



UiO • Universitetet i Oslo

# Mekanismen bag effekten af TGF- $\beta$ 3 på lavdosis-hypersensitivitet

Henrik Vorup Mortensen

Biofysik og medicinsk fysik

60 ECTS

Fysisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Universitetet i Oslo

3. januar 2022

## FORORD

Tak til mine vejledere Nina Edin, Ingunn Hansson og selv Eirik Malinen for deres tilstedeværelse, råd og vejledning på laboratorierne og i frokostrummet på BMF igennem hele dette projekt. Tak til Ingunn for at holde mig i hånden på de første forsøg og besvare alle mine spørgsmål indenfor immunocytokemi uanset hvor uuddannede de end måtte være. Jeg havde stort set ikke sat mine ben i et celledlaboratorie før dette projekt og det var lidt af en ilddåb jeg måtte hjælpes igennem. Tak til Nina fordi du altid lader døren til dit kontor stå på klem – jeg forsøgte virkelig at udnytte det så lidt som muligt. Tak Eirik for at bruge dine lunsj-pauser på at google og forklare hvad Laplace-operatoren egentlig fortæller os om.

Jeg vil også rette en tak til Jenny Vatne for at være min laboratorieassistent i flere forsøg samt hendes rolle som upartisk observatør på mine data i flowcytometri og gode kodenavne til celleprøver så jeg ikke skulle snuble i trypsineringen når jeg ikke måtte vide doserne.

Tak til alle studenterne på BMF for at spille bordtennis med mig når kroppen skulle bevæges (jeg lod jer ikke vinde og det ved I jo nok).

Tak til min mor og far for korrekturlæsning.

Denne opgave har været et livsforandrende forløb og har udviklet mig som menneske såvel som eksperimentel biofysiker. Jeg har fået tid til at sætte mig så grundigt ind i tingene som jeg altid gerne har villet. Det har været lange dage med målinger i røntgenrummet, mange fortvivlede forsøg i celledlaboratoriet og lange aftener med flowcytometri. Den som venter på resultater, venter aldrig for længe.

## RESUMÉ

Celler med lav-dosis-hypersensitivitet bliver ikke arresteret i det såkaldt tidlige G2-kontrolpunkt, når de bestråles med doser mindre end en tærskelværdi, som er omkring 0.3 Gy for T-47D-celler. Det betyder at de celler, som er for tæt på mitosen til at kunne arresteres i det andet senere G2-kontrolpunkt (Sinclair-arrest), går i mitosen med ureparerede skader og dør. Hvis celler først primes med lav dosisrate (0.3 Gy/time) i en time, vil de inducere det tidlige G2-kontrolpunkt for doser helt ned til 0.1 Gy. Det betyder at lav-dosis-hypersensitiviteten forsvinder efter lav-dosisrate-priming. Faktisk ser man en overlevelsrate som er højere for celler bestrålet med doser under 0.3 Gy end for ubestrålede celler (i det følgende kaldt oversving). Det er vist at TGF- $\beta$ 3 indgår i mekanismen bag effekten af LDR-primingen, og når man tilsætter rekombinant TGF- $\beta$ 3 til celler responderer de på samme måde som de lavdosisrate-primede celler.

I dette projekt skulle effekten af TGF- $\beta$ 3 på lavdosishypersensitivitet i T-47D-celler undersøges. Dette blev delt i to problemstillinger. Den første var at undersøge om celler som fik tilsat TGF- $\beta$ 3 inducerede det tidlige G2-kontrolpunkt for doser under 0.3 Gy. Den anden var at undersøge om oversvinget kunne skyldes at celler i hvilefase (G0) stimuleres af TGF- $\beta$ 3 til at gå ind i cellecyklus.

For at sikre præcis bestråling af cellerne blev der udført omfattende dosimetri på den røntgenapparat, som blev brugt. Statistisk analyse af målingerne afdækkede flere usikkerheder i forbindelse med korte bestrålinger og en korrektionsfaktor på  $2.0 \pm 0.3\%$  blev udledet i forbindelse med bestrålinger på 13 sekunder. Korrektionsleddet så ud til at være eksponentielt stigende jo kortere tid der bestråles. For 20 sekunders bestråling var korrektionsleddet på under 1%.

Der blev udviklet en metode for at måle det mitotiske indeks i celler ved immunocytokemi med mitosemarkør anti-phospho-histone H3 og flowcytometri. Tilstrækkeligt mange af disse forsøg blev udført til at fastslå at TGF- $\beta$ 3 ikke påvirker det mitotiske indeks, når det tilsættes cellerne 16 timer før bestråling.

Der blev også forsøgt udviklet en metode som brugte proliferationsmarkør KI-67 til at måle forholdet at senescente / quiescente celler.

Dette studie fandt ingen beviser for at TGF- $\beta$ 3 aktiverer det tidlige G2-kontrolpunkt, når det tilsættes i rekombinant form til cellerne 16 timer før bestråling, selvom denne behandling fjerner lav-dosis-hypersensitiviteten.

## ABSTRACT

Cells with low-dose hypersensitivity are not arrested at the so-called early G2 checkpoint when irradiated with doses lower than a 0.3 Gy in T-47D cells. This means that the cells that are too close to the mitosis to be arrested at the other G2 checkpoint (Sinclair arrest) enter mitosis with unrepaired damage and die. If the cells are primed at a low dose rate (0.3 Gy/hour for one hour), they will induce the early G2 checkpoint for doses as low as 0.1 Gy. This means that the low-dose hypersensitivity disappears following low dose rate (LDR) priming. In fact, one sees a survival rate which is higher for cells irradiated with doses below 0.3 Gy than that of unirradiated cells (hereinafter referred to as overshoot). TGF- $\beta$ 3 has been shown to be part of the mechanism behind the effect of LDR-priming, and when recombinant TGF- $\beta$ 3 is added to the cells, they respond in the same way as LDR-primed cells.

In this project, the effect of TGF- $\beta$ 3 on low-dose hypersensitivity in T-47D cells was to be investigated. This was divided into two issues. The first was to investigate whether cells to which TGF- $\beta$ 3 was added induced the early G2 checkpoint for doses below 0.3 Gy. The second was to investigate whether the overshoot could be due to cells in the resting phase (G0) being stimulated by TGF- $\beta$ 3 to enter the cell cycle.

To ensure accurate irradiation of the cells, extensive dosimetry was performed on the X-ray apparatus used. Statistical analysis of the measurements revealed several uncertainties associated with short exposures and a correction factor of  $2.0 \pm 0.3\%$  was derived in the context of exposures of 13 seconds. The correction term appears to be exponentially increasing the shorter the exposure time. For 20 seconds of irradiation, the correction term was less than 1%.

A method was developed to measure the mitotic index in cells by immunocytochemistry with mitotic marker anti-phospho-histone H3 and flow cytometry. Sufficiently many of these experiments were performed to determine that TGF- $\beta$ 3 does not affect the mitotic index when added to the cells 16 hours before irradiation.

Another method was also attempted developed which used proliferation marker KI-67 to measure the ratio of senescent / quiescent cells.

This study found no evidence that TGF- $\beta$ 3 activates the early G2 control point when added in recombinant form to the cells 16 hours before irradiation, although this treatment removes the low-dose hypersensitivity.

## NOMENKLATUR OG FORKORTELSER

I dette speciale anvendes decimalpunktum fremfor komma, da dette er normal skik og brug når man tager sin bachelor på Det matematisk-naturvidenskabelige fakultet, UiO. Punktumnotation kan også lette overgangen til computersprog som Python.

Enkelte ord som har ikke nogen god, etableret dansk oversættelse, (såsom ordet *gating*), vil beskrives med det engelske ord. I enkelte tilfælde bruges en blanding fordi den danske oversættelse virker mangelfuld eller beskriver fænomenet dårligt. F.eks. vil "dosishastighed" (eng: *doserate*) benævnes *dosisrate*.

Herunder findes en alfabetisk liste over forkortelser med enkle forklaringer.

### CELLE- OG RADIOBIOLOGI

- APC: Anaphase promoting complex (proteinkompleks der regulerer mitose)
- ATM: Ataxia telangiectasia mutated (protein kinase som aktiveres ved DNA-skade)
- Brca1/2: Breast cancer type 1/2 susceptibility protein (tumorsupressor-protein)
- Cdk: Cyclin dependent kinase (kinase som regulerer celleyklus)
- Chk: Checkpoint kinase (kinase involveret i celleykluskontrol)
- CKI: Cdk inhibitor (protein som blokerer cyklin-Cdk-aktivitet)
- DNA-PKcs: DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (respons til DNA-skade)
- DSB: Double strand break (dobbeltrådbrud på DNA)
- HR: Homologous recombination (reparationsmekanisme af DNA)
- HRS: Hyper-radiosensitivity (hypersensitivitet under 0.3 Gy)
- iNOS: Inducible nitric oxide synthase (inducerbar nitrogenmonoxid-syntase)
- IL-13: Interleukin 13 (protein som spiller en rolle i fjernelse af HRS)
- IRR: Increased radioresistance (forøget resistens mellem 0.3 Gy – 1 Gy)
- LAP3: Latency associated peptide 3 (peptid som binder TGF-β3)
- LD: Lethal damage (DNA-skade som fører til celledød)
- LQ-model: Linear-quadratic model (forventet celledrab som funktion af dosis)
- MRE11: Dobbelttrådbrudreparationsnuklease
- NHEJ: Non-homologous end joining (fejlbarlig reparationsmekanisme af DNA)
- NO: Nitric oxide (nitrogenmonoxid)
- p53: Tumorsupressor-protein som aktiveres ved DNA-skade)
- PDL: Population doubling level (tal for hvor hurtigt en celletype prolifererer)

- PLD: Potentially lethal damage (DNA-skade som kan føre til celledød)
- RAD51: DNA repair protein homolog 1 (protein som spiller en stor rolle i HR)
- Rb: Retinoblastoma (tumorsupressor-protein der er dysfunktionel i flere kræfttyper)
- SLD: Sublethal damage (DNA-skade som ikke fører til celledød)
- SSB: Single strand break (enkeltrådbrud på DNA)
- TGF- $\beta$ 3: Transforming growth factor beta 3

## IMMUNOCYTOKEMI OG FLOWCYTOMETRI

- BSA: Bovine serum albumin (minimerer uspecifikke bindinger med DyLight)
- EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid (forøger trypsin-aktivitet)
- FACS: Flow cytometry staining buffer (minimerer uspecifikke bindinger med KI-67)
- FITC: Fluorescein isothiocyanate
- FSC-A/H: Forward scatter area/height (fremadspredt lys i flowcytometri)
- PBS: Phosphate-buffered saline (saltopløsning med dinatriumhydrogenfosfat)
- PI: Propidium iodide (antistof som bruges til at farve DNA)
- RPM: Rounds per minute (rotationshastighed i omgange pr. minut)
- PNT: PBS m. tørmælk og Tween 20 (minimerer uspecifikke bindinger med anti- $\gamma$ H3)
- SSC-A/H: Side scatter area/height (sidespredt lys i flowcytometri)

## STRÅLINGSFYSIK OG STATISTIK

- HDR: High dose rate (høj dosisrate)
- LDR: Low dose rate (lav dosisrate, 0.3 Gy/time)
- LET: Linear energy transfer (mål for bremseevne i materie eller strålingens kvalitet)
- MU: Monitor unit (målt ladning ved eksponering med røntgen)
- SD: Standard deviation (standardafvigelse i et målingssæt som er normalfordelt)
- SE: Standard error ( $SE = \sqrt{SD^2/m}$ , hvor  $m$  er antal målinger)
- SEM: Standard error of the mean ( $SEM = \sqrt{SD^2/n}$ , hvor  $n$  er antal gennemsnit)
- SSD: Source (to) surface distance (afstand mellem strålekilde og bestrålingsplan)

## ENHEDER

- Dosis: [Gy], [mGy] (Gray, milliGray, SI: Joule/kilogram)
- Ladning: [C], [nC] (Coulomb, nanoCoulomb, SI: Ampere-sekund)
- Strøm: [A], [nA] (Ampere, nano-Ampere)

# INDHOLDSFORTEGNELSE

<b>FORORD</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUMÉ</b> .....	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>NOMENKLATUR OG FORKORTELSER</b> .....	<b>4</b>
CELLE- OG RADIOBIOLOGI .....	4
IMMUNOCYTOKEMI OG FLOWCYTOMETRI .....	5
STRÅLINGSFYSIK OG STATISTIK .....	5
ENHEDER .....	5
<b>1 INTRODUKTION</b> .....	<b>10</b>
1.1 MOTIVATION .....	10
1.2 STATE OF THE ART .....	10
1.3 DENNE OPGAVER .....	11
<b>2 TEORI</b> .....	<b>12</b>
2.1 CELLEBIOLOGI .....	12
2.1.1 Celleyklus .....	12
2.1.2 Regulering af celleyklus .....	12
2.1.3 Kontrolpunkter i celleyklus .....	14
2.1.4 G0-fasen og senescens .....	15
2.2 STRÅLINGSFYSIK .....	16
2.2.1 Radioaktivitet .....	16
2.2.2 Elektromagnetisk stråling .....	17
2.2.3 Gammastråling .....	17
2.2.4 Røntgenstråling .....	18
2.2.5 Afstandskvadratloven .....	19
2.2.6 Interaktion mellem stråling og materie .....	19
2.2.7 Dosimetri .....	20
2.2.8 Røntgendosimetri .....	21
2.2.9 Linear energy transfer (LET) .....	22
2.3 RADIOBIOLOGI .....	23
2.3.1 DNA-skade .....	23
2.3.2 DNA-reparation .....	24
2.3.3 Overlevelseskurver .....	26
2.3.4 Fraktionering og dosisrate-effekt .....	27
2.3.5 Dosisfraktionering .....	28
2.3.6 HRS og IRR .....	29

2.3.7	<i>LDR-priming og TGF-<math>\beta</math>3</i> .....	30
2.3.8	<i>Mitotisk indeks og LDR-priming</i> .....	34
2.4	FLOWCYTOMETRI .....	35
2.4.1	<i>Gating</i> .....	36
2.4.2	<i>DNA-markør PI</i> .....	37
2.4.3	<i>Proliferationsmarkør KI-67</i> .....	37
2.4.4	<i>DyLight</i> .....	38
2.4.5	<i>Mitosemarkør anti-phospho-histone H3 (anti-<math>\gamma</math>H3)</i> .....	38
2.5	MÅLINGER OG USIKKERHEDER .....	38
2.5.1	<i>Normalfordeling</i> .....	38
2.5.2	<i>Tilfældige og systematiske fejl</i> .....	41
2.5.3	<i>Beregning af usikkerheder i røntgendosimetri</i> .....	41
<b>3</b>	<b>EKSPERIMENTELT .....</b>	<b>43</b>
3.1	RØNTGENDOSIMETRI .....	43
3.1.1	<i>Udstyr i røntgendosimetri</i> .....	44
3.1.2	<i>Strålefeltkarakteristik</i> .....	44
3.1.3	<i>Python-kode</i> .....	46
3.1.4	<i>Placering af celleflaskebeholderen</i> .....	46
3.1.5	<i>Build-up-tid og estimat af dosisrate</i> .....	47
3.2	CELLEFORSØG .....	47
3.2.1	<i>Vedligeholdelse af cellelinjer (T-98G og T-47D)</i> .....	48
3.2.2	<i>Udstyr i celleforsøg</i> .....	50
3.3	BESTRÅLING AF CELLEPRØVERNE .....	51
3.3.1	<i>Bestråling med røntgen</i> .....	51
3.3.2	<i>Bestråling med gamma</i> .....	51
3.4	FARVNING AF CELLER MED KI-67 FOR AT AFGØRE ANDELEN AF CELLER I G0 .....	52
3.4.1	<i>Metode med KI-67</i> .....	53
3.5	FARVNING MED ANTI- $\gamma$ H3 FOR AT AFGØRE DET MITOTISKE INDEKS .....	53
3.5.1	<i>Metode med anti-<math>\gamma</math>H3</i> .....	54
3.6	METODER I CELLEFORSØG .....	54
3.6.1	<i>Trypsinering</i> .....	54
3.6.2	<i>Konfluens</i> .....	55
3.6.3	<i>Centrifugehastighed</i> .....	55
3.6.4	<i>Aspiration</i> .....	56
3.6.5	<i>PNT</i> .....	56
3.7	FLOWCYTOMETRI .....	57
3.7.1	<i>Opstart og kalibrering</i> .....	57
3.7.2	<i>Diskrimination af debris (smådele) og dubletter (klumper)</i> .....	57
<b>4</b>	<b>RESULTATER.....</b>	<b>59</b>



4.1	RØNTGENDOSIMETRI .....	59
4.1.1	<i>Felthomogenitet</i> .....	60
4.1.2	<i>Usikkerhed ifm. at den første måling i et målingssæt er højere end normen og at denne usikkerhed afhænger af eksponeringstid</i> .....	63
4.1.3	<i>Røntgendosimetri for ultrakorte eksponeringer</i> .....	67
4.1.4	<i>Målte doser, build-up-tid og dosisrater</i> .....	68
4.1.5	<i>Estimat af den sande SSD</i> .....	71
4.1.6	<i>Flere usikkerheder i udstyret</i> .....	72
4.2	FARVNING AF CELLER MED KI-67 OG DYLIGHT .....	74
4.3	FARVNING AF CELLER MED ANTI- $\gamma$ H3 .....	75
4.3.1	<i>Mitotisk indeks som funktion af dosis i lavdosisområdet</i> .....	76
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>77</b>
5.1	RØNTGENDOSIMETRI .....	77
5.1.1	<i>Usikkerhed ifm. aflæsning af elektrometeret</i> .....	77
5.1.2	<i>Førstemålinger som er højere end normen</i> .....	77
5.1.3	<i>Beregnete doser, dosisrater og build-up-tid</i> .....	79
5.1.4	<i>Standardafvigelse og SEM i den homogene del af feltet</i> .....	80
5.1.5	<i>Analysemetode / kode</i> .....	80
5.1.6	<i>Røntgenrørets sande SSD</i> .....	81
5.2	CELLEFORSØG - METODEUDVIKLING .....	81
5.2.1	<i>Konsekvenser ved forandring i aspirationsteknik</i> .....	81
5.2.2	<i>Farvning med KI-67 - mislykket</i> .....	82
5.3	FLOWCYTOMETRI - METODEUDVIKLING .....	83
5.3.1	<i>Metoder for at overkomme usikkerheder med flowcytometri</i> .....	83
5.3.2	<i>Præmisses for at ekskludere data</i> .....	85
5.4	EFFEKTEN AF LDR-PRIMING OG TGF- $\beta$ 3.....	86
5.4.1	<i>Hvordan påvirker priming det mitotiske indeks?</i> .....	86
5.4.2	<i>Hvad skyldes oversvinget i overlevelseshraten som følge af priming?</i> .....	87
5.4.3	<i>Hvordan påvirker TGF-<math>\beta</math>3 overlevelseshraten når den ikke påvirker det mitotiske indeks?</i> .....	88
5.4.4	<i>Inducerer LDR-priming TGF-<math>\beta</math>3?</i> .....	89
5.4.5	<i>Er TGF-<math>\beta</math>3 en nødvendig faktor i induktionen af tidlig G2-arrest?</i> .....	89
5.4.6	<i>Hvorfor påvirker LDR-priming det mitotiske indeks når tilsat TGF-<math>\beta</math>3 rekombinant ikke gør det?</i> 89	
5.5	FREMTIDEN OG VIDERE FORSKNING .....	90
<b>6</b>	<b>KONKLUSION</b> .....	<b>91</b>
	<b>LITTERATUR</b> .....	<b>92</b>
	<b>BILAG</b> .....	<b>97</b>
	A. RØNTGENDOSIMETRI.....	97

A.1 SSD = 50 cm, eksponering: 20 sekunder, 5 målinger pr punkt.....	97
A.2 SSD = 40 cm, eksponering: 14 sekunder, 5 målinger pr punkt, 3 forsøg.....	99
A.3 SSD = 40 cm, eksponering: 13 sekunder, 10 målinger pr punkt, 3 forsøg (vist i sektion 4.1.1, Resultater).....	101
A.4 SSD = 37.5 cm, eksponering: 12 sekunder, 10 målinger pr punkt, 1 forsøg.....	104
A.5 Målinger ifm. eksponeringstider for SSD50 med celleflaskebeholderen 13 cm fra kanten ved døren og 13 cm fra højre side, ordnet efter eksponeringstid (journal s. 40-45 og 80-81).....	106
A.6 Målinger ifm. iteration af eksponeringstider for SSD40 med celleflaskebeholderen 13 cm fra kanten ved døren og 13 cm fra højre side, ordnet efter eksponeringstid (journal s. 51,55, 83).....	107
A.7 Målinger i celleflaskebeholder kammer 2 (se Figur 3.3) for ultrakorte eksponeringer (journal s. 129, 133-134).....	109
<b>B. CELLEFORSØG .....</b>	<b>110</b>
B.1 KI-67, metodeudvikling (journal s. 11-38).....	110
B.2 Protokol for farvning med KI-67 og DyLight.....	111
B.3 Anti- $\gamma$ H3, metodeudvikling.....	112
B.4 Resultater med anti- $\gamma$ H3.....	119
B.5. Protokol for farvning med anti- $\gamma$ H3.....	120

# 1 INTRODUKTION

## 1.1 MOTIVATION

En tredjedel af befolkningen rammes af kræft i løbet af livet og halvdelen af disse vil blive behandlet med stråleterapi. Derfor er stråleterapi en af de vigtigste former for kræftbehandling. Stråling er effektivt mod kræftceller, men selv med dagens mest effektive behandlingsteknikker, er det ikke muligt at undgå bestråling af det omkringliggende normalvæv. De lave doser som rammer normalvævet har vist sig at have andre effekter end de høje doser som rammer selve tumoren. Hvad værre er, disse effekter involverer hypersensitivitet og forstærket effekt af den ioniserende stråling på normalvævet. En bedre forståelse af mekanismerne bag disse effekter er derfor vigtig for bedre at kunne forstå og forudsige (og evt. undgå) senskader hos færdigbehandlede kræftpatienter. Derfor vil dette masterprojekt undersøge nogle af de biologiske effekter som opstår i celler som bestråles med meget lave doser, dvs. mellem 0 – 1 Gy. Det er særligt det helt lave dosisområde under 0.3 Gy som er interessant i denne sammenhæng.

## 1.2 STATE OF THE ART

Mange cellelinjer udviser en forstørret følsomhed for røntgen- og gammastråledoser i området under 0.3 Gy. Celledrabet som funktion af stråledosen følger en simpel matematisk model, *LQ-modellen*, men ikke i lavdosisområdet under 0.3 Gy. Denne respons i cellerne kaldes for lavdosis-hypersensitivitet, eller *hyper radiosensitivity* (HRS).

Det har i tidligere studier været vist, at HRS-responsen kan fjernes ved at bestråle, eller *prime* cellerne med en dosis på 0.3 Gy. For at fjerne HRS-responsen permanent og ikke bare midlertidig, skal primingen gives med lav dosisrate på 0.3 Gy/time, kaldet LDR-priming (N. J. Edin, Olsen, m.fl. 2009). Priming med høj dosisrate fjerner kun HRS-responsen midlertidigt.

En vækstfaktor, *transforming growth factor  $\beta 3$*  (TGF- $\beta 3$ ) tyder på at spille en central rolle i den permanente effekt. Hidtil har teorien været at LDR-primingen aktiverer det tidlige G2-kontrolpunkt som gør at cellerne i større grad overlever efterfølgende akutbestråling fordi de arresteres i G2 og får tid til at reparere skaderne i stedet for at gå i mitose med DNA-skade og dø pga. skaden i det mitotiske kontrolpunkt (B. Xu m.fl. 2002).

Det mystiske er, at overlevelsesfraktionen i nogle tilfælde kan overstige 100%, hvilket kan tyde på, at det ikke kun drejer sig om et nyt G2-kontrolpunkt. En hypotese er at det i stedet er

inaktive celler i G0 som bringes i cyklus af TGF- $\beta$ 3 og således påvirker antallet af celler i cyklus efter bestråling.

### 1.3 DENNE OPGAVE

I dette studie har jeg forsøgt at teste denne hypotese ved at se på hvordan fraktionen af T-47D humane brystkræftceller i G0 og i mitose påvirkes af priming og direkte tilsætning af rekombinant TGF- $\beta$ 3. T-47D-celler blev bestrålet med røntgen og analyseret med immunocytokemi med relevante antistoffer ved flowcytometri. Der blev udført to separate forsøg hvor det ene brugte en proliferationsmarkør (KI-67) og det andet brugte en mitose markør (anti- $\gamma$ H3).

Graden af HRS påvirkes af strålingens LET (linear energy transfer). Der blev derfor brugt en ekstra hård filtrering af røntgenstrålingen, hvilket hærder strålen ved at fjerne lavenergetiske fotoner fra røntgenspekteret men går ud over intensiteten. Derfor måtte ny dosimetri udføres.

Dosisraten blev maksimeret ved at bringe cellerne så tæt på strålekilden som muligt uden at gå på kompromis med feltets homogenitet i et område som kunne indeholde en celleflaskebeholder med plads til fire prøver. Derfor blev strålefeltet karakteriseret i flere forskellige afstande til kilden (SSD) og kortlagt i Python. Statistisk analyse af målingerne afslørede en systematisk fejl som ledte til en korrektionsfaktor som er eksponentielt øgende for kortere bestrålinger.

De bestrålede celleprøver blev analyseret ved flowcytometri. Den type flowcytometri-målinger som blev udført i denne opgave, er usikre fordi de i stor grad afhænger af beskuerens øje. Derfor blev uafhængige beskuer brugt til at analysere nogle af de samme datasæt for at verificere mine egne analyser. Der blev også brugt kodenavne til prøverne i tre forsøg for at se om det påvirkede min analyse.

## 2 TEORI

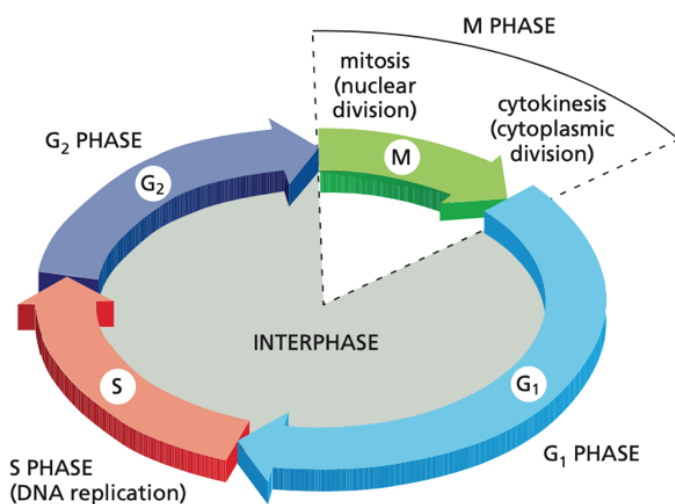
### 2.1 CELLEBIOLOGI

Delkapitlet er baseret på (Alberts m.fl. 2015; Hall og Giaccia 2012), med mindre andre referencer er opgivet.

#### 2.1.1 CELLECYKLUS

Alle eukaryote celler som deler sig, gennemgår en cyklus, som består af fire faser: M, G<sub>1</sub>, S, og G<sub>2</sub>. I M-fase sker mitosen, hvor cellen deler sig i to. I G<sub>1</sub> vokser cellen, duplikerer organeller og cytosoliske komponenter og begynder på at replikere centrosomer. I S-fase (S for syntese) replikeres DNA, og antallet af kromosomer, dvs. mængden af DNA, fordobles. I G<sub>2</sub>-fase fortsætter cellen med at vokse, enzymer og andre proteiner syntetiseres, og replikation af centrosomer afsluttes. G<sub>1</sub> kan vare i mange dage, mens S og G<sub>2</sub> ofte kun varer nogle timer. Mitose varer for de fleste relevante cellelinjer omkring en time.

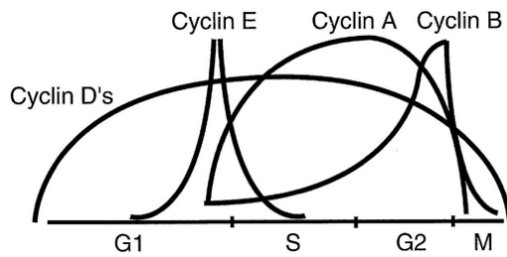
Figur 2.1 viser cellecyklus delt op i M-fase, og G<sub>1</sub>, S, og G<sub>2</sub>.



Figur 2.1: Cellecyklus med faser G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> og M. I G<sub>1</sub> er den nye celle i vækst. I S syntetiseres DNA. I G<sub>2</sub> vokser cellen endnu mere. I M går cellen i mitose og deler sig. (Alberts m.fl. 2015).

#### 2.1.2 REGULERING AF CELLECYKLUS

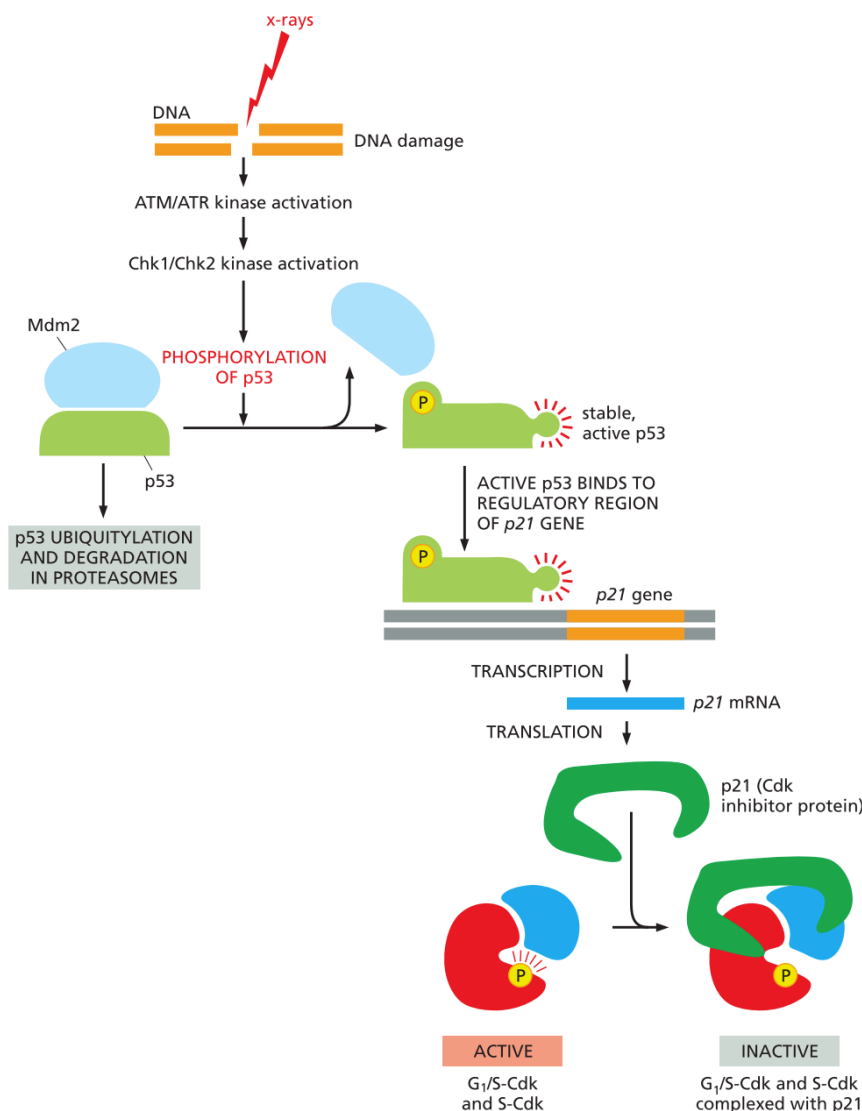
Cellecyklus reguleres af *cyklin-dependente kinaser* (Cdk) og cykliner. Cdk må bindes til en cyklin for at aktiveres. Cyklinerne regulerer aktiviteten af forskellige Cdk gennem cellecyklus ved at koncentration af den enkelte cyklin øger og falder i forskellige faser af cellecyklus. I G<sub>1</sub> stiger niveauet af cyklin E, som aktiverer G<sub>1</sub>/S-Cdk, og starter cyklus. S-Cdk aktiveres af cyklin A og G<sub>2</sub>/M-Cdk af cyklin B. Meta-anafase-overgangen reguleres af APC/C-ligase. Et overblik over cyklinkoncentration i forskellige cellecyklusfaser vises i Figur 2.2.



Figur 2.2: Cyklin-cyklus. Cyklin E regulerer overgangen fra G1 til S, cyklin A overgangen fra S til G2 og cyklin B regulerer overgangen fra G2 til M-fase, hvor cellen går i mitose. (Hall 2000).

DNA-skade starter en signalvej ved at aktivere proteinkinasen *ataxia telangiectasia mutated* (ATM) som binder sig til skadestedet og fosforylerer to andre proteinkinaser, Chk1 og Chk2. Disse to fosforylerer andre proteiner som fører til cellecyklusarrest, bl.a. det regulerende protein p53 som stimulerer transkription af Cdk-inhibitor-(CKI)-proteinet p21, der binder sig til aktive G1/S-Cdk og S-Cdk og deaktiverer dem.

Figur 2.3 viser en signalvej som fører til cellecyklusarrest.



Figur 2.3: En signalvej for cellecyklusarrest i G1 og S med p53 som den centrale figur. DNA-skaden aktiverer ataxia telangiectasia mutated (ATM) og Chk1/Chk2-kinaser som fosforylerer p53 og blokerer bindingen med Mdm2. Når Mdm2 løsner sig fra p53, aktiveres p53 og starter transkription af cyklin-inhibitor-kinaser (CKI) som p21 eller p27. Disse inaktiverer Cdk så cellecyklus stopper op og cellen bliver arresteret. (Alberts m.fl. 2015).

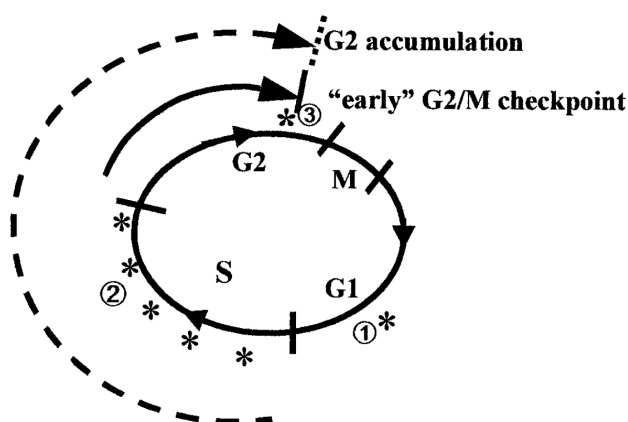
### 2.1.3 KONTROLUNKTER I CELLECYKLUS

For at sikre genomisk integritet og minimere tumorigenese har hver fase i cellecyklus kontrolpunkter, som skal sørge for at celler med skader ikke går videre til næste stadie.

G1-kontrolpunktet tilser cellevækst og miljø. Mangler cellen næringsstoffer, vækstoffaktorer, plads eller varme, eller er for lille, går cellen midlertidigt eller permanent ud af cyklus og i G0-fase. Ved DNA-skade i G1-kontrolpunktet kommer cellen i G1-arrest, hvor den enten reparerer skaden eller dør. S-kontrolpunktet tjekker om miljøet er favorabelt for at påbegynde syntese og dermed cyklus, og arresterer ligeledes cellen ved DNA-skade (se Figur 2.3).

I G2-kontrolpunktet arresteres celler med DNA-skade så de ikke skal gå i mitose før de har fået repareret skaderne. G2-kontrolpunktet har to molekylært distinkte mekanismer for cellecyklusarrest, hvoraf den ene er uafhængig af aktivering ATM. Denne kaldes Sinclair-mekanismen eller 'akkumuleret G2-arrest', fordi den kun arresterer celler som blev skadet mens de var i G1 eller S (B. Xu m.fl. 2002). Sinclair-mekanismen bruger nogle timer på at blive induceret, hvilket betyder at celler, som bliver skadet af stråling mens de er i G2, ikke kan nå arresteret med Sinclair-mekanismen, før de går ind i mitose.

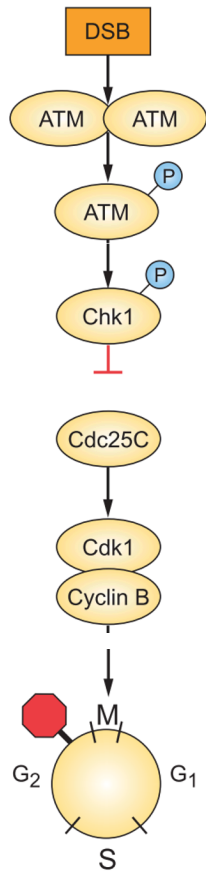
En anden strålingsinduceret G2-kontrolmekanisme, som afhænger af tilstrækkelig ATM-aktivering, blev opdaget i 2002, og induceres umiddelbart efter bestråling. Med denne mekanisme kan celler, som bliver skadet i G2, nå at blive repareret, før de går ind i mitose, selv når tærskelniveauet af ATM ikke er nået for at inducere normal arrest. Den nyopdagede, "tidlige" G2-kontrolmekanisme er kun effektiv for doser over ca. 0.4 Gy (B. Xu m.fl. 2002), hvilket betyder at G2-celler, som får DNA-skade af stråledoser under 0.4 Gy fortsætter ind i mitoser med skader. Derfor kaldes den nye mekanisme "tidlig" G2-arrest. Se Figur 2.4



Figur 2.4: Cellecyklusprogression efter bestråling. Asteriskerne viser karakteristiske kontrolpunkter. ①: Det p53-afhængige G1-kontrolpunkt. ②: Det ATM-afhængige S-kontrolpunkt som aktiveres i hele forløbet af S. ③: Det ATM-afhængige "tidlige" G2-kontrolpunkt som indtræffer omkring 30 min før cellen går i mitose og arresterer celler som får stråleskader mens de er i G2. (B. Xu m.fl. 2002)

I M-fase tjekker det mitotiske kontrolpunkt i metafase-anafase-overgangen, om kromosomerne er korrekt fastgjort på spindlen. Hvis ikke, går cellen i apoptose.

Ved DNA-skade i G<sub>2</sub> spiller ATM en rolle i aktivering af signalvejen som fører til G<sub>2</sub>-arrest. Signalvejen opsummeres i Figur 2.5.



Figur 2.5: Ved dobbeltrådbrud i G<sub>2</sub> fosforylerer ATM Chk1 som derefter fosforylerer Cdc25C, en fosfatase som inhiberer cyklin B-aktivitet og bringer cellen i G<sub>2</sub>-arrest (se Figur 2.2). I G<sub>2</sub>-arrest får cellen tid til at reparere DNA-skaden før cellen går i mitose. Reparation af DNA i G<sub>2</sub>-arrest sker oftest ved HR (homolog rekombination)-mekanismen<sup>1</sup> som bruger en søsterkromatid som skabelon og derfor ender med perfekt repareret DNA efterfulgt af succesfuld celledeling i mitose. (Hall og Giaccia 2012, redigeret)

#### 2.1.4 G<sub>0</sub>-FASEN OG SENESCENS

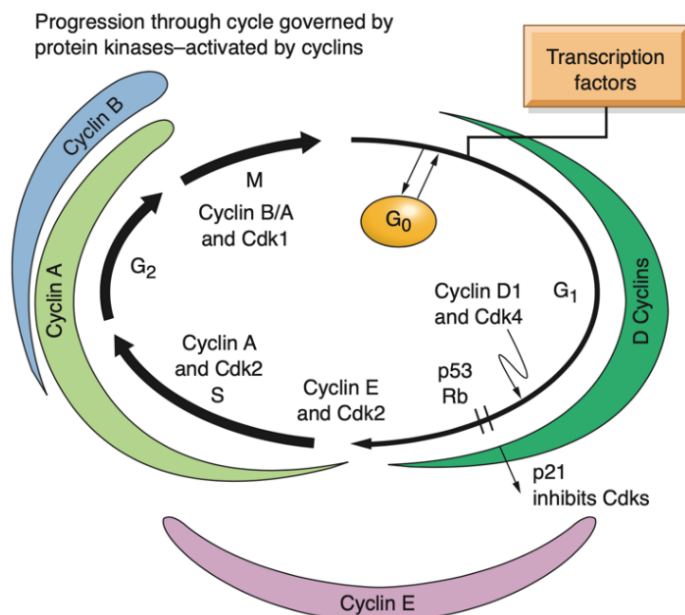
I fravær af overlevelsels- eller vækstfaktorer, varme mm., kan celler ophøre med at være i cyklus og gå ind i et særligt ikke-selvreplikerende stadie kaldet G<sub>0</sub>. Visse færdigdifferenterede celler, som for eksempel neuroner og skeletmuskulatur, kan få cykluscontrolsystemet helt demonteret, så genudtryk, som koder for Cdk'er og cykliner, bliver permanent slået fra. Dette kaldes *senescens* fordi det er irreversibelt. Andre celletyper trækker sig kun midlertidigt fra cyklus og bevarer evnen til hurtigt at genmontere controlsystemet og gå tilbage i cyklus. Dette kaldes *quiescens* fordi det er reversibelt. For eksempel kan leverceller i G<sub>0</sub> stimuleres til deling, hvis leveren beskadiges. Andre celler, som lymfocytter og fibroblaster, går ind og ud af cyklus igennem hele deres levetid (Alberts

<sup>1</sup> HR-mekanismen beskrives i detaljer i et senere afsnit i samme kapitel.



m.fl. 2015). Nødvendige vækstfaktorer findes i serum, og uden serum i cellemedium forbliver celler i kultur i G<sub>0</sub>.

Senescens er klassificeret som en tumorsuppressor-mekanisme, fordi det næsten altid karakteriseres af aktivering af p53- eller Rb-proteiner, samt kromatinforandringer som fører til *silencing* af de gener, som skal promotere overgangen fra G<sub>1</sub>- til S-fase. Mutationer i p53- eller Rb-signalveje som følge af DNA-skade vil kunne føre til tab af senescens, hvilket mest sker i tumorceller og ikke ofte i normalvævsceller. Senescente celler er metabolisk aktive men prolifererer ikke. Dog kan senescente celler stimuleres til at vokse igennem stimuli fra mitogener eller cytokiner, som udskilles i fibroblaster, hvilket kan føre til tumorvækst (Hall og Giaccia 2012). Cellecycelus med reguleringsmekanismer opsummeres i Figur 2.6.



Figur 2.6: Cellecycelus med cyklinkoncentration, reguleringsmekanismer og G<sub>0</sub>-fase. G<sub>0</sub>-celler er i samme vækststadiet og har derfor samme DNA-indhold som G<sub>1</sub>-celler, men G<sub>0</sub>-celler prolifererer ikke. (Hall og Giaccia 2012).

## 2.2 STRÅLINGSFYSIK

Delkapitlet er baseret på (Hall og Giaccia 2012) og (Attix 1986).

### 2.2.1 RADIOAKTIVITET

Et materiales radioaktive egenskaber beskrives af en differentialligning som viser forandringen i antallet af radioaktive atomkerner over tid. Radioaktiviteten aftager med antallet af atomkerner ved

$$A = -\frac{dN}{dt} = \lambda N \quad (2.1)$$

hvor  $\lambda$  er en henfaldskonstant som er karakteristisk for materialet. Differentialligningen løses ved separation af variable og giver antallet af radioaktive atomkerner som funktion af tid

$$N(t) = N_0 e^{-\lambda t} \quad (2.2)$$

hvor  $N_0 = N(t = 0)$  er det initiale antal radioaktive kerner. Et karakteristisk mål for radioaktive materialer er halveringstiden som fortæller hvor lang tid der går før halvdelen af stoffet er henfaldt. Halveringstiden findes ved at sætte  $N(t) = N_0/2$  og løse for  $t$ .

Halveringstiden defineres ud fra henfaldskonstanten og vice versa, og giver

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda} \Leftrightarrow \lambda = \frac{\ln 2}{T_{1/2}} \quad (2.3)$$

### 2.2.2 ELEKTROMAGNETISK STRÅLING

Elektromagnetisk stråling kan beskrives som bølgepakker af energi, bedre kendt som fotoner.

Hver foton har energien

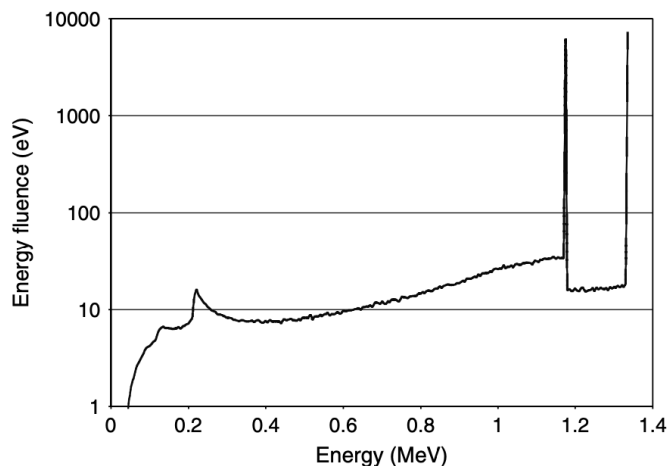
$$E = h\nu \Rightarrow E = \frac{hc}{\lambda} \quad (2.4)$$

hvor  $\nu$  er bølgens frekvens,  $\lambda$  er bølgelængden, og  $h$  er Plancks konstant. Energien er direkte proportional med frekvensen og dermed omvendt proportional med bølgelængden. Det betyder at fotonenergien er omvendt proportional med bølgelængden via

$$E \propto \nu \propto \frac{1}{\lambda} \quad (2.5)$$

### 2.2.3 GAMMASTRÅLING

Gammastråling er elektromagnetisk stråling i den højeste ende af frekvensskalaen med frekvenser over  $10^{20}$  Hz og bølgelængder på mindre end 1 pm. Gammastråling opstår ved deexcitation af tunge, ustabile atomkerner og er som regel et biprodukt af alfa- eller betastråling. Ved alfastråling emitterer atomet kernemateriale i form af en helium-2+-kerne, dvs. to protoner og to neutroner. Ved betastråling omdannes en kerne-neutron eller proton til det modsatte og ledsages af hhv. en elektron med en anti-neutrino eller en positron med en neutrino. Når kernen havner i en exciteret tilstand efter henfaldet, emitteres gammastråling ved deexcitation. Kobolt-60 er ustabil og henfalder til nikkel-60 gennem et betahenfald, hvor et elektron og en anti-neutrino emitteres ledsaget af højenergetiske gammastråler ved to veldefinerede energier på hhv. 1.17 MeV, eller 1.33 MeV (Mayles, Nahum, og Rosenwald 2007). Energispekteret for kobolt-60 vises i Figur 2.7



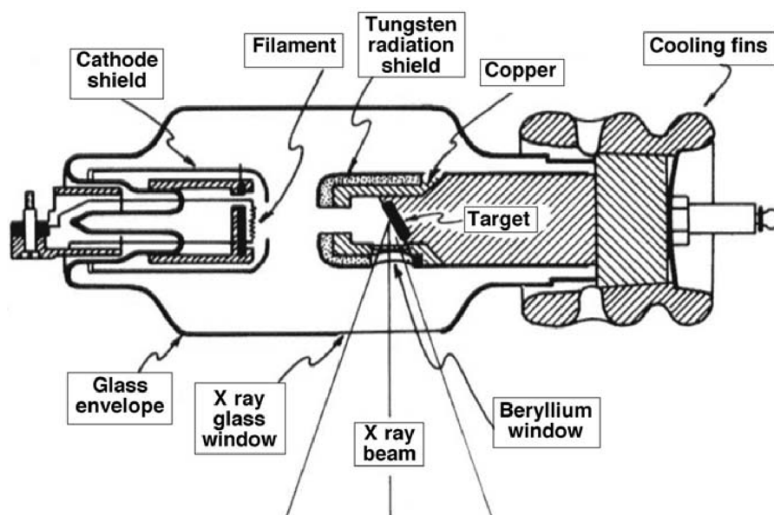
Figur 2.7: Strålningsspektrum fra kobolt-60-kilde 5 cm dybt i vand. (Mayles, Nahum, og Rosenwald 2007).

Kobolt-60 henfalder til nikkel-60 ved følgende proces:



### 2.2.4 RØNTGENSTRÅLING

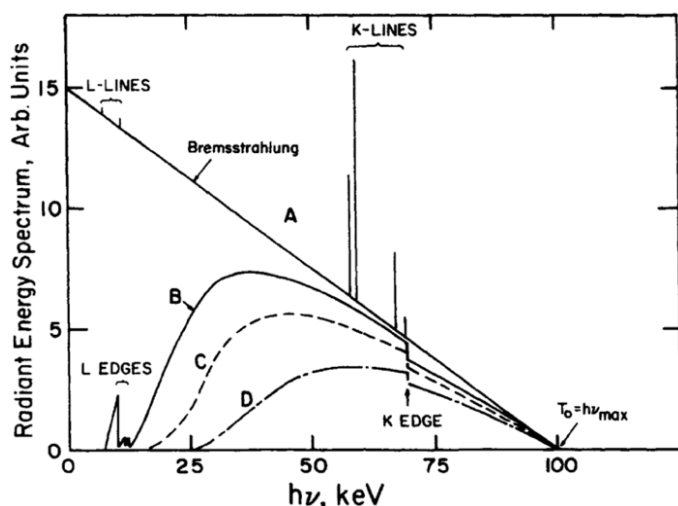
Røntgenstråling ligger lidt lavere end gammastråling på frekvensspekteret med frekvenser omkring  $10^{17}$  -  $10^{20}$  Hz og bølgelængder fra omkring 1 nm og ned til 1 pm. Røntgenstråling kan skabes i et røntgenrør ved at accelerere elektroner i et elektrisk potentiale mellem to elektroder. Her emitteres elektronerne fra en negativt ladet katode idet den opvarmes. I et spændingsfelt over røret drives elektronerne mod en anode af wolfram som de kolliderer med. Tværsnittet af et røntgenrør vises i Figur 2.8.



Figur 2.8: Tværsnit af et røntgenrør. (Podgorsak 2005).

I bløde kollisioner med atomkernerne i wolframmålet bremser elektronerne op og får afbøjet deres bane. Den overskydende kinetiske energi ved opbremsningen omdannes til røntgenstråling, eller *bremsstrahlung* (bremsestråling), på engelsk kaldt *X-rays*. Ved hårde, direkte kollisioner med anodematerialet kan elektronen slå en K- eller L-skal-elektron løs og skabe en vakance, hvilket vil få en elektron i et højere energiniveau til at deexcitere for at

udfyldte vakancen. Den overskydende energi ved deexcitationen emitteres som røntgenstråling og giver karakteristiske toppe på strålingsenergispekteret. Disse toppe kaldes for karakteristisk stråling og kan fjernes fra spekteret ved at anbringe et stålfilter foran røntgenstrålen. Aluminiums- og kobberfiltre kan bruges til at fjerne lavenergetiske stråling fra spekteret. Figur 2.9 viser et typisk røntgenspektrum med fire forskellige niveauer af filtrering. Uden filtrering er spekteret lineært med fotonenergi.



Figur 2.9: Røntgenspektrum fra 100 keV elektroner på et tykt mål af wolfram. A viser spekteret uden filtrering. B viser spekteret filtreret med 0.01 mm wolfram. C viser spekteret når strålen er yderligere filtreret 2 mm aluminium, og D viser spekteret filtreret gennem 0.15 mm kobber og 3.9 mm aluminium. (Attix 1986).

### 2.2.5 AFSTANDSKVADRATLOVEN

Intensiteten fra en strålingskilde varierer omvendt proportionalt med kvadratet af afstanden (Mayles, Nahum, og Rosenwald 2007). Strålingen antages at spredes isotropt fra punktet i midten af en tænkt kugle, og intensiteten af fluensen igennem hvert kugleskal går derfor som  $r^{-2}$ . Strålingens intensitet kan beskrives ved ligningen

$$I = \frac{E}{4\pi r^2} \quad (2.7)$$

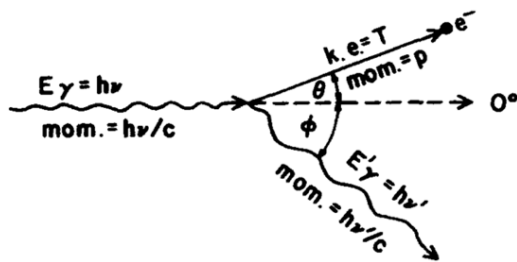
hvor  $I$  er energifluksen gennem en tænkt kugleskal i en radius  $r$  fra kilden og  $E$  er kildens (konstante) energi. Hvis flere afstande sammenlignes, kan afstandskvadratloven defineres

$$\frac{I_1}{I_2} = \frac{r_2^2}{r_1^2} \Rightarrow \frac{I_1 r_1^2}{I_2 r_2^2} = 1 \quad (2.8)$$

### 2.2.6 INTERAKTION MELLEM STRÅLING OG MATERIE

Nå fotoner kolliderer med materiale, kan de enten absorberes i fotoelektrisk effekt, hvor den indkommende foton kun har nok energi til at slå en elektron løs og selv absorberes i processen. Den kan også spredes via Compton-effekt, hvor fotonen fortsætter videre med forringet energi i en ny retning. Efter adskillige Compton-spredninger absorberes fotonen til

sidst i fotoelektrisk effekt. Når den indkommende foton selv ioniserer et molekyle, kaldes strålingen *direkte* ioniserende. Når de spredte elektroner ioniserer molekylet, kaldes den *indirekte* ioniserende. Princippet for Compton-effekt vises i Figur 2.10.



Figur 2.10: Princippet for Compton-effekt. Den spredte foton har større bølglængde end den indkommende foton og derfor lavere energi til næste interaktion. Som figuren viser, er bølglængden større for den spredte foton, hvilket betyder lavere energi. Efter nok interaktioner bliver fotonen absorberet i fotoelektrisk effekt. (Attix 1986).

Den spredte fotons energi kan beskrives ved ligningen

$$h\nu' = \frac{h\nu}{1 + \frac{h\nu}{m_e c^2} (1 - \cos \theta)} \quad (2.9)$$

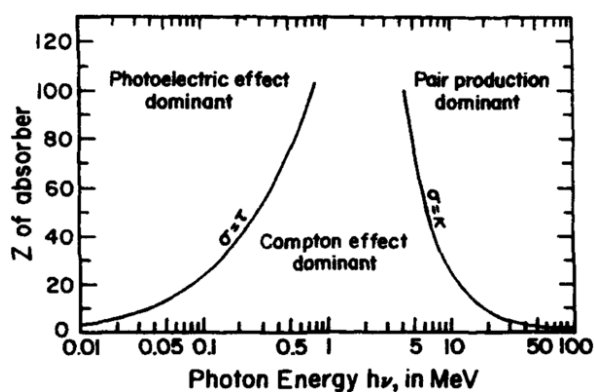
hvor  $\theta$  er den spredte fotons vinkel. Den Compton-spredte elektrons kinetiske energi  $T$  er den resterende energi ved interaktionen:

$$T = h\nu - h\nu' \quad (2.10)$$

Vi ser, at hvis fotonen ikke spredes, men absorberes, er  $T = h\nu$ , dvs elektronen får hele fotonenergien, hvilket giver fotoelektrisk effekt. Det sker, når  $h\nu$  er for lille til at resultere i Compton-effekt.

I menneskevæv er Compton-effekt dominerende for fotonenergi imellem 20 keV og 30 MeV.

Se Figur 2.11.



Figur 2.11: Relativ forekomst af tre forskellige interaktioner mellem ioniserende stråling og materie (parproduktion er ikke kommenteret i denne opgave). Væv har generelt lavt atomnummer  $Z$ , og er derfor domineret af Compton-effekt og fotoelektrisk effekt for diagnostiske og behandlende stråledoser. (Attix 1986).

### 2.2.7 DOSIMETRI

Dosimetri bruges til at bestemme den absorberede dosis i et givet medium. Absorberet dosis defineres som den deponerede energi pr masse:

$$D = \frac{\epsilon}{m} \quad (2.11)$$

Den deponerede energi fra stråling, som både består af fotoner  $\gamma$  og elektroner  $e^-$ , er lig den stråling, som går ind i mediet, minus den stråling, som forlader mediet:

$$\epsilon = R_{ind}^{\gamma} + R_{ind}^{e^-} - R_{ud}^{\gamma} - R_{ud}^{e^-} \quad (2.12)$$

Her betegner  $R$  strålingsenergien for hhv. partikler uden ladning ( $\gamma$ ), og partikler med ladning ( $e^-$ ).

### 2.2.8 RØNTGENDOSIMETRI

Når der laves dosimetri på et røntgenrør, måles ladningen med et ioniseringskammer. Ioniseringskammeret måler ladningen i nC (nanoCoulomb) som opstår når luftmolekylerne ioniseres, dvs. mister et elektron og derved opnår en ladning. Ladningen omregnes til dosis i mGy ved en kalibreringsfaktor som kommer fra DSA's kalibrering af ioniseringskammeret, ganget med en række korrektionsfaktorer som er givet herunder i Tabel 2.1. Siden vi ikke skal ionisere luft, men bestråle celler som består hovedsageligt af vand, er ioniseringskammeret kalibreret til at angive den ækvivalente dosis til vand, som er

$$D_w = M_u N_K p_u k_{TP} \left( \frac{\overline{\mu_{en}}}{\rho} \right)_{air}^w \quad (2.13)$$

hvor  $M_u$  er målingen i nC,  $N_K$  er kalibreringskoefficienten givet for den specifikke strålingskvalitet,  $p_u$  er en perturbations-korrektionsfaktor,  $k_{TP}$  er en konstant som korrigerer for temperatur- og trykforskelle som adskiller sig fra stuetemperatur og standard atmosfærisk tryk (se ligning (2.14)), og  $(\overline{\mu_{en}}/\rho)_{air}^w$  er det gennemsnitlige forhold mellem *mass energy absorption coefficient* for hhv. vand og luft. Konstanterne, som bruges i ligningen, er for en spænding på 220 kV og findes i Tabel 2.1. Kalibreringsfaktoren  $N_K$  kommer fra kalibreringen af ioniseringskammeret og elektrometeret som er udført af DSA.

Tabel 2.1:

*Konstanter til omregning af elektrisk ladning i ioniseringskammeret til dosis (SSDL NRPA 2016), (Waldeland m.fl. 2010).*

$N_K$ (mGy/nC)	$p_u$	$(\overline{\mu_{en}}/\rho)_{air}^w$	$k_{TP}$
$43.77 \pm 0.39$	1.02	1.075	$\approx 1.018$

Ved opvarmet eksponeringskammer korrigeres for temperatur ( $T$ ) og tryk ( $P$ ) ved

$$k_{TP} = \frac{273.15 + T}{273.15 + T_0} \frac{P_0}{P} \quad (2.14)$$

til referenceforhold  $T_0 = 20^\circ\text{C}$  og  $P_0 = 101.325 \text{ kPa}$  og 50% relativ luftfugtighed (SSDL NRPA 2016).

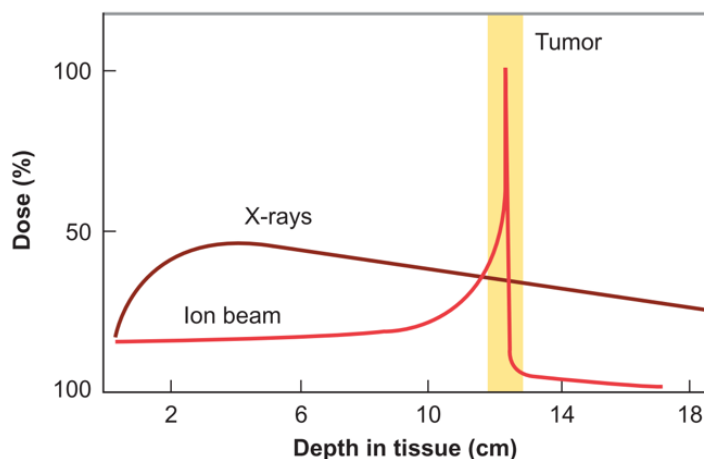
### 2.2.9 LINEAR ENERGY TRANSFER (LET)

LET er et mål for bremseevnen i et materiale og kan beskrives med Bethe-Bloch-ligningen. For en partikel med hastighed  $v$  og ladning  $z$  (i multiplum af elektronladninger) er energitabet pr. tilbagelagt afstand

$$\text{LET} = -\frac{dE}{dx} = \frac{4\pi n z^2}{m_e v^2} \cdot \left(\frac{e^2}{4\pi\epsilon_0}\right)^2 \cdot \ln\left[\frac{2m_e v^2}{I}\right] \quad (2.15)$$

hvor  $I$  er materialets ioniseringspotential,  $\epsilon_0$  er permittiviteten i vakuum, og  $n = \rho N_A Z/A$  er materialets elektrontæthed. Ved stråling med fotoner, som ikke selv har ladning, er det de indirekte ioniseringer, altså de Compton-spredte elektroner, som giver ophav til opbremsningen, altså LET. Bremseevnen defineres både af strålingens kvalitet og det bestrålede materiales egenskaber. Ved at studere ligningen ovenfor, kan vi se, at bremseevnen stiger med partiklens ladning kvadreret, stiger med materialets elektrontæthed, dvs. atomnummeret i modtagermaterialet og aftager med partiklens hastighed kvadreret.

Generelt er stor bremseevne, eller høj LET, forbundet med ladet partikelstråling med mens ringe bremseevne, eller lav LET, forbindes med fotoner, dvs. gamma- eller røntgenstråler. Stråling med tunge, ladede partikler, altså ioner, deponerer det meste af sin energi over en kort afstand et stykke inde i vævet i et såkaldt Bragg-peak, mens gammastråling og røntgenstråling svækkes gradvist med dybde. Se Figur 2.12.



Figur 2.12: Deponering af energi for røntgenstråling og ladet partikelstråling. En røntgenstråle fordeler energien mens en ladet partikelstråle har et *Bragg-peak*, hvor partikelhastigheden er minimal og strålen afsætter næsten hele sin energi. (Hall og Giaccia 2012).

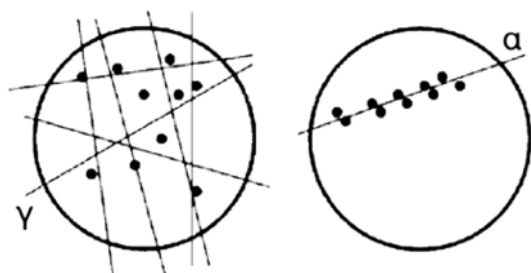
## 2.3 RADIOBIOLOGI

Delkapitlet er baseret på (Hall og Giaccia 2012) med mindre andre referencer er opgivet. De fleste figurer er lånt fra en ældre udgave af samme bog (Hall 2000).

### 2.3.1 DNA-SKADE

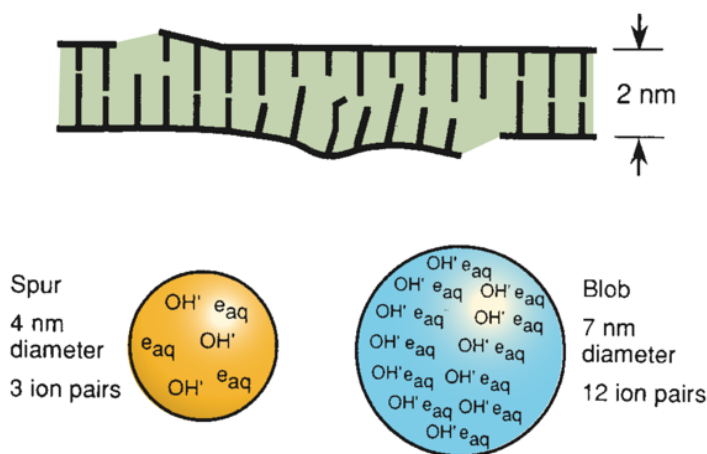
Ioniserende stråling kan enten skade DNA direkte eller indirekte. Ved direkte skade menes at DNA ioniseres i kollision med en foton. Ved indirekte skade menes at strålingen først ioniserer det omkringliggende vand, hvilket danner vandradikaler som ioniserer DNA'et.

Direkte skade er mest normalt for høj-LET-stråling, fordi de tunge partikler efterlader et smalt spor af tæt placerede ioniseringer på sin vej. Indirekte skade er mest normalt for lav LET, fordi strålingen er mere spredt ud og hovedsageligt ioniserer det omkringliggende vand og danner frie radikaler. Se Figur 2.13.



Figur 2.13: Skitse som illustrerer ioniseringshændelser i en celle for lav LET (venstre) og høj LET (højre). (Powell, Fowler, og Perkins 1960, redigeret).

Ioniseringshændelserne i det intracellulære vand deles op i *spurs*, og *blobs*, som indeholder adskillige frie radikaler og har en størrelse som er sammenlignelig med DNA's diameter på 2 nm. Spurs indeholder gennemsnitlig 6 frie radikaler, har en diameter på 4 nm, og energi på ca. 100 eV. Blobs indeholder gennemsnitlig 24 frie radikaler, har en diameter på 7 nm, og energi op til 500 eV. Se Figur 2.14.

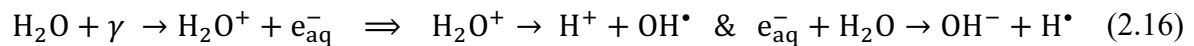


Figur 2.14: DNA, spur og blob. Spur er mest normalt (95% ved lav LET) og har gennemsnitlig tre ionpar, dvs. seks frie radikaler. (Hall og Giaccia 2012).

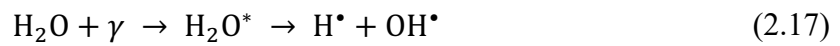
For lav-LET-stråling, som gamma- og røntgenstråling, resulterer omkring 95% af ioniseringshændelserne i spurs.



Ved ionisering af et vandmolekyle, løsrives et elektron først fra H<sub>2</sub>O, hvorefter der dannes vandradikaler i følgende processer:



Ved excitation, hvilket er mere sjældent, bliver molekylet ustabil og deler sig i to frie radikaler:



Nogle typiske reaktioner mellem biomolekyler (BMH, hvor H'et er et hydrogen) og vandradikaler er som følger:



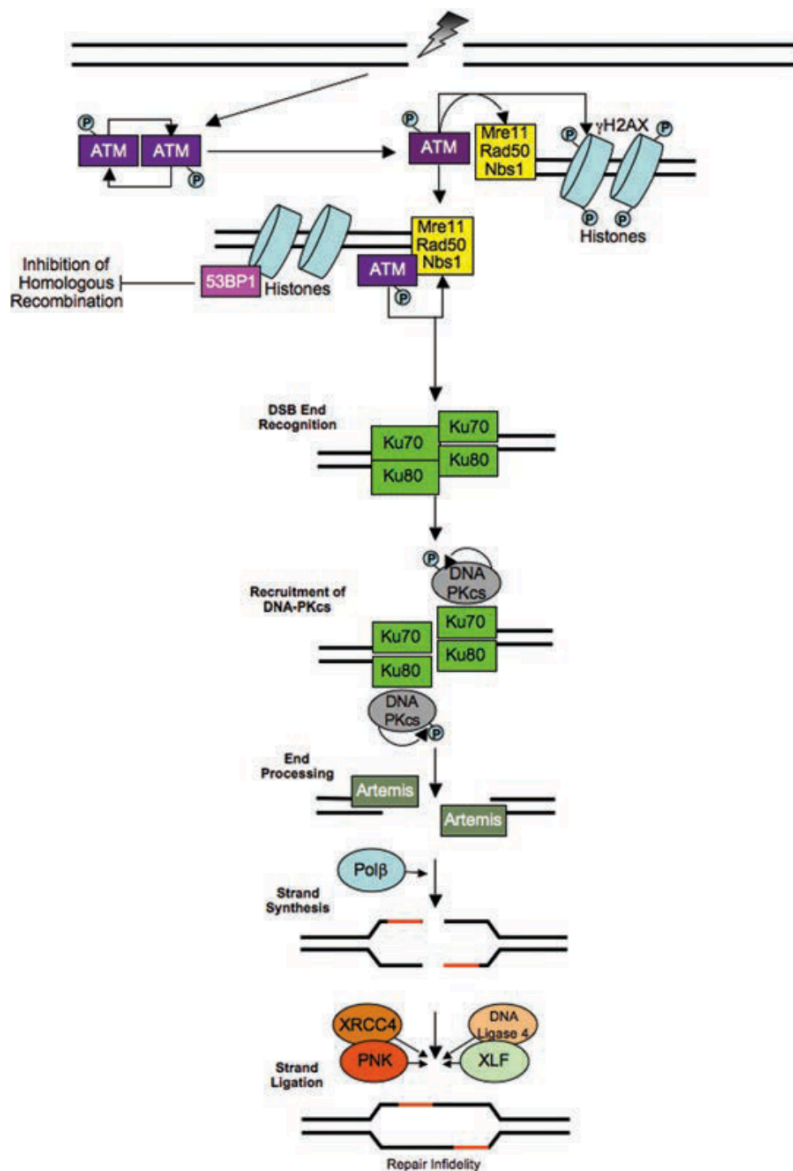
DNA-skade inddeles i tre grupper: **Dødelig skade (LD)**; fører til celledød. **Potentielt dødelig skade (PLD)**; kan repareres, men fører til celledød, hvis reparation mislykkes. **Subletal skade (SLD)**; fører kun til celledød, hvis flere skader opstår nær nok i tid og rum. Langt de fleste skader sker på DNA-baserne eller som enkelttrådbrud (SSB), mens et fåtal af skaderne sker som dobbeltrådbrud (DSB). En røntgenstråling på omkring 1 til 2 Gy giver over 1000 baseskader, omkring 1000 enkelttrådbrud og bare 40 dobbeltrådbrud (Hall og Giaccia 2012). Det er som regel kun dobbeltrådbrud, som fører til dødelig skade.

### 2.3.2 DNA-REPARATION

Ved enkelttrådbrud repareres skaden som regel hurtigt og fejlfrit, fordi den intakte DNA-tråd kan bruges som skabelon.

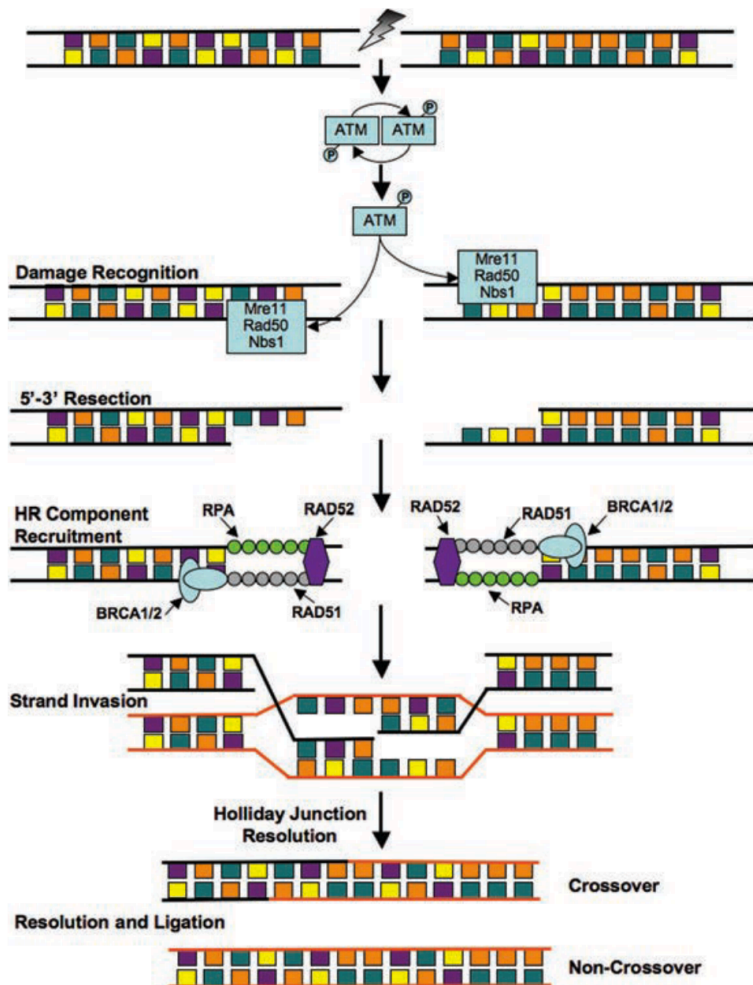
Dobeltrådbrud repareres enten ved mekanismen **homolog rekombination (HR)**, eller ved **non-homolog sammenføjning (NHEJ)**. Homolog rekombination kræver en ubeskadiget søsterkromatid som skabelon og kan derfor kun foregå i sen S-fase eller i G2-fasen, når DNA er færdigsyntetiseret. Når dobbeltrådbrud opstår i G1-fasen, sker reparation ved ikke-homolog sammenføjning, som laver fejl, fordi den DNA-sekvens, som befinder sig mellem de to brud, går tabt. Den fejlagtigt rekonstruerede DNA fører som regel til kromosomafvigelse og mitotisk celledød.

Ved tilstrækkeligt mange dobbeltrådbrud i G1 aktiveres ATM proteinkinase ved at den fosforyleres. og inducerer NHEJ-signalvejen, se Figur 2.15.



Figur 2.15: Dobbelttrådbrud i G1 opdages af ATM og MRN (Mre11-Rad50-Nbs1)-komplekset som fosforilerer H2AX-histonen og resulterer i NHEJ. HR inhiberes af det p53-bindende protein 53BP1. DNA-enderne bliver fundet af Ku70/Ku80-heterodimere som rekrutterer DNA-PKcs, hvis rolle er at sidestille de to DNA-tråde og siden rekrutterer ligaser som sammenføjer enderne. Det reparerede DNA vil generelt have fået slettet en sekvens af nukleotider, hvilket siden vil føre til kromosomafvigelser og mitotisk celledød. (Hall og Giaccia 2012)

Ved dobbelttrådbrud i G2 aktiverer ATM signalvejen som fører som regel til homolog rekombination og fejlfri reparation, se Figur 2.16.



Figur 2.16: Reparation ved homolog rekombination, aktiveret af ATM. MRN-komplekset skærer enkelttrådene til, hvilket resulterer i 3'-enkeltrådder som Rad51 kan binde sig til. Rad51 søger efter ensartethed og parrer enkelttrådene sammen hvor de passer sammen. Tumorsupressorerer Brca1/2 muliggør fastgøringen af Rad51. Resultatet af HR bliver som regel perfekt reparation og en celle som fortsætter til mitose og celledeling.

### 2.3.3 OVERLEVELSESKURVER

Overlevelsesfraktionen er defineret som andelen af celler som overlever bestråling og bevarer deres reproduktive egenskaber, dvs. den andel celler som stadig er i cyklus efter en givet stråledosis.

Eksperimentelle data tilpasses bedst med lineær-kvadrat-modellen (LQ) der beskriver overlevelsesfraktionen som funktion af dosis i et enkeltlogaritmisk plot som en eksponentielt aftagende funktion med et lineært og et kvadratisk bidrag:

$$S(D) = e^{-\alpha D - \beta D^2} \quad (2.20)$$

Her tilsvarende  $\alpha$  det lineære bidrag, og  $\beta$  det kvadratiske bidrag til kurven (se Figur 2.17).

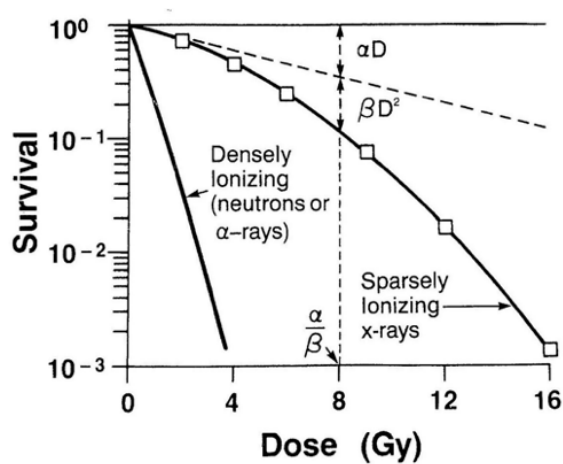
Kurvens skulder repræsenterer den subletale skade.

Kurvens form kan karakteriseres ved  $\alpha/\beta$ -ratioen, som kan bruges til at identificere hvor tidligt eller sent væv reagerer på stråling.  $\alpha/\beta$ -ratioen er den dosis, hvor den lineære

komponent og den kvadratiske komponent bidrager lige meget til celledrabet.  $\alpha/\beta$ -ratioen defineres:

$$\alpha D = \beta D^2 \Rightarrow D = \frac{\alpha}{\beta} \quad (2.21)$$

Sent reagerende væv (inkl. normalvæv) er robust mod stråling og har en lav  $\alpha/\beta$ -værdi (og altså en "bred" skulder), mens tidligt reagerende væv (inkl. tumorer) har en høj  $\alpha/\beta$ -værdi, hvorved overlevelseskurven aftager næsten lineært. Figur 2.17 viser hvordan man finder  $\alpha/\beta$ -ratioen visuelt på en skitse af en overlevelseskurve.

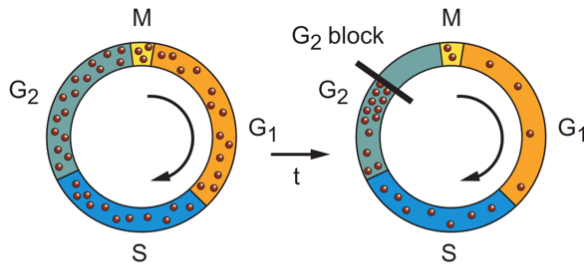


Figur 2.17: Overlevelseskurver for høj og lav LET. Stråling med ringe bremseevne, altså lav-LET-stråling giver mindre celledrab og har lav  $\alpha/\beta$ -ratio, hvor tæt ioniserende høj-LET-stråling giver mere celledrab og har høj  $\alpha/\beta$ -ratio. Ligeledes har tidligt reagerende, dvs. sensitivt væv som tumurvæv mere celledød og højere  $\alpha/\beta$ -ratio end sent reagerende væv som normalvæv.  $\alpha/\beta$ -ratioen er således både en egenskab ved vævet og et mål for strålingens kvalitet, og vekselvirkningen mellem stråling og væv. (Hall 2000).

#### 2.3.4 FRAKTIONERING OG DOSISRATE-EFFEKT

Ved at fraktionere dosen gives cellen tid til at reparere subletal skade imellem dosisfraktionerne, hvilket resulterer i at kurvens skulder gentages hver gang en dosisfraktion gives. Effekten vil være størst for sent-responderende væv (normalvæv, lav  $\alpha/\beta$ ), fordi skulderen er stor i forhold til tidligt reagerende væv (tumor, høj  $\alpha/\beta$ ).

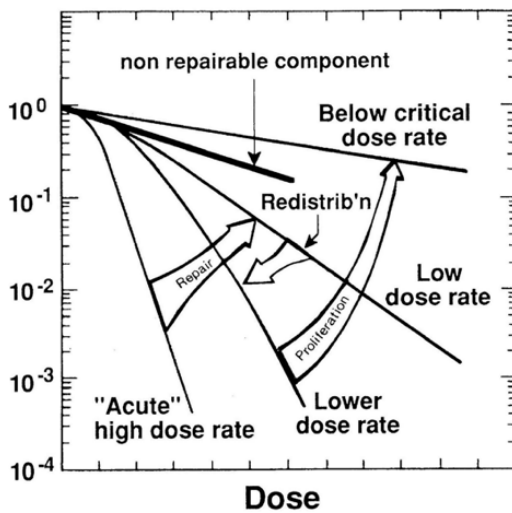
Kontinuerlig bestråling med **lav dosisrate (LDR)** kan anses for at være et uendeligt antal bittesmå doser og vil forventeligt give overlevelseskurver uden skulder og med mindre negativ hældning end for akut bestråling. Ved bestråling med lav dosisrate og lang eksponeringstid kan subletal skade repareres under selve eksponeringen, hvilket giver en mindre lodret kurve med mindre skulder. I nogen cellelinjer vil en særdeles lav dosisrate lade cellerne akkumulere i G2, hvilket er en hypersensitiv fase i cellecyklus. Dette kaldes *invers dosisrate-effekt*, fordi der opnås et større celledrab ved at sænke dosisraten. Se Figur 2.18.



Figur 2.18: G2-blokade ved kontinuerlig LDR-bestråling. Ved visse dosisrater passerer cellerne igennem cyklus og akkumulerer i sen G2-fase. Når strålingen ophører, ophæves G2-blokaden og de ophobede G2-celler redistribueres i cellecyklus. (Hall og Giaccia 2012, redigeret).

Reduceres dosisraten yderligere, ophæves G2-blokaden og cellerne fordeler sig, dvs. *redistribueres* i cellecyklus, hvor de også prolifererer ved mitose.

For akut bestråling af sent-responderende væv med **høj dosisrate (HDR)** bliver kurven mere lodret. Dosisrate-effekten opsummeres i Figur 2.19.



Figur 2.19: Dosisrate-effekt som resultat af reparation af SLD, redistribution i cellecyklus fra G2-blokade og celleproliferation. Grunden til at "lavere" dosisrate giver mere celledrab end blot "lav" dosisrate er at den lavere dosisrate skaber G2-blokade, hvor celler er ekstra radiosensitive pga. det fordoblede DNA-indhold. (Hall 2000).

### 2.3.5 DOSISFRAKTIONERING

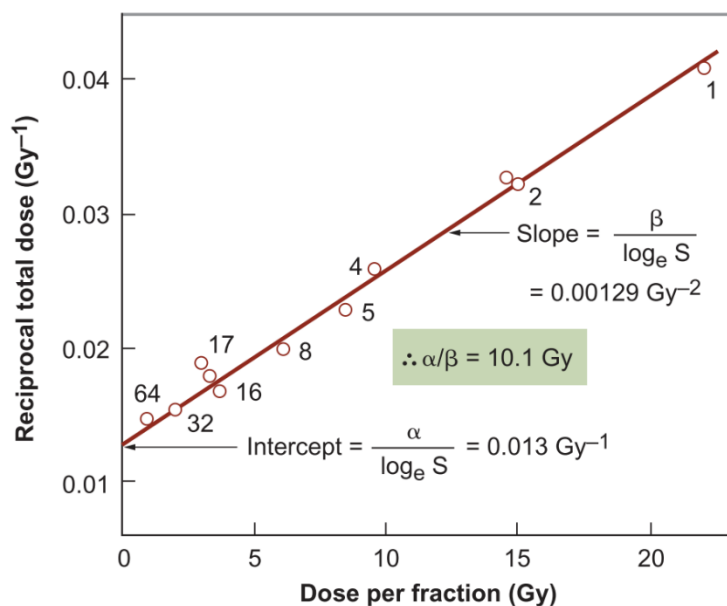
Fraktioneringseksperimenter kan bruges til at finde  $\alpha/\beta$ -ratioen in vitro og in vivo. Den totale dosis  $D$  deles op i  $n$  mindre doser, så den samlede dosis  $D = nd$ . Den fraktionerede LQ-model for overlevelsesfraktionen bliver

$$S(d) = e^{n(\alpha d - \beta d^2)} \quad (2.22)$$

$\alpha/\beta$ -ratioen identificeres ved at plote og lineærtillpasse den inverse af totaldosen  $D = nd$  som er inddelt i  $n$  lige store fraktioneringsdoser  $d$ .

$$\left| \frac{1}{D} \right| (d) = \frac{\alpha}{\ln S} + \frac{\beta}{\ln S} d \quad (2.23)$$

Skæringspunktet med y-aksen,  $(\alpha/\ln S)$  delt på kurvens stigningstal,  $(\beta/\ln S)$  giver således at  $\alpha/\beta$ -ratioen kan findes eksperimentelt. Figur 2.20 illustrerer en sådan bestemmelse af  $\alpha/\beta$ -ratioen ud fra eksperimentelle data og lineærtilpasning.



Figur 2.20: Lineærtilpasning af observerede overlevelsestal plottet i overensstemmelse med ligning (2.23) for at bestemme  $\alpha/\beta$ -ratioen og dermed vævstypen. (Hall og Giaccia 2012).

### 2.3.6 HRS OG IRR

I tidligere studier har man opdaget, at LQ-modellen ikke stemmer overens med målte overlevelsesfraktioner i lavdosisområdet mellem 0 til 1 Gy. For meget lave doser er celledøden større end forventet. Dette kan betyde at cellerne ikke arresteres i et G2-checkpunkt efter bestråling. Det blev opdaget i 2002, at der er to forskellige mekanismer for G2-arrest. Tidligere var det såkaldte Sinclair-checkpunkt kendt. Det er dosis-afhængigt og bliver først aktiveret nogle timer efter bestråling. Det betyder, at de celler som er i G2 under bestrålingen ikke når at blive arresteret før de går i mitose. Det nyopdagede såkaldt tidlige G2-checkpunkt aktiveres i løbet af minutter efter bestråling af ATM, men kun efter en vis tærskelmængde af ATM er aktiveret. Den gældende teori for HRS er at det tidlige G2-checkpunkt ikke aktiveres af stråling under 0.4 Gy gammastråling (B. Xu m.fl. 2002). Det medfører, at cellerne som er bestrålet i G2 forsætter til mitose uden at få tid til at reparere skaderne, hvilket fører til at de går i apoptose. Fænomenet kaldes for **lav-dosis-hypersensitivitet (HRS)** (*hyper-radiosensitivity*), en respons (eller mangel på respons) som findes i mange etablerede menneskelige cellelinjer og som aktiveres ved røntgendoser under 0.2 Gy og ved gammadoser under 0.3 Gy (N. J. Edin m.fl. 2012; 2013).

Doser over denne tærskelværdi,  $D_c = 0.2$  Gy for røntgen og  $D_c = 0.3$  Gy for gamma, aktiverer derimod tilstrækkelig ATM og fører til G2-arrest med Sinclair-mekanismen. I G2-

arrest får cellen tid til at reparere sit beskadigede DNA ved homolog rekombination, hvilket medfører en forøget overlevelsesrate i dosisområdet over tærskelværdien. Denne effekt kaldes **forøget resistens (IRR)** (*increased radioresistance*). Se Tabel 2.2.

Tabel 2.2:

Opsummering af responser i HRS- og IRR-regionerne ved effekt-doser med røntgenstråling.

Region	Dosis	Respons	Konsekvens
HRS	0 – 0.2 Gy	ingen arrest	Celler går i mitose med DNA-skade => apoptose
IRR	0.2 – 1 Gy	G2-arrest	DNA får tid til at repareres i G2-arrest

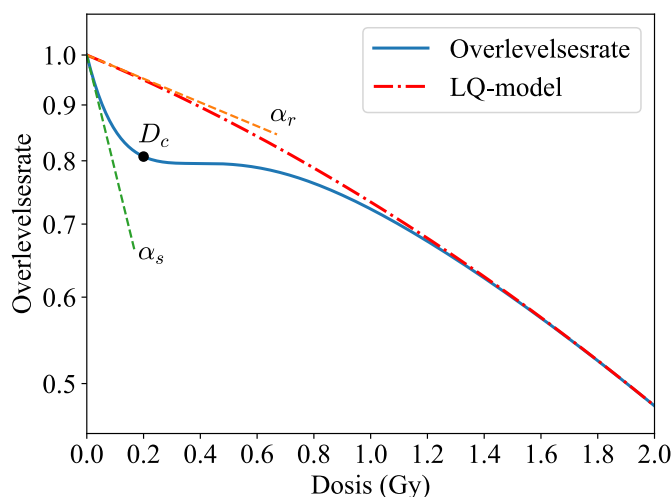
Fordi det lineære bidrag til kurven er dominerende for lave doser, korrigeres LQ-modellen med et nyt udtryk for lineær-leddet  $\alpha$ , som gør det dosis-afhængigt.

$$\alpha = \alpha_r \left( 1 + \left[ \frac{\alpha_s}{\alpha_r} - 1 \right] e^{-D/D_c} \right) \quad (2.24)$$

Her er  $\alpha_s$  hældningen på kurvens tangent i starten af HRS-regionen,  $\alpha_r$  er hældningen ifølge LQ-modellen, og  $D_c$  er dosen i overgangspunktet, hvor responsen er skiftet fra HRS til IRR i 63% af cellerne. Den fuldstændige ligning for overlevelsesraten bliver dermed

$$S(D) = e^{-\alpha_r \left( 1 + \left[ \frac{\alpha_s}{\alpha_r} - 1 \right] e^{-D/D_c} \right) D - \beta D^2} \quad (2.25)$$

Figur 2.21 viser en skitse af en overlevelseskurve med HRS. For doser over end 1 Gy sammenfalder overlevelseskurven med HRS (2.25) med LQ-modellen (2.20).

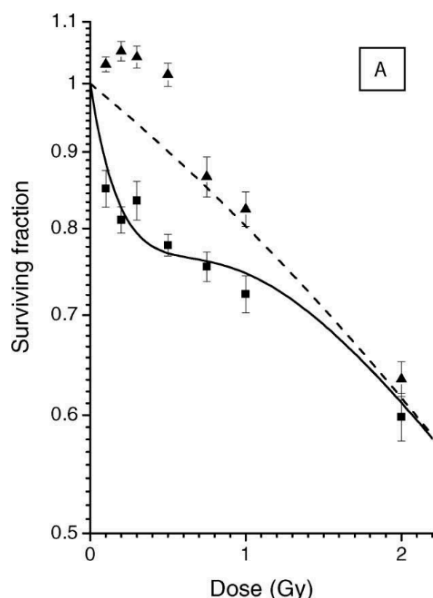


Figur 2.21: Overlevelseskurve med HRS og IRR (blå).  $\alpha_s$  er den lineære hældning i starten af HRS-regionen,  $\alpha_r$  er den lineære hældning på LQ-modellen, og  $D_c$  er defineret som dosen i inflektionspunktet, hvor responsen er skifter fra HRS til IRR i 63% af cellerne.

### 2.3.7 LDR-PRIMING OG TGF- $\beta$ 3

Tidligere studier har vist, at HRS kan fjernes ved at give cellerne en lille forbe-stråling, en såkaldt *priming-dosis* på 0.3 Gy. Hvis priming-dosen gives med en høj dosisrate (HDR),

genvinder cellerne HRS efter 12 til 24 timer. Hvis priming-dosen i stedet gives med en lav dosisrate (LDR), f.eks. 0.3 Gy/time, fjernes HRS permanent (N. J. Edin, Olsen, m.fl. 2009).



Figur 2.22: Overlevelsesrate for uprimede (firkanter) og LDR-primede (0.3 Gy/time, trekanter) T-47D-celler efter effektdosis med en Co60-kilde. HRS-responsen vises tydeligt i de uprimede celler og fjernes helt i de primede celler, som oveni købet har et oversving i HRS-regionen, altså over 100% overlevelse. (N. J. Edin, Olsen, m.fl. 2009).

Det blev vist at cellemedium fra LDR-primede celler midlertidigt fjernede HRS-responsen når det blev tilsat til uprimede celler. Ved at tilsætte LDR-primet konditioneret cellemedium (primet uden celler tilstede) til uprimede celler kunne HRS også midlertidigt fjernes, men kun når serum var tilstede i cellemediet under konditioneringen (N. J. Edin, Sandvik, m.fl. 2009). Ud fra dette blev det konkluderet, at der er to faktorer involveret: en i medium, som udskilles af cellerne og som aktiveres ved LDR-priming og en i serum, som proaktiverer den første faktor.

Vækstfaktoren, som udskilles af cellerne, som aktiveres af LDR-priming og som tyder på at være ansvarlig for at fjerne HRS-mekanismen, blev vist at være *transforming growth factor  $\beta$ 3*, eller TGF- $\beta$ 3 (N. J. Edin m.fl. 2014).

Tilsætning af **TGF- $\beta$ 3-neutralisator**, både under priming og når medium overføres til uprimede celler, modvirkede HRS-fjernelsen, mens direkte tilsætning af TGF- $\beta$ 3 til T-47D- og T-98G-celler kun fjernede HRS-responsen midlertidigt (N. J. Edin m.fl. 2014).

TGF- $\beta$ 3 er en vækstfaktor, som syntetiseres som en proprotein-homodimer med en masse på 75 kDa bundet kovalent til *latency associated peptide-3 (LAP3)*. Aktivering af TGF- $\beta$ 3 sker ved, at furin-agtig pro-protein-konvertase først omdanner det kovalente bånd mellem TGF- $\beta$ 3 og LAP3 til et hydrogenbånd (proaktivering), som derefter kan nedbrydes helt vha. sure eller basiske miljøer, varme, eller ioniserende stråling (Annes, Munger, og Rifkin 2003; Brownh m.fl. 1990; Ehrhart m.fl. 1997). Aktiv TGF- $\beta$ 3 optræder som dimere, dvs. bundet to og to,



som kan binde sig til specielle receptorer på cellemembranen og påvirke både den bestrålede celle men også andre celler igennem en såkaldt bystander-effekt.

Bystander-effekten er defineret som induktion af biologiske effekter i celler som ikke er direkte bestrålet, men som enten har direkte forbindelse til den bestrålede celle gennem kanaler i cellemembranerne eller som eksponeres for signalmolekyler, som udskilles fra den bestrålede celle til cellemediet.

En faktor, interleukin-13, må være til stede for at kunne aktivere TGF- $\beta$ 3. Hvis IL-13 tilsættes i cellemediet, behøver serum ikke være til stede under konditioneringen. Hvis IL-13/receptoren IL-13R2 inhiberes, hjælper det ikke at tilsætte serum. Dermed må IL-13 være serumfaktoren som muliggør aktiveringen af TGF- $\beta$ 3 og videre fjernelsen af HRS-responsen i cellerne. IL-13 inducerer en furin-agtig pro-protein-konvertase og samtidig opregulerer den *inducible nitric oxide synthase* (iNOS). IL-13 proaktiverer altså både TGF- $\beta$ 3—LAP3-komplekset og fremmer videre aktivering, hvilket gør effekten af IL-13 tosidig (Nina F. Jeppesen Edin 2014).

Det at LDR-priming, men ikke HDR-priming, fjerner HRS permanent, har vist sig at hænge sammen med nitrogenmonoxid(NO)-produktion gennem iNOS-aktivering. iNOS producerer nitrogenmonoxid, et frit radikal og signalmolekyle som blandt andet spiller en rolle i induktion af cytotoxiske bystander-effekter (Gow m.fl. 2010; Chunlin Shao, Prise, og Folkard 2008; C. Shao, Folkard, og Prise 2008), adaptiv respons (Matsumoto, Takahashi, og Ohnishi 2007) og bystander-adaptiv respons (Matsumoto, Takahashi, og Ohnishi 2004; Shankar, Pandey, og Sainis 2006; Matsumoto m.fl. 2001). Frie radikaler kendetegnes ved at have et uparret valenselektron, hvilket gør dem i stand til at ionisere molekyler i deres nærmiljø, fordi de stjæler elektroner fra dem.

Hvis NO tilsættes i form af en kemisk NO-donor (DEANO), får HDR-priming samme permanente effekt som LDR-priming. Tilsvarende, hvis iNOS inhibitor 1400W tilsættes før LDR-priming, forsvinder den permanente effekt af LDR-primingen. Når NO møder et superoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ), et anion og ekstremt reaktivt frit radikal, kan der dannes peroxinitrit ( $ONOO^-$ ).

En hypotese er, at  $ONOO^-$  binder sig kovalent med LAP3 og derved ”stjæler” LAP3 fra at kunne reassociere med TGF- $\beta$ 3 (N. J. Edin m.fl. 2013). Både HDR- og LDR-stråling bryder hydrogenbindingen mellem TGF- $\beta$ 3 og LAP3, men LDR-strålingen aktiverer også iNOS, som fører til at LAP3 bindes op og forhindres i at inaktivere TGF- $\beta$ 3 igen.

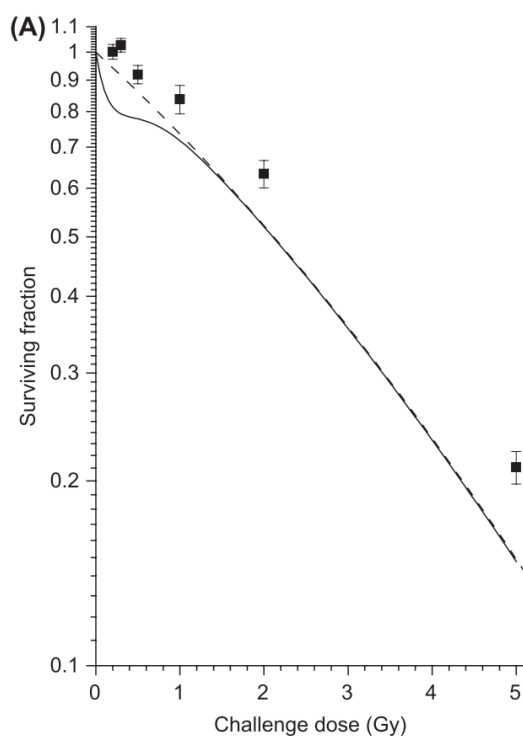
Opsummeret:

$\text{TGF-}\beta\text{3} \text{---LAP3} + \text{furin} \Rightarrow \text{TGF-}\beta\text{3} \cdots \text{LAP3}$

$\text{TGF-}\beta\text{3} \cdots \text{LAP3} + \text{priming (HDR og LDR)} \Leftrightarrow \text{TGF-}\beta\text{3} + \text{LAP3}$

$\text{ONOO}^- + \text{LAP3} + \text{TGF-}\beta\text{3} \Rightarrow \text{ONOO}^- \text{---LAP3} + \text{TGF-}\beta\text{3}$

Det er stadig uklart, hvordan TGF- $\beta$ 3 virker, når den har bundet sig til receptoren på cellemembranen. En teori har været at TGF- $\beta$ 3 aktiverer det tidlige G2-checkpunkt og dermed fjerner HRS, men det har vist sig at TGF- $\beta$ 3 også kan fjerne HRS-responsen, når det tilsættes op til 48 timer efter testbestrålingen (upublicerede data, Edin). Dette tyder på at der ligger en anden mekanisme bag. I de fleste celleforsøg har man set at både LDR-priming og direkte tilsætning af TGF- $\beta$ 3 har fået overlevelsesprocenten til at overstige 100% i lav-dosisområdet. En anden hypotese er derfor, at TGF- $\beta$ 3 egentlig ikke fjerner HRS men i stedet bringer celler ud af senescens / quiescens, altså G0 (Nina F. Jeppesen Edin 2014). Se Figur 2.23.



Figur 2.23: Effekten af TGF- $\beta$ 3 på overlevelsesraten i T-47D-celler hvor effektdosen er givet med en doserate på 30 Gy/time (8.34 mGy/s). Cellerne er givet 0.01 ng/ml TGF- $\beta$ 3 rekombinant. HRS-responsen er fjernet men cellerne har også forøget overlevelsesrate for højere doser end HRS-regionen. (N. J. Edin m.fl. 2014, redigeret).

#### DYREFORSØG

Forsøg med helkrops-bestrålede mus hvor musene blev bestrålet med 0.3 Gy/t eller 0.03 Gy/t i en time viste i begge tilfælde at HRS-responsen kan fjernes i celler ved at overføre serum fra de LDR-primede mus. Serum fra ubestrålede mus havde ingen effekt. Hvis man tilsatte TGF- $\beta$ 3-neutralisator samtidig med serum fra de LDR-bestrålede mus, påvirkede det ikke

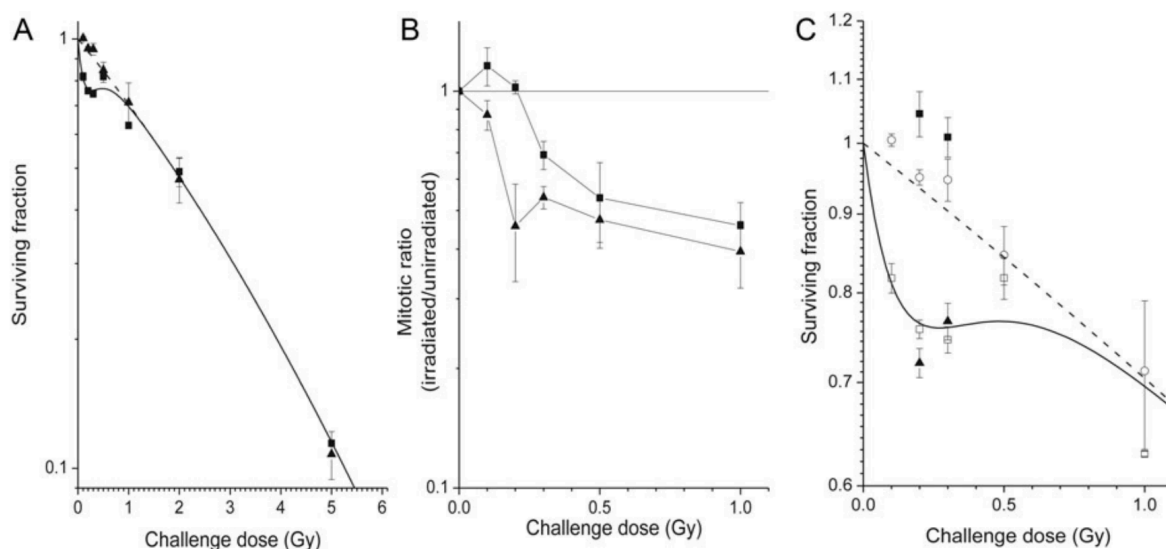
cellernes HRS-respons. Hvis musene blev behandlet med iNOS-inhibitor 1400W efter LDR-bestrålingen forsvandt effekten, hvilket indikerer, at musene får aktiveret TGF- $\beta$ 3 i blodet af LDR-priming (Nina F. Jeppesen Edin 2014). Overraskende viste det sig, at de LDR-primede mus udviklede en beskyttelse mod en senere ellers dødelig stråledosis på omkring 10 Gy (Nina Frederike Jeppesen Edin m.fl. 2016). Overraskende viste det sig at musenes overlevelsesrate også blev højere når musene blev injiceret intraperitonealt med rekombinant TGF- $\beta$ 3 24 timer efter den letale effektdosis på 10.5 Gy (Edin, upublicerede data).

TGF- $\beta$ 3 er påvist at beskytte gastrointestinale stamceller hos mus mod store stråledoser (12 til 16 Gy) (Potten, Booth, og Haley 1997). Det modvirker fibrose, dvs. arvævsdannelse, og har været testet under navnet avotermin i flere medicinske sammenhænge som involverer et ønske om at minimere fibrose, bl.a. plastickirurgi (H. Xu og Fan 2020; Occleston m.fl. 2011; Young, Bush, og O’Kane 2009). Efter fase 2 studier har man dog opgivet at bruge TGF- $\beta$ 3 indenfor plastickirurgi.

### 2.3.8 MITOTISK INDEKS OG LDR-PRIMING

Det mitotiske indeks defineres som forholdet mellem antallet af mitotiske celler i en population og det totale antal af celler og er et mål på proliferation i en cellepopulation. Det absolutte mitotiske indeks findes ved at ”tælle” antallet af mitotiske celler i en population og dele på antallet af mitoser i en kontrolpopulation. For bestrålede prøver findes et relativt mitotisk indeks for hvor bestrålede prøvers absolutte mitotiske indeks normaliseres på den mitotiske indeks i en ubestrålet kontrolprøve.

Ved at finde det mitotiske indeks kan vi få information om effekten af bestråling af primede og uprimede celler som bestråles i HRS-regionen. Forventningen er, at celler i G2 som er bestrålet i HRS-regionen vil gå i mitose som om de ikke havde fået bestråling og dermed gå i apoptose jf. Tabel 2.2. Dermed vil det mitotiske indeks ikke forandre sig meget før effektbestrålingen overstiger  $D_c$ . Hvis HRS-responsen fjernes ved LDR-priming vil det mitotiske indeks aftage som funktion af dosis selv i HRS-regionen, se Figur 2.24 (N. J. Edin m.fl. 2013).



Figur 2.24: Tidligere publicerede resultater af forsøg med primede og uprimede T-98G-celler. A: Overlevelseskurve med HRS (uprimede celler, 'lukkede trekant'er') og overlevelseskurve som følger LQ-modellen (LDR-primede celler, 'lukkede firkant'er'). B: Mitotisk indeks for LDR-primede og uprimede celler (samme symboler som A). Det tidlige G2-kontrolpunkt aktiveres for doser under HRS-tærsklen ( $D_c$ ) for primede celler, hvilket forklarer dykket i antal mitoser allerede fra 0.1 Gy. C: Overlevelseskurver zoomet ind på HRS-regionen så man ser oversvinget i overlevelsesrate for LDR-primede celler. Oversvinget kan ikke forklares af det tidlige G2-kontrolpunkt. De åbne firkant'er er kontrol-T-98G-celler og de åbne cirkler er HDR-primet og tjener som reference. (N. J. Edin m.fl. 2013, redigeret).

## 2.4 FLOWCYTOMETRI

I flowcytometri måles enkeltcellers fysiske og/eller cytochemiske egenskaber ved enkeltvis at lade dem passere forbi en laser og måle det spredte lys med optiske sensorer. Lyset spredes både fremad ved *forward scatter* (FSC), eller ortogonalt ved *side scatter* (SSC). Det fremadspredte lys giver information om cellens størrelse, mens det sidespredte lys giver information om cellens struktur og kompleksitet.

Ved at anvende fluoroforer som binder sig til forskellige celleelementer og emitterer lys ved forskellige bølgelængder (dvs. farver), kan man for eksempel isolere celler med forskelligt DNA-indhold eller måle forekomsten af specielle molekyler som i sin tur giver information om cellecyklusstatus eller andre specificiteter. Fluoroforen sidder typisk på et sekundærtantistof, som bindes til et primærtantistof, efter primærtantistoffet først har bundet sig til det ønskede protein i cellen. For at minimere uspecifikke bindinger af antistofferne bruges en såkaldt antistofblokker som f.eks. BSA, tømme eller EDTA. Disse blokkere kan okkupere de uønskede proteiner før antistoffet introduceres. Alternativt kan et konjugeret antistof anvendes. Konjugeret antistof skabes ved at fastgøre, dvs. konjugere en fluorofor

direkte til et primærantistof, således at det ikke længere er nødvendigt at bruge et sekundærantistof.

Med flowcytometri er det muligt at skelne mellem cellepopulationer med forskellige egenskaber eller i forskellige cellecyklusfaser ved for eksempel at mærke cellerne med markører for bl.a. mitose, proliferation eller DNA.

Flowcytometeret bruger dikroiske filtre til at adskille det sidespredte signal i forskellige bølgelængder, og kan således måle mere end én fluorofor samtidig.

#### 2.4.1 GATING

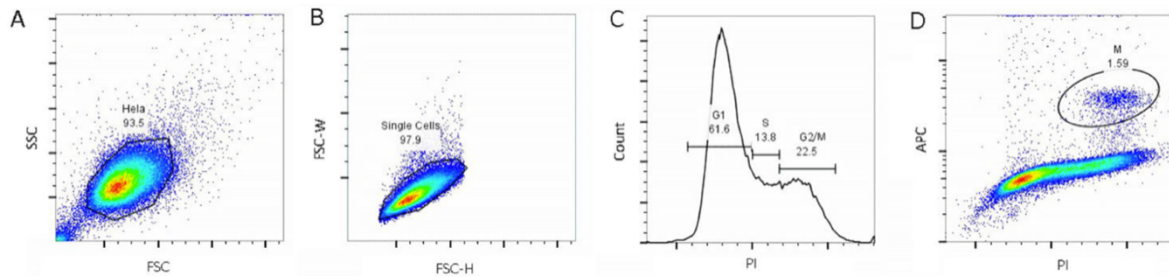
Når cellerne har kørt igennem flowcytometerets gennemlysningssproces er det første som må gøres, at isolere og fjerne signaler fra debris (stumper og smådele), dubletter (celleklumper) og andet uinteressant som måtte befinde sig i celleprøven. Til dette plottes SSC-A mod FSC-A og FSC-A mod FSC-H<sup>2</sup>. I et plot hvor arealet af signalet plottes mod højden af signalet ligger signalet fra de sfæriske celler på diagonalen. Celler, som ikke er sfæriske, er sandsynligvis dubletter eller klumper som er vanskelige at analysere og som derfor gates fra. Meget små signaler kommer sandsynligvis fra debris og bør sorteres fra.

Med SSC-areal mod FSC-areal får vi i grove træk et indblik i hvilket celler i prøven som er små og simple (nedre venstre), små og komplekse (nedre højre), store og simple (øvre venstre), eller store og komplekse (øvre højre). Signaler som er for små og simple eller for store og komplekse sorteres bort siden disse sandsynligvis er hhv. debris og dubletter.

De analyserbare signaler vises i plot fra flowcytometerets fire kanaler som er indstillet til at fange hver sin bølgelængde lys. Lyset forstærkes ved farvningen med de forskellige fluoroforer som er bundet til sekundærantistofferne. I plot over hændelserne i flowcytometeret selekteres forskellige populationer ved gating, f.eks. for at tælle hvor mange celler som findes i hver population. En gating-strategi for at fjerne debris, klumper og dubletter, og adskille prøvens indhold af forskellige cellecyklusfaser vises i Figur 2.25.

---

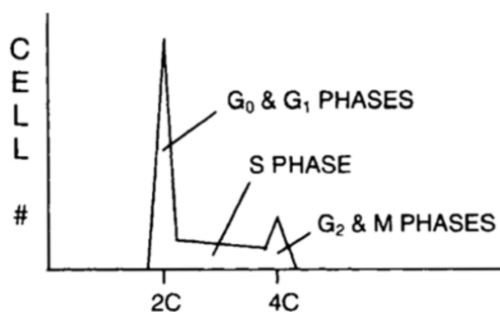
<sup>2</sup> A står for *area* (areal) og giver et mål for signalets størrelse. H står for *height* (højde) og giver et mål for signalets facon og cellens (eller klumpens) kompleksitet.



Figur 2.25: A: Diskrimination af debris ved FSC – SSC. B: Dubletdiskrimination ved FSC-W – FSC-H. C: Identifikation af G1, S, G2/M ved PI. D: Identifikation af M-fase ved anti-phospho-histone H3. (Shen, Vignali, og Wang 2016).

## 2.4.2 DNA-MARKØR PI

Ved at mærke cellernes DNA med PI, som binder sig til DNA og fluorescerer, kan flowcytometri bruges til at identificere, hvor mange celler i en population som er i hvert fase af cellecyklus, fordi DNA-mængden er fordoblet i G2 i forhold til G1. Figur 2.26 viser en tegning af et typisk DNA-histogram. I G1 beskrives DNA-indholdet som ”diploid” eller 2C, dvs. mængden af DNA indeholdt i de to sæt af kromosomer som er til stede før DNA-replikation begynder. I S-fase forøges DNA-indholdet til ”tetraploid”, eller 4C og forbliver 4C igennem G2- og M-fase (Shapiro 2003).



Figur 2.26: Cellecyklusfaser defineret ud fra DNA-indhold. I G2 og M er DNA-indholdet dobbelt så stort som i G1 fordi det syntetiseres og fordobler sig i løbet af S. Diagrammet fortæller ikke hvor stor andel er i G2 i forhold til M. For at vide dette kan man bruge en mitosemarkør. (Shapiro 2003).

DNA-fluoroforen propidiumiodid (PI) er en fluorescent interkalaterende agent som kan indsættes i DNA og exciteres af bølglængder mellem 325 og 568 nm, og emitterer lys med bølglængder omkring 610 nm (Shapiro 2003).

## 2.4.3 PROLIFERATIONSMARKØR KI-67

Siden DNA-indholdet er 2C i både G0-celler og G1-celler kan antistoffet KI-67 bruges til at bestemme andelen af G0-celler i en population. KI-67 opsporer et antigen som kun udtrykkes i prolifererende celler (Gerdes m.fl. 1984). Derfor kan KI-67 bruges til at markere prolifererende celler, så de træder tydeligt frem som en særskilt population i flowcytometri. Information om G1/G0-forholdet findes ved at sætte en gate omkring 2C-peaket i DNA-plottet i Figur 2.26 og så se på de to populationer. Populationen med mindst KI-67 vil være G0-populationen.

#### 2.4.4 DYLIGHT

DyLight er en generel fluorofor, som kan bruges til intern kalibrering af flowcytometeret ved at tilsætte DyLight-farvede kontrolceller til en celleprøve som internstandard. Blandingen farves så med de relevante antistoffer. Efter prøverne er kørt i flowcytometeret, kan cellepopulationer med forskelligt DyLight-signal skilles og man kan aflæse signalet fra testprøven relativt til kontrolcellerne.

#### 2.4.5 MITOSEMARKØR ANTI-PHOSPHO-HISTONE H3 (ANTI- $\gamma$ H3)

DNA er viklet rundt om nukleosomer som perler på en snor. Hvert nukleosom er en histone-oktamer som består af otte histoner, der sidder sammen som to heterodimere H2A-H2B, og en tetradimer (H3-H4)<sub>2</sub>. Histonerne har haler som kan acetyleres, metyleres og fosforyleres. I særdeleshed fosforyleres H3-halen ved aminosyren serine10 som en uundgåelig del af mitosen.

Anti-phospho-histone H3 er et antistof som søger til, og finder histone H3 i menneskekromatin, kun når H3 er fosforyleret ved serine10. Derfor bruges anti-phospho-histone H3 som mitosemarkør, som ved flowcytometri lader os tælle hvor stor andel af en population som er i mitose og hvor stor en andel som ikke er det. Dette kaldes for det mitotiske indeks (se sektion 2.3.8).

Ved at farve med anti-phospho-histone H3 kan der findes indikationer på induktion af det tidlige G2-tjekpunkt i respons til doser i HRS-regionen for de primede celler siden HRS-proficiente celler ikke bliver arresteret i G2 ved doser i HRS-regionen og derfor går i mitose med skader (N. J. Edin, Olsen, m.fl. 2009).

### 2.5 MÅLINGER OG USIKKERHEDER

Afsnittet er baseret på (Squires 2001).

#### 2.5.1 NORMALFORDELING

I et målingssæt hvor de individuelle målinger  $x_1, x_2, \dots, x_m$  varierer pga tilfældige fejl, vil målingerne hovedsagligt samle sig rundt om gennemsnittet  $\bar{x}$ .

Gennemsnittet af målingerne defineres

$$\bar{x} = \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m x_i \quad (2.26)$$

Den sande værdi,  $X$ , kan vi ikke vide hvad er, men vi kan gøre beregninger for at se hvor tæt  $\bar{x}$  sandsynligvis ligger på  $X$ . Jo tættere målingerne ligger på den sande værdi, jo mindre bliver fejlen ved  $\bar{x}$ .

Centralgrænseteoremet siger at hvis vi har en population med gennemsnit  $\bar{x}$  og standardafvigelse  $\sigma$  og tager et tilstrækkeligt stort antal tilfældige prøver med tilbagelægning, så vil distributionen af prøvegennemsnit være tilnærmet normalfordelte, dvs. Gauss-fordelte. Gennemsnittet vil ligge på toppen af normalkurven.

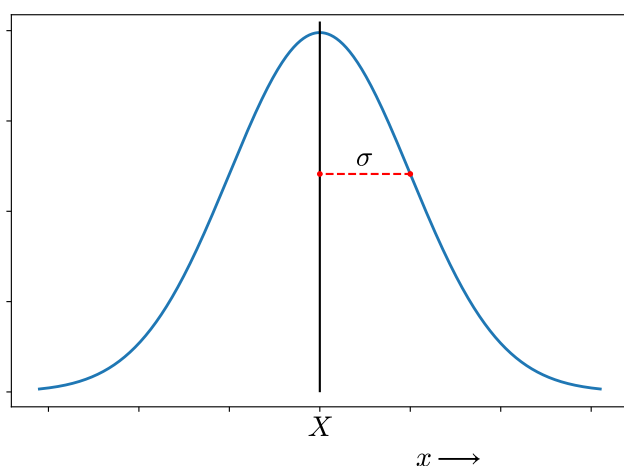
I et histogram af et stort antal målinger af den samme dosis vil omridset af en normalfordeling, eller Gaussisk distribution, træde frem. Normalkurven bliver mere og mere glat jo større målingsudvalget er. En Gaussisk fordeling har formen

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \frac{1}{\sigma} e^{-(x-X)^2/2\sigma^2} \quad (2.27)$$

hvor  $X$  er den sande værdi,  $\sigma^2$  er variansen, som fortæller hvor langt den enkelte måling ligger fra gennemsnittet, og  $\sigma$  er standardafvigelsen (herunder benævnt SD).

Grafisk findes standardafvigelsen der, hvor kurven ændrer sig fra konkav til konveks, dvs. i infleksionspunktet. Siden variansen ikke repræsenteres grafisk på normalkurven, men er et udtryk for hvor langt individuelle målinger varierer fra gennemsnittet i et målingssæt, kan standardafvigelsen findes i et hvilket som helst målingssæt (selvom de har langt for få målinger til at danne omridset af en normalfordeling) ved at tage kvadratroden af variansen. Det er sådan standardafvigelsen findes når vi har eksempelvis fem eller ti målinger.

Et eksempel på en Gaussisk distribution, eller normalfordeling vises i Figur 2.27.



*Figur 2.27: Den Gaussiske distributionsfunktion. Infleksionspunkterne findes ved  $x \pm \sigma$ , hvor  $\sigma$  er standardafvigelsen. Integralet af kurven er lig 1 fordi alle målingerne ligger under grafen.*



Standardafvigelse er et mål for spredningen i observationer, og er defineret som kvadratroden af variansen.

$$SD = \left[ \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m (x_i - \bar{x})^2 \right]^{1/2} \quad (2.28)$$

hvor  $\bar{x}$  er det aritmetiske gennemsnit, dvs. middelværdien, og  $(x_i - \bar{x})$  er residualen i den  $i$ 'ende måling<sup>3</sup>.

Hvis vi har  $n$  målingssæt som hver især indeholder  $m$  målinger, kan vi udregne det totale gennemsnit (distributionsgennemsnittet) i hvert punkt på to måder, som begge giver samme resultat.

1. Tage gennemsnittet af samtlige punktmålinger:  $\langle x \rangle = \frac{1}{n \cdot m} \sum_{i=1}^{n \cdot m} x_i$
2. Tage gennemsnittet af gennemsnittene fra hvert sæt:  $\langle x \rangle = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \bar{x}_j$ ,

hvor  $\bar{x}_j = \left( \frac{1}{m} \sum_{i=1}^m x_i \right)_j$  er punktets gennemsnittet i hvert sæt af de  $n$  sæt målinger og  $\langle x \rangle$  repræsenterer distributionsgennemsnittet og vores bedste bud på den sande værdi<sup>4</sup>.

Ligeledes kan standardafviget findes for alle  $n \cdot m$  målinger eller for de  $n$  gennemsnit, men disse to giver ikke samme resultat.

1. Standardafvigelsen til alle  $n \cdot m$  punktmålinger:  $SD(x) = \left[ \frac{1}{n \cdot m} \sum_{i=1}^{n \cdot m} (x_i - \langle x \rangle)^2 \right]^{1/2}$
2. Standardafvigelsen til gennemsnittet fra  $n$  forsøg:  $SD(\bar{x}) = \left[ \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n (\bar{x}_j - \langle x \rangle)^2 \right]^{1/2}$

Standardfejlen SE kan derefter udregnes som hele målingssættets standardafvigelse delt på kvadratroden af det totale antal målinger i alle forsøg.

$$SE(x_i) = \frac{SD(x_i)}{\sqrt{n \cdot m}} = \left[ \sum_{i=1}^{n \cdot m} (x_i - \langle x \rangle)^2 \right]^{1/2} \quad (2.29)$$

hvor  $x_i$  er selve målingen og  $n \cdot m$  er det totale antal målinger, dvs. antal forsøg gange antal målinger pr. forsøg.

---

<sup>3</sup> I et sæt målinger med gennemsnitsværdi  $\bar{x}$  bør ca. to tredjedele af målingerne ligge indenfor  $\bar{x} \pm SD$ .

<sup>4</sup> Her lader vi  $i \in [1, m]$  repræsentere indekset i målingssættet og  $j \in [1, n]$  repræsentere indekset i forsøgene. Altså vi har  $n$  forsøg med  $m$  målinger pr. forsøg.

Ligeledes kan gennemsnittets standardfejl, eller *standard error of the mean* SEM udregnes som standardafvigelsen til målingsgennemsnittet delt på kvadratroden af antallet af gennemsnit, dvs. antallet af forsøg.

$$\text{SEM}(\bar{x}_j) = \frac{\text{SD}(\bar{x}_j)}{\sqrt{n}} = \left[ \sum_{j=1}^n (\bar{x}_j - \langle x \rangle)^2 \right]^{1/2} \quad (2.30)$$

hvor  $\bar{x}_j$  er gennemsnitsmålingen i forsøget  $j$ .

SEM siger noget om hvor forskellige forsøgene er i forhold til hinanden.

Ved tilstrækkeligt store målingssæt vil SE og SEM blive mere og mere lig hinanden.

### 2.5.2 TILFÆLDIGE OG SYSTEMATISKE FEJL

Tilfældige fejl er et udtryk for en type fejl skyldes usikkerheder i udstyret eller andre tilfældigheder der ikke kan reproduceres. Tilfældige fejl håndteres ved at estimere usikkerheden ved at tage det lineære produkt eller sum af udstyrets usikkerheder og standardafvigelsen eller SEM.

Hvis en måling  $x$  er et produkt eller en kvotient af flere forskellige faktorer  $k_i$  som hver har deres egen usikkerhed  $\Delta k_i$  udregnes fejlen  $\Delta x$  ved hjælp af formelen

$$\left(\frac{\Delta x}{x}\right)^2 = \sum_i \left(\frac{\Delta k_i}{k_i}\right)^2 \quad (2.31)$$

Når flere fejllid tilsammen udgør den samlede fejl, adderes fejlene lineært ved

$$(\Delta x)^2 = \sum_i (\Delta k_i)^2 \quad (2.32)$$

Når der er tale om en eksponentiel fejl så fejllid  $k$  er i  $n$ 'te, udregnes fejlen

$$\frac{\Delta x}{x} = n \frac{\Delta k}{k} \quad (2.33)$$

Systematiske fejl er derimod et udtryk for reproducerbare fejl, som sker hver gang en måling tages. De er oftest vanskelige at kvantificere, men hvis de er kendte, kan de korrigeres for i senere udregninger ved at addere eller gange med en konstant.

### 2.5.3 BEREGNING AF USIKKERHEDER I RØNTGENDOSIMETRI

Ved dosimetri af et røntgenrør aflæses strømmen i et ioniseringskammer på et elektrometer når ioniseringskammeret bestråles. Den aflæste værdi  $M_U$  (monitor unit) ganges med en kalibreringsfaktor fra DSA, ved ligning (2.13). Kalibreringsfaktoren er givet med et estimat

af usikkerhed. Den aflæste værdi har også en usikkerhed, og de to usikkerheder må derfor adderes kvadratisk i henhold til ligning (2.31). Fejlen i dosen giver

$$\Delta D = D \left[ \left( \frac{\Delta M_U}{M_U} \right)^2 + \left( \frac{\Delta N_K}{N_K} \right)^2 \right]^{1/2} \quad (2.34)$$

hvor  $N_K$  med usikkerhed er givet Tabel 2.1 og  $\Delta M_U$  er den lineære sum (ligning (2.32)) af målingernes standardafvigelse (eller standardfejl SEM, hvis der er flere målingssæt) og elektrometrets fejlestimeret som sættes til  $\pm 0.02$  nC, altså plus/minus én af den mindste målbare enhed i hver ende

$$\Delta M_U = \left[ \left( \frac{\Delta M_U}{M_U} \right)^2 + \left( \frac{\text{SEM}(\overline{M_U})}{M_U} \right)^2 \right]^{1/2} \quad (2.35)$$

Den samlede usikkerhed i dosen findes ved at addere gennemsnittet af  $\Delta D$  i hvert punkt med den beregnede standardfejl i samme punkt i overensstemmelse med ligning (2.32). Den totale standardfejl i den beregnede dosis kan således findes enten vha. SE ved

$$\Delta D_{SE} = [SE^2 + \langle \Delta D \rangle^2]^{1/2} \quad (2.36)$$

hvor SE er givet i ligning (2.29) og  $\Delta D$  er givet i ligning (2.35). Den kan også estimeres vha. SEM ved

$$\Delta D_{SEM} = [SEM^2 + \langle \Delta D \rangle^2]^{1/2} \quad (2.37)$$

hvor SEM er givet i ligning (2.30) og  $\Delta D$  er givet i ligning (2.35). Da jeg mener SEM giver det mest realistiske estimat af usikkerheden, vil fejlen i dosen blive udregnet ved ligning (2.37).

Dosisraten  $\dot{D} = D/t$  findes ved at dele dosen på den pågældende eksponeringstid, hvor  $D = M_U N_K$ . Fejlen i dosisraten findes således ved

$$\Delta \dot{D} = \dot{D} \left[ \left( \frac{\Delta D_{SEM}}{D} \right)^2 + \left( \frac{\Delta t}{t} \right)^2 \right]^{1/2} \quad (2.38)$$

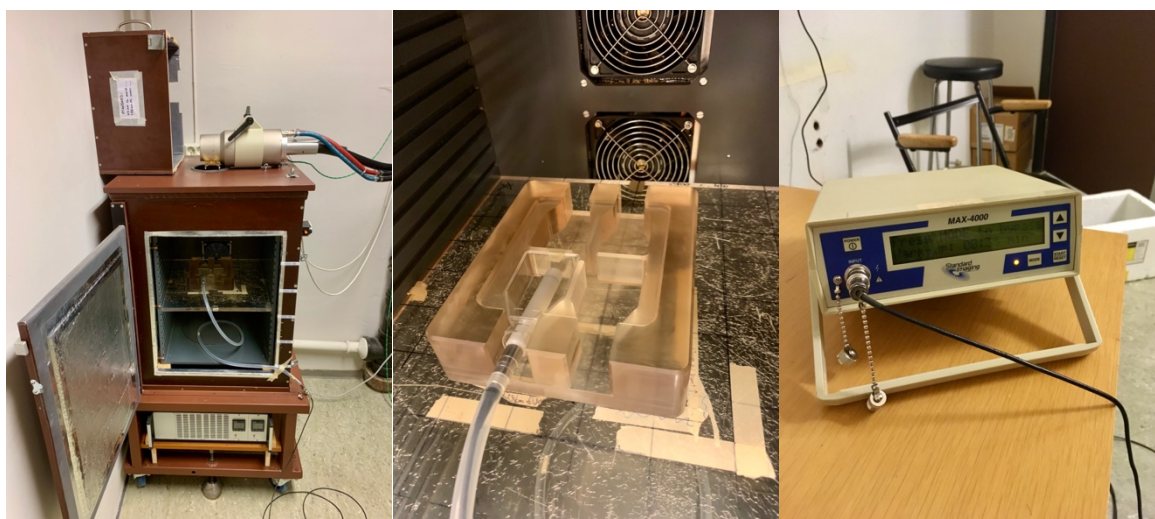
hvor  $t$  er eksponeringstiden og  $\Delta t$  er fejlestimatet i eksponeringstiden

### 3 EKSPERIMENTELT

Afsnittet Eksperimentelt tilsigter at beskrive forsøgene som de faktisk har fundet sted, hvilket udstyr som er brugt samt forklare metoderne som er brugt i analysen.

#### 3.1 RØNTGENDOSIMETRI

For at gøre røntgenstrålingen hårdere blev der indsat ekstra filtre på 1.52 mm Al og 2.60 mm Cu. Opstillingen er tidligere kalibreret for 1.52 mm Al og 0.7 mm Cu. Filtrering fjerner de lavenergetiske fotoner fra røntgenstrålen, dette kan kaldes strålehærdning (eng: *beamhardening*). Den ekstra filtrering, og for at sikre feltet er homogent nok til at celleflaskebeholderens fire kamre får den samme dosis indenfor én standardafvigelse, gør det nødvendigt at udføre ny dosimetri og karakterisere strålefeltet på ny. Figur 3.1 viser opstillingen for røntgendosimetri og Tabel 3.1 viser hvilket udstyr som blev brugt ifm. dosimetri og hvilke usikkerheder som er forbundet med dette udstyr.



Figur 3.1: Venstre: Røntgenrør og eksponeringskammer. Midten: Celleflaskebeholder med ioniseringskammer indsat i en T25-celleflaske. Elektrometer som måler strømmen og ladningen som opstår i ioniseringskammeret ved bestråling. Celleflaskebeholderens fire kamre bør modtage den samme dosis indenfor én standardafvigelse.

### 3.1.1 UDSTYR I RØNTGENDOSIMETRI

Tabel 3.1:

Udstyr som blev brugt i røntgendosimetri. Usikkerheder og specifikationer er fundet i brugermanualerne og/eller kalibreringsbevis fra DSA (tidl. Statens Strålevern).

Udstyr	Mærke / Model	Indstillinger	Usikkerheder / specifikationer
Røntgensystem	Pantak PMC1000	220 kV, 10 mA. Filtrering: 1.52 mm Al + 2.60 mm Cu.	Spænding: Nominel $\pm 15\%$ Nøjagtighed $< \pm 1\%$ Repeterbarhed $< \pm 0.03\%$ Strøm: Nøjagtighed $< \pm 1\%$ Repeterbarhed $< \pm 3\%$ Eksponeringstimeren har ingen usikkerhed.
Ioniseringskammer	FC65-G; Wellhöfer, Germany	Placeres og fæstnes på perspexpladen i hvert målepunkt, se Figur 3.2.	Kavitetvolumen: $0.65\text{cm}^3$ Kavitetlængde: 23.1mm Kavitetradius: 3.1mm Ydre diameter: $150 \pm 0.2$ mm (målt med skydelære). Kalibreringskoefficient: $43.77 \pm 0.39$ mGy/nC
Elektrometer	MAX4000	Range: High, Bias: 100% - 300VDC (faktisk 302VDC).	Repeterbarhed (kort sigt): $\pm 0.1\%$ Linearitet: $\pm 0.06\%$ Aflæsningsusikkerhed: $\pm 0.02$ nC <sup>1</sup>
Celleflaske	T25	Ioniseringskammer anbringes helt inde i flasken.	Tykkelse af bund inkl. ”ben”: $2.1 \pm 0.2$ mm (målt med skydelære).
Plexiglasbeholder med plads til fire T25-celleflasker		Se Figur 3.3 for nummerering af kamre.	Tykkelse af bund: $1.5 \pm 0.2$ cm (målt med tommestok).

### 3.1.2 STRÅLEFELTKARAKTERISTIK

Strålefeltet blev karakteriseret ved at placere et ioniseringskammer på forskellige punkter i et givet område af eksponeringsplanet i røntgenrørets eksponeringskammer og måle ladningen i

---

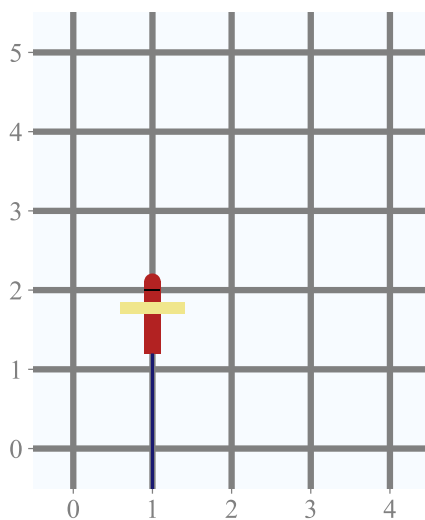
<sup>1</sup> De tekniske usikkerheder fra apparatets datablad er meget små i forhold til den estimerede usikkerhed og antages derfor at være indeholdt i denne usikkerhed som baseres på antagelsen om plus/minus én af den mindste målbare enhed i hver ende.

hvert punkt for eksponeringstider på 12 sekunder på SSD37.5, 13 og 14 sekunder på SSD40 og 20 sekunder på SSD50 . Se Figur 3.2 som indeholder en skitse af opstillingen.

Ladningen i direkte proportional med dosen i hvert punkt og udregnes ved ligning (2.13) med konstanterne givet i Tabel 2.2. Målingerne blev skrevet ind i en matrice og plottet og interpoleret med matplotlib i Python, hvor standardafvigelse, SEM og totalfejl inkl. udstyrsusikkerheder også blev udregnet og plottet.

For at få et mål for røntgenrørets stabilitet over tid blev forsøget gjort tre gange.

Se Figur 3.2 for en skitse af perspexpladen med ioniseringskammeret tapet fast i et punkt.



Figur 3.2: Skitse af målingsområdet af perspexpladen i eksponeringskammeret med ioniseringskammer fastgjort med malertape. For hvert punktmålingssæt blev ioniseringskammeret flyttet et punkt mod højre, hvorefter rækken ovenfor blev påbegyndt. I alt blev dosen målt i 30 punkter.

Forsøget blev udført i tre etaper:

1. Først blev rigtig eksponeringstid fundet ved afprøvning for en dosis på 0.1 Gy til ioniseringskammeret som var placeret helt inde i en T25-celleflaske i hvert af de fire rum i en celleflaskebeholder.
  - a. Celleflaskebeholderen blev flyttet lidt rundt imellem bestrålinger indtil dosen i de fire kamre var så ens som muligt.
  - b. Fem eller ti målinger blev gjort i hvert kammer i celleflaskebeholderen.  
Dosisgennemsnit og standardafvigelse blev udregnet.
2. Da korrekt eksponeringstid var fundet, blev ioniseringskammeret fastgjort med tape i hvert af 30 målepunkter i gitteret på perspexpladen (uden celleflaske og celleflaskebeholder) i røntgenrørets eksponeringskammer og eksponeret fem eller ti gange lige efter hinanden (Se Figur 3.2). Et sæt målinger i samme punkt kaldes senere for en ”målingskohorte”.

3. Punkt 2 blev gentaget op til tre gange i alt, hvor røntgenrøret var slået helt af mellem hver gang for at undersøge røntgenrørets stabilitet mellem eksperimenter ved at udregne standard error of the mean (SEM).

Forsøget blev gjort i forskellige afstande til kilden for at opnå så kort afstand som muligt uden at feltet bliver for inhomogent eller ustabil.

### 3.1.3 PYTHON-KODE

Koden læser en datafil med eksperimentnummer i første kolonne,  $y$ -koordinat og  $x$ -koordinat i gitteret på perspexpladen og målinger i de resterende kollerter.

Fjelleddet  $\Delta D$  udregnes i overensstemmelse med ligning (2.34) og fyldes ind i en array der har samme dimension som målingerne i datafilen.

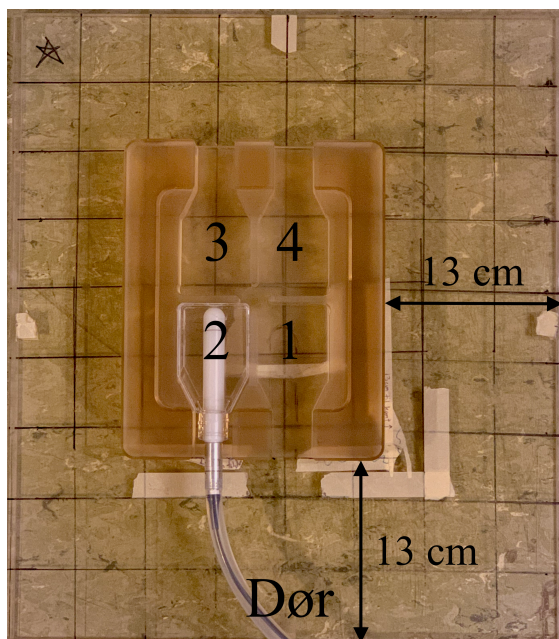
Gennemsnit, SD, totalgennemsnit, SE og SEM udregnes med `numpy.mean()` og `numpy.std()`, fyldes ind i matricer med samme dimension som gitteret på perspexpladen og plottes i en matrice med farveintensiteter som tilsvarende den målte dosis i hvert punkt.

For at se efter systematiske fejl, normaliseres alle enkeltmålinger i forhold til alle målinger i samme målingskohorte, og plottes sammen med gennemsnittet af målinger i samme kohorte.

### 3.1.4 PLACERING AF CELLEFLASKEBEHOLDEREN

Celleflaskebeholderen blev anbragt i den mest homogene del af strålefeltet. Stikprøver blev taget i de fire kamre og placeringen blev justeret indtil tilfredsstillende lighed i dosis imellem de fire kamre var opnået. Da den bedste placering var fundet, blev denne markeret på perspexpladen med tape, 13 cm fra højre kant og 13 cm fra den nedre kant af perspexpladen, dvs. kanten nærmest mod døren til eksponeringskammeret, se Figur 3.3.

Eksponeringstid blev fundet ved afprøvning for 0.1 Gy, 0.2 Gy, 0.3 Gy, 0.5 Gy og 1.0 Gy i SSD50- og SSD40-regionen ved at tage stikprøver med ioniseringskammeret i hvert kammer i celleflaskebeholderen og omregne ved ligning (2.13).



Figur 3.3: Celleflaskebeholder med fire nummererede kamre, T25-celleflaske i kammer 2 med FC65-G-ioniseringskammer.

### 3.1.5 BUILD-UP-TID OG ESTIMAT AF DOSISRATE

For at finde dosisraten blev de målte doser delt på den eksponeringstid som blev fundet ved afprøvning af forskellige eksponeringstider til ioniseringskammeret i de fire kamre celleflaskebeholderen. Pga. røntgenrørets build-up-tid blev dette ikke helt præcist fordi der går nogle sekunder, før røntgenrøret begynder at stråle. For at finde ud af hvor lang build-up-tiden (og om røret stråler i denne) er blev der udført dosimetri for helt ned til 1 sekunds eksponering og op til 13 sekunder.

Ioniseringskammeret blev placeret i en T25-celleflaske og anbragt i celleflaskebeholderens kammer nr. 2, se Figur 3.3, og eksponeret fem gange med så kort pause som muligt mellem hver eksponering for tider mellem 1 sekund og 13 sekunder. Pausen mellem målingsæt blev valgt til 40-60 sekunder for at undersøge om dosen påvirkes af længere pauser mellem bestrålinger. Målingen i nC blev skrevet ned for hver eksponering og maksimumraten i nA blev noteret imens apparatet kørte.

## 3.2 CELLEFORSØG

I arbejde med levende celler foretrækkes et sterilt miljø. Derfor vaskes flader med Virkon (DuPont, USA) og sprøjtes med 70% etanol før og efter forsøg. Før cellerne fikseres behandles de udelukkende i et sikkerhedsskab som har laminar luftstrøm for at undgå kontamination. Sterile sikkerhedshandsker bør anvendes og isolationskasser, som bruges til at transportere celleflasker i, sprittes af med 70% etanol som må få lov at dampe helt af før celleflaskerne placeres i dem. Udstyr og materialer som entrer sikkerhedsskabet sprittes af



først og al berøring af pipetter, centrifugerør og andet bør undgås. Hvis berøring alligevel sker, steriliseres på ny eller nyt udstyr tages i brug. Efter cellerne er fikseret kan arbejdet foregå udenfor sikkerhedsskabet hvis dette er lettere. Ved overførsel af væsker passes på tilbagesprøjt for at undgå kontamination af pipetten, hvis denne bruges flere gange.

Figur 3.4 viser noget af udstyret i et pågående celleforsøg efter cellerne er overført til centrifugerør.



Figur 3.4: Celleforsøg med celleprøver i centrifugerør, isoporkasse med knust is og flaske med PBS og 50 ml-pipette, autopipette, to mikropipetter og vakuumaspirator.

### 3.2.1 VEDLIGEHOLDELSE AF CELLELINJER (T-98G OG T-47D)

T-98G er en cellelinje af humane hjernekræftceller, som har høj proliferationsrate (*population doubling level* (PDL)) (Stein 1979). Kultivering af cellelinjen kræver udsåning hver mandag og fredag og udskiftning af cellemedium hver onsdag. Ved udsåning mandag (tre dages inkubation) beholdes en tiendedel af cellerne og ved udsåning fredag (fire dages inkubation) beholdes en tyvendedel.

T-47D er en cellelinje af humane brystkræftceller, som prolifererer langsommere end T-98G. Ved udsåning mandag beholdes en fjerdedel af cellerne og ved udsåning fredag beholdes en sjattedel.

Cellerne blev kultiveret i 5 ml cellemedium og inkuberet ved 37°C. Ved udsåning aspireredes mediet, og cellerne blev vasket med 2 ml trypsin og derefter inkuberet i 3 til 5 minutter med 3 ml trypsin ved 37°C for at få cellerne til at løsne sig fra flasken. Cellesuspensionen blev tilsat 3 ml 37°C medium og centrifugeret ved 1500 RPM i 3 minutter. Supernatant blev aspireret og cellerne resuspenderet i 2 ml medium, fortyndet til ønsket tæthed og sået ud i en ny flaske med i alt 5 ml medium.

Tabel 3.2:

Væsker som bruges til vedligeholdelse af cellelinjen.

Virkestof	Producent, Land; Katalognr.	Funktion
Cellemedium RPMI 1640 med L-Glutatamine	BioWhittaker, USA; BE17-161E	Giver næring og gode vækstbetingelser for cellerne som inkuberes.
Trypsin EDTA	BioWhittaker, USA; BE12-702F	Opløser cellemembranen og får cellerne til at løsne sig fra bunden af celleflasken.
10X PBS <sup>2</sup>	BioWhittaker, USA; 17-517Q	Vasker cellerne rene for supernatant eller medium.

---

<sup>2</sup> Fortyndes 1:10 med demineraliseret vand (milliQ H<sub>2</sub>O).

### 3.2.2 Udstyr i CELLEFORSØG

Udstyret som bruges i celleforsøg beskrives i Tabel 3.3.

Tabel 3.3:

Udstyr som er brugt i celleforsøgene.

Udstyr	Mærke / model	Bemærkninger
Røntgensystem	Pantak PMC1000	220 kV, 10 mA. Filtrering: 1.52 mm Al + 2.60 mm Cu
Præcisionstermometer	VWR PT1000, TD131	
Varmeblæser	Red Lion PXU PID Controller	Indstillet så det bliver 37.0°C i eksponeringskammeret.
<sup>60</sup> Co-enhed	Gammabeam X200, MSD Nordion (serie-nummer. 006)	
Sikkerhedsbænk	Safe2000	Startes 30 min før for laminær luftstrøm.
Vakuumaspirator	INTEGRA VACUSAFE	
Celleflasker	Thermo SCIENTIFIC Nunc EasYFlask T25V	Lukket låg ved bestråling.
Autopipette	HIRSCHMANN Pipetus	Elektrisk.
Mikropipetter	RAININ Pipet-Lite XLS	Manuel.
Stereoskop	Nikon TMS	
Centrifuge	MEGA STAR 600, 600R	Rotorbræt afkøles før brug. Rotorradius ≈ 13 cm.
Inkubator	Thermo SCIENTIFIC Mod. 371	CO <sub>2</sub> -niveau: 5.0%. Temperatur: 37.0°C.
Varmebad	GRANT JBA Aqua-18	Kalibreres til 37°C.
Shaker	IKA VORTEX 1, Heidolph Rotamax 120	
Vægt	METTLER TOLEDO AG245	Præcision: 0.1 ± 0.2 mg.
Digitalt armbåndsur	Casio A158W	Bruges til at notere tidspunkter for trypsinéring og overførsel af celleduspension til medium. Her afrundes til nærmeste hele minut.
Flowcytometer	Accuri C6	Program: CFlowPlus.
Polysterene round-bottom-rør	FALCON	Cellesuspension overføres til disse for at køres i flowcytometeret.
Nylon mikrofilament	NYTAL 7XXX-200	Filtrering af prøverne i overførsel til round-bottom-rør (FALCON)

### 3.3 BESTRÅLING AF CELLEPRØVERNE

#### 3.3.1 BESTRÅLING MED RØNTGEN

Fire T25-celleflasker i en 37°C-opvarmet desinficeret celleflaskebeholder, blev placeret i den mest homogene region af strålefeltet i afstand til kilden SSD = 40 cm. Positionen er markeret med tape, se Figur 3.3. Temperaturen i eksponeringskammeret blev holdt på 37°C vha. to varmeblæsere. Røntgenstrålen blev filtreret med 1.52 mm aluminium og 2.60 mm kobber. Spænding over røntgenrøret var indstillet til 220 kV og katodestrøm til 10 mA. Tabel 3.4 viser eksponeringstider for de udvalgte doser.

*Tabel 3.4:*

Eksponeringstider for bestråling med røntgen, spænding: 220 kV, katodestrøm: 10 mA, filtrering: 1.52 mm Al + 2.60 mm Cu.

Dosis (Gy)	Eksponeringstid (s)	
	SSD40	SSD50
0.1	<b>13</b>	18
0.2	<b>22</b>	33
0.3	<b>32</b>	47
0.5	<b>51</b>	1 min + 16
1.0	<b>1 min + 38</b>	ingen data

#### 3.3.2 BESTRÅLING MED GAMMA

Ved gamma-bestråling af cellerne blev Radiumhospitalets kobolt-60-kilde brugt. Afstand fra kilden blev fastsat til SSD = 80 cm og temperaturen holdt på 37°C. Figur 3.5 viser et billede af Radiumhospitalets gammakilde under hvilken celleprøverne blev placeret ved to bestrålingsforsøg.



Figur 3.5: Radiumhospitalets gammakilde *Gammabeam X200, MSD Nordion (serienr. 006)*.

Siden materialet henfalder, skal dosisraten udregnes hver gang man bestråler. Dosisraten for dags dato udregnes

$$A(t) = A_0 e^{-\ln 2 \cdot \Delta t / T_{1/2}} \quad (3.1)$$

hvor  $A_0$  er den sidst kendte dosisrate,  $\Delta t$  er antallet af dage mellem dags dato og  $t_0$ .  $T_{1/2} = 1925.1$  dage er halveringstiden for kobolt-60.

Eksponeringstiden for den ønskede dosis findes ved

$$T_{\text{eksponering}} = \frac{D_{\text{ønsket}}}{A(t)} \quad (3.2)$$

Hvis eksponeringstiden er meget kort deles tallet på en konstant som kalibrerer for *shutter-effekt*, en egenskab ved kobolt-apparatet selv.

### 3.4 FARVNING AF CELLER MED KI-67 FOR AT AFGØRE ANDELEN AF CELLER I G0

For at kunne undersøge om TGF- $\beta$ 3 bringer celler ind eller ud af G0 blev der udviklet en metode til at analysere andelen af G0-celler i en givet population, så andelen af prolifererende celler kunne sammenlignes med andelen af hvilestadieceller i ubestrålede og bestrålede prøver i HRS- og IRR-regionen.

Farvningsprotokollen tog udgangspunkt i artiklen fra (Kim og Sederstrom 2016) og brugte KI-67 FITC-konjugeret antistof til at farve prolifererende celler, dvs. G1-, S-, og G2/M-celler og PI til at markere DNA. Som internstandard blev brugt celler, som var dyrket til konfluens og derefter havde stået i rumtemperatur over natten. Det blev antaget at en stor del af disse

celler var i G0. Disse celler blev mærket med DyLight 670 og derefter blandet op i test-cellerne før behandlingen med KI-67 antistof.

Kontrolceller blev dyrket i serumfri medium og inkubéret i stuetemperatur 24 timer før forsøget.

### 3.4.1 METODE MED KI-67

Cellerne blev sået ud i T25/T75-flasker mindst 16 timer før bestråling, trypsineret i med trypsin EDTA og fikseret i 99.8%  $-20^{\circ}\text{C}$  metanol. Kontrolceller i G0 blev vasket i kold PBS og inkuberet i 30 minutter på is med DyLight-løsning (40  $\mu\text{l}$  stock solution opløst i 68  $\mu\text{l}$  DMSO og videre opløst i 2 ml PBS med 1% BSA. Cellerne blandet med DyLight-farvede kontrolceller blev vasket to gange i FACS-buffer og inkuberet i 30 minutter på is med 15  $\mu\text{l}$  KI-67 opløst 1:400 i PBS med 1% BSA. Efter inkubation blev cellerne vasket to gange i FACS-buffer og løst op i 500  $\mu\text{l}$  PI (50  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ) og RNase (250  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ) i PBS.

Protokollen findes i Bilag B.2 Protokol for farvning med KI-67 og DyLight.

## 3.5 FARVNING MED ANTI- $\gamma\text{H3}$ FOR AT AFGØRE DET MITOTISKE

### INDEKS

I dette forsøg blev celler i mitose farvet for at afgøre ratioen af celler i mitose, det *mitotiske indeks*. Metoden tager udgangspunkt i (Juan m.fl. 1998). Forsøgene blev gjort med cellelinjer T-47D og T-47D-P (P står for (lav dosisrate) Primet) for effektdoser 0.1 Gy, 0.2 Gy, 0.3 Gy, 0.5 Gy og 1.0 Gy.

Celler fikseres med  $-20^{\circ}\text{C}$  70% etanol. Ved forsøg med TGF- $\beta$ 3, tilsættes 0.01 ng/ml rekombinant TGF- $\beta$ 3 til uprimede celleflasker 16 timer før cellerne fikseres i etanol.

Mitosemarkøren, som bruges i alle forsøgene, er Polyclonal rabbit anti-phospho-histone H3 (ser10) (Upstate, Cat# 06-570) som blandes med PNT i forholdet 1:250 og FITC-konjugeret alexa fluor sekundær antistof i samme forhold.

Hvis man vælger at lade 100  $\mu\text{l}$  supernatant ligge i bunden ved aspiration før tilsætning af antistof, skal der korrigeres for denne dråbe som hovedsagelig består af PBS i løsningerne antistoffet tyndes ud i. Korrektionsfaktoren afhænger af hvor stor mængde fortyndet antistof som tilsættes cellerne. For primærantistof tilsættes 100  $\mu\text{l}$  fortyndet antistof til 100  $\mu\text{l}$  PBS (med celler); forholdet skal altså være gange 2. For sekundær antistof tilsættes 200  $\mu\text{l}$ , og dette forhold skal altså korrigeres med gange 1.5. Da antistofferne fortyndes i PNT, en

løsning som består af PBS, tørmælk og Tween 20, skal forholdet af tørmælk og Tween 20 også korrigeres hhv. gange 2 og gange 1.5.

### 3.5.1 METODE MED ANTI- $\gamma$ H3

Cellerne blev sået ud i T25/T75-flasker mindst 16 timer før bestråling, trypsineret i med trypsin EDTA og fikseret i 70%  $-20^{\circ}\text{C}$  metanol. Efter 24 timer på is blev cellerne vasket to gange med kold PBS og inkuberet i 60 minutter på is med anti- $\gamma$ H3 1:250 i PNT. Efter inkubation blev cellerne vasket i kold PBS og inkuberet i 30 minutter med sekundær antistof Alexa Fluor. Til sidst blev cellerne vasket i kold PBS og løst op i PBS med PI og RNase.

## 3.6 METODER I CELLEFORSØG

### 3.6.1 TRYPSINERING

Trypsin er et enzym som bl.a. findes i ko-maver og som bruges til at opløse cellemembranen så cellerne slipper bunden af celleflasken og kan overføres til centrifugerør. Ved forsøg med prolifererende celler er det vigtigt cellerne har god plads, altså er ikke-konfluente. Derfor er der ikke mange celler i hver flaske, og det er vigtigt at få alle celler med for at undgå at få en selektion af celler.

Efter inkubation med trypsin holdes cellerne under et mikroskop for at se om cellen er løst fra underlaget. Dette kan man se ved at cellerne er blevet runde i formen og at nogle af dem flyder rundt i væsken. Celleflaskens hjørner bankes mellemhårdt i bordpladen 4 gange på hvert hjørne indtil alle cellerne er frigjort fra celleflaskebunden og flyder rundt i væsken.

Derefter suges cellesuspensionen op og ned i en 2 ml-pipette med gummipumpe for at skille celleklumper ad til enkeltceller. Dette kaldes resuspension til enkeltceller. Ca. 2 af de 3 ml trypsin/cellessuspension suges op og pumpes ud stødvis med ca. 4 resolute stød. Det er vigtigt at undgå at suge luft op, da luftbobler kan skade cellerne. Hvis cellesuspensionen bliver slimet, er det tegn på at cellerne er gået for meget i opløsning og at DNA-et flyder frit rundt i væsken.

For at sikre neutralisering af trypsinen overføres de 3 ml cellesuspension til 5 ml cellemedium i et centrifugerør. For at undgå degeneration af cellerne eller at de fortsætter i cyklus i ventetiden mens de andre prøver trypsinéres, anbringes celleprøverne i knust is eller i isvand i en isoporkasse. Derefter centrifugeres alle prøver i 5 minutter ved 200 g og vaskes to gange i PBS før de resuspenderes langsomt i 5 ml  $-20^{\circ}\text{C}$  70% etanol.

Etanolen tilsættes så langsomt at cellesuspension og etanol lægger sig i faser. Derefter opløses fasespejlet ved blid hvirvling i 5 min på 100 rpm, så etanolen ”masseres” roligt ind i cellesuspensionen, mens prøverne holdes på is.

I forsøg som søger efter at finde tendensen i det mitotiske indeks er det altafgørende at få *alle* celler med ved trypsinering. Dette skyldes, at de mitotiske celler sidder løst mens de andre celler sidder fast. Man er derfor så at sige sikker på at få alle mitoserne med ved trypsinering mens G1-, S-, G2-, og G0-celler sidder fast på bunden af celleflasken. Fås ikke alle med videre påvirker det det mitotiske indeks for den gældende prøve.

Ved trypsinering af T-47D-celler anbefales i tidligere protokoller en inkubationstid på 3 – 5 min ved 37°C når trypsinen er tilsat. Hvis cellerne trypsinéres for længe opløses de, for kort slipper de ikke bunden af celleflasken eller hinanden.

Jeg fandt ud af, at cellerne først begynder at give ordentligt slip efter ca. 5 minutter i trypsin, hvorefter flasken må bankes rimelig hårdt i bordet ad flere omgange. For at ensarte trypsineringen over alle prøverne bør dette gøres så ens som muligt for alle celleflaskerne. Et forsøg med gammel trypsin viste at dette virker meget dårligere end frisk trypsin. Ligeledes blev det testet om celleflaskerne kunne inkuberes ved stuetemperatur med trypsin, men dette virkede også væsentligt dårligere end at have dem stående i varmeskab med 37°C.

### 3.6.2 KONFLUENS

I forsøg med anti-phospho-histone-H3 er det vigtigt der er mitotiske celler i cellekulturen. For at celler skal kunne gå i mitose må de først og fremmest have nok plads omkring sig, dvs. være ikke-konfluente. For at sikre et så stort som muligt omfang af mitotiske celler, valgte jeg efter flere forskellige forsøg 30% konfluens. I en T25-flaske med et fladeareal på 25 cm<sup>2</sup> er der relativt lille plads og derfor relativt få celler ved kun 30% konfluens. Derfor er det desto vigtigere ikke at miste nogen celler i løbet af forsøget, bl.a. ved aspiration.

### 3.6.3 CENTRIFUGEHASTIGHED

Før cellerne er fikseret tåler de ikke kraftig centrifugering. Derfor handlede det om at finde en så høj centrifugehastighed som muligt, som ikke skader cellerne men samtidig skaffer en hård nok pellet til at den ikke flyder rundt i det nederste af røret når supernatanten aspireres. Før fiksering brugte jeg en lav centrifugehastighed på 200 g og lod i stedet en god dråbe på ca. 200 µl ligge i bunden efter at supernatanten var fjernet. Ved to vaske med 5 ml PBS giver dette et forhold mellem supernatant og PBS på ca.  $1:26^2 = 1:676$ .



Efter fiksering tåler cellerne kraftigere centrifugering. Jeg fastsatte centrifugehastigheden til 300 g efter fiksering.

#### 3.6.4 ASPIRATION

En kombination af at centrifugere så hårdt som muligt uden at skade cellerne og lade en dråbe ligge på præcis 200 µl ved hver aspiration sikrer derfor både at cellerne ikke aspireres sammen med supernatanten, samt at blandingsforholdene i tilsatte antistofløsninger ikke bliver forskellig fra prøve til prøve. For at ramme 200 µl præcist bruges den anden nederste streg på centrifugerøret.

##### ASPIRATION AF ETANOL

Ved centrifugering med etanol dannes der ikke en ordentlig pellet på samme måde som med andre medier. Cellerne ligger mere løst i bunden og her kan man risikere at miste celler ved aspiration. Når supernatant aspireres med vakuumaspirator kan der dannes turbulens i væsken. I etanol er det muligt at se turbulensen med det blotte øje. Ved aspiration af etanol kan man, ved at holde man øje med turbulensen i bunden af røret, fastslå at denne starter når der er ca. 200 µl væske tilbage. Turbulensen kan få mere løstliggende celler til at hvirvle op i væsken og blive suget op. Derfor er denne del af forsøget et af de farligste steder for at miste celler. Derfor bestemte jeg en aspiration til ca. 200 µl ved alle andre punkter end selve farvningen med antistoffer. Bruges denne metode for aspiration er det derfor vigtigt at have centrifugerør med streger nederst som indikerer hvert 100 µl-trin.

Med hård centrifugering og aspiration til 200 µl er man næsten helt sikker på ikke at miste celler ved vask og opnår stadig et pænt forhold af supernatant ved to vaske som udregnet ovenfor.

#### 3.6.5 PNT

PNT består af PBS tilsat detergenten Tween 20 og tørmælk. Tween 20 er en meget viskøs væske som for det første bruger tid på at blive suget op, og for det andet ofte har en stor dråbe hængende på pipettespidsen. Derfor satte jeg forholdet af Tween 20 lidt ned i de korrigerede løsninger og sikrede en rolig opugning med kun de yderste af mikropipettespidsen dyppet i Tween 20. Denne seje dråbe opløses ved resuspension med pipetten og efterfølgende hvivling på høj hastighed.

Ved tilsætning af tørmælk krævedes ligeledes en prompte og hård hvirvling på høj hastighed så tørmælken ikke begynder at klumpe.

Anti- $\gamma$ H3 og sekundær antistof tilsættes til hhv. PNT(2X) og PNT(1.5X) lige før farvning af cellerne så stoffet holder sig så frisk som muligt. PNT holdes på is før brug og blandes nyt i hvert forsøg.

### 3.7 FLOWCYTOMETRI

Figur 3.6 viser flowcytometeret og programmet C6.



Figur 3.6: Flowcytometer med celleprøve, programmet C6 og labjournal.

#### 3.7.1 OPSTART OG KALIBRERING

Før opstart af flowcytometeret bør det tjekkes at sheath-tanken er fuld og waste-tanken er tom. Når apparatet har brummet lidt og er klar, køres der *beads*, et stof som giver bestemte udslag på alle flowcytometerets fire kanaler når systemet er kalibreret rigtigt. Hvis de fire plot giver de forventede resultater, kan celleprøverne køres.

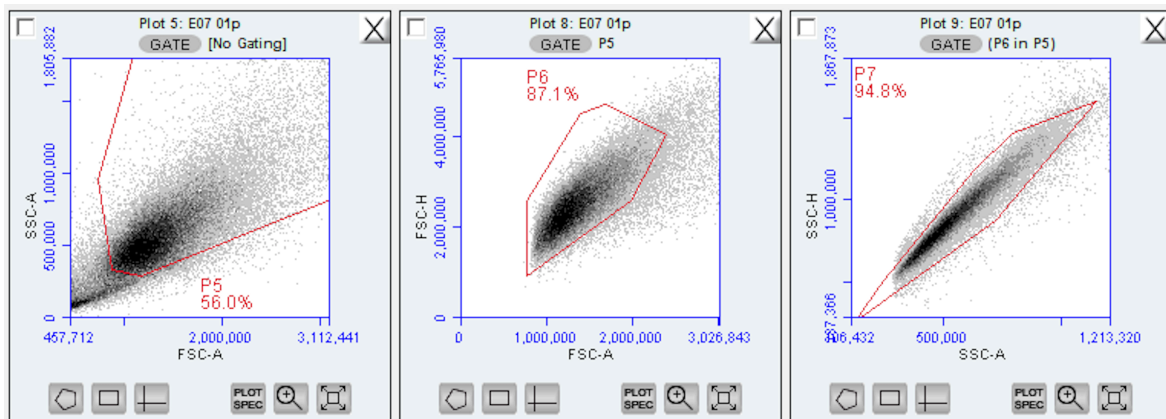
#### 3.7.2 DISKRIMINATION AF DEBRIS (SMÅDELE) OG DUBLETTER (KLUMPER)

Debris, altså smådele, cellefragmenter osv. har både lavt FSC-A-signal og lavt SSC-A-signal fordi de både er små og simple. Derfor ligger de i nederste venstre hjørne i et FSC-A—SSC-A-density-plot. De fjernes ved at indramme resten af populationen i en gate.

Den gatede population tages videre i et FCA-A—FSC-H-density-plot som gør det muligt at fjerne dubletter, dvs. celleklumper. Som tommelfingerregel er højt signal på begge kanaler et dårligt tegn. I udgangspunktet ligger enkeltcellerne på diagonalen hvor signalets område og højde er lige store, dvs. sfæriske signaler. Det er ofte nødvendigt at prøve sig frem og

kalibrere sin gating efter et DNA-histogram. Hvis gatingen ændrer på selve DNA-histogrammet, fjerner den for meget. Hvis der er toppe udenfor DNA-histogrammet, fjerner den for lidt.

Når det ikke er muligt at fjerne uønskede toppe i DNA-histogrammet, kan man evt. afprøve en tredje gating-strategi. Et SSC-A—SSC-H-plot med cellerne fra dublet-gatingen (som kun tog sig af cellerne fra debris-gatingen) kan være løsningen. Her så jeg i nogen forsøg en ”ekstra” population som lå i en stribe over hovedpopulationen. Når denne population fjernes, og alt andet beholdes, kunne jeg fjerne en del af de celler som havde for meget eller for lidt DNA til at være en del af den ønskede population. Og det uden at påvirke DNA-histogrammet for den ønskede population overhovedet.



Figur 3.7: Eksempel på gatingstrategi for diskrimination af smådele, dubletter og andet ikke-brugbart materiale i en celleprøve.

## 4 RESULTATER

### 4.1 RØNTGENDOSIMETRI

Fordi HRS afhænger af lav LET, blev røntgenstrålingen i denne opgave filtreret med 1.52 mm Al og 2.60 mm Cu for at fjerne lavenergetiske fotoner fra røntgenstrålen, dvs. hærde den. Derfor måtte dosimetrien gøres fra grunden. Formålet med forsøget er at finde den kortest mulige afstand til røntgenkilden for at sikre højest mulig dosisrate uden at strålefeltet bliver for inhomogent eller ustabil. Jo tættere prøven er på røntgenrøret, jo højere er dosisraten og jo kortere bliver eksponeringstiden. En høj dosisrate er ønskeligt men må holdes op imod den ulempe, at feltet bliver tiltagende inhomogent, jo tættere prøven er på kilden. En anden ulempe kan være at meget korte eksponeringer kan føre til større usikkerhed pga. udstyrets build-up-tid, dvs. de sekunder det tager spændingsfeltet at komme op på 220 kV. Når strålefeltet er karakteriseret, placeres celleflaskebeholderen i den mest homogene region.

Eksponeringstiden for udvalgte doser 0.1 Gy, 0.2 Gy, 0.3 Gy, 0.5 Gy og 1.0 Gy blev fundet ved afprøvning af forskellige varigheder. Strømmen blev målt i flere af kamrene i celleflaskebeholderen (se Figur 3.3) og omregnet til dosis ved ligning (2.13).

Hvis feltet er tilstrækkeligt homogent og røret tilstrækkelig stabilt for den korteste eksponeringstid som behøves, så vil det også være stabilt og homogent nok ved større doser.

Røntgenrøret har en build-up-tid før ønsket spænding på 220 kV over røret opnås. Jo kortere eksponeringstid, jo større andel af eksponeringstiden fylder build-up-regionen. Build-up-tiden er ikke fast defineret og kan variere mellem eksponeringer, og mellem individuelle forsøg.

Derfor blev hvert punkt på perspexpladen i eksponeringskammeret målt fem eller ti gange pr. forsøg. Forsøget blev gentaget tre gange for at se om noget ændrer sig når røntgenrøret har været slukket og tændes igen.

I hvert målepunkt blev dosisgennemsnit og standardafvigelse udregnet i hvert punkt i overensstemmelse med ligning (2.28). Når mere end ét forsøg blev gjort kunne SEM udregnes i overensstemmelse med ligning (2.36) og (2.37). Doserne blev plottet med en lineærtilpasning for at finde nulpunkterne, dvs. eksponeringstiderne ifølge linjen som giver

dosis = 0.0 Gy, for at estimere build-up-tiden. Doserne blev derefter delt på eksponeringstiden for at finde den specifikke dosisrate ved hver dosis.

En oversigt over dosimetrieforsøgene findes i Tabel 4.1.

Tabel 4.1:

*Oversigt over forsøgene med røntgendosimetri. Forsøget for SSD40, 13 sekunder (markeret med fed skrift) vises i kapitlet, resten vises i Bilag A. Røntgendosimetri.*

SSD (cm)	Eksponeringstid (s)	Antal målinger pr punkt $m$	Antal forsøg $n$
50	20	5	3
40	14	5	3
<b>40</b>	<b>13</b>	<b>10</b>	<b>3</b>
37.5	12	10	1

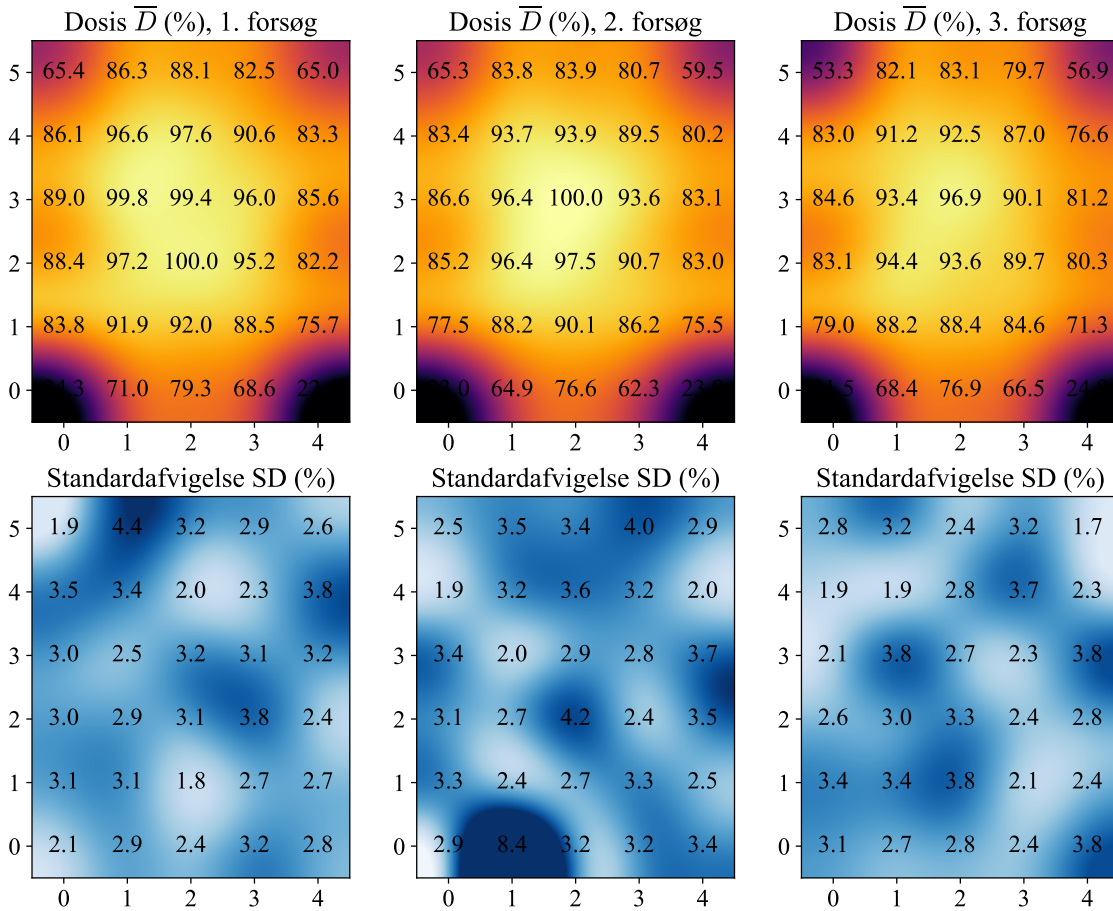
#### 4.1.1 FELTHOMOGENITET

Eksponeringsfeltet bliver mere inhomogent, jo tættere ioniseringskammeret er på kilden. Strålefeltet vises for et udvalgt forsøg (SSD = 40 cm, bestråling i 13 sekunder) i Figur 4.1 og Figur 4.2. Resultaterne for de resterende forsøg er vist i Bilag A. Røntgendosimetri.

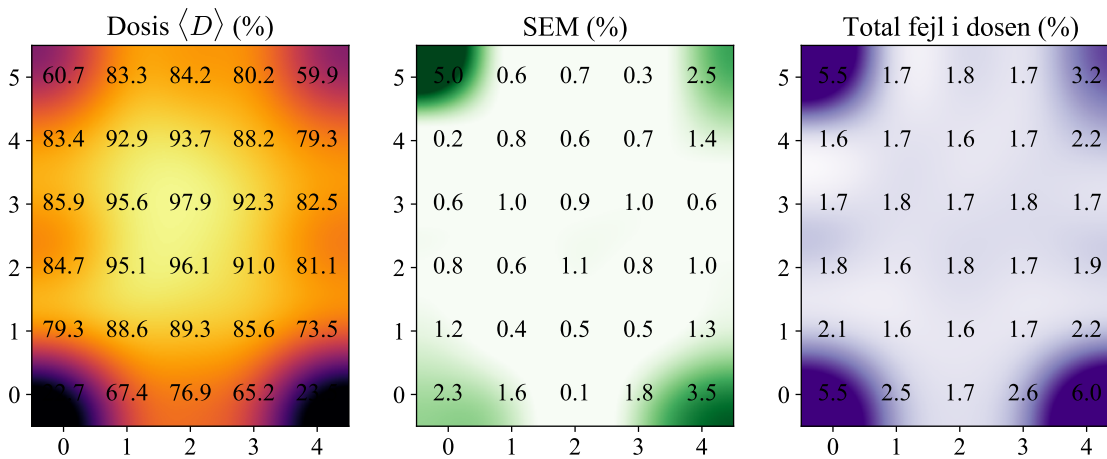
Figur 4.1 viser dosis og standardafvigelse i procent i tre individuelle forsøg og Figur 4.2 viser gennemsnittet af de tre forsøg med SEM og totalfejl som inkluderer usikkerheden i elektrometeret på  $\pm 0.02$  nC. Standardafvigelsesfiguren (i blå) giver et billede af, hvor feltet er mest usikkert i procent af den målte dosis indenfor hvert forsøg i Figur 4.1 og i gennemsnittet i Figur 4.2.

Kortere SSD går mest udover dosen i hjørnerne, mens midten af feltet, hvor intensiteten er højest, ikke varierer lige så meget. Regionen med størst intensitet ligger i  $x \in [1,3]$  og  $y \in [2,4]$ . I denne region er feltet homogent nok til at forvente en ensartet bestråling af alle fire kamre i celleflaske beholderen og vil benævnes fremover som den ”felthomogene region”.

Matricerne i Figur 4.1 og Figur 4.2 er normaliseret på maksimumintensiteten, så 100% er den største stråleintensitet i målt i alle tre forsøg. For at gøre plottene sammenlignelige er de alle (inklusive gennemsnittene i Figur 4.2) normaliseret på den højest målte intensitet indenfor alle tre forsøg som er udført på samme SSD og samme eksponeringstid. 100% tilsvarende 0.1 Gy når ioniseringskammeret er placeret i en T25-celleflaske som ligger i celleflaskebeholderen, altså  $1.5 + 7.5 + 0.21$  cm over perspexpladen, jf. værdierne givet for udstyret i Tabel 3.1. Målingerne er dog gjort direkte på perspexpladen med ioniseringskammeret tapet fast i hvert målepunkt.

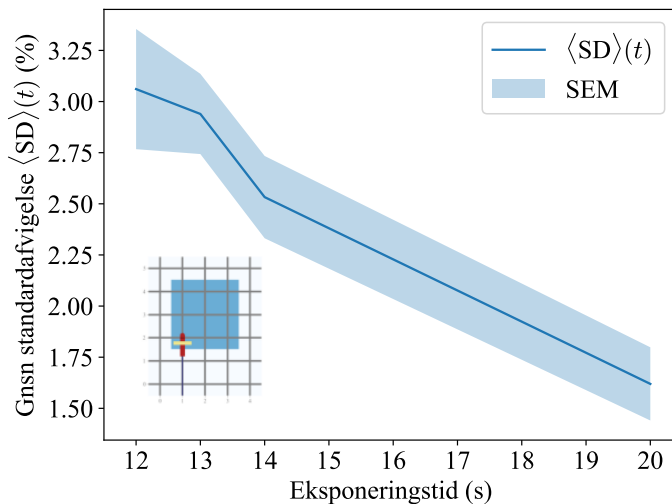


Figur 4.1: Dosis og standardafvigelse i hvert forsøg med SSD = 40 cm, 13 sekunders eksponering og 10 målinger pr punkt. Standardafvigelsen i procent for hvert målepunkt vises i de blå paneler under.



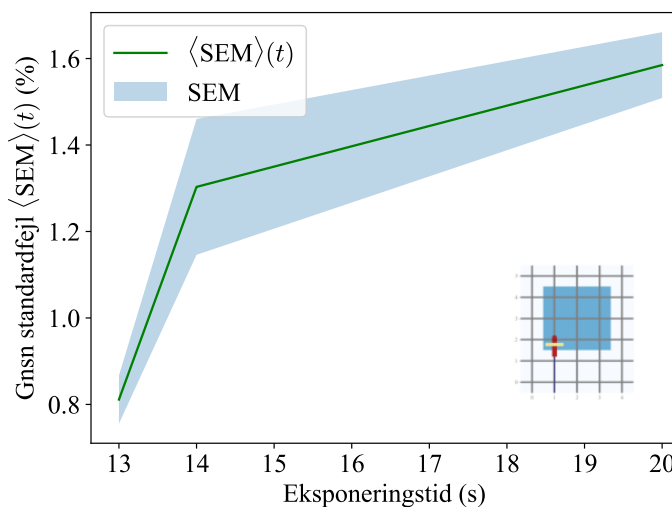
Figur 4.2: Totalgennemsnit (gennemsnit af de tre forsøg i Figur 4.1) i procent med SEM og totalfejl for SSD = 40 cm, 13 sekunder eksponering over alle tre forsøg som blev gennemført med mindst én dags mellemrum. Totalfejl inkluderer SEM samt usikkerheden i elektrometeret som anslås til  $\pm 0.02$  nC. Det mest homogene område ser ud til at ligge lidt venstreforskuet i en tænkt firkant med hjørner i koordinaterne (1,2) - (3,2) - (1,4) - (3,4).

For at få et mål for, hvor usikker dosen bliver når eksponeringstiden er kort, vises i Figur 4.3 et plot over den gennemsnitlige standardafvigelse som funktion af eksponeringstid i den mest felthomogene region, dvs. firkanten med hjørner i (1,2) - (3,2) - (1,4) - (3,4). Jo længere eksponeringstid, jo mindre bliver standardafvigelsen og altså den tilfældige maskinelle usikkerhed. Den største gennemsnitlige usikkerhed lå på lidt over 3% for eksponeringstid på 12 sekunder på SSD40 og den laveste usikkerhed på under 2% for eksponeringstid på 20 sekunder på SSD50.



Figur 4.3: Gennemsnitlig standardafvigelse i målingerne i den mest felthomogene region i de 4 forsøg med forskellig eksponeringstid og afstand til kilden: SSD = 50 cm, 20 sekunder, SSD = 40 cm, 14 sekunder og 12 sekunder, SSD = 37.5 cm, 12 sekunder.

På samme måde kan SEM plottes som funktion af eksponeringstid (dog ikke for forsøget med SSD = 37.5 cm fordi det ikke blev gentaget). Figur 4.4 viser den gennemsnitlige SEM i den felthomogene region, som vises i hjørnet af figuren, som funktion af eksponeringstid i de tre forsøg som blev gentaget.



Figur 4.4: Gennemsnitlig SEM i den mest felthomogene region i de 3 forsøg som blev gentaget flere gange (SSD = 50 cm, 20 sekunder, 5 målinger pr punkt, SSD = 40 cm, 14 sekunder, 5 målinger pr punkt, og SSD = 40 cm, 13 sekunder, 10 målinger pr punkt).

#### 4.1.2 USIKKERHED IFM. AT DEN FØRSTE MÅLING I ET MÅLINGSSÆT ER HØJERE END NORMEN OG AT DENNE USIKKERHED AFHÆNGER AF EKSPONERINGSTID

Ved at normalisere de enkelte målinger på gennemsnitsmålingen i hvert punkt, blev der fundet en fejl ifm. måden målingerne bliver gjort på, dvs. i dosimetri hvor ti målinger gøres hurtigt efterfølgende hinanden i hvert målepunkt. Den første måling i et sæt med ti målinger i et punkt giver højere udslag end normen af målingssættet på alle forsøgene. Resultaterne i dette afsnit viser en fejl, der afhænger af eksponeringstiden, og som bør korrigeres hvis man laver dosimetri med ti hurtigt efterfølgende målinger i hvert målepunkt.

Der blev fundet en tidsafhængig tendens som viser at førstemålingernes afvigelse fra normen bliver større for kortere eksponeringstider og at denne tendens er eksponentiel når eksponeringstiden går mod nul sekunder, Figur 4.7.

Tabel 4.2 viser alle enkeltmålinger gjort i forsøget med 13 sekunders eksponering på SSD40. Førstemålingerne er markeret med fed skrift. Normen er markeret med rødt når første måling er højere end normen og fed skrift, rød når førstemålingen er den højeste af alle målingerne i samme sæt.

Det er oftere tilfældet end det modsatte, at førstemålingen er højere end normen. Det er også førstemålingen som har den største afvigelse når man sammenligner med de andre enkeltmålinger pr. indeks, dvs. ”rækkefølgenummer”.

Øverste plot til venstre i Figur 4.5 viser hvor meget førstemålingerne afviger fra gennemsnittet af egen målingskohorte og Figur 4.6 viser hvordan enkeltmålingerne i et hurtigt gentaget målingssæt varierer generelt.



Tabel 4.2:

Alle enkeltmålinger som blev taget i forsøget med 13 sekunders eksponering på SSD40. Førstemålinger er markeret med **fed** skrift og gennemsnittet af målingskohorten står i yderste højre kolonne.

De gange førstemålingen er højere end gennemsnittet, er gennemsnittet markeret med **rod**. De gange førstemålingen er den højeste af alle målingerne, er gennemsnittet markeret med **fed**. De gange førstemålingen er lavere end gennemsnittet, er gennemsnittet markeret med **blå**. (Det skete aldrig at førstemålingen var den laveste af alle målingerne i kohorten).

Det tydeliggøres i Figur 4.5 og Figur 4.6, hvor meget højere førstemålingen generelt er end gennemsnittet af målingskohorten og hvordan førstemålingen stikker mest ud.

Forsøgs- indeks $j \in [1,3]$	Punkt- indeks $k \in [1,30]$	Koor- dinat $(x, y)$	Målinger (nC)										Gennem- snit (nC)
			Målingsindeks $i \in [1,10]$										
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	1	0,0	<b>0.42</b>	0.42	0.40	0.43	0.42	0.43	0.43	0.42	0.41	0.42	0.420
	2	1,0	<b>1.21</b>	1.20	1.19	1.19	1.21	1.23	1.31	1.22	1.24	1.27	<b>1.227</b>
	3	2,0	<b>1.35</b>	1.37	1.35	1.40	1.34	1.38	1.41	1.42	1.36	1.31	<b>1.369</b>
	4	3,0	<b>1.25</b>	1.19	1.13	1.18	1.21	1.20	1.13	1.23	1.17	1.15	<b>1.184</b>
	5	4,0	<b>0.40</b>	0.38	0.39	0.37	0.39	0.38	0.38	0.36	0.38	0.39	<b>0.382</b>
	6	0,1	<b>1.53</b>	1.38	1.44	1.41	1.38	1.49	1.46	1.46	1.47	1.45	<b>1.447</b>
	7	1,1	<b>1.62</b>	1.61	1.52	1.55	1.63	1.61	1.60	1.51	1.67	1.55	<b>1.587</b>
	8	2,1	<b>1.62</b>	1.61	1.60	1.53	1.60	1.58	1.61	1.59	1.61	1.54	<b>1.589</b>
	9	3,1	<b>1.53</b>	1.56	1.46	1.56	1.50	1.52	1.58	1.49	1.49	1.59	<b>1.528</b>
	10	4,1	<b>1.30</b>	1.32	1.26	1.35	1.38	1.32	1.28	1.30	1.29	1.27	<b>1.307</b>
	11	0,1	<b>1.52</b>	1.53	1.44	1.46	1.50	1.56	1.56	1.57	1.59	1.54	<b>1.527</b>
	12	1,2	<b>1.74</b>	1.63	1.65	1.63	1.64	1.63	1.76	1.66	1.73	1.72	<b>1.679</b>
	13	2,2	<b>1.79</b>	1.77	1.73	1.68	1.77	1.74	1.79	1.64	1.65	1.71	<b>1.727</b>
	14	3,2	<b>1.70</b>	1.71	1.59	1.69	1.63	1.56	1.73	1.68	1.59	1.56	<b>1.644</b>
	15	4,2	<b>1.44</b>	1.38	1.38	1.39	1.42	1.41	1.44	1.49	1.40	1.45	<b>1.420</b>
	16	0,3	<b>1.57</b>	1.48	1.57	1.51	1.53	1.48	1.49	1.60	1.61	1.53	<b>1.537</b>
	17	1,3	<b>1.71</b>	1.77	1.64	1.69	1.76	1.72	1.77	1.78	1.70	1.69	<b>1.723</b>
	18	2,3	<b>1.72</b>	1.66	1.71	1.72	1.86	1.76	1.71	1.69	1.66	1.68	<b>1.717</b>
	19	3,3	<b>1.65</b>	1.61	1.67	1.64	1.64	1.72	1.57	1.72	1.74	1.62	<b>1.658</b>
	20	4,3	<b>1.51</b>	1.49	1.52	1.41	1.53	1.45	1.50	1.53	1.44	1.40	<b>1.478</b>
	21	0,4	<b>1.55</b>	1.56	1.52	1.44	1.49	1.39	1.44	1.46	1.48	1.54	<b>1.487</b>
	22	1,4	<b>1.74</b>	1.73	1.65	1.60	1.72	1.62	1.71	1.72	1.61	1.59	<b>1.669</b>
	23	2,4	<b>1.65</b>	1.69	1.72	1.72	1.74	1.67	1.64	1.70	1.64	1.69	<b>1.686</b>
	24	3,4	<b>1.55</b>	1.62	1.57	1.51	1.62	1.57	1.54	1.52	1.59	1.56	<b>1.565</b>
	25	4,4	<b>1.49</b>	1.36	1.41	1.49	1.45	1.51	1.36	1.49	1.45	1.38	<b>1.439</b>
	26	0,5	<b>1.14</b>	1.11	1.13	1.16	1.14	1.09	1.11	1.12	1.14	1.16	<b>1.130</b>
	27	1,5	<b>1.58</b>	1.56	1.54	1.42	1.45	1.42	1.52	1.43	1.57	1.42	<b>1.491</b>
	28	2,5	<b>1.55</b>	1.61	1.54	1.46	1.52	1.57	1.45	1.54	1.48	1.49	<b>1.521</b>
	29	3,5	<b>1.43</b>	1.38	1.48	1.37	1.40	1.46	1.38	1.49	1.41	1.45	<b>1.425</b>
	30	4,5	<b>1.09</b>	1.11	1.07	1.15	1.16	1.14	1.09	1.13	1.13	1.15	<b>1.122</b>
2	1	0,0	<b>0.43</b>	0.39	0.41	0.42	0.40	0.40	0.41	0.42	0.40	0.40	<b>0.408</b>
	2	1,0	<b>1.14</b>	1.15	1.00	0.95	1.25	1.16	1.22	1.20	1.25	1.20	<b>1.152</b>
	3	2,0	<b>1.40</b>	1.32	1.30	1.40	1.34	1.32	1.33	1.42	1.36	1.42	<b>1.361</b>
	4	3,0	<b>1.16</b>	1.10	1.15	1.10	1.07	1.08	1.06	1.07	1.15	1.13	<b>1.107</b>
	5	4,0	<b>0.43</b>	0.44	0.41	0.43	0.41	0.42	0.45	0.41	0.41	0.44	<b>0.425</b>
	6	0,1	<b>1.39</b>	1.31	1.35	1.36	1.47	1.43	1.36	1.41	1.34	1.35	<b>1.377</b>
	7	1,1	<b>1.61</b>	1.55	1.62	1.53	1.53	1.52	1.61	1.60	1.54	1.56	<b>1.567</b>
	8	2,1	<b>1.62</b>	1.57	1.57	1.68	1.62	1.58	1.58	1.65	1.52	1.61	<b>1.600</b>
	9	3,1	<b>1.58</b>	1.45	1.59	1.46	1.59	1.54	1.53	1.49	1.58	1.50	<b>1.531</b>
	10	4,1	<b>1.31</b>	1.38	1.40	1.37	1.35	1.29	1.35	1.32	1.30	1.34	<b>1.341</b>
	11	0,1	<b>1.52</b>	1.58	1.55	1.45	1.55	1.46	1.49	1.45	1.57	1.51	<b>1.513</b>
	12	1,2	<b>1.79</b>	1.73	1.70	1.66	1.72	1.72	1.69	1.76	1.73	1.62	<b>1.712</b>
	13	2,2	<b>1.81</b>	1.63	1.81	1.63	1.79	1.74	1.81	1.76	1.67	1.66	<b>1.731</b>
	14	3,2	<b>1.65</b>	1.61	1.58	1.67	1.59	1.62	1.65	1.57	1.54	1.62	<b>1.610</b>
	15	4,2	<b>1.52</b>	1.38	1.44	1.40	1.48	1.54	1.45	1.50	1.51	1.52	<b>1.474</b>
	16	0,3	<b>1.53</b>	1.54	1.48	1.52	1.57	1.63	1.46	1.59	1.48	1.58	<b>1.538</b>

	17	1,3	<b>1.69</b>	1.75	1.71	1.74	1.75	1.65	1.75	1.67	1.69	1.72	1.712
	18	2,3	<b>1.71</b>	1.82	1.82	1.67	1.80	1.84	1.80	1.79	1.78	1.73	1.776
	19	3,3	<b>1.73</b>	1.59	1.74	1.65	1.61	1.64	1.64	1.68	1.64	1.70	1.662
	20	4,3	<b>1.55</b>	1.53	1.50	1.41	1.52	1.40	1.46	1.46	1.40	1.52	1.475
	21	0,4	<b>1.47</b>	1.52	1.52	1.45	1.46	1.53	1.47	1.48	1.47	1.45	1.482
	22	1,4	<b>1.74</b>	1.60	1.67	1.61	1.61	1.73	1.73	1.70	1.64	1.61	1.664
	23	2,4	<b>1.78</b>	1.66	1.58	1.72	1.60	1.65	1.59	1.70	1.68	1.71	1.667
	24	3,4	<b>1.64</b>	1.66	1.64	1.52	1.58	1.64	1.54	1.60	1.56	1.52	1.590
	25	4,4	<b>1.42</b>	1.45	1.43	1.44	1.40	1.42	1.38	1.48	1.39	1.43	1.424
	26	0,5	<b>1.21</b>	1.13	1.17	1.15	1.18	1.19	1.12	1.12	1.15	1.17	1.159
	27	1,5	<b>1.55</b>	1.47	1.56	1.51	1.53	1.48	1.52	1.45	1.42	1.40	1.489
	28	2,5	<b>1.45</b>	1.54	1.49	1.42	1.54	1.45	1.44	1.46	1.53	1.58	1.490
	29	3,5	<b>1.54</b>	1.48	1.45	1.38	1.49	1.40	1.37	1.36	1.40	1.46	1.433
	30	4,5	<b>1.12</b>	1.01	1.04	1.07	1.02	1.03	1.08	1.06	1.07	1.07	1.057
3	1	0,0	<b>0.39</b>	0.39	0.36	0.40	0.39	0.39	0.38	0.38	0.37	0.37	0.382
	2	1,0	<b>1.27</b>	1.16	1.26	1.22	1.22	1.22	1.23	1.19	1.19	1.18	1.214
	3	2,0	<b>1.37</b>	1.36	1.27	1.36	1.39	1.40	1.36	1.34	1.38	1.42	1.365
	4	3,0	<b>1.15</b>	1.22	1.17	1.18	1.18	1.21	1.19	1.21	1.12	1.18	1.181
	5	4,0	<b>0.47</b>	0.46	0.46	0.43	0.45	0.45	0.42	0.43	0.44	0.42	0.443
	6	0,1	<b>1.51</b>	1.36	1.41	1.36	1.35	1.39	1.37	1.40	1.45	1.43	1.403
	7	1,1	<b>1.61</b>	1.62	1.56	1.50	1.64	1.57	1.53	1.51	1.49	1.63	1.566
	8	2,1	<b>1.69</b>	1.52	1.51	1.57	1.51	1.56	1.60	1.55	1.53	1.66	1.570
	9	3,1	<b>1.50</b>	1.50	1.56	1.47	1.47	1.52	1.50	1.47	1.48	1.55	1.502
	10	4,1	<b>1.27</b>	1.27	1.33	1.26	1.27	1.28	1.30	1.24	1.23	1.22	1.267
	11	0,1	<b>1.46</b>	1.42	1.47	1.47	1.45	1.49	1.54	1.48	1.43	1.54	1.475
	12	1,2	<b>1.69</b>	1.73	1.60	1.71	1.73	1.61	1.69	1.74	1.64	1.62	1.676
	13	2,2	<b>1.70</b>	1.76	1.61	1.62	1.68	1.61	1.63	1.62	1.64	1.75	1.662
	14	3,2	<b>1.64</b>	1.62	1.54	1.57	1.66	1.60	1.56	1.58	1.61	1.55	1.593
	15	4,2	<b>1.43</b>	1.50	1.48	1.44	1.41	1.39	1.38	1.45	1.42	1.37	1.427
	16	0,3	<b>1.52</b>	1.49	1.47	1.55	1.50	1.51	1.53	1.54	1.44	1.48	1.503
	17	1,3	<b>1.64</b>	1.58	1.73	1.68	1.77	1.63	1.61	1.59	1.74	1.62	1.659
	18	2,3	<b>1.80</b>	1.73	1.67	1.69	1.76	1.71	1.63	1.75	1.72	1.75	1.721
	19	3,3	<b>1.61</b>	1.64	1.61	1.56	1.64	1.54	1.59	1.66	1.57	1.58	1.600
	20	4,3	<b>1.53</b>	1.38	1.39	1.45	1.50	1.46	1.39	1.43	1.52	1.38	1.443
	21	0,4	<b>1.44</b>	1.49	1.49	1.52	1.50	1.46	1.49	1.47	1.42	1.46	1.474
	22	1,4	<b>1.62</b>	1.67	1.65	1.56	1.63	1.59	1.62	1.60	1.65	1.60	1.619
	23	2,4	<b>1.62</b>	1.64	1.70	1.68	1.62	1.55	1.71	1.63	1.67	1.60	1.642
	24	3,4	<b>1.61</b>	1.47	1.54	1.53	1.57	1.48	1.58	1.46	1.60	1.62	1.546
	25	4,4	<b>1.39</b>	1.33	1.36	1.37	1.34	1.36	1.35	1.39	1.30	1.41	1.360
	26	0,5	<b>0.99</b>	0.94	0.97	0.94	0.95	0.98	0.91	0.92	0.95	0.91	0.946
	27	1,5	<b>1.54</b>	1.44	1.48	1.45	1.40	1.44	1.53	1.42	1.40	1.48	1.458
	28	2,5	<b>1.53</b>	1.46	1.42	1.47	1.46	1.54	1.50	1.45	1.47	1.45	1.475
	29	3,5	<b>1.49</b>	1.43	1.45	1.45	1.38	1.45	1.40	1.33	1.41	1.37	1.416
	30	4,5	<b>0.99</b>	1.01	1.03	1.03	1.02	0.99	1.02	0.99	0.99	1.03	1.010

Antal første målinger som er højere end gennemsnittet: 65/90 ≈ 72.2%

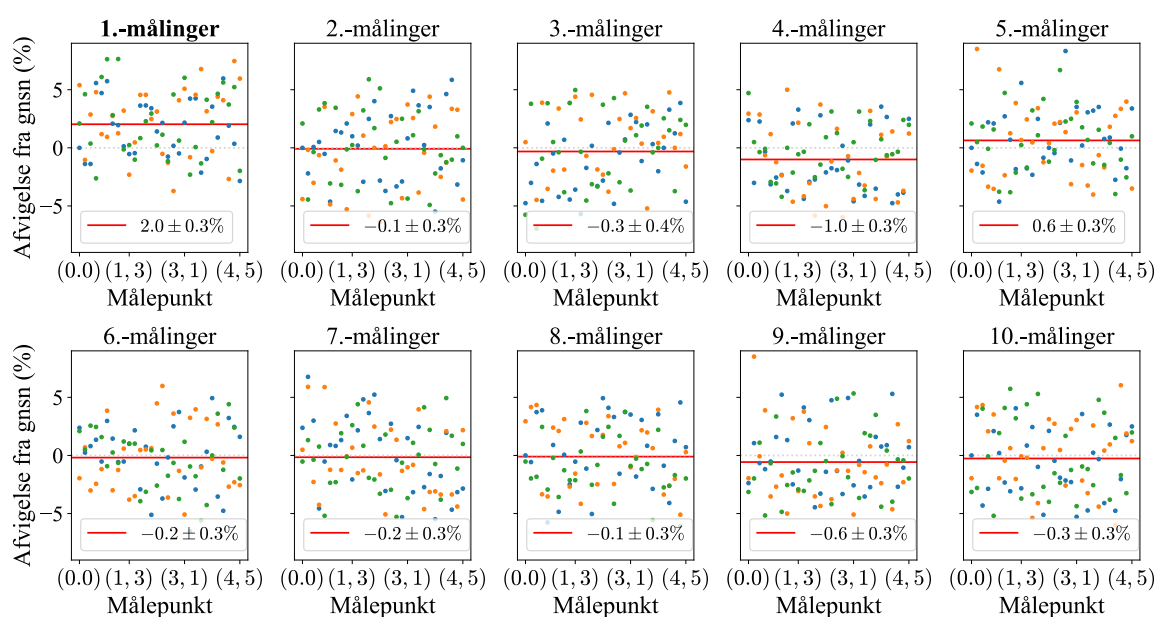
Hvor meget den enkelte måling generelt afviger fra normen kan findes ved at normalisere hver enkelt punktmåling på gennemsnittet af målingskohorten i hvert punkt.

Normen udregnes i alle punkter i samtlige forsøg for samme eksponeringstid og SSD.

$$\tilde{x}_{i,j,k} = \frac{x_{i,j,k}}{\left(\frac{1}{10} \sum_{i=1}^{10} x_i\right)_{j,k}} \quad (4.1)$$

hvor  $k \in [1,30]$  er alle målepunkterne og  $j \in [1,3]$  er alle forsøgene med samme eksponeringstid og SSD. Afvigelsen fra normen findes ved at omregne til procentvis forandring  $(\tilde{x}_{i,j,k} - 1) \cdot 100 \sim [\%]$ .

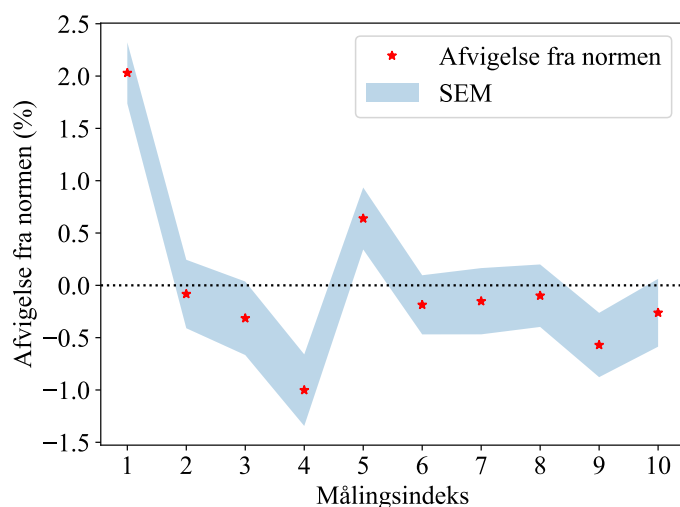
Figur 4.5 viser den procentvise afvigelse for hver målingsindeks i alle målingskohorter. Den røde streg indikerer gennemsnittet af målingsindeksernes afvigelse fra målingskohorten i hvert punkt, dvs. normen for målingsindekset  $i \in [1,10]$ . Det interessante er, at det er førstemålingen som afviger mest fra gennemsnittet af alle enkeltmålinger, Figur 4.6, og at dette er afhængig af eksponeringstid, se Figur 4.7. De tilsvarende beregninger fra de andre forsøg med andre eksponeringstider og SSD vises i Bilag A. Røntgendosimetri.



Figur 4.5: Alle målinger pr. indeks ( $i \in (1,10)$ ) i forhold til gennemsnittet af egen målingskohorte, se Tabel 4.2. Plottene viser hvordan målinger pr. indeks, altså rækkefølgen i punktmålingerne, afviger fra gennemsnittet af målingssættene (kohorterne). Det første plot (med **fed**) viser førstemålingen i alle målepunkter, det næste viser måling nr. 2 i alle punkter osv. helt op til 10. og sidste måling i hvert målingssæt. Den gennemsnitlige afvigelse fra kohortegennemsnittet vises med en rød streg. Første måling i hvert målingssæt (første plot, øverst til venstre, **fed skrift**) afviger mest og er generelt  $2.0 \pm 0.3\%$  højere end kohortegennemsnittet. Hvis hele forsøget var gjort med kun én måling i hvert punkt, ville det kun være førstemålingerne som karakteriserede strålefeltet. I dette tilfælde ville dosen generelt være  $2.0 \pm 0.3\%$  højere end det dosimetrien her tilsiger. Tendensen for målingskohorterne tydeliggøres i Figur 4.6, hvor det tydeligt træder frem at førstemålingen afviger mest og at denne er højere end gennemsnittet.

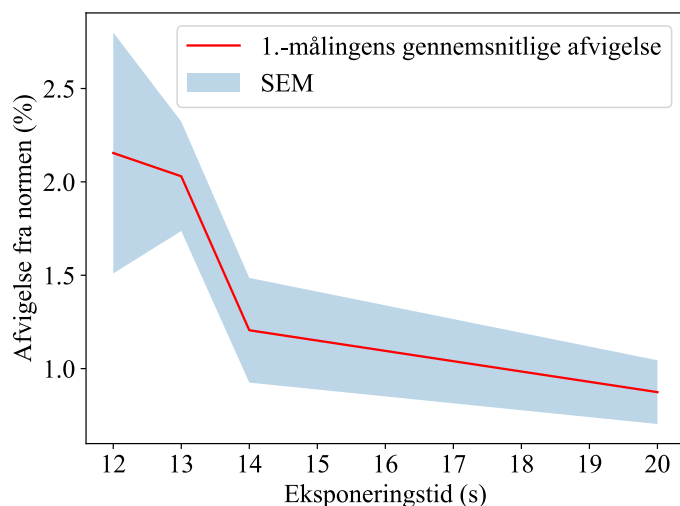
De enkelte målingers (pr. indeks) generelle afvigelse fra gennemsnittet for 13 sekunder vises som graf i Figur 4.6. Den første måling i et sæt er generelt  $2.0 \pm 0.3\%$  for høj. Anden måling, som foretages få sekunder efter den første, ligger lige på gennemsnittet, tredje måling er lidt

for lav osv. Pointen er at røntgenrøret får en længere pause før førstemålingerne fordi det tager lidt tid at åbne dørene og fæste ioniseringskammeret i et nyt punkt.



Figur 4.6: Målingsindeksernes gennemsnitlige afvigelse fra gennemsnittet af målinger i samme punktkohorte som funktion af eksponeringstid for 13 sekunders eksponering. Den største afvigelse findes generelt i kohortens første måling og er på  $2.0 \pm 0.3\%$  for 13 sekunders eksponeringstid. Afvigelsen er uafhængig af SSD.

Førstemålingens gennemsnitlige afvigelse fra normen i målingskohorten varierer som funktion af eksponeringstiden. Eksponeres kortere er førstemålingens afvigelse fra normen større. Eksponeres længere tid er afvigelsen fra normen mindre. Hvor meget højere end normen førstemålingerne er som funktion af eksponeringstid vises i Figur 4.7. Her er hele datasættet fra i alt fire forsøg brugt; SSD50 med 20 sekunder, SSD40 med 13 og 14 sekunder og SSD37.5 med 12 sekunder som vises i A. Røntgendosimetri.



Figur 4.7: Førstemålingernes gennemsnitlige afvigelse fra gennemsnittet af målinger i samme kohorte som funktion af eksponeringstid.

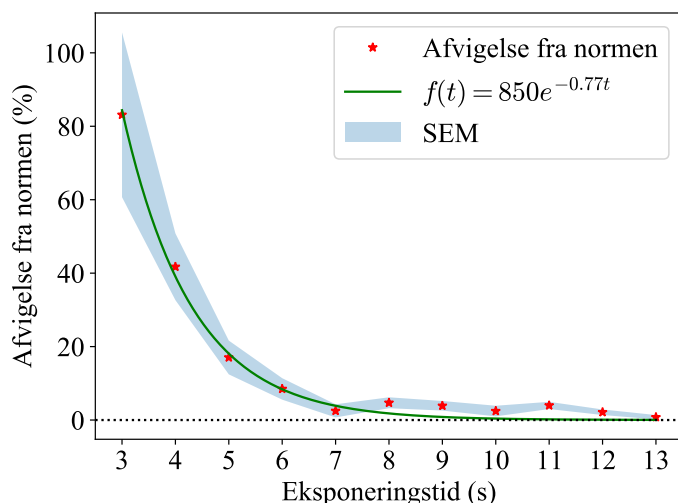
#### 4.1.3 RØNTGENDOSIMETRI FOR ULTRAKORTE EKSPONERINGER

Ti målingskohorter blev foretaget for hver eksponeringstid fra 3 – 13 sekunder.

Enkeltmålinger blev gjort med 4-5 sekunders mellemrum, mens der blev ventet ca. 40-60 sekunder før en ny målingskohorte blev påbegyndt. Førstemålingerne blev normaliseret på

gennemsnittet i overensstemmelse med ligning (4.1) for at finde den procentvise afvigelse fra gennemsnittet.

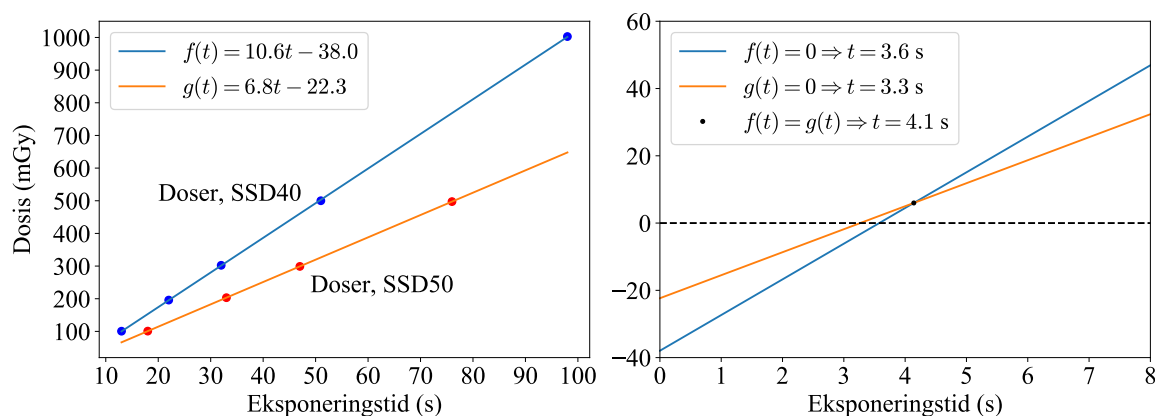
Førstemålingernes afvigelse fra gennemsnittet vises i Figur 4.8 sammen med en linjetilpasning. Alle målingerne er tabuleret i Bilag A.7 Målinger i celleflaskebeholder kammer 2 (se Figur 3.3) for ultrakorte eksponeringer (journal s. 129, 133-134).



Figur 4.8: Førstemålingernes afvigelse fra gennemsnittet af målinger i samme målingskohorte for eksponeringstider ned til 3 sekunder. En eksponentiel linjetilpasning kommer med et forslag til en funktion som kan finde den rigtige korrektionsfaktor for meget korte bestrålinger.

#### 4.1.4 MÅLTE DOSER, BUILD-UP-TID OG DOSISRATER

De målte doser for eksponeringstider 13 s, 22 s, 32 s, 51 s og 1 m + 38 s for SSD40, og 18 s, 33 s, 47 s og 76 s for SSD50 er plottet og linjetilpasset i Figur 4.9. Doserne ligger på to lige linjer og kan derfor bruges til at finde ud af hvilken eksponeringstid som giver 0 Gy, hvilket kan give et estimat af røntgenrørets build-up-tid.



Figur 4.9: Målte doser med linjetilpasning (højre) og skæringspunkt og nulpunkter for linjetilpasningerne (venstre). Skæringspunktet og dosisnulpunkterne giver et estimat af build-up-tiden når gennemsnittet beregnes. Stigningstallene giver estimater af dosisraterne på 10.6 mGy/s for SSD40 og 6.8 mGy/s for SSD50.

Jeg antager at build-up-tiden ligger et eller andet sted imellem grafernes skæringspunkt og nulpunkter (Ved tilstrækkeligt præcise målinger ville skæringspunktet og nulpunkterne sammenfalde hvor dosen er lig nul).

Linjernes skæringspunkt og nulpunkter bruges til at beregne et estimat af røntgenrøret build-up-tid. Gennemsnittet af grafernes skæringspunkt samt hver af grafernes nulpunkter i Figur 4.9 (højre) giver følgende estimat af build-up-tiden:

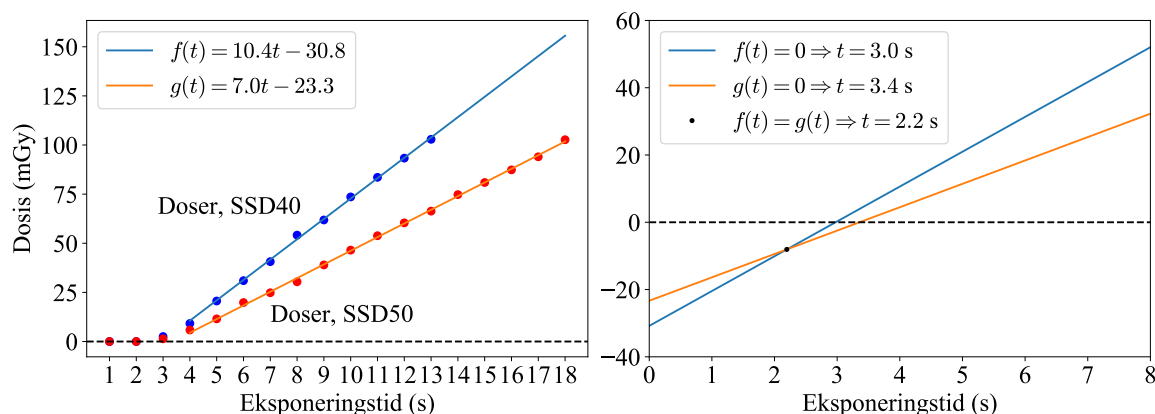
$$\overline{t_{build}} = \frac{3.6 + 3.3 + 4.1}{3} = 3.7 \pm 0.4 \text{ s} \quad (4.2)$$

Grafernes stigningstal giver et estimat af doseraterne, på

$$\dot{D}_{SSD40} = 10.6 \text{ mGy/s} \quad (4.3)$$

$$\dot{D}_{SSD50} = 6.8 \text{ mGy/s} \quad (4.4)$$

Målte doser for ultrakorte eksponeringer (helt ned til ét sekund) for SSD40 og SSD50 er plottet og linjetilpasset i Figur 4.10. Linjetilpasningen tager ikke målepunkter for under 4 sekunder med fordi disse ikke ligger på linjen, altså enten er nul eller lige omkring nul.



Figur 4.10: Målte doser med linjetilpasning (højre) og skæringspunkt og nulpunkter for linjetilpasningerne (venstre). Linjetilpasningen er lavet for målinger mellem 4 og 13 (SSD40) eller 18 sekunder (SSD50) fordi 3 sekunders eksponering for det meste giver nul i udslag og målinger under 4 sekunder ikke ligger på linje med de andre målinger. Målingerne viser at røntgenrøret ikke giver nogen dosis overhovedet for eksponeringstid på to sekunder eller derunder og i bedste fald en meget lille eller ingen dosis i det tredje sekund.

Gennemsnittet af nulpunkterne og skæringspunktet i Figur 4.10 (højre) og endnu et estimat af build-up-tiden, er

$$\overline{t_{build}} = \frac{3.0 + 3.4 + 2.2}{3} = 2.8 \pm 0.5 \text{ sekunder} \quad (4.5)$$

Doseraterne kan også her estimeres ved stigningstallet og giver

$$\dot{D}_{SSD40} = 10.4 \text{ mGy/s} \quad (4.6)$$

$$\dot{D}_{SSD50} = 7.0 \text{ mGy/s} \quad (4.7)$$

Gennemsnittet af resultaterne af ligning (4.2) og (4.5)  $\pm$  SEM giver en estimeret build-up-tid på

$$\langle t_{build} \rangle \pm \text{SEM} = 3.3 \pm 0.4 \text{ sekunder} \quad (4.8)$$

Gennemsnittet af stigningstallene, altså doseraterne er

$$\langle \dot{D}_{SSD40} \rangle = 10.5 \pm 0.1 \text{ mGy/s} \quad (4.9)$$

$$\langle \dot{D}_{SSD50} \rangle = 6.9 \pm 0.1 \text{ mGy/s} \quad (4.10)$$

Målte doser, beregnede eksponeringstider og dosisrater korrigeret for build-up-tid med beregnede usikkerheder vises i Tabel 4.3.

Tabel 4.3:

Målte og beregnede eksponeringstider og dosisrater. Den præindstillede tid for hver dosis er fundet ved afprøvning og den beregnede tid korrigeret for build-up-tiden på  $3.3 \pm 0.4$  sekunder. Usikkerhederne er beregnet med ligningerne i sektion 2.5.3 ud fra usikkerhedstallene givet i Tabel 3.1. Doserne er et udregnet gennemsnit af forskellige antal målinger i flere af celleflaskebeholderens fire kamre plus/minus SEM, se bilag A.5 og A.6. Den præindstillede dosisrate er beregnet ud fra den målte dosis delt på den præindstillede eksponeringstid mens den beregnede dosisrate ved at dele på den beregnede eksponeringstid som er korrigeret for build-up-tiden.

SSD = 40 cm					
Ønsket dosis (Gy)	Eksponeringstid (s)		Målt dosis (mGy)	Dosisrate (mGy/s)	
	Præindstillet	Beregnet		Præindstillet	Beregnet
0.1	13	$9.7 \pm 0.4$	$101 \pm 1$	$7.7 \pm 0.1$	$10.3 \pm 1.3$
0.2	22	$18.7 \pm 0.4$	$200 \pm 3$	$9.1 \pm 0.1$	$10.7 \pm 1.4$
0.3	32	$28.7 \pm 0.4$	$304 \pm 3$	$9.5 \pm 0.1$	$10.6 \pm 1.4$
0.5	51	$47.7 \pm 0.4$	$503 \pm 5$	$9.9 \pm 0.1$	$10.5 \pm 1.4$
1.0	98	$94.7 \pm 0.4$	$1008 \pm 8$	$10.3 \pm 0.1$	$10.6 \pm 1.4$
				Gennemsnit:	<b><math>10.5 \pm 1.4^3</math></b>
SSD = 50 cm					
0.1	18	$14.7 \pm 0.4$	$101 \pm 2$	$5.6 \pm 0.1$	$6.8 \pm 0.9$
0.2	33	$29.7 \pm 0.4$	$203 \pm 2$	$6.2 \pm 0.1$	$6.8 \pm 0.9$
0.3	47	$43.7 \pm 0.4$	$299 \pm 3$	$6.4 \pm 0.1$	$6.8 \pm 0.9$
0.5	76	$72.7 \pm 0.4$	$497 \pm 5$	$6.6 \pm 0.1$	$6.8 \pm 0.9$
				Gennemsnit:	<b><math>6.8 \pm 0.9</math></b>

#### 4.1.5 ESTIMAT AF DEN SANDE SSD

For at undersøge om røntgenkilden faktisk har den afstand til bestrålingsplanet som er bestemt af dem der har monteret systemet, kan afstandskvadratloven, som formuleret i ligning (2.8), bruges. Intensiteterne, dvs. doserne i de to afstande tages som linjetilpasningerne af doserne i Figur 4.9, og afstandene som de to afstande SSD = 40 cm og SSD = 50 cm. Intensiteten, dvs. dosislinjetilpasningen er en funktion af tid, og asymptoten findes ved at lade  $t \rightarrow \infty$ , hvilket i programmet tilnærmes ved at indsætte et meget højt tal for eksponeringstiden. Der korrigeres for celleflaskebeholderens tykkelse på 1.5 cm,

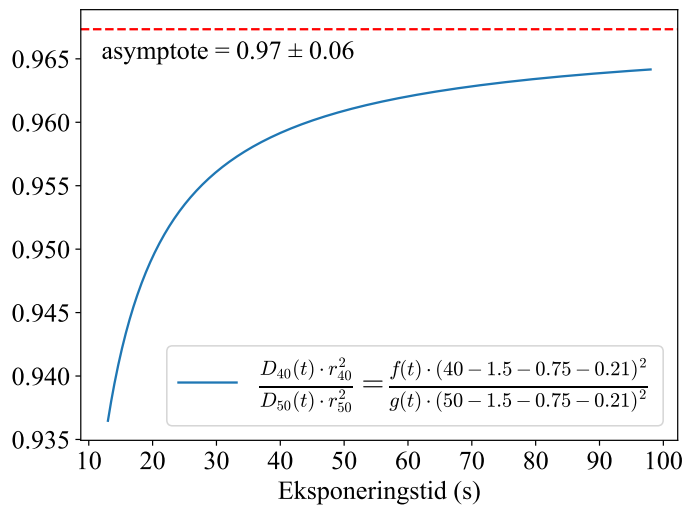
---

<sup>3</sup> Antallet af decimaler er valgt for at kunne sammenligne med tallene i ligning (4.9) og (4.10) samt senere i opgaven i diskussionskapitlet *Beregnete doser*, dosisrater og build-up-tid til trods for usikkerheden har to decimaler.



ioniseringskammerets radius på 7.5 mm og celleflaskens bund på 2.1 mm som også gives i Tabel 3.3.

Usikkerheden er beregnet ud fra usikkerhederne i målingerne af bunden af celleflaskebeholderen og T25-flasken, målingen af den ydre diameter på ioniseringskammeret og kavitetsradius i Tabel 3.3, ved at bruge ligningerne (2.33) og (2.31).



Figur 4.11: Analyse af røntgensystemets SSD ved afstandskvadratloven, ligning (2.8). Ved at lade  $t \rightarrow \infty$  findes asymptoten og dermed fejlen i røntgenrørets anførte SSD. Afstanden til kilden er korrigeret for en celleflaskebeholdertykkelse på 1.5 cm, ioniseringskammerets radius på 7.5 mm og celleflaskebeholderens bund på 2.1 mm.

Den sande SSD er altså en faktor

$$\Delta\text{SSD} = 0.97 \pm 0.06 \tag{4.11}$$

forskellig end den anførte SSD.

#### 4.1.6 FLERE USIKKERHEDER I Udstyret

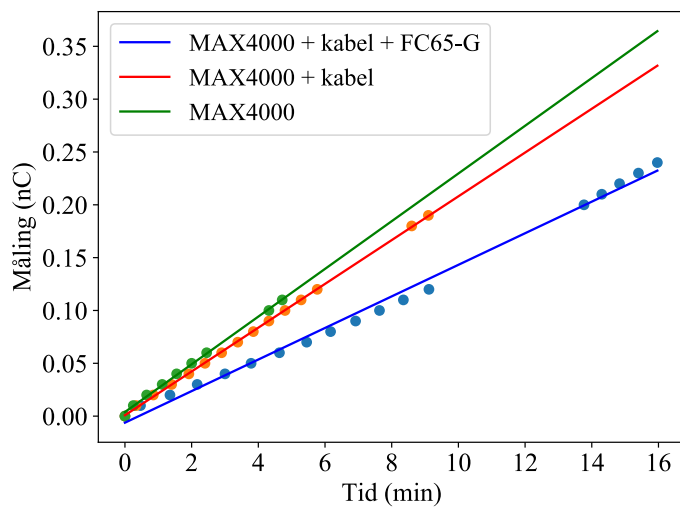
Når elektrometeret er tilkoblet ioniseringskammeret med et kabel, drifter ladningen imens der ikke eksponeres med røntgenstråling. Driften blev målt med et stopur, for hhv.

- a) elektrometeret med kabel og ioniseringskammer tilkoblet,
- b) elektrometeret med kabel tilkoblet, og
- c) elektrometeret alene.

Overraskende nok steg ladningen hurtigere når man fjernede udstyr.

Dette eksperiment afdækker en (eksponerings)tidsafhængig fejl, som er tiltagende vigtig at tage højde for, jo længere eksponeringer man arbejder med.

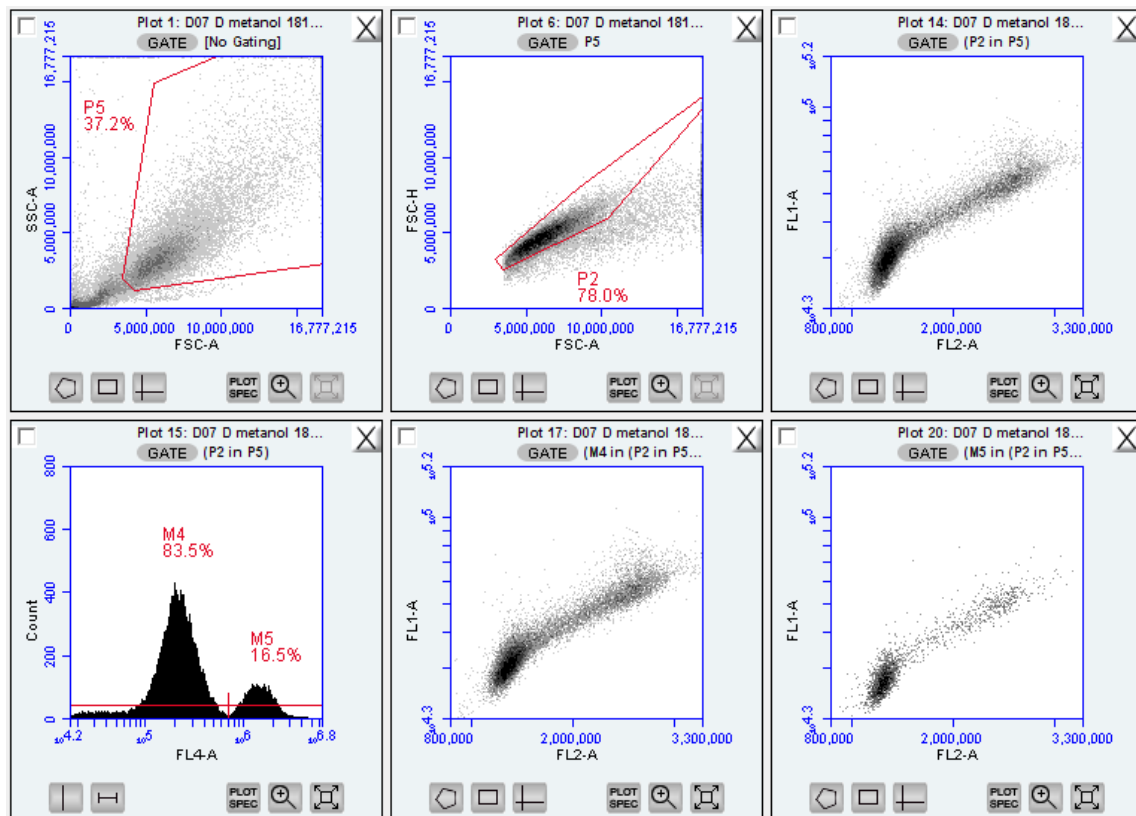
Figur 4.12 viser driften ved disse tre omstændigheder. For eksponeringer under 2 minutter holder fejlen sig nogenlunde indenfor for de ovenfor estimerede  $\pm 0.02$  nC. Eksponeres i 16 minutter må man derimod påregne en fejl på over 0.2 nC.



*Figur 4.12:* Tidsafhængig fejl i målingen med linjetilpasninger. Fejlen er mindst når MAX4000 er tilkoblet kabel og FC65-G. Siden den længste eksponering, denne opgave indeholder, er under 2 min, holder fejlen sig indenfor de i forvejen estimerede  $\pm 0.02$  nC (se afsnit 2.5.3).

## 4.2 FARVNING AF CELLER MED KI-67 OG DYLIGHT

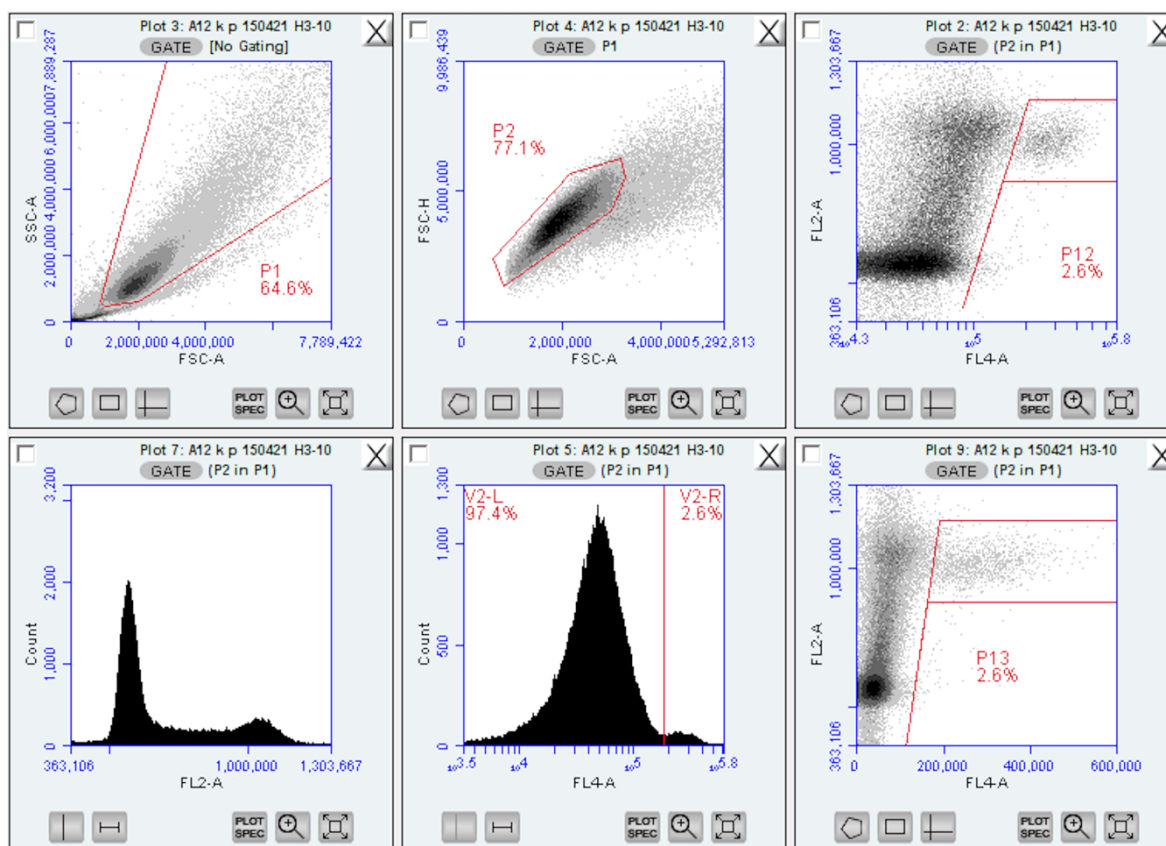
Figur 4.13 viser resultatet fra et forsøg. Det øverste plot til højre viser data med DyLight-signalet på  $x$ -aksen (FL4) og KI-67-signalet på  $y$ -aksen (FL1). Et højt DyLight-signal er kontrolcellerne som var forsøgt bragt i G0. Et højt KI-67-signal er prolifererende celler. De første to plot (øverst til venstre og i midten) viser hhv. debris-diskrimination og dublet-diskrimination.



Figur 4.13: Figuren viser resultatet fra en prøve som blev fikseret med metanol og farvet med KI-67 1:400 i PBS. FL1 viser KI-67, FL2 viser PI og FL4 viser DyLight. Det øverste plot til højre viser KI-67 mod PI. Her er der kun en G0/G1-population. I histogrammet er de to DyLight-populationer gatet for DyLight-positive og negative celler. De DyLight-positive er kontrolceller som er sultet for serum og varme før forsøget for at bringe dem i G0. Nederst til højre vises DNA-profilen for de DyLight-positive G0-celler og nederst i midten vises DNA-profilen for de DyLight-negative. Ingen af dem har nogen særskilt G0- eller G1-population men bare en sammenhængende G0/G1-population til venstre, en S-population i midten og en G2/M-population til højre. Hvis farvningen med KI-67 havde virket efter hensigten, skulle vi have set en særskilt G0-population nedenunder G1-populationen.

### 4.3 FARVNING AF CELLER MED ANTI- $\gamma$ H3

I Figur 4.14 vises et eksempel på flowcytometri på en kontrolprøve (primede T-47D fra H3-10-forsøget). FL2—FL4-plottene til højre har DNA-indhold på  $x$ -aksen og anti- $\gamma$ H3 på  $y$ -aksen. Det øverste er plottet med logaritmisk skala på FL4 og det nederste er lineært på begge akser. Det er også muligt at finde den mitotiske population i et histogram (nederst i midten) men denne metode er mindre sikker, særlig når den mitotiske population er meget lille. De første to plot (øverst til venstre og i midten) viser hhv. debris-diskrimination og dublet-diskrimination.



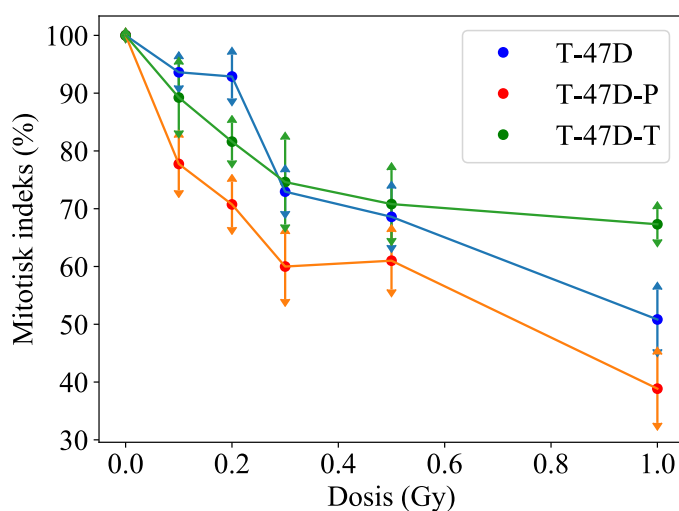
Figur 4.14: Figuren viser resultatet fra kontrolprøven for primede celler i H3-10-forsøget. PI (DNA) på FL2 og anti- $\gamma$ H3 (mitoser) på FL4. Debris-diskrimination i første plot øverst til venstre og dublet-diskrimination i andet plot øverst i midten. Det absolutte mitotiske indeks sættes her til 2.6% i forhold til hele populationen (i plottingen, Figur 4.15, er alle mitotiske indeks normaliseret på kontrolprøven for at kunne sammenligne data på tværs af forsøg).

### 4.3.1 MITOTISK INDEKS SOM FUNKTION AF DOSIS I LAVDOSISOMRÅDET

Tilstrækkeligt mange forsøg med primede og uprimede celler bekræftede tendensen fra tidligere publicerede data i Figur 2.24. Det gør det muligt at stole på de data som efterfølgende og sideløbende blev indsamlet for T-47D-celler med tilsat TGF- $\beta$ 3.

Tilsætning af 0.01 ng TGF- $\beta$ 3-recominant pr ml medium så ikke ud til at have nogen effekt på det mitotiske indeks, som vises i Figur 4.15, hvor tendensen for TGF- $\beta$ 3-cellerne følger de uprimede celler.

Figur 4.15 er udregnet gennemsnit af data fra forsøgene H3-7,9,10,11,12,13,14,15,19,23,27,28,29,20,31, som alle vises individuelt i Bilag B.4 Resultater med anti- $\gamma$ H3<sup>4</sup>.



Figur 4.15: Gennemsnitligt normaliseret mitotisk indeks fra alle vellykkede forsøg med anti- $\gamma$ H3<sup>5</sup>. Primede og uprimede celler viser samme tendens som tidligere publicerede data i Figur 2.24 B (N. J. Edin m.fl. 2014). Primede celler har et lavere mitotisk indeks i HRS-regionen fordi de arresteres i G2 mens uprimede celler går i mitose ved bestråling i HRS-regionen. T-47D-T går mest som uprimede T-47D-celler selvom tendensen ikke er helt utvetydig.

En kronologisk oversigt over udviklingen i forsøgene med anti- $\gamma$ H3 vises i bilag B. Celleforsøg.

<sup>4</sup> H3-12 vises ikke selvom nogle af punkterne blev brugt i udregningen af gennemsnittet.

<sup>5</sup> Usikkerhederne i doserne (Tabel 4.3) er ikke med fordi de er for små til at kunne ses på dosis-aksen.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 RØNTGENDOSIMETRI

#### 5.1.1 USIKKERHED IFM. AFLÆSNING AF ELEKTROMETERET

Elektrometeret måler ladningen i ioniseringskammeret til enhver tid (også når man kigger væk) og ladningen kan påvirkes af andre faktorer end bare bestråling, f.eks. statisk elektricitet eller restladning fra tidligere bestråling som neutraliseres. Dette giver anledning til usikkerhed bl.a. fordi elektrometeret nulstilles manuelt ved hver bestråling, dvs. for hver måling på elektrometeret nulstilles ved at trykke på ”START/RESET”-knappen. Siden ladningen i ioniseringskammeret kan påvirkes af andre ting end bare bestrålingen, bør det tilstræbes at

- a) nulstille elektrometeret så tæt som muligt i tid på selve eksponeringen, og
- b) aflæse målingen så hurtigt som muligt efter eksponeringen

Når luften i ioniseringskammeret er blevet ioniseret, begynder ladningen hurtigt at stige igen (og absolutværdien falder). Det skyldes nok at radikalerne møder nye elektroner og dermed mister deres ladning. Den mest korrekte værdi for mængden af ladning påført af eksponeringen, må altså være den højeste værdi elektrometeret viser, før det begynder at falde. Dette er ikke altid muligt, medmindre man har blikket fæstet mod aflæsningsskærmen til enhver tid mens målingerne gøres. Man kan prøve, men i et forsøg med op til 300 målinger som varer under et minut er det ikke altid muligt at være opmærksom nok. Ud fra dette estimeres en fejlmargen på  $\pm 0.01$  nC.

Imellem målinger, når elektrometeret nulstilles er der ligeledes mulighed for, at ladningen når at stige før eksponeringen går i gang. I hver måling trykker man først ”Start” på røntgenapparatet, dernæst to gange på ”START/RESET” på elektrometeret, og venter. Fra Start-knappen aktiveres, går der ca. 10 sekunder før eksponeringen starter. I denne periode kan ladningen nå at stige med 0.01 nC.

Den samlede målingsusikkerhed ved disse to omstændigheder er.

$$\Delta M_U = 0.02 \text{ nC} \quad (5.1)$$

#### 5.1.2 FØRSTEMÅLINGER SOM ER HØJERE END NORMEN

Når første måling afviger markant fra gennemsnittet, har vi tre valg. Vi kan enten vente et minut imellem hver måling for at lade systemet stabilisere sig før næste måling. I et så

omfattende forsøg, som indebærer ti målinger i 30 punkter vil dette gøre selve forsøget 300 minutter længere, 900 minutter, altså 15 timer længere for at gøre tre forsøg. Dette er ikke en mulighed. Vi kan også tage færre målinger, eller interpolere mellem færre målepunkter, men dette ville ikke give en lige så detaljeret strålefeltkarakteristik. Den sidste mulighed er at se på hvor meget første måling er højere end gennemsnittet og finde en kalibreringsfaktor. Tendensen vises i Figur 4.7 og resultaterne fra hvert enkelt forsøg vises i detaljer i Bilag A. Røntgendosimetri. Kalibreringsfaktoren ( $2.0 \pm 0.3\%$  for 13 sekunders eksponering og 0.1 Gy dosis) kan bruges til at estimere den præcise dosis som gives til cellerne i bestrålingsforsøgene, hvis det ikke er muligt at måle dosen direkte i disse forsøg. Siden afvigelsen kun er omkring 1% for 20 sekunders eksponering og tendensen er faldende, ser jeg ikke tilstrækkelig grund til at finde nøjagtige kalibreringsfaktorer for højere doser end 0.1 Gy. En afvigelse på  $2.0 \pm 0.3\%$  er dog tilpas stort, større end flere af de andre korrektionsfaktorer som er involveret i ladning-dosis-omregningsfaktoren, og af den grund mener jeg den er stor nok til at have med.

For at undersøge tendensen nærmere, og eventuelt have mulighed for at lave fremtidige bestrålingsforsøg med endnu mindre doser end 0.1 Gy, besluttede jeg at gennemføre et ultralavdosis-dosimetri-eksperiment, hvor jeg testede røret for eksponeringstider helt ned til et sekund. Gennem dette forsøg opdagede jeg at røntgenrøret ikke leverer nogen dosis i de første  $3.3 \pm 0.4$  sekunder, hvilket udgør røntgenrørets build-up-tid. Siden dosen i denne tid er lig 0, findes dosisraten mere præcist end ved blot at dele dosen på den præindstillede eksponeringstid, se Tabel 4.1.

Omregningsfaktorerne fundet i eksperimentet med ultrakorte eksponeringer, gør os i stand til at bestråle celler med temmelig stor præcision med doser helt ned til ca. 25 mGy. Siden det mitotiske indeks i anti- $\gamma$ H3-forsøget udvikler sig hurtigt som funktion af dosis, kunne det eventuelt være interessant at køre et forløb med flere målepunkter HRS-regionen for at få mere præcise data angående det mitotiske indeks ved helt lave bestrålinger.

Det er også interessant at se at udviklingen i afvigelsen som funktion af eksponeringstid ser ud til at gå som  $e^{-t}$ , hvor  $t$  er eksponeringstiden.

Skal man bestråle celler med ultrakorte eksponeringstider for at opnå en dosis på eksempelvis 25 mGy er det nødvendigt at bruge korrektionsfaktoren fundet her. Der er ikke tid til at sætte cellerne på plads i eksponeringskammeret og starte maskinen på kort nok tid til at katoden ikke når at "lade op", og det kan derfor ikke lade sig gøre at køre en prøveeksponering før

den egentlige bestråling for at "lette trykket" på røntgensystemet. Resultaterne i kapitel 4.1.3 bekræfter fænomenet som bliver eksponentielt større for stadigt lavere doser, se Figur 4.10.

Det er muligt at lave dosimetri for en bestemt dosis, for eksempel 25 mGy som tilsvarende 6 sekunders teknisk eksponeringstid på SSD40, dvs.  $2.7 \pm 0.4$  sekunders sand eksponeringstid, og 7 sekunder teknisk eksponeringstid på SSD50, altså  $14.7 \pm 0.4$  s sand eksponeringstid, og vente 30 – 60 sekunder mellem hver måling uden at dette ville tage alt for lang tid. I dette hypotetiske eksperiment tror jeg man vil finde den samme dosis som med normal dosimetri med kort tid imellem eksponeringer ved at bruge min kurve for kalibrering ved meget korte eksponeringer.

### 5.1.3 BEREGNEDE DOSER, DOSISRATER OG BUILD-UP-TID

De målte maksimumrater på  $0.218 \pm 0.002^1$  nA for SSD40 og  $1.141 \pm 0.002$  nA for SSD50 bekræfter hypotesen om build-up-tiden på  $3.3 \pm 0.4$  sekunder. Udregnes doserne ved at gange maksimumraten med den sande eksponeringstid for hhv. SSD40 og SSD50 fås

$$D_{SSD40}^{0.1 \text{ Gy}} = 9.7 \text{ s} \cdot 0.218 \text{ nA} \cdot N_K p_u k_{TP} (\overline{\mu_{en}}/\rho)_{\text{air}}^w = 104 \pm 5 \text{ mGy} \quad (5.2)$$

$$D_{SSD50}^{0.1 \text{ Gy}} = 14.7 \text{ s} \cdot 0.141 \text{ nA} \cdot N_K p_u k_{TP} (\overline{\mu_{en}}/\rho)_{\text{air}}^w = 102 \pm 3 \text{ mGy} \quad (5.3)$$

Endnu et estimat af dosiserne kan findes ved omregne ioniseringsraten, som blev aflæst på elektrometeret mens røret kører, til dosis ved ligning (2.13).

Ioniseringsraten stabiliserede sig på maksimum efter ca. 7 sekunder. Siden ioniseringsraten er lavere de første sekunder og de udregnede doser her ikke tager højde for det, giver det god mening at svarene ligning (5.2) og (5.3) giver lidt højere svar end de målte doser, se Tabel 4.3.

Den aflæste maksimumrate i nA kan sættes lig målingen pr. tid, altså  $\text{RATE} = M_U/t \sim [\text{nC/s}] = [\text{nA}]$ . Omregningsfaktoren i ligning (2.13), skaleret på tid, giver dosisrate

$$\dot{D}_{SSD40} = 0.218 \text{ nA} \cdot N_K p_u k_{TP} (\overline{\mu_{en}}/\rho)_{\text{air}}^w = 10.7 \pm 0.1 \text{ mGy/s} \quad (5.4)$$

$$\dot{D}_{SSD50} = 0.141 \text{ nA} \cdot N_K p_u k_{TP} (\overline{\mu_{en}}/\rho)_{\text{air}}^w = 6.9 \pm 0.1 \text{ mGy/s} \quad (5.5)$$

---

<sup>1</sup> Usikkerheden estimeres til  $\pm 0.002$  ud fra samme logik som usikkerheden i den målte ladning på  $\pm 0.02$  nC, dvs. plus/minus én af den mindste målbare enhed i hver ende.



Dette stemmer godt overens med gennemsnittene af de sande dosisrater, vist med fed skrift i Tabel 4.3. Det giver også god mening at estimaterne som findes fra ioniseringsraten, er lidt højere end de ”sande” dosisrater, siden maksimumraten først opnås efter ca. 7 sekunder og de sande dosisrater beregnes ud fra en build-up-tid på  $3.3 \pm 0.4$  sekunder. Det forklarer hvorfor de sande værdier for dosisraterne i Tabel 4.3 er lidt lavere end resultaterne i ligning (5.4) og (5.5).

#### 5.1.4 STANDARDAFVIGELSE OG SEM I DEN HOMOGENE DEL AF FELTET

Standardafvigelsen i procent i gennemsnit i den homogene del af feltet i Figur 4.3 giver et billede af hvor ustabil røntgenrøret er i et givet forsøg (dvs. uden at røret bliver tændt og slukket imellem målingerne). Her ville jeg forvente en stigning i stabilitet når eksponeringstiden går op fordi røntgenrøret bruger godt 3 sekunder på build-up-tiden, altså en stor procentdel af eksponeringstiden når vi eksponerer i bare 12 eller 13 sekunder. Jeg tror det er forventeligt at build-up-tiden ikke er helt ens hver gang og at dette må gøre standardafvigelsen større.

Den gennemsnitlige SEM i procent i den felthomogene region i Figur 4.4 giver et billede af røntgenrørets stabilitet imellem individuelle forsøg. SEM er mindst for 13 sekunder, højere for 14 sekunder og højest for 20 sekunders eksponering. Jeg tror udviklingen i SEM kan forklares med rækkefølgen forsøgende blev gjort i. 20 sekunder blev gjort først og har den højeste SEM, derefter 14 og derefter 13 sekunder. Min hypotese er at røntgenrøret ikke har været brugt i så omfattende forsøg i et stykke tid og at maskineriet brugte de første forsøg på at stabilisere sig. Det er også fuldt ud muligt at udviklingen i SEM som funktion af eksponeringstid ikke giver mening og derfor er fuldstændig tilfældigt.

#### 5.1.5 ANALYSEMETODE / KODE

Til at begynde med skrev jeg alle målinger ind i hver sin `numpy.array()` og udregnede gennemsnit og standardafvigelse af disse arrays direkte. Da jeg så skulle skrive koden med loop, indlæsning af datafil osv. kunne jeg sammenligne resultatet med de hardcodede værdier. Ulempen ved hardcoding er at det er forvirrende at se på, jo større datamængden er. Da bliver det fristende at bruge copy/paste og bare ændre ”indekserne”, og her er det let at lave fejl. Loops derimod laver ikke fejl og fylder kun nogle få linjer.

Sammenligningstest. Siden totalgennemsnittet kan udregnes på to måder med samme resultat, som beskrevet i afsnit 2.5.1, testes om disse *faktisk* giver samme svar. I så fald vil SE og

SEM også være udregnet rigtigt da de befinder sig i samme loop med eneste forskel at de udregnes med `numpy.std()` og ikke `numpy.mean()`.

### 5.1.6 RØNTGENRØRETS SANDE SSD

For at sikre reproducérbarhed af forsøg på tværs af laboratorier og udstyr er det vigtigt at undersøge alle parametre som kan føre til afvigelse. Når røntgenrørets SSD afviger fra det præindstillede er dette en kilde til fejl. En fejl på en faktor  $0.97 \pm 0.06$  fra den påskrevne SSD, angivet i ligning (4.11), giver en beregnet og sand SSD på

$$\text{SSD}_{40} = 40 \text{ cm} \cdot 0.97 = 39 \pm 3 \text{ cm} \quad (5.6)$$

$$\text{SSD}_{50} = 50 \text{ cm} \cdot 0.97 = 48 \pm 3 \text{ cm} \quad (5.7)$$

## 5.2 CELLEFORSØG - METODEUDVIKLING

### 5.2.1 KONSEKVENSER VED FORANDRING I ASPIRATIONSTEKNIK

Da jeg holdt op med at aspirere supernatant med 5 ml pippette og begyndte med at bruge vakuumaspirator i stedet for (se Tabel 3.3), så jeg fordelen af at kunne suge alt op til sidste dråbe så pelleten lå tilbage helt tør i bunden af røret. Dette viste sig at have den ulempe at cellerne forsvandt i løbet af forsøget. Jeg begyndte derfor at lade 100  $\mu\text{l}$  ligge i bunden ved hver vask. Dette har ulempen, at lidt af den opløsning, som skal vaskes væk, ligger tilbage i glasset ved hver aspiration. Når der vaskes to gange med 5 ml PBS efter trypsinering giver dette et forhold på 0.2 ml til 5.2 ml, dvs. 1:26 ved hver vask og efterlader derfor et blandingsforhold på  $\frac{1}{26^2} = 1:676$  af supernatant ved to vaske.

Ved fiksering i 70% etanol resuspenderes pelleten i 200  $\mu\text{l}$  PBS før 5 ml 70% etanol tilsættes. Dermed ligger pelleten i 200  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ , hvilket giver forholdet 1:26 mellem PBS og 70% etanol. Dette giver en etanolstyrke på 66% i løsningen når etanolen er tilsat. 70% etanol fås ved forholdet 3.5 ml abs. etanol + 1.5 ml  $\text{H}_2\text{O} = 5.0 \text{ ml}$ .

Når vi så har 0.2 ml  $\text{H}_2\text{O}$  / PBS i bunden af røret har vi 3.5 ml abs. etanol + 1.7 ml  $\text{H}_2\text{O} = 5.2 \text{ ml}$ , hvilket giver en alkoholprocent på

$$\frac{3.5}{5.2} \approx 67\% \quad (5.8)$$

Ulempen ved ikke at suge alt op er at det er usikkert hvor meget nøjagtig der ligger i dråben. Dette gør blandingsforholdene usikre når cellerne mærkes med forskellige løsninger. Det er

derfor vigtigt at prøve at gøre det så ens som muligt hver gang, når det ikke kan lade sig gøre at suge pelleten helt tør.

En mulighed er at ændre på protokollen for at kompensere for de ændrede forhold, men dette har usikkerhed forbundet med sig, da det ikke er til at vide om dem, der har fundet frem til blandingsforholdene i protokollen, har efterladt en dråbe ved aspiration eller ej. Siden en trænet laboratorietekniker generelt ikke har problemer med at aspirere hele væskemængden uden at miste celler, er det rimeligt at antage protokollen ikke tager højde for en ”dråbe” i bunden af centrifugerøret ved aspiration og derfor er det rigtigt at korrigere for dette i blandingsforholdene hvis man (som jeg) må finde alternativer for ikke at miste celler i løbet af forsøget.

#### FARVNING MED ANTI- $\gamma$ H3 VED FORANDRING I ASPIRATIONSTEKNIK

Når supernatant aspireres ligger der en dråbe igen i bunden af centrifugerøret, medmindre man aspirerer, indtil pelleten er helt tør. Efter en del uheld med aspiration af celler, hvor jeg i løbet af forsøget mistede cellerne, fastsatte jeg en fast størrelse på dråben på 100  $\mu$ l ved hver aspiration før antistoffet blev tilsat.

Ved forandring af dråbens størrelse ændres forholdene af det stof som tilsættes og der bør derfor kalibreres for dette. Når der tilsættes 100  $\mu$ l anti- $\gamma$ H3 i PNT (PBS med 4% tørmælk og 0.5% Tween 20) til 100  $\mu$ l PBS (med celler) må derfor både styrken på PNT og mængden af anti- $\gamma$ H3 fordobles fra den oprindelige protokol. Når 200  $\mu$ l sekundær antistof i PNT tilsættes til 100  $\mu$ l må forholdet være halvanden gang større.

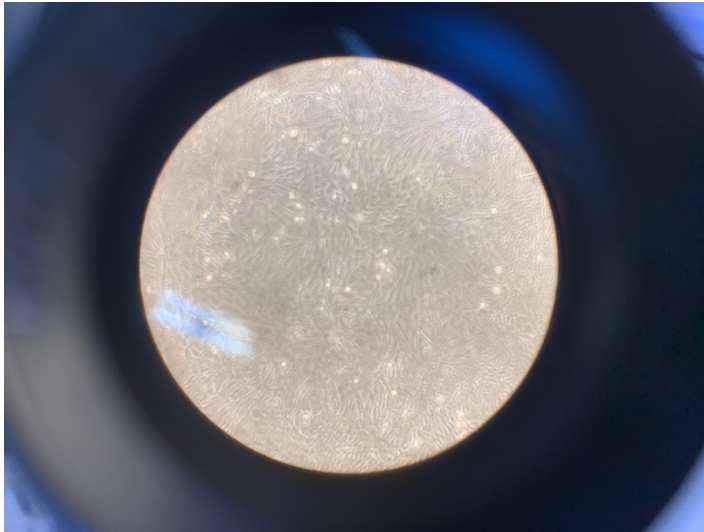
Da jeg ikke fik helt entydige resultater hver gang med forholdene 1:500 i PNT fordoblede jeg forholdet til 1:250 for både primær og sekundær antistof, kalibreret for dråbe på 100  $\mu$ l i begge tilfælde. Dette landede på en mængde af 12  $\mu$ l anti- $\gamma$ H3 i PNT(2X) og 18  $\mu$ l sekundær antistof i PNT(1.5X) i et forsøg med 16 prøver.

#### 5.2.2 FARVNING MED KI-67 - MISLYKKET

Når konfluente celler farves med DyLight og blandes sammen med cyklende celler uden DyLight forventes to populationer i kanalen som måler fluorescens fra DyLight. Ligeledes forventes KI-67 at binde sig til celler som er i cyklus men ikke G0-celler, hvilket også bør give to populationer i kanalen som måler fluorescens fra KI-67-bundet FITC.

Fortyndingen af DyLight, og af KI-67 blev varieret mellem forsøgene. Fiksering med 70% etanol og med 99.8% metanol blev afprøvet, og forsøget blev udført med både T-98G- og med T-47D-celler. For at sikre, at G0-kontrolceller er i G0 på forsøgsdagen havde konfluente

celler været inkubéret ved stuetemperatur i serumfri medium de sidste 24 timer før forsøget, da 100% konfluens ikke er nok for at få cellerne til at holde op med at proliferere, se Figur 5.1.



*Figur 5.1:* 100% konfluente T-47D-celler i et mikroskop. De lysende celler er mitoser.

Den bedste fikséringsagent for at få DyLight ind i cellerne ser ud til at være 99.8% metanol, se histogrammet Figur 4.13, nederst til venstre.

## 5.3 FLOWCYTOMETRI - METODEUDVIKLING

### 5.3.1 METODER FOR AT OVERKOMME USIKKERHEDER MED FLOWCYTOMETRI

Når man analyserer cellepopulationer i flowcytometri og vil vide hvor stor procentdel af en population som befinder sig i en vis region, har det meget at sige hvordan man anbringer gaten. Dette giver en stor usikkerhed og det er let at komme til at fremhæve ønskede resultater. Jeg prøvede at gøre mig selv så upartisk som muligt ved at sætte gaten i flere plot samtidig (to density-plot og to dot-plot) hvor to af gatene var kvadrantgate og to var polygongate. Jeg prøvede også at gennemgå hele datasættet mange gange hvor jeg satte gaten på ny for hver prøve. Dette tog meget lang tid med op til fem gentagelser og op til 16 prøver.

Jeg besluttede mig for at prøve at få en kontrolgruppe til at evaluere prøveresultaterne uden at kende til de forventelige svar. Jeg prøvede også at køre forsøget uden at kende doserne før analysen var gjort.

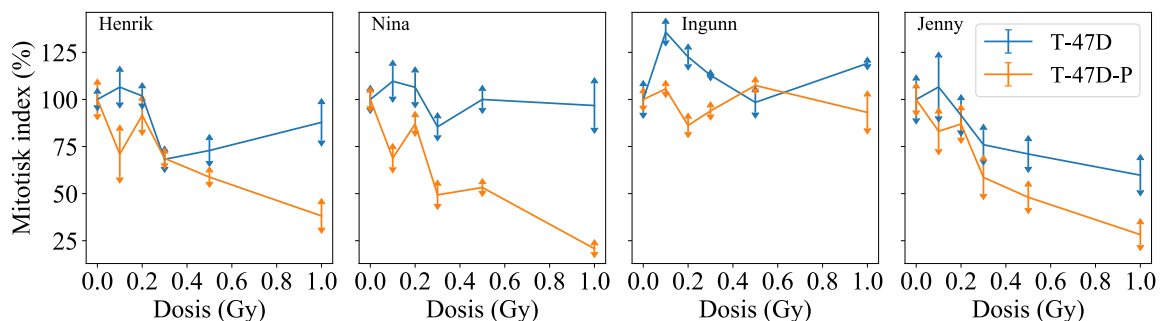
#### UPARTISKE OBSERVATØRER

Fordi det kan være ualmindeligt let at narre sig selv med analyse af plot i flowcytometri, fik jeg en kontrolgruppe af udenforstående personer til at analysere den samme datamængde.

Deltagerne inkluderede en masterstudent (Jenny Vatne) som er nybegynder i flowcytometri,

en ph.d.-student (Ingunn Hansson) som er godt kendt med flowcytometri og en forsker (Nina Edin) med mange års erfaring. Ingen af dem fik at vide hvilke doser som var givet til hvilke prøver. Jenny fik en træning i at sætte gaten på samme måde som jeg havde gjort det (fem gennemløb af alle prøver med en polygon-gate i et lineært density-plot, se Figur 4.14 nederst til højre), og de to andre fik lov til at analysere data, som de selv ønskede. Ingunn brugte histogram for anti- $\gamma$ H3, se Figur 4.14 nederst i midten. Deres opgave lød på at finde procentandelen af populationen som både havde højt signal på flowcytometerets FL2-kanal, dvs. DNA-indhold som G2/M-celler, og højt FL4-signal, dvs. hændelser som var mærket med anti- $\gamma$ H3.

Fordi forsøget handlede om at kvantificere min egen upartiskhed (eller det modsatte) for at kvalitetsstemple, eller give mig en tilbagemelding, fik deltagerne til opgave at se på et vellykket og, hvis jeg tænker rigtigt, let analyserbart resultat, samt et ikke vellykket forsøg, hvor mærkningen eller et eller andet var gået galt så resultaterne ikke gav nogen mening. Hvis alle deltagere, inklusive mig selv var enige om populationens størrelse i forhold til hele populationen, dvs. det mitotiske indeks, så ville det betyde jeg sandsynligvis kan stole på min analyse i de andre forsøg. Figur 5.2 viser resultaterne fra H3-11 fra fire forskellige observatører som brugte hver deres metode for at finde den mitotiske population.

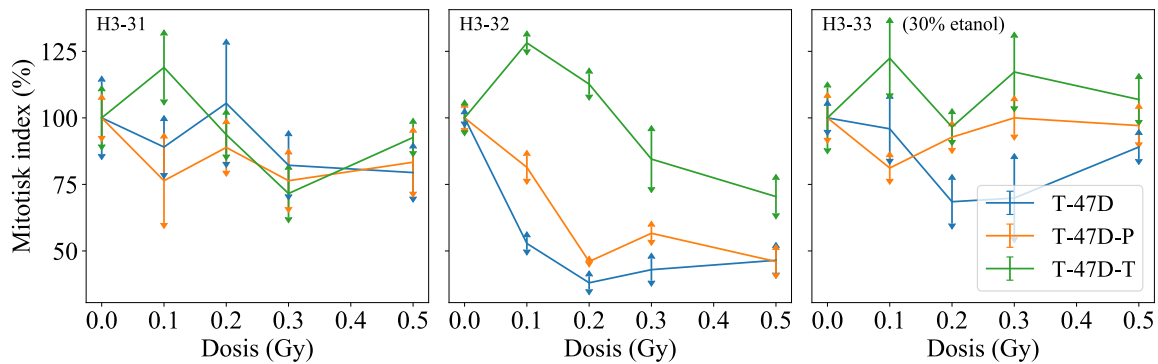


Figur 5.2: Analyse af flowcytometri fra H3-11-forsøget fra fire forskellige observatører. De tre mod højre kendte ikke doserne og den længste mod højre kendte slet ikke til forsøgets hensigt eller mening. Tendensen viser i alle tilfælde et højere mitotisk indeks for uprimede celler i HRS-regionen, og dermed det forventede resultat i overensstemmelse med tidligere publiceret og anerkendt data (Figur 2.24).

#### ANALYSE AF PRØVERESULTATER UDEN AT VIDE DOSER

En anden måde at granske min egen partiskhed på er at få en udenforstående person til at give celleflaskerne kodenavne, så doserne ikke er kendt før efter analysen. Dette gjorde jeg i tre forsøg med hjælp fra Jenny Vatne, som skrev på celleflaskerne efter bestråling og blandede dem så jeg ikke vidste hvilke prøver som havde fået hvilke doser før overstået evaluering af prøveresultaterne i C6. Uheldigvis lavede jeg en fejl i det tredje forsøg så

blandingsforholdene i etanol blev byttet om så etanolstyrken endte på 30%. Resultatet vises i Figur 5.3. En tendens som går igen i disse tre forsøg er en stigning til over 100% i mitotisk indeks for T-47D-T-cellerne ved 0.1 Gy, mens T-47D/P-cellerne begge falder som funktion af dosis, P-celler generelt mere end normalceller som forventet, bortset fra H3-32, som havde en underligt stor mitotisk population i kontrolprøven.



Figur 5.3: Resultater af tre individuelle forsøg hvor doserne ikke var kendt før efter fuldent evaluering af prøveresultaterne i C6. Datapunkter fra H3-31 beholdes fordi de bekræfter tendensen for primet og uprimet. H3-32 afvises fra gennemsnitsberegningen fordi tendensen ikke bekræftes for uprimede celler, højst sandsynlig pga. en underligt stor mitotisk population for kontrolprøven. H3-33 afvises fordi cellerne blev fikseret i 30% etanol ved en fejl, hvilket gør det tvivlsomt at stole på resultatet. Fælles for alle forsøgene er dog et stort hop i mitotisk indeks for T-47D-T-cellerne udfor 0.1 Gy, hvilket (hvis vi godtager resultaterne) evt. skal forklares med at TGF- $\beta$ 3 har fået G0-celler ind i cyklus og at der derfor er mange celler i mitose.

### 5.3.2 PRÆMISSER FOR AT EKSKLUDERE DATA

Data fra forsøg med tilsætning af TGF- $\beta$ 3 til 6 af flaskerne blev kun inkluderet i den endelige analyse når data fra primede og uprimede celler bekræftede tendensen fra tidligere studier (Figur 2.24, B). De inkluderedes ligeledes kun når der ikke er sket andre store fejl som forkert etanolstyrke, forbytning af prøver eller svært udtværede plot i flowcytometri. Usikkerheden på graferne er standardafvigelsen på målingerne i analysen og altså et tal for hvor forskelligt man kan evaluere resultaterne med flere forskellige gatinger. Den kendte tendens bør i det mindste ligge indenfor standardafvigelsen for primet og uprimet for at kunne godtage resultaterne for TGF- $\beta$ 3-forbedrede celler.

Forsøg som ikke havde nok celler til at give tætte populationer i flowcytometri blev også ekskluderet.

Hvis ét eller flere prøvesvar gav mystiske resultater og ikke opfyldte ovenstående kriterier kunne det enkelte prøvesvar ekskluderes mens de gode svar kunne inkluderes i udregning af gennemsnit. Hvis kontrolprøven var den dårlige prøve, måtte hele rækken ekskluderes.

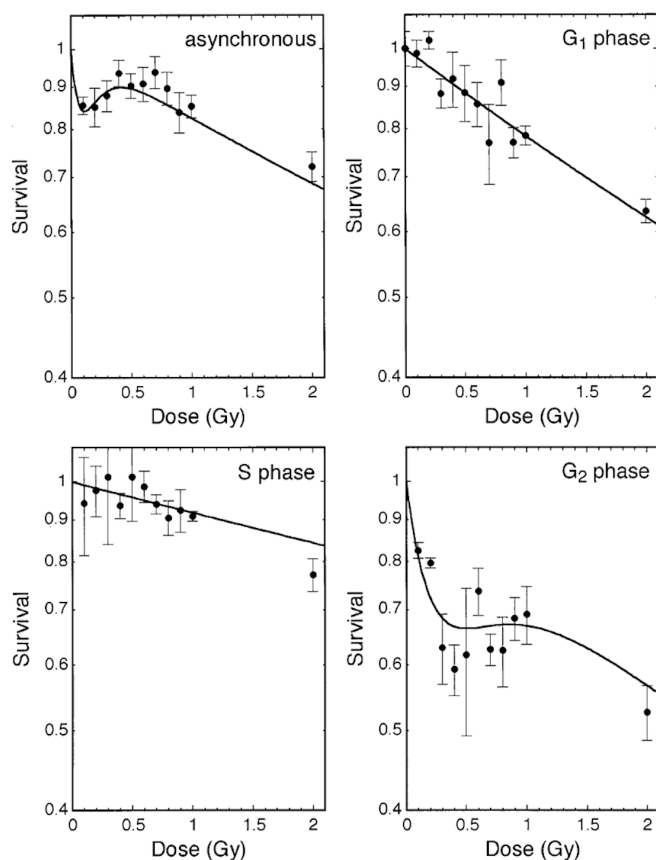
## 5.4 EFFEKTEN AF LDR-PRIMING OG TGF- $\beta$ 3

Den gennemgående tendens i de udførte forsøg med anti- $\gamma$ H3 er at TGF- $\beta$ 3 ikke påvirker det mitotiske indeks og i al fald ikke på samme måde som priming gør det. Når tilsat TGF- $\beta$ 3 rekombinant i tidligere studier giver en forøget overlevelsesrate i HRS-regionen må forandringen i det mitotiske indeks skyldes noget andet end (kun) TGF- $\beta$ 3.

### 5.4.1 HVORDAN PÅVIRKER PRIMING DET MITOTISKE INDEKS?

Forsøgene i denne opgave bekræfter en sammenhæng mellem HRS og det mitotiske indeks som er set i adskillige tidligere studier.

I et studie fra 2003 viser (Marples, Wouters, og Joiner 2003) at overlevelsesraten for V79-hamsterceller kun påvirkes af bestråling i HRS-regionen når de er i G<sub>2</sub>. I V79-celler påvirker lavdosisbestråling ikke overlevelseskurven for G<sub>1</sub>- eller S-celler men kun for G<sub>2</sub>-celler. Se Figur 5.4. Studiet er en bekræftelse på at dykket i overlevelsesraten er et produkt af at det tidlige G<sub>2</sub>-kontrolpunkt som beskrives i kapitel 2.1.3, først foreslået af (B. Xu m.fl. 2002) ikke er effektivt for HRS-positive cellelinjer for doser under en vis tærskelværdi.



Figur 5.4: Effekten af bestråling i HRS-regionen af V79 hamsterceller med en Co60-kilde. Studiet viser at kun G<sub>2</sub>-celler påvirkes af lavdosisbestråling og bekræfter derfor hypotesen om det tidlige G<sub>2</sub>-kontrolpunkt. (Marples, Wouters, og Joiner 2003).

At kontrolpunktet kan induceres af LDR-priming er vist i senere studier som efterforsker det mitotiske indeks i sammenhæng med overlevelsesraten, bl.a. (N. J. Edin, Olsen, m.fl. 2009)

og (N. J. Edin m.fl. 2013), se Figur 2.24 B. Mine resultater i Figur 4.15 bekræfter denne tendens og dermed at HRS-bortfaldet kan skyldes et ATM-afhængigt G2-kontrolpunkt, nemlig det tidlige G2-kontrolpunkt, foreslået af (B. Xu m.fl. 2002) og bekræftet af (Marples, Wouters, og Joiner 2003), (N. J. Edin, Olsen, m.fl. 2009) m.fl.

Overlevelseskurvens  $D_c$  (dosen hvor 63% har en strålefølsomhed bestemt af  $\alpha_r$ ) blev fastsat for T-47D-celler eksponeret med 220 kV røntgenstråling til  $D_c \pm SE = 0.20 \pm 0.06^2$  (N. J. Edin m.fl. 2012). Det er ved  $D_c$  det mitotiske indeks forventes at begynde at falde for uprimede celler hvis vi tror på hypotesen om at deres HRS skyldes ineffektiv G2-arrest før 0.2 Gy, hvilket betyder de sendes i mitose med DNA-skader og går i apoptose for doser mindre end  $D_c$ . Grafen for uprimede T-47D-celler i Figur 4.15 har samme  $D_c$ , med en ganske lille grad af arrest indtil 0.2 Gy, ca. 95% relativ mitotisk indeks i forhold til kontrolprøven og et drastisk fald til omkring 70% ved 0.3 Gy, hvorefter grafen igen flader ud. Grafen for primede celler falder derimod lige fra starten helt i tråd med forventningen om at primingen fjerner HRS ved at inducere det tidlige G2-kontrolpunkt som arresterer celler med DNA-skade forvoldt af doser  $D < D_c = 0.2$  Gy.

Problemet er at dette fortsat ikke kommer med noget svar på hvad oversvinget til  $> 100\%$  i overlevelseskurven skyldes.

#### 5.4.2 HVAD SKYLDES OVERSVINGET I OVERLEVELSES RATEN SOM FØLGE AF PRIMING?

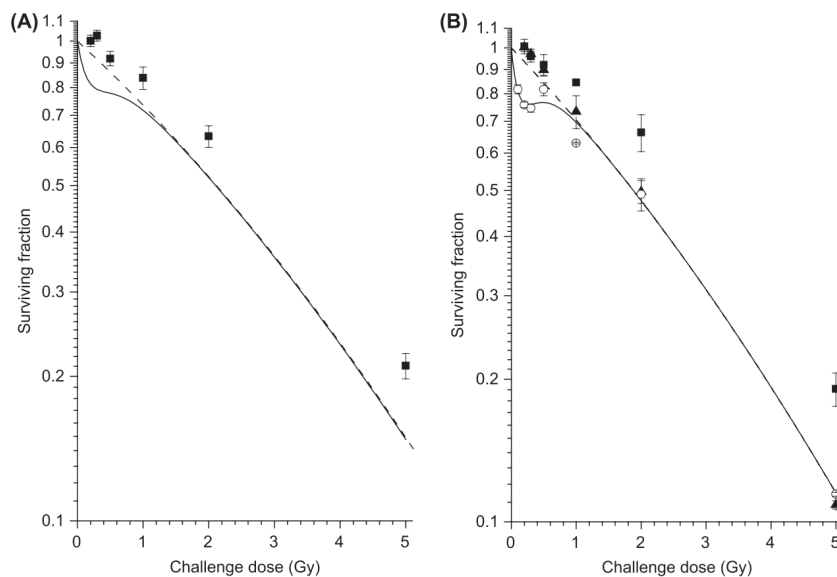
Resultatet i Figur 4.15 bekræfter at priming inducerer det tidlige G2-kontrolpunkt men tilsiger at TGF- $\beta$ 3 ikke gør det. Tidligere studier har vist et oversving på overlevelseskurven til over 100% både efter LDR priming og tilsætning af TGF- $\beta$ 3 (N. J. Edin m.fl. 2007; N. J. Edin, Olsen, m.fl. 2009; N. J. Edin m.fl. 2013). I disse studier sammenfalder kurven for LDR primede celler med LQ-modellen når dosen overskrider HRS/IRR-regionen, dvs. over 1.0 Gy. Resultater fra studier hvor TGF- $\beta$ 3 er tilsat (N. J. Edin m.fl. 2014) viser dog en lidt anden tendens, se Figur 5.5. Overlevelsesraten for TGF- $\beta$ 3-tilsatte celler ser ud til at være højere end forudsagt af LQ-modellen for doser helt op til 5 Gy. Med lidt god vilje kan disse tendenser endda se ud til at have bevaret HRS og simpelthen ladet hele LQ-kurven skifte et hak op. Tegnes en streg gennem punkterne for 0.01 ng/ml TGF- $\beta$ 3 rekombinant-tilsatte T-

---

<sup>2</sup> I dette forsøg blev bestrålingen gjort med mindre filtrering og derfor højere LET. Derfor forventes  $D_c$  ikke at ligge det samme sted som i disse forsøg.



98G-celler (firkanterne, Figur 5.5 B) ligner dette er overlevelseskurve med HRS og IRR som blot ligger lidt højere oppe end LQ-modellen. En overlevelseskurve med HRS og IRR har ikke fået induceret det tidlige G2-kontrolpunkt. De ekstra ”overlevende” eller aktive celler må derfor komme fra et andet sted. Det mine data i Figur 4.15 tilsiger er at TGF- $\beta$ 3 ikke påvirker det tidlige G2-kontrolpunkt, helt i tråd med denne observation.



Figur 5.5: Overlevelseskurver for T-47D-celler (A), og T-98G-celler (B) som er tilsat TGF- $\beta$ 3. Begge cellelinjer viser en tendens til forøget overlevelses over hele dosisspekteret 0 – 5 Gy. (N. J. Edin m.fl. 2014, redigeret).

### 5.4.3 HVORDAN PÅVIRKER TGF- $\beta$ 3 OVERLEVELSES RATEN NÅR DEN IKKE PÅVIRKER DET MITOTISKE INDEKS?

Resultaterne i denne opgave peger på at TGF- $\beta$ 3 ikke påvirker overlevelsesraten ved at inducere det tidlige G2-kontrolpunkt. Dette stemmer overens med hypotesen fra (N. J. Edin m.fl. 2014) m.fl. hvor TGF- $\beta$ 3 ser ud til at have en anden effekt end priming til trods for at de begge bortskaffer HRS i cellerne. TGF- $\beta$ 3 kan tilføres helkropsbestrålede mus op til 48 timer efter en letal dosis helt op til 10 Gy og forøge musenes overlevelsesrate (Nina Frederike Jeppesen Edin m.fl. 2016), hvilket er en stærk fortaler for at både priming og TGF- $\beta$ 3 gør noget andet eller mere end bare at inducere tidlig G2-arrest. I musenes tilfælde er effekten også for store doser, ikke kun HRS-området, hvilket også tyder på at der er en anden effekt i TGF- $\beta$ 3.

Den førende hypotese er at TGF- $\beta$ 3 bringer celler ud af G0. Selvom det ikke lykkedes mig at bevise dette direkte, fordi forsøgene med proliferationsmarkør KI-67 ikke gav resultat, er hypotesen fortsat i spil i og med at TGF- $\beta$ 3 ikke har nogen effekt på det mitotiske indeks i bestrålede celler i HRS-regionen til trods for at den har en stor indflydelse på

overlevelsesraten når der tilsættes 0.01 ng/ml rekombinant TGF- $\beta$ 3 (N. J. Edin m.fl. 2014), netop samme mængde som jeg tilsatte i mine forsøg.

#### 5.4.4 INDUCERER LDR-PRIMING TGF- $\beta$ 3?

Oversvinget i overlevelsesraten må følge af at LDR-priming (i hvert fald blandt andet) inducerer TGF- $\beta$ 3. Et induceret tidligt G2-kontrolpunkt kan ikke få overlevelsesraten til at stige til over 100%, det kan i bedste fald give 100% overlevelse hvis alle cellerne får repareret al DNA uden fejl.

Effekten af LDR-priming har været fundet til at afhænge af TGF- $\beta$ 3 (Nina F. Jeppesen Edin 2014), men for at gøre fjernelsen af HRS permanent måtte cellerne selv LDR-primere. LDR-priming af cellemediet er ikke nok, hvilket betyder at HRS-fjernelsen også afhænger af iNOS-aktivering inde i cellen for at producere NO der i samspil med superoxid  $O_2^{\cdot-}$  danner peroxinitrit  $ONOO^{\cdot-}$ , et molekyle som skal til for at frigøre TGF- $\beta$ 3 fra sin kovalente makker LAP3. Dette sker kun med LDR-priming men ikke ved HDR-priming (N. J. Edin m.fl. 2013).

Siden TGF- $\beta$ 3 ikke påvirkede det mitotiske indeks når det blev tilsat 16 timer for bestråling kunne det være interessant at tilsætte det sammen med en radikaldonor som DEANO for at se om det er iNOS som af en eller anden grund ikke er aktiveret i mine celler.

#### 5.4.5 ER TGF- $\beta$ 3 EN NØDVENDIG FAKTOR I INDUKTIONEN AF TIDLIG G2-ARREST?

Resultaterne i dette studie afkræfter at TGF- $\beta$ 3 har noget at gøre med den tidlige G2-arrest. Celler som fik tilsat den samme mængde TGF- $\beta$ 3 som tilsyneladende fjernede HRS-mekanismen permanent i et tidligere studie (N. J. Edin m.fl. 2013) har ikke haft nogen effekt på det mitotiske indeks i forsøgene med anti- $\gamma$ H3, se Figur 4.15. Dog viser (N. J. Edin m.fl. 2014) at TGF- $\beta$ 3-neutralisator kan modvirke fjernelsen af HRS-responsen igennem LDR-priming. Altså spiller TGF- $\beta$ 3 en rolle i induktionen af det tidlige G2-kontrolpunkt selvom den ikke kan inducere det alene. LDR-primingen må gøre noget andet og mere end kun at aktivere TGF- $\beta$ 3.

#### 5.4.6 HVORFOR PÅVIRKER LDR-PRIMING DET MITOTISKE INDEKS NÅR TILSAT TGF- $\beta$ 3 REKOMBINANT IKKE GØR DET?

Når priming tilsyneladende stimulerer mekanismen som bringer bestrålede celler i tidlig G2-arrest og TGF- $\beta$ 3 ikke har den samme effekt, må det være en anden eller andre faktorer som medvirker til at udløse denne respons.

Tendensen i Figur 5.5 fra (N. J. Edin m.fl. 2014) tyder i mine øjne på at TGF- $\beta$ 3 også bringer overlevelsesraten op for effektdoser helt op til (og muligvis over) 5 Gy. Denne effekt kan stadig bedst forklares med at TGF- $\beta$ 3 bringer G0-celler ind i cyklus. Hvis dette er tilfældet, taler det for at priming også inducerer en anden eller flere fortsat ukendte faktorer som påvirker kontrolmekanismen for tidlig G2-arrest sammen TGF- $\beta$ 3.

## 5.5 FREMTIDEN OG VIDERE FORSKNING

Siden tilsætning af TGF- $\beta$ 3 ikke ser ud til at have nogen effekt på det mitotiske indeks i anti- $\gamma$ H3-forsøgene, dvs. de TGF- $\beta$ 3-tilsatte celler følger tendensen som normale, uprimede celler, kan dette lige så godt betyde at stoffet ikke virkede, og det kan der være flere grunde til. Det kan være der blev tilsat for meget eller for lidt, forkert inkubationstid, stoffet kan have været ødelagt pga. dårlig opbevaring etc. I fremtidige forsøg kunne det være spændende at eksperimentere med at variere parametre som mængde af tilsat TGF- $\beta$ 3 og inkubationstid for at lede efter en tendens som afviger fra det åbenlyse resultat af ikke at have nogen effekt. Det er ikke sikkert det skal have en effekt på det mitotiske indeks at tilsætte TGF- $\beta$ 3, men for at være sikker på om det har en effekt eller ikke, bør det undersøges nærmere om mængde og inkubationstid har noget at sige.

Det ville være interessant at se hvordan det mitotiske indeks opfører sig lige omkring  $D_c$  med den LET som blev brugt i dette studie, dvs. filtrering med 1.52 mm Al og 2.60 mm Cu. Dette ville give en mere præcis værdi for  $D_c$  når strålen har denne hærkning. Derfor mener jeg det kunne det være fint at køre nogle anti- $\gamma$ H3-forsøg med bestrålinger som giver 1.5 Gy og 2.5 Gy udover de doser som allerede er målt.

## 6 KONKLUSION

Da TGF- $\beta$ 3 i dette studie ikke ser ud til at have nogen tydelig effekt på det mitotiske indeks i bestrålede celler i og omkring HRS-regionen støttes hypotesen om at TGF- $\beta$ 3 henter celler ind fra G0. Siden studiet ikke fandt en brugbar metode til at farve prolifererende celler med proliferationsmarkør KI-67 er det desværre ikke muligt at bekræfte eller afkræfte det med sikkerhed.

Der blev udviklet en rimelig sikker metode til at afgøre det mitotiske indeks ved farvning med anti- $\gamma$ H3. Metoden blev brugt på bestrålede T-47D-celler i lavdosisområdet og fandt bekræftelse på at priming inducerer tidlig G2-arrest men fandt ingen tydelig effekt på det mitotiske indeks ved at tilsætte rekombinant TGF- $\beta$ 3 til uprimede celler før bestråling.

Det er stadig usikkert hvordan LDR-priming aktiverer mekanismen for tidlig G2-arrest. Resultaterne i dette studie taler ikke for at TGF- $\beta$ 3 nødvendigvis er en faktor i denne mekanisme.

Den udførte dosimetri gjorde det mulig at fastslå dosis og dosisrate med meget stor præcision. Siden første måling i 72% af målingssættene var højere end sættets norm og at denne afvigelse generelt var  $2.0 \pm 0.3\%$  og stigende for kortere bestrålinger, konkluderer jeg at denne korrektionsfaktor bør medregnes ifm. bestrålinger på ca. 13 sekunder og kortere. Med den hærdede røntgenstråling ved 1.52 Al + 2.60 mm Cu-filtrering gav røntgenrøret et tilstrækkeligt homogent strålefelt for bestrålinger ned til 13 sekunder på SSD40. Feltet skulle være homogent nok til at kunne omkranse en celleflaskebeholder med plads til fire T25-flasker så alle fire flasker fik samme dosis indenfor en standardafvigelse. Kortere afstand end dette gav for store forskelle fra punkt til punkt i den mest intense del af feltet samt større standardafvigelse i målingerne og større korrektionsled.

Selvom det ser ud til at det lykkedes at få KI-67 ind i cellerne var det ikke muligt at adskille G0-populationen fra den prolifererende population. Metoden, som blev udviklet i dette studie, er ikke sensitiv eller udviklet nok. Det tyder dog på at fiksering med metanol virkede bedst, i al fald for at få DyLight til at binde.

Dog fik jeg gode resultater ved at farve mitotiske celler med anti- $\gamma$ H3 og analysen gav ensartede resultater både med uafhængige observatører og med evaluering uden at kende doserne.

## LITTERATUR

- Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, og Peter Walter. 2015. *Molecular Biology of the Cell*. 6. udg. New York: Garland Science.
- Annes, Justin P., John S. Munger, og Daniel B. Rifkin. 2003. "Making sense of latent TGF $\beta$  activation". *Journal of Cell Science* 116 (2): 217–24. <https://doi.org/10.1242/jcs.00229>.
- Attix, Frank Herbert. 1986. *Introduction to Radiological Physics and Radiation Dosimetry*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/9783527617135>.
- Brownh, Peter D., Lalage M. Wakefiel, Arthur D. Levinson, og Michael B. Sporn. 1990. "Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factor-beta's 1, 2, and 3". *Growth Factors* 3 (1): 35–43. <https://doi.org/10.3109/08977199009037500>.
- Edin, Nina F. Jeppesen. 2014. "The role of interleukin-13 in the removal of hyper-radiosensitivity by priming irradiation". *Journal of Radiation Research* 55 (6): 1066–74. <https://doi.org/10.1093/jrr/rru053>.
- Edin, Nina Frederike Jeppesen, Āestmír Altaner, Veronika Altaneroval, Peter Ebbesen, og Erik O. Pettersen. 2016. "Low-Dose-Rate Irradiation for 1 Hour Induces Protection Against Lethal Radiation Doses but Does Not Affect Life Span of DBA/2 Mice". *Dose-Response* 14 (4): 1–6. <https://doi.org/10.1177/1559325816673901>.
- Edin, Nina Jeppesen, Dag Rune Olsen, Joe Alexander Sandvik, Eirik Malinen, og Erik Olai Pettersen. 2012. "Low dose hyper-radiosensitivity is eliminated during exposure to cycling hypoxia but returns after reoxygenation". *International Journal of Radiation Biology* 88 (4): 311–19. <https://doi.org/10.3109/09553002.2012.646046>.
- Edin, Nina Jeppesen, Dag Rune Olsen, Trond Stokke, og Erik Olai Pettersen. 2007. "Recovery of low-dose hyper-radiosensitivity following a small priming dose depends on priming dose-rate". *International Journal of Low Radiation* 4 (1): 69–86. <https://doi.org/10.1504/IJLR.2007.014491>.
- Edin, Nina Jeppesen, Dag Rune Olsen, Trond Stokke, Joe Alexander Sandvik, Peter Ebbesen, og Erik Olai Pettersen. 2009. "Mechanisms of the elimination of low dose hyper-radiosensitivity in T-47D cells by low dose-rate priming". *International Journal of Radiation Biology* 85 (12): 1157–65. <https://doi.org/10.3109/09553000903242107>.

- Edin, Nina Jeppesen, Joe Alexander Sandvik, Chang Cheng, Linda Bergersen, og Erik Olai Pettersen. 2014. "The roles of TGF- $\beta$ 3 and peroxynitrite in removal of hyper-radiosensitivity by priming irradiation". *International Journal of Radiation Biology* 90 (7): 527–37. <https://doi.org/10.3109/09553002.2014.906767>.
- Edin, Nina Jeppesen, Joe Alexander Sandvik, Dag Rune Olsen, og Erik Olai Pettersen. 2009. "The Elimination of Low-Dose Hyper-Radiosensitivity by Transfer of Irradiated-Cell Conditioned Medium Depends on Dose Rate". *Radiation Research* 171 (1): 22–32. <https://doi.org/10.1667/RR1143.1>.
- Edin, Nina Jeppesen, Joe Alexander Sandvik, Hilde Synnøve Vollan, Katharina Reger, Agnes Görlach, og Erik Olai Pettersen. 2013. "The role of nitric oxide radicals in removal of hyper-radiosensitivity by priming irradiation". *Journal of Radiation Research* 54 (6): 1015–28. <https://doi.org/10.1093/jrr/rrt061>.
- Ehrhart, E. J., Patricia Segarini, Monica L.-S. Tsang, Alan G. Carroll, og Mary Helen Barcellos-Hoff. 1997. "Latent transforming growth factor  $\beta$ 1 activation in situ: quantitative and functional evidence after low-dose  $\gamma$ -irradiation 1". *The FASEB Journal* 11 (12): 991–1002. <https://doi.org/10.1096/fasebj.11.12.9337152>.
- Gerdes, Johannes, Hilmar Lemke, Heinz Baisch, Hans-h Wacker, Ulrich Schwab, og Harald Stein. 1984. "Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody KI-67". *The Journal of Immunology* 133 (4): 1710–15.
- Gow, M. D., C. B. Seymour, L. A. Ryan, og C. E. Mothersill. 2010. "Induction of bystander response in human glioma cells using high-energy electrons: A role for TGF- $\beta$ 1". *Radiation Research* 173 (6): 769–78. <https://doi.org/10.1667/RR1895.1>.
- Hall, Eric J. 2000. *Radiobiology for the Radiologist*. 5. udg. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Hall, Eric J., og Amato J. Giaccia. 2012. *Radiobiology for the Radiologist*. 7. udg. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Juan, Gloria, Frank Traganos, William M. James, Jill M. Ray, Michel Roberge, Debra M. Sauve, Hilary Anderson, og Zbigniew Darzynkiewicz. 1998. "Histone H3 phosphorylation and expression of cyclins A and B1 measured in individual cells during their progression through G2 and mitosis". *Cytometry*.

[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19980601\)32:2<71::AID-CYTO1>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19980601)32:2<71::AID-CYTO1>3.0.CO;2-H).

- Kim, Kang Ho, og Joel M. Sederstrom. 2016. “Assaying cell cycle status using flow cytometry Kang”. *Curr Protoc Mol Biol*.  
<https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2806s111>.
- Marples, B., B. G. Wouters, og M. C. Joiner. 2003. “An association between the radiation-induced arrest of G2-phase cells and low-dose hyper-radiosensitivity: A plausible underlying mechanism?” *Radiation Research* 160 (1): 38–45.  
<https://doi.org/10.1667/RR3013>.
- Matsumoto, Hideki, Sachiko Hayashi, Masanori Hatashita, Ken Ohnishi, Hiroki Shioura, Toshio Ohtsubo, Ryuhei Kitai, Takeo Ohnishi, og Eiichi Kano. 2001. “Induction of Radioresistance by a Nitric Oxide-Mediated Bystander Effect”. *Radiation Research* 155 (3): 387–96. [https://doi.org/10.1667/0033-7587\(2001\)155\[0387:iorban\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1667/0033-7587(2001)155[0387:iorban]2.0.co;2).
- Matsumoto, Hideki, Akihisa Takahashi, og Takeo Ohnishi. 2004. “Radiation-induced adaptive responses and bystander effects.” *Biological sciences in space = Uchū seibutsu kagaku* 18 (4): 247–54. <https://doi.org/10.2187/bss.18.247>.
- . 2007. “Nitric oxide radicals choreograph a radioadaptive response”. *Cancer Research* 67 (18): 8574–79. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1913>.
- Mayles, Philip, Alan Nahum, og Jean-Claude Rosenwald. 2007. *Handbook of Radiotherapy Physics, Theory and Practice*.
- Occleston, Nick L., Sharon O’Kane, Hugh G. Lavery, Mark Cooper, David Fairlamb, Tracey Mason, Jim A. Bush, og Mark W.J. Ferguson. 2011. “Discovery and development of avotermin (recombinant human transforming growth factor beta 3): A new class of prophylactic therapeutic for the improvement of scarring”. *Wound Repair and Regeneration* 19 (SUPPL. 1): s38–48. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2011.00711.x>.
- Podgorsak, E.B. 2005. *Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students*. Vienna: IAEA.
- Potten, C. S., D. Booth, og J. D. Haley. 1997. “Pretreatment with transforming growth factor beta-3 protects small intestinal stem cells against radiation damage in vivo”. *British Journal of Cancer* 75 (10): 1454–59. <https://doi.org/10.1038/bjc.1997.249>.

- Powell, C. F., P. H. Fowler, og D. H. Perkins. 1960. *The Study of Elementary Particles by the Photographic Method*. London New York Paris Los Angeles: Pergamon Press.
- Shankar, Bhavani, Ruchi Pandey, og Krishna Sainis. 2006. “Radiation-induced bystander effects and adaptive response in murine lymphocytes”. *International Journal of Radiation Biology*. <https://doi.org/10.1080/09553000600877114>.
- Shao, C., M. Folkard, og K. M. Prise. 2008. “Role of TGF-B1 and nitric oxide in the bystander response of irradiated glioma cells”. *Oncogene* 27 (4): 434–40. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210653>.
- Shao, Chunlin, Kevin M. Prise, og Melvyn Folkard. 2008. “Signaling factors for irradiated glioma cells induced bystander responses in fibroblasts”. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 638 (1–2): 139–45. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.09.007>.
- Shapiro, Howard M. 2003. *Practical Flow Cytometry*. *Practical Flow Cytometry*. 4. udg. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471722731>.
- Shen, Yaquin, Paolo Vignali, og Ruoning Wang. 2016. “Rapid Profiling Cell Cycle by Flow Cytometry Using Concurrent Staining of DNA and Mitotic Markers”. *Physiology & behavior* 176 (1): 100–106. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2517.Rapid>.
- Squires, G. L. 2001. *Practical physics*. 4. udg. Cambridge: The Press Syndicate of the University of Cambridge.
- SSDL NRPA. 2016. “KALIBRERINGSBEVIS (FC65-G)”.
- Stein, Gretchen H. 1979. “T-98G: An anchorage-independent human tumor cell line that exhibits stationary phase G1 arrest in vitro”. *Journal of Cellular Physiology* 99 (1): 43–54. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040990107>.
- Waldeland, Einar, Eli Olaug Hole, Einar Sagstuen, og Eirik Malinen. 2010. “The energy dependence of lithium formate and alanine EPR dosimeters for medium energy x rays”. *Medical Physics* 37 (7): 3569–75. <https://doi.org/10.1118/1.3432567>.
- Xu, Bo, Seong-Tae Kim, Dae-Sik Lim, og Michael B. Kastan. 2002. “Two Molecularly Distinct G2/M Checkpoints Are Induced by Ionizing Irradiation”. *Molecular and Cellular Biology* 22 (4): 1049–59. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.4.1049-1059.2002>.
- Xu, Haoyuan, og Guo Kang Fan. 2020. “The Role of Cytokines in Modulating Vocal Fold



Fibrosis: A Contemporary Review”. *Laryngoscope*, 1–7.

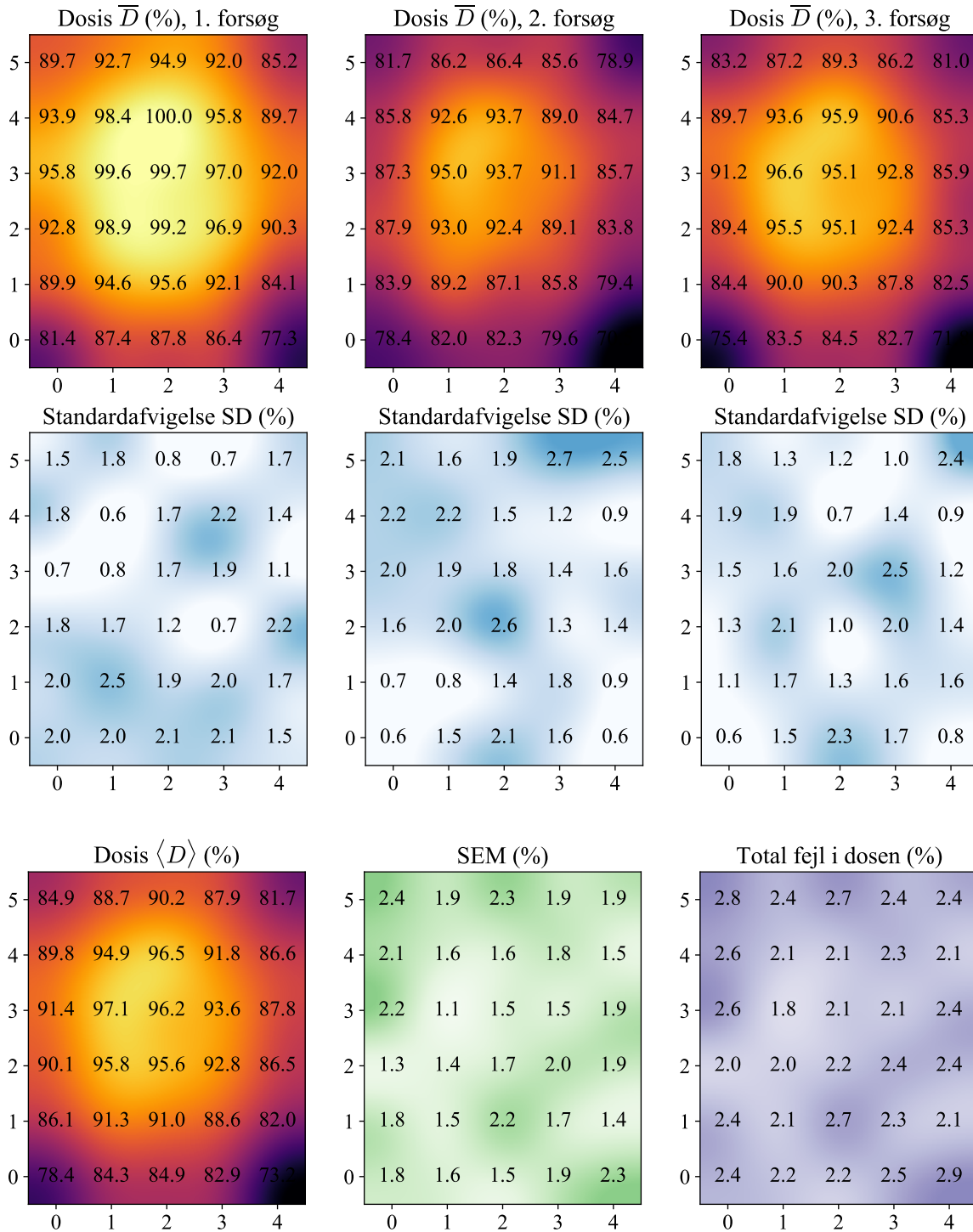
<https://doi.org/10.1002/lary.28507>.

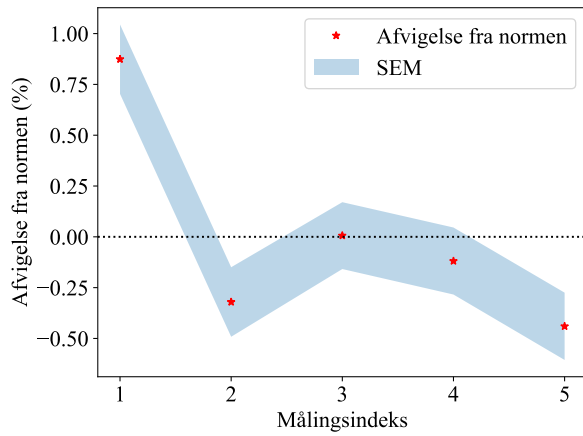
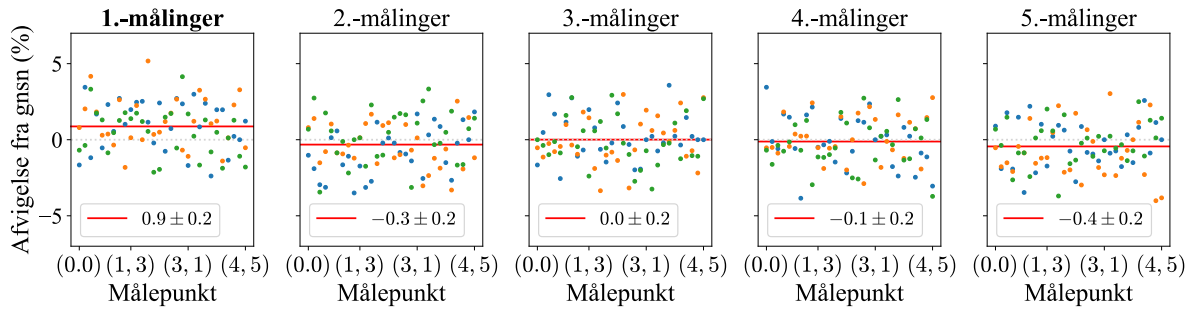
Young, V. Leroy, James Bush, og Sharon O’Kane. 2009. “A New Approach for the Prophylactic Improvement of Surgical Scarring: Avotermin (TGF $\beta$ 3)”. *Clinics in Plastic Surgery* 36 (2): 307–13. <https://doi.org/10.1016/j.cps.2008.11.008>.

# BILAG

## A. RØNTGENDOSIMETRI

A.1 SSD = 50 CM, EKSPONERING: 20 SEKUNDER, 5 MÅLINGER PR PUNKT.

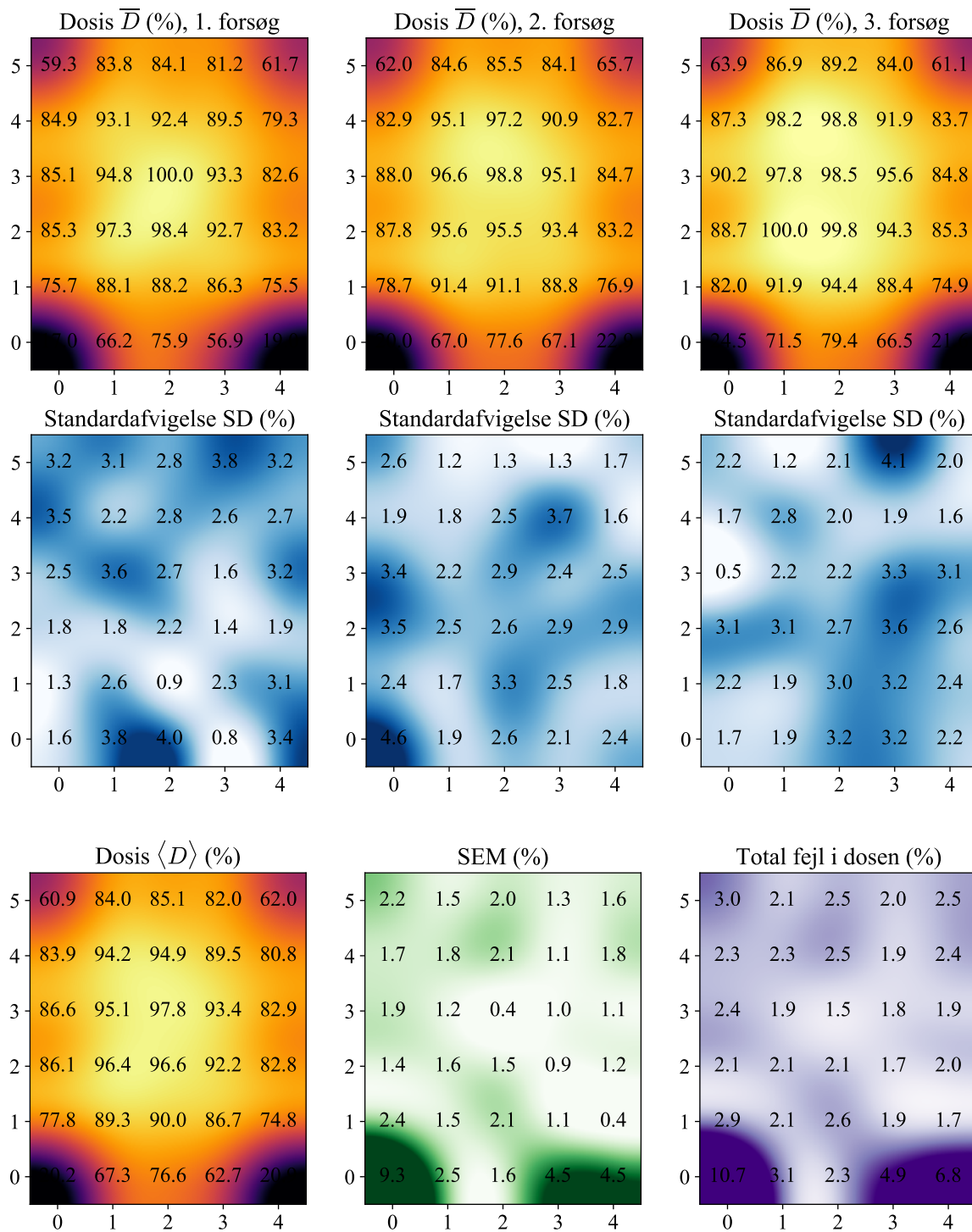


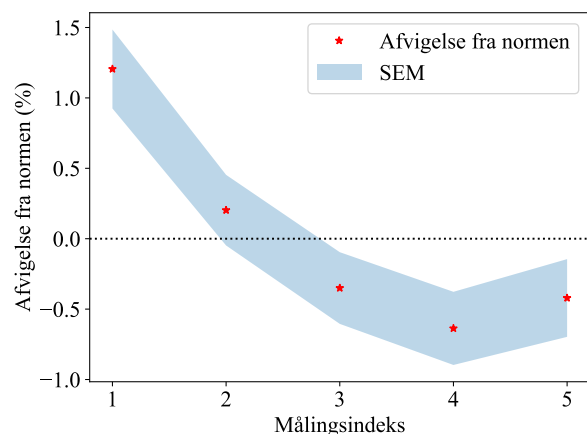
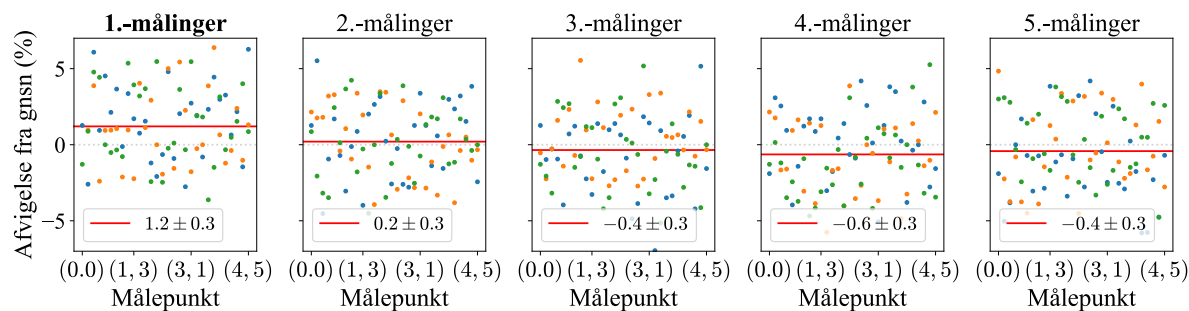


(x, y)	Målinger i 1. forsøg (nC)					Målinger i 2. forsøg (nC)					Målinger i 3. forsøg (nC)				
0,0	<b>1.54</b>	1.55	1.54	1.62	1.58	<b>1.52</b>	1.52	1.50	1.50	1.50	<b>1.44</b>	1.46	1.45	1.44	1.46
1,0	<b>1.74</b>	1.65	1.69	1.68	1.65	<b>1.61</b>	1.60	1.56	1.57	1.55	<b>1.60</b>	1.65	1.60	1.58	1.60
2,0	<b>1.67</b>	1.64	1.74	1.68	1.72	<b>1.65</b>	1.56	1.58	1.57	1.56	<b>1.68</b>	1.57	1.61	1.62	1.65
3,0	<b>1.69</b>	1.61	1.69	1.69	1.63	<b>1.56</b>	1.52	1.52	1.56	1.50	<b>1.62</b>	1.62	1.59	1.58	1.55
4,0	<b>1.48</b>	1.49	1.45	1.51	1.51	<b>1.36</b>	1.37	1.35	1.35	1.35	<b>1.40</b>	1.39	1.37	1.38	1.37
0,1	<b>1.77</b>	1.74	1.75	1.72	1.67	<b>1.62</b>	1.60	1.63	1.62	1.60	<b>1.61</b>	1.61	1.65	1.64	1.61
1,1	<b>1.83</b>	1.79	1.87	1.75	1.86	<b>1.71</b>	1.70	1.71	1.72	1.74	<b>1.74</b>	1.73	1.78	1.72	1.69
2,1	<b>1.89</b>	1.82	1.82	1.87	1.80	<b>1.72</b>	1.67	1.66	1.68	1.65	<b>1.76</b>	1.70	1.73	1.76	1.74
3,1	<b>1.79</b>	1.71	1.76	1.81	1.79	<b>1.62</b>	1.63	1.68	1.69	1.63	<b>1.72</b>	1.69	1.70	1.64	1.70
4,1	<b>1.65</b>	1.59	1.65	1.61	1.59	<b>1.53</b>	1.53	1.55	1.52	1.51	<b>1.61</b>	1.59	1.55	1.57	1.62
0,1	<b>1.83</b>	1.73	1.80	1.78	1.79	<b>1.73</b>	1.71	1.66	1.66	1.70	<b>1.75</b>	1.69	1.73	1.70	1.73
1,2	<b>1.95</b>	1.85	1.89	1.90	1.92	<b>1.79</b>	1.82	1.73	1.78	1.83	<b>1.86</b>	1.88	1.86	1.82	1.77
2,2	<b>1.93</b>	1.93	1.88	1.88	1.92	<b>1.87</b>	1.75	1.76	1.77	1.74	<b>1.84</b>	1.81	1.82	1.82	1.86
3,2	<b>1.86</b>	1.86	1.86	1.89	1.85	<b>1.72</b>	1.73	1.70	1.74	1.68	<b>1.74</b>	1.76	1.83	1.81	1.75
4,2	<b>1.78</b>	1.74	1.78	1.70	1.69	<b>1.62</b>	1.63	1.59	1.58	1.64	<b>1.61</b>	1.65	1.67	1.66	1.62
0,3	<b>1.83</b>	1.84	1.86	1.83	1.86	<b>1.70</b>	1.66	1.73	1.68	1.63	<b>1.78</b>	1.78	1.75	1.71	1.75
1,3	<b>1.93</b>	1.90	1.91	1.94	1.90	<b>1.86</b>	1.81	1.77	1.86	1.84	<b>1.89</b>	1.89	1.84	1.81	1.86
2,3	<b>1.97</b>	1.90	1.88	1.94	1.90	<b>1.85</b>	1.82	1.79	1.75	1.80	<b>1.82</b>	1.86	1.78	1.88	1.81
3,3	<b>1.91</b>	1.84	1.83	1.91	1.84	<b>1.74</b>	1.74	1.77	1.79	1.72	<b>1.86</b>	1.73	1.75	1.80	1.79
4,3	<b>1.74</b>	1.80	1.77	1.77	1.77	<b>1.63</b>	1.65	1.68	1.67	1.61	<b>1.68</b>	1.67	1.64	1.63	1.64
0,4	<b>1.86</b>	1.76	1.81	1.81	1.79	<b>1.67</b>	1.60	1.66	1.62	1.70	<b>1.73</b>	1.77	1.67	1.73	1.73
1,4	<b>1.91</b>	1.90	1.88	1.90	1.88	<b>1.84</b>	1.74	1.81	1.78	1.74	<b>1.77</b>	1.86	1.77	1.81	1.79
2,4	<b>1.97</b>	1.95	1.92	1.89	1.89	<b>1.85</b>	1.78	1.81	1.79	1.78	<b>1.87</b>	1.84	1.84	1.84	1.84
3,4	<b>1.80</b>	1.86	1.91	1.80	1.85	<b>1.73</b>	1.68	1.71	1.74	1.70	<b>1.73</b>	1.74	1.74	1.79	1.72
4,4	<b>1.76</b>	1.70	1.73	1.74	1.70	<b>1.65</b>	1.62	1.64	1.61	1.63	<b>1.65</b>	1.65	1.66	1.62	1.63
0,5	<b>1.76</b>	1.68	1.72	1.73	1.74	<b>1.55</b>	1.52	1.61	1.59	1.59	<b>1.57</b>	1.63	1.58	1.58	1.64
1,5	<b>1.76</b>	1.78	1.81	1.74	1.83	<b>1.66</b>	1.70	1.64	1.67	1.62	<b>1.68</b>	1.65	1.71	1.69	1.66
2,5	<b>1.83</b>	1.85	1.83	1.81	1.81	<b>1.70</b>	1.63	1.65	1.63	1.70	<b>1.74</b>	1.69	1.70	1.72	1.74
3,5	<b>1.77</b>	1.77	1.77	1.75	1.79	<b>1.70</b>	1.67	1.61	1.67	1.58	<b>1.64</b>	1.67	1.64	1.68	1.66
4,5	<b>1.66</b>	1.67	1.64	1.59	1.64	<b>1.51</b>	1.50	1.56	1.56	1.46	<b>1.53</b>	1.58	1.60	1.50	1.58

## A.2 SSD = 40 CM, EKSPONERING: 14 SEKUNDER, 5 MÅLINGER PR PUNKT, 3

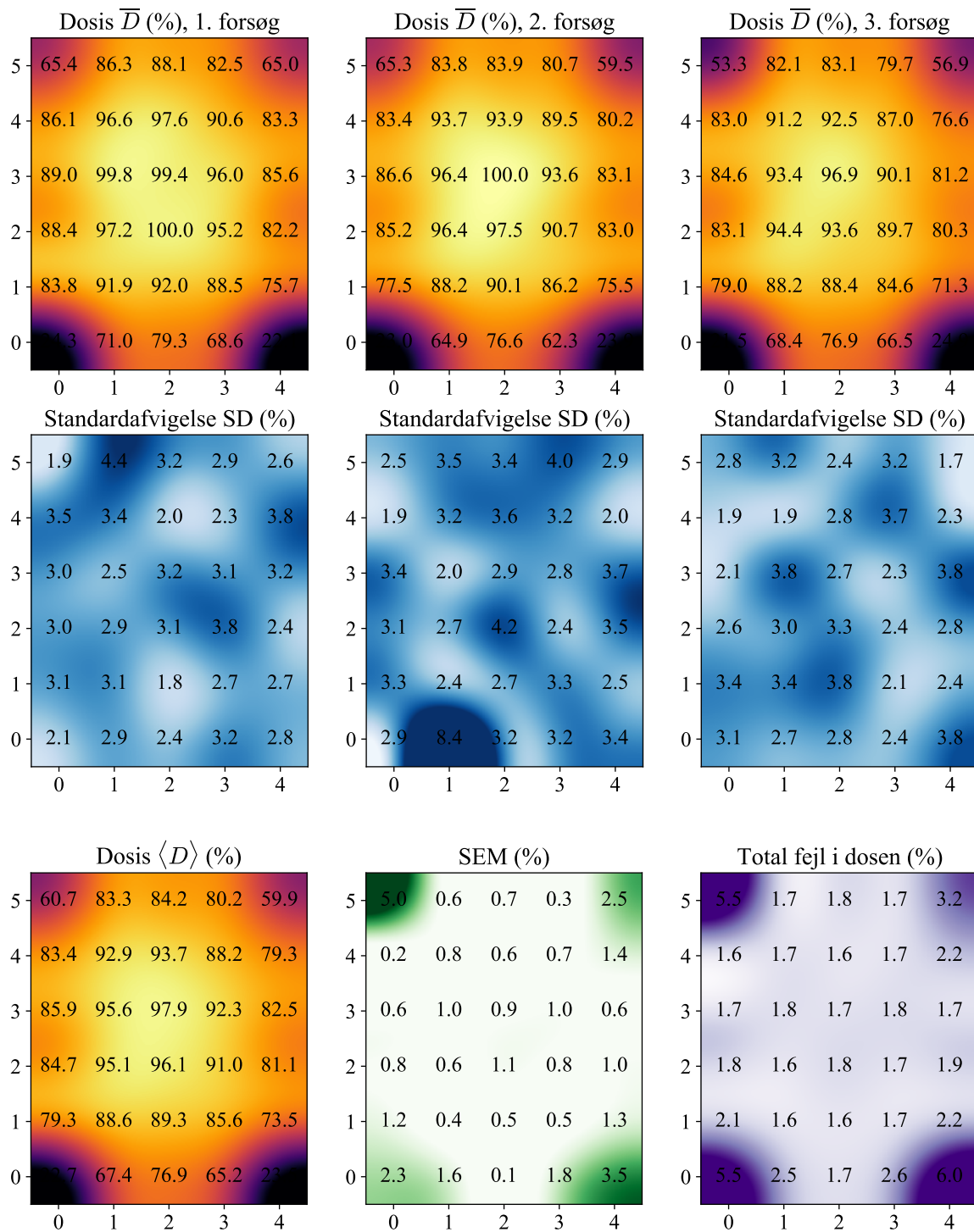
### FORSØG

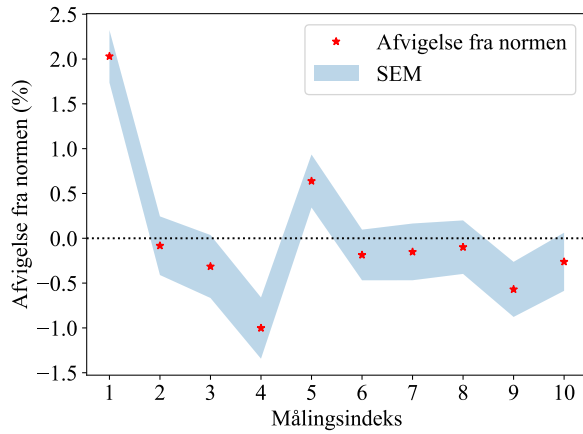
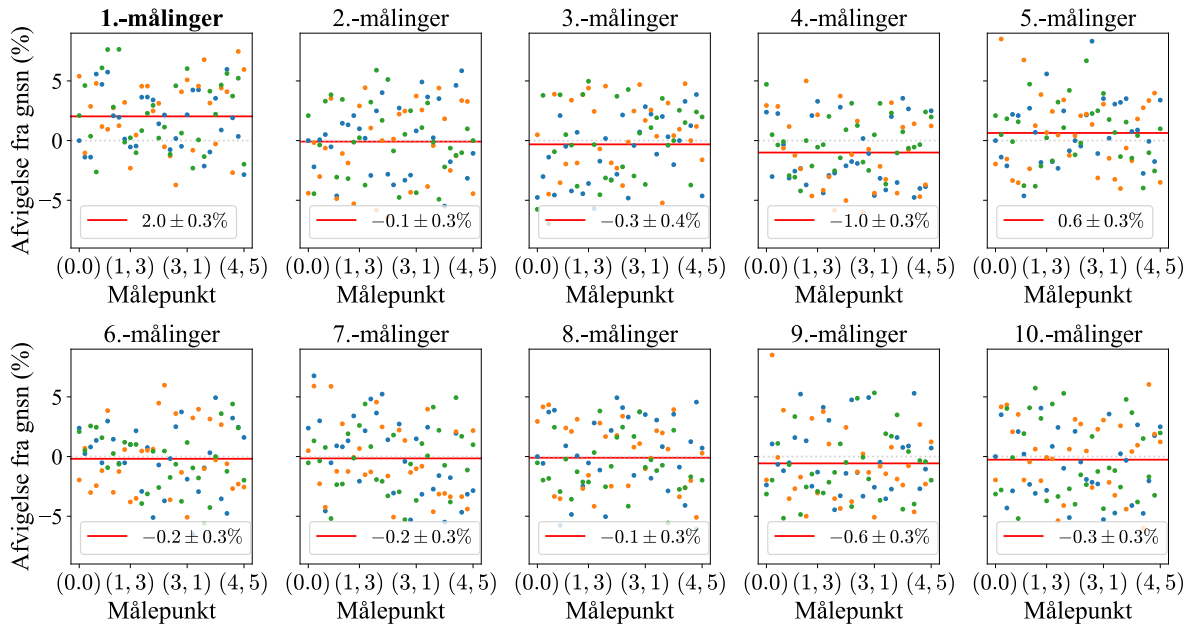




Koordinat	Målinger i 1. forsøg (nC)					Målinger i 2. forsøg (nC)					Målinger i 3. forsøg (nC)				
0,0	<b>0.32</b>	0.32	0.32	0.31	0.31	<b>0.34</b>	0.38	0.37	0.38	0.39	<b>0.46</b>	0.47	0.46	0.46	0.48
1,0	<b>1.20</b>	1.30	1.22	1.27	1.17	<b>1.26</b>	1.27	1.22	1.27	1.22	<b>1.37</b>	1.33	1.33	1.36	1.40
2,0	<b>1.50</b>	1.35	1.41	1.45	1.36	<b>1.50</b>	1.47	1.44	1.42	1.39	<b>1.58</b>	1.46	1.46	1.49	1.55
3,0	<b>1.07</b>	1.05	1.05	1.07	1.06	<b>1.22</b>	1.29	1.27	1.23	1.24	<b>1.32</b>	1.22	1.30	1.22	1.26
4,0	<b>0.37</b>	0.36	0.34	0.34	0.36	<b>0.43</b>	0.44	0.42	0.43	0.41	<b>0.41</b>	0.42	0.42	0.40	0.40
0,1	<b>1.44</b>	1.40	1.42	1.39	1.40	<b>1.48</b>	1.46	1.50	1.49	1.40	<b>1.55</b>	1.56	1.60	1.50	1.58
1,1	<b>1.70</b>	1.59	1.66	1.66	1.59	<b>1.72</b>	1.72	1.69	1.65	1.73	<b>1.74</b>	1.81	1.72	1.73	1.73
2,1	<b>1.64</b>	1.64	1.63	1.67	1.63	<b>1.66</b>	1.68	1.79	1.72	1.63	<b>1.78</b>	1.87	1.78	1.71	1.83
3,1	<b>1.66</b>	1.62	1.57	1.62	1.56	<b>1.67</b>	1.71	1.67	1.59	1.63	<b>1.77</b>	1.65	1.70	1.61	1.67
4,1	<b>1.43</b>	1.35	1.36	1.43	1.46	<b>1.40</b>	1.46	1.40	1.45	1.45	<b>1.48</b>	1.42	1.44	1.38	1.40
0,1	<b>1.60</b>	1.62	1.61	1.54	1.57	<b>1.70</b>	1.61	1.68	1.54	1.64	<b>1.74</b>	1.61	1.67	1.66	1.75
1,2	<b>1.84</b>	1.86	1.78	1.78	1.80	<b>1.80</b>	1.71	1.80	1.75	1.84	<b>1.97</b>	1.90	1.82	1.85	1.96
2,2	<b>1.81</b>	1.89	1.85	1.84	1.77	<b>1.83</b>	1.84	1.73	1.75	1.74	<b>1.85</b>	1.96	1.83	1.89	1.95
3,2	<b>1.69</b>	1.73	1.75	1.75	1.71	<b>1.74</b>	1.80	1.70	1.67	1.79	<b>1.89</b>	1.73	1.84	1.72	1.78
4,2	<b>1.54</b>	1.51	1.56	1.54	1.60	<b>1.52</b>	1.56	1.58	1.61	1.48	<b>1.58</b>	1.60	1.67	1.67	1.58
0,3	<b>1.66</b>	1.58	1.57	1.57	1.54	<b>1.72</b>	1.59	1.61	1.58	1.69	<b>1.71</b>	1.72	1.72	1.70	1.72
1,3	<b>1.75</b>	1.72	1.68	1.84	1.84	<b>1.77</b>	1.85	1.84	1.75	1.78	<b>1.86</b>	1.93	1.86	1.81	1.83
2,3	<b>1.90</b>	1.81	1.79	1.91	1.90	<b>1.94</b>	1.80	1.79	1.84	1.83	<b>1.94</b>	1.87	1.86	1.88	1.81
3,3	<b>1.69</b>	1.76	1.77	1.74	1.73	<b>1.81</b>	1.72	1.73	1.76	1.83	<b>1.81</b>	1.77	1.91	1.74	1.85
4,3	<b>1.58</b>	1.59	1.56	1.46	1.50	<b>1.55</b>	1.61	1.63	1.52	1.58	<b>1.70</b>	1.60	1.56	1.63	1.57
0,4	<b>1.61</b>	1.60	1.47	1.60	1.62	<b>1.54</b>	1.50	1.53	1.56	1.59	<b>1.69</b>	1.68	1.62	1.67	1.63
1,4	<b>1.72</b>	1.71	1.75	1.80	1.69	<b>1.77</b>	1.75	1.83	1.75	1.75	<b>1.90</b>	1.90	1.77	1.85	1.91
2,4	<b>1.76</b>	1.73	1.66	1.78	1.67	<b>1.88</b>	1.75	1.82	1.83	1.77	<b>1.81</b>	1.91	1.87	1.89	1.91
3,4	<b>1.74</b>	1.64	1.61	1.67	1.67	<b>1.80</b>	1.69	1.70	1.61	1.66	<b>1.72</b>	1.80	1.77	1.72	1.72
4,4	<b>1.52</b>	1.52	1.47	1.42	1.45	<b>1.55</b>	1.55	1.55	1.49	1.56	<b>1.64</b>	1.57	1.58	1.59	1.57
0,5	<b>1.14</b>	1.13	1.11	1.10	1.04	<b>1.14</b>	1.11	1.15	1.17	1.20	<b>1.21</b>	1.20	1.18	1.26	1.22
1,5	<b>1.57</b>	1.61	1.59	1.56	1.47	<b>1.57</b>	1.57	1.61	1.58	1.55	<b>1.66</b>	1.68	1.63	1.63	1.66
2,5	<b>1.60</b>	1.59	1.50	1.61	1.53	<b>1.63</b>	1.60	1.58	1.57	1.58	<b>1.72</b>	1.70	1.67	1.64	1.74
3,5	<b>1.49</b>	1.57	1.59	1.47	1.44	<b>1.55</b>	1.55	1.59	1.55	1.59	<b>1.66</b>	1.59	1.53	1.68	1.52
4,5	<b>1.22</b>	1.12	1.13	1.13	1.14	<b>1.24</b>	1.22	1.22	1.25	1.19	<b>1.17</b>	1.16	1.16	1.12	1.19

A.3 SSD = 40 CM, EKSPONERING: 13 SEKUNDER, 10 MÅLINGER PR PUNKT, 3  
 FORSØG (VIST I SEKTION 4.1.1, *RESULTATER*)





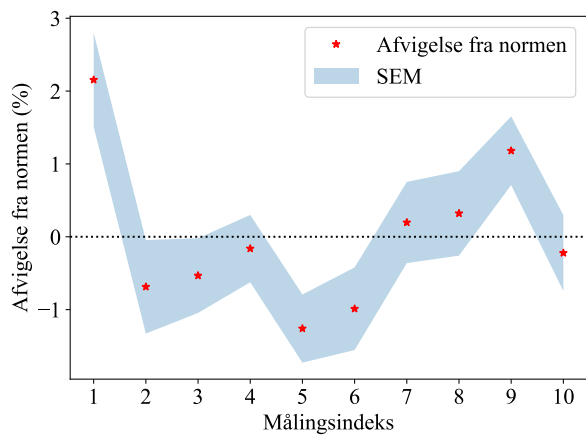
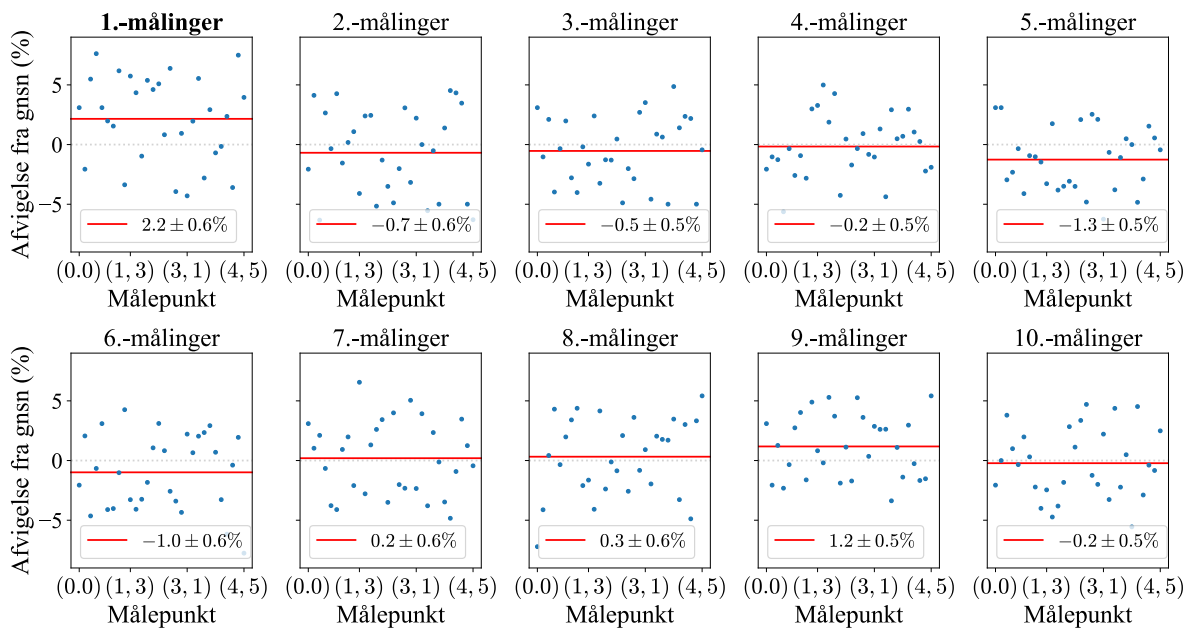
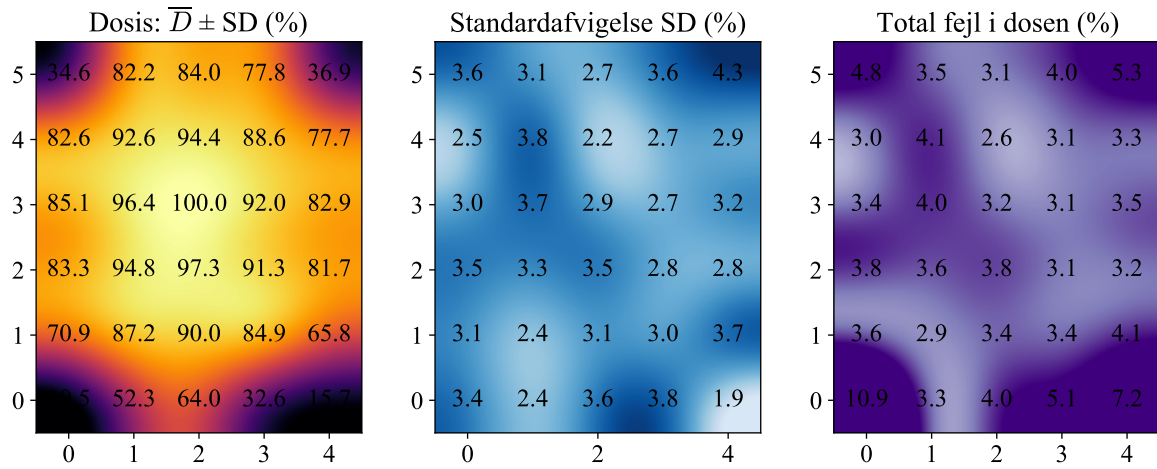
Forsøg #	Koordinat	Målinger (nC)									
1	0,0	<b>0.42</b>	0.42	0.40	0.43	0.42	0.43	0.43	0.42	0.41	0.42
	1,0	<b>1.21</b>	1.20	1.19	1.19	1.21	1.23	1.31	1.22	1.24	1.27
	2,0	<b>1.35</b>	1.37	1.35	1.40	1.34	1.38	1.41	1.42	1.36	1.31
	3,0	<b>1.25</b>	1.19	1.13	1.18	1.21	1.20	1.13	1.23	1.17	1.15
	4,0	<b>0.40</b>	0.38	0.39	0.37	0.39	0.38	0.38	0.36	0.38	0.39
	0,1	<b>1.53</b>	1.38	1.44	1.41	1.38	1.49	1.46	1.46	1.47	1.45
	1,1	<b>1.62</b>	1.61	1.52	1.55	1.63	1.61	1.60	1.51	1.67	1.55
	2,1	<b>1.62</b>	1.61	1.60	1.53	1.60	1.58	1.61	1.59	1.61	1.54
	3,1	<b>1.53</b>	1.56	1.46	1.56	1.50	1.52	1.58	1.49	1.49	1.59
	4,1	<b>1.30</b>	1.32	1.26	1.35	1.38	1.32	1.28	1.30	1.29	1.27
	0,1	<b>1.52</b>	1.53	1.44	1.46	1.50	1.56	1.56	1.57	1.59	1.54
	1,2	<b>1.74</b>	1.63	1.65	1.63	1.64	1.63	1.76	1.66	1.73	1.72
	2,2	<b>1.79</b>	1.77	1.73	1.68	1.77	1.74	1.79	1.64	1.65	1.71
	3,2	<b>1.70</b>	1.71	1.59	1.69	1.63	1.56	1.73	1.68	1.59	1.56
	4,2	<b>1.44</b>	1.38	1.38	1.39	1.42	1.41	1.44	1.49	1.40	1.45
	0,3	<b>1.57</b>	1.48	1.57	1.51	1.53	1.48	1.49	1.60	1.61	1.53
	1,3	<b>1.71</b>	1.77	1.64	1.69	1.76	1.72	1.77	1.78	1.70	1.69
	2,3	<b>1.72</b>	1.66	1.71	1.72	1.86	1.76	1.71	1.69	1.66	1.68
	3,3	<b>1.65</b>	1.61	1.67	1.64	1.64	1.72	1.57	1.72	1.74	1.62
	4,3	<b>1.51</b>	1.49	1.52	1.41	1.53	1.45	1.50	1.53	1.44	1.40
0,4	<b>1.55</b>	1.56	1.52	1.44	1.49	1.39	1.44	1.46	1.48	1.54	
1,4	<b>1.74</b>	1.73	1.65	1.60	1.72	1.62	1.71	1.72	1.61	1.59	
2,4	<b>1.65</b>	1.69	1.72	1.72	1.74	1.67	1.64	1.70	1.64	1.69	
3,4	<b>1.55</b>	1.62	1.57	1.51	1.62	1.57	1.54	1.52	1.59	1.56	
4,4	<b>1.49</b>	1.36	1.41	1.49	1.45	1.51	1.36	1.49	1.45	1.38	

	0,5	<b>1.14</b>	1.11	1.13	1.16	1.14	1.09	1.11	1.12	1.14	1.16
	1,5	<b>1.58</b>	1.56	1.54	1.42	1.45	1.42	1.52	1.43	1.57	1.42
	2,5	<b>1.55</b>	1.61	1.54	1.46	1.52	1.57	1.45	1.54	1.48	1.49
	3,5	<b>1.43</b>	1.38	1.48	1.37	1.40	1.46	1.38	1.49	1.41	1.45
	4,5	<b>1.09</b>	1.11	1.07	1.15	1.16	1.14	1.09	1.13	1.13	1.15
2	0,0	<b>0.43</b>	0.39	0.41	0.42	0.40	0.40	0.41	0.42	0.40	0.40
	1,0	<b>1.14</b>	1.15	1.00	0.95	1.25	1.16	1.22	1.20	1.25	1.20
	2,0	<b>1.40</b>	1.32	1.30	1.40	1.34	1.32	1.33	1.42	1.36	1.42
	3,0	<b>1.16</b>	1.10	1.15	1.10	1.07	1.08	1.06	1.07	1.15	1.13
	4,0	<b>0.43</b>	0.44	0.41	0.43	0.41	0.42	0.45	0.41	0.41	0.44
	0,1	<b>1.39</b>	1.31	1.35	1.36	1.47	1.43	1.36	1.41	1.34	1.35
	1,1	<b>1.61</b>	1.55	1.62	1.53	1.53	1.52	1.61	1.60	1.54	1.56
	2,1	<b>1.62</b>	1.57	1.57	1.68	1.62	1.58	1.58	1.65	1.52	1.61
	3,1	<b>1.58</b>	1.45	1.59	1.46	1.59	1.54	1.53	1.49	1.58	1.50
	4,1	<b>1.31</b>	1.38	1.40	1.37	1.35	1.29	1.35	1.32	1.30	1.34
	0,1	<b>1.52</b>	1.58	1.55	1.45	1.55	1.46	1.49	1.45	1.57	1.51
	1,2	<b>1.79</b>	1.73	1.70	1.66	1.72	1.72	1.69	1.76	1.73	1.62
	2,2	<b>1.81</b>	1.63	1.81	1.63	1.79	1.74	1.81	1.76	1.67	1.66
	3,2	<b>1.65</b>	1.61	1.58	1.67	1.59	1.62	1.65	1.57	1.54	1.62
	4,2	<b>1.52</b>	1.38	1.44	1.40	1.48	1.54	1.45	1.50	1.51	1.52
	0,3	<b>1.53</b>	1.54	1.48	1.52	1.57	1.63	1.46	1.59	1.48	1.58
	1,3	<b>1.69</b>	1.75	1.71	1.74	1.75	1.65	1.75	1.67	1.69	1.72
	2,3	<b>1.71</b>	1.82	1.82	1.67	1.80	1.84	1.80	1.79	1.78	1.73
	3,3	<b>1.73</b>	1.59	1.74	1.65	1.61	1.64	1.64	1.68	1.64	1.70
	4,3	<b>1.55</b>	1.53	1.50	1.41	1.52	1.40	1.46	1.46	1.40	1.52
	0,4	<b>1.47</b>	1.52	1.52	1.45	1.46	1.53	1.47	1.48	1.47	1.45
	1,4	<b>1.74</b>	1.60	1.67	1.61	1.61	1.73	1.73	1.70	1.64	1.61
	2,4	<b>1.78</b>	1.66	1.58	1.72	1.60	1.65	1.59	1.70	1.68	1.71
	3,4	<b>1.64</b>	1.66	1.64	1.52	1.58	1.64	1.54	1.60	1.56	1.52
	4,4	<b>1.42</b>	1.45	1.43	1.44	1.40	1.42	1.38	1.48	1.39	1.43
	0,5	<b>1.21</b>	1.13	1.17	1.15	1.18	1.19	1.12	1.12	1.15	1.17
	1,5	<b>1.55</b>	1.47	1.56	1.51	1.53	1.48	1.52	1.45	1.42	1.40
	2,5	<b>1.45</b>	1.54	1.49	1.42	1.54	1.45	1.44	1.46	1.53	1.58
	3,5	<b>1.54</b>	1.48	1.45	1.38	1.49	1.40	1.37	1.36	1.40	1.46
	4,5	<b>1.12</b>	1.01	1.04	1.07	1.02	1.03	1.08	1.06	1.07	1.07
3	0,0	<b>0.39</b>	0.39	0.36	0.40	0.39	0.39	0.38	0.38	0.37	0.37
	1,0	<b>1.27</b>	1.16	1.26	1.22	1.22	1.22	1.23	1.19	1.19	1.18
	2,0	<b>1.37</b>	1.36	1.27	1.36	1.39	1.40	1.36	1.34	1.38	1.42
	3,0	<b>1.15</b>	1.22	1.17	1.18	1.18	1.21	1.19	1.21	1.12	1.18
	4,0	<b>0.47</b>	0.46	0.46	0.43	0.45	0.45	0.42	0.43	0.44	0.42
	0,1	<b>1.51</b>	1.36	1.41	1.36	1.35	1.39	1.37	1.40	1.45	1.43
	1,1	<b>1.61</b>	1.62	1.56	1.50	1.64	1.57	1.53	1.51	1.49	1.63
	2,1	<b>1.69</b>	1.52	1.51	1.57	1.51	1.56	1.60	1.55	1.53	1.66
	3,1	<b>1.50</b>	1.50	1.56	1.47	1.47	1.52	1.50	1.47	1.48	1.55
	4,1	<b>1.27</b>	1.27	1.33	1.26	1.27	1.28	1.30	1.24	1.23	1.22
	0,1	<b>1.46</b>	1.42	1.47	1.47	1.45	1.49	1.54	1.48	1.43	1.54
	1,2	<b>1.69</b>	1.73	1.60	1.71	1.73	1.61	1.69	1.74	1.64	1.62
	2,2	<b>1.70</b>	1.76	1.61	1.62	1.68	1.61	1.63	1.62	1.64	1.75
	3,2	<b>1.64</b>	1.62	1.54	1.57	1.66	1.60	1.56	1.58	1.61	1.55
	4,2	<b>1.43</b>	1.50	1.48	1.44	1.41	1.39	1.38	1.45	1.42	1.37
	0,3	<b>1.52</b>	1.49	1.47	1.55	1.50	1.51	1.53	1.54	1.44	1.48
	1,3	<b>1.64</b>	1.58	1.73	1.68	1.77	1.63	1.61	1.59	1.74	1.62
	2,3	<b>1.80</b>	1.73	1.67	1.69	1.76	1.71	1.63	1.75	1.72	1.75
	3,3	<b>1.61</b>	1.64	1.61	1.56	1.64	1.54	1.59	1.66	1.57	1.58
	4,3	<b>1.53</b>	1.38	1.39	1.45	1.50	1.46	1.39	1.43	1.52	1.38
	0,4	<b>1.44</b>	1.49	1.49	1.52	1.50	1.46	1.49	1.47	1.42	1.46
	1,4	<b>1.62</b>	1.67	1.65	1.56	1.63	1.59	1.62	1.60	1.65	1.60
	2,4	<b>1.62</b>	1.64	1.70	1.68	1.62	1.55	1.71	1.63	1.67	1.60
	3,4	<b>1.61</b>	1.47	1.54	1.53	1.57	1.48	1.58	1.46	1.60	1.62
	4,4	<b>1.39</b>	1.33	1.36	1.37	1.34	1.36	1.35	1.39	1.30	1.41
	0,5	<b>0.99</b>	0.94	0.97	0.94	0.95	0.98	0.91	0.92	0.95	0.91
	1,5	<b>1.54</b>	1.44	1.48	1.45	1.40	1.44	1.53	1.42	1.40	1.48
	2,5	<b>1.53</b>	1.46	1.42	1.47	1.46	1.54	1.50	1.45	1.47	1.45
	3,5	<b>1.49</b>	1.43	1.45	1.45	1.38	1.45	1.40	1.33	1.41	1.37
	4,5	<b>0.99</b>	1.01	1.03	1.03	1.02	0.99	1.02	0.99	0.99	1.03



# A.4 SSD = 37.5 CM, EKSPONERING: 12 SEKUNDER, 10 MÅLINGER PR PUNKT, 1

## FORSØG



Koordinat	Målinger (nC)									
0,0	<b>0.20</b>	0.19	0.20	0.19	0.20	0.19	0.20	0.18	0.20	0.19
1,0	<b>0.95</b>	1.01	0.96	0.96	1.00	0.99	0.98	0.93	0.95	0.97
2,0	<b>1.25</b>	1.11	1.21	1.17	1.15	1.13	1.21	1.19	1.20	1.23
3,0	<b>0.65</b>	0.62	0.58	0.57	0.59	0.60	0.60	0.63	0.59	0.61
4,0	<b>0.30</b>	0.29	0.29	0.29	0.29	0.30	0.28	0.29	0.29	0.29
0,1	<b>1.34</b>	1.37	1.34	1.28	1.26	1.26	1.26	1.34	1.35	1.34
1,1	<b>1.64</b>	1.59	1.57	1.60	1.60	1.55	1.63	1.67	1.68	1.62
2,1	<b>1.77</b>	1.67	1.60	1.62	1.65	1.65	1.70	1.74	1.64	1.63
3,1	<b>1.52</b>	1.59	1.57	1.62	1.55	1.64	1.54	1.54	1.65	1.51
4,1	<b>1.29</b>	1.17	1.20	1.26	1.18	1.18	1.30	1.20	1.23	1.19
0,1	<b>1.61</b>	1.58	1.58	1.62	1.57	1.48	1.50	1.48	1.54	1.47
1,2	<b>1.74</b>	1.80	1.70	1.79	1.69	1.70	1.78	1.83	1.85	1.69
2,2	<b>1.90</b>	1.71	1.78	1.88	1.74	1.77	1.85	1.76	1.87	1.77
3,2	<b>1.77</b>	1.67	1.67	1.62	1.64	1.71	1.75	1.69	1.66	1.74
4,2	<b>1.59</b>	1.46	1.52	1.52	1.46	1.56	1.46	1.50	1.53	1.53
0,3	<b>1.59</b>	1.50	1.50	1.55	1.61	1.59	1.64	1.61	1.55	1.63
1,3	<b>1.90</b>	1.75	1.75	1.78	1.70	1.74	1.75	1.74	1.88	1.87
2,3	<b>1.78</b>	1.91	1.80	1.87	1.90	1.79	1.81	1.92	1.92	1.83
3,3	<b>1.72</b>	1.65	1.75	1.69	1.74	1.63	1.79	1.69	1.71	1.67
4,3	<b>1.47</b>	1.57	1.59	1.52	1.44	1.57	1.50	1.55	1.58	1.57
0,4	<b>1.56</b>	1.53	1.46	1.55	1.52	1.54	1.59	1.50	1.57	1.48
1,4	<b>1.81</b>	1.62	1.73	1.64	1.65	1.75	1.65	1.75	1.76	1.79
2,4	<b>1.70</b>	1.74	1.76	1.80	1.73	1.79	1.79	1.78	1.69	1.71
3,4	<b>1.69</b>	1.56	1.56	1.65	1.65	1.69	1.64	1.67	1.66	1.65
4,4	<b>1.43</b>	1.46	1.51	1.45	1.44	1.45	1.39	1.49	1.42	1.36
0,5	<b>0.64</b>	0.67	0.65	0.66	0.61	0.62	0.61	0.62	0.66	0.67
1,5	<b>1.56</b>	1.59	1.56	1.54	1.48	1.43	1.51	1.57	1.52	1.48
2,5	<b>1.50</b>	1.61	1.59	1.56	1.58	1.55	1.61	1.48	1.53	1.55
3,5	<b>1.55</b>	1.37	1.37	1.41	1.45	1.47	1.46	1.49	1.42	1.43
4,5	<b>0.71</b>	0.64	0.68	0.67	0.68	0.63	0.68	0.72	0.72	0.70

## A.5 MÅLINGER IFM. EKSPONERINGSTIDER FOR SSD50 MED

CELLEFLASKEBEHOLDEREN 13 CM FRA KANTEN VED DØREN OG 13 CM FRA HØJRE SIDE, ORDNET EFTER EKSPONERINGSTID (JOURNAL S. 40-45 OG 80-81)

Eksp.tid (s) \ {Sidetal i journal}	Målinger, kammer 1 (nC)		Målinger, kammer 2 (nC)		Målinger, kammer 3 (nC)		Målinger, kammer 4 (nC)	
17 {s. 80}	1.99	1.91	1.90	1.97	1.88	1.88	1.96	1.91
	1.98	1.89	1.94	1.92	1.85	1.87	1.94	1.90
	1.98	1.91	1.97	1.94	1.86	1.97	1.97	1.92
	1.90	1.90	1.90	1.93	1.95	1.85	1.98	1.96
	1.93	1.88	1.91	1.97	1.88	1.86	1.87	1.91
	1.93 ± 0.04		1.93 ± 0.03		1.89 ± 0.04		1.93 ± 0.03	
18 {s. 80}	2.12	2.07	2.10	2.12	2.06	2.07	2.02	2.05
	2.11	2.10	2.00	2.06	2.04	2.01	2.03	1.99
	2.04	2.11	2.13	2.11	2.01	1.98	2.09	2.00
	2.10	2.11	2.06	2.07	2.06	1.97	2.06	2.07
	2.12	2.12	1.99	2.13	2.08	2.11	2.08	2.03
	2.10 ± 0.02		2.08 ± 0.05		2.04 ± 0.04		2.04 ± 0.03	
19 {s. 43}	2.20	2.26	2.32	2.30	2.21	2.30	2.18	2.18
	2.31	2.21	2.32	2.26	2.20	2.28	2.32	2.28
	2.15	2.23	2.26	2.27	2.26	2.21	2.15	2.19
	2.25	2.29	2.25	2.18	2.16	2.23	2.18	2.17
	2.22	2.23	2.28	2.27	2.15	2.21	2.19	2.22
	2.24 ± 0.04		2.28 ± 0.04		2.22 ± 0.05		2.21 ± 0.05	
20 {s. 42}	2.36	2.40	2.47	2.36	2.38	2.36	2.36	2.31
	2.46	2.45	2.40	2.44	2.36	2.39	2.34	2.39
	2.45	2.39	2.35	2.39	2.32	2.44	2.31	2.41
	2.43	2.36	2.39	2.36	2.42	2.43	2.41	2.40
	2.39	2.34	2.39	2.43	2.38	2.41	2.31	2.41
	2.40 ± 0.04		2.40 ± 0.04		2.38 ± 0.04		2.37 ± 0.04	
32 {s. 80}	4.01	4.01	4.10	3.97	3.95	4.00	3.97	4.01
	4.01	3.98	3.97	3.98	4.00	4.05	4.08	4.03
	4.03	3.99	4.02	4.02	4.09	4.02	3.98	4.04
	3.98	4.00	4.06	4.05	4.04	4.06	3.98	3.97
	4.08	4.03	4.06	4.05	4.00	4.05	4.09	3.98
	4.01 ± 0.03		4.03 ± 0.04		4.03 ± 0.04		4.01 ± 0.04	
33 {s. 80}	4.14	4.25	4.25	4.16	4.14	4.07	4.12	4.20
	4.14	4.23	4.22	4.11	4.05	4.16	4.18	4.20
	4.24	4.20	4.22	4.18	4.07	4.09	4.12	4.10
	4.20	4.16	4.13	4.22	4.15	4.16	4.21	4.11
	4.15	4.17	4.18	4.13	4.18	4.19	4.10	4.16
	4.19 ± 0.04		4.18 ± 0.04		4.12 ± 0.05		4.15 ± 0.04	
35 {s. 43}	4.57	4.54	4.51	4.49	4.55	4.51	4.42	4.44
	4.58	4.46	4.51	4.55	4.42	4.42	4.52	4.44
	4.47	4.51	4.48	4.48	4.48	4.43	4.56	4.50
	4.47	4.44	4.49	4.52	4.55	4.44	4.45	4.49
	4.46	4.50	4.52	4.55	4.45	4.54	4.47	4.51
	4.48 ± 0.04		4.51 ± 0.02		4.49 ± 0.05		4.48 ± 0.04	
36 {s. 44}	4.68	4.62	4.62	4.60	4.60	4.59	4.59	4.57
	4.61	4.71	4.60	4.62	4.55	4.60	4.56	4.59
	4.64	4.63	4.69	4.66	4.59	4.66	4.67	4.66
	4.65	4.66	4.63	4.64	4.62	4.56	4.64	4.60
	4.69	4.64	4.60	4.64	4.57	4.67	4.55	4.55
	4.63 ± 0.03		4.63 ± 0.03		4.60 ± 0.04		4.60 ± 0.04	
47 {s. 80}	6.11	6.11	6.24	6.16	6.16	6.16	6.12	6.12
	6.15	6.12	6.09	6.16	6.10	6.07	6.09	6.08
	6.13	6.17	6.14	6.08	6.11	6.11	6.07	6.03
	6.15	6.15	6.11	6.14	6.12	6.03	6.11	6.12
	6.21	6.09	6.12	6.20	6.07	6.14	6.03	6.05
	6.15 ± 0.04		6.14 ± 0.05		6.11 ± 0.04		6.08 ± 0.03	
48 {s. 81}							6.28	6.18
							6.24	6.23
							6.29	6.22
							6.31	6.29
							6.23	6.18

Eksp.tid (s) \ {Sidetal i journal}	Målinger, kammer 1 (nC)		Målinger, kammer 2 (nC)		Målinger, kammer 3 (nC)		Målinger, kammer 4 (nC)	
							6.24 ± 0.04	
51 {s. 45}	6.71		6.78		6.71		6.70	
	6.66		6.69		6.68		6.67	
	6.79		6.71		6.67		6.66	
	6.70		6.79		6.72		6.71	
	6.76		6.71		6.74		6.65	
	6.72 ± 0.05		6.74 ± 0.04		6.70 ± 0.03		6.68 ± 0.02	
52 {s. 44}	6.98		6.96		6.91		6.84	
	6.93		6.83		6.83		6.86	
	6.92		6.89		6.91		6.81	
	6.95		6.96		6.88		6.80	
	6.99		6.89		6.88		6.88	
	6.95 ± 0.03		6.91 ± 0.05		6.88 ± 0.03		6.84 ± 0.03	
53 {s. 44}	7.14		7.09		7.06		7.02	
	7.09		7.06		6.99		7.03	
	7.12		6.99		6.99		7.07	
	7.06		6.98		7.06		7.06	
	6.99		7.03		7.03		6.93	
	7.08 ± 0.05		7.03 ± 0.04		7.03 ± 0.03		7.02 ± 0.05	
77 {s. 81}					10.24		10.27	10.30
					10.35		10.37	10.34
					10.26		10.31	10.32
					10.29		10.26	10.29
					10.31		10.28	10.37
					10.29 ± 0.04		10.31 ± 0.04	
78 {s. 81}	10.32	10.19	10.23	10.19	10.16	10.13	10.21	10.24
	10.16	10.22	10.15	10.14	10.16	10.06	10.22	10.18
	10.28	10.26	10.23	10.14	10.14	10.13	10.11	10.11
	10.21	10.20	10.23	10.18	10.23	10.14	10.15	10.22
	10.18	10.19	10.18	10.25	10.07	10.14	10.16	10.16
	10.22 ± 0.05		10.19 ± 0.04		10.14 ± 0.04		10.18 ± 0.04	
85 {s. 45}	11.50		11.56		11.40		11.50	
	11.48		11.54		11.39		11.39	
	11.59		11.56		11.47		11.44	
	11.53		11.55		11.36		11.49	
	11.53		11.45		11.39		11.45	
	11.53 ± 0.04		11.53 ± 0.04		11.40 ± 0.04		11.45 ± 0.04	

A.6 MÅLINGER IFM. ITERATION AF EKSPONERINGSTIDER FOR SSD40 MED  
 CELLEFLASKEBEHOLDEREN 13 CM FRA KANTEN VED DØREN OG 13 CM  
 FRA HØJRE SIDE, ORDNET EFTER EKSPONERINGSTID (JOURNAL S. 51,55,  
 83)

Eksp.tid (s) \ {Sidetal i journal}	Målinger, kammer 1 (nC)		Målinger, kammer 2 (nC)		Målinger, kammer 3 (nC)		Målinger, kammer 4 (nC)	
10 {s. 55}	1.46		1.43		1.43			
	1.54		1.46		1.31			
	1.52		1.41		1.32			
	1.53		1.42					
	1.51		1.37					
	1.51 ± 0.03		1.42 ± 0.03		1.35 ± 0.05			
{s. 61}	1.58							
	1.56							
	1.52							
	1.62							
	1.64							
	1.58 ± 0.04							
11 {s. 61}	1.82							
	1.82							
	1.83							
	1.86							
	1.76							

Eksp.tid (s) {Sidetal i journal}	Målinger, kammer 1 (nC)	Målinger, kammer 2 (nC)	Målinger, kammer 3 (nC)	Målinger, kammer 4 (nC)	
	1.81 ± 0.05				
12 {s. 55}			1.82		
			1.91		
			1.72		
			1.91		
			1.81		
			1.83 ± 0.07		
{s. 61}	2.05	2.01	1.96	2.12	
	2.04	2.07	2.05	2.00	
	2.04	1.92	1.99	2.06	
	1.95	2.00	2.05	1.90	
	1.95	2.06	2.03	1.94	
{s. 83}	2.01 ± 0.05		2.02 ± 0.04		
	1.90				
13 {s. 55}	2.20	2.17	2.14	2.22	
	2.04	1.99	1.99	2.09	
	2.00	2.04	1.94	1.96	
	1.98	2.11	2.05	2.05	
	2.16	2.05	2.05	1.95	
	2.08 ± 0.09		2.07 ± 0.06		
{s. 61}				2.17	
				2.29	
				2.24	
				2.23	
				2.10	
				2.21 ± 0.07	
{s. 83}	2.15	2.22			
	2.09	2.04			
	2.14	2.16			
	2.13 ± 0.03		2.14 ± 0.07		
14 {s. 51}	2.35	2.35	2.24	2.16	
	2.19	2.25	2.15	2.21	
	2.12	2.21	2.21	2.18	
	2.17	2.27	2.17	2.13	
	2.19	2.19	2.20	2.31	
	2.20 ± 0.08		2.26 ± 0.06		
			2.19 ± 0.03		
			2.20 ± 0.06		
15 {s. 51}	2.50	2.45	2.42	2.53	
	2.43	2.38	2.31	2.34	
	2.49	2.49	2.49	2.33	
	2.44	2.56	2.42	2.33	
	2.53	2.45	2.45	2.33	
	2.48 ± 0.04		2.47 ± 0.06		
			2.42 ± 0.06		
			2.37 ± 0.08		
22 {s. 83}	4.02	4.11			
	4.06	4.03			
	3.97	3.98			
	3.96	3.94			
	4.00 ± 0.04		4.02 ± 0.06		
23 {s. 83}	4.33	4.19			
	4.34	4.18			
	4.26	4.14			
	4.31 ± 0.04		4.17 ± 0.02		
24 {s. 83}		2.55			
		2.56			
		2.56 ± 0.01			
31 {s. 83}	6.00	5.89			
	6.04				
	5.88				
	5.97 ± 0.07		5.89 ± 0.00		
32 {s. 83}	6.32	6.25			
	6.15	6.13			
	6.23	6.05			
	6.23 ± 0.07		6.14 ± 0.08		
51 {s. 83}	10.31	10.17			
	10.31 ± 0.00		10.17 ± 0.00		

A.7 MÅLINGER I CELLEFLASKEBEHOLDER KAMMER 2 (SE FIGUR 3.3) FOR  
ULTRAKORTE EKSPONERINGER (JOURNAL S. 129, 133-134)

Tid (s)	Målinger (nC)					Maks.rate (nA)	Tid (s)	Målinger (nC)					Maks.rate (nA)	
SSD40							9	1.29	1.30	1.29	1.20	1.25	0.218 ± 0.000	
1	0.00	0.00	0.00			0.000 ± 0.000		1.27	1.17	1.21	1.16	1.29		
2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.000 ± 0.000		1.16	1.13	1.29	1.24	1.29		
3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.022 ± 0.024		1.31	1.23	1.13	1.20	1.12		
	0.10	0.08	0.00	0.02	0.06			1.20	1.18	1.18	1.24	1.23		
	0.01	0.00	0.06	0.00	0.06			1.41	1.21	1.26	1.31	1.27		
	0.10	0.03	0.01	0.03	0.07			1.33	1.18	1.29	1.36	1.30		
	0.06	0.04	0.04	0.00	0.03			1.30	1.21	1.31	1.19	1.17		
	0.09	0.02	0.01	0.01	0.02			1.40	1.18	1.31	1.25	1.36		
	0.02	0.06	0.00	0.01	0.15			1.59	1.56	1.48	1.46	1.44		
	0.14	0.04	0.06	0.01	0.00			1.42	1.51	1.35	1.31	1.52		
	0.03	0.07	0.01	0.00	0.03			1.40	1.51	1.46	1.49	1.44		
4	0.06	0.06	0.00	0.01	0.03	0.090 ± 0.029		1.56	1.52	1.38	1.41	1.40		
	0.14	0.18	0.23	0.14	0.25			1.47	1.48	1.35	1.45	1.36		
	0.29	0.12	0.10	0.17	0.12			1.47	1.57	1.56	1.54	1.56		
	0.30	0.12	0.10	0.15	0.24			1.55	1.41	1.42	1.54	1.51		
	0.28	0.23	0.17	0.08	0.20			1.63	1.45	1.49	1.55	1.45		
	0.16	0.26	0.14	0.09	0.09			1.42	1.45	1.53	1.57	1.52		
	0.25	0.12	0.23	0.20	0.15			1.71	1.65	1.78	1.75	1.66		
	0.33	0.14	0.13	0.24	0.17			1.79	1.61	1.71	1.54	1.59		
	0.29	0.22	0.10	0.18	0.25			1.72	1.57	1.57	1.58	1.63		
5	0.33	0.12	0.22	0.12	0.17	0.161 ± 0.027		1.79	1.64	1.75	1.63	1.60		
	0.53	0.39	0.35	0.41	0.34			1.61	1.55	1.60	1.62	1.62		
	0.32	0.40	0.43	0.36	0.30			1.79	1.80	1.66	1.63	1.73		
	0.59	0.33	0.30	0.44	0.44			1.69	1.62	1.59	1.73	1.62		
	0.40	0.40	0.29	0.39	0.27			1.68	1.78	1.77	1.67	1.70		
	0.40	0.33	0.37	0.48	0.35			1.86	1.67	1.76	1.70	1.71		
	0.39	0.31	0.34	0.42	0.32			1.87	1.87	2.02	1.88	1.91		
	0.50	0.37	0.34	0.34	0.37			1.90	1.79	1.87	1.80	1.95		
	0.45	0.56	0.38	0.39	0.29			1.89	1.74	1.83	1.87	1.90		
6	0.55	0.47	0.33	0.42	0.41	0.197 ± 0.009		1.88	1.83	1.89	1.87	1.92		
	0.72	0.69	0.56	0.55	0.65			1.99	1.92	1.86	1.75	1.84		
	0.74	0.60	0.52	0.59	0.61			1.91	1.88	1.86	2.02	1.90		
	0.63	0.47	0.53	0.59	0.62			2.02	1.92	1.88	1.91	1.99		
	0.56	0.67	0.59	0.54	0.63			2.03	1.86	1.96	1.98	1.90		
	0.71	0.56	0.62	0.68	0.51			1.95	1.96	1.87	1.98	1.83		
	0.69	0.52	0.62	0.68	0.48			2.12	2.03	2.14	2.22	2.02		
	0.65	0.54	0.70	0.56	0.63			2.03	2.11	2.14	2.18	2.02		
	0.74	0.61	0.66	0.70	0.54			2.15	2.04	2.11	2.07	2.07		
7	0.59	0.54	0.55	0.57	0.48	0.214 ± 0.002		2.16	2.17	2.09	2.07	2.13		
	0.92	0.81	0.84	0.70	0.89			2.18	2.15	2.12	2.06	2.13		
	0.81	0.75	0.71	0.83	0.85			2.23	2.05	2.08	2.07	2.27		
	0.78	0.78	0.77	0.72	0.80			2.14	2.23	2.24	2.03	2.13		
	0.91	0.79	0.88	0.81	0.71			2.15	2.11	2.21	2.22	2.09		
	0.87	0.90	0.81	0.90	0.87			2.19	2.13	2.21	2.23	2.06		
	0.84	0.83	0.91	0.91	0.86			SSD50						
	0.92	0.78	0.84	0.77	0.77			3	0.06	0.02	0.02	0.01	0.03	0.017 ± 0.011
	0.81	0.89	0.73	0.77	0.90			4	0.19	0.11	0.13	0.08	0.09	0.064 ± 0.013
0.85	0.92	0.70	0.87	0.78		5	0.27	0.23	0.20	0.19	0.29	0.106 ± 0.012		
8	1.10	1.14	1.07	1.11	1.12	0.217 ± 0.000	6	0.35	0.40	0.41	0.43	0.44	0.134 ± 0.002	
	0.96	0.95	1.04	0.89	0.93		7	0.49	0.50	0.56	0.53	0.46	0.137 ± 0.001	
	1.16	0.91	0.96	1.07	1.00		8	0.63	0.63	0.60	0.62	0.63	0.140 ± 0.000	
	1.13	1.02	1.05	0.95	1.01		9	0.80	0.76	0.86	0.75	0.82	0.140 ± 0.000	
	1.04	0.92	1.06	0.90	0.96		10	1.01	0.95	0.89	0.96	0.95	0.140 ± 0.000	
	1.09	0.94	1.04	0.98	0.95		11	1.15	1.08	1.05	1.10	1.13	0.141 ± 0.000	
	1.03	0.99	1.08	1.02	0.98		12	1.28	1.8	1.24	1.27	1.21	0.140 ± 0.000	
	1.13	1.05	1.05	0.99	1.08		13	1.36	1.38	1.39	1.35	1.30	0.141 ± 0.000	
	1.15	1.12	1.07	0.97	1.05		14	1.51	1.55	1.55	1.55	1.49		
					15	1.71	1.66	1.61	1.65	1.65				
					16	1.83	1.73	1.79	1.77	1.82				
					17	1.89	1.89	1.99	1.94	1.91				
					18	2.06	2.03	2.09	2.09	2.14				

## B. CELLEFORSØG

### B.1 KI-67, METODEUDVIKLING (JOURNAL S. 11-38)

# \ Dato \ {journal}	KI-67- fortynding	DyLight-fortynding	Bemærkninger
KI-1 7-8. okt. 20 {s. 11-16}	1:30	3.5 µl stock + 50 µl DMSO + 3 ml PBS m. 1% BSA	T-98G-celler, fiksering med 70% etanol.
KI-2 14-15. okt. 20 {s. 17-22}	1:5, 1:10, 1:30, 1:60	3.5 µl stock + 50 µl DMSO + 3 ml PBS m. 1% BSA	
KI-3 21-23. okt. 20 {s. 23-27}	1:30, 1:60, 1:100, 1:200	5.8 µl stock + 50 µl DMSO + 3 ml PBS m. 1% BSA	Forandrede forholdet af DyLight
KI-4 28-29. okt. 20 {s. 28-30}	1:50, 1:100, 1:200, 1:400	10 µl stock + 17 µl DMSO + 1 ml PBS m. 1% BSA	Forandrede forholdet af DyLight
KI-5 4. nov. 20 {s. 31-32}	1:400	10 µl stock + 17 µl DMSO + 1 ml PBS m. 1% BSA	
KI-6 10-11.nov. 20 {s. 33-34}	1:400	20 µl stock + 34 µl DMSO + 1 ml PBS m. 1% BSA	Forandrede forholdet af DyLight
KI-7 18. nov. 20 {s. 35}	1:400	20 µl stock + 34 µl DMSO + 1 ml PBS m. 1% BSA	Testede fiksering med 70% etanol og 99.8% metanol. DyLight ser ud til at fungere bedst med fiksering med metanol.
KI-8 25. nov. 20 {s. 36}	1:50, 1:100, 1:150, 1:200	20 µl stock + 34 µl DMSO + 1 ml PBS m. 1% BSA	Fiksering med 70% etanol. Bedst resultat med 1:150 KI-67
KI-9 14-15 dec. 20 {s. 37}	1:150	20µL stock 34µL DMSO 0.75mL PBS m. BSA	Testede både T-98G og T-47D. Bedst resultat med T-47D, metanol.
KI-10 22. dec. 20 {s. 38}	1:150	20µL stock 34µL DMSO 0.75mL PBS m. BSA	

## B.2 PROTOKOL FOR FARVNING MED KI-67 OG DYLIGHT

1. Celler sås ud i T25/T75-flasker mindst 16 timer før fiksering
2. Fiksering:
  - a. Aspirér medium og vask med 2 ml (T25) / 5 ml (T75) PBS
  - b. Tilsæt 2 ml (T25) / 5 ml (T75) trypsin (EDTA) og inkubér i 3-5 min ved 37°C med 5% CO<sub>2</sub>
  - c. Opløs til enkeltceller med 2 ml-pipette og overfør til centrifugerør med 5 ml kold cellemedium og vask to gange i 5 ml kold PBS
  - d. Opløs pellet i 5 µl PBS og tilsæt 4.5 ml 99.8 % metanol (-20°C) dråbevis og inkubér i køleskab i mindst én time
2. Farvning<sup>1</sup> af DyLight-kontrolceller (G0-positiv):
  - a. Centrifuger ved 300g i 3 min og fjern metanol
  - b. Vask to gange i kold PBS og inkubér i 30 min på is med 750 µl DyLight-løsning
  - c. Aspirér supernatant og vask i 7 ml PBS og opløs pellet i 50 µl PBS med 1% BSA
3. Farvning af bestrålede celler og kontrolceller:
  - a. Centrifuger ved 300g i 3 min, fjern etanol og vask to gange i kold FACS-buffer
  - b. Opløs pellet i 100 µl FACS-buffer og tilsæt 50 µl DyLight-kontrolceller til hver prøve.
  - c. Inkubér i stuetemperatur i 30 min med 15 µl KI-67-løsning.
  - d. Vask to gange i 5 ml FACS-buffer og opløs pellet i 500 µl PI-RNase-løsning.
4. Flowcytometri:
  - a. *Fluid dynamics*-indstilling: Slow (10 µm cellediameter, 14 µl/min).
  - b. Afskærm og udvælg enkeltcellehændelser i FSC-A—SSC-A-plot og SSC-A—SSC-H-plot med en gate.
  - c. Åbn FL-4—FL-2-plot (KI-67 mod DNA-indhold) og se efter population med lavt DNA-indhold (G1/G0) og lavt KI-67-indhold (G0).

Åbn FL-4—FL-1-plot (DyLight mod KI-67) og se efter population med højt DyLight-indhold (G0).

---

<sup>1</sup> Eng: *Staining*.



### B.3 ANTI- $\gamma$ H3, METODEUDVIKLING

# \ Dato \ {journal}	Bemærkninger	Resultater	Fejlkilder
H3-1 7-8. jan. 21 {s. 49}	Forsøget gøres i stuetemperatur. Bestråling med røntgen på SSD50. 6+6 T-47D/P. Sekundær antistof: Goat Anti-Rabbit IgG FITC (Cat# 20302). Forhold 1:500 for begge antistoffer. DyLight-kontrol: 650 nm, 20 $\mu$ l + 34 $\mu$ l DMSO + 1.5 ml PNT. Fiksering: 99.8 % metanol. Flowcytometri fluidics: Slow, 10 $\mu$ m celler, 14 $\mu$ l/min	Gode DNA-histogram. Resultater ikke brugbare.	Vaskede celleflasker med PBS før tilsætning af trypsin, kan vaske mitoserne væk.
H3-2 4-10. feb. 21 {s. 63-66}	Samme som ovenfor. Sidste med Goat Anti-Rabbit IgG FITC (Cat# 20302).	Nej.	Vaskede celleflasker med PBS igen.
H3-3 17-18. feb. 21 {s. 69-70}	Bestråling med gamma. Sekundær antistof udskiftes med Alexa Fluor 667 nm Goat anti-rabbit IgG (H+L). DyLight udskiftes med 488 nm.	Nej.	Lang fragt med bus til Radiumhospitalet om vinteren kan have nedkølet cellerne til under 37C. Glemte at suspendere til enkeltceller med 2 ml-pipette. Fik aspireret celler under vask. Gammel PNT. Byttede rundt på prøver under trypsinéring.
H3-4 23-26. feb. 21 {s. 70}	Samme som ovenfor. Begynder at vaske to gange for at få metanolen helt væk.	Nej.	Lang fragt kan have afkølet cellerne før og efter bestråling.
H3-5 3-4. mar. 21 {s. 77-78}	Røntgenrøret repareret og bestråling med røntgen fortsætter på SSD50. Har to kontrolprøver på is.	Nej.	Mister celler formentlig ved aspiration. PBS 37°C. Fiksering med 99.8% metanol.

# \ Dato \ {journal}	Bemærkninger	Resultater	Fejlkilder
H3-6 11-12. mar. 21 {s. 84}	Sætter SSD ned til 40 cm. DyLight-kontrolceller fjernes helt fra forsøget da det konstateres at der ikke er behov for intern kalibrering af flowcytometeret. Fiksering gøres med 70% etanol fremover.	Nej. Mislykket før analyse.	Mister celler ved aspiration.
H3-7 16.03.21 17. mar. 21 {s. 86}	SSD40 fremover. Begynder at lade en større dråbe ligge ved aspiration.	Ja. Resultater vist og brugt i gennemsnit.	0.2 Gy-prøven fik tilsat etanol på en hård måde. Forsøg køres i stuetemperatur.
Kontrol 22-23. mar. 21 {s. 87-90}	Testede om forsøget skulle køres på is eller i stuetemperatur samt fiksering med 70% etanol kontra 99.8% metanol. Etanol var bedst og beholdes fremover.	Is og etanol fungerer bedst.	En times ventetid på is fordi jeg ikke kunne finde antistoffet. Mange dubletter gav ”ekko” på DNA-histogram.
H3-8 24-25. mar. 21 {s. 91}	Farvningsdelen af forsøget på is. Tester BSA i stedet for PNT. Tester sprøjte i stedet for 2 ml-pipette til at løse til enkeltceller under trypsinering.	Nej. BSA ser dog ud til at kunne erstatte tømælk som blokker.	03 Gy-prøven fik 1000 µl PI+RNAse i stedet for halvdelen.
H3-9 06.04.21 9.apr. 21 {s. 91-92}	Fortsætter med tømælk, ikke BSA. Prøverne haves på is allerede efter trypsinering og hele resten af forsøget. Suspenderer til enkeltceller med sprøjte på nær kontrolprøven med 2 ml-pipette.	Ja. Graferne for mitotisk indeks for primet og uprimet ligner igen hinanden og har begge en top på 0.5/P.	Forskellig metode til resuspendering til enkeltceller (sprøjte, 2 ml-pip.), luftbobler i trypsin for 0.3-prøven, mange dubletter i flowcytometri.

# \ Dato \ {journal}	Bemærkninger	Resultater	Fejlkilder
H3-10 14-15. apr. 21 {s. 93-94}	Erstatter sprøjte med hård pipettering: 3 gange 5 hårde stød adskilt af bundskyl.	Ja. Primet og uprimet mitotisk indeks-kurver ligner hinanden og har begge en top på 0.3/P og giver mistanke om noget i bestrålingen eller trypsineringen.	Ændrer fluidics i flowcytometri til 5 µm core size, 11 µl/min i Cflow ved en tilfældighed.
H3-11 21-21. apr. 21 {s. 95-96}	Beholder de nye fluidics 5 µm core size, 11 µl/min. Flere resultater som bekræfter forventet tendens. Pause i forsøgene i 4 måneder.	Ja.	Inkuberer med anti-γH3 i 2 timer i stedet for 1 time.
H3-12 3-5. aug. 21 {s. 100}	6+6 T-47D/P. Efter flere måneders pause pga. emne.	Ja.	Trypsin kun tilsat i 3 minutter før bankning. Lille mistanke om forbytning af 0.3/P-prøver men afviser mistanken. 0.2 Gy-prøve får etanol tilsat for hårdt. Fiksering i ufortyndet rektificeret sprit.
H3-13 09.08.21 10-12. aug. 21 {s. 101-102}	6+6 T-47D/P. Første forsøg med TGF-β3 (herefter benævnt med T). Tester gating med kvadrant-gate (Q). Begynder med aspiration af supernatant til præcis 100 µl.	Ja.	Fiksering i ufortyndet rektificeret sprit. Rystede prøverne i etanolen før centrifugering.
H3-14 17- 20. aug. 21 {s. 103-104}	6+6 T-47D/P. Etanol fortyndes til 70%.	Ja.	Har glemt at stille tømælk på køl i en hel uge. Prøver haves ved -20°C i to dage før farvning.

# \ Dato \ {journal}	Bemærkninger	Resultater	Fejlkilder
H3-15 26-27. aug. 21 {s.107-108}	6+6 T-47D/P. Skriver protokollen om og limer ind i journal på s. 105-106.	Ja.	0.2/P-prøverne giver begge udtværede FL4-plot og underligt høje resultater i mitotisk indeks. Udtværede plot mm behandles anderledes, eller forkastes. Mistanke om for gammelt sekundær antistof.
H3-16 2-3. sep. 21 {s. 109-110}	8+8 T-47D/P (2 ekstra kontrol, 2 kontrol uden anti- $\gamma$ H3). Udskifter sekundær antistof til en ny flaske af samme pga. mistanke om det er for gammelt.	Nej.	Mistanke om for blød centrifugering så sætter hastigheden op til 300 g efter fiksering.
H3-17 7. sep. 21 {s. 111}	Afblæst før trypsinering pga. tomme celleflasker.	Nej.	Mislykket pga. fejl i celleudsåning, ingen celler sået ud i flere af flaskerne.
H3-18 8-10. sep. 21 {s. 112-114}	5+5+5 T-47D/P/T. PNT-styrke kalibreres for 100 $\mu$ l-dråbe ved aspiration.	Nej.	Meget konfluente celler i nogle flasker. Antistofmængde kalibreres ikke.
H3-19 14-15. sep. 21 {s. 115-117}	7+7 T-47D/P (ekstra kontrolprøver). Mængden af antistoffer kalibreres for 100 $\mu$ l-dråbe ved aspiration.	Ja, undtagen to af prøverne som blev blandet sammen. De brugbare prøver tages med i gennemsnit. 0.3P lavere mitotisk indeks end forventet.	Hvirvler ikke pellet før tilsætning af antistof, hvor den bliver vanskelig at få øje på. 0.3P fik etanol tilsat for hårdt. Lidt for tynd anti- $\gamma$ H3.

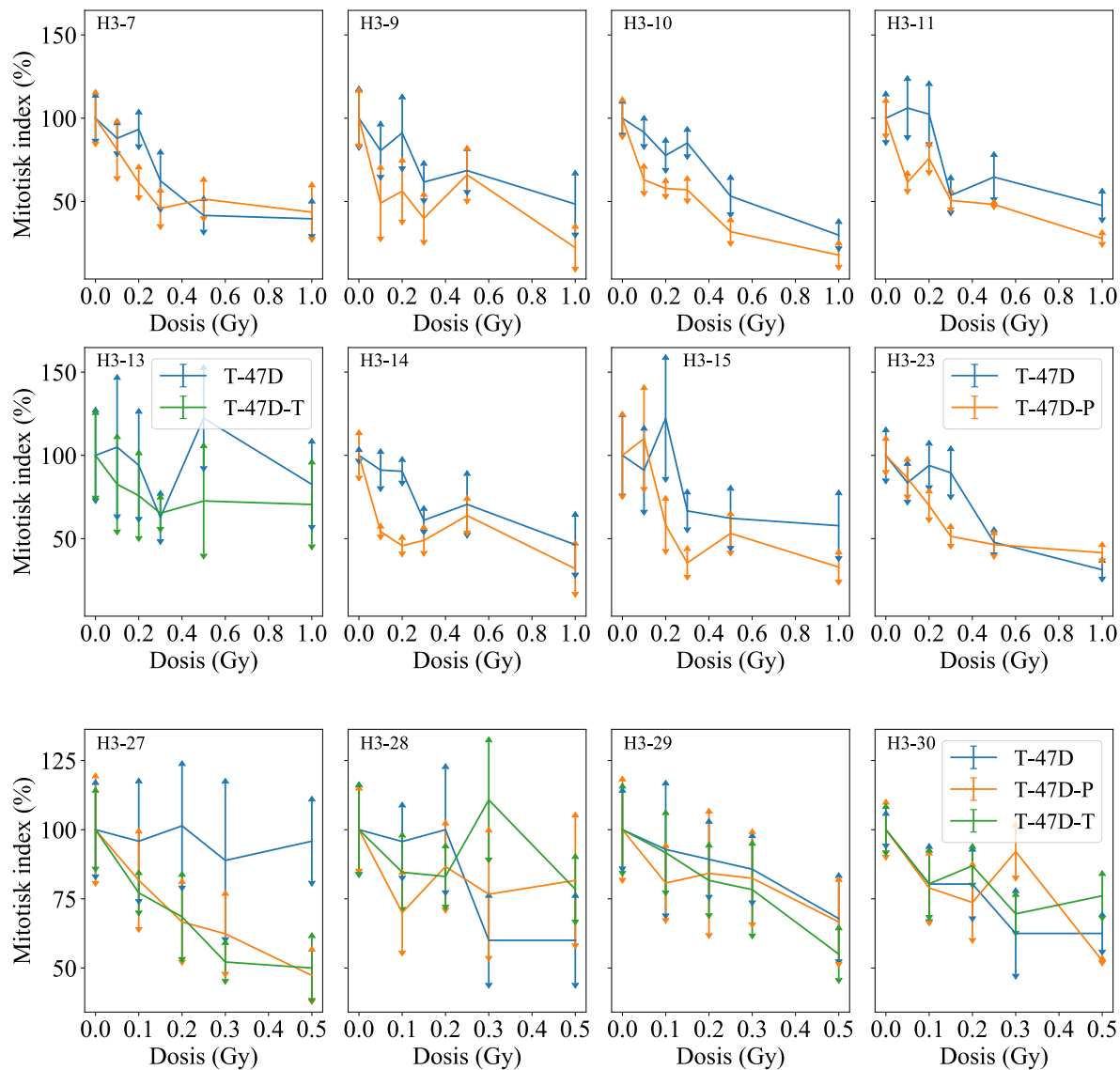
# \ Dato \ {journal}	Bemærkninger	Resultater	Fejlkilder
H3-20 16-17. sep. 21 {s. 118-122}	5+5+5 T-47D/P/T. Forholdet af antistoffer i PNT fordobles til 1:250 i PNT. Ændrer til at aspirere til 200 µl ved cellevask. Bruger fire timer på flowcytometri, opdager SSC-A—SSC-H-plot kan bruges til at diskriminere en population som giver hændelser med DNA-indhold udenfor DNA-histogram uden at ændre på selve histogrammet.	Nej, ikke nok hændelser i flowcytometri.	0.1-prøven fik dobbelt så meget PI+RNAse som de andre. Manglende hvirvling lige før flowcytometri.
H3-21 21. sep. 21 {s. 126}	7+7 T-47D/P.	Nej, ingen.	Afblæst før resultater pga. mangel på nødvendige centrifugerør.
H3-22 23-24. sep. 21 {s. 128, 131-132, 135-136}	5+5+5 T-47D/P/T. Har ioniseringskammer inde sammen med celleflaskerne underbestråling for at sikre at de får det rigtige. Begynder at vente 5 minutter imellem hver bestråling for at synkronisere med trypsinering præcis én time senere.	Nej, ikke nok hændelser i flowcytometri. Røntgenrøret bestråler meget stabilt og er ikke skyld i de ensartede grafer mellem primet og uprimet, jf. H3-9/10. Fejlen må ligge i trypsinering da det er den eneste anden ting de har til fælles.	Forskellig grad af succes med trypsinering. Usikkerhed med afmåling af sekundær antistof. Pipettens udløserknap låste sig da 0.5-prøven fik vask så den fik 9 ml PBS i stedet for 5 ml ved en vask.
H3-23 28-29. sep. 21 {s. 137-138}	7+7 T-47D/P (ekstra kontrol uden anti-γH3). Temperatur måles ved hver bestråling. Mere fokus på trypsinering. Begynder at skrive tidspunkter ned for hvor længe de er i trypsin for at gøre det så ens som muligt. Prøver at banke og løse til enkeltceller på en så ensartet måde som muligt.	Nej, ikke nok hændelser i flowcytometri.	1.0 Gy-prøven blev hvirvlet i etanol.

# \ Dato \ {journal}	Bemærkninger	Resultater	Fejlkilder
H3-24 30. sep. - 1. okt. 21 {s. 141-142}	5+5+5 T-47D/P/T. Begynder at tjekke celleflaskerne efter trypsinering for at vurdere godt de er trypsineret, relativt til hinanden, fordi mange efterladte celler formentlig vil få det mitotiske indeks til at øge i den enkelte prøve.	Nej, ikke nok hændelser i flowcytometri.	Tilsætter 100 gange for meget TGF- $\beta$ 3. 0.5/P/T væltede i isoporkassen efter bestråling. Pellet ikke opløst før etanol så alle blev hvirvlet i etanol. 0.5P fik aspireret celler. PNT(2X) fik en tredjedel for meget tørmælk.
H3-25 4-6.okt. 21 {s. 143-144}	5+5+5 T-47D/P/T.	Nej, ikke nok hændelser i flowcytometri.	Manglende hvirvling før flowcytometri.
H3-26 6-8. okt. 21 {s.145-146}	5+5+5 T-47D/P/T. Opdager at hvirvling af cellerne før flowcytometri ikke har været tilstrækkelig i de sidste forsøg.	Nej, ikke nok hændelser i flowcytometri.	Manglende hvirvling før flowcytometri.
H3-27 11-13. okt. 21 {s. 147-148}	Sætter ind med kraftig hvirvling af prøver før flowcytometri og lidt kraftigere hvirvling under selve forsøget, da jeg erfarer at cellerne sagtens kan tåle det.	Ja.	Aspirerer trypsin fra 03/P/T ved en fejl, tilsatte ny trypsin og bankede. De kan have mistet mitoser ved det. Tilsætter en tredjedel for meget anti- $\gamma$ H3 så forholdet bliver forvrænget.
H3-28 13-15.okt. 21 {s. 149-150}	5+5+5 T-47D/P/T. Jeg indfører karactersætning af trypsinering med henblik på evt. kalibrering for dette. Jeg begynder at nedkøle centrifugerotorbræt til 4°C før centrifugering.	Ja.	Ingen.
H3-29 18-20. okt. 21 {s.151-152}	5+5+5 T-47D/P/T. 60% konfluens. Finder god måde at hvirvle pellet i 100 $\mu$ l-dråbe ved at variere hastigheden af hvirvlingen imens den kører.	Ja.	Ingen.

# \ Dato \ {journal}	Bemærkninger	Resultater	Fejlkilder
H3-30 20-22. okt. 21 {s. 153}	5+5+6 T-47D/P/T. 45% konfluens. Begynder bestråling af én T-prøver med 1.0 Gy for at få datapunkter til gennemsnitsgraf.	Ja.	Ingen.
H3-31	5+5+6 T-47D/P/T. 33.3% konfluens. Analyse i blinde: Jenny har mærket celleflaskerne med kodenavne så jeg ikke ved hvilke prøver jeg ser på i analysen.	Primede celler ligger under uprimet i mitotisk indeks. Kurverne ligner hinanden begge med dyk på 0.1 Gy og top på 0.2 Gy.	Nogle af celleflaskerne væltede i isoporkassen lige efter bestråling, hvilket kan risikere at slå mitoserne løs før trypsinéring. Ikke præcis én time mellem bestråling og trypsinéring. Inkubationstid med anti- $\gamma$ H3 forkortet til 45 min.
H3-32	5+5+6 T-47D/P/T. 33.3% konfluens. Analyse i blinde.	Mystisk højt mitotisk indeks på det som viste sig at være kontrolprøven for uprimede, ikke-TGF- $\beta$ 3-tilsatte celler. Data for normalceller afvises. Primede celler opfører sig som de plejer.	Kontrolprøve kan være trypsineret dårligt hvilket giver forhøjet mitotisk indeks. Ikke præcis én time mellem bestråling og trypsinéring. Inkubationstid med anti- $\gamma$ H3 forkortet til 45 min.
H3-33	5+5+6 T-47D/P/T. 33.3% konfluens. Analyse i blinde.		Brugte 30% etanol til fiksering ved en fejl.

## B.4 RESULTATER MED ANTI- $\gamma$ H3

Forsøg som havde analysérbar data i flowcytometri vises herunder. Forsøg som manglede et eller flere datapunkter er udeladt her men taget med i gennemsnitsplottet i *Resultater*.





## B.5. PROTOKOL FOR FARVNING MED ANTI- $\gamma$ H3

### 1. Udsåning og forberedelser:

T-47D/P-celler sås ud i T25V-flasker mindst 16 timer før bestråling.

Ved forsøg med TGF- $\beta$ 3 tilsættes 0.01 ng/ml til halvdelen af flaskerne ca. 16 - 20 timer før fiksering. Konfluens skal være mellem 30 – 60%.

Fordi mitoserne sidder løst, skal celleflaskerne håndteres så forsigtigt som muligt før trypsinering. Tag forsigtigt T25V-flaskerne ud af varmeskabet og placér dem i en isoporkasse og sørg for de ikke kan vælte rundt ved at stille dem indtil hinanden eller indtil et hjørne. Hvis cellerne skal fragtes langt, opbevares celleflaskerne sammen med en stor celleflaske som indeholder 37°C vand. Varmeflasken opnår rigtig temperatur ved at stå i varmeskabet sammen med cellerne eller ved at opvarmes i vandbadet.

### 2. Bestråling:

Celleflaskebeholderen stilles i eksponeringskammeret med bunden op mens røntgenrøret varmer op. Varmeblæserne startes før warm-up-rutinen igangsættes.

SSD = 40cm, filtrering: 1.52 mm Al + 2.60 mm Cu. Kobberplader ligger øverst med 0.5 mm + 3x0.7mm oppefra og aluminium nederst.

Efter hver bestråling ventes nogle minutter før celleflaskerne i celleflaskebeholderen skiftes ud. 5 minutters mellemrum er optimalt da trypsinering tager 5 minutter pr prøvesæt.

Efter bestråling klargøres en isoporkasse med is. Bland en ny flaske med PBSx1 med 450 ml milliQ-vand og 50 ml PBSx10. Stil den i isoporkassen med 50 ml-pipetten i ved siden af et 4x4-stativ til centrifugerør. Hæld knust is på og ryst godt så det kommer ned i stativet.

Skriv på centrifugerørene, både på låget og på siden, hvilken prøve der skal i. Her er det smart at have dem stående i et system i stativet så der ikke sker fejl under trypsineringen, som godt kan være lidt stressende. P-celler markeres med dosis og P og har en tyk prik på låget, f.eks. 0.2P •. T-celler markeres med T og har en streg på låget. For at undgå forvirring mellem 0.1 Gy og 1.0 Gy, skrives hhv. "0.1" og "1." på låget.

Overfør 5 ml medium til hvert rør og prop dem ned i isen i stativet ved siden af PBS'en. Sæt dem i samme formation hele vejen op med løse låg så det er hurtigt at tage dem af når et sæt prøver er trypsineret og klar til at blive overført til mediet.

Stil dem som i tabellen under og trypsiner 3 ad gangen og 4 til sidst.

0.5	0.3	0.3P	0.3T
0.5P	0.2	0.2P	0.2T
0.5T	0.1	0.1P	0.1T
1.T	k	kP	kT

Du sidder her.

### 3. Trypsinering:

Trypsin skal være 37°C for at virke bedst. Trypsin skal helt være ny og frisk så brug en gammel flaske og varm kun nok plus ca. 5 ml. Hver celleflaske tilsættes 3 ml trypsin så ved 16 prøver varmes ca. 55 ml trypsin i varmebadet.

Fordi mitoserne sidder løst, er det vigtigt at flaskerne trypsinéres så ens som muligt. De celler som ikke kommer med, er kun ikke-mitoser og det påvirker derfor det mitotiske indeks for den enkelte celleprøve. En konfluens på 30 – 60% er ønskeligt for at sikre et godt miljø for celledeling, men for mange celler gør det vanskeligt at få alle med ved trypsinering. Med 200 µl ved hver aspiration er det ikke noget problem at have relativt få celler.

- Tag et sæt bestrålede celleprøver med samme dosis ud af varmeskabet så tidspunktet trypsinen tilsættes er præcis én time efter bestråling. Vær yderst forsigtig med flaskerne så mitoserne ikke slås løs.
- Hold flaskerne på ca. 20° på skrå så mediet samler sig i hjørnet og aspirér forsigtigt væsken med aspiratorspidsen i overfladen af væsken.
- Tilsæt 3 ml 37°C trypsin til hver flaske, sæt dem i varmeskabet og notér tiden.
- Efter 4 minutter, tag et nyt sæt prøver ud, aspirér mediet, tilsæt trypsin og byt dem ud med de prøver der nu har stået i varmeskabet i 5 minutter med trypsin.
- Bank flaskerne mellemhårdt mod bordet fire gange på hvert hjørne ad tre omgange. Find det mest solide sted på bordet først ved at banke med knoerne, og hold dig til det.

- f. Tjek evt. i stereoskopet at alle cellerne flyder rundt i væsken. For at spare tid kan du nøjes med at gøre det på én af flaskerne.
- g. Tag en 2 ml-pipette med manuel pumpeballon og sug cellesuspensionen op, skyl bunden én til to gange, sug op og pump væsken ud med fire hårde tryk. Undgå bobler. Gentag tre gange.
- h. Overfør cellesuspension til centrifugerør med 5 ml kold medium som står på is.
- i. Centrifuger prøverne i 5-6 minutter på 200 g.
  - i. Brug tiden til at tjekke de færdigtrypsinerede T25V-flasker under stereoskopet og giv dem hver deres bogstavkarakter<sup>2</sup>.
- j. Aspirér supernatant til 200 µl og tilsæt 5 ml PBS, centrifuger igen og gentag.
- k. Aspirér til 200 µl, vortex pellet på lav hastighed hvor du øger hastigheden gradvist indtil pelleten letter og til sidst opløses, eller pump på mellem hastighed.
- l. Tilsæt 5 ml etanol (70%, -20°C) langs kanten af røret på hver prøve, så etanolen og cellesuspensionen lægger sig i faser. Placer prøverne i stativet i isoporkassen med is og hvirvl hele kassen blidt på 100 rpm i 5 minutter.
- m. Sæt kassen med prøver og PBS i køleskabet.

I tabellen under noteres tidspunkterne for færdig bestrålet, trypsin tilsat og overført til medium. I de sidste tre kolonner noteres bogstavkarakter for trypsinering.

Vurderingskriteriet vises i fodnoten [2].

Dosis (Gy)	Tid (s)	Færdig bestrålet (kl)	Trypsin tilsat (kl)	Bragt i medium (kl)	Bogstavkarakter trypsinering.		
					D	P	T
0.1	13						
0.2	22						
0.3	32						
0.5	51						
1.0	1m38s						

<sup>2</sup> Ved karakter A er det fuldstændig tomt på bunden, B har spredte enkeltceller med god afstand, C har spredte enkeltceller med mindre afstand, D har plamager med celler ("byer") og ellers som C, E har plamager ("byer") og klumpninger ("koncerter") med tætsiddende celler og ellers jævnt mange celler. F er "Roskilde Festival" for celler med mange store klumpninger og jævnt mange celler generelt.

#### 4. Farvning / mærkning:

- a. Centrifuger ved 300g i 5 min, vask to gange i 5 ml kold PBS. Aspirér supernatant til 200  $\mu$ l. Bland Anti-phospho-histone-H3 så forholdet bliver 1:250 når man medregner de 100  $\mu$ l supernatant. Efter to vaske er supernatanten næsten ren PBS.
- b. Aspirér supernatant til 100  $\mu$ l, opløs pellet ved vortex med variabel lav hastighed, og tilsæt 100  $\mu$ l anti- $\gamma$ H3-løsning. Vortex igen på lidt højere hastighed og inkubér i køleskab i mindst 60 minutter.
- c. Tilsæt 5 ml kold PBS til hver prøve og centrifuger ved 300g i 5 min.
  - i. Tilsæt Goat-anti-rabbit 647 alexa fluor til så forholdet bliver 1:250 når PBS-dråben på 100  $\mu$ l medregnes.
- d. Aspirér supernatant til 100  $\mu$ l, opløs pellet ved vortex som ovenfor beskrevet, og tilsæt 200  $\mu$ l alexa fluor-løsning. Vortex igen og inkuber i køleskab i 30 min.
  - i. Bland PI med RNase og start flowcytometeret. Kvalitetssikring af flowcytometeret gøres ved at køre beads.
- e. Tilsæt 5 ml kold PBS, centrifuger ved 300g i 5 min, aspirér supernatant til 100  $\mu$ l og tilsæt 500  $\mu$ l PI med RNase til hver prøve.

#### 5. Flowcytometri:

- a. Vortex hver prøve grundigt før den overføres til de små rør igennem et finmasket filter. Vortex først nogle gange på lav hastighed for at opløse pelleten og derefter fire-fem gange på maksimal hastighed for at opløse alle klumper helt.
- b. Filtrer væsken ved overførsel til round-bottom-rør og sæt prøven på flowcytometerets SIP. (Backflush og unclog-rutine køres mellem hver prøve og 2 minutter med milliQ-vand på fluid dynamics på fast køres evt. for hver femte prøve).
- c. Sæt fluid dynamics til custom: 5  $\mu$ m cell core og 10  $\mu$ l/min eller slow (10  $\mu$ l cell core, 14  $\mu$ l/min). Vælg 50000 - 100000 events.
- d. Gating:
  - i. Åbn FSC-A—SSC-A til debris-diskrimination i density plot. Gate med P1.

- ii. Åbn FSC-A—FSC-H til dublet-diskrimination af hændelserne i P1-gatingen i density plot. Gate med P2.
- iii. Åbn SSC-A—SSC-H til evt. diskrimination af en lille population med højere SSC-H-signal end hovedpopulationen i P2 i density plot, som når fjernet giver et renere DNA-histogram. Gate med P3 og husk at få alt andet med en den lille ”stribе” med høj SSC-H-signal.
- iv. Åbn FL2-histogram og brug DNA-plottet som vejledning i diskriminationen i i, ii, og iii. Sæt en gate omkring DNA-plottet.
- v. Åben FL2-A—FL4-A-density plot og mål mitosepopulationen med en polygongate.

#### Løsninger (nok til 16 prøver):

- **PBS:** Blandes ud fra PBS10X 1:10: 50 ml PBS10X + 450 ml milliQ H<sub>2</sub>O.
- **Anti- $\gamma$ H3 1:250 i PNT:** 1.5 ml PBS + 10  $\mu$ l Tween 20 + 0.12 g tørmælk + 12  $\mu$ l Polyclonal rabbit anti-phospho-histone H3 (Upstate, Cat# 06-570). Vortex grundigt efter både tilsætning af Tween 20, tørmælk og anti- $\gamma$ H3.
- **Alexa fluor 1:250 i PNT:** 3.0 ml PBS + 15  $\mu$ l Tween 20 + 0.18 g tørmælk + 18  $\mu$ l FITC-konjugeret sekundært antistof (Blå, alexa fluor 647).
- **PI+RNase:** 5.7 ml PBS + 2.1 ml RNase (400  $\mu$ g/ml) + 0.6 ml PI (1mg/ml).