

10003  
10020  
10030

## En studie av effekten dokosaheksaensyre (DHA) har på cellesyklusen til A549-celler

Bacheloroppgave i Bioteknologi  
Veileder: Gro Audveig Hagen Bjørnøy  
Mai 2021



10003

10020

10030

# **En studie av effekten dokosaheksaensyre (DHA) har på cellesyklusen til A549-celler**

Bacheloroppgave i Bioteknologi  
Veileder: Gro Audveig Hagen Bjørnøy  
Mai 2021

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet  
Fakultet for naturvitenskap  
Institutt for biologiske fag Ålesund



**NTNU**

Kunnskap for en bedre verden



## Forord

Kjære leser,

Vi er en gruppe med tre bioteknologistudenter ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU) i Ålesund, som gjennom tre år har lagt grunnlaget for gjennomføringen og skrivingen av denne bacheloroppgaven. Situasjonen rundt COVID-19 var det derimot ingen som kunne forberede oss på. Pandemien har satt sine egne begrensinger for prosjektet og har til tider gitt oss grå hår. Kontrollfrikene i oss har blitt satt på prøve og det har blitt mange omveier for å nå målet. Etter mange tidlige morgener og sene kvelder har vi likevel kommet i mål med arbeidet. Det har vært en lærerik og spennende prosess, som har bekreftet at det er dette feltet vi interesserer oss for.

Vi vil gjerne rette en stor takk til vår fantastiske veileder Gro Audveig Hagen Bjørnøy, for hennes veiledning og tilgjengelighet i tide og utide. Takk til venner og familie som har tatt seg tid til å lese og komme med tips til forbedring av oppgaven vår. Bente Alm fortjener også en takk for god hjelp med flowcytometeret.

## Sammendrag

Forskning tyder på at omega-3-fettsyrene, særlig eikosapentaensyre (EPA) og dokosaheksaensyre (DHA), har en rekke helsemessige fordeler (1). Interessen for å undersøke effekten omega-3 kan ha på kreft har økt de siste årene, da ulike studier har vist at fettsyrene påvirker cellevekst og følsomhet i enkelte typer kreft (1, 2). Potensielt kan disse fettsyrene ta del i nye behandlingsformer som selektivt dreper kreftceller, i motsetning til konvensjonell behandling (3). I denne studien ble lungekreftcellene A549 brukt for å studere endringer i cellesyklus hos celler eksponert for DHA.

Cellene ble eksponert for ulike konsentrasjoner DHA og inkubert i 24 timer ved 37 °C og 5 % CO<sub>2</sub> atmosfære. Forsøket ble gjennomført i tre delforsøk. Hvert delforsøk besto av to cellebrett med celler eksponert for henholdsvis 40 og 60 µg/ml DHA med tilhørende kontroller. For å undersøke om DHA har noen effekt på celleproliferasjonen til A549-cellene, ble cellesyklusen analysert ved hjelp av flowcytometer. Prosentandelen celler i hver cellesyklusfase i oljeprøvene ble kartlagt for å se om det hadde skjedd noen opphopning i syklusen som kunne tyde på en cellesyklusarrest. Sammenligningen av resultatene fra oljeprøvene og kontrollene viser en økt prosentandel celler i G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen for celler eksponert for 40 µg/ml DHA, og en vesentlig større økning for cellene eksponert for 60 µg/ml DHA. Dette tyder på at DHA kan ha en økt hemmende effekt på celleproliferasjonen med økende konsentrasjoner.

## Abstract

Research has shown that omega3 fatty acids, especially eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), may have numerous health benefits (1). The interest in investigating how omega-3 may affect cancer has increased in recent years, as various studies have shown that these fatty acids affect cell growth and sensitivity in certain types of cancer (1, 2). Potentially these fatty acids may be part of new therapies in which cancerous cells are targeted selectively, as opposed to conventional therapies that act more globally on the organism (3). In this study, the A549 lung cancer cells were used to study cell cycle changes in cells exposed to DHA.

The cells were exposed to different concentrations of DHA and incubated for 24 hours at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub> atmosphere. The experiment was divided in three sub-experiments. Each sub-experiment consisted of two cell culture plates with cells exposed to respectively 40 and 60 µg/ml DHA, and controls. To see if DHA has any effect on A549 cell proliferation, the cell cycle was analyzed by a flow cytometer. The percentage of cells in each phase were mapped to see if there had been any accumulation in the cycle that may indicate a cell cycle arrest. The comparison of the results from the oil samples and the controls shows an increased percentage of cells in the G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> phase for those exposed to 40 µg/ml DHA and a significant increase for the cells exposed to 60 µg/ml DHA. The results may indicate that DHA has an increased inhibitory effect on cell proliferation with an increasing concentration.

## Innholdsfortegnelse

<b>Terminologi og forkortelser .....</b>	<b>1</b>
<b>Begrensinger .....</b>	<b>2</b>
<b>1 Introduksjon .....</b>	<b>3</b>
<b>2 Teori .....</b>	<b>5</b>
2.1 <i>Cellesyklus</i> .....	5
2.1.1 <i>Interfase</i> .....	5
2.1.2 <i>M-fase</i> .....	6
2.1.3 <i>Cellesyklus-kontrollsystem</i> .....	6
2.1.4 <i>Cellesyklus-arrest og apoptose</i> .....	7
2.1.5 <i>Utvikling av kreftceller</i> .....	8
2.2 <i>Omega 3-fettsyrer</i> .....	8
2.3 <i>Flowcytometri</i> .....	9
2.4 <i>A549-celler</i> .....	11
<b>3 Material og metode .....</b>	<b>13</b>
3.1 <i>Cellekultivering</i> .....	13
3.2 <i>Tillaging av oljemedium</i> .....	14
3.3 <i>Preparering av cellebrett og tilsetting av oljemedium</i> .....	14
3.4 <i>Analyse av cellesyklus på BD Accuri C6 Flowcytometer</i> .....	14
3.4.1 <i>Fiksering og preparering av prøvemateriale</i> .....	15
3.4.2 <i>Kalibrering av flowcytometer</i> .....	16
3.4.3 <i>Analyse på flowcytometer</i> .....	17
3.4.4 <i>Statistiske utregninger av data</i> .....	17
<b>4 Resultat .....</b>	<b>19</b>
4.1 <i>G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen</i> .....	19
4.2 <i>S-fasen</i> .....	21
4.3 <i>G<sub>2</sub>/M-fasen</i> .....	22



4.4 Statistisk utregning av innsamlet data .....	23
4.4.1 Uavhengig t-test for å studere ulikhet mellom 40 µg/ml DHA i de ulike delforsøkene.....	23
4.4.2 Uavhengig t-test for å studere likhet mellom 60 µg/ml DHA i de ulike delforsøkene .....	23
4.4.3 Uavhengig t-test for å studere ulikheter mellom celler eksponert for 40 µg/ml DHA og kontroll i de ulike delforsøkene .....	24
4.4.4 Uavhengig t-test for å studere ulikheter mellom celler eksponert for 60 µg/ml DHA og kontroll i de ulike delforsøkene .....	24
4.4.5 Uavhengig t-test for å studere ulikheter mellom celler eksponert for 40 µg/ml DHA og 60 µg/ml DHA i de ulike delforsøkene .....	25
<b>5 Diskusjon .....</b>	<b>26</b>
5.1 Cellekultivering.....	26
5.2 Initiering av forsøk.....	27
5.3 Fiksering, preparering og analyse av prøvemateriale.....	27
5.4 Analyse av cellesyklus .....	28
5.4.1 Uavhengig t-test for å studere ulikheter mellom 40 µg/ml i de ulike delforsøkene.	29
5.4.2 Uavhengig t-test for å studere ulikheter mellom 60 µg/ml i de ulike delforsøkene.	29
5.4.4 Uavhengig t-test for å studere ulikheter mellom celler eksponert for 60 µg/ml DHA og kontroll i de ulike delforsøkene .....	31
5.4.5 Uavhengig t-test for å studere ulikheter mellom celler eksponert for 40 µg/ml DHA og 60 µg/ml DHA i de ulike delforsøkene .....	31
5.4.6 Drøfting av resultat og videre forskning .....	32
<b>6 Konklusjon.....</b>	<b>34</b>
<b>7 Litteratur .....</b>	<b>35</b>
<b>A.0 Vedlegg.....</b>	<b>40</b>
A.1 Reagenser.....	40
A.2 Prosedyrer .....	41
A.2.1 Rutiner på cellelaboratorium.....	41

A.2.2 Cellekultivering .....	43
A.2.3 Fiksering og preparering av prøvemateriale .....	44
A.2.4 Kalibrering av flowcytometer .....	45
A.2.5 Analyse på Flow Cytometer .....	46
A.3 A549-celler.....	47
A.4 Utsnitt av rute i Bürker tellekammer .....	47
A.5 Utklipp av histogram fra analyse på flowcytometer.....	48
A.6 Prosentandel celler i de ulike fasene .....	49
A.7 Resultater fra utførte t-tester .....	52
A.7.1 Resultat fra utført t-test for å studere forskjellen mellom 40 µg/ml i de ulike delforsøkene.....	52
A.7.2 Resultat fra utført t-test for å studere forskjellen mellom 60 µg/ml i de ulike delforsøkene.....	53
A.7.3 Resultat fra utført t-test for å studere forskjellen i delforsøk 1-3, mellom prøver tilsatt 40 µg/ml DHA og kontroll.....	54
A.7.4 Resultat fra utført t-test for å studere forskjellen i delforsøk 1-3, mellom prøver tilsatt 60 µg/ml DHA og kontroll.....	55
A.7.5 Resultat fra utført t-test for å studere forskjellen i delforsøk 1-3, mellom prøver tilsatt 40 µg/ml DHA og 60 µg/ml DHA.....	56
A.8 Trend over andelen celler i de ulike fasene .....	57

## Terminologi og forkortelser

Antineoplastisk middel	Tumorhemmende middel som motvirker kreft (4).
Apoptose	Programmert celledød (5).
A549	Adenokarinomiske humane alveolare basale epitelceller
Cdk	Syklinavhengige kinaser
Cellesyklusarrest	Stopp-punkt i cellesyklusen hos celler (6).
DHA	Docosahexaenoic syre
Ekspensiell fase	Fase hvor celler vokser eksponensielt med tiden (7).
EPA	Eicosapentaenoic syre
Fluorescens	Lys som blir sendt ut fra et eksitert molekyl (8).
<i>In vitro</i>	Ekspesimenter i reagensglass, utenfor organismen (9).
Konfluens	Prosentandel av overflate som er dekket av et monolag med celler (10).
Mitogener	Kjemisk stoff som gir signal om at en celle skal dele seg (11).
Mutasjon	En varig endring i arvestoffet, DNAet (12).
Proliferasjon	Økning i antall celler på grunn av cellevekst (13).

## Begrensinger

### *COVID-19*

Strengt smitteverntiltak og tidspress på laboratoriet grunnet COVID-19, gjorde at forsøket måtte begrenses. Planen var i utgangspunktet å undersøke cellesyklus på flowcytometer, i tillegg til en komparativ metode. Usikkerheten rundt situasjonen gjorde derimot at vi måtte ekskludere den komparative metoden og begrense omfanget av flowcytometer-analysen. Oppgaven er dermed mindre omfattende enn planlagt.

### *Uforutsette hendelser*

Grunnet lengre leveringstid på DHA enn beregnet, ble oppstarten av forsøket forskjøvet innledningsvis. Da opplæring i bruk av flowcytometeret skulle starte, ble det oppdaget at det manglet ulike reagenser til instrumentet. Disse måtte også bestilles og forskjøvet forsøket ytterligere en uke. Uken etter var flowcytometeret reservert til undervisning. Underveis i undervisningen oppdaget underviser feil på instrumentet. Alle disse faktorene førte til at forsøket samlet ble utsatt tre uker.

Disse begrensingene tatt i betraktning ble følgende problemstilling formulert: «*En studie av effekten dokosaheksaensyre (DHA) har på cellesyklusen til A549-celler*».

# 1 Introduksjon

Kreft rangeres som en av de hyppigste dødsårsakene i verden. Samlet sett synes det som om forekomsten og dødeligheten stadig stiger (14). Tall fra rapporten Global Cancer Statistics 2020 (14) utgitt i 2021, viser at omtrent 19,3 millioner mennesker ble diagnostisert med kreft i 2020 og at nærmere 10 millioner døde som følge av sykdommen (14). Ordet «kreft» brukes i dagligtale som en samlebetegnelse på alle de ulike typer kreftsykdommer som kan ramme et individ (15).

Lungekreft er en av krefttypene med høyest insidens på verdensbasis. I 2020 ble hele 2,2 millioner mennesker diagnostisert med denne kreftformen. I tillegg til å ha en høy forekomst, er lungekreft også den typen kreft som har høyest dødelighet. I 2020 døde ca. 1,8 millioner personer av denne kreftformen (14). Forekomsten av lungekreft er også relativt høy i Norge (16). I 2019 ble i overkant 3 300 mennesker diagnostisert med denne krefttypen (17). Kreftformen medfører således både store menneskelige belastninger for alle dem som rammes, samtidig som den også medfører høye økonomiske omkostninger for samfunnet (18).

Den høye dødeligheten blant lungekreftpasienter skyldes at sykdommen ofte oppdages så sent at pasienter kun kan tilbys lindrende, palliativ, behandling (19). I de tilfellene hvor kreften er på et tidlig stadium, og målet er å kurere pasienten, bruker man kurativ behandling (20). Kurativ behandling for lungekreft dreier seg hovedsakelig om kirurgi, stråling og medikamenter (19). De kreftpasientene som får denne typen behandling har større sannsynlighet for å overleve. Risikoen for alvorlige bivirkninger og senskader etter kurativ behandling er derimot stor (21, 22).

Epidemiologiske studier har gitt oss grunn til å tro at et sunt kosthold kan virke inn på både forebygging og behandling av lungekreft (1, 2). Gjennom fisk og sjømat får vi blant annet i oss omega-3-fettsyrene EPA og DHA, som har vist seg å ha effekt på kreftceller (1). *In vitro*-forsøk som er gjort med lungekreftceller antyder at disse fettsyrene kan påvirke cellenes livssyklus, proliferasjon og deres evne til å indusere apoptose (2).

I denne oppgaven skal vi se på om omega-3-fettsyren DHA har noen hemmende effekt på celleproliferasjonen til lungekreftcellene A549. *In vitro* skal disse cellene eksponeres for ulike konsentrasjoner av DHA over et gitt tidsrom. For å se på effekten dette har på cellesyklusen, skal det utføres en cellesyklusanalyse på flowcytometer. Vi vil først presentere relevant teori. Materialer og metoder som ble brukt under selve forsøket blir deretter beskrevet, før resultatene

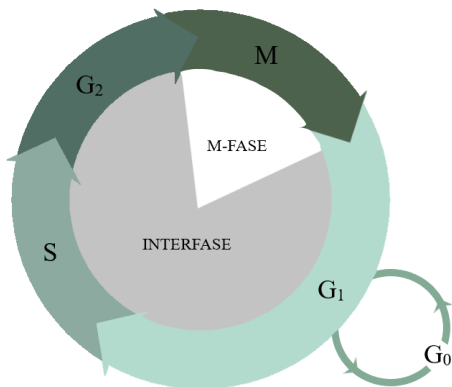
blir presentert og deretter drøftet i en diskusjonsdel. Til slutt trekkes en konklusjon, etterfulgt av litteraturliste og vedlegg.

## 2 Teori

I denne delen av oppgaven presenteres relevant teori for forsøket. Her skal cellyklusen og dens kontrollmekanismer forklares nærmere, samt apoptosemekanismen og kreftutvikling. Deretter legges teorien for omega-3-fettsyrer, flowcytometri og A549-cellene fram.

### 2.1 Cellyklus

Cellyklusen er en av de mest grunnleggende prosessene en celle går gjennom. Dette er prosessen hvor en celle deler seg og blir til to identiske datterceller, som inneholder nøyaktig det samme genetiske materialet. Eukaryote celler har en cellyklus bestående av en interfase og en mitosefase, M-fasen. Interfasen deles videre inn i tre underfaser  $G_1$ -, S- og  $G_2$ -fasen. Cellene har i tillegg et cellyklus-kontrollsystem som kontrollerer og sørger for at prosessen blir korrekt utført (23).



**Figur 1:** Grafisk fremstilling av cellyklus og de fire tilhørende fasene;  $G_1$ -, S- og  $G_2$ - og M-fasen. De tre førstnevnte fasene utgjør interfase. Her vokser cellene og gjør seg klar for delingen som skjer i M-fasen. Etter celledelingen vil cellene enten starte en ny cellyklus, eller gå over i en hviletilstand i  $G_0$ . Figuren er basert på (23), boka *Essential cell biology* sin figur av cellyklusen.

#### 2.1.1 Interfase

En celle befinner seg vanligvis i interfase i opptil 90% av den totale tiden en syklus tar (24). Dette er fasen hvor cellene vokser og gjør seg klare til å dele seg. I den første fasen,  $G_1$ , mottar cellen både intra- og ekstracellulære signaler. Disse gir informasjon om cellens størrelse og

miljøet rundt cellen. Ut fra disse signalene vurderer et kontrollsystem om cellen skal forbli i G<sub>1</sub>-fasen eller gå videre inn i S-fasen. Dersom cellen ikke får klarsignal til å gå over i neste fase, holdes den i G<sub>1</sub>-fasen og kan eventuelt gå over i en hviletilstand, G<sub>0</sub>. Hvor lenge cellen blir værende i G<sub>0</sub>-fasen, kan variere fra noen dager til måneder. Enkelte celler kan bli værende i denne fasen livet ut. Cellen er avhengig av ekstracellulære stimuli fra mitogener for å komme seg ut av G<sub>0</sub>. Når cellen er over i S-fasen, kopieres cellens genetiske materiale. I interfases siste fase, G<sub>2</sub>, forbereder cellen seg på å starte selve celledelingen i M-fasen. G<sub>2</sub> har en rekke reguleringer og kontroller som sørger for at cellen er helt klar og at DNA-replikasjonen er fullført (23, 25).

### *2.1.2 M-fase*

Selve delingen av en celle til to datterceller skjer i M-fasen, i mitosen og cytokinesen. Mitosen deles inn i fem trinn; profase, prometafase, metafase, anafase og telofase. I disse trinnene kopieres DNAet og de andre cellekomponentene skilles fra hverandre. Til slutt deles cellen fullstendig i cytokinesen. Resultatet blir to identiske datterceller, som indikerer slutten på syklusen. Disse cellene går så over i G<sub>1</sub> og starter syklusen på nytt (23).

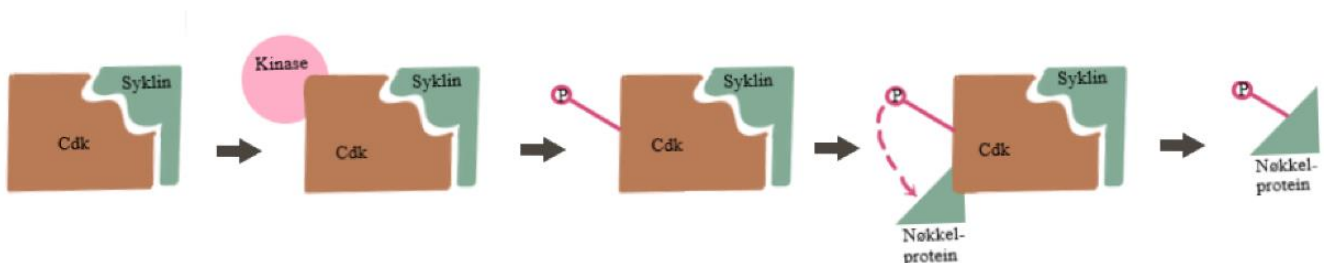
### *2.1.3 Cellesyklus-kontrollsystem*

Progresjonen gjennom fasene som en celle må gjennom før den kan dele seg, er nøye regulert av cellesyklusens kontrollsystem (24). I syklusen til en eukaryot celle er det en rekke sjekkpunkter som enten fremmer eller hindrer progresjon. Dette skjer ved positiv eller negativ regulering, avhengig av hvilken tilstand cellen er i (26). Det er to typer molekyler som i hovedsak driver cellen gjennom syklusen; sykliner og syklinavhengige kinaser (Cdk) (26, 27).

Sykliner er regulatoriske proteiner som har varierende konsentrasjon gjennom cellesyklusen, mens nivået av Cdk er relativt stabilt gjennom cellesyklusen (26). Cdk aktiveres ved binding til sykliner kun i de fasene hvor de regulerer en prosess. Én type sykliner bindes kun til én type Cdk (23). Aktiverte syklin-Cdk-komplekser vil fosforylere og dermed aktivere viktige nøkkelproteiner som er nødvendige for å få cellen videre i syklusen (23, 26). For eksempel vil aktivering av syklin E-Cdk2 aktivere et nøkkelprotein som muliggjør transkripsjonen av gener som trengs for å entre S-fasen (24, 27).



Syklinene er de primære regulatoriske molekylene som skyver cellene videre i syklusen (26). I tillegg til disse har vi andre molekyler som også regulerer progresjonen; inhibitorer (CdkI), kinaser og fosfataser (23, 24). Gjennom syklusens signaliseringssystem, mottar disse molekylene signaler om å aktivere eller inaktivere Cdk og syklin-Cdk-kompleksene (23). Hvis syklusens sjekkpunkter oppdager avvik ved cellene eller ufullstendige cellesyklus-trinn, sendes det signaler om dette. Molekylene vil da inhibere Cdk og cellene settes i cellesyklus-arrest (23, 27).



**Figur 2:** Grafisk fremstilling av hvordan et syklin-Cdk-kompleks dannes og aktiverer andre nøkkelprotein ved fosforylering og defosforylering. Cdk er avhengig av binding til syklin for å bli aktivert. Først når en kinase fosforylerer syklin-Cdk-komplekset vil det være fullstendig aktivert. Deretter kan komplekset defosforyleres og på den måten fosforylere det ønskede nøkkelproteinet. Figuren er basert på (26), OpenStax figur 10.12.

#### 2.1.4 Cellesyklus-arrest og apoptose

En cellesyklus-arrest er en midlertidig stopp i cellesyklusen ved et sjekkpunkt (6). Denne mekanismen blir utløst som en respons på at noe i eller ved cellen er galt. Om det skjer feil ved sjekkpunktene og cellen ikke holdes i arrest, kan det ha store konsekvenser for cellen og potensielt hele organismen (28). Disse feilene kan føre til kromosomskader og genmutasjoner, og gi opphav til tumordannelse i kroppen. Det er derfor viktig at cellesyklus-arrest-mekanismen fungerer som den skal og holder syklusen i arrest helt til feilene er rettet opp. Om feilene ikke kan rettes opp, kan cellen få signaler om å gjennomgå programmert celledød, apoptose (28).

Apoptose er cellenes mekanisme for å eliminere unødvendige- eller uønskede celler (29). Det er to ulike signalveier som kan føre til apoptose; indre- og ytre vei. Signalveiene aktiveres av henholdsvis intra- og ekstracellulære signaler (29). Disse signalene vil aktivere en familie av proteaser, kalt caspaser (23). Det er to hovedtyper caspaser; en type som kløyver cellen og en

type som kutter målproteiner inne i cellen, som til slutt fører til at den dør (23, 29). Disse mekanismene er nøye regulert og aktiveres kun hvis det blir gitt signal om det (29).

### 2.1.5 Utvikling av kreftceller

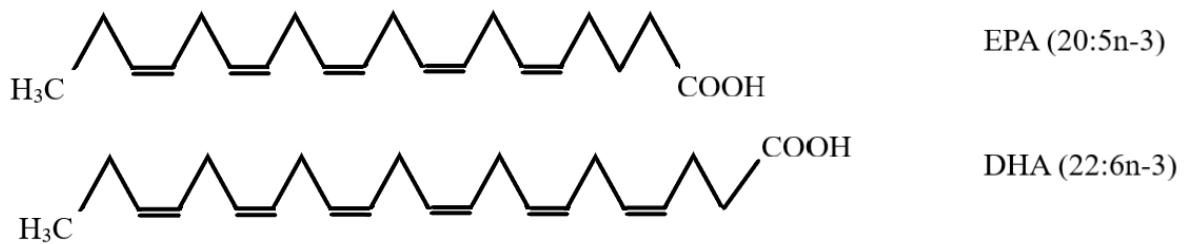
Kreft er fundamentalt en genetisk sykdom som oppstår som en konsekvens av forandringer i informasjonen som bæres i DNA (23). Disse forandringene gir oss hovedkjennetegnene til alle typer kreftceller; den ukontrollerte veksten, angiogenese og evnen til å unngå apoptose (29). Vi har to klasser av gen som knyttes til utviklingen av kreftceller; onkogener og tumor supressor-gener. Tumor supressor-genene, for eksempel RB og p53, sine oppgaver er primært å kontrollere cellevekst. Onkogener er derimot gener som fører til ukontrollert celledeling (30).

På grunn av inhibering eller mutasjoner av tumor supressor-genene og overekspressjon av onkogener, kan kreftceller miste mange av de inhibitoriske sjekkpunktene i cellyklusen (23, 24). Disse endringene vil for eksempel kunne gi en økt konsentrasjon av syklin-Cdk eller inaktiverte CdkI, som forstyrrer en normal regulering av cellyklusen (24, 27). Cellene vil på denne måten dele seg ukontrollert, noe som kan gi opphav til flere genetisk ustabile celler (27).

Genetisk ustabilitet hos celler gjør dem utsatt for å akkumulere mutasjoner i gener som kan ligge til grunn for utvikling av kreft (31). I 50% av tilfellene av human kreft, finner man mutasjoner i p53-genet (23). Dette tumor supressor-genet koder for et protein som finnes i lave konsentrasjoner i friske celler (31, 32). Dersom det oppstår feil i cellen, øker konsentrasjonen av p53. Denne økningen fører til cellyklus-arrest eller apoptose. Om det skjer mutasjoner i dette genet vil ikke celler med feil stoppes, men ha muligheten til å dele og spre seg ukontrollert (31).

## 2.2 Omega 3-fettsyrer

Omega 3-fettsyrer er en type flerumettet fett som finnes i sjømat og planter. Marine lipider har vist seg å være gode kilder til PUFA, *polyunsaturated fatty acid*, særlig omega 3-fettsyrene eikosapentaensyre (EPA) og dokosaheksaensyre (DHA) (33). Fra planter får vi alfa-linolenisyre (ALA). Denne syren kan kroppen omdanne til EPA og DHA, men dette er en lite effektiv prosess. Det er derfor nødvendig for kroppen å få tilført tilstrekkelige mengder gjennom fisk og fiskeoljeprodukter (34).



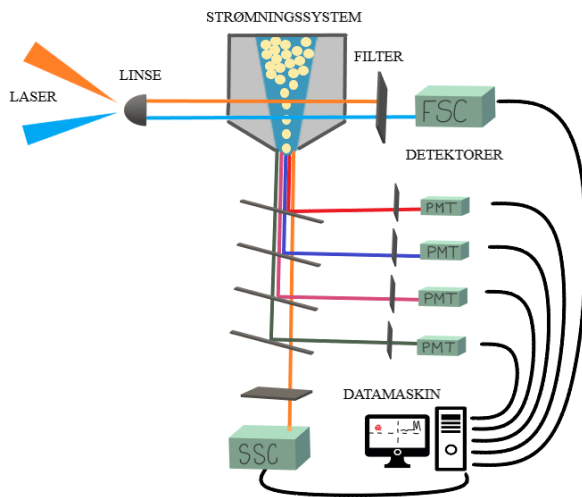
**Figur 3:** Strukturformelen til EPA og DHA. Det som kjennetegner omega 3-fettsyrer er at de er flerumettede. Det vil si at de har to eller flere dobbeltbindinger, og at alle har første dobbeltbinding ved karbon nummer tre fra metylenden. Figuren er basert på (35) Olsen, RL. sin figur.

Flerumettede fettsyrer finnes flere steder i kroppen og er svært viktig i flere fysiologiske celledfunksjoner. DHA og EPA er komponenter i fosfolipid som bygger opp cellemembranene. Fettsyrene påvirker også celledsignaleringen, genuttrykk og cellevekst (34). DHA finnes i store mengder i hjernen og netthinnen. Flere studier har vist at disse omega-3 fettsyrene har positiv effekt på fosterutvikling og kan redusere faren for Alzheimers sykdom og hjerte- og karsykdommer etc. (36, 37). Forskning viser at n-3 PUFA kan ha en antineoplastisk effekt og indusere apoptose i kreftceller. Fettsyrene virker enten alene eller i kombinasjon med konvensjonell behandling, som for eksempel cellegift og stråling. Effekten av disse behandlingsformene kan potensielt forbedres av omega-3-fettsyrer ved at de øker følsomheten til kreftcellene. En mulig fordel ved å utnytte disse fettsyrene, kontra tradisjonelle terapier, er at de virker å ha en selektiv cytotoxiskitet mot kreftceller. Dette medfører også at behandlingen har lite eller ingen skadelig effekt på friske celler (3).

### 2.3 Flowcytometri

Flowcytometri er en teknologi som analyserer celler i løsnning. Et flowcytometer består av et strømningsystem, optisk system og elektronisk system. Cellene føres enkeltvis forbi en laserstråle. Når lyset treffer en celle, spres det i alle retninger. Lysspredningen blir målt av ulike detektorer. Lyset som blir spredt framover med en vinkel på 0,5-10° kalles *forward scatter* (FSC) og sier noe om størrelsen på cellen (38, 39). I motsetning til FSC blir *side scatter* (SSC) målt ved 90° og indikerer både den indre kompleksiteten og granulariteten til cellene. Når cellene har gått gjennom strømningsystemet og det optiske systemet, går det videre til et

elektronisk system. Her blir signalene omgjort til digitale data som blir uttrykt i plot eller histogrammer (40).



**Figur 4:** Forenklet grafisk fremstilling av oppbyggingen til et flowcytometer. En og en celle blir tatt opp i systemet og utsettes for laserstråler. Cellene bryter laserstrålene slik at de spres i ulike retninger. Disse strålene går gjennom filter som filtrerer etter spesifikke bølgelengder. Det lyset som slipper gjennom filteret, detekteres av ulike detektorer; FSC, SSC og PMT. Detektoren omdanner disse signalene til digitale data, som gjør det mulig å tolke resultatet på datamaskin i form av plot og histogrammer. Figuren er basert på (38) boken *Critical Reviews in Biotechnology*.

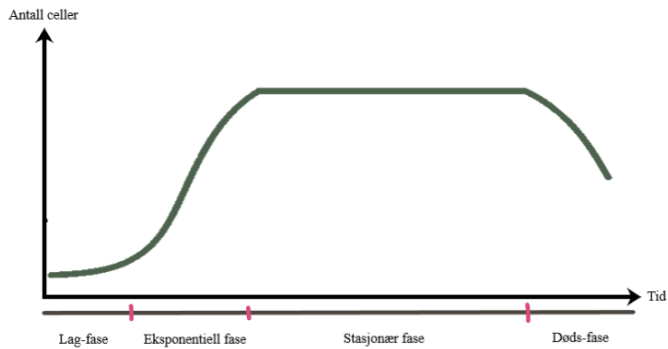
Cellefiksering og farging av det cellulære genomet er nødvendige trinn før analysen med flowcytometer. Når man fikserer cellene, sørger man for å holde cellene i stasis ved et bestemt tidspunkt (41). Slik forblir cellene uforandret før analysen er gjennomført. Ved fikseringen blir cellene behandlet på en måte som gjør cellemembranen semipermeabel. Dette gjør at det fluorescerende fargestoffet propidiumjodid/RNase (PI/RNase) klarer å trenge gjennom (41). Fargestoffet PI binder seg til både DNA og RNA, men siden fargeløsningen er tilsatt RNase, vil alt RNA bli degradert. På denne måten får man farget kun dobbeltrådet DNA. For å binde seg til DNAet interkalerer PI/RNase mellom basene med liten eller ingen sekvenspreferanse (42). Mengden DNA i cellene avgjør hvor mye PI som bindes til. Dette gjør at intensiteten til fluorescensen som avgis når laserstrålene i flowcytometeret treffer cellene, er sterkere for celler med høyt DNA-innhold enn de med lavt (43). Gjennom cellesyklusen varierer mengden DNA i cellene. I for eksempel G<sub>2</sub>-fasen, før celledelingen, har cellene dobbelt opp med DNA og intensiteten blir sterkere enn i G<sub>1</sub>- og S-fasen (43).

Fluorescensen som avgis går gjennom det optiske systemet, bestående av ulike optiske filtre og detektorer. Filtrene skiller ut de aktuelle bølglengdene for målingen og detektoren samler fotonene av lys. Detektorene, PMTene, konverterer så disse fotonene til elektriske impulser, som deretter omgjøres til et numerisk signal. Disse verdiene fremstilles i ulike diagram på datamaskinen, for eksempel histogram. For å eliminere resultater fra uønskede partikler, slik som døde celler, velges bestemte parametere som definerer en *gate*. Hvor man velger å plassere *gaten*, avgjør hvilket område man henter ut resultatene dine fra. Resultatet gir en oversikt over det prosentvise antallet celler i hver fase av cellyklusen (38, 44).

## 2.4 A549-celler

A549-cellene er humane alveolære basale epitelceller. Ved fjerning og dyrking av lungekreftvev fra en 58 år gammel europeisk mann, utviklet Giard *et al.* i 1972 A549-cellelinjen. *In vitro* vokser disse cellene adherent. Det vil si at de vokser sammen som et monolag på en kunstig overflate ved hjelp av overflateproteiner (45, 46). For å dyrke disse cellene kan man ta i bruk Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12) (45, 47). Mediet forsyner cellene med næringsstoffer, blant annet glukose, aminosyrer og vitaminer. I tillegg inneholder DMEM/F-12 GlutaMAX, som sørger for å begrense dannelsen av toksisk ammonium og Phenol Red, som er et pH-indikerende fargestoff (47, 48). For å unngå vekst av uønskede organismer i mediet, tilsettes penicillin, for eksempel Penicillin Streptomycin (Pen Strep) (45). Mediet mangler proteiner, lipider og vekstfaktorer, og det kan derfor være nødvendig å tilsette disse. Dette kan for eksempel gjøres med Fetal Bovine Serum (FBS). For at mediet skal opprettholde sin fysiologiske pH, må inkubasjon skje i 5% CO<sub>2</sub> og 37°C atmosfære (47).

Siden A549-cellene vokser adherent, ønsker de ikke å vokse for tett. Når hele overflatearealet i den aktuelle beholderen er dekket med celler, begynner de å vokse i høyden. Slik vil næringstilgangen bli redusert for de cellene som ikke lenger er i direkte kontakt med mediet. Det er derfor viktig å splitte cellene i eksponensiell fase, cirka ved 70-80 % konfluens. På denne måten unngår man at cellene påvirkes av andre faktorer enn av dem man ønsker å undersøke (49, 50).



**Figur 5:** Grafisk fremstilling av vekstkurven til en normal cellekultur. Vekstkurven består av fire faser; lag-fase, eksponentiell fase, stasjonær fase og døds-fase. I lag-fasen bruker cellene tid på å tilpasse og feste seg til overflaten. Her skjer det ingen celledeling. I den eksponentielle fasen vokser cellene hyppig under optimale forhold. Celledelingen avtar gradvis i overgangen mot stasjonær fase. Her begynner tilgangen til næring å begrense seg og det er like mange celler som deler seg, som dør. I døds-fasen er all næringen brukt opp og cellene dør (49, 50). Figuren er basert på (50) Leica Microsystems, sin figur av vekstkurve til celler.

### 3 Material og metode

I material og metode fremlegges utførelsen av de ulike trinnene i prosedyrene. Dette omfatter trinnene fra cellekultivering til statistisk utregning av resultat fra analysen.

#### 3.1 Cellekultivering

A549-cellene (*ATTC, a.nr. ATCC CCL-185*) ble dyrket i celleflasker på 75 cm<sup>2</sup> i DMEM (*Gibco, a.nr. 10565-018*) med 10% fetal bovine serum (*Gibco, a.nr. A3840401*) og penicillin-streptomycin (*Gibco, a.nr. 15140-148, 10,000 units/mL penicillin og 10,000 µg/mL streptomycin*). Flaskene ble satt i inkubatorskap ved 37°C og 5 % CO<sub>2</sub> atmosfære. Prosedyren *Cellekultivering* (vedlegg A.2.2), beskriver trinnene som inngår ved dyrking og splitting av A549-cellene.

Cellene ble studert ved hjelp av et invert mikroskop og konfluensen ble anslått. Ved en konfluens på 70-80 % antok man at cellene var i eksponensiell vekst og dermed kunne splittes eller analyseres videre. Arbeidet ble gjort aseptisk i en LAF-benk. Gammelt medium ble sugd av og cellene ble vasket to ganger med 5 ml HBSS (*HyClone, a.nr. SH30588.02*). 1 ml 0.25 % trypsin (*Gibco, a.nr. 25200-056*) ble tilsatt for å løsne cellene fra celleflasken. Trypsineringen ble nøye fulgt med i et invert mikroskop. Da 70-80 % av cellene hadde løsnet ble det tilsatt 5 ml medium for å inaktivere trypsinet. Innholdet i celleflasken ble overført til et 50 ml falconrør (*Falcon, a.nr. 352070*) og sentrifugert på 1200 rpm i tre minutter. Supernatanten ble sugd forsiktig av, slik at cellepelleten ikke ble ødelagt. For å resuspendere cellepelleten ble 1 ml medium tilsatt. Ytterligere x ml medium ble tilsatt, alt etter hvor mange ml suspensjon som skulle overføres til nye celleflasker. Mengden cellesuspensjon i forhold til mengden medium ble tilpasset etter forholdene. Ved splitting av én celleflaske til to nye som skulle splittes på nytt etter to døgn, ble det brukt 1 ml cellesuspensjon og 19 ml DMEM. Flaskene ble så satt i inkubatorskapet.

A549-cellene kom frosset på -270°C til NTNU. Disse ble deretter kultivert og splittet fem ganger før oppstarten av forsøket, fra p-0 til p-05. Antallet passasjer ble regnet fra de ble kultivert fra frosset tilstand. Fra oppstart med optimalisering og til selve gjennomføringen av forsøket, ble cellene totalt splittet 13 ganger, fra p-05 til p-18.

### 3.2 Tillaging av oljemedium

A549-cellene skulle eksponeres for ulike konsentrasjoner av DHA i mediet. For å lage dette oljemediet ble mengden medium i forhold til olje regnet ut ved bruk av formel 1.

**Formel 1:**  $C1 \times V1 = C2 \times V2$

Beholderen med cis-4, 7, 10, 13, 16, 19-DHA-fettsyrer (*Sigma-Aldrich, a.nr. 53171*) inneholdt 10 mg. Ved uttak av oljen før fortytning gikk det tapt en liten mengde DHA. Det ble dermed tilsatt DMEM i en mengde som ga en konsentrasjon på rundt 100 µg/ml. Videre fortytninger ble altså også omtrentlige. For å fortynne 100 µg/ml til 40 og 60 µg/ml ble formel 1 brukt for beregning. Oljemediet ble sterilfiltrert ved hjelp av filter (*PALL life sciences, a.nr. 4652*) og sprøyter (*Henke-Sass wolf, a.nr. 5050-, 5100-, 5200-000V0*). Det ferdige oljemediet ble lagt i fryseren frem til bruk.

### 3.3 Preparering av cellebrett og tilsetting av oljemedium

A549-cellene skulle dyrkes med to ulike konsentrasjoner av DHA i 24 timer. Før tilsetningen av oljemediet ble cellene overført fra celleflasker til 6-brønners cellebrett (*Greiner bio-one, a.nr. 657 160*) med 9,6 cm<sup>2</sup> volum. Fremgangsmåten her er den samme som for kultiveringen. Totalvolum i hver brønn var 6 ml. Cellene ble dyrket med rent DMEM i 24 timer før DHA ble tilsatt. Konfluensen ble da anslått å være rundt 50 %. Ved tilsetningen ble gammelt medium sugd av og erstattet med oljemedium. Fire av seks brønner ble tilsatt oljemedium og de to siste ble tilsatt rent DMEM. Cellene ble deretter inkubert.

### 3.4 Analyse av cellesyklus på BD Accuri C6 Flowcytometer

Forsøket har fokusert på endringer i cellesyklus hos levende celler. Disse cellene vil være festet til overflaten i brønnen. Cellene som er til stede flytende i gammelt medium og HBSS fra skyllingen ekskluderes og behandles ikke videre. Det ble også valgt å fokusere på de cellene som var i cellesyklus ved analysen på flowcytometer. Celler som utsettes for blant annet kjemiske og fysiske faktorer kan dø og gi debri. Debri er organiske rester etter døde celler, og de telles gjerne som hele celler under analysen (51). Under *gating* ble derfor områdene med debri ekskludert. I oppgaven er ikke debri studert.



### 3.4.1 Fiksering og preparering av prøvemateriale

Før cellene skulle analyseres på flowcytometer ble de fiksert. Cellebrettene ble tatt ut av inkubatoren og konfluensen ble studert i et invert mikroskop. I LAF-benken ble gammelt medium sugd av, og hver brønn ble vasket med 2x3 ml HBSS. Etter vasketrinnet ble det tilsatt 0,3 ml 0,25 % trypsin for å løsne cellene. Trypsineringen ble overvåket i mikroskopet. Da ca. 70-80 % av cellene hadde løsnet, ble trypsineringen inaktivert av 4 ml DMEM. Det ble brukt celleskraper for å løsne ytterligere celler. Cellesuspensjonen i alle brønnene ble overført til hvert sitt respektive 15 ml falconrør (*Falcon, a.nr. 352196*).

For å regne ut antall celler per milliliter ble det brukt engangs Bürker tellekammer (*NanoEnTek, a.nr. CHC-B01*). Hver av dem har to tellekammer, A og B, hvor begge kamrene ble brukt til den samme celleprøven som paralleller. Til hvert tellekammer ble det overført 10 µl cellesuspensjon. Ved telling ble to tilfeldige ruter i både A og B telt, se utsnitt av tellekammer i figur 8 (vedlegg A.4). Gjennomsnittlig antall celler i hvert tellekammer, X, ble regnet ut ved å dele telte celler på to, og deretter dele på 0,0001 ml. Dette ga oss antallet celler per milliliter, C, slik som formel 2 under viser. I en prøve som skal analyseres på flowcytometeret skal det ikke være mer enn en million celler (52). Formel 3 viser hvilken formel man kan ta i bruk for å finne det totale antallet celler det var i en prøve, T. Verdien av C fra formel 2 ble ganget med 4,5 ml, som er totalvolumet i falconrøret.

$$\text{Formel 2: } \frac{X}{0,0001 \text{ ml}} = C$$

$$\text{Formel 3: } C \times 4,5 \text{ ml} = T$$

**Tabell 1:** forklaring på hva de ulike leddene i formel 2 og 3 betyr.

X	Gjennomsnittlig antall telte celler per tellekammer
C	Celler per milliliter
0,0001 ml	10 µl prøve pr. tellekammer
4,5 ml	Totalt volum i falconrør (4ml etanol)
T	Totalt antall celler i prøve ved bruk av hele volumet

Samtidig som tellingen pågikk ble de seks falconrørene sentrifugert på 1200 rpm i 5 minutter. Supernatanten ble deretter sugd av og PBS (*Sigma-Aldrich, a.nr. D8537*) ble tilsatt hvert rør for å resuspendere pelleten. Mengden PBS som ble tilsatt avhenger av antall celler telt pr ml. Ved et antall på rundt en million ble 0,5 ml PBS tilsatt. Dersom antallet oversteg en million,

ble 1 ml tilsatt og volumet splittet i to rør. 0,5 ml cellesuspensjon fra hvert rør ble tilsatt i hvert sitt nye falconrør med 4 ml 96 % iskald etanol. Prøvene ble vortexet rett etter tilsetningen og lagt på frys i ca. 15-30 minutter.

Prøvene ble tatt ut av fryseren og sentrifugert ved 1200 rpm i 5 minutter. Supernatanten ble sugd av og pelleten ble løsnet ved å knipse på røret. 5 ml romtemperert PBS ble tilsatt hvert rør og deretter vortexet. Cellene rehydrerte så i 15 minutter ved romtemperatur. Rørene ble sentrifugert på nytt ved 1200 rpm i 5 minutter, og supernatanten ble fjernet. Til slutt ble 0,5 ml PI/RNase (*Invitrogen, a.nr. F10797*) tilsatt i hvert rør. Rørene ble pakket inn i aluminiumsfolie og inkubert i fryser i 90 minutter. Prosedyren *Fiksering og preparering av prøvemateriale* (vedlegg A.2.3), beskriver alle trinnene for fiksering og preparering av A549-celler før de kan analyseres på flowcytometer.

#### 3.4.2 Kalibrering av flowcytometer

BD Accuri C6-flowcytometeret ble kalibrert før og etter analysene av prøvematerialet. Følgende løsninger ble klargjort i sine respektive rør før kalibreringen:

1. Cleaning solution (*Flow cytometer kit, BD Accuri Cytometers a.nr. 653158*)
2. Decontamination (*Flow cytometer kit, BD Accuri Cytometers a.nr. 653158*)
3. MQ-vann
4. 8-peak beads (*BD Accuri Cytometers, a.nr. 653144*)
5. 6-peak beads (*BD Accuri Cytometers, a.nr. 653145*)
6. MQ-vann

Cleaning solution og decontamination-løsningen ble pipettert ut fra originalbeholderene på flowcytometeret og over i egne rør. Milli-Q-vann ble tatt fra filtreringsinstrumentet Milli-Q Advantage A10. Kalibreringsrør 4 og 5 inneholder 0,5 ml MQ-vann og 1 dråpe av henholdsvis 6- og 8-peak beads. 6-peak beadsene kommer i to separate beholdere; en flaske for peak 1 og en flaske for peak 2-6. Flaskene med beads ble vortexet godt før uttak, og ble i tillegg vortexet etter blanding i kalibreringsrøret.

Etter oppstart av flowcytometerets datamaskin, ble det ferdigpreparerte templatet for kalibrering, «wash and validation template 2021», åpnet. Denne filen oppgir hvilke parametere man skal bruke for de ulike løsningene. For rør 1-3 ble parameterne FAST på 5 minutter stilt inn. For rør 4 og 5 med beads i, ble instrumentet stilt inn på SLOW og 10.000 events. Under

analysen av 8-peak-løsningen så man at plot 3 fikk 8 peakene og det ble kontrollert at plot 3 M12 FL2-H lå på under 5 % når instrumentet hadde nådd de 10.000 eventene. Før rør 5 ble plassert i flowcytometeret, ble det utført en backflush. Aspirasjonsnålen i instrumentet lakk dermed litt væske. For å kontrollere at backflushen var god, så man først noen dråper, så en hel stråle, etterfulgt av noen dråper. Nålen ble tørket forsiktig med linsepapir.

Rør 5 ble så plassert i flowcytometeret og de samme parameterne som for rør 4 ble brukt. Her var det plot 6 som fikk peaker og det var plot 6 M12 CV FL-4H som ble kontrollert at lå under 5 %. Deretter ble det gjort en ny backflush, som også ble kontrollert på samme måte som sist. Nålen ble igjen tørket forsiktig med linsepapir. Rør 6 med MQ-vann ble så plassert i instrumentet og aspirert med parameterne FAST og 5 minutter. Etter disse 5 minuttene var kalibreringen fullført og rør 6 sto i instrumentet helt til prøvene skulle analyseres. Prosedyren *Kalibrering av flowcytometer* (vedlegg A.2.4) beskriver hvert trinn i kalibreringen av flowcytometeret.

### *3.4.3 Analyse på flowcytometer*

Etter kalibreringen var fullført kunne prøvene analyseres på flowcytometeret. Analysene ble gjort i et ferdig templat som var laget av tidligere bachelorstudenter ved NTNU Ålesund. Prøvene ble tatt ut av fryseren og lagt på is. En og en prøve ble tint, før hele volumet ble overført til sitt respektive prøverør. Parameterne SLOW og 20.000 events ble brukt til alle prøvene i analysen. Templatet som ble brukt var laget til en annen cellekultur og *gatingen* i FL2-A måtte derfor justeres manuelt for prøvene av A549-celle. Prosedyren *Analyse på flowcytometer* (vedlegg A.2.5) beskriver alle trinnene for analysen.

### *3.4.4 Statistiske utregninger av data*

For tolking av resultater fra analysene på flowcytometer, ble det utført statistiske utregninger av data. Dataene fra flowcytometeret ble organisert i tre ulike tabeller etter de ulike cellesyklusfasene, tabell 3, 4 og 5 (vedlegg A.6). Før en kunne utføre en t-test måtte det kontrolleres at dataene var normalfordelt. Da det ble bekreftet at resultatene var normalfordelt, ble det utført tosidig uavhengige t-tester. Det ble først gjort t-tester mellom 40 µg/ml i de ulike forsøkene, og mellom 60 µg/ml i de ulike forsøkene. Deretter ble det utført t-tester mellom prøvene med 40 µg/ml DHA og kontroll, og mellom 60 µg/ml DHA og kontroll. Til slutt ble

det utført t-tester mellom 40 µg/ml DHA og 60 µg/ml DHA. Det ble benyttet hypotesetest, hvor nullhypotese (H0) beviser at det ikke er en hemmende effekt, og den alternative hypotesen (H1) beviser at det er en hemmende effekt. Signifikansnivået ble satt til 5 %, altså en p-verdi på 0,05. Dersom p-verdien er 0,05 eller lavere er det en statistisk signifikant forskjell og en forkaster nullhypotesen og konkluderer med at det er en hemmende effekt. Motsatt vil en p-verdi på over 0,05 ikke regnes som statistisk signifikant og en beholder H0. Excel ble benyttet til å utføre de statistiske beregningene.

## 4 Resultat

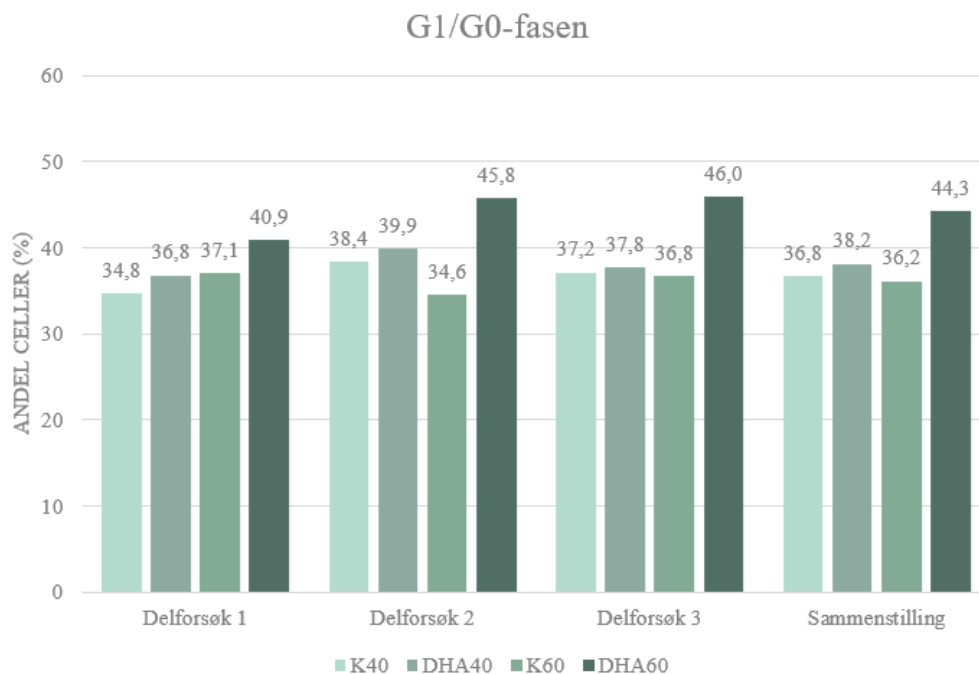
I denne delen av oppgaven skal resultatene fra forsøket presenteres. Cellene ble eksponert for DHA i to ulike konsentrasjoner over 24 timer i cellebrett. På hvert cellebrett var det fire brønner med oljemedium og to kontrollbrønner med rent DMEM. Ett delforsøk besto av ett brett med celler eksponert for 40 µg/ml DHA (DHA40) og ett brett med 60 µg/ml DHA (DHA60). Det ble gjennomført tre delforsøk over tre ulike dager. Det er seks paralleller av hver kontroll (K40 og K60), 12 paralleller for DHA40 og 15 paralleller for DHA60, som ligger til grunn for beregningene som er gjort.

Tabell 3, 4 og 5 (vedlegg A.6) viser andelen av celler i hver av de ulike fasene av cellesyklusen for hver prøve. I vedlegg A.6 blir det innledningsvis forklart hvordan navnsettingssystemet fungerer. Verdiene i tabellene er resultater etter manuell *gating* i histogram for hver prøve. Eksempel på dette er vist i figur 9-12 (vedlegg A.5).

Før de statistiske beregningene ble gjort ble uteliggere, altså verdier som skiller seg veldig ut, identifisert og ekskludert. I tabell 3-5 (vedlegg A.6) er disse verdiene skraveret. Ved å ekskludere disse vil man få et gunstig standardavvik. Det er lagt til grunn at et standardavvik på 10 % av gjennomsnittet er mest optimalt (53).

### 4.1 G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen

Diagram 1, G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen, er basert på tabell 3 (vedlegg A.6). Det er en grafisk fremstilling av gjennomsnittsverdiene for prosentandelen celler for K40, K60, DHA40 og DHA60 i fasen. Gjennomsnittsverdiene for hvert delforsøk presenteres hver for seg, i tillegg til en sammenstilling av dem.



**Diagram 1:** Gjennomsnittsandelen celler i prosent i G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen for kontrollprøver og prøver med DHA i hvert delforsøk, samt en sammenstilling av disse. Hver søylekvartett har søyler for kontroll 40 og 60, og prøver med DHA-konsentrasjon på 40 og 60 µg/ml. Langs x-aksen vises de ulike delforsøkene i tillegg til sammenstillingen. Y-aksen viser andelen celler i fasen oppgitt i prosent. Over hver søyle er gjennomsnittsverdiene oppgitt.

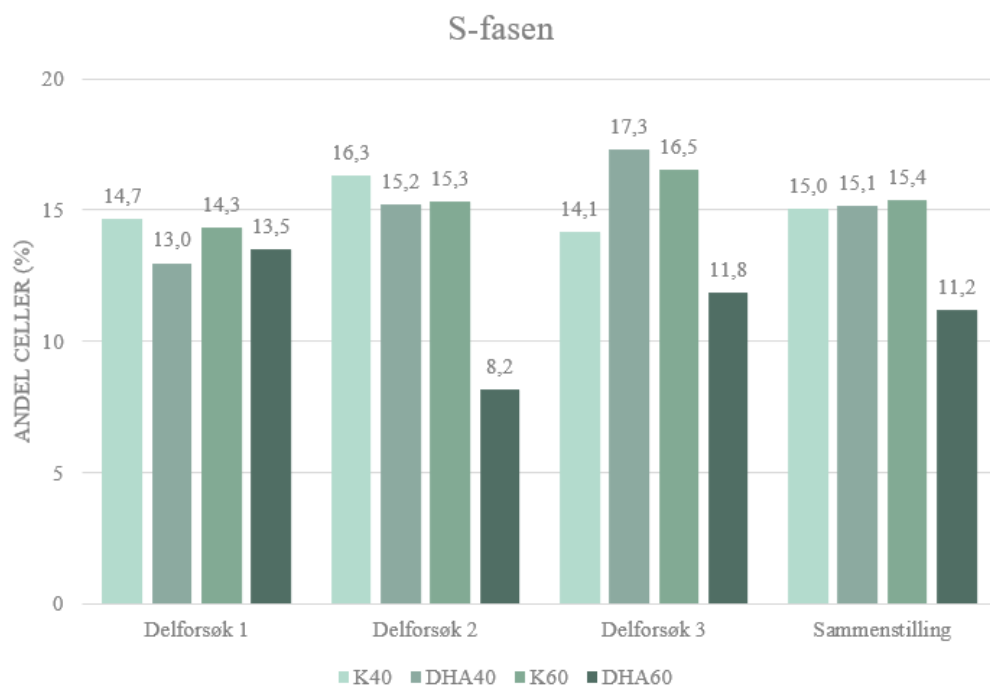
For K40 og DHA40 kan man i alle delforsøkene observere at det skjer en økning i andelen celler i G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen hos DHA40-prøvene. I delforsøk 1 er det 2 % flere celler for DHA40 enn for K40 og 1,5 % i delforsøk 2. I delforsøk 3 er differansen mindre, med 0,6 % høyere andel celler i fasen for DHA40 enn for K40.

Sammenstillingen av alle delforsøkene viser at DHA40-prøvene i snitt gir en økt andel celler i G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen, sammenlignet med K40. I gjennomsnitt er det 1,4 % større andel celler i fasen for DHA40 enn for K40. K40 varierer noe mellom de tre delforsøkene.

I alle de tre delforsøkene kan man se en likhet når det gjelder K60 og DHA60. Diagrammene viser at DHA60 gir betydelig høyere andel celler i G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen enn K60. Særlig i delforsøk 2 og 3 er forskjellen markant med henholdsvis 11,2 % og 9,2 %. I delforsøk 1 er forskjellen i andel celler mellom K60 og DHA60 3,8 %, som er noe mindre, men likevel signifikant. Sammenstillingen av de tre delforsøkene viser at det i snitt er 8,1 % flere celler i G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen i prøvene med DHA sammenlignet med kontrollprøvene. K60 har liten variasjon mellom de tre delforsøkene.

## 4.2 S-fasen

Diagram 2, S-fasen, er basert på tabell 4 (vedlegg A.6). Det er en grafisk fremstilling av gjennomsnittsverdiene for prosentandelen celler for K40, K60, DHA40 og DHA60 i fasen. Gjennomsnittsverdiene for hvert delforsøk presenteres hver for seg, i tillegg til en sammenstilling av dem.



**Diagram 2:** Gjennomsnittsandelen celler i prosent i S-fasen for kontrollprøver og prøver med DHA i hvert delforsøk, samt en sammenstilling av disse. Hver søylekvartett har søyler for kontroll 40 og 60 og prøver med DHA-konsentrasjon på 40 og 60  $\mu\text{g/ml}$ . Langs x-aksen vises de ulike delforsøkene i tillegg til sammenstillingen. Y-aksen viser andelen celler i fasen oppgitt i prosent. Over hver søyle er gjennomsnittsverdiene oppgitt.

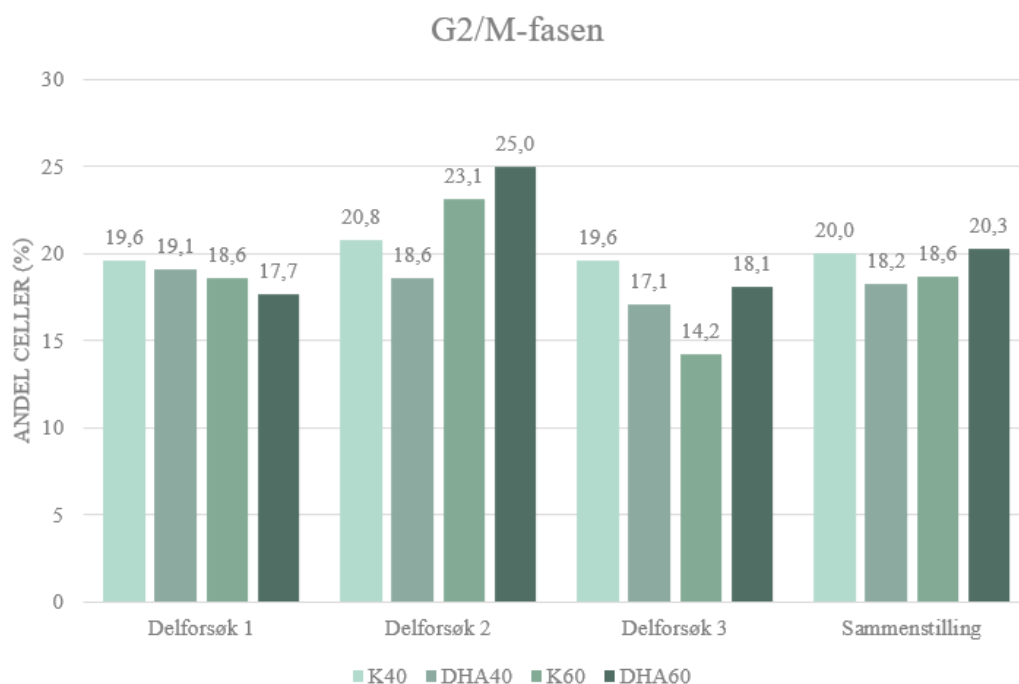
For K40 og DHA40 observeres det i delforsøk 1 og 2 en nedgang i andelen celler i fasen for DHA40, med henholdsvis 1,7 % og 1,1 %. Man ser derimot i delforsøk 3 at DHA40 i snitt har 3,2 % høyere andel celler i S-fasen enn kontrollprøvene. Sammenstillingen viser at det i gjennomsnitt er 0,1 % høyere andel celler i fasen for K40 enn DHA40. Det er noe variasjon mellom K40 i de ulike delforsøkene.

Alle de tre delforsøkene viser at andelen celler i S-fasen synker for DHA60, sammenlignet med K60. I delforsøk 1 er differansen mellom K60 og DHA60 0,8 %, som er relativt mye mindre enn i delforsøk 2 og 3. I delforsøk 2 er differansen 7,1 % og i delforsøk 3 er den 4,7 %.

Sammenstillingen av de tre delforsøkene viser at det i snitt er 4,4 % mindre andel celler i S-fasen for DHA60 enn for K60. K60 hadde en liten variasjon.

### 4.3 G<sub>2</sub>/M-fasen

Diagram 3, G<sub>2</sub>/M-fasen, er basert på tabell 5 (vedlegg A.6). Det er en grafisk fremstilling av gjennomsnittsverdiene for prosentandelen celler for K40, K60, DHA40 og DHA60 i fasen. Gjennomsnittsverdiene for hvert delforsøk presenteres hver for seg, i tillegg til en sammenstilling av dem.



**Diagram 3:** Gjennomsnittsandelen celler i prosent i G<sub>2</sub>/M-fasen for kontrollprøver og prøver med DHA i hvert delforsøk, samt en sammenstilling av disse. Hver søylekvartett har søyler for kontroll 40 og 60 og prøver med DHA-konsentrasjon på 40 og 60 µg/ml. Langs x-aksen vises de ulike delforsøkene i tillegg til sammenstillingen. Y-aksen viser andelen celler i fasen oppgitt i prosent. Over hver søyle er gjennomsnittsverdiene oppgitt.

I alle delforsøkene er det en nedgang i andelen celler for DHA40 i forhold til K40, med henholdsvis 0,5 %, 2,2 % og 2,5 %. I delforsøk 1 var det altså en noe mindre differanse i andelen celler i fasen. K40 i alle tre delforsøkene er relativt stabil. Sammenstillingen viser at det i gjennomsnitt er en nedgang på 1,8 % for DHA40 sammenlignet med kontrollprøvene.



For delforsøk 2 og 3 observeres en økning i andelen celler i G<sub>2</sub>/M-fasen for DHA60 kontra K60, med 2,9 % og 3,9 %. I delforsøk 1 er det derimot 0,9 % mindre andel celler i fasen for DHA60 sammenlignet med K60. Sammenstillingen viser en gjennomsnittlig differanse på 1,7 %, med en høyere andel for DHA60 enn for K60. Det er variasjoner mellom K60 i de tre delforsøkene, særlig mellom K60 i delforsøk 2 og 3.

#### 4.4 Statistisk utregning av innsamlet data

For tolking av analyseresultat fra forsøket ble det gjennomført ulike t-tester. Det ble gjort mellom de ulike konsentrasjonene, de ulike delforsøkene og for de enkelte konsentrasjonene.

##### *4.4.1 Uavhengig t-test for å studere ulikhet mellom 40 µg/ml DHA i de ulike delforsøkene*

Den første t-testen ble utført for å studere ulikheter mellom 40 µg/ml i de ulike delforsøkene, som presentert i tabell 6 (vedlegg A.7.1).

I G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen mellom delforsøk 1 og 2 ( $p > 0,14$ ), mellom delforsøk 1 og 3 ( $p > 0,62$ ) og mellom delforsøk 2 og 3 ( $p > 0,20$ ) er det ingen statistisk signifikant forskjell. Det vil si at det ikke er ulikheter i G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen i de ulike delforsøkene, hvor cellene er eksponert for 40 µg/ml DHA.

I S-fasen er det en statistisk signifikant forskjell mellom de ulike delforsøkene, delforsøk 1 vs. 2 ( $p < 0,05$ ), delforsøk 1 vs. 3 ( $p < 0,01$ ) og delforsøk 2 vs. 3 ( $p < 0,04$ ). Delforsøkene er derav ulike i S-fasen.

Det er ingen statistisk signifikant forskjell i G<sub>2</sub>/M-fasen mellom delforsøk 1 og 2 ( $p > 0,74$ ), delforsøk 1 og 3 ( $p > 0,13$ ) og delforsøk 2 og 3 ( $p > 0,21$ ). Det vil si at det ikke er ulikheter i G<sub>2</sub>/M-fasen i de ulike delforsøkene hvor cellene er eksponert for 40 µg/ml DHA.

##### *4.4.2 Uavhengig t-test for å studere likhet mellom 60 µg/ml DHA i de ulike delforsøkene*

Den neste t-testen ble utført for å studere ulikheter mellom 60 µg/ml i de ulike delforsøkene, som presentert i tabell 7 (vedlegg A.7.2).

I G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen mellom delforsøk 1 og 2 ( $p < 0,00$ ) og mellom delforsøk 1 og 3 ( $p < 0,00$ ) er det en statistisk signifikant forskjell. Mellom delforsøk 2 og 3 ( $p > 0,79$ ) er det ingen statistisk

signifikant forskjell. Det vil si at det er likhet i G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen mellom delforsøk 1 vs. 2 og 1 vs. 3. Derimot er det ikke en statistisk signifikant forskjell mellom delforsøk 1 og 2.

I S-fasen er det en statistisk signifikant forskjell mellom de ulike delforsøkene, delforsøk 1 vs. 2 ( $p < 0,00$ ), delforsøk 1 vs. 3 ( $p < 0,01$ ) og delforsøk 2 vs. 3 ( $p < 0,00$ ). Delforsøkene er derav ulike i S-fasen.

Det er en statistisk signifikant forskjell i G<sub>2</sub>/M-fasen mellom delforsøk 1 og 2 ( $p < 0,00$ ) og mellom delforsøk 2 og 3 ( $p < 0,00$ ). Derimot er det ikke en statistisk signifikant forskjell mellom delforsøk 1 og 3 ( $p > 0,17$ ). Det vil si at det er både likheter og ulikheter mellom delforsøkene i G<sub>2</sub>/M-fasen.

#### *4.4.3 Uavhengig t-test for å studere ulikheter mellom celler eksponert for 40 µg/ml DHA og kontroll i de ulike delforsøkene*

Den tredje t-testen ble utført for å studere ulikheter mellom celler eksponert for 40 µg/ml DHA og kontroll i de ulike delforsøkene, som presentert i tabell 8 (vedlegg A.7.3). Dette ble gjort for å undersøke om det hadde forekommet en endring i cellesyklus, som følge av tilsetning av DHA.

I G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen i de samtlige delforsøkene, er det ingen statistisk signifikant forskjell. Det vil si at det ikke er noen forskjell i denne fasen mellom celler eksponert for 40 µg/ml DHA og kontroll.

Det er heller ingen statistisk signifikant forskjell i S-fasen mellom celler eksponert for 40 µg/ml DHA og kontroll. Det samme gjelder for G<sub>2</sub>/M-fasen, altså ingen statistisk signifikant forskjell mellom cellene som er blitt eksponert for 40 µg/ml DHA og kontrollene.

#### *4.4.4 Uavhengig t-test for å studere ulikheter mellom celler eksponert for 60 µg/ml DHA og kontroll i de ulike delforsøkene*

Den fjerde t-testen ble utført for å studere ulikheter mellom celler eksponert for 60 µg/ml DHA og kontroll i de ulike delforsøkene, som presentert i tabell 9 (vedlegg A.7.4).

I delforsøk 1 er det ingen statistisk signifikant forskjell i noen av fasene i cellesyklusen. Det betyr at det ikke er ulikheter mellom celler eksponert for 60 µg/ml DHA og kontroll.

Det samme gjelder for delforsøk 3. Her er det heller ingen statistisk signifikant forskjell i de ulike fasene, mellom celler eksponert for 60 µg/ml DHA og kontroll.

I delforsøk 2 er det derimot en statistisk signifikant forskjell i S-fasen ( $p < 0,00$ ). Det vil si at det er ulikheter mellom celler eksponert for 60 µg/ml DHA og kontroll i denne fasen.

#### *4.4.5 Uavhengig t-test for å studere ulikheter mellom celler eksponert for 40 µg/ml DHA og 60 µg/ml DHA i de ulike delforsøkene*

Den siste t-testen ble utført for å observere ulikheter mellom celler eksponert for 40 og 60 µg/ml DHA i de ulike delforsøkene, som presentert i tabell 10 (vedlegg A.7.5).

Det er en statistisk signifikant forskjell i  $G_1/G_0$ -fasen mellom delforsøk 1 ( $p < 0,05$ ), delforsøk 2 ( $p < 0,01$ ) og delforsøk 3 ( $p < 0,02$ ). I samtlige forsøk observeres det en høyere verdi i  $G_1/G_0$ -fasen hvor cellene er eksponert for 60 µg/ml DHA, kontra de som er eksponert for 40 µg/ml.

I S-fasen er det en statistisk signifikant forskjell i delforsøk 2 ( $p < 0,00$ ) og delforsøk 3 ( $p < 0,00$ ). I delforsøk 1 ( $p > 0,51$ ) er det ingen statistisk signifikant forskjell mellom cellene som er eksponert for 60 µg/ml DHA, kontra 40 µg/ml. Delforsøk 1 viser en høyere verdi i S-fasen hos de cellene som er eksponert for 60 µg/ml. I delforsøk 2 og 3 blir det derimot observert en høyere verdi i S-fasen hos cellene som er eksponert for 40 µg/ml, sammenlignet med de som er eksponert for 60 µg/ml.

Det er en statistisk signifikant forskjell i  $G_2/M$ -fasen i delforsøk 2 ( $p < 0,00$ ). I delforsøk 1 ( $p > 0,26$ ) og delforsøk 3 ( $p > 0,22$ ) er det ingen statistisk signifikant forskjell. Det blir observert en lavere verdi hos cellene som ble eksponert for 40 µg/ml DHA sammenlignet med de som er eksponert for 60 µg/ml i delforsøk 2 og 3. I delforsøk 1, ble det derimot observert en høyere verdi hos cellene som ble eksponert for 40 µg/ml DHA, sammenlignet med de som ble eksponert for 60 µg/ml.

## 5 Diskusjon

I denne delen av oppgaven skal trinnene i prosessen og resultatene drøftes. Her blir også svakheter og potensielle feilkilder tatt i betraktning. Avslutningsvis vil aktuelle endringer for gjennomføring av liknende forsøk foreslås.

### 5.1 Cellekultivering

Gjennom hele forsøket hadde A549-celleene god vekst og det var ingen tegn til kontaminasjon, se figur 6 og 7 (vedlegg A.3). Det ble tatt utgangspunkt i en ferdig utarbeidet protokoll for CHSE-214-celler, som ble tilpasset A549-celleene. Optimalisering av cellekultiveringen var en viktig del av forarbeidet før forsøket skulle gjennomføres.

I løpet av optimaliseringsprosessen ble det passende forholdet mellom cellesuspensjon og DMEM i brønnene for det aktuelle tidsrommet funnet. Hvis DHA potensielt hemmer cellevekst, vil den også kunne påvirke cellenes evne til å feste seg til underlaget. Det ble derfor bestemt at cellene skulle få feste seg før DHA ble tilsatt. Målet under optimaliseringen var å finne et forhold som ga omtrent 50 % konfluens etter inkubasjon i 24 timer.

Kultivering og splitting ble først utført i celleflasker, før de ble splittet over til cellebrett. Jevnt over ble splittingen gjennomført ved 70-80 % konfluens. Ved splitting av flasker til brett ble det observert at konfluensen i brønnene var ujevn. I enkelte områder av brønnen var konfluensen 90-100 %, mens den var nede i 20-30 % i andre områder. Ved hver splitting ble suspensjon og medium blandet godt. Det betyr at ujevnheten ikke skyldtes dårlig fordeling av cellesuspensjonen i brønnene. Den varierende veksten gjorde det vanskelig å anslå konfluensen. Konsekvensen av for høy konfluens kan være at cellene begynner å vokse for tett. På den måten reduseres næringstilgangen, og forholdene kan gjøre at cellene går inn i cellyklus-arrest av andre grunner enn de man ønsker å undersøke.

Veksten endret seg og avtok noe en uke før selve forsøket skulle starte. Dette gjorde det vanskelig å forutse hvordan veksten ville være noen dager frem i tid. Optimalt sett burde veksten stabilisert seg før forsøket ble gjennomført, men på grunn av COVID-19-situasjonen kunne ikke oppstarten utsettes.

## 5.2 Initiering av forsøk

I utgangspunktet var planen å eksponere A549-cellene for DHA over lengre tidsintervall og med flere konsentrasjoner. På grunn av COVID-19 og tilgangen på DHA, ble variablene begrenset til ett tidsintervall på 24 timer og to konsentrasjoner av DHA, 40 og 60 µg/ml.

Etter tillaging av oljemedium til to forskjellige prosjekt, ble det bestemt at alt oljemediet skulle brukes til dette forsøket. Dette resulterte i at beholderne med startkonsentrasjoner på 50 og 100 µg/ml som ble benyttet, var fortynnet av forskjellige personer. Videre fortynning til 40 og 60 µg/ml ble gjort med liten eller ingen blanding av de ulike gruppenes beholdere. Det kan ha medført at konsentrasjonen til oljen som ble brukt i for eksempel delforsøk 1 ikke var helt lik oljen brukt i delforsøk 2. Optimalt sett burde hele volumene av de to konsentrasjonene blitt blandet før de ble separert i beholdere og fryst til de ulike delforsøkene. Slik hadde man vært helt sikker på at DHA-konsentrasjonen i oljemediene var de samme.

Ved oppstart av hvert delforsøk ble cellebrettene først inkubert i 24 timer med rent DMEM. Da DHA skulle tilsettes til delforsøk 1 var konfluensen i brønnene betydelig høyere enn ønsket. Konfluensen i brønnene ble anslått å være rundt 70-80 %. Det skyldtes trolig at celleflaskene som var utgangspunktet for disse brettene hadde nærmere 100 % konfluens før splitting. Dette skjedde som en konsekvens av den uforutsigbare celleveksten og at flaskene måtte stå over flere dager grunnet helg. Optimalt sett burde ikke disse cellebrettene blitt tatt i bruk, men på grunn av begrenset tilgang til laboratorium og tidspress, ble det likevel besluttet å tilsette oljen. Ved tilsetting av olje til delforsøk 2 og 3 ble konfluensen anslått å ligge rundt 50 % som ønsket, se figur 6 (vedlegg A.3). En slik betydelig forskjell i konfluens, medførte at forholdene ikke ble helt like for alle de tre delforsøkene.

## 5.3 Fiksering, preparering og analyse av prøvemateriale

Nøyaktig 24 timer etter tilsetting av oljemedium ble cellene fiksert. *Fiksering og preparering av prøvemateriale* (vedlegg A.2.3) beskriver alle trinnene for gjennomføringen. Flere av trinnene i prosedyren kunne påføre cellene uønsket stress og på denne måten føre til en syklus-arrest. Siden det er antallet celler i de ulike fasene etter eksponering av DHA som skulle undersøkes, kunne disse stressfaktorene påvirke analysen. A549-cellene vokser under spesifikke omgivelser og det ble vurdert at tiden cellene var ute av inkubatorskap måtte reduseres så mye som mulig under optimaliseringen. Fikseringene som ble gjort under forsøket

tok 21-25 minutter, fra uttak fra inkubatorskap til cellene ble lagt på frys (trinn 17). Dette var trolig ikke nok tid til at cellene skal ha blitt påvirket i en vesentlig grad.

Etter trypsineringstrinnet i fikseringen hadde de fleste cellene løsnet fra overflaten. For å sørge for at alle cellene hadde løsnet, ble brønnene skrapet forsiktig med celleskraper. Grunnet høyt forbruk av celleskraper innledningsvis i forsøket, samt andre bachelor-prosjekt, ble tilgangen etter hvert begrenset. Dette medførte at celleskrapene måtte brukes flere ganger. Mellom hvert delforsøk og mellom de ulike variablene, ble celleskrapene vasket i etanol og lufttørket. Det er vurdert at dette ikke har hatt noen innvirkning på resultatene. Ved bruk av celleskraper utsetter man cellene for mekaniske påkjenninger som potensielt kan skade dem. Celler som ødelegges slik, kan gi en økt mengde debri i analysen på flowcytometer, som kan forstyrre resultatene (51). I en optimalisering ville man standardisert metoden og sørget for at variasjon i mengden debri i de ulike prøvene hadde vært minimal. COVID-19-situasjonen gjorde at det var flere usikkerhetsmomenter rundt forsøket og det ble dermed besluttet å utelukke debri i oppgaven for å spare tid.

BD Accuri C6-flowcytometeret krevde at *gatingen* for hver prøve ble gjort manuelt. Denne bør være tilnærmet lik for alle prøver og det ble derfor bestemt at én person skulle *gate*. Dette økte nøyaktigheten og sørget for at *gatene* ble definert på like grunnlag. Til tross for dette kan det ha forekommet avvik som påvirket resultatene. Det er svært små justeringer på *gaten* som skal til før verdiene endres betydelig.

Fokuset i forsøket var å studere endringer i cellesyklusen til levende celler. På grunnlag av dette ble det besluttet å ikke analysere det gamle mediet og HBSS fra skyling i fikseringen. I disse væskene er det i stor grad døde celler og muligens små mengder levende celler. Påvirkningen disse cellene kunne hatt på resultatet er antatt å være minimale.

#### 5.4 Analyse av cellesyklus

Ved analyse av cellesyklus på flowcytometer ble det observert endringer i cellesyklus mellom kontroll 60 og DHA60 i de ulike delforsøkene. Det var derimot en mindre endring mellom kontroll 40 og DHA40 basert på gjennomsnittsverdiene i de enkelte fasene (vedlegg A.7). Det er ingen indikasjon på en cellesyklusarrest i kontroll 40 og DHA40. Det ser derimot ut som at det kan ha oppstått en cellesyklusarrest i  $G_1/G_0$  hos celler behandlet med DHA60. Det ble utført t-tester for å undersøke om disse endringene var statistisk signifikante. T-testene som er blitt

utført i denne oppgaven har to potensielle svakheter. Den første svakheten er at det er for få paralleller i delforsøkene, noe som kan gi upålitelige resultater (54). I hvert delforsøk ble det brukt 2 cellebrett. I hvert cellebrett var det 4 paralleller med den gitte DHA konsentrasjonen og to kontroller. Begrenset antall paralleller var en følge av for lite tilgang på DHA og for lite tid på laboratoriet grunnet COVID-19-pandemien. Det ble også ekskludert enkelte verdier fra de ulike delforsøkene, da disse ble regnet som uteliggere. Ekskluderte verdier var en konsekvens av for høyt standardavvik. Den andre svakheten er at selv om en får en p-verdi på eller under 0,05, og resultatet blir regnet som statistisk signifikant, vil det være 5 % sannsynlighet for at resultatet skyldes tilfeldigheter. Som følge av disse to svakhetene vil ikke en t-test alene kunne avgjøre om det har oppstått endringer i cellesyklusen.

Det ble utført t-tester med verdiene fra  $G_1/G_0$ -, S- og  $G_2/M$ -fase hver for seg, se tabell 3, 4 og 5 (vedlegg A.6). I tabell 6, 7 og 8 (vedlegg A.7) vises resultatene fra de ulike t-testene mellom delforsøkene.

#### *5.4.1 Uavhengig t-test for å studere ulikheter mellom 40 $\mu\text{g/ml}$ i de ulike delforsøkene*

Mellom DHA40 i de ulike delforsøkene ble det ikke observert signifikant forskjell i  $G_1/G_0$ - og  $G_2/M$ -fasen. En ønsker ikke signifikant forskjell mellom de ulike delforsøkene, da det vil vise at delforsøkene er repetitive. I S-fasen observeres det derimot en statistisk signifikant forskjell, tabell 6 (vedlegg A.7.1), mellom alle delforsøkene. Diagram 2 viser at i delforsøk 1 er gjennomsnittsandelen celler på 13,0 %, mens i delforsøk 3 er den på 17,3 %. Det er en differanse på 4,3 %. Siden det ikke er en statistisk signifikant forskjell i  $G_1/G_0$ - og  $G_2/M$ -fasen, kan endringen i S-fasen skyldes naturlig variasjon. Den statistiske signifikante forskjellen i S-fasen i delforsøkene kan også skyldes avvik under utførelsen av prosedyren. Det ble ikke avdekket noen konkrete årsaker til avvikene, men det er flere faktorer som kan ha spilt inn. Den ene faktoren kan være at tilsetningen av DHA ble gjort ved ulik konfluens. Som nevnt i 5.2 *Initiering av forsøk* ble oljemediet fortynnet av flere personer, som også kan være en faktor som påvirker at delforsøkene er litt forskjellige.

#### *5.4.2 Uavhengig t-test for å studere ulikheter mellom 60 $\mu\text{g/ml}$ i de ulike delforsøkene*

Mellom DHA60 i delforsøk 1 og 3 er det ikke en signifikant forskjell i  $G_2/M$ -fasen,  $p > 0,17$ , se tabell 7 (vedlegg A.7.2). Det er heller ikke en signifikant forskjell i  $G_1/G_0$ -fasen mellom

delforsøk 2 og 3. Resten av t-testene utført mellom delforsøkene og de ulike fasene viser en signifikant forskjell. Siden prøvene ble behandlet helt like i de tre delforsøkene ønsker man ingen signifikant forskjell. Forskjellene i de ulike delforsøkene med DHA60 kan også være resultat av avvik under utførelsen av prosedyren. Det ble heller ikke her avdekket noen konkrete årsaker til avvikene, men de samme faktorene som over, 5.4.1, kan ha påvirket resultatene. Konfluensen i delforsøk 1 var for eksempel mye høyere ved tilsetning av olje, enn i delforsøk 2 og 3.

#### *5.4.3 Uavhengig t-test for å studere ulikheter mellom celler eksponert for 40 µg/ml DHA og kontroll i de ulike delforsøkene*

Det er liten variasjon mellom celler eksponert for 40 µg/ml DHA og kontroll i de ulike delforsøkene, se diagram 1, 2 og 3. Dette gjenspeiles i t-tester utført mellom celler eksponert for 40 µg/ml DHA og kontroll i de ulike delforsøkene. Det observeres ingen signifikant endring mellom prøvene og kontrollene, tabell 8 (vedlegg A.7.3).

I delforsøk 1 i G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen har kontroll 1 en verdi på 31,47 % og kontroll 2 har en verdi på 38,06 %. Dette gir et standardavvik på 4,66. Et slikt standardavvik er ikke optimalt, da det er for høyt. Som nevnt i 5.4 analyse av cellesyklus er minimumskravet for å utføre en t-test to verdier, derfor kan man ikke utelukke noen av kontrollene for å senke standardavviket. Optimalt sett burde man hatt flere paralleller av kontrollene.

Flere publiserte studier, blant annet Yao, Q-H *et. al* (2), har vist at celler eksponert for 40 µg/ml DHA i 24 timer ikke blir påvirket i veldig stor grad, men at en inhibering er til stede. Selv om det ikke ble observert noen signifikant forskjell mellom kontroll og prøve, ser man i diagram 1 at DHA40 har høyere verdi enn K40 i alle delforsøkene. Dette kan tyde på at 40 µg/ml DHA kan ha hatt en hemmende effekt på proliferasjonen, men at effekten er for liten til å gi utslag på t-tester. Artikkelen viser også at påvirkningen på proliferasjonen ved en gitt konsentrasjon over et lengre tidsintervall, vil ha en større påvirkning. Derfor ville det vært optimalt å la prøvene stå over flere døgn med samme konsentrasjon. Dette var ikke mulig grunnet COVID-19 pandemien og tilgang på DHA.



#### *5.4.4 Uavhengig t-test for å studere ulikheter mellom celler eksponert for 60 µg/ml DHA og kontroll i de ulike delforsøkene*

Kontrollene i alle delforsøkene har en lavere verdi i G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen enn prøvene. I delforsøk 1 er forskjellen på 3,8 %, i delforsøk 2 og 3 er forskjellen betydelig høyere, med en verdi på 11,2 % og 9,2 %, se diagram 1. T-testen utført mellom kontroll og prøver gir derimot ikke en statistisk signifikant forskjell, tabell 9 (vedlegg A.7.4). Ser man bare på prosent antall celler kan det tyde på at det har forekommet en G<sub>1</sub>-arrest.

Det observeres en nedgang i S-fasen i alle prøvene (DHA60) i de tre delforsøkene sammenlignet med kontrollene. I t-testen som er utført observeres dette bare som en signifikant forskjell i delforsøk 2. Videre, i G<sub>2</sub>/M-fasen, observeres det heller ikke en statistisk signifikant forskjell mellom prøvene og kontrollene. I delforsøk 1 observeres det en litt høyere verdi i kontrollene sammenlignet med prøvene. Kontrollene har derimot en lavere verdi i delforsøk 2 og 3 sammenlignet med prøvene.

Når man ser en økning av celler i G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen, en G<sub>1</sub>-arrest, er det vanlig å se en nedgang i enten S-fasen eller G<sub>2</sub>/M-fasen (23). Selv om det bare observeres en statistisk signifikant forskjell i S-fasen i delforsøk 2, kan den høye verdien i G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen sammenholdt med nedgangen i S-fasen tyde på at det har forekommet en G<sub>1</sub>-arrest. For få paralleller vil som sagt gjøre t-testene upålitelige, og en kan derfor ikke bare benytte seg av disse resultatene for å fastslå om det har skjedd endringer i cellyklusen eller ikke.

#### *5.4.5 Uavhengig t-test for å studere ulikheter mellom celler eksponert for 40 µg/ml DHA og 60 µg/ml DHA i de ulike delforsøkene*

I delforsøk 1 observeres det kun en signifikant forskjell i G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen. Antall celler i fasen er høyere i prøven med celler eksponert for 60 µg/ml DHA sammenlignet med 40 µg/ml DHA.

I delforsøk 2 er forskjellen i verdi mellom celler eksponert for 40 µg/ml DHA og 60 µg/ml DHA betydelig i alle fasene, se diagram 1, 2 og 3. DHA40 har en lavere verdi i G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen sammenlignet med DHA60. I S-fasen har DHA60 en lavere verdi enn DHA40. DHA60 har en høyere verdi i G<sub>2</sub>/M-fasen. Dette vises som signifikante forskjeller i t-testene utført mellom celler eksponert for 40 µg/ml DHA og 60 µg/ml DHA, tabell 10 (vedlegg A.7.5).

Det observeres en signifikant forskjell i G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen og S-fasen, men ikke en signifikant forskjell i G<sub>2</sub>/M-fasen, i delforsøk tre. Liknende studier som er gjort av Yao, Q-H *et. al* (2) og

Yin, Y *et. al* (55) viser at DHA har økt hemmende effekt på celleproliferasjonen med økende konsentrasjoner i 24-timers tidsintervall. Yin *et. al.* (55) sitt arbeid viste at konsentrasjoner over 50 µg/ml DHA hadde svært stor påvirkning på celleproliferasjonen, noe som også gjenspeiles i Yao *et. al.* (2) sine resultater. Den samme tendensen observeres i dette forsøket. DHA60 har en høyere verdi i G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen i alle delforsøkene, sammenlignet med DHA40, se diagram 1. T-testene viste også at det er en signifikant forskjell i andelen celler mellom de to konsentrasjonene i G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen, tabell 10 (vedlegg A.7.5). Dette kan tyde på at cellene inhiberes i større grad ved eksponering for 60 µg/ml DHA enn for 40 µg/ml DHA, som kan resultere i en G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-arrest.

#### 5.4.6 Drøfting av resultat og videre forskning

Felles for alle de statistiske beregningene som ble utført, er at de har samme svakheter. De største svakhetene er antallet paralleller og delforsøk. Disse gjør beregningene mindre pålitelige, og på grunn av antallet paralleller blir terskelen høy for å fjerne uteliggere. Hadde man skulle gjennomført dette forsøket på nytt, hadde det vært optimalt å kjøre flere delforsøk med flere paralleller. I tillegg burde man utført en komparativ metode som kunne støttet opp under resultatene fra cellesyklusanalysen.

Liknende studier har vist at den hemmende effekten til DHA på A549-celler øker med økende konsentrasjon i 24-timers tidsintervall (2, 55). Resultatene fra disse studiene tyder på at DHA i konsentrasjoner under 50 µg/ml har begrenset hemmende effekt på celleproliferasjonen, mens konsentrasjoner over har en betydelig høyere hemmende effekt. I diagram 4 kan man se en mulig trend som samsvarer med dette. Kontrollene og DHA40 har en lavere andel celler i G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen sammenlignet med DHA60 i alle delforsøkene. Dette kan tyde på at cellesyklusen til celler eksponert for 60 µg/ml DHA i større grad hemmes i denne fasen, noe som er typisk for en G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-arrest. I diagram 5 og 6 ser man derimot litt varierende trender. Trenden i diagram 5 viser en nedgang i andelen celler i S-fasen i to av delforsøkene, noe som underbygger antagelsen om at det har skjedd en G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-arrest. Variasjonen i trendene i de ulike fasene understreker nok en gang viktigheten av å ha flere paralleller.

For å få et mer helhetlig bilde av effekten DHA har på celleproliferasjonen, hadde det vært interessant å sett på flere ulike variabler, som konsentrasjon- og tidsgradienter. Ved å se på flere konsentrasjoner kunne man studert mer nøyaktig hvilke mengder DHA som kreves for å påvirke celleproliferasjonen og i hvilken grad. Yao *et. al.* (2) sin studie viste at de ulike

konsentrasjonene hadde større hemmende effekt ved lengre eksponering. Derfor ville det også vært hensiktsmessig å undersøke flere tidsintervall. Dette vil kunne gi informasjon om hvilke variabler som potensielt kan skru på de normale apoptosemekanismene i cellene igjen, slik at kreftcellene ikke fortsetter å dele seg i det uendelige.

Lungekreft er i dag en stor trussel mot den globale folkehelsen (14). Dagens behandlingsformer har stort forbedringspotensial, særlig rettet mot bivirkninger og senskader. De tradisjonelle behandlingene har liten spesifisitet på celler, og friske celler påvirkes derfor i stor grad (3). Om det kan bevises at DHA påvirker og hemmer celleproliferasjonen til lungekreftceller, kan det være et stort steg i riktig retning innen behandling av lungekreft. DHA kan potensielt ha effekt alene eller i kombinasjon med eksisterende behandlingsformer, som stråling og cellegift (3). Det gjenstår imidlertid fortsatt en del forskning før vi vet sikkert hvordan omega-3-fettsyrene kan utnyttes i behandling av lungekreft (56).

## 6 Konklusjon

Analysen ved bruk av flowcytometer for å undersøke cellesyklus i A549-celler tyder på at DHA har økt hemmende effekt på celleproliferasjonen med økende konsentrasjon. Resultatene viser en større andel celler i G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen for celler eksponert for DHA, sammenlignet med kontroll. En konsentrasjon på 40 µg/ml DHA ga 38,2 % andel celler i fasen, mens 60 µg/ml DHA ga 44,3 %. Kontrollene lå på 36,8 % og 36,2 %. Denne økningen i andel celler kan tyde på at det forekommer en arrest i denne fasen og at DHA potensielt kan skru på de normale apoptosemekanismene i kreftcellene. Det er derimot for lite prøvemateriale til å trekke en slik konklusjon basert på resultatene fra dette forsøket. Det hadde også vært nødvendig med en komparativ analyse for å se på graden av påvirkning DHA har på celleproliferasjonen og nøyaktig hva som skjer.

## 7 Litteratur

1. Zajdel A, Wilczok A, Tarkowski M. Toxic effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in human lung A549 cells. *Toxicology in Vitro*. 2015;30(1, Part B):486-91.
2. Yao Q-H, Zhang X-C, Fu T, Gu J-Z, Wang L, Wang Y, et al.  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids inhibit the proliferation of the lung adenocarcinoma cell line A549 in vitro. *Mol Med Rep*. 2014;9(2):401-6.
3. D'Eliseo D, Velotti F. Omega-3 Fatty Acids and Cancer Cell Cytotoxicity: Implications for Multi-Targeted Cancer Therapy. *Journal of Clinical Medicine*. 2016;5(2):15.
4. Medisinsk ordbok [Internett]. Felleskatalogen; [cited 2021 5. mai]. Available from: <https://www.felleskatalogen.no/medisin/ordbok/a>.
5. Apoptose [Internett]. UiO - institutt for biovitenskap; 2011 [updated 8. mai 2020; cited 2021 5. mai]. Available from: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/a/apoptose.html>.
6. Li Y, Fan J, Ju D. 15 - Neurotoxicity concern about the brain targeting delivery systems. In: Gao H, Gao X, editors. *Brain Targeted Drug Delivery System*: Academic Press; 2019. p. 377-408.
7. Eksponentiell vekst [Internett]. UiO - institutt for biovitenskap; 2011 [updated 12. des 2019; cited 2021 5. mai]. Available from: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/e/eksponensiell.html>.
8. Fluorescens [Internett]. UiO - institutt for biovitenskap; 2011 [updated 29. apr 2021; cited 2021 5. mai]. Available from: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/f/fluorescens.html>.
9. In vitro [Internett]. UiO - institutt for biovitenskap; 2011 [updated 4. feb 2011; cited 2021 5. mai]. Available from: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/i/invitro.html>.
10. Common Cell Culture Problems: Poor Cell Growth [Internett]. Sigma Aldrich; [cited 2021 5. mai]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/cell-culture/poor-cell-growth.html>.
11. Mørland V. Mitogen [Internett]. Store norske leksikon; 2019 [updated 2. jan 2020; cited 2021 5. mai]. Available from: <https://snl.no/mitogen>.
12. Mutasjon [Internett]. UiO - institutt for biovitenskap; 2011 [updated 21. des 2020; cited 2021 5. mai]. Available from: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/m/mutasjon.html>.

13. Roald B. Proliferasjon [Internett]. Store medisinske leksikon; 2009 [updated 30. april 2021; cited 2021 5. mai]. Available from: <https://sml.snl.no/proliferasjon>.
14. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2021.
15. Kreft [Internett]. NHI; 2018 [cited 2021 17. feb]. Available from: <https://nhi.no/kroppen-var/sykdomsprosesser/kreft/>.
16. Cancer in Norway 2019 - Cancer incidence, mortality, survival and prevalence in Norway [Internett]. Norway: Cancer Register of Norway; 2020 [cited 2021 19. feb]. Available from: [https://www.kreftregisteret.no/globalassets/cancer-in-norway/2019/cin\\_report.pdf](https://www.kreftregisteret.no/globalassets/cancer-in-norway/2019/cin_report.pdf).
17. Kreft i Norge [Internett]. Kreftforeningen; 2020 [cited 2021 19. feb]. Available from: <https://kreftforeningen.no/om-kreft/kreft-i-norge/>.
18. Kreft i Norge - kostnader for pasientene, helsetjenesten og samfunnet [Internett]. Oslo Economics; 2019 [cited 2021 19. feb]. Available from: [https://osloeconomics.no/wp-content/uploads/20161014-Kreftkostnader\\_i\\_Norge-WEB-Del1-Kap1-8.pdf](https://osloeconomics.no/wp-content/uploads/20161014-Kreftkostnader_i_Norge-WEB-Del1-Kap1-8.pdf).
19. Lungekreft [Internett]. Kreftregisteret; [updated 21. jan 2021; cited 2021 19. feb]. Available from: <https://www.kreftregisteret.no/Temasider/kreftformer/Lungekreft/>.
20. Klepp O, Olsen TK. Kreftbehandling [Internett]. Store medisinske leksikon; 2012 [updated 7. oktober 2020; cited 2021 15. mars]. Available from: <https://sml.snl.no/kreftbehandling>.
21. Hva er kreft? [Internett]. Kreftforeningen; [updated 23. oktober 2020; cited 2021 17. feb]. Available from: <https://kreftforeningen.no/om-kreft/hva-er-kreft/>.
22. Mongre RK, Mishra CB, Prakash A, Jung S, Lee BS, Kumari S, et al. Novel Carbazole-Piperazine Hybrid Small Molecule Induces Apoptosis by Targeting BCL-2 and Inhibits Tumor Progression in Lung Adenocarcinoma in Vitro and Xenograft Mice Model. Cancers (Basel). 2019;11(9):1245.
23. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson AD, Lewis J, Raff M, et al. Essential cell biology. 4th ed. New York, NY: Garland Publishing; 2014.
24. Icard P, Fournel L, Wu Z, Alifano M, Lincet H. Interconnection between Metabolism and Cell Cycle in Cancer. Trends in Biochemical Sciences. 2019;44(6):490-501.

25. Brody LC. Cell Cycle [Internet]. NIH: National Human Genome Research Institute; [cited 2021 19. januar]. Available from: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Cell-Cycle>.
26. Rye C, Wise R, Jurukovski V, DeSaix J, Choi J, Avissar Y. Control of the Cell Cycle [Internet]. Houston, TX: OpenStax; 2016 [cited 2021 19. januar]. Available from: <https://openstax.org/books/biology/pages/10-3-control-of-the-cell-cycle>.
27. Williams GH, Stoeber K. The cell cycle and cancer. *The Journal of Pathology*. 2012;226(2):352-64.
28. Pietenpol JA, Stewart ZA. Cell cycle checkpoint signaling: Cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology*. 2002;181-182:475-81.
29. Pfeffer CM, Singh ATK. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(2).
30. Mirzoyan Z, Sollazzo M, Allocca M, Valenza AM, Grifoni D, Bellosta P. *Drosophila melanogaster*: A Model Organism to Study Cancer. *Front Genet*. 2019;10.
31. Brown JM, Attardi LD. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nature Reviews Cancer*. 2005;5(3):231-7.
32. Ozaki T, Nakagawara A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers (Basel)*. 2011;3(1):994-1013.
33. Narayan B, Miyashita K, Hosakawa M. Physiological Effects of Eicosapentaenoic Acid (EPA) and Docosahexaenoic Acid (DHA)—A Review. *Food Reviews International*. 2006;22(3):291-307.
34. Calder PC, Yaqoob P. Understanding Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *Postgraduate Medicine*. 2009;121(6):148-57.
35. Olsen RL. *Lipidkjemi: med vekt på fisk [Kompendium]*: UiT; 2017.
36. Swanson D, Block R, Mousa SA. Omega-3 Fatty Acids EPA and DHA: Health Benefits Throughout Life. *Advances in Nutrition*. 2012;3(1):1-7.
37. Trombetta A, Maggiora M, Martinasso G, Cotogni P, Canuto RA, Muzio G. Arachidonic and docosahexaenoic acids reduce the growth of A549 human lung-tumor cells increasing lipid peroxidation and PPARs. *Chemico-Biological Interactions*. 2007;165(3):239-50.
38. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2017;37(2):163-76.
39. Macey MG. *Flow cytometry*: Springer; 2007.

40. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. 2018;120:5.1.-5.1.11.
41. Preparing Fixed Cells for Labeling [Internet]. ThermoFischer; [cited 2021 8. apr]. Available from: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/imaging-basics/sample-considerations/preparing-fixed-cells-imaging.html>.
42. Propidium Iodide [Internet]. ThermoFischer; [cited 2021 8. apr]. Available from: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/propidium-iodide.html>.
43. Flow cytometric analysis of cell cycle with propidium iodide DNA staining [Internet]. Abcam; [cited 2021 8. apr]. Available from: <https://www.abcam.com/protocols/flow-cytometric-analysis-of-cell-cycle-with-propidium-iodide-dna-staining>.
44. Darzynkiewicz Z, Bedner E, Smolewski P. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Seminars in Hematology*. 2001;38(2):179-93.
45. Sundararajan R, Salameh T, Camarillo IG, Prabu RR, Natarajan A, Sankaranarayanan K. 10 - Irreversible electroporation: a drug-free cancer treatment. In: Sundararajan R, editor. *Electroporation-Based Therapies for Cancer*: Woodhead Publishing; 2014. p. 219-43.
46. Adherent Cell Culture vs. Suspension Cell Culture [Internet]. ThermoFischer; [cited 2021 16. feb]. Available from: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-lines/adherent-vs-suspension-culture.html>.
47. DMEM/F-12, GlutaMAX™ supplement [Internet]. ThermoFischer; [cited 2021 16. feb].
48. Held P. Using the Cytation 5 Cell Imaging Microplate Reader to Monitor Cell Culture Status [Internet]. Winooski, VT USA: BioTek; 2018 [updated 22. Mars 2018; cited 2021 16. feb]. Available from: <https://www.biotek.com/resources/application-notes/using-phenol-red-to-assess-ph-in-tissue-culture-media/>.
49. Tronsmo A. *Innføring i mikrobiologi*. 1. ed. Norge: Universitetsforlaget; 2016.
50. Straube T, Müller C. How to do a Proper Cell Culture Quick Check [Internet]. Leica Microsystems; 2016 [cited 2021 16. feb]. Available from: <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/how-to-do-a-proper-cell-culture-quick-check/>.
51. Talukder MA, Menyuk CR, Kostov Y. Distinguishing between whole cells and cell debris using surface plasmon coupled emission. *Biomed Opt Express*. 2018;9(4):1977-91.



52. Givan AL. Critical aspects of staining for flow cytometry [Internett]. 2000 [cited 2021 08. mars]. Available from: <https://med.virginia.edu/flow-cytometry-facility/wp-content/uploads/sites/170/2015/10/Critical-Aspects-of-Staining-Cells.pdf>.
53. Rapport fra brukerundersøkelse ved dagsenteret ved Lillehammer helsehus 2012 [Internett]. Lillehammer: Lillehammer kommune; 2012 [cited 2021 12. mai]. Available from: <https://docplayer.me/49035169-Rapport-fra-brukerundersokelse-ved-dagsenteret-ved-lillehammer-helsehus-2012.html>.
54. Skovlund E. Når bør man velge en ikke-parametrisk metode? [Internett]. Tidsskriftet; 2017 [cited 2021 19. apr]. Available from: <https://tidsskriftet.no/2017/05/medisin-og-tall/nar-bor-man-velge-en-ikke-parametrisk-metode>.
55. Yin Y, Sui C, Meng F, Ma P, Jiang Y. The omega-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid inhibits proliferation and progression of non-small cell lung cancer cells through the reactive oxygen species-mediated inactivation of the PI3K /Akt pathway. *Lipids in Health and Disease*. 2017;16(1):87.
56. Vega OM, Abkenari S, Tong Z, Tedman A, Huerta-Yeppez S. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Lung Cancer: nutrition or Pharmacology? *Nutrition and Cancer*. 2021;73(4):541-61.

## A.0 Vedlegg

### A.1 Reagenser

*Tabell 2: Oversikt over de ulike reagensene som ble brukt gjennom forsøket, sammen med tilhørende artikkelnummer og leverandør.*

<b>REAGENS</b>	<b>ARTIKKELNUMMER</b>	<b>LEVERANDØR</b>
Cellebrett (6 brønner)	657 160	Greiner bio-one
Celleflasker (75cm <sup>2</sup> )	734-2313	VWR
A549, passasjenummer-05	ATCC CCL-185	ATCC
Cis-4, 7, 10, 13, 16, 19 – Docosahexaenoic acid (DHA)	53171-10MG	Sigma-Aldrich
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	SH30588.02	HyClone
DMEM/F-12 + GlutaMAX (1X)	10565-018	Gibco
Fetal Bovine Serum (FBS) One shot	A3840401	Gibco
Trypsin-EDTA (0,25 %)	25200-056	Gibco
Penicillin Streptomycin 10,000 units/mL penicillin 10,000 µg/mL streptomycin	15140-148	Gibco
Flow Cytometer Kit	653158	BD Accuri Cytometers
6-peak beads	653145	BD Accuri Cytometers
8-peak beads	653144	BD Accuri Cytometers
Falconrør (50ml poly-Propylene Conical Tube)	352070	Falcon
Falconrør (15 ml high-clarity Polypropylene Conical Tube)	352196	Falcon

FxCycle™ PI/RNase Staining solution	F10797	Invitrogen by Thermo Fischer Scientific
Burker Tellekammer; C-Chip	CHC-B01	NanoEnTek
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	D8537-500ML	Sigma-Aldrich
32 mm sterilfiltre med 0.2 µm Supor Membran	4652	PALL Life Sciences
Soft-Ject Luer 5ml 10ml 20ml	5050-000V0 5100-000V0 5200-000V0	Henke-Sass wolf

## A.2 Prosedyrer

### A.2.1 Rutiner på cellelaboratorium

Prosedyre for rutiner som skal følges i cellelaboratoriet for å forhindre kontaminering i cellekulturen og spredning av cellemateriale i miljøet. Prosedyren er opprinnelig hentet fra celledyrkningskurs i faget anvendt bioteknologi ved NTNU.

1. Ta på skotrekk før man går inn i cellelaboratoriet.
2. Dersom UV-lys skiltet henger på døra, må UV-lyset slås av umiddelbart.
3. LAF-benken må slås på 15 minutter før bruk. Pass på at luftstrømmen har riktig fart før bruk.
4. Alltid bruk labfrakk og dersom man har langt hår – sett det i strikk.
5. Vask henda og ta på hansker. Desinfiser hanskene og armene med 70 % etanol.
6. Spray innsiden av LAF-benken med 70 % etanol når den slås på. Alt man tar inn i benken må sprayes med 70 % etanol.
7. Tørk vekk søl med en gang og vask overflaten med 70 % etanol.
8. Ha så få gjenstander inne i LAF-benken under arbeid, unngå å ha noe rett på luftstrømmen.
9. Planlegg arbeidet i LAF-benken. Alt man trenger skal være plassert inni i benken før man starter. Mediet og saltløsning må ha ideell temperatur før man starter. Unngå å gå ut og inn av benken flere ganger når man jobber med celler. Hvis man må ut henda fra LAF-benken må de sprayes med 70 % etanol før man tar de inn igjen.

10. LAF-benken må slås på 15 minutter før bruk. Pass på at luftstrømmen har riktig fart før bruk.
11. Alltid bruk labfrakk og dersom man har langt hår må det i strikk.
12. Vask henda og ta på hansker. Desinfiser hanskene og armene med 70 % etanol.
13. Spray innsiden av LAF-benken med 70 % etanol når den slås på. Alt man tar inn i benken må sprayes med 70 % etanol.
14. Tørk vekk søl med en gang og vask overflaten med 70 % etanol.
15. Ha så få gjenstander inne i LAF-benken under arbeid, unngå å ha noe rett på luftstrømmen.
16. Planlegg arbeidet i LAF-benken. Alt man trenger skal være plassert inni i benken før man starter. Mediet og saltløsning må ha ideell temperatur før man starter. Unngå å gå ut og inn av benken flere ganger når man jobber med celler. Hvis man må ut henda fra LAF-benken må de sprayes med 70 % etanol før man tar de inn igjen.
17. Aldri åpne celleflasker, plater og pipetter på utsiden av kabinettet. Alltid sett på lokk og topp så fort som mulig etter du har tatt de av.
18. Bruk beger til brukt medium og spisser tilbake i sine respektive beholdere inne i kabinettet og kast det i farlig avfall-kontaineren til slutt.
19. Aldri rør de serologiske pipettene direkte.
20. Lokk og topper bør settes med bunnen ned på benken etter de er fjernet fra flaskene.
21. Aldri jobb med to ulike cellelinjer samtidig i LAF-benken!! Dette kan føre til krysskontaminering.
22. Aldri bruk den samme pipetten i ulike beholdere og aldri la pipetten stå i flasken etter bruk.
23. Prøv å ikke rør flaskehalsen med pipetten.
24. Vær så stille som mulig når man jobber i LAF-benken. Bruk ansiktsmaske hvis du er forkjølet.
25. Jobb så raskt som mulig
26. Sett cellene tilbake i inkubator. Fjern alt utstyr fra LAF-benken og rengjør benken med 85 % EtOH. Kjør ned coveret på LAF-benken og sett på UV-lys. Man skal ikke oppholde seg på cellelaboratoriet mens UV-lyset er på. Dette kan føre til alvorlige brannskader. UV-lyset blir slått automatisk av etter to timer.

### A.2.2 Cellekultivering

Prosedyren beskriver fremgangsmåte ved dyrking og splitting av A549-celler.

1. Slå på LAF-benken og rengjør arbeidsbenken med 85 % EtOH, tørk av med papir.
2. Forbered forsøket og klargjør alt aktuelt utstyr i LAF-benken.
3. Sjekk konfluensen til cellene i et invert mikroskop. Den skal være rundt 80 % ved splitting.
4. Forbered nye celleflasker og cellebrett ved å tilsette DMEM-medium. Volumet avhenger av splittingsforhold og arealet i de nye beholderene.
  - a. 5,5 ml DMEM-medium tilsettes i hver brønn på cellebrettet.
  - b. 17 ml DMEM-medium tilsettes i hver celleflaske
5. Pipetter bort gammelt medium fra celleflaska som skal splittes.
6. Vask cellene forsiktig med 2x5 ml HBSS, sug av og kast.
7. Tilsett 1 ml 0,25 % trypsin. Sørg for at alle cellene er dekt.
8. Kakk flasken forsiktig i hånda. Se på cellene i et invert mikroskop og når omtrent 80 % av cellene har løsnet fra overflaten, er trypsineringen ferdig.
9. Tilsett 5 ml DMEM-medium til kulturflasken for å inaktivere trypsin.
10. Forsiktig bland cellesuspensjonen og deretter overfør hele volumet til et 15 ml Falconrør.
11. Sentrifuger cellesuspensjonen på 1200 rpm i 3 minutter.
12. Fjern supernatanten. Pass på å ikke sug opp cellepelleten.
13. Tilsett 1 ml DMEM-medium for å løsne pelleten. Pipetter forsiktig opp og ned.
14. Tilsett 8 ml DMEM-medium til cellesuspensjon.
15. I celleflaskene og cellebrettet med medium fra punk 4 tilsettes cellesuspensjon.
  - a. 0,5 ml cellesuspensjon tilsettes hver brønn på cellebrettet.
  - b. 3 ml cellesuspensjon tilsettes i hver celleflaske.
16. Bland cellesuspensjonen og medium forsiktig ved å bevege på flaske og brett.
17. Sett celleflaskene og cellebrettene i inkubator på 37°C og 5 % CO<sub>2</sub>.
18. Kast alt av engangsutstyr i risikoavfall, samt spill. Tørk opp søl og vask alt med 85 % EtOH. Ta ned skjerm på LAF-benk og skru på UV-lys.

### A.2.3 Fiksering og preparering av prøvemateriale

Før analyse på flowcytometeret må prosedyren for fiksering og preparering av prøvemateriale gjennomføres. Prosedyren er opprinnelig hentet fra celledyrkningskurs i faget anvendt bioteknologi ved NTNU.

1. Start LAF-benken etter prosedyre
2. Planlegg arbeidet i LAF-benken og gjør klart alt av utstyr
3. Konfluensen til cellene sjekkes i et invert mikroskop, optimal konfluens er mellom 70-80 % v/splitting.
4. Sug av gammelt medium og kast
5. Cellene skylles med 2x3ml HBSS og deretter suges av og kastes. Samme pipette blir brukt i brønnene på samme cellebrett.
6. For å løsne cellene fra underlaget blir 1 ml 0,25 % trypsin tilsatt. Viktig at trypsinen dekker hele brønnen, dette gjøres ved å bevege brettet forsiktig fra side til side. La cellebrettet stå i romtemperatur når trypsineringen foregår.
7. Gi brettet et forsiktig dunk og studer trypsineringen i et invert mikroskop og når omtrent 80 % av cellene har løsnet fra overflaten, er trypsineringen ferdig.
8. 4ml medium blir tilsatt for å inaktivere trypsinen.
9. For å løsne cellene fra underlaget brukes en celleskrape i rekkefølgen brønn 1-6.
10. Fra hver brønn pipetterer en ut cellesuspensjonen og tilsetter de i hvert sitt falconrør.
11. 10 µl av cellesuspensjonen fra falconrørene blir tilsatt i hvert sitt Burker tellekammer og talt opp.
12. Sentrifuger falconrørene i 5 minutter på 1200 rpm.
13. Pipetter ut supernatanten og kast.
14. Tilsett 0,5ml PBS (til 1 000 000 celler)/1 ml PBS (til over 1 000 000 celler) til hvert falconrør. Bland cellepelleten og PBS ved å pipettere opp og ned.
15. Tilsett hele cellesuspensjonen dersom det er under 1 000 000 celler til et falconrør, dersom det er over 1 000 000 celler tilsett 0,5ml til to 15ml falconrør, som allerede inneholder 4 ml iskald etanol (96 % EtOH).
16. Vortex falconrørene.
17. Plasser så rørene i fryseren, i minst 15 minutter.
18. Ta rørene ut fra fryseren og sentrifuger prøvene i 5 minutter ved 1200 rpm.
19. Sug av supernatanten og kast. Knips lett på falconrøret for å løse opp pelleten.
20. Tilsett 5 ml PBS til hvert rør og vortex

21. La falconrørene stå i romtemperatur i 15 minutter
22. Sentrifuger falconrørene i 5 minutter ved 1200 rpm.
23. Sug av supernatanten og kast. Knips lett på falconrøret for å løse opp pelleten.
24. Tilsett 0,5 ml PI/RNase til hvert falconrør, dekk til med aluminiumsfolie og dermed inkuber i 90 minutter i fryser.

#### *A.2.4 Kalibrering av flowcytometer*

Prosedyre for kalibrering av flowcytometer blir brukt før og etter bruk av maskinen. Prosedyren er opprinnelig hentet fra celledyrkningskurs i faget anvendt bioteknologi ved NTNU.

1. Forbered 6 ulike kalibreringsrør og la de stå i et stativ
2. De ulike kalibreringsrørene inneholder:
  - 1) Clean
  - 2) Decontamination
  - 3) MQ-vann
  - 4) 8 peak beads
  - 5) 6 prak beads
  - 6) MQ-vann
3. Rør 1 og 2 er allerede gjort klart. Rør 4 inneholder 0,5 ml MQ-vann + 1 dråpe 8 peak beads mix. Rør 5 inneholder 0,5 ml MQ-vann + 1 dråpe 6 peak beads mix.
4. Start datamaskinen og trykk på ikonet for Flow Cytometer
5. Bla gjennom filene og finn filen: «wash and celan/wash and template». Velg «wash and template» og vent til det kommer et grønt signal.
6. Velg følgende paramtere: Clean 2-5 min FAST
7. Plasser rør 1 i instrumentet og trykk RUN! Lagre fila som: dato, tid og navn. Kontroller at eventene ikke overstiger 100 events/s.
8. Erstatt rør 1 med rør 2 (decontamination) og trykk RUN!
9. Erstatt rør 2 med rør 3 (MQ-vann) og trykk RUN!
10. Erstatt rør 3 med rør 4 (8 peak beads) og velg paramteret SLOW og 10 000 events/s. Events skal ligge ca. Rundt 200 – reguler opp hastigheten hvis ikke. Sjekk plot 3. Optimalt skal M6 FL2-H være mindre enn 5 %.
11. Etter rør 4 (8 peak beads) trykker man BACKFLUSH! Kontroller at en dråpe kommer ut av instrumentet. Tørk med linsepapir.

12. Erstatt rør 4 med rør 5 (6 peak beads) og velg parameteret *SLOW* og 10 000 events/s. Sjekk plot 6. M12 CV FL-4-H skal optimalt være mindre enn 5 %.
13. Etter rør 5 (6 peak beads) trykker man **BACKFLUSH!** Kontroller at en dråpe kommer ut av instrumentet. Tørk med linsepapir.
14. Erstatt rør 5 med rør 6 (MQ-vann). Velg parameter *FAST* i 5 minutter. La røret stå igjen i instrumentet.

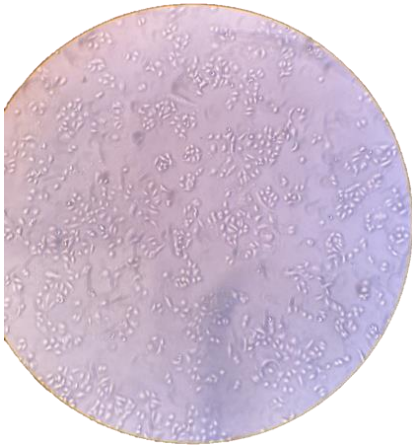
#### *A.2.5 Analyse på Flow Cytometer*

Prosedyre for analysering av celler i løsning på Flow Cytometer. Prosedyren er opprinnelig hentet fra celledyrkningskurs i faget anvendt bioteknologi ved NTNU.

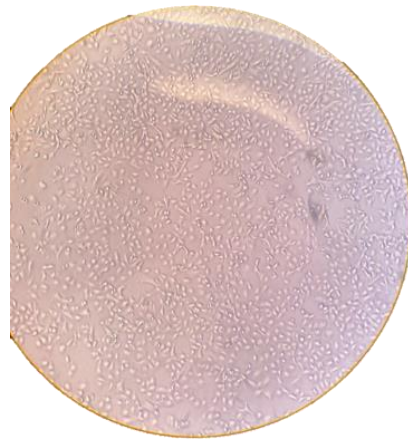
1. Kalibrer Flow Cytometeret etter prosedyren over.
2. Tilsett 500 µl prøve fra falconrør til sitt respektive flowcytometer prøverør.
3. Slå på datamaskin. Finn fil med riktig templat.
4. Velg parameterne *SLOW* og 20 000 events pr sek.
5. Erstatt rør 6 med MQ-vann, med prøve 1 og trykk *RUN*
6. Erstatt prøve 1 med neste prøve etc.
7. Når analysen av alle prøvene er gjennomført, kalibreres Flow Cytometeret igjen etter prosedyren over.



### A.3 A549-celler

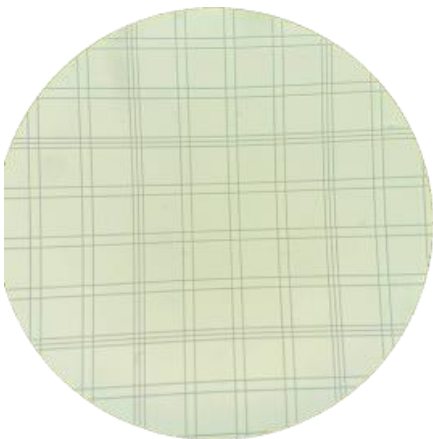


**Figur 6:** Utklipp av A549-cellene studert i invert mikroskop, vurdert til en konfluens på 50%.



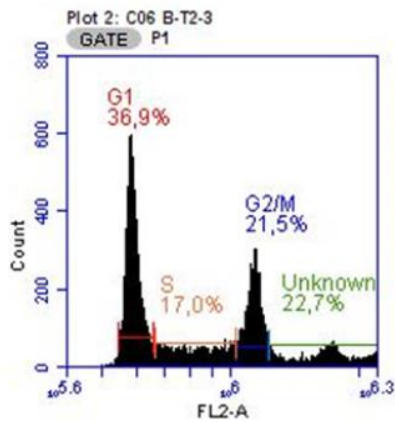
**Figur 7:** Utklipp av A549-cellene studert i invert mikroskop, vurdert til en konfluens på 80-90%.

### A.4 Utsnitt av rute i Bürker tellekammer

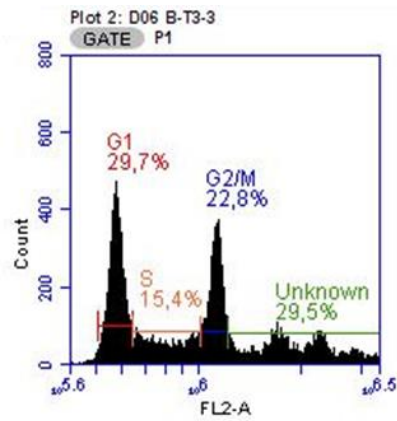


**Figur 6:** Utsnitt av en rute i Bürker tellekammer. En rute omfatter alle kvadratene innenfor de triple linjene.

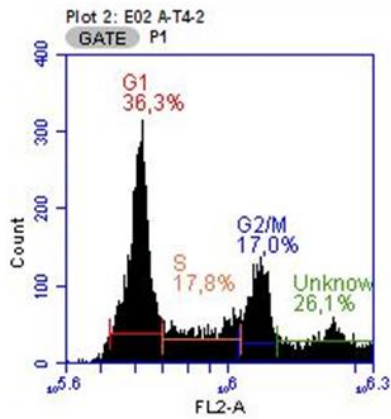
## A.5 Utklipp av histogram fra analyse på flowcytometer



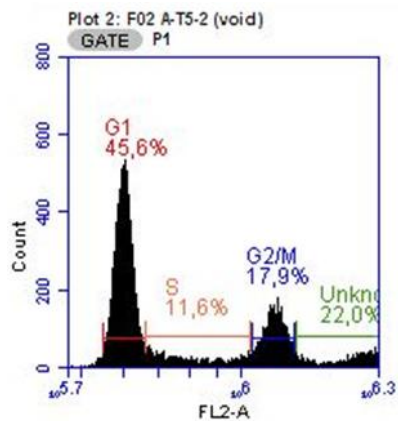
**Figur 9:** Utklipp av histogram plot 2 på flowcytometer. Utklippet er fra K40.2.2.



**Figur 10:** Utklipp av histogram plot 2 på flowcytometer. Utklippet er fra K60.2.2.



**Figur 11:** Utklipp av histogram plot 2 på flowcytometer. Utklippet er fra P40.3.2.



**Figur 12:** Utklipp av histogram plot 2 på flowcytometer. Utklippet er fra P60.3.2.

## A.6 Prosentandel celler i de ulike fasene

Her presenteres tabeller som viser andelen celler (A) i prosent som befant seg i de ulike fasene av cellesyklusen i de tre delforsøkene. Verdiene fra analysen på flowcytometeret er hentet fra plot 2 etter *gating*. Systemet for navnsetting av de ulike parallellene forklares med eksempel P40.2.4: prøve med konsentrasjon 40 µg/ml, forsøk 2, parallell 4. Kontrollene navnesettes på samme måte, men med K som forkortelse.

**Tabell 3:** Oversikt over andelen celler, A, i prosent i  $G_1/G_0$ -fasen i de ulike delforsøkene. Kolonnene skiller de ulike delforsøkene og radene skiller de ulike typene prøver fra hverandre. Videre gis prøvene navn og nye rader skiller dem. Verdiene i de skraverte feltene er ekskludert i t-testene.

DELFORSLØK 1			DELFORSLØK 2			DELFORSLØK 3		
		A (%)			A (%)			A (%)
K40	K40.1.1	31,47	K40	K40.2.1	39,91	K40	K40.3.1	36,04
	K40.1.2	38,06		K40.2.2	36,95		K40.3.2	38,28
DHA40	P40.1.1	34,67	DHA40	P40.2.1	37,48	DHA40	P40.3.1	29,30
	P40.1.2	34,84		P40.2.2	42,83		P40.3.2	36,34
	P40.1.3	36,93		P40.2.3	40,48		P40.3.3	38,34
	P40.1.4	40,81		P40.2.4	38,95		P40.3.4	38,59
K60	K60.1.1	35,81	K60	K60.2.1	39,47	K60	K60.3.1	38,82
	K60.1.2	38,37		K60.2.2	29,71		K60.3.2	34,76
DHA60	P60.1.1	39,60	DHA60	P60.2.1	44,75	DHA60	P60.3.1	47,40
	P60.1.2	41,96		P60.2.2	46,34		P60.3.2	45,56
	P60.1.3	41,37		P60.2.4	45,50		P60.3.3	46,00
	P60.1.4	39,54		P60.2.5	46,71		P60.3.4	45,08
	P60.1.5*	41,58						
	P60.1.6*	42,54						
	P60.1.7*	40,05						

**Tabell 4:** Oversikt over andelen celler, A, i prosent i S-fasen i de ulike delforsøkene. Kolonnene skiller de ulike delforsøkene og radene skiller de ulike typene prøver fra hverandre. Videre gis prøvene navn og nye rader skiller dem. Verdiene i de skraverte feltet er ekskludert i t-testene.

DELFOR SØK 1			DELFOR SØK 2			DELFOR SØK 3		
		A (%)			A (%)			A (%)
K40	K40.1.1	14,27	K40	K40.2.1	15,61	K40	K40.3.1	11,97
	K40.1.2	15,05		K40.2.2	16,97		K40.3.2	16,30
DHA40	P40.1.1	11,73	DHA40	P40.2.1	16,15	DHA40	P40.3.1	11,56
	P40.1.2	12,01		P40.2.2	14,69		P40.3.2	17,75
	P40.1.3	13,70		P40.2.3	11,40		P40.3.3	17,88
	P40.1.4	14,47		P40.2.4	14,71		P40.3.4	16,20
K60	K60.1.1	12,53	K60	K60.2.1	15,18	K60	K60.3.1	17,66
	K60.1.2	16,09		K60.2.2	15,44		K60.3.2	15,37
DHA60	P60.1.1	13,48	DHA60	P60.2.1	8,05	DHA60	P60.3.1	9,90
	P60.1.2	14,58		P60.2.2	7,67		P60.3.2	11,60
	P60.1.3	14,67		P60.2.3	8,10		P60.3.3	11,21
	P60.1.4	12,56		P60.2.4	8,83		P60.3.4	12,67
	P60.1.5*	12,97						
	P60.1.6*	13,51						
	P60.1.7*	12,78						

**Tabell 5:** Oversikt over andelen celler, A, i prosent i G<sub>2</sub>/M-fasen i de ulike delforsøkene. Kolonnene skiller de ulike delforsøkene og radene skiller de ulike typene prøver fra hverandre. Videre gis prøvene navn og nye rader skiller dem. Verdiene i de skraverte felten er ekskludert i t-testene.

DELFORSØK 1			DELFORSØK 2			DELFORSØK 3		
		A (%)			A (%)			A (%)
K40	K40.1.1	20,58	K40	K40.2.1	20,06	K40	K40.3.1	21,09
	K40.1.2	18,64		K40.2.2	21,5		K40.3.2	18,02
DHA40	P40.1.1	18,66	DHA40	P40.2.1	18,51	DHA40	P40.3.1	13,10
	P40.1.2	20,72		P40.2.2	17,17		P40.3.2	17,01
	P40.1.3	15,80		P40.2.3	14,02		P40.3.3	16,13
	P40.1.4	17,78		P40.2.4	20,15		P40.3.4	18,06
K60	K60.1.1	17,94	K60	K60.2.1	23,44	K60	K60.3.1	18,25
	K60.1.2	19,28		K60.2.2	22,77		K60.3.2	10,13
DHA60	P60.1.1	17,91	DHA60	P60.2.1	24,47	DHA60	P60.3.1	18,21
	P60.1.2	17,01		P60.2.2	26,73		P60.3.2	17,90
	P60.1.3	17,02		P60.2.3	25,70		P60.3.3	17,87
	P60.1.4	17,85		P60.2.4	23,10		P60.3.4	18,37
	P60.1.5*	18,03						
	P60.1.6*	17,54						
	P60.1.7*	18,36						

## A.7 Resultater fra utførte t-tester

A.7.1 Resultat fra utført t-test for å studere forskjellen mellom 40 µg/ml i de ulike delforsøkene

**Tabell 6:** Tabellen viser resultat fra t-test, for å studere forskjellen mellom 40 µg/ml i de ulike delforsøkene 1-3. Kolonnen til venstre viser hvilke forsøk som blir sammenlignet. De to neste kolonnene viser cellesyklusfasene, gjennomsnittsverdien og standardavviket i de ulike fasene, oppgitt i prosent. Deretter vil t-verdien, p-verdien og den utførte t-testen bli presentert i de tre siste kolonnene. Den siste kolonnen tester nullhypotesen og den alternative hypotesen.

FORSØK	FASE	GJENNOMSNIITT OG STD. AVVIK	T-VERDI	P-VERDI	T-TEST
1 vs. 2	G <sub>1</sub> /G <sub>0</sub>	36,81 ± 2,86 39,94 ± 2,29	-1,71	0,14	p>0,14
	S	12,98 ± 1,32 15,18 ± 0,84	-2,51	0,05	p<0,05
	G <sub>2</sub> /M	19,05 ± 1,51 18,61 ± 1,49	0,36	0,74	p>0,74
1 vs. 3	G <sub>1</sub> /G <sub>0</sub>	36,81 ± 2,86 37,76 ± 1,23	-0,53	0,62	p>0,62
	S	12,98 ± 1,32 17,28 ± 0,93	-4,76	0,01	p<0,01
	G <sub>2</sub> /M	19,05 ± 1,51 17,07 ± 0,97	1,92	0,13	p>0,13
2 vs. 3	G <sub>1</sub> /G <sub>0</sub>	39,94 ± 2,29 37,76 ± 1,23	1,47	0,20	p>0,20
	S	15,18 ± 0,84 17,28 ± 0,93	-2,89	0,04	p<0,04
	G <sub>2</sub> /M	18,61 ± 1,49 17,07 ± 0,97	1,50	0,21	p>0,21

A.7.2 Resultat fra utført t-test for å studere forskjellen mellom 60 µg/ml i de ulike delforsøkene

**Tabell 7:** Tabellen viser resultat fra t-test, for å studere forskjellen mellom 60 µg/ml i de ulike delforsøkene 1-3. Kolonnen til venstre viser hvilke forsøk som blir sammenlignet. De to neste kolonnene viser cellesyklusfasene, gjennomsnittsverdien og standardavviket i de ulike fasene, oppgitt i prosent. Deretter vil t-verdien, p-verdien og den utførte t-testen bli presentert i de tre siste kolonnene. Den siste kolonnen tester nullhypotesen og den alternative hypotesen.

FORSØK	FASE	GJENNOMSNIITT OG STD. AVVIK	T-VERDI	P-VERDI	T-TEST
1 vs. 2	G <sub>1</sub> /G <sub>0</sub>	40,95 ± 1,21 45,83 ± 0,88	-7,02	0,00	p<0,00
	S	13,51 ± 0,84 8,17 ± 0,48	11,52	0,00	p<0,00
	G <sub>2</sub> /M	17,67 ± 0,51 25,00 ± 1,57	-11,72	0,00	p<0,00
1 vs. 3	G <sub>1</sub> /G <sub>0</sub>	40,95 ± 1,21 46,01 ± 1,00	-7,07	0,00	p<0,00
	S	13,51 ± 0,84 11,35 ± 1,14	3,63	0,01	p<0,01
	G <sub>2</sub> /M	17,67 ± 0,51 18,09 ± 0,24	-1,50	0,17	p>0,17
2 vs. 3	G <sub>1</sub> /G <sub>0</sub>	45,83 ± 0,89 46,01 ± 1,00	-0,28	0,79	p>0,79
	S	8,17 ± 0,48 11,35 ± 1,14	-5,11	0,00	p<0,00
	G <sub>2</sub> /M	25,00 ± 1,57 18,09 ± 0,24	8,71	0,00	p<0,00

A.7.3 Resultat fra utført t-test for å studere forskjellen i delforsøk 1-3, mellom prøver tilsatt 40 µg/ml DHA og kontroll

**Tabell 8:** Tabellen viser resultat fra t-test, for å studere forskjellen i delforsøk 1-3 mellom prøver tilsatt 40 µg/ml DHA og kontroll. Kolonnen til venstre viser hvilke forsøk som blir sammenlignet. De to neste kolonnene viser cellesyklusfasene, gjennomsnittsverdien og standardavviket i de ulike fasene, oppgitt i prosent. Deretter vil t-verdien, p-verdien og den utførte t-testen bli presentert i de tre siste kolonnene. Den siste kolonnen tester nullhypotesen og den alternative hypotesen.

FORSØK	FASE	GJENNOMSNIITT OG STD. AVVIK	T-VERDI	P-VERDI	T-TEST
1 Prøve Kontroll	G <sub>1</sub> /G <sub>0</sub>	36,81 ± 2,86 34,77 ± 4,66	0,57	0,67	p>0,67
	S	12,98 ± 1,32 14,66 ± 0,55	-2,19	0,09	p>0,09
	G <sub>2</sub> /M	19,05 ± 1,51 19,61 ± 1,37	-0,43	0,71	p>0,71
2 Prøve Kontroll	G <sub>1</sub> /G <sub>0</sub>	39,94 ± 2,29 38,46 ± 2,14	0,78	0,52	p>0,52
	S	15,18 ± 0,84 16,29 ± 0,96	-1,33	0,32	p>0,32
	G <sub>2</sub> /M	18,61 ± 1,49 20,78 ± 1,02	-1,93	0,15	p>0,15
3 Prøve Kontroll	G <sub>1</sub> /G <sub>0</sub>	37,76 ± 1,23 37,16 ± 1,58	0,45	0,70	p>0,70
	S	17,28 ± 0,93 14,14 ± 3,06	1,41	0,39	p>0,39
	G <sub>2</sub> /M	17,07 ± 0,97 19,56 ± 2,17	-1,52	0,37	p>0,37



A.7.4 Resultat fra utført t-test for å studere forskjellen i delforsøk 1-3, mellom prøver tilsatt 60 µg/ml DHA og kontroll

**Tabell 9:** Tabellen viser resultat fra t-test, for å studere forskjellen i delforsøk 1-3 mellom prøver tilsatt 60 µg/ml DHA og kontroll. Kolonnen til venstre viser hvilke forsøk som blir sammenlignet. De to neste kolonnene viser cellesyklusfasene, gjennomsnittsverdien og standardavviket i de ulike fasene, oppgitt i prosent. Deretter vil t-verdien, p-verdien og den utførte t-testen bli presentert i de tre siste kolonnene. Den siste kolonnen tester nullhypotesen og den alternative hypotesen.

FORSØK	FASE	GJENNOMSNIITT OG STD. AVVIK	T-VERDI	P-VERDI	T-TEST
1 Prøve Kontroll	G <sub>1</sub> /G <sub>0</sub>	40,95 ± 1,21 37,09 ± 1,81	2,84	0,22	p>0,22
	S	13,51 ± 0,84 14,31 ± 2,51	-0,44	0,73	p>0,73
	G <sub>2</sub> /M	17,67 ± 0,51 18,61 ± 0,95	-1,34	0,41	p>0,41
2 Prøve Kontroll	G <sub>1</sub> /G <sub>0</sub>	45,83 ± 0,88 34,59 ± 6,90	2,29	0,26	p>0,26
	S	8,16 ± 0,49 15,31 ± 0,18	-25,99	0,00	p<0,00
	G <sub>2</sub> /M	25,00 ± 1,57 23,11 ± 0,47	2,22	0,09	p>0,09
3 Prøve Kontroll	G <sub>1</sub> /G <sub>0</sub>	46,01 ± 1,00 36,79 ± 2,87	4,41	0,14	p>0,14
	S	11,83 ± 0,76 16,52 ± 1,62	-3,83	0,16	p>0,16
	G <sub>2</sub> /M	18,09 ± 0,24 14,19 ± 7,74	0,96	0,51	p>0,51

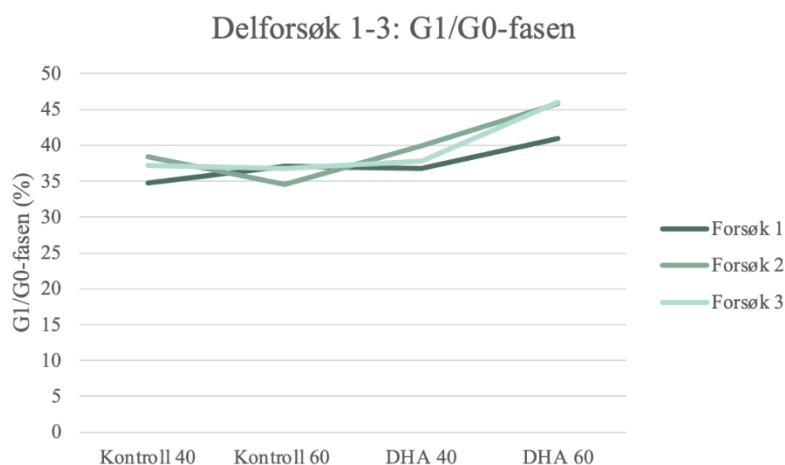
A.7.5 Resultat fra utført t-test for å studere forskjellen i delforsøk 1-3, mellom prøver tilsatt 40 µg/ml DHA og 60 µg/ml DHA

**Tabell 10:** Tabellen viser resultat fra t-test, for å studere forskjellen i delforsøk 1-3 mellom prøver tilsatt 40 µg/ml DHA og 60 µg/ml DHA. Kolonnen til venstre viser hvilke forsøk som blir sammenlignet. De to neste kolonnene viser cellesyklusfasene, gjennomsnittsverdien og standardavviket i de ulike fasene, oppgitt i prosent. Deretter vil t-verdien, p-verdien og den utførte t-testen bli presentert i de tre siste kolonnene. Den siste kolonnen tester nullhypotesen og den alternative hypotesen.

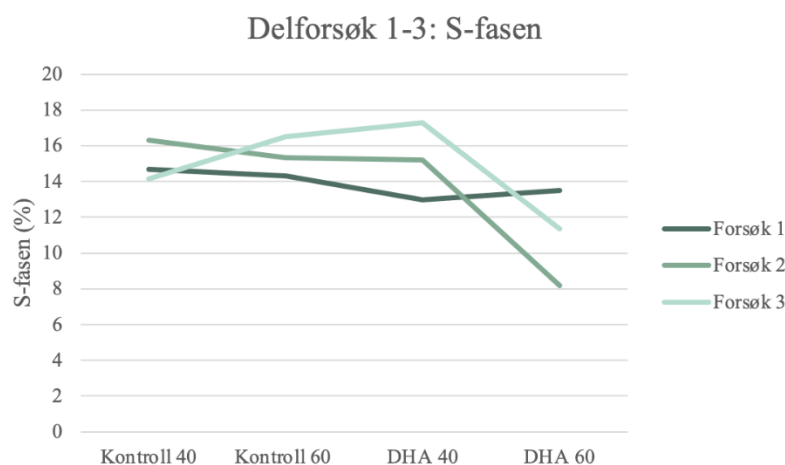
FORSØK	KONSENTRASJON	FASE	GJENNOMSNIITT OG STD. AVVIK	T-VERDI	P-VERDI	T-TEST
1	40 µg/ml 60 µg/ml	G <sub>1</sub> /G <sub>0</sub>	36,81 ± 2,86 40,95 ± 1,21	-2,76	0,05	p<0,05
		S	12,98 ± 1,32 13,51 ± 0,84	-0,72	0,51	p>0,51
		G <sub>2</sub> /M	19,05 ± 1, 51 17,67 ± 0,51	1,54	0,26	p>0,26
2	40 µg/ml 60 µg/ml	G <sub>1</sub> /G <sub>0</sub>	39,94 ± 2,29 45,83 ± 0,88	-4,8	0,01	p<0,01
		S	15,18 ± 0,84 8,16 ± 0,49	12,98	0,00	p<0,00
		G <sub>2</sub> /M	18,61 ± 1,49 25,00 ± 1,57	-5,49	0,00	p<0,00
3	40 µg/ml 60 µg/ml	G <sub>1</sub> /G <sub>0</sub>	35,64 ± 1,23 46,01 ± 1,00	-4,65	0,02	p<0,02
		S	17,28 ± 0,94 11,35 ± 1,14	7,54	0,00	p<0,00
		G <sub>2</sub> /M	17,07 ± 0,97 18,09 ± 0,24	-1,79	0,22	p>0,22

## A.8 Trend over andelen celler i de ulike fasene

**Diagram 4:** Diagrammet viser trend over andelen celler i de ulike fasene i cellesyklusen. På x-aksen viser kontroll 40, kontroll 60, DHA40 og DHA60. Langs y-aksen viser prosentandelen celler i G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen. De tre linjene i diagrammet representerer hvert delforsøk.



**Diagram 5:** Diagrammet viser trend over andelen celler i de ulike fasene i cellesyklusen. På x-aksen viser kontroll 40, kontroll 60, DHA40 og DHA60. Langs y-aksen viser prosentandelen celler i S-fasen. De tre linjene i diagrammet representerer hvert delforsøk.



**Diagram 6:** Diagrammet viser trend over andelen celler i de ulike fasene i cellesyklusen. På x-aksen viser kontroll 40, kontroll 60, DHA40 og DHA60. Langs y-aksen viser prosentandelen celler i G<sub>2</sub>/M-fasen. De tre linjene i diagrammet representerer hvert delforsøk.

