

Bacheloroppgave

NTNU  
Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet  
Fakultetet for naturvitenskap  
Institutt for biologiske fag i Ålesund

10010  
10012  
10013  
10014

## **En studie av effekten ivermectin har på celleproliferasjon og cellyklus til A549-celler**

Bacheloroppgave i Bioteknologi  
Veileder: Gro Audveig Hagen Bjørnøy  
Mai 2022



10010

10012

10013

10014

**En studie av effekten ivermectin har på  
celleproliferasjon og cellesyklus til A549-celler**

Bacheloroppgave i Bioteknologi  
Veileder: Gro Audveig Hagen Bjørnøy  
Mai 2022

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet  
Fakultetet for naturvitenskap  
Institutt for biologiske fag i Ålesund





# Forord

Kjære leser

Denne oppgaven er skrevet av fire bioteknologistudenter ved Norges Teknisk-naturvitenskaplige universitet (NTNU) i Ålesund. Kunnskapsgrunnlaget for denne bacheloroppgaven ble opparbeidet gjennom tre år med studier og erfaringer ved NTNU. Det har vært en spennende opplevelse å få brukt den kunnskapen vi har fått gjennom studieløpet. Vi har lært mye under bacheloroppgaven, som vi kommer til å ta med oss til videre studier og ut i arbeidslivet.

Covid-19 pandemien har vært en utfordring de siste årene på veien mot fullførelsen av bachelorgraden. Koronatiltakene har likevel ikke satt stopper for gjennomførelsen av studien. Inspirasjonen til denne studien kommer fra forslag om alternative behandlingsmetoder mot covid-19 i media. Som følge av pandemien, har det sirkulert rykter om at ivermectin kan kurere eller dempe symptomene ved en SARS-CoV-2 infeksjon<sup>1</sup>. Mange av de som har spredd disse ryktene har basert sine meninger på forskningsartikler som senere har blitt tilbaketrasket<sup>2</sup>. Dette har resultert i at noen mennesker har blitt svært syke av inntak av store doser ivermectin<sup>3</sup>. Under koronatiden har det også startet en skabbepidemi, og statens- legemiddelverk godkjente ivermectin til blå resept som skabbmedisin<sup>4</sup>. Det var gjennom disse hendelsene vi fikk øynene opp for ivermectin.

Vi vil rette en takk til Gro Audveig Hagen Bjørnøy for god veiledning under studien. Vil også takke familie og venner som har stilt opp for oss og korrekturlest oppgaven.

## Sammendrag

Målet med denne studien var å undersøke effekten ivermectin har på celleproliferasjonen til A549 cellelinjen, hovedsakelig ved å studere om cellene går inn i cellesyklusarrest. Studien er basert på tidligere forskningsartikler som viser til at ivermectin hemmer celleproliferasjonen til ulike kreftceller. For å bestemme konsentrasjon og tidsintervall med ivermectin ble det gjennomført optimalisering. I hoveddelen av studien ble det gjennomført cellesyklusanalyse på A549-celler dyrket i 72 timer med en konsentrasjon på 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin. Det ble dyrket fem celleflasker for kontroll og 11 celleflasker med ivermectin i hoveddelen.

For å studere celleproliferasjonen ble celleantall bestemt ut ifra celledetelling med Bürker tellekammer, og cellesyklusanalyse med BD Accuri C6 flowcytometer. Etter analyse ble det gjennomført tosidig t-test med antatt ulik varians, og resultatene ble fremstilt grafisk. Det ble observert en statistisk signifikant nedgang i celleantall hos A549-cellene dyrket med 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin sammenlignet med A549-celler dyrket uten ivermectin (heretter kalt kontroll). Ved cellesyklusanalysen ble det observert en liten, men statistisk signifikant nedgang av celler i S-fasen dyrket med 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin. Dette tyder på at ivermectin påvirker celleproliferasjonen til A549-celler ved å hemme veksten.

## Abstract

The aim of this study is to investigate the effect of ivermectin on cell proliferation to A549 cell line, mainly through studying if the cells go into cell cycle arrest. The study is based on previous research articles that indicate that ivermectin affects cell proliferation of different kinds of cancer cells. Optimization was done to determine the concentration and incubation time with ivermectin. In the main part of the study A549 cells were incubated for 72 hours with an ivermectin concentration of 5.0  $\mu\text{M}$ . Five cell flasks were cultivated for control, and 11 cell flasks with ivermectin in the main part of the study.

Cell proliferation were studied by counting cells using Bürker Counting Chamber and cell cycle were analyzed with BD Accuri C6 flow cytometer. After the analysis the results were graphicly presented and a two-tailed t-test with assumed unequal variances was used to determine a statistically significant difference between cells incubated with 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin and A549 cells incubated without ivermectin (hereby referred to as controls). It was observed a statistically significant difference in the cell count after using t-test for comparison. The result from flow cytometry showed a small but statistically significant decrease in the S-phase of cells incubated with 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin. This suggests that ivermectin does influence the cell proliferation of A549 cells by inhibiting growth.

# Innholdsfortegnelse

<b>Forord</b> .....	<b>I</b>
<b>Sammendrag</b> .....	<b>II</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>III</b>
<b>Terminologi og forkortelser</b> .....	<b>1</b>
<b>Begrensninger</b> .....	<b>3</b>
<b>1 Introduksjon</b> .....	<b>4</b>
<b>2 Teori</b> .....	<b>5</b>
2.1 <i>Lungekreft og alveoleceller</i> .....	5
2.2 <i>A594-celler</i> .....	5
2.3 <i>Cellevekst</i> .....	5
2.4 <i>Cellesyklus</i> .....	6
2.4.1 <i>Interfase</i> .....	7
2.4.2 <i>M-fase</i> .....	7
2.4.3 <i>Cellesyklus kontrollsystem</i> .....	8
2.4.4 <i>Cellesyklusarrest</i> .....	9
2.5 <i>Flowcytometri</i> .....	9
2.5.1 <i>BD Accuri C6 Flow Cytometer</i> .....	11
2.5.2 <i>PI/RNase</i> .....	11
2.5.3 <i>Cellesyklusanalyse med flowcytometer</i> .....	11
2.5.4 <i>Begrensninger ved bruk av flowcytometri</i> .....	12
2.6 <i>Ivermectin</i> .....	13
2.6.1 <i>Ivermectin til behandling av kreft</i> .....	14
<b>3 Materialer og metode</b> .....	<b>16</b>
3.1 <i>Celledyrking</i> .....	16
3.1.1 <i>Tillaging av vekstmedium</i> .....	16
3.1.2 <i>Tining av celler</i> .....	16
3.1.3 <i>Cellesplitting</i> .....	16
3.2 <i>Fiksering av cellene</i> .....	16
3.3 <i>Analyse av cellesyklus med BD C6 Flowcytometer</i> .....	17
3.4 <i>Optimalisering</i> .....	17
3.4.1 <i>Optimalisering av metode</i> .....	17
3.4.2 <i>Tillaging av ivermectin løsninger</i> .....	18
3.4.3 <i>Optimalisering av ivermectinkonsentrasjon og tidsintervall</i> .....	18
3.5 <i>Dyrking med Ivermectin</i> .....	19
3.5.1 <i>Celledyrking med ivermectin</i> .....	19
3.6 <i>Statistisk analyse</i> .....	19
<b>4 Resultat</b> .....	<b>20</b>
4.1 <i>Optimalisering</i> .....	20
4.1.1 <i>Optimalisering av tidsintervall</i> .....	20



4.1.2	Optimalisering av ivermectinkonsentrasjon.....	21
4.2	Resultat fra hoveddel.....	22
4.2.1	Celletelling .....	22
4.2.2	Resultater fra analyse på flowcytometer .....	23
4.2.3	Statistisk utregning av data .....	27
<b>5</b>	<b>Diskusjon.....</b>	<b>29</b>
5.1	Dyrking av celler.....	29
5.2	Optimalisering.....	29
5.2.1	Optimalisering av tidsintervall .....	29
5.2.2	Optimalisering av konsentrasjon .....	31
5.2.3	Optimalisering av fikseringsprosedyre.....	31
5.3	Analyse av resultat .....	32
5.3.1	Celletelling .....	32
5.3.2	Cellessyklusanalyse .....	33
5.4	Videre forskning .....	35
<b>6</b>	<b>Konklusjon.....</b>	<b>37</b>
	<b>Litteraturliste.....</b>	<b>38</b>
	<b>Vedlegg .....</b>	<b>43</b>
A.1	Reagenser.....	43
A.2	Prosedyrer.....	44
A.2.1	Rutiner på celledlaboratoriet .....	44
A.2.2	Tining av celler.....	45
A.2.3	Splitting av celler.....	46
A.2.4	Fiksering .....	47
A.2.5	Kalibrering av Flowcytometer.....	48
A.2.6	Bruk av BD Accuri C6 Flow Cytometer, før og etter analyse av prøver .....	49
A.2.7	Cellessyklusanalyse på fikserte celler på BD Accuri Flowcytometer .....	50
A.3	Resultat.....	51
A.3.1	Utklipp av histogram fra analyse på flowcytometer .....	51
A.3.2	Optimalisering .....	53
A.3.3	Resultat fra hoveddel.....	57

## Terminologi og forkortelser

Apoptose	Kontrollert celledød hos dyr <sup>5</sup>
A549-celler	Adenokarsinomisk humane alveole basale epitelceller <sup>6</sup>
AT2 celler	Alveole type 2 celler som har i oppgave å danne sekret <sup>7</sup>
Cellesyklusarrest	Stop-punkt i cellesyklusen til celler <sup>8</sup>
CDK	Syklinavhengige kinaser <sup>9</sup>
Fiksering	Behandling av celler for å stanse fysiologiske prosesser <sup>10</sup>
Ivermectin	En bredspektret antiparasittisk medisin <sup>11</sup>
ICD	Immunogenisk celledød <sup>12</sup>
<i>In vitro</i>	Undersøkelser i reagensglass, utenom organismen <sup>13</sup>
<i>In vivo</i>	Undersøkelser som foregår i levende organismer som dyr <sup>14</sup>
PI	Propidium jodid <sup>15</sup>
T-test	Test som brukes for å finne signifikant forskjell mellom to utvalg med visse likhetstrekk <sup>16</sup>
Kaspase	Proteaser som bryter ned cellulære strukturer <sup>17</sup>
Konfluens	Prosentandel av en flate som er dekket med celler <sup>18</sup>
Mutasjon	En mer eller mindre permanent endring i DNA <sup>19</sup>
Mitogener	Signalstoffer fra utsiden av cellen som fremmer celledeling <sup>20</sup>
Proliferasjon	Vekst grunnet økt antall celler <sup>21</sup>
Regulatorisk protein	Proteiner som kan regulere prosesser i cellen <sup>22</sup>
T-kritisk	Verdien som t-stat er nødt til å overskride for at nullhypotesen kan forkastes <sup>23</sup>

T-stat

Verdi som forteller om nullhypotesen kan forkastes eller ikke<sup>23</sup>

## Begrensninger

Gjennomførelsen av studien ble preget av den pågående koronapandemien. Økt smittet av Koronavirus i starten av 2022 førte til risiko for å bli syk. Et av smittespredningstiltakene fra regjeringen var anbefaling om å isolere seg ved påvist smitte. Dette resulterte i sykedager hos både deltakere og veileder. Videre var tid på laboratoriet en begrensning. Arbeid på laboratoriet kunne bare foregå på hverdager, mellom 08:00 og 16:00. Samtidig måtte alt arbeid planlegges og kommuniseres mellom andre som skulle bruke laboratoriet. Studien ble begrenset av tid til gjennomføring og økonomi. Begrenset bestillingstid på utstyr og reagenser gjorde at det var vanskelig å gjennomføre studien med flere paralleller, analysemetoder og konsentrasjoner.

# 1 Introduksjon

Kreft er den største dødsårsaken i verden, og står for 1 av 6 dødsfall<sup>24</sup>. Dette er en gruppe sykdommer og brukes som en fellesbetegnelse på celler som vokser med unormal hastighet og sprer seg ukontrollert<sup>25, 26</sup>. Disse cellene kan oppstå i ulike organer som følge av tilfeldige mutasjoner og plasseringen av enkelte kreftceller kan gjøre behandling vanskelig. Ett eksempel på dette er lungekreft<sup>26</sup>. I 2020 stod lungekreft for over 1.8 millioner dødsfall verden over, dette gjør den til krefttypen som tar flest liv både internasjonalt og i Norge<sup>24, 27</sup>.

Behandling av lungekreft/kreft dreier seg i hovedsak om strålebehandling, kirurgiske inngrep og cellegift. Disse behandlingstypene har ofte store bivirkninger og kan føre til senskader<sup>28</sup>. På grunn av den store påkjeningen av disse behandlingsformene, og behovet for ulike behandlingsformer for spesifikke typer kreft, utvikler stadig kreftforskningsfeltet nye metoder og medisiner for behandling. I flere tilfeller er disse nye medisinene og behandlingsformene reposisjonerte medisiner<sup>29</sup>. For forskning på nye typer medisiner mot kreft blir det i starten forsket på celler dyrket *in vitro*. En cellelinje som egner seg godt for forskning på lungekreft er A549. Disse cellene vil tilsvare plateepitelkarsinom fra ikke-småcellet lungekreft, og ble hentet ut fra lungeepitel hos en 58 år gammel mann i 1972. Denne cellelinjen har siden blitt holdt i gang og blitt brukt i forskning<sup>30 31</sup>.

En medisin som er interessant å forske på for å studere dens virkning mot kreft er ivermectin. Ivermectin er en bredspektret parasittmedisin, og brukes hovedsakelig mot elveblindhet<sup>11</sup>. I senere år har flere forskningsartikler vist at ivermectin kan ha en effekt som medikament mot andre typer sykdommer, blant annet ulike former for kreft<sup>11</sup>. Tidligere studier med ivermectin viser en reduksjon i celleveksten hos brystkreftceller og eggstokk-kreftceller. Dette er ikke tilfellet for alle kreftceller, for eksempel viser prostatakreftceller mer resistens mot ivermectin<sup>32</sup>. Ivermectin har vist seg å være effektiv i den spesifikke degraderingen av pak1, noe som A549-celler er avhengig av for å vokse<sup>33</sup>. Dette gjør at det er interessant å undersøke om ivermectin kan ha en inhiberende effekt på veksten av A549-celler. I tillegg til tidligere forskning har ivermectin fått mye fokus under Covid-19 pandemien, ettersom at den har vært diskutert som en medisin mot Covid-19. Diskusjonen har vært både i norske og internasjonale medier. Aftenposten skiver blant annet at «Vi må ta debatten om ivermectin»<sup>34</sup>, mens BBC stiller seg mer kritisk med overskriften «Ivermectin: How false science created a Covid 'miracle' drug»<sup>35</sup>. Det store fokuset, sammen med lite forskning på effekten av ivermectin på A549-celler, og inhiberingen av pak1 legger grunnlaget for at vi valgte ivermectin i denne studien.

Studien tar for seg hvordan ivermectin påvirker celleproliferasjon til A549-celler og cellesyklusen analysert ved bruk av BD Accuri C6 flowcytometer. Vi tar først for oss det teoretiske grunnlaget for studien og forklarer deretter hvordan vi går frem ved praktisk gjennomføring av prosedyrer og bearbeider resultatet. Etter dette vil vi legge frem resultatene fra studien og diskutere disse, før vi kommer frem til en konklusjon. Studien avsluttes med referanseliste og vedlegg.

## 2 Teori

Teorien vil gå gjennom relevant informasjon for studien. Her blir blant annet lungekreft, cellesyklus og flowcytometri forklart. Det blir også forklart hva ivermectin er og hvordan denne kan virke som medisin, mot blant annet kreft.

### 2.1 Lungekreft og alveoleceller

Kreft er celler som har mutert slik at de deler seg ukontrollert, og det er mange ulike og sammensatte former for dette. Lungekreft er kreft i bronkiene eller i lungevevet, og står for 10% av krefttilfellene i Norge<sup>36</sup>. Denne typen kan deles inn i ikke-småcellet lungekreft og småcellet lungekreft, der ikke-småcellet lungekreft er den mest vanlige. Ikke-småcellet lungekreft deles igjen inn i undergrupper slik som adenokarsinom og plateepitelkarsinom<sup>28</sup>. En av grunnene til at lungekreft er så farlig er at den har få symptomer, og i tillegg har kreftceller lett for å vise adaptivitet ved ekstracellulære fysiologiske endringer som immunresponser eller cellegift<sup>37, 38</sup>. Mellom 40-50% av de som får diagnosen får den først etter de har spredning<sup>27</sup>. Lungekreft kan oppstå spontant, men i 80-90% av tilfelle er det knyttet til røyking. Det er også andre årsaker til at lungekreft oppstår, slik som luftforurensing, radon eller andre kreftfremkallende stoffer<sup>36</sup>.

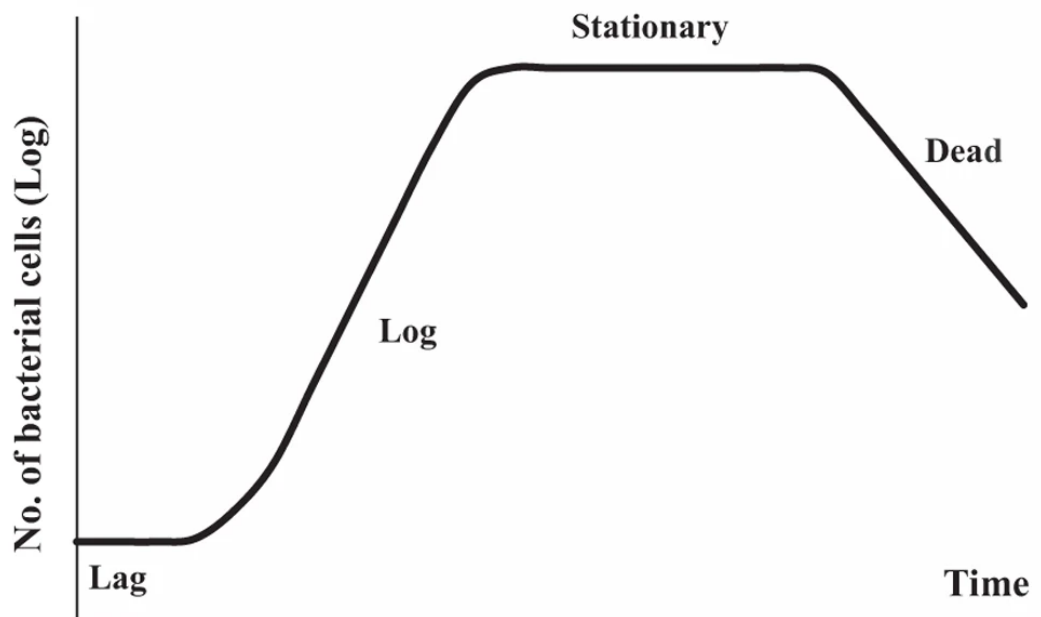
### 2.2 A549-celler

A549-celler er alveole type-II (ATII) og er den celletypen som har vanligst for å utvikle seg til lungekreft, noe som gjør den godt egnet til bruk innen forskning rettet mot lungekreft<sup>39</sup>. Cellelinjen ble startet av Giard et al. i 1972 og klassifiseres som ikke-småcellet lungekreft. Giard hentet ut ATII celler fra en lungesvulst i forbindelse med et forskingsprosjekt for å finne en kontinuerlig cellelinje. A549 cellelinjen brukes i dag som en modell for ATII og for forskning på lungekreft<sup>6, 40</sup>. ATII celler står for omtrent 11% av cellene i lungene, og er blant annet ansvarlige for produksjonen av surfaktant til overflaten av alveolene, transport av vann over epitellaget i lungene og regenerering av skadet lungeepitel. A549-cellene kan vokse adherent *in vitro* i monolag og dyrkes i kunstig medium med humane fysiologiske faktorer, som for eksempel kroppstemperatur<sup>41</sup>. Hams F-12k Kaighns modifiserte medium egner seg godt som medium ved dyrking av A549-celler da det inneholder flere komponenter som thymidin, sink og natrium pyruvat<sup>40</sup>. Hams F-12K Kaighns modifiserte medium inneholder derimot ingen vekstfaktorer eller antibiotika. Det er derfor nødvendig å tilsette eksterne vekstfaktorer, slik som heat inactivated fetal bovint serum (FBS). Det blir også tilsatt antibiotika for å beskytte cellekulturen mot kontaminasjon under celledyrkingen.

### 2.3 Cellevekst

Ved dyrking av A549-celler må disse splittes før veksten stagnerer ved stasjonær-fase. Når cellene nærmer seg stasjonær fase vil cellene påvirkes av kontakthibering, mangel på næring og andre viktige vekstfaktorer. Dette kan påvirke celleveksten og det er derfor ønskelig å splitte cellene ved 70-80% konfluens, når de fortsatt befinner seg i eksponentiell fase<sup>42, 43</sup>.

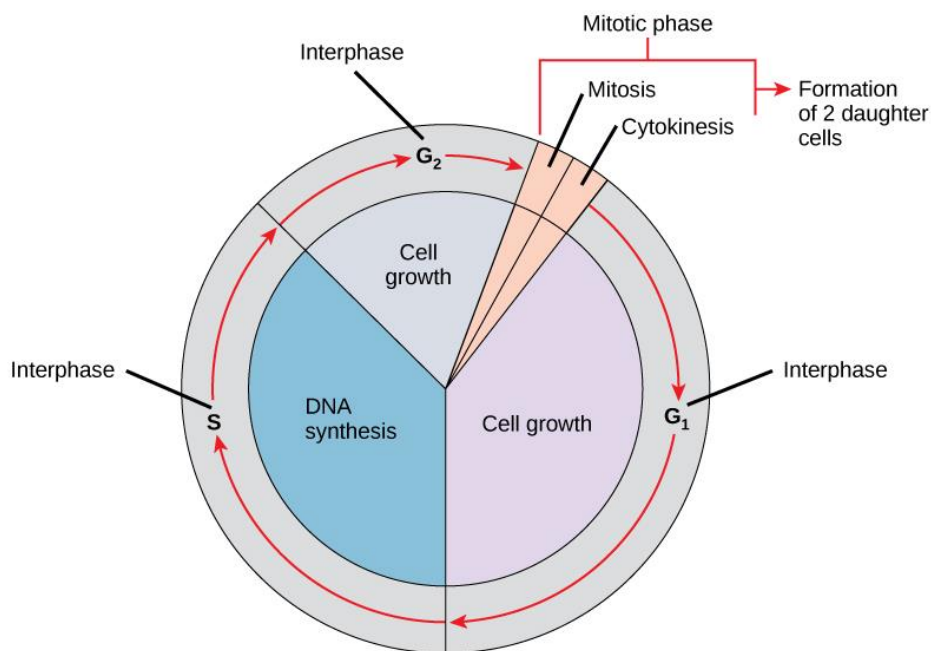
Ved dyrking av cellekulturen vil den gå gjennom flere vekstfaser, se figur 1. Celleveksten starter i lag-fasen, der cellene etablerer seg i nytt miljø og tilpasse seg etter forholdene. Det er som regel ikke mye vekst i denne innledende fasen. Videre går cellene til log fasen der det er eksponentiell vekst. Her vil cellene dele seg så lenge de har gode vekstbetingelser. For A549-celler vil det ta omtrent 22 timer for cellene å dele seg<sup>44</sup>. Den eksponentielle veksten vil flate ut i den stasjonære fasen, og ved mangel på næringsstoff, opphoping av avfallsstoff eller andre ugunstige vekstbetingelser kan cellekulturen gå over i dødsfasen<sup>42</sup>.



*Figur 1: Figuren viser vekstkurven til normalceller. Fra venstre kan man se lag-, log-, stasjonær- og døds-fase. Y-aksen illustrerer logaritmisk tallverdi for antall celler, men x-aksen illustrerer tiden. Figuren er hentet fra «Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces» av L.Wang<sup>45</sup>.*

## 2.4 Cellesyklus

Celledeling er cellens måte å formere seg på, og kalles mitose. I de fleste tilfellene vil cellen kopiere opp intracellulære makromolekyler og organeller før mitose, og doble i størrelse. De trinnvise stegene der en celle blir delt i to, kan beskrives gjennom en cellesyklus. Den eukaryote cellesyklusen innebærer som regel de to fasene, M-fase og interfase. Hvor lang tid en celle bruker i disse fasene, varierer mellom celletyper<sup>46</sup>. Figur 2 viser en oversikt over de ulike cellesyklusfasene og rekkefølgen på disse.



**Figur 2:** Viser de ulike fasene i celledelingen og en kort beskrivelse av hva som skjer i fasene. G<sub>1</sub>-fasen vil gå videre til S-fasen og G<sub>2</sub>-fasen. M-fasen beskrives ved mitose og ender i cytokinesen der det lages to datterceller som begge kan gå inn i en ny G<sub>1</sub>-fase. Den røde pilen viser til at celledelingen kan være en kontinuerlig prosess. Inndelingen av sirkelen viser til at tiden celler befinner seg i de ulike fasene ikke er lik. Figuren er hentet fra OpenStax College<sup>47</sup>.

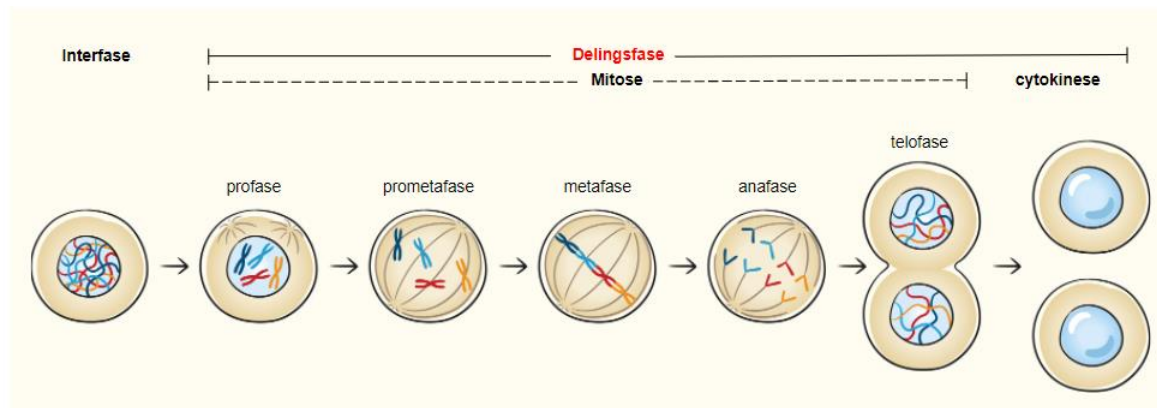
### 2.4.1 Interfase

Perioden mellom hver M-fase kalles interfase og innebærer som nevnt, duplisering av celleinnhold og en fordobling av cellens størrelse. Interfasen deles inn i tre ulike underfaser som kalles G<sub>1</sub>-fasen, S-fasen og G<sub>2</sub>-fasen. G<sub>1</sub>-fasen betegnes som starten av celledelingscyklussen. Her vokser cellen i størrelse, kopierer organeller og tilrettelegger for neste fase ved å bygge molekulære strukturer. G<sub>1</sub>-fasen vil gå videre til S-fasen. Her starter cellen med DNA-replikasjon og duplisering av sentrosomer. Det endelige steget før M-fasen, er G<sub>2</sub>-fasen. Cellen vil i denne fasen vokse enda mer i størrelse, lage protein, kopiere organeller og reorganisere celleinnhold som en forberedelse til celledelingen<sup>46</sup>.

### 2.4.2 M-fase

Mitosen er selve celledelingen og finner sted i M-fasen. I normale celler varer M-fasen i omtrent 1 time. I M-fasen vil det foregå flere prosesser kalt profase, prometafase, metafase, anafase, telofase og cytokinese. Mitotisk spindel begynner å forme seg i profasen, for så å binde seg til kromosomene i prometafasen. I metafasen vil søster-kromatidene plassere seg på cellens ekvator for å så bli trukket til hver sin ende av cellen i anafasen. En ny cellekjernevegg begynner å forme seg i telofasen og i den siste fasen, cytokinesen, starter delingen av cytoplasma og cellemembran til to enkeltceller, se figur 3<sup>46</sup>.





Celledeling ved mitose

**Figur 3:** Figuren illustrerer interfasen og trinnene i M-fasen. I interfasen befinner cellen helt til venstre i figuren. Fra interfasen mot høyre, beveger cellen seg over i mitose og går gjennom de ulike fasene som fører cellen frem til celledelingen i cytokinesen.

Illustrasjonen er hentet fra «sammendrag – celledeling» av C. Øvstebø<sup>48</sup>.

### 2.4.3 Cellesyklus kontrollsystem

De ulike fasene i cellesyklusen vil overvåkes av et kontrollsystem. Dette kontrollsystemet sørger for at cellen kun går over til neste fase i cellesyklusen dersom forholdene er gode nok. For eksempel vil cellen i G<sub>1</sub>- og G<sub>2</sub>-fasen overvåke sine eksterne og interne miljøer.

Overvåkingen kan utløse signaler som hindrer eller driver cellen inn i S- og M-fasen. Dette signalsystemet kalles cellesyklus-kontrollsystem. Systemet består av regulatoriske proteiner som blant annet forsikrer at alt DNA og alle cellekomponenter er kopiert før cellen går inn i M-fasen. Eksempler på disse regulatoriske proteinene er i tabell 1. Prosesser som DNA-replikasjon, mitose og cytokinese kan som følge av proteinene bli hindret eller fremmet. Det er aktivering og inaktivering av nøkkelproteiner og proteinkomplekser som initierer disse prosessene. Aktivering eller inaktivering av proteiner skjer gjennom fosforylering fra proteinkinaser og defosforylering fra proteinfosfataser. Enkelte kinaser må bli aktivert av syklin for å kunne drive fosforylering. Disse kalles syklin avhengige proteinkinaser (CDK). CDK-er er til stede under hele cellesyklusen og er kun aktive i det tidsrommet syklusen krever det. Mengden sykliner som er til stede i cellen, avhenger av hvor cellen er i cellesyklusen og styres av transkripsjonsfaktorer. Så fort cellen ikke trenger sykliner, vil det anafasepromoterende komplekset eller syklosom (APC/C) merke syklinene med ubiquitin for nedbrytning. Selve nedbrytningen av sykliner kan også være med på å drive cellesyklusen inn i neste fase. For eksempel vil G<sub>1</sub>-sykliner og G<sub>1</sub>/S-sykliner inhibere et protein som igjen står for inhibering av cellesyklus-fremmende transkripsjonsregulatorer. CDK-er som har blitt aktiverte av sykliner kan så aktivere et spesifikt regulatorisk protein. Når syklin og CDK har formet et kompleks vil det fortsatt ikke være aktivt da komplekset inneholder hemmende fosfater. Komplekset krever da en defosforylering for å kunne bli aktivt. Aktiviteten til CDK-komplekset kan, etter disse modifikasjonene, igjen bli hemmet av CDK-inhiberende proteiner. Disse er viktige da de hindrer cellen i å gå videre i celledelingen, slik at forbedringer i den aktuelle fasen kan gjennomføres<sup>46</sup>.

**Tabell 1:** Tabellen vise viktige sykliner i cellesyklusen som er med på å drive cellen fremover mot mitose<sup>46, 49</sup>.

Sykliner	Forklaring
M-syklin	Fremmer overgangen fra G <sub>2</sub> -fasen til M-fasen og aktiverer M-CDK.
S-syklin (Syklin A) og G <sub>1</sub> /S-syklin (syklin E)	Binder seg til en spesifikk CDK sent i G <sub>1</sub> -fasen for å danne S-CDK og G <sub>1</sub> /S-CDK og fremmer overgangen til S-fasen.
G <sub>1</sub> -syklin (syklin D)	Danner G <sub>1</sub> -CDK sammen med CDK og bidrar til å drive cellen gjennom G <sub>1</sub> -fasen.

#### 2.4.4 Cellesyklusarrest

Cellesyklusarrest skjer ved sjekkpunkter i cellesyklusen til cellene og sørger for at cellen ikke kan gå videre til neste fase i cellesyklusen, før eventuelt interne og eksterne forhold har forbedret seg<sup>50</sup>. Det vil oppstå cellesyklusarrest i G<sub>1</sub>-fasen dersom cellen blir utsatt for stress i denne fasen, der visse stressfaktorer kan føre til skade på DNA. Som følge av dette blir p53 aktivert og konsentrasjonen av syklinavhengig kinaseinhibitor-1 (p21) vil øke og inhibere G<sub>1</sub>-CDK og G<sub>1</sub>/S-CDK. p21 kan også indusere programmert celledød ved omfattende skade på DNA. Cellen vil gå i cellesyklusarrest i overgangen mellom S/G<sub>2</sub>-fasen dersom det oppstår feil i DNA-replikasjonen under S-fasen. Dette vil føre til en reparasjon av DNA skaden som har oppstått. I tillegg til reparasjonen av DNA vil S-CDK fosforylere og inaktivere Cdc6 og origin recognition complex da disse står for initieringen av replikasjonen av DNAet i S-fasen. Dette skjer for å passe på at cellen ikke fortsetter å kopiere opp DNA når det har skjedd en skade. Mekanismen for DNA-skade respons vil føre til at Cdc25 blir inhibert som igjen fører til at den ikke kan defosforylere M-CDK. M-CDK er det som driver cellen inn i M-fasen og hindrer cellen i å gå videre til G<sub>1</sub>-fase. Dette signalstoffet kan også bli inhibert av andre interne og eksterne faktorer enn DNA skade. Arrest i M-fasen kommer ofte ved feil fordeling av kromosomer til dattercellene, her vil APC/C bli inaktivert. APC/C sørger for å markere sykliner til degradering. Inaktivering av APC/C vil derfor ikke føre til nedbrytning av M-CDK og dermed hindre celler i gå videre til en ny G<sub>1</sub>-fase, ettersom deaktivering av S- og M-CDK er viktig for føre cellen fra M-fasen til G<sub>1</sub>-fasen<sup>46</sup>.

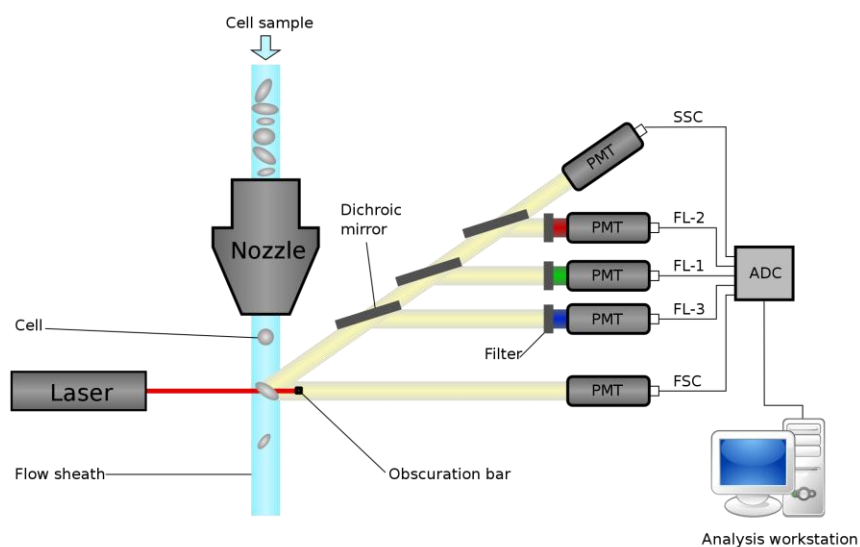
Andre signalmolekyl som påvirker cellesyklusen er mitogener. Dette er signalstoffer som cellene bruker for å kommunisere med hverandre og for å «bekrefte» at forholdene er gode nok til at cellen kan dele seg. Disse signalene stimulerer produksjon av G<sub>1</sub>-sykliner, G<sub>1</sub>/S-sykliner og andre proteiner. Mangel på mitogener vil føre til cellesyklusarrest. Dersom cellen er langvarig uten tilgang på mitogener, kan cellen gå i G<sub>0</sub>-tilstand. I G<sub>0</sub>-tilstanden er cellen ute av stand til å gå inn i cellesyklus over lengere tid og kan bruke tiden på å reparere DNA eller vente på at forholdene skal bli bedre<sup>46</sup>. Størrelsen og kompleksiteten av cellene vil forandre seg gjennom cellesyklusen. Ved bruk av analysemetoder som flowcytometri kan man undersøke hvor i cellesyklusen cellene befinner seg<sup>51</sup>.

## 2.5 Flowcytometri

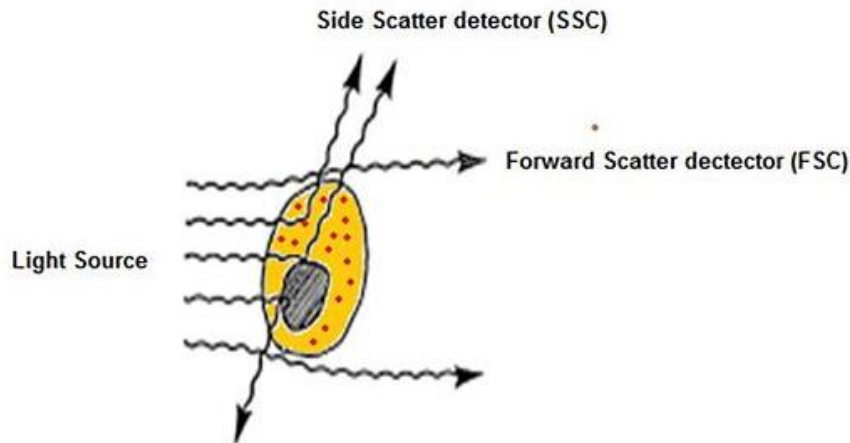
Flowcytometri er en analysemetode som har flere ulike bruksområder. Instrumentet kan blant annet brukes til å studere cellesyklus ved bruk av fargestoffer, studere protein- og genekspressjon eller deteksjon av cellepopulasjoner<sup>52</sup>. Cellesyklusanalyse på flowcytometeret kan gjennomføres ved å skille de ulike fasene fra hverandre på bakgrunn av DNA-innhold,

størrelse og granularitet som endres igjennom cellesyklusen. For å detektere DNA kan det brukes fluoroforer som binder seg til DNA. Flowcytometeret kan måle emisjonen fra disse fluoroforene etter at de har eksitert og dermed kvantifisere mengden DNA i hver celle<sup>15</sup>.

Instrumentet består av de ulike komponentene linser, filter, strålingskomponenter, flowcelle, detektorer og en datamaskin. Filter og linser fikserer lys mot celleprøven. UV/Vis stråling kan produseres av en laser, eller andre strålingsgeneratorer. Figur 4 er et eksempel på hvordan et slik flowcytometer kan konstrueres. Retning av lysspredningen gir informasjon om størrelse, kompleksitet, granula og innbuktninger i membranen, se figur 5. Lysspredning og emisjon blir målt av fotoamplifikasjonsrør. Det skiller mellom to former for lysspredning, forward scatter og side scatter. Dette vises i figur 5. Lys som har liten spredning etter å ha truffet prøvematerialet betegnes som forwardscatter, mens lys som har større spredning betegnes som sidescatter. Lysspredningen deles inn i disse gruppene fordi det ofte brukes ulike detektorer til å måle grad av lysspredning. 0° lysspredning gir informasjon om cellediameter, mens 7° lysspredning kvantifiserer cellekompleksitet. 90° lysspredning forteller om kjernens globularitet, kjernemorfologi og mengden granula i cytoplasma, se figur 5. Døde celler vil ha en større andel forward scatter enn levende celler da de har mindre diameter. Dette vil også gjelde for celle debri<sup>52</sup>. Det kan brukes ulike diagram som histogram, dot-plot eller scatter plot for fremstilling av resultat. Gating er et verktøy som benyttes for å skille celler med ulike egenskaper fra hverandre, for eksempel i et dot-plot, se figur 6. En slik avgrensning av celler med samme karakteristikk, blir ofte gjort etter en satt terskelverdi for å utelukke hendelser forårsaket av partikler som er mindre enn cellene fra resultatet<sup>52</sup>.



**Figur 4:** Figuren viser noen av komponentene i et flowcytometer. Til venstre kan man se en rød laser som sender lysstråling mot en celle. Det blå røret illustrerer flowsheat og de grå sirklene i flowsheat er cellene. De gule strekene illustrerer lysstrålingen som har truffet cellen. Lysstrålene blir reflektert til speil med bølgelengdefilter eller treffer forwardscatter. Strålingen fanges opp av detektorene forwardscatter, sidescatter og detektorer med filtre som slipper gjennom spesifikke bølgelengder. Disse filtrerte bølgelengdene er vist som rød, grønn og blå. Signalet fra detektorene blir så sendt til en analog-digital-omformer som omformer lyssignal til digitale signal. De digitale signalene sendes så videre til datamaskinen nederst til høyre i figuren for videre analyse. Figuren er hentet fra Wikimedia og er laget av kierano<sup>53</sup>.



**Figur 5:** Figuren illustrerer hvordan en celle kan spre lys i et flowcytometer. Lyskilden befinner seg på venstresiden av cellen. Pilene illustrerer retningen til lysstrålene. De fem pilene illustrerer bøyingen av strålene som et resultat av størrelse og kompleksitet av cellen. De tre pilene i midten avbøyes og detekteres av Side Scatter detector (SSC), mens de to ytterste pilene bøyes i liten grad og detekteres av Forward Scatter detector (FSC). Figuren er hentet fra 2010.igem.org<sup>54</sup>.

### 2.5.1 BD Accuri C6 Flow Cytometer

BD Accuri C6 Flow Cytometer instrumentet kan brukes til cellesyklusanalyse av A549-celler. Instrumentet har rød og blå laser, og er designet for å detektere fluoroforer med eksitasjonspunkt mellom 488 nm til 640 nm. Flowcytometeret kan også detektere lys gjennom spredningsdetektor, og har optiske filtre for en del vanlige fluoroforer. Instrumentet har blant annet et filter for propidium jodid ved 610/20 nm<sup>55</sup>.

### 2.5.2 PI/RNase

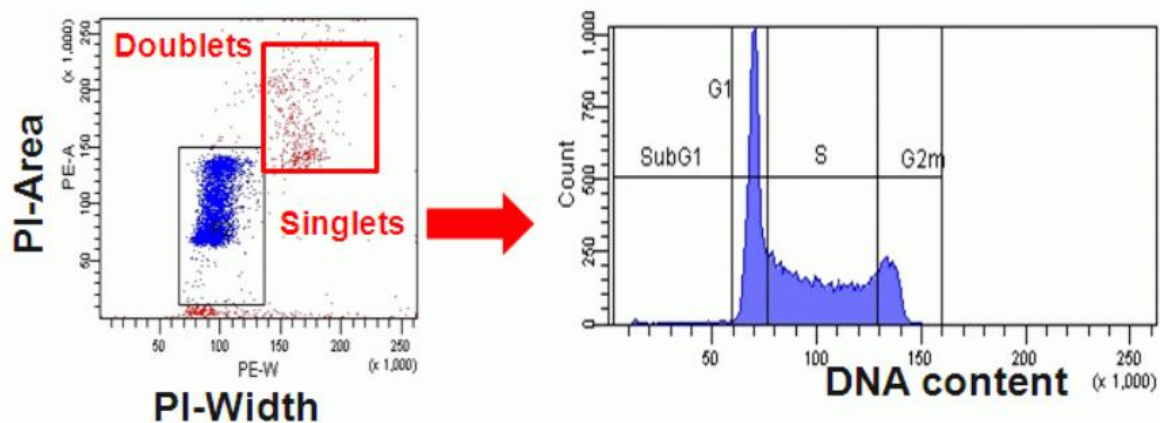
PI/RNase er en reagens som brukes til å farge nukleinsyrer i celler, og består av fluoroforen propidium jodid (PI) og RNase. RNase er tilsatt for å bryte ned RNA i løsningen da PI binder seg til dobbeltrådet nukleinsyre og ikke diskriminerer mellom dobbeltrådet DNA og dobbeltrådet RNA. PI har eksitasjonsmaksimum ved 493 nm og emisjonsmaksimum ved 636 nm. Fargestoffet vil ha 20-30 ganger økning i emisjon når det er bundet til nukleinsyrer og endrer eksitasjonsmaksimum til 535 nm og emisjonsmaksimum til 617 nm<sup>15</sup>. PI er et interkalerende stoff som binder seg med DNA mellom dobbeltrådene, og fluorescensemisjonen er proporsjonal med mengden bundet DNA<sup>56</sup>.

### 2.5.3 Cellesyklusanalyse med flowcytometer

Cellesyklus kan undersøkes gjennom flowcytometrianalyse ved bruk av PI som fluorofor. En slik prosedyre vil kvantifisere mengden DNA som er til stede i cellen. Målinger ved en slik prosedyre brukes til å danne diagrammer som vist i figur 6. Mengden dsDNA i en celle vil variere ved ulike punkter i cellesyklusen. Denne målingen kan brukes til å påpeke hvilken punkt i cellesyklusen cellen befinner seg<sup>52</sup>. Etter at cellene deler seg vil de gå inn i G<sub>1</sub>-fasen. I denne fasen er mengden DNA mindre enn i de andre fasene. Etter at en ny cellesyklus er i gang vil cellen gå inn i S-fasen, der den vil kopiere opp mer DNA for å forberede seg på

celledelingen. Denne celledelingen starter i G<sub>2</sub>/M-fasen og cellen vil ha en dobling av den opprinnelige mengden DNA. Som vist i figur 6 kan denne informasjonen brukes til å danne histogram eller andre oversikter over hvilken del av cellyklus cellene befinner seg i. Denne informasjonen kan så brukes til å påvise en eventuell cellyklusarrest<sup>52</sup>.

For å kunne analysere cellene må de fikseres. Formålet med fikseringen er å stanse cellene i cellyklusen på det tidspunktet de blir fiksert. I tillegg vil fiksering øke permeabiliteten til membranen ved å fjerne lipider og utfelle protein<sup>57</sup>. Dette fører til poredannelse i cellemembranen som gjør det mulig for PI å entre kjernen og binde seg til DNA<sup>51</sup>. Etter fiksering og farging med fluorofor skal cellene fremdeles være intakte<sup>52</sup>. Hvis ikke cellene blir fiksert, vil PI aktivt bli pumpet ut gjennom membranen til cellene. Dette fører til at PI ikke trenger inn i cellekjernen og dermed ikke når frem til DNA<sup>58</sup>. Fikseringsmidler, slik som etanol, kan forstyrre virkningen av PI og må derfor fjernes som en del av fikseringsprosedyren. Etter at cellene er fiksert og DNA er bundet med PI, kan det gjennomføres cellyklusanalyse på flowcytometer<sup>55</sup>.



*Figur 6: Bildet til venstre viser et dot-plott av celler med vanlig mengde DNA i blått, og celler med dobbelt mengde DNA i rødt. Populasjonene med ulik mengde DNA er skilt fra hverandre ved bruk av gating. Gatingen brukes også til å utelukke utliggere som vises som prikker utenfor gatene. Bildet til høyre viser et histogram over andelen celler i de ulike cellyklus-fase cellene befinner seg i basert på mengden DNA de inneholder. Figuren er hentet fra cell cycle analysis av Dr. William Ogunkolade<sup>59</sup>.*

#### 2.5.4 Begrensninger ved bruk av flowcytometri

For å kunne analysere cellene med flowcytometri, må de være i suspensjon og analyseres som enkeltceller i flowcellen, og interaksjoner mellom celler kan derfor ikke studeres. Valg av fluorofor er avhengig av lyskilden og hva som skal undersøkes og det kan være vanskelig å finne en blanding av fluoroforer som ikke overlapper. Det brukes av den grunn ofte høymolekylære fluoroforer med stort Stokes shift for å redusere spektralt overlapp. Fluoroforer mister en del av kvanteutbytte når de danner komplekser. Kvanteutbytte forklarer forholdet mellom absorpsjon og emisjon til fargestoffet og må være på over 0.4 for å kunne brukes i flowcytometri.

En begrensning ved å bruke flowcytometri til å undersøke cellesyklusarrest er at mengden DNA i G<sub>2</sub>- og M-fasen ofte vil være omtrent lik, noe som gjør at flowcytometeret vil ikke kunne skille mellom disse fasene<sup>42</sup>.

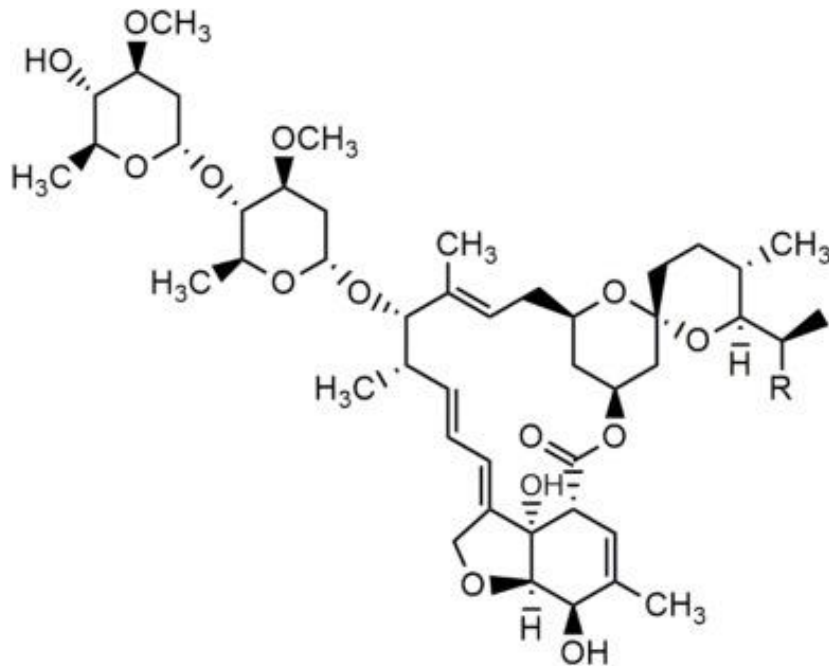
En annen begrensning er hvordan dataen fra instrumentet tolkes. For å tolke data kan en bruke programmer i instrumentet. Dette kan tillegg gjøres som et steg i kvalitetssikringen. Dataprogrammene kan blant annet brukes til å etablere gates og en threshold verdi. Spektral overlapp er en begrensning da det vil redusere spesifisiteten og introduserer usikkerhet i målingene. Instrumentet kan kompensere for dette ved å trekke fra intensiteten til den interfererende fluoroforen<sup>52</sup>.

## 2.6 Ivermectin

Kreft kan behandles ved hjelp av flere ulike medikament. Et medikament som har vist effekt i *in vitro* studier er ivermectin. I 2010 viste en rapport fra Sharmeen et al. at ivermectin hadde en god effekt på svulster fra mus med leukemi i pre-kliniske studier. Videre studier basert på funn fra denne rapporten viser at ivermectin også kan ha effekt på andre krefttyper, slik som eggstokk-kreft, brystkreft og tarmkreft. Alle de molekylære mekanismene som gjør at ivermectin har denne antikarsinogene effekten er derimot ikke fullstendig kartlagt, noe som gjør at det er vanskelig å vite hvilke krefttyper ivermectin kan være effektiv mot<sup>33</sup>.

Ivermectin er et semi-syntetisert medikament som har oppbygning illustrert i figur 7. Stoffet er basert på en blanding av avermectiner fra fungusen *Streptomyces Avermitilis*<sup>11</sup>. Det fins åtte avermectinforbindelser, A1a, A1b, A2a, A2b, B1a, B1b, B2a and B2b<sup>32</sup>. Ivermectin blir produsert gjennom en blanding av de to avermectinene; 22,23-dihydroavermectin-B1a og dihydroavermectin-B1b i et forhold på 4:1, da denne kombinasjonen har vist seg å ha best antiparasittisk effekt<sup>60</sup>. Ivermectin er hovedsakelig brukt mot elveblindhet, men fungerer også mot en rekke andre parasittsykdommer<sup>61</sup>. Ivermectin fungerer mot parasittene ved at den holder glutamatkanaler åpne i synapsen mellom nerveceller og muskelceller, noe som gjør at parasittene blir paralyisert og dør<sup>11</sup>. Denne mekanismen er høyt selektiv for parasitter, noe som gjør at den er godt egnet som medikament for bruk på pattedyr<sup>32</sup>.

Ett godt grunnlag for å vite at ivermectin ikke er skadelig for mennesker i små doser er at millioner bruker dette aktivt for å behandle parasittsykdommer, hovedsakelig i fattigere deler av Afrika. Symptomene ved denne bruken av ivermectin er tilnærmet ingen, og symptomene som oppstår er som regel fra parasitten man behandler mot<sup>60</sup>. Ivermectin er godkjent for bruk av flere ulike organisasjoner, som blant annet det amerikanske Federal Drug Administration (FDA)<sup>33</sup> og Statens Legemiddelverk<sup>62</sup>. Dosene som for øyeblikket blir brukt i medisiner ligger på rundt 200 µg/kg, men det finnes også medikamenter som går opp mot 400 µg/kg, men dette er i spesielle tilfeller som for eksempel behandling av lymfatisk filiaris<sup>11</sup>. For at ivermectin skal komme opp i doser som ikke er trygge for mennesker er man nødt til å bruke konsentrasjoner på over 2 mg/kg, noe som gjør at medikamentene som er vanlig å bruke har en lav nok konsentrasjon til at det ikke fører til farlige bivirkninger ved riktig bruk<sup>63</sup>.



R: CH<sub>3</sub> (22,23-dihydroavermecin B1b)

R: CH<sub>2</sub> CH<sub>3</sub> (22,23-dihydroavermecin B1a)

*Figur 7: Figuren viser den kjemisk strukturen av ivermectin, med R-gruppe for å illustrere variantene B1b og B1a. Figuren er hentet fra «Prospective mode of action of Ivermectin: SARS-CoV-2», av Patil<sup>64</sup>.*

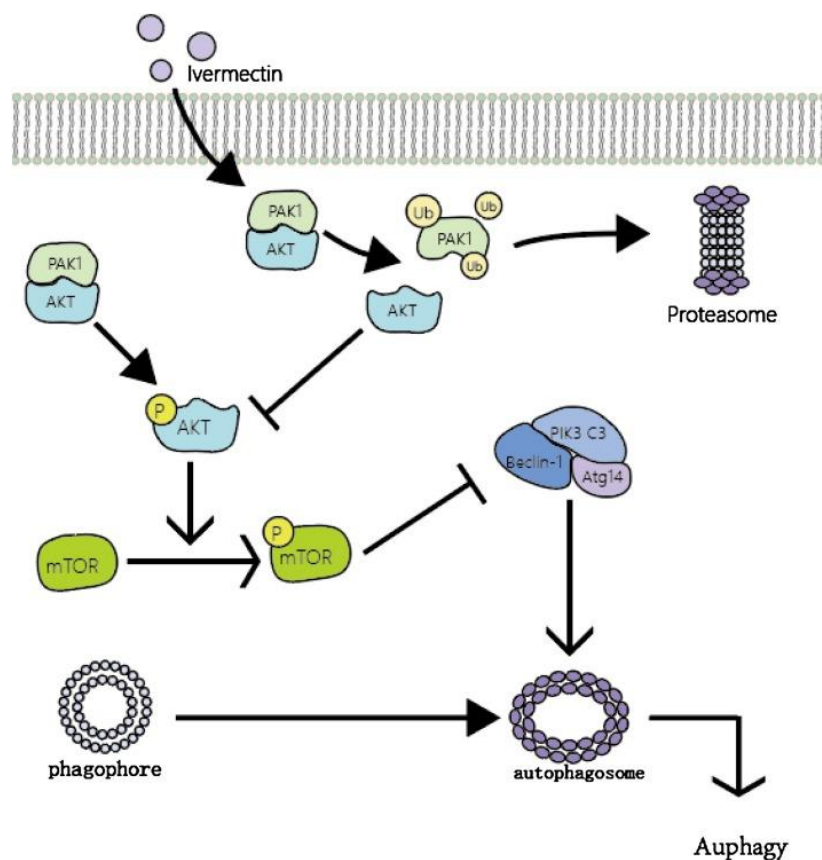
### 2.6.1 Ivermectin til behandling av kreft

Studier som viser til at ivermectin var effektiv i behandlingen av humane krefttyper i mus brukte en konsentrasjon på mellom 3-5 mg/kg. Dette er høyere enn den øvre tolererbare grensen på 2 mg/kg hos friske mennesker, men ga ingen negative bivirkninger hos musene som fikk denne dosen<sup>11</sup>. Ivermectin har vist seg å inhibere veksten av brystkreftceller uten å påvirke de friske cellene i det samme testdyret, ved å indusere cytostatisk auto fagocytose i brystkreftcellene<sup>65</sup>. Andre studier beskriver at cellyklusarresten skjer blant annet ved induksjon av pak1-mediert cytostatisk auto fagocytose, apoptose grunnet kaspase eller immunogenisk celledød (ICD). Disse mekanismene blir aktivert gjennom veier som WNT-T cellefaktorer, Akt/mTOR veier og Hippo veien<sup>33</sup>, se figur 8. Ved at det finnes kunnskap om disse mekanismene til ivermectin kan en undersøke hvilke andre kreftcelletyper ivermectin kan være effektive mot.

Tidligere forsøk med klinisk gjennomførbare konsentrasjoner tyder på at ivermectin kan hemme veksten til visse typer celler og at graden varierer ut fra cellytpe. Friske celler, prostatakreftceller og beinkreftceller som ble utsatt for en konsentrasjon på 5.0 μM ivermectin, har vist liten reduksjon i levedyktighet. Denne konsentrasjonen tilsvarer øvre tolererbar grense for friske mennesker, altså 2 mg/kg. Eggstokk-kreftceller og brystkreftceller viser derimot å få en tydelig reduksjon i levedyktigheten da de ble utsatt for samme konsentrasjon av ivermectin. Det kan tyde på at de sistnevnte cellene sin overgang fra G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-fasen til S-fasen i cellyklusen blir blokkert, da flowcytometri viser cellyklusarrest i

G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-fasen og westernblott viser en økning i p21 hos disse cellene. Westernblott-analyser på disse cellene viser også senkede nivåer av syklin-D og syklin-E<sup>32</sup>.

Nedgangen i syklin-E kan skyldes inhibering av p21 aktivert kinase 1 (pak1). Pak1 er et protein som har viktige funksjoner i flere intracellulære signalveier. Noen av disse signalveiene påvirker mitose, apoptose, immunresponser m.m., se figur 8. Pak1-inhibering har ifølge studier vist seg å føre til en nedgang i CDK2 i tillegg til syklin-E, noe som fører cellen inn i en G<sub>1</sub>/S cellyklusarrest<sup>66</sup>. Ivermectin er i stand til å gjøre målrettet pak1 degradering, og er derfor godt egnet til å behandle krefttyper som er avhengig av pak1 for å kunne fortsette videre inn i cellyklusen. A549-celler er en celletype som har Ki-RAS mutantgenet, noe som gjør de avhengige av pak1 for å vokse<sup>67</sup>. Dette gir oss grunnlag for å undersøke om ivermectin kan bli brukt til å skape en cellyklusarrest i A549-celler.



**Figur 8:** Viser et eksempel på påvirkningen til ivermectin på pak1/akt/mTOR mediert autofagi, gjennom diverse intracellulære signalveier. Figuren illustrerer hvordan ivermectin kan føre til at pak1 merkes med ubiquitin (Ub) for nedbrytning og Beclin-1 komplekset danner et autofagosom ettersom Akt/mTOR også blir inhibert ved fosforylering (P). Figuren er hentet fra artikkelen "Ivermectin, a potential anticancer drug derived from an antiparasitic drug"<sup>68</sup>.



## 3 Materialer og metode

Materialer og metode vil ta for seg de ulike trinnene i prosedyrene som ble brukt for å gjennomføre de praktiske delene av studien og bearbeidelse av resultat. Alle trinn som omfatter celledyrking, foregår aseptisk i LAF-benk etter prosedyre for rutiner på laboratoriet (vedlegg A.2.1).

### 3.1 Celledyrking

#### 3.1.1 Tillaging av vekstmedium

Hams F-12k Kaighns medium (ThermoFisher, a.nr. 21127022) ble tilsatt 50 ml qualified one shot dose Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, a.nr A3160801), og 5.5 ml PenStrep (10 000 U/ml, ThermoFisher, a.nr. 15070063) til en sluttkonsentrasjon på 100 U/ml. Denne blandingen ble brukt som vekstmedium til A549-celler (ATCC, a.nr CCL-185), og vil videre bli omtalt som HFKM.

#### 3.1.2 Tining av celler

HFKM ble forvarmet til en temperatur på 37 °C ved 5% CO<sub>2</sub> for videre bruk i prosedyren. A549-cellene var oppbevart ved -80°C og ble tint etter prosedyre «tining av celler» (vedlegg A.2.2). Suspensjonen ble videre overført til falconrør (Falcon, a.nr. 352070) og tilsatt 9.0 ml HFKM, før det ble sentrifugert ved 125 g i 5 minutter for å danne en cellepellet. Supernatanten ble fjernet og pelleten ble resuspendert i 1.0 ml HFKM før suspensjonen ble overført til en 25 cm<sup>2</sup> celleflaske med 6.0 ml HFKM. Celleflaskene ble videre inkubert ved 37 °C og 5% CO<sub>2</sub> atmosfære.

#### 3.1.3 Cellesplitting

Celleveksten ble vurdert i invertmikroskop for å måle konfluens og se etter forurensing. A549-cellene ble splittet aseptisk i LAF-benk ved 70-80% konfluens etter prosedyre (vedlegg A.2.3). Gammelt HFKM ble fjernet og celleflasken ble deretter vasket med 2x3 ml Phosphate Buffered Solution (PBS, Sigma-Aldrich, a.nr. D8437). PBS ble brukt som ekvivalent med HBSS. 0.5 ml trypsin (Gibco, a.nr. 25200-056) ble tilsatt for å løsne cellene fra underlaget. Når omtrent 80% av cellene hadde løsnet ble det tilsatt 4.0 ml HFKM for å stoppe enzymaktiviteten til trypsin. Cellesuspensjonen ble overført til et 15 ml falconrør og sentrifugert ved 1200 rpm i 3 minutter. Supernatanten ble så fjernet og cellepelleten ble resuspendert i 1.0 ml HFKM og fortynnet til en konsentrasjon på ca. 100 000 celler per ml. Deretter ble 1.0 ml av fortynningen overført til 25 cm<sup>2</sup> celleflasker med 6.0 ml HFKM. Celleflaskene ble så inkubert ved 37 °C med 5% CO<sub>2</sub> atmosfære. Forholdet mellom tilsatt celleduspensjon, ivermectin og HFKM var likt, mens volumet ble justert avhengig av størrelsen på celleflaskene.

### 3.2 Fiksering av cellene

Før analyse på flowcytometeret ble A549-cellene fiksert etter prosedyre «Fiksering» (vedlegg A.2.4). Fikseringen startet ved at cellene ble tatt ut av inkubatorskapet for å deretter bli undersøkt i invertmikroskop for å avgjøre konfluens. Cellene ble videre behandlet i LAF-bank

der gammelt HFKM ble fjernet, og cellene ble vasket med 2x3 ml PBS. Deretter ble cellene løsnet fra underlaget ved bruk av 0.5 ml 0.25% trypsin. Trypsineringen ble overvåket i invertmikroskop for å avgjøre når tilstrekkelig mengde celler hadde løsnet. Etter at cellene var løsnet ble trypsin inaktivert av 4.0 ml HFKM. Cellesuspensjonen ble deretter overført til 15 ml falconrør. 10.0 ml av suspensjonen ble tatt ut og overført til Bürker tellekammer (NanoEnTek, a.nr. CHC-B01). Cellene ble telt ved bruk av mikroskop for å beregne cellekonsentrasjonen i suspensjonen.

Mens tellingen foregikk ble falconrørene med cellesuspensjonene sentrifugert ved 500 g i 5 minutter, for å danne en cellepellet. Etter sentrifugeringen ble supernatanten fjernet og cellepelleten ble resuspendert. Basert på tellingen med Bürker tellekammer ble rør med over 1 million celler resuspendert i 1.0 ml PBS og fordelt på to falconrør, mens rør med under 1 million celler ble resuspendert i 0.5 ml PBS. Deretter ble alle suspensjonene overført til nye falconrør med 4.0 ml iskald 96 % etanol og fryst ved -20 °C.

Etter 15 minutter ble cellesuspensjonene tatt ut av fryseren og sentrifugert ved 1200 rpm i 5 minutter. Supernatanten ble så fjernet og cellepelleten ble rehydrert i 5.0 ml romtemperert PBS i 15 minutter. Deretter ble cellene sentrifugert ved 1200 rpm i 5 minutter og supernatanten ble fjernet. Så ble 0.5 ml PI/RNase (Invitrogen, a.nr. F10797) tilsatt. Rørene ble så pakket i aluminiumsfolie og satt på kjølerom frem til analyse på flowcytometer.

### 3.3 Analyse av cellesyklus med BD C6 Flowcytometer

For analyse av prøvemateriale på BD C6 Flowcytometer ble instrumentet kalibrert i henhold til prosedyre «kalibrering av flowcytometer» (vedlegg A.2.5). Det ble forberedt 6 løsninger, clean solution (Flow cytometer kit, BD Accuri Cytometers a.nr. 653158), decontamination (Flow cytometer kit, BD Accuri Cytometers a.nr. 653158), 8 peak bead (BD Accuri Cytometers, a.nr. 653144), 6 peak bead (BD Accuri Cytometers, a.nr. 653145) og to rør med MQ vann. 8 peak bead løsningen ble laget av 1 ml MQ vann og 4 dråper 8 peak bead mix. 6 peak bead løsningen ble laget av 1 ml MQ vann 4 dråper hver av peak 1 og peak 2-6 mixene. Etter kalibreringen ble det gjort en backflush og kjørt MQ-vann i 15 minutter, i henhold til prosedyre «before running sample» (vedlegg A.2.6). Ved analysen av cellene ble prøven overført til et prøverør og blandet forsiktig. Prøverøret ble satt i flowcytometeret for analyse og programvaren i instrumentet ble stilt til 20 000 events etter prosedyre. Det ble gjennomført backflush mellom hver prøve. Etter analyse ble det utført prosedyren for «After running samples» (vedlegg A.2.6). Det ble gjennomført gating av resultatene på flowcytometeret etter at analysen var gjennomført. Gatingen ble gjennomført av samme person.

### 3.4 Optimalisering

#### 3.4.1 Optimalisering av metode

Optimalisering av metode ble gjort for å sikre at fikseringen kun førte til minimalt med stress hos cellene. Dette innebar flere gjennomførelser av prosedyrene for «splitting av celler» (vedlegg A.2.3), «fiksering» (vedlegg A.2.4) og «bruk av BD Accuri C6 Flow Cytometer» (vedlegg A.2.6). Observasjon av normal-cellessyklus på flowcytometeret var en indikasjon på

at fikseringen av cellene ikke førte til betydelig stress. Cellesyklusen ble sammenliknet med en mal for normalsyklus på flowcytometeret<sup>52</sup>.

### 3.4.2 Tillaging av ivermectin løsninger

Tillaging av Ivermectin-DMSO løsningen ble gjort i LAF-benk. Ivermectin (Sigma-Aldrich a.nr. 18898-1G) kom i pulverform og ble løst i DMSO (ThermoFisher, a.nr. 85190) til en konsentrasjon på 10 mM. Deretter ble løsningen sterilfiltrert ved bruk av et 0.2 µm sterilt sprøyte-filter (VWR a.nr. 514-0061). Løsningen ble lagret i romtemperatur og brukt gjennom studien til å lage HFKM med ivermectin. HFKM ble blandet med ivermectin løst i DMSO til en konsentrasjon på 5.83 µM ivermectin for videre bruk.

For å lage konsentrasjonene 0.5 µM, 1.0 µM og 5.0 µM ivermectin i celleflaskene ble forholdet mellom HFKM med 5.83 µM ivermectin, HFKM og cellesuspensjon beregnet i henhold til tabell 2.

**Tabell 2:** Viser volum tilsatt av cellesuspensjon, HFKM og HFKM med 5.83 µM ivermectin for en 25 cm<sup>2</sup> celleflaske. Venstre kolonne viser de ulike komponentene. Øverste rad viser de ulike konsentrasjonen for den ferdige løsningen.

Ivermectinkonsentrasjon i HFKM	0.5 µM	1.0 µM	5.0 µM
Volum HFKM med 5.83 µM ivermectin	0.6 ml	1.2 ml	6.0 ml
Volum HFKM	5.4 ml	4.8 ml	--
Volum cellesuspensjon	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
Totalt volum	7.0 ml	7.0 ml	7.0 ml

### 3.4.3 Optimalisering av ivermectinkonsentrasjon og tidsintervall

Optimalisering ble gjort ved å dyrke A549-celler i HFKM med ulike konsentrasjoner av ivermectin, samt ved ulike tidsintervaller og flere gjennomføringer. Bakgrunnen for at dette ble gjort var for å finne de ulike parametere som hadde best effekt på A549-cellene.

Konsentrasjonene av ivermectin som ble brukt under optimaliseringen var henholdsvis 0.5 µM, 1.0 µM og 5.0 µM. Cellene ble dyrket i disse konsentrasjonene i tidsintervallene 24 timer, 72 timer og 120 timer.

Optimaliseringen viste at en ivermectin konsentrasjon på 5.0 µM, dyrket i 72 timer ga antydning til størst forskjell fra kontrollen. Lenger tidsintervaller ga overvekst, mens kortere tidsintervaller ga lavere forskjell fra kontrollen.

Alle celleflaskene som ble startet som en del av optimaliseringen ble telt med Bürker tellekammer og fortynnet slik at de hadde lik startkonsentrasjon av celler. Denne konsentrasjonen ble bestemt til 100 000 celler/ml da dette ikke ga overvekst i 75 cm<sup>2</sup> celleflaske ved inkubasjon i 72 timer.

## 3.5 Dyrking med Ivermectin

### 3.5.1 Celledyrking med ivermectin

Forsøket ble startet med 16 stk 75 cm<sup>2</sup> celleflasker der 5 flasker var kontroller uten ivermectin, og 11 flasker var prøver med 5.0 µM ivermectin i HFKM. Celleflaskene ble dyrket i 72 timer og fiksert i henhold til prosedyre for fiksering av celler (vedlegg A.2.4), og analysert på flowcytometer etter prosedyre (vedlegg A.2.7).

## 3.6 Statistisk analyse

Alle resultatene fra flowcytometer og telling ble lagt inn i programvaren Excel for videre analyse. Det ble først regnet ut gjennomsnitt og standardavvik for å finne utliggerer som kunne påvirke resultatet. Deretter ble normalfordelingen vurdert før det ble gjennomført en tosidig t-test med antatt ulik varians. I denne testen ble det bestemt to hypoteser der  $H_0$  representerer ingen forskjell mellom kontroll og celler dyrket med ivermectin, og  $H_1$  representerer forskjell mellom kontroll og celler dyrket med ivermectin. Under denne analysen ble antall celler i kontroll og antall celler dyrket med ivermectin satt mot hverandre i en t-test for å anslå statistisk signifikant forskjell. Det samme ble så gjort med resultatene fra cellesyklusanalysen. Prosentvis fordeling i de ulike fasene hos celler dyrket med ivermectin ble sammenlignet med de tilsvarende fasene hos kontroller. Resultatene ble også fremstilt grafisk for tolkning.

## 4 Resultat

Resultatene som presenteres er fra optimalisering av vekstfaktorer, celledelling med Bürker tellekammer, og cellyklusanalyse på BD Accuri C6 flowcytometer. Under optimalisering ble A549-celler utsatt for 0.5  $\mu\text{M}$ , 1.0  $\mu\text{M}$  og 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin, over en periode på 24, 72 og 120 timer. I hoveddelen av studien ble det brukt fem celleflasker som kontroll og 11 celleflasker dyrket med 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin, disse ble dyrket i en periode på 72 timer. Kontrollen er A549-celler dyrket uten ivermectin.

Tabell 4 (vedlegg A.3.2) og figur 21 (vedlegg A.3.2.3) viser telling av A549-celler under optimaliseringsdelen av studien, der flasker med 1.0  $\mu\text{M}$  og 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin ble dyrket i 72 timer, og telt med Bürker tellekammer. I figur 22 (vedlegg A.3.2.4) vises fordelingen av A549-celler i de ulike celfasene under optimaliseringen. Resultatene fra celledelingen i hoveddelen blir vist i figur 11. Verdiene som ble brukt til statistisk utregning av resultat kommer fra gating av flowcytometrianalysen, og eksempler på gating vises i figur 16 og 17 (vedlegg A.2.2).

Tabell 6 og 7 (vedlegg A.3.3.2) viser resultatet fra telling og analyse på flowcytometer av A549-celler. Verdiene som regnes som utliggere ved 95% konfidensnivå vises også i denne tabellen. Vedlegg A.3.3.1 viser resultat etter gjennomført tosidig t-test med antatt ulik varians på telling og cellyklusanalyse på A549-celler.

### 4.1 Optimalisering

Under optimaliseringen ble A549-cellene ble dyrket i 24, 72 og 120 timer ved ivermectinkonsentrasjonene 0.5  $\mu\text{M}$ , 1.0  $\mu\text{M}$  og 5.0  $\mu\text{M}$ , i tillegg til kontroll. Resultatet fra disse gjennomføringene ble brukt til å fastslå tidsintervall og konsentrasjon for hoveddelen av studien. Beslutningen ble tatt basert på celleantall fra celledelling med Bürker tellekammer og vurdering av konfluens i invertmikroskop. En oversikt over antall A549-celler i celleflaskene ved optimalisering finnes i tabell 4 (vedlegg A.3.2).

Det er viktig at kontrollcellene har normalsyklus etter fiksering. Dette vil si at cellene vokser normalt, og at det ikke er trinn i fikseringsprosedyren som betydelig stresser cellene. Normalsyklus ble antatt etter analyse av de fikserte A549-cellene på flowcytometeret.

#### 4.1.1 Optimalisering av tidsintervall

Ved første del av optimaliseringen ble det testet tre ulike tidsintervaller for inkubasjonstid: 24 timer, 72 timer og 120 timer. Alle tidsintervallene hadde en kontroll og tre ulike konsentrasjoner med ivermectin.

Først ble det undersøkt om ivermectin påvirket veksten til A549-cellene etter inkubasjon i 24 timer, ved bruk av 25  $\text{cm}^2$  celleflasker. Det ble det ikke observert forskjell i konfluens mellom kontrollen og cellene dyrket med ivermectin. Dette gjorde at 24 timers tidsintervall ikke ble brukt videre i studien eller telt med Bürker tellekammer.

Ved dyrking i 120 timer ble det også brukt 25 cm<sup>2</sup> celleflasker. Her ble det observert betydelig forskjell mellom celler dyrket med 5.0 µM ivermectin og kontrollen. Forskjellene ble observert ved konfluens og antall celler. Celleflaskene med 5.0 µM ivermectin hadde i gjennomsnitt 333 333 celler, mens kontrollen i gjennomsnitt hadde 1 145 000 celler, se gjennomføring 2 i tabell 5 (vedlegg A.3.2). Antall celler i flaskene med 5.0 µM ivermectin var for lavt til å kunne gjøre analyse på flowcytometeret. I celleflaskene med 1.0 µM ivermectin og kontrollen ble det antatt overvekst, basert på observert konfluens. Cellene ble telt selv om det ble antatt overvekst. Her ble det telt flere celler i flaskene dyrket med 1.0 µM ivermectin enn i kontrollen. Dette resultatet avviker fra andre resultat i studien. Det var også andre utfordringer knyttet til dyrking over så lang tid, blant annet bytte av HFKM underveis og planlegging av tilgang til laboratoriet. Derfor ble 120 timers tidsintervall utelukket fra hoveddelen.

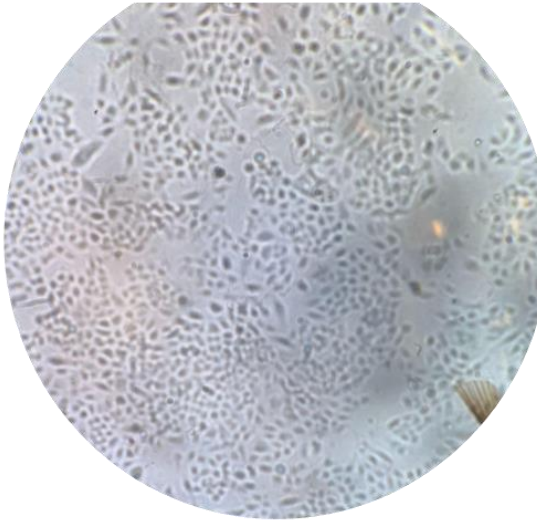
Ved dyrking i 72 timer ble det først brukt 25 cm<sup>2</sup> celleflasker. Her ble det observert en betydelig forskjell i celleveksten mellom A549-celle dyrket i ivermectin og kontrollen, basert på konfluens og antall A549-celler, se gjennomføring 1 i tabell 4 (vedlegg A.3.2). Det ble også her antatt overvekst i celleflaskene med kontroll og 1.0 µM ivermectin, basert på konfluens. I disse celleflaskene ble det telt flere A549-celler ved 1.0 µM ivermectin enn i kontrollen. I celleflaskene med 5.0 µM ivermectin var det en betydelig reduksjon i antall celler som vises i gjennomføring 1 tabell 4 (vedlegg A.3.2). For å hindre overvekst ble startkonsentrasjon av A549-celler i flaskene redusert, og det ble oppskalert til 75 cm<sup>2</sup> celleflasker. Etter disse tiltakene ble det ikke observert overvekst ved noen konsentrasjoner. I tillegg hadde flaskene dyrket med 5.0 µM ivermectin nok A549-celler til å analyseres på flowcytometer. Etter tiltakene ble det observert en reduksjon i antall A549-celler i celleflasker dyrket med ivermectin i forhold til kontrollen, ved gjennomføringer nummer 3 og 4. Gjennomsnittet for de to gjennomføringene var 2 257 500 celler i kontrollen, 1 740 000 celler i flaskene dyrket med 1.0 µM ivermectin, og 847 500 celler i flaskene dyrket med 5.0 µM ivermectin, se gjennomføring 3 og 4, tabell 5 (vedlegg A.3.2). Antall celler i celleflaskene fremstilles også i figur 21 (vedlegg A.3.2.3). 75 cm<sup>2</sup> celleflasker dyrket i 72 timer ble brukt videre i hoveddelen av studien.

#### 4.1.2 Optimalisering av ivermectinkonsentrasjon

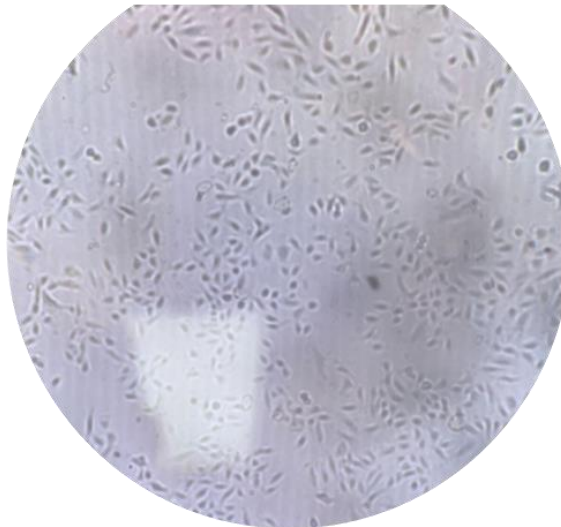
Optimalisering av ivermectin konsentrasjon ble gjennomført ved at A549-celle ble dyrket i 72 timer i 75 cm<sup>2</sup> celleflasker med konsentrasjonene 0.5 µM, 1.0 µM og 5.0 µM ivermectin. A549-celler som ble dyrket med 0.5 µM ivermectin i 25 cm<sup>2</sup> celleflasker ble raskt utelukket for videre bruk i studien, da det ble observert lite forskjell i konfluens sammenlignet med kontrollen.

Ivermectinkonsentrasjonene 1.0 µM og 5.0 µM ble sammenlignet med kontrollen på bakgrunn av antall A549-celler i celleflasken telt med Bürker tellekammer. Ved dyrking av A549-celler med 1.0 µM ivermectin ble det observert noe nedgang i celleantallet sammenliknet med kontrollen. Den største forskjellen i celleantallet var ved dyrking med 5.0

$\mu\text{M}$  ivermectin, se figur 10, da det ble observert en stor nedgang i celleantallet etter 72 timer sammenliknet med kontrollen, se figur 9.  $5.0 \mu\text{M}$  ble dermed brukt videre i studien.



**Figur 9:** Bildet viser kontroll dyrket i  $75 \text{ cm}^2$  celleflaske i 72 timer. Bildet er tatt under hoveddelen av studien og illustrerer konfluensen som ble observert i invertmikroskop ved dyrkingen av A549-cellene dyrket uten ivermectin gjennom studien. Det er en skade på linsen i instrumentet nederst i høyre del av bildet.



**Figur 10:** Bildet viser A549-celler dyrket i  $75 \text{ cm}^2$  celleflaske i 72 timer i HFKM med  $5.0 \mu\text{M}$  ivermectin. Bildet er tatt under hoveddelen av studien og illustrerer konfluensen som er observert i invertmikroskop ved dyrkingen av A549-cellene med  $5.0 \mu\text{M}$  ivermectin gjennom studien.

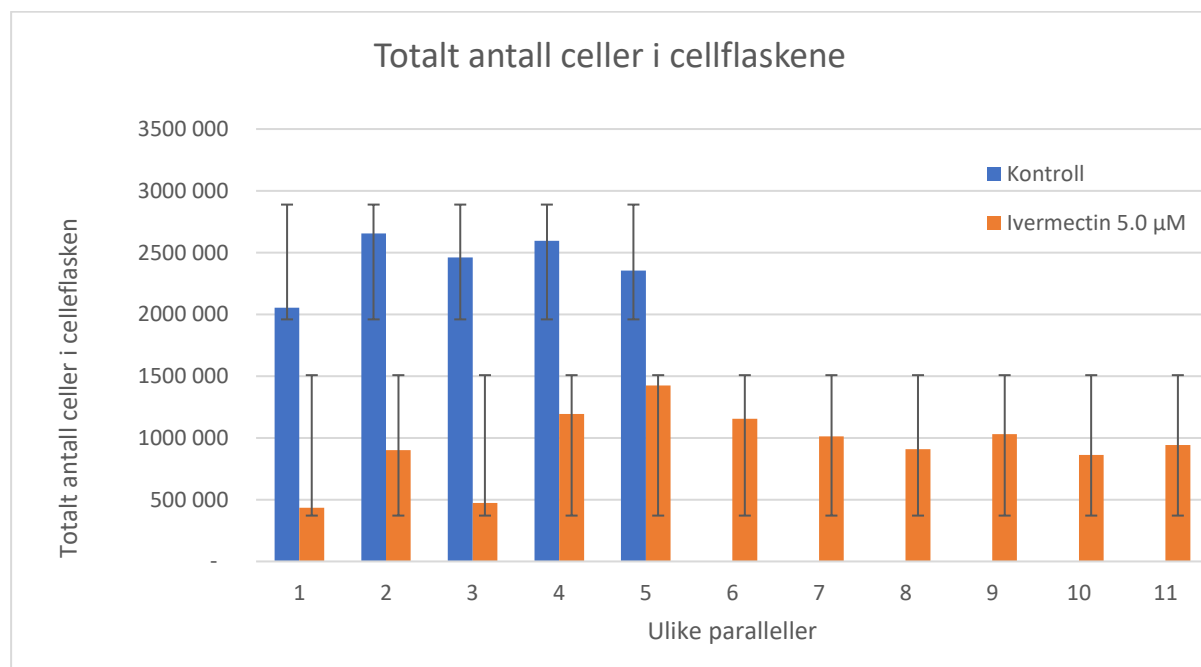
## 4.2 Resultat fra hoveddel

### 4.2.1 Celletelling

Celletellingen av A549-celler ble gjort med Bürker tellekammer, for å få et anslag på antall celler i celleflasken. Celleantallet ble brukt til å bestemme om celledensiteten inneholdt nok celler til å kunne deles i to paralleller, for analyse på flowcytometer. Det ble dyrket fem kontroller og 11 flasker med  $5.0 \mu\text{M}$  ivermectin. Kontrollene inneholdt over to millioner

A549-celler noe som er nok til at de kunne deles i to paralleller per flaske, se tabell 6 (vedlegg A.3.3.1). Dette ga oss totalt ti paralleller med kontroller for videre analyse på flowcytometeret. Prøvene med 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin inneholdt ikke nok celler til at disse kunne bli splittet til paralleller, noe som resulterte i totalt 11 paralleller til analyse på flowcytometeret, se tabell 7 (vedlegg A.3.2.1).

Antall A549-celler i celleflaskene vil også kunne si noe om veksten til cellene. Celletellingen viste at det var mindre celler i prøvene dyrket med ivermectin sammenliknet med kontrollen. Dette illustreres i figur 11. I gjennomsnitt var det 2 424 000 celler i kontrollflaskene, mens celleflaskene dyrket med 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin i gjennomsnitt hadde 939 545 celler, se tabell 6 og 7 (vedlegg A.3.3.1). Ved å gjennomføre en t-test med antatt ulik varians er t-stat større enn t-kritisk, noe som viser at det er en statistisk signifikant forskjell i antallet celler i celleflaskene med 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin sammenliknet med kontrollen.



**Figur 11:** Viser et stolpediagram med totalt antall celler etter telling og utregning i ulike paralleller. De blå stolpene viser antall celler i kontrollflaskene. De oransje stolpene viser antall celler i flasker som er dyrket med 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin. Feillinjene i figuren viser et 95% konfidensnivå. Cellene er dyrket i 75 cm<sup>2</sup> celleflasker. y-aksen viser antall celler, mens x-aksen viser de ulike parallellene.

#### 4.2.2 Resultater fra analyse på flowcytometer

Denne delen tar for seg resultater fra analyser av cellesyklus, utført på BD Accuri C6 flowcytometer. Resultatene viser fordelingen av A549-celler i de ulike cellefasene. Alle parallellene med A549-celler ble dyrket i 75 cm<sup>2</sup> celleflasker i 72 timer.

Det er fjernet to paralleller fra de endelige resultatene. Den ene parallellen (D8) er fra kontrollen, ettersom verdien i S-fasen og G<sub>2</sub>/M-fasen ligger utenfor 95% konfidensnivå. Den andre parallellen (E3) er fra prøver dyrket med 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin, ettersom verdien i S-fasen

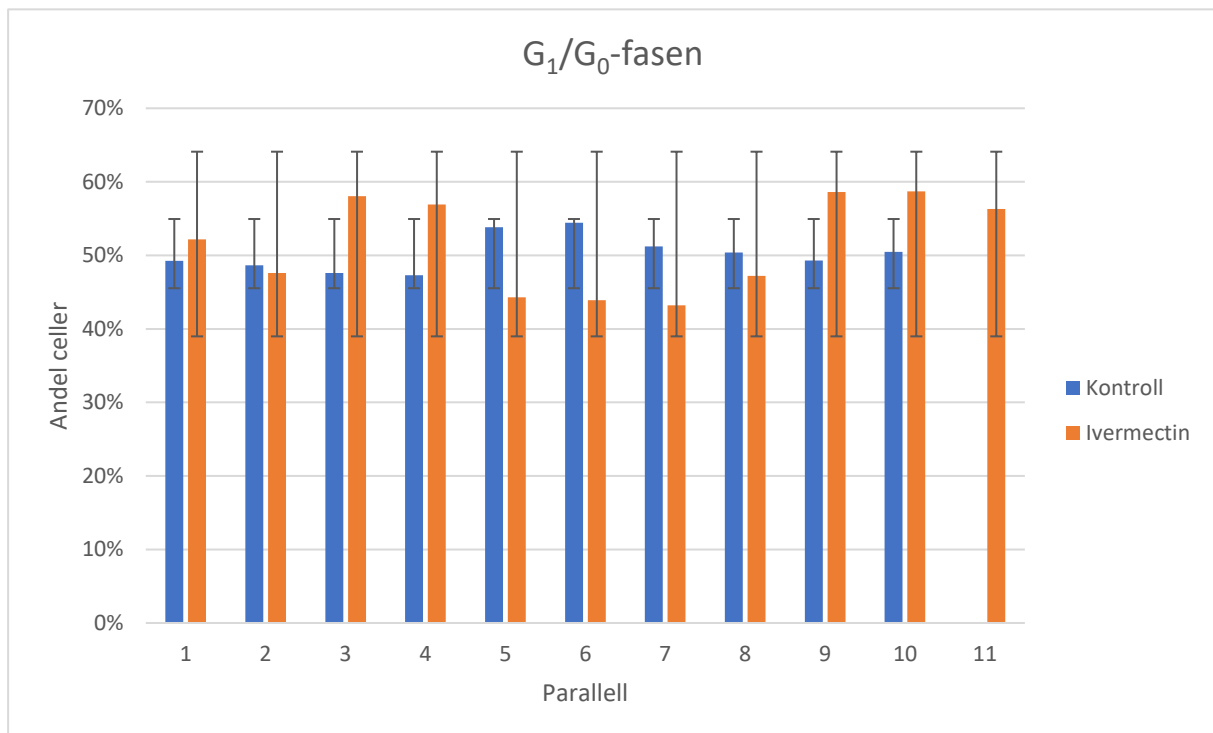


fasen ligger utenfor 95% konfidensnivå. Parallellene med utliggerere (D8, E3) vises i tabell 6 og 7 (vedlegg A.3.3.1).

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

Cellesyklusanalysen vil si hvor stor prosentandel som finnes seg i de ulike fasene.

Andelen A549-celler i G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen fra de ulike parallellene er illustrert i figur 12, og oppsummert ved gjennomsnitt i figur 15. De oransje stolpene i figur 12 og 15 er paralleller dyrket med 5.0 µM ivermectin, mens de blå stolpene er kontroller. I gjennomsnitt befinner 50.22 % av A549-celleene i kontrollene seg i G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen. For celleflaskene dyrket med 5.0 µM ivermectin er i gjennomsnitt 50.89 % av A549-celleene i G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen. Dette er en økning på 0.67 % celler i G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen for celler dyrket med 5.0 µM ivermectin.

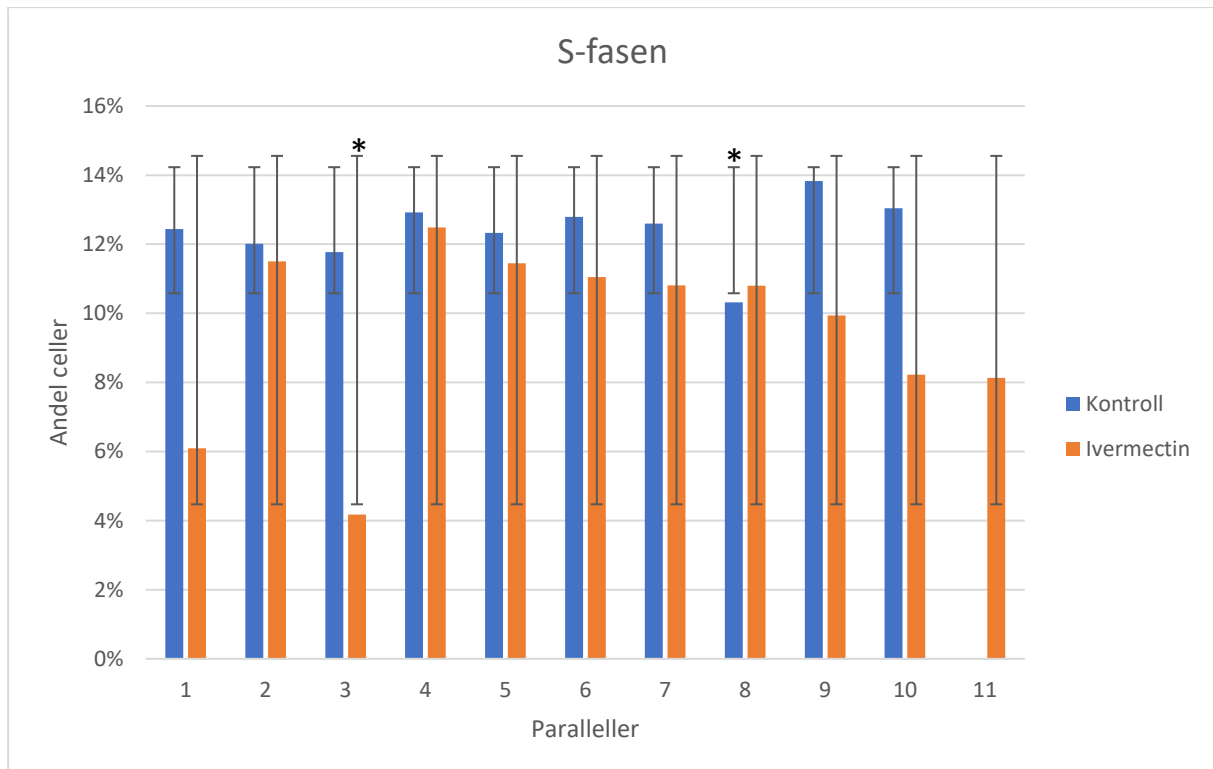


**Figur 12:** Denne figuren er basert på tabell 6 og 7 (vedlegg A.3.3.2). Figuren viser et stolpediagram med andelen av A549-celler som befinner seg i G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen etter celsesyklusanalyse på BD Accuri C6 flowcytometer. Y-aksen viser prosentandel celler i G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen, mens x-aksen viser de ulike parallellene. De individuelle parallellene med 5.0 µM ivermectin og kontroll er stilt opp mot hverandre. De blå stolpene er prosentandelen av celler i G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen fra kontroller. De oransje stolpene viser prosentandelen celler dyrket med 5.0 µM ivermectin som er i G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen. Feillinjene i figuren viser et 95% konfidensnivå. Kontrollene kommer fra fem celleflasker dyrket uten ivermectin, der hver celleflaske er delt i to paralleller. Prøvene med 5.0 µM ivermectin kommer fra 11 celleflasker, en flaske per stolpe.

#### 4.2.2.2 S-fasen

Andelen A549-celler i S-fasen fra de ulike parallellene er illustrert i figur 13, og oppsummert ved gjennomsnitt i figur 15. De oransje stolpene i figur 13 og 15 er celler dyrket med 5.0 µM ivermectin, mens de blå stolpene er kontroller. I gjennomsnitt befinner 12.64 % av A549-celleene i kontrollene seg i S-fasen. For celleflaskene dyrket med 5.0 µM ivermectin er i

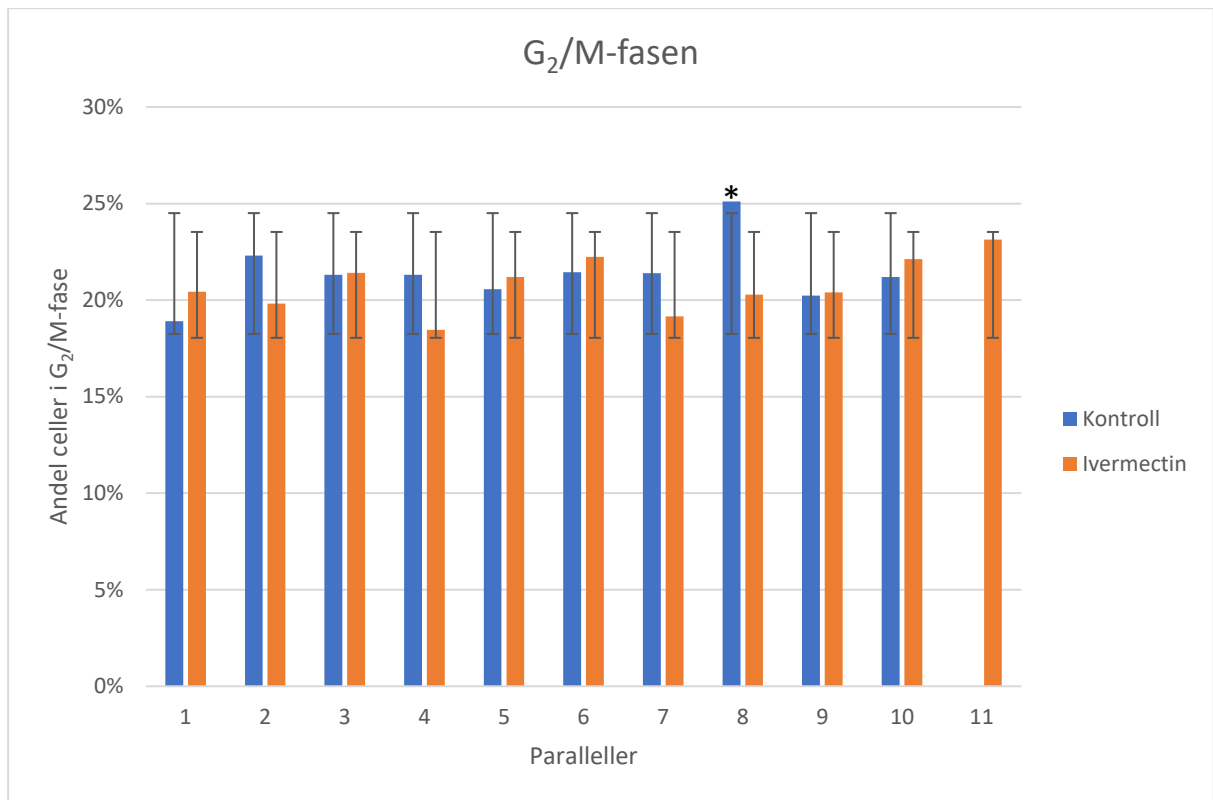
gjennomsnitt 10.05 % av A549-cellene i S-fasen. Dette er en nedgang på 2.59 % celler i S-fasen for celler dyrket med 5.0  $\mu$ M ivermectin.



**Figur 13:** Denne figuren er basert på tabell 6 og 7 (vedlegg A.3.3.2). Figuren viser et stolpediagram med andelen av A549-celler som befinner seg i S-fasen etter cellesyklusanalyse på BD Accuri C6 flowcytometer. Y-aksen viser prosentandel celler i S-fasen, mens x-aksen viser de ulike parallellene. De individuelle parallellene med ivermectin og kontroll er stilt opp mot hverandre. Stolpene i blå viser prosentandelen celler i S-fasen fra kontrollene. Stolpene i oransje viser prosentandelen av celler dyrket i 5.0  $\mu$ M ivermectin i S-fasen. Feillinjene i figuren viser et 95% konfidensnivå. Stjernene over stolpene viser at denne verdien er beregnet til å være en utligger ved 95% konfidensnivå. Kontrollene kommer fra fem celleflasker dyrket uten ivermectin, mens prøvene med 5.0  $\mu$ M ivermectin kommer fra 11 celleflasker, en flaske per stolpe.

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

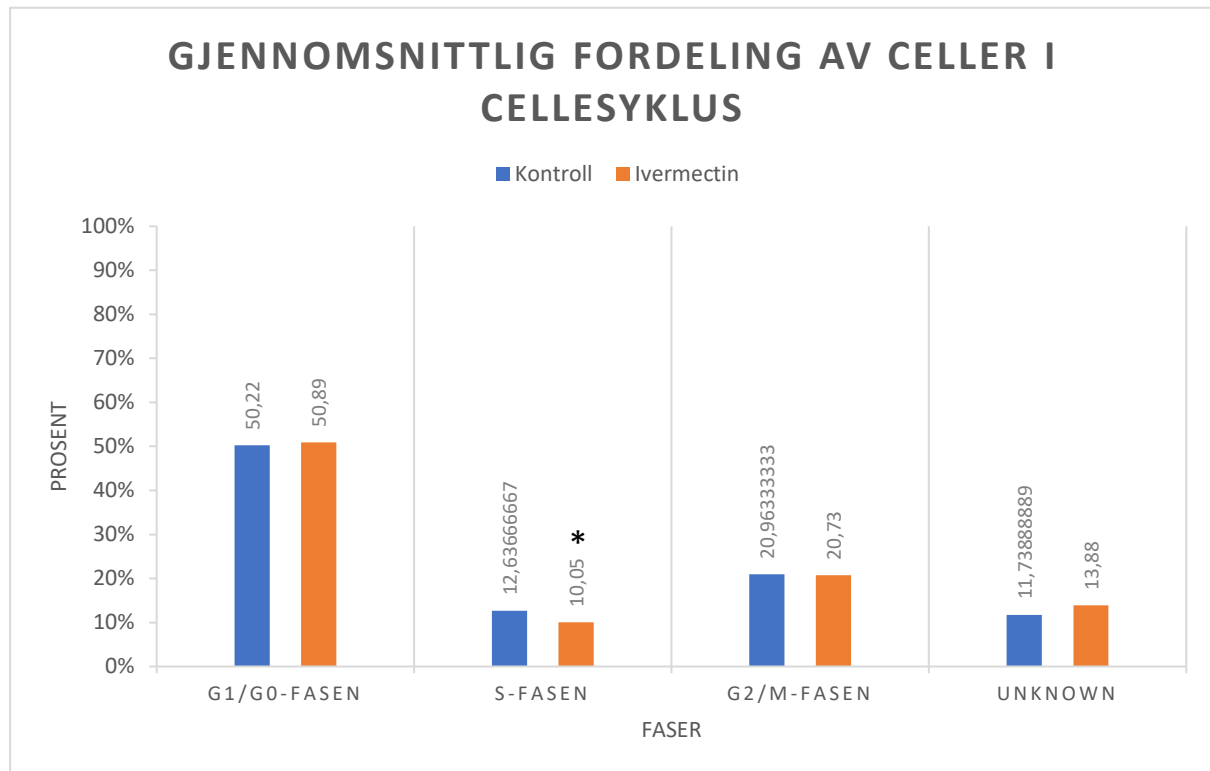
Andelen A549-celler i G<sub>2</sub>/M-fasen fra de ulike parallellene er illustrert i figur 14, og oppsummert ved gjennomsnitt i figur 15. De oransje stolpene i figur 14 og 15 er celler dyrket med 5.0  $\mu$ M ivermectin, mens de blå stolpene er kontrollene. I gjennomsnitt befinner 20.96 % av A549-cellene i kontrollene seg i G<sub>2</sub>/M-fasen. For celleflaskene dyrket med 5.0  $\mu$ M ivermectin er i gjennomsnitt 20.73 % av A549-cellene i S-fasen. Dette er en nedgang på 0.23% celler i G<sub>2</sub>/M-fasen for celler dyrket med 5.0  $\mu$ M ivermectin.



**Figur 14:** Denne figuren er basert på tabell 6 og 7 (vedlegg A.3.3.2). Stolpediagrammet viser andelen av A549-celler som befinner seg i G<sub>2</sub>/M-fasen etter cellesyklusanalyse på BD Accuri C6 flowcytometer. Y-aksen viser prosentandel celler i G<sub>2</sub>/M-fasen, mens x-aksen viser de ulike parallellene. De individuelle parallellene med ivermectin og kontroll er stilt opp mot hverandre. De blå stolpene representerer andelen celler i G<sub>2</sub>/M-fasen fra kontrollene. De oransje stolpene representerer andelen celler i G<sub>2</sub>/M-fasen fra parallellene med 5.0 μM ivermectin. Feillinjene i figuren viser et 95% konfidensnivå. Stjernene over stolpene viser at denne verdien er beregnet til å være en utligger ved 95% konfidensnivå. Kontrollene kommer fra fem celleflasker dyrket uten ivermectin, mens parallellene med 5.0 μM ivermectin kommer fra 11 celleflasker, en flaske per stolpe.

#### 4.2.2.4 Gjennomsnittlig resultat fra cellesyklusanalyse

Resultatene fra flowcytometeret fremstilles i figur 15 der det ble brukt gjennomsnittet av målingene innen de ulike fasene. Disse gjennomsnittene er stilt opp ved siden av hverandre for å illustrere den gjennomsnittlige fordelingen av alle cellene i de ulike cellefasene.



**Figur 15:** Denne figuren er basert på tabell 6 og 7 (vedlegg A.3.3.2). Figuren viser et stolpediagram over gjennomsnittlig prosentandel av cellene i de ulike cellefasene. Paralleller med utliggere er ekskludert fra utregning av gjennomsnitt. Y-aksen viser prosentandel celler i de ulike fasene, mens x-aksen viser de ulike cellesyklusfasene. De blå stolpene viser den gjennomsnittlige verdien av kontrollene, mens de oransje stolpene viser den gjennomsnittlige verdien av celler dyrket med 5.0  $\mu$ M ivermectin. Stjernen over stolpen viser at det er signifikant forskjell fra kontrollen. Unknown er målinger av DNA konsentrasjoner som er større enn verdier innenfor G<sub>2</sub>/M-fasen.

### 4.2.3 Statistisk utregning av data

#### 4.2.3.1 Celletelling

De største forskjellene mellom kontroll og paralleller med 5.0  $\mu$ M ivermectin ble funnet ved celletelling og observasjon av konfluens. Det var observert betydelig lavere konfluens hos A549-celler dyrket med 5.0  $\mu$ M ivermectin i forhold til kontrollene, se figur 9 og 10. Ut ifra celletelling med Bürker tellekammer ble det beregnet totalt antall celler i 75 cm<sup>2</sup> celleflaskene, se tabell 6 og 7 (vedlegg A.3.3.2). A594-celleene dyrket som kontroll hadde i gjennomsnitt 2 424 000 celler og et standardavvik 237 076. A594-celleene dyrket med 5.0  $\mu$ M ivermectin hadde i gjennomsnitt 939 545 celler og et standardavvik på 290 006. Forskjellen i standardavviket tyder på at variansen mellom kontrollen og A549-celleene dyrket med 5.0  $\mu$ M ivermectin er ulik. Forskjellen mellom totalt antall A549-celler i kontrollen og A549-celler dyrket med 5.0  $\mu$ M ivermectin ble studert gjennom t-test med antatt ulik varians. T-stat viser

en verdi på 10.74, mens t-kritisk viser en verdi på 2.26. Da 10.74 ligger langt over 2.26 kan  $H_0$  forkastes og  $H_1$  aksepteres ved 95% konfidensnivå. Ved 5% signifikansnivå fantes det ingen utliggere som var utenfor grenseverdiene.

#### 4.2.3.2 $G_1/G_0$ -fasen

I kontrollen ble gjennomsnittet i  $G_1/G_0$ -fasen 50.22%, mens den samme fasen hos cellene dyrket med 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin viste 50.89% i gjennomsnitt. Ved bruk av t-test med antatt ulik varians ble t-stat beregnet til å ligge mellom kontrollgrensene og viste ingen signifikant forskjell i  $G_0/G_1$ -fasen mellom kontroll og celler dyrket med 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin. t-stat viser en verdi på -0.3, mens t-kritisk viser en verdi på 2.7. Da -0.3 ligger mellom 2.7 og -2.7 kan  $H_1$  forkastes og  $H_0$  aksepteres ved 95% konfidensnivå. Prøvene med celler dyrket i 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin har en varians på 4.4, mens kontrollen har en varians på 6.5. Alle verdiene brukt er hentet fra tabell 6 og 7 (vedlegg A.3.3.2).

#### 4.2.3.3 S-fasen

I kontrollen ble gjennomsnittet i S-fasen 12.64%, mens den samme fasen hos cellene dyrket med 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin viste 10.05% i gjennomsnitt. Det ble funnet en utligger hos kontrollen (D8) med verdien 10%, denne verdien ligger utenfor 95% konfidensintervall og blir derfor betegnet som en utligger. Hos parallellen (E3) med A549-celler dyrket i 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin var verdien 4%, noe som ligger utenfor 95% konfidensintervall og blir derfor også betegnet som en utligger. Disse ble så ekskludert før videre statistiske utregninger. Ved bruk av t-test med antatt ulik varians ble t-stat beregnet til å ligge utenfor kontrollgrensene og viste signifikant forskjell i S-fasen mellom kontroll og celler dyrket med 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin. t-stat viser en verdi på 3.5 mens t-kritisk viser en verdi på 2.2. Da verdien 3.5 ligger over grensen på 2.2 kan  $H_0$  forkastes og  $H_1$  aksepteres ved 95% konfidensnivå. Prøvene med celler dyrket i 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin har en varians på 3.9, mens kontrollen har en varians på 0.4. Alle verdiene brukt er hentet fra tabell 6 og 7 (vedlegg A.3.3.2).

#### 4.2.3.4 $G_2/M$ -fasen

I kontrollen ble gjennomsnittet i  $G_2/M$ -fasen 20.96 %, mens den samme fasen hos cellene dyrket med 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin viste 20.73 % i gjennomsnitt. Det ble funnet en utligger hos kontrollen (E3) med verdien 25%, denne verdien ligger utenfor 95% konfidensintervall og blir derfor betegnet som en utligger. Denne parallellen ble så ekskludert før videre statistiske utregninger. Ved bruk av t-test med antatt ulik varians ble t-stat beregnet til å ligge innenfor kontrollgrensene og viste ingen signifikant forskjell i  $G_2/M$ -fasen mellom kontroll og celler dyrket med 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin. t-stat viser en verdi på 0.4 mens t-kritisk viser en verdi på 2.1. Da verdien 0.4 ligger mellom grensen på 2.1 og -2.1 kan  $H_1$  forkastes og  $H_0$  aksepteres ved 95% konfidensnivå. Prøvene med celler dyrket i 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin har en varians på 0.9, mens kontrollen har en varians på 2.1. Alle verdiene brukt er hentet fra tabell 6 og 7 (vedlegg A.3.3.2).

## 5 Diskusjon

Denne studien tok for seg effekten av ivermectin på celleproliferasjonen til A549-celler. Det ble brukt konsentrasjonen 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin som ligger innenfor kjente tolererbare grenser for mennesker, basert på tidligere forskning<sup>32</sup>. Ifølge Norsk Legemiddelhåndbok er det standard å bruke 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ved behandling av sykdommer som blant annet skabb og onkocerkiasis (elveblindhet)<sup>62</sup>. Konsentrasjon på 5.0  $\mu\text{M}$  *in vitro* er en konsentrasjon som tilsvarer 2  $\text{mg}/\text{kg}$ . Denne konsentrasjonen er ti ganger så høy som vanlig dosering for mennesker, men ga ikke alvorlige bivirkninger ved testing på friske mennesker<sup>63</sup>.

A549-cellene ble tilsatt ivermectin som et forsøk på å endre celleveksten, basert på informasjonen hentet fra tidligere forskning. I denne studien ble celleproliferasjonen til A549-celler dyrket med ivermectin analysert gjennom cellesyklusanalyse og celledelling. Dette vil kunne gi en antydning på om ivermectin har en hemmende effekt på celleproliferasjonen til A549-celler.

Diskusjonsdelen av oppgaven vil drøfte stegene i studien og resultatet. Den vil ta for seg styrker, svakheter, forbedringspotensial og eventuelle feilkilder. Til slutt diskuteres og foreslås muligheter for videre forskning.

### 5.1 Dyrking av celler

Før cellekultivering startet ble A549-cellene tint opp fra oppbevaring i fryseren ved  $-80^{\circ}\text{C}$ . Oppvarmingen bør skje raskt for at flest mulig celler skal overleve fordi prosedyren for tining er stressende for cellene<sup>69</sup>. Det ble ikke observert tegn til betydelig stress, da celleproliferasjonen var god fra start. Cellene ble passert seks ganger før optimalisering for å observere normal vekst før analyse som vises i figur 16 (vedlegg A.3.1). Videre gjennom forsøket ble cellelinjen dyrket med stabil vekst, uten observert kontaminasjon. Celleveksten ble observert i invertmikroskop, som gjorde det mulig å undersøke konfluensen underveis. Her må det merkes at konfluensen ble basert på anslått prosentvis dekningsgrad observert i invertmikroskopet og blir derfor ikke brukt som et resultat.

### 5.2 Optimalisering

Optimalisering av prosedyrer, og valg av ivermectinkonsentrasjon og tidsintervall, ble gjort for å finne de parametrene som i størst grad påvirker celleproliferasjonene til A549-celler. I optimaliseringen ble A549-cellene dyrket med ulike konsentrasjoner av ivermectin; 0.5  $\mu\text{M}$ , 1.0  $\mu\text{M}$  og 5.0  $\mu\text{M}$ , ved tidsintervallene 24 timer, 72 timer og 120 timer. Valget av ivermectinkonsentrasjonene og tidsintervall var basert på grunnlag av konsentrasjoner brukt i tidligere forskning. Forskningen viste at konsentrasjoner fra 0.4  $\mu\text{M}$  helt opp til 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin hadde en effekt på celleproliferasjonen til ulike karsinogene celler, som brystkreftceller og eggstokk-kreftceller<sup>11, 32, 33</sup>.

#### 5.2.1 Optimalisering av tidsintervall

Ved dyrking av A549-cellene i 24 timer ble det ikke sett noen betydelig forskjell i konfluens ved en sammenlikning av 25  $\text{cm}^2$  celleflasker dyrket med ivermectin og kontrollen. A549-

cellene kunne blitt telt med Bürker tellekammer for å undersøke om det var en forskjell i celleantall mellom konsentrasjonene av ivermectin og kontrollen. Dette ble derimot ikke gjort fordi det ble observert en større forskjell i konfluens ved de andre tidsintervallene. I tillegg var et begrenset antall Bürker tellekammere en grunn til at celleantallet ved 24 timers tidsintervall ikke ble telt. Dette tidsintervallet ble derfor utelukket for videre bruk i studien.

Optimaliseringen med 120 timer tidsintervall i 25 cm<sup>2</sup> celleflasker resulterte i flere utfordringer. Det ble antatt overvekst i både celleflaskene med kontroll og celleflaskene med 1.0 µM ivermectin, basert på konfluens. Overveksten kan ha ført til uønsket stress hos A549-cellene, som følge av blant annet kontaktinhibering. Det var antydning til at overveksten hadde en påvirkning på resultatet. Antydningen er basert på at celleflaskene med 1.0 µM ivermectin og kontrollen hadde tilnærmet likt celleantall og konfluens. Disse resultatene stemmer ikke overens med teori, tidligere forskning og senere resultater i denne studien, der overvekst ikke var en faktor. For å redusere forekomsten av overvekst i disse celleflaskene ble startkonsentrasjonen av A549-cellene i celleflaskene redusert. Ved denne reduksjonen ble det derimot for lavt antall celler i celleflaskene med 5.0 µM ivermectin til at disse kunne bli analysert på flowcytometeret. I tillegg til problemet med overvekst innebar 120 timers tidsintervallet en risiko for at cellene gikk tom for næring og fikk en opphopning av avfallsstoff. Her kunne det blitt gjort en gjennomføring på 75 cm<sup>2</sup> celleflasker for å gi cellene mer plass å vokse på, men dette innebar venting på levering av flaskene. Samtidig kunne dyrkingen på 120 timer krevet at det måtte byttes HFKM underveis. Dette var ønskelig å unngå fordi tilgang til laboratoriet var begrenset. Tilgangen til laboratoriet gjorde det utfordrende å følge med på veksten til cellene, og tilføre nytt HFKM til riktig tid.

Under optimalisering med 72 timer intervall ble det antatt overvekst hos kontrollen og A549-celler dyrket i 1.0 µM ivermectin, ved bruk av 25 cm<sup>2</sup> celleflasker. Antagelsen om overvekst ble tatt ut ifra observasjoner av konfluens i invertmikroskop. Ved 72 timers tidsintervall var det imidlertid lettere å finne en startkonsentrasjon som ga nok celler til analyse på flowcytometeret ved 5.0 µM ivermectin og samtidig ikke førte til overvekst. Startkonsentrasjonen ble nedregulert til 100 000 celler/ml, mens størrelsen på celleflaskene ble oppskalert til 75 cm<sup>2</sup> for å sikre at det var nok A549-celler til analyse på flowcytometeret. Tidsintervallet 72 timer ble derfor valg for hoveddelen av studien.

Resultatene framstilt i figur 19 (vedlegg A.3.2.1) og figur 20 (vedlegg A.3.2.2) viste flest A549-celler i celleflaskene dyrket med 1.0 µM ivermectin for både 120 og 72 timer tidsintervall. Dette resultatet blir utelukket da det ble antatt at det var overveksten i celleflaskene som førte til at det var flere celler i flaskene med 1.0 µM ivermectin, basert på sammenligning med resultatene framstilt i figur 21 (vedlegg A.3.2.3) der det ikke var overvekst. Overveksten førte til usikkerhet i resultatet. I tillegg støttes ikke dette resultatet av videre forsøk som tyder på et synkende antall A549-celler ved økende konsentrasjon av ivermectin. Det ble også observert en betydelig nedgang i antall A549-celler i celleflaskene dyrket med 5.0 µM ivermectin, og disse celleflaskene hadde ikke overvekst.

### 5.2.2 Optimalisering av konsentrasjon

Tidligere studier som Juarez, M. et al. 2018 viser at en rekke konsentrasjoner av ivermectin, deriblant at 0.5  $\mu\text{M}$ -, 1.0  $\mu\text{M}$ - og 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin, har en effekt på celleproliferasjonen til ulike karsinogene celler<sup>60</sup>. Optimaliseringen av konsentrasjon ble gjort ved 72 timers tidsintervall. Her ble ivermectin sin påvirkning på A549-celler undersøkt ved konsentrasjonene 0.5  $\mu\text{M}$ -, 1.0  $\mu\text{M}$ - og 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin. Dette optimaliseringstrinnet ble gjort for å undersøke hvilken konsentrasjon av ivermectin som ga den største effekten på A549-cellene. Effekten ble studert ved å se på forskjell i konfluens og antall celler mellom kontrollen og celler dyrket med ivermectin.

Det ble observert at den laveste konsentrasjonen, 0.5  $\mu\text{M}$  ivermectin, ikke ga vesentlig forskjell i konfluens fra kontrollen. Konfluensen ble observert i celleflaskene ved bruk av invertmikroskop. Dersom cellene hadde blitt telt i Bürker tellekammer er det mulig at det kunne blitt observert en større forskjell i celleantall enn det som ble observert ved konfluens. Dette ble ikke gjort for å spare tid og utstyr, da det ikke ble observert forskjell i konfluens mellom celleflaskene med 0.5  $\mu\text{M}$  ivermectin og kontrollen. Videre optimalisering med A549-celler dyrket med 0.5  $\mu\text{M}$  ivermectin ble derfor utelukket.

Celleveksten til A549-celler dyrket med 1.0  $\mu\text{M}$ -, 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin og kontrollen ble vurdert i invertmikroskop, og deretter telt med Bürker tellekammer. I celleflaskene med 1.0  $\mu\text{M}$  ivermectin var det i gjennomsnitt 1 740 000 A549-celler, mens celleflaskene med 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin hadde et gjennomsnitt på 857 500 A549-celler. Til sammenligning var celleantallet i kontrollene i gjennomsnitt 2 257 500, se tabell 5 (vedlegg A.3.2). Ved en sammenligning mellom 1.0  $\mu\text{M}$ - og 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin viste celleflasker dyrket med 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin en betydelig større nedgang i celleantall fra kontrollen. Resultatene fra optimalisering kan tyde på at økning i ivermectinkonsentrasjon fører til redusert celleproliferasjon hos A549-celler. Det kan ses likhetstrekk mellom disse resultatene og en studie av Dominguez-Gomez, G. et al., da denne forskningsartikkelen viser at levedyktigheten til brystkreftceller synker ved økende konsentrasjoner av ivermectin opp til 5.0  $\mu\text{M}$ <sup>11</sup>. Basert på disse resultatene fra optimaliseringen ble 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin brukt i hoveddelen av studien.

### 5.2.3 Optimalisering av fikseringsprosedyre

Målet med fikseringsprosedyren var å fikserer cellene og farge DNA med PI, samtidig som cellene holdes intakte for analyse med flowcytometri. Det var viktig å optimalisere fikseringen for å sikre at fikseringsprosedyren ikke stresset cellene på en slik måte at det påvirket resultatene. Dette ble gjort ved å holde faktorer som tid og mekanisk stress på A549-cellene til et minimum. Som et resultat av optimaliseringen ble det gjort ulike tilpasninger i prosedyren under optimaliseringsdelen av studien. Ved fikseringsprosedyren var det kritisk at tid utenfor optimale forhold for A549-cellene var så kort som mulig. Det ble derfor brukt tidtaker for å fastslå hvor lang tid fikseringsprosedyren tok. Tiden startet fra celleflaskene ble hentet ut fra inkubatoren til A549-cellene ble tilført etanol, da etanol fikserer A549-cellene. Det ble brukt i underkant av 20 minutter på fikseringen, noe som ble vurdert som tilstrekkelig kort tid for å minimalisere påvirkning av stress på A549-cellene. Denne tiden ble basert på



tidligere erfaringer fra veileder. I tillegg kunne man se på resultatet, etter analyse av de fikserte A549-cellene på flowcytometeret, at kontrollene var i normalsyklus, som i figur 16 (vedlegg A.3.1).

For å kunne gjennomføre analyse på flowcytometeret var det nødvendig med et minimum antall celler i hver parallell. Det var derfor viktig å minimalisere tapet av celler underveis i prosedyren. I fikseringstrinnet der celleduspensjonen overføres til etanol, er det mulig at celler synker til bunnen og dermed ikke blir med under pipetteringen. Derfor ble det lagt fokus på å homogenisere celleduspensjonen før dette trinnet. Homogenisering ble prioritert i de trinnene cellepelleten skulle løsnes. Dette var for å sikre at alle cellene kom i kontakt med væsken. Homogenisering ved bruk av vortex kan ha vært årsaken til at det ble observert mye celledebri ved første gjennomføring på flowcytometeret. Derfor ble trinn i fikseringen som innebar bruk av vortex byttet til homogenisering ved pipettering, fordi dette opplevdes som en mer skånsom metode. Dette var gunstig ettersom cellene kan være skjøre etter fiksering som følge av at etanol perforerer membranen og kan skade cellestrukturer slik som mikrotubuli<sup>57</sup>.

### 5.3 Analyse av resultat

Resultatet fra studien viste at det var en stor nedgang i celleantallet mellom kontrollen og prøvene dyrket med 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin. Reduksjonen i celleantall var statistisk signifikant. Nedgangen var også tydelig observert ved konfluens, se figur 9 og 10. Det ble ikke observert store endringer i cellyklusen til A549-cellene dyrket med 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin sammenliknet med kontrollen, se figur 15. Dette gjorde at det ble lagt størst vekt på celletellingen ved vurdering av resultatene.

#### 5.3.1 Celletelling

Før det første sentrifugeringstrinnet i fikseringsprosedyren ble det tatt ut 10  $\mu\text{L}$  fra celleduspensjonen som ble overført til Bürker tellekammer. Dette ble gjort for å kunne anslå antall A549-celler ved telling. Antall celler var viktig å bestemme, fordi dette kunne si noe om celleveksten, samt brukes til å kontrollere om det var nok A549-celler til å dele celleduspensjonen til flere paralleller for analyse på flowcytometeret.

Bürker tellekammer ble brukt til å bestemme celleantall i hver celleflaske. A549-cellene som ble telt med Bürker tellekammer var kun et representativt utvalg som ble brukt til å anslagsvis beregne totalt antall celler i celleflaskene. Dette gjør at celleantallet som beregnes ved tellingen kan variere fra den reelle verdien. For å redusere slike variasjoner og tilfeldige feil er det gunstig å ha flere paralleller fra hver prøve. Dette ble derimot ikke gjort på bakgrunn av et begrenset antall tellekamre. Celletellingen som ble gjennomført skilte heller ikke mellom levende og døde celler. Dette kunne blitt undersøkt ved å bruke trypan blå eksklusjons test<sup>70</sup>, men siden det ble fokusert på levende celler så ble denne metoden utelukket.

Antallet celler ved telling kan påvirkes av hvor lenge cellene blir behandlet med trypsin. Trypsin ble tilsatt og virket til omtrent 80% av cellene hadde løsnet. Konfluens er vanskelig å fastslå eksakt, og er en individuell vurdering. Dette kan ha ført til noen forskjeller i hvor mye

av cellene som løsnet fra celleflaskene. Trypsin burde ikke virke for lenge da dette er et enzym som kan bryte ned overflateproteinene til cellene, som kan føre til celledød<sup>71</sup>. Ved utilstrekkelig trypsinering vil telling kunne resultere i at konsentrasjonen av celler blir vurdert som lavere enn den faktiske verdien i celleflasken. For å undersøke at trypsineringen var vellykket, og at det ikke lå for mange celler igjen i celleflasken, ble celleflaskene studert i invertmikroskop etter at celsesuspensjonen var overført til falconrøret. For høy konsentrasjon av trypsin ved trypsineringen av cellene kan føre til at de vil klumpe seg sammen<sup>71</sup>. Det ble observert noe sammenklumping under tellingen, noe som gjorde det vanskelig å skille cellene fra hverandre. Resultatet fra telling med tellekammer ble brukt til å anslå celleveksten ved dyrkingen av A549-celler med ivermectin, sammenliknet med kontrollen. Ved å gjennomføre tellinger av flere paralleller og utelukke tilfeldige feil gjennom statistiske beregninger, kunne dette bidratt til å styrke sikkerheten i resultatet.

Det ble gjort statistisk analyse av celledeling, ved bruk av tosidig t-test med antatt ulik varians. Dette er en statistisk metode som sier om forskjellen mellom to utvalg med visse likheter er tilfeldig eller ikke<sup>16</sup>. t-test av celledelingen viser en signifikant forskjell mellom celler dyrket med 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin og kontrollen. T-testen med antatt ulik varians på 95% konfidensnivå viste at t-stat var langt over t-kritisk, se figur 23 (vedlegg A.3.3.2). Dette vil si at det er 95% sannsynlig at nedgangen i celleantall skyldes ivermectin og ikke er tilfeldig.

### 5.3.2 Cellesyklusanalyse

For å undersøke om cellesyklusen til A549-cellene ble påvirket av ivermectin, ble cellesyklusen til disse cellene sammenliknet med kontroller. Selve analysen ble gjort på et flowcytometer, som angir hvor cellene befinner seg i cellesyklusen ved å plassere cellene i et histogram med de ulike celle-fasene. Gating ble gjennomført for å skille fasene fra hverandre i histogrammet. Dette ble gjennomført av én person for å senke variasjoner som kan oppstå av ulike bedømmelser. Selv små endringer i gatingen kunne ført til endringer i resultatet. Gatingen, sammen med andre årsaker, kan ha forårsaket utliggere.

Cellessyklus hos A549-cellene ble undersøkt med flowcytometri. For å undersøke normalsyklus hos kontrollene ble histogrammet til kontrollcellene sammenliknet med histogrammet for en antatt normalsyklus fra tidligere studier<sup>52, 72</sup>. Normalsyklus hos kontrollcellene er vist i figur 16 (vedlegg A.3.1). Det ble dermed antatt at det var liten sannsynlighet for at steg under fikseringsprosedyren førte til betydelig stress hos cellene. For å utelukke at tilfeldige feil fra prosedyrene påvirket resultatet, ble utliggere ekskludert ved 95% konfidensnivå. Dette bidro til å gjøre t-testen for de to ulike konsentrasjonene mer korrekt ved å utelukke tilfeldige feil som kan ha oppstått under fikseringen.

Ved gjennomføring av t-test ble det observert statistisk signifikant nedgang i andelen A549-celler i S-fasen hos celler dyrket med 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin sammenliknet med kontrollen, se figur 25 (vedlegg A.3.3.2). Det ble ikke observert en tydelig årsak til hva som kan ha ført til nedgangen i S-fasen, da det ikke er signifikant endring i G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>- og G<sub>2</sub>/M-fasene. Nedgangen i S-fasen kan ha fordelt seg jevnt over de andre fasene, noe som gjør at det ikke er en

signifikant opphopning i de andre fasene. At det ikke er observert signifikant endring i de andre fasene kan også tyde på at det er en mulighet for at cellene er adaptive<sup>73</sup>. Dette kan bety at celler som overlever, og til en viss grad etablerer toleranse mot ivermectin ikke vil ha en spesielt endret cellesyklus. Her kunne det vært gunstig å bruke western-blott eller PCR analyse til å undersøke om varmesjokkproteiner som HSP70 blir overuttrykt, fordi proteinet kan brukes som en markør for stress<sup>74</sup>. Det kunne også vært relevant å se om det er mye døde celler i brukt HFKM og brukt PBS ved vasketrinn i fikseringsprosedyren. Antall døde celler i disse suspensjonene kan gi en indikasjon om ivermectin dreper en stor andel celler.

I hoveddelen av studien ble det observert en gjennomsnittlig økning på 0.67 % celler i G<sub>1</sub>-fasen for A549-celler dyrket med 5.0 µM ivermectin, se figur 15. Denne økningen i G<sub>1</sub>-fasen er ikke statistisk signifikant, men ble også observert under resultatet fra optimaliseringen. Andre forskningsartikler har sett en økning i G<sub>1</sub>/S-fasen som følge av at pak1 inhiberes og konsentrasjonen av syklin-E og CDK2 reduseres<sup>33</sup>. Det er mulig at endringene i andelen celler observert i de ulike fasene er så liten at den ikke gir utslag på t-testen. Derfor kan det være relevant å gjennomføre forsøk med dyrking av celler med ivermectin over lengre tid, ved høyere konsentrasjoner og over flere delforsøk for å undersøke om endringen blir signifikant. Flere delforsøk vil også muligens kunne være med på å forklare hvorfor variansen i fasene hos parallell dyrket med 5.0 µM ivermectin er høyere enn variansen i fasene for kontrollcellene.

Det er en andel celler som er klassifisert som «unknown». Dette kan være celler som har klumpet seg sammen. Sammenklumping av celler etter at de løsnes fra underlaget kan blant annet skyldes for høy konsentrasjon av trypsin, voldsom pipettering eller sentrifugering, eller at det er for høy konfluens i celleflasken<sup>71</sup>. For å redusere antall celler i denne gruppen kunne det vært prøvd en lavere konsentrasjon av trypsin, eller prøven kunne vært kjørt gjennom et sterilt sprøytefilter. Dette ble ikke gjort med tanke på tid og ressurser, og fordi studien fokuserte på fasene i cellesyklusen.

Før det var mulig å sammenligne antall celler mellom de ulike konsentrasjonene måtte gjennomsnitt og standardavvik regnes ut for å finne utliggere i de ulike prøvene. Det ble valgt å ekskludere utliggere som var utenfor 95% konfidensintervall, da det var ønskelig med en sikkerhet på 95% for at resultatet ikke kan ha kommet av tilfeldige feil. Etter denne ekskluderingen av verdier som antas å være forårsaket av tilfeldige feil, ble det regnet ut nye verdier for gjennomsnitt og standardavvik som igjen kunne brukes i en t-test. Hos kontrollen ble det totalt funnet to utliggere fra parallell D8, se tabell 6 (vedlegg A.3.3.2). Den ene utliggeren finnes i S-fasen og er ca. 2% lavere enn gjennomsnittet. Det samme gjelder den andre utliggeren hos kontrollen i G<sub>2</sub>/M-fasen, som ligger ca. 4% over gjennomsnittet. Siden begge utliggerne kommer fra samme prøve og de to fasene ligger rett ved siden av hverandre, kan en forskyvning i gatingen ha oppstått. Ut ifra figur 18 (vedlegg A.3.1) kan man se en liten forskyvning i gatingen. Denne forskyvningen antas likevel å ikke være stor nok til å forårsake utliggerne. Det er valgt å ekskludere hele denne prøven fra utregning av statistiske resultat for å hindre tilfeldige feil i å påvirke det endelige resultatet. Hos parallell dyrket med 5.0 µM

ivermectin ble det funnet en utligger, E3, som ligger 6% under gjennomsnittet. Denne ble også ekskludert fra det endelige resultatet.

Sammenlignet med resultatet fra tellingen, der det ikke ble observert noen utliggere, ser en at det er tre utliggere ved cellesyklusanalysen. Årsaken til at det blir observert flere utliggere i resultatet til cellesyklusanalysen og ingen fra celletellingen kan komme av at cellesyklusanalysen er det siste trinnet i forsøket og vil dermed være mer utsatt for tilfeldige feil. Flere prøver og paralleller kunne ha endret resultatet på hvilke av prøvene som er utligger eller ikke, så det hadde vært spennende å gjøre en ny studie med enda flere prøver og paralleller.

#### 5.4 Videre forskning

I denne studien ble det observert en signifikant nedgang i celleantallet hos celler dyrket med 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin. Det ble ikke observert cellesyklusarrest og det er usikkerhet om hvordan ivermectin påvirker celleproliferasjonen til A549-cellene. For å underbygge resultatene som er lagt fram kan det være interessant å gjennomføre flere studier som bruker andre forutsetninger enn denne studien. Ved videre studier kunne det vært gunstig å gjennomføre flere delforsøk med flere paralleller, over lenger tid. Det kunne også vært brukt eventuelle andre analysemetoder slik som Western Blot, for å undersøke genekspresjon hos A549-celler dyrket med ivermectin<sup>32</sup>.

Forskning gjort av Juarez, M, et al. viser at en rekke stamcellelignende kreftceller har ulik sensitivitet for ivermectin<sup>32</sup>. Det kan derfor være relevant i fremtidige studier å undersøke om det er andre konsentrasjoner av ivermectin og tidsintervaller som er mer optimale for behandling mot kreftceller som ligner A549-cellene. Det kan være interessant å se på hva som har best effekt av celler som utsettes for en lav konsentrasjon av ivermectin over lengre tid, i forhold til celler som utsettes for en høy konsentrasjon over et kortere tidsintervall. Celler som utsettes for lave konsentrasjoner over lenger tid kan muligens opparbeide toleranse mot stoffet de utsettes for, spesielt kreftceller der mutasjoner brukes for å endre genomet for proliferering. Utsettes cellene derimot for høyere konsentrasjoner av ivermectin over kortere perioder kan dette i større grad resultere i celledød<sup>75</sup>.

En studie av Dominguez-Gomez, G. et al, 2017<sup>11</sup> gjennomfører ulike proteinassayer, i tillegg til analyse av cellesyklus på flowcytometer. Det kan være spennende for videre forskning å også bruke slike metoder, for å avdekke hvilke cellulære mekanismer som ivermectin påvirker for å hemme veksten. Dette kan blant annet gjøres for å undersøke om det skjer en endring i konsentrasjonen av signalmolekyler, slik som p21 og pak1, langs signalveiene knyttet til cellesyklusarrest ved dyrking med ivermectin<sup>33</sup>.

Ved bruk av ivermectin som en behandling mot lungekreft er det viktig å se på hvordan ivermectin påvirker A549-lignende celler *in vivo*. Dette er vanskelig å gjennomføre hvis det tas utgangspunkt i samme vekstvilkår for celletypene. Dette er fordi lungeceller *in vivo* ikke

vokser på samme måte som lungeceller *in vitro*<sup>76</sup>. Videre studier burde derfor undersøke effekten av ivermectin *in vivo* uten å gjøre en direkte sammenligning med *in vitro* studier.

Det kan være interessant å studere varigheten til den observerte effekten av ivermectin på celleproliferasjonen til A549-cellene. Dette ble ikke undersøkt i denne studien, fordi det kun ble observert et øyeblikksbilde av effekten til ivermectin på A549-cellene. Ved videre studier kan man undersøke virkningen over lenger tidsperioder, for å se om effekten forsvinner eller vedvarer.

Resultatet fra studien sier ikke noe hva som er årsaken til at celleveksten hos A549-cellene reduseres ved en konsentrasjon på 5.0  $\mu$ M ivermectin. En mulig årsak er at ivermectin reduserer veksthastigheten til A549-celler. En annen mulighet er at ivermectin tar livet av en andel celler, mens de cellene som overlever ikke får en endret cellyklus. Dette kunne forklart hvorfor det ikke ble observert store endringer i cellyklusen til A549-cellene ved flowcytometri. For videre forskning kunne det også vært interessant å analysere HFKM fra celleflaskene som ble brukt til å dyrke A549-cellene, og PBS som ble brukt til å vaske cellene før trypsinering. Dersom suspensjonene inneholdt et stort antall døde celler kunne det tydet på at ivermectin drepte A549-cellene. Analysen av disse komponentene kan også gi en indikasjon på om ivermectin påvirker hvordan A549-cellene fester seg til underlaget, da A549-celler vokser adherent. Dersom ivermectin fører til at noen celler ikke klarer å feste seg til underlaget i celleflasken vil dette påvirke veksten. For å studere dette kunne det vært interessant å se på om det er forskjell mellom veksten i celleflasker der ivermectin er tilsatt sammen med cellene, og celleflasker der cellene har fått festet seg til underlaget før ivermectin tilsettes.

## 6 Konklusjon

For å studere effekten av ivermectin ble A549-cellene dyrket med en konsentrasjon på 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin i 72 timer. Det ble observert en betydelig statistisk signifikant nedgang i veksten av A549-celler, og en liten nedgang i andelen A549-celler i S-fasen. Dette kan tyde på at ivermectin har en hemmende effekt på celleproliferasjonen til A549-celler, når det brukes *in vitro*. Det er ikke nok grunnlag til å mene noe om at ivermectin kan brukes som et medikament på kreftceller *in vivo* ut ifra denne studien, eller hva som er grunnen til at veksten reduseres. Mer forskning må gjøres videre for å kunne begrunne de cellulære mekanismene bak resultatene, samt styrke disse.

## Litteraturliste

1. Dickson E. How Joe Rogan Became a Cheerleader for Ivermectin. RollingStone. 2021.
2. Reardon S. Flawed ivermectin preprint highlights challenges of COVID drug studies. News [Internet]. 2021 02.05.2022 [cited 2022 02.05]. Available from: <https://www.nature.com/articles/d41586-021-02081-w#ref-CR1>.
3. Karlsen MØ. Bruken av "Hestekuren" mot korona har eksplodert: 88.000 resepter bare den siste uken. 2021.
4. Dæhlen M. Vi får mer skabb til tross for at koronapandemien holder oss fra hverandre Forskning.no2020 [Available from: <https://forskning.no/sykdommer/vi-far-mer-skabb-til-tross-for-at-koronapandemien-holder-oss-fra-hverandre/1764657?fbclid=IwAR304Lw-z9gH4OmdDm51paLIYFzVeq2SHr4si6UfLNnaEqaS7kP0nrBgWb>].
5. UiO. Apoptose mn.uio.no: UiO; 2020 [Available from: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/a/apoptose.html>].
6. ECACC. Cell line profile, A549 (ECACC catalogue no. 86012804): UK Health Security Agency; [cited 2022 15.02.22]. Available from: <https://www.culturecollections.org.uk/media/126404/a549-cell-line-profile.pdf>.
7. Yamamoto Y, Korogi Y, Hirai T, Gotoh S. Chapter 6 - A method of generating alveolar organoids using human pluripotent stem cells. In: Spence JR, editor. Methods in Cell Biology. 159: Academic Press; 2020. p. 115-41.
8. 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.
9. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. Nature Reviews Cancer. 2009;9(3):153-66.
10. Holck P. histologi sml.snl.no: Store Medisinske Leksikon; 2020 [Available from: <https://sml.snl.no/histologi>].
11. Dominguez-Gomez G, Chavez-Blanco A, Medina-Franco JL, Saldivar-Gonzalez F, Flores-Torrontegui Y, Juarez M, et al. Ivermectin as an inhibitor of cancer stem-like cells. Mol Med Rep. 2018;17(2):3397-403.
12. Zhou J, Wang G, Chen Y, Wang H, Hua Y, Cai Z. Immunogenic cell death in cancer therapy: Present and emerging inducers. Journal of cellular and molecular medicine. 2019;23(8):4854-65.
13. Otterholt E. in vitro sml.snl.no: Store Medisinske Leksikon; 2021 [Available from: [https://sml.snl.no/in\\_vitro](https://sml.snl.no/in_vitro)].
14. Øye I. in vivo sml.snl.no: Store Medisinske Leksikon; 2020 [Available from: [https://sml.snl.no/in\\_vivo](https://sml.snl.no/in_vivo)].
15. Thermofisher. Propidium Iodide Thermofisher.com: Thermofisher; 2022 [cited 2022 26.1.2022]. Available from: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/propidium-iodide.html>.
16. Hayes A. T-test2022 [cited 2022 11.05]. Available from: <https://www.investopedia.com/terms/t/t-test.asp>.
17. Puccini J, Kumar S. Caspases. In: Bradshaw RA, Stahl PD, editors. Encyclopedia of Cell Biology. Waltham: Academic Press; 2016. p. 364-73.

18. Agilent. Determination of cell confluence using automated cell imaging for verification of cell retention during rigorous cell washing: biotek.com; 2017 [Available from: <https://www.biotek.com/resources/technical-notes/determination-of-cell-confluence-using-automated-cell-imaging-for-verification-of-cell-retention-during-rigorous-cell-washing/>].
19. Griffiths AJF. Mutation. 2020.
20. Hazra S, Ghosh S, Hazra B. Chapter 8 - Phytochemicals With Antileishmanial Activity: Prospective Drug Targets. In: Atta ur R, editor. Studies in Natural Products Chemistry. 52: Elsevier; 2017. p. 303-36.
21. Farstad IN. Proliferasjon sml.snl.no: Store medisinske leksikon; 2020 [Available from: <https://sml.snl.no/proliferasjon>].
22. Aasland R. Proteinfunksjon uib.no: uib; 2006 [Available from: [https://org.uib.no/gensidene/protein\\_funksjon.html#:~:text=En%20stor%20gruppe%20poteiner%20deltar,og%20bestemte%20sekvenser%20i%20DNA](https://org.uib.no/gensidene/protein_funksjon.html#:~:text=En%20stor%20gruppe%20poteiner%20deltar,og%20bestemte%20sekvenser%20i%20DNA)].
23. Distribution Introduction cvgs.k12.va.us: Central Virginia Governor's School for Science and Technology Lynchburg; 2003 [Available from: [http://www.cvgs.k12.va.us/DIGSTATS/main/inferant/d\\_tdist.htm#:~:text=The%20t%2Dcritical%20value%20is,the%20null%20hypothesis%20is%20retained](http://www.cvgs.k12.va.us/DIGSTATS/main/inferant/d_tdist.htm#:~:text=The%20t%2Dcritical%20value%20is,the%20null%20hypothesis%20is%20retained)].
24. Organization WH. Cancer: World Health Organization; 2022 [cited 2022 22.04.22]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
25. helseinformatikk N. Kreft [cited 2022 22.04]. Available from: <https://nhi.no/kroppen-var/sykdomsprosesser/kreft/>.
26. Klepp BRTSO. Kreft2020 [cited 2022 22.04]. Available from: <https://sml.snl.no/kreft>.
27. NHI.no. Lungekreft NHI2021 [cited 2022 01.02.22]. Available from: <https://nhi.no/sykdommer/kreft/lunger-kreft/lungekreft/>.
28. Kreftforeningen. Lungekreft Kreftforeningen.no: Kreftforeningen; 2022 [cited 2022 31 januar]. Available from: <https://kreftforeningen.no/om-kreft/kreftformer/lungekreft/>.
29. Würth R, Thellung S, Bajetto A, Mazzanti M, Florio T, Barbieri F. Drug-repositioning opportunities for cancer therapy: novel molecular targets for known compounds. Drug Discovery Today. 2016;21(1):190-9.
30. Donald J. Giard SAA, George J. Todaro, Paul Arnstein, John H. Kersey, Harvey Dosik, Wade P. Parks. In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors2. Journal of the National Cancer Institute. 1973;51(5).
31. Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML, Audus KL. Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. Exp Cell Res. 1998;243(2):359-66.
32. Juárez M, Schcolnik-Cabrera A, Dominguez-Gomez G, Chavez-Blanco A, Diaz-Chavez J, Duenas-Gonzalez A. Antitumor effects of ivermectin at clinically feasible concentrations support its clinical development as a repositioned cancer drug. Cancer Chemotherapy and Pharmacology. 2020;85(6):1153-63.
33. Liu J, Zhang K, Cheng L, Zhu H, Xu T. Progress in Understanding the Molecular Mechanisms Underlying the Antitumor Effects of Ivermectin. Drug Des Devel Ther. 2020;14:285-96.



34. Bugge A. Vi må ta debatten om ivermectin. Aftenposten. 2021.
35. Schraer R, Goodman J. Ivermectin: How false science created a Covid 'miracle' drug. BBC. 2021 06.10.2021.
36. Skjønberg OH, Hofslie E. Lungrekreft. Store Norske Leksikon. 2021.
37. Ribas A. Adaptive Immune Resistance: How Cancer Protects from Immune Attack. *Cancer Discov.* 2015;5(9):915-9.
38. Chern Y-J, Tai IT. Adaptive response of resistant cancer cells to chemotherapy. *Cancer Biol Med.* 2020;17(4):842-63.
39. Lin C, Song H, Huang C, Yao E, Gacayan R, Xu SM, et al. Alveolar type II cells possess the capability of initiating lung tumor development. *PLoS One.* 2012;7(12):e53817.
40. ECACC. ECACC General Cell Collection: A549 UK Health Security Agency [cited 2022 15.02.22]. Available from: [https://www.culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=86012804&collection=ecacc\\_gc](https://www.culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=86012804&collection=ecacc_gc).
41. Gehl J, Frandsen SK. [Electroporation-based therapies in the treatment of cancer]. *Ugeskr Laeger.* 2019;181(20a).
42. Tamara Straube P, Müller C, Microsystems L. How to do a Proper Cell Culture Quick Check Leica microsystems2016 [cited 2022 25 januar]. Available from: <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/how-to-do-a-proper-cell-culture-quick-check/>.
43. Spencer L. Cell culture guidelines2012 02.05.2022 [cited 2022 02.05]. Available from: [https://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/cell\\_culture.pdf](https://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/cell_culture.pdf).
44. ATCC. A549 ATCC.org [cited 2022 16.02.2022]. Available from: <https://www.atcc.org/products/ccl-185>.
45. Wang L, Fan D, Chen W, Terentjev EM. Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces. *Scientific Reports.* 2015;5(1):15159.
46. Bruce Alberts KH, Alexander Johnson, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. *Essential Cell Biology.* fifth ed. Betsy Twitchell MM, editor: W.W Northon and Company; 2019.
47. The Cell Cycle legacy.cnx.org: OpenStax College; 2013 [Available from: <https://legacy.cnx.org/content/m44460/1.7/>].
48. Øvstebø C. Mitose: ndla.no; 2021 [Available from: <https://ndla.no/en/article/32877>].
49. Yang VW. Chapter 8 - The Cell Cycle. In: Said HM, editor. *Physiology of the Gastrointestinal Tract (Sixth Edition): Academic Press;* 2018. p. 197-219.
50. direct S. Cell Cycle Arrest. Sciencedirect. 2021.
51. Pozarowski P, Darzynkiewicz Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods Mol Biol.* 2004;281:301-11.
52. Chantzoura E, Kaji K. *Flow Cytometry. Basic Science Methods for Clinical Researchers: Elsevier;* 2017. p. 173-89.
53. Kieran. Cytometer Wikimedia2012 [cited 2022 27.04]. Schematic of a flow cytometer, from sheath focusing to data acquisition.]. Available from: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cytometer.svg>.

54. Flow cytometry Analysis of fluorescence Proteins Igem.org: Unversity of Aberdeen; 2010 [Available from: [http://2010.igem.org/FACS\\_analysis\\_of\\_fluorescent\\_proteins](http://2010.igem.org/FACS_analysis_of_fluorescent_proteins)].
55. Biosciences B. BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer Brochure 2022 [25.1.2022].
56. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature protocols*. 2006;1(3):1458-61.
57. Hobro AJ, Smith NI. An evaluation of fixation methods: Spatial and compositional cellular changes observed by Raman imaging. *Vibrational Spectroscopy*. 2017;91:31-45.
58. Rosenberg M, Azevedo NF, Ivask A. Propidium iodide staining underestimates viability of adherent bacterial cells. *Scientific Reports*. 2019;9(1):6483.
59. ogunkolade w. Cell Cycle Analysis Barts and The London School of Medicine and Dentistry: Institute of Cell and Molecular Science; 2019 [updated 04.12.2019. Available from: <http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/uses/cellcycleanalysis/cellcycle/index.html>].
60. Juarez M, Schcolnik-Cabrera A, Dueñas-Gonzalez A. The multitargeted drug ivermectin: from an antiparasitic agent to a repositioned cancer drug. *Am J Cancer Res*. 2018;8(2):317-31.
61. Nappi L, Aguda AH, Nakouzi NA, Lelj-Garolla B, Beraldi E, Lallous N, et al. Ivermectin inhibits HSP27 and potentiates efficacy of oncogene targeting in tumor models. *Journal of Clinical Investigation*. 2020;130(2):699-714.
62. Legemiddelhåndbok N. L1.6.6 Ivermectin Norsk Legemiddelhåndbok2016 [cited 2022 01.02.22]. Available from: <https://www.legemiddelhandboka.no/L1.6.6/Ivermectin>.
63. Guzzo CA, Furtek CI, Porras AG, Chen C, Tipping R, Clineschmidt CM, et al. Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Escalating High Doses of Ivermectin in Healthy Adult Subjects. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2002;42(10):1122-33.
64. Patil VM, Verma S, Masand N. Prospective mode of action of Ivermectin: SARS-CoV-2. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*. 2022;4:100018.
65. Wang K, Gao W, Dou Q, Chen H, Li Q, Nice EC, et al. Ivermectin induces PAK1-mediated cytostatic autophagy in breast cancer. *Autophagy*. 2016;12(12):2498-9.
66. Liu H, Liu K, Dong Z. The Role of p21-Activated Kinases in Cancer and Beyond: Where Are We Heading? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;9.
67. Nguyen BCQ, Yoshimura K, Kumazawa S, Tawata S, Maruta H. Frondoside A from sea cucumber and nymphaeols from Okinawa propolis: Natural anti-cancer agents that selectively inhibit PAK1 *in vitro*. *Drug Discoveries & Therapeutics*. 2017;11(2):110-4.
68. Tang M, Hu X, Wang Y, Yao X, Zhang W, Yu C, et al. Ivermectin, a potential anticancer drug derived from an antiparasitic drug. *Pharmacol Res*. 2021;163:105207.
69. Scientific TF. Thawing Frozen Cells Thermofisher.com: Thermo Fisher; [cited 2022 05.05.2022]. Available from: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/thawing-cells.html>.
70. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*. 1997;21(1):A. 3B. 1-A. 3B. 2.
71. Merck. Cell Dissociation Protocol with Trypsin Sigmaaldrich.com [cited 2022 05.04.22]. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/technical->

[documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/cell-dissociation-with-trypsin.](#)

72. Børve ML, N.G; Trøen, S. En studie av effekten dokoheksaensyre (DHA) har på cellyklusen til A549-celler. ntnuopen.ntnu.no: NTNU; 2021.

73. Mansoori B, Mohammadi A, Davudian S, Shirjang S, Baradaran B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. Adv Pharm Bull. 2017;7(3):339-48.

74. Aarnes H. Varmesjokkproteiner snl.no: Store Norske Leksikon; 2019 [cited 2022 21.04.22]. Available from: <https://snl.no/varmesjokkproteiner>.

75. Graduate School of Biostudies KU. Laboratory of Cell Cycle Regulation & Laboratory of Radiation Stress Resistance: Kyoto University; [cited 2022 11.05.2022]. Available from: [fish.lif.kyoto-u.ac.jp/en/stress\\_en.html](http://fish.lif.kyoto-u.ac.jp/en/stress_en.html).

76. Katt ME, Placone AL, Wong AD, Xu ZS, Searson PC. In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. Front Bioeng Biotechnol. 2016;4:12.

## Vedlegg

### A.1 Reagenser

**Tabell 3:** Viser oversikt over reagenser med produsent og artikkelnummer.

Reagens	Produsent	Artikkelnummer
A549-celler	ATTC	CCL-185
PI/RNase	Invitrogen	F10797
Ivermectin	Sigma-Aldrich	18898-1G
0,2 µm sprøyte-filter	VWR	514-0061
Bürker tellekammer	NanoEnTek	DCH-B01
PenStrep	ThermoFisher	15070063
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich	D8537
Trypsin	Gibco	25200-056
Ham's F-12K Kaighn's Medium (HFKM)	ThermoFisher	21127022
Pierce™ Dimethylsulfoxide (DMSO), LC-MS Grade	ThermoFisher	85190
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco	A3160801
Etanol, 96%	Univar Solutions AS	NO02257442
Clean solution, Flow cytometer kit	BD Accuri Cytometers	653158
Decontamination, Flow cytometer kit	BD Accuri Cytometers	653158
8 peak bead	BD Accuri Cytometers	653144
6 peak bead	BD Accuri Cytometers	653145

## A.2 Prosedyrer

### A.2.1 Rutiner på cellelaboratoriet

Prosedyre for rutiner på cellelaboratoriet er brukt for å hindre kontaminasjon og spredning av celler ut av laboratoriet. Prosedyren er hentet fra laboratoriekurv i faget anvendt bioteknologi (emnekode: MB301712 Anvendt bioteknologi) ved NTNU Ålesund og utarbeidet av Gro Audveig Hagen Bjørnøy ved Instituttet for biologiske fag.

1. Bruk alltid labfrakk og ta den på før du begynner å arbeide på laben. Har du langt hår må dette settes opp.
2. Vask hendene og ta på hansker. Desinfiser hanskene med 70% etanol. Fukt hanskene godt og gni inn spriten over hele hansen. Spray så armene dine med etanol.
3. Løft opp glassdøra til LAF-benken og fjern dekslene foran UV-lyset. Spray over dekslene med etanol. Lukk døra og trykk på pila oppover for å åpne LAF-benken til arbeidsposisjon. Spray samtidig benken med 70% etanol og alle flater der du evt. har berørt med hanskene. Når lyset for vifta og for arbeidsposisjon lyser grønt, er LAF-benken klar til bruk.
1. Tørk alltid opp eventuelt søl med en gang og vask overflaten med 70% EtOH.
2. Prøv å ha så få ting i skapet som mulig mens du arbeider. Sett aldri noe oppå luftfilteret, for da bryter du luftstrømmen som skal beskytte atmosfæren i kabinettet.
3. Planlegg jobben du skal gjøre i kabinettet og sett inn alt du trenger i kabinettet før du begynner å arbeide der. Alt du fører inn i kabinettet skal sprites med 70% etanol før det settes inn i LAF-benken. Spray også armene dine med etanol før du fører dem inn i kabinettet. Dette må gjøres hver gang du fører dem inn i kabinettet. Enkelte celler er sensitive på temperatur og da kan det være lurt å forvarme mediet før bruk.
4. Åpne aldri en celleflaske, plate eller pipette FØR du har gått inn i LAF-benken. Ha på toppen så raskt som mulig etter du er ferdig å ta ut eller tilsette det du skal. Når du skrur av toppen av en celleflaske eller medieflaske, så skal den legges ned i LAF-benken med åpningen ned. Husk at LAF-benken er ren og det er større sjanse for kontaminering fra lufta enn fra overflaten i benken.
5. Sett opp en beholder for spill og brukte pipettespisser i LAF-benken. Tøm så denne i risikoavfallsboks etter bruk.
6. Ta aldri direkte på en pipette. Pipetten skal ikke berøre noe annet enn det den skal suge opp evt. levere. Dersom du er uheldig å komme borti noe med pipettespissen, så må denne kaste og du må ta en ny. Ikke ta av plasten av pipettespissen før du er klar til å bruke den.
7. Arbeid aldri med to cellelinjer samtidig i samme LAF-benk. Dette kan føre til krysskontaminering og det er ofte umulig å oppdage pga. cellene ser like ut.
8. Sett på UV-lys i 60 minutter dersom du skal bytte fra en cellelinje til en annen.
9. Bruk aldri samme pipette i ulike beholdere.
10. Prøv og ikke berør flaskehalsen med pipetten. Dette er tungt, men gjør et forsøk.
11. Vær så stille som mulig mens du arbeider i LAF-benken. Bruk gjerne munnbind dersom du er forkjølet eller du trenger å prate.

12. Arbeid så raskt som mulig, men det skal selvfølgelig ikke gå på bekostning med nøyaktigheten. Cellene trives best i riktig temperatur og da bør de være kortest mulig ved romtemperatur.
13. Sett cellene tilbake i inkubatoren etter at du er ferdig. Fjern alt fra LAF-benken og vask LAF-benken med 70 % etanol. Trykk på pila nedover for å lukke LAF-benken. Åpne døra til LAF-benken og ta av dekslene foran UV-lysrørene. Sett dekslene i LAF-benken og lukk døra.
14. Spray golvet på cellelaben med klorin spray og mopp over gulvet med en engangsmopp
15. Skru på UV-lyset i LAF-benken og forlat labsalen med en gang. Husk at labfrakk skal oppbevares på cellelaben og sko overtrekk/hansker skal kastes i risikoavfall.

### A.2.2 Tining av celler

Prosedyren beskriver tining av A549-celler fra oppbevaring i frys ved -80 °C. Prosedyren er basert på prosedyren «Thawing Frozen Cells» fra Thermo Fisher<sup>69</sup>, og tilpasset av Gro Audveig Hagen Bjørnøy ved Instituttet for biologiske fag ved NTNU i Ålesund.

1. Sett på varmeblokk på 37°C, eventuelt vannbad
2. Forvarm mediet til 37 °C
3. Tin røret med celler i vannbadet/varmeblokken. Vend røret frem og tilbake i vannbadet. For å unngå kontaminasjon må o-ringen og toppen ikke berøre vannet. Tining bør skje raskt og ikke vare mer enn ca. 2 minutter.
4. Fjern røret fra vannbadet og dekontaminer det ved å spraye det med 70% etanol. Videre operasjoner må foregå i LAF-benk.
5. Tilsett 9,0 ml vekstmedium i et Falcon-rør og tilsett innholdet fra røret med celler opp i mediet.
6. Sentrifuger 125 x g i 5-7 minutter.
7. Sug av medium og resuspende pelleten i 1 ml vekstmedium.
8. Overfør til liten celleflaske  
Inkuber ved 37 °C med 5% CO<sub>2</sub>

NB! Mediet som skal brukes i denne prosedyren bør settes i inkubatorskap i 16 min slik at det når riktig pH (7.0 – 7.6)

### A.2.3 Splitting av celler

Prosedyren beskriver fremgangsmåten for dyrking og splitting av A549-celler i 25 cm<sup>2</sup> celleflasker. Prosedyren er hentet fra laboratoriekurs i faget anvendt bioteknologi (emnekode: MB301712 Anvendt bioteknologi) ved NTNU Ålesund og utarbeidet av Gro Audveig Hagen Bjørnøy ved Instituttet for biologiske fag.

#### Splitteprosedyre

1. Klargjør LAF-benken ved å skru den på, sørg for at dekslene foran UV-lyset er satt på og ved å sprite over alle flater med 70% etanol. Når både lampen for arbeidsposisjon og vifte lyser grønt, er LAF-benken klar til bruk.
2. Planlegg arbeidet i LAF-benken
3. Celleflaskene må merkes med passasjenummer, hvilke celler det er, dato og initialer.
4. Medium, PBS, Trypsin, pipettespisser, pipettepistol, falconrør(15 ml) og spillbeger kan settes inn i LAF-benken.

NB!! Spray alt du setter inn i LAF-benken med 70% EtOH før du setter det inn!!!

5. Sjekk cellekonfluensen ved å studere dem i invertmikroskop
6. Fjern gammelt medium ved hjelp av en pipette og overfør det til spillbegeret.
7. Vask cellene forsiktig med 2×3 ml HBSS, fjern saltløsningen og overfør den til spillbegeret.
8. Tilsett 0,5 ml 0,25% Trypsin og sørg for at alle cellene er dekket av den. La flasken stå med Trypsin i ca. 2 minutter eller til 80% av cellene har løsnet.
9. Tap forsiktig flasken mot handbaken din og se på den i invertmikroskopet. Når ca. 80% av cellene har løsnet, inaktiveres Trypsinet ved å tilsette 4 ml medium. NB! Dette må gjøres i LAF-benk.
10. Bland forsiktig cellekulturen ved å pipettere rolig opp og ned og overfør den så til et 15ml Falconrør. Skru på korken godt!
11. Sentrifuger cellesuspensjonen på 1200 rpm i 3 minutter.
12. Det skal nå dannes en tydelig cellepellet. Fjern supernatanten over cellepelleten og kast den i spillbegeret. Vær forsiktig så du ikke suger opp pelleten!
13. Tilsett 1 ml medium og pipetter opp og ned for å løsne pelleten.
14. Tilsett 1 ml medium og pipetter forsiktig opp og ned.
15. Tilsett 6 ml medium til en ren, tom 25 cm<sup>2</sup> celleflaske og tilsett 1 ml cellesuspensjon. Dette gjentas for flaske nummer 2. Roter flaskene horisontalt for å blande.
16. Sett begge celleflaskene i CO<sub>2</sub>-inkubator på 37°C.
17. Kast alt avfall i risikoavfall. Tørk opp eventuelt søl og spray alle overflater med 70% etanol. Ta av coveret foran UV-lysene og plasser de inne i LAF-benken. Spray gulvet med klorin og mopp over med en engangsmopp. Kast hanskene og skoovertrekk i risikoavfall og sett på UV-lys. Forlat øyeblikkelig cellelaben!

#### A.2.4 Fiksering

Prosedyren beskriver fremgangsmåten for fiksering og preparering av A549-celler før analyse på flowcytometer. Prosedyren er hentet fra laboratoriekurs i faget anvendt bioteknologi (emnekode: MB301712 Anvendt bioteknologi) ved NTNU Ålesund og utarbeidet av Gro Audveig Hagen Bjørnøy ved Instituttet for biologiske fag.

1. Vurder konfluensen til cellene
2. Fjern gammelt medium
3. Vask med 2x3 ml PBS
4. Tilsett 0,5 ml Trypsin
5. Overvåk cellene i mikroskopet til de har løsnet
6. Tilsett 4 ml medium for å stoppe trypsineringen
7. Overfør cellesuspensjonen til et rent 15ml Falconrør
8. Pipetter opp og ned og overfør 2x11 µl av cellesuspensjonen til Bürker tellekammer.
9. Resten av cellesuspensjonen sentrifugeres i 5 minutter på 500xg
10. Resuspender pelleten i 1 ml PBS
11. Del cellesuspensjonen i 2 porsjoner på 500 µl og overfør porsjonene til hvert sitt 15-ml Falconrør som inneholder 4 ml 96% iskald etanol (fyll røret med etanol før cellesuspensjonen tilsettes).
12. Vortex på full hastighet i 1 minutt.
13. Sett rørene i fryser (-20°C) i 15 minutt.
14. Sentrifuger i 5 minutter på 1200 rpm
15. Fjern supernatanten og tapp forsiktig på pelleten for å løsne den.
16. Tilsett 5 ml romtemperert PBS, vortex og la cellene rehydrere i 15 minutter
17. Sentrifuger cellesuspensjonen i 5 minutter ved 1200 rpm
18. Fjern supernatanten og tappe forsiktig på røret for å løsne pelleten.
19. Tilsett 0,5 ml PI/RNase i hvert rør og inkuber i 90 minutter i mørke.



## A.2.5 Kalibrering av Flowcytometer

Prosedyren beskriver kalibrering av BD Accuri flowcytometeret. Prosedyren er hentet fra laboratoriekurs i faget anvendt bioteknologi (emnekode: MB301712 Anvendt bioteknologi) ved NTNU Ålesund og utarbeidet av Gro Audveig Hagen Bjørnøy ved Instituttet for biologiske fag.

1. Sett fram 6 rør I et stativ og merk dem slik;
  1. Clean
  2. Decontamination
  3. MQ Water
  4. 8 peak bead
  5. 6 peak bead
  6. MQ Water

Rør 1 og 2 er allerede laget.

Rør 4 er laget av 0,5 ml MQ water + 1 dr 8 peak bead mix.

Rør 5 er laget av 0,5 ml MQ water + 1 dr 6 peak bead mix.

2. Start pc 'en trykk på ikonet til Flowcytometeret (BD Accuri)
3. Browse filene for å finne; wash and clean/wash and template. Velg wash and template og vent til lampen lyser grønt.
4. Velg følgende parameter; Clean 2-5 min FAST (husk å trykke DELETE EVENTS)
5. Sett rør 1 I instrumentet og trykk RUN! Save the file; Merk filen med dato og tidspunkt. Kontroller at antall events ikke overskrider 100 events/s.
6. Bytt rør 1 med rør 2 (decontamination). Trykk RUN!
7. Bytt rør 2 med rør 3 (MQ water) og trykk RUN!
8. Bytt rør 3 med rør 4 (8-peak-bead). Velg SLOW og 10000 events. Trykk bort "min". Sjekk om events er ca 200, hvis ikke øk hastigheten. Sjekk Plot 3 M6 CV FL-2-H! Den skal være mindre enn 5 %.
9. Ta bort røret fra holderen og trykk «Backflush» og sjekk at det kommer ut en dråpe. Tørk av med linsepapir
10. Sett inn rør 5 (6-peak-bead). Velg hastighet SLOW og 10000 events. Se på plot 6 M12 CV FL-4-H. Den skal være mindre enn 5 %.
11. Ta bort rør 5 og trykk «Backflush» og sjekk at det kommer ut en dråpe. Tørk av med linsepapir.
12. Sett inn rør 6 (MQ-vann). Velg hastighet «FAST» i 5 minutter. La røret stå i MQ-vann etter kalibrering.

A.2.6 Bruk av BD Accuri C6 Flow Cytometer, før og etter analyse av prøver  
Prosedyren beskriver rutiner for bruk av BD Accuri™ C6 flowcytometer. Prosedyren er utviklet av BD biosciences, og fulgte med manualer ved innkjøp av BD Accuri C6 flowcytometeret.

Before running samples:

1. Place an empty 12x75 mm tube under the SIP.
2. Click BACKFLUSH.
3. Place a **fresh** tube with 2 ml of filtered, deionized H<sub>2</sub>O on the SIP.
4. Set time limit for 10 – 15 minutes and Fluidics speed to **Fast**.
5. Click **RUN**.
6. Once time limit is reached, click **DELETE SAMPLE DATA**.
7. Remove the tube and run samples.

After running samples:

1. Place a tube with 2 ml of diluted Decontamination Solution (#653154) (dilute per label instructions) on the SIP.
2. Select an empty data well.
3. Set time limit for 2 minutes and Fluidics speed to **Fast**.
4. Click **RUN**.
5. Once time limit is reached, remove the tube of Decontamination Solution.
6. Place a tube of 2 ml filtered, DI H<sub>2</sub>O on the SIP.
7. Set a time limit of two 2 minutes.
8. Click **RUN**. The cytometer will stop automatically when the time limit is reached.
9. Leave the tube on the SIP until the cytometer is used again.

It is recommended that the system be shut down if it will not be run again that day.

Use only approved fluids, described in the Approved Reagents table of the BD Accuri Cytometer Instrument Manual.

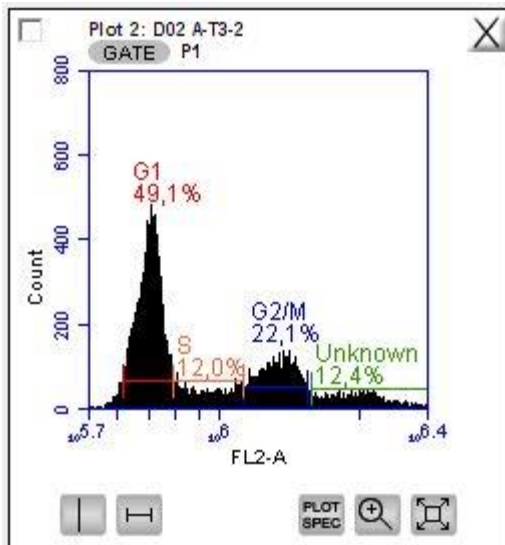
### A.2.7 Cellesyklusanalyse på fikserte celler på BD Accuri Flowcytometer

Prosedyren beskriver analyse av fikserte celler på BD Accuri flowcytometeret. Prosedyren er hentet fra laboratoriekurs i faget anvendt bioteknologi (emnekode: MB301712 Anvendt bioteknologi) ved NTNU Ålesund og utarbeidet av Gro Audveig Hagen Bjørnøy ved Instituttet for biologiske fag.

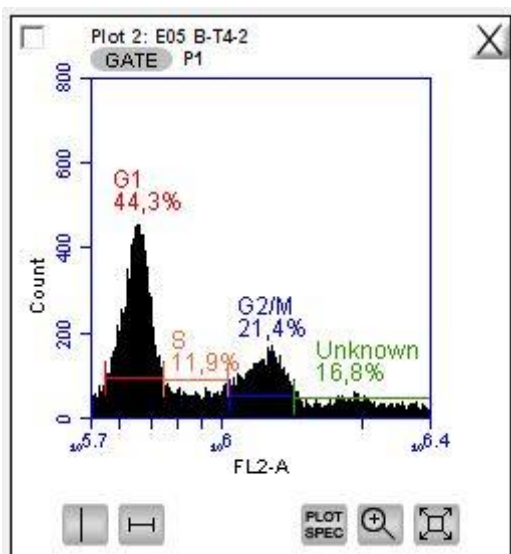
1. Etter at instrumentet er kalibrert, er det klart til å analysere prøver.
2. Sett de fikserte cellene på is og legg aluminiumsfolie over. NB! Bruk hansker!!
3. Åpne «dokumenter – Bachelorprosjekt T-W – fil PI-experiment 08.042019 1300 H9 Stress 26C 03062019-A
4. Velg hastighet «SLOW» og 20000 events.
5. Erstatt røret med MQ-vann med prøve nummer 1 og trykk «RUN»
6. Ta ut resultatene ved å ta bilde av skjermen.
7. Etter endt analyse gjøres «after running sample» fra prosedyre «Bruk av BD Accuri C6 Flow Cytometer, før og etter analyse av prøver»

## A.3 Resultat

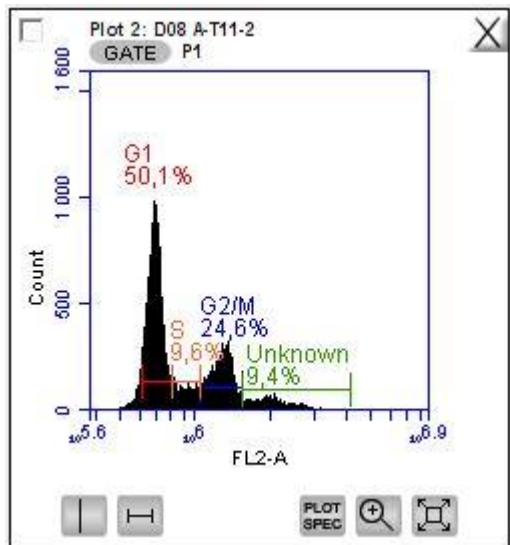
### A.3.1 Utklipp av histogram fra analyse på flowcytometer



*Figur 16:* viser histogram for cellyklus for rute D2, kontroll. Fra venstre til høyre ses  $G_1$ -fasen, S-fasen og  $G_2/M$ -fasen. Y-aksen viser antall celler, x-aksen viser karakteristikk for hvor i syklusen cellen befinner seg.



*Figur 17:* viser histogram for cellyklus for rute E5, 5.0  $\mu$ M ivermectin. Fra venstre til høyre ses  $G_1$ -fasen, S-fasen og  $G_2/M$ -fasen. Y-aksen viser antall celler, x-aksen viser karakteristikk for hvor i syklusen cellen befinner seg.



**Figur 18:** Figuren viser histogram for cellyklus for D8, kontroll. Parallellen er ekskludert fra resultatet ettersom den har to utliggere, en i S-fasen og en i G<sub>2</sub>-fasen. De ulike fasene er separert fra hverandre med gating. Fra venstre til høyre ses G<sub>1</sub>-fasen, S-fasen og G<sub>2</sub>/M-fasen. Y-aksen viser antall celler, x-aksen viser karakteristikk for hvor i syklusen cellen befinner seg.

### A.3.2 Optimalisering

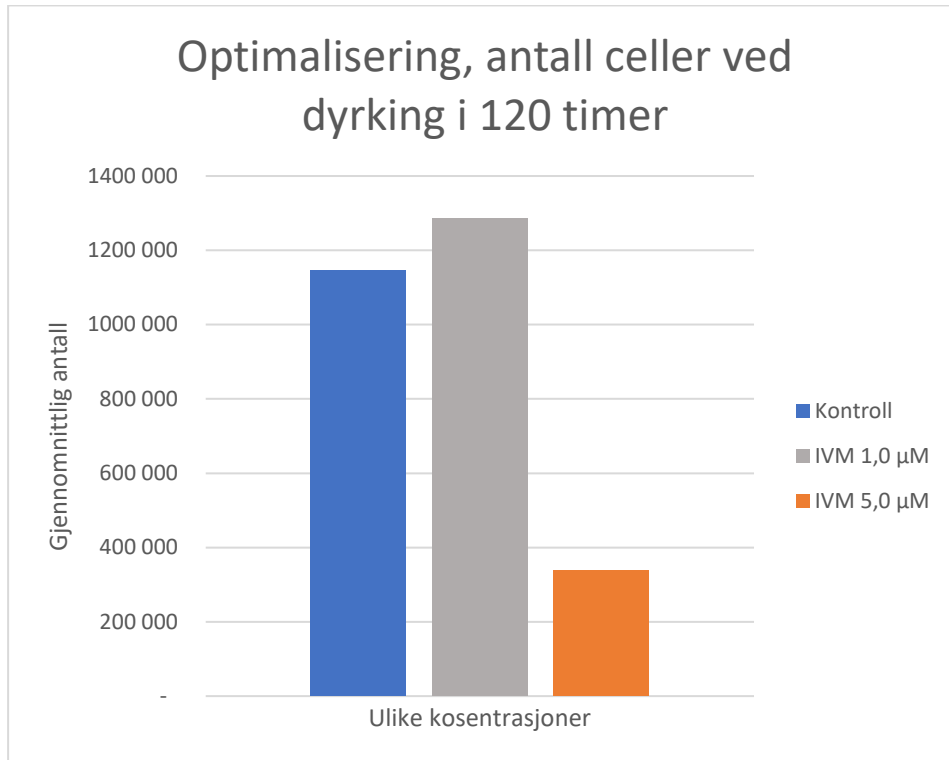
**Tabell 4:** viser prøver tatt under optimaliseringen ved ulike datoer og ulike tidsintervall. Tabellen viser totalt antall celler for de ulike prøvene med et volum på 4.5 ml og 13.5 ml, antallet celler er beregnet ut ifra volum og celler telt med Bürker tellekammer. Gjennomføring 1 er illustrert i oransje farge, mens gjennomføring 2 er illustrert i grønn. Begge disse gjennomføringene ble foretatt i 25 cm<sup>2</sup> celleflasker og var det ble antatt overvekst i flere prøver. Gjennomføring 3 og 4 er illustrert i blå og ble foretatt i 75 cm<sup>2</sup> celleflasker.

Gjennomføring nr:	Dato fiksert	Prøve	Volum i falconrør	Celler telt med Bürker tellekammer	Totalt antall celler	Kommentar
1	14.03.22	72 timer – kontroll	4,5 ml	72	360 000	Overvekst
		72 timer – kontroll	4,5 ml	60	300 000	Overvekst
		72 timer – 1.0 µM IVM	4,5 ml	87	435 000	Overvekst
		72 timer – 1.0 µM IVM	4,5 ml	110	550 000	Overvekst
		72 timer – 5.0 µM IVM	4,5 ml	55	275 000	
		72 timer – 5.0 µM IVM	4,5 ml	60	300 000	
2	15.03.22	120 timer – kontroll	4,5 ml	258	1 290 000	Overvekst
		120 timer – kontroll	4,5 ml	200	1 000 000	Overvekst
		120 timer – 1.0 µM IVM	4,5 ml	247	1 235 000	Overvekst
		120 timer – 1.0 µM IVM	4,5 ml	267	1 335 000	Overvekst
		120 timer – 5.0 µM IVM	4,5 ml	65	325 000	
		120 timer – 5.0 µM IVM	4,5 ml	60	300 000	
		120 timer – 5.0 µM IVM	4,5 ml	75	375 000	
3	17.03.22	72 timer – kontroll	13,5 ml	141	2 115 000	
		72 timer – 1.0 µM IVM	13,5 ml	90	1 350 000	
		72 timer – 1.0 µM IVM	13,5 ml	118	1 770 000	
		72 timer – 5.0 µM IVM	13,5 ml	58	870 000	
		72 timer – 5.0 µM IVM	13,5 ml	43	645 000	
4	18.03.22	72 timer – kontroll	13,5 ml	160	2 400 000	
		72 timer – 1.0 µM IVM	13,5 ml	136	2 040 000	
		72 timer – 1.0 µM IVM	13,5 ml	120	1 800 000	
		72 timer – 5.0 µM IVM	13,5 ml	58	870 000	
		72 timer – 5.0 µM IVM	13,5 ml	67	1 005 000	

**Tabell 5:** Viser gjennomsnittlig antall celler for kontroller, celler dyrket med 1.0  $\mu\text{M}$  ivermectin og celler dyrket med 5.0  $\mu\text{M}$  ivermectin for de ulike gjennomføringene. Tabellen er basert på verdiene i tabell 4. I likhet med tabell 4 er gjennomføring 1 illustrert i oransje farge, mens gjennomføring 2 er illustrert i grønn. Begge disse gjennomføringene ble foretatt i 25 cm<sup>2</sup> celleflasker og det ble antatt overvekst i flere prøver. Gjennomføring 3 og 4 er illustrert i blå og ble foretatt i 75 cm<sup>2</sup> celleflasker. Gjennomføring 1, 3 og 4 er celler dyrket i 72 timer, gjennomføring 2 er dyrket i 120 timer.

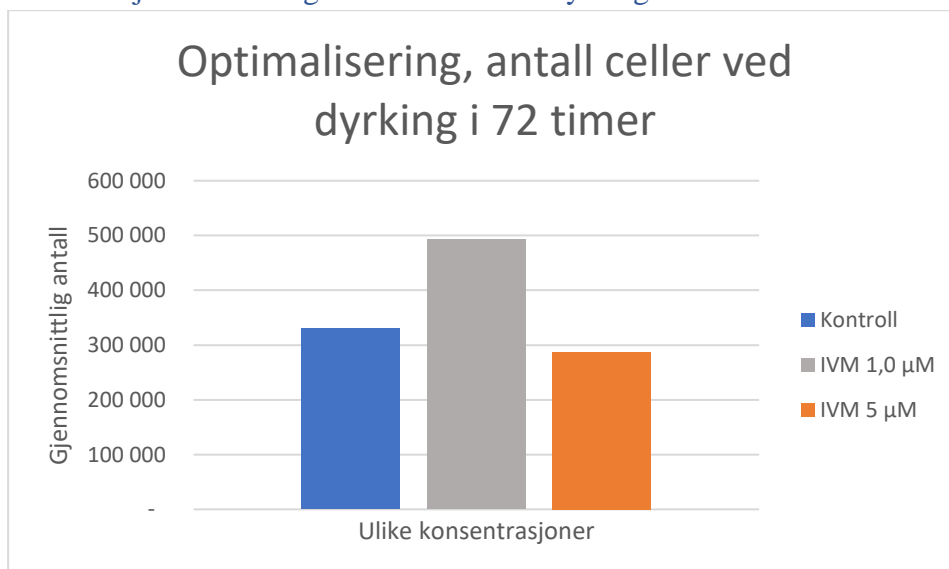
Gjennomføring	1	2	3 og 4
Gjennomsnittlig antall celler i kontroll	330 000	1 145 000	2 257 500
Gjennomsnittlig antall celler i 1.0 $\mu\text{M}$ ivermectin	492 500	1 285 000	1 740 000
Gjennomsnittlig antall celler i 5.0 $\mu\text{M}$ ivermectin	287 500	333 333	847 500

### A.3.2.1 Gjennomsnittlig antall celler etter dyrking i 120 timer



**Figur 19:** Figuren viser et stolpediagram med gjennomsnittlig antall A549-celler med ulike konsentrasjoner ivermectin som ble dyrket i 120 timer i 25 cm<sup>2</sup> celleflasker. Resultatet er fra celleflasker med antatt overvekst, gjennomføring 2. Den blå stolpen viser kontroll, den oransje stolpen viser 1.0 µM ivermectin og den grå stolpen viser 5.0 µM ivermectin. Gjennomsnittet er beregnet ut ifra to prøver av hver konsentrasjon. y-aksen viser gjennomsnittlig antall celler, mens kontroll og de ulike konsentrasjonene av ivermectin er vist på x-aksen.

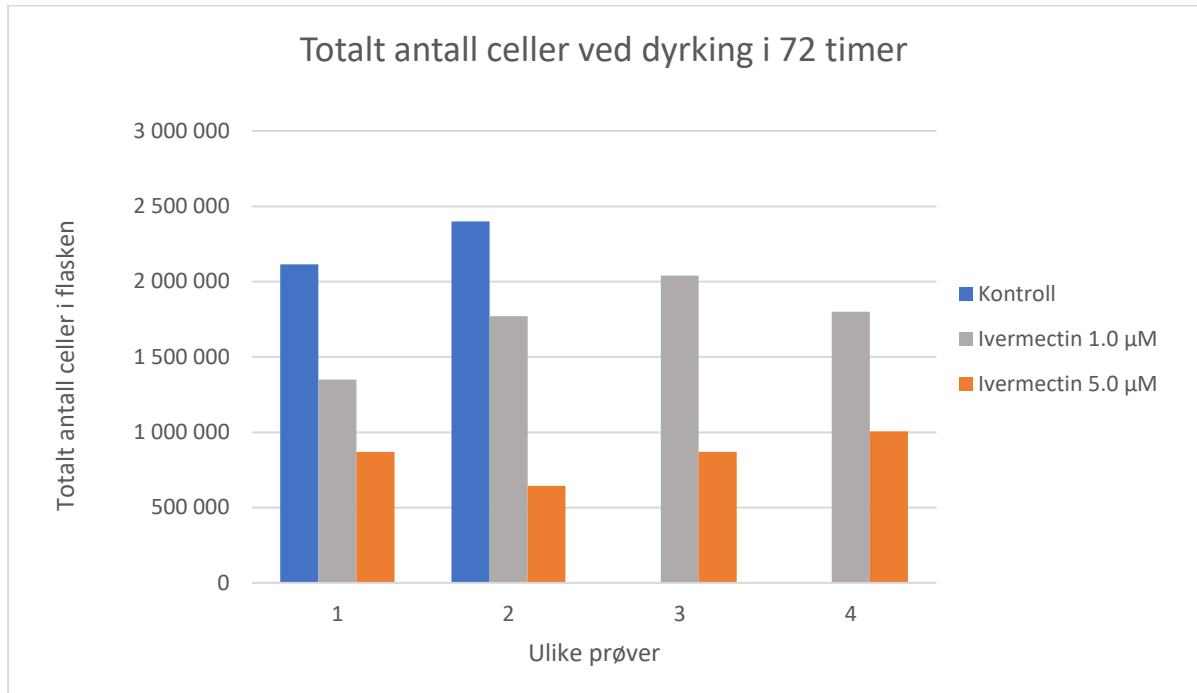
### A.3.2.2 Gjennomsnittlig antall celler etter dyrking i 72 timer



**Figur 20:** Figuren viser et stolpediagram med gjennomsnittlig antall A549-celler med ulike konsentrasjoner ivermectin som ble dyrket i 72 timer i 25 cm<sup>2</sup> celleflasker. Resultatet er fra celleflasker med antatt overvekst, gjennomføring 1. Den blå stolpen viser kontroll, den oransje stolpen viser 1.0 µM ivermectin og den grå stolpen viser 5.0 µM ivermectin. Gjennomsnittet er beregnet ut ifra to prøver av hver konsentrasjon. y-aksen viser gjennomsnittlig antall celler, mens kontroll og de ulike konsentrasjonene av ivermectin er vist på x-aksen.

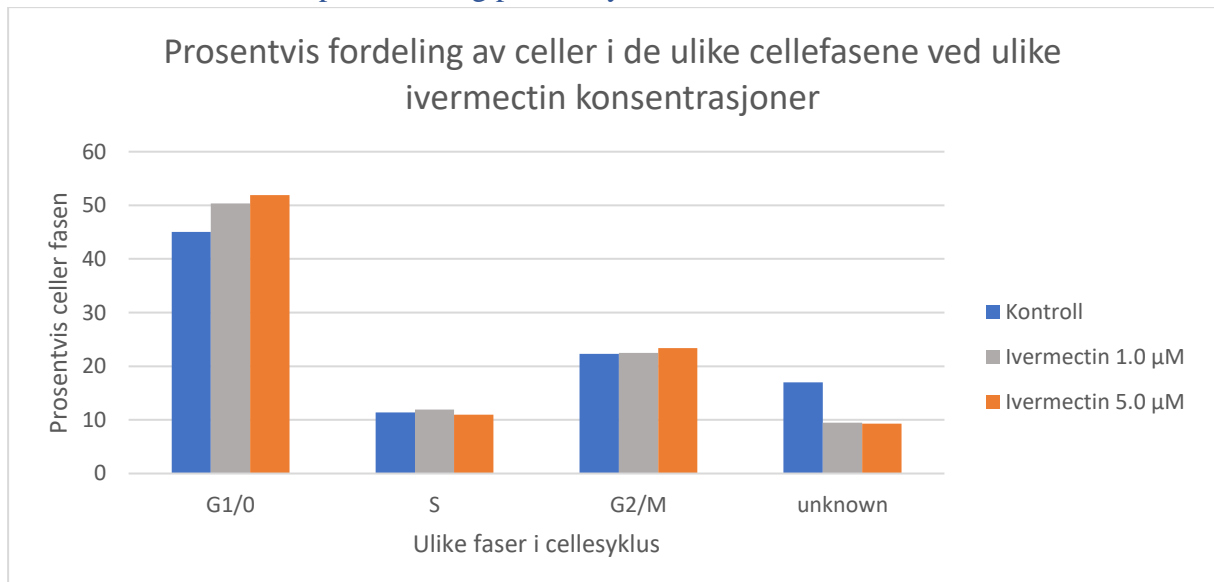


### A.3.2.3 Totalt antall celler, optimalisering ved dyrking i 72 timer



**Figur 21:** Viser et stolpediagram av totalt antall A549-celler i celleflasken basert på telling med Bürker tellekammer for ulike konsentrasjoner av ivermectin og for kontrollcellene ved gjennomføring 3 og 4. A549-cellene ble dyrket i 72 timer i 75 cm<sup>2</sup> celleflasker som en del av optimaliseringen. De blå stolpene er celler dyrket uten ivermectin, de oransje stolpene viser cellene dyrket i 1.0 µM ivermectin og de grå stolpene viser celler dyrket i 5.0 µM ivermectin. y-aksen viser antall celler, mens x-aksen viser de ulike prøvene.

### A.3.2.4 Cellefaser ved optimalisering på flowcytometeret



**Figur 22:** Figuren viser et stolpediagram med gjennomsnittlig prosentandel i de ulike fasene i cellesyklusen fra gjennomføring 3 og 4. Den blå stolpen er A549-celler dyrket uten ivermectin, den oransje stolpen viser A549-cellene dyrket i 1.0 µM og den grå stolpen viser A549-celler dyrket i 5.0 µM ivermectin. Den grafiske fremstillingen viser prøver undersøkt under optimaliseringen. y-aksen viser prosentvis fordeling og x-aksen viser de ulike fasene i cellesyklusen.

### A.3.3 Resultat fra hoveddel

#### A.3.3.1 Tabell over prosentvis fordeling i cellesyklus, og totalt antall celler fra telling

**Tabell 6** : Tabellen viser resultatene fra kontrollen og statistiske tall som ble brukt for å utelukke utliggere. Øverst til venstre oppgis det navn på prøvene som er D1-D9. I kolonnen til høyre for parallellene ses prosentvis andel av A549-celler i G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> fasen, samt bestemmelsen på om den gjeldene parallellen er en utligger. Ved bruk av funksjonen «eller» ble det kontrollert for om verdiene ligger innenfor øvre og nedre grense, altså om verdien er en utligger. Dersom verdien er en utligger vil kolonnen til høyre for verdien vise «SANN» og i motsatt tilfelle vil kolonnen vise «USANN». Lenger til høyre ses det samme for de ulike fasene, samt totalt antall celler. Nedenfor resultatene er det oppgitt gjennomsnitt før og etter ekskludering av paralleller med utliggere og deretter standardavvik før og etter ekskludering av paralleller med utliggere. Helt nederst viser tabellen de statistiske tallverdiene som ble brukt til å bestemme hvilke verdier som utgjør en utligger innenfor 95% konfidensnivå.

Kontroll								
Parallell	G1/G0-fasen		S-fasen		G2/M-fasen		Totalt antall celler	
	Prosentvis andel	Utligger?	Prosentvis andel	Utligger?	Prosentvis andel	Utligger?	Antall	Utligger?
D1	49%	USANN	12%	USANN	19%	USANN	2 055 000	USANN
D2	49%	USANN	12%	USANN	22%	USANN		
D3	48%	USANN	12%	USANN	21%	USANN	2 655 000	USANN
D4	47%	USANN	13%	USANN	21%	USANN		
D5	54%	USANN	12%	USANN	21%	USANN	2 460 000	USANN
D6	54%	USANN	13%	USANN	21%	USANN		
D7	51%	USANN	13%	USANN	21%	USANN	2 595 000	USANN
D8	50%	USANN	10%	SANN	25%	SANN		
D9	49%	USANN	14%	USANN	20%	USANN	2 355 000	USANN
D10	50%	USANN	13%	USANN	21%	USANN		
Gjennomsnitt								
Før ekskludering av parallell	50,24%		12,41%		21,38%		2 424 000	
Etter ekskludering av parallell	50,22%		12,64%		20,96%		2 424 000	
Standardavvik								
Før ekskludering av parallell	2,4		0,9		1,6		237 076	
Etter ekskludering av parallell	2,5		0,6		1,0		237 076	
	1,96 standardavvik	Nedre grense	Øvre grense					
Antall:	464 669	1 959 331	2 888 669					
G1/G0:	5%	46%	55%					
S:	2%	11%	14%					
G2/M:	3%	18%	25%					

**Tabell 7:** Tabellen viser resultatene fra paralleller behandlet med 5.0 µM ivermectin og er statistisk brukt for å utelukke utliggere. Øverst til venstre oppgis det navn på prøvene som er E1-E11. I kolonnen til høyre for parallellene ses prosentvis andel i celler i G1/G0 fasen, samt bestemmelsen på om den gjeldende verdien er en utligger. Ved bruk av funksjonen «eller» ble det kontrollert for om verdiene ligger innenfor øvre og nedre grense, altså om verdien er en utligger. Dersom verdien er en utligger vil kolonnen til høyre for verdien vise «SANN» og i motsatt tilfelle vil kolonnen vise «USANN». Lenger til høyre ses det samme for de ulike fasene, samt totalt antall A549-celler. Nedenfor resultatene er det oppgitt gjennomsnitt før og etter ekskludering av paralleller med utliggere og deretter standardavvik før og etter ekskludering av paralleller med utliggere. Helt nederst viser tabellen de statistiske tallverdiene som ble brukt til å bestemme hvilke verdier som utgjør en utligger innenfor 95% konfidensnivå.

5 µM Ivermectin								
Parallell	G1/G0-fasen		S-fasen		G2/M-fasen		Totalt antall celler	
	Prosentvis andel	Utligger?	Prosentvis andel	Utligger?	Prosentvis andel	Utligger?	Antall	Utligger?
E1	52%	USANN	6%	USANN	20%	USANN	435 000	USANN
E2	48%	USANN	12%	USANN	20%	USANN	900 000	USANN
E3	58%	USANN	4%	SANN	21%	USANN	472 500	USANN
E4	57%	USANN	12%	USANN	18%	USANN	1 192 500	USANN
E5	44%	USANN	11%	USANN	21%	USANN	1 425 000	USANN
E6	44%	USANN	11%	USANN	22%	USANN	1 155 000	USANN
E7	43%	USANN	11%	USANN	19%	USANN	1 012 500	USANN
E8	47%	USANN	11%	USANN	20%	USANN	907 500	USANN
E9	59%	USANN	10%	USANN	20%	USANN	1 031 250	USANN
E10	59%	USANN	8%	USANN	22%	USANN	862 500	USANN
E11	56%	USANN	8%	USANN	23%	USANN	941 250	USANN
Gjennomsnitt								
Før ekskludering av parallell	51,54%		9,51%		20,79%		939 545	
Etter ekskludering av parallell	50,89%		10,05%		20,73%		939 545	
Standardavvik								
Før ekskludering av parallell	6,8		2,4		1,5		290 006	
Etter ekskludering av parallell	6,4		2,0		1,5		290 006	
	1,96 standardavvik	Nedre grense	Øvre grense					
Antall:	568 411	371 135	1 507 956					
G1/G0:	13%	38%	65%					
S:	5%	5%	14%					
G2/M:	3%	18%	24%					

### A.3.3.2 t-tester

t-Test: To utvalg med antatt ulike varianser		
Totalt antall celler		
	Kontroll	5 $\mu$ M Ivermectin
Gjennomsnitt	2424000	986250
Varians	5,6205E+10	6,6788E+10
Observasjoner	5	10
Antatt avvik mellom gjennomsnittene	0	
fg	9	
t-Stat	10,7403245	
P(T<=t) ensidig	9,8433E-07	
T-kritisk, ensidig	1,83311293	
P(T<=t) tosidig	1,9687E-06	
T-kritisk, tosidig	2,26215716	

**Figur 23:** Figuren viser resultatet fra tosidig t-test med antatt ulik varians utført på antall A549-celler i kontroll sammenlignet med antall A549-celler behandlet med 5.0  $\mu$ M ivermectin. Tabellen ble laget ved bruk av dataanalyse i programvaren Excel. Under kontroll og 5.0  $\mu$ M ivermectin ses en sammenligning av gjennomsnitt, varians og observasjoner. Kolonnene nedenfor viser statistiske resultater fra sammenligningen. t-stat viser t-verdien som skal være mindre enn den positive verdien av t-kritisk eller større enn negative verdien av t-kritisk dersom det ikke er signifikant forskjell.

t-Test: To utvalg med antatt ulike varianser		
G1/G0-fasen		
	Kontroll	5 $\mu$ M Ivermectin
Gjennomsnitt	50,22	50,888
Varians	6,482275	40,43344
Observasjoner	9	10
Antatt avvik mellom gjennomsnittene	0	
fg	12	
t-Stat	-0,3060617	
P(T<=t) ensidig	0,38240128	
T-kritisk, ensidig	1,78228756	
P(T<=t) tosidig	0,76480256	
T-kritisk, tosidig	2,17881283	

**Figur 24:** Figuren viser resultatet fra tosidig t-test med antatt ulik varians utført på G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-fasen i kontrollen og G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> i prøvene behandlet med 5.0  $\mu$ M ivermectin. Tabellen ble laget ved bruk av dataanalyse i programvaren Excel, der paralleller med utliggere er ekskludert fra utregningen. Under kontroll og 5.0  $\mu$ M Ivermectin ser man en sammenligning av gjennomsnitt varians og observasjoner. Kolonnene nedenfor viser statistiske resultater fra sammenligningen. t-stat viser t-verdien som skal være mindre enn den positive verdien av t-kritisk eller større enn negative verdien av t-kritisk dersom det ikke er signifikant forskjell.

t-Test: To utvalg med antatt ulike varianser		
<b>S-fasen</b>		
	<i>Kontroll</i>	<i>5 µM Ivermectin</i>
Gjennomsnitt	12,6366667	10,048
Varians	0,37105	3,876128889
Observasjoner	9	10
Antatt avvik mellom gjennomsnittene	0	
fg	11	
t-Stat	3,95301216	
P(T<=t) ensidig	0,00113049	
T-kritisk, ensidig	1,79588482	
P(T<=t) tosidig	0,00226099	
T-kritisk, tosidig	2,20098516	

**Figur 25:** Figuren viser resultatet fra tosidig t-test med antatt ulik varians utført på S-fasen i kontrollen og  $G_1/G_0$  i prøvene behandlet med 5.0 µM ivermectin. Tabellen ble laget ved bruk av dataanalyse i programvaren Excel, der paralleller med utliggere er ekskludert fra utregningen. Under kontroll og 5.0 µM Ivermectin ses en sammenligning av gjennomsnitt varians og observasjoner. Kolonnene nedenfor viser statistiske resultater fra sammenligningen. t-stat viser t-verdien som skal være mindre enn den positive verdien av t-kritisk eller større enn negative verdien av t-kritisk dersom det ikke er signifikant forskjell.

t-Test: To utvalg med antatt ulike varianser		
<b>G2/M-fasen</b>		
	<i>Kontroll</i>	<i>5 µM Ivermectin</i>
Gjennomsnitt	20,96333333	20,726
Varians	0,929525	2,126871111
Observasjoner	9	10
Antatt avvik mellom gjennomsnittene	0	
fg	16	
t-Stat	0,42221865	
P(T<=t) ensidig	0,33924219	
T-kritisk, ensidig	1,74588368	
P(T<=t) tosidig	0,67848438	
T-kritisk, tosidig	2,1199053	

**Figur 26:** Figuren viser resultatet fra tosidig t-test med antatt ulik varians utført på  $G_2/M$ -fasen i kontrollen og  $G_2/M$ -fasen i prøvene behandlet med 5.0 µM Ivermectin. Tabellen ble laget ved bruk av dataanalyse i programvaren Excel, der paralleller med utliggere er ekskludert fra utregningen. Under kontroll og 5.0 µM ivermectin ses en sammenligning av gjennomsnitt varians og observasjoner. Kolonnene nedenfor viser statistiske resultater fra sammenligningen. t-stat viser t-verdien som skal være mindre enn den positive verdien av t-kritisk eller større enn negative verdien av t-kritisk dersom det ikke er signifikant forskjell.





**NTNU**

Kunnskap for en bedre verden