

10003

10009

10016

En studie om effekten av Ivermectin på celleproliferasjon og cellevekst hos cellelinjen Caco-2

Bacheloroppgave i Bioteknologi

Veileder: Gro Audveig Hagen Bjørnøy

Mai 2023



NTNU

Kunnskap for en bedre verden

10003

10009

10016

En studie om effekten av Ivermectin på celleproliferasjon og cellevekst hos cellelinjen Caco-2

Bacheloroppgave i Bioteknologi
Veileder: Gro Audveig Hagen Bjørnøy
Mai 2023

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



Kunnskap for en bedre verden

Forord

Kjære leser,

denne oppgaven er skrevet av tre bioteknologistudenter ved NTNU Ålesund. Vi har gjennom tre år opparbeidet oss kunnskap og erfaringer som har ledet opp til denne bacheloroppgaven. I løpet av studiet har undervisning vedrørende genetikk og cellebiologi, samt praktisk arbeid på cellelaboratorium, skapt interesse for arbeid med celler og kreftforskning. Valg av tema for bacheloroppgaven har dermed basert seg på denne interessen.

Vi vil rette en stor takk til NTNU for økonomiske midler, og alle faglærere og andre ved NTNU Ålesund, som har gitt oss kunnskapen og motivasjonen vi har trengt for å skrive denne oppgaven. Videre vil vi gi en spesiell takk til vår veileder, Gro Audveig Hagen Bjørnøy, som har gitt oss uvurderlig hjelp og støtte under hele prosessen.

Sammendrag

Målet med studien var å se på celleproliferasjon og cellevekst på cellelinjen Caco-2 etter introduksjon av stressfaktor i form av legemiddelet Ivermectin. For å vite at eventuell reduksjon i vekst eller endring i celleproliferasjon kom av Ivermectin, ble celleveksten først optimalisert. Etter optimaliseringen ble det gjennomført en grovscreening, for å undersøke hvilken Ivermectinkonsentrasjon som ga mest reduksjon i vekst, for videre studering. Ivermectinkonsentrasjonene i grovscreeningen ble valgt med bakgrunn i litteratur, og valget falt på å dyrke celler med 2.5 μM , 5.0 μM og 7.5 μM Ivermectin. I hovedforsøket ble celler dyrket med 5.0 μM Ivermectin studert videre, basert på reduksjon i celletall fra grovscreeningen og tidligere studier rundt klinisk trygge grenser.

Etter celledyrking med 5.0 μM Ivermectin i 72 timer ble cellene telt med Bürker tellekammer, og analysert i AttuneTM NxT Acoustic Focusing Cytometer. På flowcytometeret ble det gjennomført en cellesyklusanalyse for å se etter endring i celleproliferasjon, som kunne tyde på cellesyklusarrest basert på fordeling i cellesyklusen. Resultatene fra celletelling og cellesyklusanalyse ble vurdert ved hjelp av statistiske metoder, for å se etter statistisk signifikant variasjon. Celletellingen viste en statistisk signifikant reduksjon i cellevekst. Cellesyklusanalysen gjort med flowcytometer viste ikke statistisk signifikant endring i cellesyklusen.

Abstract

The aim of this study was to study cell proliferation and cell growth of the Caco-2 cell line, after introduction of a stress factor, the drug Ivermectin. To determine whether reduction in cell growth or changes in cell proliferation, was caused by Ivermectin, the cells were subject to a growth optimization period prior to the growth experiment. Afterwards, an optimization of Ivermectin concentrations was performed, with the concentrations 2.5 μM , 5.0 μM and 7.5 μM . The concentrations were determined based on studies and literature. In the main experiment, cells cultivated with 5.0 μM Ivermectin, were further studied, based on reduction in cell growth from the optimization, and known clinically safe doses.

After cell culture with 5.0 μM Ivermectin for 72 hours, the cells were counted using Bürker counting chambers, and analysed with AttuneTM NxT Acoustic Focusing Cytometer. The flow cytometer was used to perform a cell cycle analysis, in order to detect changes in cell proliferation, based on distribution in the different cell phases. The results from the cell counting and cell cycle analysis were evaluated using statistic methods, to test for statistic significant variation. The cell counting showed a statistic significant reduction in cell growth, while the cell cycle analysis revealed no statistic significant change in cell cycle.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract	III
Terminologi og forkortelser	VI
Begrensninger	VII
1 Introduksjon	1
2 Teori	2
2.1 Kreft	2
2.1.1 Kolorektal kreft	2
2.1.2 Caco-2-celler	3
2.2 Cellevekst og cellyklus	3
2.2.1 Cellevekst	3
2.2.2 Vekstbetingelser for Caco-2	4
2.2.3 Cellyklus og cellykluskontrollsystem	4
2.3 Flowcytometri	6
2.3.1 Prinsipp	6
2.3.2 Attune™ NxT Acoustic Focusing Cytometer	7
2.3.3 Cellyklusanalyse	9
2.4 Ivermectin.....	10
3 Materialer og metoder	11
3.1 Celledyrking	12
3.1.1 Tillaging av vekstmedium	12
3.1.2 Oppstart av celledyrking	12
3.1.3 Optimalisering av vekst	13
3.2 Celledyrking med Ivermectin-modifisert vekstmedium	13
3.2.1 Tillaging av vekstmedium med 2.5, 5.0 og 7.5 µM Ivermectin	14
3.3 Grovscreening	14
3.4 Hovedforsøk	15
3.4.1 Celledyrking med Ivermectin og kontroller	15
3.4.2 Fiksering av Caco-2-celler til cellyklusanalyse	18
3.4.3 Cellyklusanalyse med Attune™ NxT Acoustic Focusing Cytometer	18
3.5 Resultathåndtering.....	19
3.5.1 Celletelling	19
3.5.2 Cellyklusanalyse på flowcytometer	20
4 Resultat	20

4.1 Celledyrking	20
4.1.1 <i>Optimalisering av vekst</i>	20
4.1.2 <i>Tillaging av vekstmedium med 2.5, 5.0 og 7.5 µM Ivermectin</i>	21
4.3 Grovscreening	22
4.4 Hovedforsøk	23
4.4.1 <i>Celletelling</i>	23
4.4.2 <i>Cellesyklusanalyse av Caco-2-celler dyrket i 5.0 µM Ivermectin med flowcytometer</i>	24
5 Diskusjon	25
5.1 Celledyrking	26
5.1.1 <i>Tillaging av vekstmedium</i>	26
5.1.2 <i>Oppstart av celledyrking</i>	26
5.1.3 <i>Optimalisering av vekst</i>	27
5.2 Dyrking av Caco-2-celler i Ivermectin-modifisert vekstmedium	29
5.2.1 <i>Tillaging av vekstmedium Ivermectin</i>	29
5.3 Grovscreening	29
5.4 Hovedforsøk	31
5.4.1 <i>Celletelling</i>	31
5.4.2 <i>Fiksering av Caco-2-celler til cellesyklusanalyse</i>	32
5.4.3 <i>Cellesyklusanalyse med Attune™ NxT Acoustic Focusing Cytometer</i>	33
5.5 Videre forskning.....	34
6 Konklusjon	35
7 Referanser	36
Vedlegg.....	39
A.1 Reagenser	39
A.2 Prosedyrer.....	40
A.2.1 <i>Rutiner på celledlaboratoriet</i>	40
A.2.2 <i>Tining og overføring av celler</i>	42
A.2.3 <i>Splitting av celler</i>	43
A.2.4 <i>Fiksering av Caco-2-celler til cellesyklusanalyse</i>	45
A.2.5 <i>Kalibrering av Attune™ NxT Acoustic Focusing Cytometer</i>	46
A.3 Resultater.....	47
A.3.1 <i>Celletelling ved grovscreening</i>	47
A.3.2 <i>Cellesyklusanalyse ved hovedforsøk</i>	48

Terminologi og forkortelser

Adenocarcinom	Kreft i kjertelepitelceller.
Adherent	Sammenhengende.
Apoptose	Programmert celledød.
Cellesplitting	Fortynning av celler for å gi de tilstrekkelig næring.
CDK	Cyklin-avhengige kinaser.
Dublett	To celler som sitter fast i hverandre og blir registrert sammen under analysing i flowcytometer.
Fiksering	Metode som forhindrer autolyse av biologisk materiale.
In vitro	Forsøk utenfor en levende organisme, på et laboratorium.
Ivermectin	Et legemiddel (anthelmintika) primært brukt for behandling av parasittiske sykdommer hos mennesker og dyr.
Konfluens	Grad av tetthet av celler under celledyrking in vitro.
Monolag	Enkeltlag.
Ploiditetsmodellering	Bestemme hvor en celle er i celsesyklusen basert på antall sett kromosomer den har.
PI	Propidium Iodid. Rød-fluorescent farge brukt til å bestemme DNA innhold i celsesyklusanalyse.
T-test	Statistisk test for å se om det er en statistisk signifikant forskjell mellom to populasjoner, eller om det bare er tilfeldig variasjon. Den tar utgangspunkt i gjennomsnitt og standardavvik.

Begrensninger

Gjennomførelsen av studien ble begrenset av en rekke faktorer. Arbeid på lab var begrenset til hverdager mellom 08:00 og 16:00, som gjorde at enkelte analyser måtte utsettes og tilrettelegges med hensyn til dette. Ellers gjorde økonomiske begrensninger at antall prøver måtte begrenses, grunnet pris på reagenser og utstyr. Valg av cellelinje ble begrenset av tilgjengelighet og leveringstid, og resulterte i cellelinjen Caco-2. Forskning på denne celletypen er ikke blitt utført tidligere ved instituttet, og optimalisering av vekst tok derfor litt lenger tid. Flowcytometeret som skulle brukes under cellesyklusanalyse var helt nytt, bare levert noen uker før oppstart. Dette gjorde det utfordrende å stille inn riktige innstillinger for analysene, grunnet manglende erfaring rundt dette på det nye flowcytometeret.

1 Introduksjon

Kreft er en alvorlig sykdom som rammer mange i verden, bare i Norge blir rundt 35 000 mennesker rammet hvert år, hvor én av fire dør. Mange av behandlingsalternativene er omfattende, og fører til uheldige bivirkninger da de er generelle og lite tilpasset personen og krefttypen. Dette er et stort samfunnsproblem, som det forskes mye på. Dersom man finner medisiner, eller andre behandlingsformer som spesifikt virker på kreften, uten å angripe resten av kroppen, og i tillegg har lite bivirkninger, vil dette revolusjonere måten kreft behandles på i dag (1).

Ivermectin er et legemiddel som i dag brukes i behandling mot parasittsykdommer, hos både mennesker og dyr (2). Legemiddelet har generelt lite bivirkninger, og tidligere forskning har vist effekt på kreftceller, i form av redusert celleproliferasjon (3), blant annet på HeLa-celler (4). Selv om effekten av Ivermectin på kreftceller tidligere er studert, finnes det fortsatt lite forskning på dette. I denne studien skal effekten av Ivermectin på tarmkreftcelletypen Caco-2 studeres. Denne celletypen ble valgt på bakgrunn av tilgjengeligheten på Caco-2-celler, og at det finnes lite forskning på Ivermectin og tarmkreft. Det er tilsynelatende ikke gjort forskning på Ivermectin sin effekt på Caco-2-celler. Tarmkreft er den tredje vanligste krefttypen, og den andre mest dødelige i verden. I dag behandles det ved hjelp av kirurgi og cellegift, og i noen tilfeller stråling eller immunterapi (5). Spesielt kirurgi og cellegift er omfattende behandlingsformer, som fører til stor belastning på pasienten.

Med utgangspunkt i tidligere studier som viser en effekt av Ivermectin på kreftceller (4,6), og tilgjengelige behandlingsformer for tarmkreft (7), ville det vært interessant å se om cellevekst hos Caco-2-celler ble redusert etter introduksjon av Ivermectin in vitro. Dette har ført oss frem til problemstillingen; Kan Ivermectin hemme veksten av tarmkreftceller fra cellelinjen Caco-2? For å studere effekten av Ivermectin, må veksten av Caco-2-cellene først optimaliseres på laben, for å vite at eventuelle endringer i vekst kommer fra legemiddelet, og ikke av at cellene er stresset. Ivermectin må så tilsettes cellene i konsentrasjonsgradienter innenfor et referanseområde basert på tidligere forskning, før celleveksten overvåkes. Et mål på at veksten av cellene blir hemmet av legemiddelet kan være å telle celler, men også å se om cellene deler seg normalt eller er på vei til cellesyklusarrest. For å se om cellene beveger seg mot cellesyklusarrest kan man benytte flowcytometer. I flowcytometeret vil det bli utført en cellesyklusanalyse, for å finne ut hvor stor andel av cellene som befinner seg i de ulike

fasene i cellesyklusen. Da ser man om cellene er på vei til å dele seg, eller om de inngår i cellesyklusarrest.

2 Teori

I teorien beskrives aktuell informasjon for denne studien. Her blir tarmkreft, cellevekst og cellesyklus, flowcytometri med cellesyklusanalyse, og Ivermectin beskrevet.

2.1 Kreft

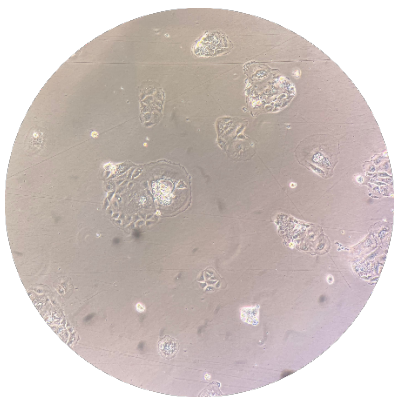
Kreft er en samlebetegnelse på en rekke sykdommer som kan oppstå i vev rundt om i kroppen. Kreft kjennetegnes av ukontrollert cellevekst, som følge av mutasjoner i cellenes arvestoff. Etter hvert som disse kreftcellene deler seg, vil de danne kreftsvulster. Hvor mutasjonen oppstår i kroppen, avgjør hvordan pasienten påvirkes. Kreftsvulsten kan etter hvert forstyrre funksjonen til organet den har oppstått i. I tillegg kan kreften spre seg, og danne metastaser. Dette skjer når kreftceller løsriver seg, og transporteres gjennom blod- og lymfebanen til andre deler av kroppen. Konvensjonelle behandlingsmetoder for kreft er cellegift, stråling og kirurgi, gjerne i kombinasjon for best mulig effekt. Dette er omfattende behandlinger, som fører til stor påkjenning for pasienten (1).

2.1.1 Kolorektal kreft

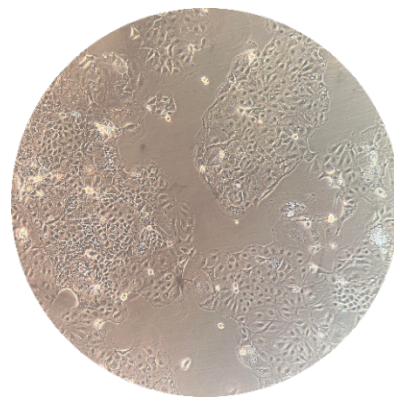
Kolorektal kreft er en samlebetegnelse på tykktarm- og endetarmskreft, og er den andre mest hyppige kreftformen blant den generelle befolkningen i Norge. For mennesker over 70 år er det den vanligste krefttypen (8). Etter tidligere HPV-infeksjoner, eller ved betennelsesykdommer som Crohns sykdom og ulcerøs kolitt er risikoen for å få kolorektal kreft høyere. Krefttypen assosieres også i større grad til personer rammet av overvekt og fedme. Personer som har en inaktiv livsstil og et kosthold med høyere inntak av bearbeidet og rødt kjøtt, kan også ha en høyere risiko for å få tarmkreft. Små godartede svulster i tarmen, som polypper og adenomer, kan med tid også forårsake tarmkreft der behandling ikke blir foretatt (7). Denne kreftformen behandles vanligvis med kirurgi, cellegift og/eller strålebehandling. I tillegg er immunterapi og målrettet behandling mulig i visse tilfeller (9). Adenokarsinom innebærer kreft i kjertelepitelceller, og er den vanligste formen for kolorektal kreft. Denne står for 95% av tilfellene (10).

2.1.2 Caco-2-celler

Caco-2 er en etablert cellelinje, isolert fra et humant kolorektalt adenokarsinom (11). Cellelinjen har blitt brukt som modell for epitellaget i tarmsystemet, spesielt grunnet dens egenskaper til å danne et adherent monolog av celler. Ved kultivering av cellene, kan cellene differensiere til subpopulasjoner av celler. Dette resulterer i systemer som avviker fra den originale cellelinjen og kan problematisere reproduserbarheten mellom studier av cellelinjen (12). Cellelinjen har vist gode absorptive egenskaper, likt absorberende enterocytter i tynn- og tykktarm. Grunnet disse egenskapene, har Caco-2-celler blitt mye brukt til forskning og screening av permeabilitet til legemidler (13).



Figur 1. Bildet viser Caco-2-celler 24 timer etter splitting i en 25 cm² celleflaske. Her er konfluensen lav. Bildet er tatt gjennom okularet på invertmikroskop med privat mobil.



Figur 2. Bildet viser Caco-2-celler i en 25 cm² celleflaske. Her er konfluensen høy. Bildet er tatt gjennom okularet på invertmikroskop med privat mobil.

2.2 Cellevekst og cellesyklus

2.2.1 Cellevekst

Friske celler gjennomgår apoptose, programmert celledød, når de blir skadet eller er for gamle til å utføre oppgavene sine. Kreftceller gjør ikke dette, da denne mekanismen er skrudd av (14). Dette gjør det mulig å dyrke dem in vitro, og holde dem i live over tid. Cellene kan dyrkes i celleflasker eller brønner, med vekstmedium modifisert med antibiotika og vekstserum. Celleveksten skjer i faser. Den første fasen er lag-fasen. Her er celletallet relativt konstant, da cellene bruker tid på å gjenopprette overflateproteiner og binding til underlaget. Den neste fasen er eksponentiell fase, også kalt log-fasen, hvor celletallet stiger raskt, på grunn av kontinuerlig deling av cellene. Her er det eksponentiell vekst. På slutten av log-fasen vil cellekulturen bli konfluent. Den siste fasen er platåfasen, også kalt stasjonærfasen. I denne fasen er bunnen av celleflasken dekt av celler. Her vil veksthastigheten gå ned grunnet opphoping av avfallsstoffer og redusert næringstilgang, både fordi den blir brukt opp og at

cellene ikke når næringen når de begynner å vokse i høyden. For å unngå at cellene dør, og at veksten stagnerer, er det viktig å fortynne dem før dette, i den eksponentielle fasen, gjerne ved 70-80% konfluens. Da sørger man for at cellene vokser i monolag, og ikke i høyden. Denne prosessen kalles splitting. For at cellene skal ha best mulige forutsetninger for vekst, brukes en CO₂-inkubator innstilt på 37°C, for å etterligne kroppstemperatur. I tillegg brukes aseptiske LAF-benker, for å forhindre kontaminering av cellene under dyrking og splitting. Disse har en sirkulerende luftstrøm, som hindrer luftbårne patogener i å komme inn i benken. I tillegg brukes det hansker og lab-frakker under arbeid med cellene (15). Før en stressfaktor skal introduseres for cellene in vitro, er det viktig at celleveksten først optimaliseres. Optimalisering vil her innebære å oppnå stabil cellevekst, som er forutsigbar over tid. På denne måten kan man vite om eventuelle endringer i cellevekst kommer av stressfaktoren, og ikke av at cellene var stresset før stressfaktoren ble innført.

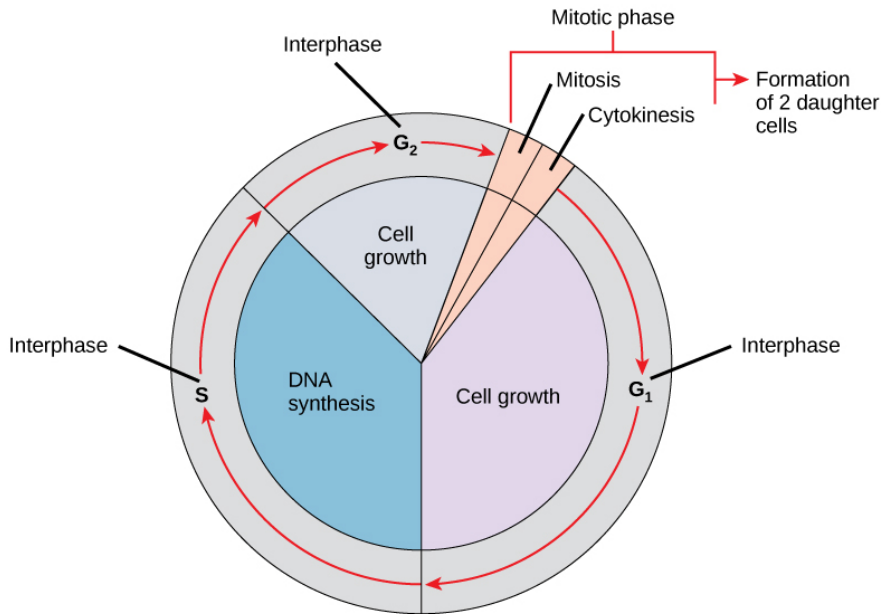
2.2.2 Vekstbetingelser for Caco-2

Dyrkning av cellelinjen Caco-2 in vitro, krever at vekstforholdene etterligner det humane miljøet. Flere studier har sett på optimalisering av vekstforhold som karbondioksidkonsentrasjon, næringsmedium, veksthormoner og generelle dyrkingsforhold. Caco-2 dyrkes gjerne i Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), supplert med fetal bovine serum og Penicillin-Streptomycin. Dyrkingen gjennomføres ved en atmosfære på 5% eller 10% CO₂ og 37°C (16,17). Ved celledyrking, dyrkes cellene normalt til 80% konfluens, før de splittes og dyrkes videre. Caco-2 beskrives som en mer saktevoksende cellelinje og har en dobling av populasjon etter 3-4 dager. Det anbefales derfor å la populasjonen vokse til en konfluens på 100% ved oppstart, og skifte vekstmedium hver 48-time. Det er også verdt å merke at Caco-2 konsekvent vokser ut fra små øyer (figur 1), og 100% konfluens vil derfor kunne se annerledes ut enn hos andre cellelinjer (18).

2.2.3 Cellesyklus og cellykluskontrollsystem

Deling av celler gjennom cellyklus er en nødvendig mekanisme for at organismer skal kunne leve og formere seg. Dette er en kompleks prosess, som styres av regulatoriske proteiner, ofte referert til som cellyklusens kontrollsystem. Hele prosessen kan deles inn i de fire fasene; M-fase, S-fase, G1- og G2-fase. M-fase består av mitose og cytokinese. Mitose er deling av cellekjerne, og cytokinese består av deling av cellen og dens cytoplasma (19). Interfasen innebærer de siste tre fasene av cellyklusen, og er en viktig del av

celleproliferasjonen (20). I S-fasen syntetiserer cellen nytt DNA. S-fasen er omringet av to G-faser (G1 og G2), som innebærer videre vekst av cellen og en rekke sjekkpunkt der det indre og ytre miljøet til cellen vurderes (19). DNA-replikasjon, mitose og cytokinese styres av cellesyklusens kontrollsystem. Kontrollsystemet innebærer en rekke sjekkpunkt, hvor cellen kan gå inn i cellesyklusarrest, eller fortsette cellesyklusen. Cellesyklusens kontrollsystem koordinerer alle fasene i cellesyklusen ved å skru av og på ulike mekanismer. Dette gjøres gjennom en rekke molekylære signaler som jobber sammen for å trigge de ulike fasene i syklusen. Kontrollsystemet består i hovedsak av syklisk aktiverte proteinkinaser, proteiner og proteinkomplekser som jobber sammen med å aktivere og inaktivere DNA-replikasjon, mitose og cytokinese. Proteinkinaseene i cellesyklusen er cyklin-avhengige kinaser (CDK). Som navnet antyder, skrur kinasene av og på ved hjelp av cykliner som binder seg til kinasene og trigger den enzymatiske aktiviteten. Cyklinene har konsentrasjoner som endrer seg syklisk, og aktiverer cyklin-CDK-kompleksene ved binding. Dette gjøres mulig ved at konsentrasjonene av cyklinene reguleres av transkripsjon og proteolyse. Molekylene syntetiseres jevnt i S-fase til de når et bestemt nivå, før de degraderes i M-fase ved hjelp av enzymer kalt anafase-promoterende kompleks, som markerer cyklinene og gjør de tilgjengelige for degraderende proteosomer. Proteosomene sørger for degradering av cyklinene, og fører de inn i et inaktivt stadium. Selve cyklin-CDK-kompleksene er inaktive etter binding, men kan aktiveres raskt ved hjelp av fosforylering og defosforylering av hemmende fosfater på kompleksene. Disse fosfatene defosforyleres av spesifikke proteinfosfataser. CDK kan også reguleres ved hjelp av CDK-hemmende proteiner, som blokkerer aktiviteten til enkelte CDK-komplekser. Kontrollsystemet kan på denne måten stoppe cellesyklusen midlertidig. Dette gjøres for å sikre at mekanismene i cellesyklusen foregår under riktige indre og ytre betingelser. Det er flere ulike typer cykliner og CDK-er involvert i eukaryot cellesykluskontroll. De ulike kompleksene G1-CDK, G1/S-CDK, S-CDK og M-CDK, trigger forskjellige mekanismer i cellesyklusen ut fra hvilke faser de befinner seg i. Når CDK-ene blir aktivert fra cyklinbinding, trigger de ulike mekanismer i cellesyklusen, som oppstart av S-fase og M-fase. Dette skjer ved at kompleksene fosforylerer regulatoriske proteiner som aktiverer mekanismene i de ulike fasene, og fører til initiering av nye faser (19).



Figur 3. Viser de ulike fasene i cellyklusen, og sier kort hva som skjer i de ulike fasene. G-fase viser til den første fasen hvor cellens hovedoppgave er å vokse. Etter G₁-fasen får vi initiering av S-fase, hvor DNA syntetiseres. Deretter får vi G₂-fasen, hvor cellen vokser seg til ønsket nivå og initierer M-fasen med mitose og dermed opphav til to nye datterceller. Illustrasjonen er hentet fra kapittel 10.2 i boken *Biology*, via Openstax (21).

2.3 Flowcytometri

Flowcytometri er et analyseverktøy, mye brukt til forskning da det kan gi detaljert informasjon om en rekke enkeltpartikler, spesielt celler. Metoden er en rask og effektiv molekylærmedisinsk metode, som også kan brukes klinisk. Flowcytometeret kvantifiserer og analyserer hver celles fysiske karakteristikk, og gir informasjon om cellepopulasjonen i sin helhet. Eksempelvis kan flowcytometeret bestemme DNA-innhold i cellene, og dermed avgjøre hvilken fase av cellyklusen de befinner seg i. Dette blir mye brukt i kreftforskning, da det gir informasjon om cellene inngår i cellyklusarrest (22).

2.3.1 Prinsipp

I et flowcytometer kvantifiseres og måles cellers fysiske karakteristikk, som størrelse og granularitet. Ved hjelp av farging eller antistoff, med spesifisitet til strukturer i eller på cellene, kan flowcytometeret brukes for å tilegne seg kunnskap om komplekse cellepopulasjoner. Selve prinsippet i flowcytometri baserer seg på lysspredning og/ eller fluorescensemisjon. En strøm av enkelt-celler i suspensjon beveger seg gjennom en eksitasjonskilde, gjerne en laserstråle, og et deteksjonssystem måler mengden spredt og ikke-spredt lys (23). Denne optiske informasjonen vises som forward scatter (FSC), og side scatter (SSC), og kommer av vinkelen på det emitterte lyset fra cellen. FSC kommer fra lys spredt av

cellen ved en liten vinkel, som detekteres av en sensor på motsatt side av lyskilden. FSC forteller om størrelsen til cellen. SSC kommer fra lys spredt av cellen ved en 90° vinkel, som detekteres av flere sensorer på sidene av lyskilden. SSC forteller om granulariteten til cellene (24). Fluorescensemisjonen kommer fra fluorescensprober festet til spesifikke strukturer i eller på cellene. Denne emisjonen er proporsjonal med mengden fluorescerende prober som er festet til cellene, og dermed også av den spesifikke strukturen disse er festet til på cellen (23). Hovedelementene i et flowcytometer er fluidikk, optikk, og elektronikk (25). Fluidikken sørger for at suspensjonen med cellene blir sendt til laserstrålen, og at strømmen av celleduspensjon holdes så smal at cellene bare kan passere en om gangen. Den optiske delen deles i eksitasjon og deteksjon. Den eksiterende delen av optikken er laserstrålen, og den detekterende delen av optikken er detektorer, som detekterer, omformer, og eventuelt amplifiserer det spredte lyset og den emitterte fluorescensen. Fotomultiplikatorrør og fotodioder er slike detektorer (23). Mellom laseren og multiplikatorrørene er det et sett med filtre som filtrerer og sorterer lys etter bestemte bølgelengder. Slike filtre er “shortpass”, “longpass” og “bandpass” -filtre. “Shortpass” -filtre slipper bare gjennom bølgelengder kortere enn en viss lengde, “longpass” slipper bare gjennom lengre bølgelengder, og “bandpass” slipper gjennom et spekter av bølgelengder mellom to gitte verdier. Den elektroniske delen består av detektorer og en datamaskin. Etter at detektorene har detektert lyset, omgjøres signalet til en proporsjonal mengde elektroner, for å skape en elektrisk strøm. Denne strømmen blir amplifisert, og omgjort til en spenningspuls. Dette analoge signalet må omgjøres til et digitalt signal, ved hjelp av en analog til digital konverter, før en datamaskin kan analysere signalet. Resultatet blir digitale data som vises i plot eller histogram (23).

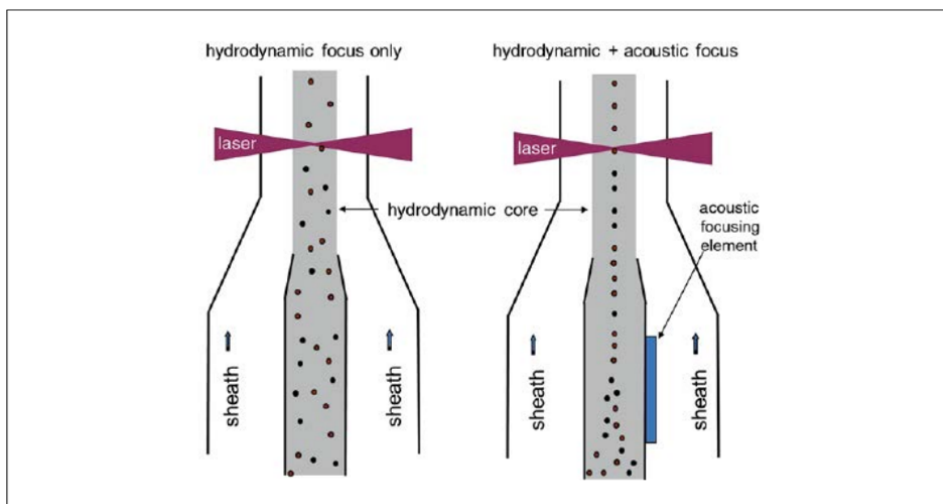
Ved oppstart av et nytt eksperiment må man justere spenningen som brukes for amplifisering av signalene slik at man får et sterkt nok signal til at det kan tolkes, men ikke så sterkt amplifisert at det overdøver alt annet, og blir støy. Etter dette blir signalene bearbeidet digitalt. Da setter man såkalte «gater» som gjør at man kan skille ut resultater innenfor en bestemt kategori. Eksempelvis kan man skille celler fra cellefragmenter, eller enkeltceller fra celler som har klumpet seg sammen. Denne «gatingen» gjøres direkte i programvaren, etter at analysen er utført.

2.3.2 Attune™ NxT Acoustic Focusing Cytometer

Attune™ NxT Acoustic Focusing Cytometer er et flowcytometer utviklet for å forbedre analysetiden og sensitiviteten ved flowcytometrianalyser. Instrumentet har en svært høy

følsomhet og evner å analysere mange ulike partikler med høy gjennomstrømning, noe som sørger for ti ganger raskere analysetid, sammenlignet med andre flowcytometer. Dette er grunnet bruken av akustisk trykk (ultrasoniske bølger (25)), for å konsentrere prøvestrømmen gjennom den optiske flowcellen i flowcytometeret. Akustisk fokusering utnytter forskjellene mellom tetthet og komprimerbarheten til partiklene i prøven og løsningen som partiklene av interesse befinner seg i, til å posisjonere cellene langs en fokusert strøm av partikler (26). Flowcytometeret kan ha opptil fire lasere, som bestråler partiklene ved interrogation point, hvor partiklene sprer lyset gjennom emisjon og fluorescens fra tilknyttede fluoroforer. Optiske filtre og speil, sorterer emisjon og fluorescens til detektorer for spesifiserte bølgelengder. Detektorene består av en fotodiode for deteksjon av forward scatter (FSC), og fotomultiplikatorrør (PMT) for deteksjon av fluorescens og side scatter (SSC). De forsterker og konverterer lysspredningen til elektriske signaler som bearbeides av programvaren til instrumentet (26).

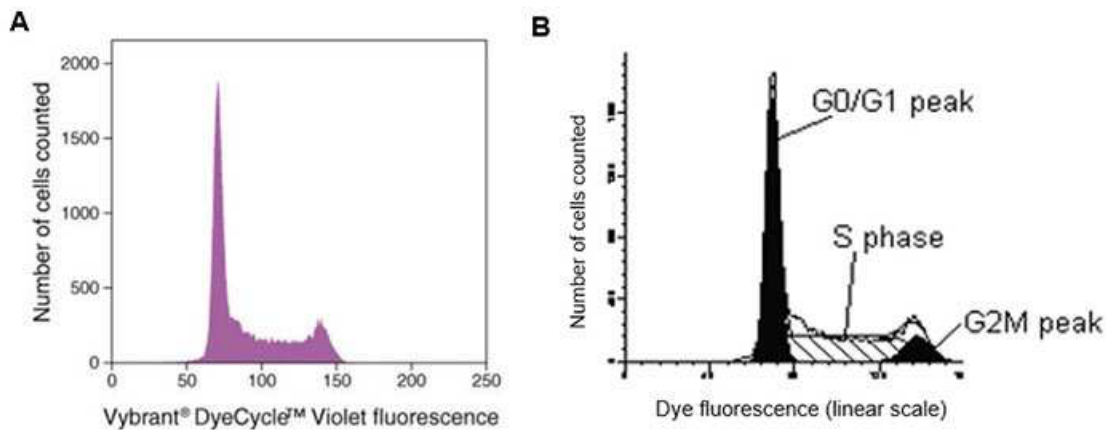
Programvaren bruker i tillegg en rekke funksjoner som sørger for høykvalitetsanalyser. Dette innebærer jevnlig desinfeksjon av system og autosampler med 10% blekemiddel, fjerning av eventuelle «clogger», celler som har klumpet seg sammen, og bobler som kan påvirke prøveresultatene og fullstendige oppstarts- og nedstengingsprotokoller. Dette sørger for høy brukervennlighet, og minimering av feil under prosessen (26).



Figur 4. Bildet viser forskjellen i hvordan cellene fokuseres ved interrogation point i to ulike flowceller. Flowcellen til venstre viser hvordan cellene fokuseres med hydrodynamisk fokusering. Flowcellen til høyre viser hvordan Attune™ NxT Acoustic Focusing Cytometer, fokuserer cellene med akustisk fokusering i tillegg til hydrodynamisk fokusering. Bildet er et skjermbilde hentet fra artikkelsamlingen «Acoustic Focusing for Multiparameter Flow cytometry», fra Thermo Fisher (27).

2.3.3 Cellesyklusanalyse

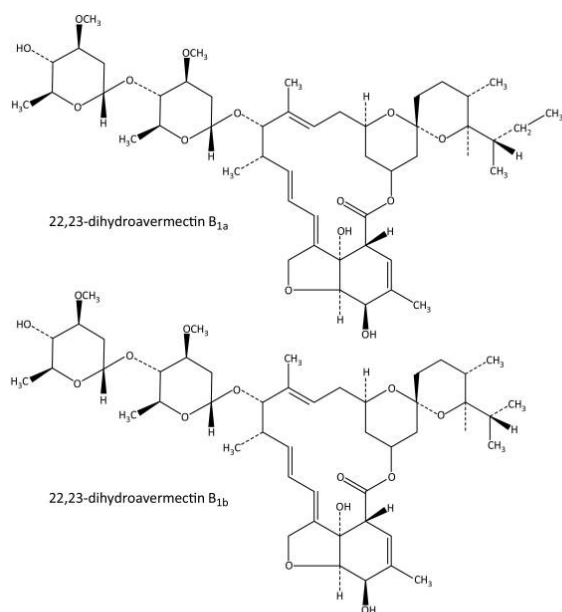
Flowcytometri egner seg til å utføre cellesyklusanalyse. I de fleste tilfeller fikseres cellene med etanol, som bryter ned deler av cellemembranen, og gjør den permeabel for fargestoff som binder seg til DNA. Et slikt fargestoff er PI (Propidium Iodid) (25). PI er en rød-fluorescent farge, som binder seg støkiometrisk til DNA, med ett fargestoff per 4.-5. basepar, og gjør at mengden emittert lys er proporsjonal til mengden DNA. Fargestoffet har ingen sekvenspreferanse, og er derfor ofte kombinert med RNase, for at det skal være mulig å skille mellom DNA og RNA. RNasen degraderer RNA, slik at bare DNA er tilgjengelig for binding til PI (28). PI fluorescerer bare når det er bundet til dobbeltrådet DNA. I replikasjonen åpnes DNA-heliksen, og de fluorescerende signalene for cellene i S-fasen vil dermed være redusert. Etter hvert som mer DNA replikeres, og igjen danner dobbelheliks, vil de fluorescerende signalene øke (29). Datamaskinen som analyserer signalene bruker ploeditetsmodellering for å bestemme hvor cellen er i cellesyklusen, basert på antall sett kromosomer i cellen (25). Når analysen er gjennomført plasseres «gater» på histogrammet som viser cellepopulasjonenes fordeling i cellesyklusen. På denne måten ser man prosentandelen av celler som er innenfor de ulike fasene, og bare cellene av interesse blir brukt videre i resultathåndteringen. Da utelukkes også støy, som cellerester og dubletter (23). For å kunne lese resultatene etter analysen må histogrammet settes opp lineært, med DNA på x-aksen. Toppen lengst til venstre i histogrammet vil representere cellene i G1/G0-fasen. Cellene her har et sett kromosomer. Toppen lengst til høyre i histogrammet viser cellene i G2/M-fasen. Her har cellene kopiert DNA, og dermed to sett kromosomer. Området mellom de to toppene representerer cellene i S-fase, som forbereder seg på å kopiere DNA, gjennom DNA-syntese (30). Ved å sammenligne testpopulasjonen til en kontrollpopulasjon, vil det være mulig å se om det er noen endring i andelen celler i de ulike fasene. På denne måten kan man undersøke om cellene inngår i cellesyklusarrest eller ikke, etter introduksjon av en stressfaktor.



Figur 5. Histogram fra cellyklusanalyse på flowcytometer som viser normal cellyklus. Histogrammet er hentet fra Thermo Fisher (29), og viser fordeling av DNA innholdet i Jurkat-celler farget med Vybrant DyeCycle Violet farge. G0/G1- og G2/M-fasen vises som to forhøyninger (peaks), og er separert av S-fasen. I denne analysen ble det brukt fiolett 405 nm eksitasjon med 440 nm bandpass filter. Prinsippet for identifisering av de ulike fasene i flowcytometer, baserer seg på at cellene i de forskjellige fasene har ulik mengde DNA.

2.4 Ivermectin

Ivermectin er et legemiddel som opprinnelig ble brukt i behandling av et spekter av parasittsykdommer hos dyr (31). Det har siden blitt godkjent og brukt til behandling av mennesker for helmint- og parasittinfeksjoner (32), som blant annet elveblindhet og skabb (33). Ivermectin fungerer som behandling mot parasitter ved at de aktiverer glutamatregulerte klorid-ione kanaler i nervesystemet til parasittene (34), som deretter fører til at de blir paralyserte og dør. Ivermectin aktiverer ikke glutamatregulerte klorid-kanaler i nervesystemet på mennesker eller dyr, og er dermed trygt å bruke klinisk. Nye studier har åpnet for at Ivermectin potensielt også har egenskaper som kan anvendes ved behandling av diverse kreftformer som lungekreft (35), tarmkreft (6) og livmorhalskreft (4). Virkemåten er enda ikke helt klarlagt, selv om studier viser en opp- eller nedregulering av diverse apoptosefaktorer og tumorsuppressorgener som *Caspase-3* (36), *Bax* (37) og *BCL-2* (38), som vil føre til økt dødelighet blant cellene de påvirker (6). Kjemisk er Ivermectin en sammensetting av to komponenter, avermectin B_{1a} (20%) og B_{1b} (80%), som ble oppdaget som et biprodukt fra bakterien, *Streptomyces avermitilis*, i en jordprøve (39).



IUPAC name - 22,23-dihydroavermectin B_{1a} + 22,23-dihydroavermectin B_{1b}
 Formula - C₄₈H₇₄O₁₄ (22,23-dihydroavermectin B_{1a}) + C₄₇H₇₂O₁₄ (22,23-dihydroavermectin B_{1b})

Trends in Parasitology

Figur 6. Figuren viser strukturen til de to komponentene i Ivermectin; avermectin B_{1a} (øverst) og B_{1b} (nederst). Figuren er hentet fra artikkelen "Ivermectin - Old Drug, New Tricks?" (39).

Under vanlig bruk av Ivermectin i behandling av eksempelvis elveblindhet, brukes lave doser på 150 mikrogram/kg kroppsvekt (40). Dette er den anbefalte dosen, og vil som regel ikke overstiges ved klinisk behandling av parasitter. Det har likevel blitt gjort studier der langt høyere doser har vært benyttet, da enkelte parasitter krever høyere dose for å bli drept. Et slikt studie er gjort mot lus på mennesker (41), der de testet enkeltdoser på 2 mg/kg kroppsvekt, som er langt over de anbefalte, og ellers godkjente dosene Ivermectin. En dose på 2 mg/kg kroppsvekt tilsvarer 5.0 μM (35). Studiet viste ingen bivirkninger utover de som ble observert i placeboparallelene, noe som indikerer at disse dosene også kan være trygge i ellers friske individer. Dette er en indikasjon på at dosering av Ivermectin over de anbefalte dosene kan være trygt, men at 2 mg/kg bør brukes som en øvre grense med utgangspunkt i hva som er kjent trygt hos mennesker (41).

3 Materialer og metoder

Her beskrives de materialer og metoder som er blitt anvendt i studien. Den praktiske delen av studien deles i optimalisering av vekst, grovscreening og hovedforsøk. Under optimalisering av vekst, ble Caco-2-cellenes dyrket til de oppnådde stabile vekst. Grovscreeningen gikk ut på

optimalisering av tidsintervall og Ivermectinkonsentrasjoner. Optimalisering av tidsintervall gjøres for å finne ut hvor lang tid det tar fra man introduserer Ivermectin til cellene, til man faktisk ser en effekt av legemiddelet. Optimalisering av Ivermectinkonsentrasjoner ble gjort med utgangspunkt i tolererbare grenseverdier, for å undersøke hvilke konsentrasjoner som påvirket celleveksten i størst mulig grad. Målet med hovedforsøket var å måle eventuell reduksjon i vekst hos cellene dyrket med Ivermectin, gjennom celletelling, og endring i celleproliferasjon ved cellesyklusanalyse i flowcytometer.

3.1 Celledyrking

For å gjøre forsøk på kreftceller, må de dyrkes. Celledyrking går ut på å holde cellene i live in vitro. For å holde de i live må de få den næringen de trenger, og de må fortynnes før de går tomme for næring. En slik fortynning er viktig for at cellene skal vokse i monolag, og ikke i høyden, da monolag sikrer cellene god tilgang til vekstmedium og næringsstoffer. Prosessen hvor cellene fortynnes, kalles splitting. Når dette gjøres vil man øke celletallet, og optimalisere veksten. Optimalisering av vekst gjøres for å sikre at cellene vokser normalt, før det innføres en stressfaktor, eksempelvis et legemiddel, til cellekulturen. For å vite at det er stressfaktoren som gir eventuelle endringer i cellevekst, er det essensielt å vite at cellene før innføring av stressfaktor, vokste normalt og ikke var stresset. Alle prosedyrer som omfatter celledyrking, gjennomføres aseptisk i LAF-benk etter prosedyre for arbeid på cellelaboratorium (vedlegg A.2.1).

3.1.1 Tillaging av vekstmedium

DMEM/F-12-vekstmedium (*Gibco, a.nr.11320-033*) ble modifisert med penicillin og serum. 5 ml ferdig porsjonert Penicillin-Streptomycin (*Gibco a.nr. 15140-122*) i 15 ml Falconrør, og en flaske Fetal Bovine Serum (*Gibco a.nr. A3840401*) på 50 ml, ble tatt fra fryser på -18°C og tint i omtrent 1 til 2 timer. Etter tining, ble de hellest over i en ny flaske DMEM/F-12-vekstmedium på 500 ml. Arbeidet ble utført aseptisk i LAF-benk. DMEM/F-12-vekstmedium med Penicillin og serum vil heretter bli referert til som vekstmedium eller DMEM/F-12.

3.1.2 Oppstart av celledyrking

Ved oppstart av celledyrking, ble Caco-2-celler hentet fra Møreforskning, hvor cellene var fryst i 2 ml kryorør på kryotank ved -196°C . Cellene ble tint ved romtemperatur og overført etter prosedyre (vedlegg A.2.2). Når cellene var tint, ble de raskt tilsatt forvarmet

vekstmedium og blandet ved pipettering. Etter at cellene var løst i vekstmediet, ble de overført til 25 cm² celleflaske med 6 ml forvarmet vekstmedium, og satt i inkubator. Inkubatoren var innstilt til 37°C og 5% CO₂. Det ble også laget til en 25 cm² celleflaske med vekstmedium, som ble brukt som kontroll gjennom hele vekstforsøket, for å se eventuelle kontamineringer i inkubasjonsskap eller vekstmedium.

3.1.3 Optimalisering av vekst

Etter tillaging av vekstmedium og tining av cellene, startet optimaliseringen av cellevekst. Den opprinnelige celleflasken ble hver 24. time studert i invertmikroskop, frem til konfluensen var ved 80%. 24 timer etter tining av cellene, ble det byttet vekstmedium. Dette ble gjort i LAF-benk ved at gammelt vekstmedium ble fjernet, og cellene ble vasket med 3 ml Hank's Balanced Salt Solution (*Gibco, a.nr. 14175-095*), heretter referert til som HBSS, to ganger, før det ble tilsatt 7 ml vekstmedium. Når cellene hadde nådd mellom 80% og 100% konfluens ble de splittet etter prosedyre (vedlegg A.2.3). 6 ml vekstmedium ble overført til to nye 25 cm² celleflasker, og satt i inkubatorskapet. Gammelt vekstmedium ble så fjernet fra celleflasken, cellene ble vasket med 3 ml HBSS to ganger, før det ble tilsatt 0.5 ml 0.25% trypsin (*Gibco, a.nr. 25200056*). Etter tilsetning av trypsin ble celleflasken studert i invertmikroskop, og jevnlig kakket forsiktig i siden, til omtrent 80% av cellene hadde løsnet fra bunnen av celleflasken og hverandre. Da ble trypsinen inaktivert av 4 ml vekstmedium, før hele innholdet i celleflasken ble pipettert opp og ned, og overført til et 15 ml Falconrør. Røret ble sentrifugert på 1200 rpm i 3 minutter, til det dannet seg en cellepellet. Supernatanten ble fjernet, og cellepelleten resuspendert i 2 ml vekstmedium. De to celleflaskene med forvarmet vekstmedium ble tatt ut av inkubatorskapet, og plassert i LAF-benken. 1 ml av cellesuspensjonen ble overført til hver av de to celleflaskene. Hver 48. time ble det byttet vekstmedium i celleflaskene, som beskrevet over, og når konfluensen nådde 80% ble cellene splittet på nytt. Fortynningen cellene ble splittet til ble vurdert etter veksten i celleflasken, og ble gjort ved å justere volumet av vekstmedium cellepelleten ble resuspendert i. For å oppkonsentrere cellene raskere ble det benyttet celleflasker på 75cm².

3.2 Celledyrking med Ivermectin-modifisert vekstmedium

Før cellene kunne dyrkes med Ivermectin, ble det laget en stamløsning på 10mM som kunne blandes med vekstmediet til cellene.

3.2.1 Tillaging av vekstmedium med 2.5, 5.0 og 7.5 μM Ivermectin

Ivermectin-pulver (*Sigma-Aldrich a.nr. I8898*) ble fortynnet i dimetylsulfoksid (*Thermo Scientific, a.nr. 85190*), heretter referert til som DMSO, for å lage en stamløsning som kunne blandes med vekstmedium, i ønsket konsentrasjon. Etter vurdering av nødvendig mengde vekstmedium med Ivermectin, og utregning ved hjelp av formlene $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ og $C = \frac{n}{V}$, ble det veid opp 0.0437 gram Ivermectin, som ble fortynnet til 5 ml med DMSO. Stamlløsningen ble da på 10 mM. Den ble oppbevart i kjøleskap.

Konsentrasjonene som ble brukt var 2.5 μM , 5.0 μM og 7.5 μM med Ivermectin. For å få ønsket konsentrasjon av Ivermectin i vekstmediet, ble formelen $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ brukt. Etter innsetting av ønsket konsentrasjon Ivermectin i vekstmediet, kjent konsentrasjon på stamløsningen, og sluttvolumet, ble volum av stamløsning funnet. For hver konsentrasjon ble det laget porsjoner på 50 ml. Bakgrunn for valg av konsentrasjoner beskrives under 5.3 Grovscreening. Vekstmedium ble blandet med stamløsningen av Ivermectin. Dette ble gjort ved å tilsette riktig volum stamløsning, og fortynne dette til 50 ml med vekstmedium, før det ble overført til 50 ml Falconrør. For vekstmedium med 2.5 μM Ivermectin ble det eksempelvis brukt 12.5 μl stamløsning. Volum stamløsning tilsatt for de resterende konsentrasjonene, er listet opp i tabell 1.

Tabell 1. Tabellen viser ønskede konsentrasjoner av Ivermectin (IVM) til grovscreeningen, for å undersøke reduksjon i cellevekst, og endring i celleproliferasjon hos *Caco-2*-cellelinje. I midterste kolonne står ønsket totalvolum av vekstmedium med de ulike konsentrasjonene til vekstforsøket. I den siste kolonnen står volum stamløsning med 10 mM Ivermectin som er nødvendig å tilsette for å få 50 ml vekstmedium, med ønskede konsentrasjoner.

Ønsket IVM-konsentrasjon	Totalt volum DMEM-F12-vekstmedium modifisert med IVM	Volum stamløsning av 10mM IVM
2.5 μM	50 ml	12.5 μl
5.0 μM	50 ml	25.0 μl
7.5 μM	50 ml	37.5 μl

3.3 Grovscreening

I grovscreeningen ble Ivermectin tilsatt cellene i konsentrasjonsgradienter innenfor et referanseområde basert på tidligere forskning, før celleveksten ble overvåket gjennom konfluensvurdering og celledelling. Under grovscreeningen ble cellene splittet 1:3 ved 80%

konfluens over i 16 celleflasker (25 cm²). 24 timer senere ble gammelt vekstmedium fjernet og celleflaskene vasket med 3 ml HBSS to ganger, før de ble tilsatt 7 ml nytt vekstmedium med ulike konsentrasjoner Ivermectin. Falconrørene med vekstmedium og Ivermectin ble forvarmet i inkubator før tilsetning. Det ble i tillegg varmet rent vekstmedium i 50 ml Falconrør, til kontrollene. Ved tid 0 ble fire av celleflaskene vasket og tilsatt vekstmedium med 2.5 µM Ivermectin. Etter 1 time ble fire av celleflaskene vasket og tilsatt vekstmedium med 5.0 µM Ivermectin. Etter 2 timer ble fire av celleflaskene vasket og tilsatt vekstmedium med 7.5 µM Ivermectin. Etter 3 timer ble de siste fire celleflaskene, kontrollene, vasket og tilsatt vekstmedium uten Ivermectin. Etter hvert som celleflaskene fikk tilsatt nytt vekstmedium ble de satt i inkubatorskapet. En del av grovscreeningen var å finne ut når cellene dyrket med Ivermectin viste tegn til vekstreduksjon. Dette ble undersøkt ved å studere celleflaskene hver 24. time i invertmikroskop og vurdere konfluens. Etter 72 timer ble cellene fiksert og analysert, i samme rekkefølge og til samme klokkeslett som de ble vasket og tilsatt Ivermectin 3 døgn tidligere. Cellene fra grovscreeningen ble fiksert og brukt som mal for å stille inn de riktige spenningene på flowcytometeret til hovedforsøket.

3.4 Hovedforsøk

Ut fra resultatene etter grovscreeningen, ble det bestemt å arbeide videre med 5.0 µM Ivermectin i hovedforsøket. Caco-2-cellene ble dyrket med 5.0 µM Ivermectin i 25 cm² celleflasker i 72 timer, før cellene ble telt og analysert i flowcytometer, for å se på reduksjon i cellevekst og endring i celleproliferasjon sammenlignet med kontroller.

3.4.1 Celledyrking med Ivermectin og kontroller

Parallelt med grovscreeningen ble det splittet celler videre til hovedforsøket, hvor det skulle brukes 40 celleflasker (25 cm²). Det ble splittet fem ekstra, til reserve. Celleflaskene ble splittet 1:3 ved 80% konfluens etter prosedyre (Vedlegg A.2.3). Til hovedforsøket ble det blandet fire Falconrør (50 ml) med 5.0 µM Ivermectin. 24 timer etter splitting til 25 cm² celleflasker ble gammelt vekstmedium fjernet, cellene vasket med 3 ml HBSS to ganger, og tilsatt 7 ml forvarmet vekstmedium med 5.0 µM Ivermectin. For å ha mulighet til å håndtere alle celleflaskene, ble dette gjort i flere omganger på ti celleflasker, med en time mellom hver. I tabell 2 er omgangene listet opp som tid 0, 1, 2 og 3. De første 20 celleflaskene ble tilsatt Ivermectin, og de resterende 20 ble brukt som kontroller. Alle cellene ble dyrket i 72 timer, med unntak av paralleller som ble tatt ut etter 24 og 48 timer for å overvåke veksten.

24 timer etter tilsetning av Ivermectin ble konfluensen studert i invertmikroskop, og cellene telt i Bürker tellekammer. Fire av celleflaskene fra tid 1, med Ivermectin, og fire av celleflaskene fra tid 3, kontroll, ble studert og telt. Se oversikt i tabell 2. To paralleller fra hver celleflaske ble telt. Gammelt vekstmedium i flasken ble fjernet, cellene ble vasket med 3 ml HBSS to ganger, og deretter tilsatt 0.5 ml 0.25% trypsin. Celleflasken ble studert i invertmikroskop frem til alle cellene hadde løsnet fra hverandre og underlaget. Da ble trypsinen inaktivert av 4 ml vekstmedium. Cellesuspensjonen ble deretter overført til et 15 ml Falconrør. Etter pipettering opp og ned ble 2x11 µl av cellesuspensjonen overført til Bürker tellekammer. Cellene i hvert kammer ble telt, og formelen: $\frac{\text{antall celler i tellekammeret}}{9 \cdot 0.0001 \text{ ml}} = \text{celler/ml}$, ble brukt for å bestemme celler per milliliter. 48 timer etter tilsetning av Ivermectin ble konfluensen studert i invertmikroskop, og cellene telt i Bürker tellekammer. Fire av celleflaskene fra tid 0, med Ivermectin, og fire av celleflaskene fra tid 2, kontroll, ble studert og telt som beskrevet over. To paralleller fra hver celleflaske ble telt. 72 timer etter tilsetning av Ivermectin var det igjen seks celleflasker per klokkeslett. Celleflaskene ble studert i invertmikroskop for å bestemme konfluens, cellene ble telt som beskrevet over, fiksert og analysert.

Tabell 2. Oversikt over gangen i hovedforsøket, og når de ulike celleflaskene med og uten Ivermectin ble dyrket, studert og telt. Det var 1 time mellom de ulike tidene listet opp til venstre i tabellen. Alle splittingene i forkant av forsøket ble gjort 1:3.

	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 4	Dag 5
<i>Generell oversikt over hovedforsøket</i>	5 medium celleflasker (75 cm ²) ble splittet til 45 små celleflasker (25 cm ²)	40 små celleflasker (25 cm ²) ble vasket med HBSS, og tilsatt nytt vekstmedium. 20 med 5.0 µM Ivermectin, og 20 uten Ivermectin	Konfluensen til celleflaskene ble studert i invertmikroskop, og telt i Bürker tellekammer	Konfluensen til celleflaskene ble studert i invertmikroskop, og telt i Bürker tellekammer	Konfluensen til celleflaskene ble studert i invertmikroskop, og telt i Bürker tellekammer, før de ble fiksert og analysert.
<i>Tid 0</i>		10 celleflasker ble tilsatt 5.0 µM Ivermectin		4 av celleflaskene ble studert i invertmikroskop, og telt i Bürker tellekammer	6 celleflasker ble studert, telt, fiksert og analysert
<i>Tid 1</i>		10 celleflasker ble tilsatt 5.0 µM Ivermectin	4 av celleflaskene ble studert i invertmikroskop, og telt i Bürker tellekammer		6 celleflasker ble studert, telt, fiksert og analysert
<i>Tid 2</i>		10 celleflasker ble tilsatt vekstmedium (kontroll)		4 av celleflaskene ble studert i invertmikroskop, og telt i Bürker tellekammer	6 celleflasker ble studert, telt, fiksert og analysert
<i>Tid 3</i>		10 celleflasker ble tilsatt vekstmedium (kontroll)	4 av celleflaskene ble studert i invertmikroskop, og telt i Bürker tellekammer		6 celleflasker ble studert, telt, fiksert og analysert

3.4.2 Fiksering av Caco-2-celler til cellesyklusanalyse

Før analysering av cellene i flowcytometer, ble konfluensen til hver enkelt celleflaske vurdert i invertertmikroskop. Cellene ble deretter fiksert etter prosedyre (vedlegg A.2.4). Fikseringen ble gjennomført under aseptiske forhold i LAF-benk. Gammelt vekstmedium ble fjernet, og cellene ble vasket to ganger med 3 ml HBSS. Cellene ble trypsinert med 0.5ml 0.25% trypsin, og ble overvåket i invertmikroskop til de hadde løsnet fra overflaten i celleflasken. Deretter ble 4 ml nytt vekstmedium tilsatt for å inaktivere trypsinen, og cellesuspensjonen ble overført til et rent 15ml Falconrør. Det ble pipettert opp og ned for å sørge for en homogen blanding, før 11 µl x 2 ble tatt ut av cellesuspensjonen og overført til Bürker tellekammer for telling. Falconrørene med cellesuspensjonen ble deretter sentrifugert i 5 minutter ved 500g. Etter sentrifugering ble supernatanten fjernet, og cellepelleten resuspendert i 500 µL eller 1000 µL romtemperert Phosphate Buffered Saline (*Sigma-Aldrich, a.nr. D8537*), heretter referert til som PBS, avhengig av konsentrasjonen av cellene i cellesuspensjonen. 500 µL av ble overført i nye Falconrør med 4ml 96% etanol fra fryser på -20°C. Falconrørene ble vortexet på full hastighet i 1 min, før de ble inkubert i fryser (-20°C) i 15 min. Etter inkubering ble Falconrørene overført til sentrifugen, og sentrifugert ved 1200 rpm i 5 minutter. Supernatanten ble fjernet, og pelleten forsiktig løsnet, ved å tappe på røret. Pelleten ble deretter løst i 5 ml romtemperert PBS, vortexet og rehydrert ved romtemperatur i 15 minutter. Resten av fikseringsprosedyren (vedlegg A.2.4), ble gjennomført før cellesyklusanalysen.

3.4.3 Cellesyklusanalyse med Attune™ NxT Acoustic Focusing Cytometer

Cellene ble klargjort til cellesyklusanalyse etter prosedyre (vedlegg A.2.4). De fikserte cellene (rehydrert i PBS), ble sentrifugert i 5 minutter ved 1200 rpm. Supernatanten ble fjernet, og pelleten forsiktig løst fra Falconrøret, ved å tappe på det. Deretter ble det tilsatt 0.5 ml PI/RNase (*Invitrogen™, a.nr. F10797*), til hvert Falconrør, før prøvene ble inkubert i minimum 90 minutter i mørket. De ble inkubert på kjølerom frem til de skulle analyseres. Før analysen ble det gjennomført en oppstartsprosedyre på flowcytometeret, etter prosedyre (vedlegg A.2.5). Instrumentfanen ble åpnet, før det ble trykket på «Run Startup». Da instrumentet ga beskjed om at «Startup» var gjennomført, ble det trykket på «Run Performance Test». Beads (*Attune™, a.nr. 449754*) ble deretter klargjort ved å vortexe flasken de kom i, før det ble tilsatt 3 dråper til et prøverør med 2 ml «Focusing Fluid» (*Invitrogen, a.nr. 4488621*). Prøverøret ble deretter vortexet, før det ble satt i flowcytometeret, og det ble trykket på «Run Baseline».

Etter oppstartsprosedyren ble det satt opp et nytt eksperiment i programvaren, og fire grupper med seks prøver i hver ble opprettet og navngitt. De to første gruppene rommet de 12 prøvene med Ivermectin. De to siste gruppene, var for de 12 kontrollene. Deretter ble spenninger for analysen justert. Forward scatter ble satt til 160. Side scatter ble satt til 300. Detektoren for blå laser, BL3, ble satt til 320. Spenningene ble satt basert på prøver fra grovscreeningen. Hastigheten prøvene ble analysert ved, ble stilt til 200 µL/minutt, med et totalvolum på 200 µL. Prøvene ble analysert i rekkefølgen de ble satt opp i eksperimentet i programvaren. Mellom hver gruppe på fire, ble det gjennomført en desinfeksjon, kalt «Sanitize SIP», med blekemiddel (*Invitrogen, a.nr. 4467467*) fortynnet til 10% med Milli-Q-vann.

3.5 Resultathåndtering

3.5.1 Celletelling

Celletelling ble utført med Bürker tellekammer ved at 11 µL av cellesuspensjonen ble pipetert over i hvert av de to cellekammerne like etter inaktivering av trypsin, før resten av prøven gikk videre til fiksering. Cellene ble så telt i lysmikroskop, og totalt celletall ble beregnet ut fra konsentrasjonen i prøven, med denne formelen: $\frac{\text{antall celler i tellekammeret}}{9 \cdot 0.0001 \text{ ml}} = \text{celler/ml}$. For å finne antall celler i celleflasken, måtte celler/ml multipliseres med 4.5, da det var 4 ml vekstmedium og 0.5 ml trypsin i celleflaskene.

Prøvene ble senere sammenliknet og vurdert mot hverandre med en tosidig paret t-test i Microsoft Excel ved funksjonen “=TTEST(“datasett1”;“datasett2”;2;1)” der $\alpha=0.05$ ble satt som signifikansnivå for datasettene. For å kunne gjennomføre en paret t-test må det være like mange verdier i begge datasettene. Dersom antallet er ulikt, må dette kompenseres for ved å legge til eller fjerne en verdi. Dette gjør resultatet noe mer usikkert. Dersom man fjerner en verdi nært gjennomsnittet til et av datasettene burde resultatet forskyves slik at p blir større, og usikkerheten reduseres.

For uteliggere eller prøver som måtte forkastes under analyse og celletelling, ble det tatt et gjennomsnitt av alle gyldige tellinger for å få likt antall verdier i datasettene. For å kvalitetssikre t-testen, ble det gjennomført en alternativ t-test hvor en av prøvene nærmest gjennomsnittet ble fjernet.

3.5.2 Cellesyklusanalyse på flowcytometer

Resultatene fra flowcytometeret ble bearbeidet ved hjelp av en paret t-test. Etter omregning i Microsoft Excel slik at summen av «%Gated» fra de ulike cellefasene i cellesyklusen utgjorde 100%, ble funksjonen “=TTEST(“datasett1”;“datasett2”;2;1)” i Microsoft Excel brukt. Her ble de like cellefasene i de to populasjonene sammenliknet, og signifikansnivået ble satt til 5%.

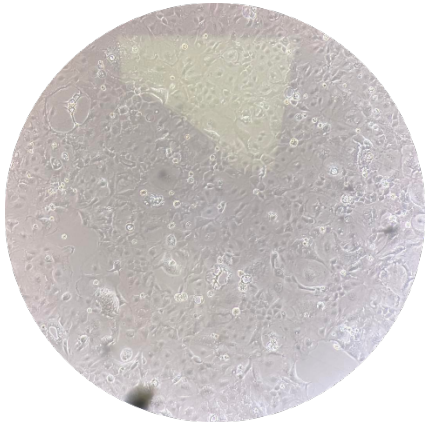
4 Resultat

Her beskrives resultatene fra celledyrking og vekstforsøk på Caco-2-celler. Grovscreeningen innebærer resultater fra celledelling av celler dyrket ved tre ulike konsentrasjoner av Ivermectin (2.5, 5.0 og 7.5 μM), samt kontroller. Fra hovedforsøket presenteres resultater fra celledelling og cellesyklusanalyse på celler dyrket i 5.0 μM Ivermectin i 72 timer, sammenliknet med kontroller.

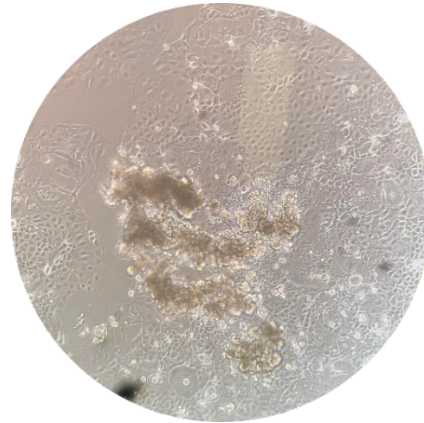
4.1 Celledyrking

4.1.1 Optimalisering av vekst

24 timer etter oppstart hadde 50% av cellene festet seg til overflaten i celleflasken, og 50% av cellene var døde. Cellene ble vasket og fikk nytt vekstmedium. Etter 48 timer, ble cellene studert i invertmikroskop, og konfluensen ble vurdert til 80%. Cellene ble da splittet 1:3. De neste 14 dagene av celledyrkingen, brukte cellene 7 dager på å oppnå 80% konfluens. De ble da splittet 1:3. Etter tre uker med splitting og bytting av medium, var veksten optimalisert. Underveis i optimaliseringen ble det på gjentatte tidspunkt oppdaget svulster i celleflaskene (figur 8). Ved oppstart, tok trypsingeringen mellom 8-10 minutter før cellene løsnet fra hverandre og bunnen av celleflasken. Ved slutten av vekstforsøket var denne tiden redusert til 3-4 minutter.



Figur 7. Bildet er tatt gjennom okularet på invertmikroskopet som ble brukt til å studere cellene, med privat mobil. Bildet viser cellene 48 timer etter oppstart, med tilnærmet 100% konfluens.



Figur 8. Bildet viser svulst i en celleflaske, noe som oppstod flere ganger i løpet av vekstoptimaliseringsperioden. Bildet er tatt gjennom okularet på invertmikroskop med privat mobil.

4.1.2 Tillaging av vekstmedium med 2.5, 5.0 og 7.5 μM Ivermectin

Ønsket konsentrasjon og volum av stamløsning ble satt til 5 ml 10 mM Ivermectin løst i DMSO, og nødvendig masse Ivermectinpulver ble regnet ut ved hjelp av molberegninger med formlene: $n = C \cdot V$, for å finne antall mol av Ivermectin for stamløsningen, og $m = n \cdot M_m$, for å finne massen Ivermectin.

Finner mol av Ivermectin (IVM) for 5 ml 10mM løsning:

$$n(\text{mol IVM}) = C(\text{ønsket konsentrasjon av IVM løsning}) \times V(\text{volum DMSO})$$

$$n(\text{mol IVM}) = 0.01 \frac{\text{mol}}{\text{L}} \text{ IVM} \times 0.005 \text{ L DMSO}$$

$$n(\text{mol IVM}) = 0.00005 \text{ mol IVM}$$

Finner masse for 0.00005 mol IVM:

$$m(\text{IVM}) = n(\text{mol IVM}) \times M_m(\text{molar masse IVM})$$

$$m(\text{IVM}) = 0.00005 \text{ mol IVM} \times 875.1 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

$$m(\text{IVM}) = 0.043755 \text{ g}$$

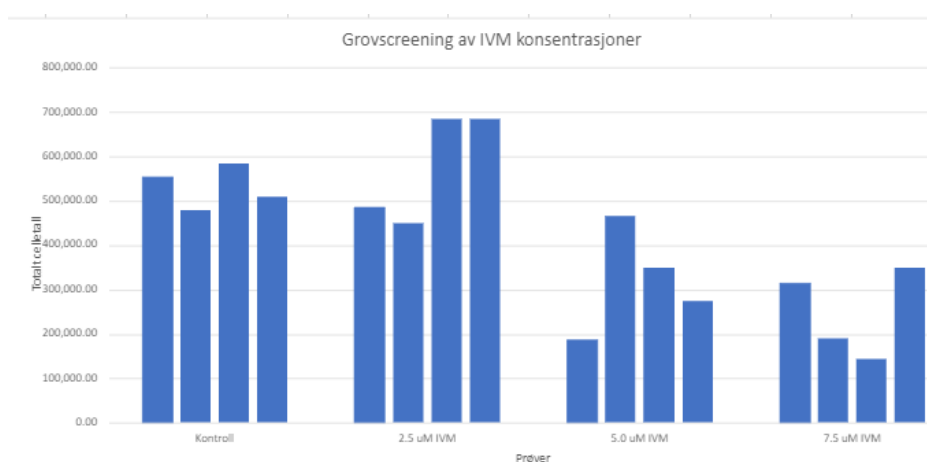
Etter utregning ble 0.0437 gram Ivermectinpulver brukt for å lage 5 ml 10 mM stamløsning av Ivermectin. Det ble fortynnet til 5 ml med DMSO. Forventet bruk av vekstmedium ble satt til 50 ml per konsentrasjon, og nødvendig volum 10 mM stamløsning ble beregnet ved hjelp av formelen $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$. Eksempelvis ble 12.5 μl stamløsning ble brukt for å lage

vekstmedium med 2.5 μM Ivermectin. Resultatene fra de resterende utregningene vises i tabell 1, under «3 Materialer og metoder».

4.3 Grovscreening

I grovscreeningen ble celler tilsatt ulike konsentrasjoner av Ivermectin, 2.5 μM , 5.0 μM og 7.5 μM , for å studere ved hvilken konsentrasjon Ivermectin hadde en eventuell reduserende effekt på celleveksten. Cellenes konfluens ble studert i invertmikroskop hver 24. time. Etter 24 og 48 timer var det ingen synlig forskjell i konfluens mellom kontrollene og cellene dyrket med Ivermectin. Etter 72 timer ble det heller ikke observert betydelig vekstreduksjon i celleflaskene dyrket med Ivermectin, men det ble likevel besluttet å avslutte grovscreeningen. Det var store variasjoner i konfluensen, både hos cellene dyrket med Ivermectin og hos kontrollene. Det var dermed ikke mulig å tyde forskjell basert på konfluens sett i invertmikroskop.

Grovscreeningen viste ingen reduksjon i vekst for cellene dyrket med 2.5 μM Ivermectin. For cellene dyrket med 5.0 μM Ivermectin, var det gjennomsnittlig 40% reduksjon i cellevekst. For cellene som ble dyrket med 7.5 μM Ivermectin, var det gjennomsnittlig 53% reduksjon i cellevekst. Resultater fra celledtelling hos alle parallellene er vist i figur 9. Eksakte tall er vist i vedlegg A.3.1, tabell 6.



Figur 9. Diagrammet viser totalt celledtall for kontrollene og Ivermectinkonsentrasjonene; 2.5 μM , 5.0 μM og 7.5 μM i 25 cm^2 celleflasker. For hver konsentrasjon er det 4 paralleller.

Cellene fra grovscreeningen ble fiksert og brukt som mal for å stille inn de riktige spenningene på flowcytometeret til hovedforsøket.

4.4 Hovedforsøk

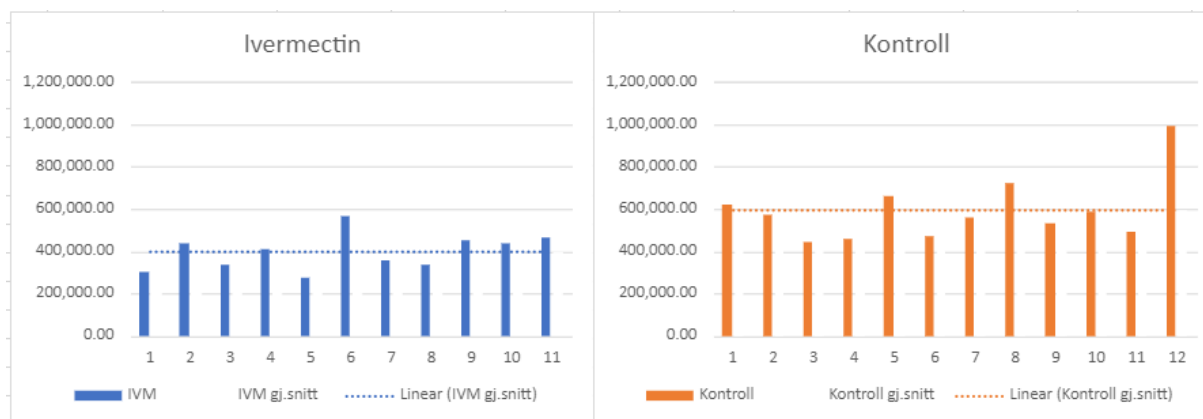
Grovscreeningen ble gjennomført med konsentrasjonene 2.5, 5.0 og 7.5 µM Ivermectin, og viste gjennomsnittlig 40% reduksjon i cellevekst for Caco-2-celler dyrket i 5.0 µM Ivermectin i 72 timer. I hovedforsøket ble det gjort videre dyrking av Caco-2-celler, med 5.0 µM Ivermectin. Det ble gjennomført celledelling og cellesyklusanalyse på Attune™ NxT Acoustic Focusing Cytometer. Resultatene presenteres i tabeller og histogrammer.

4.4.1 Celledelling

Celleprøvene ble telt med Bürker tellekammer, med to paralleller per prøve. Deretter ble totalt celledtall regnet ut med formelen: $\frac{\text{antall celler i tellekammeret}}{9 \times 0.0001 \text{ ml}} = \text{celler/ml}$. Tellekammeret rommer 10 µl, og det blir telt 9 A-ruter. Dette gir celler/ml, som ble multiplisert med 4.5, da det var 4.5 ml væske i celleflaskene. Dette resulterte i totalt celledtall, som er vist i tabell 3. En av celleflaskene dyrket med Ivermectin ble forkastet.

Tabell 3. Viser totalt antall celler i 25 cm² celleflasker fra hovedforsøket. Tabellen viser celledtall for hver av de 12 parallellene dyrket med vekstmedium modifisert med 5 µM Ivermectin (5.0 µM IVM), samt celledtall for 12 kontroller (dyrket under normale forhold, uten modifisert vekstmedium). Prøve 12 for 5.0 µM IVM, ble forkastet. Nederst i tabellen vises gjennomsnittet til de to variablene.

Prøve:	Kontroll	5.0 µM IVM
1	620 000	302 500
2	5750 00	440 000
3	442 500	337 500
4	457 500	407 500
5	662 500	275 000
6	472 500	565 000
7	560 000	355 000
8	725 000	335 000
9	530 000	452 500
10	587 500	435 000
11	490 000	465 000
12	992 500	-
Gjennomsnitt:	592 917	397 273

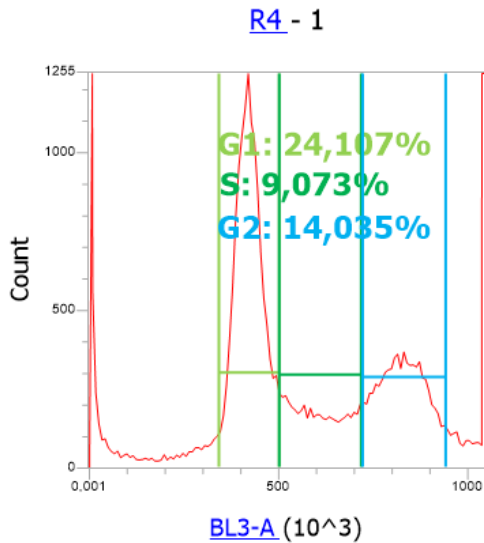


Figur 10. Søylediagrammet viser celletall for hver av de 12 parallellene av celler dyrket med (til venstre) og uten (til høyre) 5.0 μ M Ivermectin (IVM). Y-aksen viser totalt celletall fra hver prøve (25 cm² celleflasker). Gjennomsnittet viser som en stiptet linje for hver av de to histogrammene. Gjennomsnittet for prøvene dyrket med Ivermectin er 397 273 celler. Gjennomsnittet for kontrollene er 592 917 celler. Prøve 12 for Ivermectin ble forkastet.

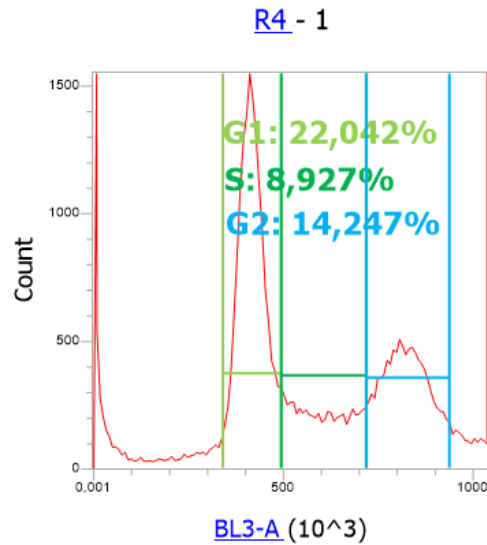
Etter paret tosidig t-test med innsetting av gjennomsnittsverdi for ugyldig prøve ble resultatet $p=0.004889$, som er mindre enn 5%, som ble satt som signifikansnivå. En alternativ paret tosidig t-test, der verdien nærmest snittet for kontrollene, prøve 6, ble fjernet ga $p=0.018597$, som er mindre enn 5%, som ble satt som signifikansnivå.

4.4.2 Cellesyklusanalyse av Caco-2-celler dyrket i 5.0 μ M Ivermectin med flowcytometer

Etter innstilling av flowcytometeret med hensyn til spenning, og gating av tilsynelatende riktig cellepopulasjon, ble alle prøvene analysert, og resultatet fra cellesyklusanalysen fremstilt i histogram for hver av prøvene. Spenningen for forward scatter ble satt til 160, side scatter ble satt til 300, og detektoren for blå laser, BL3, ble satt til 320. Histogrammene i figur 11 og 12, representerer en prøve med og en prøve uten Ivermectin, og er fra prøve 1 med 5.0 μ M Ivermectin, og prøve 1 fra kontrollene. De viser prosentvis gating for de ulike cellefasene i cellesyklusen. Resultatene fra resten av prøvene er listet opp i tabell 10 og 11 under vedlegg. I tabell 4 vises gjennomsnittlig fordeling for de ulike cellefasene, med og uten Ivermectin, og i tillegg vises differansen mellom dem.



Figur 11. Viser histogram med gating av cellefasene G1/G0, S og G2/M fra prøve 1 med Ivermectin tatt ved tid 0. På x-aksen viser mengde målt lys, som korrelerer med DNA i cellene. Y-aksen viser til antall målinger.



Figur 12. Viser histogram med gating av cellefasene G1/G0, S og G2/M fra prøve 1 av kontrollene, tatt ved tid 2. På x-aksen viser mengde målt lys, som korrelerer med DNA i cellene. Y-aksen viser til antall målinger.

Tabell 4. Tabellen viser gjennomsnittene av den prosentvise fordelingen innenfor de ulike fasene etter gatingen fra flowcytometrianalysen. Snitt kontroll viser gjennomsnittene for prøvene dyrket uten modifisert vekstmedium og snitt med IVM viser gjennomsnittene for prøvene med 5.0 μM Ivermectin. Differanse viser gjennomsnittlig forskjell mellom kontrollene og prøvene med Ivermectin.

	G1/G0	S	G2/M
<i>Snitt Kontroll</i>	48.79 %	20.13 %	31.08 %
<i>Snitt med IVM</i>	47.97 %	20.82 %	31.21 %
<i>Differanse</i>	-0.82 %	0.69 %	0.13 %

Etter gjennomført paret t-test på alle verdiene fra de ulike cellefasene i prøvene (tabell 10 og 11 under vedlegg), ble det funnet at for G1/G0-fasen: $p=0.4338$, S-fasen: $p=0.1642$ og for G2/M-fasen: $p=0.8885$. Siden ingen av dem hadde $p<0.05$, som ble satt som signifikansnivå, er ikke variasjonen statistisk signifikant. Variasjonen er ifølge denne t-testen tilfeldig.

5 Diskusjon

Hensikten med denne studien var å studere effekter Ivermectin har på cellevekst og celleproliferasjon, spesielt tegn på induksjon av cellesyklusarrest, hos Caco-2-celler. Det ble benyttet celledelling for å studere cellevekst og Attune™ NxT Acoustic Focusing Cytometer til å studere eventuelle endringer i cellesyklus. Før celledelling og analysing med flowcytometer, ble veksten av cellelinjen Caco-2 optimalisert, før stressfaktor, i form av

legemiddelet Ivermectin, ble introdusert. Basert på tidligere forskning rundt Ivermectintoleranse hos mennesker (41), ble det valgt tre konsentrasjoner av Ivermectin, som ble brukt i en grovscreening. Disse konsentrasjonene var 2.5 μM , 5.0 μM og 7.5 μM . Dette screeningforsøket ble gjennomført for å undersøke hvilken konsentrasjon som var mest interessant å gå videre med, med hensyn på reduksjon av cellevekst. Etter grovscreeningen viste 5.0 μM og 7.5 μM reduksjon i celletall, og 5.0 μM ble undersøkt videre i hovedforsøket.

5.1 Celledyrking

Under celledyrking ble veksten av Caco-2-cellene optimalisert over tre uker. Dette for at cellekulturen skulle ha en så normal vekst som mulig, før den ble introdusert for stressfaktor, i form av Ivermectin. På denne måten ville en eventuell reduksjon i cellevekst kunne tyde på påvirkning av Ivermectin, og ikke av andre faktorer.

5.1.1 Tillaging av vekstmedium

For at cellene skal få optimale vekstforhold, ble DMEM/F-12-vekstmedium modifisert med Penicillin-Streptomycin og Fetal Bovine Serum. Penicillin-Streptomycin ble tilsatt for å forhindre kontaminering i cellekulturen. Fetal Bovine Serum inneholder essensielle vekstfaktorer, og ble tilsatt for å stimulere veksten (42). For å undersøke om vekstmediet ble kontaminert under tillaging eller underveis i vekstforsøket, ble det tilsatt vekstmedium i en ren celleflaske (25 cm^2), som ble plassert i inkubatorskapet sammen med resten av cellene. Celleflasken ble regelmessig undersøkt i invertmikroskop gjennom hele vekstforsøket, for å undersøke om det oppstod uønsket vekst. Dette ble gjort ved å se etter abnormaliteter i celleflaskene. Eventuell vekst ville indikert kontaminering i mediet eller miljøet cellene befant seg i. Det ble ikke observert vekst i celleflasken, som kan tyde på at det ikke var noen betydelig kontaminering i vekstmedium eller inkubasjonsskap. Dersom kontaminering har forekommet underveis, har denne trolig blitt eliminert av Penicillin-Streptomycin i vekstmediet.

5.1.2 Oppstart av celledyrking

Ved oppstart av celledyrkingen, var det kritisk at cellene ble overført til en celleflaske med forvarmet vekstmedium akkurat i det de var tinte. Oppholder de seg lenger i romtemperatur, uten å bli resuspendert i forvarmet vekstmedium kan de bli stresset, og i verste fall dø. Mediet cellene befinner seg i, i fryst tilstand, er vekstmedium modifisert med Penicillin-Streptomycin

og serum, tilsatt 5% DMSO (18). DMSO er skadelig for cellene etter tining, da det osmotiske trykket i cellene vil øke, på grunn av at DMSO hindrer vann i å forlate cellene (43). For å øke sjansen for overlevelse, ble cellene i kryorøret studert nøye under tiningprosessen. Det ble tilsatt forvarmet medium akkurat i det de var tinte for å forhindre at cellene skulle sprekke. For å få best mulig overlevelse, må tiningen gjennomføres så raskt som mulig (44). Det ble forventet at mange av cellene kom til å dø under prosessen, og dermed vurdert til at flere celler var å foretrekke for å ha et godt utgangspunkt for videre cellevekst. Hele cellevolumet fra tiningen ble derfor overført til en celleflaske, da det var mellom 1 ml og 2 ml cellesuspensjon i beholderen, og dermed ikke nok til å tilsette celler til to celleflasker. Blir det for mange celler i celleflasken vil dette trolig føre til at flere celler dør, da mengden vekstmedium er beregnet ut fra overføring av 1 ml celler.

Etter 24 timer hadde cellene begynt å feste seg til underlaget. 50% av cellene i celleflasken var på dette tidspunktet døde. For å bedre vekstforholdet i celleflasken ble døde celler fjernet ved å pipettere ut gammelt vekstmedium, og ved vasking med HBSS. Deretter fikk de levende cellene nytt vekstmedium med den næringen de trengte. Etter 48 timer, var konfluens 80%, og cellene ble splittet. Siden veksten var såpass god, så fort, kan man anta at cellene ikke ble stresset utover det som var forventet, under optiming. Likevel kan andre faktorer føre til stressrespons senere.

5.1.3 Optimalisering av vekst

Før optimalisering av cellevekst ble det valgt vekstbetingelser til cellene. Temperaturen i inkubatorskapet ble satt til 37°C, og CO₂-konsentrasjonen ble satt til 5%, for å etterligne kroppens miljø. I forkant av vekstforsøket ble det drøftet om CO₂-konsentrasjonen skulle være 5% eller 10%. 5% simulerer miljøet i kroppen, men siden det er brukt tarmkreftceller i forsøket kunne det blitt brukt 10%, for å bedre simulere miljøet i mage- og tarmsystemet. I forskningsartikler blir det ikke brukt en konsekvent CO₂-konsentrasjon. Flertallet bruker 5%, og enkelte bruker 10%. I og med at flertallet brukte 5%, ble det bestemt å benytte denne konsentrasjonen (12). Leverandøren cellene kom fra, oppga også at cellene skulle inkuberes ved 5% CO₂ (18). Etter første splitting gikk celleveksten raskt, men utover i optimaliseringsperioden gikk vekstraten betydelig ned, før den mot slutten tok seg opp igjen, og ble stabil. Dette samsvarer med anbefalingene fra ATCC, som beskriver langsom cellevekst hos Caco-2 i oppstart av kultivering, og forventet 100% konfluens etter 7 dager

(18). Det kan diskuteres om dette er grunnet en sen stressrespons ved endring av miljø, og at cellene derfor ikke fikk redusert veksthastighet før etter 48 timer.

En annen forklaring på langsom veksthastighet, er at cellene ble splittet for tynt. Ved et tidspunkt ble noen av cellene splittet 1:3, og de andre splittet 1:4. De ble fortynnet ulikt, basert på forskjell i konfluens. Alle celleflaskene ble igjen splittet etter 7 dager. Celleflaskene splittet 1:3 var da 100% konfluente, i motsetning til celleflaskene splittet 1:4. De hadde omtrent 80% konfluens. Veksten i celleflaskene fra denne fortynningen hadde i ettertid redusert veksthastighet, og brukte over 1 uke på å bli 100% konfluente. Både celleflaskene som ble splittet 1:3 og 1:4, ble trolig splittet for tynt. Dette ble gjort på bakgrunn av observasjon av svulster i celleflaskene. Dette ble tolket som overvekst, og det ble vurdert å splitte cellene tynt for å fordele cellene bredt på flere celleflasker, og på den måten redusere sjansen for at det skulle skje igjen. Dette resulterte i at passasjene fra celleflaskene splittet 1:4 aldri tok opp veksthastigheten, og veksten ble aldri stabilisert. De ble dermed forkastet, til fordel for passasjene fra celleflaskene splittet 1:3, for å få et sammenlignbart resultat fra hovedforsøket. Det ble vurdert til at det var viktig å bruke celler med samme utgangspunkt.

Veksten av Caco-2-celler er ulik fra andre celletyper, og tolking av vekst må dermed gjøres på en annen måte. Caco-2-celler vokser i «øyer», og 100% konfluens kan dermed ikke vurderes på samme måte som celler som vokser jevnt over hele flaten. Dersom det er for langt mellom de opprinnelige cellene vil ikke hele bunnen i celleflasken dekkes, men det vil fortsatt være 100% konfluens da vekstpotensialet i monolag er nådd. Vi har ikke erfaring med denne cellelinjen fra tidligere, og konfluensvurderingen ble dermed gjort for første gang.

Det ble i utgangspunktet satt av 14 dager til optimalisering av vekst, da det ble antatt at det var tilstrekkelig, med bakgrunn i tidligere erfaringer. Optimaliseringstiden ble utvidet til 21 dager grunnet langsommere cellevekst enn forventet. Etter splitting i tre uker, var veksten optimalisert. Vekstoptimalisering er en viktig del av studien, da den sørger for stabil cellevekst, før innføring av Ivermectin. Det er avgjørende at celleveksten er stabil før innføring av stressfaktor, slik at eventuelle endringer i vekst kan knyttes til effekten av Ivermectin, og ikke kommer av at cellene er stresset.

Gjennom normalisering av celleveksten og starten av vekstforsøket, kunne trypsineringen ta opp til 8-10 minutter. Tiden ble gradvis redusert gjennom hele dyrkningsperioden, og var ved

slutten av perioden redusert til 3-4 minutter. Cellene er sterkt bundet til overflaten ved hjelp av overflateproteiner, og har en tendens til å feste seg til hverandre. Cellene blir derfor oppfattet som “seige”. Det var også variasjoner fra dag til dag. Dette kan til dels forklares på bakgrunn av hvordan trypsineringen ble håndtert. Der cellene ble kakket jevnt på, for å “hjelpe” cellene til å løsne, ble det observert at cellene løsnet betydelig raskere. Det kan dermed antas at kakking av celleflasken har en effekt, selv om det er vanskelig å måle effekten av dette. En annen utfordring knyttet til trypsinering av cellene, var at etter cellene hadde sluppet taket fra beholderen, dannet de flak som klumpet seg sammen, og gjorde det vanskelig å vurdere om trypsineringen var ferdig.

5.2 Dyrking av Caco-2-celler i Ivermectin-modifisert vekstmedium

5.2.1 Tillaging av vekstmedium Ivermectin

Under tillaging av vekstmedium med Ivermectin, ble det valgt å lage en stamløsning på 10 mM Ivermectin, fortynnet i DMSO. Ved å lage denne stamløsningen, ble det enkelt å lage vekstmedium med riktig konsentrasjon Ivermectin, ved å tilsette utregnet volum av stamløsning til vekstmediet. I og med at det er laget mindre porsjoner med riktig konsentrasjon Ivermectin, blir alle parallellene tildelt vekstmedium modifisert med Ivermectin fra den samme homogene løsningen. Dette kvalitetssikrer resultatene, siden det gir mindre rom for variasjon i Ivermectinkonsentrasjonen mellom parallellene.

5.3 Grovscreening

Konsentrasjonene i grovscreeningen ble brukt til å finne den konsentrasjonen som ga størst reduksjon i cellevekst. Konsentrasjonene av Ivermectin til grovscreeningen ble valgt med bakgrunn i litteratur (41), som viser til at 5.0 μM Ivermectin skal være trygt ved klinisk bruk. 5.0 μM tilsvarer 2 mg/kg kroppsvekt (35). 2.5 μM Ivermectin ble valgt som et alternativ med lavere konsentrasjon. Dette med bakgrunn i at det ble funnet lite litteratur rundt denne konsentrasjonen. 7.5 μM Ivermectin ble valgt som et alternativ over den kjente klinisk trygge grensen til hva som er brukt på mennesker, for å se om det har en mer avtakende effekt på cellevekst eller celleproliferasjon på Caco-2-celler. For å utforske reduksjon i cellevekst og celleproliferasjon i enda større grad, kunne det ha vært testet ytterligere konsentrasjoner med Ivermectin. Eksempelvis 10 μM . For enkelte kreftpasienter vil det være enkelt å takke ja til å delta i kliniske studier med utprøvende behandling, selv om denne kan gi plagsomme bivirkninger, dersom all tilgjengelig behandling er utprøvd uten godt resultat (45). I noen

tilfeller kan det dermed være verdt å prøve en høyere dose av et legemiddel, eksempelvis Ivermectin, dersom denne har vist reduserende effekt in vitro. Derfor er det nyttig å undersøke høyere konsentrasjoner.

En del av grovscreeningen var å undersøke hvor lenge cellene måtte inkuberes med Ivermectin før det hadde en effekt. Denne optimaliseringen ble gjort for å vite hvor lenge cellene skulle dyrkes med Ivermectin i hovedforsøket. Celleflaskene med og uten Ivermectin hadde store variasjoner i konfluens, og det var tilnærmet umulig å vurdere om noen hadde nedgang i vekst. Etter 24 timer ble det observert en betydelig konfluensøkning i alle celleflaskene, da cellene har fått festet seg til underlaget, og bredt seg utover et større areal. Etter 48 timer hadde konfluens økt minimalt, i alle celleflaskene. Etter 72 timer, ble det heller ikke observert betydelig reduksjon i konfluens, etter sammenligning av cellene med Ivermectin til kontrollene. På grunn av tidsbegrensing, ble det besluttet å avslutte grovscreeningen etter 72 timer.

Resultatene fra optimaliseringen av Ivermectinkonsentrasjoner viste ingen reduksjon i celler dyrket med 2.5 μM Ivermectin, men heller en liten økning. Det er dermed grunn til å tro at denne konsentrasjonen hadde ubetydelig effekt på cellene, og at tilfeldige variasjoner kan ha ført til høyere vekst i noen av celleflaskene dyrket ved 2.5 μM . Enkelte studier som er gjort på lavere konsentrasjoner, har også fått en liten økning i vekst (35), men det er viktig å merke seg at dette kan komme av tilfeldig variasjon. For cellene dyrket med 5.0 μM Ivermectin, var det 40% reduksjon i cellevekst basert på celledelling etter 72 timer. Dette resultatet tyder på en betydelig effekt på celleveksten, i form av reduksjon i celledelling. Cellene dyrket i vekstmedium med 7.5 μM Ivermectin, hadde 53% reduksjon i cellevekst basert på celledelling, sammenlignet med kontrollene. Siden dette bare er en reduksjon på 13% fra 5.0 μM Ivermectin, ble det bestemt at det ikke er hensiktsmessig å gå videre med denne konsentrasjonen, da den i tillegg ville krysset den kjente klinisk trygge grensen. Grunnet disse observasjonene, ble det bestemt å gå bort fra 2.5 μM og 7.5 μM , og undersøke 5.0 μM videre.

Grovscreeningen ble gjennomført med 4 paralleller for hver av de tre Ivermectinkonsentrasjonene, som ikke gir stort nok grunnlag til å gjennomføre t-test for å undersøke statistisk signifikant variasjon. Resultatet kan derfor være basert på tilfeldig variasjon. I og med at Caco-2-cellene klumper seg, og ikke løser seg fullstendig fra hverandre under trypsinering, blir det utfordrende å distribuere cellene likt ved overføring til nye

celleflasker i splittingen. Cellesuspensjonen ble derfor alltid pipettert opp og ned flere ganger, i et forsøk på å distribuere cellene likt, men det hadde lite effekt, da cellene ikke løsnet fra hverandre. Dette kan ha hatt stor påvirkning på resultatene gjennom celleforsøket, da det ikke var mulig å estimere eksakt antall celler/ml overført i nye celleflasker for videre dyrking. Dette påvirket også celletellingen.

Studiet som har vært brukt til å vurdere toleransegrensen hos mennesker for Ivermectin var basert på undersøkelser på friske mennesker (41). Det kan tenkes at toleransen hos kreftpasienter med nedsatt immunforsvar kan være noe annerledes enn hos friske mennesker.

5.4 Hovedforsøk

Under celledyrkingen i hovedforsøket ble det tatt utgangspunkt i 40 celleflasker (25cm²). 20 av dem ble dyrket med 5.0 µM Ivermectin, og 20 ble brukt som kontroller. Det ble brukt 20 paralleller av hver for å sikre bredt grunnlag for resultatene, og for gjennomføring av t-test på celledtall og resultatene fra flowcytometrianalysen. Noen av parallellene ble tatt ut etter 24 og 48 timer for å bli telt og få vurdert konfluens. Siden grovscreeningen resulterte i celleflasker med svært varierende konfluens, og det ikke ble gjennomført celletelling, var det ikke mulig å avgjøre reduksjon i vekst etter 24, 48 eller 72 timer. Tidsbegrensning gjorde at forsøket måtte avsluttes etter 72 timer, da laboratoriearbeid måtte gjennomføres mellom 08:00 og 16:00 på hverdager. Det ble dermed valgt å telle celler etter 24 og 48 timer i hovedforsøket, siden det er en mer nøyaktig metode for å vurdere cellemengden. 12 paralleller av celler dyrket med Ivermectin og 12 paralleller av kontrollene, ble fiksert og analysert i flowcytometeret. Når det ble oppdaget celleflasker med vekst som skilte seg fra de andre i form av overvekst, ble disse forkastet, og byttet ut med celleflasker dyrket som reserve. Dette for å sikre et sammenlignbart resultat fra hovedforsøket, med nok paralleller.

5.4.1 Celletelling

Etter celletelling, ble det observert stor variasjon i celledtall, selv etter at det ble forsøkt å kontrollere celleantallet før splitting. Celledtallene fra prøvene dyrket med 5.0 µM Ivermectin, ble sammenlignet med kontrollene, ved hjelp av paret t-test. For å gjennomføre paret t-test må det være like mange verdier for hver av variablene. I og med at én av prøvene med Ivermectin måtte forkastes på grunn av at cellene klumpet seg sammen, ble det bestemt å ta et gjennomsnitt av alle de gyldige tellingene for prøvene med 5.0 µM Ivermectin, for å få et tall

å sette inn for denne. Da ble det like mange verdier for Ivermectin som for kontroller. Resultatet fra t-testen ble $p=0.004889$. Dette er godt innenfor $\alpha=0.05$, som ble satt som signifikansnivå. Dette ble satt som signifikansnivå basert på oppfatningen, om at det å bruke $\alpha=0.05$, er normalen i denne typen statistiske analyser (46). Det ble gjort for å vurdere om den variasjonen som oppstod var tilfeldig eller statistisk signifikant. $p<0.05$ viser at variasjonen er statistisk signifikant, men $p>0.05$ tyder på tilfeldig variasjon.

I og med at det manglet en verdi ble det satt opp en alternativ paret t-test for å kvalitetssikre resultatet av den første t-testen, og undersøke om den ga et representativt resultat. I denne t-testen ble celletallet for prøve 6 blant kontrollene fjernet, da denne var nærmest gjennomsnittsverdien, for å få likt antall verdier. Dersom man fjerner en verdi nært gjennomsnittet til et av datasettene, vil standardavviket øke, og resultatet forskyves slik at p blir større, og usikkerheten reduseres, da $p<0.05$ blir vanskeligere å oppnå. Resultatet av denne ble $p=0.018597$, som også er innenfor det satte signifikansnivået. Ved å utføre t-testen på denne måten, blir det vanskeligere å få statistisk signifikant variasjon. Når begge t-testene viser statistisk signifikant variasjon, kan det tyde på at det er en faktisk forskjell i celletall mellom cellene dyrket i Ivermectin og kontrollene. Reduksjonen i celletall for cellene dyrket med $5.0 \mu\text{M}$ Ivermectin, er dermed ikke tilfeldig ifølge t-testene.

5.4.2 Fiksering av Caco-2-celler til cellesyklusanalyse

Fikseringen ble gjennomført etter vekstforsøk og tok utgangspunkt i fikseringsprosedyre hentet fra bacheloroppgave skrevet ved NTNU Ålesund i 2022 (35) under arbeid med cellelinjen A549. Denne prosedyren har et vaskesteg mindre enn liknende prosedyrer, og ble valgt for å ivareta effektivitet under fiksering, og dermed kvaliteten på de fikserte cellene. Det ble også diskutert om et ekstra vasketrinn kunne føre til at flere av cellene ville klynge seg sammen i celleklumper, og dermed påvirke resultatene i cellesyklusanalysen negativt, i form av dubletter og cellerester. Det er ikke funnet studier som omtaler fiksering av Caco-2-celler, dermed ble cellesuspensjonen sentrifugert ved 1200 rpm, basert på prosedyren laget for A549-celler, som er beskrevet over (35). Det ble observert at cellene brukte lang tid på å rehydrere i PBS, potensielt fordi cellene festet seg til hverandre under sentrifugering. Én studie (47) viser bruk av 1200 rpm ved sentrifugering av Caco-2. Det ble derfor bestemt å bruke dette videre, istedenfor å redusere sentrifugeringshastighet, selv om cellene var vanskelige å rehydrere. Resultatene fra cellesyklusanalysen på flowcytometeret hadde tilsynelatende ingen negativ

effekt av sentrifugeringen. Etter at cellene var fiksert måtte farging med PI utsettes i 3 døgn, på grunn av utilgjengelig flowcytometer den aktuelle dagen, og påfølgende helg. Cellene ble dermed oppbevart på kjølerom ved 4°C etter fiksering, slik at alle cellene kunne analyseres samme dag.

5.4.3 Cellesyklusanalyse med Attune™ NxT Acoustic Focusing Cytometer

Etter fiksering av cellene, ble de analysert i flowcytometeret. Samme dagen som fiksering, ble de første prøvene brukt for å stille inn riktig spenning over detektorene, for detektering av Caco-2-celler. Spenningen ble justert til plottene visuelt lignet på det som ble forventet å se basert på opplæring på flowcytometeret, og gater ble satt inn etter det vi mente var hovedpopulasjonen av celler.

Alle prøvene med og uten Ivermectin ble analysert med innstillingene og gatene som ble stilt inn etter de første prøvene, og resultatene lagret i flowcytometeret. Restene av hver prøve ble kastet etter at alle prøvene var analysert. I etterkant ble det oppdaget samlinger av celler til venstre og høyre i alle histogrammene, og histogrammene for gatene rundt hovedpopulasjonene viste ikke fordeling i cellesyklusen slik det skal se ut. Dette var uforventet, men ble ikke gjort noe med der og da, da vi ikke visste hva som forårsaket problemet. Etter noen uker ble resultatene sett på av en representant fra firmaet instrumentet var kjøpt fra (Thermo Fisher Scientific). Han kunne informere om at spenningen på flowcytometeret var stilt for høyt for denne celletypen, slik at det som hadde blitt gatet bare var støy i form av cellerester. Tarmkreftceller er store celler, som reduserer behovet for signal-amplifisering. Spenningen må derfor være lavere. Tarmkreftcellene er større enn celletypen som ble brukt under opplæring på flowcytometeret. Det forklarer hvorfor denne høye spenningen for Caco-2-cellene ble prøvd. I og med at vi fikk en populasjon som lignet på det vi forventet, lot vi denne spenningen stå. Det ble satt en ny gate oppe i høyre hjørne av plottet, da det var her cellene av interesse befant seg. Siden de riktige cellene ikke var gatet under analysing av prøven, vil det være støy sammen med cellene i den nye gaten. De nye gatene ga nye histogram, som viste fordeling av celler i cellesyklusen mye tydeligere enn histogrammene tilhørende de gamle gatene.

For å rette opp i feilen burde alle prøvene blitt analysert på nytt i flowcytometert, med riktig spenning og gating. Dette lot seg ikke gjøre da prøvene var kastet etter analysen, og tidsbegrensing gjorde at celleforsøket ikke kunne gjennomføres på nytt. Dersom prøverestene

hadde blitt bevart etter analyseringen kunne disse prøvene blitt analysert på nytt med riktig spenning. Det kunne gitt mer pålitelige resultater. Tilsynelatende er omtrent 50% av målingene flowcytometeret gjorde, hele Caco-2-celler, og ikke støy i form av cellerester. Selv om vi i utgangspunktet ikke fikk gatet de riktige cellene, skal dette være nok resultater til at de kan vurderes og bearbeides videre. En ulempe ved at cellene ikke ble gatet riktig under analyse, er at det ikke kan skilles mellom dubletter og enkeltceller. Dette fører til at dubletter av celler som egentlig er i G1/G0-fasen vil registreres i histogrammet i toppen for G2/M-fasen, da de har to sett kromosomer til sammen. Normalt ville alle dubletter blitt fjernet ved hjelp av gating, og resultatene er dermed noe mer usikre. Det ble likevel vurdert at dette vil være likt for cellene dyrket med Ivermectin, som for kontrollene, som gjør at resultatene er sammenlignbare.

Etter omregning slik at «%Gated» fra de ulike cellefasene i cellesyklusen utgjorde 100%, ble det gjennomført en parret t-test på prosentene, og resultatet viste at det ikke var statistisk signifikant forskjell i fordeling i cellesyklus mellom cellene dyrket med Ivermectin og kontrollene. I t-testen ble hver fase hos cellene dyrket med Ivermectin, sammenlignet med de samme fasene hos kontrollene. Validiteten av resultatene kan diskuteres, siden det med stor sannsynlighet ble med støy i «%Gated», for hver cellefase. Flowcytometeret som ble brukt i studien er helt nytt, med ny teknologi. Arbeidet som ble gjort under cellesyklusanalysen anses som et ledd i innføring og optimalisering av prosedyren på instrumentet.

5.5 Videre forskning

Det kunne vært hensiktsmessig å gjøre studier av Caco-2-celler som ser på celleveksten over lengre tid. I denne studien ble cellesyklusen hos Caco-2-cellene analysert etter dyrkning med Ivermectin i 72 timer. Denne analysen viser bare et øyeblikksbilde av fordeling av celler i cellesyklusen, i den totale populasjonen. Det kan ha vært endringer i cellesyklusen ved tidligere tidspunkt i dyrkningsprosessen, som dermed ikke ville blitt fanget opp i cellesyklusanalysen.

For en mer grundig forståelse av hvordan Ivermectin påvirker vekst av Caco-2-celler kunne det vært aktuelt å utføre en analyse rettet mot genekspressjon av apoptosefaktorer og tumorsupressorgener. Dette kunne gitt en grundigere forståelse av hvordan Ivermectin påvirker cellene og hvorfor det ikke ble registrert en cellesyklusarrest i denne studien.

6 Konklusjon

For å undersøke om legemiddelet Ivermectin har en reduserende effekt på celleveksten til tarmkreftcellene Caco-2, ble det gjennomført en optimalisering av vekst på cellelinjen, før Ivermectin ble innført. Cellene ble dyrket videre med 5.0 μM Ivermectin i 25 cm^2 celleflasker i 72 timer. Etter celledelling ble det funnet en statistisk signifikant reduksjon av cellevekst. Det ble derimot ikke registrert statistisk signifikante endringer i cellesyklusen etter cellesyklusanalyse med flowcytometer, som videre kunne tydet på cellesyklusarrest. Caco-2-cellene klenger seg til hverandre, noe som kan gi utfordringer i denne metoden og dermed må tas hensyn til, da det fører til store variasjoner i celledistribusjon under splitting og telling. Det kunne dermed vært nyttig å undersøke andre metoder for splitting av denne cellelinjen, for å optimalisere prosedyren, og sørge for lik celledistribusjon. For videre forskning på Ivermectin i forbindelse med tarmkreft, kunne det vært interessant å se på reduserende effekt i cellevekst og endring i celleproliferasjon, i mer omfattende studier på Caco-2-celler og hos andre cellelinjer isolert fra tarmkreft. Det er også mulig å se på genekspresjon av apoptosefaktorer og tumorsuppressorgener.

7 Referanser

1. Kreftforeningen. Hva er kreft? [Internett]. Kreftforeningen. 2023 [sitert 19. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://kreftforeningen.no/om-kreft/hva-er-kreft/>
2. Martin RJ, Robertson AP, Choudhary S. Ivermectin: An Anthelmintic, an Insecticide, and Much More. *Trends Parasitol.* 1. januar 2021;37(1):48–64.
3. Juarez M, Scholnik-Cabrera A, Dueñas-Gonzalez A. The multitargeted drug ivermectin: from an antiparasitic agent to a repositioned cancer drug. *Am J Cancer Res.* 1. februar 2018;8(2):317–31.
4. Zhang P, Zhang Y, Liu K, Liu B, Xu W, Gao J, mfl. Ivermectin induces cell cycle arrest and apoptosis of HeLa cells via mitochondrial pathway. *Cell Prolif.* 2019;52(2):e12543.
5. Lotfollahzadeh S, Recio-Boiles A, Cagir B. *Colon Cancer. I: StatPearls* [Internett]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [sitert 19. april 2023]. Tilgjengelig på: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470380/>
6. Alghamdi HA, Al-Zharani M, Aljarba NH, Alghamdi AA, Alghamdi AA, Aldahmash BA, mfl. Efficacy of ivermectin against colon cancer induced by dimethylhydrazine in male wistar rats. *Saudi Pharm J.* 1. september 2022;30(9):1273–82.
7. Tarmkreft - Helsenorge [Internett]. [sitert 4. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.helsenorge.no/sykdom/kreft/tarmkreft/#arsak-forebygging-og-risiko>
8. Tykk- og endetarmskreft [Internett]. [sitert 21. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.kreftregisteret.no/Temasider/kreftformer/Tykk--og-endetarmskreft/>
9. Tarmkreft [Internett]. 2019 [sitert 21. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.helsenorge.no/sykdom/kreft/tarmkreft/>
10. Hofslie E, Klepp O. tykktarmskreft. I: *Store medisinske leksikon* [Internett]. 2023 [sitert 26. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://sml.snl.no/tykktarmskreft>
11. Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, mfl., redaktører. *The Impact of Food Bioactives on Health* [Internett]. Cham: Springer International Publishing; 2015 [sitert 26. april 2023]. Tilgjengelig på: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-16104-4>
12. Lea T. Caco-2 Cell Line. I: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, mfl., redaktører. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models* [Internett]. Cham: Springer International Publishing; 2015 [sitert 4. mai 2023]. s. 103–11. Tilgjengelig på: https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_10
13. Sun H, Chow EC, Liu S, Du Y, Pang KS. The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 1. april 2008;4(4):395–411.
14. Sandal T. Regulert celledød. *Tidsskr Den Nor Legeforening* [Internett]. 12. juni 2003 [sitert 19. april 2023]; Tilgjengelig på: <https://tidsskriftet.no/2003/06/doktoravhandlinger/regulert-celledod>
15. Verma A, Verma M, Singh A. Chapter 14. Animal tissue culture principles and applications | Elsevier Enhanced Reader [Internett]. ScienceDirect. [sitert 19. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/B9780128117101000124?token=D3EC05F87C294455AD054690B092D6C2C66F971FB7FAA500BEE9F06E7962E125B1DBC095757D46D7A4F943672774F94E&originRegion=eu-west-1&originCreation=20230419180617>
16. Olejnik A, Lewandowska M, Grajek W, Czaczyk K. NEW RAPID METHOD OF CACO-2 CELL DIFFERENTIATION. *Pol J Food Nutr Sci.* 31. mars 2003;53(1s):60–4.
17. Natoli M, Leoni BD, D’Agnano I, Zucco F, Felsani A. Good Caco-2 cell culture practices. *Toxicol In Vitro.* 1. desember 2012;26(8):1243–6.
18. ATCC. Caco-2 [Caco2] - HTB-37 | ATCC [Internett]. [sitert 26. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.atcc.org/products/htb-37>

19. Alberts B, Hopkin K, Johanson A, Morgan D, Raff M, Roberts K, mfl. *Essential Cell Biology*. 5th utg. W.W. Norton & Company Ltd; 2019. 612 s.
20. NCI. Definition of cell proliferation - NCI Dictionary of Cancer Terms - NCI [Internett]. 2011 [sitert 26. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/cell-proliferation>
21. 10.2 The Cell Cycle - Biology | OpenStax [Internett]. [sitert 4. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://openstax.org/books/biology/pages/10-2-the-cell-cycle>
22. Vartholomatos G, Alexiou GA, Lianos GD, Harissis H, Kyritsis AP, Voulgaris S. Intraoperative cell cycle analysis for tumor margins evaluation: The future is now? *Int J Surg*. mai 2018;53:380.
23. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*. 17. februar 2017;37(2):163–76.
24. Jahan-Tigh RR, Ryan C, Obermoser G, Schwarzenberger K. Flow Cytometry. *J Invest Dermatol*. 1. oktober 2012;132(10):1–6.
25. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*. 21. februar 2018;120:5.1.1-5.1.11.
26. 100024235_AttuneNxT_HW_UG.pdf [Internett]. [sitert 20. april 2023]. Tilgjengelig på: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/100024235_AttuneNxT_HW_UG.pdf
27. Ward og Kaduchak - 2018 - Fundamentals of Acoustic Cytometry.pdf [Internett]. [sitert 11. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Reference-Materials/acoustic-focusing-multiparameter-flow-cytometry-white-paper.pdf?fbclid=IwAR05cnfGtZSoj7hl-d7hOwd6AGQB-KTj5ozlPwFv-SgNDW0kWyhZj0bxcHQ>
28. FxCycle™ PI/RNase Staining Solution [Internett]. [sitert 4. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/F10797>
29. cell-cycle-assay-with-propidium-iodide.pdf [Internett]. [sitert 5. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.nexcelom.com/wp-content/uploads/2019/09/cell-cycle-assay-with-propidium-iodide.pdf>
30. Blasi T, Hennig H, Summers HD, Theis FJ, Cerveira J, Patterson JO, mfl. Label-free cell cycle analysis for high-throughput imaging flow cytometry. *Nat Commun*. 7. januar 2016;7(1):10256.
31. CRUMP A, ŌMURA S. Ivermectin, ‘Wonder drug’ from Japan: the human use perspective. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 10. februar 2011;87(2):13–28.
32. Norsk legemiddelhåndbok. L1.6.6 Ivermectin | Legemiddelhåndboka [Internett]. L1.6.6 Ivermectin. [sitert 26. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.legemiddelhandboka.no/L1.6.6/Ivermectin>
33. Drugs.com. Ivermectin (Systemic) Monograph for Professionals [Internett]. Drugs.com. [sitert 27. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.drugs.com/monograph/ivermectin-systemic.html>
34. Priel A, Silberberg SD. Mechanism of Ivermectin Facilitation of Human P2X4 Receptor Channels. *J Gen Physiol*. 9. februar 2004;123(3):281–93.
35. Akre SB, Andersen VD, Dvergsdal S, Ulvang ML. En studie av effekten ivermectin har på celleproliferasjon og cellyklus til A549-celler [Internett] [Bachelor thesis]. NTNU; 2022 [sitert 27. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://ntnuopen.ntnu.no/ntnu-xmlui/handle/11250/3004220>
36. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*. februar 1999;6(2):99–104.
37. Brady HJM, Gil-Gómez G. Molecules in focus Bax. The pro-apoptotic Bcl-2 family member, Bax. *Int J Biochem Cell Biol*. 12. juni 1998;30(6):647–50.

38. Hardwick JM, Soane L. Multiple Functions of BCL-2 Family Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* februar 2013;5(2):a008722.
39. Laing R, Gillan V, Devaney E. Ivermectin – Old Drug, New Tricks? *Trends Parasitol.* juni 2017;33(6):463–72.
40. Taylor HR. Ivermectin treatment of onchocerciasis. *Aust N Z J Ophthalmol.* november 1989;17(4):435–8.
41. Guzzo CA, Furtek CI, Porras AG, Chen C, Tipping R, Clineschmidt CM, mfl. Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Escalating High Doses of Ivermectin in Healthy Adult Subjects. *J Clin Pharmacol.* 2002;42(10):1122–33.
42. Fetal Bovine Serum (FBS) - NO [Internett]. [sitert 16. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.thermofisher.com/uk/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/fbs.html>
43. Connolly A, Hempling HG. The effects of dimethyl sulfoxide on the osmotic properties of a rat megakaryocytopoietic cell line. *Cryobiology.* 1. august 1985;22(4):351–8.
44. Kielberg V. Cryopreservation of Mammalian Cells – Protocols. Tech Note [Internett]. 2010 [sitert 11. mai 2023];No. 14. Tilgjengelig på: <https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/Application-Notes/D19575.pdf>
45. Kreftforeningen. Kliniske studier [Internett]. Kreftforeningen. 2023 [sitert 16. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://kreftforeningen.no/om-kreft/behandling/kliniske-studier/>
46. Pripp AH. Hvorfor p-verdien er signifikant. *Tidsskr Den Nor Legeforening* [Internett]. 8. september 2015 [sitert 11. mai 2023]; Tilgjengelig på: <https://tidsskriftet.no/2015/09/kronikk/hvorfor-p-verdien-er-signifikant>
47. Rashidi L, Vasheghani-Farahani E, Soleimani M, Atashi A, Rostami K, Gangi F, mfl. A cellular uptake and cytotoxicity properties study of gallic acid-loaded mesoporous silica nanoparticles on Caco-2 cells. *J Nanoparticle Res.* 2. februar 2014;16(3):2285.

Vedlegg

A.1 Reagenser

Tabell 5. Oversikt over reagenser, med produsent og artikkelnummer.

Navn	Produsent	REF-nr.
Fetal Bovine Serum	Gibco	A3840401
Penicillin-Streptomycin	Gibco	15140-122
HBSS	Gibco	14175-095
DMEM/F-12	Gibco	11320-033
PBS	Sigma- Aldrich	D8537
Trypsin-EDTA (0.25%) phenol red	Gibco	25200056
Ivermectin	Sigma- Aldrich	I8898
DMSO LC-MS grade	Thermo Scientific	85190
Performance Tracking Beads	Attune	449754
Focusing Fluid	Invitrogen	4488621
Attune Bleach	Invitrogen	4467467

A.2 Prosedyrer

A.2.1 Rutiner på cellelaboratoriet

Prosedyren beskriver rutiner for arbeid på cellelaboratoriet under aseptiske forhold. Den brukes for å forhindre kontaminasjon og spredning av celler til rundt om på cellelaboratoriet og ut av laboratoriet. Prosedyren er hentet fra er hentet fra laboratoriekurs i emnet Anvendt Bioteknologi (Emnekode MB301712) ved NTNU Ålesund og er utarbeidet av Gro Audveig Hagen Bjørnøy ved Institutt for biologiske fag. Prosedyren er oversatt fra engelsk.

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 hansken. 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 LAFbenken 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 LAFbenken 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 trenger å prate.
12. Arbeid så raskt som mulig, men det skal selvfølgelig ikke gå på bekostning av 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 LAFbenken og lukk døra.
14. Spray golvet på cellelaben med klorinspray 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 og overføring av celler

Prosedyren beskriver oppstart av vekstforsøk fra mottakelse av Caco-2-celler fra Møreforskning til tining og overføring til 25 cm² celleflaske for videre dyrkning. Cellene ble transportert på is. Prosedyren er for å minske sjansene for død blant cellene. Prosedyren er utarbeidet sammen med Gro Audveig Hagen Bjørnøy ved Institutt for biologiske fag ved NTNU Ålesund, og er tilrettelagt for Caco-2-celler.

1. DMEM/F12-vekstmedium modifisert med Penicillin-Streptomycin (*Gibco, a.nr. 15140-122*) og “Fetal Bovine Serum” (*Gibco, a.nr. A3840401*) overføres til 25 cm² celleflaske og satt i inkubasjonsskap ved 37 °C og 5% CO₂ for oppvarming.
2. Desinfiser beholder med fryste Caco-2-celler før overføring til LAF-benk.
3. Caco-2-celler tines ved romtemperatur.
4. Overfør 1 ml forvarmet modifisert DMEM/F12-vekstmedium til beholder med Caco-2-celler, og pipetter så opp og ned.
5. Pipetter 1 ml av hele cellesuspensjonen med Caco-2-celler over i 25 cm² celleflasker med 6 ml forvarmet DMEM/F12-vekstmedium.
6. Celleflaske med Caco-2-celler settes i inkubasjonsskap ved 37 °C og 5% CO₂ i 24 timer.
7. Vekstmedium byttes etter 24 timer.

A.2.3 Splitting av celler

Prosedyren beskriver prosessen for dyrking og splitting av Caco-2-celler under aseptiske forhold i 25 cm² celleflasker. Prosedyren er hentet fra laboratoriekurs i emnet Anvendt Bioteknologi (Emnekode MB301712) ved NTNU Ålesund og er utarbeidet av Gro Audveig Hagen Bjørnøy ved Institutt for biologiske fag. Prosedyren er oversatt fra engelsk.

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 invertermikroskop.
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 invertermikroskopet. Når ca.
10. 80% av cellene har løsnet, inaktiveres Trypsinet ved å tilsette 4 ml medium. NB! Dette må gjøres i LAF-benk.
11. Bland forsiktig cellekulturen ved å pipettere rolig opp og ned og overfør den så til et 15ml Falconrør. Skru på korken godt!
12. Sentrifuger celleduspensjonen på 1200 rpm i 3 minutter.
13. Det skal nå dannes en tydelig cellepellet. Fjern supernatanten over cellepelleten og kast den i spillbegeret. Vær forsiktig så du ikke suger opp pelleten!
14. Tilsett 1 ml medium og pipetter opp og ned for å løsne pelleten.
15. Tilsett 1 ml medium og pipetter forsiktig opp og ned.
16. Tilsett 6 ml medium til en ren, tom 25 cm² celleflaske og tilsett 1 ml celleduspensjon. Dette gjentas for flaske nummer 2. Roter flaskene horisontalt for å blande.
17. Sett begge celleflaskene i CO₂-inkubator på 37°C.

18. 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 av Caco-2-celler til cellesyklusanalyse

Prosedyren beskriver fremgangsmåten for fiksering og preparering av Caco-2-celler før analyse på flowcytometer. Prosedyren er hentet fra bacheloroppgaven «En studie av effekten Ivermectin har på celleproliferasjon og cellesyklus til A549 -celler» skrevet av Sindre Bech Akre, Vegard Dammen Andersen, Synnøve Dvergsdal og Marit Louise Ulvang (35), 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 mørket.

A.2.5 Kalibrering av Attune™ NxT Acoustic Focusing Cytometer

Prosedyren beskriver fremgangsmåten for kalibrering av Attune™ NxT Acoustic Focusing Cytometer. Den er hentet fra «Attune™ NxT Acoustic Focusing Cytometer User Guide» (26), og oversatt fra engelsk til norsk.

1. Åpne «Instrument» fanen.
2. Trykk «Run Startup».
3. Hvis «Tube lift» er oppe, skal denne senkes.
4. Trykk så «Next». Maskinen sier fra når «Startup» er ferdig, og man skal da gå videre.
5. Gå til forsiden og trykk «Performance Test».
6. Velg riktig «bead» fil basert på LOT-nr og de beadene bruker har (LOT skal være det samme).
7. Rist flasken med Attune™ Performance Tracking Beads» (*Attune, a.nr. 449754*) og tilsett 3 dråper til 2 ml “Focusing Fluid” (*Invitrogen, a.nr. 4488621*) i et prøverør, og bland forsiktig med vortexing.
8. Sett røret med focusing fluid og beads i «Tube Lift» og heis den opp.
9. Trykk «Run Baseline» og la maskinen være i fred til den er ferdig.

A.3 Resultater

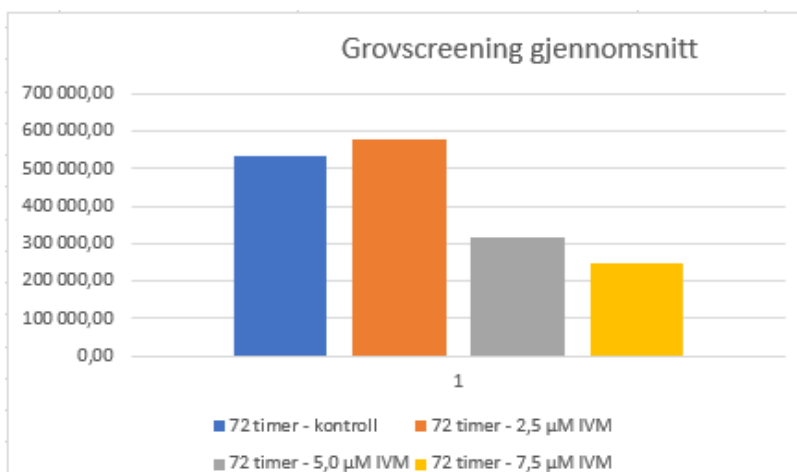
A.3.1 Celletelling ved grovscreening

Tabell 6. Tabellen viser alle prøver fra grovscreeningen, med dato og tidsintervall. Den viser totalt antall celler i celleflaskene, basert på telte celler i tellekammer og volum i prøveløsning. Prøvene er tatt fra dyrking av Caco-2-celler med Ivermectin av ulike konsentrasjoner, dyrket i 25 cm² celleflasker.

Tid	Dato	Prøve	Volum i falconrør	Celler i tellekammer	Totalt antall celler
0,00	44 988,00	72 timer - kontroll A	4,5 ml	111,00	555 000,00
	44 988,00	72 timer - kontroll B	4,5 ml	96,00	480 000,00
	44 988,00	72 timer - kontroll C	4,5 ml	117,00	585 000,00
	44 988,00	72 timer - kontroll D	4,5 ml	102,00	510 000,00
1,00	44 988,00	72 timer - 2,5 µM IVM A	4,5 ml	97,50	487 500,00
	44 988,00	72 timer - 2,5 µM IVM B	4,5 ml	90,00	450 000,00
	44 988,00	72 timer - 2,5 µM IVM C	4,5 ml	137,00	685 000,00
	44 988,00	72 timer - 2,5 µM IVM D	4,5 ml	137,00	685 000,00
2,00	44 988,00	72 timer - 5,0 µM IVM A	4,5 ml	37,50	187 500,00
	44 988,00	72 timer - 5,0 µM IVM B	4,5 ml	93,00	465 000,00
	44 988,00	72 timer - 5,0 µM IVM C	4,5 ml	70,00	350 000,00
	44 988,00	72 timer - 5,0 µM IVM D	4,5 ml	55,00	275 000,00
3,00	44 988,00	72 timer - 7,5 µM IVM A	4,5 ml	63,00	315 000,00
	44 988,00	72 timer - 7,5 µM IVM B	4,5 ml	38,00	190 000,00
	44 988,00	72 timer - 7,5 µM IVM C	4,5 ml	29,00	145 000,00
	44 988,00	72 timer - 7,5 µM IVM D	4,5 ml	70,00	350 000,00

Tabell 7. Tabellen viser gjennomsnitt for hver av prøvegruppene (2.5, 5.0 og 7.5 µM IVM og kontroller). Gjennomsnittet baserer seg på resultater fra celletelling, vist i tabell 8.

Prøvegruppe	Gjennomsnitt totalt antall celler
72 timer - kontroll	532 500,00
72 timer - 2,5 µM IVM	576 875,00
72 timer - 5,0 µM IVM	319 375,00
72 timer - 7,5 µM IVM	250 000,00



Figur 13. Figuren er en visuell fremvisning av gjennomsnitt for totalt antall celletall i celleflaskene dyrket med 2.5, 5.0 og 7.5 µM Ivermectin, og kontroller. Cellene var dyrket i 25 cm² celleflasker.

A.3.2 Cellesyklusanalyse ved hovedforsøk

Tabell 8. Tabellen viser rådata fra cellesyklusanalysen, og viser fordeling i cellesyklusen for Caco-2-celler dyrket med 5.0 μ M Ivermectin. Sum annet viser alle avlesinger gjort av flowcytometeret utenfor satte gater.

Med ivermectin	G1/G0	S	G2/M	Sum annet
1	24,10 %	9,07 %	14,03 %	52,80 %
2	21,40 %	9,21 %	13,83 %	55,56 %
3	21,32 %	9,77 %	14,15 %	54,76 %
4	22,86 %	9,30 %	17,10 %	50,74 %
5	28,67 %	10,82 %	13,70 %	46,81 %
6	25,21 %	11,13 %	16,60 %	47,06 %
7	20,95 %	10,00 %	15,02 %	54,03 %
8	26,96 %	12,30 %	17,74 %	43,00 %
9	28,17 %	13,13 %	17,34 %	41,36 %
10	19,90 %	9,25 %	15,60 %	55,25 %
11	20,92 %	8,52 %	14,32 %	56,24 %
12	28,88 %	13,29 %	17,72 %	40,11 %

Tabell 9. Tabellen viser rådata fra cellesyklusanalysen, og viser fordeling i cellesyklusen for Caco-2-celler dyrket uten Ivermectin, kontroller. Sum annet viser alle avlesninger gjort av flowcytometeret utenfor satte gater.

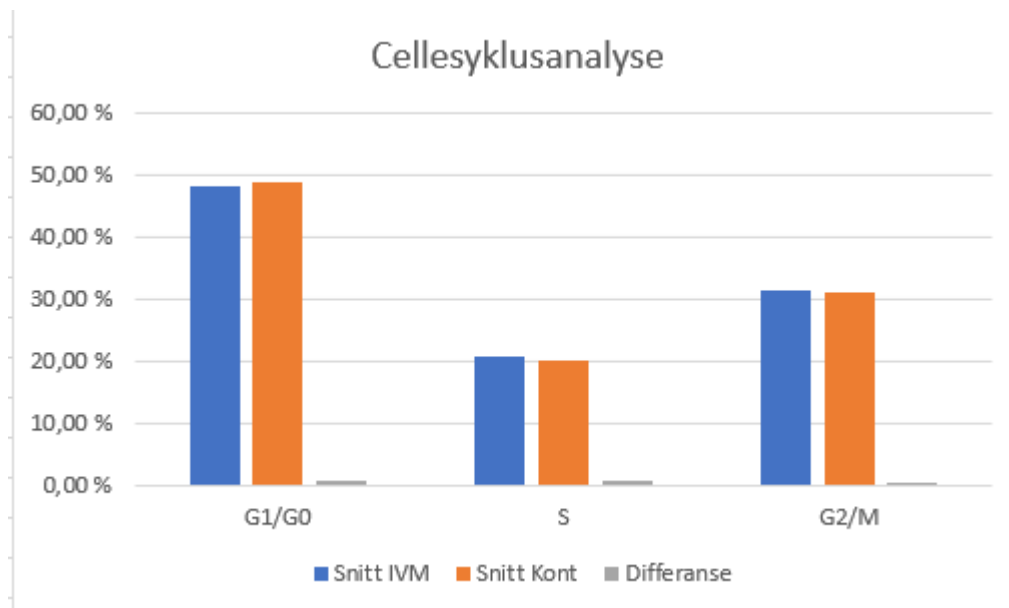
Kontroll	G1/G0	S	G2/M	Sum annet
1	22,04 %	8,93 %	14,25 %	54,78 %
2	21,91 %	8,07 %	14,99 %	55,03 %
3	26,09 %	9,92 %	15,28 %	48,71 %
4	22,43 %	9,89 %	14,27 %	53,41 %
5	24,38 %	10,70 %	16,28 %	48,64 %
6	29,38 %	11,58 %	17,31 %	41,73 %
7	23,18 %	8,35 %	13,91 %	54,56 %
8	23,60 %	10,57 %	16,00 %	49,83 %
9	24,64 %	11,76 %	16,30 %	47,30 %
10	28,15 %	11,18 %	16,49 %	44,18 %
11	24,15 %	10,36 %	17,47 %	48,02 %
12	26,44 %	11,14 %	15,90 %	46,52 %

Tabell 10. Prosentvis fordeling innenfor de ulike cellefasene, fra cellesyklusanalysen på Attune™ NxT Acoustic Focusing Cytometer. Resultatene er fra 12 paralleller dyrket med 5.0 µM Ivermectin i 72 timer. Nederst i tabellen inkluderes gjennomsnitt for alle prøvene.

Med ivermectin	Sum	%G1	%S	%G2	
1	47,20 %	51,06 %	19,22 %	29,72 %	100,00 %
2	44,44 %	48,15 %	20,72 %	31,12 %	100,00 %
3	45,24 %	47,13 %	21,60 %	31,28 %	100,00 %
4	49,26 %	46,41 %	18,88 %	34,71 %	100,00 %
5	53,19 %	53,90 %	20,34 %	25,76 %	100,00 %
6	52,94 %	47,62 %	21,02 %	31,36 %	100,00 %
7	45,97 %	45,57 %	21,75 %	32,67 %	100,00 %
8	57,00 %	47,30 %	21,58 %	31,12 %	100,00 %
9	58,64 %	48,04 %	22,39 %	29,57 %	100,00 %
10	44,75 %	44,47 %	20,67 %	34,86 %	100,00 %
11	43,76 %	47,81 %	19,47 %	32,72 %	100,00 %
12	59,89 %	48,22 %	22,19 %	29,59 %	100,00 %
	Snitt	47,97 %	20,82 %	31,21 %	

Tabell 11. Prosentvis fordeling innenfor de ulike cellefasene, fra cellesyklusanalysen på Attune™ NxT Acoustic Focusing Cytometer. Resultatene er fra 12 paralleller av kontroller, dyrket under normale vekstforhold i 72 timer. Nederst i tabellen inkluderes gjennomsnitt for alle prøvene.

Kontroll	Sum	%G1	%S	%G2	
1	45,22 %	48,74 %	19,75 %	31,51 %	100,00 %
2	44,97 %	48,72 %	17,95 %	33,33 %	100,00 %
3	51,29 %	50,87 %	19,34 %	29,79 %	100,00 %
4	46,59 %	48,14 %	21,23 %	30,63 %	100,00 %
5	51,36 %	47,47 %	20,83 %	31,70 %	100,00 %
6	58,27 %	50,42 %	19,87 %	29,71 %	100,00 %
7	45,44 %	51,01 %	18,38 %	30,61 %	100,00 %
8	50,17 %	47,04 %	21,07 %	31,89 %	100,00 %
9	52,70 %	46,76 %	22,31 %	30,93 %	100,00 %
10	55,82 %	50,43 %	20,03 %	29,54 %	100,00 %
11	51,98 %	46,46 %	19,93 %	33,61 %	100,00 %
12	53,48 %	49,44 %	20,83 %	29,73 %	100,00 %
	Snitt	48,79 %	20,13 %	31,08 %	



Figur 14. Figuren viser gjennomsnitt av fordeling av celler i cellefasene, for celler dyrket med og uten (kontroll) Ivermectin. Gjennomsnitt for Caco-2-celler dyrket med Ivermectin vises i blått, og gjennomsnitt for kontroller vises i oransje. I tillegg vises differanse i grått.

