

In vitro cytotoksisk effekt av venom fra
vestlig honningbie (*Apis mellifera*) hos
glioblastoma cellelinjer av typen U251 og C6.

av

Sivert Andreas Bruvoll Knutsen



Masteroppgave i farmasi

Juni 2008

Senter for Farmasi / Institutt for Indremedisin

Haukeland Universitetssykehus

Universitetet i Bergen

FORORD

Denne masteroppgaven er skrevet ved Senter for Farmasi/Institutt for Indremedisin, Seksjon for Gastroenterologi, Haukeland Universitetssykehus, Universitetet i Bergen. Min faglige veileder har vært Professor Knut-Jan Andersen, og uten han hadde ikke denne oppgaven vært mulig. Takk til Institutt for Indremedisin, som har lagt alt til rette slik at denne oppgaven kunne gjennomføres, og samtidig en stor takk til avdelingsingeniørene Aut Utheim og Behzad Gharehnia som alltid har stilt opp for å hjelpe meg med den minste lille ting på labben, det er utrolig hvor hjelpsomme dere er.

I tillegg må jeg få takke alle venner som har gjort livet i Bergen trivelig selv om Kristine har vært 70 mil unna i Trondheim. Det har vært et langt år alene i Bergen, men alt er mulig med god støtte fra venner, mamma og pappa, og ikke minst Siri. Du har vært kjemeflink til å opmuntre meg og komme med råd og tips når det har vært nødvendig. Takk også til Bjørk for mye lek, moro og selskap en kald vinterkveld.

Til slutt må jeg få takke min kjæreste Kristine, som alltid har støttet meg og kommet med oppmuntrende ord og konstruktiv kritikk. Du har vært, og er fortsatt, uunnværlig.

Nå kommer jeg til Trondheim!

Sivert A. B. Knutsen, Bergen, Juni 2008

INNHALDSFORTEGNELSE

FORORD	3
INNHALDSFORTEGNELSE	4
1. SAMMENDRAG	6
2. INTRODUKSJON	7
2.1 - BIOPROSPEKTERING	7
2.2 - KREFT	8
2.3 - CELLEKULTURER	9
2.4 - TOKSIKOLOGISKE STUDIER - CYTOTOKSIKOLOGI	10
2.5 - BIVENOM	11
2.6 - MÅL MED STUDIEN	12
3. MATERIALER	13
3.1 - KJEMIKALIER	13
3.2 - APPARATER OG UTSTYR	13
3.3 - BIOLOGISKE MATERIALER	13
3.4 - TESTMATERIALE	14
4. METODE	15
4.1 – EUKARYOT CELLEKULTUR	15
4.2 - MEDIUM	15
4.2.1 - <i>Innhold</i> :.....	15
4.2.2 - <i>Prosedyre</i> :.....	15
4.3 - KRYOPRESERVERING	16
4.3.1 - <i>Teori</i>	16
4.3.2 - <i>Prosedyre</i>	16
4.4 - OPPTINING AV FROSNE CELLER	17
4.4.1 - <i>Prosedyre</i>	17
4.5 - OMSETNING AV CELLELINJER - SUBKULTURER	17
4.5.1 - <i>Teori</i>	17
4.5.2 - <i>Prosedyre</i>	17
4.6 – TELLING AV CELLER	18
4.6.1 - <i>Teori</i>	18
4.6.2 - <i>Prosedyre</i>	19
4.7 – VEKSTKURVE	20
4.7.1 - <i>Teori</i>	20
4.7.2 - <i>Prosedyre</i>	20
4.8 - LEVEDYKTIGHET	21
4.8.1 - <i>Teori</i>	21
4.8.2 - <i>Prosedyre</i>	21
4.9 - INHIBERING AV VEKST	21
4.9.1 - <i>Teori</i>	21
4.9.2 - <i>Prosedyre</i>	22
4.10 - EKSPONERING I 48 TIMER - REKONVALENS	22
4.10.1 - <i>Teori</i>	22
4.10.2 - <i>Prosedyre</i>	22
4.11 - APOPTOSE	23
4.11.1 - <i>Teori</i>	23
4.11.2 - <i>Prosedyre</i>	24

5. RESULTATER.....	25
5.1 - VEKSTKURVE.....	25
5.1.1 - U251.....	25
5.1.2 - C6.....	26
5.2 - LEVEDYKTIGHET	26
5.2.1 - U251.....	26
5.2.2 - C6.....	27
5.3 - INHIBERING AV VEKST.....	28
5.3.1 - U251.....	28
5.3.2 - C6.....	28
5.4 - EKSPONERING I 48 TIMER - REKONVALENS	30
5.4.1 - U251.....	30
5.4.2 - C6.....	30
5.5 - APOPTOSE.....	32
5.5.1 - U251.....	32
5.5.2 - C6.....	32
6. DISKUSJON	34
6.1 - GENERELT	34
6.2 - VEKST OG PROLIFERASJON	34
6.3 - APOPTOSE.....	36
6.3 - SAMMENLIGNING MELLOM U251 OG C6	38
6.4 - <i>IN VITRO</i> TOKSIKOLOGI.....	39
6.5 - VIDERE ARBEID.....	40
7. REFERANSER.....	41

1. SAMMENDRAG

Flere *in vitro*-metoder kan benyttes til å evaluere både generell og organspesifikk toksisitet. Disse metodene kan kombineres med bioprospektering for å screene mulige legemidler for cytotoxisk effekt, og samtidig begrense bruken av dyr til slike forsøk. *In vitro*-metoder kan dermed være både et supplement og et alternativ til bruk av forsøksdyr. I denne studien er det benyttet kontinuerlige cellelinjer fra krefttypen *glioblastoma multiforme*, som stammer fra hjerne, til å evaluere cytotoxisk effekt av helt bivenom (BV) fra vestlig honningbie (*Apis mellifera*). De to cellekulturene som ble benyttet, U251 og C6, var henholdsvis av humant opphav og hentet fra rotte. Det ble benyttet forskjellige metoder for å evaluere levedyktighet, vekstbegrensning, rekonvalens og induksjon av apoptose med tanke på en eventuell fremtidig bruk som legemiddel mot kreft.

BV gir en betydelig begrensning av levedyktighet av både U251 og C6 allerede etter 24 timers eksponering. U251-cellene viste 70% levedyktige celler ved eksponering med 6 µg/ml BV i 24 timer, mens C6-cellene viste tilsvarende effekt ved 9 µg/ml, med 65,8% levedyktige celler. Tilsvarende effekt ble observert ved eksponering over lengre tid, der 6 µg/ml BV opprettholdt den veksthemmende effekten etter 72 timer hos U251, mens 9 µg/ml måtte til for å opprettholde veksthemmende effekt hos C6. Når eksponeringen ble fjernet etter 48 timer og cellene fikk vokse i friskt medium viste det seg at 6 µg/ml BV ikke ga en varig veksthemmende effekt hos noen av celletypene. C6 viste også her høyest grad av toleranse, der de første 24 timene etter fjerning av eksponering ga en vekstøkning på 111%, mot 70% hos U251. Hoechst-farging for apoptose viste at BV gir en doseavhengig induksjon av apoptose hos U251. Apoptose var også tilstede hos C6, men det er usikkert i hvilken grad BV induserer denne effekten, og om den er doseavhengig.

Denne studien er den første som viser at BV gir induksjon av apoptose hos U251-celler *in vitro*. Resultatene viser også tydelig at forskjellige typer glioblastoma-celler reagerer i ulik grad på eksponering med BV. C6-cellene viste en gjennomgående høyere toleranse for BV sett i forhold til U251-cellene. Mekanismen for den observerte vekstreduksjonen er ikke kjent, men andre studier antyder at både calmodulin- og COX-2-hemmende effekt kan være medvirkende. Årsken til den observerte forskjellen i respons er heller ikke kjent, men en grunn kan være at de to celletypene har opphav fra forskjellige arter.

2. INTRODUKSJON

Ved Universitet i Bergen, Institutt for Indremedisin, Haukeland Universitetssykehus, har Professor Knut-Jan Andersen og hans gruppe i en årrekke benyttet vevskulturer til toksikologiske studier *in vitro*, og i de senere årene også inkludert bioprospektering som en del av disse studiene. Gjennom disse studiene har de utviklet mange gode metoder for enkelt å kunne screene substanser for eventuell cytotoxisk effekt på forskjellige cellelinjer. I kampen mot kreft har det i den senere tid blitt vist økende interesse for medisiner fra plante- og dyreriket gjennom bioprospektering. Disse medisinene har ofte vist god medisinsk effekt kombinert med lav toksisitet, som er ønskelig i en eventuell behandling for å forhindre bivirkninger og allikevel opprettholde tilfredstillende effekt. Bi-venom (BV) er et slik lett tilgjengelig middel fra dyreriket, og er mye brukt i tradisjonell østlig medisin på lidelser som forkjølelse, reumatisme og kreft. Ved å eksponere forskjellige cellelinjer for BV kan man evaluere den cytotoxiske effekten med tanke på eventuell fremtidig bruk i kreftbehandling.

2.1 - BIOPROSPEKTERING

Oppdagelse og utvikling av nye legemidler gjennomgikk en markant forandring i løpet av det forrige århundre. Før 1900-tallet bestod de fleste medisiner av forskjellige komponenter hentet fra planter, dyr, mineraler og mikrober, enten i ubehandlet form eller i delvis behandlede produkter og ekstrakter. Rundt århundreskiftet lanserte Langley idéen om en ”reseptor-substans” som medierte virkningen av et legemiddel (Langley, 1901; Langley, 1905). Selv om enkelte legemidler allerede ble brukt som rene, isolerte substanser (f.eks. morfin), ble nå flere og flere legemidler isolert og rengjort istedet for at man brukte ubehandlede materialer og ekstrakter. Et velkjent eksempel av slike legemidler i daglig bruk er *digoxin*, et hjerteglykosid fra planten *Digitalis lanata*, som først ble isolert i 1930 av Dr Sydney Smith (GlaxoSmithKline, 2008).

På 1970-tallet begynte forskere for alvor å syntetisere legemidler kjemisk i laboratorier, men fortsatt var naturen en viktig kilde til legemidler. Mellom 1981-2006 var 63% av nye småmolekylære legemidler enten hentet direkte fra naturen eller derivert av et naturlig produkt (Newman & Cragg, 2007). Bioprospektering er definert av FN som ”Utforsking av biodiversitet for kommersielt, vitenskapelig eller kulturelt nyttige genetiske og biokjemiske

ressurser”(UNEP, 2008). I legemiddelsammenheng beskriver dette en prosess der man ser etter potensielle legemidler i naturen. Det finnes flere forskjellige strategier for å utøve bioprospektering, der en vanlig brukt metode går ut på tilfeldige prøver og screening av materialet, mens en annen metode benytter folkemedisin/tradisjonell medisin som utgangspunkt for søk etter nyttige substanser. Den første metoden må naturligvis foregå i stor skala, og har sitt hovedargument i at bare en liten del av klodens biologiske materiale er testet for biologisk effekt. I denne studien er den siste metoden valgt, som har sine fordeler ved at man selv i småskala eksperimenter kan finne substanser med biologisk aktivitet, og at man i utgangspunktet har indisier om at prøven inneholder substanser med biologisk effekt.

2.2 - KREFT

Kreft er en samlebetegnelse for en rekke sykdommer som har som fellestrekk at en gruppe celler viser en form for *ukontrollert cellevekst*, *invasjon* av nærliggende områder i organismen og i enkelte tilfeller også *metastase* (spredning til fjerntliggende deler av organismen via blodbanen eller lymfesystemet). Disse cellene danner *maligne svulster* (tumorer) som vokser ukontrollert og aggressivt. Per definisjon er det kun maligne svulster som defineres som kreft. *Benigne svulster* mangler de tre fellestrekkene som maligne svulster viser og er normalt ikke dødelige (f.eks. føflekker). Noen benigne svulster kan allikevel forårsake store skader, f.eks. ved dannelse av svulster i hjernen, med påfølgende press på deler av nervesystemet. Kreft er et stort problem på verdensbasis, og i følge Verdens Helseorganisasjon (WHO) var kreft årsaken til 13% av alle dødsfall i 2005 (WHO, 2006). Behandling av kreftsvulster er et svært viktig forskningsområde, og per i dag er kirurgi (fjerning av svulst), kjemoterapi (medikamentell behandling - *cytostatika*), immunoterapi (forsterking av immunforsvar) og strålebehandling (radioaktiv stråling av svulst) de vanligste behandlingsmetodene. Ofte benyttes flere av disse metodene for best mulig resultat, men allikevel er det mange typer kreft vi, per i dag, ikke er i stand til å helbrede. En av disse typene er *glioblastoma multiforme*, den mest aggressive typen kreft fra gliaceller (DeVita et al., 2005).

2.3 - CELLEKULTURER

En cellekultur beskrives som *in vitro* vedlikehold og vekst av celler med opprinnelse fra multicellulære organismer (FAO, 2001). Dyrking av cellekulturer utenfor organismen ble oppdaget allerede i 1885 (Alberts B., 2002), men tok seg opp først på 1950-tallet, med utviklingen av poliovaksinen som det første store resultatet innenfor forskning med cellekulturer (Chaudry, 2004). Cellekulturer dyrkes og bearbeides alltid under tilnærmet sterile forhold, da enhver form for infeksjon med bakterier/virus/sopp o.l. vil kunne ødelegge for en cellekultur. Dette kommer av at bakterier/sopp/virus har en mye høyere vekstrate enn eukaryote celler, og vil fort kunne ta over en cellekultur hvis den blir infisert. Dette er nok også noe av grunnen til at cellekulturer ble lite brukt før 1950, siden teknologien til å jobbe med og dyrke celler under sterile forhold ikke var tilgjengelig. Det er flere fordeler ved å dyrke celler i kultur, blant annet er resultater reproducerbare ved at man bruker en batch med klonede celler, og man kan få hurtige svar på aktuelle problemstillinger. Ved dyrking av celler i kultur omtaler man to forskjellige typer cellelinjer:

1. Primære cellelinjer
2. Kontinuerlige cellelinjer

Primære cellelinjer stammer fra biopsier av mammalsk vev, der cellene ofte viser vevs-spesifikke egenskaper, som uttrykk av spesifikke proteiner. Disse cellelinjene krever en del arbeid å klargjøre, og brukes primært når det ikke finnes kontinuerlige cellelinjer tilgjengelig eller der behov for differensiering er nødvendig. En slik primær cellelinje vil etterhvert dø ut, men noen slike primære linjer ”transformeres” til en kontinuerlig cellelinje. Dette skjer etter mange subkulturer på friskt medium, og den nye kontinuerlige cellelinjen vil ofte være svært forskjellig fra den primære moderlinjen, både med tanke på morfologi, genetikk og mulighet til å danne svulster. Noen slike kontinuerlige cellelinjer kan vedlikeholdes tilnærmet uendelig.

2.4 - TOKSIKOLOGISKE STUDIER - CYTOTOKSIKOLOGI

Toksikologiske studier utføres på alle potensielle legemidler, og er en nødvendig del av legemiddelutviklingen. Dette består av forskjellige tester som utføres på de fleste nye substanser/produkter som skal i handel, for eksempel tilsetningsstoffer i mat, husholdningsprodukter, legemidler, kosttilskudd etc. De fleste toksikologiske tester utføres på forsøksdyr, og ca 1 million forsøksdyr benyttes i toksikologiske studier hvert år i Europa (Abbott, 2005). Som et alternativ eller tillegg til bruk av forsøksdyr kan man også benytte cellekulturer til toksikologiske tester. Dette er meget nyttig innenfor legemiddelutvikling, der man kan undersøke generell toksisitet på humane celler, og også en eventuell effekt på celler tatt fra et målorgan. Særlig ved utvikling av cytostatika er toksikologiske studier ved hjelp av cellekulturer et viktig instrument. En vanlig strategi ved bekjempelse av kreftceller er å skape en spesifikk hemming av kreftcellenes vekst uten store bivirkninger/skader på det omliggende vevet.

Ved å benytte *in vitro* cytotoxiske studier på cellekulturer kan man raskt og effektivt undersøke effekten av et potensielt legemiddel på både normale celler og kreftceller. Bruken av cellekulturer gjør dermed at man kan ekskludere substanser fra videre studier på et tidlig stadium uten at man behøver å benytte seg av forsøksdyr i like stor grad. Det er verdt å merke seg at bruken av kontinuerlige cellelinjer kan ha begrenset verdi ved undersøkelse av organspesifikk toksisitet. Dette kommer av den tidligere nevnte ”overgangen” fra en primær til en kontinuerlig cellelinje, som ofte innbefatter en høy grad av forandring i morfologi og genetikk. Kontinuerlige cellelinjer vil dermed ikke nødvendigvis være representativt for opprinnelsesorganet (Barile, 1994). Dette betyr at primære cellelinjer bør brukes til slike studier. Ved undersøkelse av basal cytotoxisitet, derimot, er kontinuerlige cellelinjer velegnet.

Fra *in vivo* toksikologiske studier er LD₅₀ (dødelig dose i 50% av dyrene) og gjennomsnittlig human dødelig blod-konsentrasjon noen av de vanligste parametrene man ser på. Til sammenligning vil man ved *in vitro* undersøkelser kunne se på IC₅₀-verdier. IC₅₀-verdier er de verdiene som gir 50% inhibering av forhåndsbestemte endepunkter. Det er tidligere vist at IC₅₀-verdier kan gi vel så gode resultater som LD₅₀-verdier når man skal forutsi toksisitet hos mennesker (Hopkinson et al., 1993).

2.5 - BIVENOM

Stikk fra vestlig honningbie (*Apis mellifera*) og relaterte produkter fra honningbier har vært brukt i tradisjonell medisin i både Kina og Korea i tusenvis av år, og brukes den dag i dag mot en rekke lidelser som forkjølelse og autoimmune sykdommer. Bruken av bivenom (BV) er imidlertid en omstridt metode sett med vestlige øyne og forskning gjøres nå rundt sikkerheten ved slik behandling. BV er lett tilgjengelig, og består av mange forskjellige substanser med biologisk aktivitet, deriblant melittin, fosfolipase A₂ (PLA₂), apamin og mastcelledegranulerende peptid (Habermann, 1972). Studier utført på disse komponentene av BV har vist en god del toksiske effekter. Melittin, som utgjør ca. 50% av tørt venom (Orlov et al., 1981; Orsolich et al., 2003), er vist å ha hemolytisk og antimikrobiell effekt (Habermann, 1972; Wade et al., 1990), mens PLA₂ gir en myotoksisk effekt på skjelettmuskulatur (Gutiérrez & Ownby, 2003). Melittin kan også inducere smerte og gi økt blodtilstrømming, kjent som neurogen inflammasjon (Sumikura et al., 2003). Konsentrert BV i pulverform er naturligvis helseskadelig, og det er viktig med gode rutiner på laboratoriet for å forhindre skader ved håndtering.

Studier utført på BV som en helhet, ikke enkeltkomponenter, viser at BV kan gi en anti-inflammatorisk effekt ved å frigi katekolaminer fra adrenal medulla (Kwon et al., 2003) og at BV kan inhibere cellevekst av maligne melanoma-celler både *in vitro* og *in vivo* (Liu et al., 2002) samt inhiberer vekst av celler fra carcinoma mammae *in vitro* (Orsolich et al., 2003). Det er også vist en calmodulinhemmende effekt med påfølgende inhibering av cellevekst i L1210 leukemiske celler (Hait et al., 1983). Andre studier av legemidler som inhiberer calmodulineffekt har vist at slike legemidler kan gi en påfølgende inhibering av DNA-syntese i glioblastoma celledinjer (Okumura et al., 1982), noe som kan være et viktig hjelpemiddel i behandling av denne aggressive formen for kreft. Det er gjort få studier på den generelle cytotoxiske effekten av BV, men en studie viste cytotoxisk effekt på normale humane lymfocytter og HL-60-celler (Lee et al., 2007). Bivenom er også påvist å inducere apoptose i flere tilfeller, blant annet i synoviale fibroblaster fra pasienter med reumatoid arthritt (Hong et al., 2005) og på en human lungekreft-celledinje, NCI-H1299 (Jang et al., 2003).

2.6 - MÅL MED STUDIEN

For å videreføre tradisjonen til Knut-Jan Andersen og hans gruppe ved Institutt for Indremedisin var hovedfokuset i denne studien lagt til å undersøke den cytotoksiske effekten av en substans hentet fra naturen, spesifikt ved å undersøke bi-venom (BV) hentet fra vestlig honningbie (*Apis mellifera*). BV er mye brukt i østlig folkemedisin og lett tilgjengelig kommersielt. Den cytotoksiske effekten ble evaluert *in vitro* på cellekulturer av typene U251 (human tumor fra hjerne) og C6 (glial tumor induisert hos rotte). Begge disse cellelinjene er kontinuerlige cellelinjer som danner monolayer cellekulturer.

Målet med studien ble å evaluere den cytotoksiske effekten BV utgjorde *in vitro* på U251 og C6 celler, med tanke på eventuell inhibering av tumorvekst og -spredning, og samtidig sammenligne effekten på disse to forskjellige cellelinjene. Flere metoder er benyttet for å undersøke akutt/kronisk toksisitet, eventuell redusert vekst/proliferasjon, samt hvorvidt BV gir induksjon av apoptose.

3. MATERIALER

3.1 - KJEMIKALIER

Alle kjemikalier som er brukt i studien er av beste tilgjengelige kvalitet, og har sitt opphav fra en av følgende produsenter, om ikke annet er spesifisert:

- Sigma-Aldrich Ltd., St. Louis, MO, USA
- Cambrex Bio Science Verviers, Verviers, Belgia
- Oxiozid Ltd, Basingstoke, Hampshire, UK
- Thermo Electron Corp, Pittsburg, PA, USA

3.2 - APPARATER OG UTSTYR

Vekstflasker, skåler og plater brukt til dyrking av celler er alle kjøpt inn fra Nunc AS, Danmark.

- **Lysmikroskop:** Nikon TMS-F (Nikon, Japan)
- **Inkubator:** ThermoForma Steri-Cycle CO₂ Incubator (Thermo Electron Corp, USA) satt til 37°C, 5% CO₂, 100% relativ fuktighet.
- **Fluorescensmikroskop:**
 - o **Mikroskop:** Olympus BX51
 - o **Kamera:** Olympus DP71
 - o **Fluorescenslampe:** Olympus U-RFL-T

3.3 - BIOLOGISKE MATERIALER

Glioma U251, humane kreftceller tatt fra hjerne er benyttet. Cellekulturen var en gave til Institutt for Indremedisin fra Professor Claus Edvardsen, Institutt for Patologi, Haukeland Universitetssykehus, Universitetet i Bergen. Cellelinjen har sitt opphav fra pasienter med *glioblastoma multiforme*, som er den mest aggressive formen for glioma. (DeVita et al., 2005)

C6-cellelinjen kommer fra glial tumor hos Wistar-Furth-rotter, induisert med N-nitrosometylurea (Benda et al., 1968)

3.4 - TESTMATERIALE

Bi-venom ble kjøpt inn fra Sigma-Aldrich Ltd, St. Louis, MO, USA. Venomet kom i pulverform, og ble løst i 0.9 % saltvann til 10 mg/ml og oppbevart ved under 0°C (Lee et al., 2007). BV er svært giftig i konsentrert form, og sikkerhetstiltak i form av doble hansker og sikkerhetsbenk med avtrekk ble benyttet for å hindre skade på personer under håndtering av materialet.

4. METODE

4.1 – EUKARYOT CELLEKULTUR

To eukaryote cellekulturer er benyttet for *in vitro* studier, og det er benyttet standard teknikker i alle operasjoner (Freshney, 2005). Alt arbeid med cellekulturer er utført i en sterilbenk med laminar flow. Hansker og sterile pipettespisser er benyttet, og sterilbenken, samt alle flasker, plastrør og annet utstyr brukt inne i benken ble vasket med 70% etanol før bruk. Alle forsøkene er utført med 3 paralleller og i tillegg gjentatte repetisjoner der det har vært mulig.

4.2 - MEDIUM

4.2.1 - Innhold:

Komponenter blandet inn i en flaske på 0,5 L serum-tilsatt DMEM (Sigma-Aldrich Ltd.) er gitt i tabell 3.1.

Tabell 3.1: Komponenter i serum-supplementert DMEM

<i>Komponenter</i>	<i>Volum (mL)</i>
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	500
Fetal Bovine Serum (FBS) 10%	50
L-glutamine 2%	10
Penicillin (100 IU/mL)+Streptomycin (100 mg/mL)	10
Non-Essential Amino Acids (NEAA)	16

4.2.2 - Prosedyre:

1. 500 ml Føtal Bovine Serum (FBS), lagret ved under -20°C, ble tint over natten ved 4°C og deretter varmet det opp i et vannbad til 56°C. Flasken vendes og ristes hvert 5. minutt for å opprettholde uniform temperatur.
2. Når 56°C er nådd holdes flasken i vannbadet i 30 minutter før serumet deretter fordeles i sterlie 50 ml plastrør og fryses ned til under -20°C for videre oppbevaring.
3. Ved tillaging av medium: Et 50 ml rør tas opp av fryseren og tines i et vannbad ved 37°C, før det deretter tilsettes i en 0,5 L flaske DMEM sammen med resten av komponentene, gitt i tabell 3.1. Innholdet blandes godt og det ferdige mediet oppbevares ved 4°C.

4.3 - KRYOPRESERVERING

4.3.1 - Teori

Kryopreservering innebærer frysing ved ekstremt lave temperaturer. Vanligvis brukes flytende nitrogen til å oppnå slike lav temperaturer. Flytende nitrogen koker ved -196°C , og holder derfor en konstant temperatur så lenge det alltid er nitrogen i tanken. Vevsprøver og celler kan fryses ned slik at alle biologiske prosesser stopper opp og kan oppbevares i det uendelige før de tines opp igjen og kan brukes videre. For at vevet og cellene ikke skal ta skade av fryse- eller tineprosessen brukes en type frostvæske, f.eks etylenglykol eller dimetylsulfoksid (DMSO). Etter tilsetning av frostvæske må cellene dehydreres, slik at det ikke dannes iskrystaller inne i cellene. Dette gjøres ved at temperaturen senkes veldig sakte før prøvene overføres til nitrogentanken. For å senke temperaturen sakte benyttes ofte en beholder med isopropanol, som fryseampullene plasseres i. Deretter plasseres denne beholderen i en fryser ved -80°C , slik at temperaturen synker med ca 1°C per minutt. Ved å benytte kryopreservering kan man opprettholde en cellelinje, og gjøre gjentatte forsøk med samme passasje, uten å risikere genetisk drift i cellelinjen.

4.3.2 - Prosedyre

1. Friske celler trypsineres med 0,25% Trypsin-EDTA-løsning og telles. Cellene sentrifugeres ved 2200 rpm i 2 minutter for å fjerne medium. Supernatanten fjernes.
2. Cellene resuspenderes deretter i riktig mengde frysemedium, slik at man oppnår ca $3,0 \cdot 10^6$ celler/ml. Frysemediet består av DMEM supplementert med 20% FBS og 10% (w/v) DMSO.
3. Cellesuspensjonen blir deretter fordelt i fryseampuller, 1 ml per ampulle. Ampullene plasseres i en beholder med isopropanol, og settes inn i en fryser ved -80°C i 3 timer.
4. Deretter overføres cellene raskt til nitrogentanken. Hvis temperaturen stiger over -50°C mens fryseampullene transporteres blir cellene raskt ødelagt, og det er derfor viktig at overføringen her skjer kjapt.

4.4 - OPPTINING AV FROSNE CELLER

4.4.1 - Prosedyre

For å ta kryoampuller med frosne celler ut av nitrogentanken brukes beskyttelseshansker og en maske foran ansiktet.

1. Ampullene som skal brukes fjernes fra tanken ved hjelp av en pinsett, og transporteres raskt til et vannbad som holder 37°C.
2. Etter et par minuttter, når cellene er opptinet, vaskes ampullen med 70% etanol før cellene overføres til et 10 ml plastrør med skrukork.
3. 5 mL DMEM medium tilsatt serum tilsettes i røret dråpevis for at cellene skal unngå osmotisk sjokk.
4. Cellesuspensjonen sentrifugeres i 2 minutter ved 2200 rpm, og supernatanten fjernes. Dette gjøres for å fjerne frysemediet, DMSO.
5. Cellene resuspenderes deretter i 10 mL nytt medium, og plasseres så i inkubator ved 37°C.

4.5 - OMSETNING AV CELLELINJER - SUBKULTURER

4.5.1 - Teori

Omsetning av cellekulturer gjøres regelmessig for å unngå at celleveksten blir hindret. Hindring av cellevekst skjer f.eks. når cellepopulasjonen har nådd maksimal tetthet, eller det meste av vekstflaten er okkupert. Omsetning av cellekulturen gjøres når cellene har oppnådd konfluens, som er gitt når cellepopulasjonen opptar nesten all tilgjengelig vekstflate (McAteer & Douglas, 1979). Rent praktisk involverer *in vitro* omsetning av en cellekultur at cellene trypsineres slik at de løsner, og overføres til en ny vekstflaske.

4.5.2 - Prosedyre

1. Når cellene har oppnådd konfluens tas de ut av inkubator og over i en arbeidsbenk med steril luftflow.
2. Mediet fjernes fra flasken, og cellene vaskes med 1 ml 0,25% trypsin. Trypsinet fjernes, og nye 2 ml trypsin tilsettes før flasken plasseres i inkubator i 5-10 minutter til cellene løsner.

3. Løsningen pipetteres opp og ned noen ganger for å bryte opp celleklumper, før 0,5 ml cellesuspensjon overføres til en ny flaske.
4. 10 ml vekstmedium tilsettes, og flasken settes til videre inkubasjon. Serumet i vekstmediet inhiberer effekten av trypsin, slik at cellene igjen kan feste seg til flaskebunnen.

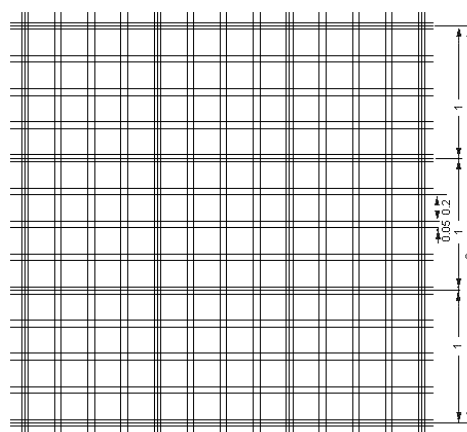
4.6 – TELLING AV CELLER

4.6.1 - Teori

For de fleste studier som gjøres med celler er det nødvendig med en kvantifisering av cellene. Ved å bruke like mengder celler i hvert forsøk vil man oppnå optimal vekst, og metoden kan i større grad standardiseres. Hvis man i tillegg bruker kryopreserverte celler fra samme omsetning kan resultatene ofte reproduseres i stor grad.

En vanlig teknikk for å kvantifisere celler er å bruke et haemocytometer i kombinasjon med et invertert lysmikroskop. Med et haemocytometer beregnes cellekonsentrasjonen, oftest gitt i antall celler/ml. I denne studien er det benyttet et haemocytometer av Bürker-typen (Bürker-kammer). Et Bürker-kammer består av en glassplate med to definerte områder på 9 mm^2 , avgrenset av 3 parallelle linjer. Dette området er dekket av et dekkglass, slik at dybden blir 0,1 mm. Telleområdene er videre delt inn i 9 like store kvadrater, hvert på 1 mm^2 , som igjen er delt inn i 16 like store kvadrater for å lette tellingen.

Ca 20 μl cellesuspensjon tilsettes i Bürker-kammeret og blir ført inn av kapillærkrefter. Cellene kan deretter observeres under et lysmikroskop med et 10X objektiv, og et kvadrat på 9 mm^2 fokuseres. Selve tellingen gjøres ved å telle antall celler i et 1 mm^2 kvadrat, fordelt på 16 små hjelpekvadrat. Disse er skilt fra hverandre med doble linjer, og hvert hjelpekvadrat telles derfor fra toppen og venstre side for å forhindre at den samme cellen telles flere ganger. Et minimum av 3



Figur 4.i: Bürker haemocytometer.
Figuren viser et forstørret område på 9 mm^2 .
Alle tall gitt i mm. (LO-LaborOptik GmbH,
Tyskland)

slike 1 mm² kvadrater telles, og gjennomsnittlig antall celler beregnes, for å få et statistisk signifikant resultat.

Konsentrasjonen av celler i suspensjonen kan deretter beregnes på følgende måte:

$$c = n/V \quad \text{(formel 4.1)}$$

Der c = konsentrasjonen av celler (celler/ml), n = gjennomsnittlig antall celler per 1 mm² kvadrat og V = volumet av kvadratet (ml). Et areal på 1 mm² og dybde på 0,1 mm gir et volum på 0,1 mm³ = 1·10⁻⁴ ml. For å ende opp med antall celler/ml, multipliseres det derfor med 10⁴:

$$c = n \cdot 10^4 \quad \text{(formel 4.2)}$$

Ved beregning av totalt antall celler i suspensjonen tas også en eventuell fortynningsfaktor med i formelen, som blir som følger:

$$\text{Antall celler totalt} = n \cdot 10^4 \cdot \text{fortyningfaktor} \quad \text{(formel 4.3)}$$

4.6.2 - Prosedyre

1. Bürker-kammeret rengjøres forsiktig med 70% etanol, og et dekkglass plasseres over tellekvadratene.
2. Cellekulturen trypsineres på vanlig måte med 2 ml trypsin til den har løsnet fra flasken. Deretter overføres suspensjonen til et 10 ml plastrør med skrukork, før det fortynnes med medium til 10 ml totalvolum.
3. For å sikre en enkeltcellesuspensjon pipetteres cellene forsiktig opp og ned noen ganger slik at celleklumper brytes opp.
4. Prøven blandes godt før 20 µl overføres til Bürker-kammeret ved å sette pipettespissen forsiktig til kanten av kammeret og la suspensjonen bli dradd inn i kammeret ved hjelp av kapillærkrefter.
5. Kammeret overføres til et lysmikroskop, og cellene telles ved 10X forstørrelse.
6. Gjennomsnittlig antall celler per mm² beregnes, og cellekonsentrasjonen i suspensjonen beregnes ved hjelp av formel 4.2.

4.7 – VEKSTKURVE

4.7.1 - Teori

Celler vokser med forskjellig hastighet, og de fleste cellekulturer har en karakteristisk vekstkurve, som kan deles inn i 3 faser. Latensfase, eksponetialfase (log-fase) og stasjonærfase (plata-fase). Hvis man plotter antallet celler mot tid, vil disse tre fasene stort sett danne en S-kurve, og man kan bestemme cellekulturens maksimale celletetthet, tid for dobling av populasjonen mm. For å beregne cellekulturens doblingstid, *mgt* (*mean generation time*), benyttes følgende formel (Zhou et al., 2008):

$$N = N_0 \cdot 2^{(T/mgt)} \quad \text{(formel 4.4)}$$

der N_0 er antall celler ved starten av et gitt måleintervall og N er antall celler etter T timer.

4.7.2 - Prosedyre

1. 10^4 celler sås ut i hver brønn i en 6-brønns-plate og tilsettes 5 ml medium. Platene settes til inkubering. Dette er dag 0.
2. På dag 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 og 18 vaskes cellene i tre parallelle brønner først med 1 ml trypsin, og deretter trypsineres cellene med 2 ml trypsin i 5-10 minutter, til de har løsnet fra brønnen.
3. 2 ml nytt medium tilsettes hver brønn for å stoppe effekten av trypsin, og cellene pipetteres forsiktig opp og ned for å oppnå en enkeltcelle-suspensjon.
4. Fra hver brønn tas 50 μ l godt blandet celleduspensjon over til et eppendorfrør og blandes med 50 μ l Trypanblå. Prøven las stå i 5 minutter.
5. Det totale antall levende celler beregnes ved å telle i et Bürker-kammer.
6. Plotter en kurve med antall celler mot tid.

4.8 - LEVEDYKTIGHET

4.8.1 - Teori

I et vanlig lysmikroskop kan man ikke uten videre skille levedyktige celler fra skadede celler, og det kan være nødvendig å undersøke mengden levedyktige celler i en cellekultur. I denne studien er det benyttet farging med Trypanblå (Sigma), som penetrerer cellemembranen til døde celler og farger de blå (Hoskins et al., 1956). Dette kan observeres i et lysmikroskop, og antallet døde celler i forhold til levedyktige celler telles.

4.8.2 - Prosedyre

1. $1,0 \cdot 10^5$ celler sås ut i en 24-brønns-plate og inkuberes til semikonfluens i 2 ml DMEM.
2. Mediet fjernes, og cellene eksponeres for varierende konsentrasjoner BV i DMEM (3, 6, 9 og 12 $\mu\text{g/ml}$). Platen inkuberes i 24 timer ved 37°C.
3. Mediet fjernes, og cellene trypsineres med 0,5 ml trypsin. Nye 2 ml DMEM tilsettes for å nøytralisere effekten av trypsin.
4. Fra hver brønn tas 50 μl godt blandet celleduspensjon over til et eppendorfrør og blandes med 50 μl Trypanblå. Prøven las stå i 5 minutter.
5. Cellene telles i et Bürker-kammer, og andelen døde celler etter eksponering beregnes og plottes i et diagram.

4.9 - INHIBERING AV VEKST

4.9.1 - Teori

En viktig prosess i utviklingen av en kreftsvulst er kreftcellenes ukontrollerte vekstprosess. Medikamentell behandling av kreft har ofte som hensikt å stanse denne ukontrollerte celleveksten. Denne studien har undersøkt i hvilken grad BV kan inhibere cellevekst hos ulike kreftceller, U251 og C6. Det er brukt konsentrasjoner fra mellom 3 og 12 $\mu\text{g/ml}$ BV i DMEM, dette har tidligere vist veksthemmende effekt på humane lymfocytter og HL-60-celler (Lee et al., 2007).

4.9.2 - Prosedyre

1. $1,0 \cdot 10^5$ celler sås ut i hver brønn i en 6-brønns-plate, og tilsettes 5 ml medium. Platene settes til inkubering over natten.
2. Mediet i brønnene fjernes, og 5 ml medium inneholdende ulike konsentrasjoner av BV tilsettes i hver brønn som skal eksponeres (3, 6, 9 og 12 $\mu\text{g/ml}$ BV i DMEM). Kontrollbrønnene tilsettes 5 ml DMEM uten BV. Dette er tid 0.
3. Kontroll ved tid 0 telles. Cellene i tre parallelle brønner vaskes først med 1 ml trypsin, og deretter trypsineres cellene med 2 ml trypsin i 5-10 minutter, til de har løsnet fra brønnen.
4. 2 ml nytt medium tilsettes hver brønn for å stoppe effekten av trypsin, og cellene pipetteres forsiktig opp og ned for å oppnå en enkeltcelle-suspensjon.
5. Fra hver brønn tas 50 μl godt blandet celleduspensjon over til et eppendorfrør og blandes med 50 μl Trypanblå. Prøven las stå i 5 minutter.
6. Det totale antall levende celler beregnes ved å telle i et Bürker-kammer.
7. Punkt 3-6 gjentas ved 24, 48 og 72 timer etter eksponering, både for kontroll og eksponerte celler.
8. Plotter en kurve med antall levende celler mot tid.

4.10 - EKSPONERING I 48 TIMER - REKONVALENS

4.10.1 - Teori

Det er også nyttig å undersøke om en cellekultur tar varig skade av eksponering over et visst tidsintervall. En måte å undersøke dette på er ved å eksponere cellene i 48 timer, for deretter å tilsette nytt friskt medium, og undersøke hvordan veksten forandrer seg i forhold til kontroll-cellene.

4.10.2 - Prosedyre

1. $2,0 \cdot 10^5$ celler sås ut i hver brønn i en 6-brønns-plate, og tilsettes 3 ml medium. Platene settes til inkubering over natten.
2. Mediet i brønnene fjernes og 5 ml medium (6 $\mu\text{g/ml}$ BV) tilsettes i hver brønn som skal eksponeres. Kontrollbrønner tilsettes 5 ml DMEM uten BV. Dette er tid 0.

3. Cellene i tre parallelle brønner vaskes først med 1 ml trypsin, og deretter trypsineres cellene med 2 ml trypsin i 5-10 minutter, til de har løsnet fra brønnen.
4. 2 ml nytt medium tilsettes hver brønn for å stoppe effekten av trypsin, og cellene pipetteres forsiktig opp og ned for å oppnå en enkeltcelle-suspensjon.
5. Fra hver brønn tas 50 µl godt blandet celleduspensjon over til et eppendorfrør og blandes med 50 µl Trypanblå. Prøven las stå i 5 minutter.
6. Det totale antall levende celler beregnes ved å telle i et Bürker-kammer.
7. Punkt 3-6 gjentas etter 24, 48 og 72 timer etter eksponering, både for kontroll og eksponerte celler.
8. Etter 48 timer fjernes mediet med BV fra de 3 brønnene som skal undersøkes for rekonvalens, og det tilsettes 5 ml medium uten BV. Platen settes til inkubasjon igjen.
9. Etter 72 timer telles de 3 brønnene som i punkt 3-6.
10. Plotter en kurve med antall levende celler mot tid.

4.11 - APOPTOSE

4.11.1 - Teori

Apoptose er en av to spesifikke måter en celle kan dø på, der den andre er nekrose. Nekrose beskriver celledød pga ekstern skade. Morfologisk kjennetegnes nekrotiske celler ved at de sveller opp og lyseres, innholdet i cellen slippes ut med påfølgende skade og inflammasjon av det omliggende vevet. Nekrose av en celle kan skje i løpet av et par sekunder (Collins et al., 1997), mens apoptose er en relativt mye tregere prosess. Apoptose kalles ofte for programmert celledød og ble først beskrevet i 1972 (Kerr et al., 1972). Apoptose innebærer morfologiske forandringer i cellen, som krymping av cellekroppen, kondensering av kromatin, fragmentering av cellekjernen og bortfall av evne til adhesjon. Selve mekanismen for apoptose utløses av en "dødsfaktor" (Willingham, 1999) som er programmert i cellens DNA. Apoptose kan detekteres i en celle ved å farge cellene med Hoechst-33342. Hoechst-33342 er en fluoriserende farge som går gjennom cellemembraner, og binder til adenin/thymin-rike områder i kromatinet. Fargen brukes dermed til å undersøke kondensering av kromatin, og kan detekteres i et fluorescensmikroskop. Eksitasjons- og emisjonsmaksima: 350/460 nm. Mange legemidler som brukes i kampen mot kreft har til hensikt å indusere apoptose i kreftcellene, og denne studien har undersøkt hvorvidt BV induserer apoptose i U251 og C6.

4.11.2 - Prosedyre

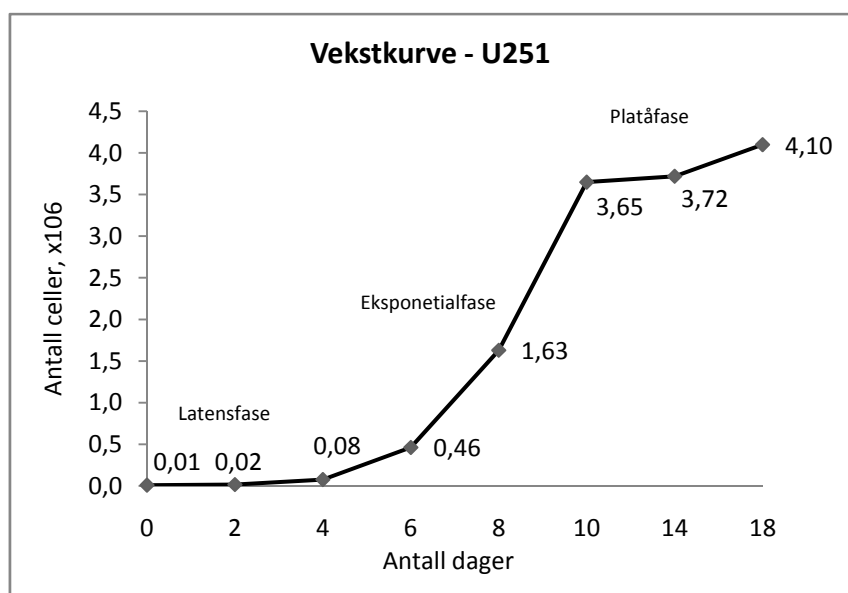
1. Med en steril pinsett vaskes 6 dekkglass i 70% etanol, tørkes forsiktig ved å plassere kanten mot et stykke papir, før resten av etanolen brennes av i en propanflamme.
2. Dekkglassene avkjøles i pinsetten før de plasseres i hver brønn i en 6-brønns plate. Hver brønn tilsettes $2,0 \cdot 10^5$ celler og 5,0 ml medium.
3. Platen inkuberes ved 37°C til cellene har nådd semikonfluens på dekkglasset.
4. Mediet fjernes, og nye 5,0 ml medium tilsatt forskjellige konsentrasjoner BV tilsettes i hver brønn (3, 6, 9 og 12 $\mu\text{g/ml}$ BV i DMEM). Platen inkuberes videre i 24 timer.
5. Mediet fjernes, og cellene vaskes forsiktig med PBS (Oxiod) i 30 sekunder.
6. Prøvene fikseres med 100% iskald metanol i 10 minutter, og vaskes deretter med PBS i 2x2 minutter.
7. En Hoechst-33342-løsning (50 $\mu\text{g/ml}$ i PBS) tilsettes på dekkglasset og prøvene står i 10 minutter, tildekket med aluminiumsfolie.
8. Prøvene vaskes igjen med PBS i 2x2 minutter før de får tørke et par minutter på benken.
9. En liten dråpe monteringsmedium plasseres på et objektglass, og dekkglasset plasseres forsiktig på objektglasset med celle-siden ned. Prøvene oppbevares mørkt.
10. Prøvene observeres med en fluorescensmikroskop.

5. RESULTATER

5.1 - VEKSTKURVE

5.1.1 - U251

Et likt antall celler ($1,0 \cdot 10^4$) ble sådd ut i hver brønn i flere 6-brønns-plater, tilsatt medium og inkubert ved standard betingelser. Antall celler i en brønn ble telt i et haemocytometer under et lysmikroskop ved forskjellige tidsintervaller og er presentert i en kurve (figur 5.i). Alle tellinger er gjort med 3 paralleller. Celleveksten gir en forventet S-formet kurve, med en treg latensfase som går over i en logaritmisk vekstfase (eksponentialfase), før veksten flater ut i en platåfase. For begge cellekulturene ble det ved hjelp av lysmikroskop observert semi-konfluens i eksponentialfasen av vekstkurven.

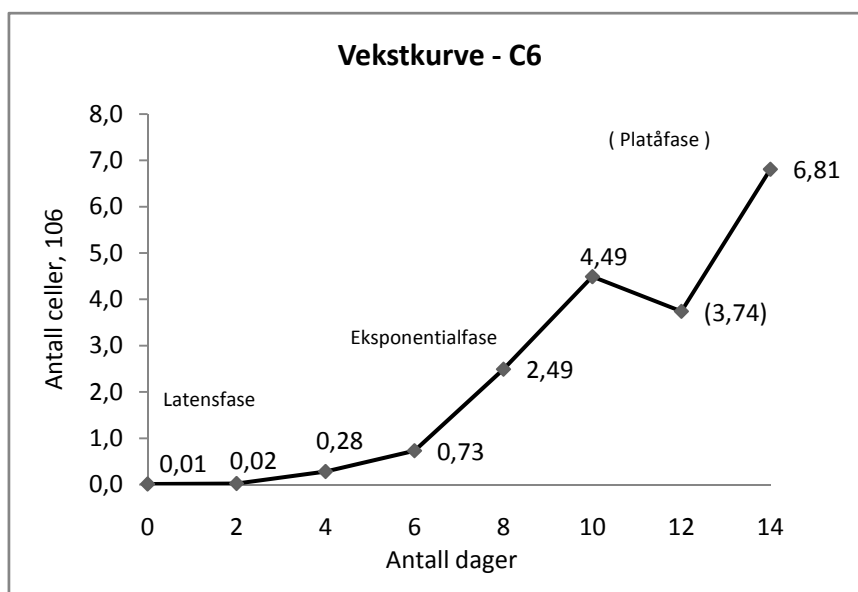


Figur 5.i: Vekstkurve for U251 cellelinje. $1,0 \cdot 10^4$ celler ble sådd ut i hver brønn i flere 6-brønns-plater og antall celler ble beregnet ved gitte tidsintervaller i et haemocytometer.

U251 viser logaritmisk vekst fra dag 5-10 etter utsåing. Observering under lysmikroskop viser at det i dette tidsintervallet er semikonfluens i cellekulturen. Dette er nyttig informasjon når senere forsøk planlegges, både for å vite optimal eksponeringstidspunkt for cellene, samt hvor raskt cellekulturen vokser. På denne måten kan forberedelsene til et forøk forkortes og man jobber mer effektivt. Cellekulturens doblingstid beregnes til 26,4 timer (formel 4.4).

5.1.2 - C6

Samme prosedyre ble fulgt for C6 som for U251, med $1,0 \cdot 10^4$ celler sådd ut i hver brønn. Resultatene, vist i figur 5.ii, viser tendenser til samme S-formede vekstkurve som ble observert for U251. Tall fra dag 12 antas å være ukorrekte, da disse ligger langt lavere enn tall fra dag 10. Det er rimelig å anta at ukorrekte data fra dag 12 gjør at den stasjonære fasen ikke observeres i forsøket.



Figur 5.ii: Vekstkurve for C6 cellelinje. $1,0 \cdot 10^4$ celler ble sådd ut i hver brønn i flere 6-brønns-plater og antall celler ble beregnet ved gitte tidsintervaller i et haemocytometer.

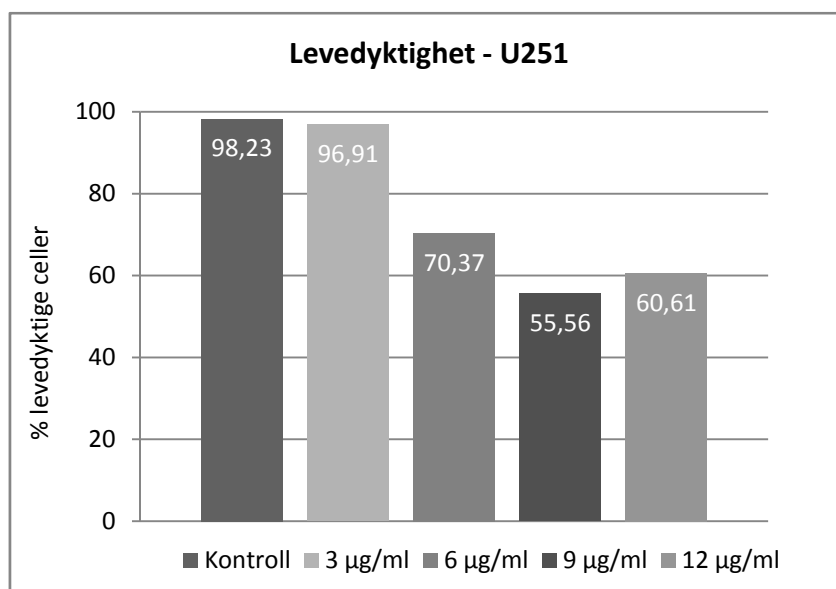
Den logaritmiske vekstfasen for C6-cellelinjen ligger her mellom dag 6 og 10, men det må antas at denne veksten varer videre til dag 11-12 ut i fra forventning om S-formet vekstkurve. Cellekulturen har en beregnet doblingstid lik 27,1 timer.

5.2 - LEVEDYKTIGHET

5.2.1 - U251

I en 24-brønns-plate blir $1,0 \cdot 10^5$ celler sådd ut i hver brønn og inkuberes over natten. Cellene blir deretter eksponert i 24 timer med varierende konsentrasjoner BV i DMEM. Cellene farges deretter med trypanblå, og telles i et haemocytometer. Andelen levedyktige celler beregnes og presenteres i figur 5.iii og 5.iv. For U251-cellelinjen ses det lite nedgang i levedyktighet ved eksponering for 3 $\mu\text{g/ml}$ BV i DMEM. Derimot observeres en markert nedgang i

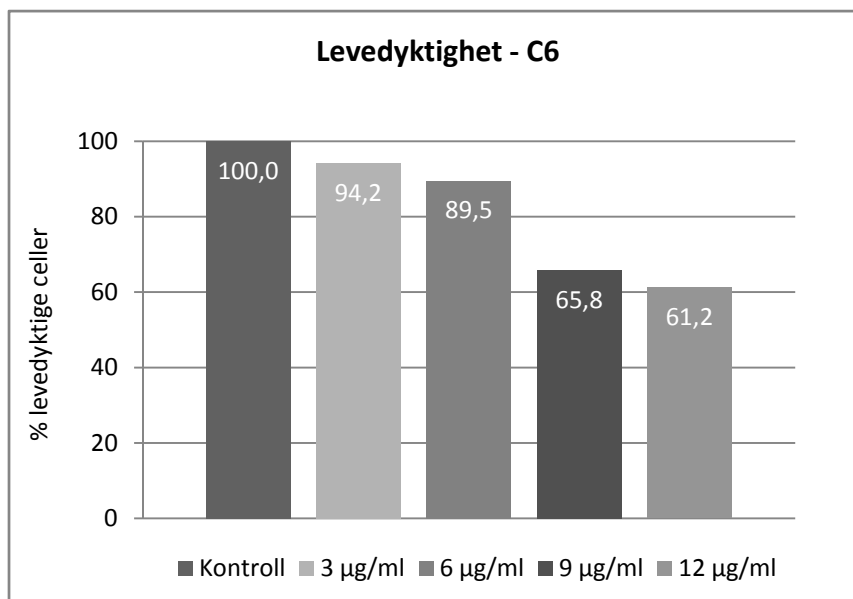
levedyktighet ved 6 $\mu\text{g/ml}$, og en videre nedgang til 9 $\mu\text{g/ml}$. Levedyktighet for kontrollen ligger på 98,23 %. Ekstrapolering med lineær tilnærming gir en IC_{50} -verdi lik 12,8 $\mu\text{g/ml}$ for 24 timers eksponering.



Figur 5.iii: Andel levedyktige celler av U251. $1,0 \cdot 10^5$ celler sås ut i hver brønn og inkuberes over natten. Cellene ble så eksponert med forskjellige konsentrasjoner av BV i DMEM i 24 timer. Andel levende celler telles i et haemocytometer etter farging med trypanblå.

5.2.2 - C6

Samme prosedyre ble fulgt for C6-cellene som for U251-cellene. Resultatene er vist i figur 5.iv, og viser noe nedgang i levedyktighet ved eksponering for 3 $\mu\text{g/ml}$ og 6 $\mu\text{g/ml}$ BV i DMEM. Deretter observeres markant nedgang i levedyktighet ved 9 $\mu\text{g/ml}$ og 12 $\mu\text{g/ml}$ BV i DMEM. Levedyktighet for kontroll-cellene var på tilnærmet 100%. Ekstrapolering med lineær tilnærming gir en IC_{50} -verdi lik 15,1 $\mu\text{g/ml}$ for 24 timers eksponering.



Figur 5.iv: Andel levedyktige celler av C6. $1,0 \cdot 10^5$ celler sås ut i hver brønn og inkuberes over natten. Cellene ble så eksponert med forskjellige konsentrasjoner av BV i DMEM i 24 timer. Andel levende celler telles i et haemocytometer etter farging med trypanblå.

5.3 - INHIBERING AV VEKST

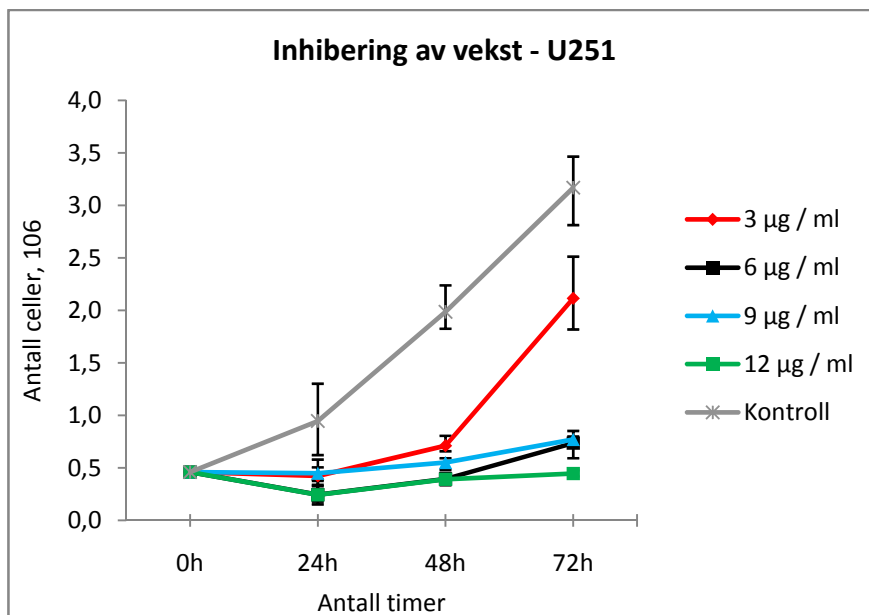
5.3.1 - U251

$1,0 \cdot 10^5$ celler fra U251-cellelinjen ble sådd ut i hver brønn i 6-brønns-plater og inkubert over natten med DMEM. Deretter ble det tilsatt varierende konsentrasjoner av BV i DMEM (3,6,9 og 12 µg/ml), og cellene ble satt til inkubering. Ved 24,48 og 72 timer ble det foretatt telling av 3 parallelle brønner for hver konsentrasjon. Resultatet er vist i figur 5.v.

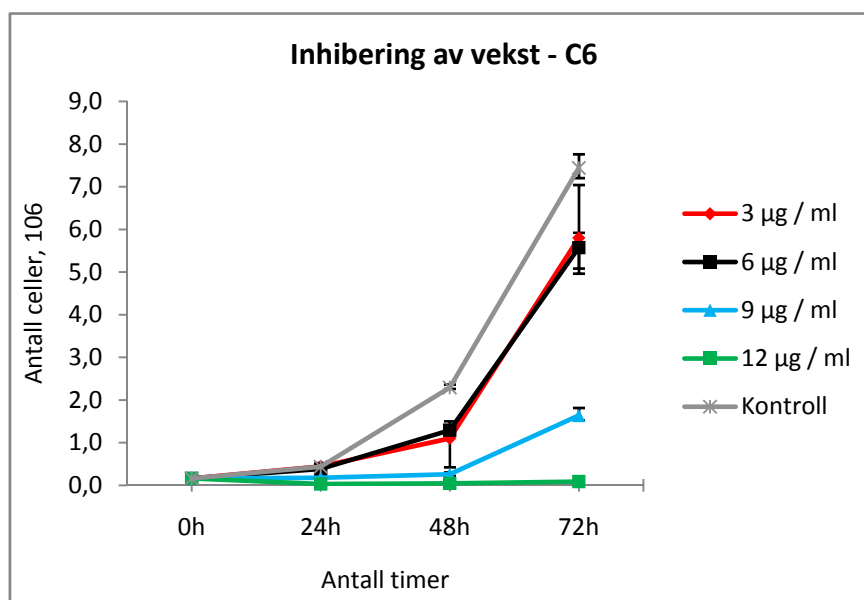
Allerede etter 24 timer ses tydelig begrensning av cellevekst for alle de eksponerte cellene. Denne trenden holder seg ved telling etter 48 timer, mens etter 72 timer har veksten betydelig bedret seg for cellene som ble eksponert for 3 µg/ml. Alle konsentrasjoner over 3 µg/ml ser ut til å hemme veksten i stor grad. Direkte observasjon i lysmikroskopet ved 10x forstørrelse viser også tydelig at økende mengde BV gir større grad av celler som har løsnet fra underlaget, samt morfologiske forandringer.

5.3.2 - C6

Samme prosedyre ble fulgt for C6- som for U251-cellelinjen, med $1,0 \cdot 10^5$ celler sådd ut i hver brønn. Resultatet for eksponeringen er vist i figur 5.vi.



Figur 5.v: Inhibering av vekst av U251 ved forskjellige konsentrasjoner BV i DMEM. $1,0 \cdot 10^5$ celler ble sådd ut og eksponert for 3,6,9 og 12 µg/ml BV i DMEM i 72 timer. Stolpene angir minimums- og maksimumsverdi.



Figur 5.vi: Inhibering av vekst av C6 ved forskjellige konsentrasjoner BV i DMEM. $1,0 \cdot 10^5$ celler ble sådd ut og eksponert for 3,6,9 og 12 µg/ml BV i DMEM i 72 timer. Stolpene angir minimums- og maksimumsverdi.

Det ses lite begrensning av vekst etter 24 timer for de eksponerte cellene. Etter 48 timer ser vi noe begrenset vekst hos cellene som ble eksponert med 3 og 6 $\mu\text{g/ml}$ BV i DMEM. For cellene som ble eksponert med 9 og 12 $\mu\text{g/ml}$ BV er veksten tilnærmet lik 0. Etter 72 timer har veksten økt betraktelig for 3 og 6 $\mu\text{g/ml}$, med samme trend som for kontrollcellene mellom 48 og 72 timer. De cellene som ble eksponert for 9 $\mu\text{g/ml}$ viser fortsatt redusert vekst, selv om den har kommet seg noe i forhold til de første 48 timene. For cellene med 12 $\mu\text{g/ml}$ er fortsatt veksten tilnærmet lik 0. Direkte observasjon i lysmikroskopet ved 10x forstørrelse viser også her, som for U251, økende grad av celler som har løsnet fra underlaget, samt morfologiske forandringer ved økende mengde BV i mediet.

5.4 - EKSPONERING I 48 TIMER - REKONVALENS

5.4.1 - U251

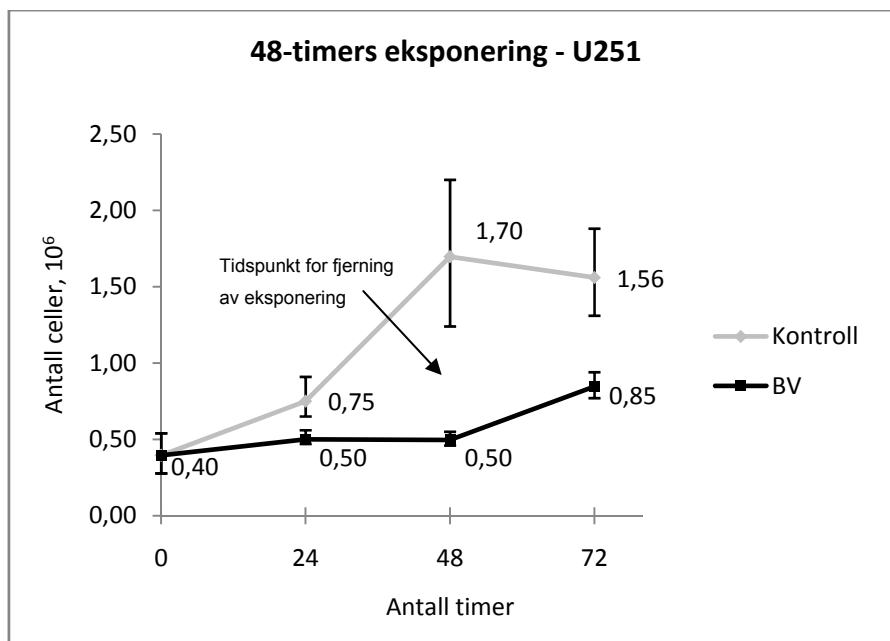
I hver brønn i flere 6-brønns-plater ble $2,0 \cdot 10^5$ celler av U251-cellelinjen sådd ut, tilsatt 3 ml DMEM og inkubert over natten. Påfølgende dag ble det tilsatt 5 ml medium med 6 $\mu\text{g/ml}$ BV, og vanlig DMEM uten BV til kontrollbrønnene. Antall celler ble talt i et haemocytometer ved 0, 24 og 48 timer. Etter 48 timer ble mediet fjernet, og alle cellene ble tilsatt friskt medium uten BV. Etter nye 24 timer (72 timer totalt) ble antall celler beregnet. Resultatet er vist i figur 5.vii.

For de eksponerte cellene vises en forventet hemming av vekst frem til 48 timer. Fra 48 timer til 72 timer ses noe økning av veksten, men ikke i større grad enn for de fortsatt eksponerte cellene fra figur 5.v.

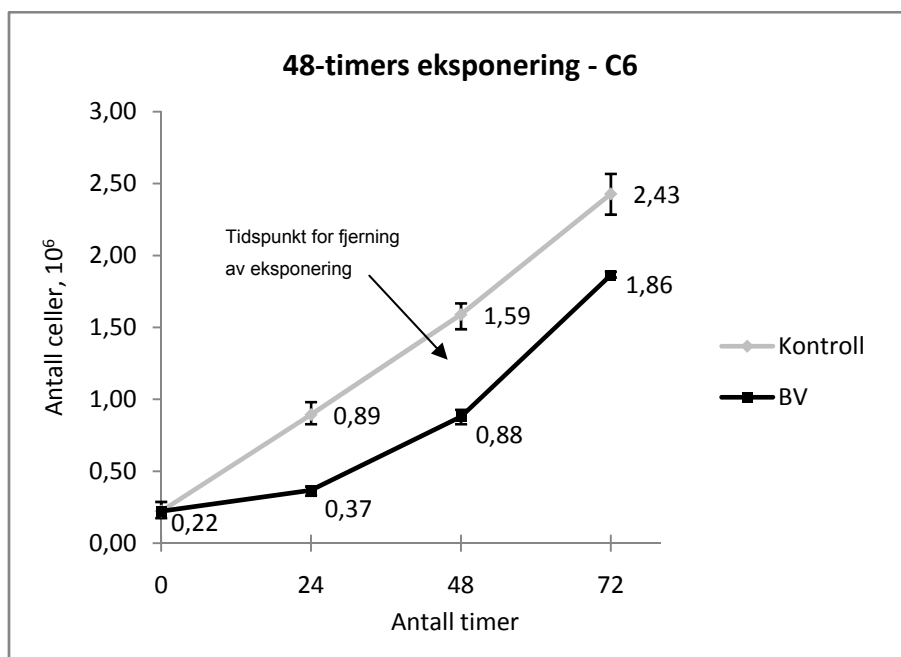
5.4.2 - C6

Samme prosedyre følges for C6- som for U251-cellelinjen, med $2,0 \cdot 10^5$ celler sådd ut i hver brønn, som eksponeres for 6 $\mu\text{g/ml}$ BV i DMEM. Resultatet er vist i figur 5.viii.

Kontrollcellene har en jevn vekstkurve, mens de eksponerte cellene viser tydelig hemming av vekst, dog i mindre grad enn U251-cellene viste. Etter fjerning av BV etter 48 timer øker veksten betraktelig, og viser samme trend som for kontrollcellene.



Figur 5.vii: 48-timers eksponering av U251 med 6 $\mu\text{g/ml}$ BV DMEM. $2,0 \cdot 10^5$ celler av U251 ble sådd ut i hver brønn og eksponert for 6 $\mu\text{g/ml}$ BV i DMEM. BV fjernes etter 48 timer. Stolpene angir minimums- og maksimumsverdi.



Figur 5.viii: 48-timers eksponering av C6 med 6 $\mu\text{g/ml}$ BV DMEM. $2,0 \cdot 10^5$ celler av C6 ble sådd ut i hver brønn og eksponert for 6 $\mu\text{g/ml}$ BV i DMEM. BV fjernes etter 48 timer. Stolpene angir minimums- og maksimumsverdi.

5.5 - APOPTOSE

De første forsøkene med farging for apoptose var mislykkede, da ingen farge trengte inn i cellene. Det ble bekreftet ved lysmikroskopi at det faktisk var celler på dekkglassene, og dermed konkludert med at det muligens var noe galt med Hoechst-fargen som ble benyttet. En ny flaske Hoechst-33342 ble derfor kjøpt inn fra Sigma-Aldrich Ltd., og forsøket ble gjentatt etter samme metode.

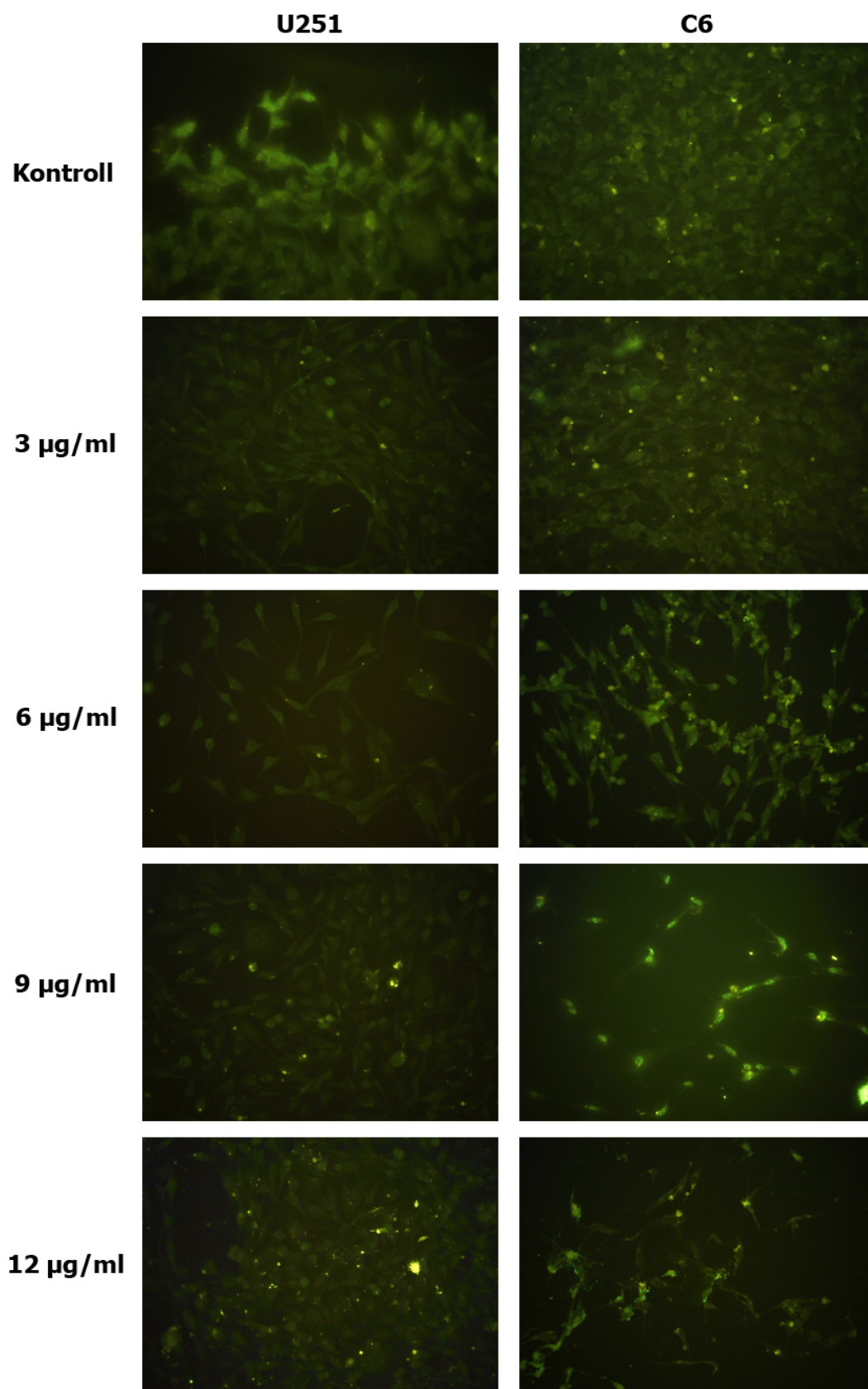
5.5.1 - U251

$2,0 \cdot 10^5$ celler av U251-cellelinjen ble sådd ut på sterile dekkglass i hver brønn i en 6-brønnsplate og satt til inkubering over natten. Påfølgende dag ble cellene eksponert for 3,6,9 og 12 $\mu\text{g/ml}$ BV i 5 ml DMEM, og satt til inkubering i 24 timer. Etter 24 timer ble eksponeringen fjernet, og cellene ble vasket, fiksert og farget med Hoechst-33342. Dekkglassene ble deretter montert på objektglass, og cellene ble fotografert i et fluorescensmikroskop ved 40x forstørrelse. Resultatet for både U251 og C6 er vist i figur 5.ix.

For U251 kan man se en tydelig økning i kondensering av kromatin og dannelse av apoptotiske kropper med økt konsentrasjon av BV. Ved 9 og 12 $\mu\text{g/ml}$ ses det også en økt grad av andre morfologiske forandringer, som krymping av celler og celler som har sprukket.

5.5.2 - C6

Samme prosedyre ble utført for C6 som for U251, med $2,0 \cdot 10^5$ celler sådd ut i hver brønn. Resultatene for C6 viser apoptotiske celler med tydelig kondensering av kromatin og dannelse av apoptotiske kropper. Som ved U251 observeres også her økende grad av morfologiske forandringer med økt mengde BV (krymping av celler, ødelagte og sprukne celler). I tillegg observeres det en klar reduksjon av celletetthet ved økende mengde BV.



Figur 5.ix: Farging for apoptose, U251 og C6. $2,0 \cdot 10^5$ celler av U251 og C6 ble sådd ut og eksponert for 3,6,9 og 12 µg/ml BV i DMEM i 24 timer. Farget med Hoechst-33342 og fotografert i fluorescensmikroskop ved 40x forstørrelse.

6. DISKUSJON

6.1 - GENERELT

I denne studien har hovedfokus vært å undersøke den cytotoksiske effekten av bivenom (BV) ved hjelp av vevskulturer, som et alternativ til bruk av forsøksdyr. Flere godt innarbeidete *in vitro*-modeller har blitt brukt på to forskjellige cellelinjer, maligne humane glioma kreftceller, U251, og induserte kreftceller fra rotte, C6. Etter min kunnskap har det ikke tidligere vært utført studier som undersøker en mulig anti-tumor-effekt på disse celletypene. En studie fra 2007 undersøkte den generelle cytotoksiske effekten på normale humane lymfocytter og HL-60-celler (Lee et al., 2007), og viste at BV gir en cytotoksisk effekt. C6-celler er tidligere vist å være en god modell for å undersøke de forskjellige aspektene rundt glioblastoma-vekst og -invasjon (Grobben et al., 2002).

6.2 - VEKST OG PROLIFERASJON

Det innledende forsøket i denne studien var å finne frem til en standard vekstkurve for begge celletypene. En vekstkurve gir oss vital informasjon om cellelinjens veksthastighet, doblingstid, konfluensområde etc. Alt dette er nyttig å vite når man skal planlegge de kommende forsøkene for å finne optimale eksponeringstidspunkt o.l.

U251-cellene viste seg å ha en noe tregere vekst og doblingstid (fig 5.i) enn for C6-cellene (fig 5.ii), men denne forskjellen var så liten at det ble besluttet å bruke de samme forsøksbetingelsene på begge cellelinjene; dette letter også sammenligning av resultatene for de to cellelinjene. For U251 var gjennomsnittlig doblingstid i eksponentialfasen 26,4 timer og for C6 lå den på 27,1 timer. Begge vekstkurvene viser at ved å så ut mellom $1,0 \cdot 10^5$ og $5,0 \cdot 10^5$ celler, vil cellene ha kommet inn i starten av den eksponentielle vekstfasen etter 1 døgn. Dette er derfor et passende tidspunkt å eksponere cellene for BV. I figur 5.ii er det verdt å merke seg en ”uteligger” etter 12 døgn som ikke korresponderer med de andre resultatene. Det er rimelig å anta at dette er forårsaket av en menneskelig feil, enten under utsåing av celler eller selve telleprosessen. Før videre studier gjennomføres bør det derfor utføres et nytt forsøk for å bekrefte at C6 virkelig viser en slik S-formet vekstkurve som er forventet. For U251 samsvarer resultatene med tidligere funn (Yaeger et al., 1991).

Levedyktighet

For å undersøke levedyktigheten til U251- og C6-celler ved tilsetning av BV ble det utført 24-timers eksponering med økende konsentrasjoner av BV og påfølgende ekskludering av ikke-levedyktige celler med farging med trypanblå. Dette er en enkel og rask metode for å undersøke effekten av en substans som tidligere er benyttet i denne forskningsgruppen med god effekt og stor grad av reproducerbarhet (Andersen et al., 1994). På bakgrunn av tidligere studier på andre celletyper ble det forventet en reduksjon i levedyktighet ved konsentrasjoner av BV mellom 3-12 µg/ml (Lee et al., 2007).

I denne studien viser det seg at tilsetning av 3 µg/ml BV gir svært lite nedgang i levedyktighet sammenlignet med kontrollen for U251-celler (fig 5.iii). Derimot merker man en markant nedgang i levedyktighet allerede ved 6 µg/ml BV, og enda lavere levedyktighet for 9 og 12 µg/ml BV. Beregning av konsentrasjon som gir 50% levedyktige celler etter 24 timer, IC_{50} -verdi, gir her et resultat på 12,8 µg/ml. Til sammenligning ligger resultatene for C6-cellene førskjøvet ett hakk mot kraftigere konsentrasjon (fig 5.iv). Resultatene viser at 3 og 6 µg/ml gir en svak nedgang sammenlignet med kontrollen og man må helt opp på 9 µg/ml før det ses en markant nedgang i levedyktigheten. En ekstrapolering gir her en IC_{50} -verdi lik 15,1 µg/ml BV ved eksponering i 24 timer.

Inhibering av vekst

For å undersøke hvilken hemmende effekt BV har på cellenes vekst over tid ble det satt opp et forsøk der cellene eksponeres for forskjellige konsentrasjoner BV i 72 timer. Resultatene viser tydelig den samme trenden som ble observert ved levedyktighet. For U251-cellene gir alle konsentrasjonene av BV hemming av vekst etter 24 og 48 timer (fig 5.v), mens etter 72 timer ser det ut til at bare konsentrasjoner over 3 µg/ml gir hemmende effekt. Cellene som ble gitt 3 µg/ml BV ser ut til å ha normalisert veksten og følger samme trenden som kontroll-cellene.

For C6-cellene viser 3 og 6 µg/ml BV ingen umiddelbar hemming av vekst etter 24 timer, men både 9 og 12 µg/ml BV hemmer veksten markant (fig 5.vi). Etter 48 timer er det fortsatt tilnærmet null vekst hos de to kraftigste konsentrasjonene, mens 3 og 6 µg/ml BV viser nå tegn til veksthemming. Først etter 72 timer ses resultatet klart og tydelig; 3 og 6 µg/ml BV har

normalisert veksten og følger kontrollcellene. Cellene med 9 µg/ml BV har betydelig redusert vekst i forhold til kontroll, mens de med 12 µg/ml BV fortsatt gir tilnærmet null vekst.

For både U251-cellene eksponert med 3 µg/ml, og for C6-cellene eksponert med 3 og 6 µg/ml, ses en klar økning av vekst etter 48 timer. Den samme effekten er rapportert for maligne melanoma-celler (Liu et al., 2002), og kan ha sammenheng med at de aktive komponentene i BV har relativt kort halveringstid i serumtilsatt medium (Orsolice et al., 2003).

Eksponering i 48 timer - Rekonvalens

Et forsøksoppsett ble også benyttet for å undersøke i hvilken grad cellene tar varig skade av eksponeringen med BV. Cellene ble eksponert i 48 timer med 6 µg/ml BV i DMEM og deretter tilsatt frisk DMEM uten BV. For U251-cellene vises en klar hemming av veksten frem til og med 48 timer etter eksponering. Dataene for kontroll ved 48 timer er noe usikre, men resultatene viser allikevel en klart hemmet vekst hos de eksponerte cellene. I løpet av de første 24 timene ses en økning i antall celler på 25%. De neste 24 timene er veksten tilnærmet lik null, mens når eksponeringen fjernes etter 48 timer, ses en økning i antall celler på 70% frem mot 72 timer.

For C6-cellene er det noe hemming av vekst etter 24 og 48 timer (fig 5.viii), men etter at nytt medium tilsettes uten BV normaliseres veksten, og etter 72 timer følger de eksponerte cellene samme trend som kontrollcellene. Dette er som forventet, da 6 µg/ml BV ikke ga markant hemming av vekst for C6 cellene etter 72 timer (fig 5.vi). Det ser dermed ikke ut til at BV gir en varig vekstreduksjon for noen av celletypene etter fjerning av eksponering.

6.3 - APOPTOSE

Aktivering av det apoptotiske systemet og påfølgende programmert celledød er svært interressant vedrørende hemming av vekst hos kreftceller. Hvorvidt kreftcellene ”drepes” gjennom apoptose eller nekrose er et viktig moment med tanke på eventuelle bivirkninger, da nekrotisk celledød vil gi en større grad av skade på det omliggende vevet enn ved apoptotisk celledød. Særlig ved kreftsvulster i hjernen er dette et stort problem, da eventuelle skader på friskt vev kan ha store konsekvenser for pasienten. I slike tilfeller er det derfor ekstremt viktig

at man begrenser skadevirkningene mest mulig, samtidig med at man klarer å fjerne kreftcellene på en effektiv måte.

I denne studien er det benyttet farging med Hoechst-33342 for å detektere kondensering av kromatin og dannelse av apoptotiske ”kropper”. Bildene fra fluorescensmikroskopet viser celler eksponert i 24 timer med økende konsentrasjoner av BV samt ikke-eksponerte kontrollceller. For U251-cellene ses en doseavhengig økning i dannelse av apoptotiske celler (fig 5.ix). Mens det hos kontrollcellene knapt finnes apoptotiske celler, er det tydelige apoptotiske celler både ved 9 og 12 µg/ml BV. Det er også antydning til en økning i antall celler med morfologiske forandringer ved 9 og 12 µg/ml BV. Det må derfor kunne antas at BV induserer det apoptotiske systemet hos U251-celler. Mekanismen for denne aktiveringen er derimot uklar.

BV ser også ut til å indusere apoptose ved 24 timers eksponering av C6-cellene. Selv om apoptose observeres ved alle prøvene er trenden allikevel økende med økt konsentrasjon av BV. Dette underbygges ved at celletettheten synker betraktelig med økt konsentrasjon av BV, slik at andelen apoptotiske celler øker. Resultatet er allikevel noe mer usikkert enn hos U251, da eventuell nekrotisk celledød i løpet av disse 24 timene kan forårsake at celler løsner fra dekkglasset og forsvinner med vasking før de blir fiksert. Hvis flere celler løsner med økende konsentrasjon av BV vil dette i så fall forklare hvorfor celletettheten synker i så stor grad. Dette gjør at det ikke uten videre undersøkelser kan fastslås om induksjon av apoptose hos C6-cellene er doseavhengig. Det er allikevel rimelig å anta at effekten er doseavhengig også her, da denne studien viser at induksjon av apoptose er doseavhengig hos U251-celler, samt at BV tidligere har vist å ha en dose-avhengig induksjon av apoptose hos flere celletyper, deriblant synoviale fibroblaster (Hong et al., 2005) og hos lungekreftceller (Jang et al., 2003).

Den samme studien utført av Jang et al. viste også at BV ga en klar nedregulering av COX-2 hos de samme cellene, uten å nedregulere COX-1. Ved inflammatoriske reaksjoner og kreftsvulster finner man en oppregulering av COX-2 med påfølgende produksjon av prostaglandiner (Herschman, 1996; Tomozawa et al., 2000; Wardlaw et al., 2000), og det er kjent at NSAIDS (COX-hemmere) brukes i behandling av forskjellige typer kreft (Thun et al., 1993). Andre studier har vist at oppregulering av COX-2 er svært vanlig hos *glioblastoma multiforme* (Prayson et al., 2002), og det er derfor rimelig å anta at dette også er tilfelle hos U251- og C6-cellene. Den manglende hemmingen av COX-1 som observeres av Jang et al. er

også et godt tegn, da legemidler som fører til hemming av COX-1 ofte gir bivirkninger som f.eks. ulcer.

En annen mulig forklaring på den observerte induksjonen av apoptose og den veksthemmende effekten kan være at BV virker som en calmodulin-antagonist, som tidligere vist hos leukemiske celler (Hait et al., 1983). Calmodulin-antagonister inhiberer DNA-syntese og forårsaker morfologiske forandringer hos gliaceller (Okumura et al., 1982), og dette er muligens også tilfellet hos U251/C6.

6.3 - SAMMENLIGNING MELLOM U251 OG C6

Denne studien er den første som viser at BV induserer apoptose hos celler av typen U251, og at denne effekten er doseavhengig. Allikevel kan det ikke konkluderes med at BV uten videre vil gi en doseavhengig induksjon av apoptose hos andre glioblastoma-celler, da resultatene fra C6-cellelinjen er noe uklare. Disse forsøkene bør repeteres og utvides for å undersøke dette nærmere.

Resultatene antyder at BV gir en kraftigere inhibering av levedyktighet for U251-celler enn for C6-celler, og at effekten også her er doseavhengig. Tilsvarende resultater er tidligere observert på synoviale fibroblaster, som viste at 10 µg/ml BV ga en reduksjon i levedyktighet til 40,7% etter 24 timer (Hong et al., 2005). Også i denne studien var effekten doseavhengig. En annen studie viste samme trend for HL-60-celler og normale humane lymfocytter (Lee et al., 2007) der 5 og 10 µg/ml BV i DMEM ga kraftig reduksjon av levedyktighet etter 24 timer, mens 1 µg/ml ga svært liten reduksjon. Disse resultatene viste også en liten forskjell mellom de to celletypene som var undersøkt, der lymfocytter viste tegn til lavere toleranse for BV enn HL-60. Noe av årsaken til dette ble tillagt at nylig tillagde lymfocytt-kulturer *in vitro* var utsatt for spontan apoptose i større grad enn HL-60. Det er en mulighet for at det samme kan være tilfellet for C6-cellene i denne studien, da farging for apoptose viste en høyere andel apoptose hos ikke-eksponerte celler for C6 enn for U251. Årsaken til den spontane apoptosen vil allikevel ikke være den samme, da vi i denne studien benytter en kontinuerlig cellelinje, mens Lee et al. benyttet blodceller hentet fra en 33-årig kvinne.

Videre funn i studien viser at det kreves noe høyere konsentrasjon av BV for å oppnå den samme veksthemmende effekten for C6-cellene som man observerer for U251-cellene. Til

slutt ser man at C6-cellene viser større grad av rekonvalens når BV fjernes etter 48 timers eksponering enn det som er observert for U251-cellene ved samme konsentrasjon av BV.

Som et lite sammendrag kan vi derfor konkludere med at BV har en kraftigere cytotoxisk effekt *in vitro* på celler av typen U251 enn på C6. Selv om begge celletypene er tatt fra tumor i gliaceller, er det mulig at effekten på humane celler er mer tilstede enn hos C6-cellene som er hentet fra rotte. Videre studier må til for å verifisere disse resultatene. En annen forskjell mellom disse cellelinjene som kan forklare de forskjellige resultatene er at U251 er hentet fra naturlig forekomst av *glioblastoma multiforme*, mens C6-cellen er kunstig indusert (Grobben et al., 2002). Dermed er det sannsynlig at disse to cellelinjene vil utvise noe forskjellige karakteristikk i slike forsøksmodeller.

6.4 - *IN VITRO* TOKSIKOLOGI

Som tidligere nevnt er bruken av *in vitro*-modeller en nyttig ressurs for å evaluere den cytotoxiske effekten av forskjellige substanser. Innenfor farmasien er toksikologiske tester et nødvendig steg i utviklingen av legemidler. Forskningsgruppen her på Institutt for Indremedisin har tidligere vist at cellekulturer kan være nyttige også til mekanistiske studier, blant annet ved undersøkelse av nefrotoksisitet av røntgenkontrastmedia, som viste doseavhengig nefrotoksisitet og vakuolisering av to renale cellelinjer, proximale tubul, LLC-PK, og distale tubuli, MDCK (Andersen et al., 1994).

Denne studien viser at ved å benytte forskjellige *in vitro* modeller kan man raskt og enkelt evaluere den cytotoxiske effekten av potensielle legemidler. I enkelte tilfeller, som ved potensielle kreftmidler, vil man også raskt kunne fastslå om det potensielle legemiddelet viser tegn til en fremtidig ønsket klinisk effekt. Ved fravær av en slik ønsket effekt kan man derfor raskt utelukke den aktuelle substansen fra videre forsøk med dyr.

In vitro-metoder for å undersøke cytotoxisk effekt er ikke en erstatning for bruk av forsøksdyr, men derimot et viktig supplement til bruken av disse dyrene. Man kan estimere fornuftige konsentrasjoner til bruk videre forsøk samt fullstendig utelukke substanser som åpenbart ikke har ønsket effekt. Dette kan dermed være en metode som kan begrense bruken av forsøksdyr i alle de tilfellene der man ser at den cytotoxiske effekten er for høy eller ikke gir ønsket effekt.

6.5 - VIDERE ARBEID

En fortsettelse av denne studien bør starte med verifisering av resultatene som er oppnådd. I tillegg bør metodene kjøres på flere cellelinjer, også på friske ikke-carcinome humane celler, slik at den generelle cytotoksiske effekten av BV kan evalueres. Til dette arbeidet bør det også benyttes primære cellekulturer, slik at organspesifikk toksisitet kan evalueres. Videre kan man undersøke den tumor-suppressive effekten av BV ved å benytte sferoider av kreftceller og konfrontere disse med friske celler. Dette er en metode som er benyttet i mange år i denne forskningsgruppen med gode resultater.

Induksjon av apoptose bør også verifiseres hos flere cellelinjer og med flere metoder. Mulige metoder man kan bruke er farging med DAPI for å se på kondensering av kromatin og gel-elektroforese for å detektere DNA-fragmenter som er typiske for celler som går i apoptose. En annen mulighet er å undersøke hvilken effekt BV har på cellyklus ved å benytte flow-cytometri. Det er også ønskelig å fastslå hvilke mekanismer som resulterer i at BV induserer apoptose. Den mulige calmodulinhemmende effekten bør undersøkes, samt også eventuell nedregulering av COX-aktivitet. Til dette formålet kan det også være aktuelt å se på enkeltkomponenter i venomet, ikke bare på helt venom. I en eventuell fremtidig bruk som legemiddel vil det også med all sannsynlighet være enkeltkomponenter som administreres og ikke BV som helhet.

7. REFERANSER

Abbott A. 2005. Animal testing: More than a cosmetic change. *Nature* **438**: 144-146.

Alberts B. JA, Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science.

Andersen K, Christensen E, Vik H. 1994. Effects of Iodinated X-Ray Contrast Media on Renal Epithelial Cells in Culture. *Investigative Radiology* **29**: 955-962.

Barile F. 1994. Introduction to *In Vitro* Cytotoxicology - Mechanisms and Methods: CRC Press Inc.

Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W. 1968. Differentiated Rat Glial Cell Strain in Tissue Culture. *Science* **161**: 370-371.

Chaudry A. 2004. Cell Culture. Benyttet: 22. April 2008. <http://www.scq.ubc.ca/cell-culture/>

Collins JA, Schandl CA, Young KK, Vesely J, Willingham MC. 1997. Major DNA Fragmentation Is a Late Event in Apoptosis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **45**: 923-934.

DeVita VT, Rosenberg SA, Hellman S. 2005. *Cancer: principles & practice of oncology*. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia.

FAO. 2001. Glossary of biotechnology for food and agriculture. Benyttet: 23. April 2008. <http://www.fao.org/DOCREP/004/Y2775E/y2775e07.htm#bm07.1>

Freshney RI. 2005. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*.

GlaxoSmithKline. 2008. Our History - About GSK. Benyttet: 22. April 2008. <http://www.gsk.com/about/history.htm>

Grobben B, De Deyn P, Slegers H. 2002. Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell and Tissue Research* **310**: 257-270.

Gutiérrez JM, Ownby CL. 2003. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A2: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon* **42**: 915-931.

Habermann E. 1972. Bee and Wasp Venoms. *Science* **177**: 314-322.

Hait WN, Cadman E, Benz C, Cole J, Weiss B. 1983. Inhibition of growth of L1210 cyclic leukemic cells by inhibitors of nucleotide phosphodiesterase and calmodulin. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* **24**: 50-50.

Herschman HR. 1996. Prostaglandin synthase 2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1299**: 125-140.

- Hong S-J, Rim GS, Yang HI, Yin CS, Koh HG, Jang M-H, Kim C-J, Choe B-K, Chung J-H. 2005.** Bee venom induces apoptosis through caspase-3 activation in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. *Toxicon* **46**: 39-45.
- Hopkinson D, Bourne R, Barile FA. 1993.** INVITRO CYTOTOXICITY TESTING - 24-HOUR AND 72-HOUR STUDIES WITH CULTURED LUNG-CELLS. *Atla-Alternatives to Laboratory Animals* **21**: 167-172.
- Hoskins JM, Meynell GG, Sanders FK. 1956.** A comparison of methods for estimating the viable count of a suspension of tumour cells. *Experimental Cell Research* **11**: 297-305.
- Jang MH, Shin MC, Lim S, Han SM, Park HJ, Shin I, Lee JS, Kim KA, Kim EH, Kim CJ. 2003.** Bee venom induces apoptosis and inhibits expression of cyclooxygenase-2 mRNA in human lung cancer cell line NCI-H1299. *Journal of Pharmacological Sciences* **91**: 95-104.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**: 239-257.
- Kwon YB, Kim HW, Ham TW, Yoon SY, Roh DH, Han HJ, Beitz AJ, Yang IS, Lee JH. 2003.** The Anti-Inflammatory Effect of Bee Venom Stimulation in a Mouse Air Pouch Model Is Mediated by Adrenal Medullary Activity. *Journal of Neuroendocrinology* **15**: 93-96.
- Langley JN. 1901.** On the stimulation and paralysis of nerve-cells and of nerve-endings: Part I. *J Physiol* **27**: 224-236.
- Langley JN. 1905.** On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari. *J Physiol* **33**: 374-413.
- Lee YJ, Kang SJ, Kim BM, Kim YJ, Woo HD, Chung HW. 2007.** Cytotoxicity of honeybee (*Apis mellifera*) venom in normal human lymphocytes and HL-60 cells. *Chemico-Biological Interactions* **169**: 189-197.
- Liu X, Chen D, Xie L, Zhang R. 2002.** Effect of honey bee venom on proliferation of K1735M2 mouse melanoma cells in-vitro and growth of murine B16 melanomas in-vivo. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **54**: 1083-1089.
- McAteer JA, Douglas WH. 1979.** Monolayer culture techniques. *Methods Enzymol* **58**: 132-140.
- Newman DJ, Cragg GM. 2007.** Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J. Nat. Prod.* **70**: 461-477.
- Okumura K, Kato T, Ito J, Tanaka R. 1982.** Inhibition by calmodulin antagonists of glioblast DNA synthesis and morphological changes induced by glial maturation factor. *Developmental Brain Research* **3**: 662-667.
- Orlov BN, Romanova EB, Omarov SM. 1981.** Immunological properties of bee venom 28th *Int. Congr. Apicult.* Acapulco. Mexico: Apimondia Publishing House. 490-493.

- Orsolio N, Sver L, Verstovsek S, Terzic S, Basic I. 2003.** Inhibition of mammary carcinoma cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo by bee venom. *Toxicol* **41**: 861-870.
- Prayson RA, Castilla EA, Vogelbaum MA, Barnett GH. 2002.** Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression by immunohistochemistry in glioblastoma multiforme. *Annals of Diagnostic Pathology* **6**: 148-153.
- Sumikura H, Andersen OK, Drewes AM, Arendt-Nielsen L. 2003.** A comparison of hyperalgesia and neurogenic inflammation induced by melittin and capsaicin in humans. *Neuroscience Letters* **337**: 147-150.
- Thun MJ, Namboodiri MM, Calle EE, Flanders WD, Heath CW, Jr. 1993.** Aspirin Use and Risk of Fatal Cancer. *Cancer Research* **53**: 1322-1327.
- Tomozawa S, Tsuno NH, Sunami E, Hatano K, Kitayama J, Osada T, Saito S, Tsuruo T, Shibata Y, Nagawa H. 2000.** Cyclooxygenase-2 overexpression correlates with tumour recurrence, especially haematogenous metastasis, of colorectal cancer. *Br J Cancer* **83**: 324-328.
- UNEP. 2008.** United Nations Environment Program - Division of Environmental Law and Conventions - Glossary. Benyttet: 10. April 2008.
<http://www.unep.org/dec/onlinemanual/Resources/Glossary/tabid/69/Default.aspx?letter=B>
- Wade D, Boman A, Wahlin B, Drain CM, Andreu D, Boman HG, Merrifield RB. 1990.** All-D Amino Acid-Containing Channel-Forming Antibiotic Peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**: 4761-4765.
- Wardlaw SA, March TH, Belinsky SA. 2000.** Cyclooxygenase-2 expression is abundant in alveolar type II cells in lung cancer-sensitive mouse strains and in premalignant lesions. *Carcinogenesis* **21**: 1371-1377.
- WHO. 2006.** Fact sheet No 297 - Cancer. Benyttet: 24. April 2008.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
- Willingham MC. 1999.** Cytochemical Methods for the Detection of Apoptosis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* **47**: 1101-1110.
- Yaeger MJ, Koestner A, Marushige K, Marushige Y. 1991.** The reverse transforming effects of nerve growth factor on five human neurogenic tumor cell lines: in vitro results. *Acta Neuropathologica* **83**: 72-80.
- Zhou H, Imrich A, Kobzik L. 2008.** Characterization of immortalized MARCO and SR-AI/II-deficient murine alveolar macrophage cell lines. *Part Fibre Toxicol* **5**: 7.