

Alfa-radioimmunterapi

*Effekten av det α -emitterende radioimmunkonjugatet ^{227}Th -
DOTA-Herceptin på ovarie kreftceller*

Hans Magnus Hopen



Masteroppgave
for graden
Master i Fysikk

FYSISK INSTITUTT
UNIVERSITETET I OSLO

Mars 2009

Forord

Arbeidet med denne masteroppgaven i biofysikk og medisinsk fysikk ved Universitetet i Oslo ble utført ved avdeling for Strålingsbiologi, Institutt for Kreftforskning, ved Radiumhospitalet, Rikshospitalet.

Jeg vil først og fremst takke min veileder Jostein Dahle for kritisk og entusiastisk veiledning under arbeidet. Det har virkelig vært inspirerende å skrive oppgave under deg! Jeg vil også takke internveileder, professor Erik O. Pettersen ved fysisk institutt, for gode faglige tilbakemeldinger og innspill underveis i oppgaven.

En ekstra takk til Cecilie Krogh og Katrine Melhus for all opplæring på cellelaben, Anne Kristine Hjelmerud for uvurderlig god hjelp under dyreforsøkene og Kirsti Solberg Landsverk for teknisk assistanse ved kjøring av flowcytometri. Jeg vil også takke Randi Syljuåsen som har vært behjelpelig med DNA-transfeksjon, Debbie Hege Svendsrud for kjøring av PCR og sist, men ikke minst Jørgen Borrebæk og Åsmund Larsen ved Algeta ASA for å ha laget radioimmunkonjugatene og levert dem på døra. Hjertelig takk!

Til slutt vil jeg takke familie og venner for deres oppmuntring og støtte. Jeg vil spesielt takke min kjære Wenche fordi du alltid er god mot meg og at du har tro på meg.

Oslo, mars 2009

Hans Magnus Hopen

Sammendrag

Radioimmunterapi (RIT) benytter seg av konjugater av radionuklider og antistoffer for å avsette terapeutisk stråledose til kreftceller som uttrykker de rette antigenene. Hovedmålet med denne oppgaven var å undersøke effekten av det α -emitterende radioimmunkonjugatet ^{227}Th -Herceptin på ovariekreftceller fra cellelinjen SKOV-3.

Cellenes antigenuttrykk ble undersøkt ved hjelp fluorescensmikroskopi. Deretter ble terapeutisk effekt undersøkt ved å måle cellenes evne til å danne kolonier, samt cellenes veksthastighet, etter behandling med ^{227}Th -Herceptin. Videre ble det målt cellebundet aktivitet fra ^{227}Th -Herceptin over tid for å finne antall decay per celle i terapiforsøkene. Disse dataene ble brukt for å estimere gjennomsnittelig absorbert strålingsdose til cellene ved hjelp av en forenklet mikrodosimetrisk modell. I virkeligheten varierer dosen til cellene svært mye på grunn av statistiske variasjoner. Derfor ble det utviklet en metode for å detektere α -sporene gjennom cellekjernen. Metoden kan gi et mer eksakt svar på antall treff per cellekerne og videre strålingsdosen per celle; SKOV-3-cellene ble transfektert med vektoren pEGFP-C1-53BP1 slik at de overuttrykte et fluorescerende DNA-reparasjonsprotein som oppkonsentreres rundt DNA-skader. Ved hjelp av fluorescensmikroskopi og filmobservasjon kunne antall treff i kjernen og enkeltcellers skjebne følges over tid. Utover dette ble cellenes antigenuttrykk kartlagt ved flowcytometri og sammenlignet med to andre kjente cellelinjer, BT-474 og MCF-7. Videre ble det gjort biodistribusjonsforsøk på mus med implanterte SKOV-3-tumorer for å undersøke opptak av ^{227}Th -Herceptin i tumor og normale organer.

Det var en svak, men signifikant reduksjon i celleoverlevelse ned mot 50-60 % av kontrollen etter behandling med 10-20 kBq/ml ^{227}Th -Herceptin. I samsvar med dette var det også liten effekt av ^{227}Th -Herceptin på cellevekst. Ved samme konsentrasjoner ble det målt cellebundet aktivitet med verdier i området 50-150 Bq/ 10^6 celler ved utsåing til koloniforsøk. Ved måling av cellebundet aktivitet over tid ble det beregnet opp mot 25 henfall per celle i løpet av inkubasjonstiden på 12 dager under koloniforsøkene. Ut fra disse tallene mottok cellekjernene en estimert dose opp mot 60 mGy.

Flowcytometridataene viste en svært bred antigenfordeling blant SKOV-3-cellene. Det betyr at opp mot 50 % av cellene hadde 10 ganger færre antigener enn resten. Disse cellene ville

da få en lavere dose, og dette kan forklare den svake effekten av ^{227}Th -Herceptin. Cellenes korte halveringstid (24 timer) og ^{227}Th -Thoriums relativt lange halveringstid (18,72 dager) vil også bidra til lavere dose da bundet aktivitet per celle raskt vil avta på grunn av celledeling. I tillegg flater SKOV-3-cellene svært mye ut. Dette vil føre til økt avstand mellom aktiviteten og kjernen som igjen reduserer sannsynligheten for treff i kjernen.

Etter transfeksjon av SKOV-3 fluorescerte cellekjernene grønt ved eksitasjon med blått lys. Fluorescensen var imidlertid noe lav, hvilket resulterte i relativt lang lukkertid for å oppnå ønsket eksponering. α -sporene var synlige i 1-3 timer etter at de oppsto, men var tydeligst den første timen. Metoden for å oppdage α -sporene gjennom cellekjernen gjør det mulig å angi en mer eksakt dose til hver enkelt celle, samt å følge enkelcellers utvikling over tid. Dette vil kanskje være en bedre måte å gjøre overlevelsesforsøk på. Metoden bør imidlertid optimaliseres videre for å oppnå høyere fluorescensintensitet.

Biodistribusjonsforsøk på mus viste et opptak på under 5 % av injisert dose/g (% ID/g) i samtlige organer med unntak av lever som hadde maks opptak på ca 8 % ID/g. Aktiviteten gikk raskt ut av blodet som målte 7 % ID/g etter 4 dager og 2,4 % ID/g etter 14 dager. Tumor hadde maks opptak etter 7 dager på 34 % ID/g.

Ytterligere biodistribusjonsforsøk med flere tidspunkt bør imidlertid prøves for å undersøke hvor raskt radioimmunkonjugatet går ut av blodet. Det er også viktig å kartlegge om det er ytterligere opphopning i lever og andre organer samt videre utvikling i tumor. Videre bør det gjøres terapeutiske forsøk på mus med ^{227}Th -Herceptin.

Innhold

FORORD	3
SAMMENDRAG	5
INNHold	8
1. INNLEDNING	12
2. TEORI	15
2.1 TUMORBIOLOGI	15
2.1.1 <i>Ovariekreft</i>	16
2.1.2 <i>Cellebiologi</i>	18
2.2 IMMUNTERAPI MED MONOKLONALE ANTISTOFFER	20
2.2.1 <i>Monoklonale antistoffer</i>	21
2.2.2 <i>Herceptin og HER2</i>	24
2.3 STRÅLINGSFYSIKK	26
2.3.1 <i>Ioniserende stråling</i>	26
2.3.2 <i>Radioaktivitet</i>	27
2.3.3 <i>Strålingens vekselvirkning med materie</i>	29
2.3.4 <i>Nukliden ²²⁷Th – en α-emitter</i>	32
2.3.5 <i>Dosimetri/mikrodosimetri</i>	34
2.4 STRÅLINGSBIOLOGI	35
2.4.1 <i>Cellens respons på ioniserende stråling</i>	35
2.4.2 <i>Celleoverlevelseskurver</i>	38
2.4.3 <i>Strålebiologiens 4 R'er</i>	39
2.5 RADIOIMMUNTERAPI	41

2.5.1	<i>α</i> -emitterende konjugater	42
2.6	FLOWCYTOMETRI	42
3.	MATERIALER OG METODER.....	44
3.1	CELLELINJEN	44
3.2	CELLEDYRKNING.....	44
3.2.1	<i>Utstyr/kjemikalier og sterile rutiner.....</i>	<i>44</i>
3.2.2	<i>Omsetting</i>	<i>45</i>
3.2.3	<i>Celletelling og fortynning</i>	<i>46</i>
3.3	RADIOIMMUNKONJUGATENE ²²⁷ Th-HERCEPTIN OG ²²⁷ Th-RITUXIMAB.....	47
3.3.1	<i>Produksjon av radioimmunkonjugatene</i>	<i>47</i>
3.3.2	<i>Rensing av ²²⁷Th-Herceptin</i>	<i>48</i>
3.4	AKTIVITETSTELLING	48
3.5	MÅLING AV EKSPRESJON AV HER2.....	49
3.5.1	<i>Fluorescensmikroskopi</i>	<i>49</i>
3.5.2	<i>Flowcytometri</i>	<i>51</i>
3.6	TRANSFEKSJON OG SELEKSJON.....	52
3.6.1	<i>Transfeksjon.....</i>	<i>54</i>
3.6.2	<i>Seleksjon</i>	<i>54</i>
3.7	BEHANDLING MED RADIOIMMUNKONJUGATER OG KALDT ANTISTOFF	55
3.7.1	<i>Koloniforsøk.....</i>	<i>55</i>
3.7.2	<i>Beregning av overlevelsesfraksjonen ved koloniforsøk</i>	<i>57</i>
3.7.3	<i>Strippingbuffer – optimalisering og cellepåvirkning</i>	<i>58</i>
3.7.4	<i>Måling av cellebundet aktivitet over tid.....</i>	<i>59</i>
3.7.5	<i>Vekstforsøk.....</i>	<i>60</i>

3.7.6	<i>Mikroskopiforsøk med transfekterte celler</i>	60
3.8	DYREFORSØK (BIODISTRIBUSJON).....	61
3.9	DOSIMETRI.....	62
3.9.1	<i>Mikrodosimetrmodell</i>	62
3.9.2	<i>Beregning av antall henfall pr celle</i>	65
3.9.3	<i>Måling av cellulære størrelser</i>	66
3.10	STATISTIKK.....	66
3.10.1	<i>Standardfeil</i>	66
3.10.2	<i>Signifikanstest</i>	67
4.	RESULTATER	68
4.1.1	<i>Måling av ekspresjon av HER2 ved fluorescensmikroskopi</i>	68
4.2	AKTIVITET TILSATT ETTER UTSÅING - KOLONIFORSØK.....	69
4.3	AKTIVITET TILSATT FØR UTSÅING.....	72
4.3.1	<i>Måling av cellebundet aktivitet</i>	73
4.3.2	<i>Koloniforsøk</i>	76
4.3.3	<i>Vekstforsøk</i>	78
4.4	MÅLING AV EKSPRESJON AV HER2 VED FLOWCYTOMETRI.....	79
4.5	ANTALL HENFALL PER CELLE.....	82
4.6	DOSIMETRI.....	83
4.6.1	<i>Måling av cellulære størrelser</i>	83
4.6.2	<i>Mikrodosimetrmodell</i>	85
4.7	OVERLEVELSEFRAKSJON SOM FUNKSJON AV DOSE.....	87
4.8	MIKROSKOPIFORSØK MED TRANSFEKTERTE CELLER.....	89
4.9	DYREFORSØK (BIODISTRIBUSJON).....	90

5.	DISKUSJON	93
5.1	EFFEKTEN AV ²²⁷ TH-HERCEPTIN IN VITRO	93
5.2	MIKRODOSIMETRIMODELLEN	95
5.3	STRIPPINGBUFFER	96
5.4	PLATING EFFICIENCY	96
5.5	INKUBERING MED ANTISTOFF	96
5.6	ANTALL ²²⁷ TH-ATOMER PER CELLE	97
5.7	TRANSFEKSJON, SELEKSJON OG TIME-LAPSE MED SKOV-3-EGFP	98
5.8	DYREFORSØK	99
5.9	RADIOIMMUNKONJUGATETS KVALITET OG LEVERING	99
6.	KONKLUSJON	101
	REFERANSER	102
	VEDLEGG A TEST AV STRIPPINGBUFFER	109
	VEDLEGG B OPTIMALISERING AV HEPES-KONSENTRASJON	111
	VEDLEGG C FLOWCYTOMETRI DATA	112
	VEDLEGG D MÅLING AV CELLE- OG CELLEKJERNEDIAMETRE	115
	VEDLEGG E RÅDATA – KOLONIFORSØK	116
	VEDLEGG F RÅDATA – VEKSTFORSØK	122
	VEDLEGG G RÅDATA – BINDINGSFORSØK	124
	VEDLEGG H RÅDATA – DYREFORSØK	129
	VEDLEGG I SUPPLERENDE DATA	139

1. Innledning

Med nåværende behandlingsmetoder vil ca 50 % av kreftpasientene bli kurert. 50 % vil dø fordi behandlingen ikke virker (Ferlay et al., 2007).

En av de største utfordringene i kampen mot kreft er å overvinne mikrometastaser som er resistente mot kjemoterapi. Selv om primærtumor fjernes eller inaktiveres, vil mange pasienter fortsatt ha metastaser. Dette er kreftceller som har revet seg løs fra tumor og spredd seg til andre organer, ofte før diagnosen gis. Ulempen med konvensjonell behandling av metastaser, som ekstern strålebehandling og kjemoterapi, er manglende cellulær spesifisitet. Dette medfører ofte at friskt normalvev blir skadet før kurativ dose oppnås i tumor. Behovet for en ny og bedre behandlingsmetode mot metastaser er derfor svært stort (Aurlien, 2004).

Radioimmunterapi (RIT) benytter seg av konjugater av radionuklider og antistoffer for å avsette terapeutisk stråledose til kreftceller som uttrykker de rette antigenene. En optimal radioisotop og et målsøkende antistoff er helt avgjørende for å oppnå dette. Frem til dags dato har de fleste studier benyttet seg av β -emitterende nuklider. Disse er relativt lett tilgjengelig og kan i noen tilfeller være å foretrekke. Rekkevidden til β -stråling er ofte på noen få millimeter, slik at energien vil bli avsatt i en viss avstand fra decay-punktet. Dette medfører kryssbestråling av celler som ikke er tilgjengelig for antistoffene. Ulempen er igjen at det er vanskelig å oppnå kurative doser uten at friskvevet rundt tar skade av behandlingen (Palm et al., 2007).

Monoklonale antistoffer konjugert til α -emittere er et nytt og spennende felt innen kreftforskning. α -partikler har flere fordeler sammenlignet med β -partikler. De er omlag 8000 ganger større enn β -partikler og har en høy LET-verdi (Linear Energy Transfer), altså en høy ionisasjonstetthet. Dessuten er rekkevidden på bare noen få cellediametre i kroppsvev. Kort rekkevidde minimerer dosen til normalvev, og på grunn av den høye LET-verdien (ca 100 keV/ μ m) kan en enkelt tumorcelle dø som følge av selvbestråling av α -partikler. Dette er generelt ikke mulig med β -partikler. Med selvbestråling menes stråling fra en emitter som er internalisert eller bundet til cellemembranen til den aktuelle cellen. For små metastaser under en millimeter i diameter, skulle en α -emitterende nuklide med sin korte rekkevidde (50-80 μ m) og ødeleggende effekt, være en svært god kandidat innen radioimmunterapi (Stigbrand et al., 2008).

Tidligere studier har vist lovende resultater med nuklidene ^{213}Bi , ^{211}At , og ^{225}Ac (Jurcic et al., 2002; Palm et al., 2007; Zalutsky og Vaidyanathan, 2000; McDevitt et al., 2001). Palm et al. (2007) undersøkte effekten av ^{211}At -Herceptin i mus med humane SKOV-3-tumorer (ovariekreft) med svært gode resultater. Herceptin er et monoklonalt antistoff mot antigenet HER2 som er overuttrykt på kreftcellene i 20-30 % av alle tilfeller med bryst-, lunge-, mage- og ovariekreft – inklusive SKOV-3 (Horak et al., 1997). I tillegg er det vist en sammenheng mellom overuttrykk av HER2 og dårlig prognose, slik at disse cellene er spesielt vanskelig å overvinne med konvensjonell behandling (Horak et al., 1997; Slamon et al., 1987; Iglehart et al., 1990; Wright et al., 1989). Det har imidlertid vært vanskelig å innføre ^{213}Bi og ^{211}At i klinikken på grunn av deres korte halveringstider (henholdsvis 46 minutter og 7,2 timer) og produksjonskapasiteten er svært begrenset med dagens teknologi. Kildematerialet som trengs for å produsere ^{225}Ac er også svært begrenset (McDevitt et al., 2001; Miederer et al., 2004).

^{227}Th derimot, kan være en lovende kandidat. ^{227}Th er en radioaktiv isotop av grunnstoffet thorium som også henfaller ved utsendelse av en α -partikkel. Halveringstiden er 18,72 dager, noe som gjør den til en aktuell nuklide i klinikken. I tillegg kan den produseres i klinisk relevante mengder fra ^{227}Ac . Datternukliden, ^{223}Ra , er også en α -emitter med en noe kortere halveringstid på 11,43 dager. På grunn av dens kjemiske egenskaper, som forøvrig er svært lik kalsium, vil radium søke til beinvev før den decayer. Her vil nukliden bestråle eventuelle beinmetastaser, uavhengig av antigenuttrykk, og siden α -partikler har så kort rekkevidde vil sannsynligvis ikke beinmargen få noen dose av betydning. På grunn av denne egenskapen til datternukliden, kan ^{227}Th være spesielt egnet for behandling av HER2-positiv bryst- og ovariekreft som ofte gir metastaser til bein (Bruland et al., 2006; Larsen et al., 2006).

I denne oppgaven ble det sett på hvordan cellelinjen SKOV-3 responderer på radioimmunkonjugatet ^{227}Th -Herceptin. Terapeutisk effekt ble undersøkt ved å sammenligne økning i celleantall per tidsenhet og den kolonidannende evnen til cellene for behandlede og ubehandlede celler. Antall utsendte α -partikler per celle og dosen cellene mottok ble estimert ved hjelp av en forenklet mikrodosimetrisk modell. Ekspresjonen av HER2 ble kartlagt ved hjelp av flowcytometri og fluorescensmikroskopi.

Videre ble det etablert en metode for å detektere α -sporene gjennom cellekjernen. I denne metoden ble SKOV-3 transfektert med vektoren pEGFP-C1-53BP1 og undersøkt i mikroskop ved bruk av time-lapse-metoden (filmobservasjon). Det er stor variasjon i dose

fra celle til celle. Metoden gir mulighet for mer eksakt doseestimat for hver enkelt celle og vil videre vise hva som skjer med cellene.

Deretter ble det gjort biodistribusjonsforsøk for å undersøke hvordan ^{227}Th -Herceptin tas opp i SKOV-3-tumorer og i forskjellige normale organer i mus. På denne måten kan man få en indikasjon på hvorvidt radioimmunkonjugatet er egnet til klinisk bruk ved ovariekreft. For å undersøke om ^{227}Th -Herceptin var stabilt in vivo, ble det målt opptak i tumorvev og normale organer av både ^{227}Th -Herceptin og datternukliden ^{223}Ra .

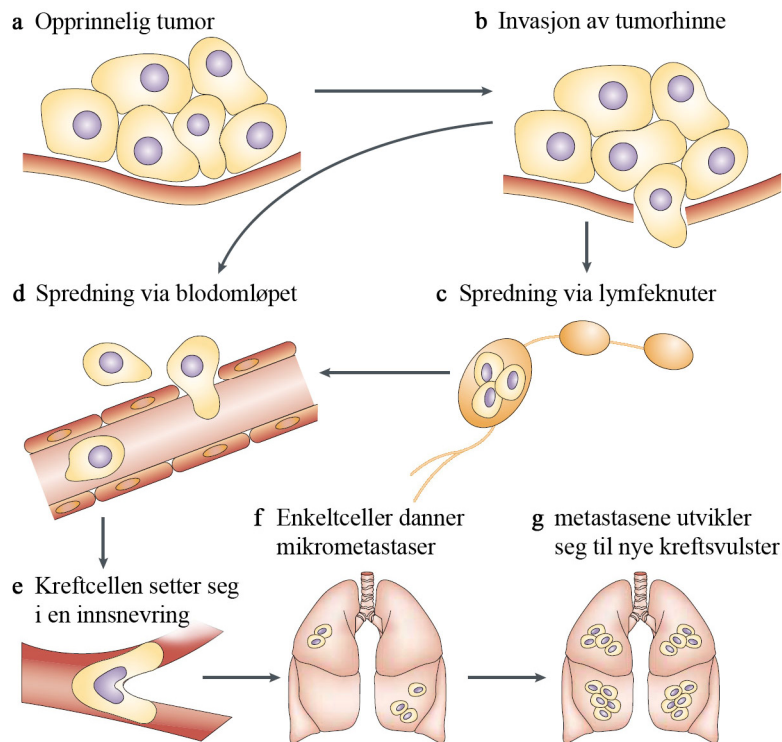
2. Teori

Hver tredje nordmann som blir født i dag vil statistisk sett få kreft i løpet av sin levetid. Selv om det ennå er mange ubesvarte spørsmål i kreftforskningen, er det gjort mange fremskritt innen diagnostikk og behandling, og i dag helbredes rundt halvparten av de 25000 nordmenn som årlig rammes av kreft (Larsen IK et al., 2007)

2.1 Tumorbiologi

Normalt er det balanse mellom ny cellevekst og død av gamle celler. Det kan imidlertid oppstå forandringer i DNA som forstyrrer den normale vekstkontrollen. Slike forandringer kalles mutasjoner og kan ha mange årsaker, blant annet kjemikalier (f.eks. fra røyking eller kosthold), stråling samt virus eller bakterier. En mutert celle oppfattes vanligvis som skadet og vil gå i apoptose. Apoptose er en form for selvmord hos cellene der gamle eller skadde celler ødelegger seg selv. Dersom muterte celler ikke fjernes, kan de bli til kreftceller som vokser ukontrollert og utvikler seg videre til en kreftsvulst. Det kreves gjerne fire til seks mutasjoner i cellens DNA for å få en fullt utviklet kreftsvulst. Det kan ta opptil 20 år fra en mutasjon skjedde første gang til en svulst er stor nok til å bli oppdaget. Andre ganger går utviklingen raskere (Hanahan og Weinberg, 2000).

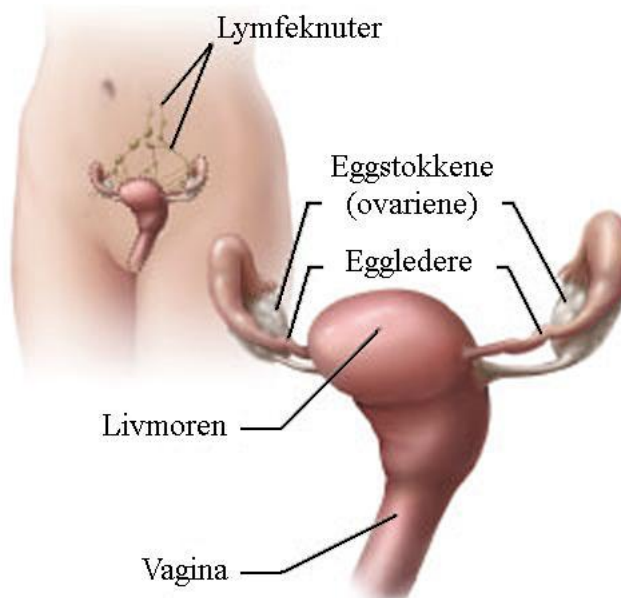
Hvis kreftcellene transporteres med blod- eller lymfesystemet, kan det dannes dattersvulster helt andre steder i kroppen enn der de oppsto. Disse kalles metastaser. Den metastatiske prosessen krever et kompleks av cellulære funksjoner som blant annet involverer forandringer i måten kreftcellene bindes sammen på, økt bevegelighet og cellens evne til å bryte ned den ekstracellulære matriksen ved proteolyse (enzymatisk spalteprosess). Dette bidrar til at kreftcellene kan rive seg løs fra hverandre og nærmest spise seg vei til blodomløpet, enten direkte eller via lymfesystemet. Når cellene har kommet så langt vil de kunne overleve i blodsirkulasjonen og sette seg ned i fjerntliggende organer. Her kan de ligge i opptil flere år som mikrometastaser før de plutselig slår ut og danne nye svulster (figur 2.1) (Steege, 2003). Kreft som har spredt seg til flere organer gir dårligere leveutsikter enn en liten, lokalisert svulst.



Figur 2.1: Dannelsen av metastaser skjer i flere trinn. a) Den opprinnelige tumoren er omgitt av en intakt tumorhinne (basalmembran). b) Kreftcellene bryter seg gjennom tumorhinnen. Metastatiske celler kan gå via lymfesystemet c), eller de kan trenge seg direkte inn i blodløpet d). e) Kreftcellene setter seg fast i fjerntliggende organer. f) Her trenger dem seg inn i organets vev og danner mikrometastaser. Slik kan cellene ligge i flere år før de utvikler seg til nye kreftsvulster (Steeg, 2003, figuren er modifisert).

2.1.1 Ovariekreft

Ovariene, eller eggstokkene, er en del av kvinnens forplantningsorgan og er lokalisert i bekkenet (se figur 2.2). Vanligvis har man to eggstokker hvor de to viktigste funksjonene er utskillelse av kjønnshormoner og produksjon og modning av egg. Hvert ovarium veier ca 7 g, har mandelform og størrelsen er omtrent det dobbelte av en mandel (Sand et al., 2006).



Figur 2.2: Tegning av eggstokkene med eggledere og livmor (National Cancer Institute, 2006, figuren er modifisert).

Hvert år rammes ca 500 norske kvinner av eggstokkreft. Det er den sjette mest vanlige kreftformen blant kvinner i Norge. Ved eggstokkreft har man en ondartet svulst i én eller begge eggstokkene. Den er mer alvorlig enn de andre formene for underlivskreft fordi den i mange tilfeller oppdages sent. Eggstokkreft oppstår oftere hos kvinner som ikke har født barn enn hos kvinner som har gått gjennom en fødsel. Det er også vist at p-piller reduserer risikoen for eggstokkreft. Dette tyder på at kjønnshormonene og antallet egglosninger en kvinne gjennomgår kan ha betydning for utviklingen. Noen tilfeller er også arvelige, og det brukes derfor gentesting i større grad for å stille sikker diagnose av arvelig kreft. (Larsen IK et al., 2007; Kreftforeningen, 2008).

Ved behandling av sykdommen er sjelden ekstern strålebehandling aktuelt. Den mest brukte behandlingsformen ved eggstokkreft er en operasjon der så mye som mulig av svulstvevet fjernes. Som regel fjernes eggstokkene, livmoren og lymfeknutene i nærheten, i tillegg til en del av vevet som blant annet omkranser eggstokkene. Dette blir gjort for å hindre eventuell spredning. Deretter må de fleste gjennom en cellegiftbehandling for å redusere risikoen for tilbakefall (Kreftforeningen, 2008; Rikshospitalet, 2008).

Prognosen ved ovariekreft er dystert. Tall fra England bekrefter dette: Av alle kvinnene som får diagnosen er kun 36 % i live etter 5 år. Dersom kreften spres med blodbanen til andre steder i kroppen, vil mellom 5 og 16 % være i live etter 5 år (Cancer Research UK, 2008).

Det er altså et enormt behov for en ny og bedre behandlingsmetode. Radioimmunterapi (RIT) kan være aktuelt som en tilleggsbehandling etter kirurgi for å hindre spredning. For å forstå hvordan RIT fungerer, må man ha kunnskap om cellebiologi, immunsystemet, strålingsfysikk og strålingsbiologi.

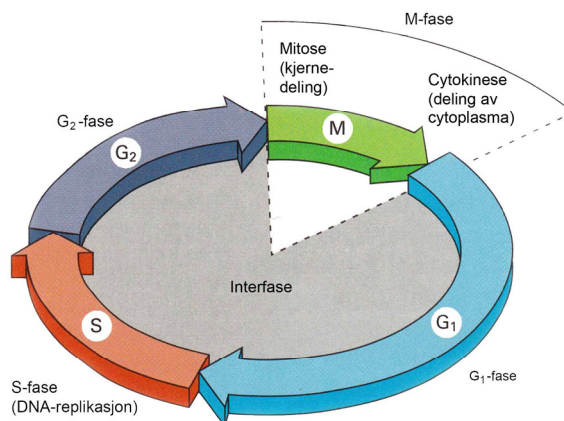
2.1.2 Cellebiologi

Cellesyklus

Delkapitlet er basert på kapittel 17-18 i *Molecular biology of the cell* (Alberts et al., 2002)

En celle produserer etterkommere ved at den deler seg i to. Det er mange prosesser som cellen må gjennom før en deling kan skje, blant annet må den fordoble alle sine bestanddeler. Alt dette skjer innenfor det vi kaller cellesyklus. Cellesyklus deles inn i G_1 , S, G_2 og M (se figur 2.3). DNA-replikasjonen foregår i S-fase (syntese-fase) slik at alt DNA i cellen blir fordoblet. De fleste celler trenger mer tid til å vokse og doble antall proteiner og organeller enn å replikere DNA. I G_1 og G_2 får cellene tid til å vokse. Her overvåker også cellen det interne og eksterne miljøet for å forsikre seg om at forholdene er passende og prosessene er riktig gjennomført før den går videre til neste fase. G_1 -fasen er spesielt påvirket av ytre forhold. Varigheten kan variere svært mye og påvirkes av ekstracellulære signaler fra andre celler. Dersom de ekstracellulære forholdene er lite gunstige, for eksempel at cellene vokser for tett i kultur, kan cellene presses inn i en hvilefase kalt G_0 . I denne fasen kan cellene forbli i dager, uker eller år.

Siste fase i cellesyklus er M-fasen. Her deles cellen i to, hvor hver starter på en ny cellesyklus. M-fasen kan deles inn i to hoveddeler; mitosen hvor cellekjernen deler seg og cytokinesen hvor hele cellen deles.



Figur 2.3: De forskjellige fasene i cellyklus. Cellen vokser gjennom interfase som består av G₁, S og G₂-fase. DNA-replikasjon finnes sted i S-fase. Celledelingen foregår i M-fase (Alberts et al., 2002, figuren er modifisert).

Kontroll av cellyklus

Koordineringen av alle prosessene som er nødvendig for en vellykket cellyklus og celledeling skjer ved en sentral kontrollenhet bestående av to proteingrupper, Cdk (cyclin-dependent kinase) og sykliner. Disse proteinene samspiller og aktiverer en rekke enzymer ved de to hovedkontrollpunktene i cellyklus, G₁k og G₂k. Kontrollpunktet G₁k ligger i G₁, og her avgjør cellen om DNA er uskadet før den går inn i S-fase og starter DNA-syntesen. Dersom cellens DNA er skadet kan den holdes tilbake i G₁ slik at skadene enten blir reparert, eller at cellen går i apoptose som er en programmert celledød. Dette er en svært viktig avgjørelse som kan forhindre at cellen dupliserer sitt DNA med feil (mutasjon) som kan resultere i kreft.

Cellevekst

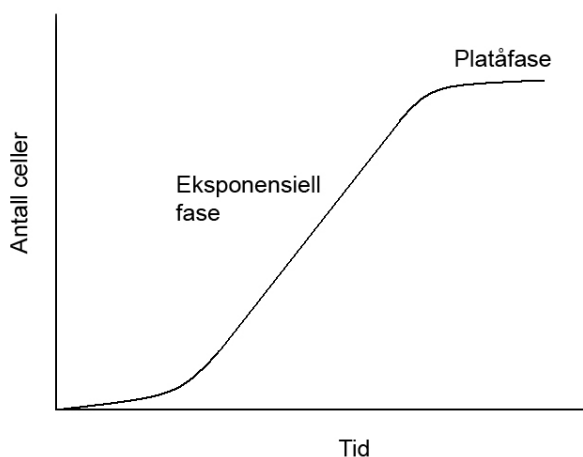
Celler i kultur vil vanligvis dele seg med faste intervaller dersom de dyrkes under gode vekstforhold. Tiden det tar før antall celler er doblet kalles doblingstiden, t_d . Et uttrykk for cellens eksponentielle vekst kan være som følger:

$$N = N_0 e^{kt} \quad (2.1)$$

hvor N_0 er celleantallet ved tiden $t = 0$. k er en vekstkonstant gitt ved:

$$k = \frac{\ln(2)}{t_d} \quad (2.2)$$

En vekstkurve er en grafisk fremstilling av celleantallet som funksjon av tiden. Denne kurven fremstilles ofte i et enkeltlogaritmisk plott hvor en får en rett linje hvis cellepopulasjonen vokser eksponentielt. Figur 2.4 skisserer en slik vekstkurve.



Figur 2.4: Typisk vekstkurve for celler i kultur, som viser antall celler som funksjon av tid. I starten vil det ofte ta litt tid for cellene å "komme i gang" pga av stor avstand mellom cellene og mangel på vekstfaktorer. Etter hvert som det blir trangt for cellene, oppnår de en platåfase hvor de går inn i G_0 . Y-aksen er logaritmisk.

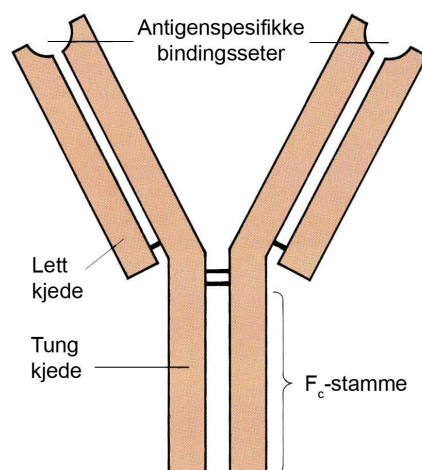
2.2 Immunterapi med monoklonale antistoffer

Som en direkte konsekvens av et ustabilt genom, har ofte kreftceller et unormalt uttrykk av proteiner på cellemembranen. Slike proteiner kalles gjerne tumorassosierte antigener (TAA), og uttrykkes i svært liten grad på normale celler (Schuster et al., 2006). Tumorassosierte antigener kan gjenkjennes av kroppens immunsystem, men det viser seg imidlertid at immunresponsen kun har en marginal effekt på tumor. (Maecker et al., 2005; Huber og Wölfel, 2004).

Utviklingen av monoklonale antistoffer (monoclonal antibodies, mAbs) har gitt nytt liv i målrettet terapi av kreft. Antistoffene binder seg til de spesifikke tumorassosierte antigenene og kan føre til en immunrespons mot kreftceller. Noen antistoffer reduserer også vekst og deling av målcellene hvilket kan bidra til å hemme videre vekst av svulsten og/eller drepe kreftcellene. I tillegg kan spesielle stoffer, som toksiner, kjemoterapeutiske medikamenter og radioaktive nuklider, konjugeres til antistoffet for effektivt å nå frem til målcellene (Bodey et al., 1996).

2.2.1 Monoklonale antistoffer

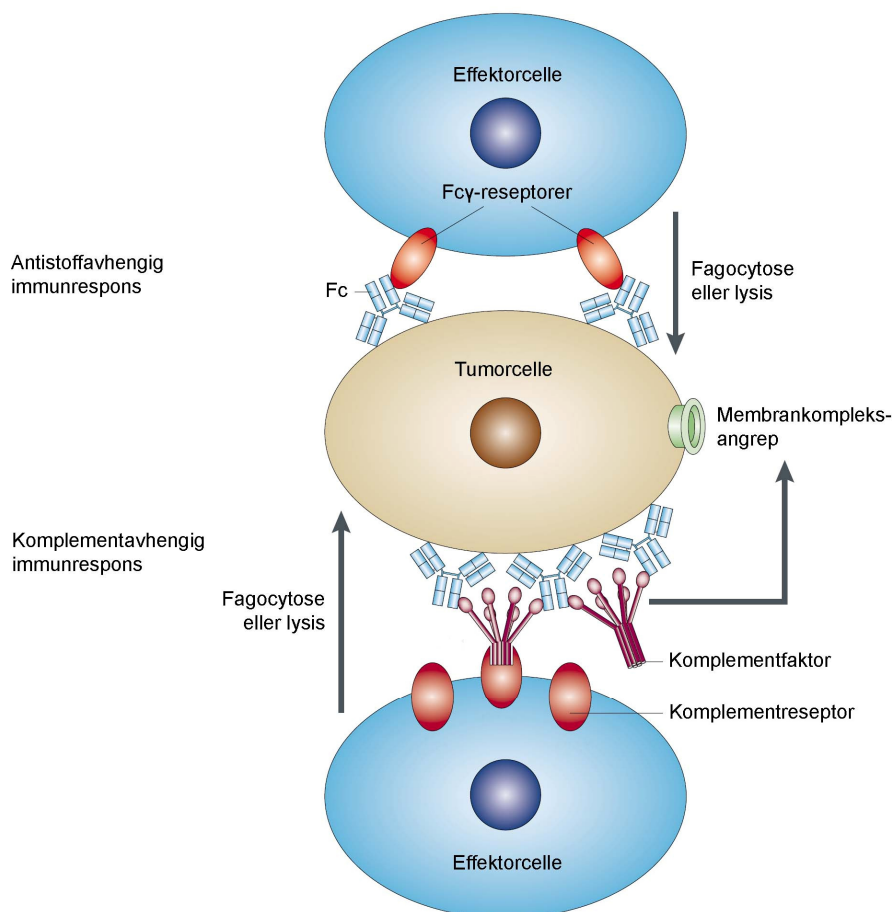
Antistoffer, som også kalles immunglobuliner, er store karbohydratholdige proteiner. Ett antistoff binder kun til én spesifikk type antigen, og består av 4 sammenkoblede polypeptidkjeder. Som figur 2.5 viser, kalles de to korte *lette kjeder*, og de lange kalles *tunge kjeder*. Antistoffene har en stamme som kalles Fc-delen (også kalt effektorområdet), hvilket utgjør den nedre halvdel av de to tunge kjedene, og to antigenspesifikke bindingssteder som binder til seg antigen. Antigen-antistoff-komplekset forsterker blant annet det uspesifikke immunforsvaret. Bekjempelsen blir da spesifikk, fordi antistoffene blinker ut den riktige fienden (Vander et al., 1990; Sand et al., 2006).



Figur 2.5: Antistoffets struktur. Kun helt spesifikke antigener kan binde seg til antistoffets bindingssteder. Antigen-antistoff-komplekset kan videre sette i gang en immunreaksjon (Vander et al., 1990, figuren er modifisert).

Når antistoffene binder til tumorassosierte antigener på tumorcellen, vil dette kunne utløse to immunresponser: antistoffavhengig- og komplementæravhengig immunrespons (figur 2.6).

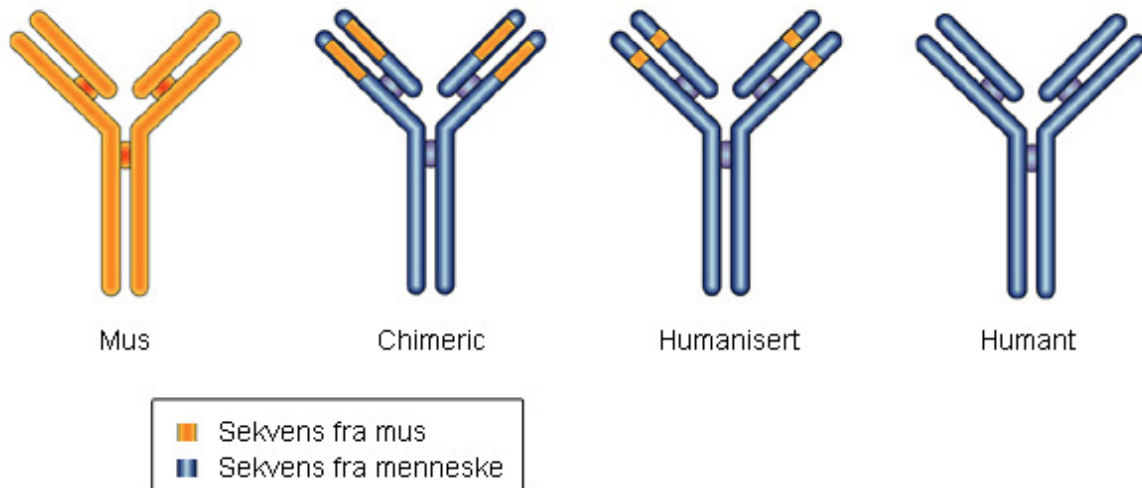
Den første foregår ved at effektorceller, ved hjelp av sine Fc γ -reseptorer, binder seg til antistoffets Fc-del. Effektorcellene kan være av typen nøytrofile granulocytter, makrofager eller naturlige drepeceller (NK-celler). Tumorcellen blir deretter eliminert ved fagocytose (cellespising) eller lysis (oppløsning), avhengig av hvilken effektorcelle som er i aksjon. Den andre immunresponsen settes i gang av komplementfaktorer – spesielle proteiner – som finnes fritt i blodet. Ved at en komplementfaktor bindes til antistoffets Fc-del, settet det i gang en kaskadereaksjon hvor nye komplementfaktorer stadig binder seg til komplekset som nå oppstår. Dette komplekset av komplementfaktorer kan i seg selv drepe kreftcellen fordi cellemembranen blir svært ustabil. Alternativt kan komplementfaktorer videre binde seg til komplementreseptorer på effektorcellene. Dette vil føre til fagocytose eller lysis, som nevnt ovenfor (Carter, 2001).



Figur 2.6: Monoklonale antistoffer kan aktivere effektorceller i immunforsvaret. Immunresponsen er enten antistoffavhengig hvor effektorcellen binder seg direkte til antistoffets Fc-del, eller komplementavhengig hvor komplementfaktorer binder seg til antistoffet. Komplementfaktorene vil i sin tur binde seg til effektorcellens komplementreseptor. Felles for disse immunresponsene er at tumorcellen blir eliminert ved fagocytose eller lysis. I tillegg kan komplementfaktorene alene eliminere tumorcellen ved membrankompleksangrep hvor en kaskade av komplementfaktorer bindes til cellemembranen og gjør den ustabil.

I klinikken brukes monoklonale antistoffer. Monoklonale betyr at alle antistoffene er av samme klon, altså er de helt like og binder kun til én type antigener. Et problem i medisinsk anvendelse, er at standardprosedyren for å lage monoklonale antistoffer resulterer i museantistoff (murine). Selv om murine antistoffer er svært lik humane antistoffer, er det fortsatt forskjeller som gjør at immunsystemet gjenkjenner museantistoffet som fremmed. Dette setter i gang en immunreaksjon som raskt fjerner antistoffene fra blodomløpet. Løsningen på dette problemet har vært å ta DNA som koder for bindingssetene i museantistoffet, og integrere dette med DNA som koder for menneskeantistoff. DNA-sekvensene settes deretter inn i mammalske celler som deretter kan produsere halvt mus- og

halvt menneskeantistoff. Bakterier produserer ikke de rette proteinene, og kan derfor ikke brukes til dette formålet. Avhengig av hvor stor del av museantistoffet som blir brukt, snakker en om chimeric antistoff eller humanisert antistoff (Yamashita et al., 2007). Se figur 2.7 nedenfor:



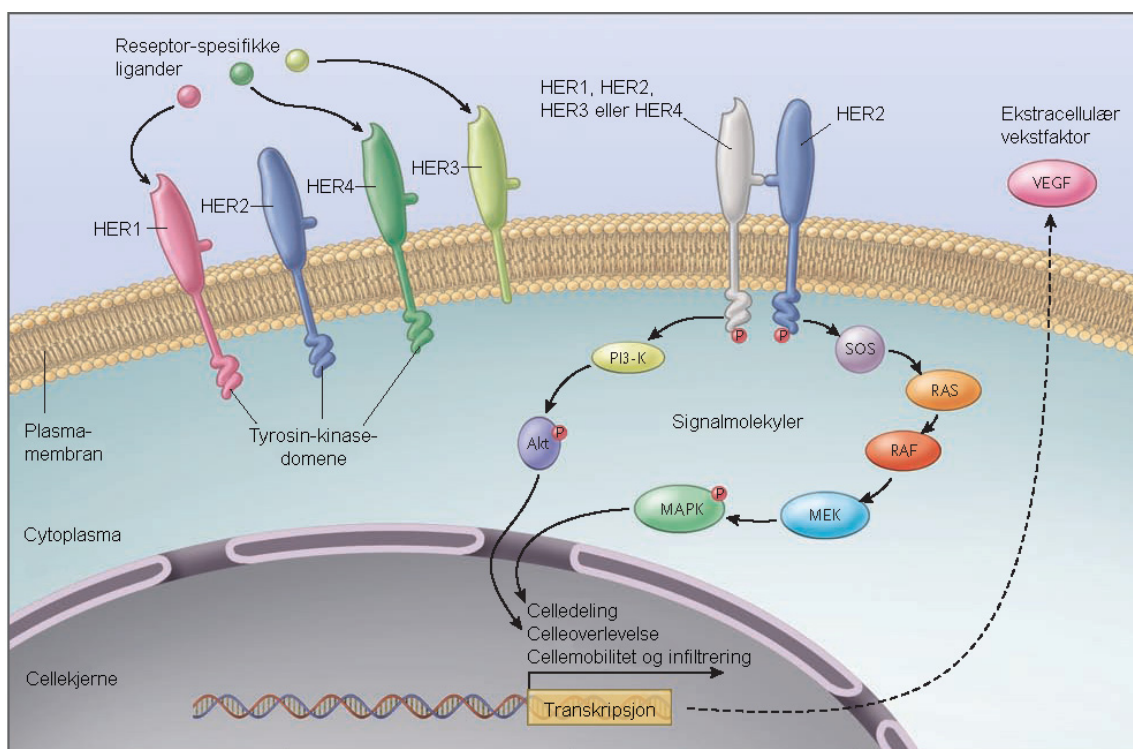
Figur 2.7: Chimeric og Humanisert antistoff blir produsert ved å blande gener fra mus og menneske. Resultatet er et humant antistoff med bindingsegenskaper fra murene antistoffer som ikke blir frastøtt av kroppens immunforsvar (Brekke OH og Sandlie I, 2003, figuren er modifisert).

2.2.2 Herceptin og HER2

Herceptin (Trastuzumab) er et humanisert monoklonalt antistoff mot antigenet HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor, også kalt HER2/neu eller ErbB-2). (Clifford og Hudis, 2007). HER2 er overuttrykt på kreftcellene i 20-30 % av tilfellene med bryst-, ovarie-, lunge- og magekreft (Horak et al., 1997). I tillegg er det vist en sammenheng mellom overuttrykk av HER2 og dårlig prognose (Horak et al., 1997; Slamon et al., 1987; Iglehart et al., 1990; Wright et al., 1989).

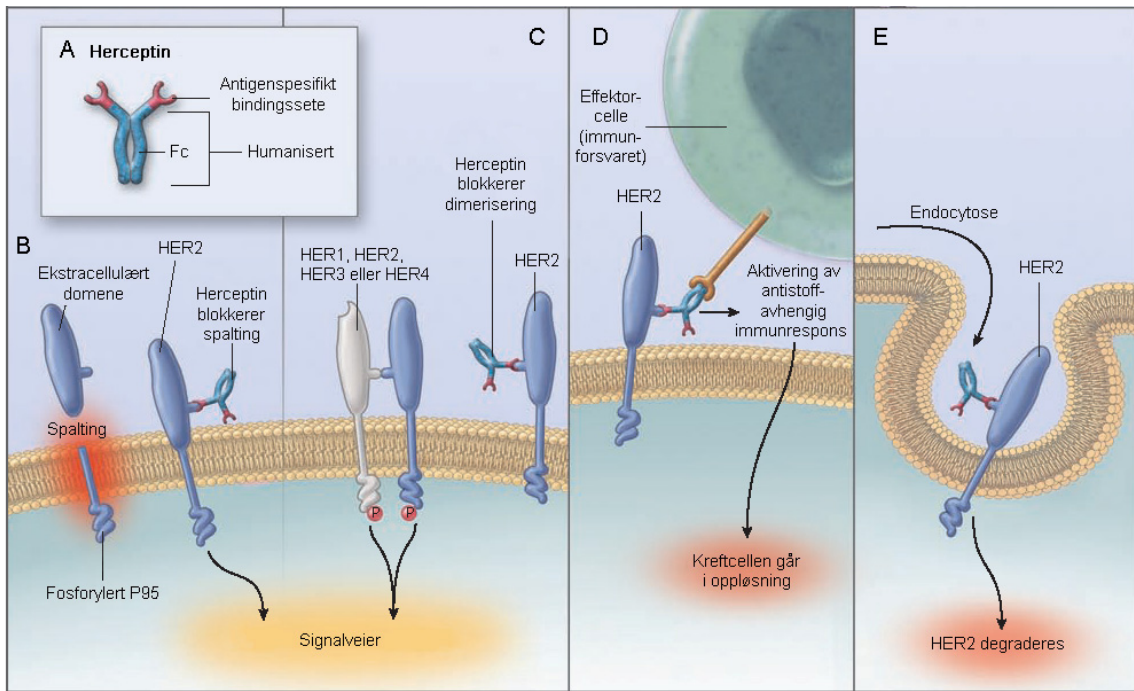
HER1, HER2, HER3 og HER4 er membranreseptorer som gjør kreftcellene mer aggressiv, og regulerer celledeling og celleoverlevelse. Hver av disse reseptorene består av et ekstracellulært bindingsområde, en transmembran del og (bortsett fra HER3) et intracellulært tyrosin-kinase-domene. Tyrosin-kinase-domenet kan, når det blir aktivert ved fosforylering, sette i gang en kaskadereaksjon som medfører en rekke cellulære effekter, blant annet økt celledeling og celledeling. Ekstracellulære vekstfaktorer (vascular endothelial

growth factors, VEGF) blir også produsert som følge av dette og bidrar blant annet til økt blodkardannelse. Tyrosin-kinase-domenet blir aktivert gjennom blant annet dimerisering av HER2, det vil si at HER2 binder seg til en annen membranreseptor som vist figur 2.8. HER2 er foretrukket som dimeriseringspartner for de andre medlemmene i HER-familien. Forklaringen er at HER1, 3 og 4 er avhengig av ligander for å kunne dimerisere, det er ikke HER2. Ligander er i dette tilfellet signalmolekyler (f.eks. vekstfaktorer), utskilt fra kreftcellene, som binder til en HER-reseptor og sørger for at denne kan dimerisere med en annen (Clifford og Hudis, 2007; Olayioye, 2001).



Figur 2.8: Signaloverføring av HER-familien. HER familien består av HER1, HER2, HER3 og HER4. Fosforylering av tyrosin-kinase-domenet, hovedsakelig gjennom dimerisering, induserer celledeling og økt overlevelse, i tillegg til produksjon av ekstracellulære vekstfaktorer (vascular endothelial growth factors, VEGF) (Clifford og Hudis, 2007, figuren er modifisert).

Som figur 2.9 viser, kan også tyrosin-kinase-domenet fosforyleres ved at den ekstracellulære delen av HER2 spaltes av. Denne spaltingen kan forhindres ved at Herceptin binder seg til HER2. Dette medfører også at HER2 ikke kan dimeriseres fordi bindingssetet er opptatt. Dermed er to kilder til signalisering om celledeling fjernet. I tillegg vil HER2-Herceptin-komplekset aktivere immunforsvaret som kan drepe kreftcellen. Figur 2.9-E viser hvordan Herceptin internaliseres ved endocytose.



Figur 2.9: Herceptin – mekanismer og virkemåter. Panel A: Antistoffets struktur. Spalting av det ekstracellulære domenet til HER2 danner et fosforylert P95 som videre kan aktivere signalveiene (B). Binding av Herceptin reduserer spaltingen i tillegg til at det hindrer dimerisering (C). Bindingen fører til forandringer i antistoffets Fc-del, som i sin tur aktiverer immunforsvaret (D). Panel E viser hvordan HER2 degraderes ved endocytose. Herceptin blir samtidig internalisert (Clifford og Hudis, 2007, figuren er modifisert).

2.3 Strålingsfysikk

2.3.1 Ioniserende stråling

Ioniserende stråling er stråling med nok energi til å ionisere et atom. Energien som trengs for å slå løs et valenselektron ligger i området 4-25 eV. For at strålingen skal kunne kalles ioniserende, må energien være over dette. Det er vanlig å dele ioniserende stråling inn i to kategorier: direkte- og indirekte ioniserende stråling. Direkte ioniserende stråling består av ladde partikler som elektroner, protoner og ladde kjerner. Partiklene avsetter sin energi direkte i mediet gjennom en rekke coulombvekselvirkninger. Indirekte ioniserende stråling, som består av fotoner og uladde partikler, avsetter energien til ladde partikler i mediet. Disse vekselvirker videre direkte med det omliggende medium slik at energien avsettes her (Attix, 2004)

I denne oppgaven er det hovedsakelig alfapartikkelstråling og dens cellulære effekter som undersøkes. Derfor vil det legges mest vekt på α -partiklers fysiske egenskaper og vekselvirkningsmekanismer.

2.3.2 Radioaktivitet

Delkapitlet er basert på kapittel 4-5 i *Nuclear and radiochemistry* (Lieser, 2001)

Radioaktiv stråling er spontan emisjon av energi fra en ustabil atomkjerne. En slik emisjon kalles i denne sammenhengen en desintegrasjon, decay eller henfall. Det sendes ut enten en partikkel eller elektromagnetisk stråling. De tre mest vanlige er α - og β partikler og γ -stråling.

En α -partikkel er en heliumkjerne og består følgelig av to protoner og to nøytroner. Prosessen ved α -decay er som følger:



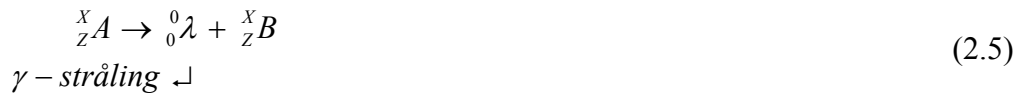
Kjernen blir altså 4 atomiske masseenheter lettere og mister 2 protoner slik at det blir et atom med andre kjemiske egenskaper enn det opprinnelige. α -partiklene har to positive ladninger, er monoenergetiske og har ofte energier i området 2-7 MeV. Partikkelen har kort rekkevidde, og vil ta opp to elektroner slik at det blir et nøytralt He-atom. Denne type stråling avsetter derfor sin energi svært lokalt og vil kunne gi store stråleskader innenfor dette området. LET (Linear Energy Transfer) er et uttrykk for energi overført til mediet per lengdeenhet. α -partikler har høy LET-verdi (rundt 100 keV/ μm). Rekkevidden vil være rundt 3,5 cm i luft og bare noen titalls μm i kroppsvev.

En β^- -partikkel er et energirikt elektron med negativ ladning som sendes ut fra nøytronrike kjerner. Ved utsendelse av en β^- -partikkel vil følgende reaksjon foregå:



Her blir et nøytron omgjort til et proton mens et elektron sendes ut.

γ -stråling er elektromagnetisk stråling som oppstår på grunn av kjernens overskudd av energi, ofte etter en av de tidligere nevnte decayene. Kjernen har veldefinerte energinivåer slik at overskuddsenergien som sendes ut er monoenergetisk. Det er ingen forandring i nøytron og protonantall. Reaksjonen kan skrives som følger:



Radioaktivitet er et statistisk fenomen og sannsynligheten for at en radioaktiv desintegrasjon vil skje i løpet av et bestemt tidsintervall er konstant (Khan, 1992). Antall desintegrasjoner per tidsenhet dN/dt er proporsjonal med antall radioaktive kjerner N tilstede:

$$-\frac{dN}{dt} = \lambda N \quad (2.6)$$

der λ er en desintegrasjonskonstant som er karakteristisk for en hver radioaktiv nuklide. Minustegnet indikerer at antall radioaktive atomer (av opprinnelig isotop) minker med tida. Ligning (2.6) gir følgende uttrykk for N som funksjon av tiden t :

$$N = N_0 e^{-\lambda t} \quad (2.7)$$

Der N_0 er antall radioaktive kjerner ved tiden $t=0$.

Aktiviteten til et radioaktivt materiale er definert som antall desintegrasjoner per tidsenhet. Dette gir:

$$A = \lambda N \quad (2.8)$$

som også kan skrives som:

$$A = A_0 e^{-\lambda t} \quad (2.9)$$

der A er aktiviteten ved tiden t og A_0 er aktiviteten ved tiden $t=0$. SI-enheten for radioaktivitet er becquerel (Bq), definert som:

$$1 \text{ Bq} = 1 \text{ desintegrasjon/sekund} \quad (2.10)$$

Ethvert radioaktivt materiale har en unik fysisk halveringstid $t_{1/2}$ som er tiden det tar før halvparten av kjernene har desintegert og aktiviteten er halvert. Denne halveringstiden er gitt som:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{\lambda} \quad (2.11)$$

2.3.3 Strålingens vekselvirkning med materie

Avhengig av strålingstype finnes det mange ulike vekselvirkningsmekanismer. Elektromagnetisk ioniserende stråling som røntgen- og γ -fotoner vekselvirker med materie gjennom tre hovedprosesser: comptoneffekt, fotoelektrisk effekt og pardannelse. Gjennom disse tre prosessene avgir strålingen sin energi til elektronene i materialet som videre avsetter energien gjennom mange coulombvekselvirkninger. Høyenergetiske fotoner kan gå rett gjennom materialet (f.eks. en menneskekropp) uten noen vekselvirkninger eller miste sin energi gjennom få vekselvirkninger, men med store energioverføringer. Hvilken av de tre prosessene som inntreffer, avhenger av fotonets energi og materialets atomnummer, Z (Attix, 2004).

Ladde partikler avsetter sin energi på en helt annen måte. Disse partiklene er omgitt av et coulombfelt og vekselvirker med ett eller flere elektroner eller med kjernen til omtrent ethvert atom det passerer. På denne måten kan en ladd partikkel bremses kontinuerlig ned i en friksjonsløs prosess, ofte kalt *continuous slowing down approximation* (CSDA). Ladde partikler vekselvirker inelastisk med coulombfeltet på to forskjellige måter: myke kollisjoner og harde kollisjoner. Ved myke kollisjoner passerer den ladde partikkelen et stykke fra atomet den vekselvirker med. Atomet som helhet blir forstyrret og eksiteres til et høyere energinivå eller i noen tilfeller ionisert ved at et valenselektron sparkes ut. Ved harde kollisjoner passerer den ladde partikkelen i nærheten av atomet eller innenfor atomets radius. Sannsynligheten for å reagere med ett enkelt elektron er større. Dette elektronet blir slått ut med stor nok energi til at det kan ionisere andre atomer. Slike elektroner kalles δ -elektroner. α -partikkelen er en tung, ladd partikkel som i hovedsak vekselvirker gjennom harde kollisjoner og danner mange ionisasjoner og δ -elektroner langs sin bane.

Stopping power og LET

Stopping power er partikkelens gjennomsnittlige energitap per lengdeenhet og kan sies å være mediets bremsevne for en bestemt partikkel. Ved å dividere stopping power på mediets tetthet, får vi en størrelse kalt *mass stopping power* som for tyngre partikler kan beskrives ved Bethe-Block-ligningen (Attix, 2004):

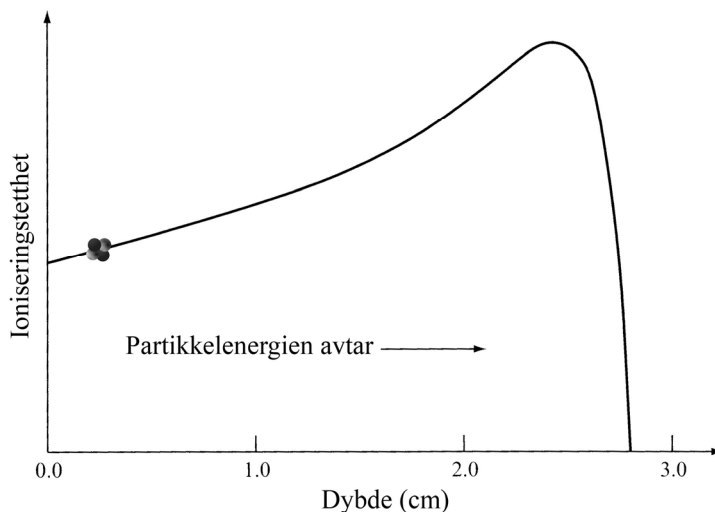
$$\frac{dT}{\rho dx} = \frac{4\pi(N_A Z/A)r_0^2 m_0 c^2 z^2}{\beta^2} \left[\ln \left(\frac{2m_0 c^2 \beta^2}{(1-\beta^2)I} \right) - \beta^2 \right] \quad (2.12)$$

hvor:

- dT/dx = partikkelens energitap/lengdeenhet.
- ρ = mediets tetthet.
- $N_A Z/A$ = antall elektroner per gram i det absorberende medium.
- r_0 = klassisk elektronradius.
- $m_0 c^2$ = elektronets hvileenergi.
- z = partikkelens antall elementærladninger.
- β = v/c (partikkelens hastighet relativ til lyshastigheten).
- I = ionisasjonspotensialet (middelverdien av løsrivelsespotensialet for alle elektronene i det bestrålte materialet)

Tre viktige faktorer som bestemmer stopping power er partikkelens ladning og hastighet samt mediets elektrontetthet $N_A Z/A$. Økt ladning bidrar til høyere energitap per lengdeenhet fordi coulombfeltet partikkelen er omgitt av, blir sterkere. Redusert hastighet øker også energitapet siden partikkelen får lengre tid til å vekselvirke med mediet. Ligningen bryter imidlertid sammen når hastigheten nærmer seg null. Partikkelen vil da plukke til seg elektroner slik at ladningen blir null. Antall elektroner per gram ($N_A Z/A$) varierer lite mellom forskjellige typer av biologisk materiale (Dertinger og Jung, 1970). Derfor er det hovedsakelig partikkelens ladning og hastighet bestemmer stopping power i kroppsvev.

Når energien til partikkelen avtar innover i mediet, øker ionisasjonstettheten. Dette medfører at store deler av den totale kinetiske energi avsettes i et lite område mot slutten av partikkelens bane. Dette kalles en bragg-topp. Bragg-kurven for α -partikler i luft er vist i figur 2.10. Kurvens form vil være lignende for α -partikler i vann eller biologisk vev, men rekkevidden vil da være kortere (under 100 μm).



Figur 2.10: Bragg-kurve. Variasjoner i ionisasjonstetthet som funksjon av dybde for en α -partikkel i luft. Kurven ender i en bragg-topp (bragg-peak) hvor partikkelen avsetter store deler av energien og faller til ro (Lilley, 2001, figuren er modifisert).

I tilfeller hvor energien transporteres ut av målvolumet av δ -elektroner, vil absorbert energi være lavere enn partikkelens energitap. LET (Linear Energy Transfer) tar hensyn til dette. LET gir et uttrykk for den gjennomsnittelige energien som er overført til mediet per lengdeenhet og måles i keV/ μ m. Høyenergetiske elektroner og fotoner er eksempler på lav-LET-stråling, mens tyngre kjerner, blant annet α -partikler, er eksempler på høy-LET-stråling (Hall og Giaccia, 2006). Se tabell 2.1.

Tabell 2.1: Typiske LET-verdier for ulike typer ioniserende stråling (Hall og Giaccia, 2006)

Strålingstype	Linear Energy Transfer [keV/ μ m]
Cobolt gammastråling	0,2
10 MeV protoner	4,7
150 MeV protoner	0,5
2,5 MeV alfapartikler	166

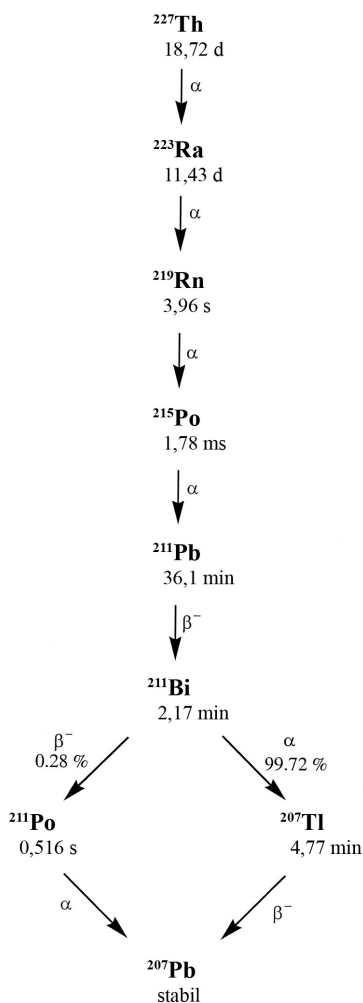
Direkte og indirekte effekt av stråling

Energiabsorpsjon kan skje enten direkte eller indirekte. Ved direkte effekt avsettes energien direkte i målmolekylet, enten som en ionisasjon eller eksitasjon. Ved indirekte effekt blir strålingen absorbert av et annet molekyl og det blir produsert frie radikaler som kan diffundere over store avstander for så å indusere skader i målmolekylet. Kroppsvev består av 70-90 % vann. De tre vanligste vannradikalene er OH^{\bullet} , H^{\bullet} og e_{aq}^{-} (hydratisert elektron). For

lav-LET-stråling dominerer den indirekte effekten, mens for høy-LET-stråling dominerer den direkte effekten (Hall og Giaccia, 2006). Det at direkte effekter domineres for høy-LET-stråling, er en konsekvens av svært høy ionisasjonstetthet som medfører stor konsentrasjon av vannradikaler. Den høye konsentrasjonen gjør at vannradikalene rekombinerer til H₂ og H₂O₂, som rent biologisk er uten særlig virkning i våre celler. H₂O₂ er en reaktiv oksygenforbindelse, men blir tatt hånd om av spesielle enzymer i cellen (Pettersen, 2006).

2.3.4 Nukliden ²²⁷Th – en α-emitter

Nukliden ²²⁷Th (thorium) er en α-emitter med halveringstid på 18,72 dager. Den desintegrerer til ²²³Ra (radium) ved utsendelse av en α-partikkel. Hele desintegrasjonskjeden er vist i figur 2.11 nedenfor.



Figur 2.11: Decay-kjede for ^{227}Th . Figuren viser fysisk halveringstid samt strålingstype for hver datternuklide. Kjeden deler seg i to før siste α -partikkel sendes ut. 99,72 % går veien om thallium-207. Kjeden ender i ^{207}Pb , stabilt bly (National Nuclear Data Center, 2009. Figur hentet fra Henriksen et al., 2002, figuren er modifisert).

α -partikkelen fra ^{227}Th har en gjennomsnittelig energi på 5,9 MeV og rekkevidden i bløtvev er mindre enn 100 μm (Dahle et al., 2007). Til sammenligning er cellediameteren 10-40 μm for SKOV-3. Tabell 2.2 viser en oversikt over de vanligste α -energiene til ^{227}Th .

Tabell 2.2: Oversikt over de vanligste α -energiene til ^{227}Th og forekomsten av disse (Browne, 2001).

α -energi (MeV)	Forekomst (%)
6,038	24,2
5,978	23,5
5,757	20,4
5,709	8,3

For hvert α -decay sendes det også ut ett γ -kvant. Disse γ -kvantene gjør det mulig å måle aktiviteten fra blant annen ^{227}Th ved bruk av en gammateller eller en germaniumdetektor. I tabell 2.3 finnes en oversikt over noen av de mest karakteristiske γ -linjene til ^{227}Th og forekomsten av disse.

Tabell 2.3: Oversikt over de viktigste γ -linjene til ^{227}Th og forekomsten av disse (Browne, 2001).

γ -energi (keV)	Forekomst (%)
235,96	17,5
50,13	11,4
256,23	9,5
329,85	4,0

2.3.5 Dosimetri/mikrodosimetri

Størrelsen som brukes til å måle ”mengden” av ioniserende stråling er *absorbert dose*, men kalles ofte bare *dose*. Absorbert dose er definert som energi absorbert per masseenhet. SI-enheten er J/kg og har fått det spesielle navnet Gray (Gy). $1 \text{ J/kg} = 1 \text{ Gy}$.

I denne oppgaven snakkes det til tider om dose i forbindelse med tilsatt/injisert aktivitetmengde (Bq). Dette må sees ut fra sammenhengen og ikke forveksles med stråledose (Gy).

Strålingsdosimetri er beregningen av absorbert dose i materie eller kroppsvev. Når vi snakker om dose i konvensjonell dosimetri, befinner vi oss gjerne på et makroskopisk nivå hvor targetvolumene er mange ganger større enn de cellulære enhetene som kroppsvev er bygd opp av. Dosen blir bestemt ved summering av total energi avsatt av multiple strålingsspor over et gitt makroskopisk volum, dividert på massen til dette volumet.

Mikrodosimetri på sin side, er beregning av energiavsetningen innenfor et mikroskopisk volum som omfatter sensitive targetvolumer, alt fra en cellediameter (ca 20 μm) ned til diameteren til DNA-molekylet (2 nm). Selv om mikrodosimetri omhandler samme konseptet med energiavsetning per masseenhet hva dose angår, så vil targetvolumets størrelse introdusere stokastiske effekter som er neglisjerbare i konvensjonell dosimetri. Viktigheten av de stokastiske fluktuasjonene i targetvolumet er svært avhengig av størrelsen på dette volumet, partikkelens energi og LET-verdi, samt det relative antall partikler, altså dosen. For

eksempel vil en større bit av kroppsvev som mottar 1 cGy med γ -stråling, i gjennomsnitt resultere i 50 elektronspor per celle. Til sammenligning vil 1 cGy med α -stråling resultere i et spekter av individuelle celledoser i området 0-30 cGy med et gjennomsnittelig antall α -treff per celle på bare 0,1. 90 % av cellene vil ikke få noen treff overhode (Humm et al., 1993).

Mikrodosimetri ved α -partikkelstråling er svært vanskelig, og den komplekse geometrien ved radioimmunterapi gjør det ikke noe lettere. Diverse analytiske modeller og Monte Carlo-simuleringer har vært benyttet uten store gjennombrudd. Årsaken til dette er at modellene bare fungerer for visse geometrier og spesifikke nuklider.

2.4 Strålingsbiologi

Strålingsbiologi omhandler blant annet studien av cellulære effekter av ioniserende stråling. I strålingsbiologi er det viktig å forstå hva som er den mest strålefølsomme delen i cellen, og hva som defineres som en død celle.

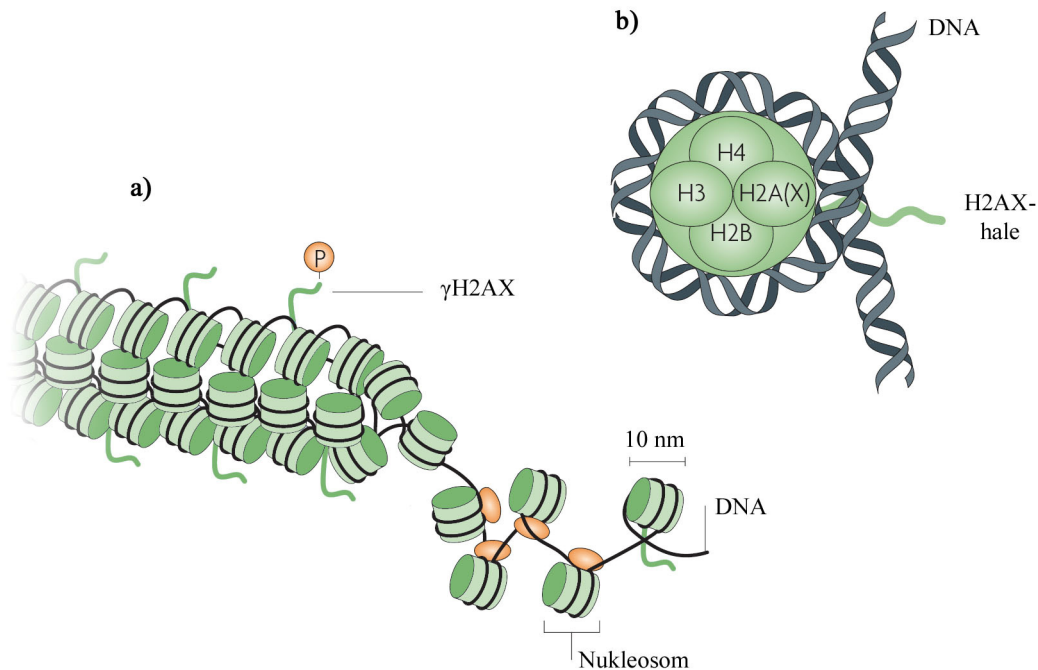
2.4.1 Cellens respons på ioniserende stråling

Delkapittel 2.4.1-2.4.3 er basert på kapittel 17 i *Molecular biology of the cell* (Alberts et al., 2002) og kapittel 2-7 i *Radiobiology for the radiologist* (Hall og Giaccia, 2006).

Stråleskader i DNA

Gjennom en rekke studier har det blitt påvist at DNA-molekylet er det mest strålefølsomme target i cellen. DNA-skader oppstår hele tiden av ulike årsaker, og en forutsetning for alt liv er derfor at mesteparten av skadene blir reparert. Ioniserende stråling forårsaker primært to typer skader; enkelttråbrudd (SSB, single strand break) der den ene tråden i DNA-spiralen blir brutt, og dobbelttråbrudd (DSB, double strand break) der det blir brudd i begge trådene. I tillegg kan også baseskader oppstå. Multiple skader (MDS, multiple damaged sites) involverer mer enn én av disse skadene samtidig. DSB blir regnet som den farligste skaden. Slike brudd kan oppstå direkte eller indirekte som et resultat av flere SSB. Dersom det oppstår to SSB nær hverandre på hver sin tråd innenfor en gitt tidsramme, klarer ikke de svake kovalente bindingene mellom DNA-trådene å holde disse sammen. Dette resulterer i at DNA bryter opp og et DSB dannes.

I hver eneste celle er det omlag 2 m utstrakt DNA som må pakkes inn i en kjerne på ca 10 μm . DNA surres rundt nukleosomer som igjen består av 4 forskjellige histoner. Et av disse histonene heter H2AX (figur 2.12). Ved et DSB vil H2AX fosforyleres og formes til γH2AX som i sin tur setter i gang reparasjonsapparatet. Et av proteinene som spiller en viktig rolle i reparasjon av DSB er p53-binding protein 1 (53BP1). 53BP1 binder til γH2AX og er brukt i oppgaven for å detektere DSB (Bonner et al., 2008; Adams og Carpenter, 2006.).



Figur 2.12: DNA pakkes tett sammen ved at det kveiles rundt nukleosomer (a) som består av 4 forskjellige histoner (b), blant annet H2AX. H2AX har en hale som blir fosforylert ved dobbeltråbrudd. Histonet omdannes da til γH2AX som skaper et fokus for proteiner som er involvert i DNA-reparasjon (Bonner et al., 2008, figuren er modifisert).

DSB representerer en potensielt letal stråleskade, ettersom DSB i mange tilfeller medfører celledød dersom de ikke repareres før cellen når M-fase. Cellens stråleskader deles inn i tre hovedgrupper; *letale*, *subletale* og *potensielt letale*. Letale skader er irreversible og leder per definisjon alltid til celledød. Dette kan være kompliserte MDS som er umulig å reparere. Subletale skader blir reparert på kort tid under normale forhold, og én subletal skade er i seg selv ikke dødelig for cellen. Dette kan være en baseskade eller et SSB. To eller flere slike skader i nært tid og rom kan likevel samvirke og danne en letal skade. Potensielt letale skader vil normalt føre til celledød, men dersom cellen får nok tid, kan skadene repareres. Som nevnt i kapittel 2.1.2 kan cellen holdes tilbake i G_1k og ved hjelp av spesielle stråleinduserte enzymer i G_2k for å fremme reparasjon av slike skader. Dette, samt dårligere

vekstforhold, gir reparasjonsmekanismene økt virketid hvilket øker sannsynligheten for celleoverlevelse.

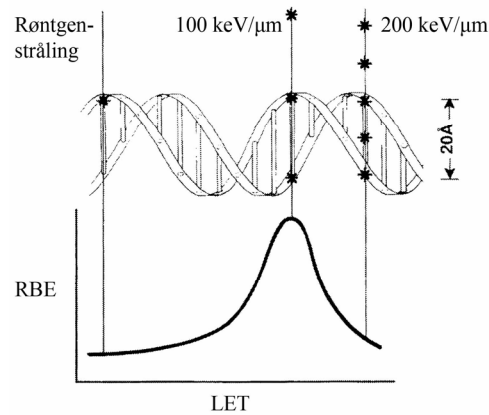
Celledød

En død celle defineres ofte som en celle som har mistet sin reproduserende evne. Cellen kan dø gjennom ulike prosesser der nekrose og apoptose er de to viktigste. Apoptose, som er en form for programmert celledød, kjennetegnes først ved at cellen slutter å kommunisere med sine naboceller. Videre kondenserer kromatinene i kjernemembranen og kjernen deles opp. Hver del blir omgitt av en membran som spises av nabocellene, slik at innholdet ikke tømmes ut i omgivelsene. Ved nekrotisk celledød dør cellen når den forsøker å dele seg. Cellemembranen sprekker og innholdet spres ut i omgivelsene, noe som er toksisk for omliggende celler.

Relativ Biologisk effekt, RBE

Strålingstype har mye å si for hvordan skaden blir og hvilken biologisk effekt den får. Som tidligere nevnt har α -stråling en høy LET-verdi sammenlignet med for eksempel røntgen- og γ -stråling; energien avsettes tettere. For samme dose er derfor sannsynligheten for DSB atskillig høyere for α -stråling enn for lav-LET-stråling. I den forbindelse er det innført et begrep for å sammenligne den biologiske effekten av ulike stråletyper, nemlig *relativ biologisk effekt*, RBE. RBE er definert som forholdet mellom dosen med 250 keV røntgenstråling og dosen med for eksempel tett ioniserende stråling som gir samme biologiske effekt. Denne verdien vil variere med dose, partikkelenergi og endepunkt (altså hva en måler på). En generell antagelse er at α -stråling kan ha RBE-verdier mellom 10 og 20. Med andre ord; det trengs en dose med 250 keV røntgen som er 10-20 ganger så høy som dosen med α -stråling, for å gi samme biologisk effekt. Dette er basert på tidligere *in vitro*-data (Hall EJ og Giaccia AJ, 2006). Denne faktoren har imidlertid aldri blitt reproduisert *in vivo* (Behr et al., 1999). Ved måling av spermatogenese (utvikling av sædceller) i bestrålte musetestikler demonstrerte Howell et al. (1994; 1997) RBE-verdier mellom 3 og 9. Dahle et al. (2008) bestemte RBE-verdier for ^{227}Th -Rituximab og ^{90}Y -Zevalin som henholdsvis er et α - og et β -emitterende radioimmunkonjugat. Her ble hemming av tumorvekst målt i mus og brukt som endepunkt. RBE-verdiene ble funnet til å være mellom 2,5 og 7,2 for ^{227}Th -Rituximab, og mellom 1 og 1,3 for ^{90}Y -Zevalin.

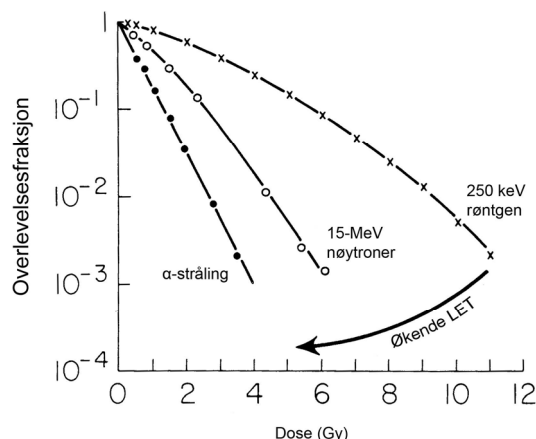
RBE varierer altså med stråletype, og det viser seg å være en direkte sammenheng mellom RBE og LET. Effekten av stråling ser ut til å være størst ved LET-verdier rundt 100 keV/μm. Dette kan forklares med at avstanden mellom ionisasjonene er sammenfallende med avstanden mellom sukkerfosfatkjedene i DNA som er 2 nm (figur 2.13).



Figur 2.13: RBE som funksjon av LET. Figuren viser hvorfor stråling på 100 keV/μm har størst relativ biologisk effekt (Hall og Giaccia, 2006, figuren er modifisert).

2.4.2 Celleoverlevelseskurver

En celleoverlevelseskurve viser sammenhengen mellom en gitt behandling, ofte stråledose, og fraksjonen av celler som har beholdt evnen til å danne koloni. Fraksjonen viser sannsynligheten for at en celle skal overleve denne dosen. Fraksjonen overlevende celler plottes vanligvis langs en logaritmisk ordinat som funksjon av dosen som plottes langs en lineær abscisse. Ekstern stråling gir kurvene typiske fasonger når celleoverlevelsesdataene plottes i et slikt koordinatsystem (figur 2.14). Stråling med høy LET, for eksempel α -stråling, gir en bratt og tilnærmet rett linje. Stråling med lav LET, for eksempel røntgen og γ , gir en initiell rett linje etterfulgt av et krumt område (som ofte rettes ut igjen ved store doser).



Figur 2.14: Typiske kurver for ulike typer ekstern stråling. Ved bruk av stråling med høy LET, for eksempel α -stråling, blir formen på kurven bratt og rett (Hall og Giaccia, 2006, figuren er modifisert).

Det finnes mange modeller og teorier som beskriver disse formene. Den mest brukte er den lineær-kvadratiske modellen (LQ-modellen eller $\alpha\beta$ -modellen) som ble utledet av Chadwick og Leenhouts i 1973. Denne modellen knytter celleoverlevelsen opp mot dobbeltråbrudd i DNA-molekylet (Chadwick og Leenhouts, 1973; Pettersen, 2006). Overlevelsesfraksjonen S er gitt som:

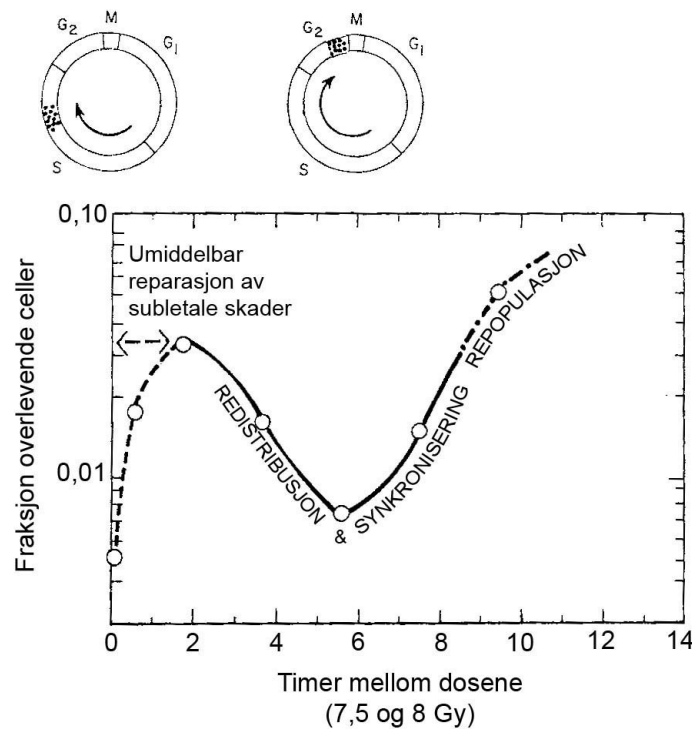
$$S = e^{-\alpha D - \beta D^2} \quad (2.13)$$

hvor α og β er konstanter og D er dosen. Det lineære α -leddet representerer dobbeltråbrudd der en enkel strålepartikkel bryter begge DNA-trådene i én hendelse, mens det kvadratiske β -leddet representerer hendelser der to partikler bryter hver sin tråd nært nok i tid og rom til å skape et dobbeltråbrudd.

2.4.3 Strålebiologiens 4 R'er

I tilfeller der stråledosen blir gitt i fraksjoner, eller hvis doseraten er så lav at totaldosen blir gitt over et betydelig tidsrom, er det spesielt 4 faktorer som virker inn på celleoverlevelsen. Disse kalles strålebiologiens fire R'er og omfatter reparasjon, redistribusjon, repopulasjon og reoksygenering. Tre av R'ene er illustrert på en god måte i figur 2.15. Her har en cellepopulasjon mottatt to doser røntgen-stråling med varierende tidsintervaller mellom disse dosene. Etter første dose er det hovedsakelig celler i sen S-fase som har overlevd. Disse cellene er de mest stråleresistente siden de akkurat har doblet sitt DNA. En ny dose

umiddelbart etter den første, tar livet av nesten hele populasjonen. To timer mellom dosene sørger for at subletale skader blir *reparert* før det oppstår nye subletale skader i nær tid og rom. Dette bidrar til økt overlevelse. Videre har cellene en progresjon gjennom cellesyklus som kalles *redistribusjon*. Dersom intervallet mellom dosene er på ca 6 timer, har S-fasecellene beveget seg inn i G₂/M-fase, hvilket er et svært sensitivt område i cellesyklus og man får en knekk på kurven akkurat her. Ved forlenget intervall går cellene gjennom mitose og deler seg, slik at *repopulasjon* bidrar til økt overlevelse.



Figur 2.15: Overlevelse av kinesiske hamsterceller eksponert for to doser med røntgenstråling (7,5 og 8 Gy), og inkubert ved 37°C i forskjellige tidsintervall mellom dosene. Første dose lar bare sen S-fase-celler overleve. En ny dose umiddelbart etter den første, tar livet av nesten hele populasjonen. Videre bidrar reparasjon av subletale skader til en topp på kurven etter 2 timer. Redistribusjon fører cellene videre i cellesyklus, først til den strålefølsomme G₂/M-fase etter 6 timer, deretter gjennom mitose hvor repopulasjon (celledeling) bidrar til økt overlevelse (Hall og Giaccia, 2006, figuren er modifisert).

Den siste R'en, reoksygenering, er spesielt viktig ved strålebehandling av kreftsvulster hvor blodgjennomstrømningen og derfor oksygentilførselen er dårlig. Som tidligere nevnt er den indirekte effekten (radikaldannelsen) av stråling den mest dominerende for lav-LET-stråling. Oksygen gir normalt økt effekt av stråling av den årsak at oksygen fikserer skadene påført av radikaler. En fiksert skade lar seg ikke reparere like lett. I hypoksisk vev (med lite oksygen) vil oksygenmolekylene kjapt bli "oppbrukt", men ved å fraksjonere totaldosen eller redusere

doseraten, vil oksygenet få tid til å nå frem til skadestedet før det blir reparert. Reoksygenering bidrar derfor til redusert celleoverlevelse.

Ved høy-LET-stråling blir effektene av reparasjon, redistribusjon og reoksygenering mindre gjeldende. Grunnen til dette er at de skadene som oppstår er såpass omfattende at de sjelden lar seg reparere. Dette gjelder nærmest uavhengig av hvor cellen er i cellesyklus, eller om det er oksygen til stede eller ikke. Men repopulasjon vil fortsatt være svært viktig. Dersom doseraten er lav, som for eksempel ved noen former for radioimmunterapi, vil cellen kunne rekke å dele seg før én av dattercellene får en dødelig treff. I den forbindelse er det derfor viktig å være oppmerksom på radionuklidens halveringstid og cellenes doblingstid.

2.5 Radioimmunterapi

Prognosen for pasienter med ovariekreft er dårlig på grunn av hyppig tilbakefall, spredning og utvikling av resistens mot kjemoterapi (Palm et al., 2007). Monoklonale antistoffer rettet mot cellemembranens antigener, har vært brukt for å kurere pasienter med ulike former for kreft, men umodifiserte monoklonale antistoffer (immunterapi) vil i mange tilfeller ha liten effekt på tumor. Ofte får pasienten tilbakefall selv om behandlingen gir god effekt i starten. Derfor er det et stort behov for andre behandlingsstrategier (Horak et al., 1997).

Radioimmunterapi (RIT) har vært forsket på siden tidlig på 1970-tallet. Et antistoff, spesifikt til antigenene på kreftcellemembranen, er merket med en terapeutisk radionuklide og blir systematisk injisert i pasienter. Radionukliden henfaller, hvilket resulterer i dødelig stråling som fortrinnsvis dreper kreftceller (Eary og Brenner, 2007; Palm et al., 2007).

Det er mange hensyn å ta ved valg av radionuklide for RIT; tilgjengelighet, bindingsegenskaper, strålekvalitet, biokinetikk, halveringstid, strålingens rekkevidde og døtrenes egenskaper. Frem til i dag er de fleste studiene av RIT gjort med β -emitterende nuklider. Disse nuklidene er ofte lett tilgjengelig og kan være å foretrekke i noen tilfeller. Rekkevidden til elektronet varierer mye med energien, men er oftest på noen få millimeter slik at energien vil bli avsatt i en viss avstand fra decay-punktet. Dette medfører kryssbestråling av celler som ikke er tilgjengelig for antistoffene. Men for små metastaser, under en millimeter i diameter, vil en α -emitterende nuklide med kort rekkevidde være en

bedre kandidat. Grunnen til dette er at fraksjonen av strålingsenergien som blir avsatt i tumor, øker når partikkelens rekkevidde nærmer seg tumorstørrelsen (Palm et al., 2007).

2.5.1 α -emitterende konjugater

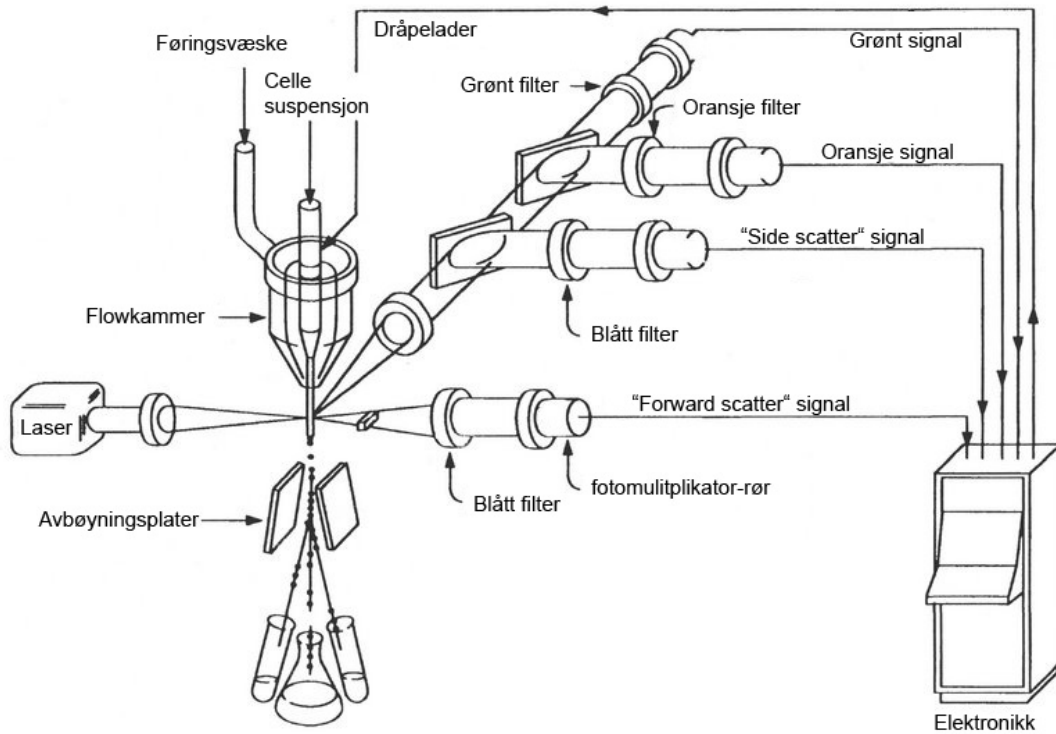
α -partikler har en typisk rekkevidde kortere enn 100 μm og er svært skadelig innenfor denne radien. Monoklonale antistoffer merket med nuklidene ^{213}Bi , ^{211}At , og ^{225}Ac har vist lovende resultater innen RIT (Jurcic et al., 2002; Zalutsky og Vaidyanathan, 2000; McDevitt et al., 2001). Ulempene med disse nuklidene er at ^{213}Bi og ^{211}At er vanskelig å innføre i klinikken på grunn av deres korte halveringstider (henholdsvis 46 minutter og 7,2 timer) og fordi produksjonskapasiteten er svært begrenset med dagens teknologi. Kildematerialet som trengs for å produsere ^{225}Ac er også svært begrenset (McDevitt et al., 2001; Miederer et al., 2004).

^{227}Th , som har blitt brukt i denne oppgaven, kan imidlertid være en aktuell kandidat, basert på fysiske og kjemiske egenskaper og tilgjengelighet. ^{227}Th har en halveringstid på 18,72 dager og kan produseres i tilnærmet ubegrensede mengder fra ^{227}Ac (Larsen RH et al., 2007). Den lange halveringstiden gir tid til å merke radioimmunkonjugatet før betydelige mengder av ^{223}Ra blir dannet. ^{223}Ra på sin side har også en relativt lang halveringstid (11,4 dager), noe som sikrer at nukliden blir utskilt av kroppen eller fanget i beinvev før den decayer. På grunn av alfapartikkelens korte rekkevidde vil beinmargen sannsynligvis ikke ta skade av dette (Bruland et al., 2006; Larsen et al., 2006).

2.6 Flowcytometri

Flowcytometri er en teknologi som måler fluorescens og spredt lys fra celler eller andre partikler, ofte med et fluorescerende fargestoff bundet til det molekylet en ønsker å måle. Føringsvæsken transporterer cellene enkeltvis gjennom en laserstråle. Cellene sprer lyset i alle kanter, men lyset som går rett igjennom - og 90° til siden - blir registrert som henholdsvis *forward scatter* og *side scatter*. Forward scatter gir informasjon om cellens relative størrelse, mens side scatter sier noe om cellens indre kompleksitet. Lyset blir omgjort til elektriske signaler av et fotomultiplikator-rør og videre behandlet av en datamaskin. Dersom cellen bringer med seg et fluorescerende stoff, kan fluorescenslyset filtreres ut og gi informasjon om relativ mengde av dette stoffet. Celler med ønskede

egenskaper kan deretter sorteres ut i et rør (BD Biosciences, 2000). En prinsippsskisse av et flowcytometer er vist i figur 2.16.



Figur 2.16: Prinsippsskisse av et flowcytometer (Givan, 2001, figuren er modifisert).

3. Materialer og metoder

3.1 Cellelinjen

En etablert cellelinje er en cellepopulasjon som har evnen til å dele seg uendelig mange ganger i kultur som følge av en genetisk endring (Alberts et al., 2002).

Denne oppgaven omfatter forsøk med den etablerte, humane cellelinjen SKOV-3 som ble isolert ved dyrkning av celler fra ascites (væske fra magesekken) fra en pasient med adenocarcinom i ovariene. SKOV-3-cellene har epitel morfologi og danner monolag i kultur (Fogh og Trempe, 1975). Cellelinjen har overuttrykk av HER2 antigenet på cellemembranen (Horak et al., 1997; Steffen et al., 2008). Cellene ble dyrket i RPMI 1640-medium med 10 % føtalt kalveserum (FCS), 1 % penicillin og 1 % L-glutamin.

Cellene ble testet negativ for mycoplasma ved hjelp av PCR (Polymerase Chain Reaction). Dette ble gjort i samarbeid med Debbie Svendsrud.

Doblingstiden til SKOV-3-cellene ble bestemt ved celledelling til 24-26 timer.

To brystkreftcellelinjer, BT-474 og MCF-7, ble brukt for sammenligning i enkelte forsøk. BT-474 har et høyt uttrykk av HER2, mens MCF-7 er tilnærmet fri for dette antigenet (Akabani et al., 2006).

3.2 Celledyrking

All celledyrking er utført på celledyrkingen ved avdeling for Strålingsbiologi, Institutt for Kreftforskning, ved Radiumhospitalet, Rikshospitalet.

3.2.1 Utstyr/kjemikalier og sterile rutiner

Sterilitet er meget viktig i forbindelse med celledyrking. Mikroorganismer som bakterier, virus, sopp og mycoplasma har evnen til å dele seg omtrent 50 ganger raskere enn humane celler og vil raskt vokse over en cellekultur (Kielberg et al., 2001). For å unngå slike

infeksjoner ble alt arbeid med levende celler utført i et sterilt miljø i en Laminar Flow (LAF)-benk (Safety Cabinet HERAsafe KS12, Thermo Electron, Langenselbold, Tyskland). I en LAF-benk filtreres luften gjennom et HEPA-filter som fanger opp det meste av partikler, inkludert bakterier, slik at luften i LAF-benker blir steril (Kielberg et al., 2001). Før og etter bruk ble benken desinfisert med 70 % etanol. Alt utstyr som kom i kontakt med cellene ble autoklavert (Getinge LS-33, Skärhamn, Sverige) ved 121°C i 16 minutter og glassutstyr ble brent med en gassflamme like før bruk.

SKOV-3 cellene ble dyrket i RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Østerrike) vekstmedium tilsatt 10 % føtalt kalveserum (FCS), 1 % penicillin (5000 IU/ml?) og 1 % L-glutamin for å sikre optimale vekstforhold. Mediet inneholder de næringsstoffene, vitaminene og uorganiske saltene cellene trenger, mens kalveserum og insulin tilfører vekstfaktorer nødvendige for celleproliferasjon. Cellene dyrkes optimalt ved pH 7,2 – 7,5 (Kielberg et al., 2001) og for å ha kontroll på pH-verdien er mediet tilsatt pH-indikatoren fenolrødt.

Trypsin (PAA Laboratories) er et proteolytisk enzym som løser cellene fra underlaget ved å bryte proteinbindinger mellom naboceller og enkeltcellenes feste til underlaget. EDTA tilsatt trypsinen hjelper til å løsne opp båndene mellom cellene ved at den binder seg til Ca^{2+} som cellene er avhengige av for å kunne opprettholde intracellulære bindinger.

Cellene i oppgaven ble dyrket i sterile 75 cm² eller 175 cm² plastflasker med filterkork (Nunclon, Danmark) og oppbevart i en semisteril CO₂-inkubator (Steri-Cycle CO₂ Incubator 371, Thermo Forma, Marietta, Ohio, USA) som sikret stabil temperatur (37°C), fuktighet (95 %) og CO₂-nivå (5 %).

3.2.2 Omsetting

Prolifererende celler trenger jevnlig tilførsel av vekstfaktorer og næringsstoffer, samt at cellulære avfallstoffer må fjernes for å opprettholde optimal proliferasjon. Celletettheten må også reguleres, ettersom både for høy og for lav tetthet hemmer celleveksten. For å ha kontroll på disse faktorene ble cellene omsatt to ganger i uka, hver mandag og fredag, og mediet byttet på onsdag.

Ved omsetting ble trypsin og medium varmet opp til 37°C i vannbad. Først ble gammelt medium fjernet fra celleflaska med vannsug. Deretter ble cellene vasket med trypsin (2 ml i 75 cm² flaske, 4 ml i 175 cm² flaske) to ganger før trypsinen ble fjernet og flaska plassert i inkubatorskapet i 3-5 minutter til cellene løsnet fra underlaget. For å hjelpe litt til ble flasken kasket forsiktig mot benken. 10 ml medium ble så tilsatt og pumpet over hele flaskebunnen med en pipette for å få med alle cellene. Mediet opphever trypsinets virkning og pumpingen separerer cellene til enkeltceller. Sistenevnte ble kontrollert i mikroskop (Olympus CK40, Tyskland) før cellene ble sådd ut til klonogene forsøk. En passe mengde av celledensiteten ble overført til en ny flaske med ferskt medium (totalt 15 ml i 75 cm² flaske, 30 ml i 175 cm² flaske). Normalt ble 1/8 – 1/6 av cellene dyrket videre. Celleflasken ble deretter plassert i et inkubatorskap.

3.2.3 Celletelling og fortynning

For å finne cellekonsentrasjonen er det vanlig å benytte et bürkerkammer. Bürkerkammeret består av et kammer oppdelt av et rutenett, hvor hver rute har et fastsatt volum. Ved å telle cellene i én rute i mikroskop og dividere antallet på rutens volum, får en ut cellekonsentrasjonen.

På cellelaboratoriet ved avdeling for Strålingsbiologi ble det istedenfor benyttet en automatisk celledetektor (Vi-cell XR, Bechman Coulter Inc., Miami, USA). Denne krever 0,5 ml av en celledensitet som blir sugd opp og fordelt i et kammer som kan sammenlignes med et bürkerkammer. Deretter tas det 50 bilder av kammeret samtidig som det sprøytes inn nye celler for hvert bilde. Døde celler detekteres ved at tilført trypan blått trenger inn i celler med perforert membran. Celledetektoren måler i tillegg gjennomsnittlig cellediameter. Ved å automatisere den manuelle bürkerkammer-metoden blir reproduserbarheten bedre. Dessuten blir resultatene mer nøyaktige fordi instrumentet analyserer 10-100 ganger flere celler enn den manuelle metoden.

Celledensiteten ble fortynnet til ønsket celledensitet i flere trinn med fortynning 1:10 – 1:30 per trinn.

3.3 Radioimmunkonjugatene ^{227}Th -Herceptin og ^{227}Th -Rituximab

Herceptin er et humanisert IgG1 monoklonalt antistoff mot HER2/neu antigenet som er overuttrykt på SKOV-3 cellene. Radioimmunkonjugatet ^{227}Th -Herceptin består av Herceptin merket med ^{227}Th ved hjelp av kelatoren p-SCN-benzyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (p-SCN-benzyl-DOTA, heretter kalt DOTA) (Larsen et al., 2007).

På samme måte som ^{227}Th -Herceptin, består ^{227}Th -Rituximab av antistoffet Rituximab merket med ^{227}Th . Også her ble merkingen gjort ved hjelp av kelatoren DOTA. Rituximab er et IgG κ monoklonalt antistoff som gjenkjenner antigenet CD20 som finnes på overflaten til normale B-celler og lymfekreftceller. Mesteparten av antistoffet er humant, men de delene som binder CD20 er fra mus. Ovariekreftceller har ikke dette antigenet. Rituximab ble brukt som en kontroll på effekten av ubundet aktivitet.

3.3.1 Produksjon av radioimmunkonjugatene

Følgende delkapittel samt neste – baserer seg på Larsen RH et al., 2007

Produksjonen av radioimmunkonjugatene ble utført av Jørgen Borrebæk og Åsmund Larsen ved Algeta ASA, Oslo.

Prepareringen av ^{227}Th er en prosess som går over mange trinn. Kort fortalt ble først ^{227}Ac produsert ved termisk nøytronbestråling av ^{226}Ra fulgt av β^- -henfall av ^{227}Ra til ^{227}Ac . Etter hvert som ^{227}Ac henfalt til ^{227}Th , ble ^{227}Th filtrert ut i en kolonne. Videre ble ^{227}Th og DOTA mikset sammen og varmet opp til 55°C for at ^{227}Th -DOTA-komplekset skulle holdes stabilt. Dette måtte gjøres før konjugeringen til antistoffet siden proteinet ikke tåler så høye temperaturer.

Kvalitet ble testet ved å måle immunreaktiv fraksjon, det vil si den prosentandelen av antistoffene som kan binde seg til antigen. Celler benyttet til kvalitetskontroll var av typen CD-20-antigenpositive Raji lymfocytter og HER2-positive BT-474 brystkreft celler. 0,25-0,4 ml celleduspensjon med 40-100 millioner celler/ml ble tilsatt 20-500 ng radioimmunkonjugat og inkubert i 2 timer ved 4°C . For å avgjøre andelen uspesifikk binding ble en tilsvarende prøve på forhånd inkubert med 25 ng kaldt antistoff i 15 minutter for å

blokkere antigenene på cellemembranen. Begge prøvene ble til slutt vasket og målt i en gammateller.

3.3.2 Rensing av ^{227}Th -Herceptin

Konjugatet ble normalt benyttet samme dag som det ankom fra Algeta. Ved lagring ble det fortynnet i PBS (phosphate-buffered saline) til et totalvolum på 5 ml. Før fortynning var volumet under 1 ml. Når konjugatet fortynnes økes avstanden mellom molekylene slik at færre antistoffer blir skadet som følge av bestråling fra nabomolekylene.

Som beskrevet i kapittel 2.3.4 vil ^{227}Th desintegre til radium og andre døtre. På grunn av den relativt korte halveringstiden til ^{227}Th (18,72 dager) får man en betydelig innvekst av disse døtrene allerede etter et par dager. Etter 4 dager er det foreksempel bare 86 % ^{227}Th igjen, resten er døtre. Dersom konjugatet skal benyttes videre må dette renses før bruk. Til denne prosedyren benyttes en metode som er under patentering og kan derfor ikke beskrives her (søknad nr 08159720.5, patentnr. 2113, European Patent Office). Med denne metoden blir man kvitt det meste av radium og andre døtre, og sitter igjen med et oppkonsentrert og tilnærmet rent konjugat.

3.4 Aktivitetstelling

Før radioimmunkonjugatet brukes må aktiviteten måles. Dette er viktig for å vite hvor mye aktivitet - og hvilken konsentrasjon en har, og for å kunne tilsette riktig mengde aktivitet i forsøkene. Noen ganger måler en direkte på cellene for å undersøke hvor mye aktivitet som er bundet til for eksempel cellemembranen. Til slike målinger ble to ulike aktivitetstellers benyttet, en gammateller (Cobra II Auto Gamma, Packard Instrument company, Downers Grove, USA) og en germaniumdetektor (Canberra 747, Canberra Industries INC, Oak Ridge, Tennessee USA)

Gammatelleren er noe mer følsom enn germaniumdetektoren. Lavere aktivitetsmengder kan dermed måles med høyere sikkerhet. En annen fordel er at den er utstyrt med flere magasin som kan fylles opp med prøver som dermed måles automatisk i tur og orden. Germaniumdetektoren på sin side har den fordelen at den registrerer ulike gammalinjer, slik

at en kan skille ^{227}Th fra sine døtre. Sistenevnte er viktig dersom en gjør målinger flere dager etter at aktiviteten er tilsatt.

Telletiden ble satt til 5 minutter (300 sekunder) for begge tellerne, med unntak av biodistribusjonsforsøkene hvor telletiden til germaniumdetektoren ble satt til 3 minutter.

3.5 Måling av ekspresjon av HER2

En viktig forutsetning for å bruke SKOV-3 celler i denne oppgaven, er at de overuttrykker antigenet HER2 på cellemembranen. Det er svært viktig å kartlegge denne ekspresjonen og finne ut hvordan SKOV-3 uttrykker antigenene i forhold til andre kjente cellelinjer. En ønsker å se på antall antigener per celle, samt fordelingen av antigener innen populasjonen. Til dette ble flowcytometri og fluorescensmikroskopi benyttet. Felles for disse metodene er å detektere fluorescens fra cellene ved bruk av Alexa Fluor 488 Herceptin (heretter kalt Alexa-Herceptin). Alexa er et molekyl som fluorescerer grønt ved eksitasjon med blått lys (450-500 nm). Dette molekylet ble bundet til Herceptin ved hjelp av Alexa Fluor 488 Protein Labeling Kit i henhold til produsentens prosedyre (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA). Ved å belyse en celle behandlet med Alexa-Herceptin med 488 nm lys, vil den totale emitterte lysintensiteten være proporsjonal med antall antigener på cellemembranen. Det vil si at det relative antallet antigener på SKOV-3-celler og andre celler kan bestemmes.

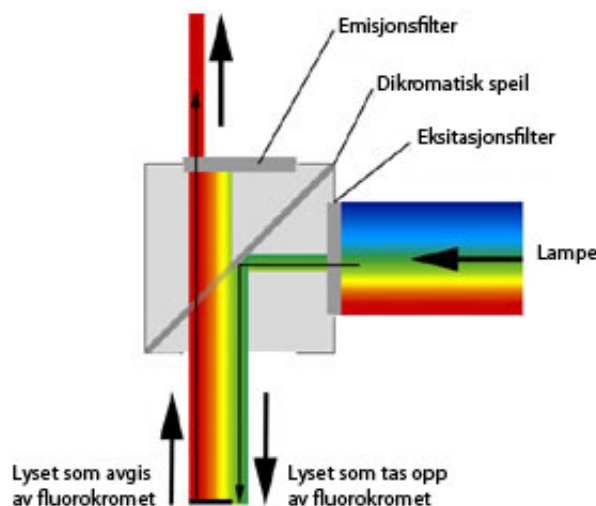
Hoechst er et annet fargestoff som blir brukt mye i forbindelse med flowcytometri og mikroskopi. Hoechst 33342, såkalt vital Hoechst, er et fluorescerende fargestoff som tas opp av levende celler gjennom en intakt cellemembran og farger DNA (Kielberg et al., 2001). Molekylet eksiteres av UV-lys med bølglengder i området 320-370 nm og emitterer blått lys (420-520 nm).

3.5.1 Fluorescensmikroskopi

Ved å farge cellene med Alexa-Herceptin og se på dem i et fluorescensmikroskop, får man en visuell oppfatning om hvor antistoffet befinner seg i cellen. Dette kan gi en økt forståelse for hvordan cellen tar opp - og distribuerer Herceptin.

Mikroskopet brukt i dette forsøket var av typen Carl Zeiss Axiovert 200M (Göttingen, Tyskland) med kamera (Carl Zeiss AxioCam HRm) og inkubatorboks som holder 37°C. Det ble sådd ut 50.000-100.000 celler i 4 skåler med diameter lik 3 cm. Skålene ble satt i inkubator i 2 timer for at cellene skulle feste seg. Videre ble cellene i to av skålene blokkert med 500 µg/ml kald Herceptin i 15 min. Deretter ble det tilsatt 10 µg/ml Alexa-Herceptin i alle 4 skålene. To av skålene, én blokkert og én ublokkert, ble vasket etter 1 time. De to andre ble vasket etter 48 timer. Umiddelbart etter vask ble cellene inkubert i nye 30 min med 2 µg/ml Hoechst, vasket og satt inn i mikroskopet.

For hver skål ble det tatt to bilder med samme utsnitt. I det ene bildet ble det benyttet en Hoechst filterblokk og i det andre en FITC filterblokk. Filterblokken sørger for at cellene blir belyst med riktig bølgelengde, og at lyset som emitteres fra cellen kommer til mottaker (øye eller kamera). Filterblokken består av 3 deler: eksitasjonsfilter, dikromatisk speil og emisjonsfilter. Eksitasjonsfilteret filtrerer lyset fra lyskilden og tillater kun et smalt lysspekter å slippe gjennom. Det dikromatiske speilet speiler lys under en viss bølgelengde, mens lyset over denne bølgelengden slippes gjennom. Emisjonsfilteret filtrerer det emitterte lyset fra fluorokromet (for eksempel Hoechst) og slipper gjennom et ønsket område av lysspekteret. På denne måten får en frem kjernen farget med hoechst, samt områdene hvor Alexa-Herceptin er konsentrert. Prinsippskisse av en filterblokk er vist i figur 3.1.



Figur 3.1: Prinsippskisse av en filterblokk (Universitetet i Oslo, 2008, figuren er modifisert)

3.5.2 Flowcytometri

Uttrykk av HER2 ble sammenlignet for SKOV-3, BT-474 og MCF-7 ved hjelp av flowcytometri.

Først ble cellene trypsinert og resuspendert i 10 ml medium. Av celledensiteten gikk 0,5 ml til celledetelling mens resten ble spunnet ned ved 1700 rpm i 3 minutter. Cellene ble så resuspendert i et passende volum iskaldt RPMI-1640 medium med 5 % FCS slik at cellekonsentrasjonen ble 2 mill. celler/ml. Dette ble gjort separat med hver enkelt cellelinje. FCS inneholder et mangfold av proteiner som er viktig for cellen. Disse binder seg uspesifikt til cellemembranen og forhindrer Alexa-Herceptin i å gjøre det samme siden de uspesifikke bindingssetene allerede vil være opptatt.

SKOV-3 ble farget med 8 µg/ml Hoechst 33342 i 20 min ved 37°C og deretter vasket én gang med iskaldt RPMI-1640 med 5 % FCS. Det ble så klargjort 7 prøver i samsvar med tabell 3.1 nedenfor. I prøve 1-3 var det 2 millioner celler per prøve, i prøve 4-7 var det 1 mill celler av hver cellelinje. Prøve 4 og 5 ble tilsatt kaldt Herceptin, 200 µg/ml, og inkubert på is i 10 min for å blokkere binding av Alexa-Herceptin. Videre ble prøvene 4-7 inkubert med 10 µg/ml Alexa-Herceptin i 1 time på is. Til slutt ble samtlige prøver vasket én gang med iskald PBS og filtrert for å unngå celleklumper. Rett før en prøve skulle kjøres i flowcytometeret ble det tilsatt 5 µl propidium jodid (1 µg/µl) til 1 ml med den aktuelle prøven som til slutt ble vortexet i ca 1 sekund. Propidium jodid (PI) trenger inn i en perforert cellemembran slik at cellens kjerne fluorescerer rødt (bølgelengde 590-680 nm) ved eksitasjon med grønt lys (470-560 nm). Så snart molekylet er bundet til DNA, forsterkes fluorescensen 20-30 ganger. På denne måten får man en indikasjon på om cellen er død eller ikke, og man kan velge å se bort fra informasjonen fra slike celler.

Ved å farge SKOV-3 med Hoechst kan man enkelt skille disse cellene fra en annen cellelinje i flowcytometeret (Trond Stokke, personlig meddelelse). På denne måten kan man kjøre to cellelinjer samtidig (slik det ble gjort i prøve 4-7) og det blir enklere å sammenligne dem opp mot hverandre siden alt av parametere og innstillinger nødvendigvis blir like.

Målingene ble gjort med et LSR-II flowcytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)

Tabell 3.1: Oversikt over prøvene for måling av ekspresjon av HER2 ved bruk av flowcytometri.

Prøve nr	Prøve type	Cellelinje		Herceptin [µg/ml]	Alexa-Herceptin [µg/ml]
1	Kontroll	SKOV-3			
2	Kontroll		MCF-7		
3	Kontroll		BT-474		
4	Blokkert	SKOV-3	MCF-7	200	10
5	Blokkert	SKOV-3	BT-474	200	10
6	Ublokkert	SKOV-3	MCF-7		10
7	Ublokkert	SKOV-3	BT-474		10

Analysen av flowcytometridataene ble gjort med programmet BD FACSDiVa Software (BD Biosciences). Signalene man får fra flowcytometeret kommer fra lysspredning og fluorescens. Lysspredning deles inn i *forward scatter* (FCS) og *side scatter* (SSC) som henholdsvis sier noe om cellens størrelse og innhold. En ønsker utelukkende å se på enkeltceller, derfor ble det sett bort fra celler med høy og lav lysspredning, da slike signaler representerer dubletter og små fragmenter. Celler med høyt fluorescenssignal fra propidium jodid ble heller ikke tatt med videre i analysen. Videre ble data fra SKOV-3 sortert ut ved hjelp av fluorescenssignal fra Hoechst og sammenlignet med data fra BT-474 og MCF-7.

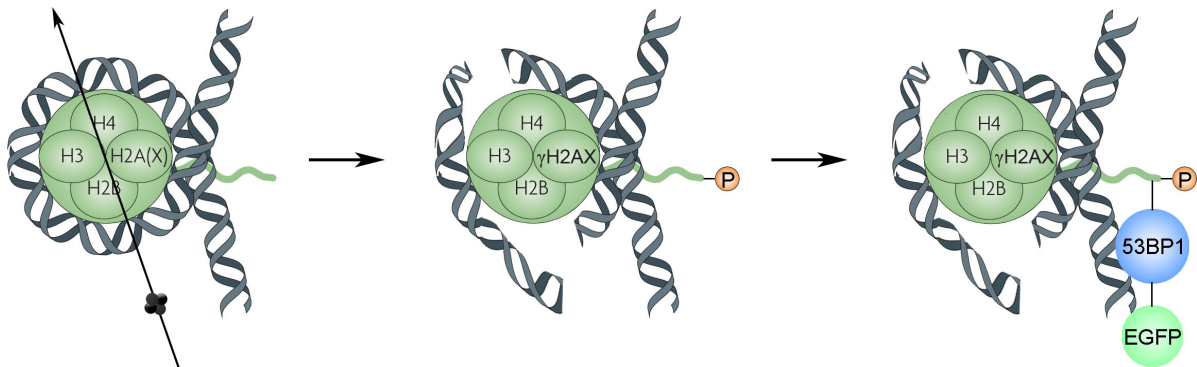
3.6 Transfeksjon og seleksjon

Det ble etablert en metode for å detektere α -sporene gjennom cellekjernen. Dette ville gi verdifull informasjon om hvor stor andel av cellene som faktisk får en direkte treff av en α -partikkel, og videre hva som skjer med disse cellene samt deres naboceller.

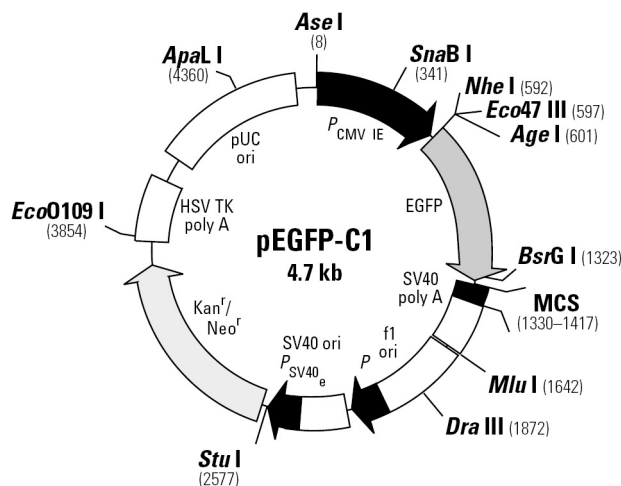
I denne metoden ble SKOV-3-cellene transfektert med vektoren pEGFP-C1-53BP1. Disse cellene ble kun brukt til mikroskopiforsøk og blir heretter kalt SKOV-3-EGFP. Forsøkene er beskrevet i kapittel 3.7.6 *Mikroskopiforsøk med transfekterte celler*.

Etter en vellykket transfeksjon begynner cellen å produsere en lenke av proteiner hvor spesielt to av dem er interessante. Det ene er 53BP1 som binder seg til det fosforylerte histonet γ H2AX. Som nevnt i kapittel 2.4.1 vil H2AX fosforyleres ved dobbeltråbrudd i

DNA og formes til γ H2AX. Det andre proteinet er EGFP (enhanced green fluorescence protein) som fluorescerer ved eksitasjon med blått lys. Dette er koblet til 53BP1 (figur 3.2). Denne lenken av proteiner gjør det mulig å se nøyaktig hvor en α -partikkel passerer gjennom kjernen, og ved hjelp av time-lapse-metoden (se kapittel 3.7.5) kan en blant annet få informasjon om hvor mange treff en celle må ha før den dør. Vektoren fikk vi ferdig amplifisert og rensset av Randi Syljuåsen ved vår avdeling. Se figur 3.3 for vektorinformasjon.



Figur 3.2: En α -partikkel forårsaker dobbeltråbrudd i DNA som fører til at histonet H2AX fosforyleres og omdannes til γ H2AX. γ H2AX binder til seg 53BP1 som er et viktig protein i reparasjonsapparatet. I de transfekterte cellene er EGFP bundet til 53BP1, og EGFP fluorescerer ved eksitasjon med blått lys. Dette gjør det mulig å detektere DSB i cellene (Bonner et al., 2008, figuren er modifisert).



Figur 3.3: pEGFP-C1 Vektorinformasjon. Viktige gener er kanamycin/neomycin resistensgen som gjør cellen resistent mot blant annet antibiotikumet geneticin (G418), og EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) som får cellekjernen til å fluorescere grønt. 53BP1-genet har blitt satt inn i MCS (Multi Clonal Site). (Clontech, Palo Alto, CA, USA)

3.6.1 Transfeksjon

Dagen før transfeksjonen ble det sådd ut 500.000 celler i en 6 cm skål med 3 ml medium. 138 µl serumfritt medium (OPTI-MEM GlutaMAX, Invitrogen, Grand Island, NY, USA), forvarmet til 37°C i vannbad, ble blandet med 9 µl transfeksjonsreagent (FuGene6, Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) i et rør. Transfeksjonsreagenten består blant annet av lipider som pakker inn DNAet og transporterer det inn i cellene. Dette ble inkubert i romtemperatur i 5 min. Videre ble det tilsatt 3,5 µl DNA (pEGFP-C1-53BP1), av en konsentrasjon på 0,85 µg/µl. Røret ble så inkubert i romtemperatur i 25 minutter. 100 µl av blandingen ble deretter tilsatt dråpevis til skålen med celler. Skålen ble deretter satt i CO₂-inkubator.

Dagen etterpå ble cellene trypsinert, fortynnet og sådd ut i 3 6-cm-skåler med henholdsvis 100.000, 20.000 og 5.000 celler med totalt 3 ml medium per skål. Videre ble det tilsatt total konsentrasjon 800 µg/ml geneticin (G418) til alle skålene som deretter ble satt i inkubator i 14 dager. Transfekterte celler vil med stor sannsynlighet være resistente mot antibiotikumet geneticin siden vektoren inneholder antibiotika-resistens-genet neomycin (figur 3.3). Celler som ikke har fått transfektet vektoren vil derfor selekteres bort under celledyrkingen. SKOV-3-cellene ble testet for dyrking med medium med geneticin før transfeksjonen for å optimalisere geneticinkonsentrasjonen.

3.6.2 Seleksjon

Etter transfeksjonen var det stor variasjon i fluorescensintensiteten ved eksitasjon med UV-lys. Derfor ble én av skålene med passe celledetthet merket med tusj på undersiden der hvor fluorescensen var best. Deretter ble disse områdene trypsinert ved hjelp av trypsinlapper. Trypsinlapper er sirkelformede biter av trekkpapir (ca 5 mm) som dynkes i trypsin og legges over cellene som ønskes trypsinert. Etter trypsinering ble trypsinlappene lagt i hver sin skål med medium og plassert i inkubator til cellene i skålen hadde en passe tetthet. Videre ble hver skål undersøkt i fluorescensmikroskop. Skålen med best fluorescens ble trypsinert på normal måte og cellene ble analysert og sortert ved flowcytometri (FACS DiVa, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). På denne måten endte vi opp med en cellepopulasjon med homogen fluorescensintensitet.

3.7 Behandling med radioimmunkonjugater og kaldt antistoff

I de fleste forsøkene har cellene blitt behandlet med ^{227}Th -Herceptin, men i enkelte kontrollforsøk ble det benyttet ^{227}Th -Rituximab eller kaldt antistoff. Med kaldt antistoff menes her rent Herceptin uten aktivitet.

3.7.1 Koloniforsøk

Koloniforsøk, eller klonogen overlevelse, er en metode for å finne overlevelsesfraksjonen av celler etter en gitt behandling. Det er cellens evne til å danne koloni som bestemmer om den er i live eller ikke. Måten dette gjøres på er at enkeltceller sås ut og dyrkes under optimale vekstforhold. Etter en viss tid, når cellene har dannet store nok kolonier, blir antall kolonier sammenlignet med en kontroll som ikke har vært utsatt for den spesifikke behandlingen.

Ved koloniforsøk ble det benyttet to ulike prinsipper for inkubering med radioimmunkonjugat; aktivitet tilsatt *før* - og *etter* utsåing. I begge metodene ble cellene trypsinert og talt etter prosedyrene beskrevet i 3.2.2 *Omsetting* og 3.2.3 *Celletelling og fortykning*. Videre ble cellene fortyknet og deretter sådd ut i 6-brønnsbrett, inneholdende 200 celler per brønn for kontrollcellene, før brettene ble plassert i en CO_2 -inkubator i ca 12 dager. I løpet av denne tiden ble det byttet medium én gang etter 7 dager.

Cellene ble fiksert når koloniene var store nok og dermed godt synlig med det blotte øye, ved at de ble skylt 1 gang med NaCl (0,9 %) før de ble fiksert i 70 % etanol i omtrent 5 minutter. Videre ble cellene farget med metylenblått i ca 5 minutter før de ble skylt 2 ganger med vann og satt til tørk.

Ved kolonitelling ble alle kolonier som inneholdt 50 celler eller mer tatt med i tellingen. Kolonier med celleantall nær 50 celler ble undersøkt i mikroskop (Olympus CK40, Tyskland) for å avgjøre antall celler i kolonien.

Aktivitet tilsatt etter utsåing

2 timer etter utsåing, når cellene hadde festet seg, ble de tilsatt 0-20 kBq/ml radioimmunkonjugat og satt tilbake i inkubatoren. Etter nye 4 timer ble cellene vasket 1

gang med medium (37°C) for å fjerne aktivitet fra mediet før de ble inkubert videre i CO₂-inkubator i ca 12 dager

Aktivitet tilsatt før utsåing

Underveis i studiet ble det byttet metode for inkubering med radioimmunkonjugat. Ved å tilsette radioimmunkonjugatet før utsåing, kunne det tilsettes til et stort antall celler. Kun en liten del av disse cellene ble sådd ut til koloniforsøk. Resten gikk til aktivitetstelling for å finne bundet aktivitet per celle. Ved å finne ut hvordan cellebundet aktivitet avtar over tid (kapittel 3.7.4), kunne man regne ut totalt antall decay per celle i perioden frem til fiksering.

I denne metoden ble 15,4 millioner celler vasket 1 gang før telling, før de ble resuspendert i 7,7 ml iskaldt medium til en konsentrasjon på 2×10^6 celler/ml. Cellene ble overført til 7 sentrifugerør (Eppendorf, Hamburg, Tyskland), 1 ml per rør, før de ble satt på is i 10 minutter. Deretter ble det tilsatt forskjellig konsentrasjon (0-20 kBq) ²²⁷Th-Herceptin til hvert rør. Videre ble cellene inkubert i risteinkubator ved 80 "runder"/minutt (Kühner Shaker LT-W, Adolf Kühner AG, Birsfeiden, Sveits) med radioimmunkonjugatet i 1 time ved 4°C. Ved å tilsette aktiviteten til celler i suspensjon vil aktiviteten bindes til hele cellemembranen, ikke bare på oversiden av en utflatet celle, hvilket er tilfellet når aktivitet tilsettes etter utsåing. Ved å sette cellene på is stoppes alle internaliseringsprosesser. På denne måten vil aktiviteten bare sitte på cellemembranen. Dette fører til et enklere geometrisk startpunkt ved eventuelle dosimetriberegninger. Dessuten trives cellene bedre i suspensjon over lang tid ved 4°C enn ved 37°C, og tåler vaskeprosessen bedre (personlig meddelelse fra Jostein Dahle).

Videre ble cellene vasket 1 gang med kaldt medium og resuspendert i nye 2 ml kaldt medium. Av dette ble 0,5 ml tatt ut til videre fortykning (37°C) mens resten gikk til aktivitetstelling. Etter fortykning ble cellene sådd ut i 6-brønnsbrett, inneholdende 200 celler per brønn for kontrollcellene, og satt i inkubator i ca 12 dager.

Kaldt antistoff

Ved eventuelle effekter av ²²⁷Th-Herceptin er det viktig å kartlegge hvorvidt det er radionukliden som gir effekt, eller om det er Herceptin alene som har en funksjon på disse cellene. Derfor ble det gjort to forsøk, 6 paralleller i hvert forsøk, med kaldt Herceptin. Forsøkene ble gjort på samme måte som *aktivitet tilsatt før utsåing*, ved at 5 prøver med

2×10^6 celler i 1 ml ble satt på is i 10 min. Deretter ble det tilsatt forskjellig konsentrasjon kaldt Herceptin til hvert rør før de ble satt i risteinkubator i 1 time ved 4°C . Konsentrasjonene (0-20 $\mu\text{g/ml}$) tilsvarer samme mengde Herceptin som finnes i 0-20 kBq/ml ^{227}Th -Herceptin med en spesifikk aktivitet på 1000 Bq/ μg , noe som var ganske vanlig.

Videre ble cellene vasket 1 gang med kaldt medium før de ble fortynnet og sådd ut i 6-brønnsbrett, inneholdende 200 celler per brønn, og satt i inkubator i 12 dager.

3.7.2 Beregning av overlevelsesfraksjonen ved koloniforsøk

Antall kolonier i hver skål ble talt og gjennomsnittet N i hver gruppe ble beregnet. Kontrollgruppen ble brukt til å finne plating efficiency, PE, for cellene. PE brukes til å justere overlevelsesfraksjonen til de behandlede cellene. PE er gitt ved:

$$PE = \frac{K}{K_0} \quad (3.1)$$

der K er gjennomsnittelig antall kolonier per skål i kontrollgruppa, og K_0 er antall celler utsådd per skål i kontrollgruppa.

Overlevelsesfraksjonen for hver gruppe som har fått samme behandling er gitt ved:

$$S = \frac{N}{N_0 \cdot PE} \quad (3.2)$$

der N er gjennomsnittelig antall kolonier og N_0 er antall celler utsådd for den aktuelle gruppen.

Microsoft Excel ble benyttet for å beregne standardavvik og standard error (se kapittel 3.10 *Statistikk*).

Multiplisitetsskorreksjon

Når man sår ut celler til koloniforsøk ønsker man å så ut enkeltceller. Dette er fordi man ønsker å studere enkeltcellers evne til å danne kolonier, da enheter bestående av flere celler vil ha større sjanse for å danne kolonier. Mange cellelinjer kan være vanskelig å separere, og cellene vil gjerne klumpe seg sammen til dubletter eller triplerter. Dersom man kjenner andelen dubletter og triplerter etc., kan man allikevel beregne overlevelsesfraksjonen for

enkelceller ved å korrigere for multiplisiteten, det vil si gjennomsnittelig antall celler i de kolonidannende enhetene.

Etter at SKOV-3-cellene har blitt trypsinert og pipetert som nevnt i kapittel 3.2.2 *Omsetting* har det aldri blitt oppservert annet enn enkeltceller. Cellene har flere ganger blitt observert i bürkerkammer før utsåing og i flaskene etter utsåing. I tillegg ble det tatt 50 bilder av totalt flere tusen celler ved hjelp av den automatiske celledetektoren før hvert forsøk, og her har det heller aldri vært registrert celleklumper som dubletter eller tripletter.

Multiplisitetskorreksjon var derfor ikke nødvendig i denne oppgaven.

3.7.3 Strippingbuffer – optimalisering og cellepåvirkning

HER2 er internaliserende. Ved doseberegninger kan det være interessant å vite hvor stor andel av aktiviteten som er internalisert og befinner seg på innsiden av cellen, og andelen som befinner seg på cellemembranen. Dette kan la seg gjøre ved å benytte en strippingbuffer før aktivitetsmålingene. Strippingbufferen er en væske som fungerer ved at dens lave pH bryter bindingen mellom antistoff og antigen på cellemembranen. På denne måten strippes cellemembranen for radioaktivitet og en kan finne internalisert aktivitet ved å måle på cellene, samt aktiviteten på cellemembranen ved å måle på strippingbufferen.

Haigler et al. (1980) og Borchardt et al. (2003) har i sine studier benyttet en enkelt sammensatt strippingbuffer av 50 mM glysin og 150 mM NaCl. Samme strippingbuffer ble benyttet i denne oppgaven. pH-verdien reguleres ved å tilsette saltsyre (HCl) og glysinen fungerer som en pH-buffer. Det ble benyttet et pH-meter for å fastsette pH-verdien (Jenway 3510 pH Meter, Barloworld Scientific, Dunmow, Essex, UK).

Det ble gjort ett kontrollforsøk for å optimalisere strippingbufferen, og ett forsøk for å undersøke dens virkning på cellemembranen. Ved førstenevnte forsøk ble det laget tre strippingbuffer med pH 2,4, 2,6 og 2,8. Videre ble 12 millioner celler satt på is i 20 minutter før 400 ng/ml ²²⁷Th-Herceptin ble tilsatt. Etter 1 times inkubasjon på is ble cellene vasket to ganger med iskald PBS m/1% FCS før de ble fordelt i 6 rør, 2 millioner celler per rør. Cellene ble spunnet ned og supernatanten fjernet før to og to rør ble tilsatt romtemperert strippingbuffer med henholdsvis pH 2,4, 2,6 og 2,8. 1 ml per rør. Halvparten av rørene ble inkubert på Vortex i rolig tempo i 10 minutter, andre halvparten i 20 minutter (Vortex-Genie 2 G560E, Scientific Industries Inc, NY, USA). Videre, etter nøyaktig 10 og 20 minutter ble

cellene spunnet ned, og supernatanten overført til et nytt rør nr 1. Cellene ble vasket én gang med 1 ml PBS og denne supernatanten ble også tilført rør nr 1. Deretter ble cellene resuspendert i 1 ml PBS og overført til et rør nr 2. Dette ble gjort med alle 6 rørene slik at 12 rør ble satt til aktivitetstelling.

Strippingbufferens virkning på cellemembranen ble undersøkt ved å la celler gå gjennom samme behandling som beskrevet ovenfor. Etter 10 minutter inkubasjon på Vortex ble cellene talt i en automatisk celleteller. Her ble celler med perforert membran detektert ved at tilført trypan blått trenger inn disse cellene (se 3.2.3 Celletelling og fortykning)

3.7.4 Måling av cellebundet aktivitet over tid

Radioaktiviteten knyttet til en celle vil avta over tid, og det er mange faktorer som spiller inn. Når cellene deler seg i to, vil samtidig aktiviteten deles mellom dem. I tillegg vil ^{227}Th henfalle og noe av radioimmunkonjugatet vil falle av. Derfor er det viktig å måle cellebundet aktivitet på forskjellige tidspunkter siden dette gir informasjon om hvor mye radioaktivitet som er tilknyttet cellen til en hver tid. Denne informasjonen kan videre brukes til å beregne antall α -henfall per celle som igjen gir en indikasjon på dose.

Celler med kjent cellekonsentrasjon ble satt på is i minimum 10 min for å stoppe internalisering av antistoff. Det ble deretter tilsatt 2500 bq/ml ^{227}Th -Herceptin og cellene ble satt i risteinkubator ved 4°C i 1 time. Videre ble cellene vasket en gang med kaldt medium, resuspendert i nye 4 ml og satt til aktivitetstelling. Deretter ble cellene sådd ut i seks 75 cm²-flasker, samt i tre 175 cm²-flasker – 1 million celler i hver flaske. For å unngå at cellene vokser for tett ble de største flaskene benyttet til det siste tidspunktet. Til slutt ble flaskene satt i inkubator.

På dag 1 (24 timer) ble cellene i tre av de minste flaskene trypsinert og vasket en gang med iskald PBS med 1 % FCS. Dette utgjorde 3 paralleller som ble behandlet uavhengig av hverandre under hele prosedyren. Cellene ble talt i tellemaskin, resuspendert i 1 ml PBS og overført til sentrifugerør. Videre ble cellene spunnet ned og supernatanten sugd av med vannsug før det ble tilført 1 ml stripping buffer (ca 20°C). Cellene ble straks satt på vortex (Vortex-Genie 2 G560E, Scientific Industries Inc, NY, USA) i rolig tempo i 10 minutter. Etterpå ble cellene spunnet ned og supernatanten overført til ett nytt rør nr 1. Cellene ble deretter vasket 1 gang med PBS hvor supernatanten ble overført til rør nr 1 sammen med

strippingbufferen. Til slutt ble cellene resuspendert i 1 ml PBS og overført til et nytt rør nr 2. Både rør nr 1 og 2 ble satt til aktivitetstelling (til sammen 6 rør i 3 paralleller)

Samme prosedyre ble gjort etter 4 dager og etter 7 dager hvor 175 cm²-flaskene ble tatt på dag 7.

3.7.5 Vekstforsøk

Doblingstiden til SKOV-3-cellene er ganske kort (ca 25 timer). Samtidig er halveringstiden til ²²⁷Th relativt lang (18,72 dager). Dette kan medføre at cellene ikke oppnår tilstrekkelig dose før de er godt etablert i kolonier. Resultatet kan bli mindre kolonier, ikke nødvendigvis færre. Det ble derfor gjort vekstforsøk hvor totalt celleantall ble undersøkt over tid.

I vekstforsøket ble cellene behandlet med 0-20 kBq/ml ²²⁷Th-herceptin som beskrevet i 3.7.1 koloniforsøk, aktivitet tilsatt før utsåing, og sådd ut i 75 cm² flasker, 10⁶ celler per flaske. Cellene ble inkubert i 5 dager (til dag 5) før de ble trypsinert, talt og omsatt i to nye sett 75 cm² flasker, også nå 10⁶ celler per flaske. Det ene settet med flasker ble talt på dag 9, det andre på dag 12.

3.7.6 Mikroskopiforsøk med transfekterte celler

Det ble gjort mikroskopiforsøk med den transfekterte cellelinjen SKOV-3-EGFP. Målet med forsøket var i første omgang å undersøke muligheten for å detektere α -sporene gjennom cellekjernen. Dersom dette lar seg gjøre vil det kunne gi verdifull informasjon om hva som skjer med en celle etter én eller flere treff.

For å følge cellene i mikroskop over tid ble time-lapse-metoden benyttet. Dette er en metode hvor det blir tatt bilder over flere tidspunkt som kan vises som en film i ettertid.

2 millioner SKOV-3-EGFP-celler ble behandlet med 5000 Bq/ml ²²⁷Th-Herceptin i suspensjon som beskrevet under *Aktivitet tilsatt før utsåing* i kapittel 3.7.1 *Koloniforsøk*. Av disse ble 100.000 celler sådd ut i en 25 cm² flaske med kork uten filter. Flasken ble deretter satt i CO₂-inkubator med løs kork i to timer for at cellene skulle feste seg. Den løse korken sørger for tilførsel av CO₂ og stabil pH. Videre ble det tilsatt 25 mM Hepes buffer før korken ble skrudd igjen og cellene plassert i en forvarmet inkubatorboks i mikroskopet (Carl Zeiss

Axiovert 200M, Göttingen, Tyskland). Hepes er en pH-buffer som sørger for konstant pH gjennom forsøket. Dette er nødvendig siden det ikke er tilgang på CO₂ i mikroskopet. Hepes-konsentrasjonen ble optimalisert i et lite forsøk beskrevet under.

Det ble tatt ett fasekontrastbilde og ett bilde med UV-lys og FITC filterblokk (se kapittel 3.5.1 Fluorescensmikroskopi). Bildene ble tatt hvert 15. min i 15 timer.

Optimalisering av Hepes-konsentrasjonen

100.000 celler ble sådd ut i 5 små flasker (25 cm²). Flaskene ble tilsatt 0-100 mM Hepes buffer og plassert i en forvarmet inkubatorboks i mikroskopet i 24 timer. Videre ble mediet fra en og en flaske overført til et rør og umiddelbart målt med et digitalt pH-meter.

3.8 Dyreforsøk (biodistribusjon)

Det ble gjort biodistribusjonsforsøk for å se hvordan ²²⁷Th-Herceptin tas opp i forskjellige organer i mus. Hvis konjugatet tas opp i stor grad i normale organer, eller hvis konjugatet er ustabil i mus, så kan det oppdages i et biodistribusjonsforsøk. Dette kan videre gi en indikasjon på hvorvidt radioimmunkonjugatet er egnet til klinisk bruk ved ovariekreft.

Dyreforsøkene ble utført i dyrestallen ved Radiumhospitalet, Rikshospitalet, i samarbeid med veterinärsykepleier Anne Kristine Hjelmerud. Dyrene benyttet i disse forsøkene var av typen hunkjønn Balb/C nu/nu (NCR) mus med kroppsvekt 20-25 g. Alle prosedyrer og eksperimenter var godkjent av Forsøksdyrutvalget (FDU) og er i overensstemmelse med *den europeiske konvensjonen for beskyttelse av dyr brukt til eksperimentelle - og andre vitenskapelige årsaker* (Strasbourg, 18.III.1986).

Musene ble bedøvet med 200 µl Tiletamin-Zolazepam mix (Virbac, Carros Cedex, Frankrike) fortynnet 1:5 i fysiologisk saltvann, før implantering av ca 2x2x2-mm SKOV-3-tumorer under huden på dyrets rygg (Hjelmerud gjorde dette). Dyrene ble samtidig øremerket.

2-3 uker etter implantering av tumor ble 100 µl med 20 kBq ²²⁷Th-Herceptin injisert gjennom halens vene. 3 dyr ble obdusert etter 4, 7 og 14 dager (totalt 9 dyr). Alle organer, samt tumor og blod, ble fordelt til hvert sitt rør. Alle rørene var veid på forhånd og ble veid igjen med organer før aktiviteten ble målt.

Da aktiviteten ble fortynnet til riktig konsentrasjon før injisering, ble det samtidig preparert 4 standarder. Hver av disse standardene inneholdt 10 % av den aktiviteten som skulle injiseres i ett dyr. Standardene ble målt ved injeksjonstidspunktet og før hvert måletidspunkt. Alle aktivitetsmålinger av organer ble sammenlignet med disse standardene for å ta høyde for radionuklidens henfall. Utenom aktivitetsmålingene ble standardene oppbevart i kjøleskap til forsøket var avsluttet.

3.9 Dosimetri

3.9.1 Mikrodosimetrimodell

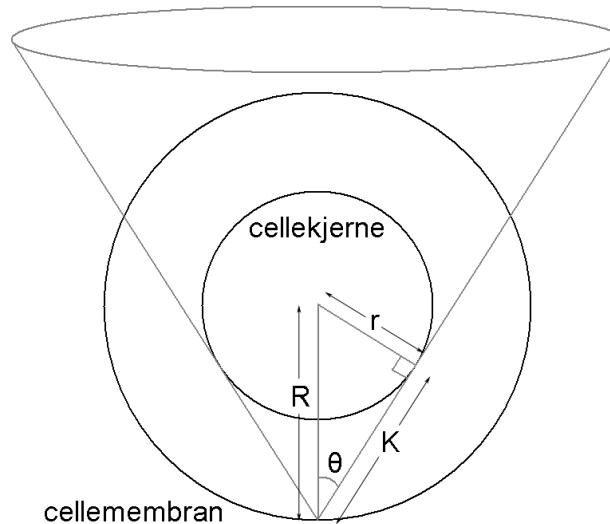
På grunn av kompleksiteten i mikrodosimetrisk beregning, er det i denne oppgaven ikke gjort forsøk på å utlede en fullverdig mikrodosimetrisk modell, men heller å gi en indikasjon på hva slags doser cellekjernene kan motta. Dette er gjort ved å forenkle hele bildet, samt å foreta noen antagelser om hvordan aktiviteten distribueres og hvor stor andel av α -partikkelenergien som avsettes i kjernen.

La oss anta at det ikke avsettes noe energi fra døtrene til ^{227}Th . Målinger har vist at det ikke er noen betydelig opphopning av ^{223}Ra i cellene etter de 7 dagene som bindingsforsøkene har gått over. Dersom vi videre antar at all α -partikkelenergien fra ^{227}Th avsettes og absorberes i kjernen, får vi følgende gjennomsnittlige dose, D , for cellekjernen:

$$D = \frac{E}{m} = \frac{\varepsilon C}{\frac{4}{3}\pi r^3 \rho} = \frac{3\varepsilon C}{4\pi r^3 \rho} \quad (3.3)$$

hvor E er absorbert energi, ε er gjennomsnittelig energi per α -henfall, C er antall henfall per celle og m , r og ρ er henholdsvis cellekjernens masse, radius og massetetthet. Dette er selvfølgelig kraftig overestimert. α -partiklene sendes ut i alle retninger og bare en liten andel vil treffe cellekjernen. La oss for enkelhets skyld anta at all aktiviteten sitter på cellemembranen. Hva er da sannsynligheten for at en α -partikkel som sendes ut skal treffe kjernen?

Figur 3.4 viser en celle med cellekjerne, hvor to linjer, trukket fra et punkt på cellemembranen, tangerer cellekjernen på hver sin side. Disse to linjene danner en kjege med toppvinkel (apex) = $2 \times \theta$



Figur 3.4: Skisse av cellen med en α -emitter i avstand R fra kjernens sentrum. Kjernens radius = r . To linjer, trukket fra α -emitteren, tangerer cellekjernen på hver sin side. Disse linjene danner en kjege med toppvinkel (apex) = $2 \times \theta$. Vinkelen θ kan brukes til å finne sannsynligheten for å treffe cellekjernen.

Romvinkelen Ω som denne kjegeen fyller, kan regnes ut på følgende måte:

$$\Omega = \int_0^{2\pi} \int_0^\theta \sin \theta \, d\theta \, d\phi = 2\pi \int_0^\theta \sin \theta \, d\theta = 2\pi [-\cos \theta]_0^\theta = 2\pi(1 - \cos \theta) \quad (3.4)$$

Videre kan $\cos \theta$ uttrykkes ved r og R :

$$\cos \theta = \frac{K}{R} = \frac{\sqrt{R^2 - r^2}}{R} \quad (3.5)$$

hvor K er hosliggende katet i trekanten vist i figur 3.4, R er α -emitterens avstand fra kjernens sentrum og r er cellekjernens radius. Dette gir:

$$\Omega = 2\pi \left(1 - \frac{\sqrt{R^2 - r^2}}{R} \right) \quad (3.6)$$

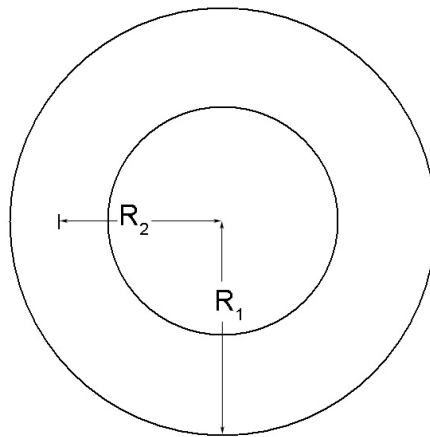
En hel kule har maksimal romvinkel lik 4π . Dette kan kontrolleres ved å integrere over hele volumet ved å la det første integralet i ligning (3.4) gå fra 0 til 2π , og det andre fra 0 til π .

Sannsynligheten for å treffe cellekjernen, vil da være $\Omega/4\pi$. Dersom all aktiviteten er bundet til cellemembranen, blir dosen til cellekjernen som følger:

$$D = \frac{\frac{\Omega}{4\pi} 3 \varepsilon C}{4\pi r^3 \rho} = \frac{3\Omega \varepsilon C}{16\pi^2 r^3 \rho} = \frac{3 \left(1 - \frac{\sqrt{R^2 - r^2}}{R} \right) \varepsilon C}{8\pi r^3 \rho} \quad (3.7)$$

Nå er det slik at store deler av aktiviteten er internalisert i cellen, og sannsynligheten for å treffe kjernen blir større jo nærmere kjernen α -emitteren befinner seg. Ved å fjerne aktiviteten på overflaten med en strippingbuffer (se kapittel 3.7.3), kan man finne antall henfall fra cellemembranen, C_1 , og antall henfall fra cytoplasma, C_2 . For å forenkle bildet kan vi anta at internalisert aktivitet er samlet i et skall midt mellom cellekjernens ytterpunkt og cellemembranen, som vist i figur 3.5. Dette gir:

$$D = \frac{3\varepsilon \left[\left(1 - \frac{\sqrt{R_1^2 - r^2}}{R_1} \right) C_1 + \left(1 - \frac{\sqrt{R_2^2 - r^2}}{R_2} \right) C_2 \right]}{8\pi r^3 \rho} \quad (3.8)$$



Figur 3.5: Aktivitet på cellemembranen antas å være i avstand R_1 fra kjernens sentrum, og internalisert aktivitet i avstand R_2 .

I tillegg må en ta i betraktning at bare deler av α -partikkelen avsettes i kjernen. Noe energi avsettes før partikkelen når kjernen, mens mesteparten avsettes kanskje etter at partikkelen kommer ut på grunn av bragg-toppen. Den avsatte energien vil variere mye fra treff til treff. For enkelhets skyld antar vi at 50 % av α -partikkelenergien avsettes i kjernen. Den endelige mikrodosimetriske modellen brukt i denne oppgaven gir følgende dose for cellekjernen:

$$D = \frac{3\varepsilon \left[\left(1 - \frac{\sqrt{R_1^2 - r^2}}{R_1} \right) C_1 + \left(1 - \frac{\sqrt{R_2^2 - r^2}}{R_2} \right) C_2 \right]}{16\pi r^3 \rho} \quad (3.9)$$

3.9.2 Beregning av antall henfall pr celle

Bq er det samme som antall henfall per sekund. Dersom dette multipliseres med tid i sekunder, blir resultatet antall henfall. Ved å plote bundet aktivitet [Bq/celle] som funksjon av tid og beregne arealet under kurven (AUC), får vi antall henfall pr celle for den gitte aktivitetskonsentrasjonen. Fra *måling av cellebundet aktivitet over tid* (kapittel 3.7.4) ble kun konsentrasjonen 2500 Bq/ml brukt. Men fra koloniforsøket *aktivitet tilsatt etter utsåing* (kapittel 3.7.1) ble det målt bundet aktivitet rett etter vask for alle tilsatte konsentrasjoner. Forholdstallet mellom målt aktivitet ved en gitt konsentrasjon og målt aktivitet ved 2500 Bq/ml ble funnet, og dette forholdstallet ble deretter multiplisert med antall henfall per celle for 2500 Bq. Dette ga antall henfall per celle for den gitte konsentrasjonen.

Antall henfall per celle, C , for konsentrasjonen 2500 Bq/ml ble regnet ut på følgende måte:

$$\begin{aligned} C_{2500 \text{ Bq/ml}} &= AUC_{2500 \text{ Bq/ml}} \\ &= \frac{A_0 + A_1}{2} (t_1 - t_0) + \frac{A_1 + A_2}{2} (t_2 - t_1) + \dots + \frac{A_{n-1} + A_n}{2} (t_n - t_{n-1}) \quad (3.10) \\ &= \sum_{i=1}^n \frac{A_{i-1} + A_i}{2} (t_i - t_{i-1}) \end{aligned}$$

hvor A_i er bundet aktivitet per celle ved tidspunkt t_i . Deretter ble antall henfall per celle for andre konsentrasjoner, K , funnet:

$$AUC_K = \frac{AUC_{2500 \text{ Bq/ml}} \cdot B_K}{B_{2500 \text{ Bq/ml}}} \quad (3.11)$$

hvor B er bundet aktivitet målt rett etter vask.

3.9.3 Måling av cellulære størrelser

Cellens – og cellekjernens diameter ble målt for SKOV-3 og BT-474. Til dette ble fikserte kolonier som hadde vokst i ca 12 dager studert i mikroskop (Carl Zeiss Axiovert 200M, Göttingen, Tyskland) og målt ved hjelp av en digital målestokk i programmet AxioVision (versjon 4.6.3, Carl Zeiss Imaging Solutions, Göttingen, Tyskland). Den digitale målestokken hadde blitt kalibrert ut fra et objektmikrometer (Carl Zeiss, Göttingen, Tyskland) som er en målestokk risset inn i glass.

15 celler i ytterkant av en tilfeldig valgt koloni fra SKOV-3 og tilsvarende fra BT-474 ble målt. Cellene i ytterkant ble valgt fordi disse vokser mer fritt enn cellene i sentrum av kolonien, og har dermed en fasong som ligner mer på cellene i koloniens startfase. Som nevnt er det i startfasen cellene mottar høyest dose rate; Aktiviteten avtar over tid da noe av aktiviteten faller av samt naturlig henfall av ^{227}Th , og aktiviteten deles mellom cellene på grunn av celledeling.

Det ble målt største og minste cellediameter samt største og minste cellekjernediameter for de 15 valgte cellene i hver cellelinje. Deretter ble gjennomsnittelig celle- og cellekjernediameter funnet for SKOV-3 og BT-474.

3.10 Statistikk

3.10.1 Standardfeil

Standardavviket (standard deviation) angir fordelingen av data rundt en middelvei.

Standardavviket, S , er gitt ved:

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \quad (3.12)$$

hvor n er antall målinger, og \bar{X} er gjennomsnittet av målingene X_i .

I denne oppgaven har det blitt brukt standardfeil (standard error). Standardfeilen, SE , er gitt ved:

$$SE = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (3.13)$$

Som nevnt tidligere ble Microsoft Excel benyttet for å beregne standardavvik og standard error.

3.10.2 Signifikanstest

I denne oppgaven er all statistisk analyse basert på forutsetningen at de stokastiske variablene, X , er normalfordelte. Dette representerer nok kun en tilnærming i våre målinger som inneholder et svært begrenset antall observasjoner.

For å teste statistisk signifikans ble tosidig student t-test benyttet. En tosidig student t-test avgjør mulig signifikant forskjell mellom to ulike sett målinger X_1 og X_2 . Programmet Sigmaplot 10.0 (Systat Software, San Jose, CA, USA) ble brukt for utføre t-testene. Sigmaplot benytter følgende formel for å finne t-verdien:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{S_{X_1X_2} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (3.14)$$

hvor $S_{X_1X_2}$ er et felles standardavvik:

$$S_{X_1X_2} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)S_{X_1}^2 + (n_2 - 1)S_{X_2}^2}{n_1 + n_2 - 2}} \quad (3.15)$$

n_1 og n_2 representerer antall målinger i henholdsvis X_1 og X_2 . S_{X_1} og S_{X_2} er standardavviket i de respektive gruppene. Når t-verdien er funnet kan p-verdien bestemmes ut fra en tabell med verdier fra en student t-distribusjon, men her ble p-verdien funnet i Sigmaplot. I denne oppgaven ble det benyttet et signifikansnivå på $p = 0,05$.

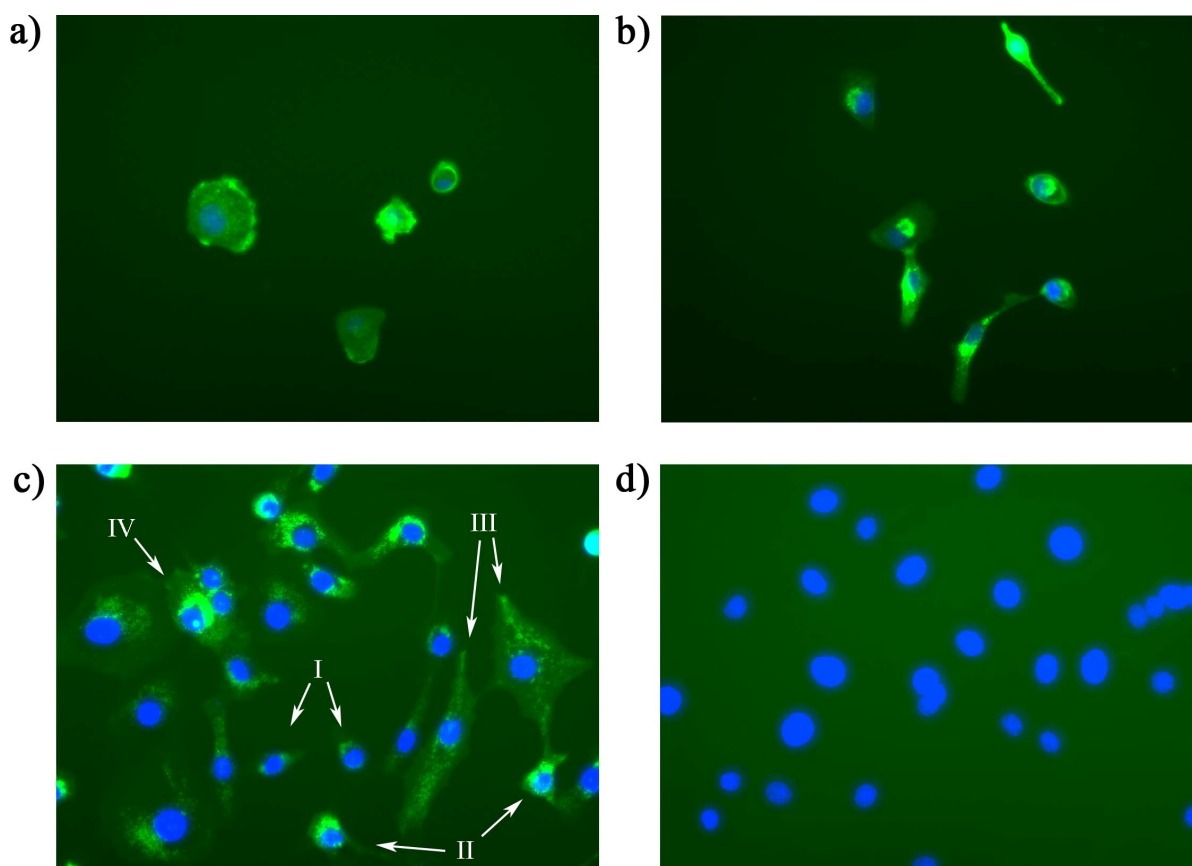
4. Resultater

4.1.1 Måling av ekspresjon av HER2 ved fluorescensmikroskopi

Som nevnt var det viktig å kartlegge ekspresjon av HER2 på SKOV-3-cellene. Overuttrykk av HER2 var nødvendig for å kunne benytte cellelinjen i denne oppgaven. Fra litteraturen var det kjent at SKOV-3 uttrykte HER2 (Horak et al., 1997; Steffen et al., 2008), men dette ble også undersøkt ved hjelp av fluorescensmikroskopi før overlevelsesforsøkene ble satt i gang.

Følgende forsøk illustrerte visuelt hvordan Herceptin bandt seg til – og fordelte seg i cellen. Etter én times inkubasjon ved 37°C kunne det virke som om mesteparten av Herceptinet var bundet til cellemembranen (figur 4.1 a). Forsterket fluorescens i randen av cellemembranen og en bortgjemt cellekjerne ga indikasjoner på dette. Etter 48 timer så det ut som om Herceptinmolekylene ble oppkonsentrert i nærheten av kjernen (figur 4.1 b). Siden det nylig hadde vært Alexa-Herceptin i mediet, var det fortsatt en betydelig konsentrasjon i cellemembranen. 48 timer etter vask, kunne det virke som om mesteparten av antistoffene hadde internalisert (figur 4.1 c) og konsentrasjonen var lav på cellemembranen. Randen rundt cellen var borte og cellekjernen framtrådte uforstyrret i bildet. Figur 4.1 d) viser celler som var blokkert med kaldt Herceptin i 30 minutter før farging med Alexa-Herceptin og Hoechst. Slik vil også celler uten HER2 se ut.

Figur 4.1 c) viser store forskjeller når det gjelder opptak og distribusjon av Herceptin; Enkelte celler hadde lite cellebundet aktivitet (I), mens andre hadde atskillig mer (II). Noen celler flatet mye ut slik at aktiviteten fikk stor avstand til cellekjernen (III), mens andre satt i klynger slik at de ble påvirket av aktiviteten bundet til nabocellene (IV). Alle disse faktorene vil bidra til store variasjoner i dosen levert til cellekjernen.



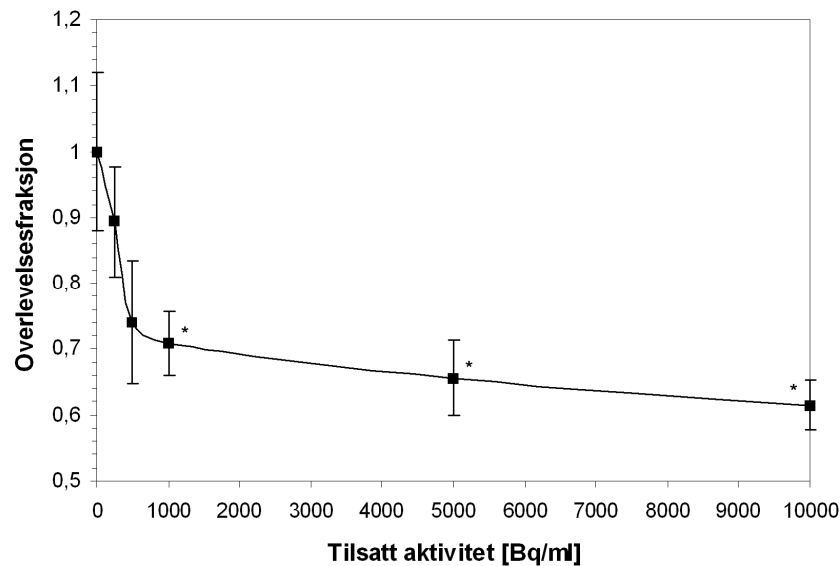
Figur 4.1: Fluorescensmikroskopi av SKOV-3-celler farget med Alexa-Herceptin og Hoechst ved 37°C. Bildene viser ikke konfokale snitt, men viser fokus gjennom hele cellen. Forstørrelsen er 100 x. a) Vask etter 1 t, bilde tatt etter 1 time. b) Vask etter 48 t, bilde tatt etter 48 timer. c) Vask etter 1 t – bilde tatt etter 48 t. Pilene (I-IV) viser variasjoner i opptak av Herceptin (se teksten). d) Blokk med kaldt Herceptin 30 min før farging med Alexa-Herceptin og Hoechst, vask etter 1 time – bilde tatt etter 48 t.

4.2 Aktivitet tilsatt etter utsåing - Koloniforsøk

Denne metoden ble først valgt fordi det var ønskelig å gjøre betingelsene mest mulig lik hva som er tilfelle *in vivo*. Kroppen holder en temperatur på 37°C og blodet vil transportere bort resterende antistoff. Derfor ble også cellene inkubert med antistoff ved 37°C og vasket etter 4 timer.

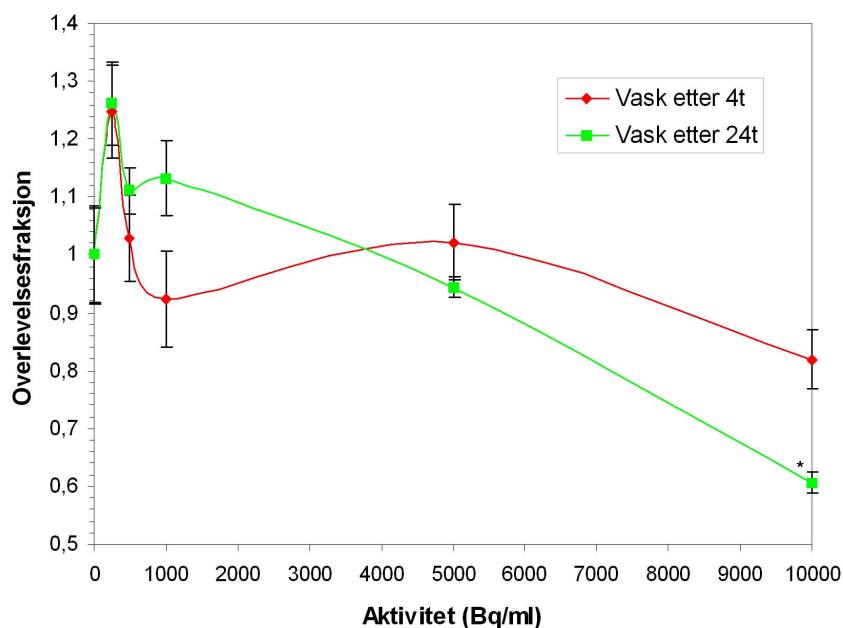
Det ble gjort to forsøk, 2 paralleller i det første – og 4 paralleller i det andre forsøket, hvor cellene ble behandlet med ^{227}Th -Herceptin etter utsåing. Spesifikk aktivitet på konjugatet var tilnærmet lik i disse to forsøkene (700 og 800 Bq/ μg) slik at forsøkene ble slått sammen. Overlevelsesfraksjonen falt raskt ned til 70 % ved 1.000 Bq/ml. Her begynte kurven å flate ut og overlevelsesfraksjonen var 60 % ved 10.000 Bq/ml (figur 4.2). Overlevelsesfraksjonen

for 1.000, 5.000 og 10.000 Bq/ml var signifikant forskjellig fra overlevelsesfraksjonen for ubehandlede celler.



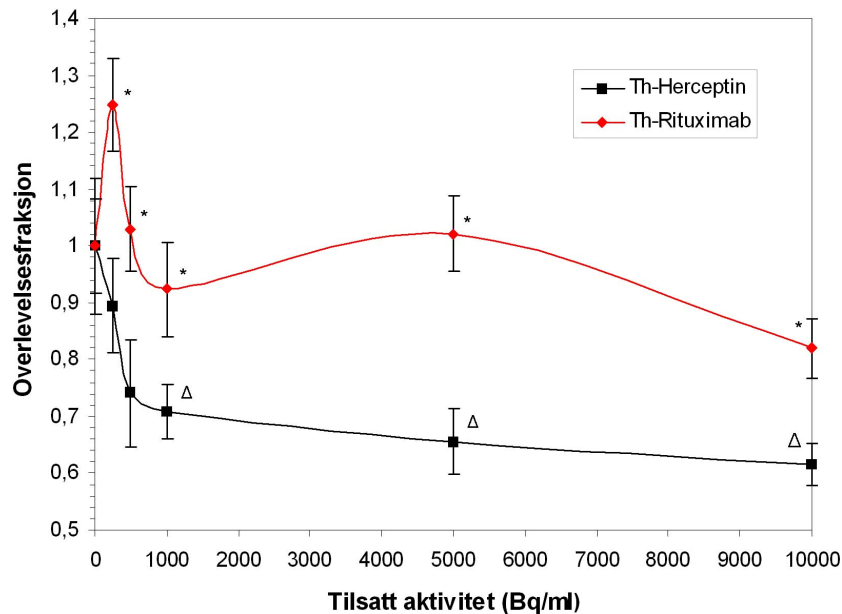
Figur 4.2: Overlevelsesfraksjoner for SKOV-3-celler inkubert med økende konsentrasjon av ^{227}Th -Herceptin. Radioimmunkonjugatet ble tilsatt 2 timer etter utsåing og overskuddet ble vasket av etter nye 4 timer. *: Signifikant forskjellig fra kontroll ($p < 0.05$, student t-test).

For å undersøke om effekten skyldtes α -partikkelstråling fra spesifikt bundet ^{227}Th -Herceptin, ble det gjort to kontrollforsøk med ^{227}Th -Rituximab som ikke binder seg til cellene; Ett hvor cellene ble vasket etter 4 timers inkubasjon med ^{227}Th -Rituximab, og ett hvor cellene ble vasket etter 24 timer (figur 4.3). Det var 6 paralleller i hvert forsøk. Bortsett fra høyeste tilsatte konsentrasjon (10.000 Bq/ml) var det ingen signifikant forskjell mellom 4- og 24 timers inkubasjon med ^{227}Th -Rituximab. Videre ga ingen av behandlingene signifikant lavere celleoverlevelse enn kontrollen bortsett fra inkubasjon i 24 timer med 10.000 Bq/ml (merket med * i figuren). Dette indikerer at stråling fra mediet hadde liten effekt på cellene. Men dersom det tilsettes store konsentrasjoner uten at dette vaskes av, vil stråling fra mediet allikevel kunne ha innvirkning på cellene.



Figur 4.3: Overlevelsesfraksjoner for SKOV-3-celler behandlet med ^{227}Th -Rituximab. Radioimmunkonjugatet ble tilsatt 2 timer etter utsåing og vasket av etter nye 4 timer (rød) og 24 timer (grønn). *: Signifikant forskjellig fra "vask etter 4t" med samme tilsatt aktivitet OG signifikant forskjellig fra kontroll ($p < 0.05$, student t-test).

Effekten av 4 timers inkubasjon med ^{227}Th -Herceptin og ^{227}Th -Rituximab er direkte sammenlignet i figur 4.4. Det ble en signifikant lavere overlevelsesfraksjon etter behandling med ^{227}Th -Herceptin enn med ^{227}Th -Rituximab, henholdsvis 61 % og 82 % celleoverlevelse ved 10 kBq, og 66 % og 100 % celleoverlevelse ved 5 kBq. Når det gjelder ^{227}Th -Rituximab, så er som nevnt ingen av punktene i figur 4.4 signifikant forskjellig fra kontrollen.



Figur 4.4: Sammenligning av overlevelsesfraksjoner for SKOV-3-celler etter behandling med ^{227}Th -Herceptin (sort) og ^{227}Th -Rituximab (rød). Radioimmunkonjugatene ble tilsatt 2 timer etter utsåing og vasket av etter nye 4 timer. *: Signifikant forskjellig fra ^{227}Th -Herceptin med samme tilsatt aktivitet ($p < 0.05$, student t-test). Δ : Signifikant forskjellig fra kontroll.

Etter behandling med ^{227}Th -Herceptin flatet overlevelseskurven ut for konsentrasjoner høyere enn 1000 Bq/ml, som kan tyde på at noen av cellene ikke mottok tilstrekkelig dose for bli inaktivert. Fluorescensmikroskopibildene (figur 4.1) viste at en del av cellene hadde få antistoffer bundet til seg, eller at antistoffene var fordelt i stor avstand fra kjernen. Begge disse faktorene kan bidra til lavere dose, og kanskje var dette nok til at enkelte celler ikke ble inaktivert.

4.3 Aktivitet tilsatt før utsåing

For å oppnå større opptak av antistoff, og dermed øke effekten, ble det byttet metode for inkubering med antistoff. Tanken var at ved å tilsette aktiviteten i suspensjon, altså *før* utsåing isteden for *etter*, ville hele cellen være eksponert for antistoffer, ikke bare oversiden av en utflatet celle. En annen fordel ved å tilsette aktivitet i suspensjon, var at aktiviteten kunne tilsettes til et stort antall celler slik at bundet aktivitet kunne måles etter vask. Etter aktivitetsmåling ble cellene fortynnet og sådd ut til koloniforsøk. På denne måten hadde man full kontroll over initiell bundet aktivitet. Aktiviteten ble tilsatt til celler på is og inkubert

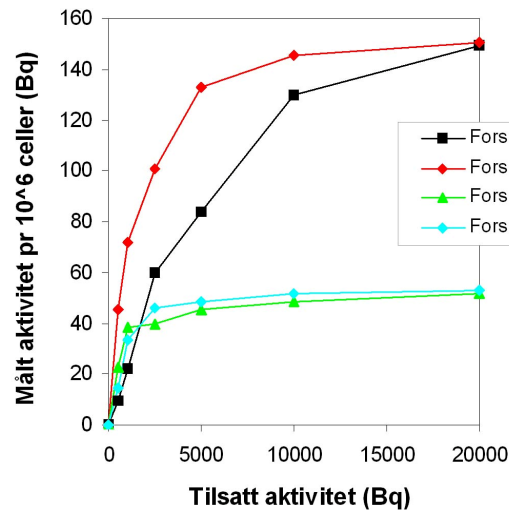
ved 4°C for å hindre internalisering. Tanken var å oppnå et kjent geometrisk utgangspunkt for eventuelle fremtidige mikrodosimetriske beregninger.

I tillegg til koloniforsøkene ble også cellebundet aktivitet målt over tid. Dette ble gjort ved å så ut et større antall celler, med en kjent cellebundet aktivitet, i flasker for så å måle aktiviteten på forskjellige tidspunkt. Denne informasjonen kunne brukes til å beregne antall α -henfall per celle som igjen ga en indikasjon på dose. For å finne fordelingen av aktiviteten (på cellemembranen eller internalisert) ble det benyttet en strippingbuffer som førte til at antistoff på celleoverflaten løsnet fra antigenet. Dermed fikk vi skilt membranbundet – og internalisert aktivitet. Denne strippingbufferen ble optimalisert i et kontrollforsøk vist i Vedlegg A.

Det ble gjort fire serier med forsøk. For hver serie ble det målt cellebundet aktivitet rett etter vask og deretter sådd ut celler til koloniforsøk og langtidsbinding.

4.3.1 Måling av cellebundet aktivitet

Cellene som ble tilsatt aktivitet og videre sådd ut til koloniforsøk, ble som nevnt også satt til aktivitetsmåling. Figur 4.5 viser cellebundet aktivitet for hver tilsatt aktivitetmengde i forsøk 1-4. Det er stor forskjell mellom forsøkene. Dette har sannsynligvis sammenheng med variasjonen i spesifikk aktivitet som henholdsvis var ca 2400, 2600, 1350 og 950 Bq/ μ g i forsøk 1-4 (tabell 4.1).

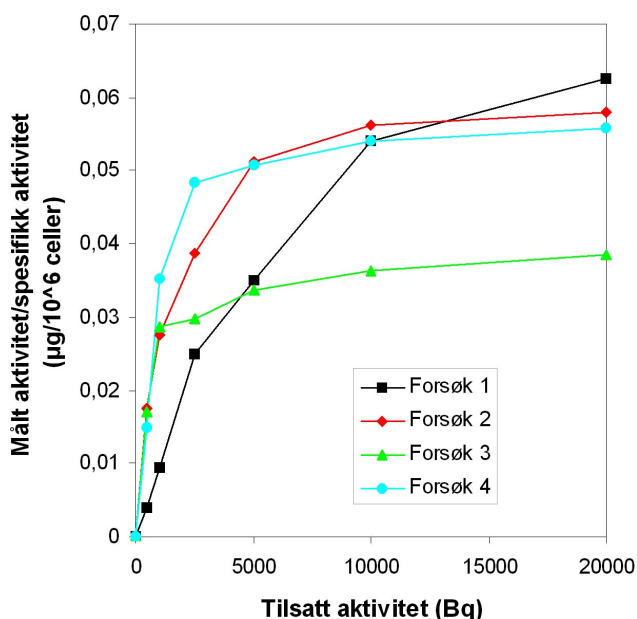


Figur 4.5: Cellebundet aktivitet per 1 million SKOV-3-celler. Cellene ble tilsatt ulike aktivitetsmengder med ^{227}Th -Herceptin og inkubert i 1 time ved 4°C før radioimmunkonjugatet ble vasket av. Måletidspunktet er rett etter vask, like før cellene sås ut til koloniforsøk. Figuren viser forsøk 1-4. Spesifikk aktivitet og IRF er gitt av tabell 4.1.

Tabell 4.1: Spesifikk aktivitet og immunreaktiv fraksjon (IRF) for radioimmunkonjugatet benyttet i forsøk 1-4.

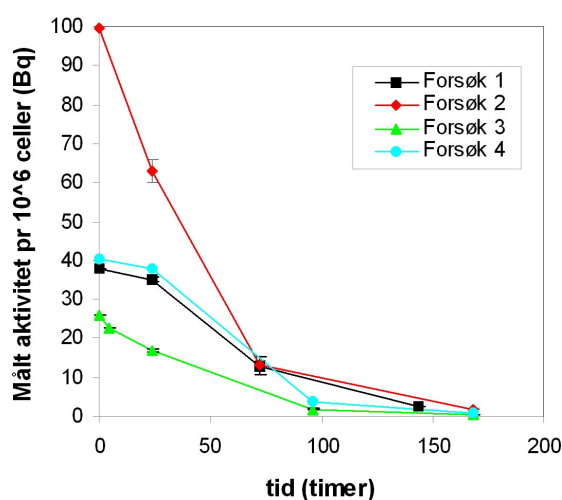
Forsøk nr	Spesifikk aktivitet (Bq/ μg)	IRF (%)
1	2400	85
2	2600	65
3	1350	80
4	950	80

Cellebundet aktivitet ble dividert på spesifikk aktivitet for å justere for forskjell i spesifikk aktivitet (figur 4.6). Forsøk 3 var fremdeles forskjellig fra de tre andre forsøkene selv om immunreaktiv fraksjon (IRF) var minst like god. En mulig forklaring på dette kan være lavere antall antigener på cellene i dette forsøket.



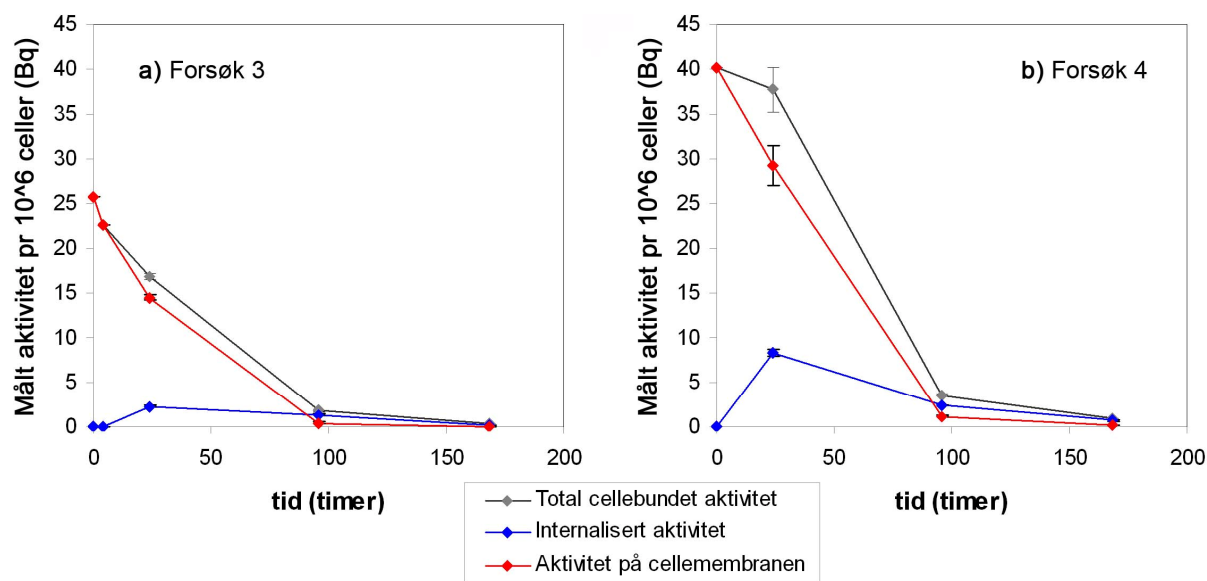
Figur 4.6: Cellebundet aktivitet (fra figur 4.5) dividert på spesifikk aktivitet (tabell 4.1) viser at det var mer samsvar mellom forsøkene når det ble tatt høyde for den spesifikke aktiviteten.

Det ble også sådd ut celler til måling av cellebundet aktivitet over tid hvor 3 parallelle flasker ble trypsinert og målt på hvert tidspunkt (1, 4 og 7 dager) (figur 4.7). Disse cellene ble behandlet på samme dag og med samme batch av radioimmunkonjugatet som de respektive koloniforsøkene. I forsøk 1 og 2 ble det brukt feil pH i strippingbufferen, derfor ble kun den *totale* aktivitetmengden fra cellene tatt med fra disse to forsøkene.



Figur 4.7: Total cellebundet aktivitet for SKOV-3-celler målt over tid. Cellene ble tilsatt 2500 Bq/ml ²²⁷Th-Herceptin og inkubert i 1 time ved 4°C før radioimmunkonjugatet ble vasket av. Cellebundet aktivitet ble målt ved t=0, før cellene ble sådd ut i flasker. Videre ble cellene, på ulike tidspunkt, trypsinert, talt og målt for radioaktivitet. Figuren viser forsøk 1-4.

I forsøk 3 og 4 ble det benyttet en annen strippingbuffer som ble optimalisert som nevnt i kapittel 3.7.3 *Strippingbuffer – optimalisering og cellepåvirkning* (resultatene er vist i Vedlegg A). Figur 4.8 viser total cellebundet aktivitet i tillegg til internalisert – og membranbundet aktivitet for forsøk 3 og 4. Det kan se ut som om aktiviteten på overflaten dominerte frem til dag 4. Dette er ikke i samsvar med fluorescensmikroskopibildene (figur 4.1) som antyder at brorparten er internalisert etter 48 timer. Strippingbufferen kan være toksisk for cellene (Vedlegg A). Da kan internalisert aktivitet lekke ut fra døde celler og man måler et kunstig høyt nivå for membranbundet aktivitet, og for lavt for internalisert aktivitet.



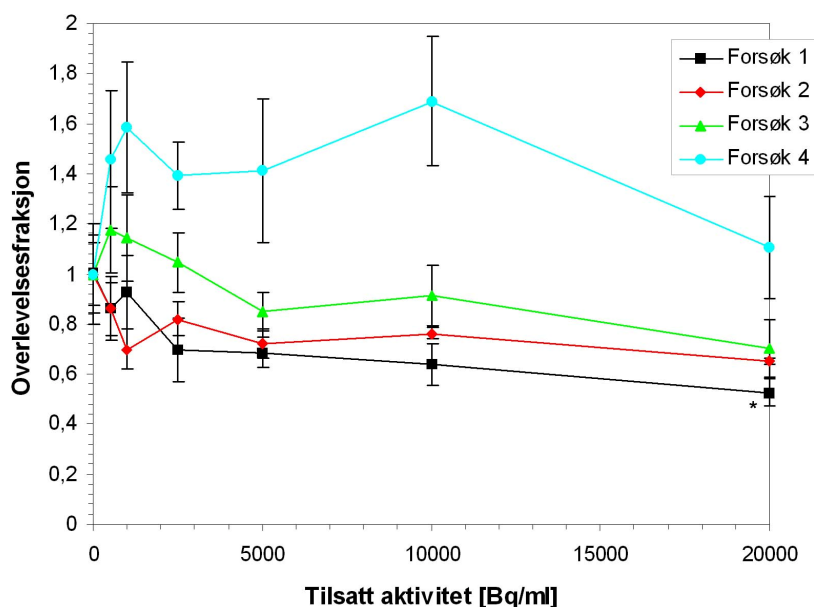
Figur 4.8: Cellebundet aktivitet for SKOV-3-celler målt over tid i a) forsøk 3 og b) forsøk 4. Cellene ble tilsatt 2500 Bq/ml ^{227}Th -Herceptin og inkubert i 1 time ved 4°C før radioimmunkonjugatet ble vasket av. Cellebundet aktivitet ble målt ved $t=0$ før cellene ble sådd ut i flasker (det ble antatt 100 % membranbundet aktivitet ved $t=0$). Videre ble cellene, på ulike tidspunkt, trypsinert, talt og behandlet med strippingbuffer før måling av radioaktivitet. Figuren viser aktiviteten målt i strippingbufferen (rød) og i cellene (blå), samt den totale aktiviteten som er summen av disse to (grå).

4.3.2 Koloniforsøk

Fire koloniforsøk ble gjort med tilsatt aktivitet før utsåing (figur 4.9). Hvert forsøk inneholdt 6 paralleller. På grunn av varierende spesifikk aktivitet på radioimmunkonjugatet kunne ikke forsøkene slås sammen (tabell 4.1). Ut fra figuren ser dette fornuftig ut, hvor høyest spesifikk aktivitet ga lavest overlevelsesfraksjon og vice versa. Nå skal det imidlertid nevnes at kun ett datapunkt var signifikant forskjellig fra kontrollen, nemlig ved 20.000 Bq/ml i forsøk 1. Her var overlevelsesfraksjonen på 53 %.

Det er sannsynligvis atskillig mindre internalisering i dette oppsettet enn hva som er tilfelle i *aktivitet tilsatt etter utsåing* (kapittel 4.2) på grunn av inkubasjonstiden samt temperaturen under inkubering med antistoff. Til tross for tre ganger høyere spesifikk aktivitet og omtrent samme overlevelseshfraksjon, indikerer dette at internalisering er viktig for å få ned celleoverlevelsen. Internalisering under inkubasjon med antistoff fører sannsynligvis til at enda flere antistoffer kan binde seg til cellen. Videre vil økt internalisering bidra til lavere avstand mellom aktivitet og cellekjerne. Dette fører til økt dose i kjernen.

Forsøk 4 viker fra de tre andre forsøkene og kan vanskelig forklares. Det kan for eksempel ha blitt sådd ut feil antall celler i kontrollene, men dette blir spekulasjoner. Forsøk 4 blir derfor utelatt i videre beregninger.

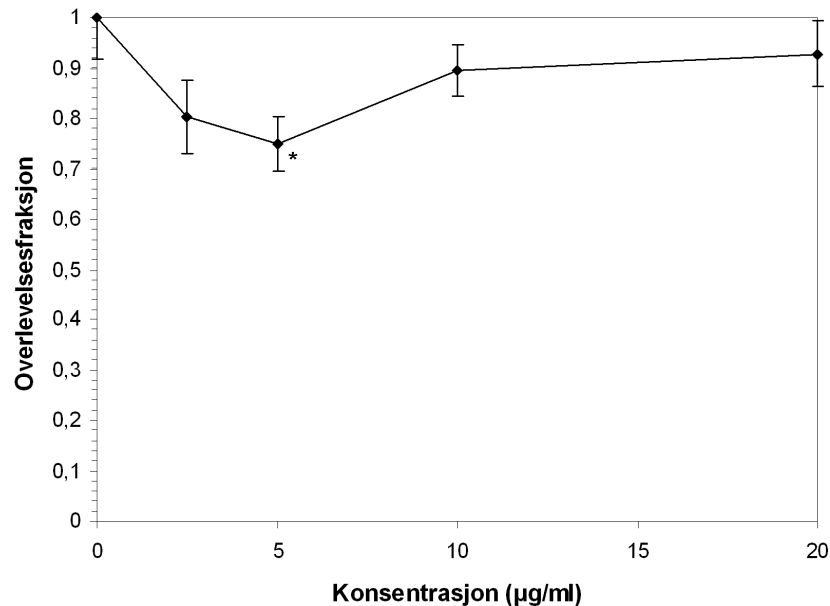


Figur 4.9: Overlevelseshfraksjoner for SKOV-3-celler etter behandling med ^{227}Th -Herceptin. Radioimmunkonjugatet ble tilsatt i suspensjon, inkubert i 1 time ved 4°C og vasket av før utsåing. *: Signifikant forskjellig fra kontrollen i samme forsøk ($p < 0.05$, student t-test).

Kaldt antistoff

For å undersøke om radionukliden hadde noen effekt, eller om det er antistoffet alene som påvirker cellene, ble det gjort forsøk med kaldt antistoff (figur 4.10). Forsøket ble utført to ganger med 6 paralleller i hvert forsøk. Herceptin ble tilsatt i cellesuspensjon før utsåing.

I ^{227}Th -Herceptin-forsøkene varierte den spesifikke aktiviteten i området 950-2600 Bq/ μg . Dermed vil 20.000 Bq/ml tilsvare 8-21 $\mu\text{g/ml}$ Herceptin. Dette er i samme området som konsentrasjonene med kaldt Herceptin.



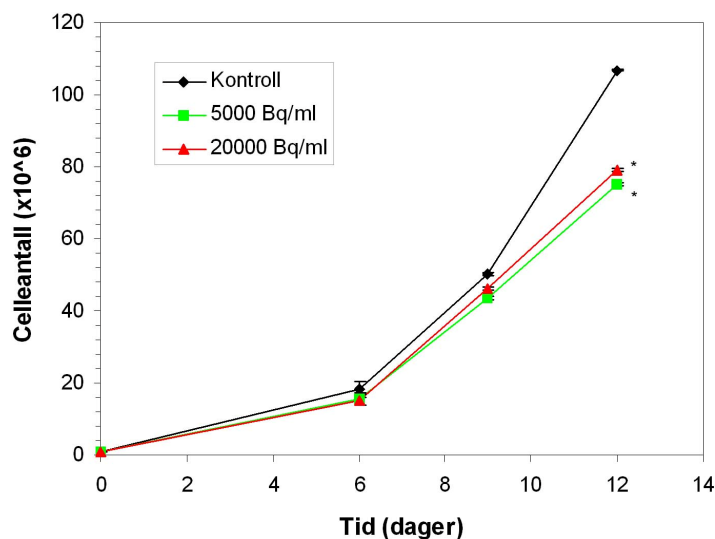
Figur 4.10: Overlevelsesfraksjoner for SKOV-3-celler etter behandling med kaldt Herceptin. Herceptin ble tilsatt i suspensjon, inkubert i 1 time ved 4°C og vasket av før utsåing. *: Signifikant forskjellig fra kontroll ($p < 0.05$, student t-test).

Figuren antyder liten effekt av kaldt Herceptin. Bortsett fra ett datapunkt (ved 5 $\mu\text{g/ml}$) er det ingen signifikant forskjell fra kontrollen. Det er usikkert hvorfor akkurat denne verdien er signifikant forskjellig fra kontrollen. Men siden kurven stiger igjen for de to siste punktene, er det nærliggende å tro at dette ene punktet beskriver feil i data eller feil i forsøkene. Det burde derfor vært gjort flere forsøk som eventuelt kunne avkrefte denne verdien.

4.3.3 Vekstforsøk

^{227}Th har som nevnt en relativt lang halveringstid (18,72 dager). Doseraten blir følgelig relativt lav. Det var derfor tenkelig at enkelte celler kunne danne kolonier på over 50 celler før dødelig dose ble oppnådd. Disse koloniene ville da bli talt med som levende kolonier og overestimere overlevelsesfraksjonen. Ut fra denne teorien ble effekten av ^{227}Th -Herceptin også undersøkt ved å måle cellevekst.

Det ble gjort to forsøk med 3 paralleller i hvert forsøk. Etter 1 t inkubasjon med ^{227}Th -Herceptin ble cellene sådd ut i flasker og satt til inkubering i 5 dager før de ble trypsinert, talt og omsatt i nye flasker. Disse ble igjen talt på dag 9 og 12. Den spesifikke aktiviteten var på 800 og 850 Bq/ μg , og forsøkene ble derfor slått sammen. Figur 4.11 viser en beskjeden reduksjon i celleantall fra kontrollen ved 5 og 20 kBq/ml. Etter 12 dager var celleantallet signifikant lavere enn kontrollen, henholdsvis 70 og 75 % av kontrollen.



Figur 4.11: Antall celler som funksjon av tid for SKOV-3-celler behandlet med ^{227}Th -Herceptin. Radioimmunkonjugatet ble tilsatt i suspensjon, inkubert i 1 time ved 4°C og vasket av før utsåing. Standardfeil var tilnærmet lik null. *: Signifikant forskjellig fra kontroll ($p < 0.05$, student t-test).

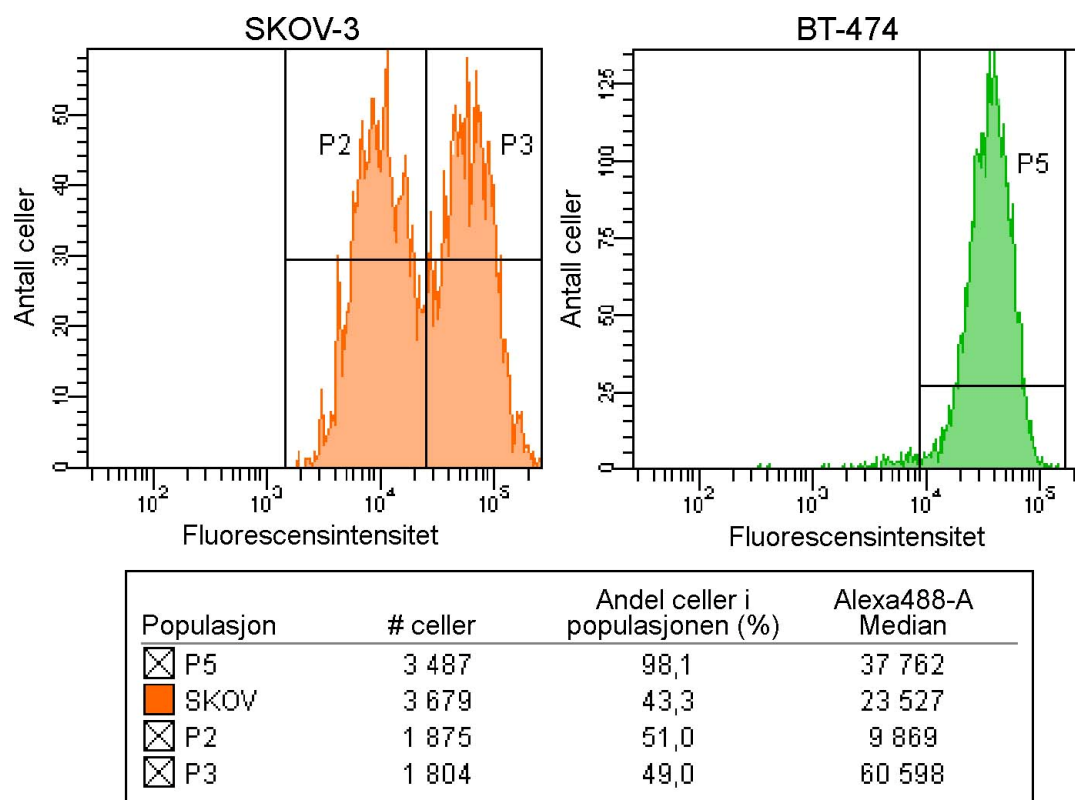
4.4 Måling av ekspresjon av HER2 ved flowcytometri

Den svake effekten av ^{227}Th -Herceptin (kapittel 4.2 og 4.3) kan skyldes at noen av cellene har færre antigener enn andre (figur 4.1). For å undersøke dette nærmere ble uttrykk av HER2 på cellemembranen kartlagt ved hjelp av flowcytometri.

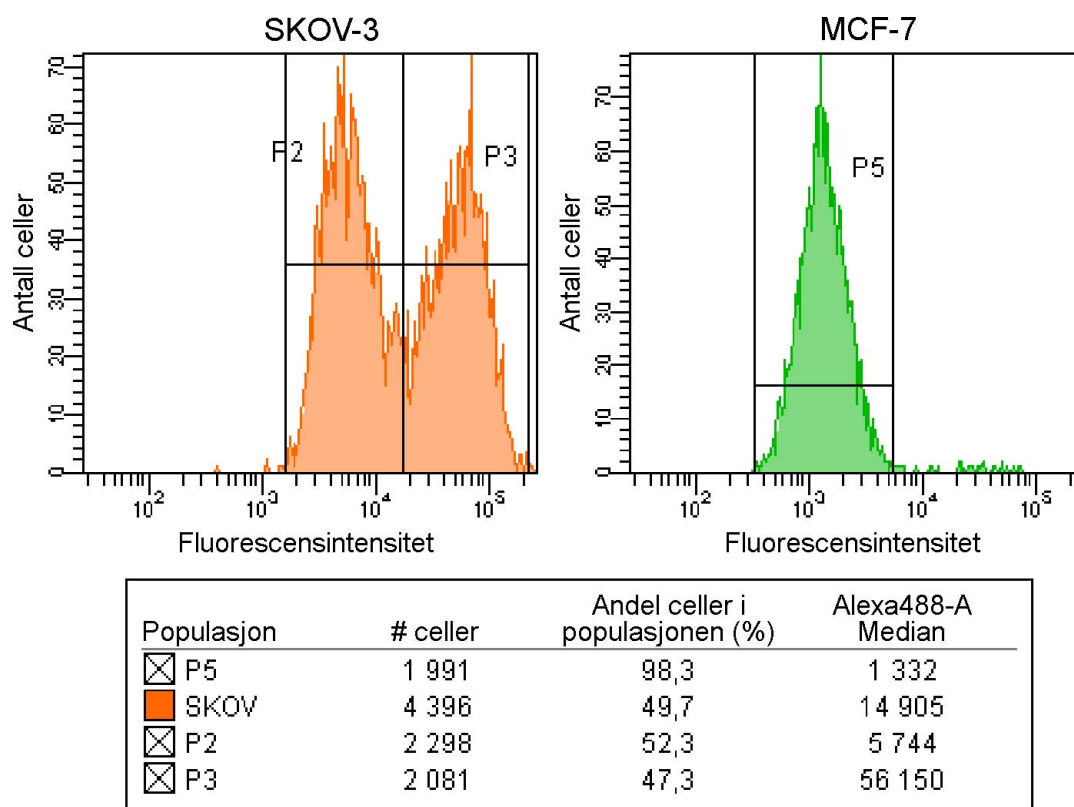
Ved å merke cellene med Alexa-Herceptin ble uttrykk av HER2 på SKOV-3-celler sammenlignet med uttrykket på BT-474 – og MCF-7-celler (figur 4.12 og figur 4.13). Histogrammene viser fordelingen av relativt antall antigener innen cellepopulasjonene. BT-474 har høyt uttrykk av HER2 mens MCF-7 har svært lavt uttrykk. Dette er i samsvar med tidligere publiserte data (Akabani et al., 2006).

SKOV-3 hadde to tydelige topper i sin fordeling av antigener, med ca 50 % av cellene i hver topp. Dette betyr at cellelinjen var delt i to populasjoner hvor den ene populasjonen (P3) hadde et rikt antall antigener på cellemembranen, og den andre (P2) hadde 6-10 ganger færre.

BT-474, på sin side, hadde en nokså jevn fordeling av antigener innen cellepopulasjonen. Det samme gjaldt MCF-7. Populasjonen med flest antigener i SKOV-3 hadde ca 4 ganger flere antigener som BT-474. Den andre populasjon hadde derimot ca 4 ganger flere antigener enn MCF-7.



Figur 4.12: Flowcytometridata fra SKOV-3 og BT-474. Histogrammene viser fordelingen av relativt antall antigener innen cellepopulasjonene. Antall antigener er proporsjonal med fluorescensintensiteten fra Alexa-Herceptin. Ved å dele inn i populasjoner (p2-p5) kan man finne antall celler i hvert område samt forholdet i antall antigener mellom populasjonene (se teksten).

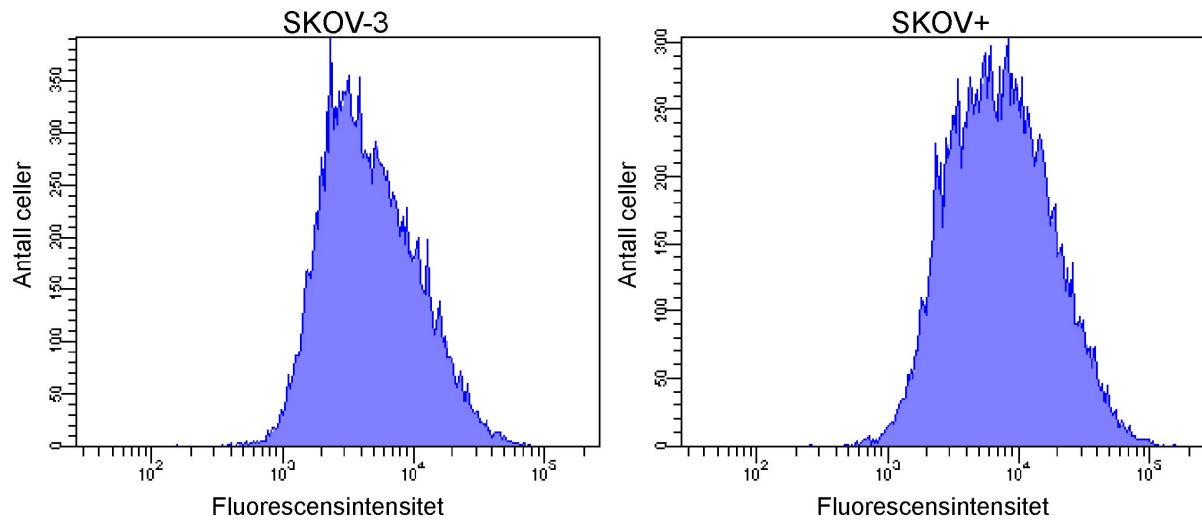


Figur 4.13: Flowcytometridata fra SKOV-3 og MCF-7. Histogrammene viser fordelingen av relativt antall antigener innen cellepopulasjonene. Antall antigener er proporsjonal med fluorescensintensiteten fra Alexa-Herceptin. Ved å dele inn i populasjoner (p2-p5) kan man finne antall celler i hvert område samt forholdet i antall antigener mellom populasjonene (se teksten).

Forsøket ble gjort tre ganger. De to første gangene ble resultatene som ovenfor, med to topper for SKOV-3. Den tredje gangen ble det målt én bred fordeling av antigener som overlappet de to toppene som ble målt tidligere (Vedlegg C). Årsaken til disse variasjonene er uvisst, men kan muligens skyldes dyrkningsbetingelser.

For å prøve å få en cellelinje med et mer homogent uttrykk av HER2, ble cellene med 20 % høyest antigenuttrykk sortert ut med et FACS DiVa flowcytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) og dyrket videre som normalt i 4 uker. Den sorterte cellelinjen ble kalt SKOV+. Etter 4 uker ble antigenuttrykket på SKOV-3 og SKOV+ igjen undersøkt ved flowcytometri (LSR-II, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Det ble observert to ting (figur 4.14); 1. SKOV-3 viste én bred fordeling som overlappet de to toppene. 2. Det var liten forskjell i antigenuttrykk mellom SKOV-3 og SKOV+ (gjennomsnittelig 1,6 ganger flere antigener blant SKOV+). Etter dette ble cellelinjen SKOV+ lagt ned. (merk:

Fluorescensintensiteten i figur 4.14 og figur 4.13 må ikke sammenlignes direkte da dette er to uavhengige forsøk kjørt med forskjellig spenning på flowcytometeret.)



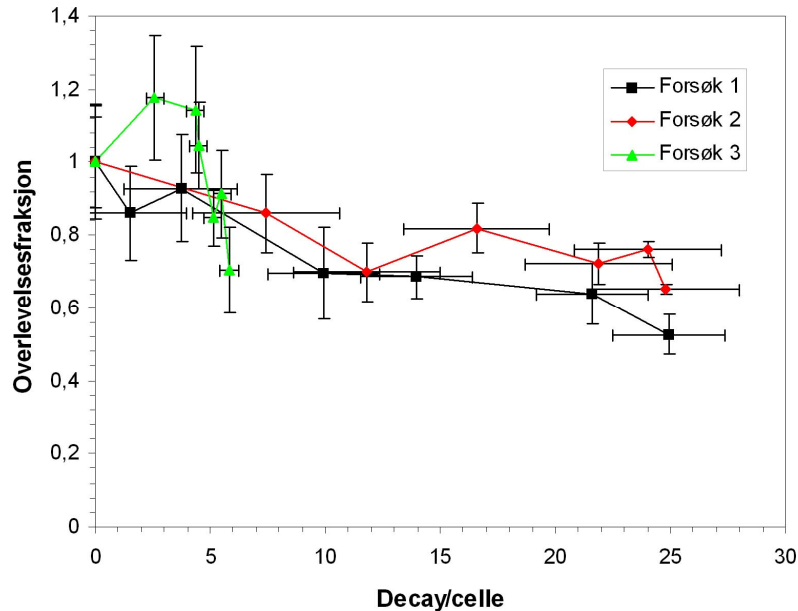
Figur 4.14: Flowcytometridata for SKOV-3 og den sorterte cellelinjen SKOV+. Histogrammene viser fordelingen av relativt antall antigener. Antall antigener er proporsjonal med fluorescensintensiteten fra Alexa-Herceptin. Målingene ble utført 4 uker etter sortering. Antigenuttrykket til SKOV+ har falt tilbake omtrent til normalt.

Overlevelseskurvene kan til dels forklares ut fra flowcytometridataene; Den brede fordelingen av antigener ga svært store variasjoner i opptak av ^{227}Th -Herceptin som kan ha gitt varierende avsatt dose til cellene.

4.5 Antall henfall per celle

Ved å se på total aktivitet som funksjon av tid og regne ut arealet under kurven, finnes antall henfall per celle for den gitte aktivitetsmengden. Dette ble gjort for data i figur 4.7. Formelverket i kapittel 3.9.2 *Beregning av antall henfall pr celle* ble brukt for å finne arealet under kurven. Aktiviteten ble målt frem til 7 dager mens koloniforsøket varte i 12 dager. For enkelhetsskyld antok vi at aktiviteten sank lineært til 0 fra siste målepunkt (7 dager) frem til forsøkets slutt (12 dager). Dette er ikke helt korrekt siden aktiviteten i virkeligheten synker eksponentielt, men fungerer som en god tilnærming. For figur 4.7 er den tilsatte aktivitetsmengden 2500 Bq/ml. Ved å bruke figur 4.5 kan man finne forholdet mellom målt aktivitet ved 2500 Bq/ml og målt aktivitet ved andre tilsatte aktivitetsmengder. Disse forholdstallene multiplisert med antall henfall per celle for 2500 bq, gir antall henfall per celle for alle tilsatte aktivitetsmengder. Dette forutsetter at forholdstallene kan overføres

mellom disse to eksperimentene. Videre ble antall henfall per celle byttet ut med sin korrelerende tilsatte aktivitetmengde i overlevelseskurven. Resultatet er vist i figur 4.15. Forsøk 4 ble utelatt fra figuren da den avvok betydelig fra de andre forsøkene (se figur 4.9).

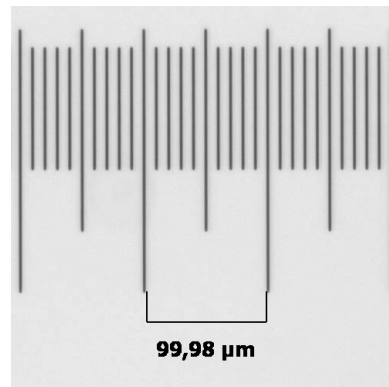


Figur 4.15: Overlevelsesfraksjoner (fra figur 4.9) som funksjon av antall henfall per celle (beregnete verdier) for SKOV-3-celler. Figuren viser forsøk 1-3.

4.6 Dosimetri

4.6.1 Måling av cellulære størrelser

Cellens – og cellekjernens diameter ble målt for SKOV-3 og BT-474. Den digitale målestokken i programmet AxioVision hadde tidligere blitt kalibrert ved hjelp av et objektmikrometer og viste fortsatt bra samsvar med denne (figur 4.16).



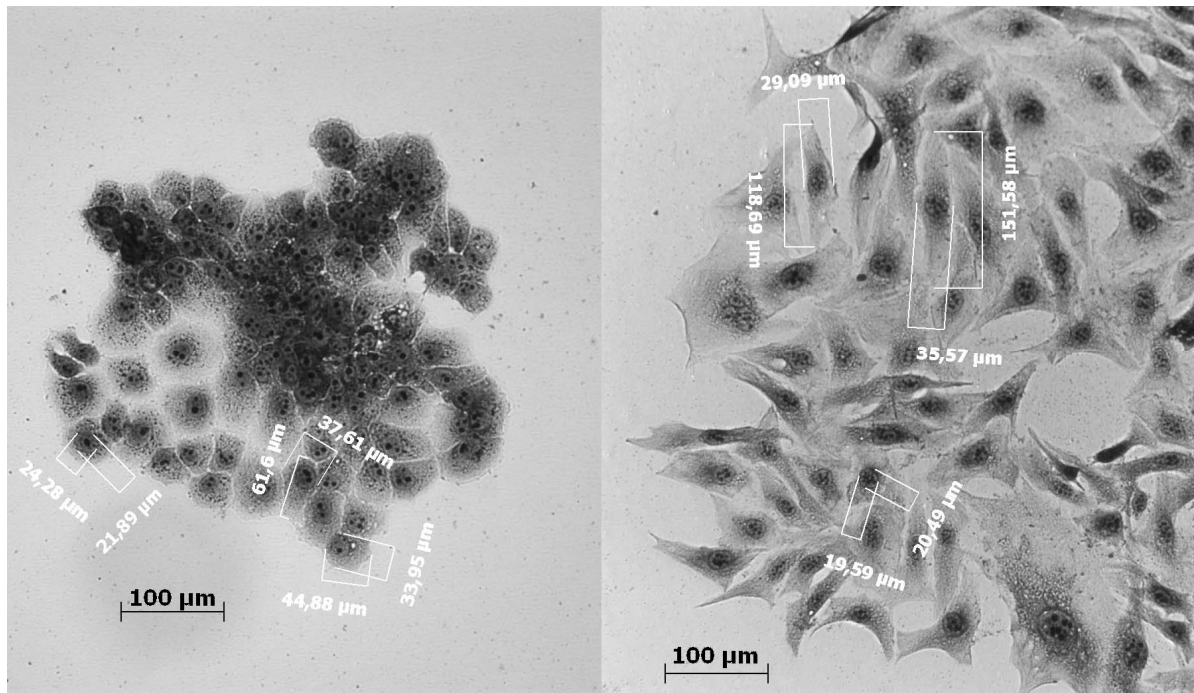
Figur 4.16: Mikroskopibilde av objektmikrometret. Avstanden mellom linjene som er målt skal være 100 μm.

En tilfeldig koloni fra BT-474 og SKOV-3 ble valgt og cellene i ytterkant av koloniene ble målt. Både for cellen og kjernen ble det målt største og minste diameter. Dette ble gjort med 15 celler i begge cellelinjene. Deretter ble gjennomsnittelig diameter beregnet både for cellen og kjernen (Vedlegg D). Figur 4.17 viser eksempler på hvordan målingene ble gjort.

Gjennomsnittelig cellediameter var henholdsvis 73,3 og 42,6 μm for SKOV-3 og BT-474. Altså er SKOV-3-cellene 72 % større enn BT-cellene. Kjernesens diameter var henholdsvis 22,8 og 21,7 μm, og er dermed nesten like store (SKOV-3 har 5 % større kjerne enn BT-474).

Våre målinger er ikke i samsvar med målinger fra Steffen et al. (2008) hvor cellediameter og kjernediameter for SKOV-3 og BT-474 ble målt i en coulter counter. Cellediameteren ble der bestemt til å være henholdsvis 15,6 og 17,5 μm for SKOV-3 og BT-474, og kjernen henholdsvis 8,4 og 11,8 μm. Dette var riktignok celler i suspensjon, mens våre målinger ble gjort på utflatete celler. Cellekjernens diameter burde ikke påvirkes av dette, likevel er våre målinger av kjernediameteren omlag det dobbelte av målinger fra Steffen et al.

En annen ting som bør nevnes, og som fremgår til en viss grad i figur 4.17, er at SKOV-3-cellene danner noe utflytende kolonier. Det er generelt noe avstand mellom cellene, spesielt i startfasen av kolonidannelsen. BT-474 på sin side, vokser svært tett. Det er vanlig at cellene vokser oppå hverandre, til og med i startfasen. Dette gjør at cellekjernene i praksis har enda mindre avstand til hverandre enn hva beregnet cellediameter skulle tilsi.

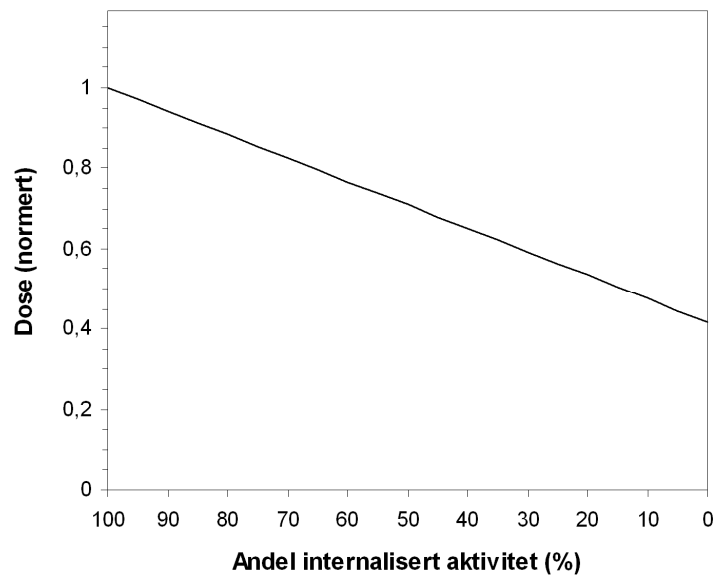


Figur 4.17: Mikroskopibilde av BT-474 (til venstre) og SKOV-3 (til høyre). Enkeltceller ble sådd ut og fiksert etter 12 dager. Figuren viser eksempler på hvordan cellens – og cellekjernens diameter ble målt.

4.6.2 Mikrodosimetrmodell

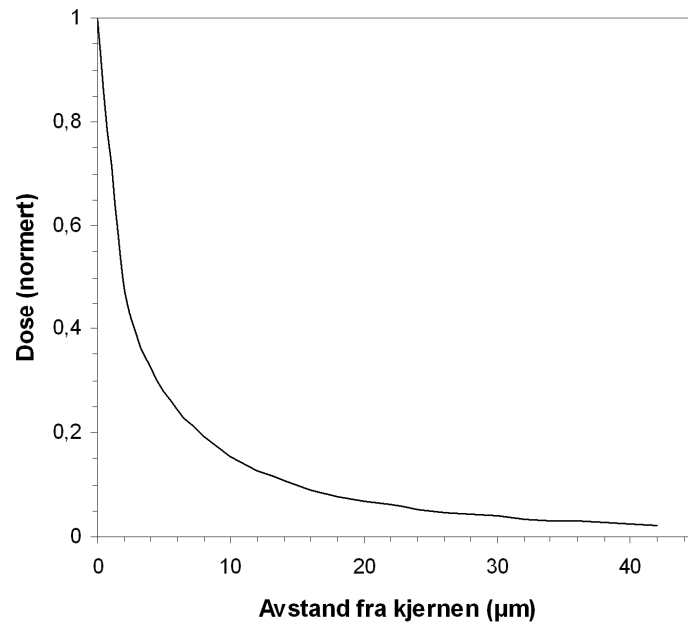
Vi undersøkte hvordan absorbert dose varierer med andel internalisert aktivitet og aktivitetens avstand fra cellekjernen. Mikrodosimetrmodellen fra kapittel 3.9 ble plottet ved å variere diverse parametere. Gjennomsnittsenegien til α -partiklene ble beregnet ut fra tabell 2.2 til å være 5,9 MeV og cellekjernens tetthet ble satt til 1000 kg/m^3 . Cellens radius, R_1 , og cellekjernens radius, r , ble i kapittel 4.6.1 bestemt til henholdsvis $36,7 \text{ }\mu\text{m}$ og $11,4 \text{ }\mu\text{m}$. Kuleskallet midt mellom cellekjernens ytterpunkt og cellemembranen fikk da en radius lik $24,1 \text{ }\mu\text{m}$.

Ved å bruke de antagelsene gjort i kapittel 3.9 om at internalisert aktivitet befinner seg i et kuleskall midt mellom cellekjernens ytterpunkt og cellemembranen, ble dose plottet som funksjon av andel internalisert aktivitet (figur 4.18). 0 % internalisert aktivitet ga en dose på ca 40 % sammenlignet med dosen ved 100 % internalisert aktivitet.



Figur 4.18: Beregnede verdier ut fra mikrodosimetrimodellen. Figuren viser absorbert dose i cellekjernen som funksjon av internalisert aktivitet i %. Dosen er normert til 1 ved 100 % internalisert aktivitet. x-aksen er reversert for å vise en synkende kurve.

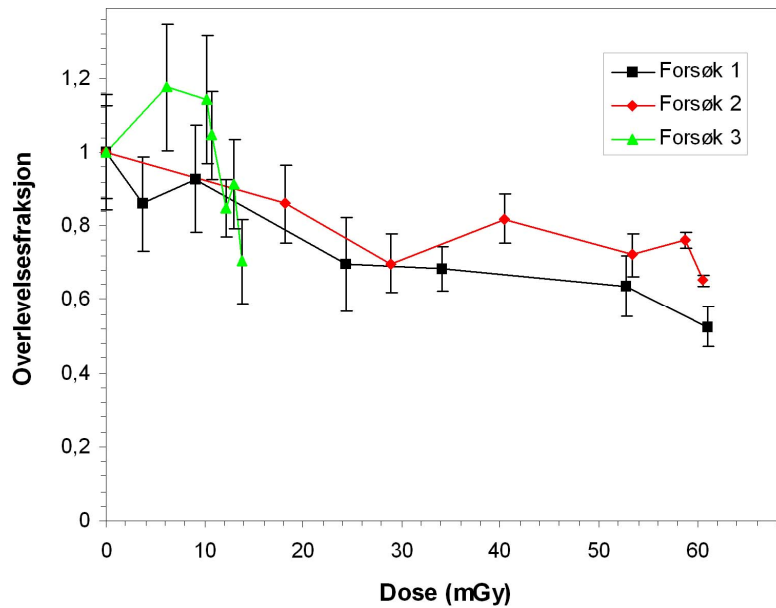
Dersom en antar at all aktivitet holder lik avstand fra kjernen og plotter dose som funksjon av aktivitetens avstand fra kjernen, får vi en kurve som faller eksponentielt med avstanden (figur 4.19). Dette viser at celler som flater mye ut vil motta svært lave doser i cellekjernen dersom aktiviteten ligger ytterst i cytoplasma. Fra fluorescensmikroskopibildene (figur 4.1) vet vi at nettopp dette kan være tilfelle blant noen SKOV-3-celler. Mikroskopibildene i kapittel 4.6.1 (figur 4.17) viser også at SKOV-3 flater mye ut sammenlignet med BT-474. Selv om cellebundet aktivitet hadde være den samme for begge cellelinjene, ville SKOV-3-celle mottatt lavere dose i cellekjernen og hadde dermed hatt større sannsynlighet for å overleve behandlingen med ^{227}Th -Herceptin enn BT-474.



Figur 4.19: Beregnede verdier ut fra mikrodosimetrimodellen. Figuren viser absorbert dose i cellekjernen som funksjon av aktivitetens avstand fra cellekjernemembranen. Dosen er normert til 1 ved 0 µm fra kjernen.

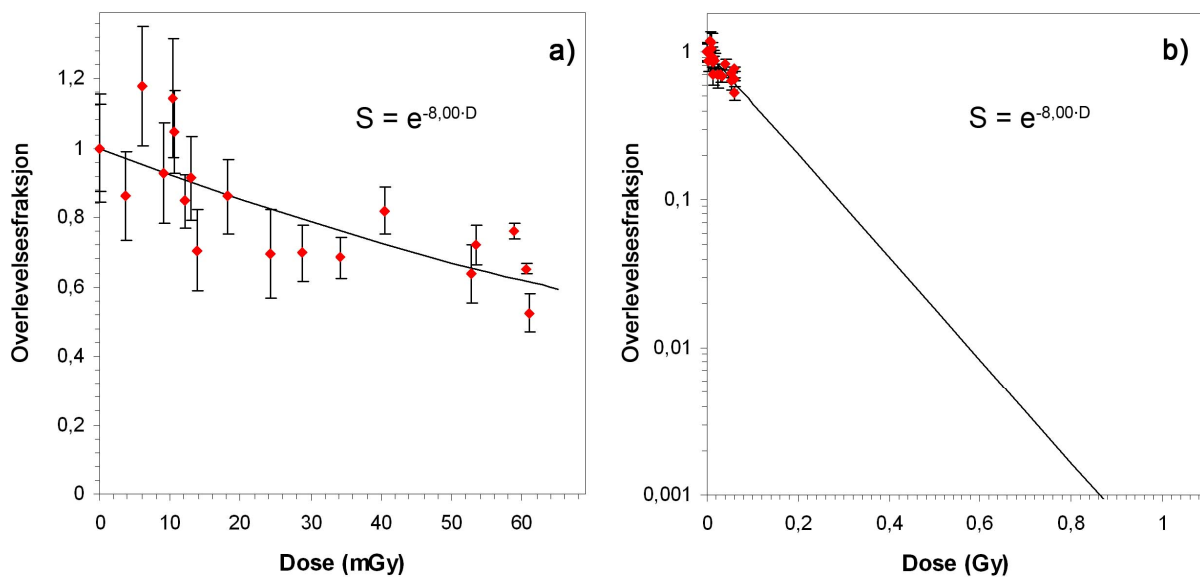
4.7 Overlevelsefraksjon som funksjon av dose

Ut fra verdiene om antall henfall per celle (kapittel 4.5) ble dosen beregnet som vist i kapittel 3.9 *Dosimetri*. I forsøk 1 og 2 ble det kun plottet total bundet aktivitet på grunn av en feil med strippingbufferen. Andelen internalisert aktivitet for disse to forsøkene ble satt til å være 21 % fordi dette var gjennomsnittelig internalisert aktivitet for forsøk 3 og 4. Overlevelsesfraksjonen som funksjon av dose for forsøk 1-3 er vist i figur 4.20.



Figur 4.20: Overlevelsesfraksjoner som funksjon av dose til cellekjernen for SKOV-3-celler.

Den lineærkvadratiske modellen omtalt i kapittel 2.4.2 ble tilpasset datapunktene i figur 4.20 ved hjelp av programmet Sigmaplot (figur 4.21a). α - og β -verdien ble beregnet til å være henholdsvis 8,00 og $2,40 \cdot 10^{-8}$. Altså var β -leddet tilnærmet lik null. Dermed utgjør kurvetilpasningen en rett linje i et enkeltlogaritmisk plott. Figur 4.21 b) har forlengede akser for å illustrere celleoverlevelsen for mer klinisk relevante doser. Disse dosene kan muligens oppnås ved gjentatte behandlinger over tid.

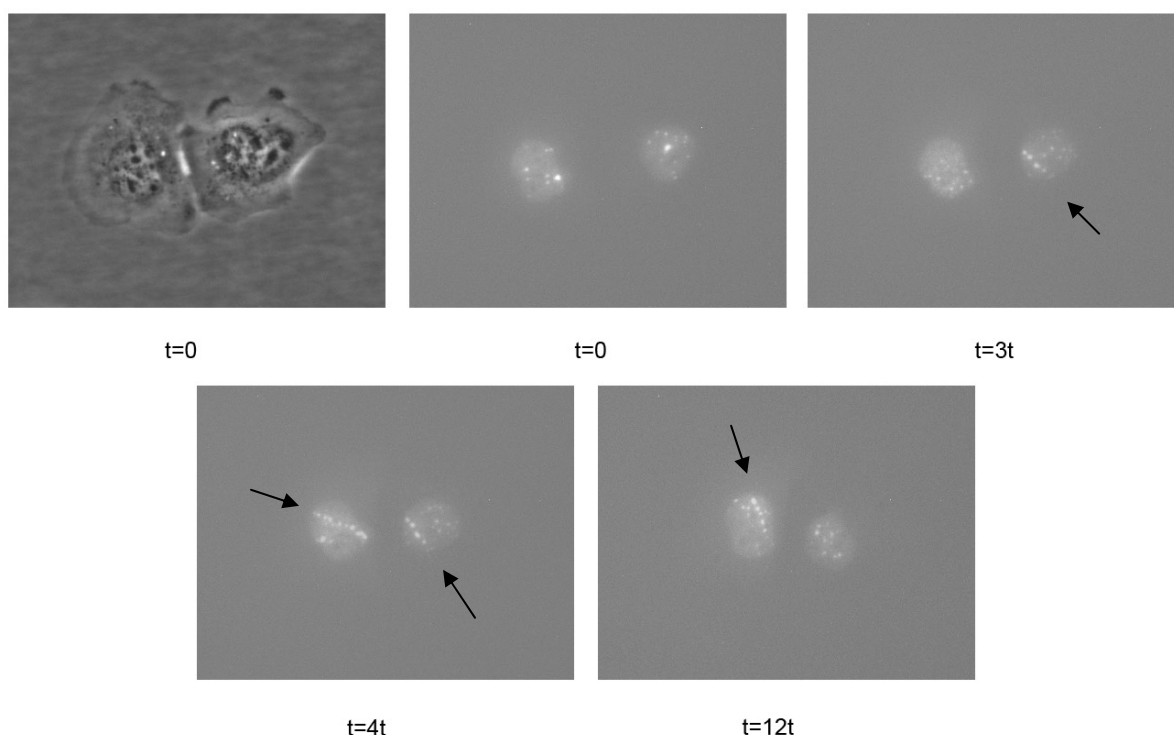


Figur 4.21: a) Den lineærkvadratiske modellen tilpasset til datapunktene fra figur 4.20. β -leddet er tilnærmet lik null. b) Forlengede akser illustrerer overlevelsesfraksjonen for mer klinisk relevante doser.

4.8 Mikroskopiforsøk med transfekterte celler

Hensikten med mikroskopiforsøket var å detektere α -sporene gjennom cellekjernen til den transfekterte cellelinjen SKOV-3-EGFP. Der hvor en mikrodosimetrisk modell kun gir gjennomsnittlig dose til cellene, vil denne metoden gi antall treff for hver enkelt celle sammen med informasjon om enkeltcellenes skjebne. Ved å følge et større antall celler over tid kan man på denne måten få et bedre mål på effekten av behandlingen. Sistnevnte lot seg imidlertid ikke gjøre innenfor oppgavens tidsrammer.

Cellene ble behandlet med 5000 Bq/ml ^{227}Th -Herceptin i suspensjon ved 4°C i 1 time. Deretter ble radioimmunkonjugatet vasket av og cellene ble sådd ut i en flaske. Cellene festet seg etter 2 timer i inkubator og ble så tilsatt 25 mM HEPES for å sikre riktig pH under filmforsøket (optimalisering av HEPESkonsentrasjonen vises i Vedlegg B). Deretter ble cellene filmet i mikroskop ved hjelp av time-lapse-metoden. Figur 4.22 viser et lite utvalg bilder fra forsøket. Pilene i figuren markerer hvor α -partiklene har gått gjennom kjernen. α -sporene var synlige i 1-3 timer etter at de oppsto, men var tydeligst den første timen.



Figur 4.22: Bildeserien viser to transfekterte SKOV-3-EGFP-celler som ble behandlet med 5000 Bq/ml ^{227}Th -Herceptin i suspensjon ved 4°C i 1 time. Radioimmunkonjugatet ble deretter vasket av før cellene ble sådd ut i en flaske. Bildet øverst til venstre viser et fasekontrastbilde av cellene, mens

de 4 andre viser fluorescensen fra cellekjernene. Pilene markerer α -sporene gjennom kjernen. $t=0$ angir starttidspunktet for time-lapse-forsøket, ca to timer etter inkubasjon med ^{227}Th -Herceptin.

Gjennom forsøket på 15 timer ble det talt totalt 5-8 treff på disse to cellene (α -sporene normalt på planet blir visende som store prikker, men er vanskelig å vite om det faktisk er α -spor). La oss si 6,5 treff. Dette gir følgende antall treff per celle per time:

$$\frac{6,5 \text{ treff}}{2 \text{ celler} \cdot 15 \text{ timer}} = 0,22 \text{ treff / celle / time} \quad (4.1)$$

Figur 4.7 viser cellebundet aktivitet ved forskjellige tidspunkt. Ved $t = 0$ var gjennomsnittsverdien for de 4 forsøkene $51 \text{ Bq}/10^6$ celler, og ved $t = 24t$ var gjennomsnittsverdien $38 \text{ Bq}/10^6$ celler. Ved $t = 15 t$ får vi følgende verdi:

$$\left(51 - \left(\frac{51 - 38}{24} \right) \cdot 15 \right) \text{ Bq}/10^6 \text{ celler} = 43 \text{ Bq}/10^6 \text{ celler} \quad (4.2)$$

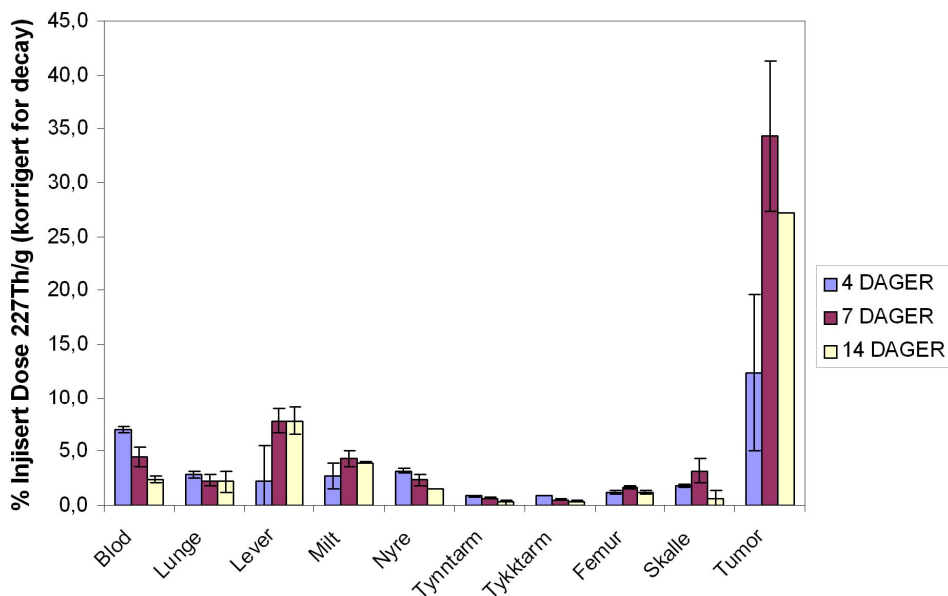
Dette gir følgende antall henfall per celle per time:

$$\frac{\frac{(51 + 43)}{2} \text{ henfall / sekund} \cdot 3600 \frac{\text{sekund}}{\text{time}}}{10^6 \text{ celler}} = 0,26 \text{ henfall / celle / time} \quad (4.3)$$

Altså er beregnet antall *henfall per celle per time* i samme størrelsesorden som antall observerte *treff per celle per time*.

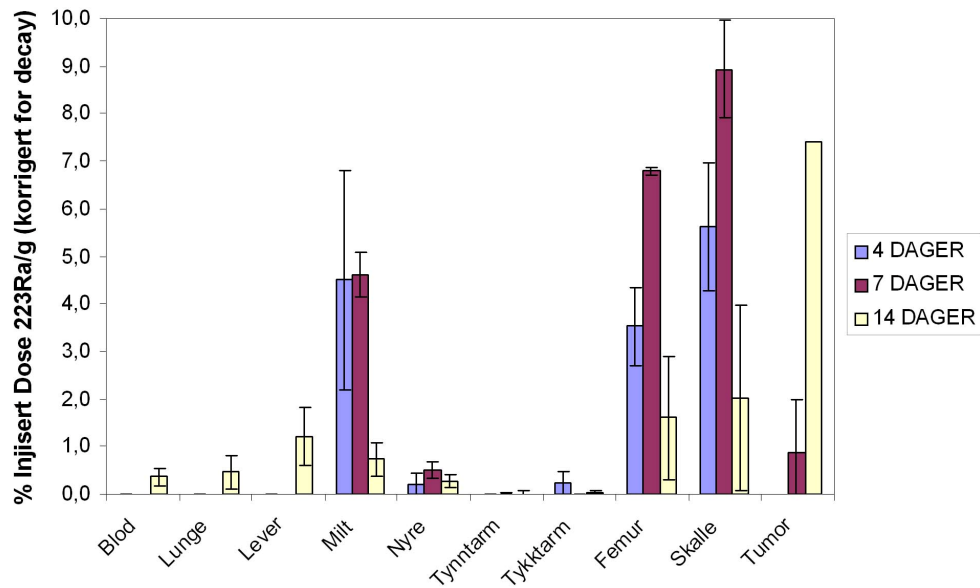
4.9 Dyreforsøk (biodistribusjon)

Det ble gjort forsøk på mus for å kartlegge opptak av ^{227}Th -Herceptin og ^{223}Ra i de ulike organene i dyret. Målt aktivitet ble dividert på organets masse. Deretter ble aktiviteten i organet sammenlignet med total injisert dose som ble korrigert for decay. Figur 4.23 viser fordelingen av ^{227}Th -Herceptin blant de respektive organene ved 4, 7 og 14 dager etter injisering. Tumor har et maksimalt opptak etter 7 dager. Denne verdien er 4,4 ganger høyere enn maks opptak i lever, som er det organet med høyest opptak.



Figur 4.23: Biodistribusjonsdata for ^{227}Th -Herceptin. Histogrammet viser hvor stor prosentandel av total injisert dose ^{227}Th -Herceptin (korrigert for decay) som finnes i de forskjellige organene per gram på ulike tidspunkt etter injisering. Det er 3 mus pr måletidspunkt (4, 7 og 14 dager).

Som nevnt vil ^{223}Ra søke til bein på grunn av bindingsegenskaper. Figur 4.24 bekrefter dette ved at femur (lårbein) og skalle har relativt høyt opptak av ^{223}Ra ved dag 4 og 7. Denne aktiviteten synker imidlertid betraktelig ved dag 14. Milt har også høyt opptak ved dag 4 og 7. Tumor ved dag 14 består bare av én måling da de resterende tumorene forsvant, og gir dermed en noe usikker verdi i begge figurene.



Figur 4.24: Biodistribusjonsdata for ^{223}Ra . Histogrammet viser hvor stor prosentandel av totalt injisert dose ^{223}Ra (korrigert for decay) som finnes i de forskjellige organene per gram på ulike tidspunkt etter injisering. Det er 3 mus pr måletidspunkt (4, 7 og 14 dager).

5. Diskusjon

5.1 Effekten av ^{227}Th -Herceptin in vitro

I denne oppgaven ble det sett på hvordan cellelinjen SKOV-3 responderer på radioimmunkonjugatet ^{227}Th -Herceptin. Ved å sammenligne effekten av ^{227}Th -Herceptin og ^{227}Th -Rituximab direkte, er det nærliggende å tro at det enten er cellebundet aktivitet eller antistoffet Herceptin som står for redusert celleoverlevelse. Uspesifikk binding samt bestråling fra mediet gjenspeiles i kurven fra ^{227}Th -Rituximab, som viser en høyere overlevelsesfraksjon. Kaldt Herceptin later imidlertid til å ha liten effekt på cellene. Det kan derfor virke som om α -strålingen fra ^{227}Th -Herceptin er hovedårsaken til redusert celleoverlevelse. Det bør imidlertid gjøres flere forsøk med ^{227}Th -Rituximab og kaldt Herceptin for å bekrefte dette. Effekten av α -strålingen gjenspeiles også av doseresponskurven. Regresjonen gir en rett linje i et enkeltlogaritmisk plott (β -leddet er lik null). Dette er helt typisk for α -stråling (Hall og Giaccia, 2006).

Effekten av radioimmunkonjugatet ^{227}Th -Herceptin på SKOV-3 er imidlertid beskjeden. Samme type forsøk (aktivitet tilsatt i suspensjon før utsåing) er gjort med cellelinjen BT-474 hvor overlevelsesfraksjonen er nede på 1 % ved 20.000 Bq/ml (Krogh et al., upublisert data). Problemet med SKOV-3-cellene er å få avsatt tilstrekkelig høye doser i cellekjernen. Det er tre faktorer som gjør at dette kan være vanskelig:

Antigenuttrykk

Flowcytometridata viste at SKOV-3 uttrykker HER2 på cellemembranen. Cellene ble sammenlignet med BT-474 og MCF-7. BT-474 har et høyt uttrykk og en tilnærmet homogen fordeling av antigener, noe som gjør at de fleste cellene får tilstrekkelig høy dose for å bli inaktivert. Disse cellene responderer derfor godt på ^{227}Th -Herceptin (1 % celleoverlevelse ved 20 kBq/ml). MCF-7 har få antigener på cellemembranen og responderer dårlig på samme behandling (60 % celleoverlevelse ved 20 kBq/ml, Krogh et al., upublisert data). SKOV-3 derimot, har en bred fordeling av antigener, hvor rundt halve populasjonen ligger i samme område som BT-474 med høyt uttrykk, og den andre halvdel ligger i samme område som MCF-7 med nesten like lavt uttrykk. Dette var nok den viktigste forklaringen på

dårlig respons av ^{227}Th -Herceptin på SKOV-3. En kan tenke seg at kun den ene halvdel av cellene – de med flest antigener – binder et tilstrekkelig antall antistoffer for å utgjøre en dødelig effekt. Den andre halvdel vil ikke få stor nok dose og lever videre.

Aktivitetens avstand til kjernen

Steffen et al. (2008) har i sine studier sett på forskjell i strålesensitivitet blant tre ulike cellelinjer som overuttrykker HER2, deriblant SKOV-3 og BT-474. Cellene ble behandlet med det α -emitterende radioimmunkonjugatet $^{211}\text{At}-(Z_{\text{HER2:4}})_2$ og analysert ved klonogen overlevelse. Det ble slått fast at SKOV-3 var den mest stråleresistente cellelinjen blant disse tre. Videre ble cellediameteren sammenlignet med cellekjernens diameter. SKOV-3 hadde den minste kjernen, med en større avstand til cellemembranen enn BT-474. Steffen et al. mener dette bidrar til høy stråleresistens for SKOV-3. Celledimensjonene ble målt med en annen metode i denne oppgaven, men våre målinger viser også at SKOV-3 har atskillig større avstand mellom cellemembranen og kjernen enn BT-474. Koloniene til SKOV-3 vokser svært ”utflytende” med stor avstand mellom cellekjernene, mens BT-474-cellene nærmest vokser oppå hverandre. Dette vil også bidra til lavere dose for SKOV-3-cellene.

Doblingstid

I tillegg til antigenuttrykk og aktivitetens avstand til kjernen, kan muligens doblingstiden være en tredje forklaring til redusert effekt av ^{227}Th -Herceptin på SKOV-3-celler. Som nevnt vil celledelingen bidra til færre henfall per celle siden aktiviteten deles blant dattercellene. Celler som dyrkes *in vitro* (i skåler) vokser under optimale forhold, og deler seg følgelig svært hyppig. Dersom cellene vokser i en tumor *in vivo* (f.eks. i mus), vil de trolig leve under dårligere vekstforhold og vil følgelig vokse mye saktere. Dette vil kunne bidra til høyere dose for cellene *in vivo* enn cellene *in vitro*. Teorien er i samsvar med resultatene fra Abbas et al., (upublisert data) som har oppnådd god effekt av ^{227}Th -Herceptin på mus med implanterte SKOV-3-tumorer (Vedlegg I).

SKOV-3 har en mye kortere doblingstid *in vitro* (24 t) enn BT-474 (72 t). Forskjellen i doblingstid kan også være et bidrag til den dårlige effekten av ^{227}Th -Herceptin på SKOV-3. Det kunne derfor vært interessant å undersøke effekten av Herceptin konjugert til en α -emitterende nuklide med kortere halveringstid enn ^{227}Th .

Klonogen overlevelse er sannsynligvis en lite egnet metode for å undersøke effekten av ^{227}Th -Herceptin. Dette fordi cellene blir bestrålt etter at de er sådd ut og kanskje lenge etter at de har delt seg. Forsøk med gjentatte behandlinger med ^{227}Th -Herceptin bør uansett prøves for å oppnå større effekt. Inkubering med radioimmunkonjugatet i suspensjon ved 37°C vil sannsynligvis øke total cellebundet aktivitet da antistoffene internaliseres under inkubasjonen og nye antistoffer slipper til. Men dette bør undersøkes nærmere.

5.2 Mikrodosimetrmodellen

Den lineærkvadratiske modellen ble tilpasset datapunktene for dose-responskurven. Det må presiseres nok en gang at det ikke ble gjort forsøk på å utvikle en fullverdig mikrodosimetrisk modell i denne oppgaven, men heller prøve å gi en indikasjon på hvilke doser cellene mottok. Kurvetilpasningen viser allikevel bra samsvar med Humm og Chin (1993) sin Monte Carlo modell som beskriver celleoverlevelse som funksjon av dose til mediet fra cellebundne α -emittere (Vedlegg I). Det vises best samsvar i tilfellet hvor 50 % av aktiviteten er bundet til *alle* cellene, og 50 % er fritt i mediet. I tilfellet hvor 50 % av aktiviteten er bundet til *halvparten* av cellene (Type A), vises en noe slakere overlevelseskurve. Type A-oppsettet er kanskje en bedre modell for SKOV-3, da halvparten av SKOV-3-cellene binder atskillig mer antistoff enn de resterende cellene. Husk at våre datapunkter vil ligge helt i øverste, venstre hjørne i figuren til Humm og Chin, slik at kurven for Type A-oppsettet vil kunne passe for våre datapunkter. Det vil uansett være vanskelig å sammenligne våre data med Humm og Chin sin Monte Carlo modell, da denne beskriver dosen til mediet mens våre data beskriver dosen til cellekjernene.

Det finnes dessuten utallige svakheter ved vår mikrodosimetriske modell. Blant annet tar ikke modellen hensyn til strålingsbidraget fra ^{227}Th og døtrene i mediet eller stråling fra nabocellene. Modellen tar heller ikke hensyn til en komplisert cellegeometri. Mange av cellene viser seg for eksempel å være lange og smale med lange utstikkere. Dessuten er det stor variasjon i cellestørrelse. Bragg-toppen er en annen viktig faktor som ikke er tatt med i modellen. Inntil et visst maksimum vil avsatt energi øke med avstanden. En treff fra en kilde som ligger $50\ \mu\text{m}$ fra kjernemembranen vil kunne avsette mye mer energi i kjernen enn et treff fra en kilde som ligger helt inntil kjernen.

5.3 Strippingbuffer

To av bindingsforsøkene i denne oppgaven ble gjort før kvalitetskontroll av strippingbufferen fordi det tidligere har blitt gjort tilsynelatende vellykkede forsøk med samme strippingbuffer (Haigler et al., 1980; Borchardt et al., 2003). Uoverensstemmelse med mikroskopiavbildning av Alexa-Herceptin gjorde derimot kvalitetskontroll til en nødvendighet. Det må presiseres at dette kun var et kontrollforsøk uten gjentatte paralleller. Under kvalitetskontrollen ble det oppdaget at cellene ikke tålte behandlingen med strippingbuffer (Vedlegg A); cellemembranen ble perforert. Det er derfor nærliggende å tro at internalisert aktivitet lekker ut og overestimerer målt aktivitet på cellemembranen. Likevel må det presiseres at den totale aktiviteten som er målt i og på cellene, sannsynligvis viser sann verdi, da det ikke går tapt noe aktivitet ved bruk av strippingbuffer.

Akabani et al. (2006) har i sine studier benyttet en annen strippingbuffer med en høyre saltkonsentrasjon og en annen syre (500 mM NaCl og eddiksyre istedenfor 150 mM NaCl og saltsyre som ble benyttet i denne oppgaven). Det er mulig at den høye saltkonsentrasjonen minsker trykket i cellen og forhindrer at den sprekker. Derfor bør denne strippingbufferen prøves.

5.4 Plating efficiency

Cellenes gjennomsnittelige plating efficiency har variert i området 8 – 36 % i forsøkene. Det har vært fokus på gode vekstforhold for stamcellekulturen under hele oppgaven, nettopp for å forhindre variasjoner som dette. Plating efficiency forteller hvor stor andel av de utsådde cellene som har mulighet til å vokse opp til kolonier. Dersom denne prosentandelen varierer svært mye fra forsøk til forsøk, kan man heller ikke utelukke at det finnes tilsvarende variasjoner innen ett og samme forsøk. En ustabil plating efficiency vil i så fall kunne medføre stor usikkerhet i resultatene.

5.5 Inkubering med antistoff

Under den første metoden for inkubering med radioimmunkonjugat (aktivitet tilsatt etter utsåing), ble det tilsatt maksimum 10 kBq/ml. Dette ble bestemt ut fra en metningskurve for

BT-474 (Vedlegg I) hvor det ble plottet spesifikk binding som funksjon av tilsatt Alexa-Herceptin (Krogh et al., upublisert data). Cellene var mettet ved 10 $\mu\text{g/ml}$, hvilket tilsvarer 10 kBq/ml med spesifikk aktivitet lik 1000 Bq/ μg , og siden SKOV-3 har færre antigener er det ingen grunn til å tro at cellene kan binde mer enn BT-474.

Da det ble byttet metode for inkubering av antistoff (til *aktivitet tilsatt før utsåing*) ble det tilsatt aktivitet til et mye større antall celler, dermed doblet vi maksimumsdosen til 20 kBq/ml. Det er viktig å tenke på forholdet mellom antall antistoffer og antigener når en tilsetter antistoff til et stort antall celler. Det bør være et stort overskudd av antistoffer for å få maks binding. Akabani et al. (2006) har beregnet antall HER2 antigener på BT-474. Disse cellene har $1,72 \times 10^6$ antigener på cellemembranen. Ved å se på forholdet mellom BT-474 og SKOV-3 fra flowcytometridataene, kan man anslå antall antigener på SKOV-3 cellene. Figur 4.12 viser at forholdet BT-474:SKOV-3 var 38.000:24.000. Altså er gjennomsnittelig antall antigener på SKOV-3-cellene trolig lik $1,07 \times 10^6$. Videre kan en beregne antall antistoffer tilsatt:

$$\text{Antall antistoffer} = N_{Abs} = \frac{A(\text{Bq}) \cdot N_A (\text{molekyler} / \text{mol})}{M_m (\text{g} / \text{mol}) \cdot A_{spes} (\text{Bq} / \mu\text{g})} \quad (5.1)$$

hvor A er tilsatt aktivitet, N_A er Avogadros tall ($6,022 \times 10^{23}$), M_m er molekylmassen til Herceptin (145.000 g/mol) og A_{spes} er spesifikk aktivitet. Dersom en tilsetter maks dose på 20.000 Bq og spesifikk aktivitet er 1000 Bq/ μg ($= 10^9$ Bq/g), vil det være 39 ganger flere antistoffer som antigener på 2 millioner celler. Dette er et stort overskudd. Figur 4.5, som viser bundet aktivitet som funksjon av tilsatt aktivitet, bekrefter dette ved at kurven flater ut ved 5-10 kBq. Altså skulle ikke antall celler være problematisk i metoden *aktivitet tilsatt før utsåing*.

5.6 Antall ^{227}Th -atomer per celle

^{227}Th -Herceptin har vist dårlig effekt på SKOV-3-celler in vitro i dette studiet. I den forbindelse er det interessant å regne på hvor mange Th-atomer som faktisk er bundet til cellen. Først kan man beregne hvor mange Th-atomer det er per antistoff, eller rettere sagt antistoffer per Th-atom. For det er nemlig langt fra alle antistoffer som har bundet til seg et

Th-atom. En kan finne forholdet mellom antall antistoffer, N_{Abs} , og antall Th-atomer, N , fra ligning (2.8) og (5.1):

$$\frac{N_{Abs}}{N} = \frac{N_{Abs}}{A/\lambda} = \frac{N_A \cdot \ln(2)}{M_m \cdot A_{spes} \cdot t_{1/2}} \quad (5.2)$$

Med spesifikk aktivitet på 1000 Bq/ μg vil dette forholdstallet bli 1780. Altså er det ett ^{227}Th -atom per 1780 antistoff. Dersom cellene i snitt har $1,07 \times 10^6$ antigener (beregnet ovenfor), vil det ved maks binding være ca 600 ^{227}Th -atomer bundet til cellen. Aktiviteten blir da 260 μBq per celle (ligning (2.8)). Med en så lav aktivitet ser man viktigheten av at radionukliden er en α -emitter som kan avgi mye energi per decay. I virkeligheten er aktiviteten mye lavere fordi mange antistoffer vil falle av samtidig som de resterende deles mellom cellene ved celledeling.

5.7 Transfeksjon, seleksjon og time-lapse med SKOV-3-EGFP

Ved time-lapse-forsøk med SKOV-3-EGFP er det helt avgjørende med korrekt eksponering for å oppdage α -sporene i kjernen. Derfor er det svært viktig at alle cellene uttrykker proteinet pEGFP i samme grad. Seleksjon av SKOV-3-EGFP med flowcytometri var helt nødvendig for å oppnå dette. Etter seleksjonen endte vi riktignok opp med en homogen fluorescensintensitet, men intensiteten på fluorescenssignalet kunne vært bedre. Det var behov for en lukkertid på omlag 10 sekunder for å oppnå ønsket eksponering. Dette er i lengste laget. Cellene trives dårlig i synlig lys da ulike ingredienser i mediet (blant annet fenolrødt) fungerer som fotosensibilisatorer og kan føre til at reaktive oksygenforbindelser dannes (Stoien og Wang, 1974; Edwards et al., 1994; Grzelak et al., 2001). Av denne årsak bør det strebes etter å få ned eksponeringstiden. Ved å optimalisere transfeksjonsmetoden kan man muligens oppnå sterkere fluorescens i cellene. Medium uten ph-indikatoren fenolrødt kan være et supplerende tiltak for å redusere mengden reaktive oksygenforbindelser, men da bør pH undersøkes med pH-papir eller lignende.

Metoden ser uansett ut til å fungere etter formålet; α -sporene lot seg oppdage. Dette er en spennende metode som kan jobbes videre med. Ved å følge et større antall celler over lengre tid, vil en kunne få informasjon om hvor mange treff gjennom kjernen som er nødvendig for

at cellen skal dø. Metoden gir også et mer eksakt svar på dosen til hver enkelt celle, og viser videre enkeltcellenes skjebne. Dette vil kanskje være en bedre måte å gjøre overlevelseshforsøk på. Bystandereffekt er et annet spennende område som kan la seg studere med denne metoden. Hva skjer med ubestrålte naboceller rundt en celle som har fått dødelig treff?

5.8 Dyreforsøk

Biodistribusjonsforsøket viste tydelig opphopning av ^{227}Th -Herceptin i tumor. Dahle et al. (2007) har oppnådd lignende resultater med ^{227}Th -Rituximab i mus med Raji-tumorer som overuttrykker antigenet CD20 mot Rituximab. De fikk høyest opptak av ^{227}Th -Rituximab i tumor ved dag 4 og relativt lavt opptak i samtlige organer med unntak av en liten forhøyning i lever. Dahle et al. fikk også høyt opptak av ^{223}Ra i bein (femur og skalle). Resultatene fra denne oppgaven viser i tillegg en opphopning av ^{223}Ra i milt. Dette kan muligens skyldes forkalkning i milten som gjør at ^{223}Ra setter seg der.

For å bedre statistikken må forsøket gjentas flere ganger. Tre dyr per tidspunkt er også litt lite. I tillegg må det tas med flere tidspunkt, for eksempel 1t, 24t og 21 dager. De to første tidspunktene vil vise hvor raskt radioimmunkonjugatet går ut av blodet. Det siste tidspunktet vil avsløre om det er ytterligere opphopning i lever og andre organer, samt videre utvikling i tumor.

5.9 Radioimmunkonjugatets kvalitet og levering

Det er to faktorer som bestemmer kvaliteten til radioimmunkonjugatet. Den ene er spesifikk aktivitet [$\text{Bq}/\mu\text{g}$] som forteller hvor stor andel av antistoffene som har ^{227}Th bundet til seg. Desto høyere denne verdien er, desto flere ^{227}Th -atomer vil binde seg til cellemembranen. Den andre er immunreaktiv fraksjon (IRF) som forteller hvor stor andel av antistoffene som er uskadd og har beholdt bindingsegenskapene sine. Begge faktorene blir testet før konjugatet tas i bruk. To faktorer som imidlertid ikke testes før konjugatet tas i bruk, er hvorvidt ^{227}Th faller av antistoffet over tid og hvor lenge radioimmunkonjugatet holdes bundet til HER2. Det er tenkelig at også disse to sistnevnte faktorene kan variere fra konjugat til konjugat. Dette vil i så fall bidra til variasjoner i forsøkene.

Akabani et al. (2006) har studert effekten av varierende spesifikk aktivitet for det α -emitterende radioimmunkonjugatet ^{211}At -Herceptin. Deres beregninger har vist at overlevelsesfraksjonen som funksjon av dose ikke påvirkes av den spesifikk aktiviteten, men at en høyere spesifikk aktivitet gir muligheten for høyere dose. Derimot vil overlevelsesfraksjonen som funksjon av tilsatt aktivitetsmengde (Bq/ml) påvirkes i stor grad av den spesifikke aktiviteten. Ved å øke den spesifikke aktiviteten med en faktor 10^3 , kan celleoverlevelsen reduseres med en faktor 10^4 ved aktivitetsmengden 20 kBq/ml. Dette viser viktigheten av å oppnå høy spesifikk aktivitet i produksjonen.

Et problem i denne oppgaven har vært varierende kvalitet på radioimmunkonjugatet. Da med tanke på spesifikk aktivitet og immunreaktiv fraksjon. Det er svært vanskelig å forutsi kvaliteten før konjugatet er ferdig produsert. Variasjoner i spesifikk aktivitet har medført vanskeligheter med å slå sammen forsøkene og se sammenhengen mellom dem. Lav IRF førte ofte til at planlagte forsøk måtte avlyses. Årsakene til lav IRF kunne være dårlig kvalitet på antistoffet eller kelatoren DOTA, dårlig utbytte av ^{227}Th eller det kunne være problemer med metoden for å måle IRF.

Produksjon av ^{227}Th -Herceptin er en kostbar, tidkrevende og komplisert prosess. Enkelte ganger ble det ikke levert nok av radioimmunkonjugatet til at et ønskelig antall paralleller lot seg gjennomføre i forsøkene.

6. Konklusjon

^{227}Th -Herceptin viste liten effekt på SKOV-3-celler *in vitro*. Dette hadde sannsynligvis sammenheng med stor variasjon i antigenuttrykk blant cellene, samt cellenes korte doblingstid og ^{227}Th relativt lange halveringstid. I tillegg kunne cellene flate svært mye ut slik at aktiviteten fikk stor avstand til cellekjernen hvilket resulterte i lavere dose. Dessuten kunne måling av cellebundet aktivitet og flowcytometri antyde at cellenes antigenuttrykk varierte betraktelig over tid. Dette gjør det vanskelig å tolke data.

Andre inkubasjonsmetoder bør fortsatt prøves. For eksempel inkubering i suspensjon ved 37°C og fraksjonert behandling. Konjugatet virker dessuten lovende *in vivo*. Effekten på tumorer i mus bør derfor undersøkes nærmere.

Ved å transfektere cellene med 53BP1-EGFP var det mulig å filme α -sporene gjennom cellekjernen. Metoden vil kunne gi en mer eksakt dose til hver enkelt celle, samt at enkelcellers utvikling kan følges over tid. Metoden bør imidlertid optimaliseres videre for å utvikle celler med høyere fluorescensintensitet og etablere metoder for måling av toksisk effekt.

Referanser

Abbas N, Hjelmerud AK, Borrebæk J, Dahle J, upublisert data. *Targeted radionuclide therapy of mice with SKOV-xenografts*. Upublisert data.

Adams MM og Carpenter PB, 2006. *Tying the loose ends together in DNA double strand break repair with 53BP1*. Cell Division, vol 1, s 19.

Akabani G, Carlin S, Welsh P, Zalutsky MR, 2006. *In vitro cytotoxicity of 211At-labeled trastuzumab in human breast cancer cell lines: effect of specific activity and HER2 receptor heterogeneity on survival fraction*. Nuclear medicine and biology, vol 33(3), s 333-347.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, 2002. *Molecular biology of the cell*, 4th edition. Garland Science, New York.

Attix FH, 2004. *Introduction to radiological physics and radiation dosimetry*. WILEY-VCH, Weinheim.

Aurlien E, 2004. *Alpha-particle based radioimmunotherapy. Experimental studies in lymphoma, osteosarcoma and bone marrow cells*. Doktorgradsavhandling, mediskinsk fakultet, universitetet i oslo.

BD Biosciences, 2000. *Introduction to flow cytometry, a learning guide*. Becton, Dickinson and company, California.

Behr TM, Béhé M, Stabin MG, Wehrmann E, Apostolidis C, Molinet R, Strutz F, Fayyazi A, Wieland E, Gratz S, Koch L, Goldenberg DM, Becker W, 1999. *High-linear energy transfer (LET) alpha versus low-LET beta emitters in radioimmunotherapy of solid tumors: therapeutic efficacy and dose-limiting toxicity of 213Bi- versus 90Y-labeled CO17-1A Fab' fragments in a human colonic cancer model*. Cancer research, vol 59, s 2635-2643.

Bodey B, Siegel SE, Kaiser HE, 1996. *Human cancer detection and immunotherapy with conjugated and non-conjugated monoclonal antibodies*. Anticancer research, Vol 16(2), s 661-674.

Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, Pommier Y, 2008. *GammaH2AX and cancer*. Nature reviews. Cancer, vol 8(12), s 957-967.

Borchardt PE, Yuan RR, Miederer M, McDevitt MR, Scheinberg DA, 2003. *Targeted actinium-225 in vivo generators for therapy of ovarian cancer*. Cancer research, vol 63(16), s 5084-5090.

Brekke OH og Sandlie I, 2003. *Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century*. Nature reviews. Drug discovery, vol 2(1), s 52-62.

Browne E, 2001. *Nuclear Data Sheets for A = 215, 219, 223, 227, 231*. Academic Press, vol 93(4), s 763-1061.

Bruland ØS, Nilsson S, Fisher DR, Larsen RH, 2006. *High-linear energy transfer irradiation targeted to skeletal metastases by the alpha-emitter 223Ra: adjuvant or alternative to conventional modalities?* Clinical cancer research, vol 12(20), s 6250s-6257.

Cancer Research UK, 2008. Tilgjengelig fra <http://www.cancerresearchuk.org> [sist besøkt 9. desember 2008].

Carter P, 2001. *Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies*. Nature reviews. Cancer, vol 1(2), s 118-129.

Chadwick KH, Leenhouts HP, 1973. *A molecular theory of cell survival*. Physics in medicine and biology, vol 18, s 78-87.

Clifford A og Hudis MD, 2007. *Trastuzumab – mechanism of action and use in clinical practice*. The New England journal of medicine, vol 357, s 39-51.

Dahle J, Borrebæk J, Jonasdottir TJ, Hjelderud AK, Melhus KB, Bruland ØS, Press OW, Larsen RH, 2007. *Targeted cancer therapy with a novel low-dose rate α -emitting radioimmunoconjugate*. Blood, vol 110(6), s 2049-2056.

Dahle J, Bruland OS, Larsen RH, 2008. *Relative biologic effects of low-dose-rate alpha-emitting 227Th-rituximab and beta-emitting 90Y-tiuexetan-ibritumomab versus external beam X-radiation*. International journal of radiation oncology, biology, physics, vol 72(1), s 186-92.

Dertinger H og Jung H, 1970. *Molecular radiation biology*. Heidelberg Science Library, Berlin.

Eary JF og Brenner W, 2007. *Nuclear medicine therapy*. Informa Healthcare, New York

Edwards AM, Silva E, Jofré B, Becker MI, De Ioannes AE, 1994. *Visible light effects on tumoral cells in a culture medium enriched with tryptophan and riboflavin*. Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology, vol 24(3), s 179-186.

Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P, 2007. *Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006*. Annals of oncology, vol 18 (3), s 581-92.

Fogh J og Trempe, G. I: J. Fogh (ed.), 1975. *Human Tumor Cells In Vitro*. Plenum Press, NY, s 155-159.

Givan AL, 2001. *Flow cytometri, first principles*, second edition. Wiley, New York.

Grzelak A, Rychlik B, Bartosz G, 2001. *Light-dependent generation of reactive oxygen species in cell culture media*. Free radical biology & medicine, vol 30(12), s 1418-1425.

Haigler HT, Maxfield FR, Willingham MC, Pastan I, 1980. *Dansylcadaverine inhibits internalization of 125I-epidermal growth factor in BALB 3T3 cells*. The Journal of biological chemistry, vol 255(4), s 1239-1241

Hall EJ og Giaccia AJ, 2006. *Radiobiology for the radiologist*, sixth edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Hanahan D og Weinberg RA, 2000. *The hallmarks of cancer*. Cell, vol 100(1), s 57-70.

Henriksen G, Breistøl K, Bruland ØS, Fodstad Ø, Larsen RH, 2002. *Significant antitumor effect from bone-seeking, α -particle-emitting ^{223}Ra demonstrated in an experimental skeletal metastases model*. Cancer research, vol 62, s 3120-3125.

Horak E, Hartmann F, Garmestani K, Wu C, Brechbiel M, Gansow OA, Landolfi NF, Waldmann TA, 1997. *Radioimmunotherapy targeting of HER2/neu oncoprotein on ovarian tumor using lead-212-DOTA-AE1*. Journal of nuclear medicine, vol 38(12), s 1944-1950.

Howell RW, Azure MT, Narra VR, Rao DV, 1994. *Relative biological effectiveness of alpha-particle emitters in vivo at low doses*. Radiation Research, vol 137(3), s 352-360.

Howell RW, Goddu SM, Narra VR, Fisher DR, Schenter RE, Rao DV, 1997. *Radiotoxicity of gadolinium-148 and radium-223 in mouse testes: relative biological effectiveness of alpha-particle emitters in vivo*. Radiation Research, vol 147(3), s 342-348.

Huber CH og Wölfel T, 2004. *Immunotherapy of cancer: from vision to standard clinical practice*. Journal of cancer research and clinical oncology, vol 130(7), s 367-374.

Humm JL og Chin LM, 1993. *A model of cell inactivation by alpha-particle internal emitters*. Radiation Research, vol 134(2), s 143-50.

Humm JL, Roeske JC, Fisher DR, Chen GT, 1993. *Microdosimetric concepts in radioimmunotherapy*. Medical physics, vol 20(2), s 535-541.

Iglehart JD, Kraus MH, Langton BC, Huper G, Kerns BJ, Marks JR, 1990. *Increased erbB-2 gene copies and expression in multiple stages of breast cancer*. Cancer Research, vol 50(20), s 6701-6707.

Jurcic JG, Larson SM, Sgouros G, McDevitt MR, Finn RD, Divgi CR, Ballangrud AM, Hamacher KA, Ma D, Humm JL, Brechbiel MW, Molinet R, Scheinberg DA, 2002. *Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia*. Blood, vol 100(4), s 1233-1239.

Khan, FM, 1994. *The Physics of Radiation Therapy*, 2nd edition. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.

Kielberg V, Brünner, N., Briand, P., 2001. *Celledyrkning. En praktisk håndbog i dyrkning af mammalske celler*. Gads Forlag, København.

Kreftforeningen, 2008. Tilgjengelig fra: <http://www.kreftforeningen.no> [Sist besøkt: 8. desember 2008].

Krogh C, Abbas N, Hopen HM, Borrebæk J, Larsen Å, Dahle J, upublisert data. *Treatment of breast cancer cells with low dose rate alpha emitting 227Th-DOTA-p-benzyl-trastuzumab*. Upublisert data.

Larsen IK, Småstuen M, Parkin DM, Bray F, 2007. *Cancer in Norway 2006 - Cancer incidence, mortality, survival and prevalence in Norway*. Cancer Registry of Norway, Oslo.

Larsen RH, Saxtorph H, Skydsgaard M, Borrebaek J, Jonasdottir TJ, Bruland OS, Klastrup S, Harling R, Ramdahl T, 2006. *Radiotoxicity of the alpha-emitting bone-seeker ^{223}Ra injected intravenously into mice: histology, clinical chemistry and hematology*. *In vivo*, vol 20(3), s 325-31.

Larsen RH, Borrebaek J, Dahle J, Melhus KB, Krogh C, Valan MH, Bruland ØS, 2007. *Preparation of ^{227}Th -labeled radioimmunoconjugates, assessment of serum stability and antigen binding ability*. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, vol 22, s 431-437

Lieser KH, 2001. *Nuclear and radiochemistry: fundamentals and applications*, second edition. Wiley- VCH, Berlin.

Lilley JS, 2001. *Nuclear physics, principles and application*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.

Maecker B, von Bergwelt-Baildon MS, Anderson KS, Vonderheide RH, Anderson KC, Nadler LM, Schultze JL, 2005. *Rare naturally occurring immune responses to three epitopes from the widely expressed tumour antigens hTERT and CYP1B1 in multiple myeloma patients*. *Clinical and Experimental Immunology*, vol 141(3), s 558-562.

McDevitt MR, Ma D, Lai LT, Simon J, Borchardt P, Frank RK, Wu K, Pellegrini V, Curcio MJ, Miederer M, Bander NH, Scheinberg DA, 2001. *Tumor therapy with targeted atomic nanogenerators*. *Science*, vol 294(5546), s 1537-1540.

Miederer M, McDevitt MR, Borchardt P, Bergman I, Kramer K, Cheung NK, Scheinberg DA, 2004. *Treatment of neuroblastoma meningeal carcinomatosis with intrathecal application of alpha-emitting atomic nanogenerators targeting disialo-ganglioside GD2*. *Clinical cancer research*, vol 10(20), s 6985-6992.

National Cancer Institute, 2006. Tilgjengelig fra: <http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/ovary/page2> [Sist besøkt: 8. desember 2008].

National Nuclear Data Center. Tilgjengelig fra: <http://www.nndc.bnl.gov> [Sist besøkt 1. februar 2009].

-
- Olayioye MA**, 2001. *Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members*. Breast Cancer Research, vol 3(6), s 385–389.
- Palm S**, Bäck T, Claesson I, Danielsson A, Elgqvist J, Frost S, Hultborn R, Jensen H, Lindegren S, Jacobsson L, 2007. *Therapeutic efficacy of astatine-211-labeled trastuzumab on radioresistant SKOV-3 tumors in nude mice*. International journal of radiation oncology, biology, physics, vol 69(2), s 572-579.
- Pettersen EO**, 2006. *Cellulær radiobiologi*. Kompendium for FYS4720 – Cellulær radiobiologi, Fysisk institutt, Universitetet i Oslo.
- Rikshospitalet**, 2008. Tilgjengelig fra: <http://www.rikshospitalet.no> [Sist besøkt: 8. desember 2008].
- Sand O**, Sjaastad ØV, Haug E, Bjålie JG, 2006. *Menneskekroppen, fysiologi og anatomi*, 2. utgave. Gyldendal Forlag, Oslo.
- Schuster M**, Nechansky A, Loibner H, Kircheis R, 2006. *Cancer immunotherapy*. Biotechnology Journal, vol 1(2), s 138-147.
- Slamon DJ**, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL, 1987. *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. Science, vol 235(4785), s 177-182.
- Steeg PS**, 2003. *Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells*. Nature reviews. Cancer, vol 3(1), s 55-63.
- Steffen AC**, Göstring L, Tolmachev V, Palm S, Stenerlöw B, Carlsson J, 2008. *Differences in radiosensitivity between three HER2 overexpressing cell lines*. European journal of nuclear medicine and molecular imaging, vol 35(6), s 1179-1191.
- Stigbrand T**, Carlsson J, Adams GP, 2008. *Targeted Radionuclide tumor therapy. Biological aspects*. Springer Science, Berlin.
- Stoien JD og Wang RJ**, 1974. *Effect of near-ultraviolet and visible light on mammalian cells in culture II. Formation of toxic photoproducts in tissue culture medium by blacklight*.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol 71(10), s 3961-3965.

Universitetet i Oslo: Institutt for oral biologi, 2008. Tilgjengelig fra: <http://www.iob.uio.no/forskning/celler/teknikk/fluorescens.html#Filterblokk> [Sist besøkt: 29. mai 2008].

Vander AJ, Sherman JH, Luciano DS, 1990. *Human physiology, the mechanisms of body function*, fifth edition. McGraw-Hill, New York.

Wright C, Angus B, Nicholson S, Sainsbury JR, Cairns J, Gullick WJ, Kelly P, Harris AL, Horne CH, 1989. *Expression of c-erbB-2 oncoprotein: a prognostic indicator in human breast cancer*. Cancer Research, vol 49(8), s 2087-2090.

Yamashita M, Katakura Y, Shirahata S, 2007. *Recent advances in the generation of human monoclonal antibody*. Cytotechnology, vol 55(2-3), s 55-60.

Zalutsky MR og Vaidyanathan G, 2000. *Astatine-211-labeled radiotherapeutics: an emerging approach to targeted alpha-particle radiotherapy*. Current pharmaceutical design, vol 6(14), s 1433-1455.

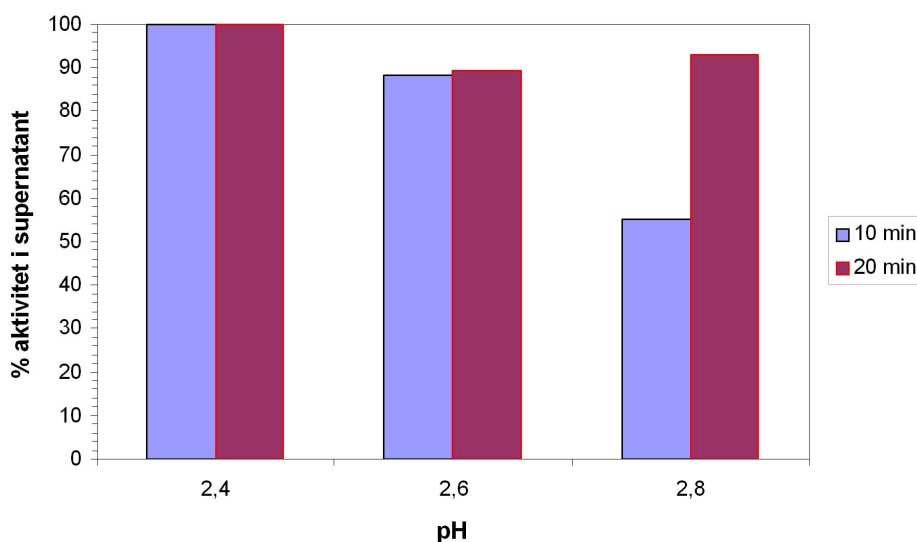
Vedlegg A Test av strippingbuffer

Test av strippingbuffer – optimalisering og cellepåvirkning

Kontrollforsøket for å optimalisere strippingbufferen er vist i figur A.1. Tre forskjellige pH-verdier ble sammenlignet. Cellene ble satt på is før og under behandling med ^{227}Th -herceptin for å hindre internalisering. Videre ble cellene inkubert med strippingbuffer i 10 eller 20 minutter.

Ved 10 minutters inkubasjon med strippingbuffer falt andel aktivitet i supernatanten med økende pH (figur A.1). Dette er naturlig siden det er den lave pH-verdien som bryter antistoff-antigen-bindingene. pH-verdien utgjorde imidlertid mindre forskjell ved inkubasjon i 20 minutter. Her får sannsynligvis strippingbufferen tid nok til å bryte bindingene ved alle 3 pH-verdier.

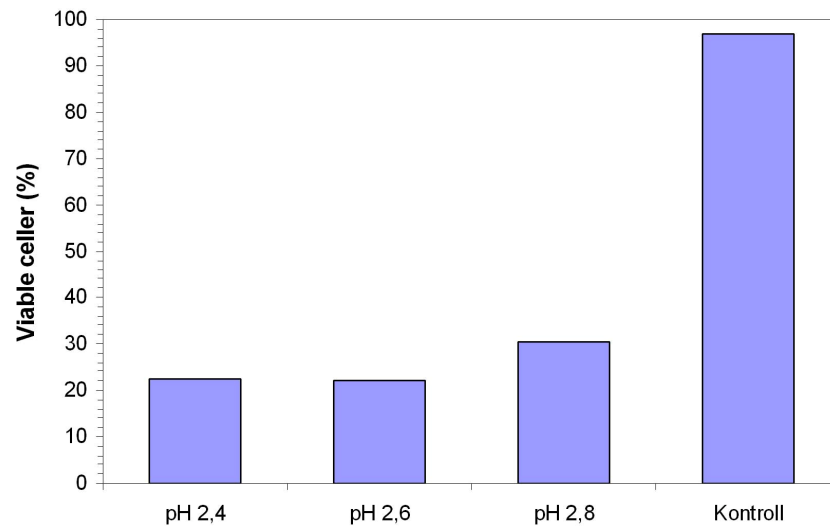
Siden 10 minutter inkuberingstid ga tilfredsstillende resultater ved pH 2,6 og lavere, ble denne tiden valgt som standardprosedyre for videre forsøk. Som figur A.1 viser, er det liten forskjell mellom pH 2,4 og pH 2,6 (henholdsvis 100 % og 90 %). For å skåne cellene i størst mulig grad ble pH 2,6 valgt for videre forsøk.



Figur A.1: Andelen aktivitet i supernatanten ved forskjellige pH-verdier i strippingbufferen. Ett sett med celler ble inkubert med strippingbuffer i 10 minutter, ett annet sett med celler i 20 minutter.

Videre ville vi undersøke om cellene tålte å bli behandlet med strippingbuffer. Figur A.2 viser hvor stor andel av cellene som er ”viable” etter behandling med forskjellige

strippingbufferer. Viable celler menes her at cellemembranen er intakt. ”Ikke-viable” celler har her en perforert cellemembran som tillater fargestoffet trypan blått å trenge inn i cellen. Som figur A.2 viser, er andelen viable celler ned mot 20 % etter behandling med strippingbuffer i 10 minutter. Spørsmålet er om skadene på cellemembranen er så omfattende at ^{227}Th -Herceptin-molekylet kommer ut av cellene ved vask.



Figur A.2. Andelen viable celler etter bruk av strippingbufferer med forskjellig pH. Inkubasjonstiden er 10 minutter. Cellene ble talt med en automatisk celledetektor (Vi-Cell XR). Døde celler detekteres ved at tilført trypan blått trenger igjennom en perforert cellemembran.

Vedlegg B Optimalisering av Hepes-konsentrasjon

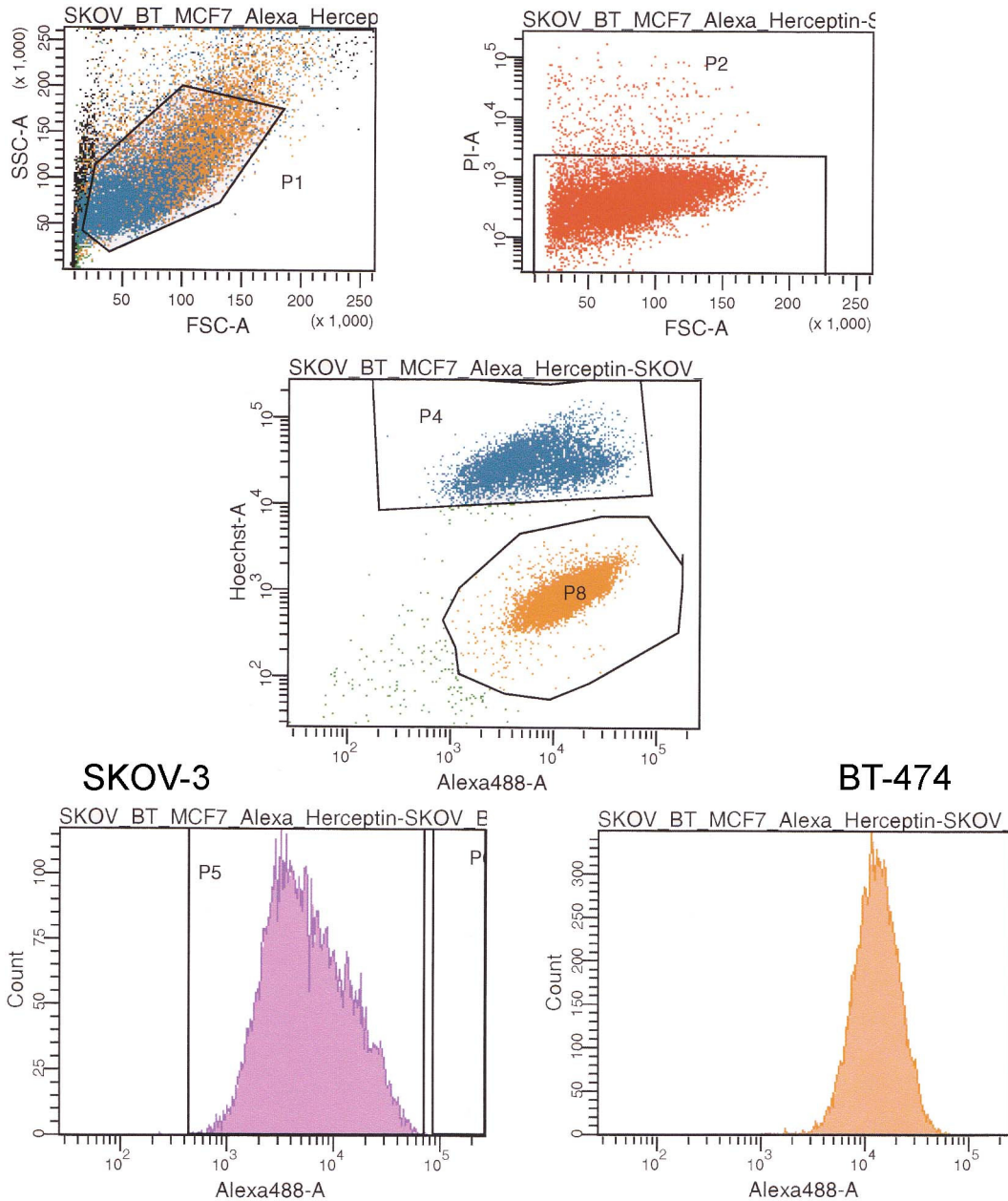
Under time-lapse-forsøket ble cellene inkubert med Hepesbuffer i mediet på grunn av mangel på CO₂. Det var viktig å optimalisere Hepeskonsentrasjonen for å oppnå riktig pH i mediet som forøvrig skal være i området 7,4-7,6. Tabell B.1 viser hvordan pH-verdien i mediet varierer med Hepeskonsentrasjonen. Det ble funnet at 25 mM Hepes ga en pH på 7,4. Denne konsentrasjonen ble brukt i mikroskopiforsøkene.

Tabell B.1: Tabellen viser hvordan pH-verdien i mediet varierer med ulike konsentrasjoner av Hepes-buffer.

Hepes [mM]	pH
0	8,35
25	7,40
35	7,29
50	7,20
100	6,92

Vedlegg C Flowcytometri data

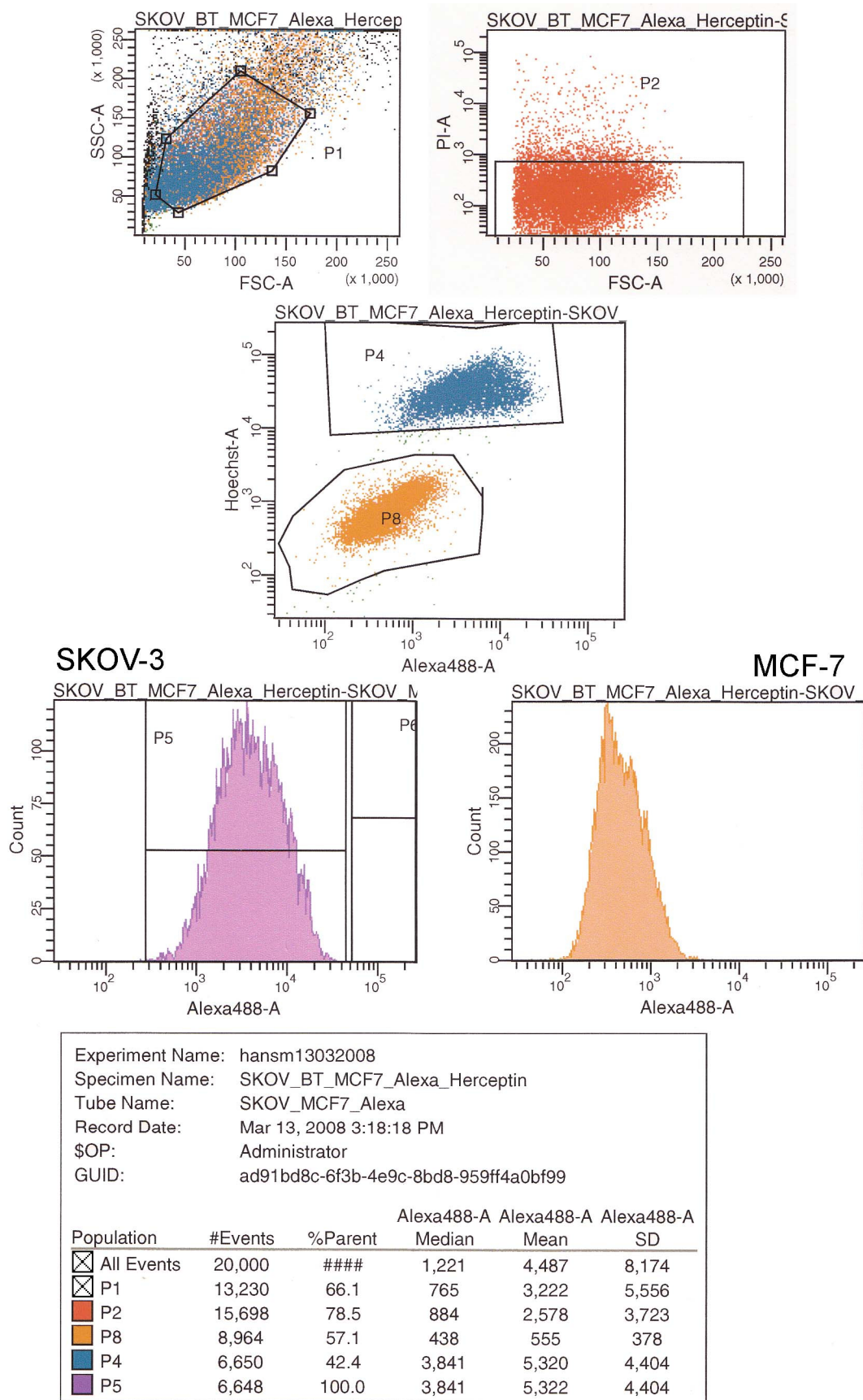
På grunn av et omfattende opprydningsarbeid på serveren som var tilknyttet flowcytometeret, gikk dessverre noe data tapt. Det ble imidlertid tatt noe kopier og utskrifter fra deler av forsøkene. Dot-plot og gating for flowcytometriforsøkene vist i kapittel 4.4 *Måling* av ekspresjon av HER2 ved flowcytometri er dessverre ikke til å oppdrive, men gatingen ble gjort på samme måte som vist i figurene under (figur C.1 og C.2). I tillegg til histogrammene som viser antigenekspresjonen, vises også her dot-plot og gating for det tredje flow-forsøket. Gatingen øverst til venstre utelukker celler med svært høy og svært lav lysspredning, da slike celler representerer dubletter og små fragmenter. Øverst til høyre utelukkes døde celler som har høye verdier av propidium iodid (PI). Dot-plotet i midten viser hvordan SKOV-3-cellene farget med hoechst enkelt kan skilles fra den andre cellelinjen. Cellene som er plotet her er kun de som har gått videre fra gatingen i de to øverste dot-plotene. Histogrammene nederst viser data fra samme cellene som er innenfor gatene i det midterste dot-plotet.



Experiment Name: hansm13032008
 Specimen Name: SKOV_BT_MCF7_Alexa_Herceptin
 Tube Name: SKOV_BT_Alexa
 Record Date: Mar 13, 2008 3:22:18 PM
 \$OP: Administrator
 GUID: f32daa8b-9c2f-41fb-8a17-86876fb27d3a

Population	#Events	%Parent	Alexa488-A Median	Alexa488-A Mean	Alexa488-A SD
All Events	20,000	####	10,265	13,257	15,327
P1	14,880	74.4	10,079	11,194	7,092
P2	17,110	85.6	10,629	12,104	8,366
P8	10,720	62.7	12,856	14,428	7,363
P4	6,194	36.2	5,213	8,411	8,470
P5	6,191	100.0	5,213	8,392	8,396

Figur C.1: Flowcytometriforsøk nr 3. SKOV-3 og BT-474.



Figur C.2: Flowcytometriforsøk nr 3. SKOV-3 og MCF-7.

Vedlegg D Måling av celle- og cellekjernediametre

SKOV-3:	Cellediameter		Cellekjernediameter	
	maks	min	maks	min
1	121	30	33,1	24,5
2	93	46	18,1	18,1
3	98	39	27,8	18,7
4	106	26	23,7	18,8
5	130	59	23,9	23,3
6	147	36	32,6	22,5
7	94	53	26,8	20,6
8	123	47	23,1	18,4
9	110	31	27,8	21,5
10	161	67	23,2	18,7
11	98	31	27,1	20
12	64	33	21,5	21,3
13	131	17	19,1	17,8
14	73	41	27,2	20
15	66	29	24,3	19,7
SNITT:	107,67	39,00	25,29	20,26

SNITT
cellediameter: 73,33 SNITT cellekerne: 22,77

BT-474:	Cellediameter		Cellekjernediameter	
	maks	min	maks	min
1	45	33	22,4	21,1
2	46	34	19,8	19,2
3	47	37	25,2	17,4
4	51	34	24	22,6
5	57	37	22,7	20,5
6	39	38	23,8	20,7
7	61	37	24	18,6
8	61	49	24	21,3
9	39	33	19,2	19
10	43	35	21,9	21,4
11	42	26	22,7	27,1
12	39	36	23,4	23,2
13	58	46	23,2	20
14	60	23	23,1	19,7
15	57	34	20,5	18,6
SNITT:	49,67	35,47	22,66	20,69

SNITT
cellediameter: 42,57 SNITT cellekerne: 21,68

Vedlegg E Rådata – Koloniforsøk

Under vises en oversikt over koloniforsøkene samt alle rådata for hvert enkelt forsøk.

Type forsøk	Antall forsøk	Antall paralleller
Aktivitet tilsatt etter utsåing		
227Th-Herceptin	2	2 + 4
227Th-Rituximab	2	6 + 6
Aktivitet tilsatt før utsåing		
227Th-Herceptin	4	6 + 6 + 6 + 6
Kaldt Herceptin	2	6 + 6

Forsøk 1 og 2, 227Th-Herceptin
 Aktivitet tilsatt etter utsåing, vask etter 4 t
 Dato: 5. september - og 2. november 2007

Counted colonies								cells seeded in 1,2	cells seeded in 3,4,5,6
Aktivitet [Bq/ml]	Parallell 1 ⁽¹⁾	P2 ⁽¹⁾	P3 ⁽²⁾	P4 ⁽²⁾	P5 ⁽²⁾	P6 ⁽²⁾			
0	55	53	55	28	28	47	200	200	
250	40	49	49	25	40	35	200	200	
500	29	36	25	26	29	52	200	200	
1000	28	27	64	53	78	72	200	400	
5000	20	29	50	65	60	76	200	400	
10000	- ⁽³⁾	- ⁽³⁾	62	49	58	49		400	
Plating efficiency (PE)								PE	
	0,275	0,265	0,275	0,140	0,140	0,235	0,222		
Survival Fraction (SF)								SF	St.error
0	1,241	1,195	1,241	0,632	0,632	1,060	1,000	0,120	
500	0,902	1,105	1,105	0,564	0,902	0,789	0,895	0,084	
1000	0,654	0,812	0,564	0,586	0,654	1,173	0,741	0,093	
2500	0,632	0,609	0,722	0,598	0,880	0,812	0,709	0,048	
5000	0,451	0,654	0,564	0,733	0,677	0,857	0,656	0,057	
10000			0,699	0,553	0,654	0,553	0,615	0,037	

⁽¹⁾ Parallell 1 og 2 tilhører forsøk 1.

⁽²⁾ Parallell 3, 4, 5 og 6 tilhører forsøk 2.

⁽³⁾ I forsøk 1 var maks tilsatt aktivitet 5000 Bq/ml

227Th-Rituximab
 Aktivitet tilsatt etter utsåing, vask etter 24 t
 Dato: 16. november 2007

Counted colonies								Cells seeded	
Aktivitet [Bq/ml]	Parallell 1	P2	P3	P4	P5	P6			
0	39	70	70	60	74	65	200		
250	68	82	95	82	65	85	200		
500	78	62	69	73	64	74	200		
1000	71	61	79	62	68	87	200		
5000	62	61	56	57	62	59	200		
10000	35	36	43	39	37	39	200		
Plating efficiency (PE)								PE	
	0,195	0,350	0,350	0,300	0,370	0,325	0,315		
Survival Fraction (SF)								SF	St.error
0	0,619	1,111	1,111	0,952	1,175	1,032	1,000	0,082	
250	1,079	1,302	1,508	1,302	1,032	1,349	1,262	0,072	
500	1,238	0,984	1,095	1,159	1,016	1,175	1,111	0,040	
1000	1,127	0,968	1,254	0,984	1,079	1,381	1,132	0,065	
5000	0,984	0,968	0,889	0,905	0,984	0,937	0,944	0,017	
10000	0,556	0,571	0,683	0,619	0,587	0,619	0,606	0,019	

227Th-Rituximab
 Aktivitet tilsatt etter utsåing, vask etter 4 t
 Dato: 16. november 2007

Counted colonies									
Aktivitet [Bq/ml]	Parallell 1	P2	P3	P4	P5	P6	Cells seeded		
0	44	76	70	55	72	54	200		
250	64	82	81	60	89	87	200		
500	43	76	67	61	70	65	200		
1000	44	58	53	52	81	55	200		
5000	46	72	65	72	58	66	200		
10000	39	55	58	53	43	56	200		
Plating efficiency (PE)								PE	
	0,220	0,380	0,350	0,275	0,360	0,270		0,309	
Survival Fraction (SF)								SF	St.error
0,000	0,712	1,229	1,132	0,889	1,164	0,873	1,000	0,083	
250,000	1,035	1,326	1,310	0,970	1,439	1,407	1,248	0,080	
500,000	0,695	1,229	1,084	0,987	1,132	1,051	1,030	0,075	
1000,000	0,712	0,938	0,857	0,841	1,310	0,889	0,925	0,083	
5000,000	0,744	1,164	1,051	1,164	0,938	1,067	1,022	0,065	
10000,000	0,631	0,889	0,938	0,857	0,695	0,906	0,819	0,051	

Forsøk 1, 227Th-Herceptin
 Aktivitet tilsatt før utsåing
 Dato: 22. februar 2008

Counted colonies								Cells seeded in 1,2,3	Cells seeded in 4,5,6
Aktivitet [Bq/ml]	Parallell 1	P2	P3	P4	P5	P6			
0	28	37	47	23	58	31	200	300	
500	23	38	37	20	44	30	200	300	
1000	72	122	121	- ⁽¹⁾	- ⁽¹⁾	- ⁽¹⁾	727		
2500	76	148	130	- ⁽¹⁾	- ⁽¹⁾	- ⁽¹⁾	1090		
5000	39	45	35	74	84	47	400	600	
10000	58	91	39	85	103	66	600	900	
20000	34	56	59	72	94	52	600	900	
Plating efficiency (PE)								PE	
	0,140	0,185	0,235	0,077	0,193	0,103		0,156	
Survival Fraction (SF)								SF	St.error
0	0,900	1,189	1,511	0,493	1,243	0,664	1,000	0,157	
500	0,739	1,221	1,189	0,429	0,943	0,643	0,861	0,128	
1000	0,637	1,079	1,070				0,928	0,146	
2500	0,448	0,873	0,767				0,696	0,128	
5000	0,627	0,723	0,563	0,793	0,900	0,504	0,685	0,061	
10000	0,621	0,975	0,418	0,607	0,736	0,471	0,638	0,082	
20000	0,364	0,600	0,632	0,514	0,671	0,371	0,526	0,054	

⁽¹⁾ Pga feil antall celler utsådd i parallell 1, 2 og 3, var det ikke nok celler til parallell 4, 5 og 6.

Forsøk 2, 227Th-Herceptin
Aktivitet tilsatt før utsåing
Dato: 31. mars 2008

Counted colonies									
Aktivitet [Bq/ml]	Parallell 1	P2	P3	P4	P5	P6	Cells seeded in 1,2,3	Cells seeded in 4,5,6	
0	38	57	29	91	108	95	200	300	
500	30	38	40	81	104	66	200	300	
1000	43	70	37	63	102	82	300	400	
2500	47	65	63	76	107	108	300	400	
5000	55	87	79	95	123	144	400	600	
10000	117	129	120	- ⁽¹⁾	- ⁽¹⁾	- ⁽¹⁾	600	900	
20000	109	101	103	- ⁽¹⁾	- ⁽¹⁾	- ⁽¹⁾	600	900	
Plating efficiency (PE)							PE		
	0,190	0,285	0,145	0,303	0,360	0,317	0,267		
Survival Fraction (SF)							SF	St.error	
0	0,713	1,069	0,544	1,138	1,350	1,188	1,000	0,125	
500	0,563	0,713	0,750	1,013	1,300	0,825	0,860	0,107	
1000	0,538	0,875	0,463	0,591	0,956	0,769	0,698	0,081	
2500	0,588	0,813	0,788	0,713	1,003	1,013	0,819	0,068	
5000	0,516	0,816	0,741	0,594	0,769	0,900	0,722	0,058	
10000	0,731	0,806	0,750				0,763	0,023	
20000	0,681	0,631	0,644				0,652	0,015	

⁽¹⁾ Kolonier for tett til å telle

Forsøk 3, 227Th-Herceptin
Aktivitet tilsatt før utsåing
Dato 17. april 2008

Counted colonies									
Aktivitet [Bq/ml]	Parallell 1	P2	P3	P4	P5	P6	Cells seeded in 1,2,3	Cells seeded in 4,5,6	
0	13	24	14	14	32	16	200	300	
500	15	10	29	31	28	23	200	300	
1000	22	36	41	22	30	27	300	400	
2500	15	31	24	23	40	37	300	400	
5000	19	19	27	18	27	25	300	400	
10000	15	36	39	33	47	38	400	600	
20000	12	28	16	29	54	28	400	600	
Plating efficiency (PE)							PE		
	0,065	0,12	0,07	0,047	0,107	0,053	0,077		
Survival Fraction (SF)							SF	St.error	
0	0,845	1,56	0,91	0,606	1,386	0,693	1	0,157	
500	0,975	0,65	1,884	1,343	1,213	0,996	1,177	0,171	
1000	0,953	1,56	1,776	0,715	0,975	0,877	1,143	0,173	
2500	0,65	1,343	1,04	0,747	1,3	1,202	1,047	0,119	
5000	0,823	0,823	1,17	0,585	0,877	0,812	0,848	0,077	
10000	0,487	1,17	1,267	0,715	1,018	0,823	0,913	0,12	
20000	0,39	0,91	0,52	0,628	1,17	0,606	0,704	0,116	

Forsøk 4, 227Th-Herceptin
Aktivitet tilsatt før utsåing
Dato: 1. mai 2008

Counted colonies										
Aktivitet [Bq/ml]	Parallell 1	P2	P3	P4	P5	P6	Cells seeded in 1,2,3	Cells seeded in 4,5,6		
0	9	19	11	13	41	36	200	300		
500	8	26	29	25	61	36	200	300		
1000	28	58	21	38	76	57	300	400		
2500	30	42	29	35	62	44	300	400		
5000	20	53	29	30	81	33	300	400		
10000	40	81	39	106	72	- ⁽¹⁾	400	600		
20000	18	59	34	46	91	- ⁽¹⁾	400	600		
Plating efficiency (PE)							PE			
	0,045	0,095	0,055	0,043	0,137	0,120	0,083			
Survival Fraction (SF)							SF	St.error		
0	0,545	1,152	0,667	0,525	1,657	1,455	1,000	0,200		
500	0,485	1,576	1,758	1,010	2,465	1,455	1,458	0,275		
1000	1,131	2,343	0,848	1,152	2,303	1,727	1,584	0,261		
2500	1,212	1,697	1,172	1,061	1,879	1,333	1,392	0,132		
5000	0,808	2,141	1,172	0,909	2,455	1,000	1,414	0,287		
10000	1,212	2,455	1,182	2,141	1,455		1,689	0,258		
20000	0,545	1,788	1,030	0,929	1,226		1,104	0,204		

⁽¹⁾ 900 celler utsådd

Forsøk 1, kaldt Herceptin
Tilsatt før utsåing
Dato: 20. november 2008

Counted colonies										
Konsentrasjon [mg/l]	Parallell 1	P2	P3	P4	P5	P6	Cells seeded			
0	37	38	46	23	33	24	200			
2,5	29	39	31	21	34	29	200			
5	32	17	27				200			
10	25	40	29	23	34	34	200			
20	32	35	29	28	35	19	200			
Plating efficiency (PE)							PE			
	0,185	0,190	0,230	0,115	0,165	0,120	0,168			
Survival Fraction (SF)							SF	St.error		
0	1,104	1,134	1,373	0,687	0,985	0,716	1,000	0,108		
2,5	0,866	1,164	0,925	0,627	1,015	0,866	0,910	0,073		
5	0,955	0,507	0,806				0,756	0,132		
10	0,746	1,194	0,866	0,687	1,015	1,015	0,920	0,078		
20	0,955	1,045	0,866	0,836	1,045	0,567	0,886	0,073		

Forsøk 2, kaldt Herceptin
Tilsatt før utsåing
Dato: 21. november 2008

Counted colonies									
Concentrasjon [mg/l]	Parallell 1	P2	P3	P4	P5	P6	Cells seeded		
0	21	47	32	26	47	28	200		
2,5	14	27	26	9	32	32	200		
5	30	32	22	19	23	24	200		
10	22	38	31	33	26	25	200		
20	40	44	33	18	32	28	200		
Plating efficiency (PE)								PE	
	0,105	0,235	0,160	0,130	0,235	0,140		0,168	
Survival Fraction (SF)								SF	St.error
0	0,627	1,403	0,955	0,776	1,403	0,836	1,000	0,135	
2,5	0,418	0,806	0,776	0,269	0,955	0,955	0,697	0,117	
5	0,896	0,955	0,657	0,567	0,687	0,716	0,746	0,061	
10	0,657	1,134	0,925	0,985	0,776	0,746	0,871	0,072	
20	1,194	1,313	0,985	0,537	0,955	0,836	0,970	0,112	

Vedlegg F Rådata – Vekstforsøk

Vekstforsøk 1

Dag	Konsentrasjon (bq/ml)_ Parallell	Viable celler, talt verdi (x10 ⁶)	Gjennomsnittlig celleantall (x10 ⁶)	Viable celler, beregnet verdi (x10 ⁶)
dag 0	kontroll_1	1,00 ⁽¹⁾		
	kontroll_2	1,00 ⁽¹⁾	1,00	1,00
	kontroll_3	1,00 ⁽¹⁾		
	5000_1	1,00 ⁽¹⁾		
	5000_2	1,00 ⁽¹⁾	1,00	1,00
	5000_3	1,00 ⁽¹⁾		
	20000_1	1,00 ⁽¹⁾		
	20000_2	1,00 ⁽¹⁾	1,00	1,00
	20000_3	1,00 ⁽¹⁾		
Dag 6	kontroll_1	13,22		
	kontroll_2	13,51	13,19	13,19
	kontroll_3	12,83		
	5000_1	11,45		
	5000_2	12,00	11,84	11,84
	5000_3	12,08		
	20000_1	12,98		
	20000_2	12,33	12,16	12,16
	20000_3	11,18		
Etter dag 6 ble cellene omsatt. 1 million celler per parallell.				
Dag 9	kontroll_1	2,89		
	kontroll_2	2,61	2,77	36,54 ⁽²⁾
	kontroll_3	2,81		
	5000_1	2,66		
	5000_2	2,41	2,51	29,74
	5000_3	2,46		
	20000_1	2,91		
	20000_2	3,03	3,03	36,91
	20000_3	3,16		
dag 12	kontroll_1	8,73		
	kontroll_2	8,74	8,43	111,20
	kontroll_3	7,83		
	5000_1	7,27		
	5000_2	6,70	6,97	82,60
	5000_3	6,95		
	20000_1	8,35		
	20000_2	6,95	7,56	91,95
	20000_3	7,38		

⁽¹⁾ Ved forsøkets start ble det sådd ut 1 million celler.

⁽²⁾ Cellene ble omsatt på dag 6. Kun 1 million av disse ble dyrket videre, altså 1/13,19 av cellene. Beregnet verdi er derfor *gjennomsnittlig celleantall* multiplisert med (i dette tilfellet) 13,19.

Vekstforsøk 2

Dag	Konsentrasjon (bq/ml)_ Parallell	Viable celler, talt verdi ($\times 10^6$)	Gjennomsnittlig celleantall ($\times 10^6$)	Viable celler, beregnet verdi ($\times 10^6$)
dag 0	kontroll_1	1,00 ⁽¹⁾		
	kontroll_2	1,00 ⁽¹⁾	1,00	1,00
	kontroll_3	1,00 ⁽¹⁾		
	5000_1	1,00 ⁽¹⁾		
	5000_2	1,00 ⁽¹⁾	1,00	1,00
	5000_3	1,00 ⁽¹⁾		
	20000_1	1,00 ⁽¹⁾		
	20000_2	1,00 ⁽¹⁾	1,00	1,00
	20000_3	1,00 ⁽¹⁾		
Dag 6	kontroll_1	23,08		
	kontroll_2	22,24	23,39	23,39
	kontroll_3	24,86		
	5000_1	18,36		
	5000_2	20,75	19,40	19,40
	5000_3	19,08		
	20000_1	17,45		
	20000_2	18,84	18,36	18,36
	20000_3	18,79		
Etter dag 6 ble cellene omsatt. 1 million celler per parallell.				
Dag 9	kontroll_1	4,62		
	kontroll_2	4,72	4,60	107,65 ⁽²⁾
	kontroll_3	4,47		
	5000_1	4,72		
	5000_2	4,58	4,84	93,90
	5000_3	5,22		
	20000_1	4,34		
	20000_2	4,85	4,94	90,64
	20000_3	5,61		
dag 12	kontroll_1	7,57		
	kontroll_2	7,01	7,41	173,41
	kontroll_3	7,66		
	5000_1	5,86		
	5000_2	6,77	5,68	110,18
	5000_3	4,41		
	20000_1	5,60		
	20000_2	6,63	5,90	108,35
	20000_3	5,47		

⁽¹⁾ Ved forsøkets start ble det sådd ut 1 million celler.

⁽²⁾ Cellene ble omsatt på dag 6. Kun 1 million av disse ble dyrket videre, altså 1/23,39 av cellene. Beregnet verdi er derfor *gjennomsnittelig celleantall* multiplisert med (i dette tilfellet) 23,39.

Vedlegg G Rådata – Bindingsforsøk

Binding som funksjon av tilsatt aktivitet:

Tilsatt aktivitet [Bq/ml]	Bq/1mill celler			
	Forsøk 1	Forsøk 2	Forsøk 3	Forsøk 4
0	0,00	0,00	0,00	0,00
500	9,28	45,16	22,92	14,20
1000	22,28	71,58	38,31	33,60
2500	59,60	100,53	39,69	46,05
5000	83,60	132,63	45,15	48,30
10000	129,60	145,79	48,46	51,50
20000	149,60	150,53	51,38	53,00

Vedlegg G

Måling av cellebundet aktivitet over tid – Forsøk 1.

DAG 0:

ant celler	målt aktivitet [Bq]	Bq/1mill celler
2,00E+07	760,00	38,00

DAG 1 (24t):

	ant celler	målt aktivitet [Bq]	Bq/1mill celler				
1 Supernatant	1,26E+06	4,24	3,37				
2 Supernatant	1,20E+06	6,72	5,60	snitt supernatant:	5,10	St.error:	0,90
3 Supernatant	1,30E+06	8,25	6,35				
1 celler	1,26E+06	41,40	32,86				
2 celler	1,20E+06	34,60	28,83	snitt celler:	29,95	St.error:	1,47
3 celler	1,30E+06	36,60	28,15				

DAG 3 (72t):

	ant celler	målt aktivitet [Bq]	Bq/1mill celler				
1 Supernatant	3,70E+06	5,89	1,59				
2 Supernatant	2,90E+06	5,09	1,76	snitt supernatant:	1,92	St.error:	0,25
3 Supernatant	2,60E+06	6,25	2,40				
1 celler	3,70E+06	28,20	7,62				
2 celler	2,90E+06	30,30	10,45	snitt celler:	10,98	St.error:	2,11
3 celler	2,60E+06	38,70	14,88				

DAG 6 (144t):

	ant celler	målt aktivitet [Bq]	Bq/1mill celler				
1 Supernatant	1,22E+07	0,76	0,06				
2 Supernatant	1,12E+07	0,94	0,08	snitt supernatant:	0,08	St.error:	0,01
3 Supernatant	1,18E+07	1,23	0,10				
1 celler	1,22E+07	26,50	2,17				
2 celler	1,12E+07	27,70	2,47	snitt celler:	2,41	St.error:	0,12
3 celler	1,18E+07	30,40	2,58				

Måling av cellebundet aktivitet over tid – Forsøk 2.

DAG 0:

ant celler	målt aktivitet [Bq]	Bq/1mill celler
1,00E+07	997,00	99,70

DAG 1 (24t):

	ant celler	målt aktivitet [Bq]	Bq/1mill celler			
1 Supernatant	1,00E+06	13,20	13,20			
2 Supernatant	8,30E+05	13,70	16,51	snitt supernatant:	15,38	St.error: 1,09
3 Supernatant	9,50E+05	15,60	16,42			
1 celler	1,00E+06	44,20	44,20			
2 celler	8,30E+05	40,30	48,55	snitt celler:	47,69	St.error: 1,82
3 celler	9,50E+05	47,80	50,32			

DAG 3 (72t):

	ant celler	målt aktivitet [Bq]	Bq/1mill celler			
1 Supernatant	3,80E+06	5,20	1,37			
2 Supernatant	3,60E+06	6,10	1,69	snitt supernatant:	1,86	St.error: 0,34
3 Supernatant	2,90E+06	7,30	2,52			
1 celler	3,80E+06	35,50	9,34			
2 celler	3,60E+06	40,30	11,19	snitt celler:	11,16	St.error: 1,04
3 celler	2,90E+06	37,50	12,93			

DAG 7 (168t):

	ant celler	målt aktivitet [Bq]	Bq/1mill celler			
1 Supernatant	1,24E+07	0,89	0,07			
2 Supernatant	1,32E+07	0,82	0,06	snitt supernatant:	0,07	St.error: 0,00
3 Supernatant	1,17E+07	0,76	0,06			
1 celler	1,24E+07	22,00	1,77			
2 celler	1,32E+07	22,20	1,68	snitt celler:	1,76	St.error: 0,04
3 celler	1,17E+07	21,40	1,83			

Måling av cellebundet aktivitet over tid – Forsøk 3.

DAG 0:

ant celler	målt aktivitet [Bq]	Bq/1mill celler
1,00E+07	258,00	25,80

DAG 1 (24t):

	ant celler	målt aktivitet [Bq]	Bq/1mill celler				
1 Supernatant	6,80E+05	10,30	15,15				
2 Supernatant	8,50E+05	12,00	14,12	snitt supernatant:	14,51	St.error:	0,32
3 Supernatant	8,70E+05	12,40	14,25				
1 celler	6,80E+05	1,62	2,38				
2 celler	8,50E+05	1,98	2,33	snitt celler:	2,31	St.error:	0,05
3 celler	8,70E+05	1,93	2,22				

DAG 4 (96t):

	ant celler	målt aktivitet [Bq]	Bq/1mill celler				
1 Supernatant	6,50E+06	2,27	0,35				
2 Supernatant	5,70E+06	2,88	0,51	snitt supernatant:	0,46	St.error:	0,06
3 Supernatant	5,10E+06	2,68	0,53				
1 celler	6,50E+06	7,53	1,16				
2 celler	5,70E+06	7,41	1,30	snitt celler:	1,31	St.error:	0,09
3 celler	5,10E+06	7,47	1,46				

DAG 7 (168t):

	ant celler	målt aktivitet [Bq]	Bq/1mill celler				
1 Supernatant	1,48E+07	0,74	0,05				
2 Supernatant	1,33E+07	0,49	0,04	snitt supernatant:	0,04	St.error:	0,00
3 Supernatant	1,44E+07	0,60	0,04				
1 celler	1,48E+07	3,47	0,23				
2 celler	1,33E+07	3,82	0,29	snitt celler:	0,26	St.error:	0,02
3 celler	1,44E+07	3,73	0,26				

Måling av cellebundet aktivitet over tid – Forsøk 4.

DAG 0:

ant celler	målt aktivitet [Bq]	Bq/1mill celler
8,00E+05	32,20	40,25

DAG 1 (24t):

	ant celler	målt aktivitet [Bq]	Bq/1mill celler				
1 Supernatant	9,00E+05	22,70	25,22				
2 Supernatant	8,10E+05	26,60	32,84	snitt supernatant:	29,28	St.error:	2,21
3 Supernatant	8,80E+05	26,20	29,77				
1 celler	9,00E+05	7,40	8,22				
2 celler	8,10E+05	7,41	9,15	snitt celler:	8,42	St.error:	0,38
3 celler	8,80E+05	6,93	7,88				

DAG 4 (96t):

	ant celler	målt aktivitet [Bq]	Bq/1mill celler				
1 Supernatant	6,40E+06	6,14	0,96				
2 Supernatant	6,10E+06	7,43	1,22	snitt supernatant:	1,18	St.error:	0,12
3 Supernatant	5,50E+06	7,52	1,37				
1 celler	6,40E+06	15,00	2,34				
2 celler	6,10E+06	14,80	2,43	snitt celler:	2,40	St.error:	0,03
3 celler	5,50E+06	13,40	2,44				

DAG 7 (168t):

	ant celler	målt aktivitet [Bq]	Bq/1mill celler				
1 Supernatant	1,33E+07	2,91	0,22				
2 Supernatant	1,33E+07	2,27	0,17	snitt supernatant:	0,19	St.error:	0,02
3 Supernatant	1,32E+07	2,21	0,17				
1 celler	1,33E+07	8,26	0,62				
2 celler	1,33E+07	8,98	0,68	snitt celler:	0,68	St.error:	0,04
3 celler	1,32E+07	9,98	0,76				

Vedlegg H Rådata – Dyreforsøk

Biodistribusjonsforsøk for SKOV-3: 227Th-DOTA-Herceptin
Tidspunkt: 4d, 7d og 14 d

Immuneraktivitet: 83 %
Spesifikk aktivitet: 1109 kBq/mg

Injeksjonsdato 24.01.2008 Kl: 12:00
Tumortype: SKOV-3

Standarder 0 d	rør	227Th		223Ra	
		10 %	Injisert aktivitet	10 %	Injisert aktivitet
Std A	BD	1,62E+03	16700	0,00E+00	0
Std B	BD	1,72E+03		0,00E+00	
Std C	SC	2,29E+03	25550	0,00E+00	0
Std D	SC	2,82E+03		0,00E+00	

Vedlegg H

4 DAGER

Mus ID

1

Vekt mus : 25 g

Avl.dato: 28.01.2008

Kl: 11

Organ	Rør	Aktivitet Th-227	Aktivitet Ra-223	Vekt glass	Vekt m/organ	vekt	227Th pr gr	227Th %inj/gr	223Ra pr gr	223Ra %inj/gr
Urin	BD			3,4507		-3,4507	0,0	0,0	0,0	0,0
Blod	BD	1,14E+03	-3,67E-01	3,4284	4,5509	1,1225	1015,6	7,0	-0,3	0,0
Lunge	BD	6,32E+01	-3,45E-02	3,4383	3,634	0,1957	322,9	2,2	-0,2	0,0
Lever	SC	2,20E+03	-9,73E+00	6,3045	3,7198	-2,5847	-851,2	-4,0	3,8	0,0
Milt	BD	1,16E+02	6,85E+01	3,4477	7,8262	4,3785	26,5	0,2	15,6	0,1
Nyre	BD	1,52E+02	-1,27E-01	3,4426	3,829	0,3864	393,4	2,7	-0,3	0,0
Tynntarm	BD	1,53E+02	-1,49E-01	3,493	4,7944	1,3014	117,6	0,8	-0,1	0,0
Tykkarm	SC	3,42E+02	-1,57E+00	6,3611	8,3027	1,9416	176,1	0,8	-0,8	0,0
Femur	BD	2,40E+01	4,86E+01	3,4738	3,6505	0,1767	135,8	0,9	275,0	1,9
Skalle	BD	1,68E+01	3,36E+01	3,4794	3,5525	0,0731	229,8	1,6	459,6	3,1
Tumor vs	BD	5,63E+02	-7,95E-01	3,4803	3,8461	0,3658	1539,1	10,5	-2,2	0,0
Tumor hs	BD									

Standarder 4d	rør	227Th		223Ra	
		10 %	Injisert aktivitet	10 %	Injisert aktivitet
Std A	BD	1,42E+03	14600	4,61E+02	4785
Std B	BD	1,50E+03		4,96E+02	
Std C	SC	1,95E+03	21150	5,25E+02	5455
Std D	SC	2,28E+03		5,66E+02	

4 DAGER**Mus ID: 2**

Vekt mus : 28,5 g

Avl.dato: 28.01.2008

Kl: 11

Organ	Rør	Aktivitet Th-227	Aktivitet Ra-223	Vekt glass	Vekt m/organ	vekt	227Th pr gr	227Th %inj/gr	223Ra pr gr	223Ra %inj/gr
Urin	BD			3,4363		-3,4363	0,00	0,00	0,0	0,0
Blod	BD	7,77E+02	-1,21E+00	3,4975	4,313	0,8155	952,79	6,53	-1,5	0,0
Lunge	BD	9,23E+01	-1,58E-01	3,5520	3,7459	0,1939	476,02	3,26	-0,8	0,0
Lever	SC	1,94E+03	-7,42E+00	6,5078	7,8216	1,3138	1476,63	6,98	-5,6	-0,1
Milt	BD	9,17E+01	6,40E+01	3,4601	3,6292	0,1691	542,28	3,71	378,5	7,9
Nyre	BD	1,69E+02	-3,37E-01	3,4991	3,8397	0,3406	496,18	3,40	-1,0	0,0
Tynntarm	BD	1,35E+02	-2,89E-01	3,4385	4,4323	0,9938	135,84	0,93	-0,3	0,0
Tykkertarm	SC	4,70E+02	-1,87E+00	6,5143	8,9006	2,3863	196,96	0,93	-0,8	0,0
Femur	BD	3,60E+01	4,29E+01	3,4525	3,66	0,2075	173,49	1,19	206,7	4,3
Skalle	BD	3,52E+01	3,89E+01	3,4950	3,6312	0,1362	258,44	1,77	285,6	6,0
Tumor vs	BD									
Tumor hs	BD	1,81E+02	-4,65E-01	3,4840	3,6694	0,1854	976,27	6,69	-2,5	-0,1

7 DAGER

Mus ID: 4 Vekt mus : 26,5 g Avl.dato: 31.01.2008 Kl: 10:00

Organ	Rør	Aktivitet Th-227	Aktivitet Ra-223	Vekt glass	Vekt m/organ	vekt	227Th pr gr	227Th %inj/gr	223Ra pr gr	223Ra %inj/gr
Urin	BD	0,00E+00	0,00E+00	3,4948	3,5236	0,0288	0,00	0,00	0,0	0,00
Blod	BD	8,87E+02	-9,22E+00	3,4917	4,6377	1,146	774,00	5,95	-8,0	-0,11
Lunge	BD	1,13E+02	-1,19E+00	3,4981	3,7631	0,265	426,42	3,28	-4,5	-0,06
Lever	SC	1,29E+03	-7,52E+00	6,3161	7,5825	1,2664	1018,64	5,55	-5,9	-0,07
Milt	BD	7,06E+01	4,98E+01	3,4973	3,6261	0,1288	548,14	4,22	386,6	5,52
Nyre	BD	1,50E+02	2,19E+01	3,4584	3,8269	0,3685	407,06	3,13	59,4	0,85
Tynntarm	BD	1,48E+02	7,65E+00	3,5342	5,1213	1,5871	93,25	0,72	4,8	0,07
Tykketarm	SC	1,67E+02	-1,17E+00	6,2973	7,6972	1,3999	119,29	0,65	-0,8	-0,01
Femur	BD	3,12E+01	5,98E+01	3,4827	3,6074	0,1247	250,20	1,92	479,6	6,85
Skalle	BD	2,41E+01	6,13E+01	3,4483	3,5398	0,0915	263,39	2,03	669,9	9,57
Tumor vs	BD	5,94E+02	2,18E+01	3,4637	3,5637	0,1	5940,00	45,69	218,0	3,11
Tumor hs	BD									

Standarder 7d	rør	227Th		223Ra	
		10 %	Injisert aktivitet	10 %	Injisert aktivitet
Std A	BD	1,26E+03	13000	6,74E+02	7000
Std B	BD	1,34E+03		7,26E+02	
Std C	SC	1,69E+03	18350	7,78E+02	8205
Std D	SC	1,98E+03		8,63E+02	

7 DAGER

Mus ID: 5 Vekt mus : 28 g Avl.dato: 31.01.2008 KI: 10:00

Organ	Rør	Aktivitet Th-227	Aktivitet Ra-223	Vekt glass	Vekt m/organ	vekt	227Th pr gr	227Th %inj/gr	223Ra pr gr	223Ra %inj/gr
Urin	BD	0,00E+00	0,00E+00	3,4909	3,5335	0,0426	0,00	0,00	0,0	0,0
Blod	BD	4,13E+02	-3,88E+00	3,4841	4,5592	1,0751	384,15	2,96	-3,6	-0,1
Lunge	BD	3,55E+01	-3,39E-01	3,4415	3,6272	0,1857	191,17	1,47	-1,8	0,0
Lever	SC	2,11E+03	-1,52E+01	6,3437	7,6227	1,279	1649,73	8,99	-11,9	-0,1
Milt	BD	5,07E+01	3,34E+01	3,4559	3,5786	0,1227	413,20	3,18	272,2	3,9
Nyre	BD	5,58E+01	6,56E+00	3,4519	3,7913	0,3394	164,41	1,26	19,3	0,3
Tynntarm	BD	1,11E+02	-1,04E+00	3,4641	5,3591	1,895	58,58	0,45	-0,5	0,0
Tykketarm	SC	1,03E+02	2,61E-01	6,3389	7,782	1,4431	71,37	0,39	0,2	0,0
Femur	BD	1,73E+01	4,35E+01	3,5186	3,6126	0,094	184,04	1,42	462,8	6,6
Skalle	BD	2,77E+01	1,92E+01	3,4065	3,446	0,0395	701,27	5,39	486,1	6,9
Tumor vs	BD	5,24E+02	-4,18E+00	3,5181	3,6315	0,1134	4620,81	35,54	-36,9	-0,5
Tumor hs	BD			3,4635		-3,4635	0,00		0,0	0,0

7 DAGER

Mus ID: 6 Vekt mus : 25,5 g Avl.dato: 31.01.2008 KI: 10:00

Organ	Rør	Aktivitet Th-227	Aktivitet Ra-223	Vekt glass	Vekt m/organ	vekt	227Th pr gr	227Th %inj/gr	223Ra pr gr	223Ra %inj/gr
Urin	BD			3,4943		-3,4943	0,00	0,00	0,0	0,0
Blod	BD	6,20E+02	-8,06E+00	3,4642	4,5093	1,0451	593,24	4,56	-7,7	-0,1
Lunge	BD	4,38E+01	-5,78E-01	3,4041	3,5663	0,1622	270,04	2,08	-3,6	-0,1
Lever	SC	1,86E+03	-1,43E+01	6,3448	7,5035	1,1587	1605,25	8,75	-12,3	-0,2
Milt	BD	1,07E+02	4,48E+01	3,4922	3,6372	0,145	737,93	5,68	309,0	4,4
Nyre	BD	9,84E+01	8,53E+00	3,4607	3,7505	0,2898	339,54	2,61	29,4	0,4
Tynntarm	BD	1,49E+02	-1,95E+00	3,4368	5,0494	1,6126	92,40	0,71	-1,2	0,0
Tykkarm	SC	1,20E+02	-9,30E-01	6,335	7,6988	1,3638	87,99	0,48	-0,7	0,0
Femur	BD	1,83E+01	4,03E+01	3,4824	3,5658	0,0834	219,42	1,69	483,2	6,9
Skalle	BD	2,28E+01	6,32E+01	3,4534	3,5411	0,0877	259,98	2,00	720,6	10,3
Tumor vs	BD	4,91E+02	1,91E+01	3,4473	3,621	0,1737	2826,71	21,74	0,0	0,0

14 DAGER

Mus ID: 7 **Vekt mus :** 27 g **Avl.dato:** **KI:** 09:00

Organ	Rør	Aktivitet Th-227	Aktivitet Ra-223	Vekt glass	Vekt m/organ	vekt	227Th pr gr	227Th %inj/gr	223Ra pr gr	223Ra %inj/gr
Urin	BD	0,00E+00	0,00E+00	3,4556	3,5669			0,00		0,0
Blod	BD	2,54E+02	0,00E+00	3,4669	4,3347	0,8678	292,69	3,02	0,0	0,0
Lunge	BD	2,96E+01	0,00E+00	3,4588	3,6609	0,2021	146,46	1,51	0,0	0,0
Lever	SC	1,14E+03	0,00E+00	6,3608	7,8491	1,4883	765,97	5,59	0,0	0,0
Milt	BD	5,46E+01	0,00E+00	3,4574	3,6065	0,1491	366,20	3,78	0,0	0,0
Nyre	BD	5,51E+01	0,00E+00	3,4366	3,8467	0,4101	134,36	1,39	0,0	0,0
Tynntarm	BD	5,21E+01	0,00E+00	3,474	4,431	0,957	54,44	0,56	0,0	0,0
Tykkertarm	SC	1,60E+02	0,00E+00	6,3214	9,0603	2,7389	58,42	0,43	0,0	0,0
Femur	BD	2,76E+01	7,79E+01	3,4843	3,6859	0,2016	136,90	1,41	386,4	4,2
Skalle	BD	1,71E+01	7,04E+01	3,4796	3,6096	0,13	131,54	1,36	541,5	5,9
Tumor vs ^[1]	BD									
Tumor hs ^[1]	BD									

Standarder 14d	rør	227Th		223Ra	
		10 %	Injisert aktivitet	10 %	Injisert aktivitet
Std A	BD	9,54E+02	9685	8,93E+02	9160
Std B	BD	9,83E+02		9,39E+02	
Std C	SC	1,29E+03	13700	1,19E+03	12250
Std D	SC	1,45E+03		1,26E+03	

^[1] Tumor mangler

14 DAGER

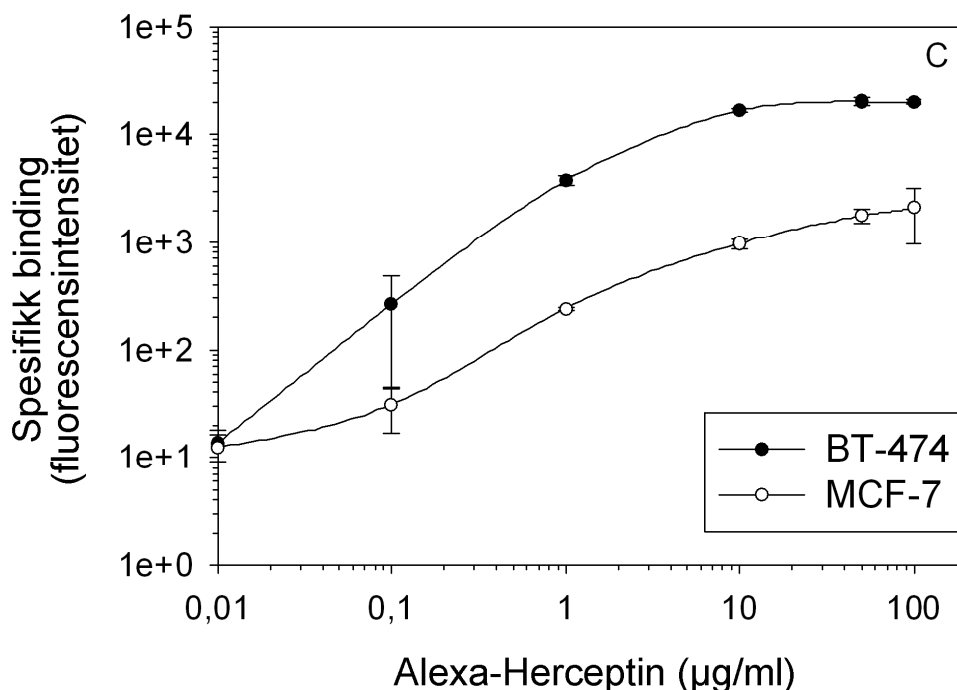
Mus ID: 9 Vekt mus : 24 g Avl.dato: KI: 09:00

Organ	Rør	Aktivitet Th-227	Aktivitet Ra-223	Vekt glass	Vekt m/organ	vekt	227Th pr gr	227Th %inj/gr	223Ra pr gr	223Ra %inj/gr
Urin	BD									
Blod	BD	1,64E+02	0,00E+00	3,4538	4,3454	0,8916	183,94	1,90	47,48	0,5
Lunge	BD	1,48E+01	0,00E+00	3,598	3,6348	0,0368	402,17	4,15	103,81	1,1
Lever	SC	1,83E+03	0,00E+00	6,3193	7,6814	1,3621	1343,51	9,81	245,17	2,0
Milt	BD	4,79E+01	5,79E+01	3,4592	3,5788	0,1196	400,50	4,14	103,38	1,1
Nyre	BD	4,77E+01	0,00E+00	3,4964	3,8356	0,3392	140,63	1,45	36,30	0,4
Tynntarm	BD	4,88E+01	0,00E+00	3,467	4,5771	1,1101	43,96	0,45	11,35	0,1
Tykkertarm	SC	1,32E+02	0,00E+00	6,3174	8,793	2,4756	53,32	0,39	9,73	0,1
Femur	BD	2,72E+01	8,43E+01	3,5302	3,7952	0,265	102,64	1,06	26,49	0,3
Skalle	BD	9,82E+00	4,59E+01	3,4268	3,4993	0,0725	135,45	1,40	34,96	0,4
Tumor vs ⁽¹⁾	BD									
Tumor hs ⁽¹⁾	BD									

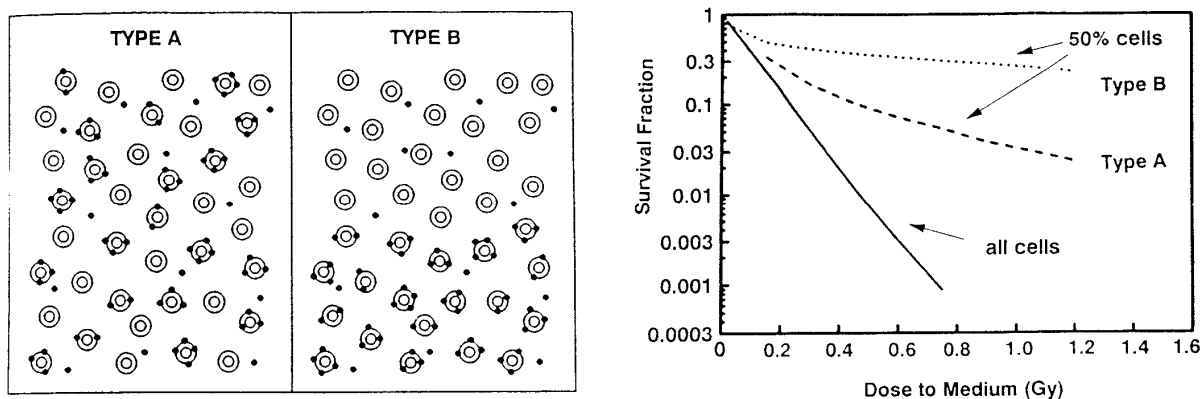
⁽¹⁾ Tumor mangler

Vedlegg I Supplerende data

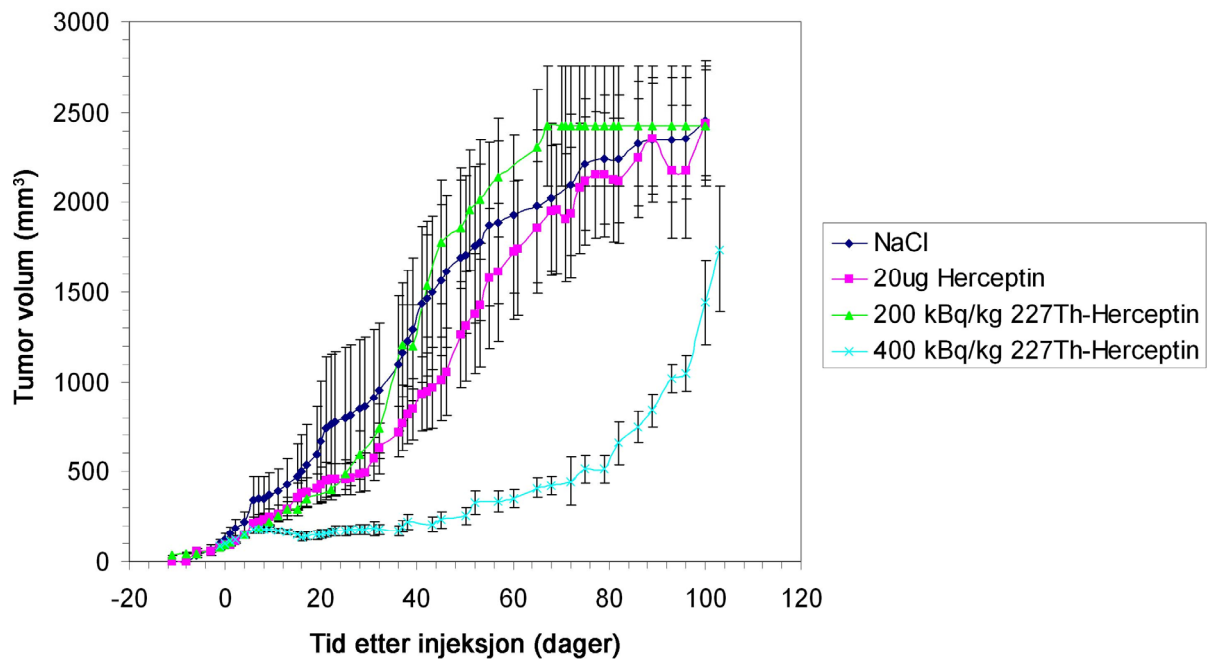
Her vises figurer som blir omtalt i resultater/diskusjon.



Figur 1.1: Metningskurve for BT-474 og MCF-7. Spesifikk binding målt ved flowcytometri som funksjon av tilsatt Alexa-Herceptin (Krogh et al., upublisert data).



Figur 1.2: Monte Carlo modell som beskriver fraksjonen overlevende celler som funksjon av dose til mediet fra α -emittere. Nederste kurve representerer tilfellet hvor 50 % av α -emitterne er jevnt fordelt blant alle cellene og bundet til cellemembranen. Den midterste kurven er for 50 % av α -emitterne bundet til halvparten av cellene i type A-oppsett. Den øverste kurven er for 50 % av α -emitterne bundet til halvparten av cellene i type B-oppsett. I alle tre tilfellene er de resterende 50 % av α -emitterne distribuert tilfeldig i mediet (Humm og Chin, 1993).



Figur I.3: Terapiforsøk med ^{227}Th -Herceptin på mus med implantert SKOV-3-tumorer. Tumorstørrelse målt på ulike tidspunkter før og etter en enkelt injeksjon med NaCl, 20 μg Herceptin, 200 – eller 400 kBq/kg ^{227}Th -Herceptin (Abbas et al., upublisert data).