskelverdi, 46 °C og 1t inkubering



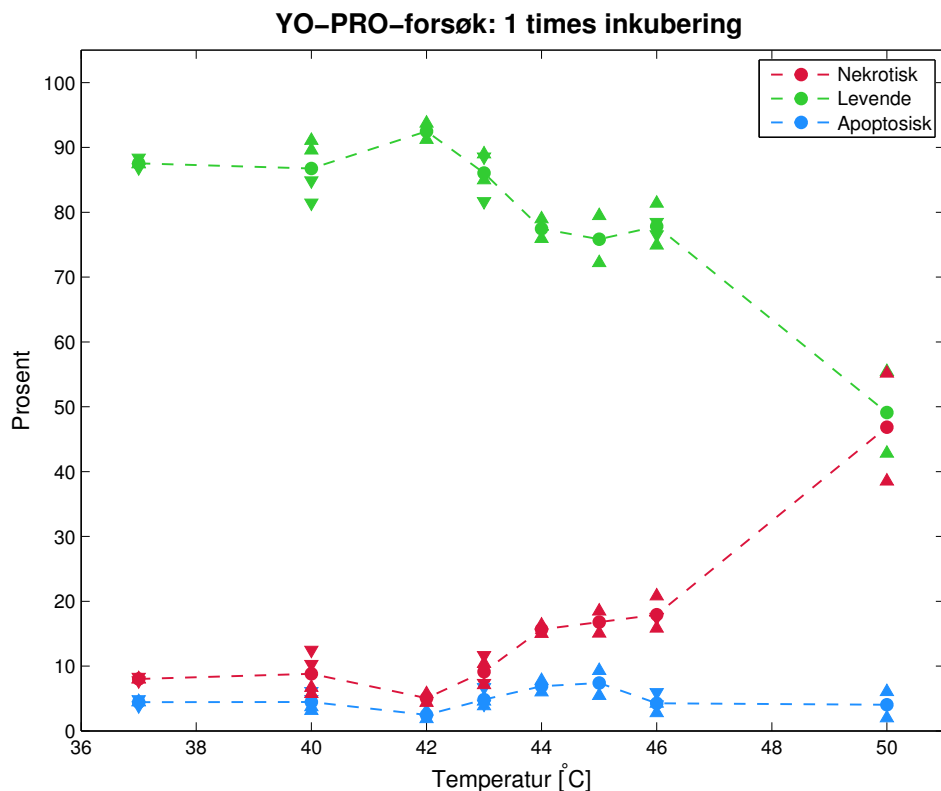
(e) Standard terskelverdi, 50 °C og 3t inkubering



(f) Ny terskelverdi, 50 °C og 3t inkubering

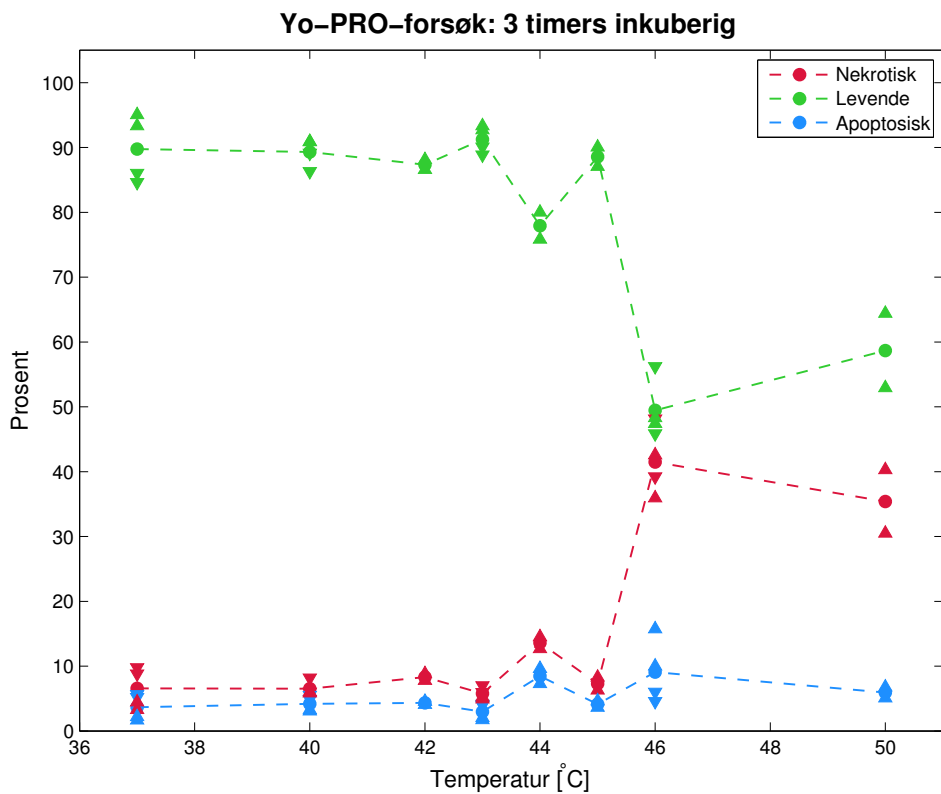
Figur 6.8: **Konturplott for celler merket med YO-PRO og PI** Aksene er inndelt i 1024 kanalverdier der økt kanalverdi tilsvarer høyere fluorescens. x-aksen viser fluorescens fra YO-PRO mens y-aksen viser fluorescens fra PI. De mange kanalverdiene fører til over 1 million mulige fluorescenskombinasjoner. Dette fører til at hvert punkt normalt sett maks vil inneholde 3 hit og det gjør det vanskelig å se hvor hovedvekten av cellene ligger. Derfor er plottet laget ved å slå sammen 8x8 kanalverdier og fargeskalaen viser da hvor mange celler som har den aktuelle fluorescensen i hvert av de nye punktene som består av 8x8 kanaler. I høyre kolonne er terskelverdiene som vist i tabell 6.1 mens i venstre kolonne er det satt individuelle terskelverdier for å maksimere apoptose.

For de levende cellene er det en del spredning i resultatene ved alle temperaturene. Spredningen er enda litt større på 45 °C. Ved 46 °C er det veldig stor forskjell på de to inkuberingstidene. Der gjennomsnittlig levende celler ligger på 77,8% etter 1 time er det bare 49,5% av cellene som er levende ved 3 timers inkubering. Ved 50°C er det også stor spredning, men som ved 50 °C nekrose overlapper de målingene for de to inkuberingstidene

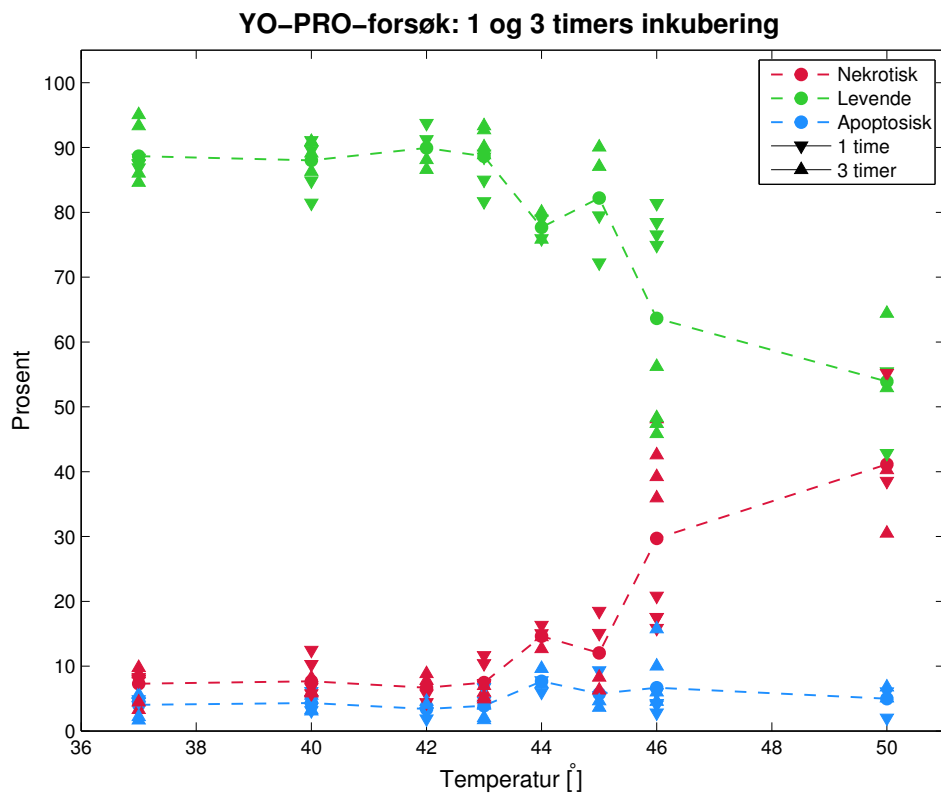


Figur 6.9: **Temperaturforsøk med YO-PRO. 1 times inkubering.** Trekanter vendt samme vei indikerer at målingene kommer fra samme forsøkdag men forskjellig flaske med celler. Det sees en nedgang i viable celler fra 44-46 °C . Ved 50 °C er rundt halvparten døde nekrotiske celler.

I figur 6.8 vises eksempelbilder på den informasjonen vi får ut av flowcytometeret. Ved Annexin/PI-forsøket (fig. 6.2) var det klare inndelinger av de nekrotiske, apoptotiske og viable cellepopulasjonene. Dette er ikke tilfellet ved merking med YO-PRO og PI. Dette gjør det vanskeligere å sette terskelverdier. I fig. 6.9 og 6.10 er terskelverdien valgt til å være den samme for alle måledataene (tabell 6.1). Dette er vist i høyre kolonne på fig. 6.8. Kanskje er det mulig å oppdage apoptosetopp ved en temperatur ved å velge individuelle terskelverdier for hvert målepunkt. Nye individuelle terskelverdiene for hvert av målepunktene er vist i venstre kolonne av fig. 6.8. Resultatet av endringene



Figur 6.10: **Temperaturforsøk med YO-PRO. 3 times inkubering.** Trekantene vendt samme vei indikerer at målingene kommer fra samme forsøksdag men forskjellig flaske med celler. En tydelig nedgang i overlevelse kommer ikke før ved 46 °C, og ved 50 °C stiger overlevelsen noe. Apoptosen er jevnt over liten.



Figur 6.11: **Temperaturforsøk med YO-PRO. 1 og 3 times inkubering.** Trekanter vendt samme vei indikerer lik inkuberingstid. Ved å plote gjennomsnittet av forsøkene med 1 og 3 times inkubering ser en nedgang i overlevelse fra og med 43 °C . Ved 46 °C er det stor forskjell i målingene gjort med 1 times inkubering i forhold til 3 timers inkubering.

er vist i fig. 6.14. Figur 6.12 og 6.13 viser endringene etter henholdsvis 1 og 3 timers inkubasjonstid.

Når en ser på overlevelse både etter 1 og 3 timer fig. 6.14 ligger den på rundt 83% ved temperaturer i området 37°C -43°C . Deretter synker overlevelsen til 69,3% ved 44°C før den går opp til 77,3°C ved 45°C og deretter ned til 59,5% ved 46%. Ved 50°C har overlevelsen sunket til 52,8%.

Apoptosen begynner holder seg rundt 11% men svinger litt. Den begynner på 9,5% ved 37°C før den øker til 11,4% ved 40°C . Den går deretter ned til 9,7% ved 42°C . Ved 43°C ligger overlevelsen på 11,1%, ved 44°C 15,1%, ved 45°C 11,3%, ved 46°C 10,3% og 9,3% ved 50°C .

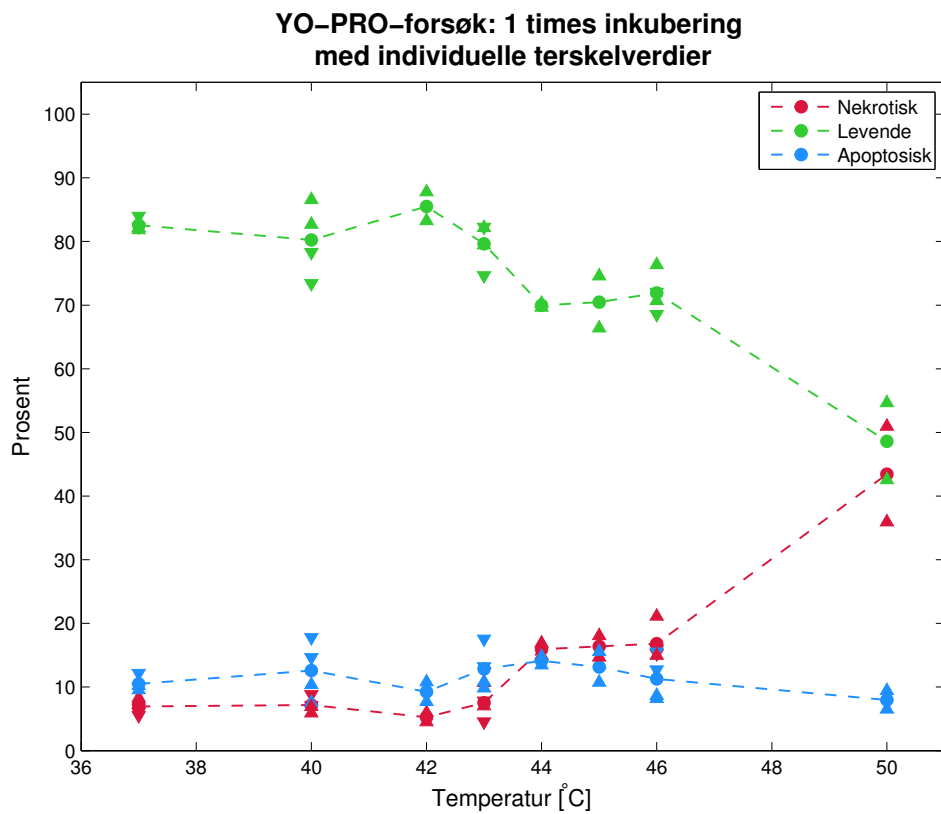
Nekrosen holder seg lav under 45% med henholdsvis 5,9%, 6,3%, 7,1% og 6,0% for temperaturene 37°C , 40°C , 43°C og 43°C . Deretter stiger den til 15,7% ved 44°C før den går litt ned til 11,4% ved 45°C . Deretter stiger den til 30,3% og 37,9 for henholdsvis 46°C og 50°C .

6.4 Kombinert PDT og varmebehandling

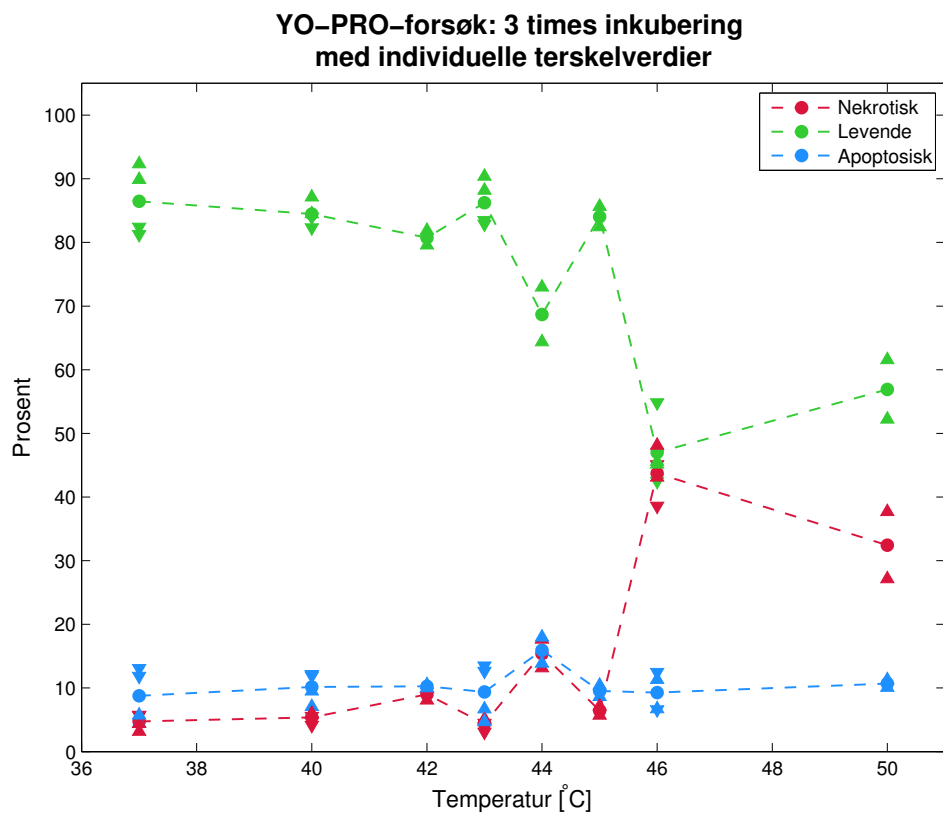
Kombinert PDT- og temperaturbehandling ble gjennomført, som beskrevet i kap. 5.6, med farging etter 1 times inkubering. Ved lysbehandling og temperaturbehandling på 20 °C er overlevelsen på 19% (fig. 6.15). Ved 37 °C er ligger gjennomsnitts overlevelse på 39,8% men det er stor forskjell på de forskjellige målepunktene med et minimum på 11,4% overlevelse og helt opp til 77,4% overlevelse. Ved 43 °C er overlevelsen på bare 9,6% og den nedadgående trenden fortsetter på 44 °C med 8,0% og 5,2% ved 45 °C. Ved 46 °C er overlevelsen steget til 12,3%, men her er måledataene spredt. De fleste målepunktene ligger under 5,7%, men ett forsøk gir to målinger med meget høy overlevelse på henholdsvis 23,8% og 38,3%. Dette trekker opp gjennomsnittet betraktelig. Under dette forsøket ble også temperaturbehandling på 37 °C brukt. Ved denne temperaturen fås også resultater som ligger betraktelig unna de andre målepunktene med overlevelse på 54,0 og 77,5%. Uten dette forsøket ville gjennomsnittlig overlevelse ved 37 °C ligget på 26,8% og ved 46 °C på 3,0%.

Apoptosen er relativt høy ved 20 °C med 10,7%. Deretter synker den til 4,9% ved 37 °C og deretter holder den seg nesten konstant med henholdsvis 4,2%, 4,4%, 4,5% og 3,0% ved 43, 44, 45 og 46°C. Spredningen av målepunktene er stort sett liten og under 3,5 prosentpoeng fra gjennomsnittet. Det største avviket er ved 37°C der det høyeste målepunktet er 5,1 prosentpoeng fra gjennomsnittet.

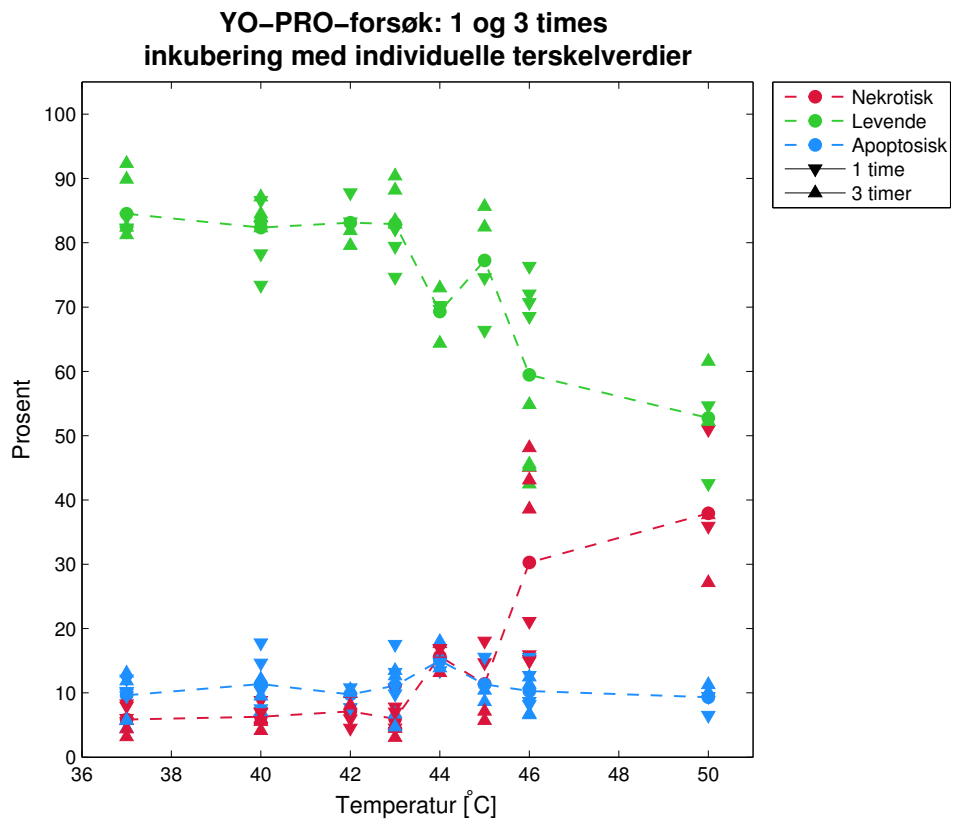
I det apoptosen stort sett er konstant vil nekrosen være omvendt proporsjonal med overlevelsen. Ved 20 °C er nekrosen på 62,2%, deretter synker den til



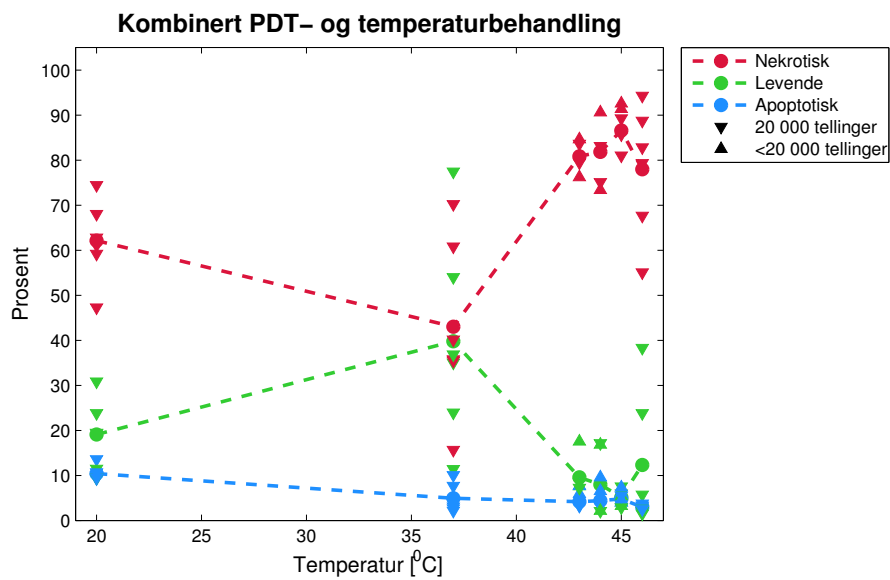
Figur 6.12: **Temperaturforsøk med YO-PRO/PI etter 1 times inkubasjon med nye terskelverdier** Figuren viser levende, apoptotiske og nekrotiske celler etter å ha satt nye terskelverdier på alle målepunktene for å optimalisere for apoptose. Figur 6.11 viser resultat med vanlige terskelverdier.



Figur 6.13: **Temperaturforsøk med YO-PRO/PI. 3 times inkubasjon og nye terskelverdier.** Figuren viser levende, apoptotiske og nekrotiske celler etter å ha satt nye terskelverdier på alle målepunktene for å optimalisere for apoptose. Figur 6.11 viser resultat med vanlige terskelverdier.



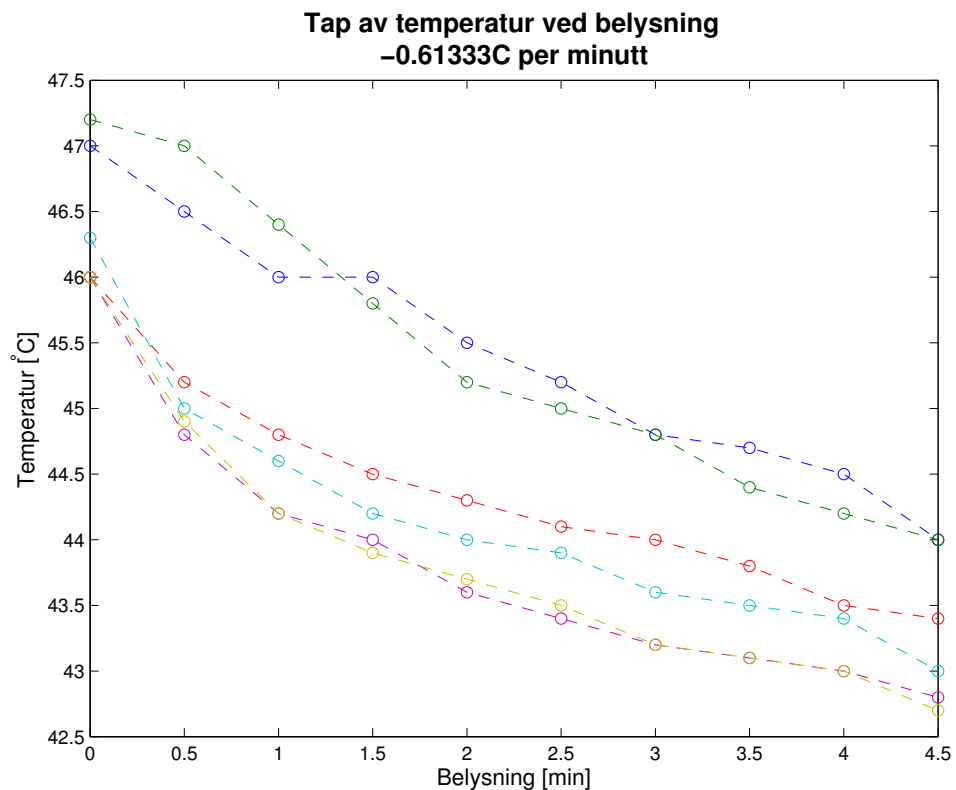
Figur 6.14: **Temperaturforsøk med YO-PRO/PI. 1 og 3 times inkubasjon og nye terskelverdier.** Figuren viser levende, apoptotiske og nekrotiske celler etter å ha satt nye terskelverdier på alle målepunktene for å optimalisere for apoptose. Figur 6.11 viser resultat med vanlige terskelverdier.



Figur 6.15: **Kombinert PDT og temperaturbehandling.** PDT-behandlingen fører til en vesentlig større celledød enn ved temperaturbehandling. Dette sees ved å se på overlevelsen ved 37 °C . Ved denne temperaturen er også spredningen i målepunktene stor, se diskusjon i kap. 7.5. Ved 43-45 °C har overlevelsen falt til rundt 85%. Ved 45 °C sees også en stor spredning i overlevelse. Apoptosen er på 10,7% ved 20 °C men er stabilt lav ved de andre temperaturene.

43,2% men på dette punktet er det stor variasjon på målepunktene med et minimum på 15,7% og maksimum på 70,2%. Ved 43 °C er nekrosen økt til 80,9% og deretter stiger den sakte til 81,9% ved 44 °C og 86,8% ved 45%. Deretter synker den til 78,0% ved 46 °C. Her er det igjen ett forsøk som gir målepunkter som drar gjennomsnittet ned betraktelig. Uten disse to punktene ville gjennomsnittlig nekrose ligget på 86,3%.

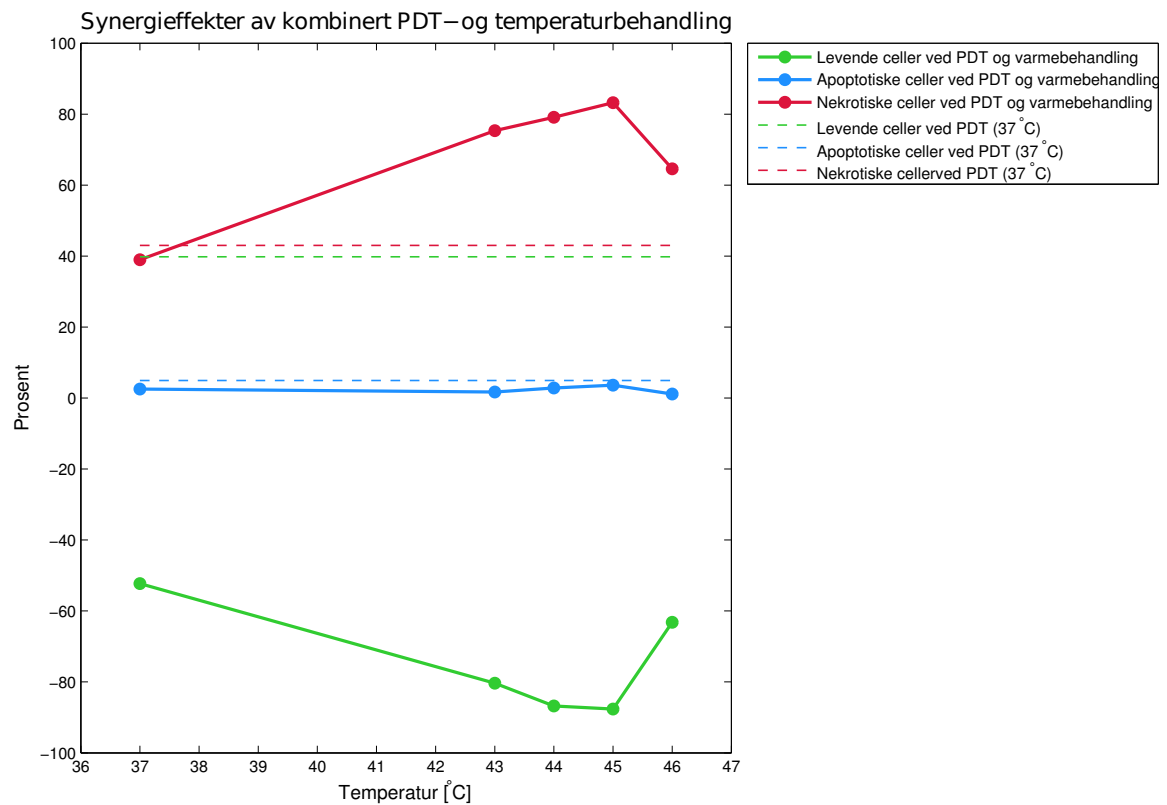
Før og etter lysbehandlingen får cellene varmebehandling. Siden lysbehandlingen foregår på et rom med 37 °C vil cellene kjøles litt ned under lysbehandlingen. Ut i fra figur 6.16 er det ikke urimelig å anta at temperaturen synker med ca. 2,75 grader under lysbehandlingen.



Figur 6.16: **Nedgang i temperatur under lysbehandling.** Cellene varmebehandles før de lysbehandles. Under lysbehandlingen er lufttemperaturen 37 °C og cellenes temperatur vil derfor senkes under denne behandlingen.

Mens temperaturforsøket viste stor overlevelse ved alle temperaturer, førte kombinert hypertermi og PDT-behandling til omfattende celledød. I figur 6.17 er differansen mellom effekten av den kombinerte behandlingen og kun temperaturbehandling plottet som en heltrukket linje mens den stiplede linjen viser effekten av PDT-behandling ved kontrollen på 37 °C . Hvis

den kombinerte behandlingen fører til like stor effekt som summen av de to behandlingene gjort hver for seg ville de to linjene overlappet hverandre. For apoptosen er dette nesten tilfellet, mens det for nekrosen er en avstand på minst 20 prosent poeng mellom aksene. Overlevelsen har dermed gått ned og dette sees ved den store avstanden mellom den heltrukne grønne linjen og grønne stiplede linjen.



Figur 6.17: De heltrukne linjene viser synergieffekten ved kombinert PDT- og temperaturbehandling. F.eks. viser den røde heltrukne linjen differensen i andel nekrotiske celler mellom kombinert PDT- og temperaturbehandling og kun temperaturbehandling. Den røde stiplede linjen viser nekrose ved kun PDT-behandling (under temperaturbehandlingen av de andre cellene ble cellene som kun fikk PDT-behandling oppbevart på 37 °C).

Kapittel 7

Diskusjon

7.1 Temperaturforsøk med Annexin/PI-løsning

Varmebehandling under 46 °C ser ikke ut til å påvirke AY-27-cellene i større grad, overlevelsen ligger på rundt 90% uavhengig av om man gir dem temperaturbehandling eller har dem på 37 °C (fig. 6.3). Det ser altså ut til at håndteringen av cellene kan ha drept dem mens varmebehandlingen ikke har hatt noen virkning. Det var forventet at hypertermi ikke skulle være effektiv nok til å brukes som behandling alene og her ser det ut til at varmebehandlingen ikke har noen effekt. En mulig teori kan være at cellelinjen AY-27 er spesielt motstandsdyktig mot varme.

Ved 46 °C går gjennomsnittlig overlevelse ned, men det er veldig stor spredning i resultatene. De fleste inkuberingstidene gir en overlevelse som ligger litt under de andre temperaturforsøkene, men ved 5,5 timer forekommer et veldig fall i overlevelse. Det er ingen åpenbar grunn til at det skal være slik. Ved 5,5 timers inkubering ved de andre temperaturene ligger overlevelsen ganske nær gjennomsnittsverdiene.

I konturplottet fig. 6.2 ser de forskjellige cellepopulasjonene ut til å være godt adskilt. For å videre teste dette ble seks forskjellige inkubasjonstider og behandlingstemperaturer valgt ut for å se hva som hendte når man endret på terskelverdiene. Resultatet er vist i fig. 6.4. En endring i terskelverdien til PI på 50 kanaler opp eller ned gir nesten ingen forskjell i apoptose. Hvis en øker terskelverdien for Annexin fra 550 til 700 vil det heller ikke endre apoptosen særlig. Hvis en derimot setter ned terskelverdien til 400 vil det for flere av plottene være en stor økning i apoptosen, men ved å sammenligne med konturplottene i fig. 6.2 ser en da ut til å telle deler av den viable cellepopulasjonen som apoptotisk.

7.2 Konfokalmikroskopi vs. flowcytometri

Under de første forsøkene ble konfokalmikroskop og flowcytometer brukt samtidig for å få studert cellene med ulike metoder og for å se om det var samsvar mellom dem. Konfokalmikroskopet har den fordel at man kan se hvordan hver enkelt celle blir farget. Dog har denne metoden flere ulemper: Fokus må stilles inn før hvert bilde kan tas og dette fører til at det tar veldig lang tid å ta bildene. Dette fører til at cellene som blir sist avbildet må stå en stund på konfokalmikroskopet. Cellene er da i omgivelser med en CO_2 -konsentrasjon på 0,38 promille i motsetning til 5% som er vanlig i kroppsvev og i inkubatorskapet. I tillegg er romtemperaturen på rundt 20 °C mot cellenes foretrukne 37 °C . Dette kan stresser cellene og i verste fall få dem til å dø.

Et annet problem er at AY-27-cellene er adherente. I forsøkene ble cellene løsnet før de ble plassert i brønnplattene, noe som kan være enda en stressfaktor for dem. Det beste vil være å dyrke cellene direkte i brønnene. Imidlertid ble dette valgt bort fordi formålet med forsøket var å se hvor godt samsvar det var mellom målingene gjort med flowcytometer og konfokalmikroskop. For å studere cellen i flowcytometer må disse være i løsning. Det ble derfor valgt å løsne cellene, farge dem og plassere en del i brønnene mens resten ble plassert i rør og kjørt på flowcytometeret. Cellene synker raskt til bunnen, som er det planet bildene er tatt i. Det er imidlertid ikke sikkert at alle cellene har sunket til bunnen på det tidspunktet bildene tas. Dette kan være et problem hvis noen typer celler, for eksempel nekrotiske celler, ikke synker like raskt som intakte celler.

En annen svakhet med metoden er at det kan være vanskelig å avgjøre om det en ser er en celle eller ikke. Dette kan være fordi flere celler ligger oppå hverandre, at de er ute av fokus, eller at cellene er veldig deformerte på grunn av nekrose. I tillegg vil det være vanskelig å avgjøre hvilken kategori en celle tilhører, enten nekrotisk, levende eller apoptotisk.

Øyet vil i motsetning til en datamaskin ikke velge en bestemt terskelverdi, men vurderer cellen som en helhet for å finne ut hvilken kategori den skal plasseres i. Dette kan være en fordel fordi øyet kan detektere cellerester og unngå å ta dem med i tellingen, men det gjør også metoden mer subjektiv, fordi en fra celle til celle kan ha forandret syn på hvor intens fluorescens som skal kreves og hvor stor del av cellen som må lyse for at den skal karakteriseres som apoptotisk eller nekrotisk.

Det er vanskelig å sammenligne resultatene fra flowcytometeret og konfokalmikroskopet fordi resultatene fra flowcytometeret er basert på to avlesninger á 20 000 tellinger. På konfokalbildene er det stor variasjon i hvor mange celler som er på hvert bilde. Derfor er andel apoptotiske og nekrotiske celler

regnet ut fra alle de fire bildene for hver temperatur og inkubasjonstid, i stedet for fra statistikk fra hvert bilde. Når en ser på resultatene fra figur 6.5 ser en ikke noen klar tendens til at den ene metoden gir større andel apoptotiske eller nekrotiske celler enn den andre. For de fleste målepunktene er differansen mellom de to metodene mindre enn 2,7 prosentpoeng. I fig. 6.3 vises målepunktene fra flowcytometeret som henholdsvis stjerne, trekant, kryss og firkant for 0, 1,5, 3,5 og 5,5 timers inkubasjon. En ser her at de to målepunktene som er registrert i hvert enkelt forsøk kan ha en variasjon som er større enn 2,7 prosentpoeng. Dette kan tolkes som en indikasjon på at forskjellen mellom de to metodene er insignifikant.

Begge metodene viser også samme trend: at apoptosen og nekrosen nærmest er konstant og uavhengig av inkuberingstid og temperatur utenom ved 46 °C , der nekrosen er betydelig større enn ved de andre temperaturene.

Vi forventet at apoptosen ville være temperaturavhengig (se f.eks. Andersens masteroppgave om Jurkatceller^[31]) og at en derfor ville se varierende apoptose og gjerne en apoptosetopp ved en bestemt temperatur. Denne ville dermed skille seg ut som en god temperatur å bruke i behandling for å minske inflammasjon skapt av nekrose. Siden vi ikke så slike tydelige variasjoner, og fordi apoptosen var ganske lav ved alle temperaturer, mistenkte vi at flowcytometeret ikke fanget opp de apoptotiske cellene. For å undersøke dette brukte vi konfokalmikroskopet for å se om det var apoptotiske celler som ikke var merket med Annexin. På bildene fra konfokalmikroskopet kunne en totalt sett bare se noen få celler som ikke var merket, men hadde en apoptotisk morfologi. Det ser derfor ut som at Annexin/PI-metoden fanger opp så godt som alle de apoptotiske cellene.

7.3 Temperaturforsøk med YO-PRO/PI-løsning

Ved bruk av YO-PRO-kitet er overlevelsen høy ved alle temperaturer under 46 °C . Dette er den samme trenden som i Annexin/PI-forsøket, nemlig at AY-27-cellene ikke ser ut til å være særlig sensitive for mild hypertermi.

Ved 46 °C er det stor forskjell på nekrosen etter 1 times inkubasjon og etter 3 timers inkubasjon. Dette var noe overraskende i det nekrose ikke er en kontrollert prosess, men en ukontrollerbar oppsvulming og bristing som en skulle anta tok forholdsvis kort tid. En ser ikke noe til denne trenden i Ax/PI-forsøk, utenom ved én bestemt temperatur og inkubasjonstid. Dette til tross for at disse forsøkene tok for seg mange forskjellige inkubasjonstider.

7.4 Farging med YO-PRO vs. Annexin

Generelt viser YO-PRO-kitet litt mer apoptose enn ved Annexin/PI-fargingen. Begge viser høy overlevelse ved temperaturer under enn 46 °C . Når YO-PRO brukes settes cellene på is under innfargingen. Dette kan være en påkjenning for cellene. Generelt viser begge fargemetodene, både Ax/PI og YO-PRO/PI, høy og nærmest stabil overlevelse under 44 °C . Ved 44 °C spriker måleresultatene for YO-PRO, og gjennomsnittet for overlevelse synker noe mens det for Ax/PI går noe opp. Ved å bruke individuelle terskelverdier er trenden for overlevelse den samme som ved en bestemt terskelverdi for alle målingene, men overlevelsen er generelt noe lavere. Det er derfor vanskelig å si om nedkjølingen av cellene har noen effekt på måleresultatet.

7.5 Kombinert PDT- og varmebehandling

Ved kombinert temperatur- og PDT-forsøk må all behandling av cellene gjøres i mørket slik at dødeligheten hos cellene kun skyldes lysbehandlingen med det røde lyset, og ikke lys mottatt under resten av forsøket. Dette medførte et problem under løsningen av cellene fordi det var for mørkt til å sjekke visuelt om de hadde løsnet. Cellene løsnes med Accutase og skal ifølge produsentens prosedyre bare trenge 5-10 minutter inkubering før dette skjer. Før vi begynte med forsøkene testet vi ut ulike inkuberingstider og fant ut at AY-27-cellene trengte lengre tid for å løsne. Når AY-27-cellene er festet til bunnen av flasken kan dette sees med de blotte øye som et matt gjennomsiktig lag som dekker bunnen. 14 minutters inkubering og lett vipping av flasken var nok til at en kunne se at cellene løsnet. Denne tiden ble brukt i temperaturforsøkene, noe som fungerte greit, det var rikelig med celler når de ble målt med flowcytometeret.

I følge Ingvild Kinn Ekroll som i samme tidsrom holdt på med å gjøre fraksjonerte PDT-forsøk på AY-27-cellene, løsnet cellene tregere etter PDT-behandling enn etter varmebehandling. Inkubasjonstiden med Accutase ble derfor økt til 20 minutter i temperatur/PDT-forsøkene. Denne tiden fungerte fint for cellene som ble holdt på 37 °C før og etter lysbehandlingen, men ved høyere temperaturer var det av og til for få celler i prøven til å oppnå 20 000 tellinger med flowcytometeret. Disse tellingene er markert med oppovervendte trekantene på fig. 6.15. Siden prøvene med høy temperatur inneholder mer døde celler kan dette tyde på at jo mer skadd cellene er jo vanskeligere har de for å løsne fra flasken. At cellene må inkuberes ekstra lenge for å løsne bør ikke være noe problem i seg selv, da Accutase ifølge produsenten er meget mild mot cellene. Opp mot 100% av cellene overlever etter 45 min i Accutase^[32]. Det vil gjøre at det går litt lenger tid fra inkubasjon til faktisk

måling på flowcytometeret, i forhold til ved temperaturforsøkene. Det er mulig at skadde celler ikke løsner og at målingen dermed vil vise for få døde celler. Om dette er tilfelle er umulig å si ut i fra målingene. Målepunktene med færre enn 20 000 tellinger har generelt sett ikke en mindre andel døde celler enn målepunkter med 20 000 tellinger.

I forsøkene ble 0,5 millioner celler sådd ut to dager på forhånd. Doblingsiden til AY-27 er ca. 24 timer og dermed skulle det være 2 millioner celler i hver flaske ved forsøksstart. Mengde fargestoff ble også regnet ut i fra dette, men siden det i flere forsøk var for få celler til 20 000 tellinger kan det tyde på at det var betraktelig færre celler (i hvert fall i en del av prøvene). Til seinere forsøk kan en derfor kanskje forsøke med noe mindre eller halvparten så mye fargestoff til hver prøve.

Når en sår ut celler to dager på forhånd vil en ikke ha like mange celler i hver flaske under forsøket. Overlevelsen etter PDT-behandling med PpIX, har i forsøk utført av J. Moan *et. al.*^[33] på cellelinjene WiDr og V79, vist seg å være avhengig av celletettheten. I et forsøk der en skal gjennom mange steg før en kommer frem til resultatet kan små forskjeller i gjennomføringen, gjerne så små at en ikke merker dem, ha innvirkning på resultatet. Dette kan føre til avvikenede resultater i et forsøket eller mellom forsøk. AY-27-celler er adherente. Hvis en skulle ha vært sikker på antall celler i hver flaske måtte disse løsnes og telles. En kunne så ha gjennomført forsøket med cellene flytende rundt i mediet eller ventet en stund slik at de fleste cellene fikk festet seg. Med flytende celler eller celler som nettopp har festet seg vil forholdene være veldig ulike slik cellene har det i sitt naturlige miljø i epitellaget i blæren hos rotter. Dette kan stresse cellene og/eller få dem til uttrykke andre proteiner enn i sitt naturlige miljø og således endre behandlingsresultatet. Det ble derfor besluttet å gjennomføre forsøkene med cellene festet til bunnen av flasken for å gjenskape et miljø nærmere *in vivo*.

Ved temperaturforsøkene ble flaskene lagt 30 min på vannbad. Under kombinerte temperatur/PDT-forsøk ble det brukt 10 min temperaturbehandling før og 30 min etter lysbehandling. Ved lysbehandlingen var romtemperaturen 37 °C , og dette førte til at temperaturen til cellen sank med rundt 2,8 grader (hvis en antar at temperaturnedgangen er konstant, se fig. 6.16). I tillegg vil det ta litt tid å få temperaturen opp igjen til behandlingstemperaturen etter lysbehandlingen. Dette vil føre til en total behandlingstid på 40 min, men denne er delt opp i fraksjoner. Det blir dermed vanskelig å anslå hvor mye de ekstra 10 minuttene har å si for det totale resultatet. Ideelt sett burde temperatur/PDT-forsøket vært satt opp med lampen over et vannbad slik at cellene hadde beholdt konstant temperatur under behandlingen. På denne måten kunne cellene stått i vannbad 10 min før lysbehandling slik at de hadde oppnådd rett temperatur og deretter opprettholdt konstant temperatur under lysbehandlingen, med en total behandlingstid på 30 minutter. Dette

oppsettet lot seg dessverre ikke realisere fordi da det ville ødelagt for andres forsøk. Derfor blir det vanskelig å sammenligne temperaturforsøket og det kombinerte temperatur- og PDT-forsøket direkte. Det er usikkert hvor mye den ekstra temperaturbehandlingen har å si når temperaturbehandling uten PDT ikke ser ut til å drepe mer celler enn kontrollen. Selv om forsøkene ikke lar seg sammenligne direkte indikerer fig. 6.17 at der er en synergieffekt av kombinert varme- og PDT-behandling i forhold til kontrollen (PDT ved 37 °C). Siden temperaturbehandling alene ikke ser ut til å ha noen effekt vil de 20 prosentpoengene ekstra nekrose sannsynligvis ikke kunne tilskrives 10 minutter ekstra behandlingstid.

En forklaring på den antatte synergieffekten er at både varmebehandling og PDT-behandling induserer skader som i seg selv ikke ville vært dødelige, men når flere av disse subletale skadene inntreffer på samme tid vil ikke cellen greie å reparere skadene. Konsekvensen vil være at cellen dør. En annen forklaring kan være at lysdosen som er brukt ligger midt i den bratte stigningen til overlevelseskurven (se appendiks E). Det er ikke sikkert en får en like god varmerespons i den kombinerte behandlingen hvis en ikke bruker en dose som ligger i dette området. Den bratte stigningen kan også være årsaken til den store spredningen i måleresultatene for overlevelse ved 37 °C (se fig. 6.15).

Kapittel 8

Konklusjon

Ved bruk av begge de to forskjellige metodene for å detektere apoptose, Ax/PI og YO-PRO/PI, ser en av resultatene at temperaturbehandling fører til lite apoptose i AY-27-cellelinjen. Apoptosen viser også lite tegn til å være temperaturavhengig og cellene ser heller ikke ut til å være særlig varmesensitive. Overlevelsen ligger på rundt 90% ved bruk av begge de to målemetodene med temperaturer i området 40-43 °C , noe som er det samme som ved kontrollen på 37 °C . Ved Ax/PI-forsøket holder overlevelsen seg rundt 90%, også ved 44 og 45 °C , før den synker litt ved 46 °C , men ved denne temperaturen er det stor variasjon i målepunktene. Ved YO-PRO/PI-forsøket går overlevelsen litt ned ved 44-45 °C og videre ned til 50% ved temperaturene 46 og 50 °C . Det bør imidlertid merkes, som nevnt i seksjon 7.3, at spredningen i måleresultatene ved 46 °C er stor.

Konfokalmikroskopi er en tungvint metode å studere celledød kvantitativt. Det tar lang tid å få tatt nok bilder til å få et representativt utvalg. I denne perioden ligger cellene i romtemperatur med en vesentlig mindre CO₂-konsentrasjon enn det som er vanlig i kroppsvev. Etter bildetaking må cellene telles opp for hånd, noe som er veldig tidkrevende. Metoden ser ikke ut til å gi signifikant andre resultater enn flowcytometri og anbefales derfor ikke til slike studier ved mindre man mistenker at merkingen av cellene ikke fungerer som den skal. I begynnelsen av vårt forsøk lurte vi på om merkingen av apoptotiske celler ikke fungerte, og konfokalmikroskopi var da en grei metode for å sammenligne celler med apoptotisk morfologi og celler som var merket med Annexin. Hvis en vil gjøre direkte sammenligninger mellom forsøk gjort med flowcytometer og konfokalmikroskop er det en fordel å bruke celler som ikke er adherente. I vårt forsøk ble cellene løsnet for å kunne se på celler fra samme forsøk og forsøksflaske samtidig på flowcytometer og i konfokalmikroskop.

Kombinert PDT- og temperaturbehandling ser ut til å kunne være mer effektiv enn de to behandlingene hver for seg (fig. 6.17), men denne gevinsten bør testes opp mot fordelene av å kjøle ned cellen/vevet slik at en kan bruke sterkere lysdose. Det er også mulig at effektiviteten til den kombinerte behandlingen går ned med andre lysdoser. Lysdosen i dette forsøket er LD₅₀-dosen og i dette området synker overlevelsen eksponensielt med lysdosen. En liten ekstra belastning for cellen kan derfor føre til stor endring i overlevelsen. Temperaturbehandling kan derfor vise seg å være mer effektivt her enn ved høyere lysdoser, som kan være mer relevante i klinisk behandling.

Det kan videre være interessant å finne ut hva som er viktig for den tilsynelatende synergieffekten. Er det viktig at cellene er oppvarmet under selve PDT-behandlingen, eller er det viktigere med varme etter lysbehandlingen mens cellene prøver å reparere skadene? Eller er begge viktig? Et annet viktig spørsmål er hvor lenge temperaturbehandlingen må vare for å gi ønsket synergieffekt. Det er med andre ord flere interessante problemstillinger å ta fatt i innenfor dette feltet.

Bibliografi

- [1] Statistisk Sentralbyrå. <http://www.ssb.no/dodsarsak/>. Lastet ned: 15.11.08.
- [2] Juarranz, A., Jaén, P., Sanz-Rodríguez, F., Cuevas, J., og González, S. *Clinical and Translational Oncology* **10**(3), 148–154 (2008).
- [3] Becker, W. M., Kleinsmith, L. J., og Hardin, J. *The world of the cell*, kapittel 19, 24. Lippincott Williams Wilkins, 6. utgave (2006).
- [4] Wikipediabrukere: MesserWoland og Szczepan1990. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Biological_cell.svg. Creative Commons attribution sharealike 2.5.
- [5] Javois, L. C. *Methods in Molecular Biology: Immunocytochemical Methods and Protocols*, kapittel 19. Humana Press Inc, 2. utgave (1999).
- [6] Roald, B. Store norske leksikon http://www.sn1.no/.sml_artikkel/nekrose. Lastet ned: 05.03.09.
- [7] Fink, S. L. og T., C. B. *Infection and immunity* **73**(4), 1907–1916 (2005).
- [8] Becker, W. M., Kleinsmith, L. J., og Hardin, J. *The world of the cell*, kapittel 14. Lippincott Williams Wilkins, 6. utgave (2006).
- [9] Roald, B. og Sauer, T. http://www.sn1.no/.sml_artikkel/kreft/1. Lastet ned: 11.05.09.
- [10] Dollinger, M., Rosenbaum, E. H., og Tempero, M. *Everyone's Guide to Cancer Therapy; How Cancer Is Diagnosed, Treated, and Managed Day to Day*. 4. utgave, (2002).
- [11] Kreftforeningen. http://www.kreftforeningen.no/vp/multimedia/archive/00000/Cellegift__113a.pdf. Lastet ned: 14.05.09.

- [12] Kampinga, H. H. *International Journal of Hyperthermia*, **22**(3), 191–196 (2006).
- [13] Roti Roti, J. L. *International journal of Hyperthermia* **24**(1), 3–15 (2008).
- [14] Kreftforeningen. <http://www.pasienthandboka.no/default.asp?mode=document&documentid=2579>, (2007). Lastet ned: 13.05.09.
- [15] Division of Occupational Health and Safety National Institutes of Health. <http://dohs.ors.od.nih.gov/pdf/2-Naphthylamine%20REVISED.pdf>. Lastet ned: 13.05.09.
- [16] Division of Occupational Health and Safety National Institutes of Health. <http://dohs.ors.od.nih.gov/pdf/Benzidine%20REVISED.pdf>. Lastet ned: 13.05.09.
- [17] Tønnesson, K. og Wahlqvist, R. Store norske leksikon http://www.snl.no/.sml_artikkel/b1%C3%A6rekreft. Lastet ned: 13.05.09.
- [18] Wæhre, H. Oncolex <http://www.oncolex.no/Urotel/PasientInfo/Blaerekreft.aspx?lg=patientinfo>, (2008). Lastet ned: 15.05.09.
- [19] Norsk elektronisk legehåndbok. <http://www.legehandboka.no>, (2008). Lastet ned: 01.01.09.
- [20] Ackroyd, R., Kelty, C., B. N., og Reed, M. *Photochemistry and Photobiology* **74**(5), 656–669 (2007).
- [21] Josefsen, L. B. og Boyle, R. W. *Metal-based drugs* **2008** (2007).
- [22] Halliwell, B. og C., G. J. M. *Biochemical journal* **219**, 1–14 (1984).
- [23] Juarranz, A., Jaén, P., Sanz-Rodríguez, F., Cuevans, J., og González, S. *Clinical & translational oncology* **10**(3), 148–154 (2008).
- [24] Peng, Q., Warloe, T., Berg, K., Moan, J., Kongshaug, M., Giercksky, K., og Nesland, J. M. *Cancer* **79**(12), 2282–2308 (1997).
- [25] de Lange Davies, C. og Stokke, B. Biophysics and medical technology, Dept. of physics, NTNU.
- [26] Roche Applied Science. *Annexin-V-FLUOS Staining Kit*, (2005). Lastet ned: 17.01.09.
- [27] Invitrogen Corporation. *Annexin V Conjugates for Apoptosis Detection*, (2005). Lastet ned: 20.06.09.
- [28] Invitrogen Corporation. *Propidium iodine nucleic acid stain*, (2006). Lastet ned: 17.01.09.

-
- [29] Invitrogen Corporation. *Vybrant Apoptosis Assay Kit 4*, (2005). Lastet ned: 11.06.09.
- [30] The Comparative Toxicogenomics Database. <http://ctd.mdibl.org/detail.go?type=chem&acc=C089813>. Lastet ned: 11.06.08.
- [31] Andersen, S. Masteroppgave 2008, NTNU.
- [32] Innovative Cell Technologies Inc. <http://www.innovativecelltech.com/accutase.html>, (1997). Lastet ned: 30.06.09.
- [33] Moan, J., Bech, Gaullier, J.-M., Stokke, T., B., S. H., Ma, L. W., og Berg, K. *Int. J. Cancer* **75**(1), 134–139 (1998).
- [34] Ingvild Kinn Ekroll. Masteroppgave 2009, NTNU.

Tillegg **A**

Instrumentinnstillinger for Annexin/PI-forsøk

Cytometer Type: BD LSR

Detectors/Amps:

Param	Detector	Voltage	AmpGain	FineGain	Laser
P1	FSC-H		8	Off	1
P2	SSC-H	899	16	Off	1
P3	FL1-H	500	Log	Off	1
P4	FL2-H	391	1	Off	1
P5	FL4-H	693	2	Off	2
P6	FL5-H	501	4	Off	2
P7	FL3-H	999	16	Off	1
P8	SSC-W	800	Log	Off	1

Threshold:

Parameter: FSC
Value: 54

Compensation:

FL1 - 0.0 % FL2
FL2 - 0.0 % FL1
FL2 - 0.0 % FL3
FL3 - 0.0 % FL2
FL4 - 0.0 % FL5
FL5 - 0.0 % FL4
FL1 - 0.0 % FL3
FL3 - 0.0 % FL1
FL1 - 1.6 % FL6
FL6 - 4.0 % FL1
FL2 - 0.0 % FL6
FL6 - 0.0 % FL2
FL3 - 0.0 % FL6
FL6 - 0.0 % FL3

Tillegg **B**

Instrumentinnstillinger for YO-PRO/PI forsøk

Cytometer Type: BD LSR

Detectors/Amps:

Param	Detector	Voltage	AmpGain	FineGain	Laser
P1	FSC-H		8	Off	1
P2	SSC-H	800	16	Off	1
P3	FL1-H	600	Log	Off	1
P4	FL2-H	390	1	Off	1
P5	FL4-H	800	Log	Off	2
P6	FL5-H	501	4	Off	2
P7	FL3-H	999	16	Off	1
P8	SSC-W	800	Log	Off	1

Threshold:

Parameter: FSC
Value: 54

Compensation:

FL1 - 0.0 % FL2
FL2 - 0.0 % FL1
FL2 - 0.0 % FL3
FL3 - 0.0 % FL2
FL4 - 0.0 % FL5
FL5 - 0.0 % FL4
FL1 - 0.0 % FL3
FL3 - 0.0 % FL1
FL1 - 1.6 % FL6
FL6 - 4.0 % FL1
FL2 - 0.0 % FL6
FL6 - 0.0 % FL2
FL3 - 0.0 % FL6
FL6 - 0.0 % FL3

Dyrking av AY-27

Denne protokollen er i helhet bygget på og en forkortet utgave av Kvalitetshåndbok for cellelab ved Institutt for fysikk, Biofysikk og medisinsk teknologi, NTNU, dokumentkode BS 504; *Dyrking av AY-27*.

AY-27 er en blærekreftcelle fra rotte som vokser i monolag festet til en overflate. Den har eksponensiell vekst med en doblingstid på et døgn.

PBS (Fosfat Buffere Saline) brukes til å vaske vekk proteiner som kan inhibere enzymet trypsin. Trypsin bryter ned de proteinene som fester cellen til overflaten av celledyrkningsflasken. Hvis cellene inkuberes for lenge med trypsin vil enzymet angripe vitale deler av cellen og kunne forårsake celledød. Medium må derfor tilsettes celle/trypsinløsningen etter inkubering. Trypsinløsningen vil da bli så fortynnet av enzymreaksjonen stopper.

Cellene må omsettes to ganger i uken med et mediumskift imellom.

1. Varm PBS, trypsin og celledyrkningsmedium til 37°C.
2. Sug av vekstmedium.
3. Tilsett 5mL PBS og vipp på flaske slik at PBSen blir jevnt fordelt.
4. Sug av PBSen og tilsett 4mL trypsin.
5. Sett flasken på varmerom (37°C) i ca. 5 minutter.
6. Vipp flasken til en ser at majoriteten av cellene er løsnet.
7. Tilsett 6mL vekstmedium.
8. Pipetter celle til en homogen løsning og overfør til et sentrifugerør. Pipetter ut en liten prøve av celle og legg i Bürkerkammer.

9. Sentrifuger cellene i 5 minutter med 1500 omdreininger per minutt mens du teller cellene i Bürkerkammeret i mikroskop.
10. Sug av supernatanten i sentrifugerøret og tilsett medium til en oppnår en konsentrasjon på 2 millioner celler per milliter.
11. Overfør 2 millioner celler til en middels dyrkningsflaske (overflate på 75cm^2) og tilsett medium til en total væske på 15 mL.
12. Inkuber i inkubatorskap på 37°C med 5% CO_2 konsentrasjon.

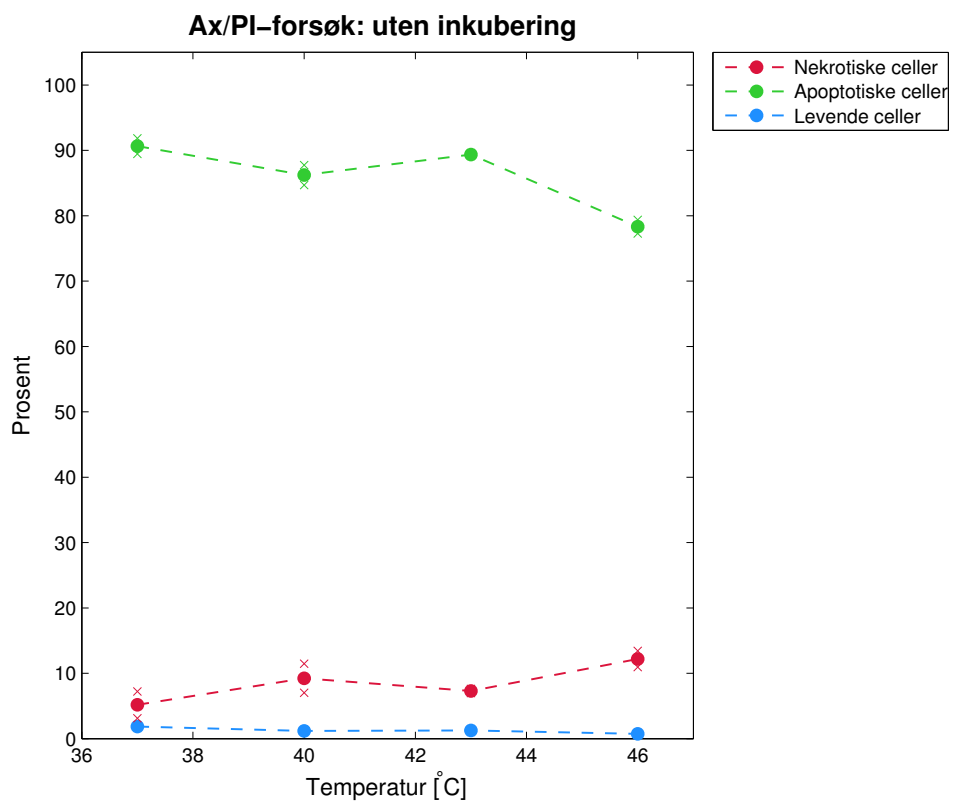
Tillegg **D**

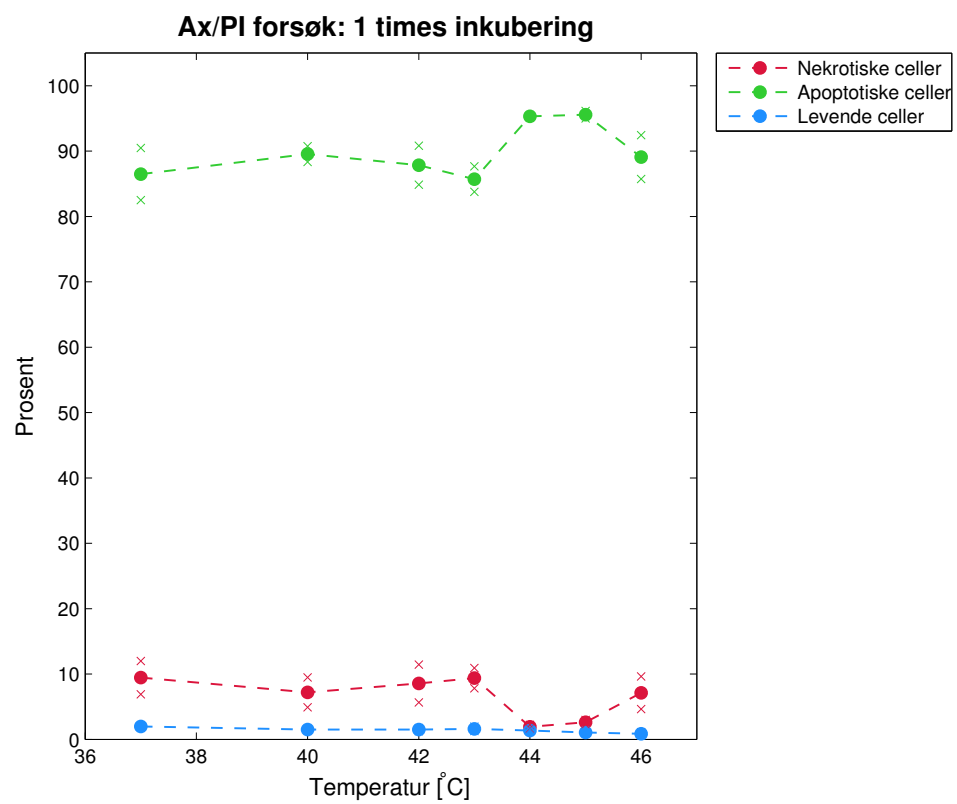
Overlevelse, apoptose og nekrose etter Annexin/PI -forsøk med ulike inkubasjonstider

Nedenfor vises overlevelseskurvene for individuelle behandlinger i forsøkene, slik at en enklere kan studere resultatene som ble presentert i kondensert form i figur 6.3 og kapittel 6.1 i hovedteksten.

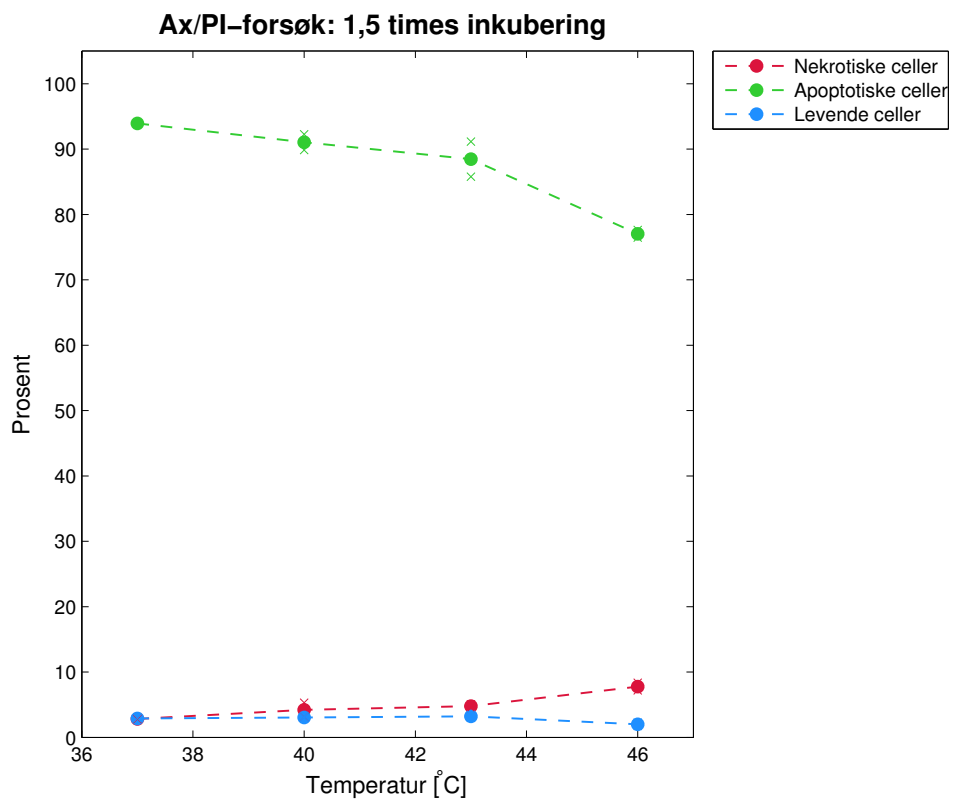
TILLEGG D. OVERLEVELSE, APOPTOSE OG NEKROSE
ETTER ANNEXIN/PI -FORSØK MED ULIKE
INKUBASJONSTIDER

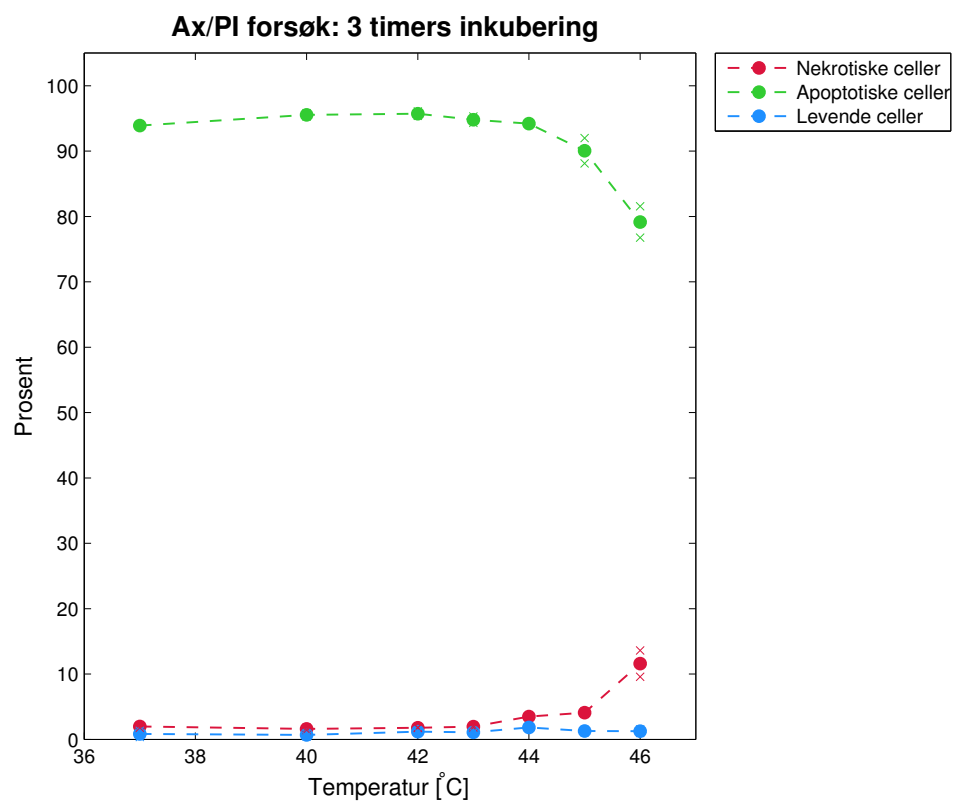
72



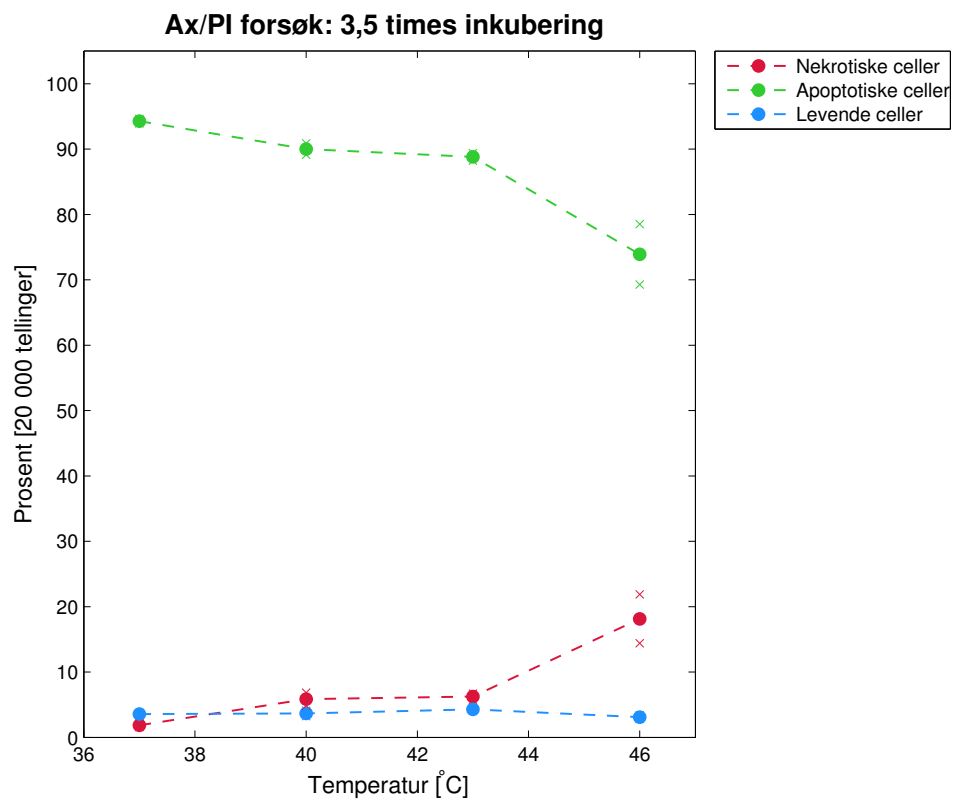


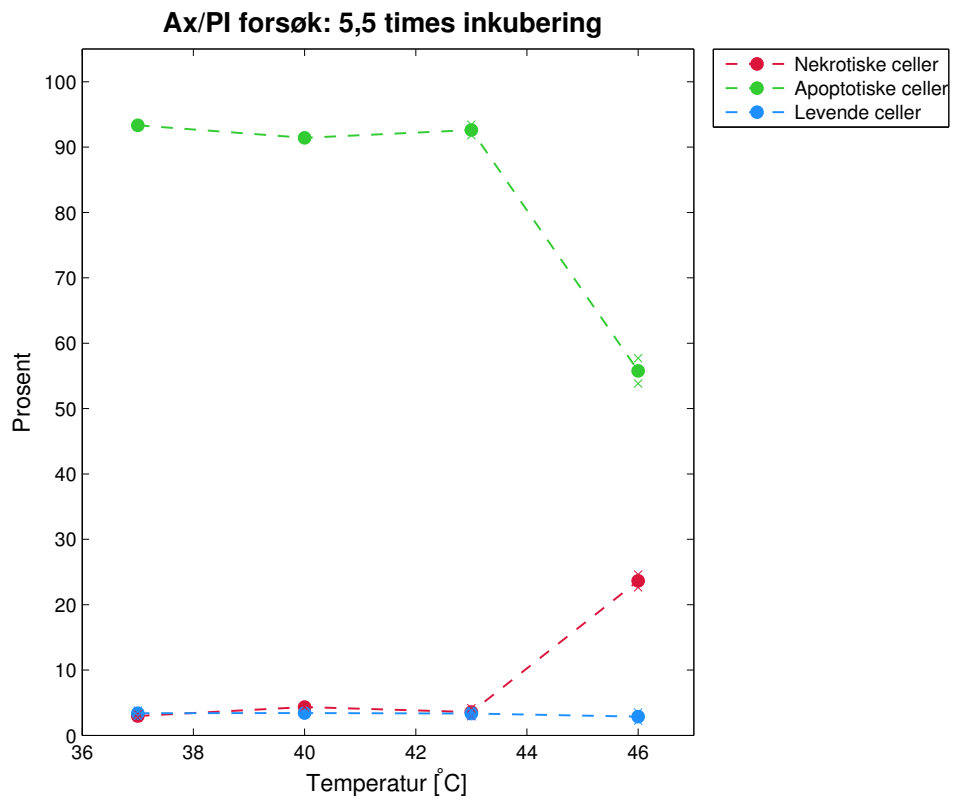
TILLEGG D. OVERLEVELSE, APOPTOSE OG NEKROSE
ETTER ANNEXIN/PI -FORSØK MED ULIKE
INKUBASJONSTIDER





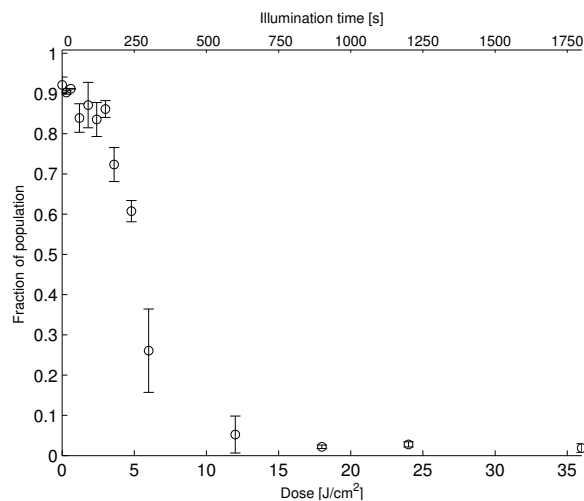
TILLEGG D. OVERLEVELSE, APOPTOSE OG NEKROSE
ETTER ANNEXIN/PI -FORSØK MED ULIKE
INKUBASJONSTIDER





Tillegg **E**

Overlevelse etter HAL-PDT-behandling som funksjon av dose



Figur E.1: Fraksjon av viable celler etter HAL-PDT-behandling ($10 \mu\text{M}$, $3,5 \text{ t}$) målt med flowcytometri der Annexin og PI er brukt for å markere viable, apoptotiske og nekrotiske celler. Middelerdier \pm standardavvik er basert på fire eksperimenter, hver med to paralleller. Adaptert fra Ingvild Kimm Ekrolls masteroppgave^[34].